

[原 著]

静岡県西部地域における *Haemophilus influenzae* の疫学解析

山影 望¹⁾・名倉理教¹⁾・石川仁子¹⁾・泉 敦³⁾・伊藤尚美⁴⁾・上村桂一⁵⁾
上村のり子⁶⁾・釋 悦子⁷⁾・鈴木裕子⁸⁾・高須光世⁷⁾・山本理恵⁹⁾・前川真人¹⁾²⁾

¹⁾ 浜松医科大学医学部附属病院検査部

²⁾ 浜松医科大学医学部臨床検査医学講座

³⁾ 国立病院機構天竜病院検査科

⁴⁾ JA 静岡厚生連遠州病院臨床検査科

⁵⁾ 中東遠医療センター臨床検査室

⁶⁾ 磐田市民病院臨床検査技術科

⁷⁾ 聖隷浜松病院臨床検査部

⁸⁾ 浜松赤十字病院検査課

⁹⁾ 浜松医療センター臨床検査技術科

(平成 27 年 2 月 4 日受付, 平成 27 年 6 月 4 日受理)

2012 年 12 月～2013 年 2 月に静岡県西部地域 9 施設において分離された *Haemophilus influenzae* 252 株について, 性別, 年齢等の患者背景, 薬剤感受性, 免疫血清型 (莢膜型) の陽性割合について検討した。遺伝子型の割合は gBLNAR (β -lactamase 非産生 ABPC 耐性株) が 51.6% と最も多く, 続いて gBLNAS (β -lactamase 非産生 ABPC 感受性株) が 29.8%, gLow-BLNAR (β -lactamase 非産生 ABPC 軽度耐性株) が 9.9% であった。*H. influenzae* に対する抗菌薬の感受性率が低下傾向にある薬剤も認められた。免疫血清型陽性率は全体で 3.6%, *H. influenzae* 莢膜 b 型株 (Hib) は 37 歳女性からの 1 株のみであった (1/252 株: 0.4%)。適切な抗菌薬使用や耐性菌出現防止のために, 地域における臨床分離株の耐性状況や疫学的特性を把握しておくことは非常に重要であり, 今後も継続的な調査が必要である。

Key words: *Haemophilus influenzae*, 疫学調査, MIC, Hib

序 文

Haemophilus influenzae は呼吸器感染症における重要な起因菌の一つであるが, 近年 β -ラクタム系抗菌薬に対する耐性化が問題となっている。また, *H. influenzae* の各種薬剤感受性成績は地域ごとに差が見られるとの報告があり, 地域のサーベイランスを行うことは, *H. influenzae* の薬剤耐性化状況を把握するにあたって非常に重要である¹⁾²⁾。

今回, 静岡県西部地域 9 施設において分離された *H.*

influenzae 252 株について, 分離状況及び薬剤感受性等の疫学調査を行った。

材料と方法

1. 使用菌株

2012 年 12 月～2013 年 2 月の期間に静岡県西部地域 9 施設 (浜松医科大学医学部附属病院, 聖隷三方原病院, 聖隷浜松病院, 浜松医療センター, JA 静岡厚生連 遠州病院, 浜松赤十字病院, 国立病院機構 天竜病院, 磐田市立総合病院, 袋井市立聖隷袋井市民病院) において分離された *H. influenzae* 252 株を解析対象とした。

2. MIC 測定法

Minimum inhibitory concentration (MIC) は, 日本化学療法学会標準法³⁾に準拠した微量液体希釈法により測定した。測定用培地として 15 μ g/mL NAD, 2%

著者連絡先: (〒431-3125) 静岡県浜松市東区半田山 1-20-1
浜松医科大学医学部附属病院検査部
山影 望
TEL: 053-435-2111
FAX: 053-435-2096
E-mail: yamakage@hama-med.ac.jp

表1. *Haemophilus influenzae* 252株の年齢別例数成績

年齢	件数 (%)
4歳以下	112 (44.4)
5～14歳	16 (6.4)
15～59歳	30 (11.9)
60歳以上	94 (37.3)
計	252 (100)

