

AP-PCR 法によるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌ゲノム DNA フィンガープリントの検討

桜田京子 根本優子 金子 克

岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座

(主任:金子 克 教授)

(受付:1995年5月9日)

(受理:1995年6月20日)

Abstract: Arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) was applied to genome DNA fingerprinting of twenty clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and this method was evaluated in comparison with phenotypes, such as coagulase typing and minimum inhibitory concentration of four β -lactam antimicrobial agents. Genomic DNA, obtained by mild cell lysis and treated with phenol/chloroform, was suitable for AP-PCR, and the addition of 3mM MgCl₂ and using P1 primer (5'-TCTGTCTTGAAAACTGATGCCTG-3') provided four different patterns of DNA fingerprinting. Although a strong correlation between the phenotypes and DNA fingerprinting patterns was not observed in 20 isolates investigated, AP-PCR can be applicable for genotyping as a time-saving method.

Key words: MRSA, fingerprinting, AP-PCR

緒 言

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) は、ペニシリン結合タンパクである PBP-2' を細胞膜上に発現しており、PBP-2' が β ラクタム系薬に対して低親和性であることにより、薬剤耐性を獲得すると考えられている。PBP-2' をコードする遺伝子 *mecA* は外来性の遺伝子で、MRSA は *mecA* を染色体上に獲得したブドウ球菌であると定義されている¹⁾。さらに、*mecA* 遺伝子の発現を調節する遺伝子 (*femA*)^{2,3)} や高度耐性をもたらす複数の遺伝子座が、トランスポゾン変異株を用いた研究など⁴⁻⁶⁾から明らかにされつつある。しかし、実際

に臨床材料から分離される MRSA の各種抗菌薬に対する耐性には大きな違いがみられ、個々の菌株についての最小発育阻止濃度 (MIC) の変動を *mecA* や *femA* 遺伝子の発現だけで説明できる状況にはない。臨床現場での感染予防や使用する抗菌薬の選択には、MRSA の迅速、確実な診断が要求されるが、さらに薬剤耐性の分子機構についての知見を蓄積していく必要があると考える。

これまで、MRSA の識別としては抗菌薬感受性試験、疫学についてはコアグララーゼ型別、ファージ型別、毒素産生性などの表現型についての検討が主流であった。しかし、近年の分子生物学的研究手法の確立によって、遺伝的特性にもとづき、より詳細な識別や疫学的検討が可

Fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by arbitrarily primed polymerase chain reaction.

Kyoko SAKURADA, Yuko OHARA-NEMOTO, and Masaru KANEKO

(Department of Microbiology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 20:175-182, 1995

能になってきた。それらの方法のひとつにゲノム DNA 分析があり、制限酵素によって断片化された DNA をパルスフィールド電気泳動によって分離し、DNA 断片長を比較する RFLP 法 (またはフィンガープリント法)⁷⁾ や、さらに制限酵素処理とパルスフィールド電気泳動後に、リボソーム RNA 遺伝子についてサザンハイブリダイゼーションを行うリボタイプ法⁸⁾ などが報告されている。これらの分析手段は MRSA 分析の場合、特に薬剤耐性獲得のメカニズムの解析や、感染経路の特定において威力を発揮するが、一方、分析手法の修得には研究者の非常な努力が必要であり、同時に特殊な機器と設備が要求される難点がある。最近報告された arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR)⁹⁾ によるゲノム DNA フィンガープリントは、特定の合成 DNA プライマーを選択し、かつ PCR 条件を最適化することにより、ゲノム DNA の多型を明らかにすることが可能で、方法が比較的簡便であることから今後の応用が期待される分析手段である。MRSA については Belkum らの報告があり、ファージ型¹⁰⁾、および RFLP 法¹¹⁾ と比較検討しているが、確かな対応はまだされていない。本研究では、実際に臨床材料から分離した MRSA のゲノム分析が AP-PCR 法により可能であるかどうか検討した。同時に表現型との相関性について検討した。

