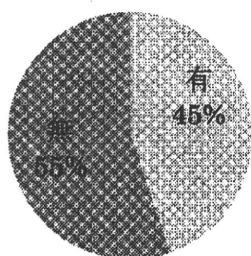


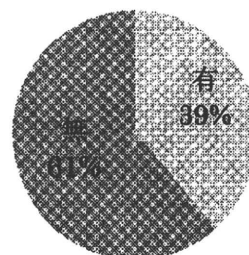
通訳



有の場合

職場・学校など	42.2%
友人・知人	22.7%
行政サービス	8.2%
ボランティア	5.9%
その他	23.2%

翻訳パンフレット



有の場合

中国語	34.7%
英語	23.7%
タガログ語	6.4%
韓国語	6.3%
ポルトガル語	2.8%
その他・不明	26.1%

図9 通訳と翻訳パンフレット

触者健診を実施することが重要である。潜在性感染の有無はクオンティフェロン（QFT）検査により診断が可能となったため、QFTを利用して感染者を発見し、その治療を進めることが推奨される。QFTは接触者健診だけでなく、結核高蔓延国からの入国者に対しては入国時や入職、入学時に行ったほうがよいのではないかとと思われるが、この管理方法に関しては今後の検討課題であると考えられる。

③ 患者支援

外国人結核患者の中には日本語によるコミュニケーションが困難な患者も少なくない。医療機関を受診する場合、あるいは保健所で面談をする場合は、家族・友人・後見人・ボランティアなど日本語による会話が可能な通訳の同席を依頼する。結核についての説明の際には、母国語で書かれた指導用のパンフレット「結核?!でも心配しないで（英語・中国語・タガログ語・韓国語・ポルトガル語）」や「外国人結核患者用パンフレット（結核予防会）」などを活用して指導する。結核予防会では電話相談（英語、中国語、韓国語）にも応じている。東京都では外国人結核患者治療・服薬支援員制度が実施されており、患者と同一国籍など、言語や文化が同じ治療・服薬支援員が登録されている。支援員は保健師が行う療養支援に同行し、言語の壁や心理的不安を軽減することにより、治療の促進と服薬の中断を防ぐことを目的とし、実績をあげている。今回の全国調査では、何らかの形で通訳を利用していた例は45%となっており、通訳の重要性が示された。また、翻訳パン

フレットは39%で利用されていたが、患者数の多いタガログ語、韓国語、ポルトガル語の利用が少なく問題と思われた（図9）。また、治療開始後の帰国者が15%ほど存在したことは大きな問題ではないかと思われる。帰国の理由としては、コミュニケーションがうまくできないため病気や治療について理解できないことや、医療費などの経済的な問題や不法滞在などの法的な問題がある。長期治療で就労が切れると帰国せざるを得ないという状況があり、そのような場合にも日本で治療を完了できる制度があればよいのではないかとと思われる。

おわりに

外国人結核をめぐる最近の実態調査の結果と問題点、それに基づく対策について述べた。外国人結核と言っても、日本の地域による違いや国籍による背景因子、臨床像の違いがみられ、それぞれに応じた適切な取り組みが必要である。外国人結核は徐々ではあるが増えており、とくに耐性結核の日本への持ち込みは脅威にも感じられるが、QFTを使った健診による感染者の発見、発病者の早期発見と治療完遂の支援を徹底すればその克服は決して困難なものではない。しかし、グローバル化は進む一方であり、逆に日本人が結核蔓延国に行き感染機会が増えることも予想される。日本への結核の輸入をブロックするだけでなく、日本に入ってくるアジア諸国の結核蔓延状態を改善することがなによりも重要なことであろう。

[Ⅲ] 外国人結核の現状と今後の対応に関する研究

研究分担者 豊田恵美子 国立病院機構東京病院呼吸器科医長

研究要旨

「結核の統計 2010」によると 2009 年の新規結核登録 24170 のうち外国籍結核患者は 938 人で、全体では 3.9%であった。2002 年には 2.2%であったのでその割合はゆっくり上昇している。とくに 20 歳代では 4 人に一人が外国籍で、入国後 5 年以内の発病が多いと報告されている。

外国籍結核は地域的にも偏在があり、東京 23 区には多いが、東京都 23 区外にある当院では全国平均レベルである。2004 年より 2010 年に当院結核病棟入院データベースに登録されている外国籍結核患者 87 名について検討した。20～30 歳代、HIV 感染、MDR は日本国籍の人よりもやや高率であるが、治療については殆ど差はなく、言葉の問題はあるが何とか解決されている。退院後の治療継続については追跡が不十分で不明な症例が多く、支援のための連携が必要である。

今後の対策として入国時の結核健診が有用か、欧米先進国の文献や Web site 検索をおこない情報を収集し、検討した。難民受入や永住申請については殆どの国で行われているが、その他の入国者の一時的なスクリーニングはあまり評価されておらず、地域の対策に基づいて取り組む必要がある。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

当院 2004 年以降の結核患者データベースより外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。

(倫理面への配慮)

個人情報やプライバシーの侵害にならないようデータは施設内整理番号で取り扱い情報保護を念頭において取り扱っている。

C. 研究結果

国立病院機構東京病院では 2009 年の外国人結核は 9 人(全結核患者の 2.4%)で、全国平均より少なかった。また 2004～2010 年の 7 年間に当院で結核治療を行った外国人結核患者数は 87 名であった。この間の全結核患者入院数は 2900 人の 3.0%で、2009 年の全国平均の割合よりも低かった。男性 41 人、女性 46 人で、20 代が 32%、30 代が 33%で、主な国籍は中国、フィリピン、韓国で肺結核 75 例、肺外結核のみ 12 例であった。HIV 陽性者 5 例、多剤耐性 6 例あり、標準治療は 67 例(77.0%)うち PZA を含む A 法は 56 人に実施した。当院では外国人結核治療は高齢者結核に比較すれば臨床的な困難性は低く、頻度も大体横ばいでありインパクトは大きくはない。しかし退院後の治療継続や治療成績については十分に追跡されておらず、さらに保健所や転院先との連携が必要と思われる。

D. 考察

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る。

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(図参照)。

E. 結論

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。

過去7年間の国立病院機構東京病院の
外国人結核

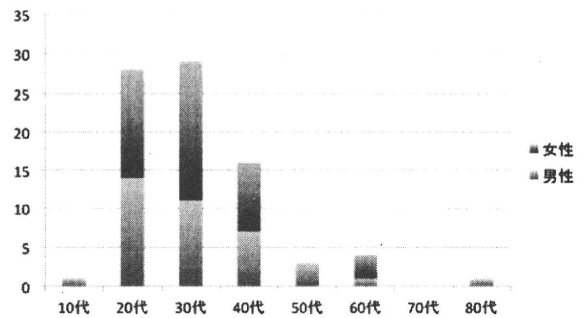
国立病院機構東京病院
呼吸器科
豊田恵美子

2009年の全国外国人結核
(結核の統計)

