

結核検査の解釈と 新しい検査技術の開発

(H230203宮城県保健福祉部業績発表会)

保健環境センター微生物部
畠山 敬

結核関連事業

【事業内容】

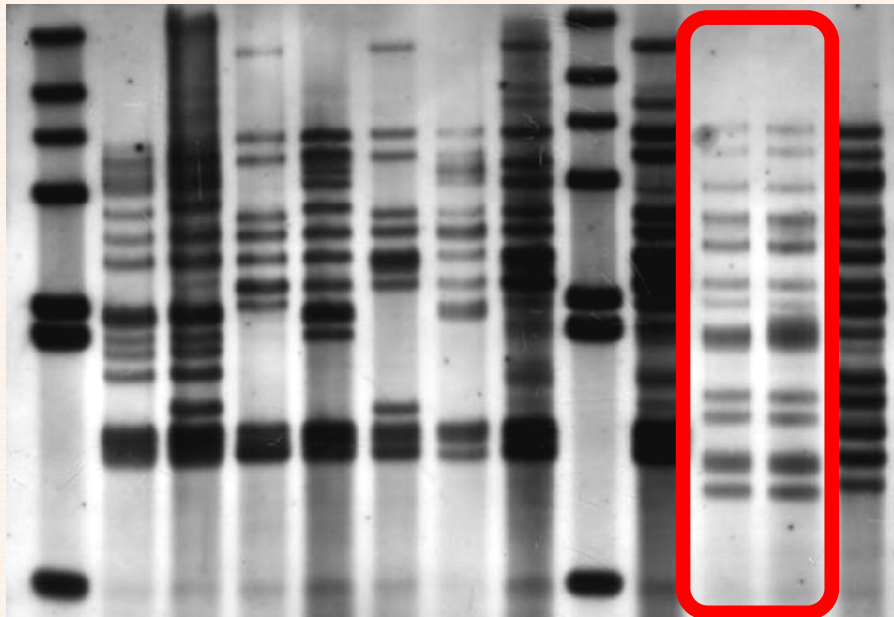
1. 結核菌培養検査(管理検診)
2. 結核菌遺伝子解析検査(遺伝子解析検査事業)
3. QFT検査(結核接触者健康診断事業)

【研究内容】

4. 新しい検査技術の開発
(結核菌迅速検出法の応用に関する研究)

1. 結核菌遺伝子解析検査

RFLP法
(画像解析)



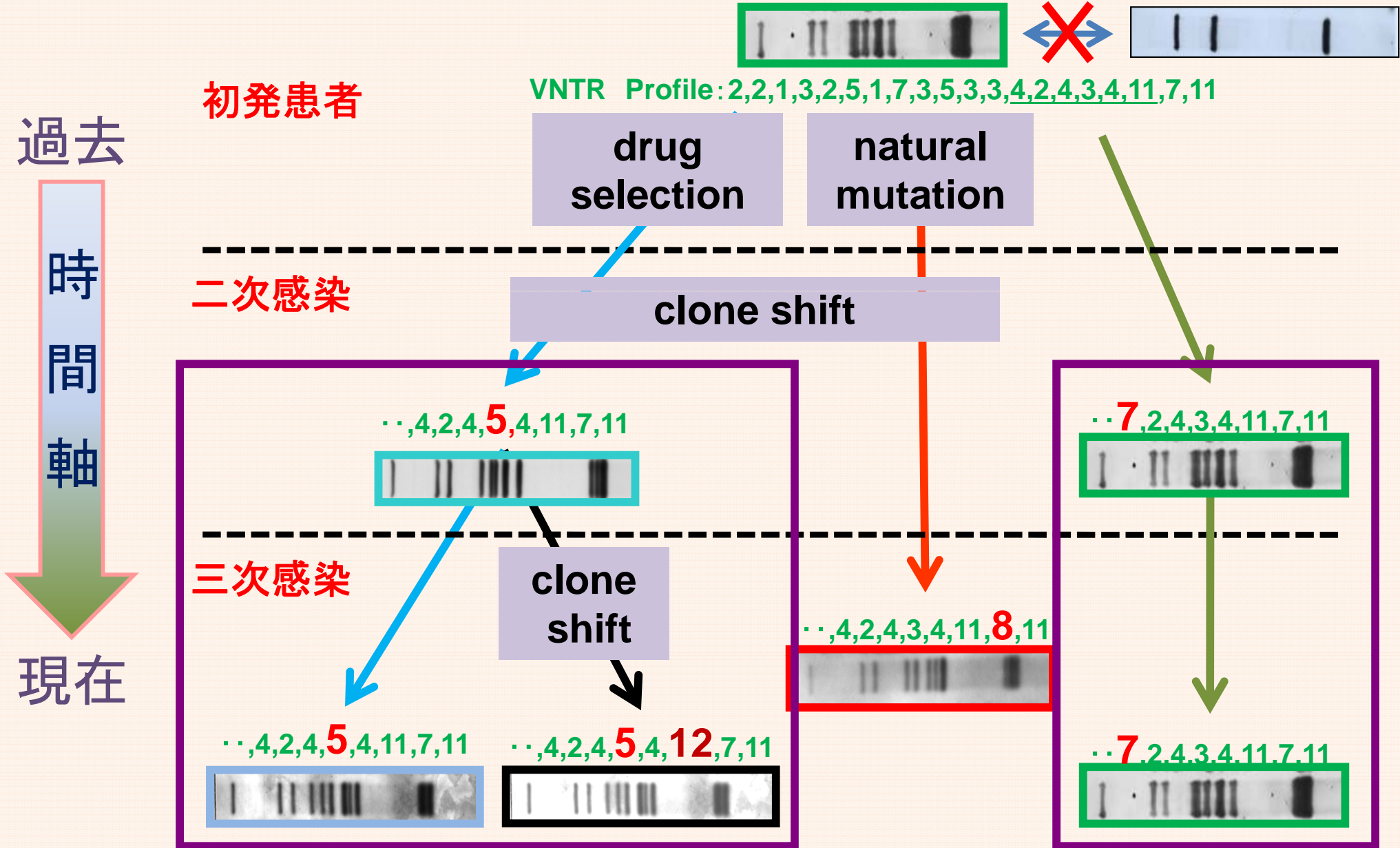
特異遺伝子 (IS6110) 座のアナログ分析

VNTR法
(allele profile解析)

