

図4. pAD1プラスミドの接合伝達領域をprobeに用いた
pUI22プラスミド(*Eco*RI消化)のSouthern hybridization

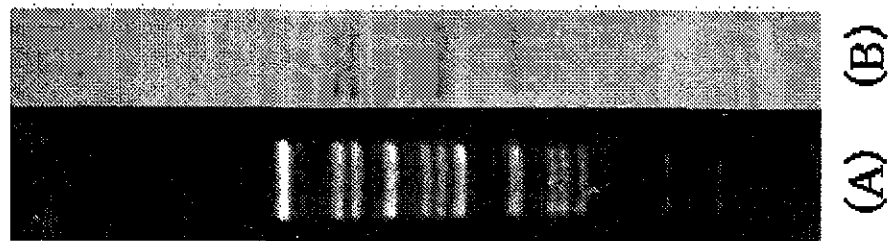


図5. pUI22プラスミドにコードされる遺伝子と機能

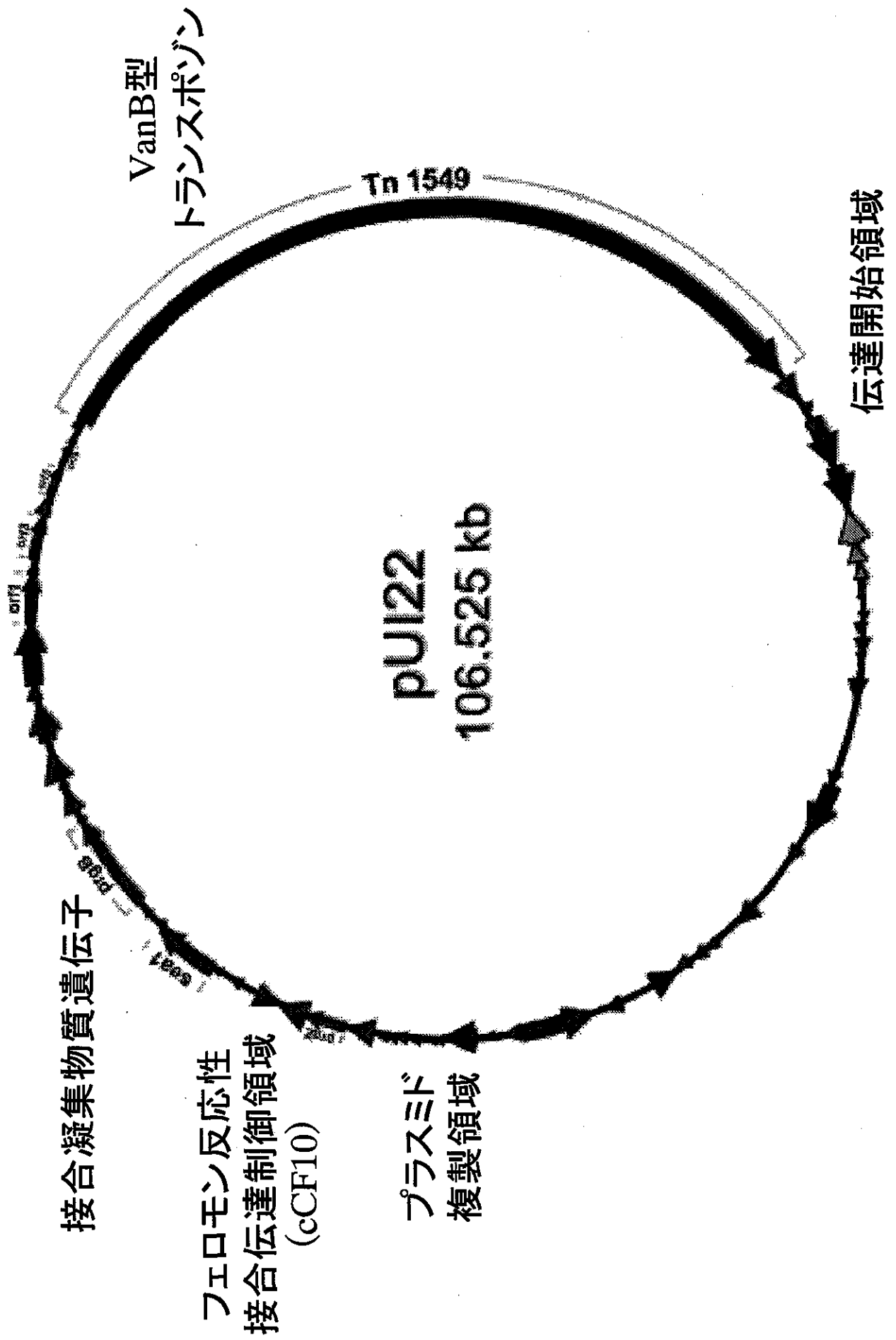


図6. *vanB2*型耐性遺伝子と接合伝達性トランスポゾンTn1549(34kb)の構造

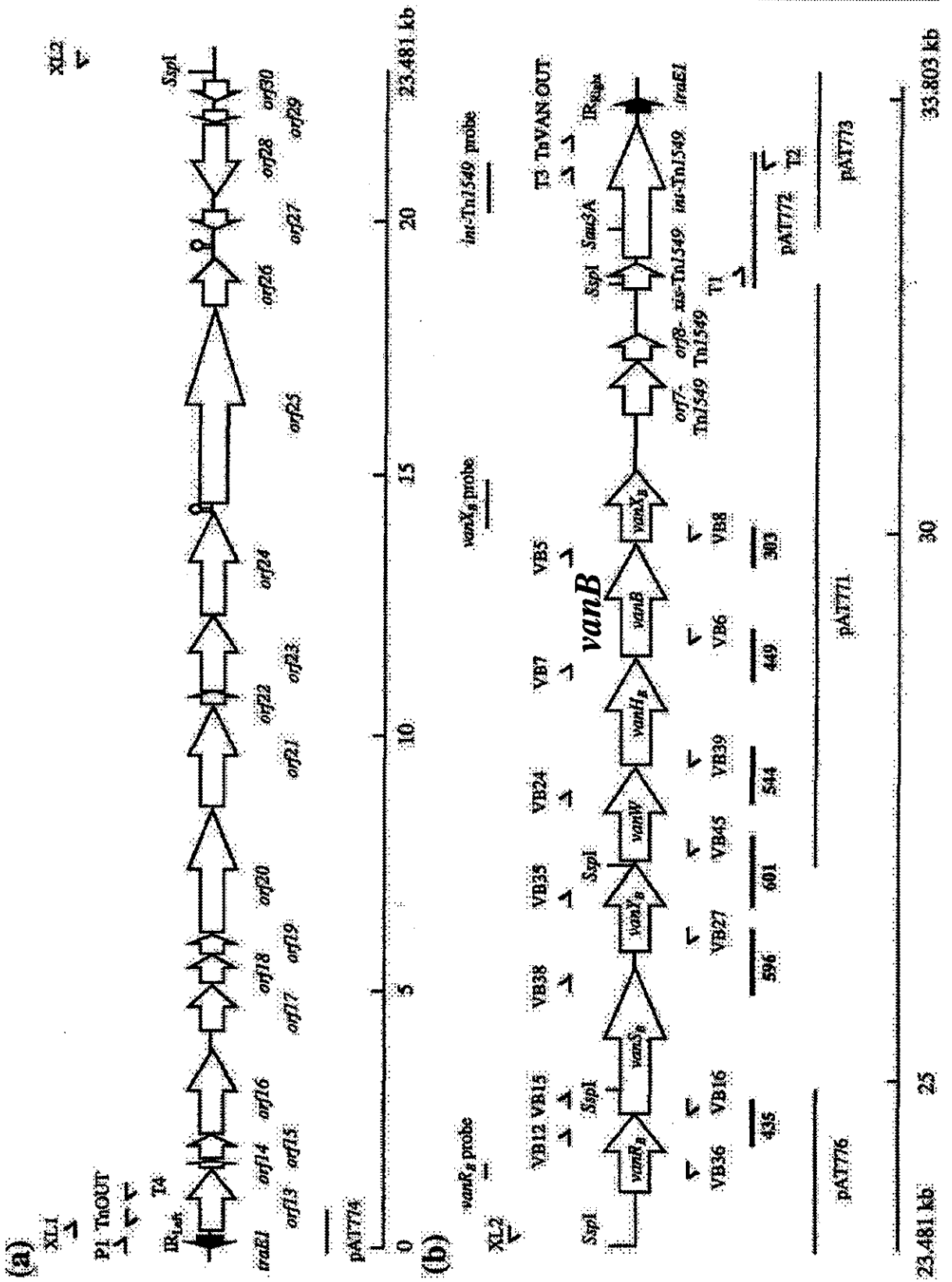


図7. 野生型VRE株とそれぞれから得られた
