

[症 例]

フルオロキノロン耐性 *Salmonella* Typhimurium が分離された
小児下痢症の 2 症例小倉健一¹⁾・齊藤冬彦¹⁾・森田耕司²⁾¹⁾ (財)東京都保健医療公社多摩南部地域病院検査科²⁾ 杏林大学保健学部臨床微生物学教室

(平成 18 年 1 月 10 日受付, 平成 18 年 4 月 27 日受理)

発症時期が異なる小児下痢症 2 例より, フルオロキノロン耐性 *Salmonella* Typhimurium を分離した。症例 1 は 7 歳女児, 症例 2 は生後 7 カ月の男児で, ともに入院時便培養よりフルオロキノロン耐性 (ciprofloxacin (CPFX) MIC 16 μ g/ml) *S.* Typhimurium が分離された。治療は, 2 症例ともに fosfomycin (FOM) を投与して軽快したが, 菌消失までには 1 カ月以上を要した。フルオロキノロン耐性は, キノロン耐性決定領域の PCR により *gyrA* 遺伝子と *parC* 遺伝子の変異によることが確認された。プラスミドプロファイルおよび RAPD-PCR による DNA 多型分析より, 同一株による感染事例であることが示唆された。しかし, 家族の便培養検査は陰性であり, 感染経路は不明であったが, 飼っていたペット由来の可能性が考えられた。本邦でのフルオロキノロン耐性 *S.* Typhimurium の拡散・伝播が懸念されるため, 今後の耐性菌出現動向に十分注意することが重要である。

Key words: *Salmonella* Typhimurium, フルオロキノロン耐性, *gyrA* 遺伝子, *parC* 遺伝子, キノロン耐性決定領域

Salmonella は汚染食品などを介して散発・集団食中毒を起こし, 細菌性食中毒の主要な原因菌として認識されている。一般に, サルモネラ腸炎は重症例となることが多く, 下痢を主体とした症状の経過および除菌確認までに長期間を要する¹⁾。近年, 多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium が欧州, 米国各国において分離されており, 国際的に注目されている^{2), 3)}。特に, 欧米では多剤耐性である *S.* Typhimurium definitive phage type 104 (DT104) が主要流行菌型となり, ペットに関連した人畜共通感染症としての発生動向が, 公衆衛生上の大きな問題になっている⁴⁾。

本邦においても松浦らが下痢症由来 *Salmonella* における旧キノロン耐性を含めた薬剤耐性株の出現・増加傾向を報告している^{5)~8)}。また, 中矢らは乳児下痢

症の便からフルオロキノロン耐性 *S.* Typhimurium を分離している⁹⁾。

今回われわれは 2 例の小児の糞便から分離されたフルオロキノロン耐性 *S.* Typhimurium による細菌性胃腸炎を経験し, その分離株を対象にフルオロキノロン耐性因子の検索および DNA 多型分析による同一性について検討したので報告する。

I. 症 例

症例 1

患者: 7 歳 女児。

主 訴: 腹痛, 下痢, 発熱。

既往歴, 家族歴: 特記すべきことなし。

現病歴: 2001 年 8 月 14 日夜より, 39°C の発熱と腹痛が出現し, 16 日未明になっても下痢および腹痛がひどいため, 細菌性腸炎疑いで入院となった。

入院時現症: 体重 25 kg, 体温 39.1°C。1 日に 5 回以上の下痢, 血便を伴っていた。

入院時検査所見 (Fig. 1): 白血球数 (WBC) 9,100/ μ l, CRP 9.5 mg/dl

著者連絡先: (〒206-0036) 東京都多摩市中沢 2-1-2
(財)東京都保健医療公社多摩南部地域病院
検査科
小倉健一
TEL: 042-338-5111 内線 2254
FAX: 042-339-6111
E-mail: ogura@tamanan-hp.com

