信州大学審査学位論文

「小児感染症起因菌に関する細菌学的解析」

2014 年　3 月

久保田　紀子

目次

略語一覧 4

緒論 7

第1章　小児高度専門医療施設における Extended-Spectrum β- Lactamase (ESBL)産生腸内細菌の保菌サーベイランスに関する研究 11
1．1　諸言 12
1．2　材料と方法 17
1．2．1　対象 17
1．2．2　ESBL 疑い菌株の検出 17
1．2．3　PCR 法による *bla* ESBL の検出 17
1．2．4　*bla* TEM の塩基配列解析 18
1．2．5　統計学的解析 19
1．3　結果 19
1．3．1　*bla* ESBL の検出 19
1．3．2　ESBL 産生菌の保菌率と統計学的解析 19
1．4　考察 22

第2章　新生児集中治療部門における *Burkholderia cepacia* complex の院内感染阻止に関する研究 25
2．1　諸言 26
2．2　材料と方法 28
2．2．1　NICU 入院患者における細菌検査の実施 28
2．2．2　アウトブレイクの検出 29
2．2．3　Pulsed-field gel electrophoresis による菌株相同性解析 29
2．2．4　環境と消毒液からの *B. cepacia* complex 検出 29
2．2．5　手洗い調査 30
2．3　結果 30
2．3．1　アウトブレイクの検出 30
2．3．2　環境と消毒液からの *B. cepacia* complex 検出 33
2．3．2　手洗い調査結果と手洗いに関する啓蒙 33
2．4　考察 34

第３章　*Kingella kingae* を起因菌とする小児骨髄炎に関する研究 36

3．1　諸言　37
3．2　材料と方法　37
3．2．1　臨床検体からの *K. kingae* の検出　37
3．2．2　形態と生化学的性状による菌種同定　38
3．2．3　16S rRNA 遺伝子配列による分子生物学的菌種同定　38
3．2．4　薬剤感受性検査　38
3．2．5　血清抗体価の測定　38
3．3　結果　39
3．2．1　症例　39
3．3．2 入院時検査所見　39
3．3．3　掻爬組織からの *K. kingae* の検出と同定　41
3．3．4　薬剤感受性結果　41
3．3．5　血清抗体価　42
3．3．6　治療経過　42
3．4　考察　43

第 4 章　オレイン酸栄養要求性 *Enterococcus faecalis* small-colony variant に関する研究　45
4．1　諸言　46
4．2　材料と方法　47
4．2．1　臍炎部からの *E. faecalis* SCV の検出　47
4．2．2　生化学的性状による菌種同定　47
4．2．3　16S rRNA 遺伝子配列による分子生物学的菌種同定　47
4．2．4　薬剤感受性検査　48
4．2．5　Pulsed-field gel electrophoresis による菌株相同性解析　48
4．2．6　栄養要求性試験　48
4．2．7　SCV 株の脂肪酸濃度依存性発育試験　48
4．2．8　SCV 株からの revertant 株発生率と安定性　49
4．2．9　SCV 株における FabZ1 遺伝子塩基配列解析　49
4．3　結果　49
4．3．1　症例　49
4．3．2　臍炎部からの *E. faecalis* SCV の検出　50
4．3．3　生化学的性状による菌種同定　50
4．3．4　16S rRNA 遺伝子配列による分子生物学的菌種同定　50
4．3．5　SCV 株栄養要求性　52
4．3．6　薬剤感受性結果　55

4．3．7　SCV 株からの revertant 株発生率と安定性　55
4．3．8　Pulsed-field gel electrophoresis による菌株相同性　56
4．3．9　*fabZ1* 遺伝子塩基配列解析　57
4．4　考察　58

総括　61

引用文献　65

関係論文　77

謝辞　78

略語一覧

抗菌薬

A/C	amoxicillin/clavulate	アモキシシリン/クラブラン酸
A/S	ampicillin /sulbactam	アンピシリン/スルバクタム
ABPC	ampicillin	アンピシリン
AMK	amikacin	アミカシン
AZT	aztreonam	アズトレオナム
C/S	cefoperazone/sulbactam	セフォゾプラン/スルバクタム
CAM	clarithromycin	クラリスロマイシン
CAZ	cefrazidime	セフタジジム
CCL	cefaclor	セファクロール
CDTR	cefditoren	セフジトレン
CEZ	cefazolin	セファゾリン
CFIX	cefixime	セフィキキム
CFPM	cefepime	セフェピム
CFPN	cefcapene	セフカペン
CFS	cefsulodin	セフスロジン
CLDM	clindamicin	クリンダマイシン
CMZ	cefmetazol	セフメタゾール
CP	chloramphenicol	クロラムフェニコール
CPDX	cefpodoxime	セフポドキシム
CPFX	ciprofloxacin	シプロフロキサシン
CPR	cefpirome	セフピロム
CTM	cefotiam	セフォチアム
CTRX	ceftriaxone	セフトリアキソン
CTX	cefotaxime	セフォタキシム
CZOP	cefozopran	セフォゾプラン
EM	erythromicin	エリスロマイシン
FMOX	flomoxef	フロモキセフ
FOM	fosfomycin	ホスホマイシン
GM	gentamicin	ゲンタマイシン
IPM	imipenem	イミペネム
LVFX	levofloxacin	レボフロキサシン
MEPM	meropenem	メロペメム
MINO	minocycline	ミノサイクリン

P/T	piperacillin/tazobactam	ピペラシリン/タゾバクタム
PCG	penicillin	ペニシリン
PIPC	piperacillin	ピペラシリン
REP	rifanpicin	リファンピシン
SP	streptomucin	ストレプトマイシン
ST	sulfamethoxazole/trimethoprim	スルファメトキサゾール/トリメトプリム
TC	tetracycline	テトラサイクリン
TOB	tobramycin	トブラマイシン
VCM	vancomycin	バンコマイシン

検査項目

WBC	white blood cell	白血球
Neut	neutrophil	好中球
Lymph	lymphocyte	リンパ球
Mono	monocyte	単球
Eosino	eosinocyte	好酸球
Baso	basocyte	好塩基球
RBC	red blood cell	赤血球
Hb	hemoglobin	ヘモグロビン
Hct	hematocrit	ヘマトクリット
Plt	platelet	血小板
ESR	erythrocyte sedimentation rate	赤血球沈降速度
TP	total protein	総タンパク
ALB	albmin	アルブミン
BUN	blood urea nitrogen	尿素窒素
UA	uric acid	尿酸
CRE	creatinine	クレアチニン
T-BIL	total bilirubin	総ビリルビン
Na	natrium	ナトリウム
K	kalium	カリウム
Cl	chlorine	クロール
Ca	calcium	カルシウム
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノ酸転移酵素

ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノ酸転移酵素
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
ALP	alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
γ-GTP	gamma-guanosine triphosphate cyclohydrolase	グアノシン三リン酸シクロヒドラーゼ
CK	creatine kinase	クレアチンリン酸化酵素
GLU	glucose	グルコース
T-CHO	total-cholestelol	総コレステロール
CRP	c-reactive protein	C 反応性タンパク

その他

CDC	centers for disease control and prevention	アメリカ疾病予防管理センター
CFU	colony forming unit	
CLSI	clinical and laboratory standerds institute	アメリカ臨床検査標準委員会
ESBL	extended-spectrum β-lactamase	基質特異性拡張β−ラクタマーゼ
ICD	infection control doctor	感染制御専門医
ICN	infectionccontrol nurses	感染制御専門看護師
McF	Macfarland	マクファーランド濁度
MDRP	multi drug-resistant pseudomonas aeruginosa	多剤耐性緑膿菌
MIC	minimum inhibitory concentration	最小発育阻止濃度
MRI	magnetic resonance imaging	核磁気共鳴画像法
MRSA	methicillin-resistant staphylococcus aureus	メチシリン耐性黄色ブドウ球菌
NICU	neonatal intensive care unit	新生児集中治療部門
ONPG	*O*-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	
PBP	penicillin binding protein	ペニシリン結合性タンパク
PFGE	pulsed-field gel electrophoresis	パルスフィールドゲル電気泳動
Q.O.L	quality of life	生活の質
SCV	small-colony variant	

緒論

感染症はヒトの疾病において最も一般的な疾病の一つであるが、軽微な普通感冒から重篤な場合は死に至る全身感染症まで、その臨床症状はバリエーションに富んでいる。これは、感染症の原因微生物の多様性とともに、宿主となるヒトの免疫状態の多様性にも原因がある。悪性腫瘍などの重篤な基礎疾患を持つ患者、他の基礎疾患の治療のために免疫抑制剤を使用している患者、化学療法により二次性に免疫力が低下している患者、手術後患者、加齢により免疫力が低下している高齢者、まだ免疫システムが成熟していない小児などの通常よりも感染を受けやすい状態にある患者、すなわち易感染性宿主は、感染の重症化もしくは通常は感染の原因とはならないような微生物によって感染が引き起こされる。とりわけ小児に関しては、免疫機能の成熟に新生児期、乳児期、幼児期、学童期までの長い期間を必要とし、多くの場合には外来からの病原微生物に初感染で、成人における易感染性宿主とは異なる小児に特有の感染症を発症する。

宿主側の感染防御機構は、まず物理化学的感染防御機構があり、ついで貪食細胞や NK 細胞、補体などによる自然免疫が働き、その後 B 細胞系、T 細胞系による獲得免疫系が働く。皮膚、粘膜は外来微生物の侵入に対する物理的な障壁であり、リゾチームや胆汁などの消化酵素や胃酸は侵入微生物に対する化学的防御を行う。また、正常細菌叢は外来微生物と発育競合することで防御機構の一端を担っている。自然免疫は抗原による前感作を必要とせず、生まれながらに生体に備わっている防御機構であり、すべての動物種に備わっている。外来微生物の細胞膜に存在するリポ多糖やペプチドグリカンなどの細胞壁多糖類のように多くの病原体が共通して持つ分子パターンを認識し補体が反応し、貪食細胞の遊走を促す。貪食細胞には好中球、単球、樹状細胞などがあり、異物と認識した微生物を貪食消化する。その後、標的となる外来微生物に対して特異的に反応する抗体産生 B 細胞による抗原(=外来微生物)抗体反応による体液性免疫が働く。また、特異的な抗原レセプターを細胞表面に表出した T 細胞は標的微生物に特異的に結合する細胞性免疫として働く。この B 細胞と T 細胞による獲得免疫は生後抗原と接触することによって後天的に獲得される防御機構であり、脊椎動物種に認められる。これら一連のシステムが正しく作用することにより、病原菌は駆逐され感染の拡大を防ぐ [1)]。

通常、10 か月間母体内で成長し出生した新生児(満期産児)であってもこれらの感染防御機構は未熟で、母体内における在胎週数が少ない状態で出生した新生児(早産児)についてはより一層未熟な免疫機構しか持たない。

一般に新生児は、成人と比較して皮膚は薄く、胃酸 pH は中性側に傾いている。

補体血中濃度は成人の 2/3 程度と低く、NK 細胞活性は低い [2]。体液性免疫(B 細胞系)はとくに未熟である。ただし妊娠 34 週以降に出生した新生児は、母体から胎盤を通過して移行した十分量の免疫グロブリン IgG を有しており、この母体由来特異抗体により、疾患特異的に、たとえば麻疹、風疹、溶血連鎖球菌感染症などの発症を阻止あるいは軽症化できる。一方妊娠 34 週以前(26 週から 33 週)で出生した新生児は、母体からの十分量の IgG 供給を受けていないためこのような受動免疫を最大限に活用することができない。さらに 26 週以前に出生した新生児の体内には母親由来の IgG は全く存在せず [3]、その易感染性は決定的である。

新生児は、無菌状態の母体体内から出生するときの産道および環境中に存在する微生物にさらされ、それらの中の一定の微生物、*Streptococcus* 属、*Staphylococcus* 属、*Corynebacterium* 属、*Neisseria* 属などが口腔や鼻腔などの粘膜、皮膚表面に定着し常在細菌叢を形成していく。また、哺乳や食品の経口摂取により腸内における常在細菌叢も形成されていく [4]。これら常在細菌叢の獲得や皮膚の角化進行や皮脂分泌の適正化によるバリア機能の進展、補体活性値の上昇や、抗体産生能の発達など、学童期までの長い期間をかけてさまざまな免疫防御機構を確立させていく。

免疫機構の大きな特徴に、認識の特異性と記憶がある。それぞれの病原体に対して特異的に認識され誘導された免疫は記憶される。過去に感染したことのある病原体が再感染すると、免疫系は迅速かつ強力に反応し防御する。小児は、初めて病原性微生物が体内に侵入し暴露される初感染を繰り返しながら記憶免疫を発達させていく。この点においても成人とは異なった特徴をもつ易感染性宿主である。

小児における感染症は、その起因菌種、発症経過、臨床症状、治療選択において成人とは異なった特徴を示す。

小児における感染起因菌の薬剤感受性パターンは、成人のそれと異なる場合があることが知られている。たとえば、成人において感染起因菌として検出される *Escherichia coli* にキノロン系薬耐性株が増加しているのに対して、小児患者から検出される *E. coli* にキノロン系薬耐性株は多くない [5]。また咽頭から検出される *Haemophilus influenzae* に関しては、成人よりも小児において耐性化傾向が高い [6]。そのため、成人由来感染起因菌の薬剤感受性パターンをそのまま小児由来菌に当てはめるべきではないと考えられる。本研究では、これまでに明らかになっていなかった本邦の小児(基礎疾患を有し、小児専門 3 次医療施設に入院した小児)における Extended spectram β-lactamase: ESBL 産生腸内細菌の保菌サーベイランスを行い保菌状況を解析し、患者背景に関連する保菌リスクを分析した。この保菌サーベイランスから得られた知見は、成人を対象

とした保菌率からの推測値でなく、小児専門 3 次医療施設入院患者を対象とした実測値を提供し、より効果的な治療の提供に有効に活用されると期待できる。

また、小児の中でも新生児は、感染症の発症経過に特に際立った特徴を有する。重篤な症状を呈する血流感染症などであっても、一般的な感染症兆候である発熱や白血球数の増加、C-reactive protein: CRP 値の上昇等の変化がとらえにくい [3)]。これらはすべて、感染起因菌に対する免疫系細胞の活性化の結果ひきおこされる身体所見であるため、免疫系の未熟な低出生体重児であるほどその傾向は強い。そのため、感染症発症の予兆がとらえにくく、感染兆候を検出したタイミングにはすでに感染が進行している場合もある。よって、感染症の原因となりうる細菌からの防御が重要である。本研究では、新生児集中治療部門でおこった *Burkholderia cepacia* comple の院内感染アウトブレイクを検出し、Infection control team: ICT の積極的な介入によって、継続的に続いていた *B. cepacia* complex による院内感染を阻止した事例について提示した。本研究において示した知見は、今後、起こりうるアウトブレイク発生に際する普遍的な手法として活用が可能であり、ひいては院内感染を原因とする新生児での感染症発症の防止に貢献できると考えられる。

一方、基礎疾患を有することのない健康な小児であっても、健康成人では感染症の原因菌となることのない常在菌や弱毒菌が感染の原因となりうることは、成人における感染症と同一に小児特有の感染起因菌を検出し、治療することでは不十分であることを示す。そのため小児に特化した感染症の知見・検出系・治療が必要とされ、小児特有の感染起因菌の特徴を明らかにすることが必要である。中でも発症頻度の低い起因菌に関する情報は十分ではないことから、本研究において、成人では一般的に感染起因菌となり難い *Kingella kingae* による骨髄炎を発症した 3 才男児の症例について、またさらに、生下時より繰り返す臍炎の起因菌となった *Enterococcus faecalis* Small-colony variant : SCV について研究した。比較的まれな感染症であると考えられていた *K. kingae* における骨髄炎についての知見は小児感染症を理解するうえで有用であり、今後のより効果的な治療の提供に有効に活用されると期待できる。臍炎の原因となった *E. faecalis* SCV 株については、オレイン酸に栄養要求性を示す *E. faecalis* であることを突き止めた。本株はゲンタマイシンに高度耐性を示し、β-ラクタム系薬にも耐性の傾向を示した。これは臨床的ゲンタマイシン不応性であることと合致し、反復性臍炎の起因菌として妥当性は高いと考えられた。これまでに *E. faecalis* SCV 株を起因菌とする臍炎の報告例はない。*E. faecalis* SCV 株が臍炎の原因となり得るという知見は、小児感染症分野において広く知られるべき情報である。SCV 株は菌種特徴的所見を呈さないことから、臨床検査においては同定不能菌として扱われることが想定され、その場合には治療に必要な情報が

十分に提供されていないと考えられる。本研究において明らかにされた知見は、感染起因菌同定の精度向上に貢献し、より効果的な治療の提供に寄与する。

本研究は、すべて長野県立こども病院倫理委員会の許諾を得て行った。(倫理委員会受付番号 24-38、22-20、24-3、24-4)

第　1　章

小児高度専門医療施設における
Extended-Spectrum　β - Lactamase (ESBL)
産生腸内細菌の保菌サーベイランスに関する研究

第１章　小児高度専門医療施設における Extended-Spectrum β- Lactamase（ESBL）産生腸内細菌の保菌サーベイランスに関する研究

1．1　諸言

1929 年に A. Fleming によって発見されたペニシリンにより、人類は感染症を治療するための効果的なツールを手にした。ペニシリンは青かびの 1 種である *Penicillium* 属菌から単離された抗生物質で、β-ラクタム環と呼ばれる特徴的な 4 員環構造を持つ。細菌には、ヒトの細胞には存在しない細胞壁が存在し、これは重合したペプチドグリカン層を主な成分とする。ペニシリンを含むβ-ラクタム薬は細菌の細胞壁ペプチドグリカン合成系の最終段階の架橋結合に関与する酵素 penicillin binding protein : PBP に結合しその peptidoglycan trans peptidase 活性を阻害する [7]。これにより細胞壁合成が阻害され細菌は溶菌し、死滅する。　β-ラクタム薬の構造は細胞壁の D-Ala-D-Ala 末端と類似した L-Cys-D-Val の立体構造を有するため、β-ラクタム薬が細菌の peptidoglycan trans peptidase 酵素の活性中心に結合し、酵素活性を阻害する [8]。ヒトの体内組織を構成する細胞には細胞壁は存在しない。一方、原核細胞である細菌には細胞壁が存在するため、β-ラクタム薬は人体内で増殖した細菌のみを選択的に死滅させることができる [7]。この特異的な選択毒性によりβ-ラクタム薬は、高濃度での使用が可能となり、副作用の軽減と殺菌力の増強を併せ持つことができた。β-ラクタム薬はその化学的構造からペネム、セフェム(セファロスポリン、セファマイシン)、オキサセフェム、モノバクタムに分類される。また、抗菌スペクトラムの観点から第一世代から第四世代に分類され、一般的には世代が進むにつれ抗菌スペクトラムは広域化する。現在 150 種類以上の抗菌薬があり、そのうちの過半数はβ-ラクタム薬である。感染症治療において最も重要な抗菌薬の一つである。

一方、1940 年に Abrahum ら [9]によってペニシリン耐性 *S. aureus* の検出が報告された。この株はペニシリンのペプチド結合(-CO-NH-)を加水分解しβラクタム環を開環させることでペニシリンの抗菌活性を阻害するペプチダーゼ酵素を有していた。このペプチダーゼ酵素はβ-ラクタマーゼと呼ばれ、責任遺伝子はプラスミド上に座位しており、容易に別の菌株、菌種に遺伝子伝達された。その後、β-ラクタム薬の臨床的使用が広がっていく中で様々な菌種から様々なβ-ラクタマーゼが検出された。Ambler は膨大な種類のβ-ラクタマーゼをその分子生物学的相同性により Class A、Class B、Class C、Class D の 4 種類に分類した [10]。また Bush らはβ-ラクタマーゼの機能により 1、2(2a、2b、 2be、 2br、2c、2d、2e、2f)、3、4 に分類した [11]。

1983 年に knothe ら [12]によって報告されたβ-ラクタマーゼは、それまでに発見されていたβ-ラクタマーゼとは一線を画し、第 3 世代セフェム系薬であるセフォタキシムを分解するものだった。このβ-ラクタマーゼはプラスミドに耐性遺伝子が座位しており、ペニシリン系薬に基質特異性を示す SHV 型β-ラクタマーゼにアミノ酸置換が生じることでセフォタキシムに対する基質特異性を獲得した酵素であることが明らかとなった。このようにβ-ラクタマーゼ遺伝子にアミノ酸置換が起こることでそれまでは基質として分解できなかった第 3 世代、第 4 世代セフェム系薬、モノバクタム系薬を基質として分解するβ-ラクタマーゼは、基質特異性拡張β-ラクタマーゼ(Extended-Spectrum β-Lactamase: ESBL)と呼ばれる。ESBL は Ambler のクラス分類ではクラス A に、Bush らの分類では 2be に分類され、活性中心にセリン残基を有するセリンペプチダーゼであり、クラブラン酸によりそのβ-ラクタマーゼ活性が阻害される特徴を有する。プラスミドに耐性遺伝子が座位するため、菌株・菌種を越えて容易に耐性遺伝子の伝達が起こる。ESBL 耐性遺伝子はアミノ酸配列の相同性により TEM 型、SHV 型、CTX-M、VEB、GES 型に分別され [13]、それぞれの亜型を合計すると 300 種類を超える。

