

## 第87回総会シンポジウム

## II. 結核低蔓延社会に向けたこれからの結核検診

—接触者健診から積極的疫学調査へ—

座長 <sup>1</sup>前田 秀雄 <sup>2</sup>白井 千香

キーワード：接触者健診，QFT検査，VNTR分析，低蔓延

シンポジスト：

1. 東京都におけるQFT検査を活用した検診の現状と課題  
前田秀雄（東京都福祉保健局保健政策部）
2. 都内中高一貫校で発生した結核集団感染事例における接触者健診  
宮本謙一（杉並区高井戸保健センター）
3. 接触者健診における分子疫学的手法の導入  
伊藤正寛（京都市保健所）
4. 接触者健診における結核分子疫学調査およびQFT検査の活用  
藤山理世（神戸市保健所）
5. 結核分子疫学による疫学動向の推察  
岩本朋忠（神戸市環境保健研究所）

感染症法（略）第15条には積極的疫学調査に関する条文がある。第17条にはいわゆる接触者健診の位置づけが示されている。わが国の結核は未だ中蔓延とはいえず、保健所単位によっては罹患率が低くなり、そのような地域では行政施策としてむしろ優先順位が低くなるのが危惧される。また高齢者と若年者を比べると既感染率の差は大きく、医療機関では結核の診療経験が少なくなり、診断精度の問題や発見の遅れによる集団発生の恐れもある。また都市部と過疎地では人口移動や密度の違いがあるものの、どこの保健所においても社会的・経済的弱者や外国人などにも対応が可能な個別の対策が必要である。結核の発生を減らした低蔓延化社会は、現在の対策の目標であるが、感染リスクが「遍在から偏在へ」表面に見えなくなるという危うさを含むことになる。

このシンポジウムでは、地域格差拡大、診断能力の低下、行政の地盤沈下などを見通して、結核対策のパラダイムシフトを求めるため、実際に経験した事例を提示し、低蔓延化に向けて結核対策を後退させないよう、今後の対策への展望を討論した。

前田氏は、東京都が独自に「結核の積極的疫学調査と接触者健診のためのマニュアル」を作成し、QFT検査を年齢に考慮しつつ積極的に活用し、感染の早期発見につなげていることやVNTR分析等を組み合わせて地域のリスク集団の特定をするなど、結核の低蔓延化に対応できる体制づくりを紹介した。宮本氏は、そのような体制における接触者健診の一例として、東京都内の中高一貫校における結核集団感染事例から結核患者の早期発見ができたことを報告した。伊藤氏は、低蔓延化を目指した京都市の結核対策の再構築として、対策推進プロジェクトチームの取り組みやRFLPからVNTR導入への分子疫学分析の事業化について報告した。藤山氏は、神戸市が先駆的に取り組んできた分子疫学分析から集団発生か否かがわかった事例や結核菌の地域伝播を示唆した。岩本氏は、低蔓延時代にこそ一定地域や短期間ではない巨視的な観点で、VNTRなど分子疫学分析を広域的・地域間連携に活用できると総括した。

今回はいずれも、未だ高蔓延状態にある都市部の事例を情報提供された。それらは必ずしも低蔓延化における偏在を浮き彫りにしたものではなかったが、QFT検査や分子疫学分析を先駆的に行って得られた接触者健診の方法論を普及する意図があり、いざ低蔓延になってからは、それぞれの検査方法や分析の活用が間に合わないことを示唆していた。その意味で全国的な分子疫学の基盤

<sup>1</sup>東京都福祉保健局，<sup>2</sup>神戸市保健福祉局・保健所連絡先：白井千香，神戸市保健福祉局・保健所，〒650-8570 兵庫県神戸市中央区加納町6-5-1  
(E-mail: chika\_shirai@office.city.kobe.lg.jp)  
(Received 31 Oct. 2012)

整備に向けて、ややテクニカルな内容に集中した議論もあったが、患者発生が面から線へ、線から点へ偏在していく中で、接触者健診がその点を結び線となり、また対策の基礎となる積極的疫学調査を面として、改めて作り直す時期ではないかと思われた。

接触者健診のツールとして、QFT検査とVNTR分析を

駆使すること、菌情報や患者情報の蓄積から結核感染のリスクを地域で把握し、それに応じた対策を行うこと、今はその準備をしていく時期である。このような方法によって、結核の積極的疫学調査を行うことは、今後、新たな感染や発病のリスクを解明し、本質的解決のための政策提言につなげることができるであろう。

## 2. 都内中高一貫校で発生した結核集団感染事例における接触者健診

杉並区高井戸保健センター 宮本 謙一

### はじめに

近年、学校等における結核の大規模な接触者健診において、QFT（クオンティフェロン）検査等を用いた感染診断ならびにRFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）分析やVNTR（Variable Numbers of Tandem Repeats）分析を用いた分子疫学調査が積極的に活用されるようになり、接触者健診の進め方が大きく様変わりしている。

今回、都内の中高一貫校で発生した結核の大規模集団感染事例の接触者健診において、QFT（第2世代）検査およびVNTR分析を活用し良好な結果が得られた事例を経験したので、その詳細について報告する。

### 事例の詳細

都内の中高一貫校に通学中の中学生1名が肺結核（病型H3I3、喀痰塗抹3+）と診断された。本生徒（以下、初発患者）は、診断の約半年前から断続的に発熱および咳・喀痰などの症状を認め、診断の2カ月前から呼吸器症状が悪化したため複数の医療機関を受診したが、胸部X線検査等の精査は実施されず、診断が遅れる結果となった。

初発患者登録後、居住地保健所が速やかに同居家族に対する健診を実施し、1名が肺結核（病型H3I3、QFT陽性、喀痰・胃液検査で結核菌は証明されず）、2名が潜在性結核感染症（LTBI）と診断された。また、初発患者が通学する学校の全校生徒数は約900名で、中学と高校が同じ敷地内に存在し、保健室や食堂、体育館などは中高共用であり、管轄保健所が接触状況に従いFig. 1のとおり健診を実施した。その結果、胸部X線検査（対象者約190名）では明らかな結核発病者は認めなかったが、QFT検査（対象者約130名）の陽性率は同年代の推定既感染率より高く、特に初発患者と同クラスの生徒の陽性率は約20%、陽性と判定保留を合わせると約50%と非常に高率であった。そのため、本事例の接触者健診における

QFT検査の結果については判定保留も陽性として取り扱うこととした。QFT検査が陽性または判定保留だった接触者については専門医療機関に紹介し、胸部CT検査等による精査を依頼した。その結果、複数の肺結核発病者が認められた。LTBIと診断された接触者には治療を強く勧奨し、治療を希望しない場合は胸部X線検査等により注意深く経過観察することとした。

初発患者の登録から約3カ月後、初発患者とほとんど接触がなかった同学校の高校生1名が肺結核（病型H3I1、喀痰塗抹陰性、培養陽性）と診断され、東京都健康安全研究センターでVNTR分析を実施したところ初発患者と遺伝子パターンが一致し、同一の結核菌と考えられた。この結果より、当初設定した接触者健診の枠外まで感染が拡大していると考えられたため、接触者健診の範囲を全校生徒・教職員に拡大し、QFT検査未実施であった残りの生徒・教職員すべて（約800名）にQFT検査を実施するとともに、すでにQFT検査を受けて陰性だった者に

