

表1 単回帰解析によるHIV感染状況毎の再発危険因子(1)  
Per 1,000 person-years after the successful TB treatment in 1997-2008

Characteristics	HIV- negative (n=4,791)					HIV -positive (n=2,684)				
	Recurred	PY	Rates	95% CI	P-value	Recurred	PY	Rates	95% CI	P-value
<b>Overall</b>	118	22979	5.1	4.3-6.2		90	9281	9.7	7.8-11.9	
<b>Regimen</b>					0.62					0.041
CAT1	110	21662	5.1	4.2-6.1	Ref	87	8472	10.3	8.2-12.7	Ref
Others	8	1317	6.1	2.6-12.0	0.62	3	808	3.7	0.8-10.8	0.083
<b>Hospital</b>					0.015					0.81
Provincial	27	8575	3.2	2.1-4.6	Ref	36	3826	9.4	6.6-13.0	Ref
District	91	14404	6.3	5.1-7.8	0.015	54	5455	9.9	7.4-12.9	0.81
Hospital/others										
<b>Prisoners</b>					0.043					0.044
No	112	22463	5.0	4.1-6.0	Ref	85	9098	9.3	7.5-9.3	Ref
Yes	6	515	11.6	5.3-26.3	0.043	5	182	27.4	8.8-64.0	0.019
<b>Race</b>					0.0001					0.77
Thai	95	21427	4.4	3.6-5.4	Ref	87	8917	9.8	7.8-12.0	Ref
Hill tribe	23	1552	14.8	9.4-22.2	<0.0001	3	364	8.3	1.7-24.1	0.78
<b>Age group</b>					0.0004					0.039
15-35	16	6704	2.4	1.4-3.9	Ref	68	5700	11.9	9.3-15.1	Ref
35-65	84	12611	6.7	5.3-8.3	<0.0001	21	3533	5.9	3.7-9.1	0.005
>65	18	3664	4.9	2.9-7.8	0.04	1	48	20.8	0.3-115.9	0.6
<b>Gender</b>					0.19					0.017
Female	32	7407	4.3	4.4-6.8	Ref	26	3760	6.9	4.5-10.1	Ref
Male	86	15571	5.5	3.0-6.1	0.19	64	5520	11.6	8.9-14.8	0.020

表1 単回帰解析によるHIV感染状況毎の再発危険因子(2)  
Per 1,000 person-years after the successful TB treatment in 1997-2008

Characteristics	HIV-negative (n=4,791)					HIV-positive (n=2,684)				
	Recurred	PY	Rates	95% CI	P-value	Recurred	PY	Rates	95% CI	P-value
<b>DOTS</b>					0.95					0.49
Yes	68	13038	5.2	4.1-6.6	Ref	46	4460	10.3	7.6-13.8	Ref
No	49	9687	5.1	3.7-6.7	0.80	42	4724	8.9	6.4-12.0	0.49
Unknown	1	254	3.9	0.1-21.9	0.87	2	96	20.8	2.3-75.2	0.33
<b>TB Site</b>					<0.0001					<0.0001
PTB	116	19257	6.0	5.0-7.2	Ref	70	5237	13.4	10.4-16.9	Ref
ETB	2	3158	0.6	0.1-2.3	0.0016	16	3481	4.6	2.6-7.5	<0.0001
PTB & ETB	0	564	0.0	0.0-6.6	>0.99	4	563	7.1	1.9-18.2	0.22
<b>Year since TX completion</b>					<0.0001					<0.0001
0	58	4612	12.6	9.6-16.3	Ref	12	2211	30.3	23.5-38.5	Ref
1	19	3984	4.8	2.9-7.5	0.0003	8	1695	3.5	1.3-7.7	<0.0001
2	16	3357	4.8	2.7-7.8	0.0010	9	1400	2.9	0.8-7.3	<0.0001
3	14	2742	5.1	2.8-8.6	0.0056	10	1138	5.3	1.9-11.5	<0.0001
4	6	2187	2.7	1.0-6.0	0.0011	10	901	2.2	0.3-8.0	0.0003
5	3	1732	1.7	0.4-5.1	0.0021	16	649	4.6	0.9-13.5	0.0014
6	1	1388	0.7	0.0-4.0	0.0078	9	449	2.2	0.0-12.4	0.0096
7	1	1099	0.9	0.0-5.1	0.016	6	316	0.0	0.0-11.7	>0.99
8	0	820	0.0	0.0-4.5	>0.99	5	222	4.5	0.1-25.0	>0.99
9	0	552	0.0	0.0-6.7	>0.99	3	151	0.0	0.0-24.4	>0.99
10	0	331	0.0	0.0-11.2	>0.99	1	92	0.0	0.0-39.9	>0.99
11	0	152	0.0	0.0-24.3	>0.99	0	50	0.0	0.0-74.2	>0.99
12	0	22	0.0	0.0-168	>0.99	1	7	0.0	0.0-567.9	>0.99

#### D. 考察

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てる必要がある。

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。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Pitabut N, Mahasirimongkol S, Yanai H, Ridruechai C, Sakurada S, Dhepakson P, Kantipong P, Piyaworawong S, Moolphaet S, Harnsuthivatchakul C, Yamada N, Keicho N, Okada M, Khusmith S, Decreased granulysin and increased IFN-levels in plasma of patients with newly diagnosed and relapse tuberculosis. Submitted

##### 2. 学会発表

1. 野内英樹、山田紀男、吉山崇 難治性結核(再発・治療失敗例)の臨床疫学的研究 第 86 回日本結核病学会総会(一般口頭演題)、東京、2011 年 6 月
2. 野内英樹、出井禎 タイと日本における菌体と人検体の長期縦断的検体バンクによる結核の発症と難治化に関する要因研究 第 57 回日本臨床検査医学会学術集会(一般口頭演題、微生物検査(2)演題番号 10145)、東京、2010 年 9 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他  
該当なし

## 黒竜江省の結核菌解析に関する研究

研究分担者 服部俊夫 東北大学大学院感染症呼吸器病態学分野 教授  
研究協力者 凌 虹 ハルピン医科大学微生物学教室 教授  
鈴木定彦 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター  
国際疫学分野 教授

### 研究要旨

黒竜江省は中国の北東部に位置して、薬剤耐性結核菌が中国の他の地域より高いことが知られている。流行している結核菌の遺伝子型と薬剤耐性検出率を検討した。ハルピン市胸部病院で2007年5月から2008年10月までに収集した結核菌を解析した。Spoligotyping、北京型特異的PCR(RD105欠損)、mycobacterial interspersed repetitive units-variable-number tandem repeats(MIRU-VNTRs)法を用いて解析したところ、北京タイプが極めて高かった(89.5%)。しかし北京型にMDRが特に多いという見解は得られなかった。MIRU-VNTR lociでは、16座で4つのグループに分類したところ10のクラスターが見られた。クラスター率は10.0%と低く流行が活動性であるという証左は得られなかった。

### A. 研究目的

アジア諸国では結核の遺伝子型で北京型が多く流行している。この型は薬剤耐性と密接に関連していることも知られている。事実中国では多数の結核患者が発生し、若干減少傾向ではあるが感染症疾患の第一位である事には変わりはない(<http://www.moh.gov.cn>)。多剤耐性率(MDR)は2007年では8.3%にも及ぶ。

黒竜江省は中国の北東部に位置し、原発性と獲得性のMDRはそれぞれ55.6%と71.6%で極めて高いことが知られている。しかし黒竜江省で北京型が流行しているか否か、また北京型が薬剤耐性と関係あるかも明らかではない。ここではそれらの疑問に答えるべく結核菌の解析をした。

