

長崎県における結核菌の分子疫学解析(2012～2019)

右田 雄二、蔡 国喜、田栗 利紹

Yuji MIGITA, Guoxi CAI and Toshitugu TAGURI

長崎県では結核菌の分子疫学調査事業を2012年度から開始している。本研究では開始以来2019年度まで収集してきた、県南地区、県央地区、県北地区(佐世保市含む)および長崎市由来の526株の結核菌株について、VNTR(Variable Numbers of Tandem Repeats)法による分子疫学解析を行った。遺伝系統において、北京型株が376株(72%)と非北京型株(28%)に比べて割合が高く、北京型株のうち祖先型は289株(77%)、新興型は87株(23%)であった。祖先型の割合が最も高かったのは県北地区で、79株(83%)が認められ、そのうち9株(11%)は多剤耐性菌に多い遺伝子型(ST11/26)に分類された。年齢別では若い年齢層ほど非北京型株の出現割合が高かったが、41歳未満の非北京型株10株の中に外国出生患者によるEAI(East-African-Indian)型が4株(40%)を占めていた。地域別、年齢別ともに、遺伝系統の出現割合は全国の検出状況と類似していた。地区ごとのクラスター形成性を調べたところ、高い罹患率を示す県南地区は比較的クラスター形成率(18.2%)が低かったことから、本地域では高齢者の内因性再燃と考えられる患者が多くを占めると推察された。本研究結果と実地疫学を組み合わせることにより、7事例において、患者の感染経路等の解明につながったことから、本技術は本県で高度に流行する結核菌の伝播状況の把握や感染拡大防止に寄与できると考えられた。

キーワード：結核菌、VNTR分析、遺伝系統、クラスター、分子疫学

はじめに

結核は、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)によって引き起こされる感染症で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において、二類感染症に指定されている。結核研究所疫学情報センターの集計結果¹⁾によると、2018年の我が国の新登録結核患者数は15,590人、罹患率(1年間に発病した患者数を人口10万対率で表したもの)12.3で、日本の結核は国際的には中蔓延国に位置付けられている。長崎県においては、同年の新登録結核患者数222人、罹患率16.6であり²⁾、国内でも罹患率の高い地域となっている。

2011年5月に「結核に関する特定感染症予防指針」(厚生労働省)³⁾が一部改正され、自治体の取り組むべき課題としては、結核対策における分子疫学調査の積極的な実施や研究推進の必要性を、さらに2016年11月の改正では2020年までに日本の結核罹患率を低蔓延の水準(罹患率10以下)まで引き下げる目標が明記された。日本が結核低蔓延国入りするには分子疫学的手法を用いた結核菌の伝播状況の把握と結核菌の伝播を遮断する対策が必要とされている。

このような状況から本県においても感染症法第15条の積極的疫学調査の一環として、長崎県結核菌分子疫学調査実施要領を策定し、結核菌の遺伝子型別法の一つであるVNTR(Variable Numbers of Tandem Repeats)法によるサーベイランス分析を2012年に県南地域から開始した。その後、県央、長崎市、県北・佐世保市と対象地域を順次拡大し、2015年には本土地域を概ね網羅できるようになった。

本法は結核菌のゲノム上に数多く点在する数10 bpを単位とする縦列反復配列多型から菌株の識別に適した複数の領域をPCR(Polymerase Chain Reaction)法により増幅し、増幅産物の分子量サイズから反復配列回数を算定し、得られた数字の羅列を菌株固有のDNAプロファイルとするものである。国際的な標準法としてはSupplyらによるSupply's 15-mycobacterial interspersed repetitive unit(MIRU)-VNTR⁴⁾があるが、東アジア地域に位置するわが国の結核菌の7～8割は北京型株に属し、5型[祖先型(4型:ST11/26、STK、ST3、ST25/19)、新興型]⁵⁾に分類される。諸外国では新興型の分離率が高いのに対して、わが国では、逆に、祖先型の分離比率が高く、特異性が際立ってい

る。このような背景から前田ら⁶⁾は国内の結核菌株の識別に優れたJATA (Japan Anti-Tuberculosis Association) 12-VNTRを提唱し、現在では国内標準法となっている。本法は集団感染疑い事例など疫学的関連がある場合は菌株の異同判定に高い信頼性を示すが、網羅的に収集された菌株の場合は分解能が不足しているため分析領域を追加する必要がある。

また、遺伝子型別の決定方法については、VNTR各領域の傾向から最大事後確率(maximum a posteriori: MAP)推定法によっても分類できると報告⁵⁾されている。

本報告は、長崎県内の結核患者から2012年4月～2019年3月までに収集した結核患者株526株のVNTR法による分析結果と保健所の実地疫学調査結果とを合わせた解析状況について報告する。

対象および方法

1 VNTR分析の方法

2011年11月から2019年3月までの結核発生届に基づき県内の結核病床を有する医療機関から分離された結核菌株(熱処理済み: 95～105℃、10分)のうち収集可能であった526株を解析対象とした。鋳型DNAはフェノールクロロホルム処理後、エタノール沈殿法により精製した。VNTR領域ごとの反復回数の測定方法は「結核菌VNTRハンドブック」⁷⁾に準拠し、JATA12領域にJATA(15)3領域(QUB-11a, ETR A, QUB-18)⁸⁾および超可変3領域(QUB-3232, VNTR3820, VNTR4120)⁹⁾を加えた合計18領域のプライマーを使用した。PCRの反応条件は、95℃で2分加熱後、95℃30秒、60℃30秒、72℃90秒のサイクルを35回実施し、最後に72℃で7分加熱した。PCR増幅産物は0.5×TBE緩衝液を用いた2% Nuesieve 3:1 Agarose (Lonza社)のアガロースゲルを使用し、Mupid®-One (Mupid社製)を用いて、100V 60～120分間の条件下で電気泳動を行った。サイズマーカーにはO'RangeRuler 100bp+500bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific社)を使用した。泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色した後に紫外線照射下で撮影した。このようにして得られた各領域それぞれのPCR増幅産物の分子量サイズから反復配列回数を算定した。

2 遺伝系統

分析した各菌株のVNTRプロファイルを山形県衛生研究所より提供された最大事後確率(maximum a

posteriori: MAP)推定法⁵⁾による解析プログラムを用いて、北京型株5型[祖先型4型(ST11/26, STK, ST3, ST25/19)および新興型]と非北京型株に分類し、管轄保健所地域ごと、年齢層ごとに遺伝系統を考察した。

3 クラスタ解析

本研究では、遺伝子の変異等も考慮し、1領域の反復配列回数が異なる菌株までを同一の遺伝型(クラスター)と定義した¹⁰⁾。クラスター形成性については、県内4地域(県南、県央、県北・佐世保市、長崎市)の特徴について考察した。

4 分子疫学解析事例

同じVNTRプロファイルを示す菌株群の由来患者については、保健所による患者間の行動歴等の実地疫学調査結果と組み合わせて感染経路等の解析を試みた。その結果、分子疫学解析が有用であった事例について取りまとめた。

結果および考察

1 遺伝系統

サーベイランス解析対象4地域(県南、県央、県北・佐世保市および長崎市)520株のVNTRプロファイルを用いたMAP推定解析プログラムで解析し得られた亜種系統を地域別(表1-1)、年齢層別(表1-2)に示した。全地域では、北京型株は376株(72%)、北京型株のうち祖先型は289株(77%)であった。この解析結果は北京型株のうち祖先型が7～8割を占めるわが国の報告^{11, 12)}とも合致していた。地域別では県北・佐世保市において北京型株のうち祖先型が79株(83%)と最も高く、多剤耐性菌に多いとされるST11/26型^{11, 12)}が9株(11%)みられたことが特徴的であった。年齢層別にみると、41歳未満の年齢層では北京型株のうち新興型が6株(35%)と高く、41歳以上のすべての年齢層では、北京型株のうちST25/19型の分離株数が多かった。新興型は国内では若年層に多く、感染伝播および発病において祖先型よりも優れている型^{11, 12)}、ST25/19型は最も分離頻度の高い型^{11, 12)}と報告されている。年齢層別の遺伝子型の出現割合も全国の状況と合致していた。さらに、若い年齢層ほど非北京型株の出現割合が高かったが、41歳未満で分離された非北京型株10株中4株(40%)はフィリピン蔓延株であるEAI (East-African-Indian) 型¹³⁾であった。いずれもフィリピン出生あるいはフィリピン滞在歴のある外国出生患者であっ

表1-1 サーベイランス対象地域における遺伝的特徴

| 対象地域 | 北京型株 | | | | | | 非北京型株 | |
|---------|---------|-----|-----|---------|---------|----------------|---------|---------|
| | 祖先型 | | | | 合計(%)** | 新興型 合計(%)** | 合計(%)* | |
| | ST11/26 | STK | ST3 | ST25/19 | | | | |
| 県南 | 1 | 8 | 19 | 27 | 55(71) | 22(29) | 77(70) | 33(30) |
| 県央 | 4 | 14 | 20 | 35 | 73(75) | 24(25) | 97(68) | 45(32) |
| 長崎市 | 3 | 17 | 19 | 43 | 82(77) | 25(23) | 107(74) | 37(26) |
| 県北・佐世保市 | 9 | 11 | 17 | 42 | 79(83) | 16(17) | 95(77) | 29(23) |
| 合計 | 17 | 50 | 75 | 147 | 289(77) | 87(23) | 376(72) | 144(28) |

合計(%)*:全株内で占める割合 合計(%)**:北京型株内で占める割合

表1-2 各年齢階級における遺伝的特徴

| 年齢区分 | 北京型株 | | | | | | 非北京 | |
|--------|---------|-----|-----|---------|---------|----------------|---------|---------|
| | 祖先型 | | | | 合計(%)** | 新興型 合計(%)** | 合計(%)* | |
| | ST11/26 | STK | ST3 | ST25/19 | | | | |
| 41歳未満 | 1 | 2 | 3 | 5 | 11(65) | 6(35) | 17(63) | 10(37) |
| 41-60歳 | 3 | 3 | 6 | 16 | 28(80) | 7(20) | 35(69) | 16(31) |
| 61-80歳 | 4 | 13 | 20 | 41 | 78(71) | 32(29) | 110(70) | 47(30) |
| 81歳以上 | 9 | 32 | 46 | 85 | 172(80) | 42(20) | 214(75) | 71(25) |
| 合計 | 17 | 50 | 75 | 147 | 289(77) | 87(23) | 376(72) | 144(28) |

合計(%)*:全株内で占める割合 合計(%)**:北京型株内で占める割合

た。本県における41歳未満の非北京型株の増加は外国出生患者の影響が大きいと思われる。

2 クラスタ解析

サーベイランス解析対象地域から収集した520株のVNTRプロファイルを基に各地域のクラスタ形成性(表2)を示す。2017年の国内結核¹⁾の新登録患者16,789人のうち80歳以上は6,726人(40%)、長崎県においては新登録患者

227人のうち80歳以上は113人(50%)であり、本県は全国平均よりも高齢者結核が多い地域といった特徴がある。県内を地区ごとにみると、県北・佐世保市はクラスタ形成率25%(31株/124株)、平均クラスタ3.4と他の地区よりも高かったが、2013年に発生した大規模な院内感染(11クラスタ)による影響と考えられる。また県南地域は継続的に罹患率の高い(2012~2017年:22.8~36.5)²⁾地域であり、解析した菌株の患者の平均年齢は81歳と他の地区よりも高かった。今回、県南地区のクラスタ形成性を検証した結果、高い罹患率に

表2 各地域におけるクラスタ形成性

| 調査地区 | 県南 | 県央 | 長崎市 | 県北・佐世保市 |
|-------------|------|------|------|---------|
| 平均年齢(歳) | 81 | 77 | 79 | 72 |
| 解析株数(n=520) | 110 | 142 | 144 | 124 |
| クラスタ形成株数 | 20 | 18 | 19 | 31 |
| クラスタ形成率(%) | 18.2 | 12.7 | 13.2 | 25.0 |
| クラスタ数 | 7 | 8 | 9 | 9 |
| 平均クラスタ | 2.9 | 2.3 | 2.1 | 3.4 |
| 最大クラスタ | 5 | 3 | 3 | 11 |

反してクラスタ形成率は18.2%(20株/110株)と低かった。即ち、このことは81.8%の患者にクラスタ形成がみられなかったことを意味しており、本地域内には過去に特定菌株による流行・拡散がみられず、多様な遺伝子型が存在することが分かった。これより県南地域の高い罹患率は高齢者の内因性再燃によるものと推察される。さらに、県央および長崎市については、クラスタ形成率はそれぞれ12.7%(18株/142株)、13.2%(19株/144株)と低く、平均クラスタも小さかった。

3 分子疫学解析事例

全526株(サーベイランス解析対象地域外の菌株含む)を解析した結果、クラスターを形成した株は多数みられたが、保健所の実地疫学調査の結果、多くは疫学的関連性を認めなかった。患者間で疫学関連性が判明した事例を示す(表3)。その内訳は宿泊施設内感染事例(No.1)、家族内感染事例(No.2)、病院内感染事例(No.3、No.5、No.6)および高齢者施設内感染事例(No.4、No.7)の合計7事例であった。No.1は同じ飲み会に参加後、同じ宿泊施設を利用したことで感染した事例であった。No.3は2013年5月に病院内で発生した59名の集団感染事例〔確定例:22名、潜在性結核感染症(LTBI):37名〕であり、分析した10株のうち9株は18領域のDNAプロファイルは完全に一致したが、1株(S205)は超可変領域の1領域(VNTR3820)で異なっていた。その後、2019年2月に集団発生以前から同じ医療機関に長期入院していた患者(S482)からも同じ遺伝子型が検出された。この患者は30年程前に結核治療歴があり内因性再燃と考えられたが、集団感染事例と同じDNAプロファイルであったことから集団発生時に再燃し感染源となった可能性、あるいは再感染し、2019年2月になって発病した可能性も考えられる。No.6は患者間、患者から看護師間への院内感染事例感染であった。看護師は当該医療機関を退職後に他県にて発症した。患者との関連性は他県保健所からVNTR検査結果の照会を受け判明した。県境を越えてDNAプロファイルが活用された事例であった。また、No.4およびNo.7は高齢者施設内感染であり、No.4は入所者から職員へ、No.7は入所者間で感染した事例であった。

まとめ

2012～2019年の長崎県における新登録結核患者由来526株の分子疫学解析結果を取りまとめた。県内結核菌の北京型株祖先型の出現割合は全国と同じ傾向であったが、県北・佐世保市は祖先型の中でもST11/26型の割合が高かった。41歳未満の年齢層では非北京型株10株中4株(40%)は外国出生患者によるEAI型であり、外国人結核対策にも力を入れる必要があると思われる。県南地域のクラスター形成率は18.2%と低く、本地域の高い罹患率は高齢者の内因性再燃によるものと推察される。最後に、本報告による分子疫学解析事例を通して、これまでの実地疫学だけでは推定の域を出なかった感染経路の証明、未知の感

染経路の発見、再燃・再感染の鑑別および散発事例の確認がある程度可能となった。このように分子疫学解析による事例検討を進めることで、保健所は接触者健診の適正な範囲を選択し、重点的に取り組むべき対策を明確にする根拠になり得ると思われる。

