

らに、in vitroのヒト・キラーT前駆細胞からエフェクター・キラーT細胞への分化にも15K GranulysinタンパクはキラーT分化因子とした作用することを明らかにした。また、15K GranulysinはIL-6やIL-2と相乗効果的にキラーT細胞の分化を誘導した。すなわち、Granulysinは結核菌を直接殺傷する効果以外に、キラーTの分化誘導を介して抗結核作用を発揮することが示された。

(16) 動物の安全性試験 (図32)

まず、ラットによるin vivo 遺伝毒性試験として、ラット小核試験を実施した。ラット皮下に被験物質であるHVJ-Eを投与限界量まで投与し、投与24時間後と48時間後に血液細胞と骨髄細胞を採取し、標本細胞中に認められる幼若赤血球の比率を求めた。その結果、指標となるMNIE (%、幼若赤血球2000個に対する小核を有する幼若赤血球の発現率)及びIE (%、赤血球1000個に対する幼若赤血球の比率)のいずれについてもHVJ-Eの投与による遺伝毒性は認められなかった。次に、カニクイザルを使用した心血管系に対する安全性薬理試験を実施した。カニクイザルの体内に手術によりに発信機を埋め込み、テレメトリーシステムを用いた心血管系の評価試験を実施した。その結果、HVJ-Eの投与による重篤な異常は特に認められなかった。

②薬効薬理試験

HVJ-Eの投与後の免疫活性化についてマウスを用

いた評価系で検討を実施した。ラットの皮下に被験物質であるHVJ-Eを投与し、その作用により免疫システムを介した薬理作用が認められるかを検討したところ、免疫の活性化を示唆するデータを取得する事ができた。

③製造

新規DNAワクチンの成分であるHVJ-Eについて、医薬品として応用した際に輸送・保存期間をどの程度保証できるかを検討するために長期安定性試験を実施した。その結果、ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: 日米欧医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議)で規定された基準に従って、18ヶ月の有効期限を設定できる事が明らかとなった。また、今後の臨床応用の際に新規DNAワクチンの成分であるHVJ-EをGMPレベルで製造する必要があるため、治験薬GMP製造を想定した体制を確立し、規制当局のガイドラインなどを参考にして製造手順の整備を実施した。また、確立した製造体制や整備した手順で実際に再現性をもって製造を実施できる事を検証するため、実際に臨床用に使用できるレベルのGMP製造を実施した。更に、注射剤を想定した高度無菌化のために新規に凍結乾燥システムを開発し、その性能についても検証を実施した。

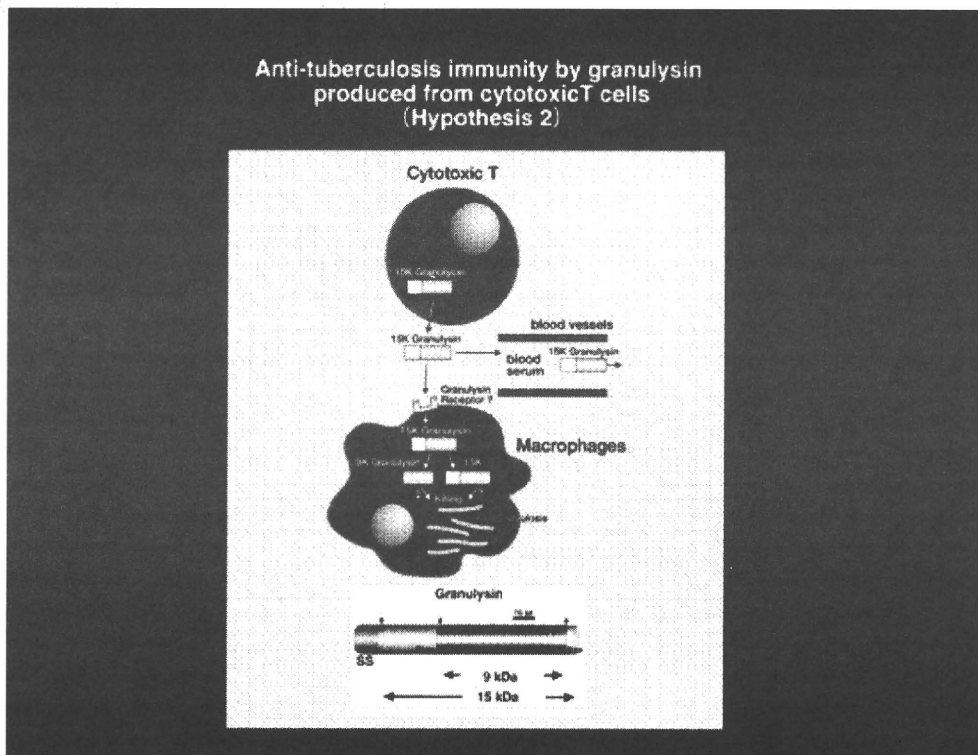
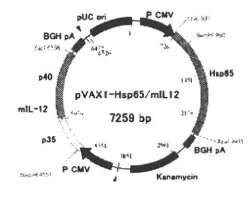


図 3 1

前臨床試験(安全性・毒性試験、GMPレベル製造)と臨床応用

HSP-65とIL12遺伝子は1つのプラスミドで発現される

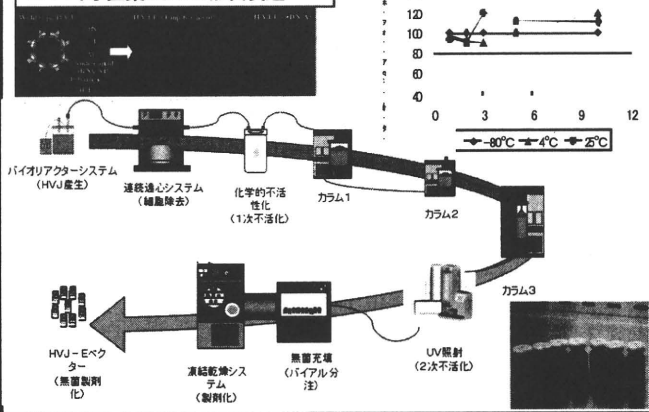


新規結核DNAワクチンの開発状況(まとめ) 岡田、中島

1. 前臨床開発(動物での有効性、安全性試験)
 - ① 有効性(マウス、モルモット、サル、SCID/hu)
 - ② 安全性(サル・ラット、GLP適合試験)実証
 - a. 一般毒性試験
 - b. 安全性薬理試験、TK試験
2. 製造関連(非臨床、臨床試験用製造)
 - ① 長期安定性
 - a. 加速試験、苛酷試験
 - b. 長期安定性試験

HVJ-Eベクターの治験薬GMP製造技術・製剤化技術

1. 精製工程は治験薬GMP製造対応
2. バイオ医薬としての無菌製造



- ② 臨床用のGMP製造実績
 - a. 臨床応用のためにGMPレベルの製造を実施
 - b. 実際に臨床研究用に供給

臨床応用の申請用データパッケージを整備

3. 臨床応用
 - ① フランス研究施設と臨床応用 HSP65DNA+IL-12DNAワクチン
 - ② WHO STOP TB Partnership会議で推奨された(2009年)
 - ③ 臨床研究(大阪大学病院) HVJ-Envelopeベクターは悪性黒色腫に対し第I/II相試験

図32

- (17) マクロファージ細胞株RAW264.7にESAT-6、CFP-10遺伝子を導入したが、CFP-10恒常発現株は単離できたが、ESAT-6恒常発現株は単離することができなかった。CFP-10恒常発現マクロファージをもちいて、この細胞に非病原性のBCGを感染させたところ、CFP-10恒常発現細胞で、有意にBCGの菌数が増加した。CFP-10の哺乳類細胞発現ベクターには、Flag、MycタグおよびTEVプロテアーゼ切断部位が挿入されているので、CFP-10恒常発現マクロファージ細胞株から、細胞溶解液を作製し、これを抗Flag、Myc抗体およびTEVプロテアーゼで処理し、これらの処理により抽出されたタンパク溶解液を電気泳動し、抽出されたタンパク質を解析したところ、貪食胞に発現する分子がいくつか同定された。またGST融合ESAT-6タンパク質を持ちたpull down解析でも、ESAT-6に会合する宿主分子を探索した。その結果、従来ESAT-6に会合することが報告されている、TLR2、MHC class I分子が同定されるとともに、貪食胞に発現する分子がいくつか同定された。
- (18) われわれは二つの結核療養所を舞台とした、MDR TB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MDR TB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、MDR TB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、MDR TBの中に感染力の強い菌株が存在する事、

MDR TB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検体に適用し、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が可能となった。(図33)

- (19) 3446例中、LiPA法でRFP感受性、RFP耐性と判定されたのはそれぞれ426例、20例であった。RFP感受性と判定された426例中、425例は従来の薬剤感受性検査でもRFP感受性と判定されたが、1例は耐性であった。また、RFP耐性と判定された20例中、19例は従来の薬剤感受性検査でもRFP耐性であったが、1例は感受性であった。さらにこの20例中、15例はイソニアジドにも耐性を示す多剤耐性結核であった。(図33)

IV. 先進国の外国人結核

1. サンタクララ郡における結核対策の現状
 - 1) サンタクララ郡は、シリコンバレーが近くにあり工場労働者として外国人が多く流入し、外国人の多くはアジア系であった。
 - 2) 結核対策は、結核専門の結核クリニックを設けて対応されていた。クリニックは陰圧設備を有し、検査と外来治療を実施していた。また、患者登録と追跡、呼び出し、外来診療、その間の訪問DOTと結核対策の実務を担っていた。看護スタッフは月に1回、月から金の毎週の週日の訪問は公衆衛生アシスタ

ントが行っていた。特徴は多言語対応できるスタッフを雇用して患者に対応していたことである。

3)患者のほとんどは移民や難民でアジア、アフリカ諸国の人々であった。移民や難民は、入国後、結核等の検診(胸部レントゲン検査、ツ反またはQFT)、必要な予防接種が行われている。検診で活動性結核が見つければ、外来治療が開始され、貧困層や経済困難者には公費負担により治療がなされていた。

4)入院は、治療困難例のみ、短期間に限られていた。感染させる危険が低い患者は在宅生活に移行させ、DOTを実施していた。

5)公衆衛生検査センターは病院に併設されており、QFTの自動分析機(他の病原体EIA検査にも汎用している)をはじめ最新の設備の施設であった。昨年のインフルエンザ蔓延に対応するために近代的なバーコード処理システムが導入されていた。

6)行政の財政問題が深刻であり、合理化による人員削減と経費削減が課題とされていた。

7)接触者と関係者の情報漏えい防止の守秘義務をきわめて厳格に守り、企業で患者発生があった時には職場の換気状況等の環境の調査が詳細に行われ、接触者検診と二次感染防止に力が入られていた。

8)結核対策は、国のガイドラインに原則として従い患者発見、患者登録、管理を徹底されていた。しかし、国のガイドラインを基本にしながらも地域毎に詳細なガイドラインが定められていた。(図34)