### B. 研究方法

#### 結核菌サンプル

本研究では2007年5月から2008年10月にハルピン胸部病院で収集された200の結核菌株を解析しH37Rvを参考株とした。結核菌培養はBACTECのMycobacterium Growth Indicator Tube(MGIT)で行いDNAを抽出した。結核菌の同定はPCRを用いて16S rDNA, Rv0577, Rv2073cとRv3120の領域で行った。また北京型の特徴であるRD105欠損もPCRで解析した。

#### スポリゴタイピング

Kamerbeekら(J. Clin. Microbiol. 1997, 35:907-914)の方法でスポリゴタイピングを行ったDR領域は以下のプライマーで増幅した。(DRa: GGTTTTGGGTCTGACGAC, DRb: GAGAGGGGACGGAAAC)得られたPCR産物はスベーカーの異なる43種類のプローブでハイブリダイズさせた。得られたバンドについてはSpolDB4データベースによりSIT(Spoligotype international Type)番号を決め、そのクレードを定めた。

#### MIRU-VNTR typing

まず19座の解析を行い、データの解析をHunter-Gaston discriminatory index(HDGI)及び

MIRU-VNTR法で解析した。

#### 系統樹解析

結核菌200株の遺伝子多型をR 2.11.1(<http://cran.r-project.org/>)を用いて、系統樹解析した。ここで解析した結核菌はクラスター群と非クラスター群の2種類に分類された。クラスターは2株以上の菌が同じ遺伝子群に属した際に表現される。

#### 統計学的解析

スポリゴタイピングとRD105欠損の一致はkappa統計で行った。0.75以上を一致すると判断した。

### C. 研究結果と考察

#### 黒竜江省の結核菌の北京型の疫学

BACTEC 960 Automated Systemを用いて収集した200株のうち、初期(2007年5月から11月)に収集した44株について、スポリゴタイピングとRD105欠損の2法での北京型の同定を行った。前法では41株がSpolDB4 databaseで解析され(表1)39株は35-43スベーカーをもつ最もよく見られる北京型であった。もう一つの株はSIT190に属し、最後の株はデータベースには存在しない型であった。残りの3株は新しいタイプであった。44株のうち40株がRD105を欠損していた。スポリゴタイピングとRD105欠損のカッパ値は0.8451と高かった。他の156株については179株(89.5%)を北京型とし、10.5%を非北京型とした。

#### MIRU-VNTR 適正座数の検討

北京型が大多数であったので、MIRU-VNTR遺伝子解析が最も適切と思われる。最初に適正座数を決定するために、19 MIRU-VNTR座で解析した(表2)。最初の44株のアリル多様性率は19座では(QUB11b, QUB26)0.6となりよく分離された。7座(MIRU4, MIRU16, MIRU26, MIRU31, MIRU40, Mtub21 and Mtub4)の多様性度は低いが(0.3≤h≤0.6), ETR C(h=0.068)とETR B(h=0.066)は特に多様性度は低かった。MIRU23(h=0)座には多様性はなかった。そこでETR C, ETR B



(表3)

TABLE 3. Differences of MTB characteristics among the four sub-groups\*

Characteristic	No. of isolates	Sub-groups (%)				P value
		□ (n = 21)	□ (n = 13)	□ (n = 21)	□ (n = 145)	
<b>Resistance</b>						
Streptomycin	85	9 (42.9)	6 (46.2)	8 (38.1)	62 (42.8)	0.9704*
Isoniazid	92	9 (42.9)	8 (61.5)	7 (33.3)	68 (46.9)	0.4317*
Rifampin	55	4 (19.0)	7 (53.8)	3 (14.3)	41 (28.3)	0.0815
Ethambutol	48	4 (19.0)	6 (46.2)	3 (14.3)	35 (24.1)	0.2070
MDR	51	4 (19.0)	6 (46.2)	2 (9.5)	39 (26.9)	0.1032
Four-drug susceptibility	77	8 (38.1)	3 (23.1)	9 (42.9)	57 (39.3)	0.6786*
Four-drug resistance	23	2 (9.5)	3 (23.1)	1 (4.8)	17 (11.7)	0.4402
History of TB <sup>#</sup>	126	17 (81.0)	9 (69.2)	11 (52.4)	89 (61.4)	0.2294
Hemoptysis	169	15 (71.4)	9 (69.2)	20 (95.2)	125 (86.2)	0.0562
Beijing strains	179	3 (14.3)	12 (92.3)	20 (95.2)	144 (99.3)	<0.0001
Clustered	30	0 (0)	0 (0)	0 (0)	30 (20.7)	0.0018

\*The numbers in the parentheses indicate the percentages from each subgroup.

\*Chi-square test, the rest were Fisher's exact test.

# The number of patients with acquired TB.

#### クラスター株の特性

北京型の30株が10のクラスターを形成しその比率は10.0%であった。非北京型の殆どがクラスターを形成していなかった。殆どのクラスターは小さく4株(A6), 3株(A5, A10)で以下は2株であった。結核菌収集時期の前期, 2007年5月から2008年5月(106株)と後期2008年6月から2008年10月(94株)はそれぞれ6.4%と12.8%であった(OR, 0.3240; 95% CI, 0.1161-0.8265; P = 0.0088)。

またクラスターの場所を見るとA2とA7は黒竜江省の郊外でA3-A6, A9, A10はハルビン市であった。

#### 黒竜江省の結核菌の薬剤耐性

ストレプトマイシン、イソニアジッド、リファンピシンとエタンブトールに対する感受性のうち77株(38.5%)は4種類全てに感受性であった。また123株(61.5%)は少なくとも1種類に抵抗性で51株(41.5%)がMDR-MTBであった(表3)。51株のMDR-MTB株のうち48株が北京型であった。これから北京型の26.8%(48/179)がMDRで非北京型の14.3%(3/21)がMDRであった。この2群に有意差はなかった。(OR, 0.4564; 95% CI, 0.0824-1.6670; P = 0.2127)。

#### E. 結論

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が欠損しているため北京型とした。

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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Zhang Jing, Yamada O, Matsushita Y, Haorile Chagan-Yasutan, Hattori T. Transactivation of human osteopontin promoter by human T cell leukemia virus type 1-encoded Tax protein. *Leuk Res* 34:763-8, 2010
- 2) Cheng DC, Zhong GC, Su JX, Liu YH, Li Y, Wang JY, Hattori T, Ling H, Zhang FM. A sensitive HIV-1 envelope induced fusion assay identifies fusion enhancement of thrombin. *Biochem Biophys Res Commun*. 39:1780-4, 2010

