

表 3

TABLE 3. Differences of MTB characteristics among the four sub-groups^a

Characteristic	No. of isolates	Sub-groups (%)				P value
		□(n = 21)	□(n = 13)	□(n = 21)	□(n = 145)	
Resistance						
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 ^b	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

^aThe numbers in the parentheses indicate the percentages from each subgroup.

^{*} Chi-square test, the rest were Fisher's exact test.

^b The number of patients with acquired TB.

有意差はなかった。(OR, 0.4564; 95% CI, 0.0824-1.6670; P = 0.2127).

E. 考察・結論

症例数は少ないがその末梢血リンパ球を解析することにより見掛け上 PPD 陰性者にも結核菌特異的抗原に対しては陽性者がいることを明らかにした。この個体は医療従事者であり、結核患者の診療にあたった経験があるのにも関わらず、PPD は以前より陰性であった。この PPD- の末梢血リンパ球の CD4+ CD25+ T 細胞を除去するとサイトカイン産生が PPD+ の末梢血より増加した。これらのことは CD4+ CD25+ T 細胞が見掛け上のアナジーの原因となっていることを示唆している。黒竜江省由来の結核菌の遺伝型を解析した。北京型は中国で最も分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が認められなかった。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ての研究でクラスター率は最も低かった。今まで黒竜江省では、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

- 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
- 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
- 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
- Guio H, Ashino Y, Saitoh H, Mizusawa M, Xiao P, Soto A, Theo A and Hattori T. High numbers of Interferon- γ -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 Juan, Liu Yan, 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-kB 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) 浩日勤、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 8TH CHINA-JAPAN INTERNATIONAL CONFERENCE OF VIROLOGY 2010.7. 7/4~7/7 HARBIN, CHINA
- 6) Changan-Yasutan H, Zhang J, Fukumoto M and Hattori T. Potential role of OPN in ATL pathogenesis. 3rd 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. 3rd 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. 3rd 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. 3rd 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. 3rd 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-Yasutani 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.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他
特記事項なし

[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

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

結核は、世界的にはまだまだ大きな感染症として存在している。そのため先進国においては輸入感染症としての対策の強化がなされてきている。本研究では、英国、米国に焦点をあてて、結核対策およびそれを支えている公衆衛生制度について、現地を訪問し、保健医療組織、結核対策に関わる専門職種について調査を行った。結核の低蔓延状況下のもとでは、結核問題はホームレス者、外国人、H I V感染者、薬物依存者に偏在化し、また耐性結核や合併症患者などの複合的な問題が生じていた。結核患者の減少していくにつれ、個別的に濃厚に対応した対策への転換が求められていた。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。英国、米国のいずれにおいても、結核対策を支える公衆衛生体制の基盤の強化と連動して、結核対策の強化がなされていた。わが国の結核対策のあり方を考えると、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ことが示唆された。

A. 研究目的

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

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。

C. 研究結果

1. 平成 20 年度

英国では発展途上国からの流入してくる人口が大きく、ロンドンにおいては外国人の患者が 75%を占めている。そのため結核は輸入感染症として対策を行っていくことが重要となっている。中央レベルで結核対策の中核となっている Health Protection Agency の Centre for Infections, Colindale Colindale を訪問した。地域レベルの調査のためにリーズ市にある地域の Health Protection Agency のブランチである Health Protection Unit を訪問した。輸入感染症として結核に対応するために作りあげられている仕組みについて調査を行った。結核患者の大半が集中しているロンドンでは、結核対策は 5つのエリアに分けて行われており、移民、ホームレス、犯罪者などの困難事例に対応できる看護系の専門職員を配置して対策が行われていた。ブラッドフォード市では近年移民が増加してきており、地域の大部分の居住者が外国人であるところも存在している。そのような地域では結核問題が深刻になっていた。英国の結核対策の基本的なフレームワークは公衆衛生の側面を持つ呼吸器科医師を Chest Clinic(呼吸器疾患診療所)に配置し、これを公衆衛生専門組織である Health Protection Agency が技術的な専門に支える体制となっていた。患者に対する保健医療の提供は National Health Service に属する Primary Care Trust が担っていた。Primary Care Trust に Chest Clinic が所属して、そこにいる呼吸器専門医と結核専門サービスを行う看護職 (Tuberculosis Special Nurse) とが協働して結核患者管理が行われていた。外国人の結核対策の強化のために多くの外国人の入国の玄関口となっているロンドンのヒースロー国際空港において結核健診を行う水際対策を進められてきた。しかし、この方法で輸入感染症としての結核患者の侵入防止はできなかったことから、現在は入国後に外国人が居住する地域におけるプライマリーケアで対応する方式を重視した仕組みづくりに取り組まれていた。

2. 平成 21 年度

1) 連邦政府機関支援による結核センターの活動

ニュージャージー大学のグローバル結核研究センター (GTBI) は結核の研究、実践、研修を担っている。米国疾病管理センター (CDC) の TB Trial Consortium と TB Epidemiologic Trial に参加していた。併設の結核クリニックでは MDR・XDR などの複雑な結核症例に対する専門診療を行っていた。米国では、全国を 4 区分に分けて、CDC が資金援助して地域の結核医療者を支援する結核センターが設置されている。ニュージャージー大学の GTBI はニューヨーク州、マサチューセッツ州などの米国北東部地域の Training and Medical Consultation Center (RTMCC) に位置づけられている。研修と技術支援は研修コース、インターネットを活用した研修、現場研修、技術支援 (研修教材、資源、講師派遣、計画策定) がある。医療相談は、医療従事者にも一般にも公開されており、地域の結核対策担当者または保健部の職員の研修や支援も行われていた。

2) ニューヨーク州 (NYS) 保健局

ニューヨーク州は人口約 1800 万 (その内 1000

万が NYC) で 57 の County と NYC はその中の 5 つの County から成っている。2008 年の結核患者は 305 人、NYC は 985 人であった。ニューヨーク州の結核罹患率は 6.2、NYC を除くと 2.4 であった。州内の保健区は 57 county あるが、39 の County の年間患者発生数が 0~1 の低まん延地域である。州の結核対策は医師、保健師、アウトリーチワーカー合わせて 15 人程度で行われていた。その中の 8 人は 5 つの County に配置されている。結核対策の実務の実施と責任は地域保健行政当局 County にあり、州は小さい County の後方支援を行っていた。ニューヨーク市は、大都市であり州政府とは独立した自治体であり、独自の保健行政を行っており、専門スタッフはニューヨーク市の方が多い状況にある。