| 株 | TR番号 | | | | | | |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 2 | 4 | 10 | 16 | 20 | 23 | ... |
| 1 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 5 | ... |
| 2 | 8 | 2 | 7 | 2 | 2 | 5 | ... |
| 3 | 8 | 2 | 3 | 4 | 2 | 5 | ... |
| 4 | 7 | 2 | 3 | 4 | 2 | 5 | ... |
| 5 | 7 | 2 | 3 | 4 | 2 | 5 | ... |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |

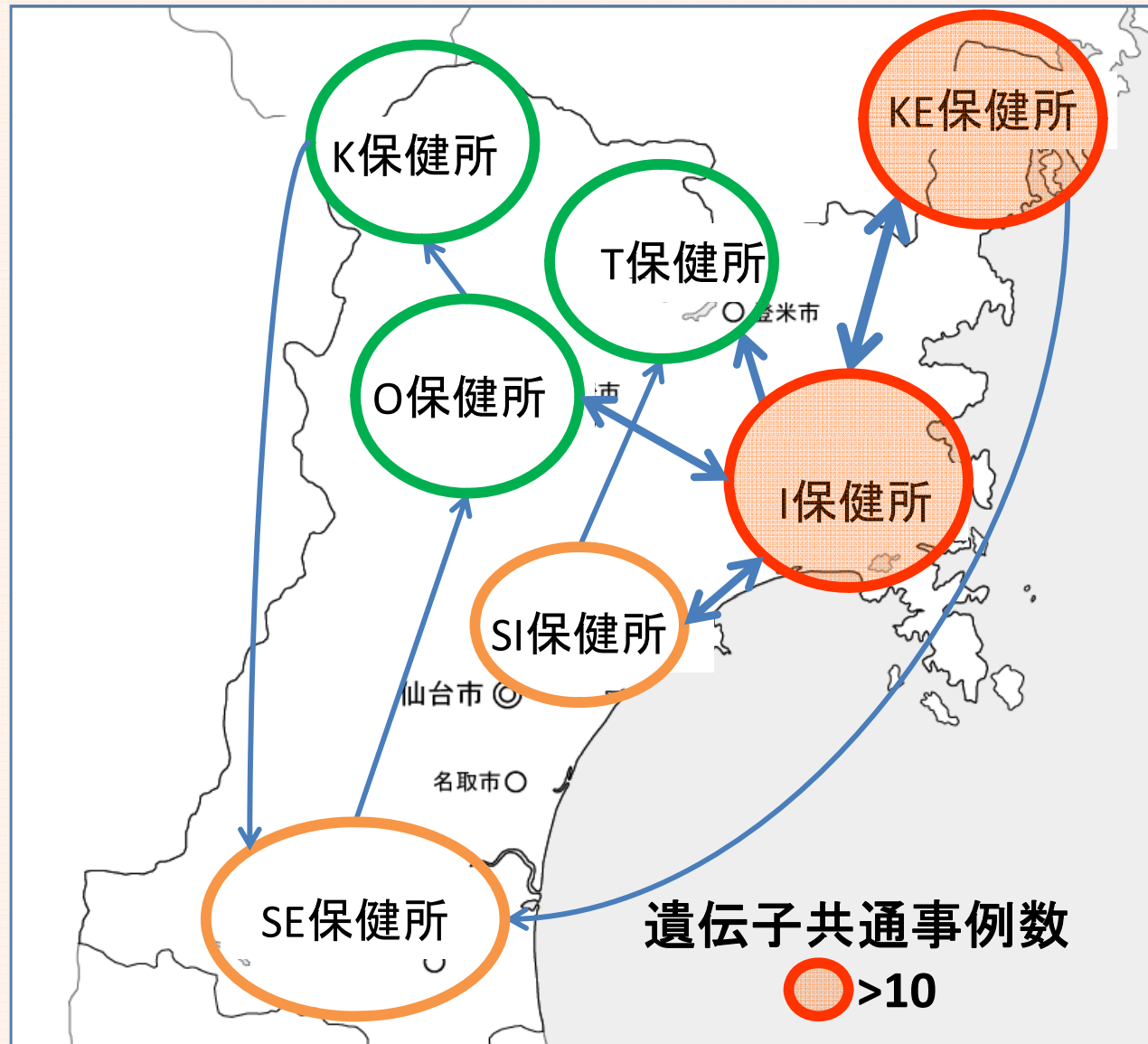
個々の領域のデジタル情報による分析

各解析法の特徴




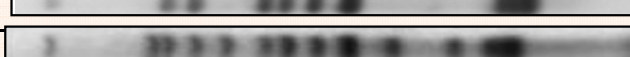







遺伝子解析の応用



1) 分子疫学的関係性の解明



2) 特定型結核菌の発生予測

| RFLP and VNTR information | ~2005 | 2006 | 2007 | ...2008 |
|---|-------|------|------|---------|
|  | 2 | — | — | 流行終息? |
|  | 3 | — | — | |
|  | 1 | 1 | — | 状況観察 |
|  | — | 2 | — | |
|  | — | 4 | — | |
|  | 2 | 2 | — | |
|  | 1 | — | 1 | 危険度大! |
|  | 2 | — | 1 | |
|  | 2 | 1 | 1 | |

