

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
プロテイナーゼ 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) ブ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%)

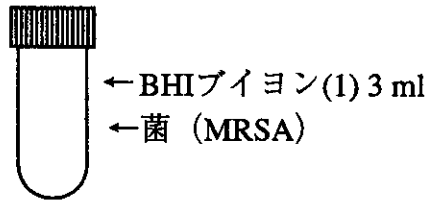
要時、この液でプロテイナーゼ K 1 mg/mlを調整する (=ESP溶液)。

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

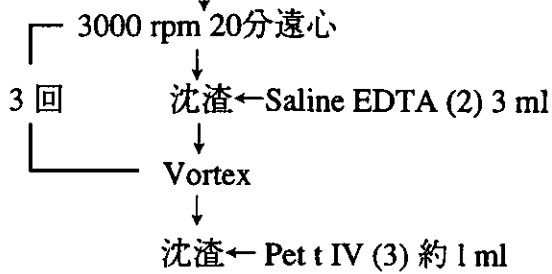
8) プロトコール

1日目



35°C 1夜振とう培養

2日目



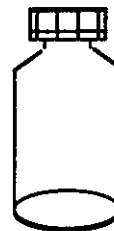
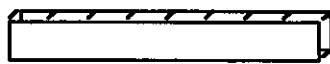
(McF4.0の濃度にする)
(20)

↓ 100 μ l



← 100 μ l
素早く混和

↓ 100 μ l



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

4°C 15分



(アガロースブロック)



← 200 μ l
リゾスタフィン (6)
20 U / 20 μ l



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

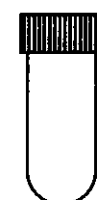
3日目



(溶菌した
アガロースブロック)



