

Reagents

Ceftriaxone (CTRX) provided by Chugai Pharmaceutical Co., Japan was dissolved in saline and adjusted to the intended concentration. Meropenem (MEPM) and trypan blue solution purchased from Sigma-Aldrich, US, was dissolved in distilled water and adjusted to the required concentrations. Clarithromycin (CAM), provided by Taisho Toyama Pharmaceutical Co., Japan, was dissolved with dimethyl sulfoxide (DMSO) and adjusted to the intended concentrations.

Antimicrobial susceptibility test and identification of β -lactamase

Susceptibility tests for 19 antimicrobial agents was performed for all 96 *H. influenzae* strains according to CLSI/NCCLS broth dilution method in *Haemophilus* Test Medium (HTM) (M100-A15:M7-MIC. The strains were evaluated with MICroFAST 4J (Date Behring Co., USA). Strains with a MIC value for ampicillin $>8\mu\text{g/mL}$, and gentamicin, were evaluated with the broth dilution method for CLSI/NCCLS.

The test was carried out in *Haemophilus* Test Medium broth (Japan Becton Dickinson), by 20–24 h of incubation at 35°C. The production of β -lactamase was confirmed by a nitrocefin test (Cefinase: Japan Becton and Dickinson Co.). The reaction time for *H. influenzae* took 1 min. The strains which showed ampicillin resistance and negative nitrocefin test results were classified as BLNAR strains. The serotype was classified into capsular types a to f by the slide-glass aggregation method (Denka Co., Tokyo, Japan).

Sequencing of *fts I* gene

The 1.3-kb DNA fragment encoding the PBP3 transpeptidase domain was amplified from the chromosomal DNA of *H. influenzae* by PCR using the primers 5'-GTTGCACATATCTCCGATGAG-3' and 5'-CAGCTGCTTCAGCATCTTGC-3'. The PCR-products were cloned with pCR2.0 TOPO cloning kit (Invitrogen, USA). Double strand sequence was generated using an ABI automatic DNA sequencer (Applied Biosystems). BLNAR was defined as having amino acid substitution of PBP-3, which was reported previously (Ubukata et al. 2001): Met377 to Ile, Ser385 to Thr, Leu389 to Phe, Arg517 to His, and/or Asn526 to Lys.

Three hours invasion assay using BEAS-2B cells

BEAS-2B cell was a transfected human bronchial epithelial cell line (Reddel et al. 1993; Yamazaki et al. 2006) purchased from ATCC (Rochville, MD, USA), and a standard cell line for bronchial epithelial cell experiments. BEAS-2B cell were cultured in bronchial epithelium growth media (BEGM, Cambrex Bio Science, Walkerville, MD) at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. For the invasion assay, BEAS-2B cells were seeded (1×10^5 cells/well) in a 24-well tissue culture plate (Coster, Corning NY) and incubated until greater than 90% confluence was obtained (approximately for 4 days).

Bacterial suspensions at about 6×10^6 CFU/mL were inoculated at 10 μL /well. The invasion assay was performed as reported previously (Ketterer et al. 1999; Swords et al. 2000). Briefly, monolayers were infected and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 3 h, washed 3 times with Hank's buffered salt solution (HBSS), and treated with gentamicin at a concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$ for 2 h. Gentamicin kills extracellular bacteria within 2 h, while intracellular bacteria remain viable. The monolayers were washed 3 additional times with HBSS, and the viable intracellular bacteria were released by incubation with 0.5 mL of 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in HBSS for 15 min. The samples were harvested and vortex agitated for 1 min to lyse cells. The numbers of viable bacteria were serially diluted and plated onto chocolate agar for colony counting. The experiment was repeated 3 times with each of the 91 strains. The invasion rate was calculated by the equation: {Bacterial amount recovered from BEAS-2B cells (CFU/mL)/inoculated bacterial amount (CFU/mL)} $\times 100$ (%). Isolates with an invasion rate of 1% or higher and lower than 1% were defined as high- and low-invasive strains, respectively.

Electron microscopy (EM)

The polarized cell layer of BEAS-2B cells was grown on transwell membrane as reported previously (Yamazaki et al. 2006). Briefly, the BEAS-2B cells in BEGM were seeded at 0.2×10^5 cells/well on a transwell insert (Costar, USA) containing 0.33 cm² porous filter membrane (3.0 μm pore). Polarized monolayers achieved confluence after 5–7 days at 37°C in 5% CO₂. Monolayers were incubated for two to three additional days until the transwell electrical resistance reached to 250 Ω , as measured with a Millicell-ESR apparatus (Millipore,

USA). To facilitate electron microscopic examination, cells were treated for 3 and 6 h with bacterial suspensions at concentrations about 10 times higher than those used in the invasion assay.

Polarized monolayers on transwell inserts infected with bacteria were washed 6 times with HBSS and fixed in cold (4 °C) with 2.5% glutaraldehyde (Merk, USA) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, overnight. After washing with phosphate buffer, samples were dehydrated in series of ethanol and embedded in epoxy resin, and ultra-thin sections (80 nm) were cut out of blocks and mounted on grids and stained with uranyl acetate and lead citrate before examination in a JEOL JEM-1230 transmission electron microscopy (TEM). For scanning electron microscopy (SEM), the transwell membranes were fixed as described above, dehydrated in a critical point apparatus and examined with a JEOL JSM 6360 scanning electron microscope, after a Pt sputter coating.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm S.E. or mean \pm S.D. Analysis of variance (ANOVA) was used for the comparison among three or more groups, and between-group comparisons were tested using the Mann-Whitney *U*-test. $p < 0.05$ was considered to be significant.

Results

H. influenzae strains

Sequencing of the *ftsI* gene of PBP-3 was performed in the 91 *H. influenzae* strains. All 91 strains were non-typeable *H. influenzae*. Gentamicin-MIC were below 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in all β -lactamase-negative ampicillin-susceptible and BLNAR strains. β -Lactamase-positive ampicillin-resistant strains were excluded by the nitrocefin method ($n = 5$).

H. influenzae, in the present study, was classified into seven types based on amino acid substitution of PBP-3, as cited from previous reports (Ubukata et al. 2001): type 0 (no amino acid substitution), type I (Met377 to Ile, Ser385 to Thr, and Arg517 to His), type II (Asn526 to Lys), type IIIa (Met377 to Ile, Leu389 to Phe, and Asn526 to Lys), type IIIb (Met377 to Ile, Ser385 to Thr, and Asn526 to Lys), type IIIc (Met377 to Ile, Ser385 to Thr, and Leu389 to Phe, and Asn526 to Lys), and type IV (Met377 to Ile, Ser385 to Thr, and Leu389 to Phe).

Screening of *H. influenzae* strains by 3 h invasion assays

Invasion assays were performed to screen 34 β -lactamase-negative ampicillin-susceptible and 57 BLNAR strains. As shown in Table 1, high-invasive strains were observed more often among the BLNAR strains as the MIC value for ampicillin increased. The invasion rates, ampicillin-MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$), and PBP-3 amino acid substitution types of these high invasion BLNAR strains were defined in (Table 2). The invasion rate was 1% or higher in nine strains, which were all BLNAR strains (Table 3). The invasion rate was studied 1 and 2 h after inoculation using high invasion BLNAR strains (BR49, BR56, and BR66) (Figure 1).

Relationships of the invasion rate with the MIC values for ampicillin and *ftsI* amino acid substitution

As shown in Table 1, the mean invasion rate increased with the ampicillin-MIC, but it did not differ significantly according to the ampicillin-MIC. The mean invasion rate was significantly higher in type IIIc than in type 0 ($p = 0.0075$) (Table 2).

Intracellular bactericidal effects of various antimicrobial agents (Figure 1)

Pharmacokinetics and pharmacodynamics are not reflected in the effects of antimicrobial effects against BLNAR that have invaded BEAS-2B cells. We investigated the intracellular bactericidal effects of MEPM, CTRX, and CAM, to which BLNAR is susceptible based on the US CLSI judgment criteria.

