

結核分子疫学調査の手引き 第一版

2017年9月修正版

略語一覧

AMK: amikacin (アミカシン)

BCG: Bacille de Calmette et Guérin (ウシ型結核菌ワクチン株)

CAM: clarithromycin (クラリスロマイシン)

CDC: Centers for Disease Control and Prevention (疾病管理予防センター)

CPFX: ciprofloxacin (シプロフロキサシン)

CPM: capreomycin (カプレオマイシン)

CS: cycloserine (サイクロセリン)

EB: ethambutol (エタンブトール)

INH: isonicotinic acid hydrazide/isoniazid (イソニコチン酸ヒドラジド/イソニアジド)

KM: kanamycin (カナマイシン)

MDR-TB: multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (多剤耐性結核菌)

MGIT: Mycobacterium Growth Indicator Tube

NGS: Next generation sequencer (次世代型シーケンサー)

PCR: polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)

PZA: pyrazinamide (ピラジナミド)

QFT: QuantiFERON-TB (クオンティフェロン TB)

RFLP: restriction fragment length polymorphism (制限酵素断片長多型)

RFP: rifampicin (リファンピシン)

VNTR: variable numbers of tandem repeats (反復配列多型)

WGS: Whole genome sequencing (全ゲノムシーケンス)

WHO: World Health Organization (世界保健機関)

XDR-TB: extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (超多剤耐性結核菌)

著者（執筆順）

加藤誠也 公益財団法人結核予防会結核研究所所長
瀧井猛将 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部副部長・結核菌情報科長
大角晃弘 公益財団法人結核予防会結核研究所臨床疫学部部長
藤山理世 神戸市保健福祉局保健所担当部長中央保健センター長
玉井清子 株式会社ミロクメディカルラボラトリー代表取締役社長
岩本朋忠 神戸市環境保健研究所感染症部部長
村瀬良朗 公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科科長代理
山本香織 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所 微生物部 微生物課
瀬戸順次 山形県衛生研究所微生物部 主任専門研究員
阿彦忠之 山形県健康福祉部 医療統括監

謝辞

執筆をご担当頂いた先生方には、深甚の感謝を申し上げます。

なお、本手引き書は平成 28 年度国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 研究開発課題「地域における結核対策に関する研究」(主任研究者:石川信克)の分担研究課題「結核病原体サーベイランスシステム構築に向けた広域分子疫学評価と検査精度保証」(分担研究者:御手洗聡)の一部として作成されたものである。

連絡先

分担研究者:御手洗 聡

〒204-8533

東京都清瀬市松山 3-1-24

結核予防会結核研究所抗酸菌部

利益相反（COI）

本指針の著者全員は、本研究に関して、「厚生労働科学研究における利益相反（Conflict of Interest : COI）の管理に関する指針」（平成 20 年 3 月 31 日付科発第 0331001 号厚生労働省大臣官房厚生科学課長決定）及び「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について」（平成 26 年 4 月 14 日付科発第 0414 第 5 号厚生労働省大臣官房厚生科学課長決定）の示す利益相反について、報告すべき事項を有さない。

接触者健診に関連する基本用語解説

感染性期間の始期

結核の初発患者が接触者に結核を感染させる可能性のある期間を「感染性期間」とよび、その始期を示す。感染性期間の始期を正確に判断することは困難であり、実際上は患者の症状出現時期や検査履歴から推測する。現在では基本的に「結核診断日の3ヶ月前、または初診時の胸部X線検査で既に空洞所見を認めた例では初診日の3ヶ月前」を始期と考える。

(接触者健診の手引き 改訂第5版)

集団感染

結核集団感染は「1人の感染源が2家族以上にまたがり、20人以上に感染させた場合を言う。ただし発病者1人は感染者6人と見なして、感染者数を数える」と定義され、この定義に当てはまる事例は国に報告するようになっている。

(新結核用語事典)

結核菌遺伝子型

結核菌がもつ遺伝子の構成のこと。ジェノタイプ。(型別法の詳細は本文)

三種病原体等

感染症法が定める特定病原体等の一種。結核菌の場合、以下の要件を満たしていることが三種病原体の定義となる。

次に掲げる薬剤に対し耐性を有するものに限るものとする。 (法第6条第22項第2号及び令第1条の4関係)

- 1) イソニコチン酸ヒドラジド
- 2) リファンピシン
- 3) オキフロキサシン、ガチフロキサシン、シプロフロキサシン、スパルフロキサシン、モキシフロキサシン又はレボフロキサシン
- 4) アミカシン、カナマイシン又はカプレオマイシン

1)と2)は必須、3)と4)は各薬剤のいずれかに耐性であれば良い。

(感染症法)

四種病原体等

上記三種病原体等以外の結核菌

病原体カテゴリーA・カテゴリーB

輸送上の用語で、感染性物質を分類するカテゴリーである。輸送でいう感染性物質とは、「病原体を含むことがわかっているか、それが合理的に予想される物質」である。また病原体とは「ヒトあるいは動物に疾病を引き起こすことができる微生物およびその他の物質」、と定義されている。感染性物質はカテゴリーA とカテゴリーB に分類され、カテゴリーA は「その物質への曝露によって健康なヒトまたは動物に恒久的な障害や、生命を脅かすような、あるいは致命的な疾病を引き起こす可能性のある状態で輸送される感染性物質」を指す。国連番号 UN2814 が適用される。結核菌の生菌はカテゴリーA である。対してカテゴリーB はカテゴリーA に該当しない感染性物質で、UN3373 が適用される。

(感染性物質の輸送規則に関するガイダンス 2013-2014 年版)

ポリクロール感染

異なる遺伝子型の複数の結核菌による感染を指す。異なる菌種の感染は混合感染。

Polymerase Chain Reaction (PCR)

ポリメラーゼ連鎖反応と訳される、人為的な遺伝子増幅反応。基本的に 2 本のプライマーセットを用いて、そのプライマー配列に挟まれている遺伝子配列をプライマーの領域を含めて増幅する。1 つの標的遺伝子を基本的には 2^n (n は増幅サイクル数) 倍するので、30 サイクルで 10^9 程度となる(実際の効率は 100% でないので、ここまでは増えない)。

北京型結核菌

1995 年の van Soolingen らの中国での調査で明らかとなった遺伝学的に近接した結核菌群の総称。同じ論文でモンゴル、韓国、タイでも多く分離されることが示されており、東アジア地域に優位と報告されている。現在では世界的に分布が拡大している遺伝子系統である。

(van Soolingen D, et al.. J Clin Microbiol 1995; 33: 3234–3238.)

バイオリスク管理

バイオセーフティとバイオセキュリティを合わせた概念である。バイオセーフティは、微生物や毒素などの物質がヒトや他の生物体にもたらすリスクである生物災害の防止のために行う対策の総称である。一方バイオセキュリティとは防護・監視を要する重要な生物材料への不正アクセス、紛失、盗難、濫用/悪用、流用、意図的な放出を防止するための対策の総称である。

(WHO Biorisk management: Laboratory biosecurity guidance, 2006)

目次

略語一覧.....	2
著者.....	3
謝辞.....	4
利益相反.....	5
接触者健診に関連する基本用語解説.....	6
要約.....	10
序文.....	12
第1章 結核対策における結核分子疫学の役割.....	13
1-1 日本の結核対策における分子疫学調査の位置づけ	13
1-2 結核対策における分子疫学の役割	13
第2章 結核分子疫学調査の関係機関.....	16
2-1 保健所	17
2-1-1 分子疫学調査のアレンジメント	17
2-1-2 結核菌の確保と運搬.....	17
2-1-3 結核菌遺伝子型分析結果の報告	18
2-2 検査機関（病院検査室+検査センター）	19
2-2-1 結核菌の運搬	19
2-2-2 結核菌の同定	21
2-2-3 結核患者の報告	22
2-3 地方衛生研究所	23
2-3-1 結核菌の確保と運搬	23
2-3-2 結核菌遺伝子型分析	23
2-3-3 結核菌遺伝子型分析の報告	25
2-4 結核研究所（レファレンスラボとしての役割）	29
2-4-1 結核菌型別分析法の指導・講習会の実施.....	30
2-4-2 結核菌型別分析の支援（個別相談等）	30

2-4-3 結核菌型別分析の精度保証	30
2-4-4 結核菌株の取扱と長期保管	32
第3章 結核菌の検査.....	34
3-1 結核菌株の分離・保存・輸送法	34
3-1-1 結核菌の分離	34
3-1-2 結核菌の保存.....	34
3-1-2-1 結核菌の保存方法.....	34
3-1-3 結核菌の輸送	35
3-1-3-1 生菌の輸送.....	35
3-1-4 DNA の抽出と輸送	35
3-1-4-1 DNA の抽出法	35
3-1-4-2 DNA の輸送	36
3-2 反復配列多型 (VNTR) 分析法.....	36
第4章 結核菌遺伝子型分析結果の報告.....	44
4-1 分析から報告までの期間	44
第5章 結核菌遺伝子型別情報を用いた疫学調査.....	47
5-1 追加の疫学調査の要否	47
5-1-1 結核登録票記載事項の比較検討.....	48
5-1-2 新たな感染ルートの検索	49
5-1-3 疫学調査結果の分類	49
5-1-4 分子疫学調査によって得られる公衆衛生上の利益.....	50
5-1-5 今後の分子疫学調査の展望	51
第6章 結核菌遺伝子型別情報を用いた接触者健診等の実施事例	53
おわりに.....	61
Q&A.....	62

要約(加藤誠也)

2011年に改正された「結核に関する特定感染症予防指針」において、接触者健診や外国出生者結核患者の国内の感染に対する影響を検証するために、分子疫学的手法を用いた調査・研究が推奨されている。

結核対策における分子疫学の役割には、①接触者健診における感染経路の証明、②疫学的に疑いがもたれなかった感染経路の発見、③再燃(古い感染からの発病)と新しい感染の鑑別、④再発と再感染の鑑別、⑤薬剤耐性の推定、⑥検査室における汚染の解明、⑦感染状況の解明などがあり、今後、研究の進展によって、感染性・病原性が強い菌株を特定することができるようになれば、さらに結核対策上の有用性が高まると期待される。

地域における分子疫学調査を円滑に実施するためには、患者の疫学情報の収集とその分析を担う保健所、遺伝子型検査を実施する機関(地方衛生研究所)及び菌株を保存し遺伝子型検査実施機関に提供する医療機関あるいは検査センターの協力・連携体制を構築することが重要である。この構築にあたっては本庁結核対策担当課(あるいは保健所)のスタッフの分子疫学の意義に対する理解が重要である。さらに、関係協力機関には調査への協力の意義を感じられるように、得られた情報を還元する努力が必要である。

分子疫学調査の実施に当たって、まず重要なのは菌株の確保であり、保健所(あるいは地方衛生研究所)は医療機関あるいは検査センターが菌を廃棄する前に確保する必要がある。結核菌の運搬は関係法令やマニュアルに従って、国連規格容器及びジュラルミンケースを用いて適切に行う必要がある。死菌にして輸送する方が簡便であるが、追加の検査ができるように、なるべく生菌を確保し保存する。

結核予防会結核研究所は衛生微生物技術協議会のレファレンスラボとして結核菌分子疫学に関する研修と技術相談を行っている。また、検査実施機関においては、外部精度評価による分析精度の維持が望ましい。

VNTR解析の対象領域はJATA12, MIRU15などいくつかの組み合わせが使われている。JATA12は東アジアで多く分布している「北京型株」で分解能が高い領域の組み合わせで、簡便性、コスト、精度管理などに優れており、疫学的リンクがある患者間の感染源調査では、概ね菌株の異同を判断できる(ただし、地域で高頻度に出現する)VNTR型別には注意が必要である)。一方、病原体サーベイランスとして実施する場合には、VNTR領域を追加して分解能を高める必要がある。

一般的なアガロースゲルを用いたVNTR法は、①結核菌からのPCR鑄型の抽出、②VNTR領域のPCRと③アガロースゲル電気泳動・結果の解析の3つの作業となる。詳細は「結核菌VNTRハンドブック」を参考にする。分析結果の報告はできるだけ速やかに行うのが望ましいが、難しい場合には集団感染疑いや院内感染の検証など、緊急性の高い事例を優先する。特に分析を急ぐ事例では、液体培地の加熱死菌を入手する。

得られた遺伝子型分析結果の活用のためには、疫学調査結果と統合したデータベース構築の必要がある。また、疫学調査を担当する保健師が使いやすい形で分析結果を還元

することによって接触者健診に役立てることができ、その成果として疫学調査の向上につながる。

同一遺伝子型を認めた場合は、①患者間の最近の感染、②過去に同一流行株に感染した者が同時発病、③VNTR 分析の分解能の限界が原因で本来異なる菌株が同一パターンを示すと判定される場合があるので、疫学情報と合わせた検証が必要である。

疫学調査との検証はまず結核登録票の記載事項から、発症時期、感染性期間の始期、菌検査所見、薬剤感受性検査結果、感染・発病リスク、当該患者の接触の有無あるいは可能性（「場所」と「時間」の共有の有無）を検討する。患者等に対する再調査は難しい場合がしばしばであることから、医療機関、高齢者施設、学校、刑務所、パチンコ店、およびインターネットカフェなど各地域において結核感染伝播リスクの高い施設を予め設定しておき、疫学調査の際にもれなく聞き取りすると分析を進めやすくなる。

分子疫学調査を行うことによって公衆衛生上の利益として、患者の結核菌の遺伝子型の一致による疫学調査から推定された感染経路の科学的裏付け、集団感染事例の追跡、新たな感染リスク集団や未知の感染経路の探知がある。一方、結核菌の遺伝子型が一致しないことが示されることによって、散発事例であることの確認、特に施設内感染の否定ができ、接触者健診の範囲を適正に選択することが可能となる。これらによって、重点的に取り組むべき対策を明確にする根拠となる。

序文(瀧井猛将)

2011年に改正された予防指針では、国及び都道府県等は薬剤感受性試験及び分子疫学的手法からなる病原体サーベイランス体制の構築に努めることが記載され、本指針に基づいて、自治体において分子疫学調査体制の構築が進められている。2014年に公表された予防指針の中間評価等では、自治体の対策現場から検査の精度保証が未確立、疫学情報と菌情報の管理のあり方や自治体の枠を超えた情報の共有の問題など様々な課題、要望等が寄せられた。また、2016年11月に改正された予防指針では、分子疫学的手法を用いた病原体サーベイランスのさらなる推進に努めるように記載された。

結核菌分子疫学病原体サーベイランス推進の背景には、近年、結核菌の遺伝子解析技術が飛躍的に進歩してきた状況がある。同時に、結核の患者数の減少や、海外からの輸入結核など疫学的感染動態の変化に伴い、結核菌の感染ルートの分子疫学的解析の必要性が高まっているという背景もある。そのため、分離した結核菌を確保し、精度の高い検査による遺伝子情報、薬剤耐性情報等の収集・解析の重要性が高まっている。それらの検査結果は、積極的疫学調査の一環として結核のまん延の防止に大いに活用されるべきものである。

現在結核分子疫学調査における遺伝子型別法は VNTR 法が主流であり、衛生微生物協議会のハンドブックに技術的指針が示されている。本書は保健所、地方衛生研究所、医療機関を含めた分子疫学調査体制の整備とさらなる活用の推進を目指したものであり、前述のハンドブックと併せて活用して頂きたい。本書が全国の保健所、地方衛生研究所、医療機関、衛生検査所等で活用され、結核患者および感染者の効果的な発見と治療を通じた結核の早期制圧に活用されることを期待する。

平成 29 年 7 月 12 日

第1章 結核対策における結核分子疫学の役割(加藤誠也)

1-1 日本の結核対策における分子疫学調査の位置づけ

日本における結核菌の遺伝子タイピングは90年代になって、RFLPが1990年代から集団感染事例の確認等に用いられるようになった¹⁾。しかし、① 生きた結核菌を増菌培養して大量のDNAが必要であるため、結果を得るまでに時間がかかること、② 得られるデータがアナログデータであるために施設間の比較が困難な場合がある、などの問題があった²⁾。2000年に入って、上記の問題を解決したVNTRが使われるようになり、近年、多くの地方衛生研究所で実施されるようになった³⁾。

2011年に改正された「結核に関する特定感染症予防指針」(以下、予防指針)では「国及び都道府県等は、薬剤感受性検査及び分子疫学的手法からなる病原体サーベイランスの構築に努める必要がある」とされており、接触者健診における分子疫学的調査手法の活用、さらに「ハイリスクグループや感染が生じるリスクのある場を特定するとともに、感染経路の把握や海外からの人の移動が国内感染に与える影響を検証するため、分子疫学的手法等を用いた研究を推進することが必要である」と記載された。以上のように、国の方針として低まん延化を進めるにあたって、分子疫学的手法を積極的に取り入れる方向が明示されている。

近年、次世代シーケンサー(NGS)を用いた結核菌の全ゲノム解析(WGS)が使われるようになってきている。

1-2 結核対策における分子疫学の役割

結核対策における分子疫学調査・研究は以下のような役割がある。

① 接触者健診における感染経路の証明

保健所が患者発生時に実施する疫学調査で感染経路が疑われたとされた患者同士の結核菌遺伝子型が同一であれば、疫学調査結果が証明されたことになる。逆に同一でなければ、別の感染源から感染を受けた人がたまたま同時期に発症したこと(同時多発)が明らかになる。

② 疫学的に疑いがもたれなかった感染経路の発見

結核菌サーベイランスで実施された遺伝子型が一致し、相互の疫学調査の結果を照合した結果、関連が想定される場合、あるいは、追加調査によって感染経路が同定される可能性がある。追加調査実施することは容易でないことが多いため、普段からの疫学調査がより重要になるため、担当者の疫学調査実施の意識向上につながる。

③ 再燃(古い感染からの発病)と新しい感染の鑑別

高齢者施設、病院、刑事施設をはじめとするハイリスクグループが集団的生活をする場において複数の患者が発生した場合、それらの患者が相互の感染によって発病したのか、過去の感染からの再燃が同時期に発症したのかの鑑別のために有用である。日本では再感

染発病はまれと考えられてきたが、高齢者施設における再感染を含む集団感染事例が報告されている⁴⁾。

④ 再発と再感染の鑑別

再治療例の中に、初回治療からの結核菌による再燃が多いと考えられ、この場合は初回治療時に検出された結核菌と再治療時の結核菌の遺伝子型は同一となる。一方、高齢や免疫状態が低下する要因がある場合には新たな感染源から再感染を受けて発病する例があり、この場合には、初回治療と再治療時の結核菌遺伝子型は異なったものになるので、両者の鑑別が可能である⁵⁾。