D. 考察

I. 日本における外国人結核

国立国際医療研究センターにおいて最近4年間で診

療を行った外国人結核患者は、20~30歳代の若年者が多く、女性の割合が日本人結核患者と比較して多くみられたが、この傾向は以前の調査とほぼ同様の傾向であった。国籍については、全国調査と比べると韓国が2番目に多くなっているが、これは当センターの近くに新宿区の韓国人居住地があるためと思われる。職業に関しては、中国では学生が、フィリピンでは主婦が、ネパールやミャンマーでは就業者の割合が高く、国により違いのあることが示唆された。発見動機については、学生の結核は約半数が健康診断で発見されているに対し、就業者では健診による発見が18%程度と低かった。以上のように外国人結核といっても、その臨床像は出身国による違いがあることは興味深く、その点をふまえた結核対策を立てる必要があると思われる。治療中断例は以前と比べて少なくなっており、病院と保健所の連携、DOTSの徹底、通訳・パンフレットなどのツールの使用が外国人結核の治療脱落の防止に寄与したことが示唆される。

日本における外国人登録者数の多い国ほど、その国の結核患者数は多くなると予想されるが、日本における国別の結核発病率は明らかになっていない。法務省入国管理局による「外国人登録者数」は約220万人(2008年)であるが、国別の登録者数の順位と結核発病者数の順位は一致していない。これには母国の結核感染率の違いのほか、年齢や日本での居住年数も関連していると思われる。日本における韓国、ブラジル、ペルー出身者の結核発病率は、母国における発病率よりも低いことは興味深い。

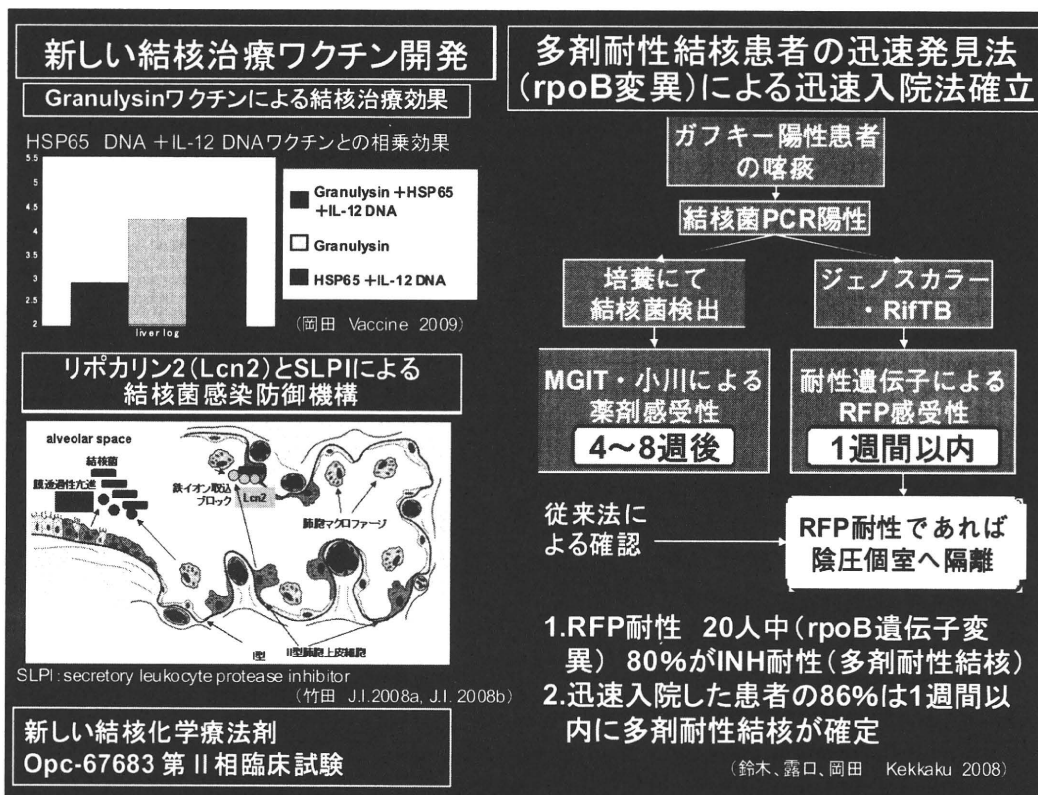


図33

IV. 先進国の外国人結核対策

先進国における輸入感染症としての結核対策の評価(高島毛)

イギリス(ロンドン)

ロンドンでは外国人結核 75%
イギリスでは外国人結核 64%

- 移民の結核問題の解決
- 入国前健診成功せず
- 入国後における移民のプライマリーケアサービス
- 世界の結核対策の感染診断や治療支援投資
- 近い将来低蔓延国の日本の結核対策も同様に必要

米国(ニューヨーク)

ニューヨークでは外国人結核 76%
米国では外国人結核 57%

- 外来治療を中心
- ニューヨーク市のように低まん延状況となるにつれ、結核の専門施設を維持困難。既存の医療機関の中で結核患者に対応できる制度へと変革

米国(サンフランシスコ)

Dr.Masae Kawamura 調査(岡田)
サンフランシスコ
Public Health

ツベルクリン反応診断をQFT
診断に変えてからサンフランシスコの移民結核が62%減少

サンフランシスコにおけるQFT診断法を活用した結核有病率の低下

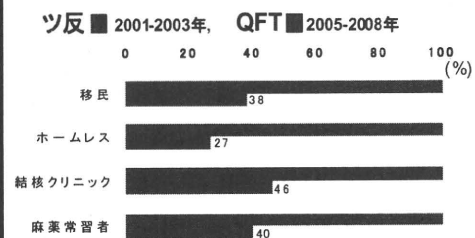


図 3 4

分子疫学解析から、薬剤耐性の集積はみられず、外国人結核患者の中でモダンタイプの北京型結核菌が蔓延している可能性が示唆された。また、これら菌株が分離された患者の国籍は韓国籍・中国籍が過半数を占めた。引き続き全体像解明のため分子疫学解析を実施していく。また、今後の課題として、VNTR解析における標準法の確立が挙げられる。現在、米国疾病管理センターで採用されている方法と、日本独自のJATA(12)-VNTR法がある。本研究ではJATA(12)-VNTRを採用しており、解析結果を他国で実施されたものと直接比較することができない。プロトコール作成も含めて検討していく必要がある。

- (2) 国立病院機構東京病院で過去7年間に入院散らうした外国人結核について検討した。年間の患者数、重症度、治療内容は同年代日本人結核患者と変わらず、もっとも大きな障害は言語であるが通訳の派遣などでどうにか切り抜けられている。退院後の治療継続や治療完遂については少ない人数にも拘わらず十分追跡がされておらず、この点が当院の今後の対策の重要課題である。DOTSの見直しや評価を実施する必要があると思われた。外国籍結核は地域的に偏在しており、むしろ地域とリンクした問題とおもわれる。また20-30代に多く、主な治療の場は外来であり、支援においても日本の結核の半数以上を占める高齢者結核とはある程度異なった対応が必要である。日本の結核は、低蔓延に向かっており、欧米諸先進国の歴史的結核事情

を考えると、今後日本の結核における外国人の割合の上昇が予測され、より重大なターゲットとなるであろう。すでに低蔓延となり、50%以上が外国人である欧米先進国の現状と対策から、よりよい対策を模索すべきと考え文献やWeb site から情報収集した。今回は入国時の結核健診についてであるが、欧米、オセアニアの低蔓延国では、高蔓延国からの難民受入や永住申請では殆どの国で実施されてしているが、他の入国者については、入学時健診、入職時健診以外は一様に行っても効果は少なく費用効果に見合わずむしろ人権問題になりかねない。一時的なスクリーニングではなく地域の対応に根ざした取り組みが必要である

- (3) 大阪市で登録された日本国以外で出生した外国籍の者(外国人)結核患者は、20代に限ると大阪市全体の20%を占め、外国人の中で20-39歳の者は68%を占めていた。また、この年代の外国人の70%が入国後3年未満に発病していた。日本語によるコミュニケーションに不安のある外国人は、入国後早期に日本語学校に通うことが予想される。以上より日本語学校入学後早期に健診を行うことにより患者を早期発見し治療することが期待できると考えられ、日本語学校における結核健診の現状を調査することは有用であると考えた。

感染症法には、「学校(専修学校及び各種学校を含み、修業年限が1年未満のものを除く)の長又は、当該学校の学生に対して、政令で定める定期において、期日又は期間を指定して、結

核に係る定期の健康診断を行わなければならない」と明記されている。今回の研究では、上記学校に該当するものは17校あり、回答を得た14校のうち健診を実施していない4校はいずれも感染症法で結核健診が義務付けられている学校であった。今後は上記学校に対してはもちろんのこと、修業年限が1年未満の者や、結核健診義務のない学校に対しても、健診の重要性を十分に説明し結核患者の早期発見に努めなければならないだろう。

登録された20～39歳の外国人結核患者では脱落者が19% (12/64) と有意に多く、うち5名は治療中に帰国していた。今回の研究で発病者が発見された後の対応について質問したところ、28%の学校は発病者を帰国させ治療をうけさせている、と回答していた。まず本人の希望が優先されることが重要であるが、可能な限り国内で治療を完了し、脱落・中断を防ぐ努力が必要であると思われた。

大阪市において2007年から2009年に登録された日本語学校に在籍する外国人結核患者は14名であり、うち8名は学校健診により発見されていた。一方、今回の研究より同時期に発見された発病者は4名であり乖離がみられた。健診結果を把握していない学校や、回答の得られなかった学校において、発病しているにも関わらず通学し続け、他の学生や教師に感染を広げている危険性が示唆された。日本語学校に対し結核健診を実施することを勧奨するのみならず、要精密検査者が医療機関を受診したかどうか、精密検査の結果がどうであったか、についても学校が正確に把握することを徹底していくことが必要であろう。

- (4) 在留外国人の罹患率は低下傾向にあるが、同じ就業状況の日本人の罹患率の数倍を示しており、患者の早期発見は重要な課題である。具体的には、学生、労働者（特に臨時・日雇い）、家事従事者に対する定期健診の普及や有症状時における医療機関受診の勧奨が挙げられる。また、出身国の結核蔓延状況の改善が、在留外国人の罹患率に影響する可能性があるため、周辺国への対策支援による日本国内の外国人の結核対策への寄与が期待される。

II. 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)

- (5) 東アジア（日本、中国、韓国、台湾）の研究施設で実際に分析に使われているVNTRローカスから選択した10-locus VNTRであるが、中国、韓国、日本でそれぞれ広まっているModem型、RD181陽性Ancient型、RD181陰性Ancient型をグループ分けすることが可能であった。しかし、10箇所だけのVNTR解析なので、個別の結核菌についての型別能は高くないと考えられる。また、このVNTRシステムは北京型結核菌を対象にしたものであり、台湾のように北京型結核菌の割合が低い地域では利用が難しいことが考えられる。そこで、北京型以外の結核菌にも適用可能で、組み合わせることでVNTR自体の型