- 3) Chagan-Yasutan H, Shiratori B, Siddiqi UR, Saitoh H, Ashino Y, Arikawa T, Hirashima M, Hattori T. The increase of plasma galectin-9 in a patient with insulin allergy: a case report. *Clin Mol Allergy*. 8:12, 2010
- 4) Guio H, Ashino Y, Saitoh H, Mizusawa M, Xiao P, Soto A, Theo A and Hattori T. High numbers of Interferon- $\gamma$ -Producing T Cells and Low Titers of Anti-Tuberculous Glycolipid Antibody in Individuals with Latent Tuberculosis. *Tohoku J Exp Med*220:21-5. 2010
- 5) Shimane K, Kodama EN, Nakase I, Futaki S, Sakurai Y, Sakagami Y, Li X, Hattori T, Sarafianos SG, Matsuoka M. Rev-derived peptides inhibit HIV-1 replication by antagonism of Rev and a co-receptor, CXCR4. *Int J Biochem Cell Biol*. 42(9):1482-8.2010
- 6) Li S, Kodama EN, Inoue Y, Tani H, Matsuura Y, Zhang J, Tanaka T, Hattori T. Procyanidin B1 purified from Cinnamon cortex suppresses hepatitis C virus replication. *Antivir Chem Chemother*. 20(6):239-48. 2010
- 7) Wang J, Liu Y, Zhang C-L, Ji B-Y, Zhang L-Z, Shao Y-Z, Jiang S-L, Suzuki Y, Nakajima C, Fan C-L, Ma Y-P, Tian G-W, Hattori T, and Hong L. Genotypes and characteristics of clustering and drug-susceptibility of Mycobacterium tuberculosis isolates in Heilongjiang Province, China *J Clin Microbiol* in press
- 8) Siddiqi U. R, Punpunich Warunee , Chuchottaworn Charoen , Ashino Y, Saitoh H, Okada M, Chotpittayasunondh T and Hattori T. Antibody to tubercular glycolipid antigen; TBGL-IgG and TBGL-IgA responses in pulmonary tuberculosis patients and healthy individuals from Thailand: a TB-endemic country (投稿中)
- 9) Zhang Jing, Yamada O, Kida S, Matsushita Y, Yamaoka S, Hattori T, Identification of CD44 as a downstream target of noncanonical NF- $\kappa$ B pathway activated by Human T-cell leukemia virus type 1-encoded Tax protein (投稿中)
- 10) Bisi-Johnson M A, C. L. Obi, Hattori T, Oshima Y, Li S, Kambizi L, Eloff J N and Vasaikar S D. Evaluation of the antibacterial and anticancer activities of some South African medicinal Plants. *BMC Complementray and Alternative Medicine*11:14, 2011
2. 学会発表
- 1) 芦野有悟、齋藤弘樹、服部俊夫 「HAART 施行中の薬剤副作用に対する Raltegravir への薬剤変更を行った 3 例」2010.4.5~6 第 84 回感染症学会 京都
- 2) 浩日勲、齋藤弘樹、芦野有悟、服部俊夫 「in vitro, In vivo での HAART による Osteopontin 産生促進機構の解析」2010.4.5~6 第 84 回感染症学会 京都
- 3) Siddiqi U.R , Hattori T. Enhanced circulatory leptin with elevated level of KL-6 in Thai 第 80 回実験結核研究会 2010.5.19 京都
- 4) 服部俊夫 「マニラの熱帯感染症にみる渡航感染症」 第 9 回東北国際保健研究会 2010.5.29 仙台
- 5) Li , Qian H, Kodama E, Horie S , Watanabe Y, Kumagai H, Govender T, Kodama T, Hattori T. Building the Mouse Model of HIV-1 DNA Vaccine Delivered by Nanobubbles and Ultrasound. THE 8<sup>TH</sup> CHINA-JAPAN INTERNATIONAL CONFERENCE of VIROLOGY 2010.7. 7/4~7/7 HARBIN, CHINA
- 6) Chagan-Yasutan H, Zhang J, Fukumoto M and Hattori T. Potential role of OPN in ATL pathogenesis. 3<sup>rd</sup> WSU Research Conference 18-20 August 2010. The Health Resource Centre .Mthatha, Eastern Cape
- 7) Kabongo PN, Obi CL, Hattori T, Nakajima C, Suzuki Y and Moyo SR. Isolation, antibiogram profile and molecular characterization of Mycobacterium spp .from cattle and wildebeest in Mpumalange province. 3<sup>rd</sup> WSU Research Conference 18-20 August 2010. The Health Resource Centre. Mthatha, Eastern Cape
- 8) Bisi-Jonson MA ,Obi CL, Hattori T, Vasaikar S and Baba K. Diversity of extended spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Salmonella from the Eastercape, South africa. 3<sup>rd</sup> WSU Research Conference 18-20 August 2010. The Health Resource Centre. Mthatha, Eastern Cape

- 9) Bisi-Jonson MA, Obi CL, Hattori T, Oshima Y, Kambizi L, Eloff JN and Li S. Profiling of some South Africa medicinal plants for their therapeutic safety. 3<sup>rd</sup> WSU Research Conference 18-20 August 2010. The Health Resource Centre. Mthatha, Eastern Cape
- 10) Bisi-Jonson MA, Obi CL, Hattori T, Oshima Y, Kambizi L, Eloff JN and Li S. Evaluation of the therapeutic safety of some South Africa medicinal plants. 3<sup>rd</sup> WSU Research Conference 18-20 August 2010. The Health Resource Centre. Mthatha, Eastern Cape
- 11) CHAGAN-YASUTAN. H, S.LI, J.ZHANG, T. Hattori. Induction of Osteopontin Synthesis of Huh7 cells by Anti-HIV Agents. THE 50th ICAAC BOSTON Sep12-15, 2010
- 12) Shiratori Beata Fluoroquinolones up-regulate osteopontin production in pulmonary epithelial cell line A549. 10/18 第2回エコバイオフォーラム仙台
- 13) Siddiqi UR Bio-markers among Non TB mycobacterium (NTM) Patients with or without latent TB infection 10/18 第2回エコバイオフォーラム 仙台
- 14) CHAGAN-YASUTAN. H, Expression of osteopontin in non-leukemic cells in adult T cell leukemia/lymphoma. 10/18 第2回エコバイオフォーラム仙台
- 15) Zhang J, Yamada O, Kida S, Matsushita Y, Yamaoka S, Chagan-Yasuatan H, Hattori T. Identification of CD44 as downstream target of noncanonical NF-kappaB pathway activated by Human T-cell leukemia virus type 1-encoded Tax protein. 2/24 マヒドール大学微生物学教室 招待講演 Multiple roles of osteopontin in infectious diseases.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特許取得 なし

# 先進国における輸入感染症としての多剤耐性結核対策に関する研究

研究分担者 高鳥毛敏雄 関西大学・社会安全学部・社会安全研究科教授

## 研究要旨

米国の中で最も結核罹患率の高いカリフォルニア州サンフランシスコ市およびサンタクララ郡を訪問して結核対策に関する調査を行った。サンフランシスコ市、サンタクララ郡の2009年の罹患率は14.2と10.8、患者数は116人と194人、外国生まれの患者割合は76%と90%であった。患者数は少なくなっているが、ホームレス者、外国人、HIV感染者、薬物依存者、耐性結核患者など複合的な問題を抱える結核患者への対応に直面させられていた。それに対する結核対策として、最新の医療技術の導入した効果的な対策の推進、ホームレスなどの社会的支援施策と連動した対策の実施、結核対策全体をマネジメントする組織と施設を位置づけた対策の展開、一般医療機関の診断・治療を支援を中心とした対策を進めていた。米国サンタクララ郡、サンフランシスコ市の罹患率がわが国と比べて低いにも関わらず外国人、ホームレス者に対しても、専門性が高い結核対策を進めることができている背景には公衆衛生行政の基盤の上に結核対策が確立しているからであると思われる。今後のわが国の結核対策においても、公衆衛生行政の基盤整備とあわせた検討が必要であると思われる。

## A. 研究目的

米国の都市の中で罹患率の高いサンフランシスコ市およびサンタクララ郡に訪問し、低蔓延状況の中で、外国人、およびホームレス者、HIV感染者、耐性結核などの結核患者に対して行っている結核対策の現状について調査を行った。調査項目として、結核対策のマネージメントシステム、結核のサーベイランス体制、結核菌検査システム、結核患者に対する医療システム、専門医療機関および入院治療機関の位置づけ、一般医療機関における医療者への診断支援システム、一般医療機関における医療関係者への啓発・研修、さらに一般市民に対する啓発、そして外国人、社会経済弱者に対する対策の現状とした。

## B. 研究方法

米国における結核対策に関する訪問調査はサンフランシスコ市結核対策部長 Masae Kawamura、サンタクララ郡結核対策部長 Julie Higashi のご協力とご支援により行った。平成22年11月1日～5日にサンタクララ郡とサンフランシスコ市を訪問して行った。訪問先は、サンタクララ郡の Lenzen TB clinic、サンフランシスコ市の TB clinic、San Francisco General Hospital、Francis J. Curry National TB Center、シェルターである。

## C. 研究結果

### 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。

### 2. サンフランシスコ市における結核対策の現状

- 1) 移民、難民など外国生まれのサンフランシスコ在住者に対し、無保険者に対しては無料で結核健診を実施されていた。発見された患者には、徹底的な治療支援がなされていた。
- 2) 結核クリニックはサンフランシスコの移民、難民等外国生まれの者も含めすべての在住者の結核に対応している拠点施設となっている。
- 3) 接触者調査では、結核患者がホームレス者の場合であっても接触者を明らかにする努力がなされていた。
- 4) ホームレス者に対しては、シェルターの短期間の収容と保護がなされ、その後自立支援の施策を行い、対象者との信頼関係をつくりながら結核対策



が進められていた。

- 5) シェルター入所中には徹底的に治療支援と追跡が行うことができている。しかし、シェルターを退所し、簡易宿泊施設に移った患者から脱落者が出てきている。そのためその対策をどうするかが課題となっていた。
- 6) 医療とケアの提供にあたっては、患者中心主義を徹底し、週に一回、全フォローケースについて全スタッフのカンファレンスを行っていた。スタッフ間でケアのあり方について徹底討論が行われ、患者に対する支援や関わりの方針が決められていた。
- 7) 結核対策部門は結核の疫学指標をモニターし、市中の医療機関や大学病院であっても指導できる技術水準と信頼感がもたれていた。
- 8) コストカット圧力が厳しく、決して予算面、ハード面でも十分な状況になっていない。結核対策予算は、市60%、CDC30%、残りは州が負担していた。
- 9) ホームレス支援と患者や接触者検診の追跡のため、すべてのシェルター利用者の情報がコンピュータ登録がなされ、行方不明者を極力防ぐシステムを設けられていた。
- 10) シェルターは、現在の市長の新しい施策として行われ、入所者の支援内容が見直され、施設の清潔さや快適さが格段に改善されている。ドロップインで受け入れの登録がなされ、入所中は清潔なトイレとシャワー、寝床、クリーニング、食事、プライマリケア(歯科を含む)が提供されていた。入所期間は7日から1か月であり、在宅でケアを徹底する方法の方がコストはかからないとのことである。
- 11) 大規模なシェルターは公的に運営され、小規模なシェルターはNPOによって運営されている。
- 12) 結核対策に必要な技術的基盤が確立され、徹底した患者の追跡、結核疑い者の胸部レントゲン写真については専門医のチェックが行われている。
- 13) QFTと発見患者さんについては、短期入院とDOTを結核専門医が担当し、一般医療機関で診療を受けている患者の診療をサポートしている。
- 14) 結核病床は縮小され、入院は極力押さえられていた。外来中心で治療が行われ、患者の感染診断には最新の世代のQFTが導入されていた。しかし、人件費を含めた全体の結核対策もコストが少なくなるように工夫されていた。

#### D. 考察

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があると思われる。

#### E. 結論

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. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) T.Tabuchi, T.Takatorige, Y.Hirayama, N.Nakata, S.Harihara, A.Shimouchi, K.Fujita, H.Yoshida, Y.Tamura, T.Nagai, T.Matsumoto, T.Takashima, H.Iso, Tuberculosis infection among homeless persons and caregivers in a high-tuberculosis-prevalence area in Japan: a cross-sectional study, BMC Infectious Diseases, 11:22, doi:10.1186/1471-2334-11-22, 2011.
- 2) 高鳥毛敏雄: 米国、イギリス、ドイツにおける結核医療の提供体制, 結核, 85(2), 98-101, 2010.

##### 2. 学会発表

- 1) 第85回日本結核病学会総会(京都)、一般演題、低蔓延下の結核対策を支えるわが国の保健医療体制の課題、2010年5月21日。
- 2) 第69回日本公衆衛生学会総会(東京)、一般演題、低蔓延時代の結核対策を支える保健医療基盤の検討、2010年10月29日。

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## ベトナム多剤耐性結核の宿主要因に関する研究

研究分担者 慶長直人 国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部長

### 研究要旨

ホーチミン市のファムゴックタック病院は、ベトナム南部随一の結核拠点病院である。多剤耐性結核についての共同研究を実施したのでその結果を報告する。多剤耐性結核の発生に関わる宿主側の要因を検討すべく、研究プロトコルを作成し、両国両施設の倫理委員会での承認を得たのち、断面研究を実施した。60名の多剤耐性結核患者の研究参加を得て、結核菌の殺菌に関わる分子である granulysin について、遺伝子タイピングと遺伝子発現量の検討を行った。今後さらに、いくつかの候補遺伝子について、予後との関連を見て行くことが必要と思われた。

### A. 研究目的

わが国に居住している外国人のうち、アジア人は、全体の70%以上を占めるため、アジア人の結核対策が外国人結核対策に重要である。日本人の結核発症者の中で、多剤耐性結核の頻度は低いものの、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、これまで先進国がたどったように、今後、わが国でも外国人結核対策が、多剤耐性結核対策の主な部分を占めるようになる可能性が懸念される。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、わが国を含むアジア全体の、多剤耐性結核対策に貢献するものと思われる。

これまで我々は東南アジア諸国において、結核に関する国際共同研究をおこなってきた。多剤耐性結核の発生は、不適切な治療により、結核菌ゲノムの中の薬剤効果に関連する遺伝子に変異が生じ、増殖することが最も重要なメカニズムとして知られており、結核医療に関わる人為的要因や制度上の問題が一義的であるが、その背景となる宿主側の免疫応答、薬剤代謝能なども、大いに関与しているものと推測される。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手法により明らかにすることを目的にしている。

### B. 研究方法

ベトナム南部のホーチミン市にあるファムゴックタック病院は、ベトナム国内南北2カ所の薬剤感受性検査を実施する結核レファランスセンターのうち、ベトナム南部の結核対策の責任病院であり、本研究班において初めて我が国から共同研究を申し入れた。研究プロトコルを作成し、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、RFLP法などを用いた遺伝子タイピングを実施した。

(倫理面への配慮)

実際の患者検体を用いたゲノム解析は、両国の指針(我が国では、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針)に準拠して、事前にプロトコルは、両国の倫理委員会の承認を得た上で実施した。

### C. 研究結果

ベトナムの多剤耐性率は、約5%と報告され、都市部の、結核既治療再排菌例に多いことが、我々独自の調査でも明らかである(未発表資料)。ファムゴックタック病院では、2006年に多剤耐性結核外

来を開設して以来、360例の多剤耐性結核患者がすでに治療を受けており、そのうち57例が治療を完遂しており、多剤耐性結核のベトナムにおける臨床共同研究の受け入れ機関として、最も適していた。

本研究では、共同研究のプロトコル作成を行い、医療センター倫理委員会にて平成21年5月承認、ファムゴックタック病院倫理委員会にて平成21年8月承認を得た。

エントリー基準は、薬剤感受性試験で多剤耐性結核(INH, RFP耐性)と診断された、16歳以上70歳までの患者で、18か月の治療、観察期間を完遂できる見通しがあり、書面同意を得たものとして、HIV陽性、悪性腫瘍、免疫抑制剤の使用者を除外した。

新型インフルエンザのアウトブレイクのために中断を余儀なくされたが、外来通院中の多剤耐性結核患者60名から研究参加の同意を得て、平成21年9月に患者リクルートを開始し、平成22年3月にリクルートを終了した。今年度、サンプルの輸送を行ない、解析を実施することができた。

大規模なコホート研究は、本研究班の3年間の枠組みでは困難なため、断面研究に近い小規模な研究デザインとならざるを得なかった。本年度は、特に結核の殺菌能と深く関係するとされている granulysin 遺伝子についてその特徴的な遺伝子変異と遺伝子頻度、遺伝子発現の検出を試みた。

granulysin 遺伝子には、rs11127として公共のデータベースに登録されている SNP がよく知られており、これは、アミノ酸の非同義置換 Thr119Ile を生じる。アレル頻度を決定(Cアレル=40%, Tアレル=60%)し、全血中の発現量との関連をみたが、ベトナム人検体で、遺伝子発現量と遺伝子型には、統計的に有意な関連は認められなかった(図1)。

今後、さらに、治療反応性との関連を明らかにする予定である。

### D. 考察

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、明らか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。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 書籍
- 2) 雑誌

- 1) Tanaka T, Sakurada S, Kano K, Takahashi E, Yasuda K, Hirano H, Kaburagi Y, Kobayashi N, Hang NT, Lien LT, Matsushita I, Hijikata M, Uchida T, Keicho N. Identification of tuberculosis-associated proteins in whole blood supernatant. *BMC Infect Dis.* 2011;11(1):71.
- 2) Keicho N, Hijikata M. Genetic predisposition to diffuse panbronchiolitis. *Respirology.* 2011 in press
- 3) Hijikata M, Matsushita I, Tanaka G, Tsuchiya T, Ito H, Tokunaga K, Ohashi J, Homma S, Kobashi Y, Taguchi Y, Azuma A, Kudoh S, Keicho N. Molecular cloning of two novel mucin-like genes in the disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Hum Genet.* 2011;129(2): 117-28.
- 4) Keicho N. [Biomarkers to assess different aspects of tuberculosis--from development to relapse]. *Kekkaku.* 2010;85(11):823-8.
- 5) Ridruechai C, Mahasirimongkol S, Phromjai J, Yanai H, Nishida N, Matsushita I, Ohashi J, Yamada N, Moolphate S, Summanapan S, Chuchottaworn C, Manosuthi W, Kantipong P, Kanitvittaya S, Sawanpanyalert P, Keicho N, Khusmith S, Tokunaga K. Association analysis of susceptibility candidate region on chromosome 5q31 for tuberculosis. *Genes Immun.* 2010;11(5):416-22.

## GNLV marker SNP rs11127 and whole blood gene expression

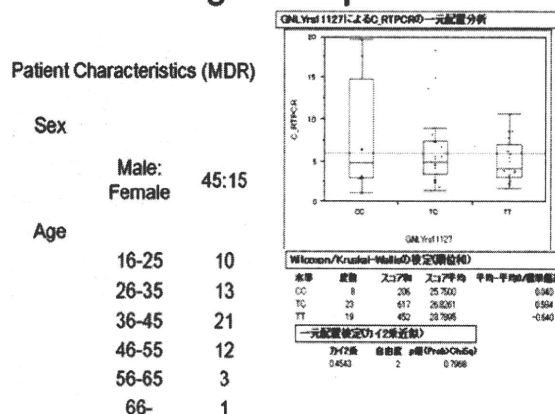


図1 患者の年齢分布と Granulysin の遺伝子型別発現量

# 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

研究分担者 櫻田紳策 国立国際医療センター 呼吸器疾患研究部 室長

## 研究要旨

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)vitaminD<sub>3</sub> 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。

## A. 研究目的

HIV 合併結核においては、様々な免疫機構の障害・異常が報告されているが、本研究では、患者血漿中の活性型 vitamin D 値と患者末梢血単球由来マクロファージにおける BCG 感染時に発現する vitamin D 関連遺伝子の発現レベルを検討することを目的とした。

## B. 研究方法

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、③ HIV 感染者 HAART(-)、④ HIV 感染者 HAART(+)、⑤ HIV 合併結核患者 (HAART(-)) の 5 群とし、サンプル数として、血漿 25(OH)vitaminD<sub>3</sub> および 1,25(OH)vitamin D<sub>3</sub> の測定は、それぞれ①8 名、②23 名、③11 名、④17 名、⑤7 名由来の全血から血漿を分離し、-80℃で一定期間保存後 ELISA にて実施した。また、単球より分化した培養マクロファージを用いての in vitro 実験では、①11 名、②10 名、③8 名、④12 名、⑤3 名由来の全血から末梢血単核球をフィコール法で分離後抗 CD14 抗体に認識した磁気マイクロビーズを用いて単球を分離した。単球は M-CSF(5ng/ml)または GM-CSF(1ng/ml)存在下に 10%FBS RPMI1640 で 7 日間培養した。BCG は Tokyo172 株を使用し、MOI=2 で感染させた。感染 48 時間後に total RNA を抽出し、CYP27B1、VDR、cathelicidin について定量的 RT-PCR を実施して、GAPDH 遺伝子の発現レベルと比較して検討した (図 1)。

### (倫理面への配慮)

ヒト臨床検体を用いた研究であるため各臨床検体の採取にあたって、インフォームド・コンセントを取得した。その他の倫理的配慮は、タイ公衆衛生保健省の定める指針に準拠した。本研究に関する試料採集に関しては、先行研究において平成 18 年 12 月に国立国際医療センター倫理委員会にて、平成 19 年 5 月にタイ公衆衛生省、6 月にチェンライ病院の倫理委員会からそれぞれ承認を得ている。

## C. 研究結果

### 1. 血漿 25(OH)vitamin D<sub>3</sub> (表 1)

血漿 25(OH) vitamin D<sub>3</sub> レベルにおいて、結核と HIV 合併結核群においては他群より deficiency が多い傾向が見られたが、サンプル数が少なく健常者との有意差は得られなかった。また、血漿 1,25(OH) vitamin D<sub>3</sub> は結核 2 名、それ以外の患者グループで各 1 名の合計 5 名が正常下限 (39pmol/L) 以下

## Vitamin D and Macrophage Activation

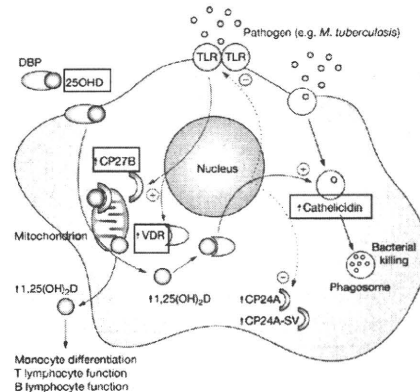


図 1

であった。

### 2. Vitamin D 関連遺伝子の発現

① CYP27B1: GM-CSF によって文化した GM-Mφ においては、未刺激であってもどのグループであっても CYP27B1 の発現が一定レベルで認められると同時に、BCG 感染による発現増幅が認められた。また、GM-CSF 単独では増幅作用が認められなかったが、BCG 感染時に GM-CSF が存在した場合、発現は増強される傾向が認められた。一方、M-CSF によって分化した M-Mφ においては、未刺激では CYP27B1 の発現は、極めて低く検出限界以下であったが、BCG 感染によって発現が増強した。さらに、結核群、HIV 結核群、健常者群に比較して、非結核 HIV 群では BCG 刺激によっても CYP27B1 の発現レベルが低くなる傾向が認められた。M-CSF 存在下では、M-Mφ における CYP27B1 の発現はむしろ抑制された。GM-Mφ と M-Mφ における GAPDH との発現比を比較すると GM-Mφ において CYP27B1 の発現が高い傾向にあった (図 2)。

② VDR: GM-Mφ においては、VDR の発現は、GM-CSF の存在によって増幅されるが、BCG 感染によってはされない。M-Mφ においては、M-CSF の存在下では VDR 発現は増幅されずに、むしろ抑制的な効果

表 1

Group	Total	Deficient, no. (%)	Insufficient, no. (%)	Sufficient, no. (%)
TB+ HIV-	23	9 (39)	11 (48)	3 (13)
HIV+ TB- HAART-	11	0 (0)	8 (73)	3 (27)
HIV+ TB- HAART+	17	6 (35)	11 (65)	0 (0)
HIV+ TB+ HAART-	7	3 (43)	3 (43)	1 (14)
Healthy control	8	2 (25)	3 (38)	3 (38)
total	66	20 (30)	36 (55)	10 (15)

\* Deficient, <50 nmol/L; insufficient, 50-75 nmol/L; sufficient, >75 nmol/L

CYP27B1

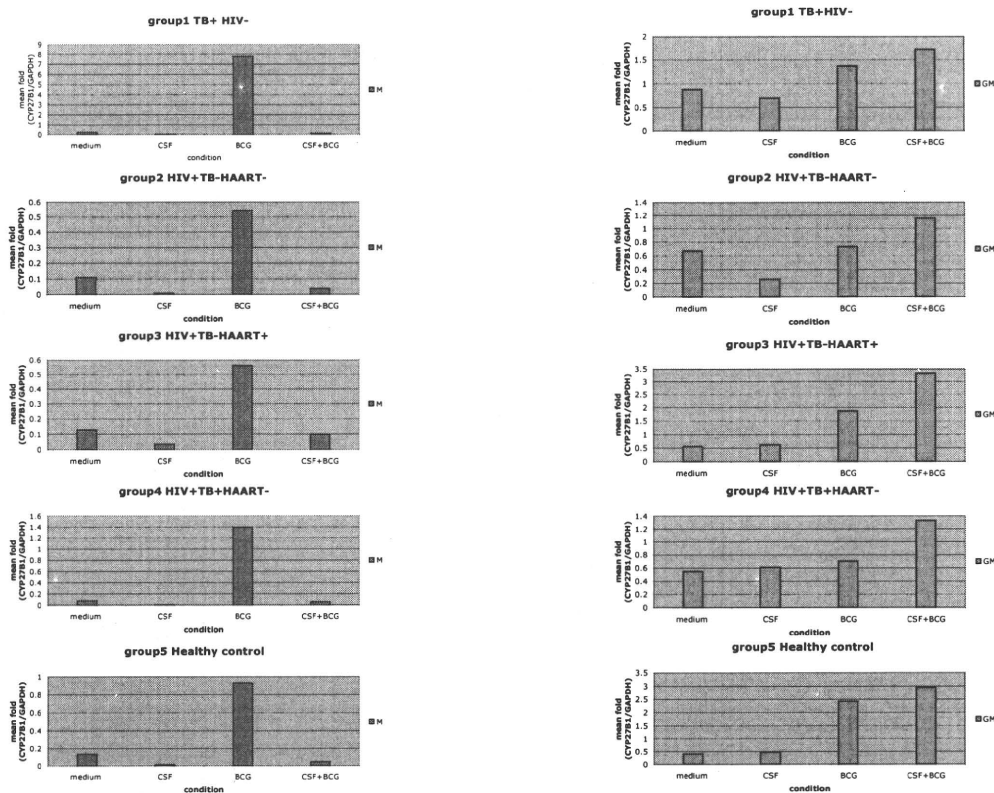
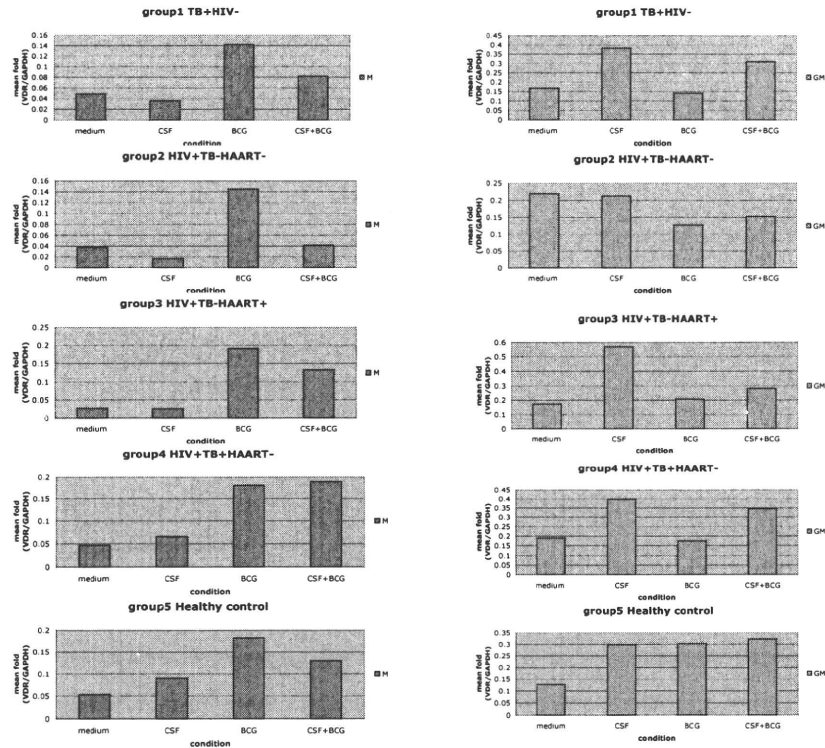


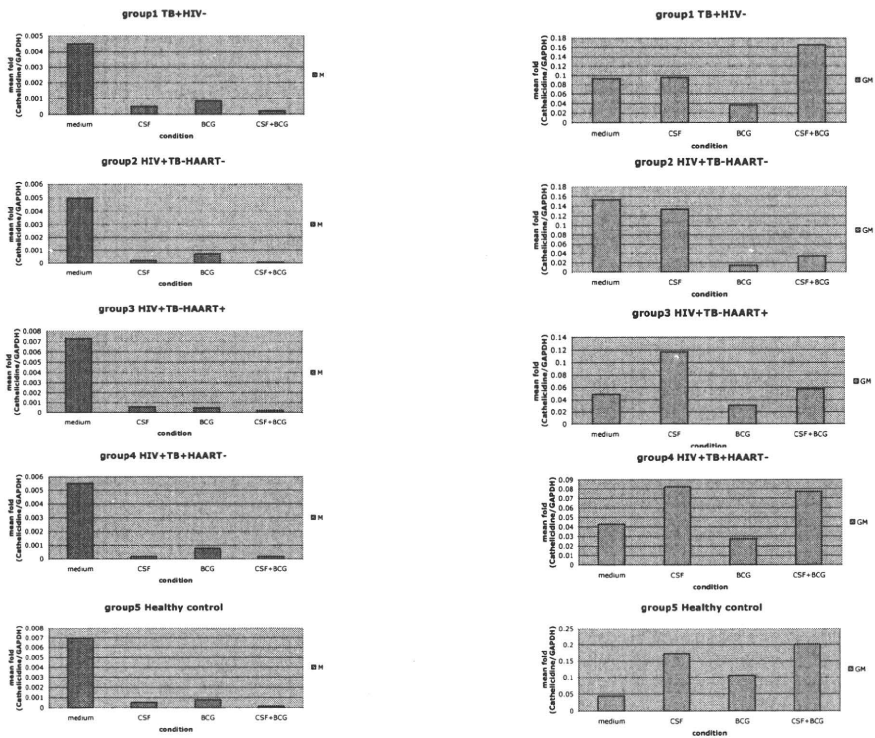
图 2

# VDR



3

# Cathelicidine



4

が認められた。一方、BCG 感染による増幅が認められた。GAPDH との発現比では、GM-M $\phi$ 、M-M $\phi$ いずれの場合も発現レベルは 0.6 以下であった (図 3)。

- ③ Cathelicidine : GM-M $\phi$  においては、GM-CSF および BCG 感染のいずれの刺激でも明らかな cathelicidine 遺伝子の発現増強は認められなかった。M-M $\phi$  においても、未刺激と比較しても M-CSF および BCG 感染において、cathelicidine 遺伝子は検出限界以下のレベルであった。GAPDH 遺伝子との発現比では、GM-M $\phi$  においてはいずれも 0.2 以下、M-M $\phi$  においては、0.007 以下であった (図 4)。\*図 2~4 については、各遺伝子と GAPDH 発現レベルとの比の平均値を棒グラフで表した。