ESBL 産生菌は地域により流行株が異なることが報告されている。以前は欧米や韓国では TEM 型や SHV 型の検出頻度が高かったが、現在では本邦を含め世界的に CTX-M 型 ESBL 産生菌が主流となっている [14, 15, 16]。CTX-M 型 ESBL はそのアミノ酸配列の相同性によって 5 つのグループ(CTX-M-1 group、CTX-M-2group、CTX-M-8 group、CTX-M-9 group CTX-M-25 group)に型別されている。本邦ではこのうち CTX-M-1 group、CTX-M-2group、CTX-M-9 group に分類される ESBL 産生株が主流である [17]。

ESBL 遺伝子は、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Proteus mirabilis*、*Serratia marcescens*、*Enterobacter cloacae*、*Salmonella enterica* serovar *enteritidis*、*Pseudomonas aeruginosa* など様々なグラム陰性桿菌で菌種を越えて検出される [18, 19, 20]。しかし日常的な臨床検査においては Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI M100-S19 [21]版に従い *E. coli*、*K. pneumoniae*、*K. oxytoca*、*P. mirabilis* の 4 菌種に限った検出が行われている。

一般的に感染症起因菌検出を目的とする検査は、患者に何らかの感染兆候(発熱や悪寒、疼痛、発赤、低体温、白血球数の増加・減少など)を認めた段階で、感染の原因巣(推定)からの感染起因菌の検出検査を開始する。起因菌の検出、菌種同定、薬剤感受性検査までには 2～3 日間必要なことが一般的で、場合によってはそれ以上の検査期間が必要となる。検査結果が判明するまでの数日間抗菌薬による治療を行わないことは、感染の悪化をひきおこし、場合

によっては致死的である。そのため検査結果の判明までの間に、臨床症状や患者の年齢、他の臨床検査データ、これまでの感染履歴等から総合的に判断し、適切と推測される抗菌薬を選択し治療を開始する。これを empiric therapy : エンピリック治療と表現し、現在の感染症治療における初動治療として一般的に用いられる方法である。このエンピリック治療に際して有効な判断材料の一つとして、各病院や地域で一定期間に検出された感染起因菌の抗菌薬感受性(ブレイクポイントカテゴリーSensitive)を累積して、菌種ごとに一覧表として示したアンチバイオグラムがある。アンチバイオグラムは、限定された集団において各抗菌薬が治療的効果を示す菌がどの程度の割合で存在するかを示すため、数値が高いほど治療成功の確率が高いことが推定される。一例として 2012 年度の長野県立こども病院におけるグラム陰性桿菌のアンチバイオグラムを表 1. に示した。たとえば、*E. coli* に対する ABPC : ampicillin の感性率は 45%であり、大腸菌感染症を疑う場合のエンピリック治療に ABPC を選択すると約 1/2 の確率で治療効果が得られないことが示唆される。一方 IPM: imipenem もしくは AMK : amikacin を使用すれば 100%の治療効果が見込まれる。それぞれの集団(地域や病院、場合によっては病棟ごと)のアンチバイオグラムは、エンピリック治療に有用なデータを提供することができる。ただし一般的にアンチバイオグラムは過去に感染をおこし、その感染起因菌が同定され、薬剤感受性検査を行った菌についてのデータのみが反映される。そのため、感染症の起因菌となっていない保菌状態にある細菌についての情報は加味されない。よって対象となる集団ごとの耐性菌の保菌率を知ることはエンピリック治療のためにアンチバイオグラムに加えたさらなる情報を提供できる。これまで小児 3 次機能医療施設である長野県立こども病院における ESBL 産生菌の保菌状況は把握されておらず、成人を対象とした本邦の中規模病院での検出率 [22]や、特定地域における多施設での検出状況 [23]、本邦における健康成人保菌状況 [24]を参考に、当院における ESBL 産生菌保菌率を推定するにすぎなかった。成人と小児とでは抗菌薬に対する感性率が異なる場合がある [5, 6]ことが知られており、同様に ESBL 産生菌の保菌状況に関しても成人を対象とした報告例からの推定が適切でない可能性が考えられた。そのため、本研究では小児 3 次機能医療施設に入院した患児における ESBL 産生菌の正確な保菌率を算出することを目的に、長野県立こども病院に入院した患児を対象に、糞便中の ESBL 産生菌を検出し保菌率を算出した。CLSI M100-S19 において定められた ESBL 産生菌検出法 [21]では AmpC 産生型腸内細菌も含めた ESBL 産生菌の検出は困難であるため、本研究では PCR 法による ESBL 遺伝子の検出を行った。そのため、臨床検査のレベルでは検出不能である ESBL 遺伝子産生性腸内細菌を含めた腸内細菌全般

をターゲットとした保菌率算出が可能となった。また、ESBL 産生菌保菌者に関する医学的背景と保菌リスクファクターとの関連性について検討し、考察した。

表 1.　2012 年度グラム陰性桿菌アンチバイオグラム

菌名	ABPC	PIPC	CEZ	CTM	CTX	CAZ	CPR	CMZ	CCL	CFPN	FMOX	IPM	A/C	C/S	AZT	AMK	GM	MINO	LVFX	ST	FOM
Escherichia coli	45%	52%	60%	72%	80%	79%	79%	95%	64%	72%	95%	100%	81%	98%	80%	100%	91%	90%	72%	81%	95%
Citrobacter freundii	14%	57%	0%	29%	71%	57%	100%	43%	0%	71%	14%	100%	0%	71%	71%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Klebsiella pneumoniae	0%	34%	69%	78%	81%	78%	78%	97%	78%	72%	100%	100%	91%	81%	78%	94%	88%	84%	94%	81%	38%
Klebsiella oxytoca	11%	35%	58%	84%	84%	85%	84%	100%	84%	74%	100%	100%	100%	85%	80%	85%	85%	95%	100%	85%	40%
Enterobacter cloacae	8%	92%	0%	8%	92%	100%	92%	0%	0%	67%	8%	100%	0%	92%	83%	92%	92%	92%	100%	92%	42%
Serratia marcescens	23%	71%	0%	4%	77%	79%	100%	88%	0%	54%	88%	100%	4%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	36%

菌名	CAZ	MINO	LVFX	ST	CFPM	CZOP
Stenotrophomonas maltophilia	50%	100%	96%	92%	29%	8%

菌名	PIPC	CAZ	CFPM	CZOP	IPM	MEPM	C/S	AMK	TOB	GM	MINO	LVFX	ST	CPFX
Acinetobacter baumani/hemolyticus	69%	78%	78%	78%	100%	100%	97%	91%	88%	78%	100%	75%	78%	75%

菌名	PIPC	CAZ	CFS	CFPM	CZOP	IPM	MEPM	C/S	AZT	AMK	TOB	GM	LVFX	CPFX	FOM	P/T
Pseudomonas aeruginosa	86%	86%	72%	84%	88%	72%	78%	79%	78%	95%	99%	89%	85%	88%	5%	90%

ABPC: ampicillin, PIPC: piperacillin, CEZ: cefazolin, CTM: cefotiam, CTX: cefotaxime, CAZ: cefrazidime, CPR: cefpirome, CMZ: cefmetazol, CCL: cefaclor, CFPN: cefcapene, FMOX: flomoxef, IPM: imipenem, A/C: amoxicillin/clavulate, C/S: cefoperazone/sulbactam, AZT: aztreonam, AMK: amikacin, GM: gentamicin, MINO: minocycline, LVFX: levofloxacin, ST: sulfamethoxazole/trimethoprim, FOM: fosfomycin, CFPM: cefepime, CZOP: cefozopran, MEPM: meropenem, TOB: tobramycin, CPFX: Ciprofloxacin, CFS: cefsulodin, P/T: piperacillin/tazobactam

1．2　材料と方法

1．2．1　対象

長野県立こども病院は長野県安曇野市にある小児 3 次医療施設であり、小児科 3 病棟、小児 ICU 病棟、新生児病棟、産科病棟を有する 160 床の小児・周産期医療施設である。

2011 年 6 月の特定日に長野県立こども病院に小児科に入院しておりインフォームドコンセントを得られた 62 名のうち、検査日に糞便検体の採取が可能であった 50 名をサーベイランスの対象とした。

1．2．2　ESBL 産生疑い菌株の検出

50 名の患児より採取された糞便検体を CHROMager ™ ESBL 培地(Kanto chemical Co., Inc., Tokyo, Japan)に塗り広げ、35℃24 時間の好気培養を行った。発育コロニーを釣菌し、ドリガルスキー乳糖加寒天培地(Nippon Becton Dickinson Co., Tokyo, Japan)にて 35℃ 1 晩好気培養を行い純培養した。純培養された菌株は、ESBL 産生疑い菌株として Neg Combo 6.11J パネル(Simens Healthcare Diagnostics, Tokyo, Japan)を用いて、全自動細菌同定薬剤感受性測定装置 MicroScan WalkAway (Siemens Healthcare Diagnostics, München, Germany)を使用して菌種同定と微量液体希釈法による薬剤感受性試験を行った。

1．2．3　PCR 法による *bla* ESBL の検出

純培養された 1 コロニーを 200μl の滅菌蒸留水に浮遊させ DNA 抽出用サンプルとして使用した。QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 手順書に従って使用し、DNA の溶出は 100μl の滅菌蒸留水で行った。

ESBL 関連βラクタマーゼ遺伝子検出は、*bla* TEM、*bla* SHV、*bla* CTX-M-1-group、*bla* CTX-M-2-group、*bla* CTX-M-9-group 遺伝子群を標的とした Multiplex-PCR 法によって行った。Table 2 にプライマー配列を示した。プライマーは *bla* TEM；0.5μM、*bla* SHV；8μM、*bla* CTX-M-1-group；2μM、*bla* CTX-M-2-group；4μM、*bla* CTX-M-9-group；4μM に混合したプライマー混合液を作成し使用した [25]。QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen)を用い、Multiplex PCR Master Mix 2.5μl、5 種類のプライマー混合液 2.5μl、DNA サンプル 2.5μl、滅菌蒸留水 17.5μl を混和し、サーマルサイクラー　i-Cycler (Bio Rad, Hercules, U. S. A.)を使用し、95℃15 分の Taq ポリメラーゼ賦活化反応の後、95℃30 秒-58℃30 秒-72℃30 秒の遺伝子増幅反応を 25 サイクル行い、72℃7 分の伸

長反応の後 4℃にて冷却を行った。PCR 産物 10μl を 2%アガロースゲル(Sigma Aldrich, St.Louis, U. S. A.)電気泳動し、増幅産物の分子量で増幅された *bla* ESBL 遺伝子グループを決定した。

表 2. ESBL 遺伝子検出用 PCR プライマー

bla ESBL gene	プライマー配列		増幅産物 (bp)
bla TEM	forward	5'-taagagaattatgcagtgctgcc-3'	459
	reverse	5'-catccatagttgcctgactcc-3'	
bla SHV	forward	5'-tgacgaacagctggagcgaaa-3'	511
	reverse	5'-gcgctctgctttgttattcgg-3'	
bla CTX-M-1 group	forward	5'-gcgtgataccacttcacctc-3'	260
	reverse	5'-tgaagtaagtgaccagaatc-3'	
bla CTX-M-2 group	forward	5'-tgataccaccacgccgctc-3'	341
	reverse	5'-tattgcatcagaaaccgtggg-3'	
bla CTX-M-9 group	forward	5'-atcaagcctgccgatctggtta-3'	293
	reverse	5'-gtaagctgacgcaacgtctgc-3'	
*bla*TEM full	forward	5'-ccgctcatgagacaataa ccc-3'	940
	reverse	5'-atatgagtaaacttggtctgacag-3'	

1. 2. 4 *bla* TEM の塩基配列解析

TEM-1、TEM-2、SHV-1 型β-ラクタマーゼ遺伝子は一部の腸内細菌属菌が染色体性に遺伝子を有し、基質特異性の拡大は認められないペニシリナーゼとして機能している [17]。*bla* ESBL 遺伝子の検出用 PCR プライマーのうち *bla* TEM と bla SHV 特異的プライマーでは ESBL の性質を持たない *bla* TEM-1、*bla* TEM-2、*bla* SHV-1 ペニシリナーゼ遺伝子も増幅される。よって ESBL 遺伝子の確定のために、PCR によって *bla* TEM 遺伝子が増幅された菌株の *bla* TEM 遺伝子の塩基配列解析を行った。

bla TEM コーディング領域全長を標的とした *bla* TEM full プライマー(表 2.)を用いた PCR 反応を行い、DTCS quick start master mix kit(Beckman Coulter Inc., Brea, U. S. A) を用いたシークエンス反応後、CEQ 2000XL

DNA analysis system (Beckman Coulter Inc.)にて一本鎖 DNA 塩基配列を決定した。得られた塩基配列から blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) にて *bla* TEM-1、*bla* TEM-2 とのアミノ酸相同性解析を行った。

1．2．5　統計学的解析

統計学解析はχ二乗検定とフィッシャーの正確確率検定を解析に用い、R ソフトウェアを用いて解析した。P-value<0.05 をもって有意差ありと判定した。

1．3　結果

1．3．1　*bla* ESBL の検出

表 3. に示したように CHROMager ™ ESBL 培地によるスクリーニングでは 15 名の検体で ESBL 産生疑い株が検出され、PCR 法にて陽性を示した株は 8 名から 11 株検出された。そのうち *bla* TEM 遺伝子は塩基配列解析結果によりすべて *bla* TEM-1 でありペニシリナーゼと判定した。

bla ESBL 遺伝子は、6 名の検体から 9 株の菌種で検出された。内訳は *Citrobacter freundii* 3 株、*Citrobacter amalonaticus* 1 株、*Enterobacter aerogenes* 1 株、*Enterobacter agglomaticus* 1 株、*Klebsiella pneumoniae* 1 株、*Serratia marcescens* 1 株、*Escherichia coli* 1 株である。*bla* ESBL 遺伝子はすべて *bla* CTX-M-1group だった。

1．3．2　ESBL 産生菌の保菌率と統計学的解析

検査対象となった 50 名の患児の基本情報と ESBL 産生株保菌の有無での統計学的解析結果を表 4. に示した。

50 名のうち 6 名の検体から ESBL 産生菌が検出され、ESBL 産生菌保菌率は 12%だった。男女間での保菌率に大きな差はなく、1 歳以下、1～4 歳、5～9 歳、10 歳以上の年齢区分内での ESBL 産生菌保菌率は、5～9 歳群での 20%が最も高かった。3 か月以内の抗菌薬投与があった群における ESBL 産生菌保有率は 14.8%で、抗菌薬投与のなかった群と比較したオッズ比は 1.8 と算出された。P-value は 0.67 だった。また、基礎疾患ごとでの ESBL 産生菌保有率は心疾患で最も高く 23.5%だった。しかし、これらの差異に統計学的な有意差は認められなかった。

表 3. *bla* ESBL 産生菌検出結果

患者番号	CHROMager ESBL	検出菌	*bla* ESBL PCR
1	+	*Escherichia coli*	TEM*
2	+	*Escherichia coli*	TEM*
3	+	*Escherichia coli*	−
4	+	*Klebsiella pneumoniae*	TEM*、CTX-M1
	+	*Citrobacter freundii*	TEM*、CTX-M1
5	+	*Citrobacter freundii*	TEM*、CTX-M1
	+	*Citrobacter amalonaticus*	TEM*、CTX-M1
6	+	*Enterobacter agglomerans*	TEM*、CTX-M1
	+	*Citrobacter freundii*	TEM*、CTX-M1
7	+	*Escherichia coli*	TEM*、CTX-M1
8	+	*Citrobacter freundii*	−
9	+	*Enterobacter aerogenes*	−
10	+	*Enterobacter cloacae*	−
11	+	*Enterobacter aerogenes*	−
12	+	*Enterobacter aerogenes*	TEM*、CTX-M1
13	+	*Enterobacter cloacae*	−
14	+	*Enterobacter cloacae*	−
15	+	*Serratia marcescens*	TEM*、CTX-M1

CHROMager ESBL：ESBL 産生株スクリーニング用培地、＋：発育コロニーあり、－：*bla* ESBL PCR 検出なし. TEM*：塩基配列解析によって *bla* TEM-1 と確定.

表 4.　患者背景と ESBL 産生株検出率

	Total (人)	ESBL+ (人)	ESBL- (人)	ESBL 保菌率(%)	オッズ比 (95%C.I.)	P
総数	50	6	44	**12.0**		
性別						
男	27	3	24	11.1	0.84 (0.10-6.95)	1
女	23	3	20	13.0	--	
年齢群(才)						
<1	12	1	11	8.3	0.56 (0.006-49.9)	
1~4	16	1	15	6.3	0.42 (0.005-36.6)	
5~9	15	2	12	**20.0**	1.47 (0.09-91.6)	
>10	7	1	6	14.3	--	
年齢中央値(才)	4.6	6.1	4.4			
年齢範囲	1ヵ月 -12 歳	8ヵ月 -12 歳	1ヵ月 -12 歳			
3 か月以内の抗菌薬使用歴(+)	27	4	23	**14.8**	1.80 (0.23-21.9)	0.67
長期もしくは頻回の入院歴(+)	37	4	33	10.8	0.67 (0.08-8.40)	0.64
基礎疾患						
心疾患	17	4	13	**23.5**	--	
神経性疾患	7	1	6	14.3	0.55 (0.009-7.45)	
腫瘍性疾患	7	1	6	14.3	0.55 (0.009-7.45)	
その他	19	0	19	0.0	--	

P：P-value　P<0.05 有意差ありとした.

1．4　考察

感染症治療成功におけるもっとも重要なポイントは、感染起因菌に対し有効な抗菌薬の選択である。現在、β-ラクタム系薬をはじめとして、アミノグリコシド系、ポリペプチド系、マクロライド系、テトラサイクリン系、キノロン系等さまざまな抗菌薬が広く使用されている。これらの多種多様な抗菌薬にはそれぞれ特有の特性があるため、治療目的菌の抗菌スペクトラム、臓器移行性、体外排出性、副作用の有無等を加味したうえで使用抗菌薬が選択される。小児科領域においては、薬剤副作用により使用禁忌もしくは一定の年齢以下での使用を推奨しないとされるものが多い。さらに保険診療において「適用」とされた抗菌薬以外を使用した場合には診療報酬支払基金において査定され、診療報酬は支払われない。このような制約の中、セフェム系薬は広い抗菌スペクトラムと副作用の少なさ、種類の豊富さから小児感染症治療においては重要であり、使用頻度は高い。よってセフェム系薬すべてに耐性となる ESBL 産生菌の増加は、エンピリック治療における抗菌薬選択の幅を狭める。

Nakamura ら [23]は 2000 年から 2009 年までの間に関西地区の 17 の医療施設と 1 つの臨床検査センターにおいて検出された ESBL 産生菌は 0.13%から 5.89%へと年々増加していることを報告している。このデータは感染症を発症し、医療機関での治療目的で検査が行われた感染起因菌の中での ESBL 産生菌の割合を示しているが、感染起因菌の中で ESBL 産生菌が増加していることがわかる。

一方、本邦における健康人における ESBL 産生菌保有率について Niki ら [24]は大学生 67 名の ESBL 産生菌保有率が 6.4%だったことを、Luvsansharav ら [26]は健康成人の ESBL 産生菌保有率が 7.5%だったことを報告している。また、Valverde ら [27]は 2003 年のスペインにおける ESBL 産生菌保菌率について、市中健康成人では 3.7%、外来診療の患者で 5.5%、入院患者で 12%だったことを報告した。また、Andriatahina ら [28]のマダガスカルの小児病院での入院時保菌調査結果では 22%の保菌率だった。本研究での ESBL 産生菌の保菌率 12%は、本邦における健康人の保菌率より高いが、ESBL 産生菌を保有していた患児は、心疾患、神経系疾患(先天異常症候群や、脳性まひなどの周産期障害、先天代謝異常症など)、腫瘍性疾患の基礎疾患を有していた。その中でも心疾患患児において保菌率が高い傾向にあり、これは長野県立こども病院が長野県内全域(場合によっては近隣の県も含む)の重篤な心疾患患者(左心低形成やファロー四徴症など)が紹介されてくるセンター的役割を担っている特徴を持っていることと関連するかもしれない。県下全域から紹介されてきた患者に対する侵襲性の高い手術、その後の術後管理、病状の安定化までに起こる感染症治療のための抗菌薬の使用、院内感染にさらされる機会の増加などの複合的な要因が考えられる。Valverde らはイスラエルの 3 次医療機関では入院時 8%の ESBL 産生菌保菌者が、入院加療期間の間に 21%に上昇したと報告しており [29]、入院加療は ESBL 産生菌保菌のリスクファクターである可能性がある。また、3 か月以内の抗菌薬の使用歴を有する患者は ESBL 産生菌保菌率が高い傾向にあり、これは以前に報告されている [30]ように ESBL 産生

