

内で多剤耐性結核の感染予防対策としては、個室や専用室の利用、前室の設置、陰陽圧の調整が有効であると考えられる。(藤田)

- (14) 国立国際医療研究センター病院における新規HIV感染者149例中のQFT陽性率は4.7%で、陽性例は全例活動性結核または潜在性結核の診断となり、QFT-3Gの特異度は高い。  
新規患者でQFT-3Gを施行することにより、149例中で4例の潜在性結核の患者を発見することができた。HIV患者に初診時にルーチンでQFTを施行することで、結核発症率が高いHIV患者で結核を早期に発見できる可能性がある。  
判定不可症例では、抗HIV療法開始後にCD4値50 $\mu$ LとなりQFTが判定可能となるまで、QFTを施行すべきである。  
HIV患者におけるQFT判定保留の扱いについては、結核を無治療にて経過観察中に、QFT-3Gの結果が変動する症例が多い。米国では判定として判定保留を用いておらず、今回の判定保留症例11例は、米国の基準では全例陰性となることも考慮すると、判定保留例については慎重な臨床診断と経過観察を要すると考える。(青木)
- (15) 多剤耐性結核の迅速診断・迅速隔離法の普及と自動化。  
本法の感度は93.3%、特異度は99.7%と優れた結果が得られており、また多剤耐性結核の迅速なスクリーニング法としても有用であると考えられた。
- (16) 新規抗結核剤OPC67683 (Delamanid) の臨床応用と新規結核治療ワクチンの併用効果解析。
- (17) 多剤耐性結核に対するDNAワクチンの臨床応用に必要な試験デザインの骨子(案)作成。  
1)DNAワクチンの構成物質(アジュバント兼デリバリーシステム)であるHVJ-Eに関するGLP

安全性試験データの取得を実施した。また、臨床での安全性については、大阪大学医学部附属病院が、皮内やリンパ節内の腫瘍内投与に加え、前立腺内投与や皮下投与の安全性評価を開始した。これらの試験結果を考慮して、臨床応用デザインを設定する必要がある。

2)HVJ-Eは、結核防御に重要なTh1を介する細胞性免疫をより強く活性化する事が明らかとなった。DNAワクチンの投与には、従来の筋内投与よりも皮内投与の方が優位性高い事を示唆する報告があり、今後作用機序を詳細に検討する必要があると考えられた。

- (18) 外国人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。
- (a) 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。
  - (b) 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。
  - (c) 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。
  - (d) 外国人結核はMDR-TBが多い。
  - (e) 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。
  - (f) 中国から日本の移民にスーパー・スプレッダー多剤耐性結核を我々は世界で初めて発見した。(日本のみならず中国のある都市にも12%でスーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌が存在することも我々は発見)
  - (g) 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。

## E. 結論

### I. 日本の外国人結核

1. 日本全国：2012年全国保健所528、結核病床を有する病院262、合計790施設に2009年～2011年の調査票(外国人結核)を送り、90%の回答。2121例(重複なし)を解析した(岡田)。

外国人結核は年々増加。20代が48%。国籍は中国、フィリピン、韓国の順。インドネシア、ネパールが増加。東京都、愛知県、千葉県の増加。学生22.4%と著増。多剤耐性結核は4.4%で高頻度。HIV合併結核1.4%。

〔さらに2009年(2006年～2008年)外国人結核調査票と比較解析：前回の調査結果の対策を厚生行政に反映、改善された結果〕：①日本語学校健診4.2%と増加改善。学生が多いという前回調査結果より、保健所が日本語学校健診を増やす対応(大阪市等)。②通訳(言語障壁への対応)を増加(行政サービス14.5%)。③帰国者の低下。④治療中断・脱落者低下。

〔問題点〕：言葉の問題、経済的問題、法的問題、生活習慣の違い。(結核2011,2012, UW Conf 2012)(岡田)

さらに強い感染力を持つスーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌(S・S多剤耐性結核菌：我々が世界に先駆けて発見)が日本のみでなく、中国にも存在し、S・S多剤耐性結核の患者の中国と日本の移動が示唆された。

神戸市の外国人結核(藤山理世・岡田)20名/年。中国多い。学生36%。日本語学校の健診必要。

2. 国立国際医療研究センターにおける外国人結核と分子疫学研究：東京における外国人結核の比率は増加傾向にある。国立国際医療研究センターでは東京都在住の外国人塗抹陽性結核例の23%を診療しており、治療脱落例は減少している。しかし、新宿区全体では多剤耐性結核の母国からの持ち込み例が3例みられた。東京に在住している外

国人由来結核菌のゲノムDNAを抽出した。全ゲノム配列を決定し、日本人由来株との相違について検討する。(小林、切替)

3. 東京病院(豊田恵美子・岡田)では外国人結核患者50例解析。有空洞40%。HIV合併結核4%と高率。多剤耐性結核2%。
4. (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、特に日本語学校に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、疫学的つながりは認められなかった。

### II. 日本・中国・韓国・台湾の分子疫学研究

1. 近年、東アジアに位置する日本、中国、韓国、台湾では、多くの人々がそれぞれの国を訪れている。そのため、人の移動に伴い結核をはじめとした感染症も輸入・輸出されている可能性がある。結核においてこの可能性を明らかにするために、まずそれぞれの国内で広まっている結核菌遺伝子型の特徴を調べた。東アジアでは、台湾を除き北京型結核菌の割合が高いことや結核罹患率が先進諸国に比べて高いなどの共通の特徴を持っている。各国の分子疫学担当者との会議を持ち、型別データを共有できる反復

配列多型 (VNTR) システムの構築を行った。さらに、各国で広まっている北京型結核菌の遺伝的系統の違いを明確にするために、次世代シーケンサーを用いた解析から報告されている一塩基多型 (SNP) 分析法を利用した結核菌を遺伝系統的にグループ分けできる新しいシステムの構築を行った。このシステムは、リアルタイム PCR を利用して 22 箇所 SNP を検出するもので、分離された結核菌を網羅的に解析することによって、各国で広まっている結核菌の特徴を明らかにすることができる。各国での特徴が整理されることで、結核菌の由来国等の推定も可能となると考えられる。

2. VNTR の MST 解析で、日本、韓国の結核菌は北京型の“祖先型”、中国は北京型の“蔓延型”、韓国は RD181 陽性、台湾は非北京型で、日、中、韓、台の結核菌は各々区分可能な発見。(加藤・前田)
3. シーケンサー 全ゲノム比較で北京型と非北京型を型別できる SNP 型別システム開発中。非北京型、北京型(蔓延型)、北京型(祖先型)の3つに分類可の発見。
4. SNP と VNTR 法でアジア各国由来結核菌を区分・分類できる方法解析中。

### Ⅲ. アジア諸国の多剤耐性結核

1. 複十字病院とタイ・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実施している。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人と比較する事により、多角的に難治化に関する因子の同定を進めている。今年度の主な成果としては、タイ国における菌体側の解析から英文論文が出版され[*Microbiol Immunol* 2013 ;57(1):21-9]、難治性結核で北京株は 66.7%と全国平均の20.8%に比して高い事などを報告した。更に、結核菌培養1,333例と数を増やし、より詳細な解析法にて菌体の解析を実施した結果、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。臨床情報との相関で、北京株がより若年者に多く、耐性菌症例など難治性結核に多いなど上記の論文結果をより多くの数で確認・定量する結果が得られている。(野内)