#### D. 考察

健常、結核、HIV+ HAART-、HIV+ HAART+、HIV+ TB+ の 5 群について血漿 25(OH)D<sub>3</sub> と 1,25(OH)D<sub>3</sub> を ELISA により測定した。また、末梢血単球から分化させたマクロファージ、GM-M $\phi$  と M-M $\phi$  に対して BCG の感染実験を行い、Vitamin D 関連遺伝子の発現を定量的に評価した。M-M $\phi$  は結核菌および BCG に対して抵抗性であり、一方 GM-M $\phi$  は感受性である。しかし、10%FBS の培地に含まれる 25(OH)D<sub>3</sub> は十分量ではなく、細胞内に取り込まれた後、CYP27B1 が高発現しても、十分な量の 1,25(OH)D<sub>3</sub> へと転換が起きないこと、このため VDR を介した cathelicidine 遺伝子の発現が起きないことが指摘されているが、GM-M $\phi$  と M-M $\phi$  双方における実験結果は、この指摘を裏付けるものとなった<sup>1)</sup>。今後、培地に 25(OH)D<sub>3</sub> のサプリメントを加えて cathelicidine 遺伝子の発現を検討することによって活性型 vitamin D によるマクロファージの活性化が GM-M $\phi$  と M-M $\phi$  の表現型の違いによって異なるかどうか確認することができる。さらに、CYP27B1 遺伝子は、M-M $\phi$  では BCG 感染ではじめて誘導され、未刺激でも一定レベルで発現している GM-M $\phi$  と対照的な結果となった。多くのサイトカイン遺伝子の発現が、GM-M $\phi$  では構成的であり、M-M $\phi$  では誘導性であることから細胞の基本的な性格による違いと考えられる。また、HIV 陽性群では、GM-M $\phi$  と M-M $\phi$  の双方において、CSF 存在下ないし BCG 感染時において vitamin D 遺伝子の発現レベルが低下している傾向が認められた。このことは HIV 感染の影響である可能性が考えられるが、今回は培養細胞の HIV 感染については検討していない。HIV については、結核菌と逆で M-M $\phi$  は感受性で、GM-M $\phi$  は抵抗性であるが<sup>2)</sup>、患者由来培養マクロファージにおける HIVp24 の検出を試みる必要があると考えている。

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.

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)vitaminD<sub>3</sub> 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。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
該当なし

2. 学会発表  
該当無し

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当無し
2. 実用新案登録  
該当無し
3. その他  
該当無し

#### E. 結論

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

# 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

研究分担者 竹田 潔 大阪大学大学院医学系研究科・免疫制御学・教授

## 研究要旨

非病原性結核菌 *M. bovis* BCG で欠損する ESAT-6, CFP-10 のマクロファージの機能におよぼす影響を解析した。CFP-10 を恒常的に発現したマクロファージには、BCG 感染に対する感受性が高くなった。このことから、CFP-10 は病原性因子として作用することが確認された。さらに ESAT-6, CFP-10 に会合する宿主分子を、プロテオミクス法のアプローチにより同定した。従来 ESAT-6 に会合することが報告されている分子に加え、貪食胞に発現する分子がいくつか同定された。今後、これら分子が ESAT-6, CFP-10 と会合した結果、貪食胞の成熟にどのような影響を及ぼすかを解析していきたい

## A. 研究目的

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。

## B. 研究方法

結核菌がマクロファージに侵入後、貪食胞の成熟を抑制し、増殖をするが、貪食胞の成熟を抑制するメカニズムには不明な点が多い。結核菌の病原性因子として分泌たんぱく質である ESAT-6, CFP-10 が知られていて、これらの遺伝子はワクチン株としてももちいられる *M. bovis* BCG 株で欠損していることが知られている。ESAT-6 は、T 細胞に対する強い抗原性を有していることが知られているが、一方で CFP-10 と複合体を形成し、貪食胞の中で結核菌から分泌されることも知られている。また、CFP-10 は貪食胞の成熟を抑制することを示唆する報告もある。そこで、マクロファージ内の貪食胞で分泌される ESAT-6, CFP-10 が宿主細胞とどのように相互作用するかを解析した。ESAT-6 および CFP-10 の哺乳類用の発現ベクターを作製し、マクロファージ細胞株 RAW264.7 に導入し、両遺伝子の恒常発現細胞株を単離しようとした。CFP-10 恒常発現マクロファージに、非病原性の BCG を感染させ、2, 3 日後に菌数を測定した。CFP-10 発現細胞を用い、Flag, Myc タグなどを用いた免疫沈降法により、CFP-10 に会合する宿主分子の同定を試みた。ESAT-6 については、恒常発現細胞株が単離できないので、GST 融合 ESAT-6 を一過性に発現させ、その細胞溶解液を GST pull down を行うことにより、ESAT-6 に会合する宿主分子の同定を試みた。

### 倫理面への配慮

本研究は実験動物を用いたものを含むが、実験は大阪大学動物実験指針に基づき行った。実験動物の

飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に 1 回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、苦痛の軽減を行うよう配慮している。

## C. 研究結果

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。

## D. 考察

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。



## E. 結論

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。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1 Hedayat, M., Takeda, K. and Rezaei, N.: Prophylactic and therapeutic implications of Toll-like receptor ligands. *Med. Res. Rev.* in press
- 2 Ueda, Y., Kayama, H., Jeon, S.-G., Kusu, T., Isaka, Y., Rakugi, H., Yamamoto, M. and Takeda, K.: Commensal microbiota induce LPS hyporesponsiveness in colonic macrophages via the production of IL-10. *Int. Immunol.* 22, 953-962 (2010).
- 3 Xiao, G., Miyazato, A., Abe, Y., Zhang, T., Nakamura, K., Inden, K., Tanaka, M., Tanno, D., Miyasaka, T., Ishii, K., Takeda, K., Akira, S., Saijo, S., Iwakura, Y., Adachi, Y., Ohno, N., Yamamoto, N., Kunishima, H., Hirakata, Y., Kaku, M., and Kawakami, K.: Activation of myeloid dendritic cells by deoxynucleic acids from *Cordyceps sinensis* via a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *Cell Immunol.* 263, 241-250 (2010).
- 4 Yamamoto, M. and Takeda, K.: Current views of Toll-like receptor signaling pathways. *Toll-Like Receptor Signaling in Liver Diseases.* 2010, 240365 (2010).
- 5 Okuyama, M., Kayama, H., Atarashi, K., Saiga, H., Kimura, T., Waisman, A., Yamamoto, M., and Takeda, K.: A novel inducible dendritic cell ablation model in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397, 559-563 (2010).
- 6 Kayama, H. and Takeda, K.: The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.* 12, 511-517 (2010).
- 7 Obana, M., Maeda, M., Takeda, K., Hayama, A., Mohri, T., Yamashita, T., Nakaoka, Y., Komuro, I., Takeda, K., Matsumiya, G., Azuma, J. and Fujio, Y.: Therapeutic activation of STAT3 by Interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Circulation* 121, 684-691 (2010).

### 2. 学会発表

- 1 Regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa. Kiyoshi Takeda.

