

第83回総会シンポジウム

IV. 分子疫学研究の進歩と対策への応用

座長 ¹長谷 篤 ²前田 秀雄

キーワード：分子疫学，結核対策，遺伝子タイピング，VNTR，RFLP

シンポジスト：

1. 分子疫学先進国の状況—オランダの結核菌情報システムを中心に—
内村和広（財団法人結核予防会結核研究所）
2. 共通化した反復配列多型（VNTR）分析法による結核菌の型別
°前田伸司，村瀬良朗（結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター）
3. 大阪府の結核対策における結核菌分子疫学の有用性
田丸重貴（大阪府立公衆衛生研究所感染症部細菌課）
4. 低まん延地域の結核対策における分子疫学的解析
横山栄二（千葉県衛生研究所）
5. 結核菌の反復配列多型（VNTR）解析におけるローカライジングと国際標準化
和田崇之（大阪市立環境科学研究所）
6. 新宿区内の全結核患者に対するIS6110RFLP分析の実施と評価—接触者健診への応用の可能性について—
長嶺路子（東京都福祉保健局保健政策部疾病対策課）
7. 自治体の結核対策における分子疫学研究の位置づけ
°白井千香（神戸市兵庫区保健福祉部），藤山理世（神戸市保健所予防衛生課），岩本朋忠（神戸市環境保健研究所）

日本における結核の疫学的状況は，全体的には中蔓延から低蔓延に移行しつつあり，結核対策自体も新たな展開が必要となっている。一方で，大都市部では依然として，特定集団・地域において高蔓延状態を呈し，より積極的な対応が求められている。

しかしながら，罹患率の低下とともに健康政策全体における結核対策のプライオリティも低下し，対策を実施する保健所・地方衛生研究所ではその予算および業務量も減少している。また，行財政改革の中で，各自治体はより効率的，効果的な結核対策への転換が求められている。

こうした状況にあつて，近年，結核対策の強化を促進し，疫学的状況の改善に資する様々な新技術が開発されている。中でもRFLP (restriction fragment length polymorphism)，VNTR (variable numbers of tandem repeats) 法等による結核菌の分子疫学的解明は，これまで，実地疫学のみならずをえなかった感染拡大状況に対する積極的疫学調査において，実証的な分析を進めることが可能となった。そして，試験研究機関においては，その技術の精査および標準化が図られ，また，保健所においても実務的に結核対策に実用化され疫学的状況の改善のために実用化されつつある。これによって，接触者健診等の実務の効率化が可能となるとともに，各自治体が連携して取り組むことにより広域的な疫学状況を解明する効果も期待できる。

しかしながら，こうした新たな技術を基盤に，対策全体をパラダイムシフトするためには，対策に関わる様々な分野の人々が新技術とその応用による対策の推進についての理解と認識を一致させ，共同して新たなシステムの構築に取り組むことが必要となる。

本シンポジウムでは，分子疫学研究を基盤に結核対策のリニューアルを果たすことを目標に，研究の進歩の状況とその対策への応用の可能性について基本的理解を深め，さらに，結核対策の政策的推進に資するための具体的な戦略を検討した。

¹大阪市立環境科学研究所，²東京都健康安全研究センター連絡先：前田秀雄，東京都健康安全研究センター，〒169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1
(E-mail: Hideo_Maeda@member.metro.tokyo.jp)
(Received 27 Oct. 2008)

財団法人結核予防会結核研究所の内村和広氏が、分子疫学先進国であるオランダの状況を報告した。オランダの分子疫学分析による結核菌情報システムは、結核対策の中心となる組織に機能が集約され、その上でそれぞれの組織間で緊密な連携がとられることで可能となっている。分子疫学への結核対策への応用は、結核低蔓延化を目指す疫学状況と同時に起こる結核問題の偏在化、また多剤耐性・超多剤耐性結核の脅威といった状況に対して日本においても有用であり、機能集約と組織間の緊密な連携といったオランダの先進的な取り組みはその範になると考えられる。

次に、結核予防会結核研究所の前田伸司氏から VNTR 法による結核菌の型別の標準化の現況が報告された。同研究所で国内株の分析に特化して樹立した JATA (12)-VNTR は、集団感染疑い例で RFLP 分析法と同程度の識別能をもち非常に有効であることが確認できた。地域内での結核菌分子疫学調査の利用には改良すべき点が残されているが、異なる地域間で型別結果を比較する場合の一次スクリーニングとして有用であり、JATA (12)-VNTR は、日本の広域的分子疫学における型別解析標準化の基本となると考えられる。

大阪府立公衆衛生研究所の田丸重貴氏からは、結核対策における VNTR 法による結核菌分子疫学の有用性について報告された。大阪府では 1995 年から IS6110-RFLP 分析法 (RFLP 分析) による結核集団発生事例の感染源調査、地域分子疫学を実施してきたが、同法には解析時間の長さ、解析上の困難、同一 RFLP パターンの地域集積などにより実用に限界があった。そこで、迅速性、比較の容易さに優れた反復配列多型 (22 loci-VNTR 型別) の導入により、結核感染源調査は単なる確認検査でなく感染拡大防止につながる有用な手段となっている。VNTR 型別のさらなる有効活用のためには、VNTR 型別の標準化・精度管理を実施したうえで、各地域における地域分子疫学を含めた積極的疫学調査の事業化が望まれる。

千葉県衛生研究所の横山栄二氏からは、低蔓延地域の結核対策における分子疫学的解析について報告された。特定の高蔓延地域を有しない結核低蔓延地域では、地域内の社会的背景を考慮した結核対策が必要である。千葉県内の東京都市圏地域では、分子疫学的解析により疫学的関連性が不明なクラスターが出現し、また、新規登録患者における 30~59 歳の働き盛り人口が占める割合が千葉県を含む首都圏の都県市で非常に高いことから、潜在的感染が首都圏の他自治体住民との間で発生していることが推察される。したがって、東京都市圏地域等の大都市圏では、圏内自治体が連携して広域的な分子疫学的解析を実施することにより潜在的結核感染を把握し、その蔓延を防止することが必要である。

大阪市立環境科学研究所の和田崇之氏からは、結核菌の反復配列多型 (VNTR) 解析におけるローカライジングと国際標準化について報告された。結核菌の VNTR 型別におけるローカライジング化と国際標準化は本質的に指向性が異なっており、特異的な系統群の定着を示すわが国においてその傾向は顕著である。このような背景にあつて、国内での分子型別データの統一化と高分解能を目的とした JATA (12)-VNTR セットと、国際比較・系統分類解析を目的とした Supply らの 15 領域セット (計 19 領域) の両者によって VNTR データ蓄積を進め、地域特異性と国際汎用性の両面をカバーすることで、将来的に見込まれる公衆衛生上の様々なニーズに対応可能であると期待される。

東京都疾病対策課の長嶺路子氏からは、新宿区内の全結核患者に対する IS6110RFLP 分析の実施と評価について報告された。集団発生事例の分析および一般住民、住所不定者、外国籍者の各属性のクラスター形成の状況から、一般住民から住所不定者への感染、日本人から外国籍者への結核感染が示唆されるなど、固定観念的な時系列関係を覆す新たな地域疫学的状況の解析が可能であることが明らかとなった。事業を定着させるための今後の課題として、保健所と結核指定医療機関等との連携、広域的なデータを集積・分析する機関の存在、経費・マンパワーの確保、等があげられる。

神戸市兵庫区保健福祉部の白井千香氏からは、自治体の結核対策における分子疫学研究の位置づけについて報告された。神戸市では、2005 年度からの「第二次神戸市 5 年結核対策指針」において菌バンク事業を行政施策として位置づけた。神戸市内の患者からの結核菌分離株を収集・保存し、収集した菌株について VNTR 解析を行い、遺伝子型別データを含む菌株情報データベース (KOBE VNTR データベース) を構築し、集団感染の早期発見や接触者検診での感染経路の特定に活用している。このように「研究を対策化する」ためには、医療機関、研究所、行政が、目的の共有化を図り、対策への貢献度の高い研究に着目して意義を見出すことが大切である。

本シンポジウムを通じて、低蔓延化を迎えた今後の日本の結核対策において、分子疫学研究を推進強化することの重要性が確認された。その達成のためには、VNTR 検査法の全国標準化、広域的連携システムによる結核菌情報データベースの構築、医療機関・行政機関・研究機関の有機的連携による分子疫学研究と結核対策の地域における一体的な推進体制を構築することが必要である。今後は全国レベルおよび各地域においてこうした取り組みが一層進展することを期待する。

1. 分子疫学先進国の状況—オランダの結核菌情報システムを中心に—

財団法人結核予防会結核研究所 内村 和広

はじめに

結核菌分子疫学研究は制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析から反復配列多型 (VNTR) 分析へと遺伝子型別分析法研究の進歩によりさらに発展がみられている分野である。しかし、分子疫学手法を実際の結核対策へと応用するための結核菌情報や疫学情報を含めたシステム構築には各国に固有の課題が多くあり実際の応用を可能としている国は多くない。そのようななかで現在研究のみならず結核対策へも分子疫学的手法を用いている分子疫学先進国のひとつがオランダである。オランダは1990年にオランダ国立公衆衛生環境研究所の Hermans ら¹⁾が結核菌由来 IS6110 をプローブとした RFLP 分析が結核菌の疫学や診断のための手段に利用できることを報告して以来、結核菌分子疫学研究の分野において世界をリードし、また1995年には世界でいち早く接触者健診への分子疫学研究の応用を目的とした国家規模のプロジェクトを開始している²⁾。本報告ではオランダの分子疫学研究・対策事業を支える結核菌情報システムと結核対策への応用を紹介する。

オランダの結核疫学状況

オランダは国土面積約4万平方キロメートル、人口約1,600万人の国で人口構成は約80%がゲルマン系オランダ人、その他にはインドネシア、トルコ、スリナム、モロッコなどからの移民が多い。

結核罹患率は1987年までは順調な減少を遂げ、人口10万人対率で8.2まで減少したが、1988年以降は他の西欧先進国と同じく外国人患者の増加が主な原因となって増加に転じ1994年には罹患率11.4に達した。その後移民入国者への結核特別プログラムの実施をはじめとする対策を講じた結果、再び減少傾向を取り戻し2005年の新登録患者数は1,157名(人口10万対7.1)となっている。登録患者の内訳は66%が移民などの外国出生者、6%が移民第二世代、そして27%がオランダ人で、依然として外国人結核が主要な問題である³⁾。

