

## 多摩川は ESBL 産生大腸菌株のリザーバーになっている

◎嶋田 彩里、野村 莉咲、橋口 果、戸口 明宏<sup>1)</sup>、大塚 喜人<sup>1)</sup>、花尾 麻美<sup>2)</sup>、岡崎 充宏<sup>2)</sup>  
医療法人 鉄蕉会 亀田総合病院<sup>1)</sup>、東京工科大学<sup>2)</sup>

【目的】本研究では、自然環境の都市河川における薬剤耐性菌の汚染状況を調査することを目的とし、ESBL 産生大腸菌を対象に分離頻度の調査、薬剤感受性検査及び ESBL 遺伝子型の解析を行ったので報告する。【材料および方法】検体採取及び処理は、2018 年 5 月に多摩川中流域の河川水（表層から 30cm の流水）を採水し、M-FC 法（100mL を処理）によりクロモアガー ECC 寒天培地（関東化学）及びクロモアガー ESBL 寒天培地（関東化学）を用いて対象菌を分離した。上記 2 種類の寒天培地に発育した大腸菌疑いの分離菌株の菌種同定は、従来法による確認培地、NC-EN2T パネル（ベックマン・コールター）及びマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法（Bruker）を用いた。ESBL 産生確認試験は、CLSI に準拠したディスク拡散法及び NC-EN2T パネルを用い、ESBL 遺伝子型の解析はシカジーニアス®ESBL 遺伝子型検出キット（関東化学）を用いた。【結果】検出された大腸菌の総分離菌株数は 128 菌株/10mL（100mL の換算

値は 1280 菌株）であり、そのうち ESBL 産生菌株は 52 菌株/1280 菌株（約 4%）であった。薬剤感受性検査は、MEPM、CMZ 及び FMOX では 52 株(100%)が感性であったが、ほかのセフェム系抗菌薬及び LVFX では、それぞれ 52 株(100%)及び 37 株(73%)が非感性であった。もっとも高頻度であった型は CTX-M-9 が 20 株（38.5%）であり、次いで CTX-M-1 が 11 株（21.2%）、TEM 型+CTX-M-9 が 9 株（17.3%）及び TEM 型+CTX-M-1 が 8 株（15.4%）であった。【考察】今回、われわれは多摩川中流域の河川水の表層水における ESBL 産生大腸菌株による汚染を確認した。また、これらの分離菌株の ESBL 遺伝子型において CTX-M-9 群が優位であったことは医療関連感染で問題となっている菌型と一致する結果であった。以上のことから、多摩川は ESBL 産生大腸菌株のリザーバーとなっていることが考えられ、継続的な挙動の監視が必要であると考えられた。（共同研究者：藤本瑞穂，本多 望）連絡先：岡崎充宏 03-6424-2228

## 都市河川流水における毒素産生性 *Clostridium difficile* 株の汚染状況の調査報告

◎須田 育未、山本 乃絵瑠、丹澤 千恵、佐野 友紀、満島 尚平、花尾 麻美<sup>1)</sup>、岡崎 充宏<sup>1)</sup>  
東京工科大学<sup>1)</sup>

【目的】*Clostridium difficile*による抗菌薬関連下痢症および偽膜性腸炎は、医療関連感染症の重要な疾患として認識されている。一方で近年、抗菌薬使用歴のない市中型感染症の患者が報告されており、自然環境や動物を介したヒトへの伝播が危惧されている。しかし、その病因学特徴や感染経路など不明な点が多い。今回、我々は、自然環境における存在状況を明らかにするため、都市河川水からの分離を試み、分離菌株の細菌学的特徴の解析を行った。【材料および方法】供試水と処理方法は、多摩川中流域の河川水（表層水）を採水し、100mLをM-FC法により処理後、その集菌したフィルターをCCMA寒天培地EX（日水製薬）上に置き、分離培養（嫌気培養、35℃、48時間）を行った。本培地に発育した集落をポアメディア羊血液寒天培地M58（BA、栄研化学）に純粋培養後、偏性嫌気性および有芽胞のグラム陽性桿菌であることを確認した。分離菌株の菌種同定、毒素型および菌株型別は、シカジーニクス®分子疫学解析POTキット（*C. difficile*用）

（POT法、関東化学）を用いて遺伝子検査を行った。【結果】CCMA寒天培地EXに発育した集落は48株であった。これらのすべての分離菌株は、POT法により*C. difficile*と同定され、河川水における存在が明らかとなった。各種毒素型はtoxinA<sup>+</sup>toxinB<sup>+</sup>が27株（56.3%）、toxinA<sup>-</sup>toxinB<sup>+</sup>が2株（4.2%）およびtoxinA<sup>-</sup>toxinB<sup>-</sup>が18株（37.5%）であり、毒素関連遺伝子を保有する菌株の方が優位であった。また、binary toxin産生遺伝子陽性株が1株（2.1%）認められ、POT法による型別と既知のリボタイプとの照合により、本菌株は強毒型の可能性のあるリボタイプ078と一致した。【考察】本河川において毒素産生株が優位に存在していることを明らかにしたことは、臨床由来株の毒素産生株の優位性を支持するとともに、本河川が本菌のリザーバとなっていることを示唆した。しかし、これらの菌株がヒト由来なのか否か不明であり、今後、ヒトと自然環境との循環について明らかにしていきたい。（連絡先：岡崎充宏 03-6424-2228）

## MinIONを用いた革新的ストレプトコッカク属の鑑別法の確立

©根本莉奈<sup>1)</sup>、今井一男<sup>2)</sup>、小棚雅寛<sup>3)</sup>、河村亨<sup>3)</sup>、樽本憲人<sup>2)</sup>、前田卓哉<sup>4)</sup>、村上孝<sup>4)</sup>、前崎繁文<sup>2)</sup>  
埼玉医科大学 保健医療学部 四年<sup>1)</sup>、埼玉医科大学 医学部 感染症科・感染制御科<sup>2)</sup>、埼玉医科大学病院 中央検査部<sup>3)</sup>、埼玉医科大学 医学部 微生物学<sup>4)</sup>

*Streptococcus* 属はヒトに様々な疾患を引き起こす細菌種を含み、より簡便かつ迅速な同定法の確立が求められている。しかしながら、*S. pneumoniae* および *S. mitis* には表現型による鑑別が困難な菌株が存在し、菌種間の塩基配列の相同性も高いため、正確な鑑別には MLST のほか特定遺伝子のシーケンス解析が必要な場合がある。次世代型ポータブル・シーケンサーである MinION はリアルタイムにシーケンス情報を解析し、様々な感染症の迅速診断への応用が試みられている。今回、我々は MinION を用いた *S. pneumoniae* / *S. mitis* 鑑別システムの構築を試みた。

方法) MLST により、*S. pneumoniae* と同定された 4 株、および *S. mitis* と同定された 7 株、ならびに *Streptococcus sp.* と同定された 1 株を用いて検証した。さらに、ナショナルバイオリソースより譲渡を受けた *S. pneumoniae*, *S. mitis* および *S. oralis* の Type strain もあわせて解析に用いた。ゲノム DNA の抽出後、Rapid barcoding kit (Oxford Nanopore Technologies; ONT, UK) を用いてバーコード付加及びライブラリー調整を行った。これらのライブラリーを MinION ID

sequence protocol 用いて、最大 12 株を同時に multiplex にシーケンスし、得られたシーケンスデータは EPI2ME Barcoding/WIMP (what is in my pot)を用いて解析した。WIMP を用いて得られた菌種のうち、マッピングリードの最も多い菌種をコンセンサス菌種とし、菌種同定の可能性を検討した。

結果) MinION によるシーケンス開始から 24 時間後に得られたリードを解析に用いた。demultiplexing 後に各検体平均 18,893 リードを入手できた。WIMP による解析の結果、Type strain を含むすべての検体で、それぞれのコンセンサス菌種として正確に同定することができた。

考察) MinION を用いた多検体ゲノム解析により、*S. pneumoniae* / *S. mitis* を正確に同定することが可能であった。得られたシーケンスデータを追加解析することで、薬剤耐性情報や系統樹解析も可能であり、今後の臨床への応用が期待できる。

連絡先 前田卓哉 049-276-1166

## MinION による病原微生物同定能の検討—血液培養陽性検体を用いた解析—

©蘆川 彩瑛<sup>1)</sup>、小棚 雅寛<sup>2)</sup>、酒井 純<sup>3)</sup>、樽本 憲人<sup>3)</sup>、今井 一男<sup>3)</sup>、河村 亨<sup>2)</sup>、前田 卓哉<sup>4)</sup>、前崎 繁文<sup>3)</sup>  
埼玉医科大学保健医療学部 4 年<sup>1)</sup>、埼玉医科大学病院 中央検査部<sup>2)</sup>、埼玉医科大学 医学部 感染症科・感染制御科<sup>3)</sup>、埼玉医科大学 医学部 微生物学<sup>4)</sup>

本研究では、新たにリリースされた 1D2 chemistry を使用し、ナノポア型ポータブルシーケンサー MinION を用いた amplicon sequence による血液培養陽性ボトルの菌種同定能を検証した。細菌および真菌の同定を可能にするために、16S rRNA ならびに ITS1-5.8S-ITS2 rRNA を標的とする PCR 法を行ない、シーケンスに供した。さらに、検査コストの削減を狙い、各 PCR プライマーには特異的バーコード配列を付加させ、その増幅産物の Multiple sequencing とした。なお、解析には 10 分と 48 時間のシーケンスで得られた fastq データを使用し、サンガー法によるシーケンス結果と比較することで、1D2 chemistry により決定した contig 配列の正確性を評価し、臨床検査への応用の可能性を検証した。

方法) 当院細菌検査室に提出された血液培養検体のうち、培養結果が陽性で、MALDI/TOF MS による菌種同定された血液培養陽性の残余検体計 9 検体を使用した。さらに、5 種類の *Candida* 属を含む 11 菌種の Type strain をナショナルバイオリソースより入手し、その抽出 DNA も合わせて

解析に用いた。DNA の抽出はビーズ破碎により実施し、16S-rRNA ならびに ITS1-5.8S-ITS2 遺伝子の増幅後に、最大 12 検体を用いて MinION による Multiplex sequencing を実施した。

結果) 10 分と 48 時間のシーケンス・データともに、すべての菌種において MALDI/TOF MS による同定結果と一致した。さらに、サンガー法によるシーケンスと 98.3~99.8% で一致しており、いずれも菌種判定には影響を及ぼさなかった。

考察) 本方法は、短時間で多検体の同時処理・解析も可能であり、大型の機材を使用せずに実施できる検査であることから、新たな検査法として、今後の臨床応用が期待できる。

連絡先 前田卓哉 049-276-1166