

200931029A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

輸入感染症としての多剤耐性
結核の対策・制御に関する研究

平成 21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 全司

平成 22 (2010) 年3月

目 次

I. 総括研究報告			
輸入感染症としての多剤耐性結核の対策・制御に関する研究	岡田全司	-----	1
II. 分担研究報告			
1. 日本・中国・韓国分子疫学共同研究	加藤誠也	-----	58
2. 国立国際医療センターにおける外国人結核の臨床像および患者由来株の分子疫学解析	小林信之	-----	61
3. 外国人結核の現状と今後の対応に関する研究	豊田恵美子	-----	67
4. 我が国における外国人結核の発生状況と治療の実態把握及び必要な対策の検討 大阪市の場合	下内 昭	-----	68
5. タイから日本への伝播の検討も含めた難治性結核の疫学的研究	野内英樹	-----	76
6. 非結核性抗酸菌症患者の潜伏結核感染ハルピンの薬剤耐性結核の起源	服部俊夫	-----	82
7. 輸入感染症としての多剤耐性結核の対策・制御に関する研究	高鳥毛敏雄	-----	88
8. ベトナム多剤耐性結核の宿主要因に関する研究	慶長直人	-----	92
9. 輸入感染症としての多剤耐性結核の対策・制御に関する研究	櫻田紳策	-----	94
10. アジア諸国・日本の外国人多剤耐性結核患者TLR・リポカリン2の反応性と治療ワクチン開発の研究	竹田 潔	-----	96
11. 新しい結核治療ワクチンによる臨床応用計画に関する研究及び新規化学療法剤との併用療法計画	坂谷光則	-----	99
12. 研究協力者研究報告		-----	106
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		-----	110
IV. 研究成果の刊行物・別刷		-----	114

輸入感染症としての多剤耐性結核の対策・制御に関する研究

研究代表者 岡田全司 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター・臨床研究センター長

研究要旨（図1）

I. 日本における外国人結核

1. 日本全国：調査票（外国人結核）を作成し全保健所・結核病院 800 施設に送付。1000 例解析。20 代、中国、フィリピン、韓国多し。多剤耐性結核 3.4%、XDR-TB 存在。学生、常勤者多し。言語や治療途中の帰国が問題（岡田）。結核発生動向調査分析（星野 結核 2009）。
2. 東日本：(1)国際医療センター・東京病院外国人結核 135 名解析。結核全体の 9%。(2) RFLP で特定菌株蔓延。HIV 6%、薬剤耐性獲得は母国（小林、豊田 結核 2008）。
3. 西日本：大阪市・神戸市外国人結核 103 名、学生の集団感染。日本語学校の定期健診必要。VNTR 解析で母国感染（下内、公衆衛生 2009）。

II. アジア諸国の結核菌分子疫学と宿主要因研究（ネットワーク研究）

1. アジアでの感染伝播状況解析。3 カ国（日、中、韓）の結核施設共同研究。(1)IS6110 遺伝子と VNTR MST 解析で、日本・韓国の結核菌は“祖先型”。中国、ロシアや欧米は“蔓延型”で、遺伝的背景は異なる発見（加藤、結核 2008）。(2)韓国は RD181 陽性株で日本の結核菌と区別できる大発見。
2. 中国の結核 315 株。rpoB 変異 87%。
3. タイ特有な結核株発見。難治性結核で Gra 産生異常。

III. 新結核ワクチン・治療・診断

1. ヒト結核に酷似のサルを用い、HSP65+IL-12DNA ワクチンの世界初の治療効果（岡田 Vaccine 2009）。XDR-TB にも効果。①前臨床試験（毒性・安全性）②GMP 製造。
 2. Gra ワクチンは結核治療効果（岡田 Hum. Vac.出版中）上記ワクチンと相乗効果。リポカリン 2 や SLPI の結核菌殺傷解明（竹田 J.I 2008）。
 3. 多剤耐性結核患者迅速発見法（rpoB）で迅速入院システム構築（鈴木・岡田 結核 2009）。
- IV. 先進国 英・米国の外国人結核75%。米国でツ反をQFT診断に変え外国人結核減少。（岡田）

・研究代表者（岡田全司）（表 1, 2, 3, 4）

・研究代表者

- (1) 日本全国：下内、小林、豊田、星野、加藤と改訂を繰り返し、岡田が調査票（外国人結核及び入国者結核）を当班で作成した。これを全国保健所527施設、国立病院機構施設54施設を含む結核病床を有する病院273施設、合計800施設に送付した。現在、集計中で2006年～2008年の2700例の対象者を解析。日本における外国人結核は20代、中国、フィリピン、韓国、ブラジル国籍の順、来日1～3年発症多し。多剤耐性結核は3.4%、XDR-TBも存在。学生13%、常勤者32%。糖尿病合併44%、HIV合併1.2%。患者管理上の問題として言語の壁や治療途中の帰国割合が高いこと。（岡田）
- (2) 先進国、米国サンフランシスコの調査（公衆衛生局Dr. Kawamuraと）で外国人移民結核（特に中国から）が多く問題。ツ反からQFT診断に変えてから外国人結核減少。（岡田）
- (3) 日本全国：結核発生動向調査を分析。外国人労働者、学生、日本人配偶者、不法在留者の人数が外国人結核患者数に影響。脱落率と転出率の高さが課題。（星野、岡田）
- (4) 平20年神戸市内結核届出患者366名中外国人結核2.5%。（藤山、岡田）
- (5) 新結核治療ワクチン：ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用い、HVJ-エンベロープ(E)/HSP65+IL-12 DNAワクチンが結核治療効果を発揮することを世界で初めて報告（岡田,Vaccine 2009）。XDR-TBに対しても治療効果。
- (6) このワクチンの動物実験による前臨床試験データ取得：一般毒性試験、安全性試験（中島、岡田）。①前臨床試験：a.薬効薬理試験。マウス、カニクイザル、SCID-PBL/huで薬効確立（予防+治療） b.安全性確認 c.安定（凍結乾燥）②GMP製造で臨床応用可能。
- (7) 結核菌殺傷蛋白Granulysin(Gra)はキラーT細胞分化因子活性も有する発見。15キロダルトンGranulysin（特

許取得) 蛋白ワクチンは結核治療効果 (Human Vaccine in press)。Graと上記DNAワクチンで結核治療相乗効果を得た。

- (8) 多剤耐性結核患者の迅速発見法(rpoB変異)を用い、多剤耐性結核患者迅速入院方法及び病院内で多剤耐性結核が感染しない体制を構築した(鈴木、岡田等、結核2008)。107人に応用し、rpoB変異を発見し、迅速入院したうちの86%は後に多剤耐性結核が確定。

・研究分担者 (小林信之)

- (a) 日本における外国人結核：東日本：国立国際医療センターの外国人結核80名(うち入院38名)を解析(2007年1月～2009年5月)。結核患者全体の8.9%、20-30才、中国・韓国、入国後1年以内多し。欧州出身増加。空洞46%、喀痰塗抹陽性46%。薬剤耐性率9.6%で、以前に比し減少。治療中断例は、以前に比し少なく病院と保健所の連携、DOTSの徹底、通訳、パンフレット等の使用が治療脱落の防止に寄与示唆。

- (b) 外国人結核の結核菌RFLP解析。70%以上のクラスター形成より、特定の菌株が蔓延。

・研究分担者 (豊田恵美子)

東日本：東京病院で診療55人(2004～2008年)の外国人結核解析。全結核の2.7%。高蔓延国から帰国の児童(外国生まれ)も多くQFT陽性(5.7%)も多し。QFT診断導入の方向。

・研究分担者 (下内昭)

西日本：大阪市で在留外国人結核患者は過去3年間で94名。20代、中国、韓国籍、学生が多く大きな集団感染を引き起こした。日本語学校の定期健診必要。VNTR分析で一致例なし。ユーラシア大陸型で、大阪市流行株の型なし。母国で感染例が多い。

・研究分担者 (加藤誠也)

アジアでの感染伝播状況の解析。3カ国(日本、中国、韓国)の結核研究施設が分子疫学共同研究会。(1)IS6110遺伝子とVNTRのMST解析で、日本、韓国の結核菌は“祖先型”(75%)。中国(上海、北京)、ロシアや欧米は“蔓延型”(90%)で、遺伝的背景は異なることを発見。(2)日本と韓国との比較：MST(minimum spanning tree)解析により韓国に特徴的なRD181陽性株(韓国の6割)はVNTRでB5グループに区分。B5には韓国株に特徴的なK-strain株が含まれる。日本の結核菌と区分可能。

・研究分担者 (野内英樹) タイから日本への伝播の解析。RFLPでタイに特有な結核株(Nonthaburi株)発見。37%が北京株、11%がNonthaburi株。難治性結核でGra産生異常。

・研究分担者 (櫻田紳策) タイのHIV陽性結核の宿主要因：IL-10の上昇により抑制的制御。

・研究分担者 (服部俊夫) 中国・ハルピンの薬剤耐性結核：結核315株解析。S・S多剤耐性結核(12%)、XDR-TB解析。rpoB変異86.4%、KatG変異45.6%、gyrA変異34.1%。