馬溶血液, 5 mg/mL 酵母エキス加2価イオン調製 Mueller-Hinton broth を用い, 試験薬剤として, ペニシリン系: ampicillin (ABPC), amoxicillin (AMPC), clavulanic acid/amoxicillin (CVA/AMPC), セフェム系: cefditoren (CDTR), cefcapene (CFPN), cefdinir (CFDN), ceftriaxone (CTRX), ペネム系: faropenem (FRPM), カルバペネム系: tebipenem (TBPM), biapenem (BIPM), meropenem (MEPM), マクロライド系: azithromycin (AZM), clarithromycin (CAM), キノロン系: tosufloxacin (TFLX), levofloxacin (LVFX), ulifloxacin (UFX) の16薬剤を使用した。

ABPC による感受性は, CLSI M100-S24 (Clinical and Laboratory Standards Institute)⁴⁾ に従い分類し, ABPC の MIC ≤ 1 μg/mL を「ABPC 感受性」, MIC 2 μg/mL を「ABPC 中等度耐性」, MIC ≥ 4 μg/mL を「ABPC 耐性」とした。

薬剤ごとの感受性は, 日本化学療法学会の呼吸器感染症の肺炎におけるブレイクポイントによる分類⁵⁾ の感受性率を用いて検討した。TBPM に関しては, 砂川の報告⁶⁾ によるブレイクポイント MIC 1 μg/mL を用いた。

3. 薬剤耐性遺伝子型解析

PCR 法による *H. influenzae* の薬剤耐性遺伝子型解析は, 「インフルエンザ菌遺伝子検出試薬」(湧永製薬株式会社) を用いて溶菌, DNA 増幅を行い, マイクロチップ電気泳動装置 (株式会社 島津製作所) を用いて検出した。この PCR 法による結果から, 生方らの報告⁷⁾ を参考に6種類の遺伝子型に分類した①耐性遺伝子が検出されない β-lactamase negative ampicillin susceptible (gBLNAS), ② TEM-1 型遺伝子を有する β-lactamase positive ampicillin resistant (gBLPAR), ③ *ftsI* 遺伝子の Lys-526 変異と Ser-Se-Asn (SSN) 配列周囲に Thr-385 変異を有する β-lactamase negative ampicillin resistant (gBLNAR), ④ *ftsI* 遺伝子の Lys-Thr-Gly (KTG) 配列近位に Lys-

表2. *Haemophilus influenzae* 252株の検査材料別例数成績

検査材料	件数 (%)
喀痰	126 (50)
鼻咽頭粘液	118 (46.8)
耳漏	3 (1.2)
胸水	1 (0.4)
気管分泌液	1 (0.4)
その他	3 (1.2)
計	252 (100)

526 変異を有する β-lactamase negative ampicillin low-resistance (gLow-BLNAR), ⑤ TEM-1 と gBLNAR 耐性遺伝子 (Lys-526 変異) を有する β-lactamase positive ampicillin/clavulanic acid resistant (gBLPACR-I), ⑥ TEM-1 と gBLNAR 耐性遺伝子 (Lys-526 変異および SSN 配列周囲の Thr-385 変異) を有する β-lactamase positive ampicillin/clavulanic acid resistant (gBLPACR-II)。

4. 免疫血清型 (莢膜型) の判定

被験菌株の免疫血清型 (莢膜型) は, 「インフルエンザ菌莢膜型別用免疫血清「生研」」(デンカ生研 株式会社) を用いて, 培養菌との凝集反応により判定した。

結 果

1. 患者背景と検査材料

H. influenzae 252 株を分離した患者背景のうち, 性別割合は, 男性 136 例 (54.0%), 女性 116 例 (46.0%) であった。

年齢分布は4歳以下の小児が112例 (44.4%), 60歳以上が94例 (37.3%) と小児と高齢者が多くを占めた (表1)。

検査材料は, 喀痰 126 例 (50.0%), 鼻咽頭粘液 118 例 (46.8%) と両材料がほとんどであった (表2)。

2. 薬剤感受性

今回対象とした菌株の薬剤感受性について, 表3, 図1, 表4に示す。

ペニシリン系抗菌薬の ABPC の MIC 分布は, MIC 0.25 μg/mL の gBLNAS を中心としたピークに加え, MIC 2 μg/mL, 4 μg/mL の gBLNAR を中心としたピークが確認された。AMPC と AMPC/CVA ではその MIC 分布に大きな差は見られなかった。セフェム系抗菌薬では, CFPN で特に顕著に2峰性の傾向が認められた。CFDN は耐性傾向が強くと, MIC 32 μg/mL

