

## 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危機管理研究センター 室長）  
研究協力者：蜂巢 友嗣（千葉県衛生研究所）  
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（横浜市健康福祉局健康安全部健康安全課 横浜市保健医療医幹）  
平井 晋一郎（国立感染症研究所感染症危機管理研究センター 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）  
研究分担者：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）  
研究代表者：大石 和徳（富山県衛生研究所 所長）

**研究要旨** 令和2年（2020年）1月から同年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のうち43菌株が当所へ搬入された。これら患者由来株のうち、41株（95%）が non-typable *Haemophilus influenzae* (NTHi) であった。加えて、莢膜型 f 型を示す菌株が2株認められた。薬剤耐性については、 $\beta$ -lactamase 産生菌株が9株（21%）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、平成25年（2013年）から令和2年（2020年）12月までの間に、327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、当所へ搬入された（これらのうち平成25年〔2013年〕から平成30年〔2018年〕の間の分離株に関してはNESID登録菌株のみを対象とした）。このうち、95%（312/327）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（2013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（2013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年度（2014年度）から高齢者を対象としてPPV23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

令和2年（2020年）1月から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・搬入された。分担者研究が、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

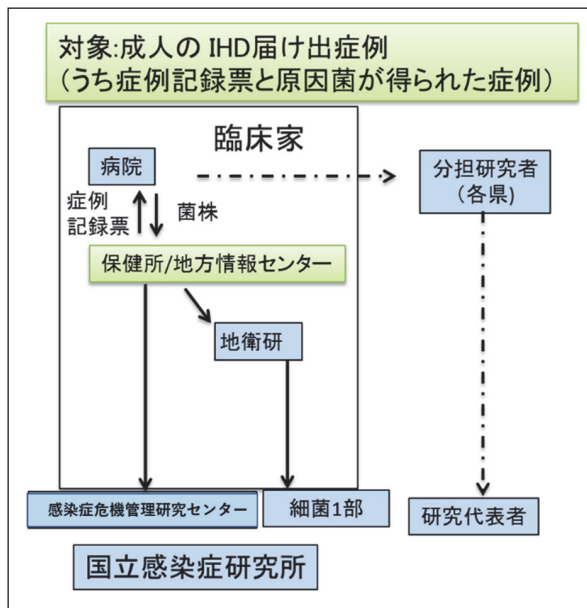


図1. 成人の侵襲性インフルエンザ菌感染症患者情報と分離菌株の搬送・搬入

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株について、血清型について精査した。まず、送付菌株が真にインフルエンザ菌であることを 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（Becton, Dickinson, Franklin Lakes, NJ）を用いた。

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

平成25年（2013年）から令和元年（2019年）に搬入された菌株のうち搬入時期の早い215分離株を対象に、*adk*、*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11月1日参照) に準拠した。

(倫理面への配慮)