2. ①ベトナムのハノイ肺病院との連携研究を立ち上げ、ベトナムにおけるHIV合併結核の病態とグラニューライシンの関連についての臨床研究に先立ち、健常医療従事者対象にした血漿グラニューライシン濃度と臨床疫学的要因との関連解析研究を実施した。②国立国際医療研究センター・エイズ治療開発センターにおけるHIV合併結核患者血漿・血清検体を用いて、倫理委員会からの承認後グラニューライシン濃度の測定を行った。結果、グラニューライシン濃度はHIV合併結核患者において健常者やHIV陰性結核患者と比較して有意に上昇していた。③HIV感染が活性型ビタミンD3によるマクロファージの活性化機構に与える影響を検討するために、平成23年10月以降の洪水の影響で中断されていたタイN IHとの共同研究を再開した。(タイ・ベトナム 櫻田)
3. ホーチミン市のファムゴックタック病院は、ベトナム南部の結核拠点病院である。多剤耐性結核についての共同研究として多剤耐性結核の発生に関わる宿主側の要因を検討すべく、断面研究を実施した。58名の多剤耐性結核患者について、抗結核剤代謝に関連する宿主側遺伝子MBL2の検討を行った。炎症時においてもMBL2の遺伝子型は、mannose binding lectin (MBL) の血中濃度を明確に規定しており、MBLの高発現型(YA/YA)、中発現型(YA/XA)、低発現型(それ以外)に分けられた。高発現型の遺伝子型が多剤耐性結核群では健常者に比してやや低頻度に認められたが、検出力が低く有意差には至らなかった。さらに27種類のサイトカイン等の免疫系分子の血中濃度との関連を検討したところ、MBLとインターフェロン $\gamma$ の血中濃度との間に有意な相関が認められた。また、インターロイキン $12\alpha$ 鎖(p35)の遺伝子発現

はMBL値と逆相関にあった。MBLはヒトにおいて自然免疫の初期応答のみならず、Th1応答にも影響を与えている可能性が示唆された。(慶長)

4. 中国東北部黒竜江省を中心とする地域における薬剤耐性結核菌の調査を2007年より行っている。これまでに結核患者より1,230株の結核菌を分離し、その薬剤感受性を調査した。その結果、何らかの耐性を示す結核菌が全体の4割近くに上ること、全体の2割が多剤耐性結核菌であることが明らかとなった。(服部)

#### IV. HIV合併

1. 国立病院機構(NHO)病院144施設に対して調査票を送り、2011年1月1日~12月31日の間のHIV感染症合併結核症例数の把握と臨床データの集積を行った。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。HIV感染症に合併した結核の頻度は変化無く、毎年一定数の患者が存在する。2011年はHIV合併多剤耐性結核を認めなかったが、今後もHIV感染症合併多剤耐性結核に注意を払っていく必要がある。(永井)
2. 全国のHIV(エイズ)診療拠点病院・結核診療病院(国立病院機構を除く)、保健所を対象に、2010年と2011年におけるHIV合併結核症例の有無に関する調査を実施した結果、HIV合併結核うち多剤耐性結核の報告はなかった。医療機関からは合計63例、保健所からは合計88例のHIV合併結核症例が報告され、2010年以降の結核登録情報システムによるHIV合併例数(同期間計128例の報告)は2009年以前と比較してより実態に近くなったものと考えられた。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、多剤耐性結核はなかったが、今回、INH, EB, SMに対する耐性1例(ネパール人)の報告があった。(藤田)
3. HIV感染者における結核症の早期診断を目指し、インターフェロン $\gamma$ 遊離試験の有用性を検討した。HIV感染が判明した時点で、インターフェロン $\gamma$ 遊離試験を施行することは、

結核症の早期診断に有用である。CD4値50 $\mu$ L以下の症例では、抗HIV療法による免疫能の改善で測定可能となるまで検査を繰り返し施行することが望まれる。(青木)

#### V. 新しい迅速診断の開発・新治療剤(化学療法剤等)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、露口)  
多剤耐性結核は世界的に問題となっている。その診断の遅れは、治療失敗につながるのみならず、他者への感染リスクの増大をももたすため、迅速な診断はきわめて重要である。我々は、多剤耐性結核のスクリーニング法としてのリファンピシン(RFP)耐性迅速診断法の有用性につき検討を行った。従来法の薬剤感受性検査をgood standardとした場合の感度は93.3%、特異度は99.7%と優れた成績が得られた。本法はRFP耐性迅速診断、ひいては多剤耐性結核の迅速なスクリーニング法として有用であると考えられた。
2. 多剤耐性結核に対する初めての治療ワクチンを開発(サルで)(岡田)。INHと結核治療相乗効果。皮内投与最適。前臨床試験データ取得(中島、岡田)。新薬カプラザマイシンとも相乗効果。カプラザマイシンは超薬剤耐性結核(XDR-TB)治療効果。
3. HVJ-エンベロープ(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. 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による自然免疫や細胞性免疫の活性化には、RIG-Iを介した新規メカニズムが関与する事などが明らかとなった。更に、臨床治験への移行を目指し、規制当局である

PMDAとの品質面での相談についても開始した。

5. Granulysinは結核治療効果（岡田）。SLPIと相乗効果（竹田）。
6. 自然免疫応答に関わるAbsent in Melanoma 2 (AIM2)の結核感染防御における役割をノックアウトマウスを作製し、解析した。AIM2欠損マウスは、結核菌に対する感受性が高くなった。その分子機構として、AIM2は、細胞質内に逃れた病原性結核菌のDNA認識し、インフラマゾームの活性化、そしてIL-1beta, IL-18の分泌を誘導することにより、結核菌感染防御を担っていることが明らかになった。

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を中国 Heping、韓国 Cho、タイ Srisin博士等と確立した結核ネットワークで開始。

・研究代表者（岡田全司）（表1, 2, 3, 4）

- (1) 日本全国：2006年～2008年の調査票（外国人結核）2,136例の対象者の年度別登録者数を解析（岡田）。日本の外国人結核は20代、国籍は中国、フィリピン、韓国の順に多い。多剤耐性結核は3.8%と高頻度。INH耐性やRFP耐性も高率。XDR-TBも存在。来日1～3年発症多し。2006年度は外国人結核患者数560人、2007年599人、2008年691人と年々増加。国籍別の年推移では、中国、フィリピン出身者が年々増加傾向。都道府県別年推移では東京都、愛知県、岐阜県が増加。愛知県周辺企業への移民増加示唆。（結核2011）患者管理上の問題として言語の壁や治療途中での帰国率が高いが、より詳細な問題点の解析を行った。  
さらに強い感染力を持つスーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌（S・S多剤耐性結核菌：我々が世界に先駆けて発見）が日本のみでなく、中国にも存在し、S・S多剤耐性結核のある患者は中国と日本の移動が示唆された。
- (2) 東京病院（豊田恵美子・岡田）では外国