表3. *Haemophilus influenzae* 252株の薬剤別MIC成績一覧

	MIC (μg/mL)																Range	MIC (μg/mL)		
	≤0.002	0.004	0.008	0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64		>64	MIC50	MIC90
ABPC	0	0	0	0	0	0	7	66	7	23	65	40	24	8	0	5	7	0.12 ~ >64	2	8
AMPC	0	0	0	0	0	0	0	21	59	13	35	37	31	41	5	10	0	0.25 ~ 64	2	16
CVA/AMPC	0	0	0	0	0	0	0	15	64	15	40	43	34	40	1	0	0	0.25 ~ 32	2	16
CDTR	0	0	0	58	31	20	23	66	51	2	1	0	0	0	0	0	0	0.016 ~ 2	0.12	0.5
CFPN	0	0	0	51	37	5	3	9	8	26	68	45	0	0	0	0	0	0.016 ~ 4	1	4
CFDN	0	0	0	0	0	0	2	43	46	15	31	29	65	19	2	0	0	0.12 ~ 32	2	8
CTRX	10	48	33	5	9	8	32	103	4	0	0	0	0	0	0	0	0	≤0.002 ~ 0.5	0.12	0.25
FRPM	0	0	0	0	0	1	9	29	56	33	52	55	17	0	0	0	0	0.06 ~ 8	1	4
TBPM	0	0	1	6	22	39	55	35	68	25	1	0	0	0	0	0	0	0.008 ~ 2	0.25	1
BIPM	0	0	0	1	3	8	10	13	37	45	37	31	61	6	0	0	0	0.016 ~ 16	2	8
MEPM	0	0	0	6	51	53	52	68	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0.016 ~ 0.5	0.12	0.25
AZM	0	0	0	1	1	0	2	4	23	103	97	16	4	0	1	0	0	0.016 ~ 32	1	2
CAM	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	4	41	129	58	10	5	1	0.03 ~ >64	8	16
TFLX	2	41	160	41	4	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	≤0.002 ~ 2	0.008	0.016
LVFX	1	0	4	194	46	4	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	≤0.002 ~ 1	0.016	0.03
UFX	0	1	30	189	27	3	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.004 ~ 1	0.016	0.03