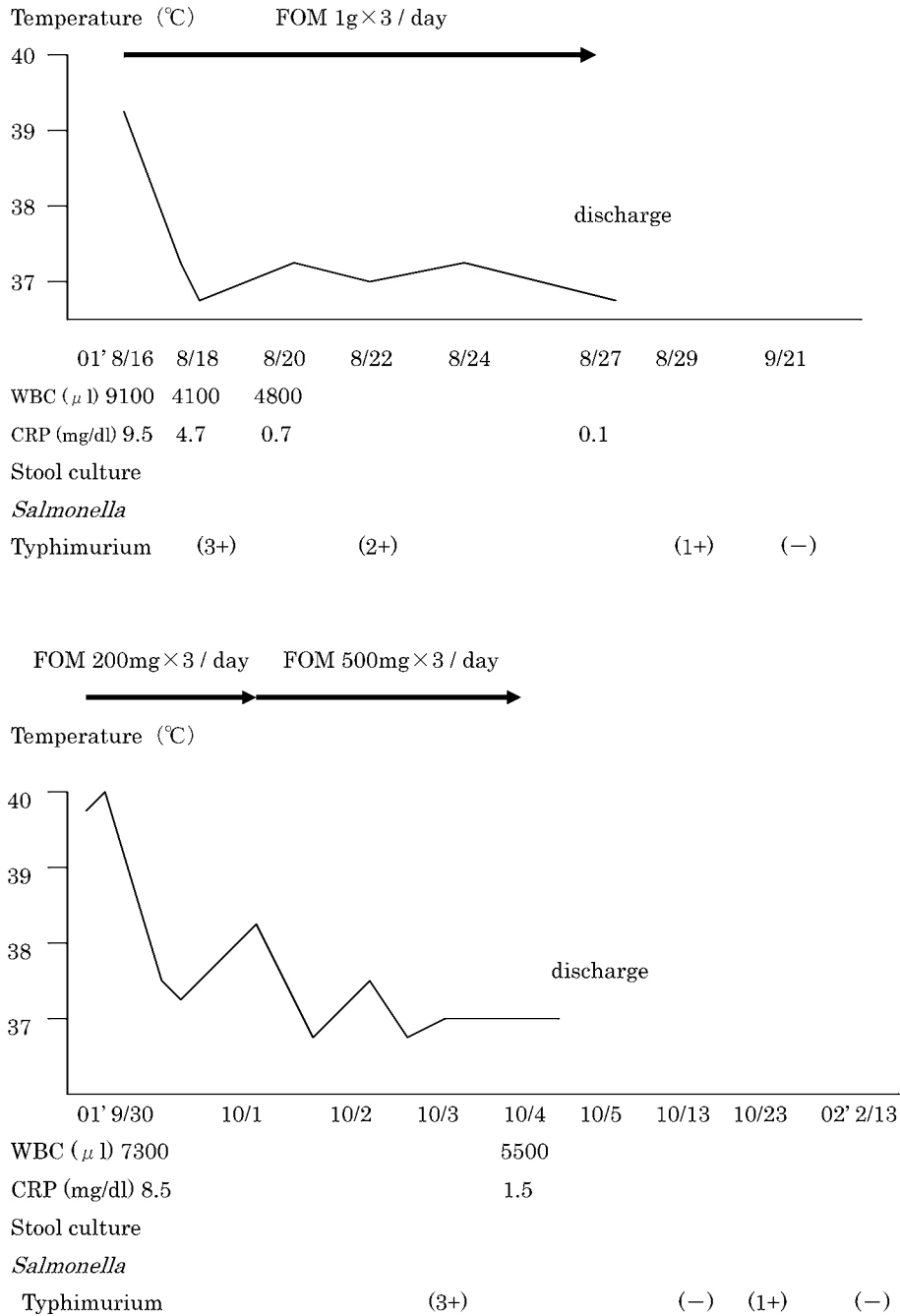


Fig. 1. Clinical course of case 1 and case 2.

