

# 神戸市の結核患者の分子疫学調査

有川 健太郎  
神戸市健康科学研究所



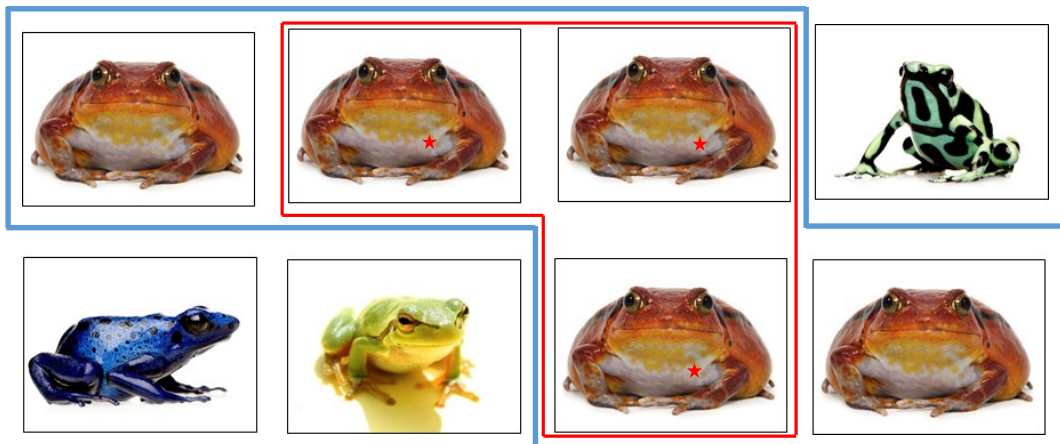
## 本日の内容

- 結核菌分子疫学とは
- 神戸市健康科学研究での結核菌分子疫学解析状況
- 神戸市の外国生まれ結核患者の発生動向
- 分子疫学解析手法（VNTR解析と全ゲノム比較解析）
- VNTRクラスター形成株の全ゲノム比較解析

# 結核分子疫学(菌の遺伝情報を活用)

- 個別事案対応型分子疫学  
→ 疫学情報の確からしさを菌の遺伝情報から検証する。
- 地域内分子疫学 (地域内の分離株を網羅的に解析)  
→ 保健所に「結核対策を効果的に実施するためのヒント (ノーマークの感染源、感染伝搬への気付き)」を提供する。

同一遺伝型の塊 (クラスター) を見つける技術がベース。



地域内分子疫学では、患者クラスターの論拠は、遺伝型別の一致のみである。もっとも確からしいクラスターを検出する手法が求められる。

→ 現行のVNTRの解像度を凌駕する  
**全ゲノム解析が実用化。**

**より確かな患者クラスターの検出**

# 神戸市健康科学研究所で実施したVNTR検査数と外国生まれ結核患者の年次推移

年	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
神戸新規結核登録者数	562	544	548	527	494	417	417	403	380	380	376	369	330	328	260	302	258	262	213	201	-
培養陽性患者数	-	-	-	-	-	-	-	298	297	292	280	292	246	254	212	237	183	194	154	-	-
VNTR実施数 (培養陽性者中、結果までも回収済みの数)	-	-	-	-	-	-	-	206	228	215	252	255	214	233	196	213	156	176	152	-	-
市内分離培養株の 分子疫学調査実施率 (%)	-	-	-	-	-	-	-	69	77	74	90	87	87	92	93	90	85	91	99	-	-
神戸VNTRデータベース 登録患者数	110	138	169	161	161	151	165	206	223	215	250	250	198	247	208	201	160	182	163	153	118
神戸VNTRデータベース 外国生まれ結核患者数	0	1	5	3	2	5	0	8	9	8	13	13	9	11	14	18	12	15	15	7	7
神戸VNTRデータベース 外国生まれ結核患者割合 (%)	0.0	0.7	3.0	1.9	1.2	3.3	0.0	3.9	4.0	3.7	5.2	5.2	4.5	4.5	6.7	9.0	7.5	8.2	9.2	4.6	5.9

- VNTR検査数は年々減少傾向
- 外国生まれ患者の検査数は10台で推移
- 外国生まれ患者の割合は増加傾向

# 外国生まれ結核患者の国別検出状況（2002-2023 菌陽性-VNTR実施患者数）

出身国	登録年	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023-	合計
VNM	ベトナム					2			1			1	2	4	4	6	8	4	6	3	2	1	44
CHN	中国		1	2	1			2	5	2	4	3	2	2	4	3	1	1	2	2	1	1	39
KOR	韓国					1		1		4	5	7	2		3	1	1		1				26
NPL	ネパール							1	1					1	1	1		2		2		1	10
PHL	フィリピン								1				1	2		2			2			1	9
IND	インド					1		2			1	1		2				1	1				9
IDN	インドネシア			1				1			1		1			1		1			1		7
?	不明		4						1		1							1					7
MNG	モンゴル										1				1	1	1	1					5
MMR	ミャンマー														1	2							3
TWN	台湾				1													1	1				3
BGD	バングラデシュ																				2		2
PRK	北朝鮮	1								1													2
THA	タイ					1						1											2
BTN	ブータン																	1					1
AUS	オーストラリア																				1		1
BRA	ブラジル									1													1
COG	コンゴ共和国												1										1
DEU	ドイツ							1															1
HKG	香港																					1	1
LKA	スリランカ																1						1
MWI	マラウイ																	1					1
NGA	ナイジェリア																	1					1
	合計	1	5	3	2	5	0	8	9	8	13	13	9	11	14	17	12	15	15	7	7	3	177

結核低蔓延化により、ポストコロナは外国生まれ結核患者の割合は増加すると予想される。

分子疫学解析より  
その動向を捉える

反復配列多型解析  
(Variable Number of Tandem Repeat : VNTR)

同じ配列の繰り返し数に菌株固有の特性がある  
ことを利用した遺伝子型別解析方法。

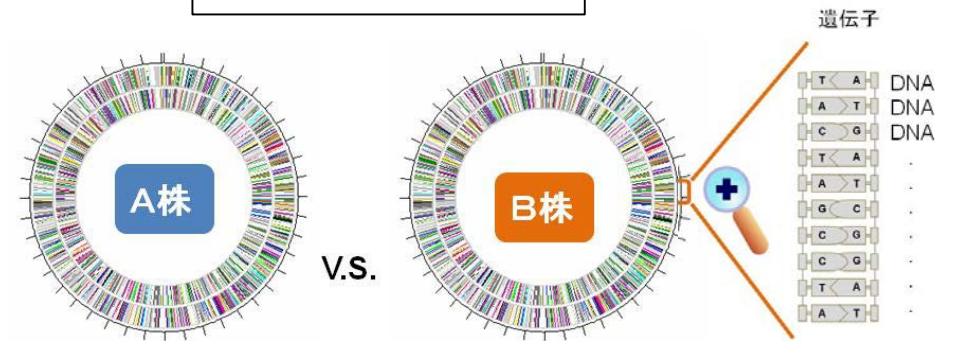


メリット：遺伝子型が16桁のデジタルデータのため、株間の比較が容易

PCRをベースにした手法で、操作が簡易で、結果も迅速

デメリット：菌解像度は全ゲノム比較解析に劣る。

全ゲノム比較解析



メリット：全塩基の比較になるため、これ以上ない菌株異同判定法

デメリット：解析コストがかかる。比較する菌株も選別する必要ある。

# 神戸市の結核菌分子疫学解析 (VNTR法)

反復配列多型解析  
(Variable Number of Tandem Repeat : VNTR)  
可変数 縦列反復

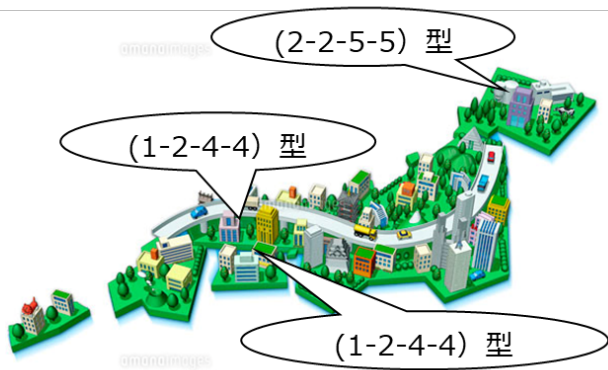
同じ配列の繰り返し数に菌株固有の特性がある  
ことを利用した遺伝子型別解析方法。