Three high-invasive BLNAR strains (BR49, BR56, and BR66) were selected. The MIC values of CTRX, MEPM, and CAM were 0.25, 0.5, and 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against BR49, 0.25, 0.5, and 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against BR56, and 0.5, 1.0, and 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against BR66, respectively. These antimicrobials were mixed with gentamicin to kill extracellular bacteria and cul-

Table 1. Correlation between percentage invasion and ampicillin-MIC in BLNAR

Ampicillin-MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	No.	Percentage invasion (%)
0.25	27	0.014 \pm 0.033
0.5	5	0.011 \pm 0.013
1	14	0.036 \pm 0.013
2	13	0.497 \pm 0.829
4	21	0.84 \pm 2.251
8	9	0.967 \pm 2.448
16	2	4.500

Table 2. Correlation between invasion and amino acid substitution in PBP3 in BLNAR

Type	Amino acid substitution in PBP-3					(n)	
	377Met	385Ser	389Leu	517Arg	526Asn		
0	–	–	–	–	–	34	0.01 ± 0.03%
I	Ile	Thr	–	His	–	5	0.65 ± 1.27%
II	–	–	–	–	–	12	0.58 ± 2.06%
IIIa	Ile	–	Phe	–	Lys	1	(0.05%)
IIIb	Ile	Thr	–	–	Lys	2	(0.38%), (1.8%)
IIIc	Ile	Thr	Phe	–	Lys	34	0.95 ± 2.12%*
IV	Ile	Thr	Phe	–	–	4	0.01 ± 0.02%

M ± S.D.

*p = 0.0075.

Table 3. The high invasive BLNAR strain of over 1% or higher

Strain	Invasion (%)	MIC of ampicillin (µg/mL)	Type of amino acid substitution
BR17	5.75 ± 2.33	16	IIIc
BR27	2.92 ± 0.41	2	I
BR28	2.34 ± 1.09	4	IIIc
BR42	1.37 ± 0.33	4	IIIc
BR49	10.14 ± 2.12	4	IIIc
BR53	7.33 ± 2.46	8	II
BR56	4.67 ± 2.91	4	IIIc
BR66	3.25 ± 0.87	16	IIIc
BR99	1.80 ± 0.89	2	IIIB

tured for 2 h. CAM at the concentration of MIC showed an intracellular bactericidal effect in all three strains (Figure 1).

SEM findings (Figure 2)

High-invasive BLNAR strain (BR49) showed microvilli extending from BEAS-2B cells and covering bacteria attached to the cell surface (Figure 2a and b), and showed bacteria entering cells and the formation of lamellipodia (Figure 2c). Bacteria entered cells individually without aggregating. However, low invasive β -lactamase-negative ampicillin-susceptible strain (H30) did not attach to the cell surface (Figure 2d).

TEM findings (Figures 3 and 4)

After 3 h, the surface of BEAS-2B cells was smooth (Figure 3a). Invasion of high-invasive BLNAR strain (BR49) was observed in cells close to the surface among layered cells. Most bacteria inde-

pendently entered into cells by macropinocytosis, but a few bacteria were surrounded by vacuoles (Figure 3b and c).

After 6 h, the cell arrangement on the surface was irregular compared with the TEM images after 3 h (Figure 4a). A considerably larger number of bacteria had entered cells than after 3 h (Figure 4a). Moreover, bacteria were also observed in cells in areas deep from the surface (Figure 4a and b). The cytoplasm was expanded due to the presence of many bacteria, intercellular adhesion was physically detached, and some cells were detaching from the surface, in which bacteria clustered in some vacuoles. It was not clear whether the vacuoles were formed by the fusion of bacteria-containing linings or bacterial proliferation in the vacuoles. However, low invasion β -lactamase-negative ampicillin-susceptible strain (H30) was not observed in BEAS-2B cells (Figure 4d). Trypan blue dye staining among attaching BEAS-2B cells were significantly high at 6 h ($9.44 \pm 1.76\%$, $p < 0.001$) and at 3 h ($1.78 \pm 0.63\%$, $p < 0.01$) compared with those of control ($0.78 \pm 0.34\%$, $0.54 \pm 0.24\%$, respectively). These data demonstrate that BEAS-2B cell injury was induced by high-invasive BLNAR strain.

Discussion

The rate of invading BEAS-2B cells was high in some BLNAR strains of *H. influenzae* that had acquired resistance to ampicillin. On screening by the 3 h invasion assay, this invasion rate exceeded 1% in 9 of the 91 *H. influenzae* strains. They were all BLNAR strains with a serotype of non-typeable *H. influenzae*. The invasion rate did not differ significantly according to the ampicillin-MIC but was significantly higher in type IIIc with PBP-3 amino acid substitution at BLNAR resistant sites (Met377 to Ile, Ser385 to Thr, Leu389 to Phe, and

Please cite this article as: Okabe T, et al. An amino acid substitution in PBP-3 in *Haemophilus influenzae* associate with the invasion to bronchial epithelial.... Microbiol Res 2006; (2008), doi:10.1016/j.micres.2008.03.003

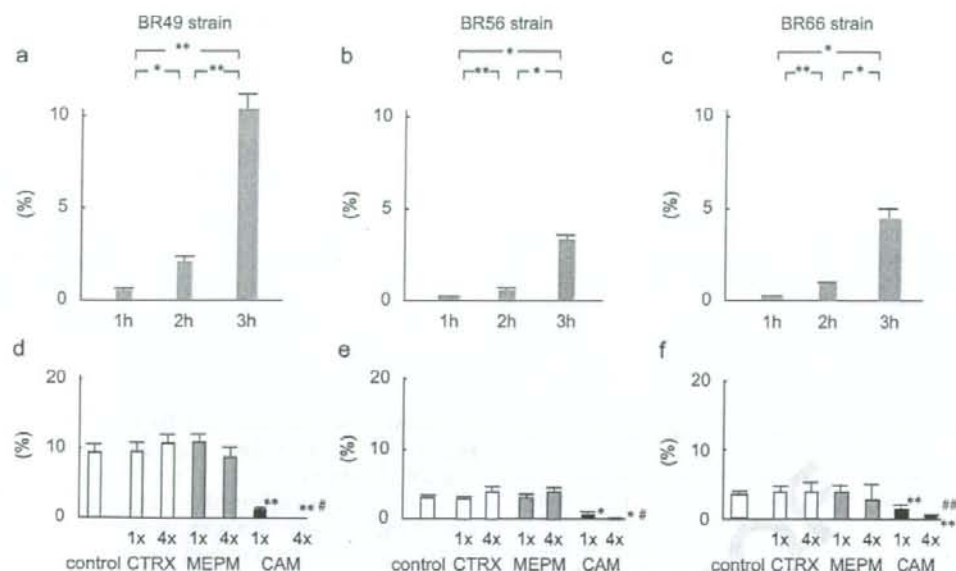


Figure 1. Time-course changes of three high-invasive BLNAR strains invasion rates and intracellular bactericidal effects of three antimicrobial agents to BLNAR strains. The invasion rates of BR49, BR56, and BR66 strains (a, b and c) increased significantly after 2 and 3 h. The invasion rates after 3 h were significantly higher than those after 2 h ($n = 3$, mean \pm S.E., $p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$). The invasion rates of BR49, BR56, and BR66 strains (d, e, and f) were significantly reduced when they were treated with clarithromycin (CAM) at the CAM-minimum inhibitory concentration (1 \times MIC) and 4 \times MIC compared with the control invasion rate ($n = 3$, mean \pm S.E., $^{*}p < 0.05$ and $^{**}p < 0.01$ compared with control, $^{#}p < 0.05$ and $^{##}p < 0.01$ compared with 1 \times MIC). No significant difference was noted in the invasion rate after treatment with ceftriaxone (CTRX) or meropenem (MEPM) at 1 \times ABPC-MIC or 4 \times MIC.

Asn526 to Lys) than in the types with no substitution.

Ubukata et al. (2001) showed that, in BLNAR, 5 amino acid substitution of PBP-3, i.e., Met377 to Ile, Ser385 to Thr, Leu389 to Phe, Arg517 to His, and/or Asn526 to Lys, were related to ampicillin resistance. Moreover, PBP-3 with multiple substitutions (Met377 to Ile, Ser385 to Thr, and/or Leu389 to Phe) together with Asn526 to Lys resulted in increased resistance compared to that for PBP-3 with the Asn526 to Lys substitution alone (Sanbongi et al. 2006). Some 93.2% of the BLNAR strains had amino acid substitutions at the Lys-Thr-Gly (KTG) motif, the two most common being Asn526 to Lys (83.9%) and Arg517 to His (9.3%). Amino acid substitutions at positions 377, 385, and 389, which conferred cefotaxime and cefixime MICs 10–60 times higher than those of susceptible strains, were found for the first time in Europe (García-Cobos et al. 2007).

