

2011年に福島県で分離された赤痢菌の分子疫学的解析と 薬剤感受性試験について

千葉一樹 渡邊奈々子 菅野奈美 遠藤嘉子 小黒祐子 佐藤弘子
微生物課

要旨

2011年1月から12月までに福島県内で分離され、当所に搬入された *Shigella sonnei* (以下 *S.sonnei* とする) について性状確認、パルスフィールドゲル電気泳動 (以下 PFGE とする) による分子疫学的解析および薬剤感受性試験を実施した。分子疫学的解析の結果は、2例の集団感染事例から分離された株で遺伝子切断パターンがほぼ一致した。薬剤感受性試験の結果は、海外渡航者からニューキノロン耐性株が分離され、集団感染事例から基質拡張型βラクタマーゼ (以下 ESBL とする) 産生株が分離された。さらに、βラクタマーゼ遺伝子の型別を行うと、CTX-M-15型であることが明らかとなった。

キーワード: *S.sonnei*, PFGE, ESBL, CTX-M-15型

はじめに

2011年に本県で報告された細菌性赤痢は全て *S.sonnei* であった。また、*S.sonnei* によって2例の集団感染が起きた。本県における細菌性赤痢感染症の発生報告は、ここ数年、主に海外渡航歴のある患者からの散発例が数件あるだけに留まり、集団発生は、2001年から2002年にかけて、同一居住区の井戸水の使用が原因と疑われた、*Shigella flexneri 2a* による diffuse outbreak が発生して以来、久しく無かった¹⁾。また、近年、我が国では海外からの薬剤耐性菌の流入が問題視されている。

そこで2011年1月から12月までに当所に搬入された *S.sonnei* について、集団感染の関連性の有無や薬剤耐性菌の侵淫実態の把握のため、分離菌の性状確認、PFGEによる分子疫学的解析および薬剤感受性試験を実施したのでその概要を報告する。

材 料

2011年1月から12月までに当所に搬入された23株の *S.sonnei* を用いた。内訳は、インド渡航者からの散発例 (事例1) が1株、外食チェーン店における集団感染例 (事例2) が13株、県内の飲食店における集団感染例

(事例3) が8株、カンボジア渡航者からの散発例 (事例4) が1株である。

方 法

1 性状確認

SS, DHL 寒天培地 (日水製薬) で培養を行い、性状確認用培地の TSI 培地, LIM 培地, シモンズのクエン酸ナトリウム培地 (日水製薬), VP 半流動培地 (栄研化学) 及びバイテック GNI + カード (シスメックス・バイオメリュー) を用いて生化学的性状の確認を行った。また、赤痢菌免疫血清 (デンカ生研) で血清型別試験を行った。さらに、赤痢菌および腸管侵入性大腸菌 (EIEC) 検出用 Primer Set (タカラバイオ) を用いて *invE* 遺伝子と *ipaH* 遺伝子の有無の確認を行った。

2 PFGEによる分子疫学的解析

国立感染症研究所が作成したプロトコールに従って実施した²⁾。また、制限酵素は *Xba* I を使用した。

3 薬剤感受性試験・βラクタマーゼ遺伝子型別試験

米国臨床検査標準化協会 (CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute) の抗菌薬デ

ディスク感受性試験実施基準に基づき、センシディスク (BD) を用いて行った。供試薬剤は、アンピシリン (ABPC)、セフェピム (CFPM)、ナリジクス酸 (NA)、ノルフロキサシン (NFLX)、テトラサイクリン (TC)、ストレプトマイシン (SM)、カナマイシン (KM)、クロラムフェニコール (CP)、ST 合剤 (ST)、ホスホマイシン (FOM)、セフォタキシム (CTX)、セフトジジム (CAZ) の計 12 種類を使用した³⁾。

また、CTX あるいは CAZ のいずれかに耐性を示した株については ESBL 産生株を疑い、CTX に CVA を添加した合剤ディスク (ESBLs-CTX/CVA; 栄研化学) および CAZ に CVA を添加した合剤ディスク (ESBLs-CAZ/CVA; 栄研化学) を用いて確認試験を行った。

さらに、ESBL 産生株と判定された供試菌について TEM 型、SHV 型、CTX-M 型の遺伝子型別を行った^{4), 5)}。また、各々のサブタイプについてはシークエンサーによる塩基配列決定によって行った。

