

[総 説]

小児気道感染症におけるインフルエンザ菌のトピックス

矢野寿一¹⁾・角田梨紗子²⁾・小澤大樹²⁾・中野竜一¹⁾

¹⁾ 奈良県立医科大学微生物感染症学講座

²⁾ 東北大学病院耳鼻咽喉・頭頸部外科

(平成 27 年 8 月 10 日受付)

気道は生体が外界と接する最前線であることから、微生物の侵襲を受けやすく、感染症の好発部位であり、様々な感染性疾患がみられる。その原因となる病原微生物のひとつにインフルエンザ菌があり、市中呼吸器感染症を起こす菌として重要である。本稿では、インフルエンザ菌について、血清型、耐性機序、耐性菌の動向などの基本的事項から、バイオフィーム産生能、細胞侵入性に加え、*Haemophilus haemolyticus* の問題点や Neutrophil extracellular traps (NETs) など最近の話題までとりあげて紹介する。

Key words: インフルエンザ菌, 薬剤耐性, 市中感染症

I. はじめに

Haemophilus influenzae (インフルエンザ菌) は肺炎などの市中呼吸器感染症の主要な原因菌のひとつであり、急性中耳炎・副鼻腔炎や小児化膿性髄膜炎を起こす菌としても重要である。従来は、ペニシリンを良好な基質として加水分解する β-ラクタマーゼ (ペニシリナーゼ) を産生し、ペニシリンに耐性を示す菌株が耐性菌の主流であったが、近年 β-ラクタマーゼ非産生で ampicillin (ABPC) 耐性 (β-lactamase-negative ABPC resistant ; BLNAR) *H. influenzae* が 2000 年以降、我が国で急速に増加した。本稿では、気道感染症の主な原因となる無莢膜型 *H. influenzae* を中心に、最近のトピックスを含め紹介したい。

II. *H. influenzae* とは

H. influenzae は、1892 年 Pfeiffer によって、ヨーロッパ大陸で大流行中のインフルエンザ患者喀痰から分離された菌である。1930 年代にインフルエンザウイルスが発見されるまでこの疾患の原因菌と誤解され

ていたことが本菌名の由来である。

H. influenzae は *Haemophilus* 属に属する菌種であるが、この属の中でヒトに感染を起こす主要な病原菌である。0.2~0.5 μm の非運動性、無芽胞性のグラム陰性小桿菌で、鏡検により本菌の推定は可能である。チョコレート寒天培地を用いた炭酸ガス培養で、露滴状の円形で光沢のあるコロニーを形成し、ヒツジ血液寒天培地での非発育、ウマ血液寒天培地での非溶血、X・V 因子要求性ではほぼ同定される。

III. 病原性

H. influenzae は、莢膜の有無により莢膜型 (typable) と無莢膜型 (non-typable) に分類され、さらに、莢膜型 *H. influenzae* は莢膜多糖体の抗原性から a~f の 6 つの血清型に分けられる。莢膜は重要な病原因子であり、侵襲性の全身感染症を起こすのは b 型菌 (Hib) である。Hib はヒトに対する病原性が強く組織侵入性も高いため、小児における化膿性髄膜炎、敗血症、急性喉頭蓋炎、骨髄炎、あるいは関節炎などの原因菌として重要である。一方、無莢膜型 *H. influenzae* (non-typable *H. influenzae* ; NTHi) は、敗血症を伴わない肺炎や気管支炎、急性中耳炎、副鼻腔炎などの原因菌となる。

IV. β-ラクタム耐性

H. influenzae における β-ラクタム耐性は、1) β-ラ

著者連絡先：(〒634-8521) 奈良県橿原市四条町 840
奈良県立医科大学微生物感染症学講座
矢野寿一
TEL: 0744-29-8839
FAX: 0744-29-8839
E-mail: yanohisa@naramed-u.ac.jp