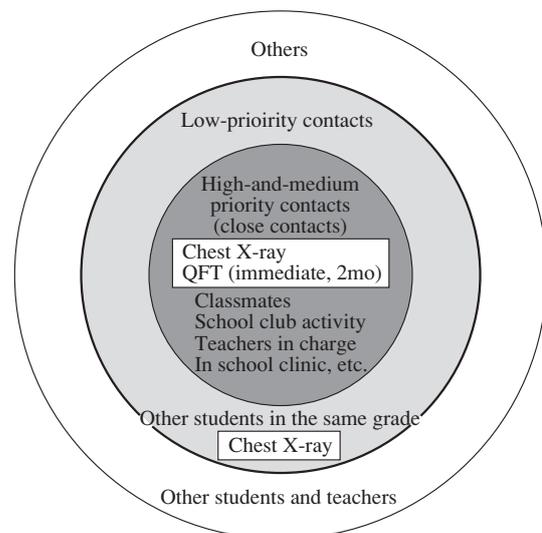


Fig. 1 Primary plan of contact investigation in this school

**Table** Six cases whose QFT tests showed positive conversion in 4 months after last contact with first patient

Contact situation	Immediately (25–26 days after last contact)	2 mo. later (81 days after last contact)	4 mo. later (143–146 days after last contact)	Chest CT	Diagnosis
Classmate	E=0.07 C=0.00	E=0.08 C=0.00	E=0.12 C=0.02	Normal	LTBI
Classmate	E=0.05 C=0.03	E=0.09 C=0.05	E=0.14 C=0.22	Normal	LTBI
Classmate	E=0.00 C=0.00	E=0.01 C=0.00	E=0.29 C=0.02	Suspected TB	Pulmonary TB
School club activity	E=0.00 C=0.02	E=0.03 C=0.09	E=0.01 C=0.17	Normal	LTBI
Former classmate	Not tested	E=0.06 C=0.00	E=0.02 C=0.10	Normal	LTBI
Teacher	E=0.02 C=0.00	E=0.05 C=0.01	E=0.14 C=0.01	Normal	LTBI

TB: tuberculosis LTBI: latent tuberculosis infection  
E: ESAT-6 C: CFP-10

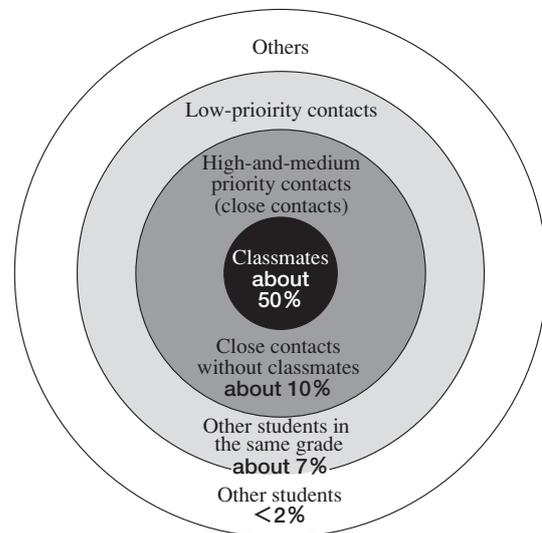
についても再度（初発患者との最終接触から約4カ月半後）QFT検査を実施することとした。また、教職員や保護者・生徒への正確な情報提供および有症状時の速やかな受診の徹底、QFT陽性・判定保留者の早期受診勧奨、胸部CT等による発病診断ならびにLTBI治療・肺結核治療の徹底など、あらためて保健所による総合的な感染拡大防止対策を強化した。

範囲拡大後の接触者健診におけるQFT陽性率はあまり高くなかったため、学校全体への感染の拡大は限定的であると考えられた。一方、Tableに示すとおり、初発患者との最終接触から2カ月半後のQFTが陰性であった最優先・優先接触者のうち6名が、最終接触から4カ月半後のQFTで判定保留となり、そのうち1名は胸部CT検査にて肺結核の発病が確認された。

最終的な本学校生徒のQFT検査陽性率（判定保留を含む）をFig. 2に示す。最優先・優先接触者および低優先接触者の陽性率が高かったため、QFT検査で陰性であった生徒に対する2年間の胸部X線検査による経過観察を実施し、接触者健診を終了した。本学校の接触者健診における最終的な結核発病者数は、生徒9名、教員2名であったが、診断時にすでに排菌していた発病者はおらず、学校内でのさらなる感染拡大を防ぐことができた。

## 考 察

接触者健診の目的は、「①潜在性結核感染症の発見と進展防止」「②新たな結核患者の早期発見」「③感染源および感染経路の探求」の3つである<sup>9)</sup>。これらの目的を達成するためには、初発患者の症状経過や集団生活における接触状況等の丁寧な調査と、それに基づく接触者の感染・発病リスクの正確な評価、そして接触者健診や治療に関する接触者・保護者への十分な説明など、接触者



**Fig. 2** Rates of QFT-positive students (including "indeterminant")

健診の基本的事項を確実に実施したうえで、必要に応じてQFT検査等による感染診断やVNTR等による分子疫学調査を活用することが重要である。今回の集団感染事例における接触者健診では、QFT検査（第2世代）による感染診断を積極的に活用し、結核感染者および発病者の早期発見と治療に役立てることができた。またVNTR分析の結果、当初の想定よりも広範に学校内に感染が拡大していることが疑われたため、速やかに接触者健診の範囲を拡大することができた。これらの対応により、前述の接触者健診の目的のうち「①潜在性結核感染症の発見と進展防止」と「②新たな結核患者の早期発見」については十分に達成することができた。その結果、学校内におけるさらなる感染拡大を防ぐことができたと考えられる。

集団感染事例におけるQFT検査による結核感染診断

の有用性に関しては、濃厚接触者と非濃厚接触者にツベルクリン反応検査（以下、ツ反）とQFT検査（第2世代）を実施して比較分析した研究がある<sup>2)</sup>。この研究では、濃厚接触群と非濃厚接触群のツ反の分布にはわずかな違いしか認めなかったが、ツ反で発赤長径30 mm以上の対象者に実施したQFT検査では、濃厚接触群と非濃厚接触群の陽性率に大きな差が認められ、集団感染事例におけるQFT検査の有用性が示された。今回の事例では、狭い教室内で長時間にわたる接触があった初発患者と同クラスの生徒のQFT陽性率が著しく高く、その他の接触者でも接触時間や接触の程度に応じたQFT陽性率の差が認められ、学校内における感染の拡がりを詳しく把握することができた。また、この結果を受けて、QFT検査の判定保留者を陽性者（感染あり）として取り扱い、発病の有無を胸部CT検査で慎重に判断し、発病していない場合はLTBI治療を強く勧めるなど、QFT検査の結果を事後対応の質の向上につなげることができた。検査費用と人員の確保という大きな課題があるものの、今回の事例のようにQFT検査の対象者が多い大規模接触者健診においても、QFT検査を最大限に活用することが望まれる。