結果及び考察

1 性状確認

性状確認培地および同定キットの結果では、23 株全てが *S.sonnei* の性状を示した。血清型と *invE/ipaH* 遺伝子の保有については、表 1 にその結果を示した。

表 1 分離株の血清型と *invE/ipaH* 遺伝子の保有状況について

多価	単味	保有遺伝子		分離数
		<i>invE</i> 遺伝子	<i>ipaH</i> 遺伝子	
D群	第I相	(+)	(+)	18株
D群	第I相	(-)	(+)	1株
D群	第II相	(-)	(+)	4株

第 I 相あるいは第 II 相に凝集が認められるかはコロニーの性状の違いによっておおよその検討が付き、スムーズ型 (以下 S 型) コロニーでは第 I 相に、ラフ型 (以下 R 型) コロニーでは第 II 相に凝集が認められることが多い。また第 I 相の株、第 II 相の株につい

てそれぞれ *invE/ipaH* 遺伝子の保有を調べると、そのほとんどが第 I 相の株で *invE/ipaH* 遺伝子の両方の遺伝子を保有しており、第 II 相の株では *ipaH* 遺伝子のみを保有していることがわかっている。しかし、*S.sonnei* は継代培養の過程で、S 型コロニーから R 型コロニーに解離し易く、プラスミド上にある *invE* 遺伝子が脱落することがしばしばある。

今回の保有遺伝子の検査で第 I 相の株であるものの *invE* 遺伝子が脱落していた株があったが、これは第 I 相から第 II 相へと解離する過程であったことが考えられる。

2 PFGEによる分子疫学的解析

事例 2 および事例 3 に関連して搬入された計 21 株の遺伝子切断パターンを図 1 および図 2 に示した。

図 1 および図 2 の遺伝子切断パターンがほぼ一致したことから、感染源が同一である可能性が示唆された。しかし、事例 3 の喫食者と経営者の家族の 2 名が、喫食日の数日前より下痢症状があったが、事例 2 の外食チェーン店での飲食は無く、また利用者との接触も不明であったので、疫学調査からは、同一感染源であると断定することができなかった。

3 薬剤感受性試験・βラクタマーゼ遺伝子型別試験

23 株の *S.sonnei* の薬剤感受性試験の結果、薬剤耐性パターンは表 2 に示したとおり 4 パターンに分かれた。

表 2 薬剤感受性試験結果について

パターン	耐性を示した薬剤	分離株	
		分離数	事例
A	NA・NFLX・TC・SM・ST	1株	事例1
B	ABPC・NA・TC・SM・ST・CTX	20株	事例2・3
C	ABPC・CFPM・NA・TC・SM・ST・CTX・CAZ	1株	事例3
D	NA・TC・SM・ST	1株	事例4

また CTX あるいは CAZ に耐性を示した株については ESBL 産生株を疑い、CTX, CTX/CVA および CAZ, CAZ/CVA を使用した確認試験を行った。その結果、全ての株で阻止円の拡大が認められたことから、ESBL

