

図3 広域分子疫学データベース登録株の地理的分布状況

### (2) 北京型結核菌新興型の広域的分布状況

日本の一部地域において感染拡大傾向が指摘されている北京型結核菌新興型の分布状況を広域的に分析した(図4)。北京型に占める新興型の割合は全国平均で23.7%であった。各地域ブロックにおける割合は18.5%~30.2%であり、ブロック間における有意な差は認められなかった( $p=0.626$ ) (表1)。患者背景を比べると、祖先型と比べて新興型に感染していた患者は有意に若かった(62歳 vs 76歳,  $p<0.001$ )。薬剤感受性では、リファンピシン耐性、ストレプトマイシン耐性の割合が高かった(2% vs 0%;  $p=0.013$ , 18.3% vs 5.5%;  $p<0.001$ )。

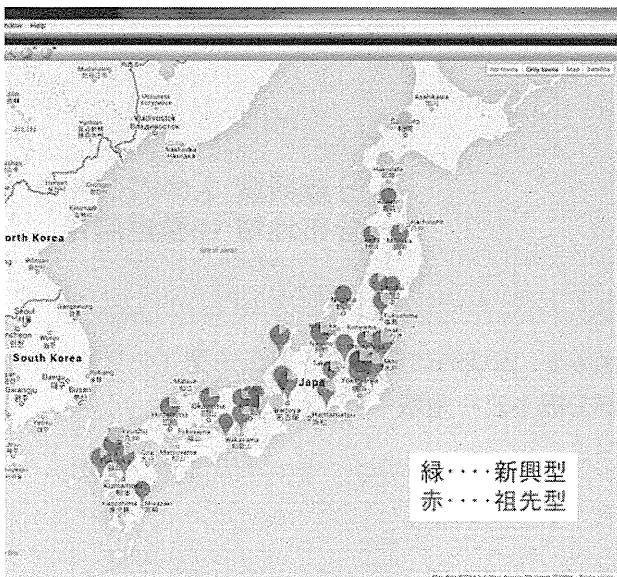


図4 北京型結核菌新興型、祖先型の広域分布状況

### (3) 薬剤耐性結核菌の広域的分布状況

広域分子疫学データベースモデルに登録されている薬剤耐性結核菌の地理的分布状況を図5に示した。いずれかの薬剤に対する耐性をもつ菌株の全国平均は11.1%であった。各地域ブロックにおける割合は、北海道・東北8.2%、関東13.3%、中部8.1%、近畿11.0%、中国・四国12.5%、九州・沖縄5%であり、地域ブロック間に差は認められなかった( $p=0.092$ )。

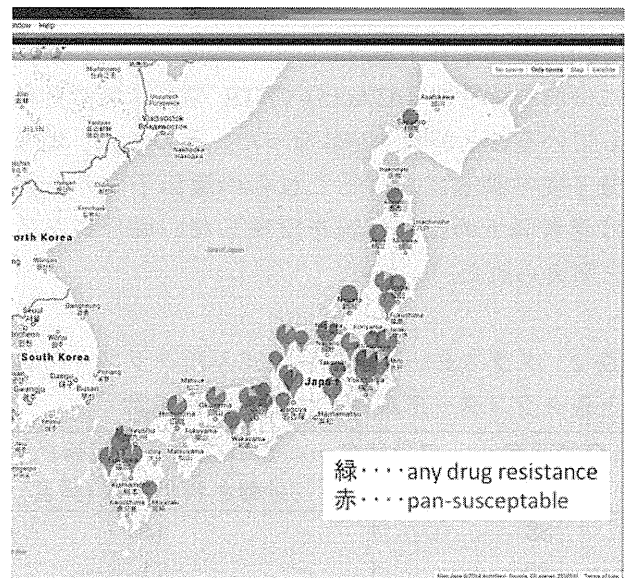


図5 広域分子疫学データベースモデルに登録されている薬剤耐性株の広域分布状況

### (4) JATA(15)-VNTR 型別に基づく全国株のクラスター分析

全国から収集された菌株について、JATA(15)-VNTR 型別に基づいたクラスター分析を実施した。987株のうち、603株はユニークな型別を示した。384株は合計103クラスターを形成した。クラスター形成率は39%であった。クラスターサイズの分布を表2に示した。最大クラスターサイズは38株であり、続いて20株、15株、11株のクラスターがそれぞれ1クラスターであった。それぞれのクラスターに該当するJATA(15)-VNTR 遺伝子型の出現頻度は3.9%、2.0%、1.5%、1.1%であった。クラスターサイズが2株、3株のものはそれぞれ57クラスター、23クラスターありクラスター数全体の77.7% (80/103)を占めていた。

(5)JATA(15)-VNTR クラスターの地理的分布状況

JATA(15)-VNTR クラスターを形成する株が分離された県数を算出し、クラスター形成株の広域的な分布状況を分析した(表2)。クラスターサイズが2株、3株の一部のクラスターを除くと、その他のクラスターは複数の県で分離された菌株で構成されていた。たとえば、クラスターサイズの最も大きな3つのクラスターについて地理的分布状況をみると、38株で形成されるクラスター1は14県で分離されており、20株のクラスター2は11県、15株のクラスター3は6県で分離されていた(図6-1, 6-2, 6-3)。以上の結果から、わが国にはある特定のJATA(15)-VNTR型が広域に分布していることが明らかになった。そのため、地域分子疫学調査におけるこれらの遺伝子型の一致は患者同士の接触状況を反映しない場合があると考えられた。

表2 クラスター形成株数別にみたクラスター数と各クラスター形成株が分離された県数

クラスター形成株数	クラスターの個数	クラスター形成株が分離された県数(頻度)
38	1	14
20	1	11
15	1	6
11	1	6
10	2	6, 5
9	4	7, 6, 5, 4
6	2	5, 4
5	5	4(3), 3, 2
4	6	4(4), 3, 2
3	23	3(11), 2(11), 1
2	57	2(48), 1(9)

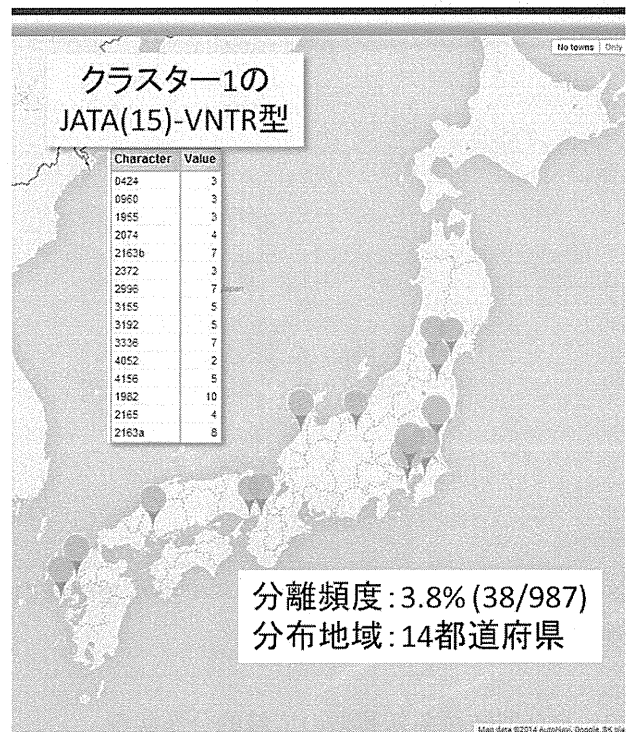


図6-1 広域的に頻出する遺伝子型(クラスター1)が分離された地域

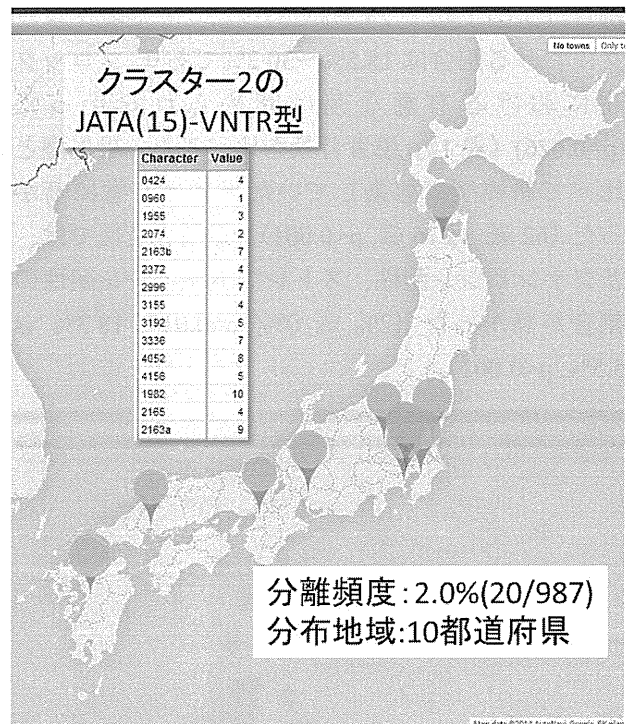


図6-2 広域的に頻出する遺伝子型(クラスター2)が分離された地域

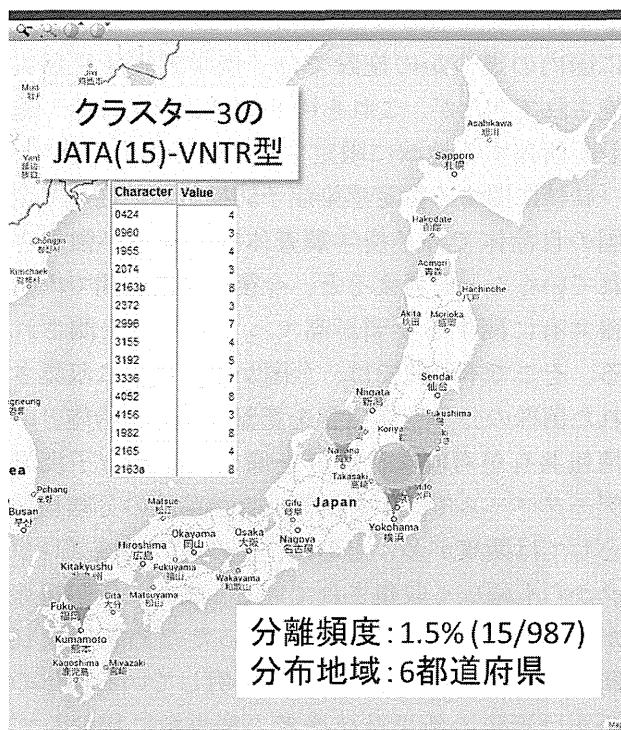


図 6-3 広域的に頻出する遺伝子型（クラスター1）が分離された地域

#### 《地域分子疫学調査における広域分子疫学データベースモデルの評価》

広域分子疫学データベースモデルを活用した地域分子疫学の意義を明らかにする目的で、2009～2012年に東京都新宿区で登録された結核菌陽性患者から分離された325株と広域分子疫学データベースに登録された987株の遺伝子型別情報を比較した。東京都新宿区では34 loci-VNTRの情報が入手可能であったため、34 loci-VNTRの遺伝子型別情報を用い、Minimum Spanning Tree (MST)法により各株の系統関係を計算して系統樹を作成した（図 7-1）。全国株と新宿区株の合計1,312株は図中赤矢印で示された非北京型、北京型祖先型、北京型新興型の3つに大別された。なお、系統樹におけるクラスター形成株の存在をパイチャートで示した（全国株[緑]、新宿区株[赤]）。

祖先型に属する最大クラスターは全国株13株と新宿区株3株が混在していた（図 7-2）。これらの全国株は、宮城、茨城、千葉、東京、佐賀、長崎から分離されており、新宿区で検出された3株からなるクラスターAの遺伝子型は全国的に分布していることがデータベースを参照することにより示された。なお、実地疫学情報からは、新宿区3株のクラスターを形成した患者間の疫学的接

触は確認されなかった。

次に感染拡大傾向が懸念される新興型の系統樹中心部を拡大して図示した（図 7-3）。この拡大領域では、新宿区株のみで形成される2クラスター（クラスターB, C）の存在が確認できる。これら2つの遺伝子型は広域分子疫学データベースモデルに登録されていないことから新宿区周辺への局在が予測され、地域内での新たな感染拡大の可能性が推察された。なお、実地疫学情報からクラスターBは都内の複合ビルで発生した集団発生事例由来の菌株であったことが判明している。

#### 【薬剤感受性試験の外部精度評価】

日本国内でPZAの感受性試験を日常的に行っている施設は20施設ほどであり、今回外部精度評価の実施を受諾したのは5施設のみであった。パネルテストには以下の10株（全て非多剤耐性結核菌）を使用した（表 3）。

表 3 パネルテスト使用株の耐性状況

由 来	MGIT PZA AST	
	耐性/感受性	MIC (μg/ml)
P/M-01	感受性	—
P/M-11	感受性	—
P/M-15	感受性	—
P/M-16	感受性	—
H37Rv	感受性	25–50
2053534	耐性	>400
2064392	耐性	>400
2074140	耐性	>400
H37Ra	耐性	300
12039	耐性	>800

発育不良は認められず、全ての施設で10株の試験を実施した。方法は全ての施設でMGIT PZA ASTであった。5施設のうち、4施設は標準結果と完全に一致しており、1施設で1株（2074140株）のみ誤って感受性と判定されていた。

#### 【衛生検査所データによる薬剤耐性状況】

2013年にミロクメディカルラボラトリーで薬剤感受性試験を実施された1,561株（症例）に関するデータが供与された。

表4 抗結核薬耐性状況 (n=1,561)

薬剤	耐性	感受性	比率
INH (0.2)	52	1,509	0.033
INH (1.0)	23	1,538	0.015
RFP	12	1,549	0.008
SM	66	1,495	0.042
EB	10	1,551	0.006
TH	6	1,555	0.004
KM	2	1,559	0.001
EVM	15	1,545	0.010
PAS	18	1,542	0.012
CS	1	1,560	0.001
LVFX	17	1,544	0.011

患者は、男性 898 名、女性 519 名 (不明 144 名) で、平均年齢は 67.3±28.7 (197 例 12.6%の年齢不明) であった。表4にそれぞれの薬剤に対する耐性結核菌分離数および比率を示した。また、同じ数値を図8に示した。

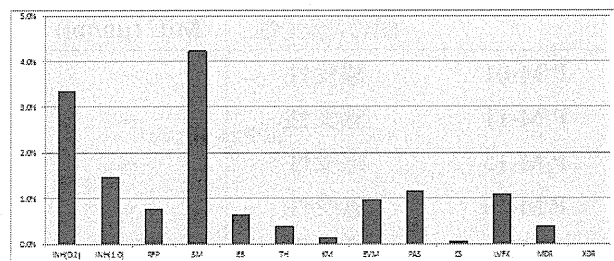


図8 抗結核薬耐性状況 (n=1,561)

INH 0.2µg/ml における耐性率 (Combined) は 3.3%であり、同様に RFP の耐性率は 0.8%であった。INH, RFP, SM 及び EB のいずれかの薬剤に耐性を有する株は 105 株で、比率は 6.7%であった。多剤耐性結核菌に相当する株は 6 株認められ、比率としては 0.4%となった。いわゆる超多剤耐性結核菌 (多剤耐性に加え、注射剤とキノロン剤に耐性を有する) は認められなかった。

#### D. 考察

【結核菌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モデルの構築】

結核の地域分子疫学を理解するためには、その周辺地域を含む広範なエリアでの結核菌の遺伝

子型分布状況を知ることが必要である。これまでに国内の幾つかの施設で分子疫学調査研究が実施されてきたが、これらのサンプリングはその施設が所在する地域に限定されている場合が多い。

「結核に関する特定感染症予防指針」に従って全国の自治体で分子疫学調査体制の構築が強化されていくことを考えると、今後、自治体間での情報共有に関する要望が高まってくると予測される。そこで本研究では、全国から網羅的に収集された菌株の分子疫学情報を基盤とし、自治体との情報共有が可能な仕組みを備えた広域分子疫学データベースモデルを構築した。菌株の分離地域としては関東が多いものの、その他の地域ブロックからも幅広く収集されている。また、年齢情報が得られなかった検体が多かったため正確な判断は出来ないものの、年齢が判明している検体の分布は近年の新規結核患者の罹患数に相似しており、近年の罹患状況を反映していると考えられる。以上から、本研究で構築された広域分子疫学データベースモデルは、我が国において現時点で最も代表的な分子疫学データベースと考えられ、自治体の実施する分子疫学調査においてレファレンス情報として活用されることが期待される。

全国から分離された結核菌 897 株は、北京型が 66.1%を占め、そのうち祖先型が 76.3%、新興型 23.7%であり、全国的に同様の割合で新興型が定着していることが本研究で示された。岩本らは関西地区から分離された菌株を用いた研究において新興型が若年層の患者から有意に分離されることを報告している<sup>5)</sup>。本研究でも新興型に感染していた患者は祖先型の患者と比較して若いことが示された (62 歳 vs. 76 歳, p<0.001)。若年層では結核既感染率が低く最近の感染による発病の割合が高いことを考えると、新興型は祖先型に比べ伝搬や発病が優れている可能性があり<sup>6)</sup>、継続して新興型の発生状況を監視していくことが重要である。また、祖先型と比べて新興型ではストレプトマイシン耐性の割合が高かった。この一因として、新興型に属する M 株と呼ばれるストレプトマイシン単独耐性株の存在<sup>7)</sup>が挙げられる。本データベースでは全体の 11% (11/987) が M 株であったことが JATA(15)-VNTR 分析の結果から判明している。

