

〔原著〕 小児呼吸器感染症由来インフルエンザ菌の 臨床細菌学的検討

杉 岡 竜 也

(1997年12月25日受付, 1997年12月26日受理)

要 旨

1995年および1996年の2年間の呼吸器感染症由来インフルエンザ菌について検討した。洗浄喀痰培養における本菌の分離頻度はエピソード別平均32.3%, 症例別平均29.3%であり, 常に最上位を占めていた。由来病名の確認された菌株の疾患分類による分離頻度は急性気管支炎→反復・遷延性気管支炎→慢性気管支炎の順で増加し, その結果は従来報告を裏付けるものであった。過去5年間の生物型別の分布では, II型(35.4%) > III型(32.4%) > I型(16.4%)で, この3つの生物型で全体の84.2%を占めていた。感受性分布ではアンピシリン耐性菌(ABPC; MIC \geq 1.56 μ g/ml)が27.7%を占めていたが, β -L産生のアンピシリン耐性菌は11.8%に過ぎず, 残りの β -L非産生アンピシリン耐性菌(15.9%)が前回(1980-1991年)の中村らの報告の値(1.3%)と比べて著しく増加していた。この事実はインフルエンザ菌の β -Lの変化を含めた, 耐性機構の変容を示唆しており, 今後の感受性の動向に注意しつつ適切な抗菌薬を選択することが重要だと考えられた。

Key words: インフルエンザ菌, 下気道感染症, 洗浄喀痰培養, 慢性気管支炎, 抗菌薬感受性

略語一覧: β -L (β -Lactamase)

ODC (ornithine decarboxylase)

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)

MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

I. 緒 言

Haemophilus influenzae (インフルエンザ菌) は小児科領域における下気道感染症の主要な起因菌であり, その経年的臨床細菌学的検討は重要な課題である。我々の教室では本菌の重要性に早くから着目し, 洗浄喀痰培養における本菌の分離頻度, 疾患との関連, 抗菌薬感受性等について報告してきた[1]。本菌の小児下気道感染症における臨床的背景を明らかにし, 診断治療に反映させるため, 千葉大学医学部小児科およびその関連施設

の臨床の場より得られた下気道感染症例洗浄喀痰培養由来インフルエンザ菌の検討結果について報告する。

II. 対象と方法

対象は1995年および1996年の2年間に千葉大学小児科およびその関連施設を受診した呼吸器感染症児556症例, 896エピソードより得られた洗浄喀痰培養由来インフルエンザ菌株である。洗浄喀痰培養は当教室既報の方法(上原 1982)にて施行

千葉大学医学部小児科学講座

Tatsuya SUGIOKA: Clinical Bacteriology of *Haemophilus influenzae* Isolated from Respiratory Tract in Pediatric Patients.

Department of Pediatrics, School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670.

Received December 25, 1997, Accepted December 26, 1997.

した。有意菌判定基準は好気性細菌叢中に占める細菌叢百分率が50%以上とした。分離頻度に関しては原則として1感染エピソードを1菌株として集計し、持続的あるいは反復して分離されている症例は有意菌の消失、臨床症状の改善を目安としてエピソードを決定した。由来病名の確認された菌株の病態別の内訳に関しては表1に示した疾患分類[2]に従って分類した。また慢性気管支炎群での肺炎は総て原疾患の急性増悪と扱い急性疾患としての肺炎には含めなかった。

表1 疾患分類

気管支炎群	急性気管支炎 反復・遷延性気管支炎 (嚥下協調障害, 副鼻腔気管支炎等) 慢性気管支炎 (気管支拡張症等)
*百日咳群 *急性細気管支炎群	
肺炎群	
気管支喘息群 *アレルギー性気管支炎群	