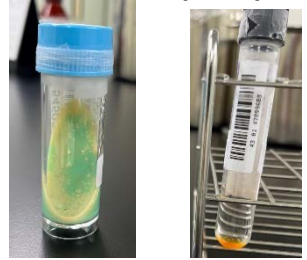
データベース作成が簡便

多施設・多サンプル間のデータ比較が可能

AAC ID & Kinki ID	Subtype	MDR-TB	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	JATA1	24 VNTR	24VNTR cluster	
FY19HC001	B-JLA	MDR-TB	E	3	4	4	3	3	F	7	3	7	5	8	C	9	2	2	4	3	E	4	2	2	B-JLA	STK	E34433 P3719 (3-24-18-44)2	1		
FY19HC006	B-JLA	MDR-TB	I	3	5	4	4	3	N	8	3	7	5	0	L	8	0	2	2	3	A	4	4	3	B-JLA	ST19	E54533 S3570 (3-22-23-44)4	1		
FY19HC007	B-JLA	MDR-TB	E	3	4	4	3	3	I	4	3	7	2	7	D	6	3	2	3	A	4	4	3	2	B-JLA	STK	E44333 T2706 (3-23-34)2	1		
FY19K091	B-African	MDR-TB	8	2	4	3	2	3	1	5	A	5	1	3	6	4	8	1	2	1	8	3	4	2	Euro-American	NB	E24233 S4135 (4-12-12)3	2		
FY19HC001	B-African	MDR-TB	6	1	3	2	4	2	3	5	6	2	5	3	2	2	4	3	2	1	3	5	3	4	2	Euro-American	NB	E12423 S2022 (4-12-12)3	2	
FY19HC008	East Asian	MDR-TB	9	3	2	4	3	3	2	B	1	8	7	7	0	3	6	8	2	3	2	5	4	1	2	East Asian		E24233 S7135 (3-22-34)2	1	
FY19HC029	B-JLA	MDR-TB	G	3	5	4	4	3	2	E	7	1	7	5	9	C	8	7	2	3	3	A	4	4	3	4	B-JLA	ST3	E23443 S7135 (3-22-34)4	1
FY17MDR01	B-JLA	MDR-TB	G	3	5	4	4	3	2	A	7	1	7	5	9	A	9	6	2	3	3	9	4	4	3	4	B-JLA	ST3	E23443 A17703 (3-22-34)4	1
FY17N092	B-African	MDR-TB	8	2	4	3	2	3	1	5	A	5	1	3	6	4	8	1	2	1	8	3	4	2	Euro-American	NB	E24233 S4135 (4-12-12)3	2		
FY17N112	B-JM	MDR-TB	A	4	3	4	4	3	3	E	7	3	7	5	8	7	5	2	3	3	8	3	4	3	2	B-JM	ST22	E42433 E17707 (3-22-34)2	1	
FY18N125	B-JLA	MDR-TB	D	3	5	4	4	3	3	C	7	3	8	5	0	8	0	2	3	3	9	0	4	3	4	B-JLA	ST19	E23443 C7703 (3-22-34)4	1	
FY19HC005	B-JEA	MDR-TB	D	4	4	3	2	4	3	9	E	3	7	4	8	8	9	5	2	2	A	4	4	3	4	B-JEA	ST25	E42433 S17489 (3-22-34)4	1	
FY19N101	B-JEA	MDR-TB	C	1	4	2	2	3	3	3	B	3	7	5	0	4	8	6	2	3	3	A	4	4	2	B-JEA	ST25	E14223 S17704 (3-22-34)4	1	
FY20N016	B-JM	MDR-TB	I	4	3	4	4	3	3	I	7	3	7	5	8	A	7	5	2	3	8	4	4	3	4	B-JM	ST10	E44333 S7392 (3-22-34)4	1	
FY20N037	B-JLA	MDR-TB	6	3	4	4	4	3	3	F	7	3	7	5	8	8	9	3	2	3	3	E	4	4	3	2	B-JLA	ST3	E44333 S7392 (3-22-34)2	1
FY20SH009	B-JM	MDR-TB	D	4	3	4	4	3	3	K	6	3	4	5	8	C	8	6	2	3	3	7	4	4	3	4	B-JM	ST10	E42433 K4013 (3-22-34)4	1
FY20N103	B-JLA	MDR-TB	D	3	4	4	4	3	3	I	7	3	7	5	8	D	7	3	2	3	3	8	4	4	2	B-JLA	STK	E34433 S7392 (3-22-34)2	1	



小川培地 MIGIT (液体)培地



ポイルDNA抽出  
(0.5mLのTEバッファーに菌を少量懸濁し、100℃で16分処理した上清)

繰り返し領域のPCR  
(1株につき16領域)

PCR産物から繰り返し数を判定し、VNTR遺伝子型を決定する。

VNTRデータベースの更新、過去の遺伝子型との比較

# 新規クラスター形成株の確認

## 検査月のVNTR解析結果

	菌株番号	QUB3232	V1955 (D03)	Q4156 (D12)	M104 (D11)	V3155 (D08)	no272 (D96)	V2074 (D04)	V3820	Q3336 (D10)	M10 (D02)	M26 (D07)	M31 (D09)	QUB11A	V4120	V4052 (D11)	G11B (D09)
1	R04KI024	D	3	4	2	2	3	3	9	B	3	7	5	8	2	8	5
2	R04KI025	6	2	4	2	2	3	1	8	D	5	1	3	0	4	8	2
3	R04KI026	3	3	4	2	4	3	2	5	9	4	5	3	6	5	B	3
4	R04KI027	E	4	3	4	4	3	3	E	7	3	7	5	5	A	8	5
5	R04KI028	A	1	2	4	4	3	2	C	A	8	7	3	9	3	8	C
6	R04KI029	9	3	4	4	4	3	3	I	A	4	3	7	2	8	E	3
7	R04KI030a	A	3	4	5	4	3	3	T	5	3	7	5	0	F	5	3
8	R04KI030b	A	3	4	5	4	3	3	T	5	3	7	5	0	G	5	3
9	R04KI031	5	1	3	2	4	2	4	5	A	2	5	3	2	2	4	4
10	R04KI032	1	5	2	2	4	2	3	8	9	4	2	5	4	4	6	9
11	R04KI033	I	5	5	4	4	4	2	E	7	1	7	5	7	C	8	6
12	R04KI034	F	3	5	4	4	4	2	C	7	3	7	5	5	8	A	5
13	R04KI035	F	4	3	4	4	3	3	G	7	3	7	5	5	A	8	5
14	R04KI036	E	4	3	4	4	3	3	E	5	3	7	4	8	6	8	6

## 患者情報込みのVNTRデータベース (2023 7月時点で4210株登録)

Serial No.	菌株番号	整理番号	氏名	性別	生年月日	住所	登録時年齢	JATA-HV4	INH	RFP	SM	EB	KM	EVM	LVFX
S00036	FY14N459	20012812000573		2	1950/11/18	須磨区	50	413274745785-EIC7							
S00037	FY14N472			2				413274745785-GFA9							
S00038	FY15HC001	19982812000448		1	1955/3/15	北区	43	433323745794-EFC8	1	1					
S00039	FY15HC002	20032812000158		1	1947/3/1	中央区	56	434363744783-EE68	1						
S00040	FY15HC003	20032812000146		1	1941/11/11	中央区	61	413274745775-GEC9							
S00041	FY15HC004	20032812000430		1	1923/3/5	須磨区	80	434361745584-EEA8							
S00042	FY15HC005	19992812000169		1	1921/7/6	灘区	77	433303745885-INL0	1	1					初
S00043	FY15HC006	20032812000147		1	1925/9/21	中央区	77	333353526A94-5977	2	2					
S00044	FY15HC007	885054		1	1940/10/11	北区	63	433333732464-EID7	1	1					手
S00045	FY15HC008	20012812000225		1	1964/8/13	兵庫区	37	434363745883-EHB8							

検査月のVNTR遺伝子型が過去のデータベースに登録されているか確認する。クラスター形成株について、年齢、住所、氏名等の実地疫学情報と分子疫学情報が結びつくことで、より有効な考察が可能となる。  
(より重点的にや、手を引いても良い等の調査判断基準に有用)

一方で、菌解像度の低さから、関連の無い菌株をクラスターとして誤判定してしまう可能性も。

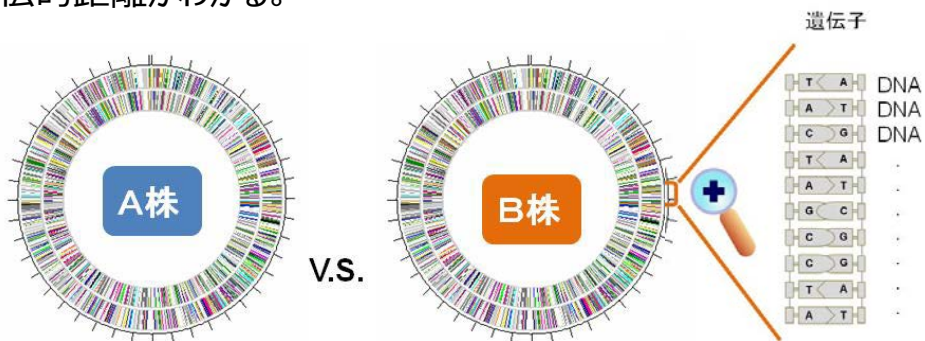
Serial No.	菌株番号	KCT CLUSTER	KCT Cluster size	整理番号	性別	生年月日	住所	登録時年齢	INH	RFP	SM	EB
S03202	FY29KI064	KCT443	2	20172812000160	1	19461128	灘区	70	2	2	1	2
	R04KI035	KCT443	2	20222812000091	2	19430426	中央区	79				
S00217	FY16N027	KCT442	2	20032812000238	1	1942/1/6	兵庫区	61				
	R04KI033	KCT442	2	20222812000082	1	19281105	中央区	93				
S00679	FY18N028	KCT296	18	20062812000309	1	1937/8/8	長田区	68				
S02554	FY26KI0164	KCT296	18	20142812000215	1	19800302	北区	34	2	2	2	2
S02616	FY26KI0224	KCT296	18	20152812000010	1	19510126	中央区	63	2	2	2	2
S02784	FY27KI0139	KCT296	18	20152812000264	2	19840411	須磨区	31	2	2	2	2
S03205	FY29KI067	KCT296	18	20172812000164	1	19350629	北区	81	2	2	2	2
S03275	FY29KI0135	KCT296	18	20172812000272	1	19381204	長田区	78	2	2	2	2
S03316	FY29KI0175	KCT296	18	20172812000123	1	19610325	長田区	56	2	2	2	2
S03322	FY29KI0181	KCT296	18	20172812000272	1	19381204	長田区	78	2	2	2	2
S03403	FY30KI0041	KCT296	18	20182812000094	1	19490224	須磨区	69	2	2	2	2
S03450	FY30KI0088	KCT296	18	20182812000215	1	19750226	須磨区	43	2	2	2	2
S03668	FY31KI0133	KCT296	18	20192812000285	1	19970816	須磨区	22	2	2	2	2
S03702	FY31KI0167	KCT296	18	20202812000007	2	19420904	須磨区	77	2	2	2	2
S03984	R03KI082	KCT296	18	20212812000163	1	19630815	長田区	57				
S03985	R03KI083	KCT296	18	20212812000164	1	20000630	東灘区	20				
S04038	R03KI0135	KCT296	18	20212812000272	1	19671007	中央区	54				
S04066	R04KI0003	KCT296	18	20222812000033	2	19830528	長田区	38				
S04067	R04KI0004	KCT296	18	20222812000038	1	19690326	垂水区	52				
	R04KI024	KCT296	18	20222812000072	1	19731004	灘区	48				
S01180	FY21N002	KCT296	5	20002812000000	1	1978/6/12	垂水区	20	2	2	2	2



# 神戸市の結核菌分子疫学解析（全ゲノム比較解析）

## 全ゲノム比較解析

4,411,529個のDNA全てを対象として菌株を比較する最も精密な菌株異同性判定。比較の際に出現した異なる塩基をSNVと呼び、SNV数から遺伝的距離がわかる。



メリット：全塩基の比較になるため、これ以上ない菌株異同判定法

デメリット：解析コストがかかる。比較する菌株も選別する必要ある。

小川培地



7H11平板培地



2白金耳分の菌量が必要。ガラスビーズで破碎後、PCIでDNA抽出。二日ほどかかる。

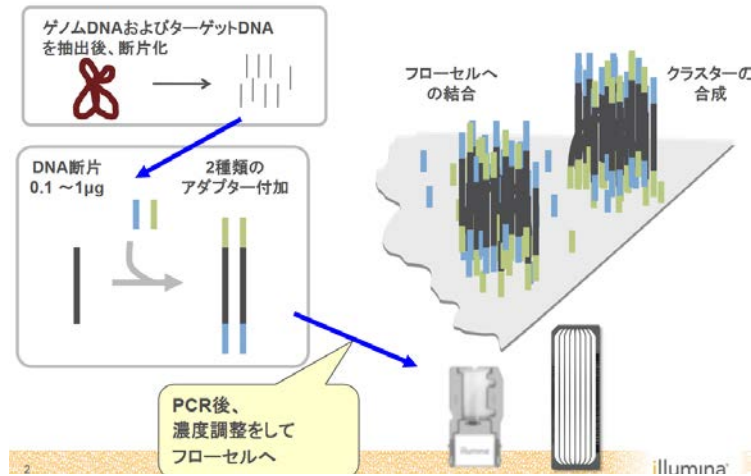
ゲノムライブラリーの作製（ゲノムの断片化、インディケーターの付与）

イルミナ社のMiseqでシーケンス。大量のショートリード獲得

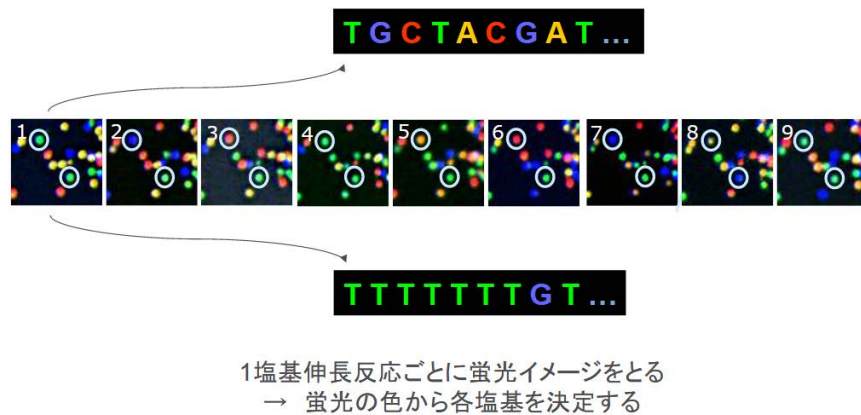
MTBseq等のソフトウェアでゲノム解析

# NGS解析のフロー (イルミナ社)

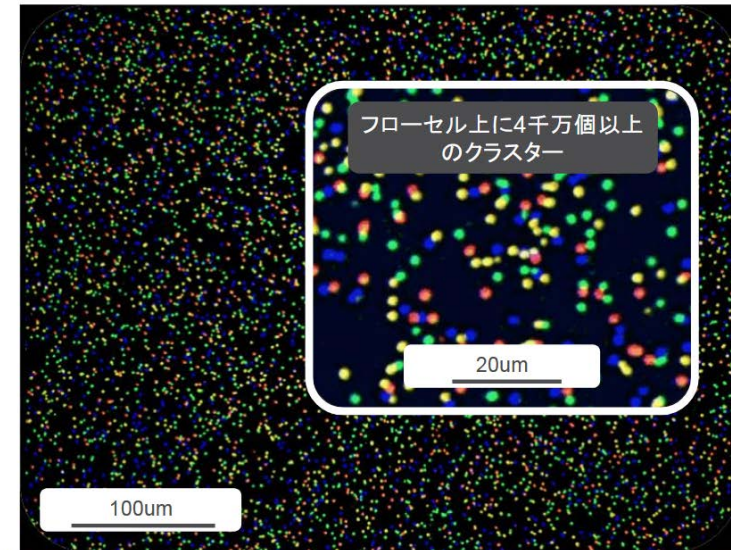
## サンプル調製とDNA分子の増幅(自動化)