広域分子疫学データベースモデルを活用した

地域分子疫学調査の有用性を評価するために、全国株の遺伝子型分布状況を参照して新宿区株のクラスター分析をおこなった。新宿区株のクラスターは、(1)新宿区株のみで形成されるクラスターと(2)新宿区株と全国株で形成されるクラスターの2種類に分類された。前者のクラスターは新たな遺伝子型結核菌の発生と拡大を示唆しており、地域内において感染伝播が生じていることが推察されるため、結核対策上注意を要する事例であると判断される。一方、後者のクラスターは全国的に頻出する遺伝子型が偶発的に地域で発生して見かけ上のクラスターを形成している可能性と真の感染伝播を反映している可能性があり、感染経路の推定には注意を要する。今回用いた新宿区の分子疫学調査には13症例からなる集団発生事例が含まれていたが、この集団発生事例の遺伝子型は新宿区に特徴的なものであった。一方、新宿区株のみで形成されるクラスターであっても、疫学的接触が見いだされない事例が存在した。この原因として不特定多数の人と接触することが多い都市部における実地疫学調査の限界が挙げられる。そのため、感染経路の把握に適した低蔓延地域等でも同様の評価をおこなう必要がある。

地域分子疫学調査において生じたクラスターは必ずしも最近の感染を反映しないことが報告されているが<sup>8)</sup>、これは分子疫学調査を実施する上での最も大きな障害の一つである。なぜならば地域の保健所では人員と予算の問題から全てのクラスターについて感染伝播の可能性を詳細に検討することが困難な場合が多いからである。広域分子疫学データベースモデルを活用することにより、クラスター形成の信頼性を事前に評価することが可能となれば、従来よりも効果的な分子疫学調査の実施が期待できる。そのため、今後は地域分子疫学データベースモデルの情報の拡充と、データベースモデルの有用性を様々な地域の自治体と共同で評価していく必要がある。

#### 【薬剤感受性試験の外部精度評価】

本邦で初めてとなるPZAの薬剤感受性試験外部精度評価を実施した。今回、MGIT PZA ASTを使用している施設を対象としたため、施設数が限定されていた上、コスト・手間等を理由に参加を固辞された施設が複数あった。実施の方法は、こ

れまで経験のある主要抗結核薬の外部精度評価と同じ方法を採用したが、発育不良などの問題は認められなかった。

今回の5施設では1施設のみ偽感受性の結果が示された。一般にピラジナミドの感受性試験では「偽耐性」が示されることが多く、この点は予想外であった。原因は不明であるが、比較的判定の容易な株が使用されていることを考慮すると、接種ミス等が考えられた。

ピラジナミドは結核の多剤併用療法上極めて重要な薬剤であるが、感受性試験の実施が難しく、日本を含めて偽耐性の判定傾向が報告されている。今回の結果は、限定的であるが実施施設の検査精度がほぼ正確であることを示していた。今回の外部精度評価では一種類の検査法の評価のみ行ったが、今後は今回の経験を元に日本で使用されている全てのピラジナミド感受性試験法に対応した評価を実施可能と思われる。

#### 【衛生検査所データによる薬剤耐性状況】

本邦では抗酸菌検査の70%程度が検査センターで実施されていると考えられている。同施設で試験されたデータは個人に還元されるが、疫学的には全く利用されていない。検査センターが日常的に受託し産生する薬剤感受性試験データの有用性は過去の研究班で既に表示されており、ほぼ正確に日本全体の耐性状況を反映する。今回のデータもほぼ日本全国をカバーしており、INH, RFP, SM及びEBに対するAny resistanceは6.7%、多剤耐性結核は0.4%となったが、これは結核の統計に示された2013年のデータ(それぞれ9.8%と0.6%)と大差ないものであった。結核の統計で耐性率が高くなる傾向があるのは、耐性結核を診療している病院が自施設で行っている試験結果が反映されるためと考えられる。

検査センターは適切に精度保証された感受性試験を実施している施設が多く、一般的に病院施設よりも信頼性が高い。病原体サーベイランスが機能していない現状では、検査センターデータの有効活用が重要である。

#### E. 結論

【結核菌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モデルの構築】

全国から網羅的に収集された結核菌 987 株の分子疫学情報を基盤とした広域分子疫学データベースモデルを構築した。このデータベースは登録株の分子疫学情報を地図上に出力可能な仕様となっており、結核の広域的な流行状況を把握するために有用であると考えられる。結核菌の分布状況を広域的に分析すると、北京型結核菌新興型の全国的な感染拡大傾向が疑われた。また、全国的な VNTR 遺伝子型の出現頻度が明らかとなった。この情報を地域分子疫学調査で活用することにより、地域内で新たに発生した遺伝子型結核菌の同定が可能となり、感染経路を究明するための有用な情報となると考えられた。

#### 【薬剤感受性試験の外部精度評価】

PZA においても外部精度評価が可能であることが示された。輸送の問題のため、今回のパネルには多剤耐性結核菌を使用することが困難であったが、2015 年 5 月 21 日に施行される改正感染症法ではいわゆる超多剤耐性結核菌以外は四種病原体等に分類されることになるため、現状よりも現実性のあるパネル構成が可能になると思われる。二次抗結核薬を含めて薬剤感受性試験の精度保証を進めることで、無用な患者の不利益を可能な限り減少させることが期待される。

#### 【衛生検査所データによる薬剤耐性状況】

本邦では 1 年間におよそ 10 万件程度の結核菌薬剤感受性試験が実施されていると推定される。そのうち 7~8 万件は検査センターが実施しており、さらにその 80%程度は大規模検査センターで実施されていると考えられる。これらのデータは疫学的に利用されることはほとんどないが、実際には一般病院レベルでの耐性状況をよく表していると考えられる。系統的な利用が有益と思われる。

#### F. 健康危惧情報

多剤耐性菌を含む結核菌の取扱に関してバイオハザード上の危険があるが、GMT を基礎とした適切な実験・検査施設 (BSL3) を用いて研究を実施しており、危険は最小限と考えられる。

#### G. 研究発表

##### 論文

1. Nishiyama H, Aono A, Sugamoto T, Mizuno K, Chikamatsu K, Yamada H, Mitarai S. Optimization of the microscopic observation drug susceptibility assay for four first-line drugs using *Mycobacterium tuberculosis* reference strains and clinical isolates. J Microb Method 2014 Jun; 101: 44-48.
2. Aono A, Chikamatsu K, Yamada H, Kato K, Mitarai S. The association between *pncA* gene mutations, pyrazinamidase activity and pyrazinamide-susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobiol Agent Chemother 2014 Aug; 58(8): 4928-4930.

##### 学会発表

1. 加藤朋子, 青野昭男, 村瀬良朗, 近松絹代, 山田博之, 御手洗聡. 日本全国に分布する結核菌の分子疫学的プロファイリング. 結核 2014; 89(3): 4465. 第 89 回日本結核病学会総会. 岐阜 2014 年 5 月 9-10 日
2. Kobayashi M, Aoki S, Saito T, Aono A, Mitarai S. Total-deletion mutation of *pncA* as a new mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* - The first report from Japan-. IDWeek 2014, the Pennsylvania Convention Center in Philadelphia, PA. October 8-12, 2014.
3. 青野昭男, 近松絹代, 高木明子, 御手洗聡. Pyrazinamide 薬剤感受性試験法の評価. 日本臨床微生物学会雑誌 2015; 25(S1): 221. 第 26 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 東京 2015 年 1 月 31 日-2 月 1 日.
4. 金谷潤一, 磯部順子, 木全恵子, 清水美和子, 増田千恵子, 御手洗聡, 佐多徹太郎, 綿引正則. 富山県における結核菌分子疫学調査. 第 49 回富山県公衆衛生学会. 富山 2015 年 2 月 10 日

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

- I. 参考文献
- 1) Maeda et al. 2008. 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. 83:673-678.
  - 2) Maeda et al. 2009. 結核菌の反復配列多型(VNTR)標準分析法の確立と型別情報データベースの構築. 結核. 84:784-786.
  - 3) Warren et al. 2004. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. Am J Respir Crit Care Med. 169:610-614.
  - 4) Wada et al. 2009. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis. FEMS Microbiol Lett. 291:35-43.
  - 5) Iwamoto et al. 2009. 結核菌北京型ファミリーの集団遺伝学的解析から推察される日本国内定着型遺伝系統群の存在と遺伝系統別薬剤耐性化傾向の違い. 結核. 84:755-759.
  - 6) Hanekom et al. 2007. A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. J Clin Microbiol. 45:1483-1490.
  - 7) 大角晃弘, 村瀬良朗, 森 正明, 他: 首都圏におけるストレプトマイシン耐性結核菌 M 株の伝播状況. 結核. 2009 ; 84 : 388.
  - 8) 長嶺路子, 大森正子, 永井恵, 他: 新宿区内の全結核患者に対する IS6110RFLP 分析の実施と評価. 結核. 2008 ; 83 : 379.

