

平成25年度厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進事業）
分担研究報告書

「サハラ以南アフリカにおけるエイズ・結核研究ネットワークの構築に関する研究」

研究分担者 鈴木定彦 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
研究協力者 中島千絵 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター

研究要旨

サハラ以南アフリカ地域における結核菌群菌の伝播動態を調査し、これらの制圧のための基礎データを蓄積するためのネットワークの構築を目的とする。この地域の国々の結核研究・検査担当者と結核研究ネットワークを構築し、結核菌群菌株を収集するとともに、これらの詳細な解析により対象国における結核菌群菌の蔓延状況ならびに薬剤耐性結核の伝播状況を明らかにする事を目的としている。本年度の研究では、ザンビアにおいてヒト患者より分離された結核菌群菌の薬剤感受性試験を実施し、薬剤耐性菌の蔓延状況について調査した。

A. 研究目的

結核は地球規模で蔓延している感染症である。世界保健機構（WHO）より発行された「Global Tuberculosis Report 2013」では、2012年の全世界での新規患者を約860万人、死亡者を約94万人と推定している。このことから結核は、マラリア、エイズと並んで最も重要な感染症の一つと考えられている。特にサハラ以南アフリカにおいてはエイズの蔓延に付随した結核が大きな問題となっており、この地域において適切な対策を講じ、結核を減少させる事は喫緊の課題である。

B. 研究方法

1. 結核菌群菌の分離

検体は2011年から2013年の間にザンビアにおいて患者から得られた喀痰を用いた。喀痰は常法に従ってN-Acethyl-L-Cystein-苛性ソーダ溶液により処理して可溶化・汚染除去を行った。その後、3,000 x g、15分間の遠心分離によりはホモジナズした後 Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 培地に添加し、37℃で4から8週間培養した。増殖が見られたものは、菌液を用いて塗抹・検鏡ならびにキャピリア TB法により結核菌群菌とそれ以外に鑑別した。

2. 薬剤感受性試験

培養により得られた菌液 0.1ml をリファンピシン、イソニアジド、エタンブトールならびにストレプトマイシンを含むMGIT培地に添加し、更に2から4週間培養した。培養期間中に結核菌の増殖が見られたものを耐性と判定した。

C. 研究結果

薬剤感受性試験の結果を表1に示す。125の被検結核菌株のうち103株（82.4%）は主要4抗結核剤（リファンピシン、イソニアジド、エタンブトールならびにストレプトマイシン）の全てに感受性を示すものであった。リファンピシン、イソニアジド、エタンブトールならびにストレプトマイシンの単剤に対する耐性菌はそれぞれ5、2、4、2株であった。2剤以上に耐性を示す結核菌は9株（7.2%）、そのうち6株（4.8%）はリファンピシン、イソニアジドを含む2剤以上に耐性を示す多剤耐性結核菌であった。4株（3.2%）は主要4抗結核剤の全てに耐性を示していた。

D. 考察

125の被検結核菌株のうち6株（4.8%）が多剤耐性結核菌と判定された事は、ザンビアにおいて多剤耐性結核が広がり始めて

いる事を示すものであった。本研究では母数が125と小さい事から、今後更なる調査が必要なものと考えられた。5株(4.0%)がリファンピシン単剤耐性である事は興味深い。現在WHO推奨の元に世界規模で評価試験が実施されているGeneXpert MTB/RIFでは、リファンピシン耐性と判定された場合にはこれを多剤耐性と理解して治療方針に反映させるものであるが、ザンビアの耐性結核の状況はこの考え方の再考を示唆するものである。

E. 結論

ザンビアにおいては4.8%の結核が多剤耐性であり、今後の更なる広がりが危惧される。また、4.0%がリファンピシン単剤耐性である事はGeneXpert MTB/RIFによる多剤耐性判定が正しくない事を示すものであった。今後更なる耐性結核の調査が必要である。

F. 健康危険情報

125の被検結核菌株のうち6株(4.8%)が多剤耐性結核菌と判定された。この事は、ザンビアにおいて多剤耐性結核が広がり始めている事を示すものであった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Nakajima C, Tamaru A, Rahim Z, Poudel A, Maharjan B, Aye KS, Ling H, Hattori T, Iwamoto T, Fukushima Y, Suzuki H, Suzuki Y, Matsuba T. (2013) A simple multiplex PCR for the identification of Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* with a lineage-specific mutation in *Rv0679c*. *J. Clin. Microbiol.* 51(7):2025-2032
- ・ Phetsuksiri B, Rudeeaneksin J, Srisungngam S, Bunchoo S, Roienthong D, Mukai T, Nakajima C, Hamada S, Suzuki Y. (2013) Applicability of in-house loop-mediated isothermal amplification for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex grown on solid media. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66 (3):249-251

2. 学会発表

- ・ Suzuki Y. Current situation of drug resistant

tuberculosis. The 21st Annual Medical Sciences Conference, Department of Medical Sciences (DMSc), Ministry of Public Health, Thailand. June 17, 2013. Centra Government Complex Hotel & Convention Centre Chaeng Watthana, Nontabri, Thailand

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

表1 ザンビアにおいて分離された結核菌の主要4剤に対する耐性

	No. of Isolates
none	103
Rifampicin	5
Isoniazide	2
Ethambutol	4
Streptomycin	2
Rifampicin + Isoniazide	2
Isoniazide + Ethambutol	1
Isoniazide + Streptomycin	1
Isoniazide + Ethambutol + Streptomycin	1
Rifampicin + Isoniazide + Ethambutol + Streptomycin	4
Total isolates	125

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
分担研究報告書

ガーナにおける現行抗エイズ治療薬(ART)の評価に関する研究と
アフリカ中央部における HIV 分子疫学の研究

研究分担者 山岡昇司 東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・教授
研究協力者 井戸栄治 東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・特任教授
(ガーナ大学野口記念医学研究所)

研究要旨

アフリカを始めとする多くの発展途上国においてエイズ患者に対して現在処方されている WHO が第一選択肢として推奨している抗ウイルス治療法(ART)の有効性を評価するため、ガーナのある地方病院を定点観測地点として選定し、前年度に引き続き 270 名の患者の追跡調査を行った。血中ウイルス量と CD4 陽性細胞数を指標として ART 評価を行ったところ、Failure ケースは 8.1%と前年の 17.3%より更に減少し、現行の ART は概ね有効性を保持していることが明らかとなった。しかしながら、血中ウイルス量が抑制されていながら CD4 細胞数の回復が見られないケースが前年度の 14.6%から 30.0%に増加していた。NRTI 等の長期服用によって免疫細胞系に慢性的な障害が生じ始めていることが疑われ、この現象の原因究明が新たな課題として浮上して来た。また分子疫学の研究として今年度は、西アフリカに局在して存在していると言われている HIV の 2 型について最近の動向を調べてみた。ガーナから得られた HIV 陽性の 500 検体の内、Westernblot 法によって血清学的に HIV-2 と HIV-1 の重複感染と確認されたのは 14 症例 (2.8%) で、HIV-2 の単独感染は 1 症例 (0.2%) であった。この HIV-2 単独感染の患者については遺伝子解析によって prototype の HIV-2 株である GH1 に近い株であることが確認され、ほとんど消滅しつつあると思われる HIV-2 が未だにエイズの病因として根強く残っており、存在比は低いながらも確実に流行を続けていることが明らかとなった。

A. 研究目的

エイズ患者の抗ウイルス治療(ART)に際しては、先進国の場合、種々の逆転写酵素が臨床に使われているばかりでなく、インテグラーゼ阻害薬や融合阻害薬など新しいメカニズム抗ウイルス剤など様々な新薬の使用が可能である。しかし、アフリカを含む大半の発展途上国においては、そうした

高価な新薬は無論のこと、様々な副作用が起こるため今ではあまり使われなくなったプロテアーゼ阻害剤すら入手は困難である。ほぼ唯一の選択肢が、国際機関等からの援助によって配給される NRTI 2 剤と NNRTI 1 剤からなる混合薬剤であるが、この組み合わせの薬剤もガーナに導入されてからほぼ 10 年が経過しており、その有効性

