

[短 報]

石川県で分離された結核菌株の VNTR 分析を用いた分子疫学的解析

児玉洋江<sup>1)</sup>・小坂 恵<sup>1) 2)</sup>・木村恵梨子<sup>1)</sup>・塩本高之<sup>1)</sup>  
北川恵美子<sup>1) 3)</sup>・谷村睦美<sup>1)</sup>・出雲和彦<sup>1)</sup>・金戸恵子<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 石川県保健環境センター

<sup>2)</sup> 現 石川県南加賀保健福祉センター)

<sup>3)</sup> 現 石川県健康福祉部)

(令和2年1月28日受付, 令和2年8月25日受理)

石川県の結核患者から分離された結核菌株 170 株について 12 領域分析法 (JATA (12)-VNTR) および 24 領域分析法 (24<sub>Beijing</sub>-VNTR) による遺伝系統の推定を行った。北京型は 125 株 (73.5%) を占め、70 歳未満の患者と比較すると、70 歳以上では STK 群の割合が有意に高く、新興型が有意に低かった。非北京型株のうち日本人患者由来株の 9 割以上が Euro-American であった。また、外国人患者では、入国から発症までの期間が 2 年以内と短いこと、株の遺伝系統が日本人患者由来株とは異なることから、日本国外での感染が示唆された。JATA (12)-VNTR のプロファイルが一致した 38 株について 24<sub>Beijing</sub>-VNTR を実施した結果、プロファイルが一致したのは疫学的な関連がある 2 株のみであった。このことから、菌株の異同判定をする上で 24<sub>Beijing</sub>-VNTR の有用性が示唆された。今後も VNTR 分析を用いた結核菌株の遺伝系統解析を継続するとともに、その分析結果を関係機関へ還元することにより、精度の高い実地疫学調査の実施に寄与したい。

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, variable numbers of tandem repeats, JATA(12)-VNTR, 24<sub>Beijing</sub>-VNTR

序 文

現在、国内の結核罹患率は減少傾向にあるものの、若年齢層の患者数や輸入結核の増加など疫学的動態は常に変化し続けている<sup>1)</sup>。

国内で分離される結核菌株の遺伝系統は 7~8 割が北京型である<sup>2)3)</sup>。近年、若年齢層において北京新興型の分離頻度が有意に増加していることが報告されている<sup>3)4)</sup>。また、都市部において外国人患者から国内での分離例が少ない非北京型株が高い割合で分離されることが報告されている<sup>4)5)</sup>。地域で分離される結核菌株について遺伝系統群の分布状況 (集団構造) を把握することで地域の感染状況に関する情報が得られる<sup>2)</sup>。また、網羅的に収集された菌株から菌の異同を解析し、同一由来株を検出することが可能となれば、特定の感染リスクを原因とする事例の把握につながる<sup>2)</sup>。これらの理由から、結核菌株の分子疫学的解析は効果的な結核対策を講じるための有用な分析法として現在位置付けられている<sup>2)</sup>。

結核菌株の分子疫学的解析の 1 つに、反復配列多型 (variable numbers of tandem repeats : VNTR) 分析がある。本分析は、PCR を基礎とした解析法であり、結核菌染色体上に多数存在する単一配列が繰り返り存在する領域について、

その繰り返り数の違いを基に菌株を型別する方法である。この VNTR 法を用いて複数の領域を解析し、数字データで表したプロファイルから遺伝系統の推定が可能となる。

VNTR 分析のうち、北京型において分解能が高い 12 領域を組み合わせた 12 領域分析法 (JATA (12)-VNTR, 以下 JATA12) が現在国内標準法となっている<sup>6)</sup>。JATA12 は、反復配列が数 10 bp と大きく、また PCR 産物が高分子となる領域を含まないことから、アガロース電気泳動にて反復数を識別することができ、安価かつ簡便な手法であるため、主に地方衛生研究所で広く普及している。JATA12 では北京型株について遺伝系統の推定が可能となるほか、疫学的な関連がある患者間の感染源調査において、概ね菌株の異同を判断できる利点がある<sup>2)</sup>。一方で、網羅的に収集した菌株の異同判定には、JATA12 では分解能が低いとされ、分析する領域を追加して分解能を高める必要があるといわれている<sup>2)</sup>。

