

and Europe preceding PCVs [34], and serotype 1, which has been predominant in complicating pneumonia before and after PCVs became available [35], were undetectable in our blood culture. Information about non-bacteraemic pneumonia serotypes is limited. The coverage rates of PCV7 in patients aged <5 years with respiratory infections determined using oropharyngeal swab samples in Vietnam, hypopharyngeal aspirates in China and nasopharyngeal isolates in Switzerland were 88.7% [36], 76.3% [37], and about 70% (<2 years) [38], respectively, with serotype 19F being the most frequent.

PCV7 coverage rates for PRSP were 92.9% and 100% in sputum and blood isolates, respectively. We hope that PCV7 will reduce the incidence of respiratory tract infections, especially those caused by strains that are less susceptible to penicillin.

Serotypes have changed in countries where PCV7 has been introduced as routine immunization and the emergence of serotype 19A with multidrug resistance has become a problem [1, 2, 39–41]. ST199 and ST320 are the major STs found in these countries. Here, we found only serotype 19A *S. pneumoniae* with ST2331. One isolate had ST199 but its serotype was 15B.

The incidence of serotype 6C, which was distinguished from serotype 6A in 2007 [42], also increased after the introduction of PCV7 [43]. Serotype 6C was isolated from <2% of children with IPD and from 9.5% of samples from the nasopharyngeal mucosa of healthy children in Japan [16]. We identified three 6C isolates from sputum (4.8%) with the new sequence type ST5832 in our patients with CAP.

Some limitations of this study should be considered. This study covered only a 1-year period and therefore does not account for annual variations in either the incidence of disease or the detected serotypes. In addition, information about previous antibiotic administration was not available.

PCV7 was introduced as an elective vaccine in Japan in February 2010. New PCVs, especially 13-valent and the investigational 15-valent types, would potentially increase the coverage rate of sputum isolates. Switching to these new PCVs should be considered with the increase of non-vaccine serotype. Continued surveillance to detect changes in the incidence of CAP caused by pneumococci, their antimicrobial resistance, serotypes and genotypes are crucial for evaluating the impact of PCV7 and to effectively prevent pneumococcal infections.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the assistance of the participants in the Chiba Paediatric Infectious Disease Meeting, namely Fumie Nagai, Masanaga Arima, Katuaki Abe, Hisae Kazukawa, Chie Fukasawa, Tadashi Hoshino, Jiro Aizawa, Hiroko Oshima, Nobuyasu Ishikawa and Yoshio Kori in the planning and implementation of this study. The authors are also grateful to the paediatricians in and around Chiba City who contributed toward this study. This study was financially supported by the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare grants for Research on the Mechanism, Epidemiology, Prevention and Control of Acute Respiratory Infections (H22-iyaku-shitei-028), Research on Regulatory Science of Pharmaceuticals and Medical Devices (H22-kokui-shitei-009) and the Research Project for Emerging and Re-emerging Infectious Disease (H21-shinkou-ippan-008 to A.W.).

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. **Pilishvili T, et al.** Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *Journal of Infectious Diseases* 2010; **201**: 32–41.
2. **Isaacman DJ, McIntosh ED, Reinert RR.** Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *International Journal of Infectious Diseases* 2010; **14**: e197–209.
3. **Grivea IN, et al.** Impact of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* among day-care center attendees in central Greece. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2008; **27**: 519–525.
4. **Bettinger JA, et al.** The effect of routine vaccination on invasive pneumococcal infections in Canadian children, Immunization Monitoring Program, Active 2000–2007. *Vaccine* 2009; **28**: 2130–2136.
5. **Black SB, et al.** Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children younger than five years of age for prevention of pneumonia. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2002; **21**: 810–815.
6. **Grijalva CG, et al.** Decline in pneumonia admissions after routine childhood immunisation with pneumococcal conjugate vaccine in the USA: a time-series analysis. *Lancet* 2007; **369**: 1179–1186.

7. Madhi SA, Klugman KP, Group TVT. A role for *Streptococcus pneumoniae* in virus-associated pneumonia. *Nature Medicine* 2004; **10**: 811–813.
8. Kubo S, *et al.* Clinical aspects of 'asthmatic bronchitis' and chronic bronchitis in infants and children. *Journal of Asthma Research* 1978; **15**: 99–132.
9. Uehara S. A method of bacteriological examination of washed sputum in infants and children. *Acta Paediatrica Japonica* 1988; **30**: 253–260.
10. Cao LD, *et al.* Value of washed sputum gram stain smear and culture for management of lower respiratory tract infections in children. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2004; **10**: 31–36.
11. Takeda N, *et al.* Evaluation of ampicillin for the initial treatment of pneumonia in pediatric inpatients. *Journal of the Japan Pediatric Society* 2008; **112**: 1081–1087.
12. Hishiki H, *et al.* Incidence of bacterial coinfection with respiratory syncytial virus bronchopulmonary infection in pediatric inpatients. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2011; **17**: 87–90.
13. Uehara S, *et al.* Japanese guidelines for the management of respiratory infectious diseases in children 2007 with focus on pneumonia. *Pediatrics International* 2011; **53**: 264–276.
14. Japanese Census. Japan census data for Chiba city (<http://www.city.chiba.jp/sogoseisaku/sogoseisaku/tokei/jinkou.html>).
15. Ogita J, *et al.* Incidence of community-acquired pneumonia and pneumococcal pneumonia, among children in Chiba city, Japan. *Kansenshogaku Zasshi* 2008; **82**: 624–627.
16. Chang B, *et al.* Isolation of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6C and 6D from the nasopharyngeal mucosa of healthy Japanese children. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2010; **63**: 381–383.
17. Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 1998; **144**: 3049–3060.
18. Ishiwada N, *et al.* The incidence of pediatric invasive pneumococcal disease in Chiba prefecture, Japan (2003–2005). *Journal of Infection* 2008; **57**: 455–458.
19. Clark JE, *et al.* Epidemiology of community-acquired pneumonia in children seen in hospital. *Epidemiology and Infection* 2007; **135**: 262–269.
20. Djuretic T, *et al.* Hospital admissions in children due to pneumococcal pneumonia in England. *Journal of Infection* 1998; **37**: 54–58.
21. Henrickson KJ, *et al.* National disease burden of respiratory viruses detected in children by polymerase chain reaction. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2004; **23**: S11–18.
22. Weigl JA, *et al.* Population-based burden of pneumonia before school entry in Schleswig-Holstein, Germany. *European Journal of Pediatrics* 2003; **162**: 309–316.
23. Cherian T, *et al.* Standardized interpretation of paediatric chest radiographs for the diagnosis of pneumonia in epidemiological studies. *Bulletin of the World Health Organization* 2005; **83**: 353–359.
24. Bartlett JG, Finegold SM. Bacteriology of expectorated sputum with quantitative culture and wash technique compared to transtracheal aspirates. *American Review of Respiratory Disease* 1978; **117**: 1019–1027.
25. Ishiwada N, *et al.* Etiology of pediatric inpatients with pneumonia. *Kansenshogaku Zasshi* 1993; **67**: 642–647.
26. Hamano-Hasegawa K, *et al.* Comprehensive detection of causative pathogens using real-time PCR to diagnose pediatric community-acquired pneumonia. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2008; **14**: 424–432.
27. Ziyade N, Aksu B, Yagci A. Value of washed sputum samples in children with lower respiratory tract infections. *Pediatrics International* 2009; **51**: 438–440.
28. Don M, *et al.* Aetiology of community-acquired pneumonia: serological results of a paediatric survey. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2005; **37**: 806–812.
29. Michelow IC, *et al.* Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. *Pediatrics* 2004; **113**: 701–707.
30. Yoshida R, *et al.* Trends in antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995; **39**: 1196–1198.
31. Hotomi M, *et al.* Serotype distribution and penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates from middle ear fluids of pediatric patients with acute otitis media in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; **46**: 3808–3810.
32. Chiba N, *et al.* Serotype and antibiotic resistance of isolates from patients with invasive pneumococcal disease in Japan. *Epidemiology and Infection* 2010; **138**: 61–68.
33. Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infectious Diseases* 2005; **5**: 83–93.
34. Hausdorff WP, *et al.* Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clinical Infectious Diseases* 2000; **30**: 100–121.
35. Hausdorff WP, Dagan R. Serotypes and pathogens in paediatric pneumonia. *Vaccine* 2008; **26** (Suppl. 2): B19–23.
36. Watanabe K, *et al.* Drug-resistant pneumococci in children with acute lower respiratory infections in Vietnam. *Pediatrics International* 2008; **50**: 514–518.
37. Yao KH, *et al.* Pneumococcal serotype distribution and antimicrobial resistance in Chinese children hospitalized for pneumonia. *Vaccine* 2011; **29**: 2296–2301.
38. Muhlemann K, *et al.* Nationwide surveillance of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with respiratory infection, Switzerland, 1998–1999. *Journal of Infectious Diseases* 2003; **187**: 589–596.
39. Moore MR, *et al.* Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005. *Journal of Infectious Diseases* 2008; **197**: 1016–1027.

