

## βラクタマーゼ陰性アンピシリン耐性の f型インフルエンザ菌による侵襲性感染症： 5歳小児例

<sup>1)</sup> 神戸市立西神戸医療センター小児科, <sup>2)</sup> 同 臨床検査技術部, <sup>3)</sup> 国立感染症研究所細菌第二部,  
<sup>4)</sup> 千葉大学真菌医学研究センター感染症制御分野

宇治田 風紗<sup>1)</sup> 松原 康策<sup>1)</sup> 磯目 賢一<sup>1)</sup> 岩田 あや<sup>1)</sup>  
竹川 啓史<sup>2)</sup> 佐々木 裕子<sup>3)</sup> 大楠美佐子<sup>4)</sup> 石和田 稔彦<sup>4)</sup>

(令和2年7月27日受付)

(令和2年11月13日受理)

Key words: invasive *Haemophilus influenzae* disease, type f, β-lactamase-negative ampicillin-resistant

### 序 文

インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) は、頻度の高い小児期細菌感染症の起炎菌のひとつであり、肺炎や中耳炎などの非侵襲性感染症や、菌血症や髄膜炎などの侵襲性感染症を引き起こす<sup>1)</sup>。なかでも、インフルエンザ菌莢膜 b 型株 (*H. influenzae* type b, Hib) による侵襲性感染症の疾病負担は重く、その発症予防を目的に結合型ワクチンが世界中で導入されてきた<sup>1)~5)</sup>。わが国では2013年4月にHibワクチンが定期接種になり、以来Hibによる侵襲性 *H. influenzae* 感染症 (invasive *H. influenzae* disease, IHD) の症例数は著しく減少した<sup>5)</sup>。

Hibワクチンが先行して導入された欧米では、IHDの起炎菌は、無莢膜株 (non-typeable *H. influenzae*, NTHi) や非 b 型莢膜株が主体となっている。非 b 型莢膜株の内訳については、米国では f 型, a 型, e 型の順に多く<sup>2)</sup>、欧州では f 型に次いで e 型が多く<sup>3)</sup>、地域差を認める。一方、わが国では、Hibワクチン導入後の小児 IHD 全体の発症率は米国と比較して約 1/4<sup>2)5)</sup> と少なく、なかでも非 b 型莢膜株の IHD は 2013~2017 年の小児 IHD 31 症例中 1 例<sup>5)</sup> と稀であることが特徴である。

今回我々は、インフルエンザ菌莢膜 f 型株 (*H. influenzae* type f, Hif) による小児 IHD 例を経験した。本

症例は小児 IHD において国内初の β-lactamase-negative ampicillin-resistant (BLNAR) の Hif が起炎菌であり、かつ、背景疾患を保有しない小児においては 5 歳という比較的高い年齢の発症であったことから、その臨床経過と細菌学的性質を報告する。

### 症 例

症例：5 歳 1 カ月, 男児

主訴：発熱, 咽頭痛, 食思不振

既往歴：特記事項なし

家族歴：特記事項なし。同居する両親, 姉, 妹に発熱者なし。

生活歴：幼稚園に通園中。過去 1 年間に抗菌薬の内服歴なし。

予防接種歴：4 回の Hib ワクチンを含め、年齢に相当するワクチンはすべて接種済み。

現病歴：入院 2 日前から発熱と咽頭痛を認めた。入院当日に近医を受診し血液検査を実施したところ炎症反応の上昇を認めたため、熱源不明の感染症疑いで当院を紹介され受診した。

入院時現症：体温 40.0℃, 脈拍 156 回/分。体重 16 kg。意識は清明で、項部硬直を認めなかった。咽頭発赤を認め、扁桃は両側 II 度の腫大と右扁桃に白苔の付着を認めた。口蓋垂の偏位、鼓膜の異常所見を認めなかった。胸腹部に異常を認めず、表在リンパ節の腫大を認めなかった。

入院時検査所見：WBC 12,300/μL (分葉核球 84.5%, 桿状核球 1.5%), CRP 10.7mg/dL と炎症反応の上昇を認めた。咽頭・扁桃のスワブを用いたアデノウイルス