⑤ 薬剤耐性の推定

培養をベースにした薬剤耐性検査は時間がかかるが、感染源となる患者が薬剤耐性で接触者の結核菌遺伝子型が同じで感染を受けたことが明らかになっている場合には、当該患者も同様の薬剤耐性を持っている可能性が高いと考えられることから、早期から適正な治療を行うことができる。

⑥ 検査室における汚染の解明

同一医療施設で同時期に結核患者の届出が多発して、患者の菌の遺伝子型が一致しているにも関わらず、臨床像及び疫学調査結果と整合しないような場合には、検査室における結核菌の汚染が解明される場合がある。

⑦ 感染状況の解明

分子疫学調査を地域におけるサーベイランスで実施することによって、地域の感染状況に関する情報が得られる。例えば、結核菌の遺伝子型から起源が推定できる場合があり、近年増加傾向にある高まん延国出生者の日本国内における感染伝播の影響等が明らかにできる可能性がある。また、地域における年齢階層あるいは特定グループにおける結核菌遺伝子型をモニターすることによって、特定の遺伝子型の菌が増加を続ける場合には、病原性・感染性が高い菌がグループ内でまん延しつつある可能性がある。

⑧ 今後の期待

菌株に特異的な特性(感染力・病原性)に関する研究が進められているが、その解明が進むと、以下のように結核対策に貢献することが期待される。感染力や病原性が強い菌株を特定することができれば、接触者健診の範囲の設定や臨床現場での対応に応用することができる。世界の地域毎の菌株の特徴がより明確に区別されるようになれば、それぞれの地域における外国出生者の疫学状況に与える影響をより明瞭に示すことができるようになる。

【参考文献】

1. 高橋光良. 結核分子疫学の成果と展望. 結核 2002; 77: 741-752
2. 前田伸司. 沖縄県での長期にわたる RFLP 分析の成果と課題. 結核 2006; 81: 694-696
3. 岩本朋忠, 藤山理世, 田中賀子他. 結核対策行政での分子疫学データの活用. 結核

2006; 81: 703-705

4. 岩本信一, 矢野修一, 西川恵美子他. 高齢者での外来性再燃が確定できた老人福祉施設における結核集団感染事例の検討. 結核 2016; 91: 451- 455
5. 松本智成. 結核菌分子疫学解析法を用いた大阪における外来性再感染の考察. 結核 2006; 81: 87- 90

第2章 結核分子疫学調査の関係機関(大角晃弘)

ある地域内で結核分子疫学調査を実施するためには、その地方自治体における結核対策担当課、保健所、医療機関、衛生検査所(いわゆる検査センター)、遺伝子型別分析の実施機関(地方衛生研究所等)が協力する体制が必須である。

地方自治体の結核対策担当課(あるいは保健所)は、地域内で結核分子疫学調査を実施するための体制整備と関係諸機関との連絡・調整の役割を持つ。保健所は、結核登録患者からの疫学情報収集、接触者健診の対象者範囲検討と実施を担う。分離培養される結核菌の運搬、遺伝子型分析結果報告は、自治体の方針によって保健所あるいは地方衛生研究所が担当している。本調査を実施するための予算及び人員の確保については、各地方自治体が管轄地域における結核対策の一環として実施すべきこととされているが、地方自治体を越えた広域の結核分子疫学調査を実施するためには、情報共有するための枠組みの構築等が必要である。結核菌が分離培養された患者からの本調査への参加に関する同意書の取得については、本調査が感染症法第15条に基づく積極的疫学調査の一環として実施するものであることを各地方自治体が明らかにすれば、基本的には患者からの同意書の取得は不要である。

医療機関・検査センターは、本調査の趣旨をよく理解した上、結核菌が分離培養された場合、その菌株の確保と遺伝子型検査実施機関(地方衛生研究所等)への検体送付に協力する必要がある。2015年5月以降、三種病原体として、その保管および運搬に厳重な管理体制を要する結核菌は、INH、RFP、フルオロキノロンおよび注射薬(AMK、KM またはCPM)に耐性の菌(いわゆる、超多剤耐性結核菌)とされており(健感発0407第9号平成27年4月7日 厚生労働省健康局結核感染症課長通知)、それ以外の多剤耐性結核菌は、一般の結核菌と同様に四種病原体として取り扱うこととなっている。

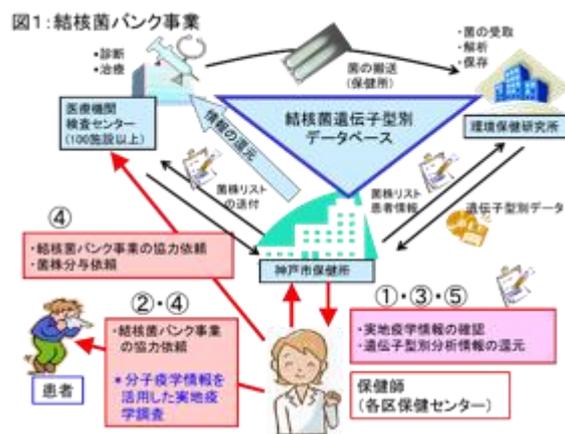
結核菌遺伝子型分析を実施する検査機関(地方衛生研究所等)は、結果を速やかに担当保健所にフィードバックする役割を持つ。保健所にフィードバックする情報については、保健所の担当者がよく理解できる情報として提供し、連絡を密に行うことにより、不明な点はすぐに解決されるように支援する必要がある。さらに、分離培養される結核菌の保存や、結核菌遺伝子型分析の精度保証の実施も極めて重要である。

わが国において、地方自治体を越えた地域、さらに全国の結核分子疫学情報を共有するための体制は未構築である。今後、国および地方自治体関係者により、より広域における結核分子疫学情報の共有体制が構築されることにより、地方自治体関係者が、効率的な結核対策を実施するための情報が提供されることを目指す必要がある。

2-1 保健所(藤山理世)

2-1-1 分子疫学調査のアレンジメント(図1及び図1の説明)

分子疫学調査における保健所の主な役割は関係機関の調整、そして分子疫学情報と実地疫学情報との統合である。まず、結核菌株の収集にあたり、患者の診療にあたる医療機関、菌株を実際に扱う検査室あるいは検査機関、菌株の保存、及び、解析を行う地方衛生研究所などとの間で、菌株のやり取りができるように各々の部署に説明して協力を依頼する必要がある。そのためには、まず保健所のスタッフが分子疫学調査の目的と意義を理解すべきである。国の「結核に関する特定感染症予防指針」に「薬剤感受性試験及び分子疫学的手法からなる病原体サーベイランスの構築に努める必要」が明記されているにも関わらず、着手できないのは有用性が実感できないからであると考えられる。自治体の規模や患者数にもよるが、これからの低まん延の時代に向け、データベースを構築し、感染経路の解明の道筋をつけておくことは大変重要である。より低まん延になるほど、個々の自治体だけの問題でなく、全国的に分子疫学調査を実施することが重要となる。したがって、現在未実施の自治体においては、すでに実施している自治体の事例をスタッフに紹介して、分子疫学に対する理解を深め、各機関への協力を求めるべきである。個人情報については法定事項として提供をお願いし、また分子疫学調査も地域の積極的疫学調査として行われるもので、個人情報には守られることも伝える。協力関係機関には情報の還元が重要で、それにより調査に協力することの意義が感じられたなら、一層協力体制が進む。患者の検体から培養される結核菌はかけがえのないもの、廃棄せずに保存すべきものである。



結核菌バンク事業(図1の説明)

【菌株バンクの対象】

全ての結核で培養が陽性となった場合

保健師・看護師の結核展覧102
Vol.51 No.2 p7-14参照

【取り組み】

- ① 研修会の実施(事業の目的・方法の共有)
- ② ビジブルの項目(実施疫学情報)聞き取りの充実
- 【例】職業(退職前も含む)、国籍・入国年数、外国生まれかどうか、受診経過など
- ③ 診査会訪問時にビジブル項目の確認
- ④ 菌バンク事業への協力依頼の口頭説明文の作成
- ⑤ クラスター形成の情報・リストをタイムリーに各区保健センターへ還元し情報の共有を図る

2-1-2 結核菌の確保と運搬(簡易版・詳細は総説を参照)

分子疫学調査はまず結核菌株を確保することから始まる。検査機関などでの結核菌の保管期間は感受性試験が終わってから1か月程度のところが多いので、培養陽性で診断がついて発生届が出てくる場合は急がないと菌が廃棄されてしまうので注意が必要である。かけがえのない検体であり保存が重要である。一方で感染症法上特定病原体等に指定され

ている結核菌は適切な管理を必要とし、リストを作って検体の受け渡しを行う。リストは新登録患者名簿から作成する。培養が生えたかどうか、感受性試験結果がどうであったかを確認し、超多剤耐性菌(三種病原体等)ではないことを確認する。超多剤耐性菌であれば、搬送方法は大きく異なるので確認が必要である(詳細は別項)。検体は破損しないように、国連容器を用意し、検査室で検体の中に入れてもらったら、途中で開けたりせず、検体を扱える施設まで運ぶ。またはゆうパックで、注意事項を遵守し、適切に梱包して送ってもらう(詳細は別項)。

2-1-3 結核菌遺伝子型分析結果の報告

結核菌遺伝子型分析結果の報告は、下記の3段階からなる。

- 1) 実際に遺伝子型分析を行う地方衛生研究所などから保健所への報告
- 2) 保健所から現場の保健師への報告
- 3) 保健所から各医療機関への報告

1)については、データベースをどこで管理するかということも含め、常に情報交換ができる体制を整えるべきである。遺伝子型分析を実施する施設からの分析結果と保健所からの感受性試験の結果や実地疫学的情報を統合して管理し、その結果を解析していく。神戸市では患者登録番号を介して分子疫学調査の結果と、サーベイランスの情報とをエクセルファイル上で結び付けて、両者を統合して情報を共有して管理している。

保健所としては接触者健診の検討に必要な実地疫学的情報の把握に努める(図2, 3)。その際、後日菌の分子疫学的解析により、新たな情報の確認が必要になったときのことも考えて、聞き取りのポイント(図4)をおさえて情報を得ておく。

2)について、タイムリーに解析結果を送付し、保健師が使いやすい形で分析結果を還元する。接触者健診に役立てることができ、さらなる実地疫学情報の向上につながる。クラスターを形成しているかどうかの情報還元が重要である(図5, 6)。

図2: 実地疫学情報の把握

図4: 実地疫学調査時の聞き取りのポイント

通勤・通学	1有 2無
入院・入所	1有 2無
通院・通診	1有 2無
社会的活動	1有 2無
福祉サービスの利用	1有 2無
よく利用する店	1有 2無
半感染集団(若年者)と接触	1有 2無

聞き取りの重要な箇所

聞き取りのポイント

- * 日中によく行くところは?
- * 夜によく行くところは?
- * 休日によく行くところは?
- * 習い事やサークルに行ってますか?
- * 地域の行事には参加しましたか?

3)について、患者を診療し菌の提供を協力してくれる医療機関への情報還元も重要である。分子疫学調査としての遺伝子型分析は、あくまでも法に基づく疫学調査として実施するもので、医療機関からのオーダーによる検査と異なり、個々の結果を返すわけではないことをあらかじめ説明し理解を得ておく。地域の疫学情報としての情報還元により、結核菌の遺伝子型別解析の意義を理解し、さらなる菌株の提供、実地疫学情報の提供につながる。それぞれの情報交換がスムーズにできること、その結果わかることを、結核対策に役立てることが保健所の役割である。

図5: 分子疫学調査後の情報の還元1

2012年8月解析株リスト																
Social No.	菌株番号	JATA CLUSTER	KCT CLUSTER	Cluster size	発症番号	氏名	性別	生年月日	住所	登録時年齢	ENH	RFP	SM	EB	外国人	出身国
501894	FV74KI0046	JATA228	KCT216	5	201281200092		1		北区	63						
501895	FV74KI0047	JATA228	KCT216	5	201281200093											
501896	FV74KI0048	JATA019	KCT	1	201281200093											
501897	FV74KI0049	JATA	KCT	1	201281200093											
501898	FV74KI0050	JATA064	KCT064	6	201281200045											
501899	FV74KI0051	JATA001	KCT004	12	201281200045											
501900	FV74KI0052	JATA	KCT	1	201281200055				北区	80						
501901	FV74KI0053	JATA036	KCT	1	201281200079											
501902	FV74KI0054	JATA055	KCT045	5	201281200094											
501903	FV74KI0055	JATA	KCT	1	201281200089				高槻区	35						
501904	FV74KI0056	JATA	KCT	1	201281200090				東淀川区	67						
501905	FV74KI0057	JATA	KCT	1	201281200091											
501906	FV74KI0058	JATA	KCT	1	201281200096		2		清洲区	95						
501907	FV74KI0059	JATA	KCT	1	201281200091				西区	85						
501908	FV74KI0060	JATA227	KCT	1	201281200093				西区	19						

※1 このリストに患者さんが載っている場合は必ず「菌株あり」と記入してください。さらに「KCT CLUSTER」もリストにある場合はこの番号も記入してください。
 ※2 ENH/RFP等の薬耐感受性結果欄の数字の見方(1:耐性、2:感受性、3:未実施、4:不明)
 ※3 住所(区)は登録時のものになりますので、転入により現在の居住区と異なる場合があります。

図6: 分子疫学調査後の情報の還元2

2012年8月新規クラスター形成株リスト															
Social No.	菌株番号	KCT CLUSTER	Cluster size	発症番号	氏名	性別	生年月日	住所	登録時年齢	ENH	RFP	SM	EB	外国人	出身国
501909	FV74KI0012	KCT210	3	201281200079		2		北区	54	2	2	2	2		
501910	FV74KI0046	KCT210	3	201281200092		2		北区	63						
501911	FV74KI0047	KCT210	3	201281200093		2		北区	63						
501912	FV74KI0048	KCT210	3	201281200093		2		北区	63						
501913	FV74KI0049	KCT210	3	201281200093		2		北区	63						
501914	FV74KI0050	KCT210	3	201281200093		2		北区	63						
501915	FV74KI0051	KCT210	3	201281200093		2		北区	63						
501916	FV74KI0052	KCT210	3	201281200093		2		北区	63						
501917	FV74KI0053	KCT210	3	201281200093		2		北区	63						
501918	FV74KI0054	KCT210	3	201281200093		2		北区	63						
501919	FV74KI0055	KCT210	3	201281200093		2		北区	63						
501920	FV74KI0056	KCT210	3	201281200093		2		北区	63						
501921	FV74KI0057	KCT210	3	201281200093		2		北区	63						
501922	FV74KI0058	KCT210	3	201281200093		2		北区	63						
501923	FV74KI0059	KCT210	3	201281200093		2		北区	63						
501924	FV74KI0060	KCT210	3	201281200093		2		北区	63						

このリストは、今月解析した菌株の中で新たにクラスターを形成した患者リストになります。結核者健診の際の患者調査に活用してください(未知の感染経路がないかどうか)。

【参考文献】

保健師・看護師の結核展望 102 Vol.51, No.2 p7-14

2-2 検査機関 (病院検査室+検査センター) (玉井清子)

2-2-1 結核菌の運搬

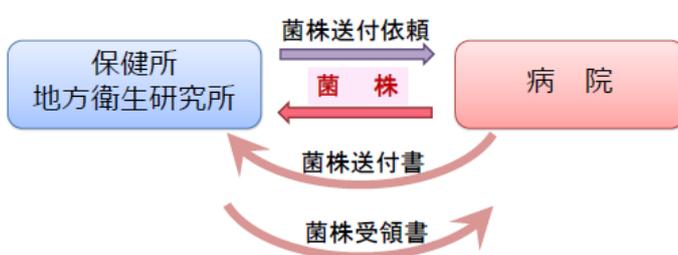
四種結核菌の運搬については、車などを利用して運搬する場合とゆうパックにて送付する場合とがある。結核菌の運搬については、感染症法に基づき運搬の基準や運搬体制等

について定めた「特定病原体等の安全運搬マニュアル」などに基づいた厳格な対応を行わなければならない。感染症法「特定病原体等の四種病原体等、カテゴリーA」の方法に従って行う。詳しくは、厚生労働省のホームページの「特定病原体等の安全運搬マニュアル」や結核研究所のホームページに結核菌運搬方法の記載があるので確認し、正しい方法にて運搬することが大切である（特定病原体等の安全運搬マニュアルは http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/7_01.pdf#search=%27 から入手可能）。特に三種病原体等（多剤耐性結核菌の一部：XDR-TB 相当）を運搬する場合は、警察・公安委員会の許可が必要である。輸送の際には法令を遵守し、個別に対応を確認する。一般施設が実施することは困難であるが、専門業者に依頼することができる。

結核の届出があった段階で、保健所または地方衛生研究所より病院または検査センター宛に「結核菌株が分離された場合には行政機関宛に菌株を送付してほしい」旨の連絡があることが望ましい。病院、または外注先検査センターによって結核菌の保管期間に違いがあるためである。特に病院では、感染症法上結核菌保管の申請をしていないと 1 週間以内に菌株を破棄することとなっている。結核菌保持の届け出をするか否か、各施設であらかじめ

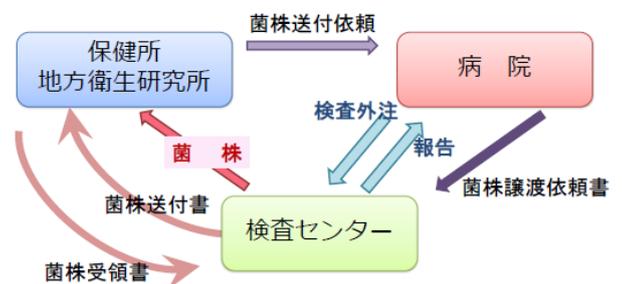
菌株送付イメージ図 1

(病院と保健所・地方衛生研究所)



菌株送付イメージ図 2

(病院と検査センター ⇄ 保健所・地方衛生研究所)



め決めておく必要がある。また外注先検査機関により結核菌を保管している期間に違いがある(数週間から半年程度)ので、事前の情報収集が必要である。

- ① 菌株の保管: 結核菌株を保管する場合は鍵の掛かる場所に保管し、定期的な点検を行い、その記録を残す。特に三種病原体(多剤耐性結核菌の一部: XDR-TB)を保管・使用する場合には、三種病原体取扱い施設の届け出が必要である。また保管・使用・破棄・譲渡の記録を作成して運用する。
- ② 容器: 国連規格容器(国連番号 UN2814 用)およびジュラルミンケース(ゆうパックの場合)を使用しなければならないので、購入して常備しておく。包装責任者: 厚生労働省および都道府県にて開催される「特定病原体等の運搬に関する講習会」(包装責任者の講習会)を受け、包装責任者を届け出る必要がある。
- ③ 手続き: 書式は各施設それぞれではあるが、菌株を送付する場合には、「菌株送付書」および「菌株受領書」を作成して利用する。菌株送付書は、「誰が、何時、どこに、何を、

