

## 成人の侵襲性インフルエンザ菌感染症の細菌学的解析

研究分担者：村上 光一（国立感染症研究所感染症疫学センター 室長）  
研究協力者：蜂巢 友嗣（国立感染症研究所感染症疫学センター FETP）  
福住 宗久（国立感染症研究所感染症疫学センター 主任研究官）  
池上 千晶（国立感染症研究所感染症疫学センター FETP）  
平井 晋一郎（国立感染症研究所感染症疫学センター 主任研究官）  
久保田 眞由美（国立感染症研究所細菌第二部 主任研究官）  
常 彬（国立感染症研究所細菌第一部 主任研究官）  
砂川 富正（国立感染症研究所感染症疫学センター 室長）  
大石 和徳（富山県衛生研究所 所長）

**研究要旨** 平成31年（2019年）1月から令和元年（2019年）12月の間、10道県における成人の侵襲性インフルエンザ菌感染症分離菌は、96菌株が当所へ搬入された。これら患者由来株のうち、93株（96.9%）がnon-typable *Haemophilus influenzae* (NTHi) であった。加えて、莢膜型f型が3株認められた。薬剤耐性については、 $\beta$ -lactamase 産生菌株が13株（13.5%）を占めた。当研究班の過去の資料をも含め、比較的長期間の解析を行うと、2013年から令和元年12月までの間に、308件の侵襲性インフルエンザ菌感染症原因菌株が、研究班にて収集後、当所へ搬入され、そのうち、95.5%（294/308）の菌株がNTHiであった。

今後とも成人の侵襲性インフルエンザ菌感染症分離菌株の継続的な解析が必要であるとともに、各自治体レベルで本感染症の流行を監視していくことが重要であると考えられた。

### A. 研究目的

平成25年4月から、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律の一部が改正され、「侵襲性肺炎球菌感染症」および「インフルエンザ菌感染症」が5類感染症に追加された<sup>1)</sup>。これにより、地方自治体はそれぞれの疾病の発生状況を各自治体レベルで把握することが可能になった。一方、侵襲性肺炎球菌感染症および侵襲性インフルエンザ菌感染症の予防のため、平成25年度から小児を対象としたPCV7またはPCV13、Hibワクチンが、また、平成26年10月から高齢者を対象としてPPSV23が公費助成の対象となったことから、本疾病の患者から分離される菌株の血清型に強い関心が寄せられている<sup>1)</sup>。インフルエンザ菌も成人の市中肺炎の原因菌であるが、本邦における成人の侵襲性インフルエンザ菌感染症に関する詳細はよくわかっていない。そこで本分

担研究では、成人における侵襲性インフルエンザ菌感染症の患者由来菌株について細菌学的検査を実施した。

### B. 研究方法

#### 1. 菌株の収集

平成31年（2019年）1月から12か月間、10道県における成人の侵襲性インフルエンザ菌感染症を対象に調査した。図1に示すように、患者情報および菌株は、臨床家から関係自治体の機関（保健所、地方衛生研究所等）を介して、国立感染症研究所（感染研）に搬送・搬入される。研究分担者が、この菌株収取過程で様々な役割を果たしている。

#### 2. 侵襲性インフルエンザ菌感染症患者由来菌株の同定・血清型別

地方衛生研究所（地衛研）等から感染研に送付された侵襲性インフルエンザ菌感染症患者由来菌

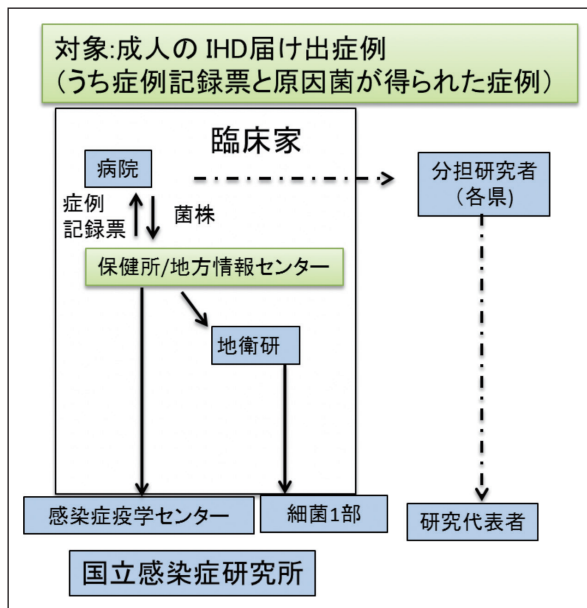


図1. 成人の侵襲性インフルエンザ菌感染症患者情報と分離菌株の搬送・搬入

株について、血清型、薬剤感受性について精査した。まず、送付菌株が真にインフルエンザ菌であるかをZhangら(2014)のPCR鑑別法<sup>2)</sup>を用いて検査した(表1)。莢膜型に関しては、市販抗血清(デンカ生検、東京)を用いて確認するとともに、各莢膜抗原構造遺伝子の特異配列を検出対象としたPCRを用いて確認した<sup>3-5)</sup>(図2)。薬剤感受性試験については、アンピシリン(ABPC)およびアンピシリン/スルバクタム(ABPC/BT)について、E test(bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France)を用いて実施した。 $\beta$ ラクタマーゼ活性の有無に関しては、センシディスク・セファロチン30(BD)を用いた。

