

図1. SNPs を利用した結核菌の系統解析
23 箇所の SNP で分析することで結核菌は 21 のグループに分けることができる

た北京型と非北京型結核菌の双方を網羅的に型別できる SNP 型別システムを各国参加者に提案した(図1)。このシステムで各国の結核菌を分析して広まっている結核菌の遺伝型を比較することにした。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。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。

C. 研究結果

1. SNP タイピング用のプローブのデザイン

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 23 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。そして最終的に 23 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。

2. SNP 解析のローサイ

北京型結核菌と非北京型結核菌を区別する SNP として今まで 3284855 を使用していた。最近、中島らによって新しい 779615 部位の SNP が報告された。

どちらの SNP 部位が型別に適切か検討を行った。スポリゴタイピングで北京型と判定された 318 株と非北京型と判定された 318 株について、3284855 と 779615 の SNP 分析を行い型別しスポリゴタイピングの型別結果と比較した(表)。779615 位を使った型別では、北京型と非北京型ともすべての例でスポリゴタイピング結果と一致した。一方、3284855 部位の SNP 型別では、318 株の非北京型結核菌株の内、313 株はスポリゴタイピング結果と一致したが、5 株は本部位の SNP 分析で北京型と判定され、1.6% が不一致となった。

3. SNP ローサイと解析法

共通な 10-locus VNTR については、それぞれの国で実際に分析に使っている共通のローカスを集めたものなので、参加者の同意が得られた。しかし、それらの VNTR としての識別能は低いと考えられた。そこで、VNTR 分析だけでなく SNP 解析も行い、各国で広まっている結核菌の遺伝子的背景等の比較を進めた。

既出の報告を検索し、適切に分類できると考えられる SNP ローカスを抽出し、組み合わせで構成した SNP 解析システムを原案として日本から提案し、これを元に議論を進めた。結核菌を各グループに分けるにあたり、複数の SNP サイトが報告されている場合は、どちらかひとつに絞り分析ローカスを減らした。

結果として図1に示すような SNP 解析システムで解析を進めることになった。本システムでは、まず 2 箇所の SNP 分析、すなわち 779615 位で北京型(C)と非北京型(G)を区別、1477596 位で北京型結核菌は、ancient (C) と modern (T) に分けた。

表. 北京型結核菌と非北京型結核菌を分ける 3284855 部位と 779615 部位の SNP 解析
各部位における SNP 分析でスポリゴタイピング結果と一致した株数と一致率

Spoligotyping	SNP position	
	3284855	779615
Beijing	318 (100%)	318 (100%)
non-Beijing	313 (98.4%)	318 (100%)

これら 2 箇所の分析で結核菌は、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た。3 つのグループは、非北京型結核菌はさらに 7 箇所の SNP 分析、北京型 (ancient) はさらに 10 箇所、北京型 (modern) はさらに 4 箇所の SNP 分析を行うことで遺伝的背景に基づき、全体を 21 のサブグループに分類することができた。

4. 各国で分析する株について

各国で 200 株程度の結核菌を分析することとした。各国結核菌のサブグループの存在比等の比較を行うためには、一定期間内に分離された population-base の株を用いる必要があるが、本システムが国際比較に活用可能であるか等、有用性を早く検証することを優先して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株を選択することとした。

5. SNP 法による分析

日本 (東京都内: 191 株) と台湾 (210 株) で分離された結核菌について本 SNP システムで分析した。779615 位で北京型と非北京型、北京型はさらに 1477596 位の分析で ancient と modern 型のへ型別を行い、結核菌を 3 グループに分けた。各グループはさらに別の SNP 部位の分析を行った。北京型 ancient と北京型 modern についてサブタイプの存在比を比較した。

東京で分離された北京型 ancient 株は、大きく 4 グループに分けることが可能で最大グループは BJ06-II サブグループで 36.4% であった。一方、台湾で分離された ancient 株も 4 グループに分けることが可能で最大グループは東京都同じく BJ06-II で 30% であった。台湾で 20% を占めている BJ06-I と BJ07-III は日本では 2% しか存在していなかった。また、BJ04-I グループは台湾では存在せず、日本だけで存在 (全体の 19.2%) する型の結核菌であることがわかった (図 2-a)。

日本の Modern 株の分析では、BJ09 (72.1%) と BJ11-III (23.3%) の 2 グループで大部分を占めていた。台湾の modern は BJ09 型が 45.6%

で最も多く、他に 4 つのサブタイプが存在した。また、BJ11-IV 型は、台湾で 11.8% 占める型であるが、日本では検出されなかった (図 2-b)。同じ北京型 ancient あるいは北京型 modern のグループの結核菌でも、分離された地域によってサブタイプの種類やその割合が異なることが明らかになった。

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。

6. 会議での合意

本研究所で樹立した SNP 分析システムで、それぞれの地域で分離された最低 200 株の結核菌を分析しデータを平成 26 年 5 月まで本研究所に送るということで合意が得られた。その分析のために必要なデザインしたプローブや試薬を本研究所が準備して供給することにした。試薬類は平成 26 年 2 月に送付済である。

D. 考察

北京型結核菌と非北京型結核菌を区別する SNP 部位に関して検討した結果、3284855 位の分析では一部の非北京型結核菌が北京型と判定され、本部位の SNP は結核菌 Lineage-2 の分岐と関連していることが明らかになった。一方、最近報告された 779615 位の変異は、北京型結核菌の定義であるスポリゴタイピングの結果と一致していることが本研究から確認できた。そのため、今まで使用していた 3284855 位ではなく、今後は北京型と非北京型を区別する SNP として 779615 位の SNP を利用して分析を進めることとした。また、3284855 位は、今後も非北京型結核菌の型別のための SNP 部位として利用することにした。