40. Ardanuy C, *et al.* Emergence of a multidrug-resistant clone (ST320) among invasive serotype 19A pneumococci in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; **64**: 507–510.
41. Choi EH, *et al.* *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in children, South Korea. *Emerging Infectious Diseases* 2008; **14**: 275–281.
42. Park IH, *et al.* Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; **45**: 1225–1233.
43. Tocheva AS, *et al.* Increase in serotype 6C pneumococcal carriage, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases* 2010; **16**: 154–155.

インフルエンザ

渡邊 浩

インフルエンザは、わが国においておもに冬季に流行がみられる呼吸器感染症である。2009年、突如パンデミック（H1N1）2009が出現し、急速に感染が世界中に広がりWHOはパンデミックを宣言するに至った。わが国でも従来はあまり流行のみられない夏季から秋季にかけて大流行がみられ重症例の増加が懸念されたが、死亡率は人口10万対0.15と他国と比べてきわめて低いものであった。約41年ぶりに発生した新型インフルエンザを契機としてインフルエンザの診療や管理方法についてさまざまな議論が行われた。

インフルエンザ診療のガイドラインとしては、海外では「WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 and other Influenza Viruses」（2010年）や「Seasonal influenza in adults and children—diagnosis, treatment, chemoprophylaxis, and institutional outbreak management : clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America」（2009年）、国内では「新型インフルエンザ対策ガイドライン」（2009年）や「インフルエンザ脳症ガイドライン」（2009年）などがある。

定義・概念

インフルエンザウイルスは上気道に感染し、増殖する。潜伏期は1～4日程度であり、おもに飛沫感染や接触感染によりヒトの間で感染が広がる。迅速診断キットが普及する前は臨床症状と疫学情報（最近インフルエンザが流行しているかどうか）で診断されていた。そのためインフルエンザウイルス感染であっても症状が非典型的だと見逃されるケースが多く存在した。しかし現在、日本ではインフルエンザを疑った場合、まず迅速診断キットでインフルエンザの診断を行い、陽性であれば抗インフルエンザウイルス薬を投与するという合理的な診療法が確立している。この診療法は海外では必ずしも一般的でないが、インフルエンザの患者を見逃す割合の減少や重症化予防にもつながっていると考えられる。

インフルエンザによる合併症として、肺炎、脳症、ライ症候群、心筋炎などがある。肺炎の合併はおもに高齢者でみられ、重症化

しやすくときに致命的となる。インフルエンザ肺炎には、インフルエンザウイルスそのものによる純ウイルス性肺炎、インフルエンザが軽快して数日～1週間後に肺炎を発症する2次性細菌性肺炎、およびウイルスと細菌が同時に感染し肺炎を発症するウイルス・細菌混合性肺炎の3つの病型がある。一方、インフルエンザ脳症はおもに5歳以下の乳幼児に発症しやすく、日本では年間100～200例の発症例がみられる。インフルエンザに罹患・発熱後、0～1日以内に意識障害、けいれん、異常言動・行動といった中枢神経症状が現れる。致命率は無治療で30%、後遺症は25%と予後が非常に重篤である。最近はステロイドパルス療法や低体温療法などの治療法の普及により致命率は10%にまで低下している。発症機序についてはまだよくわかっていないが、ウイルス感染により産生されたサイトカインが血管内皮細胞を障害することが発症につながると推測されている。

新型インフルエンザは、鳥類や哺乳動物のインフルエンザウイルスが変異によりヒトか

らヒトへと効率よく感染できるようになったものである。インフルエンザウイルスにはA、B、Cの3つの型があるが、20世紀に発生した1918年のスペインかぜ(H1N1)、1957年のアジアかぜ(H2N2)、1968年の香港かぜ(H3N2)の3度の新型インフルエンザはいずれもA型であった。ひとたび新型インフルエンザが発生すれば、人類の大半がそのウイルスに対する免疫を持たないため、パンデミックを引き起こす。2009年、突如パンデミック(H1N1)2009が出現し、急速に感染が世界中に広がり、WHOがパンデミックを宣言するに至ったことは記憶に新しい。

高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)のヒトでの感染例は、2003～2011年に571人で、うち335人が死亡したと報告されている(2011年11月29日現在)。ヒト型インフルエンザウイルスはヒトの上気道部にあるシアリルオリゴ糖SA α 2,6Galをレセプターとして認識するが、H5N1は下気道部にあるSA α 2,3Galを認識するためウイルス感染が下気道に限局すると考えられている。H5N1感染で入院した患者のほとんどで肺炎がみられ、その死亡率は30～80%ときわめて高い。H5N1は基本的に鳥のインフルエンザであり、現在ヒトからヒトへ感染が広がっているものではないが、感染した鳥との接触があり、下気道までウイルスが到達すればヒトでの感染は起こり得るため、鳥の感染例がある地域へは立ち入らないようにすることが重要である。

診 断

1. インフルエンザを疑う愁訴・症状

急激な全身症状を伴った発症が特徴である。頭痛、悪寒に続いて発熱、筋肉痛、関節痛、全身倦怠感などの全身症状が現れる。咽頭痛、鼻汁、咳などの呼吸器症状もよくみら

れ、嘔吐、下痢などの消化器症状を伴うこともある。発熱は発症24時間以内に38～40℃の高熱になり、インフルエンザウイルス感染の有用な指標となるが、高齢者では高熱が出にくい傾向にあり、発熱以外の臨床症状や周囲のインフルエンザ流行状況も踏まえて判断する必要がある。

2. 初診時に必要な検査

わが国では迅速診断キットが普及しており、臨床症状や周囲の感染状況などよりインフルエンザを疑った場合、約15分でA型とB型のインフルエンザを鑑別して診断することが可能である。検出感度・特異度はともに90%以上と高いが、発症初期はウイルス量が少ないため陰性となることもあるので注意を要する。原理はおもにイムノクロマトグラフィー法で、キット上にウイルスの核蛋白(NP)に対するモノクローナル抗体が固相化されており、検体中のウイルス抗原と反応すれば発色する仕組みになっている。現在多くのキットが市販されているが、メーカーにより検出感度に差がある(検出限界 10^3 ～ 10^5 PFU/ml)。検体中のウイルス量は鼻腔吸引液>鼻咽頭拭い液>咽頭拭い液の順に多く、低感度のキットでは咽頭拭い液で検出できない場合がある。

インフルエンザはときに肺炎を合併することがあるので、膿性痰、胸痛、呼吸困難などの症状やパルスオキシメーターにおけるSpO $_2$ の低下などがみられれば、胸部X線検査や血液検査も考慮すべきである。また、特に乳幼児において意識障害やけいれんがみられる場合はインフルエンザ脳症を疑い、頭部CTやMRIなどの画像検査あるいは脳波検査を実施することを忘れてはならない。

3. 鑑別診断

呼吸器感染症の原因ウイルスにはインフルエンザウイルス以外にRSウイルス、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス、ヒトメタニューモウイルスなどがあり、また未同定のウイルスも存在するであろう。これらもインフルエンザ様の症状を引き起こすことがあるので、臨床診断のみでインフルエンザを鑑別するのは困難である。そのためインフルエンザに対する検査を行う必要がある。また、患者の周囲でインフルエンザの流行があるという疫学情報はインフルエンザを疑うのに重要である。