入院後経過 (Fig. 1): 患者は強度の腹痛と発熱, 頻回下痢, 特に血便を伴っており, 入院時より fosfomycin (FOM) 3 g/日/分3 静注の投与を開始した。8月18日の入院時便培養より *S. Ty-*

phimurium が菌量 3+ で分離された。8月27日全身状態改善し軽快退院した。その後外来フォローアップにて, 9月21日菌陰性となった。

症例 2

患者: 0歳 (7カ月) 男児。

主訴: 下痢, 発熱。

既往歴, 家族歴: 特記すべきことなし。

現病歴: 2001年9月29日朝より水様便が出現し, 翌日には40°Cの高熱も発したため入院となった。

入院時現症: 体重8.8kg, 体温40.3°C

入院時検査所見 (Fig. 1): 白血球数7,300/ μ l, CRP 8.5 mg/dl

入院後経過 (Fig. 1): 患者は40°C以上の高熱と頻回下痢をしており, 入院時よりFOM 600 mg/日/分3静注の投与を開始した。いったん下熱したが再び熱の上昇と下痢が続いたため, FOMの投与量を1,500 mg/日/分3静注に増加し, 解熱した。10月3日に入院時便検体より *S. Typhimurium* が菌量1+で分離された。10月5日全身状態改善し軽快退院した。その後外来フォローアップにて, 1度菌量1+で検出されたが無症状であったため経過観察とし, 翌年2月13日菌陰性となった。

II. 細菌学的検討

1. 対象菌株は症例1, 2の便培養検査で分離された *Salmonella* sp. 2株を用いた。

2. 生物学的性状同定は細菌同定自動機器 (Micro Scan Walk/Away NC5J パネル: DADE) 血清型別は, 市販のサルモネラ免疫血清 (デンカ生研) を用いた。

3. 薬剤感受性試験: 最少発育阻止濃度 (MIC) は ampicillin (ABPC), cefotaxime (CTX), kanamycin (KM), streptomycin (SM), minocycline (MINO), chloramphenicol (CP), FOM, norfloxacin (NFLX), ofloxacin (OFLX), levofloxacin (LVFX), sparfloxacin (SPFX), tosufloxacin (TFLX), ciprofloxacin (CPF) の13薬剤について CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 法に準拠した微量液体希釈法¹⁰⁾により測定した。

4. プラスミドDNAの検出

プラスミドDNAの検出は Kado and Liu の方法¹¹⁾ に準じて行い, アルカリ-sodium lauryl sulfate (SDS) による溶菌の後にクロロホルム-フェノールでDNAを抽出し, アガロースゲル (0.9%) 電気泳動によって分析した。

5. Randomly amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) を利用したDNA多型分析

菌株の全DNAを直接煮沸法で調整し, Okazakiらの方法¹²⁾に従ってPCRを行った後に, 増幅DNAをアガロースゲル (2.4%) 電気泳動によって分析した。

6. キノロン耐性関連遺伝子群の変異解析

Giraudらの方法¹³⁾に従ってDNAジャイレース遺伝子 *gyrA*, *gyrB*, トポイソメラーゼ遺伝子 *parC*, *parE* のキノロン耐性決定領域 (quinolone resistance-determining regions, QRDR) を含むDNA断片をPCRによって増幅した。さらに, PCR増幅DNAを直接使用したダイターミネータ法¹⁴⁾によって塩基配列を決定した。

III. 結果

症例1, 2の菌株は同一の生物学的性状 (Table 1) *Salmonella* sp. と判定し, 血清型別により *S. Typhimurium* (O:4: i: 1, 2) と同定した。

薬剤感受性試験 (Table 2): 菌株1, 2に対するMIC (μ g/ml) が耐性を示した薬剤は, NFLX (32, 64), OFLX (8, 8), LVFX (8, 8), SPFX (16, 32), TFLX (16, 16), CPF (16, 16), ABPC (>128, >128), SM (>128, >128), MINO (64, 32), CP (>128, >128) であり, 腸管感染症に汎用されるフルオロキノロン薬

Table 1. Differentiation of fluoroquinolone-resistant strains of *Salmonella* Typhimurium strains