完成した 23 箇所の 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、変異型用コントロールからな

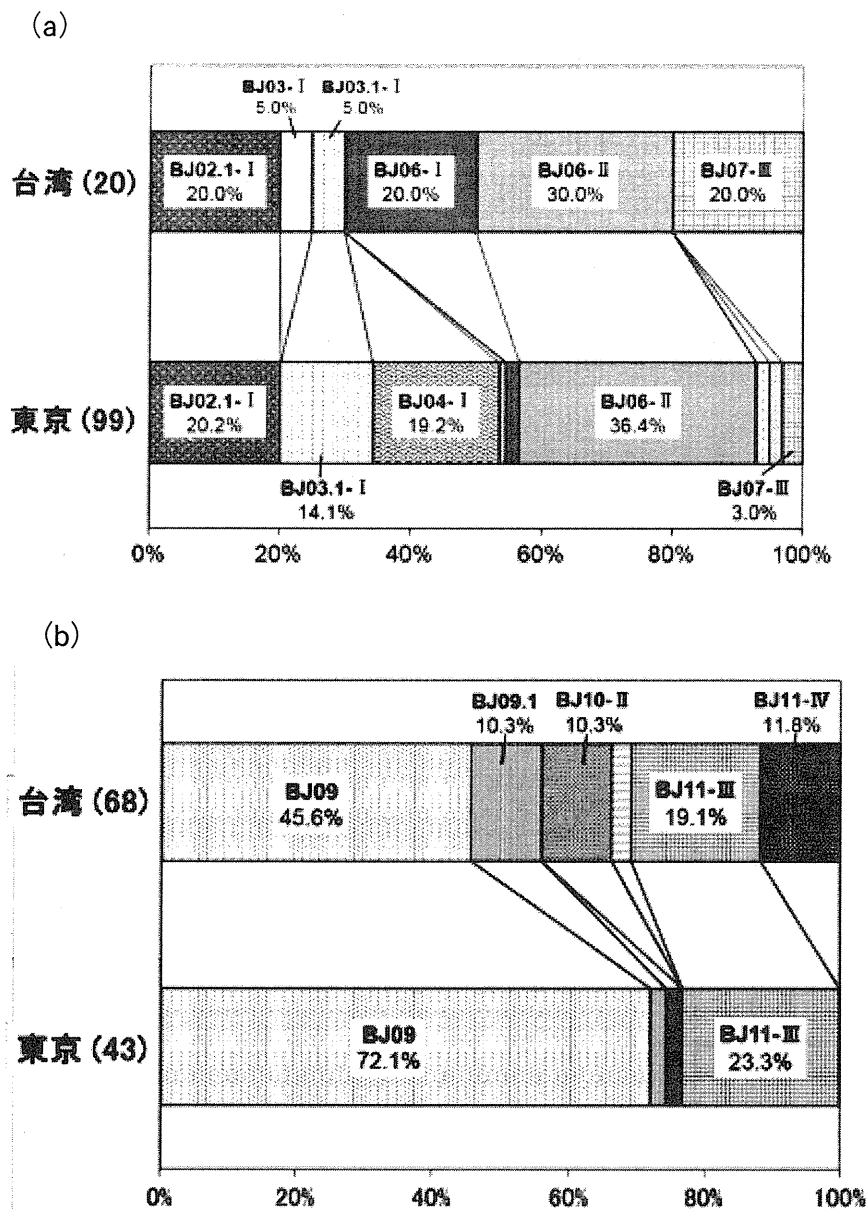


図 2. 樹立した SNP 分析システムを用いた結核菌の分析
779615 部位と 1477596 部位の SNP を調べることで結核菌を非北京型、
北京型 ancient (a)、北京型 modern (b)に分けて、それぞれのグループ
毎に SNP 解析を行った。各グループ内で SNP 分析により型別できた
サブグループの割合を示した。

る) 及び分析用試薬を既に各国の施設に送付した。各施設では、地域内で分離された結核菌を分析し、得られた型別データを平成 26 年 5 月までに提供してもらうことで合意を得ている。このように共同研究によって、共通な手法を利用してそれぞれの地域の結核菌を解析することで、各国で広まっている結核菌を直接比較することができる。その結果、各地域で広まっている結核菌の遺伝的な特徴を明らかにできる。実際に、東京と台湾で分離された結核菌を SNP 分析すると同じ北京型 ancient や北京型 modern でも分離された場所によってサブタイプの

種類やその組成が異なることが明らかになった。特定の地域で特異的にみられる遺伝型が判明すれば、感染した地域の推定も可能となると考えられる。

本システムが確立され、広く活用できるようになれば、より簡便に系統解析が可能になり、それぞれの国や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。今後、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

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型別法（VNTR や SNP など）が開発され、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れば、結核菌が由来した国（将来的には感染した国や地域など）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共通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

【Ⅲ】東京における外国人結核 —臨床像の推移と分子疫学解析—

研究分担者 小林信之 国立病院機構東京病院 統括診療部長
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
秋山 徹 国立国際医療研究センター研究所 感染症制御研究部
加藤雅子 国立国際医療研究センター研究所 感染症制御研究部
菅野芳明 国立国際医療研究センター 呼吸器内科
高崎 仁 国立国際医療研究センター 呼吸器内科

研究要旨

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。本研究では、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ため、2007年1月から2012年12月の6年間に国立国際医療研究センターで診療した外国人結核患者を対象として、前半（2007-2009年）と後半（2010-2012年）に分け、その臨床的特徴の推移について検討した。前半と後半を比較し、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の減少、就労者の増加がみられ、治療成績は後半で改善し、脱落者は減少した。2007-2012年に診療した外国人133名と日本人1300人の結核患者の薬剤感受性を比較したところ、外国人結核では日本人結核と比較してRFP耐性率と多剤耐性率が有意に高値であった。結核菌の分子疫学解析は2通りの方法によって行った。東京の外国人結核患者由来株87株についてRFLP解析を実施した結果、相同性70%以上の株を「グループ」と定義すると、全体の30%は「グループI」を、6%は「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。次に、東京における外国人由来91株および日本人由来コントロール168株の全配列を用いて分子疫学解析を行った。その結果、外国人および日本人から得られた計259株の結核菌は4つの遺伝系統に分類されたが、それぞれの遺伝系統における外国人由来株と日本人由来株の比率は全ての系統で有意に異なっていた。このことから、日本国内において外国人と日本人は異なる結核菌に感染し、各コミュニティで維持されていることが示唆された。同時に、これまで国内に存在しなかった新たな表現型を持つ結核菌が、外国人あるいは旅行者から国内に持ち込まれる可能性が示された。

A. 研究目的

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。本分担研究では、東京における最近の外国人結核の発病と治療の現状、および臨床像の経年的推移を把握することを目的に、国立国際医療研究センターにおいて過去6年間に診療した外国人結核の臨床像について、さらに、新宿区保健所のデータをもとに新宿区における外国人結核患者の経時的推移を含めて検討する。さらに同期間における外国人由来結核菌の薬剤耐性について日本人結核患者と比較検討する。また、東京における外国人結核の感染状況を把握し、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、東京に在住している外国人結核患者から分離された結核菌の分子疫学調査を実施する。

B. 研究方法

1) 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年間の前半（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。

2) 前研究班では、国立国際医療研究センターで診療した外国人結核患者由来株を用いたIS6110-probed RFLP分析（解析ソフトFingerPrinting II (Bio-Rad) を使用して解析）により、70%以上の相同性を認める2つの「グループ」が検出されたことを報告した。今回の研究班では、それぞれのグループに属する外国人結核患者の臨床情報を収集し、その特徴や遺伝子型について検討した。その中で、新宿区在住の外国人結核患者20名については、新宿区の結核患者の分子疫学データをもとにクラスター形成率を求めた。なお、新宿区における結核患者の分子疫学解析については、新宿区保健所（島 史子先生）と結核研究所（石川信克先生、大角晃弘先生、村瀬良朗先生）にご協力をいただいた。

3) 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。

(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、国立国際医療研究センターの倫理審査委員会の承認を得た。外国人結核の分子疫学解析の研究計画については同センターの倫理審査委員会の承認 (NCGM-G-001467-00) を得てから開始した。

C. 研究結果

1) 東京における外国人結核の臨床像：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 178 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。前半は 2007-2009 年で 95 例 (31.7 人/年)、後半は 2010-2012 年で 83 例 (27.6 人/年) であった。年齢・性別では、前半、後半ともに 20 歳代が最も多く、次に 30 歳代であり、男性が女性よりも多かった (図 1)。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 (図 2)。性別ではフィリピンの女性の増加が目立っていた。なお、新宿区の外国人居住者数については、国籍別にみると、最近 3 年間で韓国または北朝鮮の減少、中国の増加がみられ、韓国または北朝鮮と中国がほぼ同数となり、他国と比べて圧倒的に多数であった。職業では学生と主婦が減少し就労者が増加した (図 3)。入国時期は結核診断の 1 年以内が 24% から 30% へと増加傾向であり、また、治療成績は改善し、脱落者は 5 名 (5.3%) から 3 名 (3.6%) に減少した (図 4)。薬剤感受性については、外国人 133 名と日本人 1300 人の結核患者の検査結果を比較した。2007-2009 年では外国人結核で RFP 耐性率が有意に高く ($p=0.003$)、2010-2012 年では外国人結核で多剤耐性率が高い傾向がみられ、全体の 2007-2012 年を総合すると外国人結核では日本人結核と比較して、RFP 耐性率 ($p=0.002$) と多剤耐性率 (0.018) が有意に高値であった (表 1)。

2) RFLP 法による分子疫学解析：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の RFLP 解析から、86 株のうち 26 株 (30%) は相同性 70% 以上の「グループ I」を、5 株 (6%) は「グループ II」を形成していた (表 2)。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 61.5% と多く、薬剤耐性率は 7.6% に認め、HIV 陽