*印の疾患群はそれぞれ、百日咳群、急性細気管支炎群は気管支炎群より、アレルギー性気管支炎群は気管支喘息群より別個の疾患群として分類した。

インフルエンザ菌分離に使用した培地は brain-heart infusion agar を基礎培地とする 7%馬血チョコレート寒天で 5% CO₂ の存在下にて培養した。嫌気培養は施行しなかった。インフルエンザ菌の同定はチョコレート培地上の露滴状のコロニー外観, XV 因子要求性 (BBL Taxo X, V, X and V Factor Strips®), ポルフィリンテスト陰性にて確認した[3]。生物型別は Kilian らの方法にて実施した[4-7]。すなわち, インドール産生能, ウレアーゼ活性, オルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) 活性の有無の組合せにより I から VIII まで型別した。試薬および培地としてはインドールテスト用 SIM semi solid agar® (栄研), urea agar base® (Difco), decarboxylase base Moeller® (Difco) を用いて全て 0.3% 半流動寒天培地として菌接種後 24 時間で判定した。

β-L 産生能は菌分離時に必要に応じてアシド

メトリー法を用いた β チェック® (Pfizer) を行い, 感受性測定時に Rosenblatt らのヨード澱粉法を用いて判定を行った[8]。抗菌剤感受性測定は 1996 年の洗浄喀痰由来インフルエンザ菌計 119 株について, 日本化学療法学会標準法 (1981 年改訂) に準拠して実施した[9]。基礎培地には Mueller-Hinton 寒天培地® (Difco) を用い, これに 5% 濃度の Fildes enrichment® (Difco) を添加して使用した。培養条件は 37°C, 5% CO₂, 20 時間とした。菌株の保存は年度の毎に通し番号を付けて 5% デキストロース加 3% スキムミルク培地 (pH 7.4) に濃厚接種し, -80°C で凍結保存した。感受性測定の結果は MIC (Minimum Inhibitory Concentration 単位 μg/ml) 値で表した。なおアモキシシリン・クラバン酸 (CVA/AMPC) およびスルタミシリン・アンピシリン (SBT/ABPC) の両合剤はそれぞれ CVA:AMPC=1:2 SBT:ABPC=1:2 の比率で測定し, MIC は AMPC と ABPC の値で表した。

測定した抗菌剤原末は 1. アンピシリン (ABPC 明治製薬), 2. アモキシシリン・クラバン酸 (CVA/AMPC スミスクライン・ビーチャム), 3. スルタミシリン・アンピシリン (SBT/ABPC ファイザー製薬), 4. セフトリアキソン (CTR-X 日本ロシュ), 5. セフォタキシム (CTX ルセル森下), 6. セフジトレン・ピボキシル (CDTR-PI 明治製薬), 7. パニペネム・ベタミプロン (PAPM/BP 三共株式会社), 8. クラリスロマイシン (CAM ダイナボット), 9. エリスロマイシン (EM 大日本製薬), 10. ミノサイクリン (MINO 日本レダリー), 11. ノルフロキサシン (NFLX 杏林製薬), 12. クロラムフェニコール (CP 三共株式会社) 以上 12 薬剤である。なお, 感受性測定時の接種菌量の濃度は 10⁶CFU/ml である。

抗菌剤の略号は日本化学療法学会制定の新抗菌微生物薬略語一覧表によった。

III. 結 果

1995 年, 1996 年の 2 年間に呼吸器感染症児の洗浄喀痰から対象として分離・保存・生物型別施行されたインフルエンザ菌株は 339 株。感受性測定

検査を実施した菌株数は1996年の119株であった。検討期間内に洗浄喀痰の得られたエピソード数および症例数の内訳を施設別に示す(表2)。千葉大学医学部付属病院小児科外来, 入院および県内外関連施設小児科外来の3つに分類した。1症例あたりのエピソード数は大学外来で2.4, 入院と関連施設ではそれぞれ1.3前後であり, 大学の外来では同一症例が複数回のエピソードをもつ傾向を認めた。表3にエピソードおよび症例別にみた洗浄喀痰培養より有意菌として認められた主要菌種の2年間の平均分離頻度を示す。インフルエンザ菌はエピソード別からみて平均32.3%で, 他の主要菌種である肺炎球菌, モラキセラ・カタラリス菌はそれぞれ8.9%, 10.7%であった。A群

