

難治性結核の分子疫学解析

(Molecular epidemiology study on recurrence TB in Thailand and Japan)

研究分担者 野内英樹 公益財団法人結核予防会複十字病院臨床検査部臨床検査診断科長

研究要旨

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。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 解析法では、EAI 株が 524 人から 531 株(39.8%)、非 EAI 株として、北京株が 591 人より 595 例(44.6%)、Euro-American 株が 184 人より 187 株(14.0%)、CAS 株が 11 人より 11 株(0.83%)、その他 9 人より 9 株(0.68%)であった。この結核患者 1319 人での 1 年間での死亡に関しての危険因子を見たところ、Cox-Proportional ハザード比モデルによる単回帰解析で、EAI 株による結核患者が非 EAI 株による患者よりハザード比で 2.7 倍 1 年死亡の危険が高かった。EAI 株は死亡率が高い事が多い年齢が高い群で比率が大きいため、年齢や HIV 感染状況、体重など死亡に影響する因子による交絡を多変量回帰で調整したが、調整ハザード比は 1.75 で菌株の種類の影響が独立して存在する事が示された。

A . 研究目的

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「海外から輸入される多剤耐性結核の分子疫学的解析、HIV 合併の把握、多剤耐性結核の診断・治療の対応し、タイ NH という日本が建設してアジアの中心研究機関に育て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。

B . 研究方法

結核の感染・発病と治療転帰のモデルに基づき、難治性の結核患者 (再発例、治療失敗例、

慢性排菌例等)の要因に関して研究を継続している。

(1) 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前回の岡田班より継続している。(1)の群に関しては、菌側のタイピングを活用して、厳格に内因性の再燃と外来性再感染を区別している。(2) 結核治療に反応が良く再発をしなかった群、(3) 結核に罹患していない正常人のコントロール群を設定し、比較の対象としている。ケース・コントロール研究の形態にて、(1)と(2)の比較により結核症の難治に関する種々の要因検討、(3)と結核症群(1-2)の比較により結核自体の発症に関連する様々な疫学的因子の検討を進めている。

日本においては、公益財団法人 (公財) 結核予防会・複十字病院臨床検査部にて、タイ国においては、結核予防会・結核研究所とタイ保健省の共同プロジェクトが設立母体となり、現在はタイ NH 等とコンソーシアムを組んで運営しているタイ国チェンライ県の

結核研究フィールドに参加して、検体バンクと臨床データ管理を実施している。

複十字病院は厚生労働省より 2011年 5月に独立行政法人 独 国立病院機構・近畿中央胸部疾患センターと共に日本で 2 ヲ所の結核医療の「高度専門施設」に指定されて先駆的役割を期待されている。抗結核薬開発と共に抗酸菌診断法の研究開発の参加依頼が来る。複十字病院は数多く多剤耐性結核症例が多く紹介されるので、多剤耐性結核が少なく再発、治療失敗、慢性排菌例を含めて難治性結核として症例数を増加させて研究する必要があるタイと異なり、多剤耐性結核を単独で検討できる。

（倫理面への配慮）

日本においては、臨床研究に関する倫理指針（平成 20年厚生労働省告示第 415号）疫学研究に関する倫理指針（平成 19年文部科学省・厚生労働省告示第 1号）ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1号）に従っている。

これらの検体収集は既に倫理委員会の承認（日本は、複十字病院倫理委員会を 2010年 10月 18日、独 理化学研究所横浜研究所研究倫理委員会を 2011年 2月 15日、東京大学ヒトゲノム・遺伝子研究倫理審査委員会を 2011年 2月 21日承認済みである。

タイ国側については、タイ保健省倫理委員会の定める倫理規定に沿って研究を実施している。参加研究者全員の合意を得た研究プロトコルを作成し、タイ国保健省倫理委員会に 2012年 12月 21日に再度承認を得た。

本研究に参加する患者については、担当医師による十分な説明の後、書面によるインフォームドコンセントを得た。研究を通して得られた個人情報厳密に管理し、参加研究者以外のもので内容を知り得ることはない。現在までの日泰間の共同研究でこれらの基本原則を遵守し、更に、検体等の日泰間の移動等に関しては文書での Material Transfer Agreement 等を結び、知的財産権（パテント）等の問題も含め国際共同研究に関連した倫理的な問題に配慮してきた実績がある。コ

