

解析研究中 (加藤・前田)

- (1) 全箇所のプローブを各国各研究者に送付。
- (2) 各国の200株の結核菌を解析し、広まっている結核菌遺伝子型を解析。
- (3) SNP法による結核菌型別システムの樹立。

東アジアで広まっている結核菌遺伝型の解析
・SNP法による遺伝型解析
 (大きなグループに分類)
・VNTR法による型別
 (より細かいグループに分類)

図12

Ⅲ. アジア諸国の多剤耐性結核 (表30、31)

1. 中国 ハルピン市では治療経験群の薬剤耐性結核80%。北京型結核菌膜蛋白Rv0679の新診断法開発 (服部)

黒竜江省の結核菌の解析では1,230株の解析を行い、通常の抗結核剤あるいはフルオロキノロンに対する抵抗性を検討した。その結果、通常の抗結核剤に対する抵抗性は2007年から2011年までの薬剤耐性株は58.4%でMDRは23.3%であった。

耐性株の比率は2009年が最も高く、2011年が最も低かった。2011年では新規患者の8.1%が、治療歴のある患者の31.9%がMDR-TBであった。期間全体では、何らかの薬剤耐性を示したものが35%、MDRが23%であった。

結核の治療歴のある患者は全体の65%であった。治療歴のある患者と入院期間の短い患者ではMDRの比率が高い傾向にあった。2009年の株では23.1%がLevofloxacinに抵抗性であった。薬剤耐性を示した株についてみると、何らかの薬剤耐性を示したものが431あり、このうち治療歴ありは35%、治療歴なしは65%もあった。一方MDRについては、287株のうち治療歴ありは60%、治療歴なしは40%であった (図13)。

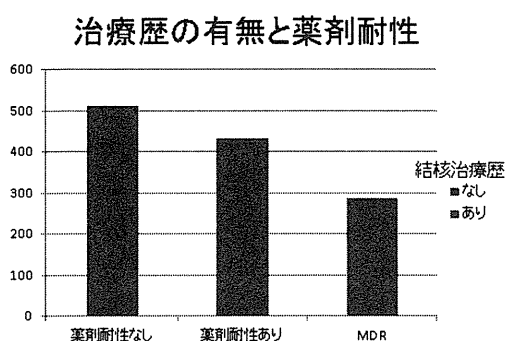


図13：結核の治療歴の有無と薬剤耐性
薬剤耐性あり(中央)において、結核治療歴なしが6割を占める。MDR(右)においてはこの傾向はみられない。

2. タイ (野内)

難治性結核の分子疫学解析をタイで進めて来た成果論文が一つ受託された(Sukkasem S, et al. *Microbiology and Immunology* 2013

Jan;57(1):21-9. doi:

10.1111/1348-0421.12000.)。再治療の為に結核菌培養が得られた42人について検討したところ、40人は同一のRFLPパターンであったが、2人は異なるRFLPパターンがあり外因性再感染が疑われた。初回では多剤耐性が12.5%であったのが、2回目では22.5%と有意に高かった。これらの難治性結核で北京株は66.7%と全国平均の20.8%に比して高かった。

更に、結核菌培養1,333例と数を増やしRFLPより詳細な解析法にて菌体の解析を実施している。国際的に結核菌のlineages分類法として標準化されたThe large sequence polymorphism (LSP)とregions of deletions (RD)を活用したLSP/RD解析法による菌の分類では北京株(Beijing lineages)が595例(44.6%)、East-African-Indian (EAI) 株が531例(39.8%)、Euro-American株が187例(14.0%)、Central-Asian (CAS)株が11例(0.83%)、その他9株(0.68%)であった。非北京・非EAI株は、CAS種に対してRD750のタイピング、Euro-American種に対してpks15/1解析をして分類している。

Spoligotyping (polymorphisms of the direct repeat (DR) region) による1,123株の菌体分類では、北京株が548例(48.8%)、EAI株が406例(36.2%)、Euro-American株が157例(14.0%)、CAS株が11例(0.98%)、その他1株(0.09%)で、LSP/RD法と関連していた。

菌の分類と臨床情報との相関の検討では、前述のRFLPでの研究と同様に、年齢共に薬剤耐性が相関を示した。45歳で区別した場合、若年者での北京株は51.0%(353/692)と年配者での37.8%(242/641)とくらべオッズ比1.72(95%信頼区間 1.38-2.14, $p < 0.0001$)と有意に高かった。また、多剤耐性菌の主であるRFP耐性菌での北京株の割合は56.5%(35/62)とRFP感受性菌での割合の44.0%(519/1180)とくらべオッズ比1.65(95%信頼区間 0.99-2.76)と高かった。体重、結核病変の部位(肺外病変の有無等)、胸部レントゲン所見(空洞の有無、広がり)、喀痰塗抹検査での菌量は、菌の分類と相関はなかった。

日本では、複十字病院の結核登録を活用した検討を継続している。2007年1月1日より2011年12月末日までに登録された結核患者1,958名において、外国と関連がある結核患者は5.7%の111名で、そのうち多剤耐性結核患者は29名(26.1%)であった。これは、外国と関連のない結核患者1,847名での、多剤耐性結核患者67名(3.7%)と比べて、オッズ比5.89(95%信頼区間3.70-9.37)と有意に高かった。

HIV合併結核研究としては、タイにおけるHIV感染者コホートの研究での保存血清を活用した潜在性結核感染診断法の検討を目指したが、WHOより結核血清診断の限界が指摘された影響にて、倫理委員会よりHIV陰性結核患者にて十分な結果が得られるか、細胞性免疫を活用した診断法を考える様に示唆された。

表 3 0

〔Ⅲ〕アジア諸国の多剤耐性結核 分子疫学研究 と宿主要因解析 (結核研究ネットワークを活用した)

中国 (服部)

① 中国ハルビンの多剤耐性結核3年間調査。VNTR解析で4サブグループと10個のクラスター形成。北京型結核菌の特異的変異遺伝子で診断解析中。(服部 J. Clin. Micro. 2011)

② 中国東北部: 治療歴なしで薬剤耐性あり58.4%。多剤耐性結核で治療歴あり23.3%と高率。

③ 外国研究者招へい事業ハルビン医大Ling教授

フィリピン (服部)

潜在性結核のTBGL診断はQFTと相関し有用 (服部 Int.J.TLD:2012 Clin Dev Imm. 2012)

タイ (野内、櫻田)

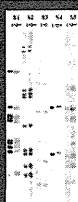
① 難治性結核の分子疫学解析(野内) (Microbio.Imm.2012)

(1) 再治療結核はRFLPパターンより外因性再感染。
(2) 初回多剤耐性12.5%が、再発で22.5%と高。
(3) 難治性結核で北京株は66.7%。

② HIV合併結核493名中活動性結核は15.6%。

黒龍江省の薬剤耐性結核 (全員HIV陰性)