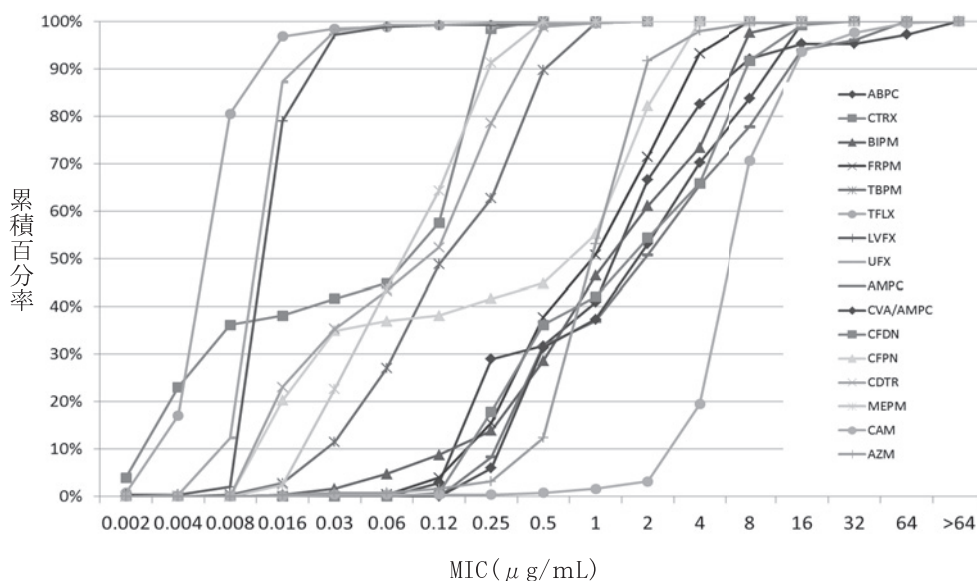


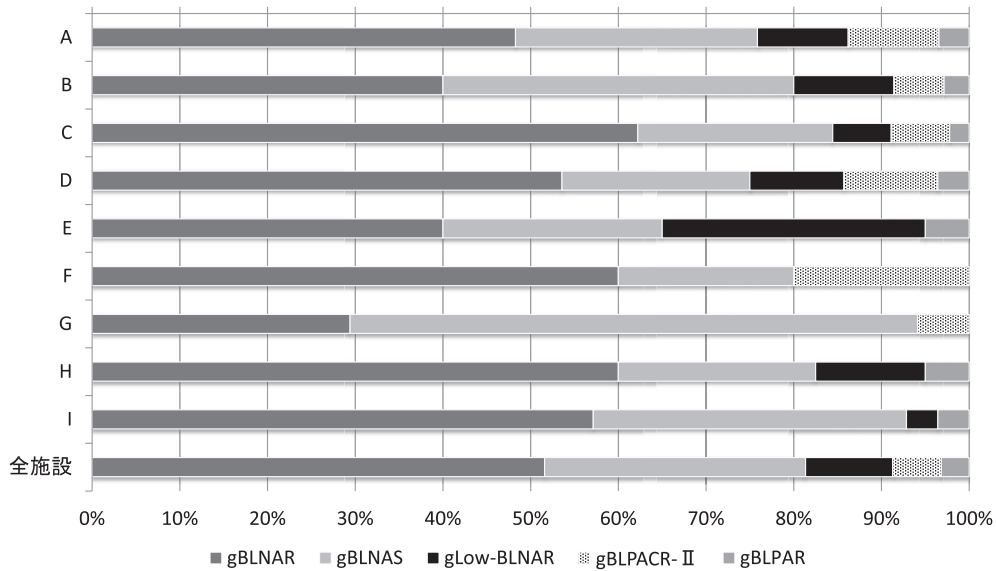
図1. *Haemophilus influenzae* 252株の薬剤別MIC累積分布

の株が2株認められた。CDTRは感受性傾向にあり、MIC 2 μg/mL以下であった。ペネム、カルバペネム系抗菌薬ではFRPMよりもTBPMが比較的感受性傾向にあり、マクロライド系抗菌薬ではCAMに比べAZMが感受性傾向にあった(表3, 図1)。

ABPCに対する感受性とPCR法によるgBLNAS, gLow-BLNAR, gBLNAR, gBLPAR, gBLPACR-IIによる分類との相関を表4に示した(gBLPACR-Iは検出されなかった)。その結果、40.9%がABPCに感受性であったが、gBLNASの75株は全て感受性で、

表4. *Haemophilus influenzae* 252株の遺伝子型別およびABPC感受性成績別分布

遺伝子型	ABPC感受性成績別株数 (%)			
	感受性	中等度	耐性	合計
gBLNAR	9 (3.6)	59 (23.4)	62 (24.6)	130 (51.6)
gBLNAS	75 (29.8)	0 (0)	0 (0)	75 (29.8)
gLow-BLNAR	18 (7.1)	6 (2.4)	1 (0.4)	25 (9.9)
gBLPACR-II	0 (0)	0 (0)	14 (5.5)	14 (5.5)
gBLPAR	1 (0.4)	0 (0)	7 (2.8)	8 (3.2)
計	103 (40.9)	65 (25.8)	84 (33.3)	252 (100.0)

