ナリジクス酸耐性 *Shigella sonnei* の増加とその耐性機構

千葉県衛生研究所
内村眞佐子　　岸田　一則　　小岩井健司

（平成 13 年 6 月 18 日受付）
（平成 13 年 7 月 23 日受理）

Key words：　*Shigella sonnei*, antibiotic resistance, nalidixic acid, quinolone, DNA gyrase subunit A

要　旨

千葉県で 1991 年から 2000 年の間に患者から分離された *Shigella sonnei* 114 株の薬剤感受性を調べた．薬剤耐性株は 103 株（90.4%）で，TC，SM，SXT 3 剤耐性株が 55 株（48.2%）と多くを占めた．NA 耐性株は，1993 年に 2 株（13.3%），1996 年に 2 株（25%），1998 年に 1 株（20%），1999 年に 7 株（33.3%）および 2000 年に 7 株（41.2%）分離され，増加傾向が認められた．NA 耐性の 19 株中 9 株はインド旅行者由来株で 8 株は国内発生由来株であった．PFGE による遺伝子解析により，インド由来株と国内由来株は異なるパターンを示し，別のクラスターに分類された．

DNA gyrase subunit A 遺伝子（*gyrA*）のキノロン耐性決定領域（Quinolone resistance-determining region，QRDR）を増幅し，塩基配列を調べた．その結果 11 株は Ser-83（TCG）→Leu（TTG）変異を示し，5 株は Asp-87（GAC）→Try（TAC），2 株は Asp-87（GAC）→Asn（AAC）変異を示した．さらに Ser-83 変異株は Asp-87 変異株に比べ，NA および 7 種類のニューキノロン剤に対し，わずかではあるが高い MIC 値を示した．これらの結果から，*Shigella dysenteriae* や *Shigella flexneri* におけると同様 *S. sonnei* においても，gyrA 遺伝子における変異は NA 耐性獲得に重要な役割を果たしていることが示唆された．

〔感染症誌　75：923～930，2001〕

序　文

近年我が国における赤痢患者発生数は年間 1,000 例前後で推移し，その半数以上は海外で罹患して帰国するいわゆる旅行者下痢症患者である．分離株の多くは国内発生，海外由来にかかわらず抗生物質耐性株で，特にテトラサイクリン，ストレプトマイシン，ST 合剤に耐性率が高い[1)2)]．分離菌種は *Shigella sonnei* が最も多く，赤痢菌分離数の 70% 以上を占める現状である[3)]．

我々は，*S. sonnei* の薬剤感受性の動向を知る目的で，1991 年から 2000 年の 10 年間に千葉県内の散発下痢症患者および旅行者下痢症患者から分離された株について薬剤感受性試験を行った．その結果，年ごとに多剤耐性化が進んでいる状況にあわせて，1999 年以降ナリジクス酸（NA）耐性株の分離頻度が高い傾向が認められた．これまで NA 耐性 *S. sonnei* の増加に関する報告は見られなかったが，赤痢感染症を含む腸管感染症治療の第 1 選択薬としてニューキノロン剤が推奨されている[4)5)]現在，薬剤の汎用に伴い様々な菌種でキノロン耐性菌が出現し問題となっている[6)～8)]．そこで，千葉県で分離された NA 耐性 *S. sonnei* 株について分子疫学的解析を行うと共に，NA 耐性機序を知るために，*gyrA* 遺伝子上のキノロン耐性決定

別刷請求先：（〒260-8715）千葉市中央区仁戸名町666―2
千葉県衛生研究所　　内村眞佐子

平成13年11月20日

領域（QRDR）の遺伝子変異について検討した．

材料と方法

1．使用菌株

1991年1月から2000年12月の間に千葉県で分離された*S. sonnei* 114株を用いた．由来別内訳は，散発患者，保菌者，集団感染事例患者（集団事例由来株は1事例1株とした）を含む国内事例由来株35株および海外旅行下痢症者由来株79株である．

2．薬剤感受性試験

センシディスク（BBL）を用い，使用書に従い測定を行った．アンピシリン（ABPC），テトラサイクリン（TC），ストレプトマイシン（SM），クロラムフェニコール（CP），カナマイシン（KM），ナリジクス酸（NA），スルフォメトキサゾール/トリメトプリム（SXT），フォスフォマイシン（FOM）およびセフォタキシム（CTX）の9剤について試験を行った．

3．最小発育阻止濃度（MIC）の測定

NA（Sigma），シプロフロキサシン（CPFX，バイエル薬品），エノキサシン（ENX，Sigma），ロメオフロキサシン（LFLX，Sigma），ノルフロキサシン（NFLX，Sigma），オフロキサシン（OFLX，第一製薬），スパルフロキサシン（SPFX，大日本製薬）およびトスフロキサシン（TFLX，富山化学）に対するMICは，日本化学療法学会標準法に準拠して平板希釈法で測定した．感受性分類は，米国臨床検査標準委員会（NCCLS）の好気生菌に対する希釈抗菌薬感受性試験法[9]に従った．

4．gyrA遺伝子上のキノロン耐性決定領域の塩基配列決定

S. sonnei のキノロン耐性決定領域（QRDR）の塩基配列は，PCR産物の直接シークエンス法で決定した．QRDRのPCRは，Raumanら[10]が*Shigella dysenteriae* type 1の*gyrA* QRDRの増幅に用いた20塩基のオリゴヌクレオチド，5'-TACACCGGTCAACATTGAGG-3'および5'-TTAATGATTGCCGCCGTCGG-3'をプライマーとして用い，供試菌をTryptic soy broth（Difco）で一夜培養後100℃で10分加熱した抽出液を鋳型DNAとして，94℃30秒，60℃30秒，72℃30秒のサイクルを25回行った．増幅産物をQIAquick PCR Purification Kit（50）（キアゲン）で精製し，DNA Sequencing Kit（Applied Biosystems）を用いてPCR（96℃10分後，96℃で10秒，55℃で5秒，60℃で4分を25サイクル）を行い，PCR産物をAutoSeq G-50 column（Amersham Pharmacia Biotech Inc.）で精製し，塩基配列を決定した（310 Genetic Analyzer；Applied Biosystems）．

5．パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）による解析

DNAの抽出と試料の調整は，満田ら[11]の方法に準じて行った．制限酵素（*Xba* I）で37℃，18時間処理後，CHEF-DR III（Bio-Rad）システムで，0.5 x TBEバッファー，1%アガロースゲルを用い，12℃，200V，パルスタイム5〜50秒の条件下21時間電気泳動を行った．Diversity Database（PDI）を用いてPFGEパターンを解析し，UPGMA法によりデンドログラムを作成した．

結　果

1．薬剤耐性菌出現状況

1991年から2000年の間に千葉県で分離された*S. sonnei* 114株の薬剤感受性試験結果は，感受性株が11株（9.6%），単剤耐性株が5株（4.4%），多剤耐性株が98株（86.0%）であった．薬剤別の耐性率は，SMが86.0%（98株），TCが79.0%（90株），SXTが79.0%（90株）と高率で，次いでNAが16.7%（19株），APが18株（16.0%）であった．耐性パターンは，単剤耐性から6剤耐性まで19種類に分類され，TC・SM・SXT 3剤耐性型が最も多く55株（48.2%），次いでTC・SM・SXT・NA 4剤耐性型が14株（12.3%）であった．国内感染事例由来株と旅行者下痢症患者由来株の薬剤耐性率はそれぞれ88.9%および89.9%であった．NA耐性株は，1993年に2株，1996年に2株，1998年に1株，1999年に7株，2000年に7株分離された．これらの19株は全て多剤耐性株であった（Table 1）．

2．NA耐性株の分離状況

NA耐性株の由来別内訳は，8株が国内感染事例由来で11株が旅行者下痢症患者由来であった．旅行先別分離数は，インド（およびインドとネパー

Table 1 Drug resistance patterns of *Shigella sonnei* strains isolated in Chiba prefecture. from 1991 to 2000

resistance patterns	Number of isolates										Total
	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	
sensitive	1	2	1	1		2			3	1	11
SM			1			1					2
SXT						1	1		1		3
AP, TC						1					1
TC, SM		1					1				2
SM, NA									1		1
SM, SXT	2		1						1	1	5
AP, TC, SM										1	1
AP, TC, CP						1					1
AP, SM, SXT			1								1
TC, SM, SXT	5	2	8	3	4	5	14	2	8	4	55
AP, TC, SM, CP		1				1	2		1		5
AP, TC, SM, SXT										1	1
AP, SM, CP, SXT						1					1
TC, SM, NA, SXT						2		1	4	7	14
TC, SM, SXT, FF		1	1								2
AP, TC, SM, NA, SXT			1								1
AP, TC, SM, CP, SXT								2		2	4
TC, SM, NA, SXT, FF			1								1
AP, TC, SM, KM, NA, SXT									2		2
Total	8	7	15	4	4	15	18	5	21	17	114

Table 2 Number of strains isolated from patients with traveler's diarrhea and their infected countries suspected(1991—2000, Chiba prefecture)

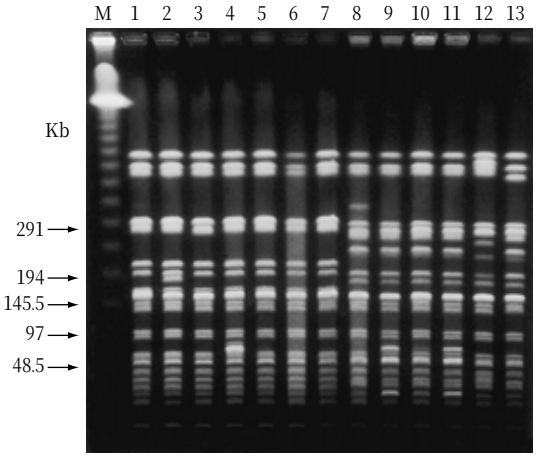
Case		Number of isolates (number of NA resistant isolates)										
	Country traveled	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	Total
Imported	India(+Nepal)	1	1	3(1)	1	2	1	4	1(1)	3(1)	6(6)	23(9)
	Thailand	4		5			3			3	1	16
	Indonesia		2		1	1	1	5	2	1	3	16
	Egypt					1		6				7
	Philippines						3			2		5
	Malaysia		1				1					2
	China						1(1)					1(1)
	Korea									1(1)		1(1)
	Other	1	2	1						2	2	8
	Total	6	6	9(1)	2	4	10(1)	15	3(1)	12(2)	12(6)	79(11)
Domestic		2	1	6(1)	2		5(1)	3	2	9(5)	5(1)	35(8)

Other(Spain: 1, Jamaica: 1, Morocco: 1, New Caledonia: 1, Maldives: 1, Tanzania: 1, Mexico: 1, Shingapore: 1)

平成13年11月20日

ル)が 9 株, 中国が 1 株, 韓国が 1 株であった(Table 2). 2000 年には, インド（およびインドとネパール）旅行者由来株 6 株すべてが NA 耐性株であった.

Fig. 1 PFGE patterns of *S. sonnei* isolated from traveler 's diarrhea cases and domestic cases
Lane, M：molecular size marker, 1 to 7：strains isolated from patients who had traveled to India, 8 to 13：strains isolated from domestic patients.



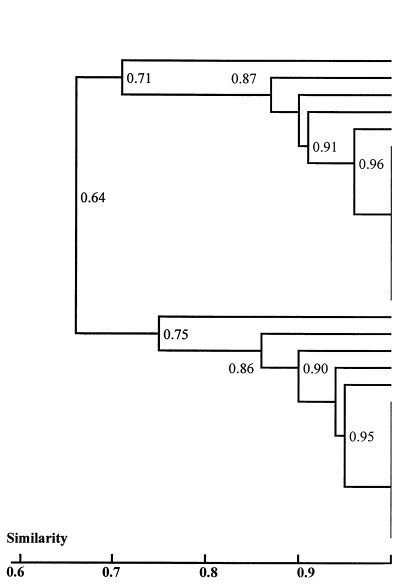
3. NA 耐性株の PFGE による疫学解析

これら NA 耐性株の類似性を知る目的で NA 耐性株 19 株を含む *S. sonnei* 39 株について PFGE を行い, 遺伝子パターンを解析した. 供試した *S. sonnei* 株の遺伝子は, 制限酵素 Xba I により 20～22 断片に切断された (Fig. 1). これらの泳動パターンから UPGMA 法により系統樹を作成したところ, 供試株は大きく 2 つのクラスターに分類された(Fig. 2). 一方のクラスターは 1993 年以降にインド旅行者から分離された株で構成され, 他方のクラスターは, 国内患者由来株, タイ, インドネシア, 中国, 韓国旅行者由来株および 1992 年以前のインド旅行者由来株で構成されていた.

