

201318002A

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

海外から輸入される多剤耐性結核に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 全司

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告			
海外から輸入される多剤耐性結核に関する研究	岡田全司 (鈴木克洋)	-----	1
外国人結核対策マニュアルの作成		-----	58
外国人結核対策マニュアル(保健所向け)	下内 昭	-----	59
外国人結核対策マニュアル(医療者向け)(全国、東京)	小林信之、岡田全司	-----	67
II. 分担研究報告			
1. 多剤耐性結核とHIV合併の実態把握と対策	永井英明	-----	82
2. 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	加藤誠也	-----	85
3. 東京における外国人結核 —臨床像の推移と分子疫学解析—	小林信之	-----	90
4. 全国病院施設・保健所との連携による多剤耐性結核と HIV合併の実態把握と対策	藤田 明	-----	95
5. フィリピン、中国、日本における結核菌感染拡大阻止に関 する研究	服部俊夫	-----	99
6. 日本(大阪・神戸・西日本)における海外から輸入される 結核の実態把握及び分子疫学的解析	下内 昭	-----	104
7. 難治性結核の分子疫学解析	野内英樹	-----	108
8. ベトナム多剤耐性結核の宿主要因に関する研究	慶長直人	-----	112
9. 海外から輸入される多剤耐性結核に関する研究	櫻田紳策	-----	117
10. 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	竹田 潔	-----	119
11. HIV感染者における結核の実態調査と早期診断	青木孝弘	-----	121
12. 研究協力者研究報告		-----	126
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		-----	128
IV. 研究成果の刊行物・別刷		-----	131

平成25年度

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）

総括研究報告書

海外から輸入される多剤耐性結核に関する研究

研究代表者 岡田全司 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター・
臨床研究センター長
(研究分担者 鈴木克洋 統括診療部長)

研究要旨 (図1)

I. 日本の外国人結核

1. 外国人結核対策のガイドライン（国際的な協力も含め）を策定した。東京及び全国の外国人結核（2009年～2011年）の外国人結核診療マニュアル（第二版）を策定（小林、岡田等）。また大阪市における外国人結核対策マニュアルを策定（小向、下内、岡田等）。アジア諸国との結核対策共同ガイドライン（中国、Heping 博士等と）の作成が進展中。
2. 日本全国：2012年全国保健所528、結核病院262、合計790施設に2009～2011年の調査票（外国人結核）。90%の回答。2121例（重複なし）を解析（岡田）。外国人結核は年々増加。20代48%。国籍は中国、フィリピン、韓国の順。学生22.4%と著増。多剤耐性結核は4.4%で日本人結核0.7%に比べ6.4倍と高頻度。〔さらに（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通訳を増加（行政サービス15%）。③帰国者の減少。④治療中断・脱落者減少。（結核2012,2013, U W 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）51名/年。20代39%。学生36%。日本語学校健診必要。

3. 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：①国際医療研究セの外国人結核、2007年以降の6年間で前後半に分けて検討。国籍別では中国が最多。韓国が減少しフィリピンが増加。脱落者は減少し治療成績は改善。外国人株でRFP耐性と多剤耐性率が高率。②外国人結核91株および日本人結核菌168株の全ゲノムを次世代シーケンサーで決定した。外国人由来分離株は日本人株と異なり、菌株特異的一塩基多型の数も多く、外国人由来分離株が海外から持ち込まれたことが示唆。③東京都の外国人結核対策マニュアルを作成（2013）。（小林、切替）
4. 大阪市における外国出生結核患者の発生動向
① 2008～2012年に大阪で新規登録された外国人（外国出生）結核患者を対象とした。外国人は、20代に限ると2008年13.6%から2012年29.3%へと年々増加していた。性別は、日本出生者で男性の割合が多いのとは対照的に外国人では女性が多く約半数を占めており、2012年15名（44.1%）であった。年齢の中央値は2012年27.5歳であり、ここ3年は大きな変化は見られなかった。出身国は、5年間の合計では中国・韓国・フィリピンの順に多かったが、特に近年韓国が減少し、中国の増加がみられ

た。また入国から5年未満で登録された者は約半数を占めていた。日本語学校生の割合は、2008年には12.1%であったが、2012年には23.5%を占めていた。これらの結果よ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 大阪市の外国人結核対策マニュアル（2013）を作成。

II. 日本・中国・韓国・台湾の分子疫学研究

1. 東アジアに位置する日本、中国、韓国、台湾では、多くの人が観光・ビジネスでそれぞれの国を訪れている。その際、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。日本では結核患者の約5%が外国出生であるが、結核菌の由来を明らかにすることは対策上重要であることから、それぞれの国内で広まっている結核菌の特徴を調べて比較することにした。東アジアでは結核罹患率が先進諸国に比べて高く、結核菌の型別では台湾を除き北京型結核菌の割合が高いなど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、各国で広まっている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）分析法を利用した型別法で結核菌の解析を行った。本研究で樹立したSNPシステムは、リアルタイムPCRを利用して23箇所のSNPを検出するもので、結核菌を網羅的に解析することができる。今までの型別法では、北京型結核菌はNTF領域へのIS6110の挿入の有無で、ancient型とmodern型の2グループにしか分けることができなかった。しかし、本SNP分析システムで日本と台湾からの結核菌を分析すると、少なくともancient型は4グループ、modern型も5グループに分けることができた。このような解析により、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ので、今後注目する結核菌が由来した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）

III. アジア諸国の多剤耐性結核

1. 中国・黒竜江省の結核菌の解析では44例中42例（95%）は北京型であり、その中2例は新たな北京型を同定。さらに1,230株黒竜江省の結核菌の解析を行い、通常の抗結核剤に対する薬剤耐性株は58.4%でMDRは23.3%。さらにRv0679c点突然変異検出multiplex PCR法を開発し、非北京型と北京型を100%鑑別。（J. Clin. Mic. 2013）（服部）
2. フィリピン・マニラのサンラザロ病院の抗酸菌染色陽性菌は100% MTB complex。Spoligotypingでマニラ型。（Clin. Dev. Imm. 2012）（服部）
3. 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67%と高率（タイ平均21%）。③複十字病院の結核1958名中外国人結核5.7%で、そのうち多剤耐性結核患者26%と高率。（野内）
4. 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Mφ活性化を阻害し易結核感染（タイ）。③ハノイ市の潜在性結核感染者では健常者よりグラニューリシンの発現が低下。（Int. J. Med. 2013）④さらに、結核菌（H37Rv）殺菌後の培養液上清中の殺菌活性に関与している可能性があるdermicidin遺伝子の発現への関与について検討した。（タイ・ベトナム 櫻田）
5. ベトナム ホーチミン市で宿主側の要因を検討。結核感受性遺伝子の候補の一つとして注目され、機能的には細胞内シグナルに対して負の制御を行う脱リン酸化酵素であるdual specificity phosphatase 14遺伝子（DUSP14）の遺伝子多型と免疫関連遺伝子発現に関する検討を行った。免疫炎症制御に関連して注目されるDUSP14の遺伝子多型が、トランスの作用を通じて結核免疫にも関連している可能性が示された。（慶長）