QFT検査の判定保留の取り扱いについては、集団のQFT陽性率が高い場合、QFT検査のカットオフ値を0.35 IU/mLから0.10 IU/mLに下げ、すなわち判定保留を陽性とするすることで、陽性的中率をあまり下げずに感染者の見落としを減らせることが示されている<sup>3)</sup>。また、「感染症法に基づく結核の接触者健診の手引き（改訂第4版）」<sup>4)</sup>には、「集団的に検査を実施してQFT陽性率が高い場合（※注：例えば、対象とした接触者集団のQFT陽性率が15%以上の場合）などには、『判定保留』者も『感染あり』として扱うことが望まれる」と記載されている。このような知見に基づき、今回の接触者健診では、QFT検査の判定保留はすべて「陽性」として取り扱い、胸部CT検査等で結核の発病が認められなかった場合はLTBI治療を強く勧奨した。これにより、感染者の見落としを減らし、新たな結核発病者の発生を最大限防ぐことができたと考えられる。

QFT検査のウィンドウ期は、これまでの研究結果から、感染後約2～3カ月間と考えられている<sup>4)</sup>。今回の事例では、初発患者との最終接触から約3カ月後（81日目）

のQFT検査が陰性で、その約2カ月後のQFT検査で判定保留となった濃厚接触者が6名おり、そのうちの1名はすでに発病していた。すなわち、感染後約3カ月～それ以降にQFTが陽転化した事例が確認された。今回の知見に基づき、平成23年3月に改訂された東京都福祉保健局作成の「結核の積極的疫学調査と接触者健診のためのマニュアル」では、QFT再検査の必要性について「QFT陽性者が多くなることが予測される場合、もしくはすでにQFT陽性者が多数発見されている場合は、最終接触から3カ月後以降に2回目のQFT検査を実施することが望ましい」と記載している。

最後に、本シンポジウムのテーマとは直接関係ないものの、今回の集団感染事例における最も重要な点である「診断の遅れ」について触れておく。今回の事例では、初発患者の「発病から医療機関受診の遅れ（patient's delay）」と「医療機関受診から診断の遅れ（doctor's delay）」が重なり、大規模な集団感染につながった。その背景には、社会全体の結核に対する認識の低下があり、特に発病者が少ない小児結核に関して顕著であると思われる。結核対策に携わる行政機関等の関係者は、保護者や学校関係者、小児科医など、小児を取り巻くすべての関係者に対する結核の正しい知識の普及啓発に努め、長引く呼吸器症状があれば年齢にかかわらず結核を疑うよう、継続的に働きかけていくことが必要である。

## 文 献

- 1) 阿彦忠之, 他: 厚生労働科学研究(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. 感染症法に基づく結核の接触者健診の手引き(改訂第4版). 2010年6月.
- 2) 原田登之, 森 亨, 宍戸真司, 他: 集団感染事例における新しい結核感染診断法 QuantiFERON®TB-2Gの有効性の検討. 結核. 2004; 79: 637-643.
- 3) 原田登之, 樋口一恵, 関谷幸江, 他: 結核菌抗原 ESAT-6およびCFP-10を用いた結核感染診断法 QuantiFERON®TB-2Gの基礎的検討. 結核. 2004; 79: 725-735.
- 4) 吉山 崇, 原田登之, 樋口一恵, 他: 接触者健診のためのクオンティフェロン®TB-2G検査のタイミングについて. 結核. 2007; 82: 655-658.

### 3. 接触者健診における分子疫学的手法の導入

京都市保健所 伊藤 正寛

#### はじめに

結核の低蔓延化を目指して対策を推進するためには、効果的かつ確実に接触者健診を行うことが重要である。京都市は接触者健診マニュアルに基づいて、保健所内検討会において健診対象者の範囲選定を行い、高い接触者健診受診率を維持することを目標にしている。接触者健診により新たな発病者および潜在性結核感染症を早期発見し、感染源と感染経路を探索することにより結核の感染拡大防止対策を行うことが可能である。初発患者の初期調査の結果に基づいて初発患者の感染性と接触者の感染・発病リスクを評価し、優先度に基づいて接触者健診を企画する。特に集団感染に進展する可能性がある場合は疫学的な関連性を把握することがきわめて重要である。初発患者や接触者の行動状況や接触の度合い、頻度などの疫学的情報とツベルクリン反応やQFT検査などの検査情報を把握することが基本である。結核菌の分子疫学的な解析方法は従来RFLP分析法が利用されていたが、最近ではVNTR法を用いた結核菌の分子疫学的解析法が利用されるようになった。VNTR法はPCR (polymerase chain reaction) 法を用いているため、その利便性や迅速性から非常に有用な方法である。VNTR法を接触者健診に導入するためには、検体の採取、搬送、検査法の確立、検査結果の解析など解決すべき課題が多い。

京都市は結核対策としてこれまで、①15歳以上の結核健診の受診率向上、②接触者健診の実施、③DOTS (Directly Observed Treatment, Short-course, 対面服薬確認治療) 事業による服薬支援の充実、④市民への普及啓発、などを行ってきた。しかし京都市の平成15年以降における前年と比べた結核罹患率の減少率は一定ではなく、結核対策評価指数として用いられている発見の遅れ、治療成績判定の中の成功、脱落・失敗の割合は全国より劣っている。ゆえにこれまでの京都市の結核対策事業を検証し、根本的な対策を再構築することが必要であるとの認識のもとに、平成19年10月に京都市結核対策推進プロジェクトチーム (PT) を発足させ、結核対策基本指針を策定した。京都市PTの活動と、平成22年からVNTR法の導入を試みたので報告する。

#### 京都市の結核対策推進プロジェクトチーム (PT) の取り組み<sup>1)</sup>

平成24年までに京都市の結核罹患率を18以下、喀痰

塗抹陽性の肺結核罹患率を8以下に低減することを基本目標として設定した。①発生予防と啓発普及、②早期発見対策の推進、③接触者健診の徹底、④適正医療の推進、⑤患者管理の充実、⑥発生動向調査の精度向上、について各項目の基本目標と具体的対策を策定した。PTは、①結核発生動向検討グループ、②接触者健診検討グループ、③DOTS・コホート検討グループ、により構成され、各グループが目標を達成するための具体的対策を策定した。発生動向検討グループは結核登録者情報システムの精度管理と入力率の向上を目的に、入力項目の定義を統一し入力状況をチェックした。入力項目の中では特に各保健センターにおける培養検査結果と薬剤感受性検査結果の把握率100%を目標に入力状況をチェックした。平成21年の培養検査結果把握率は100%であった。

#### RFLP分析の応用例

平成15年から19年の5年間にわたる居酒屋を発端とした集団感染の1事例を経験した。集団感染発見の発端であった患者は、平成16年6月に肺結核と診断された居酒屋店長の38歳男性。初発患者は、居酒屋店長の診断7カ月前に肺結核と診断された居酒屋の常連客の36歳の女性と考えられた。この居酒屋の常連客、従業員を中心にその家族、友人などの疫学調査を行ったところ、計15人が結核を発症していた。この中で菌株を確保できた発症者11人についてRFLP分析を行った。その結果、発症者を含む8例のRFLPのパターンが一致したが、3例は発症者とは一致しなかった。最終的に疫学的解析とRFLPの結果から12例が同一感染源による発症と判断した<sup>2)</sup>。集団感染が疑われ積極的疫学調査の対象者の接触者健診から発病者が発見されたとしても、同一感染源によらない発病者が含まれる可能性がある。したがって極力菌株を保存し分子疫学的解析を行うことが重要である。

結核の集団感染例について、感染源の特定や集団感染の範囲決定にRFLP分析が有用であることは報告されている<sup>3)</sup>。しかしRFLP分析は結果を得るまでに時間を要するretrospectiveな解析であり、接触者健診を実施する初期の段階で結果を反映することは困難である。

#### 京都市におけるVNTR法の導入

京都市では平成22年から分離された結核菌を用いて京都市衛生環境研究所微生物部においてVNTR法を試行的に開始し、平成22年12月に結核菌病原体遺伝子検査

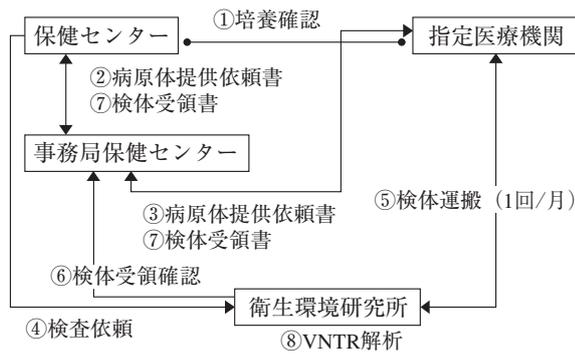


図 1-1 京都市 VNTR 検査の流れ (結核菌→衛生研究所)

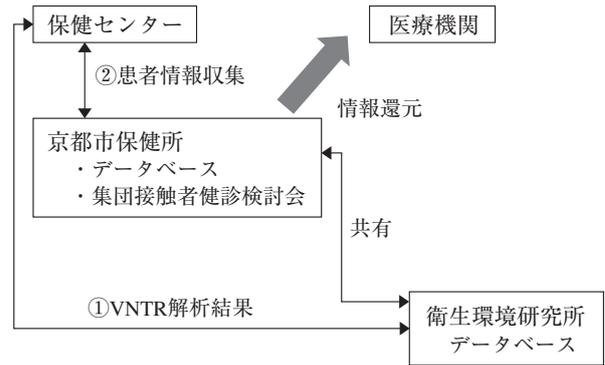


図 1-2 京都市 VNTR 検査の流れ (解析結果→保健所, センター)

表 京都市における VNTR 型別解析の結果

クラスター番号	株数	年齢 (中央値)	69歳未満の人数	行政区数
Cluster 2	2	74-82 (78)	0	2
Cluster 3	11	18-84 (77)	5	4
Cluster 4	2	84-97 (91)	0	1
Cluster 5	4	78-90 (83)	0	4
Cluster 6	2	71-89 (80)	0	2
Cluster 7	2	83-84 (84)	0	2
Cluster 8	2	58 (58)	2	1
Cluster 9	4	61-88 (72)	1	2
Cluster 10	3	35-62 (48)	3	3
Cluster 11	5	46-83 (71)	2	4
Cluster 12	3	22-91 (90)	1	3
Cluster 13	2	78-85 (82)	0	2
Cluster 14	2	62-87 (75)	1	2
Cluster 15	2	79-93 (86)	0	2

解析調査事業要綱を策定し平成23年1月から事業を開始した。喀痰塗抹陽性患者を対象とし、患者から分離・培養された結核菌を回収し遺伝子検査を実施する。なお塗抹陽性ではなくても結核菌が培養された場合も検査対象に含めることを可能にした。協力医療機関は結核病床を有する感染症指定医療機関を主とし、結核菌を保管し協力が得られる医療機関も含めた。VNTR検査は京都市衛生環境研究所微生物部においてJATA(12)-VNTR解析法を用いて行った。京都市におけるVNTR検査の流れを示す(図1)。なお京都市は各11行政区における保健センターが結核事業を行っている。指定医療機関との事務調整機能を行う4カ所の事務局保健センターを定めた。患者登録地の各保健センターは①結核菌培養陽性を確認すると、②「結核菌病原体提供依頼書」を事務局保健センターに送付する。③事務局保健センターは、各保健センターから送付された「結核菌病原体提供依頼書」を月1回まとめて、一括して管轄する感染症指定医療機関へ送付する。保健センターは「結核菌病原体提供依頼書」を事務局保健センターに送付後、④「検体送付書」を衛生環境研究所へ送付し検査を依頼する。⑤検体は衛生環

境研究所が指定医療機関から研究所へ搬送する。⑥衛生環境研究所は検体を受領すると「検体受領書」を事務局保健センターへ送付し、次いで⑦事務局保健センターから指定医療機関へ送付する。VNTR検査結果は衛生環境研究所が患者登録地の保健センターに検査結果を送付する。VNTR検査結果の一覧は衛生環境研究所においてデータベースとして登録し、京都市保健所と共有する。

平成22年10月から平成23年12月までの間に144株の結核菌を対象にVNTRの分析を行った。144株中130株が分析可能であった。2株以上のVNTRパターンが一致したクラスターは14存在し、クラスター形成を認めた株は46株、クラスター形成率は35%であった。それぞれのクラスターに含まれる菌株数、クラスターに含まれた患者の年齢、年齢が69歳未満の人数、行政区数を表に示す(表)。

考 察

結核の接触者健診の目的は、①潜在性結核感染症の早期発見と進展防止、②新たな発病者の早期発見、③感染源および感染経路の探求、の3点である<sup>4)</sup>。接触者健診

を実施するには行動調査や検査所見に基づく実地疫学的解析が基本である。感染症における病原体の遺伝子型解析は感染源の特定、感染経路の解明など公衆衛生的対策に有力な手法である。結核菌の遺伝子型を分析する方法には古くからRFLP分析法が用いられてきた。われわれも、RFLP分析法は集団発生において発病者間の疫学的リンクの解析に有用であることを報告した。しかしながらRFLP分析法は菌株の識別能に優れた方法であるが、手技が煩雑で解析に時間と熟練を要し、施設間での比較が困難であるなどの欠点があることが知られている<sup>5)</sup>。結核菌の全ゲノムの解読により多型縦列反復領域 (VNTR) が存在することが発見された。VNTR法はPCR法により特定領域の繰り返し配列数を算出することにより結核菌の型別判定を行う。VNTR法はその迅速性やデジタル表示による解析の容易さから結核菌の分子疫学の第一選択と考えられており、日本においてはJATA (12)-VNTRは型別解析の標準法とされている<sup>6)</sup>。積極的疫学調査における結核菌の分子疫学調査の重要性は「結核の接触者健康診断の手引きとその解説」平成22年度改訂版に記載され<sup>4)</sup>、また平成23年の「結核に関する特定感染症予防指針の一部改正」に分子疫学的手法からなる病原体サーベイランス構築に努めることが盛り込まれている。

VNTR法を結核の公衆衛生的対策に応用するためにはVNTR検査体制を構築する必要がある。そのためには、①結核菌の培養結果の把握、②結核菌をVNTR検査を実施する地方衛生研究所へ搬送、③検査結果のデータベース化、保健所や医療機関へ通知、などのステップが円滑に連動する体制が必要である。京都市では平成22年に本庁課 (保健衛生推進室・保健医療課) が中心になり保健センター、医療機関、京都市衛生環境研究所間で協議しVNTR検査実施要項を策定した。VNTR検査を行うためには発生届のあった患者の培養結果を把握することが必須である。京都市は結核対策推進プロジェクトチームの活動の一環として、培養検査結果と薬剤感受性検査結果を100%把握することを目標にし、100%近い把握率を達成したことがVNTR検査の導入に役立った。