エリスロマイシン耐性伝達株の β -Hemolysin活性

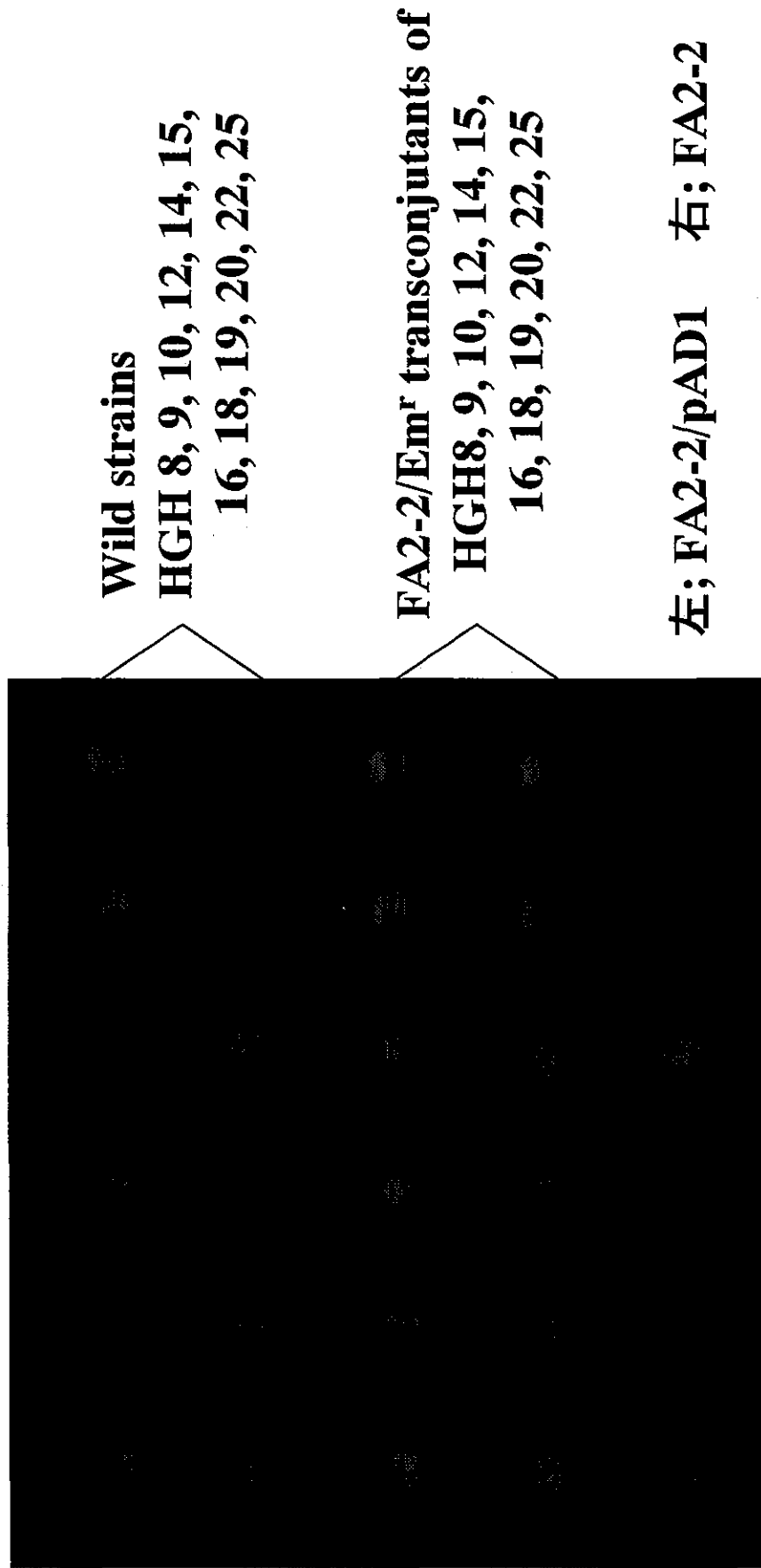
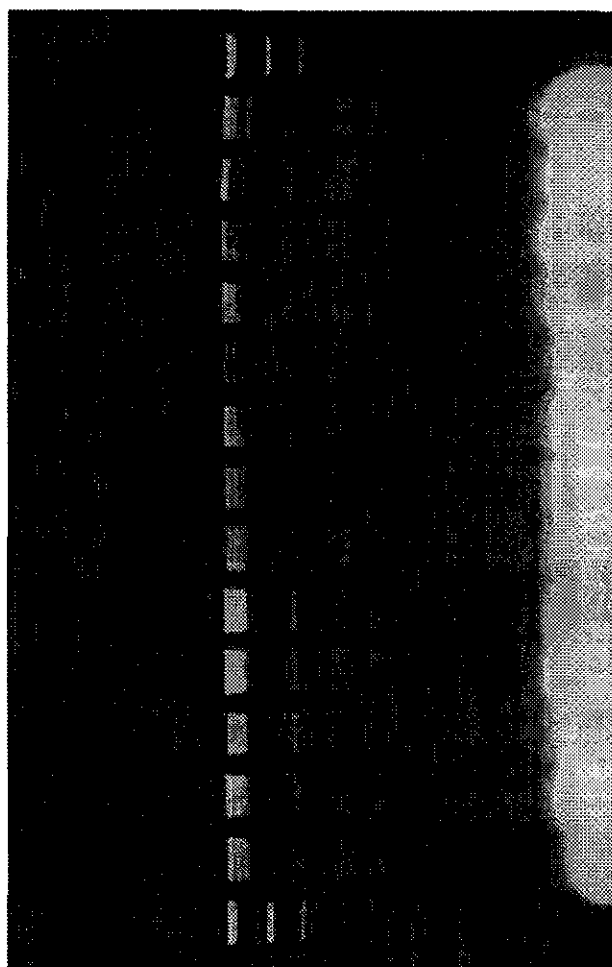
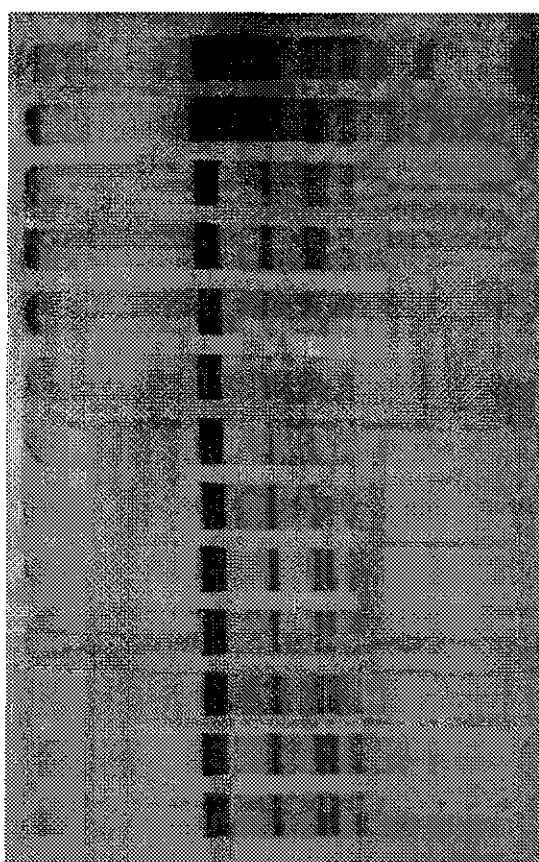