Murase らは、解析する領域が異なる複数の VNTR 法を用いて国内で分離された結核菌株を解析し、その分解能について報告している。このなかで、保健所による実地疫学調査から得られた情報と併せた検証はされていないものの、超過変領域 (QUB-18, QUB-3232, VNTR 3820, VNTR 4120) を分析対象に含む 24 領域分析法 (24<sub>Beijing</sub>-VNTR, 以下 24<sub>Beijing</sub>) などは、プロファイルが一致した菌株ごとのグループ数が少ないことなどから、結核の伝播状況について、より正確な推定が可能であるとしている<sup>7)</sup>。24<sub>Beijing</sub> については、解析する領域の一部で PCR 産物が高分子となることから、一般的には自動シーケンサーを用いたフラグメント解析により反復数を識別する。価格および簡便性の面では JATA12 に

著者連絡先 : (〒920-1154) 石川県金沢市太陽が丘 1-11  
石川県保健環境センター  
児玉洋江  
TEL: 076-229-2011  
FAX: 076-229-1688  
E-mail: kodama@pref.ishikawa.lg.jp

Table 1. Attributes of patients whose strains analyzed in the present study

	Number of patients	Age group, Number of patients (%)							
		20 ~ 29	30 ~ 39	40 ~ 49	50 ~ 59	60 ~ 69	70 ~ 79	80 ~ 89	90 ~
Male	100	5 (5.0)	2 (2.0)	5 (5.0)	4 (4.0)	11 (11.0)	16 (16.0)	48 (48.0)	9 (9.0)
Female	70	5 (7.1)	2 (2.9)	0 (0.0)	3 (4.3)	3 (4.3)	8 (11.4)	31 (44.3)	18 (25.7)
Japanese	160	2 (1.3)	2 (1.3)	5 (3.1)	7 (4.4)	14 (8.8)	24 (15.0)	79 (49.4)	27 (16.9)
Foreign nationals	10	8 (80.0)	2 (20.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

は劣るものの、Supply らが提唱する 15 領域<sup>8)</sup>をすべて含むことから、MIRU-VNTR<sub>plus</sub><sup>9)</sup>による非北京型株の遺伝系統の推定が可能である。

今回、石川県（以下、当県）在住の結核患者から分離された結核菌株を対象に VNTR 分析による遺伝系統の推定を行い、菌株が分離された患者の年齢や出身国との関係を検証することにより、集団構造を把握した。さらに、JATA12 が一致した菌株について 24Beijing を実施し、保健所が実施した実地疫学調査の結果と併せて検証することにより、網羅的に収集された菌株の異同判定における 24Beijing の有用性を検証したので報告する。

## 材料と方法

### 1. 供試菌株

2016 年 4 月から 2019 年 3 月までの期間に当県在住の結核患者から分離された菌株を解析の対象とした。このうち、当県および金沢市が実施する結核対策に関する事業の一環として同期間中に入手が可能であり、かつ解析の実施について同意が得られた患者 170 人から分離された 170 株を試験に供した。同意は、文書を用いて口頭にて概要、方法などについて説明し、自筆署名の文書にて得た。なお、2016 年 1 月から 2018 年 12 月の当県における新登録結核患者数は 374 人であった<sup>10)</sup>。

170 株が分離された患者の内訳は、男性が 100 人 (58.8%)、女性が 70 人 (41.2%) であった。年齢階級別の患者数は、80 歳代が最も多く 79 人 (46.5%) と全体の約半数を占め、70 歳以上が 130 人 (76.4%) と全体の 7 割以上を占めた (Table 1)。

対象とした患者 170 人のうち日本人は 160 人 (94.1%) であった。日本人患者の年齢は 21 歳から 97 歳で、中央値は 84 歳であり、このうち 2 人で疫学的な関連 (従業員と客) が認められた。

一方、外国人患者は 10 人 (5.9%) であり、出身地は、中国およびインドネシアが各 3 人、ベトナムが 2 人、カンボジアおよびフィリピンが各 1 人であった。外国人患者の年齢は 21 歳から 35 歳で、中央値は 24 歳であり、保健所による実地疫学調査により、このうちの 2 人 (いずれもインドネシア人) で疫学的な関連 (同一施設での就労) が把握されていた。また、対象とした外国人患者 10 人のうち 9 人は 2014 年以降に入国しており、いずれも結核診断は入国後 2 年以内にされていた。なお、今回の解析では出身地が国内である患者を日本人とし、国外である患者を外国人と定義した。