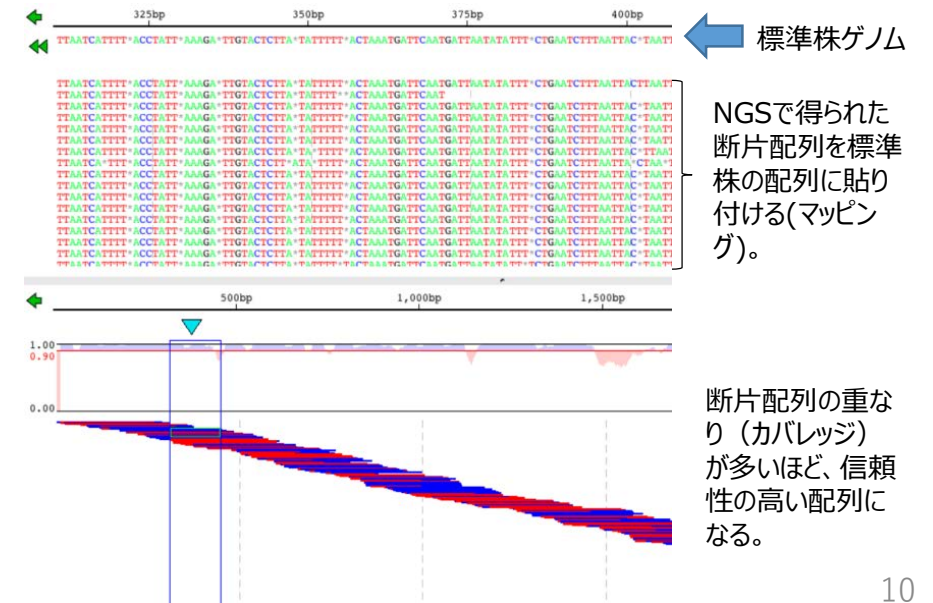
## 画像蛍光シグナルから塩基への変換



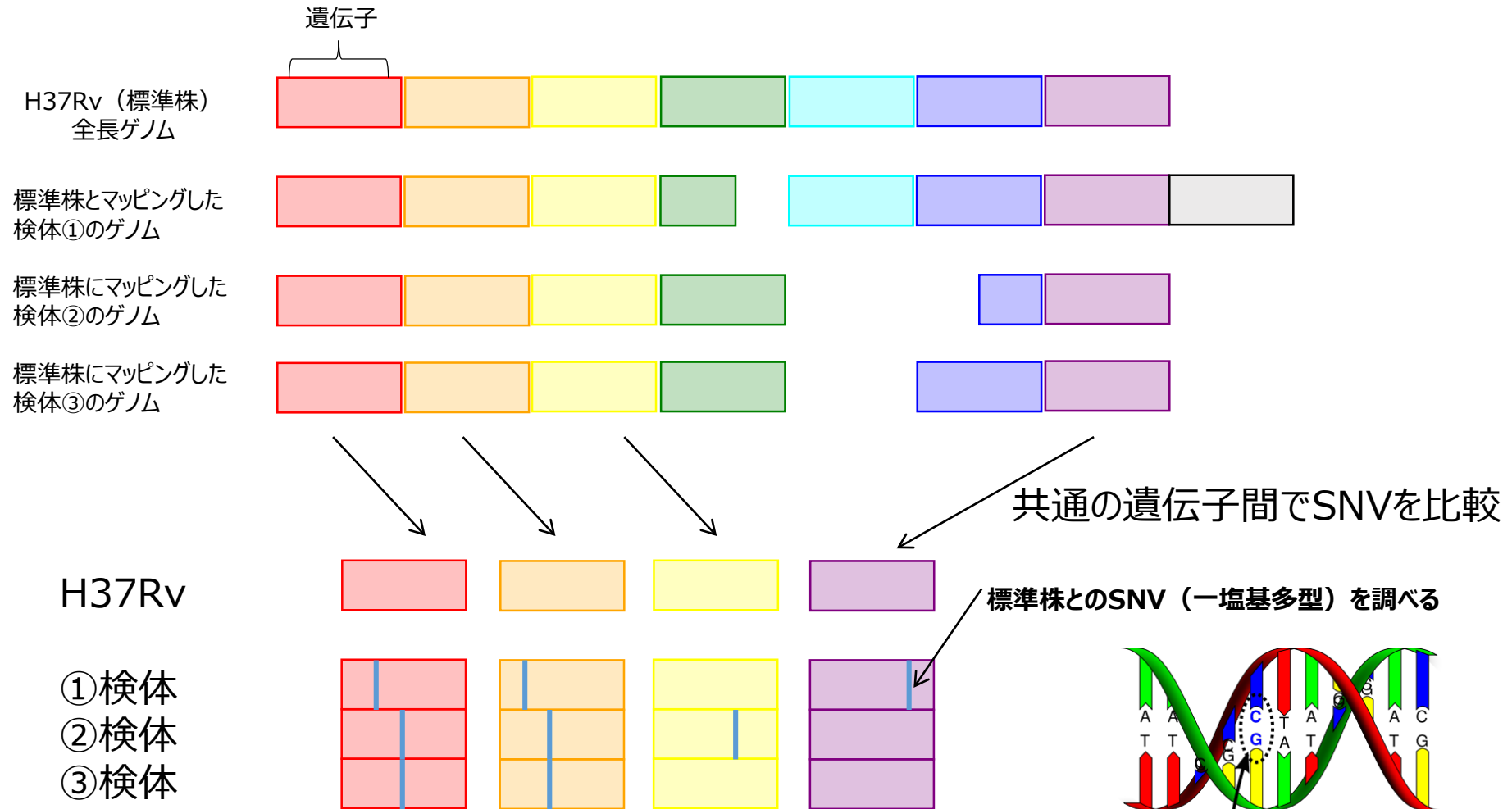
## 画像イメージの取り込み



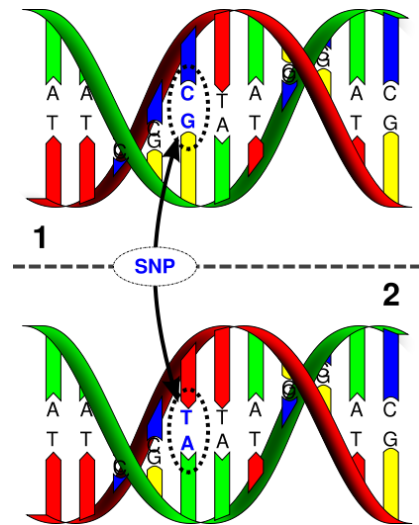
## 得られたDNA配列を標準株のゲノム遺伝子に貼り付け



得られた全ゲノムのSNV情報を比較し、菌株の関連を調べる。

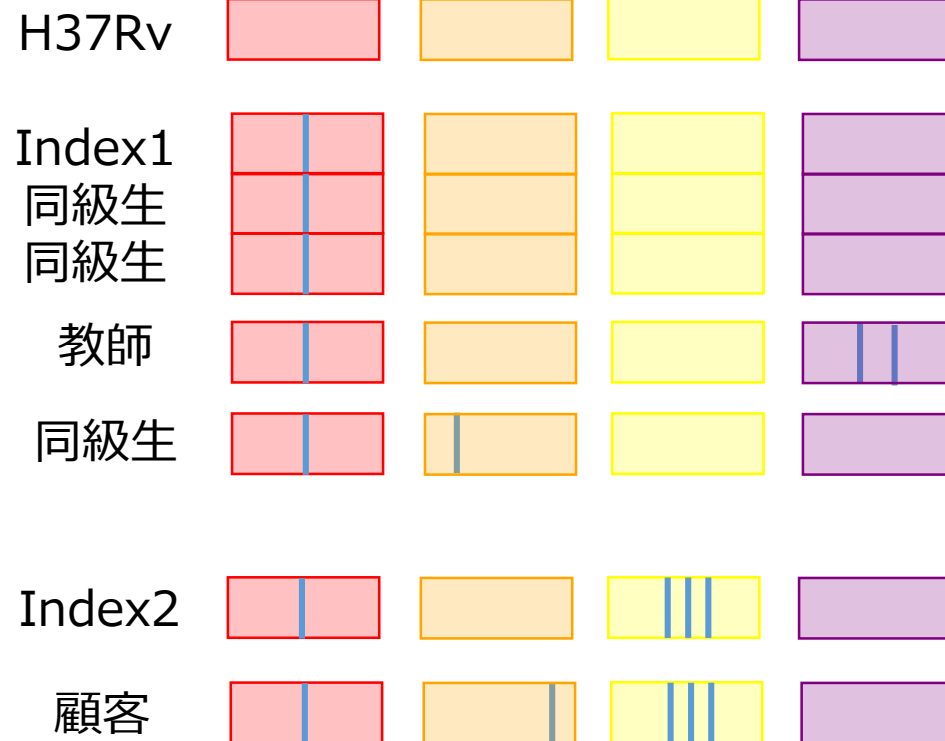
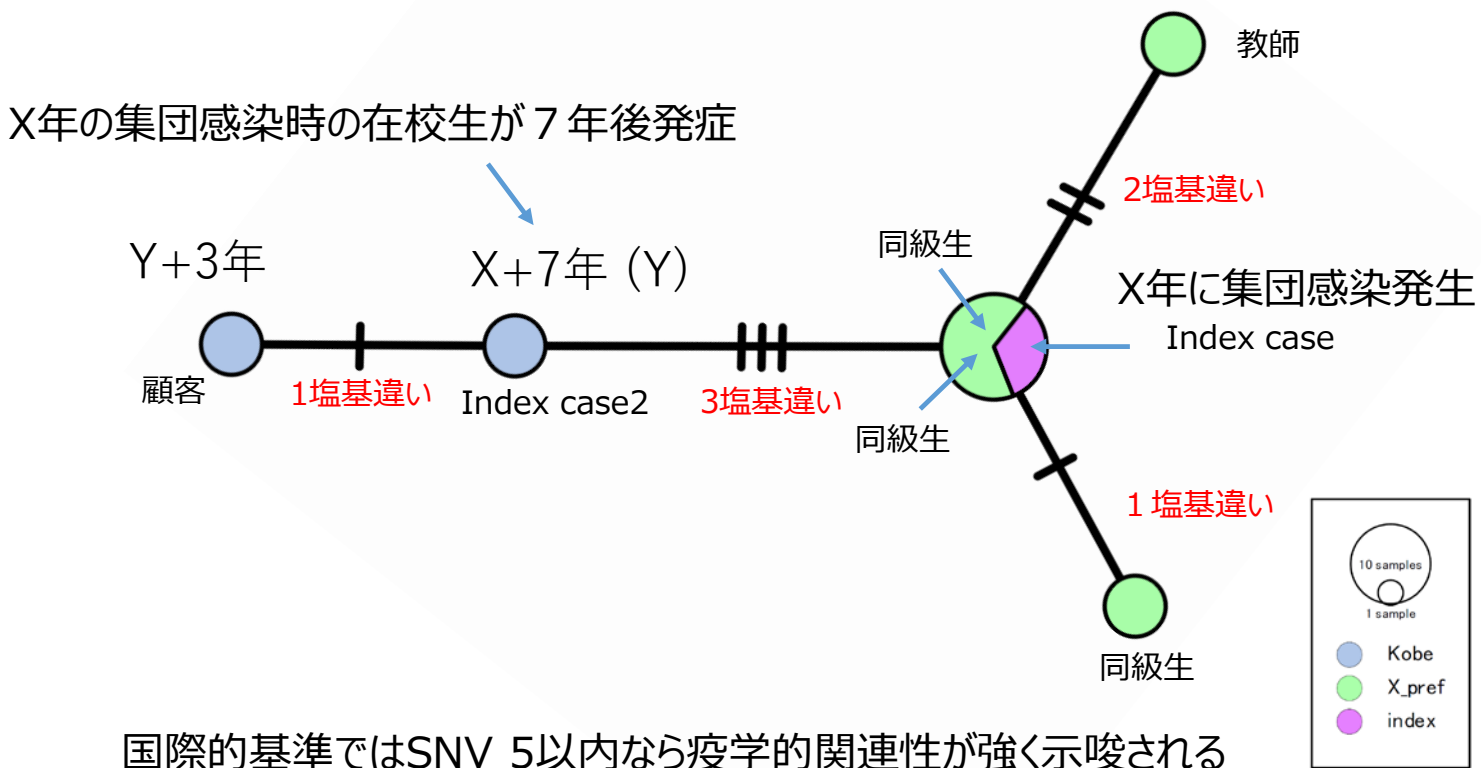