図2. *Haemophilus influenzae* 252株の施設別および遺伝子型別成績の比較

他はgLow-BLNARの18株(72.0%), gBLNARの9株(6.9%), gBLPARの1株(12.5%)が感受性であった(gBLPACR-IIは0株(0%))。また、全体の33.3%を占めたABPC耐性株のうち、gBLNARが62株(24.6%)と最も多く、次いでgBLPACR-IIが14株(5.5%), gBLPARが7株(2.8%), gLow-BLNARが1株(0.4%)であり、gBLNASは検出されなかった。

3. 遺伝子型

H. influenzae 252株の薬剤耐性遺伝子型の割合は、gBLNAR 51.6% (130株), gBLNAS 29.8% (75株) gLow-BLNAR 9.9% (25株), gBLPACR-II 5.5% (14株), gBLPAR 3.2% (8株)であった。また、gBLPACR-Iについては検出されなかった(図2)。

これら遺伝子型の割合について、分離材料別に大き

な差は認められなかったが、施設による差が認められた(図2)。慢性期病院であるため成人の割合が高い施設Gは、他施設に比べてgBLNASが64.7% (11/17株)と多く、gBLNARは29.4% (5/17株)と少ない傾向にあった。また、小児患者の多い3施設において、gBLNARが施設Hで60.0% (24/40株)、施設Cで62.2% (28/45株)、施設Dでは53.6% (15/28株)であるのに対し、gBLNASは施設Hで22.5% (9/40株)、施設Cで22.2% (10/45株)、施設Dでは21.4% (6/28株)と比較的gBLNARが多く認められる傾向にあった。また、施設Fは15歳未満の小児の割合が40.0%であるのに対して、成人が60.0%と多い施設であるにもかかわらず、gBLNASが20.0% (2/10株)であるのに対し、gBLNARが60.0% (6/10株)と多

表5. *Haemophilus influenzae* 252株のうち免疫血清陽性となった9株の莢膜型別成績

年齢	免疫血清型(莢膜型)別株数						合計
	a	b	c	d	e	f	
4歳以下	0	0	0	1	2	3	6
5歳以上	0	1	0	0	0	2	3
合計	0	1	0	1	2	5	9

数検出された。

4. 血清型

免疫血清型の陽性率(a, b, c, d, e, f型)は全体で3.6%(9株)であった(表5)。

H. influenzae 莢膜b型株(Hib)は37歳女性からの1株のみであった(1/252株:0.4%)。4歳以下の小児の株からHibは検出されなかった。

考 察

今回、我々は、小児の髄膜炎等の重症細菌感染症のほか、市中肺炎をはじめとした種々の呼吸器感染症の主要な起炎菌である *H. influenzae* について、静岡県西部地域での疫学調査を行った。

遺伝子型の割合は、慢性期病院であるため成人の割合が高い施設ではgBLNASが、小児患者の多い施設ではgBLNARが多い傾向にあるなど、静岡県西部地域全体でも施設により大きな差が認められた。また、小児に比べて成人の割合が多い施設であるにもかかわらず、gBLNASに対し、gBLNARが多く検出された施設があったが、検出された *H. influenzae* の株数自体が10株と他施設に比べて少ないため、継続した調査が必要であり、施設ごとに耐性化状況を把握していく必要もあると考えられた。

CLSIの判定基準⁴⁾によるABPCに対する感受性率は、ABPCに感受性を持つ株が40.9%(103/252株)、中等度耐性が25.8%(65/252株)、耐性が33.3%(84/252株)であった。ABPCに対する感受性と遺伝子型との関係について見た場合、全体の29.8%(75/252株)となるgBLNASはMIC値が全て0.5以下の感受性株であった。ABPC耐性の多くはgBLNARで(24.6%:62/252株)、中等度耐性はgBLNAR(23.4%:59/252株)もしくはgLow-BLNAR(2.4%:6/252株)、gBLPACR-IIは全てがABPC耐性であった(5.5%:14/252株)。以上より、ABPCの感受性結果と遺伝子型には一定の傾向があり、ABPCの薬剤感受性結果はgBLNARである可能性を予測するための参考とすることができるのではないかと考えられ