3) ニューヨーク市保健局

ニューヨーク市は 5 つの County からなるニューヨーク州の地域連合であるが、1 つの自治体として州保健局からは独立している。市長は Commissioner を任命し保健対策の全責任と執行を任せている。市保健局は 6000 人の職員がいる。結核対策を所管している疾病対策部 (Disease Control) は結核以外に HIV、STD、その他の感染症の業務を行っている。ニューヨーク市の保健行政の歴史は連邦政府より古く、ニューヨーク市保健局は州政府とは独立して結核行政の責任主体となり、結核対策の計画策定、人員の確保、条例の制定、医療体制の構築を行っている。結核対策予算は連邦政府から CDC に渡され配分されている。CDC が自治体に予算を配分していた。1980 年に HIV の増加などがあり多剤耐性結核の流行など深刻な結核再興に直面した。CDC が結核緊急事態を発令し、ニューヨーク市に結核対策の専門チームを派遣し、結核対策の立て直しが行われた。結核関連予算が増やされ、結核対策のためのアウトリーチワーカーなど人員が大幅に増やされ、結核対策を進めるために地域に 9 か所の結核センター (Chest Center) が設置され、結核対策の患者発見、診断・治療、DOT の推進など患者管理体制を整えられた。1992 年には 5000 人の患者で 454 人の MDR (そのほとんどが HIV) であったのに比較すると、2008 年の結核患者は 895 人、MDR 患者は 11 人となり、70%減少して、その対策が成果をあげた。1992 年には 70%が米国生まれの患者が占めていたが、現在は 70%が外国生まれが占めている。エクワドール、中国、ハイチ、最近特にチベットからの移民の罹患率は 500 (人口 10 万人対) と極めて高く、結核対策の対象者は現在は外国生まれの人々となっている。米国に 6 ヶ月以上滞在する外国人 (米国に来る人の 5%に相当) には在外大使館にビザ申請時に X 線検査及び喀痰検査を受けて、証明書を求める措置がとられている。結核対策の職員は 300 人で、その単数の者は Public Health Advisor (PHA) と呼ばれるアウトリーチワーカーとして仕事をしている。その点がニューヨーク市の結核対策の特徴となっていた。PHA は患者のカルテのチェック、接触者健診のための患者と接触者への面接、DOT を行っている。BCG を実施している国からの移民が増えているため、結核感染診断検査はツ反から QFT に移行している。QFT 陽性者に対しては潜在性結核感染症 (LTBI) として治療を勧奨して

いる。患者の50%がChest centerで治療され、残りの50%が民間病院、大学病院等で治療されている。医療保険を持っていない患者はChest center無料で保健医療サービスが提供されている。入院が必要な場合には市立病院(Government corporate hospital)に入院する。医療保険を持っている患者はその保険に応じた医療施設で治療を受けている。Chest centerには医師、看護師、PHA (Public health advisor)、事務職員が配置されている。Chest centerで治療を受けていない患者に対しては、市保健局結核対策部の地域支援室(Field Unit)のスタッフが患者管理支援を行っている。

4) 市立公衆衛生研究所

市立公衆衛生研究所(PhI)はNYCにある65病院のReference laboratoryになっている。ニューヨーク市の結核対策を菌検査の上で支えている。塗抹検査は24時間以内に依頼元の病院に結果を返している。塗抹陽性の場合にはMTDで結核菌同定を行っていた。液体培地と固形培地(LJ)に分けて培養している。薬剤感受性検査は1次抗結核の他、2次抗結核薬について実施し、3次抗結核薬についてはコロラド州デンバーにある研究所に委託して実施していた。菌株の分子遺伝学的分析(スポリゴタイプングなど)は州公衆衛生研究所で、RFLPはNewarkにあるニュージャージー州の公衆衛生研究所に委託して実施していた。NYCのPhIの検査室はBSL3の設備が整備され、検査機器は液体培地としてBactec960を使い、必要に応じてHPLCを使っていた。結核菌検査は7人の検査技師で年間11,000の検体を扱っている。

5) 地域の結核診療センター(Chest center)

NYCの結核のサービス提供は2000年に組織改編が行われ、4カ所のフィールドオフィス(Field office)を設置し、一般医療機関受療患者に対するケースマネジメント室(Case management unit(CMU))を設け、市直営の9カ所の結核診療を行っているChest centerとあわせてニューヨーク市のすべての患者管理が行われていた。フィールドオフィスには医師とPHAが配置され、業務は患者面接、病院のスタッフと連携してDOTの実施、患者の退院の確認、DOTの対象外の患者については薬局で抗結核薬を受け取っているかチェックするなどの業務を行っている。訪問したCorona Chest CenterはQueens地域にあり、Corona地区はヒスパニックの人々が多い地域である。市内9カ所の中で最も忙しいChest centerである。職員は約30人であった。建物の中には母子保健、予防接種などのPrimary health careの提供が行われている。患者の診断・治療が行われる胸部X線装置、採痰室があり、患者が使う部屋は陰圧、換気装置と紫外線発生装置があり、特に採痰室は前室があって感染制御が出来る構造になっていた。Chest centerで行われている業務は、①患者発見とサーベイランス、②患者管理、③医師または看護師が全ての患者と疑いの者に面接、④PHAはNon-adherentな患者を治療に戻す、⑤医療機関から結核患者に関する治療等について医師が相談を受ける、⑥DOTを行う、⑦接触者健診、⑧HIVの相談と検査、⑨社会福祉サービスとの照会、⑩コホートレビュー会議、である。

6) 市立ベルビュー病院入院施設

Bellevue病院は長い歴史を持つ市立病院である。ニューヨーク市内の公的医療機関ネットワークであるHHC(Health and Hospital Corporation)の中の中心的な医療施設となっている。患者の多くは医療保険を持たない貧困者、移民などの公的医療が必要な人である。病院内には表示は英語、スペイン語と中国語など多言語であった。医療水準は高くニューヨーク市立大学医学部の教育病院にもなっている。犯罪者に対する病棟も持っている。結核病床は呼吸器科病棟の中にある陰圧病室である。喀痰の誘発採取を行う部屋には前室が設けられている。拘束治療の病床は21あり、1995年頃は常時15-20人の患者が入院していたが、近年患者の減少とともにここに入院する者も減少して、現在は2人のみが入院していた。拘束下治療(D4、D5命令)の対象になるのは、主に、薬物中毒、精神疾患を合併している患者である。D4は感染性が消失するまでの拘束、D5は治療するまで拘束される患者である。患者の人権の保護のために、患者は訴えることが出来ることになっており、判事による聴聞が1ヶ月以内に行われることになっており、患者は2ヶ月毎に訴えることができるようになっている。