連結不可能匿名化されたデータのみを用いた。

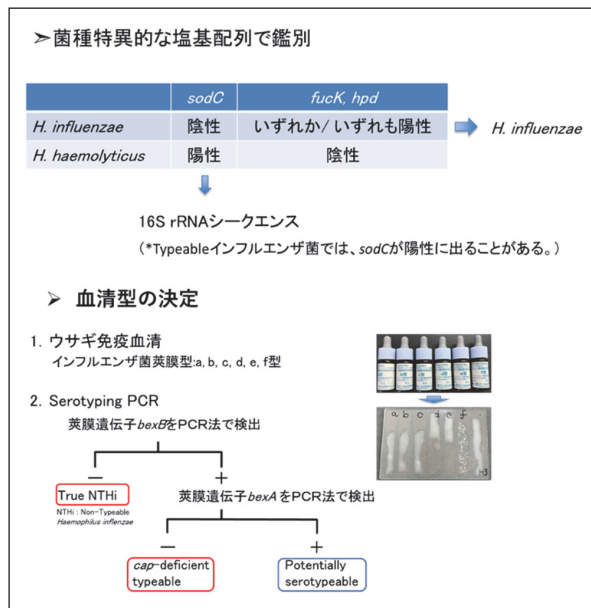


図2. 成人の侵襲性インフルエンザ菌感染由来分離菌株の同定、血清型別の手順

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 ttt gc	250	
	a2:	gaa tat gac cgc atc ttc tg		
b型	b1:	ggc aac gtc aac tct tat ctc tc	480	
	b2:	gct tac gct tct atc tgc gtc aa		
c型	c1:	tct gtc tag atg atg gtt ca	250	
	c2:	cag agg caa gct att agt ga		
d型	d1:	tgc tga ccc ata caa cct gt	150	
	d2:	tcc act ctt caa acc att ct		
e型	e1b:	ctt tgg ta a cga atg tag tgg tag	1,350	
	e2c:	aat gtt gtt ata cat agc ttt aet gta taa gtc tag		
f型	f1:	gct act atc aag tcc aac tc	450	
	f2:	cgc aat tat gga aga ang ct		
<i>bexB</i> 遺伝子確認用プライマー (5' → 3')				2
<i>bex</i>	1F:	gggtgaaacgcggttattagc	567	
	1R:	ttgtgcctgtaggaaggattatg		
	FLF:	tcattgtggccaactccttaact	760	
	FLR:	agcattcaaaagcgggattaaagc		
PCR増幅確認	popN_F:	gatgggcactggggg	918	
	popN_R:	gatctgggtgagcgggtgag		
16S rRNA-DNA塩基配列確認用プライマー (5' → 3')				3
錐型検出・作成用	16SUNI-L	agagttgatcatgctcag		
	16SUNI-R	gfgtggcgggagggtgtagc		
シーケンス用	16SRNA1-S	ctacggagggcagcagggagga		
	16SRNA1-S	ctacggagggcagcagggagga		
	16SRNA1-S	gfgtaggggaaatcgttag		
	16SRNA2-S	gfgtaggggaaatcgttag		
	16SRNA2-S	ggftaa gccc geaac ggggc		
	16SRNA4-S	gcttaagggcctaacgggggc		
	16SRNAV-S	ecccaactgctccctccttag		
	16SRNAV-S	ctaacgattaccctacc		
	16SRNAV1-S	gcgctcgtggggagctaac		
	16SRNAV3-S	ctacggattaccctacc		
	16SRNA6-S	gcgctcgtttggcctaaagc		
被検菌がインフルエンザ菌であることの確認 (5' → 3')				4
<i>SodC</i>	SodC(F)	caavsaana vccaagctg	300	
	SodC(R)	caVmcgvgsgccgscrcrc	(y, m, s, r は混合塩基)	
<i>fucK</i>	fucK(F)	accacttccg cgtggatgg	560	
	fucK(R)	aaagttcccggtggcag		
<i>hpd#3</i>	hpd#3(F)	ggtaaatatgccgatggttg	151	
	hpd#3(R)	tgcatcttaccgcaagctga		

1. Falla 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. Falla 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. Kuhneri 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 B, Kandle D, Tristram S. *Haemophilus haemolyticus* is infrequently misidentified as *Haemophilus influenzae* in diagnostic specimens in Australia. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;80:272-3.

## C. 研究結果

### 1. 侵襲性インフルエンザ菌感染症患者由来株の血清型別結果等

43株のすべてがインフルエンザ菌であることを確認した。そのうち、41株（95%）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2株を認めた。

表 2. 2013年から2020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（暦年別）

	血清型			NTHi	計
	b	e	f		
2013				3	3
2014				18	18
2015	1	1		21	23
2016			1	30	31
2017		2	1	49	52
2018	1	1	2	72	76
2019			3	78	81
2020			2	41	43
総計	2	4	9	312 (95%)	327

NTHi: non-typable *Haemophilus influenzae*

## 2. 薬剤耐性試験結果

本年の搬入菌株のうち9株におけるβ-lactamase negative ampicillin resistant (BLNAR) は5株 (9/43, 56%) であった。

## 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3)。

## D. 考察

平成25年度 (2013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五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、令和2年搬入菌株の莢膜血清型は、95%の菌株が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、莢膜多糖生成遺伝子が欠損し莢膜型とは遺伝子レベルで同系列でないと報告がされてい

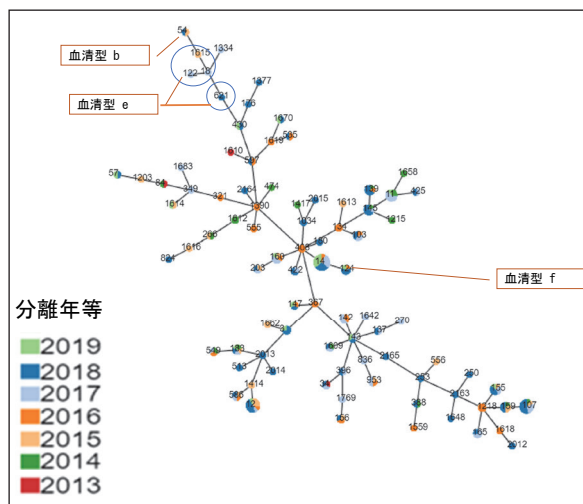


図 3. Multilocus sequence typing (7 遺伝子による) 結果。搬入年別に色分けした。215菌株解析の結果。Non-typable *Haemophilus influenzae* は、204株 (81種類のSTに分類) であり、ST14、ST12およびST107に分類されたものが、14株、11株および11株と比較的多くを占めた。血清型 b 型を示した株は2株でSTは54を示した。血清型 e 型を示した株は4株でSTは18、122、621および1615を示した。血清型 f 型を示した株は5株でSTは124を示した。図では、搬入年別に菌株を区分しているが、特定の年に特定の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。

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。

令和2年 (2019年) の搬入菌株の全株の解析は終了していないが、平成25年 (2013年) からの搬入株において薬剤感受性に関して、ABPCおよびABPC/SBTに、比較的多くの分離株が耐性を示した (表3)。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る。

## E. 結論

地衛研から侵襲性肺炎球菌感染症および侵襲

表 3.  $\beta$ -lactamase negative ampicillin resistant (BLNAR) 菌株および  $\beta$ -lactamase 発現菌株数の変化\*

分離年等	供試菌株数	BLNAR 菌株数 (%)	$\beta$ -lactamase 発現 菌株数 (%)
2013	3	0 (0%)	0 (0%)
2014	18	6 (33%)	1 (6%)
2015	23	8 (35%)	1 (4%)
2016	31	6 (19%)	3 (10%)
2017	52	14 (27%)	8 (15%)
2018	76	16 (21%)	8 (11%)
2019	79	24 (30%)	15 (19%)
2020	9	5 (56%)	2 (22%)
計	291	79 (27%)	38 (13%)

\*2013年から2018年分離のNESID登録菌株並びに2019年および2010年搬入菌株の一部を解析した。

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.