材料と方法

- 1) 使用菌株：1994年5月、水沢市A病院において臨床材料から分離したMRSA 20株を使用した。
- 2) MRSA の培養：MRSA 20株を普通寒天培地で37°C、16時間培養した。新鮮培養菌の1白金耳を brain heart infusion (BHI) 培地 20 ml に接種して、37°C、20時間振とう培養した。
- 3) コアグラエゼ型別：ブドウ球菌コアグラエゼ型別用免疫血清 (デンカ生研) を用いてマイクロプレート法¹²⁾ により型別した。
- 4) 抗菌薬感受性試験：日本化学療法学会の微

量液体希釈法¹³⁾ による MIC 測定を各抗菌薬について行った。使用した抗菌薬は、ペニシリン系：benzylpenicillin G (PCG, 萬有), methicillin (DMPPC, 萬有), oxacillin (MPIPC, 萬有), セフェム系：ceftizoxime (CZX, 藤沢) の4種類である。

5) PCR による *mecA* 遺伝子の検出：普通寒天培地上に発育した MRSA の1コロニーを50 μ l のミリQ水に懸濁し、100°C、15分間加熱後、遠心して上清を得た。PCR は上清 1 μ l と 0.4 μ M のプライマー (5'-GGTGGTTACAACGT-TACAAG-3', 5'-GCATTGTAGCTAGCCAT-TCC-3')¹⁴⁾ と PCR 用反応液 (0.2 μ M dNTP, 0.5 U Taq DNA ポリメラーゼ, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.01% ゼラチン) を加え、94°C、1分間、55°C、1分間の反応サイクルを40サイクル行った。PCR 産物は0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイドを含む1.8% アガロースゲル電気泳動で分離して検出した。

6) ゲノム DNA の精製：BHI 培地 20 ml で培養した MRSA を遠心して集め、500 μ l の 20% グルコース・TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0.1 mM EDTA) 溶液に懸濁した。ムタノリジン (最終濃度 0.074 mg/ml) を加え、37°C、30分間加温後、リゾチーム (2.7 mg/ml) を添加し、さらに30分間加温処理した。プロテアーゼ K (0.125 mg/ml), EDTA (0.1 M), RNase A (0.2 mg/ml) を添加し、37°C、30分間加温した。これに NaCl (1M) と hexadecyltrimethyl ammonium bromide (1.6%) を加えて、65°C、15分間処理後、遠心して上清を得た。さらにフェノール/クロロホルム処理、エタノール沈澱によりゲノム DNA を得た。DNA 濃度は 260nm の吸光度を測定して決定した。

7) AP-PCR：ゲノム DNA 標品に 0.4 μ M の合成 DNA プライマーを加え、12.5 μ l の PCR 反応液中で、94°C、2分間、38°C、2分間、72°C、2分間の反応を5サイクル行い、つぎに94°C、1分間、55°C、1分間、72°C、1分間の反応を40サイクル行った。PCR 産物はアガ

ロースゲル電気泳動で検出した。

結 果

1. MRSA 表現型の検討: 臨床材料から分離した MRSA 20 株についてコアグララーゼ型の検討と抗菌薬感受性試験を行い, Table 1 に示す結果を得た。検討した 20 株はすべて MIPIC に, MRSA の判定基準である 4 µg/ml 以上の MIC を示し, 表現型上は MRSA に分類された。コアグララーゼ型別では II 型が 20 株中 12 株で, 残り 8 株は VII 型であった。また, MIC を指標として分けると, PCG, MIPIC, CZX の 3 薬剤に高度耐性 (判定基準: MIC > 100 µg/ml) を示した株は 1 株のみであり, MIPIC と CZX の 2 薬剤に高度耐性を示したのは 6 株, CZX のみに高度耐性を示したのは 5 株, また, 4 種類の抗菌薬に軽度または中度耐性 (判定基準: 4 - 64 µg/ml) を示した 8 株に分けられた。したがって本研究で検討した MRSA は, コアグララーゼ II

型で, MIPIC と CZX に高度耐性である菌株の割合が高い傾向が認められた。VII 型は CZX のみに高度耐性の 3 株と, 中度耐性の 5 株に分けられた。

