

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

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

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

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

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

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

<sup>‡</sup> These six loci composed the international Supply's 15-MIRU-VNTR by combination with JATA (12)-VNTR.

<sup>§</sup> Da03 formed clusters with both Dc08 and Da34.

<sup>¶</sup> PCR products were so long that we could not decide the copy number, but agarose electrophoresis indicated the same product size.

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

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

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

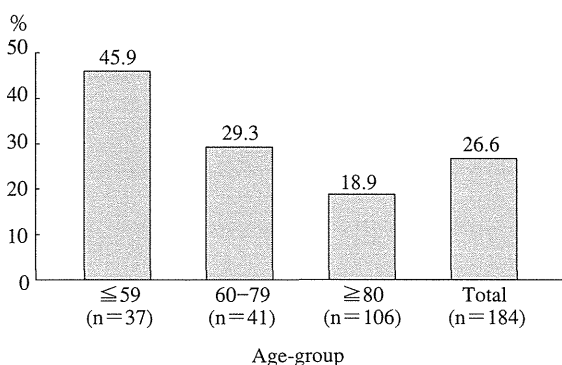


Fig. The clustering rate of 24 loci VNTR analysis by age-group. A cluster was defined when the 24 loci VNTR pattern of each strain was identical or differed by 1 locus.

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

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

山形県内の結核菌184株とpECTs-VNTRパターン9種類との24領域VNTRパターン比較の結果、pECT04, pECT07(M4株<sup>10</sup>)およびpECT08と完全一致した菌株がそれぞれ1株ずつ、計3株確認された(Table 4)。pECT07, pECT08の由来患者には、結核発病前に首都圏での長期の職歴があったが、pECT04の由来患者については県外での感染を示唆する実地疫学情報はなかった。

## 考 察

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

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

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

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

<sup>†</sup>The relationship between tuberculosis patients was identified after additional epidemiological investigation at the Public Health Center.

<sup>‡</sup>The 24 loci VNTR pattern differed by 1 locus from other strains in the same cluster.

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

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

<sup>†</sup> pECT 07 is identical to M4 strain<sup>10)</sup>.

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

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

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

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

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

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

本研究の24領域VNTR分析においてクラスタを形成し

た菌株の約4割は、実地疫学調査結果と組み合わせて分析しても、クラスタ内での関連性が不明であった。この要因としては大きく2点が考えられる。1つは、実地疫学調査の限界として、患者間に最近の接触があったにもかかわらず関連性を見出すことができなかった可能性、あるいは特に高齢者間で形成されたクラスタについて、過去の流行株でのVNTRパターン的一致を捉えたため関連性を把握できなかった可能性である。2点目は、VNTR分析の限界として、本来異なる菌株を同一と判定した可能性である。特に、本研究では24領域VNTRパターンのうち1領域違いであっても同一クラスタとしたため、実際は由来の異なる菌株を同一と判定した可能性は充分考えられる。しかし、1領域違いであっても明らかな関連性を認めたクラスタも存在しており (Table 3: クラスタ番号3, 4, 5, 12のRelated該当例)、本研究では1領域違いを許容したクラスタ形成結果を保健所に還元し、保健所の追加の実地疫学調査によって関連性の有無を最終判定することで、関連性のある事例の見逃しを防ぐことを第一に考えた。

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

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

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

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

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

## 謝 辞

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

## 文 献

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

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

————— Original Article —————

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## A MOLECULAR EPIDEMIOLOGIC ANALYSIS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* AMONG FILIPINO PATIENTS IN A SUBURBAN COMMUNITY IN THE PHILIPPINES

<sup>1</sup>Jaime C. MONTOYA, <sup>2</sup>Yoshiro MURASE, <sup>1</sup>Concepcion ANG, <sup>3</sup>John SOLON,  
and <sup>2</sup>Akihiro OHKADO

**Abstract** [Background] The Philippines is designated as one of the high tuberculosis (TB) burden countries by WHO. We conducted a molecular epidemiologic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected from patients consulting at the health clinics in the city of Santa Rosa, Laguna, a suburban community in the Philippines. [Methods] A total of 116 *M. tuberculosis* isolates were characterized and genotyped using spoligotyping and 15 loci of variable number of tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units (15 MIRU-VNTR). The strains were then compared with the international spoligotyping database (SpolDB4). Cluster analyses were done using 15 MIRU-VNTR and spoligotyping. [Results] Majority of the patients with pulmonary tuberculosis were young (18–29 year age group at 41.4%) and male (62.1%). 86/116 (74.1%) were sputum-smear positive and 43/116 (37.1%) had severe pulmonary tuberculosis. When the genotyping results were compared to the SpolDB4, there were 10 identified Spoligo-International-Types (SITs) with SIT 19 as the predominant SIT (89/116, 76.7%). 10 out of 116 (8.6%) did not match any SIT in the SpolDB4. The distribution of strains according to major *M. tuberculosis* clades was as follows: EAI2\_Manilla (101/116, 87.1%; U 2/116, 1.7%; LAM2 1/116, 0.9%; EAI3\_Ind 1/116, 0.9%; MANU2 1/116, 0.9%. Using univariate and multivariate analysis, there was no significant association shown between the EAI2\_Manilla clade and SIT with patient characteristics such as sex and age groups as well as bacillary load based on sputum-smear positivity and severity of pulmonary tuberculosis. Using logistic regression, no patient characteristic, as well as bacillary load or severity of TB, were significant predictors for clade or SIT. Based on the molecular typing method used, spoligotyping identified 4 clusters and 20 genotypes (16 unique strains) with a Hunter-Gaston discrimination index (HGDI) of 0.409. 15 MIRU-VNTR identified 16 clusters and 69 genotypes (53 unique strains) with an HGDI of 0.960. The combination of spoligotyping and 15 MIRU-VNTR identified 11 clusters and 79 genotypes (68 unique strains) with the highest HGDI at 0.970. High case rate of TB among young people in this community suggests the high transmission rate of infection. However, in the absence of significant association between clustering and age, the interpretation of observed high cluster rate warrants caution, and requires further molecular and epidemiological observation. [Conclusion] This is the first molecular epidemiology study to show the distribution of genotypes of the *M. tuberculosis* strains, systematically and prospectively sampled, of the patient population in a suburban community in the Philippines. The combination of spoligotyping and 15 MIRU-VNTR identified 11 clusters and 79 genotypes (68 unique strains) with the highest HGDI at 0.970. High case rate of TB among young people in this community suggests the high transmission of infection. However, in the absence of significant association between clustering and age, the interpretation of observed high cluster rate warrants caution, and requires further molecular and epidemiological observation.

**Key words:** Tuberculosis, Molecular epidemiology, Spoligotyping, Variable numbers of tandem repeats, *Mycobacterium tuberculosis*, Philippines

### Background

Tuberculosis (TB), long known to be a major cause of

morbidity and mortality throughout the world, has for the past several decades been a neglected disease in both industrialized and developing countries. In 2011, there were estimated 8.7

<sup>1</sup>Section of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, College of Medicine, University of the Philippines Manila, <sup>2</sup>Research Institute of Tuberculosis (RIT), Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA), <sup>3</sup>Department of Parasitology, College of Public Health, University of the Philippines Manila

Correspondence to : Jaime C. Montoya, Section of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, College of Medicine, University of the Philippines Manila, Manila, Philippines,  
(E-mail: jmontoya204@gmail.com)

(Received 5 Mar. 2013/Accepted 15 Mar. 2013)

million new cases of TB (13% co-infected with HIV) and 1.4 million deaths from TB<sup>1</sup>). Most of the cases were in developing countries where *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*) transmission has been associated with factors like crowding and poor or weak public health infrastructure<sup>2</sup>). In the Philippines, tuberculosis is the fifth leading cause of morbidity and mortality in the general population<sup>3</sup>). It is one of the twenty-two high burden countries that account for 80% of the world's TB cases. Approximately 150,000 new smear-positive cases of pulmonary TB are identified every year which represents one-third of the total TB cases, majority of which are smear-negative. This heavy burden of TB may further be compounded by the problems of HIV and multi-drug resistant TB in the country.

