

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：林原 絵美子（国立感染症研究所細菌第二部 室長）

研究協力者：久保田 眞由美（国立感染症研究所細菌第二部 主任研究官）

研究要旨

2022年から2024年に10道県にて収集された成人の侵襲性感染症由来インフルエンザ菌186株について、莢膜型別解析を行った結果、a型が1株（0.5%）、b型が1株（0.5%）、e型株が2株（1.1%）、f型が7株（3.8%）であり、残りの175株はnon-typable *Haemophilus influenzae*（NTHi）（94.0%）であった。E-test法で薬剤感受性の測定を行った184株のうち、 β -lactamase 産生菌株29株（15.8%）を含む116株（63.0%）がアンピシリン非感受性を示した。また、ドライプレート法による薬剤感受性試験結果をE-test法と比較した結果、概ね良好な一致率を示したが、アンピシリン・スルバクタムにおいてはE-test法で感受性とされた株の一部がドライプレート法で耐性となる傾向があった。またゲノム解析では、2015年から2024年に分離された202株と小児由来株78株と合わせて系統樹を作成したところ、分離株は有莢膜株で構成される2つのCladeとNTHiで構成される7つのCladeの計9つのCladeに大きく分類され、一部のCladeでは成人由来株が多い傾向が認められた。

A. 研究目的

インフルエンザ菌は有莢膜株と無莢膜株に分けられ、特に有莢膜b型（Hib）株はかつて乳児や小児において髄膜炎等を引き起こす主要な侵襲性細菌感染症起因菌の一つであった。小児を対象としたHibワクチンの導入（日本では2008年に承認、2013年より定期接種化）により、小児における侵襲性インフルエンザ菌感染症の罹患率は劇的に減少した。本研究は予防接種施策等に反映できる有用な情報を提供することを目的として侵襲性細菌感染症の発生動向とその原因菌の莢膜型別等の細菌学的背景と

の関連性を明らかにするため、2013年度より継続して積極的サーベイランスを行っている。インフルエンザ菌に関してはこれまでに成人の侵襲性細菌感染症の原因として分離されるインフルエンザ菌株の多くが無莢膜株であることを明らかにしてきた。本年度においても10道県において侵襲性細菌感染症の原因菌として分離されたインフルエンザ菌株を収集し、血清型別や薬剤感受性などの細菌学的解析、及びゲノム解析を行った。

B. 研究方法

1. 菌株と臨床情報の収集

2024 年に 10 道県の医療機関で成人の侵襲性感染症の原因菌として分離されたインフルエンザ菌株を収集した。菌株と臨床情報は保健所あるいは地方衛生研究所等を介して国立感染症研究所（感染研）に送付された。

2. 菌株の莢膜型別解析

莢膜型別はインフルエンザ菌莢膜型別用免疫血清「生研」（デンカ株式会社）を用いて判別した。また、ゲノム解析（後述）により得られたゲノム情報により、血清型別解析の結果と莢膜関連遺伝子情報の同一性を確認した。

3. β -lactamase 産生の有無と薬剤感受性解析

β -lactamase 産生はセフィナーゼディスク（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を用いニトロセフィン法により検査した。薬剤感受性は E-test（バイオメリュー・ジャパン株式会社）を用いて測定した。アンピシリン（ABPC）の最小発育阻止濃度がストリップ目盛りが 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の時 ABPC 耐性とし、 β -lactamase が陽性の場合 BLPAR（ β -lactamase-producing ampicillin resistant）、 β -lactamase が陰性の場合 BLNAR（ β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant）と分類した。アンピシリン感受性の場合 BLNAS（ β -lactamase-nonproducing ampicillin-susceptible）とした。また 2022 年から 2024 年に分離された 130 株についてはドライプレート（栄研化学）を用いて薬剤感受性を測定した。

4. 全ゲノム解析

2015 年から 2024 年に侵襲性感染症の原因菌として分離されたインフルエンザ菌株について解析を行った。ゲノム解析は Nova Seq（Illumina）を用い、150 bp の Paired-end で解析した。得られたリードは shovill 1.1.0 (<https://github.com/tseemann/shovill>) で de novo assembly を行った。roary (<https://github.com/sanger-pathogens/Roary>) により作成された core gene alignment について RAxML-NG (<https://github.com/amkozlov/raxml-ng>) を用いて系統樹を作成した。系統樹作成には AMED 新興再興感染症事業（菅班）で収集している 2011 年から 2024 年までの分離株のゲノム情報および NCBI より入手した日本分株および各莢膜型の代表株のゲノム情報も用いた。