がどこまで保持されているのか、きちんと科学的エビデンスに基づいて評価されて来なかったため明らかではないのが現状である。こうした背景から、本研究ではガーナで主に採用されている薬剤が実際どのくらいウイルス制御に働いているのかをより正確に評価するために、ある地方病院に登録されている患者集団を毎年追跡調査することにした。また本研究では、ダイナミックに変動しつつあるアフリカ大陸における HIV の遺伝子型プロフィールを明らかにする研究も行っている。本年度はアフリカ大陸の主に西部地域に限定して存在していると言われる HIV-2 についてガーナを例に取り上げ、その最近の実態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ART 評価のフィールドとしては、昨年度に引き続きガーナ共和国の首都アクラの北方に位置するイースタン州にあるコフォリデュア州立病院で調査を行った。本研究グループが同病院との共同研究を開始した 2009 ~ 2010 年には延べ約 1,100 人分の検体を収集しており、これらの臨床データと血漿や末梢血リンパ球(PBMC)が研究所内に保管され、それ以後同一の患者グループより毎年 300 人分の検体を集めることにした。平成 25 年度(2013 年)は、前年度と同様、特にフォローアップ患者に限定して 270 検体を再採血し、それらの CD4 細胞数と血中ウイルス量を測定した。検体数を少し減らしたのは、多少死亡したこともあるが、主にはコフォリデュアの町から他の都市へ流出したりなどして、患者の追跡が幾分か困難になったことが理由で、収集の効

率を考慮して 270 検体としたに過ぎない。CD4 細胞数は BD 社の FACSCount を用いコフォリデュア州立病院にて測定し、後者は血液検体を野口研究所に持ち帰り、血漿と PBMC に遠心分離後、血漿中のウイルス量を自家で確立した LTR 領域にプライマーが設定された定量的 RT-PCR 法で測定した。薬剤耐性変異の有無については、ウイルス遺伝子の RT 領域 5'側部分を配列分析することで解析した。また分子疫学研究については、このガーナのコフォリデュア州立病院で収集した 500 検体について、Bio-Rad 社の Westernblot キットである Lavblot I と Lavblot II を用いて血清学的な確認試験を行い、HIV-1 と HIV-2 の鑑別診断を行った。また pol 領域のユニバーサルプライマーを用いて、1 型も 2 型も検出できる PCR を行い、遺伝子配列に基づく分子系統解析を行った

(倫理面への配慮)

患者からの検体採取に際しては、ヘルシンキ宣言の精神に基づき本人からの同意書を得た上で採血している。また本研究は、ガーナ大学野口記念医学研究所、東京医科歯科大学、および該当するアフリカ諸国の倫理委員会、またはそれに相当する機関の承認を受けて行われている。

C. 研究結果

ART 評価に関して、初めに血中ウイルス量の分布状況を調べたところ、検出限界(160 copies/ml)が 248 人(91.8%)、検出限界以上 ~ 10^3 copies/ml が 18 人、 10^3 ~ 10^4 copies/ml が 4 人、 10^4 copies/ml 以上の患者は 0 人となり、前年度に比べても全体的

にウイルス量はかなり抑制されていることが分かった。本研究開始時のデータと比べ、ウイルス量が抑制され、CD4 細胞数が回復している場合は治療が Success (S) のケース、逆にウイルス量が増加、CD4 細胞数が減少すれば Failure (F) のケース、またウイルス量は抑制されているが CD4 細胞数の回復が見られないような場合は Moderately Success (M) のケースという 3 つのカテゴリーに分けることにすると、270 ケースの内、S が 167 (61.9%)、M が 81 (30.0%)、F が 22 (8.1%) であった。過去 3 年間 (2011/2012/2013) のそれぞれのカテゴリー別の割合を % で示すと、S については 68.8/68.0/61.7、M については 18.4/14.6/30.0、F については 12.8/17.3/8.1 であった。F が前年度の 17.3% に比べ 8.1% と大幅に減少しており、これは昨年度の結果から臨床医を通じて特に Failure 患者に対して服薬指導を行った効果が出たものと考えられた。しかしながら、ウイルス量は抑制されているのに CD4 細胞数の回復が見られない M のケースが前年度の 14.6% から 30.0% に大幅に増加したことが顕著である。

ウイルス遺伝子の RT 領域 5'側の配列分析による NNRTI に対する耐性変異の出現状況も昨年引き続き調べたが、AZT や d4T 単剤に対する変異はかなり広範に見られたものの、NVP や EFV に対する耐性変異としてよく知られる変異は未だ出現頻度が少なく、多剤耐性と考えられる株の出現は現時点ではほとんど起こっていないことが分かった。

アフリカ大陸における HIV の分子疫学に関して、今年度は西アフリカを中心に限局

的に存在していると言われている 2 型のエイズウイルス (HIV-2) について調べた。対象検体は基本的に上記 ART 評価のためにコフォリデュア市立病院で 2011 ~ 2012 年に収集したものの中から、重複を避けた 500 検体である。ガーナではエイズが疑われる患者が来院すると、1 型と 2 型の簡易判定が出来るインド製のイムノクロマトグラムキット (Fast Response Card Test 1-2.0) を用いて鑑別診断を行い、この時 1 型の反応しか示さなかった場合、HIV-1 の単独感染として CD4 数の測定結果如何によって即治療開始か否かが判断される。2 型の反応が見られた場合は、更に Westernblot による確認試験に移ることになっているが、現実にはキットが十分に手に入らないため、そのまま CD4 細胞数のみを判断材料に治療が行われているのが実情である。Card Test では、おおよそ 1 割くらいが 2 型のバンドとの反応性を示し、これが本当に HIV-2 感染なのか、あるいは HIV-1 との交差反応がそのような結果を示すのかが問題となっていた。そこで我々が Lavblot I および Lavblot II を用いてきちんと Westernblot を行った結果、HIV-2 の gp140 等のバンドなど確実に HIV-2 と判定出来た症例は 500 検体中、15 であり、その内 1 検体だけ (0.2%) が HIV-2 の単独感染 (患者は 37 歳の女性)、残りの 14 (2.8%) は HIV-1 と HIV-2 の重複感染であることが明らかとなった。pol 領域に設定された 1 型も 2 型も検出できるユニバーサルプライマーによって、これらの検体を PCR したところ、HIV-2 単独感染からは HIV-2 の配列が増幅され、分子系統解析から 2 型の prototype であり、以前ガーナから分離された GH1

株に近い株であることが明らかとなった。HIV-1 と HIV-2 の重複感染の検体については、いずれも HIV-1 の配列のみが増幅され、HIV-2 の配列は検出されなかった。このことがかつては HIV-2 に感染していたが、現在は HIV-1 に感染しただけなのか、あるいは検出効率が異なっているために HIV-2 が増幅出来なかったのかは現時点では不明である。しかし、興味深いことはこれら HIV-2 に感染している患者たちも少なくとも CD4 細胞数的には現行の ART が 15 人中 12 人まで有効であるように見えたことである。

D. 考察

3 年間に亘って継続して行った追跡調査の結果、ガーナにおける現行の ART は概ねその効果を保持していることを確認するものではあったが、特に今年度ウイルス量は一見抑制されているように見えながら CD4 細胞数の回復が見られないケースが大幅に増加した点が非常に気になった。もしかすると NRTI などヌクレオチドアナログを長期に摂取すると、免疫担当細胞等は慢性的な障害を受け、死滅したりして新たな細胞の供給に齟齬を来すことがあるのではなかろうか。今後、この現象の原因究明が急がれねばならないと考えられた。

HIV 分子疫学の研究においては、HIV-1 の席捲によってやがては消滅するのではないかと思われていた HIV-2 が西アフリカのガーナでは未だに根強く残っており、割合は少なくなっているものの、新たな感染者を生じているほど active に流行していることが明らかとなったことは極めて重要である。これまでの血中ウイルス量の測定技術は HIV-1 のみを標的として開発されており、

