

過去 15 年に県内で分離された赤痢菌の薬剤耐性状況

Drug-resistance Distribution of *Shigella* Isolated from Domestic and Imported Cases from 2006 to 2021 in Miyagi

水戸 愛 矢崎 知子 山口 友美 後藤 郁男 山木 紀彦

Ai MITO, Tomoko YAZAKI, Yumi YAMAGUCHI, Ikuo GOTO, Norihiko YAMAKI

2006年10月から2021年9月までの15年間に、宮城県内（仙台市を除く）で分離された赤痢菌20株（国内由来7株、海外渡航者による輸入事例由来13株）を対象として薬剤耐性状況の調査を行った。薬剤耐性遺伝子は17株から検出された。第3世代セファロスポリン系薬剤に耐性を示す腸内細菌科細菌が20株中4株分離され、基質特異性β-ラクタマーゼ（extended-spectrum β-lactamase; ESBL）を対象にPCR法を実施した。さらに、ESBL遺伝子に関してシーケンス解析を実施し、CTX-M-15型（4株：20%）が検出された。今後の県内における赤痢菌の薬剤耐性状況に注視する必要があると考えられる。

キーワード：赤痢菌；基質特異性拡張型βラクタマーゼ；最小発育阻止濃度；薬剤耐性

Key words: *Shigella*; extended-spectrum β-lactamase (ESBL); MIC; Drug-resistance

1 はじめに

赤痢菌は、感染症法において3類感染症に分類される細菌性赤痢の起原因菌である。細菌性赤痢は経口感染症で、汚染された物からヒトへ感染し、発熱、下痢、腹痛、粘血便、しぶり腹（テネズムス）等の症状を呈する。海外渡航者が汚染された水や食品を摂取し、発症するケースが多いものの、国内でも感染する場合もある。

1980年以降、従来の抗菌薬が効かない薬剤耐性菌の出現が問題となっている。感染した菌に適した抗菌薬を投与しても効果が期待できず、治療薬の選択肢が限られる。

赤痢菌の薬剤耐性に関しては、以前からスルファメトキサゾール/トリメトプリム (ST) 耐性株が多いことが知られているが、近年になって基質特異性拡張型βラクタマーゼ (ESBL) 産生株¹⁾やニューキノロン系薬剤への耐性株²⁾の存在が報告されている。そこで本研究では、2006年から2021年までの15年間に宮城県内で分離された菌を用いて、薬剤耐性状況について調査したので、報告する。

2 材料及び方法

2.1 材料

2006年10月から2021年9月までの15年間に、宮城県内（仙台市を除く）で分離された赤痢菌20株（国内由来7株、海外渡航者による輸入事例由来13株）を対象とした。

2.2 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、米国臨床検査標準委員会 (CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute) に基づき、微量液体希釈法（ドライプレート DP41（栄研化学）:21 薬剤）を用いて最小発育阻止濃度 (MIC: μg/mL) を測定した。供試薬剤は、ピペラシリン (PIPC)、アンピシリン (ABPC)、ホスホマイシン (FOM)、タゾバ

クタム・ピペラシリン (TAZ/PIPC)、スルバクタム・アンピシリン (S/A)、ミノサイクリン (MINO)、セファゾリン (CEZ)、セフトリアキソン (CTRX)、セフトジジム (CAZ)、セフメタゾール (CMZ)、セフポドキシム (CPDX)、ゲンタマイシン (GM)、アミカシン (AMK)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム (ST)、セフォチアム (CTM)、セフェピム (CFPM)、フロモキシセフ (FMOX)、イミペネム (IPM)、レボフロキサシン (LVFX)、メロペネム (MEPM)、アズトレオナム (AZT) の計21薬剤を用いた。さらに、STについてはE-test（バイオメリュー・ジャパン）によるMICの測定も実施した。