何株」送付したかの内容を記載して菌株とともに送付する。また菌株受領書は、「誰が、何時、どこで、何を、何株」受領したかの内容を記載して菌株の送り元の機関に返送する。各施設にて、菌株送付書・菌株受領書の記録は残すことが大切である。

- ④ 患者情報：各県や地方衛生研究所によって対応が違うが、患者情報を付記する場合と、指定された番号のみで菌株および菌株リストを送る場合がある。具体的な連絡を取り合うことが必要である。
- ⑤ 輸送容器の返却、および送付時の送料：菌株を送付する場合の送料、および輸送容器の返却方法、また輸送容器の用意の方法についての打ち合わせを行う。

2-2-2 結核菌の同定

結核菌群は、*M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. africanum*、”*M. canetti*”^{*}、*M. caprae*、*M. microti*、*M. pinipedii* で構成されている。これらの菌は分子系統学的に非常に似通った菌であるため個々の菌を区別することが難しい。通常は「結核菌群」として届け出て結核菌のみを同定している訳ではない。本邦で臨床的に分離される結核菌群のほとんどが結核菌(*M. tuberculosis*)である。しかしながら、結核菌群の中で時に区別が必要となるのは、結核菌とBCGとの鑑別である。この鑑別は、結核研究所抗酸菌部、または一部の病院、地方衛生研究所および一部の検査センターで行っている。

統計によると、肺結核患者のうち塗抹陽性は約40%、培養陽性は約80%である。検査材料の喀痰などからPCR法にて結核菌群が陽性となっても、培養が陰性であれば菌株を入手できない場合がある。また、肺のレントゲン写真や臨床症状から肺結核と診断されるものの、排菌されないと同定や菌株入手が不可能なケースもある。

一般的に行う保険適用可能な結核菌同定検査法の一覧を表1にまとめるので参照されたい。

その他の同定方法としては、16S rRNA 領域やその他のハウスキーピング遺伝子を増幅し、シーケンスにて得られた遺伝子配列をデータベース上で比較し、99%以上の相同性で同一菌種とする方法がある。

*未承認種であるため””表記

表1 国内において体外診断用医薬品として保険収載されている結核菌群同定可能キット

製品名	販売元	検出原理	検体対象		注意点
			臨床検体	菌液	BCG株、偽陽性を示す菌名
コバス TaqMan MTB	ロシュ・ダイアグ ノスティックス株 株式会社	TaqMan PCR	○	○	

TRCRapid M.TB	東ソー株式会社	TRC	○	○	※(1)
TRCReady M.TB	東ソー株式会社	TRC	○	○	
Loopamp 結核 菌群検出試薬 キット	栄研化学株式 会社	Lamp 法	○	○	
GENECUBE MTB	東洋紡株式会 社	Q-probe 法	○	○	
DNA プローブ 「FR」-MTB	極東製薬工業 株式会社	TMA+HPA	○	×	※(1)
アキュプローブ 結核菌群同定	極東製薬工業 株式会社	HPA	×	○	※(1)
DDH マイコバ クテリア‘極東’	極東製薬工業 株式会社	DDH	×	○	※(1)
キャピリア TB- Neo	株式会社タウン ズ	免疫クロマトグラフ法	×	○	※(2)
キャピリア TB	日本ベクトン・デ イツキンソン	免疫クロマトグラフ法	×	○	※(3)

2016年10月現在

※(1) : *Mycobacterium shinjukuense*

※(2) : *M. bovis* BCG のうち Tokyo 株, Russia 株, Moreau 株

※(3) : *M. bovis* BCG のうち, Tokyo 株, Moreau 株, Russia 株, Sweden 株, *M. marinum*

2-2-3 結核患者の報告

結核とは、結核菌群 (*Mycobacterium tuberculosis complex* ただし *Mycobacterium bovis* BCG を除く) による感染症である。結核は感染症法における届出対象疾患の二類に分類され、診断後ただちに届出なければならない全数報告の疾患である。そのため結核菌が検出された場合には、速やかに医師へ報告しなければならない。特に注意しなくてはならないのは、検査センターにて結核菌が検出された場合である。突発的に結核菌が検出されたことを想定し、日頃より医療機関への緊急連絡先として電話番号・FAX 番号、および連絡方法を確認しておく必要がある。また検査センター内では、緊急報告対象の検査項目と結果をあらかじめ決め、検査員は内容を熟知して適切な対応がとれるようにしておく必要がある。

2-3 地方衛生研究所(岩本朋忠)

2-3-1 結核菌の確保と運搬

結核菌は一般的に病院検査室あるいは衛生検査所(検査センター)にて分離培養が行われ、結核菌群の同定についても当該施設で実施される。施設によっては分離培養同定した結核菌を保管しない(保管する場合であっても限定的期間)場合もあるので、必要に応じて保健所等と連携し、検査施設での分離株の確保をはかる。運搬については、生菌状態あるいは核酸化した状態で行う。それぞれの状態での輸送方法については、総説あるいは第3章「結核菌の検査」に記載されている。ただし、これも後述するが「ポリクローナル感染」が疑われる場合には生菌が必要となる。解析に用いた菌株の保存も地方衛生研究所の重要な役割であるので、可能な限り、生菌状態のサンプルを入手し、菌株の植継・保存に努めるべきである。

2-3-2 結核菌遺伝子型分析

VNTR 法は、遺伝子型別情報をデジタル表示、すなわち数字と記号で表示でき、多施設のデータとの比較が容易であるという利点を持つ。VNTR 分析法の詳細については第3章「結核菌の検査」で述べられているので、ここでは、実際に衛生研究所が分析を行うに当たり注意する点などについて記述する。

緊急報告対象とされる検査項目と結果

検査項目	検査結果
遺伝子検査 結核菌群 TaqMan MTB 法、TB-LAMP 法、TRC 法、TMA 法など	陽性
DDH 法	TB complex
結核菌群抗原(イムノクロマト法)	陽性
IGRA(QFT、T-spot)	陽性
質量分析装置	結核菌群の菌名

1. VNTR 型別表示の注意点

VNTR コピー数を単純に羅列した数列によるプロファイルの表現では、10 以上の繰り返し領域を含む場合、解析した領域の数とプロファイルの桁数が一致せず、VNTR プロファイルの誤認識を引き起こす危険性がある。つまり、1-12-2 という3つの領域の反復回数組み合わせは 1122 となり、1-1-2-2、1-1-22、11-2-2 など、異なる遺伝子型と混同される余地を含んでしまう。この問題を回避するために、VNTR プロファイルを表示するときには、通常、10 以上の数字を昇順にアルファベット順と関連付けて「10→A、11→B、12→C……」と表示変換している(下図参照)。

あるいは、各領域の繰り返し回数をハイフンでつなぎ「#-#-#-#-#・・・」と表示すれば、整数表示のままでもプロファイルの誤判定は回避できる。

Strain	JATA01	JATA02	JATA03	JATA04	JATA05	JATA06	JATA07	JATA08	JATA09	JATA10	JATA11	JATA12
菌株 A	3	3	3	3	8	4	7	2	5	11	13	4

↑ ↑
B D

数列表示:

33338472511134 → 14ケタの数列。解析領域数(12領域)より大きく、誤判定の危険有り。

333384725BD4 → 解析領域数と同じ桁数となるので、誤判定を回避できる。

3-3-3-3-8-4-7-2-5-11-13-4 あるいは3-3-3-3-8-4-7-2-5-B-D-4と表現してもよい。

エクセル上で VNTR プロファイルデータベース化してソーティング等の処理を行う場合には、1 セル内で数値として認識できるのは 15 ケタまでというエクセルの特性に注意願いたい。15 領域を超える VNTR プロファイルをエクセルシートで管理する場合には、数値情報ではなく文字情報として管理するか、あるいは、###-###-###のように 15 ケタ以内の数字をハイフンで連結して管理することで、この問題に対処できる。

2. データの施設間比較時の注意点

結核感染が広域にわたる場合、各検査施設間の解析結果の共有化が必要となる。VNTR領域のリピート数は、PCR産物をリピート数に換算するための換算表を用いて決められる(詳細は、第3章「結核菌の型別分析法」参照)。このため、施設間で使用している換算表に違いがあると、同一遺伝子型の菌株が、異なる遺伝子型と判断されて

しまう。この危険性を回避するために、施設間でのデータを比較する場合には、必ず、VNTRプロファイルが分かっている標準株(H37Rv株)のデータが施設間で一致することを確認したうえで、実検体のデータ比較を行う必要がある。精度管理用H37Rv株は結核予防会結核研究所より分与を受けることができる。他施設への結果報告の一例を下図に示した。

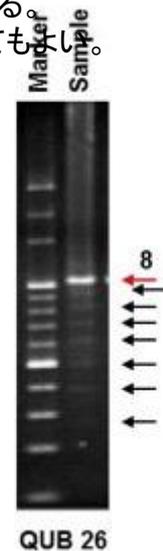


図. Stutter peakの例。黒矢印の部分にstutter peaksが検出されており、反復数を逆算出来ることが分かる。QUB 26領域の反復数8と判定。

ID	JATA(12)-VNTR No/Repeats												追加4領域				備考	
	JATA No.	J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12					
	locus	0424	0960	1955	2074	2163b	2372	2996	3155	3192	3336	4052	4156	3232	3820	4120		2163a
H37Rv(参照株)	Alias	t04	M10	t21	t24	Q11b		M26	Q15	M31		Q26					Q11a	
H37Rv(参照株)		2	3	1	4	5	2	3	4	3	8	5	3	4	3	2	2	
Kobe007		4	3	2	3	6	3	7	4	5	7	9	3	12	13	10	8	

3. ラダー状のバンドパターンの出現とその活用

VNTR 領域を対象とした PCR 産物を電気泳動すると、右図のようなラダー状の泳動パターンが得られることがある。実際の反復数を示すバンドとは明らかに異なる弱い輝度のバンドであり、stutter peak と呼ばれている¹⁾。反復配列を PCR 増幅する場合に発生するアーティ

ファクト(偽の増幅産物)であり、反復数が多い(分子量が大きい)時や反復ユニットのサイズが大きい領域で起こりやすいようである。この stutter peak を反復数算出に利用することで、分子量の大きな産物から正確な反復数を算出できる。

4. 一つの VNTR 領域内に複数の明瞭なバンドが検出されたときの対応

上記のラダー状に出現する stutter peak とは異なり、一つの VNTR 領域内に、輝度が明瞭なバンドが 2 本検出される場合がある(ダブルバンド)。この場合、VNTR プロファイルとしては、ダブルバンドを検出した領域で区別した 2 パターンのプロファイルを単一の分離株に割り当ててデータを管理する。例えば、JATA12 の 3 番目の領域(JATA03)に 4 と 5 のリピート数に相当する 2 本のバンドが検出された場合、2-3-4-2-2-6-7-8-5-6-3-4 と 2-3-5-2-2-6-7-8-5-6-3-4 の 2 パターンの VNTR プロファイルを一人の患者由来株に割り当てることになる。このような、1 領域のみで認められるダブルバンドは、単一の株が増殖する際に起きた VNTR 領域の複製エラーによるものと考えてよいであろう。

一方、2 本以上のバンドが複数領域(通常 3 領域以上)で検出された場合は、複数株による重感染(ポリクローナル感染)の可能性が高いと判断できる。このような場合は、Middlebrook 7H11 などの寒天プレート培地を用いて線画培養し、シングルコロニーを 5-10 個程度単離して個別に VNTR 解析を行うことで、患者体内に存在する複数の遺伝子型株を区別する。この場合も、一人の患者由来株に対して、複数の VNTR パターンを割り当て、管理することになる。

5. 増幅産物が検出できない場合

PCR 増幅不良が多数の領域で認められる場合は、鋳型として用いた DNA の質の問題や PCR の誤操作などが考えられるので、DNA を再抽出し、VNTR 解析をやり直す必要がある。一方、PCR 増幅不良が特定の領域のみで認められ、他の全ての領域では明瞭な輝度を示す PCR 産物が得られる場合は、再度、その領域のみ PCR 増幅を行う。PCR 増幅不良が繰り返し認められた場合は、その解析対象領域で非典型的な変化が起こった株であると考えられる。すなわち、解析対象となる VNTR 領域の欠落、あるいは結核菌が多数保有する 1.5kb 程度の長さの移動性の配列の挿入が起こった株である可能性が高い。解析対象領域の増幅産物無しという情報も、菌株の異同性判定のためのデータとして活用できる。このような場合、対象領域の反復数は、0'とか\$のように、他の整数とは異なる表記で VNTR プロファイルを記録しておくが良い。

2-3-3 結核菌遺伝子型分析の報告

結核菌の VNTR 解析で用いる解析対象領域は、結核研究所より提案された JATA 12 領域²⁾やフランス・パスツール研究所より提唱されている 15-MIRU (Supply's 15 領域)³⁾など、複数の領域の組み合わせがあり、それぞれの目的別に使い分けている。従って、VNTR 解

析結果を報告する場合は、解析した VNTR 領域名と合わせて VNTR プロファイルを報告する必要がある。また、報告する遺伝子型の意味についても理解しておく必要がある。ここでは、結果報告の際に有用となる情報や注意点についてまとめる。

1. VNTR 領域名

表に、わが国で汎用されている VNTR 領域と国際標準法である 15-MIRU 領域の名称、並びに、各領域のわが国の分離株における多様度をまとめた^{4,5)}。JATA 12 領域は国際的標準法として用いられている 15-MIRU-VNTR とは異なり、東アジア全域で優占している結核菌株「北京型株」において分解能が高い領域が選定されており、国内の標準法となっている。また、簡便性、コスト、精度管理などに優れており、結核分子疫学解析を未だ実施したことがない地方衛生研究所においても導入しやすいという利点がある。一方、より高い分解能が要求される感染源(菌株)の同一性・類似性にかかる解析では、12 領域のみでの適用・解釈が困難な場合もあり、そのような場合には、多様度の高い領域を組み合わせる菌株異同性を判定する必要がある。菌株識別力を高めるための追加領域としては、Q11a, V3232, V3820, V4120, Q18 が有用である。ただし、これらの領域で得られる PCR 産物は分子量が大きく、1000 base を超える場合も少なからずある。そのため、レポート数換算のための精度管理には、JATA12 領域に比べて、より高度な技術が必要になる。これらの領域の解析には、キャピラリーシーケンサーを用いたフラグメント解析が推奨される。

略称	Alias	Locus	多様度	VNTR set		
				JATA-12	15-MIRU	24 _{Beijing}
J01	JATA 1; Mtub04	424	低	x	x	x
J02	JATA 2; MIRU 10	960	低	x	x	x
J03	JATA 3; Mtub21	1955	低	x	x	x
J04	JATA 4; Mtub24	2074	中	x		x
J05	JATA 5; QUB-11b	2163b	高	x	x	x
J06	JATA 6; VNTR2372	2372	低	x		x
J07	JATA 7; MIRU 26	2996	中	x	x	x
J08	JATA 8; QUB-15	3155	低	x		x
J09	JATA 9; MIRU 31	3192	中	x	x	x
J10	JATA 10; QUB-3336	3336	中	x		x
J11	JATA 11; QUB-26	4052	高	x	x	x
J12	JATA 12; QUB-4156	4156	低	x	x	x
M04	MIRU 4	580	低		x	x
M16	MIRU 16	1644	低		x	x
M40	MIRU 40	802	低		x	x
EA	ETR A; JATA15	2165	低		x	x
EC	ETR C	577	低		x	x
t30	Mtub30	2401	低		x	x
t39	Mtub39	3690	低		x	x
Q11a	QUB-11a; JATA 14	2163a	高			x
v3232	QUB-3232	3232	高			x
v3820	VNTR3820	3820	高			x
v4120	VNTR4120	4120	高			x
Q18	QUB-18; JATA 13	1982	中			x
JATA-12 (2), 15-MIRU (3), 24 _{Beijing} (5)						

2. VNTR型別での菌株異同判定の考え方

疫学調査で集団事例の可能性(患者間の疫学的関連性)があり、VNTR型別が一致した場合、分離株の型別一致は共通感染源の可能性を強く支持すると考えてよい。わが国での集団感染事例を中心にした田丸らの報告⁶⁾から、疫学的リンクがある患者間の感染源調査の場合は、多くの場合、JATA12領域による型別のみと比較で菌株の異同性を判断できると考えてよい。ただし、地域的に高頻度に出現するVNTR型別には、注意する必要がある、そのような遺伝子型情報の収集のためにも、結核菌分子疫学サーベイランスは重要である。

一方、疫学情報が得られない場合、すなわち、結核菌分子疫学による病原体サーベイランス等の場合、型別一致のみが菌株の異同性の判定根拠となってしまう。サーベイランス調査におけるJATA12領域による型別では、非常に多くの患者から同一型別株が分離され、それらに同一感染源の可能性を仮定することは困難であることが分かっている⁷⁾。このような時は、分解能を可能な限り高めたVNTR領域の組み合わせにより異同判定を厳しく見積もり、調査の対象を絞る必要がある。

3. VNTR バンドパターンから結核菌遺伝系統を推定する方法

結核菌には複数の遺伝系統が存在していて、それぞれの疫学的特徴が把握されつつある⁸⁾。実際、我が国では北京型株が7から8割を占め、その中でも、新興型が最近の感染伝搬によるクラスターを形成しやすいと報告されている⁹⁾。つまり、VNTR による遺伝型別に加えて、遺伝系統の情報を提示することで、その菌の潜在的な影響力を推定できる可能性がある。

一般的に VNTR 解析は、リピート数の増減による可逆的な変化に基づく遺伝子型別なので、単純に遺伝系統の分子マーカーとして利用することはできないと考えられている。しかしながら、結核菌株(特に北京型結核菌)においては一定の傾向が認められ、精度高く、個々の VNTR 型別から菌株の系統を推定することができる。この傾向を利用して、最大事後確率(maximum a posteriori: MAP)推定法により、北京型株と非北京型株の区別と北京型株の細分類化(ST11/26 群、STK 群、ST3 群、ST25/19 群と新興型群(Modern type))を行えるマクロを組んだエクセルファイルが山形県衛生研究所より入手可能である¹⁰⁾。

提供されているマクロを活用することで、VNTR 型別情報から遺伝系統情報を得ることが出来る(下図参照)。

最大事後確立推定法による結核菌遺伝系統推定プログラム
(データ入力用シート)

No.	MAP estimation																		Clear data		Result		Result (2)													
	Strain No.	J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	M04	M16	M40	EA	EC	t30	t39	Q11a	v3232	v3820	v4120	Q18	Bj	nBj	ST11/26	STK	ST3	ST25/19	Modern	SNP type			
1																																				
2																																				
3																																				
4																																				
5																																				
6																																				
7																																				