2. PCR による *mecA* 遺伝子の検出: Table 1 の MRSA 20 株について遺伝子のレベルでも *mecA* 遺伝子を保有しているかどうかを, *mecA* 特異的 DNA プライマーを用いた PCR 法により検討した。Fig.1 に示すように, 20 株全てに *mecA* の遺伝子配列から予想される 623 bp の PCR 産物が得られた。したがって, これらの菌株はすべて *mecA* 遺伝子を保有していることが判明した。

3. AP-PCR によるフィンガープリント:

1) ゲノム DNA の精製

菌株からのゲノム DNA の精製が煩雑であったり, 長時間の操作が必要になれば, AP-PCR でフィンガープリントを行う利点が半減する。そこで最初に, AP-PCR に適したゲノム DNA

Table 1. Coagulase typing and MIC of MRSA investigated.

MRSA strains	Coagulase types	MIC (µg/ml)			
		PCG	DMPPC	MIPIC	CZX
1	II	256	32	256	1024
2	II	32	32	256	256
3	II	32	4	256	512
4	II	32	8	256	512
5	II	64	32	512	256
6	II	32	64	256	512
7	II	32	32	512	512
8	VII	32	16	8	256
9	VII	32	32	64	256
10	VII	32	32	64	256
11	II	64	16	8	512
12	II	32	16	8	1024
13	VII	16	8	8	32
14	VII	16	8	16	32
15	II	32	32	8	16
16	VII	16	8	8	64
17	II	16	8	8	64
18	VII	16	16	8	64
19	II	64	8	8	64
20	VII	64	8	8	64

PCG, penicillin G ; DMPPC, methicillin ; MIPIC, oxacillin ; CZX, ceftizoxime.

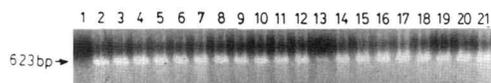


Fig. 1. Detection of the *mecA* gene by PCR. An aliquot (1 μ l) of bacterial lysates containing genomic DNA was amplified by PCR with a set of specific primers for the *mecA* gene. Lane 1, methicillin-sensitive *S. aureus*, and lane 2 - 21, MRSA.

の精製法について主に3種類の方法について検討した。

mecA 遺伝子の検出に用いたDNA抽出液(新鮮培養コロニーを直接ミリQ水に懸濁し、100 $^{\circ}$ C、15分間加熱処理後得られた上清)では、まったくAP-PCRによるDNA産物が得られなかった。また、強力な変性剤である4M グアニジンイソチオシアネートによる溶菌とフェノール処理によって得られたDNAでは、一部の菌株由来DNAではフィンガープリントが得られたものの、DNAが増幅されない標品が多く、実用には適さなかった。これらのネガティブな結果は得られたDNA標品がAP-PCRに適当な長さをもたないか、あるいはDNA標品中にPCRを阻害する夾雑物の混入によるもの

と考えられた。最終的には「材料と方法」に示したDNAの抽出法により、AP-PCRに適したDNA標品が得られた。

2) Mg 濃度および DNA 量

AP-PCR 反応時の Mg 濃度について検討したところ、1.5 mM よりも 3 mM MgCl₂ 存在下でよりシャープなバンドが得られた。また、反応に必要な DNA 量について 25, 50, 100 ng を用いて検討したところ、フィンガープリントのパターンはいずれの DNA 量でも再現性のある結果が得られたが、多数の検体を処理する場合は電気泳動後のバンドのシャープさを比較して、50 ng の DNA 量が適当であると結論した。

3) プライマーの検討

AP-PCR 法で得られる DNA パターンは使用する合成 DNA プライマー (P) により異なる。そこで、MRSA 8 株から抽出したゲノム DNA と Table 2 に示した各種プライマーについて、解析が可能な DNA パターンが得られるかどうか検討した。P3 + P4 では高分子量領域から低分子量領域にかけてスメアになった (Fig. 2)。P5 + P6 は 300 bp 領域に 1 本あるいは 2 本の PCR 産物が得られた。P7 + P8 では 100 bp 以下の 1 本の DNA 産物が見られたが、菌株間での差異は顕著でなかった。P9 + P10 の組合せでも PCR 産物はスメアとなった。

Fig. 3 はプライマー 1 種類を用いた場合の結

Table 2. DNA sequence used for AP-PCR.