Macropinocytosis defines a series of events to internalized bacteria initiated by extensive plasma membrane reconstitution or ruffling (Jones 2007). On the other hand, micropinocytosis defined to uptake of extracellular molecules by cells, which

can be either nonspecific endocytosis to form small vesicles at the plasma membrane, or cell surface receptor-mediated endocytosis of substances (Marino and McCluskey 2000). In this study, SEM images are considered to correspond to "micropinocytosis". Rearrangement of the cytoskeleton occurs in microvilli. The mechanism of this phenomenon is signal transduction induced by contact of bacteria with cell surface receptors and subsequent actin rearrangement (Ketterer et al. 1999; Kunishima et al. 2000), i.e., 20–30 actin filaments inside microvilli form bundles and are arranged in the same direction. Swords et al. (2000) reported that PAF receptors are involved in the invasion mechanism of *H. influenzae*, speculating that binding of the outer membrane of *H. influenzae* with PAF receptors activates small GTP, which induces actin rearrangement. Based on our study, it may be suggested that the amino acid substitution of high-invasive BLNAR strain possesses a bacterial factor inducing host macropinocytosis.

According to electron microscopic findings, the non-invasive β -lactamase-negative ampicillin-susceptible *H. influenzae* strain did not adhere to the epithelial cell surface, suggesting that adhesion to

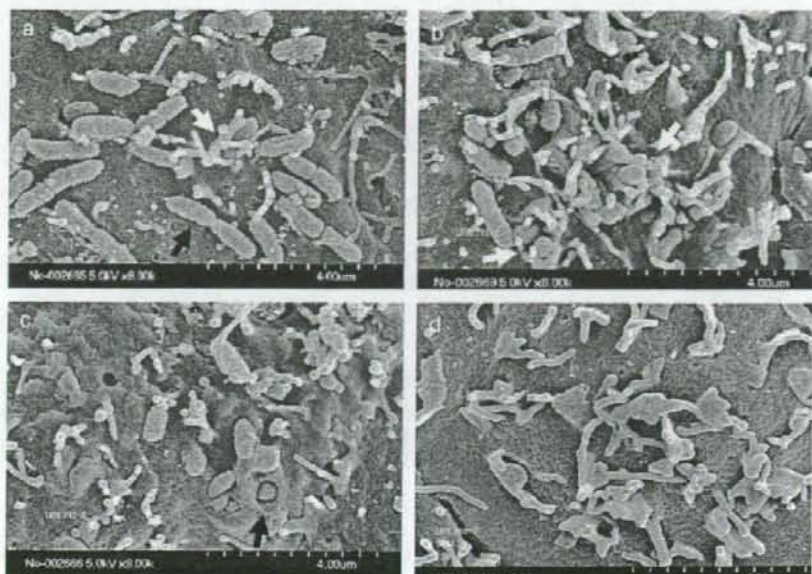


Figure 2. Scanning electron microscopy (SEM) of the polarized cell layer of BEAS-2B cells allowed to develop over the transwell membrane. Three hours after inoculation of a high invasion BLNAR strain (BR49) to the culture supernatant, the cells were washed gently 3 times with HBSS using a pipette and fixed (a) ($\times 8000$), (b) ($\times 8000$). Bacteria attached to the surface of BEAS-2B cells (black arrow) were covered by microvilli extending from cells (white arrow). Some bacteria have entered cells or formed lamellipodia (two white arrows). Bacteria entered cells individually without aggregating. In (c) ($\times 8000$), some bacteria have entered cells nearly completely, with only the tail being visible, or be completely covered by the cell surface (black arrow). In (d) ($\times 8000$), low invasive β -lactamase-negative ampicillin-susceptible strain (H30) did not attach to the cell surface ((d) $\times 8000$).

the cell surface is necessary for *H. influenzae* to enter epithelial cells. Analysis of the BLNAR strain, which entered epithelial cells, suggested that PBP-3 with several amino acid substitutions acts as an adhesion molecule. According to reports on bacterial PBP and epithelial cell invasion, it is possible that PBP-2b also is an adhesion molecule, as well as a cell surface antigen and lipoprotein, in adhesion to and invasion to cultured cervical epithelial cells by Group B *Streptococcus* (GBS) (Johri et al. 2007). It has also been reported that expression of *ampH*, which is homologous to PBP of *Escherichia coli*, in addition to the *salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) gene regulatory genes (*hilD* and *invF*), is involved in invasion of intestinal epithelial cells by *Salmonella enterica* (Gantois et al. 2006). These findings suggested that PBP-3 with amino acid substitutions is an adhesion molecule. To clarify adhesion to the epithelial cell surface or bind to receptors, it is necessary to investigate the structure of amino-acid substituted PBP-3 including hydrophilic or hydrophobic characteristics.

We studied changes in the invasion rate of high invasion BLNAR with the 1 h invasion rate in BR49, BR56, and BR66, but the 3 h invasion rates were 5

times higher than the 2 h invasion rates. Based on these findings, bacterial invasion of BEAS-2B cells increased with time. Moreover, findings on TEM and trypan blue staining suggested progressive cell injury. A comparison of TEM images after 3 and 6 h indicated bacterial invasion causing an increase in bacteria in vacuoles, the swelling of cells, and their detachment from other cells after 6 h. It was not clear whether the presence of bacteria in one vacuole was due to the fusion of bacteria-containing linings or bacterial proliferation in the vacuole. The mechanism of bronchial epithelial cell impairment by the BLNAR strain may be clarified in the future experiment.

H. influenzae infection is known to repeatedly cause to exacerbation of COPD, and induces airway epithelial disorder and excess of secretion, aggravating symptoms (Sapey and Stockley 2006). This study suggested that *H. influenzae* invade and destroy airway epithelial cells and damage the airway. The prevalence of BLNAR suggested that antibacterial drug resistance may increase. Macrolides and quinolones are thought to transfer and accumulate intracellularly and have intracellular bactericidal effects. We should pay attention to the

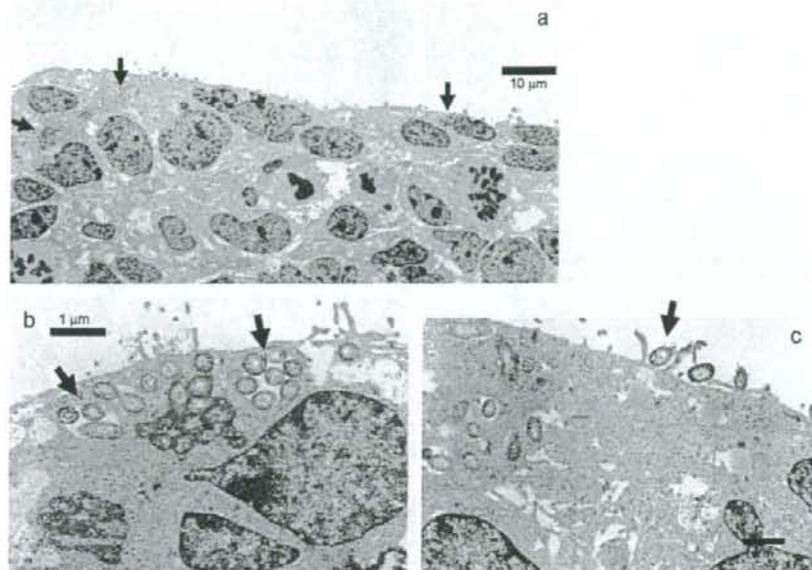


Figure 3. Transmission electron microscopy (TEM) of the polarized cell layer of BEAS-2B cells allowed to develop on the transwell membrane after 3 h. In this photograph obtained 3 h after inoculation of a high-invasive BLNAR strain (BR49) to the culture supernatant, the cell surface is smooth. Invasion of bacteria is observed in cells near the surface (three black arrows) (a) ($\times 1000$). Bacteria are surrounded by vacuoles and are observed in multiple numbers (two black arrows) (b) ($\times 8000$). In (c) ($\times 8000$), microvilli adhering to bacteria, i.e., an image of macrospinosis, is observed (black arrow).

antimicrobial agents when the pathogenic bacteria are BLNAR.

It has been recognized that antimicrobial drug therapy based on pharmacodynamics and pharmacokinetics is necessary for the treatment of infectious diseases (Craig 1998). As shown in the BLNAR strains, there is no treatment against bacteria that have invaded airway epithelial cells. The high-invasive BLNAR strains (BR49, BR56, and BR66) were susceptible to MEPM, CTRX, and CAM based on the US CLSI MIC criteria, but only CAM exhibited an intracellular bactericidal effect in BEAS-2B cells. Considering the pathology of airway infection by the high-invasive BLNAR strains, an antimicrobial agent that readily penetrates airway epithelium to which bacteria show susceptibility is necessary.

The concentrations of β -lactams, MEPM, and CTRX, in airway epithelial lining fluid are not easily elevated, but those of macrolides are high compared with serum concentrations. Furthermore, macrolides also penetrate cell membrane and exhibit a bactericidal effect, suggesting that these are appropriate for the treatment of BLNAR infection. Investigation of the clinical usefulness of macrolides is needed in the future.