・研究分担者 (慶長直人) ベトナムの多剤耐性結核調査と宿主要因。(1)ベトナムの多剤耐性結核約5%で、都市部、結核既治療再排菌例に多い。(2)ホーチミン市結核レファランスセンター50例の細胞性免疫関連遺伝子の遺伝子多型頻度解析。

・研究分担者 (竹田潔) 多剤耐性結核に対する自然免疫治療法：(1)TLRを介し産生されるリポカリン2の鉄の取り込みの抑制による結核菌増殖抑制を発見。(2)secretory leukocyte protease inhibitor(SLPI)が細胞膜の透過性を亢進させる結核菌の感染防御を発見。(3)リポカリン2DNA、SLPI DNAワクチン構築し上記ワクチンとの相乗効果解析中(岡田、竹田)。

・研究分担者 (高鳥毛敏雄) 先進諸国における移民結核対策：(1)ロンドン、ニューヨークでは外国人結核患者が増加し、結核患者の75%と大問題。結核対策の中核組織調査。(移民、ホームレス等の分野に分け専門職員設置。)(2)医療者の相談支援体制の整備。

・研究分担者 (坂谷光則) 発現効率が高いHVJ-E封入製剤調整。安全性・毒性検査。OPC67683(新結核治療剤)の臨床応用。

[日本における外国人結核]

- (9) 当班で新たに外国人結核調査票を作成し、日本全国保健所と結核診療施設800施設に送付、過去3年間の外国生まれで外国国籍を対象者とし、2700人の多数の情報を解析。20才台が最も多く、中国、フィリピン、韓国、ブラジルの順でした。入国1～3年の発症が多く、外国での結核感染が示唆された。常勤者、学生が多いのも特徴。しかし、定期健診や学校健診による発見は少なく、これを改善する必要が示唆された。薬剤耐性に関して、多剤耐性結核(MDR-TB)は3.4%と、明らかに日本人結核より高い頻度を示した。また、INH単独耐性、RFP単独耐性も高頻度を示した。転帰として治療途中の帰国が17%も存在し、大きな問題点であった。具体的

な問題点として、言語の問題が大きく、通訳対策の重要性が示された。翻訳パンフレットは外国人結核の多い韓国語、ブラジル人のポルトガル語、フィリピン人のタガログ語は少なく問題点であった。

- (10) わが国の結核患者における外国人結核の割合は増加傾向にあり、結核蔓延国からの薬剤耐性菌とくに多剤耐性結核 (MDR-TB) 菌の国内への持ち込みが懸念されている。外国人結核の臨床的特徴、菌の薬剤感受性を知る目的で、国立国際医療センターで診療した外国人結核と日本人結核の臨床像および薬剤感受性について比較検討した。2007年以降に診療した85例の外国人結核の国籍は、以前の報告と同様に中国・韓国・フィリピンなどアジア諸国が多く、日本人結核と比較して年齢が低く、女性の割合が高いことが統計学的に示された。基礎疾患や肺結核の有空洞率、排菌量に関しては日本人結核と有意な差はみられなかった。薬剤耐性に関しては、外国人結核でRFP耐性およびMDRの率が有意に高いことが明らかとなり、今後わが国においてMDR対策を進めていく上で外国人結核対策は重要な課題であると考えられた。外国人結核由来菌株の分子疫学解析を開始し、RFLP解析の結果、高い相同性を持つ2つのクラスターが同定された。とくにクラスターIは20株から構成されており、中国人患者由来菌株と韓国人患者由来菌株が過半数を占めていた。特定の菌株が特定の集団に蔓延している可能性が示唆された。
- (11) 日本の20才代の新規登録結核患者の1/5は外国人結核患者であり、その割合は増加傾向である。医療領域でも外国人スタッフを導入する計画が進められている。当院で治療している外国人結核は少数であるが、外国人の医療スタッフの研修が行われている。活動性結核治療ばかりでなく、今後に向けて潜在性結核治療や感染、発病予防を考える必要がある。
- (12) 大阪市における在留外国人の結核患者は、年々増加傾向にある。2006-2009年に新規登録された在留外国人結核患者に関して、患者票に記載されている項目から患者の特性、結核の病態、治療結果について調査した。患者の特性として若年者の学生や常勤者が多かった。定期健診によって早期発見ができ、軽症例を多く認めた。来日初期の発病が多いため、外国人が多く集まる学校や職場での、来日直後およびその後の定期的な健診を実施することが重要である。結核菌の耐性率が高く多剤耐性を6.1%に認め、早期の感受性検査が必要である。治療途中の中断・転出の症例が多いため、これらを防ぐためには、母国語の冊子の配布や通訳の依頼などにより、コミュニケーション問題を解決し、治療完了に導く患者教育を強化する必要がある。結核菌株のVNTR解析のデータ集積と解析の高精度化により、患者の出身国での感染を証明することや、日本国内で感染・発症した可能性のある症例を絞り込むことができるようになった。
- (13) 在日外国人結核患者数の推移について、結核発生動向調査と出入国管理統計、在留外国人統計、不法残留者推計を用いて背景を検討した。外国人結核患者数は739名 (1998年) から毎年増加し、931名 (2004年) でピークを迎え、その後漸減し2007年は842名だった。外国人結核患者数の変動は、正規労働者、就学生、不法在留者の人数が影響すると考えられた。

[アジア諸国の結核分子疫学研究と宿主要因解析 (ネットワーク研究)]

- (14) 東アジアに位置する日本、中国、韓国、台湾では、近年ビジネスや観光で人々がそれぞれの国を訪れていることから、結核をはじめとした感染症も人の移動に伴い輸入・輸出されていると考えられる。これらの地域では、北京型結核菌の割合が高いという共通の特徴を持ち、さらに結核罹患率は先進諸国に比べて高く、罹患率を低下させるためには今後も精力的な対策が必要である。その対策のひとつとして、各国の分子疫学担当者と会議を持ち、型別データを共有できる反復配列多型 (VNTR) システムの構築を進めている。今回は、各国で現在分析に利用しているVNTRローサイを中心に、共同で分析すべきローサイの選択を行った。今後は、このローサイ分析のための精度管理を行い、minimum spanning tree (MST)解析により各国の結核菌が持つ遺伝的背景や型別データの比較及び型別情報のデータベース化を図る予定である。
共通の反復配列多型 (VNTR) 結核菌型別システムの構築を目指し、各国で広まっている結核菌の遺伝的背景の解析を行った。中国で広まっている北京型結核菌は、ヨーロッパや米国と同様に9割以上がModern型であった。しかし、日本および韓国の北京型株は、7割以上がAncient型であった。また、韓国の広まっている結核菌は日本のものと似ているが、RD181領域を持つ結核菌の割合が高い点が異なることが明らかになった。一方、台湾では北京下部株が44.4%で、北部、東部では北京株が数十年間流行株になっていると考えられた。このように、日本、中国、韓国では、共通して北京型結核菌の割合が高いことが知られているが、それぞれの国で広まっている北京型結核菌の遺伝的背景が異なることが明らかになった。
- (15) 北タイ・チェンライ県において、難治性結核患者 (多剤耐性・再発・治療失敗例) の検体バンク、コホート研

究を継続している。輸入感染症としての側面を検討するため、結核菌側のDNA解析を進めている。

- (16) 非結核性抗酸菌症患者の潜伏結核感染の頻度とその病態を非潜伏結核感染者と比較検討した。潜伏結核感染者の炎症反応が、非潜伏結核患者より高値で、臨床症状も強い事が明らかになった。またハルピン医科大学との共同研究を継続し、当大学で特性化した多剤薬剤耐性結核菌の由来でそのうち80%以上が北京株であることを明らかにした。
- (17) タイ・チェンライでOPNならびにgranulysin等の細胞障害性顆粒とHIV感染者とHIV合併結核を標的として臨床試料を用いた解析を行った。OPN、granulysinともにHIV感染における結核発症の高いリスクと密接に関わっている可能性が示唆された。HIV合併結核においては、血漿中のOPNや一部Th1 cytokineまたはIL-10のような抑制性cytokineのレベルが健常者のみならずHIV陰性結核患者と比較しても有意に上昇していた。
- (18) ベトナム南部随一の結核拠点病院であるホーチミン市のファムゴックタック病院との共同研究を実施した。多剤耐性結核の宿主要因を分子遺伝学的な手法により明らかにする研究プロトコールについて両国両施設の倫理委員会での承認を得た後、断面研究を実施し、60名の多剤耐性結核患者の研究参加を得て、血液検体を当センターに移送した。今後、薬剤代謝酵素NAT2など、耐性結核の宿主要因の候補遺伝子の特徴的な遺伝子変異、アジア人の遺伝子分布の特徴を明らかにするための遺伝子タイピングを行い、多剤耐性結核の遺伝要因に関する知見を得たい。

[新規結核ワクチン・治療・診断]