IV. HIV合併

1. 国立病院機構 (NHO) 病院143施設に対して調査票を送り、2012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。143施設中76施設 (53.1%) から回答があった。総結核患者数は3502例であり、そのうちHIV合併者は10例 (0.29%) であった。結核患者におけるHIV感染症合併の頻度はやや低下した。2012年はHIV合併多剤耐性結核を認めなかった。(永井)
2. 全国のHIV (エイズ) 診療拠点病院、結核診療医療機関 (国立病院機構を除く)、保健所を対象に、2012年におけるHIV合併結核およびそのうちの多剤耐性結核症例の有無に関する調査を行った。その結果、HIV合併結核のうち多剤耐性結核はこの1年間で1例 (中国人) のみであり、国内のHIV感染者の間で多剤耐性結核が蔓延している状況はないと考えられた。医療機関からは合計32例のHIV合併結核症例が報告された。一方、保健所からの報告では結核新登録患者のうち0.28%がHIV合併結核であると報告された (多剤耐性結核は1例)。一方、結核診療医療機関における結核入院患者に対するHIVスクリーニング検査の実施率は「ほぼ全例実施」が7施設6.9%と少なく、今後、多剤耐性結核とHIV合併の実態を正しく把握するためには、結核患者においてHIV感染の有無を確認する必要がある。(藤田)
3. ① 国際医療研究セのHIV合併結核患者129例。男性91%、24%は外国籍。12%抗結核剤耐性。多剤耐性2%。 ② HIV合併結核患者のQFT-3G診断法は有用 (特異度高い) : HIV149例中QFT-3G陽性7例 (4.7%)。陽性全例結核。 ③ LTBI診断はQFT陽性。治療は全例INH。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 γ 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 γ 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/ μ L以下の症例では、判定できない症例も認めるため、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。
2. 結核菌感染により、肺組織でヒアルロン酸が蓄積した。ヒアルロン酸合成酵素HAS1、HAS3の発現が、結核菌感染によりマクロファージや肺胞上皮細胞で亢進した。ヒアルロン酸合成酵素HAS1の遺伝子欠損マウスは結核菌感染に対して高感受性であった。

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) 外国人結核対策のガイドライン (国際的な協力も含め) を策定した。東京及び全国の外国人結核 (2009年～2011年) の外国人結核診療マニュアル (第二版) を策定 (小林、岡田等)。また大阪市における外国人結核対策マニュアルを策定 (小向、下内、岡田等)。アジア諸国との結核対策共同ガイドライン (中国、Heping博士等) の作成が進展中。
- (2) 日本全国 : 2012年全国保健所528、結核病院262、合計790施設に2009～2011年の調査票 (外国人結核)。90%の回答。2121例 (重複なし) を解析 (岡田)。外国人結核は年々増加。20代48%。国籍は中国、フィリピン、韓国の順。学生22.4%と著増。多剤耐性結核は4.4%で日本人結核0.7%に比べ6.4倍と高頻度。〔さらに (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通訳を増加(行政サービス15%)。③帰国者の減少。④治療中断・脱落者減少。(結核2012,2013, U W Conf 2012)
- (3) 東京病院(豊田恵美子・岡田)では外国人結核50例解析。有空洞40%。多剤耐性結核2%。
 - (4) 神戸市の外国人結核(藤山理世・岡田)51名/年。20代39%。学生36%。日本語学校健診必要。
 - (5) 中国からの日本移民にスーパー・スプレッダー(S・S)多剤耐性結核(MDR-TB)発見。
 - (6) 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、フィリピンDayrit、ベトナムThuong博士等と確立した結核ネットワークで蓄積。

・研究分担者(小林信之) 研究協力者 切替照雄 ①国際医療研究セの外国人結核、2007年以降の6年間に前後半に分けて検討。国籍別では中国が最多。韓国が減少しフィリピンが増加。脱落者は減少し治療成績は改善。外国人株でRFP耐性と多剤耐性率が高率。 ②外国人結核91株および日本人結核菌168株の全ゲノムを次世代シーケンサーで決定した。外国人由来分離株は日本人株と異なり、菌株特異的一塩基多型の数も多く、外国人由来分離株が海外から持ち込まれたことが示唆。 ③東京都の外国人結核対策マニュアルを作成(2013)。

・研究分担者(下内昭) 研究協力者 松本健二、小向潤 ①2008~2012年に大阪市で新規登録された外国人(外国出生)結核患者を対象とした。外国人は、20代に限ると2008年13.6%から2012年29.3%へと年々増加していた。性別は、日本出生者で男性の割合が多いのとは対照的に外国人では女性が多く約半数を占めており、2012年15名(44.1%)であった。年齢の中央値は2012年27.5歳であり、ここ3年は大きな変化は見られなかった。出身国は、5年間の合計では中国・韓国・フィリピンの順に多かったが、特に近年韓国が減少し、中国の増加がみられた。また入国から5年未満で登録された者は約半数を占めていた。日本語学校生の割合は、2008年には12.1%であったが、2012年には23.5%を占めていた。これらの結果よ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大阪市の外国人結核対策マニュアル(2013)を作成。

・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23箇所のSNPを検出するためのリアルタイムPCR系を確立した。 ③今まで北京型結核菌は、modern型とancient型の2群にしか分けられなかったが、本SNPシステムで日本の株はmodern型が5グループ、ancient型は4グループに細かくグループ分けができた。

・研究分担者(永井英明) ①HIV合併結核症例の解析。2007~2011年の5年間で結核20,895例。HIV合併結核87例(0.42%)とほぼ一定。このうち多剤耐性結核3例。すべて男性、国籍は中国1例、日本2例で、CD4は100/pl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。INHのみ耐性3例、SMのみ耐性3例。 ②結核発病を契機にHIV陽性と判明した症例は61%。

・研究分担者(藤田明) ①HIV合併結核を調査。全国531保健所、248結核病院(国立病院機構を除く)、230 HIV診療拠点病院(国立病院機構を除く)を対象。 ②2007~2011年菌陽性121例(二次調査)中、多剤耐性結核1例(0.8%)、INH耐性8.3%、RFP耐性が1.7%(外国人)。 ③HIV抗体検査なしの結核医療機関6割。 ④結核病棟がないHIV拠点病院で排菌陽性疑い患者に個室や専用室を利用。