責任著者：(〒651-2273) 兵庫県神戸市西区梶台 5-7-1  
神戸市立西神戸医療センター小児科

宇治田 風紗

E-mail: h39d73@bma.biglobe.ne.jp

Table 1 Minimal inhibitory concentrations (MICs) of the tested antimicrobial agents against the *H. influenzae* strain isolated by blood culture, and the interpretive category

Antimicrobials	MIC (μg/mL)	Interpretive category	
		CLSI criteria	Breakpoints CLSI (μg/mL)
ABPC	4	R	S: ≤1, I:2, R: ≥4
ABPC/SBT	4/2	R	S: ≤1/2, R: ≥2/4
CTX	2	S	S: ≤2
CTRX	1	S	S: ≤2
MEPM	2	Non-susceptible	S: ≤0.5
LVFX	0.25	S	S: ≤2
ST	9.5/0.5	S	S: ≤9.5/0.5, I:19/1-38/2, R: ≥76/4

ABPC, ampicillin; ABPC/SBT, ampicillin/sulbactam; CTX, cefotaxime; CTRX, ceftriaxone;

MEPM, meropenem; LVFX, levofloxacin; ST, sulfamethoxazole-trimethoprim.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, M100-S29, 2018.

S, susceptible; I, intermediate; R, resistant

ス抗原検査, A群レンサ球菌抗原検査はいずれも陰性であった。生化学検査, 免疫関連検査 (IgG/IgG2/IgA/IgM : 1,077/152/110/102mg/dL, C3/C4 : 119/34 mg/dL) に異常を認めなかった。

入院後経過: A群レンサ球菌以外の細菌による扁桃炎と診断したが, 他の感染巣の存在も否定できなかったため, 初期治療は cefotaxime (CTX) 35mg/kg の8時間ごとの静注を選択した。入院時採取した血液から入院翌々日に *H. influenzae* が分離, 同定され, IHD と診断した。入院3日目には 37~38°C 前半に解熱傾向を認め, 咽頭痛は消失した。入院時の咽頭培養からも *H. influenzae* が検出された。入院4日目には咽頭の発赤は軽減し, 扁桃は1度に縮小し白苔は消失した。入院5日目に解熱し, 8日間のCTX治療後退院した。退院後1年間以上入院を要する感染症の発症はない。

血液ならびに咽頭から分離された *H. influenzae* 2株の解析を行った。莢膜型は, 莢膜型別抗血清 (インフルエンザ菌莢膜型別免疫血清「生研」, デンカ生研) による凝集法と, *H. influenzae* の莢膜株を示す *bexB* 遺伝子ならびに a-f 型の各莢膜遺伝子の polymerase chain reaction 増幅法<sup>67)</sup>により判定した。血液分離株は Hif と, 咽頭分離株は NTHi と同定された。β-ラクタマーゼ産生の判定はセフィナーゼディスク (日本ベクトンディッキンソン) を用い, 両株とも陰性であった。薬剤感受性試験は微量液体希釈法を用いた。感受性の判定は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2018 に準拠した。血液分離株は ampicillin (ABPC) に耐性, CTX に感性の上限, meropenem (MEPM) に非感性を示した (Table 1)。Penicillin-binding protein 3 をコードする *ftsI* の解析<sup>4)</sup>では両株とも Asp350Asn, Ser357Asn, Met377Ile, Ser385Thr, Leu389Phe, Asn526Lys の6カ所に変異を認めた。総合して両株を BLNAR と判定した。また, Multi-locus

sequence type 解析<sup>8)</sup>では, 血液分離株が ST124 と判明したが, 咽頭分離株は7つの housekeeping gene のうち6つが異なり (1遺伝子は決定不能), 同一の sequence type ではなかった。扁桃から分離された NTHi が扁桃炎の起炎菌であったのか, 臨床症状には影響しない保菌であったかの解釈は困難であった。