菌保菌のリスクファクターとして矛盾しない。

適正な感染症治療のためには、抗菌効果のある抗菌薬を適切に選択して治療に使用することが必要である。そのために臨床検査として感染起因菌の薬剤感受性検査は必須であり、日常的に検査が行われている。この *in vitro* での薬剤感受性検査結果から治療効果を予測するための指標としてとしてブレイクポイントが存在する。本研究では CLSI M100-S19 版 [21]で定めた検査法とブレイクポイントを用いた。CLSI においてブレイクポイントは sensitive (S)、intermediate (I)、resistance (R) のクライテリアに分類され、「sensitive」と判定されれば臨床的治療効果が見込まれ、「resistance」と判定されれば治療効果は見込めないことが示唆される。CLSI は毎年ブレイクポイントと検査法に関する見直しを行っており、M100-S19 版では、ESBL の検出は、*E. coli*、*K. pneumoniae*、*K. oxytoca*、*P. mirabilis* の 4 菌種に限って行い、CAZ: cefrazidime、CTX: cefotaxime、CTRX: ceftriaxone、AZT: aztreonam、CPDX: cefpodoxime の MIC 値：最小発育阻止濃度が基準以上の時に ESBL を疑い、ESBL 確認試験にて基準を満たした場合に ESBL と判定すると定められている。そして ESBL の産生が確認できた場合には、β-ラクタム薬のうちペニシリン系薬、セファロスポリン系薬、モノバクタム系薬については、*in vitro* での MIC 値が「S」カテゴリ―を示す場合であっても、臨床的には効果が認められないため「R」に変換して報告すべきとしている。

ESBL はさまざまな菌種から検出されており、CLSI において提唱された 4 菌種のみに認められるものではない。よって CLSI M100-S19 での前述 4 菌種に限って ESBL を検出することは他の菌種に関しては十分な検査結果とは言えない。しかし、臨床的に感染起因菌として高頻度に検出される *E. coli*、*K. pneumoniae*、*K. oxytoca*、*P. mirabilis* を除いた腸内細菌科やブドウ糖非発酵菌に属するグラム陰性桿菌の多くの菌種では、染色体上に Ambler の分類でクラス C に分類されるβ-ラクタマーゼ遺伝子が存在し、β-ラクタム薬に自然耐性を示す。よって *in vitro* での MIC 値によるスクリーニングとクラブラン酸による阻害反応によって ESBL 産生の有無を決定することが困難である。これらの染色体性クラス Cβ-ラクタマーゼ保有菌種については抗菌薬に対する表現型検査ではなく PCR 法による ESBL 遺伝子の検出が必須である。PCR 法は遺伝子検出法の一つとして簡便かつ有用な手法ではあるものの、本邦を含め世界的に、一般的な臨床検査室で広く利用可能な状況にはない。そのため CLSI は *E. coli*、*K. pneumoniae*、*K. oxytoca*、*P. mirabilis* に限った検査を提唱している。本研究で検出された 9 株の ESBL 産生腸内細菌には 3 株の *C. freundii* と *C. amalonaticus*、*E. aerogenes*、*E. agglomaticus*、*S. marcescens* 各 1 株が含まれており、これらは通常の臨床検査では ESBL 産生の有無を確認されることのない菌種であり、PCR 法を使用したことで検出が可能となった。今回のサーベイランスでは、通常検査されることのない菌種での ESBL 産生株が多く検出された。ESBL 遺伝子はプラスミドに座位するため、菌種間での遺伝子伝播が想定され、院内感染対策に十分な配慮が必要である。院内感染阻止の側面からは、看護・診療現場への保菌者情報提供の必要性が高い。そのため、耐性菌サーベイランス結果を含めた耐性菌検出

情報を患者情報に付加しスタッフ間での情報共有を図る試みを開始した。

本研究で検出された ESBL 遺伝子はすべて *bla* CTX-M1-group であった。近年検出される ESBL 遺伝子の主流は欧米においても日本においても *bla* CTX-M 型である [14, 15, 16]。院内感染による *bla* CTX-M1-group プラスミドの伝播による可能性はあるが、この可能性を証明するためには *bla* CTX-M1-group の塩基配列や菌株の相同性解析などのさらに詳細な解析が必要である。

本研究によって得られた ESBL 産生菌保有率、そのリスクファクターは、アンチバイオグラムとともにエンピリック治療薬選択の有用な情報として使用可能である。また、この ESBL 保菌率をベースラインデータとして検出菌の監視を絶え間なく行うことにより、ESBL 産生菌による院内感染の早期確定が可能となり、さらに、スタッフ間での情報共有により感染対策の徹底によるアウトブレイクの防止のために活用が期待できる。

第 2 章

新生児集中治療部門における *Burkholderia cepacia* complex の院内感染阻止に関する研究

第２章　新生児集中治療部門における *Burkholderia cepacia* complex の院内感染阻止に関する研究

２．１　諸言

本邦における院内感染の問題は 1980 年代からメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA)の分離頻度が急増し、その原因が院内感染であることが社会問題となったことを契機とし、場合によっては直接的な死因に成りうることから、医療分野のみならず広く社会的にも認知され、問題視されてきた。その後、さまざまな対策が取られたことにより、MRSA の院内感染は一定のレベル以下に制御された。一方、さまざまな抗生物質が広く臨床の場で使用され始めると、バンコマイシン耐性腸球菌、extended-spectrum β-lactamase ：ESBL 産生グラム陰性桿菌、多剤耐性 *Pseudomonas aeruginosa* ：MDRP、多剤耐性 *Acinetobactor* 等多様な耐性機構を有した細菌が出現し、その検出頻度が増加してきた。これらの多剤耐性菌は多くの場合、菌そのものの病原性は高くないヒトの常在菌や環境菌であるが、免疫力の低下した易感染性患者に対しては感染症を発症させることがある。これを日和見感染という。

院内感染は、「入院時には存在せず、入院 48～72 時間以降に原疾患とは別に新たに発生した感染」をいうが、昨今、関連学会においては病院のみでなく、長期療養施設、外来クリニック、在宅医療等も含めた医療関連感染という用語を使用することが多い。本研究では、対象を病院内の病棟内に限っているため、院内感染の用語を使用した。

院内感染原因菌は「明らかに他の患者や医療従事者から感染したもので、他の患者への伝播が危惧されるもの」ととらえることが可能で、外来性の感染症を持ち込む患者との隔離が効果的な対策であり、医療従事者の持ち込む感染症は、予防的ワクチン接種の推奨によって対策される。また、日和見感染の原因菌が医療従事者を介して患者から患者へと伝播することを防ぐことも必要である。院内感染の原因菌となる細菌は感染症を発症していない患者にも保菌の状態で定着しており、これらを抗菌薬の使用や消毒によって完全に除菌することは不可能である。それに代わるものとして、院内感染対策に有効な方法として米国の Centers for Disease Control and Prevention ：CDC が提唱し、日本の厚生労働省監修ガイドラインでも勧告されている「標準予防策と感染経路別予防策」の実施が有効である。「標準予防策」は、すべての患者の血液・体液、分泌物、排泄物は感染の危険があるとみなし、医療的ケアのために患者にふれた後の手指衛生(手洗いと手指消毒)と手袋やマスクなどの個人防具の使用、鋭利器材の取扱いについての具体策を行うことをいう。手指衛生についてはせっけんと流水による物理的な手洗いとともに、アルコールを主成分とする擦り込み式手指消毒薬を用いた消毒があげられている。当院では医療ケアの最中に頻回に手指消毒を行うために、スタッフ全員が、擦り込み式手指消毒薬をすぐに使用できる状態で携帯している。

院内感染によるアウトブレイクとは、通常発生しているレベル以上に感

染症が増加することであり、通常は同一菌による感染症が同時期に複数発生することで検知される。これは施設ごと、もしくは病棟ごとの感染率のベースラインをあらかじめ把握したうえで常に感染症の発生状況を監視していることが前提となる。被害を最小限にとどめるためには、可能な限り早い段階でアウトブレイクを感知し、効果的な感染対策を講じることが必須である。

長野県立こども病院の新生児集中治療部門(Neonatal Intensive Care Unit：NICU)は、長野県下全域の早産児や低出生体重児、先天性疾患や出生時の問題によって特殊な治療・管理を必要とする新生児が入院している。長野県立こども病院の2011年度NICU入院患者の主疾患を表1.に示した。

表１．2011年度NICU入院患者疾患別内訳(重複なし)

入院患者主疾患		人数
超低出生体重児	出生体重1000g未満	43
極低出生体重児	出生体重1500g未満	40
低出生体重児	出生体重2500g未満	87
感染症・呼吸障害		88
先天性心疾患		60
小児外科疾患		31
奇形症候群・染色体異常		26
仮死		15
脳神経外科疾患		7
その他		24
合計		421

受精後出生するまでの母体内新生児は、出生時の状態やおこりやすい合併症・生育予後の予測を行ううえで有用であるため、在胎週数、出生体重によりしばしば分類される。在胎週数による分類では、在胎37週未満出生児を早産児、このうち在胎28週未満児を超早産児と分類し、出生時体重による分類では、出生時体重2500g未満の児は低出生体重児、このうち1500g未満の児は極低出生体重児、さらに1000g未満の児は超低出生体重児と分類[3)]される。これらの早産児・低出生体重児は、呼吸管理のための気管挿管や、治療薬投与のための血管カテーテルの留置が日常的に行われる。また、さまざまな先天性器質疾患、後天性合併症治療のための外科的処置などが行われる。このような外部デバイスの存在や侵襲性の高い治療は感染機会を著しく増加させる。免疫機能が十分に成熟していない新生児の中でもとりわけ感染

に対する感受性の高い患者が多く、院内感染のリスクが高い。

Burkholderia cepacia complex はブドウ糖非発酵性のグラム陰性桿菌で、かつては *Pseudomonas* 属に分類されていた。現在は 16S rRNA 遺伝子配列において 97.5%以上の高い相同性を示す 17 種の正式な菌種名を有し、15 の遺伝学的に分類される近縁種を内包した複合的菌種として分類される [31, 32, 33]。*B. cepacia* complex に含まれるそれぞれの菌種について分子生物学的な分類は整備されてきたが、その菌種同定には多大な労力を要し、日常的臨床検査では詳細な同定は困難であるため *B. cepacia* complex として扱われる [34]。*B. cepacia* complex は移植後患者や免疫不全者などに呼吸器関連感染症や尿路感染症、血流感染症を引き起こし [35, 36, 37]、近縁の *P. aeruginosa* や *Acinetobacter* sp.などと同様に院内感染の原因菌として重要である。また、院内におけるさまざまな水性環境に生育し [38, 39]、消毒薬に抵抗性を示す特徴を有する [40, 41]ため、これまでに、気道内の加湿や薬液投与のための吸入療法に用いられるネブライザー、蛇口、消毒薬、静脈注射用液などからのアウトブレイクに関して報告されている [42, 43, 44, 45]。また、*B. cepacia* complex はその薬剤感受性パターンに特徴があり、カルバペネム系薬を含む多くのβ-ラクタム薬に耐性を示す。

本研究により NICU における *B. cepacia* complex のアウトブレイクを感知し、病棟内サーベイランスや標準予防策の啓蒙を行い、*B. cepacia* complex のアウトブレイクを収束させた。

2．2　材料と方法

2．2．1　NICU 入院患児における細菌検査の実施

2007 年 4 月から 2011 年 3 月まで、新生児科に入院した患児すべてに対して入院時(当院産科での出生による転棟入院時、他院からの搬送入院時ともに含む)鼻腔分泌物もしくは気管吸引痰検体を用いた保菌検査を行った。入院期間中は 1 週間に 1 度の割合で継続的に保菌検査を行った。また、感染兆候が認められた場合には感染起因菌の検出を目的に推定感染巣から採取した検体を用いた細菌検査を行った。

検体は、5%ヒツジ血液寒天培地(Nippon Becton Dickinson Co.)、チョコレート寒天培地(Nippon Becton Dickinson Co.)、ドリガルスキーBTB 乳糖加寒天培地(Nippon Becton Dickinson Co.)、CHROMage MRSA 選択培地(Kanto chemical)に塗り広げ、5%ヒツジ血液寒天培地とチョコレート寒天培地は 5%炭酸ガス存在下にて 35℃18 時間の炭酸ガス培養を、ドリガルスキーBTB 乳糖加寒天培地、CHROMage MRSA 選択培地は 35℃18 時間の好気培養を行い、発育菌を釣菌した。

同定と薬剤感受性検査には Neg Combo 3.12J パネル(Simens Healthcare Diagnostics)を用い、全自動細菌同定薬剤感受性検査システム WalkAway 40 (Simens Healthcare Diagnostics)を用いた。Neg Combo 3.12J パネルを用いた WalkAway 40 システムで菌種同定が不能だった場合には、菌種同定キット ID-Test NF18 (Nissui Phermaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan)を用いて菌種同定を行った。

2．2．2　アウトブレイクの検出

2007 年 4 月から 2011 年 3 月までの間に検出されたすべての *B.cpacia* complex 株分離検体情報を抽出した。

2011 年 6 月 17 日付厚生労働医政局指導課長通知「医療機関等における院内感染対策について」[46]において示されたアウトブレイクを疑う基準“1 例目の発見から 4 週間以内に同一病棟において新規に同一菌種による感染症の発症症例が計 3 例以上特定された場合、あるいは同一機関内で同一菌株と思われる感染症の発病症例(抗菌薬感受性パターンが類似した症例等)が計 3 例以上特定された場合”を参考に、3 例以上の保菌を含めた感染をアウトブレイクとして検出した。

2．2．3　Pulsed-field gel electrophoresis による遺伝子相同性解析

NICU における *B. cepacia* complex 院内感染が疑われた 9 例のうち 5 例と対照株として、NICU 以外の病棟から検出された *B. cepacia* complex2 株を Pulsed-field gel electrophoresis : PFGE 解析した。2ml の Brain-Heart-Infusion broth(Nissui Phermaceutical Co. Ltd.)に被検菌 1 コロニーを浮遊させ、35℃好気環境下 250rpm にて 0.8-1.0 $O.D._{600}$ まで振盪培養した。CHEF ゲノム DNA プラグキット (Bio Rad, Hercules, U. S. A.)を用いプロトコールに従って DNA プラグを作成し、Proteinase K による 50℃18 時間のタンパク質分解反応を行った。1 プラグあたり 4Unit の Spe I (Takara Bio Inc., Ostu, Japan)を使用し 25℃18 時間の制限酵素反応を行った。 1%Pulsed Field Certified Agarose (Bio Rad) にプラグを埋め込み、CHEF-DRⅢシステム(Bio Rad)にてパルスタイム 30-70 秒、5.0V/cm の泳動条件で 25 時間電気泳動した。泳動終了後のアガロースゲルをエチジウムブロマイド(Bio Rad)で染色後、泳動像を撮影した。

2．2．4　環境と消毒薬からの *B. cepacia* complex 検出

2 名の感染制御専門医（Infection control doctor: ICD）と 1 名の感染制御専門看護師(Infection control nurse: ICN)からなる 3 名の感染制御専門チーム(Infection control team : ICT)が NICU 内で行われている人工呼吸関連機器の取り扱い方法、留置カテーテル類の管理、医療的ケアに付随するさまざまな処置に関する手順、消毒方法、環境整備に関する病棟内監査を行った。その中で、*B. cepasia* complex のリザーバーとなりえるものとして、医療スタッフが手指消毒を常に行えるように各自で装備していた消毒薬に焦点を当てた。

2010 年 10 月の特定の日に、すべての医療スタッフが装備していた手指消毒薬、手洗い所や病棟入口に常備されていた手指消毒薬合計 104 本とともに手洗い用液体せっけん 34 本、手荒れ防止用ローション 7 本をすべて回収し、*B. cepacia* complex 検出用検体とした。消毒薬 104 本の内訳は、37 本のグリセリン添加エタノール、13 本のグルコンサンクロルヘ

キシジン(一般名：ヒビテン)添加エタノール、13 本の塩化ベンザルコニウム添加エタノールだった。これらの消毒液は滅菌生理食塩水にて 10 倍に希釈し、10 枚のトリプチケース・ソイ寒天培地(Eiken Chenical Co. Ltd., Tokyo, Japan)に塗布し、35℃72 時間の好気培養を行った。また、手洗い用液体せっけんと手荒れ防止用ローションは原液のまま 1ml を 15ml の Brain-Heart-Infusion broth に添加し、35℃72 時間の好気培養を行った。

消毒薬類の回収と同時に、NICU 環境調査として、人工呼吸器デバイスの表面、保育器内壁、コンピューターキーボード表面を生理食塩水で湿らせた綿棒で拭い取り、サンプリングした。綿棒で採取された検体は、5%ヒツジ血液寒天培地に塗り広げ、35℃72 時間の好気培養を行った。

2．2．5　手洗い調査

標準予防策の重要項目である手洗いの質を調査するために、NICU を含めた 7 つの小児病棟、手術室、外来の部門ごとに、感染対策に重要な役割を持つ 9 名のリンクナースと 50 名の常勤医師について、手掌スタンプ法による手洗い後の手掌残存菌の検出を行った。被験者は通常どおりの手洗い実施の前後に、SCDLP ager plate (Nikken Bio Medical Laboratory Inc., Kyoto, Japan)に掌を押し当て、スタンプされた SCDLP ager plate は 35℃18 時間の好気培養を行った。連結不可能匿名化の後、培養済み SCDLP ager plate の写真を撮影した。撮影された写真から手洗い前後において、発育細菌コロニーが顕著に減少した場合を「良」、減少が認められない場合や、わずかな減少しか認められない場合を「不良」と判定した。検査結果は ICN のみが連結可能情報として管理した。

2．3　結果

2．3．1　アウトブレイクの検出

図 1 に 2007 年 4 月から 2011 年 3 月の間に *B. cepacia* complex が検出された 9 名(Patient-1 から Patient -9 とした)の検出に関する模式図を示した。2007 年 4 月から 2009 年 9 月の間では、*B. cepacia* complex が検出された新生児は 1 名ずつだった。しかし 2010 年の 4 月から 2011 年の 3 月までに 6 名の新生児から *B. cepacia* complex が検出され、そのうち 2 例で感染症を発症した。

先天性胸腔疾患を持つ Patiant-4 は 2010 年 4 月 4 日に採取された鼻腔分泌物検体と 4 月 27 日に採取された鼻腔分泌物検体と気管吸引痰検体から *B. cepacia* complex が検出された。染色体異常と心疾患を合併していた Patiant-5 は 2010 年 6 月 13 日に採取された気管吸引痰から初めて *B. cepacia* complex が検出された後 2011 年 3 月まで継続して検出された。超低出生体重児であった Patiant-6 は 2010 年 9 月 14 日から 2011 年 3 月まで継続的に *B. cepacia* complex が検出された。呼吸窮迫症候群を発症した低出生体重児 Patiant-7 は 2010 年 9 月 21 日から、人工呼吸管理を必要としていたピルビン酸脱水素酵素欠損症の Patiant-8 は 2010 年 9 月 28

日から、18 トリソミーを有した超低出生体重児 Patiant-9 は 2010 年 9 月から、それぞれ *B. cepacia* complex が検出され始めた。Patiant-5、-6、-7、-8、-9 の入院期間と *B. cepacia* complex 保菌期間は完全に重複していた。

検出期間が重複していることから水平感染が疑われた Patiant-5、-6、-7、-8、-9 より分離された *B. cepacia* complex 6 株(Patiant-6 からは 2 株)と NICU 以外の病棟に入院している患児から検出された *B. cepacia* complex 2 株の薬剤感受性結果の MIC 値を表１．に示した。NICU 新生児を由来とする *B. cepacia* complex は WalkAway システムでのプロファイルナンバーは完全に一致しており、感受性パターンは類似していた。一方、NICU 以外の病棟から検出された 2 株と NICU 由来株での感受性パターンには乖離があった。

また、図 2 には水平感染が疑われた Patiant-5、-6、-7、-8、-9 由来株と他病棟検出株 2 株の PFGE を示した。Patiant-5、-6、-7、-8、-9 由来の 6 株は同一の PFGE 像を示し、他病棟由来の 2 株はそれぞれ異なった PFGE 像を示した。

以上の結果から、NICU 内での *B. cepacia* complex の水平感染によるアウトブレイクの発生と確定した。

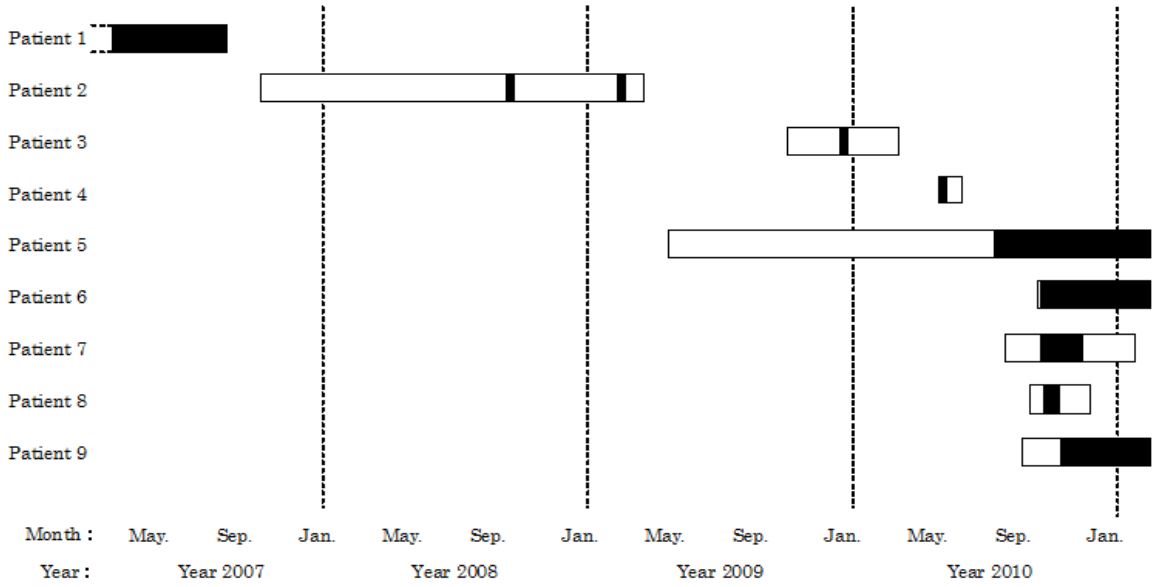


図１．　2007 年 4 月から 2011 年 3 月における新生児集中治療部門 *Burkholderia cepacia* complex の継時的検出状況

それぞれの棒状カラムは各患者の入院期間を示す.