・研究分担者(服部俊夫) ①中国・黒竜江省の結核菌の解析では44例中42例(95%)は北京型であり、その中

2例は新たな北京型を同定。さらに1,230株黒竜江省の結核菌の解析を行い、通常の抗結核剤に対する薬剤耐性株は58.4%でMDRは23.3%。さらにRv0679c点突然変異検出 multiplex PCR法を開発し、非北京型と北京型を100%鑑別。(J. Clin. Mic. 2013) ② フィリピン・マニラのサンラザロ病院の抗酸菌染色陽性菌は100% MTB complex。Spoligotypingでマニラ型。(Clin. Dev. Imm. 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)。 ② HIV感染は、ビタミンDのMφ活性化を阻害し易結核感染(タイ)。 ③ハノイ市の潜在性結核感染者では健常者よりグラニューリシンの発現が低下。(Int. J. Med. 2013) ④さらに、結核菌(H37Rv)殺菌後の培養液上清中の殺菌活性に関与している可能性があるdermicidin遺伝子の発現への関与について検討した。

・研究分担者(慶長直人) ベトナム ホーチミン市で宿主側の要因を検討。結核感受性遺伝子の候補の一つとして注目され、機能的には細胞内シグナルに対して負の制御を行う脱リン酸化酵素であるdual specificity phosphatase 14遺伝子(DUSP14)の遺伝子多型と免疫関連遺伝子発現に関する検討を行った。免疫炎症制御に関連して注目されるDUSP14の遺伝子多型が、トランスの作用を通じて結核免疫にも関連している可能性が示された。

・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67%と高率(タイ平均21%)。 ③複十字病院の結核1958名中外国人結核5.7%で、そのうち多剤耐性結核患者26%と高率。

・研究分担者(青木孝弘) ①国際医療研究セのHIV合併結核患者129例。男性91%、24%は外国籍。12%抗結核剤耐性。多剤耐性2%。 ②HIV合併結核患者のQFT-3G診断法は有用(特異度高い): HIV149例中QFT-3G陽性7例(4.7%)。陽性全例結核。 ③LTBI診断はQFT陽性。治療は全例INH。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γ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γ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/μL以下の症例では、判定できない症例も認めるため、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。

・研究分担者(竹田潔) 結核菌感染により、肺組織でヒアルロン酸が蓄積した。ヒアルロン酸合成酵素HAS1,HAS3の発現が、結核菌感染によりマクロファージや肺胞上皮細胞で亢進した。ヒアルロン酸合成酵素HAS1の遺伝子欠損マウスは結核菌感染に対して高感受性であった。

・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)

研究分担者

永井英明
国立病院機構東京病院
呼吸器内科
外来診療部長

加藤誠也
公益財団法人結核予防会結核研究所
副所長

小林信之
国立病院機構東京病院
統括診療部長

藤田 明
東京都保健医療公社 多摩北部医療センター
副院長

服部俊夫
東北大学災害科学国際研究所
災害医学研究部門 災害感染症学分野
感染病態学
教授

下内 昭
公益財団法人結核予防会結核研究所
主幹

野内英樹
公益財団法人結核予防会複十字病院
臨床検査診断科
科長

慶長直人
公益財団法人結核予防会結核研究所
生体防御部
部長

櫻田紳策
国際医療研究センター研究所
国際医療協力局派遣協力課
派遣協力専門職

竹田 潔
大阪大学大学院医学系研究科
感染免疫医学講座免疫制御学
教授

青木孝弘
国立国際医療研究センター病院
エイズ治療・研究開発センター
医師

鈴木克洋
国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
統括診療部長

表1

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)
 岡田全司班 平成25年度 第一回班会議
 「海外から輸入される多剤耐性結核に関する研究」

研究代表者	岡田 全司	国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター センター長
研究分担者	永井 英明	国立病院機構東京病院 外来診療部長
	加藤 誠也	公益財団法人結核予防会結核研究所 副所長
	小林 信之	国立病院機構東京病院 統括診療部長
	藤田 明	東京都立保健医療公社 多摩北部医療センター 呼吸器科 副院長
	服部 俊夫	東北大学 災害科学国際研究所 教授
	下内 昭	公益財団法人結核予防会結核研究所 主幹
	野内 英樹	公益財団法人結核予防会複十字病院 臨床検査診断科長
	慶長 直人	公益財団法人結核予防会結核研究所生体防御部 部長
	櫻田 紳策	国際医療研究センター研究所国際医療協力局派遣協力課
	竹田 潔	大阪大学大学院 医学系研究科感染免疫医学講座 免疫制御学 教授
	青木孝弘	国際医療研究センター病院エイズ治療・研究開発センター医師
	鈴木 克洋	国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 統括診断部長

表2

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)
 岡田全司班 平成25年度 第一回班会議
 「海外から輸入される多剤耐性結核に関する研究」

研究協力者	切替照雄	国立国際医療センター感染症制御研究部 部長
	前田伸司	結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部結核菌情報科長
	高鳥毛敏雄	関西大学 社会安全学部 教授
	松本 健二	大阪市保健所 感染症対策監
	小向 潤	大阪市保健所 感染症対策課医長
	藤山理世	神戸市中央区保健福祉部 医務担当部長
	中島 俊洋	ジェノメディア株式会社 取締役・CEO
	赤川 清子	北里大学生命科学研究所 客員教授
	螺良 英郎	(財)大阪結核研究会 理事長
	露口 一成	国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター 部長

表3

5. 研究組織情報	
研究者名	分担する研究項目
岡田全司	研究の統括。 多剤耐性結核の診断・治療の確立。海外から輸入される多剤耐性結核の分子疫学と対策研究。 多剤耐性結核とHIV合併の実態把握と対策。(国立病院機構ネットワークを活用した)
永井英明	多剤耐性結核とHIV合併の実態把握と対策。(国立病院機構ネットワークを活用した)
加藤誠也	韓国と中国及び台湾と日本とのネットワークによる結核・多剤耐性結核分子疫学共同研究
小林信之	日本(東京・東日本)における海外から輸入される結核の実態把握および分子疫学的解析。
藤田 明	全国病院施設・保健所との連携による多剤耐性結核とHIV合併の実態把握と対策。
服部俊夫	中国及びフィリピンとの研究ネットワーク活用による多剤耐性結核の分子疫学的解析及びHIV合併結核研究。