← 100 μ l
ES溶液(8) 800 μ l

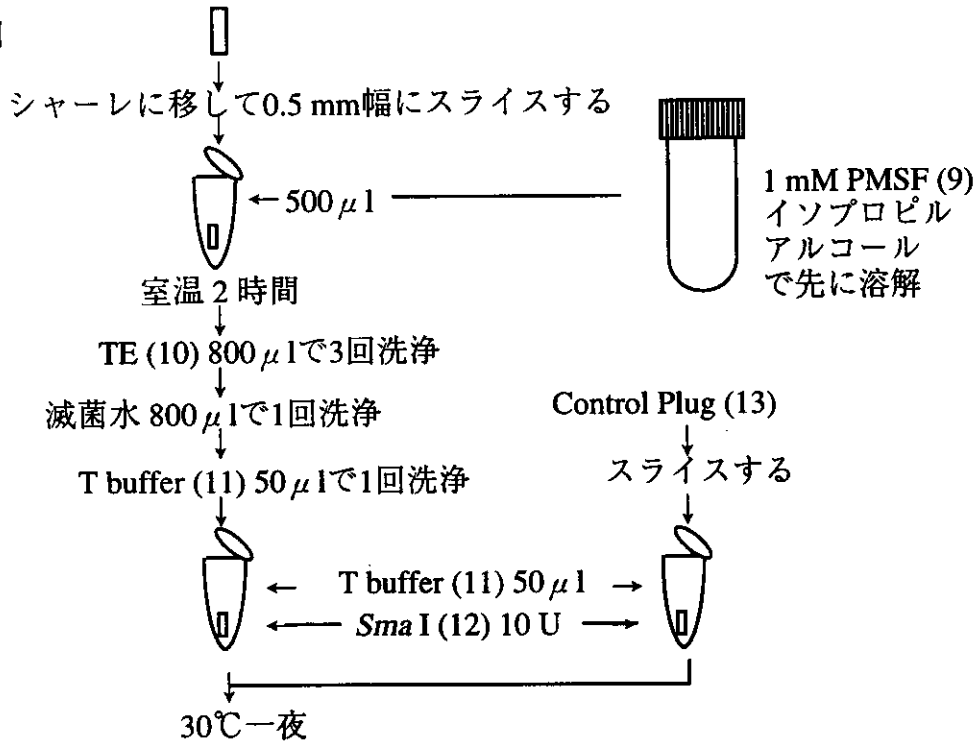


ES溶液 (8)で
プロテイナーゼK溶液
(1 mg/ml)を作る

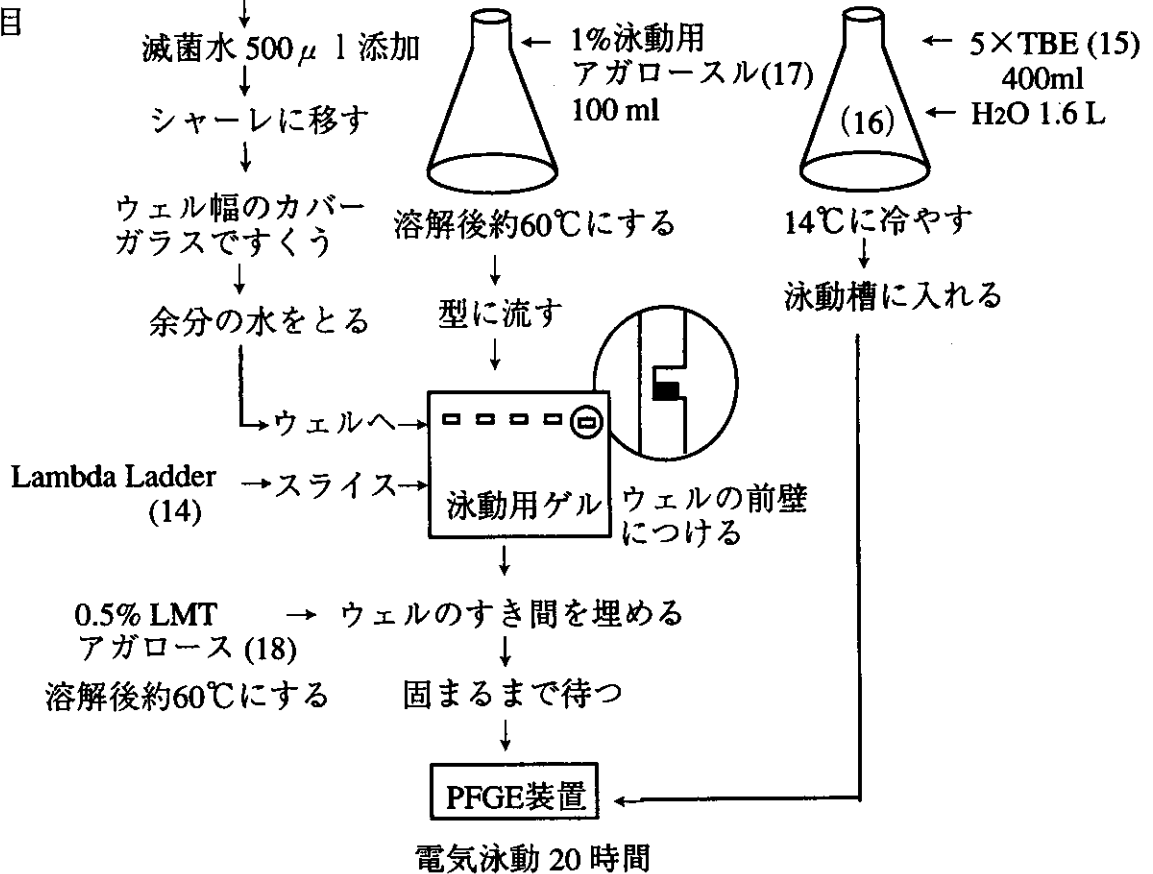
50°C 一夜

60°C 30分

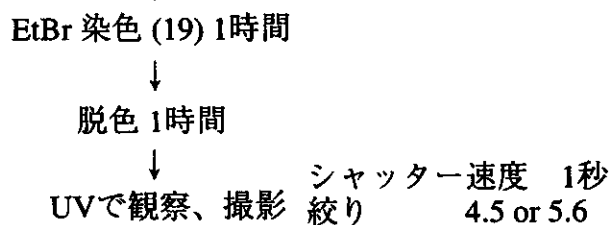
4日目



5日目



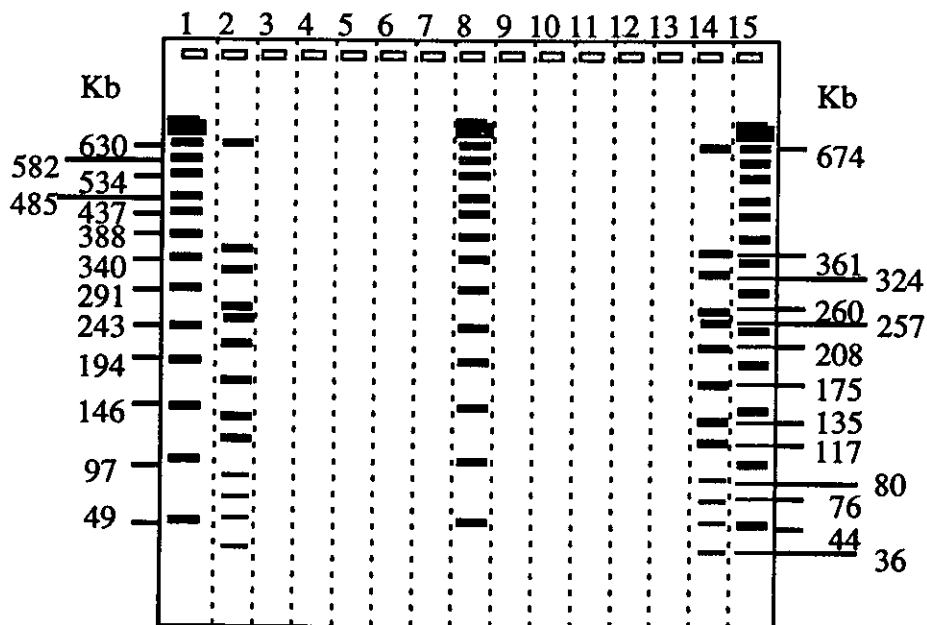
6日目



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

20000818

以降 P.239－244は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
下記「参考資料」をご参照ください。

「参考資料」

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

一山智

JARMAM. 8 卷 2 号, Page55-60,1998.2

II-11
ICT と臨床検査技師の役割

京都大学医学部 臨床生体統御医学
臨床病態検査学 一山 智

※資料を参考にしてください。

20000818

以降 P.246－250は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
下記「参考資料」をご参照ください。

「参考資料」

院内感染防止における微生物検査部門の役割.

一山智

臨床と微生物, 26 巻 4 号, Page375-379, 1999.7

厚生連安城更生病院 臨床検査科
犬塚 和久

院内感染の対策においては、院内感染の発生をより早く確認するサーベイランスシステムが重要である。サーベイランスの目的は、病院感染の発生率を最小限に抑えることであり、検査室は、病院感染の標準感染率の把握、病院感染率（アウトブレイク）の認知、病院感染管理に必要な情報収集・感染管理の評価など感染対策情報を、院内感染対策委員会や感染対策チーム、その他病院内の各部門に対して、感染対策情報を伝える情報センターとしての中心的役割を担っている。

【臨床分離菌サーベイランス】