C. 研究結果

1. 侵襲性感染症由来インフルエンザ菌株の莢膜型別解析

2022 年から 2024 年に 10 道県の医療機関で成人の侵襲性感染症の原因菌として分離されたインフルエンザ菌株 186 株について、莢膜型別解析を行った結果、a 型が 1 株（0.5%）、b 型が 1 株（0.5%）、e 型が 2 株（1.1%）、f 型が 7 株（3.8%）であり、残りの 175 株は non-typable *Haemophilus influenzae* (NTHi)（94.0%）であった（表 1、図 1）。

2. 侵襲性感染症インフルエンザ菌由来株の薬剤感受性

2022 年から 2024 年の間に 10 道県の医療機関で成人侵襲性感染症の原因菌として分離されたインフルエンザ菌株 186 株のうち 181 株で薬剤感受性試験を行った結果、

BLPAR が 29 株 (16.0%)、BLNAR が 87 株 (低感受性株を含む、48.1%)、残りの 65 株 (35.9%) が BLNAS であった (図 2)。130 株についてドライプレート法によって感受性試験を行った結果を E-test による結果と比較したところ、E-test 法とドライプレート法の一致率は ABPC で 91.5% であった (MIC が 2 µg/mL の低感受性株を耐性とした場合、表 2)。一方アンピシリン・スルバクタムでは E-test で感受性と判定された 74 株のうち、22 株はドライプレート法で耐性と判定され (表 2)、これらの多くは PBP3 のペニシリン結合領域近傍に 2 か所以上の変異を有する株であった。

3. ゲノム情報を用いた系統樹解析
成人由来 202 株、AMED 新興再興感染症事業・菅班で収集している 2011 年から 2023 年までの分離株 64 株、日本で 2008 年から 2015 年に分離された 14 株、および reference 株 6 株 (a 型株 : NML 株、b 型株 : 10810 株、c 型株 : ATCC9007 株、d 型株 PTHi-10983 株、e 型株 : M15895 株、f 型株 : KR494 株) の計 286 株について core gene alignment を用いた系統樹を作成した。菌株は大きく 9 つの Clade に分類された (図 3)。e 型および f 型の莢膜をもつ株は Clade V、a 型、b 型の莢膜を持つ株は Clade III に分類され、残りの 7 つの Clade は NTHi のみを含んでいた (図 3)。Clade IV や Clade VIII では成人が多い傾向が認められた。

D. 考察

侵襲性感染症由来インフルエンザ菌株の多くは莢膜を持たない NTHi であり、これまでの成人における侵襲性感染症由来インフルエンザ菌株の傾向と変わらなかったが、2024 年は本研究班での調査開始以降初めて a 型株が分離された。BLNAR および BLPAR を合わせた ABPC 耐性株の割合は 64.1% であり、今後注視していく必要が考えられた。E-test とドライプレート法による薬剤感受性測定結果を比較したところ PBP3 に変異を複数もつ株の一部は、E-test 法によるアンピシリン・スルバクタムの感受性がドライプレート法に比べて低く出る傾向があり注意が必要であることが分かった。また、ゲノム情報を用いた系統樹解析の結果、分離株は有莢膜株で構成される 2 つの Clade と無莢膜株で構成される 7 つの Clade に分類されることが分かった。今後定着因子等との関連等を精査していく必要があると考えられた。

E. 結論

侵襲性感染症由来インフルエンザ菌株について、継続的に莢膜型別、薬剤感受性情報、遺伝的背景を調べることは、今後のインフルエンザ菌感染症に対する予防接種施策等に反映できる有用な情報であり、調査の継続が重要であると考えられた。

表 1. 侵襲性感染症由来インフルエンザ菌株の年度ごとの莢膜型別株数

	a	b	e	f	NTHi	総数
2013					5	5
2014					23	23
2015		1	1	2	25	29
2016				1	30	31
2017			2	1	56	59
2018		1	1	2	81	85
2019				3	75	78