■：*Burkholderia cepacia* complex 検出あり

□：*Burkholderia cepacia* complex 検出なし

表 2.　新生児集中治療部門において検出された *Burkholderia cepacia* complex 薬剤感受性結果

患者番号	分離検出日	検体	MIC(μg/ml)																	
			PIPC	CAZ	CFS	CFPM	CZOP	AZT	IPM	MEPM	TOB	AMK	GM	MINO	LVFX	CPFX	ST	FOM	C/S	P/T
P-A	07/09/2010	気管吸引痰	>64	>16	>16	>16	>16	>16	>8	<1	>8	>32	>8	<2	2	2	<2	>16	>32	<8
P-B	13/09/2010	喀出痰	64	4	>16	>16	>16	>16	>8	2	>8	>32	>8	4	4	>2	>2	>16	>32	<8
P-5	14/09/2010	気管吸引痰	>64	4	>16	>16	>16	>16	>8	<1	>8	>32	>8	<2	1	1	<2	>16	>32	<8
P-6a	21/09/2010	静脈血	>64	4	>16	>16	>16	>16	8	<1	>8	>32	>8	<2	1	1	<2	>16	>32	<8
P-6b	12/10/2010	カテーテル尿	>64	8	>16	>16	>16	>16	8	<1	>8	>32	>8	<2	1	1	<2	>16	>32	<8
P-7	14/09/2010	気管吸引痰	64	8	>16	>16	>16	>16	>8	<1	>8	>32	>8	<2	1	1	<2	>16	>32	<8
P-8	28/09/2010	気管吸引痰	>64	4	>16	>16	>16	>16	8	<1	>8	>32	>8	<2	1	1	<2	>16	>32	<8
P-9	18/01/2011	気管吸引痰	64	8	>16	>16	>16	>16	8	<1	>8	>32	>8	<2	<0.5	0.5	<2	>16	>32	<8

MIC: minimum inhibitory concentration、PIPC: piperacillin、CAZ: ceftazidime、CFS: cefsulodin、CFPM: cefepime、CZOP: cefozopran、AZT: aztreonam、IPM: imipenem、MEPM: meropenem、TOB: tobramycin、AMK: amikacin、GM: gentamicin、MINO: minocycline、LVFX: levofloxacin、CPFX: ciprofloxacin、ST: sulfamethoxazole/trimethoprim、FOM: fosfomycin, C/S: cefoperazone/sulbactam、P/T: tazobactam/piperacillin

P-A、P-B は NICU 以外の病棟の患者から分離された菌株を示す．P-5、P-6a と P6b、P-7、P-8、P-9 は NICU 病棟患者から分離された株を示し、それぞれ図 1．に示した菌株に対応する．

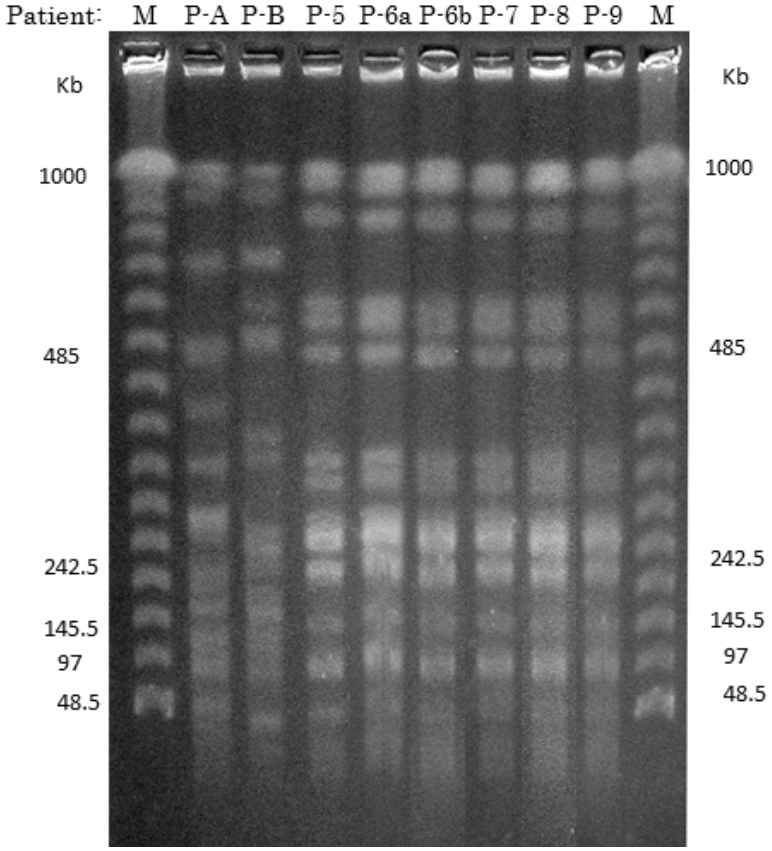


図２． *Burkholderia cepacia* complex 全ゲノムを制限酵素 Spe I によって切断したパルスフィールド・ゲル電気泳動像

レーン M: サイズマーカー(lambda DNA ladder)

P-A、P-B は NICU 以外の病棟の患者から分離された菌株を示し、NICU 病棟分離株の対照として提示する.

P-5、P-6a と P6b、P-7、P-8、P-9 は NICU 病棟患者から分離された株を示し、それぞれ図 1. に示した菌株に対応する.

2．3．2　環境と消毒薬からの *B. cepacia* complex 検出

NICU 内人工呼吸器デバイスの表面、保育器内壁、コンピューターキーボード表面からの *B. cepacia* complex の検出は認められなかった。また、すべての手指消毒液、手洗い用液体せっけん、手荒れ防止用ローションで *B. cepacia* complex の検出は認められなかった。

2．3．3　手洗い調査と手洗いに関する啓蒙

合計 59 名の手掌スタンプ法による検査の結果、すべての被検者の手洗い前の手掌から *B. cepacia* complex と推定される発育コロニーが検出されることはなかった。また、ほとんどの医療スタッフは手洗い後に発育したコロニー数は有意に減少しており良好な手洗いが実施されていることが分かった。しかし 2 名のリンクナースと 7 名の医師で「手洗い不良」と判定された。

ICN のみが連結可能情報として管理し、検査結果に応じて個別に手洗い指導を行った。

2．4　考察

B. cepacia cpmplex はこの菌種が特徴的に有する抗菌薬に対する耐性のため、感染症を発症した際の治療に難渋する場合がある。今回アウトブレイクが起こった株は、*in vitro* の薬剤感受性結果からは CAZ、MEPM、MINO、LVFX、CPFX、ST、P/T に抗菌効果があることが推定されたが、新生児に使用する抗菌薬として、MINO、LVFX、CPFX、ST は使用禁忌もしくは使用を推奨されない抗菌薬であるため、治療選択薬は限定される。

図 1．に示したように 2007 年 4 月から 2010 年 3 月までは 3 名の異なる新生児で 3 株の *B. cepacia* complex が検出された。これらは鼻腔分泌物や気管吸引検体から 10^3CFU/ml 以下の菌量で検出されており、感染兆候は認められなかったことから、保菌状態にあったと考えられる。2010 年の 4 月から 10 月の間には 5 名の新生児から重複した入院期間中に *B. cepacia* complex が連続して検出され続けた。また、1 名の新生児はこの重複期間に入院し *B. cepacia* complex が検出されたが、早期に他院へと転院した。新生児が *B. cepacia* complex を保菌した状態で出生することはないことから入院後に院内感染によって保菌に至ったと考えるのが妥当である。とりわけ 2010 年 9 月から 10 月には 5 名の新生児において *B. cepacia* complex が検出されたことから、*B. cepacia* complex を保菌状態にあった新生児から医療スタッフを介して別の新生児へと伝播したと考えられた。2009 年から 2010 年に 5 名の新生児から検出された菌株の PFGE 解析から、これらはすべて同一菌株であることが示され、NICU における *B. cepacia* complex アウトブレイクであると判断した。*B. cepacia* complex は消毒薬に抵抗性を示し [40]薬液中に残存した菌株を原因として院内感染が起こることが報告されている [47, 48]ことから、この院内感染の原因として各医療スタッフが携帯していた手指消毒液に着目し、それら消毒液中からの *B. cepacia* complex の検出を試みた。合計 104 のサンプルについて検査したが、*B. cepacia* complex の混入は確認できなかった。また、同時に検査した NICU 内人工呼吸器デバイスの表面、保育器内壁、コンピューターキーボード表面からの拭い液からも、*B. cepacia* complex は認められなかった。そのため、今回の *B. cepacia* complex のアウトブレイクの発生源を突き止めることはできなかった。今回の研究において原因菌のリザーバーを決定して根本的な改善策を講じることはできなかったが、その後 NICU での新たな保菌者は検出されていない。

手掌スタンプ法による手洗い後残存菌の検査は、リンクナースと医師らに感染対策の重要性と標準予防策の徹底、手洗いの重要性について啓蒙する良い機会となった。手洗い後に細菌が残存した場所が視覚的に確認できるため、それぞれの個人の「手洗いのクセ」が分かりやすく、自分の「クセ」を理解してもらうことは効果的な手洗いの指導となった。

当初、NICU 病棟内に *B. cepacia* complex のリザーバーが存在することを

想定し、その場所を特定し除去することによって *B. cepacia* complex の院内感染を阻止することを目的とした。しかし、今回の研究で必ずしもリザーバーの除去に至らなかったとしても、効果的な ICT 介入と徹底した標準予防策の順守により院内感染を阻止できることが示された。この知見は今後の感染対策において重要な発見である。本研究では、NICU における *B. cepacia* complex の院内感染排除成功にとどまらず、院内感染阻止全般に対して普遍的に利用できる手法を提示できた。

第 3 章

Kingella kingae を起因菌とする
小児骨髄炎に関する研究

第 3 章　*Kingella kingae* を起因菌とする小児骨髄炎に関する研究

3. 1　諸言

Kingella kingae は、*Neisseria* 科 *Kingella* 属に分類されるグラム陰性の非運動性の短桿菌で、カタラーゼ陰性、オキシダーゼ陽性、を示す通性嫌気性菌で、対もしくは単連鎖状をなす。5%羊血液寒天培地上でβ溶血を示す特徴的な小コロニー形態を示し、5～10%の炭酸ガス培養によってその発育は促進される [49]。通常ヒトの鼻咽頭粘膜に常在しており、生後 6 か月ごろに初めて保菌し、生後 12～24 か月の間に保菌率が上昇しその後成長とともに検出されなくなる [50]。これは年齢による免疫反応の違いによるものと考えられている [51, 52]。HACEK グループ（栄養要求性が高く、発育が遅く、免疫低下状態の患者において感染性心内膜炎や敗血症の原因となりうる臨床的意義の高い常在菌である *Haemophilus　aphrophilus*、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*、*Cardiobacterium hominis*、 *Eikenella corrodens*、*Kingella kingae* の 5 種を 1 つのグループとし、その頭文字から命名された）に含まれる菌種である。*K. kingae* は小児の骨・関節炎感染症起因菌としても重要であり、慢性骨髄炎や敗血症、感染性心内膜炎などを呈し、成人に比して症状の重篤化を認める場合がある [53, 54, 55]。

感染性骨髄炎は、基本的には小児の疾患 [56] で、先行する蜂窩織炎などの感染病巣からの血行性感染、化膿性関節炎などの感染病巣からの直接的な波及、解放骨折や手術などによる直接感染の 3 つの経路で発症する。急性骨髄炎は骨髄という閉鎖環境で炎症が発生し、内圧上昇が著しいために強い疼痛をきたし、患部の腫脹や発赤が認められる。一方、亜急性、慢性骨髄炎の場合には発症が緩慢で臨床所見に乏しい場合があるが、骨融解像や骨柩、腐骨などの存在によって診断が可能である。どのタイプの骨髄炎であっても、適切な診断と強力な治療が必要で、適切な抗菌薬治療が行われずに炎症が遷延し悪化した場合には関節の変形や成長に伴う四肢の障害をひきおこすこともある。鑑別診断としては、骨腫瘍、白血病などの血液疾患、悪性腫瘍の骨転移などがあり十分な検索が必要である [57]。

本研究では、3 才 8 か月男児に発症した *K. kingae* を感染起因菌とする骨髄炎について、その臨床像と細菌学的特徴について解析した。*K. kingae* は臨床材料からの通常の固形培地での分離が難しいとされており、稀な感染起因菌と考えられていたが、本症例は臨床材料から固形培地による検出分離が可能であった貴重な症例である。

3. 2　材料と方法

3. 2. 1　臨床検体からの *K. kingae* の検出

炎症部の掻破手術にて採取された組織は、乾燥を防ぐために滅菌生理食塩水によって湿らせた滅菌ガーゼに包み、細菌検査室へと搬送された。組織塊を 5%羊血液寒天培地、チョコレート寒天培地、ドリガルスキー乳糖加寒天培地、CHROMager ™ MRSA 培地に塗り広げ、血液寒天培地とチョコレー

ト寒天培地は5%炭酸ガスにて存在下にて、ドリガルスキー寒天培地とCHROMager ™ MRSA培地は好気環境下にて35℃48時間の培養を行った。
また、掻爬組織をスライドガラスに塗り広げ、バーミー法によるグラム染色を行った。

3. 2. 2　形態と生化学的性状による菌種同定

48時間培養後に発育したコロニーはグラム染色を行った。生化学的性状による菌種同定は、ID test HN20-rapid キット(Nissui Phermaceutical Co. Ltd.)を用い、用法に従って検査し判定は目視にて行った。 カタラーゼ試験はスライドガラス上においたコロニーに5%過酸化水素水を1滴滴下し、気泡発生が認められた場合にはカタラーゼ陽性、気泡発生が認められない場合はカタラーゼ陰性と判定した。オキシダーゼ試験はチトクロームオキシダーゼ試験用ろ紙(Nissui Phermaceutical Co. Ltd.)に発育コロニーを塗り付けて、ろ紙が30秒以内に紫色に変化した場合にオキシダーゼ陽性、ろ紙色に変化が認められなかった場合はオキシダーゼ陰性と判定した。

3. 2. 3　16S rRNA遺伝子配列による分子生物学的菌種同定

Neilanら[58]の方法に従ってPCR法にて16S rRNAのコーディング領域を増幅し、DTCS quick start master mix kitを用いたシークエンス反応後、CEQ 2000XL DNA analysis systemにて一本鎖DNA塩基配列を決定した。得られたDNA配列はRibosomal Database Project databases (http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp)と、blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)により配列相同性解析を行った。

3. 2. 4　薬剤感受性検査

MIC 値測定は細菌同定薬剤感受性自動分析システム Microscan Walk Away 40 system にて MF5J panel (Simens Healthcare Diagnostics)を用いて行った。CLSI M45-Aによる判定基準[59]に従って感受性判定を行った。

3. 2. 5　血清抗体価の測定

*K. kingae*を骨髄炎の感染起因菌と確定するため、分離された*K. kingae*に対する患者の抗体価を測定した。分離された*K. kingae*株を生理食塩水に浮遊させ、121℃15分の滅菌処理後、生理食塩水にて2回の洗浄を行い、MicroScan turbidity meter (Simens Healthcare Diagnostics)を使用しマクファーランド濁度法[60]により 1.0 マクファーランドに調整した死細菌混濁液を作成した。手術後 99 日目の患者血清を 56℃1 時間の非動化処理を行い、患者血清の10倍から1280倍までの2倍希釈系列を作成した。死細菌混濁液と患者血清希釈系列をそれぞれ等量混和し、35℃2 時間の静置反応後、1晩室温放置後に沈殿してきた死細菌の凝集の有無を目視にて検査した。
同時に、対照検体として健康正常人の血清検体 3 例について同様に検査した。

3.3　結果

3.2.1　症例

3 才 8 か月男児。既往歴に水痘、流行性耳下腺炎、突発性発疹あり。入院時に姉が伝染性紅伴斑に罹患しており、隔離されていた家族歴を有する。予防接種は、三種混合(DPT)ワクチン I 期、BCG、ポリオ、麻疹・風疹(MR)ワクチン I 期を接種済みだった。

平成 23 年 10 月 25 日から右足踵の疼痛が始まり、翌日には尖足歩行となった。さらに 2 週間後に発赤が出現し、近医を受診した。骨腫瘍疑いで同年 11 月 30 日に長野県立こども病院整形外科に紹介となった。

3.3.2　入院時検査所見

入院時の局所所見は、右足踵全体に腫脹、熱感、発赤があり圧痛は踵骨後方内外側にあった。表 1. に入院時の生化学検査、血液学的検査データを示した。WBC(白血球数)は 10370 個/μl であり、成人の白血球数基準値から見ると白血球数の増加を示す検査データであるが、3 才 8 か月という患児の年齢層における白血球数基準値から見ると、基準値内～やや増加の範囲である。また、白血球数と同様に炎症反応の指標として用いられる CPR は、0.06mg/dl を示し基準値以下だった。K、AST、LDH は高値を示したが、これは検体の溶血による影響と考えられた。

また、MRI T2 強調画像で高信号の病巣が踵骨内から骨外に連続して認められた(図１.)。長い経過と乏しい炎症所見より、亜急性骨髄炎や液性腫瘍(白血病、リンパ腫、好酸球性肉芽腫など)が想定され、翌日掻爬術が施行された。

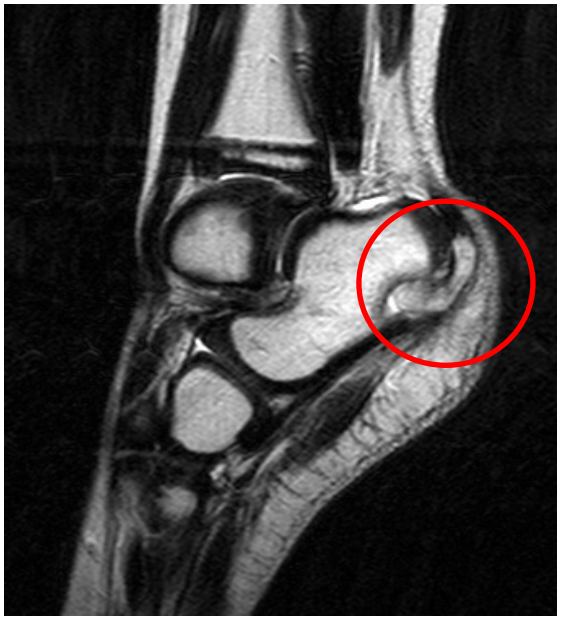


図１. 入院時右踵骨部の MRI T2 強調画像
異常な高信号の集積が認められる病巣部を赤丸で示した.

表１．入院時臨床検査データ

血液検査			生化学検査		
WBC	10,370	/μL	TP	7.2	g/dL
Neut	50.9	%	ALB	4	g/dL
Lymph	40.9	%	BUN	14	mg/dL
Mono	4.1	%	UA	4.5	mg/dL
Eosino	3.7	%	CRE	0.27	mg/dL
Baso	0.4	%	T-BIL	0.6	mg/dL
RBC	451×104	g/dL	Na	137	mEq/L
Hb	12.6	g/dL	K	6.2	mEq/L
Hct	36.6	%	Cl	106	mEq/L
Plt	26.2×104	/μL	Ca	9.5	mg/dL
ESR	22	mm/h	AST	52	IU/L(*)
			ALT	12	IU/L
			LDH	684	IU/L(*)
			ALP	652	IU/L
			γ-GTP	11	IU/L
			CK	79	IU/L
			GLU	83	mg/dL
			T-CHO	135	mg/dL
			CRP	0.06	mg/dL

(*)溶血による影響

3. 3. 3　掻爬組織からの *K. kingae* の検出と同定

掻破組織の直接グラム染色像では、白血球が少数確認されたが、細菌は認められなかった。48 時間培養後の 5%羊血液干天培地にはβ-溶血を呈する湿潤な白色小コロニーが純培養状に発育した(図 2)。この発育コロニーのグラム染色像は、短連鎖状を示すグラム陰性短桿菌であり(図 2)、カタラーゼ試験は陰性、オキシダーゼ試験は陽性を示した。ID test HN20-rapid キットでは *K. kingae* (コード No. 3003002)>99%と同定された。また、16S rRNA 遺伝子配列相同性解析では *K. kingae* (AY5519999)と 99%の相同性を示した。

5%羊血液寒天培地　　グラム染色(×1000)

図 2.　*Kingella kingae* の形態的所見
5%羊血液寒天培地上に 48 時間培養後発育したコロニー像とグラム染色像.