病院における臨床分離菌株の経時的推移を微生物検査室でモニターする必要がある、現時点では表1の院内感染原因菌を対象菌種と考える。

また、伝染病予防法が101年ぶりに改正され、平成11年4月1日より「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」いわゆる感染症新法が施行された。そのなかに感染症発生動向調査実施要綱に基づく報告基準（*4類感染症）が規定され、検査室での判定基準抗菌薬の種類、MIC値、感受性ディスク（KB）阻止円の直径などが具体的な数値として記載された。

表1 微生物検査室のモニターすべき原因菌

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）注*
バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）*
ペニシリン高度耐性肺炎球菌（PRSP）*
多剤耐性緑膿菌*
広域スペクトラムβ-ラクタマーゼ産生腸内細菌（ESBL）
β-ラクタマーゼ非産生インフルエンザ菌
バンコマイシン耐性MRSA
β-ラクタマーゼ産生腸球菌
ゲンタマイシン高度耐性腸球菌
カルバペネム耐性腸内細菌
多剤耐性結核菌

注*：4類感染症

【院内感染サーベイランス】

感染症診断における微生物検査の役割は、起因微生物を特定することである。検査材料から検出された菌が原因菌か否かの判断が必要となる、本来無菌材料からの菌の検出、病原性非常在菌、特定病原因子を持った菌の検出などは起炎菌であると意味づけることができる。しかし、MRSA、VRE、緑膿菌などは検出、即起炎菌とはならず検体の品質管理、塗抹検査、臨床情報など加味して判断する必要がある。

【伝播要因把握のためのサーベイランス】

院内環境の汚染検査は無菌状態を必要とする環境や、病棟において特定の菌による感染症が多発した場合、伝播経路遮断を効率的に行う目的で職員の保菌検査や環境検査が必要となる。

【スタッフへの感染症報告と対応】

上述のように、検査部から日単位で主治医へ、週単位で各病棟へ、さらに月単位で病院全体へ MRSA の検出状況の報告を行う。また、報告が検査部や院内感染対策チームからの一方的なものにならないように、主治医あるいは各病棟からの報告書の提出を義務づけるのが望ましい。フィードバック機構を設けることで、患者背景を含めた院内感染の全体像を把握することが可能になると考えられる。