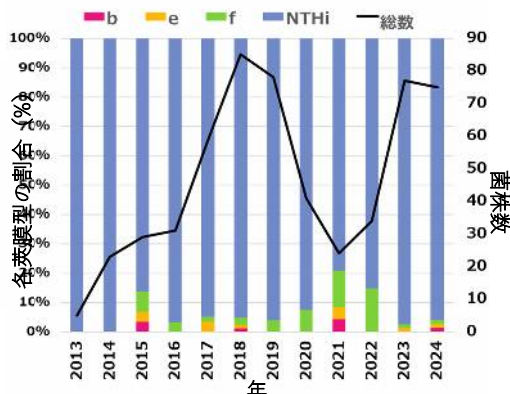


図1. 侵襲性感染症由来インフルエンザ菌株の各英膜型の割合の年次推移

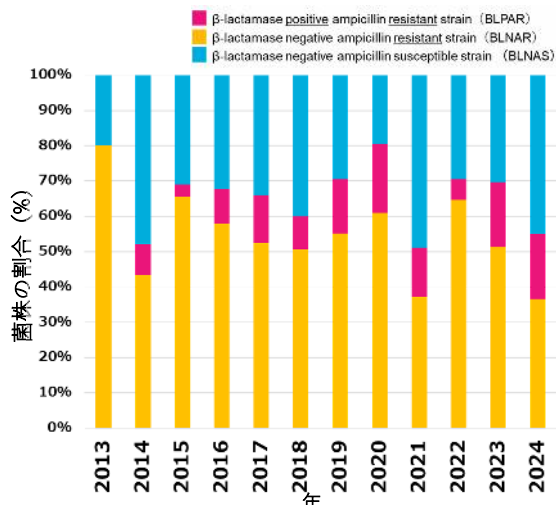


図2. 侵襲性感染症由来インフルエンザ菌株の年度ごとのアンピシリン感受性

図3. 成人由来株202株、小児由来株78株、reference6株について core gene alignment を用いて作成した系統樹

成人由来株は本研究班で、小児由来株は2008年から2015年に分離された14株およびAMED新興再興感染症事業・菅班で収集している2011年から2024年までの分離株64株とreference株6株を用いた解析。

表2. 侵襲性感染症由来インフルエンザ菌130株のアンピシリンおよびアンピシリン・スルバクタム感受性測定結果

アンピシリン

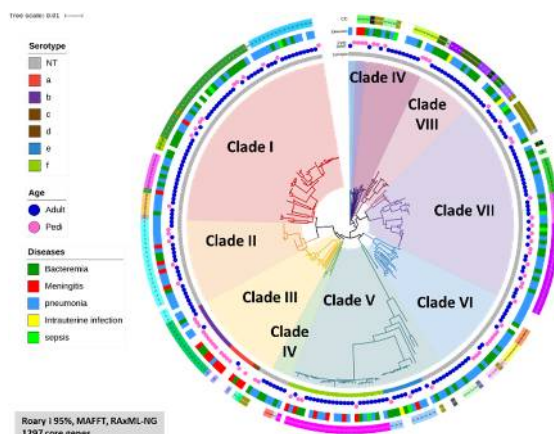
		E-test			Total
		S	I	R	
Dryplate	S	36	9	0	45
	I	1	5	12	18
	R	1	13	53	67
Total		38	27	65	130

S, Susceptible (<1 mg/L), I, Intermediate (>1 mg/L, <4mg/L), R, Resistant (≥4mg/L)

アンピシリン・スルバクタム

		E-test		Total
		S	R	
Dryplate	S	52	9	61
	R	22	47	69
Total		74	56	130

S, Susceptible (<2 mg/L), R, Resistant (>4mg/L)



F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hachisu Y, Tamura K, Murakami K, Fujita J, Watanabe H, Tanabe Y, Kuronuma K, Kubota T, Oshima K, Maruyama T, Kasahara K, Nishi J, Abe S, Nakamura M, Kubota M, Hirai S, Ishioka T, Ikenoue C, Fukusumi M, Sunagawa T, Suzuki M, Akeda Y, Oishi K Invasive *Haemophilus influenzae* disease among adults in Japan during 2014-2018. *Infection* Apr;51(2)355-364, 2023

2. 学会発表

1. 久保田眞由美、林原絵美子、加藤博史、見理 剛、大島謙吾、阿部修一、笠原 敬、西 順一郎、仲松正司、明田幸宏、大石和徳、成人の侵襲性感染症由来 *Haemophilus influenzae* の細菌学的解析、第 36 回日本臨床微生物学会総会・学術集会（2025 年 1 月、名古屋）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし