

● 2-メルカプトプロピオン酸法：

被検菌を NCCLS 法に従い、MN 寒天培地に塗布した後、2 枚の CAZdisk を 4～5 cm 離して置き、その一方に近接（2 cm 程度）して空のろ紙片を置く。そのろ紙片に、2-メルカプトプロピオン酸の原液を 2～3 μ l しみ込ませ、一夜培養する。

翌日、2-メルカプトプロピオン酸を添加したろ紙片の近傍の CAZ-disk の周囲の発育阻止帯の形状を観察し、メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌か否かを判定する（図 3）。

● PCR 法： IMP-1 メタロ- β -ラクタマーゼ検出用プライマーセット

5'-ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC-3'

5'-ACAACCAGTTTTGCCTTACC-3'

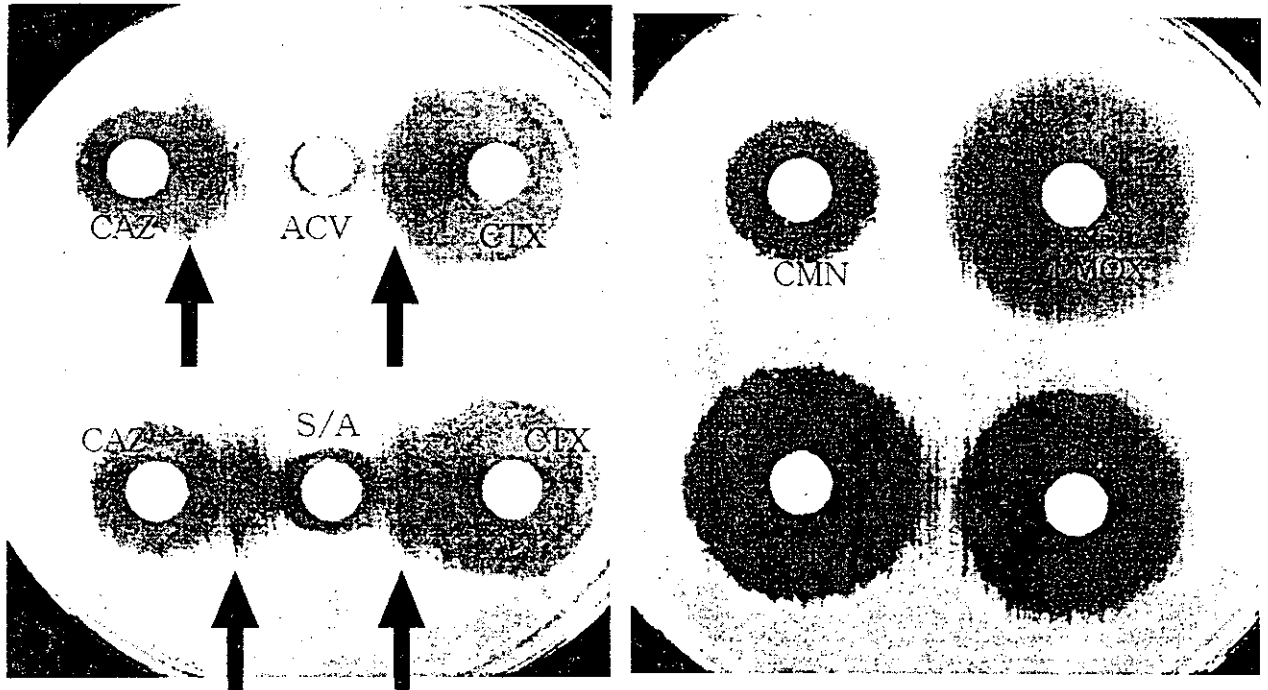
PCR 結果の例を図 4 に示す。

*PCR の条件

テンプレート DNA の抽出は boiling 法を用いる。

- ① 94℃ 2分
- ② 94℃ 1分 → 55℃ 1分 → 72℃ 1.5分 (30 サイクル)
- ③ 70℃ 5分
- ④ 4℃ (保存)

図1. 阻害剤の影響

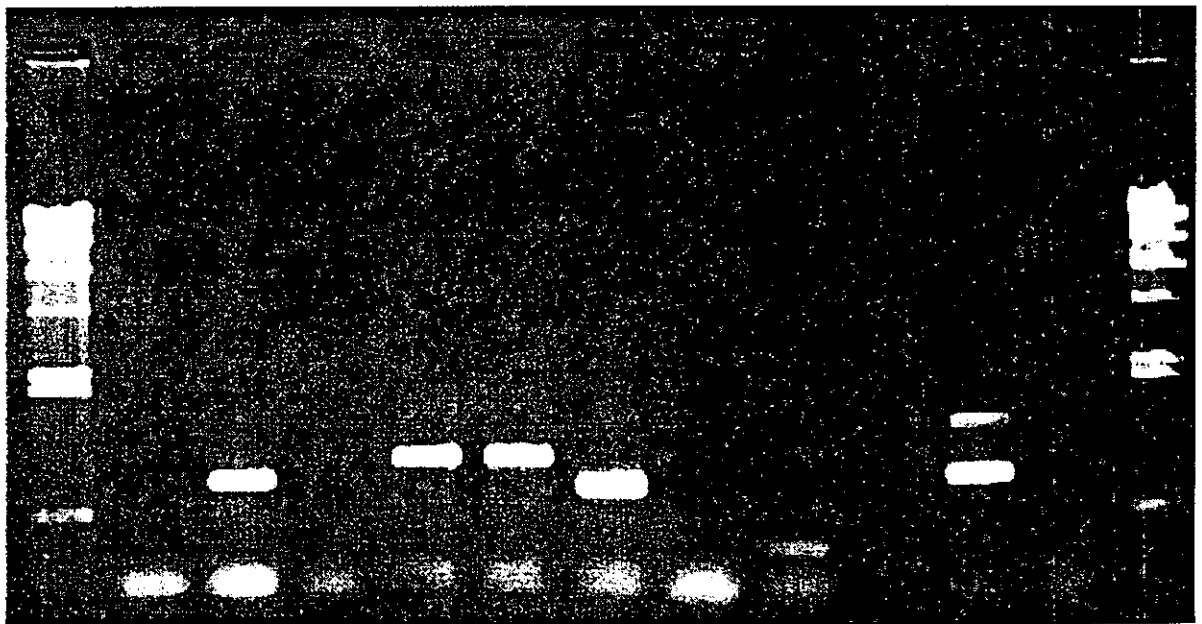


阻害剤による発育阻止帯の拡張

(クラスA β -ラクタマーゼの特徴を示しています。)

