

[原 著]

化膿性髄膜炎患者の *Haemophilus influenzae* 由来材料別にみた相同性, 耐性遺伝子解析野畑亜希子¹⁾・森木省治¹⁾・森山英彦¹⁾・柴田 宏¹⁾・益田順一²⁾¹⁾ 島根大学医学部附属病院 検査部²⁾ 島根大学医学部 臨床検査医学講座

(平成 17 年 9 月 26 日受付, 平成 18 年 7 月 25 日受理)

化膿性髄膜炎 6 症例において髄液, 血液および口腔材料など複数材料から検出された *H. influenzae* の相同性を臨床細菌学および DNA 解析技術を用いて解析した。血清型はすべて b 型, 生物型は I 型が 5 症例, IV 型が 1 症例であった。薬剤感受性検査および PCR 法による薬剤耐性遺伝子の検索では, 一つの症例の髄液から β -lactamase non-producing ampicillin (ABPC) resistant strain (BLNAR) および β -lactamase producing clavulanic acid/amoxicillin (CVA/AMPC) resistant strain で TEM-1 と BLNAR resistant genes (BLPACR-II) 陽性の 2 種類が同時に検出されたが, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) では同一株由来であることが示された。

その他の 5 症例は β -lactamase non-producing ABPC susceptible strain (BLNAS) 1 症例, TEM-1 type β -lactamase producing ABPC resistant strain (BLPAR) 2 症例, β -lactamase producing CVA/AMPC resistant strain possessing TEM-1 and low-BLNAR resistant genes (BLPACR-I) 1 症例, BLNAR 1 症例であった。

6 症例から検出された *H. influenzae* 18 株について PFGE を行ったところ, 症例間では異なる電気泳動像を示したが, 同一症例の複数材料から検出された株はすべて同一の泳動像が得られた。このことから, 化膿性髄膜炎症例では髄液, 血液および呼吸器検体に同一の菌株を保有しており, 化膿性髄膜炎における上気道, 血液を介した病態の進展経路が推測された。

Key words: 化膿性髄膜炎, *H. influenzae* type b (Hib), TEM-1 type β -lactamase, PBP 変異, pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

Haemophilus influenzae は 1 歳前後の乳幼児から高頻度に検出される市中感染原因菌の一つで, *Streptococcus pneumoniae* と同様に化膿性髄膜炎など小児の重症感染症を引き起こすことが知られている¹⁾。本菌による重症感染症の標準的治療には ampicillin (ABPC) と cefotaxime (CTX) の併用療法が主になされてきたが^{1), 2)}, 1974 年に β -lactam 剤不活化酵素である TEM-1 type β -lactamase を産生する TEM-1 type β -lactamase producing ABPC resistant strain (BLPAR) が報告された¹⁾。また, 1980 年には細胞壁

合成酵素である penicillin-binding protein (pbp) 3 をコードする *ftsI* 遺伝子に変異を生じた β -lactamase non-producing ABPC resistant strain (BLNAR) が出現し¹⁾, 従来の ABPC+CTX の併用療法治療では十分な効果が期待できないことが懸念された。 β -lactamase 非産生の ABPC 耐性菌は β -lactamase 非産生 pbp 3-1 に変異のある ABPC 軽度耐性菌 (low-BLNAR) と, β -lactamase 非産生 pbp 3-1 と pbp 3-2 に変異のある ABPC 耐性菌 (BLNAR) の 2 種類に分けられる³⁾。さらに現在では, TEM-1 type β -lactamase 産生 pbp 3-1 に変異のある clavulanic acid/amoxicillin (CVA/AMPC) 耐性菌 (BLPACR-I) と, TEM-1 type β -lactamase 産生 pbp 3-1 と pbp 3-2 に変異のある CVA/AMPC 耐性菌 (BLPACR-II) も報告されている⁴⁾。これらの薬剤耐性化とともに, 低年齢からの集団保育など, 社会環境の変化によって *H. in-*

