

析結果と同様に、抗 IMP-1 イムノクロマト法構築に用いた抗体が広範囲のメタロβラクタマーゼを検出可能であることを強く示唆している。

4. 多剤耐性緑膿菌の分子疫学解析

4-1. AAC(6')-Iae 陽性株

イムノクロマト法によって 248 株中 157 株(64%)で AAC(6')-Iae 産生が検出された。陽性株の地理的分布を解析した結果、47 都道府県中、24 都道府県において検出されることが分かった(図 3)。陽性株は全て *aac(6')-Iae* 遺伝子陽性であった。AAC(6')-Iae は多剤耐性緑膿菌におけるアミカシン耐性に大きく寄与していることが示唆される。しかしながら、AAC(6')Iae 陽性 158 株中 23 株においてはクラス 1 インテグロンが検出されなかった。陽性株のパルスフィールドゲル電気泳動解析は、これまでに見いだされてきた AAC(6')-Iae 産生多剤耐性緑膿菌とは異なるゲノム構造を有する AAC(6')-Iae 産生株がクローナルなクラスターを形成していることを示した(図 4)。既知 AAC(6')-Iae 産生株の多くは血清型が O:11 であるが、新規クラスターに属する株の血清型は、デンカ生研の血清型判別試験では、いずれの血清型にも凝集反応を示さなかった。

4-2. AAC(6')-Iae 陰性株

90 株の AAC(6')-Iae 非産生株について既知 *aac(6')-I* 遺伝子およびクラス 1 インテグロンの PCR 解析を行ったところ、45 株の *aac(6')-Ib* 遺伝子保有株、5 株の *aacA7* 遺伝子保有株、および 5 株の *aac(6')-3I* 遺伝子保有株を同定した。陽性株を含む全ての解析対象株のパルスフィールドゲル電気泳動解析は、陰性株の中にも陽性株と類似性が高いゲノム構造を有する株が存在することを示した(図 5)。

D. 考察

本アンケート調査から、以下のような多剤耐性緑膿菌分離状況が推定された。平成 21 年度が多剤耐性緑膿菌株数の割合は、わが国の 200 床以上の医療施設では 2.5%であった。分離される検査材料として尿路系検査材料が多かった。ほとんどの医療施設で多剤耐性緑膿菌の分離患者数は 1000 床あたり 1 年間に 20 名程度で、医療施設内で高頻度に分離されている状況ではなかった。一方、1000 床あたり 1 年間に百名を超える患者から多剤耐性緑膿菌が分離されている医療施設もあった。以上の結果から、多剤耐性緑膿菌が医療施設で新興していることが明らかとなった。

多剤耐性緑膿菌による院内感染を防止するためには以下の対策が重要であると考えられる。

【多剤耐性緑膿菌感染対策に関わる提案】

1) 病院長のリーダーシップ:

病院長の強いリーダーシップのもとに多剤耐性緑膿菌分離に焦点を絞った感染対策プログラムを実施する。

2) 職員教育(周知徹底):

全ての医療従事者が多剤耐性緑膿菌に関する知識を十分に持つ。

3) 感染制御に関わる院内体制の見直し:

実行力のある感染制御チーム(ICT)を作る。

4) 多剤耐性緑膿菌分離の重点的な監視:

・施設内監視体制の強化

細菌検査室を中心に多剤耐性緑膿菌を重点的に監視し、得られた情報をできるだけ早く医療現場に周知。

・地域連携

他の医療施設と情報を交換し地域内での多剤耐性緑膿菌の分離状況を把握する。

5) 感染制御マニュアルの作成:

標準予防策、接触予防策、場合によっては飛沫予防策の手順(感染制御マニュアル)を作成。

E. 結論

本研究から、これまで宮城県、広島県、東京都の医療施設で分離された AAC(6')-Iae および IMP-1 産生高度多剤耐性緑膿菌が、日本全国の医療施設から検出されることが明らかとなった。今後は、aac(6')-Iae ならびに bla_{IMP} 遺伝子の伝達様式につ

いて詳細を明らかにして行く必要がある。また、高度多剤耐性緑膿菌による院内感染伝播の感染伝播防止対策は非常に重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Tanaka M, Narahara K, Saito N, **Kirikae T.**

Development of an immunochromatographic assay for the rapid detection of AAC(6')-Iae-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

J Antimicrob Chemother. 2010, 65(7):1382-6.

表 1

薬剤耐性菌判定基準: <http://www.nih-janisis.jp/section/kensa.html>

MDRP: 多剤耐性緑膿菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	微量液体希釈法	カルバペネム(IP M/ CS, MEPM) の何れかが“R” かつ AMK \geq 32 μ g /mL
		かつ フルオロキノロン(NFLX、O FLX、LVFX、CPFX、LFLX、GFLX) の何れかが“R”
	ディスク拡散法:	カルバペネム(IP M/ CS, MEPM) の何れかが“R” かつ AMK \leq 14mm かつ フルオロキノロン(NFLX、O FLX、LVFX、CPFX、LFLX、GFLX) の何れかが“R”

IPM/CS: イミペネム、ME PM: メロペネム、AMK: アミカシン、NFLX: ノルフロキサシン、OFLX: オフロキサシン、LVFX: レボフロキサシン、CPFX: シプロキサシン、LFLX: ロメフロキサシン、GFLX: ガチフロキサシン

表2. 771医療施設における緑膿菌、2剤耐性緑膿菌および多剤耐性緑膿菌の分離状況

菌株		平成19年度	平成20年度	平成21年度
緑膿菌	分離総数 ^a	228449	233301	223232
	年・1000床あたりの分離数	723.0	738.4	706.5
2剤耐性緑膿菌	分離総数	14340	14043	13009
	年・1000床あたりの分離数	45.4	44.4	41.2
	分離率(% ^b)	6.3	6.0	5.8
	分離患者数 ^c	6789	6474	6231
	年・1000床あたりの患者数	21.5	20.5	19.7
多剤耐性緑膿菌	分離総数	7688	6540	5683
	年・1000床あたりの分離数	24.4	20.7	18.0
	分離率(%)	3.4	2.8	2.5
	分離患者数	2779	2481	2246
	年・1000床あたりの患者数	8.8	7.9	7.1

a: 回答のあった771施設から分離された菌株数

b: 緑膿菌分離総数あたりに占める耐性緑膿菌数の割合(%)

c: 耐性菌が分離された患者数

表3. 臨床検査受託事業所における緑膿菌および多剤耐性緑膿菌の分離状況

菌株		平成19年度	平成20年度	平成21年度
緑膿菌	分離総数 ^a	70718	66997	52302
多剤耐性緑膿菌	分離総数 ^b	1281	1103	1107
	分離率(%)	1.8	1.6	2.1

a: 回答のあった2事業所から分離された菌株数

b: 緑膿菌分離総数あたりに占める多剤耐性緑膿菌数の割合(%)

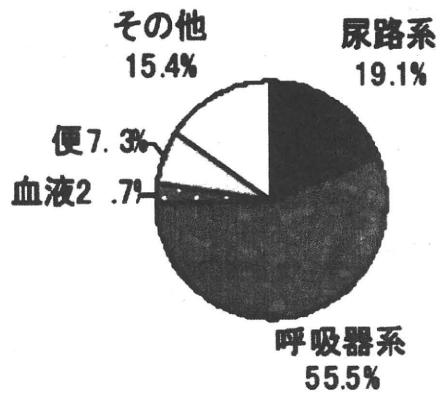


図1a. 医療施設において単剤耐性が分離された臨床材料の種類(平成19~21年度合計)