VNTRデータを入力しMAP estimationをクリックする。
(JATA 12領域のデータのみでも推定可能)

結果が表示される

最大事後確立推定法による結核菌遺伝系統推定プログラム
(解析結果の例)

No.	MAP estimation																		Clear data		Result		Result (2)												
	Strain No.	J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12	M04	M16	M40	EA	EC	t30	t39	Q11a	v3232	v3820	v4120	Q18	Bj	nBj	ST11/26	STK	ST3	ST25/19	Modern	SNP type		
1	FY17HC025	3	3	3	3	8	4	7	2	5	11	13	4	2	3	3	4	4	4	3	8	12	11	7	10	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	ST11/26
2	FY17MDR01	4	1	3	2	6	5	7	4	5	7	9	5	2	3	3	4	4	4	3	9	16	10	10	9	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	ST3
3	FY17MDR02	3	3	3	4	6	3	7	5	5	7	2	5	2	4	4	4	4	2	3	8	12	12	11	10	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	ST25/19
4	FY17MDR03	4	1	3	2	7	4	6	4	5	7	8	3	2	3	3	4	4	4	3	9	8	14	12	10	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	ST3
5	FY17N002	3	4	2	3	2	4	5	4	2	8	7	3	2	3	7	2	4	1	2	4	7	3	3	2	0.000	1.000								nBj
12	FY17N009	2	3	4	3	5	3	7	4	5	11	8	3	0	3	3	4	4	4	3	5	14	12	10	6	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	Modern
13	FY17N010	4	3	3	3	3	3	7	4	5	7	6	4	3	3	3	2	4	2	3	8	9	14	3	8	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	STK

【参考文献】

- Iwamoto T, Yoshida S, Suzuki K, Tomita M, Fujiyama R, Tanaka N, Kawakami Y, Ito M. 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.
2. 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 菅原 勇, 加藤誠也. 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型(VNTR)分析システム. 結核 2008; 10: 673–678.
 3. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Loch C, van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006; 44: 4498–4510.
 4. 地研協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編. 結核菌 VNTR ハンドブック第一版. 2012年10月編.
 5. Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, Nakanishi N, Caviedes L, Coronel J, Sheen P, Wada T, Taype CA, Shaw MA, Moore DA, Gilman RH. Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. PLoS One. 2012; 7: e49651.
 6. 田丸亜貴, 和田崇之, 岩本朋忠, 長谷篤. 結核集団発生事例菌株異同調査. 結核 2013; 88: 399–403.
 7. 和田崇之, 田丸亜貴, 岩本朋忠, 有川健太郎, 中西典子, 小向潤, 松本健二, 長谷篤. 複数自治体をまたぐ広域的結核分子疫学基盤構築. 結核 2013; 88: 393–398
 8. 岩本朋忠. 結核菌分子疫学の成果と挑戦. 結核 2011; 12: 917–921.
 9. Iwamoto T, Fujiyama R, Yoshida S, Wada T, Shirai C, Kawakami Y. Population structure of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan. J Clin Microbiol. 2009; 47: 3340–3343.
 10. Seto J, Wada T, Iwamoto T, Tamaru A, Maeda S, Yamamoto K, Hase A, Murakami K, Maeda E, Oishi A, Migita Y, Yamamoto T, Ahiko T. Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation. Infect Genet Evol. 2015; 35: 82–88.

2-4 結核研究所（レファレンスラボとしての役割）（村瀬良朗）

感染症対策上の基本として、国内の病原体検査法を標準化し、一般検査室を含めて検査水準を一定に維持する必要がある。結核研究所は結核菌の検査に関するナショナルレファレンス検査室として認識されており、衛生微生物技術協議会においては結核部門のレファレンスラボと位置づけられている。結核菌の分子疫学調査に関するレファレンス活動として、1) 結核菌型別分析法の指導・講習会の実施、2) 結核菌型別分析の支援、3) 結核菌型別分析の精度保証、4) 結核菌株保存（長期保管）を実施している。

2-4-1 結核菌型別分析法の指導・講習会の実施

結核菌の分子疫学調査では、特に生物学的危険度の高い結核菌を取り扱う必要があるため、バイオリスク(バイオセーフティ及びバイオセキュリティ)管理が重要である。また VNTR 型別分析の実施にも分子生物学的な専門性が求められる。そのため検査担当者に対する研修や訓練が必要不可欠である。結核研究所では、主に地方衛生研究所の抗酸菌検査担当者を対象とした研修を実施している。本研修は、これまでに抗酸菌の取扱や VNTR 型別分析の経験が浅い担当者を対象としており、分子疫学調査が地方自治体において円滑に導入されることを支援する目的で実施している(研修内容は技術開発、疾患の疫学状況、参加者の要望等に応じて変更される)。

2-4-2 結核菌型別分析の支援(個別相談等)

結核研究所では、VNTR 型別検査に関する技術的な質問を随時受け付けている。これまでに、結核菌からの DNA 抽出法や PCR 反応、電気泳動の条件といった技術的な質問、同一感染源が疑われたにもかかわらず VNTR プロファイルが異なった場合の解釈などについての質問が寄せられている。大半の質問は、本手引きや以下の資料が参考になると思われるが、不明な点がある場合は結核研究所抗酸菌部結核菌情報科まで問い合わせ頂きたい。VNTR 型別分析に関する参考資料

- 1) 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, 83, 673-678, 2008
- 2) 結核菌 VNTR ハンドブック(第 1 版)、地研協議会保健情報疫学部会マニュアル作成ワーキンググループ編, 2012
- 3) JATA(12)-VNTR 型別による結核集団発生事例の菌株異同調査, 結核, 88, 399-403, 2013
- 4) 結核菌 VNTR ハンドブック(追補版)、地研協議会保健情報疫学部会マニュアル作成ワーキンググループ編, 2014
- 5) 抗酸菌検査ガイド 2016 南江堂, 2016

問い合わせ先

結核予防会結核研究所抗酸菌部

TEL: 042-493-5711(代)

FAX: 042-492-4600

E-mail: mrc@jata.or.jp

2-4-3 結核菌型別分析の精度保証

VNTR 型別分析では、結果が一連の数値(デジタル)で表されるため、異なる施設間でデータを容易に共有・比較できることが大きな利点である。しかしながら、そのためには信頼性

の確保が必要であり、全国的な精度保証の実施が必要である。また、2015 年度に改正された感染症法でも検査の信頼性確保に関する取り組み(内部精度管理の実施、外部精度評価の受検等)が地方衛生研究所等に求められるようになった。こうした背景の下、結核研究所では衛生微生物技術協議会の結核部会を核として、地方衛生研究所に対する VNTR 分析の外部精度評価を 2014 年以降年 1 回実施している。

これまでに、2014 年度と 2015 年度に外部精度評価を実施している。参加施設は、それぞれ 54 施設、53 施設であった。PCR 産物のサイズ測定の方法は、2015 年度の調査では 2014 年度と同様に、アガロースゲル電気泳動による分析を行っている施設が最も多かった(64.2%, 34/53)。次いで自動シーケンサーを用いたフラグメント解析が 10 施設(18.9%, 10/53)、マルチナ 4 施設(7.5%, 4/53)、QIAxcel 3 施設(5.7%, 3/53)、コスモアイ 2 施設(3.8%, 2/53)であった(表 2)。

国内で結核菌型別に標準的に用いられている JATA(12)のローカセットによる 3 株の分析では、2014 年度と比べて 2015 年度はより多くの施設から基準値と完全一致する結果が報告された(分析結果が完全一致した施設の割合:66.7%[36/54]vs.92.5%[49/53], $p=0.001$) (表 1)。また、2014 年度の外部精度評価で精度の低かった 5 つのローサイ(1955, 3336, QUB26, 4156, 2163a)においても高い正答率(99–100%)が示された。2015 年度に各分析システムを利用していた施設数は、JATA(15)、HV、Supply らのローサイが、それぞれ 36、30、15 であり 2014 年度とほぼ同様の傾向であった(図 2)。

このように、外部精度評価を通じて分析精度が向上することが確認されており、今後も分析精度を維持するための活動が必要と考えられる。

表 1 各施設で用いられていた PCR 産物の分子量測定方法

分子量測定方法	2014		2015	
	施設数	割合(%)	施設数	割合(%)
アガロースゲル	37	68.5	34	64.2
自動シーケンサー	7	13.0	10	18.9
マルチナ	4	7.4	4	7.5
QIAxcel	4	7.4	3	5.7
コスモアイ	2	3.7	2	3.8

表 2 3 株を JATA(12)-VNTR で分析した場合の正当施設数

	2014 年度		2015 年度	
	施設数	割合 %	施設数	割合 %
全ローサイ完全一致	36	66.7	49	92.5
1 ローカス違い	7	13.0	1	1.9
2 カ所以上違い	11	20.4	3	5.7

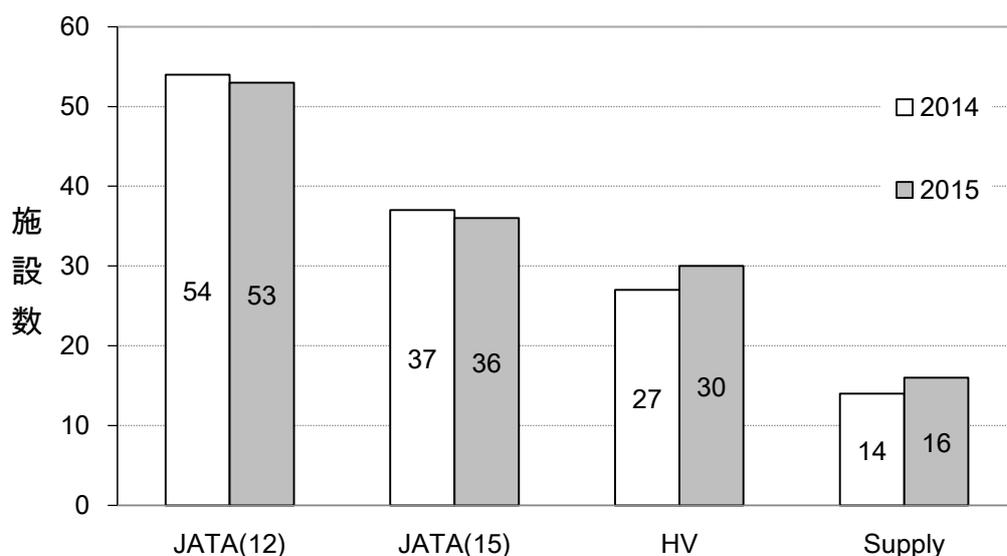


図1 VNTR 分析システムと報告施設数

2-4-1 結核菌株の取扱と長期保管

結核研究所抗酸菌部では、抗酸菌の中でもとりわけバイオハザードレベルの高い結核菌を安全に取扱、保管している。従って、国際的なバイオセーフティ基準を遵守した施設となっている。また、2007年に改訂施行された「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(感染症法)」においては、生物テロや事故による感染症の発生・まん延を防止するための病原体等の管理体制の確立が主目的の一つとなっており、病原体管理に関する基準が明確化されているが、結核研究所はこの感染症法の基準にも準拠している。当該施設は以下の様な目的と機能を有する。

1. 全国レベルでの菌株・菌情報の安全管理(長期保管)

分子疫学調査や病原体サーベイランスでは、収集した結核菌の個別の特徴を明確にすることが必要となる。また、その過程で一部の結核菌は三種病原体等(超多剤耐性結核菌)に分類されることになり、一般の結核菌(四種病原体等)よりも厳密な管理を要求される。菌バンクは結核菌の分子疫学的あるいは生理・生化学的プロフィールを明確にする機能と、その結核菌株を情報とともに安全に管理する機能を有する。

2. 将来の新技术開発に備えた試料保存

現在十分な感度、精度で測定しえない結核菌の生物学的特性や、新たな診断技術の評価を将来において実施するため、臨床的・生物学的情報を備えた試料(菌株)の保存管理は重要である。この点は世界保健機関(WHO)も必要性を強調している(参照 HP: <http://www.who.int/tdr/diseases/tb/specimen.htm>)。具体的には、新しい耐性機構の解明、易

感染菌等の毒力の解析、外国人結核患者の影響の解析等が考えられる。菌バンクは多様性を持った結核菌株の収集と管理を行う。

3. 薬剤耐性動向の調査

病原体サーベイランスの目的は、結核菌の感染動態の解析や薬剤耐性結核菌のモニタリングにある。現在およそ 5 年に一回実施されている全国薬剤耐性結核菌動向調査(結核療法研究協議会:療研)において、結核研究所は菌株の収集管理と検査の実施について重要な役割を果たしている。将来的に病原体サーベイランスシステムが全国的に整備されれば、特に多剤・超多剤耐性結核の検査や解析困難な結核菌の遺伝子型別解析に関するレファレンス機関として当該菌の発生動向調査における主要な役割を果たすことになる。

4. 結核菌検査の精度保証

結核菌検査は結核菌の検出と解析を中心としたシステムであり、結果が臨床あるいは行政活動に与える影響が大きいため、安全性や精度の確保が何よりも重要である。結核研究所抗酸菌部は抗酸菌検査のレファレンス施設として解析困難な結核菌や非結核性抗酸菌の解析を行っており、それによって得られた知見や菌株は、抗酸菌検査の精度保証に重要な役割を果たしている。

第3章 結核菌の検査(山本香織)

3-1 結核菌株の分離・保存・輸送法

3-1-1 結核菌の分離

臨床検体から結核菌を分離しようとする場合、殆どの検体は喀痰であるため、前処理(検体の可溶化・均質化と一般細菌の発育阻止)が必要になる。通常は、等量以上のNALC-2% NaOHと15分間混合して均質化と雑菌処理を同時に行い、その後リン酸バッファー(pH 6.8)で中和して遠心分離集菌する。前処理が過剰であると塗抹陽性検体さえ培養陰性化することがある。

1. 液体培地

MGIT(ベクトン・ディッキンソン)、バクテアラート 3D(シスメックス・バイオメリュー)、マイコアシッド(極東製薬工業)などがある。発育が早い、雑菌汚染に弱い。自動判定装置では陽性発育を見逃すことがある。発育陽性時の菌濃度は 10^6 CFU/ml程度はある。

2. 固形培地

2%小川培地、2%ピット培地などがある。発育には3~8週間かかるが、コロニーが確認でき、大量の菌が確保可能な利点がある。プラスチック・スクリーキャップ付培地であればそのまま輸送できる利点がある。

3-1-2 結核菌の保存

3-1-2-1 結核菌の保存方法

1. 短期保存

小川培地での培養後、冷蔵庫保管または室温で保管する。数か月から一年は保存可能である。短期保存用の培地としては、極東小川培地(SP):プラスチック式スクリーキャップが販売されている。容器破損の恐れがあるため、メーカーから凍結保存をしないよう注意喚起されている。

2. 長期保存

結核菌は培養後に -20°C 以下で凍結することにより長期保存が可能である¹⁾。凍結保存には以下のような方法がある。

- (1) 小川培地でのコロニー形成後、そのまま凍結
- (2) ただし、通常の培養検査で使用している小川培地はゴム栓で密閉性が無いため、2mLのスクリーキャップ式保存チューブで1%小川培地を作成することも可能である。
- (3) 液体培地(7H9, マイコブロスなど)で培養後、菌液を保存チューブに移して凍結する。

液体培地・固形培地で培養後、スキムミルク分散媒(終濃10%)に混和して凍結する。

液体培地からの保存の場合は培地底部の菌塊を混合する。また、1%グリセリン液なども利用できる。

※スキムミルク分散媒(10%)の作り方

- (1) スキムミルク 10g を 50ml の蒸留水に溶解し、121℃で 20 分間オートクレーブ滅菌する。
- (2) グルコース 5g を 50ml の蒸留水に溶解し、121℃で 20 分間オートクレーブ滅菌する。
- (3) 室温まで冷却後①と②を混ぜる。分散媒は 4℃に保存する。

3-1-3 結核菌の輸送

3-1-3-1 生菌の輸送

生菌を輸送する場合には「特定病原体等の安全運搬マニュアル」²⁾に従う。特定病原体の運搬に係る容器等の基準については、世界保健機関(WHO)の「感染性物質の輸送規制に関するガイダンス」³⁾に基づき、国連規格に適合した容器を用いて三重梱包することが示されている。運搬の実施体制は三種病原体等に相当する結核菌と四種病原体等に相当する結核菌で異なる。

a) 三種病原体等に相当する結核菌

三種病原体等に相当する結核菌を事業所の外へ運搬する場合には事前に各都道府県の公安委員会に運搬の届出を行い、運搬証明書の交付を受ける必要がある。運搬する際には運転者の他に、当該病原体の取り扱いに携わる研究者など、知識を有するものの同行が必要である。また、運搬証明書に加えて、万が一当該病原体が漏えいした時の安全確保のための防護用品、消毒薬等を携行することとなっている。

b) 四種病原体等に相当する結核菌

四種病原体等に相当する結核菌については、所持・輸入・運搬に際しての許可あるいは届け出は必要ないが、運搬中に漏えいすることのないよう安全対策を行う。

日本郵便株式会社のゆうパックによる検体の送付については、一般の民営の宅配便の利用と原則的に同様の規定である。ただし、安全性を担保するために万国郵便条約とは異なる特殊な約款に基づき、国連規格に適合した容器を用いて三重梱包した上で、四次容器(ジェラルミン等)に入れるなどの更なる厳重な措置が規定されている⁴⁾。

3-1-4 DNA の抽出と輸送

3-1-4-1 DNA の抽出法

DNA の抽出法は様々あり、目的とする検査に応じて選択する。VNTR では高純度のゲノム DNA を必要としないため、ここでは最も簡便な菌懸濁液の加熱による抽出法を示す⁵⁾。

- (1) DNA の抽出作業は BSL3 実験室の生物学的安全キャビネット(クラス II)内で行うこと。
- (2) 作業前にヒートブロックを 95℃に設定しておく。

*加熱にオートクレーブを使用する際は 95°C、10 分に設定すること。一般的なオートクレーブの条件(121°C、20 分)では PCR の感度が低下することがあるため注意すること。

- (1) 200 μ L の滅菌精製水を 1.5mL スクリューキャップ式マイクロチューブに入れておく。
- (2) プラスチックループを用いて被験株 0.5～1 白金耳を懸濁する。被験株が液体培地に生えている場合は菌塊を滅菌スポイトで吸い取り懸濁する。
- (3) 95°Cのヒートブロックで 10 分加熱する。ここで結核菌は死滅するので、以後の作業は BSL3 外実験室で実施して良い。
- (4) 13,000rpm で 10 分間遠心する。
- (5) 上清を新しい 1.5mL マイクロチューブに移し、-20°C以下で保管する。