ホートの参加者にはインフォームド・コンセントに基づく自発的な参加を実施し、参加者のフォローアップにも強制は加えなかった。なるべく、医療的な利益が参加者に得られる様に、タイ保健省の発行する国民健康保険への参加の支援等を行った。

C . 研究結果

公益財団法人結核予防会複十字病院は 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マイド医療実現化プロジェクトに 2003年開始の第一期より参加協力している。検査残余検体を活用した難治性要因研究は、2014年 3月現在 380名より同意が得られている。再発 31例、治療失敗 13例、治療中断後再治療 3例、多剤耐性 37例（外国居住歴 16例）の難治性結核症例がある。外国に関連ある結核患者での多剤耐性率はない患者に比し有意に高い。2013年 は実数でも外国関連のない日本人と同一になっている。事例としては、フィリピンでスラムのボランティアをした高校生の一次 MDR 症例も入院している。

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 解析法では、EA I 株が 524人から 531株 (39.8%)、非 EA I 株として、北京株が 591人より 595例 (44.6%)、Euro-American 株が 184人より 187株 (14.0%)、CAS 株が 11人より 11株 (0.83%)、その他 9人より 9株 (0.68%) であった。

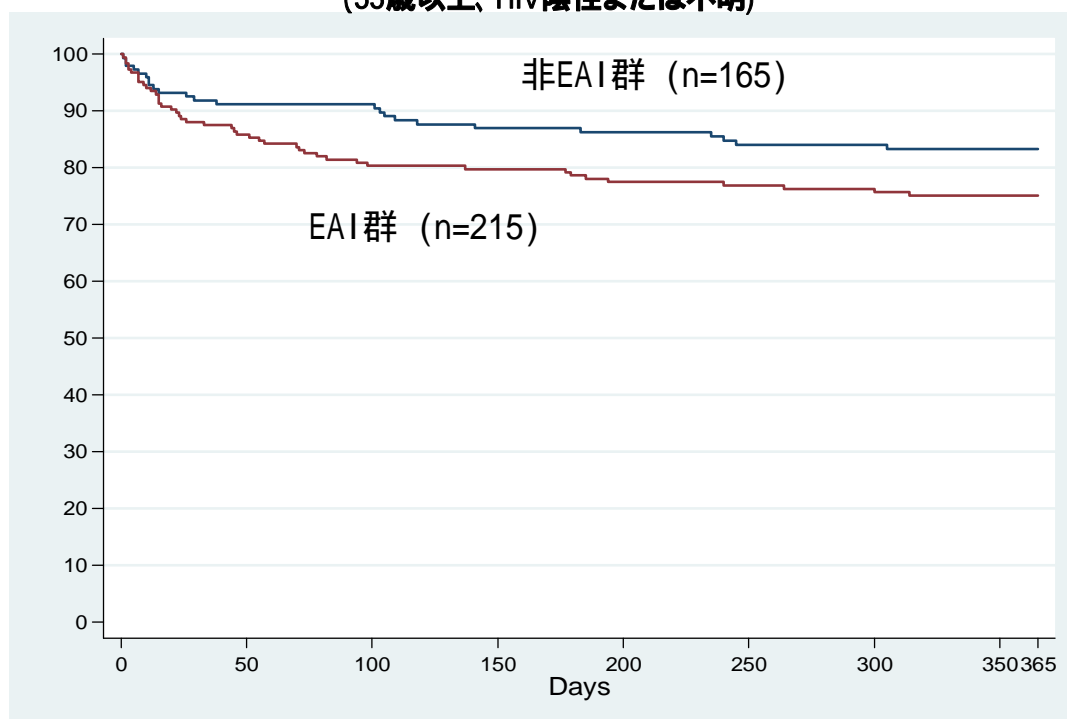
表 1 に、この結核患者 1319人での 1年間での死亡に関しての危険因子を示す。Cox-Proportional ハザード比モデルによる単回帰解析で、EA I 株による結核患者が非 EA I 株による患者よりハザード比で 2.7倍 1年死亡の危険が高かった。EA I 株は死亡率が高い事が多い年齢が高い群で比率が大きいので、年齢や HIV 感染状況、体重など死亡に影響する因子による交絡を多変量回帰で調整しても、調整ハザード比は 1.75で菌株の種類の影響が独立して存在する事が示された。