2.3 ESBL産生性の確認

薬剤感受性試験でCTRX及びCPDX耐性であった株については、ESBL産生を疑い、クラブラン酸阻害試験を実施し、ESBL産生性の有無を確認した。

2.4 薬剤耐性遺伝子の検出

ESBL遺伝子としてTEM型、SHV型、CTX-M-1group、CTX-M-2group、CTX-M-9groupの検出をPCR法により実施した。また、スルホンアミド耐性遺伝子として *sul1* 及び *sul2*³⁾、トリメトプリム耐性遺伝子として *dfrA1*、*dfrA5*、*dfrA7*、*dfrA12*、*dfrA13*、*dfrA14*、*dfrA15*、*dfrA16* 及び *dfrA17*⁴⁾ を対象にグループごとにPCR法による検出を行った。これらは文献4より一部改変した（表1）。

2.5 薬剤耐性遺伝子の解析

dfrA 遺伝子が検出された菌株については、シーケンスで解析し、耐性遺伝子型を決定した。

ESBL遺伝子が検出された菌株については、ESBL遺伝子全長を決定するためのプライマー（表2）をgroupごとに設計し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を解析した。

表1 トリメトプリム耐性遺伝子に対するプライマー

プライマー名	検出可能な遺伝子	塩基配列 (5' - 3')
<i>dfrA1</i> -group_F	<i>dfrA1</i> , <i>dfrA5</i> , <i>dfrA15</i> ,	GTGAACTATGAC TAATGG
<i>dfrA1</i> -group_R	<i>dfrA16</i>	AATTGGAAAACGG TZTAAA
<i>dfrA7</i> -group_F	<i>dfrA7</i> , <i>dfrA17</i>	TTGAAAATTCAT TGATTT
<i>dfrA7</i> -group_R		AATCGGAAAAAAG GTTTAGA
<i>dfrA12</i> -group_F	<i>dfrA12</i> , <i>dfrA13</i>	GGTGAGCAGAAGA TTTTTCGC
<i>dfrA12</i> -group_R		AACCCTTCTCCG CAGTGGGAG
<i>dfrA14</i> -group_F	<i>dfrA14</i>	GAGCAGCTACTTT TTAAAGC
<i>dfrA14</i> -group_R		AATTGGGAAAAAAG GTTTAAA

表2 シークエンス解析用プライマー

プライマー名	塩基配列 (5' - 3')
CTX-M1-seq_F	TTGTTGTTAWTTCGTMCTTCCAGA
CTX-M1-seq_R	TATGGCCTGGTATGCGCAAG
TEM-1-seq_F	TCCGCTCATGAGACAATAACCC
TEM-1-seq_R	GGAACGAAAACCTCACGTTAAGGG

3 結果

3.1 耐性菌出現状況

薬剤感受性試験を実施した20株中、何らかの薬剤に対し耐性を示した株は19株(95%)であった。図1に耐性薬剤パターン別株数を示した。このうち、1剤に対してのみ耐性であった株は10株(ST8株とABPC2株)、2剤(ABPC/ST)に耐性であった株は2株、4剤が3パターン(PIPC/ABPC/GM/ST, PIPC/ABPC/CEZ/ST, ABPC/CEZ/ST/LVFX)3株、9剤(PIPC/ABPC/CEZ/GM/ST/CTRX/CPDX/CFPM/AZT)が1株、10剤が1パターン(PIPC/ABPC/CEZ/GM/ST/CAZ/CTRX/CPDX/CFPM/AZT)3株であった。

図2に薬剤ごとの耐性菌出現状況を示した。STへの耐性が最も多く17株(85%)、ABPCが11株(55%)、PIPC及びCEZがそれぞれ6株(30%)、GMが5株(25%)であった。CTRX、CPDX、CTM及びAZTに耐性であった株が4株(20%)確認されたが、この4株は前述した9剤耐性株(1株)及び10剤耐性株(3株)であった。また、ニューキノロン系薬剤であるLVFXに耐性を示す株が1株確認された。