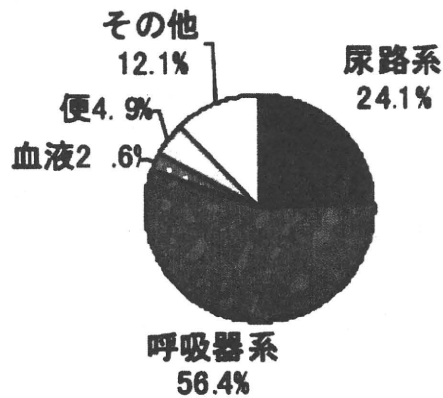


図1b. 医療施設において2剤耐性が分離された臨床材料の種類(平成19~21年度合計)

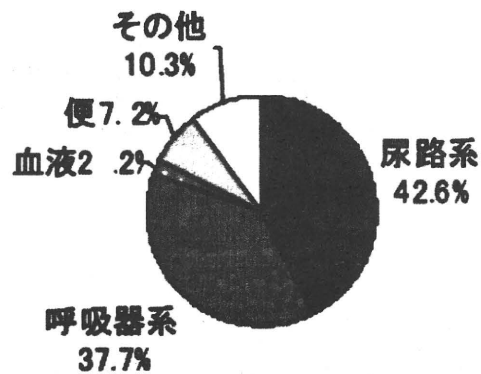


図1c. 医療施設において多剤耐性が分離された臨床材料の種類(平成19~21年度合計)

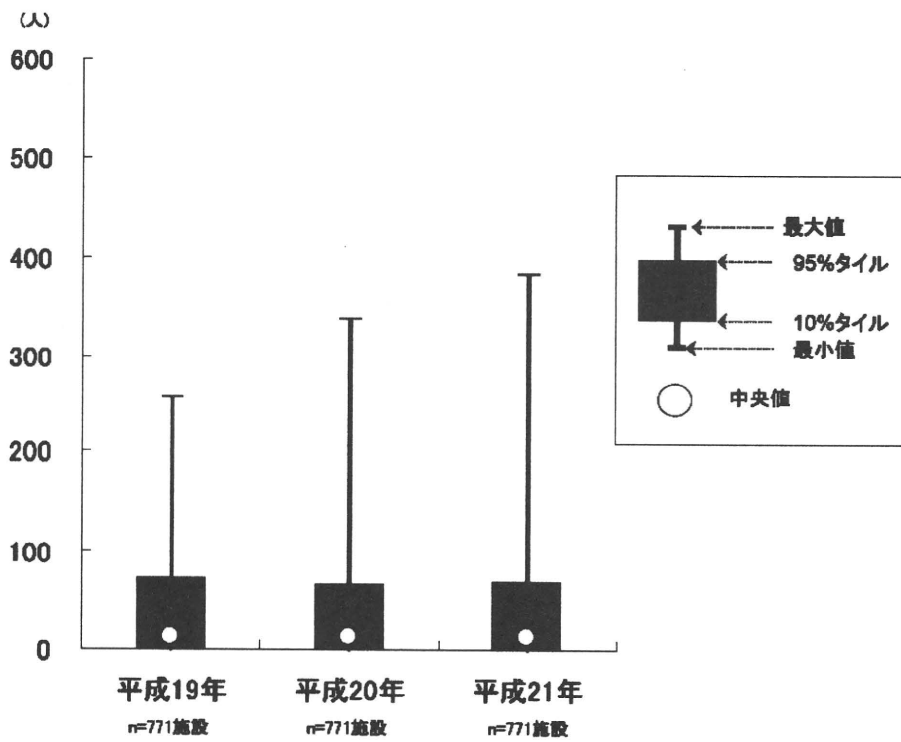


図 2a. 2 剤耐性緑膿菌分離患者数 (年・1000 床あたり)

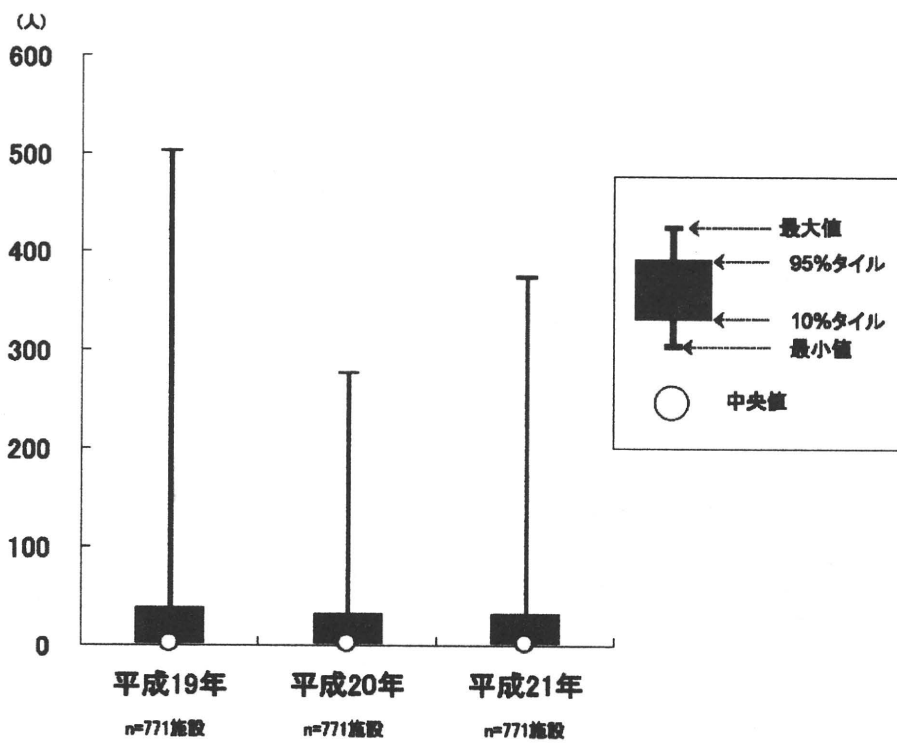


図 2b. 多剤耐性緑膿菌分離患者数 (年・1000 床あたり)