図8. HGH病院のVRE株から分離したEm^r接合伝達性プラスミドDNAの
*EcoRI*切断パターンとpAD1をprobeに用いたSouthern hybridization



HGH8 9 10 12 14 15 16 18 19 20 22 25 pAD1



HGH8 9 10 12 14 15 16 18 19 20 22 25 pAD1

平成 16 年度 厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業 (H15-新興-9)

「新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに耐性機構の解析及び

迅速・簡便検出法に関する研究」

プラスミドにコードされた AmpC β -ラクタマーゼ産生遺伝子の解析

分担研究者 井上 松久 北里大学医学部微生物・寄生虫学

研究協力者：岡本 了一、中野 竜一、兼子 謙一

プラスミド pKU601 がコードする AmpC β -ラクタマーゼ CFE-1 は、その *ampR-ampC* が *C. freundii* GC3 と 99% と非常に高い相同性を示し、かつ *ampC* の上流には *C. freundii* と同様に fumarate operon *frdA*、*B*、*C*、*D* が確認された。CFE-1 は産生調節遺伝子である *ampR* を保有しており、その塩基配列から Asp135 が Ala に変異した *ampR* が CFE-1 多量産生の原因であることが明らかになった。さらに、*ampC* のすぐ下流と *ampC* の上流にある *frdA* にはトランスポゾン IS26 が完全な形で挿入されていることが分かった。二つの IS26 は同一方向を向いていた

が、何れも DNA の転移に関するトランスポザーゼ *tnpA* を持っていた。したがって、*C. freundii* 染色体上の *ampC* 遺伝子がプラスミド化する過程でこれら IS26 が大きく関与していると推測された。

一方、プラスミド pKU631 がコードする CMY-4 は、*ampC* が *C. freundii* のそれと 95% の相同性を持ち、しかも CFE-1 に認められたような *ampR* が *ampC* の上流には認められず、代わって *ISEcp1* の挿入が確認された。CMY-4 は調節遺伝子 *ampR* を持たないにもかかわらず AmpC を多量産生することから、その原因を究明したところ、挿入された *ISEcp1* 内の強力なプロモーターにより *AmpC* が転写されていることが明らかになった。

大腸菌や肺炎桿菌のセフェム系薬	かったが、ここ数年わが国においても
高度耐性化のメカニズムの一つとし	分離されるようになった。プラスミド
て、プラスミドにコードされた AmpC	性 AmpC β -ラクタマーゼ産生遺伝子は、
β -ラクタマーゼがある。プラスミド性	<i>C. freundii</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>M. morgani</i> ,
AmpC β -ラクタマーゼ産生菌は、ヨー	<i>Aeromonas</i> 属などの染色体上の <i>ampC</i>
ロッパやアメリカからの報告例が多	遺伝子とその由来とされるが、どのよ
	うな過程を経て染色体上の遺伝子が

プラスミド化するかについてはわかっていない。わが国では現在のところ *C. freundii* 由来の AmpC β -ラクタマーゼが報告されている。そこで、臨床分離の大腸菌から検出されたプラスミド pKU601 にコードされた AmpC β -ラクタマーゼ CFE-1 および肺炎桿菌から検出された pKU631 にコードされた CMY-4 産生遺伝子の解析を行い AmpC 多量産生機構の解析とプラスミド化の過程について考察した。

1. 大腸菌から検出された CFE-1 産生遺伝子の解析

臨床分離のセフェム系薬耐性 *E. coli* KU6400 は、第四世代セフェム系薬の cefepime (CFPM) およびカルバペネム

系薬の imipenem (IPM) を除くペニシリン系薬およびセファロスポリン系薬に耐性を示す菌株であり、cefotaxime (CTX) に対する MIC が clavulanic acid (CVA) により感受性化することはなかった (Table 1)。したがって、KU6400 株は AmpC β -ラクタマーゼを産生していることが予想された。そこで、KU6400 株から超音波破砕により粗酵素液を抽出して cephalothin (CET) を基質として β -ラクタマーゼ活性を測定したところ、酵素活性は 7.7 u/mgprotein と高い活性を示すとともに、cefoxitin (CFX) 10 μ g/ml 添加による酵素の誘導産生性を検討したが 7.9 u/mg 蛋白と誘導産生は認

められなかった。さらに、CVA 添加による酵素活性の阻害を検討したが、阻害効果は認められなかった。以上のことから、KU6400 株が産生するβ-ラクタマーゼは、構成的に多量に産生されること並びにその基質特異性から AmpCβ-ラクタマーゼであることが確認された。