【主治医との連携】

MRSA などが検出された場合、隔離などの特別な処置をとる場合が多く、主治医は患者および家族にインフォームド・コンセントをおこなう必要がある。その際、黄色ブドウ球菌は本来ヒトの常在菌であり、健常人は発症しないこと、バンコマイシンなど有効な薬剤があること、手洗いの励行などで伝播が予防できることなどを説明し、いたずらに恐怖心を与えないような配慮が必要である。主治医の説明のみでは不十分な場合は、感染対策チームのメンバーも立ち会い、十分な説明を行うように努める。

参考文献

- 1) 大久保憲, 賀来満夫編: 感染対策 ICT 実践マニュアル, メディカ出版, 大阪, 1997
- 2) NNISmanual: National nosocomial infection surveillance system, CDC, 1994.
- 3) 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律 (医師から都道府県知事等への届出のための基準) 厚生省保健医療局結核感染症課, 1999

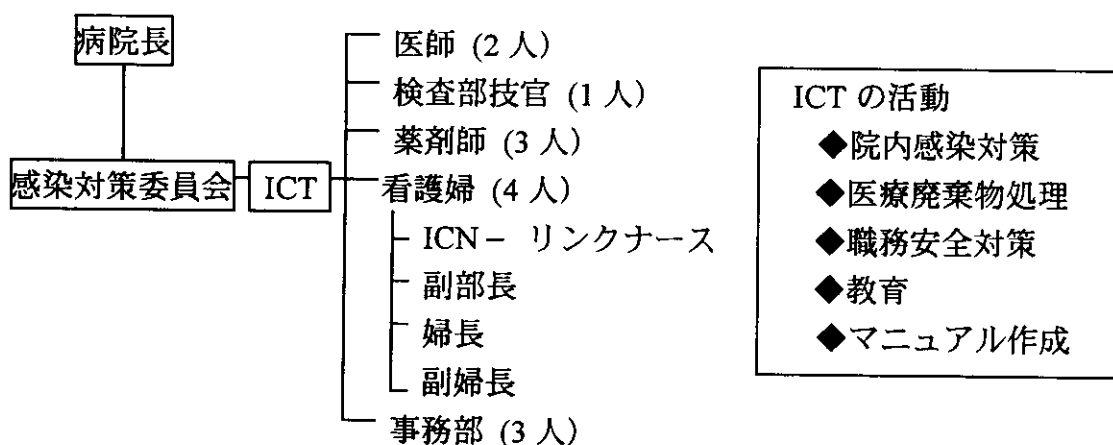
感染対策を効果的・効率的に行うためには、院内全体で組織的な取り組みを行うことが必要である。また、組織が機能を果たし、院内感染対策活動を推進していくためには、感染症に関する正しい判断ができる感染症の専門家-ICD,ICN が必要である。日本ではまだ制度化されていないが、当院での現状の活動を報告し、感染対策における ICN の役割について述べる。

1. ICN の役割と業務

ICN とは、看護専門分野において高度の知識と技術を持つ臨床実践家-専門性に基づいて看護行為のアドバイスと指針を提供する役割を負う

<業務> 監視：Surveillance 情報収集：Monitoring
教育：Education 研究：Research

2. 当院の ICT の組織と役割



3. 当院の感染対策婦長の役割と活動範囲

(1) 患者や職員の感染に関するサーベイランス及びその分析と報告

(2) 患者ケアのモニタリング (病棟ラウンドによる)