The characteristics of macrolide antibiotics have the superiority in being taken up by phagocytes,

lymphocytes, and epithelial cells (Kunishima et al. 2000; Bosnar et al. 2005). In a reported *in-vitro* experiment using an epithelial cell line (A549 and MDCK), when a macrolide antibiotic was added to the culture medium, the intra- and extracellular antibiotic concentrations became similar within 1 h (Bosnar et al. 2005).

In conclusion, the BLNAR strains isolated from clinical samples included isolates capable of invading BEAS-2B cells, and an amino acid substitution in PBP-3 was assumed to be a factor involved in invasion. It was also clarified that *H. influenzae* causes epithelial cell damages in invaded BEAS-2B cells.

Conflicts of interest

Tadashi Okabe, Yoshitaka Yamazaki, Miho Shiota-ni, Takefumi Suzuki, Mayumi Shiohara, Eriko Kasuga, Shigeyuki Notake, Hideji Yanagisawa have no conflicts of interest.

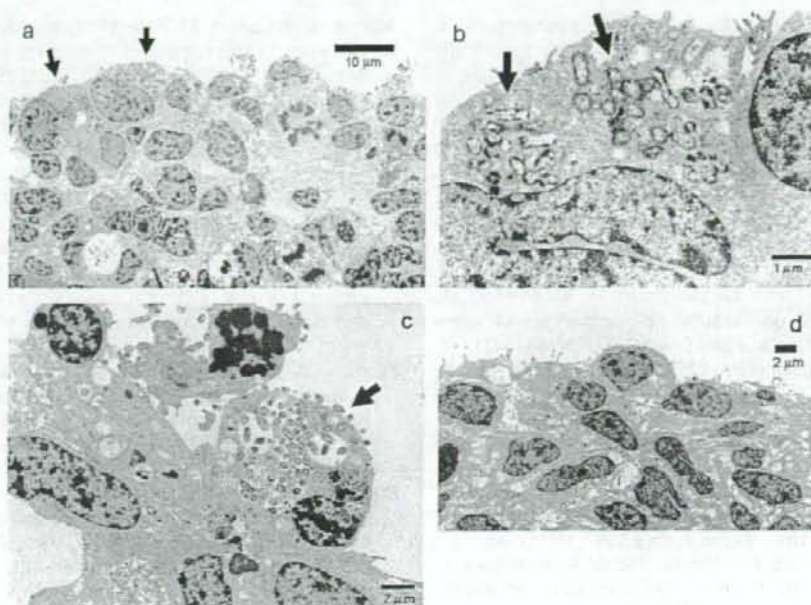


Figure 4. Transmission electron micrographs (TEM) of the polarized cell layer of BEAS-2B cells allowed to develop on the Transwell membrane after 6 h. This is a TEM image 6 h after inoculation of a high-invasive BLNAR strain (BR49). The cell surface is irregular, showing elevations and depressions compared with the image after 3 h. Considerably more bacteria are observed in cells than after 3 h (black arrows) (a) ($\times 1000$), (b) ($\times 8000$). Some cells on the surface were swollen and became spherical due to the presence a large number of bacteria in the cells (black arrow) (c) ($\times 3000$). Low invasion β -lactamase-negative ampicillin-susceptible strain (H30) was not observed in BEAS-2B cells (d).

Q8 Uncited references

Ahren et al. (2002); Hasegawa et al. (2003); Swords et al. (2001).

References

- Ahren IL, Karlsson E, Forsgren A, Riesbeck K. Comparison of the antibacterial activities of ampicillin, ciprofloxacin, clarithromycin, telithromycin and quinupristin/dalfopristin against intracellular non-typeable *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:903–6.
- Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, File Jr TM, Musher DM, Fine MJ. Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. *Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis* 2000;31:347–82.
- Bosnar M, Kelneric Z, Munic V, Erakovic V, Parnham MJ. Cellular uptake and efflux of azithromycin, erythromycin, clarithromycin, telithromycin, and cethromycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2372–7.
- Bouchet V, Hood DW, Li J, Brisson JR, Randle GA, Martin A, et al. Host-derived sialic acid is incorporated into *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide and is a major virulence factor in experimental otitis media. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8898–903.
- Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998;26:1–10.
- Dabernat H, Delmas C, Seguy M, Pelissier R, Faucon G, Bennamani S, et al. Diversity of beta-lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2208–18.
- Ehrlich GD, Veeh R, Wang X, Costerton JW, Hayes JD, Hu FZ, et al. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA* 2002;287:1710–5.
- Fletcher AR, Insel RA. Characterization of lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1978;138:719–30.
- Fluit AC, Florijn A, Verhoef J, Milatovic D. Susceptibility of European beta-lactamase-positive and -negative *Haemophilus influenzae* isolates from the periods 1997/1998 and 2002/2003. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:133–8.
- Forsgren J, Samuelson A, Ahlin A, Jonasson J, Rynnel-Dagoo B, Lindberg A. *Haemophilus influenzae* resides and multiplies intracellularly in human adenoid tissue as demonstrated by *in situ* hybridization and bacterial viability assay. *Infect Immun* 1994;62:673–9.

Please cite this article as: Okabe T, et al. An amino acid substitution in PBP-3 in *Haemophilus influenzae* associate with the invasion to bronchial epithelial.... *Microbiol Res* 2006; (2008), doi:10.1016/j.micres.2008.03.003

- Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, et al. Butyrate specifically down-regulates *salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:946-9.
- García-Cobos S, Campos J, Lázaro E, Román F, Cercenado E, García-Rey C, et al. Ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:2564-73.
- Gotschlich EC, Fraser CA, Nishimura O, Robbinsand JB, Liu TY. Lipid on capsular polysaccharides of gram negative bacteria. *J Biol Chem* 1981;256:8915-21.
- Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs MR, et al. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microb Drug Resist* 2003;9:39-46.
- Holmes KA, Bakaletz LO. Adherence of non-typeable *Haemophilus influenzae* promotes reorganization of the actin cytoskeleton in human or chinchilla epithelial cells *in vitro*. *Microb Pathog* 1997;23:157-66.
- Hotomi M, Fujihara K, Billal DS, Suzuki K, Nishimura T, Baba S, et al. Genetic characteristics and clonal dissemination of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains isolated from the upper respiratory tract of patients in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3969-76.
- Johri AK, Margarit I, Broenstrup M, Brettoni C, Hua L, Gygi SP, et al. Transcriptional and proteomic profiles of group B *Streptococcus* type V reveal potential adherence proteins associated with high-level invasion. *Infect Immun* 2007;75:1473-83.
- Jones AT. Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and a role in the uptake of cell penetrating peptides. *J Cell Mol Med* 2007;11:670-84.
- Karlowsky JA, Critchley IA, Blosser-Middleton RS, Karginova EA, Jones ME, Thornsberry C, et al. Antimicrobial surveillance of *Haemophilus influenzae* in the United States during 2000-2001 leads to detection of clonal dissemination of a beta-lactamase-negative and ampicillin-resistant strain. *J Clin Microbiol* 2002;40:1063-6.
- Ketterer MR, Shao JQ, Hornick DB, Buscher B, Bandi VK, Apicella MA. Infection of primary human bronchial epithelial cells by *Haemophilus influenzae*: macro-pinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry. *Infect Immun* 1999;67:4161-70.
- Kunishima H, Takemura H, Yamamoto H, Kanemitsu K, Shimada J. Evaluation of the activity of antimicrobial agents against *Legionella pneumophila* multiplying in a human monocytic cell line, THP-1, and an alveolar epithelial cell line, A549. *J Infect Chemother* 2000;6:206-10.
- Kuo JSC, Doelling VW, Graveline JF, McCoy DW. Evidence for covalent attachment of phospholipids to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Bacteriol* 1985;163:769-73.
- Marino M, McCluskey RT. Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C1295-306.
- Mendelman PM, Chaffin DO, Kalaitzoglou G. Penicillin-binding proteins and ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 1990;25:525-34.
- Murphy TF. The role of bacteria in airway inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Infect Dis* 2006;19:225-30.
- Murphy TF, Apicella MA. Nontypable *Haemophilus influenzae*: a review of clinical aspects, surface antigens, and the human immune response to infection. *Rev Infect Dis* 1987;9:1-15.
- Parr Jr TR, Bryan LE. Mechanism of resistance of an ampicillin-resistant, beta-lactamase-negative clinical isolate of *Haemophilus influenzae* type b to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;25:747-53.
- Pfaller MA, Ehrhardt AF, Jones RN. Frequency of pathogen occurrence and antimicrobial susceptibility among community-acquired respiratory tract infections in the respiratory surveillance program study: microbiology from the medical office practice environment. *Am J Med* 2001;111(Suppl. 9A):45-125 [discussion 365-385].
- Reddel RR, Salghetti SE, Willey JC, Ohnuki Y, Ke Y, Gerwin BI, et al. Development of tumorigenicity in simian virus 40-immortalized human bronchial epithelial cell lines. *Cancer Res* 1993;53:985-91.
- Sanbongi Y, Suzuki T, Osaki Y, Senju N, Ida T, Ubukata K. Molecular evolution of beta-lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2487-92.
- Sapey E, Stockley RA. COPD exacerbations 2: aetiology. *Thorax* 2006;61:250-8.
- Sethi S, Evans N, Grant BJ, Murphy TF. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2002;347:465-71.
- Swords WE, Buscher BA, Ver Steeg II K, Preston A, Nichols WA, Weiser JN, et al. Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol Microbiol* 2000;37:13-27.
- Swords WE, Ketterer MR, Shao J, Campbell CA, Weiser JN, Apicella MA. Binding of the non-typeable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide to the PAF receptor initiates host cell signalling. *Cell Microbiol* 2001;3:525-36.
- Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, et al. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1693-9.
- Wang B, Cleary PP, Xu H, Li JD. Up-regulation of interleukin-8 by novel small cytoplasmic molecules of nontypeable *Haemophilus influenzae* via p38 and