図2. PCR結果

TEM		SHV		Toho-1		MEN-1		RbiA		
NC	PC	被検株	PC	被検株	PC	被検株	PC	被検株	PC	被検株

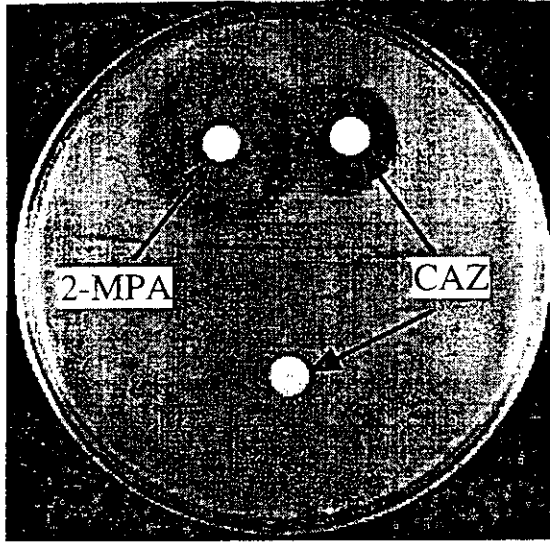


↑
SVH-特異的プライマーで陽性結果が得られた。

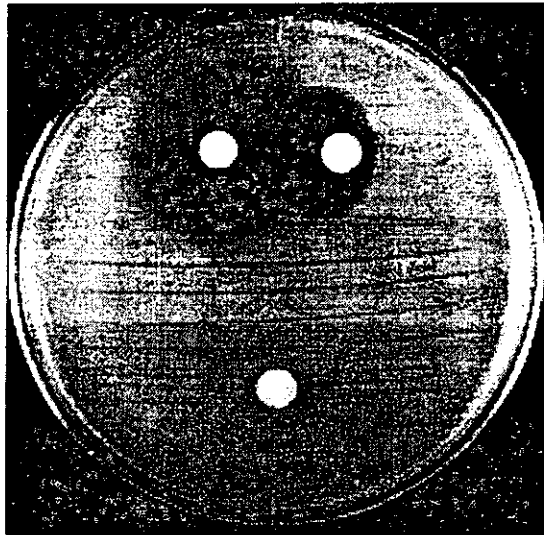
☒3. Inhibitory effect of 2-mercaptopropionic acid (2-MPA) on IMP-1 producers and non-IMP-1 producers.

IMP-1 producers

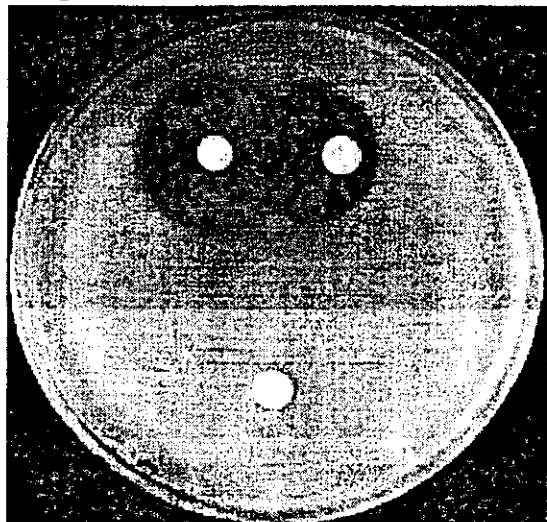
P. aeruginosa [IMP-1]