- (19) HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンはBCGワクチンよりも1万倍強力な結核予防ワクチン効果。結核菌数の減少効果のみでなくマウスで初めてワクチンによる延命効果を発見（マウス）。結核菌由来 HSP65蛋白に対するキラーT細胞やINF- γ 産生T細胞の分化を強力に誘導した。カニクイザル（レオナルド・ウッド研究所：ヒト結核感染に最も近いモデル。Nature Med.1996）でワクチン免疫を行い、結核予防効果を解析した。カニクイザルでHVJ/HSP65+IL-12DNAワクチン投与群は100%生存率（BCGワクチン群は33%の生存率）の画期的な結核予防ワクチン効果を示した。
さらに、ヒトのBCGワクチン接種（乳幼児）プライム—小学生・中学生・高校生ブースター（当ワクチン）をサルモデルで考案した。サルにプライム（BCGワクチン）後長期間の4ヶ月後にブースターワクチン（当DNAワクチン）を接種した結果、BCGプライム—当DNAワクチンブースター群で最も強力な予防ワクチン効果（延命効果、血沈改善効果、体重増加、免疫反応増強）が発揮された。すなわち、再現性をもって当DNAワクチン結核予防効果が明らかとなった。
多剤耐性結核に対する世界で初めての治療ワクチン効果を明らかにした。超薬剤耐性結核菌（XDR-TB）に対しても治療効果。多剤耐性結核(XDR-TB)に対する強力な治療ワクチンを発見（マウスの系）。さらにカニクイザルの系でもHVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンは生存率改善、体重増加、免疫反応増強、血沈改善の治療効果を得た。
さらに、同じカニクイザルモデルを用い、HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA+Ag85BDNA+Ag85ADNAワクチンは、生存率改善、血沈改善、体重改善、免疫反応増強の著明な結核治療効果を示すことを明らかにした。
- (20) 結核菌殺傷タンパクである15K及び9K Granulysin遺伝子導入マウス作製に成功し、15K Graが生体内でも結核菌殺傷を初めて証明。多剤耐性結核患者でキラーT産生Gra有意に低下を発見。
リコンビナント15K Granulysinと他のワクチンで結核治療相乗効果が認められるか解析した。
- (21) 多剤耐性結核の制御を目的として開発している新規ワクチンのアジュバント兼DDSでワクチン成分であるHVJ-Eについて、安全性試験、安定性試験、GMP製造技術確立を進めた。その結果、重篤な毒性は認められない事、12ヶ月の有効期限の設定ができる事、GMP製造が的確である事が明らかとなった。
- (22) 結核菌の感染により肺で早期に誘導される遺伝子産物、リポカリン2およびsecretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)の機能を解析した。マウスに結核菌の感染を感染させると、気道上皮細胞から気道腔内、肺胞腔内にリポカリン2およびSLPIが2日目をピークに分泌される。リポカリン2は、肺胞上皮細胞に受容体依存性エンドサイトシスにより取り込まれ、上皮内に侵入した結核菌の増殖を鉄イオンの取り込みを抑制することによりブロックする。一方、SLPIは、結核菌の細胞膜の透過性を亢進させることにより殺菌作用を示し、in vitroでの結核菌の増殖を抑制した。SLPIは2つのwhey acidic protein (WAP)ドメインを有しているが、各WAPドメインが結核菌の増殖を抑制した。さらに、WAPドメイン内の陽性電荷を有するアミノ酸が増殖抑制

に必須であることが明らかになった。このように、結核感染防御において、リポカリン2やSLPIが重要な役割を担っていることが明らかになった。

- (23) われわれは二つの結核療養所を舞台とした、MDRTBの院内集団感染事例を報告した。特に全剤感受性結核治療中にMDRTBが重感染した2症例の報告はわが国結核行政にも大きな影響を与えた。分子疫学的検討で、MDRTBの感染様式が、感受性結核菌と同等である事を発見した。以上の結果から、MDRTBの中に感染力の強い菌株が存在する事、MDRTBの院内感染対策が重要であると判明した。そこで喀痰塗抹陽性の結核患者のRFP感受性をrpoBの変異から迅速に判定する方法を実行した。3ヶ月間で107検体に応用し、7件でrpoBの変異を発見。速やかに患者の隔離に成功。7件中6件は後に薬剤感受性検査で多剤耐性が確定した。病院内で多剤耐性結核が感染しない体制の構築をした。これが厚生行政に大きく寄与した。
- (24) 多剤耐性結核の感染防止のためには多剤耐性の迅速な診断が必要である。今回我々は、リファンピシン (RFP) の耐性遺伝子であるrpoBの変異を検出することによるRFP耐性迅速診断法と従来の薬剤感受性検査結果の比較検討を行った。耐性遺伝子による診断法は、従来法をgold standardとした場合、感度93.3%、特異度99.7%と優れた結果であった。本法は一日で結果が得られ、耐性結核の迅速な診断において有用であると考えられた。

[先進国の外国人結核対策]

- (25) 米国ニューヨーク市は移民社会であり、貧富の格差も大きく、多様な人々が存在している困難な中で結核対策を進めてきている。結核の再興に対するために1990年代には外来治療も行う総合的に結核対策を行う公的な拠点施設(Chest Center)を設け、すべての人々に対応できる結核対策システムをつくり対応している。2000年代に入り既存の公的医療機関ネットワークと公的結核センターと保健当局が組み合わさった体制に移行している。結核対策を専門的に進めるために人材や技術面ではCDCの大きな支援を得ていた。わが国も不安定就労者、医療保険未加入者、そして外国人の結核患者割合も増加傾向にあり、多様な人々に対応した結核対策を進めているニューヨークの結核対策システムの実践は参考となる点が多い。

研究分担者

野内英樹
財団法人結核予防会複十字病院
臨床検査診断科
科長

服部俊夫
東北大学大学院医学研究科
内科病態学感染症内科
教授

加藤誠也
財団法人結核予防会結核研究所
副所長

高鳥毛敏雄
大阪大学大学院医学系研究科
社会環境医学講座
特任教授

小林信之
国立国際医療センター
呼吸器科医長

慶長直人
国立国際医療センター研究所
呼吸器疾患研究部
部長

豊田恵美子
国立病院機構東京病院
呼吸器科医長

櫻田紳策
国立国際医療センター研究所
呼吸器疾患研究部
細菌性呼吸器感染症研究室室長

下内 昭
財団法人結核予防会結核研究所
副所長

坂谷光則
国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
院長

竹田 潔
大阪大学大学院医学系研究科
感染免疫医学講座免疫制御学
教授

表1

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)		
岡田全司班 平成21年度		
「輸入感染症としての多剤耐性結核の対策・制御に関する研究」		
研究代表者	岡田 全司	国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター センター長
研究分担者	野内 英樹	財団法人結核予防会複十字病院 臨床検査診断科 科長
	加藤 誠也	財団法人結核予防会結核研究所 副所長
	小林 信之	国立国際医療センター研究所 呼吸器科 医長
	豊田恵美子	国立病院機構東京病院 呼吸器科 医長
	服部 俊夫	東北大学大学院 内科病態学 教授
	高鳥毛敏雄	大阪大学大学院医学系研究科 特任教授
	慶長 直人	国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部 部長
	櫻田 紳策	国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部 室長
	下内 昭	財団法人結核予防会結核研究所 副所長
	竹田 潔	大阪大学大学院医学系研究科感染免疫医学講座 免疫制御学 教授
	坂谷 光則	国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 院長

表2

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)		
岡田全司班 平成21年度 第一回班会議		
「輸入感染症としての多剤耐性結核の対策・制御に関する研究」		
研究協力者	星野齊之	財団法人結核予防会結核研究所 企画・医学科長
	藤山理世	神戸市保健福祉局健康部予防衛生課 主幹
	切替照夫	国立国際医療センター感染症制御研究部 部長
	赤川 清子	北里大学生命科学研究所 客員教授
	螺良 英郎	(財)大坂結核研究会 理事長
	中島 俊洋	ジェノメディア株式会社 取締役・CTO
	鈴木 克洋	国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター 部長
	露口 一成	国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター 室長

表3

研究者名	分担する研究項目
岡田全司	研究の統括。 アジア諸国との結核対策研究ネットワークを束ね、疫学研究・結核ワクチン・新診断法による多剤耐性結核対策・制御。 日本の外国人結核に対する対策・制御。
野内英樹	タイ及びベトナムとの結核研究ネットワーク活用による多剤耐性結核の制御。HIV感染合併結核対策。
加藤誠也	韓国及び中国との結核研究ネットワーク活用による多剤耐性結核の制御(結核菌の分子疫学研究)。外国人結核疫学研究・対策。
小林信之	日本(東京、東日本)における外国人結核の発生状況と診断・治療の実態把握及び対策・制御。
豊田恵美子	日本(東京、東日本、全国国立病院機構病院)の外国人結核の実態把握及び対策・制御。
服部俊夫	中国及びフィリピンとの研究ネットワーク活用による多剤耐性結核の制御(分子疫学研究)。HIV感染合併結核。