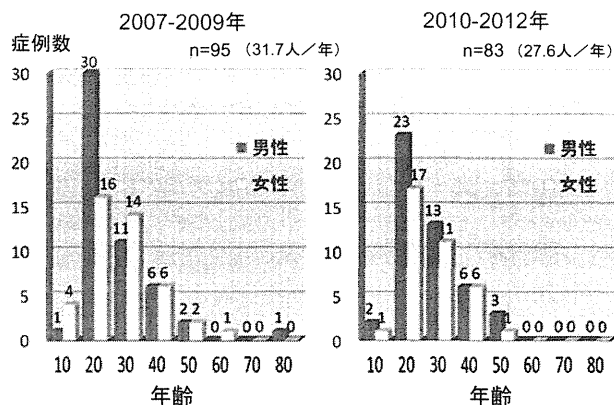


図 1 外国人結核患者の年齢・性別分布

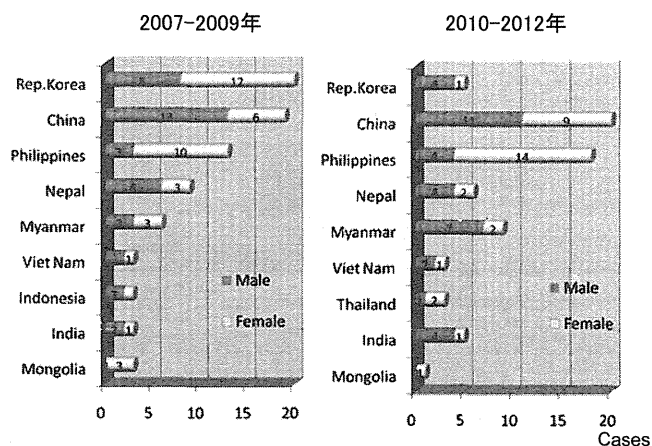


図 2 外国人結核患者の出身国別分布

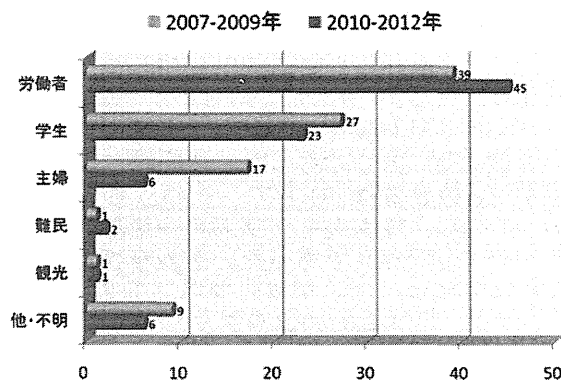


図 3 外国人結核患者の職業

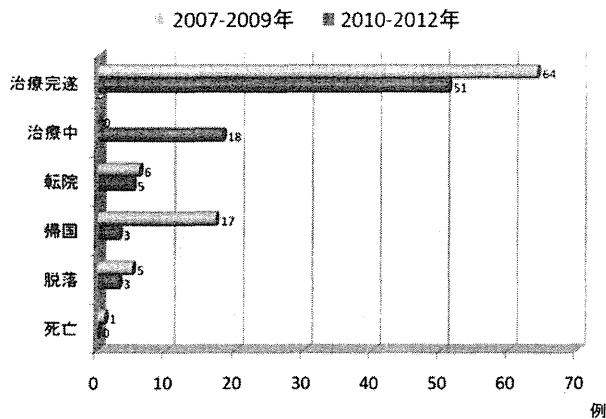


図4 外国人結核患者の治療経過

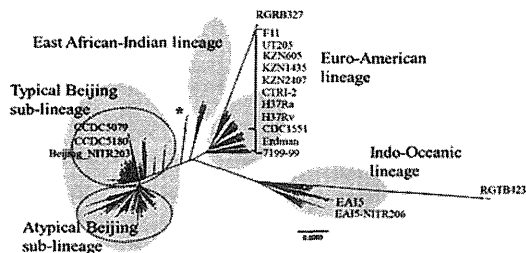


図5 全ゲノム配列による系統樹

性率は11.5%と高い傾向がみられた。入国1年未満の患者はグループIで38.4%、グループIIで0%、その他で37.5%であった。遺伝子型に関しては、グループIでは北京型 (Modern) 67%、北京型 (Ancient) 33%、非北京型 0%に対して、グループIIでは非北京型が100%であった。グループI、II以外では北京型 (Modern) 8%、北京型 (Ancient) 23%、非北京型 70%であった。新宿区に居住している外国人結核患者は20名で、そのうち8名はグループIに属し、日本人とクラスターを形成しているのは5例 (62.5%) であった。グループIIに属している者はいなかった。グループI、II以外の12例については、日本人とのクラスター形成者は4例 (33%) であった。

3) 全ゲノムシーケンス法による解析: 2001年2月から2012年6月までに、国立国際医療研究センターにおいて診療した東京に在住している外国人および日本人結核患者由来の結核菌259株 (外国人由来91株、日本人由来168株) の全配列を決定し、得られたIlluminaの配列はDDBJに登録した (accession No. DRA001219)。本研究で解析した全臨床分離結核菌259株は、Beijing lineage (70.3%)、Euro-American lineage (17.8%)、

	日本人 2007-2012 n=1300	外国人 2007-2012 n=133	有意確率p
INH0.2	73 5.6 %	6 4.5 %	0.595
RFP40	4 0.31 %	3 2.3 %	<u>0.002</u>
SM10	102 7.8 %	9 6.8 %	0.657
EB2.5	10 0.77 %	1 0.75 %	0.983
KM20	5 0.38 %	0 0 %	0.474
LVFX1	21 1.6 %	0 0 %	0.140
INH/RF	3 0.23 %	2 1.5 %	<u>0.018</u>

Pearsonのχ2乗検定

表1 結核菌の薬剤耐性 日本人と外国人の比較 2007-2012年

RFLP解析	グループI (26)	グループII (5)	その他 (56)	
年齢 (歳)	33	35.2	30.8	
性別 男性 (%)	20 (76.9%)	4 (80%)	33 (58.9%)	
国籍 東アジア (%)	16 (61.5%)	1 (20%)	27 (48.2%)	
居住地 新宿区 (%)	8 (30.7%)	0%	12 (21.4%)	
クラスター形成率	5/8 (62.5%)	—	4/12 (33%)	
入国1年未満 (%)	10 (38.4%)	0%	21 (37.5%)	
HIV陽性 (%)	3 (11.5%)	0%	2 (3.5%)	
薬剤(H,R)耐性あり (%)	2 (7.6%)	0%	2 (3.5%)	
肺結核 (%)	22 (84.6%)	4 (80%)	52 (92.8%)	
塗抹陽性率 (%)	14 (53.8%)	5 (100%)	40 (71.4%)	
遺伝子型	北京型 Modern	12 (67%)	0 (0%)	3 (8%)
	北京型 Ancient	6 (33%)	0 (0%)	9 (23%)
	非北京型	0 (0%)	5 (100%)	28 (70%)

表2 外国人結核菌株のRFLP解析と臨床データ

Lineage	Isolates from patients				p-value*
	Foreign-born		Japan-born		
	n	%	n	%	
East-Asian (Beijing)	43	47.3	139	82.7	5.80E-09
{ typical Beijing	29	67.4	52	37.2	1.01E-03
	{ atypical Beijing	14	32.6	87	
Euro-American	23	25.3	23	13.7	0.03089
Indo-Oceanic	19	20.9	4	2.4	1.87E-06
East African-Indian	6	6.6	2	1.2	0.04306

* Statistical analysis done using Fisher's exact test.

表3 外国人または日本人由来結核菌の結核菌型別

Indo-Oceanic lineage (8.9%) および East African-Indian lineage (3.1%)に分類された。しかし、その遺伝系統における外国人由来株と日本人由来株の比率は全ての系統で有意に異なった(表3)。特に、外国人由来株の大部分は Beijing lineage (47.3%)、Euro-American (25.3%) および Indo-Oceanic(20.9%)だったが、日本人由来株は82.7%が Beijing lineage だった。また、Beijing lineage の中で、外国人由来株では67%が modern型であるのに対し、日本人由来株では63%が ancestral型だった。図5は、臨床分離259株およびゲノム公開されている18株を用いた全ゲノム配列による系統樹を示す。各灰色の楕円内の臨床株は記載されている各系統(lineage)に属した。

D. 考察

新宿区は東京都のなかで最も多くの外国人結核患者を診療しているが、外国人登録者の絶対数が多いのがその原因と考えられる。また、国籍別では韓国人のコミュニティが存在するため、韓国人の結核患者の率が大きいのが特徴といえるが、最近では韓国人の減少、中国人の増加がみられている。国立国際医療研究センターにおいて最近6年間で診療を行った外国人結核患者は、20~30歳代の若年者が多く、女性の割合が日本人結核患者と比較して多くみられたが、この傾向は以前の調査と同様の傾向であった。6年間で前半3年と後半3年に分けて、その差について検討した。特徴的なことは、韓国人とくに韓国人女性が減少し、フィリピン人が増加していることである。職業については学生と主婦の率の減少がみられている。いずれも原因は明らかではないが、東日本大震災の影響があるのかもしれない。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、RFP耐性と多剤耐性の率が日本人と比較して高率にみられた。外国人結核患者の多剤耐性率は1.5%であり、統計学的に日本人結核より高いが、全国集計の4.4%に比べて低かった。その原因は明らかではないが、本研究は1つの病院における結果であり、集計数が少ないための誤差である可能性もある。また、外国人結核といっても日本の地域により国籍や職業、滞在年数などが異なるため、薬剤耐性率や多剤耐性率についても地域により異なる可能性がある。2011年の新宿区全体の結核患者の統計では、外国人結核8名中に多剤耐性結核が3名(中国2名、韓国1名)みられた。いずれも20歳代前半の学生であり、初回治療1名、再治療2名であり、外来での治療経過中に発見された。母国から日本への持ち込み例と考えられ、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。