HIV-2 の診断並びに同ウイルスの定量法の確立が急務と考えられた。

E. 結論

先進諸国とは異なり、エイズ治療薬が WHO が推奨している発展途上国向け 3 剤混合の ART 以外には現状他の選択肢がない特にアフリカのような貧しい発展途上国では、現処方限界を知ることは極めて重要なグローバルレベルの課題である。これまでは多剤耐性株の出現が最も警戒すべき関心点であったが、今回長期服用による細胞障害と思われるような結果が得られたことは特に注目すべきで、その現象の解明が一刻も早くなされることが肝要と思われた。分子疫学研究から、HIV-2 が今もガーナ(西アフリカ)のエイズの病原因子として少なからぬ役割を演じていることが分かったことは、これまた重要な知見である。近年日本でも複数の HIV-2 感染の報告がなされたこともあり、HIV-2 がただ消えつつあるのではなく、何らかの変異等により強い感染性を獲得する可能性を全く否定することはできない。本研究のように流行地における研究はそうした事態に備えるためにも続行しなければならないと思われた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nii-Trebi NI, Ibe S, Barnor JS, Ishikawa K, Brandful JA, Ofori SB, Yamaoka S, Ampofo WK, Sugiura W. HIV-1 drug-resistance surveillance among

treatment-experienced and -naïve patients after the implementation of antiretroviral therapy in Ghana. PLoS One. 2013 Aug 19;8(8):e71972. doi: 10.1371/journal.pone.0071972.

井戸栄治、山岡昇司. 東京医科歯科大学がガーナ大学野口医学研究所で展開している2つの感染症研究プロジェクト. ウイルス, 第63巻, 第1号: 79-86, 2013.

2. 学会発表等

1) Ido E, Karhemere S, Nakamura S, Nakaya T, Barnor J, Brandful J, Ampofo W, Aziati I, Agbosu E, Ebengho M, Bakuba K, Ikuta K, Yamaoka S, Muyembe JJ: Molecular epidemiology of HIV in the Congo basin (Democratic Republic of Congo) analyzed by high-throughput DNA sequencing. 6^{eme} Congres International de Pathologie Infectieuse et Parasitaire (CIPIP), June 13-15, 2013, Kinshasa, DRC.

2) 井戸栄治, Stormy Karhemere, Joseph Kayumba, Joachim-Massa Mukedi, Ishmael Aziati, Esinam Agbosu, William Ampofo, 伊吹謙太郎, 山岡昇司, Jean-Jacques Muyembe: コンゴ民主共和国北キヴ州に流行するHIVのサブタイプ解

析. 第54回日本熱帯医学会大会、2013年10月3-5日、長崎、日本.

3) 井戸栄治, Jacob Barnor, Ishmael Aziati, Esinam Agbosu, James Brandful, William Ampofo, George Danquah-Dampitey, Samuel Morton, Samson Ofori, 山岡昇司: ガーナ共和国におけるHIV-2感染の最新動向に関する研究. 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10-12日、神戸、日本.

4) 井戸栄治, Jacob Barnor, Ishmael Aziati, Esinam Agbosu, James Brandful, William Ampofo, George Danquah-Dampitey, Samuel Morton, Samson Ofori, 石川晃一, 山岡昇司: ガーナ国コフォリデュア州立病院における現行ARTの有効性評価に関する追跡調査研究. 第27回日本エイズ学会学術集会総会、2013年11月20-22日、熊本、日本.

5) 掘 恭徳, Nursarat A, Tungguyen H, 宇都拓洋, 森永 紀, 吉仲由之, 神奈木真理, 正山征洋, 山岡昇司: ガーナ産植物由来成分による潜伏HIV-1プロウイルス再活性化とサイトカイン産生誘導の解析. 第27回日本エイズ学会学術集会、2013年11月20日-22日、熊本、日本.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

ケニア拠点を活用したネットワーク構築

研究分担者 一瀬 休生

長崎大学熱帯医学研究所・アジアアフリカ感染症研究施設・教授

研究要旨

ケニアにおいても保健医療資源が十分でないのは例外ではない。CDC などの海外のドナーがケニア保健省と協力し、むしろドナーが強力にリードしながら、ケニアにおける結核の研究体制が構築されており、そのような中でケニアにおける結核研究、とくに薬剤耐性結核の発生状況の把握などこれからのケニアでの結核研究の基盤づくりを目指しながら、他研究機関とも共同研究を行う枠組みを模索している。ケニアにおいては、ケニア中央医学研究所における JICA による医療技術協力や医学分野での共同研究の先鞭を切っていたはずの日本であったが、特に結核研究の分野においては欧米勢に席卷され、ケニアとの共同研究体制の構築には乗り遅れてしまっているのが現状で、むしろ外国ドナーの支援や協力を受けていない国内の研究機関を探すのが難しいという状況ではある。しかし、さらにアフリカにおける日本の大学による結核研究の連携のためのネットワークづくりを目指していく。

A. 研究目的

研究目的はケニアにおけるエイズ・結核に関する疫学情報収集及びケニアにおける検査・治療の特性とその問題点の把握をおこない、その改善点を追及すると同時に共同研究者からサンプルの譲渡を受け、種々の菌株の性状解析し、ネットワーク間での比較・検討すべく、その道筋を模索することである。と同時に潜在性結核感染（LTBI）についても研究を進める予定である（大阪市大研究グループ、松本

壮吉准教授（現新潟大学教授）との共同研究）。

B. 研究方法

1、ケニアの保健省、結核研究の実施機関からの情報収集を行い結核に関する検査・治療面の問題点に把握などを行う。疫学情報はケニア国公衆衛生省の Division of Leprosy, Tuberculosis and Lung Disease (DLTLD), CRDR、CMR（胸部疾患研究センター）JICAケニア事務所（菅本専門

家)、KEMRIブシア支所(ムワウ所長)等から入手した。

2、ウガンダ国境のブシア県立病院における結核患者から喀痰を採取し、ナイロビの長崎大拠点のP3ラボにおいて培養を行い、PCR法およびLAMP法により検出感度の比較を行い、薬剤感受性試験を行う。

3、ケニア共和国(結核高蔓延地域)における、潜在性抗酸菌感染症の把握、および潜在性結核と寄生虫感染との関連について調査を実施した。ナイロビから約400km離れたビクトリア湖畔のビタ地区のランダムに選んだ小学校7校を選定し、小学生269名を対象として採血し、LTBIの検出を行い、寄生虫感染との相関について検討した。

C. 研究結果

1、ケニアは結核の高蔓延国の22か国のうち、その一つに位置付けられ、結核対策は取り組むべき課題である。ケニアにおける2008年の結核患者発生数は約11万人で1990年代のその約10倍に増加している。これに対し、ケニア公衆衛生省は国家公衆衛生改善戦略計画(2008年から2012年まで)で結核対策を重点課題として取り上げている。またWHO、CDC、世界銀行などからの協力を得て、その検査と診断、治療体制の強化、結核対策のモニタリング、結核検査室の整備などの取り組みを推進した結果、患者発見率70%以上、治療成功率85%以上の国際目標を達成している(2009年:患者発見

率85%、2008年:治療成功率85%)。しかし、未だHIV結核の重複感染、多剤耐性結核患の増加、治療困難な症例の増加といった問題が大きな課題である。ケニアの結核の検査体制は技術的にも財政的にも十分に機能しているとは言いがたく、CDCなどのドナーの支援が無くてはならない。JICAケニア事務所はLED蛍光顕微鏡を用いた塗沫検査法の導入支援を行ってきている。今後もさらに本法の導入支援事業を推進するべく、専門家派遣事業を継続するとの事である。しかし、結核菌培養および薬剤感受性検査に至っては、CDC、MSFなどのドナーに依存しているのが実情である。以上がケニアにおける結核の現状と検査体制の概要であり、CDC等のドナーがほとんどの主要な地域をカバーしていて、我々が参入可能な残された地域はあまりない。しかし、我々、長崎大学ケニア拠点のP3ラボも結核の培養が可能になり、ブシアKEMRI、大阪市立大学、松本准教授との共同研究に向け、調整と整備を進めている。