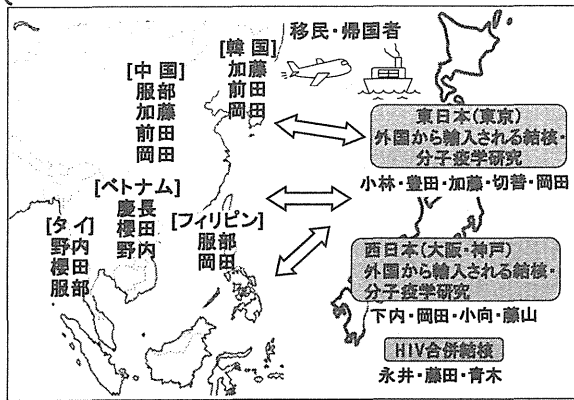
表4

5. 研究組織情報	
研究者名	分担する研究項目
下内 昭	日本(大阪・神戸・西日本)における海外から輸入される結核の実態把握及び分子疫学的解析。
野内英樹	タイ及びベトナムとの結核研究ネットワーク活用による多剤耐性結核の分子疫学解析とHIV合併結核研究。
慶長直人	ベトナムとの結核研究ネットワーク活用による多剤耐性結核の分子疫学・宿主要因解析。
櫻田紳策	タイ及びベトナムとのネットワーク活用による多剤耐性結核とHIV合併結核の宿主要因・分子疫学的解析。
竹田 潔	外国から輸入される多剤耐性結核治療の確立。
青木孝弘	HIVによるT細胞免疫不全解析及びHIVに合併する結核研究と対策。
鈴木克洋	国立病院機構呼吸器ネットワークを活用した多剤耐性結核の迅速診断・隔離法開発。

図1

海外から輸入される多剤耐性結核に関する研究

目的
日本の外国人結核等の実態把握と分子疫学、HIV合併結核研究とアジア諸国のネットワーク活用による多剤耐性結核制御



期待される効果

1. 結核・多剤耐性結核の日本への流入・蔓延防止
2. 外国人結核・多剤耐性結核の減少・早期発見
3. HIV合併結核の減少
4. 多剤耐性結核 新しい迅速診断・入院法
5. アジア諸国の結核減少
6. 医療費節減
7. 国際貢献

研究方法・日本

1. 海外から輸入される多剤耐性結核(日本の外国人結核)実態調査と分子疫学解析
岡田, 小林, 下内, 豊田, 加藤, 切替, 前田, 小向, 松本
2. 日本・中国・韓国・台湾結核菌分子疫学解析
加藤, 前田
3. アジア諸国の多剤耐性結核・分子疫学研究, HIV合併結核
岡田, 加藤, 服部, 野内, 慶長, 櫻田
4. HIV合併結核の把握
永井, 藤田, 青木
5. 新しい多剤耐性結核迅速診断入院法
鈴木, 露口, 竹田, 岡田
6. 外国人結核の多いアジア諸国の結核対策情報収集 (岡田, 服部, 加藤, 野内, 慶長, 櫻田)

研究成果

I. 日本の外国人結核

1. 本邦の外国人結核の実態把握と対策。
(1) 全国の外国人結核調査票(2012年)にて2121例解析(岡田)。(2009~2011年全国保健所・病院 790施設) 年々増加。中国国籍、フィリピン、韓国の順。学生22%と著増。多剤耐性結核は4.4%と高頻度。日本人の6.4倍。(2) 東京(小林, 豊田): MDR-TB多し。東京都外国人結核マニュアル作成 (3) 大阪(下内): 学生が多く35% (50%以上日本語学校生)、学生健診強化の必要。大阪市外国人結核マニュアル作成 (4) 中国から日本移民にS・S MDR-TB。
2. 分子疫学研究(小林, 切替, 岡田)
外国人結核菌株のRFLP解析: クラスターI(中国, 韓国 多)と, IIを形成。外国人結核菌91株と日本人結核167株の全DNA解読: 外国人株は日本人株と異なり、菌株特異的一塩基多型の数も多く、外国人株は海外から持ち込まれたことが示された。

II. 日本・中国・韓国・台湾分子疫学研究

1. VNTR解析で、日本、韓国の結核菌は“祖先型”、中国は“蔓延型”、韓国はRD181陽性で日、中、韓、台の結核菌は各々区分可能な発見。(加藤・前田)
2. さらに全23箇所のSNP検出リアルタイムPCR系を確立。
3. 今まで北京型結核菌は、modern型とancient型の2群にしか別けられなかったが、本SNPシステムで日本株はmodern型は5群、ancient型は4群に細かくグループ分けができた。

IV. HIV合併結核

1. HIV合併結核症例の解析。国立病院機構: 結核20,845例中HIV合併結核0.4%。このうちHIV合併多剤耐性結核3.4%。粟粒結核や死亡例。HIV合併多剤耐性結核は治療に難渋(永井) 国立病院機構以外: HIV合併結核121例中多剤耐性0.8%。HIV抗体検査なしの結核医療機関6割(藤田)
2. HIV合併結核129例(国際医療セ) 外国籍24%、多剤耐性結核2%。HIV合併結核患者におけるQFT-3G診断法は有用(特異度は高い)。(青木)

V. 多剤耐性結核に対する迅速診断の開発

rpoB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・露口)

III. アジア諸国の多剤耐性結核

1. タイ: MDR-TB再発例で23%と著増。HIV合併結核493名中活動性結核16%(野内)。再発結核患者では血清granulysin (Gra) 低下(櫻田)。TBGL診断有用(服部)
2. 中国東北部: 治療歴なしで薬剤耐性結核58%と高率。多剤耐性結核で治療歴あり60%と高率。(服部)
3. ベトナム: INH代謝NAT2遅延型は多剤耐性結核で多い(慶長)。潜在性結核はGra値低下発見(櫻田)。
4. フィリピン: 結核の疫学、診断(服部)

VI. アジア諸国の結核対策・治療システム

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(岡田・加藤・服部・野内・慶長)を中国 Heping、韓国 Cho、タイ Srisin、フィリピン Dayrit 博士等と、すでに確立した結核ネットワークで行った。アジア諸国との結核対策共同ガイドライン作成中。

A. 研究目的 (図1) (表5)

1. 近年、海外から輸入される多剤耐性結核が問題。
2. したがって
 - (1) 海外から輸入される多剤耐性結核 (日本の外国人結核・帰国者の結核) の分子疫学的解析 (表5、図1)
 - (2) 日本・中国・韓国・台湾の結核菌分子疫学研究
 - (3) アジア諸国の多剤耐性結核
 - (4) 多剤耐性結核とHIV合併の把握 (図1)
 - (5) 多剤耐性結核の迅速診断法・迅速治療法の確立 (図1) と多剤耐性結核の治療法 (化学療法等) の確立 (図1)
 - (6) アジア諸国の結核対策研究ネットワークを活用したアジア諸国の結核対策治療システム (図1、図2)

具体的には (図3、4、5、6)

- (1) 観光やビジネス等に伴う人の移動によって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が考えられる。

欧米諸国では既に反復配列多型 (VNTR) 法を利用した標準型別システムが、フランスパスツール研究所のSupplyらによって報告されている。また、北京型結核菌が他の系統と比べて病原性が高いこと、多剤耐性菌へ変化しやすいことなどが報告されている。一方、東アジアの国々では、欧米で主流となっている遺伝型の結核菌とは異なる北京型結核菌の割合が高く、この株に対する国際標準VNTRシステムでの型別能は低いことがわかっている。そのため、東アジア諸国で共通で利用できる結核菌型別システムの構築を目指して共同研究を開始した。