3-1-4-2 DNA の輸送

DNA の輸送については特に制限は設けられていない。ゆうパックまたは宅配便を利用して送付する際は、品名に試料(DNA)等の記載をする。液漏れ、乾燥を防ぐためフタをパラフィルム等で密封し、緩衝剤、保冷剤を詰めて冷蔵または冷凍で送付する。

【参考文献】

1. 東村道雄, 水野松司. 抗酸菌 菌株の保存法. *Kekkaku* Vol.57, No.9:467-470.1982
2. 「特定病原体等の安全運搬マニュアル」国立感染症研究所 HP
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou17/pdf/03-34.pdf> (2017/2/7)
3. WHO「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス 2013-2014」(日本語版). 国立感染症研究所 HP
<http://www.nih.gov/niid/ja/lab/706-biosafe/out/4032-whoguidance-transport13-14.html> (2017/2/7)
4. 「ゆうパックを利用して検体を送付する場合の包装に関する遵守事項」厚生労働省 HP
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou17/pdf/120323-02.pdf> (2017/2/7)
5. 結核菌 VNTR ハンドブック地研協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編 第一版 2012 年 10 月編／追補版 2014 年 3 月編

3-2 反復配列多型 (VNTR) 分析法(瀧井猛将)

結核の分子疫学的検査の主流は VNTR 法である。この方法は結核菌の遺伝子にある縦列反復配列 (Variable Number of Tandem Repeat ; VNTR) は株間で様々な反復数 (コピー数) を示すことを利用している。さらに、平成 28 年 11 月改正の予防指針では菌の確保と分子疫学的検査の実施し、検査結果を発生動向の把握や対策の評価に用いるように書かれている。本書では VNTR 法を実施するのに際し必要な原理と操作

法を記載した。詳しくは「結核菌 VNTR ハンドブック」とさらに追補版が地方衛生研究所のホームページから無償でダウンロードできるので、参照されたい。また、結果の記録やデータベース化、比較については本書の第 2 章 2-3「地方衛生研究所」の項にも記載されているので、そちらを参照されたい。

結核の分子疫学における VNTR 法の背景

結核菌の遺伝子型別は、患者から分離された結核菌の異同や近似性を調べ、実地疫学から得られた情報と合わせて結核の伝播やまん延状況を把握し、結核対策に用いることを目的としている。遺伝子型別には今までに様々な方法が開発されてきている。1 つにはゲノムに挿入されたトランスポゾンが株によって異なることを利用した RFLP 法、同じように反復配列を利用した VNTR 法である。ここでは遺伝子型別検査として現在主に使用されている VNTR 法について解説する。(別の手法の原理等については総説を参照)

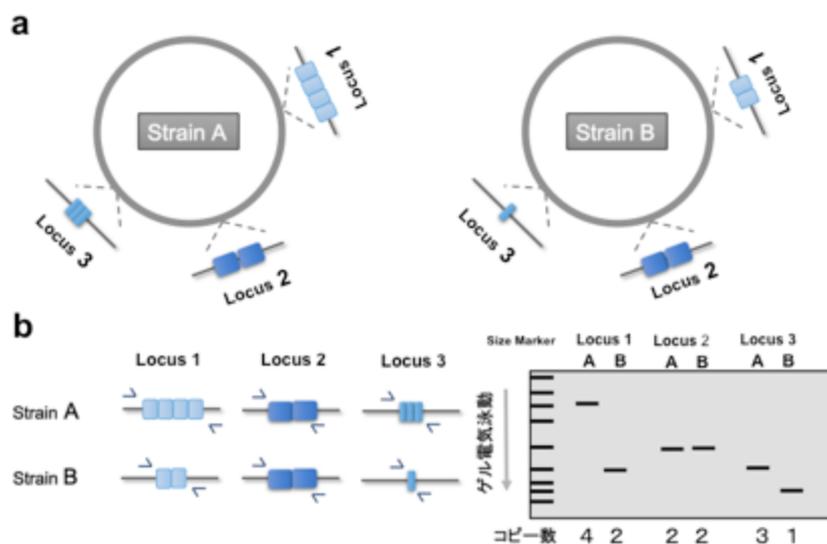


図1. VNTR法の概容
a; 検査対象のVNTR領域、b; PCRによるVNTR領域の増幅と電気泳動によるPCR産物の分子量(bp)の測定、及び反復配列の反復数(コピー数)の算出

VNTR 法の概容を図 1 に示した。VNTR 法の作業には、大きく①結核菌からの PCR 鋳型の抽出、②VNTR 領域の PCR と③アガロースゲル電気泳動等での結果の解析の 3 つがある。検査する VNTR 領域の種類や実施方法は目的によって使い分けている自治体が多い。国際的な標準法としては Supply の 15 領域が使用されているが、北京型が多く分離される日本では分解能が不足している。そのため、前田らが考案した JATA12 が日本での遺伝子型別に適した方法であり、現在までこの領域を使用した VNTR 法の普及が進められている。さらに JATA12 では十分に分解能が得られない場合には、QUB-18、QUB-11a、ETR-A の 3 領域を加えた JATA15 を実施している自治体や 24 領域など独自の領域を加えて実施している自治体もある。結核研究所では VNTR による遺伝子型別の依頼に対して主に JATA12 に超可変部位 Higher variable

region(HV)を加えた JATA12+HV で検査を行っている。今回は JATA15+3 つの HV 領域の反復配列のコピー数を表 1 に記載した。また、使用するプライマーセットの配列は付録に記載した。

表 1. VNTRの各領域毎の反復数と増幅サイズの対応

略称	Locus	Alias	JATA名	反復配列 毎の差	反復数と増幅産物サイズ(bp)の対応*															
					0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
J01	0424	Mtub04	JATA 1	51	535	586	637	688	739	790	841	892	943	994	1,045	1,096	1,147	1,198	1,249	1,300
J02	0960	MIRU10	JATA 2	53	483	536	589	642	695	748	801	854	907	960	1,013	1,066	1,119	1,172	1,225	1,278
J03	1955	Mtub21	JATA 3	57	208	265	322	379	436	493	550	607	664	721	778	835	892	949	1,006	1,063
J04	2074	Mtub42	JATA 4	56	14	70	126	182	238	294	350	406	462	518	574	630	686	742	798	854
J05	2163b	QUB-11b	JATA 5	69	200	269	338	407	476	545	614	683	752	821	890	959	1,028	1,097	1,166	1,235
J06	2372	VNTR 2372	JATA 6	57	176	233	290	347	404	461	518	575	632	689	746	803	860	917	974	1,031
J07	2996	MIRU26	JATA 7	51	285	336	387	438	489	540	591	642	693	744	795	846	897	948	999	1,050
J08	3155	QUB-25	JATA 8	54	71	125	179	233	287	341	395	449	503	557	611	665	719	773	827	881
J09	3192	MIRU31	JATA 9	53	491	544	597	650	703	756	809	862	915	968	1,021	1,074	1,127	1,180	1,233	1,286
J10	3336	QUB-3336	JATA 10	59	98	157	216	275	334	393	452	511	570	629	688	747	806	865	924	983
J11	4052	QUB-26	JATA 11	111	168	279	390	501	612	723	834	945	1,056	1,167	1,278	1,389	1,500	1,611	1,722	1,833
J12	4156	QUB-4156	JATA 12	59	510	569	628	687	746	805	864	923	982	1,041	1,100	1,159	1,218	1,277	1,336	1,395
Q18	1982	QUB-18	JATA 13	78	231	309	387	465	543	621	699	777	855	933	1,011	1,089	1,167	1,245	1,323	1,401
Q11a	2163a	QUB-11a	JATA 14	69	170	239	308	377	446	515	584	653	722	791	860	929	998	1,067	1,136	1,205
EA	2165	ETR-A	JATA 15	75	184	259	334	409	484	559	634	709	784	859	934	1,009	1,084	1,159	1,234	1,309
	3232	VNTR 3232		56	181	237	293	349	405	461	517	573	629	685	741	797	853	909	965	1,021
	3820	VNTR 3820		57	226	283	340	397	454	511	568	625	682	739	796	853	910	967	1,024	1,081
	4120	VNTR 4120		57	326	383	440	497	554	611	668	725	782	839	896	953	1,010	1,067	1,124	1,181

\$前田ら, 結核 83(10): 673-672 (2008)と和田 地研協議会 結核VNTRハンドブック, QIAxcelシステムを用いたVNTR分析ハイスループット処理(QIAGEN)を参照して改変, * 数字は理論値で有り, 実測値は分析手法に応じて変動するので, 反復数が既知の陽性対照を用いて適宜確認することを勧める。

【鋳型(template) DNA の調製】 (注意: 以下の操作は BSL3 の部屋で行うこと)

小川培地の検体の場合

1. あらかじめ遺伝子用蒸留水 300 μ L を入れた 1.5 mL のスクリーキャップ付きのサンプリングチューブを用意する。
2. 使い捨ての 1 μ L プラスチックエーゼで小川培地上のコロニーを掻き取る。尚、掻き取る量は爪楊枝の先ほどの少量でよい。
3. ②のエーゼの先を用意した蒸留水 300 μ L に浸けて上下に数回動かして掻き取った菌体を蒸留水に十分懸濁する。キャップを閉めて次の操作に移行する。尚、複数の検体があるときに①の操作に戻って③まで実施する。
4. 滅菌は以下のいずれかの方法を 1 つでおこなう。
 - ① オートクレーブ 121°C、10 分
 - ② ヒートブロック 98°C、15~30 分
 - ③ 写真の様な器具を用いて 95°Cの湯浴で 15~20 分
5. 冷却し、11,000 rpm で 1 分間遠心した上清を Template DNA とする。(この操作を含め、以降の操作は BSL3 以外の部屋で実施可能である。)

6. すぐに検査しない場合は-20℃で保存する。

MGIT 培地の検体の場合

1. あらかじめ遺伝子用蒸留水 300 μL を入れた 1.5 mL のスクリーキャップ付きのサンプリングチューブを用意する。MGIT 試験管のできるだけ底部付近から 50 μL 程度の溶液を滅菌ピペット等で取り、用意した蒸留水 300 μL に十分懸濁する。キャップを閉じて前述の滅菌操作の行程④に移行する。以後小川培地に同じ。

【PCR 反応】（この行程は BSL3 以外の実験室で実施可能）

①マスターミックスの作成

1.5 ml チューブを用いて以下の組成を作成する。検体数に応じて適宜準備する。

各試薬名	領域数（一検体分の量を記載）*					単位: μl
	1	12	15	18	24	終濃度
TaKaRa 2x GCl buffer	4	48	60	72	96	1x
2.5 mM dNTP mix	0.64	7.68	9.60	11.52	15.36	0.5 mM
TaKaRa ExTaq HS version	0.04	0.48	0.60	0.72	0.96	0.025 U/mL
純水 (H ₂ O)	2.52	30.24	37.80	45.36	60.48	
合計	7.2	86.4	108	129.6	172.8	

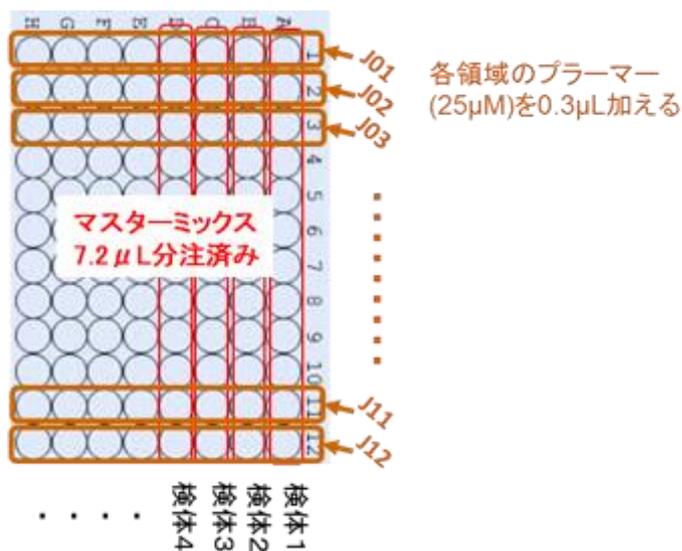
*ピペットマンの誤差等を考慮し、マスターミックスが余剰になる方がよいので（検体数+1）の分量を作成すると良い。

②マスターミックスの分注

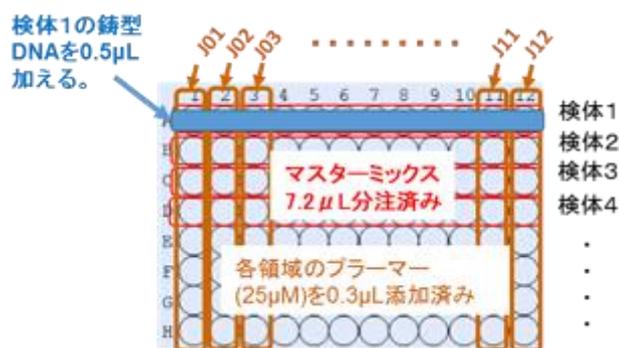


PCR 用の 96 穴マイクロプレートを利用するとよい。以下の様に各ウエルに（JATA12 の場合は 12 領域検査するので 12 本）にマスターミックス 7.2 μL を分注する。

③各ウエルに JATA12 の場合は 12 か所の VNTR 領域に対応したプライマー溶液（各 25 μM）を 1 反応溶液量あたり 0.3 μL 加えて混和する。（プレートの場合はシールして軽くタップしてからプレート用の遠心機で軽く遠心する。）



④各ウェルに検体の鋳型 DNA を 0.5 μL 加える。



⑤プレートを軽く遠心する。

⑥以下のプログラムにより PCR 反応を実行する。

94°C	2分	}	35 サイクル
94°C	30秒		
63°C	30秒		
72°C	1分		
72°C	7分		
10°C	∞		

(注) PCR 条件は使用するプライマー配列によって変化する。また、使用する PCR 機器によっても増幅効率が異なることがあるのであらかじめサイクル数 (35~40 サイクル) を検討するのがよい。

【アガロースゲル電気泳動】

先の表に示したように結核菌 VNTR 領域の繰り返しの配列の 1 つの長さは 50 bp 以上のものが多い。また、増幅された DNA 断片の長さは 100~1,200bp 程度であり 2~2.5%のアガロースゲル電気泳動でも十分に反復数を測定することが可能である。ただし、JATA11 (QUB-26) は反復数によっては 1,000bp を越える場合があるのでゲルの濃度を変えて泳動するなどの工夫が必要となる。

- ・電気泳動層：泳動距離が長い物を使用するのが良い。結核研究所では泳動距離 6 cm (写真参照 12 cm の 2 段で使用) のものを使用している。

①試薬

1. アガロース：NuSieve 3:1 などの高濃度用アガロースを使用する。

5 X TBE bufferの調製		
	使用量	最終濃度
トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン	54 g	0.455 M
ほう酸	27.5 g	0.455 M
EDTA	20 mL	0.01 M
精製水	1 Lにする	

2. 泳動用の緩衝液は TAE でも TBE でも問題ない。結核研究所では TBE を用いている。
3. 10 mg/mL 臭化エチジウム (発がん性物質。取り扱い時には必ず手袋着用)
4. アガロースゲルに直接加える場合には使用時は 0.5 µg/mL に希釈して使用する。

②アガロースゲルの作成

1. 必要量のアガロースを秤量し、0.5×TBE バッファー中に入れてよく混和する。
2. 電子レンジで暖めて溶解する (突沸に注意)。
3. フラスコを素手で触って熱くない程度になったら、水平になっているトレイにゆっくり流し込む。
4. コームがトレイの底面から 1mm 程度浮くように差し込み、固まるまで放置する (すぐに使用しない時は固まった後にサランラップを張って、冷蔵保存する)。
5. (注意：ゲルが厚いと DNA バンドがぼやけて解析ができなくなるので、ゲルをあまり厚く作らないこと。)

③泳動

1. 泳動槽にゲルが沈むまで 0.5×TBE 緩衝液を入れ、コームを静かにはずす。
2. PCR 産物を精製水もしくは TE 緩衝液で 10 倍希釈し、1/5 倍量の BPB 溶液を加える。
3. 5~10 µL をアガロースのゲルのウェルに入れて泳動する。
4. (サンプルの並べ方) VNTR では同一の領域での反復数の換算を正確にすることと検体間での比較を容易にするために、VNTR 領域ごとにまとめて電気泳動する。
5. (注意：ゲルに載せる DNA の量が多いとバンドが太くなり、反復数の算定がで

きない。VNTR では各領域の増幅効率などに違いがあるため、PCR 産物の濃度にバラつきができることもあるので、領域毎に泳動する量を変える必要もある。）

6. アガロースゲル 10cm あたり 100V 前後の電圧をかけ電気泳動する（泳動時間はサイズにより調節する）。

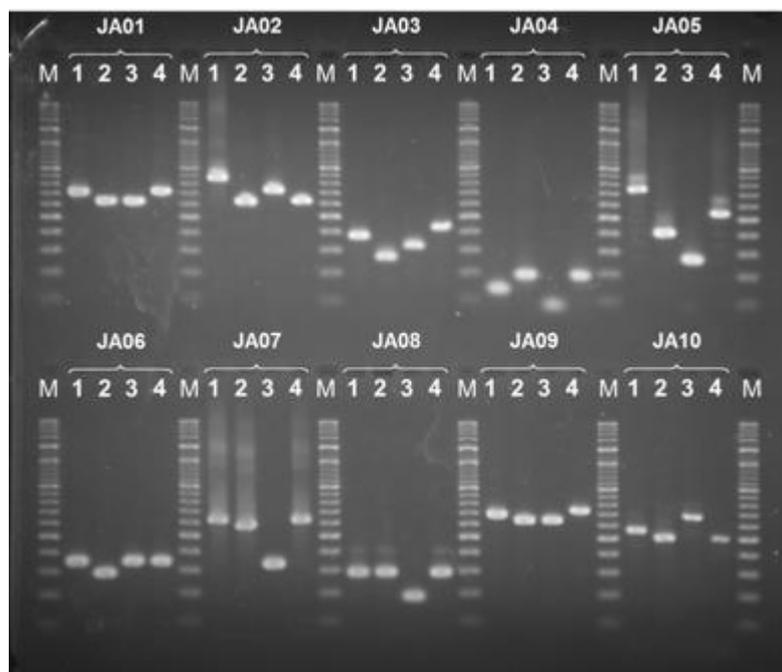
④染色・脱色とゲル撮影

1. 十分な量の臭化エチジウム溶液を用意する。（蒸留水またはゲル緩衝液中の臭化エチジウムの濃度 0.5~1 µg/ml）
2. 電気泳動槽からゲルを取り出し、臭化エチジウム溶液にゲルを 20 分間沈める。
3. 溶液からゲルを取り出し、蒸留水を満たした新しい容器にゲルを 20 分間沈める。
4. 蒸留水を換えて繰り返す。
5. 卓上型紫外線照射器を使ってゲルを観察し、撮影装置で泳動像を撮影する。