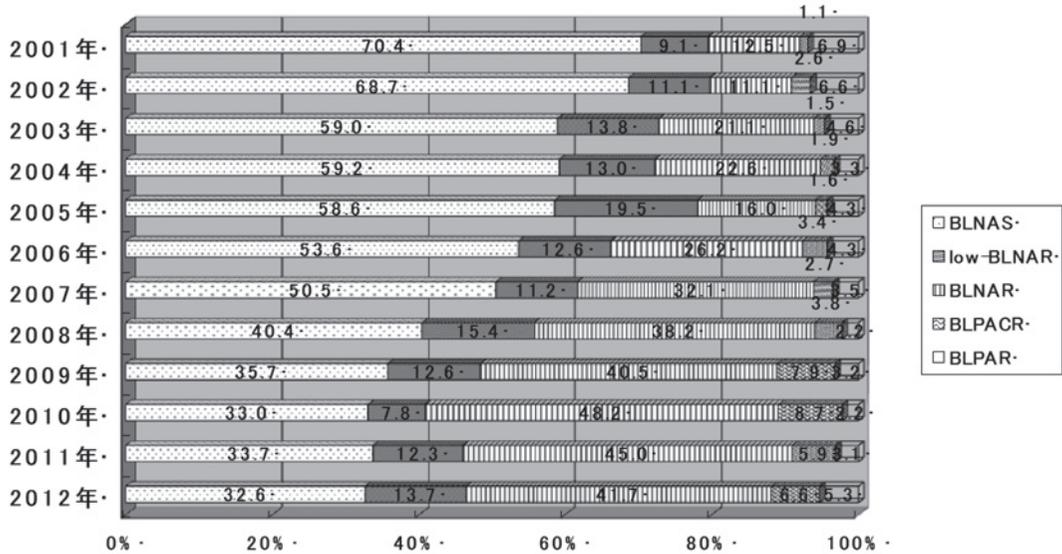


図1. インフルエンザ菌の時期別分離頻度 (2歳以下 41,751株) (著者データより)

クタマーゼによる加水分解, 2) β -ラクタム系薬の標的部位である細胞壁合成酵素 (penicillin binding protein: PBP) の変異, という2つの機序によるが, β -ラクタマーゼ産生性, ABPCおよび amoxicillin (AMPC)/clavulanic acid (CVA) への感受性から, BLNAS (β -lactamase-negative ABPC susceptible), low-BLNAR (または BLNAI: β -lactamase-negative ABPC intermediate resistant), BLNAR, BLPAR (β -lactamase-positive ABPC resistant), BLPACR (β -lactamase-positive AMPC-CVA resistant) に分類される。

H. influenzae の産生する β -ラクタマーゼは, Ambler のクラス分類¹⁾でクラス A 型 β -ラクタマーゼで, プラスミド上に存在する TEM-1, もしくは ROB-1 遺伝子にコードされている²⁾。この酵素は, ペニシリン系薬を良好な基質として加水分解し, セフェム系薬やカルバペネム系薬の分解は苦手としている。また, β -ラクタマーゼ阻害剤である CVA や sulbactam によって強力に阻害される。 β -ラクタマーゼ産生による ABPC 耐性 *H. influenzae* は, 1974 年に米国で初めて報告された³⁾。しかし, セフェム系薬あるいは β -ラクタマーゼ阻害剤との合剤は, 本酵素産生株に対し強い抗菌力を示すことから, 臨床でそれほど問題視されることはなかった。

ところが 1980 年に β -ラクタマーゼ非産生でありながら ABPC に耐性を示す株, すなわち BLNAR が米

国で分離された⁴⁾。BLNAR の耐性機序は, β -ラクタム系薬の標的部位である PBP を変異させ, この酵素への β -ラクタム系薬の親和性を低下させることによるもので, *H. influenzae* の場合, PBP3 をコードしている *ftsI* 遺伝子を変異させている。PBP3 はセフェム系薬の主な標的酵素であり, この酵素への薬剤の親和性を低下させた BLNAR は, ペニシリン系薬のみならずセフェム系薬にも耐性を示しうる点で臨床問題となっている。