図3

AAC(6')Iae産生多剤耐性緑膿菌の地理的分布

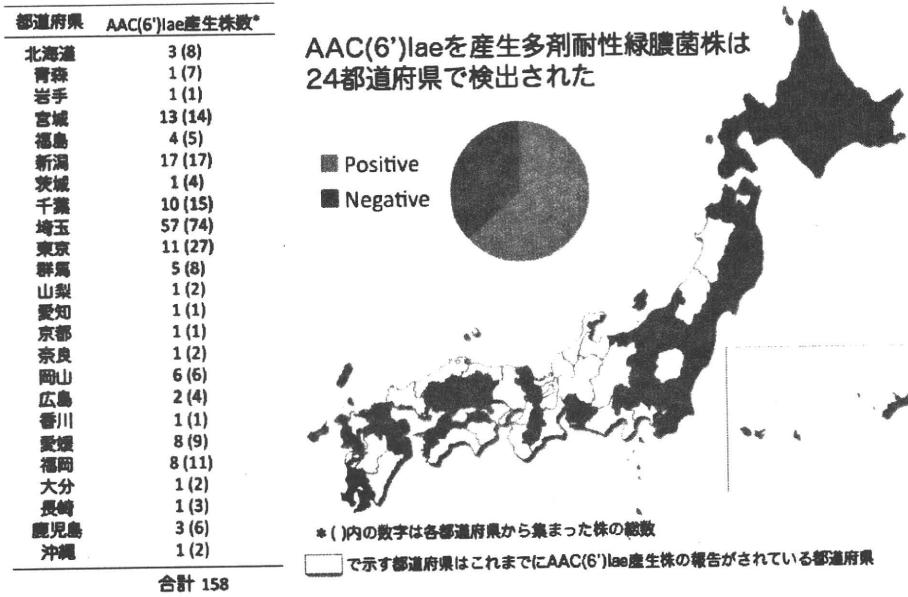


図4

AAC(6')Iae産生多剤耐性緑膿菌のPFGE解析

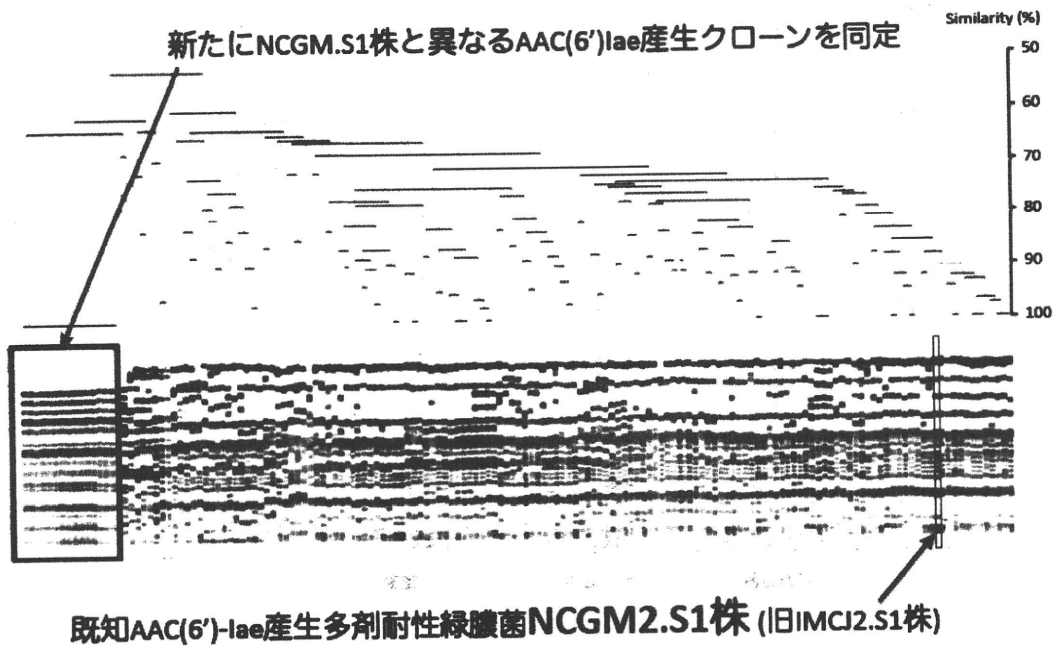
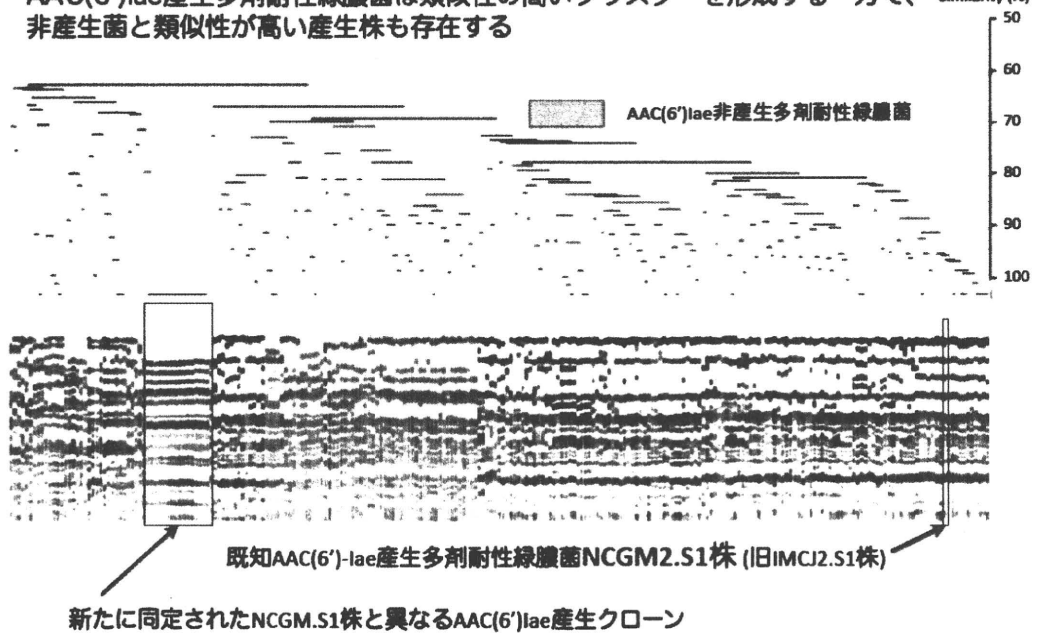


図 5

多剤耐性緑膿菌248株のPFGE解析

AAC(6')*lae*産生多剤耐性緑膿菌は類似性の高いクラスターを形成する一方で、非産生菌と類似性が高い産生株も存在する



地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究

研究分担者 倉田 毅（富山県衛生研究所）

研究要旨

薬剤耐性菌（以下、「耐性菌」）を医療機関その他において迅速に把握し、健康被害の拡大を防止することは現在の医療のかかえる重要な課題である。本研究では、地方衛生研究所（以下、「地研」）の耐性菌検査の現状を把握し、その上で検査技術の向上を目的とした研修会を今年度も昨年と同様に行ない、地研と耐性菌検査の取り組み方に対する方向性について議論した。さらに、新しい耐性遺伝子の出現や多剤耐性化へ向かう耐性菌に対応した分子疫学的データを得るための検査法の開発（「LinePCR」と命名）を行った。

研究協力者

綿引 正則（富山県衛生研究所）
磯部 順子（同上）
八柳 潤（秋田県健康環境センター）
白木 豊（岐阜県保健環境研究所）
鈴木 匡弘（愛知県衛生研究所）
石畝 史（福井県衛生環境研究センター）
菅野 奈美（福島県衛生研究所）
青木 敦子（埼玉県衛生研究所）
砂押 克彦（同上）
村上 光（福岡県衛生研究所）
緒方喜久代（大分県衛生環境研究センター）

A. 研究目的

耐性菌による医療関連感染症などの発生を早期に把握し、健康被害の拡大を防止するために、地研の検査解析能力をどのように有効利用するか、具体的に検討し提言することが本研究の目的である。

そのために、1) 検査技術強化のための研修会を開催し、地研担当者と議論し、耐性菌の解析機能強化について支援すること、2) 近年発生している新しい耐性菌の検査に対応した新たな解析法の開発を行い、その過程で自ら耐性菌の解析能力の向上を図り、医療関連分野だけでなく、広く公衆衛生分野で貢献することを目指す。

B. 研究方法

B-1. 平成22年度研修会の開催

薬剤耐性菌解析機能強化のために技術研修会を実施した。

B-2. 薬剤耐性菌の検査法開発

B-2-1. DNA と供試菌株

LinePCR のモデル実験には、既に配列が明らかにされているλファージ DNA（Accession No. J02459）を鋳型として用いた。

LinePCR の実際の評価には、メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 産生性緑膿菌 20 株を用いた (Table 1)。

B-2-2. PCR

PCR に用いた酵素は、市販されている以下の酵素あるいはキット(メーカー名)を使用した。

Multiplex PCR Amplification Kit (Qiagen)
KODFX (Toyobo)
GoTaq Hot Start (Promega)
Phusion Flash HF PCR Kit (NEB)
KAPA2G Fast HS (KAPA Biosystems)
AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)
AmpliTaq Gold 360 (Applied Biosystems)
MightyAmp DNA polymerase (Takara)
Prime STAR GXL (Takara)

反応条件は、いずれもメーカー推奨条件に従った。また、PCR は、サーマルサイクラー-DICE TP600 あるいは TP650 (Takara) を使い、2 ステップあるいは 3 ステップサイクリング法を用いた。伸長温度をグラジエントモードで反応する場合には、TP600 を用いた。

また、PCR 後の増幅産物の解析には、1.5% アガロース (1×TAE) で、100V 40 分泳動し、エチジウムブロミドにて染色、脱色後、ChemiDocXRS

にて撮影した。

B-2-3. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)
緑膿菌 20 株は、制限酵素 *SpeI* を用いて、PFGE
解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、疫学研究に関する倫理指針の対象外
である。

C. 研究結果

C-1. 研修会の概要

研修会は、平成 22 年 9 月 10 日(金)~11 日(土)
の二日間にわたり、国立感染症研究所村山庁舎、
講義室及び実習室にて、参加者 27 名を得て、実
施した。

研修内容 (Fig.1、研修内容のプログラム記載)
を昨年と同様とし、感染症法で届出が義務付けら
れているバンコマイシン耐性腸球菌の遺伝子検
査およびメシチリン耐性黄色ブドウ球菌の分子
疫学的な解析法である POT 法の実習した (Fig.2
実習風景)。

また、昨年の研修会とは異なり、今年度は国の
薬剤耐性菌の院内感染対策サーベイランス事業
(JANIS)を JANIS 事務局から紹介してもらう時
間を設け、耐性菌の分離状況と院内感染の発生状
況に関する活動内容を解説してもらい、理解を深
めた。

C-2. 耐性菌の新しい分子疫学的検査法 (LinePCR)の開発

C-2-1. λファージゲノム配列を鋳型とした LinePCR のモデル実験

LinePCR のモデル実験に使用するプライマーは、
λファージ DNA 上の配列約 1.5kb の領域 (6507
- 8111) に約 500bp 間隔で 4ヶ所設定し、いずれ
も完全に相補的な配列として作製した。今回使用
したプライマーは Table 2 及び Fig.6 に示した。

8 本のプライマー各々 10μM とし等量混合して、
終濃度各々 0.1μM とし、Multiplex PCR
Amplification Kit (以下、Multiplex PCR Kit) ある
いは KODFX を用いて PCR を実施した。サイク
リングプログラムは、2 ステップ反応を 30 回繰り
返した。また、KODFX については、ステップダ
ウン法 (伸長温度を徐々に下げながら、PCR の特
異性を維持する方法) を採用した。その結果、約

500 塩基対の距離で、完全な相補的な配列として、
添加したプライマーにより、Multiplex PCR Kit 及
び KODFX を用いた場合、ほぼ予想通りの位置に
特異的と思われる増幅物が得られることが判明
した (Fig.7)。

C-2-2. インテグロンを型別する LinePCR

C-2-2-1. プライマー設計

細菌間で起こる遺伝子伝達機序として、インテ
グロンは、耐性遺伝子と関連した機能単位として
知られている。そこで MBL 産生性緑膿菌を対象
とした、インテグロンに共通して存在する遺伝子
やカセット化した薬剤耐性遺伝子を含めて、既に
報告されている配列から LinePCR 用プライマー
を設計した。今回対象とした配列及びプライマー
設計に利用した配列を以下に示す (Fig.9)。

- 1) インテグロンに共通に存在する対象遺伝子
int1 (インテグラーゼ Ac. No. AF467306)
sul1 (ジヒドロプロテロイン酸シンターゼ
Ac. No. AF263519)
qacE Δ (四級アンモニウム化合物耐性遺伝子
の一部、Ac.No. AF313472)
- 2) インテグロン中に存在する薬剤耐性に寄与す
る遺伝子
aacA4 (Ac.No. AF302086)
aadA (Ac.No. KOU90945)
aadB (Ac.No. AF078527)
blaVIM-1 (Ac.No. AJ784805)
blaIMP-1 (Ac.No. X98393)

以上の配列を基本として、DDBJ の配列デー
タベースに登録されている同一遺伝子の配列を複
数選択し配列比較を行った。そこで、全ての配列
に共通し、プライマー配列内に 2 塩基以上の同
塩基の連続がなく、さらに 3'-末端は G あるいは C
となる条件を満たす配列を選択した (Fig.9、こ
こでは配列は示していない)。実際の PCR に使用す
るプライマーの選択は、同一遺伝子中からは距離
にして 300~600 塩基離れたプライマーを適宜選
択して使用した。

C-2-2-2. 作製したプライマーの非特異的な増幅の 有無の確認

本法は、添加するプライマーの種類及びその数
が通常の PCR と比較して極めて多いことが特徴
である。従って、PCR に用いる酵素により非特異
的な増幅が生じることが予想される。そこで作成
したプライマーを用いて、鋳型を添加しない PCR
の条件下で、非特異的な増幅物の有無を検証した。

従来から市販されている TaqDNA ポリメラーゼ (ニッポンジーン) と非特異的な増幅を極力減らすように工夫された Multiplex PCR Kit を用いた結果を比較した。また、対照として単一のプライマーを添加した PCR も実施した。

その結果、Taq DNA ポリメラーゼを用いた場合、いくつかの相補的なプライマーで、非特異的と思われる増幅物が確認された。また、一本のプライマーについても確認したところいくつかのプライマーを用いたときに、非特異的な増幅物が観察された。しかし、Multiplex PCR Kit を用いた場合には、まったく観察されなかった (Fig.10)。

C-2-2-3. LinePCR に最適な市販 PCR 用酵素及びキットの検討

LinePCR 法に最適な PCR 用酵素を調べるために市販酵素あるいは Kit、9 種類を評価した。

評価方法は、以下の通りである。

- 1) DNA 緑膿菌 Pa2 株 10ng 使用、PCR 反応体積 20 μ L
- 2) Primer Mix (以下の 6 本のプライマー、Fig.9) *int1-a31f*, *int1-a31r*, *int11-a673r* (インテグラーゼ遺伝子) *sull-a292f*, *sull-a292r*, *sull-a607f* (ジヒドロプロテロイン酸シンターゼ遺伝子)
- 3) サイクルプログラム
2ステップ 30サイクル
伸長反応温度: 69–75°C 間で12段階の温度グラジェンド プログラム使用 (Takara サーマルサイクラー-DICE TP600)

結果を、Fig.11に示した。この結果の評価は、使用したプライマーが、*int1*及び *sull*を鋳型とした増幅物 (各々、642塩基対と315塩基対) と *int1*及び *sull*間に存在する配列を含むサイズの増幅物 (642塩基対以上) が検出されるかどうかによって判断することができる。

その結果、AmpliTaq Gold, AmpliTaq Gold 360及び GoTaq HS は、*int1*由来の増幅物が伸長温度が低いところで検出されるが、その他の増幅物はほとんど検出されず、本研究目的の LinePCR には利用できないことが判明した。また、Phusion Flash HF PCR Kit, KAPA2G Fast HS, MightyAmp DNA polymerase は、高分子領域に増幅物が観察され、非特異的な増幅物であると思われた。PrimeSTAR GXL DNA polymerase は、明確な増幅物が観察されているが、*sull*由来の増幅物がほとんど観察されていないため、プライマーによる PCR 反応中のバイアスが大きいと思われた。Qiagen Multiplex PCR Kit 及び KODFX については、その増幅を比