著者連絡先: (〒693-8501) 島根県出雲市塩冶町 89-1
島根大学医学部附属病院 検査部
野畑亜希子
TEL: 0853-20-2420
FAX: 0853-20-2423
E-mail: akikoi@med.shimane-u.ac.jp

fluensae による化膿性髄膜炎はさらに低年齢化し, また増加傾向にあることが報告されている²⁾。

従来から *H. influenzae* の疫学調査では血清型, 生物型, β -lactamase 産生能および薬剤感受性検査などが用いられている。BLNAR の薬剤感受性検査を実施すると ABPC の MIC 値は低いことから, ABPC に対する MIC 値を National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 判定基準 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を耐性とすると⁵⁾ BLNAR を正しく検出できないことが知られている⁴⁾。また近年, PCR 法によるインフルエンザ菌の薬剤耐性遺伝子の検出が有用とされている⁴⁾。

微生物検査において, 化膿性髄膜炎などの感染症では同一患者の上気道, 耳鼻科領域および血液などの複数の検体から, 感染巣と同一の菌種が同時期に検出されることをしばしば経験する。一方, 院内疫学調査では従来からの臨床細菌学的な表現型に基づく菌株の同定識別方法に加え, 近年, PFGE が用いられている⁶⁾。そこで筆者らは, この手法を化膿性髄膜炎症由来株に適用し, *H. influenzae* による化膿性髄膜炎において同一症例の複数材料から検出された *H. influenzae* について臨床細菌学および DNA 解析技術を用いて, その相同性を検討した。

I. 材料と方法

2001 年 7 月から 2004 年 10 月の間に *H. influenzae* が検出された化膿性髄膜炎症例 7 例を経験した。このうち 1 症例は血液培養のみから *H. influenzae* が検出され, 臨床症状より化膿性髄膜炎と診断された。その他の 6 症例は同一症例の複数材料から 18 株の *H. influenzae* が検出され, これら 18 株の相同性について検討した。

化膿性髄膜炎症例 7 例は 6 カ月から 3 歳までの女児で, このうち 5 例は髄液のグラム染色でグラム陰性小桿菌が観察され, 2 例は Slidex meningite-kit 5 (日本ビオメリュー) で *H. influenzae* 抗原が検出された。なお, 全例が後遺症なく軽快している。

提出された検体は羊血液 (栄研) およびチョコレート寒天培地 (栄研) で 35°C , 一夜炭酸ガス培養, ドルガルスキー改良培地 (BBL) は 35°C , 一夜好気培養した。さらに, 脳脊髄液においてはブルセラ HK-RS (極東) で 35°C , 48 時間嫌気培養およびブルセラ HK 半流動 (極東) で 35°C , 増菌培養した。血液培養は BacT/ALERT3D (日本ビオメリュー) 用血液培養瓶を使用した。

症例 2 の髄液からは一夜培養後, チョコレート寒天

培地上に形態的な特徴の異なるコロニーが観察されたため 3 種類のコロニーを釣菌し検査を進めた。その他の検体は同一検体から発育した複数コロニーの形態的な特徴が同一であったことから検査成績が同一であると仮定し一つのコロニーを釣菌し代表させた。また, 症例 6 は 2004 年 10 月 6 日, 翌 7 日に採取された髄液から 2 回にわたり本菌が検出された。

これらのコロニーは, グラム染色でグラム陰性小桿菌が観察され, XV 因子要求性と溶血性を XV テストストリップ (BBL) および馬血液寒天培地 (日水) で 35°C , 一夜炭酸ガス培養後に検出し *H. influenzae* と同定した。血清型はインフルエンザ菌莢膜型別用免疫血清 (デンカ生研) を用い, チョコレート寒天培地上に発育した *H. influenzae* とインフルエンザ菌莢膜抗原 b 型とスライド凝集反応を行い凝集を肉眼的に確認した。なお, *H. influenzae* による化膿性髄膜炎の多くは b 型によって引き起こされるため b 型血清とのみ反応を行った。生物型は Juni の方法⁷⁾ に準じ Indole 産生能, Urease 産生能, Ornithine 脱炭酸能を検出した。各試薬に被検菌を接種して, 35°C , 4 時間後に一時判定, さらに 24 時間後に最終判定として色調の変化を肉眼的に判定し, その生物型を I~VIII 型に分類した。 β -lactamase 産生の確認はニトロセフィン法で行った。薬剤感受性検査は NCCLS 法に準拠した微量液体希釈法の MICroFAST Panel Type 4J (DADE BEHRING) を用いてチョコレート寒天培地上の純培養菌を #0.5 McFarland の菌液として $100 \mu\text{l}$ 加え, 35°C , 18 時間好気培養後に被検菌の最小発育阻止濃度を求めた。ABPC に対する MIC 値が NCCLS 判定基準 $\geq 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ を耐性とし, かつ β -lactamase が陰性の被検菌を BLNAR と判定した。使用薬剤は ABPC, CVA/AMPC, Sulbactam/Ampicillin (SBT/ABPC), CCL (Cefaclor), CTM (Cefotiam), CTX, CZOP (Cefozopran), LVFX (Levofloxacin), CPFX (Ciprofloxacin), Meropenem (MEPM) を用いた。