また, β -ラクタマーゼを産生し β -ラクタマーゼ阻害薬に耐性を示す BLPACR が 1997 年に報告された⁵⁾。当初, そのメカニズムはインフルエンザ菌の産生する β -ラクタマーゼの活性もしくは基質特異性の変化が考えられた。しかし, その後の研究により現在では β -ラクタマーゼ産生性の PBP 変異株であることが明らかになっている。

欧米諸国では, *H. influenzae* の ABPC 耐性機序は, β -ラクタマーゼ産生によるものが主であり, BLNAR 株はそれほど見られないことに対して, 本邦においては, BLNAR 株の分離頻度が高いという特徴がある^{6)~9)}。

V. 耐性インフルエンザ菌の動向

我が国における β -ラクタマーゼ産生株の分離率は 1990 年頃まで徐々に上昇し 20% 台に達したが, その後, 頻度は低下し多くの施設で 5% 以下となったが,

近年は10%前後で推移している。一方、BLNARあるいはlow-BLNARの分離率は2010年頃まで大きく上昇し、*H. influenzae* 感染症難治化のひとつの要因となっている。

筆者らが2001年より2012年までに宮城県で調査したデータ(2歳以下の耳鼻咽喉科クリニック由来41,751株)でも、2010年頃までBLNARが増加傾向にあり、感性株は30%程度になっている(図1)。また、この頃よりβ-ラクタマーゼ産生株の分離頻度が10%ほどで推移している。

海外においては、米国やヨーロッパでのBLNARの分離率は非常に低く、現在のところ分離率が高いのは、本邦や韓国など一部の国のみとなっている。

VI. 市中での伝播

H. influenzae は市中感染の原因菌であり、気道分泌物による飛沫感染、接触感染により、ヒトからヒトへと伝播する。家庭や幼稚園・保育所などの集団保育、病院の待合室などといった濃厚な接触が起こりうる場所で容易に伝播することが証明されている^{10)~12)}。特に保育園における伝播が問題視され、抵抗力の弱い免疫学的に未熟な低年齢児が、耐性菌を保育園内でやりとりし、難治性感染症を発症している。また、保育園で流行する株は、一つの株が長期に居座るのではなく、1~3ヶ月単位でターンオーバーし、次々と pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 型の異なる株が流行することが明らかとなっている¹⁰⁾。同様に、園児個人においても、原因菌はエピソードごとにターンオーバーしており、すなわち、市中感染症の治療に際しそれぞれのエピソードごとに原因菌検索を行う必要がある。

VII. 市中での流行株

本邦および海外における特定のクローン流行の有無には、時期、地域、人種など様々な要因が関連してくる。筆者らは、2011年から2012年にかけて本邦で分離された *H. influenzae* を収集し、その動向を調査してみた¹³⁾。ただし、収集した株は3歳以下の小児急性中耳炎症例の中耳貯留液由来株である。157株収集し、微量液体希釈法による薬剤感受性試験の結果、ABPC耐性株の割合は68.8%(108株)を占めていた。その内訳として、low-BLNARが42株(26.7%)、BLNARが53株(33.8%)、BLPARが7株(4.5%)、BLPACRが6株(3.8%)であり、耐性株の割合としては、上述した宮城県のみ調査とほぼ同様であった(ただし、宮城県の調査では対象が0~2歳で、本調査

と対象年齢が一部異なることから本来は比較できない)。次に、ABPCのMICが4μg/ml以上であった66株について multilocus sequence typing (MLST) 解析を行ったところ、39種類の異なるSTに分類され、地域分布の明らかな偏りもみられず、遺伝子学的に多様性を示した。海外での調査であるが、市中における小児鼻腔ぬぐい液、肺炎症例の吸引液を対象にMLSTを行った報告が海外から少数ながら見られ、本研究と同様にインフルエンザ菌のSTは多様性を示すものであり、本研究で検出されたSTとの重複もほとんど見られず^{14)~16)}、本邦、海外における市中感染症由来インフルエンザ菌は、多様なクローンから構成されていると言える。