3. 3. 3　薬剤感受性結果

薬剤感受性試験により検出された MIC 値(最少発育阻止濃度)と CLSI M45-A に従った判定を表 2. に示した。ペニシリン系薬、セフェム系薬、カルバペネム系薬、TC、CP、キノロン系薬、ST に感性を示した。

表 2. 薬剤感受性検査結果

抗菌薬	MIC (μg/mL)	判定 (S/R)	抗菌薬	MIC (μg/mL)	判定 (S/R)
PCG	≦ 0.03	S	CAM	≦ 0.12	S
ABPC	≦ 0.06	S	CLDM	1	ND
CTM	≦ 0.5	ND	TC	≦ 0.5	S
CTX	≦ 0.06	S	CP	≦ 4	S
CFPM	≦ 0.5	ND	LVFX	≦ 0.25	S
CTRX	≦ 0.12	S	ST	≦ 0.5	S
CFIX	≦ 0.12	ND	VCM	> 1	ND
CDTR	≦ 0.06	ND	RFP	≦ 1	ND
MEPM	≦ 0.12	S	A/C	≦ 1	S
EM	≦ 0.12	ND	A/S	≦ 0.25	S

PCG: penicillin、 ABPC: ampicillin、 CTM: cefotiam、 CTX: cefotaxime、 CFPM: cefepime 、 CTRX: ceftriaxson 、 CFIX: cefixime 、 CDTR: cefditoren 、 MEPM: meropenem、EM: erythromycin、CAM: clarithromycin、CLDM: clindamycin、TC: tetracycline 、CP: chloramphenicol 、LVFX: levofloxacin 、 ST: sulfamethoxazole /trimethoprim、VCM: vancomycin、REF: rifampicin、A/C: amoxicillin/clavulate、A/S: ampicillin /sulbactam
ND: CLSI M45-A でのカテゴリーなし、S: 感性

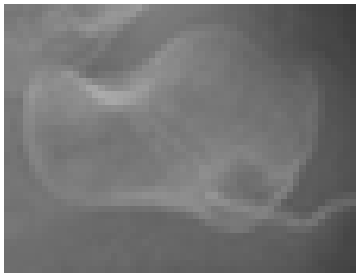
3. 3. 4　血清抗体価

分離菌株に対する患者の血清抗体価は 320 倍を示した。対照として同時に検査した健康人血清の分離菌株に対する血清抗体価は 16 倍から 80 倍を示した。

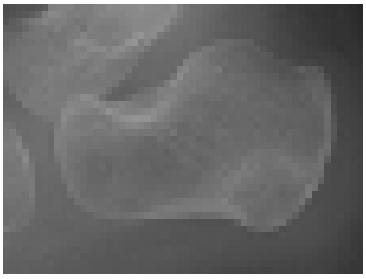
3. 3. 5　治療経過

右踵骨髄炎の最終診断にて手術当日よりエンピリックに CTM 85mg/kg を 1 日に 3 回に分けた投与が開始され、薬剤感受性結果報告により術後 5 日目より ST をトリメトプリムとして 9mg/kg を 1 日に 3 回に分けての内服となった。ST を 2 か月間内服した手術 3 か月後、右踵部の炎症所見と尖足は消失し、X 線画像にて骨修復を認めた。図 3. に X 線画像による骨修復の時間経過を示した。

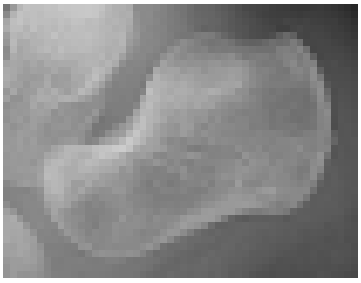
掻破術施行直後



掻破術施行直後



掻爬術施行 25 日後



掻爬術施行 99 日後

図 3．右踵部 X 線写真

上段に掻爬術施行直後の X 線を示した．黄色四角形で病巣部を示し、下段には病巣部の術後経過の拡大像を示した．

3. 4　考察

感染巣部より採取された検体の直接塗抹グラム染色は、感染の有無を推定する有益な情報を提供できるため、広く臨床細菌検査に利用されている。本来無菌状態である骨髄組織を直接塗抹された検体に、単一菌種の存在、好中球を主体とする白血球の増加や細菌を貪食した好中球を認めた場合には感染を示唆する根拠となる。しかし *K. kingae* による骨感染症の臨床材料直接塗抹標本のグラム染色では、細菌を検出できる確率が低いことが指摘されており [53, 56]、今回の研究の対象症例においても、骨髄内掻爬組織の直接塗抹グラム染色においては、少数の白血球が散見されたものの細菌は検出できなかった。

また、*K. kingae* は関節液や膿などに含まれる阻害因子により寒天平板培地による検出が困難である可能性が指摘されており [61]、4 日以上の培養によって検出されることがあることの報告がある [53]。このため、以前は *K. kingae* は骨、関節、心内膜炎における起因菌として非常にまれに検出される菌種と考えられていたが、近年、検体由来の阻害因子を希釈でき、菌の発育のために必要な栄養素が豊富に含まれる血液培養ボトルを用いる培養法 [61, 62, 63]や、検体

からの直接 PCR 法などの利用 [64, 65, 66]により検出例が増加してきている。

Ilharreborde ら [66]は、化膿性関節炎が疑われた 1～14 歳の小児 89 例のうち、培養検査にて陰性だった 53 症例の関節液すべてに *K. kingae* を標的とした PCR 法を行ったところ、24/53(45%)の症例で *K. kingae* が陽性となったと報告している。小児の敗血症性関節炎や骨髄炎においては、40～70%は感染起因菌が不明であるとされていたが、この中には一定の割合で *K. kingae* を起因菌とする感染症を含んでいる可能性があると考えられる。本症例では血液培養ボトルや PCR 法によらない寒天平板培地による 48 時間培養で *K. kingae* を検出することができた。今回の検査材料は手術による骨髄掻爬組織であり、手術中に術部で使用される生理食塩水により、*K. kingae* の発育を阻害する因子等が洗浄されたことが原因の一つではないかと推測する。

抗菌薬治療に関しては、当初エンピリックに CTM が投与されたが、菌種同定と薬剤感受性結果に加え、退院治療による患児 Q.O.L. : Quality of life の向上を目的とした内服薬への変更を考慮し、ST への変更を行った。

K. kingae による骨髄炎では、明らかな高熱や末梢血中の白血球数の増加、炎症反応の上昇を伴わない場合がある [67]。本症例においても入院時には明らかな高熱はなく、白血球数や CRP 値も高値を示してはいなかった。そのため白血病等の液性腫瘍、骨肉腫などの悪性腫瘍細胞との鑑別が必要で、病理学的検索により腫瘍の存在は否定された。患児の既往歴、家族歴、臨床所見より抗酸菌感染を疑わせる所見はなかったことから、*K. Kinage* による亜急性踵部骨髄炎と診断された。急性期の抗 *K. kingae* 血清抗体価についてはデータがないものの、手術後約 3 か月時点での血清抗体価が 320 倍と健康人対照抗体価 20～80 倍に比して高値を示した。これは急性期に上昇した IgG 抗体の残存と考えられた。この点からも *K. kingae* を起因菌とする骨髄炎に矛盾はなかった。海外においてはデイ・ケアセンターにおける基礎疾患のない小児でのアウトブレイクの報告例 [53]もある。本症例の患児は保育園へ通園していたが、保育園内や家族内で同様の症状を呈するものはおらず、友人や兄弟間における咬傷もなく、感染経路は不明だった。

本研究では、*K. kinage* を感染起因菌とする 3 才 8 か月男児の亜急性踵部骨髄炎の発症、起因菌、治療経過について提示した。本邦における *K. kinage* による骨髄炎報告例はほとんどなくその実態は明らかではないが、本研究による *K. kinage* 骨髄炎の臨床像の提示は、同様な症例に遭遇した際の有用な知見となる。臨床細菌検査の立場からは、直接グラム染色での推定起因菌陰性、一般培養検査での陰性結果を示す症例のうち、臨床経過が長く炎症所見が乏しい乳幼児の関節炎・骨髄炎においては *K. kingae* を念頭に置き、血液培養用ボトルでの培養や直接 PCR 法による追加検査を促すことが起因菌検出率の向上のために必要であることを特に強調したい。

第 4 章

オレイン酸要求性
Enterococcus faecalis Small-colony variant
に関する研究

第 4 章　オレイン酸要求性 *Enterococcus faecalis* Small-colony variant に関する研究

4．1　諸言

Enterococus faecalis は 1984 年以前には *Streptococcus* 属に含まれ、*Streptococcus faecalis* として連鎖球菌群の一部に分類されていたが、分子生物学的分類法の発達に伴い、新たに *Enterococcus* 属が提案され、*E. faecalis* として命名された。*E. faecalis* は単連鎖をなすやや縦長の球状のグラム陽性球菌である。通性嫌気性の性質を有し、カタラーゼ反応陰性、ピロリドニル-β-ナフチルアミド加水分解陽性、ロイシンアミノペプチダーゼ活性陽性、6.5%NaCl 耐性、40%胆汁酸耐性を示し、エスクリン分解能を有する。5%羊血液寒天培地では特徴的なα溶血を示す湿潤な白色コロニーを形成し、ドリガルスキー乳糖加寒天培地ではつやのない小コロニーとして観察される[68]。臨床検査においてはこれら典型的な培地上コロニー所見から、容易にその菌種を推定できる。*E. faecalis* は通常ヒトの腸管や外陰部に常在し、常在細菌叢を形成している。ただし *Enterococcus* 属菌には病原因子として hemolysin、lipoteichoic acid、protease (gelatinase)、hyaluronidase など[69, 70, 71]が挙げられており、免疫力低下状態にある場合には *Enterococcus* 属菌が感染起因菌となる例は少なくなく、術後の創部感染症や感染性心内膜炎、敗血症などの重篤な感染症を引き起こす[72]。*Enterococcus* 属菌の中でも *E. faecalis* がその起因菌である感染症が 80-90%を占める[73, 74]。

Small-colony variants (SCVs)は、一般的に臨床検査で用いられる培地では小さく遅増殖の非典型コロニーを形成する変異体であり、dwarf もしくは G-variant と称されることもある。その最初の報告例は *Eberthella typhosa*(*現在の Salmonella enteria* serovar Typhi)に関するもので 100 年以上前にさかのぼることができる[75]。その後 *Staphylococcus aureus*[76, 77]、*Staphylococcus epidermidis*[78]、*Pseudomonas aeruginosa*[79]、*Escherichia coli*[80]、*N*eisseria gonorrhoeae[81]、*Burkholderia cepacia*[82]などグラム陽性菌、グラム陰性菌にかかわらず多岐にわたる菌種において報告されている。SCVs はそれぞれの菌種が示す特異的特徴である色素産生能、溶血性、糖類分解能、各種病原因子の発現などの表現型の異常が認められ、定型的でないコロニー形態を示すことから、臨床細菌検査における同定の困難さが指摘されている[83]。SCVs は骨髄炎や関節炎、嚢胞性線維症などにより長期にわたる抗菌薬治療を受けた患者から検出されることが多く、持続感染や再燃感染の原因の一つであり[84, 85, 86]、各種細菌が有する抗菌薬からのエスケープ機構の一つ[87, 88]と考えられている。

SCVs は、menadione[89]、hemin[90, 91]、thymidine[92]、炭酸ガス[91]などに対して栄養要求性を示し、これらを添加することで典型的コロニー形態と特徴的形質を回復することが報告されている。このような栄養要求性の表現型は、しばしば特定の遺伝子変異によってもたらされ[93, 94, 95]、その中には DNA 修復を担う遺伝子の変異により遺伝子修復能を欠いたことが原因である場合もある[96, 97]。SCVs の中でもとりわけ *S. aureus* については光学的形態、電子顕微鏡的形態、代謝、病原性等さまざまな側面から精力的に研究さ

れてきている [88, 92, 95, 98, 99]。しかし *Enterococcus* spp.の SCVs については *E. faecalis* SCV を起因菌とする感染性心内膜炎に関する 2 つの報告例 [100, 101]、慢性骨髄性白血病患者での *E. faecium* SCV を起因菌とする血流感染症に関する 1 つの報告例 [102]があるのみであり、*Enterococcus* 属菌の SCV に関する知見はあまりにも少ない。

本研究では、慢性的臍炎の起因菌として検出された *E. faecalis* SCV がオレイン酸に栄養要求性を示すことを発見し、表現型の特性、生化学的特徴、増殖特性、そして抗菌薬に対する感受性について解析した。

４．２　材料と方法

４．２．１臍炎部からの *E. faecalis* SCV の検出

臍炎部からの浸出液はカルチャースワブ・プラス(Becton Dickinson Japan, Tokyo, Japan)滅菌綿棒で拭われ、添付の運搬用培地に保存され細菌検査室へと搬送された。

臍炎症部ぬぐい液は、5%羊血液寒天培地、チョコレート寒天培地、ドリガルスキー寒天培地に塗布し、同時に HK 半流動培地(Kyokuto Seiyaku, Tokyo, Japan)に添加した。5%羊血液寒天培地とチョコレート寒天培地は 5%炭酸ガス培養、ドリガルスキー寒天培地と HK 半流動培地は好気培養にて 35℃48 時間の培養を行った。

４．２．２　生化学的性状による菌種同定

48 時間培養後に発育したコロニーはバーミー変法によるグラム染色を行った。従来法である生化学的性状による菌種同定は、全自動細菌同定・薬剤感受性システム Microscan Walk Away 40 system にて Posi Combo 3.1J panel (Siemens Healthcare Diagnostics)を用いて行った。また、用手法同定検査として API 20 Strep (Nippon Sysmex BioMerieux, Kobe, Japan)を用い、用法に従って検査し判定は目視にて菌種同定を行った。カタラーゼ試験はスライドガラス上においたコロニーに 5%過酸化水素水を 1 滴滴下し、気泡発生が認められた場合にはカタラーゼ陽性、気泡発生が認められない場合はカタラーゼ陰性と判定した。また、ONPG(*O*-Nirophenyl-β-D-galactopyranoside) 試験は *O*-Nitrophenl- β-D-Galactopyranoside (Shigma Aldrich, St.Louis, U. S. A.)を用い、Pezzo ら [103]の方法に従って検査した。

４．２．３　16S rRNA 遺伝子配列による分子生物学的菌種同定

Neilan ら [58]の方法に従って PCR 法にて 16S rRNA のコーディング領域を増幅し、DTCS quick start master mix kit を用いたシークエンス反応後、CEQ 2000XL DNA analysis system にて一本鎖 DNA 塩基配列を決定した。得られた DNA 配列は Ribosomal Database Project databases (http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp)、blast (http://blast. ncbi. nlm. nih.gov) により配列相同性解析を行った。

4．2．4　薬剤感受性検査

微量液体希釈法による MIC 値は Posi Combo 3.1J panel を用い Microscan Walk Away 40 system にて測定した。ディスク拡散法による薬剤感受性検査は、MicroScan turbidity meter を使用しマクファーランド濁度 0.5McF に調整した菌液をミュラーヒントン培地(Becton Dickinson Japan)に塗布し、PCG、ABPC、CEZ、CMZ、ABPC/SBT、EM、CLDM、LVFX、VCM、GM、GM 120μg、SM 300μg のディスクを置き、35℃20 時間の好気培養後阻止円径の計測を行い、CLSI M100-S22[104]による判定基準に従って感受性判定を行った。

4．2．5　Pulsed-field gel electrophoresis による遺伝子相同性解析

SCV 株と正常形態復帰株(Revertant)、対照株として *E. faecalis* ATCC29212 株を用い、Oana ら[105]の方法に従って PFGE による泳動解析を行った。2ml の Brain-Heart-Infusion broth (Nissui Phermaceutical) に被検菌 1 コロニーを懸濁させ、35℃好気環境下 250rpm にて 0.8-1.0 $O.D._{600}$まで振盪培養した。CHEF ゲノム DNA プラグキットを用いプロトコールに従って DNA プラグを作成し、Proteinase K による 50℃18 時間のタンパク分解反応を行った。つづいて Labiase (CosmoBio Co. Ltd. Tokyo, Japan) 1mg/ml と Lysostaphin(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) 10U/ml にて 37℃にて一晩溶菌反応後、1 プラグあたり 4Unit の Not I (Takara Bio Inc.)を使用し 25℃18 時間の制限酵素反応を行った。1%Pulsed Field Certified Agarose にプラグを埋め込み、CHEF-DRⅢシステムにてパルスタイム 30-70 秒、5.0V/cm の泳動条件で 25 時間電気泳動した。泳動終了後のアガロースゲルをエチジウムブロマイドで染色後、泳動像を撮影した。

4．2．6　栄養要求性試験

Hemin、NAD 要求性は 0.5McF に調整した SCV 分離株をミュラーヒントン寒天培地(Oxoid, Basingstoke, U.K))に塗布し、XV マルチディスク(Eiken Chemical Co. Ltd.)を静置後、35℃20 時間の好気培養を行った。

また、ミュラーヒントン寒天培地(Oxoid)に、menadion (Shigma-Aldrich Co.)は終濃度 10μg/ml、thymidine (Shigma-Aldrich Co.)は終濃度 100μg/ml、biotin は終濃度 1000 , 100, 10, 1μg/ml となるように添加し、SCV を塗抹後、35℃24～48 時間の好気培養を行った。脂肪酸のオレイン酸(Shigma-Aldrich Co.)とラウリル酸(Shigma-Aldrich Co.)はそれぞれ終濃度 3.5mM になるようにミュラーヒントン寒天培地に添加し、SCV を塗抹後、35℃24～48 時間の好気培養を行った。すべての栄養要求性試験で対照株として *E. faecalis* ATCC29212 株を使用し、同時に試験した。

4．2．7　SCV 株の脂肪酸濃度依存性発育試験

オレイン酸を終濃度 0.035、0.35、3.5mM に添加したミュラーヒントン寒天培地とオレイン酸を添加しないミュラーヒントン寒天培地を作成し

SCV 株と対照用 *E. faecalis*　ATCC29212 を塗布し、24 時間の好気培養後発育したコロニー形態を観察した。また、SCV の増殖能におけるオレイン酸の影響を調べるために、ミュラーヒントン液体培地(Oxoid)にオレイン酸を終濃度 0.035、0.35、3.5mM に添加し、225rpm の振盪培養を行った。生菌数を測定するために、0、2、4、6、8、10、12 時間後にそれぞれ 100 μl を回収し、10 倍希釈系列を作成し各希釈系列のうちの 100 μl を 5%羊血液寒天培地に塗布後、24 時間の好気培養を行い、発育したコロニー数を測定した。1ml あたりの生菌数を算出し、成長曲線を描いた。対照株として *E. faecalis* ATCC29212 を同様に測定した。測定はすべて 2 重測定した。

さらに、オレイン酸添加による生化学的性状の変化を調べるため、被検菌液に終濃度 3.5mM にオレイン酸を添加し、Posi Combo 3.1J panel を使用した Microscan Walk Away 40 system による同定試験と、用手法同定試薬 API 20 Strep による同定検査を行った。

4．2．8　SCV 株からの Revertant 株発生率と安定性

SCV 形質の安定性を評価するために、コロニーの大きさを指標とし、微小コロニーから正常大コロニー(Revertant)が発生する確率を調べた。SCV 株をトリプチケースソイ液体培地(Eiken Chemical)中にて振盪培養し、わずかに混濁する程度まで培養し対数増殖期にある状態を形成させ、100 μl ずつチョコレート寒天培地 3 枚に塗布し、35℃24 時間培養後に発育した Revertant コロニー数を測定した。同時に全生菌数を計測し、Revertant 発生率を算出した。また、Revertant から SCV への回帰率を測定するために、Revertant 株を同様の手法にて対数増殖期の状態を形成させ、100 μl ずつ 30 枚のチョコレート寒天培地にコンラージし、35℃24 時間培養後に発育した SCV 形質の微小コロニー数と全生菌数を測定し、Revertant 株から SCV 株への回帰率を算出した。

4．2．9　SCV 株における FabZ1 遺伝子の塩基配列解析

FabZ1 遺伝子を標的として Forword primer 5'-AAA TTG GGA TTG CAG　GCT TT-3'、Reverse primer 5'-TCC AAA AAT GAT TGA TTC TTA TC-3'にて PCR 反応を行い、16r RNA 遺伝子配列解析と同様に一本鎖 DNA 塩基配列を決定した。得られた DNA 配列は、Wang らの *E. faecalis* における FabZ1 の機能解析実験において用いられた *E. faecalis* V583 株[106]との配列相同性解析を行った。