	Primer	Tm ^{a)} ($^{\circ}$ C)	%GC ^{b)}
P1	5'-TCTGTCTTGAAAACTGATGCCTG-3'	68	41.7
P2	5'-GATCCCGGACAGGATTCTATGG-3'	68	54.5
P3	5'-TCGTGGGCCGCTCTAGGCAC-3'	68	70.0
P4	5'-TGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'	66	65.0
P5	5'-GTCTCACCTCCAACTGCTT-3'	62	55.0
P6	5'-ACGTACTCTGGTTGGCTTCC-3'	62	55.0
P7	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTG-3'	66	57.1
P8	5'-CTCTTCAAAAACTTCTCCACAAC-3'	64	78.3
P9	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	62	55.0
P10	5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'	62	55.0

^{a)}Melting temperature.

^{b)}Per cent contents of guanine and cytosine.

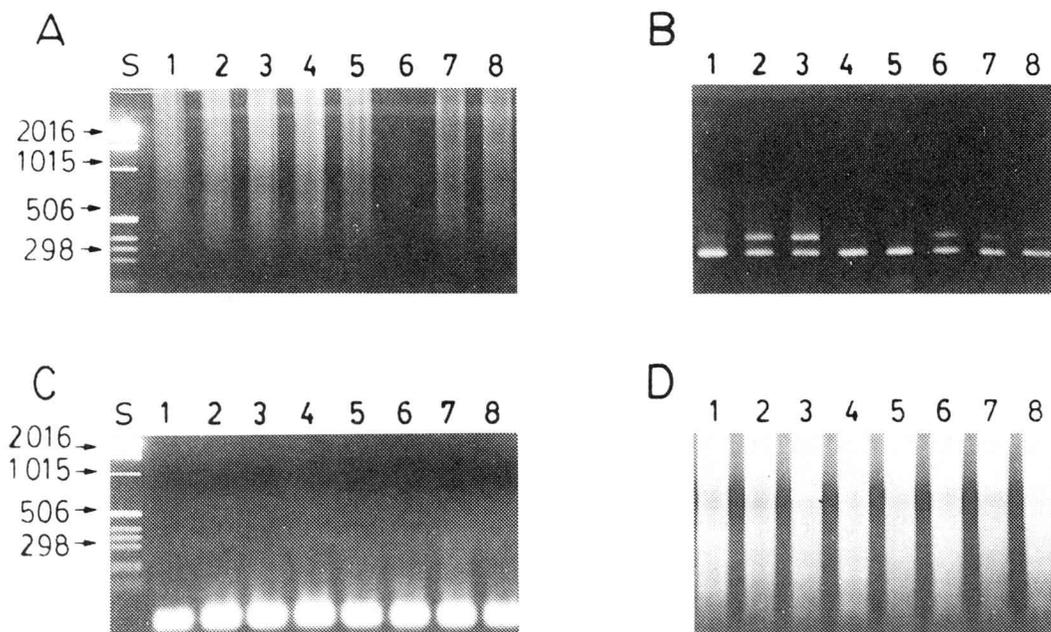


Fig. 2. AP-PCR patterns of selected MRSA isolates amplified with a different pair of primers. Genomic DNA (50ng) was amplified by AP-PCR with a set of primers of (A) P3 and P4, (B) P5 and P6, (C) P7 and P8, and (D) P9 and P10. Lane S, DNA maker fragments (1kb ladder, GIBCO-BRL) and lanes 1 - 8, MRSA.