<衛生検査所データによる薬剤耐性状況>  
玉井清子, 柳沢英二  
株式会社ミロクメディカルラボトリー

<研究協力者>

<結核菌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モデルの構築>

村瀬良朗

結核予防会結核研究所抗酸菌部

大角晃弘

結核予防会結核研究所臨床・疫学部

神楽岡澄、渡部裕之、高橋郁美

新宿区保健所

<結核菌薬剤感受性試験精度評価>

青野昭男, 近松絹代, 山田博之, 高木明子

結核予防会結核結核研究所抗酸菌部

表1 北京型結核菌新興型、祖先型における臨床疫学的特性と薬剤感受性の比較

		祖先型 n=492 (%)	新興型 n=153 (%)	p.value
居住地 ブロック	北海道 ・ 東北	22 ( 4.5)	5 ( 3.3)	0.626
	関東	262 ( 53.3)	89 ( 58.2)	
	中部	78 ( 15.9)	20 ( 13.1)	
	近畿	37 ( 7.5)	16 ( 10.5)	
	中国・四国	31 ( 6.3)	8 ( 5.2)	
	九州・沖縄	62 ( 12.6)	15 ( 9.8)	
性別	女性	152 ( 38.4)	38 ( 30.2)	0.111
	男性	244 ( 61.6)	88 ( 69.8)	
年齢 (中央値 [IQR])		76.00 [60.00, 84.00]	62.00 [46.00, 72.00]	<0.001
いずれかの薬剤 に対する耐性	あり	50 ( 10.2)	30 ( 19.6)	0.003
	なし	442 ( 89.8)	123 ( 80.4)	
INH 1.0	耐性	10 ( 2.0)	5 ( 3.3)	0.365
	感受性	482 ( 98.0)	148 ( 96.7)	
RFP	耐性	0 ( 0.0)	3 ( 2.0)	0.013
	感受性	492 (100.0)	150 ( 98.0)	
EB	耐性	2 ( 0.4)	1 ( 0.7)	0.557
	感受性	490 ( 99.6)	152 ( 99.3)	
SM	耐性	27 ( 5.5)	28 ( 18.3)	<0.001
	感受性	465 ( 94.5)	125 ( 81.7)	



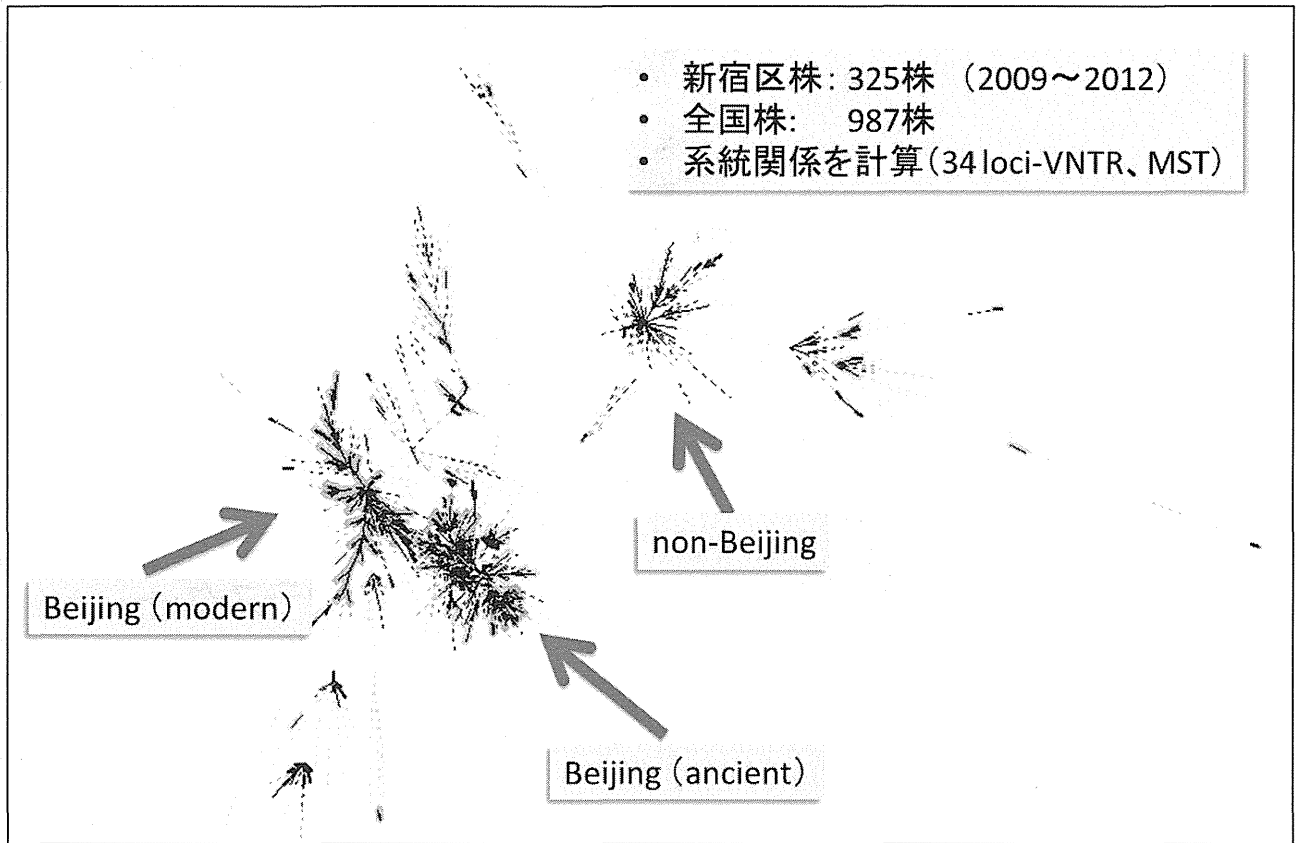


図 7-1 新宿区株、全国株の系統図 (34 loci-VNTR, Minimum spanning tree)

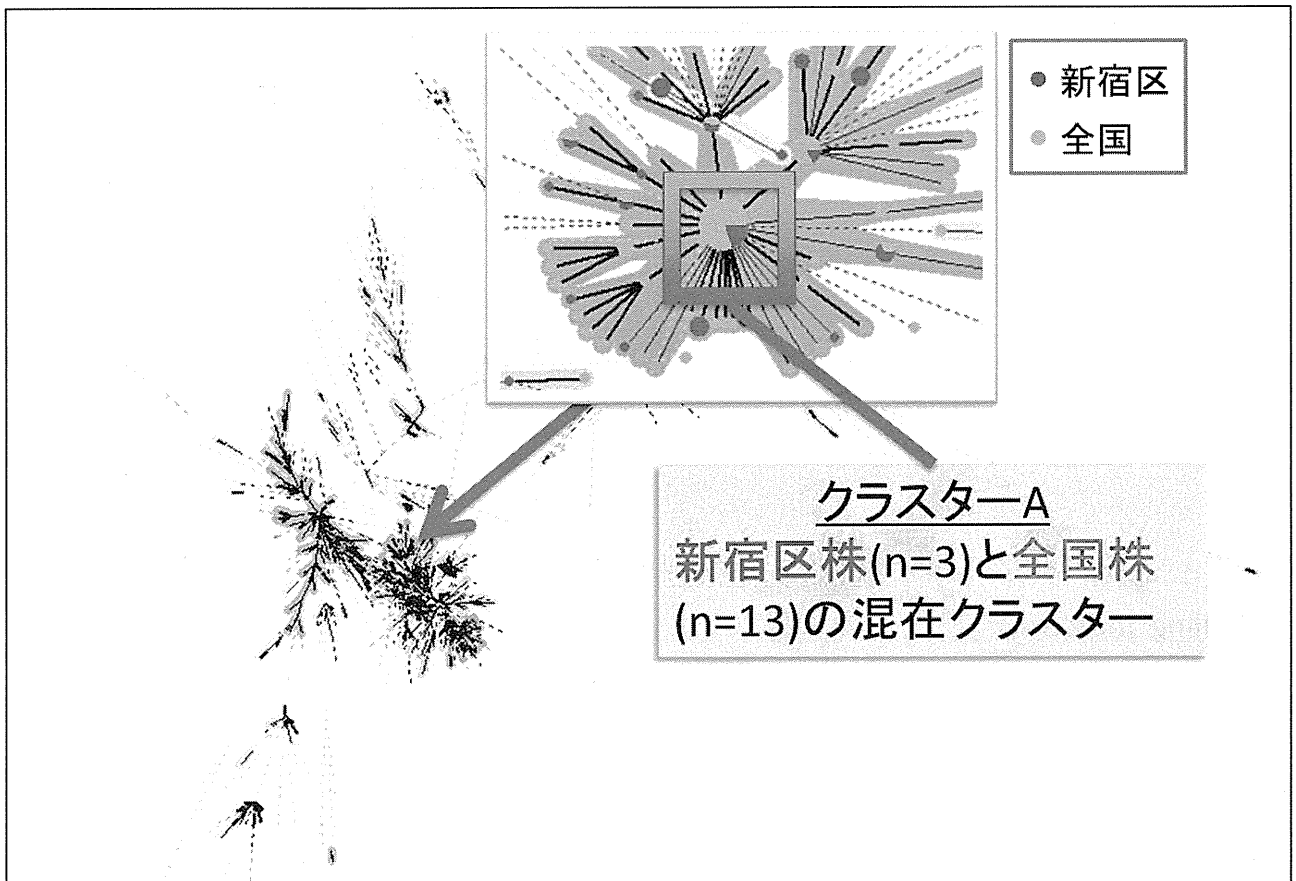


図 7-2 新宿区株、全国株の系統図 (34 loci-VNTR, Minimum spanning tree)、祖先型の一部を拡大

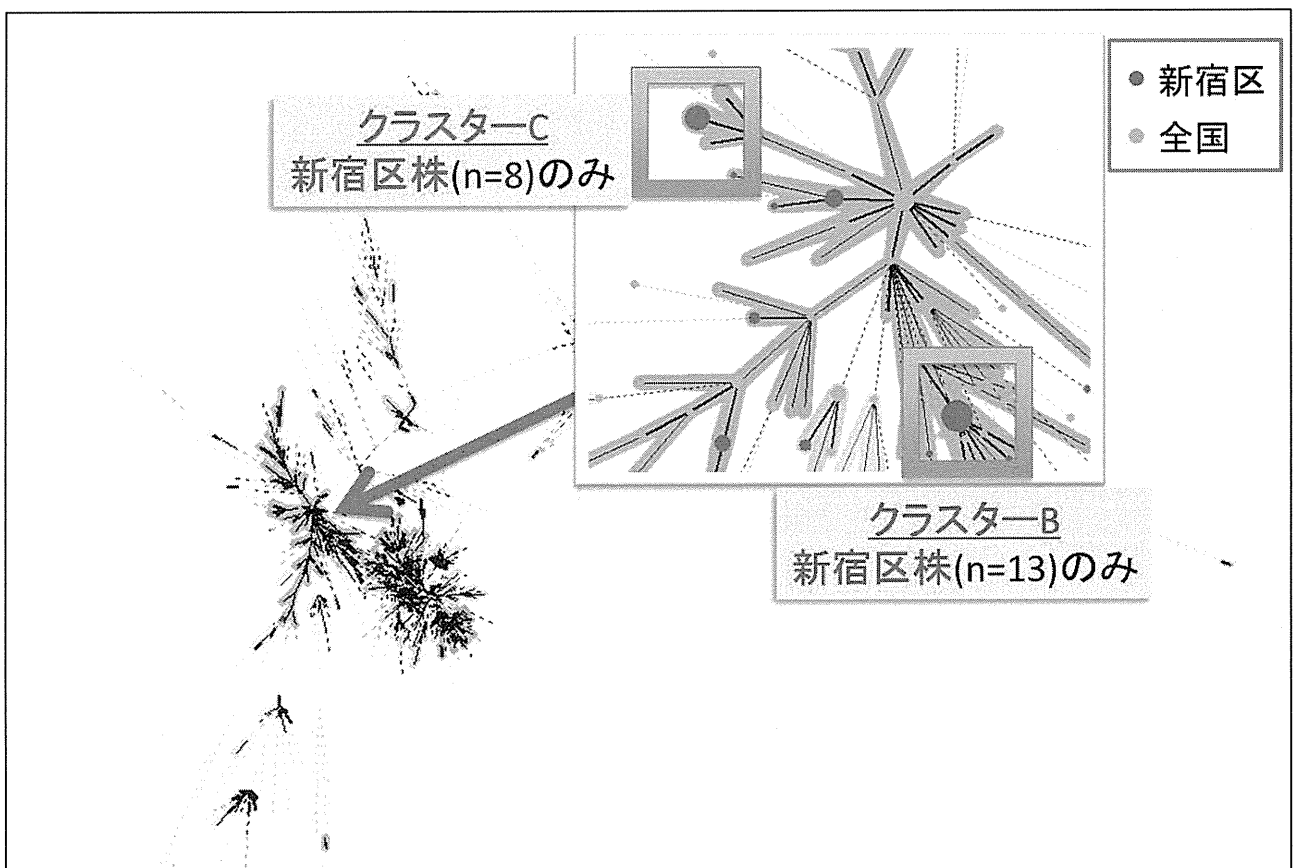


図 7-3 新宿区株、全国株の系統図 (34 loci-VNTR, Minimum spanning tree)、新興型の一部を拡大

厚生労働科学研究委託事業  
(新興・再興感染症法に対する革新的医薬品等開発研究事業)  
分担研究報告書

「的確な疫学状況把握のための結核菌の遺伝子型情報及びGIS（地理情報システム）等  
を用いた結核菌伝播状況の分析」

研究分担者：大角 晃弘

(公財) 結核予防会結核研究所 臨床・疫学部、疫学情報センター

研究協力者：

泉 清彦 (公財) 結核予防会結核研究所 臨床・疫学部

河津里沙 (公財) 結核予防会結核研究所 臨床・疫学部

村瀬良朗 (公財) 結核予防会結核研究所 抗酸菌レファレンスセンター

研究要旨

今後わが国が、結核中蔓延国から結核低蔓延国（人口10万対全結核登録者数10人未満）に、より速やかに移行するためには、結核登録患者が偏在している都市部全体における結核対策の強化とともに、結核発病の危険性がより高い人口集団を対象とする結核対策の強化が必須である。そのためには、都市部における結核菌伝播の状況を推定し、より積極的かつ効率的な結核対策を推進するとともに、結核発病の危険性が高い人口集団である結核患者接触者を対象とする接触者健診を強化することが必要である。

本研究は、2002年9月以降、新宿保健所と結核研究所とが行っている、東京都新宿区内で登録された全結核患者から分離培養された結核菌を対象とする結核分子疫学調査から得られた情報を主に用いて、結核分子疫学（RFLP分析、VNTR分析、全ゲノム分析等による結核菌遺伝子型情報と疫学情報とを用いた分析）・地理情報システム（Geographic Information System, GIS）・社会ネットワーク分析（Social Network Analysis, SNA）等の技術を導入し、都市部における結核菌伝播状況について記載すると共に、接触者健診を強化して、より効率的な都市部結核対策を実施するための基礎資料を提供することが目的である。また本研究により、内因性再燃と考えられる再発結核事例での遺伝子変異に基づく結核菌株の識別・わが国の都市部における結核菌の地理的伝播状況・集団感染事例におけるより詳しい結核菌伝播状況を記載し、より効率的な結核の集団感染対策に資するとともに、より迅速に結核菌遺伝子型情報を得るための方法の確立も目指す。

(1) 2003～2011年に、新宿区保健所において登録された結核患者の内、菌陽性結核患者を対象として、既存の患者疫学情報や結核菌遺伝子型別解析に基づいて、1) 結核患者の主な活動場所の集積性、2) 結核患者数と都市環境要因との関連性について

検討した。1)の結果から、結核患者の活動時の主な滞在場所が新宿駅周辺に有意に集積していることを確認した。一般住民においては比較的同区内の広い範囲に分散していたが、住所不定患者では駅周辺に強く集積していた。最近の感染を示唆する結核菌遺伝子型を共有している患者群（菌株クラスタ群）では、非菌株クラスタ群に比べてより集積する傾向が見られた。2)の結果から、菌株クラスタ群では駅周辺の商業地域が有意な予測因子と検出され、一般住民の非菌株クラスタ群（外国人や住所不定者の非菌株クラスタ群は含まない）は、患者数は最寄り駅からの距離と非就労世帯割合に比例しており、退職高齢者の過去の結核感染からの発病の可能性が示唆された。

(2) 2010～2012に新宿区で発生した大規模な集団感染において、患者9名、接触者431名（うち潜在性結核感染症（LTBI）63名）分の情報について、患者登録票及び接触者検診問診票から収集した。今回の事例に関しては、媒介中心性の指標が接触者におけるLTBI患者発見率を示し得る指標であることが示唆された。「優先接触者」には有意に喫煙者が多かったことから、「優先接触者」は、喫煙所を介して自身とは異なるフロアや部屋にいる発病者と接触するリスクを高めていた可能性が示唆された。

(3) -1 複十字病院および東京都新宿区において発生した結核患者のうち、前回治療時と再発時の菌株のVNTR法及びRFLP法による分析で、型別が一致した症例を内因性再燃として分析対象とし、全ゲノム分析を行った。その結果、全ゲノム分析は、従来法であるRFLP法やVNTR法と同様に、再感染と再燃の鑑別が可能であると考えられた。結核菌ゲノムDNA変異の発生した遺伝子領域の分布状況では、SNPs変異によって影響を受けた遺伝子は、全ての株で異なっていたことから、再燃に至る過程で結核菌ゲノムに発生した変異は無作為に発生したと考えられた。

