

備考

- 乳腺膿瘍は出産後に最も頻繁に生じる。出産後7日以内に生じた乳腺膿瘍は院内感染であると見なさなければならない。

感染部位 臍炎**コード** UMB**定義**

新生児（生後30日以内）臍炎は以下の基準の少なくとも一つを満たしていなければならない。

基準1

患者が臍の紅斑および／または漿液性排液がある。かつ、以下の事柄の少なくとも一つに該当している。

- 排液または針穿刺吸引の培養で微生物が認められる。
- 血液培養で微生物が認められる。

基準2

患者が臍に紅斑と化膿の両症状を呈している。

報告に関する指示

- 臍カテーテルの挿入に関連した臍動脈または静脈の感染は、VASCと報告すること。
- 退院後7日以内に新生児に感染が発生した場合は、院内感染と報告すること。

感染部位 乳児膿疱症**コード** PUST**定義**

乳児（生後12ヵ月以内）膿疱症は以下の基準の少なくとも一つを満たすこと。

基準1

乳児が一つまたはそれ以上の膿疱を有しており、かつ、皮膚における感染であると医師が診断している。

基準2

乳児が一つまたはそれ以上の膿疱を有しており、かつ、医師が適切な感染の治療を開始している。

報告に関する指示

- 中毒性紅斑ならびに非感染性の原因による膿疱は報告しないこと。
- 退院後7日以内に乳児に膿疱が生じた場合は、院内感染と報告すること。

感染部位 新生児環状切開部の感染

コード C I R C

定義

新生児（生後30日以内）環状切開部の感染は、以下の基準の少なくとも一つを満たしていなければならない。

基準1

新生児の環状切開部位から膿性排液が認められる。

基準2

新生児の環状切開部位で、次に示す徴候または症状の少なくとも一つを呈しており、その他の原因が認められない：紅斑、腫張、あるいは圧痛。かつ、環状切開部位から採取した検体で起病菌が培養される。

基準3

新生児の環状切開部位で、次に示す徴候または症状の少なくとも一つを呈しており、その他の原因が認められない：紅斑、腫張、あるいは圧痛。かつ、環状切開部位の皮膚培養で、汚染物（コアグラールゼ陰性ブドウ球菌、類ジフテリア菌、*Bacillus* spp.、あるいはミクロコッカス）が認められる。かつ、感染と医師が診断しているか、あるいは適切な治療が医師により開始されている。

SYS 全身性の感染**感染部位 播種性感染**

コード D I

定義

播種性感染とは、多臓器あるいは組織が感染している状態であり、この場合、感染が単一部位ではなく、通常はウイルスに起因したものである。また、その他の原因が考えられず、徴候または症状が、多臓器あるいは多組織が関与している感染の所見と一致したものである。

報告に関する指示

- このコードは主として多臓器あるいは多組織が関与しているウイルス性感染（例、

麻疹、流行性耳下腺炎、風疹、水痘、伝染性紅斑)のために使用すべきである。これらの感染はしばしば臨床的な基準のみにより確認することができる。このコードは細菌性心内膜炎のように多臓器感染を伴う院内感染のためには使用しないこと。これらの感染の本来の部位だけを報告しなければならない。

- 原因不明の発熱 (FUO) はDIと報告してはならない。
- 新生児の「敗血症」はCSEPと報告しなければならない。
- ウイルス性皮疹あるいは発疹はDIと報告しなければならない。

監訳者略歴

山岸 高由

金沢大学教授 医学部保健学科検査技術科学専攻 (医学検査学講座)

昭和35年、金沢大学薬学部卒、同年、金沢大学助手 (医学部微生物学講座)

昭和44年、医学博士。

昭和45年、金沢大学講師 (医学部附属病院、検査部細菌検査室)

昭和48年、金沢大学医療技術短期大学部助教授 (衛生技術学科)

昭和51年、富山医科薬科大学助教授 (医学部細菌学免疫学講座)

昭和63年、金沢大学医療技術短期大学部教授 (衛生技術学科)

平成7年、金沢大学教授 (医学部保健学科医学検査学講座)

牧本 清子

金沢大学教授 医学部保健学科看護学専攻

昭和48年～昭和49年 大阪厚生年金病院、看護婦

昭和60年～昭和62年 テキサス大学公衆衛生学部 ファカルティアソシエイト

昭和64年 テキサス大学医療センター公衆衛生学部疫学学科 博士号授与

平成2年～平成5年 ワシントン大学公衆衛生学部

ヘルスサービス学科 リサーチサイエンティスト

平成6年～平成7年 金沢大学医学部第二病理学教室 講師

平成7年、 金沢大学教授 (医学部保健学科看護学専攻)