4. 確定診断

迅速診断キット以外に以下のような検査法がある (表)。

(1) RT-PCR

ウイルス遺伝子を検出する方法で、PCR装置が必要だが、高感度でヘマグルチニン (HA)、ノイラミニダーゼ (NA) の亜型まで判定できる。ウイルス分離よりも迅速に結果が得られること、感度が高く、迅速診断キットやウイルス分離が陰性の場合でも確定診

断が可能になる場合があるなどの利点がある。一方で、偽陽性やコンタミネーションに注意する必要がある。

(2) 血清抗体価

通常は赤血球凝集抑制法 (HI法) で判定され、急性期と2週間程度の間隔をあけた回復期の血清をペア血清で判定する。抗体価が4倍以上上昇した場合にウイルス感染の確定診断となるが、時間を要するため初期診断には有用でない。

(3) ウイルス分離

呼吸器分泌液をMDCK細胞 (イヌ腎臓由来) またはCaCo-2細胞 (ヒト結腸腺癌由来) に接種し培養するため、分離まで2~7日と時間がかかる。しかし流行株の遺伝的解析、ワクチン株との比較、次シーズン流行株の推測、ワクチン製造などにおいて重要な意味を持つ。

【臨床検査項目】

・血液検査において、インフルエンザでは他のウイルス感染症と同様に、白血球は正常か低下することが多く、CRPも軽度上昇にとどまることが多い。白血球やCRPが高値である場合は2次性細菌感染の合併も考慮する必要がある。

表 おもなインフルエンザの診断法

	所要時間	特徴
迅速診断キット	10~15分	簡便、迅速で治療に還元できる。メーカーにより検出感度に差がある。検出限界： $10^3 \sim 10^6$ PFU/ml。
赤血球凝集抑制法 (HI法)	数時間 (亜型の予測) ~1週間 (ペア血清の抗体価測定)	新鮮な赤血球を必要とするが、検体を標準抗血清と反応させることで簡便にウイルスの亜型の判定ができる。また患者の抗体価の上昇 (回復期が急性期の4倍以上) を調べることでウイルス感染の確定診断が可能だが、初期診断には有用でない。
蛍光抗体法	2~4時間	蛍光顕微鏡が必要だが、ウイルス抗原および抗体の検出が可能。
RT-PCR	7~8時間	PCR装置が必要だが、高感度でHA、NAの亜型まで判定できる。検出限界：10 PFU/ml以下。
ウイルス分離	2~7日	培養細胞が必要で時間を要するが、分離したウイルスを用いてさまざまな解析ができる。検出限界：10 PFU/ml以下。

(原ら, 2007より一部改変)

- ・肺炎の合併が疑われる際は、パルスオキシメーターにおけるSpO₂の測定や胸部X線検査が有用である。
- ・心筋炎の合併の診断には心電図、心エコー検査や血清中のCPK (CK) の測定が重要であり、脳症を疑う場合は頭部CT、MRIや脳波検査を実施する。

管理・治療

1. 管理・治療の目標

インフルエンザによる症状の程度や期間を減少させること、および重症化や合併症を防ぐことが管理・治療の目標である。

2. 治療方法

わが国では、迅速診断キットの普及とほぼ同時期にノイラミニダーゼ阻害薬が臨床使用可能となった。インフルエンザ治療の基本は安静と対症療法ではあるが、抗ウイルス薬としてはノイラミニダーゼ阻害薬が中心である。本剤はA型、B型インフルエンザのいずれにも有効であり、発症48時間以内に投与開始することにより効果を得られやすい。

従来は発熱期間が1日ほど短縮されるという程度の臨床効果と認識されていたが、パンデミック (H1N1) 2009の発生後、早期投与が重症化予防に有効であるという報告がなされるようになった。薬剤の種類も増え、従来より使用されてきた内服薬のオセルタミビルリン酸塩 (タミフル®)、吸入薬のザナミビル水和物 (リレンザ®) (ともに治療期間は5日間) に加え、2010年には1回の点滴静注で同等の効果があるとされるペラミビル水和物 (ラピアクタ®) と単回吸入で治療が完結できるラニナミビルオクタン酸エステル水和物 (イナビル®) も使用可能となり、状況に応じた使い分けができるようになった。吸入がうまく行えない低年齢の小児における治療では、内服薬のオセルタミビルリン酸塩が選択

されやすいであろうし、経口摂取もできない重症例においては点滴静注のペラミビル水和物が考慮されるであろう。臨床試験中のファビピラビルはRNAポリメラーゼ阻害薬であり、ノイラミニダーゼ阻害薬がウイルスが細胞から遊離するのを阻害し他の細胞への感染拡大を防ぐものであるのに対し、直接ウイルスの遺伝子複製を阻害するという新しいメカニズムの薬剤である。最も古くから用いられているM₂イオンチャネル阻害薬のアマンタジン塩酸塩 (シンメトレル®など) はA型インフルエンザのみにしか効果がないこと、耐性誘導が早いことなどの理由で現在はあまり使用されない。

オセルタミビルリン酸塩は、10歳以上の未成年の患者において因果関係は明らかでないが服用後に異常行動を発現し、転落などの事故に至った例が報告されており、この年代の患者には合併症、既往歴などからハイリスク患者と判断される場合を除いては、原則として本薬の使用を差し控えることになっている。ただし、小児・未成年者では抗インフルエンザ薬投与の有無にかかわらず異常行動を来すことがあり、万が一の事故を防止するために発症48時間以内は目の届くところで看病することを家族に指導する。

3. 管理

インフルエンザは、高熱や全身倦怠感、筋肉痛などの全身症状、食欲不振などにより、特に小児や高齢者においては脱水症への注意が必要である。

小児のインフルエンザ患者に対し解熱薬を使用する場合、アスピリンなどサリチル酸系薬剤はライ症候群発症のリスクを高める可能性があるため注意を要する。ジクロフェナクナトリウム (ボルタレン®など) やメフェナム酸 (ポンタール®など) の投与はインフル

エンザ脳症の予後不良因子という報告があり、アセトアミノフェン（カロナール[®]錠・細粒、アンヒバ[®]坐剤など）の使用が適切である。

インフルエンザ患者の家族や共同生活者のなかに重症化のリスクがある65歳以上の高齢者や慢性基礎疾患を有する者がいればノイラミニダーゼ阻害薬による予防内服も考慮する。

現行のインフルエンザワクチンはウイルスの感染部位である上気道には免疫を誘導しないため感染予防効果は十分でないが、重症化予防には有用である。すでに海外では上気道にも免疫を誘導する経鼻ワクチンが臨床応用されているが、生ワクチンであるため安全性の問題がある。現在わが国では不活化経鼻ワクチンの開発が進められており、臨床応用が

期待される。

インフルエンザ発症後3～7日間はウイルスを排出するとされており、学校保健法では、「解熱後2日を経過するまで」をインフルエンザによる出席停止期間としている。

経過・予後

大多数の患者は合併症を伴うことなしに治癒する。しかし、高齢者における肺炎や乳幼児における脳症などのような合併症が発生した場合は不幸な転帰をとることもあるため、インフルエンザの症状以外に合併症を疑う症状がみられた場合は早めの医療機関受診で検査を受けることが望まれる。

患者・家族への説明のポイント

- ①迅速診断キットは、特に感染初期にはインフルエンザに罹っていても陰性となることがある。
- ②ノイラミニダーゼ阻害薬は、発症48時間以内に投与開始することにより、発熱期間の短縮だけでなく重症化の予防が期待できる。
- ③インフルエンザ患者の大部分は予後良好であるが、ときに合併症を伴い重症化する場合があるため、治癒するまでは症状や経過に注意する。
- ④小児・未成年者では抗インフルエンザ薬投与の有無にかかわらず異常行動を来すことがあり、発症48時間以内は目の届くところで看病する。

[参考文献]

- 原 好勇 他：インフルエンザの臨床像と診断。特集 インフルエンザを取り巻く治療・予防の現状と課題。Prog Med 27：2271, 2007.
- Wright PF, et al：Orthomyxoviruses. Fields Virology, 5th edition (Knipe DM, et al, eds). p1691, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007.
- Harper SA, et al：Seasonal influenza in adults and children—diagnosis, treatment, chemoprophylaxis, and institutional outbreak management：clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 48：1003, 2009.
- 新型インフルエンザ及び鳥インフルエンザに関する関係省庁対策会議：新型インフルエンザ対策ガイドライン。厚生労働省、東京、2009.
- 厚生労働科学研究費補助金 振興・再興感染症研究事業 インフルエンザ脳症の発症因子の解明とそれに基づく発症前診断方法の確立に関する研究班：インフルエンザ脳症ガイドライン 改訂版。2009.
- WHO：WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 and other Influenza Viruses. Revised February 2010.
- 日本臨床内科医会インフルエンザ研究班 編：インフルエンザ診療マニュアル2010-2011年シーズン版（第5版）。日臨内科医会誌 25 臨時付録。日本臨床内科医会、東京、2010.