オランダの結核菌情報システムの中心的役割を果たす3つの組織

結核対策において中心的役割を果たす3つの組織が緊密な連携をとり結核菌情報システムを構成している。

(1) 各地方自治体の保健センター

オランダ国内の40自治体にある保健センターが結核患者の診断・治療・管理の役を担う。結核対策活動は結核医、結核保健師そして技師による TB Unit と呼ばれる組で行われる。結核の診断・治療はもとより患者治療支援、ハイリスクグループへの健診、接触者健診を行っている。

(2) オランダ結核予防財団 (KNCV)

国内結核対策のみならず、発展途上国への協力支援活動、各国と共同した研究活動も活発に行っており世界の結核対策のイニシアチブをとっている。

国内結核対策の面では、国家結核対策プログラムの技術アドバイザーとして政府に対し結核対策の意見答申や勧告を行っており国家結核対策の中心的役割を担っている。さらに国内の結核サーベイランスを行っている。結核サーベイランスは新発生患者の登録およびその後の治療成績を含めた発生動向サーベイランス、薬剤耐性結核サーベイランスそして結核菌 DNA fingerprinting サーベイランスが行われている。

(3) オランダ国立公衆衛生環境研究所 (RIVM)

公衆衛生および環境に関する研究・検査を行う国立の施設である。活動内容は基礎部門から疫学部門など多岐にわたり、またオランダ国内のみならず西ヨーロッパでの関連分野での中心的役割を成しており総職員数も2000人を超える巨大機関である。

オランダ国内で発生した結核患者のすべての培養陽性検体は RIVM 内の抗酸菌レファレンスラボに送られ、結核菌同定検査、薬剤耐性検査そして RFLP 分析や VNTR 分析をはじめとする結核菌遺伝子タイピングが行われている。

オランダの結核菌情報システム

結核菌情報システムの流れは大きく3つの部分に分かれ、それらが相互にリンクされ一つの結核菌情報システムを成している (Fig.)。

(1) 結核患者登録情報

オランダでは、感染症法に基づいて結核患者を診断した医師は24時間以内に各地方自治体の保健センターに患者の届け出をしなければならない。その後各保健センターは中央の保健省へ定期的に患者報告を行うが、これまでのオランダ国内での結核対策における歴史的背景もありオランダ結核予防財団が主体となって報告システムを構築し、現在は感染症登録システムの一部として結核

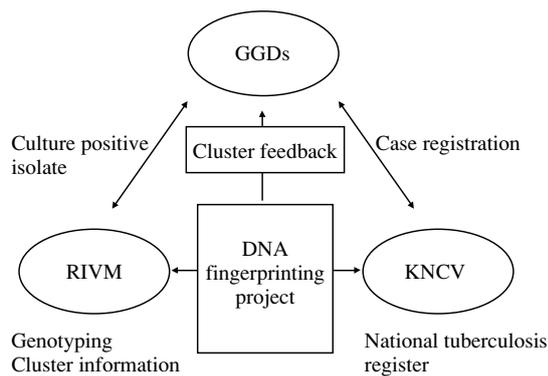


Fig. National tuberculosis genotyping and surveillance network in the Netherlands

登録システムを運用している。登録データは診断時報告と登録から約1年後に報告する治療成績を含めた患者追跡報告から成っている。報告されたデータはKNCVの研究部門によって集計分析が行われ、毎年「Tuberculosis Index」として報告書が作成されるほか、国内結核対策への基礎資料として提供されている。

(2) 結核菌データベース

オランダ国内で抗酸菌検査を行っている検査施設の正確な数は不明であるが、報告⁴⁾によると44~46の施設で年間平均1,700検体(100未満から10,000検体の施設まで)の検査を行っている。各検査施設で培養陽性となった検体のすべてはRIVMの抗酸菌レファレンスラボに送られ同定・感受性検査が行われる。一部の病院の検査室などでは独自に同定・感受性検査を行っているが、原則として各検査施設では分離培養までである。

1993年よりRIVM抗酸菌レファレンスラボにおいてオランダ国内培養陽性結核患者の全分離株に対するIS6110をプローブとしたRFLP分析の実施とRFLPパターンのデータベース化が開始された。2005年までRFLPによる結核菌遺伝子タイピングデータベースは10,000株を超えているが、現在VNTR法による遺伝子タイピングへと変更が進められており約半数の株についてはVNTRによる再分析が行われている。

RIVMの結核菌データベースに登録されているのは菌情報と元の送付施設等簡単な背景情報のみであり患者個人情報は一切含まれていない。

(3) 結核菌DNA fingerprinting サーベイランス・プロジェクト

RFLP分析による同一結核菌株による感染患者群の同定結果(クラスター分析)の結核対策現場へのフィードバック(クラスターフィードバックと呼ばれる)と評価を目的として、1995年国家結核対策の一環としてDNA fingerprinting サーベイランス・プロジェクトが開始され

た。これはクラスターが判明した患者に対し疫学リンクの有無を再接触者健診により調査分析するものである。プロジェクトには専任のプロジェクト・ナースが任命されプロジェクト・ナースはKNCVの患者登録データとRIVMの結核菌データベースとの照合を行う。個人情報保護のためこの照合を行うのはプロジェクト・ナースに限られており保健センター等からの参照はできない。照合の結果クラスター判明患者については他の同クラスター患者の情報とともに患者登録地区の保健センター所属の結核保健師に情報が伝達される。情報を受けた保健師は各患者について再接触者調査を行う。再調査は調査項目が記載された調査票が標準化されており、また調査項目にはオランダの結核疫学状況を反映し外国人、薬物中毒者などのハイリスク者を想定した項目も多い。再調査の結果からクラスター内の患者間について疫学的リンクの有無が「確認」「推定」「未確認」の3段階で判定される。結果は再びプロジェクトに戻され分析・報告が行われる。国内の結核保健師はプロジェクト・ナースを中心として密なネットワークを形成しており、四半期に一度プロジェクト・ミーティングが行われ評価、情報共有が行われている²⁾。

結核対策への応用

分子疫学研究の結核対策への応用は上記の結核菌DNA fingerprinting サーベイランス・プロジェクトによるクラスターフィードバックをもとにした接触者健診の強化があげられる。従来の接触者健診では見落とされていた疫学的リンクが新たに遺伝子タイピング分析結果により判明し、そこからさらなる接触者対策が行われる。実際にどれくらいの「隠れたリンク」が判明したかについては、Lambregts-van Weezenbeekら⁵⁾によるとクラスターフィードバック前では疫学的リンク未判明者であった1,744名に対し再接触者調査後には「確認」と「推定」が504名とあわせて31%に対して新たな疫学的リンクが判明した。

現在では結核菌培養陽性患者の遺伝子タイピングと現場へのフィードバックによる接触者健診はルーチンとなっており毎年成績も公表されている。2005年の新登録患者のうち菌陽性患者は851人、そのうちクラスターを形成したのは442人(52%)であった。このうち感染経路の疫学的なリンクが判明した者が143人(32%)であった。ただしこのリンクはクラスター情報が蓄積されることにより判明されるものが増していく。1995年から2005年まで全体ではクラスターを形成した患者の43%の感染経路が判明している。

結核対策への応用は接触者健診の強化以外に、流行株のモニタリングにも使われている。5人以上からなる大型のクラスターについての患者構成や動向について、薬

剤耐性菌株からなるクラスターについてなどの情報が定期報告から出されている。

ま と め

オランダの分子疫学分析による結核菌情報システムは、結核対策の中心となる組織に機能が集約され、その上でそれぞれの組織間で緊密な連携がとられることで可能となっている。そしてこの緊密な連携を確保するものが国家結核対策の一環として開始された DNA fingerprinting サーベイランス・プロジェクトであった。

日本の現状と比較すれば人口規模、結核患者数、保健行政組織などでの相違も多く、現時点でオランダの分子疫学と結核菌情報システムをそのまま導入することはもちろんできない。しかし日本においても接触者健診強化をはじめとする分子疫学への結核対策への応用は、結核低蔓延化を目指す疫学状況と同時に起こる結核問題の偏在化、また多剤耐性・超多剤耐性結核の脅威といった状況に対して有用であり、機能集約と組織間の緊密な連携

といったオランダの先進的な取り組みはその範になると考えられる。

文 献

- 1) Hermans PWM, van Soolingen D, Dale JW, et al.: Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol. 1990; 28: 2051-2058.
- 2) Sebek M: DNA fingerprinting and contact investigation. Int J Tuberc Lung Dis. 2000; 4 (2): S45-S48.
- 3) Index Tuberculosis 2005. The Netherlands. KNCV Tuberculosis Foundation, 2007.
- 4) Review of the Netherlands Tuberculosis Control Programme. KNCV Tuberculosis Foundation, 2003.
- 5) Lambregts-van Weezenbeek CSB, Sebek MMGG, et al.: Tuberculosis contact investigation and DNA fingerprint surveillance in The Netherlands: 6 years' experience with nation-wide cluster feedback and cluster monitoring. Int J Tuberc Lung Dis. 2003; 7 (12): S463-S470.

2. 共通化した反復配列多型 (VNTR) 分析法による結核菌の型別

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター 前田 伸司, 村瀬 良朗

結核菌型別データベースは、制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析のように時間と手間が必要な数居の高い分析法ではなく、どの研究施設においても迅速に分析可能な反復配列多型 (VNTR) 法で構築する必要がある。平成 19 年の総会において日本国内で分離された結核菌を型別するための VNTR 分析システムについて報告した。すなわち、結核菌ゲノム上の 35 カ所を VNTR 分析し、解析が難しい 4 カ所を除き、識別能が高い 12 カ所を分析する JATA (12)-VNTR 分析法である。本 JATA (12) 分析法は、8 カ所がヨーロッパ諸国で採用されている Supply (15)-VNTR システム¹⁾と重複し、4 カ所が JATA 独自のローカスである²⁾。本稿では、JATA (12)-VNTR 法で国内株を分析する方法・問題点をまとめた。

各型別法のクラスター率の比較

一般に北京型結核菌は、ミニサテライト等の変化が起こりにくいこと³⁾、また、米国で採用されている 12-locus MIRU-VNTR による型別で大きなクラスターが形成することが報告されている⁴⁾。分離される結核菌の約 7~8 割が北京型であるわが国では、これら報告されている VNTR 分析システムを直接利用できない。そのため、独自の VNTR 分析システムを構築する必要がある⁵⁾。国内 325 株の結核菌を IS6110 RFLP 法で型別分析するとクラ

スター率は、18.5% だった。クラスター率で識別能を比較すると、Supply (15) が 17.2%, JATA (12) が 12.6% となり、国内株の分析では JATA システムが非常に高い識別能をもつことが確認できた。

実際の分析法

(1) VNTR 分析に用いる結核菌 DNA 画分の調製

結核菌からゲノム DNA を精製し、それを PCR の鋳型として用いる方法が最も効率よい分析ができると考えられる。しかし、VNTR 法では PCR を利用し DNA を増幅するので、オートクレーブ処理した菌体や 95℃、10~15 分程度、熱処理した菌からの粗抽出 DNA 画分を検体として用いることもできる。死菌体を検体として利用できることから、生菌状態での移動が困難な多剤耐性結核菌 (三種病原体) などの例でも本 VNTR 法で型別が可能である。粗抽出 DNA 画分を調製する 1 例としては、オートクレーブ後、凝固水と菌体を掻き取り懸濁液としてチューブに回収し遠心後、その上清を PCR の鋳型とする方法がある。さらに、この得られた上清をフェノール抽出ならびにエタノール沈殿すると反応阻害物質の除去、検体の濃縮が可能なので、さらに良好な結果が得られると期待できる。

(2) PCR の条件

Table Comparison of clustering rates in analyses of RFLP and VNTR

Typing method	Cluster (%)
IS6110 RFLP	36.8 (53/144)
JATA (12) -VNTR	48.6 (70/144)
Supply (15) -VNTR	51.4 (74/144)

DNA増幅条件は、94℃で5分間処理した後、94℃ 30秒(熱変性)、63℃ 30秒(アニーリング)、72℃ 3分(合成反応)のサイクルを35回繰り返した。本条件は、解析した35カ所のDNA増幅に共通で利用できる。しかし、各研究施設でサーマルサイクラー等が異なるため若干の条件検討が必要と考えられる。また、いくつかの会社のTaqポリメラーゼを使って比較すると、タカラ(株)のEx Taq, 2×GC buffer Iを使うと、最も効率よくDNAを増幅できた。

(3) アガロースゲルを用いた電気泳動

PCR産物は、1.5～2.5%アガロースゲルを用いた電気泳動で分子量を測定する。特にPCR産物の分子量が大きくなると分子量の比較が困難となるので、アガロース濃度の調整やコピー数の明らかな標準品と並べて、再度電気泳動するなどして分子量を正確に算出する必要がある。

集団感染疑い例での異同判定の基準

VNTR分析で何カ所コピー数が異なれば、注目した株同士が異なる株と判定すべきか等の基準は明らかになっていない。理論的には1カ所でもコピー数が異なれば別株となるが、集団感染や家族内感染例の分析から1カ所のコピー数の違いで別株と判定するとIS6110 RFLP分析結果と矛盾が生じる例が報告されている。そのため、各ローカスにおけるコピー数変化の頻度や安定性を明らかにしていく必要がある。今後、多くの研究施設からのデータ等を蓄積すれば、RFLP法で1本バンド違いは同一株と考えるというようなVNTR分析におけるルールが見出せるものと考えられる。

地域内における結核菌分子疫学調査でのJATA (12) の利用

結核菌の型別法は、集団発生や院内感染が疑われるグループ内での判別だけでなく、地域内で発生した結核菌分子疫学調査にも使われている。平成16年5月から平成17年11月までの間に東京都内で分離された結核菌144株について、RFLP分析法、VNTR法で分析してクラスター率を比較した(Table)。IS6110 RFLP分析のクラスター率は36.8%、それに対してJATA (12) -VNTRでは48.6%だった。JATA (12) -VNTR法は、RFLP分析法よ

りクラスター率が高いことから、地域内での分子疫学調査にRFLP分析に代えて本VNTR法を直接利用できないことが判明した。しかし、15カ所を分析するSupplyらのVNTR分析より識別能は高いことが確認できた。このJATA (12) -VNTRでクラスター率が高い原因として以下の理由が考えられる。JATA (12) を樹立する際に使った菌株は、各都道府県から3～10株ランダムに集めたものなのでIS6110 RFLP分析、JATA (12) -VNTRのクラスター率は、それぞれ18.5%、12.6%と低かった。しかし、東京都内から分離した結核菌のRFLP分析のクラスター率は約2倍の36.5%であり、都市部の狭い範囲内には多くの似た株(VNTR法では区別できない)が存在しているために、VNTR法での型別能が低くなったと考えられる。

地域内の分子疫学調査にJATA (12) -VNTRシステムを利用できるように、いくつかのローカスを加えるなどして、識別能を高める改良を現在検討中である。

ま と め

当研究所で国内株の分析に特化して樹立したJATA (12) -VNTRは、調べた範囲内の集団感染疑い例での型別にRFLP分析法と同程度の識別能をもち非常に有効であることが確認できた。一方、地域内での結核菌分子疫学調査の利用には改良すべき点が残されている。しかし、JATA (12) -VNTRは、型別分析が容易なローカスの組み合わせなので、例えば、異なる地域間で型別結果を比較する場合の一次スクリーニングとして利用可能である。

文 献

- 1) 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.
- 2) Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, et al.: Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol. 2008; 57: 873–880.
- 3) Yokoyama E, Kishida K, Uchimura M, et al.: Improved differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains, including many Beijing genotype strains, using a new combination of variable number of tandem repeats loci. Infect Genet Evol. 2007; 7: 499–508.
- 4) Wada T, Maeda S, Hase A, et al.: Evaluation of variable numbers of tandem repeat as molecular epidemiological markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. J Med Microbiol. 2007; 56: 1052–1057.
- 5) 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.

3. 大阪府の結核対策における結核菌分子疫学の有用性

大阪府立公衆衛生研究所感染症部細菌課 田丸 亜貴

はじめに

本邦では都市部の結核高蔓延が問題となっており、特に大阪の結核状況は全国ワースト1であり、府市を併せると年間3000人以上の結核患者が新規登録されている。

大阪での結核発生状況は、塗抹陽性患者の割合が高い、65歳未満の患者の割合が高い、診断の遅れが全国平均を上回っている、など都市型結核の典型を示している。大阪府では結核対策として早くから結核菌遺伝子型別法を導入してきたので、その有用性を以下に示す。

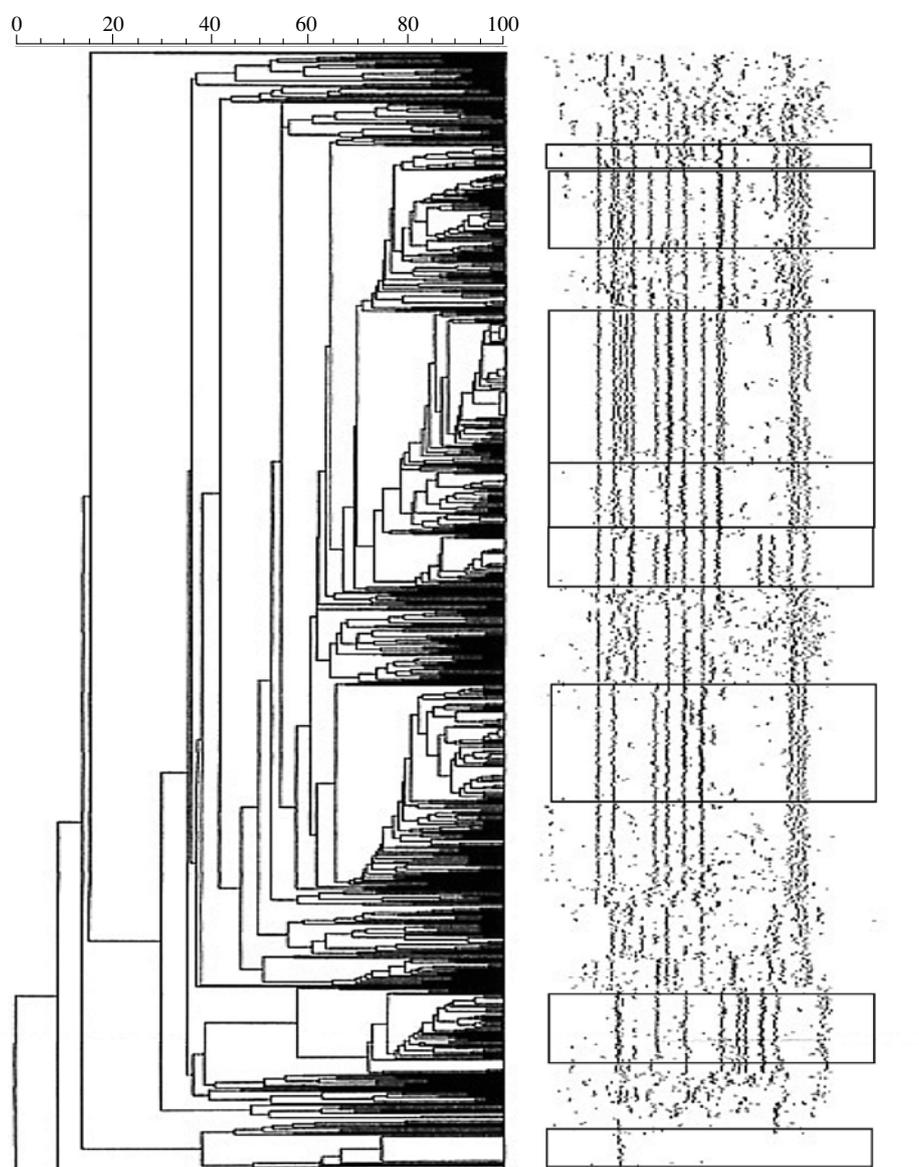


Fig. Cluster analysis of the IS6110-RFLP patterns of 900 isolates from Hokusetsu, Sakai, Izumisano and Gobou regions. The surrounded clusters show common clusters in these regions.