S. marcescens [IMP-1]

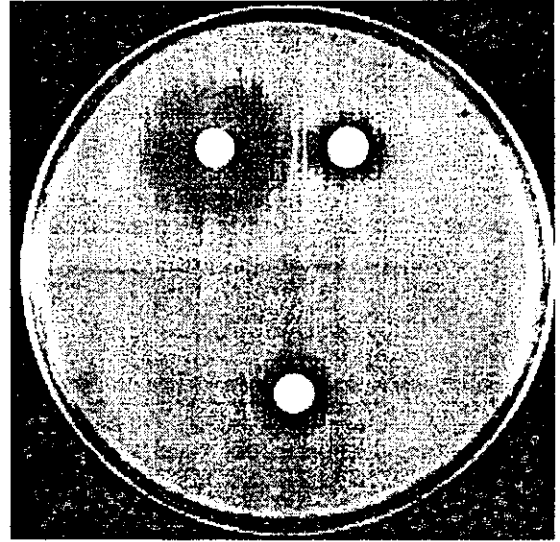


K. pneumoniae [IMP-1]

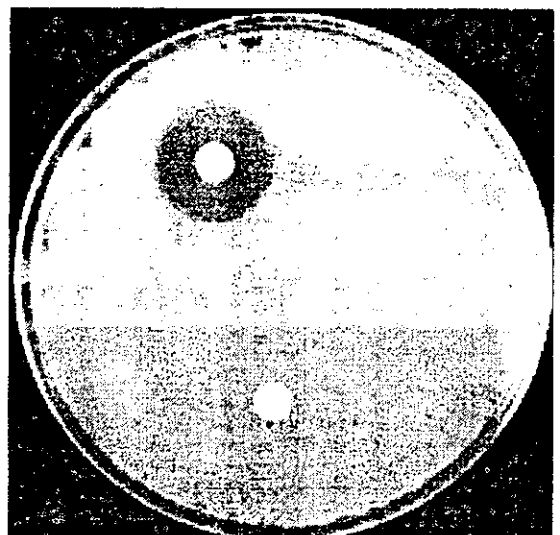


non-IMP-1 producers

P. aeruginosa [AmpC]



S. marcescens [AmpC]



K. pneumoniae [SHV-12]

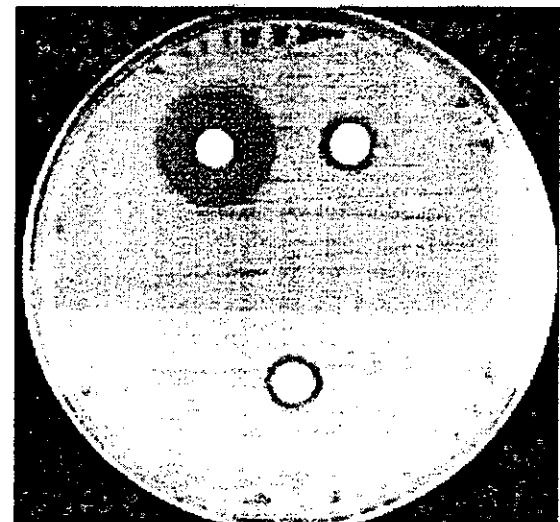
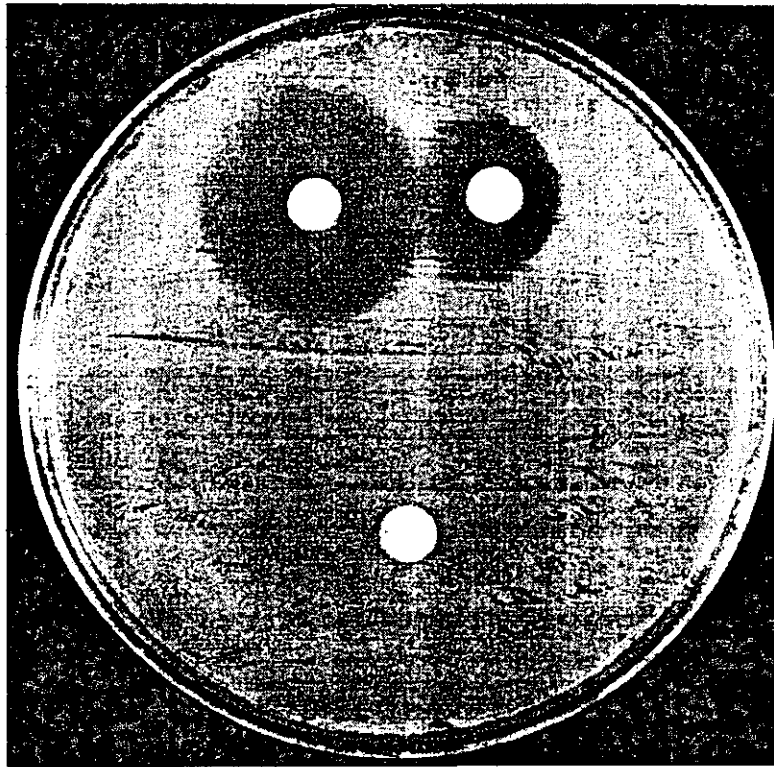
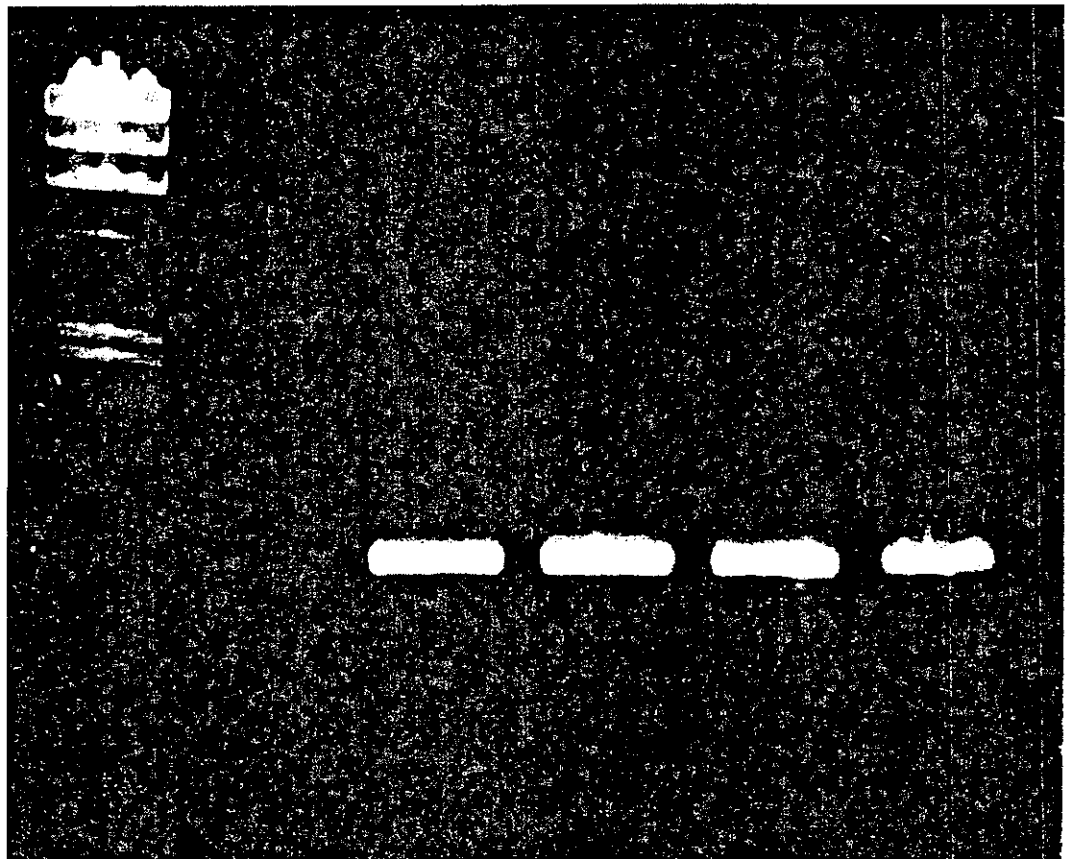


図4. メタロ- β -ラクタマーゼを産生する緑膿菌の例
 2-メルカプトプロピオン酸による阻害試験



PCR結果

PCR結果	被 検 株			陽性株
	陰性株	株 1	株 2	



II-9

糞便等検査材料よりの VRE の選択分離

群馬大学医学部微生物学教室

同 薬剤耐性菌実験施設

池 廉嘉

検査材料を直接分離用培地に塗布してもほとんどの場合 VRE を分離することは困難で、あらかじめ選択的に増菌させておく必要がある。

- 1) 検査試料をバンコマイシン 4 μ g/ml を含む Bile esculine azide agar (Difco) より調整した液体培地（あるいは Enterococcosel broth (BBL)）に接種し 37°C で一晚培養する。
- 2) 培養液 100 μ l をバンコマイシン 4 μ g/ml を含む分離用培地に塗布する。（分離用培地として Bile esculine azide agar (Difco)、EF 寒天培地（日水）、Enterococcosel agar (BBL)、等がある。）37°C で一晚ないし二晩培養する。
- 3) Bile esculin azide agar あるいは Enterococcosel agar を用いた時には直径 0.5~1.5mm 程度の黒又は黒灰色のコロニー、EF 培地を用いた時には海老茶色 (*E. faecalis*)、黄色 (*E. faecium*) のコロニーをバンコマイシン耐性腸球菌として推定し、純粋培養を行い菌の同定と薬剤耐性検査を行う。バンコマイシンを含む腸球菌分離用培地には、VRE、*Pediococcus*、*Leuconostoc* が生育するが、VRE は比較的コロニーが大きく液体培地での生育も良い。

E. faecalis や *E. faecium* が多いが、*E. gallinarum*、*E. casseliflavus* 等も少数分離される。通常分離・同定検査の過程では、生来 VCM 耐性である菌種 (*Pediococcus*、*Lactobacillus* など) を、VRE と誤同定する可能性もあり、同定検査の精度管理にも留意する必要があります。

【実習】

1. (時間の都合上) 上記の step2 まで行った平板を配布しますのでそこから VRE らしきコロニーをバンコマイシンを含む分離用培地に単集落分離を行う。
2. 37°C で一晚培養を行う。

ディスク法による *van* 遺伝子型の簡易推定法 (国立感染研ホームページより抜粋) 臨床分離された VRE が *vanA*、*vanB*、*vanC* のどの型の *van* 遺伝子を保有するかを PCR 法により判定する前に、既存のディスク法によりその型別を概ね推定することができます。

- 1) *vanA* タイプは、バンコマイシンとテイコプラニンの双方のディスクの周囲に阻止円がほとんど形成されません。
- 2) *vanB* タイプはテイコプラニンのディスクの周辺に明瞭な阻止円が形成されるもの

のバンコマイシンのディスクの周囲には 10 mm 以下の径の阻止円が形成されるか、あるいは阻止円がほとんど形成されない。

- 3) *vanC* タイプの VRE (*E. gallinarum* など) は双方のディスクの周囲に、明瞭な阻止円が形成され、バンコマイシンのディスクの周囲の阻止円径の測定から「判定保留」となる場合があります。

バンコマイシン感受性の腸球菌は双方のディスクの周囲に、明瞭な大き目の阻止円が形成され径の測定により「感受性」と判定されます。

【実習】

1. 与えられた平板 (3つのタイプのうちのいずれかの VRE が生育している。) からコロニーをミューラー・ヒントン培地に塗布し、そこにバンコマイシンとテイコブラニンの感受性試験用ディスクをおく。
2. 37°C で一夜培養の後、阻止円形成のパターンにてバンコマイシン耐性の型別の判定を行う。

パルスフィールドゲル電気泳動法を用いたMRSAの型別法

名古屋大学医学部附属病院 検査部

飯沼由嗣、奈田俊

はじめに

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (*Methicillin resistant Staphylococcus aureus*: MRSA) は、今や入院患者の臨床材料から分離される黄色ブドウ球菌の70%以上を占めるようになり院内に広く分布している。MRSA感染症は外科手術後や重篤な基礎疾患を有する患者、高齢者、新生児、カテーテルを留置している患者に発症する頻度が高く、MRSAは院内感染の主要原因菌となっている。院内感染の疫学調査において、感染源、感染経路を解明することは重要である。そのためにA患者からのMRSAとB患者からのMRSAは同一株であるか否かの鑑別、または同一菌の院内への拡がりを知るための方法として、パルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed Field Gel Electrophoresis: PFGE法) による泳動パターンを比較する方法が最も優れ、広く利用されている。