(3) -2 複十字病院細菌検査室において結核菌検査の過程で生じた喀痰NALC-NaOH処理残液を収集し、結核菌の研究や結核菌検査で一般的に用いられるDNA抽出法（熱処理法[Boil法]、QIAmp法[QIAGEN]、Loopamp pure DNA法[栄研化学]、TaqMan MTB検体前処理法[ロシュ]、TRC検体前処理法[東ソー]）を用いてDNAを抽出し、JATA(12)-VNTR検査を行った。その結果、各方法において、喀痰中の菌量とJATA(12)-VNTR検査の成功率には有意な相関があり、菌量が多く含まれる検体群(2+, 3+ [蛍光法]、n=4)では菌量が少ない検体群(±, 1+ [蛍光法]、n=4)と比べて検査の成功率が高かった。

#### A. 研究目的

わが国の2013年における全結核登録率は人口10万対16.1で、2000年以降減少傾向が続いているが、毎年2万人以上の結核患者が新登録されており、結核は、未だにわが国最大の伝染病である。今後わが国が、結核中蔓延国から結核低蔓延

国（人口10万対全結核登録者数10人未満）に、より速やかに移行するためには、結核登録患者が偏在している都市部全体における結核対策の強化とともに、結核発病の危険性がより高い人口集団を対象とする結核対策強化が必須である。そのためには、都市部における結核菌伝播の

状況を推定し、より積極的かつ効率的な結核対策を推進するとともに、結核発病の危険性が高い人口集団である結核登録患者接触者健診を強化することが必要である。

本研究は、2002年9月以降、新宿保健所と結核研究所とが行っている、東京都新宿区内で登録された全結核患者から分離培養された結核菌を対象とする結核分子疫学調査から得られた情報を主に用いて、結核分子疫学(RFLP分析、VNTR分析、全ゲノム分析等による結核菌遺伝子型情報と疫学情報とを用いた分析)・地理情報システム(Geographic Information System, GIS)・社会ネットワーク分析(Social Network Analysis, SNA)等の技術を導入し、都市部における結核菌伝播状況について記載すると共に、接触者健診を強化して、より効率的な都市部結核対策を実施するための基礎資料を提供することを目的としている。また本研究により、内因性再燃と考えられる再発結核事例での遺伝子変異に基づく結核菌株の識別・わが国の都市部における結核菌の地理的伝播状況・集団感染事例におけるより詳しい結核菌伝播状況を記載し、より効率的な結核の集団感染対策に資することも目指している。

(1) 結核分子疫学と GIS の組み合わせによる地域結核対策強化

(1) - 1 結核分子疫学的手法と GIS を組み合わせることにより、地域における結核伝播・患者発生状況の偏りやその要因を探り、この手法による地域の結核対策を強化することの有用性を検討することと、

(1) - 2 GIS を用いて、結核病床の需要と供給のバランスを検討し、今後のわが国の結核医療提供体制再編のための基礎資料を提供することを目的に実施した。

(2) 結核分子疫学と SNA の組み合わせによる地域結核対策強化

東京都新宿区において発生した結核集団感染事例を、SNA を用いて再解析し、結核の疫学調査における SNA の実施方法及び有用性について、実際の患者情報を用いて検討することを目的とした。今回は、SNA における社会ネットワーク内の個々の位置を表す「中心性」に関する統計量の、接触者健診の優先度を示す指標としての有用性について検討した。

(3) - 1 内因性再燃症例の結核菌全ゲノム解析

全国の地方衛生研究所では主に IS6110-RFLP 法や VNTR 法を用いた結核菌型別検査が実施されている。しかしながらこれら従来法の型別能力は都市部における分子疫学調査において十分ではなく、結核菌感染経路を推定することが困難である場合が多いことが分かってきた。効果的な結核対策をおこなうためには型別能力が高い手法を導入することが必要であり、次世代の結核菌型別分析法として全ゲノム解読法の導入が世界的に期待されている。従来法から全ゲノム解読法へ型別法を移行するためには、型別能力の優位性を客観的に示す必要があるが、こうした知見は限られている。本研究では従来法と比べた際の全ゲノム解読法の優位性を明らかにする目的で、内因性再燃前後に発生した菌ゲノムの微小な変化の定量性を評価した。

### (3) - 2 VNTR 情報の迅速なフィードバックの具体的方法についての検討

結核に関する特定感染症予防指針に従って全国の自治体では結核の分子疫学調査実施体制が強化されつつある。この分子疫学調査では、患者の実地疫学情報と患者から分離された結核菌の遺伝子型別情報から合理的な感染経路を推定し、感染経路の究明と感染拡大の防止を目的としている。現在の結核菌遺伝子型別法の型別能力には限界があり、感染経路を推定するには患者同士の接触状況に関する実地疫学情報を合わせて分析することが必須である。実地疫学情報の取得は、地域の保健所の保健師が患者と面接することによって行われるが、この時点では型別検査結果が判明していない場合が多い。この理由の一つに、現在の結核菌型別検査が時間のかかる分離培養を経て実施されている現状が挙げられる。本研究では結核診断と同時にVNTR検査を実施することを目的として、臨床検体からVNTR検査を直接おこなうためのDNA抽出条件を検討した。

## B. 研究方法

### (1) 結核分子疫学とGISの組み合わせによる地域結核対策強化

(1) - 1 2003～2011年に新宿区保健所で登録された培養陽性結核患者の性別・年齢・国籍・居住地住所・主な滞在場所などの既存情報を収集し、各患者から分離培養された結核菌DNA指紋型(IS6110-RFLP)から、結核菌株クラスタ形成群(以降、菌株クラスタ)と非クラスタ形成群(以降、非菌株クラスタ群)

とに分類し、RFLP分析結果と結核患者の疫学情報を用いた。昨年度(H25年度)は以下の分析を実施し、様々な知見を得られたが(詳しくは、「平成25年度分担研究報告書」を参照)、いくつかの課題も確認された。①居住地に基づく集積性分析による感染場所の推定よりも、主な滞在場所に基づいた分析をとすべきである。②主な滞在場所を住所とし、頻出地域(ホットスポット、非統計学的手法)を検出し、環境要因の解析を交えて感染リスクの高い地域の推定を行ったが、統計学的に検出したホットスポットではなかった。

本年度は、上記課題に対応して、1) 主な滞在場所に基づいて、一般住民・外国生まれ・住所不定者の患者実数を利用して以下の分析を実施した。

ア) 逆距離加重法(IDW)により単位面積あたりの年間患者数の平面を作成し患者分布を検討した。同手法は、近傍にあるサンプルデータポイント値を平均することにより、サンプル間の値を距離の逆数の重み付けを用いて推定する方法である。これにより、単位面積あたりの年間患者数の平面を作成した。イ) これらの分布に関連して、統計学的検定によりホットスポットを特定するために最適化ホットスポット分析を実施した。同手法は、当該町目に多数の患者がおり、同様に隣接する町目にも多数の患者がいる場合をホットスポットとして、その逆をコールドスポットとして検出する手法である。ウ) 線形モデルを用い結核感染場所の予測環境因子を検討した。線形モデルには、希な事象であり過分散となるようなカウントデータに広く用いられている

Multivariate Negative Binomial

Regression を使用した。従属変数には町目毎の患者数を取り、独立変数は次の2群を採用した。i) 土地利用区分4クラス（住宅専用地、住宅地域、商業地域、準工業地域）及び、ii) 18種の都市環境要因（人口密度、駅までの距離、事業所数など）。更に、患者属性（一般住民・外国生まれ住民・住所不定者）及び菌株クラスタ分析結果を用いて、グループ毎の調整リスク比（adjusted risk ratio, ARR）を算出することで各要因を検討した。独立変数ii)の分析に関してはステップワイズ法により変数選択を行った。

(1)-2 2次医療圏毎の2011年時点の次のデータを用いた。1) 需要変数：喀痰塗抹陽性肺結核患者数（以降、塗抹陽性患者）、2) 供給変数：a) 認可結核病床数（以降、結核病床）、b) 結核病床に感染症病床及びモデル病床を含めた病床数（以降、全病床）。昨年度までの研究では、GISを利用したTwo-Step Floating Catchment Area (2SFCA)法を用いて、全国の2次医療圏毎に認可結核病床数に基づく需給バランスについて検討し、モデル病床及び感染症病床の積極的な導入による需給バランス改善を確認した。課題として、どのような地域で特に効果的に結核病床数の需給バランスが改善できるのか整理すべきと考えられた。そのため本年度は、昨年度の結果から判明したアクセススコアが低い2次医療圏（スコアが0.2以下）について、都市化指標を用いて分類し、モデル病床及び感染症病床の導入の効果を検討した。都市化指標は、国勢調査により設定されている人口集中地区（DID）

に居住している人口の、同地域の総人口に占める割合（DID人口割合）を用いた。DID人口割合を4分位毎に4カテゴリに区切り分類し、都市化度合いと結核病床へのアクセスを比較検討した。

