

## 総説

# 結核集団感染事例にみる 分子疫学調査の必要性

高橋智恵子

## The necessity of molecular epidemiological analysis on tuberculosis outbreaks

Chieko TAKAHASHI

Key Words：結核，分子疫学，VNTR法，QFT，集団感染

### はじめに

結核はマラリア，エイズとともに世界三大感染症と呼ばれ，世界の3分の1の20-30億人が結核菌に感染し，960万人の患者が新たに発症し，150万人が命を失っている（2014年）<sup>1)</sup>．日本の結核は明治時代から昭和20年代まで死亡原因の第1位であり，「不治の病」であった．しかし，抗生物質（ストレプトマイシン）やBCGワクチンの普及により死亡率は激減した．それでも未だに，罹患率（人口10万人当たりの結核新規登録患者数）が15.4人（2014年）<sup>2)</sup>と「中蔓延国」に分類されており，毎年約2万人（1日に54人）が新たに結核を発症し，3,000人あまり（1日に6人）が死亡している重要な感染症なのである．先進国の多くが10万人当たり10人以下の「低蔓延国」であり，2020年の東京五輪開催までに厚生労働省は低蔓延化を目指している（図1）．

日本の患者が減らない理由のひとつとして，若いときに結核に感染した人が高齢となり，免疫力が低下して発症することが挙げられる．現在，日本の結核患者の約60%が70歳以上である．神奈川県下では70歳以上の結核患者は50.2%（2014年）を占め10年前（31.5%）の1.6倍となっている．高齢者は典型的な症状が出なかったり認知症により発見が遅れることがある．また，都市部ではホームレスなどの生活困難者や対策が難しい外国人など社会的弱者に患者が多い状況となっている．

結核は結核菌が体内で増殖したことにより起こる細菌

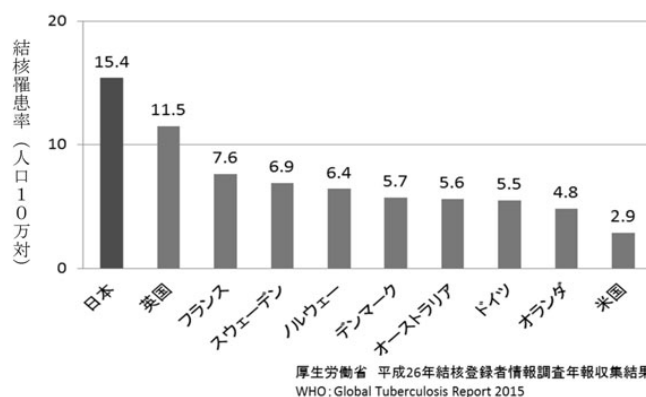


図1 先進国の結核罹患率（2014年）

感染症で，病巣部位により，肺結核，腸結核，腎結核となるが，結核患者の80%は肺結核が占めている．発症すると，風邪のような咳，痰，発熱，倦怠感などの症状が現れ，その症状が長く続くのが特徴である．体重減少，食欲減退が起こり，さらに進むと血痰が出る．

結核菌は1882年にロベルトコッホにより発見された．菌の大きさは $2\sim4\times0.3\sim0.6\mu\text{m}$ で，芽胞，鞭毛，荚膜はない．細胞壁にミコール酸などの脂質を多く含んでいるため，酸やアルカリに強く，その性質を利用した抗酸菌染色（チールネルゼン法）があり，結核菌は赤い糸くずのように染色される．痰を染色して顕微鏡下で菌が見つかる\*と人に感染させる危険性があるので，入院することになり，顕微鏡下では見つからないが培養で痰から菌が検出された場合は通院で投薬治療となる．

\*ガフキー号数（G）で表す：視野の中の菌数を数え，G0(0/300視野)～G9( $\geq 10/1$ 視野)で表記される

### 結核の接触者健康診断

発症者の周囲で生活している人に対しては，その接触度合いにより結核の接触者健康診断（接触者健診）が実施される．接触者健診は発症者と接触度の高い（濃厚接触）集団にまず検査を行い，その集団の陽性率が高い場合は段階的に検査対象を広げていき，感染者を発見するように進められる．また，時間をおいて検査をするなど，漏れの無いように実施し，感染拡大防止に努めている．接触者健診により，新たな発症者及び見かけ上の臨床症状やX線画像に結核を疑う所見はみられないが結核に感染している状態（潜在性結核感染症）を早期に発見する．

潜在性結核感染症とは，Latent tuberculosis Infection (LTBI)を邦訳したもので，感染が成立したもののまだ発症には至っていない状態であり，最近の感染である場合は発症予防のため，1種類の薬を6～9ヶ月内服することが勧められている．

結核感染の有無を判定する方法には，インターフェロ

ン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 遊離検査 (IGRA) がある。現在, IGRA には2つの方法があり, 1つは採血した血液をそのまま用いて結核菌特異抗原 (ESAT-6,CFP10,TB7.7) と混合し一晩反応後, 産生されたINF- $\gamma$ 量を定量する方法 (クオンティフェロン-TBゴールド:QFT検査), もう1つは, 採血した血液から一定量のリンパ球を分離し結核菌特異抗原 (ESAT-6,CFP10) と混合し一晩反応後, IFN- $\gamma$ を産生する細胞数をスポットとして数える方法 (T-スポット,TB:T-SPOT検査) である。

これらの検査はツベルクリン反応検査 (ツ反) と異なり, BCGワクチン接種や非結核性抗酸菌による影響を受けずに結核菌による感染の有無が判定できる。ただし, 現在の感染だけでなく過去の感染についてもとらえてしまっている。神奈川県衛生研究所 (当所) では2005年からQFT検査を実施しており, 2009年から2015年では検査数が増加傾向にある (表)。

表 QFT検査結果 (2009-2015年)

| 年    | 検査数            | 陽性            | 判定保留          | 陰性              | 判定不可         |
|------|----------------|---------------|---------------|-----------------|--------------|
| 2009 | 261            | 22            | 13            | 226             | 0            |
| 2010 | 480            | 43            | 36            | 401             | 0            |
| 2011 | 776            | 91            | 81            | 600             | 4            |
| 2012 | 1156           | 126           | 95            | 930             | 5            |
| 2013 | 1151           | 99            | 100           | 944             | 8            |
| 2014 | 1546           | 161           | 142           | 1229            | 14           |
| 2015 | 1414           | 130           | 128           | 1150            | 6            |
| 計    | 6784<br>(100%) | 672<br>(9.9%) | 595<br>(8.8%) | 5480<br>(80.8%) | 37<br>(0.5%) |

## 結核菌の分子疫学検査

感染源・感染経路の解明には, 菌検査, ツ反, QFT, 胸部X線所見などの臨床情報に加え, 実地疫学調査を用いて推定している。さらに, 結核菌の分子疫学研究の進展に伴い, 患者から分離した結核菌を遺伝子レベルで解析することにより結核菌の由来や感染経路をかなり正確に確認することができるようになった。

1993年にIS6110制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP) 法<sup>3)</sup>が報告され, 遺伝子型別の標準分析法となった。しかし, この解析方法は手技が煩雑で時間がかかることに加え, 結果が画像データとなる。その短所を解決できたのが, 反復配列多型 (Variable numbers of tandem repeats: VNTR) 法<sup>4)</sup>である。これは, 結核菌ゲノム上にあるミニサテライト中の繰り返し配列数を算出する。手技も簡便・迅速で結果が数値化されるので, 他機関で解析したデータとの比較が容易となった。VNTR法に利用できる

解析領域は数十カ所が存在しており, どの領域を用いるかの検討がなされてきた。

当所においてはMIRU領域10カ所, ETR領域6カ所, 追加領域7カ所の計23カ所で取り組み始め, その後, 結核研究所が確立したJapan Anti-Tuberculosis Association(JATA)12<sup>5)</sup>に変更し, 必要に応じて追加領域の解析をしている。JATA12の解析領域は, Mtub04, MIRU10, Mtub21, Mtub24, QUB11b, VNTR2372, MIRU26, QUB15, ETR-E, VNTR3336, QUB26, VNTR4156の12カ所である。

## 結核集団感染事例

わが国における結核患者は減少傾向にはあるものの, 結核に対する免疫保有率が低下していることや非常に強い病原性を持つ株が存在していることから, 集団感染を起こし易くなっている。患者発生時において実施された接触者健診対象者の中から患者が発症すると, 同一結核菌による患者の発生かどうか確認するために, 患者から分離した結核菌の遺伝子型別を実施している。県域で発生した結核集団感染事例の概要, QFT検査および遺伝子型別結果を示す。

### 事例1 職場内感染

**概要:** 職場健診で50歳代男性がX線所見から精密検査を勧められたが, そのまま放置。症状が進み, 約1年後に受診し, 塗抹検査がガフキー(G)9となり, 結核と診断され入院。接触者健診は家族と職場同僚について実施。同僚は同じフロアで働く人を対象としたが, その後, 違うフロアで働く同僚が結核を発症し, さらに, 1ヶ月後に1名が発症。そこで, 職場同僚全員 (52名: 24~61歳) を対象とした接触者健診に拡大。この事例は患者2名, 感染者12名, 経過観察2名と国へ報告。

**QFT検査:** 初発患者の家族の結果は, 陽性1名, 判定保留2名。同僚の結果は, 陽性8名, 判定保留5名, 陰性39名。同僚においてはツ反も実施しQFT検査結果と比較したところ, ツ反最大径30mm以上を示した6名の中にQFT陽性は2名のみ。逆に, 他のQFT陽性者 (6名) のツ反の径は10~20mm。

**遺伝子型別:** 初発患者と発症者2名のうち1名の結核菌分離菌株について, VNTR法およびRFLP法による遺伝子型別を実施。VNTR法では, MIRU領域10カ所とETR領域6カ所に追加領域7カ所の計23領域の全てが一致し, RFLP法での解析パターンも一致。これらの結果から, 同一型と判定。

## 事例2 病院内感染

**概要：**県内のある病院の入院患者において、2004～2007年の4年間に6名の結核の届出。2008年5月には70歳代女性（G2）が発症し、同月に60歳代男性（G7）が発症。病院は院内感染を疑い対策委員会を設置し、入院患者（242名）および職員（182名）計424名を対象に接触者健診を実施。潜在性結核感染症は46名、経過観察は86名、要精検者は7名で、そのうち1名が発症。2004年に遡ると計9名が発症。

**QFT検査：**病院で実施した411名の結果は、陽性62名（入院患者38名、職員24名）、判定保留41名（入院患者27名、職員14名）、陰性300名、判定不可8名。

**遺伝子型別：**結核を発症した9名のうち、6名の結核菌分離菌株について、VNTR法およびRFLP法による遺伝子型別を実施。VNTR法の解析領域は23領域とJATA12の二つの方法を実施し比較したところ、二つの方法の各領域の繰り返し配列数は6株すべてが一致。一方、RFLP法での解析パターンは1株にバンド1本の違いが認められた。この違いは変異によるものと考えられ、同一型の結核菌による感染と判定。

## 事例3 病院内感染

**概要：**病院の入院患者60歳代男性（G5）が結核と診断され、続いて同じ病棟に入院する60歳代女性（G0）、70歳代女性（G0）も結核性胸膜炎と診断。そこで、同じ病棟の入院患者69名及び当該病棟に勤務する職員24名の合計93名に対して、X線検査を実施。経過観察となった入院患者70歳代女性が結核と診断され、その後も患者が発生し、最終的には発症14名、潜在性結核感染症15名と報告。

**QFT検査：**104名の結果は、陽性26名、判定保留6名、陰性72名。

**遺伝子型別：**結核を発症した14名のうち、9名の結核菌分離菌株について、JATA12領域を用いたVNTR法を実施。その結果、3つのパターン（6、2、1株）に分けられ、他と異なる1株のみのパターンを示した1名は20歳代の職員で入院患者との接触はなく、7領域が異なっていたことより、異なる型の結核菌による発症であり、感染源は別であると判断。6株と2株のパターンは1領域のみの違いで、疫学的な関係からもこの1領域は変異と考え、同一型の結核菌による感染と判定。

## 事例4 高齢者施設内感染

**概要：**特別養護老人ホームに入居していた80歳代の男性（G3）と80歳代の女性（G3）が同時期に結核を発症。職員等90名のうち48名の接触者健診を実施。その後、

接触者健診を受けた中から4名が発症し、対象外とされた50歳代の女性職員も結核と診断。この事例は発症8名、潜在性結核感染症27名と報告。

**QFT検査：**職員48名の結果は、陽性16名、判定保留8名、陰性24名。その後、陽性16名の中から4名が発症。

**遺伝子型別：**結核を発症した8名のうち、7名の結核菌分離菌株について、JATA12領域を用いたVNTR法を実施し、7株すべてが一致し、同一型と判定。

## 集団事例から見たこと

感染症法に基づく結核接触者健康診断の手引き（改訂第5版）<sup>6)</sup>では、IGRAは結核感染の有無の検査法として第一優先と位置づけされた。事例1<sup>7)</sup>ではツ反とQFT検査を実施し比較したところ、ツ反が強陽性を示してもQFTが陽性とは限らず、QFT陽性者のツ反の径の大きさにはかなりのばらつきがみられた。年齢が24～61歳と成人であったので、ツ反の大きさに関係なくQFT検査結果を優先させ、潜在性結核感染症として治療が行われた。