3.2 ESBL産生性の確認と遺伝子解析結果

表3に示したように、第3セファロスポリン系薬剤で

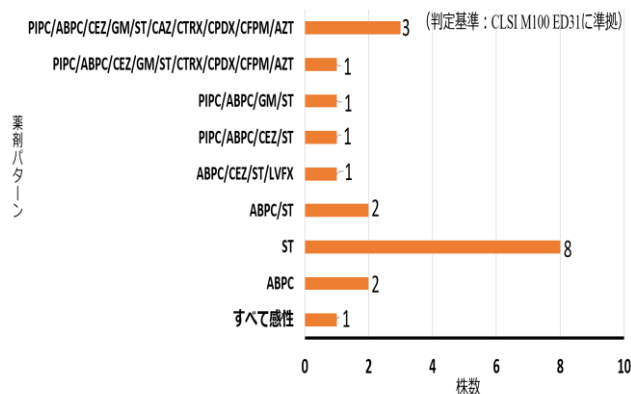


図1 耐性薬剤パターン別株数

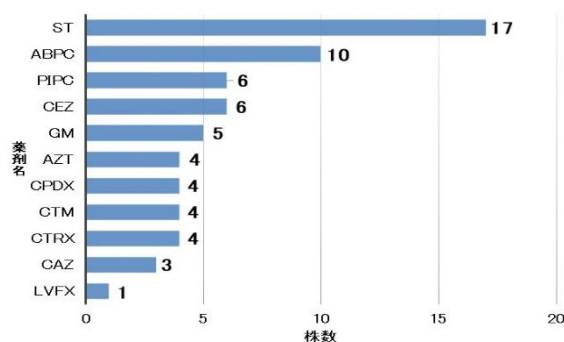


図2 薬剤ごとの耐性菌出現状況

あるCTRX及びCPDX耐性であった4株(No.7,8,11,12)については、ESBL産生を疑い、クラブラン酸阻害試験を実施したところ、阻害を認めたため、ESBL産生菌(CTX-M型)であると推測された。PCR法によりESBL遺伝子を検出したところ、4株ともTEM及びCTX-M-1group遺伝子の増幅が確認された。さらに、塩基配列データを解析した結果、遺伝子型は4株全てTEM-1及びCTX-M-15であった。

3.3 ST耐性遺伝子解析結果

スルホンアミド耐性遺伝子については、20株中14株で*sul2*が検出された。残りの6株は*sul1*, *sul2*ともに検出されなかった。トリメトプリム耐性遺伝子については、*dfrA1*のみが9株、*dfrA1*及び*dfrA12*保有株が3株であった。その他の8株では、今回検査の対象としたトリメトプリム耐性遺伝子9種は検出されなかった。

3.4 MIC値の結果

STに対するMIC値は、ドライプレート(DP)を用いた微量液体希釈法では17株が76/4µg/mL以上と検出上限値であった。残り3株は9.5/0.5µg/mL以下であった。一方、E-testでは検出上限値(608/32µg/mL)の株が14株、7.22/0.38~14.25/0.75µg/mLの株が3株、0.437/0.023~0.893/0.047µg/mLの株が3株あった。