KU6400 株のセフェム系薬耐性は、接合伝達により 10^{-5} の頻度で大腸菌 ML4947 株に伝達された。接合伝達されたプラスミド pKU601 は 102-kb でセフェム系薬耐性のみをコードしていた。接合伝達株 ML4947(pKU601)株のβ-ラクタム系薬耐性並びにその酵素活性を検討したところ、供与菌の

KU6400 株と同様の薬剤感受性と酵素産生性を示した (Table 1) ことから、pKU601 はプラスミド性のセファロスポリナーゼタイプのβ-ラクタマーゼ産生遺伝子 *bla_{CFE-1}* をコードしていることが明らかとなった。

pKU601 の *bla_{CFE-1}* 領域の DNA 塩基配列を決定するため、BamHI/BglII を用いてベクタープラスミド pHSG398 にクローニングした。プラスミド pKU611 は、pKU601 の BamHI/BglII 断片(14-kb)が挿入されており、その全塩基配列を決定したところ、β-ラクタマーゼをコードしていることが明らかとなった。β-ラクタマーゼ産生遺伝子は、1137bp で 378 個のアミノ酸をコ

ードしており、SXXK、YSN および KTG の AmpC β -ラクタマーゼに特有のモチーフが確認された。この領域の塩基配列についてデータベースで検索したところ、*C. freundii* GC3 の染色体性 *ampC* 遺伝子と 99.8% の相同性が認められ、*bla*_{CFE-1} が *C. freundii* GC3 の染色体由来であることが強く示唆された。また、*ampC* の上流領域についても同様に塩基配列を決定したところ、*C. freundii* GC3 と 99.0% の相同性を持つ AmpR をコードしており、その向きは *ampC* とは反対であることが明らかになった。さらに、*ampR-ampC* の近傍の領域についても塩基配列を確認したところ、*ampC* の下流には *blc* が、*ampR* の下流には *frdA, B, C, D* の *frd* オペロンが確認され、いずれも *C. freundii* のそれと高い相同性を有していた。また、*blc* と *frdA* の中に IS26 が同じ向きにそれぞれ一つずつ挿入されていることも確認された (Fig. 1)。 *bla*_{CFE-1} は *ampR* を保有しているにもかかわらず構成的に多量の酵素を生ずることから、その原因についても検討した。*bla*_{CFE-1} の AmpR は配列を *C. freundii* GC3 のそれと比較すると 135 番目の Asp が Ala に変化していることが明らかになったため、pKU601 の *ampC* のみを pHSG398 にサブクローニングした pKU612 を構築し、pKU601 および pKU611 と MIC および

β-ラクタマーゼの産生性を比較した (Table 1, 2)。その結果、*bla*_{CFE-1} の変異した AmpR が CFE-1 の構成的多量産生に大きくかかわっていることが明らかになった。通常、AmpR は *ampC* 転写のリプレッサーとして機能しているが、ムレインモノマー (anh-Mur Nac-tripeptide) が結合することにより転写アクチベーターとして機能すると考えられている。しかし、*bla*_{CFE-1} の AmpR は 135 番目の Asp が Ala に変化することでムレインモノマーの存在なしで転写アクチベーターと機能していることが判明した。

2 . 肺炎桿菌から検出された CMY-4 産生遺伝子の解析

臨床分離の *K. pneumoniae* KU6500 は、ペニシリン系薬やセファロスポリン系薬に耐性を示す菌株であり、β-ラクタム系薬に対する感受性パターンから AmpCβ-ラクタマーゼの産生が強く疑われた(Table 3)。そこで、*E. coli* DHαに接合伝達を試みたところ、 10^{-6} の頻度でセフェム系薬耐性が伝達され、その耐性は約 60-kp のプラスミド pKU631 にコードされていることが明らかになった。そこで、pKU631 の *bla* 領域の DNA 塩基配列を決定するため、BamHI/BglIII を用いてベクタープラスミド pBCSK(-)にクローニングを試みた。得られたプラスミド pKU641 は、pKU631 の BamHI/BglIII 断片 (5-kb)が

挿入されており、塩基配列を決定したところ、既に報告のある *C. freundii* の染色体性由来と考えられている AmpC β -ラクタマーゼ CMY-4 をコードしていることが判明した。*bla*_{CMY-4} の近傍の塩基配列も決定したところ、前述の *bla*_{CFE-1} と異なり *ampR* に相当する領域が欠損しており、代わって挿入配列 *ISEcp1* の挿入が確認された (Fig.1)。CMY-4 産生菌は *ampR* が欠損しているにもかかわらず高い β -ラクタマーゼ産生性を示すことから (Table 3)、この *ISEcp-1* の挿入が酵素の多量産生に大きくかかわっていると考え、その発現機構を解析した。

ampC とその固有のプロモーター領

域を含むプラスミド pMWampC と *ampC* とその固有のプロモーター領域およびさらに上流の *ISEcp1* の一部を含むプラスミド pMWISEcp1 の二つを構築し、それぞれの MIC と酵素活性を測定した (Table 3)。その結果、*E. coli* DH α (pMWISEcp1) は *E. coli* DH α (pMWampC) に比べて 16 倍高い酵素活性を示したことから、*ISEcp1* の配列の一部に強いプロモーター活性をもつ配列が存在することが強く示唆された (Table 3)。