- extracellular signal-regulated kinase pathways. *Infect Immun* 2003;71:5523–30.
- Weiser JN, Maskell DJ, Butler PD, Lindberg AA, Moxon ER. Characterization of repetitive sequences controlling phase variation of *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide. *J Bacteriol* 1990;172:3304–9.
- Yamazaki Y, Danelishvili L, Wu M, Hidaka E, Katsuyama T, Stang B, et al. The ability to form biofilm influences *Mycobacterium avium* invasion and translocation of bronchial epithelial cells. *Cell Microbiol* 2006;8:806–14.

Please cite this article as: Okabe T, et al. An amino acid substitution in PBP-3 in *Haemophilus influenzae* associate with the invasion to bronchial epithelial.... *Microbiol Res* 2006; (2008), doi:10.1016/j.micres.2008.03.003

MICRES : 25251

研究成果の刊行に関する一覧表

平成 20 年度 国立病院機構 東京病院 呼吸器科 永井英明

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
永井英明	特集 肺結核診断の決め手と治療開始までに遭遇するジレンマ	薬局	59	29-32	2008
永井英明	粟粒結核 I 感染症呼吸器疾患 B. 抗酸菌感染症	日本臨牀	8	83-86	2008
永井英明	非結核性抗酸菌症に対する薬物治療の検証	呼吸	27	1146-1150	2008
永井英明, 池田和子, 織田幸子, 城崎真弓, 菅原美花, 山田由美子, 今井敦子, 遠藤 卓, 大野稔子, 河部康子, 小西加保留, 山田三枝子	長期療養が必要なHIV感染者の受け入れ施設についての検討	IRYO	62 (11)	628-631	2008
永井英明	HIV感染と結核	臨床検査	52	1115-1118	2008
永井英明, 池田和子, 織田幸子, 城崎真弓, 菅原美花, 山田由美子, 今井敦子, 遠藤 卓, 大野稔子, 河部康子, 小西加保留, 山田三枝子	緩和ケア病棟における後天性免疫不全症候群患者の受け入れについての検討	IRYO	62 (8)	436-439	2008
永井英明	肺結核と結核性胸膜炎	日本医師会雑誌	137	198-201	2008
永井英明	7. 結核の治療法と院内感染対策 I 感染症別に考えること	化学療法領域	24	58-65	2008

肺結核診断の決め手と治療開始 までに遭遇するジレンマ

永井 英明*

はじめに

結核の診断は、症状、臨床経過、検査所見などから結核症を疑わなければ難しい。日本は、結核罹患率が欧米先進国に比べ高く、結核の中蔓延国といわれており、日常臨床のなかでは、常に結核を念頭に置いて対応しなければならないと考えている。

どのような患者に、結核の検査を進めるかという点、「15日以上長びく咳を訴える患者」、「抗菌薬に反応の悪い不明熱」、「1年以内に塗抹陽性患者と接触した人」、「他疾患の治療中に咳、発熱が出現し治りがたい症例」、「他医で結核疑いとされた症例」などがあげられる¹⁾。また、初診時に胸部異常陰影がある症例については、原則として喀痰の抗酸菌検査を行うべきである。

結核の胸部X線写真所見

肺結核でみられる胸部X線写真所見を表1に示したが、画像所見だけで結核の確定診断をくだすことは不可能であり、ほかの呼吸器疾患の鑑別が必要である。典型的な胸部X線写真所見は、上葉(S¹, S², S⁶)を中心とする

*国立病院機構東京病院(呼吸器科) 外来診療部長

空洞影とその周辺の散布影を伴う陰影であるが、胸水貯留、縦隔リンパ節腫大を認めることもある。

肺結核の進展は基本的には気道散布であり、それを端的に示す胸部X線所見は多発小粒状影であり、散布性粒状影といわれる。それは終末細気管支から肺泡道周辺に形成される結核性病変を反映している。散布性粒状影はほとんどの肺結核症でみられ、ほかの疾患との鑑別が問題となった場合、ほかの疾患を否定する重要な所見となる。この陰影は胸部CTでは小葉中心性の粒状影として認められ、ときに分岐状影を呈する。粒状影とそれを連結する細気管支の樹枝状陰影を、tree-in-bud(図1)といい特徴的であり、終末細気管支程度の太さの気道からその末梢気道を埋めるように充満する炎症性物質を反映する像を表している。

表1 肺結核の胸部X線写真所見と鑑別すべき疾患

肺結核の典型的所見	鑑別すべき疾患
空洞影	肺腫瘍、肺膿瘍、肺真菌症
散布性粒状影	比較的結核に特有
浸潤影	肺炎
結節影	肺腫瘍
粟粒影	過敏性肺炎、転移性腫瘍
胸水	心不全、悪性腫瘍
肺門・縦隔リンパ節腫大	悪性腫瘍、肺真菌症、サルコイドーシス

図1 肺結核の胸部CT：
散佈性粒状影(tree-in-bud像)



血行性播種性結核症である粟粒結核の典型的な胸部X線写真所見は、全肺野に認められる均一な直径1~3mmの粒状影であり、粒状影が密になると血管影が不明瞭になる。CTでは胸膜に接した粒状影も認められる。このような、典型例では診断は容易であるが、免疫不全症例、ステロイド薬・抗がん薬の投与を受けているような症例では、粒状影の大小不同、結節影、浸潤影などの非典型的所見を呈することがあり、生前診断が困難な場合もある。一般に肺の粟粒結核結節は、はじめは肺胞壁に形成されて円形であるが、その後、肺胞腔内に破れて肺胞腔内の変化を伴い病変がひろがる。したがって、粟粒結核症の診断が行われた時期により、胸部X線写真は典型的な粟粒影のみの所見から、粟粒大よりも大きい結節影、さらに浸潤影を伴うようになると考えられる。HRCT(High Resolution CT:高精度CT)を検討した報告²⁾では、粟粒結核では粟粒影に次いで多い陰影はスリガラス陰影であったという。非典型的所見は、発病から診断までの期間が長いほど出現する確率が高くなる。病状が進行し成人呼吸促迫症候群(ARDS)を合併すると、両肺に広範な浸潤影を呈する。肺門および縦隔リンパ節腫大はHIV感染症に合併した粟粒結核では高頻度で認め

られるが³⁾、合併症のない粟粒結核症での頻度は高くない。

結核感染の新しい診断法

従来、結核感染の診断はツベルクリン反応(ツ反)によって行われてきた。この方法はBCG未接種者においては感度、特異度ともに高く基本的には優れた方法であるが、BCG接種者においては、現れる反応が過去のBCG接種によるものか、最近受けた結核感染によるものが区別できないという大きな問題がある。BCG接種に積極的に取り組んできたわが国では、結核感染の有無をツ反で判定するのはしばしば困難をきわめる。そこにBCG接種の影響を受けない新しい結核診断法が開発された。特異的抗原刺激に対するリンパ球のインターフェロン γ (IFN- γ)産生能を測定することによって結核感染の診断を行う方法(QuantiFERON-TB第2世代;QFT-2G)である。

QFT-2Gは、結核菌由来の特異抗原early secreted antigenic target 6(ESAT-6)とculture filtrate protein 10(CFP-10)の刺激による末梢血リンパ球のIFN- γ 産生能を測定する検査法で、結核感染の診断有用性は高い。Moriら⁴⁾によればQFT-2Gの結核感染の診断における特異度は98.1%、感度は89%である。