(2) 結核分子疫学とSNAの組み合わせによる地域結核対策強化

東京都新宿区において、2010年～2012年に発生した大規模結核集団感染事例の発病者及び接触者に関する情報を収集し、SNAソフトUCINET 6.0 (Analytic Technologies, Harvard, MA, USA)を用いて解析し、結核菌遺伝子情報と併せて検討した。具体的には集団感染事例の患者9名、接触者431名のうち、Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR)分析結果が一致しない1名及びその接触者を除いた、患者8名、接触者386名（うちLTBIと判定された人60名）に関する情報をSNAの対象とした。

結核登録患者に関しては結核患者登録票より下記の情報を収集した。

- 1) 基本情報（性別、登録時年齢、国籍、職業、家族構成、社会活動、その他）、
- 2) 臨床情報（活動性分類、塗抹検査結果、薬剤感受性検査結果、治療歴、その他）、
- 3) 結核菌分子疫学情報（RFLP、VNTR、結核菌株クラスタ情報等）。

接触者に関しては接触者健診問診票より下記の情報を収集した。

- 1) 基本情報（性別、登録時年齢、国籍、職業、社会活動）、
- 2) 臨床情報（QFT検査結果、胸部X線結果、治療の有無）、
- 3) 患者との接触歴（接触場所、接触期間、接触時間）。

解析の手順としては先ず患者及び接触者の属性をまとめた一覧を Microsoft Excel 2010 (Microsoft Japan, Tokyo) にて作成し、それを基にそれぞれの関係性を示す社会関係行列 (ソシオマトリクス) を作成した。次に社会関係行列を UCINET で解析し、次数中心性<sup>1</sup>及び媒介中心性<sup>2</sup>を算出した。さらに、UCINET に組み込まれているネットワーク描画ソフト NetDraw を用いて結核患者及び接触者の関係性の視覚化による集団感染状況を描写した。接触者健診に有用な関係性を示し得るパラメータを特定するために、下記 3 通りのモデルを構築し、比較検討した。

- 1) 患者及びその接触者のみの関係性のモデル (モデル 0)、
- 2) 上記モデル 0 に、家族関係と職場における勤務先フロアとによる関係性を加えたモデル (モデル 1)、
- 3) 上記モデル 1 に、喫煙所を介した関係性を加えたモデル (モデル 2)。

また、各モデルにおいて次数中心性及び媒介中心性と接触者中の LTBI 発見率との関係を検討した。具体的にはそれぞれの標準化スコアをパーセントイル地点毎に区切り、それ以上のスコアを示した群とそれ以下のスコアを示した群における LTBI の割合をオッズ比として算出し、比較した。統計解析には、IBM SPSS

<sup>1</sup> 次数中心性: ネットワークの中心を示す指標の一つで、ノードの次数をそのまま中心性とする。考え方としては「線が集まっているノードほど、次数中心性が高い」。

<sup>2</sup> 媒介中心性: ネットワークの中心を占める指標の一つで、ノード *i* を除く全てのノードが互いに関係する際に、ノード *i* を通る割合で求める。考え方としては「そのノードを媒介する線が多いほど、媒介中心性が高い」。

Statistics 20 (IBM Japan, Tokyo) を用いた。

### (3) - 1 内因性再燃症例の全ゲノム解析

複十字病院および東京都新宿区において発生した結核患者のうち、前回治療時と再発時の菌株を VNTR 法及び RFLP 法で分析し、型別が一致した症例を内因性再燃と定義して研究対象とした。内因性再燃症例の再発前後の菌株のゲノム DNA を ISOPLANT (WAKO) にて精製し、Nextera XT DNA sample prep kit (illumine) を用いてゲノム DNA ライブラリーを調製し、全ゲノム解読装置 Miseq (illumina) および専用試薬 MiSeq reagent kit v3 (600 cycle) を用いてゲノム解読をおこなった。H37Rv を参照配列として検体の DNA 配列を決定し、再発前後の変異 (SNPs) を同定した。

### (3) - 2 VNTR 情報の迅速なフィードバックの具体的な方法についての検討

2014 年に複十字病院細菌検査室において結核菌検査の過程で生じた喀痰 NALC-NaOH 処理残液を収集し、結核菌検査で一般的に用いられる DNA 抽出法 (熱処理法 [Boil 法]、QIAmp 法 [QIAGEN]、Loopamp pure DNA 法 [栄研化学]、TaqMan MTB 検体前処理法 [ロシュ]、TRC 検体前処理法 [東ソー]) を用いて DNA を抽出した。これらの DNA 抽出検体を材料として JATA(12)-VNTR 検査を行った。使用した locus は、0424、MIRU10、1955、2074、QUB11b、2372、MIRU26、QUB15、MIRU31、3336、QUB26、4156 であり、1.8%アガロースゲル電気泳動にて増副産物を確認し、コピー数を算出した。各 DNA 抽出法における分析可能



loci 数を算出することにより、VNTR 法に適した DNA 抽出法について検討した。

#### (倫理面への配慮)

本研究では体液や血液等生体由来の検体を使用せず、新宿保健所及び結核予防会複十時病院により結核患者から収集された結核菌を対象に DNA 指紋分析を行っているため、分析対象の検体そのものについての倫理的問題は生じない。また本研究では、保健所が日常業務として実施する登録結核患者の疫学調査から得られる患者情報を用いている。研究実施者が保健所から入手する患者情報については、患者個人を同定できる情報（氏名・生年月日・番地等）を除いた情報にしており、研究実施者は患者個人を同定できる対応表を保持していない。そのため分析過程及び分析結果の発表においても、結核患者個人が同定されることはない。従って「疫学研究による倫理指針」の第 3 章インフォームド・コンセント等、(2) 観察研究を行う場合、②人体から採取された試料を用いない場合、イ) 既存資料等のみを用いる観察研究の場合、の規定に従って、書面におけるインフォームド・コンセントは取得しなかった。さらに研究実施者は、取り扱っている情報について研究協力者以外の者が入手できないように、パスワードで管理されたコンピュータに厳重に管理しているため、取り扱っている情報が外部に漏洩する危険性はない。

### C. 研究結果

(1) 結核分子疫学情報と GIS とを用い

た研究

(1) —1 2003～2011 年に、新宿区保健所に結核菌陽性結核として登録された患者 1021 名のうち、新宿区内に主な滞在場所が確認できた全患者 643 名を分析対象とした。内訳は、413 名の一般住民（内、菌株クラスタ群 165 名、非菌株クラスタ群 248 名）、及び住所不定者（184 名）である。

ア) 主な滞在場所に基づき逆距離加重法 (IDW) を用いて患者密度面を作成し、患者分布を検討した。指標値は  $1\text{km}^2$  あたりの年間菌陽性結核患者数であり、最大値は新宿駅周辺において 41.7 であった (図 1)。更に、患者属性及び菌株クラスタ属性による患者の分布特性を比較した (図 2)。日本人一般住民では、区内全域に患者分布が見られたが、一般住民菌株クラスタ群において新宿駅周辺においてより顕著な集積性を認めた。一方、住所不定患者は、菌株クラスタ状況に関わらず新宿駅周辺にピークを認めた。

イ) IDW により観察された患者分布に関して、最適化ホットスポット分析により有意な患者集積地と非集積地を検出した (図 3)。IDW の結果に対応する形で新宿駅を含む対象地域の 14% ( $2.5\text{km}^2$ ) をホットスポットとして検出し、対象地域の 6% ( $1.1\text{km}^2$ ) がコールドスポットとして検出された。また、患者属性及び菌株クラスタ属性によるホットスポットの違いを検討した結果、一般住民菌株クラスタ群では新宿駅周辺にホットスポットが見られたが、一般住民非菌株クラスタ群では小さく弱いホットスポットが観察された (図 4)。外国生まれ患者では、患者数

が少なく適切な分析は困難であった。住所不定患者では、菌株クラスタに関わらず、新宿駅周辺に広く強い集積性を示した。

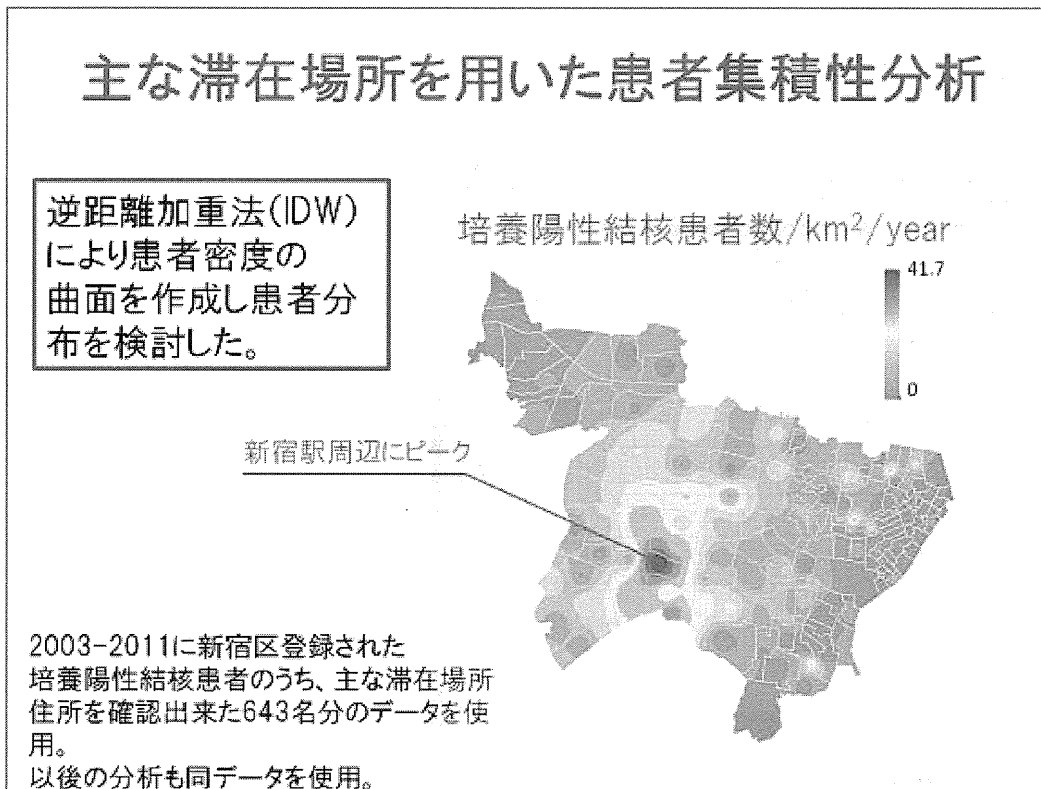
ウ) 線形モデルを用い結核感染場所の予測環境因子を検討した。i) 土地利用区分のモデルでは、商業地域が唯一の有意な患者発生の予測因子であった(図5)。商業地域が統計学的に有意であった群は、全患者( $ARR=1.79$ )、一般住民菌株クラスタ群( $ARR=1.60$ )、住所不定患者( $ARR=3.83$ )であった。つまり、住所不定患者においては、主な滞在場所となる町目が、住宅専用地に比べて商業地域となる傾向が3.83倍高かったことになる。

ii) 都市環境要因のモデルを分析した結果、全患者では「単位面積あたりの昼間人口」、「65歳以上の人口割合」、「単位面積あたりの洗濯・理容・美容・浴場業事業所数」が有意な正の予測因子であった(図6)。一般住民菌株クラスタ群と非菌株クラスタ群とでは、共通する有意な都市環境因子は見られなかった。住所不定患者では、特に「単位面積あたりの娯楽業事業所数」の $ARR$ が2.65(95%信頼区

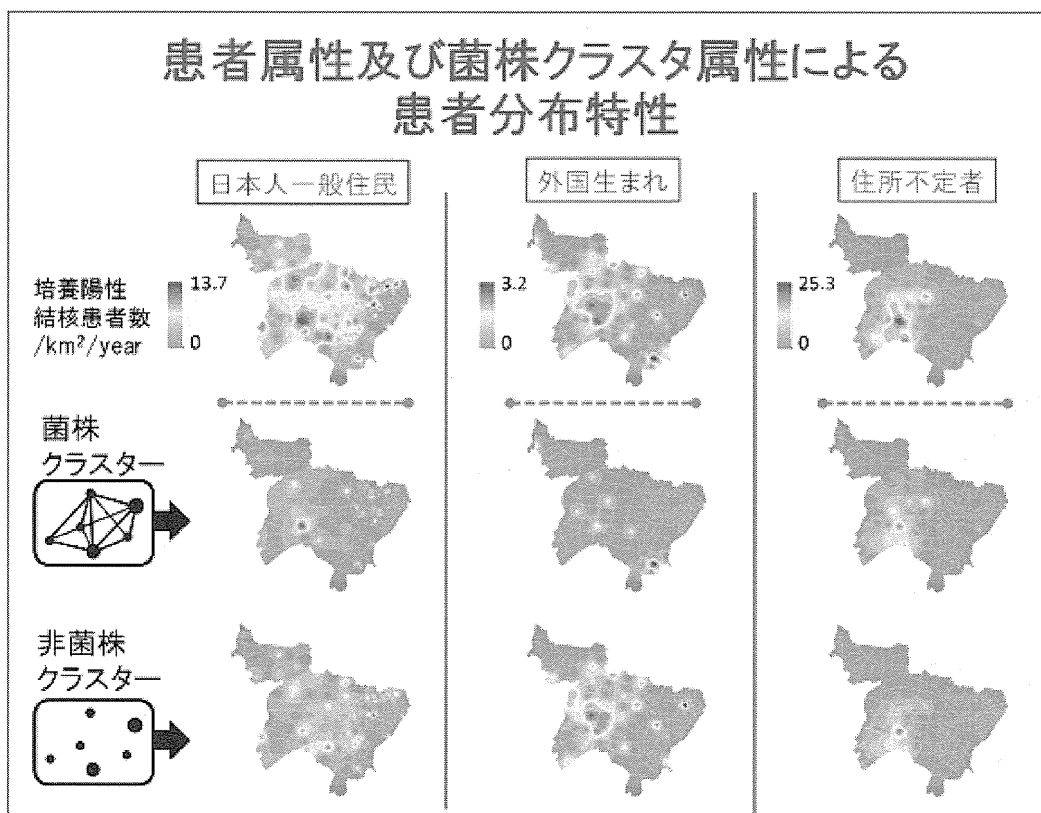
間 1.72-4.06)と高い値であった。

(1) - 2 2SFCA法による結核病床のアクセススコアについて都市化指標を用いて分類し、モデル病床及び感染症病床の導入の効果を検討した。結核病床へのアクセススコアが低い2次医療圏から、2011年に報告された塗抹陽性肺結核患者数は合計897名であった。都市化別に見ると、都市化の“やや高い”2次医療圏から298名、“やや低い”から275名、“低い”から208名、そして“高い”から123名であった。(図7棒グラフ上限) 結核病床に加えて、感染症病床及びモデル病床を利用した場合(図7棒グラフ下限)、アクセススコアが低い2次医療圏からの塗抹陽性肺結核患者数は全体で72%減少した。特に、都市化度が“低”~“やや高”のカテゴリで8割前後の減少率であった(図7ダイヤ)。

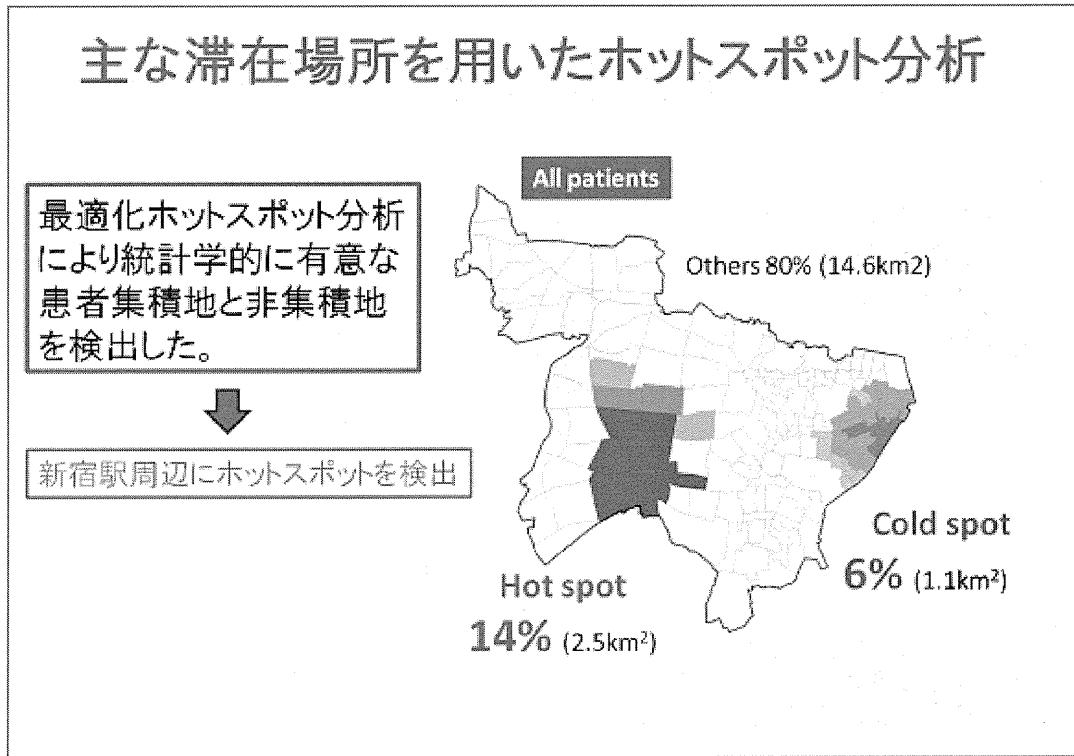
(1) - 1 図1



(1) - 1 図2



(1) - 1 図3



(1) - 1 図4

