

## [症 例]

既知赤痢菌血清に反応しなかった *Shigella boydii* による下痢症の1例口広智一<sup>1)</sup>・宮田佳穂里<sup>2)</sup>・河村真保<sup>3)</sup>・甲斐明美<sup>3)</sup><sup>1)</sup> 公立那賀病院 中央検査科<sup>2)</sup> 公立那賀病院 内科<sup>3)</sup> 東京都健康安全研究センター 微生物部

(平成24年7月5日受付, 平成24年9月13日受理)

*Shigella boydii* は海外旅行者下痢症の一因である赤痢菌のC群に分類されているが、本邦での分離はまれである。今回われわれは既知の赤痢菌抗血清に反応しなかった *S. boydii* による下痢症を経験した。17歳、男性、平成22年4月にインドに旅行し帰国2日後39.7度の発熱、腹痛、水様下痢を認めたため当院内科を受診した。海外旅行者下痢症を疑い便培養と血液培養を施行し Fosfomycin が処方された。便培養にてSS寒天、BTB乳糖加寒天培地上で赤痢菌を疑う乳糖非分解集落が形成された。集落の同定検査では自動機器により *Shigella group* と判定され、試験管培地での生化学的性状試験では乳糖分解能、ガス産生、運動性および酢酸塩利用能が陰性であり赤痢菌を強く疑う性状を示した。しかしすべての市販の赤痢菌抗血清に凝集を示さず菌種同定に至らなかったため精査したところ、2002年に松下らが報告した *S. boydii* の新血清型(仮称SM00-27)であることが判明した。本菌はまれな菌種であり、赤痢菌同定に不可欠な血清型別試験で反応を示さなかったため同定に苦慮した。また本菌は多剤耐性傾向にあり、ニューキノロン低感受性菌であったことから抗菌薬治療に注意が必要な菌種であると考えられた。

**Key words:** *Shigella boydii*, 海外旅行者下痢症, 細菌性赤痢, 血清型

## 序 文

*Shigella* 属による細菌性赤痢は数百個というわずかな菌量でも感染が成立し、感染症法により3類感染症に指定されている重要な感染症であり、海外旅行者下痢症の主要な病原菌である。そのうち *Shigella boydii* は赤痢菌のC群に該当し、血清型によりC1~18型に分類されている<sup>1)</sup>が、本邦での分離例は少なくまれである。赤痢菌の同定には生化学的性状試験と血清型別試験が必須であるが、赤痢菌と大腸菌は生化学的性状が近似し、同じ抗原構造を持つ菌も多数あり鑑別が難しいことがある。今回同定検査にて赤痢菌様の性状を示したものの、既知の赤痢菌抗血清に反応を示さなかったため菌種決定に苦慮した細菌性赤痢症例を経験

したので報告する。

## 症 例

患者：17歳、男性。

既往歴：特記事項なし

現病歴：平成22年4月にインドに旅行し、帰国2日後に39.7℃の発熱、腹痛、水様下痢を認め、当院内科を受診した。血液検査ではWBC 14,710/μl, CRP 2.42 mg/dlで炎症所見が見られた。海外旅行者下痢症を疑い、血液培養2セットと便培養検査を施行し、Fosfomycin (FOM)が処方された。入院を勧めたが拒否されたため、外来で経過観察となった。

## 細菌学的検査

## 1. 培養検査

血液培養は全自動血液培養装置BACTEC9050(日本ベクトン・ディッキンソン、以下日本BD)にて実施したが、2セット共に菌の発育を認めなかった。便培養はドリガルスキー改良培地Blue (BTB乳糖加寒天

著者連絡先：(〒649-6414)和歌山県紀の川市打田1282

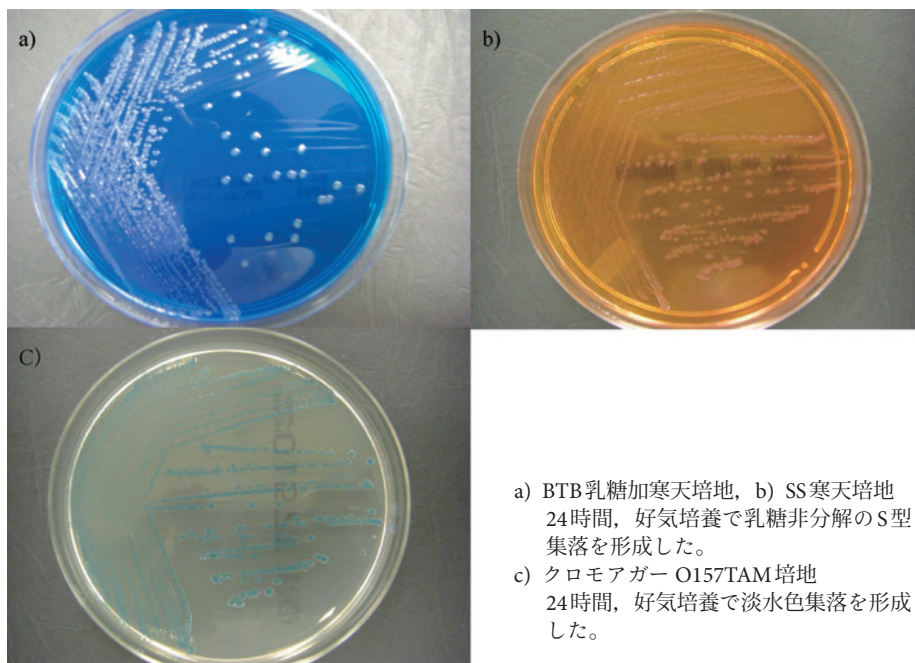
公立那賀病院 中央検査科

口広智一

TEL: 0736-77-2019 (内線1264)

FAX: 0736-77-7171

E-mail: tk\_kensa@nagahp.jp



a) BTB乳糖加寒天培地, b) SS寒天培地  
24時間, 好気培養で乳糖非分解のS型  
集落を形成した。  
c) クロモアガー O157TAM 培地  
24時間, 好気培養で淡水色集落を形成  
した。

図1. 24時間培養後の培地上の集落

培地, 以下BTB培地, 栄研化学), SS寒天培地(シスメックス), TCBS寒天培地(極東製薬工業), クロモアガー O157TAM 培地(関東化学, 以下TAM 培地)およびマンニット食塩培地(関東化学)を用いて35°Cで好気培養を, CCDA寒天培地(関東化学)にて42°Cで微好気培養を実施した。24時間後, BTB培地, SS寒天培地上に赤痢菌を疑う乳糖非分解グラム陰性桿菌のS型集落を形成した(図1 a, b)。

2. 同定検査

発育集落はVITEK2C(シスメックス)のGNカードで同定した結果, 99%の確率で *Shigella* groupであると判定されたため, 試験管培地による生化学的性状の補助同定試験をTSI寒天培地(栄研化学), OIML培地(栄研化学), シモンズクエン酸ナトリウム培地(栄研化学)および酢酸ナトリウム培地(日本BD)を用いて行った。その結果, ガス産生能, 運動性, インドール試験, クエン酸利用能および酢酸塩利用能が陰性であり, かつマンニット分解陽性, オルニチン脱炭酸試験が陰性であったことから *Shigella flexneri* または *S. boydii* を疑った(表1)。そこで赤痢菌免疫血清1号セット(デンカ生研)を用いてスライド凝集反応試験を実施したが, すべての赤痢菌抗血清に反応を示さず当院では同定には至らなかった。そのため複数の研究

表1. 生化学的性状試験の結果

Test	Reaction (days of incubation)
Oxidase	-
SI/Bt (TSI)	- / +
H <sub>2</sub> S (TSI)	-
Gas (TSI)	-
Lysine (LIM)	-
Indole production (LIM)	-
Motility (LIM)	-
Urea	-(3)
Voges	-
Proskauer, 37C	-(2)
Simmons citrate	-(3)
IPA (SIM)	-(3)
Sodium acetate	-(3)
Mannitol	+(3)
Mucate	-(4)
Lysine decarboxylase	-(3)
Arginine dihydrolase	+(3)
Ornithine decarboxylase	-(3)
Christensen citrate	-(3)
Lactose	-(6)
Dulcitol	-(6)
Sorbitol	+(2-3)
Xylose	+(5-6)
Rhamnose	-(6)

表2. 薬剤感受性検査の結果

薬剤名	MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	ディスク阻止円(mm)	判定
Ampicillin (ABPC)	2	N/A	S
Cefotaxim (CTX)	$\leq 0.03$	N/A	S
Ceftazidime (CAZ)	$\leq 1$	N/A	S
Meropenem (MEPM)	$\leq 0.06$	N/A	S
Tetracycline (TC)	N/A	6	R
Minocycline (MINO)	2	N/A	S
Streptomycin (SM)	N/A	6	R
Chloramphenicol (CP)	N/A	27	S
Nalidixic acid (NA)	N/A	6	R
Levofloxacin (LVFX)	1	N/A	S
Sulfamethoxazole/trimethoprim (ST)	$> 38/2$	N/A	R
Fosfomycin (FOM)	0.5 <sup>a)</sup>	N/A	S

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute (M100-S18)

N/A: not applicable

<sup>a)</sup> FosfomycinのみE-testにてMICを測定した。

機関にてさらなる同定検査を依頼したところ、PCR法による組織侵入性遺伝子 *invE*, *ipaH* は陽性であったが、依然血清型は不明であったため *Shigella* sp. としか判定できず菌種同定には至らなかった。そこで東京都健康安全研究センターにてさらに精査したところ、家兎を用いて作製した自家調整血清に凝集を示したため、本菌は2002年に松下らが報告し提案中<sup>2)</sup>である *S. boydii* の新血清型(仮称SM00-27)であることが判明した。

### 3. 薬剤感受性検査

薬剤感受性試験はClinical Laboratory Standards Institute (CLSI) に従いドライプレート(栄研化学)の当院オーダーパネルを用いて最小発育阻止濃度(MIC)を微量液体希釈法にてAmpicillin (ABPC), Cefotaxime (CTX), Ceftazidime (CAZ), Minocycline (MINO), Meropenem (MEPM), Sulfamethoxazole/trimethoprim (ST), Levofloxacin (LVFX)の薬剤を測定した<sup>3)</sup>。パネルに搭載されていないChloramphenicol (CP), Tetracycline (TC), Streptomycin (SM), Nalidixic acid (NA)はセンシディスク(日本BD)を用いてCLSIに従いディスク拡散法(Kirby-Bauer法)にて実施し<sup>4)</sup>、FOMのみE-test(シスメックス)を用いてMICを測定した。CLSIの判定基準<sup>5)</sup>に準じて判定した結果、本菌はTC, SM, STとNAの4剤に耐性を示した(表2)。

### 考 察

本邦における細菌性赤痢の報告は年々減少傾向にある<sup>6)</sup>。しかし、感染症法にて3類感染症に指定されていること、診断後の社会的影響が大きいこと、また二

次感染の危険性もあるため依然重要な病原菌である。主に海外旅行者下痢の原因菌ではあるが、渡航歴がない国内発生例も多数報告されており、2011年に東北地方の外食チェーン店で細菌性赤痢による集団食中毒が発生した事例のように、国内の感染者の水面下での広がりも懸念されている。細菌性赤痢の確定診断には培養検査による赤痢菌の検出が必要であるが、赤痢菌は分類学上近縁である大腸菌と性状が類似することから、鑑別困難な場合や誤同定に陥ることも散見される。また赤痢菌同定は他菌種の同定とは異なり生化学的性状試験とともに血清型別試験が必須であるため、本症例のように既知の赤痢菌抗血清に反応しない新血清型の場合同定に苦慮することとなる。逆に赤痢菌抗血清に凝集を示す大腸菌も報告<sup>7)</sup>もあるため、判定には細心の注意が必要である。

本症例では海外渡航歴ありとの情報により赤痢菌を強く疑い、通常当院で便培養に使用する培地のうちBTB培地とSS寒天培地を2枚に増やして培養を行った。これは赤痢菌が便中で死滅しやすいこと、SS寒天培地に発育不良株があること、および培地上で大腸菌など他の腸内細菌の集落に覆われて赤痢菌集落の検出が困難となる場合を考慮して当院で行っている方法である。本症例では計4枚のBTB, SS寒天培地すべてに発育していたが、筆者らは4枚中1枚のBTB培地からのみ検出できた *Shigella sonnei* の分離症例を経験している。赤痢菌やチフス菌などは特異的な選択培地がないため、これらの病原菌をなるべく逃さないよう検出感度を高める工夫が必要であると考えている。

培養では典型的な赤痢菌様の乳糖非分解集落BTB

乳糖加寒天培地, SS寒天培地に発育した。TAM培地において赤痢菌は黄白色様の集落を形成するとされてきたが, 本菌の集落は淡水色に着色して発育しており(図1c), 典型的な赤痢菌集落とは異なる色調であった。大腸菌は水色集落を形成するため, TAM培地での本菌との鑑別は極めて困難であった。TAM培地は赤痢菌分離目的の培地ではないが, 検便検査等に使用する場合には注意が必要であると思われる。