昨年までの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と考えられる。このための型別法として、次世代シーケンサーによる結核菌の全ゲノム解析から得られた一塩基多型 (SNP) を

用いた型別法を利用した分析システムの構築を進めた。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、もっと安定した遺伝系統 (型別情報) を提供するものと期待される。

各国、各地域から結核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体制をつくることができる。

- (2) わが国における外国人結核の割合は日本人結核とは逆に増加傾向にある。2012年より結核の統計分類が変更になり (外国生まれ、日本生まれ、不明)、2012年の外国生まれの結核患者数は1000人を超えた。外国国籍、外国生まれを合わせて外国人結核患者として扱うと、2012年の外国人患者の新登録結核患者数に占める割合は5.2%であり、若年層、とくに20歳代では37.0%にまで増加した。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懸念されている。実際、岡田班の第2次調査では外国人結核の4.4%が多剤耐性であり、日本人結核に比べて高率であることが明らかとなった。また、同調査では都道府県別にみて、最も多くの外国人結核が発症しているのは東京都であった。国立国際医療研究センターは東京都新宿区に位置し、東京都各地域の外国人結核患者を扱っている。本年度の研究では、東京における外国人結核の臨床像の経年的推移を明らかにするとともに、薬剤耐性について日本人結核患者と比較検討する。また、外国人結核患者が母国で感染してわが国に入国したのか、わが国で結核を感染したのかを推定することを目的に、外国人由来結核菌の分子疫学調査を実施する。
- (3) フィリピン、中国、日本における結核菌 (MTB) 遺伝子型の同定によりアジア諸国間での結核菌の感染ルートを解析し感染の拡大を阻止する手立てを講ずることを目指した。またバイオマーカーを用いて各国の結核患者の免疫反応の特徴

表5

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(平成25年度)

海外から輸入される多剤耐性結核に関する研究

研究代表者
岡田全司 (独)国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター長 研究の統括

研究分担者・研究目的

I	日本における外国人結核の実態把握と分子疫学解析 小林信之 (国際医療研究センター) 東日本(東京) 岡田全司 下内 昭 (結核研究所, 大阪市保健所) 西日本(大阪・神戸)	
II	日本・中国・韓国・台湾との結核分子疫学研究(研究ネットワークを活用した) 加藤誠也 (結核研究所) 中国、韓国、台湾の結核菌分子疫学・日本の結核菌と比較	
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(研究ネットワークを活用した) 服部俊夫 (東北大学) 中国、フィリピンの実態調査と分子疫学 野内秀樹 (結核予防会複十字病院) タイの結核菌分子疫学 慶長直人 (国際医療研究セ) ベトナム宿主要因 櫻田紳策 (国際医療研究セ) タイ・ベトナム	
IV	HIV合併結核 永井英明 (国立病院機構東京病院) 国立病院機構ネットワーク活用HIV合併結核 藤田 明 (東京都多摩北部医療セ) 全国病院施設・保健所 青木孝弘 (国際医療研究セ) HIVによる免疫不全と結核	
V	多剤耐性結核に対する迅速診断・新治療剤の開発 鈴木克洋 (近畿中央胸部疾患セ) 多剤耐性結核迅速入院法 竹田 潔 (大阪大学) 新しい結核治療剤開発	
VI	アジア諸国の結核対策・治療システム 岡田、加藤、服部、野内、慶長	

表6

研究方法

アジア諸国のネットワークの活用による
多剤耐性結核・HIV合併結核制御

必要性

1. 日本国内への結核流入・蔓延防止。
2. 日本の外国人結核は年々増加。集団感染。
3. 日本のHIV増加。HIV合併多剤耐性結核は難治性。
4. 多剤耐性結核の迅速診断・迅速隔離重要。世界で50万人。莫大な費用。新治療剤必要。

を特定し適切な結核治療ガイドラインの作成に役に立つと思われる。北京型特異的配列を有するRv0679c抗原の変異・非変異型蛋白、あるいは

は変異領域を含むoverlapping peptideでMTBの北京型と非北京型を宿主反応から検出することを目標にした。

- (4) 外国人結核の特定の結核菌株蔓延示唆。患者が多い新宿区の分子疫学調査が重要。

低蔓延の欧米先進諸国では結核患者の半数以上を外国出身者が占めている。これは国際交流がすすみ、人の行き来や交流のなかで起こってくる事態である。自国の高齢者が結核の半数以上を占めている日本でも、20代の結核患者では外国籍の患者が28.2%を占めており、83.4%が5年以内の発病であるという。高蔓延の母国で感染し、他国でのストレス等の要因で発病という一連の病態は納得しやすい説明である。実際には結核で入院治療する外国人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変わらないが、言葉の問題や服薬支援ではより力を注ぐ必要がある。また結核の2大問題であるHIVと多剤耐性に注目し実態に迫りたい。

- (5) ① 大阪市における外国出生結核患者の発生動向

2008年以降に大阪市において登録された全結核患者に占める外国人（外国出生）の割合は、全年齢で見ると3%前後で大きな変化はみられなかったが、20代に限ると2008年13.6%から2012年29.3%へと年々増加していた。外国人結核対策に資するため、大阪市において外国出生結核患者の発生動向を調査した。

- ② 日本語学校に在籍する外国出生者に対する結核健診

2013年現在大阪市には34校の日本語学校があり、うち専修学校（健診義務あり）は13校、その他（健診義務なし）は21校であった。2011年4月より、健診義務の対象となっていない者（専修学校以外の学校および専修学校のうち短期コースの者）に対する健診を実施している。

- ③ 外国出生結核患者由来菌株のVNTR解析

外国出生患者由来結核菌株のVNTR解析をすることにより、国内での伝播状況を考察した。

- (6) 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、結核中蔓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。

- (7) 多剤耐性結核は治療の難しい結核であるが、HIV感染を合併していると予後が悪いことが海外から報告され、院内集団感染事例では死亡率がきわめて高い（死亡率72～98%）。国内では近年、村上・加藤ら、村松ら、千葉らによって3本のHIV合併結核に関する臨床検討が報告されている。それによると、外国人の割合は17～29%であり、結核全体の外国人比率よりも多い。多剤耐性結核菌については、千葉らの報告では、2/129例1.6%（1996～2010年のエイズ治療・研究開発センターにおける症例）また、全国HIV感染合併結核症アンケート調査報告（2003～2006年に診療）は3/105例2.9%で認められた。そこで日本における多剤耐性結核とHIV合併についてその実態を詳細に把握することを本研究の目的として、平成25年度も23年度からの研究を継続した。

- (8) ① HIV感染者が結核菌に暴露した場合、その発症の確率は1年間に5から10%と推定されており、HIV非感染者が生涯で5から10%の発症率であることと比べると非常に高い。また、HIV感染者の結核による死亡率は、HIV非感染症例の約2倍と高値であり、HIV患者において結核は重要な合併感染症である。結核発症率が有意に高いHIV感染者における結核の実態を把握することで、結核の蔓延の予防につながると考えられる。

本研究の目的は、HIV合併結核患者の患者背景、HIV感染の状態、HIVおよび結核の治療経過を後視的に検討することで、HIV合併結核患者の実態を把握することにある。国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センターでは、平成8年以後に約130症例の結核合併HIV感染の症例を経験しており、当センターでの症例を調査することで、本邦のHIV合併結核に重要な知見となると考える。

- ② 結核の診断に関しては、本邦でもBCGの影響を受けない客観性を有する検査であるインターフェロン γ 遊離試験（Interferon γ Releasing Assay、以下IGRA）がツベルクリン反応に代わり施行されるようになった。IGRA法にはクオンティフェロン（QFT）とT-spot TBの2種類がある。第3世代QFTであるクオンティフェ

ロンTBゴールド（以下QFT-3G）が、本邦でも平成22年4月1日より保険診療で行なえるようになった。本邦は結核中蔓延国であり、結核診断においてIGRAに関する報告は多数あるが、HIV感染合併結核におけるQFT-3Gの報告は限られている。

QFT-3Gは、非HIV感染者におけるQFT-3Gの感度が90%以上であるのに対し、HIV感染者では、QFT-3Gの感度が80%前後とする報告もある。以上より、HIV感染者においてQFTが陽性、判定保留、判定不可となった患者の背景を検討することで、HIV感染者におけるQFT-3Gの検査特性を検討できると考えられる。

次世代IGRAであるQFT-3GのHIV感染者における検査特性の解明と本邦独自の新たなHIV感染者での診断法としての検討を行なうことを目標とした。

③平成24年11月より同じIGRAの1つであるT-スポット TBが本邦でも保険収載され利用可能となった。QFT-3Gと比較しT-スポット Tbは感度・特異度ともに高いとされているが、本邦でHIV感染者における両検査の比較検討は施行されていない。

そこで、平成25年度は、当センターの初診HIV感染者及び抗酸菌症と確定した当センターの通院中のHIV感染者を対象とし、QFT-3GとT-スポット TBを施行することで、両検査の感度・特異度などの比較検討を行う。

HIV感染者における2種類のIGRAの診断法としての有用性を明らかとすることを目標とする。HIV合併結核に関する診療ガイドライン策定の際の基礎データとなると考える。

- (9) 多剤耐性結核の多数発症が日本・世界（特にアジア地域）で大問題。有効な治療法なし。
- (10) 多剤耐性結核菌に対する宿主側の防御機構と菌側の要因との両面からの解明が切望。
- (11) 海外から輸入される多剤耐性結核・HIV合併結核の実態把握と分子疫学的解析で対策・成果。
- (12) アジア諸国（特に韓国、中国、台湾）との研究ネットワークを活用し、海外から流入する結核菌株を迅速に把握するシステム（分子疫学解析）構築。結核菌型別データベース構築。
- (13) 日本における外国人結核の分子疫学解析による特定菌株蔓延の解析と治療実態把握。国際医

療研・国立病院機構・保健所・結研の全国研究。外国人同士や日本人への感染伝播分析。

- (14) 多剤耐性結核の診断の遅れは、患者本人の治療失敗に加えて周囲への感染拡大につながるため、迅速な感受性検査はきわめて重要である。ジェノスカラー-Rif-TB は、喀痰中の結核菌に存在する RFP 耐性遺伝子である *rpoB* 遺伝子領域の変異をラインプローブアッセイで検出することによる RFP 耐性迅速診断法であり、24 時間以内に結果を得ることができる。RFP 耐性結核の大部分は多剤耐性結核であるため、本法は多剤耐性結核のスクリーニング法としても期待できる。我々は本法の従来法との相関、有用性につき検討した。
- (15) 多剤耐性結核、難治性結核患者の前向きコホートを含めた人と菌の検体バンクを活用し、日本への伝播も検討した疫学研究を目的とした。岡田班本体「海外から輸入される多剤耐性結核に関する研究(H23-新興一般-002)」が掲げる①海外から輸入される多剤耐性結核の分子疫学的解析、②HIV合併の把握、③多剤耐性結核の診断・治療に対応し、タイ NIH という日本が建設してアジアの中心研究機関に育てるネットワークを活用する。前岡田班時代より進めている多剤耐性結核を含む難治性結核(再発、治療失敗、慢性排菌例)患者の正常治癒例と比較した検体バンクとコホートを、日本には少ない HIV 感染毎の情報も持ちながら補強し、前記の研究目的の為の疫学研究を遂行した。
- (16) わが国に居住している外国人のうち、アジア系の集団は 70%以上を占めることが知られている。このためアジア人の結核対策は外国人結核対策の主要部分を占める。さらに日本人の結核発症者の中で多剤耐性結核の占める割合は低い、アジアを含む発展途上国では、治療歴のない患者でも数%以上の頻度で多剤耐性結核が認められるのが通例であり、今後、外国人結核対策がわが国の多剤耐性結核対策の重要な部分を占めるようになるのではないかと懸念されている。

このような背景のもと、アジア人における発症増加が危惧される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地域全体の結核対策に貢献するものと期待される。

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。

DUSP14 は二重特異性タンパク脱リン酸化酵素 (DUSP)ファミリーに属し、リン酸化により活性化となったMAPキナーゼ(MAPK)のリン酸化セリン/スレオニンとリン酸化チロシンとともに脱リン酸化し、MAPK を不活性化状態に戻す、ネガティブ・フィードバックの働きを有しており、サイトカインの発現量を調節するなど、重要な免疫炎症制御の役割を担っていると考えられている。Barreiroらは実際に *in vitro* で *DUSP14* の機能的 SNP である rs712039 と主要な免疫系サイトカインである TNF- α および IFN- γ の産生量が有意に関連している(トランスに働いている)ことを報告している。我々は、regulatory SNP により規定される *DUSP14* の発現量の違いが結核免疫の個体差、さらに多剤耐性結核の病態に関与している可能性を考え、多剤耐性結核患者の血液中で、SNP rs712039、あるいは同価の SNP がシスに働き、*DUSP14* の遺伝子発現量を調節していること、また同 SNP がトランスに働き、免疫関連分子や炎症性サイトカイン の発現量を制御しているか否かを検討した。

- (17) 活性化型マクロファージ (M-M ϕ) における活性化型ビタミン D₃ 関連遺伝子発現について確認を行うとともに、活性化型ビタミン D₃ の存在とは無関係に H37Rv 殺菌後に培養上清に現れる dermicidin について検討を行う。活性化型マクロファージによる結核菌殺菌のエフェクター分子が同定され、そのような分子の産生に関わる因子が同定されることによって、結核菌感染初期の封じ込めのメカニズムが明らかとなり、結核の診断及び治療に対して資するところがある。
- (18) 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。これまでに、マウスを用いた我々の解析から、リポカリン2やSLPIなどの分子群が、結核感染における自然免疫応答で重要な役割を担っていることが明らかになっている。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。