感染症発生状況の把握、対応策の検討、患者ケア状況の把握

指導・助言、マニュアル行動の監視・点検、職場環境の整備と点検

(3) 職務安全対策

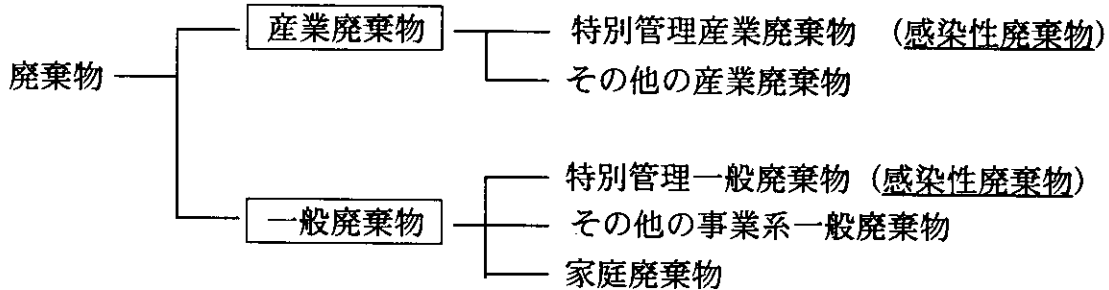
針刺し事故防止対策、結核感染管理、ワクチン接種

- (4) 感染防止の教育と啓蒙活動
 - リンクナースの育成、初任者研修
 - キャンペーン、会報の発行、講演会の開催、院外活動
- (5) 情報の提供とコンサルテーション
- (6) 他部門との連絡・調整
- (7) ガイドライン・マニュアルの作成と修正

II - 14
医療廃棄物

愛知県環境部廃棄物対策課
近藤 了

1 医療廃棄物とは



廃棄物の処理及び清掃に関する法律 (以下「廃掃法」という。)

感染性一般廃棄物と感染性産業廃棄物の種類と具体例

廃棄物の種類	感染性一般廃棄物	感染性産業廃棄物
1 血液等		血液、血清、血漿、体液 (精液を含む。)、血液製剤
2 手術等に伴って発生する病理廃棄物	臓器、組織	
3 血液が付着した鋭利なもの		注射針、メス、試験管、シャーレ、ガラスくず等
4 病原微生物に関連した試験、検査等にもちいられたもの	実験、検査等に使用した培地、実験動物の死体等	実験、検査等に使用した試験管、シャーレ等
5 その他の血液等が付着したもの	血液等が付着した紙くず、繊維くず (脱脂綿、ガーゼ、包帯等) 等	血液等が付着した実験・手術用の手袋等
6 汚染物若しくはこれらが付着した又はそれらのおそれのあるもので1～5に該当しないもの	汚染物が付着した紙くず、繊維くず	汚染物が付着した廃プラスチック類等

2 感染性廃棄物の管理体制

医療関係機関等の施設内で生ずる感染性産業廃棄物を適正に処理するために、特別管理産業廃棄物管理責任者を置き、管理体制の充実を図る。(廃掃法第12条の2第4項)

(1) 特別管理産業廃棄物管理責任者に必要な資格

- ・ 厚生大臣が認定する講習の課程を修了した者
- ・ 医師、歯科医師、薬剤師、保健婦、助産婦、看護婦、臨床検査技師、衛生検査技師（衛生検査所に勤務する者に限る。）及び獣医師

(2) 特別管理産業廃棄物管理者の設置（変更）報告

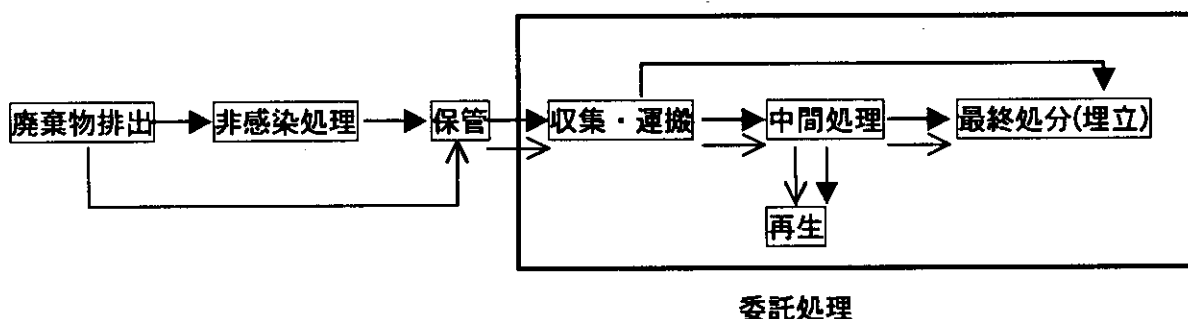
30日以内に都道府県知事に報告（保健所設置市では市長）

3 廃棄物の処理

医療関係機関等は、医療行為等によって生じた廃棄物を自らの責任において適正に処理しなければならない。(廃掃法第3条第1項)

(1) 一般廃棄物：市町村の指示に従って処理する。

(2) 産業廃棄物：医療関係機関等は、自らの責任の下で、自ら又は他人に委託して処理する。



ア 保管等の注意(廃掃法第12条の2第2項)