人結核患者50例解析。有空洞40%。HIV合併結核4%と高率。多剤耐性結核2%。

- (3) 神戸市の外国人結核（藤山理世・岡田）20名/年。中国多い。学生36%。日本語学校の健診必要。
- (4) 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、露口）  
多剤耐性結核は世界的に問題となっている。その診断の遅れは、治療失敗につながるのみならず、他者への感染リスクの増大をももたらすため、迅速な診断はきわめて重要である。我々は、多剤耐性結核のスクリーニング法としてのリファンピシン（RFP）耐性迅速診断法の有用性につき検討を行った。従来法の薬剤感受性検査をgood standardとした場合の感度は93.3%、特異度は99.7%と優れた成績が得られた。本法はRFP耐性迅速診断、ひいては多剤耐性結核の迅速なスクリーニング法として有用であると考えられた。
- (5) 新結核治療剤（化学療法剤等）：①ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用い、HVJ-エンベロープ/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, 2012）。XDR-TBに治療効果。INHと相乗的結核治療効果。皮内投与が最適で、筋肉内投与や皮下投与に比較して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）。上記ワクチンと相乗的治療効果。
- (6) 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-エンベロープ/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。

- (7) 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)の抗結核作用を初めて示した。

・研究分担者(小林信之) ①国際医療研究セの外国人結核6年間189名。治療成績は改善し脱落者は減少。RFP耐性、MDR-TB(新宿区38%)が多い。②外国人結核患者由来結核菌株のRFLP解析から、86株のうち29%はクラスターI (中国、韓国籍 多)を、6%はクラスターIIを形成していた。③東京在住外国人結核の91菌株のDNA解読を目的に、患者分離結核菌のゲノムDNA抽出を完了。さらに、DNAシーケンスを解読した。

・研究分担者(下内昭) ①大阪市における外国人結核毎年約30名。MDR-TB・治療脱落者が多く治療支援が重要。転出割合が高い。帰国時には母国にて治療が継続できる医療システム重要。②若年学生が多く(35%。このうち日本語学校生50%)、学生の健診を強化する必要。

・研究分担者(加藤誠也) ①IS6110遺伝子とVNTRのMST解析で、日本、韓国の結核菌は“祖先型”。中国は“蔓延型”で、韓国はRD181陽性、台湾は非北京型で日、中、韓、台の結核菌は各々区分可能な発見。②全ゲノム比較でSNP型別システム開発中。非北京型、北京型(蔓延型)、北京型(祖先型)の3つに分類可の発見。③アジア各国で共通・簡易・迅速に行える遺伝子解析方法を東アジア各国と共同で開発した。東アジア地域内で広まっている結核菌遺伝子型の解析をSNP法遺伝型解析(大分

類)+VNTR法型別(細分類)で実施中。共通に使用するSNP部位23箇所を決定。より簡便なりアルタイムPCR系を作り各国に提供。非北京型、北京型(蔓延型)、(祖先型)の3分類できる19箇所の合成プローブ設計に成功。

・研究分担者(永井英明) HIV合併結核症例の解析。2007~2010年の4年間で結核16,804例。HIV合併結核68例(0.4%)。このうち多剤耐性結核3例(4.4%)。すべて男性、国籍は中国1例、日本2例で、CD4は100/ul以下と低値。肺結核2例、粟粒結核1例。HIV合併多剤耐性結核は治療に難渋する事を明らかにした。2011年はNHO(国立病院機構)で結核患者4091例のうちHIV合併者19例(0.46%)

・研究分担者(藤田明) 全国のHIV(エイズ)診療拠点病院・結核診療病院(国立病院機構を除く)、保健所を対象に、2010年と2011年におけるHIV合併結核症例の有無に関する調査を実施した結果、HIV合併結核うち多剤耐性結核の報告はなかった。医療機関からは合計63例、保健所からは合計88例のHIV合併結核症例が報告され、2010年以降の結核登録情報システムによるHIV合併例数(同期間計128例の報告)は2009年以前と比較してより実態に近くなったものと考えられた。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、多剤耐性結核はなかったが、今回、INH, EB, SMに対する耐性1例(ネパール人)の報告があった。

・研究分担者(服部俊夫) ①中国ハルピンの多剤耐性結核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。(J.Clin.Mic. 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60.3%と高率。③フィリピン及びタイ：潜在性結核のTBGL診断はQFTと関連し有用(Int.J.TLD., Cl.D.I., 2012)。

・研究分担者(櫻田紳策) ①ベトナム・タイにおける再発結核患者では血清granulysin値低下を明らかにした(Micro.Imm.2011)。②HIV感染は、ビタミンDのM $\phi$ 活性化を阻害し、易結核感染(タイ)。  
・研究分担者(慶長直人) 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は代謝遅延型遺伝子が少ない。②自然免疫関連遺伝子 MBL2は変異型Bアレル、Xアレルを持つ変異型が、ベトナムの多剤耐性結核では高い。(MBLの血中濃度が、変異型では低値)

・研究分担者(野内英樹) ①タイでのHIV合併結核493名中活動性結核は15.6%。②初回MDR-TB 12.5%が、2回目22.5%と著増。これらの結核で北京型66.7%と(タイ平均20.8%)高率。③複十字病院の結核1958名中外国人結核患者5.7%で、そのうち多剤耐性結核患者26.1%と極めて高率。

・研究分担者(青木孝弘) ①国立国際医療研究センター病院におけるHIV合併結核患者129例。男性

91%、24%は外国籍。12%に抗結核剤に耐性。多剤耐性2%。②HIV合併結核患者におけるQFT-3G診断法は有用(特異度は高い)： HIV149例中QFT-3G陽性7例(4.7%)。陽性全例結核。

・研究分担者(竹田潔) ①SLPIは結核治療効果。Granulysinとの相乗効果。②細胞内DNAセンサーであるAIM2の欠損マウスが結核感染に高感受性を発見。

・研究分担者(鈴木克洋) 多剤耐性結核迅速発見法(rpoB変異)を用い、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構築(鈴木、露口、岡田)。この方法を6施設に普及。(結核2012)

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Okada, M., Y. Kita, T. Nakajima, S. Hashimoto, H. Nakatani, S. Nishimatsu, Y. Nishida, N. Kanamaru, Y. Kaneda, Y. Takamori, D. McMurray, E V.Tan, M L. Cang, P. Saunderson, and E.C.Dela Cruz. The study of novel DNA vaccines against tuberculosis: Induction of pathogen-specific CTL in the mouse and monkey models of tuberculosis. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (in press)
- 2) Kita, Y., S. Hashimoto, T. Nakajima, H. Nakatani, S. Nishimatsu, Y. Nishida, N. Kanamaru, Y. Kaneda, Y. Takamori, D. McMurray, E V.Tan, M L. Cang, P. Saunderson, E.C.Dela Cruz, and M. Okada. Novel therapeutic vaccines [(HSP65+IL-12)DNA-, granulysin- and Ksp37-vaccine] against tuberculosis and synergistic effects in the combination with chemotherapy. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 2013;9(3):526-533
- 3) Siddiqi UR, Punpunich W, Chuchottaworn C, Jindaku S, Ashino Y, Saitoh H, Okada M, Chotpittayasunondh T, Hattori T.: Elevated anti-tubercular glycolipid antibody titers in healthy adults as well as in pulmonary TB patients in Thailand. *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases*. 2012;16(4):532-8
- 4) 岡田全司、喜多洋子、橋元里実、西田泰子、仲谷均、西松志保、木岡由美子 II 予防接種 Q&A (B) BCG100. (結核予防ワクチン; DNA ワクチン) 結核予防ワクチン (DNA ワクチン) の開発状況とその応用の可能性について教えてください。小児内科 45 巻 (2013 年) 増刊号 予防接種 Q&A 改訂 3 版 出版中 小児内科
- 5) 岡田全司、喜多洋子、橋元里実、西松志保、仲谷均、木岡由美子、西田泰子 結核の免疫反応「免疫学的機序からみた呼吸器疾患」日本胸部臨床 出版中
- 6) 岡田全司 11 章 1 節 DNA ワクチンの開発事例「遺伝子・DNA 利用の製品研究開発における規制・倫理対応と解析、操作技術のトラ