## 考 察

本症例の特徴は, まず第1に本邦では極めて少ない Hif による小児 IHD 例である。Hib ワクチン導入後 Hif による IHD の発症頻度 (10万小児あたり) は, 米国で0歳児, 1~4歳児, 5~17歳児が各々 0.83, 0.28, 0.06 人<sup>2)</sup>, 欧州12か国で各々 0.30, 0.07, 0.01 人 (5~19歳児)<sup>3)</sup>と報告されている。一方わが国の小児 IHD の疫学調査<sup>5)</sup>では, 2013~2017年に莢膜型を検索し得た IHD 31例のうち Hif は1例のみで, その頻度は低い。既知の本邦小児報告4例<sup>8)</sup>と本症例の比較を Table 2 に示す。上述の通り Hif による小児 IHD は5歳未満が多数を占め, 5歳以上は著減する<sup>1)~3)</sup>。本症例は5歳1カ月で発症したが, 液性免疫スクリーニング検査で異常を示さず, 侵襲性細菌感染症や耳鼻咽喉科領域感染症の反復等の免疫不全を疑う既往もなく, 比較的高い年齢で発症した理由は明らかではなかった。

第2の特徴として, 本症例の起炎菌が複数の抗菌薬に耐性または非感性であったことが挙げられる。Hib ワクチン導入前の時期には Hib の耐性化が問題視されていた<sup>4)</sup>。2011年には Hib 髄膜炎由来の約70%が BLNAR 株となり, ABPC 耐性のみならず CTX に対する感受性低下が指摘されていた<sup>4)</sup>。本症例の起炎菌は, CLSI 基準で ABPC 耐性, CTX 感性上限 (MIC : 2μg/mL), MEPM 非感性 (MIC : 2μg/mL) を示した (Table 1)。近年の NTHi による IHD の28小児例の解析<sup>9)</sup>では MEPM 感性率は100%, MIC 最高値が 0.5 μg/mL であり, CTX の MIC 最高値が 1μg/mL であ

Table 2 Clinical and microbiological features of invasive *H. influenzae* type f disease in children in Japan

Case	Age	Sex	Diagnosis	Prognosis	Microbiological data			Year*	Reference	
					Sequencing type	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )				
						ABPC	CTX			MEPM
1	3 years	M	Bacteremia	Died**	124	0.25	$\leq 0.03$	$\leq 0.06$	2004	8)
2	7 months	F	Meningitis	Survived	124	0.25	$\leq 0.03$	$\leq 0.06$	2013	8)
3	5 months	M	Meningitis	ND	124	1	0.25	0.125	2013	8)
4	ND	ND	Meningitis	ND	ND	ND	ND	ND	2017	5)
5	5 years	M	Bacteremia	Survived	124	4	2	2	2019	Present case

\*Year at onset of infection

\*\* Patient 1 had an underlying disease with mitochondrial respiratory chain complex I deficiency, which was closely related to the fatal outcome<sup>8)</sup>.

MIC, minimal inhibitory concentration; ND, not documented; ABPC, ampicillin; CTX, cefotaxime; MEPM, meropenem

ることと比較すると、本症例の感受性結果は特異である。本症例はBLNAR Hifによる本邦初の小児IHD例であり、全年齢を通じて本邦初のMEPM非感性のHifによるIHDである。

$\beta$ ラクタム系薬剤の耐性機序は $\beta$ ラクタマーゼ産生の有無と*ftsI*変異に大別される<sup>1)</sup>。*ftsI*変異は置換部位とその組み合わせによって多段階的に耐性化に関与する<sup>4)10)</sup>。第1段階は、Arg517HisあるいはAsn526Lys置換により耐性度の低いBLNARとなる。第2段階はSer385Thr置換が追加され、第3段階でLeu389Phe置換が加わると、一層ABPCの耐性化が進み、CTX感受性の大幅な低下が導かれる<sup>10)</sup>。本症例の血液分離株は、高度耐性に関連するAsn526Lys, Ser385Thr, Leu389Phe置換をすべて保有していた。また、*H. influenzae*のカルバペネム系薬剤耐性について、薬剤の流入・流出に関連する遺伝子の変異を有するNTHi株が報告<sup>11)</sup>されており、本症例も*ftsI*変異以外の耐性機序が関与していた可能性がある。なお、本児は過去1年間抗菌薬内服歴がないにもかかわらず、耐性菌による感染症を惹起したことから、集団生活の中で水平感染した可能性があり、本耐性菌の小児保菌状況についても注目していく必要がある。