3. 平成22年度

1. サンタクララ郡における結核対策

1) サンタクララ郡は、シリコンバレーが近くにある工場労働者として外国人が多く流入している。外国人の多くはアジア系外国人であった。

2) 結核対策は、結核専門の結核クリニックを設けて対応していた。陰圧設備有し、検査と外来治療も実施し、患者登録と追跡、呼び出し、そして外来診療、その間の訪問DOTを行っていた。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い、多言語対応できるスタッフを雇用して対応していた。

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(X-p、ツ反またはQFT)、必要な予防接種がなされている。

活動性結核が見つければ、外来治療が開始され、経済状況を評価して、貧困層や経済困難者には公費負担や、保険適用により治療がなされていた。

4) 入院は、治療困難例のみであり、感染させる危険が低い患者は在宅生活に移行し、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でさら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ながら、企業での発生時の職場の換気状況等の環境については、詳細に調査し、接触者検診と二次感染防止に集中して力を入れられていた。

8) 結核対策は、原則に従った患者発見、患者登録、管理を徹底している。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を定めて行っていた。

4. サンフランシスコ市における結核対策

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は無料で結核健診を実施している。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に対し、結核対策を実施している拠点施設である。

3) 接触者の調査ではホームレス者に対しても接触者を洗い出す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により、自立支援の施策を対象者との信頼関係をつくりながら実施している。

5) シェルターに入所中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の中から脱落者が出てきていることが課題となっており、その対策を検討していた。

6) 重要な点は、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実施し、スタッフ間でケアのあり方について徹底的な討論を行い、支援や関わりの方針が決められている。

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をもっている。

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%、残りは州である。

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をコンピュータ登録して、行方不明を極力防ぐシステムをとられている。

10) シェルターは、現在の市長の新しい政策として行われている。支援内容と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て登録し、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）を提供している。収容期間は7日から1か月であり、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を確立して、患者の徹底した追跡体制、結核疑い者の胸部レントゲン写真は専門医がチェックすることになっている。

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、他の医療機関の診療をサポートしている。

14) 結核病床は縮小し、入院は極力抑さえ、外来中心で治療を行い、患者発見のために感染診断には最新の世代のQFTゴールドを導入している。しかし、人件費を含めた全体の結核対策コストは上げないように対応している

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に特化した組織や制度をつくることにより進められてきた。しかし、結核罹患率が低下してくるとともに結核対策を特定の組織だけで行っていくこと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り、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。英国リーズ、米国ニューヨーク、サンフランシスコではわが国の都市部と比べて罹患率、患者数ともに少ないにも関わらず、最新の医療技術を導入し、専門性を有する医師やスタッフを公的に配置した結核対策が行われている。結核問題を公衆衛生制度の立て直しと連動して対応しているように思われる。わが国は結核蔓延時代に確立された全国一律の結核対策により大きな成果をあげてきたが、結核病床、結核に関わる医師、保健スタッフが減少してきており、一方で、結核患者は高齢化、不安定就労者、不安定生活者に加え外国人の患者も目立つようになってきている。結核低蔓延状況となるにつれ、人的、物的な資源が限られている中で専門性の高い対策を進めていくことが必要になっていくものと思われる。そのためには、英国、米国におけるように結核対策をマネージメントする専門組織を位置づけ、戦略的な対策のやり方に転換していくことが必要と考えられる。具体的には、外国人など多様な結核患者を抱える地域において、結核対策における保健所の位置づけを医療も含めて機能を強化するか、サンフランシスコのように公的な診療施設を結核対策の中心組織として位置づけるか、方向性を明確にしていく必要がある。輸入感染症としての結核対策に対するには、1) 結核対策を進めようとする強い対策当局の意志を明確にする。2) 結核対策の地域のケースマネージメント体制とそれを担う組織を明確にする。3) すべての人々に対応できる結核の保健医療保障制度へと転換する。4) 結核医療を担う一般医療機関の医療関係者に対する研修と医療相談支援組織を明確にする。

E. 結論

結核が低蔓延状況となるにつれ、結核対策のためだけの独自の制度と施設、例えば結核専門病院、保健所などの組織を維持することは困難となるが、結核患者は全国の何処で発生するかわからない。しかも、外国人、ホームレス者、透析患者、高齢者などの患者の割合が増えていくものと考えられる。このような状況に対し、英国、米国においては、一般医療機関をも巻き込んだ新たなケースマネージメントシステムの構築を重要視した対策を進めている。一般医療機関の結核に関わる診療支援体制と、一般医療機関で行っている結核診療を適切なものとするように調整する機能の強化である。罹患率が低下し、患者数が減少している中で、専門性の高い、個別ニーズに対応した対策を進めていくことが必要となる。この点については結核対策のマネージメントを行う組織が必要である。英国、米国における結核対策は、それを支える公衆衛生体制の基盤が存在しているから成り立っているように思われる。わが国においても結核対策を支える公衆衛生体制のあり方もあわせて、輸入感染症としての結核に備えた体制づ

くりが求められていると思われる。

る保健医療基盤の検討、平成 22 年 10 月 29 日。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 高鳥毛敏雄: わが国の結核対策の現状と課題 結核対策の及ばない人々に対する対策, 日本公衛誌, 56(6), 418-421, 2009.
- 2) 高鳥毛敏雄: 英国における公衆衛生人現任教育の現状. 公衆衛生, 73(3), 200-205, 2009.
- 3) 高鳥毛敏雄: 低まん延国における結核対策の保健医療組織—米国、英国、ドイツ—. 結核, 84(2), 94-96, 2009.
- 4) 高鳥毛敏雄: わが国の貧困と医療の課題 —英国との比較から—, Vol.2, 51-58, 貧困研究、明石書店、2009.
- 5) 高鳥毛敏雄: 救急医療現場における薬物中毒者の実態, 大阪保険医雑誌, 38(519), 26-30, 2010.
- 6) 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.
- 7) 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. 学会発表

- 1) 高鳥毛敏雄: 財団法人結核予防会 第 13 回国際結核セミナー
「ドイツにおける保健所を中心とした結核対策」
平成 20 年 3 月 6 日
- 2) 高鳥毛敏雄: 第 83 回日本結核病学会総会 (東京) 「シンポジウム I 低まん延に向けた結核対策のあり方」低まん延国における結核対策の保健医療組織 平成 20 年 4 月 24 日
- 3) 高鳥毛敏雄: 第 101 回日本結核病学会近畿地方会、第 71 回日本呼吸器学会近畿地方会 教育講演「結核医療の展望」 平成 20 年 7 月 5 日
- 4) 高鳥毛敏雄: 第 84 回日本結核病学会総会 (札幌) 一般演題 英国における輸入感染症としての結核対策 平成 21 年 7 月 3 日
- 5) 高鳥毛敏雄: 第 84 回日本結核病学会総会 (札幌) シンポジウム I 感染症法のもとでの結核医療のあり方 S1-2 欧米の結核医療の提供体制 平成 21 年 7 月 2 日
- 6) 高鳥毛敏雄: 第 68 回日本公衆衛生学会総会 (奈良) 第 13 分科会 一般演題、結核低まん延時代における輸入感染症としての結核対策に関する研究 平成 21 年 10 月 22 日
- 7) 高鳥毛敏雄: 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、平成 22 年 5 月 21 日。
- 8) 高鳥毛敏雄: 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

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

【Ⅷ】 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

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。3年間という短期間で、カウンターパートの設定、共同研究計画の策定、協議、実施、解析までは、かなり困難が伴われたが、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。今回の枠組みを利用して、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。本研究班では、特に外国人の持ち込む多剤耐性結核が、問題であり、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な手法により明らかにすることを目的にした(図1)。

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。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

ファムゴックタック病院(ホーチミン市)における多剤耐性結核の宿主要因の検討

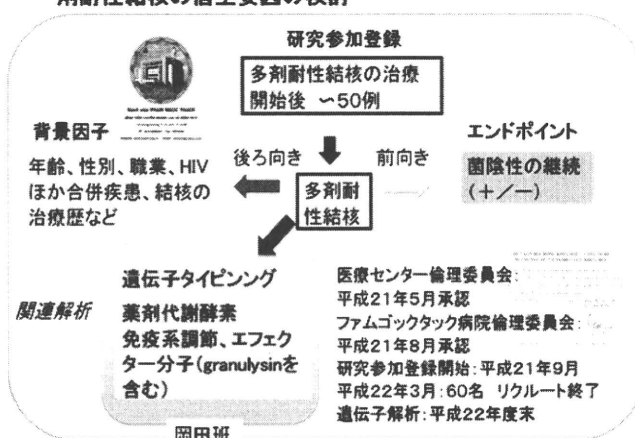


図1 研究の全体像

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。

(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結核は、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、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。

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. Respiriology. 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.

6. Lien LT, Hang NT, Kobayashi N, Yanai H, Toyota E, Sakurada S, Thuong PH, Cuong VC, Nanri A, Mizoue T, Matsushita I, Harada N, Higuchi K, Tuan LA, Keicho N. Prevalence and risk factors for tuberculosis infection among hospital workers in Hanoi, Viet Nam. PLoS One. 2009;4(8) e6798.

7. Hang NT, Ishizuka N, Keicho N, Hong LT, Tam DB, Thu VT, Matsushita I, Harada N, Higuchi K, Sakurada S, Lien LT. Quality assessment of an interferon-gamma release assay for tuberculosis infection in a resource-limited setting. BMC Infect Dis. 2009;9:66.

8. Keicho N, Itoyama S, Kashiwase K, Phi NC, Long HT, Ha LD, Ban VV, Hoa BK, Hang NT, Hijikata M, Sakurada S, Satake M, Tokunaga K, Sasazuki T, Quy T. Association of human leukocyte antigen class II alleles with severe acute respiratory syndrome in the Vietnamese population. Hum Immunol. 2009 ;70(7):527-31.

9. Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, Nakata K, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M, Sakurada S, Sasazuki T, Inoko H. Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary Mycobacterium avium complex infection. J Infect Dis. 2009;199 (11):1707-15.

[IX] タイにおける結核、HIV 結核のバイオマーカー

研究分担者 櫻田 紳策 国立国際医療研究センター 呼吸器疾患研究部 室長

研究要旨

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。

A. 研究目的

結核および HIV 合併結果について、自然免疫と適応免疫との運動・協調において何らかの障害が存在する可能性が考えられる。本研究では、活性化マクロファージおよび T 細胞から産生される osteopontin と Th1 系サイトカイン、NK 細胞やキラー T 細胞によって産生され細胞溶解ならびに抗菌活性を持つ granulysin、活性化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うことを目的とする。

B. 研究方法

1. 結核、HIVHAART (-)、HIVHAART (+)、HIV 結核合併、健常の5群からの血漿と血球細胞の取得は先行研究によった。また、血漿 osteopontin、granulysin 一部の Th1 系サイトカインの ELISA 測定、CSF 二より分化させた末梢血単球由来マクロファージからの total RNA サンプル取得も先行研究によった。

2. 本研究では、上記測定に加えて、血漿 IFN- γ および活性型ビタミン D (25(OH)D₃ と 1,25(OH)₂D₃) を ELISA で行った。さらに、ビタミン D 関連遺伝子 (CYP27B1、VDR、cathelicidine) について定量的 RT-PCR を実施した。また、血漿 granulysin の分子量を明らかにするためイムノブロッティングを実施した。

3. 本研究では、健常者 26 名中から Quantiferon test 陽性者 (潜在結核疑い) 3 名を除外して、計 23 名の健常対照で、統計学的解析をやり直した。本研究のデータでは正規性は乏しく、ノンパラメトリック解析 (Mann-Whitney U test と Wilcoxon Signed Ranks test で検定を行った。)

(倫理面への配慮)

本研究で用いたヒト臨床サンプルは、先行研究において任意の研究協力者から取得したものである。先行研究は、平成 18 年 12 月に国立国際医療センター (当時) 倫理委員会にて承認された。次いで、平成 19 年 5 月にタイ公衆衛生省の、6 月にチェンライ病院の倫理委員会の承認を得た。協力病院の一つであるメーチャン病院には倫理委員会は設置されていない。

C. 研究結果

1. Osteopontin: 患者血漿における IFN- γ 値は結

核、HIV 合併結核群において有意に上昇しており、他群との比較から、osteopontin、IL-18、IP-10 の場合と同様のパターンを示すことが確認された。IL-12 は HIVHAART (+) 群で有意上昇していたため、osteopontin ならびに上記サイトカインと異なったパターンを示したが、結核、HIV 合併結核においても有意に上昇しており、osteopontin と Th1 系サイトカインが HIV 合併結核患者血漿で著明に上昇していた。

2. Granulysin: 患者血漿における granulysin 値は、健常者から Quantiferon test 陽性者を除外したことから、結果に違いが出た。結核患者では健常者および HIVHAART (+) の患者と比較して有意に granulysin 値は減少していた。一方、補正後も HIV 合併結核では他群に比較して有意に上昇しており、この点は変わらなかった。さらに、HIV 合併結核で血漿中 granulysin が著明に上昇していたことから、その分子量を明らかにするためイムノブロッティングを実施したところ、この方法によっても HIV 合併結核患者血漿では granulysin 量が著明に増加していることが分かった。また、分子量は 15kDa と 9kDa のものが確認され、9kDa のものが大半であった。