分子生物学的解析は PCR による薬剤耐性遺伝子の検出および PFGE による系統樹解析を行った。被検菌をインフルエンザ菌遺伝子検出試薬 (湧永製薬) の PCR ミックスに接種し, 94°C 15 秒, 54°C 30 秒, 72°C 15 秒の 35 cycle で Gene Amp PCR System 9600-R (TaKaRa) を使用して増幅した。増幅産物 $10 \mu\text{l}$ を 1.5%-Agarose gel で 20 min 電気泳動後 Ethidium bromide 染色し, PCR ミックス A で 196 bp の *H. influenzae* 特異遺伝子 P6 の確認および 458 bp の TEM 型 β -lactamase 遺伝子の有無, PCR ミックス B

表1. 6 症例から検出された18株の由来と血清型, 生物型, 薬剤感受性検査, β -lactamase 産生能およびPCRによる薬剤耐性遺伝子の検出結果

症例	材料	生物型	血清型	ABPC	CVA/ AMPC	SBT/ ABPC	CCL	CTM	CTX	CZOP	LVFX	CPFX	MEPM	β -lac- tamase	PCR 判定
1	髄液	I	b	0.25	$\leq 1/0.5$	$\leq 0.5/0.25$	1	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	-	BLNAS
	扁桃粘液	I	b	0.25	$\leq 1/0.5$	$\leq 0.5/0.25$	1	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	-	BLNAS
	耳漏	I	b	0.25	$\leq 1/0.5$	$\leq 0.5/0.25$	1	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	-	BLNAS
2	髄液-1	IV	b	1	$\leq 1/0.5$	0.5/0.25	4	4	≤ 0.12	1	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	-	BLNAR
	髄液-2	IV	b	>4	2/1	>4/2	32	>8	0.25	2	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	+	BLPACR-II
	髄液-3	IV	b	>4	$\leq 1/0.5$	2/1	16	8	0.25	1	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	+	BLPACR-II
	静脈血	IV	b	>4	2/1	4/2	16	8	≤ 0.12	1	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	+	BLPACR-II
	鼻咽腔粘液	IV	b	>4	2/1	4/2	32	8	≤ 0.12	1	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	+	BLPACR-II
3	静脈血	I	b	>4	2/1	2/1	32	4	≤ 0.12	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	0.25	+	BLPACR-I
	髄液	I	b	>4	2/1	2/1	32	4	≤ 0.12	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	0.25	+	BLPACR-I
4	静脈血	I	b	>4	$\leq 1/0.5$	2/1	4	1	≤ 0.12	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	+	BLPAR
	髄液	I	b	>4	$\leq 1/0.5$	2/1	2	1	≤ 0.12	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	+	BLPAR
5	髄液	I	b	>4	$\leq 1/0.5$	1/0.5	1	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	+	BLPAR
	咽頭粘液	I	b	>4	$\leq 1/0.5$	1/0.5	2	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	+	BLPAR
6	咽頭粘液	I	b	0.25	$\leq 1/0.5$	$\leq 0.5/0.25$	2	1	≤ 0.12	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	-	BLNAR
	髄液-1	I	b	1	$\leq 1/0.5$	1/0.5	4	4	≤ 0.12	1	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	-	BLNAR
	髄液-2	I	b	0.25	$\leq 1/0.5$	$\leq 0.5/0.25$	2	2	≤ 0.12	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	-	BLNAR
	血液	I	b	0.25	$\leq 1/0.5$	$\leq 0.5/0.25$	2	2	≤ 0.12	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	-	BLNAR