2、この研究の実施に当たり、研究プロポーザルの提出を試みるも、3年間の本研究プロジェクトに2年目から参加し、新たなプロポーザルによる研究開始にむけた組織構築はできず、菌株の性状解析までには至らなかった。

3、ビクトリア湖畔のビタ地区の小学校7校の小学生を対象として、ケニアにおける潜在性抗酸菌感染症の検査

を実施した結果、240 名中 75 名 (31,3%) が検出され、潜在性結核と寄生虫感染との関連については 75 名中、hookworm 感染がみられたのは 10 名で有意な相関が確認された。

D. 考察

ケニアなどの比較的発展していると思われる途上国においても、自前の予算のみで自立しているような独立性の高い研究機関はほとんど皆無であり、とくに結核のような大きな研究テーマの場合、アメリカ CDC などの大きなドナーとの競合は不可避で、そのような状況の中で新たな研究の柱を立てることは困難であるが、しかしこの目標に向かって、継続していくことは非常に重要であり、今後の更なる研究をめざし、施設整備および研究費獲得を行って行きたい。今回判明した潜在性結核と hookworm 感染との関連のメカニズムの解析については、更に分析を行って行く必要がある。

E. 結論

本研究によってサハラ以南アフリカで行われている結核に関する疫学・検査・治療の情報を共有し、またこのネットワークから得られる結核菌の耐性情報はこれからのこの地域の結核治療戦略に大きな意義がある。ケニアにおいてもこのような大陸の各国を結ぶネットワークへの情報提供・共有が可能となるようサンプル入手と解析結果の共有化に向けて環境を整備していく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文

- 1) Akihiro Wadaa, Pooi-Fong Wong, Hironobu Hojo, Makoto Hasegawa, Akitoyo Ichinose, Rafael Llanes, Yoshinao Kubo, Masachika Senba, Yoshio Ichinose. Alarin but not its alternative-splicing form, GALP (Galanin-like peptide) has antimicrobial activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 28 March 2013
- 2) Sheru Wanyua, Morris Ndemwa, Kensuke Goto, Junichi Tanaka, James K' Opiyo, Silas Okumu, Paul Diela, Satoshi Kaneko, Mohamed Karama, Yoshio Ichinose and Masaaki Shimada Profile: The Mbita Health and Demographic Surveillance System. *International Journal of Epidemiology*, 42, 1678-1685, 2013

学会発表

2013 年度の研究業績 (2013 年 4 月 2014 年 3 月)

- 1) Ernest W. Apondi, Koki Taniguchi, Satoshi Komoto, Yoshimasa Maeno, Mitsutaka Wakuda, Mohammad Shah, Kouichi Morita, Yoshio Ichinose

- DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ROTAVIRUS STRAINS FROM DIARRHOEAL CHILDREN IN KIAMBU, KENYA, BETWEEN 2009 AND 2011
細菌学会九州支部総会 6-7, Sep. 長崎 (口頭)
- 2) Ernest W. Apondi, Koki Taniguchi, Satoshi Komoto, Yoshimasa Maeno, Mitsutaka Wakuda, Mohammad Shah, Kouichi Morita, Yoshio Ichinose
DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ROTAVIRUS STRAINS FROM DIARRHOEAL CHILDREN IN KIAMBU, KENYA, BETWEEN 2009 AND 2011
第 54 回日本熱帯医学会 4-5, Oct. 長崎 (ポスター)
- 3) 井上学、岡真優子、仁木満美子、尾関百合子、一瀬休生、濱野真二郎、松本壮吉 ケニア共和国 Mbita 地区の児童における結核菌感染と鉤虫感染の関連
第 54 回日本熱帯医学会 4-5, Oct. 長崎 (ポスター)
- 4) 河本聡、Ernest Wandera、富田万由祐子、前野芳正、一瀬休生、谷口孝喜
ケニアで検出された G12 ヒトロタウイルス株ゲノムの全塩基配列の解析
第 54 回日本熱帯医学会 4-5, Oct. 長崎 (ポスター)
- 5) Risk factor and spatial distribution of *Shistosoma mansoni* Infection among Primary School Children in Western Kenya
Sachiyo Nagi, Chadeka Evans, 砂原俊彦、Chaves Luis Fernando, Justin Yombo K.Dan, 金子聡、一瀬休生、松本壮吉、嶋田雅暁、濱野真二郎
第 54 回日本熱帯医学会 4-5, Oct. 長崎 (ポスター)
- 6) Ernest W. Apondi, Koki Taniguchi, Satoshi Komoto, Yoshimasa Maeno, Mitsutaka Wakuda, Mohammad Shah, Kouichi Morita, Yoshio Ichinose
DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ROTAVIRUS STRAINS FROM DIARRHOEAL CHILDREN IN KIAMBU, KENYA, BETWEEN 2009 AND 2011
第 6 1 回日本ウイルス学会学術集会、10 - 12、November、神戸
- 7) 尾関百合子、武田知芳里、岡部真裕子、井上学、岡真優子、平山幸雄、一瀬休生、小林和夫、松本壮吉 ケニア共和国クワレ地区小学生を対象とした潜在性結核感染と寄生虫感染の関連 第 87 回日本細菌学会総会 3月 22-24 日、2014、東京
- 国際学会
- 1) Erick Odoyo and Yoshio Ichinose,

Etiology of Diarrhoea in Kenya, 2009-2011

Cross-Sectoral Collaboration for Health and Sustainability through Research and Action in Malawi, Chancellors' College, University of Malawi, Lilongwe, Malawi, 18th April, 2013

2) Sheru Wanyua, Morris Ndemwa, Kensuke Goto, Junichi Tanaka, James Kopyo, Satoshi Kaneko, Mohamed Karama, Yoshio Ichinose, Masaaki Shimada. Trends of Active Illness Symptoms and Health Seeking Behaviour In Rural Western Kenya: A Case Of The Mbita Health and Demographic Surveillance System. The 12th Awaji International Forum on Infection and immunity Awaji, 10-13, Sep. 2013 (poster)

3) Ernest W. Apondi, Koki Taniguchi, Satoshi Komoto, Yoshimasa Maeno, Mitsutaka Wakuda, Mohammad Shah, Kouichi Morita, Yoshio Ichinose
DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ROTAVIRUS STRAINS FROM DIARRHOEAL CHILDREN IN KIAMBU, KENYA, BETWEEN 2009 AND 2011
The 12th Awaji International Forum on Infection and immunity, Awaji, 10-13, Sep. 2013 (poster)

4) Mohammad Shah, Erick Odoyo, Amina Galata, Cyrus Kathiiko, Gabriel Miringu, Yosio Ichinose

The emergence of *Providencia alcalifaciens*, a food born pathogen causes diarrhea among children in Kiambu, Kenya, between 2012-2013, Asia-Africa Research Forum, Sendai, Jan. 2014

5) Yoshito Fujii, Satoshi Kaneko, Samson Muuo Nzou, Matilu Mwau, Sammy M. Njenga, Chihiro Tanigawa, James Kimotho, Anne Wanjiru Mwangi, Ibrahim Kiche, Sohkichi Matsumoto, Mamiko Niki, Osada-Oka Mayuko, Yoshio Ichinose, Manabu Inoue, Makoto Itoh, Hiroshi Tachibana, Kazunari Ishii, Takafumi Tsuboi, Lay Myint Yoshida, Dinesh Mondal, Rashidul Haque, Shinjiro Hamano, Mwatasa Changoma, Tomonori Hoshi, Ken-ichi Kamo, Mohamed Karama, Masashi Miura, Kenji Hirayama
Serological surveillance development for tropical infectious diseases using simultaneous microsphere-based multiplex assays Asia-Africa Research Forum, Sendai, Jan. 2014