当所では、迅速・簡便な遺伝子型別法であるVNTR法を2004年から導入し、従来法のRFLP法と比較しながら、型別精度の向上を図ってきた<sup>8)</sup>。前述の結核感染事例においても遺伝子型別を行い、同一型と判定したことが、国への結核集団感染報告の根拠となっている。臨床情報と実地疫学調査に加えて、分子疫学調査の情報を加えることにより、より正確な集団感染の実像を確認することが可能となった。

事例2<sup>7)</sup>においては長期間にわたる患者の発生にもかかわらず菌株が確保できたことにより、同一型と確認することができた。当初は散発事例としていたが、院内での集団感染が解明された事例であった。

VNTR解析で領域のうち1か所でも反復数が異なると異なる遺伝子型とみなされるが、同一型株でも変異は偶発的に起こる。事例3において2つのパターン（6株、2株）の違いは1領域で1反復数の差であったが、疫学的に考慮し同一感染源と判定した。濃厚接触が疑われる事例にもかかわらずJATA12で不一致を示したときには、多変性を示す領域の追加解析及びRFLP法での確認も必要と考える。

事例2～4は、高齢者が多い集団であった。高齢者は結核の既感染率が高い上に免疫力が低下しているので、ひとたび患者が発生すると集団感染になるリスクが高くなる。集団感染を防ぐには患者の早期発見が重要となるので、症状の出にくい高齢者に対しては、細心の注意を払って観察することが必要である。

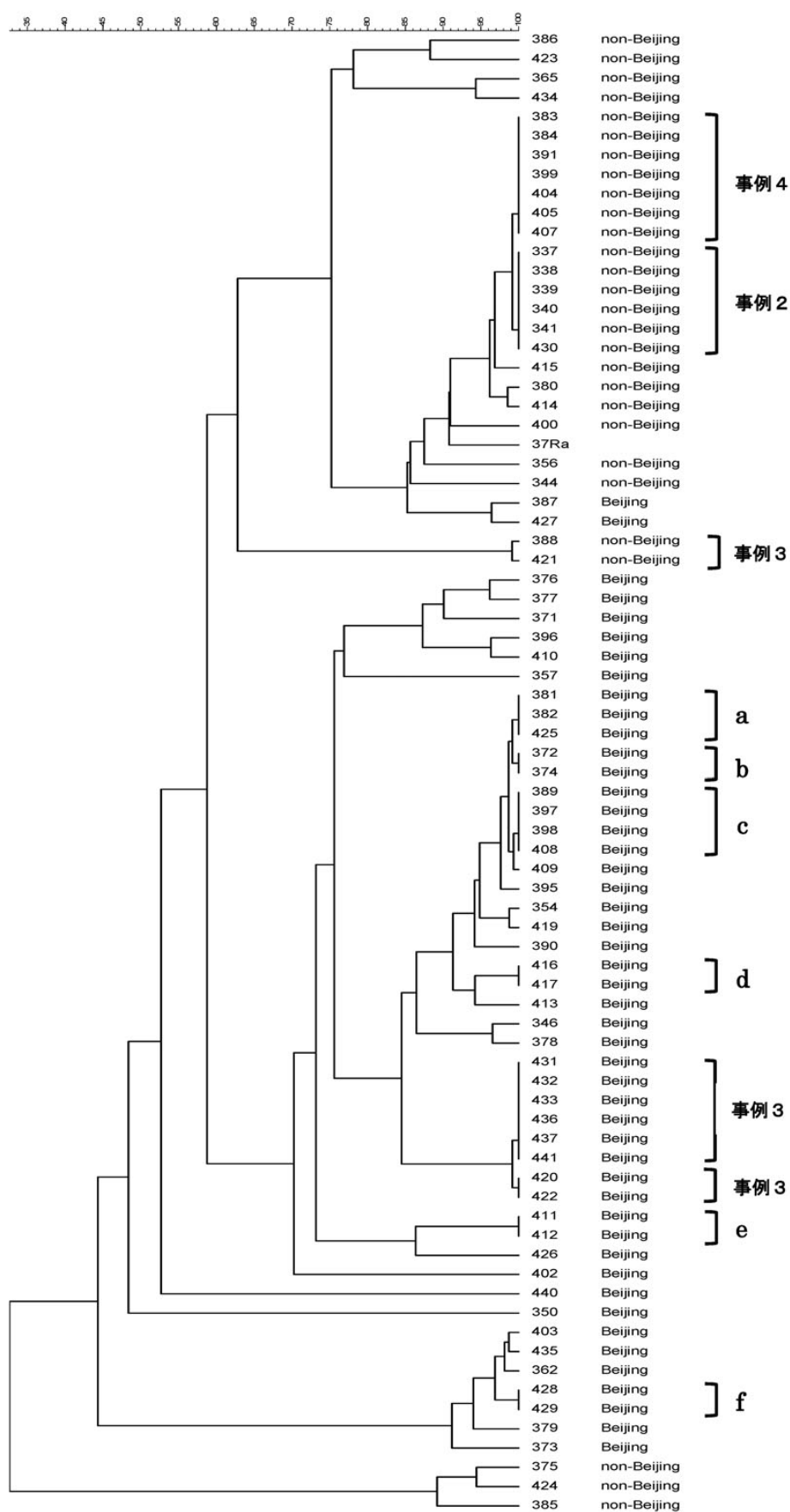


図 2 JATA12を用いたVNTR解析の結核菌樹形図 (77株)



## 結核菌分子疫学調査事業

2013年4月1日に神奈川県結核菌分子疫学調査事業実施要領<sup>9)</sup>が施行され、保健福祉事務所に登録された結核患者からの分離菌株調査が開始された。

遺伝子型別による結核菌分子疫学調査については、感染症法第15条に基づく調査の一環として、感染源・感染経路等の究明のために積極的に実施すべきと考える。その場合、患者の同意を得ることが検査を行うための必須条件ではないが、情報公開等の観点から、患者本人に説明しておくことが望ましいとされている。それには、患者との初回面接時に、服薬の重要性、接触者健診等の実施、個人情報取扱等に関する説明をするとともに、分子疫学調査を実施する可能性についても触れておくことで速やかに同意を得ることができると考えられる。

2008～2012年に当所で収集した77株について、JATA12を用いたVNTR解析をクラスター分析し、樹形図を作成した結果（図2）、51パターンに分けられた。

前述の集団感染事例は、事例2が6株で1つのパターン、事例3は6株、2株、1株の3つのパターンに分かれ（うち1株は異なる型と判定）、事例4が7株で1つのパターンであった。事例1はJATA12で解析していないのでこの樹形図には表していない。

その他に2株以上でクラスターを形成したのは、6つ（a～f）あった。そのうち、d、e、fは家族や職場など疫学的な関連が判明しているが、a、b、cはそれぞれの患者の居住地が離れているなど疫学上の共通点は見られなかった。aは2003～2004年にかけて首都圏で広く流行した株<sup>10)</sup>と同一型を示し、それらとの関連性が推察され、b、cについてもaと類似度が高く、近年の流行株であると考えられた。

東アジアで分離される結核菌の多くが特徴的な遺伝子型を示し、これに属する株はBeijing型株と名付けられた<sup>11)</sup>。Beijing型かnon-Beijing型かの分類を77株について実施したところ、48株（62.3%）がBeijing型株であった（図2）。国内は70%程度がBeijing型株であると報告されている<sup>12)</sup>。Beijing型株は、感染力が強いとされており、前述のa、b、cがBeijing型株であったことから、接触機会が少なくても感染が拡大することが示唆された<sup>13)</sup>。

感染経路の解明や集団感染の把握には遺伝子型別検査は欠かすことはできず、結核分離菌株の確保が必要となる。ところが、感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律（平成10年法律第114号）の一部改正が平成18年にあり、病原体等の管理に係る制度が新たに創設され、医療機関・検査機関では菌株所持が難しくなり、短期間で菌株を処分するようになった。菌株から