で 551 bp の pbp 3-1 の変異を, PCR ミックス C で 451 bp の pbp 3-2 の変異の有無を検出した. なお, pbp 3-1 に変異があるものを Low-BLNAR, pbp 3-1 および pbp 3-2 に変異があるものと, pbp 3-2 に変異があるものを BLNAR と判定した. DNA サイズマーカーは 100 bp DNA Ladder (Roche) を使用した.

PFGE はチョコレート寒天培地で 35°C, 一夜炭酸ガス培養した被検菌をヘモフィルスサプリメント (栄研) を添加した Brain Heart Infusion Broth (日水) に接種し 35°C, 4 時間, 振とう培養後, 遠心洗浄した菌液に等量の Embedding Agarose (Bio-Rad) を加えアガロースプラグを作製した. Lysozyme/Lyso-staphin (Bio-Rad), Proteinase K (Bio-Rad) 処理後 TE Buffer で洗浄し, 制限酵素 *Sma*I 10 U/ μ l (Roche) で 30°C, 一夜消化した. 1%-PFGE Agarose にこのサンプルプラグを包埋した. 0.5×TBE buffer を 14°C で装置に循環させ Mitsuda らの方法⁸⁾に従い, パルスタイム 5~20 秒を 7 時間, 5~80 秒を 14 時間, 電圧 5.1 V/cm で CHEF-DRIII システム (Bio-Rad) を使用して電気泳動した. サイズマーカーは Lambda Ladder (Bio-Rad) を用いた. 電気泳動後, Ethidium bromide 染色し UV ランプ下でバンドパターンを観察した. さらに, ゲルバンドパターン解析ソフト (Bio-Rad) を使用して系統樹解析した.

II. 成績

1) 6 症例から検出された 18 株の検査材料, 血清型, 生物型, 薬剤感受性検査, β -lactamase 産生能および PCR による薬剤耐性遺伝子の検出成績

H. influenzae 18 株の材料と血清型, 生物型, 薬剤感受性検査成績, β -lactamase 産生能および PCR による薬剤耐性遺伝子の検出成績を示した (表 1). 血清型はすべて b 型で, 生物型は I 型が 5 症例, IV 型が 1 症例であった. NCCLS の判定基準で⁹⁾薬剤感受性検査成績および β -lactamase 産生能から BLNAS 6 株, low-BLNAR 2 株, BLPAR 10 株が検出された. これらの成績は PCR による薬剤耐性遺伝子検出成績と異なったため参考までとした.

2) PCR による薬剤耐性遺伝子の検出成績

PCR ミックス A, B, C で得られた増幅産物の電気泳動像から症例 1 の 3 株は BLNAS と判定した (図 1). 同様に判定すると, 症例 2 髄液-1 および症例 6 は PCR ミックス A で 458 bp の増幅産物は陰性, PCR ミックス B で 551 bp の増幅産物は陽性, PCR ミックス C で 451 bp の増幅産物は陽性で BLNAR, 症例 2 髄液-2, 髄液-3, 静脈血, 鼻咽腔粘液は PCR ミックス

A で 458 bp の増幅産物は陽性, PCR ミックス B で 551 bp の増幅産物は陽性, PCR ミックス C で 451 bp の増幅産物は陽性で BLPACR-II, 症例 3 は PCR ミックス A で 458 bp の増幅産物は陽性, PCR ミックス B で 551 bp の増幅産物は陰性, PCR ミックス C で 451 bp の増幅産物は陰性で BLPACR-I, 症例 4 および症例 5 は PCR ミックス A で 458 bp の増幅産物は陽性, PCR ミックス B で 551 bp の増幅産物は陽性, PCR ミックス C で 451 bp の増幅産物は陰性で BLPAR であった. なお, すべての株で PCR ミックス A で 196 bp の増幅産物は陽性であった. 以上から, BLNAS 3 株, BLNAR 5 株, BLPAR 4 株, BLPACR-I 2 株, BLPACR-II 4 株が検出され, 薬剤感受性検査成績および β -lactamase 産生能から判定した成績と 6 症例中 3 症例が異なっていた.

