

結核低蔓延地域における網羅的な結核菌 反復配列多型（VNTR）分析の有用性

¹瀬戸 順次 ¹阿彦 忠之 ²和田 崇之 ³長谷 篤
⁴山田 敬子

要旨：〔目的〕国内の結核低蔓延地域において結核菌 VNTR 分析を広範に実施し、低蔓延下の結核対策における同分析の有用性を明らかにする。〔方法〕2009～2011 年に山形県内で新規登録された菌陽性肺結核患者 266 人中 184 人（69.2%）から分離された結核菌の 24 領域 VNTR 分析を実施した。VNTR パターンが 23 領域域以上一致した菌株を同一クラスタと定義し、各クラスタの由来患者間の関連性の有無を実地疫学調査結果から検証した。〔結果〕184 株中 49 株（26.6%）が 17 クラスタを形成した。関連性がある事例として、6 クラスタ内に院内感染 3 事例、家族内感染 3 事例、施設内感染 1 事例を見出した。このうち、院内感染、施設内感染各 1 事例では VNTR 分析により未知の伝播が明らかにされた。最大クラスタ（12 株）の VNTR パターンは、2007 年発端の集団感染事例の初発患者パターンと一致した。〔考察〕結核低蔓延地域では、広く収集した患者由来菌株の VNTR 分析と実地疫学調査の結果を組み合わせることで、未知の感染伝播の発見、新たな感染リスク集団の探知、および集団感染の追跡に役立つなど、VNTR 分析の高い有用性が確認された。

キーワード：結核低蔓延、結核菌、VNTR 分析、分子疫学、実地疫学

はじめに

わが国の 2011 年の結核新登録患者数は 22,681 人、罹患率（人口 10 万対）は 17.7 であり、国際的には結核中蔓延国に位置付けられている。今後、早期に低蔓延国（罹患率 10 未満）の仲間入りを果たし、その先の制圧（elimination）を目指すにあたっては、結核患者一人ひとりの感染源・感染経路の特定が重要となる。これを支援する方法として結核菌の遺伝子タイピングを用いた分子疫学調査が必須とされている¹⁾。遺伝子タイピングのうち、現在国内において主流となりつつある反復配列多型（variable number of tandem repeat, VNTR）分析は、地方衛生研究所を中心として実施体制の整備が進んでいる。しかし、VNTR 分析を保健所の実地疫学調査と組み合わせて活用した報告はまだ少ない²⁾³⁾。これまでは主に結核集団感染事例における活用報告であり、都道府県レベルの地域全体の結核患者から分離された結核菌株を広く収集し、

その VNTR 分析結果と結核患者の実地疫学調査情報を組み合わせて VNTR 分析の有用性を検証した報告はない。

既に結核低蔓延に近い状況にある山形県（2011 年罹患率 11.3）では、結核菌 VNTR 分析を、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第 15 条に基づく積極的疫学調査の基本項目と位置付けた。これにより 2009 年からは、原則として菌陽性結核患者全例の結核菌株について保健所が医療機関あてに譲渡を依頼し、譲渡を受けた菌株について山形県衛生研究所が VNTR 分析を実施する体制となった。そこで本研究では、山形県全域の患者由来菌株を広く収集して VNTR 分析を実施し、VNTR 分析の結果と実地疫学調査情報を組み合わせた検討を行うことにより、低蔓延地域の結核対策における VNTR 分析の有用性を明らかにすることを目的とした。

対象と方法

〔対象〕

¹山形県衛生研究所、²長崎大学熱帯医学研究所国際保健学、³大阪市立環境科学研究所、⁴山形県置賜保健所

連絡先：瀬戸順次，山形県衛生研究所，〒990-0031 山形県山形市十日町 1-6-6

(E-mail: setoj@pref.yamagata.jp)

(Received 13 Nov. 2012 / Accepted 7 Mar. 2013)

2009～2011年（3年間）の山形県における新登録菌陽性肺結核患者のうち、保健所が医療機関に依頼して患者由来菌株の譲渡を受けた全例を対象としてVNTR分析を実施した。また、対象患者については必要に応じてVNTR分析結果と保健所による実地疫学調査の結果を組み合わせ、感染源・感染経路の分析を行った。なお、これらの調査・分析は法律に基づく行政権限として県の保健所および衛生研究所が実施したものであり倫理上の問題は無いと判断されたが、研究目的の分析を含むため、山形県衛生研究所倫理審査委員会の承認を得て実施した。

〔VNTR分析の方法〕

結核菌1白金耳を300 μ lの蒸留水に懸濁し、100℃10分間加熱処理した結核菌粗抽出液を鋳型とした。PCR法によるVNTR領域の増幅は前田らの方法⁴⁾に準拠した。得られたPCR産物は0.5×TBE緩衝液を用いた2% Nuesieve 3:1 Agarose（Lonza社）でアガロース電気泳動を行い、コピー数を算定した。遺伝子増幅産物の鎖長が長くコピー数の判定が困難なPCR産物については、マイクロチップ電気泳動（i-チップ/コスモアイ、日立化成工業株式会社）により鎖長を算出することでコピー数の判定を行った。