One of the identified strategies for TB control is the conduct of molecular epidemiologic studies that will describe transmission patterns of TB and characterization of the circulating *M.tuberculosis* strains. Recent advances in molecular microbiology have allowed the development of molecular tools for the genetic analysis of *M.tuberculosis* strains, which subsequently can provide better insights on the epidemiology of TB. This molecular epidemiology approach, that combines molecular biology with epidemiology, statistics and clinical medicine, permits the formulation of more effective and targeted control strategies. These studies can estimate the fraction of cases attributable to recent transmission or reactivation, confirm laboratory based errors, distinguish endogenous reactivation and exogenous reinfection and identify routes of transmission of infection. Also, it is useful for investigating patterns of drug resistance with specific populations or groups of strains to better understand transmission dynamics within specific populations<sup>4</sup>). Molecular genotyping tools for tuberculosis include several technologies such as IS6110-based restriction fragment length polymorphism (RFLP), spoligotyping, 15 loci of variable number of tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units (15 MIRU-VNTR) and single nucleotide polymorphism (SNP).

The Philippines has very limited data regarding the molecular epidemiology of *M.tuberculosis* isolates in the country. In the initial study done by Douglas et al, the isolates of *M.tuberculosis* from Filipino patients without HIV infection were found to belong to a distinct family of TB strains, which may be called the Manila family of *M.tuberculosis*, different from the identified strains in the Asian region based on RFLP and spoligotyping analysis<sup>5</sup>). The Manila family of *M.tuberculosis* has also been described among Filipino patients with TB in countries like the United States where large immigrant Filipino communities are located<sup>6</sup>).

The present study aims to characterize the strains of *M.tuberculosis* in adult Filipino patients in the city of Santa Rosa, a suburban community in the Philippines through molecular analytic methods, identify genotype clustering of TB cases that may indicate active TB transmission, and to describe possible association of transmission with specific demographic charac-

teristics of the host as well as molecular and microbiologic characteristics of the organism.

## Materials and Methods

### *Study population and mycobacterial strains*

Sputum specimens were collected consecutively from all adult patients (age 18–64 years old) who consulted at the City Health Office and the Barangay Health Stations of the city of Santa Rosa, Laguna, Philippines for evaluation and management of possible pulmonary TB from March 2009 to June 2010, and who were assessed to be eligible for inclusion in the study. The study excluded patients already on treatment for TB for more than 7 days or a history of previous tuberculosis treatment as these may lead to negative culture results. Patients with extrapulmonary TB were also excluded.

Three sputum samples were sent to the Tuberculosis Laboratory, Medical Research Laboratories, Philippine General Hospital (PGH). Acid-fast bacilli smear examination on concentrated sputum was done as well as culture for *M.tuberculosis* using Löwenstein-Jensen culture medium. For the purpose of this study, a chest radiography was also obtained.

### *Genomic DNA extraction*

Genomic DNA was extracted from the *M.tuberculosis* isolates<sup>6</sup>). The mycobacterial colonies were re-suspended in 100 to 200  $\mu$ l of distilled water and boiled at 100°C for 15 minutes to obtain genomic DNA. After the suspension was centrifuged, the supernatant containing the DNA was removed and stored at -20°C until used for analysis.

### *Genotyping*

Spoligotyping was performed on all of the isolates according to the standardized protocol of Kamerbeek et al<sup>7</sup>). Family name and SIT number (Spoligo-International-Type number) was assigned based on SpoIDB4 (up to SIT1939)<sup>8</sup>). 15 MIRU-VNTR typing was performed as previously described<sup>9</sup>) on all of the isolates using agarose gel electrophoresis based on a subset of 15 loci, which was proposed as the international standard for routine epidemiological discrimination of *M.tuberculosis* strains<sup>10</sup>). The subset includes MIRU 4, 10, 16, 26, 31, 40; Mtub 04, 21, 30, 39; ETR A, C; and QUB-11b, -26, -4156<sup>10</sup>).

### *Data analysis*

Frequencies of identified genotype families based on spoligotyping and 15 MIRU-VNTR using 15 loci were described. Frequencies of patient characteristics and smear positivity as well as severity of pulmonary TB among different genotype families were compared using Pearson chi-square test. The extent of association was expressed as an odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (95% C.I.). Univariate and multivariate analysis were done with logistic regression for possible predictors of clade or SIT. All statistical tests were two-sided and statistical significance was set at a p-value of <0.05. The 15 MIRU-VNTR dendrogram was built with the unweighted pair group method for mathematical averages (UPGMA), using BioNumerics® (v.5.1 Applied Maths, Sint



Martin Latems, Belgium).

TB strains in this study can be classified into two groups, clustered or non-clustered *M.tuberculosis* isolates. A cluster is defined as a group of two or more strains with identical genetic patterns defined by 15 MIRU-VNTR typing and/or by spoligotyping and strains with unmatched or unique genetic characteristics were considered non-clustered. Clustering rate corrected using "n-1 method" is defined as  $(N_c - n_c)/N_o$ , where  $N_o$  is the total number of cases in the sample,  $n_c$  is the number of clusters, and  $N_c$  is the total number of cases in clusters of two or more patients<sup>11</sup>. This is assumed to represent the recent transmission rate. Hunter-Gaston discrimination index (HGDI) was computed in order to see the efficacy of discrimination of each typing method<sup>12</sup>.

#### Ethical consideration

Potential study participants were informed of the nature and rationale of the study using an information sheet in Filipino. Separate written informed consent on study participation and specimen banking were also obtained.

The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee of the National Institutes of Health, University of the Philippines, Manila, Philippines.

### Results

A total of 616 TB symptomatics were seen at the Santa Rosa City Health Office and Barangay Health Stations during the study period. 584 patients consented to participate and submitted sputum samples. Out of this, 129 patients had positive *M.tuberculosis* by culture. However, only 124 isolates underwent molecular typing since the 5 samples did not have adequate DNA for analysis. After molecular typing, further 8 strains were excluded from the 124 because of mixed infections. Double alleles were detected in two or more VNTR loci suggesting co-existence of different strains in the sample possibly due to contamination<sup>13</sup>. There is now a total of 116

isolates of *M.tuberculosis* for analysis.

#### Patient characteristics

More than half (72/116, 62.1%) of the culture-positive patients were men. About 41.4% (48/116) were aged between 18 to 29 years. 41/116 or 35.3% had a high bacillary load based on a smear positivity of +3 or greater, and 43/116 or 37.1% of the patients had severe pulmonary TB, i.e., with pulmonary involvement with cavitation, miliary TB, extensive involvement of one lung or both lungs, or pleural effusion, as defined by chest X-ray findings (Table 1). These patient characteristics well represent the TB patients of the Philippines in general, as compared with the national notification data.