平成23年のVNTR解析結果から144株中46株が14のクラスターを形成していた。接触者健診によりクラスター内の患者間に疫学的リンクが明らかであった1クラスターを認めたが、それ以外のクラスターの中の患者間では特に疫学的関連性は証明できなかった。接触者健診を

進める経過中にVNTRの検査結果により結核菌の遺伝子型を把握することは、感染源の判定、集団発生の判定、接触者健診の範囲決定に有力な科学的根拠を寄与する。VNTR検査結果を蓄積し、サイズが増加するクラスターについてはVNTRの追加解析と実地疫学調査を追加し、疫学的解析を行い結核対策に役立てることが必要である。また、京都市と近畿地区のデータベースとを比較することにより大きな規模の結核感染との関連性を解析することが可能である。今後VNTR検査を推進するためには、①結核菌の培養結果の確実な把握、②源患者と接触者の十分な疫学調査、③VNTR結果の迅速な接触者健診への反映、④追加領域解析の適応、⑤結核菌のサーベイランス分析に必要な実地疫学調査、⑥医療機関・行政・研究所間の連携構築、などが課題である。

京都市における接触者健診におけるVNTR法の導入について報告した。VNTR法による分子疫学的手法は接触者健診や結核の公衆衛生的対策に有力な科学的根拠を提供することが示唆された。

研究協力者：有本晃子 (伏見保健センター)、江口菜未子、荒賀陽子、石橋るみ子 (京都市保健所)、渡辺和義、清水麻衣、木澤正人、梅垣康弘 (京都市衛生環境研究所)

## 文 献

- 1) 伊藤正寛, 江口菜未子, 石橋るみ子, 他: 京都市における結核対策推進プロジェクトチームの活動. 日本公衆衛生学会雑誌. 2012; 59: 755-761.
- 2) 有本晃子, 谷口隆司, 松井祐佐公: 居酒屋を発端とした結核集団感染の一事例. 結核. 2009; 84: 430. (第84回総会抄録)
- 3) 長嶺路子: 新宿区内の全結核患者に対するIS1600 RFLP分析の実施と評価. 第83回総会シンポジウム「分子疫学研究の進歩と対策への応用」. 結核. 2009; 84: 61-63.
- 4) 石川信克, 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年度改訂版. 結核予防会, 東京, 2010.
- 5) 前田伸司, 和田崇之: 抗酸菌の分子疫学解析とその応用. Medical Technology. 2008; 36: 170-175.
- 6) 前田伸司, 村瀬良朗: 結核菌の反復配列多型 (VNTR) 標準分析法の確立と型別情報データベースの構築. 第84回総会ミニシンポジウム「結核菌分子疫学の展望」. 結核. 2009; 84: 784-786.

#### 4. 接触者健診における結核分子疫学調査およびQFT検査の活用

神戸市保健所 藤山 理世, 松林 恵介, 水尻 節子, 樋口 純子  
 白井 千香, 片上 祐子, 千原三枝子, 伊地智昭浩  
 神戸市環境保健研究所 有川健太郎, 中西 典子, 岩本 朋忠

##### はじめに

神戸市は人口約154万人、面積約553 km<sup>2</sup>の政令指定都市である。従来、全国平均より罹患率が高く、平成23年全国罹患率18.2に対し神戸市は24.6で、新登録患者数は神戸市380人である。

平成11年に厚生省が「結核緊急事態宣言」を発表した当時、神戸市の結核罹患率は57.9であった。そのため、全市的に結核対策を強化すべく、平成12年に「神戸市緊急5カ年結核対策指針」を策定して対策25の事業を推進し、平成16年に罹患率は36.1まで低下した。当初より、調査研究の項目を掲げ、平成15年から結核菌の分子疫学調査を開始した。また二次感染の防止として、接触者健診の受診率向上にも力を入れた。「第二次神戸市5カ年結核対策指針」にも調査研究事業、蔓延の防止対策として受け継いだ。平成22年度からは「神戸市結核予防計画2014」において厚生労働省の特定感染症予防指針に則し「原因の究明 調査研究の継続」を7大項目の第1に掲げ、接触者健診は「神戸市結核予防計画2014」の7大項目の第2に「発生の予防及びまん延の防止—患者の早期発見・早期治療」として100%受診を目標に掲げ、取り組んでいる。

##### 結核菌の分子疫学調査

神戸市で分子疫学調査を開始した平成15年度には、1つの病院から1年分あるいは半年分まとめて菌株の譲渡を受けていた。近年では分子疫学調査に基づく情報を接触者健診にも活用できるよう、多数の医療機関の協力を得て速やかな菌株収集に努めている。接触者健診は患者発見から約2カ月後に実施されるため、登録2カ月後の菌株収集・分析をめざしている。

平成24年4月までに市内約1800の結核菌株の分析をVNTR法 (JATA12 + HV4 locus) で行い、189のクラス

ター形成を認めている。クラスターサイズは2~19である。年齢別にクラスター形成率をみると、高齢者より、若年者のほうでクラスター形成率が高い傾向にある (Table)。このことは、高齢者は過去に別々に感染を受けていたのが、高齢となって発病してきていることを示していると考えられる。クラスターサイズの大きい株については感染力が強い可能性を考え、接触者健診を慎重に検討している。しかし、これまでにクラスターサイズの大きい結核菌が検出された例の接触者健診で、多数の感染者が発見されたという事実はない。やはり、環境因子も大きいという印象をもっている。

また、1つの集団において同時に複数の患者が発見された場合、接触状況や発病時期から、感染が集団内で広がったものかどうか実地疫学的に検討するが、菌の分子疫学的調査結果が一致するかどうかは重要である。不一致であれば、偶然の同時発見と考え、個々の患者について接触者健診を検討すればよい。実際、神戸市では約3000人の集団で、同じ日の健診で2名、ほぼ同時に有症状で1名の患者が発見されたことがあった。実地疫学的には接点がなく、万一3名が同じ結核菌の感染であれば、動線が交差した可能性のある食堂を利用する者全員に拡大して接触者健診を行う必要性が考えられた。各々喀痰または気管支洗浄液で結核菌が培養され、分子疫学的に3名の菌は異なっていたため、偶然の同時発見と判断し、接触者健診は塗抹陽性の1名についてのみ行うこととし、3000人の中でも日頃一緒に行動することの多かった22名 (20代) にQFT検査を実施した。1名がQFT陽性で、発病はなく潜在性結核感染症 (LTBI) 治療を行った。

##### QFT検査の活用

神戸市では平成17年11月よりQFT検査の接触者健診での活用を開始、当初は研究として同意の得られた接触

Table Clustering rate/age group

Age group	≥ 80	79-70	69-60	59-50	49-40	39-30	30>
No. of strains	416	457	315	241	145	118	130
Clustering rate	23.6	27.8	44.8	50.2	55.2	54.2	54.6

No. of strains: 1845 (2002-2012, April) No. of clustered strains: 712 (JATA12 + 4HV)  
 Clustering rate: 38.6% (Maximum size, 19)