また、ABPCのMICが8μg/ml以上であったABPC高度耐性株(43株:BLNAR 30株、BLPAR 7株、BLPACR 6株)についてPFGE型別を行ったところ、40のPFGEパターンを示し、MLST同様、多様性を示す結果であった。しかしながら、その一部に遺伝子学的関連性があると考えられる2つの小さなクラスターが認められ、それらはそれぞれST161(3株)とST549(2株)に属するNTHiであった。García-Cobosらは、スペインにおいて小児の中耳炎や結膜炎に関連のあるBLNAR株によるクラスターが存在することを報告している¹⁷⁾。また、Hotomiらは、本邦における全年齢層の上気道より収集したABPC耐性 *H. influenzae* のクラスターについて報告している¹⁸⁾。本研究においても同様に、中耳炎の原因となった *H. influenzae* は多様性を示しながらも、高度耐性株の一部に同一クローンが存在するようである。

本研究において、MLSTとPFGE双方において一部を除き多様性を示す結果であったことは、これまでのいくつかの報告で言われているように、BLNAR株の増加は特定クローンの広がりによるものではなく、広汎な抗菌薬使用によりそれぞれ独自に出現してきた、という考えを支持するものであると思われる¹⁷⁾¹⁸⁾。しかしながら、ABPC高度耐性 *H. influenzae* の小規模のクラスターが認められたことは注目すべき点である。これまでのところ、ST161、ST549によるクラスター形成の報告はされていないが、データベース(<http://haemophilus.mlst.net>)から得られる情報によるとST161、ST549共に血液から検出された株として登録されており、侵襲性感染症を引き起こす病原性の高い株である可能性も考えられる。また、ST549のように同じクローンであってもアミノ酸置換部位が異なっているものも確認でき(data not shown)、今後もアミノ酸置換を繰り返し、さらなるABPC耐性

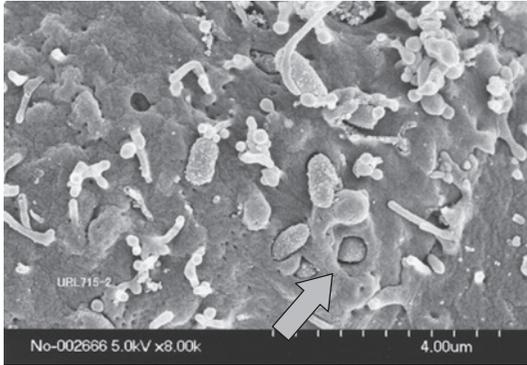


図2. *H. influenzae* 接種後の気管支上皮培養細胞表面～走査型電子顕微鏡像～
(長野県立須坂病院 感染制御部, 呼吸器・感染症内科 山崎善隆先生より供与)

が進むことも充分考えられる。今後、このような侵襲性の強い高度耐性株が流行した場合、小児感染症における重症例や遷延例の増加が懸念される。そのようなことを未然に防ぐために、今回クラスターを形成した高度耐性株である ST161 と ST549 の細菌学的特徴、すなわち、薬剤感受性、病原性、接着性、バイオフィーム形成能、細胞内侵入性などについての早急な評価が必要である。

VIII. バイオフィーム, 細胞内侵入性

近年, *H. influenzae* 感染症の難治化, 遷延化の原因として, 薬剤耐性化に加え, *H. influenzae* がバイオフィームを形成すること, あるいは細胞内に侵入すること (図2) で, 投与されたβ-ラクタム系薬からエスケープすることが示唆されている。

Moriyama らは, 小児急性中耳炎から分離されたインフルエンザ菌のうち 84% がバイオフィームを産生し, AMPC で改善しない患者群にバイオフィーム産生能が優位に高いインフルエンザ菌が分離されたことを報告している¹⁹⁾。また, 筆者らの研究では, 74 株の小児急性中耳炎由来のインフルエンザ菌のうち, 46 株 (62.2%) が BEAS-2B 細胞に侵入能を有していた²⁰⁾。本研究では有意差はでなかったものの, 重症例, 遷延例から分離されるインフルエンザ菌の細胞内侵入性が高い傾向が見られ, インフルエンザ菌の細胞内侵入が臨床所見に何らかの役割を果たしていることが示唆される。