別能力の向上にも寄与すると考えられる結核菌の遺伝系統情報を調べるシステムの構築を試みた。結核菌の遺伝系統情報は、ゲノムのSNPs解析で明らかにすることができる。しかし、本会議では20箇所候補を絞ったが、どの箇所を何箇所調べると東アジア諸国で共通に利用できるシステムができるか、確認のため実際に分離菌の解析を進めている。SNPs分析による結核菌の系統情報とVNTR分析による型別結果を総合することで、各国で広まっている結核菌の遺伝的背景の同異を客観的に評価することが可能となる。また、SNPs法は特定場所の塩基多型を調べる方法なので、薬剤耐性菌の検出のために利用されているラインプローブアッセイ法の原理・手法を利用し分析することができる。この塩基多型検出系でSNPs解析ができれば、高価な分析機器が必要なDNAシーケンス分析やTaqMan法を利用せず、簡便・迅速に結核菌の遺伝系統情報を調べることができる。今後、このようなSNPs検出システムを構築して、キット化する予定である。

このような研究により各国における結核菌の特徴を明らかにできれば、注目している結核菌を型別することで国際的に感染が伝播している可能性が高いのか、それぞれの国内だけで感染が広がっているか推定することが可能となる。

- (6) 難治化に及ぼす、臨床疫学的因子として、まずHIVの関与が大きい事が示唆された。それは、特に治療完了後に大きく、その後、少しずつ低下している。タイ国チェンライの場合は、山岳民族である事や、投獄歴である事等が危険因子として同定された。今後、再発を予防する対策を立てる上で役立つ必要がある。菌体と宿主要因のそれぞれと相互作用の研究を症例数が大きく必要であり、日本での研究基盤が輸入感染症の検討という観点でも必要である。複十字病院倫理委員会承認が得られたので進めている。複十字病院は10年以上の菌体を保持しており、また文部科学省オーダーメイド医療プロジェクトに協力してヒト検体も収集しているのでタイと平行した研究が可能である。
- (7) ベトナム人における多剤耐性結核と宿主要因の関連について、本研究班で、初めてのアプローチを行った。本年度検討したgranulysin遺伝子の非同義置換と多剤耐性結核については、明確な関連性を認めなかったが、今後、さらに候補遺伝子を加えて検討したい。ベトナム人多剤耐性結核について、具体的な研究プロトコルを協議し、詳細にわたり検討し、倫理委員会承認後、迅速に研究を実施することができたことは、ベトナムとの7年来の共同研究における信頼関係にもとづくものと思われる。多剤耐性菌に関しては、ベトナムでも深刻な問題としてとらえられており、両国に裨益する研究成果が待たれる。
- (8) 結核におけるOsteopontinの産生の亢進は、以前から指摘されてきた。今回、HIV合併結核において血漿osteopontinが著明な高値を示した。

HAARTを行っていないHIV症例であり、CD4+T細胞数も全群の中で最も減少していたが、IFN- γ 、IL-12p40、IL-18、IP-10といったTh1系のサイトカイン・ケモカインの有意な産生亢進を伴っていた。このことから、一般に慢性進行性のHIV感染症においては、HIV特異的な細胞性免疫は強く抑制され、また他の病原微生物に対する細胞性免疫も低下していると考えられているHIV感染症においても、結核を発症し、急速に増悪している時期には、Th1応答ないしはそれに類似した応答が誘導されている可能性が示唆された。しかし、これが抗原特異的な応答であるかは不明であり、むしろgranulysinの実験結果から想像されるように、結核特異的な免疫応答は抑制されているにもかかわらず、強い非特異的免疫応答ないし炎症反応だけが誘導されている可能性も考えられる。また、osteopontinが、このような疾患において、今まで指摘されているようにTh1誘導に正に関与しているかどうか不明である。結核患者およびHIV結核患者血漿におけるgranulysin値については、結核では健常より減少、HIV合併結核では著明に上昇していたことは、granulysinの分子量を明らかにする必要性を迫るものであった。今回、われわれは、HIV合併結核における血漿granulysinの分子量が主として9kDaであるというイムノブロッティングの結果を得たが、サンプル採取、保存、実験中のdegradationによって9kDaの分子量のものが生じた可能性を排除仕切れていない。今後、検討する必要があると考えている。活性化型ビタミンDは、マクロファージの活性化因子と考えられているが、VDRを介したcathelicidineの産生誘導によって、結核菌を殺菌すると考えられている。しかし、この活性系が異なる表現型のマクロファージにおいて、結核菌殺菌時にどのように働いているかは明らかになっていない。培養M-M \square は、結核菌(H37Rv)を10%FBS RPMI1640中で殺菌する。しかし、10%FBS中の25(OH)D $_3$ の濃度は低く、cathelicidineを誘導するレベルではない。従って、M-M \square はVDR-cathelicidineとは異なるメカニズムで結核菌を殺菌していると考えられる。今後、25(OH)D $_3$ の培地への添加によるcathelicidine 遺伝子の発現検討およびキリングアッセイを行って、M-M \square ならびにGM-M \square の活性化における活性化型ビタミンDの関与を明らかにしていく必要がある。さらに、HIV感染群では、BCG感染時のCYP27B1の発現が抑制されている傾向が見られることから、HIV感染によって活性化型ビタミンDによるマクロファージの活性化が阻害されている可能性も考え得る。

1) PT Liu et al, *Science*, 311: 1770-1773, 2006.

2) I Komuro et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105: 12509-12514, 2008.

Ⅲ. 新結核ワクチン・治療・診断

(9) [将来計画]

1. 開発した結核ワクチン (Hsp65+IL-12 DNA ワクチン) を流行地 (アジア地域等) で臨床応

用し、結核予防ならびに結核治療を行う。平成18~19年はこのワクチンの第I相臨床試験。

2. 開発した結核ワクチンならびに化学療法剤 (opc) を流行地で活用し、多剤耐性結核治療。
3. 開発したワクチン・診断法を呼吸器ネット及びWHOネットワークを用い、全国・全世界に普及。
4. granulysinとTLR認識をさらに解明し、薬剤耐性を生じない新しい機序の結核治療剤を開発。
5. BCGに代わる1万倍強力な結核ワクチン (Hsp65+IL-12DNA ワクチン)・化学療法剤・granulysin 予後診断法は日本、世界の結核対策に貢献し、日本国内行政・国際協力施策に極めて重要。
6. 国立病院機構政策医療呼吸器ネットワーク54施設を活用し、多くの国民に実施できる行政施策。
7. スーパー・スプレッダー多剤耐性結核の発見・研究は結核病室の個室化等の重要な行政施策。
8. 新しい結核予防ワクチン・結核治療ワクチン (HVJ/Hsp65+IL-12DNA ワクチン) の臨床応用
 - (1) 開発した結核ワクチン (HVJ/Hsp65+IL-12DNA ワクチン: BCG ワクチンより1万倍強力) がマウスのみでなくモルモットの系でもHVJ-リボソーム/Hsp65+IL-12 DNA 及びBCGと比較してはるかに強力な予防ワクチン効果を示すことを解明する。
 - (2) 開発したこの結核ワクチン (Hsp65+IL-12 DNA) を流行地 (日本、アジア地域、アフリカ、南アメリカ等) で臨床応用し、結核予防ならびに結核治療を行う。
 - (3) このワクチン効果はBCGでプライムし開発したワクチンでブースターする方法が最も強く、本邦において乳幼児 (BCG・プライム) - 成人 (開発したワクチン・ブースター) で結核予防を行う。日本では乳幼児にBCGを接種しており、Hsp65+IL-12DNA ワクチンは成人ワクチンとして極めて強力なワクチンとなることを証明する。
 - (4) 開発した結核ワクチンを流行地 (日本、インド、中国、アジア地域) で活用し多剤耐性結核治療を行う。
 - (5) 開発した結核ワクチン・新しい診断法を本邦の国立病院機構政策医療呼吸器ネットワーク (54施設より組織化され、本邦の50%の結核患者診療) を用い、全国に普及させる。当院は呼吸器疾患 (結核を含む) 準ナショナルセンターであり54施設を活用し、統括しうる。
 - (6) 開発したワクチン・診断法をWHO STOP TB Partnership (岡田がメンバー) のネットワークを用い、アジア・世界で臨床応用する。
 - (7) HVJ-エンベロープはすでにGMP (Good Manufacturing Practice) レベルであり、純国産のベクターで、基本特許を有することより、世界に普及させる
 - (8) このワクチンを多剤耐性結核患者に治療ワクチンとして用い、多剤耐性結核の制御と撲滅を目指す。

- (9) このHsp65+IL-12 DNAワクチンを第一候補ワクチンとして焦点を絞って研究を進展させる。すでにタイ国に臨床試験の共同研究者がいる。
- (10) 平成24~25年はBCGより1万倍強力なワクチンの第Ⅰ相臨床試験を行う。さらに、これに基づき第Ⅱ相臨床試験を行う。第Ⅲ相臨床試験の後、厚生労働省の認可を得て臨床応用を目指す。
9. 新しい結核ワクチン組み合わせによる結核撲滅戦略
HVJ/Hsp65+IL-12DNAワクチンとgranulysinワクチンを組み合わせ、更により強力なワクチンを創製する。
10. 新しい多剤耐性結核化学療法剤の臨床応用
開発した結核ワクチンならびに化学療法剤(opc及びCPZ)を流行地(日本、インド、中国、アジア地域、アフリカ)で活用し多剤耐性結核治療を行う。
11. 自然免疫系に属するマクロファージや樹状細胞はT細胞を中心とした獲得免疫系との連携などにより、結核感染防御に深く関与している。しかし、今回の研究から、結核菌の呼吸器感染において、最初の侵入サイトとなる肺上皮細胞が、抗結核応答の最前線の応答場所としてLcn2を分泌することにより、極めて重要な役割を担っていることが明らかになった。Lcn2は、一度分泌されたあと、細胞内に受容体を介して取り込まれ、細胞のアポトーシスを抑制することが報告されている。そのため、結核感染の最前線でも上皮細胞内に侵入した結核菌を細胞内でその増殖を抑制している可能性もあるのではないかと考えている。
12. 多剤耐性結核・難治性結核の予後診断法の開発
開発した新しい難治性結核予後診断法(granulysin, KSP37の測定による予後診断法)を流行地、特に日本、アジア地域で活用し知見の収集。
13. 結核菌殺傷蛋白(granulysin)の臨床応用
granulysin機能解明とTLR認識をさらに解明し、(開発した多剤耐性結核治療モデルを用い)薬剤耐性を生じない新しい機序の結核治療剤を開発する。
14. スーパー・スプレッダー結核に対する制御とTLRアゴニストによる治療剤の開発
(1) スーパー・スプレッダー多剤耐性結核のTLR認識エスケープと感染性を解明。この方法論を用い、流行地での多剤耐性結核の制御研究を行う。
(2) スーパー・スプレッダー多剤耐性結核の発見・研究結果を踏まえ、本邦の全ての結核病室の個室化等による多剤耐性結核制御を行う。
- [アジアとのネットワーク研究を活用した多剤耐性結核の制御]
- (10) 多剤耐性結核の克服にとって、正しい薬剤感受性検査が迅速に得られることは必須の項目である。今回の5症例は従来の培養法を用いる薬剤感受性結果が得られないか、正確な結果を得るのに長

期間要し、臨床的には問題の例であった。今回市販の2キットを用いて、薬剤耐性遺伝子の変異の有無の検討を実施した。その結果は臨床的な薬剤選択判断に有益な情報をもたらした。培養不能例では結果の妥当性の判断は正確にはできない。しかし臨床経過は順調であり、結果が正しかったものと推定している。一方NTM混在例の結果は、後に結核菌を純培養して得られた薬剤感受性結果との比較が可能であった。一部若干の相違はあったものの臨床的に問題になるほどではなく、特にINH・RFPの結果は完全に一致していた。通常薬剤感受性検査が不能な例、また結果が変動したり臨床経過と合わない例では、耐性遺伝子を用いた薬剤感受性検査で臨床上有益な情報が得られる可能性が示唆された。

(11) [ワクチンや診断法の活用・提供]

我々は臨床応用に極めて間近な新しい結核ワクチン、診断法を開発しつつある。当院は呼吸器疾患(結核を含む)準ナショナルセンターとなった。日本の結核患者数の60%の診断治療を行っている、国立病院機構の呼吸器疾患研究ネットワーク65施設を統括・指導するグループリーダー施設であり、岡田はその呼吸器疾患研究ネットワークグループリーダーである。したがって、このネットワークを用い、これらは多くの国民に活用・提供しうるものである。(図35)

- 1 DNAワクチン研究の成果と今後の活用・提供
HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは極めて強力な予防ワクチンとなることが考えられる。早急な臨床応用を計画中。さらに、HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは薬剤感受性結核のみでなく多剤耐性結核に対しても、マウスの系で強力な治療ワクチン効果を世界に先駆けて明らかにした。さらに、サル系の系でHSP65 DNA+IL-12DNAワクチンは結核治療効果を発揮した。あこの研究成果は通常の結核のみでなく難治性結核や多剤耐性結核に対する新しい予防・治療に活用することができる。特に高度の免疫不全を伴うAIDS合併結核患者におけるリコンビナントBCG療法を慎重にしなければいけない時に強力な活用ワクチンとなる。これらのDNAワクチンは本邦のみでなく全世界に提供する用意がある。
- 2 Granulysin, KSP37による予後診断法は簡便・迅速であり、結核患者の治療効果を予測する新しい診断法となり、入院期間の短縮や最良の治療方針の決定において、治療経済面でも行政施策にとり極めて有用な診断法となる。今後全国の54施設国立病院機構呼吸器ネットワークで多剤耐性結核患者・難治性結核患者に迅速に普及させ、活用する。もちろんこの新しい予後診断方法及びアッセイ系の提供の用意は積極的に行いたい。
- 3 世界に先駆けてのヒト生体内抗結核感染免疫モデルの作製：我々が開発したIL-2レセプターγ鎖(-)JSCID-PBL/huモデルは多剤耐性結核の新しいワクチン治療開発のみでなく、新しい化学療法剤開発の良いモデルとなる。

- 4 ワクチンの開発研究が評価され、World Health Organization(WHO)のSTOP TB Partnership及びWHOのSTOP TB Vaccine Working Groupのメンバーに選出され、極めて高い評価を受けた。すなわち、世界の現在の最先端のワクチン4つのうちの1つにHVJ-liposome /Hsp65DNA+IL-12DNAが選ばれ、WHOの会議で公に認められた。特にHVJ-エンベロープ /Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンはマウスの系でBCG東京よりも1万倍強力なワクチンで、モルモットでBCG東京よりも強力なことより、Mtb72f Fusion蛋白よりも強力であることが示唆される。さらに、Peter Andersen博士のESAT-6 Ag85B fusionワクチンやHorowitzらのリコンビナントAg85B BCGワクチンよりもこのHVJ-liposome /Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンははるかに強力である。さらに、このHVJ-liposome /Hsp65DNA+IL-12DNAワクチンはカニクイザルでも有効であり、ヒトへの臨床応用を考えている。WHOのSTOP TBワクチンミーティングにより米国FDAのDr. 米国CDCのDr. やスイス、ジュネーブ、WHO本部のDr. 多数及び南アフリカ、ウガンダ、インド、韓国、イギリス等世界各国のトップの結核研究者・行政者とネットワークができたことより、このワクチンを全世界に提供する計画である。
- (12) 安全性試験においては、ラット（げっ歯類）とカニクイザル（非げっ歯類）の2種の動物を選択して毒性試験を実施したところ、被験物質で

あるHVJ-Eの投与による重篤な異常は認められなかった。HVJ-Eによる免疫の活性化には、細胞内に存在する核酸受容体であるRIG-Iの関与が示唆されており、HVJ-Eの成分の一種である残存核酸が細胞内に取り込まれると予測されるが、特に遺伝毒性は認められず安全である事が示唆された。また、カニクイザルにおいても重篤な毒性は認められず、げっ歯類と非げっ歯類で共に安全性が実証された。

また、薬効薬理試験でも皮下投与での免疫の活性化が示唆された。これまでに、自然免疫を活性化する成分として核酸の一種であるCpGなどが報告されているが、それらの物質についても皮下投与での免疫活性化が示唆されている。ただし、CpGの受容体については細胞外に存在するTLR-9であり、RIG-Iを介するHVJ-Eとはシグナル伝達経路は異なると考えられる。今後、免疫活性化メカニズムについての詳細な解析により、どのようなシグナル伝達経路を活性化する事が結核の予防と治療に重要であるかを明らかにする必要がある。

更に、長期安定性試験の結果から、冷蔵の保存条件下で18ヶ月の有効期間設定が示唆された。通常臨床応用の初期段階では、1年程度の安定性を保証できるレベルでもよいと考えられるため、本研究により適切なレベルの安定性を保証できると考えられる。

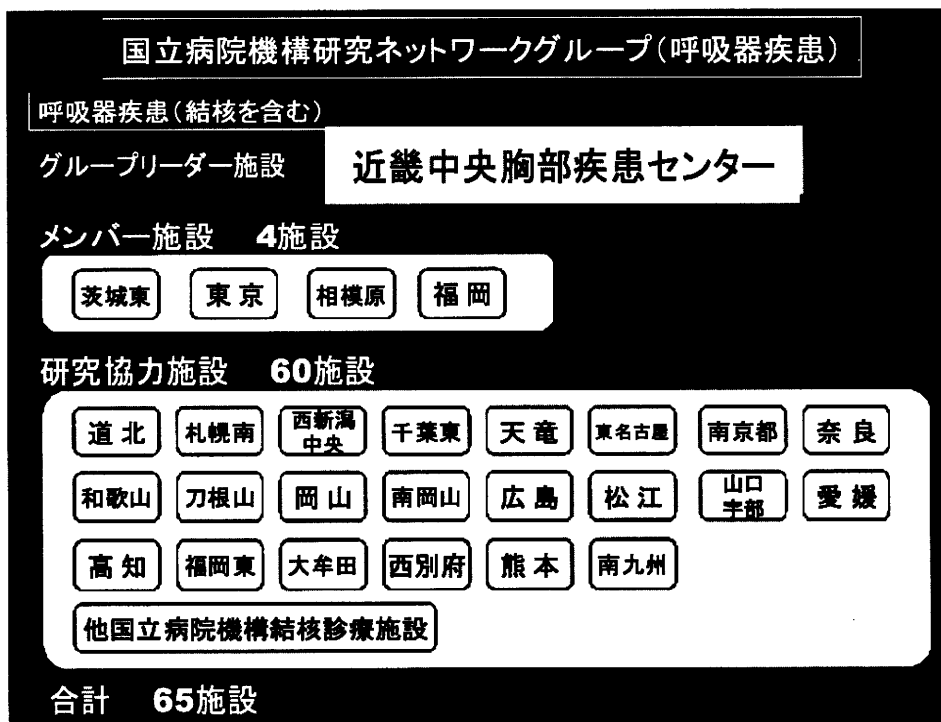


図35

行政施策への貢献

1. 日本の外国人結核の全国研究(実態把握・マニュアル作成)で早期予防、治療の厚生行政に寄与。
2. アジア各国共通利用のVNTRシステム構築。結核菌が由来した国の同定法を確立。(中国、韓国、日本、台湾の結核菌はそれぞれ区分できる発見)
3. アジア諸国の分子疫学研究は日本への結核流入・蔓延防止行政に寄与。
4. 多剤耐性結核患者迅速診断法・迅速入院(隔離)法の確立及びS-S多剤耐性結核の発見は結核病室の個室化等、重要な厚生行政施策にすでに寄与。
5. 結核ワクチンと新薬開発は多剤耐性結核や超薬剤耐性結核の医療費節減・行政施策に重要。国際貢献。
6. 日本の外国人結核患者の間で特定の結核菌株蔓延示唆。

今後考えられる新たな課題

1. 外国人結核の分子疫学解析。特定菌株が特定集団に蔓延を解明。
2. 結核高蔓延国からの移住者・日本語学校・外国人雇用事業所の早期診断(入国時・入国後QFT)。
3. 外国人結核の最多国、中国・韓国と10-locusのVNTR + 20 SNPs系統解析の分子疫学解析。
4. INHやPZA耐性結核の迅速診断迅速入院法の確立。新しい化学療法ワクチンの開発。
5. HIV合併結核・多剤耐性結核の実態把握と分子疫学研究。

図36

- (12) ESAT-6は何度試みても、恒常発現マクロファージ株を単離することができなかった。ESAT-6はマクロファージに細胞死を誘導するのかもしれない。

CFP-10を恒常的に発現させたマクロファージの解析から、CFP-10がマクロファージにおいて病原性を担っていることが示唆された。

ESAT-6, CFP-10に会合する分子として、貪食胞に関連する分子をいくつか同定した。これら分子の中に、ESAT-6/CFP-10が相互作用し、その機能を抑制するなどして貪食胞の成熟を抑制するものが存在しているものと考えている。今後、これら分子候補の中で、ESAT-6/CFP-10が実際に会合する分子を同定し、さらにどのような分子機構で貪食胞の成熟が抑制されているのかを明らかにしていきたい。

- (13) 多剤耐性結核菌は感染しない、結核の再感染はない、以上二つのドグマがわが国における結核の感染対策を遅らせた事は間違いない。現在は両者ともに否定されている。むしろ薬剤が無効でいつまでも排菌の続くMDRTBの感染力は強いと考えねばならない。今後は結核病棟に陰圧個室を増加し、MDRTBが否定されるまで、個室隔離する体制の構築が急務である。我々の経験を活かし、全国的に院内感染対策を普及させたい。(図36)

- (14) 従来の薬剤感受性検査をgold standardとすると、LiPA法の感度は95.0%、特異度は99.8%となり、極めて優れた相関が得られた。LiPA法は1日で結果を得ることができるため、迅速診断法として有用である。また、LiPA法でRFP耐性と診断

された例の75%は多剤耐性結核であり、本法は多剤耐性結核の迅速なスクリーニング法として優れていると考えられた。

IV. 先進国の外国人結核

わが国の結核対策は、保健所、療養所、医療費公費負担制度、結核検診や結核予防の組織づくりなど、国を挙げて結核対策のための組織や制度をつくることにより進められてきた。低蔓延下においては、結核対策だけの組織や制度だけで対応していくのが困難な状況になってきている。さらに、多剤耐性結核患者、ホームレス者、高齢者、糖尿病など合併症を有する者の割合が高くなってきており、また外国人の患者の割合が増えていくものと推測されている。サンフランシスコではわが国の都市部と比べて結核罹患率、患者数ともに少ない状況であったが、結核対策に対して最新の医療技術を積極的に導入し、専門性を有する医師やスタッフを公的に配置されていた。地域の結核対策について公的にマネージメントするよう努力が傾注されていた。わが国では結核罹患率が減少してくるのに対応して、全国一律に結核病床、結核に関わる医師、保健所、保健スタッフが減少してきている。このままでは将来結核の困難ケースに対処できなくなる可能性が示唆される。地域の結核対策をマネージメントする組織として保健所の機能強化により対応していくのか、サンフランシスコのように公的な診療施設を中心とした結核対策のシステムに転換していく

のか、方針を明確にしていく必要性があると思われる。

V. 行政施策への貢献と今後考えられる新たな課題 (図37)

行政施策への貢献と今後考えられる新たな課題

- (1) 日本の外国人結核の全国研究 (実態把握・マニュアル作成) で早期予防、治療の厚生行政に寄与。
- (2) アジア各国共通利用のVNTRシステム構築。結核菌が由来した国の同定法を確立。(中国、韓国、日本、台湾の結核菌はそれぞれ区分できる発見)
- (3) アジア諸国の分子疫学研究は日本への結核流入・蔓延防止行政に寄与。
- (4) 多剤耐性結核患者迅速診断法・迅速入院 (隔離) 法の確立及びS・S 多剤耐性結核の発見は結核病室の個室化等、重要な厚生行政施策にすでに寄与。
- (5) 結核ワクチンと新薬開発は多剤耐性結核や超薬剤耐性結核の医療費節減・行政施策に重要。国際貢献。
- (6) 日本の外国人結核患者の間で特定の結核菌株蔓延示唆。

今後考えられる新たな課題

- (1) 外国人結核の分子疫学解析。特定菌株が特定集団に蔓延を解明。
- (2) 結核高蔓延国からの移住者・日本語学校・外国人雇用事業所の早期診断 (入国時・入国後QFT)。
- (3) 外国人結核の最多国、中国・韓国と10-locusのVNTR + 20 SNPs系統解析の分子疫学解析。
- (4) INHやPZA耐性結核の迅速診断迅速入院法の確立。新しい化学療法ワクチンの開発。
- (5) HIV合併結核・多剤耐性結核の実態把握と分子疫学研究。

E. 結論

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 4.7%、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 JI 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1000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、インドネシア、ブラジル国籍の順、来日1~3年発症多し。多剤耐性結核は4.7%、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-12DNA 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キログルトン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、*mpoB*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)

(1) 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。

(2) 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。*mpoB*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) 国立国際医療研究センターにおける最近の外国人結核患者の臨床像は、全国調査の結果とほぼ同様であったが、国籍別では韓国人が多かった。外国人結核患者の職業や発見動機は出身国により違いのあること示唆された。日本における国籍別の結核発病率が、母国の発病率に比べて高い国はネパールとモンゴル、低い国は韓国、ブラジル、ペルーであった。分子疫学解析から、外国人結核患者の中でモダンタイプの北京型結核菌が蔓延している可能性が示唆された。

(10) 当院入院の過去7年間の外国籍結核患者の検討より、入院中の治療は日本人と同様におこなわれているが、通院に関してはDOTSの見直しや評価が必要で、今後の課題と考える。入国時の結核スクリーニングについては、難民、永住申請、入学、入職等を除いては、あまり推奨できない。

(11) 大阪市における日本語学校では、結核健診を実施していない学校が16%あった。日本語学校に対し健診の重要性を十分に説明し結核患者の早期発見に努める必要がある。また、外国人結核患者では脱落者が多いとの報告があり、学校側と連携して可能な限り国内で治療を完了できるよう配慮していくことが重要である。大阪市において登録された日本語学校在籍の外国人結核患者数と、質問紙から得られた結核患者数に乖離がみられており、精密検査結果の把握を学校に指導し患者の早期発見に努めることが必要であろう。

(12) 在留外国人の結核患者数は増加傾向にあり、罹患率は日本人より数倍高い。在留外国人は、日本の結核罹患状況におけるハイリスク集団の一つとして、今後も特別な対策を講じていく必要がある。

[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)]

(13) 近年、人の移動が活発になり、感染症が流入する可能性が高まっている。東アジア諸国の研究者との共同研究によって、それぞれの国で広まっている結核菌の特徴を明らかにし、共有できる型別法(SNPsやVNTRなど)の開発が可能となった。近隣諸国で問題となっている病原性の高い結核菌や多剤耐性結核菌などの遺伝子型情報を共有することができれば、注意すべき高病原性結核菌の流入を早期に把握するためのシステムの確立が可能となる。

(14) 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、コホート研究を実施し、再発予の危険因子を同定し、再発予防に活用が望まれる。

(15) 北京型は中国で最も流布しているタイプであるた

めスポリゴタイピングとRD105欠損を比較した。この二法は非常によい相関を示した。2460株が新しいスポリゴタイピングである可能性を示した。しかしこの株はRD105が欠損しているのが北京型とした。黒竜江省では89.5%が北京型であった。北京型は北京だけでなく宁夏(67%), 上海(89%), 浙江(70%), 天津(91.7%), 广西(55.3%)で頻度が高かったが広東(25%)では低かった(5, 24, 25, 36, 48)。黒竜江省で北京型が多いことが、薬剤耐性と関与していると推測された。しかし他の地区ではそんなに薬剤耐性と関係していないと言われている。統計学的解析では北京型と非北京型に薬剤耐性の差は認められなかった。様々な解析がMIRU-VNTRで行われている。我々は16座を使用すればHGDI=0.9977が高く十分に分解能があることを指摘した。さらにMtub29座を除去しても十分に診断価値があることもわかった。また10座と16座のHGDIは余り差がないので、10座を使用することがMTBを解析する上ではスクリーニングとして優れている。今までにさまざまな研究が中国で行われているが、ここで用いた15座の研究は今まで用いられたどの研究よりも多くの座を用いたものでクラスター率は最も低かった。今までは黒竜江省では薬剤耐性の北京型の感染が非常に活発に生じていると思われていたが、クラスター率が低いことは、潜在性感染の再燃や、不適切な治療によることが多いと思われる。これらのことを念頭において黒竜江省の結核対策は進めなければならない。

- (16) 本研究では、結核およびHIV合併結核発症のリスクを自然免疫から適応免疫まで広く検討を進めている。今年度は、タイ・チェンライにおける結核とHIV感染者とHIV合併結核の患者群から分離された血漿25(OH)vitaminD₃値をELISAにて測定すると同時に、末梢血単球由来培養マクロファージを用いて、*in vitro*のBCGの感染実験を行い、vitamin D関連遺伝子の発現をRT-PCRにて検討した。
- (17) わが国の外国人登録者数は、アジア人が146万4,360人と全体の74.2%を占め、今後、日本人の結核罹患率の低下に伴い、相対的にアジア人の結核対策が重要である。アジア人集団の多剤耐性結核発症に関する臨床疫学情報、宿主側の発症素因をとらえ、アジア全体の結核対策へ反映させるよう提言すし、多剤耐性結核対策に貢献したい。

[新規結核ワクチン・治療・診断]

- (18) HVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA+HL-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+HL-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。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+HL-12DNAワクチンは生存率改善、体重増加、免疫反応増強の治療効果を得た。

- (19) 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。
- (20) 新規DNAワクチンの成分であるHVJ-Eについて、臨床応用を想定した安全性、薬効、安定性に関するデータを取得した。臨床応用上特に問題となる重篤な異常などは認められておらず、今後臨床応用を目指して開発を進める予定である。
- (21) 結核感染に際し、最前線となる上皮系細胞から分泌されるSLPIやリポカリン2が結核菌の増殖抑制作用を異なる分子機構により発揮していることが明らかになった。今後、SLPI、リポカリン2以外にも、自然免疫系による結核感染防御機構を担う分子を同定していきたい。結核菌由来の遺伝子CFP-10を、宿主マクロファージに直接発現させることにより、このマクロファージが非病原性のBCGに対する感受性が高まることを見出した。異なるプロテオミクス法を用いたアプローチにより、ESAT-6, CFP-10に会合する宿主分子候補を同定した。今後、これら候補分子のESAT-6, CFP-10会合による貪食胞成熟に及ぼす影響を明らかにしていきたい。
- (22) 結核菌由来の遺伝子CFP-10を、宿主マクロファージに直接発現させることにより、このマクロファージが非病原性のBCGに対する感受性が高まることを見出した。異なるプロテオミクス法を用いたアプローチにより、ESAT-6, CFP-10に会合する宿主分子候補を同定した。今後、これら候補分子のESAT-6, CFP-10会合による貪食胞成熟に及ぼす影響を明らかにしていきたい。
- (23) 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。
- (24) LiPAは多剤耐性結核のスクリーニング法として有用である。

[先進国の外国人結核対策]

- (24) 米国サンタクララ郡、サンフランシスコ市の結核罹患率はわが国と比べて低い状況にあった。しかし、結核罹患率、患者数が減少している中で、外国人、ホームレス者に対する専門性が高いサービスが提供されていた。このようなことが可能である背景としては、結核対策を支える公衆衛生体制の基盤が存在していることにあると思われる。また結核対策を行う公衆衛生組織が、直接困難ケ

ースに対する保健医療サービスを提供しているだけでなく、一般医療機関における結核診療に対して指導的な役割を果たしていた。わが国の結核対策においても、公衆衛生部門は直接的な保健医療サービスの提供と、一般医療機関における診断と診療の支援を行う機能を強化していく必要があると思われる。また、結核対策を支える公衆衛生体制のあり方もあわせて検討が必要である。

F. 健康危険情報

試料採取からその処理、試料を使った各種測定、試料の保存等、本研究にけるすべてのステップがタイ国内において実施された。従って、HIV陽性者の血液試料に関しては、BSL1が適応される。BCGの感染実験は、病院内のBSL2の施設にて実施された。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Hoshino H, Ohmori M, Okada M. Trends in tuberculosis infection among foreigners in Japan according to work status. *Kekkaku*. 85(9):697-702, 2010.
2. Takahashi Y, Igarashi M, Ishikawa K, Komatsuki Y, Shotome H, Koyama Y, Miyake T, Nakagawa N, Hattori S, Inoue K, Doi N, Okada M, Matsumoto S, Tamaru A, Akamatsu Y: Synthesis and SAR of Caprazamycin derivatives CPZEN-45: as a promising drug candidate for treating XDR-TB. *ACS Medical Chemistry Letters*. (in press)
3. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Inoue Y, McMurray DN, Sakatani M.: Novel vaccine against tuberculosis using prime-boost method. *Clin. Develop Immunol*. (in press)
4. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Inoue Y, Matsumoto M, McMurray DN, E.C.Dela Cruz, E.V. Tan, R.M.Abalos, J.A.Burgos, Saunderson P, Sakatani M: Novel therapeutic vaccine: granulysin vaccine against tuberculosis. *Human Vaccine*. (in press)
5. Kita Y, Okada M Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Takamori Y, McMurray DN, E.C.Dela Cruz, Tan EV, R.M.Abalos, J.A.Burgos, Saunderson P, Sakatani M.: Development of therapeutic and prophylactic vaccine against tuberculosis using monkey and granulysin transgenic mice models. *Human Vaccine*. (in press)
6. Yoshida S, Suzuki K, Iwamoto T, Tsuyuguchi K, Tomita M, Okada M, Sakatani M. Comparison of rifabutin susceptibility and rpoB mutations in multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by DNA sequencing and the line probe assay. *J Infect Chemother*. 16(5):360-3, 2010.
7. Yoshida S, Suzuki K, Iwamoto T, Tsuyuguchi K, Tomita M, Okada M, Sakatani M. Detection of molecular epidemiology of *Mycobacterium gordonae* isolates. *Kekkaku*. 85(7):609-14, 2010.
8. Okada M, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Inoue Y, Nakajima T, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Matsumoto M, P Saunderson, E V.Tan, Dela Cruz E.C., D McMurray, Sakatani M.: A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccine (HVJ-Envelope/Hsp65 DNA+IL-12 DNA) against Tuberculosis Using The Cynomolgus Monkey Models. *Procedia in Vaccinology*. Vol.2. Issue1:34-39, 2010.
9. Okada M, Kita Y. Tuberculosis vaccine development: The development of novel (preclinical) DNA vaccine. *Human Vaccine*. 6(4):297-308, 2010.
10. Okada M, Kita Y. Anti-tuberculosis immunity by cytotoxic T cells granulysin and the development of novel vaccines (HSP-65 DNA+IL-12 DNA). *Kekkaku*. 2010;85(6):531-8.
11. Okada M. Immunity against *Mycobacterium tuberculosis* (introduction). *Kekkaku*. 85(6):501-8, 2010.