■ FIGURE 1.1
Estimated number of new TB cases, by country, 2007

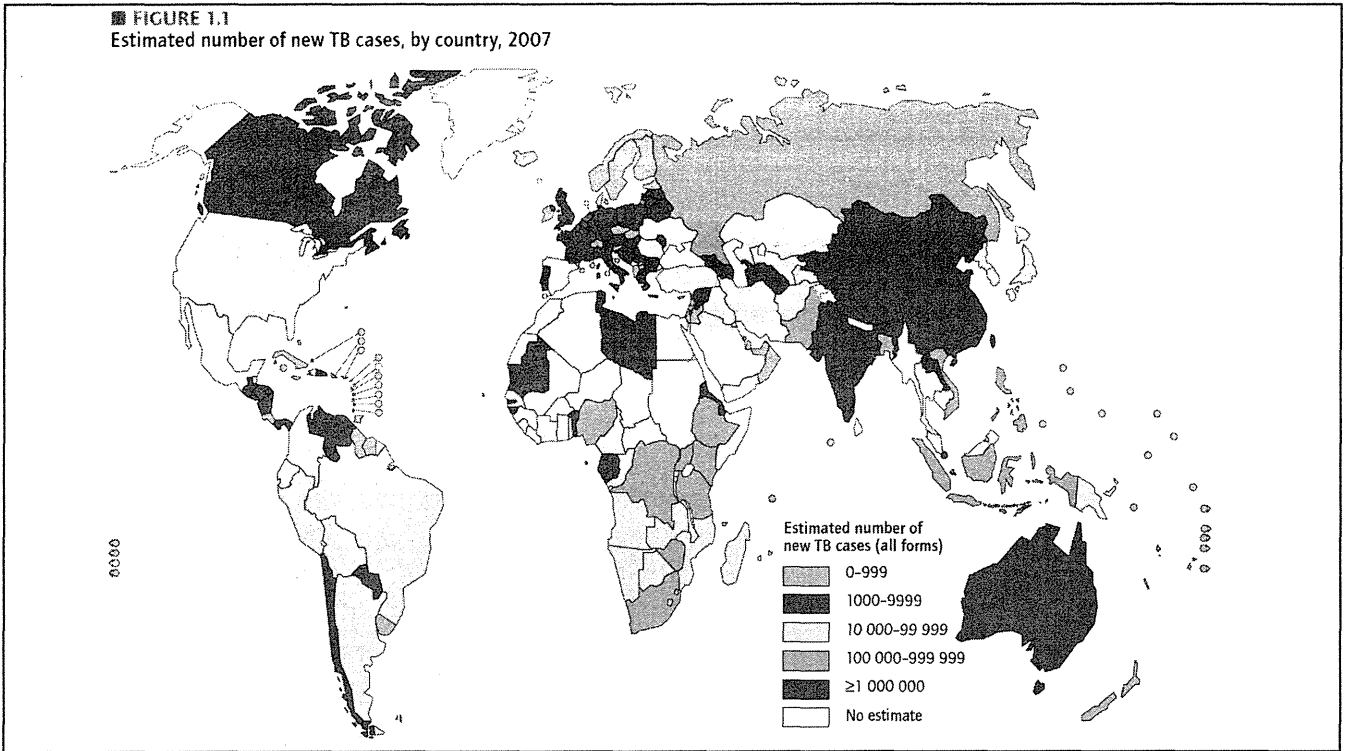


図2

[1] 海外から輸入される多剤耐性結核の分子疫学的解析

アジア諸国の結核菌遺伝子解析による感染伝播菌解明

【平成23～25年度計画】

中国株、韓国株、日本株、台湾株
分離可能の発見

結核菌	中国	韓国	日本	台湾
北京型				
蔓延型	○			
祖先型				
RD181(+)		○		
RD181(-)			○	
非北京型				○

(Kato, J. Med Micro. 2010)

1. 左表の如く日本・中国・韓国・台湾の結核菌感染では、出身国(母国)を遺伝子解析同定しうる発見をした。
2. アジア諸国20カ国(ベトナム、フィリピン、タイ、インド等)にこの遺伝子解析を応用する。
3. 多くのアジア諸国の結核菌を区分する方法を開発する。
⇒感染伝播結核菌の母国からの入国等重点対策がたてられる。