要約

インフルエンザ

診断

- ▶ 急激な全身症状を伴った高熱が特徴であり、咽頭痛、鼻汁、咳などの呼吸器症状もよくみられる。ただし、高齢者では高熱とならない場合がある。
- ▶ 周囲で流行しているという疫学情報は診断の参考になることが多い。
- ▶ 鼻咽頭拭い液を用いた迅速診断キットが診断に有用であるが、特に発症初期は陰性となることもあり、注意を要する。
- ▶ 肺炎や脳症などの合併が疑われる場合は、胸部X線検査や頭部CTやMRIなどの検査を考慮する必要がある。

治療

- ▶ ノイラミニダーゼ阻害薬は、発症48時間以内に投与開始することにより、発熱期間の短縮だけでなく重症化の予防が期待できる。
- ▶ 治療の基本は安静と対症療法ではあるが、抗ウイルス薬としてはノイラミニダーゼ阻害薬が中心である。内服薬のオセルタミビルリン酸塩（タミフル®）、吸入薬のザナミビル水和物（リレンザ®）（ともに治療期間は5日間）に加え、点滴静注製剤のペラミビル水和物（ラピアクタ®）と単回吸入のラニナミビルオクタン酸エステル水和物（イナビル®）も使用可能となり、状況に応じた使い分けができるようになった。
- ▶ オセルタミビルリン酸塩は、10歳以上の未成年の患者において因果関係は明らかでないが服用後の異常行動・転落などの事故が報告されており、この年代の患者には原則として本薬の使用を差し控えることになっている。
- ▶ 小児のインフルエンザ患者に対し解熱薬を使用する場合は、アセトアミノフェン（カロナール®錠・細粒、アンヒバ®坐剤など）を用いる。
- ▶ 脳症や肺炎などの合併症への注意も必要である。

処方例

- ① 38歳、男性。前日より発熱し、全身倦怠感を伴う。全身状態は保たれている（以下のいずれかを選択）
 - タミフルカプセル（75mg） 1回1カプセル 1日2回 朝 夕 5日間
 - リレンザ 1回10mg（2ブリスター） 吸入 1日2回 朝 夕 5日間
 - イナビル 1回40mg 単回吸入
- ② 21歳、女性。今朝より発熱あり。嘔気が強く、内服、吸入が困難である
 - ラピアクタ注 300mg 15分以上かけて単回点滴静注
- ③ 10歳、男児。前夜より発熱あり、咽頭痛と咳を訴える。体重30kg（以下を併用）
 - リレンザ 1回10mg（2ブリスター） 吸入 1日2回 朝 夕 5日間 または
イナビル 1回40mg 単回吸入
 - カロナール錠（200mg） 1日1.5錠（1回投与量10mg/kg） 頓用（38.5℃以上の発熱時） 1日3回まで

・発症48時間以内は目の届くところで看病することを両親に指導。

④ 3歳、女児。今朝より発熱。体重 15kg

(以下を併用)

- タミフルドライシロップ (3%) 1回30mg (力価：1回投与量2mg/kg) 1日2回
朝 夕 5日間
- アンヒバ坐剤 (200mg) 1回3/4個 (1回投与量10mg/kg) 頓用 (38.5℃以上の
発熱時) 1日3回まで

⑤ 1歳、男児。前夜より発熱。熱性けいれん既往あり。内服がうまくできない。体重
10kg

(以下を併用)

- ラピアクタ注 100mg (1回投与量10mg/kg) 15分以上かけて単回点滴静注
- アンヒバ坐剤 (100mg) 1回1個 (1回投与量10mg/kg) 頓用 (38.5℃以上の発
熱時) 1日3回まで

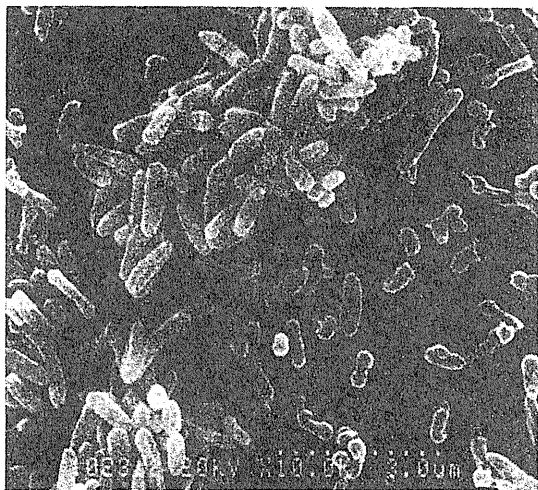
 どのような場合に専門医に紹介すべきか

- 重症例
 - ・呼吸困難、低酸素血症、胸部X線検査で異常陰影を認める場合
 - ・経口摂取不良などで脱水症状がある場合
- 重篤な合併症を疑う場合
 - ・脳症：意識障害やけいれんがある場合
 - ・心筋炎：心筋炎の症状は特異的なものに乏しく、早期の診断は容易でない。疑わしいときは心電図や心エコー検査を実施するが、状況に応じて専門医に紹介
- 基礎疾患の増悪が認められる場合
 - ・慢性呼吸器疾患、心不全、糖尿病など
- インフルエンザ症状の増悪が疑われる妊婦

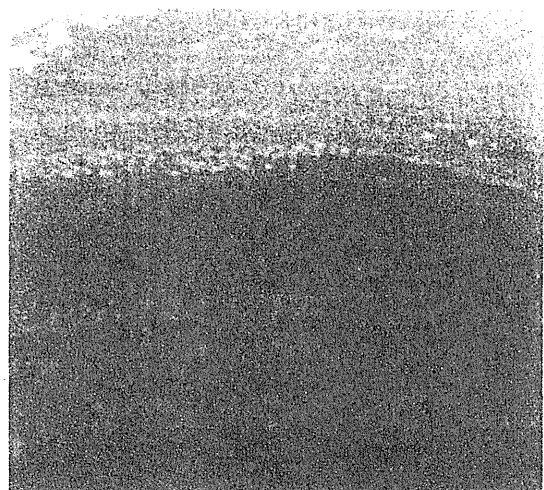
3-2 インフルエンザ菌感染症

■ 特 徴

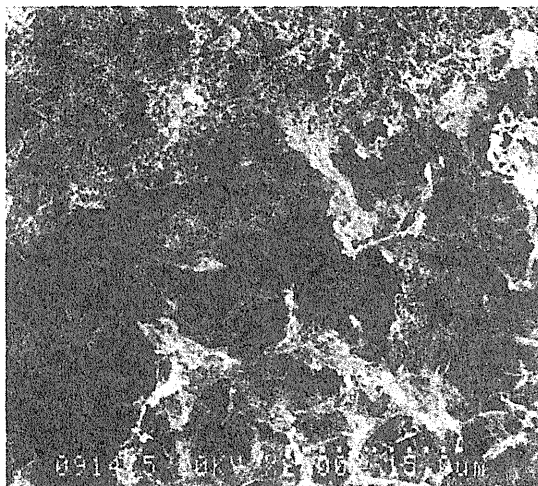
インフルエンザ菌 *Haemophilus influenzae* はヘモフィルス属の多形性を示すグラム陰性短桿菌である ($0.3\sim 0.5\mu\text{m} \times 0.5\sim 1.0\mu\text{m}$) (図1 (a)). 1892年, インフルエンザが流行した際に, 最初はインフルエンザの病原体と認識されていた. その後, インフルエンザはインフルエンザウイルスによるウイルス感染症であることが判明したが, インフルエンザ菌の名称は残ることとなった.



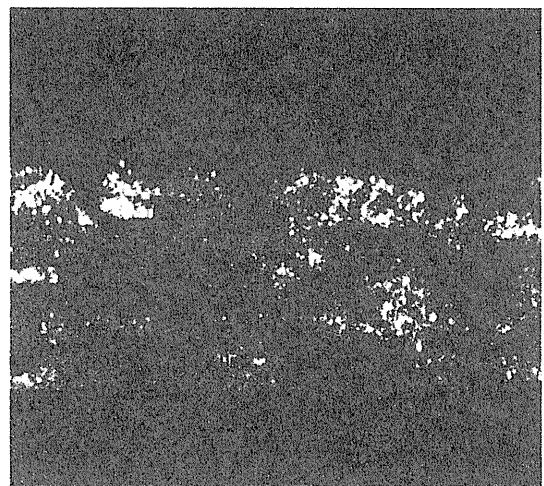
(a) 走査型電子顕微鏡下 Nontypable *Haemophilus influenzae* の形態



(b) チョコレート寒天培地上のインフルエンザ菌コロニー



(c) 走査型電子顕微鏡下のインフルエンザ菌が産生するバイオフィルムの形態



(d) 共焦点蛍光顕微鏡下のインフルエンザ菌が産生するバイオフィルムの形態

図1 *Haemophilus influenzae* の形態

本菌はインドール産生性，ウレアーゼ産生性，オルニチン脱炭酸能という三つの生化学的性状により，8種類の生物型に分類される．臨床分離株の多くはI，II，III，IV型に分布する．新生児感染症を引き起こす株は主にIV型に属する．インフルエンザ菌は莢膜抗原により，aからfの血清型と莢膜を持たない nontypable (NTHi) に分類されているが，臨床的には type b (Hib) と NTHi が重要である．また，侵襲性感染症から分離された Hib の大多数はI型に属し，NTHi 株は主にII，III型に属する．

本菌の増殖には，X因子（ヘミン），V因子 nicotinamide adenine dinucleotide : NAD が必要であり，一般的にはチョコレート寒天培地が用いられ，分離・継代培養する（図1 (b)）．至適培養温度は33～37℃で，5～10% CO₂ 存在下で発育が促進される．

NTHi は気道粘膜に定着するが，生体内においては上皮細胞内に，またトランスサイトシスにより上皮へ侵入することが報告され，その機序の一つとしては macropinocytosis であり，その他，Hap の関与や ChOP (+) LOS の糖鎖形成と気管支上皮側の platelet activating factor : PAF レセプターを介して，気道上皮へ侵入することなどが明らかにされている．

近年，インフルエンザ菌は中耳炎などの感染局所粘膜上でバイオフィーム産生することが報告された（図1 (c)，(d)）．菌体の表面構造である pili や線毛遺伝子 hifA と付着因子 Hia などがバイオフィーム形成能と関連することも報告されている．成熟したバイオフィーム内の菌体は食細胞による貪食作用から回避することや，抗生物質はバイオフィーム内の細菌に到達しにくいことから，難治性感染症の重要な要因と考えられるようになった．

わが国ではインフルエンザ菌の急速な薬剤耐性化が報告され，耐性菌による感染症の難治化が臨床上問題になっている．本菌の薬耐性機序には主に二つのメカニズムがあり，一つはβ-ラクタマーゼ産生による耐性である．β-ラクタマーゼ産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌 β-lactamase-producing ampicillin-resistant *H. influenzae* : BLPAR は TEM-1 型と ROB-1 型が知られているが，わが国で分離されるのは大部分が TEM-1 型である．

もう一つはペニシリン結合蛋白に変異による耐性機構を獲得した β -ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌 β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *H. influenzae* : BLNAR である。また、前述の二つの耐性機序の両方を有する β -lactamase producing amoxicillin/clavulanate-resistant : BLPACR 株も低頻度で (3%以下), 分離されるようになってきている (表 1)。

表 1 β -ラクタム系薬耐性インフルエンザ菌の遺伝子的特徴と呼称

呼 称	B-lactamase (TEM-1, ROB-1)	PBP3 (<i>ftsI</i> gene) 変異	
		1 カ所	2 カ所
BLNAS	—	—	—
Low-BLNAR	—	+	—
BLNAR	—	—	+
BLPAR	+	—	—
BLPACR-I	+	+	—
BLPACR-II	+	—	+

BLNAS : β -lactamase-nonproducing ampicillin-susceptible *H. influenzae*

BLNAR : β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *H. influenzae*

BLPAR : β -lactamase-producing ampicillin-resistant *H. influenzae*

BLPACR : β -lactamase-producing amoxicillin/clavulanate-resistant *H. influenzae*

■ 感染経路

インフルエンザ菌はヒトからヒトに飛沫感染する病原体であり、接触感染でも感染する。本菌は人の上気道粘膜に付着・増殖するが、成人や6ヵ月未満の乳児と比べ、就学前の幼児において保菌率は高い。NTHi株は中耳炎、副鼻腔炎、気管支炎、肺炎などの感染症を惹起する主要な原因菌となる。一方、莢膜株は同じ上気道に保菌されるものの、気道感染症を起こすことはまれであり、侵襲的感染症を起こす。ほとんどの場合は Hib が原因菌となり、直接血流中に侵入し、敗血症、髄膜炎、結膜炎、急性喉頭蓋炎、関節炎などを引き起こす。

■ 水平伝播

本菌は小児気道感染症の三大起炎菌の一つ (他は肺炎球菌, モラキセラ・カタラーリス) であり, その検出頻度は 20%前後と推測されている。最近の調査により, 55~100%の保育園児の上咽頭の細菌フローラから,

インフルエンザ菌が分離され、そのうち耐性菌の割合は50～80%であった。保育園や幼稚園に通っている一部の子供たちが上気道感染を繰り返す、周囲の子供たちへ感染するような水平伝播が報告され、また本菌は家庭内において、親子間でも伝播しうるということが明らかとなった。濃厚接触により、飛沫感染などでヒトからヒトへ水平伝播することにより、本菌の耐性菌株が広がっているものと考えられる。

■ 潜伏期間

インフルエンザ菌による肺炎の潜伏期間は1～3日である。インフルエンザ菌による髄膜炎では、明らかな潜伏期間を示すことは困難なものが多いが、一般的に2～5日間とされている。

■ 症 状

中耳炎では耳の疼痛、発熱、耳漏、肺炎では、咳や痰、発熱、胸痛、呼吸困難などの症状が見られる。レントゲン写真では、気管支の走行に一致した境界不明瞭な浸潤影が認められることが多い。髄膜炎では発熱、頭痛、嘔吐、意識障害、痙攣、項部硬直などの症状が見られるが、成人はまれで、その多くは小児が発症する。

■ 治療法

インフルエンザ菌による感染症の治療においては、 β -ラクタマーゼ阻害薬配合ペニシリン剤、第2、第3世代セフェム剤、ニューキノロン剤などが一般的に使用されている。BLNAR株に対しても第3世代セフェム剤、ニューキノロン剤は比較的良好な感受性が認められている。また、 β -ラクタム系薬で症状が改善しない場合はマクロライド剤も選択肢となりえる。呼吸器感染症の治療では、抗菌薬のほかに、解熱薬、鎮咳剤、去痰薬などが用いられ、通常軽症例は数日から1週間で治る。症状が重度であったり、脱水がある場合は入院し、抗生剤の点滴、酸素吸入などの治療を行う。2007年に発行された細菌性髄膜炎の診療ガイドラインでは、インフルエンザ菌による髄膜炎の場合は、第3世代セフェム剤（セフトキシムまたはセフトリアキソン）またはメロペネムまたは両者の併用が推奨されている。また、細菌性髄膜炎の発症早期に短期間の副

腎皮質ステロイド薬の併用が勧められている。

■ 予防法

Hib ワクチンは Hib による髄膜炎などの重症感染症の予防に極めて有効であり、すでに世界 100 カ国以上で導入されており、世界保健機関 WHO は Hib ワクチンをすべての子供たちに接種することを推奨している。

現行の Hib ワクチンはポリリボシルリピトールリン酸 PRP をキャリアー蛋白に結合させた conjugate ワクチンであり、ジフテリアトキソイド PRP-D、テタヌストキソイド PRP-T、Diphtheria CRM₁₉₇ protein conjugate : HbOC、髄膜炎菌外膜複合体 PRP-OMP を PRP につけた 4 種類である。わが国においても 2007 年 1 月 26 日 Hib ワクチンが承認され、2008 年 12 月より任意接種可能となった。

接種対象は 2 カ月齢以上 5 歳未満の小児であるが、できるだけ乳児早期に接種を開始することは望ましい。最適な接種スケジュールとしては生後 2～7 カ月までに接種開始する場合は 4～8 週間間隔で 3 回、追加免疫として 3 回目の接種から約 1 年後に 1 回の計 4 回接種である。生後 7 カ月～1 歳未満の場合は 4～8 週間間隔で 2 回、追加免疫として 2 回目の接種から約 1 年後に 1 回の計 3 回接種である。また、1 歳以上 5 歳未満の場合は追加免疫がなく 1 回のみとなる。

■ 感染症法による取扱い

感染症法では、インフルエンザ菌による細菌性髄膜炎を個別に扱っていないが、5 類感染症のうちの定点把握疾病である細菌性髄膜炎の中に含まれている。

● 参考文献

- (1) Moxon ER : Haemophilus influenzae, In : Principles and Practice of Infectious Diseases. (Mandell GL et al. ed), 4th ed, 2039-2045, Churchill Livingstone, New York, 1995.
- (2) St Geme JW : Molecular and cellular determinants of non-typeable Haemophilus influenzae adherence and invasion, Cell Microbiol, 4 (4), 191-200, 2002.
- (3) Moxon ER et al. : Haemophilus influenzae biofilms : hypothesis or fact?, Trends Microbiol 16 (3), 95-100, 2008.
- (4) 生方公子 : 耐性インフルエンザ菌, 医学のあゆみ, 209 (9), 525-528, 2004.
- (5) 大石智洋, 野々山勝人, 砂川慶介ほか : 保育園児における耐性菌感染症—肺炎球菌・インフルエン

ザ菌について一, チャイルドヘルス, 5 (1), 61-65, 2002

- (6) Watanabe H et al. : Possible high rate of transmission of nontypeable *Haemophilus influenzae*, including beta-lactamase-negative ampicillin-resistant strains, between children and their parents, *J Clin Microbiol*, 42 (1), 362-365, 2004.
- (7) 細菌性髄膜炎の診療ガイドライン作成委員会 : 細菌性髄膜炎の診療ガイドライン, 33-64, 医学書院, 東京, 2007.
- (8) WHO : *Haemophilus influenzae* type b (Hib), In : Conclusions and Recommendations from the Immunization Strategic Advisory Group, *Weekly epidemiological record*, 81, 1-12, 2006.

秦 亮, 渡邊 浩 (久留米大学)

3-3 黄色ブドウ球菌感染症

■ 特 徴

黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* は通性嫌気性のグラム陽性球菌であり, 顕微鏡で観察すると細菌同士がブドウの房のように連なった形状を確認できる. 鞭毛を持たないので運動性はなく芽胞形成能力もないが, バイオフィーム形成能力は有す. また, 10%程度の高濃度食塩下でも生育可能であり, カタラーゼ (+), マンニトール分解 (+), DNase (+), コアグララーゼ (+) 等の性質を有し, 特に他のブドウ球菌との差はコアグララーゼ産生によって区別できる.

本菌は人や動物の皮膚, 鼻腔, 咽頭, 腸管内等に生息する常在菌であるが, 皮膚軟部組織感染症や食中毒, 肺炎, 髄膜炎, 骨髄炎, 敗血症等の起炎菌でもあり, かつ難治性感染や致死的感染を起こす強毒菌でもある.

特に, 本菌は化膿性疾患の最たる原因菌であり, それぞれの特徴によって癰 (せつ), 癰 (よう), 伝染性膿痂疹 (とびひ), 蜂窩織炎, 麦粒種等に分類される. 最近では糖尿病性の皮膚軟部組織感染症や感染性心内膜炎の原因菌として問題視されているばかりか, インプラントやカテーテル等の異物が存在する患者では, 異物に本菌が定着 (バイオフィーム形成) して難治性の繰り返し感染症を起こすことがある. また, 骨髄炎や関節炎などでも同様の現象が認められる.

さらに, 本菌による食中毒は握り飯や弁当類, 乳製品等で多く発生しているが, これは本菌が産生するエンテロトキシン (腸管毒) に起因している. このエンテロトキシンは耐熱性 (100°C, 30分程度の過熱では

Original Article

Determination of Epidemiology of Clinically Isolated *Cryptococcus neoformans* Strains in Japan by Multilocus Sequence Typing

Takashi Umeyama¹, Hideaki Ohno^{1*}, Fujihiko Minamoto², Taeko Takagi³, Chiyoko Tanamachi⁴, Koichi Tanabe¹, Yukihiro Kaneko¹, Satoshi Yamagoe¹, Kazuma Kishi⁵, Takeshi Fujii⁶, Hiromu Takemura⁷, Hiroshi Watanabe⁸, and Yoshitsugu Miyazaki¹

¹Department of Chemotherapy and Mycoses, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640;

²Department of Laboratory Medicine, Microbiological Division, The Institute of Medical Science Hospital, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639;

³Department of Laboratory Medicine and ⁷Department of Microbiology, St. Marianna University School of Medicine, Kanagawa 216-8511;

⁴Department of Clinical Laboratory Medicine, Kurume University Hospital, Fukuoka 830-0011;

⁵Department of Respiratory Medicine, Respiratory Center, Toranomon Hospital, Tokyo 105-8470;

⁶Department of Infectious Diseases, Tokyo Medical University Hachioji Medical Center, Tokyo 193-0998; and

⁸Division of Infectious Diseases, Department of Infectious Medicine, Kurume University School of Medicine, Fukuoka 830-0011, Japan

(Received September 14, 2012. Accepted November 30, 2012)

SUMMARY: *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* are the causative agents of cryptococcosis. Despite its importance, our knowledge of the epidemiology of cryptococcosis in Japan remains limited. To establish an epidemiological database on cryptococcosis in Japan, we determined the genetic variability of 44 Japanese clinical isolates of *C. neoformans* (var. *grubii*: serotype A) by multilocus sequence typing (MLST). The strains were clinically isolated from 1992 to 2011 in 5 different areas of Japan (the Hokkaido region [$n = 1$], Kanto region [$n = 32$], Chubu region [$n = 1$], Kansai region [$n = 1$], and Kyushu region [$n = 9$]). According to the method recommended by the International Society for Human and Animal Mycology cryptococcal genotyping working group, 36 isolates (82%) were identified as sequence type (ST)46. The remaining strains belonged to ST45 ($n = 1$) and ST47 ($n = 1$), and 6 isolates belonged to novel independent STs. There was little geographic difference in the ST population. Our present data are still limited; however, because most clinical isolates showed the same MLST profile in Japan, applying the current MLST scheme for *Cryptococcus* may at times be insufficient for investigating the infection route among outbreak cases. To solve this problem, it may be necessary to investigate other gene loci or develop a novel method with greater discriminatory power. However, in cases in which a strain belongs to a minor ST, our data may serve as useful epidemiological information in Japan.

INTRODUCTION

Cryptococcosis is a systemic mycosis caused by the haploid, encapsulated, basidiomycetous yeast *Cryptococcus neoformans* (serotypes A, D, and AD) and *Cryptococcus gattii* (serotypes B and C), which are commonly associated with pigeon excreta and plant materials. Cryptococcosis typically involves lung diseases and central nervous system infection. *C. neoformans* causes approximately 1 million cases of meningitis globally per year in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients, resulting in approximately 624,700 deaths

within 3 months after infection (1).

C. neoformans is presently divided into 2 varieties: *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A) and *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D) (2). In addition, diploid and aneuploid AD hybrids have been isolated from the environment and patients (3,4). *C. neoformans* var. *grubii* is responsible for more than 90% cases of cryptococcosis worldwide (5). The sexual reproduction of *Cryptococcus* has a two-allele mating system comprising MAT α and MAT α (6). The α mating type of *C. neoformans* is predominant among clinical and environmental isolates (>98%–99.9%) (5). Mating basically occurs between opposite mating types. Recently, unisexual mating between 2 α cells has been suggested to occur naturally in *C. gattii* (7) and *C. neoformans* (8).

Genotypic analysis such as M13 DNA fingerprinting, amplified fragment length polymorphism, and multilocus sequence typing (MLST) of *C. neoformans* var. *grubii* has identified 3 molecular types: VNI, VNII, and

*Corresponding author: Mailing address: Department of Chemotherapy and Mycoses, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan. Tel: +81 3 5285 1111, Fax: +81 3 5285 1272, E-mail: h-ohno@nih.go.jp

VNB (9–13). VNI strains are globally dominant, and VNII isolates are less common. VNB is a novel molecular type discovered as a unique cryptococcal population in Botswana (13).

Recently, a standardized MLST scheme for *C. neoformans* and *C. gattii* has been established by the Cryptococcal Working Group I (Genotyping of *C. neoformans* and *C. gattii*) of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) to enable global standardization and overcome problems arising from interlaboratory reproducibility (10). The scheme uses 7 unlinked genetic loci, including the housekeeping genes *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, and *URA5* and the IGS1 region. Based on the ISHAM scheme, 183 clinical and environmental isolates from Thailand and 77 isolates from the global collection of *C. neoformans* var. *grubii* were analyzed, and the MLST database was established (14). The majority of Thailand isolates exhibit 3 sequence types (STs): ST44 (33%, $n = 70$), ST45 (43%, $n = 78$), and ST46 (14%, $n = 26$). ST44 and ST45 are unique to Thailand, and ST46 has been identified in Thailand and Japan (14). A recent epidemiological report has shown that 31 of the 35 *C. neoformans* var. *grubii* isolates from non-HIV patients in Nagasaki, Japan exhibited the same ST based on MLST using the same 7 loci as those used in the ISHAM scheme (15).

In Japan, cryptococcosis caused by *C. neoformans* occurs in all regions. Despite its importance, our knowledge of the epidemiology of cryptococcosis in Japan remains limited. The establishment of an epidemiological database on cryptococcosis in Japan is urgently required to manage epidemics and potential outbreaks of cryptococcosis. In this study, we used MLST, a rapid, reproducible, and discriminatory methodology for genotyping isolates of *C. neoformans* to investigate the genetic relatedness among isolates from several medical facilities in Japan. The MLST database constructed in this study could be a useful resource for global epidemiologic studies and for the recognition and tracking of the inter or intrahospital spread of *C. neoformans*.

MATERIALS AND METHODS

Clinical isolates: Forty-four clinical isolates of *C. neoformans* var. *grubii* were collected from 11 facilities from 5 regions comprising 8 prefectures in Japan. The regional distribution of the isolates was as follows: 1 clinical isolate was collected from 1 facility in the Hokkaido region, 32 clinical isolates were collected from 5 facilities in the Kanto region, 1 clinical isolate was collected from 1 facility in the Chubu region, 1 clinical isolate was collected from 1 facility in the Kansai region, and 9 clinical isolates were collected from 3 facilities in the Kyushu region (Table 1, Fig. 1). Species identification was initially performed by sequencing internal transcribed spacer (ITS) 1–2 and D1/D2 26S ribosomal DNA (rDNA) sequences.

DNA extraction: The isolates were cultured in liquid yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium at 30°C. DNA was extracted from the collected cells using Dr. GenTLE (TakaraBio, Otsu, Japan). Alternatively, a suspension of freshly grown cells was prepared in lysis buffer (DNeasy kit; QIAGEN, Valencia, Calif., USA)

and subjected to mechanical lysis using a Multi-Beads Shocker (Yasui Kikai, Osaka, Japan). DNA was then purified from the lysed cells using the DNeasy kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol.

Serotype and mating type analysis: The mating type of each isolate was determined by 4 different polymerase chain reaction (PCR) amplification reactions. Primers specific to the MAT α or MAT α allele of the *STE20* locus for either serotype A or D isolates were used, namely primers JOHE7270 and JOHE7272 (α A), JOHE7273/JOHE7275 (α D), JOHE7264/JOHE7265 (α A), and JOHE7267/JOHE7268 (α D), as described previously (16).

MLST analysis: MLST analysis was essentially performed according to a previously described protocol (10). Each isolate was PCR amplified in 30 μ l of reaction volumes for each of the 7 MLST loci using MightyAmp (TakaraBio). The primers used in this study are the same as a previously described protocol (10), except that a primer LAC1R2 (5'-TCGGACTA TTAATCTCCAAACTC) was used instead of the primer LAC1R (10). The PCR reaction procedure included denaturation at 94°C for 2 min, followed by 40 cycles of 94°C for 10 s, 60°C for 15 s, and 68°C for 1 min for all the primers. PCR products were run on 1% agarose gel and purified using the DNA purification kit (TakaraBio). Each locus was subsequently sequenced using the Applied Biosystems 3730 sequencer with the BigDye Terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) or by ordering from FASMAC Co., Atsugi, Japan. Sequences were manually edited using EnzymeX (mekentosj.com). Alleles at each locus were assigned numbers (allele types: ATs) in comparison with those identified in the global collection (13). All nucleotide sequences obtained in this study, including novel ATs, were deposited in the DNA Data Bank of Japan (DDBJ accession nos. AB744719–AB745026). Each unique allelic profile was concatenated and assigned an ST using the archived online *C. neoformans* database on MLST.net (<http://cneofor mans.mlst.net/>) (14).

Phylogenetic analysis: Evolutionary analyses were performed on concatenated sequences from 7 loci (*CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5*, and IGS1) in MEGA5 (17). The evolutionary history was inferred by the maximum-likelihood method based on the Tamura-Nei model (18).

RESULTS

All the 44 isolates collected in this study belonged to serotype A and mating type α according to PCR classification. Sequence data were obtained for all the 44 Japanese *C. neoformans* var. *grubii* isolates typed at the 7 loci (Table 1). The 7 loci yielded 26 ATs (*CAP59*, 4; *GPD1*, 3; IGS1, 3; *LAC1*, 5; *PLB1*, 4; *SOD1*, 3; and *URA5*, 4), 3 of which were novel loci (*LAC1*, *SOD1*, and *URA5*). The novel AT of *LAC1* (accession no. AB744879) is the closest to AT 1 (addition of C to AT1), the novel AT of *SOD1* (accession no. AB744945) is the closest to AT12 (addition of GGA to AT12), and the novel AT of *URA5* (accession no. AB744994) is the closest to AT1 (replacement of A with C).

We identified 9 multilocus STs within the Japanese

Table 1. Clinical isolates in this study

Strain ID no.	Region	Facility	Isolated year	Serotype	Mating type	AT ¹⁾							ST ¹⁾
						<i>CAP59</i>	<i>GPD1</i>	<i>IGS1</i>	<i>LAC1</i>	<i>PLB1</i>	<i>SOD1</i>	<i>URAS</i>	
NIIDCr0001	Hokkaido	A	2011	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0002	Kanto	B	1992	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0003	Kanto	B	1993	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0004	Kanto	B	1994	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0005	Kanto	B	1994	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0006	Kanto	B	1995	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0007	Kanto	B	1997	A	α	10	9	21	8	11	Nov	4	Nov
NIIDCr0008	Kanto	B	2000	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0009	Kanto	B	2001	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0010	Kanto	B	2006	A	α	1	1	20	3	4	13	1	47
NIIDCr0011	Kanto	B	2008	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0012	Kanto	C	2011	A	α	1	3	19	5	2	13	Nov	Nov
NIIDCr0013	Kanto	D	2005	A	α	1	1	19	4	2	13	5	45
NIIDCr0014	Kanto	D	2006	A	α	1	1	20	3	2	13	1	Nov
NIIDCr0015	Kanto	D	2007	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0016	Kanto	D	2008	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0017	Kanto	D	2008	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0018	Kanto	D	2009	A	α	2	9	21	8	11	14	4	Nov
NIIDCr0019	Kanto	D	2009	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0020	Kanto	D	2010	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0021	Kanto	E	2005	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0022	Kanto	E	2005	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0023	Kanto	E	2008	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0024	Kanto	E	2010	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0025	Kanto	E	2010	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0026	Kanto	E	2010	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0027	Kanto	E	2011	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0028	Kanto	E	2002	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0029	Kanto	E	2004	A	α	7	1	19	Nov	1	13	1	Nov
NIIDCr0030	Kanto	E	2010	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0031	Kanto	E	2011	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0032	Kanto	E	2011	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0033	Kanto	F	2010	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0034	Kyushu	G	2008	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0035	Kyushu	G	2008	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0036	Kyushu	G	2008	A	α	7	1	19	5	1	13	1	Nov
NIIDCr0037	Kyushu	G	2008	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0038	Kyushu	G	2008	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0039	Kyushu	G	2009	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0040	Kyushu	G	2009	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0041	Kyushu	H	2011	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0042	Chubu	I	2011	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
NIIDCr0043	Kansai	J	2011	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46
YC-13	Kyushu	Nagasaki Univ.	Ref. (21)	A	α	1	3	19	5	2	13	1	46