東京における外国人結核患者由来株87株のRFLP解析によると、そのうち30%は相同性70%以上の「グループI」を、6%は「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には公衆衛生の上で脅威となりうると考えられる。

全ゲノムシーケンス法による分子疫学解析研究で得られた遺伝子配列、患者情報、系統樹の解析によって、東京における臨床分離結核菌株の特徴を明らかにした。まず、今回解析した外国人由来91株および日本人由来コントロール168株において、両者は異なる遺伝系統の結核菌に感染していることが示された。さらに、日本国内において外国人と日本人は異なる結核菌に感染し、各コミュニティで維持されていることが示唆された。同時に、外国人あるいは旅行者を通じて、これまで国内に存在しなかった新たな表現型を持つ結核菌が、国内に持ち込まれる可能性が示された。

E. 結論

東京における最近の外国人結核の特徴としては、国籍別では中国人が最多で変わらないが、韓国人の減少、フィリピン人の増加がみられ、職業では学生と主婦が減少した。治療成績は改善がみられ、治療脱落者は減少した。外国人結核菌株は日本人結核菌株と比べてRFP耐性率と多剤耐性率が有意に高かった。結核菌全ゲノム解析によって、外国人から分離される結核菌株の集団は、日本人から分離される結核菌の集団とは異なっていることが明らかになった。すなわち分子疫学上、日本在住の外国人の結核は日本人にとって一定のリスクがあることが推定される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 菅野芳明、小林信之、森野英里子、高崎 仁. 当センターにおける外国人結核患者の臨床像の推移. 第53回日本呼吸器学会学術講演会、東京、平成25年4月.
- 加藤雅子、秋山徹、小林信之、切替照雄. Whole genome sequencing analysis of Mycobacterium tuberculosis isolates from residents in Tokyo. 第87回日本細菌学会総会、2014年3月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

〔IV〕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

研究分担者 藤田 明 多摩北部医療センター 副院長

研究要旨

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、2007 年から 2012 年の 6 年間における 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。一次調査の結果、HIV 合併の多剤耐性結核は 3 例であり、HIV 感染者の間で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。医療機関からは合計 222 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約 0.3% が HIV 合併結核であると報告され、多剤耐性結核は 3 例であった。HIV 合併結核の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症例の 191 例においては、何らかの薬剤耐性 (PZA を含む) を有する例は日本人 16 例、外国人 6 例で、MDR 2 例は日本人と中国人、RFP 耐性 2 例の出身国は東南アジアであった。また、菌陽性例中の薬剤耐性頻度は「少なくとも INH 耐性」が 8.3%、「MDR 以外の RFP 耐性」が 1.4% であり、引き続き耐性菌の動向には注意を要する。

A. 研究目的

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%)¹⁾。国内では近年、村上・加藤ら²⁾、村松ら³⁾、千葉ら⁴⁾ 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た。

B. 研究方法

平成 23~25 年度に、全国 531 の保健所、全国 248 の結核診療医療機関 (国立病院機構を除く)、全国 231 の HIV 診療拠点病院 (国立病院機構を除く、国立国際医療研究センターエイズ治療・研究開発センターを含む) を対象に、HIV 合併結核の症例の有無を尋ねる一次調査を実施した。ただし、調査機関数は統廃合・追加等のため調査年度間で必ずしも一致しない。その結果をもとに、症例を有した医療機関に対して匿名化症例調査票による二次調査を実施した (保健所に対しては二次調査を行わなかった)。過去に村上、加藤らによる全国 HIV 感染合併結核症アンケート調査報告 (2003~2006 年) が行われているので、今回は 2007 年以降 2012 年まで診療した症例について収集した。一次調査、二次調査ともに各施設の担当者に記入を依頼し、郵送法により実施した。

一次調査の内容は以下である。

結核病床を有する (有した) 医療機関には、年次ごとの結核入院患者のうち HIV 感染症合併例数・HIV 感染症合併例のうちの多剤耐性結核例数、HIV 拠点病院 (結核病床を有さない) には、HIV 感染症合併の結核例数・HIV 感染症合併結核例のうちの多剤耐性結核例数、保健所には、結核新登録患者数 (確定例) 数・結核患者のうち HIV 感染症合併例数・HIV 感染症合併例のうちの多剤耐性結核例数である。

関連調査としては、24 年度の単年度調査では、HIV 合併結核の患者を受け入れた経験がある施設に対して、病棟内でどの病室 (陰圧室) を使用するか、前室の有無、などについてもアンケート調査を行った。また、25 年度の単年度調査では、結核医療機関を対象に「結核入院患者に対する HIV スクリーニング検査の実施率 (概数) を教えてください。」と質問し、20% 区切りの概数選択方式による回答を求めた。

HIV 感染合併結核症例を有すると返答があった医療機関に対して、症例に関する匿名化二次調査を行った。二次調査に使用した症例調査票は国立病院機構病院の症例調査票と共通のフォーマットとし、主として結核および HIV に関する臨床的データに関して記載を依頼した。返送された調査票に基づき、HIV 耐性結核の臨床像および抗結核薬に対する耐性状況について検討した。

(倫理面への配慮)

症例を持つ施設に対して患者データ提供を求める点については患者を特定できないよう匿名化されたデータのみを収集した。厚労省の「疫学研究に関する倫理指針」に基づき、研究者分担者の所属する東京都立多摩総合医療センターの倫理委員会 (平成 23 年 9 月 5 日: 受付番号 20)、公益財団法人東京都保健医療公社多摩北部医療センターの倫理委員会 (平成 24 年 7 月 23 日: 受付番号 24-4、平成 25 年 6 月 21 日: 受付番号 25-7) にて承認を得た。