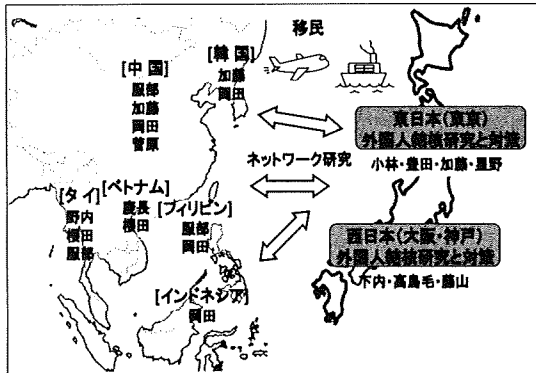
表4

研究者名	分担する研究項目
高鳥毛敏雄	先進諸国における移民結核対策の調査と日本への応用。日本(大阪)の外国人結核の実態把握と対策。
慶長直人	ベトナム及びタイとの結核研究ネットワーク活用によるアジア人の多剤耐性結核の宿主要因解明と対策・制御。
櫻田紳策	タイ及びベトナムとの結核ネットワーク活用による多剤耐性結核の宿主要因と解明と対策・制御。
下内 昭	日本(大阪・神戸、西日本)の外国人結核の実態把握及び対策・制御。
竹田 潔	アジア諸国・日本の外国人多剤耐性結核患者TLR・リポカリン2の反応性と治療ワクチン開発の研究。
坂谷光則	国立病院機構呼吸器ネットワークを活用した日本の外国人結核及び日本の多剤耐性結核対策・制御。化学療法剤による制御研究。

輸入感染症としての多剤耐性結核の対策・制御に関する研究

目的

(日本における外国人結核の対策・制御研究とアジア諸国の結核対策研究ネットワークの確立・活用による多剤耐性結核制御)



期待される効果

- ①対策の向上 ②診療の向上(新しい診断法, 新しい結核ワクチン, 化学療法剤)
- ③日本の外国人結核減少 ④日本人結核患者減少(特に多剤耐性結核)
- ⑤アジア諸国の結核患者減少 ⑥医療費節減 ⑦国際貢献

日本

- アジア諸国の結核対策研究ネットワークの確立**
岡田, 加藤, 野内, 服部, 慶長, 櫻田, 菅原
- 日本の外国人結核**
岡田, 小林, 豊田, 下内, 星野, 加藤, 藤山, 高鳥毛, 竹田, 切替, 坂谷

研究方法

- ①日本の外国人結核の発生と治療の実態。(調査票)
- ②アジア諸国の結核菌分子疫学と宿主要因と対策。
- ③新しい診断法。
- ④新しい結核ワクチン・化学療法。
- ⑤先進諸国の移民結核対策調査。(高鳥毛, 岡田)

研究成果

日本の外国人結核

1. 日本全国: 調査票(外国人結核及び入国者結核)を作製。保健所・病院800施設に配布。解析。20代、中国・フィリピン・韓国、入国3年以内多い。多剤耐性4.7%。(岡田)
2. 日本全国: 結核発生動向調査を分析。労働者、学生等が影響。(星野, 岡田)
3. 東日本: 国際医療センター及び東京病院。HIV陽性者6%。多剤耐性結核は5%。薬剤耐性の獲得は母国。特定の菌株蔓延。(小林, 豊田)
4. 西日本: 大阪市で在留外国人結核患者。学生が多く、集団感染。日本語学校の定期健診が必要。VNTR分析で大阪市流行株なし。母国で感染。(下内, 藤山, 岡田)

アジア諸国

- [結核菌分子疫学研究と宿主要因解析(ネットワーク研究)]
- (1) 中国(加藤, 服部, 岡田, Ling, Heping)
 1. アジアでの感染伝播状況の解析。3カ国(日本, 中国, 韓国)の分子疫学共同研究会。VNTRのMST解析で、日本、韓国の結核菌は“祖先型”。上海、ロシアや欧米は“蔓延型”で、遺伝的背景異なる発見。韓国株はRD181陽性で日本株とも分離可。(加藤)
 2. ハルビンの315株で薬剤耐性遺伝子解析。中国のSM耐性株研究(服部, 菅原)
 - (2) タイ(野内, 櫻田, Pathom)・タイから日本への伝播の解析。RFLPでタイ特有な結核株発見。難治性結核でGra産生異常。
 - (3) フィリピン(Tan, 岡田, 服部)
 - ・カニクイザルで結核治療ワクチン開発。
 - (4) ベトナム(慶長, Duong) 宿主要因解析。

先進国の情報

先進国ロンドン・ニューヨーク・サンフランシスコの外国人結核75%。外国人結核減少にQFT有用。(高鳥毛, 岡田)

- ・日本への流入・蔓延防止
 - ・外国人移民健康診断
 - ・多剤耐性結核治療・予防
 - ・早期発見・QFT診断
- 新しい多剤耐性結核治療ワクチン
(a)マウス
(b)サル
(c)SCID-PBL/hu

- ①薬剤耐性遺伝子解析、VNTR, RFLP解析
- ②XDR-TB, スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌解析
- ③宿主granulysinの解析。SNP解析(宿主要因解明)

(倫理委員会)

新しい結核治療ワクチンの開発・迅速診断入院法の開発

- (1) 多剤耐性結核に対する初めての治療ワクチンを発見(サルで)。XDR-TBに対して治療効果。(岡田)
- (2) BCGよりも1万倍強力な結核予防ワクチン。カニクイザル(レオナルド研究所; ヒト結核感染に最も近い)で100%生存率の予防効果(BCGは33%)。前臨床試験データを取得(毒性・安全性試験)
- (3) Granulysin (Gra)のキラーT分化因子活性発見。Graワクチンは結核治療効果。(岡田) GraTgマウスでGraが結核菌殺傷に関与。
- (4) リポカリン2はTLRを介し結核菌増殖抑制。SLPIによる結核菌殺菌機構(細胞膜透過性亢進)解明。(竹田)
- (5) 多剤耐性結核患者迅速発見法(rpoBの変異)を用いて、多剤耐性結核患者の迅速入院方法・体制を構築。(鈴木, 岡田)

ワクチン	マウス	モルモット	カニクイザル	ヒト
HVJエンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNA	BCGより1万倍強力な予防ワクチン効果	効果	効果	計画中
	結核治療ワクチン効果	計画	効果	計画中
	強力な多剤耐性結核・XDR-TB治療効果	計画	計画	

A. 研究目的 (図2) (表5)

- (1) 近年、輸入感染症としての多剤耐性結核が問題。
①日本国内への流入・蔓延防止 ②日本の外国人結核は年々増加 ③多剤耐性結核は a莫大な費用 b治療困難。新結核ワクチン、治療薬が必要。
 - (2) 日本における外国人結核の発生と治療の実態把握及び対策・制御。
 - (3) 多剤耐性結核の多数発症が日本・世界 (特に結核最多のアジア地域) で大問題。有効な治療法がない。
 - (4) HIV、多剤耐性結核増加はDOTS戦略の変更、DOTSプラス多剤耐性結核治療、ワクチン開発必要。
 - (5) BCGに代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。BCGは成人には有効でない。多剤耐性結核菌に対する宿主側の防御機構と菌側の要因との両面からの解明が切望。
 - (6) 日本における外国人結核の発生と治療実態把握及び対策・制御による結核輸入感染症の日本国内への流入・蔓延防止の飛躍的な成果。国際医療センター・国立病院機構呼吸器ネットワーク・保健所・結研の全国レベルの研究 (情報収集等) で早期に予防・治療等の対策・制御の成果が期待。
 - (7) 日本語学校、外国人雇用事業所で、早期発見の定期健診(QFT)を実施し、成果が期待。
 - (8) アジア諸国との研究ネットワーク (すでに確立) を一層強固にし、結核の分子疫学と宿主要因研究。外国人結核が多い (母国) 中国・韓国の結核情報 (日本の結核への影響) で日本への結核流入防止。
 - (9) 新しい結核予防ワクチン (BCGより1万倍強力なHSP65+IL-12DNAワクチン) で多剤耐性結核制御。
 - (10) 結核治療ワクチン、新化学療法剤の開発。アジアに蔓延の多剤耐性結核、XDR-TBに対し制御成果。
 - (11) スーパー・スプレッダー多剤耐性結核(S・S MDR-TB)及び超薬剤耐性 (XDR-TB) の対策。医療費節減。
 - (12) 先進諸国における移民結核対策の調査により、世界の標準的な移民結核対策・制御の成果が期待。
1. [日本における外国人結核] (表5, 6) (図3)
- (13) わが国の外国人結核は、先進諸国の場合と同様に増加傾向にあり、低い治療完遂率、高い薬剤耐性率などの問題が指摘されている。一般に結

核蔓延国では薬剤耐性率が高く、多剤耐性の率も高いため、外国人由来結核菌の国内への持ち込みは新たな脅威として認識されている。これに対して様々な対策がとられてきたが、本年度の研究では、外国人結核の発病と治療の現状を把握することを目的に、当センターにて最近2年間に経験した外国人結核の臨床的特徴について検討する。これまでの研究では入院患者を対象としてきたが、今回の研究では外来患者も対象に含めて検討する。また、外国人結核の臨床像や菌の薬剤耐性における特徴を明らかにするために、日本人結核との比較を行う。さらに、外国人結核患者由来の菌株を取得し、分子疫学的解析を行い、特定の菌株が特定の集団に蔓延しているかどうかを明らかにする。