IS6110-RFLP分析法の有用性とその限界

結核菌遺伝子型別の方法として最も古くから結核対策に用いられた方法はIS6110-RFLP分析法(RFLP分析)である¹⁾。大阪府でも1995年から同法を結核集団発生事例の感染源調査に用い、感染源および集団感染の範囲を的確に把握できるようになった。また、同法による和歌山県御坊市、堺市内、泉佐野保健所管内、北摂地域での地域分子疫学も実施し、○患者の疫学的関連が不明であった事例の感染の場の特定、○すべての対象地域に共通して見られ、大きなクラスターを形成する結核菌株(地域蔓延株)が数種類存在することの発見、などの成果が得られた(Fig.)。しかし、RFLP分析には、分析に長期間を要す、結果の比較が困難などの欠点があることは知られているとおりである。当所でも結核地域分子疫学にRFLP分析を用いるうえで、○地域分子疫学で遺伝子型の一致する菌株を発見しても、患者への再聞き取り調査が不可能で、接触歴を確認できないケースが多い、○フィンガープリント解析ソフトを用いても、被検株が多数になった場合は解析が困難なうえ、結果に齟齬をきたす場合がある、○地域蔓延株の存在により感染ルートが不明な株が少なくない、などの実用上の限界を感じていた。そこで、迅速性、比較の容易さに優れた反復配列多型(VNTR型別)を導入した。

VNTR型別法による感染源調査の有用性

VNTR型別を結核感染源調査に用いるには十分な解析能が必要であるが、解析能が高すぎると集団感染を見逃す恐れがある。VNTR型別の最適な多型反復部位の組み

合わせは種々の論文で報告されているが^{2)~4)}、これらを結核菌分子疫学に用いるためには結核菌株の地域特性等も考慮する必要がある。大阪府で分離される結核菌株はRFLP分析での結果から遺伝的類似が高いとわかっており、VNTR型別による分子疫学には欧米で用いられている多型反復配列の組み合わせよりも解像度の高いものが必要と考えられたため、当所ではTableに示す22 loci-VNTR型別を用いて解析を実施した。本法により、RFLP分析と患者接触歴から集団感染と同定された86事例について型別したところ、86事例中79事例(91.9%)、菌株数では245株中238株(97.1%)を同一感染源由来と同定することができた。不一致事例はTableに示す7事例で、不一致は22 lociのうち1または2 lociで起こっていた。このような不一致例があることから、結核感染源調査にはRFLP分析のほうが適しているように思われるが、RFLP分析の場合でもバンド数が5本以下のパターンでは他の遺伝子型別法でのサブタイピングが要求される。泉佐野保健所地域分子疫学の結果ではバンド数5本以下のRFLPパターンの結核菌株は4.8%で、この割合はVNTR型別で不一致を示した菌株の割合(2.9%)より多い。これらの結果から、RFLP分析による確認が必要な事例が数パーセントあるが、結核集団発生事例のほとんどはVNTR型別だけで感染源調査が可能であることが示された。

データは示していないが、Fig.に示した地域蔓延株をVNTR型別したところ、患者接触歴に比較的一致したクラスターに細分することができ、結核菌地域分子疫学においてもVNTR型別が有用であることを示唆する結果が得られている。

Table The 7 epidemic cases of tuberculosis that showed discord between IS6110-RFLP and VNTR typing

case	RFLP	year*	VNTR																						epi-link**
			M10	M16	M23	M26	M27	M31	M39	M40	EA	EF	V424	V1955	V2401	V3690	V4156	V2074	V2372	V3155	V3336	Q11a	Q11b	V26	
a	03-HS-23	2003	1	3	5	7	3	5	3	3	4	3	4	3	4	3	3	2	3	4	7	9	7	8	in the office
		2003	1	3	8	7	3	5	3	3	4	3	4	3	4	3	3	2	5	4	7	9	7	8	
b	981221k-1	1998	1	3	5	9	3	5	3	3	4	3	4	3	4	3	5	2	5	4	7	9	9	8	in the hospital
		1998	1	3	5	9	3	5	3	3	4	3	4	3	4	3	5	2	5	4	7	9	9	8	
		1998	1	3	5	9	3	5	3	3	4	3	4	3	4	3	5	2	5	4	7	9	9	8	
		2001	1	3	5	9	3	5	3	3	4	3	4	3	4	3	5	2	5	4	7	9	9	8	
		2006	1	3	5	9	3	5	3	3	4	3	4	3	4	3	5	2	5	4	7	9	9	8	
2006	1	3	5	9	3	5	3	3	4	3	5	3	4	3	5	2	5	4	7	9	9	8			
c	070713H-1	2007	3	3	6	3	3	3	1	1	3	3	2	1	2	7	3	3	4	4	12	2	4	5	in the office
		2007	3	3	6	3	3	3	1	1	3	3	2	1	2	7	3	3	3	4	12	2	4	5	
		2007	3	3	6	3	3	3	1	1	3	3	2	1	2	7	3	3	3	4	12	2	4	5	
d	AIZ15-05c	2003	3	4	5	7	2	4	2	3	4	3a	3	3	4	3	3	4	4	5	7	8	7	2	family
		2004	3	4	5	7	2	4	2	3	4	3a	3	3	4	4	1	3	4	4	5	7	8	7	
n	061127N-1	2006	3	2	5	8	3	5	3	3	4	3	4	4	4	4	3	3	4	4	7	8	9	8	family
		2006	3	2	5	8	3	5	3	3	4	3	4	4	4	4	3	3	4	4	7	8	5	8	
e	07-S38	2007	3	3	5	6	3	5	3	1	4	3	5	3	2	3	4	3	4	4	6	8	3	7	in the office
		2007	3	3	5	6	3	5	3	1	4	3	4	3	2	3	4	3	4	4	6	8	3	7	
f	20080208T-1	2007	3	3	5	8	3	5	3	2	4	3a	3	4	4	3	4	3	4	2	14	8	5	9	in the office
		2007	3	3	5	8	3	5	3	2	4	3a	3	4	4	3	4	3	4	2	14	8	5	9	
		2007	3	3	5	8	3	5	3	2	4	3a	3	4	4	3	4	3	4	2	14	8	5	9	
		2007	3	3	5	8	3	4	3	2	4	3a	3	4	4	3	4	3	4	2	14	8	5	9	

*The year each patient was found.

**Epidemiological link between cases or the place where outbreak thought to be occurred.

half-screened cell: the VNTR locus showed discord.

VNTR型別の結核対策に対する有用性

VNTR型別はPCR法を用いた型別法であるので、塗抹陽性喀痰や液体培地に発育した少量の結核菌株、死滅菌株からの型別も可能で、検体搬入から1～2日で型別が終了する。VNTR型別のこの迅速性は結核対策に大きなメリットをもたらした。大阪府では結核感染源調査時には検体搬入後速やかにVNTR型別を実施し、結果を保健所に通知している。保健所では集団発生が集団感染なのか否かを迅速に判断でき、感染源調査結果を接触者健診実施の是非や健診範囲決定の材料とするようになった。また、初発患者が薬剤耐性結核である場合には、VNTR型別結果が続発患者および潜在性結核患者の治療薬選択に役立つようになった。このように、VNTR型別を用いることにより、結核感染源調査は単なる確認検査でなく、感染拡大防止につながる有用な手段となっている。

VNTR型別のさらなる活用のために

大阪府では、地域分子疫学調査にもVNTR型別を導入し、異なる保健所管轄由来株の迅速かつ容易な比較が可能となったが、分離株のVNTR型が一致する患者の発生時が1～数年隔たっている場合が少なくない。患者接触歴は保健所で患者登録票により確認しているが、発生時の異なるケースのほとんどでは接触を確認できない。地域の結核対策のためには個々の患者の感染源の特定が必要なので、登録時の聞き取り調査による行動調査の強化および再聞き取り調査実施など、感染源特定につながる積極的疫学調査の整備が望まれる。

大阪府では2007年度から新規登録患者由来株全株の保管を目指している。これらの菌株をVNTR型別で解析し、年齢・住居地域や薬剤感受性などの患者情報と併

せてサーベイランス体制を整えることで、遺伝子型別がこれまで以上に府内の結核減少に寄与するものと期待している。このようなシステムの実現には、保健所・地方衛生研究所・行政・結核医療機関の連携が必要となるが、各機関のスムーズな連携には結核の積極的疫学の地域での事業化が有効な手段となる。結核の積極的疫学調査は2007年の感染症法の改正により法的根拠もあたえられていることから、地域での事業化を積極的に進めるべきである。

一方、自治体をまたいだ集団発生事例におけるデータの共有や全国レベルでの結核遺伝子型データベース構築もVNTR型別ではRFLP分析に比べて容易である。しかし、現状ではVNTR型別法の標準化、精度管理の検討が不十分であり、引き続き研究を進めデータを蓄積することでそのためのエビデンスを得ることが重要である。

文 献

- 1) Hermans PW, van Soolingen D, Dale JW, et al.: Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1991; 28: 2051–2058.
- 2) 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.
- 3) Kam KM, Yip CW, Tse LW, et al.: Optimization of variable number tandem repeat typing set for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* strains in the Beijing family. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 356: 258–265.
- 4) Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, et al.: Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol.* 2008; 57: 873–880.