(2) 学会発表

1. A Novel Therapeutic Vaccine Against Tuberculosis Using the Cynomolgus Monkey Model. Okada M, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nakajima T, Kaneda Y, P. Saunderson, E.V.Tan. 41th IUATLD(The International Union Against Tuberculosis and Lung Disease), 11-15 Nov, 2010, Berlin, Germany.
2. A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccine against Tuberculosis Using the Cynomolgus Monkey Model and Mouse Model. Okada M, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Inoue Y, Nakajima T, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Matsumoto M, P Saunderson, E. V.Tan, E.C.D. Cruz, D McMurray, Hayashi S. 4th Vaccine Global Congress, 3-5 Oct, 2010, Wien, Austria.
3. A Novel Therapeutic Vaccine (HVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA) against Tuberculosis Using Monkey Models. in "Symposium: Host-Directed Therapies in Bacterial and Fungal Infections (Invited Speaker)" Okada M. 50th ICAAC (International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy), Sep 11-15,2010, Boston, USA.
4. Novel therapeutic vaccines (granulysin and novel DNA vaccine) against Tuberculosis. Okada M. 7th WCVII(WORLD CONGRESS ON VACCINE, IMMUNISATION AND IMMUNOTHERAPY) 2010 May 26-28 Berlin, Germany.

5. Novel prophylactic and therapeutic vaccine against Tuberculosis using monkey and transgenic mice models. Kita Y, Okada M. 7th WCVII (WORLD CONGRESS ON VACCINE, IMMUNISATION AND IMMUNOTHERAPY), 26-28 May, 2010, Berlin, Germany.
6. A novel prophylactic and therapeutic vaccines against tuberculosis in the tuberculosis-sensitive mice and SCID-PBL/hu mice. Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Inoue Y, Nakajima T, Kaneda Y, Yoshida S, D McMurray, Okada M. 14th International Congress of Immunology, 22-27 Aug, 2010, Kobe, Japan.
7. A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccine (HVJ-Envelope/Hsp65 DNA + IL-12 DNA) against Tuberculosis Using The Cynomolgus Monkey Model. Okada M, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Nakajima T, Kaneda Y, P Saunderson, E. V.Tan, D McMurray. 14th International Congress of Immunology, 22-27 Aug, 2010, Kobe, Japan.
8. A NOVEL THERAPEUTIC VACCINE (HVJ-ENVELOPE/HSP65 DNA+IL-12 DNA) AGAINST TUBERCULOSIS USING THE MONKEY MODEL. Okada M, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu, Sekine Y, Nakajima T, Nagasawa T, Yasufumi Kaneda, Yoshida S, E. V.Tan, P Saunderson, E.C.Dela Cruz, D McMurray, Sakatani M. 45th US-JAPAN CONFERENCE ON TUBERCULOSIS AND LEPROSY, 13-16 Jul, 2010, Cambridge, USA
9. 結核高感受性マウスを用いた新しい結核治療ワクチン(Hsp 65 DNA+IL-12 DNA)の開発. 岡田全司, 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 西田泰子, 仲谷均, 高尾京子, 岸上知恵, 西松志保, 関根有紀, 井上義一, 吉田栄人, 中島俊洋, 金田安史, 坂谷光則. 第50回日本呼吸器学会学術講演会 2010年4月23日-25日 京都
日本呼吸器学会雑誌 48 巻増刊 Page296(2010.03)
10. ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた新しい結核治療ワクチン開発. 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 西田泰子, 仲谷均, 高尾京子, 岸上知恵, 西松志保, 関根有紀, 吉田栄人, 中島俊洋, 坂谷光則, 金田安史, Tan E.V., Saunderson Paul, 岡田全司. 第50回日本呼吸器学会学術講演会 2010年4月23日-25日 京都
日本呼吸器学会雑誌 48 巻増刊 Page295(2010.03)
11. ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しい予防・治療ワクチン開発研究. 喜多洋子, 岡田全司, 金丸典子, 橋元里実, 西田泰子, 仲谷均, 高尾京子, 岸上知恵, 西松志保, 関根有紀, 林清二, 吉田栄人, 中島俊洋, 金田安史, E.V.Tan, E.L.C.DelaCruz, Paul Saunderson 64 回国立病院総合医学会 2010年11月26日-27日 福岡
12. 新しい結核治療ワクチン (HVJ-エンベロープ/Hsp65+IL-12 DNA) 及び granulysin ワクチンの開発. 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 西田泰子, 仲谷均, 高尾京子, 岸上知恵, 西松志保, 関根有紀, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司. 第80回実験結核研究会総会 2010年5月19日 京都
13. 新しい結核治療ワクチン(HVJ-エンベロープ/Hsp65+IL-12 DNA)の開発(SCID-PBL/hu マウスを用いた). 岡田全司, 喜多洋子, 金丸典子, 井上義一, 坂谷光則. 第85回結核病学会総会 2010年5月20日-21日 京都 結核85巻4号 Page383(2010.04)
14. ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しい予防・治療ワクチン開発. 喜多洋子, 金丸典子, 井上義一, 坂谷光則, 岡田全司. 第85回結核病学会総会 2010年5月20日-21日 京都 結核85巻4号 Page383(2010.04)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得 (出願中)
2. 実用新案登録
3. その他

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）
分担研究報告書

日本・中国・韓国・台湾分子疫学共同研究

研究分担者 加藤誠也 結核予防会結核研究所 副所長
研究協力者 前田伸司 結核予防会結核研究所 抗酸菌リファレンス部
結核菌情報科 科長

研究要旨

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。これらの地域の各国で結核菌分子疫学解析を担当している研究者と会議を持ち、各国で広まっている結核菌の型別データを共有できる反復配列多型（VNTR）システムの構築を行った。樹立したコアとなる 10-locus VNTR（MIRU-10、MIRU-26、MIRU-31、ETR-A、VNTRs-0424、1955、2163b、3155、4052、4156）で結核菌の型別を行い、minimum spanning tree（MST）解析すると、中国、韓国、日本において、各国で広まっている北京型結核菌の Modern 型、RD181 陽性 Ancient 型、RD181 陰性 Ancient 型をグループごとに分けることができた。また、遺伝系統情報を解析できる一塩基多型（SNPs）分析システムの構築を目指した研究を開始し、北京型及び非北京型結核菌を含めた株が、解析可能と考えられる 20 箇所を SNPs 解析部位の候補とした。

研究協力者

韓国

韓国結核研究所
分子疫学部長 Dr. Park, Young-Kil

中国

中国疾病管理予防センター(CDC)
結核研究部 Dr. Yu, Pang 他2名
上海市疾病管理予防センター(CDC)
結核部門長 Dr. Mei, Jian 他1名
上海 Fudan 大学医学部
微生物教室 教授 Dr. Gao, Qian 他1名

台湾

台湾疾病管理予防センター(CDC)
抗酸菌部長 Dr. Jou, Ruwen 他1名

日本

大阪市立環境科学研究所
和田崇之
神戸市環境保健研究所
岩本朋忠
結核予防会結核研究所
村瀬良朗

A. 研究目的

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。台湾を除き、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特徴を持っている。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。反復配列多型（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。前回の会議で分析箇所の選択を行い 10-locus VNTR システムを構築した。そこで、このシステムで各国株の分析を行った。また、結核菌遺伝系統情報の解析システムの構築についても議論を行った。

東アジア諸国で共通の VNTR 分析システムを構築し、遺伝系統情報を含めた結核菌型別情報データベースが構築できれば、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等の情報を共有することができる。

B. 研究方法

日中韓台分子疫学研究会議

平成 22 年 11 月 30 日から 12 月 2 日まで公益財団法人結核予防会結核研究所において研究会議を開催した。会議において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）。

前回の会議後調査し、選択した 10 箇所（MIRU-10、MIRU-26、MIRU-31、ETR-A、VNTRs-0424、1955、2163b、3155、4052、4156）で解析各国の結核菌を分析して BioNumerics 社の解析プログラムで minimum spanning tree（MST）分析を行った。また、解析に先立ちデータが直接比較できるように結核研究所から各国の施設に結核菌 DNA を送付し分析することによって、これらのローサイの精度管理を行った。

C. 研究結果

1. 10-locus VNTR 分析による MST 解析：最初に精度管理用 DNA を送付して、10-locus VNTR（MIRU-10、MIRU-26、MIRU-31、ETR-A、VNTRs-0424、1955、2163b、3155、4052、4156）のコピー数の定義の違いを確認した後、VNTR 分析結果の比較を進めた。日本、韓国、中国（上海）で一定期間に分離された結核菌（30-100 株）について 10-locus VNTR 分析し、MST 解析を行った。その結果、それぞれの国で広まっている主要な結核菌型は異なり、大きく 3 つのグループに分けることが出来た。つまり、東アジア諸国では、北京型結核菌の割合が 70-90% と高いことが知られている。しかし、遺伝子型が各国で異なり、中国では Modern 型

が 95%、韓国では RD181 陽性の Ancient 型が 65-70%、日本では RD181 陰性の Ancient 型が 80% を占めている。これら 3 つの結核菌型は、本研究で選択した 10-locus VNTR で区分出来ることが確認できた。しかしながら、各国では広まっている主要な型以外に頻度は低いが、ある程度の割合で他国において主要な結核菌型が含まれる。そのため、分離された菌型を調べることで菌の由来を推定することができるが、感染国の断定は難しいと考えられる。しかし、構築した VNTR システムは、10 箇所だけ分析する VNTR であるが、中国、韓国、日本でそれぞれ広まっている Modern 型、RD181 陽性 Ancient 型、RD181 陰性 Ancient 型をグループ分けすることが可能であった。