ブル対策」 出版中 技術情報協会

- 7) 岡田全司 はじめに (序論) 「結核—古くて新しい感染症—」 出版中 最新医学
- 8) 岡田全司 座談会：結核の現状・問題点と最新の知見 「結核—古くて新しい感染症—」 出版中 最新医学
- 9) 喜多洋子、岡田全司 ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた新規結核予防ワクチン開発及び臨床応用に向けて 「結核—古くて新しい感染症—」 出版中 最新医学
- 10) 橋元里実、西松志保、岡田全司 多剤耐性結核治療ワクチンと T 細胞免疫 「結核—古くて新しい感染症—」 出版中 最新医学

### 2. 学会発表

- 1) 岡田全司. 新しい結核予防・治療ワクチンの開発と T 細胞免疫研究 (今村賞受賞講演). 第 87 回日本結核病学会総会 2012 年 5 月 10 日 広島
- 2) 高森靖, 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 高見泰子, 仲谷均, 岸上知恵, 西松志保, 名倉香織, 岡田全司. 新しい結核治療ワクチンの開発 (Transgenic マウス, SCID-PBL/hu マウスと DBA/1 マウスを用いた). 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会 2012 年 4 月 20 日 神戸
- 3) 喜多洋子, 金丸典子, 林清二, 岡田全司. 結核に対する新しい治療ワクチン開発と免疫機構解析. 第 87 回日本結核病学会総会 2012 年 5 月 10 日 広島
- 4) 岡田全司、喜多洋子、金丸典子、林清二、鈴木克洋、露口一成、小林信之、切替照雄. 海外から輸入される多剤耐性結核の調査・対策 (治療・迅速診断). 第 87 回日本結核病学会総会 2012 年 5 月 10 日 広島
- 5) 岡田全司. 新しい結核予防・治療ワクチンの開発と T 細胞免疫研究. 第 49 回 K-net 近畿地区研究会 2012 年 8 月 4 日 大阪
- 6) Masaji Okada, Yoko Kita, Satomi Hashimoto, Shiho Nishimatsu, Toshihiro Nakajima . Activation of CTL by novel vaccines (Granulysin-, Ksp37- and HSP65 DNA+ IL-12 DNA- vaccines) against tuberculosis in vivo. 第 41 回日本免疫学会学術集会. 2012 年 12 月 5 日
- 7) 岡田全司、喜多洋子、橋元里実、林清二、鈴木克洋、露口一成、小林信之、切替照夫、豊田恵美子、藤田明、下内昭、加藤誠也、小向潤、松



- 本健二. 海外から輸入される多剤耐性結核の調査 (本邦における外国人結核に対する調査研究). 第 88 回日本結核病学会総会 2013 年 3 月 28 日 千葉
- 8) 喜多洋子, 橋元里実, 林清二, 岡田全司. 新しい結核治療ワクチンの開発 (Hsp65+IL-12 DNA ワクチン) と他の薬剤・ワクチンとの相乗効果及びキラーT細胞分化. 第 88 回日本結核病学会総会 2013 年 3 月 28 日 千葉
  - 9) 喜多洋子, 金丸典子, 橋元里実, 高見泰子, 仲谷均, 高尾京子, 岸上知恵, 西松志保, 名倉香織, 林清二, 中島俊洋, 吉田栄人, 金田安史, E. V. Tan, P.Saunderson, E. C. Dela Cruz, 岡田全司. 新しい結核ワクチン (HVJ-エンベロープ/Hsp65+IL-12 DNA) 及び granulysin ワクチンの開発; カニクイザルを用いた解析. 第 82 回実験結核研究会 2012 年 5 月 9 日 広島
  - 10) 喜多洋子・金丸典子・林清二・岡田全司. 結核に対する新しい治療ワクチン開発と免疫機構解析. 第 87 回日本結核病学会総会 2012 年 5 月 10 日 広島
  - 11) 喜多洋子, 橋元里実, 高見泰子, 仲谷均, 西松志保, 木岡由美子, 林清二, 中島俊洋, 吉田栄人, 金田安史, E. V. Tan, P.Saunderson, E. C. Dela Cruz, 岡田全司. 新しい結核ワクチン (HVJ-エンベロープ/Hsp65+IL-12 DNA), granulysin. 及び Ksp37 ワクチンの開発; カニクイザルを用いた解析. 第 83 回実験結核研究会 2013 年 3 月 27 日 千葉
  - 12) 喜多洋子, 橋元里実, 林清二, 岡田全司. 結核患者血清中及び末梢血リンパ球から産生される Granulysin や Ksp37 等による結核慢性排菌や再発の予後診断法開発. 第 88 回日本結核病学会総会 2013 年 3 月 28 日 千葉
  - 13) 吉田 志緒美, 鈴木 克洋, 露口 一成, 岡田 全司, 林 清二, 岩本 朋忠, 和田 崇之. 半世紀前における結核患者由来病理組織標本からの結核菌 DNA 抽出の試み. 第 87 回日本結核病学会総会 2012 年 5 月 10 日 広島
  - 14) 橋元里実・喜多洋子・金丸典子・仲谷均・西松志保・西田泰子・林清二・岡田全司・竹田潔・中島俊洋・金田安史・E. V. Tan・P.Saunderson. 結核に対する新しい治療ワクチンと免疫活性化機構. 第 66 回国立病院総合医学会 2012 年 11 月 16 日 兵庫
  - 15) 岡田全司, 喜多洋子, 橋元里実, 林清二, 西松志保, 小林信之, 切替照夫, 豊田恵美子, 藤田明, 下内昭, 加藤誠也, 小向潤, 松本健二. 海外から輸入される多剤耐性結核の調査 (本邦における外国人結核に対する調査研究) 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会プログラム P.208
  - 16) 金丸典子, 喜多洋子, 林清二, 岡田全司, 豊田恵美子. 本邦における多剤耐性結核の調査 (2010 年) 研究. 第 87 回日本結核病学会総会 2012 年 5 月 10 日 広島
  - 17) Okada, M. The study of novel vaccines against tuberculosis and differentiation of CTL using monkeys and mice. WCVII 2012 (EIGHTH WORLD CONGRESS ON VACCINES, IMMUNISATION AND IMMUNOTHERAPY), 5-7 June, 2012, Barcelona, Spain.
  - 18) Kita, Y., and M. Okada. Novel therapeutic vaccines [(Hsp65+IL-12)DNA-, granulysin- and Ksp37-vaccine] against tuberculosis and synergistic efficacy with chemotherapy. WCVII 2012 (EIGHTH WORLD CONGRESS ON VACCINES, IMMUNISATION AND IMMUNOTHERAPY), 5-7 June, 2012, Barcelona, Spain.
  - 19) Kanamaru, N., Y. Kita, N. Kobayashi, T. Kirikae, T. Hattori, A. Shimouchi, S. Kato, K. Tsuyuguchi, and M. Okada. Study of very infectious (super-spreader) multi-drug resistant tuberculosis in Japan and Asia. The 43rd Union World Conference on Lung Health (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease), 13-17 November, 2012, Kuala Lumpur, Malaysia.
  - 20) Okada, M., Y. Kita, N. Kanamaru, S. Hashimoto, S. Nishimatsu, T. Nakajima, Y. Kaneda, P. Saunderson, and E V.Tan. Novel therapeutic vaccines against tuberculosis and their synergistic efficacy using chemotherapy. The 43rd Union World Conference on Lung Health (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease), 13-17 November, 2012, Kuala Lumpur, Malaysia.

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

- ① 岡田全司、高森靖、小川一行、永田欽也  
「感染症治療剤 15K granulysin」 WO  
03/070268 A1  
2002年
- ② 岡田全司、吉田栄人、中島俊洋、松本真  
「結核ワクチン HVJ-liposome/Hsp65  
DNA+IL-12 DNA」  
整理番号：MED-A0504  
受付番号：50501768464  
特許番号：特願2005-280379  
提出日：2005年9月27日  
発明の名称：DNAワクチン組成物  
2005年

- ③ 岡田全司、高森靖、安井正文  
「感染症治療剤15K granulysin」  
特許取得2008年7月4日  
特許4149713号  
2008年
- ④ 岡田全司、高森靖、安井正文  
「感染症治療剤」  
特許取得登録日：2012年10月31日  
登録番号：(欧州特許2243489号)  
2012年

### 2. 実用新案登録

### 3. その他

# 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） 分担研究報告書

## 多剤耐性結核と HIV 合併の実態把握と対策

研究分担者 永井英明 国立病院機構東京病院 呼吸器疾患センター

### 研究要旨

国立病院機構（NHO）病院 144 施設に対して調査票を送り、2011 年 1 月 1 日～12 月 31 日の間の HIV 感染症合併結核症例数の把握と臨床データの集積を行った。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。HIV 感染症に合併した結核の頻度は変化無く、毎年一定数の患者が存在する。2011 年は HIV 合併多剤耐性結核を認めなかったが、今後も HIV 感染症合併多剤耐性結核に注意を払っていく必要がある。

### A. 研究目的

細胞性免疫が著しく低下する AIDS 患者では結核の発病リスクはきわめて高い。多剤耐性結核（MDR-TB）を合併した場合、予後は不良である。わが国では HIV 感染者は増加傾向にあり、結核中まん延国であるわが国では HIV 感染者が結核を発病するリスクは欧米先進国に比べ非常に高いといえる。

国立病院機構病院における HIV 合併結核について 2007 年より継続的に調査を行ってきた。その中で MDR-TB の実態調査を行っている。今年度も継続的実態調査を行った。

### B. 研究方法

国立病院機構（NHO）病院 144 施設に対して調査票を送り、2011 年 1 月 1 日～12 月 31 日の間の HIV 感染症合併結核症例数の把握と臨床データの集積を行った。臨床データは、年齢、性別、国籍、結核の病態、治療、免疫再構築症候群の合併、転帰等である。その中から多剤耐性結核例の抽出を試みた。

### C. 研究結果

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 1）。

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  $140/\mu\text{l}$  であり、CD4 数別の患者数の分布を見ると、CD4 数  $200/\mu\text{l}$  未満の症例が 11 例（64.7%）、 $100/\mu\text{l}$  未満の症例が 8 例（47.1%）と免疫機能低下例が多かった。

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、

表1. 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	HIV合併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
2011	4091	19 (0.46%)	0
合計	20895	87 (0.42%)	3

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。

#### D. 考察

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。

#### E. 結論

HIV 感染症に合併した結核の頻度は変化無く、毎年一定数の患者が存在する。2011 年は HIV 合併 MDR-TB を認めなかったが、今後も HIV 感染症合併 MDR-TB に注意を払っていく必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Harada T, Akiyama Y, Kurashima A, Nagai H, Tsuyuguchi K, Fujii T, Yano S, Shigeto E, Kuraoka T, Kajiki A, Kobashi Y, Kokubu F, Sato A, Yoshida S, Iwamoto T, Saito H. : Clinical and microbiological differences between *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* lung diseases. J Clin Microbiol. 50(11): 3556-3561, 2012.

2. Sato R, Ohshima N, Masuda K, Matsui H, Higaki N, Inoue E, Suzuki J, Nagai H, Akagawa S, Hebisawa A, Shoji S. :

- A patient with relapsing  
polychondritis who had been  
diagnosed as intractable bronchial  
asthma. Intern Med. 51(13):1773-  
1778, 2012.
3. Ikematsu H, Nagai H, Kawashima M, Kawakami Y, Tenjinbaru K, Li P, Walravens K, Gillard P, Roman F. : Characterization and long-term persistence of immune response following two doses of an AS03A-adjuvanted H1N1 influenza vaccine in healthy Japanese adults. Hum Vaccin Immunother. 8(2):260-266, 2012
  4. Sapkota BR, Hijikata M, Matsushita I, Tanaka G, Ieki R, Kobayashi N, Toyota E, Nagai H, Kurashima A, Tokunaga K, Keicho N. : Association of SLC11A1 (NRAMP1) polymorphisms with pulmonary Mycobacterium avium complex infection. Hum Immunol 73(5):529-536, 2012.
  5. Oshitani Y, Nagai H, Matsui H, Aoshima M : Reevaluation of the Japanese guideline for healthcare-associated pneumonia in a medium-sized community hospital in Japan. J Infect Chemother [Epub ahead of print] 2012.
  6. 永井英明 : 呼吸器疾患の新治療 高用量クラリスロマイシン. 呼吸 31(7):634-640, 2012.
  7. 永井英明 : 感染症の臨床 結核の最新情報 薬剤師としての関わり. 薬剤学: 生命とくすり, 72(4):232-238, 2012.
  8. 永井英明 : 【結核と非結核性抗酸菌症】合併症のある結核患者の治療戦略. Pharma Medica, 30(6):23-25, 2012.
  9. 永井英明 : 【感染症と抗菌薬の使い方-多剤耐性菌感染症時代の予防から治療まで】 結核(特に肺結核). 診断と治療, 100(3):383-387, 2012.
  10. 石井崇史, 田村厚久, 松井芳憲, 松井 弘稔, 永井英明, 赤川志のぶ, 蛇澤晶: 重症インフルエンザ A(H1N1)2009pdm 肺炎の3例. 日本呼吸器学会誌, 1(7):567-572, 2012.
  11. 永井英明 : 【最近 10 年で最も進歩した研究分野を検証する】 抗酸菌感染症 (NTM を含む)(解説/特集). 呼吸, 31(10):946-948, 2012.
- ## 2. 学会発表
1. 永井英明. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会. 特別企画 1 : 高齢者を中心とする呼吸器感染症ワクチンの新展開: インフルエンザワクチン公費助成拡大の必要性. 2012 年 4 月 (神戸)
  2. 永井英明. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. アジュバント添加 A 型インフルエンザ HA ワクチン (H1N1 株) 接種後の抗体価の 1 年間の推移. 2012 年 4 月 (長崎)
  3. 永井英明. 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会. シンポジウム: 合併症を伴う RA 治療の実際. B. 感染症 (主に非結核性抗酸菌症感染) - 呼吸器内科医の立場から - 2012 年 4 月 (東京)
  4. 永井英明. 第 87 回日本結核病学会総会教育講演: 免疫不全と抗酸菌感染症. 2012 年 5 月 (広島)
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