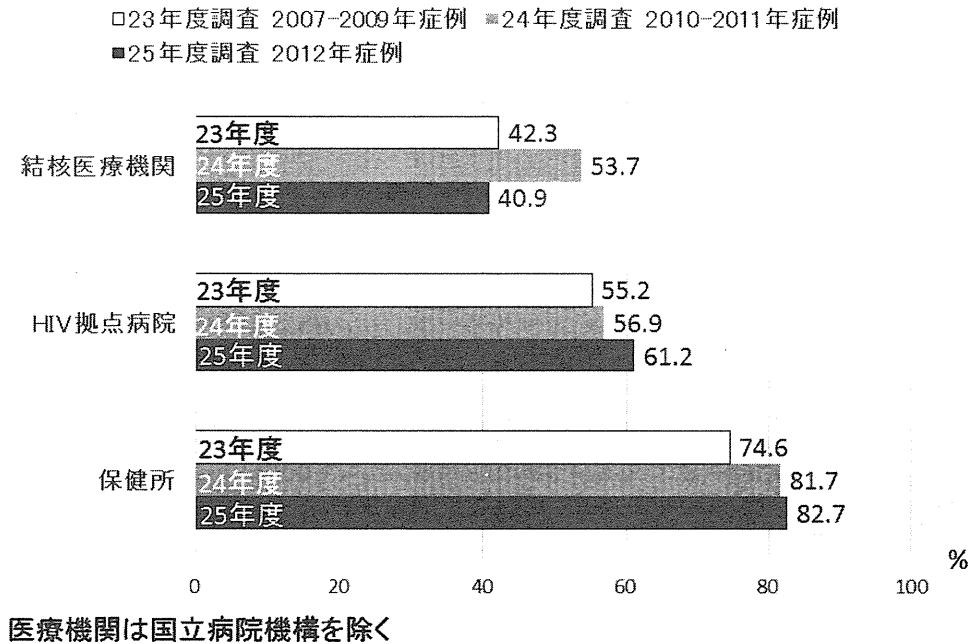
C. 研究結果

(1) 一次調査の結果

各調査年別の回収率は、結核医療機関は 40.9%~53.7%、HIV 拠点病院 (結核病床を有さない) は 55.2%~61.9%、保健所の 74.6%~82.7% と、保健所からの回収率が高かった (図 1)。施設の統廃合など理由が判明した場合には施設数を調整し回収率を算定した。また、返答数には症例のない施設も含まれる。なお、結核医療機関数については、25 年度には 235 施設と減少し、また結核患者の受け入れを休止した医療機関もあることから回収率が低かった可能性はあり、一方 24 年度調査については結核入院患者総数を尋ねなかったため、調査の簡易化により回収率がやや高くなったと推定される。

年次別の結核医療機関と保健所の HIV 感染合併

図1 一次調査の回収率 (%)



結核症例数の集計結果を表1に示す。国立病院機構の病院を除く医療機関から報告された HIV 感染合併結核の症例数は、平均で年9例、うち多剤耐性結核は0例であった。HIV 感染合併結核症例数に関しても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、症例数は結核登録情報システムによる HIV 合併例患者数統計よりも回収率見合いで下回り、新登録患者に対する HIV 感染合併結核症例の割合は結核登録情報システムとほぼ同様の 0.2%~0.3%前後であったが、2011 年症例に関しては回収率を勘案しても本調査で症例を拾い切れていないと思われる結果となった。多剤耐性結核の6年間で3例であった。地域的な集積傾向も認められなかった。

表2に、結核病床を有さない HIV 拠点病院の症例数を加えた結果を示す。6年間で HIV 拠点病院の症例数168例、結核医療機関（結核病院）54例の計222例であり、HIV 拠点病院において少なからず HIV 感染合併結核患者を診療している状況であった。多剤耐性結核については HIV 拠点病院から合計2例の報告があった。なお、本分担研究には国立病院機構の症例は含まれていないが、国立病院機構分を加えると保健所調査による症例数をやや上回ると思われた。

(2) 二次調査の結果 (表3)

症例を有すると回答した医療機関に対して二次調査を行った結果、222例中191例の症例調査票が回収された(86.0%)。男性168例、女性17例、性別記載なしが6例と9割弱が男性であった。外国人は48例(25.0%)、出身国は東南アジアが31例、

アフリカが6例、と結核高蔓延国が多くを占めた(図2)。結核診断時の CD4 陽性リンパ球数は1~707とばらつきがみられたが、平均は $148 \pm 144/\mu\text{L}$ であった。粟粒結核を除く肺外結核は75例(39.3%)、粟粒結核は48例(25.1%)と肺外結核が多いのが特徴であった。何らかの検体で結核菌陽性(塗抹陽性または培養陽性)であったものは144例(75.4%)で、喀痰検体で陽性は94例(49.2%)、喀痰陰性・胃液陽性は15例(7.9%)と、感染性またはその疑いありの例は約半数であった。

(3) 抗結核薬に対する耐性の状況

何らかの薬剤に耐性があったと記載された例は22例で、少なくともINHに耐性は最も多く12例、うちINH単独耐性は5例であった。二次調査で確認された多剤耐性結核は2例(日本人と中国人)で、そのパターンは前者がINHとRFPの2剤耐性、後者がINH、RFP、SM耐性であった。外国人においては、何らかの薬剤耐性を有する例が48例中6例であり、日本人と頻度に差を認めなかった。しかしながら、RFP耐性の2例の出身国は東南アジアであり、1例はRFP単独耐性、1例はRFPとSMに耐性であった(表4)。

結核菌陽性例中の薬剤耐性頻度を表5に示す。国内における耐性頻度については、結核発生动向調査によるデータや結核療法研究協議会による菌株検査の報告は存在するが、本調査は各施設あるいは委託施設の薬剤感受性試験結果によるものであり、また詳細な結核治療歴などは調査しておらず、単純な比較が困難である。しかしながら、結核発生动向調査の結果と比較して明らかな差はないように思われた。

表1 年次別のHIV感染合併結核患者数(結核医療機関・保健所)

	2007年			2008年			2009年			2010年			2011年			2012年		
	結核患者	HIV感染合併	多剤耐性結核	結核患者	HIV感染合併	多剤耐性結核	結核患者	HIV感染合併	多剤耐性結核	結核患者	HIV感染合併	多剤耐性結核	結核患者	HIV感染合併	多剤耐性結核	結核患者	HIV感染合併	多剤耐性結核
結核病院入院例	4424	7 0.16%	0	4280	14 0.33%	0	4091	9 0.22%	0	NA	7	0	NA	11	0	3152	6 0.19%	0
(参考) HIV陽性率前向き調査*					0.37%													
保健所	20827	47 0.23%	1	20364	62 0.30%	1	19873	35 0.18%	0	18613	42 0.23%	0	18204	46 0.25%	0	18519	51 0.28%	1
(参考) 結核統計**	23511	57 0.24%		24730	67 0.27%		24170	52 0.22%		23261	53 0.23%		22681	75 0.33%		21283	62 0.29%	