者についてツ反と併用して検査を実施した。開始当初から現在まで各区保健福祉部（保健センター）で採血し、神戸市環境保健研究所で検査という体制で実施している。接触者健診において、QFT検査はBCGの影響を受けず、採血して*in vitro*で検査できるという利点がある。平成17～19年の神戸市での研究で、接触度（接触状況をスコア化したもの）を指標にツ反と比較してQFT検査のほうが有用であることが示唆された（Fig.）。ただし、いつ感染したのかは判断できないこと、感度特異度は100%ではないこと、また免疫能の未熟な小児の問題、既感染率が高いと考えられる高齢者の問題等をよく認識して、初発患者の咳の程度や接触状況、対象者側の因子を考慮に入れて検査結果を総合的に判断すべきである。昭和40年代、神戸市の罹患率は約600であったことを考えると既感染率は全国に比し高い可能性も考えられ、一応60歳未満という年齢制限を設けてQFT検査を行うこととしている。また「結核の接触者健康診断の手引きとその解説」に則して、接触状況の濃厚な者からQFT検査を実施し、その事例での感染者が多数みられた場合には健診を拡大し、LTBIの発見、発病予防に努めている。QFT検査の対象者を検討し、また解釈する際には接触状況が一番重要であり、それをスコア化した接触度＝[対象者のcaseとの関係]×[caseの感染性]×[曝露環境]×[曝露期間（月）]は接触者健診の検討の際に目安になると考えている<sup>2)</sup>。

## まとめ

神戸市では分子疫学調査の結果を集積し、接触者健診に役立てたり、クラスターサイズの大きい菌や外国からの菌に注目したり、少しずつ活用してきている。しかしながら、まだまだ解明できない感染経路も多く、情報の還元も不十分である。結核菌は環境に存在するわけではなく、発病してしまった患者さんからのみ提供されるか

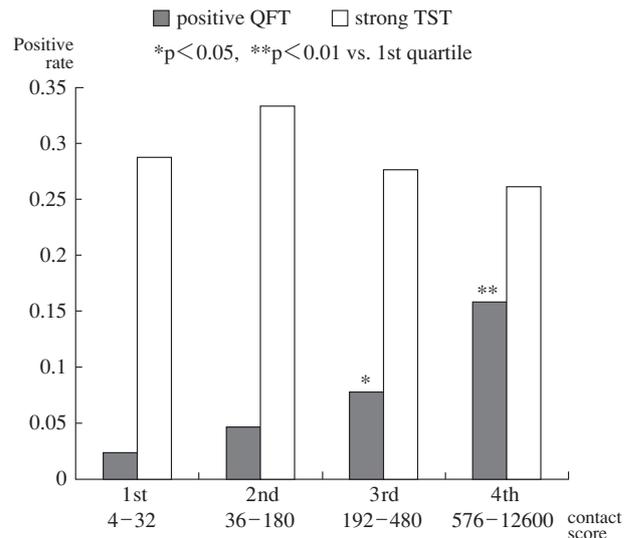


Fig. Frequencies of subjects with strong TST and positive QFT in the quartile groups of contact score

けがえのないメッセージである。無駄にすることなく、分子疫学調査を継続し、次世代の結核予防対策に役立てていきたい。QFT検査はBCGの影響を受けない優れた検査であるが、まだまだ歴史が浅く、不明な点も多い。接触者健診においては初発患者および接触者の全体の状況を考慮に入れ、QFT検査を活用すべきである。

## 文 献

- 1) 岩本朋忠：結核菌分子疫学の成果と挑戦。結核。2011；86：917-921.
- 2) 岩本朋忠，藤山理世，白井千香，他：分子疫学情報の蓄積から示唆される多発性大規模感染事例の存在とその検証。結核。2010；85：411。（第85回総会抄録）
- 3) 藤山理世，樋口純子，白井千香，他：新しい結核感染診断法QFT-2Gの有用性—接触者健診における「接触度」を用いたツベルクリン反応検査との比較検討。結核。2011；86：869-877.

## 5. 結核分子疫学による疫学動向の推察

神戸市環境保健研究所 岩本 朋忠

### はじめに

結核患者発生の背景は様々であり、その発生要因に応じた公衆衛生的対応により、結核対策は有効かつ効率的なものになるであろう。例えば、①直近の感染による発病（地域内感染拡大・集団感染の危機）、②地域外（外国等）での感染による発病（地域外からの菌の流入）、③遠い過去に感染した菌の再燃による発病（患者個人の内

因性再燃）などは、公衆衛生的に区別して考慮すべきものといえる。このような患者発生要因の背景の違いの特定に、科学的なエビデンスを提供しうるのが、地域内結核分子疫学である。

わが国の結核罹患率は10万対19.0（2010年）であり、未だ中蔓延状態にあるといわざるをえないが、徐々に低蔓延すなわち10万対10以下の状況に近づきつつある。結核罹患率の減少により、特定の感染リスクが牽引する

特徴的な感染事例の存在が浮き彫りになるものと考えられる。分子疫学により、菌の遺伝型を科学的根拠として地域内の結核蔓延状況を精査することで、感染リスクが牽引する特異な事例の検出・抽出が可能となるであろう。つまり分子疫学は、低蔓延化時代においては従来からの感染連鎖の特定のみならず、感染リスクの解明のための強力なツールとして、効果的な結核対策の推進に大きく寄与するものと考えられる。

### 広域多発性感染を引き起こす株

結核は、ヒトからヒトに伝播し、感染から発病にいたる時間経過が数カ月から時には数十年と多岐にわたっている。そのため一般の感染症とは異なり、感染様式の実態を把握するためには、時間的・空間的に巨視的な観点が必要となる。つまり、一地域あるいは短期間の調査では一過性の集団感染もしくは単なる散发例としか処理されないが、巨視的にみると単一の株が大規模な感染伝播を広域的・長時間的に引き起こしている事例が存在しているものと推察される。このような株は感染拡大におけるハイリスク株となる可能性があり、その精査が必要といえる。従来の集団感染事例とは異なる概念として扱われるべきものであり、ここでは、「広域多発性感染」と呼称することにする<sup>1)~3)</sup>。関東地方で大規模な感染拡大が確認されたストレプトマイシン耐性のM4株は<sup>4)</sup>、全国各地でも検出されており、広域多発性感染の1例といえる。

Fig. 1は神戸市において2002年から実施している地域内分子疫学により見出されたクラスター形成株の分布をまとめたものである。クラスターサイズの上位7タイプ

について菌株分離年ごとの検出数をみると、いずれのクラスター形成株も、ほぼ毎年のように検出されており、その結果クラスターサイズが拡大し続けていることが分かる。最大のクラスターサイズ(19株)を形成しているのが、上述のM4株である。このような広域多発性感染の背景には、同一クローン株の地域内定着と複数の感染伝播経路の存在が推察されるが、その解明は今後の課題である。また、集団感染を引き起こした株が時期と場所を変えて再び集団感染を引き起こした事例を神戸市では経験している。この事例も、広域多発性感染事例としてとらえることができるであろう。今後、結核罹患率の低下を背景にして、分子疫学調査の充実により、広域多発性感染の検出例は増加してくるものと思われる。それらの事例は、現在のわが国における結核感染伝播の実態を反映するものであり、その理解を深めることで、今後の結核対策に新たな方向性が提示できるものと期待される。現在われわれは、生物学の世界に新たな技術的ブレークスルーをもたらした次世代シーケンサー(Next Generation Sequencer)を活用することで、全ゲノム情報に基づく分子疫学、すなわちゲノム疫学への展開を図っており<sup>5)</sup>、広域多発性感染事例の詳細な解明を目指している。

### 海外からの流入株

国内での結核患者の数が減少してくると、相対的に外国人結核の数の増加が顕著となる。欧米諸国では海外からの移民による結核患者が国内での全結核患者の半数以上を占める例も珍しくはなく、結核低蔓延化時代では国際的視野に立った対策なくして国内の結核問題は解決しないといえる。