6) Kensuke Goto, Morris Ndemwa, Sheru Wanyua, Satoshi Kaneko,

Mohamed Karama, Yoshio Ichinose,
Masaaki Shimada: Fact finding
study of Jigger infection in
south-eastern Kenya based on big
resident data from HDSS
Asia-Africa Research Forum,
Sendai, Jan. 2014

7) Mitsuru Toda, Ian Njeru, Shikanga
O-Tipo, David Kareko, Matilu Mwau,
Shingo Inoue, Yoshio Ichinose,
Kouichi Morita
Establishing a disease outbreak

alert system in Kenya: Findings
from the baseline survey
Asia-Africa Research Forum,
Sendai, Jan. 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

平成 25 年度厚生労働省科学研究補助金（地球規模保険課題推進研究事業）
分担研究報告書

MSM (Men who have sex with men)を対象とした首都圏 AIDS 対策成功事例の検討と
その技術移転の可能性について

分担研究者名 仲宗根正 国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官

研究要旨

サハラ以南のアフリカ諸国でも重要課題である男性同性間(MSM: Men who have sex with men)HIV 感染対策について、日本での成功事例の技術移転の可能性について検討した。MSM 集団を対象とした首都圏 AIDS 対策では、主に 5 つの成功要因が考えられた。i) IT 有効活用、ii) 保健所を中心とした行政側の積極的関与、iii) MSM 支援 NPO 等の積極的活動、iv) 行政と NPO 等の連携、v) MSM 集団自身の自律的活動の成長、である。課題としては、a) MSM 集団の多様性、b) その多様性の中での潜伏性、c) 行動変容の限界、が挙げられた。これらの戦術が導入可能か、サハラ以南のアフリカ諸国での今後の現地調査・情報交換が必要である。

A．研究目的

サハラ以南のアフリカ諸国でも重要課題である男性同性間(MSM)HIV 感染対策について、日本での成功事例の技術移転の可能性について検討する。UNAIDS によれば、今世紀に入ってサハラ以南のアフリカ諸国では新規 HIV 感染者は減少している。他地域に比べてその減少速度は速く、目を見張るものがある。UNAIDS 主導のもと、世界各国が人類共通の最重要課題のひとつであることを認識し、人と予算をこの地域に重点的に集中して課題克服に取り組んできた成果である。一方で、他地域でも同様であるが、サハラ以南のアフリカ諸国においても、一般集団ではなく MSM 集団での HIV 流行が優勢であり、近年の重要課題と

なっている。日本も同様の課題を抱えているが、近年、MSM 集団を重点対象とした取組みにより、首都圏における MSM 集団での HIV 流行は押さえられつつある。この首都圏 AIDS 対策成功事例を解析し、このうちのいくつかの戦術を、サハラ以南のアフリカ諸国での AIDS 対策に導入できるか検討することは、対象国の AIDS 対策に貢献する第 1 歩として意義がある。

B．研究方法

MSM 集団を対象とした首都圏 AIDS 対策の根幹はエイズ戦略研究(平成 18-23 年、厚生労働科学研究補助金、エイズ予防のための戦略研究)であり、まず、この戦略の内容を分析した。戦略研究は首都圏のみな

らず関西圏、九州・沖縄圏、東北圏を対象にしているが、首都圏とそれ以外で最終成果が異なったその原因の解明を試みた。そのために各地の対策の現場（コミュニティーセンター）での聞き取り調査も行った。さらに戦略研究以後も継続されている首都圏の地域連携会議に参加し、情報を収集した。以上の分析により有効であった戦術を明らかにし、代表研究者が構築するネットワークを介して情報共有を図り、その技術移転の可能性について検討した。本年度は南アフリカ共和国での現地調査ができなかったが、前記ネットワークや WEB 上の情報を元に検討した。

C．研究結果

エイズ戦略研究の目標は、2010 年度末までに、1) HIV 抗体検査受検者数を 2 倍に増加させ、2) AIDS 発症者数を 25%減少させる、という 2 つであった。実は、この目標はいずれも達成できていない。特に、首都圏以外では AIDS 発症者数を減少させるどころか増加している。しかしながら首都圏においては、目標値の 25%には届かないものの 16.1%の減少に成功している。唯一の減少として、この数値は際立っており、首都圏では AIDS 発症者数を減少に転ずることに成功したと評価できた。分析の結果、この成功の要因としては、i) Web アンケート&広報といった IT 有効活用、ii) 保健所を中心とした行政側の積極的関与、iii) MSM 支援 NPO 等の積極的活動、iv) 行政と NPO 等の連携、v) 「自分たちの仲間は自分たちで守るんだ」という MSM 集団自身の自律的活動の成長が考えられた。首都圏以外でもこれらの要因は観察できたが、

首都圏ではいずれの要因も力強く、特に ii) と iv) は顕著であった。課題としては、やはり、a) MSM 集団の多様性、b) その多様性の中での潜伏性が依然として存在した。さらに生活習慣病対策でも苦戦している、c) 行動変容の限界、がかいま見られた。

これらの戦術が導入可能か、対象国における保健インフラ・ネットワークの状況に関する調査、現地の MSM 支援 NPO の実態調査、現地 MSM 集団の意識調査等を計画したが、本年度は予算的に現地調査ができなかった。WEB 上の情報では、例えば、ルワンダでは皆保険制度が導入され、保健インフラ・ネットワークが整備されていることが確認できた。具体的には、村の保健師から保健センター・病院へ携帯電話を介したデータ送信システムが構築されており、さらに日本に先行して母子手帳の電子化への取組みも始まるようである。他のいくつかの国においては、携帯端末利用者やインターネット人口が急速に増大しており、少なくとも IT 有効活用の戦術は導入可能と思われた。

D．考察

エイズ戦略研究では 2 つの目標を掲げており、これを達成するために 2 つの行動変容を求める戦術が立てられていた。2 つの行動変容とは、MSM 集団の HIV 抗体検査受検行動の促進と、安全行動の促進である。前者では、早期診断・早期治療を図ることにより AIDS 発症を食い止め、有症者の減少を目指す。後者では性交時のコンドーム着用率を上げることにより、MSM 集団内の HIV 感染率自体を下げ、最終的に AIDS 発症者数の減少を図る。首都圏にお

いては、結果の項に挙げた要因がうまく機能して、2つの行動変容に一定の効果があったと考えられる。一方で、うまく機能しなかった首都圏以外では、目に見える効果が得られなかった。首都圏でうまく機能したのは、エイズ戦略研究以前から存在していた大きな理由がひとつあると考えられる。それは首都圏においてはMSMが一定の市民権を既に得ていた点である。特に新宿区ではMSM共同体が構築されており、文化的にも市場的にも一定の価値が確立されていた。このような共同体では、エイズ戦略研究での社会的介入がより機能しやすいことが考えられる。日本各地のMSM集団にも同様の共同体が構築されていれば、エイズ戦略研究の結果はやや違ったものになっていたと考えられる。

日本の各地のMSM集団のこの市民権格差は、換言すると、課題で挙げたMSM集団の多様性である。この点を克服するべく各地にコミュニティーセンターが計6箇所整備された。これは目立たないがエイズ戦略研究の次代を見据えた大きな贈り物である。2番目の課題である多様性の中の潜伏性とは、MSM集団の中でも表に出てこない、いわゆるhard to reach集団の存在である。自ら声をあげない集団は、把握そのものが難しく、社会的介入が届かない。MSM集団へのポピュレーション戦略は、この潜伏集団には通用しにくい。3番目の課題もその克服は容易ではない。かなりの予算と人をつぎ込んでいるにも関わらず、ここ数年の報告では、前述の性交時コンドーム着用率は30%程度で頭打ち傾向である。これ以上の改善を図るには、さらに大きな予算と人をつぎ込む必要があるが現実的には難