較すると酵素によるプライマーのバイアスは存在するものの、予想通りの大きさの増幅物が観察され、特異的な LinePCR の結果とした結果であると思われた。特に KODFX については、低分子から高分子までの増幅物がほぼ均一であり、今回の検討では最も LinePCR に適した酵素であることが判明した。

C-2-2-4. LinePCR によるインテグロン構造多型と PFGE 像の比較による LinePCR の評価法

LinePCR 用の酵素として Multiplex PCR Kit 及び KODFX が最適であることが判明したので、実際の臨床分離株を用いて現在、最もよく利用されている分子疫学的手法である PFGE との比較を行い、LinePCR 法の評価を行った。

評価方法は、以下の通りである。

- 1) MBL 産生性緑膿菌
20 株 (Pa1~Pa20)は制限酵素 *SpeI* を用いて PFGE を実施した。
- 2) Pa1~Pa20 の LinePCR
Line PCR 用 Primer Mixture (以下の 16 本のプライマー、Fig.9) *int1-a31f*, *int1-a31r*, *int11-a673r* (インテグラーゼ遺伝子、3 本) *sull-a292f*, *sull-a292r*, *sull-a607f* (ジヒドロプロテロイン酸シンターゼ遺伝子、3 本) *aacA4-a31f*, *aacA4-a31r*, *aacA4-a673f*, *aacA4-a673r* (アミノグルコシド・アセチルトランスフェラーゼ、4 本) *qac-a37f*, *qac-a37r* (2 本) *vim-1a220f*, *vim-1a220r* (VIM-1型 β ラクタマーゼ、2 本) *imp1-a469f*, *imp1-a469r* (IMP-1型 β ラクタマーゼ、2 本)
- 3) サイクルプログラム
使用酵素: Qiagen Multiplex PCR Kit
3ステップ 35サイクル
95°C15 分
94°C30 秒
50°C90 秒
72°C3 分
72°C7 分

C-2-2-5. PCR による非特異的な増幅の確認

緑膿菌ゲノム DNA を用いたインテグロンを対象とした LinePCR を行う前に、今回作成したプラ

イマーによる非特異的増殖の有無を、プライマーのみで PCR を行うことにより検証した。インテグロン中に存在すると思われる遺伝子や耐性遺伝子を検出するプライマーを組み合わせて、最大 6 組の 12 本として、様々な組み合わせで、プライマーの濃度を 2 段階で確認した (Fig.12)。その結果、計 12 本のプライマーを添加したレーン①②についても Multiplex PCR Kit を用いたとき、非特異的な増幅は認められなかった。

C-2-2-6. PFGE との比較

分離施設及び分離年の異なる 20 株の MBL 産生性緑膿菌を制限酵素 *SpeI* を用いて、PFGE を行ない、インテグロン対象の LinePCR の結果と比較した (Fig.13)。今回 PFGE を行った 20 株では、その泳動像が一致するものはなかった。異なった病院から分離された株のうち、分離年が同一か、あるいは近い株に、インテグロンの LinePCR 像が同一の株 (Pa2 と 3 および Pa7 と 8) があることが分かった。また、同一病院から分離された Pa16~Pa19 については、インテグロンの LinePCR 像が 2 種類に分かれた。

D. 考察

D-1. 研修会

研修会のアンケート調査によると、研修会の開催が金曜日、土曜日となり、土曜日の夕方まで研修としたため、研修時間については不相当という意見があり、今後の検討課題である。しかし、それ以外の質問については、概ね好評であり、研修会開催の意義は大いにあったと思われる (Fig.3)。

また、研修会開催の 1 か月前に新しいタイプの MBL (*bla_{NDM-1}*) 産生性の肺炎桿菌と大腸菌の報告、さらに本邦の複数の医療機関から多剤耐性アシネトバクターが検出され、大きな問題として取り上げられていたため、参加者の耐性菌に対する関心は非常に高かった。研修会のなかでもこの新型耐性菌の最新情報等が紹介されたこと、さらに JANIS 事業の紹介は、国の耐性菌対策についての理解を深めるよい機会になったと思われる。しかし、薬剤耐性菌の問題が生じたとき、地研がどうかかわるか議論されたが明確な回答を得るまでには至らなかった。その理由は、医療機関の対応、さらには厚生労働省の基本姿勢にもかかわるからであり、今後も引き続き検討し早急に結論されるべき事項であると思われる。

D-2. Line PCR 法の開発について

PCR は迅速で特異性が高い遺伝子解析が可能であるが、しばしば点変異の蓄積や IS 因子の移動、遺伝的組換えによる遺伝子構成の変化が、PCR そのものを困難にしたり、解釈を困難にするなど細菌を対象にした場合には注意する必要がある。LinePCR 法は、このようなリスクをできるだけ減らすことを目指した方法であり、逆にこの変化を「多型」マーカーとして利用する (Fig.4,5,6,7)。

そこで、LinePCR 法の解析対象として好適な条件を有しているインテグロン (Fig.8) の解析を行うことで、LinePCR 法の評価を行った。疫学的な背景が異なる MBL 産生性緑膿菌 20 株を用いて、PFGE と比較した (Fig.13)。20 株の PFGE 像が全て異なるが、LinePCR 像が同一 (Pa7 と 8 を比較) である株や、同時期同病院から分離された株 (Pa16~19) からは、異なる PFGE 像と 2 つの LinePCR 像が検出された。現在これらの結果をどのように説明するかについては、今後追加データを得る必要があるが、興味ある結果であると思われる。今後、LinePCR のターゲットとなる遺伝子あるいは機能遺伝子単位をさらに広げ、複雑化する耐性菌の迅速解析法の一つとして開発したい。

E. 結論

E-1. 研修会

地研の細菌検査担当者を対象とした研修会を昨年引き続き実施し、好評のうちに終了した。これにより、細菌担当者間で意識の共有化、さらにネットワークを構築する基礎づくりのスタートとしては意味のある研修会であった。しかし、医療関連感染症が発生した時に地研がどのように関わるかについては、まだまだ議論する余地が残されているのも事実である。

E-2. LinePCR

PFGE を代表とする従来の分子疫学的解析法とは異なる LinePCR 法を開発した。本法により、機能遺伝子単位毎の多型に基づく新しい分子疫学的方法として利用できる可能性が示された。今後は、本法のより詳細な検討と耐性菌のアウトブレイク時に対応するためのアプリケーションとして確立することが期待される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

Lists of bacterial strains used in this study

Table 1

Species	Lab. No.	Marker	Source
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pa01	bla _{IMP-1}	Clinical isolate at A hospital
	Pa02	bla _{IMP-1}	Clinical isolate at B hospital
	Pa03	bla _{IMP-1}	Clinical isolate at C hospital
	Pa04	bla _{VIM-1}	Clinical isolate at D hospital
	Pa05	bla _{IMP-1}	Clinical isolate at E hospital
	Pa06	bla _{IMP-1}	Clinical isolate at F hospital
	Pa07	bla _{IMP-1}	Clinical isolate at G hospital
	Pa08	bla _{IMP-1}	Clinical isolate at H hospital
	Pa09	bla _{IMP-1}	Clinical isolate at I hospital
	Pa10	bla _{IMP-1}	Clinical isolate at J hospital
	Pa11	bla _{IMP-1}	Clinical isolate at K hospital
	Pa12	bla _{IMP-2}	Clinical isolate at L hospital
	Pa13	bla _{VIM-2}	Clinical isolate at M hospital
	Pa14	bla _{VIM-2}	Clinical isolate at N hospital
	Pa15	bla _{IMP-1}	Clinical isolate at O hospital
	Pa16	bla _{VIM-2}	Clinical isolate at P hospital
	Pa17	bla _{VIM-2}	Clinical isolate at P hospital
	Pa18	bla _{VIM-2}	Clinical isolate at P hospital
	Pa19	bla _{VIM-2}	Clinical isolate at P hospital
	Pa20	bla _{VIM-2}	Clinical isolate at Q hospital

Table 2

List of primers for the evaluation of line PCR performance using λ phage DNA as a model test

Primer*	Sequence (5'→3')	Length	Location**
nm1f	CAGGTCGAAGAGATGCAGG	19	6507-6525
nm1r	CCTGCATCTCTTCGACCTG	19	
nm2f	GGACGCACAGCGGAAGG	18	7007-7024
nm2r	CCTTCGCGCTGTGCGTCC	18	
nm3f	GTGTCTCTGCCGGTGTGG	18	7542-7559
nm3r	CCACACCGGCAGAGACAC	18	
nm4f	TCGGCGTCACAGGTTGCC	18	8094-8111
nm4r	GGCAACCTGTGACGCCGA	18	

*) sequences of the primer pair with "f" and "r" in the fourth letter are completely complementary.

***)location numbers of primer sequence in λ phage genome sequence (accession No. J02459).

Fig.1

平成22年度「薬剤耐性菌検出技術強化技術研修会」プログラム

第1日目 9月19日(金)		第2日目 9月20日(土)	
時間	内容	時間	内容
8:30-9:00	受付	9:00-15:00	朝食 POT法によるMRSAB分子生物学的解析 実験手帳説明
9:10-9:10	主催者挨拶	9:10-9:40	POT法 アンチビोटリキド検出及びPCR法による検出
9:10-9:25	オリエンテーション	9:40-10:00	POT法 PCR版
9:25-10:25	講義 実習に必要なバイオセーフティに関する講義	10:30-10:00	VR:P-PCR マカロニース電気泳動
10:25-10:40	休憩	12:00-13:00	昼食
10:40-11:20	講義 同時発症：薬剤耐性菌検査、地研の必要量とは？ 現状把握：薬剤耐性菌感染症予防対策の実際（ICUの立場から）	13:00-14:30	実習 POT法 電気泳動及び手配
11:20-11:50	講義 VRP/MRSB/フライールン、セル電気泳動法	14:30-15:00	POT法 結果判定及び解析
11:50-12:10	講義 VRPの分子生物学的検出（VRPの感染事例）	15:00-15:15	休憩
12:10-13:10	昼食	15:15-16:00	総論：菌検出の現状と今後の展望
13:10-13:30	オリエンテーション（実習室の案内）	16:00	閉会
13:30-15:00	実習 PCRによるバンコマイシン耐性菌検出（VRPの薬剤耐性菌検出の検出） 説明 実習指導 PCRレポート		
15:00-15:10	休憩		
15:10-15:30	講義 ESRL 薬剤耐性菌検出型β-ラクタマーゼ 産生菌の検査法		
15:30-15:50	講義 院内からの各種耐性菌検出型β-ラクタマーゼ産生菌の検出状況		
15:50-16:10	講義 市販食品中の耐性菌検出型β-ラクタマーゼ産生菌の検査法		
16:10-16:25	講義 MRSABの分子生物学的検出の実際		
16:25-16:40	招待 厚生労働省 医薬品安全対策課 薬学部長 山本 山樹		
18:00-20:00	協賛交流会（立川駅前）		

Fig.2



研修会参加者のアンケート結果

Fig.3

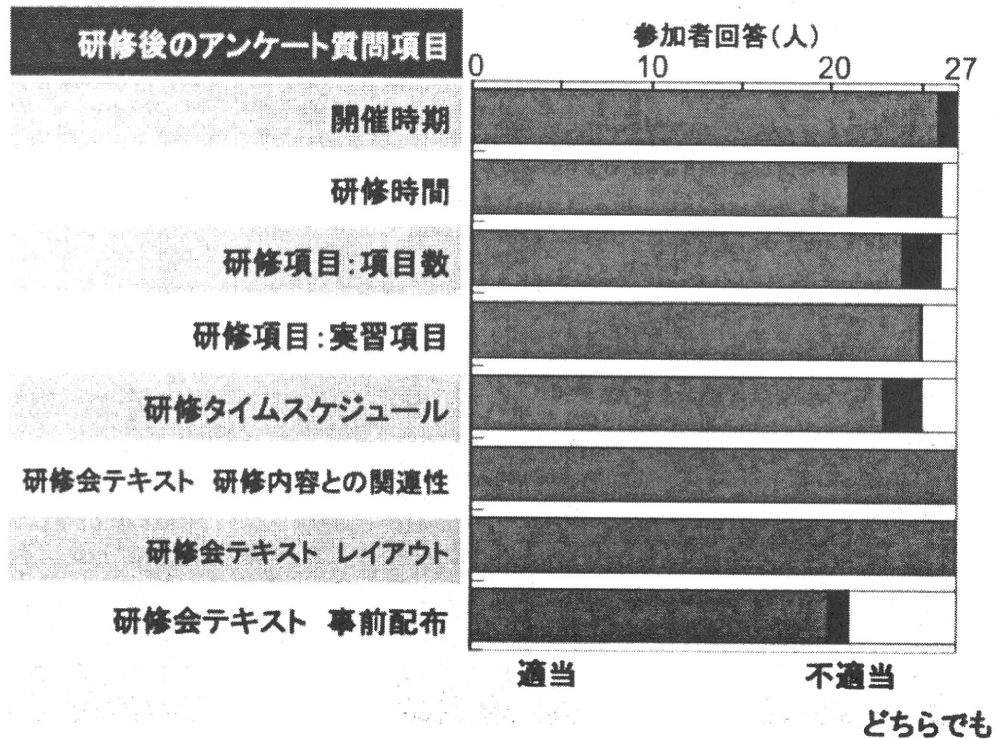
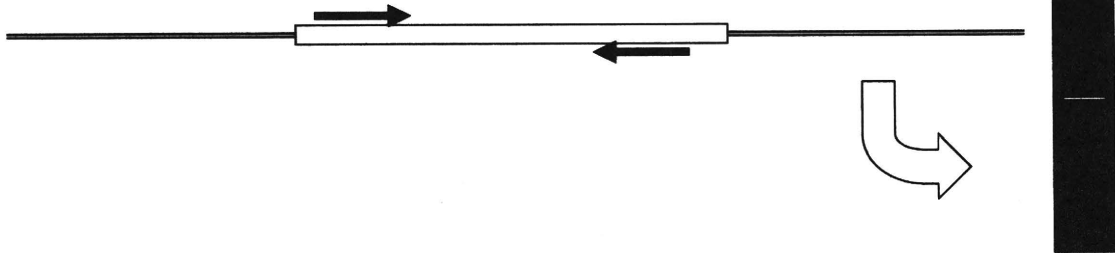