SNV情報を集積することで、非常に類縁な結核菌（集団感染を疑う事例や家族内伝播由来）は、4百4十萬塩基中の特定のSNVの有無により、菌株を識別することが可能。



# 実際の結核集団感染事例での全ゲノム解析によるネットワーク図

他県で起きた集団感染での感染者が7年後神戸で発症し新たな集団感染を起こした事例。



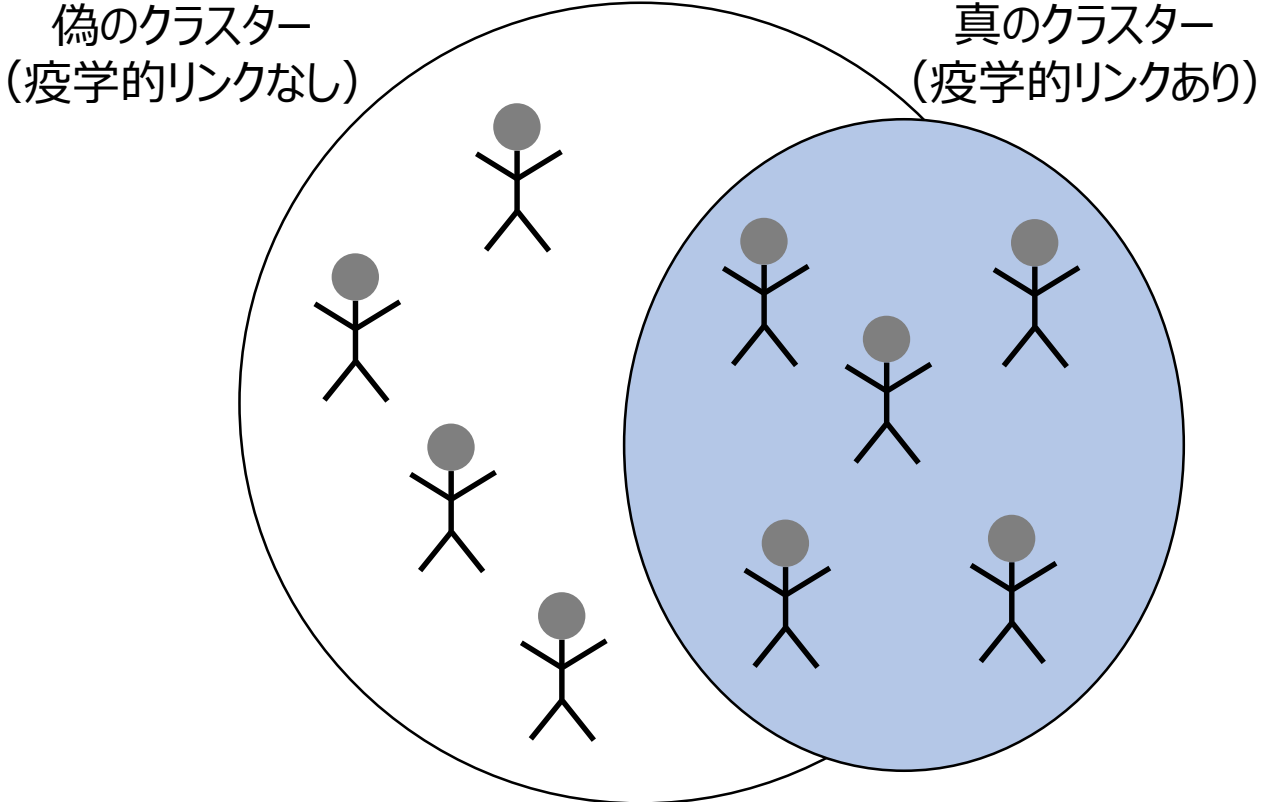
VNTR プロファイルは7株全て一致

QUB3232 V1955 (J03) Q4156 (J12) Mt04 (J01) V3155(J08) neo2372(J06) V2074 (J04) V3820 Q3336 (J10) M10 (J02) M26 (J07) M31(J09) QUB11A V4120 V4052 (J11) Q11B (J05)

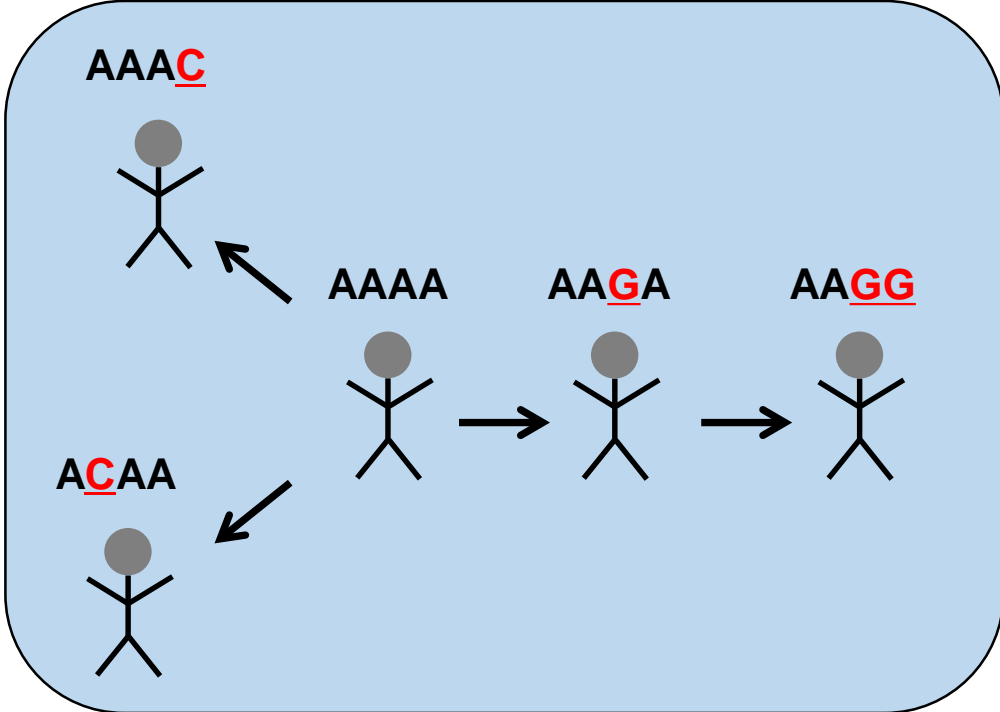
0 3 5 4 4 4 3 D 7 3 8 5 8 8 7 4

# ゲノム解析によりVNTR法で区別できない菌株間の違いが分かる。

## VNTR解析 (クラスターサイズ 9)



## 全ゲノム解析



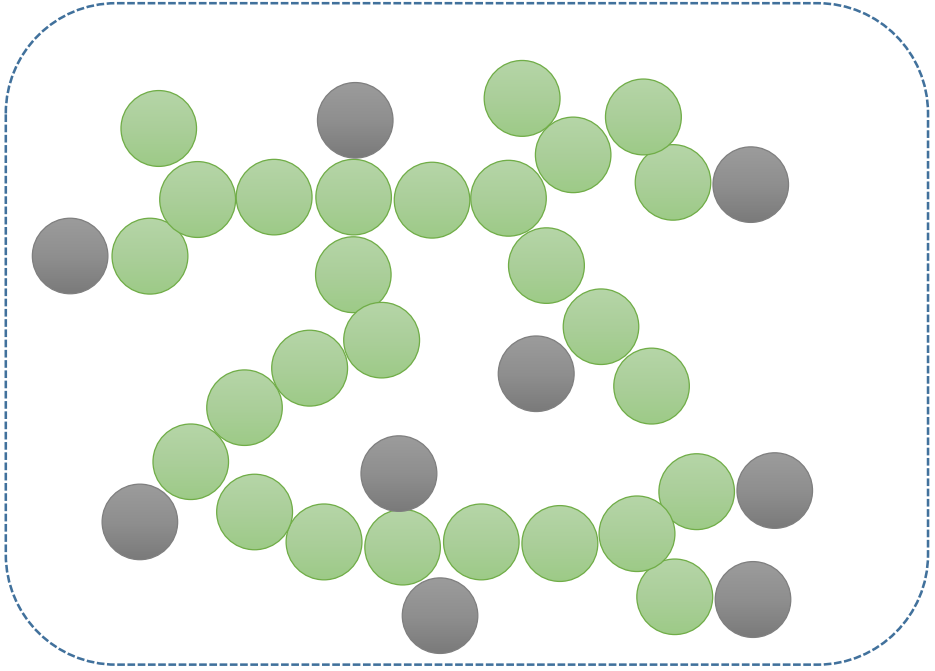
VNTR法の菌株識別力が不十分なために疫学的関連性のない菌株をクラスターとして認識する危険性がある。

# 国内で検出されるVNTRラージクラスター形成株についての推察



結核高蔓延時代には同一遺伝型株へのランダムな感染機会がある。

単一VNTR パターン株が地域内で感染拡大



- 活動性結核
- 潜在性結核

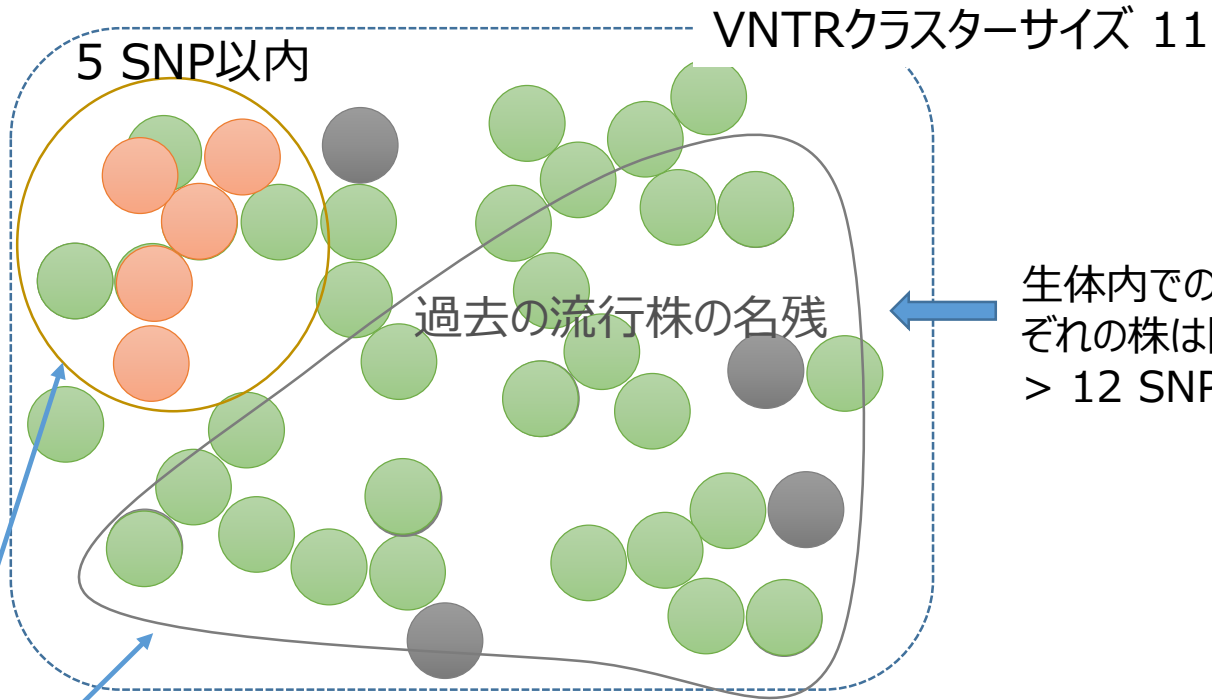
# 国内で検出されるVNTRラージクラスター形成株についての推察

結核高蔓延時代の流行株

時間経過とともに患者の消失

LTBIからの再燃

最近起こった  
感染伝播  
現在、近い将来への  
リスクが高い株



生体内での数十年の休眠中にそれぞれの株は固有のSNPを蓄積。  
> 12 SNPs

- 活動性結核
- 潜在性結核

全ゲノム解析により区別できる

**VNTR法の解像度が不十分なために疫学的関連性のない  
菌株同士をクラスターとして認識する危険性がある。**

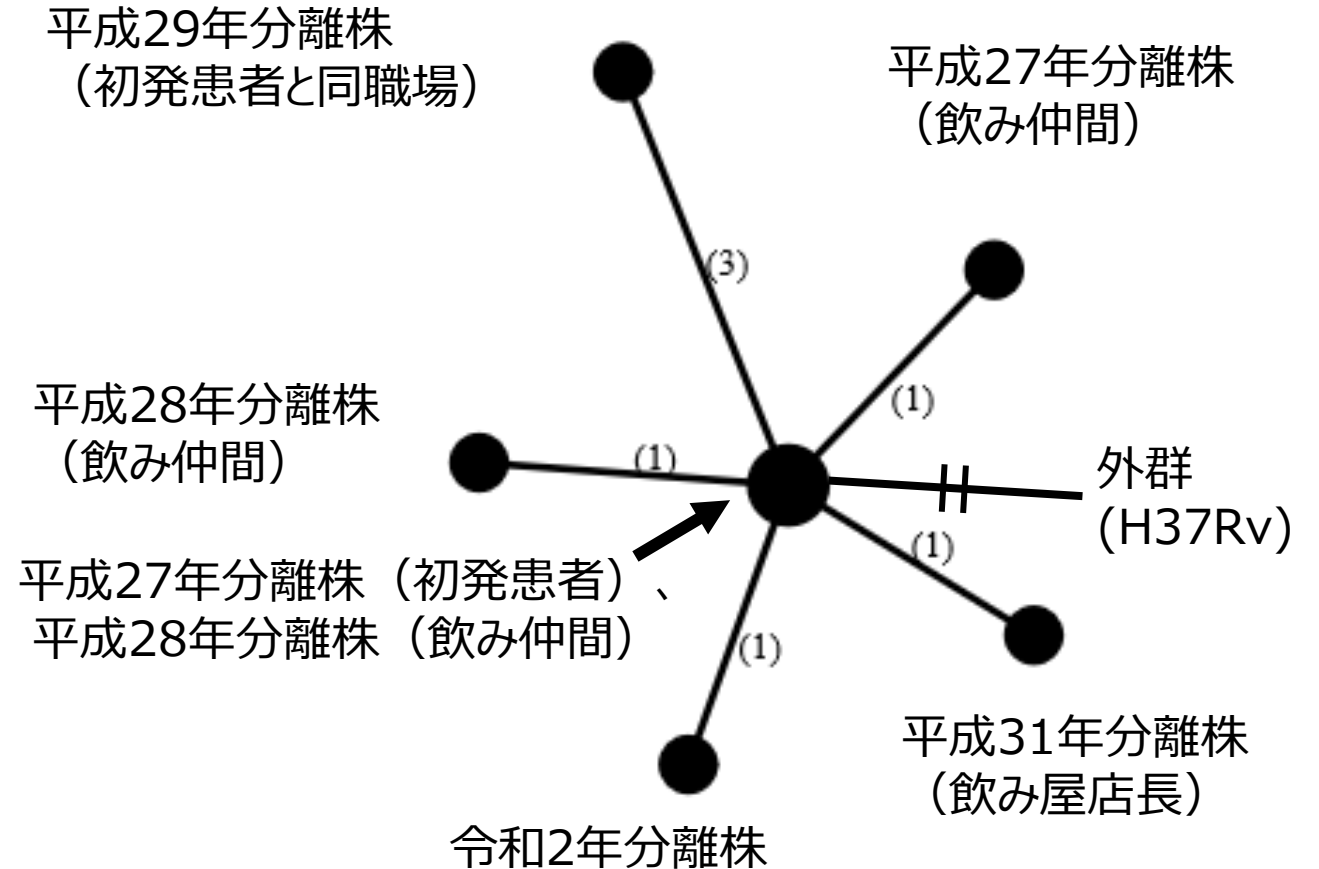
**ゲノム解析を用いてVNTRクラスター形成株間を比較し、  
神戸市におけるVNTRクラスター形成株内の感染伝播様式を調べた。**