しい。別の例を挙げると、健康日本21という国家プロジェクトを施行しても、日本人の喫煙率が20%以下に中々下がらない、肥満率の大きな改善がない、歩行等の1日運動量がなかなか増えない等、行動変容は難しく、ある時点で限界があることが指摘されている。AIDS対策における行動変容についても、ある時期で別のアプローチが必要と考える。

以上の課題も含めて、首都圏AIDS対策成功事例のいくつかの戦術を、サハラ以南のアフリカ諸国でのAIDS対策に導入できるか検討したかったが、現地調査が不十分で現時点では結果の項の記載以上の考察はできない。今後の検討課題である。

E．結論

MSM集団を対象とした首都圏AIDS対策では、主に5つの成功要因が考えられた。i) Webアンケート&広報といったIT有効活用、ii) 保健所を中心とした行政側の積極的関与、iii) MSM支援NPO等の積極的活動、iv) 行政とNPO等の連携、v) 「自分たちの仲間自分たちで守るんだ」というMSM集団自身の自律的活動の成長、である。課題としては、a) MSM集団の多様性、b) その多様性の中での潜伏性が依然として存在していること、c) 行動変容の限界、が挙げられた。これらの戦術が導入可能か、サハラ以南のアフリカ諸国での今後の現地調査・情報交換が必要である。

F．健康危険情報

特になし。

G．研究発表

1. 論文発表

仲宗根正. 国立感染症研究所における HIV
関連曝露事故対策. 日本バイオセーフティ
学会・JBSA Newsletter, 3:6-12, 2013.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 25 年度厚生労働省科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題名

サハラ以南アフリカにおけるエイズ・結核研究ネットワークの構築に関する研究

研究分担者

久保 亨

日本赤十字社長崎原爆諫早病院・医師

長崎大学熱帯医学研究所・客員研究員

研究要旨

サハラ以南アフリカ諸国で大きな脅威となっている結核は現在もなお我が国の重要な公衆衛生上の問題である。社会の高齢化に伴い高齢患者が増加している結核感染症のコントロールに資するため、従来法よりも迅速で低コストの、リアルタイム PCR 法と High Resolution Melt 解析法を用いた結核菌の迅速薬剤耐性検査法と分子疫学解析法を確立し、臨床現場に応用することを目指した。本研究により、1) 結核菌の薬剤耐性遺伝子のシーケンシング法、2) 結核菌の薬剤耐性遺伝子のリアルタイム PCR 法と High Resolution Melt 解析法を確立することができた。この方法を用いれば、結核菌の薬剤耐性の有無を臨床検体採取後約 2 時間で行うことができ、正しい治療薬の選択や感染制御において医療の受ける恩恵は非常に大きいと考えられる。

迅速、低コストで比較的簡便な本法は、今後我が国の結核診療の現場に於いて検査法の主流となって行く可能性があるのみならず、海外途上国における結核対策に大きく寄与できる可能性があると考えられる。今年度我々は多剤耐性結核蔓延国である南アフリカ共和国の Kwazulu-Natal Research Institute for Tuberculosis and HIV (K-RITH)を訪れ、同地域の研究者、医療従事者と意見を交換し、同法のアフリカにおける将来的な応用の可能性について検討した。

A. 研究目的

サハラ以南アフリカ諸国で大きな脅威となっている結核は、我が国においても現在なお公衆衛生上の大きな問題であり、長崎県の結核の人口 10 万人に対する年換算罹患率は、平成 24 年 5 月時点では大阪府に次いで全国で 2 番目に高かった。

日本赤十字社長崎原爆諫早病院(諫早日赤)は長崎県諫早市にある 140 床の内科急性期病院で、結核病床 20 床を持ち、比較的結核患者数の多い長崎県中部ならびに県南部での結核診療の中心的役割を果たしている。諫早日赤では平成 24 年 4 月より遺伝子検査ラボを立ち上げ、現在までに主に LAMP 法とリアルタイム PCR 法を用いた結核の遺伝子検査を

行っており、平成 25 年 10 月末までに計 403 人の患者(平均年齢 73 ± 14.58)からの 544 検体に対し結核 LAMP 法による検査を行い、63 名の患者が陽性(平均年齢 74 ± 16.5)であった。

途上国において多剤耐性結核の蔓延が大きな問題となっているが、日本でも過去に治療歴のある高齢者の再発例の場合などは結核菌が治療薬に耐性となっている可能性があり、薬剤耐性の有無を治療早期に知ることが重要となる。しかし現行の結核菌培養による方法(抗酸菌の培養 菌の同定 薬剤耐性試験)では確認までに 2 - 3 ヶ月が必要であり、結核菌の薬剤耐性情報が培養結果を待たずに得られればその臨床的な意義は大きい。

今回我々はリアルタイム PCR 法や DNA シーケンシング法などの分子生物学的手法を用いて結核菌の薬剤耐性情報を迅速に判定する方法の開発に取り組み、将来的なサブサハラ

B. 研究方法

今回我々はダイレクトシーケンシング法とリアルタイム PCR 法および High Resolution Melt (HRM) 解析法を用いた結核菌の薬剤耐性遺伝子変異の迅速スクリーニング検査法の開発と臨床応用についての検討を行った。HRM 解析法は、温度を徐々に上昇させて二本鎖 PCR 産物を解離させ、そのパターンを解析することでわずか 1 塩基ペアの違いまで識別する方法であり、結核菌の薬剤耐性遺伝子変異の有無を約 2 時間でスクリーニングできると考えられる。

これら迅速・簡便な遺伝子診断技術を用いれば、より迅速に低コストで結核菌の薬剤耐性

の有無と感染経路の推定が可能となり医療の受ける恩恵は大きいと考えられる。本研究の結果を、今後我が国のみならず多剤耐性結核の蔓延する途上国への技術供与を目指すべく、平成 25 年 8 月に多剤耐性結核蔓延国である南アフリカ共和国の K-RITH を訪れ、同地域の医療・研究状況を視察するとともに、現地の研究者、医療従事者と意見を交換し、同法のアフリカにおける将来的な応用の可能性について検討した。

C. 研究結果

1. 結核菌の薬剤耐性関連遺伝子変異のシーケンシング法による検索

諫早日赤病院で結核 LAMP 法陽性であった検体(喀痰、気管支洗浄液等)のうち 39 検体と、検体から培養された結核菌株 11 株の抽出 DNA を用いて、結核菌の薬剤耐性遺伝子変異を nested PCR 法とダイレクトシーケンシング法により解析した。対象遺伝子として 6 種類の主要抗結核薬の耐性に関連している計 11 個の遺伝子の配列を調べ(表 1)、薬剤耐性結核菌のデータベースと照合した。シーケンシング用 PCR 産物作成のための nested PCR プライマー計 44 本は、すべて今回新たにデザインした。本法は核酸抽出に 10 分、nested PCR に 4 時間、PCR 産物の酵素処理とサイクルシーケンシングに 2.5 時間、シーケンサーで 1.5 時間、解析に 1 時間と、合計で約 9 時間の作業であり、今まで 2 か月以上かかっていた結核菌の薬剤耐性の判定を翌日には行うことができるようになった。現在諫早日赤病院では本法を用いて結核菌の薬剤耐性の判定をほぼリアルタイムの日常臨床の中に組み込んでいる。