この菌株が臨床的に重要な点は、本菌類似株による髄膜炎が発症した場合、通常選択されるABPC, CTX, MEPMに治療抵抗性となることが懸念される点である。莢膜株のHifはHibと同程度に侵襲的で<sup>2)3)</sup>、特に1歳未満の乳児に髄膜炎を惹起する割合はNTHiと比較して7.5倍(45% vs 6%)と高い<sup>3)</sup>。Hibワクチン導入から10年以上が経過した欧米では、非b型莢膜株によるIHDが緩徐に増加しており<sup>2)3)12)13)</sup>、今後日本でも同様の変化が出現するかの監視が必要である。一方欧米<sup>2)3)10)12)13)</sup>と比較して、わが国のBLNAR<sup>4)9)</sup>、特に第3段階までの*ftsI*変異を有するBLNARの割合は高い。これらの背景から、非b型莢膜株によるIHDの莢膜型同定は重要であり、本症例のような多剤耐性(ま

たは非感性)を示す非b型莢膜株の動向について監視を継続することが必要である。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

## 文 献

- 1) Agrawal A, Murphy TF : *Haemophilus influenzae* infections in the *H. influenzae* type b conjugate vaccine era. J Clin Microbiol. 2011 ; 49 : 3728-32.
- 2) Soeters HM, Blain A, Pondo T, Doman B, Farley MM, Harrison LH, *et al.* : Current epidemiology and trends in invasive *Haemophilus influenzae* disease-United States, 2009-2015. Clin Infect Dis. 2018 ; 67 : 881-9.
- 3) Whittaker R, Economopoulou A, Dias JG, Bancroft E, Ramliden M, Celentano LP, *et al.* : Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease, Europe, 2007-2014. Emerg Infect Dis. 2017 ; 23 : 396-404.
- 4) Ubukata K, Chiba N, Morozumi M, Iwata S, Sunakawa K, The Working Group of Nationwide Surveillance for Bacterial Meningitis : Longitudinal surveillance of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with meningitis throughout Japan, 2000-2011. J Infect Chemother. 2013 ; 19 : 34-41.
- 5) Suga S, Ishiwada N, Sasaki Y, Akeda H, Nishi J, Okada K, *et al.* : A nationwide population-based surveillance of invasive *Haemophilus influenzae* diseases in children after the introduction of the *Haemophilus influenzae* type b vaccine in Japan. Vaccine. 2018 ; 36 : 5678-84.
- 6) Falla TJ, Crook DW, Brophy DW, Brophy LN, Maskell D, Maskell D, *et al.* : PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol. 1994 ; 32 : 2382-6.
- 7) Davis GS, Sandstedt SA, Patel M, Marrs CF, Gilsdorf JR : Use of *bexB* to detect the capsule locus in *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol. 2011 ; 49 : 2594-601.
- 8) Hoshino T, Hachisu Y, Kikuchi T, Tokutake S, Okui H, Kutsuna S, *et al.* : Analysis of *Haemophi-*