3. 活性型ビタミン D と関連遺伝子: 血漿 25(OH)D₃ 値は結核群で欠乏している症例が多い傾向が認められたが、サンプル数が少なく統計学的に有意な結果を出すに至っていない。M-CSF により分化した培養 M-M ϕ においては、未刺激では CYP27B1 の発現は認められず、BCG 感染刺激によってのみ発現誘導が認められた。また、M-CSF は、むしろ CYP27B1 の発現を抑制した。一方 GM-CSF によって分化した培養 GM-M ϕ においては、未刺激でも一定のレベルで発現しており、GM-CSF の添加および BCG 感染によってさらに発現が増強された。VDR は、培養 M-M ϕ において BCG 感染刺激によってのみ発現が弱く誘導され、一方、培養 GM-M ϕ においては BCG 感染ではなく GM-CSF によって VDR 遺伝子の発現が増強された。cathelicidine は双方の培養マクロファージにおいて刺激時にも誘導がかからず、とくに培養 M-M ϕ では検出限界以下のレベルであった。患者群では、CYP27B1 の遺伝子発現が、HIVHAART (-) と HIV 合併結核で、抑制されている傾向が認められた。

4. 薬剤耐性試験はバンコックの中央検査室で実施されたが、多剤耐性・超多剤耐性結核菌は全例から検出されなかった。また、薬剤別では SM に対して 14% が耐性、INH に対しては 8% が耐性であった。それ以外の薬剤に対しては耐性菌は確認されていない。

D. 考察

結核における Osteopontin の産生の亢進は、以前から指摘されてきた。今回、HIV 合併結核において血漿 osteopontin が著明な高値を示した。HAART を行っていない HIV 症例であり、CD4+T 細胞数も全群の中で最も減少していたが、IFN- γ 、IL-12p40、IL-18、IP-10 といった Th1 系のサイトカイン・ケモカインの有意な産生亢進を伴っていた。このことから、一般に慢性進行性の HIV 感染症においては、HIV 特異的な細胞性免疫は強く抑制され、また他の病原微生物に対する細胞性免疫も低下していると考えられている HIV 感染症においても、結核を発症し、急速に増悪している時期には、Th1 応答ないしはそれに類似した応答が誘導されている可能性が示唆された。しかし、これが抗原特異的な応答であるかは不明であり、むしろ granulysin の実験結果から想像されるように、結核特異的な免疫応答は抑制されているにもかかわらず、強い非特異的免疫応答ないし炎症反応だけが誘導されている可能性も考えられる。また、osteopontin が、このような疾患において、今まで指摘されているように Th1 誘導に正に関与しているかどうか不明である。

結核患者および HIV 結核患者血漿における granulysin 値については、結核では健常より減少、HIV 合併結核では著明に上昇していたことは、granulysin の分子量を明らかにする必要性を迫るものであった。今回、われわれは、HIV 合併結核における血漿 granulysin の分子量が主として 9kDa であるというイムノブロッティングの結果を得たが、サンプル採取、保存、実験中の degradation によって 9kDa の分子量のものが生じた可能性を排除仕切れていない。今後、検討する必要があると考えている。

活性型ビタミン D は、マクロファージの活性化因子と考えられているが、VDR を介した cathelicidine の産生誘導によって、結核菌を殺菌すると考えられている。しかし、この活性系が異なる表現型のマクロファージにおいて、結核菌殺菌時にどのように働いているかは明らかになっていない。培養 M-M ϕ は、結核菌 (H37Rv) を 10%FBS RPMI1640 中で殺菌する。しかし、10%FBS 中の 25(OH)D₃ の濃度は低く、cathelicidine を誘導するレベルではない。従って、M-M ϕ は VDR-cathelicidine とは異なるメカニズムで結核菌を殺菌していると考えられる。今後、25(OH)D₃ の培地への添加による cathelicidine 遺伝子の発現検討およびキリングアッセイを行って、M-M ϕ ならびに GM-M ϕ の活性化における活性型ビタミン D の関与を明らかにしていく必要がある。さらに、HIV 感染群では、BCG 感染時の CYP27B1 の発現が抑制されている傾向が見られることから、HIV 感染によって活性型ビタミン D によるマクロファージの活性化が阻害されている可能性も考え得る。

E. 結論

HIV 陽性者における結核発症と重症化のリスクは、主として Th1 免疫の機能不全と考えられ、とりわけ CD8+ T エフェクター細胞の成熟障害、機能障害が重要であるという説が有力である。今回、われわれは本研究を通して、これに加えて、自然免疫、とくにマクロファージレベルの機能障害と抗原特異的な免疫応答に反比例するような過度の非特異的な免疫応答ないし炎症反応が、病態の悪化に関与しているのではないかと疑問を抱くに至った。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nada Pitabut, Panadda Dhepakson, Hideki Yanai, Chutharut Ridruechai, Shinsaku Sakurada, Pacharee Kantipong, Surachai Piyaworawongse, Saiyud Moolphaet, Norio Yamada, Keicho, Masaji Okada, Srisin Khusmith, Plasma and cellular granulysin levels relates inversely to IFN- γ in patients with newly diagnosed and relapse pulmonary tuberculosis. (投稿中)
- 2) Chutharut Ridruechai, Shinsaku Sakurada, Hideki Yanai, Norio Yamada, Pacharee Kantipong, Surachai Piyaworawong, Panadda Dhepakson, Srisin Khusmith, Naoto Keicho. Circulating full-length osteopontin, IFN- γ and hsCRP levels correlates with tuberculosis disease activity and response to successful treatment. (投稿中)

2. 学会発表

- 1) 「北タイの結核ならびに HIV 結核合併患者における細胞障害性顆粒に関する検討」櫻田紳策、赤川清子、岡田全司、慶長直人、第 85 回日本結核病学会総会 (京都) 2010 年 4 月
- 2) 「タイ神結核ならびに HIV 合併結核患者における細胞溶解性顆粒に関する検討」櫻田紳策、Nada Pitabut, Srisin Khusmith、赤川清子、岡田全司、慶長直人、第 21 回日本生体防御学会総会 (仙台) 2010 年 7 月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

特記事項なし

[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

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

結核菌の感染により肺で早期に誘導される遺伝子産物 secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)の機能を解析した。マウスに結核菌の感染を感染させると、気道上皮細胞から気道腔内、肺胞腔内に SLPI が2日目をピークに分泌される。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 SLPI が重要な役割を担っていることが明らかになった。

また、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ワクチン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

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。

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

これまで結核感染に際し、肺胞上皮細胞から分泌されるリポカリン2が、鉄イオンの取り込みを阻害することにより、結核菌増殖を抑制していることを

見出した。さらに、結核感染に際し、肺で遺伝子発現が上昇する secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)の結核感染防御における役割を解析した。SLPI は、試験管内で結核菌の増殖を抑制した。さらにその増殖抑制機構を解析したところ、SLPI は結核菌の細胞膜の透過性を亢進させることにより細胞膜を破壊し、殺菌していることが明らかになった。SLPI は、Whey acidic protein (WAP) domain が二つ並んだ分子であるが、どちらの WAP ドメインも細胞膜の透過性を亢進させた。WAP ドメインのアミノ酸配列を解析すると、WAP ドメインの N 末側の陽性電荷を有するアミノ酸が、膜透過性亢進に必要であることが明らかになった。陽性電荷を有したアミノ酸が、陰性電荷の結核菌細胞膜に会合し、膜透過性を亢進させていることが考えられた。また、SLPI の個体レベルでの結核感染における役割を解析するため、SLPI ノックアウトマウスに結核菌を感染させたところ、感染感受性が正常マウスに比べて極めて高くなっていることが明らかになった。このように、SLPI はリポカリン 2 とは異なる分子機構で、結核感染に対する自然免疫応答を担っていることが明らかになった。

さらに、SLPI, リポカリン 2 以外に結核感染で誘導される遺伝子を同定しており、現在その機能を解析している。

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

結核感染に際し、いわゆる免疫細胞ではなく、感染防御の最前線となる上皮系細胞から分泌される SLPI が結核菌の殺菌作用を有していることが明らかになった。今後、SLPI を用いた抗結核薬の開発などが期待される。

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

結核感染に際し、最前線となる上皮系細胞から分泌される SLPI やリポカリン 2 が結核菌の増殖抑制作用を異なる分子機構により発揮していることが明らかになった。今後、SLPI, リポカリン 2 以外にも、自然免疫系による結核感染防御機構を担う分子を同定していきたい。

結核菌由来の遺伝子 CFP-10 を、宿主マクロファージに直接発現させることにより、このマクロファージが非病原性の BCG に対する感受性が高まることを見出した。

異なるプロテオミクス法を用いたアプローチにより、ESAT-6, CFP-10 に会合する宿主分子候補を同定した。今後、これら候補分子の ESAT-6, CFP-10 会合による貪食胞成熟に及ぼす影響を明らかにしていきたい。

G. 研究発表

1. 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).
 - 8 Yamamoto, M., Standley, D.M., Takashima, S., Saiga, H., Okuyama, M., Kayama, H., Kubo, E., Ito, H., Takaura, M., Matsuda, T., Soldati-Farve, D., and Takeda, K.: A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *J. Exp.Med.* 206, 2747-2760 (2009).
 - 9 Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A., Lynch, S. V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., Littman, D. R.: Induction of Intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139, 485-498 (2009).
 - 10 Pejnovic, N., Vratimos, A., Lee, S. H., Popadic, D., Takeda, K., Akira, S., and Chan, W. L.: Increased atherosclerotic lesions and Th17 in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice fed high-fat diet. *Mol Immunol.* 47, 37-45 (2009).
 - 11 Miyazato, A., Nakamura, K., Yamamoto, N., Mora-Montes, H. N., Tanaka, M., Abe, Y., Tanno, D., Inden, K., Gang, X., Ishii, K., Takeda, K., Akira, S., Saijo, S., Iwakura, Y., Adachi, Y., Ohno, N., Mitsutake, K., Gowm N. A. R., Kaku, M., and Kawakami, K.: Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by deoxynucleic acids from *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 77, 3056-3064 (2009).
 - 12 Kayama, H., Koga, R., Atarashi, K., Mak, T. W., Takayanagi, H., Honda, K., Yamamoto, M. and Takeda, K.: NFATc1 mediates Toll-like receptor-independent innate immune responses during *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Pathogens* 5, e1000514 (2009).
 - 13 Yamasaki, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Matsuzawa, T., Ishikawa, E., Sakuma, M., Takeno, H., Uno, J., Hirabayashi, J., Mikami, Y., Takeda, K., Akira, S., and Saito, T.: C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 1897-902 (2009).
 - 14 Morishita, H., Saito, F., Kayama, H., Atarashi, K., Kuwata, H., Yamamoto, M., and Takeda, K.: Fra-1 negatively regulates lipopolysaccharide-mediated inflammatory responses. *Int. Immunol.* 21, 457-465 (2009).
 - 15 Haga, S., Ozaki, M., Inoue, H., Okamoto, Y., Ogawa, W., Takeda, K., Akira, S., and Todo, S.: The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation. *Hepatology* 49, 204-214 (2009).
 - 16 Saiga, H., Nishimura, J., Kuwata, H., Okuyama, M., Matsumoto, S., Sato, S., Matsumoto, M., Akira, S., Yoshikai, Y., Honda, K., Yamamoto, M. and Takeda, K.: Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. *J. Immunol.* 181, 8521-8527 (2008).
 - 17 Nakamura, K., Miyazato, A., Koguchi, Y., Adachi, Y., Ohno, N., Saijo, S., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., Fujita, J., Ishii, K., Kaku, M., and Kawakami, K.: Toll-like receptor (TLR) 2 and dectin-1 contribute to the production of IL-12p40 by bone marrow-derived dendritic cells infected with *Penicillium marneffeii*. *Microbes Infect.* 10, 1223-1227 (2008).
 - 18 Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R., Honda, K., and Takeda, K.: ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. *Nature* 455, 808-812 (2008).
 - 19 Nakamura, J., Fujimoto, M., Yasuda, K., Takeda, K., Akira, S., Hatayama, T., Takagi, Y., Nozaki, K., Hosokawa, N., and Nagata, K.: Targeted disruption of Hsp110/105 gene protects against ischemic stress. *Stroke* 9, 2853-2859 (2008).
 - 20 Saito, F., Kuwata, H., Oike, E., Koike, M., Uchiyama, Y., Honda, K., and Takeda, K.: Inefficient phagosome maturation in infant macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 113-118 (2008).
 - 21 Herrmann, J., Imura, T., Song, B., Ao, Y., Qi, J., Nguyen, T., Korsak, R., Takeda, K., Akira, S., and Sofroniew, M.: STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 28, 7231-7243 (2008).
 - 22 Gong, L., Yao, F., Hockman, K., Heng, H. H., Morton, G. J., Takeda, K., Akira, S., Low, M. J., Rubinstein, M., and Mackenzie, R. G.: Stat3 is required in hypothalamic AgRP/Npy neurons for normal energy homeostasis. *Endocrinology* 149, 3346-3354 (2008).
 - 23 Ueta, M., Hamuro, J., Ueda, E., Katoh, N.,

- Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., and Kinoshita, S.: Stat6-independent tissue inflammation occurs selectively on the ocular surface and perioral skin of Ikbz-/- mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3387-3394 (2008).
- 24 Kayama, H., Rairez-Carrozzi, V. R., Yamamoto, M., Mizutani, T., Kuwata, H., Iba, H., Matsumoto, M., Honda, K., Smale, S. T., and Takeda, K.: Class-specific regulation of pro-inflammatory genes by MyD88 pathways and Ikbz. *J. Biol. Chem.* 283, 12468-12477 (2008).
- 25 Nakamura, K., Miyazato, A., Gang, X., Hatta, M., Inden, K., Aoyagi, T., Takeda, K., Akira, S., Saijo, S., Iwakura, Y., Adachi, Y., Ohno, N., Suzuki, K., Fujita, J., Kaku, M., and Kawakami, K: Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *J. Immunol.* 180, 4067-4074 (2008).
- 26 Nishimura, J., Saiga, H., Sato, S., Okuyama, M., Kayama, H., Kuwata, H., Matsumoto, S., Nishida, T., Sawa, Y., Akira, S., Yoshikai, Y., Yamamoto, M., and Takeda, K.: Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *J. Immunol.* 180, 4032-4039 (2008).
- 27 Hisaeda, H., Tetsutani, K., Imai, T., Moriya, C., Tu, L., Hamano, S., Duan, X., Chou, B., Ishida, H., Aramaki, A., Shen, J., Ishii, K., J., Coban, C., Akira, S. Takeda, K., Yasutomo, K., Torii, M., and Himeno, K.: Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. *J. Immunol.* 180, 2496-2503 (2008).
- 28 Owaki, T., Asakawa, M., Morishima, N., Mizoguchi, I., Fukai, F., Takeda, K., Mizoguchi, J. and Yoshimoto, T.: STAT3 is indispensable to IL-27-mediated cell proliferation but not to IL-27-induced Th1 differentiation and suppression of proinflammatory cytokine production. *J. Immunol.* 180, 2903-2911 (2008).
- 29 Yamamoto, M., and Takeda, K.: Role of nuclear Ikb proteins in the regulation of host immune responses. *J. Infect. Chemother.* 14, 265-269 (2008).
- 30 Takeda, K., Yamamoto, M., Honda, K.: Assessing the response of cells to TLR stimulation. Signaling by Toll-like receptors, 1-21 (2008).
- 2 Kiyoshi Takeda. Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. International Symposium on Organelle Network: Microbiology, Immunology, and Cell Biology, July 12-13, 2010, Osaka, Japan
- 3 Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama. Regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa. 14th International Congress of Immunology, August 22-27, 2010, Kobe, Japan
- 4 竹田潔 自然免疫系の活性制御と腸管炎症, 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 Kiyoshi Takeda. Innate immune responses at the intestinal mucosa. Annual Meeting of The Society for Leukocyte Biology & The International Endotoxin and Innate Immunity Society, October 7-9, 2010, Vancouver, Canada
- 6 Kiyoshi Takeda. Innate immune responses at the intestinal mucosa. The first CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology, Shanghai, China 2009.11.7-8
- 7 Kiyoshi Takeda. Innate immune responses at the intestinal mucosa. The 2009 Fall Conference of the Korean Association of Immunologists, Seoul, Korea 2009.11.9-10
- 8 Kiyoshi Takeda ATP from commensal bacteria induces Th17 cell development in the intestine. Regulation of innate immunity, Seoul, Korea 2009.9.17-18
- 9 竹田潔 腸管粘膜に特有の自然免疫系細胞の機能 第39回日本免疫学会学術集会、大阪 2009.12.2-4
- 10 竹田潔 自然免疫系の活性制御と免疫疾患(特別講演) 第51回日本小児血液学、東京 2009.11.27-29
- 11 Kiyoshi Takeda Secretory Leukocyte Protease Inhibitor mediates anti-mycobacterial responses. 44th US-Japan cooperative medical science program, Tuberculosis and leprosy research conference 2009.7.29-31, Fukuoka, Japan
- 12 Kiyoshi Takeda Commensal bacteria-derived ATP mediates development of intestinal Th17 cells. RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2009、横浜 2009.7.9-10
- 13 Kiyoshi Takeda, Koji Atarashi, Kenya Honda: A mechanism for development of intestinal Th17 cells causing intestinal inflammation. The 7th Sino-Japan Joint Conference for Cancer Research. 2008.12.7-10, Guangzhou, China
- 14 Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, Masahiro Yamamoto NFAT is responsible for TLR-independent innate immune responses to a protozoan parasite 第31回日本分子生物
2. 学会発表
- 1 Kiyoshi Takeda. Regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa. Host-Pathogen interactions in generalized bacterial infection. May 31-June 3, 2010, Greifswald, Germany.

学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会
2008.12.9-12、神戸

- 15 Kiyoshi Takeda, Koji Atarashi, Kenya Honda
Commensal bacteria-derived ATP mediates
Th17 cell development in the intestinal
lamina propria (Symposium) 第37回日本免
疫学会学術集会、2008.12.1-3,京都
- 16 竹田潔 自然免疫系と炎症性腸疾患 第29回
日本炎症・再生医学会、2008.7.9、東京
- 17 竹田潔 腸内フローラと炎症性腸疾患 第12回
腸内細菌学会 2008.6.13、東京

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

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）
研究協力報告書

[I] 日本における在留外国人の就業状況別結核患者数と罹患率の推移

研究協力者 星野 齊之 結核予防会結核研究所

研究要旨

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

A. 研究目的

先進国では外国人結核が課題である。日本の現状を検討することを目的とした。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

1998年以降の労働者と学生の患者数は増加傾向を示し、要因として母数としての労働者と学生の増加が示唆された。家事従事者の患者数に一定の傾向はなく、永住者数は増加傾向だったが、配偶者等の数は横ばいであり、永住者数の影響は小さいと考えられた。罹患率の推移は、労働者は不変で、学生と家事従事者は低下傾向にあり、罹患率の変化が患者数増加の要因ではなかった。なお、罹患率低下の要因として、長期在留者の増加や出身国の罹患率の低下が示唆された。

D. 考察

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

E. 結論

在留外国人の結核患者数は増加傾向にあり、罹患率は日本人より数倍高い。在留外国人は、日本

の結核罹患状況におけるハイリスク集団の一つとして、今後も特別な対策を講じていく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 就業状況別の在留外国人結核の推移とその背景 星野齊之、大森正子、岡田全司 結核 Vol 85 N09, 697-702:2010