Characteristics	Reaction	
	Strain 1	Strain 2
Oxidase	—	—
ONPG	—	—
IPA	—	—
VP	—	—
Indole	—	—
Lysin decarboxylase	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+
Arginine decarboxylase	—	—
Urease	—	—
Malonate utilization	—	—
Glucose	+	+
Adonitol	—	—
Arabinose	+	+
Inositol	—	—
Rhamnose	+	+
Sorbitol	+	+
Sucrose	—	—

Table 2. MICs of 13 antimicrobial agents against fluoroquinolone-resistant strains of *Salmonella* Typhimurium

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$) of ^a												
	NFLX	OFLX	LVFX	SPFX	TFLX	CPF	ABPC	CTX	KM	SM	MINO	FOM	CP
S. Typhimurium-1	32	16	8	16	16	16	>128	<1	4	>128	64	<1	>128
S. Typhimurium-2	64	16	8	32	16	16	>128	<1	4	>128	32	<1	>128

^a Abbreviations: NFLX, norfloxacin; OFLX, ofloxacin; LVFX, levofloxacin; SPFX, sparfloxacin; TFLX, tosufloxacin; CPF, ciprofloxacin; ABPC, ampicillin; CTX, cefotaxime; KM, kanamycin; SM, streptomycin; MINO, minocycline; FOM, fosfomycin; CP, chloramphenicol.

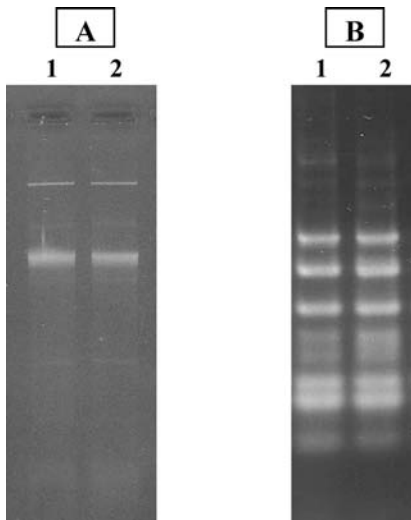


Fig. 2. Plasmid profiles (A) and RAPD profiles (B) of fluoroquinolone-resistant strains of *S. Typhimurium*. Lane 1, *S. Typhimurium* strain 1; lane 2, *S. Typhimurium* strain 2.

に対して、高レベルの耐性が確認された。また、ABPC, SM, MINO, CP にも耐性を示した。

プラスミドプロファイルと RAPD-PCR プロファイル (Fig. 2): 菌株 1, 2 のプラスミド DNA 保有パターンと RAPD-PCR による DNA パターンは同一であった。QRDR の解析では菌株 1, 2 ともに DNA ジャイレース遺伝子 *gyrA* で 2 カ所, トポイソメラーゼ遺伝子 *parC* で 1 カ所の点変異が認められ, GyrA では 83 位のセリンがフェニルアラニン, 87 位のアスパラギン酸がアスパラギンに, ParC では 80 位のセリンがアルギニンに置換していることが確認された (Table 3)。

IV. 考 察

今回われわれが経験した小児下痢症は ABPC, CP, SM, やテトラサイクリン系抗菌薬に耐性を示す多剤耐性株による *Salmonella* 腸炎であり, 抗菌薬治療を行われるうえで選択されるフルオロキノロン系抗菌薬に耐性菌株の *Salmonella* であった。今回の症例に対する抗菌薬治療には, 薬剤感受性試験において感受性であった FOM が投与されたものの, 除菌までには 1 カ月以上の長い時間を要し治癒軽快した。仲矢らの報

Table 3. Mutations in quinolone resistance-determining regions of *gyrA* (GyrA) and *parC* (PerC) of fluoroquinolone resistant-*Salmonella* Typhimurium strains