# 日本、中国、韓国および台湾で分離される結核菌の 一塩基多型 (SNP) を用いた型別

研究分担者 加藤誠也 結核予防会結核研究所 副所長  
研究協力者 前田伸司 結核予防会結核研究所 抗酸菌リファレンス部  
結核菌情報科 科長

## 研究要旨

近年、東アジアに位置する日本、中国、韓国、台湾では、多くの人々がそれぞれの国を訪れている。そのため、人の移動に伴い結核をはじめとした感染症も輸入・輸出されている可能性がある。結核においてこの可能性を明らかにするために、まずそれぞれの国内で広まっている結核菌遺伝子型の特徴を調べた。東アジアでは、台湾を除き北京型結核菌の割合が高いことや結核罹患率が先進諸国に比べて高いなどの共通の特徴を持っている。各国の分子疫学担当者との会議を持ち、型別データを共有できる反復配列多型 (VNTR) システムの構築を行った。さらに、各国で広まっている北京型結核菌の遺伝的系統の違いを明確にするために、次世代シーケンサーを用いた解析から報告されている一塩基多型 (SNP) 分析法を利用した結核菌を遺伝系統的にグループ分けできる新しいシステムの構築を行った。このシステムは、リアルタイム PCR を利用して 22 箇所の SNP を検出するもので、分離された結核菌を網羅的に解析することによって、各国で広まっている結核菌の特徴を明らかにすることができる。各国での特徴が整理されることで、結核菌の由来国等の推定も可能となると考えられる。

## 研究協力者

### 韓国

Dr. Park, Young-Kil 韓国結核研究所 分子疫学部門長

### 中国

Dr. Zhao, Yan-Lin 中国疾病管理予防センター(CDC) 結核研究部長

Dr. Mei, Jian 上海市疾病管理予防センター(CDC) 結核部門長

Dr. Gao, Qian 上海 Fudan 大学医学部 微生物教室 教授

### 台湾

Dr. Jou, Ruwen 台湾疾病管理予防センター(CDC) 抗酸菌部部長

### 日本

岩本朋忠 神戸市環境保健研究所

和田崇之 長崎大学熱帯医学研究所 国際保健学

## A. 研究目的

近年、日本から中国、韓国、台湾への渡航及びそれらの国からの来日者が増加している。これら人の移動に伴い結核を含めた感染症がアジア地域内の国々に広まる可能性も考えられる。また、台湾を除きこれらの国々では、北京型結核菌がそれぞれの国内で広まっているという共通の地域性があり、欧米の諸国と

は異なる特徴を持っている。そこで、東アジア諸国内で共通で利用できる結核菌型別システムの構築を目的として共同研究を開始した。

昨年までの共同研究で共通に利用できる反復配列多型 (VNTR) 分析システム (10-locus VNTR) を樹立した。また、各国で広まっている結核菌の遺伝型を網羅的に分析し、特徴を明らかにすることで、結核菌の由来や感染

国の推定などに利用できる可能性がある。このような解析のための分析手法として次世代シーケンサーによる分析・解析情報から得られた一塩基多型 (SNP) を用いた。SNP は、結核菌の遺伝系統に応じて発生し、蓄積されていくことから VNTR のような亜種型別ではなく、もっと安定した型別情報を提供するものと期待される。

各国から結核菌の分子疫学を専門とする研究者を集めて会議を開き本研究について議論を行った。東アジア国々で共通の SNP 解析や VNTR 分析システムを構築し、型別情報の蓄積と情報交換ができれば、例えば、各国で広がっている多剤耐性菌や病原性の高い株の型別情報を迅速に共有することができる。

## B. 研究方法

### 日中韓台分子疫学研究会議

平成 24 年 12 月 10-11 日、東京都清瀬市、結核研究所で分子疫学担当者会議を開催した。

SNP 解析については、全系統の結核菌を網羅的に分析できる 22 箇所の SNP 部位を選択

した。この内、北京型と非北京型の型別ができる *fadD*: 3284855 位と北京型結核菌の Ancient/Modern の型別ができる 1477596 位の SNP を最初に分析し、その後、非北京型：7 箇所、北京型-Ancient：10 箇所、北京型-Modern：3 箇所の分析を行った。

SNP 検出に必要なサイクリングプローブや TaqMan MGB probe は、結核研究所でデザインを行い、実際に変異を検出できるか確認を行った。

## C. 研究結果

### 1. SNP 解析のローサイと分析法

最初に 2 箇所の SNP 分析、すなわち *fadD*: 3284855 位と 1477596 位を分析することで結核菌は、非北京型、北京型-Ancient、北京型-Modern の 3 つのグループに区別することができる。これらのグループ毎に各遺伝型に特徴的な SNP 分析を行うことで、遺伝的背景に基づき 20 のサブグループに分類することができるシステムができた (図 1)。

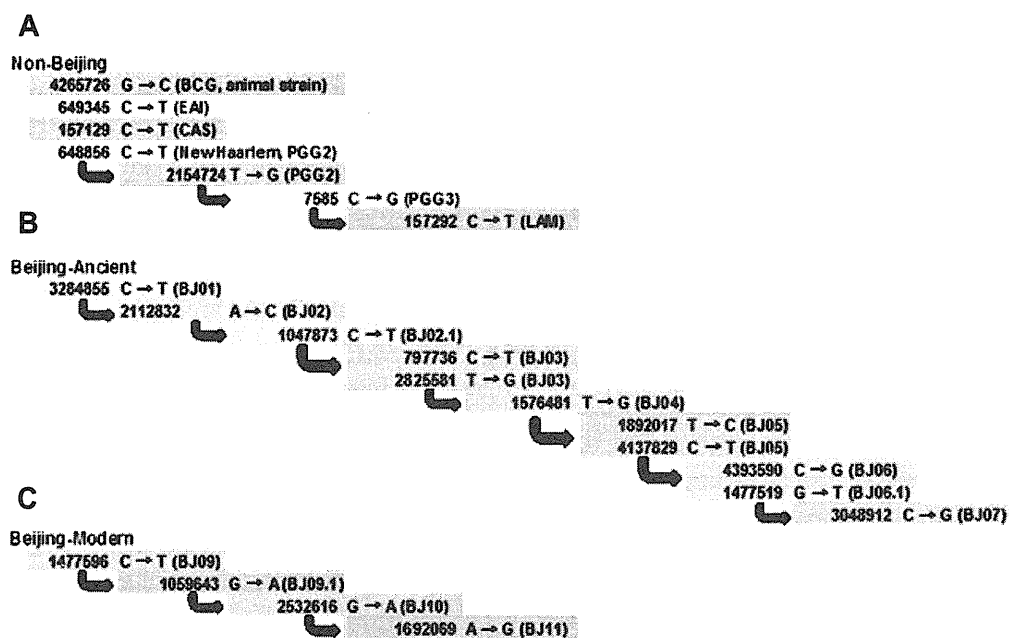


図 1 臨床分離結核菌を網羅的に分析可能な SNP システム

本解析により結核菌は 20 のグループに区分することができる。

A: 非北京型結核菌用 SNP 部位; B: 北京型-Ancient 用 SNP 部位;  
C: 北京型-Modern 用 SNP 部位

表1 北京型-Modern の SNP 解析例

	SNP position				No. of strains
	1477596	1059643	2532616	1692069	
H37Rv	C	G	G	A	—
BJ09	T	G	G	A	63
BJ09.1	T	A	G	A	15
BJ10	T	G	A	A	21
BJ11	T	G	A	G	1

## 2. SNP タイピング用のプローブのデザインと型別能力の確認

タカラバイオ（株）のサイクリングプローブあるいはライフテクノロジーズ（株）のTaqMan MGB プローブを利用したリアルタイム PCR で SNP 分析する系を 22 箇所のローカスについて検討した。サイクリングプローブの委託合成料金は、TaqMan MGB プローブの半分程度なので、サイクリングプローブを最初に選択し、プローブがデザインできない場合や確認実験でうまく検出できないローカスは、MGB プローブに変更するなど再合成を行った。最終的に 22 箇所すべての SNP サイトの変異を検出できる SNP 分析系を構築した。

## 3. SNP 解析の解析例

PCR 法で NTF 領域への IS6110 の挿入が確認できている 100 株の北京型-Modern 結核菌について 1477596、1059643、2532616、1692069 位の SNP 分析を行った（表 1）。その結果、北京型 Modern 結核菌の内、63 株が BJ09、15 株が BJ09.1 に分類され、合計 78 株が BJ09 グループの株だった。次いで BJ10 グループ（21 株）、BJ11 グループが 1 株だった。北京型-Modern は、日本国内での存在頻度がそれほど高くないが、VNTR 分析においても多型性が低く型別が難しい。SNP 解析でも報告されている SNP ローサイが少なく、十分に型別することが難しいと考えられる。

## 4. 各国で分析を行う株について

本システム検証のため、各国で約 200 株程度の結核菌を分析することとした。既にスト

ックしてある株から各国の事情に応じて、出来るだけバイアスがかからないように分析する株の選択を行うこととした。

## D. 考察

本年度は、リアルタイム PCR で SNP を検出するためのプローブ合成と型別能確認作業に手間と時間が必要だった。結核菌標準株の H37Rv を鋳型 DNA として利用することで、ほとんどのローカスの野性型コントロールが得られた。一方、分析した結核菌中で変異の割合が高い場合は、容易に臨床分離株から変異体の陽性コントロールは入手できるが、頻度が低い場合はそれが難しかった。そこで、今回の実験では 8 ローサイで、変異を持った PCR 産物が得られる様に鋳型となる DNA を人工合成し、変異コントロールとした。これらの変異コントロールの取得によって、リアルタイム PCR 系で SNP がうまく検出できているかを容易に確認することができた。

次年度は、この完成した SNP 分析システム（各ローカスは、野性型と変異型の 2 種類のプローブ、PCR プライマー、野性型と変異型コントロールからなる）及び分析用試薬を各国の施設に送付し、それぞれの地域内で分離された結核菌の分析を行ってデータを提供してもらう予定である。この点について、各国の研究者からは既に承諾を得ている。

このような共同研究によって確立した共通な方法を使って結核菌を解析することで、各国で広まっている結核菌の特徴を明らかにできると考えられる。本システムの有用性が確



立され、本会議参加国だけでなく他のアジアの国々で広く活用できるようになれば、各地域における結核菌の伝搬状況や由来地域等の推定に関する研究も飛躍的に進展すると期待される。

#### E. 結論

近年、人の移動が活発になり、感染症が流入する可能性が高まっている。アジアの国や地域で共通で利用できる SNP 分析や型別法を開発し、それぞれの国で広まっている結核菌の特徴を明らかにすることができれば、結核菌の由来国（将来的には感染した国など）を推定することができると考えられる。また、近隣諸国で問題となっている病原性の高い結核菌や多剤耐性結核菌などを特定して監視可能な遺伝子型情報を共有することができれば、注意すべき高病原性結核菌の流入を早期に把握するための国際的なシステムの確立が可能となる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

# 東京都および新宿区における外国人結核の臨床像と分子疫学解析

研究分担者 小林信之 国立国際医療研究センター病院 呼吸器内科医長

研究協力者 切替照雄 国立国際医療研究センター研究所 感染症制御研究部長

## 研究要旨

本研究の目的は、東京都および新宿区における外国人結核の実態とその推移を把握することである。平成 22 年における東京都の外国人結核の比率は、結核患者全体の 6.9%と増加がみられ、東京都のなかでも新宿区では最も多くの外国人結核患者の発症がみられた。新宿区に位置する国立国際医療研究センターでは、東京都在住の外国人結核患者の 11%、喀痰塗抹陽性結核患者の 23%を診療していることが明らかとなった。当センターにおいて最近 6 年間で診療した外国人結核患者は 168 名であり、3 年ずつの前後半に分けてその臨床像について検討した。国籍別では中国が最多で変わりなかったが、韓国が減少したのに対し、フィリピンの増加がみられた。職業では学生と主婦が減少し就労者が増加した。治療成績については、後半では脱落例が減少し、外国人結核対策強化の効果と考えられる。結核菌の薬剤耐性については日本人と差はみられていないが、新宿区全体の結核患者の調査では、多剤耐性結核が 3 名（中国 2 名、韓国 1 名）にみられた。母国から日本への持ち込みと考えられ、多剤耐性結核の流入に関しては、さらなる検討と対策が必要と思われる。

東京に在住している日本人および外国人由来結核菌の網羅的分子疫学解析を目的に、患者から分離された結核菌のゲノム DNA を抽出した。全ゲノム配列を決定する予定である。

## A. 研究目的

わが国における結核罹患率は年々減少しているが、その中の外国人の割合は増加傾向にあり、とくに 20 歳代の結核患者においては外国人の比率は 29.6%（平成 23 年度）にまで増加している。新規の外国人結核患者は結核蔓延国を母国とすることが多いため、とくに多剤耐性結核のわが国への持ち込みは新たな脅威として認識されており、この問題に対して様々な方策が施されている。しかし、最近における外国からの結核菌、とくに耐性結核菌の国内への持ち込みの実態について、また、外国人結核対策の効果については明らかになっていない。国立国際医療研究センターは東京都新宿区に位置するため、新宿区在住の結核患者を多く診療しているが、外国人結核に関しては新宿区以外にも東京都各地域の患者を扱っている。本年度の研究では、外国人居住者の多い東京における外国人結核患者のうち当センターで診療している割合を調査し、東京における外国人結核の臨床像、経年的推移を明らかにする。また、新宿区保健所

との共同研究により、新宿区に登録された外国人結核の臨床情報を収集し、外国由来菌の薬剤耐性について検討する。さらに、東京における外国人結核の感染状況を把握することを目的に、外国人由来結核菌の分子疫学調査を実施する。

## B. 研究方法

国立国際医療研究センターにおいて 2007 年 1 月から 2012 年 10 月の間に診療した外国人結核患者を対象として、性別、年齢、国籍、社会背景、基礎疾患、合併症、塗抹、培養、薬剤耐性、転帰などの臨床的特徴について調査した。そして、6 年間で前半（2007 年～2009 年）と後半（2010 年～2012 年）に分けて、それぞれの項目を比較検討した。さらに、当センターの位置する東京都新宿区における外国人結核の臨床像を把握することを目的に、新宿区保健所（島 史子先生）のデータを基に、その年次別の結核罹患率、年次別の外国人結核患者の新規登録数とその割合、国籍別患者数などについて検討した。さらに、東京都全体における外国人

結核患者の実態、推移について調査した。

東京に在住している日本人および外国人由来結核菌の網羅的分子疫学解析を目的に、外国人結核患者、および性別、年齢をマッチさせた日本人結核患者から分離された結核菌のゲノムDNAを抽出し、本年度から次年度にかけて全ゲノム配列を決定する。

(倫理面への配慮)

外国人結核の臨床像の推移に関しては後ろ向き研究となり、当センターの倫理審査委員会の承認を得た(平成25年2月)。

C. 研究結果

東京都における平成22年の新規登録外国人結核患者は211名で、過去5年間で最大であり、全国の6.9%を占めていた(図1)。このうち56名は喀痰塗抹陽性患者であった。新宿区で発症した外国人結核は東京都全体の9.0%、塗抹陽性肺結核に限っても9.0%を占め、いずれも都内で最も多かった。国立国際医療研究センター(NCGM)では東京都における外国人結核の11%、新宿区における外国人結核の32%を診療していることになる。そして、外国人塗抹陽性肺結核患者に限ると東京都全体の23%、新宿区全体の40%を診療していることが明らかとなった(図2)。

平成23年の新宿区における外国人結核は20名で、最近3年間ではほぼ一定しており、年齢別では15-19歳が2名、20-29歳が10名、30-39歳が5名、40-49歳が2名、70-79歳が1名であった(図3)。国籍別では中国8名、韓国7名、フィリピン2名、ネパール1名、その他2名で、入国から発病までの期間が1年未満のものは4名と少なかった。職業別では学生が12名、接客業が3名、無職その他が5名であった

国立国際医療研究センターで診療している外国人結核患者は2007年以降の6年間で168名であり、3年ずつの前後半に分けてその臨床像について検討した。国籍別では中国が最多で変わりがなかったが、韓国が減少したのに対し、フィリピンの増加がみられた(図4)。職業では学生と主婦が減少し就労者が増加した。入国時期は1年以内が減少傾向であり、また、治療成績は改善し、脱落者は5名から1名に減少した。薬剤感受性に関する日本人結核との比較では、外国人結核ではRFP耐性、多剤耐性の頻度がやや多いものの有意差はみられなかった(表1)。しかし、H23年の新宿区全体における調査では外国人結核8名中3名が多剤耐性結核であった(新宿区保健所)(表2)。

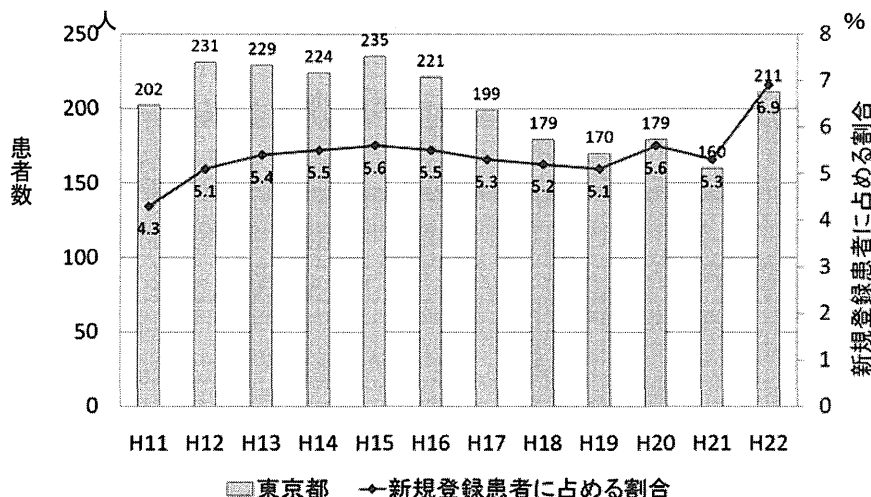


図1 東京都における新規登録外国人結核患者(平成11年~22年)

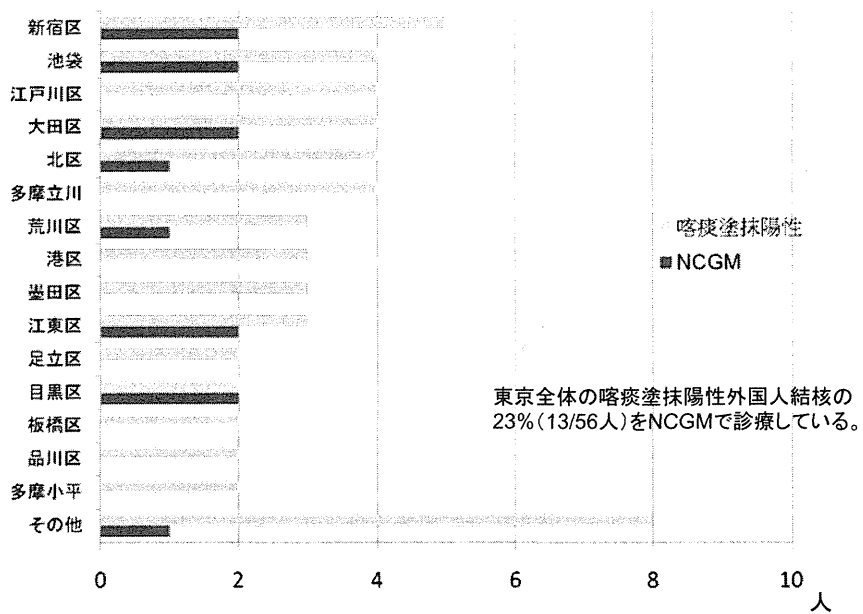


図 2 東京都保健所別の外国国籍 新登録塗抹陽性結核患者数(平成 22 年)

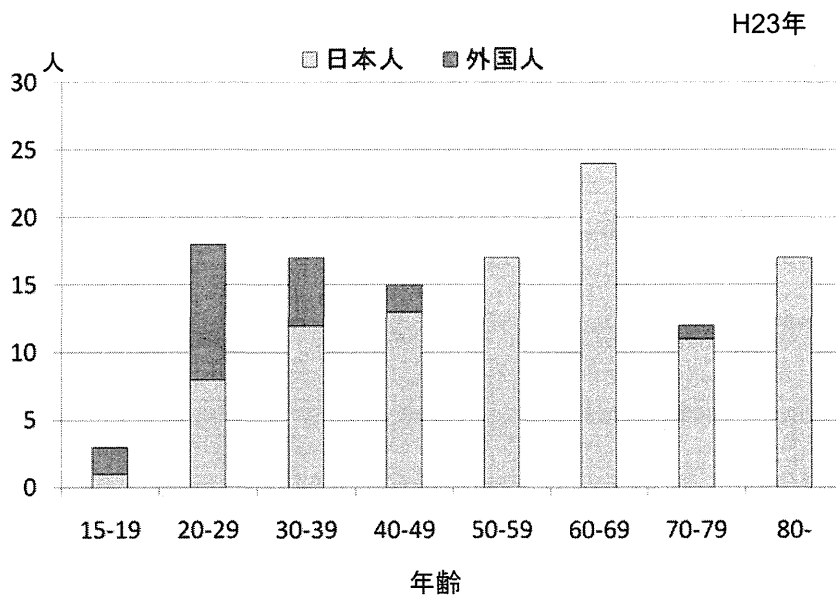


図 3 新宿区における年齢別の新規登録結核患者数