溶連菌, ブドウ球菌, インフルエンザ菌以外のグラム陰性桿菌などの分離頻度は当教室 中村らの前回の報告[1]と大きな変化は認めなかった。常にインフルエンザ菌が最上位を占めていた。症例別にみた分離頻度ではインフルエンザ菌は平均29.3%であった。症例別の検討でも, エピソード別の検討でも各主要菌種の分離頻度の順位は変わらなかった。

以上のように起因菌として最重要な位置を占めるインフルエンザ菌の疾患分類との関連を検討した。疾患分類別にみた, インフルエンザ菌の症例による分離頻度を示す(表4)。気管支炎群の中では急性気管支炎群が25.5%, 反復・遷延性気管支炎群が31.4%, 慢性気管支炎群が51.5%で分離され, 肺炎群では37.3%, 気管支喘息群で27.8%であった。分離頻度は急性気管支炎→反復・遷延性気管支炎→慢性気管支炎の順で増加し, その結果は従来の報告を裏付けるものであった[1,10]。

小数例の百日咳群, 急性細気管支炎群, アレルギー性気管支炎群では表に示した通りである。検討期間は対象と若干異なるがインフルエンザ菌の生物型別の5年間の分布を示す(表5)。頻度の

表2 施設別の洗浄喀痰培養のエピソード数/症例年次推移

yr.	外来	入院	関連施設	不明	合計
1995	226/80	95/72	179/127	7/4	507/283
1996	161/79	107/81	118/110	3/3	389/273
合計	387/159 (2.43)	202/153 (1.32)	297/237 (1.25)		896/556

表3 洗浄喀痰由来有意菌分離頻度

エピソード別

year	Hi	Sp	Mc	CPS	GAS	GNR	no pathogens
1995	174/507 34.3%	36/507 7.1%	49/507 9.7%	3/507 0.6%	0/507 0%	12/507 2.4%	267/507 52.7%
1996	115/389 29.6%	44/389 11.3%	47/389 12.1%	3/389 0.8%	3/389 0.8%	7/389 1.8%	220/389 56.6%
total	289/896 32.3%	80/896 8.9%	96/896 10.7%	6/896 0.7%	3/896 0.3%	19/896 2.1%	487/896 54.4%

症例別

year	Hi	Sp	Mc	CPS	GAS	GNR	no pathogens
1995	84/283 29.7%	29/283 10.2%	32/283 11.3%	1/283 0.4%	0/283 0%	5/283 1.8%	168/283 59.4%
1996	79/273 28.9%	35/273 12.8%	36/273 13.2%	3/273 1.1%	3/273 1.1%	3/273 1.1%	157/273 57.5%
total	163/556 29.3%	64/556 11.5%	68/556 12.2%	4/556 0.7%	3/556 0.5%	8/556 1.4%	325/556 58.5%

* Hi *Haemophilus influenzae*, Sp *Streptococcus pneumoniae*, Mc *Moracella catarrhalis*
 CPS coagulase positive staphylococcus, GAS Group A streptococcus
 GNR Gram negative rod (no including Hi)

高い順に、Ⅱ型が35.4%、Ⅲ型が32.4%、Ⅰ型が16.4%で、この3つの生物型で全体の84.2%を占めた。なお、今回の検討では生物型と血清型別の関係についての検討は除外した。

1996年の洗浄喀痰由来分離インフルエンザ菌全119株の抗菌薬感受性について、MIC分布の累積百分率を図1、2に示す。ABPCはMIC \geq 1.56 μ g/ml (以下単位省略)の株を33株(27.7%)に認めた。このうち β -L産生株は14株(11.8%)であった。MIC50値は0.8であった。

SBT/ABPCのMIC \leq 0.1-6.25に分布し、MIC \geq 3.13の株は119株中、14株(11.8%)。このうち β -L産生株は6株(5.0%)であった。MIC50値

は0.8であった。

CVA/AMPCのMICは \leq 0.1-12.5 \leq に分布し、MIC \geq 3.13の株は29株/119(24.4%)、このうち β -L産生株は6株(5.0%)であった。MIC50値は0.8であった。

CTXはMIC \leq 0.025の株が87株/119(73.1%)を占め、MIC50値は \leq 0.025であったが、MIC90値は0.1で、MIC0.4の株も1株ではあるが認めた。