2. 学会発表

1. 在日外国人結核患者数の推移とその背景 星野齊之、内村和広、山内祐子、大森正子 結核 Vol84, No5, May 424: 2009

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

〔Ⅱ〕神戸市における外国人結核の解析

研究協力者 藤山理世 神戸市保健所

研究要旨

神戸市の66名の外国人結核を解析した。20代が29名と多く、常勤12名だった。職業は日本語学校の学生13名と多く、定期健診で発見8名、有症状受診3名、接触者健診1名であった。多剤耐性結核は結核菌培養しえた患者37名中2名(5.4%)と高値を示した。22件の遺伝子型別分析でクラスター形成が2件で両者ともベトナム出身で、日本国内でのベトナム人コミュニティの中での感染が示唆された。

A. 研究目的

結核患者数が減少してきた状況で、外国人の結核患者数の動向を調査し、その実態を把握する。特に海外から結核菌が持ち込まれているのかどうか、またそれが国内で新たな感染源となっていないかについて調査し、有効な感染予防対策を講ずる。

B. 研究方法

神戸市内での新登録結核患者のなかで、外国籍であるまたは海外出身であることが明らかな者についての疫学的情報や治療状況について集計した。

C. 研究結果

2006年～2010年に神戸市内で66名の外国人結核患者の新登録があった。

男性32名、女性34名であった。母が排菌していた2歳の児が1名、10代が2名、20代が29名、30代が13名、40代が5名、50代が4名、60代が2名、70代4名、80代が4名、90代が2名、2歳の児と15歳の中学生が日本生まれの外国籍、他の64名はいずれも外国生まれ・外国国籍であった。職業は日本語学校の学生13名、留学生8名、常勤12名、非常勤5名、主婦6名、無職17名(2歳児1名、ベトナム難民1名を含む)、であった。日本語学校の学生13名のうち、定期健診で発見された者が8名、有症状受診の者が3名、接触者健診で発見された者が1名であった。日本語学校経営者も接触者健診で発見された。結核菌が培養された者は37名で2名が多剤耐性であった。その2名はいずれも中国人であったが、接触なく、出身地もことなり、遺伝子型別分析(VNTR法)にて一致はみられなかった。ほか22件の遺伝子型別分析を実施することができ、クラスターを形成が2件みられた。1件はベトナム出身で、10年以上日本で働いている女性と、近隣の日本人15人とがクラスターを形成しており国内での感染が示唆された。もう1件は2歳児の母で40代のベトナム人で、7年前に来日し、仕事をしている女性と、15歳のベトナム人の両親をもつ児童とがクラスターを形成していた。直接的には知り合いではなかったが、日本国内でのベトナム人コミュニティの中での感染が示唆された。日本語学校の接触者健診で発見された学生については菌が培養されず、感染経路の解明は出来なかった。1つの学校でほぼ同時期に発見された2名がいたが、菌は異なっていた。入国から2年以内の発病が30名と約半数で、遺伝子型別分析の結果からも出身国での感染が示唆

された。治療完了51名、治療継続中7名、死亡3名、国内転出2名、帰国1名、治療中断2名であった。

D. 考察

神戸市での新登録結核患者の年齢分布において20代30代は20名～30名であることから、その年代における日本語学校の学生の患者の割合は高いといえる。入国後半年から2年以内の発病が多く、日本語学校での定期健診が重要である。対策として、日頃から日本人学校とも連絡体制を保ち、啓発活動を行い、患者発生時には速やかに調査に入り、接触者健診を行うことが重要である。

課題として、日本語学校の短期のコースでは健診の実施義務がないことがあげられる。また、事例からは診断されても継続して服薬するということに対する意識の低さがみられ、日頃からの啓発の必要性が痛感された。また、就労条件等により、定期健診がなく、健康保険にも未加入である外国人の存在が推定され、啓発活動の工夫も課題である。

現在のところ外国人の結核は発病の時期と遺伝子型から出身国で感染があった例が多いと考える。しかしながら、日本人から感染したと考えられる1例と日本国内での外国人コミュニティのなかでの感染が疑われる例が認められ、今後も菌株の収集に努め、遺伝子型別分析を進めていく必要があると考えられた。

【Ⅲ】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

アジア地域で多発している多剤耐性結核（MDR-TB、複数の抗生物質に対して抵抗性の結核）や、超多剤耐性結核（XDR-TB、既存の抗生物質が効かない結核）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、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について、臨床応用に必要な非臨床試験データの取得を行った。具体的には、アジュバント兼DDSでワクチンの有効性向上に重要な成分であるHVJ-Eについて、GLP安全性試験、安定性試験を実施し、並行してGMP製造に必要な技術を確立した。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と、GMP製造の適格性が明らかとなった。更に確立したGMP製造体制で、実際に臨床研究用の原料をGMP体制下で製造・出荷した。これらの研究により、今後国内での制御が必要になる多剤耐性結核などの難治性結核に対して有効性の高いワクチンを臨床開発するために必要な試験データの蓄積を進めた。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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、工程についてはベ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。

①動物の安全性試験データの取得

アジュバント兼DDSでワクチン成分であるHVJ-Eについて安全性試験を行った。国内の非臨床試験ガイドライン及びICHのガイドラインに従って、ラット（げっ歯類）、カニクイザル（非げっ歯類）の2種の動物を選択し、一般毒性試験（単回投与、2週間間歇投与）、安全性薬理試験（中枢神経系、呼吸器系、心血管系）、トキシコキネティクス（TK）試験、特殊毒性試験（免疫毒性、遺伝毒性など）について試験を実施した。試験は、予備試験をGLP施設での信頼性基準適合試験で実施し、本試験をGLP試験で実施した。

ラットを用いた試験としては、一般毒性試験（単回投与、2週間間歇投与）、安全性薬理試験（中枢神経系、呼吸器系）、トキシコキネティクス（TK）試験、特殊毒性試験（免疫毒性、遺伝毒性など）を実施した。一方サルを用いた試験としては、一般毒性試験（単回投与、2週間間歇投与）、安全性薬理試験（心血管系）、特殊毒性試験（免疫毒性）を実施した。

②薬効薬理試験データの取得

サル及びマウスを用いて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。

サルを用いた試験では、筋肉内にHVJ-Eを含む新規DNAワクチンを結核モデルに投与し、その予防効果、治療効果を検討するための被験物質を提供した。一方ラットを用いた試験では、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、苛酷試験、加速試験を実施して予備安定性データを取得した後に、長期安定性試験を計画、実施した。また、GMP製造については、