図3

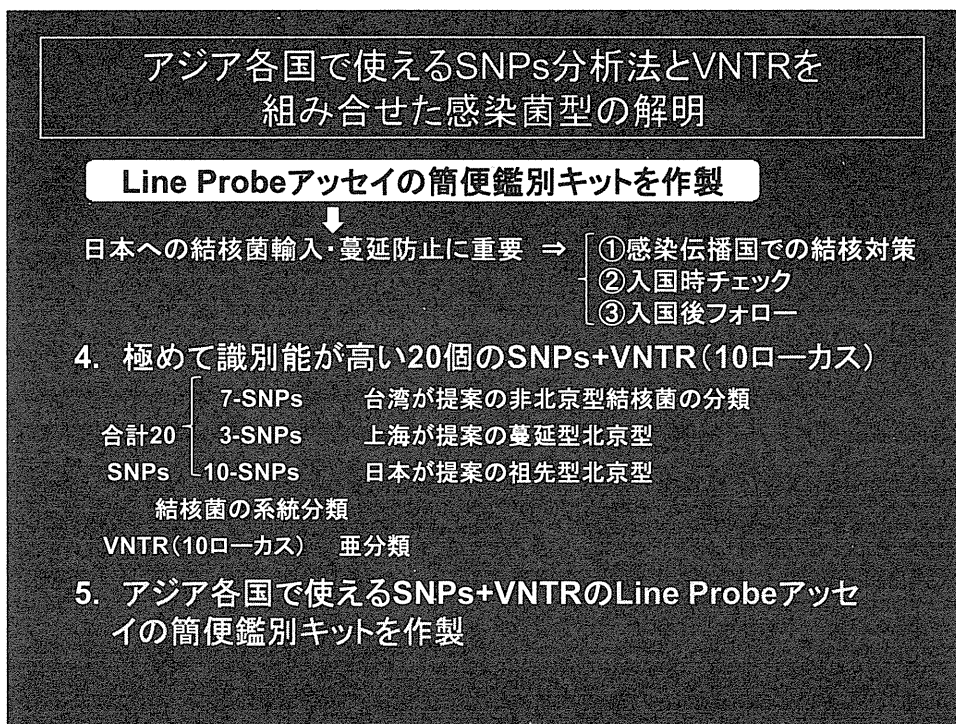


図4

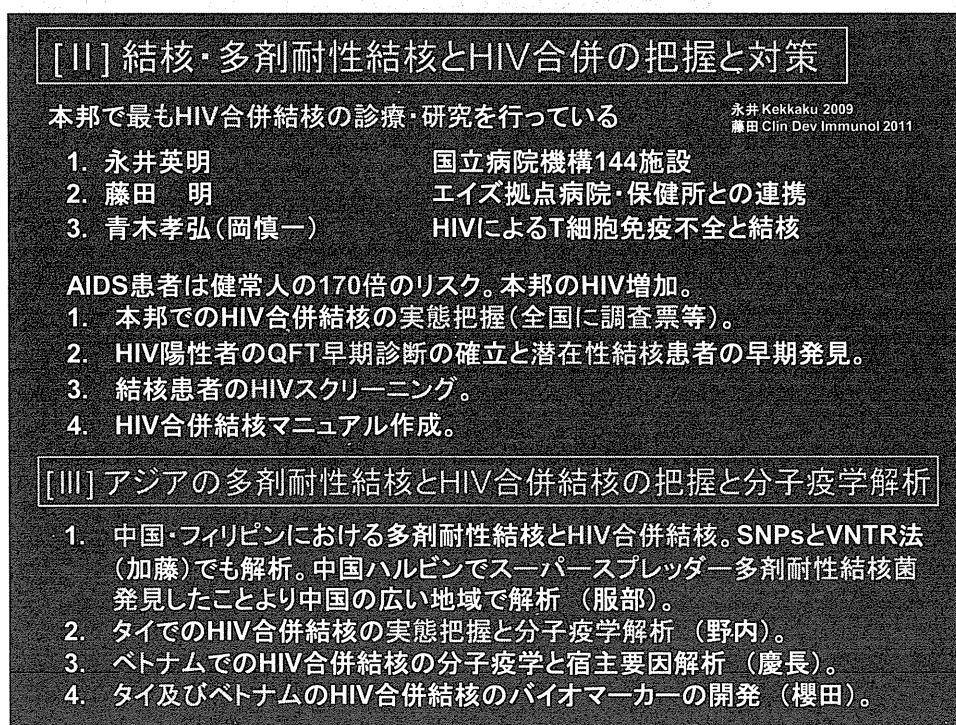
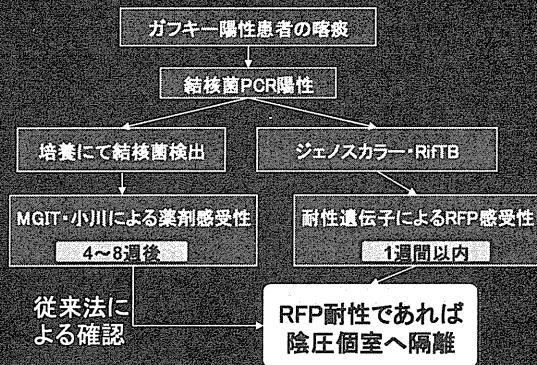


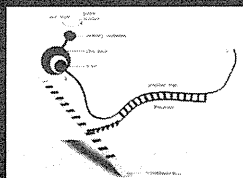
図5

[IV] 多剤耐性結核迅速診断・迅速入院(隔離)法

迅速入院法確立



- 1.初めての発見。現在6病院。
- 2.通常の方法では診断に30日以上。本法では5日以内。
⇒多剤耐性結核の蔓延・感染をブロックできる。
- 3.これを本邦270の結核診療施設に普及。
- 4.この診断法の簡易化、自動化。



診断法の簡易化・自動化

Line Probe assay

(鈴木、露口、岡田 Kekkaku 2008, 2009)

図6

B. 研究方法 (図1) (表6)

1. 海外から輸入される結核菌・多剤耐性結核菌の分子疫学研究

(1) リアルタイムPCRを利用したSNP分析システムの構築

次世代シーケンサーを使った結核菌株の分析から明らかになったSNP部位を遺伝系統毎に選択して、結核菌を遺伝系統的に型別するSNP分析システムを作成した(図4)。SNP部位の塩基は、リアルタイムPCRを利用した分析系で検出した。本システムを使って各国で分離された結核菌(200株以上)の解析を行った。

日中韓台分子疫学研究会議

平成26年1月14-15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、結核研究所で樹立した23か所の全系統の結核菌を網羅的に分析できるシステムを採用した。本研究所で各SNP部位の塩基検出のためのリアルタイムPCR用のプライマーやプローブ及び変異の入った陽性コントロールを準備して参加施設に送付した。

(2) 日本の外国人結核・帰国者結核の分子疫学解析と対策。

(a) 日本の外国人結核患者を最もよく診療・分子疫学解析研究する小林・切替・豊田(東京・東日本)、下内・和田(大阪・西日本)等により分子疫学(VNTR等)・対策構築。

(b) 国立病院機構(岡田)、国際医療研セ、保健所、結研で全国レベルで行う。全国の外国人結核の菌株をVNTRで解析し、特定の菌株蔓延があるか解明する。

当班で新たに外国人結核調査票を作成した。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)。

国立国際医療研究センターにおいて2007年1月から2012年12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年間を前半(2007-2009年)と後半(2010-2012年)に分けて、それぞれの項目を比較検討した。結核菌の薬剤感受性に関しては、同期間における日本人結核菌株の感受性結果と比較した。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、外国人結核患者由来91株、および性別、年齢をマッチさせた日本人結核患者168名から分離された結核菌のゲノムDNAを抽出し、MiSeq(Illumina Inc.)を用いて全ゲノム配列を決定した。Illuminaの配列の解析にはCLC genomics workbench ver.6.5(CLC bio)を用いた。*in silico* genotypingは、Gagneux S.らの定義を用いて、Indo-Oceanic(Lineage 1)、East Asian(Lineage 2 or Beijing)、East African-Indian(Lineage 3)、Euro-American(Lineage 4)、West African I(Lineage 5)およびWest African II(Lineage 6)の系統分類を行った(Gagneux S.*et al.*,2006)。北京型結核菌は、NTF領域へのIS6110の挿入および*mutT2*遺伝子のGly58Argの変異の有無によってmodern型とancestral型に分類した。系統樹は、PhyML3.0を用いて最尤法で作製した。

(3) ① 大阪市における外国出生結核患者の発生動向

2008年~2012年に大阪市中で新規登録された外国人(外国出生)結核患者の発生動向を調査した。性別・年齢・出身国・入国から結核登録までの期間・職業について解析した。

② 日本語学校に在籍する外国出生者に対する結核健診

2013年に実施した日本語学校16校に所属する外国出生者への結核健診について、受診者の年齢・性別・出身国・健診結果・精密検査結果を分析した。最終的に活動性結核と診断された者のうち、大阪市中において登録された者については、来日から健診受