- (14) 日本の20才代の新規登録結核患者の1/5は外国人結核患者であり、その割合は増加傾向である。医療領域でも外国人スタッフを導入する計画が進められている。当院で治療している外国人結核は少数であるが、外国人の医療スタッフの研修が行われている。活動性結核治療ばかりでなく、今後に向けて潜在性結核治療や感染、発病予防を考える必要がある。
- (15) 大阪市に登録される在留外国人 (日本国以外で出生した外国籍の者) の結核患者の発生状況と治療、患者管理の実態、菌情報を把握・分析し、適切な対策を検討した。大阪市に登録される在留外国人結核患者は、専門学校生、学生、就労者の増加とともに年々増加しているため、対応を整備する必要がある。そのため、在留外国人結核患者の発生状況と菌情報、治療、患者管理の実態を把握・分析し、適切な対策を検討する。特に早期発見早期治療、治療完了率を高めるために、定期健診および接触者健診の方法、患者管理および言葉やコミュニケーションの解決方法も検討する。
- (16) 結核の罹患率は低下してきているが、先進諸国の例から、今後日本でも外国人の結核が増加する可能性が考えられる。神戸市での外国人結核の現状を調査し、問題点を把握し、今後の結核感染予防対策の示唆を得ることを目的とする。
- (17) 外国人の結核は、西欧や米国では大きな問題になっている。日本に於ける在日外国人結核の状況を把握することにより、今後の対策を展望することを目的とする。
2. [アジア諸国の結核分子疫学研究と宿主要因解析 (ネットワーク研究)] (表5, 6) (図3)
- (18) 近年、日本から中国、韓国、台湾への渡航及び

それらの国からの来日者が増加している。人の移動に伴い結核を含めた感染症がアジア地域内の国々に広まる可能性も考えられる。また、これらの国々では、北京型結核菌が広まっているという共通の地域性があり、他の地域とは異なる大きな特徴を持っている。そこで、東アジア諸国内で共通で利用できる結核菌型別システムの構築を目的として共同研究を開始した。結核菌の型別法として、比較が難しいIS6110制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析ではなく、迅速で容易に型別結果を比較できる反復配列多型 (VNTR) 分析法を採用した。VNTR分析では、分析ローカスの選択が分解能を決定する上で最も重要である。将来のデータベース化および型別データの比較には共通のローカスで結核菌の型別を行う必要がある。それぞれの研究者間でコンセンサスを得る必要がある。そのために各国から結核菌の分子疫学を専門とする研究者を集めて会議を開き議論を行った。東アジア諸国で共通のVNTR分析システムを構築し、型別情報のデータベース化できれば、例えば、各国において広がっている多剤耐性菌や病原性の高い株の型別情報を共用することができる。

- (19) わが国の外国人登録者数は、アジア人が全体の70%以上を占め、アジア人の結核対策が外国人結核対策に重要である。わが国の日本人の多剤耐性結核の頻度は低い、外国人では、数%以上の頻度で、多剤耐性結核が認められるため、今後、先進国がたどった道と同じように、わが国でも、外国人結核対策が、多剤耐性結核対策と密接に関連する可能性が高い。特に増加しているアジア人の多剤耐性結核の発症素因を明らかにすることは、対象国とわが国、双方の多剤耐性結核対策に貢献するものと思われる。我々は、これまでベトナム、タイにおいて、結核研究の拠点研究をおこなってきた。多剤耐性結核に関しては、人為的要因や制度上の問題のみならず、その背景となる宿主側の免疫応答、薬剤代謝能などが関与していると推測される。そこで、本研究では、ベトナム人多剤耐性結核の宿主要因を分子遺伝学的な手法により明らかにする。
- (20) わが国と人的物的交流の盛んな中国における多剤耐性結核の流行状況は十分に明らかになっていない。中国東北部における多剤耐性結核の薬剤耐性遺伝子同定を行うことで、これらの結核がわが国に侵入してきた際の迅速な対応

に資する。

3. [新結核ワクチン・診療・治療](表5, 6) (図3)
- (21) 結核発症の再興、HIV感染の結核高頻度合併、多剤耐性結核の多数発症が日本のみでなく世界中 (特にアジア地域) で大きな問題となっている。(図2) 一方、HIVの流行、多剤耐性結核の増加はDOTS戦略に変更をもたらしつつある。すなわち、DOTSプラス多剤耐性結核治療、新しい結核ワクチン、新しい治療薬の開発が必要である。多剤耐性結核は ①莫大な費用 (一般の結核患者に比べ) ②治療困難 ③発病予防の困難性 等の問題がある。(図4)
- (22) したがって、アジア地域との研究ネットワークを活用して、 ①多剤耐性結核疫学調査に基づく制御 ②強力な新しい結核予防ワクチンで発症予防 ③新しい結核治療ワクチン ④新しい結核化学療法剤 ⑤新しい早期結核特異的診断法と多剤耐性結核予後診断法 ⑥多剤耐性結核患者の宿主要因 ⑦菌側の要因—迅速な薬剤感受性遺伝子変異診断、TLR認識 ⑧スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌の対応 —病室の陰圧・個別化 ⑨新しいT細胞免疫療法の普及 ⑩DOTSの普及 ⑪HIV感染症制御 ⑫セカンドライン抗結核薬、外科療法 による多剤耐性結核の制御を目的とする。
- (23) 多剤耐性結核を制御するには、耐性菌にも有効な新規化学療法剤の開発に加え、予防・治療に有効な新規ワクチンなどの治療法を開発する必要がある。特に、主に乳児期に接種されるBCGと相乗効果を認める新規ワクチンの開発に成功すれば、多剤耐性結核を含む成人結核の制御に有用な治療法となる。そこで、本事業では多剤耐性結核の制御に有効な新規治療用ワクチンを開発する事を目的として研究を行った。これまでの研究により、抗原遺伝子であるHSP65遺伝子と免疫活性化遺伝子であるIL-12を同時に発現するDNAワクチン (プラスミドDNA) をアジュバント兼DDSであるHVJ-Eに封入した組成物が、マウス、モルモット、カニクイザル、ヒト骨髓細胞を移植したマウス (SCID/hu)のそれぞれの結核モデル動物において有効性を示す事が明らかとなっている。そこで、本年度は臨床応用を目指して前臨床試験のデータ取得と、臨床研究用のGMP製造を実施できるレベルの技術を確立する事を目的として研究開発を行う事とした。

- (24) 自然免疫系は、病原体の宿主内への侵入を最初に察知し、種々の炎症・免疫応答を誘導する重要な免疫系である。最近、Toll-like receptor (TLR)ファミリーの機能解析により、自然免疫系の活性化機構が明らかになり、TLRを介した自然免疫系の活性化の生体防御における重要性が明らかになった。結核菌に対する生体防御においても、自然免疫系が結核菌の認識が重要な役割を果たす可能性が考えられる。本研究では、自然免疫系による結核感染防御機構を明らかにし、多剤耐性結核菌に対する、自然免疫系の活性化を利用した新規治療法の開発への基盤を提供することを目的とする。
- (25) 分子疫学的手法と分子生物学的手法を駆使し、多剤耐性結核 (MDR-TB) の感染性と感染様式を探索する。その結果を元に、結核病棟ならびに市中における感染対策を構築する。
- (26) 結核菌に対する薬剤感受性検査には、従来1ヶ月以上を要していた。結核患者は、入院時には薬剤感受性が不明であることがほとんどであり、そのために、結果判明までの期間、耐性結核患者と感受性結核患者が同室に収容される可能性がある。近年多剤耐性結核による再感染事例が報告され、多剤耐性結核患者の迅速な診断・隔離の必要性が強調されている。今回我々は、リファンピシン (RFP) の耐性遺伝子である *rpoB* の変異を検出することにより RFP 耐性を迅速に診断し、ひいては多剤耐性を迅速に診断する試みにつき検討した。
- (27) 多剤耐性結核、難治性結核患者の前向きコホートを含めた人と菌の検体バンクを活用し、日本への伝播も検討した疫学研究を目的とする。岡田班本体が掲げる、①日本における外国人結核の発生状況と診断・治療の実態把握及び対策・制御、②アジア地域との研究ネットワークの活用、③多剤耐性結核の制御、④新しい結核ワクチン・診断法の開発という全体目標への貢献を目指し、①に対しては、タイの結核患者の菌が来ているかどうか、外国人結核患者を含む菌体を10年以上保存している複十字病院等の菌体バンク等を活用し分子疫学的検討する。②-④については、タイ NIH という日本が建設してアジアの中心研究機関に育ててるネットワークの基に、前岡田班時代より進めている多剤耐性結核と難治性結核患者の正常治癒例と比較した検体バンクとコホートを、日本には少ない HIV 感染毎の情報も持ちながら補強し、疫学研究を遂行する。

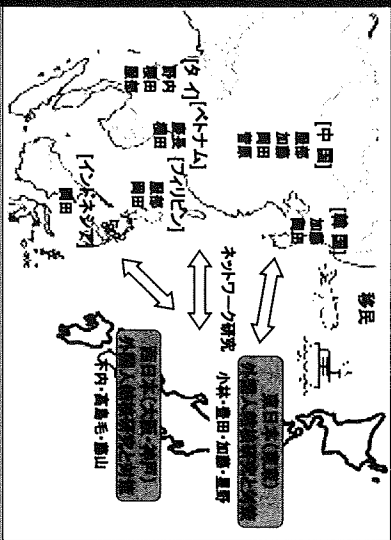
4. [先進国の外国人結核対策] (表5, 6) (図3)

