

インフルエンザ菌の薬剤耐性遺伝子検出と PCR 法による b 型別について

小黒祐子 菅野奈美 渡邊奈々子 須釜久美子 大竹俊秀
微生物課

要 旨

2007 年 1 月から 2008 年 12 月までに感染症発生動向調査事業により分離されたインフルエンザ菌 252 株について薬剤耐性遺伝子の検出と PCR 法による b 型別を実施した。薬剤耐性遺伝子の検出は、分離菌株の 67.9 % を β ラクタマーゼ陰性アンピシリン耐性インフルエンザ菌が占め最も多かった。b 型の型別は、従来の莢膜血清型別法に代わり PCR 法による b 型別を試みた結果 11 株が型別され、内 4 株は従来の方法では型を決定できない株であった。

キーワード：インフルエンザ菌，薬剤耐性遺伝子，BLNAR，血清型 b 型

はじめに

インフルエンザ菌は気管支炎や肺炎，化膿性髄膜炎の原因菌となる。インフルエンザ菌のアンピシリン耐性は、以前 β ラクタマーゼ産生が主であったが、近年は β ラクタマーゼを産生せずペニシリン結合蛋白の変異によって耐性を示す β ラクタマーゼ陰性アンピシリン耐性インフルエンザ菌が増加傾向にある。また、インフルエンザ菌の中でも特に血清型 b 型は、細菌性髄膜炎を含む侵襲性感染症の重要な起因菌となっている。

今回、感染症発生動向調査事業で得たインフルエンザ菌について、薬剤耐性遺伝子検出と従来の莢膜血清型別法に代わり PCR 法による b 型別を試みたので、その概要を報告する。

材 料

2007 年 1 月から 2008 年 12 月までに感染症発生動向調査事業で、0 才児から 16 才児より分離されたインフルエンザ菌 252 株を用いた。分離株の由来は、後鼻腔拭い液 228 株，咽頭拭い液 17 株，髄液 7 株であった。

方 法

1 薬剤耐性遺伝子検出

インフルエンザ菌遺伝子検出試薬（湧永製薬）を用いて行った。試薬はプライマーミックス A, B, C からなり、各々 PCR 反応によ

りインフルエンザ菌に特異的な表層蛋白の遺伝子の確認， β ラクタマーゼ産生に関する TEM 遺伝子の有無，ペニシリン耐性に関する遺伝子変異の有無を判定した。図 1 に PCR 反応で得られた増幅物の電気泳動像を示した。試薬の調製，PCR 反応条件等は添付書に従った。

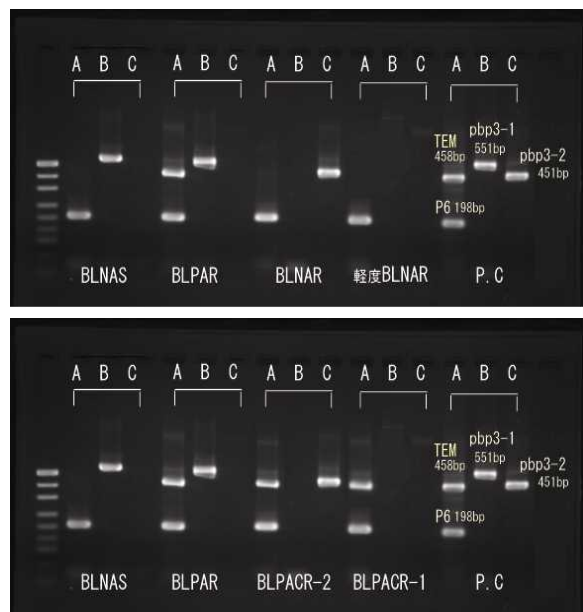


図 1 PCR 反応で得られた増幅物の泳動像

2 塩基配列による b 型別

T.J.FALLA¹⁾M.HASSAN-KING²⁾らの報告に従い PCR 法で b 型別を行った。使用したプライマーの塩基配列を表 1 に示した。反応条

表1 使用したプライマーの塩基配列

Primer name	Primer	Primer product(bp)
b1	GCG AAA GTG AAC TCT TAT CTC TC	} 480 } 370
b2	GCT TAC GCT TCT ATC TCG GTG AA	
b3	ACC ATG AGA AAG TGT TAG CG	

件は 94 °C 1 分, 60 °C 1 分, 72 °C 1 分で 25 サイクル後 72 °C 10 分と設定した。

結 果

1 薬剤耐性遺伝子検出

インフルエンザ菌の材料別の薬剤耐性遺伝子検出率を表 2 に示した。βラクタマーゼ陰性アンピシリン感受性インフルエンザ菌（以下“BLNAS”とする）25.0 %，βラクタマーゼ陰性アンピシリン軽度耐性インフルエンザ菌（以下“軽度 BLNAR”とする）9.1 %，βラクタマーゼ陰性アンピシリン耐性インフルエンザ菌（以下“BLNAR”とする）58.8 %，βラクタマーゼ陽性アンピシリン耐性インフルエンザ菌（以下“BLPAR”とする）7.1 %であった。全体の 75.0 %がいずれかの薬剤耐性遺伝子を有していた。耐性遺伝子保有の 189 株中 βラクタマーゼ陽性インフルエンザ菌は 18 株に過ぎなかった。髄液由来の 7 株は、全て耐性遺伝子を有していた。

2 PCR 法による b 型別

インフルエンザ菌 252 株について、従来の莢膜血清型別法に代わり PCR 法による b 型別の決定を行った。その結果、11 株が b 型と決定された。11 株の詳細を表 3 に示す。また図 2 に PCR 反応の結果を示す。480bp, 370bp に増幅物を認めた。髄液由来株の 7 株

は全て b に型別された。他の 4 株は後鼻腔い液であった。髄液、後鼻腔拭い液から分離された各 2 株は従来の莢膜血清型別法では、型別を決定することができなかった。11 株の薬剤耐性遺伝子 LBLNAR 3 株, BLNAR 7 株, BLPAR 1 株であった。

考 察

我々は、感染症発生動向調査において以前よりインフルエンザ菌の薬剤耐性遺伝子の検出と共に莢膜血清型別を行ってきた。今回、薬剤耐性遺伝子を有していた菌株が多く検出され、その大部分は βラクタマーゼ産生菌によるものではなく、遺伝子の変異によって耐性を獲得した菌株であった。これは、近年の傾向であり、今後経過を見守りたい。

インフルエンザ菌の中で、侵襲性感染症になりうる b 型を確実に把握することは、インフルエンザ菌 b 型（以下“Hib”とする）感染症を減少させる上で重要である。我々は、従来の莢膜血清型別法で型別を行ってきたが、この型別方法は菌の保存状態や継代によって大きく左右され、また市販血清の各ロットによっても違いがあり、型決定に苦慮してきた。武下ら³⁾も莢膜血清型別を行い型不明が 83.4%であったと報告している。今回、我々は PCR 法によって型別を試み、従来の莢膜血清型別法では型別できなかった菌株が b 型

表2 材料別の薬剤耐性遺伝子検出

菌株	後鼻腔拭い液	咽頭拭い液	髄液	計	(%)
BLNAS	59	4		63	25
L-BLNAR	17	3	3	23	9.1
BLNAR	136	8	4	148	58.8
BLPAR	16	2		18	7.1
計	228	17	7	252	100

表3 b型別結果

	菌株	材料	診断名	年齢	性別	莢膜血清型	PCR法
1	L-BLNAR	髄液	細菌性髄膜炎	0歳	男	型不明	b
2	BLNAR	髄液	細菌性髄膜炎	1歳	女	b	b
3	BLPAR	後鼻腔拭い液	細気管支炎	1歳	男	b	b
4	L-BLNAR	髄液	細菌性髄膜炎	5歳	女	b	b
5	BLNAR	後鼻腔拭い液	肺炎	1歳	女	型不明	b
6	BLNAR	髄液	細菌性髄膜炎	1歳	女	型不明	b
7	BLNAR	後鼻腔拭い液	扁桃炎	3歳	女	菌死滅により型別不能	b
8	BLNAR	髄液	化膿性髄膜炎	1歳	女	b	b
9	BLNAR	髄液	化膿性髄膜炎	1歳	女	b	b
10	L-BLNAR	髄液	化膿性髄膜炎	2歳	女	b	b
11	BLNAR	後鼻腔拭い液	気管支炎	2歳	男	型不明	b