CTR_XはCTXと比べると良好な感受性を示し、 \leq 0.025の株が106株/119(89.1%)であったが、MIC0.4の株も1株認め、CTXのMIC0.4の株と同一株であった。

CDTR-PIは118/119株(99.1%)がMIC \leq 0.05であった。

PAPM/BPはMIC50値が1.56、MIC90値が12.5で、全体は \leq 0.1-12.5 \leq の範囲で分布していた。

図2ではNFLXの感受性はMIC \leq 0.025-0.2に分布し、MIC50は \leq 0.025であった。

CPは \leq 0.2-12.5に分布し、MIC50が0.4、MIC90が1.56であったが、MIC6.25以上の株を5株に認めた。(4.6%)

マクロライド系抗菌薬であるEM、CAMのMICは全体的に高値であった。

β -L産生能が感受性分布に与えている影響を示す(図3)。 β -L非産生105株のMIC分布の累積百分率を上段に、産生14株のグラフを下段に示した。 β -L産生株は全株がMIC \geq 1.56であった。 β -L非産生のグラフにおいてABPCのMIC \geq 1.56の株は19株認めた。 β -L産生のグラフではCVA/AMPC、SBT/ABPCの高値の株が認められた。MIC \geq 3.13の株はそれぞれ、6株(42.9

表4 疾患分類によるインフルエンザ菌分離頻度(症例)

疾患分類		1995	1996	合計
気管支炎群	急性	19/74 25.7%	31/122 25.4%	50/196 25.5%
	反復・遷延性	11/32 34.3%	5/19 26.3%	16/51 31.4%
	慢性	8/17 47.1%	9/16 56.3%	17/33 51.5%
百日咳群		0/1 0.0%	0/1 0.0%	1/2
急性細気管支炎群		1/3 33.3%	1/4 25.0%	2/7
肺炎群		17/43 39.5%	11/32 34.4%	28/75 37.3%
気管支喘息群		39/111 32.8%	21/77 22.7%	60/188 27.8%
アレルギー性気管支炎群		0/1 0.0%	0/1 0.0%	0/1
合計		282(1)	271(2)	553(3)

表5 インフルエンザ菌生物型の分布の年次推移

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	TOTAL
1992	22	69	44	10	16	2	0	1	164
1993	26	74	47	12	17	2	0	1	179
1994	45	62	53	8	11	1	1	1	182
1995	34	67	75	10	19	3	2	0	210
1996	14	34	61	7	9	2	1	1	129
TOTAL	141 16.4%	306 35.4%	280 32.4%	47 5.4%	72 8.3%	10 1.2%	4 0.5%	4 0.5%	864