IX. *Haemophilus haemolyticus* の問題点

H. influenzae は気道感染症の重要な原因菌の一つであるが, *Haemophilus haemolyticus* は常在菌として, ほとんど病原性を有しないとされる (時に *H. haemolyticus* が侵襲性感染症の原因となることもある²¹⁾)。この2菌種の鑑別法であるが, 馬血液寒天培地で *H. haemolyticus* が溶血性を示すことで *H. influenzae* と識別されてきた (ともに X, V 因子要求性)。しかし近年, 馬血液非溶血性 *H. haemolyticus* が存在することが明らかとなっている²¹⁾。抗菌薬適正使用の観点からは, この2菌種を識別し不要な抗菌薬投与を避ける必要がある。

H. haemolyticus との識別には, *sodC*, *fucK*, *hpd*, 16S rRNA gene シークエンスなどの遺伝子検索が必要で, *sodC* は *H. haemolyticus* の多くが, *fucK*, *hpd* は *H. influenzae* の多くが保有していることが知られている²²⁾。しかし, 現時点では 100% 鑑別できる方法は確立されておらず, 種々の方法を組み合わせ, その同定確率を上げているのが現状であり, しかも, これらの方法による鑑別は労力がかかり病院検査室で実施するのは現実的ではない。

H. haemolyticus の分離状況であるが, 成人 COPD を対象とした調査では, 16S rRNA 遺伝子シーケンス, MLST, DNA-DNA ハイブリダイゼーション, P6 シークエンスにより同定を行い, 病院検査室で *H. influenzae* として同定された 490 株のうち, 喀痰の 39.5%, 上咽頭の 27.3% が *H. haemolyticus* であったことを報告している²¹⁾。小児では, 6~36 ヶ月の乳幼児におけるノーマルフローラでの調査があり, 312 株の *Haemophilus* 属 (X, V 要求性) について, *sodC*, *fucK*, *hpd* 遺伝子解析で分類したところ, 312 株中 236 株 (75%) が *H. influenzae*, 61 株 (20%) が *H. haemolyticus* であり, *H. haemolyticus* のうち 49 株 (80.3%) が非溶血性を示し, さらに全体の 15/312 (5%) が同定不能という結果が報告されている²²⁾。

Murphy らによると, 小児急性中耳炎の中耳貯留液から *H. influenzae* と同定された 130 株中に *H. haemolyticus* はみられなかったが, 鼻汁 44 株中 12 株 (27.3%) は *H. haemolyticus* であったとのことである²¹⁾。また, Kirkham らは, 鼻汁 266 株中 31 株 (11.7%) が *H. haemolyticus* であったが, 中耳貯留液からは *H. haemolyticus* は分離されなかったと報告し, さらに中耳炎の原因菌にはならないが otitis-prone の小児の鼻に *H. haemolyticus* がコロナイズしている傾向にあったことを述べている²³⁾。前述の筆者らの研究では, 中耳から分離された 157 株を *fucK* で全株スク

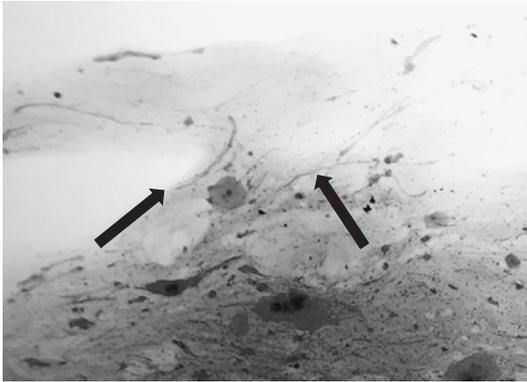


図3. NETsと考えられる網目状構造物 (矢印)

リーニングしたところ4株で陰性であったため、4株の16SrRNAの約1,500 bpの塩基配列を決定し、4株とも*H. influenzae*と確認した¹³⁾。すなわち、海外からの報告同様、中耳貯留液から*H. haemolyticus*は分離されなかった。