# ① KCT327 (VNTR型一致、疫学的リンクあり、ゲノム関連あり)

国際的基準ではSNV 5以内なら  
疫学的関連性が強く示唆される

- 疫学背景→共通の飲食店利用、職場同僚
- VNTR解析→16領域すべて一致

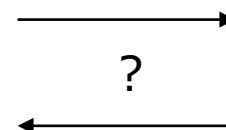


初発患者を中心に感染拡大したクラスター。

## ②KCT433（ネパール生まれ患者のみでVNTRクラスターを形成した株、疫学的リンク不明）

- 疫学背景→関連不明

2019年発症  
27歳  
6-12か月以内  
の滞在



2021年発症  
25歳  
6-12か月以内  
の滞在

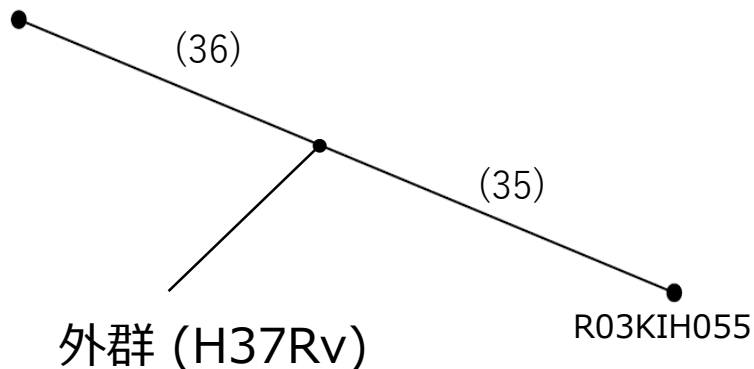
- VNTR解析→16領域すべて一致

菌株番号	KCT CLUSTER	出身国	滞在期間	分離年	QUB3232	V1955 (J03)	Q4156 (J12)	Mt04 (J01)	V3155(J08)	neo2372(J06)	V2074 (J04)	V3820	Q3336 (J10)	M10 (J02)	M26 (J07)	M31(J09)	QUB11A	V4120	V4052 (J11)	Q11B (J05)
FY31KIH081	KCT433	NPL	6-12ヶ月以内	2019	C	4	3	4	4	3	3	E	7	3	7	5	8	6	8	6
R03KIH055	KCT433	NPL	6-12ヶ月以内	2021	C	4	3	4	4	3	3	E	7	3	7	5	8	6	8	6

VNTRプロファイルの桁数を合わせるため、10→A、11→B、12→C、、、と10以上の繰り返し数はアルファベットに変換している。

- 全ゲノム比較解析→71 SNV

FY31KIH081

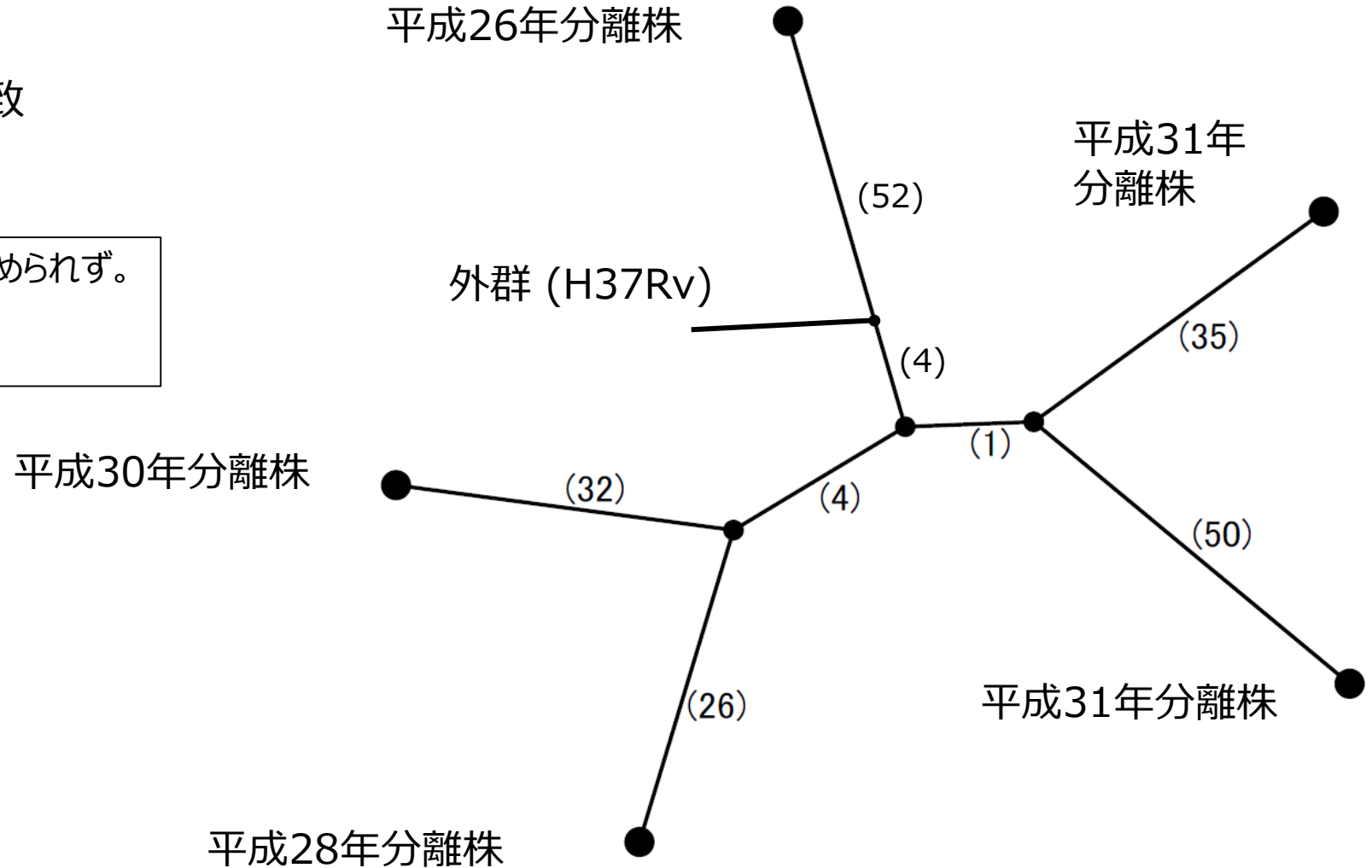


ネパールで同一VNTR型株に個別に感染し  
神戸で発病したと考えられる。

### ③ KCT010 (VNTR型一致、疫学的リンク不明、ゲノム関連なし)

- 疫学背景→関連不明
- VNTR解析→16領域すべて一致

疫学的関連不明、ゲノムからも関連求められず。  
↓  
過去の流行株の名残？



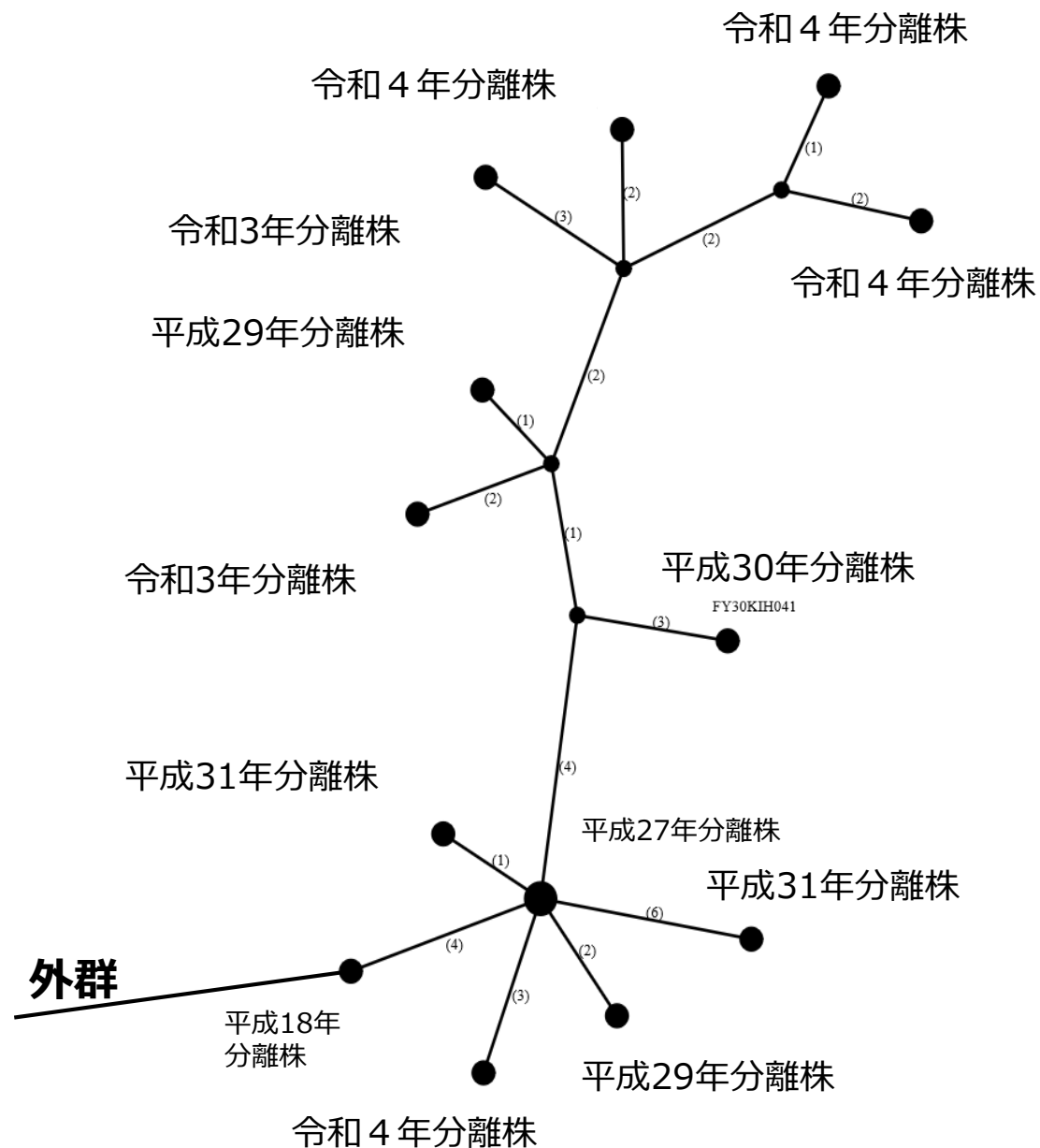
## ④ KCT296(VNTR型一致、疫学的リンク不明、ゲノム関連あり)