4. PCR による gyrA 遺伝子 QRDR の塩基配列決定

PCR により NA 耐性 *S. sonnei* 株 gyrA 遺伝子の QRDR 領域の増幅産物を用いて, QRDR の塩基配列を決定した. 大腸菌 K-12 株および NA 感受性 *S. sonnei* 株と比較したところ, NA 耐性株の 11 株は Ser-83（TCG）→Leu（TTG), 6 株は Asp-

Fig. 2 Dendrogram outlining the clonal relationship of *S. sonnei* strains, determined by PFGE analysis of genomic DNA with *Xba* I.
*1：R：resistant, S：sensitive



Strain	Year/month isolated	Case	Country	NA sensitivity*1
CSH0001	2000.01	Domestic(sporadic)		R
CSH0003	2000.03	Domestic(sporadic)		S
CSH9318	1993.11	Domestic(outbreak)		R
CSH9966	1996.09	Imported	Korea	R
CSH9901	1999.02	Domestic(sporadic)		R
CSH96113	1996.06	Domestic(sporadic)		R
CSH9902	1999.02	Domestic(sporadic)		R
CSH9955	1999.05	Domestic(sporadic)		R
CSH9956	1999.07	Domestic(outbreak)		R
CSH9968	1999.09	Domestic(sporadic)		R
CSH96119	1996.09	Imported	China	R
CSH9979	1999.12	Imported	Thailabd	S
CSH0008	2000.04	Imported	Indonesia	S
CSH9120	1991.12	Imported	India	S
CSH9209	1992.09	Imported	India	S
CSH9964	1999.08	Imported	India	S
CSH9971	1999.10	Imported	India	R
CSH9302	1993.02	Imported	India	R
CSH9804	1998.04	Imported	India	R
CSH9506	1995.11	Imported	India	S
CSH0002	2000.02	Imported	India	R
CSH0005	2000.03	Imported	India	R
CSH0006	2000.03	Imported	India	R
CSH0009	2000.04	Imported	India	R
CSH0010	2000.05	Imported	India	R
CSH9503	1995.04	Imported	India	S
CSH96116	1996.07	Imported	India	S
CSH9705	1997.03	Imported	India	S
CSH9960	1999.07	Imported	India	S

Table 3　Mutation in quinolone resistance-determining resion of *gyrA* genes of *S. sonnei* and inferred amino acid substitution in the DNA gyrase A proteins of clinical isolates

Strain	Date isolated (mon/yr)	case	resistant pattern	codon change at position:	
				83	87
(NA Resistant)					
CSH9302	03/93	imported(India+Nepal)	A, T, S, N, Sxt	Ser(TCG)→Leu(TTG)	—
CSH96119	09/96	imported(China)	T, S, N, Sxt	Ser(TCG)→Leu(TTG)	—
CSH9804	04/98	imported(India)	T, S, N, Sxt	—	Asp(GAC)→Tyr(TAC)
CSH9966	09/99	imported(Korea)	S, Sxt	Ser(TCG)→Leu(TTG)	—
CSH9971	10/99	imported(India)	T, S, N, Sxt	—	Asp(GAC)→Tyr(TAC)
CSH0002	02/00	imported(India+Nepal)	T, S, N, Sxt	—	Asp(GAC)→Asn(AAC)
CSH0005	03/00	imported(India)	T, S, N, Sxt	—	Asp(GAC)→Tyr(TAC)
CSH0006	03/00	imported(India+Nepal)	T, S, N, Sxt	—	Asp(GAC)→Tyr(TAC)
CSH0009	04/00	imported(India)	T, S, N, Sxt	—	Asp(GAC)→Try(TAC)
CSH0010	05/00	imported(India)	T, S, N, Sxt	Ser(TCG)→Leu(TTG)	—
CSH0018	09/00	imported(India)	T, S, N, Sxt	—	Asp(GAC)→Tyr(TAC)
CSH9318	11/93	domestic(outbreak)	T, S, N, Sxt	Ser(TCG)→Leu(TTG)	—
CSH96113	06/96	domestic(sporadic)	T, S, N, Sxt	—	Asp(GAC)→Asn(AAC)
CSH9901	02/99	domestic(sporadic)	T, S, N, Sxt	Ser(TCG)→Leu(TTG)	—
CSH9902	02/99	domestic(outbreak)	T, S, N, Sxt	Ser(TCG)→Leu(TTG)	—
CSH9955	05/99	domestic(sporadic)	A, T, S, N, Sxt	Ser(TCG)→Leu(TTG)	—
CSH9968	09/99	domestic(sporadic)	A, T, S, K, N, Sxt	Ser(TCG)→Leu(TTG)	—
CSH9969	09/99	domestic(sporadic)	A, T, S, K, N, Sxt	Ser(TCG)→Leu(TTG)	—
CSH0001	01/00	domestic(sporadic)	T, S, N, Sxt	Ser(TCG)→Leu(TTG)	—
(NA Susceptible)					
CSH9979	12/99	imported(Thailand)	T, S, Sxt	—	—
CSH0003	02/00	domestic(carrier)	S, Sxt	—	—
CSH0008	04/00	imported(Indonesia)	T, S, Sxt	—	—