は感染症対策に資する重要なデータを多く得られるため、地域分子疫学を進めるにはより多くの菌株を医療機関等より速やかに収集する体制づくりが重要となる。

今後は、解析した菌株データをさらに蓄積することで、地域における状況把握や疫学的関連が確認できない未知の例においての感染経路の解明、さらには、年次的に観察することで流行株の把握や薬剤耐性株の早期発見などへの応用が期待されている。

## おわりに

結核集団感染が疑われた時には、結核感染の広がりや感染経路を迅速かつ正確に把握することが重要で、そのためには、衛生研究所は保健福祉事務所および健康危機管理課と密接な連携を取りながら、より効率的な接触者健診を進める必要がある。さらに、県内のみならず、自治体間での情報共有も図ることが求められている。

そして、低蔓延になったときこそ、分子疫学調査の体制を一層強化し、分離された結核菌全株について遺伝学的解析を実施し、感染経路の解明や株の由来を確実に把握することで、感染拡大などの結核対策に活用するべきと考える。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、微生物部 細菌・環境生物グループとともに検査・研究に携わった皆様に深謝します。

## 参考文献

- 1) WHO : Global tuberculosis report 2015
- 2) 平成26年結核登録者情報調査年報集計結果（概況）  
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou03/14.html>
- 3) Takahashi,M., Y.Kazumi, Y.Fukasawa, K.Hirano, T.Mori, W.Dale et al.: Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related Mycobacterium tuberculosis isolates, Microbiol. Immunol., **37**, 289-294(1993)
- 4) Forthingham,R., and W.A.,Meeker-O'Connell : Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats, Microbiology, **144**, 1189-1196 (1998)
- 5) 前田伸司, 村瀬良朗, 御手洗 聡, 菅原 勇, 加藤 誠也 : 国内結核菌型別のための迅速、簡便な反復配列多型（VNTR）分析システム, 結核, **83**, 673-678(2008)

- 6) 感染症法に基づく結核の接触者健康診断の手引き  
(改訂第5版) : 厚生労働科学研究 (新興・再興感  
染症研究事業) 「地域における効果的な結核対策の  
強化に関する研究班」, 2014
- 7) 高橋智恵子, 近内美乃里, 大屋日登美, 渡辺祐子,  
岡崎則男: 結核集団感染事例におけるクオンティフェ  
ロンTB-2Gと結核分離菌株の遺伝子型別, 神奈川衛  
研報告, **39**, 1-3(2009)
- 8) 高橋智恵子, 富岡敏昭, 綿貫祐司, 西森 敬, 岡崎  
則男: VNTR法を利用した結核菌の遺伝子型別. 神  
奈川県衛研報告, **36**, 4-7 (2006)
- 9) 健康危機管理課長通知: 神奈川県結核菌分子疫学調  
査事業実施要領の策定について, 平成25年3月28日
- 10) Ohkado,A., Y.Murase, M.Mori, N.Hasegawa,  
G.Otsuka and M.Nagamine : Transmission of  
specific genotype streptomycin resistant strains  
of M ycobacterium tuberculosis in the Tokyo  
metropolitan area in Japan, BMC Infect.Dis.,  
**138**, 1-9 (2009)
- 11) Van Soolingen D, et al.: Predominance of a  
single genotype of Mycobacterium tuberculosis  
in countries of east Asia. J Clin Microbiol,  
**33**, 3234-3238 (1995)
- 12) 岩本明忠: 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 (2009)
- 13) 高橋智恵子, 近内美乃里, 古川一郎, 浅井良夫, 大  
屋日登美, 黒木俊郎, 古屋由美子: 神奈川県域にお  
いて分離された結核菌のVNTR法による遺伝子型別  
について, 神奈川衛研報告, **41**, 16-19(2011)

## The necessity of molecular epidemiological analysis on tuberculosis outbreaks

Chieko TAKAHASHI

Four cases of tuberculosis(TB) outbreaks were reported here from 2004 to 2012. Genotyping of Mycobacterium tuberculosis using VNTR(Variable numbers of tandem repeats) method is more simple and convenient than RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Our institute analyze genotype using VNTR,RFLP and so on as necessary. TB patients with matching genotypes share known epidemiologic linkages, the results provide good evidence that those patients were involved in the same chain of recent transmission.

Key Words : tuberculosis, molecular epidemiology,  
VNTR method, QFT, outbreaks