QFT-2GはBCG接種の影響を受けないため、接触者検診、医療関係者の結核管理、結核の補助診断などにツ反に代わって用いられることになるだろう⁵⁾。

結核菌の検出

結核の診断は臨床検体の塗抹・培養検査に

において結核菌を検出することにより確定する。喀痰検査で結核菌を検出できない場合は、胃液検査あるいは気管支内視鏡検査を行い病変部の気管支洗浄、肺生検を行う。喀痰塗抹検査は、現在では集菌法を用いており、ガフキー号数ではなく(1+)、(2+)、(3+)という記載法が行われている。

菌の同定には、喀痰などの臨床検体を用いて、結核菌のRNAやDNAを増幅する方法が汎用されている。結核患者における遺伝子学的検査の陽性率は50~60%で、培養検査とはほぼ同等である。早期の確定診断には有用である。

培養菌についても同様に核酸同定法が一般的になっており、従来の生化学法は特殊例に用いられている。

結核診断の流れとジレンマ

結核が疑われた場合、喀痰などの臨床検体の塗抹検査は直ちに行われ、抗酸菌染色により抗酸菌を認めるかどうか分かる。抗酸菌塗抹検査が陽性であっても、結核菌か非結核性抗酸菌かの鑑別はこの時点ではできない。さらにPCR法などの遺伝子学的検査を追加し、迅速に結核菌であることがわかれば、結核の治療開始ということになり、問題はない。

ところが、抗酸菌塗抹陽性だが、遺伝子学的検査を直ちにできない、あるいは陰性である場合は苦慮する。胸部X線写真上、非結核性抗酸菌症よりも肺結核が強く疑われれば、結核病棟に入院することになるが、とりあえず、個室に入ってもらい、検査を進める。個室がない場合は、結核の治療が進んで塗抹陰性者だけとなった病室に入ってもらおう。また、胸部X線写真上は結核がもっとも疑われるが、

喀痰も採れない場合の入院も同様に対応せざるを得ない。結核病棟に個室がなければ、一般病棟の個室で対応する。

喀痰が採取できない症例については、胃液検査、気管支内視鏡検査により検体を採取する。必要とあれば生検による病理学的検査を追加する。

いずれにしても結核菌を検体から検出する努力は必要である。結核の確定診断と、結核菌の感受性検査を行うことができるからである。

胸部X線写真上、結核を強く疑われるが、喀痰、胃液、気管支内視鏡による採痰などでも、抗酸菌を検出できない場合は、ツ反やQFT-2Gを参考にして、結核の治療を始めることがある。治療的診断である。その場合は、後に判明する培養検査の結果を必ず確認する必要がある。

診断の遅れる可能性の高い結核症

東京病院に紹介される結核患者のなかで、明らかに診断が遅れている症例があり、遅れやすいタイプについて述べる。

① 乾酪性肺炎型

咳嗽、喀痰、発熱という呼吸器症状があり、胸部X線写真では浸潤影を認め、細菌性肺炎との鑑別が困難な例である。浸潤影のなかに空洞があれば、肺結核も疑われるが、空洞のない症例ではしばしば、細菌性肺炎として治療されることがある。ただし、胸部CTでは、前述のtree-in-bud像をしばしば認めるので、画像の入念な観察により、結核を疑うことは可能である。

② 喉頭結核

咳嗽、のどの違和感などが主訴で、胸部X線写真に所見がないため、しばしば耳鼻科を受診する。耳鼻科では喉頭腫瘍と診断され、そのまま経過を観察したり、生検の結果待ちで時間が経ってしまう例がある。咳嗽により結核菌を環境に飛散させやすい状況のため、接触者健診などでしばしば大きな問題となる。肺結核を伴う例もあり、その場合は胸部X線写真を精査すると所見がある。

③ 気管支結核

咳嗽、喀痰、喘鳴があり、一見すると胸部X線写真に異常影がない。喘鳴があるため症状から喘息として治療されることが多い。気管支病変が主であり、胸部X線写真や胸部CTを精査すると、病変部の気管支の狭窄を認め、この狭窄があるために喘鳴が出現する。よく見ると胸部X線写真に散布性粒状影(tree-in-bud)を認めることがある。治りにくい喘息として、ステロイド治療が行われることがある。この例も結核菌を長期間散布してしまう可能性がある。

④ 高齢者の肺結核

高齢者施設などに入所中の基礎疾患のある患者は、しばしば誤嚥性肺炎をくり返す。そのなかに、肺結核が紛れることがあり、診断

は遅れやすい。それは、喀痰による結核菌の検出が困難なためである。

⑤ 肺外結核

結核菌は全身のあらゆる臓器に結核症を起こしうるため、その臓器特有の他疾患と誤診される可能性がある。例えば、()内に鑑別すべき疾患を示すと、脊椎カリエス(骨粗鬆症、脊椎炎)、腸結核(腸炎、クローン病、腸腫瘍)、関節結核(関節炎)、脳結核(脳腫瘍)、女性生殖器結核(卵巣・子宮体腫瘍)、頸部リンパ節結核(転移性腫瘍)などである。

おわりに

結核の罹患率の高い日本では、日常的に結核患者に接触する可能性があること、および結核はすべての臓器に病変を引き起こしうることを、常に認識しておかなければならない。

・ 文 献 ・

- 1) 青木正和：日常臨床・業務に役立つ結核病学 結核症の診断発症の診断。日本胸部臨床，59：944-959，2000
- 2) Hong SH et al：High resolution CT findings of military tuberculosis. J Comput Assist Tomogr. 22：220-224，1998
- 3) 永井英明ほか：Human Immunodeficiency Virus (HIV) 感染症における結核。日本胸疾患誌，35：267-272，1997
- 4) Mori T et al：Specific detection of tuberculosis infection：an interferon-gamma-based assay using new antigens. Am J Respir Crit Care Med，170：59-64，2004
- 5) 日本結核病学会予防委員会：クオンティフェロン® TB-2 Gの使用指針。結核，81：393-397，2006

*

*

*

I 感染症呼吸器疾患

B. 抗酸菌感染症

粟粒結核

Miliary tuberculosis

Key words: 粟粒結核, 播種性結核症

永井英明

1. 概念・定義

粟粒結核とは、血行性播種性結核症であり、胸部X線写真では両肺野にびまん性に径1-3mmの多発小粒状影を認める。

血行性播種性結核症は同時に複数の臓器に結核病変を生じ、細菌学的あるいは病理学的に、少なくとも2臓器以上に活動性結核病巣を認め、びまん性の粟粒大あるいはこれに近い大きさの結節性散布巣を有する症例である。

粟粒結核と血行性播種性結核症はほぼ同義と解されているが、胸部X線写真に粟粒影を認めない血行性播種性結核症も存在することから、'粟粒結核'という用語ではなく、'播種性結核症'を用いるべきであるという意見もある¹⁾。

2. 病 因

粟粒結核は、免疫機能が低下した宿主に発症することが多く、病因として白血病などの血液疾患、悪性リンパ腫や癌などの悪性腫瘍、人工透析、肝硬変、糖尿病、膠原病、HIV感染症、ステロイド投与、免疫抑制剤投与、抗癌剤投与、妊娠・分娩、高齢、アルコール中毒などがあげられる。

結核患者総数は年々減少しているが、粟粒結核患者数はむしろ増加しており、したがって、結核患者総数に占める比率は上昇している(図1)²⁾。これは、上記のような免疫機能低下例の増加が背景にあるのかもしれない。

3. 病 態

粟粒結核には早期蔓延型と晩期蔓延型とがある。早期蔓延型は、初感染に引き続いて、初期変化群の肺門リンパ節病変が強く侵され、縦隔リンパ節にも次々と炎症が波及し、静脈角リンパ節まで達し、ここから静脈血中に結核菌が侵入し、全身に散布するタイプである。晩期蔓延型は、慢性孤立性臓器結核症(肺、腎、骨、頸部リンパ節、性腺などの結核)において、結核病巣内の特に空洞壁で、病巣内の毛細血管や細静脈が侵されて、直接、結核菌が侵入し全身に散布するものをいう。

4. 診断と鑑別診断

a. 診 断

1) 症 状

初診時の全身症状としては、発熱、盗汗、体重減少、衰弱などがみられ、当院の74症例では発熱が97.3%と最も多く、平均 $38.7 \pm 1.0^\circ\text{C}$ であり、 39°C 以上の症例が50.0%を占めていた³⁾。呼吸器症状としては、咳嗽、血痰、息切れ、胸膜痛、神経系の症状としては、頭痛、失見当識、意識障害、昏睡などがみられる。

2) 一般検査

貧血、白血球数増加あるいは減少、赤沈亢進、CRP高値、低アルブミン血症を認める。肝臓に結核病変が生じ肝機能障害を認めることが多く、特にGPTに比べALP高値例が多い。ALP単独高値例も認められ、ALP高値は粟粒結核症に

Hideaki Nagai: Department of Respiratory Diseases, National Hospital Organization Tokyo Hospital 独立行政法人国立病院機構東京病院 呼吸器科

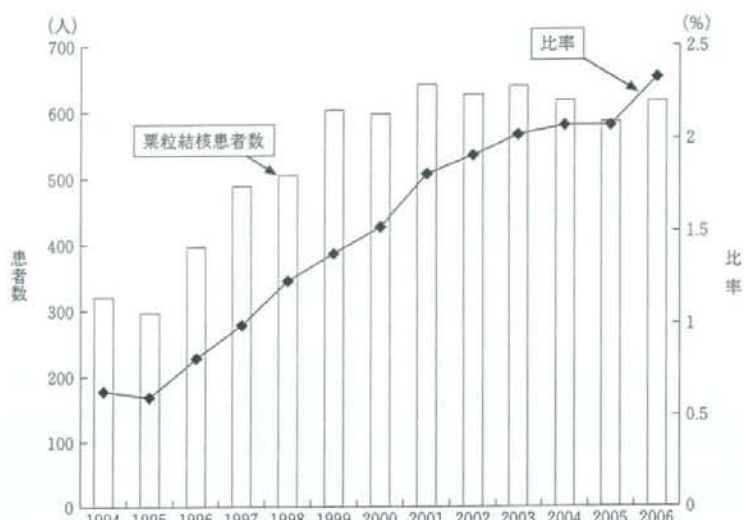


図1 我が国の粟粒結核の実数および総結核数に対する比率の年次推移

特徴的所見と考えられる³⁾。動脈血ガス分析ではPaO₂の低下した症例が多く、当院症例のPaO₂の平均値は68.5±16.2mmHg(32.9-97.7mmHg)であり、PaO₂60mmHg未満を呈した症例は28.3%であった³⁾。ツベルクリン反応は、一般的には陰性例が多い。新しい結核感染診断方法であるQuantiferon®TB第2世代(QFT-2G)は、結核感染診断の感度89.0%、特異度98.2%⁴⁾とともに高いが、免疫低下例では感度が下がるといわれている。当院の粟粒結核症例では、免疫機能低下のない症例では5例中5例(100%)が陽性であったが、免疫機能低下例では12例中7例(58%)が陽性であった。

3) 胸部X線写真

本症の典型的な胸部X線写真所見(図2-a)は、全肺野に認められる直径1-3mmの粒状影であり、粒状影が密になると血管影が不明瞭になる。CT(図2-b)では胸膜に接した粒状影も認められる。このような典型例では診断は容易であるが、免疫不全症例、ステロイド剤・抗癌剤の投与を受けているような症例では、粒状影の大小不同、結節影、浸潤影などの非典型的な所見を呈することがあり、生前診断が困難な場合もある。

一般に肺の粟粒結核結節は、初めは肺胞壁に形成されて円形であるが、その後肺胞腔内に破れて肺胞腔内の変化を伴い病変が広がる。したがって、粟粒結核症の診断が行われた時期により、胸部X線写真は典型的な粟粒影のみの所見から、粟粒大よりも大きい結節影、更に浸潤影を伴うようになると考えられる。HRCTを検討した報告⁵⁾では、粟粒結核では粟粒影に次いで多い陰影はすりガラス陰影であったという。非典型的な所見は、発病から診断までの期間が長いほど出現する確率が高くなる。病状が進行し成人呼吸促進症候群(ARDS)を合併すると、両肺に広範な浸潤影を呈する。

肺門および縦隔リンパ節腫大はHIV感染症に合併した粟粒結核では高頻度で認められる⁶⁾が、合併症のない粟粒結核症での頻度は高くない。

4) 結核菌の検出および組織診

結核菌の検出が確定診断となる。結核菌の塗抹・培養検査では喀痰(塗抹陽性率46.4%、培養陽性率76.8%)、尿、脳脊髄液の順に陽性率は低下し、特に骨髄穿刺液の陽性率は低い⁷⁾。喀痰の塗抹陽性率は他の報告でも31%⁸⁾、33

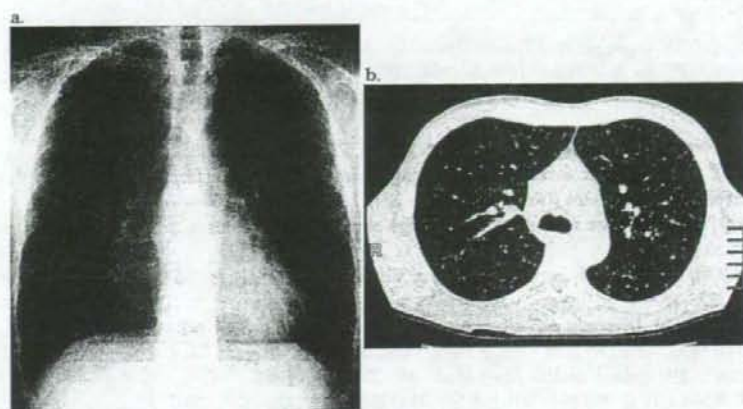


図2 粟粒結核の胸部X線写真

%⁹と高くなく、疑わしい症例では塗抹検査が陰性であっても polymerase chain reaction (PCR) による結核菌の迅速検出法を行うべきである。

2臓器以上に結核性病変を確認するためには、抗酸菌の培養検査だけでなく、生検も必要になる。組織診による診断では、肺生検および肝生検による診断率はともに100%⁹と高いが、全身状態の不良例が多いので、肺生検や肝生検は常に施行できるとはかぎらない。骨髓穿刺液凝固組織診による診断率は61.5%⁹であるが、骨髓穿刺液凝固組織診は侵襲が少ないので、全例に行うことが可能であり必須の検査と考えられる。

5) 肺外結核および合併症

粟粒結核は肺外結核の合併頻度も高く、結核性髄膜炎、脳結核、骨・関節結核、リンパ節結核、腸管結核、喉頭結核、腎結核などがある⁹。合併症としては、播種性血管内凝固症候群(DIC)、ARDS、ADH分泌異常症候群(SIADH)、気胸、縦隔気腫などがある⁹。

b. 鑑別診断

胸部X線写真上の鑑別すべき疾患としては、転移性肺腫瘍、サルコイドーシス、塵肺、過敏性肺炎、肺胞微石症などがあげられる。

5. 治療と予後

a. 治療

粟粒結核は重症例が多いが、感受性菌であれ

ば初回標準治療法に従えばよい。しかし、DICなどを合併した場合はその治療が必要になる。

肺外結核として、脳結核、結核性髄膜炎、結核性心外膜炎を合併している場合は、それぞれ水頭症、脳神経麻痺、心外膜炎着予防のために、ステロイド剤の投与を考慮すべきである(prednisolone換算30-60mg/日)。重症呼吸不全を呈する場合も、ステロイド剤の短期投与が効果を示すことがある。

基礎疾患のためにステロイド剤の投与を行っている場合は、引き続き同量を投与すべきであるが、rifampin使用例では、ステロイド剤の効果が低下するため、ステロイド剤の約50%の増量が必要である。

AIDS合併例において抗HIV薬と抗結核薬を併用する際には、薬剤の副作用、薬剤の相互作用、免疫再構築症候群などを考慮しなければならない難しさがある⁹。

b. 予後

予後をみると85.1%は治癒しており⁹、早期に診断し治療を開始すれば十分治癒しうる疾患である。しかしながら、ARDSとDICは粟粒結核症の予後不良因子であり、両者の合併例については注意深い観察が必要である¹⁰。

■ 文 献

- 1) Iseman MD: Disseminated Tuberculosis. In: A Clinician's Guide to Tuberculosis, p167, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000.
- 2) 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課: 結核の統計(1995年版~2007年版), 結核予防会, 1995-2007.
- 3) 永井英明ほか: 粟粒結核症の臨床的検討. 結核 73: 611-617, 1998.
- 4) Mori T, et al: Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. Am J Respir Crit Care Med 170: 59-64, 2004.
- 5) Hong SH, et al: High resolution CT findings of miliary tuberculosis. J Comput Assist Tomogr 22: 220-224, 1998.
- 6) 永井英明ほか: Human Immunodeficiency Virus(HIV) 感染症における結核. 日胸疾会誌 35: 267-272, 1997.
- 7) Prout S, et al: Disseminated tuberculosis. S Afr Med J 58: 835-842, 1980.
- 8) Maartens G, et al: Miliary tuberculosis: rapid diagnosis, haematologic abnormalities, and outcomes in 109 treated adults. Am J Med 89: 291-296, 1990.
- 9) 永井英明: HIV 合併結核の現状と展望. 呼吸器科 11: 423-427, 2007.
- 10) 永井英明ほか: DIC を合併した粟粒結核症—4 症例の報告—. 結核 62: 469-474, 1987.