Table 4　MICs of eight quinilones for 24 *Shigella sonnei* strains

Location of mutation	No. of strains tested		MIC(μg/dl)							
			NA	CPFX	ENX	LFLX	NFLX	OFLX	SPFX	TFLX
		Range	50—100	0.1—0.2	1.56—3.2	0.78—1.56	0.39—0.78	0.39—1.56	0.1—0.2	0.1—0.39
Ser-83	11	50%	100	0.2	1.56	1.56	0.78	0.78	0.2	0.2
		90%	100	0.2	3.2	1.56	0.78	0.78	0.2	0.39
		Range	50	＜0.05—0.1	0.78—1.56	0.39—0.78	0.2—0.39	0.2—0.39	0.1—0.2	0.1—0.2
Asp-87	8	50%	50	0.1	1.56	0.78	0.39	0.39	0.1	0.2
		90%	50	0.1	1.56	0.78	0.39	0.39	0.2	0.2
		Range	＜3.2	＜0.05	0.1	0.1	＜0.05	＜0.05	＜0.05	＜0.05
None	5	50%	＜3.2	＜0.05	0.1	0.1	＜0.05	＜0.05	＜0.05	＜0.05
		90%	＜3.2	＜0.05	0.1	0.1	＜0.05	＜0.05	＜0.05	＜0.05

87（GAC）→Try（TAC），2株はAsp-87（GAC）→Asn（AAC）遺伝子変異が認められた（Table 3）.

5．NA耐性株のニューキノロン剤感受性

NA耐性株および感受性株のニューキノロン剤に対するMICを測定した．ディスク法でNA感受性と評価された*S. sonnei*株に対するMICは，NAが3.2μg/ml以下，ニューキノロン剤が0.1μg/mlあるいは0.5μg/ml以下であった．一方NA耐性株に対するMICは，NAが50～100μg/ml

平成13年11月20日

で中等度耐性を示したが，CPFX が 1 株（0.05μg/ml 以下）を除き 0.1～0.2μg/ml，ENX が 0.78～3.2μg/ml，LFLX が 0.39～1.56μg/ml，NFLX が 0.2～0.78μg/ml，OFLX が 0.2～1.56μg/ml，SPFX が 0.1～0.2μg/ml，TFLX が 0.1～0.39μg/ml に 分布し，1 株を除き他は全て 0.1μg/ml 以上の低感受性株であった．また，Ser-83 変異株は Asp-87 変異株に比べ，わずかであるが高い MIC 値を示した（Table 4）．

考　察

わが国における細菌性赤痢患者数は減少傾向で推移していたが，1998 年には集団感染事例の多発により増加した[3]．千葉県においても，1999 年に NA 耐性 *S. sonnei* による集団感染事例が発生した[12]． *S. sonnei* は国内で分離される赤痢菌の多くを占め，その 70～90% が TC，SM，SXT に耐性を示し，ABPC，CP 耐性株も認められるが NA 耐性株の分離は 1～2% とごく僅かであると報告されている[1)2)]．確かに千葉県においても，1991～1998 年の 8 年間に分離された 76 株の *S. sonnei* のうち NA 耐性株は 5 株（6.6%）で，特に増加傾向は認められなかった．しかし，1999 年に分離された 21 株中集団感染事例由来の 1 株を含む 7 株（58.3%），および 2000 年に分離された 17 株中 7 株（41.2%）が NA 耐性を示し，この 2 年間に NA 耐性菌の急激な増加が認められた．