#### Spoligotyping

Spoligotyping of the 116 *M.tuberculosis* isolates yielded 20 genotypes, and 16 of these genotypes were unique in the data set. 4 clusters were identified involving 100 strains, which means that the clustering rate was 82.8%  $[(100-4)/116=82.8\%]$ . According to the Spoligo-International-Types (SIT), SIT 19 predominated with 89/116 (76.7%), followed by 7/116 (6.0%) of SIT 758, 2/116 (1.7%) each of SIT 483 and SIT 1479, and one strain each of SIT 894, SIT 287, SIT 897, SIT 17, SIT 1247 and SIT 11. Ten strains were unclassified (8.6%). Of these clusters based on SIT 19, 758, 483, 894, 287 and 897 comprise a sublineage of EAI2\_Manilla clade, and thus this sublineage has a total of 101 strains (87.1%). The distribution of the different SITs is indicated in the Table 2.

The frequencies of EAI2\_Manilla strains out of all strains were similar across sexes, disease severity categories and bacillary load categories; EAI2\_Manilla accounts for 86.1% and 88.6% in males and females, 84.9% and 90.7% in not severe and severe groups, and 86.7% and 87.8% in low and high bacterial load groups, respectively (Table 1).

Based on the comparison of SIT 19 and other SIT strains, no significant difference in the frequency of SIT was seen for

**Table 1** Associations of clade (EAI2\_Manilla and other genotype strains) with sex, severity of pulmonary tuberculosis, and bacillary load of patients with tuberculosis in the city of Santa Rosa, Laguna, the Philippines

		EAI2_Manilla		Others		p-value*
Total		101	87.1%	15	12.9%	
Age	18-29 years	42	87.5	6	12.5	0.907
	30 years +	59	86.8	9	13.2	
Sex	Male	62	86.1	10	13.9	0.694
	Female	39	88.6	5	11.4	
Severity <sup>a</sup>	Not severe	62	84.9	11	15.1	0.371
	Severe	39	90.7	4	9.3	
Bacillary load <sup>b</sup>	Low	65	86.7	10	13.3	0.861
	High	36	87.8	5	12.2	

\*p-value for Pearson chi-square

<sup>a</sup>Severe pulmonary tuberculosis is determined as pulmonary involvement with cavitory lesions, miliary TB, extensive involvement of one or both lungs or presence of pleural effusion.

<sup>b</sup>Bacillary load determined by acid-fast bacilli (AFB) smear examination using Ziehl-Neelsen method. Low bacillary load is  $< \text{or} = \text{AFB} + 2$  or positive only for culture. High bacillary load is  $> \text{or} = \text{AFB} + 3$ .

patient characteristics i.e., sex, disease severity and bacterial burden. SIT 19 was seen in 72.2% of male patients vs 84.1% of female patients, 72.6% of not severe cases vs 83.7% of severe cases, and 73.3% of low bacterial burden cases vs 82.9% of high burden cases, respectively (Table 3).

*Typing of strains and clustering analysis by 15 MIRU-VNTR*

Using the 15 MIRU-VNTR typing method, 69 different genotypes were identified, comprising 16 clusters formed by 63 isolates and 53 unique genotypes. Each cluster had 20, 10,

6, and 3 members, and 12 clusters had 2 members. The HGDI is calculated as 0.960. When spoligotyping and 15 MIRU-VNTR were simultaneously applied, 79 genotypes were identified with 11 clusters (each having 17, 10 and 5 members, and another 8 clusters had 2 members each) involving 48 isolates. 68 genotypes were found to be unique. The HGDI was 0.970 (Fig., Table 4).

The patient characteristics, i.e., age, sex, disease severity and bacterial load, are not significant predictors for determi-

**Table 2** Distribution of *Mycobacterium tuberculosis* isolates according to sublineages designated by spoligotype from the city of Santa Rosa, Laguna, the Philippines (n=116)

SIT (*1)	Sublineage (*2)	Spoligotype octal	Spoligotype binary	Number of Isolates
19	EAI2_Manilla	67777477413771		89
758	EAI2_Manilla	67777477413700		7
483	EAI2_Manilla	67777477413701		2
1479	U	674777470001771		2
1247	MANU2	77777607763771		1
287	EAI2_Manilla	67777477413751		1
894	EAI2_Manilla	67777477413731		1
17	LAM2	677737607760771		1
897	EAI2_Manilla	676003477413771		1
11	EAI3_Ind	47777777413071		1
NA	unknown	77777607600171		1
NA	unknown	67777477400711		1
NA	unknown	67777470003771		1
NA	unknown	67777460000001		1
NA	unknown	677757477413771		1
NA	unknown	677737607740771		1
NA	unknown	66777477413771		1
NA	unknown	64777477413771		1
NA	unknown	61777477413771		1
NA	unknown	00000000000071		1

\*1: SIT designates spoligotypes shared by two or more patient isolates in SpolDB4; "NA" designates spoligotypes not registered in SpolDB4.

\*2: Sublineages were designated according to SpolDB4. Spoligotypes not registered in SpolDB4 were designated as "unknown" sublineage.

**Table 3** Associations of SIT19 and other SIT with sex, severity of pulmonary tuberculosis, and bacillary load of patients with tuberculosis in the city of Santa Rosa, Laguna, the Philippines

		SIT 19		Others		p-value*
Total		89	76.7%	27	23.3%	
Age	18-29 years	36	75.0	12	25.0	0.712
	30 years +	53	77.9	15	22.1	
Sex	Male	52	72.2	20	27.8	0.142
	Female	37	84.1	7	15.9	
Severity <sup>a</sup>	Not severe	53	72.6	20	27.4	0.171
	Severe	36	83.7	7	16.3	
Bacillary load <sup>b</sup>	Low	55	73.3	20	26.7	0.242
	High	34	82.9	7	17.1	

\*Pearson chi-square

<sup>a,b</sup>See footnotes to Table 1.

ning an infection with strains of clusters with combined spoligotyping and 15 MIRU-VNTR genotype (Table 5).

As anticipated from the univariate analysis, multiple logistic regression analysis revealed no significant predictor for determining an infection with EAI2\_Manilla as revealed by spoligotyping (Table 6).

**Discussion**

Spoligotyping analysis showed that majority (101/116, 87.1

%) of the *M.tuberculosis* isolates seen in the city of Santa Rosa belonged to the EAI2\_Manilla clade of the SpolD4. The other clades (U, LAM2, EAI3\_Ind and MANU2) constituted only a minority. 10/116 (8.6%) did not belong to a known clade. No strain belonging to the Beijing clade was identified. This is consistent with a previous study that involved also Philippine *M.tuberculosis* isolates that resulted in the creation of the Manila Family or EAI2\_Manilla clade<sup>3)</sup>. Based on published literature, the EAI family is prevalent in Southeast

**Table 4** Discriminatory ability of spoligotyping and 15 loci of variable number of tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units (15 MIRU-VNTR) for *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the city of Santa Rosa, Laguna, the Philippines

	Spoligotyping	15 MIRU-VNTR*	Spoligotyping and 15 MIRU-VNTR combined
HGDI <sup>a</sup>	0.409	0.960	0.970
Number of clusters	4	16	11
Number of genotypes	20	69	79
Number of clustered isolates	100	63	48
Clustering rate (%) <sup>b</sup>	82.8	40.5	31.9
Number of unique strains	16	53	68

\*15 MIRU-VNTR include MIRU 4, 10, 16, 26, 31, 40; Mtub 04, 21, 30, 39; ETR A, C; and QUB-11b, 26, 4156

<sup>a</sup>HGDI: Hunter-Gaston discrimination index

<sup>b</sup>Clustering rate is defined as  $(N_c - n_c)/N_c$ , where  $N_c$  is the total number of cases in the sample,  $n_c$  is the number of clusters, and  $N_c$  is the total number of cases in clusters of two or more patients.