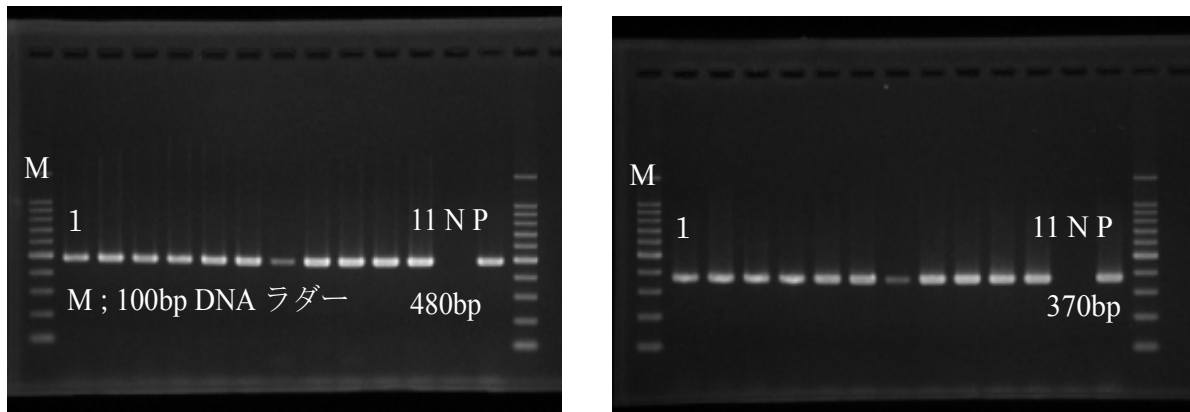


図2 インフルエンザ菌b型のPCR反応結果

と決定できた。従って PCR 法による型別はきわめて有用な手段であると思われた。また、今回 b 型 11 株がすべて耐性菌であったことを考慮すると b 型を確実に把握し薬剤耐性の状況を注視していく必要があると思われる。

海外では Hib ワクチンの接種により Hib 感染症は激減してきている。わが国でも 2007 年に承認され、2008 年 12 月より販売されている。今後 Hib ワクチンが定着し、Hib の減少が推測される中で、その過程を確実な方法で正確にデータを残していきたいと考えている。

まとめ

- 1 インフルエンザ菌の薬剤耐性遺伝子の保有率は、BLNAR 58.8 %、BLNAS 25.0 %、L-BLNAR 9.1 %、BLPAR 7.1 %であった。
- 2 耐性遺伝子保有の 189 株中 β ラクターマーゼ陽性インフルエンザ菌は 18 株に過ぎなかった。
- 3 髄液由来の菌株は、全て耐性遺伝子を有していた。
- 4 インフルエンザ菌 252 株について PCR 法による b 型別を試みた結果、11 株が型別された。その内の 4 株は従来の莢膜血清型別法では型別できない株であり、PCR 法の有用性を認識した。
- 5 髄液由来の菌株は、全て b 型に型別され

た.

謝 辞

検体採取等感染症発生動向調査事業にご協力いただいた医療機関の諸先生方に深謝いたします.

引用文献

1) T.J.FALLA,D.W.M.CROOK,et al.

PCR for Capsular Typing of *Haemophilus influenzae* Journal of Clinical Microbiology 1994 ; 32 : 2382-2386. 71-78.

2)M.HASSAN-KING,I.BALDEH,et al.

Detection of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* DNA in Blood Culture by a Single PCR Assay Journal of Clinical Microbiology 1996 ; 34 : 2030-2032.

3) 武下公子, 根ヶ山清, 今田和子, 他. 香川県下 8 施設において分離された *Haemophilus influenzae* type b の分離状況と薬剤感受性. 医学検査 2007 ; 5 : 769-774.