表3 分離菌株の薬剤耐性遺伝子解析結果

No.	菌種	耐性遺伝子	bla	薬剤耐性	ST 合剤における MIC 値 (µg/mL)		渡航先
					E-test	DP	
1	<i>S. flexneri</i> 6	<i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>		ST	>608/32	≥76/4	なし
2	<i>S. sonnei</i>	<i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>		ST	>608/32	≥76/4	ベトナム
3	<i>S. sonnei</i>	<i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>		ST	>608/32	≥76/4	インド・ネパール・ バングラデシュ
4	<i>S. sonnei</i>	<i>sul2</i> , <i>dfrA1</i> , <i>dfrA12</i>		ST, PIPC, ABPC, GM	>608/32	≥76/4	中国
5	<i>S. sonnei</i>	<i>sul2</i>		ST, ABPC	>608/32	≥76/4	エクアドル
6	<i>S. boydii</i> 4	<i>sul2</i>		ST, PIPC, ABPC, CEZ	>608/32	≥76/4	中国
7	<i>S. sonnei</i>	<i>sul2</i> , <i>dfrA1</i> , <i>dfrA12</i>	CTX-M-15, TEM1	ST, PIPC, ABPC, CEZ, GM, CTRX, CAZ, CPDX, CFPM, AZT	>608/32	≥76/4	なし
8	<i>S. sonnei</i>	<i>sul2</i> , <i>dfrA1</i> , <i>dfrA12</i>	CTX-M-15, TEM1	ST, PIPC, ABPC, CEZ, GM, CTRX, CAZ, CPDX, CFPM, AZT	>608/32	≥76/4	なし
9	<i>S. flexneri</i> 2a	<i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>		ST, ABPC, CEZ, LVFX	>608/32	≥76/4	インド
10	<i>S. sonnei</i>	-		ABPC	0.893/0.047	≤9.5/0.5	インドネシア
11	<i>S. sonnei</i>	<i>dfrA1</i>	CTX-M-15, TEM1	ST, PIPC, ABPC, CEZ, GM, CTRX, CPDX, CFPM, AZT	9.5/0.5	≥76/4	トルコ
12	<i>S. sonnei</i>	<i>dfrA1</i>	CTX-M-15, TEM1	ST, PIPC, ABPC, CEZ, GM, CTRX, CAZ, CPDX, CFPM, AZT	14.25/0.75	≥76/4	トルコ
13	<i>S. sonnei</i>	<i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>		ST	>608/32	≥76/4	インドネシア
14	<i>S. sonnei</i>	<i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>		ST	>608/32	≥76/4	ベトナム
15	<i>S. flexneri</i> 4	-		ABPC	0.437/0.023	≤9.5/0.5	中国
16	<i>S. boydii</i> 1	<i>dfrA1</i>		ST	7.22/0.38	≥76/4	なし
17	<i>S. flexneri</i> 2a	<i>sul2</i>		ST, ABPC	>608/32	≥76/4	なし
18	<i>S. sonnei</i>	<i>sul2</i>		ST	>608/32	≥76/4	なし
19	<i>S. sonnei</i>	<i>sul2</i>		ST	>608/32	≥76/4	なし
20	<i>S. flexneri</i> 4a	-		-	0.893/0.047	≤9.5/0.5	数年前にミャンマー

3.5 ST 耐性遺伝子と MIC 値の関係

ST に対する耐性遺伝子パターンは、① *sul2* のみ (5 株: No.5,6,17,18,19) , ② *sul2*&*dfrA1* (6 株: No.1,2,3,9,13,14) , ③ *sul2*, *dfrA1*& *dfrA12* (3 株: No.4,7,8) , ④ *dfrA1* のみ (3 株: No.11,12,16) 及び⑤ *sul*, *dfrA* とも検出なし (3 株: No.10,15,20) であった。

このパターン別に、DP と E-test による薬剤感受性試験の結果を比較すると、*sul2* を保有する株 (①, ②, ③) では DP, E-test とともに耐性、検出なしの株 (⑤) ではいずれも感性という判定となり、両者とも DP と E-test の判定結果は一致していた。また、⑤の E-test での MIC 値は、1.9/0.1 µg/mL 未満と感性と判定される値 (38/2 µg/mL 以下) の中でも低い値であった。

一方、*sul2* を保有せず *dfrA1* のみを保有する株 (④) では、DP で耐性と判定されたのに対し、E-test での判定は感性となり、判定結果が乖離していた。これらの E-test

の MIC 値は 1.9/0.1~19/1 µg/mL であり、⑤の MIC 値より高値となる傾向がみられた。

4 考察

今回調査した結果、薬剤別の耐性率では、ST に対する耐性株が最も多く 85% で、これは文献⁵⁾の 84%~85% とほぼ同様の傾向がみられたが、ABPC では 55% と文献⁵⁾の 34.1%~42.3% に比べ高めの結果であった。