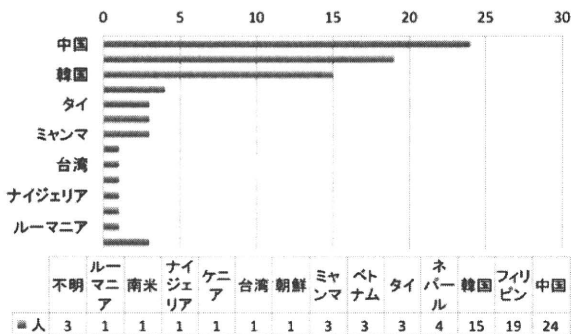
- 外国籍結核患者の割合は増加傾向にある
2009年新登録:938人 (全24170)
 - 入国5年以内の発症;558人が多い
 - 20歳代;427人 (内5年以内348)
 - 30歳代;243人 (内5年以内119)
- 20歳代の新登録患者の4人に一人、30歳代では9人に一人は外国籍結核患者である。
(全20歳代1699、30歳代2100)

年	当院新規結核入院患者数	外国人結核患者数	男性/女性
2004	444	11	9/2
2005	432	17	12/5
2006	373	10	4/6
2007	402	7	1/6
2008	415	13	4/9
2009	420	8	3/5
2010	414	21	8/13
total	2900	87	41/46

年齢分布



国籍別



その他の特徴

- 病型:
肺結核(75)・胸膜炎(4)・リンパ節炎(5)・粟粒結核(1)・喉頭結核(1)・心膜炎(1)
- 合併症:
HIV 5例
- 耐性:
MDR 6例
- 治療
HREZ (56)・HRE (11)・その他(3)・不明(16)

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 豊田恵美子、伊藤邦彦：外国人結核対策への取り組み-結核低蔓延国における外国人に対する健診実施状況-、結核 投稿中

2. 学会発表

なし

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

〔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 (3年間のまとめ)

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

研究分担者	下内 昭	結核予防会結核研究所
研究協力者	小向 潤	大阪市保健所
	松本 健二	大阪市保健所
	富原 亜希子	大阪市保健所

研究要旨

大阪市における外国人結核患者は特に若年者で増加傾向であり、出身国の薬剤感受性の状況から多剤耐性結核患者の増加が懸念される。入国後3年未満で発病する者が多く、学生の割合が多いという特徴から、日本語学校をはじめとした学校健診をさらに充実させる必要性が示唆された。外国人は結核治療において脱落・中断する者が有意に多く、医療通訳などの治療支援をさらに充実させ中断を防ぐ努力が必要である。また転出が多いという特徴があるため、本人が希望すれば雇用先の企業や学校と連携し可能な限り国内にて治療を完了できるよう配慮することが肝要である。これらの対策がさらに推進されることにより外国人結核患者の脱落中断率を減らす努力が重要である。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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⁵⁾と比較し検討した。薬剤感受性は、2007年から2009年の3年間に新規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年の新規登録患者を用いた。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。

C. 研究結果

大阪市の外国人結核患者は4年間で126名おり、男性59名、女性67名で男女比は0.9であった(表1)。全年齢における外国人患者数は29名(2006年)から34名(2009年)と増加傾向であった。外国人の割合は1.9%(2006年)から2.6%(2009年)と同様に増加傾向がみられた(表2)。20代に限ると、13%(2006年)から20%(2009年)へと増加していた(表3)。

国籍別の患者割合を、大阪市と全国の外国人結核患者で比較した⁵⁾。大阪市では中国籍が48名(38%)と最も多かった。韓国・北朝鮮籍は36名(29%)と第二位を占めたが、全国では第三位であった。フィリピン籍は13名(10%)であり、全国では第二位であった。韓国・北朝鮮籍の者は全国と比べ大阪市で有意に多く、フィリピン籍の者は大阪市で有意に少なかった(表4)。

薬剤感受性の状況を外国人と外国人を含む大阪市全体とで比較した。初回治療の群では、外国人のMDRは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、大阪市全体では6.6%であった(表5)。

年齢分布についてみると、外国人では20代が64名(51%)、30代が22名(17%)であった。一方大阪市全体では20代90名(7%)、30代(9%)であり、20~39歳群の占める割合は、外国人68%に対し、大阪市全体では16%であった(表6)。

入国から発病までの期間を20~39歳の外国人について調べたところ、1年未満が23名(29%)、1年以上2年未満が19名(24%)、2年以上3年未満が14名(18%)であり、3年未満の者は合わせて70%を占めた(表7)。

社会背景では、20~39歳の在留外国人のうち学生は36名(42%)であり、在留外国人以外の者と比較して有意に多かった(表8)。20~39歳の健康診断によって発見された者は、在留外国人29名(34%)に対し大阪市全体50名(27%)であり、有意差は認めなかった(表9)。X-P上空洞を

(表 1) 外国人結核患者数の推移

性別	2006年	2007年	2008年	2009年	計
男	15	14	17	13	59
女	14	16	16	21	67
計	29	30	33	34	126

(表 2) 全年齢における外国人の割合

	2006年	2007年	2008年	2009年	計
外国人	29	30	33	34	126
大阪市全体	1501	1399	1343	1321	5564
割合	1.9%	2.1%	2.5%	2.6%	2.3%

(表 3) 20代における外国人の割合

	2006年	2007年	2008年	2009年	計
外国人	16	17	13	18	64
大阪市全体	127	91	88	90	396
割合	13%	19%	15%	20%	16%

(表 4) 大阪市と全国の外国人結核患者の国籍の比較

国籍	大阪市		全国	
	(2006~9年)	割合	(2006~8年)	割合
中国	48	38%	507	28%
韓国・北朝鮮*	36	29%	221	12%
フィリピン*	13	10%	425	23%
タイ	7	6%	58	3%
ブラジル	4	3%	103	6%
ベトナム	4	3%	69	4%
インドネシア	3	2%	99	5%
その他	11	9%	332	18%
計	126	100%	1814	100%
不明	0		36	

* P<0.001, tested by chi-square test

認める者は、在留外国人 10 名 (12%) に対し在留外国人以外 33 名 (18%) であり、有意差は認めなかった (表 10)。塗抹検査上陽性の者は、在留外国人 29 名 (37%) に対し在留外国人以外 64 名 (44%) であり、有意差は認めなかった (表

11)。

治療成績を比較検討した結果を表 12 に示した。20~39 歳の脱落の者は、在留外国人 12 名 (19%)、在留外国人以外 6 名 (4%) と有意差を認めた。

(表5) 外国人と大阪市全体の薬剤感受性の比較

		外国人 (2006～9年)		大阪市全体 (2007～9年)	
			割合		割合
初回治療	MDR	2	2.9%	16	0.7%
	H耐性*	7	10%	108	4.7%
	R耐性*	0	0%	5	0.2%
	感受性あり	59	87%	2169	94%
	計	68	100%	2298	100%
	不明	41		1275	
再治療	MDR	3	30%	18	6.6%
	H耐性*	1	10%	16	5.9%
	R耐性*	1	10%	7	2.6%
	感受性あり	5	50%	232	85%
	計	10	100%	273	100%
	不明	6		158	
治療歴不明		1		59	