監訳者略歴

本印刷物は、NNHS マニュアルから「院内感染の定義と部位決定基準」の箇所のみを抜粋し、できる限り原文に忠実に日本語訳したものです。苦慮も加わられていますように、これに固守する必要はなく、また定義だけでは院内感染のサーベイランスをすることも出来ません。今後さらに、統一した疾患定義を基に、院内感染のサーベイランスができる環境を整えていく事が重要と思われれます。

数年前より活動を始めた「ICPの会」(世話人代表、柴田 清氏)では、こうした環境を整えるべく、サーベイランスを学び実践していこうとする活動の場として、その輪を広げています。原文の疾患定義を基に共通の定義を作成し、定義を使った具体的なサーベイランスの実践方法を学ぶ場としてこのような研究会活動もより有益であると思われれます。本印刷物が、より多くの臨床の皆様にお役立て頂ければ幸いです。

〈資料 2〉

「耐性菌による感染症診断のためのガイドライン（案）」

一山 智 京都大学医学部 病態検査学
山口恵三 東邦大学医学部 微生物学

目 的

院内感染症のサーベイランスを行う上で、感染症であるのか単なる保菌状態であるのかを鑑別することは重要であり、本ガイドラインではその基本的診断基準を示した。

方 法

NNIS（米国内院感染サーベイランスシステム）の感染部位の決定基準を参考にしたが、さらに簡素化するとともに、厚生省「薬剤耐性菌による感染症のサーベイランスシステムの構築に関する研究」（山口恵三案）に整合性を持たせ、わが国の臨床の場に対応できるようにした。

総 論（1）

検査診断学の立場から、感染症起炎菌の決定あるいは保菌状態との鑑別について以下の基本的な考え方がある。

- Ia. 健康人には存在しない病原微生物を検出した場合（検査材料は不問）
- Ib. 本来無菌の検査材料から微生物を検出した場合（微生物名は不問）
- II. Ia、Ib をいずれも満たさない場合

上記の3項目のうち、Ia および Ib では検出された微生物は感染症の起炎菌である可能性が高いと考えられるが、II においては起炎菌であるのか保菌であるのかの鑑別が必要である。

微生物の検出・同定は、主に感染部位から採取した検体を対象に塗抹鏡検、培養検査、抗原検出、遺伝子診断などを用いて行われる。これらの検査法中で、検体の品質管理や起炎菌の推定に際し塗抹鏡検の重要性を強調しておきたい（総論（2）参照）。

総論（2）

以下に3項目の具体的な事例について述べる。

1a. 健常人には存在しない病原微生物を検出した場合（検査材料は不問）

結核菌、コレラ菌、ペロ毒素産生腸管出血性大腸菌など、ヒトに対する病原性が明らかとなっている微生物を検出した場合は起炎菌と判断してほぼ間違いない。

1b. 本来無菌の検査材料から微生物を検出した場合（微生物名は不問）

無菌的に採取された血液、髄液、関節液、胸水、腹水、閉鎖膿などから微生物を検出した場合は、微生物名を問わず原則として起炎菌と考える。ただし、検体採取時における皮膚常在菌などの混入の可能性が否定できない場合には（あるいは皮膚常在菌が検出された場合には）、複数回同一菌種が検出されることを条件とする。

11. 1a、1b をいずれも満たさない場合

喀出痰からの MRSA、尿からの腸球菌、創部からの緑膿菌、などの場合は直ちに起炎菌と考えることはできない。検体のグラム染色標本による顕微鏡検査が重要な情報を与えてくれる（注）。

（注）グラム染色標本の解釈

1) 喀出痰

弱拵（100 倍）で白血球と扁平上皮の存在を観察する。広く視野を鏡検し、白血球が多数を占める視野を探す。もし、どの視野も扁平上皮が優位であれば、感染症の部位からの材料でないことを意味するので、改めて膿性部分を含んだ良質な検体を採取する（検体の品質管理）。

強拵（1,000 倍）で白血球が多数を占める視野を観察する。微生物が単独で多数存在すれば起炎菌と考えられる。複数菌感染であっても通常高々2～3種類である。平均して一視野に1～数個の菌が存在すれば、検体1 ml 中 10⁵～6 個の菌が存在するので、それ以上であれば起炎菌の可能性が高い。一方、このような所見がなかったり、扁平上皮細胞が多く観察された検体から微生物が分離培養されたとしてもそれらは起炎菌とは考えにくく、保菌である可能性が高い。