ST 耐性株については、DP による微量液体希釈法と、E-test の両方で薬剤感受性試験を実施し、対象耐性遺伝子も併せて調査した。DP 法は、測定範囲がブレイクポイント付近の 3 濃度のみと限定的であるが、E-test は測定範囲がより広域であるという特徴がある。両者の結果はおおむね一致していたが、一部で判定が異なるものもあった。E-test で感性となった 6 株のうち、3 株 (No.11,12,16) が DP では耐性と判定された。この 3 株

の E-test における MIC 値は 7.22/0.38 ~ 14.25/0.75µg/mL であり、DP と E-test の両方で感性和判定された株での E-test の MIC 値 (0.437/0.023 ~ 0.893/0.047µg/mL) より 10 倍高値であった。

また、耐性遺伝子検出の有無について比較したところ、DP と E-test の両方で耐性と判定された株は、全て *sul2* 遺伝子を保有していた。一方、両方で判定が異なった株は *dfxA1* 遺伝子を保有していたが、*sul2* 遺伝子は保有していなかった。このことから、*sul2* 等のスルホンアミド耐性遺伝子を持たず、トリメトプリム耐性遺伝子を保有している株では、DP では耐性と判定されても E-test では感性和判定される可能性が示唆された。

今回、CTX-M-15 型の赤痢菌株が 4 株検出された。4 株のうち 2 株の ESBL 産生菌は、同じ海外旅行ツアー参加者 2 名から検出され、海外渡航者による輸入事例である。薬剤感受性試験の結果から、同一の薬剤に対し耐性と判定され、同一の耐性遺伝子を保有することから 2 株の共通性が再確認された。残りの 2 株中 1 株は、飲食店チェーンの同一セントラルキッチンで調理された食品が共通と判明しており、CTX-M-15 型の ESBL 分離株が他県でも検出²⁾され、同一事例であり関連性を改めて確認できた。もう 1 株は、飲食店チェーンの利用は確認できていないが、発症時期や検出菌種が一致しており、薬剤感受性試験の結果や耐性遺伝子の検出状況からも、関連性が極めて高いと考えられた。

また、ニューキノロン系薬剤耐性を保有する 1 株が検出され、治療薬の第一選択薬剤へ耐性を示したことから更なる精査・監視が必要と考えられる。

世界保健機関 (WHO) では、2022 年 3 月に欧州地域の少なくとも 9 개국から、広範囲薬剤耐性 *S.sonnei* 感染を含む *S.sonnei* 感染の追加症例報告⁶⁾があった。英国から他国への伝播の可能性と薬剤耐性 *S.sonnei* の蔓延が懸念されている。新型コロナウイルス感染症の流行により、渡航制限下にあったにも関わらず、9 개국で感染報告が相次いでいることから、今後海外渡航制限緩和により、更なる感染拡大の恐れがある。したがって、県内における赤痢菌の菌種、薬剤耐性状況を継続して注視し、今後も調査していく必要があると思われる。

5 謝辞

赤痢菌の分与をしていただいた県内医療機関及び保健所の皆様に深謝いたします。

6 参考文献

- 1) 河村真保ら：東京健安研セ年報，59，41-46，2008
- 2) 瀬戸順次，稲毛稔：感染症学雑誌，86，608-609(2012)
- 3) M.Vrints:Journal Of Clinical Microbiology,47, 1379-1385,(2009)
- 4) Margarita M.Navia:Diagnostic Microbiology and Infections Disease,46,295-298(2003)
- 5) IDWR 2002 年第 8 号
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/406-dysentery-intro.html> (2022 年 7 月 4 日アクセス)
- 6) 厚生労働省検疫所 FORTH
https://www.forth.go.jp/topics/20220329_00001.html (2022 年 7 月 4 日アクセス)