Fig.4

機能遺伝子構成の変化に対応した遺伝子型別法の開発

従来のPCR: 一对のプライマーでPCR
 通常はアガロース電気泳動を行うと、単一バンド



新規PCR法: LinePCRと命名

遺伝子が並んで存在し、全体としてある機能単位として発現している領域を
 2本鎖相補的な複数のプライマー(一列に並んだように)で行うマルチプレックスPCR

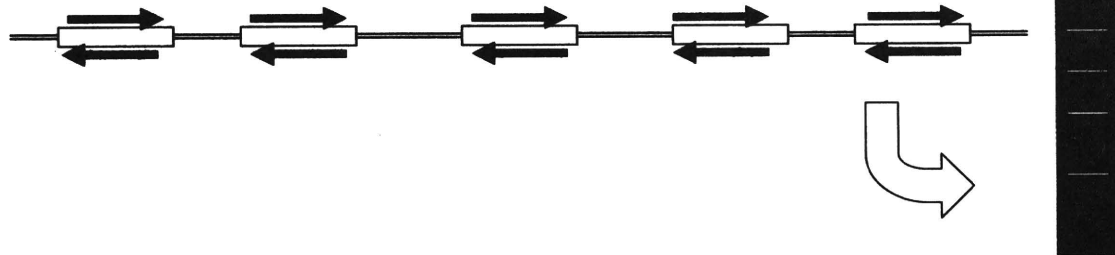
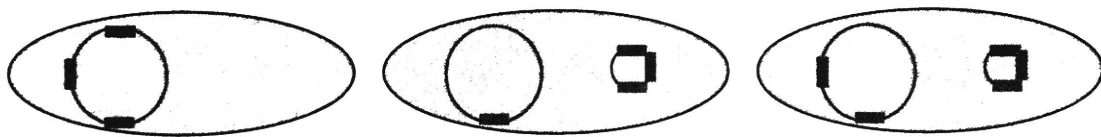


Fig.5

Line PCRのゴールは？



integron tra mex tnp

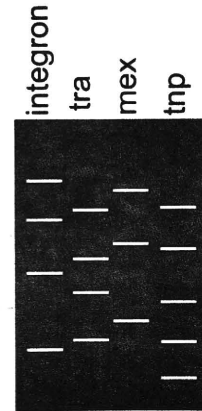
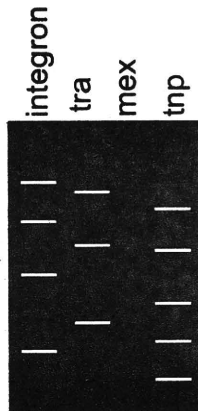
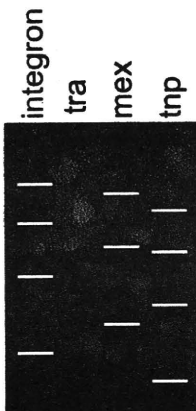


Fig.6

Outline of Line PCR testing using λ DNA as a model experiment

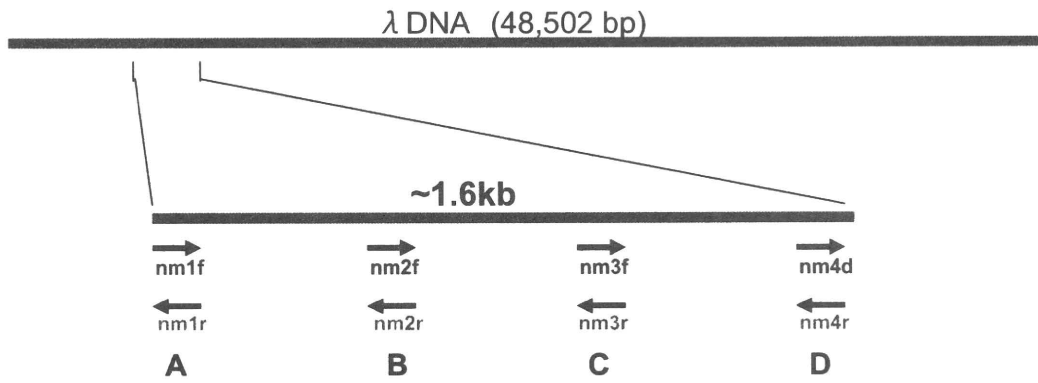
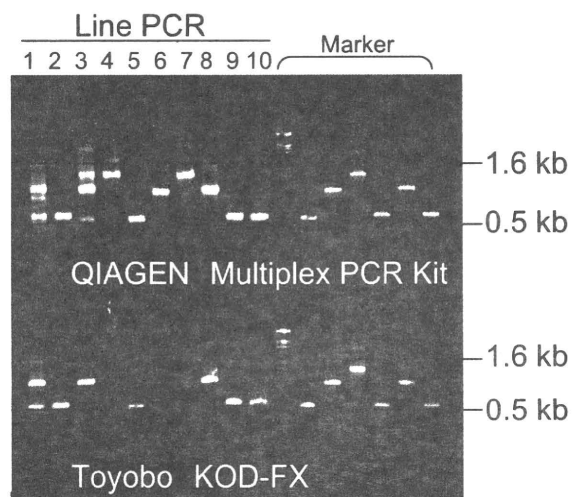


Fig.7

Primer Mix No.	Primers			
	A	B	C	D
1	○	○	○	○
2	○	-	○	○
3	○	○	-	○
4	○	-	-	○
5	○	○	-	-
6	○	-	○	-
7	○	-	-	○
8	-	○	-	○
9	-	-	○	○
10	-	○	○	-

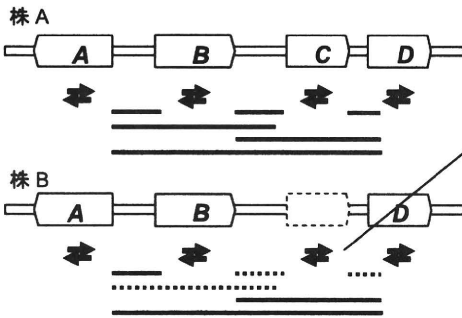


インテグロン構造に集積する遺伝子



どの遺伝子がどういった順序で集積するかは不明
保存された領域をターゲットにプライマー対を設計

Line PCR 法とは



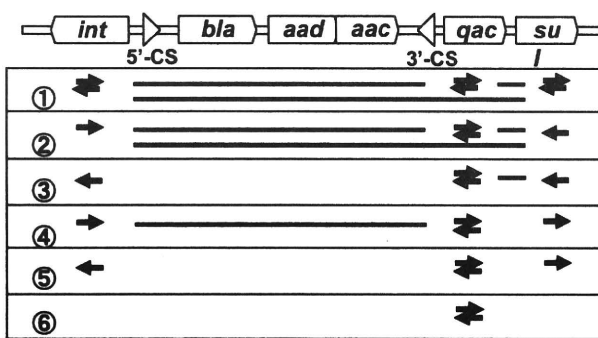
・従来のようにプライマーを1本しか添加しない場合、ゲノム上の全く関係ない領域に結合し、目的とは異なるバンドやスミアなバンドがたびたび出現する。

・相補鎖に設計したプライマー対を添加することで、PCRのアニーリング時にプライマー同士が結合し、想定されないバンドの出現を抑制できるのではないかと。

・遺伝子の有無に関わらず、プライマー対を添加してPCRが可能。

PA1のインテグロン構造

0.5 kb



M ① ② ③ ④ ⑤ ⑥



PCR kit (Supplier A)

・存在しない遺伝子をターゲットとしたプライマー対を添加してもバンドパターンに変化はないのか。

PCR kit (Supplier B)