VNTR分析領域の設定は、識別能を高めるため、および多発性大規模感染株（putative expanding cluster types, pECTs）⁵⁾として提唱されている結核菌株の24領域VNTRパターン（9種類）との比較を可能とするために、国内の標準法として提唱されているJATA（12）⁴⁾⁶⁾12領域に、JATA（15）3領域⁷⁾（QUB-11a, ETR A, QUB-18）、超可変3領域⁸⁾（QUB-3232, v3820, v4120）、および国際比較6領域⁹⁾（MIRU04, MIRU16, MIRU40, ETR C, Mtub

30, Mtub39）を加えた計24領域とした。

〔VNTR分析によるクラスタ形成と関連性評価〕

VNTR分析で同一パターンを示す菌株群（クラスタ）の定義を、「24領域のVNTRパターンのうち23領域以上が一致した菌株」とした。本研究では、結核菌の偶発的な遺伝子変異を考慮して、VNTRパターンが1領域異なる場合も同一クラスタと判定した。クラスタを形成した菌株の由来患者について、保健所による実地疫学調査結果と組み合わせ、関連性を分析した。また、pECTs-VNTRパターン9種類のいずれかと24領域のVNTRパターンが完全一致した菌株を認めた場合にも、当該患者の実地疫学調査結果を参照し、感染経路などの分析を試みた。

各クラスタ内の患者間の疫学的関連性の定義は、保健所の実地疫学調査結果との組み合わせにより明らかな関連性（明らかな接触歴など）が判明した事例を「関連あり（Related）」とした。これには、VNTR分析を実施する前の実地疫学調査で既に患者間の関連性が示唆されていた事例のほか、VNTR分析によるクラスタ形成を根拠に保健所が追加の実地疫学調査を実施して関連性が判明した事例も含めた。また、クラスタ内の患者間の明らかな接触歴は確認できないものの実地疫学調査で関連する要素（同じ時期に同じ施設の利用歴ありなど）を見出した事例を「関連の可能性あり（Probably related）」、関連が全く不明の事例を「関連なし（Unknown）」とした。

結 果

2009～2011年（3年間）の山形県内の新登録菌陽性肺結核患者数は266人であった。このうち、医療機関から患者由来菌株の譲渡を受けてVNTR分析が可能であった

Table 1 Parameters of 184 pulmonary tuberculosis patients identified in Yamagata Prefecture, Japan between 2009 and 2011

Parameters	Area inhabited				Total
	a n (%)	b n (%)	c n (%)	d n (%)	
Total	103	6	28	47	184
Sex					
Male	58 (56.3)	4 (66.7)	19 (67.9)	26 (55.3)	107 (58.2)
Female	45 (43.7)	2 (33.3)	9 (32.1)	21 (44.7)	77 (41.8)
Age group (years)					
≤ 29	7 (6.8)	0	0	2 (4.3)	9 (4.9)
30–39	9 (8.7)	1 (16.7)	0	5 (10.6)	15 (8.2)
40–49	7 (6.8)	0	1 (3.6)	0	8 (4.3)
50–59	4 (3.9)	0	1 (3.6)	0	5 (2.7)
60–69	4 (3.9)	1 (16.7)	1 (3.6)	3 (6.4)	9 (4.9)
70–79	17 (16.5)	1 (16.7)	6 (21.4)	8 (17.0)	32 (17.4)
80–89	44 (42.7)	3 (50.0)	14 (50.0)	26 (55.3)	87 (47.3)
≥ 90	11 (10.7)	0	5 (17.9)	3 (6.4)	19 (10.3)
Medical history					
Initial	100 (97.1)	6 (100.0)	23 (82.1)	44 (93.6)	173 (94.0)
Retreatment	3 (2.9)	0	5 (17.9)	3 (6.4)	11 (6.0)

者は184人（69.2%）であり、その居住地域別の性別、年齢階級および治療歴をTable 1に示した。

譲渡を受けた結核菌184株の24領域VNTR分析の結果、49株（26.6%）が17クラスタを形成した（Table 2）。ただ

し、24領域中23領域のVNTRパターンが一致した場合もクラスタ形成と定義した影響で、1株（Table 2: Da03）は2つのクラスタ（クラスタ番号13, 14）に属する結果となった。各クラスタ内の構成菌株数は、2株が最も多

Table 2 Profiles of variable number of tandem repeats (VNTRs) that formed clusters in Yamagata Prefecture, Japan between 2009 and 2011

Cluster number	Strain number [†]	JATA (12)												JATA (15)			Hypervariable			for international comparison [‡]					
		J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	Q11a	EA	Q18	3232	3820	4120	M04	M16	M40	EC	t30	t39
1	Ca02	4	3	4	3	4	3	7	4	5	7	8	3	5	4	8	14	14	11	2	3	3	4	4	3
	Ca31	4	3	4	3	4	3	7	4	5	7	8	3	5	4	8	14	14	11	2	3	3	4	4	3
	Da17	4	3	4	3	4	3	7	4	5	7	8	3	5	4	8	14	14	11	2	3	3	4	4	3
	Ea28	4	3	4	3	4	3	7	4	5	7	8	3	5	4	8	14	14	11	2	3	3	4	4	3
2	Ca03	4	3	4	2	5	3	7	4	5	7	7	3	5	3	8	14	20	8	2	3	3	4	4	3
	Ea04	4	3	4	2	5	3	7	4	5	7	7	3	5	3	8	14	20	8	2	3	3	4	4	3
	Ea13	4	3	4	2	5	3	7	4	5	7	7	3	5	3	8	14	20	8	2	3	3	4	4	3
	Ea17	4	3	4	2	5	3	7	4	5	7	7	3	5	3	8	14	20	8	2	3	3	4	4	3
3	Ca13	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	5	4	10	15	12	8	2	3	3	4	4	3
	Ca15	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	5	4	10	15	13	8	2	3	3	4	4	3
4	Ca14	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	8	4	8	4	10	12	9	7	2	3	2	4	4	3
	Ca18	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	8	4	8	4	10	12	9	7	2	3	2	4	4	3
	Ca21	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	8	4	8	4	10	12	9	7	2	3	2	4	4	3
	Ca23	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	8	4	8	4	10	12	9	7	2	3	2	4	4	3
	Ca25	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	8	4	8	4	10	12	9	8	2	3	2	4	4	3
	Ca32	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	8	4	8	4	10	12	9	7	2	3	2	4	4	3
	Da07	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	8	4	8	4	9	12	9	7	2	3	2	4	4	3
	Da14	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	8	4	8	4	10	12	9	7	2	3	2	4	4	3
	Ea03	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	8	4	8	4	10	12	9	7	2	3	2	4	4	3
	Ea18	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	8	4	8	4	10	12	9	7	2	3	2	4	4	3
	Ea31	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	8	4	8	4	10	12	9	7	2	3	2	4	4	3
	Ea33	3	3	4	3	5	3	7	2	4	14	8	4	8	4	10	12	9	7	2	3	2	4	4	3
5	Ca17	3	3	3	4	6	3	7	5	5	8	2	5	8	4	10	16	12	8	2	4	4	4	4	3
	Ca30	3	3	3	4	6	3	7	5	5	8	2	5	13	4	10	16	12	8	2	4	4	4	4	3
6	Ca19	2	3	1	3	3	2	5	4	4	12	4	3	2	3	5	5	5	2	2	3	1	3	2	5
	Ca34	2	3	1	3	4	2	5	4	4	12	4	3	2	3	5	5	5	2	2	3	1	3	2	5
	Ea16	2	3	1	3	4	2	5	4	4	12	4	3	2	3	5	5	5	2	2	3	1	3	2	5
7	Ca22	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	4	8	4	7	3/13	16	6	2	3	3	7	2	4
	Da02	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	8	4	8	4	7	13	16	6	2	3	3	7	2	4
8	Ca28	2	3	1	3	3	2	5	4	3	12	3	3	2	3	5	5	5	2	2	3	1	3	2	8
	Dc05	2	3	1	3	3	2	5	4	3	12	3	3	2	3	5	5	5	2	2	3	1	3	2	8
9	Ca38	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	>20 [¶]	2	10	15	12	8	2	3	3	4	4	3
	Da04	4	3	3	2	7	3	7	4	5	7	10	5	>20 [¶]	2	10	15	12	8	2	3	3	4	4	3
10	Cd04	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	13	4	10	9	12	11	2	4	3	4	4	3
	Da28	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	8	4	10	9	12	11	2	4	3	4	4	3
11	Cd05	4	3	3	3	3	4	7	3	3	5	9	4	8	4	13	10	13	12	2	3	3	4	2	3
	Cd12	4	3	3	3	3	4	7	3	3	5	9	4	8	4	13	10	13	12	2	3	3	4	2	3
12	Cd07	4	1	3	2	6	4	5	4	5	7	8	5	9	4	10	25	14	12	2	3	3	4	4	4
	Ed15	4	1	3	2	6	4	5	4	5	7	8	5	9	4	10	22	14	12	2	3	3	4	4	4
13	Da03 [§]	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	8	4	10	14	12	5	2	3	3	4	4	3
	Dc08	4	3	3	3	7	3	7	4	4	7	8	5	8	4	10	14	12	5	2	3	3	4	4	3
14	Da03 [§]	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	8	4	10	14	12	5	2	3	3	4	4	3
	Da34	4	3	3	3	7	3	7	4	5	7	8	5	8	4	10	15	12	5	2	3	3	4	4	3
15	Da20	4	1	3	2	7	4	8	4	4	7	8	5	9	4	9	13	14	9	2	3	3	4	4	3
	Da24	4	1	3	2	7	4	12	4	4	7	8	5	9	4	9	13	14	9	2	3	3	4	4	3
16	Dd05	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	8	5	9	4	10	16	14	12	2	3	3	4	4	3
	Ea21	4	1	3	2	6	4	7	4	5	7	8	5	9	4	10	16	14	12	2	3	3	4	4	3
	Ed07	4	1	3	2	6	2	7	4	5	7	8	5	9	4	10	16	14	12	2	3	3	4	4	3
17	Ea32	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	8	4	10	10	12	9	2	4	3	4	4	3
	Ed02	3	3	3	4	7	3	7	5	5	7	2	5	8	4	10	10	12	9	2	4	3	4	4	3

[†] Capital letters indicate registration year (C: 2009, D: 2010, E: 2011), and small letters indicate area inhabited as shown in Table 1.

[‡] These six loci composed the international Supply's 15-MIRU-VNTR by combination with JATA (12)-VNTR.

[§] Da03 formed clusters with both Dc08 and Da34.

[¶] PCR products were so long that we could not decide the copy number, but agarose electrophoresis indicated the same product size.

く12クラスタ、3株、4株がそれぞれ2クラスタ、12株が1クラスタであった。Fig.に年齢群ごとのクラスタ形成率を示した。患者の年齢層が若いほどクラスタ形成率が高く、59歳以下では37株中17株(45.9%)であったのに対して、80歳以上では106株中20株(18.9%)にとどまった。

各クラスタの患者情報および疫学的関連性をTable 3に示した。患者間の関連性が判明した事例として、6クラスタ内に院内感染3事例(クラスタ番号2, 3, 5)、家族内感染3事例(同2, 11, 12)、高齢者施設内感染1事例(同7)を見出した。このうち、クラスタ番号7, 11, 12では、高齢者間でVNTRパターンが一致した。

また、クラスタ番号3, 7はVNTR分析でクラスタ形成が判明した後に保健所で実施した追加の実地疫学調査で関連性が明らかとなった。クラスタ番号3(院内感染)の入院患者は、他疾患で入院治療後、いったん退院して数カ月後に食欲不振などで同病院の別の病棟に再入院した際に肺結核と診断された。一方、同病院の看護師(患者の初回入院時の病棟に勤務)は、その後に実施された職場の定期健康診断により肺結核が発見された。入院患者の接触者調査が結核診断時の病棟に限定されていたこともあり、両者の関連性は気付かれていなかったが、VNTR分析の結果を踏まえた再調査の結果、患者は最初の入院時から肺結核を合併していた可能性が高く、その時の接触歴から関連性ありと判断された。クラスタ番号7(高齢者施設内感染)の患者2例のうち1例は、施設入所のための健康診断書作成目的で受診した医療機関で肺結核と診断、もう1例はその半年後に急性膵炎の治療目的で入院した病院において胸部陰影を指摘され肺結核が発見された。VNTRパターン一致の結果を受けて保健所がこの2例の生活歴を再調査した結果、両者は同じ高齢者施設のデイサービスを利用し週1回以上の接触歴があったことが判明した。

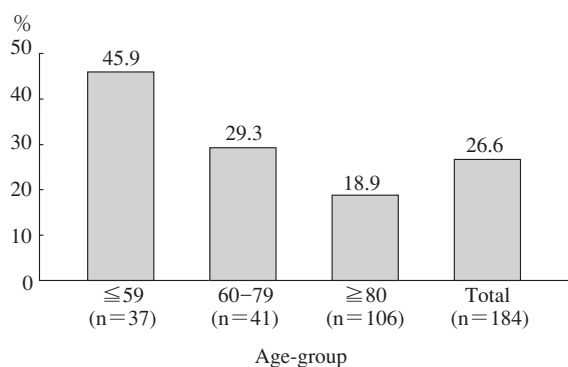


Fig. The clustering rate of 24 loci VNTR analysis by age-group. A cluster was defined when the 24 loci VNTR pattern of each strain was identical or differed by 1 locus.

クラスタ番号4のVNTRパターンは、県内X保健所管内において2007年の新登録患者を発端として発生した結核集団感染事例(2008年12月末日までの新登録菌陽性患者数17人、全員が発端患者との接触歴あり、結核菌VNTR分析結果も一致)におけるVNTRパターンと同一であった。このクラスタを構成する12人の患者は、2007年の発端患者との直接の接触歴は確認できなかった。しかし、発端患者からの二次感染により発病した患者(2008年新登録)との明らかな接触歴のある例を認めたほか、実地疫学調査により地域内の特定のパチンコ店(2007年の発端患者も利用)の利用歴があるという共通性を探知したことにより、「関連の可能性あり」と判断される例がクラスタ内の半数を占めていた。

このほかにも、実地疫学調査ではクラスタ内の患者間の接触歴は確認できないものの、結核患者が通院していた病院の看護師がのちに結核を発症していたこと(クラスタ番号1, 2)、および住所が近接しているという調査結果(同1, 6)から、「関連の可能性あり」と判断されるクラスタが存在した。一方で、24領域VNTR分析でクラスタを形成した49株のうち21株(42.9%)については、実地疫学調査を組み合わせるとしても、クラスタ内での疫学的関連性を見出すことができなかった。

山形県内の結核菌184株とpECTs-VNTRパターン9種類との24領域VNTRパターン比較の結果、pECT 04, pECT 07(M4株¹⁰⁾)およびpECT 08と完全一致した菌株がそれぞれ1株ずつ、計3株確認された(Table 4)。pECT 07, pECT 08の由来患者には、結核発病前に首都圏での長期の職歴があったが、pECT 04の由来患者については県外での感染を示唆する実地疫学情報はなかった。

考 察

本研究は、都道府県レベルの地域全体で結核患者由来菌株を広く収集し、そのVNTR分析の結果と保健所による実地疫学調査結果を組み合わせると分析した国内初の報告である。対象とした山形県は、国内の代表的な結核低蔓延地域であるため、結核低蔓延下での網羅的なVNTR分析の有用性を明らかにした初めての報告とも言える。

24領域VNTR分析の結果、184株中49株(26.6%)で17クラスタを見出した。各クラスタの構成菌株数は、比較的規模の大きい集団感染事例のVNTRパターンと一致した12株(Table 3: クラスタ番号4)を除けば最大でも4株にとどまった。このことから、低蔓延地域における網羅的なVNTR分析において、同一クラスタ内の菌株数は、集団感染に関連する事例以外ではそれほど多くならないものと推定された。一方で、VNTR分析の結果、7割以上はクラスタを形成しないこと、すなわち散発事例である可能性が示された。保健所の実地疫学調査で确实

Table 3 The epidemiological relationship among pulmonary tuberculosis patients that formed clusters by 24 loci VNTR analysis in Yamagata Prefecture, Japan between 2009 and 2011

Cluster number	Strain number	Registration year	Sex	Age	Address	Epidemiological relationship			Remarks
						Related	Probably related	Unknown	
1	Ca02	2009	M	72	A city		●		His address was close to that of patients Ca31 and Da17.
	Ca31	2009	M	81	A city		●		
	Da17	2010	F	83	B city		●		She had a record at the hospital at which patient Ea28 worked. Nurse (possibility of hospital infection from patient Da17)
	Ea28	2011	F	50	C city		●		
2	Ca03	2009	F	84	D town		●		She had a record at the hospital at which patient Ea04 worked. Nurse (possibility of hospital infection from patient Ca03)
	Ea04	2011	F	45	A city	●			
	Ea13	2011	M	42	A city	●			He had lived together with patient Ea04 (family infection). Nurse (hospital infection from patient Ea04)
	Ea17	2011	F	49	A city	●			
3 [†]	Ca13	2009	M	84	C city	●			Inpatient
	Ca15 [‡]	2009	F	41	C city	●			Nurse (hospital infection from patient Ca13)
4	Ca14	2009	M	72	E city			●	He had attended the same pachinko parlor as the incipient patient.
	Ca18	2009	M	29	F town		●		
	Ca21	2009	F	88	F town		●		She had contact with infectious TB patient who had attended the same pachinko parlor as the incipient patient.
	Ca23	2009	M	43	F town		●		
	Ca25 [‡]	2009	M	35	E city	●			He had attended the same pachinko parlor as the incipient patient.
	Ca32	2009	M	31	G city		●		
	Da07 [‡]	2010	F	26	E city		●		He had contact with an outbreak patient that developed tuberculosis in 2008.
	Da14	2010	M	24	B city			●	
	Ea03	2011	F	72	D town			●	He had attended the same pachinko parlor as the incipient patient.
	Ea18	2011	M	27	E city		●		
	Ea31	2011	M	36	E city	●			He had attended the same pachinko parlor as the incipient patient.
	Ea33	2011	F	30	E city			●	
5	Ca17	2009	M	78	C city	●			Inpatient
	Ca30 [‡]	2009	F	25	C city	●			Nurse (hospital infection from patient Ca17)
6	Ca19 [‡]	2009	M	79	G city			●	His address was close to that of patient Ca34.
	Ca34	2009	M	82	H city		●		
	Ea16	2011	M	83	C city		●		
7 [†]	Ca22	2009	F	82	I town	●			She had used the same nursing home as patient Ca22.
	Da02	2010	F	76	I town	●			
8	Ca28	2009	M	63	B city			●	
	Dc05	2010	F	93	J town			●	
9	Ca38	2009	M	50	K city			●	
	Da04	2010	M	80	C city			●	
10	Cd04	2009	F	81	L town			●	
	Da28 [‡]	2010	F	93	I town			●	
11	Cd05	2009	F	82	M city	●			He had lived together with patient Cd05 (family infection).
	Cd12	2009	M	86	M city	●			
12	Cd07	2009	M	83	L town	●			She had lived together with patient Cd07 (family infection).
	Ed15 [‡]	2011	F	85	L town	●			
13	Da03	2010	M	77	C city			●	
	Dc08 [‡]	2010	M	77	N town			●	
14	Da03	2010	M	77	C city			●	
	Da34 [‡]	2010	M	85	C city			●	
15	Da20	2010	F	78	A city			●	
	Da24 [‡]	2010	F	61	C city			●	
16	Dd05	2010	M	79	O city			●	
	Ea21	2011	M	85	H city			●	
	Ed07 [‡]	2011	M	86	L town			●	
17	Ea32	2011	F	86	B city			●	
	Ed02	2011	F	32	M city			●	

[†] The relationship between tuberculosis patients was identified after additional epidemiological investigation at the Public Health Center.[‡] The 24 loci VNTR pattern differed by 1 locus from other strains in the same cluster.

Table 4 The epidemiological information for pulmonary tuberculosis patients for whom the 24 loci VNTR pattern of the isolated strain was identical to the putative expanding cluster type (pECT)-VNTR patterns in Yamagata Prefecture, Japan between 2009 and 2011

Strain number	pECT type	Registration year	Sex	Age	Address	Remarks
Dd04	pECT 07 [†]	2010	M	76	O city	Streptomycin resistant. He had worked at a construction company in Tokyo until 2007.
Dd10	pECT 08	2010	M	32	P town	He had worked at a construction company in the Tokyo Metropolitan area between 1999 and 2004.
Da28	pECT 04	2010	F	93	I town	She was born in Ibaraki Prefecture, and moved to Yamagata Prefecture in her thirties.

[†] pECT 07 is identical to M4 strain¹⁰⁾.

に散发事例であることを証明するのは困難であるが、VNTR分析によって散发事例であることに科学的裏付けを与えられることは、保健所で実施している結核対策にとっても大きな強みである。

年齢層ごとのクラスタ形成率の検討 (Fig.) の結果、年齢層が若いほどクラスタ形成率が高く、患者間の関連性が明らかになる可能性が高いことが示された。一方で、高齢結核患者 (特に80歳以上) でクラスタ形成率が低かったが、その理由として2つの要因が考えられる。一つは、一般的に高齢者の社会的活動性が若い年齢層に比べて低いために、結核菌を他の者に伝播させる機会が少なく他者から感染を受ける機会も少ないという考察である。次に、高齢患者の感染発病論を踏まえた考察も可能である。つまり、最近のわが国の高齢結核患者では、過去 (多くは青春期) に感染歴を有する者からの内因性再燃による発病が多いといわれている。したがって、高齢患者の喀痰などから分離された結核菌は、最近になって国内に浸淫している菌ではなく、過去の流行株であった可能性が高いために、クラスタを形成しにくいという考察である。

保健所の実地疫学調査によりVNTR分析の実施前から患者間の関連性が疑われていた事例 (Table 3: クラスタ番号2, 4, 5, 11, 12のRelated該当例) については、24領域VNTR分析の結果、すべてでクラスタ形成が確認され、実地疫学調査の結果をよく反映していることが示された。これに対して、クラスタ番号3, 7の事例については、24領域VNTR分析によるクラスタ形成が判明したことを契機として保健所が追加の実地疫学調査を実施した結果、患者間の関連性が明らかとなった。これは、実地疫学調査のみでは探知が困難だった未知の感染伝播を見出すことができ、接触者健康診断の対象拡大などの対策の見直しにつながったという意味で、VNTR分析の有用性の一端を示した結果といえる。また、クラスタ番号7, 11, 12 (高齢者施設内感染1事例および家族内感染2事例) では、それぞれVNTRパターンが一致するとともに、クラスタ内患者間の疫学的関連性を認めたことから、

高齢者間での最近の感染を強く示唆する結果が得られた。このような事例を複数認めたことは、結核既感染率が高いとされる高齢者集団¹¹⁾において多いと考えられている内因性再燃による発病以外にも、最近の結核感染 (多くは外来性再感染) による発病患者が珍しくないことを示しており、VNTR分析を網羅的に実施したからこそ得られた知見である。

クラスタ番号4の12株は、2007年の新登録患者を発端とする結核集団感染事例との関連性が示唆された (Table 3)。本研究では2009~2011年の新登録患者由来の結核菌株を分析したが、発端患者の診断から2年以上経過すると、発端患者との接触歴などの疫学的関連性を追えない事例が目立った。しかし、クラスタ内の患者は全員、県内X保健所管内の居住者であり、その半数は同一パチンコ店 (発端患者も利用) の利用歴があった。これまでの調査では、当該パチンコ店を感染経路として特定するに至っていないが、この地域内に感染リスクの高い施設環境が存在する可能性を示す結果となった。結核低蔓延下においては、網羅的なVNTR分析によって、それまで未知であった感染リスクの高い集団や施設環境を探知し、その集団などを対象に潜在性結核感染症 (LTBI) の早期発見を目的とした検査 (QFT検査など) を実施するという方策も有効と考える。これによりLTBI治療が促進され、結核罹患率の低下速度を加速させることも期待できる。

クラスタ内患者間の明らかな関連性は確認できなかったものの、「関連の可能性あり」と判断したクラスタについては、通院患者と看護師、患者の居住地が近接という調査結果から疫学的関連性を推察した。現実問題として、実地疫学調査によりすべての事例の関連性を明らかにすることはきわめて困難であるが、網羅的に収集した結核菌株のVNTR分析により得られたクラスタ形成結果を蓄積し、由来患者の実地疫学情報を継続的に突き合わせていくことは、感染源・感染経路を追究していくうえで重要な作業であると考えられた。

本研究の24領域VNTR分析においてクラスタを形成し

た菌株の約4割は、実地疫学調査結果と組み合わせて分析しても、クラスタ内での関連性が不明であった。この要因としては大きく2点が考えられる。1つは、実地疫学調査の限界として、患者間に最近の接触があったにもかかわらず関連性を見出すことができなかった可能性、あるいは特に高齢者間で形成されたクラスタについて、過去の流行株でのVNTRパターンの一致を捉えたため関連性を把握できなかった可能性である。2点目は、VNTR分析の限界として、本来異なる菌株を同一と判定した可能性である。特に、本研究では24領域VNTRパターンのうち1領域違いであっても同一クラスタとしたため、実際は由来の異なる菌株を同一と判定した可能性は充分考えられる。しかし、1領域違いであっても明らかな関連性を認めたクラスタも存在しており（Table 3：クラスタ番号3, 4, 5, 12のRelated該当例）、本研究では1領域違いを許容したクラスタ形成結果を保健所に還元し、保健所の追加の実地疫学調査によって関連性の有無を最終判定することで、関連性のある事例の見逃しを防ぐことを第一に考えた。

pECTs-VNTRパターンとの24領域VNTRパターンの比較の結果、3株がそれぞれpECT 04, pECT 07, pECT 08と完全一致した（Table 4）。このうちpECT 07, pECT 08の由来患者は結核発病前に首都圏での職歴があったこと、および県内のいずれの24領域VNTRパターンとも一致しなかったことから山形県外での感染と考えられた。VNTR分析にはデジタル化されたデータの比較が容易という特徴があり、今後、pECTs-VNTRパターンのような複数都道府県にまたがる流行株のVNTRパターンがさらに明らかになれば、感染経路などの特定により有益な情報が得られるものと考えられた。

本研究の限界として、菌株収集率が約7割にとどまったことが挙げられる。理由として、2009～2011年の3年間の研究のうち、特に開始当初の2009年は山形県内で唯一結核病床を有している1病院からの菌株譲渡に限定されたことが影響した。2010年以降は、結核菌検査を外部委託している医療機関で診断された患者由来の菌株などについても収集する体制をとっているが、培養菌株を入手できない例（核酸増幅法検査で菌陽性肺結核と診断されたが培養検査では陰性だった例、譲渡依頼をした時点で既に培養菌株が廃棄されていた例など）も少なくない。今回、菌株を収集できなかった結核患者間の関連性については不明であり、われわれが把握できていない未知の伝播が存在する可能性がある。

本研究により、結核低蔓延地域での網羅的な結核菌VNTR分析が実地疫学調査で浮かび上がった患者間の関連性あるいは散発事例の可能性に科学的裏付けを与えることのほか、実地疫学調査だけでは困難な未知の感染伝

播の発見、新たな感染リスク集団の探知、および結核集団感染事例の追跡に寄与することが示された。さらに、pECTs-VNTRパターンとの比較において山形県外での結核感染を捉えたことから、VNTRデータ広域比較の今後の発展性が示唆された。VNTR分析の実施体制は、各自治体の地方衛生研究所を中心に整備が進んでおり、将来的に全国レベルでのVNTRデータ広域比較が実現する可能性がある。本研究および今後われわれが継続して実施する網羅的な結核菌VNTR分析の成果が、将来的に全国の結核対策にも活用されることを期待したい。

研究費補助：本研究は、平成21～22年度厚生労働省科学研究費補助金による新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「罹患構造の変化に対応した結核対策の構築に関する研究（研究代表者 石川信克）」、および平成23年度と同研究事業「地域における効果的な結核対策の強化に関する研究（研究代表者 石川信克）」の分担研究（研究分担者 阿彦忠之）の一部として実施したものである。また、本研究の一部はJSPS科研費22790585の助成を受けたものである。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、山形県内4保健所感染症予防担当の皆様にご多大なるご協力を頂きました。心より感謝いたします。

文 献

- 1) 阿彦忠之, 森 亨:「感染症法に基づく結核の接触者健康診断の手引きとその解説」, 平成22年改訂版, 石川信克監修, 結核予防会, 東京, 2010, 57-60.
- 2) 富原亜希子, 辰巳朋美, 有馬和代, 他: 著しい受診の遅れが原因で結核死亡した若年者からの結核集団感染事例. 結核. 2011; 86: 315. (第86回総会抄録)
- 3) 平光良充: 遠隔都市に伝播した集団感染でVNTRが有効であった事例. 結核. 2012; 87: 271. (第87回総会抄録)
- 4) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 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—JATA (12)-VNTR分析法の実際. 結核. 2008; 83: 673-678.
- 5) 和田崇之, 長谷 篤: 結核菌の縦列反復配列多型 (VNTR) 解析に基づく分子疫学とその展望—大阪市の例. 結核. 2010; 85: 845-852.
- 6) Murase Y, Mitarai S, Sugawara I: Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol. 2008; 57: 873-880.
- 7) 前田伸司, 和田崇之, 岩本朋忠: 国内結核菌を効率よく型別するための標準反復配列多型 (VNTR) 分析法. 日本細菌学雑誌. 2010; 65: 201.

- 8) Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, et al.: Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family. FEMS Microbiol Lett. 2007 ; 270 : 67-74.
- 9) Supply P, Allix C, Lesjean S, et al.: Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006 ; 44 : 4498-4510.
- 10) Ohkado A, Murase Y, Mori M, et al.: Transmission of specific genotype streptomycin resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in the Tokyo Metropolitan area in Japan. BMC Infect Dis. 2009 ; 9 : 138.
- 11) 森 亨: 結核感染をめぐる諸問題. 結核. 1988 ; 63 : 339-348.

Original Article

EFFECTIVENESS OF COMPREHENSIVE VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEAT (VNTR) ANALYSIS IN AREAS WITH A LOW INCIDENCE OF TUBERCULOSIS

¹Junji SETO, ¹Tadayuki AHIKO, ²Takayuki WADA, ³Atsushi HASE,
and ⁴Keiko YAMADA

Abstract [Purpose] To ascertain the effectiveness of variable number of tandem repeat (VNTR) analysis in areas with a low incidence of tuberculosis (TB), we examined the combination of comprehensive VNTR analyses and field epidemiological investigation results in Yamagata Prefecture, Japan, where estimated incidence of new TB cases per 100,000 population was 11.3 in 2011.

[Methods] We collected *Mycobacterium tuberculosis* isolates from 184 (69.2%) of 266 pulmonary TB patients across the whole of Yamagata Prefecture between 2009 and 2011. Next, 24 loci [JATA (12), QUB-11a, ETR A, QUB-18, QUB-3232, v3820, v4120, MIRU04, MIRU16, MIRU40, ETR C, Mtub30, Mtub39] in VNTR genotypes were determined. The relationships among TB patients derived from the respective clusters were surveyed using field epidemiological investigation results provided by the Public Health Center.

[Results] Seventeen clusters were formed by 49 (26.6%) of the 184 isolates. We found 3 hospital infection cases, 3 family infection cases, and 1 nursing home infection case forming 6 clusters. Among these cases, two relationships among patients were revealed after additional epidemiological investigation at the Public Health Center. The VNTR pattern of the largest

cluster, which was formed by 12 isolates, was identical with that of an incipient patient of a TB mass infection that occurred in 2007.

[Discussion] In areas with a low incidence of TB, a combination of comprehensive VNTR analysis and field epidemiological investigation is useful to find unknown transmission routes, identify for new risk groups, and trace mass infections.

Key words: Low tuberculosis incidence, *Mycobacterium tuberculosis*, VNTR analysis, Molecular epidemiology, Field epidemiology

¹Yamagata Prefectural Institute of Public Health, ²Department of International Health, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, ³Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, ⁴Yamagata Prefectural Okitama Public Health Center

Correspondence to: Junji Seto, Department of Microbiology, Yamagata Prefectural Institute of Public Health, 1-6-6, Tokamachi, Yamagata-shi, Yamagata 990-0031 Japan.
(E-mail: setoj@pref.yamagata.jp)