2. SNPs を用いた結核菌系統解析：本 VNTR による型別だけでなく、SNPs (一塩基多型) 分析による結核菌の系統情報も加えると、さらに細かいサブグループに分けられると考えられる。そこで、結核菌を系統別に分けることができる SNPs 部位のローカスについて検討を行った。7 箇所の SNPs (台湾が提案した非北京型結核菌の分類)、10 箇所 SNPs (日本が提案した Ancient タイプ北京型結核菌の分類) 及び 3 箇所 SNPs (上海が提案した Modern タイプ北京型結核菌の分類) の合計 20 箇所の SNPs 部位を候補とした。

これらの分析により、SNPs 分析法で結核菌の系統さらに VNTR で系統内での亜型分析という 2 つの方法を組み合わせることで、東アジア諸国で利用可能な結核菌の型別システムが樹立可能となる。分離結核菌の遺伝系統を明らかにすることができれば、国際的に感染が伝播している可能性が高いのか、それぞれの国内だけで感染が広がっているか推定することができる。

D. 考察

東アジア (日本、中国、韓国、台湾) の研究施設で実際に分析に使われている VNTR ローカスから選択した 10-locus VNTR であるが、中国、韓国、日本でそれぞれ広まっている Modern 型、RD181 陽性 Ancient 型、RD181 陰性 Ancient 型をグループ分けすることが可能であった。しかし、10 箇所だけの VNTR 解析なので、個別の結核菌についての型別能は高くはないと考えられる。また、この VNTR システムは北京型結核菌を対象にしたものであり、台湾のように北京型結核菌の割合が低い地域では利用が難しいことが考えられる。そこで、北京型以外の結核菌にも適用可能で、組み合わせることで VNTR 自体の型別能力の向上にも寄与すると考えられる結核菌の遺伝系統情報を調べるシステムの構築を試みた。結核菌の遺伝系統情報は、ゲノムの SNPs 解析で明らかにすることができる。しかし、本会議では 20 箇所に候補を絞ったが、どの箇所を何箇所調べると東アジア諸国で共通に利用できるシステムができるか、確認のため実際に分離菌の解析を進めている。SNPs 分析による結核菌の系統情報と VNTR 分析による型別結果を総合することで、各国で広がっている結核菌の遺伝的背景の同異を客観的に評価することが可能となる。また、SNPs 法は特定場所の塩基多型を調べる方法なので、薬剤耐性菌の検出のために利用されているラインプロブアッセイ法の原

理・手法を利用し分析することができる。この塩基多型検出系で SNPs 解析ができれば、高価な分析機器が必要な DNA シークエンス分析や TaqMan 法を利用せず、簡便・迅速に結核菌の遺伝系統情報を調べることができる。今後、このような SNPs 検出システムを構築して、キット化する予定である。

このような研究により各国における結核菌の特徴を明らかにできれば、注目している結核菌を型別することで国際的に感染が伝播している可能性が高いのか、それぞれの国内だけで感染が広がっているか推定することが可能となる。

E. 結論

近年、人の移動が活発になり、感染症が流入する可能性が高まっている。東アジア諸国の研究者との共同研究によって、それぞれの国で広がっている結核菌の特徴を明らかにし、共有できる型別法 (SNPs や VNTR など) の開発が可能となった。近隣諸国で問題となっている病原性の高い結核菌や多剤耐性結核菌などの遺伝子型情報を共有することができれば、注意すべき高病原性結核菌の流入を早期に把握するためのシステムの確立が可能となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kang HY, Wada T, Iwamoto T, Maeda S, Murase Y, Kato S, Kim HJ, Park YK: Phylogeographical particularity of the Mycobacterium tuberculosis Beijing family in South Korea based on international comparison with surrounding countries.: J Med Microbiol., 59: 1191-1197, 2010

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

東京における外国人結核の臨床像および外国人結核患者由来株の分子疫学解析

研究分担者 小林信之 国立国際医療研究センター病院 呼吸器内科医長
研究協力者 切替照雄 国立国際医療研究センター研究所 感染症制御研究部長
安藤弘樹 国立国際医療研究センター研究所 感染症制御研究部
前田伸司 結核予防会結核研究所 抗酸菌レファレンス部結核菌情報科
中道真仁 国立国際医療研究センター病院 呼吸器内科

研究要旨

東京における最近の外国人結核の臨床的特徴を把握する目的で、国立国際医療研究センターで診療した外国人結核患者の背景因子、治療成績などについて検討した。2007年以降4年間で診療した113例の外国人結核患者の年齢、性別、国籍は、全国調査とほぼ同様であったが、韓国が中国に次いで2番目に多かった。外国人結核で女性がとくに多いのはフィリピンであり、職業については、中国は学生が、フィリピンは主婦が、ネパール、ミャンマーは就業者が多いなど、国により背景因子に特徴のあることが示された。また、日本における国籍別の結核発病率が、母国の発病率に比べて高い国はネパールとモンゴルであり、低い国は韓国、ブラジル、ペルーであった。外国人結核由来菌株の分子疫学解析を実施し、RFLP解析から、全菌株の28.6%が相同性70%以上のクラスターIを形成することが判明した。MIRU-VNTR解析、スポリゴタイピングの結果、このクラスターを形成する菌株が全て北京型結核菌であり、新興株（モダンタイプ）であることが示された。一方で、他のクラスターを形成する菌株は非北京型結核菌であった。これらの結果は、特定の菌株が特定の集団に蔓延している可能性を示唆している。

A. 研究目的

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わが国への持ち込みは新たな脅威として認識されている。国立国際医療研究センターは東京都新宿区に位置し、東京で発症する結核患者の多くを扱っているが、外国人の結核患者全体に占める比率は7-8%であり増加傾向にある。前年度の研究では、当センターにおける外国人結核患者は、日本人結核と比較して年齢が低く女性が多いこと、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った。本年度は、最近の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、当センターの外来および入院で経験した外国人結核の臨床像、国による差異について検討する。また、わが国における国別の外国人登録者数と結核発病率、および母国の結核発病率について比較検討する。さらに、当センターにおいて入院治療を行った東京に在住している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。

B. 研究方法

国立国際医療研究センターにおいて2007年1月から2010年10月の間に診療した113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た。とくに、外国人結核の職業については国により違いがあるかどうか、また発見動機に違いがあるかどうかを検討した。さらに、法務省入国管理局から発表されている平成21年末における外国人登録者統計を基に、わが国における国別の結核発病率を計算し、母国における結核発病率と比較した。

結核菌の解析には、2000年1月から2010年5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

培養した。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した。シークエンス解析は、各薬剤耐性遺伝子をPCR増幅した後、ダイレクトシークエンス法によって塩基配列を同定し、変異の有無を確認した。分子疫学解析としては、ゲノム抽出後、IS6110プローブを用いるRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)解析とMycobacterial Interspersed Repetitive Unit (MIRU)を用いるVNTR(Variable Numbers of Tandem Repeats)解析を実施した。VNTR解析は結核予防会結核研究所の前田伸司先生に実施していただいた。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ために、クラスター解析を実施した。

C. 研究結果

2007年1月から2010年10月の間に診療した外国人結核患者は113名であった。年齢は20~30歳代の若年層が多く（20代48.6%、30代28.3%）、性別は女性が44.2%を占めていた（図1）。国籍は以前の報告と同様に中国が23.0%と最も多く、以下、韓国（18.6%）、フィリピン（14.2%）、ネパール（8.8%）、ミャンマー（8.0%）の順に多く、アジア諸国が91%を占め、フィリピンではとくに女性が多かった（図2）。職業については就業者51名（45.1%）、学生33名（29.2%）、主婦20名（17.7%）の順に多く、中国では学生が、フィリピンでは主婦が、ネパール、ミャンマーでは就業者が多かった（図3）。発見動機については、健診による発見が学生では51.5%であるのに対し、就業者では17.6%と低値であった。結核診断時の入国年数は1年以内が31%を占めていた。治療については、治療完遂または治療中が69.9%、途中帰国が16.8%、脱落が4.4%、死亡は0.9%（1名：不法滞在）であった（図4）。脱落者5名のうち、4名は日雇、1名は学生であった。

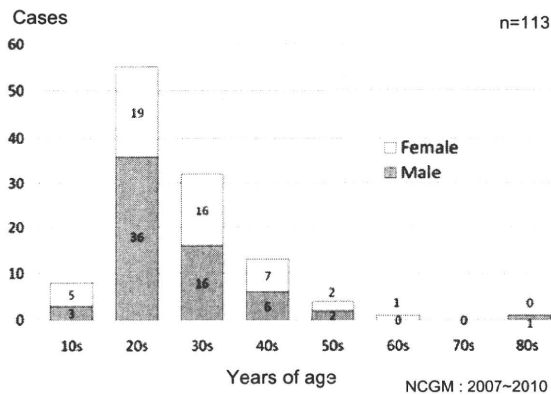


図1 外国人結核患者の年齢・性別による分布

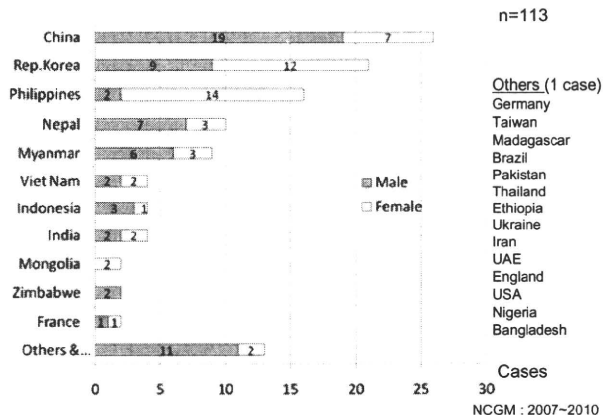


図2 外国人結核患者の出身国別分布

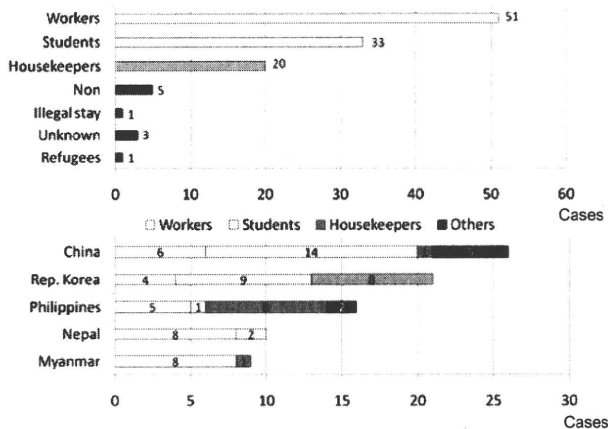


図3 外国人結核患者の職業

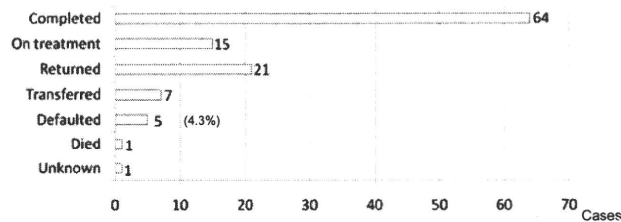


図4 外国人結核患者の治療成績と治療脱落例

Treatment outcome	Country of origin	Sex/Age	Occupation
Defaulted	Nepal	F/26	Part-time job
	Iran	M/44	Part-time job
	Philippines	F/20	Service worker
	Rep. Korea	M/29	Student
Died	Myanmar	M/26	Part-time job
	China	M/27	Illegal overstay