* 結核病院入院患者調査:加藤 誠也;日本におけるHIV合併結核に関する調査.厚生労働科学新興・再興感染症研究費事業「結核菌に関する研究」平成20年度総括・分担研究報告書 191-201, 2009

** 結核登録情報システムによる報告数

表2 HIV感染合併結核と多剤耐性結核の報告数

	2007年		2008年		2009年		2010年		2011年		2012年		計	
	HIV感染合併	多剤耐性結核	HIV感染合併	多剤耐性結核	HIV感染合併	多剤耐性結核	HIV感染合併	多剤耐性結核	HIV感染合併	多剤耐性結核	HIV感染合併	多剤耐性結核	HIV感染合併	多剤耐性結核
①結核病院入院例	7	0	14	0	9	0	7	0	11	0	6	0	54	0
②HIV拠点病院	29	0	34	1	34	0	23	0	22	0	26	1	168	2
③=①+②	36	0	48	1	43	0	30	0	33	0	32	1	222	2
保健所	47	1	62	1	35	0	42	0	46	0	51	1	283	3

表3 191例(二次調査)の結核診断状況

部位	例数 (%)
肺結核	90 (47.1%)
肺外結核合併(粟粒以外)	75 (39.3%)
粟粒結核	48 (25.1%)
菌検査	
菌陽性(塗抹または培養)	144 (75.4%)
喀痰検体	94 (49.2%)
胃液検体(喀痰陰性)	15 (7.9%)
その他の検体で陽性*	33 (17.3%)
何らか薬剤耐性	22 (11.5%)
全症例	191

* 検体種類不詳を含む

図2 外国人(45例)の国籍別症例数

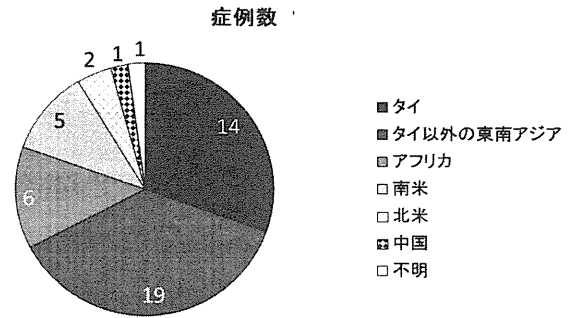


表4 日本人と外国人における抗結核薬耐性例数(二次調査全191例)

	日本人	外国人	合計
症例数	140	48	191 *
何らか薬剤耐性	16	6	22
INH耐性	10	2	12
INH単独	6	0	6
INH+SM	3	0	3
INH+EB+SM	0	1	1
MDR	1	1	2
RFP耐性(MDR以外)	0	2	2
SM単独耐性	2	2	4
PZA単独耐性	3	0	3
LVFX耐性	1	0	1

* 国籍記載なし3例を含む

表5 二次調査における抗結核薬耐性頻度

	菌陽性	全例
例数	145	191
何らか薬剤耐性	15.2%	11.5%
PZA除く薬剤耐性	13.1%	9.9%
INH耐性	8.3%	6.3%
INH単独	4.1%	3.1%
INH+SM	2.1%	1.6%
INH+EB+SM	0.7%	0.5%
MDR	1.4%	1.0%
RFP耐性(MDR以外)	1.4%	1.0%
SM単独耐性	2.8%	2.1%
PZA単独耐性	2.1%	1.6%
LVFX耐性	0.7%	0.5%

(4) HIV 合併結核の患者を受け入れた施設における病室環境(24年度単年度調査)

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は、結核医療機関10施設のうち、「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、その他が3施設であった。「前室あり」が3施設、「前室なし」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。

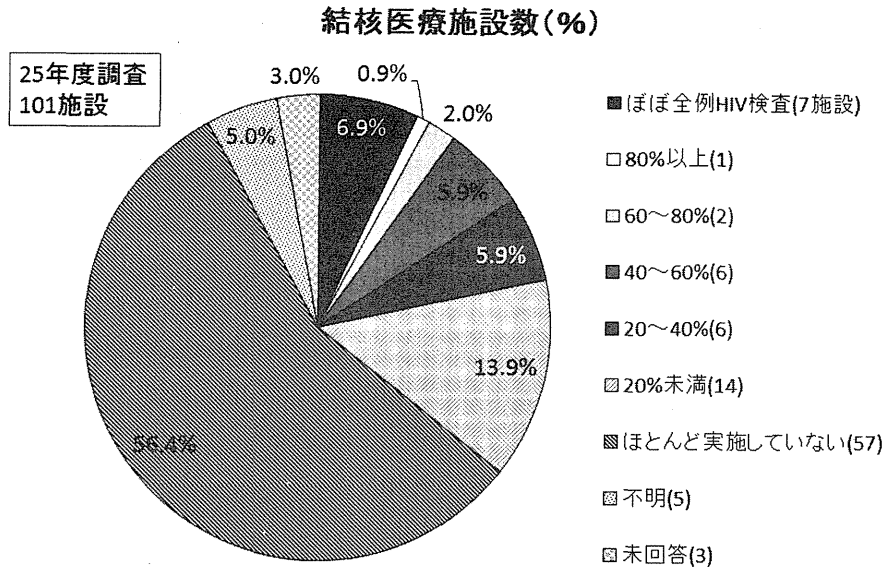
一方、HIV拠点病院17施設では、「一般病棟内の個室」3施設、「一般病棟内の専用室(陰圧室を含む)」5施設、「感染症病棟内の病室」4施設、「感染症病棟内の専用室」2施設、その他3施設であっ

た。「前室あり」が9施設、「前室なし」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施設であった。

(5) 結核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(25年度単年度調査)

HIVスクリーニング検査の実施率について、101施設におけるアンケート調査結果を図3に示す。56.4%の施設はHIV検査を「ほとんど実施していない」と回答した。「ほぼ全例に検査」は7施設6.9%で、60%以上と80%以上の検査実施を併せても10施設9.9%であった。

図3 結核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(概数)



D. 考察

過去に海外で HIV 感染者における多剤耐性結核のアウトブレイクが報告され、HIV 感染と多剤耐性結核の関係については注目されてきた。しかし、WHO は 18 国・地域におけるコホート調査から、HIV 陽性者では HIV 陰性者と比べて多剤耐性結核はオッズ比 1.4 であったが統計学的には有意でなかったと報告している⁵⁾。今回の日本国内における調査においても、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。しかしながら、191 例のうちで外国人比率が 25.0%と 2011 年の全国新登録結核患者の外国出生者率 4%よりも多く、多剤耐性のうち 1 例は中国人で、東南アジア出身者 2 例の RFP 耐性であり、引き続き耐性菌の動向には注意していく必要がある。