症例 2 は脳脊髄液から形態的特徴の異なる 3 種類のコロニーが観察され, 薬剤感受性検査成績および β -lactamase 産生能から low-BLNAR および 2 種類の BLPAR と判定したが, PCR の成績からは BLNAR および 2 種類の BLPACR-II と判定した. 症例 3 は薬剤感受性検査成績および β -lactamase 産生能から BLPAR と判定したが, PCR の成績からは BLPACR-I と判定した. 症例 6 は薬剤感受性成績および β -lactamase 産生能から BLNAS および low-BLNAR が同一症例から検出されたが, PCR の成績からはすべて BLNAR と判定した.

3) PFGE 解析

6 症例から検出された *H. influenzae* 18 株を電気泳動した結果 400 kbp から約 48.5 kbp の間にバンドが

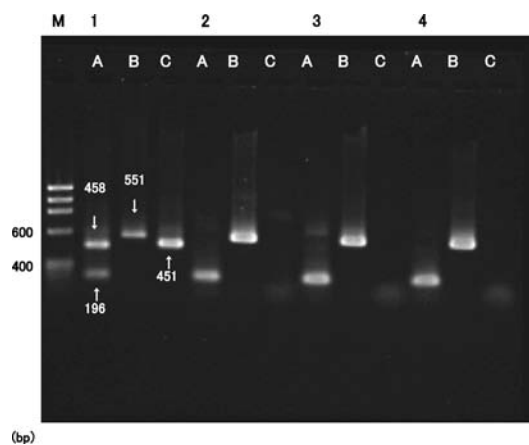


図 1. PCR による薬剤耐性遺伝子の検出結果
M) marker, 1) 陽性コントロール, 2) 症例 1 髄液, 3) 症例 1 扁桃粘液, 4) 症例 1 耳漏