### 3. 搬入菌株の Multi locus sequence typing

平成25年から令和元年に搬入された菌株のうち搬入時期の早い250分離株を対象に、*adh*, *atpG*, *frdB*, *fucK*, *mdh*, *pgi*および*recA*の7つの遺伝子の変異を指標としたmulti locus sequence typing(MLST)による型別を実施した。方法は*Haemophilus influenzae* MLST Databases (<https://pubmlst.org/hinfluenzae/>, 2020年1月30日参照)に準拠した。

## C. 研究結果

### 1. 侵襲性インフルエンザ菌感染症由来株の血清型結果等

96株のすべてがインフルエンザ菌であること

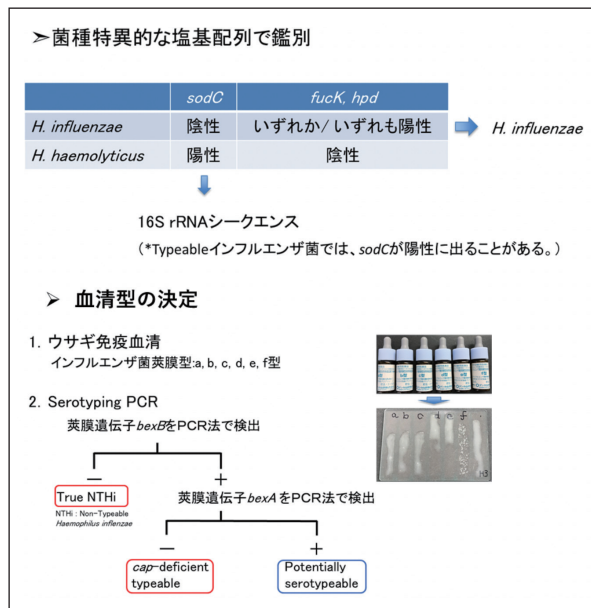


図2. 成人の侵襲性インフルエンザ菌感染由来分離菌株の同定、血清型別の手順

表1. 侵襲性インフルエンザ菌感染症分離菌株に用いるPCRプライマー

用途	プライマー名	塩基配列	産物の大きさ (bp)	文献
莢膜血清型検出用プライマー (5' → 3')				1
a型	a1:	cta ctc att gca gca ttg gc	250	
a2:	gan tat gac ctg atc ttc tg			
b型	b1:	ggc aaa gtg aac tct tat ctc tc	480	
b2:	gct tac gct tct atc tgc gtp aa			
c型	c1:	tct gfg tag atg atg gtt ca	250	
c2:	cag agg caa gct att agt ga			
d型	d1:	tga tga ccg ata caa cct gt	150	
d2:	tcc act ctt caa acc att ct			
e型	e1b:	ctt tgg taa cga atg tng tgg tag	1,350	
e2c:	aat gtt ata cat agc tt aet gta taa gtc tag			
f型	f1:	gct act atc aag tc aaa tc	450	
f2:	cgc aat tat gga aga ang ct			
bexB 遺伝子確認用プライマー (5' → 3')				2
bex	1F:	gggga taa cgc gtt gtt atg c	567	
1R:	ttg gct cgt gtc gga agt atg			
FLF:	tcatt ggc tca cca cct taact	760		
FLR:	agc taa caa ggc ggg gta taa cgc			
増幅確認	pepN_F:	gatt ggc act ggg ggg	918	
pepN_R:	gata tgc ggg tgc ggt gtc			
16S rDNA塩基配列確認用プライマー (5' → 3')				3
鑄型検出・作成用	16SUNI-L	aga gtt gat cat ggc tgc ag		
16SUNI-R	gfg tgc ggc ggg ggt gtt gac			
シーケンス用	16SRNA1-S	cta cgg ggc gca gca ggg ggg		
16SRNA1-S	cta cgg ggc gca gca ggg ggg			
16SRNA1-S	gfg tgc ggc ggc ggc ggc ggc			
16SRNA2-S	gfg tgc ggc ggc ggc ggc ggc			
16SRNA3-S	gfg tgc ggc ggc ggc ggc ggc			
16SRNA4-S	gfg tgc ggc ggc ggc ggc ggc			
16SRNA5-S	gfg tgc ggc ggc ggc ggc ggc			
16SRNA6-S	gfg tgc ggc ggc ggc ggc ggc			
16SRNA7-S	gfg tgc ggc ggc ggc ggc ggc			
16SRNA8-S	gfg tgc ggc ggc ggc ggc ggc			
被検菌がインフルエンザ菌であることを確認 (5' → 3')				4
SodC	SodC(F)	cavsa aaa vcca agc tgc	300	
SodC(R)	caym gvg ggc ggc ccc rcc cc	(y, m, s, r は混合塩基)		
fucK	fucK(F)	acc act ttc ggc cgt gga tgg	560	
fucK(R)	aga gtt ccc tgg ggc ggc ggc			
hpd#3(F)	ggtaaat atg ccc gat ggt gtt	151		
hpd#3(R)	ttc act ttt acc gca cgc gta			