平成 21 年末現在における外国人登録者数は 2,186,121 人であり、国籍別では中国が最も多く 31.1% を占め、以下、韓国・朝鮮、ブラジル、フィリピン、ペルー、米国と続いている (図 5)。これに対して、「結核統計 2008」によると、外国人の結核患者数は、中国、フィリピン、韓国、インドネシア、ブラジル、ベトナム、タイの順に多かった。わが国における結核発病率を国別に計算すると、母国の発病率に比べて比較的高い国はネパール、モンゴルであり、比較的低い国は韓国、ブラジル、ペルーということがわかった (図 6)。

分子疫学解析は、2000 年 1 月以降に診療した外国人結核患者のうち 91 株について完了した。薬剤感受性試験の結果は 86 株が INH と RFP に感受性、INH 耐性 2 株、RFP 耐性 1 株、多剤耐性 2 株であり、外国人結核患者由来結核菌における薬剤耐性化の集積はみられなかった。分子疫学解析については、IS6110-probed RFLP 解析から、91 株のうち 26 株 (28.6%) が相同性 70% 以上のクラスター I を形成することが判明した (図 7)。

MIRU-VNTR 解析、スポリゴタイピングの結果、クラスター I を形成する菌株は全て北京型結核菌であり、新興株 (モダンタイプ) であることが示された (図 8-10)。また、クラスター I を形成する菌株が分離された患者の国籍は 23% が韓国籍、37% が中国籍であった。一方でクラスター II を形成する菌株は非北京型結核菌だった。以上の結果から、解析対象では薬剤耐性が集積していることはなかったが、分子疫学解析から、特定の菌株が蔓延している可能性が示唆された。

D. 考察

当センターにおいて最近 4 年間で診療を行った外国人結核患者は、20~30 歳代の若年者が多く、女性の割合が日本人結核患者と比較して多くみられたが、この傾向は以前の調査とはほぼ同様の傾向であった。国籍については、全国調査と比べると韓国が 2 番目に多くなっているが、これは当センターの近くに新宿区の韓国人居住地があるためと思われる。職業に関しては、中国では学生が、フィリピンでは主婦が、

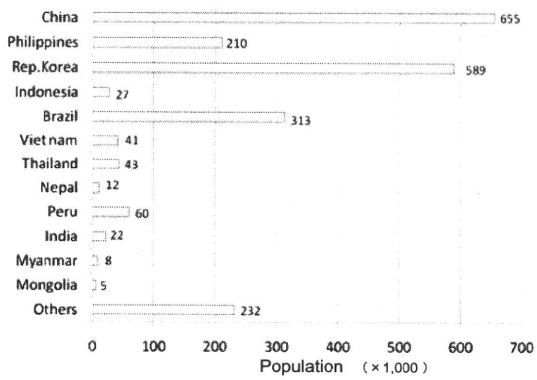


図5 国籍別の外国人登録者数（全国で222万人）：法務省入国管理局（2008年末）

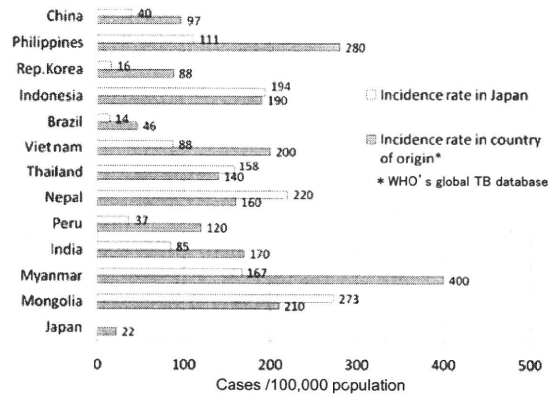


図6 外国人結核患者の日本と出身国における発病率

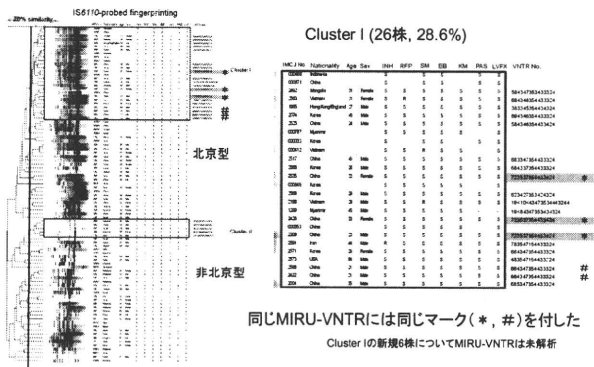


図7 IS6110-probed fingerprinting 解析結果

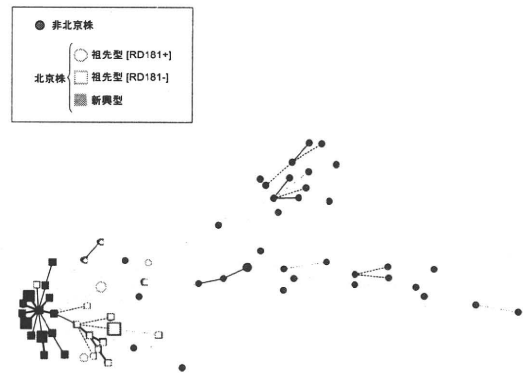


図8 VNTR解析とスポリゴタイピングとの関係

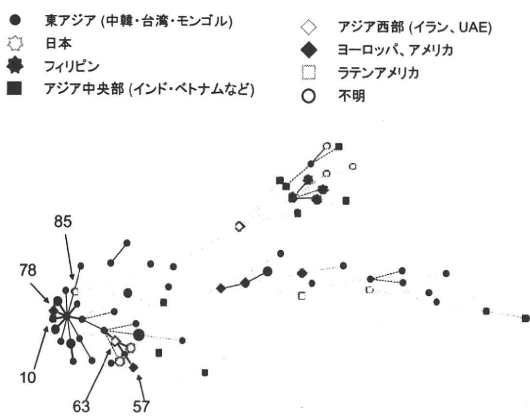


図9 VNTR解析と患者出身国との関連



図10 VNTR解析とRFLPクラスターとの関連

ネパールやミャンマーでは就業者の割合が高く、国により違いのあることが示唆された。発見動機については、学生の結核は約半数が健康診断で発見されているに対し、就業者では健診による発見が18%程度と低かった。以上のように外国人結核といっても、その臨床像は出身国による違いがあることは興味深く、その点をふまえた結核対策を立てる必要があると思われた。治療中断例は以前と比べて少なくなっており、病院と保健所の連携、DOTSの徹底、通訳・パンフレットなどのツールの使用が外国人結核の治療脱落の防止に寄与したことが示唆される。

日本における外国人登録者数の多い国ほど、その国の結核患者数は多くなると予想されるが、日本における国別の結核発病率は明らかになっていない。法務省入国管理局による「外国人登録者数」は約220万人(2008年)であるが、国別の登録者数の順位と結核発病者数の順位は一致していない。これには母国の結核感染率の違いのほか、年齢や日本での居住年数も関連していると思われる。日本における韓国、ブラジル、ペルー出身者の結核発病率は、母国における発病率よりも低いことは興味深い。

分子疫学解析から、薬剤耐性の集積はみられず、外国人結核患者の中でモダンタイプの北京型結核菌が蔓延している可能性が示唆された。また、これら菌株が分離された患者の国籍は韓国籍・中国籍が過半数を占めた。引き続き全体像解明のため分子疫学解析を実施していく。また、今後の課題として、VNTR解析における標準法の確立が挙げられる。現在、米国疾病管理センターで採用されている方法と、日本独自のJATA(12)-VNTR法がある。本研究ではJATA(12)-VNTRを採用しており、解析結果を他国で実施されたものと直接比較することができない。プロトコール作成も含めて検討していく必要がある。

E. 結論

国立国際医療研究センターにおける最近の外国人結核患者の臨床像は、全国調査の結果とほぼ同様であったが、国籍別では韓国人が多かった。外国人結核患者の職業や発見動機は出身国により違いのあることが示唆された。日本における国籍別の結核発病率が、母国の発病率に比べて高い国はネパールとモンゴル、低い国は韓国、ブラジル、ペルーであった。分子疫学解析から、外国人結核患者の中でモダンタイプの北京型結核菌が蔓延している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ando H, Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Kato S, Mori T, Kirikae T. Downregulation of katG expression is associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol*, 79(6):1615-1628, 2011.
2. Ando H, Mitarai S, Kondo Y, Suetake T, Kato S, Mori T, Kirikae T. Evaluation of a line probe assay for rapid detection of gyrA

mutations associated with fluoroquinolone resistance in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *J Med Microbiol*, 60(Pt 2):184-188, 2011.

3. Ando H, Mitarai S, Kondo Y, Suetake T, Sekiguchi JI, Kato S, Mori T, Kirikae T. Pyrazinamide resistance in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Japan. *Clin Microbiol Infect*, 16(8):1164-1168, 2010.
4. Ando H, Kondo Y, Suetake T, Toyota E, Kato S, Mori T, Kirikae T. Identification of katG mutations associated with high-level isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(5):1793-1799, 2010.
2. 学会発表
 1. Kobayashi N. Foreign-born TB cases in Japan. Japan-Russia International Workshop 2010. The 54th ISTC Japan Workshop. Tokyo, May, 2010.
 2. Kobayashi N, Nakamichi S, Morino E, Takasaki J. Clinical features of foreign-born TB patients in Japan. 8th Asia-Pacific Travel Health Conference. Nara, October, 2010.
 3. Kirikae T: Genetic diagnosis of multi-drug resistant tuberculosis, Japan-Russia International Workshop 2010: The 54th ISTC Japan Workshop, May30, Tokyo.
 4. Kirikae T: A line probe assay for rapid detection of multidrug-resistant Tuberculosis. 14th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim: US-JAPAN Cooperative Medical Science Program, October 5, 2010 Penang, Malaysia.
 5. Ando H, Kato S, Mori T, Kirikae T. Down-regulation of katG expression is associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. 110th General Meeting of the American Society for Microbiology, U-3153, USA, May, 2010.
 6. 切替照雄: 遺伝子診断最新情報; シンポジウム「今日の多剤耐性結核(MDR)最新情報」。平成22年度全国結核対策推進会議、平成23年3月4日、東京。
 7. 小林信之, 石井 聡, 高崎 仁, 仲 剛, 飯倉元保, 平野 聡, 放生雅章, 杉山温人, 工藤宏一郎. 一般病棟入院後に判明した肺結核症例に関する検討. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 4月, 2010.
 8. 小林信之, 石井 聡, 高崎 仁, 仲 剛, 飯倉元保, 放生雅章, 杉山温人, 工藤宏一郎. 一般病棟に入院した後に診断された肺結核症例とその傾向に関する検討. 第85回日本肺結核病学会総会, 京都, 5月, 2010.
 9. 中道真仁, 小林信之, 石井 聡, 堀尾雄甲, 平石尚久, 水谷友紀, 高崎 仁, 仲 剛, 飯倉元保,