図 1 に EA I 株の比率が高い 55歳以上の HIV 陰性（希に不明）の結核患者での 1年生存のカプラン・マイヤー法生存曲線を示す。こ

表1 結核患者1,319名の1年死亡危険因子(多変量回帰)

Factor	Category	Hazard ratio	P-value	Adjusted Hazard ratio	P-value
菌分類	非EAI株	Reference		Reference	
	EAI株	2.74 (1.95-3.86)	<0.001	1.75 (1.23-2.48)	0.002
Gender	Female	Reference		Reference	
	Male	1.20 (0.83-1.74)	0.335	1.21 (0.82-1.79)	0.327
Age group	0-34	Reference		Reference	
	35-49	1.5 (0.9-2.49)	0.118	1.6 (0.96-2.65)	0.07
	50-64	1.52 (0.87-2.65)	0.139	2.83 (1.55-5.18)	0.001
	65+	4.47 (2.75-7.27)	<0.001	6.95 (3.88-12.45)	<0.001
HIV status	Negative	Reference		Reference	
	Positive	2.47 (1.73-3.53)	<0.001	5.00 (3.22-7.77)	<0.001
	Unknown	1.23 (0.3-5)	0.772	(*Negative + unknown)	
Body Weight	>60	Reference		Reference (*combine 50-60,60+)	
	50-60	1.19 (0.49-2.89)	0.702		
	40-49	1.32 (0.56-3.12)	0.532	1.1 (0.69-1.76)	0.689
	<40	2.53 (1.05-6.08)	0.038	1.76 (1.05-2.96)	0.033
	Missing	3.51 (1.49-8.28)	0.004	2.43 (1.53-3.86)	<0.001

図1. EAI群と非EAI群の結核患者の治療開始1年間の生存曲線 (55歳以上、HIV陰性または不明)



の群でも EA I株の比率が低い 55未満の群でも有意の差で死亡率の差が認められている。

D . 考察

菌体分類が年齢や薬剤耐性の頻度と共に予後と関連している可能性が示唆された。タイで、今回の結核菌 LSP/RD分析は Spoligo typingで確認さてるが、別プロジェクトでする SNP解析や次世代シーケンサー解析でも確認し比較する事が望まれる。臨床情報を活用し、北京 Ancientと北京 Modernも含む比較を非 EA I株内部の違いを検討する必要がある。日本において、タイと同様に難治性結核の経時的な部分を含めた菌体の分子疫学解析が期待される。

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の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。

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。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。

E . 結論

北タイ・チェンライ県において、HM 感染状況毎に難治性結核患者（多剤耐性・再発・治療失敗例）の検体バンク・コホート研究を実施し、類似した研究を複十字病院で進めた。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1 . Sukkasem S, Yanai H, Mahasirimongkol S, Yamada N, Rienthong D, Palittapongarnpim P, Khummith S. Drug resistance and IS6110-RFLP patterns of Mycobacterium tuberculosis from recurrent tuberculosis patients in northern Thailand. Microbiology and Immunology 2013 Jan;57(1):21-29. doi: 10.1111/1348-0421.12000.
- 2 . 奥村昌夫、佐藤厚子、吉山崇、野内英樹、伊麗娜、工藤翔二、尾形英雄：当院職員の職場、職種別に分けて比較した QFT 検査の検討。結核、2013 Apr;88(4): 405-409

2 . 学会発表

- 1 . 野内英樹、Surakameth Mahasirimongkol、岩淵英子、吉森浩三、吉山崇、Supalert Nedsuan, Boonchai Chaiyasirinrija、奥村昌夫、尾形英雄、山田紀男、Pathom Sawanpanyalert、蓮田泰誠、徳永勝士、工藤翔二：宿主と菌のゲノム情報の統合的活用による結核研究を基礎医学研究者と進めるためのコホート基盤形成。第 24 回日本疫学会学術総会 (演題番号 P2-061)、仙台、2014 年 1 月 25 日
- 2 . 野内英樹、出井禎：結核菌特異的インターフェロン 産生能をみるクオンティフェロン TB 検査精度管理の為の研究とマニュアル作成。第 60 回日本臨床検査医学会学術集会 (一般口頭演題、感染症、演題番号 O-131) 2013 年 11 月 1 日、神戸国際会議場

H . 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

2 . 実用新案登録

3 . その他

該当なし