

リアルタイム PCR 法を用いた結核菌の迅速薬剤耐性検査と分子疫学解析法についての検討

¹日本赤十字社 長崎原爆諫早病院、²長崎大学 第二内科

○久保 亨¹、松竹 豊司¹、江原 尚美¹、福島 喜代康¹、河野 茂²

【背景・目的】長崎県の結核の人口 10 万人に対する年換算罹患率は、現在大阪府に次いで全国で 2 番目に高い値となっている。結核の治療時に菌の薬剤耐性に関する情報が培養結果を待たずに得られればその臨床的な意義は大きい。また、菌の分子疫学的情報が迅速に得られれば、集団感染や院内感染のコントロールに寄与できると考えられる。今回我々はリアルタイム PCR 法と High Resolution Melt (HRM) 解析法を用いた結核菌の薬剤耐性変異の迅速スクリーニング検査法と分子疫学解析法の臨床応用についての検討を行った。【方法・結果】HRM 解析法は、温度を徐々に上昇させることで二本鎖 PCR 産物を解離させ、その解離のパターンを解析することによりわずかに塩基ペアの違いまで識別する方法である。HRM 解析を用いれば、結核菌の薬剤耐性遺伝子変異の有無を約 2 時間でスクリーニングできると考えられる。我々は患者検体もしくは培養抗酸菌から抽出した DNA から、Rotor-Gene Q リアルタイム PCR 機 (キアゲン) を用いて rpoB、katG、gyrA、inhA-promotor 遺伝子の薬剤耐性関連領域を増幅させ、その後 HRM 解析法を用いて薬剤耐性変異の有無のスクリーニングを行った。現在までにリファンピシン耐性株に対し HRM 法と培養法で一致した結果が得られた。また、現在結核菌の identification に用いられている VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) 法を、リアルタイム PCR 法と Melt 解析法によって行う系の開発を行った。結核菌遺伝子を JATA(12)-VNTR 分析法用のプライマーを用いてリアルタイム PCR 法で増幅し、その後 Melt 解析を行ったところ、結核菌の分子疫学解析が可能な情報を得ることができた。この系を用いれば臨床検体から直接に 2 時間程で結核菌のプロファイリング、感染経路の推定が可能になると考えられる。【考案と結語】リアルタイム PCR 法を用いた結核菌の迅速薬剤耐性検査と分子疫学解析法は結核の臨床に応用できる有望な方法と考えられた。

LAMP 法により確認された百日咳の職場内蔓延状況

¹越谷市立病院 小児科、²順天堂大学医学部附属浦安病院 小児科、³越谷市立病院 検査科

○新妻 隆広¹、大日方 薫²、木下 恵司¹、五十里 博美³

【はじめに】米国では青年・成人における百日咳患者が増加し、百日咳感染と認識されないまま乳幼児への感染源となっているため問題視されている。2008 年には我が国においても大学・施設での集団発生が多く報告された。成人百日咳患者増加が明確となり、免疫のない乳幼児への感染を懸念しなければならない。今回当院事務部内で蔓延した百日咳を LAMP 法 (Loop-Mediated Isothermal Amplification) により明らかにした。【対象・方法】当院事務部 21 例 (男:女=13:8) に対し後鼻腔擦過検体を採取した。採取後 DNA を抽出し、LAMP 法にて百日咳感染を検査した。LAMP 検査は百日咳菌検出試薬キット (栄研化学、東京) を用いた。【結果】Index case である症例 1 は 9 月 12 日より咳嗽が出現し、クラリスロマイシン (CAM) 服用していたが、咳嗽は持続していた。その後同事務部内に咳嗽を呈する職員が増加し、延 12 人 (57.1%) に上気道炎症状を認めた。LAMP 検査で 21 例中 6 例 (28.6%) において百日咳が検出された。LAMP 検査陽性例を中心に上気道症状を有した職員に対して主に CAM 14 日間またはアジスロマイシン 3 日間投与した。約半月経過後に 2 回目の LAMP 検査施行し、6 例中 5 例で百日咳陽性であった。初回上気道症状なく、LAMP 陰性であった 1 例は、経過中から咳嗽出現し、2 回目には LAMP 陽性になった。2 回目の 1 か月に 3 回目の LAMP 検査し、6 例中 4 例で陽性であったため CAM 14 日間再投与した。3 回目の 2 か月後に 4 回目の LAMP 検査し、1 例で陽性であった。【考察】発熱のない成人の慢性咳嗽では、百日咳の認識のないまま放置されていることが少なくない。事務部は直接患者には接しないため、感染対策が緩慢となりやすい。今回百日咳が蔓延する前に予防することは困難であり、今後は欧米に倣い、成人への百日咳ワクチン接種が不可欠と考えられた。