- (28) ニューヨーク市では2008年には市の結核患者全体に占める外国生まれの患者が全体の76%を占めている。外国人の患者が多くなると、英語が話せない者、医療保険を有さない者、経済的に困窮している者に対応する必要がある。この状況に対するために結核対策の保健医療組織を改編し、人材の育成と配置を行い、そのための大幅な財政投資が行われ、見事に結核問題の克服に成功している。近年は罹患率の高い外国人に対する結核対策を強化してきている。わが国よりも結核罹患率が20年先を歩んでいるニューヨーク市の結核対策を検討することにより、わが国のこれからの結核対策のあり方を明らかとすることを目的として実施した。

研究成果

輸入感染症としての多剤耐性結核の対策・制御に関する研究

(日本における外国人結核の対策・制御研究とアジア諸国の結核対策研究ネットワークの確立・活用による多剤耐性結核制御)



日本

アジア諸国の結核対策研究ネットワークの確立

岡田、加藤、野内、服部、慶長、櫻田、菅原

日本の外国人結核

岡田、小林、豊田、下内、星野、加藤、藤山、高島毛、竹田、切替、坂谷

I. 日本の外国人結核

1. 日本全国: 調査票(外国人結核)作製。全保健所・病院800施設。2735名。20代、中国・フィリピン・韓国、入国3年以内多い。多剤耐性3.4%で日本人結核より多い(岡田)。労働者、学生。
2. 東京: 国際医療センター・東京病院。多剤耐性結核、耐性結核も高い。薬剤耐性の獲得は母国。特定の菌株蔓延(RFLP)。(小林、豊田)
3. 大阪: 学生が多く、集団感染。日本語学校の定期健診必要。大阪市流行株なし。母国で感染。(下内、岡田)

ワクチン	マウス	モルモット	カニクイサル	ヒト
HVAエンペローグHSP65 DNA + IL-12	BCGより1万倍強力な予防ワクチン効果	効果	効果	計画中
	結核治療ワクチン効果	計画	効果	計画中
	強力な多剤耐性結核・XDR-TB 治療効果	計画	計画	

IV. 先進国の情報

ロンドン・ニューヨーク・サンフランシスコの外国人結核75%。外国人結核減少にQFT有用。(高島毛、岡田)

II. アジア諸国

【結核菌分子疫学研究と宿主要因解析(ネットワーク研究)】

1. 中国・韓国(加藤、服部、岡田、Ling)
- ①アジアでの感染伝播状況の解析。3カ国(日本、中国、韓国)の分子疫学共同研究会。VNTRのMST解析で、日本、韓国の結核菌は“祖先型”。上海、北京、は“蔓延型”で、遺伝的背景異なる。韓国株(K strain)はRD181陽性で日本株とも分離可の発見。中国株と日本株分離可の発見。
- ②ハルビンでS-S多剤耐性結核・遺伝子解析。中国からの日本移民にS-S多剤耐性結核発見。(服部、岡田)
2. タイ(野内、櫻田、Pathom)。難治性結核でGranulysin低下。

III. 新しい結核治療ワクチンの開発・迅速診断入院法の開発

1. 多剤耐性結核の治療ワクチンHSP65 DNA+IL-12DNAを発見(サルで)。XDR-TBに治療効果。(岡田、Tan)
2. 100%生存率の予防効果。前臨床試験データを取得(毒性・安全性試験)。臨床用のGMPレベル製造実施。
3. Graワクチンは結核治療効果(岡田)。リポカリン2、SLPIによる結核菌抑制機構解明(竹田)。
4. (rpoB変異)多剤耐性結核の迅速入院法を構築。(岡田)

表5

研究目的

(意義)

1. 近年、輸入感染症としての多剤耐性結核が問題。①日本国内への流入・蔓延防止 ②日本の外国人結核年々増加 ③費用莫大。治療困難。新結核ワクチン、治療薬必要。
2. 多剤耐性結核の多数発症が日本・世界(特にアジア地域)で大問題。
3. BCGは成人には無効。

(目的)

1. 日本における外国人結核の発生と治療実態把握及び対策・制御による結核の日本国内への流入・蔓延防止。国立病院機構呼吸器ネットワーク・国際医療センター・保健所・結研の全国レベル研究(情報収集)で早期予防・治療ガイドライン作成の対策。
2. アジア諸国との研究ネットワークを活用し、結核の分子疫学と宿主要因研究。外国人結核が多い(母国)中国・韓国の結核情報(日本の結核への影響)で日本への結核流入防止。
3. 新しい結核予防ワクチン(BCGより1万倍強力なHsp65+IL-12DNAワクチン)で結核制御。
 - ・結核治療ワクチン、新化学療法剤の開発。アジアの多剤耐性結核、XDR-TB制御成果。スーパー・スプレッダー(S・S)多剤耐性結核対策。
 - ・多剤耐性結核迅速診断法・迅速入院法の開発。
4. 先進諸国の移民結核対策の調査により、有効な移民結核対策・制御。

表6

研究の目的、必要性

[必要性]

- ① 日本国内への流入・蔓延防止。
- ② 日本の外国人結核は年々増加。
- ③ 多剤耐性結核は a莫大な費用 b治療困難。新結核ワクチン、新治療薬必要。

図3

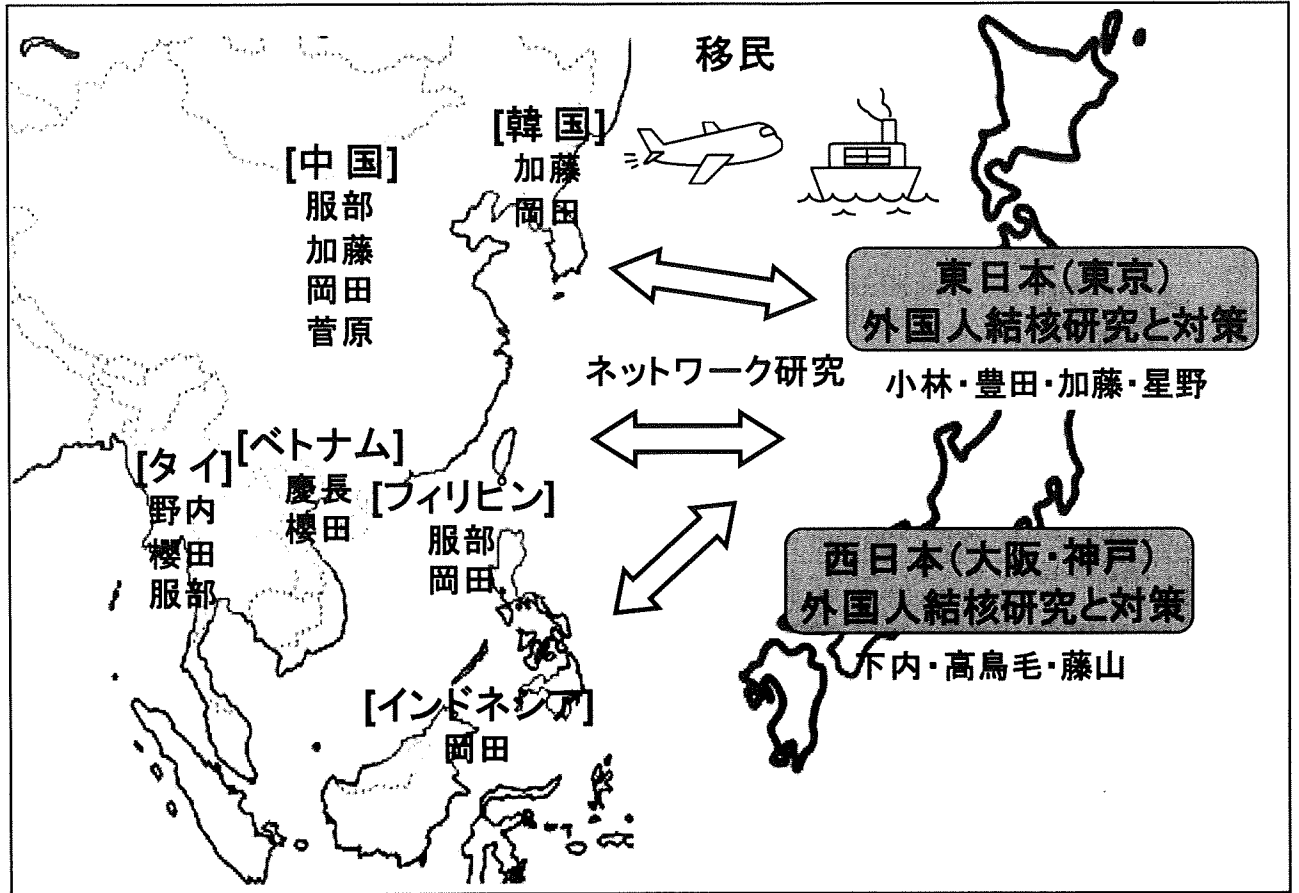
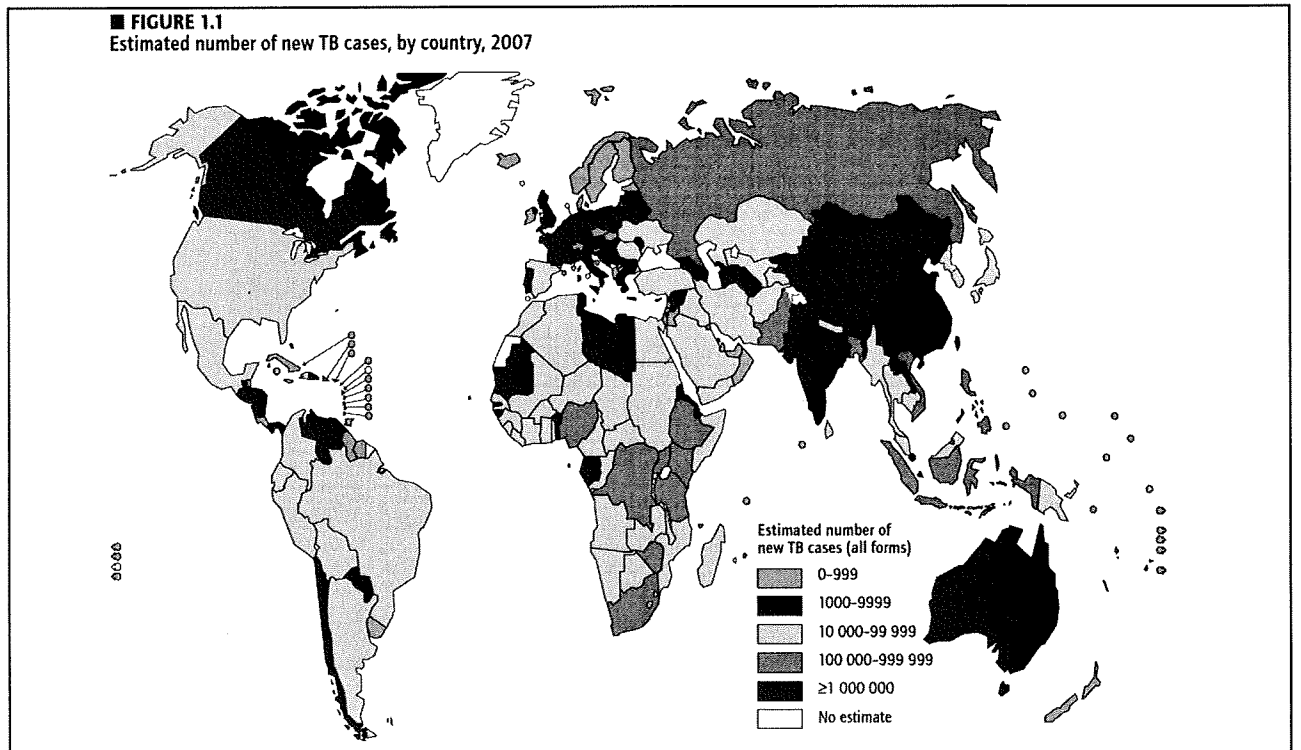