MRSA の検出

PFGE型別を行う前に、MRSAは正しく同定され、純培養の菌であることを確認する必要がある。MRSAは黄色ブドウ球菌の突然変異したものであり、ペニシリン結合蛋白 (PBP) 1~4のうちPBP2に代わるPBP2'という新しい酵素を産生しメチシリン (DMPPC) のみならず他の抗菌薬にも高度耐性を示す。PBP2'を産生する遺伝子は*mecA* 遺伝子で染色体上に存在する。

MRSAの検出には米国の臨床検査標準委員会 (NCCLS) の判定基準が用いられる。ディスク法ではオキサシリン (MIPIC) ディスク (1 μ g含有) の阻止円が10 mm以下、微量液体希釈法により最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した場合は、MIPICでは4 μ g/ml以上をMRSAと判定する。

そのほかに、セフトゾキシム (CZX) などの抗生物質を含有するMRSAスクリーニング培地が各社から発売され、これに検査材料を直接塗抹し35 $^{\circ}$ C 1~2日培養後、菌が発育してくれば簡単にMRSAと同定できる。また、*mecA*遺伝子検出用のPCR試薬キットやDNAプローブ、ラテックス試薬も市販されている。

MRSAの保存法は10%スキムミルクで-80 $^{\circ}$ C (または-40 $^{\circ}$ C)、またはカジトン培地で室温保存する。PFGE法実施にあたっては保存培地から直接液体培地に菌を接種することは避けて、寒天培地で1晩培養して菌を確認してから、1 colonyを液体培地に接種することから始める。

MRSA の疫学マーカー

従来より行われていた表現型によるものとして、生化学的性状 (バイオタイプ)、薬剤感受性パターン、ファージ型、コアグララーゼ型、TSST-1産生能、エンテロトキシン型などがあり、遺伝型によるものとして、PFGE型、Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 型、リボタイピング等がある。現在、病棟で蔓延しているMRSAはファージ型が型別不能、コアグララーゼ型がII型、TSST-1産生、エンテロトキシン型がC型を示す株が多い。

パルスフィールドゲル電気泳動法とは？

ブドウ球菌の染色体は約2,800 Kbの環状二本鎖DNAである。菌液をアガロースで包埋したまま、溶菌操作からDNA抽出、制限酵素処理によるDNAの切断を行うことによって、物理的なDNAの断裂を回避できる。抽出された環状DNAは制限酵素の認識する塩基配列によって、10-700 KbのサイズのDNA断片15-20個に切断される。それをPFGE法で電気泳動することによって小さいDNA断片は長く、大きいDNA断片は短い距離を移動する。

従来の電気泳動では、一定方向の単一な電場をかけることによって、DNAは長く伸びた状態で寒天ゲル内を移動し、分子ふるい効果によって分子量の小さい順に移動する。しかし、一旦ゲルの中で伸びきると30 Kb以上のDNAはわずかに移動した地点で停止する。1984年、SchwartzとCantorにより2,000 KbのDNAサイズまでのDNAを分離できる泳動システムが開発され、パルスフィールドゲル電気泳動法と呼ばれている。PFGE法は電場の方向を断続的に変換するために、切り換えの度にDNA分子は伸び縮みを繰り返しゲルの網目の中を移動する。ただし、大きなDNAほど方向転換に時間がかかるため相対的に遅くなり、このため、分子量計測が可能になる。現在、少なくとも6種類のPFGE法による電気泳動装置が市販されている。

PFGEの種類

(1) OFAGE (orthogonal field alteration gel electrophoresis)

最も初期の電気泳動法の一つで、非常にシャープなバンドが得られる利点を持つ。しかし、泳動槽内で電場が一様でないため、ゲルの両端にアプライしたサンプルは弧を描いて流れ、各レーン間での分子量の比較がむずかしい。

(2) FIGE (field inversion gel electrophoresis)

DNAの分離方向に対して180° 逆向きにパルス電場をかける。通常の電気泳動槽にパルス電場を与えるだけですむため簡便であるが、500 Kb以上の長大なDNA断片では分離が悪い。

(3) TAFE (transeverse alteration field electrophoresis)

ゲル厚方向に対して斜めにパルス電場をかける。バンドが非常にシャープであり、高分解能をもつ。しかし、ゲルが垂直方向を向いているという形状の性質ゆえ、あまり長い大きなゲルは取り扱い上困難である。

(4) CFGE (crossed field gel electrophoresis)

2対の電場を用いる代わりに、均一の電場内でゲルを回転させることによりパルス電場をかけるのと同じ作用を与え、DNAを分離する。このため電源は通常の電気泳動のものが利用できる。

(5) CHEF (contour-clamped homogeneous electric field gel electrophoresis)

OFAGEとは異なり、電極を四角形または六角形に配置し、各電極に抵抗器を入れることにより、泳動槽内に均一の電場を生じさせDNAを直線的に泳動させる。Pharmacia LKB社からGene Navigatorとして、また、BIO-RAD社からCHEF-DR II、DR III、ジーンパスシステムとして市販されている。

(6) PACE (programmed autonomous controlled electrode)

CHEFをさらに発展させた方法であり、PFGEでは最も新しい技術である。各24個の電極はコンピュータによって制御され、DNA分子を分解能良く分離する方法である。BIO-BAD社からCHEF-Mapperとして市販されている。

泳動条件の決定

PFGEは分離するDNAサイズによって泳動条件が異なる。電気泳動に影響を与える因子は以下の通りである。

1) アガロースゲルの濃度

アガロースゲルは濃度が高くなるほどシャープなバンドが得られるが移動度は小さくなる。移動度が小さくなると泳動時間は長くなる。

DNAサイズ	ゲル濃度
<100 Kb	1.5%
100 Kb~2 Mb	1~1.5%
2 Mb~4 Mb	0.8~1%
>4 Mb	0.5~0.8%

2) 電圧

通常は100~200 Vで行う。電圧を上げると泳動速度が速くなり、結果として、泳動時間は短くてすむ。サイズの小さいDNA断片では問題ないが、大きなDNA断片の場合はバンドが幅広くぼやけてしまう。したがって、大きなDNA断片を分離する場合はパルス時間を長く、弱い電圧に設定する。

3) パルスタイム (電場の方向転換の周期)

パルス時間を長くすると、長いDNA分子の分離が可能になる。しかし、長いパルスタイムでは泳動時間が長くなり、分離能も低下させる。最良の分離能を得るためにはDNA分子の長さを分離可能な最小のパルスタイムを用いることが必要である。

DNAサイズ	パルスタイム	泳動時間
200~1000 Kb	25~70 秒	22 時間
10~700 Kb	1~40 秒	22 時間
10~250 Kb	0.5~10秒	10~15 時間

4) 泳動時間

分離したいDNA分子のサイズが大きい程、他のパラメーターを分離能が上がるように設定しなければならないため、他のパラメーターにより泳動時間は左右される。一般的に大きなDNAサイズ程泳動時間は長くなる。

5) バッファの種類と濃度

一般的にTAEやTBEが使用される。バッファのイオン強度が低い程DNAの移動度は大きくなる。TAEの方がTBEよりも移動度は大きいといわれている。TAEとTBEの用途は以下のように分けられる。

2 Mb以下のDNAの分離：0.5~1.0×TBE

2 Mb以上のDNAの分離：1.0×TAE

6) パルス角度

パルス角度は狭くなるほど泳動速度が速くなるが、狭すぎると分子量の大きなDNA分子は分離しなくなる。一般的には120°がよく用いられる。2 Mb以上の巨大DNAを短時間で泳動するためにはパルス角度を106°まで狭めることも有効な手段の一つである。