Strain	<i>gyrA</i> /(GyrA)								<i>parC</i> /(ParC)				
	81	82	83	84	85	86	87	88	78	79	80	81	82
S. Typhimurium ^a 98-141-(NA ^s)	GGC (Gly)	GAT (Asp)	TCC (Ser)	GCA (Ala)	GTG (Val)	TAT (Tyr)	GAC (Asp)	ACC (Thr)	GGC (Gly)	GAC (Asp)	AGC (Ser)	GCC (Ala)	TGC (Cys)
S. Typhimurium- 1	---	---	-T- (Phe)	---	---	---	A-- (Asn)	---	---	---	C-- (Arg)	---	---
S. Typhimurium- 2	---	---	-T- (Phe)	---	---	---	A-- (Asn)	---	---	---	C-- (Arg)	---	---

^a Nalidixic acid-susceptible strain.

告⁹⁾においても除菌までに2週間以上要しており、一般的に小児下痢症による *Salmonella* 腸炎は重症例が多く下痢などの経過や除菌までの期間が長期傾向になるなどの特徴が挙げられる。2症例のフルオロキノロン耐性 *S. Typhimurium* は、プラスミドDNA解析およびRAPD法を用いてそれぞれの分離菌株のDNAパターンを検討した結果、興味深いことに同一であることがわかった (Fig. 2)。すなわち同一株クローンである可能性が示唆された。しかしながら、家族全員の便培養検査を行ったが2症例ともに家族全員陰性であった。また、食事内容、発症時期や年齢も異なり、調査した限り両家族との接点を見いだすことは困難であり、両症例における感染源および感染経路は不明であった。その後の調査により、唯一考えられるのは両家庭ともに犬および猫を室内で飼っており、発症当時どちらのペットも下痢症状を起していたことである。後日、保健所よりそれぞれのペットの便培養検査結果は、ABPC, CP, SM, NFLX に耐性を示す *Salmonella* O-4 が検出されたとの連絡を受けた。これらのことより本症例は、ペット由来のフルオロキノロン耐性 *S. Typhimurium* による小児下痢症であった可能性が高く、本菌株の市中への拡散が懸念される。それゆえに、本邦で市販されているペットのフルオロキノロン耐性 *S. Typhimurium* 菌株の保菌検査は、公衆衛生学として重要であり実施すべきであろう。また、疫学的情報として全国的な分布調査も必要であると思われる。

一方、フルオロキノロン薬の耐性機構はDNAジャイレースとトポイソメラーゼの変異によるキノロン薬との親和性の低下、および外膜タンパクの消失・新生による菌体へのキノロン透過性障害や排出ポンプの亢進による菌体外キノロン濃度の低下により起こることが知られている¹⁵⁾。今回検討した *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* の変異は症例1, 2株ともに、DNA複製に必須な遺伝子でキノロン耐性のホットスポットである *gyrA* 遺伝子で2カ所、薬剤の殺菌作用に大きく影響を及ぼし、親和性が低下して耐性化する *parC* 遺伝子で1カ所、計3カ所の点変異を起していたことが確認された。しかし、ジャイレースやトポイソメラーゼIVのサブユニットBをコードする *gyrB* 遺伝子および *perE* 遺伝子の変異は認められず、また膜の透過性に関しての変異も認められなかった。本症例の *S. Typhimurium* のフルオロキノロン耐性の要因は、*gyrA* 遺伝子と *parC* 遺伝子の二重変異によるもので、フルオロキノロンに対して高度耐性を示したことが確認された。このことは、市中で市販されているペットに対

して、どれだけのフルオロキノロン系抗菌薬が使用されているのかを含めた、疫学的な調査を行い、その耐性防止策を講じることが必要であると思われる。

以上のことから、同一と推定されたフルオロキノロン耐性 *S. Typhimurium* 菌株の市中における拡散が懸念され、その分離動向に注目することが必要である。

参考文献

- 1) 岡田 薫. 1999. サルモネラ. 臨床と研究 76: 63-67.
- 2) Threlfall, E. J., J. A. Frost, L. R. Ward, et al. 1996. Increasing spectrum of resistance in multiresistant *Salmonella* Typhimurium. *Lancet* 347: 1053-1054.
- 3) Glynn, M. K., C. Bopp, W. Dewitt, et al. 1998. Emergence of multidrug-resisutant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT 104 infections in the United States. *N. Eng. J. Med.* 338: 1333-1337.
- 4) Wall, P. G., E. J. Threlfall, L. R. Ward, et al. 1996. Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in cats: A public health risk. *Lancet* 348: 471.
- 5) 松下 秀, 山田澄夫, 関口恭子, 他. 1996. 東京において最近5年間(1990~1994年)に分離された国内及び輸入事例由来サルモネラの血清型と薬剤感受性. *感染症学雑誌* 70: 42-50.
- 6) 松下 秀, 小西典子, 有松真保, 他. 1999. *Salmonella* serovar Typhimurium の薬剤感受性と definitive type 104 の出現状況. *感染症学雑誌* 73: 1087-1094.
- 7) 松下 秀, 河村真保, 高橋正樹, 他. 2001. 東京において最近(1995~1999年)に分離された国内及び輸入事例由来サルモネラの血清型と薬剤耐性. *感染症学雑誌* 75: 116-123.
- 8) 松下 秀, 小西典子, 有松真保, 他. 2000. 散発事例由来サルモネラにおけるナリジクス酸耐性株の出現状況. *感染症学雑誌* 74: 345-352.
- 9) 中矢秀雄, 安原昭博, 吉村 健, 他. 2001. 乳児下痢症の便から検出したフルオロキノロン耐性 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium definitive phage type 12. *感染症学雑誌* 75: 815-818.
- 10) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 15th informational supplement CLSI/NCCLS M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA.
- 11) Kado, C. I., S. T. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365-1373.
- 12) Okazaki, M., T. Watanabe, K. Morita, et al. 1999. Molecular epidemiological investigation

- using a randomly amplified polymorphic DNA assay of *Burkholderia cepacia* isolates from nosocomial outbreaks. J. Clin. Microbiol. 37: 3809-3814.
- 13) Giraud, E., A. Brisabois, J.-L. Martel, et al. 1999. Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental *in vivo*- and *in vivo*-selected mutants of *Salmonella* spp. suggest a counterselection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 2131-2137.
- 14) Lee, L., C.R. Connell, S.L. Woo, et al. 1992. DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: Effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. Nucleic Acids Res. 20: 2471-2483.
- 15) 山岸純一, 清水 尚. 2001. キノロン系薬の分子遺伝学. 日本化学療法学会誌 49: 469-484.

Two Cases of Infantile Diarrhea Caused by Fluoroquinolone-resistant *Salmonella* Typhimurium

Ken-ichi Ogura,¹⁾ Fuyuhiko Saito,¹⁾ Koji Morita²⁾

¹⁾ Department of Clinical Laboratory, Tama-Nambu Chiiki Hospital

²⁾ Department of Microbiology, Kyorin University School of Health Sciences

Two infants, 7-year-old female and 7-month-old male, were hospitalized because of diarrhea. Stool cultures of both patients were positive for *Salmonella* Typhimurium with high-level fluoroquinolone-resistance (ciprofloxacin MIC of 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$). They were treated with fosfomycin, and recovered completely. Two *S. Typhimurium* strains, from above two cases of infantile diarrhea, had some identical features including differentiation of *S. Typhimurium* strains resistance pattern, plasmid profile, and genotype on randomly amplified polymorphic DNA-PCR. Furthermore, mutations in quinolone resistance-determining regions of GyrA (amino acids change at Ser-83 and Asp-87) and ParC (amino acid change at Ser-80) were also coserved in two *S. Typhimurium* strains. These results suggest that two infantile diarrhea patients investigated in this case study were infected with the identical clone of fluoroquinolone-resistant *S. Typhimurium*. Though a conclusive evidence of infection routes were unknown, the pet-related infections were suspected in both cases of infantile diarrhea. Extensive surveillance for fluoroquinolone-resistance *Salmonella* serovars is necessary.