そこで、これらプラスミドのプロモーター活性を比較するために、ルシフェラーゼ遺伝子をもつ pGL3-Basic Vector を用いてプロモーター活性を

比較検討した。*ampC* 固有のプロモーター領域をもつ pGLampC と ISEcp1 の配列の一部でプロモーター活性があると思われる領域をもつ pGLISEcp1 を構築し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、pGLISEcp1 は pGLampC に比べて約 19 倍高いルシフェラーゼ活性を示し、pMWISEcp1 と pMWampC のそれぞれの β -ラクタマーゼ活性と相関していた (Fig. 2)。このことから、CMY-4 産生菌は ISEcp1 の挿入により強いプロモーター活性を得た結果、AmpC を構成的かつ多量に産生するためにセフトラム系薬に高度耐性を示すと考えられた。

わが国で分離されたプラスミド性 AmpC β -ラクタマーゼ産生遺伝子はいずれも *C. freundii* の染色体性 *ampC* と相同性が非常に高く、*C. freundii* 由来であると考えられた。これら AmpC 産生菌はいずれも酵素を構成的かつ多量に産生することが特徴であり、その原因として変異型 AmpR の産生やその配列内に強いプロモーター活性をもつ挿入配列 ISEcp1 による挿入が大きく関与していることが今回の解析で明らかになった。また、本研究で解析した *bla*_{CFE-1} と *bla*_{CMY-4} はいずれもその近傍に IS26 や ISEcp-1 が挿入されており、これら挿入配列の機能によって *C. freundii* の染色体性遺伝子がプ

ラスミド化したものと強く予想され
と *bla*_{CMY-4} 近傍の IS26 や *ISEcp1* が
る。しかしながら、文献的には *ISEcp1*
ampC 遺伝子の転移に直接かかわった
が CTX-M 型β-ラクタマーゼ産生遺伝
という証明はなく、今後の課題である。
子の転移に関わっているという報告
はあるものの、今回検出された *bla*_{CFE-1}

Table 1. MICs of selected antibiotics from *E. coli* strains

Strain	MIC (µg/ml) ^a									
	PIP	CPD	CEF	CTX	CTX/CLA ^b	CAZ	CMZ	ATM	PEP	IPM
KU6400	>256	>256	>256	64	64	64	64	8	0.25	0.25
ML4947(pKU601)	>256	>256	>256	256	256	>256	256	64	1	0.5
ML4953(pKU601)	>256	>256	>256	256	256	>256	256	64	1	1
ML4947(pKU611)	64	>256	>256	16	16	8	16	2	0.25	0.25
ML4947(pKU612)	8	32	256	4	2	4	2	0.5	<006	0.25
ML4947	2	0.5	8	<006	<006	0.25	0.5	<006	<006	<006

^a Antibiotics: PIP, piperacilin; CLA, clavulanic acid; CEF, cephalexin; CPD, cefprozime; CTX, ceftaxime; CAZ, ceftazidime; CMZ, cefmetazole; ATM, aztreonam; PEP, cefepime; IPM, imipenem.

^b MICs were determined in the presence of clavulanic acid (5 µg/ml).

Table 3. MICs of β -lactam antibiotics and β -lactamase activity of clinical isolate *K. pneumoniae* KU6500 and *E. coli* DH5 α harboring plasmids.

Strain	MIC (μ g/ml) ^a							Relative β -Lactamase Activity (unit/mg protein) ^b
	AMP	CPD	CEF	CTX	CAZ	CMZ	ATM	CEF
<i>K. pneumoniae</i> KU6500	>256	256	>256	32	64	32	16	1.10
DH5 α (pKU631)	>256	128	>256	8	16	4	4	0.71
DH5 α (pMWISEcpl)	128	128	>256	8	8	4	4	0.80
DH5 α (pMWampC)	8	4	32	0.5	0.25	0.5	0.125	0.05
<i>E. coli</i> DH5 α	2	0.5	2	<0.06	<0.06	0.5	<0.06	N.D. ^c

^a Antibiotics: AMP, ampicillin; CEF, cephalothin; CPD, cefpodroxime; CTX, ceftaxime; CAZ, ceftazidime; CMZ, cefmetazole; ATM, aztreonam.

^b β -Lactamase activities are the geometric mean determinations for 3 independent cultures. The standard deviations were within 10%.

^c ND, not done

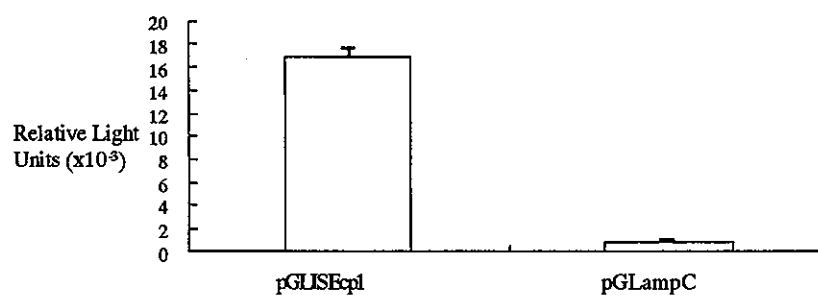


Fig. 2 Luciferase activity in the constructs. The values are presented as relative luciferase activity as measured with luminometer. Data are the geometric means of 3 independent experiments.