（注意：バックグラウンドが脱染後もまだ発色している場合は、脱染を続ける。

ただし、1 晩以上脱色するとバンドがぼやけてしまう恐れがある。）

⑤解析



【参考文献】

結核菌 VNTR ハンドブック(第 1 版)、地研協議会保健情報疫学部会マニュアル作成ワーキンググループ編、2012

付録 VNTR 遺伝子型別用プライマーセット

	Primer 1	Primer 2
JATA01	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT	GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC
JATA02	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC	GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
JATA03	AGACGTCAGATCCCAGTT	ACCCGACAACAAGCCCA
JATA04	TGTGTACCTGACGATTTCAAGG	TGGCCGGCAAATAATGGATGC
JATA05	CCGATGTAGCCCGTGAAGA	AGGGTCTGATTGGCTACTCA
JATA06	ACCTCCGTTCCGATAATCCG	CAGCTTTCAGCCTCCACAAT
JATA07	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC	CATAGGCGACCAGGCGAATAG
JATA08	GCCAGCCGTAACCCGACCAG	GGGCCGGAAATTCGCAGTGG
JATA09	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA	GTGCCGACGTGGTCTTGAT
JATA10	ATCCCCGCGGTACCCATC	GCCAGCGGTGTGCGACTATCC
JATA11	GTGCCGGCCAGGTCCTTCC	CACCGCGTGTGTTGACCCGAAC
JATA12	ACCGCAAGGCTGATGATCC	GTGCATCTCGTCGACTTCC
JATA13	ATCGTCAGCTGCGGAATAGT	AATACCGGGGATATCGGTTC
JATA14	CGTGATGTTGATCGGGATGT	ACCCTGGAGTCTGGCATC
JATA15	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT	CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT
3232	CCCCAGCCTTACGACTGA	GTCGGGCTTGGTGAAGG
3820	TGCGCGGTGAATGAGACG	ACCTTCATCCTTGGCGAC
4120	GTTCACCGGAGCCAACC	GAGGTGGTTTCGTGGTCG

第4章 結核菌遺伝子型分析結果の報告(瀬戸順次・阿彦忠之)

結核菌 VNTR 分析結果は、保健所における実地疫学調査結果と重ね合わせることで初めて意味を為す。そのため、結核菌分子疫学を担う衛生研究所は分析を行うことの意味、そして分析結果の意味を良く理解した上で、実地疫学を担う保健所に的確に結果を報告する必要がある。

4-1 分析から報告までの期間

結核菌 VNTR 分析において、衛生研究所で菌株を受領してから結果を出すまでの期間は、少ない株数であれば最短 1 日、遅くとも 1 週間以内である。衛生研究所は、得られた分析結果が保健所における結核対策に活用される点を考慮し、菌株受領後できるだけ速やかに結果を報告する必要がある。しかし、人口が多い、あるいは結核罹患率が高い自治体では常時多数の菌株を扱っており、フル稼働で分析を進めても結果を得るまでに時間を要する。その場合、保健所と衛生研究所の間で、結果を早く得る必要がある事例(集団感染疑い、院内感染の有無の検証など)の菌株を優先的に分析するための調整を行うことが望ましい。

① 迅速な分析結果を得るための検体入手法

上記の優先的な分析が必要な事例の中でも特に分析を急ぐ事例では、液体培地の加熱死菌を入手すると良い。結核菌分子疫学調査では、固形培地に発育した結核菌を入手することが多いが、発育の遅い結核菌の入手までには 1 ヶ月～数ヶ月を要する。常時結核菌の培養をおこなっている医療機関や検査センターの多くは液体培地(MGIT、日本 BD 社)による培養で陽性を示した検体を固形培地に植え継いでいるため、液体培地の入手により分析結果を得るまでの期間を短縮できる。著者らの経験では、塗抹検査陽性で液体培地に 1 週間培養した検体であれば、問題なく VNTR 分析結果を得られている。分与に際しては、液体培地底部の培養液を数滴(0.1ml 程度)マイクロチューブに分取し、100℃、10 分等加熱した死菌検体を得るようにすれば、感染症法上の特定病原体(三種・四種病原体)の規制から外れることになる。なお、結核菌株、死菌検体いずれの場合でも、分与には医療機関や民間検査センターの理解と協力が不可欠である。分与を依頼する保健所には、医療機関や検査センターとの信頼関係を損なわないような誠意ある対応が求められる。

② 定型的分析及び報告

VNTR 分析を取り入れている全ての自治体において、国内標準法とされる 12 領域分析法(JATA (12)-VNTR¹⁾)を実施している。12 領域分析法は、集団感染疑いなどの事前の疫学情報がある事例には有用な方法であるが、網羅的に収集された結核菌を分析する場合には識別能が不足し、由来の異なる株を同一株と判定してしまう危険性がある。そのため、一部自治体では、前述の 12 領域に識別能の高い領域を追加した 18 領域分析法(JATA (18)-VNTR)や 24 領域分析法(24_{Beijing}-VNTR^{2,3,4)})を実施している。領域数が多くなればなるほ

ど識別能が高くなることは言うまでもないが、領域数の選定にあたっては、図 1 に示したように保健所で関連性を疑った事例のみを扱うのか、それとも網羅的に分析するのか、その他分析コストは賄えるかなどを踏まえて決定する。なお、領域数の選定にあたっては、結核研究所で作成した広域 VNTR 型データベースが参考になる⁵⁾(付録:VNTR 型別データベース)。

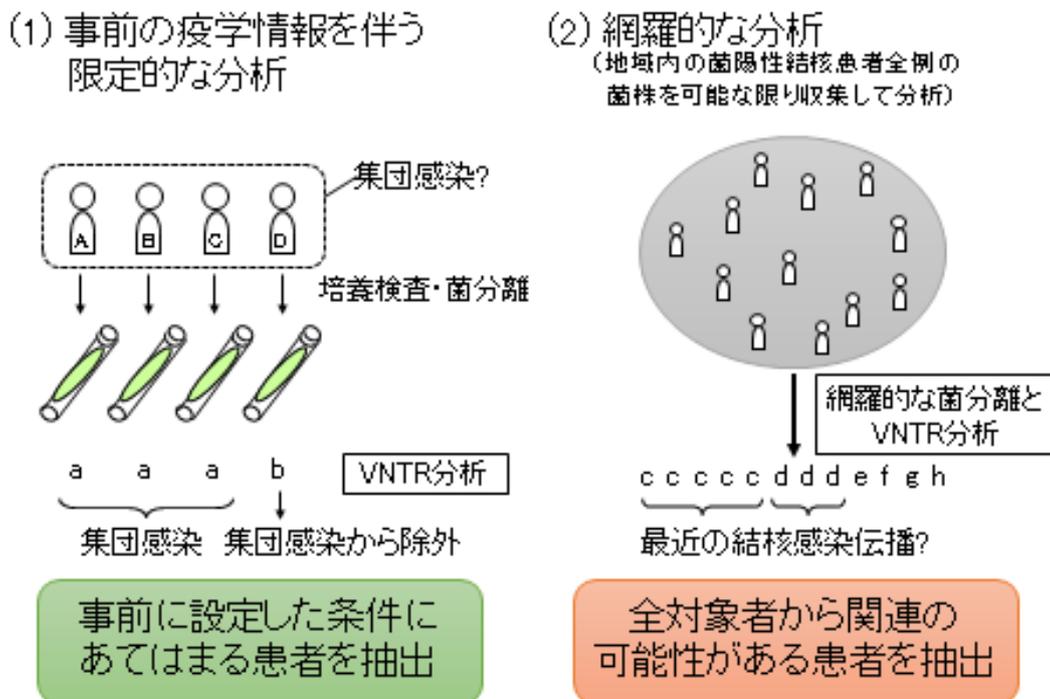


図1. 結核菌VNTR分析の用途

③ VNTR 分析一致領域数の解釈

結核菌 VNTR 分析において、全ての数字パターンが一致した場合、由来患者が同一株に感染した可能性が示唆される。一方で、結核菌の偶発的な遺伝子変異に伴い、同一菌由来の感染伝播であっても数字パターンが一致しない場合がある。そのため、衛生研究所から保健所には、少なくとも 1 領域違いの情報までは報告したほうが良い。数字パターンが 2 領域以上異なる場合に関しても同一菌由来である可能性はゼロとは言えないが、新たな感染源・感染経路が見出されるメリット、および網羅的な分析の場合には保健所における調査対象者が増加するデメリットを総合的に考えて、各自治体において対応を決定すべきである。なお、VNTR 分析の数字パターンの一致/不一致を簡便に判定可能なプログラム(エクセルマクロ)が宮城県保健環境センター微生物部より無償で入手可能である。

④ 同一遺伝子型の意味

VNTR 分析により、一致または類似の数字パターンを認めた場合であっても、それだけでは公衆衛生上有用なデータとはなり得ない。なぜならば、数字パターン一致(または類似)

には、以下の 3 つの可能性が含まれているためである。:①患者間で最近の結核感染伝播があった場合、②過去に同一流行菌株に感染した者の集団の中から最近になって(同時期または近い時期に)複数の結核患者が発生した場合、③VNTR 分析の識別能の限界により異なる菌株が同一(または類似)数字パターンと判定された場合。このうち、②に関しては、第二次世界大戦周辺の結核高まん延期を経験した高齢者の内因性再燃が多い日本の結核の現状を踏まえると、特に高齢者間で数字パターンが同一(または類似)となった場合に起き得る現象である。③に関しては、分析領域数を増やすことで回避できる場合が多い。しかし、例え 24 領域分析を行ったとしても、VNTR 分析が結核菌の全遺伝情報(ゲノム)の一部のみを調べる方法である以上、異なる株を 100%識別できるわけではないという認識が重要である。VNTR 分析を保健所の結核対策に組み入れる最大の目的は、①の「最近の結核感染伝播」を捉えていくことであるが、その調査手法に関しては、次章を参照願いたい。

第5章 結核菌遺伝子型別情報を用いた疫学調査(瀬戸順次・阿彦忠之)

結核菌遺伝子型別情報を保健所の結核対策に組み入れる最大の目的は、各地域における「最近の結核感染伝播」の実態や特徴等を明らかにしていくことである。それにより、各地域において、いつ、どのような場所で結核の感染伝播が起きているかを把握可能となり、結核対策で重点を置くべき対象(施設、職種など)を捉えることができる。併せて、これまで未知であった感染経路や感染伝播リスクの高い施設等が見出された場合、当該施設等に対する介入(接触者健康診断、啓発活動など)を通して、それ以降の結核の感染連鎖を止めることも可能になる。これらの利益を得るために、保健所は、VNTR 分析によって数字パターンが一致、もしくは類似(1 領域違いなど)であった菌株の由来患者について、最近の結核感染伝播の有無を調査する。

5-1 追加の疫学調査の要否

VNTR 分析の結果が得られて以降の保健所における追加の疫学調査の要否を図 2 にまとめた。

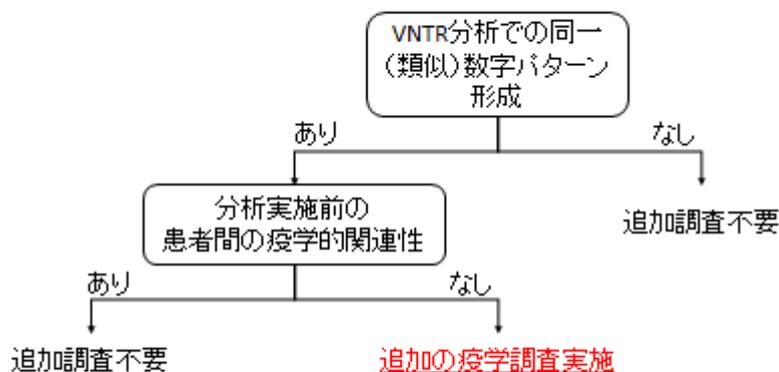


図2. 結核菌VNTR分析後の追加の疫学調査の要否

網羅的な VNTR 分析(地域内の菌陽性結核患者全例の結核菌株を可能な限り収集して分析)を実施した場合、分析領域数や何領域違いまでを類似の数字パターンと考えるかにより結果が異なるものの、概ね3割の菌株が同一(または類似)の数字パターン群(以下、「クラスター」と言う)を形成する^{3,4,6)}。このうち、例えば家族内感染のように、VNTR 分析実施前に既に患者間に明確な関連性が見出されていた事例がクラスターを形成した場合、保健所における追加の疫学調査は不要である。残りの、患者間の疫学的関連性が見出せていないクラスター形成事例に対して、最近の結核感染伝播の有無に関する追究が必要となる。

5-1-1 結核登録票記載事項の比較検討

クラスター形成患者の追加の疫学調査にあたっては、はじめに結核登録票に記載されている取得済みの患者情報の比較を行う。具体的には、年齢、性別、感染性期間の始期(いつから感染性の状態となったかを症状出現時期や菌所見等に基づき推定)、肺結核／肺外結核の別、喀痰塗抹検査結果、菌の薬剤感受性試験結果、および結核感染リスクに関する特記事項などである⁷⁾。これら情報は、図示することで全体像を理解しやすくなる(図3)。

患者	年齢	性別	薬剤耐性	特記事項
1	80	女	INH	A高齢者施設の入所者(#A)
2	26	男	なし	パチンコ趣味(#P)
3	35	男	なし	A高齢者施設の職員(#A)、パチンコ趣味(#P)

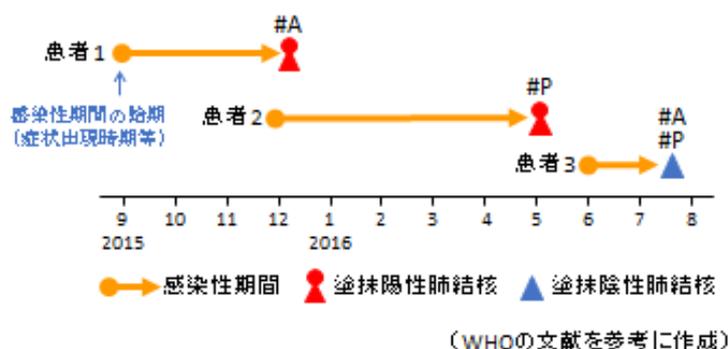


図3. クラスター形成患者の疫学情報の比較例

国内では、患者の発病時期等を図形化することが可能なプログラム(エクセルマクロ)を山形県衛生研究所微生物部あるいは結核予防会結核研究所抗酸菌部結核菌情報科より無償で入手可能である。薬剤感受性試験結果については、耐性菌を保有する患者が他者に伝播させた結核菌は必ず同じ薬剤に耐性を有している(感受性に戻ることはない)ことをもって、理論的に感染伝播の方向性を限定できる。また、結核の感染伝播は、喀痰塗抹陽性肺結核などの感染性の高い結核患者が発端となることが多いため、クラスター形成患者が全て喀痰塗抹陰性(低感染性)であった場合、最近の結核感染伝播の可能性は低くなる。図3の例では、患者1と患者3が同じ施設での接触歴(入所者と職員の関係)があるものの、患者1がイソニアジド(INH)耐性例であったのに対して、その後に診断された患者3は「薬剤耐性なし」であったことから、患者1から患者3への結核伝播は否定できる。また、感染性期間の比較から、患者2から患者1、および患者3から患者1、2への伝播は考えづらい。本例の場合、患者2と患者3には共通の趣味(パチンコ)があり、両患者の感染性期間や診断

時期を踏まえると、患者 2 から患者 3 への最近の結核感染伝播と推定し、両患者が利用したパチンコ店名とその利用時期等に関する積極的疫学調査が必要という結論が得られる。

結核登録票に記録された情報から、患者同士が物理的に接触し得ない事実が把握された場合、その時点で最近の結核感染伝播は否定的となる。具体的には、クラスター形成した患者 2 人中 1 人が寝たきりで自宅から出ていない、あるいは、クラスター形成した 2 人のうち 1 人の感染性期間にもう一方の患者は海外に滞在していたなどである。なお、複数の結核菌がクラスター形成した原因が、結核菌検査の工程における試料汚染(コンタミネーション)であった事例が国内外で報告されている^{8,9)}。最近の感染伝播が考えられないようなクラスター形成事例において、同一検査施設で結核菌の検査が行われていた場合、試料汚染の可能性を考慮しなければならない⁷⁾。

5-1-2 新たな感染ルートの検索

取得済みの疫学情報による比較を行った結果、最近の結核感染伝播の可能性が残っていた場合、クラスター形成した患者間の「場所」と「時間」の共有の有無を追究する。国内では、医療機関、高齢者施設、学校、刑務所、パチンコ店、およびインターネットカフェなどが結核感染伝播の「場所」として挙げられている^{3,4,10,11,12)}。これら施設を含め、各自治体において結核感染伝播リスクの高い施設を予め設定しておき、結核菌が分離された結核患者に対して一律に施設利用の有無を聞き取りしておくことで、クラスター形成時の調査が進めやすくなる。患者間に「場所」の共通項が見出された後には、具体的な施設名や利用時間帯などの詳細な聞き取りを行うが、保健師と患者との信頼関係の程度、およびクラスター形成した全患者のプライバシー保護などを踏まえながら慎重に対応する。なお、前章に記載した「過去に同一流行菌株に感染した者の集団の中から最近になって複数の結核患者が発生した場合」が想定された際に、過去に遡った調査(例えば、高齢者によるクラスター形成事例における、小中学校や疎開先が同一であったかの調査)を行うことは否定しない。しかし、その調査で得られた成果が現代の結核患者を減らすことに直結するかという視点に立つと、「最近」の結核感染伝播の追究を優先したほうが合理的と考えられる。

5-1-3 疫学調査結果の分類

結核登録票情報の比較、および追加の聞き取り調査を経て、クラスター形成した患者間の関連性は、以下の 3 群に分類される:①関連性あり(患者間に具体的な場所と時間の共有が確認された場合)、②関連の可能性あり(患者間に具体的な場所の共有は確認されたが、時間の共有までは確認できなかった場合)、③関連性不明(患者間に場所と時間の共有が確認されなかった場合)^{7,13)}。VNTR 分析の数字パターンが一致か類似かによる場合分けとしては、一致の場合は上記の分類によるクラスター形成として良い。しかし、類似の数字パターン(1 領域違いなど)の場合、関連性あり、もしくは関連の可能性ありと判断された患者のみをクラスターに残し、関連性不明の患者は、由来の異なる株が類似の数字パターンを示し