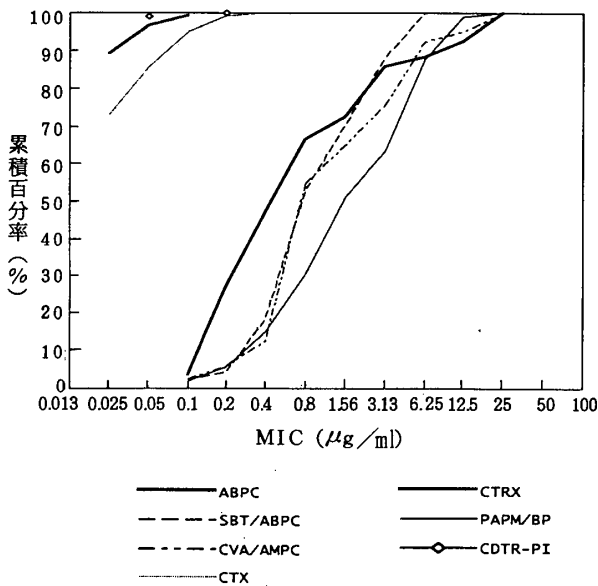


図1

1996年の洗浄喀痰由来 *H. influenzae* の感受性分布を累積百分率のグラフで示す。β-ラクタム系抗生剤。

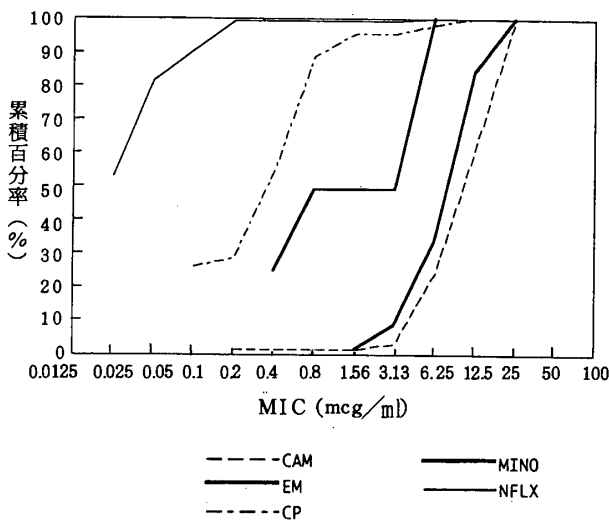


図2

1996年の洗浄喀痰由来 *H. influenzae* の感受性分布を累積百分率のグラフで示す。β-ラクタム系抗生剤以外の抗生剤。

%) ずつであった。NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) の基準にてらした MIC ≥ 8 の耐性株は CVA/AMPC で1株のみであった。

また、β-Lの関与が分布に影響をおよぼさないと考えられる PAPM/BP や CAM, EM,

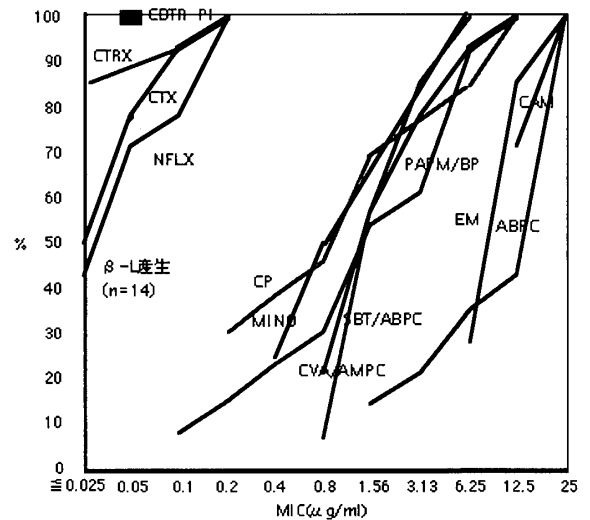
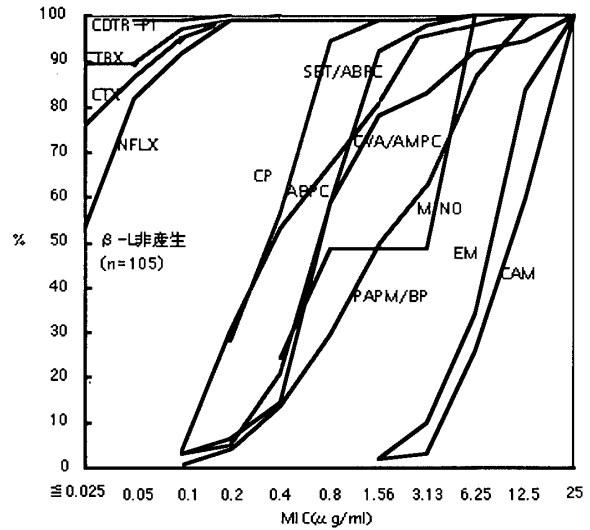


図3

上段にβ-L非産生, 下段にβ-L産生の *H. influenzae* の感受性分布のグラフを示した。

MINO, NFLX は大きな差異は見られなかった。CTX, CTRX ではともに良好な感受性を示していたが、CTRXの方がCTXに比して良好であり、この傾向はβ-Lの産生には関係なく認めた。

CDTR-PIの感受性もβ-Lの産生の有無に関係なく、良好であった。CPのMIC50は非産生株で0.4に対して、産生株ではMIC50は1.56であった。ABPCのMIC ≥ 1.56の株は33/119 (27.7%)に認めた。β-L産生株は14/119 (11.8%)を占め、全例がABPCのMIC ≥ 1.56であった。