解 説 臨 床

非結核性抗酸菌症に対する薬物治療の検証

永井 英明

要 旨 非結核性抗酸菌 (NTM) 症は殺菌的に有効な薬剤がなく、一部の NTM を除いて治療は困難である。また、感受性試験の結果と臨床効果が一致しない場合が多く、感受性のある薬剤を投与しても除菌できない可能性があることを十分に理解しておかなければならない。わが国の代表的な NTM 症のうち、肺 *M. kansasii* 症は結核と同様抗結核薬に良好に反応するが、肺 MAC 症は遭遇する頻度が最も高いにもかかわらず治療に難渋する。クラリスロマイシンの登場により肺 MAC 症の治療成績は向上したが、現在使用可能な抗菌薬の組み合わせだけで根治を目指すことは極めて困難な状況である。したがって、さらなる抗菌薬治療の効果を得るには、新たな抗菌薬の登場を待たなければならない。現状では、抗菌薬療法だけでなく、今回は触れなかった外科療法を組み合わせた集学的治療で肺 MAC 症に対応すべきである。

永井 英明：非結核性抗酸菌症に対する薬物治療の検証，呼吸 27(12)：1146—1150，2008

キーワード：非結核性抗酸菌症 *Mycobacterium avium* complex クラリスロマイシン
アジスロマイシン

I. はじめに

非結核性抗酸菌 (nontuberculous mycobacteria: NTM) は塵埃、土壌、水などの自然界に広く存在し、現在 100 種類以上が知られているが、わが国でもそのなかの 20 種類以上の感染症例が報告されている。NTM 症のなかでは *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症が最も多く約 80% を占め、残りの大部分は *M. kansasii* 症であり、その他に希少菌種による NTM 症がわずかに存在する。診断技術の進歩と医療関係者の関心が高まったためか、近年、肺 MAC 症を含めた NTM 症の増加が指摘されており、特に中年以降の基礎疾患のない女性に発症した肺 MAC

症の増加が顕著である。

なお、NTM 症には患者家族や大量排菌者との接触による発症例が殆どないことから、ヒトからヒトへの感染は無視し得ると考えられている。

また、殺菌的に有効な薬剤がなく、一部の NTM を除いて治療は困難である。したがって、手術可能例において「病変部の切除」という手段は極めて有効であるが、今回は「薬物治療」について述べる。

NTM 症の治療指針については、日本結核病学会¹⁾、米国胸部学会 (ATS)/米国感染症学会 (IDSA)²⁾、英国胸部学会 (BTS)³⁾ がそれぞれ発表しているが、主に前 2 者を参考にして述べる。なお、ATS/IDSA の治療指針²⁾ は 10 年ぶりに改訂され、幾つかの新しい指針が示されている。

わが国の代表的な NTM 症のうち、肺 *M. kansasii* 症は結核と同様、抗結核薬に良好に反応するが、肺 MAC 症は遭遇する頻度が最も高いにもかかわらず治療に難渋する。そこで、本稿では肺 MAC 症について詳しく述べる。

Review of drug therapy of nontuberculous mycobacteriosis
国立病院機構東京病院呼吸器内科
Hideaki Nagai
Department of Pulmonary Diseases, National Hospital Organization
Tokyo Hospital, Tokyo 204-8585, Japan

II. NTM に対する薬剤感受性試験

NTM に対する薬剤感受性試験の意義については議論が多い。MAC 症は結核と異なり、リファンピシン(RFP)やエタンブール(EB)などの抗結核薬に対する感受性結果が治療効果に反映せず、クラリスロマイシン(CAM)の感受性試験だけが臨床効果と相関している。また、*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. fortuitum* は無作為対照比較試験では評価されていないが、薬剤感受性試験の結果が臨床効果と一致するといわれている。さらに、*M. abscessus* と *M. simiae* は薬剤感受性試験と臨床効果は一致しないが、興味深いことに *M. abscessus* の皮膚や軟部組織感染では両者は一致するという。

感受性のブレイクポイントは検査室レベルで決定されてきたが、臨床的な意味合いについて検証されているものは少ない。また、感受性試験そのものについても、用いる培地を含めて、各々の菌にどの試験が適切なものか十分な検証がなされていない部分もある。したがって、感受性試験の限界を認識し、感受性のある薬剤を投与しても除菌できない可能性があることを十分に理解しておかなければならない。

III. MAC 症の治療

AIDS における MAC 症は全身播種型を呈し、日和見感染症として重要な位置を占めている。その臨床的エビデンスは多数集積されており、治療法もほぼ確立している。この項では、AIDS に合併した MAC 症には触れず、治療に難渋する肺 MAC 症について述べる。

1. 肺 MAC 症の治療レジメ

MAC 症の治療に不可欠な薬剤は CAM, アジスロマイシン(AZM), EB である。これらの薬剤を RFP やアミノグリコシドの注射剤と併用して用いる。

日本結核病学会の治療指針¹⁾では、ストレプトマイシン(SM), カナマイシン(KM), エンビオマイシン(EVM)のうち1薬剤と、EB, RFP の3薬剤あるいはこれにイソニアジド(INH)を加えた4薬剤に CAM を 600 mg/日以上を加えるとしている。これらに反応しない場合は、フルオロキノロン(FQ)やアミカシン(AMK)などを考慮する。なお、治療期間は菌陰性化後9~12カ月を提唱している。表1に、上記を踏まえたわが国で使用可能な抗菌薬による治療法の1例を示した。

また、表2には ATS/IDSA が推奨する治療指針²⁾を提示した。ATS/IDSA の指針に新たに加わった治療法は、

表1 日本結核病学会指針¹⁾を基にした肺 MAC 症の抗菌薬治療

・CAM	600~800 mg/日
・RFP	450 mg/日
・EB	15 mg/kg/日
・SM あるいは KM	0.5~0.75 g(15 mg/kg を超えない)2~3 回/週 (2~6 カ月)
・重症例に対しては FQ を加える	

間欠投与方法である。結節/気管支拡張型症例、連日投与方法に耐えられない空洞型症例、積極的な治療を要求しない症例(疾患の抑制が目標)などが対象である。なお、CAM は消化器症状により内服できない場合があるので、500 mg × 2/日(わが国では 400 mg × 2/日)かと分けてもよい。また、体重 50 kg 以下、または 70 歳以上の場合、500 mg/日あるいは 250 mg × 2/日(わが国では 200 mg × 2/日)に減量してもよい。投与量調節をしても連日投与方法に耐えられないときは、間欠投与方法も考慮すべきである。注射薬は重症度、治療の反応により選択する。

リファブチンは CAM と併用した場合、肝代謝を阻害されるため、血清濃度が 2 倍以上になる。したがって、リファブチンの副反応(ぶどう膜炎、白血球減少、胃腸障害、多発関節痛症候群)は CAM と併用しているときに起こりやすい。リファブチンは 300 mg/日が適当量であるが、結節/気管支拡張型の高齢者に対し CAM と併用する場合 150 mg/日まで減らす必要があるかもしれない。なお、リファブチンは、2008 年秋にわが国でも発売になる見通しである。

2. 肺 MAC 症の治療に関するエビデンス

1) CAM の登場以前の治療

抗結核薬を中心とした肺 MAC 症の治療成績は良好ではない。副作用が少なく、しかも臨床的に有効な薬剤がないからである。

CAM の登場以前に行われた HIV 陰性肺 MAC 症の治療についての多施設共同二重盲検無作為対照比較試験がある。BTS がヨーロッパで行ったものであり⁴⁾、2 回の培養陽性が確認された肺 MAC 症を、RFP+EB(RE)投与群と RFP+EB+INH(REH)投与群に分け、2 年間の治療とその後 3 年間の追跡した。RE 群 37 例、REH 群 38 例で開始したが、それぞれ 6 例、8 例が脱落した。肺 MAC 症による死亡は、5 年間でそれぞれ 0 例、3 例、24 カ月後の菌陽性例は 7 例、4 例、再排菌例は 8 例、2 例、5 年後生存かつ菌陰性例は 32.3%、43.3%であった。治療成績は REH 群のほうが有意によかったが、死亡率が高かった理由は不明である。また、化学療法開始前の感受性検査の結果