図4



B. 研究方法 (図2)

1. 日本における外国人結核

- (1) 当班で新たに外国人結核調査票を作成した。[平成20年度厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)総括研究報告書岡田全司班]。日本全国保健所527施設と結核診療施設273施設の合計800施設に送付した。過去3年間の外国生まれで外国国籍を対象者とし、2700人の多数の情報を解析。
- (2) 国立国際医療センターにおいて2007年1月から2009年9月の間に診療した85名(そのうち入院42名)の外国人結核患者を対象として、性別、年齢、国籍、社会背景、基礎疾患、合併症、塗抹、培養、薬剤耐性、転帰などの臨床的特徴について調査し、日本人結核患者(最近1年間に診療した271名)との比較検討を行った。結核菌の薬剤感受性に関しては、2004年1月~2009年11月に得られた外国人由来結核菌135株と日本人由来結核菌1613株について比較検討した。多剤耐性結核に関しては、外国人と日本人における臨床像の違いを検討した。比較結核菌の解析には、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析、VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats)解析、薬剤感受性試験、薬剤耐性遺伝子のシーケンス解析といった分子疫学的及び分子生物学的手法を用いる。2000年1月から2008年12月までに診療した外国人結核患者に由来する菌株を単離培養する。ゲノム抽出後、IS6110プローブを用いるRFLP解析とMycobacterial Interspersed Repetitive Unit (MIRU)を用いるVNTR解析を実施する。薬剤感受性試験はビットスペクトルSR(極東)もしくは1%小川培地を用いる比率法によって実施する。シーケンス解析は、各薬剤耐性遺伝子をPCR増幅した後、ダイレクトシーケンス法によって塩基配列を同定し、変異の有無を確認する。クラスター解析を実施し、特定の菌株が特定の集団に蔓延しているかどうかを明らかにする。
- (3) 患者情報については、2006-2009年に新規登録された在留外国人結核患者に関して、患者票に記載されている項目から患者の特性、結核の病態、治療結果について調査した。菌情報については、2007-2009年にかけて大阪市内で分離され、環境科学研究所に搬入した在留外国人結核患者の菌株36株を、JATA-VNTRによる型別解析を行った。これを2006年以降に解析された市内患者由来株(550株)と比較解析を行い、同一パターンを示す株を抽出し、さらに詳細なHV

領域解析を行った。また、外国人結核患者由来株を北京型および非北京型に分類した。

- (4) 当院治療中の外国人結核患者数は少ないが、年間10人前後で、HIVやMDRの症例も認める。当院2004年以降の結核患者データベースより外国国籍の結核患者を抽出して、データを収集解析した。また外国人医療スタッフの潜在性結核感染治療の是非も含めて、諸先進国の外国人結核対策について情報収集を開始した。
 - (5) 在日外国人結核患者数の推移について、結核発生动向調査と出入国管理統計、在留外国人統計、不法残留者推計を用いて背景を検討する。
- ### 2. アジア諸国の結核分子疫学研究と宿主要因解析(ネットワーク研究)
- (6) 日中韓台分子疫学研究会議
平成22年1月26日から28日まで結核予防会結核研究所において研究会議を開催し、各国における結核の状況や対策および型別に関する研究状況について発表してもらい、今後進める共同研究について議論した。(資料参照)
和田らの研究から、日本、中国、韓国で広まっている結核菌は、進化の段階つまり遺伝的背景が異なること明らかにされた。この結果からVNTRの最適ローカスが異なること示唆されたため、すべて共通なシステムではなく各国で利用できる共通のコアとなるVNTRシステムを共同で構築することとした。この分析システムなら必要であれば、それぞれの国で独自にローカスを追加することにより、人口ベースの分子疫学調査に応用できるシステムに発展させることも可能である。
 - (7) 平成19年度に先行研究にて採取された臨床試料を用いる。患者群は、①健常者、②結核患者、③HIV感染者HAART(-)、④HIV感染者HAART(+), ⑤HIV合併結核患者(HAART(-))の5群とし、サンプル数として、血漿中のオステオポンチン(OPN)ならびに各種cytokineの測定は、それぞれ①25名、②23名、③10名、④17名、⑤6名で行った。また、in vitroで単球より分化したマクロファージによるOPNの測定に関しては、①11名、②10名、③8名、④12名、⑤3名で行った。血漿中および培養上清中のOPNおよび各種cytokineとCRPの濃度はELISAによって決定した。また、結核患者喀痰からの結核菌の培養は、卵培地とMiddlebrook 7H9 brothを含む液体培地を併用した。
 - (8) ベトナム国内南北2カ所の薬剤感受性検査が可能な結核レファランスセンターのうち、ベトナム南部の拠点病院であるホーチミン市のファムゴック

タック病院は、ホーチミン市とその近隣の結核対策の責任病院でもあり、本研究班における枠組みの中で、初めて共同研究を申し入れた。研究プロトコルを作成し、薬剤代謝酵素 (NAT2など) を、耐性結核の宿主要因の候補遺伝子として、その特徴的な遺伝子変異、アジア人の遺伝子分布の特徴を明らかにするための遺伝子タイピング法を確立した。

3. 新結核ワクチン・診療・治療

(9) DNAワクチンの作製とカニクイザルへのワクチン免疫方法

カニクイザルの免疫実験のため、ヒトIL-12p40, p35両遺伝子を健常人のPBMCよりクローニングした。DNAワクチン用ベクターとしてIL-12p40 p35融合タンパクを発現するプラスミドベクターを構築した。構築したIL-12p40 p35DNAワクチンとHSP65 DNAワクチンはHVJ-liposomeに包埋し、カニクイザルに接種した。(岡田、吉田、金田、Reed, Gillis)

米国NIH branchでWHOの支援研究機関であるLeonard Wood Memorial研究所 (フィリピン、セブ) で行った。Leonard Wood Memorial研究所は世界で唯一多数のカニクイザルをP3レベルで結核研究できる施設である。この研究室からNatureに1996年、カニクイザルが最もヒト結核に近いモデルである有名な研究が発表された。Dr.Babie Tan, Dr.Cruz(Leonard Wood)との共同研究で行った。

各ワクチンを3週間隔で3回予防ワクチン 5×10^6 cfu皮内投与 (0.1mlの生食に浮遊) した。HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNAはi.m.投与した。最終ワクチン投与4週後に強毒ヒト結核菌クロノ株を気道内投与した。