た。しかし、gLow-BLNARの7.1%(18株/252株)、gBLNARの3.6%(9株/252株)でABPCに感受性を持つ株も確認された。このように、ABPCに感受性がありながら薬剤耐性遺伝子を持つ株が存在するなど、MIC値と遺伝子型の結果に乖離が生じることは以前より知られているが⁸⁾⁹⁾、これは薬剤の感受性結果のみを治療薬の選択基準とすると、*H. influenzae* の耐性化を進め、治療が困難になる可能性もあることを示唆する。今後も、継続してABPCの *H. influenzae* に対する感受性動向を調査していくことは、非常に重要であり、さらに遺伝子変異も考慮した薬剤選択が必要になってくると考えられた。

薬剤別の感受性率において、感受性率が高かったのは、TFLXの99.2%、CDTRの98.8%、TBPMの89.7%であった。ペニシリン系薬剤の感受性率は34.4%、マクロライド系薬は6.6%と、耐性化傾向にあった。一方、セフェム系薬では、CDTRの感受性率が98.8%であるのに対し、CDTRを除く場合では38.9%であった。経口カルバペネム系薬のTBPMの感受性率は89.7%であるのに対し、FRPMは15.5%であった。このように、薬剤ごとの感受性には大きな差が見られ、適切な抗菌薬を選択するためには、薬剤ごとの感受性を考慮する必要があると考えられた。

H. influenzae は莢膜多糖体の有無により有莢膜株(S型)と無莢膜株(R型)に分けられ、有莢膜株はさらにa~f型の6血清型に分類される。有莢膜株は無莢膜株よりも病原性が強く、なかでもHibは強毒株として知られている。特に、乳幼児における、細菌性髄膜炎、急性喉頭蓋炎、化膿性関節炎、骨髄炎、蜂窩織炎等の主要な起炎菌として知られている¹⁰⁾。

今回の調査における免疫血清型の陽性率は全体で3.6%(9/252株)であった。年齢別に見ると、成人では2.4%(3/124株)、小児(15歳未満)では4.7%(6/128株)であり、小児が成人に対し比較的高く検出された。また、Dawsonらの報告でも有莢膜型 *H. influenzae* は成人に比して小児から圧倒的に検出されている¹¹⁾。今後、特に小児における有莢膜型 *H. influenzae* の検出状況に注意が必要である。

今回の調査でHibの検出頻度が0.4%(1/252株)と低かったのは、2008年より国内でも接種可能となったHibワクチンの浸透によりHibの保菌率が減少してきていることによる可能性も考えられた。なお、今回検出されたHibは37歳の患者から分離された1株のみであり、4歳以下の小児患者からHibは検出されなかった。

血清型別に見ると、f型株が2.0%(5/252株)、e型

株が0.8% (2/252株), b型株とd型株が0.4% (1/252株)であった。*H. influenzae* 莢膜f型株 (Hif) の毒性は非常に強いとされており, Hib ワクチン施行後, Hif の *H. influenzae* の重症感染症例が目立つようになったとの報告がある¹²⁾。今回, Hif が検出された5例中2例は高齢者 (72歳, 81歳) であり, 3例は幼児 (3歳が2例, 4歳が1例) であった。この5例はいずれも年齢的に, 比較的易感染性である。Hib ワクチンの接種率の増加に伴い, Hib だけではなく, 別の莢膜型にも注意し, *H. influenzae* の血清別による検出動向を今後も監視していく必要がある。

本調査は, 静岡県西部地域における *H. influenzae* に対する感受性サーベイランスとして, 初の報告である。臨床現場における適切な治療薬の選択の一助として, また今後も *H. influenzae* の耐性化についての動向を把握していくためにも, 継続して地域におけるサーベイランスを行っていくことが必要であると考えらる。