S. sonnei は旅行者下痢症いわゆる輸入感染症の主な原因菌である．千葉県で 1991 から 2000 年の間に *S. sonnei* が分離された患者の主な旅行先はインド（あるいはインドとネパール），タイ，インドネシア等であった．しかし NA 耐性株はインド（あるいはインドとネパール）旅行者由来株にのみ認められ，タイおよびインドネシア旅行者由来株にはまったく認められず，現時点における NA 耐性 *S. sonnei* の分布には地域による偏りがみられた．Vila ら[7)]は旅行者下痢症患者から分離した毒素原性大腸菌を検討し，NA 耐性株の多くがインド旅行者由来であったと報告している．インドでは以前から，赤痢感染症の第 1 選択剤として NA が用いられていることから，赤痢菌に限らず大腸菌を含む多くの下痢原因菌がキノロン剤に耐性あるいは低感受性になっていることが考えられる．一方，1999 年には国内患者由来の多くが NA 耐性を示した．PFGE による遺伝子解析の結果，国内患者分離株がインド旅行者由来株とは異なるクラスターに分類されたことから，1999 年の国内患者由来における NA 耐性株の増加は，海外から持ち込まれた菌による影響ではなく，国内においても薬剤の多用等により，NA 耐性菌が増加する傾向にあることを示唆するものであろう．

キノロン剤は，菌の DNA 複製に関与する酵素 DNA gyrase の阻害剤として作用し，キノロン剤耐性化の原因として，DNA gyrase の変異や能動排出機構の関与が明らかにされている．腸内細菌を含む多くのキノロン剤耐性菌では，DNA gyrase 遺伝子上のキノロン耐性決定領域（QRDR）の遺伝子変異によるアミノ酸置換（Ser-83 および Asp-87）が報告されている[13)14)]．一方キノロン剤の MIC 値が高い *Shigella flexneri* 株で，DNA gyrase 変異に加えて能動排出機構の関与が報告され[15)]，また *S. dysenteriae* においては DNA gyrase 遺伝子変異が見られないキノロン剤耐性株で能動排出機構の関与が報告されている[16)]． *S. sonnei* のキノロン剤低感受性株を用いた実験で Horiuchi ら[17)]は，キノロン剤の菌体内蓄積量は感受性株と差が認められないことを明らかにし，DNA gyrase サブユニット A 遺伝子変異が低感受性化機構に関与している可能性を示唆したものの，その後詳細な検討はなされていなかった．本報で我々は，NA 耐性 *S. sonnei* 株では，Ser-83→Leu，Asp-87→Tyr，あるいは Asp-87→Asn のアミノ酸置換が見られることを明らかにし，*S. sonnei* のキノロン剤耐性機構の一つとして，DNA gyrase の QRDR 遺伝子変異が関与していることを示した．

今回検討を行った NA 耐性 *S. sonnei* 19 株のニューキノロン剤に対する MIC 値は 0.05μg/ml から 3.2μg/ml に分布した．ニューキノロン剤低感受性 *S. sonnei* 感染患者にニューキノロン剤を投与した結果，感受性株感染患者に比べ除菌効果が低かったことが報告されている[15)]．また，ニューキノロン剤耐性 *S. flexneri* 2a 感染患者に対する投与は除菌効果がないばかりか，菌のニューキノロ

ン剤に対する MIC 値を高める結果となった[17]とも報告されている．現在我が国において，ニューキノロン剤は小児および成人の腸管感染症の第1選択剤として使用されているが，キノロン剤耐性菌の出現状況について注意すると共に，治療薬の選択に当たっては，海外旅行の有無や旅行先などの情報を参考にすることも必要であると考える．

本論文の要旨は第75回日本感染症学会総会で発表した．

文　献

1）松下　秀，小西典子，柳川義勢，甲斐明美，諸角聖，五十嵐英夫，他：近年分離された *Shigella sonnei* について．感染症誌　1999；73：414—9.

2）上田泰史，鈴木則彦，古川徹也，竹垣友香子，高橋直樹，宮城和文：海外旅行者下痢症の細菌学的研究(6)1994～1996年の関西空港における下痢症原因菌検索成績．感染症誌　1999；73：110—20.

3）国立感染症研究所.〈特集〉細菌性赤痢1996～1998.病原微生物検出情報　1999；20：58—9.

4）小花光男，入交昭一郎．腸管（胆道）感染症1）起炎菌の変貌．細菌感染の変貌と化学療法，松本慶蔵編，p215—232.

5）石川　周，真下啓二，品川長夫：腸管（胆道）感染症2)治療．細菌感染の変貌と化学療法，松本慶蔵編，p235—247.

6）Chu YW, Housang ETS, Lyon DJ, Ling JM, Ng TK, Cheng AFB：Antimicrobial resistance in *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* in Hong Kong, 1986 to 1995. Antimicrob. Agents Chemother 1998；42：440—3.

7）Vila J, Vargas M, Ruiz J, Corachan M, Anta MTJ, Gascon J：Quinolone resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* causing diarrhea in travelers to India in comparison with other geographical areas. Antimicrob. Agents Chemother 2000；44：1731—3.

8）Corre CHL, Donnio PY, Perrin M, Travert MF, Avril JL：Increasing incidence and comparison of nalidixic acid-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium isolates from humans and animals. J Clin Microbiol 1999；37：266—9.

9）National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 2 nd ed. Approved standard M7-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. 1990.

10）Rahman M, Mauff G, Levy J, Couturier M, Pulverer G, Glasdortf N, Butzler JP：Detection of 4-quinolone resistance mutation in *gyrA* gene of *Shigella dysenteriae* 1 by PCR. Antimicrob. Agents Chemother 1994；38：2488—91.

11）満田年宏，荒井一二，川本　進，横田俊平：パルスフィールドゲル電気泳動法による感染症の分子疫学的解析．日細菌誌　1995；50：1077—86.

12）木内哲也，加瀬恭子，安藤由記男，松永敏子，井上孝夫，内村眞佐子，他：千葉県市川市の福祉施設で発生した *Shigella sonnei* による集団事例について．千葉衛研報告　1999；23：11—4.

13）Weigel LM, Steward CD, Tenover FC：*gyrA* Mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. Antimicrob. Agents Chemother 1998；42：2661—7.

14）Heisig P, Schedlrtzky H, Falkenstein-Paul H：Mutations in the *gyrA* gene of a highly fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother 1993；37：696—701.

15）大仲賢二，福山正文，田中眞由美，佐藤謙一，大西健児，安島　勇，他：ニューキノロン耐性赤痢菌の耐性機序の解明．感染症誌　1998；72：365—70.

16）Ahmed J, Gangopadhyay J, Kundu M：Mechanisms of quinolone resistance in clinical isolates of *Shigella dysenteriae*. Antimicrob. Agents Chemother 1999；43：2333—4.

17）Horiuchi S, Inagaki Y, Yamamoto N, Okamura N, Imagawa Y, Nakaya R：Reduced susceptibilities of *Shigella sonnei* strains isolated from patients with dysentery to fluoroquinolones. Antimicrob. Agents Chemother 1993；37：2486—9.

平成13年11月20日

Increasing Incidence and the Mechanism of Resistance of Nalidixic Acid Resistant *Shigella sonnei*

Masako UCHIMURA, Kazunori KISHIDA & Kenji KOIWAI
Public Health Laboratory of Chiba Prefecture

One hundred and fourteen *Shigella sonnei* strains obtained in 1991 to 2000 were tested for their susceptibilities to 12 antimicrobial agents. Nalidixic acid（NA）resistance was found in 2 of 15 strains（13.3%）in 1993, 2 of 8 strains（25%）in 1996, one of 5 strains（20%）in 1998, 7 of 21 strains（33.3%）in 1999 and 6 of 12 strains（50%）in 2000. The incidence of resistance to NA in *S. sonnei* strains increased significantly during this period. Among those 19 NA resistant strains, 11 strains were derived from patients with traveler 's diarrhea and 8 strains were derived from patients who had not traveled abroad before the infection, namely domestic patients. PFGE analysis with *Xba* I revealed that all strains tested differentiated into two major clonal clusters, one cluster consisted of strains derived from patients who had traveled to India after 1993, and another cluster included strains derived from domestic patients.

Mechanism of NA resistance was examined by sequencing the quinolone resistance-determining region（QRDR）of *gyrA* gene. Among 19 NA resistant strains tested, 11 strains presented a change at Ser-83 to Leu and 7 strains presented a change at Asp-87 to Try（5 strains）or Asn（2 strains）, whereas 3 NA sensitive strains had no change in the region. These findings indicated that this mutation in *gyrA* plays an important role in acquisition of Nalidixic-acid resistance in clinical isolates of *S. sonnei*.