1. Falli TJ, Crook DM, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, Moxon ER. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol. 1994; 32:2382-2386.  
 2. Falli TJ, Crook DM, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, Moxon ER. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol. 1994; 32:2382-2386.  
 3. Kulmert P, Frey J, Lang N, Mayfield L. Phylogenetic analysis of *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis* clinical strains reveals a clear species clustering. Int J Syst Evol Microbiol. 2002;52:1391-1399.  
 4. Zhang R, Kande D, Tristram S. *Haemophilus haemolyticus* is infrequently misidentified as *Haemophilus influenzae* in diagnostic specimens in Australia. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;80:272-3.

を確認した。そのうち、93株(96.9%)が莢膜型別用免疫血清で特異的凝集を示さず、また、PCR法によっても特異的バンドは認められなかったため non-typable *Haemophilus influenzae* (NTHi)と判定した(表2)。また、f型3株を認めた。

### 2. 薬剤耐性試験結果

本年の搬入菌株96株における $\beta$ -lactamase negative ampicillin resistant (BLNAR)は13株(13/96、13.5%)であった。これらの菌株において、アン

表 2. 平成25 (2013) 年から令和元 (2019) 年12月までの  
 侵襲性インフルエンザ菌感染症関連搬入菌株数  
 (患者1名から複数搬入された場合は、代表株の  
 み含む) と、その血清型

	NTHi	b	e	f	計
2013	1				1
2014	14				14
2015	28		1		30
2016	33	1		3	36
2017	52		2		54
2018	73	1		3	77
2019	93			3	96
計	294	2	3	9	308

NTHi: non-typable *Haemophilus influenzae*

ピシリンおよびアンピシリン・スルバクタム合剤におけるMICでは明らかな差をいずれの菌株でも認めた。平成25年から令和元年に搬入された菌株のうち、搬入時期の早い250分離株を対象にβ-lactamase negative ampicillin resistant (BLNAR) の割合を検査したところ63株 (25.2%) であった (図 3)。

### 3. 搬入菌株の Multi locus sequence typing

NTHiにおいて特定のクローンの流行は観察されなかった (図 4)。

## D. 考察

平成25年度から侵襲性肺炎球菌感染症および侵襲性インフルエンザ菌感染症が5類感染症として位置づけられたことや、肺炎球菌に関しては、ワクチン接種に関する公的助成が実施されたことなどから、地方自治体においてこれら疾患の情報収集および分離菌株の性状を把握することは重要である。侵襲性インフルエンザ菌感染症に関しては、インフルエンザ菌b型 (Hib) を原因菌とする小児の敗血症、細菌性髄膜炎のほとんどが、Hibワクチンの導入により世界的レベルで激減している<sup>6)</sup>。その一方で、Hibの減少に呼応してNTHiによる侵襲性インフルエンザ菌感染症が報告されるようになった<sup>7)</sup>。

侵襲性インフルエンザ菌感染症に関しては、小児領域においては多くの研究報告がなされているが、成人の侵襲性インフルエンザ菌に関する報告は少ない。今回の結果から、分離菌株の莢膜血清型は、3株を除きすべてNTHiであることが判明した。NTHiは、莢膜を有する菌株と比較して、莢膜多糖生合成遺伝子が欠損し莢膜型とは遺伝

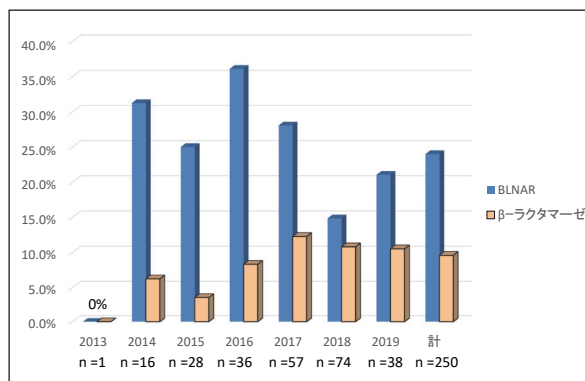


図 3. 侵襲性インフルエンザ菌感染症原因菌株のβ-ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性 (BLNAR) 菌株とβラクタマーゼ産生株の出現頻度 (n=250)

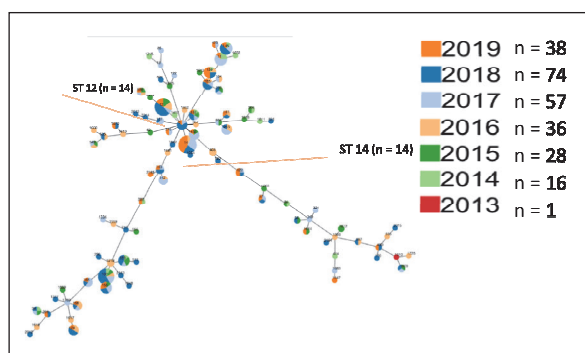


図 4. Multilocus sequence typing (7遺伝子による) 結果。搬入年別に色分けした。250菌株解析の結果。Non-typable *Haemophilus influenzae* は、239株 (92種類のSTに分類) であり、ST14、ST12およびST107に分類されたものが、14株、14株および12株と比較的多くを占めた。血清型b型を示した株は2株でSTは54を示した。血清型e型を示した株は3株でSTは18、122および1615を示した。血清型f型を示した株は6株でSTは124 (n=5) および1617を示した。図では、搬入年別に菌株を区分しているが、特定の年に特定のSTを示す株が多く存在することはなく、偏ったSTによる短期間の流行は観察されなかった。

子レベルで同系列でないことが報告されている<sup>7)</sup>。このことから、NTHiは単純に莢膜を欠損したインフルエンザ菌であるとみなすことはできないと考えられる。今後菌株側と生体側との相関関係についての解析が必要であると思われる。なお、分離菌株の莢膜血清型の多くがNTHiであったことから、今後、NTHiをさらに詳細に型別する方法の導入も必要であることが示唆された。

薬剤感受性に関しては、ABPCおよびABPC/SBTに、比較的多くの分離株が耐性を示した。小児での調査ではあるが、本邦をはじめとして世界的にもβ-lactamase negative ampicillin resistant (BLNAR) およびβ-lactamase producing ampicillin resistant (BLPAR) の検出事例が多くなっている

ことから<sup>8, 9)</sup>、成人においても薬剤耐性に対する監視体制を強化する必要があると思われた。

## E. 結論

地衛研から侵襲性肺炎球菌感染症および侵襲性インフルエンザ菌感染症患者由来菌株が順調に送付されつつある。この結果、従来不明であった成人の侵襲性インフルエンザ菌感染症の実態が明らかになりつつある。これらの疾病の血清型などの菌株情報を把握することは、今後のワクチン開発および感染症行政対応における重要な要素であることから、今後も継続していくことが必要であることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許所得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

## 参考文献

- 1) IASR Vol. 34, 2013: 64-66.
- 2) Zhang B, Kunde D, Tristram S. *Haemophilus haemolyticus* is infrequently misidentified as *Haemophilus influenzae* in diagnostic specimens in Australia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014 Dec; 80 (4) : 272-273.
- 3) Falla TJ, Crook DWM, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS and Moxon ER. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 2382-2386.

- 4) Van Ketel RJ, de Wever B, van Alphen L. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. *J Med Microbiol*. 1990; 33 (4) : 271-276.
- 5) Shuel M, Hoang L, Law DK, Tsang R. Invasive *Haemophilus influenzae* in British Columbia: non-Hib and non-typeable strains causing disease in children and adults. *Int J Infect Dis*. 2011; 15 (3) : e167-173.
- 6) Adam HJ, Richardson SE, Jamieson FB, Rawte P, Low DE, Fisman DN. Changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* in Ontario, Canada: evidence for herd effects and strain replacement due to Hib vaccination. *Vaccine*. 2010; 28 (24) : 4073-4078.
- 7) Shuel M, Law D, Skinner S, Wylie J, Karlowsky J, Tsang RS. Characterization of nontypeable *Haemophilus influenzae* collected from respiratory infections and invasive disease cases in Manitoba Canada. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010; 58 (2) : 277-284.
- 8) 砂川慶介. 全国小児科外科初診の呼吸器感染症患児より分離された *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* の検討 (2002-2003年) 耐性株の割合および経口抗菌薬に対する薬剤感受性について. *感染症誌*. 2005; 79 (11) : 887-894.
- 9) Sunakawa K, Farrell DJ. Mechanisms, molecular and sero-epidemiology of antimicrobial resistance in bacterial respiratory pathogens isolated from Japanese children. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2007; 13: (6) 7.