

# 研究経過報告書

1. 研究課題名 本邦の小児急性中耳炎の原因となったインフルエンザ菌の薬剤耐性および細菌学的特徴に関する研究
2. 研究代表者氏名 大石 哲也
3. 研究発表

北谷 栞, 角田 梨紗子, 香取 幸夫. 最近 14 年間に東北大学病院耳鼻咽喉・頭頸部外科において検出されたインフルエンザ菌の薬剤感受性の現状. 第 2 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会, 弘前, 2022 年 4 月 14 日~16 日

## 4. 研究実績

1. 菌株の収集と培養、菌株保存  
ビー・エム・エル総合研究所の協力のもと、本邦全域の診療所および病院からビー・エム・エル総合研究所に提出された 3 歳以下の小児急性中耳炎の中耳貯留液あるいは膿性耳漏から分離され、ヘモフィルス分画培地でインフルエンザ菌と同定された 194 株を収集した。対象菌株は東北大学大学院医学系研究科へ適切な方法で運搬し、臨床情報は患者個人名や施設名が特定されないよう匿名化した後に解析を開始した。収集したインフルエンザ菌の菌株をチョコレート寒天培地で培養し、同時に DNA 抽出をおこなった。発育したコロニーは、マイクロバンクに保存した。
2.  $\beta$ -ラクタマーゼ産生性の確認  
収集したすべてのインフルエンザ菌について、 $\beta$ -ラクタマーゼ産生の有無をニトロセフィン法を用いて判定した。 $\beta$ -ラクタマーゼ陽性は 15 株、陰性 179 株であった。 $\beta$ -ラクタマーゼ陽性の 15 株については、TEM-1、ROB-1 の型別のための PCR を行っている。
3. Multi Locus Sequence Typing (MLST)  
まず $\beta$ -ラクタマーゼ陽性 15 株の MLST から着手した。*adk*, *atpG*, *fucK*, *mdh*, *pgi*, *recA* の各ハウスキーピング遺伝子の PCR を行い、シーケンス解析を行った。既に MLST の解析が終了した株の結果は表 1 の通りである（数字は各々のハウスキーピング遺伝子のアレル番号を示す）。一部の株にはデータベースと一致するアレル番号がなく、新規アレルと思われるため、現在新規アレル番号の登録中である。それらの株についてはアレル番号が決定次第、新規 ST として登録予定である。現在、 $\beta$ -ラクタマーゼ非産生株についても MLST の PCR を進めており、今後シーケンス解析の上 ST を決定する予定である。

表 1. インフルエンザ菌シーケンス結果

	<i>adk</i>	<i>atpG</i>	<i>frdB</i>	<i>fucK</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>recA</i>
HI3	1	1	解析中	14	9	14	13
HI16	14	7	解析中	7	17	13	17
HI33	14	7	解析中	15	16	4	1
HI41	11	33	解析中	1	7	41	29
HI51	解析中	11	解析中	18	62	解析中	5
HI91	1	1	解析中	14	9	14	13
HI95	1	解析中	解析中	14	9	解析中	13
HI98	5	33	解析中	32	26	解析中	29
HI117	14	解析中	解析中	15	16	解析中	1
HI140	1	1	解析中	14	9	14	13

HI164	1	1	解析中	14	9	14	13
HI180	解析中	33	解析中	32	26	解析中	29
HI190	14	7	解析中	7	17	13	17
HI197	1	1	解析中	14	9	14	13

#### 4. ペニシリン結合タンパク (PBP3) のアミノ酸置換の検索

$\beta$ -ラクタマーゼ陽性 15 株について、PBP3 をコードする *ftsI* 遺伝子の PCR、およびシーケンス解析によりアミノ酸置換部位の検索に着手した。現在 PCR は終了しシーケンス解析とアミノ酸置換部位の検索中である。

#### 5. 莢膜型の決定

収集したすべてのインフルエンザ菌について PCR 法による莢膜型の検索を行ったところ、HI134 のみ有莢膜株であり、残りの 193 株は無莢膜型株であった。今後、HI134 に関して PCR 法を用いて莢膜型の決定を行う予定である。

今後、薬剤感受性試験、アンピシリン耐性株の *ftsI* 遺伝子のシーケンス解析、MLST、キノロン低感受性株についてのキノロン耐性決定領域におけるアミノ酸置換の解析、必要に応じてパルスフィールドゲル電気泳動に順次着手予定である。得られた結果は、国内外の学会で発表、さらには英文誌に投稿予定である。