すなわち、小児領域における非溶血性*H. haemolyticus*は、鼻汁検体に多いが中耳貯留液からは稀であることから、耳鼻咽喉科医が中耳貯留液を採取した場合は*H. influenzae*としてこれまでの対応でよいのではと考えられる。一方、鼻汁から検体を採取した場合は、*H. haemolyticus*が含まれていた場合は鑑別が困難であることから、むしろ小児科医の方が対応は難しいと思われる。ただ、溶血性を示さなくなったということは、一部の病原性が減弱している可能性が考えられ、むしろ望ましい現象なのかもしれない。しかし、otitis-prone症例の鼻汁に多い傾向が報告されるなど²³⁾、indirect pathogenとしての働きも示唆されることから、今後の解析と病院検査室で可能な鑑別方法の確立が待たれる。

X. Neutrophil extracellular traps (NETs)

最近話題のトピックスとして、2004年にBrinkmannらによりNeutrophil extracellular traps (NETs)という好中球の新しい機能が初めて報告された²⁴⁾。感染により活性化された好中球が自らのDNAやgranule proteinを含む網目状の構造物NETsを放出する現象である(図3)。NETsには、DNAやヒストン、好中球エラスターゼなどが含まれ²⁵⁾、体内に侵入した病原体などを網目状構造物で物理的に捕捉し、NETs上に存在する抗菌蛋白質によって効率的に殺菌する。NETsは*H. influenzae*感染症に特異的な現象ではないが、グラム染色により炎症所見、重症度などの相

関があることが示唆され、今後、病態評価、治療方針選択の新しい指標の一つとなる可能性が期待される。

一方で、NTHiはNETsを誘導するが慢性および反復性中耳炎においてはNETsの中で生存しNTHiを排除できないとする報告²⁶⁾や、NETs内で形成されたNTHiのバイオフィームはNTHiによるチンチラモデル中耳炎を持続させたという報告²⁷⁾もみられる。また、NETsそのものが組織障害に関与し、かえって重症度を高めてしまうとの報告もあり、これは好中球エラスターゼによる組織障害と考えられている²⁸⁾。このような症例には、ステロイドなどの局所投与が有効であることも充分示唆されることから、今後の臨床研究が待たれる。

XI. おわりに

気道感染症の原因となる*H. influenzae*、主にNTHiについての薬剤耐性、疫学、最近のトピックスについて述べた。*H. influenzae*は、いまだ未知の現象も多く、これから解析が進むことが期待される。

文 献

- 1) Ambler, RP. 1980. The structure of β -lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 289: 321-331.
- 2) Tristram, S, MR Jacobs, PC Appelbaum. 2007. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. Clin Microbiol Rev 20: 368-389.
- 3) Thomas, WJ, JW McReynolds, CR Mock, et al. 1974. Letter: Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* meningitis. Lancet 1: 313.
- 4) Markowitz, SM. 1980. Isolation of an ampicillin-resistant, non- β -lactamase-producing strain of *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 17: 80-83.
- 5) Doern, GV, AB Brueggemann, G Pierce, et al. 1997. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of β -lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: results of a national multicenter surveillance study. Antimicrob Agents Chemother 41: 292-297.
- 6) Karlowsky, JA, IA Critchley, RS Blosser-Middleton, et al. 2002. Antimicrobial surveillance of *Haemophilus influenzae* in the United States during 2000-2001 leads to detection of clonal dissemination of a β -lactamase-negative and ampicillin-resistant strain. J Clin Microbiol 40: 1063-1066.
- 7) Dabernat, H, C Delmas. 2012. Epidemiology and evolution of antibiotic resistance of *Haemophilus influen-*

- zae in children 5 years of age or less in France, 2001-2008: a retrospective database analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 2745-2753.
- 8) Sanbongi, Y, T Suzuki, Y Osaki, et al. 2006. Molecular evolution of β -lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2487-2492.
 - 9) Hoshino, T, Y Sato, Y Toyonaga, et al. 2013. Drug-resistant pathogen surveillance group in pediatric infectious disease: Nationwide survey of the development of drug resistance in the pediatric field in 2007 and 2010: drug sensitivity of *Haemophilus influenzae* in Japan (second report). *J Infect Chemother* 19: 495-503.
 - 10) Yano, H, M Suetake, A Kuga, et al. 2000. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of nasopharyngeal flora in children attending a day care center. *J Clin Microbiol* 38: 625-629.
 - 11) Hoshino, K, H Watanabe, R Sugita, et al. 2002. High rate of transmission of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* between parents and children. *J Clin Microbiol* 40: 4357-4359.
 - 12) Ito, M, M Hotomi, Y Maruyama, et al. 2010. Clonal spread of β -lactamase-producing amoxicillin-clavulanate-resistant (BLPACR) strains of non-typeable *Haemophilus influenzae* among young children attending a day care in Japan. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 74: 901-906.
 - 13) Kakuta, R, H Yano, H Hidaka, et al. Molecular epidemiology of ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* causing acute otitis media in Japanese infants and young children. *Pediatr Infect Dis J* (in press).
 - 14) Tian, G, L Zhang, M Li, et al. 2009. Genotypic characteristics of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric pneumonia patients in Chengdu city, Sichuan, China. *J Microbiol* 47: 494-497.
 - 15) Kaur, R, A Chang, Q Xu, et al. 2011. Phylogenetic relatedness and diversity of non-typable *Haemophilus influenzae* in the nasopharynx and middle ear fluid of children with acute otitis media. *J Med Microbiol* 60: 1841-1848.
 - 16) Puig, C, L Calatayud, S Martí, et al. 2013. Molecular epidemiology of nontypeable *Haemophilus influenzae* causing community-acquired pneumonia in adults. *PLoS One* 8: e82515.
 - 17) García-Cobos, S, J Campos, E Lázaro, et al. 2007. Ampicillin-resistant non- β -lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2564-2573.
 - 18) Hotomi, M, K Fujihara, DS Billal, et al. 2007. Genetic characteristics and clonal dissemination of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains isolated from the upper respiratory tract of patients in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 3969-3976.
 - 19) Moriyama, S, M Hotomi, J Shimada, et al. 2009. Formation of biofilm by *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric intractable otitis media. *Auris Nasus Larynx* 36: 525-531.
 - 20) Yano, H, Y Yamazaki, L Qin, et al. 2013. Improvement rate of acute otitis media caused by *Haemophilus influenzae* at one week is significantly associated with the time to recovery. *J Clin Microbiol* 51: 3542-3546.
 - 21) Murphy, TF, AL Brauer, S Sethi, et al. 2007. *Haemophilus haemolyticus*: a human respiratory tract commensal to be distinguished from *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 195: 81-89.
 - 22) Witherden, EA, SG Tristram. 2013. Prevalence and mechanisms of β -lactam resistance in *Haemophilus haemolyticus*. *J Antimicrob Chemother* 68: 1049-1053.
 - 23) Kirkham, LA, SP Wiertsema, EN Mowe, et al. 2010. Nasopharyngeal carriage of *Haemophilus haemolyticus* in otitis-prone and healthy children. *J Clin Microbiol* 48: 2557-2559.
 - 24) Brinkmann, V, U Reichard, C Goosmann, et al. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535.
 - 25) Hamaguchi, S, M Seki, N Yamamoto, et al. 2012. Case of invasive nontypable *Haemophilus influenzae* respiratory tract infection with a large quantity of neutrophil extracellular traps in sputum. *J Inflamm Res* 5: 137-140.
 - 26) Juneau, RA, B Pang, KE Weimer, et al. 2011. Nontypeable *Haemophilus influenzae* initiates formation of neutrophil extracellular traps. *Infect Immun* 79: 431-438.
 - 27) Hong, W, RA Juneau, B Pang, et al. 2009. Survival of bacterial biofilms within neutrophil extracellular traps promotes nontypeable *Haemophilus influenzae* persistence in the chinchilla model for otitis media. *J Innate Immun* 1: 215-224.
 - 28) Saffarzadeh, M, C Juenemann, MA Queisser, et al. 2012. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* 7: e32366.