謝辞: 今回の調査にあたってご協力いただきました, 各病院の関係者の皆様に感謝いたします。

利益相反: 申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) 生方公子, 千葉菜穂子, 小林菜穂子, 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.
- 2) 蜂谷 勤, 久保恵嗣, 柳沢英二. 2004. 長野県下の基幹病院における肺炎球菌, インフルエンザ菌, 緑膿菌の分離状況と各薬剤感受性の検討. THE JAPANESE JOURNAL OF ANTIBIOTICS 57 (2): 157-171.
- 3) 斎藤 厚. 1993. 抗菌薬感受性測定法検討委員会報告 (1992年). CHEMOTHERAPY 41: 183-189.
- 4) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2004. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement, M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 5) 抗菌薬ブレイクポイント委員会報告. 2009. 一呼吸器感染症, 敗血症および尿路感染症におけるブレイクポイント: 新規抗菌薬の追加 (2009年)一. 日本化学療法学会雑誌 57 (4): 343-345.
- 6) 砂川慶介. 2009. 新規経口カルバペネム系抗菌薬「テビペネムピボキシル」(オラベネム小児用細粒10% (Meiji Seika ファルマ株式会社)) の薬理学的特性と臨床成績. 日本化学療法学会雑誌 57 (4): 279-294.
- 7) 生方公子. 2006. 呼吸器感染症原因微生物の質的变化による薬剤耐性化. 日本化学療法学会雑誌 54: 69-94.
- 8) 千葉菜穂子, 生方公子. 2005. インフルエンザ菌と肺炎球菌におけるβ-ラクタム系薬の標的遺伝子変異. 化学療法の領域 21: 39-44.
- 9) 星野 直, 須藤扶佐代, 澤田恭子, 他. 2014. 小児臨床検体由来の *Haemophilus influenzae* 抗菌薬感受性に関する検討. 感染症誌 78: 943-951.
- 10) 星野 直. 2014. 耐性インフルエンザ菌. 化学療法の領域 30 (S-1): 77-84.
- 11) Dawson, B, K Zinnemann. 1952. Incidence and type distribution of capsulated *H. influenzae* strains. Brit Med J. 1: 740-742.
- 12) 佐々木裕子, 増田まり子, 久保田真由美, 他. 2014. 小児の侵襲性感染症患者から分離された *Haemophilus influenzae* の莢膜型別解析について: 国内外の動向. IASR. 35: 231-232.

Surveillance based on epidemiology for *Haemophilus influenzae* isolates in western area of Shizuoka prefecture

Nozomi Yamakage¹⁾, Osanori Nagura¹⁾, Jinko Ishikawa¹⁾, Atsushi Izumi³⁾, Naomi Ito⁴⁾, Keiichi Uemura⁵⁾, Noriko Uemura⁶⁾, Etsuko Syaku⁷⁾, Yuko Suzuki⁸⁾, Mitsuyo Takasu⁷⁾, Rie Yamamoto⁹⁾, Masato Maekawa¹⁾²⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Hamamatsu University Hospital

²⁾Department of Laboratory Medicine, Hamamatsu University School of Medicine

³⁾Department of Clinical Laboratory, National Hospital Organization Tenryu Hospital

⁴⁾Department of Clinical Laboratory, JA Shizuoka Kohseiren Enshu Hospital

⁵⁾Department of Clinical Laboratory, Chutoen General Medical Center

⁶⁾Department of Clinical Laboratory, Iwata City Hospital

⁷⁾Department of Clinical Laboratory, Seirei Hamamatsu General Hospital

⁸⁾Department of Clinical Laboratory, Hamamatsu Red Cross Hospital

⁹⁾Department of Clinical Laboratory, Hamamatsu Medical Center

Using 252 isolates of *Haemophilus influenzae* separated from 9 hospital laboratories in western area of Shizuoka prefecture, we investigated patients' background, antibiotics sensitivity and antiserum-positive rate (capsule antigen). The ratios of antibiotics-resistant isolates were 51.6% in gBLNAR, 29.8% in gBLNAS, and 9.9% in gLow-BLNAR, respectively. The antiserum-positive isolate rate was 3.6%, and Hib positive isolate was just one (0.4%; 1/252) that was separated from 37-yr-old woman. For appropriate antimicrobial use and prevention of antibiotic-resistant bacteria, it is very important to continuously examine the antibiotic-resistance of the clinical isolates and epidemiological properties in the community.