CTX, CTRXのMICは ≤ 0.025-0.4の範囲に分布していたが、 ≤ 0.025の株がそれぞれ87/119 (73.1%), 106/119 (89.1%)であった。

CDTR-PI は $MIC \leq 0.05$ の株が全体の 99.1% を占めていた。NFLX は $MIC \leq 0.2$ の株が 99.1% を占めた。PAPM/BP は MIC_{50} 値が 1.56, MIC_{90} 値が 12.5 で、全体は ≤ 0.1 - ≥ 12.5 の範囲で分布していた。

IV. 考 察

小児科呼吸器疾患において洗浄喀痰培養より有意菌として分離されるインフルエンザ菌の占める割合は他の菌種に比して最も頻度が高く、かつ下気道炎が慢性化するにつれてその分離頻度は増加することは既に当教室上原, 中村らが報告している [1,10]。今回の検討でもほぼ同様の結果を得られた。大学の外来では同一症例が複数回のエピソードをもつ傾向を認めたが、このことは大学外来に免疫不全症に伴う慢性気管支炎で長期管理を必要とする症例が多いことと無縁ではなからう。実際、千葉大学外来における慢性気管支炎の占めるエピソード数の割合は 96 年の統計で 69/161 (42.9%) であるのに対し、症例数としての割合は 12/79 (15.2%) であったことから説明できる [11] (データ未提示)。すなわち、各種抗菌薬の開発が進み、抗菌薬療法の発達した現在でも 10 年以上前の検討結果と同じくインフルエンザ菌が小児下気道感染症において最も重要な菌種であることに変化はない [1]。その事実は一次医療の現場でも、大学病院の様な三次医療を主として行う施設でも同様であることが今回の検討でも明らかにされている [11]。喀痰を下気道炎起因菌の決定のための検体とすることは未だに議論があるが、当教室の岸本 [12]、最近では武田 [13] らが洗浄喀痰および非洗浄喀痰、さらには鼻 (咽頭) 培養の比較検討を行い、洗浄培養が下気道感染症の起因菌の決定に最も有効であるとの結果が得られている。従って、臨床現場においては下気道炎起因菌同定の為の洗浄喀痰培養を行い、インフルエンザ菌を常に念頭においた抗菌薬選択が重要になる。その意味で、近年の分離株を対象としたインフルエンザ菌の感受性検査は抗菌薬治療の一つの指標となりうると考えた。感受性分布ではアンピシリン耐性菌 (ABPC; $MIC \geq 1.56 \mu g/ml$) が 27.7% を占めていたが、 β -L 産生のアンピシリン耐性菌は 11.8

% に過ぎず、残りの β -L 非産生アンピシリン耐性菌 (15.9%) が我々の前回の中村らの報告の値 (1.3%) と比べて著しく増加している [1,14]。即ち、従来インフルエンザ菌の耐性機構の主体は β -L 産生能によるものであった [14,15] が、近年インフルエンザ菌の β -L の変化を含めた、耐性機構の変容が指摘されており [16-18]、今後の感受性の動向に注意しつつ適切な抗菌薬を選択することが望まれる。

謝 辞

本研究は長期にわたる千葉大学小児科感染症研究班のインフルエンザ菌研究の一環であり、班員全員の協力無しにはなし得ませんでした。筆を置くにあたり、ここに記して深謝の意を表します。

本稿の一部は第 29 回日本小児感染症学会 (平成 9 年, 於佐賀) と第 30 回日本小児呼吸器学会 (平成 9 年, 於大阪) において発表した。

SUMMARY

Three hundred and thirty-nine (339) strains of *H. influenzae* dominantly isolated from respiratory tract in these 2 years were analyzed. These were isolated by the method of washed sputum culture.

The rate of isolation of *H. influenzae* was higher than any other pathogens in respiratory tract infection. Chronic bronchitis had high isolation rate of *H. influenzae*.