**Table 5** Associations of the combined spoligotyping and 15 loci of variable number of tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units (15 MIRU-VNTR) typing-based clustering and age, sex, severity of pulmonary tuberculosis, and bacillary load of patients in the city of Santa Rosa, Laguna, the Philippines

		Any cluster		Unique		p-value*
Total		48	41.4%	68	58.6%	
Age	18–29 years	20	41.7	28	58.3	0.958
	30 years +	28	41.2	40	58.8	
Sex	Male	31	43.1	41	56.9	0.639
	Female	17	38.6	27	61.4	
Severity <sup>a</sup>	Not severe	27	37.0	46	63.0	0.211
	Severe	21	48.8	22	51.2	
Bacillary load <sup>b</sup>	Low	31	41.3	44	58.7	0.989
	High	17	41.5	24	58.5	

\*Pearson chi-square

<sup>a,b</sup>See footnotes to Table 1.

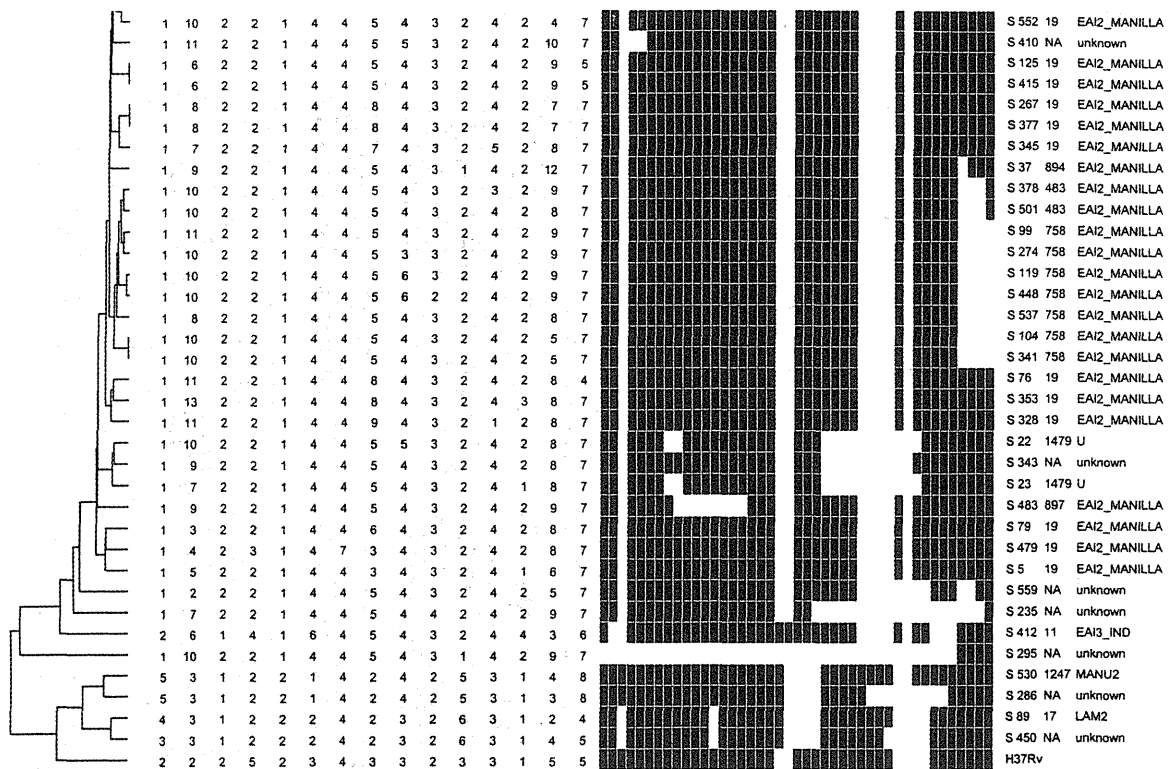
**Table 6** Logistic regression analysis of patient characteristics for association with EAI2\_Manilla clade

Characteristics	95% CI for OR			p-value
	OR	Lower	Upper	
Age	0.883	0.287	2.711	0.828
Sex	1.315	0.413	4.191	0.643
Severity of PTB	1.789	0.519	6.160	0.357
High bacillary load*	1.056	0.328	3.395	0.928

OR: odds ratio, CI: confidence interval, PTB: pulmonary tuberculosis

\*High bacillary load is sputum-smear positivity of  $\geq$  or = AFB +3





**Fig.** Unweighted pair group method using mathematical averages (UPGMA) dendrogram (first column) based on composite data set (15 MIRU-VNTR)-spoligotyping on the clinical isolates from tuberculosis patients in the city of Santa Rosa, Laguna, the Philippines. (identification number: last column) Main clades are also annotated right to identification number.

Asia, mainly in the Philippines, in Myanmar<sup>14)</sup> and Malaysia<sup>15)</sup>. Other studies have also shown that the EAI2\_Manilla clade was also identified in other countries where large Filipino immigrant communities are located<sup>16)–19)</sup>. The family is defined as an ancestral strain, containing the TbD1 region, and all isolates share the same spoligotype<sup>9)20)</sup>.

The predominance of the EAI2\_Manilla Family in the Philippines and among patients of Filipino descent may suggest the stability of the EAI2\_Manilla genome by virtue of the innate properties of the bacteria and interaction with the host. Well conserved genotypes seem to prevail in areas with high incidence of tuberculosis<sup>21)</sup> such as the Philippines. Some genotypes have also been shown to be more transmissible than others<sup>22)23)</sup>. Some genotypes of *M. tuberculosis* can be more capable of causing disease affecting particular organs<sup>24)25)</sup>.

There have been some studies suggesting the possibility that BCG may have selected the particular prevalent genotypes. Anh et al. suggested that the Beijing genotype was less associated with BCG, so that it may have resulted in the predominance of this genotype in Vietnam where BCG vaccination had been extensively used<sup>26)27)</sup>. A similar relationship between the prevalence of the Beijing strain and BCG vaccine coverage has also been shown in Tunisia and Ethiopia<sup>28)</sup>. Thus, it is possible that the Manila family is less sensitive to BCG vaccination and survived the high coverage of BCG, e.g., 84% in 2011<sup>29)</sup>. This is merely a possible hypothesis for the prev-

alence of the Manila family and remains to be determined.

Another possible hypothesis for the predominance of EAI2\_Manilla strain is because EAI strains are better adapted for growth and transmission in high-temperature environments, but this also remains to be determined<sup>30)</sup>.

In this study, possible association between patient demographic factors and the EAI2\_Manilla clade and SIT 19 was also analyzed. No significant association was shown between these predominant genotypes and patient characteristics such as age, sex, disease severity and bacillary load. However, further studies should be made to elucidate the epidemiological, pathological and clinical characteristics of these genotypes in their diversity<sup>31)32)</sup>.

Different mycobacterial strains may have differences as far as virulence and mechanisms of disease are concerned. These differences may have variable effects on smear positivity and clinical presentation as well as severity of TB. For example, there are several reports describing apparently enhanced *in vivo* virulence of certain members or sublineages of the “Beijing” lineage<sup>33)–36)</sup>. The pathogenetic mechanism responsible for this is the production of a complex phenolic glycolipid which inhibits release of pro-inflammatory cytokines by macrophages<sup>37)38)</sup>.

Apart from the Beijing genotype, there is a paucity however, of studies that describe phenotypic properties of the other TB lineages such as EAI. In one study done in Montreal,

Canada, there was evidence to show that the East African-Indian lineage strains were associated with a lower risk of transmission and, possibly, a lower risk of developing severe forms of active disease<sup>39)</sup>.

Among the 116 isolates we analyzed in our study, 48/116 (41.4%) of isolates would be considered to be potentially clustered in 11 groups based on the simultaneous spoligotyping and 15 MIRU-VNTR. This means that 37 (48–11) patients may be due to recent transmission of infection, as many previous studies have shown correlation between the level of clustering and the proportion of disease due to recent transmission<sup>(1)(40)~(43)</sup>.

Tuberculosis may result from recent infection or from reactivation of a latent infection acquired from the past. Based on the literature, recent infection is suspected if disease occurs within 5 years of infection and reactivation of a latent infection if disease occurs more than 5 years from infection<sup>44)</sup>. Since most of the affected individuals in the city of Santa Rosa were relatively young, there is more likely recent transmission. Using the “n-1 method”, the recent transmission rate is 31.9% as above, based on the most precise typing system. However, a longer period of continuing observation as well as epidemiological analysis on the links should be done to analyze ongoing transmission. The rate of molecular clustering has been observed to increase over longer periods because transmission chains are more efficiently covered<sup>45)</sup>. Because there was no association between age and clustering, the observed clustering could not be simply explained by the recent transmission. The possibility of the roles and exogenous reinfection and/or existence of predominant or endemic genotypes could not be excluded<sup>46)(47)</sup>. More detailed epidemiological information of the patients, such as situation of links among clustered patients, should be collected and analysed.

### Conclusion

The predominant genotype of *M. tuberculosis* infecting the population of the city of Santa Rosa, a suburban community in the Philippines is the EAI2\_Manilla family. This is consistent with previously published studies on the common clades of *M. tuberculosis* in the metropolitan area of the Philippines. Most of the TB patients affected are young, which suggests the possibility of recent tuberculosis transmission, as supported by the high clustering rate of 32%. No association was seen between EAI2\_Manilla clade and sex and age of patients. There was also no significant association seen between the EAI2\_Manilla clade and bacillary load based on sputum-smear positivity and severity of pulmonary TB.

### Acknowledgement

This work was supported by the National Research Council of the Philippines, Department of Science and Technology, Philippines; “Ronpaku” Program, Japan Society for the Promotion of Science, Japan; and the grant of Ministry of Health, Labour & Welfare, Japan, for Research of Emerging and

Reemerging Diseases and Influenza (Study on Development of Tuberculosis Control Responding to Changing Disease Structure, Principal Investigator: N. Ishikawa, Research Institute of Tuberculosis). We would also like to acknowledge Professor Eiji Marui, Juntendo University, for his valuable advice and guidance, Dr. Noel Juban for helping in the statistical analysis.

### References

- 1) WHO Global Tuberculosis Report 2012. WHO, Geneva, Switzerland.
- 2) Lonnroth K, Jaramilli E, Williams BG, et al.: Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants. *Soc Sci Med.* 2009 ; 68 : 2240–2246.
- 3) DOH National Epidemiology Data, 2011.
- 4) Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, et al.: Molecular Epidemiology of Tuberculosis; Current Insights. *Clinical Microbiology Reviews.* 2006 ; 19 : 658–685.
- 5) Douglas JT, Qian L, Montoya JC, et al.: Characterization of the Manila Family of *Mycobacterium tuberculosis* in Filipino Patients with tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2003 ; 41 : 2723–2726.
- 6) Kox LF, Rhlenthong D, Miranda AM, et al.: A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1994 ; 32 : 672–678.
- 7) Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al.: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997 ; 35 : 907–914.
- 8) Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiology.* 2006 ; 6 : 23 doi:10.1186/1471-2180-6-23.
- 9) Maeda S, Murase Y, Mitarai S, et al.: Rapid, simple genotyping method by the variable numbers of tandem repeats (VNTR) for *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Japan—Analytical procedure of JATA (12)-VNTR. *Kekkaku.* 2008 ; 83 : 673–678. in Japanese.
- 10) Supply P, Allix C, Lesjean S, et al.: Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006 ; 44 : 4498–4510.
- 11) Small PM, Hopewell PC, Singh SP, et al.: The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med.* 1994 ; 330 : 1703–1709.
- 12) Hunter P: Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol.* 1990 ; 28 : 1903–1905.
- 13) Shamputa IC, Jugheli L, Sadradze N, et al.: Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. *Respir Res.* 2006 ; 7 : 99.

- 14) Phyu S, Jureen R, Ti T, et al.: Heterogeneity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Yangon, Myanmar. *J Clin Microbiol.* 2003 ; 41 : 4907–4908.
- 15) Sola C, Rastogi N: Genetic description and frequency maps of some major families of *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Molecular Epidemiology and Population Genetics of Tuberculosis*. Ngeow YF, Yap SF eds. Academy of Sciences of Malaysia, Kuala Lumpur, 2006, 23–68.
- 16) Al-Hajoj SAM, Zozio T, Al-Rabiah F, et al.: First Insight into the Population Structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Saudi Arabia. *J Clin Microbiol.* 2007 ; 45 : 2467–2473.
- 17) Lari N, Rindi L, Bonanni D, et al.: Three-year longitudinal study of genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Tuscany, Italy. *J Clin Microbiol.* 2007 ; 45 : 1851–1857.
- 18) Millet J, Miyagi-Shiohira C, Yamane N, et al.: Assessment of Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-QUB Markers to Further Discriminate the Beijing Genotype in a Population-Based Study of the Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Okinawa, Ryukyu Islands, Japan. *J Clin Microbiol.* 2007 ; 45 : 3606–3615.
- 19) Millet J, Baboolal S, Akpaka PE, et al.: Phylogeographical and molecular characterization of an emerging *Mycobacterium tuberculosis* clone in Trinidad and Tobago. *Infect Genet Evol.* 2009 ; 9 : 1336–1344.
- 20) Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, et al.: A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002 ; 99 : 3684–3689.
- 21) Lopez B, Aguilar D, Orozco H, et al.: A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol.* 2003 ; 133 : 30–37.
- 22) Valway SE, Sanchez MPC, Shinnick TF, et al.: An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med.* 1998 ; 338 : 633–639.
- 23) Caminero J, Pena MJ, Campos-Herrero MI, et al.: Epidemiologic evidence for the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the 'Beijing' genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 ; 164 : 1165–1170.
- 24) Gagneux S, DeRiemer K, Van T, et al.: Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 ; 103 : 2869–2873.
- 25) Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, et al.: Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 ; 101 : 4871–4876.
- 26) Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* genotype Beijing emerging in Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2000 ; 6 : 302–305.
- 27) Lopez B, Aguilar D, Orozco H, et al.: A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol.* 2003 ; 133 : 30–37.
- 28) Hermans PWM, Messadi F, Guebrexabher H, et al.: Usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J Infect Dis.* 1995 ; 171 : 1504–1513.
- 29) WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system 2012 global summary. Retrieved January 23, 2013, retrieved from [http://apps.who.int/immunization\\_monitoring/en/globalsummary/timeseries/tscoveragebcg.htm](http://apps.who.int/immunization_monitoring/en/globalsummary/timeseries/tscoveragebcg.htm)
- 30) Chang J, Chen Y, Huang T, et al.: Clonal Expansion of Both Modern and Ancient Genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in Southern Taiwan. *PLoS One.* 2012 ; 7 : e43018.
- 31) Nicol MP, Wilkinson RJ: The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2008 ; 102 : 955–965.
- 32) Coscolla M, Gagneux S: Does *M. tuberculosis* genomic diversity explain disease diversity? *Drug Discovery Today.* 2010 ; 7 : e43–e59.
- 33) Manca C, Tsenova L, Barry CE 3rd, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response *in vivo* and *in vitro*, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol.* 1999 ; 162 : 6740–6746.
- 34) Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D: Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis.* 2010 ; 10 : 103–111.
- 35) Hernandez Pando R, Aguilar D, Cohen I, et al.: Specific bacterial genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* cause extensive dissemination and brain infection in an experimental model. *Tuberculosis (Edinb).* 2010 ; 90 : 268–277.
- 36) Kato-Maeda M, Shanley CA, Ackart D, et al.: Beijing sub-lineages of *Mycobacterium tuberculosis* differ in pathogenicity in the guinea pig. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 ; 19 : 1227–1237.
- 37) Reed MB, Domenech P, Manca C, et al.: A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature.* 2004 ; 431 : 84–87.
- 38) Tsenova L, Ellison E, Harbacheuski R, et al.: Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. *J Infect Dis.* 2005 ; 192 : 98–106.
- 39) Albanna AS, Reed MB, Kotar KV, et al.: Reduced Transmissibility of East African Indian Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. 2011. *PLoS One.* 2011 ; 6 : e25075.
- 40) Warren R, Haumann J, Beyers N, et al.: Unexpected high strain diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in a high incidence community. *South African Med J.* 1996 ; 86 : 45–49.
- 41) Warren R, Richardson M, Sampson S, et al.: Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* with additional markers enhances accuracy in epidemiological studies. *J Clin Microbiol.* 1996 ; 34 : 2219–2224.
- 42) Yang ZH, de Haas PEW, Wachmann CH, et al.: Molecular epidemiology of tuberculosis in Denmark in 1992. *J Clin Microbiol.* 1995 ; 33 : 2077–2088.
- 43) Alland D, Kalkut GE, Moss AR, et al.: Transmission of

- tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med.* 1994 ; 330 : 1710-1716.
- 44) Vynnycky E, Nagelkerke N, Borgdorff MW, et al.: The effect of age and study duration on the relationship between clustering of DNA fingerprinting patterns and the proportion of tuberculosis disease attributable to recent transmission. *Epidemiol Infect.* 2001 ; 126 : 43-62.
- 45) Vynnycky E, Fine PEM: The natural history of tuberculosis: the implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection. *Epidemiol Infect.* 1997 ; 119 : 183-201.
- 46) Vynnycky E, Fine PEM: Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis. *Am J Epidemiol.* 2000 ; 152 : 247-263.
- 47) Glynn, JR, Bauer J, de Boer AS, et al.: Interpreting DNA fingerprint clusters of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999 ; 3 : 1055-1060.

——— 原 著 ———

フィリピンー郊外地域住民結核患者から得られた結核菌の分子疫学的分析

ハイメ・C・モントヤ, 村瀬良朗, コンセプション・アン, ジョン・ソロン, 大角晃弘

**要旨:**〔背景〕フィリピンはWHOの指定する結核高負担国のひとつである。郊外都市であるラグナ州サンタ・ロサの町の診療所を受診した結核患者から得た結核菌の分子疫学的分析を行った。〔方法〕総数116株の結核菌について遺伝子型の分析をスポリゴタイピング, 15個の座位を用いたVNTR法によって実施した。菌株はスポリゴタイプ国際データベース (SpolDB4) と比較した。クラスター分析はスポリゴタイピングおよびVNTRを用いて行った。〔結果〕患者の多くは若年者 (18~29歳が41.4%) で男性が多かった (62.1%)。74%が塗抹陽性, また37%は重症例であった。遺伝子型を SpolDB4 と比較すると10種のSIT型が見出され, そのなかではSIT19が最も多かった (89株77%)。10株 (8.6%) は SpolDB4 にみられない型であった。主要抗酸菌系統の分布をみるとEAI2\_Manilla (101株, 87.1%), U (2株, 1.7%), 以下LAM2, EAI3\_Ind, MANU2が各1株 (0.9%) であった。単変量および多変量解析によってEAI2\_Manilla系統やSIT型と患者背景要因 (性, 年齢, 排菌程度, 重症度) の関連を分析したがいずれも有意の関連はみられなかった。タイピング方法別にクラスター形成をみると, スポリゴタイピングでは100株が4個のクラスターを形成, ハンター・ガストン判別指数 (HGDI) は0.409, 15MIRU-VNTRでは63株が16個のクラスターを形成, HGDIは0.960, またスポリゴタイピングと15MIRU-VNTRを組み合わせた場合には48株が11クラスターを作り, HGDIは0.970であった。この地域での患者の多くが若年者であることから, 感染伝播率が高いことは想定される。しかし患者年齢とクラスター形成の間に有意の関連がみられず, 観察された高いクラスター形成の解釈についてはさらなる分子のおよび疫学的研究を要する。〔結論〕この研究はフィリピンにおいて系統的かつ前向きに患者標本を集めて結核菌の遺伝子型をみた最初の分子疫学研究である。ラグナ州サンタ・ロサの患者集団の多くはEAI2\_Manilla系統に属する菌株に感染していることが知られた。最近の感染伝播の割合は高く, より効果的で早期の診断と十分な治療の必要性を物語っている。

**キーワード:** 結核, 分子疫学, スポリゴタイピング, VNTR, 結核菌, フィリピン



# 潜在性結核感染症治療終了後の経過観察は必要か？

伊藤 邦彦

要旨：〔目的〕潜在性結核感染症（LTBI）治療終了後に現在行われている2年間の定期的経過観察の必要性を評価するため、LTBI治療終了後の結核発病率と発病時期を推定する。〔対象と方法〕結核サーベイランスデータを用いて2008-09年新登録LTBI治療対象者の2011年末までの発病状況を調査する。〔結果〕2008-09年新登録LTBI治療対象者（合計8951例）中、その後2011年末までに活動性結核を発病したと推定されるものが56例特定された。治療中断者まで含めたデータであっても、登録年次々年末までの発病率は全結核で0.57%（51/8951）、塗抹陽性肺結核で0.10%（9/8951）、全菌陽性肺結核で0.22%（20/8951）であった。治療終了時期の情報のある37例での検討では、治療終了後1年以内に12例、2年目に22例が発病していた。〔考察と結論〕LTBI治療終了後の発病率は低いが、LTBI治療終了後1年目から2年目にかけて発病率が低下する傾向はみとめられなかった。問題とするべきは、LTBI治療終了後管理健診の妥当な期間よりも、LTBI治療終了後の管理健診の必要性そのものである。

キーワード：結核，潜在性結核感染症，経過観察，管理健診，結核サーベイランス

## 1. 背景と目的

現状の感染症法下では規定により、潜在性結核感染症（LTBI）治療対象者はLTBI治療終了後2年間登録管理、すなわち主に胸部X線写真による定期的経過観察を行うことになっている。一方、「感染症法に基づく結核接触者健康診断の手引き」改訂第4版<sup>1)</sup>では「感染あり（疑い）と診断したが、LTBIとして治療を実施できなかった場合」概ね6カ月間隔/2年間胸部X線で経過観察することになっている。

以上によるとLTBI治療を実施しなかったLTBI疑い患者よりも、LTBI治療を行った患者のほうが治療期間分だけ長く経過観察が必要とされていることになる。LTBI治療により発症がより後期にずれ込む可能性はあるが、LTBI治療終了者での治療による発病リスク低下を考えれば、上記の規定が合理的なものかどうかは直ちに明らかではない。事実、上記の規定は複数の保健所関係者等から矛盾として指摘されることも多い。また、そもそもLTBI治療終了後に2年間の経過観察が必要なのかにつ

いて疑問が出される場合もある。

この問題について議論するためには、わが国の現況でのLTBI治療終了者における発病率および発病時期のデータが必要であるが、これまでわが国におけるQFT検査登場以降のデータは存在していない。本稿の目的はこうしたデータを作成し、上記の問題に関する議論の基本的資料を提供するものである。

## 2. 方法

### 2.1. 基本的方針

2008～11年の結核登録者情報調査年報（以下、年報）を基に、2008-09年新登録のLTBI治療対象者のうちからLTBI治療終了後の発病者を抽出し、発病率および発病時期の分布を推定する。

本調査の本来の目的は、標準治療に準じた十分なLTBI治療を完了した後の発病率および発病時期に関する推定を行うことであるが、LTBI治療完了の定義がなく、また年報から実質投与日数（中断があっても精確には把握できない）や薬剤変更すべてを知ることはできない。この

ため、以下ではLTBI治療終了を中断による終了も含めた終了の意味で用い、これらすべてのLTBI治療終了後の発病状況を把握することを実際の目標とした。発病率の信頼区間（以下CI）や発病率の比較は95%の水準で推定しマイクロソフトエクセル2010でz-distributionを用いて行う。

## 2.2. データ対の特定

LTBI治療終了後の活動性結核発病者を検索するため、LTBI登録者データと活動性結核発病者データの双方から同一患者と推定されるデータを関連付けてデータ対とする。データ対検索のための手段の概略は以下のとおりである。

(ア) 2008-09年LTBI登録者で、2008~11年年報に登録削除された者のリストから「登録中の再登録」による登録削除者を抽出する（以下「LTBI登録中再登録リスト」）。「登録中の再登録」はLTBIの場合、登録中に結核発病をした場合（LTBI治療中の発病と治療終了後経過観察中の発病を含む）やLTBI治療終了後に再び新たにLTBI治療を行う場合に用いられるが、LTBI登録時点ですでに活動性結核であったことがその後に判明した場合（LTBI治療開始後の活動性結核への病型変更）にも誤って用いられている場合がある（この場合、転症削除するのが妥当）。

(イ) 2008~11年年報における新登録活動性結核患者のうち「再治療かつ前回治療がLTBI治療かつ前回治療開始時期2008-09年」の入力のある者を抽出する（以下「LTBI後結核発病リスト」）。

(ウ) 同一者であれば、LTBI登録日とその時点の年月齢データから活動性結核登録日の年月齢を、また、活動性結核登録日とその時点の年月齢データからLTBI登録日の年月齢を、誤差1カ月の精度で推定可能である。年月齢データのみから、同一保健所における登録でかつLTBI登録と活動性結核登録が同一人物として矛盾しない場合、これを「合致するデータ対」とみなす。合致するデータ対において、性・国籍・LTBI登録と活動性結核登録の年月日の前後関係・活動性結核登録時の前回治療開始年に矛盾がなければ「整合性がある」とみなす。合致するデータが唯一特定されかつ整合性が確認された場合のみ、これを同一者のデータ対とみなす。

(エ) 「LTBI登録中再登録リスト」と「LTBI後結核発病リスト」から上記の方針でデータ対を生成する。

(オ) 上記でデータ対を特定できなかった者では、2008~11年の登録削除者全リストおよび/または2007~2011年の全新登録者リストの中から、同一者と思われるデータ対を特定する。

(カ) 上記でもデータ対を特定できなかった場合には対応データ対不明とする。LTBI登録削除後の転居による

異なった保健所での活動性結核登録の場合のデータ対特定は行わない。

## 2.3. 除外規定とデータの補完および日数計算

(ア) 便宜的に、以下の条件を満たすものは「LTBI治療中の発病」または「LTBI治療開始後の活動性結核への病型変更」とみなし、LTBI治療終了後の発病から除外した。

a) LTBI治療終了時期の入力のある者では、LTBI治療終了時期から活動性結核診断までの期間（Interval、以下同様）が30日以内の者。

b) LTBI治療終了時期の入力のない者では、LTBI治療開始時期から活動性結核診断までの期間が90日（最短のLTBI治療期間の4カ月よりも1カ月足りない期間を設定）以内の者。

(イ) LTBI治療開始時期の入力がない場合はLTBI診断時期で代用する。活動性結核の診断時期が未入力の場合は活動性結核登録時期で代用する。また治療期間（システムのカレンダーによる自動計算）を除き、期間の計算は1カ月を一律30日とし1年を360日として計算する。

## 3. 結果

### 3.1. データ対

(ア) 「LTBI登録中再登録リスト」として62例、「LTBI後結核発病リスト」として75例が特定された。両リスト間で55例では双方で唯一の合致するデータ対が見出され、すべて整合性が認められた。

(イ) 「LTBI登録中再登録リスト」中、「LTBI後結核発病リスト」でデータ対を特定できなかった7例では2007~11年全新登録者リストで、

- ・2例では、唯一合致しかつ整合性のあるデータ対が特定されたが、LTBI再治療として登録されていたため以降除外した。

- ・3例では、活動性結核新登録時に前回治療歴なし（入力ミスと思われる）と入力されている唯一合致しかつ前回治療歴以外は整合性のあるデータ対が特定された。いずれもLTBI登録削除日に活動性結核新登録を行っていた。

- ・1例では、活動性結核新登録時に前回治療がisoniazid (INH)・rifampicin (RFP)を含む治療になっている（入力ミスと思われる）唯一の合致しかつ前回治療歴以外は整合性のあるデータ対が特定された。LTBI登録削除日に活動性結核新登録を行っていた。

- ・1例では、2007年治療開始のLTBIが前回治療として登録されている活動性結核で唯一合致しかつ前回治療歴以外は整合性のあるデータ対が特定された。このLTBI登録データでは治療開始は2007年末でLTBI登録は2008年1月初頭で入力されていた。登録自体は2008年なの

で、以降2008年治療開始として扱うこととした。

(ウ) 「LTBI後結核発病リスト」で、「LTBI登録中再登録リスト」中にデータ対を特定できなかった20例中、

・10例では、2008～11年の登録削除者全リストで、登録削除理由が登録中再登録以外の理由で登録削除されている、唯一の合致しかつ整合性のあるLTBI登録データ対が特定された。

・5例は2007～11年全新登録者リストで、唯一の合致し整合性のあるLTBI登録データ対が特定された。この5例は2008～11年の登録削除者リストに見出されず、LTBI登録削除後年報集計前にデータ消去されたものと思われる。3例では新登録時の登録データですでに登録中再登録による登録削除の記録があった。

・5例ではLTBI側のデータ対を特定できず、前回治療開始年をLTBI登録年としそれ以外のデータは不明とした。

(エ) 以上からLTBIとして再治療の2例を除き75のデータ対と5つのLTBI側データ対不明なLTBI後結核発病データの、合計80例分のデータが生成された。

### 3.2. LTBI治療中発病およびLTBI治療開始後の活動性結核への病型変更の除外

上記80例のデータ中、LTBI治療開始時期入力なしが2例、活動性結核の診断時期入力なしが10例あり、2.3.(イ)項に従った。LTBI治療終了時期の入力のあるものは42例、LTBI治療終了時期不明(LTBI側データ対不明を含む)が38例あった。

(ア) 上記2.3.(ア) a) 項に従い、LTBI治療終了時期の入力のある42例中5例をLTBI治療中発病またはLTBI治療開始後の活動性結核への病型変更例として除外した。5例はいずれもINHでLTBI治療を開始しており、1例は肺結核塗抹陽性(LTBI治療期間43日/LTBI治療終了から活動性結核診断まで18日だが有所見胸部X線写真撮影日までには13日)、1例は肺結核その他菌陽性(LTBI治療期間172日/LTBI治療終了から活動性結核診断まで24日だが培養陽性検体採取日はLTBI治療終了日の3日後)、残り3例はいずれも菌陰性肺結核(治療期間34日以下/LTBI治療終了から活動性結核診断まで1日以下)であった。残り37例を以下I群(LTBI治療終了時期既知群)とする。