- ・ 感染性廃棄物は他の廃棄物と分別して保管・排出する。
- ・ 感染性廃棄物の保管場所は、関係者以外立入らないよう配慮し、感染性廃棄物の存在を表示するとともに取扱いの注意事項を記載する。
- ・ 密閉できる容器に梱包し、運搬容器に感染性廃棄物の識別マーク（バイオハザードマーク等）を付ける。

イ 委託処理の方法(廃掃法第12条の2第3項)

- ・ 当該医療関係機関等と廃棄物処理業者とが直接委託契約を締結する。
- ・ 委託業者は、都道府県知事の許可を受けた業者であること。許可証の写しを提出させ、産業廃棄物処理業の区分、許可品目、許可期限、処理能力等を確認する。
- ・ 医療関係機関等は、産業廃棄物管理票（マニフェスト）を交付し5年間保

存する。

- ・産業廃棄物管理票の交付日から60日以内に委託業者から産業廃棄物管理票の写しの送付がないときは、委託した産業廃棄物の運搬又は処分の状況を把握するとともに、都道府県知事に報告する。
- ・毎年6月30日までに前年の特別管理産業廃棄物の処理実績及び産業廃棄物管理票交付状況を都道府県知事に報告する。

なぜ EBM か：価値観の転換

EBM とは 患者に対して、医療情報の妥当性・信頼性を十分ふまえた上で、確実に明確な臨床判断を行なうことを重要視する医療方法と定義されます。

これを実行するために必要とされるものは以下の3つです。

経験と専門知識

現状で利用可能な最も妥当な客観的根拠

これらに基づいた医療を可能にする環境

EBM は、実際の患者に必要な根拠、具体的には論文などを探し出す方法論だけではなく根拠を評価し、実際の患者に適用できるかどうか、適用するなら実際にどのような行なうかを判断する方法論まで含む、包括的で実際的な手法です。

なぜこの考え方がこれほど注目されるのでしょうか。これにはいくつかの要因があると思われていますが、以下のような価値観の変化も重要な要因となっています。

医療情報に関する従来の考え方

個人の経験は、臨床判断・治療成績に重要な役割を果たす。

経験のある者の意見や改訂を重ねた教科書の記述に沿った医療を行うべきである。

病態生理学的知見や生理・生化学的指標の改善から有効性の判断が行える。

In vitro や動物実験の結果はバイアスが入りにくく再現性もあるため、臨床で使用される情報として妥当性が高い。

EBM を支える基本概念

臨床家は、体系的な再現可能でバイアスのない研究結果をもとに、自らの患者に対して真の予後、治療効果、検査の有効性などを考慮し、可能な限りその信頼性を確かめてあてはめるべきである。

病態生理学的な知識は必要であるが、決してそれだけで十分なわけではない。必ずしも、病態生理学的な推論や生理・生化学的指標の改善は臨床上的効果（生存率の改善など）を予測できない。

根拠(evidence) の評価法を身につけることが、臨床論文を利用するために重要である。

Evidence-based Medicine の基本手順

- 今直面している疑問・問題を整理し、定式化する。→しばしばあいまいでわかりにくい課題を、お互いに共有しやすく答えを見つけやすいように整理する。
- この疑問に基づいて論文などの情報検索を行う。→問題の定式化の中で keyword は決まってくる。
- その情報を信頼してよいかどうか批判的に吟味する。→これも一定の手順に従って行う。
- その結果に基づいて、患者・状況にあった判断を行う。→ここでも一定のチェックポイントが示されている。
- その判断の結果を自己評価する。

現場から疑問を作る Three part question

問題の定式化とは、実際の現場で疑問の 3 要素を拾い上げることをさします。その 3 要素は以下ようになります。患者/対象(patient)・介入/曝露(intervention/exposure)・転帰/結果(outcome)

シナリオから、疑問をまとめてみましょう。この疑問をまとめる作業が、EBM の第 1 ステップであり、もっとも重要なステップです。

今回の講習会での目的

実際に臨床で直面する疑問についていくつが実例を挙げて考えてみましょう。また、その実例に基づいて、どのように情報を探るか、さらにどのような情報が価値が高いと考えられるかについてまとめてみましょう。

医療情報のチェックポイント

以下のサイトに、資料がアップしてあります：

<http://www.biwa.ne.jp/~kozai/dins/kensyu.html>

また、月刊薬事 1999 年 4 月号から、「病棟業務に役立つ臨床論文を読むときの基礎知識」という連載を行っています。いずれも、医療情報のチェックポイントについてまとめてありますのでご利用下さい。