* MDRを除く

(表6) 結核患者の年齢分布

外国人(2006～2009年)			(参考)大阪市全体(2008年)		
年齢	患者数	割合	年齢	患者数	割合
0-19	9	7.1%	0-19	12	0.9%
20-29	64	51%	20-29	88	7%
30-39	22	17%	30-39	115	9%
40-49	13	10%	40-49	131	10%
50-59	8	6%	50-59	198	15%
60-69	1	0.8%	60-69	326	24%
70-79	5	4%	70-79	287	21%
80-	4	3%	80-	186	14%
計	126	100%	計	1343	100%

(表7) 20-39歳の入国から発病までの期間(2006～9年)

1年未満	23	29%
1年～	19	24%
2年～	14	18%
3年～	13	16%
5年～	10	13%
10年～	1	1.3%
計	80	100%
不明	6	

(表 8) 20-39 歳の社会背景の比較

	在留外国人 (2006~9 年)		在留外国人以外 (2008 年)	
		割合		割合
学生*	36	42%	9	5%
常勤者	26	30%	115	66%
家事従事者	9	10%	5	3%
臨時・その他	7	8%	14	8%
無職	8	9%	32	18%
計	86	100%	175	100%
不明	0		9	

* P<0.001, tested by chi-square test

(表 9) 20-39 歳の発見方法

	在留外国人 (2006~9 年)		在留外国人以外 (2008 年)	
		割合		割合
医療機関受診	54	63%	129	70%
健康診断	29	34%	50	27%
接触者健診	3	3%	4	2%
計	86	100%	183	100%
不明	0		1	

* NS, tested by chi-square test

D. 考察

外国人の増加に伴って外国人結核患者数が増加する現象は、米国や英国でもみられている²⁾³⁾⁶⁾。日本の外国人登録者数は、1998 年の 151.2 万人から 2008 年末では 221.7 万人に増加した⁷⁾。大阪市においても結核患者における外国人の占める割合は増加傾向にあり、特に 20 代については 20%を占め、全国の 25%には及ばないものの、外国人結核は無視できない課題となりつつある⁴⁾。大阪市では外国人結核患者数に大きな変化はみられなかった。しかし大阪市全体に占める外国人結核患者の割合は増加傾向にあり、20 代に限ると 2009 年には 20%を占めており、今後大阪市においても外国人結核対策が重要な課題となることが示唆された。出身国では、全国の外国人と比べ、韓国・北朝鮮が多く、フィリピンが有意に少なかった。これは大阪市には韓国人のコミュニティが多数みられ、その家族、親族が入国している可能性が考えられた。

薬剤耐性率を外国人と大阪市全体で比較したところ、初回治療、再治療いずれにおいても多剤耐性結核の割合が外国人で高かった。主要 3 か国(中国、韓国、フィリピン)の多剤耐性結核患者の割合は、すべての新登録患者ではそれぞれ 5.0%、2.7%、4.0%、再治療患者ではそれぞれ 26%、14%、21%と報告されている³⁾。これらはいずれも本邦の薬剤耐性率より高く、大阪市の外国人結核患者の多剤耐性結核患者の割合に近似するものであっ

た。外国人結核の増加に伴って多剤耐性結核患者も増加することが予想され、多剤耐性結核患者の早期発見・早期治療がさらに重要になっていくと考えられた。

外国人結核患者の年齢分布は 20~39 歳の割合が 68%を占め、大阪市全体と比べ若年者が多くみられた。入国後 3 年未満に発病する者の割合は 70%であった。また社会背景をみると外国人では学生が有意に多かった。これらのことより、大阪市では学生として入国した若年外国人が発病する例が多くみられることが示唆された。日本語での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所属することが予想され、日本語学校を始め大学、各種学校における入学時健診の徹底が重要であると考えられた。一方、臨時雇用を含む労働者の割合は 38%と二番目に多かった。大阪市において外国人を多く雇用する企業数は不明であり、それらの企業を調査し結核健診の重要性を啓発していくことも課題の一つとして挙げられた。

20~39 歳の群では、健康診断で発見された者の割合に有意差は見られなかった。X-P 上空洞ありの割合および塗抹陽性の割合に有意差はみられなかった。このことより、大阪市では日本人と同様外国人に対しても結核健診が実施され、早期に発見されている可能性が示唆された。しかし現状に満足することなく今後学校、企業等に対し健康診断をさらに徹底することが肝要である。

2007年登録外国人のち喀痰塗抹陽性初回治療患者658名の検討では、脱落は10%、転出は11%と報告されている。この中には治療途中に母国に帰国する例が含まれ、治療中断が懸念されていた⁹⁾。我々の報告では、20~39歳の外国人では脱落者が有意に多く、うち5名は治療中に帰国していた。脱落した7名の内訳は、医師の指示による者が1名、副作用によるものが2名、拒否・行方不明の者が4名であった。その中には日本語によるコミュニケーションが困難なため中断した例があり、医療通訳を介した支援がさらに必要であると考えられた。帰国した5名の内訳をみると、配偶者が日本へ帰国して処方薬を持ち帰り治療を継続していた者が1名、薬剤を処方して帰国させた者が1名、紹介状を作成し帰国させた者が2名みられた。大阪市では治療中の帰国者に対し上記のような対応を行い得る限り治療中断を減らす努力を行っている。今後は本人の希望を考慮しつつ可能な限り国内で治療を完了できるよう配慮していく必要がある。

E. 結論

大阪市における外国人結核患者は特に若年者で増加傾向であり、出身国の薬剤感受性の状況から多剤耐性結核患者の増加が懸念される。入国後3年未満で発病する者が多く、学生の割合という特徴から、日本語学校をはじめとした学校健診をさらに充実させる必要性が示唆された。また外国人では脱落する者が有意に多かった。医療通訳を介した治療支援を充実させ、本人が希望すれば可能な限り国内にて治療を完了できるよう配慮することにより、脱落・中断、転出を減らすことが肝要であると考えられた。

F. 研究発表

第69回日本公衆衛生学会総会（東京、2010年10月）にて発表

G. 知的所有権の取得状況

なし

参考文献

- 1) WHO Collaborating Center for the Surveillance of Tuberculosis in Europe Surveillance of Tuberculosis in Europe -Euro TB Report on tuberculosis cases notified in 2006. 2008.
- 2) Cain KP, Benoit SR, Winston CA, et al.: Tuberculosis among foreign-born persons in the United States. JAMA. 2008; 300: 405-412.
- 3) CDC Trend in Tuberculosis -United States, 2008. MMWR. 2009; 58: 249-253.
- 4) 結核予防会：新登録患者数-登録時総合患者分類コード、国籍コード、性、年齢階級別「結核の統計2010」。東京、2010、76。
- 5) 「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」（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）（研究代表者：岡田全司）。

- 6) French CE, Antoine D, Gelb D, et al.: Tuberculosis in non-UK-born persons, England and Wales, 2001-2003. Int J Tuberc Lung Dis. 2007; 11: 577-584.
- 7) 財団法人入管協会：概説「平成21年版 在留外国人統計」。東京、平成21年9月、1-25。
- 8) WHO Report 2009.
- 9) 結核予防会：在日外国人の結核。「結核の統計2009」。東京、2009、18。

[V] 難治性結核(多剤耐性・再発・治療失敗例)の疫学的研究 (Molecular epidemiology study on recurrence TB in Thailand and Japan)

研究分担者 野内 英樹 財団法人結核予防会複十字病院 臨床検査部臨床検査診断科長

研究要旨

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)の検体バンクとコホート研究を立ち上げ、結核症に対するフィールド研究開発を実施してきた。得られた疫学情報、臨床情報、細菌学的情報と共に、血液サンプルを活用して、結核の感染・発病と治療転帰のモデルに基づき、難治化していない新規の結核患者、及び結核症を発症していない正常タイ人と比較する事により、対策に役立てる様に、多角的に難治化に関する因子の同定した。

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(4.3-6.2)と比較してHIV陽性結核患者は9.7(95%信頼区間7.8-11.9)と顕著に高かった。HIV陰性、陽性共に再発率が有意に初年度が一番高く、次年度以降漸減を同定した。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。

宿主免疫研究では、前向きコホートを使い、難治性結核では、グラニューライシン産生能が低下しているという知見が得られた。PPD-tuberculinで刺激した群でも同様であった。

菌体因子としては、北京株が難治性結核でより高頻度で認められ、より病原性が高いのではと示唆された。

A. 研究目的

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した。

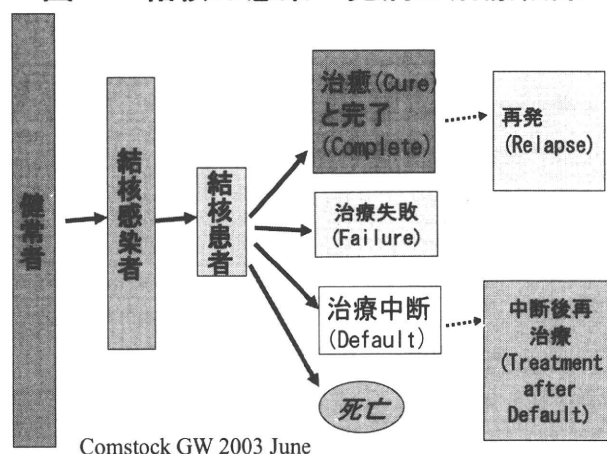
岡田班本体が掲げる、①日本における外国人結核の発生状況と診断・治療の実態把握及び対策・制御、②アジア地域との研究ネットワークの活用、③多剤耐性結核の制御、④新しい結核ワクチン・診断法の開発という全体目標への貢献を目指し、②-④について、タイ NIH という日本が建設してアジアの中心研究機関に育ててるネットワークの基に、前岡田班時代より進めている多剤耐性結核と難治性結核患者の正常治療例と比較した検体バンクとコホートを、日本には少ない HIV 感染毎の情報も持ちながら補強し、疫学研究を遂行した。

B. 研究方法

図1の結核の感染・発病と治療転帰のモデル示されるが、難治性の結核患者(再発例、治療失敗例、慢性排菌例等)の要因に関して研究した。

結核予防会結核研究所が設立母体となり、現在はタイ NIH 等とコンソーシアムを組んで運営しているタイ国チェンライ県の結核研究フィールドに参画して、(1)難治性結核患者(多剤耐性・再発・治療失敗例)の検体バンクとコホート研究を前回の岡田班より継続している。(1)の群に関しては、菌側の RFLP 等の標準タイピングを活用して、厳格に内因性の再燃と外来性再感染を区別している。(2)結核治療に反応が良く再発をしなかった群、(3)結核に罹患していない正常タイ人のコントロール群を設定し、比較の対象としている。取り込み時にケース・コントロール研究の形態にて、(1)と(2)の比較により結核症の難治に関する種々の要因検討、(3)と結核症群(1-2)の比較により結核自体の発症に関連する様々な疫学的因子の検討を進めている。

図1 結核の感染・発病と治療転帰



菌体は、比較しやすい様に、タイ国の新規結核患者の RFLP 分類法 [Dhanida Rienthong et al, 2005] に寄った。基礎データとして、タイ全国とその一部としての北タイでは、それぞれ北京株 (Beijing family) が 20.8% と 17.7%、タイ国に特有として報告されたノンタブリ株 (Nonthaburi group) が 14.3% と 8.8%、この 2 つに属さないが 6 バンド以上の多型群 (Heterogeneous group) が 17.6% と 17.7%、2-5 バンド群が 20.1% と 26.5%、1 バンド群が 27.3% と 29.4% と報告されている。

患者コホート研究で、患者サンプルは末梢血から血漿と PBMC に分離し、ツベルクリンや、結核死菌の刺激前後で血漿中のインターフェロンガンマ量とグラニューライシン量の測定した。測定法は

Figure 1. Recurrence rates by years since treatment completion

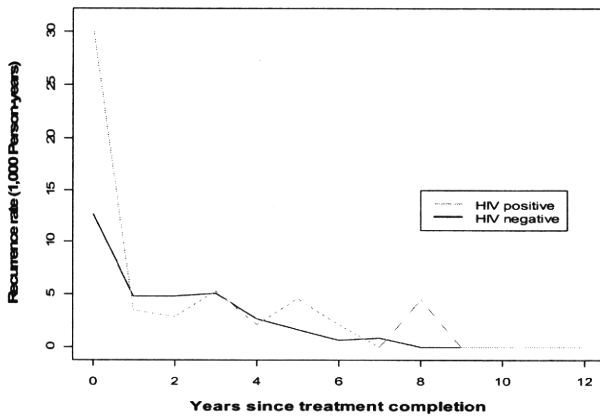


図 2

図3: Cumulative incidence of recurrence by race among HIV-uninfected TB patients.

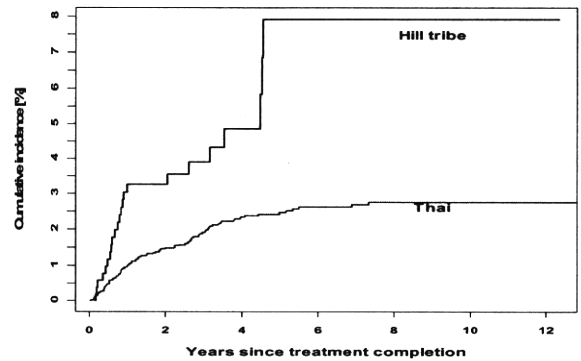
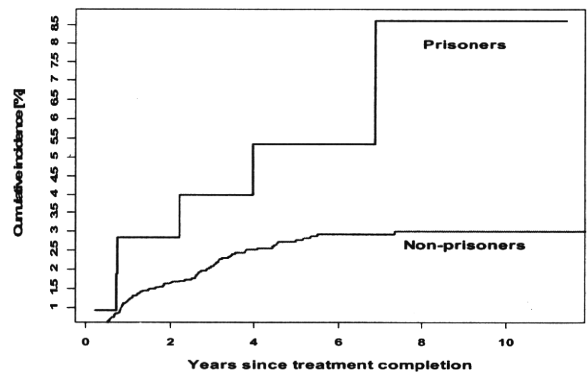


図4: Cumulative incidence of recurrence by prison among HIV-uninfected TB patients.



岡田班長の実験室で指導を受けて同じ ELISA 法のプロトコルにて、タイ NIH の協力を得て実施した。

(倫理面への配慮)

タイ国側については、タイ保健省倫理委員会の定める倫理規定に沿って研究を実施している。参加研究者全員の合意を得た研究プロトコルを作成し、タイ国保健省倫理委員会および関連研究施設の倫理委員会に提出し、今回のプロトコルも正式な研究として承認を得た。

また、日本の臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年厚生労働省告示第 415 号）、疫学研究に関する倫理指針（平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号）、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）に従った。

本研究に参加する患者については、担当医師による十分な説明の後、書面によるインフォームドコンセントを得た。研究を通して得られた個人情報 は厳密に管理し、参加研究者以外のものが内容を知り得ることはない。現在までの日泰間の共同研究でこれらの基本原則を遵守し、更に、検体等の日泰間の移動等に関しては文書での Material Transfer Agreement 等を結び、知的財産権（パテント）等の問題も含め国際共同研究に関連した倫理的な問題に配慮してきた実績がある。コホートの参加者にはインフォームド・コンセントに基づく自発的な参加を実施し、参加者のフォローアップにも強制は加えなかった。なるべく、医療的な利益が参加者に得られる様に、タイ保健省の発行する国民健康保険への参加の支援等を行った。

C. 研究結果

臨床疫学因子を再発の関与因子に絞って再解析をし、危険因子が同定された。図 2 に示す様に、1000 人年当りの再発率で、HIV 陰性結核患者の 5.1(4.3-6.2)と比較して HIV 陽性結核患者は 9.7(95%信頼区間 7.8-11.9)と顕著に高かった。HIV 陰性、陽性共に再発率が有意に初年度が一番高

く、次年度以降漸減していた。

危険因子同定は表 1 に単回帰解析の表 2 に多変量解析の詳細を示す。図 2 にも示す様に、HIV 陰性結核では再発の関与因子としては、山岳民族が顕著で、タイ族と比して調節オッズ比 2.63(95%信頼区間 1.65-4.19)であった。また、図 3 にも示す様に、監獄歴のある場合が調節オッズ比 3.38(1.39-8.21)と有意であった。他の関与因子としては、HIV 陽性結核では、男性である事が調節オッズ比 1.7(1.08-2.71)であった。結核の部位が肺外結核である場合、HIV 陰性、HIV 陽性ともにそれぞれ調節オッズ比 0.15(0.04-0.64)、0.34(0.20-0.59)と肺結核例よりも再発率が低かった。直接監視下投薬(DOT)の実施の有無は再発に関与していなかった。

宿主免疫学的因子は、倫理委員会の承認にて実施されている患者の stage や治療を詳細に解析する前向きコホート研究で、PPD-tuberculin と結核死菌(H37Ra)で Stimulation し培養した検体を活用して検討を進めた。最終年度に得られた結核の治療後のフォローアップの結果を追加し

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
Overall	118	22979	5.1	4.3-6.2		90	9281	9.7	7.8-11.9	
Regimen					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
Hospital					0.015					0.81
Provincial	27	8575	3.2	2.1-4.6	Ref	36	3826	9.4	6.6-13.0	Ref
Hospital										
District	91	14404	6.3	5.1-7.8	0.015	54	5455	9.9	7.4-12.9	0.81
Hospital/others										
Prisoners					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
Race					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
Age group					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
Gender					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
DOTS					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
TB Site					<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
Year since TX completion					<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

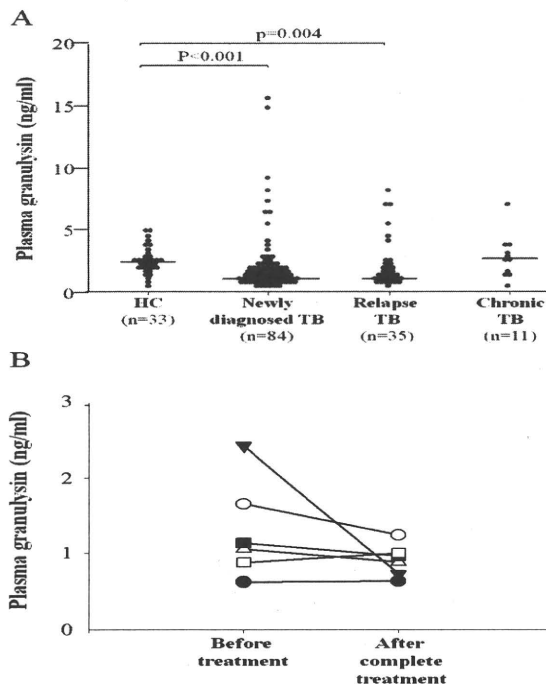
表2 多変量解析によるHIV感染状況毎の再発危険因子

Variables	HIV-			HIV+		
	Adjusted RR	95% CI	P-value	Adjusted RR	95% CI	P-value
Gender			0.23			0.022
Female	1.00	Ref	Ref	1.00	Ref	Ref
Male	1.06	0.71-1.60	0.76	1.71	1.08-2.71	0.023
Regimen						0.029
CAT1	-	-	-	1.00	Ref	Ref
Others	-	-	-	0.40	0.13-1.28	0.12
Age group			0.0004			0.0090
15-25	1.00	Ref	Ref	1.00	Ref	Ref
25-35	1.76	0.61-5.08	0.29	0.80	0.44-1.43	0.45
35-45	2.48	0.93-6.58	0.069	0.44	0.22-0.89	0.022
45-55	3.75	1.45-9.67	0.0063	0.18	0.040-0.78	0.022
55-65	4.71	1.81-12.21	0.0015	0.00	0.00-0.00	>0.99
>65	2.68	0.99-7.31	0.054	0.83	0.11-6.35	0.86
Race			<0.0001			
Thai	1.00	Ref	Ref	-	-	-
Hill tribe	2.63	1.65-4.19	<0.0001	-	-	-
Prisoner			0.011			0.12
No	1.00	Ref	Ref	1.00	Ref	Ref
Yes	3.38	1.39-8.21	0.0072	2.04	0.82-5.07	0.12
Treated Hospital			0.0031			
Provincial Hospital	1.00	Ref	Ref	-	-	-
District Hospitals and others	1.56	0.98-2.47	0.062	-	-	-
TB site			0.0002			<0.0001
PTB	1.00	Ref	Ref	1.00	Ref	Ref
EPB	0.15	0.037-0.64	0.0097	0.34	0.20-0.59	<0.0001
PTB&ETB	0.00	0.00-0.00	>0.99	0.53	0.19-1.45	0.22
Years since TX completion			<0.0001			<0.0001
0	1.00	Ref	Ref	1.00	Ref	Ref
1	0.38	0.23-0.65	0.0003	0.12	0.05-0.28	<0.0001
2	0.39	0.22-0.68	0.0010	0.10	0.04-0.27	<0.0001
3	0.43	0.24-0.77	0.0056	0.18	0.08-0.41	<0.0001
4	0.24	0.10-0.55	0.0011	0.08	0.02-0.30	0.0003

図5. Circulating granulysin levels (ng/ml) in patients with newly diagnosed TB, relapse TB and chronic TB in comparison with healthy controls (HC) (A).

Circulating granulysin levels (ng/ml) in patients with newly diagnosed TB before and after completion of anti-TB therapy (B).

Each dot represented one individual. horizontal bar indicated the median of each group.



て図5-8に示した結果にて、論文投稿した。
菌体因子として、結核菌の分析をRFLP等のDNA指紋分析標準タイピングを活用したパターンを図9-10に示す。HIV陰性例における詳細な42例の経時的検討が終了し、40例(95%)がRFLPパターンが一致し、同じ菌による再燃、2例(5%)が、RFLPが異なり違う菌による再感染と考えられた。表3に難治性結核症における北京株の割合とタイ国の

新規結核菌の全国レベルの20.8%[Dhanida Rhienthong et al, 2005]と比したオッズ比を求めた。難治性結核患者の結核菌は北京株(Beijing family)が、再発例で52.7%、オッズ比OR=5.5(95%信頼区間2.5-13.1)、治療失敗例で40%OR=2.5(95%信頼区間1.02-6.3)と有意に高かった。

Figure 6. *In vitro* granulysin production (ng/ml) by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with newly diagnosed TB, relapse TB, chronic TB and healthy individuals stimulated with PPD and H37Ra. Supernatant from PBMCs without stimulation was used as controls (A).

The granulysin production *in vitro* (ng/ml) by PBMCs from patients with newly diagnosed TB stimulated with PPD and H37Ra before and after completion of anti-TB therapy (B).

A horizontal bar indicated the median of each group.

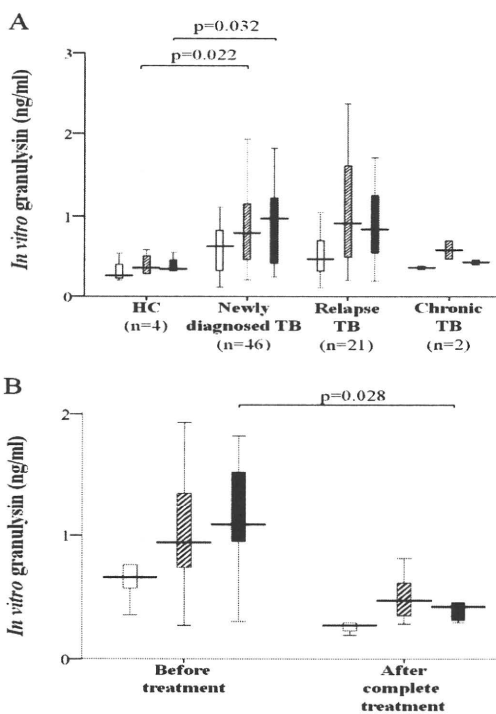


Figure 7. Circulating IFN- γ levels (pg/ml) in patients with newly diagnosed TB, relapse TB and chronic TB in comparison with healthy controls (A).

Circulating IFN- γ levels (pg/ml) in patients with newly diagnosed TB before and after completion of anti-TB therapy (B).

Each dot represented one individual. A horizontal bar indicated the median of each group.

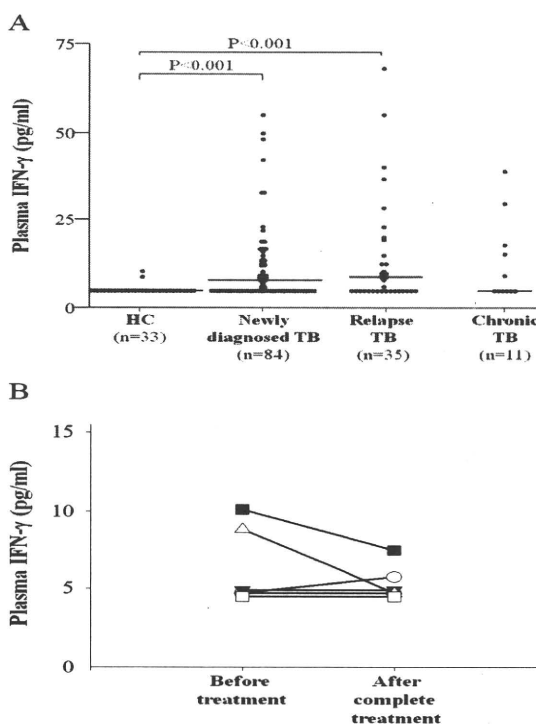


図8 *In vitro* IFN-g production (pg/ml) by PBMCs from patients with new TB, relapse TB, chronic TB and healthy individuals stimulated with PPD and H37Ra. Supernatant from PBMCs without stimulation was used as controls (A).

The IFN-g production *in vitro* (pg/ml) by PBMCs from patients with newly diagnosed TB before and after completion of anti-TB therapy stimulated with PPD and H37Ra (B).

A horizontal bar indicated the median of each group.

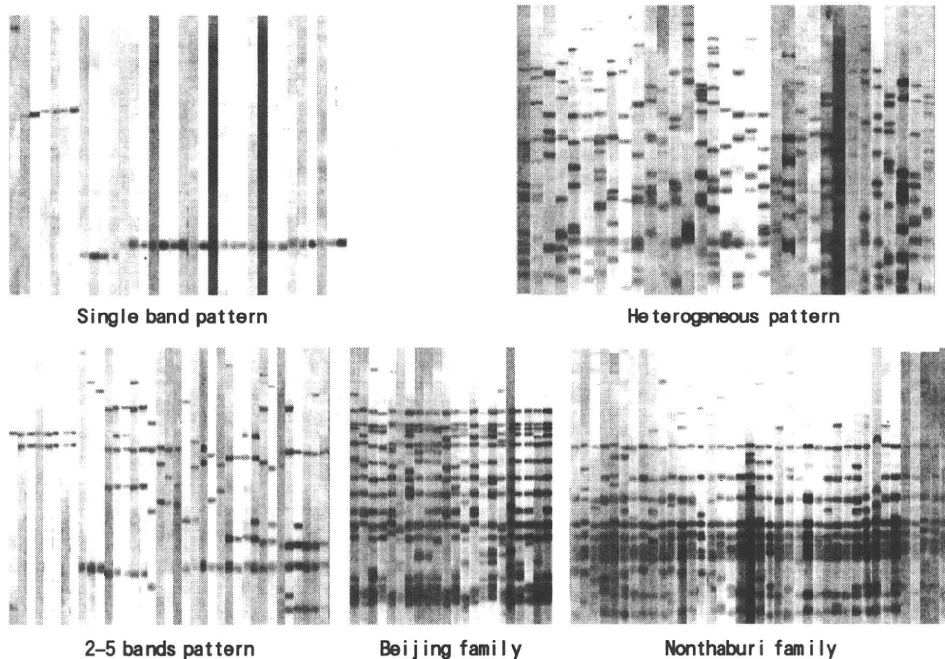
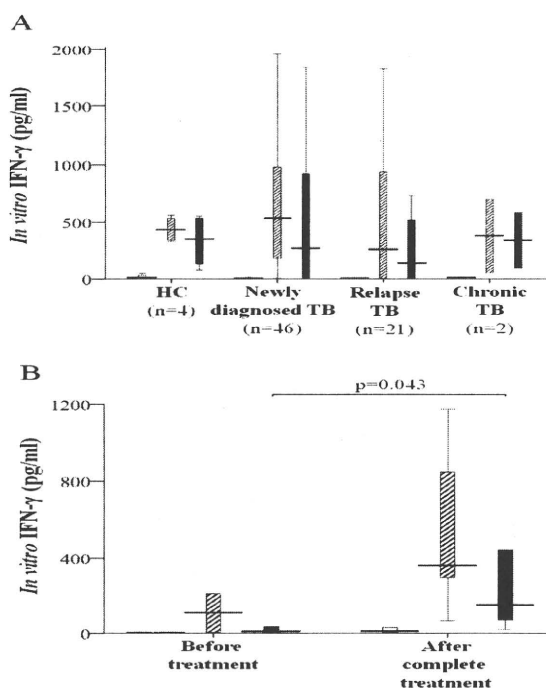


図9 タイ国における結核菌のRFLPパターン (*M. tuberculosis* strains in Thailand)

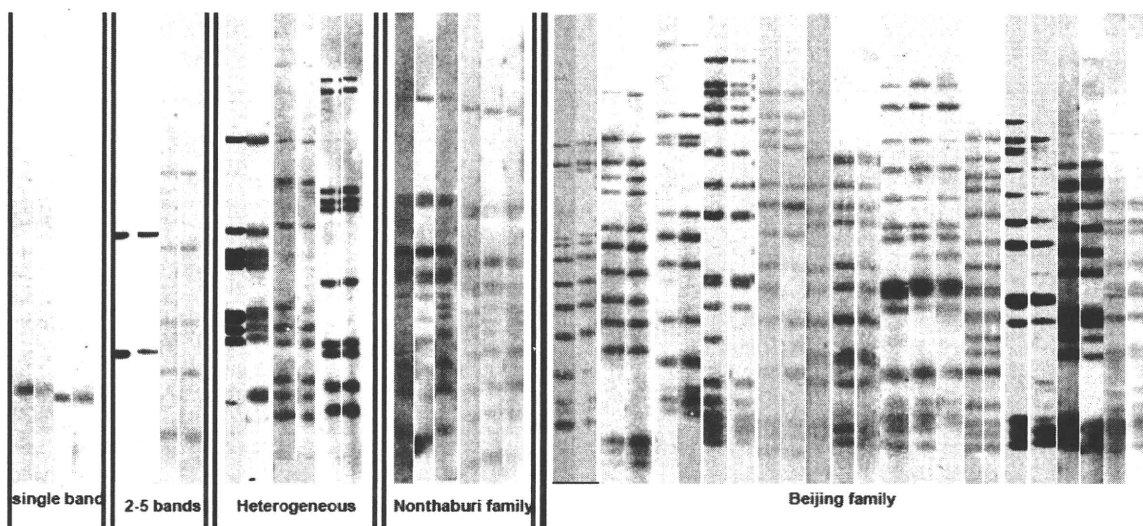


図 10 HIV 陰性の再発・治療失敗結核例から認められた結核菌 IS6110-RFLP 同一パターン例 (IS6110-RFLP patterns of identical *M. tuberculosis* isolates from some patients.)

表3 難治性結核症における北京株の割合とオッズ比

	再発例 (n=22)	治療失敗例 (n=20)	北タイ (n=34)	タイ全国 (n=828)
北京株 (IS6110が15-20コピー)	59.1%* (13)	40% ** (8)	17.7% (6)	20.8% (172)
ノンタブリ株 (IS6110が11-15コピー)	4.5% (1)	10% (2)	8.8% (3)	14.3% (118)
Heterogeneous群 (IS6110が6コピー以上あり、バンドのパターンが上記2群でない)	13.6% (3)	15% (3)	17.7% (6)	17.6% (146)
2-5バンド群	9.1% (2)	15% (3)	26.5% (9)	20.1% (166)
1バンド群	13.6% (3)	10% (2)	29.4% (10)	27.3% (226)

タイ全国と北タイのパターンに関しては、全国薬剤感受性サーベイランスの菌を使った調査[Rienthong D et al. 2005] タイ全国と比したオッズ比は、*再発例 OR=5.5(95%信頼区間2.5-13.1)、**治療失敗例OR=2.5(95%信頼区間1.02-6.3)

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。

宿主免疫学的因子では、岡田班長が CD8 陽性キラーT で in vitro で発見した現象 (TB 患者や MDR-TB 患者ではキラーT リンパ球内のグラニューライシンや in vitro 培養上清中グラニューライシンが低下) と矛盾しない結果が得られた。岡田班長の志向する「免疫賦活療法」の研究開発には、研究開発のボランティアの対象となる難治性結核患者で、指標となる免疫マーカーが変化しているかどうか突き止める必要があり、次に免疫賦活療法がそれを指標としての活用を検討する必要がある。

菌体因子として、結核菌の RFLP-IS6110 パターンは北京株 (Beijing family) が、タイ国の新規結核菌の全国レベルの 20.8%、北タイにおける分布の 17.7% [Dhanida Rhienthong et al, 2005] に比して有意に高かった。多剤耐性結核菌の北京株は更に高く 66.7% であった。北京株はより病原性が高いという報告がされており、本研究も関連していると考えられる。

本岡田班は、前回と継続してアジア地域との研究ネットワーク活用による研究開発を志向しており、現地での研究基盤が欠かせない。タイ国では、タイ赤十字が製造している BCG は東京株を使用しており、2009 年に供給不足が予想された際は、最終的には回避できたが、いち早く日本 BCG 研究所に購入を申し込んでいる。また BCG レコンビナントにて HIV ワクチンを開発してきた事より、結核ワクチンの開発に関して興味を持っている。岡田班長はアジアにおける数少ない結核ワクチンの開発者であり、共同研究の意義は深い。

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、コホート研究を継続して、その予防の為に、難治性に及ぶ因子を多角的に検討した。

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- γ levels in plasma of patients with newly diagnosed and relapse tuberculosis. Submitted