研究成果

1. Nkano R. Okamoto R. Nakano Y. Kaneko K. Okitsu N. Hosaka Y. Inoue M. CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC β -lactamase with an ampR gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1151-1158, 2004
2. Okitsu N, Kaieda S. Yano H. Nakano R. Hosaka Y. Okamoto R. Kobayashi T. Inoue M. Characterization of ermB gene transposition by Tn1545 and Tn917 in macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 168-173, 2005
3. Kaneko K. Okamoto R. Nakano R. Kawakami S. Inoue M. Gene mutations responsible for overexpression of AmpC β -lactamase in some *Enterobacter cloacae* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* (投稿中)

平成 16 年度分担研究報告書

分担研究課題：呼吸器感染症からの検査材料を用いた直接 PCR による原因菌の迅速 検索法の確立

分担研究者：生方 公子（北里大学北里生命科学研究所，感染情報学研究室）

〔研究要旨〕呼吸器感染症における原因微生物の網羅的検索法として，その原因となる確率の高い6菌種に対する新たな PCR 法であるモレキュラー・ビーコンを用いる real-time PCR 法による同時・迅速診断法の確立を目的とした。目的菌は，①肺炎球菌，②インフルエンザ菌，③A 群溶血レンサ球菌，④マイコプラズマ菌(*M.pneumoniae*)，⑤レジオネラ菌(*L.pneumophila*)，⑥クラミジア菌(*C.pneumoniae*)である。新たな方法では，結果を得るまでの所要時間を 1.5 時間に短縮できた。また，その操作は極めて省力化された。この方法を成人と小児の呼吸器感染症から採取された検査材料に応用し，培養よりもはるかに高い感度と精度で起炎菌を証明することができることを証明した。

以上の成績は，肺炎や化膿性髄膜炎例等に対し，入院当日中に最も適切な治療抗菌薬が選択できること，外来症例においては再診時に処方した抗菌薬が適切であったか否かの判断ができることを示した。省力化ならびに迅速化された real-time PCR 法の普及は，患者のみならず，医療経済効果の上からも極めて有用であると結論される。

研究協力者：

諸角 美由紀，小林 玲子，長谷川 恵子，
千葉 菜穂子（北里大学北里生命科学研究
所，感染情報学研究室）

岩田 敏（(独)東京医療センター小児科）

青木 泰子((独)東京医療センター内科)

川名 明彦((独)東京国際医療センター内科)

砂川 慶介(北里大学医学部感染症学講座)

A. 研究目的

呼吸器感染症の起炎菌として頻度の高い肺炎球菌，インフルエンザ菌，マイコプラズマ・ニューモニエなどにおいて，さまざまな抗菌薬に対する耐性化が急速に進行し，難治例や重症感染症例が増加してきている。このような背景には，外来患者に対して，細菌検索を行うことなく empiric therapy が行われていることがひと

つの増加要因になっている。新たな耐性菌増加の防止には，evidence に基づいた化学療法 (Evidence Based Chemotherapy: EBC)を行うことが最も肝要である。

そのためには，感染の初期段階において，起炎菌となりうる確率の高い微生物をできるだけ網羅的に，しかも同時に検索する手法の確立が必要との視点から，成人と小児の肺炎例を対象に，real-time PCR 法で使用可能な「呼吸器感染症起炎菌・迅速検索キット」の構築を目標とした。

B. 研究方法

1) 検査材料

平成 16 年 4 月以降，平成 17 年 1 月までに「小児呼吸器感染症研究会(ARD 研究会)」あるいは「成人呼吸器感染症研究会(MIA 研究

会)」によって収集された検査材料を対象とした。

2) 検索用プライマーとモレキュラー・ビーコン

市中で発症する呼吸器感染症における起炎菌検索の対象としたのは、①肺炎球菌、②インフルエンザ菌、③A 群溶血レンサ球菌、④マイコプラズマ(*M.pneumoniae*)、⑤レジオネラ菌(*L.pneumophila*)、および⑥クラミジア菌(*C.pneumoniae*)の6菌種である。

各プライマーは主にそれぞれの16S rRNA遺伝子上に設計したが、肺炎球菌のみ本菌に特有の *LytA* 遺伝子に設計した。real-time PCR用のモレキュラー・ビーコンは、増幅されるDNA上の約20bpの塩基に結合でき、6菌種が同一温度条件で陽性反応を示すように設計した。モレキュラー・ビーコンとはその末端に蛍光色素とクエンチャーを付けたものである(図-1)。

それぞれのプライマーの感度は、菌種ごとに正確に10倍希釈した菌液を作成し、それぞれの threshold cycle(Ct:増幅の陽性反応が確認できた cycle 数)を求めて標準曲線を描いた(図-2, 図-3)。6菌種は反応チューブあたり1-10CFUあたりのDNAが存在すれば、陽性と判定された。この成績は、検体採取用のシードスワブ(滅菌綿棒)の先に 10^3 CFUの目的菌DNAが付着していれば、real-time PCR陽性と判定される感度であった。