カニクイザルを用いて、以下の結核予防治療ワクチン効果を解析した。

<実験OKADA V>

(1)治療ワクチン効果の解析

(2) HVJ-エンベロップ・パウダー/pVAXベクターを用いた解析 (図4)

(3) pVAXベクター-HSP65DNA+IL-12DNAを二つ同じ遺伝子上に導入

G1 HVJ-エンベロップ・パウダー/pVAX HSP65DNA+IL-12DNA

1週間に3回

連続3週間合計9回 i.m

G2 BCG東京(priming 1回)+ HVJ-エンベロップ・パウダー/pVAX HSP65DNA+IL-

12DNA(booster 8回)

G3 BCG東京(priming 1回のみ)

G4 生食投与 (コントロール) 各5匹

ヒト型結核菌を気道内注入後、1週間後に治療ワクチンを開始。2~3日毎に3週間連続、合計9回ワクチンをi.m投与治療ワクチン効果は、生存率、胸部X線、血沈、体重、体温、PPD皮内反応ならびにワクチン投与ザルの末梢血Tリンパ球の増殖増強反応で解析した。末梢血T細胞をリコンビナントHSP65 10 μ g/ml、PPD 10 μ g/ml、PHA-P 0.2%で刺激し、3H-サイミジンuptakeの方法で三日後に増殖活性を測定した。上記の検査は、①ワクチン投与前、②ワクチン1回目投与後3週後、③2回目投与後3週後、④3回目投与後3週後、⑤TB菌投与4週後、⑥TB菌投与8週後行った。

<実験OKADA VI>

プライムブースト長期間隔を用いた結核予防ワクチン効果 (カニクイザルを用いた)

Prime-4ヶ月-boost-1ヶ月-boostの間隔で特にPrimeと1回目のboostの間隔を4ヶ月と長期あけた。

	Prime	Boost
G1	BCG	HVJ-エンベロップ/ HSP65+IL-12DNA
G2	HVJ-エンベロップ/ HSP65DNA+IL-12DNA	BCG
G3	HVJ-エンベロップ HSP65+IL-12DNA	HVJ-エンベロップ HSP65+IL-12DNA
G4	BCG	(-)
G5	(-)	(-)

各5匹

3回ワクチン投与後、最終免疫より4週間後にヒト型結核菌Erdman株を 5×10^2 個気道内注入した。予防ワクチン効果は、1年以上にわたり、生存率、胸部X線、血沈、体重、体温、PPD皮内反応ならびに末梢血リンパ球の増殖増強反応で解析した。

(10) <実験OKADA VII>

HSP65DNA+IL-12DNAワクチンにマウスの系で結核ワクチン効果を示したAg85B DNA+Ag85A DNAワクチンを追加して、より強力な結核治療ワクチンの開発を行った。

G1 HVJ-エンベロップ/ HSP65DNA+IL-12 DNA+ Ag85B DNA+Ag85A DNAワクチン投与群
G2 コントロール生食投与群

各5匹

ヒト型結核菌Erdman株 5×10^2 CFUをカニクイザルの気道内注入感染後4週間後にHVJ-エンベロープ/ HSP65DNA+IL-12DNA+Ag85B DNA+Ag85A DNAワクチンを400ug筋肉内注射した。2週間毎に合計6回ワクチン治療投与を行った。治療効果の評価は生存率、延命効果、胸部X-P、赤沈、体重、PPD反応、免疫反応で1年間観察・検査し評価を行った。

- (11) 多剤耐性結核菌に対する初めての治療ワクチン開発：結核に対する有効な治療ワクチンの報告は全くなされていない。したがって、我々はHVJ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンを用いて、治療ワクチン効果を解析した。DBA/1マウスに多剤耐性結核菌 5×10^5 をi.v.投与した後1日後、8日後、及び15日後に

①HVJ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチン

②BCGワクチン

③HVJ/HSP65DNA+IL-12DNA及びBCGとの同時投与

④ (HVJ /HSP65DNA+IL-12DNA) ワクチンとBCGワクチンのpriming-boosterワクチンを投与する方法を用いて強力なる予防効果を示したことより、この方法でも治療効果を解析した。

多剤耐性結核菌投与30日後、すなわち3回目の治療ワクチン投与2週間後にDBA/1マウスをsacrifyした。肺臓・肝臓・脾臓をホモジナイズし、結核菌数を7H11寒天培地で2週間培養し、CFUで測定した。

免疫応答は脾細胞のサイトカイン産生及びリンパ球のBrdU増殖反応で解析した。

- (12) Priming-Boosterワクチンの開発 (カニクイザルの系で)

本邦では6ヶ月までにBCGワクチン接種が行われることより、成人(小学生、又は中学生も含む)ワクチンにおける有効なboosterワクチンの開発が切望されている。

したがって、HSP65DNA+IL-12DNAワクチンとBCG東京ワクチンのpriming-booster結核予防ワクチン効果を解析した。

PrimingとしてHSP65DNA+IL-12DNAワクチン、boosterワクチンとしてBCG東京を用いる系で解析した。

さらに、BCGワクチンをprimingワクチンとし、DNAワクチンをboosterワクチンとする方法を比較検討した。

Primingを1回行い、3週間隔でboosterワクチンを

投与した。3回免疫後、4週後にH37Rvを感染させ、結核菌に対する予防ワクチン効果を解析した。

- (13) 臨床応用を開始するには、安全性試験、有効性試験、安定性試験などの前臨床試験データの取得が必要である。また、臨床応用のためのGMP製造を開始するには、製造工程、品質管理工程、施設・機器のバリデーション(性能、品質の実証)をガイドラインに従って実施する必要がある。

そこで、前臨床試験については、薬効の実証、薬理メカニズムについては既に解析が進んでいるため、GLPグレードの安全性試験とGMPグレードの安定性試験についてそれぞれ必要なガイドラインに従ってデータの取得を進めることとした。

また、GMP製造については、治験薬GMP製造のためのガイドラインに準拠して手順書・組織の整備を進めた上で、バリデーション(施設・機器についてはクオリフィケーション、工程についてはベリフィケーションとも表現する)を進め、実際に臨床応用(臨床研究)のためのGMP製造を実施する事とした。

- (14) 自然免疫系の結核感染防御への関与について、これまでTLRを介したシグナルの消失するMyD88/TRIF欠損マウスを用いて解析し、自然免疫系の活性化の重要性を明らかにしてきた。これまでの解析は、マクロファージ、樹状細胞を標的としてきたが、自然免疫応答はこれら貪食細胞に限らず、最初に結核菌に出会う上皮細胞も深く関与している。そこで、結核菌の気道感染により上皮細胞で誘導される遺伝子を検索した。さらに、この遺伝子(secretory leukocyte protease inhibitor: SLPI)を発現ベクターに組み込み、組み換え分子を作製し、結核菌やワクチン株BCGの試験管内で増殖に及ぼす影響を解析した。次に、SLPIによる結核菌増殖抑制機構を解析するため、走査電子顕微鏡による結核菌の形態変化、さらに1-N-phenyl-naphthylamine (NPN)を用いた細胞膜透過性亢進試験を行った。また、SLPIタンパク質の結核菌増殖抑制に必須の部位を種々の変異タンパク質を作製し解析した。最後に、SLPI遺伝子のノックアウトマウスを用いて、結核菌の気道感染を行い、感染感受性を解析した。これらの、解析によりSLPIの結核感染防御における役割を検討した。
- (15) 当院保存中の多剤耐性結核菌株と全剤感受性結核菌に対して、各種分子疫学的方法を駆使し、集団感染の有無と感染様式の比較を行う。RFP耐性遺伝子であるrpoBの変異の有無を迅速に判定する事で、MDRTBの迅速スクリーニングを行い、速やかに隔離処置をとる。

(16) 対象は、平成19年11月から平成20年11月までの間に、当院で喀痰検体に対してPCR検査を行い結核菌群陽性と判定された331例である。これらを対象に、ジェノスカラー-RifTBによるrpoB遺伝子検査を行い、培養菌に対するMGIT法・小川比率法による従来の感受性検査との比較検討を行った。

4. 先進国の外国人結核対策

(17) 平成21年9月17日（木）～27日（日）の間に行政、研究、医療に関わる施設を訪問して、結核対策の現状について調査を行った。訪問した施設は以下の通りである。

- ① NEW JERSEY MEDICAL SCHOOL Global Tuberculosis Institute
- ② Department of Health of New York State
- ③ Bureau of Tuberculosis Control of New York

City

- ④ Corona Chest Center of New York City
- ⑤ Public Health Laboratory of New York City
- ⑥ Bellevue Hospital Center of New York City

C. 研究結果

I. 日本における外国人結核

(1) 当班であらたに外国人結核調査票を作成し、日本全国保健所と結核診療施設の合計800施設に送付し、多くの584施設（73%）より回答を得た（表7）。この約2700症例を解析した。20歳台が最も多く、次いで30歳台であった（表8）。男性も女性も同じ傾向であった。女性の方がやや多くを占めた（58%）。

表7 対象者 : 外国人結核 (外国生まれ・外国国籍)
調査施設

保健所	送付	回答	
		施設数	症例数
保健所	527施設	432施設	2,114件
国立病院機構	54	38	347
結核病床を有する病院	219	114	274
計	800	584(73%)	2,735

表8 性別・年齢