Biotype distribution of the strains was as follows: type I 16.4%, II 35.4%, III 32.4%, IV 5.4%, V 8.3%, VI 1.2%, VII 0.5%, VIII 0.5%.

Among these strains 11.8% were β -lactamase positive, and 15.9% were β -lactamase negative ampicillin-resistant strains (BLNARs). An increase in the prevalence of BLNARs from 1.3% in 1980-1991 to 15.9% in 1995-1996.

文 献

1. 中村 明, 石川信泰, 鈴木 宏, 黒崎知道, 寺嶋周, 上原すゞ子, 新美仁男: 12 年間に分離した小児呼吸器感染症由来インフルエンザ菌の検討. 日誌, **99**: 1234-1241, 1995.
2. 久保政次, 吉田 亮, 上原すゞ子, 船橋 茂, 島貫金男, 内田佐太臣, 関 泰男, 寺嶋 周, 野本泰正, 朝倉幸子: 喀痰 (気管支分泌物) 検査 小児科臨床, **19**: 1191-1212. 1966.

3. Kilian M: A rapid method for the differentiation of *Haemophilus* strains. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* **82**: 835-842, 1974.
4. Kilian M, Sorensen I and Frederiksen W: Biochemical characteristics of 130 recent clinical isolates from *Haemophilus influenzae* meningitis. *J Clin Microbiol* **9**: 409-412, 1979.
5. Oberhofer TR and Back AE: Biotypes of *Haemophilus influenzae* encountered in clinical laboratories. *J Clin Microbiol* **10**: 168-174, 1979.
6. Gratten M: *Haemophilus influenzae* biotype VII. *J Clin Microbiol* **13**: 1015-1016, 1983.
7. Sttnek FO: *Haemophilus influenzae* biotype VIII. *J Clin Microbiol* **20**: 815-816, 1984.
8. Rosenblatt JE and Newmann AM: A rapid slide test for penicillinase. *Am J Clin Pathol* **69**: 351-354, 1978.
9. 五島嵯智子, 三橋 進, 小酒井望: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法改正について. *Chemotherapy* **29**: 76-77. 1981.
10. Uehara S, Terasima I and Nakamura A: The role of *Haemophilus influenzae* in lower respiratory infections in childhood. *Acta Paediatr Jpn*, **27**: 94-101, 1985.
11. 杉岡竜也, 黒木春郎, 石和田稔彦, 会澤治朗, 石川信泰, 上原すゞ子, 新美仁男: 1996年の小児呼吸器感染症における洗浄喀痰培養成績 第30回日本小児呼吸器学会, (於大阪), 抄録集.
12. 岸本圭司, 上原すゞ子, 寺島 周, 村松芳子: 小児下気道疾患における鼻咽腔細菌叢. *Chemotherapy* **20**: 769-774. 1972.
13. 武田紳江, 黒木春郎, 石川信泰, 村田 敦, 杉本和夫, 上原すゞ子, 新美仁男: 小児下気道感染症の起炎菌診断における洗浄喀痰培養の意義. (投稿中)
14. 黒崎知道, 中島博徳: 小児臨床材料より分離された Ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* の疫学と, その耐性機序に関する研究. *感染症誌* **59**: 103-114. 1985.
15. 上原すゞ子, 中村 明: インフルエンザ菌感染症-特に免疫血清学的診断法および Ampicillin 耐性について. 小児科 MOOK No.27, pp. 150-168, 金原出版, 1983.
16. 西岡きよ, 滝島 任: 呼吸器病原 *Haemophilus influenzae* の抗生物質感受性の検討-Ampicillin 耐性菌の現状. *感染症誌* **57**: 495-503. 1983.
17. 富山道夫: 小児上咽頭より検出された *Haemophilus influenzae* の経口抗生物質に対する薬剤感受性に関する検討. *感染症誌* **68**: 842-847. 1994.
18. Scriver SR, Walmsley SL, Kau CL, Hoban DJ, Brunton J, McGeer A, Moor TC and Witwicki E: Determination of Antimicrobial Susceptibilities of Canadian Isolates of *Haemophilus influenzae* and Characterization of Their β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 1678-1680, 1994.