たとえクラスターから除外する¹⁴⁾。つまり、類似の数字パターンの場合は、疫学的関連性が確認された時のみクラスター形成にするという「条件付き一致」となる。

5-1-4 分子疫学調査によって得られる公衆衛生上の利益

VNTR 分析と保健所における実地疫学調査の組み合わせによって得られる公衆衛生上の利益を、前章に示した「事前の疫学情報を伴う限定的な分析」と「網羅的な分析」に分けて表 1 にまとめた^{3,15)}。

表 1 結核菌 VNTR 分析と保健所の実地疫学調査の組み合わせにより得られる公衆衛生上の利益

	事前の疫学情報を伴う限定的な分析	網羅的な分析
1 散発事例の確認	△	○
2 実地疫学調査で見出された患者間の関連性への科学的裏付けの付与	○	○
3 集団感染事例の追跡	△	○
4 新たな感染リスク集団の探知	×	○
5 未知の感染経路の探知	×	○

○：対応可能、△：一部対応可能、×：対応不可能

初めに、散発事例の確認について、網羅的な分析では約 7 割がクラスター非形成となるが^{3,4,6)}、調査した地域内において、それら由来患者を発端とした感染伝播がないことを確認できる点は、結核対策の重点を置くべき対象を絞り込むための貴重な科学的根拠となる。また、限定的な分析であっても、例えば、同一医療機関内で連続して発生した結核患者が院内感染によるものか検証する場合、VNTR 分析でクラスター非形成だった事実をもって院内感染が否定できる。加えて、院内感染がなかったことを早期に確認できれば、医療機関における接触者健康診断の要否の決定にも応用可能となる。

次に、実地疫学調査で見出された患者間の関連性への科学的裏付けの付与では、各事例に科学的な結論を与えることで、実地疫学調査という知識や経験に頼らざるを得ない困難な作業に対する不安を払拭し、調査を担当する保健師に自信をもたらす。また、集団感染事例の追跡は、事前の疫学情報を伴う限定的な分析の場合、VNTR 分析結果を基に集団感染事例に該当しない患者を除外する作業となる。一方で、網羅的な分析では、地域内

全体の患者集団から集団感染事例に該当する患者を抽出する作業となり、予想外の患者が同一クラスターに入ることが多い^{3,4)}。

最後に、新たな感染リスク集団の探知、あるいは未知の感染経路の探知に役立つ点については、網羅的な分析における「予想外の患者が形成したクラスター」を精査することで探知が可能となる。新たな感染リスク集団等の発見により、結核の感染の拡がりや想定される集団に対する追加の接触者健康診断も可能になる。併せて、それら事例の蓄積が各地域における結核感染伝播の全体像の把握につながるため、注視すべき対象(施設、職種など)に対する重点的な結核対策の根拠となっていく。

5-1-5 今後の分子疫学調査の展望

保健所の実地疫学調査に衛生研究所の結核菌遺伝子型別情報を組み入れることは、クリアすべき課題が多いことも事実であるが、得られる利益が多いこともまた紛れもない事実である。衛生研究所は VNTR 分析を通して公衆衛生の向上に貢献しているという自負を持ちながら保健所との良好な連携体制を築き、保健所は衛生研究所から得た科学的根拠を基に現場での結核対策を実践するという Win-Win の関係が各自治体で形成されることを望みたい。そして、最終的には各自治体の分子疫学調査の進展が国内の結核患者減少という大いなる成果に結びつくことを期待している。

【参考文献】

1. 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 菅原 勇, 加藤誠也. 国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型(VNTR)分析システム. 結核 2008; 83: 673-678.
2. Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, Nakanishi N, Caviedes L, Coronel J, Sheen P, Wada T, Taype CA, Shaw MA, Moore DA, Gilman RH. Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. PLoS One 2012; 7: e49651.
3. 瀬戸順次, 阿彦忠之, 和田崇之, 長谷 篤, 山田敬子. 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. 結核 2013; 88: 535-542.
4. Seto J, Wada T, Suzuki Y, Ikeda T, Mizuta K, Yamamoto T, Ahiko T. *Mycobacterium tuberculosis* transmission among elderly persons, Yamagata Prefecture, Japan, 2009-2015. Emerg Infect Dis 2017; 23: 448-455.
5. 平成 28 年度衛生微生物技術協議会報告資料(結核レファレンス). http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/reference/H28_TB.pdf
6. Iwamoto T, Fujiyama R, Yoshida S, Wada T, Shirai C, Kawakami Y. Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan. J Clin Microbiol 2009; 47: 3340-3.
7. Anderson L, Tollefson D, Bloss E, Armstrong L, Woodruff RY, van den Hof S.

Understanding and using tuberculosis data; Chapter 3, Using genotyping data for outbreak investigation. WHO 2014: 83-107.

8. 田丸重貴. 結核分子疫学調査からの院内コンタミネーション発見事例. 日本公衆衛生雑誌 2015; 62: 102.
9. Martín A, Herranz M, Lirola MM, Fernández RF; INDAL-TB group, Bouza E, García de Viedma D. Optimized molecular resolution of cross-contamination alerts in clinical mycobacteriology laboratories. BMC Microbiol 2008; doi: 10.1186/1471-2180-8-30.
10. 豊田 誠. 若年者を中心に複数の経路で拡大した結核集団感染. 結核 2012; 87: 757-763.
11. Ohkado A, Murase Y, Mori M, Hasegawa N, Otsuka G, Nagamine M, Maeda H, Uchimura K, Ohmori M, Yamada N, Maeda S, Kato S, Mori T, Ishikawa N. Transmission of specific genotype streptomycin resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in the Tokyo Metropolitan Area in Japan. BMC Infect Dis 2009; 9: 138.
12. 結核集団感染事例一覧について, 平成 25 年 8 月 14 日付け厚生労働省健康局結核感染症課結核対策係長通知, http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/kekaku-kansenshou03/dl/renraku.pdf.
13. Walker TM, Ip CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, Eyre DW, Wilson DJ, Hawkey PM, Crook DW, Parkhill J, Harris D, Walker AS, Bowden R, Monk P, Smith EG, Peto TE. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. Lancet Infect Dis 2013; 13: 137-46.
14. Allix-Beguec C, Wahl C, Hanekom M, Nikolayevskyy V, Drobniewski F, Maeda S, et al. Proposal of a consensus set of hypervariable mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat loci for subtyping of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolates. J Clin Microbiol 2014; 52: 164-72.
15. 瀬戸順次. 保健所の結核対策における結核分子疫学の役割 複十字 2015; 365: 18-19.

第6章 結核菌遺伝子型別情報を用いた接触者健診等の実施事例(阿彦忠之)

結核菌遺伝子型別情報と保健所の実地疫学調査情報の組み合わせによって得られる公衆衛生上の利益(新たな感染リスク集団の探知など)については、第5章で解説したとおりである。本章では、結核菌遺伝子型別情報の活用による公衆衛生上の利益の具体例として、接触者健診の対象拡大あるいは不必要な接触者健診の回避などにつながった事例について紹介する。(以下の事例紹介では、保健所等の取り組みの経過をできるだけ忠実に再現したが、具体的な年月日や患者の合併症等の表現について一部改変を行った。)

<事例1> 通所型介護事業所での感染事例

網羅的な VNTR 分析(集団感染が疑われる事例等に限定せず、地域内の菌陽性結核患者全例の結核菌株を可能な限り収集して分析)を実施している県の衛生研究所から保健所あてに、同管内の結核患者2名(患者A、B)の喀痰から分離された結核菌の24領域VNTR分析パターンが完全一致したとの連絡があった。これを受けて保健所は、患者AとBの実地疫学調査情報(保健師による聞き取り調査結果等)を再確認したが(図1)、両者の間に接触歴等の関連性を認めることができなかった。

しかしながら、両者とも管内X市在住の高齢者であり、結核診断の時期と排菌状況からみて、患者A(2015年8月:喀痰塗抹3+)から患者B(2016年3月:喀痰塗抹陰性・培養陽性)への感染伝播の可能性があると考えた保健所は、2015年5月~8月頃を中心に、両者

図1 通所型介護事業所での感染事例



【患者A】

介護施設入所のための診断書作成目的で、2015年7月31日にA医院受診し胸部X線で浸潤影→8月7日にB病院受診、胸部CTで空洞性病変、8月21日に胃液検査で抗酸菌塗抹(+), 結核菌群と同定され肺結核と診断。その後の吸引痰塗抹(3+)が判明。診断時に咳・痰等の呼吸器症状なし。症状は37℃台の微熱及び体重減少のみ。

【患者B】

2016年2月中旬~心窩部痛、背部痛、食欲不振あり、C医院受診。胃潰瘍疑いで胃内視鏡検査は「異常なし」であったが、胸部X線検査で左肺陰影・胸水を指摘されD病院へ紹介。背部痛が悪化した状態で3月17日にD病院受診し、胆石+急性膵炎の診断で入院。入院後に気管支鏡検査→気管支洗浄液の塗抹(+), 結核菌群と同定され肺結核と診断。その後の喀痰塗抹(-)培養(+)

⇒ 上記の診断経過からみて、患者AとBの間に疫学的関連性はないと思っていた。

⇒ VNTR分析(24領域)完全一致の結果を受け、保健所が改めて疫学調査を実施した結果、同一の通所介護事業所のデイサービス利用歴(接触歴)が判明。

⇒ デイサービス利用時に患者Aから患者Bへ感染伝播があったと推定し、同施設の職員及び利用者を対象とした接触者健診を実施。

の生活状況や共通する高齢者サービス等の利用がないかなどを改めて調査した。その結果、患者 A の診断直前まで、両者とも X 市内にある同一の通所型介護事業所でデイサービスを週 2 回～3 回利用していたことが判明し、同一月日の利用歴も確認された¹⁾。

結核菌遺伝子型別情報の一致、および同一介護事業所での明らかな接触歴が確認されたことから、保健所は改めて当該事業所に対する積極的疫学調査を行い、2015 年 5 月～8 月に患者 A との濃厚接触歴を認めた者(事業所の職員、利用者)に対して接触者健診(インターフェロン γ 遊離試験など)を実施した。

<事例 2> 地域における大規模な集団感染の追跡事例

Y 保健所管内(人口 10 万対結核罹患率 \approx 10)では、2008 年から 2013 年にかけて大規模な結核集団感染があった(図 2)。発端患者(推定感染源)は、2009 年 11 月新登録の患者 A(20 歳代、bII1、喀痰塗抹(3+))であり、過去の胸部 X 線写真の再読影結果や咳症状の経過からみて、少なくとも 1 年以上前から感染性の状態であったが、結核の診断が大幅に遅れた事例であった。この患者が診断される前の 2008 年 11 月から 2009 年 9 月までに届出のあった結核患者 3 人と患者 A から検出された結核菌について RFLP 分析を実施した結果、すべて同一の遺伝子型であると判定された(その後に実施した VNTR 分析でも同一パターンであった)。この結核患者 3 人に共通する接触者が患者 A であったことから、保健

図2 大規模な集団感染の追跡事例



◆ 発端患者 [20歳代, 男, bII1, 喀痰塗抹(3+)]

過去の胸部X線写真の再読影の結果, 診断の3年前から異常影あり,
診断の遅れが大きかった。咳症状も1年以上前からあり。

- = 関連性あり(発端患者との接触歴あり)
- △ = 関連の可能性(発端患者と共通の遊技施設を利用)
- = 関連性不明

⇒ 発端患者の診断・登録後1年半以上経過すると、保健所による
実地疫学調査では発端患者との関連性を追えない症例が増加

⇒ 疫学調査を重ねている過程で、特定の遊技施設の利用歴を有
する患者が多いことが判明 → 当該施設の従業員等を対象に
接触者健診(QFT検査等)を実施

所では結核患者 A を発端とする集団感染を疑い、この患者の家族、友人、職場の同僚等を対象とした接触者健診を実施した。また、2009 年 11 月から 2010 年末までに発端患者居住地域周辺で登録された菌陽性肺結核患者 13 人(発端患者以外)の結核菌遺伝子型別結

果が発端患者のパターンと一致し、大部分が患者 A との明らかな接触歴を認めたため、地域内で大規模な集団感染が発生していることが推定された。

2011 年以降の新登録菌陽性患者については、接触者健診を契機とした発見例でなくとも、原則として県内全例について VNTR 分析(24 領域)を実施した。その結果、Y 保健所管内では 2011 年以降も、上記の集団感染例に共通する VNTR 分析結果と同一パターンの結核菌が検出された患者の届出が続いた。ところが、2011 年以降の新登録患者の大部分は、結核菌遺伝子型別情報が患者 A と一致していても、保健所による実地疫学調査(保健師による患者等への聞き取り調査)では患者 A との接触歴が確認できず、患者 A との関連性は不明であった。

2011 年以降の新登録患者のうち、結核菌遺伝子型別情報が患者 A と一致したにもかかわらず、患者 A との接触歴を認めなかった者については、保健所が患者の仕事以外の趣味や行動歴等を含めた疫学調査を重ねた。その結果、これらの患者には、特定の遊技施設(パチンコ店)の利用歴があるという共通性を探知し、患者 A および患者 A からの二次感染による発病患者(2010 年末までに登録された 16 人)の一部もこの遊技施設の利用歴があることを確認した。そこで Y 保健所では、この調査結果を遊技施設に説明し、接触者健診の優先対象(第一同心円)として、施設の従業員に対して IGRA(QFT 検査)を実施した。その結果、IGRA 陽性者は確認できず、当該遊技施設を感染経路として特定するには至らなかったが、この地域内に結核感染リスクの高い施設環境が存在する可能性を示唆する結果であり¹⁾、保健所では実地疫学調査に用いる調査票の内容や調査方法を見直す契機となった。

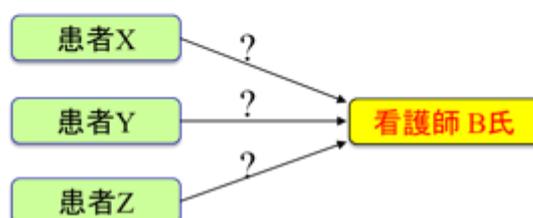
結核の集団感染では上記の例のように、発端患者(推定感染源)の診断・届出から 1 年～1 年半後までの新登録患者については、結核菌遺伝子型別情報と実地疫学調査情報の組み合わせにより、発端患者との疫学的関連性を追える場合が多い。しかし、1 年半～2 年以上経過すると、結核菌遺伝子型別情報が発端患者と一致しても、発端患者との接触歴等の疫学的関連性を追えない者が目立ってくる。その一方で、集団感染の発端患者との関連性は見出せないものの、地域の中にこれまで未知であった感染リスク環境を探知できる可能性もある。結核低まん延下においては、網羅的な VNTR 分析を実施することにより、結核感染に関する未知の高リスク集団や高リスクな施設環境等を探知し、その集団等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(IGRA 等)を実施するという方策も有効と考えられる。

<事例3> 院内感染か否かの検討に役立った事例

図3 院内感染か否かの検討に役立った事例

患者ID	登録年月	性別年齢	病型菌所見	既往歴合併症	A病院での診療経過等	看護師B氏の関わり
X	2013年4月	男 80歳代	bⅢ3 喀痰 S(-)C(+)	結核治療歴 (19歳時)	前年12月～食欲低下、3月初旬～咳、発汗、3月27日高熱あり近医の往診後、紹介により3月29日 A病院受診。胸部X線で肺炎像あり入院。喀痰塗抹(-) PCR(結核菌群)で4月10日に肺結核と診断。その後、培養(+)も判明	外来受診時に本例の診察介助
Y	2014年4月	男 70歳代	bⅡ2 喀痰 S(1+)	結核治療歴 (20年前) 糖尿病	4月中旬から咳あり、4月18日 A病院受診し胸部X線で右浸潤影、4月19日喀痰検査→24日に塗抹(1+) PCR(結核菌群)と判明し肺結核と診断	外来受診時に本例の診察介助
Z	2015年8月	女 90歳代	bⅡ2 喀痰 S(2+)	特になし	7月初旬から食欲低下、倦怠感あり、次第に増強し、7月30日 A病院受診し胸部X線で肺炎像あり入院。入院後の喀痰検査でG1号一再検査で8月10日に 喀痰塗抹(2+) 結核菌群と判明し肺結核と診断。	入院中の病棟で本例の看護(食事セッティング、トイレ誘導)に数回従事

注) 菌所見のSは塗抹検査、Cは培養検査の結果



2016年5月18日の15時頃に、S保健所の保健師から衛生研究所の結核菌検査担当者あてに電話があり、以下のような院内感染を疑う結核患者の届出があり病院も心配しているので、できるだけ早期にVNTR分析が実施してほしいという依頼があった。

※保健所から衛生研究所への電話の内容

今回の届出患者は、管内のA病院(結核病床なし)に勤務する30歳代の看護師(B氏)で、2016年4月27日に肺結核と診断された。職場の定期健診による発見例で、無症状であり、胃液の塗抹検査は陰性(培養中)であったが、胸部CT画像所見から肺結核(bⅢ1)と診断され、結核専門医のいる病院(以下、結核専門病院)に紹介され通院治療を開始。誘発喀痰の塗抹検査も陰性(培養中)であった。保健所保健師がB氏本人と面接後、勤務先の病院を訪問して積極的疫学調査を実施した結果、同院では入院中または通院中の患者の中から2013年～2015年の3年間に3人(患者X, Y, Z)が結核と診断されていた。B氏は職務上、この3人が結核と診断された当時、外来での診察介助や入院中の看護業務を通じて3人全員と接触歴があることが判明した(図3)。ただし、軽度の接触歴であったことや初発患者が低感染性であったことなどに理由に、B氏はいずれの場合も接触者健診の優先対象(いわゆる第一同心円)とされず、職場の定期健診対応でよいと判断されていた。B氏の届出受理の14日後に誘発喀痰の培養結果が陽性(結核菌群)と判明したが、B氏には結核の既往例や家族歴等はなく、保健所としては院内感染(上記3人のいずれかからの感

染)が否定できないので、3人とB氏の喀痰等から分離された結核菌のVNTR分析を実施してほしいという内容であった。(結核菌分子疫学調査の実施については、保健所保健師が患者との面接時に説明し、同意を得ているとのこと。)

※衛生研究所での対応

保健所から電話があった日は、看護師B氏の届出の20日後であった。その時点でB氏の誘発喀痰の培養陽性が判明していたので、保健所、衛生研究所および検査を行ったC病院の間で調整のうえ、衛生研究所の研究員が液体培地底部の培養液を数滴マイクロチューブに分取した検体(加熱処理後の死菌検体)を同研究所へ搬送し、同日の17時30分にVNTR分析(24領域)を開始した。

翌日(5月19日)10時にVNTR分析の結果が判明し、B氏のVNTRパターンは、分析済みであった3人(患者X,Y,Z)のVNTRパターンのいずれとも不一致であった。3人の患者が肺結核と診断された当時の疫学調査情報からみても、B氏の感染リスクが高いとはいえない状況であったが、VNTRパターンの不一致を根拠として、院内感染を否定する情報を保健所が自信をもって病院に提供することができた。同時に、「VNTRパターン不一致」の検査結果は、不必要な接触者健診を回避できる情報としても有用であった。

本事例では、保健所から衛生研究所に電話で依頼のあった当日(約2時間後)にVNTR分析を迅速に開始し、その翌日には分析結果を還元することができた。その背景には、日頃から保健所と衛生研究所および結核専門病院が定期的な結核業務検討会等を通じて情報交換を行い、担当者相互の信頼関係を築いていたことなどが促進要因になったと考える。

<事例4> 結核未診断例が院内感染の原因と推定された事例

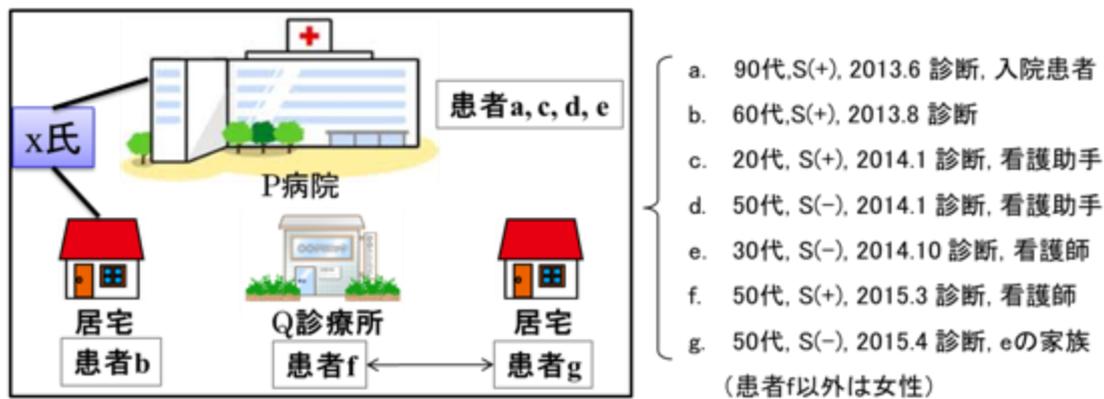
2014年1月にP病院(結核病床なし)に勤務する看護助手2人(患者c、d)が肺結核と診断され保健所に届出があった。衛生研究所でVNTR分析(24領域)を実施した結果、この2人の喀痰から分離された結核菌のVNTRパターンが一致したほか、同じ保健所管内で2013年6月登録の肺結核患者a(90歳代、喀痰塗抹陽性)から検出された結核菌も、この2人のVNTRパターンと同一であることが判明した。

※実地疫学調査による感染経路は「患者a→看護助手」?