4. 低まん延地域の結核対策における分子疫学的解析

千葉県衛生研究所 横山 栄二

はじめに

結核は、感染してから発症するまでの期間が長いことから、分子疫学的解析が感染の有無の確認のために利用されてきた。近年、結核菌の分子疫学的解析法として、VNTR型別が用いられるようになった。Supplyらによってoptimized miru標準法が提案された¹⁾が、その標準法は、日本に分布の多い北京型結核菌を十分に型別できないことが明らかとなった²⁾³⁾。一方、日本においても北

京型を含む結核菌をRFLPと同程度に型別できるJATA標準法が提案された⁴⁾。

そこで本研究では、千葉県のような特定の低まん延地域を有さない結核低まん延地域において、分子疫学的解析をどのように結核対策に活用するかということについて検討した。

材料および方法

(1) 疫学データ解析

千葉県における結核の現状を解析するため、「結核の統計2007」(http://www.jata.or.jp/rit/rj/data_tp.html 2008/03/23アクセス)に掲載された疫学データの解析を行った。

(2) 分子疫学的解析

1998～2006年に千葉県内で分離された結核菌351株を供試した。VNTR型別は、optimized miru標準法の15領域¹⁾、JATA標準法の12領域⁴⁾および北京型結核菌の型別に有効な8領域²⁾を組み合わせた24領域を使用し、既報²⁾のとおり実施した。RFLPは、既報²⁾のとおり実施した³⁾。

分子疫学的解析は、千葉県を10%通勤圏に基づく都市雇用圏で分類した場合に東京都市圏(首都圏、フリー百科事典「Wikipedia」.<http://ja.wikipedia.org/wiki/東京都市圏#.E9.83.BD.E5.B8.82.E9.9B.87.E7.94.A8.E5.9C.8F>).2008/06/29アクセス)に含まれる地域(東京都市圏地域)と、それ以外の地域(地元雇用地域)に分けて解析を行った。また、VNTRデータに基づき minimum spanning tree

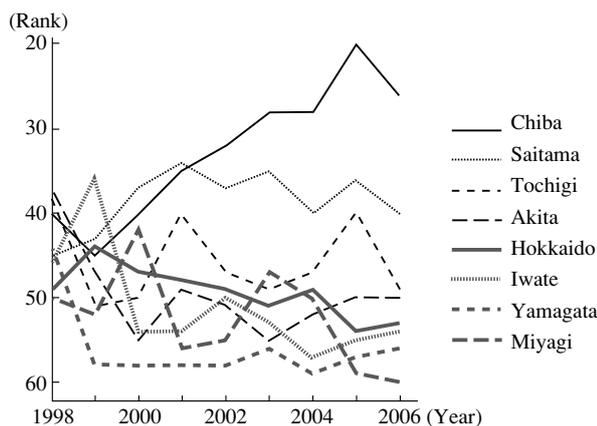


Fig. 1 Change in the rank of annual incidence of tuberculosis

(MST)を作成した。

結 果

(1) 疫学データ解析

千葉県の1998～2006年の全結核罹患率は、1998年当時に同程度であった他県に比べて減少速度の低下が認められ、全国順位は他県が減少傾向にあるのに対し千葉県では上昇傾向であった(Fig. 1)。一方、全結核有病率は1998年当時に同程度であった他県と同程度の減少傾向にあった。

新規登録患者における30～59歳の割合の全国順位は1位から順に、さいたま市、川崎市、千葉県、千葉市、大阪市、横浜市、東京都、神奈川県、埼玉県、茨城県であり、首都圏の自治体が上位を占めた。

(2) 分子疫学的解析

東京都市圏地域では、疫学的関連性が不明なクラスターを形成する菌株の割合は8.1% (22/271)であるのに対し、地元雇用地域では1.3% (1/80)であった。疫学的関連性が不明なクラスターに属する菌株のRFLPパターンはそれぞれのクラスター内で一致していた。

東京都市圏地域で分離された結核菌のMSTは、地元雇用地域で分離された結核菌と比べて complex を形成する傾向が強かった(Fig. 2)。

考 察

本研究の疫学データ解析により、千葉県では全結核罹患率の減少速度が相対的に低下していることが認められた。千葉県では1999年の結核緊急事態宣言を受けて、結核対策千葉方式を実施中である。結核対策千葉方式はDOTSを主体とした対策であり、感染者を確実に治療することで結核のまん延を防止することを目的としてい

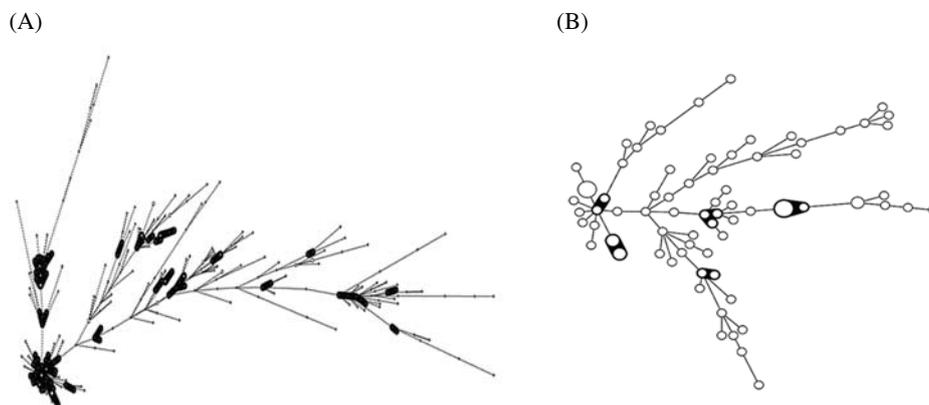


Fig. 2 Minimum spanning tree (MST) of *M. tuberculosis* strains isolated in Chiba prefecture

(A) MST of the organism isolated in commutable areas of Tokyo metropolitan

(B) MST of the organism isolated in the areas other than the commutable areas

る。疫学データ解析により、全結核有病率は順調な減少傾向にあったことから、治療を主体とした結核対策千葉方式は一定の効果をあげていることが示唆された。

千葉県の全結核罹患率における減少速度の相対的低下は、東京都市圏地域における結核発生状況が影響していることが示唆される。千葉県内の東京都市圏地域では、分子疫学的解析により疫学的関連性が不明なクラスターが出現し、分離される結核菌のMSTはcomplexを形成する傾向が強かったことから、潜在的感染の発生が懸念される。さらに、新規登録患者における30~59歳の働き盛り人口が占める割合が千葉県を含む首都圏の都県市で非常に高いことから、潜在的感染が首都圏の他自治体住民との間で発生していることが推察される。したがって東京都市圏地域では、他自治体と連携した分子疫学的解析により潜在的結核感染を把握してまん延防止措置を行う、といった結核対策が必要と思われる。

一方地元雇用地域では、疫学的関連性が不明なクラスターの出現率は東京都市圏と比べて有意に少なく、分離される結核菌のMSTはcomplex形成の傾向は弱かった。したがって潜在的感染の発生頻度は少なく、通常の疫学調査が有効であることが示唆される。しかし、この地域では高齢化が急速に進行しており⁶⁾、今後、老齢世代において結核の再燃が起こることが懸念される。したがって、分子疫学的解析により結核患者が再燃であるのか他からの感染であるのかを確認すること、すなわち結核感染の有無の特定が必要となる。

ま と め

特定の高まん延地域を有しない結核低まん延地域では、地域内の社会的背景を考慮した結核対策が必要である。そのためには、分子疫学的解析を利用した潜在的感染の把握や結核感染の有無の特定を行わなければならない

い。VNTR型別は、多量のデータを容易に比較できることや、解析結果が判明するまでに速いこと、といった特徴があり、結核低まん延地域における分子疫学的解析法として適していると思われる。

謝 辞

本研究の実施にあたり、結核菌の収集および搬入にご協力いただきました医療機関、保健所および本庁の関係者の皆様に深謝いたします。なお本研究の一部は、平成18年度財団法人柏戸記念財団医学研究奨励金により実施された。

文 献

- 1) 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.
- 2) Yokoyama E, Kishida K, Uchimura M et al.: Improved differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains, including many Beijing genotype strains, using a new combination of variable number of tandem repeats loci. Infect Genet Evol. 2007; 7: 499-508.
- 3) Wada T, Maeda S, Hase A, et al.: Evaluation of variable numbers of tandem repeat as molecular epidemiological markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. J Med Microbiol. 2007; 56: 1052-1057.
- 4) 前田伸司, 村瀬良朗: 反復配列多型を利用した結核菌の迅速遺伝子型別法の標準化. 結核. 2007; 82: 784-786.
- 5) 岸田一則, 横山栄二, 内村眞佐子, 他: 千葉県で分離された結核菌のRestriction Fragment Length Polymorphism パターンのクラスター分析. 感染症誌. 2005; 79: 672-679.
- 6) 千葉県高齢者福祉課: 県高齢者人口調査. 2005.

5. 結核菌の反復配列多型 (VNTR) 解析におけるローカライジングと国際標準化

大阪市立環境科学研究所 和田 崇之

はじめに

日本は東アジアに位置し、臨床分離結核菌の約8割が「北京型ファミリー」と呼ばれる特定の系統群に属している。同系統群に属する菌株(北京株)は、欧米諸国において実用化されているスポリゴタイピングやMIRU(12)-VNTRといった手法での型別分離が難しく、これまで国内での遺伝型別法の選択と実用化に大きな影を落としてきた。昨今、分解能の高いVNTR領域を解析部

位として選択すること(ローカライジング)によってこのような地域特異的な問題点は解消されつつあり、国内における結核分子疫学の飛躍的進展が期待される場所である。本シンポジウムでは、わが国において定着している北京株の特徴とそれに即したVNTR型別最適化の重要性、一方で今後必要不可欠となるであろう国際標準に基づいた結核分子疫学の展望について発表を行った。

日本国内由来菌株の特異性

分子疫学的応用を目指す遺伝子型別は、より簡便かつ正確に菌株の異同（あるいは相同性）を判定するツールであることが望ましい。従って、特定の地域において有効な型別法を導入するためには、その地域において分離される菌株の分布傾向を把握することが重要である。日本国内での VNTR 型別法を例に挙げると、JATA (12)-VNTR 法は国内全域で分離された結核菌を解析対象モデルとして構築された組み合わせであり、国内由来株において高い多型性を示す VNTR 領域を多数含んでいる。このような VNTR ローカライジングが有効かつ必要となった背景には、わが国において分離される結核菌が諸外国と比して特異的であることが大きく関わっている。

北京型ファミリーは遺伝学的な系統分類に基づいて、祖先型 (ancient) と蔓延型 (modern) の2グループに大別されることが知られている²⁾。北京型ファミリーの定着が報告されている中国、モンゴル、ロシア、南アフリカなどの国々では、分離菌の大部分が蔓延型に属し、祖先型の報告例は少数である。興味深いことに、そういった世界規模での傾向とは対照的に、日本由来の北京株は約75%が祖先型に属することがわかってきた (Table)。この祖先型北京株は点突然変異や欠失ゲノム領域、さらには VNTR 型別そのものの特徴に従って5つのサブグ

Table Distribution of 403 Beijing strains in East Asia based on the ancient/modern classification by the NTF region

Origin	No. of strains (%)	
	Ancient	Modern
Japan (n=355)	279 (78.6%)	76 (21.4%)
Eurasia (n=48)	14 (29.2%)	34 (70.8%)

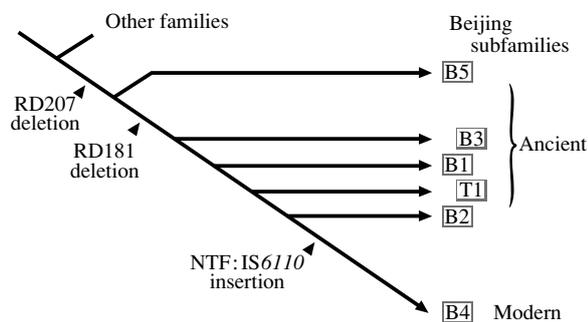


Fig. A schematic phylogenetic tree of the *M. tuberculosis* Beijing family based on SNPs. The six Beijing subfamilies (B1–B5, and T1) are observed to predominate in Japan. Only B4 belongs to the modern Beijing sublineage. Arrowheads show putative times at which three major genetic events (two deletions of regions of difference, RDs, and the insertion of IS6110 in the NTF genome region) occurred.