3) (超)多剤耐性結核菌株の蔓延監視



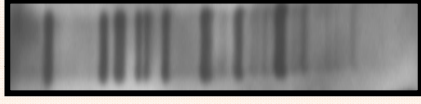
| RFLP of MDR-TB | ~2004 | 2005 | 2006 |
|---|-------|------|------|
|  | — | 1 | — |
|  | — | — | 1 |

→ 今後は…?



| | MIC of antibiotics (μ g/ml) | | | | | | | |
|------------|----------------------------------|----|----|-----|-----|------|------|------|
| | SM | EB | KM | INH | RFP | LVFX | SPFX | CPFX |
| MDR株(2005) | 4 | 8 | 4 | >32 | >32 | 2 | 1 | 4 |

4) 家族内感染等における薬剤感受性

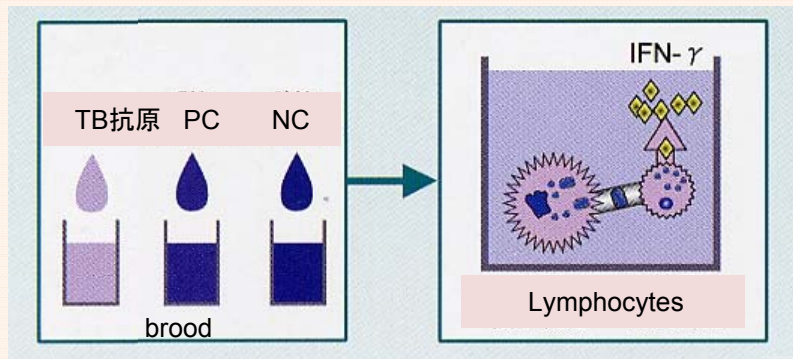
| 患者 | 関係 | VNTR allele profile | RFLP分析 |
|-------------|----|---|---|
| K18,M27 | 家族 | 3, 4, 3, 5, 7, 3, 7, 5, 5, 8, 2, 6, 4, 10, 11, 4, 5, 3, 3 |  |
| L13,L30,L32 | 友人 | 3, 3, 3, 4, 7, 3, 7, 5, 5, 7, 2, 5, 4, 10, 11, 4, 5, 3, 3 |  |
| L39,M36 | 家族 | 2, 3, 1, 3, 2, 2, 5, 4, 3, 12, 4, 3, 2, 4, 6, 3, 6, 1, 1 |  |



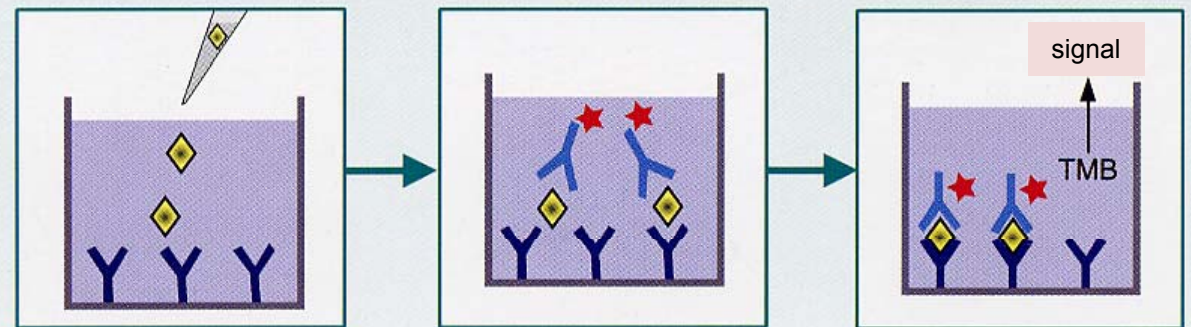
| | MIC of antibiotics | | | | | | | | |
|-----|--------------------|----|----|-------|------|-------|------|-------|-------|
| | SM | EB | KM | INH | RFP | RBT | LVFX | SPFX | CPFX |
| K18 | 0.5 | 1 | 1 | 0.125 | 0.06 | – | 0.25 | 0.125 | 0.25 |
| M27 | 0.5 | 1 | 1 | 0.125 | 0.06 | – | 0.25 | 0.125 | 0.25 |
| L13 | 0.5 | 1 | 1 | 0.125 | 0.03 | 0.008 | 0.25 | – | 0.125 |
| L30 | 0.5 | 1 | 1 | 0.125 | 0.03 | 0.008 | 0.25 | – | 0.125 |
| L32 | 0.5 | 1 | 1 | 0.125 | 0.03 | 0.008 | 0.25 | – | 0.125 |
| L39 | 1 | 1 | 2 | 0.25 | 0.06 | – | 0.25 | 0.125 | 0.25 |
| M36 | 1 | 1 | 2 | 0.25 | 0.06 | – | 0.25 | 0.125 | 0.25 |

2. QFT検査の原理

抗原刺激



γ -IFN測定



- **QFT test is not affected by BCG vaccination** or many kind of non-TB *Mycobacterium* infection. (kekkaku vol79,11:637-643,2004)
- Peculiar increase of IFN is shown in later stage of latent infection. Patient is detectable within preclinical stage.

QFT実施数と結果

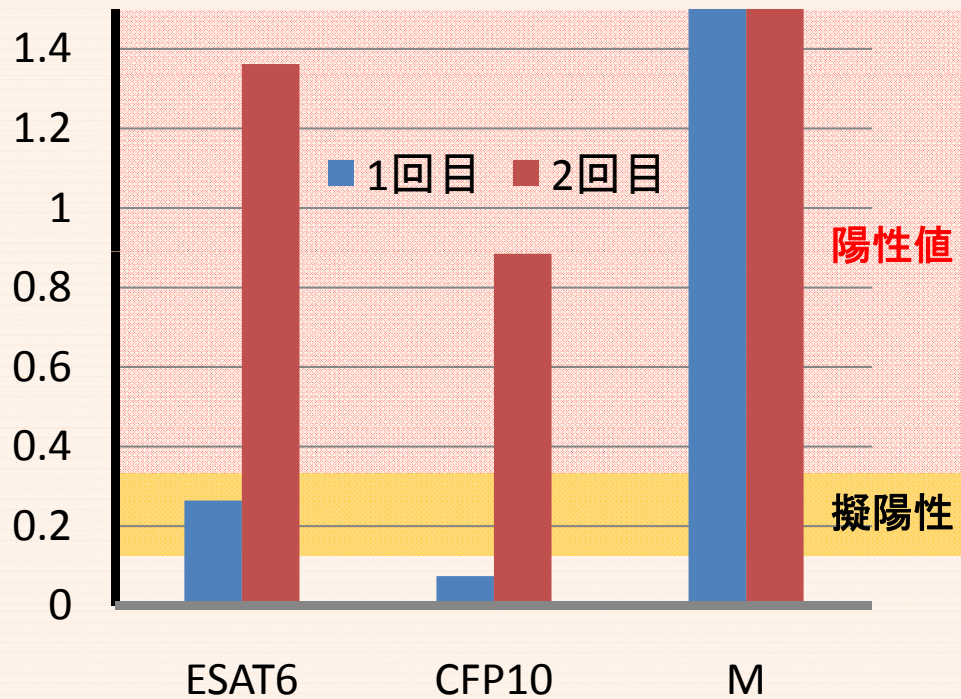
| 年 | 被験者数 | 陽性 | 判定保留 (擬陽性) | 陰性 | 再検査 |
|------------|------|------------------------|---------------|-----|-----|
| ~ 2007 | 230 | 15 ----- (13.9%) | 17 | 185 | 9 |
| 2008 | 570 | 31 ----- (11.1%) | 32 | 495 | 12 |
| 2009 | 399 | 17 ----- (8.3%) | 16 | 349 | 17 |
| 2010 9月 | 193 | 12 ----- (13.0%) | 13 | 166 | 2 |



患者家族・接触者の10%程度が感染の可能性

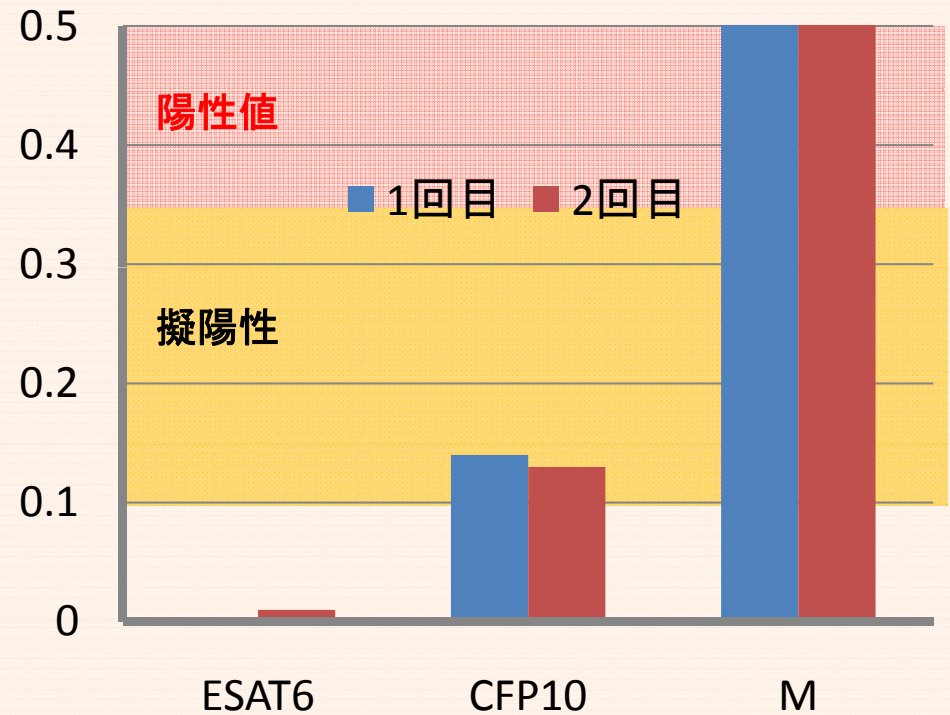
QFT検査の実例(1)

1) 再検査で感染が確定した症例



22歳女性
5/25測定: 擬陽性
6/21測定: 陽性

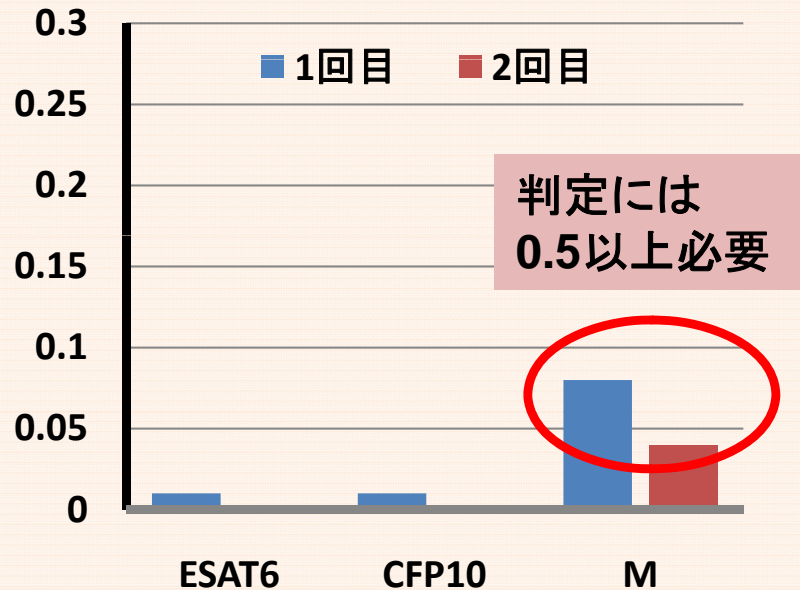
2) 疑陽性が継続した例



【疑われる原因】
・不明(既往反応?)

QFT検査の実例(2)

リンパ球が反応しなかった症例



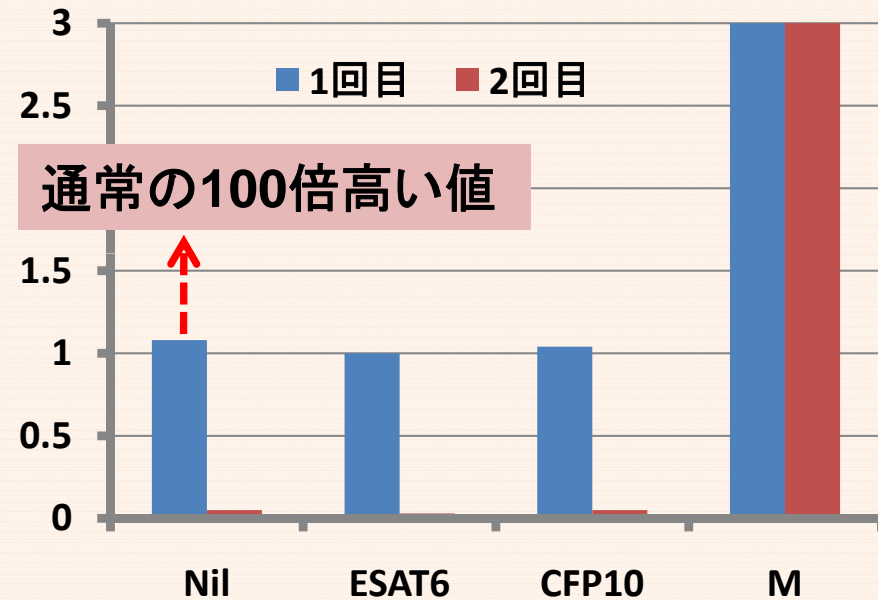
【被験者の状態】

- ・拒食症

(他に疑われる原因)

- ・AIDS, 白血病等
- ・免疫抑制治療等

平時の γ -IFNが高い症例(生データ)



【被験者の状態】

- ・胃腸炎症状

(他に疑われる原因)

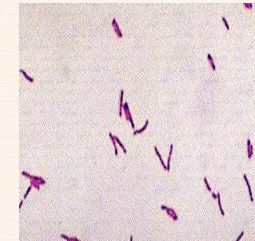
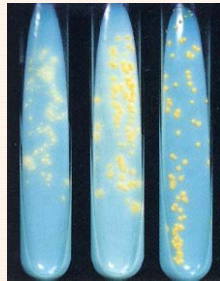
- ・感染症, 慢性疾患, 基礎疾患
(組織破壊)

3. 新しい検査技術の開発

(結核菌迅速検出法の応用に関する研究)