- 疫学背景→関連不明
- VNTR解析→16領域すべて一致

疫学的関連不明、  
ゲノム解析では患者株間がSNV 5 以内で繋がっており、  
何らかの関連が示唆される。



**感染拡大中の要注意クラスター！**

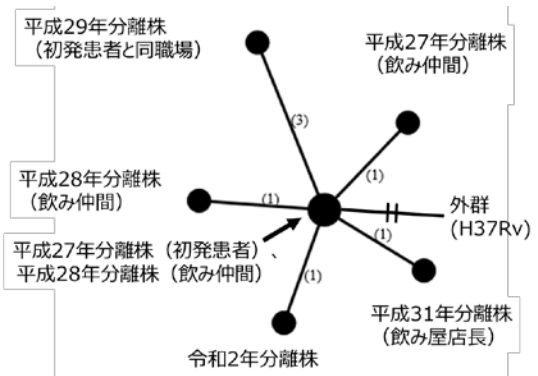


VNTRはPCR法の原理を活用し、汎用的で強力な結核菌分子疫学解析ツールである。

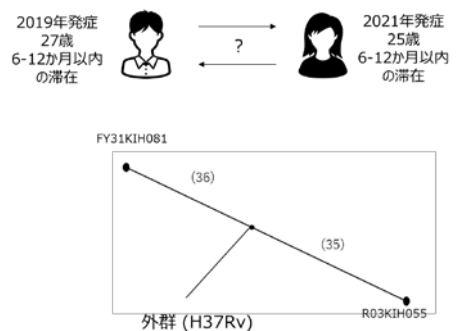
①のような集団感染事例での異同判定には十分な解像度を有するが、②③④のようなクラスターの場合、VNTRデータベースから真の感染伝播を推測する事は難しい。

昨今の新型コロナウイルスの流行により、全ゲノム解析技術の普及は全国的に進んだ。今後は、VNTRをスクリーニングとして用い、全ゲノム解析で詳細な菌株比較を行うことで、より有用な結核対策が実現できるものと思われる。

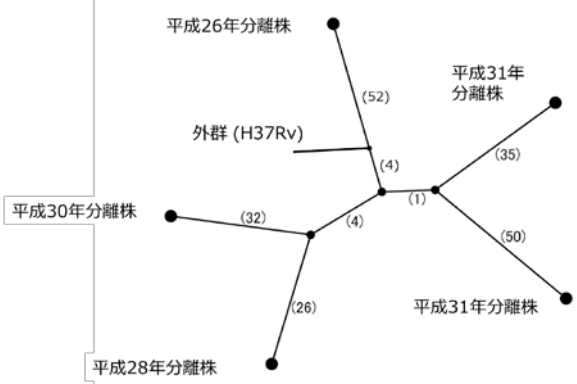
①KCT327 (VNTR型一致、**疫学的リンクあり**)



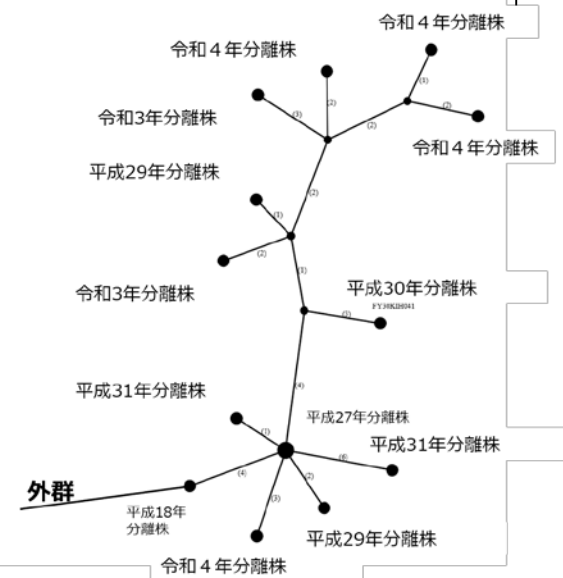
②KCT433 (ネパール生まれ患者のみでVNTRクラスターを形成した株、**疫学的リンク不明**)



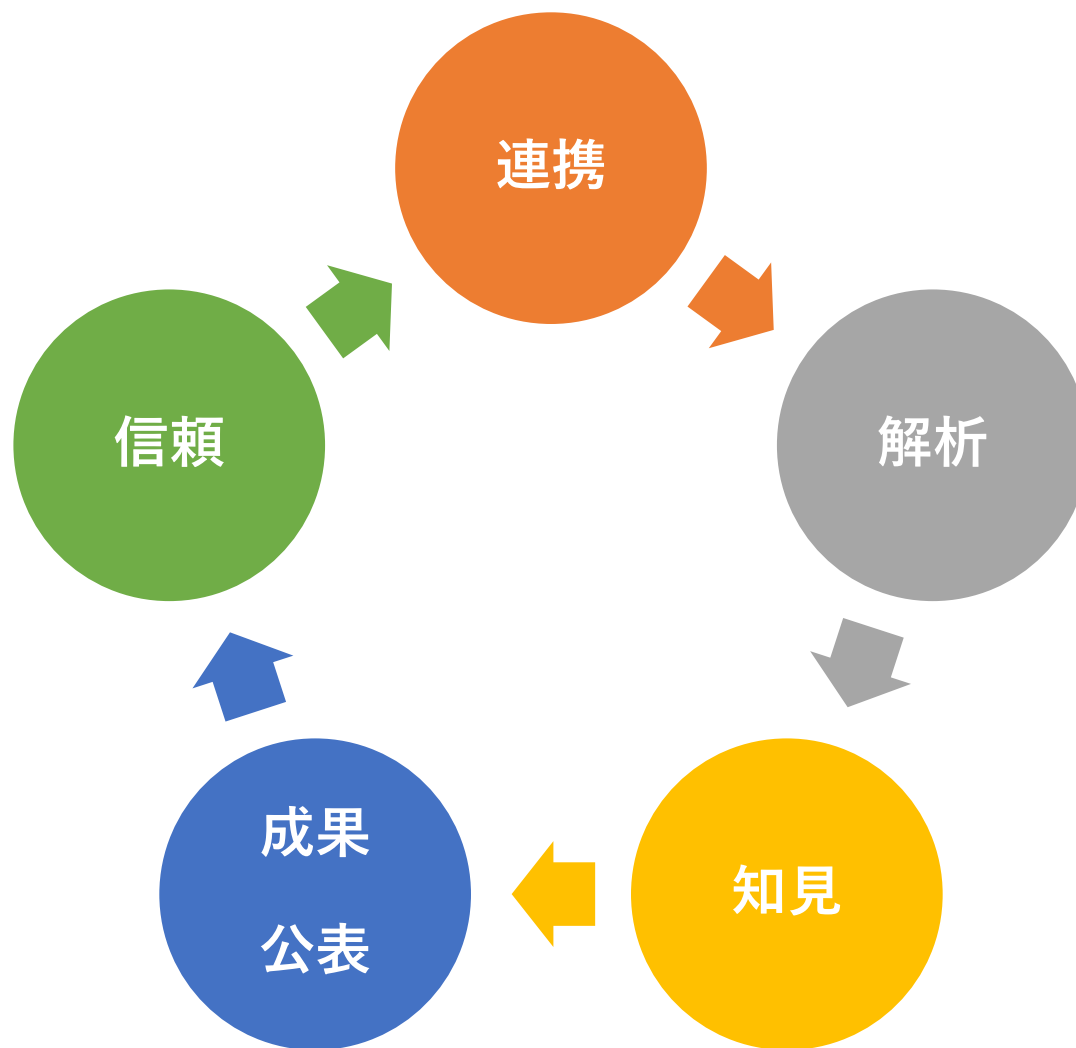
③KCT010 (VNTR型一致、**疫学的リンク不明**)



④KCT296 (VNTR型一致、**疫学的リンク不明**)



# 医療機関・保健所・研究所の連携による結核対策の推進



今後とも結核菌バンク・分子疫学事業への協力をよろしくお願いいたします。