2. 学会発表

1. 野内英樹、慶長直人、山田紀男、石川信克 海外フィールドでの結核の遺伝疫学研究 第 83 回日本結核病学会総会 (要望演題 発病に関係する宿主、菌の要因)、東京、2008 年 4 月
2. 野内英樹、山田紀男、吉山崇 結核症再登録 42 例における初回発症時との RFLP パターンと薬剤耐性状態の経時的分析 第 84 回日本結核病学会総会 (要望演題 多剤耐性結核 演題番号 41)、札幌、2009 年 7 月
3. 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
4. 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

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

[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

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

PPD-でありながら結核菌特異的抗原に対して陽性反応を示すアナジーに CD4+ CD25+ T 細胞がサイトカインの産生を制御することで関与していることを示した。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。また 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。

A. 研究目的

世界の三分の一のヒトが結核菌感染者といわれる。そしてその診断には PPD がいまでも汎用されている。しかし、結核患者や結核菌感染者にも PPD に陰性反応を示す場合がある。結核患者の 15% はアナジーであるともいわれる。アナジーの免疫学的特徴は抗原特異的な T 細胞の IL-2 産生不全である。そこでムンプスや、カンジダなどの抗原をコントロールとして用いる方法が以前から使われた。しかし技術的に困難なため現在ではこのような方法はとられていない。CD4+ CD25+ T 細胞は制御 T 細胞として知られ、CD4 細胞の 10% を占め、免疫系の制御に重要な役割をしている。ここでは、結核菌に特異的な抗原を用いて、ヒト末梢血リンパを刺激してサイトカイン産生を測定することより、このようなアナジー状態に CD4+ CD25+ 制御 T 細胞 (Treg) が関与しているかを検索した。

またわが国と人的物的交流の盛んな中国における多剤耐性結核の流行状況は十分に明らかになっていない。中国東北部における多剤耐性結核の薬剤耐性遺伝子同定を行うことで、これらの結核がわが国に侵入してきた際の迅速な対応に資する。

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。

B. 研究方法

1) 結核菌由来の、early secretory protein- (ESAT-6) と culture filtrate protein 10 (CFP-10) は H37RV 遺伝子の RD-1 領域に存在し、BCG や殆どの非結核性抗酸菌感染者は保有していない。こ

れらの抗原は、結核菌に特異的な免疫応答の指標として期待できる。抗結核免疫応答を、結核菌に暴露されている医療関係者で PPD 陰性者と陽性者と比較検討した。健康な医療従事者で以前に BCG を受けている PPD 陽性者 (PPD+, 27 才男性) と PPD 陰性者 (PPD-, 42 才男性) を検索した。それぞれ 20ml の EDTA 採血全血より Ficoll-Paque により PBMNC を分離した。細胞はその後 MACS-assisted cell sorting で CD25 抗原陽性細胞を deplete させた。処理した細胞のマーカーは streptavidin-allophycocyanin と anti-CD4 FITC 抗体で二重染色を行った。

CD4+ CD25+ 細胞を除去した群と非除去群のそれぞれを purified protein derivative (PPD), phytohemagglutinin (PHA) (Sigma, USA), recombinant CFP-10 (Proteix, Czech republic) 及び recombinant ESAT-6 protein (Proteix, Czech) と培養し、培養上清の IFN- γ を human IFN- γ Opt EIATM Set (BD Bioscience) で測定した。

結核菌採取と DNA 抽出.

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 (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 産物はスパーサーの異なる 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

IFN-gamma 産生能

CD25 除去、非除去群で各種抗原に対する IFN-gamma 産生を観察した。CFP-10 刺激では PPD+ では IFN-gamma 値は $7,023 \pm 0,689$ pg/ml で PPD-では $16,168 \pm 2,983$ pg/ml であった。PPD+ の D4+ CD25+ T 細胞除去では IFN-gamma 産生は 30.4 倍に、PPD-では 40.6 倍に上昇した。

ESAT-6 刺激

ESAT-6 刺激では PPD+ の IFN-gamma 産生は $38,07 \pm 12,413$ pg/ml。PPD-では $228,843 \pm 17,303$ pg/ml であった。CD4+ CD25+ T 細胞除去の上昇率は PPD+ では 1.8 倍であったが、PPD-では 2.6 倍であった。

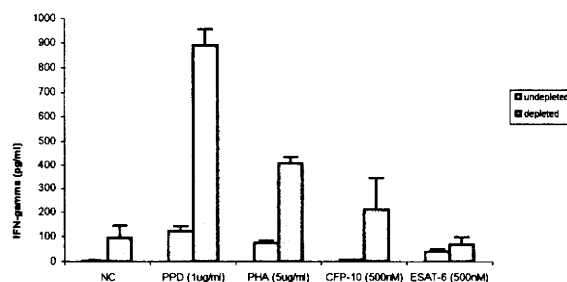
黒竜江省の結核菌の北京型の疫学

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 SpoIDB4 database で解析され(表 1) 39 株は 35-43 スペーサ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 40 株が RD105 を欠損していた。スポリゴタイピングと RD105 欠損のカップ値は 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当と思われた。最初に最も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($0.3 \leq h \leq 0.6$), ETR C ($h = 0.068$) と ETR B ($h = 0.066$) は特に多様性度は低かった。

A



B

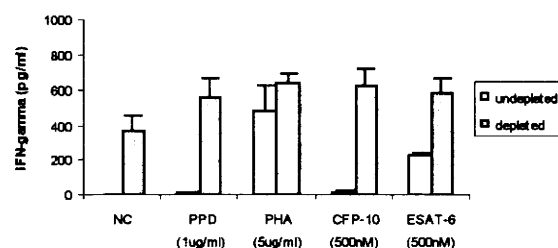


図 1 IFN-gamma production by (A) TST positive and (B) TST negative person.

MIRU23 ($h = 0$)座には多様性はなかった。そこで ETR C, ETR B と MIRU23 座は MIRU-VNTR 解析から除いた。

これらの結果に基づき残りの株を 16 MIRU-VNTR 座で解析した。その結果を見ると、全ての 16 座が 19 座解析と似通った多様性を示した。200 株のうち最も高い多様性は QUB11b ($h = 0.730$) で低い物は Mtub29 ($h = 0.138$) であった。16 座を使用した時の HGDI 値は 0.9977 だが、16 座より低い座数での解析の可能性を求めた(表 2)。10 座数解析では HGDI は 0.9950 で 15 座数あるいは 16 座数と同じであった。

黒竜江省由来結核菌の VNTR による遺伝子型

VNTR 解析では 200 株は 180 の遺伝子型に分類され、170 株がユニークな型で残りの 30 株が 10 のクラスターを示した。16 座を使用した系統樹解析を行った結果これらの株は 4 種類の大きなグループに分けることができ、それぞれ 21, 13, 21, 145 株が存在した。179 の北京株のうち 144 株 (99.3%) がグループ IV で、他の 35 株はグループ III に属していた ($P < 0.0001$)。そしてクラスター化した株は全てがグループ IV ($P = 0.0018$) に属した。これらのことは北京型とクラスターは別個であることを示した。