管理検診等での結核菌の分離同定

培養陽性(8週) ← **喀痰** → 集菌塗抹陽性



→ 遺伝子同定 ←

↓
結果報告

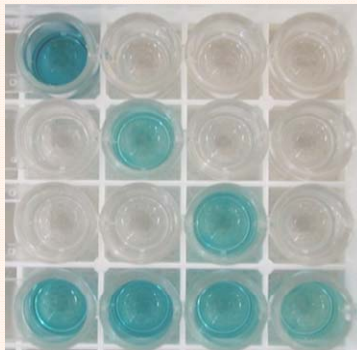
↓
遺伝子による同定

結核菌群

AV菌

INT菌

PC



【塗抹・培養検査の問題点】

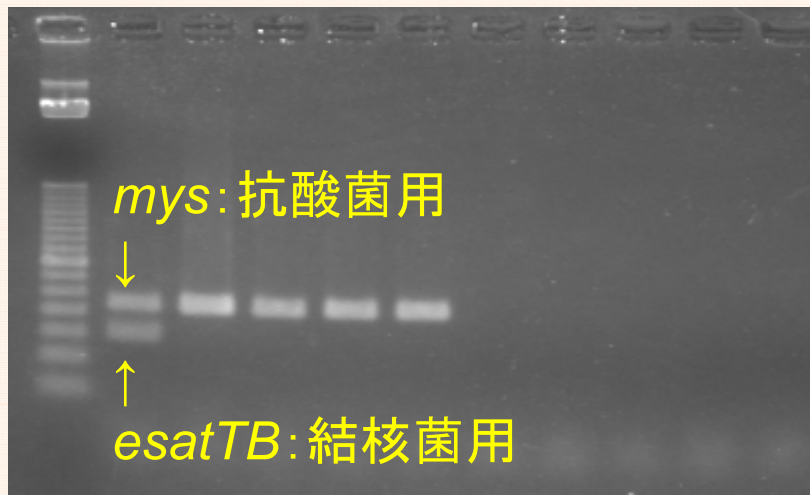
- ・ガフキー号数の不正確性
- ・死菌生菌判別の迅速性
- ・菌種同定の問題



定量PCR法を応用した研究の必要性

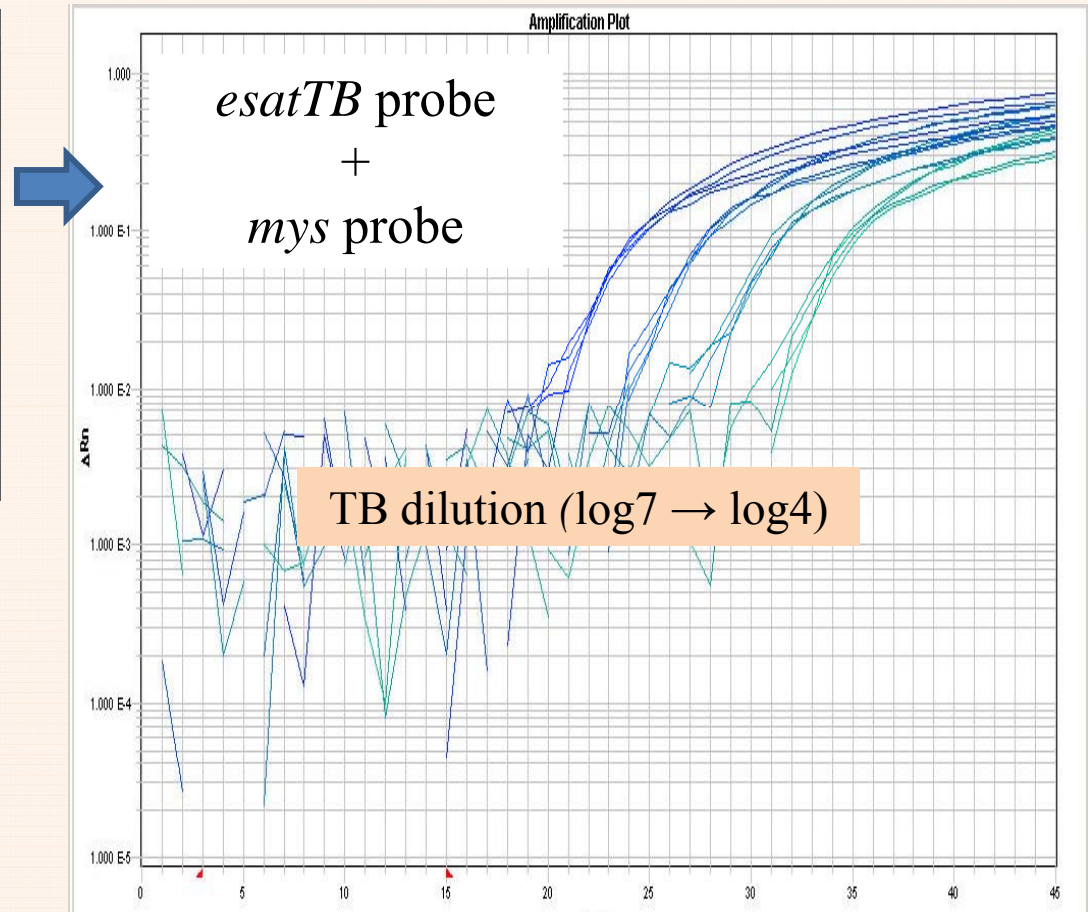
結核菌及び抗酸菌を標的にした定量PCR

【結核菌検出用 primer : *esatTB*】 QFT試験で使用するESAT-6抗原の遺伝子配列から設計
【抗酸菌検出用 primer : *mys*】 16s-23s rDNA領域(ITS)から設計