生化学性状の検査結果により赤痢菌が疑われ組織侵入性遺伝子も検出されたが, 既知の赤痢菌抗血清に反応しなかったため同定に至るまでに時間を要する結果となった。*S. boydii*の新血清型としてはE16553<sup>8)</sup>, E28938<sup>9)</sup>とSM00-27が報告, 提案されているが, 精査にてその中の一つであるSM00-27型であると判明した。SM00-27型はバングラデシュ, インド, ネパール, インドネシア, 北朝鮮から報告されており<sup>2)</sup>, アジアの広い範囲に分布しているものと考えられている。本菌の生化学的性状は, 松下らの報告によるSM00-27型の性状と一致してした。その中でSM00-27型はアルギニン遅分解の性質を持つことが報告されており<sup>2)</sup>, 後日当院にて本菌の再検査を行うと, 延長培養4日目でのアルギニン分解を確認した。この性状はSM00-27型を疑う一つの特徴となりえる可能性がある。

細菌性赤痢の治療にはニューキノロン(以下NQ)系抗菌薬とFOMが推奨されている<sup>10)</sup>が, 近年NQ耐性菌の出現とその予備群である低感受性菌の急増が報告されている<sup>11)</sup>。NQ低感受性菌はDNAジャイレースサブユニットA遺伝子(*gyrA*)上のQuinolone resistance determining regions (QRDR)に変異を起し, 感受性菌と比較して8~128倍の高いMICを示すこと, そしてオールドキノロン薬であるNAに高度耐性を示すことが知られている<sup>11, 12)</sup>。これにQRDRの変異箇所の増加やトポイソメラーゼIV ParCサブユニットの変異が加わることでNQに対し高度耐性化すると考えられている<sup>11)</sup>。松下らはNAおよびNQ感受性菌のLVFXのMICは0.016~0.032 µg/mlに分布していたと報告<sup>13)</sup>しているが, その結果と比較して本菌のLVFXのMICは1 µg/mlに上昇していたこと, そしてNAが耐性であったことからNQ低感受性菌であると判定した。このNQ低感受性菌はCLSIの判定では感受性のカテゴリーに入るため治療は有効であった可能性は高いとは思われるが, 感受性菌と比較して治療効果が低下したとの報告<sup>14)</sup>や, 治療後の再排菌や再発症例も報告<sup>15)</sup>されているため, 治療上の注意が必要である<sup>16, 17)</sup>。赤痢菌だけでなくチフス菌やサルモネラ属菌などでもNQ耐性や低感受性が問題となっているた

め, 腸管系病原菌の感受性検査にはNQ薬とNAの両方を測定することが必要である<sup>17)</sup>。本症例ではFOMが処方されており, 治療後の便からの排菌は認められなかった。

近年の本邦における赤痢菌の分離症例数の減少に伴い, 当然ながら細菌検査室における本菌の分離経験の機会も減少してきている。当院も例外ではなく赤痢菌の分離症例は十数年ぶりの機会であった。しかし, 細菌検査室には経験が少なくても確実かつ迅速に赤痢菌を分離同定できる技術と知識が当然求められている。それには自動機器による同定だけに頼るのではなく, 試験管培地での生化学的性状試験が必要不可欠である。その理由として, 赤痢菌を大腸菌や組織侵入性大腸菌と鑑別には運動性やガス産生といった自動機器では測定できない性状が重要であること, 酢酸塩利用能や粘液酸塩利用能などの二次的な生化学的性状試験が有用であることが挙げられる。特に本症例のような市販の抗血清に凝集しない場合には確定同定の遅れにつながることから, 細菌検査室でも実施可能な性状試験を用いてできる限りの判定をしておく必要がある。また遺伝子学的手法を用いても赤痢菌の鑑別が難しいことも理由の一つである。遺伝子学的には大腸菌と赤痢菌は同じ菌種であるため, 16S rRNA配列を用いた遺伝子解析では鑑別できない<sup>18)</sup>。特異性の高いDnaJ配列を用いた解析では鑑別可能である<sup>18)</sup>が, 一般的な微生物検査室での解析実施は困難であり, 仮に解析にて赤痢菌と判定されたとしても, 生化学的性状試験と血清型別試験が必須であるため菌種決定と言えないのが現状である。また新しい同定技術として注目されているMatrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)質量分析計を用いた同定機器でもこの菌種鑑別は不可能である。これらの理由から, 今後も古典的な試験管培地による生化学的性状試験は重要な細菌の同定検査技術であるため, 微生物検査技師として日頃から勉強し慣れておく必要があると思われる。

なお, 本論文の要旨は第23回日本臨床微生物学会総会(横浜, 2012年1月)において発表した。

## 文 献

- 1) Brenner, D. J. 1984. Recommendation on recent proposals for the classification of *Shigella*. Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 87-88.
- 2) 松下 秀, 河村真保, 甲斐明美, 他. 2002. 新血清型(仮称SM00-27)の*Shigella boydii*と考えられる海外旅行者下痢症例由来株について. 感染症誌76: 275-279.

- 3) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard 7th ed., Wayne, USA.
- 4) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; M45-A, CLSI, Wayne, USA.
- 5) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Eighteenth Infotmation Supplement. M100-S18, CLSI, Wayne, USA.
- 6) 国立感染症研究所. 感染症情報センター. 病原微生物検出情報. 2011. <http://idsc.nih.go.jp/iasr/index-j.html>
- 7) 正木孝幸, 江崎孝行. 2005. *Shigella boydii*との鑑別に苦慮した Enteroinvasive *Escherichia coli* の分離. 日臨微誌 15(4): 130.
- 8) Gross, R. J., L. V. Thomas, N. P. Day, et al. 1982. New provisional serovar of *Shigella boydii*: J. Clin. Microbiol. 16: 1000-1002.
- 9) Gross, R. J., L. V. Thomas, T. Cheastry, et al. 1989. Four new provisional serovar of *Shigella*: J. Clin. Microbiol. 27: 829-831.
- 10) 松下 秀. 2003. 理解して実践する感染症診療・投薬ガイド 細菌性赤痢: 総合臨牀 52(増刊号): 1219-1225.
- 11) 松下 秀, 河村真保. 2007. 感染症学各論 II. 感染症法分類 発症・病態・診断・治療. 二類感染症. 細菌性赤痢. 日本臨床 65(3): 74-77.
- 12) 内村真佐子, 岸田一則, 小岩井健司. 2001. ナリジクス酸耐性 *Shigella sonnei* の増加とその耐性機構. 感染症誌 75: 923-930.
- 13) 松下 秀. 2003. 大腸菌におけるフルオロキノロン系薬剤低感受性菌の出現. 臨床検査 47(5): 501-504.
- 14) 大仲賢二, 福山正文, 田中真由美, 他. 1998. ニューキノロン耐性赤痢菌の耐性機序の解明. 感染症誌 72: 365-70.
- 15) 阪上賀洋, 吉田英樹, 後藤哲志, 他. 2002. 大阪市西区における集団赤痢. 病原微生物情報 23(3): 62-63.
- 16) 相楽裕子. 2005. 1類, 2類, 3類感染症. p. 218-220, 抗菌薬使用のガイドライン (日本感染症学会, 日本化学療法学会編), 協和企画, 東京.
- 17) 日本臨床微生物学会検査法マニュアル作成委員会・腸管感染症検査ガイドライン委員会. 2010. 腸管感染症検査ガイドライン. 薬剤感受性検査と治療法. 腸管感染症の治療に有効な抗菌薬: 日臨微誌 20 (Suppl. 1): 99-105.
- 18) 日本臨床微生物学会検査法マニュアル作成委員会・腸管感染症検査ガイドライン委員会. 2010. 腸管感染症検査ガイドライン. 腸管感染症に有用な検査法とその役割. 下痢症の遺伝子検査. 急性下痢症の遺伝子検査. *Escherichia-Shigella*: 日臨微誌 20 (Suppl. 1): 74.

## A Case of Diarrhea Caused by *Shigella boydii* Did Not React to any Antisera of the Established *Shigella* Serovars

Tomokazu Kuchibiro<sup>1)</sup>, Kaori Miyata<sup>2)</sup>, Maho Kawamura<sup>3)</sup>, Akemi Kai<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Clinical Laboratory, Naga Municipal Hospital

<sup>2)</sup> Department of Internal Medicine, Naga Municipal Hospital

<sup>3)</sup> Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

We report a rare case of traveler's diarrhea caused by *Shigella boydii* in Japan. The patient is a 17-year-old male. He had traveled to India and was admitted to our hospital due to diarrhea, fever and abdominal pain two days after he came home. The biochemical profile of the isolate produced by a Vitek2 compact identification system from his stool was of *Shigella* group. But the organism did not react with any of the established *Shigella* serovars' antisera. The organism was further assessed and identified as new *S. boydii* serovar SM00-27 eventually at Tokyo metropolitan institute of public health. This strain was resistant to tetracycline, streptomycin, sulfamethoxazole-trimethoprim and nalidixic acid. And the strain was low level resistance to fluoroquinolone.