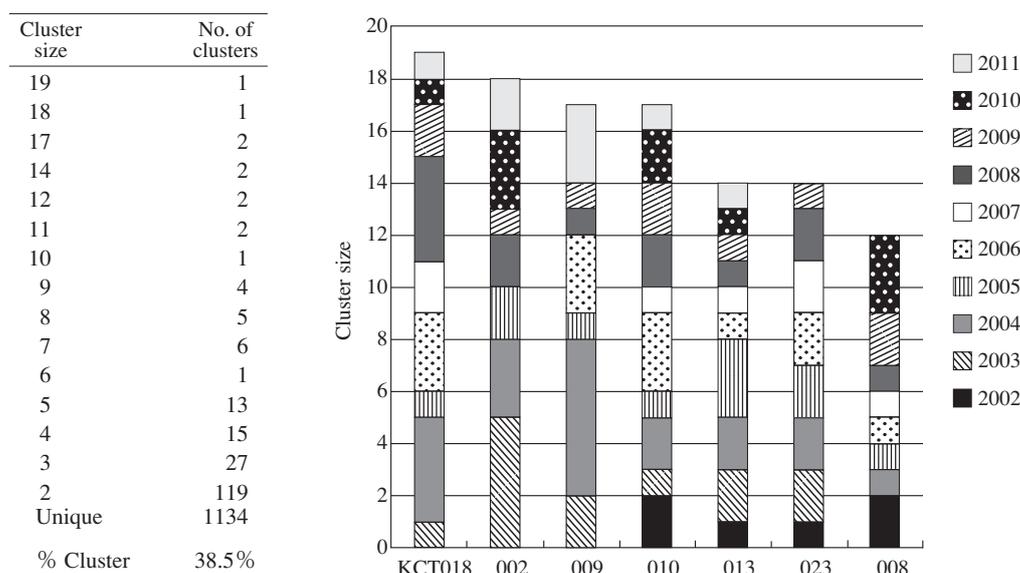


Fig. 1 Distribution of cluster forming strains in Kobe

神戸市での外国人結核を、東アジア諸国出身者と東アジア以外の国出身者に分けて菌株の遺伝系統別にその分布状況をまとめた (Fig. 2)。東アジア以外の地域出身者 (インド, ネパール, ベトナム, タイ, フィリピン, インドネシア, ドイツ, ブラジル) に着目すると, 検出された結核菌の遺伝系統のほとんどは, それぞれの出身国における主要な遺伝系統を反映しており, 神戸市およびわが国で高度に蔓延している北京型株の割合はきわめて低いことが明らかとなった。また, 遺伝型別解析 (VNTR 解析) から神戸市民由来株と一致する株はわずか2株のみであった。従って, これらの結核患者のほとんどは母国で感染し, 神戸市への移住後に発病したものと考えてよいであろう。一方, ベトナム人3名から北京型株が検出された。このうちの1名は, 上述の広域多発性感染事例に属する遺伝型であり, 神戸市で感染・発病したことが強く示唆される。他の2名は同一遺伝型を示すことから, ベトナム人コミュニティ内での感染伝播が起きている可能性が推察される。

東アジア地域出身者をみると, 分離された結核菌のほとんどがこの地域に高度に蔓延している北京型に属する遺伝系統であった。北京型株は亜系統レベルでは中国・韓国・日本で分布状況が異なることが知られている<sup>6)</sup>。すなわち, 中国では新興型の北京型株 (modern type), 韓国では初期祖先型の北京型株 (early ancient), そして日本では後期祖先型の北京型株 (late ancient) が優占して

いることがこれまでの研究から明らかになっている。神戸市における東アジア出身者由来株においても, 亜系統群の分布は各出身国の状況をほぼ反映したものであることが分かった。遺伝型別解析結果からも上記の東アジア以外の国からの移住者の場合と同様, これらの患者についても, その大部分は母国での感染後, 神戸市で発症したものと推察される。一方, 多剤耐性結核菌に着目すると, これまでに海外からの流入を強く示唆する事例が3件あり, そのうちの1株では外国人同士での感染伝播のみならず, 日本人へ感染・発病したことが, 遺伝型別解析から強く示唆された。神戸市が構築した結核菌サーベイランス体制により検出された事例であり, 今後の感染拡大に対する監視が引き続き重要であることは言うまでもない。

以上のことから, 神戸市在住の外国人結核のほとんどは本国で感染し, 日本で発病したものと考えられる。また, それらの株はクラスターを形成していないことから, 神戸においては現在までのところ海外流入株の地域内感染拡大は起っていないものと推察される。しかしながら, 少数ではあるが外国人由来株と神戸市民由来株の遺伝型が一致する例も認められており, 監視体制をますます強化する必要がある。

#### 遺伝型別 (VNTR) データを活用した地域間連携

各自治体レベルで徐々に浸透・定着しつつある結核菌

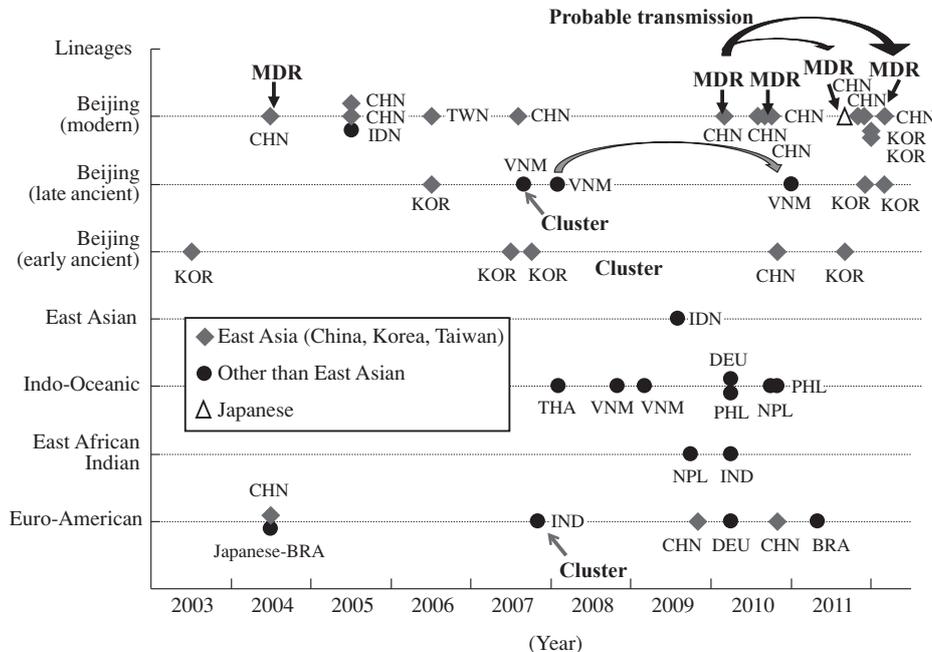


Fig. 2 Molecular epidemiology of TB in foreigners in Kobe

MDR: multi-drug resistant

CHN: China TWN: Taiwan IDN: Indonesia KOR: Korea VNM: Vietnam THA: Thai  
DEU: Deutsch PHL: Philippine NPL: Nepal IND: India BRA: Brazil