¹⁾: Nov, novel AT and ST.

isolates, consisting of ST45, ST46, ST47, and 6 novel STs. Thirty-six of the 44 isolates belonged to ST46 (81%) (Table 1). The remaining strains belonged to ST45 ($n = 1$) and ST47 ($n = 1$), and 6 isolates belonged to novel independent STs. A phylogenetic tree was constructed by the maximum-likelihood method based on a concatenated data set from 7 loci for MLST (Fig. 2). Among the novel STs, 2 strains (NIIDCr0007 and NIIDCr0018) were located in a different cradle, which indicated the VNII genetic type. The other 42 strains belonged to the VNI type, a major type of *C. neoformans*. No clinical isolate belonged to the VNB type.

From a geographic perspective, 27 of 34 isolates (79%) from Eastern Japan, including the Hokkaido, Kanto, and Chubu regions, and 9 of 10 isolates (90%) from Western Japan, including the Kansai and Kyushu regions, belonged to ST46, indicating that there is little geographical bias between Eastern and Western Japan in the contributions of ST46 isolates (Fisher's exact test; $P = 0.659$). Two isolates (NIIDCr0007 and NIIDCr0018), which belong to the molecular type VNII, were isolated from the Kanto region of Eastern Japan.

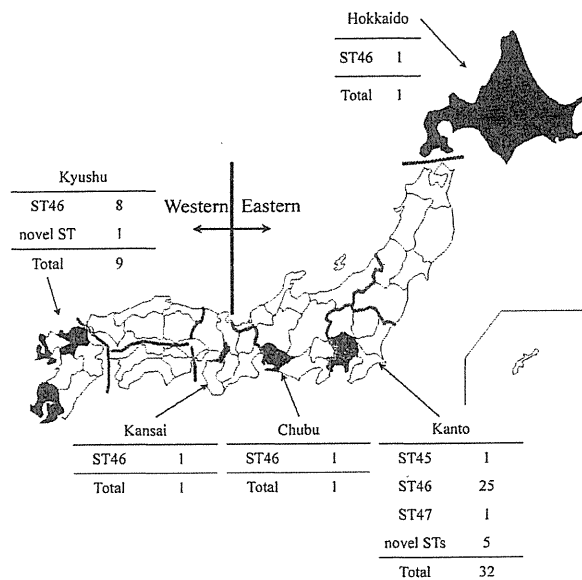


Fig. 1. Map of Japan showing the distribution of multilocus sequence typing (MLST) profile and the number of isolates according to the region involved in the study. Details are shown in Table 1.

DISCUSSION

There are no previous studies of MLST epidemiology by the ISHAM standard method for clinical isolates of *C. neoformans* var. *grubii* obtained from multiple facilities in Japan. In this study, we analyzed 44 clinical strains of *C. neoformans* from 11 facilities. Most isolates were classified as the same ST, ST46 (81%). This result indicates that it may be difficult to predict the origin of potential cryptococcosis outbreaks using the MLST scheme if the isolates belong to ST46. However, STs of other isolates are phylogenetically independent of each other (Fig. 2), and these minor STs will be useful for global epidemiologic studies, recognition, and tracking the inter or intrahospital spread of *C. neoformans* in Japan.

A recent epidemiological study has shown that clinical and environmental isolates in Thailand predominantly consist of 3 STs, ST44, ST45, and ST46, accounting for up to 90% of the total isolates investigated (14), indicating low genetic diversity. In Japan, Mihara et al. (15) has reported that 31 of the 35 isolates in Nagasaki, Japan exhibited ST5. ST46 in this study and ST5 in the study of Mihara et al. are derived from the same nucleotide sequences in the 7 loci. This discrepancy of ST might be due to the MLST database;

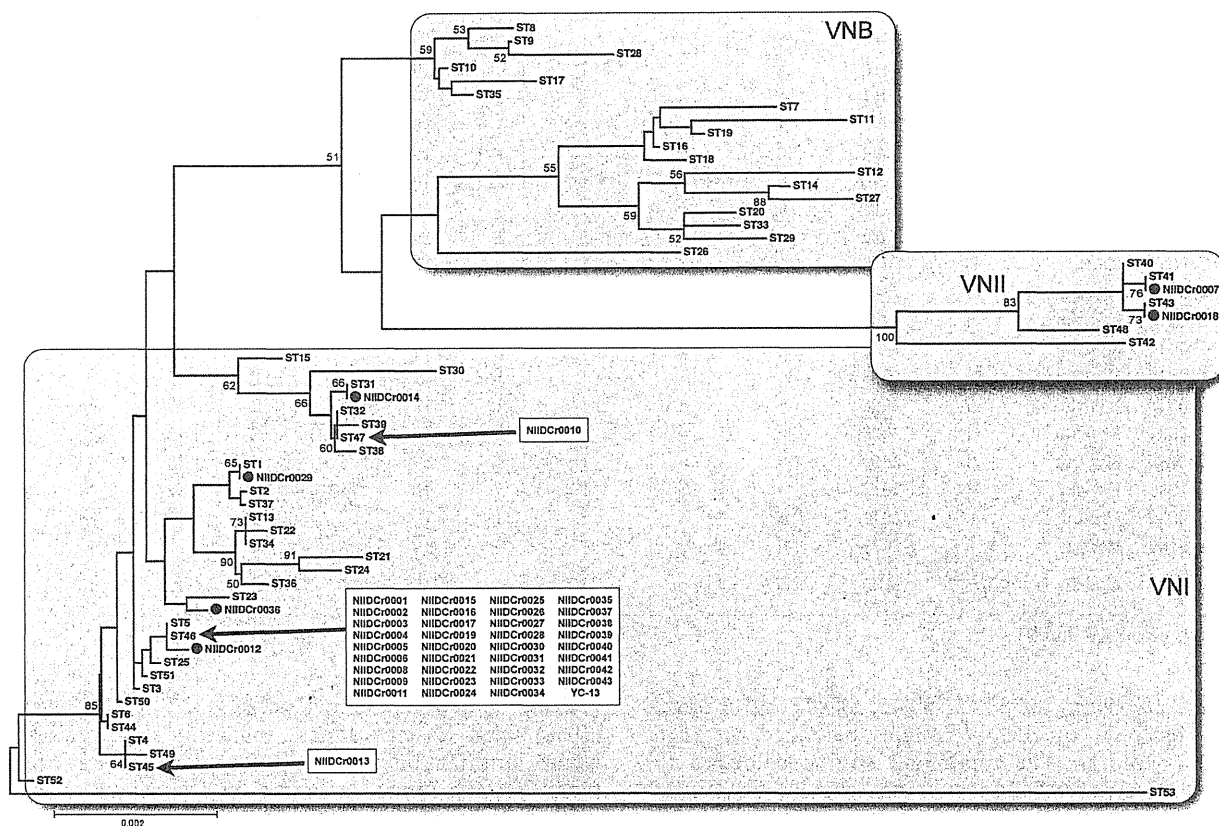


Fig. 2. Molecular phylogenetic analysis by the maximum-likelihood method of the 44 Japanese clinical isolates and known sequence types (STs) of *Cryptococcus neoformans* using a concatenated data set derived from seven loci (*CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5*, and *IGS1*). The tree with the highest log likelihood (-7730.9017) is shown and drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The percentage ($> 50\%$) of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Analysis involved 61 nucleotide sequences. There were 3901 positions in the final dataset. VN molecular types (VNI, VNII, and VNB) are represented by gray rectangles.