表3 分子疫学解析の有用事例

| 事例 No. | 菌株 No. | JATA(12) | | | | | | | | | | | | JATA(15) | | | | 超可変領域 | | 亜種系統 | 疫学関連 |
|--------|--------|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----------|-------|--------|----------|-------|-------|---------|--------------------|
| | | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | QUB-1a | ETR A | QUB-18 | QUB-3232 | v3820 | v4120 | | |
| 1 | S032 | 4 | 3 | 1 | 2 | 7 | 3 | 7 | 4 | 5 | 7 | 8 | 5 | 6 | 8 | 4 | 16 | 10 | 9 | ST25/19 | 宿泊施設感染疑い |
| | S044 | 4 | 3 | 1 | 2 | 7 | 3 | 7 | 4 | 5 | 7 | 8 | 5 | 6 | 8 | 4 | 16 | 10 | 9 | | |
| 2 | S057 | 4 | 3 | 3 | 2 | 7 | 3 | 7 | 4 | 5 | 7 | 10 | 5 | 10 | 5 | 4 | 15 | 12 | 8 | ST25/19 | 家族内感染(夫婦間) |
| | S090 | 4 | 3 | 3 | 2 | 7 | 3 | 7 | 4 | 5 | 7 | 10 | 5 | 10 | 5 | 4 | 15 | 12 | 8 | | |
| 3 | S064 | 4 | 3 | 2 | 2 | 7 | 3 | 7 | 4 | 5 | 7 | 10 | 5 | 10 | 5 | 4 | 15 | 12 | 8 | | |
| | S065 | 4 | 3 | 2 | 2 | 7 | 3 | 7 | 4 | 5 | 7 | 10 | 5 | 10 | 5 | 4 | 15 | 12 | 8 | | |
| | S066 | 4 | 3 | 2 | 2 | 7 | 3 | 7 | 4 | 5 | 7 | 10 | 5 | 10 | 5 | 4 | 15 | 12 | 8 | | 院内感染(2013年5月) |
| | S067 | 4 | 3 | 2 | 2 | 7 | 3 | 7 | 4 | 5 | 7 | 10 | 5 | 10 | 5 | 4 | 15 | 12 | 8 | | |
| | S068 | 4 | 3 | 2 | 2 | 7 | 3 | 7 | 4 | 5 | 7 | 10 | 5 | 10 | 5 | 4 | 15 | 12 | 8 | | ※入院患者ら59名 |
| | S069 | 4 | 3 | 2 | 2 | 7 | 3 | 7 | 4 | 5 | 7 | 10 | 5 | 10 | 5 | 4 | 15 | 12 | 8 | | |
| | S070 | 4 | 3 | 2 | 2 | 7 | 3 | 7 | 4 | 5 | 7 | 10 | 5 | 10 | 5 | 4 | 15 | 12 | 8 | | |
| | S071 | 4 | 3 | 2 | 2 | 7 | 3 | 7 | 4 | 5 | 7 | 10 | 5 | 10 | 5 | 4 | 15 | 12 | 8 | | |
| | S205 | 4 | 3 | 2 | 2 | 7 | 3 | 7 | 4 | 5 | 7 | 10 | 5 | 10 | 5 | 4 | 15 | 14 | 8 | | |
| | S206 | 4 | 3 | 2 | 2 | 7 | 3 | 7 | 4 | 5 | 7 | 10 | 5 | 10 | 5 | 4 | 15 | 12 | 8 | | |
| 4 | S482 | 4 | 3 | 2 | 2 | 7 | 3 | 7 | 4 | 5 | 7 | 10 | 5 | 10 | 5 | 4 | 15 | 12 | 8 | | 同じ遺伝型(H31.2発生) |
| | S121 | 2 | 3 | 1 | 3 | 3 | 2 | 5 | 4 | 3 | 10 | 4 | 3 | 4 | 5 | 3 | 10 | 5 | 2 | NonBJ | 高齢者施設内感染疑い(入所者→職員) |
| 5 | S122 | 2 | 3 | 1 | 3 | 3 | 2 | 5 | 4 | 3 | 10 | 4 | 3 | 4 | 5 | 3 | 10 | 5 | 2 | | |
| | S045 | 3 | 3 | 3 | 4 | 7 | 3 | 7 | 5 | 5 | 7 | 2 | 5 | 7 | 8 | 3 | 12 | 12 | 11 | ST25/19 | 院内感染疑い(患者間) |
| 6 | S088 | 3 | 3 | 3 | 4 | 7 | 3 | 7 | 5 | 5 | 7 | 2 | 5 | 7 | 8 | 3 | 12 | 12 | 11 | | |
| | S158 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 4 | 3 | 6 | 8 | 3 | 3 | 20↑ | 3 | 11 | 1 | 4 | NonBJ | 院内感染疑い(患者間、患者→看護師) |
| 7 | S159 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 4 | 3 | 6 | 8 | 3 | 3 | 20↑ | 3 | 11 | 3 | 4 | | |
| | S492 | 2 | 4 | 1 | 4 | 4 | 3 | 4 | 3 | 3 | 8 | 8 | 4 | 8 | 8 | 3 | 5 | 5 | 4 | NonBJ | 高齢者施設内感染(患者間) |
| S493 | 2 | 4 | 1 | 4 | 4 | 3 | 4 | 3 | 3 | 8 | 8 | 4 | 8 | 8 | 3 | 5 | 5 | 4 | | | |

反復配列回数が異なる領域

参考文献

- 1) 公益財団法人結核予防会結核研究所疫学情報センター<http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/> (2020.6.5アクセス)
- 2) 長崎県：長崎県の結核(2018) : <https://www.pref.nagasaki.jp/shared/uploads/2019/01/1576223087.pdf> (2020.6.5アクセス)
- 3) 厚生労働省：結核に関する特定感染症予防指針 <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/thuuchi.pdf> (2020.6.5アクセス)
- 4) Supply P. et al. : Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 4498-4510 (2006)
- 5) Seto J. et al.: Phylogenetic assignment of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing clinical isolates in Japan by maximum a posteriori estimation, *Infect. Genet. Evol.*, **35**, 82-88 (2015)
- 6) 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—, *Kekkaku*, **83**, 673-678 (2008)
- 7) 地研協議会保健情報疫学部会マニュアル作成ワーキンググループ編：結核菌VNTRハンドブック (2012)
- 8) 前田伸二ら：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*, **65**, 201 (2010)
- 9) Iwamoto T 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.*, **270**, 67-74 (2007)
- 10) 田丸亜貴ら：JATA(12)-VNTR型別による結核集団発生事例の菌株異同調査, *Kekkaku*, **88**, 399-403 (2013)
- 11) 岩本朋忠：世界的感染拡大傾向が危惧される結核菌北京型株, 複十字, **329** (2009)
- 12) 岩本朋忠：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, *Kekkaku*, **84**, 755-759 (2009)
- 13) Montoya J.C. et al.: A molecular epidemiologic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* among Filipino patients in a suburban community in the Philippines, *Kekkaku*, **88**, 543-552 (2013)

謝辞

本事業を遂行するにあたり、疫学情報、解析データおよび菌株の提供等にご協力いただきました県医療策課、各保健所、長崎市保健環境試験所並びに協力医療機関の関係諸氏にお礼を申し上げます。また、遺伝系統解析ソフトを提供頂いた山形県衛生研究所の瀬戸順次先生、多大なご指導ご助言を頂いた大阪市立大学の和田崇之教授に感謝します。

Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Nagasaki Prefecture, 2012–2019

Yuji MIGITA, Guoxi CAI and Toshitugu TAGURI

A molecular epidemiological survey for *Mycobacterium tuberculosis* was performed from 2012 to 2019 in Nagasaki Prefecture. In this study, 526 tuberculosis strains were collected in Nagasaki Prefecture from the Southern district, the Central district, the Northern district (including Sasebo city), and Nagasaki city. The strains were analyzed by variable number tandem repeat (VNTR) typing. Beijing genotype strains accounted for the majority (376, 72%) of isolates. Among Beijing strains, 289 (77%) had ancestral genotypes and 87 (23%) had emerging genotypes. The highest proportion of ancestral strains (79, 83%)

was found in the northern part of the prefecture; nine of these strains (11%) were classified as genotypes ST11/26, which are commonly associated with multidrug-resistant *M. tuberculosis*. Non-Beijing strains were more commonly detected in younger individuals. Among the 10 non-Beijing strains detected in individuals under 41 years old, four East African Indian strains (40%) were observed in foreign-born patients. The distribution of *M. tuberculosis* genotype prevalence observed in this study matched patterns at the national level, both by region and by age. Cluster formation in each district was examined and showed that the cluster formation rate (18.2%) was relatively low in the southern part of the prefecture, which had a high morbidity rate. Therefore, many patients in this area, especially elderly individuals, likely experienced intrinsic relapse. Combining our genotyping results with field epidemiology data elucidated the infection route in seven cases. Thus, VNTR typing is useful for understanding the transmission of tuberculosis in Nagasaki Prefecture and may contribute to preventing the spread of this infection.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, VNTR analysis, genetic lineage, cluster, molecular epidemiology