

島根県における VNTR 法を用いた結核菌分子疫学解析 (2012 年度)

角森ヨシエ・川上優太・樫本孝史・川瀬 遵・黒崎守人・佐藤浩二

1. 目的

日本において、結核は減少傾向であるが、未だに年間2万人の新規患者の届出がある。また、近年は、過去の感染の再燃による老人福祉施設での集団感染事例や院内感染等が問題となっている。

結核菌による集団感染が発生した場合、同一感染源であることを確認することは重要である。さらに結核菌分子疫学解析をすることは、感染経路や地域における状況調査などにも期待できる。

当所では2012年度からVNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 法による結核菌分子疫学解析を始めたので報告する。

2. 検体および方法

2. 1 検体

検体は保健所から依頼のあった2事例23株を用いた。小川培地に培養された結核菌を121°C15分または95°C10分オートクレーブし、その凝固水と菌体を回収した。

2. 2 方法

VNTR 法分析は前田らの方法¹⁾に従い、JATA (12)-VNTR 分析法の12領域 (Mtub04, MIRU10, Mtub21, Mtub24, QUB11b, VNTR2372, MIRU26, QUB15, MIRU31, QUB3336, QUB26, QUB4156) および追加領域として QUB18, QUB11a, ETR-A, QUB3232, VNTR3820, VNTR4120 について分析した。

3. 結果及び考察

3. 1 結果

一部領域のバンドが確認できない検体があったが、高齢者施設の集団感染事例由来の結核菌株19株についてVNTR4120を除く17領域で一致した(4, 3, 3, 3, 3, 3, 7, 4, 2, 4, 8, 4, 10, 8, 4, 14, 14, 14 または14, 16)。また、入院病棟内での病院内結核集団感染事例由来4株はすべての領域が一致した(4, 1, 3, 2, 7, 4, 7, 4, 5, 7, 7, 5, 10, 9, 4, 15, 14, 12)。

3. 2 考察

菌株を生菌のまま搬送した場合、当所で95°C10分オートクレーブしテンプレートを作成したが、医療機関でオートクレーブをかけた後に搬送する場合は121°C15分とした。その結果95°C10分の加熱の場合、結果は良好であ

ったが、121°C15分ではQUB26、QUB18、QUB11a、QUB3232、VNTR3820、VNTR4120の領域が確認できなかった。

また、液体培地であるMGIT培地について小川培地と同様に95°C10分加熱し遠心分離後、上清をテンプレートとし実施したが、バンドが確認できた。

高齢者施設の集団感染事例由来の結核菌株19株のうち、最後に依頼のあった菌株は超可変領域 (hyper variable region) であるVNTR4120で2つのバンドが識別された。超可変領域部位は変異が高頻度で起こる遺伝子部位で同一菌由来でも異なる反復数を示すことがある。(図1)この事例の菌株の依頼日は最初と最後の患者で10ヶ月間の差があった。

超可変領域はアガロースによる電気泳動では困難であるとされているが、検体およびPCR産物の濃度を抑える、電気泳動のバッファの温度を下げる等を行うことで、結果を出すことができた。

今回、入院病棟内での集団感染事例については患者同士の接触時間が短く、同一感染源であるか疑問であったが、本検査で同一感染源であることが示唆された。

平成24年11月13日に島根県結核菌分子疫学調査事業実施要領が施行され、保健所長が必要と認めた患者の結核菌株を検査することになっているが、これから集団感染事例だけでなく、地域における状況調査や薬剤耐性株の早期発見など応用が期待される。

高齢者施設事例由来

入院病棟事例由来

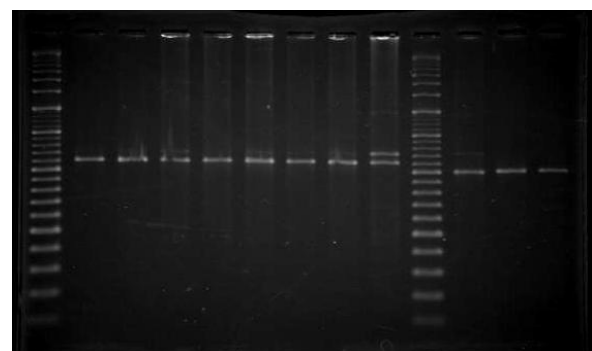


図1 VNTR4120

- 1) 前田信司他：国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型 (VNTR) 分析システム、結核, 83(10):673-678(2008)