## 2. VNTR 分析

### 1) DNA 抽出

結核菌 VNTR ハンドブック (以下、ハンドブック) に準じて実施した<sup>11)</sup>。培地に発育した結核菌株を Nuclease-Free Water に懸濁し、95°C で 10 分間加熱した。その後、13,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を DNA 抽出液として回収した。

### 2) JATA12

ハンドブックに準じて実施した<sup>11)</sup>。対象とする 12 領域は、MIRU10, MIRU26, MIRU31, Mtub04, Mtub21, Mtub24, QUB-11b, QUB-15, QUB-26, QUB-3336, QUB-4156, VNTR 2372 である。PCR により得られた増幅産物を 0.5%TBE バッファーと 2% アガロースを用いて電気泳動を行った後、目視にて測定した PCR 産物の分子量から各領域の反復数を算出した。

### 3) 24Beijing

Yokoyama らの報告に準じて実施した<sup>12)</sup>。対象とする 24 領域は、JATA12 で対象とする 12 領域に加え、MIRU4, MIRU16, MIRU40, ETR-A, ETR-C, Mtub30, Mtub39, QUB-11a, QUB-18, QUB-3232, VNTR 3820, VNTR 4120 の 12 領域である。PCR により得られた増幅産物を適宜希釈し、Applied Biosystems 3500 ジェネティック アナライザ (Life Technology Inc.) による電気泳動を行った。反復数の算出には GeneMapper ソフトウェア (Life Technology Inc.) を用いた。

なお、PCR 産物が得られない領域については、その領域の欠落や移動性の配列挿入の可能性が高いことから<sup>2)</sup>、解析対象領域の PCR 産物が無いというデータとした。

## 3. 遺伝系統解析

### 1) 北京型株

JATA12 のプロファイルをもとに、Seto ら<sup>13)</sup>の報告に基づき最大事後確率推定法により北京型株と非北京型株の推定を行い、患者年齢および性別と併せて t 検定を実施した。さらに、北京型株と推定された菌株については細分類化 (祖先型: ST11/26 群, STK 群, ST3 群, ST25/19 群と新興型) を実施し、日本人患者と外国人患者に分け、患者年齢と併せて独立性の検定を行った。有意差がみられた場合はさらに残差分析を実施した。なお、各々の検定には Excel 統計 2012 を用いた。

### 2) 非北京型株

1) により非北京型株と推定された菌株を対象に 24Beijing を行い、Supply らが提唱する 15 領域<sup>8)</sup>のプロファイルを国際標準法に基づき換算し、MIRU-VNTR<sub>plus</sub><sup>9)</sup>に登録されている菌株と併せて系統樹解析を行い、日本人患者と外国人患者に分け遺伝系統を推定した。さらに外国人患者の場合は出

Table 2. Genotype of 170 *M. tuberculosis* strains analyzed by JATA 12

Genotypic lineage	Number of isolates (%)	Number of patients (%)		Average age of patients
		Male	Female	
Beijing	125 (73.5)	72 (57.6)	53 (42.4)	76.3
Non-Beijing	45 (26.5)	28 (62.2)	17 (37.8)	74.8

Table 3. Age-specific distribution of Beijing sublineages among Japanese and foreign-national tuberculosis patients

Japanese						
Age group	Number of strains (%)	Beijing sublineage, number of strains (%)				
		Ancient type (n = 102)				Modern type (n = 18)
		ST11/26	STK	ST3	ST25/19	
20 ~ 29	2 (1.7)				2 (100.0)	
30 ~ 39	2 (1.7)				1 (50.0)	1 (50.0)
40 ~ 49	4 (3.3)			1 (25.0)	2 (50.0)	1 (25.0)
50 ~ 59	6 (5.0)	1 (16.7)			2 (33.3)	3 (50.0)
60 ~ 69	9 (7.5)		1 (11.1)	3 (33.3)	1 (11.1)	4 (44.4)
70 ~ 79	17 (14.2)	1 (5.9)	3 (17.6)	6 (35.3)	6 (35.3)	1 (5.9)
80 ~ 89	62 (51.7)	3 (4.8)	20 (32.3)	18 (29.0)	16 (25.8)	5 (8.1)
90 ~	18 (15.0)		4 (22.2)	8 (44.4)	3 (16.7)	3 (16.7)
Total	120	5 (4.2)	28 (23.3)	36 (30.0)	33 (27.5)	18 (15.0)