分子疫学は、今後、自治体の枠を超えた地域間連携すなわち広域的なクラスター解析の実現へと展開するものと期待される。実際に近畿圏においては、各地域でのVNTR解析において、コアセットとして共通性のあるJATA 12ローカセットを用いた地域間データ比較の構築に向けた取り組みが具体的に進められている。ただし、JATA 12ローカセットのみでは菌株の識別能力が不十分であり、広域的なクラスター解析がもたらす結果の解釈には限界があることは十分に留意しなければならない。低蔓延化時代に突入するわが国においては、分子疫学の重要性がますます高まることは明白であり、新時代を見据えた地域間連携への取り組みを「今」始めることの重要性をここであらためて強調しておきたい。

### ま と め

過去10年余りにわたる結核菌分子疫学研究ならびに地域分子疫学事業の成果は、結核感染様式の解明と感染連鎖の特定のみならず、病原体（結核菌）の進化・系統発生、集団遺伝学的研究、遺伝的多様性の解明など多方面にスピノフしている。また、結核菌の全ゲノム解析が小規模な研究グループで可能となった現在においては、結核菌分子疫学がゲノム疫学へと発展するのには、それほど時間はかからないであろう。様々な研究領域が

さらなる発展を遂げ、その成果が有機的に結びつくことで、結核菌という病原体に対する理解が深まり、革新的な結核対策、診断、治療へと繋がることを願っている。

### 文 献

- 1) 岩本朋忠, 藤山理世, 白井千香, 他: 分子疫学情報の蓄積から示唆される多発性大規模感染事例の存在とその検証. 結核. 2010; 85: 411. (第85回総会抄録)
- 2) 田丸重貴, 和田崇之, 長谷 篤, 他: 大阪府における多発性広域感染株について. 結核. 2010; 85: 411. (第85回総会抄録)
- 3) 和田崇之, 團野 桂, 松本智成, 他: 多発性大規模感染株による多剤耐性化事例について. 結核. 2010; 85: 403. (第85回総会抄録)
- 4) 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. 2010; 10: 79.
- 5) 岩本朋忠: 結核菌分子疫学の成果と挑戦. 結核. 2011; 86: 917-921.
- 6) Kang HY, Wada T, Iwamoto T, et al.: Phylogeographical particularity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in South Korea based on international comparison among surrounding countries. J Med Microbiol. 2010; 59: 1191-1197.

## ————— The 87th Annual Meeting Symposium —————

### HEALTH EXAMINATION IN FUTURE AT THE ERA OF LOW TUBERCULOSIS INCIDENCE —From Contacts Examination toward Active Epidemiological Studies—

Chairpersons: <sup>1</sup>Hideo MAEDA and <sup>2</sup>Chika SHIRAI

**Abstract** Japan is still “intermediate burden” country as medium-incidence of tuberculosis (TB). But the incidence of TB varies by public health units. The priority for TB control would be lowering in the areas where the incidence of TB is relatively low. In addition, younger age groups get low prevalence of TB infection than elderly persons. As a result, fewer experiences for TB diagnosis and treatment in the hospital and the medical facility would cause the delay in the detection of TB patients which eventually cause outbreaks. Although there are differences in population density and population mobility between urban and rural areas, the socially economic vulnerable patients and foreign patients are the common risks. Any public health units’ policies of TB should correspond to the individual situation. At the era of low tuberculosis incidence, the infection risk is to be “From ubiquitous to the uneven distribution”. This makes TB detection much more difficult.

At this symposium, each speaker presented the case for

actually experienced with QFT test and/or VNTR analysis. They mainly focused on the paradigm shift in TB control which is indispensable for resolving the gaps in regional differences and the differences in diagnostic capability. Although the cases in this symposium were not for the low incidence situation, the pioneering approaches presented here would boost the future application of QFT and VNTR analysis nationwide. The discussions also partially covered the technical infrastructure for molecular epidemiology which covers the whole country. By making full use of QFT test and VNTR analysis as a contact screening tool, we can appropriately understand the risk of TB infection in the region from a buildup of bacteria and patient information. Now is the time to prepare for. Active surveillance of TB by this way would clarify the risk of the disease and lead to the advocacy essential for the resolution.

1. Current situation and challenge of contact survey by using QFT test in Tokyo: Hideo MAEDA (Bureau of Social Welfare and Public Health, Tokyo Metropolitan Government)

2. Contact investigation of a tuberculosis outbreak: Kenichi MIYAMOTO (Takaido Community Health Center)

We have experienced a TB outbreak in integrated junior and senior high school in Tokyo. Index patient was a student with persistent respiratory symptoms for six months before diagnosis of sputum smear-positive TB. Public health center started contact investigation immediately. QFT-positive rates were high in close contacts, especially in classmates. Additionally, a student outside of contact investigation was diagnosed as TB and considered to be infected from the first patient by VNTR analysis. Therefore, public health center expanded QFT-tests to all students and teachers in this school. Finally, 9 students and 2 teachers in this school were diagnosed as sputum smear-negative TB by contact investigation.

3. Utilization of molecular epidemiological procedure in contact investigation in Kyoto City: Masahiro ITO (Public Health Center of Kyoto City)

Molecular epidemiological procedure using VNTR analysis has been used for contact investigation of tuberculosis since January 2011 in Kyoto City. One hundred forty four strains of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with tuberculosis were investigated and 130 strains were fully analyzed. Fourteen clusters were found and the number of strains included in the cluster was ranged from two to 11. Epidemiological relationship between patients in one cluster was found, however, significant relationship in another clusters was not demonstrated. It was suggested that VNTR analysis is useful for molecular epidemiological analysis of tuberculosis.

4. The population based molecular epidemiological studies and QFT test in a contact examination: Riyo FUJIYAMA, Keisuke MATSUBAYASHI, Setsuko MIZUSHIRI, Junko

HIGUCHI, Chika SHIRAI, Yuko KATAGAMI, Mieko CHIHARA, Akihiro IJICHI (Kobe City Public Health Center), Kentaro ARIKAWA, Noriko NAKANISHI, Tomotada IWAMOTO (Kobe Institute of Health)

The population based molecular epidemiological studies should be made good use of contacts examination. In future, we expect the tuberculosis molecular epidemiological study improve search for the process of tuberculosis infection.

The QFT positive rates correlated well with closeness of contact. QFT test is considered useful for diagnosing tuberculosis infection. However, in the judgment of tuberculosis infection, we should consider the total result of contact investigation not only QFT test but also the contact situation.

5. Insights into the TB epidemiology through population based molecular epidemiological studies: Tomotada IWA-MOTO (Kobe Institute of Health)

The population based molecular epidemiological studies unveiled the transmission dynamics of tuberculosis at bacterial clone level. This provides scientific evidences for achieving better TB control programs. In the advanced stage of the tuberculosis molecular epidemiological study, we expect to change the current geno-typing based molecular epidemiology to whole genome-typing based molecular epidemiology on the basis of the rapid innovation of next-generation sequencing technology.

**Key words:** Contacts examination, QFT test, VNTR analysis, Low-incidence

<sup>1</sup>Bureau of Social Welfare and Public Health, Tokyo Metropolitan Government, <sup>2</sup>Public Health Center of Kobe City

Correspondence to: Chika Shirai, Public Health Center of Kobe City, 6-5-1, Kanou-cho, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo 650-8570 Japan.

(E-mail: chika\_shirai@office.city.kobe.lg.jp)