・相補になったプライマー対を添加した効果なのか。

インテグロンを型別するLinePCR用プライマーの設計

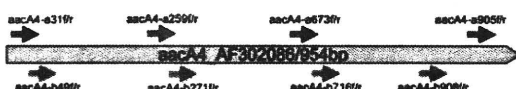


Fig.10

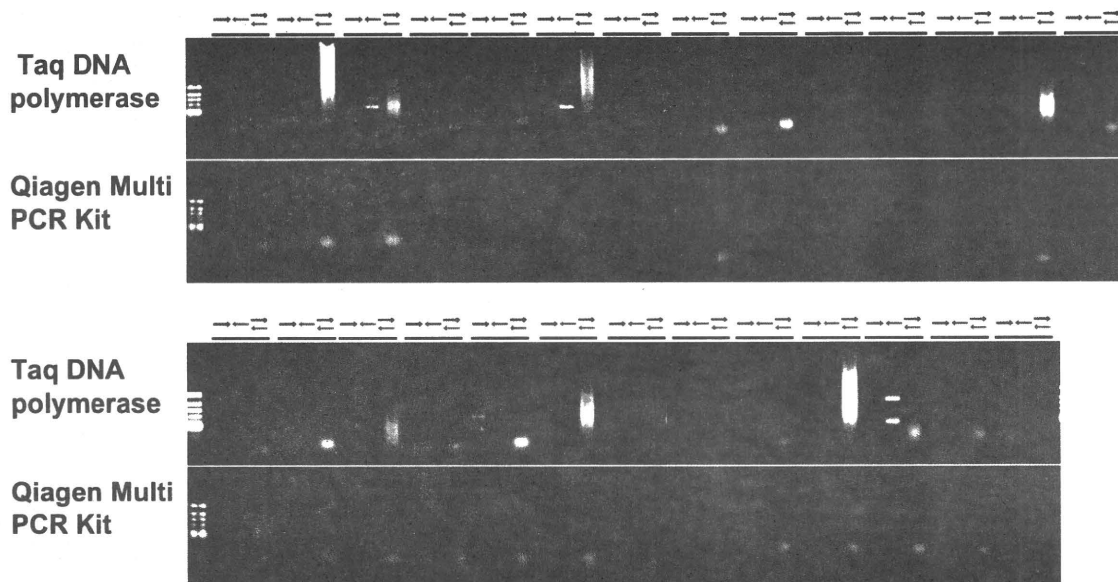


Fig.11

2-Step Cyclingによる各社PCRキットの比較:伸長温度による違いによる影響

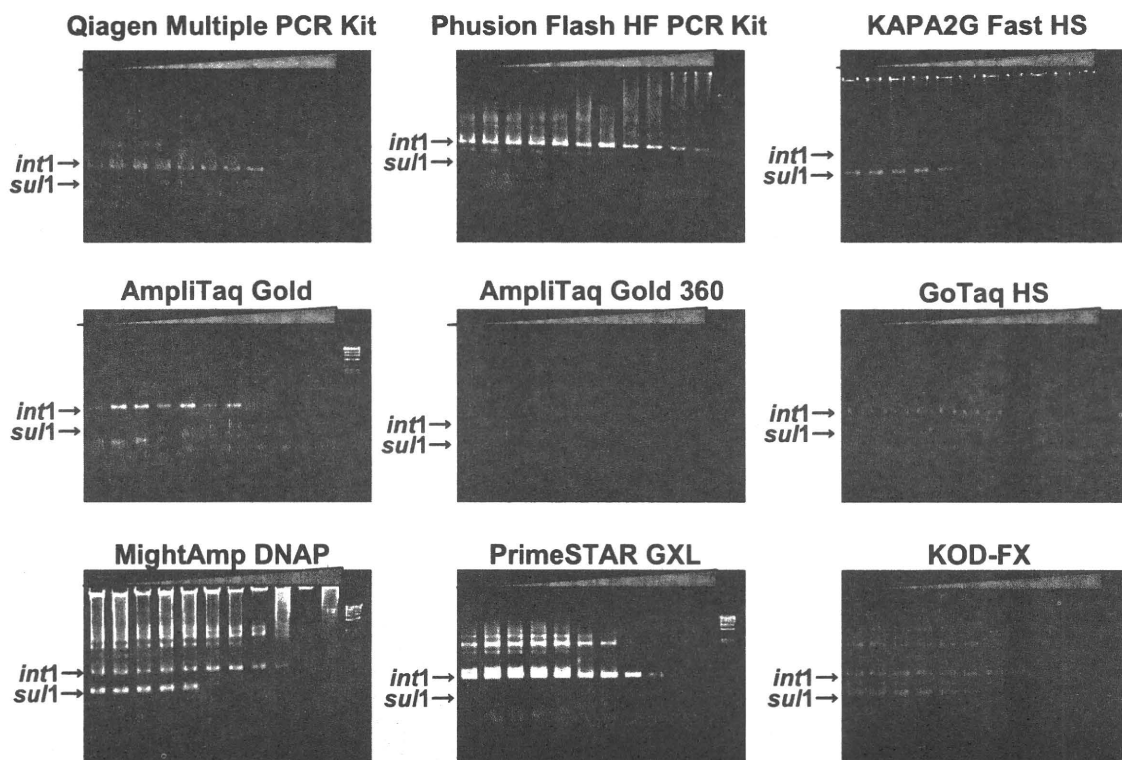
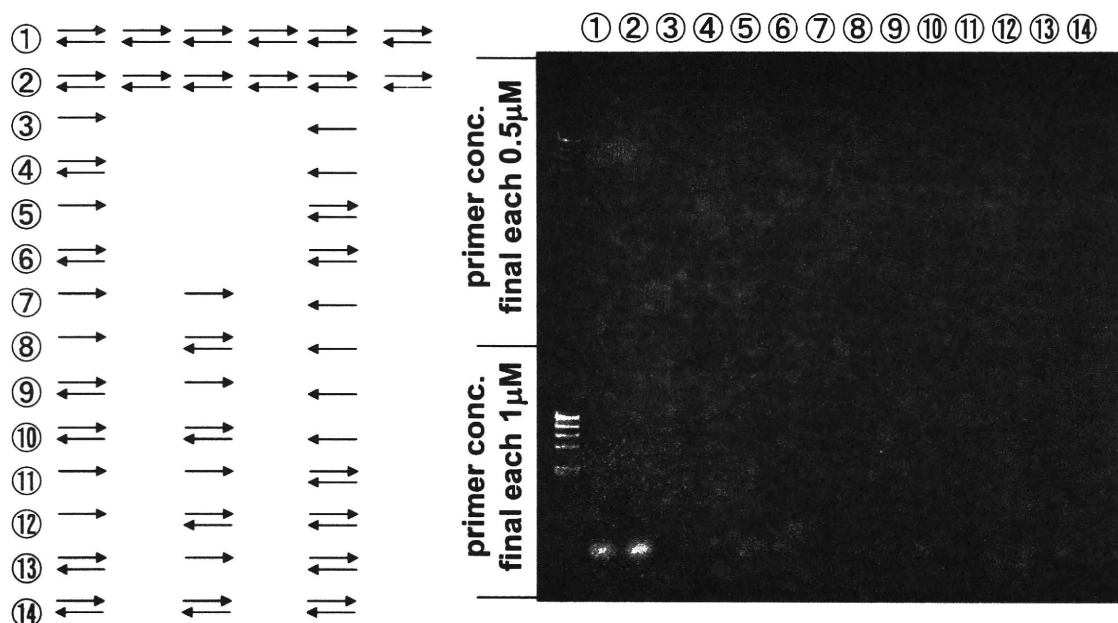


Fig.12



Side Effect of Amplification using Line PCR Primers

Fig.13