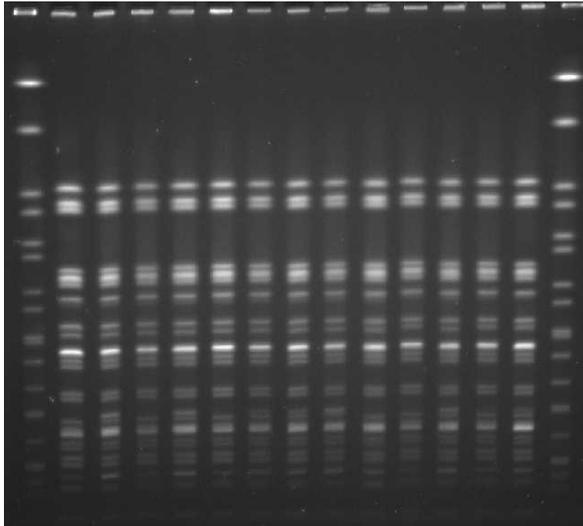


図1 事例2のPFGE遺伝子切断パターン

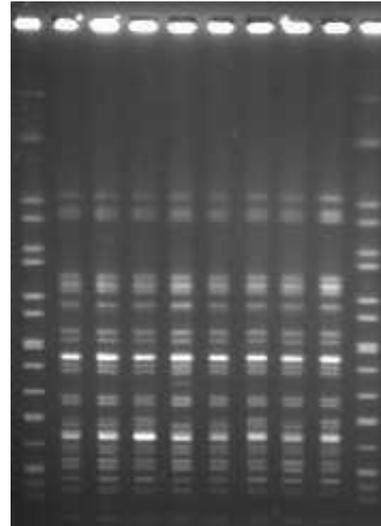


図2 事例3のPFGE遺伝子切断パターン

産生株であると判定された。

さらに、 β ラクタマーゼ遺伝子を検索したところ、全て CTX-M-15 型となった。

ESBL は、主にペニシリンを分解する Class A β ラクタマーゼの構造遺伝子の変異により拡張し、第3世代のセフェム系 (CTX や CAZ 等) を分解する能力を獲得した β ラクタマーゼを指す。また、 β ラクタマーゼ遺伝子の種類によって TEM 型、SHV 型および CTX-M 型に分かれ、現在では世界的に CTX-M 型が増加傾向にある。

近年の赤痢菌の薬剤耐性傾向は、国内発生、海外由来に関わらず、ABPC・NA・TC・ST に耐性を示す株が多く分離されている⁶⁾。

また、海外渡航者からは、細菌性下痢症の第1選択剤としてよく使用されるニューキノロン系抗菌薬耐性株の検出例も報告されている⁷⁾。さらに、ESBL 産生株が腸内細菌科の菌種に拡大しつつある中、国内での赤痢菌における報告はまだ稀ではあるが、いくつか報告されている^{8) 9)}。

今回、事例2や3で分離された CTX-M-15 型は、CAZ 加水分解能を有し、CTX に加えて CAZ にも耐性を示す ESBL である。昨年、ドイツを中心としてヨーロッパでアウトブレイクを起こし、話題となった大腸菌 O104:H4 も CTX-M-15 型 ESBL 産生株であった¹⁰⁾。国内における CTX-M-15 型 ESBL 産生性の

S. sonnei によるアウトブレイクは、過去に報告がなく、本事例がおそらく初であると思われる。

まとめ

今回の事例検討より、事例2と3が、おそらく国内初となる CTX-M-15 型 ESBL 産生性の *S. sonnei* によるアウトブレイクであると明らかになった。また、分離株の大半が、ABPC・NA・TC・ST 耐性であったことや、海外渡航者からニューキノロン系抗菌薬の NFLX 耐性株が分離されたことは、近年の赤痢菌の薬剤耐性傾向が本県の事例でも確認できたことになる。今後も薬剤耐性傾向を注視する必要があると考える。

謝辞

ご指導いただいた国立感染症研究所第一部第二室長 泉谷秀昌先生へ深謝いたします。

また患者情報を提供いただきました管轄保健所の職員の方々へ深謝いたします。

引用文献

- 1) 福島県衛生研究所. 平成14年度業務概況. 福島県衛生研究所年報, 2002; 20: 15
- 2) 国立感染症研究所細菌第一部 (主任研究者 寺嶋淳). 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究. 平成17年度総括・分担研究報告書及び平成15~17

- 年度総括・総合研究報告書, 2005 : 168-185
- 3) 麻生嶋七美, 本田己喜子, 尾崎延芳, 他.
幼稚園における *Shigella sonnei* の集団感染事例. 福岡市保健環境研究所報, 2010 ; 36 : 83-85.
 - 4) Shibata, N., et al. : Antimicrob. Agents Chemother. , 50 (2), 791-795, 2006
 - 5) Yagi, T., et al. : FEMS Microb. Lett. , 184, 53-56, 2000
 - 6) 国立感染症研究所. 厚生労働省健康局結核感染症課. 病原微生物検出情報, 2009 ; 30 : 311-313
 - 7) 吉村和修, 川島一成, 小花光, 他. ニューキノロン系抗菌薬に耐性を示した細菌性赤痢の1例. 感染症学雑誌, 1998 ; 72 : 935-938
 - 8) 国立感染症研究所. 厚生労働省健康局結核感染症課. 病原微生物検出情報, 2006 ; 27 : 264-265
 - 9) 国立感染症研究所. 厚生労働省健康局結核感染症課. 病原微生物検出情報, 2007 ; 28 : 45-46
 - 10) 国立医薬品食品衛生研究所. 食品安全情報 (微生物), 2011 ; 14 : 12-13