保健所が調査した結果、患者aは10年前から悪性リンパ腫等でP病院に定期通院していたが、2012年は8月中旬～9月中旬にかけて熱中症のためP病院で入院治療歴(入院期間は25日間)があった。2013年に入ってから同病院への通院および介護サービス(短期入所、デイサービス)を利用しながら療養していた。2013年6月14日(金)のデイサービス利用時の検温で38℃台の発熱を認めたため、職員付添いのうえP病院を受診。胸部X線検査で肺炎が疑われ同日入院。症状は発熱のみで、咳・痰等の呼吸器症状はなかったが、胸部CT検査で肺結核が強く疑われたため、吸引痰を検査した結果、6月15日(土)に塗抹ガフキー2号が判明し肺結核(bII2)と診断。その後は個室管理および空気感染予防

策を講じたうえで入院を継続し、6月17日(月)にR病院(結核病床あり)へ転院していた。転院後の吸引痰検査では塗抹(2+)、同定結果も結核菌群であった。上記のとおり、患者aが結核診断時のP病院への入院は短期間で、呼吸器症状のない病状であったが、塗抹陽性例であり、入院した病棟の看護助手2人が7ヵ月後に肺結核と診断されVNTRパターンが完全一致していることから、保健所は当初、P病院における患者aから看護助手への院内感染を疑っていた(図4-(1))。

図4-(1) 結核未診断例が院内感染の原因と推定された事例



- ・当初、P病院入院患者aからc, d への院内感染を疑った
- ・その後、P病院と無関係の患者bもVNTRパターンが一致
- ・共通する感染源(疑い)として、患者bの母であるx氏(P病院に入院歴あり)が浮上

※分子疫学調査の結果から意外な展開！

ところが、衛生研究所が2009年以降に県内の菌陽性結核患者から分離された結核菌を原則全株収集しVNTR分析を実施した結果のデータベースを確認したところ、2013年8月登録の結核患者bからも上記3人と同じVNTRパターンの結核菌が検出されていた。これを受けて保健所が調査した結果、患者bはP病院への受診歴は全くなかったが、患者bと同居の母(x氏)が2012年8月～9月にP病院で入院歴があることがわかった(図4-(2))。P病院の協力を得て詳しく調査した結果、x氏は「末期肺がん」と診断され、入院時にステロイド治療などを行ったが病状が悪化し死亡退院していた。x氏は結核治療歴があり、最初に肺がんが疑われた2010年6月から死亡する2012年9月までの胸部X線画像を遡り調査したところ、2012年8月中旬の入院時の胸部画像に肺結核を強く示唆する所見(空洞を伴う浸潤影や散布影等)が認められた。

以上の状況から、一連の結核患者の感染源は、x 氏（結核未診断のまま死亡）と推定され、感染経路は ①家族内感染(x 氏→患者 b)、および②P 病院での院内感染(x 氏→ 入院患者 a、看護助手 c、d)と推定された²⁾。

※他の診療所でも院内感染

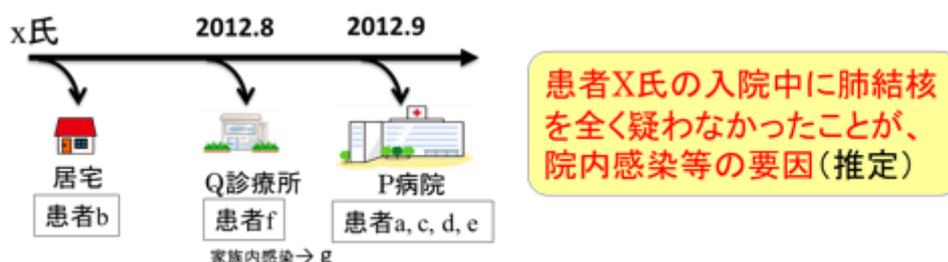
その後も同保健所管内では、2014 年 10 月に P 病院の看護師(患者 e)が肺結核と診断されたほか、2015 年 3 月には Q 診療所の看護師(患者 f)が気管結核、2015 年 4 月には患者 e の家族(g)が肺結核と診断され、これらの患者から検出された結核菌の VNTR パターンも一連の結核患者のものと完全一致していた。Q 診療所には、x 氏が P 病院に入院する前の 2012 年 8 月に通院歴があるので、この通院時に院内感染(x 氏→患者 f)があったと推定された。

本事例の推定感染源は、肺がんの診断で死亡退院した患者(結核は未診断)であったが、胸部 X 線画像等の遡り調査からは感染性肺結核の状態での入院していたと推定され、入院中に結核を全く疑わなかったことが院内感染等の要因と考えられた²⁾。接触者健診については、この患者が 2012 年に通院または入院した病院・診療所の協力を得て保健所が積極的疫学調査を綿密に実施し、当該患者との接触歴のある職員や入院時の同室者等を対象に IGRA や胸部 X 線検査等を実施した。その結果、LTBI と診断され治療を実施した者が多数に上った。また、LTBI 治療中の結核発病例(患者 e)も認められた。

図4-(2) 推定感染源の患者X氏の経過等

2010年 6月	気管支鏡検査、腫瘍マーカから肺がん疑い
2012年 8月	体調不良のため Q診療所に通院
2012年 8月	P病院に救急搬送→診断「末期の肺がん」
2012年 9月	P病院に入院し、ターミナルケアの目的でステロイド投与したが症状悪化し死亡。死亡までの期間に頻回の吸引と口腔ケアを実施（結核は未診断）

x 氏：60年前に結核の治療歴あり、胸部X線画像の遡り調査は肺結核を示唆



⇒ 患者7人(a ~ g)の24領域VNTRパターンは完全一致

本事例も「事例1」と同様に、集団感染等を疑った事例に限定せず、県内の菌陽性結核患者の喀痰等から分離された結核菌を網羅的に収集して分子疫学調査を実施したことが、実地疫学調査では気付かれない感染源・感染経路の探知につながった好事例である。

【参考文献】

1. 瀬戸順次, 阿彦忠之, 和田崇之, 長谷篤, 山田敬子. 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. 結核 2013; 88: 535-542.
2. Seto J, Wada T, Suzuki Y, Ikeda T, Mizuta K, Yamamoto T, Ahiko T. *Mycobacterium tuberculosis* transmission among elderly persons, Yamagata Prefecture, Japan, 2009-2015. Emerg Infect Dis. 2017; 23: 448-455.

おわりに(加藤誠也)

結核に関する特定感染症予防指針に分子疫学的調査研究の必要性が記載されて6年が経過し、事業として取り組む自治体が増えていますが、全国的な展開、さらには自治体間の対策に活用できる全国データベースを構築するまでには様々な課題が残っています。本篇は実施体制の構築、実際の運用、結果の解釈や活用の方法等に関する疑問や要望になるべく対応することを意図して作成されましたが、今後とも、研究成果や実施経験によって内容を更新する必要があります。

ご覧いただき内容にお気づきの点や新しい治験等があれば、ご指摘いただけますようお願いいたします。皆様のご協力によって本書がそれぞれの地域さらには日本の分子疫学調査研究の実施のために、少しでもお役に立てれば幸いと存じます。

Q&A

Q1. 結核菌の検体が複数の部位(痰、胃液など)から得られている場合、どちらを検査したほうがいいのですか？

A: どちらでも構いませんが、感染伝播を考える上では痰由来の菌株を優先して検査するほうが望ましいと考えられます。ただし、日本は結核中まん延状態(人口 10 万人あたりの新登録患者数が 10 人台)であり、1 人の結核患者は 1 種類の菌のみに感染していることが多いと想定されるため、複数の菌株のうち状態が悪いもの(例 緑膿菌が混合発育している)がある場合は、状態の良い(純培養状の)菌株を選択してください。

Q2. 菌株が入手できてから VNTR 分析が終わるまでどのくらいの期間がかかりますか？

A: 地方衛生研究所で菌株を受領してから結果を出すまでの期間は、少ない株数であれば最短 1 日、遅くとも 1 週間以内です。固形培地に発育した結核菌を入手することが多いですが、結核菌の発育には数週間～数ヶ月を要することから、液体培地培養菌の入手により分析結果を得るまでの期間を短縮できるようになります(詳しくは第 4 章 結核菌遺伝子型分析結果の報告の頁参照)。

Q3. VNTR 分析はどのような事例の対策に有効なのでしょうか？

A: 疫学調査で集団感染の可能性(患者間の疫学的関連性)がある場合、集団感染が起こっているのか、あるいは同時多発事例であるのかを区別し、接触者健診の範囲を決定する際に有効です。さらに、接触者健診における感染経路の証明、疫学的に疑いが持たれなかった事例での感染経路の発見等が可能になります(詳しくは 1-2 結核対策における分子疫学の役割や第 6 章の事例を参照)。また、VNTR 分析を保健所の結核対策に組み入れる最大の目的は、各地域における「最近の結核感染伝播」の実態や特徴を明らかにすることです。そのため、保健所が「最近の感染の有無を知りたい」と考えた事例が、VNTR 分析に有効な事例と考えられます(第 5 章 結核菌遺伝子型別情報を用いた疫学調査の頁参照)。

Q4. 海外での分子疫学調査の普及について教えてください？

アメリカ、イギリス、オランダなど多数の国々が、VNTR 分析をはじめとした分子疫学調査を実施しています。

Q5. 患者が最初に A 病院で喀痰検査を実施し、その後抗酸菌塗抹陽性と判明したため結核病床のある B 病院に入院しました。どちらの検査でも結核菌が培養陽性となりましたが、その場合 A、B どちらの病院に保有している菌株を調べるべきでしょうか？

疫学的に外来性再感染の可能性が低い場合(例 A 病院から B 病院への転院までの日数が短い、転院の過程で感染性のある結核患者と接触していない等)であれば、どちらの菌株を調べても良いと考えられます。各病院の検査の実態に合わせて、合理的な対応をしてください。例えば、A 病院が県外の民間検査センターに菌検査を依頼していて、B 病院が自施設で菌の検査をしているのであれば、B 病院から菌株をいただいたほうがスムーズな対応ができると考えられます。

Q6. 結核菌の取扱いについて、感染症法上の注意はありますか？結核菌を保管する施設で災害が発生した場合はどうしたらよいですか？

結核菌は特定病原体であるため、取扱いには感染症法に基づく特定病原体等の管理規制に基づいて必要な基準等が定められています。結核菌は薬剤の感受性によって三種病原体と四種病原体に分類され、その取扱い基準等が異なります。災害時の応急措置(感染症法第 56 条の 29)については、事故が発生した場合は、電話連絡等により速やかに警察官又は海上保安官に届け出ることとされています。また厚生労働省健康局結核感染症課に一報をいれることが義務づけられています(第 3 章 3-1 結核菌株の分離・保存・輸送方法の頁参照)。なお、この場合の事故とは盗取や所在不明を指します。

Q7. VNTR 分析の結果、菌株が同一であるとする判断基準はなんですか？JATA12 領域のうち、一領域違いの場合でも、同じ菌株と考えてよいのでしょうか？

結核菌 VNTR 分析において、全ての数字パターンが一致した場合、由来患者が同一株に感染した可能性が示唆されます。一方で、結核菌の偶発的な遺伝子変異に伴い、同一菌由来の感染伝播であっても数字パターンが一致しない場合があります。そのため、衛生研究所から保健所には、少なくとも 1 領域違いの情報までは報告したほうが良いとされています(第 4 章 3 VNTR 分析一致領域数の解釈、4 同一遺伝子型の意味の頁参照)。

Q8. 網羅的な VNTR 分析結果で菌株の遺伝子型が一致した場合、どのような調査を行えば良いのでしょうか？

大きく 3 つの原因が考えられます。①患者間で最近の結核感染伝播があったが、保健所で把握できていない場合、②過去に同一流行菌株に感染した者の集団の中から最近にな

って(同時期または近い時期に)複数の結核患者が発生した場合、③VNTR 分析の識別能の限界により異なる菌株が VNTR 分析一致と判定された場合です。保健所としては、①の可能性を少しでも減らせるように、VNTR 分析が一致した由来患者間で「最近の感染」があったと確認できた場合は、患者に共通する利用施設等における接触者の健診について再度検討する必要があります。結核は人から人へ空気感染する感染症であるため、結核菌 VNTR 分析が一致した由来患者が「同じ場所」を共有していたか、そして「同じ時間」を共有していたかを調べるのが最重要です。地域によって調べるべき「場所」は異なると考えられますが、国内では、医療機関、高齢者施設、学校、刑務所、パチンコ店、及びインターネットカフェなどが結核感染伝播の「場所」として挙げられています。「時間」については、むやみに長期間を調査する必要は無く、感染源の排菌期間を考慮すれば良いと思われま(詳しくは、第 5 章 結核菌遺伝子型別情報を用いた疫学調査の頁参照)。

Q9. 患者数が少なく VNTR 分析調査から疫学的な共通点を見出すのが難しい場合(一致しても 2~3 名)があります。対策に活用するには時間がかかるのではないですか？

集団感染等を疑った事例に限定せず、県内の結核患者の喀痰等から分離された結核菌を網羅的に収集して分子疫学調査を実施しデータを蓄積していたことが、実地疫学調査では気付かれない感染源・感染経路の探知につながった好事例が報告されています(第 5 章 分子疫学調査によって得られる公衆衛生上の利益、第 6 章<事例 4>結核未診断例が院内感染の原因と推定された事例の頁参照)。データベースとの関連で考えると、即時的な活用が可能な場合が想定されます。

Q10. 地方衛生研究所や結核研究所、厚生労働省で、VNTR 分析結果のとりまとめはしていますか？保健所が個々にオーダーして 2 つの検体が一致するか等の結果はわかりますが、別の保健所がオーダーした検体で一致することもあるのかもしれないので、その辺はどうなっているのでしょうか？

自治体によって違いがあります。県単位でとりまとめをしているところ、保健所設置都市のみで取りまとめているところなど様々です。都道府県単位ひいては全国規模で VNTR 分析結果のとりまとめや情報共有がなされれば、疫学的関連性や地域の中のこれまで未知であった感染リクスを探知できる可能性があります。

Q11. 同じ患者から得られた菌株でも A 施設と B 施設の結果が一致していない場合の解釈はどのようにしたらよいのでしょうか？

A 施設と B 施設の菌株が本当に同じ患者由来なのかをまず確認する必要があります。A 施設から B 施設に医療機関を変更し採取した痰が違う時期のものであれば、別の結核菌による外来性再感染の可能性も否定できません。採取期間が近接しており、かつ菌株の由来が同じ場合は、検査上のエラーが考えられます。また、VNTR 領域のリピート数は、PCR 産物をリピート数に換算するための換算表を用いて決められています。このため、施設間で使用している換算表に違いがあると、同一遺伝子型の菌株が、異なる遺伝子型と判断されてしまう場合があります(第 2 章 データの施設間比較時の注意点の頁参照)。

Q12. VNTR 分析結果の県を越えた連携についてどのような対応すればよいのでしょうか？

広域な集団感染が考えられる場合は各自治体同士で連携するため、集団感染対策会議を開催して情報共有する必要があります。個別の患者由来の結核菌 VNTR 分析結果を他県のデータと照合したい場合(例 A 県在住の結核患者の勤務地が B 県だった場合に、当該患者の分析結果と B 県データベースを照合)は、都道府県庁(あるいは市役所)・保健所・衛生研究所の連携により対応可能です。逆に、衛生研究所間で VNTR 分析結果(個人情報を伴わない数字パターンの羅列)の照合を行うシステムを確立しておき、一致する患者がいた場合に、保健所等が連携して疫学情報の共有を進めるという方法も考えられます。

Q13. VNTR 分析結果データが増えると、データ管理が難しくなります。ある菌株と類似の菌が存在するか、簡単に識別できるソフトウェアはありますか？

VNTR 分析の数字パターンの一致/不一致を簡便に判定可能なプログラム(エクセルマクロ)が宮城県保健環境センター微生物部より無償で入手可能です(第 4 章 結核菌遺伝子型分析結果の報告、4 VNTR 分析一致領域数の解釈の頁参照)。