7) 温度

バッファの冷却と循環は泳動中の加温、温度勾配を防ぎ、電気分解したバッファを補いイオンの不均一を防ぎ、シャープなバンドを持続させるために必要である。標準的な温度は10-14℃で一定に保つことが基本である。

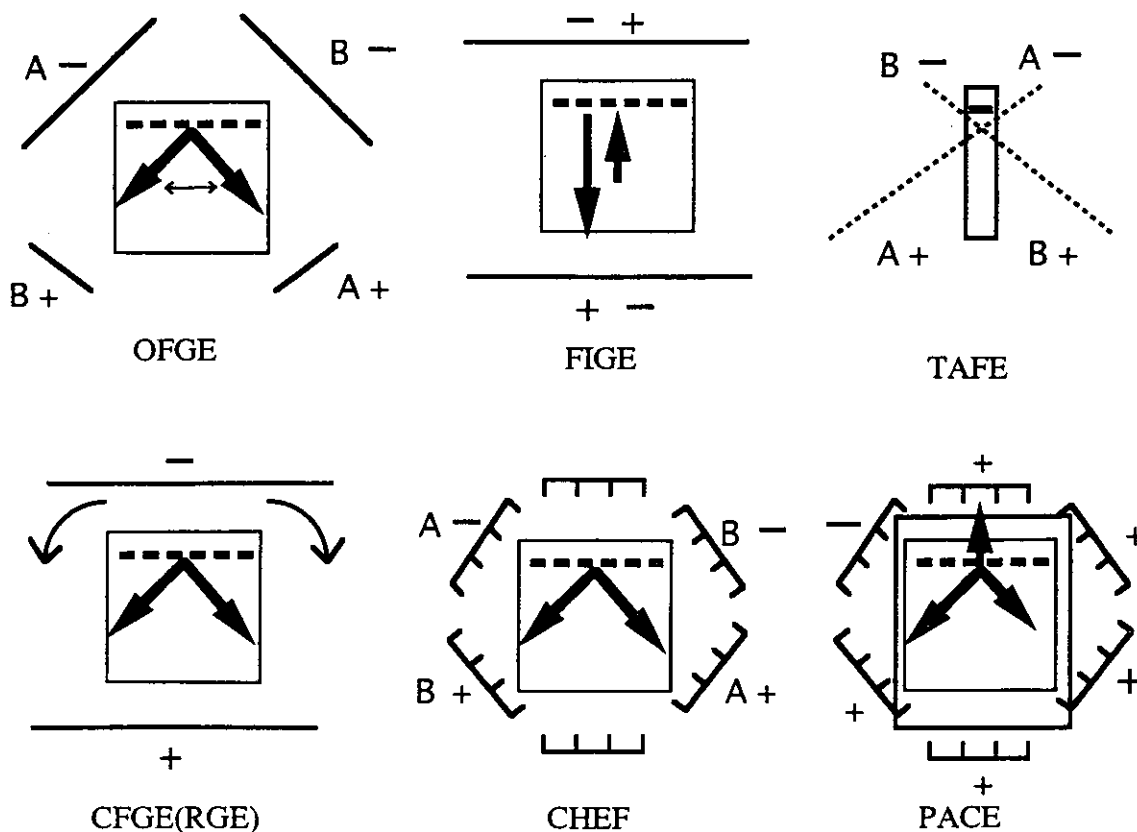
他の菌への PFGE 法の応用について

対象とする微生物によって前処理の細胞懸濁液調整法と細胞壁溶解法が異なってくる。細胞壁を溶解するためには細胞特異的溶解酵素を用いる。例えば酵母細胞には zymolyase、大腸菌には lysozyme を用いる。一般にグラム陽性菌の細胞壁は厚く密であり、グラム陰性菌の細胞壁は薄い構造になっており、また抗酸性菌の細胞壁は厚い脂質に富み溶菌しにくい。対象となる微生物のゲノムDNAのサイズとG+C%、および用いる制限酵素によって、生ずる切断DNAのサイズと数は異なる。たとえばG+C%が低い黄色ブドウ球菌 (32-36%) にはGCの多い制限酵素 (*Sma*I: CCCGGG)、反対にG+C%が高い緑膿菌 (58-71%) には、GCの少ない制限酵素 (*Spe*I: ACTAGT) が用いられる。また、8塩基認識酵素は6塩基認識酵素より切断断片が少ない。G+C%とは細菌のDNAの全塩基量に対する、グアニンとシトシンとの合計量の比で、25~75%の範囲内にあり、その値は同一菌種ではほぼ一定である。

現在では、PFGE法を用いた種々の細菌、真菌など微生物のDNA解析が数多く報告されているので、文献検索を行い、それを参考にして実施することができる。

PCR-RFLP との比較

PFGE法は特殊な装置と多種類の試薬を使用し、結果がでるのに約1週間を要する。これよりも短い日数(約3日)で手軽に実施できる、コアグラーゼ遺伝子のPCR-RFLP法は遺伝型疫学マーカーの一つとして報告されている。方法は黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ遺伝子をPCRで増幅し、その増幅産物を制限酵素 *Alu*I で切断後、従来法の電気泳動でパターンを比較する方法である。PFGE法とPCR-RFLP法における菌株識別能を比較すると、MRSA40株はそれぞれ31タイプ、13タイプに型別されPFGE法が優れた成績を示した。



PFGE 法の実際

1) 方法

一山の方法に従い、菌をアガロースに包埋したまま染色体DNAの抽出を行い、制限酵素 (*Sma*I) で切断後、パルスフィールドゲル泳動装置を用いて泳動する。泳動装置は BIO-RAD社のジーンパスを用い、泳動条件は機器内臓プログラムを使用する。(他機種の場合：電圧 170 V、パルスタイム 5から80秒、泳動時間 24時間でセットする。) 泳動後、エチジウムブロマイド染色し、紫外線をあててポラロイドカメラで撮影し、PFGE型を解析する。

2) 細菌の取り扱い注意点

微生物の取り扱いでの一般的注意としては、第一に実験に使用している菌に感染しない、または環境を汚染させないこと、第二に手指の常在菌や環境からの汚染菌を混入させないことである。そのためには、菌を取り扱う時は、手袋、マスクを着用し、安全キャビネット内で操作することが望ましい。また菌を机にこぼした時は消毒アルコールなどで消毒する。今回使用するMRSAは、溶菌操作前までは生菌で、溶菌操作後では死菌である。特に、抗酸菌は飛沫感染することから、必ず安全キャビネット内で操作しなければならない。実験に使用する培地、試薬、試験管、チップなどは121℃15分高圧蒸気滅菌(オートクレーブ)済のものを使用する。耐熱性でないものはガス滅菌などをする。また、遺伝子操作においては、DNaseやRNaseを除く目的でオートクレーブが使われる。実験後は菌のついた器具類は必ず、オートクレーブ(121℃15分)滅菌後廃棄する。耐熱性でない材質のもので再生したい時は、消毒液につけてから洗浄する。

3) 必要な機器

パルスフィールドゲル電気泳動装置
(BIO-BAD社: ジーンパス)

紫外線トランスイルミネーター

ポラロイド写真装置

オートクレーブ

pHメーター

天秤

フラン器(振とう器付)

振とう器

冷蔵庫

ヒートブロック (50℃) (30℃) (60℃)

遠心器またはマイクロ遠心器

水平台

マイクロミキサー

電子レンジ

恒温槽 など

4) 必要な器具類

手袋

マスク

白金耳

三角コルベン

滅菌スピッツ

滅菌スポイド

滅菌毛細管ピペット

シャーレ

ガラス切り

インサートモールド

エッペンドルフチューブ

マイクロピペット

マイクロチップ

カバーガラス

アルミ箔

染色バット

アルコール綿

など

5) 必要な試薬類

試薬名	メーカー	NO.	容量
TRIZMA BASE	SIGMA	T-1503	1 Kg
Na ₂ EDTA-2H ₂ O	ナカライテスク	151-30	500 g
Agarose L (低融点アガロース)	和光純薬	317-01182	25 g
Sodium N-Dodecanoly-salcosinate	和光純薬	192-10382	25 g
Deoxycholic acid	和光純薬	044-18812	25 g
Brij-58 (POLYOXYETHYLENE 20 CETYL ETHER)	SIGMA	p-5884	100 g
リゾスタフィン (990 U Protein)	SIGMA	L-7386	1 mg
アクロモペプチダーゼ (1000 U/mg)	和光純薬	014-09661	1 g
プロティナーゼ K	和光純薬	160-14001	100 mg
PMSF(Phenyl methylsulfonyl fluoride)	SIGMA	P-7626	25 g
T buffer	タカラ酒造	1085A	2000 units
Sma-I	タカラ酒造	1085A	500 g
Boric acid (ホウ酸)	ナカライテスク	052-15	
Agarose S	和光純薬	312-01193	100 g
Lambda Ladder	BIO-RAD		
Control Plug	BIO-RAD		
エチジウムブロマイド	和光純薬	054-04763	5 g
コータレスインスタント パックフィルム	ポラロイド	667	10枚× 2パック

6) 試薬の調整

事前にストック用として作製しておいて、後の試薬調整時に使用する。

0.5 M EDTA, pH 8.0

Na₂EDTA-2H₂O 186.1 gにH₂O 800 mlを加え、スターラーで攪拌しながらNaOHの粒20 gを加え、pH 8.0に調整後 (pH 8.0に近づくまでなかなか溶けない) さらにH₂Oを加えて1Lとする。

1 M Tris-HCl, pH 8.0

121.1 gのTRIZMA BASEを800 mlのH₂Oに溶かし、室温にてHClを加えてpHを確認後、さらにH₂Oを加えて1 Lとする。

(1) プレインハートインフュージョン (BHI) ブイヨン培地 (滅菌) ---増菌用

普通ブイヨンなど他の液体培地でも可

(2) Saline EDTA (滅菌不要) ---菌洗浄用

5 M NaCl	3 ml (最終濃度 0.15 M)
0.5 M EDTA, pH 8.0	2 ml (最終濃度 0.01 M)
蒸留水	95 ml

(3) Pett IV溶液 (滅菌) ---菌洗浄用

1M Tris-HCl, pH 8.0	10 ml (最終濃度 10 mM)
NaCl	58.44 g (最終濃度 1 M)

蒸留水で1 Lに調整

(4) 1.5%低融点 (LMT) アガロース (滅菌)---アガロースブロック作製用

Agarose L	1.5 g (最終濃度 1.5%)
Pett IV溶液	100 ml

電子レンジで加温溶解する。

(5) Lysis溶液 (滅菌) ---溶菌用

1 M Tris-HCl, pH 8.0	10 ml (最終濃度 10 mM)
NaCl	58.44 g (1 M)
0.5 M EDTA, pH 8.0	200 ml (100 mM)
Sodium N-Dodecanoyl-salcosinate	5 g (0.5%)
Deoxycholate	2 g (0.2%)
Brij-58	5 g (0.5%)

蒸留水で1 Lにする。

(6) リゾスタフィン溶液

蒸留水でリゾスタフィン1,000 U/mlとなるように溶解し、1ブロック分として20 μ l (20 U)ずつエッペンドルフチューブに分注する。残りは凍結保存(-20℃)できる。(例: 990 U Protein, 1 mg Proteinのものを購入したら試薬瓶に蒸留水1 mlを入れ、約1,000 U/mlとする。)

(7) アクロモペプチターゼ溶液

要時、Lysis溶液で5 mg/mlを調整。溶けにくいので早めに準備しておく。1ブロック分としてこの溶液の200 μ lを(6)に添加する。

(8) ES溶液 (滅菌)---蛋白分解用

0.25 M EDTA	100 ml
Sodium N-Dodecanoyl-salcosinate	1 g (最終濃度 1%)

要時、この液でプロテイナーゼ K 1 mg/mlを調整する (=ESP溶液)。

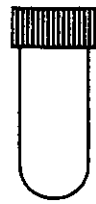
- (9) 1 mM Phenyl methylsulfonyl fluoride (PMSF, MW 174.2)
 神経毒につき、手袋をつけて取り扱う。要時調整。
 PMSF (1 mM=0.174 mg/ml) を秤量し、(極微量のため1.4 mgを秤量し、全量を8 mlにするとよい) 100-200 μ lのイソプロピルアルコールで溶かしてから、TE溶液を加える。
- (10) TE溶液 (滅菌)---洗浄用
 1 M Tris-HCl, pH 8.0 10 ml (最終濃度 10 mM)
 0.5 M EDTA, pH 8.0 2 ml (最終濃度 1 mM)
 蒸留水で1 Lにする。
- (11) 制限酵素用緩衝液 (T buffer) 市販品使用
 (12) 制限酵素 (*Sma* I) 市販品使用
 (13) Control Plug (*S. aureus* 標準株 8325) 市販品使用
 (14) Lambda Ladder サイズマーカー 市販品使用
 (15) 5 \times TBE溶液 (Stock用)
 TRIZMA BASE 107.8 g
 Boric acid 55 g
 Na₂EDTA-2H₂O 7.4 g
 蒸留水で2 Lにする。
- (16) 1 \times TBE溶液 (泳動用バッファー)
 5 \times TBE溶液 400 ml
 蒸留水 1.6 L
 14 $^{\circ}$ Cに冷やす。泳動槽の機種によって必要量に差がある。
- (17) 1%泳動用アガロースゲル
 Agarose S 1 g (最終濃度 1%)
 5 \times TBE溶液 20 ml
 蒸留水 80 ml
 電子レンジで溶解後、60 $^{\circ}$ C位に冷めてから型に流す。
- (18) 0.5%低融点 (LMT) アガロース---ウェルの隙間埋め用
 Agarose L 0.5 g (最終濃度 0.5%)
 1 \times TBE溶液 100 ml
 電子レンジで溶解後、60 $^{\circ}$ C位に冷ます。
- (19) エチジウムブロマイド (EtBr) 染色液---染色用
 発癌性があるため、手袋をつけて取り扱う。廃棄時は次亜塩素酸Naで中和、または濾過フィルターで濾過して処理する。
 Stock用としてEtBr溶液 (10 mg/ml H₂O) 1 mlを褐色瓶に作製しておく。
 使用液 EtBr溶液 (10 mg/ml H₂O) 50 μ l
 1 \times TBE溶液 1 L 褐色瓶に保存
 染色後、瓶に戻しておき、30回位は使用できる。
- (20) マックファーランド (McF) 基準液
 硫酸バリウムの白濁の程度から菌液の濁度を表現する。
- | | | | | | | |
|-----------------------------------|------|----|----|----|----|----|
| McF | (NO) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1% H ₂ SO ₄ | (ml) | 99 | 98 | 97 | 96 | 95 |
| 1% BaCl ₂ | (ml) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

7) BIO-RAD ジーンパス試薬キットとの対応

試薬 No.	自家調整試薬	BIO-RAD社 ジーンパス試薬	キット名
(1)	BHIブイヨン培地		
(2)	Saline EDTA	Cell Suspension buffer	U
(3)	Pett IV溶液	Cell Suspension buffer	U
(4)	1.5%低融点 (LMT) アガロース	Embedding Agarose, Plug Mold	U
(5)	Lysis 溶液	Lysis buffer	E
(6)	リゾスタフィン溶液	Lysozyme/Lysostaphin,	E
(7)	アクロモペプチダーゼ溶液		
(8)	ESP溶液	Proteinase K Proteinase K buffer	U
(9)	1 mM PMSF		
(10)	TE 溶液	1×Wash buffer 0.1×Wash buffer	U
(11)	(T buffer)	Restriction buffer (<i>Sma</i> I buffer)	E
(12)	(<i>Sma</i> I)	Restriction enzyme (<i>Sma</i> I)	E
(13)	(Control Plug)	Control Plug	S
(14)	(Lambda Ladder)	Lambda Ladder	S
(15)	5×TBE溶液 (Stock用)	Running buffer	G
(16)	1×TBE溶液 (泳動用)		
(17)	1%泳動用アガロースゲル	Agarose	G
(18)	0.5%低融点 (LMT) アガロース	Low melt agarose	G
(19)	エチジウムブロマイド染色液	Ethidium bromaide	G

8) プロトコール

1日目



←BHIブイヨン(1) 3 ml
←菌 (MRSA)

35°C1夜振とう培養

2日目

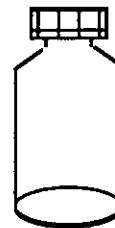
3000 rpm 20分遠心
3回 沈渣←Saline EDTA (2) 3 ml
Vortex
沈渣←Pet t IV (3) 約1 ml

(McF4.0の濃度にする)
(20)

↓ 100 μl



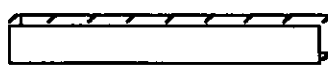
← 100 μl
素早く混和



1.5% LMT
アガロース(4)を
電子レンジで溶かす

約60°Cにする

↓ 100 μl



4°C15分



■ (アガロースブロック)



← 200 μl
リゾスタフィン (6)
20 U / 20 μl



Lysis溶液(5)で
アクロモペプチダーゼ溶液
(5 mg/ml) (7)を作る (溶けにくい)

37°C一夜

3日目



□ (溶菌した
アガロースブロック)



