

氏名	合志 聡
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大博(医)第1671号
学位授与の日付	平成17年 3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博士論文名	DNA analysis of nosocomial infection by <i>Enterobacter aerogenes</i> in three cases of septicemia in Japan (わが国での <i>Enterobacter aerogenes</i> 院内感染(敗血症)の DNA 解析)
論文審査委員	主査 教授 青柳 豊 副査 教授 山本 達男 副査 教授 下條 文武

博士論文の要旨

[緒言]

Enterobacter aerogenes は腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌で、近年、主要な院内感染菌の1つとして欧米の幾つかの国で注目されるようになった。報告例の多い院内感染例は敗血症や肺炎である。*E. aerogenes* は染色体上に *ampC* 遺伝子をもち、クラス C β-ラクタマーゼ (セファロスポリナーゼ) を産生して、ペニシリン系抗菌薬とセファロリジンなどの一部のセフェム系抗菌薬に耐性を示す。その他に、基質拡張型β-ラクタマーゼ (extended-spectrum β-lactamase; ESBL) やクラス B β-ラクタマーゼを産生する菌株も報告されており、より広域なβ-ラクタム系抗菌薬への耐性化が心配されている。*E. aerogenes* 院内感染は点滴ラインを介して、もしくは患者-患者感染で拡大していくものと考えられているが、その伝播経路に関する DNA 解析例は少ない。また、わが国では *E. aerogenes* 院内感染の DNA 解析は殆ど行われていない。我々は、*E. aerogenes* 敗血症の院内感染について、パルスフィールドゲル電気泳動とリボタイピングによる DNA 解析を行い、感染様式を明らかにした。

[患者と方法]

解析した院内感染例は同一病棟に入院していた3名の患者で、いずれの場合にも 38.5℃ 以上の発熱がみられた。患者1は61歳女性で末梢静脈点滴を施行中に発熱で発症し、血液培養、膿分泌物培養から *E. aerogenes* が検出された。症例2は症例1と同室の50歳女性で、症例1が発熱の見られた翌日、末梢静脈点滴を施行中に発熱で発症し、血液培養から同菌が検出され、また末梢静脈点滴ライン中の三方活栓の内部に残存していた点滴液より *E. aerogenes* が検出された。症例3は症例2の翌日に隣室の25歳女性で末梢静脈点滴を施行中に発熱で発症し、血液培養から同菌が検出された。その他同一病棟内で尿路感染症を併発していた患者の尿培養検体からも *E. aerogenes* が検出された。パルスフィールド

ドゲル電気泳動解析では、抽出した細菌 DNA を制限酵素 *NotI* で切断し、1%アガロース中で泳動した後でエチジウムブロマイド処理を行った。リボタイピング解析では、抽出した細菌 DNA を制限酵素 *PvuII* で切断し、アガロース電気泳動後、リボソーム RNA 遺伝子を認識するプローブでハイブリダイゼーションを行い、そのパターンを解析した。相同性解析は UPGMA クラスターアルゴリズムによった。分離株の薬剤感受性検査は、米国 NCCLS の測定法に準じて、薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。細菌数 (CFU) は普通寒天培地で培養後、出現した集落数を計測して求めた。

[結果と考察]

敗血症患者から分離した菌株、三方活栓より検出した菌株、そして尿路感染症患者の菌株の DNA をパルスフィールドゲル電気泳動で解析した結果、すべてが同一パターンを示した。従って、当該院内感染は同一クローンによる流行であったと結論した。リボタイピング解析では、症例 2 患者株と三方活栓検出株が同一であり、三方活栓から症例 2 患者に感染が起こったことが予想された。また、敗血症 3 症例の株と尿路感染症の株は同一ではなく、96% から 79% の相同性を示すことが明らかになった。三方活栓に残存していた点滴液の *E. aerogenes* 濃度は 45 CFU/mL であった。薬剤感受性検査では、全ての菌株が同じ結果を示し、アンピシリン (MIC、>256 µg/mL)、ピペラシリン (MIC、128 µg/mL)、セファゾリン (MIC、>256 µg/mL)、セフォチアム (MIC、>256 µg/mL)、セフトジジム (MIC、128 µg/mL)、フロモキシセフ (MIC、64 µg/mL) に耐性であった。セフォゾプラン、イミペネム、パニペネム、トブラマイシン、ゲンタマイシン、ミノサイクリン、レボフロキサシンには感受性であった。以上の結果から、*E. aerogenes* 敗血症 (3 症例) は三方活栓を介する血流感染であった可能性が極めて高い。また、残存点滴液中の菌数が少なかったことから *E. aerogenes* は血液中で強い病原性を持ち、比較的少量の菌量でも血流感染が成立すると考えられた。解析した敗血症と尿路感染症は同一クローンによる流行であるが、しかし全く同一株ではなかったことから、病棟に長く定着していた菌が変化し、個々に感染を起こしたと考察される。これらの菌が産生するβ-ラクタマーゼはクラス C のセファロスポリナーゼであり、染色体上に存在する AmpC 関連の遺伝子領域が変異し、セフェム系薬剤に耐性を示すようになったと考えられる。但し、セフトジジム、フロモキシセフ耐性に関しては AmpC ではなく、*Klebsiella pneumoniae* や *Escherichia coli* などのプラスミド上で見いだされるクラス C のプラスミド性 CMY 型の可能性がある。あるいはもう一つの可能性として、ESBL とクラス C の酵素の同時産生が考えられる。なお、本菌が検出された中で敗血症の 3 症例は全例パニペネムを使用して改善した。

我々の検索した限りでは本邦での *E. aerogenes* の院内感染で分子 DNA レベルでの検討例はなく、今回が初めての報告である。院内感染の原因は医療従事者により点滴ラインが汚染され発症する可能性が高いと考えられている。実際本邦では過去に *Serratia marcescens* 敗血症の院内感染が 3 度発生し、死亡例まで出ている。今回の検討では三方活栓の残存点滴液からも菌が検出され、その濃度もかなり微量なものであった。そのことから *E. aerogenes* は血液中で強い病原性を持ち、比較的少量の菌量でも感染成立させるまでの菌濃度へと増殖する菌と考えられた。三方活栓は点滴接続部位であり、その汚染は医療従事者を介したものが考えやすく、今後も医療行為においては十分な消毒などの清潔操作を意識することが院内感染の防止には必要不可欠と思われた。

審査結果の要旨

Enterobacter aerogenes は腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌で、近年、主要な院内感染菌の1つとして欧米で注目されるようになった。申請者らは、*E. aerogenes* 敗血症の院内感染様式解明を目的に、パルスフィールドゲル電気泳動とリボタイピングによる DNA 解析を行った。

解析した院内感染例は同一病棟に入院していた3名の患者で、いずれの場合にも 38.5℃以上の発熱、炎症所見が認められた。敗血症患者から分離した菌株、三方活栓より検出した菌株、そして尿路感染症患者の菌株のそれぞれの DNA をパルスフィールドゲル電気泳動で解析した結果、すべてが同一パターンを示し、同一クローンによる流行であったと結論した。また、薬剤感受性検査においても全ての菌株が同じ結果を示した。UPGMA クラスタアルゴリズムによるリボタイピング相同性解析では、症例2患者株と三方活栓検出株が同一であり、三方活栓から症例2患者に感染が起こったことが予想された。三方活栓内点滴液において、45 CFU/mL 濃度の *E. aerogenes* を検出した。

本研究は本邦における *E. aerogenes* 敗血症の存在と院内感染様式を分子 DNA レベルで初めて解明し、その重要性を示したものであり、この点に学位論文としての価値を認めた。