今回上記 50 検体のシーケンスを解析した結果、4 検体(8%)に計 8 個の耐性遺伝子変異が

認められた(表 1. 4 検体中 2 検体は多剤耐性)、残りの 46 検体には薬剤耐性遺伝子変異は認められなかった。

2. HRM 解析による薬剤耐性遺伝子変異の検索

ダイレクトシーケンシング法よりもさらに迅速・簡便に薬剤耐性変異の有無を推測できる HRM 解析法を用いた薬剤耐性結核の検出法の検定は既に米国 CDC から報告があるが、現在まだ広く一般的に使われるには至っていない。今回我々は臨床の第一線病院や途上国の検査室でも使用可能な、結核菌の薬剤耐性遺伝子変異検出のための HRM 解析システムの構築を行った。対象遺伝子として *rpoB*、*katG*、*inhA*、*gyrA* を選び、上記 1 で配列情報の得られた結核菌遺伝子とキアゲン社の Type-it HRM PCR Kit を用い、キアゲン社の Rotor-Gene Qリアルタイム PCR 機でリアルタイム PCR と HRM 解析を行った。プライマーは *rpoB* については文献に記載のあるものを用い、他の 3 遺伝子に対するプライマーは新しくデザインした。結核菌量の多い検体や培養菌体由来の DNA はそのまま、結核菌量の少ない検体から直接抽出した DNA は上記の nested PCR の 1st PCR の反応産物をテンプレートとして用いた。図 1 に *rpoB* 遺伝子の解析結果を示すが、表 1 に示した遺伝子変異の存在を反応開始後 2 時間以内に確認することができた。*katG*、*inhA* 遺伝子変異についても同様に確認することができ、結核菌の薬剤耐性 HRM 解析システムを構築することができた。現在対象遺伝子を増やし系の更なる充実を図っているところである。

3. 南アフリカ共和国 K-RITH 訪問

平成 25 年 8 月に多剤耐性結核の蔓延地として有名な南アフリカ共和国ダーバン市にある

K-RITH ならびに周辺の結核関連医療施設を訪問し、現地の研究者や医療従事者と情報交換を行った。ダーバンでは K-RITH 側のカウンターパートである Alexander Pym 博士 (MD、PhD) のオーガナイズにより、研究施設である K-RITH とともに、ダーバン市内にある 3 か所の結核医療関連施設の訪問を行った。まず Prince Cyril Zulu Communicable Disease Centre (CDC) を訪問した。ここは南アフリカで最も大きい結核外来病院のひとつで、年間 2500 例の新規患者が診断され、毎月 5000 人が治療を受けているとのことであった。次に訪問した King George V Hospital は 1939 年からある古い病院であるが、2000 年からは 160 床 (うち小児科 32 床) の多剤耐性結核 (MDR-TB) 専門の病院となっている。2007 年には 3000 例の多剤耐性結核患者が受診し、300 例の新規超多剤耐性結核 (XDR-TB) 患者が診断された。現在ベッド数を 320 床に拡張中であった。比較的よく整備された病院ではあったが、MDR-TB 患者数の増加により平均約 4 か月の入院待ちが必要とされているなど、結核医療を取り巻く環境には厳しいものが感じられた。次に南アフリカで最も大きく近代的であるといわれる Quaternary referral 病院である Inkosi Albert Luthuli Central Hospital の検査室を訪問し、セミナーを行うとともに Koleka Mlisana 教授をはじめとするスタッフと意見の交換を行い施設の視察を行った。結核検査室は MGIT を 25 台揃え、1 日 800 検体の結核菌培養を行い、年間 3000 例の多剤耐性結核の診断を行っているとのことであった。現在結核の遺伝子検査としては GeneExpert と Line Probe assay を行っているとのことであったが、1 日に約 250 検体を処理しなければならないため、より簡便で効率的な遺伝子検査法が求められており、今後

我々の研究が寄与できる部分も少なくないと感じられた。

D. 考察

本研究により、1)結核菌の薬剤耐性遺伝子のシーケンシング法、2)結核菌の薬剤耐性遺伝子の HRM 解析法、を確立することができた。これら3つの迅速・簡便な遺伝子検査法は諫早日赤のような第一線の臨床病院においても行うことが可能であり、今後結核に対する臨床に大きく貢献することが期待される。

1)のシーケンシング法では、nested PCR 法を用いることにより、結核菌量のかなり少ない臨床検体からでも直接シーケンシングが行えるようになったため、早ければ診断の翌日には薬剤耐性の判定が可能となった。現在さらに感度を高めるべく系の至適化を行っている。

シーケンシングと異なり2)の HRM 解析法では遺伝子配列の決定は困難なため、現時点ではあくまで補助的な薬剤耐性の予測手段という側面が強いが、多剤耐性結核の蔓延地、特にアフリカなどの途上国において治療方針の迅速な決定のためのスクリーニング目的には極めて適していると考えられる。今後は日本国内の結核蔓延地ならびに途上国との研究協力も進めていきたいと考えている。

E. 結論

今回我々はリアルタイム PCR 法を用いた結核菌の迅速薬剤耐性検査法を確立し、臨床

現場への応用が可能であることを示した。迅速、低コストで比較的簡便な本法は、将来的に我が国の結核診療の現場に於いて検査法の主流となっていく可能性があるのみならず、海外途上国における結核対策に大きく寄与できる可能性があると考えられる。今後は本研究班により構築された研究ネットワークを通じてサハラ以南アフリカ諸国に対して本法の技術供与を含めた協力関係の構築に努めたい。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

学会発表

1. 久保 亨、松竹豊司、江原尚美、森田 公一、河野 茂、福島喜代康、リアルタイム PCR 法を用いた結核の分子診断法の日常診療への応用に関する研究、第 87 回日本感染症学会総会学術集会、平成 25 年 6 月 5 日 - 6 日、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

抗結核薬	耐性関連遺伝子	シーケンス用PCR産物(bp)	耐性変異を持つ株数
リファンピシン(RIF)	<i>rpoB</i>	634	3 (L511P 2株、S531L 1株)
エタンブートール(EB)	<i>embB</i>	754	1 (M306V)
ストレプトマイシン(SM)	<i>rpsL</i>	401	0
	<i>rrs</i>	730	0
イソニアジド(INH)	<i>ahpC</i>	611	0
	<i>katG</i>	624	2 (S315T, S315N)
	<i>inhA</i> promoter	291	1 (-4 T→C)
	<i>kasA</i>	712	1 (G269S)
フルオロキノロン(FLQ)	<i>gyrA</i>	301	0
	<i>gyrB</i>	474	0
ピラジナミド(PZA)	<i>pncA</i>	651	0

表1. 臨床検体 39 検体と結核菌 11 株の薬剤耐性遺伝子変異のダイレクトシーケンシング法による検索結果。4 名の患者検体(2 名は多剤耐性結核)に計 8 個の薬剤耐性変異が認められた。

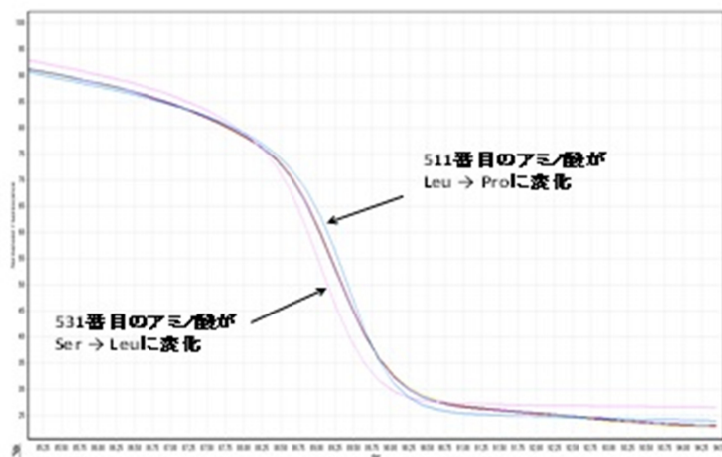


図1. *rpoB* 遺伝子中の RRDR(81 bp)を含む 152 bp の領域をリアルタイム PCR 法で増幅した後に HRM 解析を行った結果。薬剤耐性変異をもつ株の HRM 曲線は変異のない株(中心の曲線)とは異なる曲線として区別された。