2007~2011 結核菌特徴	症例数 (%)
薬剤耐性菌	58.4
SM	41.1
RFP	26.3
INH	43.7
EB	18.7
多剤耐性菌	23.3



タイ難治性結核RFLP

表 3 1

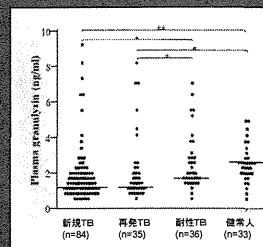
アジア諸国の多剤耐性結核 分子疫学研究と宿主要因解析

タイ (野内、櫻田)

③ 難治性結核250例を含む655例(マヒドン大)。北京株44%、EAI株40%、非北京・非EAI株16%。

④ タイNIHとの共同研究(櫻田)
活性化ビタミンDより活性化されるヒトM型マクロファージはHIV感染により、結核菌殺菌能低下。

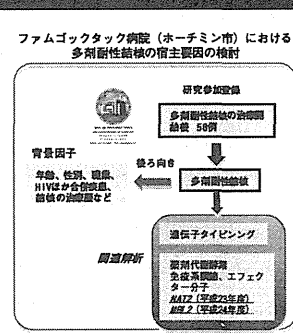
⑤ 再発結核患者では血清granulysin値低下。
(櫻田、野内、岡田、Surisin, Micro. Imm. 2011)



タイでの結核患者の血清中granulysin

ベトナム (慶長)

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



① ホーチミン市58名の多剤耐性結核患者解析で、INH代謝関連遺伝子NAT2は代謝遅延型が少い。

② 自然免疫関連遺伝子MBL2(マンノース結合レクチン)は変異型(欠損型)が、ベトナムの多剤耐性結核では高い。

3. HIV合併結核バイオマーカーとして
granulysin有望 (タイ 櫻田)

(1)ベトナム側施設に対する技術移転ならびに国立国際医療研究センターとベトナム保健省における倫理承認取得は終了していたため、平成24年度8月21～23日に対象者の登録と質問紙を用いた臨床疫学的要因との間の関連解析を実施した。最終的に採血を含めてデータを取得できた対象者数は102名であった。解析の結果、各臨床疫学的要因とグラニューライシン濃度との間に有意な関連は認められなかった

(Wilcoxon Rank-sumとKruskal-Wallisにて検定)。

また、年齢、性別、BCG接種、結核の既往歴、肺疾患既往歴、喫煙歴、飲酒歴、コーヒー・茶、睡眠時間との間の重回帰分析を実施したところ、性別：女性>男性 (P=0.006)、飲酒：無>有(P=0.04)との結果を得た。

(2)平成24年5月に国立国際医療研究センター倫理委員会から承認された後、同センター・エイズ治療開発センターの青木孝弘医師ならびに田村順子医師の協力で、HIV合併結核19例(昨年20例と報告したが1例は結核ではなかったことが判明し除外した)、HIV(クオンティフェロンテスト陰性)21例、健常ドナー19例の血漿(一部は血清)検体をすでに入手し、グラニューライシン濃度をELISA法により測定した。その結果、先行するタイ・チェンライ県における測定結果と同様に、HIV合併結核患者の血漿中グラニューライシン濃度は、患者および健常者の濃度と比較して、有意に上昇していた。

(3)本研究は、M-MΦにおける25(OH)D₃による活性化機構に対するHIV感染の影響を検討するため計画され、平成23年に洪水により中断されていたが、研究を再開した。タイ・チェンライ県でのパイロット研究で、GM-MΦでなくM-MΦにのみBCG感染後のビタミンD関連遺伝子の発現誘導が示唆されていたが、今回その結果を確認した。real time PCRの結果は、25(OH)D₃の存在によってM-MΦにおける関連遺伝子の発現ピークが早まる傾向が認められた。また、パイロット研究でも示唆されていたが、M-CSFによって刺激後0と3時間におけ

る発現が抑制されていることが確認された。現在、IFN-γ存在下の関連遺伝子発現パターンを解析しているところである。

4. ベトナム INH代謝NAT2遅延型は多剤耐性結核で少ない (慶長) (表31)

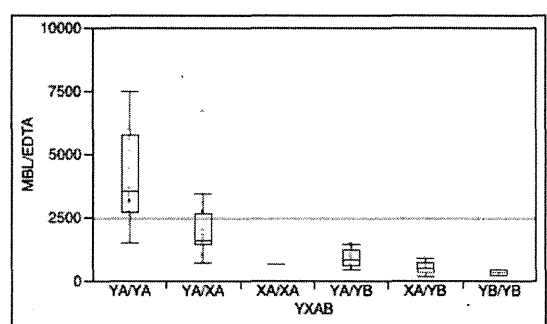
大規模なコホート研究は、本研究班の3年間の枠組みでは困難なため、断面研究に近い小規模な研究デザインとならざるを得なかった。本年度は特に菌の接着と深く関係するMBL2遺伝子についてその特徴的な遺伝子変異と遺伝子頻度、遺伝子発現、タンパク濃度に関する解析を試みた。

MBL2遺伝子は多型性に富み、遺伝子型により血中濃度が明確に規定されており、高発現型(YA/YA)、中発現型(YA/XA)、低発現型(それ以外)に分けられる。

MBLの高発現型と低発現型遺伝子型の比率をみると、MDRの例数が少ないので有意差は出ないが、高発現型(YA/YA)の遺伝子型頻度は、多剤耐性結核群では健常対照群に比べてやや低値を示した(データ省略)。

これまで遺伝子頻度と血中濃度の関連は主に健常者における検討がなされているが、MBLは急性期蛋白質であり、結核患者では健常者より血中MBL濃度が高いことが報告されている。今回の検討で治療中(治療開始3～6か月後)の患者群でも、MDR-TBの血漿中のMBL濃度はYA/YAで高値、YA/XAでは中程度、それ以外は低値を示すことが明らかになった(図14)。

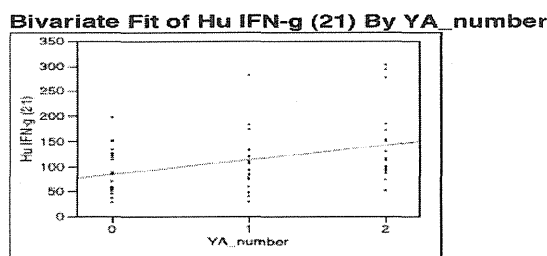
図14. MBL2遺伝子型と多剤耐性結核
治療中の血漿MBL濃度 (N=58)



次にMBLの濃度が血中サイトカイン量と関連するかどうか蛍光ビーズアレイを用いてスクリーニングしたところ、インターフェロン γ (IFNG) 濃度が最も確かな正の相関を示した (Spearmanの相関係数=0.34, P=0.0099)。

MBL血中濃度とIFNG濃度の相関がみられたので、さらにMBLのYAアレル (野生型) の保有数との関係を調べたところ、YAの本数はIFNG濃度と有意に相関していた (P=0.006; 図15)。

図15. インターフェロン- γ 濃度と、YA alleleの本数の関係



Linear Fit

Linear Fit
Hu IFN-g (21) = 83.402094 + 29.032655*YA_number

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	83.402094	12.7769	6.53	<.0001*
YA number	29.032655	10.25085	2.83	0.0065*

結核菌の耐性なしは13例、何らかの耐性がある症例は2例 (いずれもSM耐性)、記載無し4例であった。今回の調査ではMDR-TB例はなかった。

結核の治療は、HREZ 10例、HEZ-RBT 5例、HE-RBT 4例であった。

結核薬による副反応について、回答のあった17例中、副反応ありは9例 (52.9%) と高頻度であった。おもな副反応は肝機能障害 (3例)、発熱 (3例)、薬疹 (2例)、血球減少 (3例)、アナフィラキシーショック1例であった。対処法の記載があった症例は、減感作療法例3例、薬剤の変更例3例であった。抗HIV薬による副反応について回答があった18例中、副反応ありは4例 (22.2%) であり、結核薬による副反応よりも少なかった。

結核の治療中に抗HIV療法 (ART) を開始した症例は11例あり、結核の治療開始後同時~40週後に開始しており、2週以内に始めた症例は3例あった。ARTの内容が分かっている11例の治療内容では、key drugとしてraltegravir (5例)、efavirenz (3例)、darunavir (3例) が用いられていた。以前に比べraltegravirが多かった。免疫再構築症候群は3例に認められ、ステロイドの投与により対応されていた。結核の転帰が判明している例では、治癒11例、治療中5例、死亡1例 (ニューモシスチス肺炎による死亡) であった。

IV. HIV合併

1. (永井) 2011年は、144施設中85施設 (59%) から回答があった。総結核患者数は4091例であり、そのうちHIV合併者は19例 (0.46%) であった (表3 2)。

全例男性であり、日本人18例、ブラジル人1例であった。平均年齢は50.8歳 (34~82歳) であった。肺結核10例、粟粒結核7例、リンパ節結核1例、結核性胸膜炎1例であった。

結核発病を契機にHIV陽性と判明した症例は14例 (74%) に及んだ。CD4数の記載のあった17例ではCD4数の平均値は140/ μ lであり、CD4数別の患者数の分布を見ると、CD4数200/ μ l未満の症例が11例 (64.7%)、100/ μ l未満の症例が8例 (47.1%) と免疫機能低下例が多かった。

2. 全国のHIV合併の結核患者と多剤耐性結核の症例数調査。全国保健所、結核病院、HIV診療拠点病院に一次アンケート調査。現在集計解析中。(藤田) (表3 3)

(1) 症例数調査の結果

保健所よび医療機関に対して症例数を尋ねるアンケートを送付した結果、結核病床を有する (有した) 246医療機関の132施設 (53.7%)、HIV拠点病院 (結核病床を有さない) 232医療機関の132施設 (56.9%)、514保健所の420施設 (81.7%) から返答を得た。今回の回収率自体は昨年度と比較してそれぞれ11.4、1.7、7.1ポイント上昇した。なお、ここで母数の施設数は、休止・統合などの理由による対象外などを調整した数であり、調査票発送数とは一致しない。また、返答数には症例のない施設も含まれる。

国立病院機構の病院を除く医療機関から報告されたHIV合併結核の症例数は、2010年が30例、2011年が33例で、本調査における2年間のHIV合併結核症例は計63例、2007年からの5年間で192例となった。ただし、HIV合併結核症例数に関して経年的な増加傾向は認められなかった。

一方、保健所を対象とした調査からは、結核登録情報システムによるHIV合併例患者数統計の方が上回っており、回収率を勘案しても2011年については本調査の方が症例を拾い切れていないと思われる結果となった。今回は、多剤耐性結核の報告はなかった。

今回は、新登録結核患者のうちのHIV陽性者の比率を保健所調査から試算した、各年で0.2%程度となったが、2011年については結核登録情報システムに基づくHIV合併結核の比率は0.3%であった。一方、2010年以降も結核病床を有さないHIV拠点病院において少なからずHIV合併結核患者を診療している状況は続いていた。

(2) 抗結核薬に対する耐性の状況

症例を有する施設に対する匿名化症例調査票を用いた二次調査によれば、多剤耐性結核は報告されなかったが、多剤耐性の定義に合致しないがINH, EB, SMに対して耐性だった1例（ネパール人）が存在した。また、LVFXのみ耐性が1例（日本人）あった。

(3) HIV合併結核の患者を受け入れた施設における病室環境

2010年と2011年にHIV感染症合併結核患者（喀痰塗抹陽性およびその恐れ）を受け入れた病室についてのアンケート調査の結果、結核医療機関10施設において、結核病棟内の病室が6施設、結核病棟内のHIV専用室が1施設、その他3施設であった。前室ありが3施設、なしが5施設、未記入2施設であった。陰圧換気ありが6施設、陰陽圧を調整可能が2施設、未記入2室で、患者入室時に毎日陰圧を確認した施設は設備を有する8施設中7であった。

一方、HIV拠点病院17施設に対する同様の調査では、一般病棟内の個室3施設、一般病棟内の専用室（陰圧室を含む）5施設、感染症病棟内の病室4施設、感染症病棟内の専用室2施設、

その他3施設であった。前室ありが9施設、なしが5施設、未記入3施設であった。陰圧換気ありが9施設、陰陽圧を調整可能が2施設、未記入が6施設で、患者入室時に毎日陰圧を確認した施設は設備を有する11施設中8であった。

なお、アンケートでは2009年以前に症例を有した施設からも回答を得たが、集計の都合上、2010年と2011年にHIV感染症合併結核患者を受け入れた施設のみの成績とした。

3. HIV感染結核における次世代IGRAのQFTゴールドアッセイに関する研究：（表34）

登録患者数は149例で、男性が140例(94%)、年齢の中央値は38歳(18-63)、国籍は日本131例(87.9%)、男性同性愛者126例(84.6%)、CD4の中央値は240(4-819)であった。同期間の当院の新規HIV患者は220例で、その患者背景と有意差はなかった。149例中に活動性結核4例(2.7%)、潜在性結核4例(2.7%)を認めた。

QFT-3Gの判定結果は、陽性例7例(4.7%)、判定保留11例(7.4%)で、日本国籍131例に限ると、陽性例は5例(3.8%)、判定保留8例(6.1%)であった。判定不可は、8例(5.4%)で、全例QFT-3G施行時のCD4値が50/ μ L以下であった。QFT-3Gの判定別の患者背景を見ると、判定不可群で有意にCD4値が低い以外には、年齢、性別、国籍、および感染経路に群間差はなかった。QFT-3G陽性例7例中、活動性結核が3例、潜在性結核が4例であった。活動性結核例は、全例標準的結核治療に反応し奏功したが、QFT値は必ずしも低下を認めなかった。潜在性結核例は、全例イスコチン300mg/日にて9ヶ月治療を行ったが、QFT値は必ずしも低下を認めなかった。

判定保留例11例では、1例は活動性結核(QFT値0.30)、1例は判定保留持続、7例は以後2回連続陰性、1例は2・5回目が陽性で3・4回目は陰性となった。2例は追跡不能であった。

判定不可例8例では、抗HIV療法を開始後、全例でQFT判定可能となった。CD4 1桁(CD4値4/ μ L)でも判定可能な症例を認めた。また、1例は判定可能となった後にQFT陽性となった。陰性例は123例で、初診時の胸部単純写真上で、明らかな結核患者は認めなかった。QFT施行

後1年間経過観察を施行し、明らかな結核発症例は認めなかった。陰性例の1例でQFT陽転化を生じた。この症例では、吃逆の精査時にQFT陽性と判明した(初診時QFT値-0.13→8か月後5.1)。気管支肺胞洗浄液などにて精査するが、

確定診断は得られなかった。抗酸菌症については、各種検体で塗抹・培養・PCRともに全て陰性であった。抗酸菌症の治療は導入しなかったが、症状、画像、QFT値とも改善傾向となった。

表 3 2

〔Ⅳ〕 HIV合併結核			
国立病院機構呼吸器ネットワーク (永井)			
国立病院機構病院における HIV感染症合併結核患者の推移			
年	結核患者数	HIV感染症合併数	多剤耐性結核患者数
2007	4388	15 (0.34%)	1
2008	4165	19 (0.46%)	2
2009	4129	18 (0.44%)	0
2010	4122	16 (0.39%)	0
合計	16804	68 (0.40%)	3

外国人HIV合併結核の薬剤耐性結核 15%

(1) 国立病院機構病院
 ● (2007年～2010年)4年間 結核16804名中 HIV合併結核0.4%。
 ● HIV合併結核多剤耐性結核そのうち4.4%。
 死亡例や粟粒結核等治療に難渋。CD4陽性T細胞100以下。

表 3 3

〔Ⅳ〕 HIV合併結核						
全国病院施設・HIV拠点病院・保健所との連携 (藤田)						
HIV合併結核の集計結果						
	2007年		2008年		2009年	
	結核患者数	HIV合併数	結核患者数	HIV合併数	結核患者数	HIV合併数
①国立病院機構	4388	15	4165	19	4129	18
②国立病院機構以外	4424	7	4280	14	4091	9
③HIV拠点病院		29		34		34
①+②+③		51		67		61
保健所	20827	47	20364	62	19873	35

(2) 全国病院施設、HIV拠点病院
 症例調査票を用いた二次調査:
 外国人HIV合併結核 薬剤耐性13.8%
 日本人HIV合併結核 薬剤耐性8.1%
 RFP耐性2例は出身国 東南アジア

表34

HIV合併結核

国立国際医療研究センター

(1996～2010年) 129例 (青木)
 外国籍、薬剤耐性多

HIV合併結核	%
外国籍	24 ↑
薬剤耐性結核	12 ↑
多剤耐性結核	2 ↑

HIV合併結核患者のQFT-3G
 早期診断法(特異度は高い)

HIV 149例(2011～2012)
 QFT3G 陽性 7例(4.7%)
 陽性全例結核(100%)
 { 4例 活動性結核
 3例 潜在性結核

QFT3G HIV患者の潜在性結核早期発見に有効

V. 新しい迅速診断の開発・新ワクチン・化学療法剤の開発

1. **rpoB**の変異を用いて、多剤耐性結核患者の迅速隔離方法を構築。6施設に普及。(鈴木、岡田) 331例のうち、培養陰性であった8例を除く323例で比較検討を行った。ジェノスカラーRif-TBでRFP感受性と判定されたのは308例であり、307例は通常の薬剤感受性検査でもRFP感受性であったが、1例はMGIT法では感受性であったが小川比率法では耐性であった。この例は臨床的には排菌陽性が遷延しておりRFP耐性と考えられた。また、ジェノスカラーRif-TBでRFP耐性と判定された15例中、14例はMGIT法・小川比率法いずれもRFP耐性であったが、1例はMGIT法で感受性であった。RFP耐性の14例中11例(78.6%)はINHにも耐性を示す多剤耐性菌であった。
2. 結核に対する初めての治療ワクチンを開発(サルで)(岡田)。この結核治療効果とワクチン投与サルのIL-2産生量は相関した。INHと結核治療相乗効果。皮内投与最適(図16、17)。新薬カプラザマイシン(図18)とも相乗効果。
3. BCGよりも1万倍強力な結核予防ワクチン。カニクイザルで100%生存率。HVJ-Eの治験用前臨床試験データを取得ほぼ完了(毒性・安全性・安定性試験)。
4. Granulysinは結核治療効果(岡田)。SLPIと相乗効果(竹田)。
5. 外国人結核・輸入感染症結核に対する治療剤(ワクチン)の必要性及び多剤耐性結核に対する治療剤(ワクチン)の必要性。
(1)新しい結核治療剤に対しては必ず耐性結核菌が出現する。(2)一方、結核治療ワクチンに対しては耐性結核菌は出現しない。(3)したがって、多剤耐性結核菌やXDR-TBに対する治療ワクチンの開発が必要である。(4)外国人結核・輸入感染症結核はMDR-TBが多い。(5)我々が世界に先駆けて開発した結核治療ワクチンHVJ-エンベロップ/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンは外国人結核治療に有効と考えられる。(6)さらに、我々はこれらのスーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌にこのワクチンが治療効果を発揮することを明らかにした。
6. 東アジア地域で蔓延しつつある多剤耐性結核

に対して有効な新規ワクチンの開発を目的として、次世代のワクチン技術として注目されているDNAワクチンの開発を行った。DNAワクチンの開発を成功させるためには、より少ない用量で有効性を高める必要があるため、ワクチン効果を高める新規アジュバントとして注目されているHVJ-Eを用いた免疫増強や安全性評価を行った。その結果、HVJ-Eは、自然免疫や細胞性免疫の活性化に参与するRIG-Iを介した新規メカニズム有する事、結核感染に対する防御に重要な細胞性免疫側に免疫反応をシフトできる事などが明らかとなった。

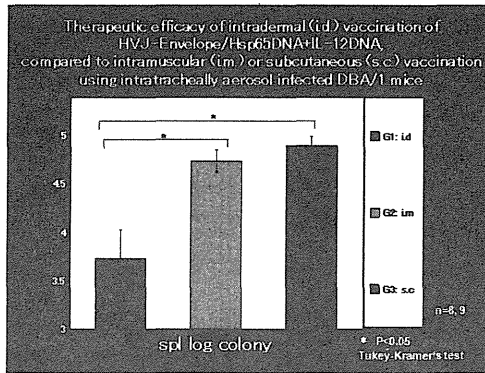
7. 新結核治療ワクチン・化学療法剤：①ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用い、HVJ-エンベロップ/HSP65+IL-12DNAワクチンの結核治療効果を世界で初めて報告
(Clin.Devel.Imm.2011, Human Vaccine 2011)。XDR-TBに治療効果。INHと相乗的結核治療効果。皮内投与が最適を明らかにした。すなわち、マウスの系でHSP65DNAワクチンを皮内投与(i.d)、皮下投与(s.c)及び筋肉内投与して治療効果を検討した。その結果、皮内投与治療が最も脾臓内結核菌数を減少させた。すなわち皮内投与治療が最も強力な治療ワクチン効果を発揮した(図16)。したがって、さらにヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いて皮内投与と筋肉内投与の治療効果と比較して解析中である。10倍ほど治療効果を増強。②GMP製造で臨床応用可能。HVJ-Eの治験開始に必要な試験データ取得完了。③新化学療法剤カプラザマイシンはXDR-TB治療効果(マウス)。上記ワクチン治療剤と相乗的治療効果。③新化学療法剤デラマニド(図18)と上記ワクチン治療剤の相乗効果解析を計画した。すでに、(1)2005年岡田全司はデラマニドがMDR-TBに対して強力な治療効果を発揮(マウスの系)することをICAAC(Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy)で発表。(2)デラマニドはXDR-TBに対しても強力な治療効果を発揮(マウスの系)ことを発表。(3)ヒトの免疫応答解析モデルを我々は世界に先駆けて開発(Cancer Research 1997年 Okada et al)した。さらに、この系を用いて

デラマニドの結核治療効果を明らかにした。

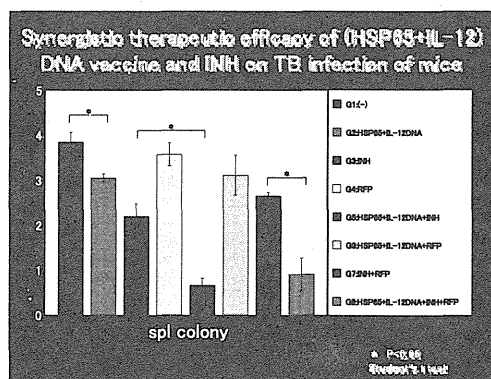
8. 結核菌殺傷蛋白Granulysin(Gra)はキラーT分化因子活性も有することを発見。15kDa Gra (特許取得)ワクチンは結核治療効果 (Human Vaccines 2011)。Graと上記DNAワクチンで結核治療相乗効果。killer secretory protein37 (KSP37) ワクチンの抗結核作用を初めて示した。
9. 多剤耐性結核患者の迅速発見法(rpo B変異)を用い、多剤耐性結核患者迅速入院法及び病院内で多剤耐性結核が感染しない体制を構築した(鈴木、露口、岡田)。現在この方法を2施設に普及した。これの普及をさらに進める。
10. granulysin DNAを用いて、HVJ-エンベロープ/granulysin DNAワクチンを作製した。このワクチンの結核治療効果をカニクイザルを用いて解析した。ヒト結核菌Erdman株 5×10^2 を気道内注入して感染させ、4週間後より、上記ワクチン $400 \mu\text{g}$ をi.m (合計6回、2週間毎) 投与して結核治療効果を解析した。コントロール群は全例死亡 (生存率0%) であった。さらに、360日後においてGra DNAワクチンは360日後には4頭中1頭 (25%) の生存率を示した。すなわち、Gra DNAワクチンの追

加は長期生存 (長期治療効果) に有効であることが強く示唆された、初めての発見である。

11. これらの上記の新しい迅速診断法及び治療ワクチンの普及を国立病院機構呼吸器ネットワーク65施設を用いて行う予定である。幸い当院はこの65施設呼吸器ネットワークグループリーダーを岡田が担当している。(図19)
- VI. 外国人結核の多い中国・韓国・フィリピン・タイ・ベトナムの結核対策や治療システムの情報収集 (図20)
- 中国Heping博士、韓国Cho博士、タイSrisin博士等と確立した結核ネットワークで開始。中国のMDR-TBの頻度 (特に上海) 等や対策の情報をすでにHeping博士より入手した。(図20)

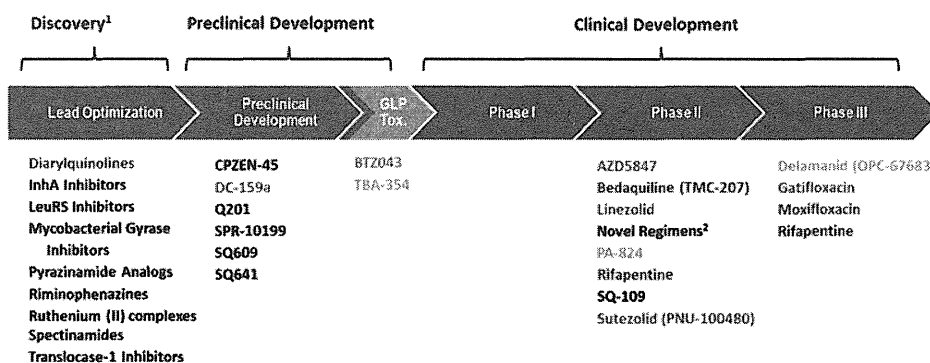


16



17

Global TB Drug Pipeline



Chemical classes: fluoroquinolone, rifamycin, oxazolidinone, nitroimidazole, diarylquinoline, benzothiazinone

¹ Ongoing projects without a lead compound series can be viewed at <http://www.newtbdugs.org/pipeline-discovery.php>.

² Combination regimens: first clinical trial (NC001) of a novel TB drug regimen testing the three drug combination of PA-824, moxifloxacin, and pyrazinamide was initiated November 2010 and completed in 2011 with promising results. The second clinical trial (NC002) of this regimen was launched in March 2012 and will test the efficacy of the regimen in drug-sensitive and multidrug-resistant patients. The third clinical trial (NC003) will evaluate PA-824, TMC-207, pyrazinamide and clofazimine in combinations and is scheduled to begin September 2012.

 **WORKING GROUP**
ON NEW TB DRUGS
www.newtbdugs.org

Updated: November 13, 2012

18

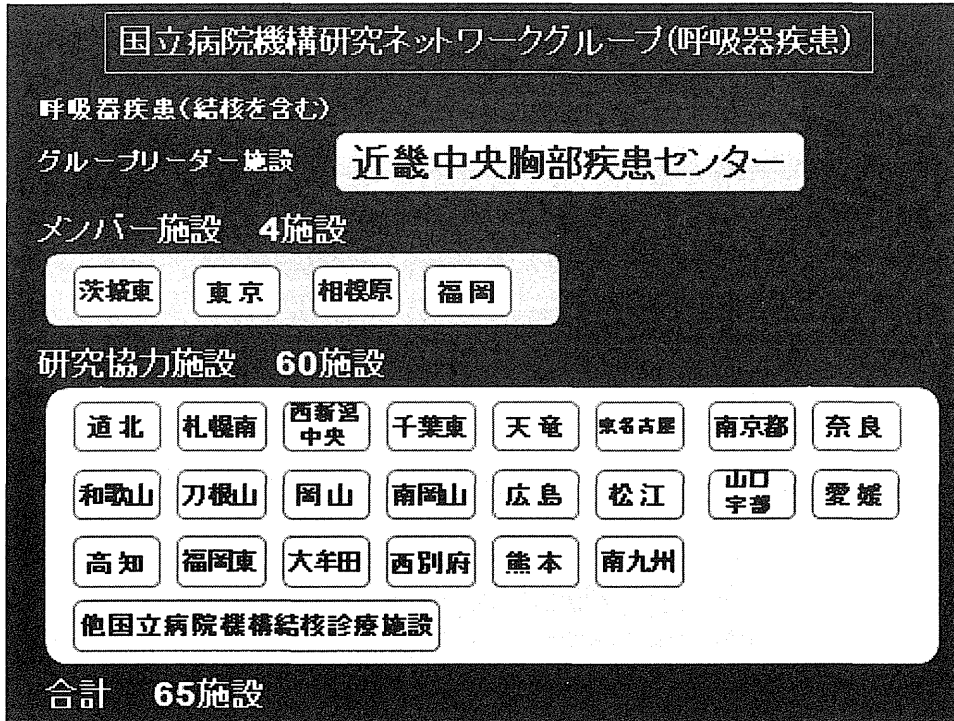


図19

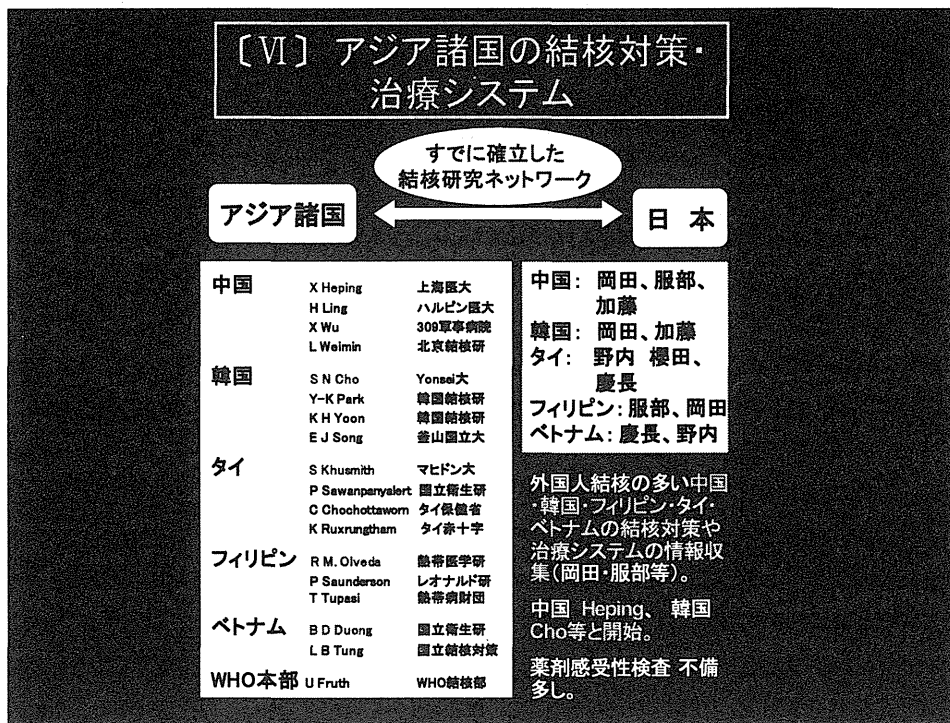


図20

表 3 5

行政施策への貢献

1. 外国人由来の特定結核菌株の蔓延対策により厚生行政に貢献。
2. 東アジア諸国、結核菌が由来した国の同定を可能とした。各国結核菌のデータベース構築。
3. 外国人結核手引書作成。
4. 日本語学校健診普及。
5. HIV合併結核の早期発見。
6. 多剤耐性結核迅速診断隔離法

今後考えられる新たな課題

1. 外国人結核に対する手引書作成。
2. 外国人結核が多いアジアの国(中国、フィリピン、韓国、タイ、ベトナム)の結核対策や情報収集と治療連携システム構築。
3. 外国人結核由来株分子疫学(全ゲノム解読)解析。
4. SNPでアジア各国の結核菌解析。
5. HIV合併結核診療ガイドライン

D. 考察

行政施策への貢献 (表35)

1. 外国人由来の特定結核菌株の蔓延対策により厚生行政に貢献。
2. 東アジア諸国、結核菌が由来した国の同定を可能とした。各国結核菌のデータベース構築。
3. 外国人結核手引書作成。
4. 日本語学校健診普及。
5. HIV合併結核の早期発見。
6. 多剤耐性結核迅速診断隔離法

今後考えられる新たな課題 (表35)

1. 外国人結核に対する手引書作成。
2. 外国人結核が多いアジアの国 (中国、フィリピン、韓国、タイ、ベトナム) の結核対策や情報収集と治療連携システム構築。
3. 外国人結核由来株分子疫学 (全ゲノム解読) 解析。
4. SNPでアジア各国の結核菌解析。
5. HIV合併結核診療ガイドライン

(1) 外国人結核の問題点

外国人結核の問題点として「外国人結核：医療上困難であった問題点と対応」に記載された問題点をまとめた。この指摘の問題点は当班が初めて詳細に調査したものとする。

まとめると、5つの大きな問題点がある。

- (1) 言葉の問題
- (2) 転帰としての治療途中の帰国 (不法滞在等)
- (3) 食事の問題 (宗教上)
- (4) 生活習慣の違い
- (5) 経済的な問題

である。

- (1) の言葉の問題として、通訳対策の重要性が明らかとなった。翻訳パンフレットは英語と中国語は多く (24%~35%) 認められた。一方、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0.4%~7.1%と非常に少なく大きな問題点であった。今後これらの韓国語、ポルトガル語、タガログ語の翻訳パンフレット作成が重要であるとする。
- (2) 転帰としての治療途中の帰国は12%も存在し、大きな問題点である。さらに連絡 (国外の

みでなく国内においても) が非常に困難であることが調査の結果、明白となった。

(3) 食事の問題について：宗教上の理由により豚肉等の摂取困難が多く報告された。

(4) 生活習慣の違いで、うつ状態になる報告も多く認められた。このうつ状態等による服薬が順調にいかないことも示された。

(5) 経済的な問題も深刻である。結核と判ると退職させられるかもしれないとの思いを多くの外国人結核患者が抱いているようである。

一方、これらの障壁に対し、通訳などの積極的なサポートがなされている。職場、学校などでの通訳が45.7%にものほり、又友人・知人の通訳サポートが19.2%認められた。これらの対応をさらに進展させるとともに、外国人結核に対する新しい治療剤の開発 (デラマニド等) の可能性が示された。(岡田)

(2) 外国人由来の特定結核菌株が蔓延。輸入感染症蔓延対策により厚生行政に貢献。

国立国際医療研究センターで経験した外国人結核患者由来株87株のRFLP解析によると、そのうち29%は相同性70%以上のクラスターI (グループI) を、5%はクラスターII (グループII) を形成していた。「グループI」ではそれ以外と比べて、中国、韓国など東アジア出身者が多く、薬剤耐性率やHIV合併率が高い傾向であった。さらに、「グループI」では新興型の北京型株が多く、日本人とのクラスター形成率が高い傾向にあった。以上のことから、中国、韓国など東アジアから新興型の北京型株が日本国内に入りこみ、日本人とクラスターを形成している可能性が示唆された。とくにグループIでは薬剤耐性率やHIV陽性率が高い傾向にあり、その日本国内での拡がりは公衆衛生の上で脅威となりうる。今後は、外国人結核患者の対象患者数を増やし、臨床情報と菌の解析から、外国人の結核が日本国内で感染したのか、あるいは蔓延国から国内に持ち込んだのか、後者の場合は日本人への感染はあるのか、という課題に取り組んでいく予定である。(小林、切替)

(3) 東アジア諸国の結核菌の遺伝的背景が異なり、結核菌が由来した国の同定を可能とした。各国結核菌のSNP解析系統情報とVNTR解析を統合したデータベース構築による行政施策への貢献：

先進国の状況を見ても、国際交流と諸外国の結核状況のギャップの流れのなかで、外国人結核は日本の結核において無視できないものとなっている。若年者結核の多くが外来患者であるように、入院を要する外国人結核患者はむしろ少数である。一方で日本の結核患者の半数以上が高齢者で殆どが日本人であるが、外国人高齢者の結核も散見されるようになった。今回の対象では、中国残留孤児で帰国した人や子育て支援に観光ビザで入国した人が含まれている。学校検診や会社検診を除く、一般外国人の健診制度はなく、欧米諸先進低蔓延国においても有効なシステムは見当たらない。日本人と結婚している女性の結核が目立っている。外国人に限らず20～40才台の主婦層は結核の発見が遅れやすいグループと思われる。受診しやすい環境が望まれる。

病型や排菌状況については他の日本人の結核と殆ど差はなかった。HIVは30代、40代の女性2例で今回判明した(4.0%)。これは日本全国の0.9%と比較すると高値である。

糖尿病の合併は5例(10%)で全国の19.0%と比較して低い。当院の2010年～2011年の新規活動性結核入院患者数821例中、HIV5例(0.6%)、糖尿病150例(18.2%)となっており、一つには年齢層の偏り、HIVでは出身国の状況を反映しているものと思われる。耐性菌については、821例中いずれか主要薬剤耐性68例(INH19例、SM25例、EB3例、RFP1例、SH12例、HE3例、SE2例、SHE3例)および多剤耐性3例であった。何らかの主要耐性率8.4%vs16%、多剤耐性率

0.4%vs4.0%で外国人結核では高いと思われる。多剤耐性やH耐性を除き殆どの症例は標準治療を実施し、帰国や転出が半数を占めるが、当院で治療中のもの22例中1例が脱落となっている。言葉の問題は若年者では滞在期間が短いこと、高齢者では外国語になかなかできない状況と思わすが、家族や友人、雇用者、日本語学校の職員、東京都から派遣される通訳の協力を得て、退院後も保健所との連携で安心して治療を継続できるよう支援することが重要である。

当院における外国人結核患者は種々の状況で発病、診断され、治療されることは日本人の場合と大差ないが、言葉の問題や服薬支援ではより

力を注ぐ必要がある。結核で入院治療する外国人は、診断・治療・服薬管理に日本人と大きな差はない。HIVや耐性は日本人よりも高率と思われるが、対象が少ないため比較は困難である。将来的なことを考慮して、若年層の外国人結核を対象とした、焦点を絞った検討と対策が必要と思われる。(豊田)

(6) (1) 大阪市における外国出生結核患者の発生動向

全結核患者に占める外国出生結核患者の割合は年々増加しており、特に20代で外国人の占める割合が高かった。職業では学生、特に日本語学校在籍している者が増加してきており、外国人が入国後早期に在籍することが多いと思われる日本語学校への健診を強化することが重要である。

(2) 日本語学校に在籍する外国出生者に対する結核健診

日本語学校に在籍する外国出生者に健診を行ったところ、10名(0.5%)の結核患者を発見し、うち2名は塗抹陽性であった。これらの対象に対して継続して健診を実施していくことが肝要である。

(3) 外国出生結核患者由来菌株のVNTR解析
日本出生と外国出生でクラスターを形成していたのは4グループあったが、Hypervariableを含む追加領域をみると1組を除きすべて異なっており、疫学的なつながりは認められなかった。
(下内、小向)

(7) SNP分析で各国、地域で分離された約200株の結核菌解析を行う。各国を代表できる結核菌株を選択。さらに細区分できるVNTRシステムを構築。簡易ラインプロブ・アッセイ系構築。

(8) 中国との結核ネットワーク研究を活用した多剤耐性結核の分子疫学低解析：

不完全な治療は薬剤耐性結核菌をもたらす。2004年の時点で、黒竜江省における薬剤耐性結核は、治療歴なしで36.2%、治療歴あり67.7%を占めていた(Xie, et al. J. Chinese Antituberculosis Assoc., 30. 305-8. 2008.)。これは中国全体の平均、新規34.2%、治療歴あり54.5%と比較して高い(He, et al., BMC Infect. Dis., 8. 166. 2008)。

ところが、今回の調査では、MDRではないが何

らかの薬剤耐性を示した患者のうち65%が、結核の治療歴がなかった。前述のとおり中国および2004年時点の黒竜江省では、薬剤耐性結核菌に感染した患者においては、治療歴ありが多数を占めていた。今回の結果はそれらとは異なる。このことは、同地域に薬剤耐性結核菌が流布してきてそれが結核の治療歴のない者に感染したと解釈することも可能であり、さらに慎重に検討する必要がある。

多剤耐性結核菌への感染で60%が結核治療歴のある患者であった。このことは、同地域の結核治療が不完全であることを示唆している。

仮に、黒竜江省において初感染で薬剤耐性結核菌に感染する例が増加しているとすると、今後、MDR結核菌が市中に流布し治療歴のない者に感染することも懸念される。さらに、黒竜江省の結核菌の解析を続ける。特に多種類の薬剤を用いて、耐性の広がりを確認したい。さらに遺伝子型の解析では北京型の中でもハルピン型ともいべき特異的な変異のある群が存在している可能性があり、その特性化に努める。黒竜江省の結核菌に関しては、カナマイシン、アミカシン、カプレオマイシンなどの薬剤に対する抵抗性を検索し、XDR-TBあるいはTDR-TBの可能性を検索する。

黒竜江省に流布する北京型の結核菌の薬剤耐性の詳細、遺伝子型の特徴を明らかにする研究は、我々のみが行っている。本研究成果をもとに同地域での薬剤耐性結核菌の広がりを注視し国内への輸入例の生じないような適切な対策が求められる。

- (9) タイでの結核・HIV対策ネットワーク共同研究：複十字病院での多剤耐性結核患者で外国との関連が強くあり、日本の輸入感染症としての結核対策と関連し、諸外国で認められる多剤耐性結核を含む難治性結核の菌が日本へ伝播していると考えられる。タイ国を含めて菌体の分子疫学解析により理由を検討すべきである。菌体と宿主要因のそれぞれと相互作用の研究を症例数が大きく必要であり、日本での研究基盤が輸入感染症の検討という観点でも必要である。臨床疫学因子、細菌学的因子、免疫遺伝学的因子を測定し、それらの因子の難治化に及ぼす影響を相互作用も含めて定量化する。

タイでの大規模でより詳細な菌解析はデータがでた直後であるが、本年度に論文報告した古典的なRFLP解析による少数の解析による北京型菌株がより難治性に関与するという仮説を検証する結果が得られている。多剤耐性に対しての検討や、多変量解析を使用しての検討など詳細な検討を進め、論文化を始めている。

日本の複十字病院での検討は、2012年末までのデータを入れて他の交絡因子を補正した疫学解析を論文化する。2012年度は3人のフィリピン人等の外国籍人の他にインドネシアに長期在住していた66歳日本人男性を経験しており、海外渡航歴の聴取が重要と考えられる。

複十字病院では10年以上の菌体を保持しており、また文部科学省オーダーメイド医療プロジェクトに協力してヒト検体も収集してきた。今回、倫理委員会の承認を得て、検査残余検体を活用した菌と人の検体バンクによる結核研究を継続している。菌体の分子疫学解析に先立つ疫学因子解析の結果を報告する。タイ国も同様に菌と人検体を臨床データと共に長期に保存しており、並行した菌体バンクを活用して伝播の検討や比較検討などの相乗効果が期待される。

HIV合併結核に関して、WHOのTB/HIV専門委員会がHIV感染者の潜在性結核感染治療に関して再度の国際レビューを実施し、Efficacyに関して、HAART時代においてもINH等の抗結核薬が結核の予防に効果がある事を、結核研究所・山田国際部長のチェンライの解析データも含む確認後、HIV感染者に対し推奨している。複十字病院では、結核症の診断の一部で積極的な結核診断法の活用をしており、精度管理について研究をしている。結核研究所・原田研究主幹、大阪市大・松本壮吉准教授、東北大学・服部教授のTBGL抗体や他の経験も指導をいただき、細胞性免疫を活用した診断法の検討を進めたい。

- (10) 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、初めてアプローチを実施している。

MBL遺伝子多型は多剤耐性結核自体とは強い関連は示さなかったが、MBL 遺伝子多型は非炎症状態のみならず、結核治療中のような炎症状態でも血中濃度に強い影響を与えていた。同

時に測定された患者のCRP値などの炎症指標には大きなばらつきがあったが、MBL血中濃度はむしろ宿主側要因により明確に規定されていることが明らかになった。またMBLはインターフェロン γ 血中濃度と正の相関を示し、IL12 α 鎖(p35)遺伝子発現と負の相関を示した。今後、より大規模な研究でこれらの結果を確認する必要がある。

自然免疫系の分子として知られるMBL遺伝子多型が疾患におけるTh1応答に関連することは、MBLが従来言われている菌のオプソニン化のみならず、宿主のTh1応答とも緊密に関連していることを示唆するものである。

また別のTh1系遺伝子であるIL12 α 鎖(p35)のmRNA発現がMBLの高濃度と逆相関するということは、すでに病変局所に動員されているのか、何らかのnegative feedbackメカニズムによって抑制されている、などが考えられた。

ベトナム人多剤耐性結核について、迅速に研究を実施することができたことは共同研究の長い歴史に基づく信頼関係によるものである。多剤耐性菌は、ベトナムにおいても最近、深刻な問題としてとらえられており、さらに両国に裨益する研究成果が期待される。

- (11) ①潜在結核の病態生理と結核の発症に関する要因分析は、結核対策を考える上で非常に重要であると考えられる。グラニューライシンは自然免疫から適応免疫まで広くエフェクター分子として、抗結核免疫に関与していると考えられている。HIV陰性結核において、血漿グラニューライシン濃度が健常者より有意に低下していることは知られているが、抗結核標準療法で治療した場合血漿グラニューライシン濃度は上昇する。結核菌感染と潜在結核の成立とその後の活動性結核の発症とのグラニューライシンレベルの関連性は、横断的研究では明らかにすることはできず、IFN- γ release assayと組み合わせた前向きコホート研究を実施することで、明らかにすることができると思われる。

②タイにおける先行研究のサンプルサイズが6例と少なく、さらに対象者が100%タイ族であったことのエスニシティの偏りから、日本人検体における確認を行う必要性があった。日本人HIV合併結核においても血漿中グラニューライシ

ン濃度は有意に上昇しており、HIV感染を背景にした免疫不全状態における結核の急激な発症と進行から考えて、短期間にグラニューライシンが高発現ないしはグラニューライシン陽性細胞が大量に動員される可能性が示唆された。今後、病理組織やHIV合併結核患者の末梢血の解析を通してさらなる研究が必要と考えられる。

- (12) 今回の調査では、2011年の総結核患者数は4091例であり、そのうちHIV合併者は0.46%であり、この頻度は例年と変わりがなかった。HIV合併MDR-TBの増加は認められなかった。結核の治療ではRBTの使用例の増加、HIVの治療ではraltegravirの使用例の増加が認められ、両者の治療方法の変化が見られた。

今後、症例の集積を続け、多剤耐性結核の増加が見られるのか注視する。(永井)

- (13) 結核登録情報システムによるHIV合併例の把握については、2009年以前では本研究班による全国調査の方が実態に近いと思われたが、2010年以降では結核登録情報システムによるHIV合併例数は128例と今回の調査による集計数よりも上回っており、アンケートの回収率を勘案しても結核登録情報システムの精度が向上し、より実態が反映されたものと思われた。最近の保健所と医療機関の連携強化、また医療機関に対する保健師の情報収集力向上によるものと考えられる。従って、今後は結核登録情報システムを活用あるいは発展させた疫学調査に基づいて、多剤耐性結核とHIV合併の実態把握が可能になると言えるだろう。

また、2010年以降も、日本ではHIV感染者の間に多剤耐性結核がまん延している状況はないと考えられた。しかし、外国人の例でINHとEBに耐性が1件あり、前回の調査と比較して症例は少ないものの今後も外国人患者の薬剤耐性に関しては注意が必要である。

今回の調査では、HIV合併結核の患者を受け入れた施設における病室環境を尋ねた。結核病棟を有さないHIV拠点病院においても喀痰塗抹陽性の恐れがある患者に対して、個室や専用室を利用して対応している実態が判明した。結核医療機関とHIV拠点病院のうち陰圧室を持つ施設の79%では陰圧を毎日確認しており、一部の施設では陰陽圧の調整が可能であった。医療機関