  

Foreign nationals						
Age group	Number of strains (%)	Beijing sublineage, number of strains (%)				
		Ancient type (n = 2)				Modern type (n = 3)
		ST11/26	STK	ST3	ST25/19	
20 ~ 29	4 (80.0)				1 (25.0)	3 (75.0)
30 ~ 39	1 (20.0)				1 (100.0)	
Total	5				2 (40.0)* <sup>1</sup>	3 (60.0)* <sup>2</sup>

\*<sup>1</sup> Home country: Indonesia (1), Vietnam (1)\*<sup>2</sup> Home country: China (2), Vietnam (1)

身地と併せて解析を行った。

#### 4. 菌株の異同判定

JATA12によりすべてのプロファイルが一致した菌株について24Beijingを実施し、患者間の疫学情報と併せて解析を行った。

#### 5. 倫理的配慮

石川県保健環境センター医学倫理審査委員会の承認を得て実施した（承認番号 2015-02-01）。

## 結 果

### 1. 遺伝系統解析

170 株について JATA12 による遺伝系統の推定を行った結果、北京型株が 125 株 (73.5%)、非北京型株が 45 株 (26.5%) であった (Table 2)。北京型株および非北京型株で性別および年齢に有意差はみられなかった。

#### 1) 北京型株

日本人から分離された 160 株のうち、120 株 (75.0%) が北京型であり、細分類化したところ、ST3 群が 36 株 (30.0%)、ST25/19 群が 33 株 (27.5%)、STK 群が 28 株 (23.3%)、新興型株が 18 株 (15.0%)、ST11/26 群が 5 株 (4.2%) であっ

た (Table 3)。年齢別にみると、70 歳以上の患者から分離された菌株は、70 歳未満の患者から分離された菌株に比較し、STK 群の割合が高く、新興型株の割合が低く (Table 3)、いずれも有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。

外国人から分離された菌株については、10 株のうち 5 株 (50.0%) が北京型であり、その内訳は新興型株が 3 株 (60.0%)、ST25/19 群が 2 株 (40.0%) であった (Table 3)。

#### 2) 非北京型株

日本人から分離された非北京型株は 40 株であり、このうち 38 株 (95.0%) が Euro-American に分類された。内訳は H37Rv-Type が 15 株 (37.5%)、TUR が 10 株 (25.0%)、New-1 が 9 株 (22.5%)、LAM が 2 株 (5.0%)、X および Uganda が各 1 株 (2.5%) で、H37Rv-Type、TUR、New-1 で全体の 8 割以上を占めた。また、残りの 2 株 (5.0%) は Indo-Oceanic である EAI に分類された (Table 4)。なお、EAI に分類された菌株が分離された 40 歳代の患者は海外居住歴を有していたが、70 歳代の患者は海外居住歴や渡航歴を有していなかった。

一方、外国人から分離された北京型株は 5 株であり、このうち 3 株 (60.0%) が Euro-American に分類され、その内訳

Table 4. Age-specific distribution of non-Beijing sublineages among Japanese and foreign-national tuberculosis patients

Japanese									
Age group	Number of strains (%)	Non-Beijing sublineage, number of strains (%)							
		Euro-American							Indo-Oceanic
		H37Rv	TUR	New-1	LAM	X	Uganda	Haarlem	EAI
20 ~ 29									
30 ~ 39									
40 ~ 49	1 (2.5)								1 (100.0)* <sup>1</sup>
50 ~ 59	1 (2.5)	1 (100.0)							
60 ~ 69	5 (12.5)	2 (40.0)		2 (40.0)	1 (20.0)				
70 ~ 79	7 (17.5)	1 (14.3)	3 (42.9)		1 (14.3)		1 (14.3)		1 (14.3)
80 ~ 89	17 (42.5)	7 (41.2)	5 (29.4)	4 (23.5)		1 (5.9)			
90 ~	9 (22.5)	4 (44.4)	2 (22.2)	3 (33.3)					
Total	40	15 (37.5)	10 (25.0)	9 (22.5)	2 (5.0)	1 (2.5)	1 (2.5)		2 (5.0)

  

Foreign nationals									
Age group	Number of strains (%)	Non-Beijing sublineage, number of strains (%)							
		Euro-American							Indo-Oceanic
		H37Rv	TUR	New-1	LAM	X	Uganda	Haarlem	EAI
20 ~ 29	4 (80.0)						1 (25.0)	2 (50.0)	1 (25.0)
30 ~ 39	1 (20.0)								1 (100.0)
Total	5						1 (20.0)* <sup>2</sup>	2 (40.0)* <sup>3</sup>	2 (40.0)* <sup>4</sup>

\*<sup>1</sup> Patient has a history of traveling abroad\*<sup>2</sup> Home country: China (1)\*<sup>3</sup> Home country: Indonesia (1), Cambodia (1)\*<sup>4</sup> Home country: Indonesia (1), Philippines (1)

Table 5. Results of the application of 24Beijing analysis to 13 groups of 38 isolates having the same profiles of JATA12

Sublineage	Number of strains													
	ST25/19						ST3					Modern	New-1	Total
	Group	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	1	1
JATA (12)-VNTR	4	3	3	3	2	2	5	4	2	2	2	4	2	38
24Beijing-VNTR	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2

は Haarlem が 2 株 (40.0%), Uganda が 1 株 (20.0%) であった。残りの 2 株 (40.0%) は EAI に分類された (Table 4)。

## 2. 菌株の異同判定

対象とした 170 株のうち JATA12 のプロファイルが 2 株以上で一致した菌株は 38 株 (22.4%) あり、プロファイルが一致した菌株ごとに分類した結果、13 グループに分類された (Table 5)。

13 グループの内訳は、ST25/19 群が最も多く 6 グループ 17 株 (44.7%) であり、次いで ST3 群が 5 グループ 15 株 (39.5%)、新興型株が 1 グループ 4 株 (10.5%)、New-1 が 1 グループ 2 株 (5.3%) であった。これらについて 24Beijing を行った結果、プロファイルがすべて一致したのは ST25/19 群の 2 株のみであり、この 2 株は疫学的関連が把握されていた日本人からの分離菌株であった。また、保健所が実施した実地疫学調査により関連が把握されていた外国人からの分離菌株 2 株にあっては、JATA12 のプロファイルがすべての領域で異なっていた。

## 考 察

今回の解析では、2016 年 4 月から 2019 年 3 月までの期間に分離された菌株 170 株を試験に供した。同時期に結核患者から分離された菌株の総数は不明であるが、2016 年 1 月から 2018 年 12 月の新登録結核患者数は 374 人であり、期間が異なるため単純に比較することは難しいものの今回の解析で対象とした患者は全体の 4 割程度を占めていると考えられる。また、2016 年 1 月から 2018 年 12 月の当県における新登録結核患者の年齢別報告数については、80 歳代が最も多く全体の約 4 割を占め、70 歳以上で全体の 7 割程度を占めていた<sup>10)</sup>。今回は結核菌株を用いた解析であり、画像検査による所見の確認や遺伝子の検出により診断された患者などは解析対象に含まれていないが、今回の解析で対象となった患者の年齢分布は、2016 年 1 月から 2018 年 12 月の当県における新登録結核患者の年齢分布と比較するとほぼ同様であった。

一般に、高齢者の大部分は結核高蔓延期の青年時代に感染した結核の内因性再燃であり、中・若年齢者は現在感染拡大が認められる患者群と言われている<sup>3)</sup>。岩本らは神戸市にお

ける結核患者から分離された北京型株を解析し、高齢者はSTK 群の割合が高く、若年者は新興型の割合が高いことを報告しており<sup>3)</sup>、Table 3で示したように今回の解析結果でも同様の傾向がみられた。STK 群はBCG 接種の導入により大きな選択圧を受けた遺伝系統であるのに対し、新興型はBCG 接種によるワクチン効果からの回避能力が優れており、ワクチン接種の影響を受けにくい可能性が報告されている<sup>3)</sup>。今回得られた結果からもBCG 接種がSTK 群や新興型の流行状況に影響を与えている可能性が考えられた。

Table 4で示したように、非北京型株では、日本人から分離された菌株の9割以上がEuro-Americanであった。非北京型株の遺伝系統については、Large Sequence Polymorphism 分析やスポリゴタイピング分析結果からEuro-Americanの国内で占める割合が高いことが報告されており<sup>4)5)</sup>、これも今回の解析結果と同様であった。さらに、非北京型株を細分類した結果、H37Rv-Type, TUR, New-1が大部分を占めていた。これらの遺伝系統が北京型株と同様に、当県における日本人患者から分離される結核菌株において一定の割合を占めている可能性があることから、今後も引き続き遺伝系統の解析を行い集団構造の解明を行う必要があると考えられた。

一方、外国人から分離された非北京型株の遺伝系統は、Euro-Americanが6割、Indo-Oceanicが4割で、日本人から分離された菌株とは異なっていた。これまでの知見により、Euro-Americanの1つであるHaarlemは世界的に分離され<sup>14)</sup>、EAIを含むIndo-Oceanicは東南アジアで多く分離されることが分かっている<sup>15)</sup>。すなわち、東南アジアではこの両系統のいずれもが分離されており、今回の外国人患者がインドネシア(Haarlem 1人、EAI 1人)、カンボジア(Haarlem 1人)、フィリピン(EAI 1人)といずれも東南アジアの出身であることと矛盾しない結果であった。また、今回、外国人患者は10人のうち9人が入国後2年以内に発症しており、入国から発症までの期間が短かった。結核菌の潜伏期間が長いことを考慮すると、今回の解析において、非北京型株が分離された外国人は、母国で流行株に感染し入国後に国内で発症した可能性が示唆された。しかし、今回の非北京型株の解析では外国人からの分離菌株が少ないことに加え、対象とした日本人と外国人との間で患者の年齢層も大きく異なることから、年齢による遺伝系統の違いも否定はできず、今後さらに患者の年齢および出身地と遺伝系統との関係を検討する必要があると考えられた。

加えて、今回の解析では、網羅的に収集した菌株を対象にプロファイルの完全一致についても検討している。JATA12では解析した菌株のプロファイルが約2割で完全に一致した。一方、Table 5で示したように24Beijingでは完全に一致したのは疫学的な関連が把握されていた2株のみであった。これは、24Beijingを用いて分析する領域を追加したことで菌株の異同判定に関する精度が高まり、正確な判定ができたためと推測された。Muraseらは、プロファイルが一致する結核菌株が広域に分布する場合は、疫学的に無関係である可能性が高いことを報告している<sup>7)</sup>。現在24Beijingを実施している自治体は限られており、24Beijingのプロファイルが一致する結核菌株の全国的な分布状況は把握されていない。今

後、広く24Beijingが実施可能となり、分析結果を自治体間で共有し、プロファイルが一致する結核菌株の全国的な分布状況を把握することが可能となれば、より正確な実地疫学調査が行えると考えられる。

結核は感染から発症までに一定の時間を要するため、保健所で実施する実地疫学調査のみでは潜在的な集団感染事例の探知が困難な場合がある。このため、網羅的に収集した菌株について地方衛生研究所がVNTR分析を実施し保健所へ情報提供することにより、潜在的な集団感染事例が探知できる可能性がある。この際には、JATA12による分析では対象となる患者数が多くなり、保健所による実地疫学調査に多くの時間と労力が必要となってしまう。24Beijingのプロファイルの一致情報と保健所の実地疫学調査を組み合わせることで正確な伝播が把握され、不要な接触者検診を回避することが可能となれば、より効率的で精度の高い実地疫学調査が可能となると考えられる。すなわち、24Beijingのプロファイルは、結核対策を実施するうえで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と考えられる。

集団構造の把握を目的に、結核菌株のVNTRプロファイルを把握し、情報を蓄積することで、その地域においてのより詳細な発生状況の把握が可能となる。重点的に監視すべき対象の選定や接触者健康診断の実施などの結核対策が明確な根拠に基づいて実施できることから、結核対策上、分子疫学解析は有益であると考えられる。今後もVNTR分析を用いた遺伝系統の解析を継続するとともに、その分析結果を関係機関へ還元することにより、地域における精度の高い実地疫学調査の実施に寄与したい。

**謝辞：**終わりに、本論文の作成にあたり、貴重なご助言、ご指導を賜りました結核予防会結核研究所 村瀬良朗氏、千葉県衛生研究所 横山栄二氏、山形県衛生研究所 瀬戸順次氏、また、菌株および疫学情報を提供して頂きました金沢市保健所、石川県南加賀保健福祉センター、石川県石川中央保健福祉センター、石川県能登中部保健福祉センター、石川県能登北部保健福祉センター、石川県健康福祉部健康推進課の関係各位に深謝いたします。