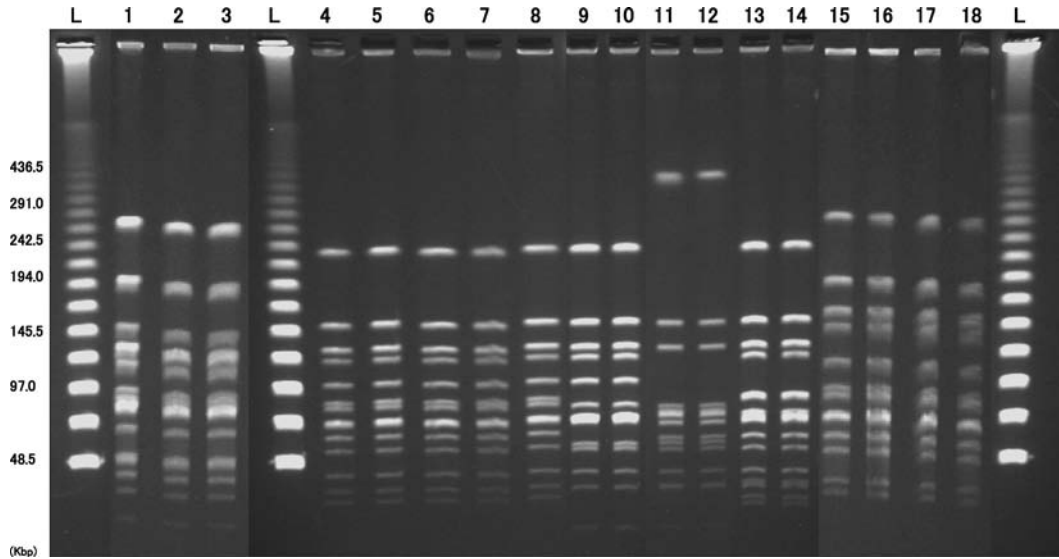


図2. 6症例より分離された *H. influenzae* の PFGE 解析結果

L) λ -ladder, 1) 症例1 髄液, 2) 症例1 扁桃粘液, 3) 症例1 耳漏, L) λ -ladder, 4) 症例2 髄液-1, 5) 症例2 髄液-2, 6) 症例2 髄液-3, 7) 症例2 静脈血, 8) 症例2 鼻咽腔粘液, 9) 症例3 静脈血, 10) 症例3 髄液, 11) 症例4 静脈血, 12) 症例4 髄液, 13) 症例5 髄液, 14) 症例5 咽頭粘液, 15) 症例6 髄液-1, 16) 症例6 髄液-2, 17) 症例6 咽頭粘液, 18) 症例6 血液, L) λ -ladder

検出され (図2), Tenover らの判定基準⁹⁾およびゲルバンドパターン解析ソフトで系統樹解析した成績から, 症例ごとの一致率は80%以下であったが, 同一症例の異なる検体から検出された株はすべて100%一致した。

III. 考 察

国内では, BLNAR は急速に増加し続け *H. influenzae* の1割程度を占める BLPAR をはるかに超え2~3割が BLNAR と報告されている¹⁰⁾。今回, 検討した化膿性髄膜炎6症例のうち2症例は薬剤耐性遺伝子の検索から β -lactamase 産生に加え PBP に変異のある BLPACR-I および BLPACR-II が検出された。砂川ら¹⁾は1997年7月以降3年間に髄液から検出された *H. influenzae* について BLNAS 29%, BLNAR 29%, BLPAR 42%と報告し BLPACR-I および BLPACR-II は検出されていないことから, 筆者らが検討した2001年7月から2004年10月間までに β -lactamase 産生株においても PBP の変異による薬剤耐性化が進んでいることがうかがえた。

H. influenzae による化膿性髄膜炎のほとんどが莢膜保有の *H. influenzae* type b (Hib) によって引き起こされることが知られている¹¹⁾。検討した6症例は髄液だけでなく, 血液, 口腔など複数材料由来株を含め

た18株の血清型もすべてb型で莢膜保有株であり, 国内では, このHibによる化膿性髄膜炎の発症頻度は年々増加傾向にあるが, 諸外国ではHib結合型ワクチンの導入によりHibによる小児重症感染症は激減している^{11, 12)}。生物型はI型が5症例, IV型が1症例で, 呼吸器検体由来株で多いII, III型やその他のV~VIII型は検出されなかった。今回の成績はMitsudaらの報告⁸⁾のI型73.3%, II型20.0%, IV型6.7%のようにI型が多く検出されたが, II型は検出されなかった。川上¹³⁾の各種臨床材料由来別生物型分布状況によると髄液および血液からの分離株はI型に限局し, プラスミド性のTEM-1 type β -lactamase 産生株はI型およびII型に集中する傾向にあるとされている。以上の血清型, 生物型の成績から化膿性髄膜炎症例から検出された *H. influenzae* の特徴は莢膜保有のHibでTEM-1 type β -lactamase 産生株が6症例中4症例から検出され, 生物型はI型に集中する傾向があった。

PBP 変異株において, その薬剤耐性を薬剤感受性検査成績だけで検出することは難しいことが知られ, PCR での薬剤耐性遺伝子の検出が有用となる^{3, 4)}。今回の症例2, 症例3, 症例6についてもABPCあるいはCVA/AMPCの薬剤感受性成績からPBP変異株であるBLNAR, BLPACR-I および BLPACR-II を検出で

きず PCR で *ftsI* 遺伝子の変異を検出し得た。おそらく、変異した遺伝子発現がうまく調節されていなかったのであろう。

近年, fluoroquinolone 耐性 *H. influenzae* が報告され, その耐性機序が解析されつつあるが¹⁴⁾, 今回, LVFX および CPMX に耐性株はなかった。

症例 2 の髄液は遠心した沈渣を培養したところチョコレート寒天培地上に, 一般的な *H. influenzae* のコロニーに比べ小さく盛り上がったコロニーの BLNAR と, 比較的大きく平坦な粘稠性の高いコロニーの BLPACR-II が検出された。BLNAR においては *ftsI* 遺伝子変異により菌分裂時の隔壁形成にかかわるとされる *pbp 3-1* と *pbp 3-2* 変異の影響で特徴的な小さく盛り上がったコロニーを形成することが知られている¹⁵⁾。症例 2 のように髄液などの無菌的材料から数種類の起原因菌が検出されることはまれである。しかし, Chaves ら¹⁶⁾は化膿性髄膜炎症例から血清型の異なった 2 種類の *S. pneumoniae* を検出し, PFGE 解析から複数株感染によるものであったことを報告している。このことから, 髄液などの分離培養においても複数起原因菌による感染も考慮してコロニーをよく観察し, 次の検査へ進むことが大切である。

化膿性髄膜炎の病態は菌種に関係なく莢膜保有の起原因菌が侵入門戸とされる上気道粘膜から血流に侵入して敗血症の状態になり脈絡叢を介して髄腔に侵入し発症するとされている。そこで, 髄液から検出された起原因菌と考えられる *H. influenzae* と, 同一症例の上気道および血液などの複数の検体から検出された *H. influenzae* が同一株かどうか解析した結果, 各症例の複数検体から検出された *H. influenzae* はすべて莢膜保有の Hib で生物型もすべて同一であった。症例 2 以外は PCR による薬剤耐性遺伝子の保有も同一の成績が得られた。PFGE では症例間では異なる泳動パターンを示したが, 同一症例の由来の異なる複数検体から検出された株はすべて同一泳動パターンを示した。すなわち, 化膿性髄膜炎症例では髄液, 血液および上気道由来検体に同一の Hib を保有しており, 上気道などの粘膜細胞に付着した *H. influenzae* のうち莢膜保有の Hib が最初のバリエーションである粘膜組織を潜り抜け血液から脳脊髄液へと侵入し発症した過程が推測された¹⁷⁾。

また, 症例 2 の髄液から同時に検出された BLNAR と BLPACR-II は PFGE による系統樹解析からは同一株由来と判定された。しかし, コロニー形態, 薬剤感受性検査成績および TEM-1 type β -lactamase 産生能は異なっていた。BLNAR と BLPACR-II はともに

PBP 変異を生じており, その違いは TEM-1 type β -lactamase 産生能である。*H. influenzae* が産生する TEM-1 type β -lactamase はプラスミド性であることが知られ¹⁸⁾, *Escherichia coli* においてはプラスミド保有は菌の発育増殖に抑制的に働くことが報告されている¹⁹⁾。一方, PFGE ではプラスミド性 DNA を解析対象としていないことから, TEM-1 type β -lactamase 産生能の有無は PFGE でバンドパターンに違いがでなかったと考えられ BLNAR と BLPACR-II は同一株由来と判定できる。

文 献

- 1) 砂川慶介, 野々山勝人, 高山陽子, 他. 2001. 本邦における 1997 年 7 月以降 3 年間の小児化膿性髄膜炎の動向. 感染症学雑誌 75: 931-939.
- 2) 生方公子. 2001. インフルエンザ菌性髄膜炎における起原因菌の急速な耐性化とその特徴. Infection Agents Surveillance Report 23: 36-37. 国立感染症研究所感染症情報センター.
- 3) 生方公子, 千葉菜穂子, 小林玲子, 他. 2002. 本邦において 1998 年から 2000 年の間に分離された *Haemophilus influenzae* の分子疫学解析—肺炎球菌等による市中感染症研究会収集株のまとめ—. 日本化学療法学会雑誌 50: 794-804.
- 4) 宇野芳史. 2004. 小児急性中耳炎症例の鼻咽腔から検出された *Haemophilus influenzae* の分子遺伝学的検討. 日化療会誌 52: 163-168.
- 5) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighth informational supplement. NCCLS document M 100-S8, 1998.
- 6) 満田年宏. 2002. 感染対策のための分子疫学入門—パルスフィールドゲル電気泳動法を中心に. p. 12-29. メディカ出版, 大阪.
- 7) Juni, B. A. 1982. Rapid biotyping of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* with Patho Tec strips and spot biochemical test. J. Clin. Microbiol. 15: 976-978.
- 8) Mitsuda, T., H. Kuroki, N. Ishikawa, et al. 1999. Molecular epidemiological study of *Haemophilus influenzae* serotype b strains obtained from children with meningitis in Japan. J. Clin. Microbiol. 37: 2548-2552.
- 9) Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33: 2233-2239.
- 10) 渡辺 彰. 2001. アンピシリン耐性インフルエンザ菌. 臨床検査 45: 821-826.
- 11) 中村 明, 石川信康, 黒木春郎, 他. 1989. 本邦における髄膜炎を主とする全身感染症由来インフル