2) 一般検体

白血球などの貪食細胞に捕捉されている微生物は、II の検体であっても起炎菌として取り扱ってよい。

* II の場合には、培養検査は塗抹検査で観察され起炎菌と推定された微生物の確認のための検査にとらえるべきである。

各 論

以下に感染症別に起炎菌であると診断するためのガイドラインを述べる。感染部位における炎症の存在を示唆する臨床症状（発熱、発赤、腫脹、疼痛など）・検査値異常（WBC、CRP、ESR、など）を伴っていることが必須条件となる。

a. 菌血症、感染性心内膜炎

総論 1b に属するので検出された微生物は原則として起炎菌と考えられる。皮膚の常在菌の混入の可能性を除外するために、無菌的に採取しなければならない。原則として抗菌薬投与前に採血し採取回数は最低3回が望ましい。報告事項のなかに微生物の分離回数と血管内留置カテーテルの有無を記載しておく。

b. 髄膜炎、脳炎、骨髄炎、関節炎

総論 1b に属するので検出された微生物は原則として起炎菌と考えられる。皮膚の常在菌の混入の可能性を除外するために、無菌的に採取しなければならない。報告事項のなかに微生物の分離回数とカテーテルやドレーンの有無を記載しておく。

c. 眼科感染症、中耳炎、副鼻腔炎 無菌的に穿刺して採取した検体から検出された微生物は起炎菌と考えられる。皮膚や粘膜の常在菌の混入が考えられる検体は、総論 II に属するので（注）グラム染色の解釈を参考にして決める。

d. 上気道炎、下気道炎、肺炎、肺化膿症

咽頭拭い液では起炎菌と常在菌の鑑別は難しいので、培養結果と臨床症状で起炎菌を推測する。自然喀出痰は総論 II に属するので（注）グラム染色の解釈を参考にして決める。無菌的に穿刺して採取した検体や、気管支鏡プロテクトブラシによる肺病巣部からの直接検体採取では、総論 1b と考えられるので検出された微生物は起炎菌と考えられる。ただし、気管支鏡による気管支肺洗浄液は、総論 II に属するので（注）グラム染色の解釈を参考にして決める。

e. 胸膜炎、膿胸

無菌的に穿刺して採取した検体は、総論 1b と考えられるので検出された微生物は起炎菌と考えられる。ただし、ドレーンからの排液は、総論 II に属するので（注）グラム染色の解釈を参考にして決める。報告事項のなかにドレーンの

有無を記載しておく。

f. 腎盂腎炎、膀胱炎、尿道炎、前立腺炎

尿路感染症の診断に際しては、膿尿が確認されなければならない。自然排尿（中間尿）による尿検体の場合は 10^4 CFU/ml 以上（？）の細菌数を以って起炎菌とする。

留置カテーテルからの尿検体、および尿道分泌物は、総論 II に属するので（注）グラム染色の解釈を参考にして決める。

無菌的に穿刺して採取した検体は、総論 Ib と考えられるので検出された微生物は起炎菌と考えられる。報告事項のなかに留置カテーテルの有無を記載しておく。

g. 皮膚軟部組織感染症、褥創

総論 II に属するので（注）グラム染色の解釈を参考にして決める。

h. 腸管感染症

総論 II に属するので（注）グラム染色の解釈を参考にして決める。

i. 腹膜炎、肝膿瘍

無菌的に穿刺して採取した検体は、総論 Ib と考えられるので検出された微生物は起炎菌と考えられる。報告事項のなかに留置カテーテルの有無を記載しておく。ただし、ドレーンからの排液は、総論 II に属するので（注）グラム染色の解釈を参考にして決める。報告事項のなかにドレーンの有無を記載しておく。

j. 婦人科感染症

自然排液による検体は、総論 II に属するので（注）グラム染色の解釈を参考にして決める。無菌的に穿刺して採取した検体は、総論 Ib と考えられるので検出された微生物は起炎菌と考えられる。

補 足

<WBC 数区分>

白血球数（顆粒球＋リンパ球）を 12,000 以上、12,000～8,000、8000～3000、3000 以下の 4 区分に分ける。

帝京大学付属病院 救命救急センター
多治見 公高

院内感染に関するサーベイランスは院内感染発症患者の情報を経時的かつ体系的に収集、分析、評価することである。その結果は医療現場に還元され、医療の計画、実施に使われる。さらに、サーベイランスの継続は院内感染発症の減少を目的に実施された対策の評価を行なう上で必要不可欠である。言うまでも無いが、サーベイランスの最終的な目的は院内感染の発生率を低下させ、患者の受ける不利益を最小限にすることである。

今回は、人工呼吸に関連した肺炎（Ventilator-associated pneumonia: VAP）や各種留置カテーテルに起因する感染など、院内感染発症率が院内で最も高い部署である集中治療室（ICU）での院内感染サーベイランスの方法と評価法について述べる。

情報収集での最大の問題点は、感染症診断の精度である。臨床研究での VAP の確定診断には気管支鏡下の検体採取（BAL あるいはブラシ）が必須とされている。一方、米国の NNIS（National Nosocomial Infection Surveillance）system における肺炎診断では、気管支鏡下の診断は要求されておらず、（1）胸部レントゲン所見での新たな浸潤影、（2）膿性喀痰、（3）起因菌の陽性所見、が使われている。これらの定義の感度と特異度の比較が必要であるが、未だに行なわれていない。いずれにしても、感染率を比較する場合の精度を高めるには、統一された診断基準の確立と、情報収集者のバイアスを避けるために ICP（ICN）の養成が必要である。