4．3　結果

4．3．1　症例

生後より臍部の炎症を繰り返していた 2 歳 7 か月男児が、尿膜管遺残の疑いで、その精査を目的に当院に紹介された。超音波画像診断等による精査を行ったところ尿膜管遺残は否定された。臍部炎症にはゲンタマイシン軟膏が処方されたものの、2 週間の加療では症状の改善は認められなかったため、感染起因菌の検索の目的で臍炎症部の細菌培養検査を行った。

4．3．2　臍炎部からの *E. faecalis* SCV の検出

24 時間培養後、5%羊血液寒天培地では溶血性を欠いた着色性のないやや光沢のある白色小コロニーが観察された。チョコレート寒天培地では溶血性を示さない極微小な非光沢性白色コロニーが、ドリガルスキー寒天培地には極微小な非光沢白色コロニーの発育が認められた。48 時間培養後には 5%羊血液寒天培地ではコロニーが 1.5 倍程度に増大したが、溶血性は出現せず、典型的な *E. faecalis* コロニー形態は呈さなかった。チョコレート寒天、ドリガルスキー寒天培地ではいずれも 48 時間培養後に著変はなく、すべて純培養状に発育していた。図 1．に 48 時間培養後のコロニー形態を示した。また、HK 半流動培地では 48 時間培養後の培地の混濁は認められなかった。

48 時間培養後のグラム染色像では大小不同かつ不整形の球菌が不規則に集塊をなす所見が観察された。図 2．にグラム染色像を示した。

これらのコロニー所見とグラム染色所見からは、特定の菌種を推定することは困難だった。

また、チョコレート寒天培地での 2 週間の継代培養によって、典型的な *E. faecalis* コロニーが数コロニー出現し、SCV コロニーと混在した状態で培養された。Revertant 株のコロニー形態を図１．にグラム染色像を図 2．に示した。

4．3．3　生化学的性状による菌種同定

Posi Combo 3.1J panel を使用した Microscan Walk Away 40 system では同定コード番号 003656744、稀なバイオタイプとなり同定不能だった。API 20 Strep では同定コード番号 7143110 であり *Lactococcus lactis* ssp *lactis* 62.9%、*E. faecium* 20.1%, *E. faecalis* 11.2%, *E. durans* 5.3%と同定確率は低く同定不能だった。カタラーゼ試験は陰性だった。

一方 Revertant 株は、Microscan Walk Away 40 system と API 20 Strep で同定したところ、ともに *E. faecalis* と同定された。

4．3．4　16S rRNA 遺伝子配列による分子生物学的菌種同定

16S rRNA のコーディング領域に対する 1472bp の PCR 産物から得られた DNA 配列は Ribosomal Database Project databases と、blast による配列相同性解析にて、*E. faecalis* ATCC19433 (GenBank/DDBJ/EMBL accession number DQ411814)と 100%一致した。この結果から、臍炎部拭い液から得られたグラム陽性球菌を *E. faecalis* と同定した。

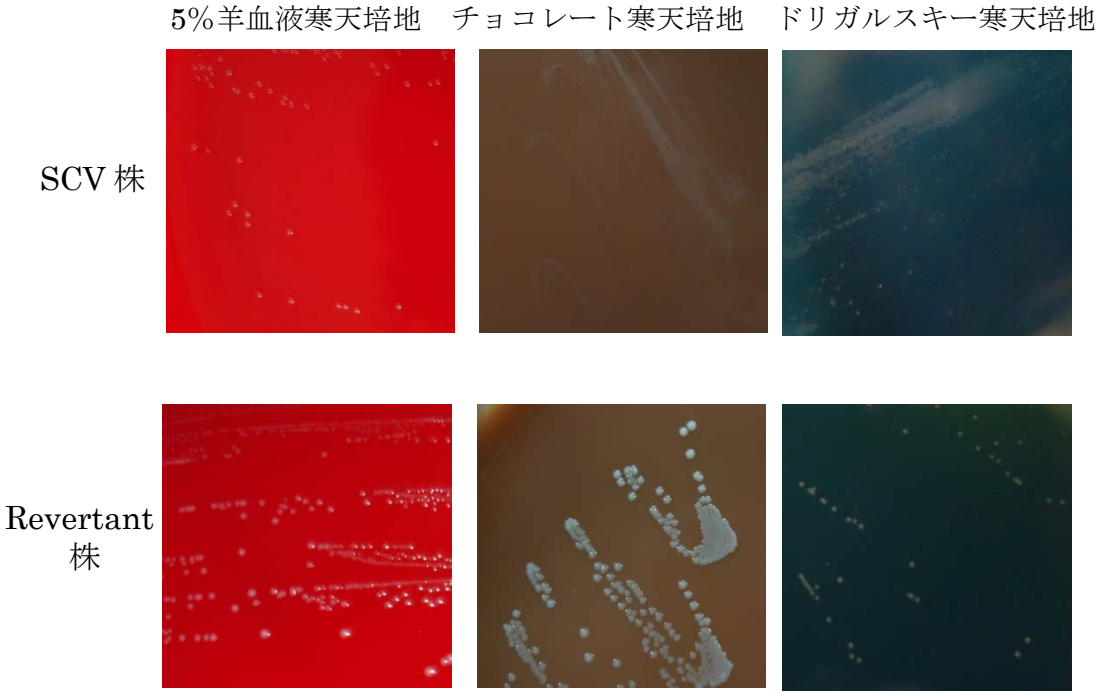


図１．*E. faecalis* SCV 株とその Revertant 株コロニー像
それぞれ 48 時間培養後のコロニー所見を示した.

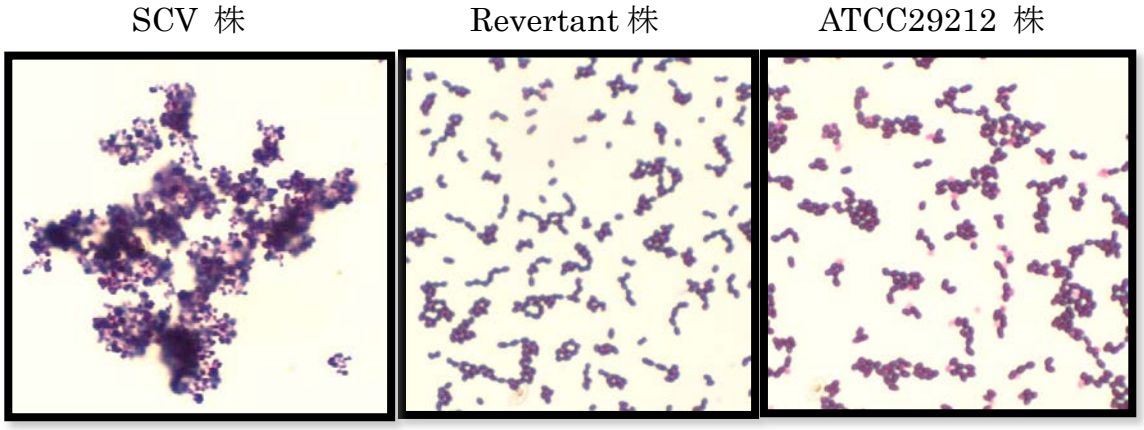
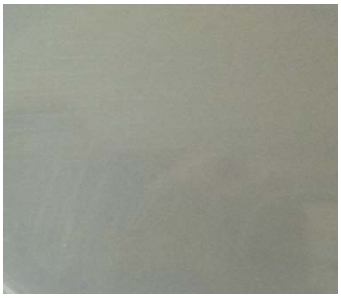


図 2. *E. faecalis* SCV 株その Revertant 株グラム染色像
5%羊血液寒天培地での 48 時間培養後のコロニーをグラム染色した.
ATCC29212 株は *E. faecalis* の典型例として提示した.

4．3．5　SCV 株の栄養要求性

SCV 株は、オレイン酸添加ミュラーヒントン培地でコロニー径が増大し、対照株 *E. faecalis* ATCC29212 株と同等程度のコロニー径を示した。一方、Hemin、NAD、Menadion、thymidine、biotin、ラウリル酸それぞれを添加したミュラーヒントン培地では、SCV のコロニー径には変化はなかった。この結果は、本 SCV 株がオレイン酸に対する栄養要求性を有することを示す。オレイン酸添加濃度を 0.035mM、0.35mM、3.5mM に変化させて添加したミュラーヒントン培地では、オレイン酸添加濃度勾配に応じて SCV 株のコロニー径は増大し、3.5mM 添加培地では *E. faecalis* ATCC29212 株と同程度のコロニー径を示した。(図 3)



オレイン酸非添加 SCV

ATCC29212

オレイン酸添加 SCV

0.035mM　　0.35mM　　3.5mM

図 3．オレイン酸濃度依存的 SCV コロニー変化

上段にオレイン酸非添加時の SCV 株、対照として ATCC29212 株を、下段に 0.035、0.35、3.5mM にオレイン酸を添加したミュラーヒントン寒天培地での 24 時間培養後の SCV コロニー形態を示した.

また、SCV 株はオレイン酸濃度依存的に増殖能も亢進した。図 4．に示すように、オレイン酸非添加の SCV は、12 時間までの成長曲線図では対数増殖期を認めなかったが、オレイン酸存在下においては対数増殖期を認め、3.5mM オレイン酸添加時には対照 *E. faecalis* ATCC29212 株と同等の増殖曲線図パターンを示した。

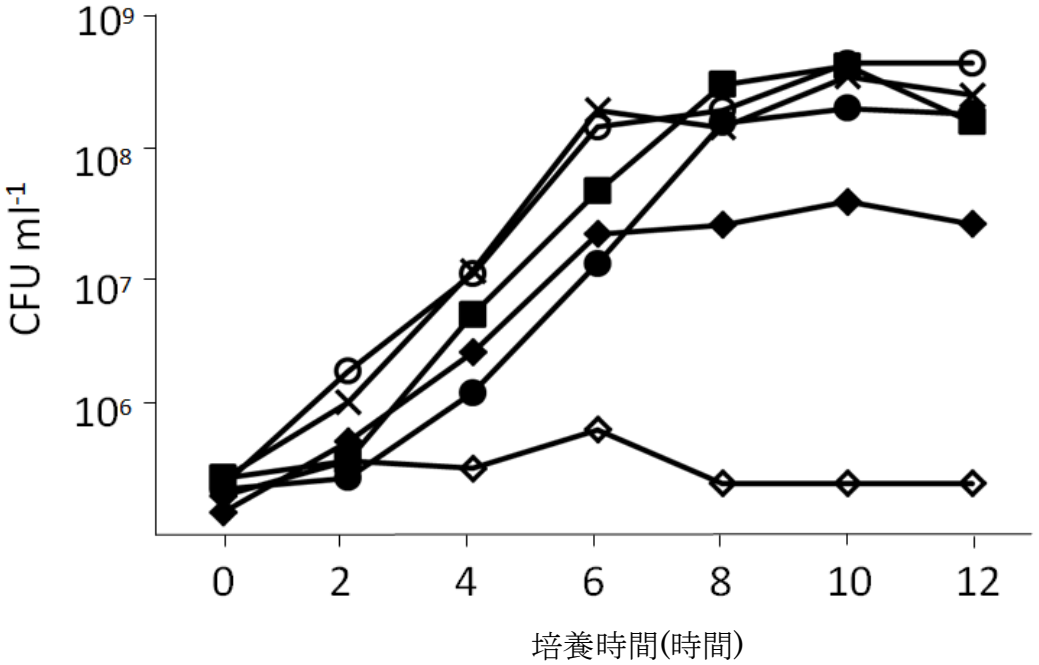


図 4. オレイン酸添加 SCV 株増殖曲線

◇: SCV 株オレイン酸非添加、◆: SCV 株 0.035mM オレイン酸添加、
●: SCV 株 0.35mM オレイン酸添加、■: SCV 株 3.5mM オレイン酸添加、
X: Revertant 株オレイン酸非添加、○: ATCC29212 オレイン酸非添加

さらに、終濃度 3.5mM にオレイン酸を添加し Posi Combo 3.1J panel を使用した Microscan Walk Away 40 system による同定試験と、API 20 Strep による要手法同定検査では、ともに *E. faecalis* と同定された。オレイン酸添加による API 20 Strep 試薬での生化学的性状を表 1. に示した。オレイン酸非添加時にはソルビトール、ラクトース、デンプンは非分解であったが、オレイン酸添加時には分解陽性となり、糖の分解能が変化した。API 20 Strep ではこれら糖の分解能力は酸の産生で判定される。ソルビトール、ラクトース、デンプン分解陽性の性状は Revertant 株と一致した。また、ONPG 試験はオレイン酸非添加、オレイン酸添加 SCV 株、Revertant 株すべてで陽性だった(図 5.)。

表 1. SCV 株と Revertant 株における生化学的性状

		SCV 株	Revertant 株	3.5mM オレイン酸 SCV 株
API 20 Strep	プロファイル番号	7143110	7143711	7143711
	ソルビトール	—	+	+
	ラクトース	—	+	+
	デンプン	—	+	+
ONPG 試験		+	+	+

ONPG：*O*-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside
—：陰性、+：陽性

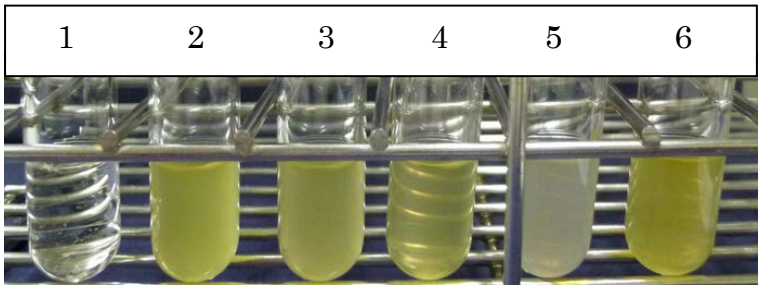


図 5　SCV 株および Revertant 株における ONPG 試験
1：試薬対照、2,：SCV 株、3：3.5mM オレイン酸添加 SCV 株、4：Revertant 株、5：陰性対照（*P. mirabilis*）、6：陽性対照（*E. coli*）

4．3．6　薬剤感受性検査結果

表 2．にディスク拡散法による薬剤感受性検査結果を示した。分離された SCV 株は、微量液体希釈法である Posi Combo 3.1J panel の growth control well に発育せず、MIC 値は測定不能だった。CLSI カテゴリーでは PCG、EM、高濃度 GM に対して R(耐性)を示し、ABPC、LVFX、VCM、高濃度 SM には S(感性)を示した。一方、Revertant 株はペニシリンのみが SCV 株と異なり S(感性)を示し、他の薬剤は SCV 株と同じだった。ただし CLSI カテゴリーが定められていないβ-ラクタム系薬(CEZ、CTM、A/S)については Revertant 株で SCV 株よりも阻止円径が拡大していた。

表 2.　ディスク拡散法による発育阻止円径

	発育阻止円径(mm)と耐性/感性判定			
抗菌薬	SCV 株		Revertant 株	
PCG	12.6	R	17.4	S
ABPC	17.2	S	22.6	S
CEZ	7.4	ND	8.2	ND
CTM	-*	ND	7.4	ND
A/S	12.5	ND	18.5	ND
EM	-	R	-	R
CLDM	-	ND	-	ND
LVFX	22.6	S	22	S
VCM	18.1	S	17.8	S
GM	-	ND	-	ND
GM 120	-	R	-	R
SP 300	14.5	S	14.3	S

-*:阻止円形成なし、ND:CLSI M100-S22 でのカテゴリーなし、R:耐性、S:感性
PCG: penicillin, ABPC: ampicillin, CEZ: Cefazolin, CTM: cefotiam, A/S: ampicillin/sulbactam, EM: erythromycin, CLDM: clindamycin, LVFX: levofloxacin, VCM: vancomycin, GM: gentamicin, GM 120: gentamicin 120μg, SP 300: streptomycin 300μg,

4．3．7　SCV 株からの revertan 株発生率と安定性

SCV 株からの Revertant 株の発生率をそのコロニーサイズを指標に算出したところ、1/5.4×10^6 cfu/ml だった。発生した通常サイズコロニーを呈する Revertant 株からの SCV 形質への転換率は 10^8cfu./ml 以下だった。

4．3．8　PFGE による菌株相同性

発生した Revertant 株と SCV 株の PFEG 解析では電気泳動パターンは同一で、コントロール株として同時に解析した ATCC 株はこれらと異なった泳動パターンを示した。図 5．に PFGE 泳動パターンを示した。

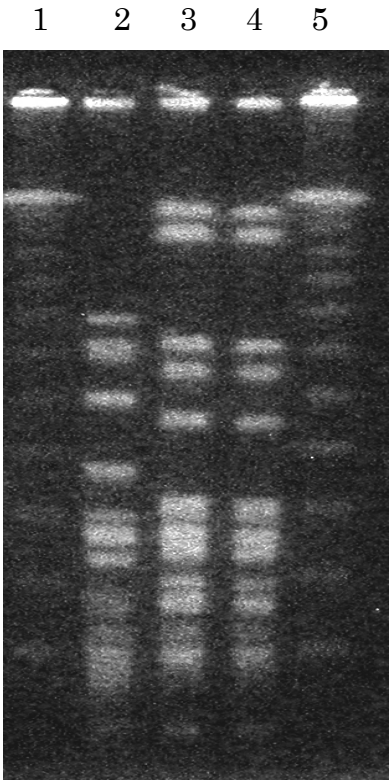


図 5．S CV 株と Revertant 株 SmaI 切断全ゲノム DNA Pulsed-field gel electrophoresis
レーン 1 およびレーン 5 ：分子量マーカー(28.5-970kbp)、
レーン 2：*E. faecalis* ATCC29212 株、レーン 3：SCV 株、
レーン 4：Revertant 株

4．3．9　*fabZ1* 遺伝子配列解析

得られた *fabZ1* 遺伝子の遺伝子相同性解析の結果、データベースに登録されていた *E. faecalis* V583 株アミノ酸配列と完全に一致した。図 6．にアミノ酸配列アライメント結果を示した。

```
V583 strain     MKKVMTATEIMEMIPNRYPICYIDYVDEIIPNEKIIATKNVTINEEFFQGHFPGNPTMPG 60
Revertant       MKKVMTATEIMEMIPNRYPICYIDYVDEIIPNEKIIATKNVTINEEFFQGHFPGNPTMPG 60
SCV             MKKVMTATEIMEMIPNRYPICYIDYVDEIIPNEKIIATKNVTINEEFFQGHFPGNPTMPG 60
                ************************************************************

V583 strain     VLIIEALAQVGSILILKMDQFEGETAYIGGINKAKFRQKVVPGDVLKLHFEIVKLRDFVG 120
Revertant       VLIIEALAQVGSILILKMDQFEGETAYIGGINKAKFRQKVVPGDVLKLHFEIVKLRDFVG 120
SCV             VLIIEALAQVGSILILKMDQFEGETAYIGGINKAKFRQKVVPGDVLKLHFEIVKLRDFVG 120
                ************************************************************

V583 strain     IGKATAYVEDKKVCECELTFIVG 143
Revertant       IGKATAYVEDKKVCECELTFIVG 143
SCV             IGKATAYVEDKKVCECELTFIVG 143
                ***********************
```

図 6．*fabZ1* 遺伝子アミノ酸配列相同性

SCV 株、Revertant 株 *fabZ1* 遺伝子配列より、対照株 *E. faecalis* V583 のアミノ酸配列とアライメントした.