(イ) 上記2.3.(ア) b) 項に従い、LTBI側データ対が存在するがLTBI治療終了時期の入力のない33例中19例をLTBI治療中発病またはLTBI治療開始後の活動性結核への病型変更例として除外した。いずれもINHでLTBI治療を開始しており、1例は肺結核塗抹陽性で発病(LTBI治療開始から活動性結核診断まで67日)、5例はその他の菌陽性で発病(LTBI治療開始から活動性結核診断まで3～69日だが5例中4例は菌陽性検体採取時期が

LTBI治療開始日ないしそれ以前)、11例は菌陰性肺結核(LTBI治療開始から活動性結核診断まで3～69日だが4例は有所見胸部X線写真撮影日がLTBI治療開始日ないしそれ以前)、2例は菌陰性肺外結核(表在リンパ節結核および肺門縦隔リンパ節結核それぞれ1例でLTBI治療開始から活動性結核診断まで43～61日)。残り14例を以下II群(LTBI治療終了時期未知群)とする。

(ウ) LTBI側データ対不明な5例のLTBI後結核発病データは、すべてLTBI治療後の発病とみなし、以下III群(LTBIデータ不明群)とする。

(エ) 以上から合計56例のLTBI治療後発病例が見出された。

### 3.3. LTBI治療終了後の発病の様相

LTBI治療後発病例56例の発病時性年齢分布をTable 1に示す。15歳未満の発病者はいなかった。菌陽性肺結核に限定した場合、平均年齢は31.3歳であった。

I群では、治療期間(治療中断を含む場合もありうる)の分布は5～211日(平均160.4日)で90日以上が81.1%(30/37)、170日以上70.3%(26/37)であった。II群では、LTBI治療開始から活動性結核診断まで97～1241日(平均294.3日)で180日未満が35.7%(5/14)、360日未満が85.7%(12/14)であった。III群では、LTBI登録年の末日から起算して活動性結核診断まで179～634日(LTBI登録翌年以降の発病4例での平均377.8日)であった。

LTBI登録時データのあるI群およびII群合計51例で、LTBI登録時点のLTBI治療内容は、47例がINHのみ、1例がRFPのみ、1例がINH+RFP+ピラジナミド、1例が化学療法なし、不明が1例であった。

全56例の活動性結核の病型と発病時症状の有無をTable 2に示す。菌陽性例は全部で25例であった。喀痰塗抹陽性肺結核では90%(9/10)、その他の菌陽性肺結核では46.2%(6/13)が有症状であった。

Table 1 Age and sex distribution of persons who suffered active tuberculosis after the end of treatment of latent tuberculosis infection (LTBI)

Y=Age at the diagnosis of active tuberculosis	Sex		
	Male	Female	All
15≤Y<20	2	2	4
20≤Y<30	8	8	16
30≤Y<40	8	6	14
40≤Y<50	7	5	12
50≤Y<70	7	2	9
70≤Y		1	1
Total	32	24	56
Mean	38.2	33.5	36.2
Range of Y	16-68	17-71	16-71

INHでLTBI治療を開始し、活動性結核発病時菌陽性であった21例中13例はINH, RFPに感受性, 2例はINH耐性RFP感受性, 6例では入力がなかった。他の菌陽性例では薬剤感受性に関する情報は得られなかった。

### 3.4. LTBI治療後の発病率と発病時期

LTBI後発病全56例のデータを基に, 2008-09年新登録LTBI治療対象者(年報集計上2008年は4832人, 2009年は4119人)で登録年次年末までの発病率, および登録年次次年1年間の発病率を全結核と喀痰塗抹陽性肺結核および全菌陽性肺結核の場合に分けてTable 3に示す(2008年は登録年3年後の発病率も示した)。2008-09年の2年間の集計で, 登録年次次年末までの発病率は0.57% (95%CI: 0.41~0.73%), 喀痰塗抹陽性肺結核で0.10% (95%CI: 0.03~0.17%), 全菌陽性肺結核で0.22% (95%

CI: 0.12~0.32%)であった。

I群37例で, 治療終了から活動性結核診断までの期間を病型別に分けてTable 4に示す。どの病型においても治療終了後1年以内(360日以内)よりも治療終了後2年目(360~720日)のほうが発病者は多い。なお, II群で全例がLTBI治療開始から180日で治療を終了していると仮定し, またIII群でLTBI登録年末をLTBI治療開始日とし180日でLTBI治療が終了したと仮定した場合, 治療終了後1年以内(360日以内)および治療終了後2年目(360~720日)の発病者はそれぞれ, 喀痰塗抹陽性肺結核で4例と5例, その他の菌陽性肺結核で5例と7例, 全結核29例と23例であった。全結核では治療終了後1年目と2年目の発病率(29/8951 vs. 23/(8951-29))に統計的な有意差はなかった( $p=0.500$ )。

**Table 2** Category of active tuberculosis after the end of treatment of latent tuberculosis infection (LTBI) and Symptom at the diagnosis of active tuberculosis

Type of active tuberculosis after the end of treatment of latent tuberculosis infection (LTBI) ※	Symptom at the diagnosis of active tuberculosis		Total
	With any symptoms	Without symptom	
<b>Lung (sputum smear positive)</b>	9	1	10
<b>Lung (other bacteriological positive#)</b>	6	7	13
Lung (bacteriological negative)	9	10	19
Lung (bacteriological negative) and pleuritis (bacteriological negative)	1		1
Lung (bacteriological negative) and mediastinal lymphadenitis (bacteriological negative)	1		1
Lung (bacteriological negative) and vertebral tuberculosis (bacteriological negative)	1		1
Pleuritis (bacteriological negative)	3		3
Mediastinal lymphadenitis (bacteriological negative)	2	1	3
<b>Superficial lymphadenitis (bacteriological positive)</b>	2		2
Superficial lymphadenitis (bacteriological negative)	1	2	3
Total	35	21	56

※bold letters indicate bacteriologically confirmed cases

# sputum smear negative, but culture and/or nuclear amplification test for tuberculosis are positive

**Table 3** Number of cases and frequency of active tuberculosis after the end of treatment of latent tuberculosis infection (LTBI)

Type of active tuberculosis	Register year	Number of registered LTBI	Number of cases and frequency of active tuberculosis after the end of treatment of latent tuberculosis infection (LTBI)			
			By the end of the second year after registration	During the third year after registration	By the end of the third year after registration	After the third year after registration
All	2008	4832	21 (0.43%)	11 (0.23%)	32 (0.66%)	5 (0.10%)
	2009	4119	12 (0.29%)	7 (0.17%)	19 (0.46%)	
	Combined	8951	33 (0.37%)	18 (0.20%)	51 (0.57%)	
Lung/sputum smear positive	2008	4832	3 (0.06%)	2 (0.04%)	5 (0.10%)	1 (0.02%)
	2009	4119	2 (0.05%)	2 (0.05%)	4 (0.10%)	
	Combined	8951	5 (0.06%)	4 (0.04%)	9 (0.10%)	
Lung/all bacterial positive <sup>※</sup>	2008	4832	6 (0.12%)	7 (0.14%)	13 (0.27%)	3 (0.06%)
	2009	4119	4 (0.10%)	3 (0.07%)	7 (0.17%)	
	Combined	8951	10 (0.11%)	10 (0.11%)	20 (0.22%)	

※sputum smear positive and/or culture positive and/or nuclear amplification test positive for tuberculosis