Host-Pathogen interactions in

generalized bacterial infection. May 31-June 3, 2010, Greifswald, Germany

- 2 Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. Kiyoshi Takeda. International Symposium on Organelle Network: Microbiology, Immunology, and Cell Biology, July 12-13, 2010, Osaka, Japan
- 3 Regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa. Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, August 22-27, 2010, Kobe, Japan
- 4 自然免疫系の活性制御と腸管炎症. 竹田潔, 第22回微生物シンポジウム(特別講演)、2010年9月3-4日、大阪
- 5 Innate immune responses at the intestinal mucosa. Kiyoshi Takeda. Annual Meeting of The Society for Leukocyte Biology & The International Endotoxin and Innate Immunity Society, October 7-9, 2010, Vancouver, Canada

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## HVJ-Eベクターの非臨床及び臨床開発の状況

研究協力者 中島俊洋 ジェノメディア株式会社 代表取締役社長

### 研究要旨

海外において多数の発生が報告されている多剤耐性結核 (MDR-TB) や、超多剤耐性結核 (XDR-TB) などの成人結核を制御する治療薬・ワクチンを開発する事は、輸入感染症を制御する上で重要である。そこで、それらの難治性結核に対して、有効性の高いワクチンを開発するために研究開発を行った。具体的にはワクチンのアジュバント兼DDSとしているHVJ-エンベロープ (HVJ-E) について、安全性試験、長期安定性試験、治験薬GMPに準拠した製造技術の確立を行った。安全性試験においては、一過性の発熱以外には特に異常は認められなかった。また、安定性試験の結果、18ヶ月の有効期限設定が可能である事が明らかとなった。更に、製造については、GMP製造体制を確立し、実際に臨床研究用の原料としてGMP体制下での製造を実施した。

### A. 研究目的

アジア地域を中心に海外においては、複数の抗生物質に対して抵抗性の多剤耐性結核 (MDR-TB) や、抗生物質が効かない超多剤耐性結核 (XDR-TB) の発生が多数報告されている。それらの成人結核は、今後アジア地域からの国内への輸入感染症となりうるため、その制御を可能にする治療薬・ワクチンを開発する必要がある。これまでに、予防及び治療に有用な新規DNAワクチンの開発を進めてきており、その臨床応用の早期実現のために非臨床試験データの取得を行った。現在開発中の新規DNAワクチンは、アジュバント兼DDSとしてHVJ-Eを使用しているため、それをを用いた非臨床試験データの取得を目的に研究開発を行った。

### B. 研究方法

#### ①動物の安全性試験データの取得

ラット遺伝毒性試験とカニクイザルを使用した安全性薬理試験を実施した。ラット遺伝毒性試験は、ラットに被験物質であるHVJ-Eを投与して、血液細胞、骨髄細胞中の、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)を測定する方法で評価した。カニクイザルを使用した安全性薬理試験については、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。具体的には、予めカニクイザルに無線で心電図を送信するための発信機の埋め込み手術を実施し、手術から回復した後に被験物質であるHVJ-Eを投与し、投与前後の心拍数 (HR)、拡張期血圧 (mmHg)、平均血圧 (mmHg)、PR間隔 (ms)、QRS時間 (ms)、RR間隔 (ms)、QT間隔 (ms)、QTc間隔 (ms) をテレメトリーシステムで測定した。

#### ②薬効薬理試験データの取得

マウスを用いてHVJ-Eの投与後に体内の免疫が活性化されるかを検討した。そのために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が活性化される事を検討した。

#### ③GMP製造データの取得

開発を進めている新規DNAワクチンについて、輸送時や保存時の安定性を保証するための長期安定性試験を実施した。具体的には、厚生労働省のガイド

ラインと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) で規定された安定性評価ガイドラインに従って評価項目を設定し、長期安定性試験を計画、実施した。本年度の評価期間としては12ヶ月ポイントを設定してデータの取得を行った。

また、今後の臨床応用の際に必要なGMP製造体制の確立、製造手順の整備、製造の再現性の確認、注射剤を想定した高度無菌化などの研究開発についても並行して実施した。

#### (倫理面への配慮)

本研究を実施するにあたり、ジェノメディア株式会社は、池田ラボラトリーの所在地である独立行政法人 産業技術総合研究所の規定に従い、国で定められている、組換えDNA実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業技術総合研究所で開催される各委員会でも実験許可を受けてから実験を行った。

また、実験に従事するものの安全確保についても、独立行政法人 産業総合技術研究所の規定に従い、年に1回行われる実験の安全講習に参加し、健康診断も受けて実験従事者の健康管理も確保した。

### C. 研究結果

#### ①動物の安全性試験

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。

## D. 考察

安全性試験においては、ラット（げっ歯類）とカンクイザル（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、カン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。

## E. 結論

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。

## F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Novel Prophylactic Vaccine Using a Prime-Boost Method and Hemagglutinating Virus of Japan-Envelope against Tuberculosis., 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., Clin Dev Immunol. 2011;2011

2. Development of therapeutic and prophylactic vaccine against Tuberculosis using monkey and transgenic mice models., Kita Y, Okada M, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Takamori Y, McMurray DN, Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Burgos JA, Saunderson P, Sakatani M., Hum Vaccin. 2011 Jan 1;7, pp108-114

### 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

# ジェノスカラーによる結核菌 RFP 耐性迅速診断法の検討に関する研究

研究協力者 露口一成 近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター部長

## 研究要旨

多剤耐性結核は、その治療が極めて困難であり適切な治療開始の遅れが致命的となりうる。また、多剤耐性結核の再感染発病が起こりうることが示されており、多剤耐性結核患者を迅速に発見し隔離することは重要である。このため、我々はリファンピシン (RFP) 耐性遺伝子による迅速 RFP 感受性測定法を用いた多剤耐性結核のスクリーニングについて検討した。

## A. 研究目的

RFP 耐性結核菌の大部分は多剤耐性結核菌であることが疫学的に知られている。このため、RFP の耐性遺伝子変異を検出するラインプローブアッセイ (LiPA) による RFP 感受性迅速診断法が、多剤耐性結核のスクリーニング法として有望である。今回我々は、臨床検体に対して RFP 感受性迅速診断法を行いその有用性につき検討した。

## B. 研究方法

当院で平成 19 年 11 月から平成 21 年 3 月の間に当院で臨床検体に対してアンプリコア PCR 検査を行って結核菌群陽性と判定され、培養検査で陽性で薬剤感受性検査を行えた 446 例を対象とした。これらに対して LiPA による RFP 耐性遺伝子検査を行い、培養菌に対する通常の薬剤感受性検査との比較を行った。

(倫理面への配慮)

後ろ向き研究であり倫理的な問題が生じる可能性は乏しいと考えられるが個人情報の取り扱いには細心の注意を払って研究を行った。

## C. 研究結果

LiPA で RFP 感受性と判定されたのが 426 例であり、425 例は従来の薬剤感受性検査でも RFP 感受性であった。また、RFP 耐性と判定されたのが 20 例であり、19 例は従来の薬剤感受性検査でも RFP 耐性であり、うち 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。

## D. 考察

LiPA の感度は 95.0%、特異度は 99.8% と計算され、本法は迅速薬剤感受性法として優れていると考えられた。また本法で RFP 耐性と判断された症例の 75% は多剤耐性結核であり、多剤耐性結核のスクリーニング法としても優れていた。

## E. 結論

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 露口一成：第 84 回総会シンポジウム V. 日本における多剤耐性結核 1. 多剤耐性結核の疫学、診断 結核. 2010; 85(2): 126-128

2. 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. 2010; 16(5): 360-363

3. 吉田志緒美、鈴木克洋、岩本朋忠、露口一成、富田元久、岡田全司、坂谷光則：当センターにおける Mycobacterium gordonae の分子疫学的解析. 結核 2010; 85(7): 609-614

### 2. 学会発表

1. 露口一成：結核の診療 - 結核専門病院からの要望を含めて - 日本結核病学会との共同企画一般病院において「結核対策」はどうするか？ 第 50 回日本呼吸器学会、京都、2010 年 4 月 25 日

2. 露口一成：結核退院基準について - 事例を元に今後の望ましい基準のあり方を考える - 第 85 回日本結核病学会総会ミニシンポジウム IV. 結核退院基準について. 京都、2010 年 5 月 21 日

3. 露口一成：多剤耐性結核 第 53 回日本感染症学会中日本地方会シンポジウム「Emerging Infectious Diseases」 京都、2010 年 11 月 13 日

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし