

201028014B

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 20 年度 ~ 22 年度 総合研究報告書

研究代表者 岡田 全司

平成 23 (2011) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告			
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 (坂谷光則) (鈴木克洋)	-----	1
II. 分担研究報告			
[I] 日本・中国・韓国・台湾分子疫学共同研究	加藤誠也	-----	61
[II] 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	小林信之	-----	64
[III] 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	-----	80
[IV] 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 大阪市における外国人結核の発生状況と必要な対策の検討	下内 昭	-----	83
[V] 難治性結核(多剤耐性・再発・治療失敗例)の疫学的研究	野内英樹	-----	88
[VI] 潜在性結核の検出にかかわる T 細胞機能と黒竜江省の結核菌解析	服部俊夫	-----	96
[VII] 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	高鳥毛敏雄	-----	102
[VIII] 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	-----	107
[IX] タイにおける結核、HIV 結核のバイオマーカー	櫻田紳策	-----	109
[X] 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	-----	111
III. 研究協力者研究報告		-----	116
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表		-----	122
V. 研究成果の刊行物・別刷		-----	130

平成20年度～22年度（3年間）

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）

総合研究報告書

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

（研究分担者 坂谷光則）
（研究分担者 鈴木克洋）

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。保健所・病院 800 施設に配布。2136 例解析。20 代、中国・フィリピン・韓国、入国 3 年以内多い。多剤耐性 3.8%と高率。INH 耐性、RFP 耐性も高率。HIV 合併結核 1.3%。言語の壁や治療途中の帰国が問題。（岡田）
2. 日本全国：結核発生动向調査を分析。労働者、学生が影響。（星野、岡田）
3. 東日本：国際医療センター及び東京病院。HIV 合併結核多し。RFP 耐性、多剤耐性結核は高率。分子疫学解析にて特定の菌株（北京型のモダンタイプ）蔓延。（小林、豊田、切替）
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 で大阪市流行株なし。（下内、藤山、岡田）

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. 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。4 カ国（日本、中国、韓国、台湾）の分子疫学共同研究。VNTR の MST 解析で、日本、韓国の結核菌は“祖先型”。中国は“モダンタイプ”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。台湾株も分離可。10locus を用いた日・中・韓・台共通の VNTR で解析。（加藤）
 2. ハルビンで薬剤耐性遺伝子解析。S・SMDR-TB12%。VNTR で 90%が北京型。（服部）
2. タイ（野内、櫻田、Pathom）
タイから日本への伝播の解析。HIV 合併結核は再発率高く、Gra 産生異常。タイ特有な結核株発見。
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。

III. 新しい迅速診断・入院法の開発。結核治療ワクチンの開発

1. 多剤耐性結核患者迅速発見法（*mpoB* の変異）を用いて、多剤耐性結核患者の迅速入院・迅速隔離方法を構築。（鈴木、岡田）
2. 多剤耐性結核に対する初めての治療ワクチンを開発（サルで）。XDR-TB に対して治療効果。（岡田）
3. 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。前臨床試験データを取得（毒性・安全性・安定性試験）
4. 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）
5. 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。SLPI は強力な治療ワクチン及び Gra との相乗効果。（竹田、岡田）

IV. 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）

・研究代表者（岡田全司）（表1、2、3、4）

- (1) 日本全国：岡田が調査票（外国人結核）を当班で作成し（下内、小林、豊田、星野、加藤）、全国保健所527、結核病床を有する病院273、合計800施設に送付。2006年～2008年の2136例の対象者を解析。日本における外国人結核は20代、国籍は中国、フィリピン、韓国の順、来日1～3年発症多し。多剤耐性結核は3.8%と高頻度。INH耐性やRFP耐性も高率。XDR-TBも存在。学生18%、常勤者38.2%。HIV合併1.3%。患者管理上の問題として言語の壁や治療途中の帰国率が高い。（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、学生が増加し、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 結核2010)
- (4) 平20年・21年神戸市内結核届出患者769名中外国人結核3.6%。日本語学校で集団感染あり。日本語学校での定期健診重要。(藤山、岡田)
- (5) 新結核治療ワクチン・化学療法剤：①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/HSP 65+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(Vaccine 2009, Human vaccine 2010)。XDR-TBに治療効果。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)。(7) 前臨床試験：a.薬効薬理試験。b.安定(凍結乾燥) (i) GMP製造で臨床応用可能。②新しい化学療法剤カプラザマイシンの発見とマウスでXDR-TB治療ワクチン効果。
- (6) 結核菌殺傷蛋白Granulysin(Gra)はキラーT分化因子活性も有する発見。15kDa Gra(特許取得)ワクチンは結核治療効果(Human Vaccine 2010)。Graと上記DNAワクチンで結核治療相乗効果。
- (7) 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)

- (1) 日本における外国人結核：国際医療研究センターの外国人結核113名解析(2007~2010年)。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。薬剤耐性ではRFP耐性及び多剤耐性結核が2.3%で高率。治療中断例は、以前に比し少なく、通訳、パンフレット等の使用が寄与。
- (2) 外国人結核91株の分子疫学解析を行い、26株(28.6%)が相同性の高いクラスターIを形成。VNTR、スポリゴタイピングの結果、クラスターIはすべて北京型のモダンタイプ。一方、クラスターII形成菌株はすべて非北京型。これら分子疫学解析から特定菌株の蔓延が示唆(切替)。
- (3) 東京における外国人結核対策マニュアルを作成した。

・研究分担者(豊田恵美子)

東京病院で過去7年87人の外国人結核。全結核の3.2%。HIV合併結核は日本人結核より多い。高蔓延国から帰国の児童(外国生まれ)も多くQFT陽性者(5.7%)多し。帰国者結核調査が重要。

・研究分担者(下内昭)

①西日本：大阪市で在留外国人結核患者は過去3年間で93名。INH耐性率が高い。大阪では20代韓国籍多い。フィリピン籍学生が多く大きな集団感染。日本語学校の定期健診必要。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。②日本語学校33校にアンケート調査。55%は健診なしが不十分。③大阪市における外国人結核対策マニュアルを作成した。

・研究分担者(加藤誠也)

アジアでの感染伝播状況の解析。4カ国(日本、中国、韓国、台湾)の結核研究施設が分子疫学共同研究会。①IS6110遺伝子とVNTRのMST(minimum spanning tree)解析で、日本、韓国の結核菌は“祖先型”(75%)。中国(上海、北京)は“モダンタイプ”(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解析により韓国に特徴的なRD181陽性株はVNTRでB5グループに区分。日本の結核菌RD181陰性。日本の結核菌と区分可能な発見。台湾株も区分可能。③VNTR結核菌遺伝子型別には共通の10-locusを用い、さらに系統別に分けるSNPs部位(20箇所)を組み合わせて解析開始。各国で広がっている結核菌をこの方法で解析してグループ化し、各国に特徴的な株を判明させる。

・研究分担者(野内英樹) ①タイから日本への伝播の解析。タイに特有な結核株(Nonthaburi株)発見。11%がNonthaburi株。②難治性結核でGra産生異常。③再発の関与因子。HIV陽性結核患者は高率。

・研究分担者(櫻田紳策) タイのHIV陽性結核の宿主要因：①IL-10の上昇により抑制的制御。②Gra、IFN- γ 、オステオポンチン値がHIV合併結核が高い。③活性型ビタミンDは結核群で低下。

・研究分担者(服部俊夫) 中国・ハルピンの薬剤耐性結核解析：①S・S多剤耐性結核(12%)、XDR-TB解析。rpoB、KatG、変異を解析。②VNTR解析で4サブグループと10個のクラスター形成。

・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多剤耐性結核5%で、都市部、再排菌例に多い。②ファムゴックタック病院と多剤耐性結核患者の結核免疫、薬剤代謝遺伝子解析。

・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：①TLRを介し産生されるリポカリン2の鉄取り込み抑制で結核菌増殖抑制を発見。②secretory leukocyte protease inhibitor(SLPI)が細胞膜透過性を亢進させ結核菌感染防御を発見。③リポカリン2、SLPIワクチンは結核治療効果。(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：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。(移民の分野に専門職員設置。)

・研究分担者(鈴木克洋 坂谷光則) S・S多剤耐性結核菌の発見。多剤耐性結核患者の迅速診断法・迅速隔離法の発見。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]

- (8) 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、2136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、ブラジルの順に多い。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3.8%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。
- (9) 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113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はすべて北京型のモグタイプであり、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。一方、クラスターII型形成菌株はすべて非北京型であった。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。
- (10) 日本の20才代の新規登録結核患者の1/4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。東京病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。
- (11) 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。大阪市の外国人結核は結核菌の耐性率が高く、多剤耐性は初回治療群で2.9%であり、大阪市全体では0.7%であった。一方、再治療群では外国人のMDRは30%であり、大阪市全体では6.6%であった。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。
- (12) 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)]

- (13) 近年、日本から中国、韓国、台湾への渡航者およびそれらの国々から日本への渡航者が増加している。そのため、結核を含めた感染症が各国に持ち込まれ国内で広まる可能性も考えられる。そこで、日本、中国、韓国、台湾において結核菌の分子疫学(型別)担当者共通の反復配列多型(VNTR)型別システムの構築を目指し、共同研究を開始した。共有できるVNTRローサイ選択のため、最初に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、韓国、日本では、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。一方台湾では非北京型が多いことを明らかにした。しかし、各国で広まっている北京型結核菌の遺伝的背景が異なり、中国はModern型、韓国はRD181陽性Ancient型、日本はRD181陰性Ancient型が多いことが明らかになった。そのため、最適なVNTRローカスは、各国で異なることが予想された。このことからすべて共通なVNTR解析システムを構築するのではなく、解析のコアとなる10箇所のVNTRローサイ(MIRU-10、MIRU-26、MIRU-31、ETR-A、VNTRs-0424、1955、2163b、3155、4052、4156)を選択した。さらに、一塩基多型(SNPs)分析を利用した結核菌の遺伝系統に関する情報を加えることで、注目している結核菌が海外で広まっている可能性が高い型なのか、正確・迅速に判定することができる総合的な型別システム構築を進めている。
- (14) 臨床疫学研究では、1000人年当りの再発率で、HIV陰性結核患者の5.1と比較してHIV陽性結核患者は9.7と顕著に高かった。危険因子としては、HIV陰性結核で山岳民族、監獄歴、HIV陽性結核では、男性である事が、結核の部位が肺外結核である場合、HIV陰性、HIV陽性ともに同定された。
- (15) 黒竜江省の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。北京タイプが

89.5% を占め極めて高かった。しかし北京型がよりMDRが多いという知見は得られなかった。また 様々な数のMIRU-VNTR loci を用いて検索し、16-locus セットで4つのグループに分類された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。

- (16) 先行研究において北タイチェンライ県で得られた結核、HIV、HIV結核の血液サンプルについて、1) 血漿 osteopontin と Th1 系 cytokine の測定、BCG 感染末梢血単球由来培養マクロファージにおける osteopontin の産生の検討、2) 血漿 granulysin、IFN- γ の測定、in vitro での刺激末梢血単核球からの遊離 granulysin の検討、3) 血漿中活性型ビタミンDの測定とBCG感染末梢血単球由来培養マクロファージにおけるビタミンD関連遺伝子の発現検討を行い、統計学的な解析を加えた。
- (17) 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計画し、多剤耐性結核の宿主要因を免疫遺伝学的な手法により明らかにするための研究プロトコールを作成し、両国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、血液サンプルの解析まで行った。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うまでに至った。

[新規結核ワクチン・治療・診断]

- (18) 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。特にこのワクチン治療サルで末梢血Tリンパ球のIL-2産生が相関した。
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。
- (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。
リコンビナント15K GranulysinとHVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンで結核治療相乗効果が認められた。
さらにカニクイザルを用いHVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA+Ag85BDNA+Ag85ADNA+MPT51DNA にHVJ-エンベロープ/granulysinDNA治療ワクチン投与群では1年近くの生存率が50%と極めて良いことを明らかにした。
- (20) 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-EI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、18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。
- (21) 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。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。SLPI ワクチンは結核治療効果を示した。SLPI ワクチンとGra ワクチンは結核免疫を相乗的に増強した。
- (22) 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。

- (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。

[先進国の外国人結核対策]

- (24) 英国においては、2003年より感染症対策を中心とした公衆衛生組織改革の中で、新たに感染症の専門職を要する Health Protection Agency が設けられ、従来からの TB Clinic に加え、結核対策の強化が行われていた。米国のニューヨーク市、サンフランシスコ市では、結核患者の個別性に対する対応力が強化され、患者中心主義が徹底されていた。結核対策において、最新の医科学技術の導入を積極的に進めた the state of the art の対策の徹底がなされていた。結核対策全体をマネジメントする組織と施設の整備がなされ、一般医療機関の診断・治療を支援を行う制度づくりに尽力されていた。さらにサンフランシスコではツ反の代わりに QFT 診断に切り替えてから移民結核の減少が認められるようになった。

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

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

加藤誠也
財団法人結核予防会結核研究所
副所長

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

小林信之
国立国際医療センター
呼吸器科医長

下内 昭
財団法人結核予防会結核研究所
副所長

豊田恵美子
国立病院機構東京病院
呼吸器科医長

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

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

坂谷光則
国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
院長

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

鈴木克洋
国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
統括診療部長

表1

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)
 岡田全司班 平成20年度～22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 英君	長崎大学 国際連携研究戦略本部 特任教授
	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	大阪大学医学系研究科感染免疫医学講座 免疫制御学 教授
	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

表2

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)
 岡田全司班 平成20年度～22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 育之	財団法人結核予防会結核研究所 企画・医学科長
	森山 理世	神戸市保健福祉局健康予防衛生課 主幹
	切替 昭夫	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
	堀良 英郎	(財)大阪結核研究会 理事長
	中島 俊洋	ジェムティア株式会社 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
	重口 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
高島毛敏雄	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。
廣長直人	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・リボカリン2の反応性と治療ワクチン開発の研究。
鈴木克洋	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。

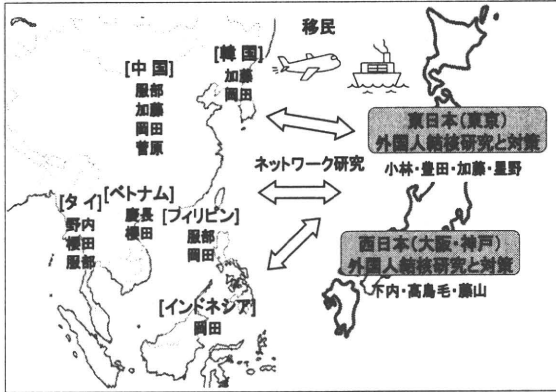
図1

[3年間の研究成果]の概要図

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)を製作。保健所・病院800施設に配布。2136例解析。20代、中国・フィリピン・韓国、入国3年以内多い。多剤耐性3.8%と高率。INH耐性、RFP耐性も高率。HIV合併結核1.3%。言語の壁や治療途中の帰国が問題。(岡田)
2. 日本全国: 結核発生動向調査を分析。労働者、学生が影響。(星野、岡田)
3. 東日本: 国際医療センター及び東京病院。HIV合併結核多し。RFP耐性、多剤耐性結核は高率。分子疫学解析にて特定の菌株(北京型のモダンタイプ)蔓延。(小林、豊田、切替)
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で大阪市流行株なし。(下内、藤山、岡田)

アジア諸国

- [結核菌分子疫学研究・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。4カ国(日本、中国、韓国、台湾)の分子疫学共同研究。VNTRのMST解析で、日本、韓国の結核菌は“祖先型”。中国は“モダンタイプ”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。台湾株も分離可。10 locusを用いた日・中・韓・台共通のVNTRで解析。(加藤)
 - 2. ハルビンで薬剤耐性遺伝子解析。S-S MDR-TB12%。VNTRで90%が北京型。(服部)
 - (2) タイ(野内、櫻田、Pathom)・タイから日本への伝播の解析。HIV合併結核は再発率高く、Gra産生異常。タイ特有な結核株発見。
 - (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

- ①薬剤耐性遺伝子解析、VNTR、RFLP解析
- ②XDR-TB、スーパー・スーパー・スーパー多剤耐性結核菌解析
- ③宿主granulysinの解析。SNP解析(宿主要因説明)

(倫理委員会)

新しい迅速診断・入院法の開発
結核治療ワクチンの開発

- (1) 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・迅速隔離方法を構築。(鈴木、岡田)
- (2) 多剤耐性結核に対する初めての治療ワクチンを開発(サルで)。XDR-TBに対して治療効果。(岡田)
- (3) 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。前臨床試験データを取得(毒性・安全性・安定性試験)。
- (4) 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)
- (5) リポカリン2はTLRを介し結核菌増殖抑制。SLPIIによる結核菌殺菌機構(細胞膜透過性亢進)解明。SLPIは強力な治療ワクチン及びGraとの相乗効果。(竹田、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・結核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。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 (図1)。本研究では、外国人結核の背景因子、発見動機、治療の現状を把握することを目的に、当センターで最近経験した外国人結核の臨床的特徴について検討す

る。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。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加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。

- (14) 日本の20才代の新規登録結核患者の1/4は外国籍結核患者であり、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あり外国人の医療スタッフの研修も行われている。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。とくに高蔓延国からの外国人入国者に結核健診を義務づければコントロールできるのかを検討したい。
- (15) 外国人の登録結核患者数は、米国や西欧の一部では年間登録患者の半数以上を占めており、高い罹患率、低い治療成功率や高い薬剤耐性率などの課題が指摘されてきた¹⁻³⁾。結核の統計2010によると、2009年の国籍不明を除く新登録患者のうち外国人の占める割合は4.0%であった。また20代に限ると25%を占めていた⁴⁾。一方大阪市における外国人の割合は2.6%であり (表2)、20代では20%であった (表3)。大阪市における外国人結核患者の現状を検討し、今後の結核対策に資することを目的とした。
- (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域内の国々に広まる可能性も考えられる。そこで、迅速で容易に型別結果を比較できる反復配列多型 (VNTR) 分析を用いた東アジア諸国内で利用できる結核菌型別データベースの構築を目的として共同研究を開始した。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。型別結果比較のためには、共通のローカスで結核菌の型別を行う必要がある。そのために日本、中国、韓国、台湾の分子疫学を専門とする結核研究者で会議を開き議論した。最初にそれぞれの国で蔓延している結核菌の遺伝的背景を解析し、共通に利用できるコアとなるVNTRローサイを決定することにした。また、各国で広まっている結核菌の遺伝系統を解析するための一塩基多型 (SNPs) 解析

システムの構築に関する研究も開始し、VNTR法とSNPs法を組み合わせた結核菌の型別システムの構築を進めている。共通の型別システムを構築し、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等の型別情報を共有することができる。

- (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要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) 中国では多数の結核患者が発生する。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。

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

の要因一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 一病室の陰圧・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) アジア地域を含むユーラシア大陸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)の発生頻発している。そのため、それらの地域からの輸入感染症として多剤耐性結核が国内でも流行するリスクに晒されており、その対策・制御が重要な課題となっている。そのため、本研究では、難治性の成人結核の制御を可能にする治療・予防用ワクチンの開発を目的として、新規DNAワクチンを開発する事を目的として研究を実施した。そのために、予防及び治療に有用な事が示唆されている新規DNAワクチンについて、その臨床応用の早期実現に必要な非臨床試験データの取得を目的として、アジュバント兼DDSとして使用しているHVJ-E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。
- (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) 多剤耐性結核は治療が極めて困難であり適切な治療開始の遅れは致命的となる可能性がある。また、近年多剤耐性結核の院内感染事例の報告も散見され、多剤耐性結核を迅速に発見して隔離することが求められている。RFP耐性結核菌の大部分は多剤耐性結核菌であり、RFP耐性を迅速に診断することによって多剤耐性結核を早期に発見することが期待される。我々はRFP耐性遺伝子変異をラインプローブアッセイ(LiPA)法により検出するキットを用いて、多剤耐性結核の迅速スクリーニング法としての有用性を検討した。
- (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ないかどうか、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。②④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) 欧米先進国はすでに低まん延状況にある。しかし1980年代頃より結核の再流行に見舞われていた。その背景には世界の結核問題が解決されていないことが関係していた。そのためグローバル化の流れの中で結核高まん延国からの流入人口が増加してくるとともに結核患者が増えてきたためである。外国生まれの結核患者の割合はアメリカ57%、オランダ63%、イギリス64%、スウェーデン72%、オーストラリア85% (2006年)と多くの国で半数以上を占めている。そのため低蔓延状況においては結核は輸入感染症としての対策への転換が必要である。わが国はまだ外国人の割合は低い状況にあるが1998年から2006年の間に2.1%から3.8%に増加しており、20歳代の患者についてはすでに20%以上を占めている。外国人労働者数は1998年の19万人から2006年の39万人へと増加している。わが国も経済活動において外国人労働者に依存しなければならぬ社会状況になっていくものと思われる。そのため、輸入感染症としての結核に備えた結核対策の体制の整備が火急の課題となっている。そこで、輸入感染症としての結核対策の先進地である英国、米国において結核対策を再構築して対応してきている現状について調査を行い、わが国における輸入感染症としての結核対策の構築につなげていくことを目的として行った。

B. 研究方法 (図1, 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、2136人の多数の情報を解析。
- (2) 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。2009年9月までの外国人結核患者85名の臨床像については、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。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、発見動機に違いがあるかどうか検討した。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。

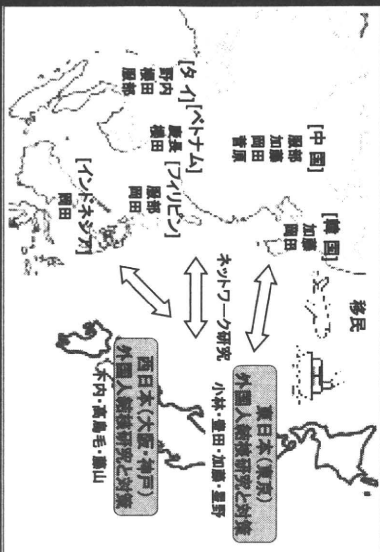
結核菌の解析には、2000年1月から2010年5月までに診療した外国人結核患者に由来する菌株を単離培養した。薬剤感受性試験はビットスペクトルSR(極東)もしくは1%小川培地を用いる比率法によって実施した。シーケンス解析は、各薬剤耐性遺伝子をPCR増幅した後、ダイレクトシーケンス法によって塩基配列を同定し、変異の有無を確認した。分子疫学解析としては、ゲノム抽出後、IS6110プローブを用いるRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)解析とMycobacterial Interspersed Repetitive Unit (MIRU)を用いるVNTR(Variable 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、クラスタ解析を実施した。

- (3) 2006年から2009年の4年間に大阪市において新規登録された外国生まれの者(外国人)の結核患者を対象とした。2007年に登録された1名は2006年にも登録されていたため除外した。国籍については全国の外国人結核患者と比較し検討した。薬剤感受性は、2007年から2009年の3年間に新登録された大阪市全体の結果を示した。大阪市外国人以外の者については、2008年の新登録患者を用いた。入国から発病までの期間、社会背景、発見方法、胸部レントゲン検査(X-P)上空洞の有無、塗抹検査、治療成績については20～39歳の群を外国人以外の群と比較検討した。治療成績については、2006年から2008年の3年間に登録された者を対象とした。なお、性格には大阪市においては二世、三世の在日外国人も多いが、本研究の対象は外国生まれの在留外国人を「外国人」とした。従って、表(10), (11)では「在留外国人」「在留外国人以外」という表現を使用した。統計学的分析については、離散量については χ^2 検定を使用した。統計解析にはSPSS II for Windows (ver. 11.0.1J)を使用し、有意水準を5%に設定した。
- (4) 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、文献やWeb siteからデータを収集解析した。諸先進国の外国人結核対策とくに今回は入国時結核スクリーニングについて検討した。

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、鈴木

II. アジア諸国の結核菌分子疫学研究(ネットワーク研究)

a. アジアでの感染伝播状況の解析。4カ国(日本、中国、韓国、台湾)の分子疫学共同研究。(加藤)

中国株、韓国株、日本株、台湾株、分離可能の発見

結核菌	中国	韓国	日本	台湾
北京型				
蔓延型	○			
祖先型				
RD181(+)		○		
RD181(-)			○	
非北京型				○

I. 日本の外国人結核

a. 日本全国:調査票(外国人結核)作成。全保健所・病院800施設 2136名解析。20代、中国・フィリピン・韓国多い。多剤耐性3.8%で日本人結核より多い(岡田)。学生。外国人結核対策マニュアルを作成した。

b. 東京:国際医療センター・東京病院。特定の菌株蔓延(RFLP-VNTR)。(小林、豊田)

c. 大阪 学生が多く、集団感染。日本語学校の定期健診必要。(下内、岡田)

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)

b. 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)

III. 多剤耐性結核迅速診断・入院法, 結核治療ワクチン

a. 多剤耐性結核患者迅速発見法(rpoB変異)を用いて迅速入院(隔離)法を確立。(鈴木・岡田)

b. 多剤耐性結核の治療ワクチンHSP65 DNA+IL-12DNAを開発(サルで)。超薬剤耐性結核に治療効果。(岡田、Tan)

c. 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GMPLレベル製造実施。

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・国際医療研究センター・保健所・結研の全国レベル研究(情報収集)で早期予防・治療マニュアル作成の対策。
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. 多剤耐性結核迅速診断法・迅速入院法の開発。
 - ・ 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、超薬剤耐性結核制御成果。スーパー・スプレッター(S・S)多剤耐性結核対策。
 - ・ 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。
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。

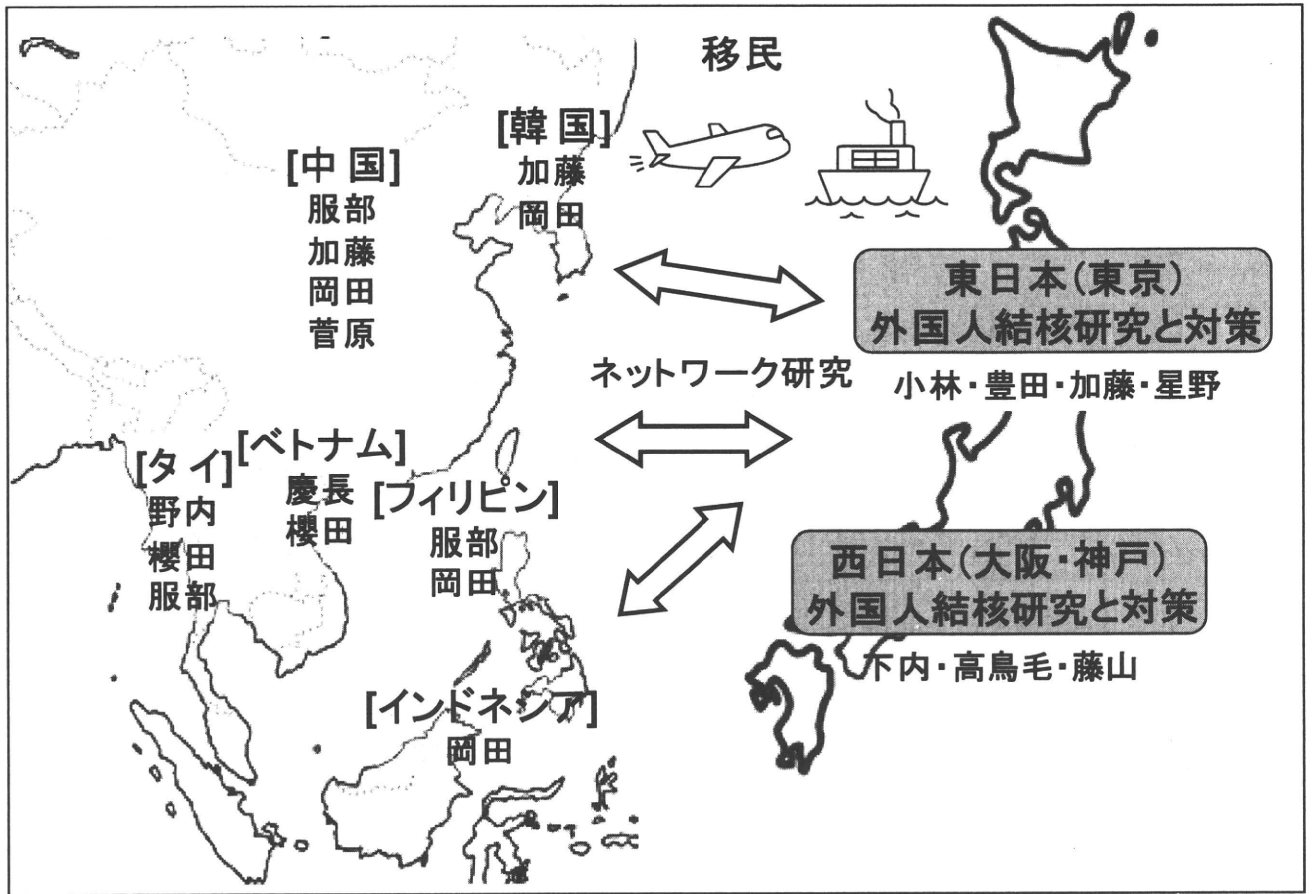


図3

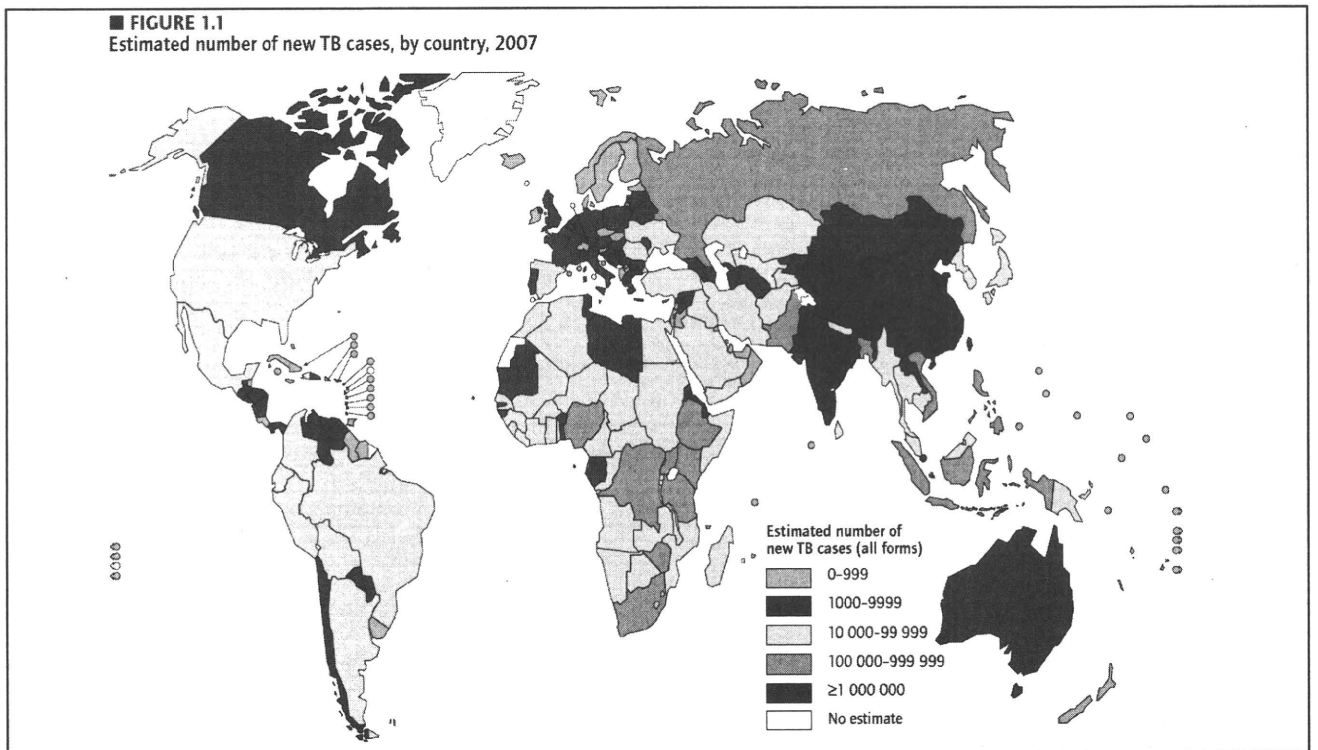


図4

- (5) 在留外国人の就業状況別患者数と罹患率の推移を解析した。就業状況別の在留外国人結核患者数は、結核登録者調査年報から入手した。外国人労働者数の推計(就労目的外国人(専門的・技術的分野)、技能実習生、留学生のアルバイト、日系人労働者、不法就労者等の和)、は外国人労働者数の推移 (<http://www2.ttcn.ne.jp/honkawa/3820.html>) から得た。学生(留学生と就学生)、配偶者、定住者、永住者等の人数は、在留外国人統計 (<http://www.immi-moj.go.jp/toukei/index.html>) から得た。(倫理面の配慮)：資料収集においては、患者の個人名は得ないことにより、倫理面に配慮した。

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
各国で広まっている結核菌型や型別法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。VNTR分析におけるローカスの選択は、各国で実際に分析に使っているローカスの内で共通な箇所を選択した。そして、各国において特定地域で一定期間内に分離された結核菌30-100株程度についてVNTR分析を行い。得られたVNTRプロファイルは、BioNumericsプログラムを用いてminimum spanning tree (MST)解析を行った。また、系統別に報告されているSNPsを精査し、非北京型、北京型(Modern)、北京型(Ancient)を区別できるSNPs部位を選択した。このように、結核菌の遺伝系統情報とVNTR解析による型別情報を組み合わせることで、各国で広まっている結核菌の特徴や違いについて検討した。
- (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郡とし、サンプル数として、血漿中の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。ホーチミン市のファムゴックタック病院は、結核菌耐性検査法の精度管理が確立しており、ベトナム国内随一の規模で、耐性結核患者の治療にあたっている。ベトナムの多剤耐性率は、2006年現在、約5%と報告され、都市部の、結核既治療再排菌例に多いため、この発生頻度を抑制することが求められる。同病院では、2008年に、1662名の新規活動性結核患者、71例の再治療例を

治療している。そのうち、8例が多剤耐性結核であった。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例が治療を完遂した。再治療例の耐性獲得には、社会的な要因、細菌学的要因のみならず、宿主側要因が疑われるため、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。

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-エンベロープ・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-エンベロープ・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-エンベロープ・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-エンベロープ/ HSP65+HL-12DNA
G2	HVJ-エンベロープ/ HSP65DNA+HL-12DNA	BCG
G3	HVJ-エンベロープ HSP65+HL-12DNA	HVJ-エンベロープ HSP65+HL-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 \times 10²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皮肉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-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA+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 \times 10²CFU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400 μ g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H37Rv 5 \times 10⁵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。

<実験OKADA VIII>

HSP65DNA+IL-12DNA+Ag85B DNA+Ag85A DNA+MPT51DNAワクチンにgranulysin DNAワクチンを加えてカニクイザルで治療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、安定性試験などの非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、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)で規定されたガイドラインに従って、安全性試験についてはGLPレベル、製造関連についてはGMPレベルのデータをそれぞれ取得する事とした。

そこで、非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、工程についてはバリフィケーションとも表現する)を進めた。また、実際に臨床応用(臨床研究)のための被験物質の原料について、GMP体制下での製造を実施した。

(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。

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。

- (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) NHO近畿中央胸部疾患センターにおいて平成19年11月より平成21年3月までの期間に、喀痰等の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、かつ抗酸菌培養検査で陽

性で薬剤感受性検査を行い得た446例を検討の対象とした。当院では抗酸菌塗抹陽性でPCR検査で結核菌群陽性と判定された検体に対してLiPA法を行っている。LiPA法は、検体から抽出したDNAに対してRFP耐性遺伝子である*rpoB*領域の一部をPCRで増幅し、ストリップ上に固相化された野生株配列、耐性株配列とハイブリダイズさせ、変異の有無を検出する方法である。この結果を、検体に対して抗酸菌培養を行って発育した結核菌を用いて行った通常の薬剤感受性検査結果と比較検討した。

4. 先進国の外国人結核対策

(17) 1. 平成20年度

平成20年10月13日(月)～10月16日(金)の間に英国のロンドン、リーズ、ブラッドフォードにおける結核対策に関わる行政、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。ロンドンではCentre for Infections

(Colindale)、North Central London TB Network and TB Lead NHS London、South-East London Health Protection Unit、リーズではLeeds Chest Clinic、Health Protection Agency - Yorkshire & Humber、ブラッドフォードではBradford Health of NHSを訪問して調査を行った。

2. 平成21年度

平成21年9月17日(木)～27日(日)の間に結核対策に関わる行政、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, Newark, NJ
- ② Department of Health of New York State, ALBANY
- ③ Bureau of Tuberculosis Control of New York City
- ④ Corona Chest Center, New York City
- ⑤ Public Health Laboratory, New York City
- ⑥ Bellevue Hospital Center, New York City
- ⑦ School of Public Health University, Albany, NY
- ⑧ Weill Cornell Medical College, New York City

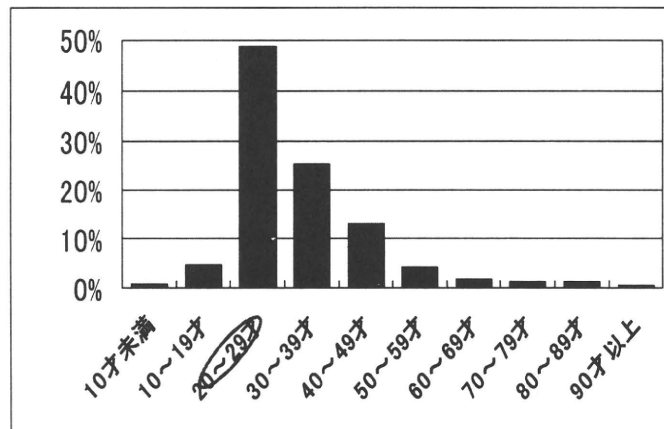
3. 平成22年度

平成22年11月1日(月)～11月5日(金)の間に、米国サンフランシスコ市およびサンタクララ郡における結核対策に関わる行政、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。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 のご協力により平成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、シェルターにおける結核対策の現状を調査した。

表7
 対象者 : 外国人結核 (外国生まれ・外国国籍)
 調査施設

	送付	回 答	
		施設数	件数
保健所	527施設	436施設	2,136件
国立病院機構	54	38	357
結核病床を有する病院	219	114	274
計	800	588(74%)	2,767

表8
 性別・年齢



国 籍

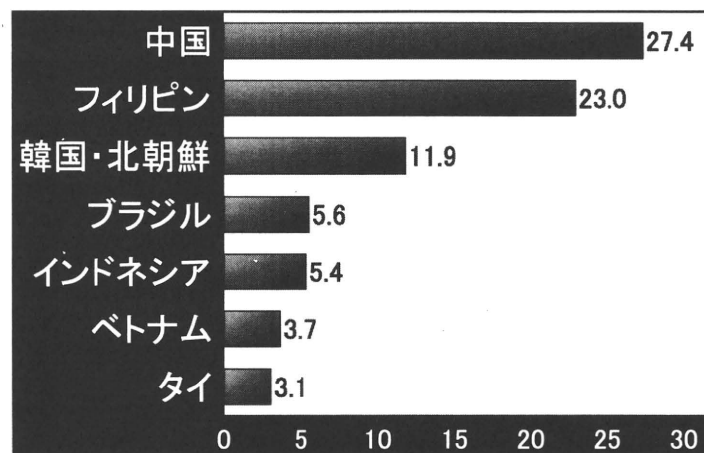


図5