ループに細分類される (Fig.)。各サブグループの出現頻度には大差はなく、国内ではこれらがほぼ均等に定着していると推定される。

このような結核菌の特異的分布 (祖先型北京株の定着) は、わが国における VNTR 多型の分布傾向に影響を与えている。例えば、QUB4156 はわが国由来の北京株では主として反復数 3~5 を呈し、型別解析において重要な意味をもつ VNTR 領域として評価されるが、蔓延型北京株では十分な変動が認められず、他国での有効性は低下することが予想される。既にわれわれは、複数の VNTR 領域がわが国特有の分布傾向を示すことを見出している。そういった知見をもとにして VNTR 型別法のローカライジングを展開することで、より有効かつ説得力のある VNTR セットの設計と分子疫学への貢献が期待できる。

VNTR 型別法の国際標準化がもたらす恩恵

VNTR 型別は解析領域の選択によって様々な用途に最適化可能であるだけでなく、異なる研究機関どうしのデータ比較が容易であるというメリットをあわせもっている。複数の施設間で VNTR 型別を比較することにより、特定の地域・研究機関に限局されない広域分子疫学が進展することが期待されるが、このような目的のためには解析領域をあらかじめ一致させておく必要がある。とりわけ、国単位での型別比較やデータベース化を見通した場合、国際的なコンセンサスに従った型別データの蓄積が不可欠である。

現在、VNTR 型別の国際的スタンダードとして、Supply が提唱している 15 (24) 領域セットが最も有力である³⁾。同セットは全世界中の各地域から集められた結核菌株をもとに構築されたもので、MIRU (12)-VNTR のような既存の標準法と比べて汎用性と分解能が飛躍的に向上している。特定の地域での用途という意味においてはローカライズされた VNTR セットの使用が簡便性・分解能など多くの点で合理的である一方で、国単位での結核菌の伝播様式の解明 (疫学的用途)、大規模データベース構築 (国際的貢献) という意味においては標準領域の解析とデータの蓄積が必須であると言える。

われわれはこの 15 領域 VNTR を用いて東アジア諸国由来の北京株を系統解析し、わが国と周辺国における北京株の伝播様式を推定しえた (Wada et al., 投稿中)。蔓延型北京株は分離された国にかかわらず VNTR 型別が非常に近似しており、比較的最近の事象としてグローバルな伝播が生じていることが示唆されている。このような VNTR 型別の比較解析は、各地域ごとの研究機関でより多数のデータを管理・解析することで詳細かつ正確なものとなり、近隣諸国間における国際的な結核対策を

推進するうえで重要なアプローチとなるだろう。

まとめ—VNTR型別のローカライジングと 国際標準化の両立を目指す

結核菌のVNTR型別におけるローカライジング化と国際標準化は本質的に指向性が異なっており、特異的な系統群の定着を示すわが国においてその傾向は顕著である。このような背景にあって、どのVNTRセットを選ぶべきかについては、VNTR型別を行う各ケースの目的に応じて決定する必要があるだろう。現在われわれの研究所では、国内での分子型別データの統一化と高分解能を目的としたJATA(12)-VNTRセットと、国際比較・系統分類解析を目的としたSupplyらの15領域セット(計19領域)についてVNTRデータ蓄積を進めることにより、その両立を目指している。地域特異性と国際汎用性

の両面をカバーすることで、将来的に見込まれる公衆衛生上の様々なニーズに対応可能であると期待される。

文 献

- 1) Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, et al.: Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Microbiol. 2008 ; 57 : 873-880.
- 2) Plikaytis BB, Marden JL, Crawford JT, et al.: Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1994 ; 32 : 1542-1546.
- 3) 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.

6. 新宿区内の全結核患者に対するIS6110 RFLP分析の実施と評価

—接触者健診への応用の可能性について—

東京都福祉保健局保健政策部疾病対策課 長嶺 路子

はじめに

新宿区の総人口は平成18年1月1日現在305,536人で、昼間人口はその約3倍の81万人以上である。そして年間に人口の約1割が入れ替わる流動性の激しい地域でもある。外国人登録者は総人口の約9.7%を占め、近年増加傾向にある。また滞在資格のない外国人はこの2倍以上と推計されている。新宿区の結核は、人口10万対の罹患率は53.0と全国の罹患率(22.2)に比べ約2.4倍、東京都全体の罹患率(29.9)に比べても約2倍弱の高さにあり、過去5年、格差の縮小は見られていない。その背景には、社会的弱者と言われる住所不定者(路上、簡易宿泊所、カプセルホテル、サウナなどを居所としている者)の結核が20~30%、流動的な外国籍(日本語学校の就学生、短期就労者、滞在資格がない者など)の結核患者が10~15%を占めていることが影響している。これら社会的弱者と外国籍は治療継続が困難な例が多いため、新宿区では2001年から住所不定者へ、2003年からは外国籍患者へのDOTS事業を開始し、治療中断率に低下が見られている。

結核対策においては、結核患者の早期発見・早期治療に加えて適切な治療の提供と服薬を完遂させることが最も重要であり、特に結核の征圧に向けては結核の感染を断ち切る対策の強化が求められる。日常の生活において一般住民が生活不安定者(本論文では、住所不定者、不

法滞在などの外国籍、住所はあり生活保護の対象にはならないが不安定な生活をしている人々を称す)と対面で直接交流する機会は比較的少ないと考えられている。しかし、同一空間の共有や間接的な接点はあると思われ、結核菌の感染機会もあるものと推測するが、これまで明らかにされてこなかった。

今回、IS6110 RFLP分析を実施し、その結果から得られたクラスター分析により、結核菌の感染状況を推定した。この結果から、接触者疫学調査の質的向上に向けて、より効率的な結核接触者健診への有効活用の可能性について検討したので報告する。

方 法

対象者は2002年9月から2006年8月の間に新宿区に新たに登録された結核患者から分離培養された402人分である。このうち389株(96.8%)についてRFLP分析結果を得ることができた。分離培養された結核菌は保健所スタッフが医療機関あるいは検査機関に出向き回収し、(助)結核予防会結核研究所に搬送した。RFLP分析の結果は、RFLP分析パターンが完全一致した菌株をクラスター形成として分析した。

疫学情報は、菌が分離培養されたかどうかにかかわらず、保健師による初回面接の際に、調査用紙を用いて聞き取りを行った。調査用紙は、一般用と住所不定者用の2種類を準備した。一般用の調査項目は、新宿区転入年

月日、通勤・通学方法、病院・医院・歯科医院の通院状況、外食の場所や頻度、習い事、理容院・美容院、マッサージ、パチンコ、サウナ・銭湯、カラオケ、ゲームセンター、サークル活動、スポーツジム、ボランティア活動、宗教活動、その他、住所不定者の調査項目は4年前からの所在地、居所（飯場・事業所の寮・簡易宿所・福祉施設である宿泊所・サウナやカプセルホテル・路上・公園・その他）、職業（就労せず、建設日雇い、雑誌や缶集め、常用雇用、その他）である。

結 果

(1) RFLP分析対象者と住民別クラスター形成率

新宿区に新規に登録された結核患者を一般、住所不定者、外国籍に分けて検体入手率、RFLP分析結果判明率、クラスター形成率を見た (Table 1)。検体入手率と結果判明率は、一般住民（入手率88.9%、判明率96.9%）と住所不定者（入手率94.9%、判明率97.3%）では高かったが、外国籍（入手率84.6%、判明率93.9%）ではやや低かった。クラスター形成率については、一般住民の34.5%に対し住所不定者では57.8%と有意に高かったが ($p < 0.001$)、外国籍は19.4%と有意差は得られなかったが低い傾向にあった ($p = 0.090$)。

(2) クラスター形成者の属性とクラスターの規模

クラスター形成者の属性とクラスター形成状況を観察した (Table 2)。一般住民と住所不定者からなるクラスター個数は23個 (83名) と最も多かったが、このうちで疫学的関連が証明された患者数は4名 (4.7%) と低かった。次にクラスター個数が多かったのは一般住民のみで形成するクラスターで、11個 (32名) が確認された。この中で疫学的関連は10名 (31.3%) で確認されたが、うち4名は他区にまたがる大規模集団感染事例の患者であった。一方、住所不定者のみで形成するクラスターは7個 (15名) と少なかったが、疫学的関連の証明率は4名 (26.7%) であった。なお、一般住民・住所不定者・外国籍の三者で構成するクラスターは3個と数が少なかったが、クラスター内平均患者数は6.7人と多かった。しかしながら、この中で疫学的関連を証明できたものはなかった。

考 察

(1) RFLP分析に基づく、クラスター形成について

RFLP分析で、住所不定者の57.8%がクラスターを形成しており (Table 1)、住所不定者内での感染が推測された。そして、住所不定者のクラスターには一般患者も混在しており、RFLP分析情報を考慮に入れた患者調査と確実な接触者健診の実施が重要と考えられた。

Table 1 Number of notified cases, number of strains for RFLP analysis and the results

Type of resident	New cases*	Culture positive cases	Isolates obtained	Proportion of isolates (%)	Results of RFLP pattern	Proportion of test results (%)	Cases in clustering	Proportion of clustering (%)	<i>p</i> value
		a	b	b/a	c	c/b	d	d/c	
General	403	289	257	88.9	249	96.9	86	34.5	$p < 0.001$ $p = 0.090$
Homeless	153	118	112	94.9	109	97.3	63	57.8	
Foreigners	88	39	33	84.6	31	93.9	6	19.4	
Total	644	446	402	90.1	389	96.8	155	39.8	

*Newly notified TB patients for the period between Sep. 2002 and Aug 2006.

p: Comparison with general citizens

Table 2 Characteristics of cluster by type of resident, epidemiological link and size of clustering

Characteristics of cluster	No. of clusters	No. of cases in clusters	Type of resident			Definite link by epidemiological investigation		No. of cases in a cluster		
			General citizens	Homeless	Foreigners	No.	(%)	Mean	Min.	Max.
General citizens only	11	32	32	0	0	10	31.3	2.9	2	6
Homeless only	7	15	0	15	0	4	26.7	2.1	2	3
Foreigners only	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—
General and homeless	23	83	44	39	0	4	4.7	3.6	2	10
General and foreigners	1	3	2	0	1	0	0.0	3.0	3	3
Homeless and foreigners	1	2	0	1	1	0	0.0	2.0	2	2
General, homeless and foreigners	3	20	8	8	4	0	0.0	6.7	6	7
Total	46	155	86	63	6	18	11.6	3.4	2	10

クラスター形成した155人中83人(53.5%)は住所不定者と一般住民の両者も含む構成であった。一般住民と住所不定者が混在する23クラスターのうち、一般住民が先に発病したのは9クラスター、住所不定者が先に発病したのは11クラスター、同時発病が3クラスターであり、発病リスクの高い住所不定者が先に発症し、その後で一般住民が発病するという時系列的関係は認められなかった。クラスター内の初発患者が住所不定者としても、それは必ずしも感染源と言えない。結核感染は過去から継続的に起こっているものであるが、感染した菌によりすぐに発病する者もいれば、5年、10年後に発病する者もある。特に、結核菌の遺伝子パターンが長期間安定している菌では、感染後すぐに発病した患者と長期間を経て発病した患者とが混在している場合、直接の感染源を時系列的順序で判断することはできない。ただ住所不定者のクラスター形成率が有意に高いことから、比較的最近の感染による発病が多いのではないかと推察される。都市型結核対策に取り組むにあたり、社会経済的弱者で結核発病ハイリスクグループである住所不定者への対策強化は、地域における結核感染を断ち切るために有益と考えられる。

新宿区においては住所不定者の結核の早期発見が結核対策の上で欠かせない。具体的対策のひとつとしては、面接調査等による接触者疫学調査の質的向上に加えRFLP分析情報を考慮に入れた確実な接触者健診を実施することが考えられる。

次に外国籍については、結果が判明した31人中、クラスター形成者は6名(クラスター形成率19.4%)と少なかった。外国籍のクラスター形成率が低いことについては、いくつか報告されているが、その理由として日本より罹患率の高いアジア周辺諸国ですでに結核に感染し、入国後発病する外国籍が多いため、日本人とは異なる結核菌であると言われてきたことがその理由に挙げられていた。これまで、外国籍の結核については、日本より罹患率の高いアジア周辺諸国で結核に感染し、入国後に発病し、日本人への感染源にもなっているのではない

かという心配がある一方、移住者から受入国住民への感染の可能性は低いとの報告もあった。今回、われわれの結果では、移住者から受入国住民への感染の可能性は低く、逆に日本人から外国籍への結核感染が起こっているのではないかと示唆される結果を得た。

(2) RFLP分析の接触者健診への応用の可能性について

接触者健診の対象の選定は、「改正感染症法に基づく結核の接触者健康診断の手引き」に基づく、届出患者の発生届情報と患者調査に基づく疫学情報から評価した「初発患者の感染性の高さ」および「接触者の感染・発病リスク」の組み合わせで必要性和優先度を判断し実施しているが、大都市の複雑な感染状況の下では限界がある。例えば、近年の集団事例の特徴として、不特定多数の人々が集まる場所例えばネットカフェやサウナなどでの感染事例、限られた地域あるいは広い地域で感染が生じた事例が報告されている。近年、不安定な雇用が増えたことにより、住所不定者の低年齢化も見受けられる。RFLP分析の導入は、感染源や感染経路等の究明に有効であり、接触者疫学調査の質的向上につながると言われている。すなわち、患者調査だけでは分からなかった感染経路を見出し、感染状況の疫学的解明に資することから、接触者健診の対象の拡大ができる等、結果として結核の感染連鎖を断つ一端になる。また、学生や就労者では居住地と日中の所在地が別の場合も多いと考えられるので、広域的なデータの蓄積が感染の状況を正確に把握するためには重要である。課題として、①分析結果の迅速化、②広域的な実施とそのための経費・マンパワー・菌株分与に関する保健所と結核指定医療機関等との連携等、③接触者健診における関係保健所間での情報の交換・共有システムの強化、④広域的なデータを集積・分析する機関の存在、などがあげられる。このような課題が克服できれば、結核罹患率の変化と同時に分子疫学によるクラスター形成率の経年変化が結核対策を評価する指標の一つとなりうるかもしれない。

7. 自治体の結核対策における分子疫学研究の位置づけ

神戸市兵庫区保健福祉部 白井 千香
 神戸市保健所予防衛生課 藤山 理世
 神戸市環境保健研究所 岩本 朋忠

はじめに

神戸市の結核罹患率は全国平均の約1.5倍、政令指定

都市間では第2位(2006年罹患率:神戸市32.2, 全国20.6)という蔓延状況が続いている。結核対策は神戸市保健医療計画2010や“こうべ”の市民福祉総合計画2010

などにおいても取り組むべき課題となっている。その中で結核菌の分子疫学分析については、まず、2000年に策定された「神戸市緊急5カ年結核対策指針」に基づく研究・調査事業として、2003年にRFLP分析の導入を行った。RFLP分析は主に集団感染の判断に有用であるが、さらに地域レベルでの感染様式を解明し、神戸市の結核蔓延状況の改善を図る必要があった。2005年度からの「第二次神戸市5カ年結核対策指針」では、菌バンク事業を対策に位置づけ、主に神戸市内の患者からの結核菌分離株を収集し保存している。収集した菌株についてVNTR解析を行い、遺伝子型別データを含む菌株情報データベース(KOBE VNTR データベース)を構築し、結核対策への活用法について模索している。

対策の企画と立案の経緯

結核菌情報は、感染症対策として診断、治療経過、患者支援に必須であるが、国の「結核緊急事態宣言」当時(神戸市では緊急5カ年結核対策以前)、保健所では必ずしも日常業務において確実な菌情報を得ていなかった。医療機関での菌検査の取り扱いも多様で、委託検査機関の違いもあり精度が保たれているとは言い難かった。当時、阪神淡路大震災後の復興期であり、折しも地域保健法の煽りを受け、神戸市に9カ所あった保健所は、1998年に1保健所(および9区保健センター)体制となったのであるが、保健所は具体的な機能強化を求めている。よって結核対策としては、地域における菌情報を確実にするため、菌株の収集を計画した。神戸市の結核患者に対して、治療機関は市内および近隣の2病院に入院患者が集約されており、菌株譲渡について医療機関の了解を得るための話し合いを繰り返した。それらの医療機関とは同時に確実な治療に反映するため、院内DOTSと地域DOTSの推進も交渉した。自治体内の事業要望としては、検査機器の予算確保や研究員の技術確保や業務の維持に努めた。危機管理の視点で神戸市環境保健研究所(=地方衛生研究所)と保健所との間で円滑な疫学情報管理に努め、全市の結核事情に注目が集まり「神戸市の結核問題をなんとかしたい」という思いが、総合的な結核対策の行動計画に結びつく「神戸市緊急5カ年結核対策指針」を得た要因と考える。

対象と方法

2000年から2007年までに、神戸市で届出、登録された結核菌陽性患者および接触者健診で関係し(市外の登録患者を一部含む)、うち同意を得た患者について、菌が保存されていた894株を対象とした。遺伝子型別タイプングは、日本標準である12-locusを用いたJATA-12による一次分類(JATA cluster)、さらに hyper variable 4-

locus (V3232, V3820, V4120, Q11a)を加えた二次分類(KCT cluster)を行った。菌株の遺伝子型別データは、患者情報(年齢、居住地、性別、登録年)と組み合わせたKOBE VNTRデータベースとして管理している。なお、研究に提供する菌情報に関する同意方法についてはそれぞれの治療機関における倫理委員会等で了承を得ている。今後、接触者健診については、感染症法による積極的疫学調査の対象となったため、研究ではなく事業の範囲内で行えば必ずしも同意を得る必要はないと解釈できる。

結 果

VNTR法を用いて、結核菌の遺伝子型別データベースを構築することで、新規患者の発生に際しその分離株が過去にも検出されている菌かどうかの検索が可能となる。分析の結果、894株のうち分析可能な836株から274株で76のクラスター形成(32.8%)が見られた(Table)。明らかな家族内感染や集団感染以外に、直接の接触がなくても同じ簡易宿泊所でのクラスターや近隣の生活圏内の患者に共通するクラスターを認めた。数年間で繰り返し感染が起こっていると思われる地域も想定された。

〔個々の事例のつながりの推測〕

事例1 3年間(2004~2006)に隣接する2区において、10株同クラスターとして拡大した。同じアパートの住人と家族5人と互いに接触歴のない患者3人(1人は獲得耐性による多剤耐性結核)および遊技場顧客と従業員3人から得られた菌株について、クラスターを形成した。

事例2 6年間(2002~2007)に互いに隣接する5区において、10株が同クラスターを形成し、さらに拡大が続いている兆しがある。結核重点地区として高蔓延地区の患者4人、その地区に隣接し勤務および仕事上不特

Table KOBE VNTR Database

(by JATA-12+HV-4)		N=836
Cluster size	No. of cluster	
14 strains	1	
11	1	
10	1	
9	2	
8	2	
6	4	
5	7	
4	8	
3	14	
2	36	
Total	76 (N=274)	
*unique	562	
Cluster (%)	32.8%	

定な者と交流の機会がある6人から得られた菌株について、クラスターを形成した。

〔マクロな視点での解析〕

分析方法 例1 多次元尺度法 (multi dimensional scaling) 各区に存在する VNTR 型の種類と数に基づき、他区のものと比較し、その類似性を算出する。神戸市9区で見られる JATA-12 VNTR プロファイル構成や KCT level プロファイル構成の相対的類似性は、図式化したり2次元の軸上でプロットしたりすることができる。

分析方法 例2 GIS (geographic information system) の活用で、地図上に同じクラスター形成をした菌株由来患者の居所をプロットすることから、患者に共通する行動範囲や移動経路を想定することができる。

考 察

(1) 結核対策における分子疫学の意義

RFLP分析によって、二次感染の証明が可能となり、さらにVNTR分析はRFLP分析より簡便な方法でデジタル化した情報が記録されるようになった。VNTR分析は再現性や互換性があるため、過去の菌株や遠隔地との菌情報の比較も可能である。この疫学の方法論を利用して、個にとどまらない公衆衛生の実践ができると考えている。長期的にデータベースを観察することで、近隣地域のクラスター数や規模の変化によっては未知感染ルートを検出や感染の連鎖が地域の蔓延状況と関連するかなど、考察を深めることができる。

(2) 今後の方向性

〔個々の事例への即応〕 データベースの観察から、新規結核患者登録とほぼ同時にクラスター形成の有無を伝えることで、集団感染の早期発見や接触者検診での感染経路の特定に活用することができる。地域において過去の集団感染に関わるクラスターや多剤耐性結核など、監視を要する菌株の出現を早期に発見する。

〔マクロな視点での解析〕 神戸市レベルまたは各区レベルでの蔓延状況を解析し、結核対策の重点化のための科学的データを示すことが重要である。クラスターサイズの分布、系統的関係、年齢層、クラスターサイズの経年変化などから、現在感染が広まりつつある株の存在を明確にする。さらに、全国レベルでのサーベイランスや他都市とのデータ共有により、広域蔓延株が特定されるであろう。

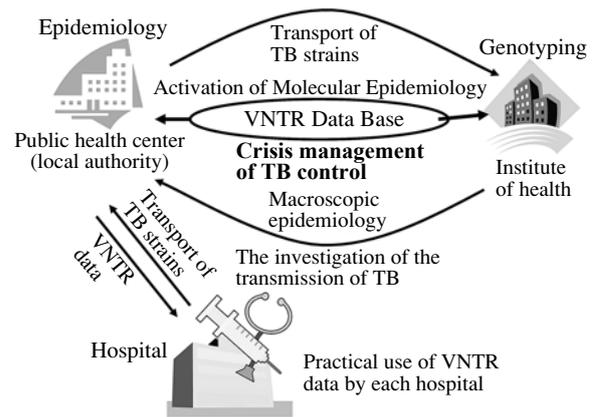


Fig. Systematic pathway of molecular epidemiology for TB control

(3) 分子疫学研究を対策に活用するための体制

VNTR分析は感染様式を探るため有用であり、患者調査の際には「積極的疫学調査」の視点で従来の聞き取りや訪問活動を強化し、信頼関係を得ながら発病前の行動範囲をより掘り下げて情報収集すべきである。また、結核病棟を有さない病院や民間検査機関からの菌株も収集し、菌情報のデータベースをより確立するよう、病院、検査機関(衛生研究所等を含む)、保健所の連携を進める。地域の医療機関へ菌バンク事業への理解を求めるとともに、分析結果について適時、還元していく。研究所には、疫学情報の解析について、よりマクロな視点でのデータ活用を介して、行政に貢献することで、分子疫学を活用した結核感染における危機管理体制が可能となる(Fig.)。

おわりに

「研究を対策化する」という課題について、研究が応用され社会貢献に資することに価値があることを、行政が認知することが重要である。医療機関、研究所、行政が、互いの組織がともに価値のある研究に関わる意識をもち、研究所のマニアックな技術に圧倒されることなく、目的の共有を図り、貢献度の高い研究に着目してその方法を活用する。神戸市では、感染経路の解明から感染防止策を見出すため、菌バンク事業推進を自治体の対策の要としていきたい。行政が、対策に結びつく公共事業としての研究に、意義を見出すことが大切である。

————— The 83rd Annual Meeting Symposium —————

**PROGRESS OF MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
AND ITS APPLICATION FOR THE PREVENTION OF TUBERCULOSIS**

Chairpersons: ¹Atsushi HASE and ²Hideo MAEDA

Abstract: Recently, molecular biological studies of *Mycobacterium tuberculosis* have extremely developed. Especially, molecular epidemiological methods have been very useful tools for the study of active survey for the infection of tuberculosis. These techniques are useful not only to investigate transmission routes and infection sources, but also to analyze the prevalence in the area. In this symposium we have invited seven speakers who are talking about each titles as followed.

1. National tuberculosis genotyping and surveillance system in the Netherlands: An example of information system of tuberculosis genotyping from advanced countries in molecular epidemiology: Kazuhiro UCHIMURA (Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association)

In the Netherlands, national tuberculosis genotyping and surveillance system is functioning well. The Royal Netherlands Tuberculosis Association (KNCV) keeps National Tuberculosis Register. The National Institute for Public Health and Environment (RIVM) performs genotyping and cluster analysis for all culture positive *M. tuberculosis* isolates. Since 1995, the National DNA fingerprinting surveillance project has routinely investigated the all genotyping patterns. Cluster information has been linked to the National Tuberculosis Register and has reported to Municipal Health Services (GGDs). There is a close relationship between GGDs, the KNCV and the RIVM to keep the national tuberculosis genotyping and surveillance system.

2. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on the variable numbers of tandem repeats (VNTR) used consensus loci: Shinji MAEDA, Yoshiro MURASE (Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association)

The JATA (12) -VNTR analysis system was established for the molecular typing of *M. tuberculosis* in Japan. The typing degree of JATA (12) -VNTR was almost the same as that of RFLP analysis when the suspected cases of mass infection were examined. On the other hand, it was found that JATA (12) -VNTR system needed to improve the ability of typing for the molecular epidemiological analyses of population base.

3. Usefulness of *Mycobacterium tuberculosis* genotyping for tuberculosis control in Osaka Prefecture: Aki TAMARU (Bacteriology Division, Osaka Prefectural Institute of Public Health)

IS6110-RFLP genotyping of tuberculosis isolates has been used as a strategy for outbreak investigations and tracing the

transmissions of tuberculosis in Osaka Prefecture since 1995, where the incidence rate of TB is highest in Japan. However, there was limitation to apply this method for tuberculosis control because of 1) complicated analysis of RFLP patterns, 2) accumulation of identical patterns of RFLP (common clusters) in Osaka. On the contrary, the PCR-based genotyping, VNTR typing is rapid and simple to compare tuberculosis isolates. From the results of genotyping of 86 epidemic cases, there was good correspondence between 22 loci-VNTR typing and RFLP typing, furthermore the common clusters were subtyped by 22 loci-VNTR typing. Although standardization and quality assessment should be necessary for future investigation of tuberculosis, the application of 22 loci-VNTR typing is useful strategy for tuberculosis control in Osaka Prefecture.

4. Molecular epidemiological analysis of *M. tuberculosis* to implement the effective measures for tuberculosis prevention in the areas of low tuberculosis incidence: Eiji YOKOYAMA (Chiba Prefectural Institute of Public Health)

In the areas of low tuberculosis incidence, molecular epidemiological analysis of *M. tuberculosis* will contribute to implement the effective measures for tuberculosis prevention by the investigation of unapparent and/or uncertain transmission of the disease. VNTR analysis will be suitable for the molecular epidemiological analysis in the areas because a lot of VNTR data can be easily compared among different local governments.

5. Localization and Global Standardization of Genotyping by variable number of tandem repeats (VNTR) for TB: Takayuki WADA (Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences)

The *M. tuberculosis* Beijing family strains in Japan were found to belong mainly to the ancient sublineage, in contrast to the worldwide evolutionary stream that led to the dominant modern sublineage. The singular epidemiologic pattern in Japan requires specific localized choice of loci of variable number of tandem repeats (VNTR) to apply the genotyping method efficiently to domestic molecular epidemiology. It is also necessary to follow global standards such as Supply's 15 (24) VNTR to meet international for future international comparison.

6. Implementation and evaluation by a population-based RFLP analysis in an urban area, Shinjuku City, Tokyo: Michiko NAGAMINE (Specific Disease Control Section,

Bureau of Social Welfare and Public Health, Tokyo Metropolitan Government)

To examine *Mycobacterium tuberculosis* transmission patterns by RFLP analysis in Shinjuku, and to elucidate more effective methods of contact investigations. Clustering rates among homeless patients are high, therefore taking countermeasures for the homeless patients is an effective way. Introduction of RFLP analysis is a practical methodology to contact investigations. If RFLP analysis can be applied in a larger area, yearly changes of notification rates and molecular epidemiological clustering rates will provide indices for preventive measures against tuberculosis.

7. Utilization of molecular epidemiological data for improving TB control program in Kobe City : Chika SHIRAI (Department of Health and Welfare of Hyogo Ward), Riyo FUJIYAMA (Public Health Center of Kobe City), Tomotada IWAMOTO (Kobe Institute of Health)

Molecular epidemiological data by VNTR is a promising scientific evidence for the investigation of the transmission of TB, through the comparison between strains from new TB cases and past cases. We have developed the Kobe VNTR database including 894 TB cases for 5 years. The mission of Kobe city is to activate molecular epidemiology for improving TB control program.

Key words: Molecular epidemiology, Tuberculosis control, Genotyping, VNTR, RFLP

¹Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, ²Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

Correspondence to : Hideo Maeda, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, 3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku, Tokyo 169-0073 Japan.

(E-mail: Hideo_Maeda@member.metro.tokyo.jp)