← 100 μl
ES溶液(8) 800 μl

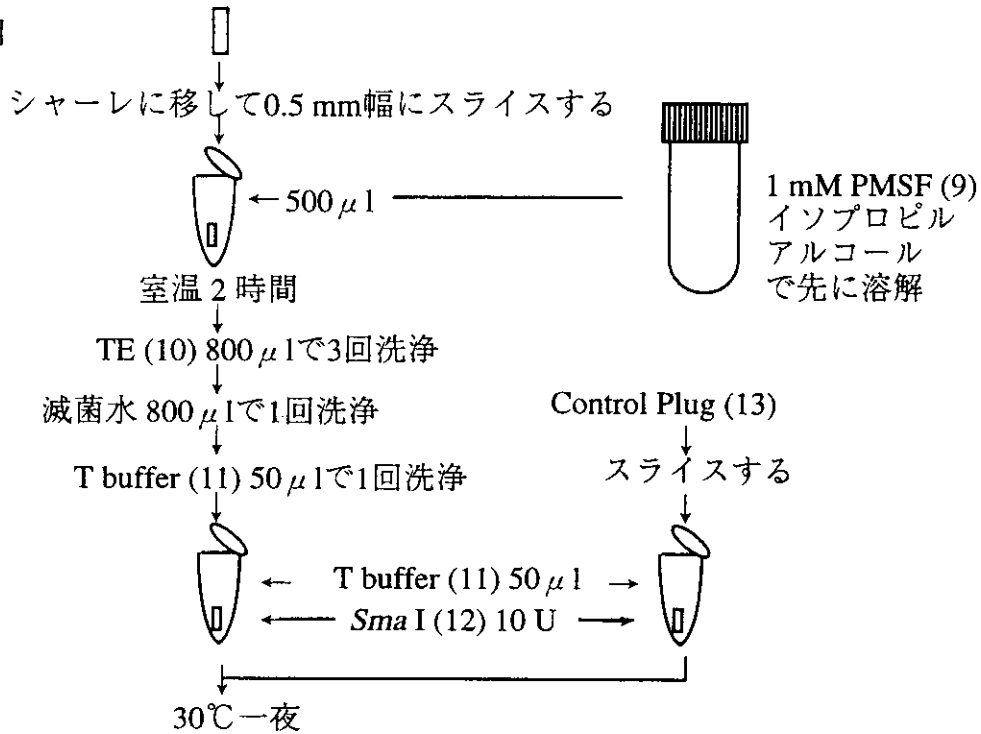


ES溶液 (8)で
プロテイナーゼK溶液
(1 mg/ml)を作る

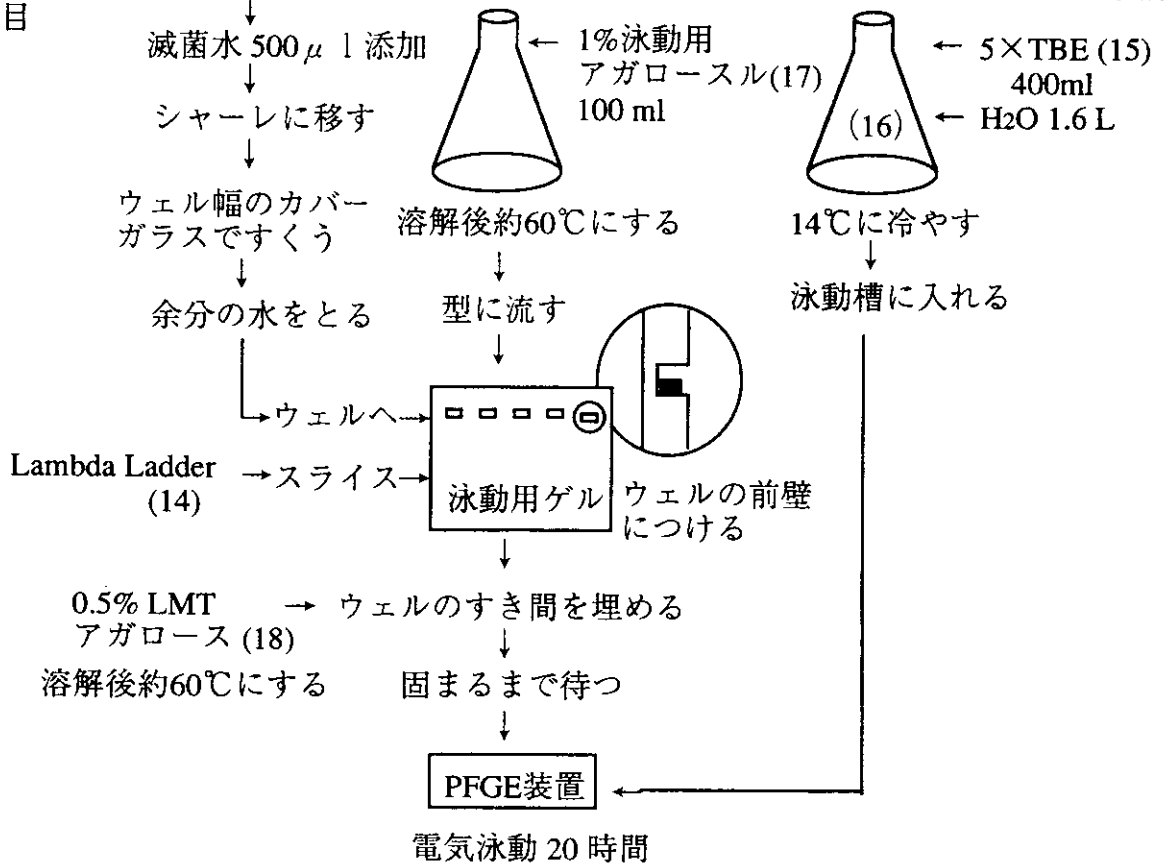
50°C一夜

60°C30分

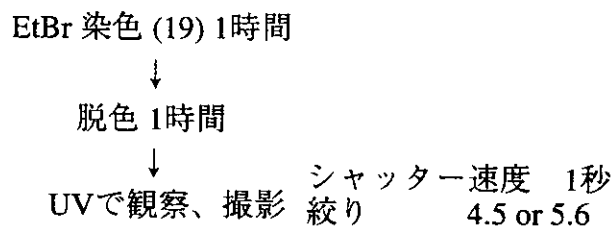
4日目



5日目



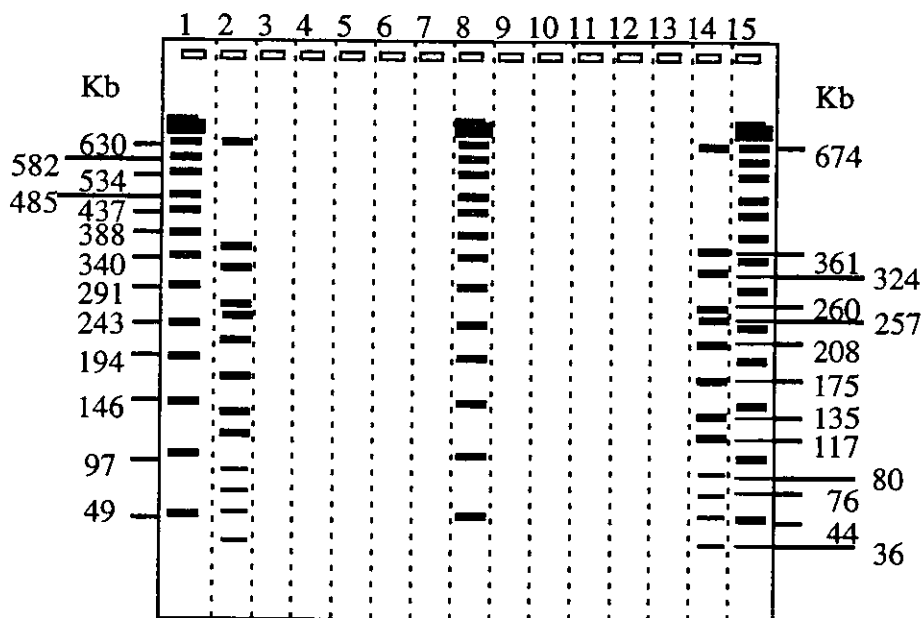
6日目



9) 観察、撮影

ゲル中のDNAはEtBrで染色され、暗室でUVトランスイルミネーターの上に置き、紫外線を当てるとオレンジに光るバンドとして観察される。紫外線は皮膚癌や網膜への悪影響があるので、プラスチック性フェースマスク、またはメガネを使用する。撮影は、まず部屋の明るい状態でUVトランスイルミネーター上のポラロイドカメラの高さを調節してゲルにピントを合わせ、サイズを決める。次に暗室にして、UVをあて、紫外線カットフィルターを用いて写真撮影する。フィルムはポラロイド社タイプ667を使用するとその場で写真ができる。ネガフィルムが必要な時はタイプ665を用いる。最近では手軽に扱えるトランスイルミネーターとフード付カメラのセットが市販されている。他の方法として、ゲルの泳動パターンをCCDカメラで撮影し、直接コンピュータに取り込み画像解析することもできる機種がある。

10) 結果



11) 結果の解釈

- (1) 同一-PFGEパターン：同一株とみなす。
- (2) 1~2本のバンドの変化：一つの遺伝的な変異(例えば制限部位の欠落と獲得、遺伝子の挿入、欠失、逆位による突然変異など)でそのパターンの違いが説明できるものについては同一株の可能性が高い。別の制限酵素で再検してみる。
- (3) 3本以上の変化：別の株とみなす。

12) 注意点

PFGE法においては、種々の変法があるが、一つの方法を示した。各施設に合ったやりやすい方法で実施されることをお勧めする。菌の培養からブロック作製までは中断できないが、後は、反応時間が延びても差しつかえない。本法は試薬の種類が多く、試薬調整は繁雑であると感じたかもしれないが、一度作製しておけば長く使用でき、経済的でもある。また、試薬調整の時間がない場合はキットとして市販されているものを使用できる。本法を用いた疫学調査から院内感染防止に役立つことを期待する。

13) 文献

- 1) Ichiyama S, Ohta M, Shimokata K, et al.: Genomic DNA fingerprinting by pulsed field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol.29: 2690-2695, 1991.
- 2) Maslow JN, Slutsky AM, Ardeit RD: Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. Eds. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Application. 563-573, 1993. ASM
- 3) Nada T, Ichiyama S, Osada Y, et al.: Comparison of DNA fingerprinting by PFGE and PCR-RFLP of the coagulase gene to distinguish MRSA isolates. J Hospital Infection 32: 305-317, 1996.
- 4) 一山智: 主要病原菌の疫学マーカー パルスフィールド-ゲル電気泳動法 原理と方法. 臨床と微生物. 23: 621-625, 1996.
- 5) 一山智: パルスフィールド-ゲル電気泳動法. 太田美智男 編. 新遺伝子操作の基礎技術. 99-103, 1995. 菜根出版
- 6) 一山智: パルスフィールド-ゲル電気泳動法を使った黄色ブドウMRSA株のタイピング. 日本細菌学雑誌. 49: 793-857, 1994.
- 7) 清水信義, 川崎和彦: パルスフィールドゲル電気泳動法. 小池克郎, 関谷剛男, 近藤寿人 編. 分子生物学プロトコール. 27-33, 1994. 南江堂
- 8) 添田栄一, 牟田滋: パルスフィールドゲル電気泳動法. 村松正實, 岡山博人, 山本雅 編. 新遺伝子工学ハンドブック. 106-111, 1996. 羊土社
- 9) 大原智子, 伊藤喜久: 最新医学講座 遺伝子診断 パルスフィールドゲル電気泳動法. 臨床検査. 40: 1191-1196, 1996.
- 10) 田中美智男: パルスフィールドゲル電気泳動法を用いたMRSAの遺伝子型別法. 日臨技微生物検査研究班 編. 第20回微生物研修会テキスト. 158-164, 1994.
- 11) 三澤成毅: 遺伝子検査法. 小栗豊子 編. 臨床微生物検査ハンドブック. 159-175, 1996. 三輪書店
- 12) パルスフィールド電気泳動法の基礎. BIO-RAD社提供資料

19990719

これ以降「p123-p134」は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

—山智、感染症の分子疫学 —分子生物学的手法による微生物の型別
—JARMAM. 1997;8(2):55-60