平成 25 年度厚生労働省科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
分担研究報告書

ネットワークの構築

研究分担者

垣本和宏 大阪府立大学 教授

研究協力者

野崎威功真 国立国際医療研究センター 医師

佐々木由理 名古屋市立大学 研究員

研究要旨

ネットワークの構築や国際比較を行う上で用語の定義は重要であり、その例として本研究においては、エイズ対策上重要である抗 HIV 薬による治療 (ART: antiretroviral therapy) の「adherence」が研究論文においてどのような用語定義がされているかを検証した。医学 MEDLINE を用いて、「HIV」と「adherence」、「Africa」、「ART」をキーワードに 2008 年以降 2013 年までの 6 年間のサブサハラアフリカで実施された研究文献を検索し、原著論文である、adherence の要因を調査した論文である、測定方法について明確に記述されているものを対象論文 (計 36 論文) として adherence の定義を分類し集計した。その結果、adherence の測定定義は、飲み忘れの自己報告が 22 件 (61.1%) と最も多く、ピルカウントが 6 件 (16.7%)、薬局の処方記録が 3 件 (8.7%)、服薬事象監視システム (ボトルの開閉回数が自動的に記録される) が 2 件 (5.6%) であった。また、近年では飲み忘れの自己報告が減少傾向にあり、研究時期によっても変化していた。ネットワークの構築や国際比較を行う上で重要な用語の定義には、研究者が研究の内容によって便宜的に定義していることも多く、それぞれの利点欠点から適切な定義を選定して研究することが必要である。

A. 研究目的

ネットワークの構築や国際比較を行う上で用語の定義は重要である。研究に用いる用語のほとんどは学会などによって定義されているが、定義づけされていない用語や、研究の内容によって研究者が便宜的に定義していることも多い。特に、社会医学的な研究においては多様な保健行動を扱うことが多く、用語の定義は多

様にならざるを得ない。本研究においては、エイズ対策上重要である抗 HIV 薬による治療 (ART: antiretroviral therapy) への adherence を例にとり、どのような用語定義がされているかを検証した。

サブサハラアフリカ地域を含む開発途上国におけるエイズ対策は、2000 年以前は予防中心であった。しかしながら、先進国との格差や

治療無しの予防対策は必ずしも成果を見せておらず、2000 年以降は WHO の強いリーダーシップと支援により開発途上国でも ART を拡大することになった。その結果、ART は 2000 年以降に拡大し、WHO の報告によると、2002 年に ART を受ける HIV 陽性者は約 30 万人であったのに対し、2012 年では約 970 万人に増加した。特にアフリカ地域での ART を受ける HIV 陽性者の数は爆発的に増加しており、10 年前の約 5 万人から 2012 年には約 750 万人となっている。しかしながら、ART の成功にはかなり高い adherence が必要とされており、adherence が保たれないことでウイルス量が抑制されないだけでなく、薬剤耐性ウイルスの蔓延の問題が生じる。WHO の報告では低中所得国で ART 開始後 60 か月後に治療に来ている患者の率 (retention rate) は 72% と低くなっており、その数は国によって大きく異なっている。アフリカなどの開発途上国では、保健医療機関への地理的なアクセスが悪だけでなく、住民の知識や教育、文化的背景など、社会的な要因が adherence に影響しているとの報告が多くあり、我々もザンビアにおいて adherence が悪くなる要因を調査した。しかしながら、adherence の定義は報告によって大きく異なっており、報告間や国際的な比較、国際的共同研究が難しくなっている。そこで、近年発表されている過去の研究論文における ART の adherence の測定定義について検討した。

B. 研究方法

医学文献データベース MEDLINE を用いて、「HIV」と「adherence」、「Africa」、「ART」をキーワードに 2008 年以降 2013 年までの 6 年間の文献を検索した。抽出された 387 文献から、サブサハラアフリカで研究された原著論文であ

る、adherence の要因を調査した論文である、測定方法について明確に記述されているものを対象論文として選択した。

対象文献をそれぞれ熟読し、adherence の定義を分類し集計した。

C. 研究結果

対象論文として 36 論文となった。各論文の研究対象者数は 66 名から 2,381 名であった。ナイジェリアからの論文とウガンダからの論文がそれぞれ 5 件で最も多く、南アフリカとカメルーンからの論文がそれぞれ 4 件、エチオピアとザンビアからの論文がそれぞれ 3 件であった。Adherence の測定定義は、飲み忘れの自己報告が 22 件 (61.1%) と最も多く、ピルカウントが 6 件 (16.7%)、薬局の処方記録が 3 件 (8.7%)、服薬事象監視システム (ボトルの開閉回数が自動的に記録される) が 2 件 (5.6%) であった。飲み忘れの自己報告は、過去 1 か月間の飲み忘れを尋ねた論文が 6 件 (20.0%) と最も多く、続いて過去 4 日間と過去 1 か月間の両方の飲み忘れを尋ねた論文が 5 件 (16.7%) と多かった。また、複数の期間の飲み忘れを問うた論文は 7 件 (19.4%) であった。過去 3 日間の飲み忘れを尋ねた論文は 2 件 (5.6%) のみであった。

また、近年の論文においては自己報告が減っている傾向も見られた。

D. 考察

ART の服薬の adherence は重要であるにも関わらず明確な定義がないが、多くの研究は自己報告による過去の飲み忘れを患者に尋ねる方法を取っていた。飲み忘れは患者の主観や recall bias も懸念される手法であるが、それを補うために 2 つの期間の飲み忘れを尋ねている論文も多く見られた。我々の過去に

2002年から2006年までの5年間の論文を対象にした調査では、特に欧米において4分の1以上の論文が客観的な評価手法として服薬事象監視システムを用いていたが、今回は2件(5.6%)のみであった。また、前回の調査では飲み忘れは過去3日間を尋ねている論文が多かったが、今回は過去3日間の飲み忘れを単独に問う論文はわずかに1件であった。

ARTの成功には高いadherenceが必要であるが、その定義は現在でも多様であり、また時代とともに変化している可能性が判明した。ART中の患者について服薬状況の公衆衛生学的な把握や国際比較にはadherenceがある程度共通に測定される必要性が示唆された。今後、このような重要事項でありながら共通の定義がない事項に関してさらなる検証が必要である。

E. 結論

ARTのadherenceに関する論文では、自己報告による飲み忘れを尋ねる論文が多くを占めることが判明したが、この傾向は研究時期によっても変化していた。ネットワークの構築や国際比較を行う上で重要な用語の定義には、研究者が研究の内容によって便宜的に定義していることも多く、それぞれの利点欠点から適切な定義を選定して研究することが必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文

1. Nozaki I, Kuriyama M, Manyepa P, Zyambo MK, Kakimoto K, Bärnighausen T False Beliefs About ART Effectiveness, Side Effects and the Consequences of Non-retention and Non-adherence Among ART Patients in Livingstone, Zambia. AIDS Behav. 2013. 17(1) :122-126

2. 垣本和宏、HIV/エイズとジェンダー、目で見えるWHO, (53), 12-14, 2013

学会発表

垣本和宏. HIV/エイズ. 健康への架け橋 - HIV/エイズ、ジェンダーから見る国際保健医療 -. 日本WHO協会・日本国際保健医療学会学生部共催. 大阪市、9月、2013年

Naomi Nakaie, Sovanna Tuon, Ikuma Nozaki, Fuzuki Yamaguchi, Yuri Sasaki and Kazuhiro Kakimoto. Family planning practice and predictors to the risk of unintended pregnancy among HIV-positive women on Antiretroviral Therapy in Cambodia. 11th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand, November, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

表 アフリカの論文の adherence 測定定義 (n=36)

自己報告(飲み忘れの報告)		22 件 (61.1%)
	内訳	
	過去 1 か月間のみ	6 件 (16.7%)
	過去 4 日間と 1 か月間	5 件 (13.9%)
	過去 4 日間のみ	3 件 (8.7%)
	過去 1 週間のみ	5 件 (13.9%)
	過去 3 日間と 1 か月間	2 件 (5.6%)
	過去 3 日間のみ	2 件 (5.6%)
	過去 15 日間のみ	1 件 (2.8%)
ピルカウント		6 件 (16.7%)
薬局の処方記録		3 件 (8.7%)
服薬事象監視システム		2 件 (5.6%)