果で、P1 単独では、検討した 8 菌株は 1600 bp から 400 bp 領域に数本のバンドが認められたものが 1 株、300 bp 領域に 2 本のバンドが認められたもの 3 株、1000 bp 領域に 1 本のバンドと 300 bp 領域に 2 本のバンドが認められたもの 3 株、そして 800 bp 領域に 1 本のバンドと 220 bp 領域に 1 本のバンドが認められたもの 1 株が得られ、4 パターンに分けられた。P2 あ

るいは P4 単独で AP-PCR を行うと、5000 bp から 200 bp の範囲で数多くのバンドが検出され、8 株中で一致するものがなかった。したがって、本研究では MRSA の AP-PCR には P1 を用いて行うのが適当であると結論した。

4) ゲノム DNA パターン

これまでに検討した AP-PCR の最適条件を用いて、MRSA 20 株について AP-PCR を行っ

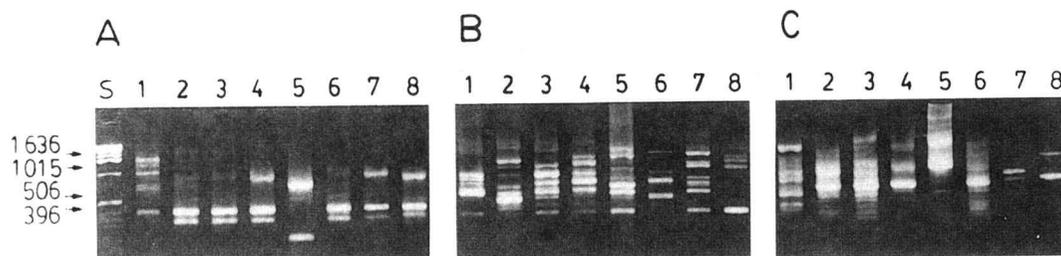


Fig. 3. AP-PCR DNA fingerprinting patterns of selected MRSA isolates amplified with a different primer. Genomic DNA (50ng) was amplified by AP-PCR with a primer (A) P1 (B) P2, and (C) P4. Lane S, DNA maker fragments, and lanes 1 - 8, MRSA.

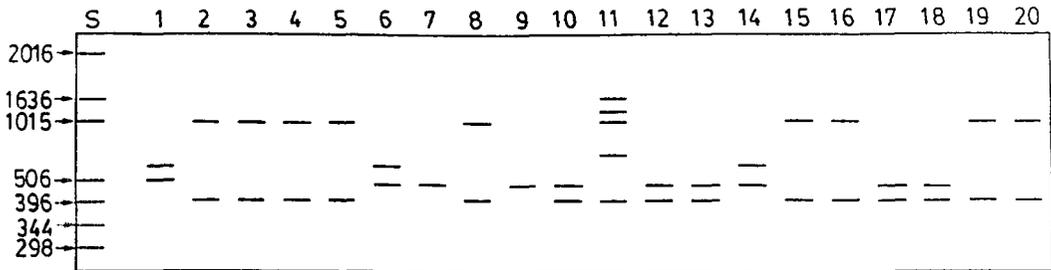


Fig.4. Schematic drawing of AP-PCR DNA fingerprinting patterns of 20 MRSA isolates. Lane S, DNA maker fragments, and lanes 1-20, MRSA. Numbers of isolates are identical with those in table 1.

た。その結果得られた DNA パターンを Fig.4 に示した。検討した 20 菌株は 4 パターンにわけられ、600 bp と 500 bp の 2 本のバンドが認められたもの 3 株、1000 bp と 400 bp の 2 本のバンドが認められたもの 9 株、500 bp と 400 bp の 2 本のバンドが認められたもの 7 株、そして、600 bp から 400 bp に 5 本のバンドが増幅されたもの 1 株であった。

考 察

AP-PCR 法は 1990 年に報告された新しいゲノム DNA フィンガープリントの方法⁹⁾で、臨床材料から分離した菌株のゲノム分析をした報告はまだ少ないが、これまで *Streptococcus* 属¹⁵⁾、*Bifidobacterium* 属¹⁶⁾への応用があり、いずれも有効な方法であったとされている。MRSA では Belkum らの報告^{10,11)}がある。本研究では、臨床材料から分離した MRSA 20 株について、コアグラゼ型別と 4 種類の抗菌薬に対する MIC を測定し、同時に AP-PCR 法による MRSA の遺伝的分類が可能であるかどうか検討した。

実験条件の検討において問題となったのは、ゲノム DNA の抽出法であった。グラム陽性菌はペプチドグリカンよりなる強固な細胞壁を持つために溶菌が難しく、物理的な方法で溶菌操作を行うか、あるいは長時間にわたり酵素と界面活性剤処理をする必要がある。一方、最終的に得られる DNA 標品は PCR によるゲノム分析に適当で十分な長さを持つことが必要で、両

方の条件をみたくゲノム DNA 抽出法は、グラム陽性菌ではまだ一般化されていない。本研究では、すでに報告¹⁷⁾のある DNA 抽出法をもとにして、AP-PCR に適当な DNA 抽出法を考案した。

AP-PCR の反応温度と反応時間、および、それらのサイクル数については、予備的に種々の反応条件について検討したが、今回用いた低温 (38°C) でのアニーリングを行う反応を 5 サイクルおこなった後に、高温 (55°C) アニーリング条件下での PCR を 40 サイクルおこなって PCR 産物を増幅する、いわゆる 2 段階 PCR が最適であった。2 段階 PCR ではより特異的な DNA 増幅が起こるものと考えられた。

また、PCR に用いるプライマーの選択も重要で、種々のプライマーとその組合せについて検討したが、MRSA の場合には P1 単独で反応を行った場合に解析可能な PCR 産物のパターンが得られた。最終的には、最も再現性が得られる条件として、DNA 濃度 50 ng/12.5 μ l, P1 プライマー単独、3 mM MgCl₂ 添加の条件を決定した。

表現型については、コアグラゼ型別と抗菌薬感受性について検討した。使用した 20 株の MRSA はコアグラゼ II 型が 12 株 (60%) であり、VII 型が 8 株 (40%) であった。同時期に水沢市 A 病院の入院患者から分離した別の MRSA 41 株では II 型 16 株 (39%)、III 型 3 株 (5%)、VI 型 1 株 (2%)、VII 型 21 株 (52%) であった。また、花巻市 B 病院の入院患者から同

時期に分離した MRSA 24 株はすべてコアグラゼ II 型であった (桜田, 未発表)。これらの結果は, 現在, 日本で臨床材料から分離される MRSA はコアグラゼ II 型が主流となっていることと一致している¹⁷⁾。MRSA の抗菌薬感受性試験では, 4 種類の抗菌薬に対する MIC により群別し, AP-PCR 法で得られたゲノム DNA パターンとの相関性を検討したが, 両者間に特に相関性はみられなかった。MIC の値は, 培地の組成や pH, 菌株の継代等により変化することが知られており, MIC による群別に妥当性があるかに関しては, 今後検体数を増やすことにより検討を重ねたい。また, AP-PCR のパターンとの相関についても菌株数を増やしての検討が必要であると考ええる。

現在, 主として DNA 解析に用いられているパルスフィールド電気泳動法は, 遺伝子解析法として優れた菌株識別能を有するする方法である¹⁹⁾。また, 平松ら²⁰⁾はパルスフィールド電気泳動と比較して, リボタイプ法は検出される DNA バンド数が少ないため解析が容易であり, 比較的低コストで実施できると報告している。両者と比較して AP-PCR 法は, 操作が簡便であり, 解析時間が短かく, そして低コストでできる点から優れた方法であると考ええる。

結 語

臨床材料から分離した MRSA 20 株について 2 種類の表現型, *mecA* 遺伝子保有状況および AP-PCR 法によるゲノム DNA の解析を試み, 以下の結果を得た。

- 1) コアグラゼ型は II 型が 12 株 (60%), VII 型が 8 株 (40%) であった。抗菌薬感受性試験により, MIC をもとに 4 グループにわけられた。コアグラゼ II 型で MIPIC と CZX に高度耐性であった菌株の割合が 6 株 (30%) と多かった。
- 2) 検討した全ての MRSA 株は *mecA* 遺伝子を保有していた。
- 3) AP-PCR 法に適する MRSA ゲノム DNA の抽出法を確立し, AP-PCR の最適条件を決定