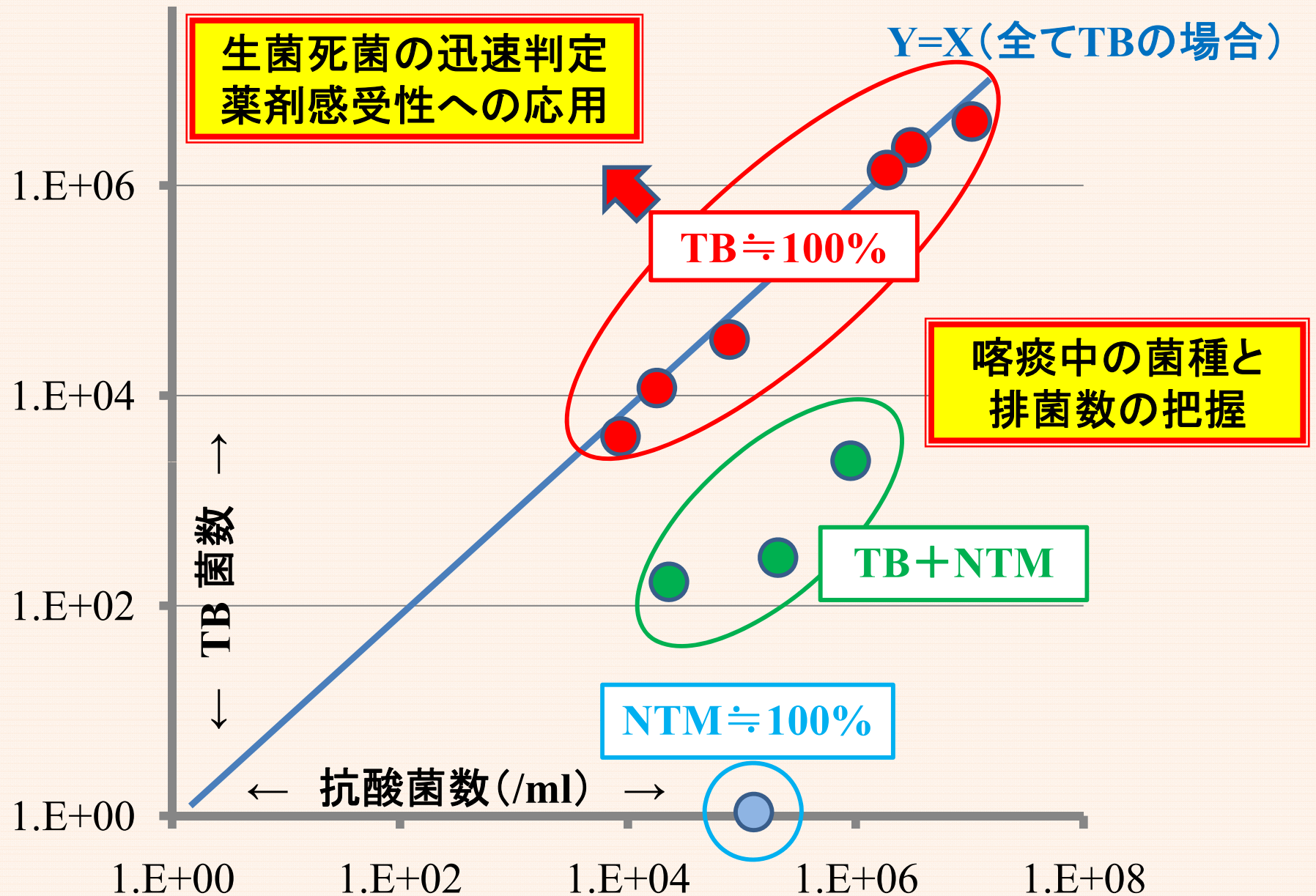


Lane 1 : DNA marker
2 : TB
3 : BCG
4 : AV
5 : INT
6 : Other Mycobacteria
7-11 : sputum(normal)

Multiplex PCR

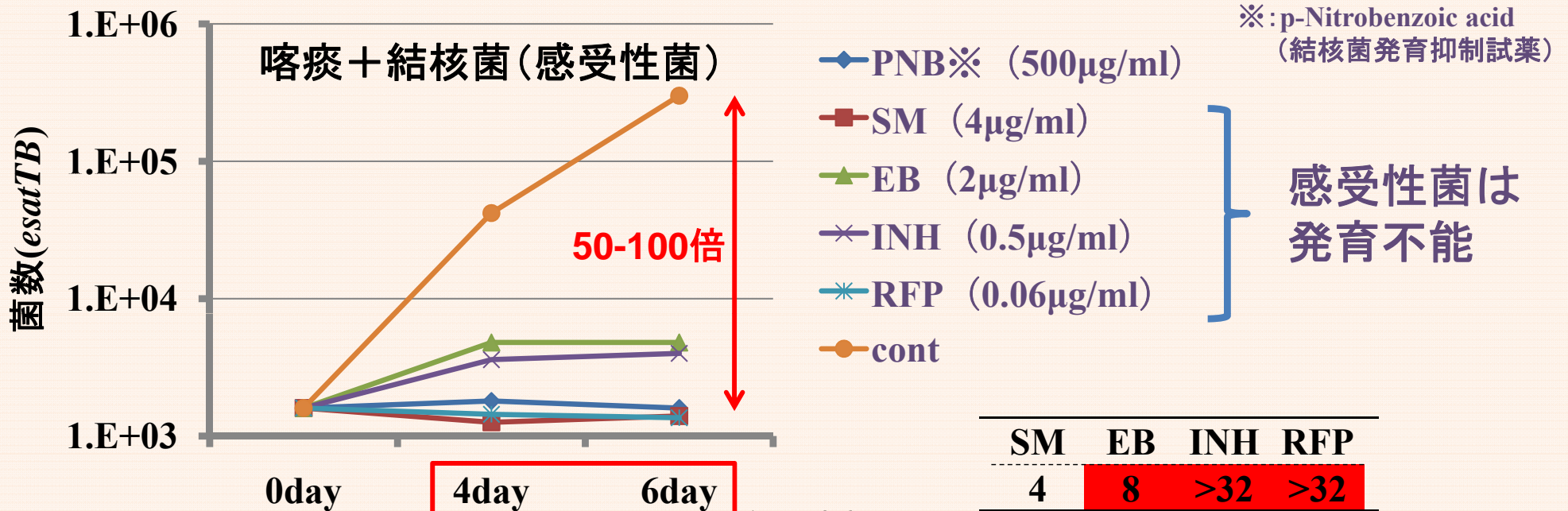


Multiplex and Double probe 定量PCR

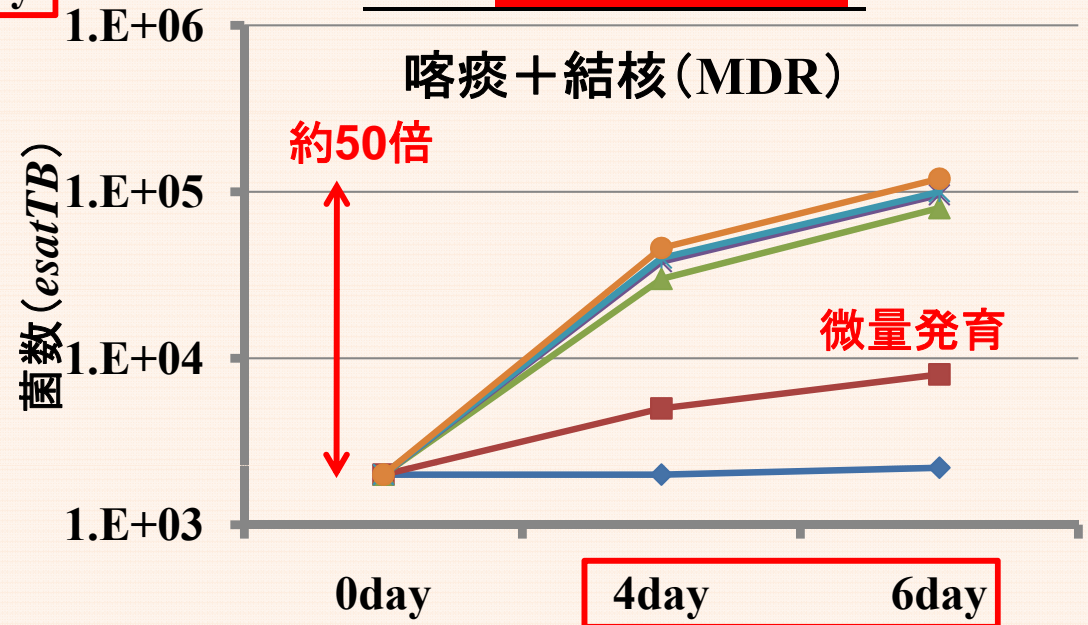


喀痰中の結核菌と非結核性抗酸菌数の推定

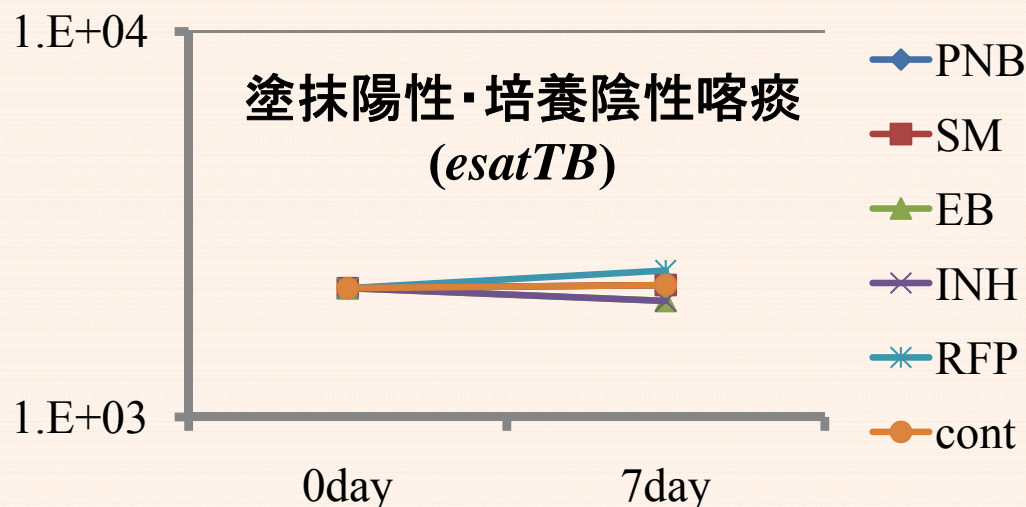
喀痰中の結核菌の発育(1)



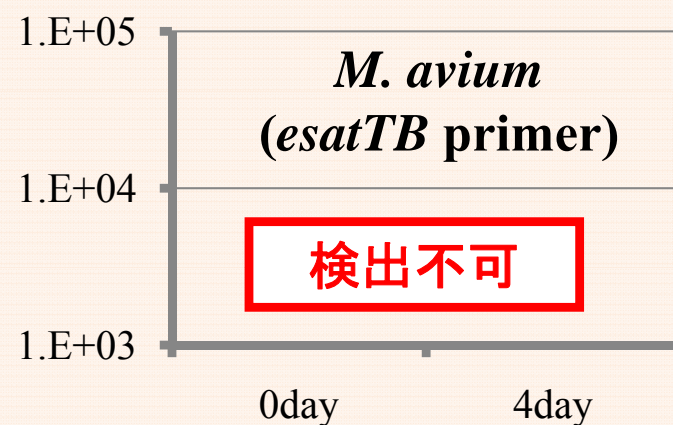
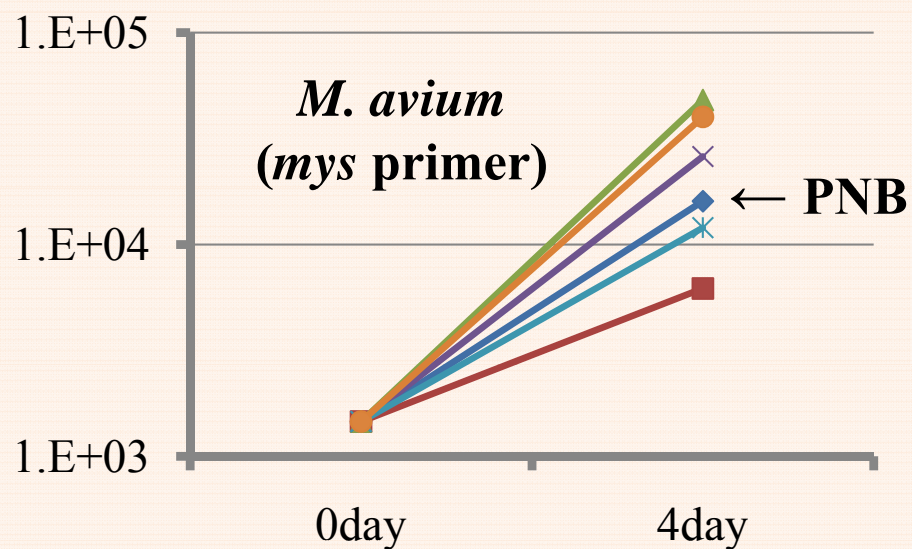
定量PCRによる
微量排菌からの
薬剤感受性試験



喀痰中の結核菌等の発育(2)



死菌排菌との区別



二種類のprimerで迅速かつ正確な結核菌検査が実施可能

定量PCRの結核菌検査における活用

1. 喀痰中の結核菌数測定の迅速化
(感染危険度の具体的提示)
2. 短時間培養法併用による生菌の証明
(死菌排菌・菌交代症の確認)
- (3. 薬剤感受性試験の迅速化)