- lus influenzae* serotype f isolated from three Japanese children with invasive *H. influenzae* infection. J Med Microbiol. 2015 ; 64 : 355-8.
- 9) Naito S, Takeuchi N, Ohkusu M, Takahashi-Nakaguchi A, Takahashi H, Imuta N, *et al.* : Clinical and bacteriologic analysis of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains isolated from children with invasive diseases in Japan from 2008 to 2015. J Clin Microbiol. 2018 ; 56 : e00141-18.
  - 10) Skaare D, Anthonisen IL, Kahlmeter G, Matuschek E, Natas OB, Steinbakk M, *et al.* : Emergence of clonally related multidrug resistant *Haemophilus influenzae* with penicillin-binding protein 3-mediated resistance to extended-spectrum cephalosporins, Norway, 2006 to 2013. Euro Surveill. 2014 ; 19 : 20986.
  - 11) Cherkaoui A, Diene SM, Renzoni A, Emonet S, Renzi G, François P, *et al.* : Imipenem heteroresistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* is linked to a combination of altered PBP3, slow drug influx and direct efflux regulation. Clin Microbiol Infect. 2017 ; 23 : 118.e9-19.
  - 12) Ladhani SN, Collins S, Vickers A, Litt DJ, Crawford C, Ramsay ME, *et al.* : Invasive *Haemophilus influenzae* serotype e and f disease, England and Wales. Emerg Infect Dis. 2012 ; 18 : 725-32.
  - 13) Tsang RSW, Shuell M, Whyte K, Hoang L, Tyrrell G, Horsman G, *et al.* : Antibiotic susceptibility and molecular analysis of invasive *Haemophilus influenzae* in Canada, 2007 to 2014. J Antimicrob Chemother. 2017 ; 72 : 1314-9.

Invasive *Haemophilus influenzae* Type f Disease Caused by a  $\beta$ -Lactamase-Negative Ampicillin-Resistant Strain in a 5-Year-Old Child

Nagisa UJITA<sup>1)</sup>, Kousaku MATSUBARA<sup>1)</sup>, Kenichi ISOME<sup>1)</sup>, Aya IWATA<sup>1)</sup>, Hiroshi TAKEGAWA<sup>2)</sup>,  
Yuko SASAKI<sup>3)</sup>, Misako OHKUSU<sup>4)</sup> & Naruhiko ISHIWADA<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Pediatrics and <sup>2)</sup>Department of Clinical Laboratory, Kobe City Nishi-Kobe Medical Center, <sup>3)</sup>Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, <sup>4)</sup>Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University

With the introduction of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) conjugate vaccine, while the incidence of invasive Hib disease has decreased dramatically, cases of invasive *H. influenzae* disease (IHD) caused by nontypeable and non-type b strains continue to be seen. As compared to the incidence of IHD in the United States and European countries, the incidence of IHD among children, especially that of IHD caused by non-type b strains, is quite low in Japan. Infections by highly resistant and multiple-resistant *H. influenzae* are issues of global concern.

We present the case of a previously healthy 5-year-old boy who was diagnosed as having IHD caused by a  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant (BLNAR) *H. influenzae*, type f (Hif) strain. The child was hospitalized because of fever, sore throat, and poor appetite. A blood culture obtained on the day after hospitalization grew *H. influenzae*. The child was successfully treated with intravenous cefotaxime administered for 8 days. Microbiological analysis showed that the *H. influenzae* isolate was  $\beta$ -lactamase non-producing, type f, and multi-locus sequence type 124. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of ampicillin, cefotaxime, and meropenem (MEPM) were 4, 2, and 2  $\mu$ g/mL, respectively. Based on these MICs, the organisms were categorized as resistant, susceptible, and non-susceptible to the three antibiotics, respectively (CLSI criteria). Analysis of *ftsI*, the gene encoding protein-binding protein 3 revealed Ser385Thr, Leu389Phe, and Asn526Lys substitutions, which are the mutations mainly associated with decreased  $\beta$ -lactam antibiotic susceptibility. Taken together, the isolate was determined as a BLNAR strain.

To the best of our knowledge, this is the first pediatric case of IHD caused by a BLNAR Hif strain, and the first such case in a child aged 5 years and older in Japan. Furthermore, the isolate was the first isolated MEPM-non-susceptible Hif strain causing IHD in any age group in Japan.

Continuous surveillance is essential to monitor shifts in the epidemiology of IHD, capsular type identification of the causative organisms, and antimicrobial susceptibility of *H. influenzae*.

[J.J.A. Inf. D. 95 : 137~140, 2021]