- エンザ菌株の性状について. 日本小児科学会雑誌 93: 890-897.
- 12) 細菌性髄膜炎2001現在. 2001. Infection Agents Surveillance Report. 23: 31-32. 国立感染症研究所感染症情報センター.
- 13) 川上由行. 1996. 生物型別 *Haemophilus influenzae*. 臨床と微生物 23: 738-741.
- 14) Xinying, L., M. Noriel, J. J. Rahal, et al. 2004. Quinolone-resistant *Haemophilus influenzae*: determination of mutant selection window for ciprofloxacin, garenoxacin, levofloxacin, and moxifloxacin. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 4460-4462.
- 15) 生方公子, 千葉菜穂子, 中山信子, 他. 1999. 薬剤耐性機構からみた 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 (BLNAR) の特徴. 日本臨床微生物学雑誌 9: 22-29.
- 16) Chaves, F., C. Campelo, F. Sanz, et al. 2003. Meningitis due to mixed infection with penicillin-resistant and penicillin-susceptible of *Streptococcus pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 41: 512-513.
- 17) Ecevit, I. Z., K. W. McCrea, M. M. Pettigrew, et al. 2004. Prevalence of the *hifBC*, *hmw1A*, *hmw2A*, *hmwC*, and *hia* genes in *Haemophilus influenzae* isolates. J. Clin. Microbiol. 42: 3065-3072.
- 18) Hindler, F. J., M. J. Swenson. 2003. Susceptibility test methods; Fastidious bacteria. Manual of Clinical Microbiology 8th Edition: 1128-1140. Washington, D.C.
- 19) Oscar, T.P., K. Dulal, D. Boucaud. 2006. Transformation of *Escherichia coli* K-12 with a high-copy plasmid encoding the green fluorescent protein reduces growth: implications for predictive microbiology. J. Food Prot. 69: 276-281.

Phylogenetic and Drug Resistant Gene Analysis of *Haemophilus influenzae* from Bacterial Meningitis —Same Original or Different Specimen

Akiko Nobata,¹⁾ Syoji Moriki,¹⁾ Hidehiko Moriyama,¹⁾ Hiroshi Shibata,¹⁾ Junichi Masuda²⁾

¹⁾ Shimane University Hospital Central Clinical Laboratory

²⁾ Shimane University School of Medicine Laboratory Medicine and Central Clinical Laboratory

We report phenotypic and genetic relationship of *Haemophilus influenzae* strains derived from cerebrospinal fluid (CSF), blood, and the nasopharynx in each patient of the 6 children with meningitis. We analyzed these isolates by serotyping, biotyping, antimicrobial susceptibility testing and PCR to identify resistant genes in *H. influenzae*. Case 2 had β -lactamase non-producing ABPC-resistant strain (BLNAR) and β -lactamase producing CVA/AMPC-resistant strain possessing TEM-1 and BLNAR-resistant genes (BLP-ACR-II) in the nasopharynx. The two strains exhibited same PFGE profiles. One patient had β -lactamase non-producing ampicillin (ABPC) susceptible strains (BLNAS), 2 patients had TEM-1 type β -lactamase producing ABPC resistant strains (BLPAR), 1 patient had β -lactamase producing clavulanic acid/amoxicillin (CVA/AMPC) resistant strains possessing TEM-1 and low-BLNAR resistant genes (BLPACR-I), and 1 patient had BLNAR. PFGE showed the same patterns among isolates from individual patients. Our results suggest that the same clone of *H. influenzae* could systematically expand causing bacterial meningitis.