4．4　考察

Enterococcus sp. SCV を起因菌とする感染症についてはその情報は限定的であり、現在 3 例の報告例 [100, 101, 102]があるに過ぎない。そのうちの 2 例は *E. faecalis* による感染性心内膜炎の症例 [100, 101]であり、1 例は *E. faecium* による敗血症例 [102]である。最初の報告例は Kasse ら [100]による 2004 年のもので、*E. faecalis*　SCV 株による僧房弁感染性心内膜炎に関する症例報告だった。この症例の SCV 株は、その SCV 形質は安定的でなく高率で正常形質に復帰した。この菌株が特定の物質に対する栄養要求性を有するかどうかについては不明であると報告されている。一方 Wellinghausen ら [101]の報告した敗血症起因菌 *E. faecalis*　SCV は haemin 依存的にその SCV 形質を正常化させ、Gröbner ら [102]は感染性心内膜炎起因菌として検出した *E. faecium* SCV が NAD と thymidine 依存的に SCV 形質を正常化させたと報告している。この 2 例の症例ではそれぞれ SCV 株と正常株が混在して検出されたものの、SCV 株の細胞形質は安定的で正常株へと復帰することはなかった。対照的に、本研究において検出された *E. faecalis* SCV 株は臨床材料からは純培養状に発育したものの、5.4×10^{-6}の頻度で正常株形質へと変化した。

これまで、細菌学者たちは多くの細菌発育抑制物質について研究してきている。それら発育抑制物質の一つに長鎖脂肪酸とその派生物質が存在し、代表的な細菌発育抑制物質として考えられてきた。事実、長鎖脂肪酸は *Streptococcus* [107]、*Corynebacterium* [108]、*Lactobacillus* [109, 110]、抗酸菌 [111]などの微生物の発育を抑制する。ただし長鎖脂肪酸の抗菌活性は BSA やレシチンの添加で不活化できる [112]。この知見は細菌の分離培地組成に活用されている。分離培地中の寒天成分や検体中に含まれる長鎖脂肪酸の抗菌活性を、血液や血清などのタンパク質成分により不活化することで、特定の菌種の発育を促している分離培地がある [113]。

ラウリル酸は、*E. faecalis* を含めたグラム陽性球菌に対して長鎖飽和脂肪酸の中でも強力な抑制効果を持つことが証明されている [107]。さらにオレイン酸のような長鎖一価不飽和脂肪酸は、ラウリル酸を含む多くの長鎖飽和脂肪酸よりも強力な抗菌活性を有するといわれていた [112]。しかし、パルミチン酸、リノレン酸、オレイン酸には低濃度では成長促進に作用し、高濃度であれば成長抑制へ作用するという濃度依存的に二元的に作用する特性が存在するという興味深い報告がある [107]。

微生物に対する成長因子としての脂肪酸の役割はあまり知られていないが、脂肪酸の代謝機能は広く生物に存在しており、微生物にとっても必須である [114]。*E. coli* での不飽和脂肪酸合成経路においては 2 つの特異的なタンパク質 FabA と FabB を必要とする [115]。しかし、*fabA*、*fabB* 遺伝子はグラム陰性の光合成系細菌やリケッチアなどのα-Proteobacteria および、腸内細菌、緑膿菌、ビブリオなどのγ- Proteobacteria のみでしか見つかっていない。*E. faecalis* では FabZ1 と名付けられたタンパク質が *E. coli* における FabA に機能的に代替される [106]。アミノ酸配列からは *E. coli* の FabZ に相同性が高いが *E. coli* では FabZ は不飽和脂肪酸の合成において特異的な役割は担っていない。*E. faecalis* の FabZ1 はグラム陰性桿菌グループに限定されていた酵素活

性、dehydratase/ isomerase（脱水素/異性化酵素）の重複的機能を有する [106]。本研究で用いた *E. faecalis* SCV がオレイン酸の添加によって正常形質を回復したことから、オレイン酸合成系の欠陥の存在を推定し、*fabZ1* 遺伝子の存在について確かめた。しかし、そのアミノ酸配列に対照株との差異は認めなかった。にもかかわらず、通常のサイズのコロニーに発育するためには、オレイン酸を必要とした。この事実は FabZ1 タンパクの発現には別の調節遺伝子の働きが必要であるか、もしくはまだ解明されていないメカニズムが存在することを想像させる。

オレイン酸のような長鎖脂肪酸は細菌の呼吸やアミノ酸取り込みに関連する [116]ことが知られている。加えて不飽和脂肪酸栄養要求性 *E. coli* K12 を利用した実験では、オレイン酸やラウリル酸の培養液への添加はβ-galactoside とβ-glucoside 輸送システムに影響を与えた [117]。本研究では表 1. に示したように、SCV 株で陰性だったソルビトール、ラクトース、デンプンの分解能が、オレイン酸の添加によって Revertant 株と同様に分解能陽性に変化した。興味深いことに、オレイン酸非添加 SCV 株において、オレイン酸添加時や Revertant 株と同様に、ONPG 反応は陽性を示していた。ラクトースは、ラクトースの膜透過を促進するたんぱく質ラクトース透過酵素：Lactose permease の働きによって菌体内に取り込まれ、ONPG はラクトースの類似体で、菌体内への取り込みにラクトースパーミアーゼの作用を必要としないため、複合的な酵素活性を必要とするラクトースの分解と、β-ガラクトシダーゼの酵素活性のみを反映する ONPG 試験結果に乖離が認めらる菌種がある。ラクトース分解陰性かつ ONPG 試験陽性を示す菌種には、*Shigella sonnei* 、*Hafnia alvei*、*Serratia marcescens*、*Yersinia entrocolitica* [118]などが知られている。*E. faecalis* はほとんどの菌株において ONPG テストと乳糖分解能ともに陽性を示す。本研究で検出された *E. faecalis* SCV 株のβ-ガラクトシダーゼ活性を有するにもかかわらずラクトース非分解を示す性状は、ラクトースの細胞膜浸透性が低下していることにその原因があることが示唆された。SCV 株がソルビトール、ラクトース、スターチの代謝分解ができなかったのは、細胞膜の浸透性が低下していたことによると考えるのが妥当である。オレイン酸はラクトースを含む炭水化物の膜浸透性に働きかけたのだろう。

表 2. に示したディスク拡散法による薬剤感受性の結果からは、SCV 株がマクロライド系薬耐性、ゲンタマイシンに高度耐性を示していた。これは Wellinghausen ら [101]の報告にある SCV 株と同様な形質である。そしてβ-ラクタム薬では Revertant 株に比べて SCV 株での阻止円径は小さく、耐性傾向にあることを示した。これはオレイン酸非存在にある SCV では細胞膜の浸透性が低下していることにより抗菌薬が膜内に取り込まれにくく耐性の傾向に傾いたと説明することができる。Wellinghausen らは SCV 株においてβ-ラクタム薬に対する耐性度が上昇しているのは細菌の細胞壁の構造変化をその原因だと推論していることとは異なっている。

一方、*Saccharomyces cerevisiae* の長鎖脂肪酸に対する栄養要求性株ではビオチンが SCV 形質の消失に影響するという報告 [119]や、*Lactobacillus* 属菌ではビオチンが不飽和脂肪酸の合成促進に必要である [120]という報告、がある

があるため、本研究においてもビオチンの添加による SCV 形質への影響を確認した。しかし、ビオチンの添加によって SCV 株が正常化することはなかった。よって本研究で検出された SCV 株は、その SCV 形質の消失に関するビオチン栄養要求性はなく、オレイン酸にのみ栄養要求性を示すことが示された。

本研究で同定した *E. faecalis* SCV の薬剤耐性化傾向や SCV としての性質は、臨床的には炎症の反復性、ゲンタマイシン不応性に合致し、本症例における臍炎の感染起因菌として矛盾しない。本研究により *E. faecalis* の SCV に関する新たな情報を提供し、*E. faecalis* が小児において臍炎を引き起こし得ることを示した。この知見は *E. faecalis* への理解を深め、その感染症の治療に有益な知識として利用されることが期待できる。

総括

総括

本研究では、小児特有の感染症症例における感染起因菌の特徴を明らかにし、治療に関する情報と感染対策に関する知見を集積することにより、小児感染症に対する理解を深め、診断、治療、感染対策に有効に活用されることを目的とした。

第 1 章では、小児高度専門医療施設における ESBL 産生腸内細菌の保菌率を明らかにした。保菌率は 12%であり、過去 3 か月以内の抗菌薬投与歴と、心疾患を基礎疾患として持つグループでの保菌率が高い傾向が認められた。本邦における健康人の ESBL 保菌率 6.4%と比べると約 2 倍の保菌率であったが、スペインにおける入院患者の保菌率が 12%であったという研究結果とはほぼ一致していた。本研究において検出された保菌率と ESBL 保菌リスクファクターはアンチバイオグラムとともにエンピリック治療薬選択の有用な情報として使用できる。また、この保菌率を基礎データとして活用することにより、ESBL 産生菌によるアウトブレイクの早期確定、感染対策の徹底による ESBL 産生菌のさらなる蔓延の防止が期待できる。

第 2 章では、新生児集中治療部門における *B. cepacia* complex による院内感染の排除について研究した。新生児集中治療部門は、小児医療領域の中でもさらに特殊性の高い患者を扱う。超低出生体重児や極低出生体重児、先天遺伝性疾患や先天的器質異常を持った新生児は、重度の易感染性宿主であり、弱毒性環境菌の一種である *B. cepacia* complex による感染症を容易に発症する。新生児集中治療部門では基本的に患者同士の接触や、患者自らが感染源と接触するリスクを全く持たない。よって、院内感染の原因は医療スタッフの手指を介した患者から患者への水平感染が主要因と考えられる。2010 年 4 月から 2011 年 3 月までの間に 6 名の新規感染者が連続して検出され、検出菌の薬剤感受性パターンと PFGE による遺伝子相同性解析により、*B. cepacia* complex 同一株による院内感染を検出した。ICT のスタッフが積極的介入を行い、医療ケア(挿管やルート確保、気管吸引や導尿操作等)に関するチェックと作業手順の変更を提案した。また、手洗い前後の手指付着菌の検出を行い、効果的手洗いに対する啓蒙を行った。さらに院内感染の原因菌が、消毒薬に抵抗性を示す性質を有する *B. cepacia* complex であったことに注目し、医療スタッフが日常で使用している消毒液に汚染がある可能性を考え、開封使用中のすべての消毒薬、ハンドケア製品、さらに人工呼吸器デバイスの表面、保育器内壁、コンピューターキーボードからの *B. cepacia* complex の検出を試みた。しかし検査したすべての消毒液からおよび NICU 環境から *B. cepacia* complex は検出されなかった。この研究によって、*B. cepacia* complex の感染源を突き止めることはできなかったが、その後 *B. cepacia* complex によるアウトブレイクは起こっておらず、ICT の積極的介入が院内感染の阻止に効果的に働いたものと推測される。このことは、原因菌のリザーバーの除去に至らなかったとしても、効果的な ICT 介入と徹底した標準予防策の順守により院内感染を阻止できることを示唆する。本研究において用いられた感染対策手法が、今後の院内感染阻止全般に対して普遍的な方法として利用できる可能性を示した。

第 3 章では小児骨髄炎の感染起因菌として *K. kingae* を検出・同定し、臨床

経過とともに *K. Kingae* に関する特徴について示した。*K.　kingae* は関節液や膿などに含まれる阻害因子により寒天平板培地による検出が困難である可能性が指摘されており、骨、関節、心内膜炎における起因菌として非常にまれに検出される菌種と考えられていた。検出法の改良や遺伝子検査により検出感度が上昇し検出例が増えていることから、これまでは見逃されていた可能性が考えられる。本症例は手術による掻爬組織から寒天平板培地上で検出され、手術中に術部で使用される生理食塩水により、*K. Kingae* の発育を阻害する因子等が洗浄されたことが検出の原因の一つではないかと推測した。本症例は発症年齢、症状、軽度な炎症反応データ等において典型的な症例であり、成人においてはほとんど認められることのない小児特有の骨髄炎であった。本邦における *K. kinage* による骨髄炎報告例はほとんどなく本研究による症例提示は、小児骨髄炎の診断、治療における具体的な例示として今後の活用が期待できる。

第 4 章では臍炎の起因菌となった *E. faecalis* Small-colony vaiant について研究し、本株がオレイン酸に栄養要求性を示すことを突き止めた。菌株の培養基質にオレイン酸を添加することで SCV 形質は失われ、正常 *E. faecalis* と同等なコロニー径を呈し、増殖速度も促進した。これらはオレイン酸添加濃度依存的であった。*E.　faecalis* における長鎖不飽和脂肪酸合成酵素として必須である dehydratase/ isomerase FabZ1 酵素のアミノ酸配列はコントロール株と同一で、本研究において検出した SCV 株のオレイン酸要求性の形質の原因としての関与は証明されなかった。よって本株では *fabZ1* 遺伝子発現に関する調節機構の存在もしくはこれまでには知られていない長鎖不飽和脂肪酸合成機構の存在の可能性が示唆された。

オレイン酸の添加によってソルビトール、ラクトース、スターチの分解能が改善したことによって生化学的性状を基にした菌種同定試薬による同定確率が上昇し、*E. faecalis* としての同定結果が得られた。これは SCV 株において低下していた細胞膜浸透性がオレイン酸添加によって変化し炭水化物の膜浸透性が上がったことによるものと考えられる。

本研究で同定した *E. faecalis* SCV の薬剤耐性化傾向や SCV としての性質は、臨床的には炎症の反復性、ゲンタマイシン不応性に合致し、本症例における臍炎の感染起因菌として妥当だった。SCV はそのコロニー形態が菌種特有の典型的所見・生化学的性状を示さないことから、感染起因菌としての菌種同定が困難である。一般的な臨床細菌検査においては、菌種同定が不可能な場合に、菌種不明グラム陽性球菌もしくは菌種不明グラム陰性桿菌等の検査結果となることが想定される。しかし、SCV 株は、抗菌薬に対する耐性化傾向を示すこと、宿主の免疫機構から逃れて残存する傾向が高いこと、それにより感染の再発を起こすことが示されているため、繰り返し検出される場合や抗菌薬治療に反応しにくい場合、感染の再発を疑う場合には、菌種同定と SCV 株であることの証明を行ったうえで、感染起因菌が SCV 株であることを治療方針の選択の際に必要な情報として付加するべきである。

本研究では、成人とは異なり完成された免疫能を有しない小児に焦点をあて、小児感染症起因菌に関する解析、感染症発症時に有用な保菌率に関する解析、

院内感染によるアウトブレイクの収束について、古典的な微生物学的解析手法から、現在臨床細菌検査で日常的に用いられている一般的な検査手法、さらには分子生物学的手法まで、幅広い実験手法を用いたデータ解析を行った。分子生物学的解析手法は本研究に有用な知見を与え、治療や予後判定、感染対策の成功をもたらした。これらの分子生物学的検査手法に関しても今後保険適応が進んでいくことが望まれる。

さらに、本研究では臨床検査の現場に存在した疑問や問題点の解決を目的としている。臨床現場において見出された疑問を見過ごすことなく、深く解析し広く情報を共有することにより、小児感染症にかかわる理解を深め、より良い治療の提供に有効に活用されていくことが期待される。

引用文献

1. 四宮博人. 感染防御と免疫. シンプル微生物学　第 5 版. 75-116 (ed. 東匡伸、小熊惠二、堀田博) (南江堂, 東京、日本, 2011).
2. 原寿郎. 免疫疾患. 標準小児科学　第 7 版. 265-287 (ed. 内山聖、原寿郎、高橋孝雄) (医学書院, 東京、日本, 2009).
3. 千田勝一. 新生児疾患. 標準小児科学　第 7 版. 67-130 (ed. 内山聖、原寿郎、高橋孝雄) (医学書院, 東京、日本, 2009).
4. 岡部昭延、松下治. 感染と発症. シンプル微生物学　第 5 版. 43-54 (ed. 東匡伸、小熊惠二、堀田博) (南江堂, 東京、日本, 2011).
5. 野々山勝人. 大腸菌. 小児耐性菌感染症の治療戦略. 135-138. (ed. 砂川慶介) (医薬ジャーナル, 東京、日本, 2011).
6. Sakata, H., Toyonaga, Y., Sato, Y., Hanaki, H., Nonoyama, M., Oishi, T. & Sunakawa, K. Nationwide survey of the development of drug-resistance in the pediatric field: drug sensitivity of Haemophilus influenzae in Japan. *J Infect Chemother* **15**, 402-409 (2009).
7. 土屋友房. 化学療法と細菌感染症の治療. シンプル微生物学　第 5 版、61-72 (ed. 東匡伸、小熊惠二、堀田博) (南江堂, 東京, 2011).
8. 山田作夫. 細菌の形態. シンプル微生物学　第 5 版、14-18 (ed. 東匡伸、小熊惠二、堀田博) (南江堂, 東京、日本, 2011).
9. Abraham, E.P. & Chain, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Reviews of Infectious Diseases* **10**, 677-678 (1988).
10. Ambler, R.P. The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **289**, 321-331 (1980).
11. Bush, K., Jacoby, G.A. & Medeiros, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 1211-1233 (1995).
12. Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M. & Mitsuhashi, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. *Infection* **11**, 315-317 (1983).
13. Canton, R., Gonzalez-Alba, J.M. & Galan, J.C. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology* **3**, 110 (2012).
14. Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L. & Woodford, N. CTX-M: changing the face of

ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**, 165-174 (2007).

15. Hirakata, Y., Matsuda, J., Miyazaki, Y., Kamihira, S., Kawakami, S., Miyazawa, Y., Ono, Y., Nakazaki, N., Hirata, Y., Inoue, M., Turnidge, J.D., Bell, J.M., Jones, R.N., Kohno, S. & Participants, S.A.-P. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **52**, 323-329 (2005).
16. Canton, R. & Coque, T.M. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology* **9**, 466-475 (2006).
17. Bradford, P.A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews* **14**, 933-951, table of contents (2001).
18. Thomson, K.S., Prevan, A.M. & Sanders, C.C. Novel plasmid-mediated beta-lactamases in enterobacteriaceae: emerging problems for new beta-lactam antibiotics. *Current Clinical Topics in Infectious Diseases* **16**, 151-163 (1996).
19. Shibata, N., Kurokawa, H., Doi, Y., Yagi, T., Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Ishikawa, S., Kato, H., Ozawa, Y., Shibayama, K., Kai, K., Konda, T. & Arakawa, Y. PCR classification of CTX-M-type beta-lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**, 791-795 (2006).
20. Paterson, D.L., Ko, W.C., Von Gottberg, A., Casellas, J.M., Mulazimoglu, L., Klugman, K.P., Bonomo, R.A., Rice, L.B., McCormack, J.G. & Yu, V.L. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 2206-2212 (2001).
21. CLSI. Paformance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S19. (Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2009).
22. Chong, Y., Yakushiji, H., Ito, Y. & Kamimura, T. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta- lactamase -producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in a long-term study from Japan. *European Journal of Clinical Microbiology and*

Infectious Diseases **30**, 83-87 (2011).

23. Nakamura, T., Komatsu, M., Yamasaki, K., Fukuda, S., Miyamoto, Y., Higuchi, T., Ono, T., Nishio, H., Sueyoshi, N., Kida, K., Satoh, K., Toda, H., Toyokawa, M., Nishi, I., Sakamoto, M., Akagi, M., Nakai, I., Kofuku, T., Orita, T., Wada, Y., Zikimoto, T., Koike, C., Kinoshita, S., Hirai, I., Takahashi, H., Matsuura, N. & Yamamoto, Y. Epidemiology of Escherichia coli, Klebsiella species, and Proteus mirabilis strains producing extended-spectrum beta-lactamases from clinical samples in the Kinki Region of Japan. *American Journal of Clinical Pathology* **137**, 620-626 (2012).
24. Niki M, H.I., Yamamoto Y. Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in medical students. *Japanese journal of environmental infections* **26**, 154-156 (2011).
25. Kasuga, E., Matsumoto, T., Hidaka, E., Oguchi, H., Kanai, S., Oana, K., Yamauchi, K., Honda, T. & Kawakami, Y. [Clinical assessment of novel ChromID ESBL agar plates for detection of ESBL producers in the family Enterobacteriaceae]. *Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi* **20**, 1-8 (2009).
26. Luvsansharav, U.O., Hirai, I., Niki, M., Nakata, A., Yoshinaga, A., Moriyama, T. & Yamamoto, Y. Prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae among healthy adult people in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy* **17**, 722-725 (2011).
27. Valverde, A., Coque, T.M., Sanchez-Moreno, M.P., Rollan, A., Baquero, F. & Canton, R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 4769-4775 (2004).
28. Andriatahina, T., Randrianirina, F., Hariniana, E.R., Talarmin, A., Raobijaona, H., Buisson, Y. & Richard, V. High prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in a pediatric unit in Madagascar. *BMC Infectious Diseases* **10**, 204 (2010).
29. Friedmann, R., Raveh, D., Zartzer, E., Rudensky, B., Broide, E., Attias, D. & Yinnon, A.M. Prospective evaluation of colonization with extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing entero-bacteriaceae among patients at hospital admission and of subsequent colonization with ESBL-producing enterobacteriaceae among patients during hospitalization. *Infection Control and Hospital Epidemiology*

30, 534-542 (2009).

30. Malloy, A.M. & Campos, J.M. Extended-spectrum beta-lactamases: a brief clinical update. *Pediatric Infectious Disease Journal* **30**, 1092-1093 (2011).
31. Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J.R. & LiPuma, J.J. Taxonomy and identification of the Burkholderia cepacia complex. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 3427-3436 (2001).
32. Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets, H., Lauwers, S., Gillis, M., Kersters, K. & Govan, J.R. Occurrence of multiple genomovars of Burkholderia cepacia in cystic fibrosis patients and proposal of Burkholderia multivorans sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 1188-1200 (1997).
33. Vandamme, P. & Dawyndt, P. Classification and identification of the Burkholderia cepacia complex: Past, present and future. *Systematic and Applied Microbiology* **34**, 87-95 (2011).
34. Paul C. Schreckenberger, M.I.D., Dannie G. Hollis. Burkholderia, Stenotrophomonas, Ralstonia, Cupriavidus, Pandoraea, Brevunfdimonas, Comamonas, Delftia, Acidovorax. (ed. Murray, P.R.) (American Society of Microbiology, Eashington, D. C., 2007).
35. Webb, A.K. & Egan, J. Should patients with cystic fibrosis infected with Burkholderia cepacia undergo lung transplantation? *Thorax* **52**, 671-673 (1997).
36. Snell, G.I., de Hoyos, A., Krajden, M., Winton, T. & Maurer, J.R. Pseudomonas cepacia in lung transplant recipients with cystic fibrosis. *Chest* **103**, 466-471 (1993).
37. Jones, A.M., Dodd, M.E. & Webb, A.K. Burkholderia cepacia: current clinical issues, environmental controversies and ethical dilemmas. *European Respiratory Journal* **17**, 295-301 (2001).
38. Thomassen, M.J., Demko, C.A., Klinger, J.D. & Stern, R.C. Pseudomonas cepacia colonization among patients with cystic fibrosis. A new opportunist. *American Review of Respiratory Disease* **131**, 791-796 (1985).
39. LiPuma, J.J., Dasen, S.E., Nielson, D.W., Stern, R.C. & Stull, T.L. Person-to-person transmission of Pseudomonas cepacia between patients with cystic fibrosis. *Lancet* **336**, 1094-1096 (1990).
40. Rose, H., Baldwin, A., Dowson, C.G. & Mahenthiralingam, E. Biocide susceptibility of the Burkholderia cepacia complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **63**, 502-510 (2009).