分析・評価での問題点は感染率を比較する場合のリスクによる調節（Risk Adjustment）である。感染を起すリスクにはカテーテル留置期間などの外部リスクと、疾患や病態の重症度などの内部リスクがある。NNIS system では外部リスクを重視し、報告される感染率は延べディバイス日の千分率で調節されている。たとえば、尿路感染は尿路感染数/1000 延べ尿路カテーテル留置日、VAP は VAP 数/1000 延べ人工呼吸日で示される。外部リスクのみにより調節された感染率は ICU の種類により異なる。NNIS の報告では内科 ICU における VAP は 8.5/1000 延べ人工呼吸日であるのに対し外科 ICU では 14.9/1000 延べ人工呼吸日である。しかし、米国では ICU の分化が明確であり、ICU の種類が同じであれば施設間の比較が可能である。一方、本邦の ICU には特性の異なる患者が入室しており、外部リスクによる調節のみでは施設間の比較が困難である。そこで本邦でのサーベイランス構築にあたっては、APACHE（acute physiology and chronic health evaluation）II scoring system を用いた内部リスクによる層別化を行なうことが必要となる。

国立感染症研究所 細菌・血液製剤部
荒川 宜親

最近、ESBL やメタロ- β -ラクタマーゼについて、細菌検査や感染症の専門家の間で関心が高まっている。しかし、日常の細菌検査業務の中で臨床分離される耐性菌がこれらの酵素を産生しているか否かを判別する事は、技術的にも未完成であり、試行錯誤の段階を脱していない。

以下、我々が用いている識別法について紹介する。

★ ESBL 産生菌のスクリーニング法

● 感受性試験法：

セフトジジムまたはセフトキシムに感受性以外 かつ
セフトドキシムに耐性

しかも、上記の耐性がクラブラン酸、スルバクタムにより阻害される
さらに、セファマイシン、カルバペネムに感受性

上記の条件を満たす株は ESBL 産生菌である可能性がある (図 1)。

● PCR 法： TEM-型 ESBL 検出用プライマーセット

5'-CCGTGTCGCCCTTATTCC-3'

5'-AGGCACCTATCTCAGCGA-3'

SHV-型 ESBL 検出用プライマーセット

5'-ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC-3'

5'-TTTATGGCGTTACCTTTGACC-3'

(注意：K. pneumoniae の場合には CAZ 耐性を E. coli に接合した後、PCR を実施する。) PCR 結果の例を図 2 に示す。

★ IMP-1 メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌のスクリーニング法

● 感受性試験法：

イミペネムに耐性または低感受性 かつ

セフトジジムに高度耐性 かつ

スルバクタム+セフトペラゾンに高度耐性

上記の条件を満たす株は、メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌の可能性が高い。

● 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'

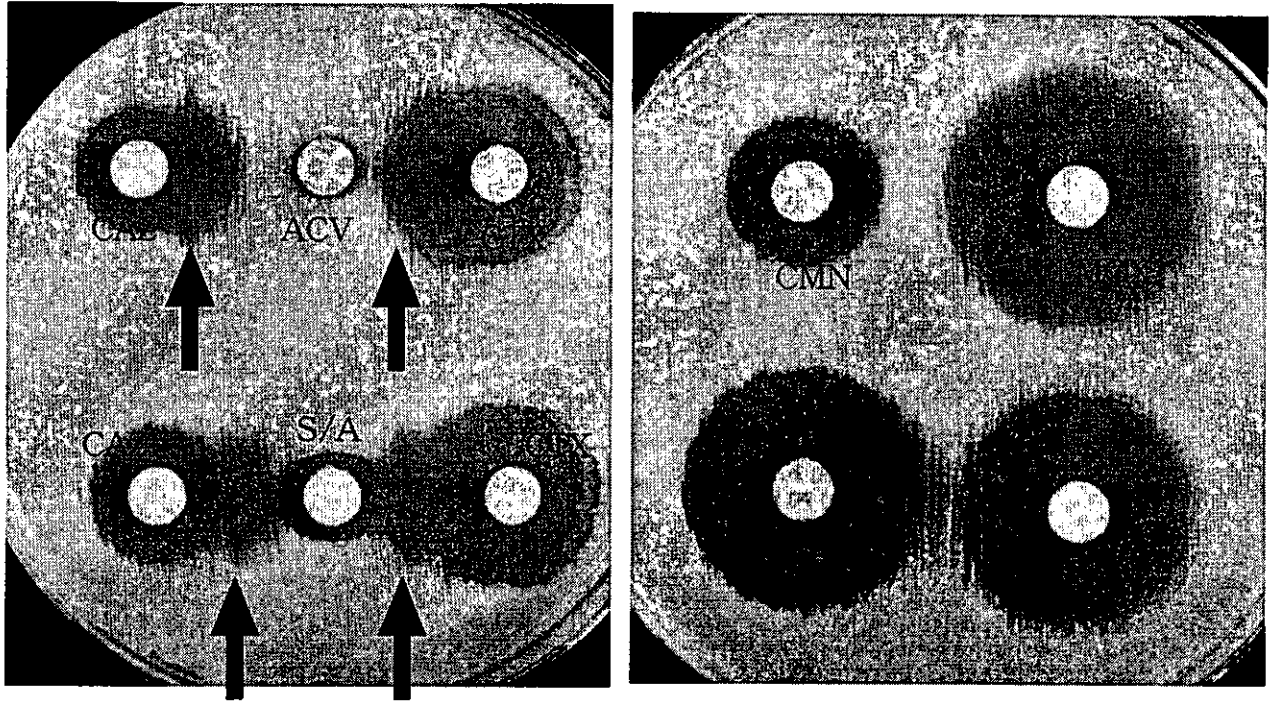
PCR 結果の例を図4に示す。

*PCRの条件

テンプレート DNA の抽出は billing 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

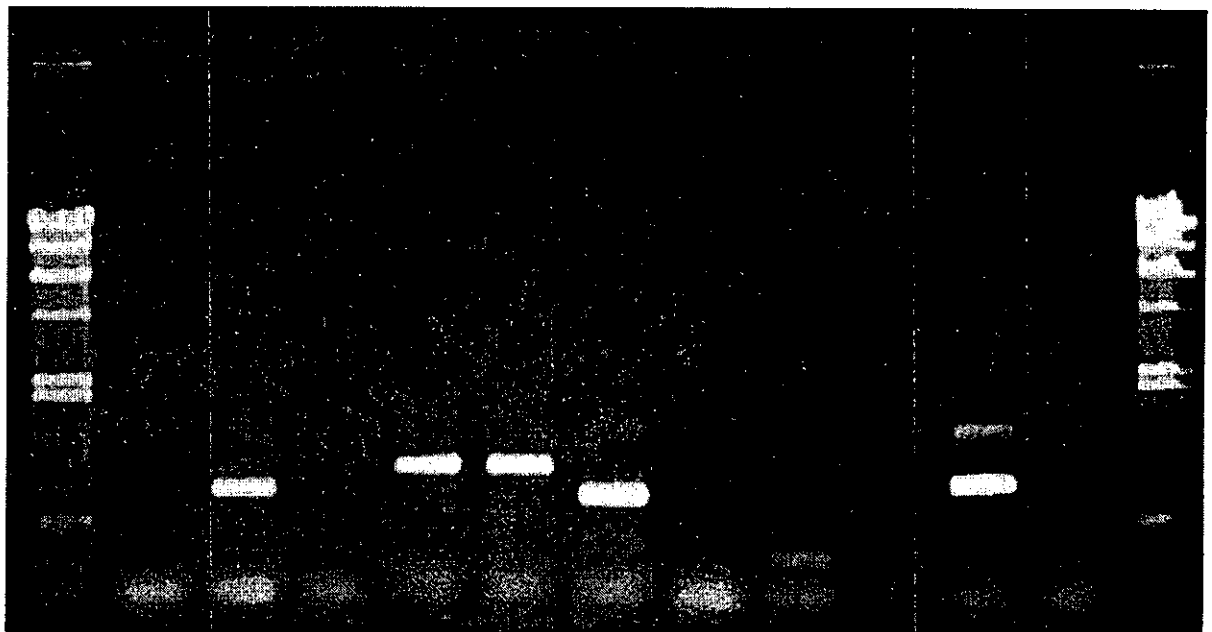


阻害剤による発育阻止帯の拡張

(クラスAβ-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

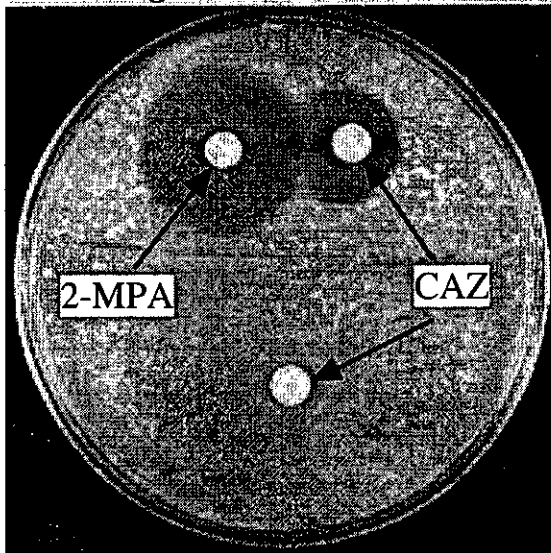


↑
SVH-特異的プライマーで陽性結果が得られた。

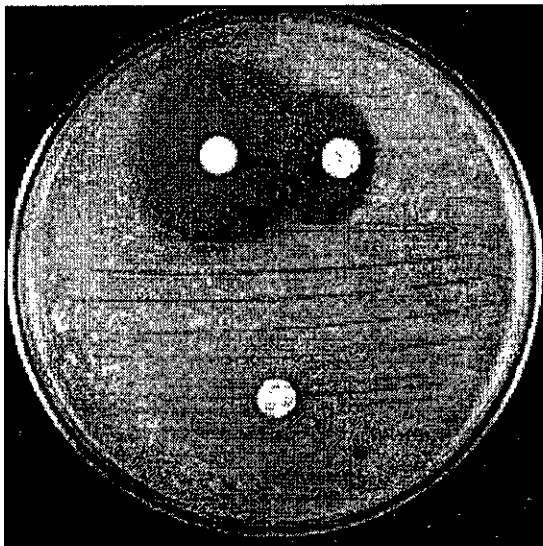
図3. Inhibitory effect of 2-mercaptopropionic acid (2-MPA) on IMP-1 producers and non-IMP-1 producers.

IMP-1 producers

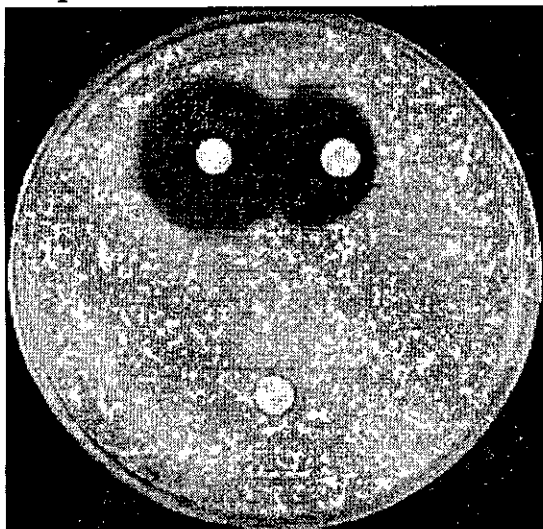
P. aeruginosa [IMP-1]



S. marcescens [IMP-1]

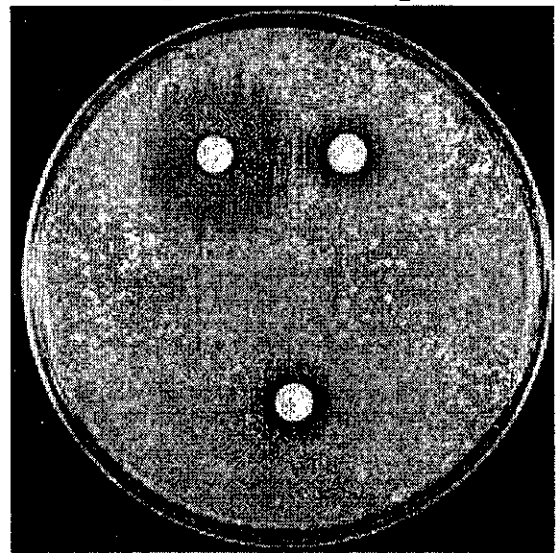


K. pneumoniae [IMP-1]

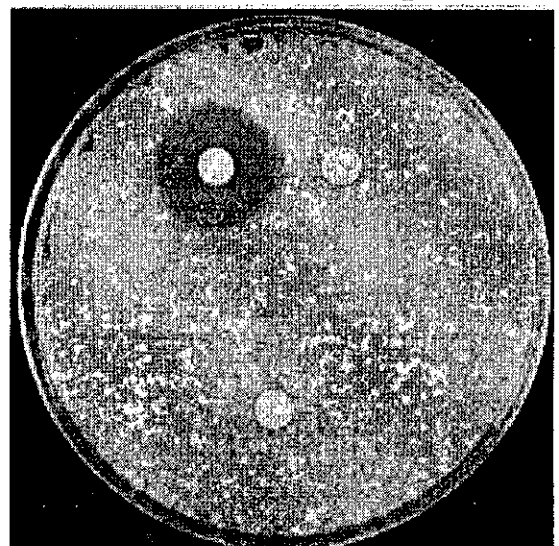


non-IMP-1 producers

P. aeruginosa [AmpC]



S. marcescens [AmpC]



K. pneumoniae [SHV-12]

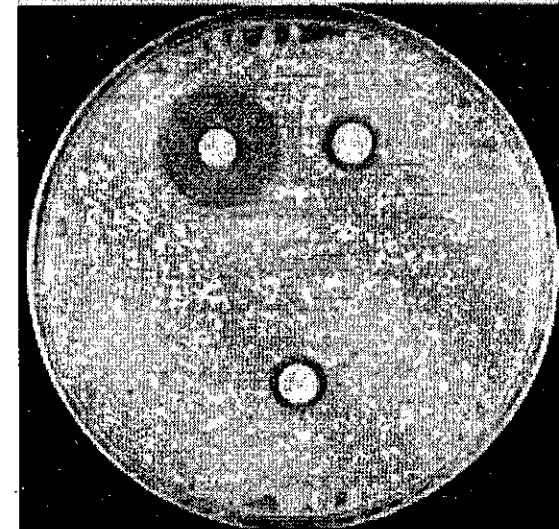
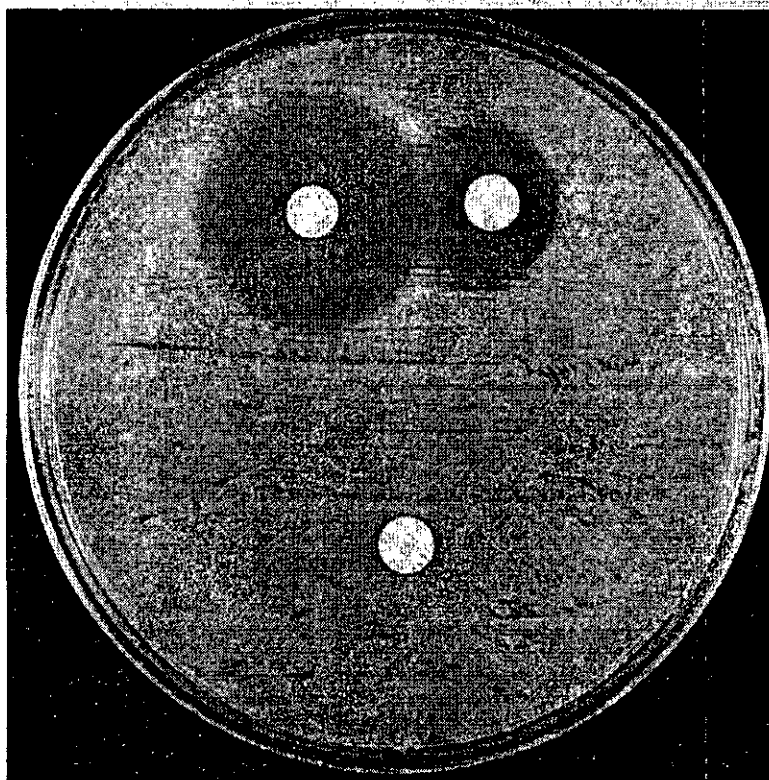


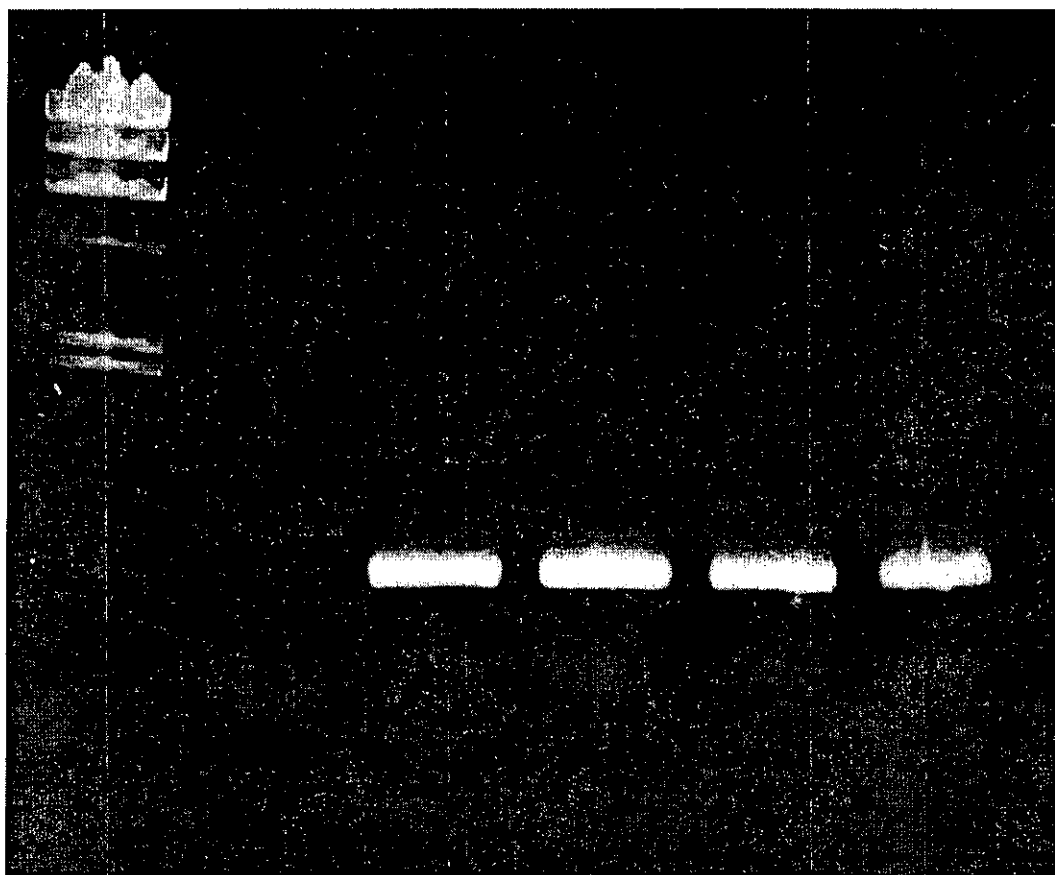
図4. メタロ- β -ラクタマーゼを産生する緑膿菌の例

2-メルカプトプロピオン酸による阻害試験



PCR結果

被 検 株
陰性株 株1 株2 株3 陽性株



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 で一晩培養する。
- 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 で一晩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 で一晩培養を行う。

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プ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 ($1\mu\text{g}$ 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 $4\mu\text{g/ml}$ 以上をMRSAと判定する。

そのほかに、セフチゾキシム (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°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°C (または -40°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は長く延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) バッファーの種類と濃度

一般的にTAEやTBEが使用される。バッファー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

バッファー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ー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。

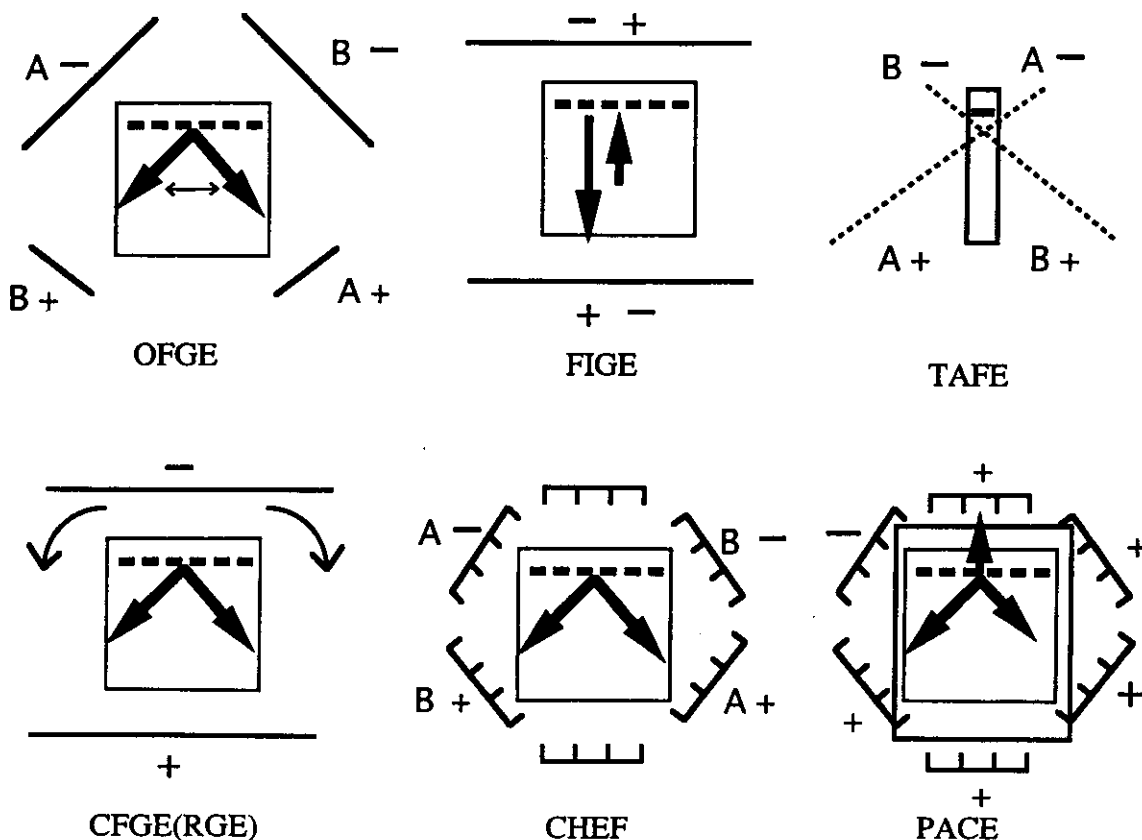
他の菌への PFGE 法の応用について

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