**利益相反：**申告すべき利益相反なし

## 文 献

- 1) 財団法人結核予防会編. 2018. 結核の統計.
- 2) 加藤誠也, 瀧井猛将, 大角晃弘, 他. 2017. 結核分子疫学調査の手引き第一版.
- 3) 岩本朋忠. 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.
- 4) 蜂巢友嗣, 橋本ルイコ, 横山栄二, 他. 2009. 千葉県における結核菌の分子疫学的解析. 千葉県衛生研究所年報 58: 65-68.
- 5) 村瀬良朗, 大角晃弘, 渡辺ゆう, 他. 2017. 都市部における来日外国人と地域住民間の結核感染動態に関する分子疫学研究. 結核 92: 431-439.
- 6) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗聡, 他. 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 10: 673-678.
- 7) Murase, Y., K. Izumi, A. Ohkado, et al. 2018. Prediction of local transmission of *Mycobacterium tuberculosis* isolates of a predominantly Beijing lineage by use of a variable-number tandem-repeat typing method incorporating a consensus set of hypervariable loci. *J. Clin. Microbiol.* 56: e 01016-17.
  - 8) Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, et al. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 44: 4498-4510.
  - 9) Allix-Beguec, C., D. Harmsen, T. Weniger, et al. 2008. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTR<sub>plus</sub>, a multi-functional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J. Clin. Microbiol.* 46: 2692-2699.
  - 10) 財団法人結核予防会編. 結核の統計. <http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/toukei/> 2020年7月31日現在.
  - 11) 地研協議会 保健情報疫学学会 マニュアル作成ワーキンググループ編. 2012. 結核菌 VNTR ハンドブック.
  - 12) Yokoyama, E., K. Kishida, M. Uchimura, et al. 2007. Improved differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains, including many Beijing genotype strains, using a new combination of variable number of tandem repeats loci. *Infect. Gener. Evol.* 7: 499-508.
  - 13) Seto, J., T. Wada, T. Iwamoto, et al. 2015. Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation. *Infect. Gener. Evol.* 35: 82-88.
  - 14) Kremer, K., D. Soolingen, R. Frothingham, et al. 1999. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2607-2618.
  - 15) Gagneux, S., K. DeRiemer, T. Van, et al. 2006. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS* 103: 2869-2873.

### Molecular epidemiological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Ishikawa Prefecture using the VNTR method

Hiroe Kodama<sup>1)</sup>, Megumi Kosaka<sup>1) 2)</sup>, Eriko Kimura<sup>1)</sup>, Takayuki Shiimoto<sup>1)</sup>, Emiko Kitagawa<sup>1) 3)</sup>,  
Mutsumi Tanimura<sup>1)</sup>, Kazuhiko Izumo<sup>1)</sup>, Keiko Kaneto<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science

<sup>2)</sup>Current address: Minami Kaga Health and Welfare Center of Ishikawa Prefecture)

<sup>3)</sup>Current address: Health and Welfare Department of Ishikawa Prefecture)

We conducted a molecular epidemiological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Ishikawa Prefecture, Japan. We collected 170 strains and analyzed them using 12-locus variable number of tandem repeats (VNTR) (JATA12) and 24-locus VNTR (24Beijing). The Beijing genotype accounted for 73.5% of all the collected strains (125/170). The ratio that STK was detected in the strains isolated from the group of 70 years or older was significantly higher than the ratio of the group under 70 years. On the contrary, the ratio that modern Beijing was detected in the strains isolated from the group over 70 years old was significantly lower. Among the non-Beijing type, Euro-American was detected in 95% of the strains isolated from Japanese patients. Most of foreign-born patients were diagnosed with active *tuberculosis* within 2 years after their first visit to Japan, and the particular lineage of the strains isolated from them was different from the strains from Japanese patients. Therefore, it was estimated that most of the foreign-born patients had originally infected in their home countries. We applied the VNTR analysis using 24Beijing to 13 groups of 38 strains having the same profiles in JATA12. As a result, only two strains that were epidemiologically related each other had the completely same profile in 24Beijing. It was revealed that the VNTR analysis using 24Beijing was discriminatory method in precise determination of genetic characteristics of *M. tuberculosis* strain.