41. Coenye, T., Van Acker, H., Peeters, E., Sass, A., Buroni, S., Riccardi, G. & Mahenthiralingam, E. Molecular mechanisms of chlorhexidine tolerance in Burkholderia cenocepacia biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**, 1912-1919 (2011).
42. Loukil, C., Saizou, C., Doit, C., Bidet, P., Mariani-Kurkdjian, P., Aujard, Y., Beaufils, F. & Bingen, E. Epidemiologic investigation of Burkholderia cepacia acquisition in two pediatric intensive care units. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **24**, 707-710 (2003).
43. Estivariz, C.F., Bhatti, L.I., Pati, R., Jensen, B., Arduino, M.J., Jernigan, D., Lipuma, J.J. & Srinivasan, A. An outbreak of Burkholderia cepacia associated with contamination of albuterol and nasal spray. *Chest* **130**, 1346-1353 (2006).
44. Ghazal, S.S., Al-Mudaimeegh, K., Al Fakihi, E.M. & Asery, A.T. Outbreak of Burkholderia cepacia bacteremia in immunocompetent children caused by contaminated nebulized sulbutamol in Saudi Arabia. *American Journal of Infection Control* **34**, 394-398 (2006).
45. Dizbay, M., Tunccan, O.G., Sezer, B.E., Aktas, F. & Arman, D. Nosocomial Burkholderia cepacia infections in a Turkish university hospital: a five-year surveillance. *Journal of Infection in Developing Countries* **3**, 273-277 (2009).
46. 医療機関等における院内感染対策について. (厚生労働省医政局指導課長, 医政指発 0617 第 2 号, 平成 23 年 6 月 17 日).
47. Heo, S.T., Kim, S.J., Jeong, Y.G., Bae, I.G., Jin, J.S. & Lee, J.C. Hospital outbreak of Burkholderia stabilis bacteraemia related to contaminated chlorhexidine in haematological malignancy patients with indwelling catheters. *Journal of Hospital Infection* **70**, 241-245 (2008).
48. Romero-Gomez, M.P., Quiles-Melero, M.I., Pena Garcia, P., Gutierrez Altes, A., Garcia de Miguel, M.A., Jimenez, C., Valdezate, S. & Saez Nieto, J.A. Outbreak of Burkholderia cepacia bacteremia caused by contaminated chlorhexidine in a hemodialysis unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **29**, 377-378 (2008).
49. Alexander Von Graevenits, R.Z., Reinier Mutters. *Actinobacillus, Capnocytophaga, Eikenella, Kingella, Pasteurell*, and other Fasitidious or rarele encountered gram-negative rods. (ed. Murray, P.R.) (American Society of Microbiology, Washington, D.C., 2007).
50. Yagupsky, P. Kingella kingae: from medical rarity to an emerging paediatric pathogen. *Lancet Infectious Diseases* **4**, 358-367 (2004).
51. Yagupsky, P., Dagan, R., Prajgrod, F. & Merires, M. Respiratory

carriage of Kingella kingae among healthy children. *Pediatric Infectious Disease Journal* **14**, 673-678 (1995).

52. Yagupsky, P., Peled, N. & Katz, O. Epidemiological features of invasive Kingella kingae infections and respiratory carriage of the organism. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 4180-4184 (2002).
53. Kiang, K.M., Ogunmodede, F., Juni, B.A., Boxrud, D.J., Glennen, A., Bartkus, J.M., Cebelinski, E.A., Harriman, K., Koop, S., Faville, R., Danila, R. & Lynfield, R. Outbreak of osteomyelitis/septic arthritis caused by Kingella kingae among child care center attendees. *Pediatrics* **116**, e206-213 (2005).
54. Van Erps, J., Schmedding, E., Naessens, A. & Keymeulen, B. Kingella kingae, a rare cause of bacterial meningitis. *Clinical Neurology and Neurosurgery* **94**, 173-175 (1992).
55. Matta, M., Wermert, D., Podglajen, I., Sanchez, O., Buu-Hoi, A., Gutmann, L., Meyer, G. & Mainardi, J.L. Molecular diagnosis of Kingella kingae pericarditis by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 3133-3134 (2007).
56. Dubnov-Raz, G., Ephros, M., Garty, B.Z., Schlesinger, Y., Maayan-Metzger, A., Hasson, J., Kassis, I., Schwartz-Harari, O. & Yagupsky, P. Invasive pediatric Kingella kingae Infections: a nationwide collaborative study. *Pediatric Infectious Disease Journal* **29**, 639-643 (2010).
57. 小林大介、薩摩真一．化膿性骨髄炎・可能性関節炎．小児整形外科．186-192　(ed. 越智隆弘、菊池臣一) (金原出版, 東京、日本, 2004).
58. Neilan, B.A., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall, L.L., Hawkins, P.R., Cox, P.T. & Goodman, A.E. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus Microcystis. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 693-697 (1997).
59. CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline. M45-A, Vol. 26 No.19 (Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2009).
60. York, M.K. Preparation of MacFarland Turbidity Standerds. (ed. Garcia, L.S.) (American Society Procedures Hndbook, Washington, DC, 2007).
61. Yagupsky, P., Dagan, R., Howard, C.W., Einhorn, M., Kassis, I. & Simu, A. High prevalence of Kingella kingae in joint fluid from children with septic arthritis revealed by the BACTEC blood culture system. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 1278-1281 (1992).

62. Moylett, E.H., Rossmann, S.N., Epps, H.R. & Demmler, G.J. Importance of Kingella kingae as a pediatric pathogen in the United States. *Pediatric Infectious Disease Journal* **19**, 263-265 (2000).
63. Moumile, K., Merckx, J., Glorion, C., Pouliquen, J.C., Berche, P. & Ferroni, A. Bacterial aetiology of acute osteoarticular infections in children. *Acta Paediatrica* **94**, 419-422 (2005).
64. Verdier, I., Gayet-Ageron, A., Ploton, C., Taylor, P., Benito, Y., Freydiere, A.M., Chotel, F., Berard, J., Vanhems, P. & Vandenesch, F. Contribution of a broad range polymerase chain reaction to the diagnosis of osteoarticular infections caused by Kingella kingae: description of twenty-four recent pediatric diagnoses. *Pediatric Infectious Disease Journal* **24**, 692-696 (2005).
65. Chometon, S., Benito, Y., Chaker, M., Boisset, S., Ploton, C., Berard, J., Vandenesch, F. & Freydiere, A.M. Specific real-time polymerase chain reaction places Kingella kingae as the most common cause of osteoarticular infections in young children. *Pediatric Infectious Disease Journal* **26**, 377-381 (2007).
66. Ilharreborde, B., Bidet, P., Lorrot, M., Even, J., Mariani-Kurkdjian, P., Liguori, S., Vitoux, C., Lefevre, Y., Doit, C., Fitoussi, F., Pennecot, G., Bingen, E., Mazda, K. & Bonacorsi, S. New real-time PCR-based method for Kingella kingae DNA detection: application to samples collected from 89 children with acute arthritis. *Journal of Clinical Microbiology* **47**, 1837-1841 (2009).
67. Yagupsky, P., Porsch, E. & St Geme, J.W., 3rd. Kingella kingae: an emerging pathogen in young children. *Pediatrics* **127**, 557-565 (2011).
68. Lucia Martins Teixeira, M.D.G.S.C., Richard R. Facklam. Enterococcus. (ed. Murray, P.R.) (American Society of Microbiology, Washinton, D.C., 2007).
69. Jett, B.D., Huycke, M.M. & Gilmore, M.S. Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* **7**, 462-478 (1994).
70. Coque, T.M., Patterson, J.E., Steckelberg, J.M. & Murray, B.E. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *Journal of Infectious Diseases* **171**, 1223-1229 (1995).
71. Elsner, H.A., Sobottka, I., Mack, D., Claussen, M., Laufs, R. & Wirth, R. Virulence factors of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium blood culture isolates. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **19**, 39-42 (2000).

72. Huycke, M.M., Sahm, D.F. & Gilmore, M.S. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging Infectious Diseases* **4**, 239-249 (1998).
73. Murray, B.E. The life and times of the Enterococcus. *Clinical Microbiology Reviews* **3**, 46-65 (1990).
74. Moellering, R.C., Jr. Emergence of Enterococcus as a significant pathogen. *Clinical Infectious Diseases* **14**, 1173-1176 (1992).
75. Proctor, R.A., von Eiff, C., Kahl, B.C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M. & Peters, G. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* **4**, 295-305 (2006).
76. Bulger, R.J. & Bulger, R.E. Ultrastructure of small colony variants of a methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology* **94**, 1244-1246 (1967).
77. Jensen, J. Biosynthesis of hematin compounds in a hemin requiring strain of Micrococcus pyogenes var. aureus. I. The significance of coenzyme A for the terminal synthesis of catalase. *Journal of Bacteriology* **73**, 324-333 (1957).
78. Baddour, L.M., Barker, L.P., Christensen, G.D., Parisi, J.T. & Simpson, W.A. Phenotypic variation of Staphylococcus epidermidis in infection of transvenous endocardial pacemaker electrodes. *Journal of Clinical Microbiology* **28**, 676-679 (1990).
79. Bryan, L.E. & Kwan, S. Aminoglycoside-resistant mutants of Pseudomonas aeruginosa deficient in cytochrome d, nitrite reductase, and aerobic transport. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **19**, 958-964 (1981).
80. Colwell, C.A. Small Colony Variants of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology* **52**, 417-422 (1946).
81. Harry E. Morton, J.S. The Identification of Neisseria gonorrhoeae by Means of Bacterial Variation and the Detection of Small Colony Forms in Clinical Material. *Journal of Bacteriology* **50**, 585-587 (1945).
82. Häussler, S., Lehmann, C., Breselge, C., Rohde, M., Classen, M., Tummler, B., Vandamme, P. & Steinmetz, I. Fatal outcome of lung transplantation in cystic fibrosis patients due to small-colony variants of the Burkholderia cepacia complex. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **22**, 249-253 (2003).
83. Neut, D., van der Mei, H.C., Bulstra, S.K. & Busscher, H.J. The role of small-colony variants in failure to diagnose and treat biofilm infections in orthopedics. *Acta Orthopaedica* **78**, 299-308 (2007).

84. Goudie, J.G. & Goudie, R.B. Recurrent infections by a stable dwarf-colony variant of Staphylococcus aureus. *Journal of Clinical Pathology* **8**, 284-287 (1955).
85. von Eiff, C., Peters, G. & Becker, K. The small colony variant (SCV) concept -- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury* **37 Suppl 2**, S26-33 (2006).
86. Kahl, B., Herrmann, M., Everding, A.S., Koch, H.G., Becker, K., Harms, E., Proctor, R.A. & Peters, G. Persistent infection with small colony variant strains of Staphylococcus aureus in patients with cystic fibrosis. *Journal of Infectious Diseases* **177**, 1023-1029 (1998).
87. Proctor, R.A., Balwit, J.M. & Vesga, O. Variant subpopulations of Staphylococcus aureus as cause of persistent and recurrent infections. *Infectious Agents and Disease* **3**, 302-312 (1994).
88. Proctor, R.A., Kahl, B., von Eiff, C., Vaudaux, P.E., Lew, D.P. & Peters, G. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clinical Infectious Diseases* **27 Suppl 1**, S68-74 (1998).
89. Bates, D.M., von Eiff, C., McNamara, P.J., Peters, G., Yeaman, M.R., Bayer, A.S. & Proctor, R.A. Staphylococcus aureus menD and hemB mutants are as infective as the parent strains, but the menadione biosynthetic mutant persists within the kidney. *Journal of Infectious Diseases* **187**, 1654-1661 (2003).
90. Roggenkamp, A., Sing, A., Hornef, M., Brunner, U., Autenrieth, I.B. & Heesemann, J. Chronic prosthetic hip infection caused by a small-colony variant of Escherichia coli. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 2530-2534 (1998).
91. Hale, J.H. Studies on staphylococcus mutation: a naturally occurring "G" gonidial variant and its carbon dioxide requirements. *British Journal of Experimental Pathology* **32**, 307-313 (1951).
92. Chatterjee, I., Kriegeskorte, A., Fischer, A., Deiwick, S., Theimann, N., Proctor, R.A., Peters, G., Herrmann, M. & Kahl, B.C. In vivo mutations of thymidylate synthase (encoded by thyA) are responsible for thymidine dependency in clinical small-colony variants of Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology* **190**, 834-842 (2008).
93. Gilligan, P.H., Gage, P.A., Welch, D.F., Muszynski, M.J. & Wait, K.R. Prevalence of thymidine-dependent Staphylococcus aureus in patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **25**, 1258-1261 (1987).
94. von Eiff, C., Heilmann, C., Proctor, R.A., Woltz, C., Peters, G. & Gotz,

F. A site-directed Staphylococcus aureus hemB mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. *Journal of Bacteriology* **179**, 4706-4712 (1997).

95. Kahl, B.C., Belling, G., Becker, P., Chatterjee, I., Wardecki, K., Hilgert, K., Cheung, A.L., Peters, G. & Herrmann, M. Thymidine-dependent Staphylococcus aureus small-colony variants are associated with extensive alterations in regulator and virulence gene expression profiles. *Infection and Immunity* **73**, 4119-4126 (2005).
96. Schaaff, F., Bierbaum, G., Baumert, N., Bartmann, P. & Sahl, H.G. Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of Staphylococcus aureus. *International Journal of Medical Microbiology* **293**, 427-435 (2003).
97. Besier, S., Zander, J., Kahl, B.C., Kraiczy, P., Brade, V. & Wichelhaus, T.A. The thymidine-dependent small-colony-variant phenotype is associated with hypermutability and antibiotic resistance in clinical Staphylococcus aureus isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**, 2183-2189 (2008).
98. Kahl, B.C., Belling, G., Reichelt, R., Herrmann, M., Proctor, R.A. & Peters, G. Thymidine-dependent small-colony variants of Staphylococcus aureus exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 410-413 (2003).
99. Chatterjee, I., Herrmann, M., Proctor, R.A., Peters, G. & Kahl, B.C. Enhanced post-stationary-phase survival of a clinical thymidine-dependent small-colony variant of Staphylococcus aureus results from lack of a functional tricarboxylic acid cycle. *Journal of Bacteriology* **189**, 2936-2940 (2007).
100. Kaase M, A.A., Gatermann S. G. First description of small-colony variants of Enterococcus faecalis isolated from an endocarditis patient. *International Journal of Medical Microbiology* **294**, 146 (2004).
101. Wellinghausen, N., Chatterjee, I., Berger, A., Niederfuehr, A., Proctor, R.A. & Kahl, B.C. Characterization of clinical Enterococcus faecalis small-colony variants. *Journal of Clinical Microbiology* **47**, 2802-2811 (2009).
102. Gröbner, S., Beck, J., Schaller, M., Autenrieth, I.B. & Schulte, B. Characterization of an Enterococcus faecium small-colony variant isolated from blood culture. *International Journal of Medical Microbiology* **302**, 40-44 (2012).
103. M., Passo. ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside) Test. (ed.

Garcia, L.S.) (American Society Procedures Hndbook, Washington, DC, 2007).
104. CLSI. Paformance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-secound Informational Supplement. CLSI document M100-S22. (Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2012).
105. Oana, Kawakami, Y., Ohnishi, M., Ishikawa, M., Hirota, M., Tozuka, M., Atarashi, K., Baba, K., Fujiki, K., Okazaki, M., Honda, T. & Hayashi, T. Molecular and epidemiological study of the first outbreak of vanB type vancomycin-resistant Enterococcus faecalis in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **54**, 17-22 (2001).
106. Wang, H. & Cronan, J.E. Functional replacement of the FabA and FabB proteins of Escherichia coli fatty acid synthesis by Enterococcus faecalis FabZ and FabF homologues. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 34489-34495 (2004).
107. Nieman, C. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriological Reviews* **18**, 147-163 (1954).
108. Cohen, S., Snyder, J.C. & Mueller, J.H. Factors Concerned in the Growth of Corynebacterium diphtheriae from Minute Inocula. *Journal of Bacteriology* **41**, 581-591 (1941).
109. Bauernfeind, J., Sotier, A. & Boruff, C. Growth Stimulants in Microbiological Assay for Riboflavin and Pantothenic Acid. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* **14**, 666-671 (1942).
110. Strong, F.M. & Carpenter, L.E. Preparation of Samples for Microbiological Determination of Riboflavin. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* **14**, 909-913 (1942).
111. Dubos, R.J. The effect of organic acids on mammalian tubercle bacilli. *Journal of Experimental Medicine* **92**, 319-332 (1950).
112. Willett, N.P. & Morse, G.E. Long-chain fatty acid inhibition of growth of Streptococcus agalactiae in a chemically defined medium. *Journal of Bacteriology* **91**, 2245-2250 (1966).
113. 岡田淳ほか. 微生物学検査法　培養と培地. 376-398 (医歯薬出版, 東京、日本, 2010).
114. Aguilar, P.S. & de Mendoza, D. Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans. *Molecular Microbiology* **62**, 1507-1514 (2006).
115. Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C.O. & Cronan, J.E., Jr. Regulation of fatty acid biosynthesis in Escherichia coli. *Microbiological Reviews* **57**, 522-542 (1993).

116. Galbraith, H. & Miller, T.B. Effect of long chain fatty acids on bacterial respiration and amino acid uptake. *Journal of Applied Bacteriology* **36**, 659-675 (1973).
117. Wilson, G., Rose, S.P. & Fox, C.F. The effect of membrane lipid unsaturation on glycoside transport. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **38**, 617-623 (1970).
118. 岡田淳ほか. 細菌学各論　グラム陰性，通性嫌気性の桿菌　腸内細菌科. 128-159 (医歯薬出版
東京、日本, 2010).
119. Stolz, J., Hoja, U., Meier, S., Sauer, N. & Schweizer, E. Identification of the plasma membrane H+-biotin symporter of Saccharomyces cerevisiae by rescue of a fatty acid-auxotrophic mutant. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 18741-18746 (1999).
120. Williams, W.L., Broquist, H.P. & Snell, E.E. Oleic acid and related compounds as growth factors for lactic acid bacteria. *Journal of Biological Chemistry* **170**, 619-630 (1947).

関係論文

1. Minami, K., Shoji, Y., Kasai, M., Ogiso, Y., Nakamura, T., Kawakami, Y., Saito, Y., Kuzumoto, K., Kubota, N., Yumoto, K. & Ishii, K. Proportion of rectal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the inpatients of a pediatric tertiary care hospital in Japan.
Japanese Journal of Infectious Diseases **65**, 548-550 (2012).

2. Kuzumoto, K., Kubota, N., Ishii, K., Yumoto, K., Ogiso, Y., Nakamura, T., Katsuyama, T., Oana, K. & Kawakami, Y. Successful cessation of transmitting healthcare -- associated infections due to Burkholderia cepacia complex in a neonatal intensive care unit in a Japanese children's hospital.
European Journal of Medical Research **16**, 537-542 (2011).

3. Kubota, N., Kuzumoto, K., Hidaka, E., Yoshizawa, K., Yumoto, K., Oana, K., Ogiso, Y., Nakamura, T. & Kawakami, Y. First isolation of oleate-dependent Enterococcus faecalis small-colony variants from an umbilical exudate of a paediatric patient with omphalitis.
Journal of Medical Microbiology 62, 1883-1890 (2013)

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始ご懇切なご指導、ご助言、ご援助を賜りました信州大学生命機能・ファイバー工学専攻生物機能科学講座　教授　林田信明　先生に心より感謝申し上げます。

本研究を推進するに当たり、多大なるご指導、ご助言、ご援助を賜りました信州大学医学部保健学科病院病態検査学講座　川上　由行　教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行に対してさまざまなご援助と励ましを賜りました、前長野県立病院機構　理事長　勝山　勉　先生（現医療法人丸山会　丸子中央総合病院院長）に深く感謝申し上げます。

本研究の解析の一端を担い、さまざまなご助言、ご援助を頂きました長野県立こども病院臨床検査科　葛本　佳以　氏、総合小児科　南　希生　医師、臨床検査　科長　日髙　惠以子　氏に深く感謝いたします。

これまで、長期間にわたる研究期間を支えてくださいました、歴代の長野県立こども病院　臨床検査科長　村松　紘一　氏、小林　正人　氏、故北和田　修介　氏、湯本　佳代子　氏、また臨床病理部長　小木曽　嘉文　医師をはじめ、長野県立こども病院　臨床検査科　職員諸氏に感謝いたします。

また、科学的研究への情熱と探究心を育んでいただきました上原　良雄　先生、戸塚　実　先生に感謝いたします。

最後に、研究生活に理解を示し支えてくれた家族に感謝いたします。