した。

- 4) MRSA 20 株は AP-PCR 法により 4 つのゲノム DNA パターンに群別され, AP-PCR 法による MRSA のゲノム分析が可能であることが判明した。しかし, 検討した MRSA 20 株では DNA パターンと表現型との相関性は特にみられなかった。

文 献

- 1) 平松啓一: MRSA の分子遺伝学, 日本臨床, 50: 20-25, 1994.
- 2) Berger-Bächi, B., Barberis-Maino, L., Strässle, A., and Kayser, F. H.: *FemA*, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Molecular cloning and characterization. *Mol. Gen. Genet.* 219: 263-269, 1989.
- 3) Maidhof, H., Reinicke, B., Blümel, P., Berger-Bächi, B., and Labischinski, H.: *femA*, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J. Bacteriol.* 173: 3507-3513, 1991.
- 4) Ornelas-Soares, A., Lencastre, H., Jonge, B., Gage, D., Chang, Y. S., and Tomasz, A.: The peptidoglycan composition of a *Staphylococcus aureus* mutant selected for reduced methicillin resistance. *J. Biol. Chem.* 268: 26268-26272, 1993.
- 5) Ornelas-Soares, A., Lencastre, H., Jonge, B. L. M., and Tomasz, A.: Reduced methicillin resistance in a new *Staphylococcus aureus* transposon mutant that incorporates muramyl dipeptides into the cell wall peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 269: 27246-27250, 1994.
- 6) Gustafson, J., Strässle, A., Hächler, H., Kayser, F. H., and Berger-Bächi, B.: The *femC* locus of *Staphylococcus aureus* required for methicillin resistance includes the glutamine synthetase operon. *J. Bacteriol.* 176: 1460-1467, 1994.
- 7) Ichihama, S., Ohta, M., Shimokata, K., Kato, N., and Takeuchi, J.: 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.
- 8) Thomson-Carter, F. M., Carter, P. E., and Pennington, T. H.: Differentiation of staphylococcal species and strains by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J. Gene. Microbiol.* 135: 2093-2097, 1989.

- 9) Welsh, J. and McClelland, M. : Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18 : 7213-7218, 1990.
- 10) Belkum, A., Bax, R., Peerbooms, P., Goessens, W. H. F., Leeuwen, N., and Quint, W. G. V. : Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by polymerase chain reaction for discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 31 : 798-803, 1993.
- 11) Struelens, M. J., Bax, R., Deplano, A., Quint, W. G. V., and Belkum, A. V. : Concordant clonal delineation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis and polymerase chain reaction genome fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 31 : 1964-1970, 1993.
- 12) 木下承皓 : マイクロプレート法を用いた黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型別, 医学検査, 41 : 318, 1992.
- 13) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告 : 微量液体希釈法によるMIC測定の一部修正, *Chemotherapy* 41 : 84-89, 1993.
- 14) 東山康仁, 古賀宏延, 河野 茂, 前崎繁文, 賀来満夫, 原 耕平 : Polymerase chain reaction 法による咽頭ぬぐい液からのメチシリン耐性ブドウ球菌 *mecA* 遺伝子の検出, 感染症誌, 67 : 12-17, 1992.
- 15) Seppala, H., He, Q., Österblad, M., and Huovinen, P. : Typing of group A Streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* 32 : 1945-1948, 1994.
- 16) 松本一政, 高山博夫, 田中隆一郎 : AP-PCR 法の *Bifidobacterium* 属菌への応用, 日細菌誌, 50 : 232, 1995.
- 17) Ausubel, F. M. et al., eds. : Current protocols in molecular biology, Current Protocols, New York, pp2.4.1-2.4.2, 1994.
- 18) 内山建二, 小堀一乃, 望月一雄, 森三樹夫 : 当院における黄色ブドウ球菌の検出状況, 医学検査, 44 : 44-48, 1995.
- 19) 一山 智, 太田美智男 : パルスフィールドゲル電気泳動とその分子疫学研究への応用, 日本臨床, 50 : 143-148, 1992.
- 20) 平松啓一 : リボタイピング : Ribotyping による菌株の識別, 日細菌誌, 49 : 829-834, 1994.