また、図-4に示すように、個々の検査材料で得られた threshold cycle(Ct)を標準曲線へ当てはめると、材料中にどの程度の菌量が存在したのかが計算でき、ある程度の定量性が得られる。

3) 検査材料への応用

前述した網羅的迅速検索用キットの精度と感度を検証するため、ARD研究会ならびにMIA研究会によって収集されている検査材料に対し、2)項のプライマーとモレキュラー・ビーコンセットを用いて原因菌の検索を行っ

た。併せて、肺炎球菌、インフルエンザ菌、およびマイコプラズマに対しては培養による検索も行った。実際の real-time PCR のプロトコールは図-5に示した通りである。

4) 倫理面への配慮

検査材料の収集については、一般細菌検査に替わって実施されているものであるが、症例の倫理面に配慮し、各施設からの材料にはイニシャルのみの記載をお願いした。また、得られた real-time PCR および培養成績は、結果判明と同時に担当医へ報告された。

C. 研究結果

1) real-time PCR と培養での成績

対象とした肺炎例は、成人40例と小児97例であったが、成人では一部気管支炎が含まれていた。

real-time PCRによって陽性と判定された菌種について、成人と小児に分けて表-1と図-6に示す。

肺炎球菌は、両研究会において最も高い割合で分離された。小児ではそれらのほとんどは培養によっても菌が証明されたが、成人例では発症から時間が経過し、既に注射薬剤が使用されているためか、培養検査で菌を分離することができない症例があった。

A群溶血レンサ球菌は、成人例で2例明らかな陽性を示し、培養でも同様に陽性であった。

マイコプラズマについては、成人と小児の両方で、real-time PCRでの陽性例がかなり認められたが、マクロライド系薬が前投与された症例では検査材料中に残存しているDNA量も少なく、培養では陰性であった。また、発症から4日以上経過した検体ではマイコプラズマはほとんど培養で陰性であった。

クラミジア菌は陽性例がわずかに認めら

れたが、その陽性率は低かった。本菌については培養が難しいことからそれらは実施していない。

レジオネラ菌の存在が証明できたのは成人の1例である。本例の検査材料は抗菌薬投与後のものを症状の改善度が悪いということで送付を受けたものである。尿中抗原が陽性とならないV型(24時間風呂の検査で強陽性)であったため、real-time PCRのみが陽性となって起炎菌を証明できた。

また、real-time PCR法では図-7に示すように、混合感染例の菌検索においては特に有用であると思われた。

2) real-time PCR への前投薬の影響

上述したように、起炎菌であった菌種に対して抗菌力を有するような注射用抗菌薬が empiric に使用された症例においては、real-time PCR で死滅あるいは増殖停止した菌の DNA を増幅することにより、高い確率で菌種を推定することは可能であった。しかし、それによってサンプル中の菌数を算出しても余り意味がないことを理解しておく必要がある。

現実的な問題としては、先生方から送付された検体のうち、小児は約半数例に経口抗菌薬が投与され、成人の場合にはほとんどに注射薬が使用されていた。耐性菌の多い肺炎球菌やインフルエンザ菌が起炎菌の症例に対し、経口セフェム薬やマクロライド系薬が使用されていた際には、生菌が残存している可能性は高いが、注射薬投与例においては培養で菌種を同定するのはほとんど不可能であった。

D. 考察 および E. 結論

real-time PCR 法による迅速診断法は、治療薬選択の上で極めて優れていると結論される。特に重症肺炎例の喀痰や、化膿性髄膜炎例の髄液に対して実施されれば有用な

方法である。

しかし、呼吸器感染症由来の上咽頭ぬぐい液や咽頭ぬぐい液のように、本来無菌的ではない材料を対象とした際には、real-time PCR 陽性の菌＝起炎菌(原因菌)と単純には判断できない場合もある。

乳幼児例においては肺炎球菌やインフルエンザ菌は高い頻度で保菌されており、また成人においてもインフルエンザ菌の保菌率は高いためである。

本研究を通し、特に重要視すべきこととして提出される検査材料の半数以上に既に抗菌薬が使用されていたことである。本来、検査材料は抗菌薬使用前に口腔内を洗浄した後に採取することが基本原則である。このことが守られない限り、real-time PCR といえどもその威力を発揮することはできない。

そのような原則が守られて real-time PCR 法が用いられるようになれば、本法は臨床サイドにおいて起炎菌検索の有力な武器になるであろうと考えられる。

その結果、臨床では余分な抗菌薬を使わなくて済み、耐性菌の出現とその増加防止や、医療コスト削減に貢献できる結論された。

将来的には、抗菌薬使用の対象外であるウイルスによる肺炎例を細菌による肺炎例から区別するために、ウイルス用 real-time PCR も構築していくことが必要である。

F. 研究発表 (論文)

1. M. Morozumi, K. Hasegawa, N. Chiba, S. Iwata, N. Kawamura, H. Kuroki, T. Tajima, and K. Ubukata. Application of PCR for *Mycoplasma pneumoniae* detection in children with community-acquired pneumonia. *Journal Infection Chemotherapy*, 10:274-279, 2004

2. 砂押 克彦, 中山 栄一, 小林 玲子, 鈴木 悦子, 田島 剛, 生方 公子: 小児急