また、前述の WHO の検討においても多数例が HIV 検査結果不明であると付記されており⁵⁾、今回の調査でも結核医療機関のうち結核入院患者に対する HIV 検査を実施状況調査では、患者の 60%以上に実施しているのが 1 割未満の医療機関であり、外来のみの患者の状況はさらに低いと推測されることから、結核患者における正確な HIV 感染の有無を把握することが今後の課題である。

薬剤感受性結核のうち INH 耐性については日本人でやや目立つ結果であったが、対照とすべき結核療法研究協議会の調査は菌株を収集して統一した方法で検査する方式であり、薬剤感受性試験方法の違いなどのため、単純な比較ができない。既治療例では耐性の頻度が上がるが、本調査では詳細な結核治療歴については調査していない。しかしながら、今後 HIV 感染症患者における潜在性結核感染症治療の普及が見込まれることから、注目していく必要がある。

日本の結核対策・国際合同レビュー 2011 年⁶⁾によると「TB/HIV」に関して、(1) 結核と HIV に関わる機関やグループは、保健と社会福祉システムのすべてのレベルで連携と協調をすべきである、

(2) 厚労省あるいは結核病学会は HIV プログラムと協調して、すべての結核患者に HIV 検査を実施することを義務付けるべきである、(3) 厚労省・県・市は HIV 合併結核患者で入院を要する場合には、結核病棟を有する 69 の HIV 専門病院のみに入院させて治療するようにすべきである、と提言されている。

そこで、24 年度の調査では、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。

日本の結核登録情報システムにおいても HIV 合併例の把握がなされており、調査期間の 6 年間の症例数については概ね結核登録情報システムのデータと同様の傾向であった。保健所側からは HIV の有無に関しては把握しきれていないとの指摘がある。ただ、医療機関に対する調査による HIV 感染結核合併頻度は行政レベルの統計と大きな差はないように思われた。今後は結核登録情報システムを活用あるいはそれを発展させた仕組みに基づいて、多剤耐性結核と HIV 合併の実態を把握することは可能であろう。その前提としては、前述のように結核患者における正確な HIV 感染の有無を把握することが重要であり、そのためには結核患者に対する HIV 抗体検

査を保険適応とし、保健所においてその結果を把握できるようなシステムを構築することを提案したい。

E. 結論

1. 多剤耐性結核と HIV 感染合併に関する全国調査の結果、多剤耐性結核は 2007～2012 年の 6 年間に 3 例（一次調査）であり、地域も異なることから HIV 感染者の間で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。
2. 2007～2012 年までの菌陽性 145 例（二次調査）において、多剤耐性結核は 2 例（1.4 %）で日本人と中国人あった。また、「少なくとも INH 耐性」は 12 例 8.3%、「MDR 以外の RFP 耐性」は 2 例 1.4 %で、RFP 耐性は 2 例とも外国であり多剤耐性化リスクが高いため注意を要する。
3. 結核中蔓延国である日本において、多剤耐性結核と HIV 感染の合併例の報告は少なかったが、結核患者に対する HIV 抗体検査を実施していない結核医療機関が 6 割弱存在していたので、把握されていない例が存在する可能性はある。

謝辞

調査にご協力いただきました全国の保健所、結核病床を有する病院、HIV 拠点病院に深謝致します。

参考文献

1. Wells CD, Cegielski JP, Nelson LJ, et al. HIV infection and multidrug-resistant tuberculosis—The perfect storm. *J Infect Dis.* 196 (Suppl 1):S86-S107, 2007.
2. 加藤誠也: 日本における HIV 合併結核に関する調査. 厚生労働科学新興・再興感染症研究費事業「結核菌に関する研究」平成 20 年度総括・分担研究報告書 191-201, 2009
3. 村松崇、藤田明、柳澤如樹、他: HAART 時代の HIV 合併結核に関する検討. *日本エイズ学会誌* 11:502, 2009
4. 千葉明生、田沼順子、橋本亜希、他: 当センターの HIV 感染者における結核症例の検討. 第 24 回日本エイズ学会学術集会口演 2010
5. Zignol M, von Gemert W, Dennis Falzon D et al. Surveillance of anti-tuberculosis drug resistance in the world: an updated analysis, 2007-2010. *Bulletin of the World Health Organization* 90:111-119D. doi:10.2471/BLT.11.092585. 2012
6. 厚生労働科学研究補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症事業「日本の結核対策 国際合同レビュー 2011 年」2011 年

F. 健康危険情報

日本国内で HIV 感染者の間で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が、多剤耐性化リスクを有する RFP 耐性 2 例の出身国は東南アジアであり、今後の動向には注意を要する。

G. 研究発表

1. 日本語論文

2. 国内学会発表

1. 藤田明. 第 86 回日本結核病学会シンポジウム 3-2「結核の現状と問題点—エイズ学会から」2011 年 6 月（東京）
2. 藤田明. 第 86 回日本結核病学会ミニシンポジウム 3-2「HIV 感染者やステロイド服用患者等の免疫脆弱宿主において IGRAs (Interferon- γ Release Assays) をどのように利用するか?」2011 年 6 月（東京）
3. 阪下健太郎, 藤田明, 畠山修司, 他. HIV 感染者患者におけるクオンティフェロン TB ゴールドを利用した潜在性結核感染症スクリーニングに関する検討. 第 52 回日本呼吸器学会学術集会 2012 年 4 月（神戸）
4. 藤田明、永井英明、青木孝弘、岡田全司. 多剤耐性結核と HIV 感染合併の全国実態調査. 第 29 回日本エイズ学会学術集会口演 2013 年 11 月（熊本）

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

[V] 中国とフィリピンで収集した結核菌の遺伝子・免疫学的解析

研究分担者 服部俊夫 東北大学災害科学国際研究所 教授
研究協力者 凌虹 ハルビン医科大学微生物学教室 教授
張曉燕 復旦大学公衆衛生学院新興感染症センター 教授
Elizabeth Telan SACCL 所長
鈴木定彦 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
国際疫学分野 教授
中島千絵 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
国際疫学分野 助教

研究要旨

結核感染拡大阻止に向けて、結核菌の遺伝子解析とそれに対する免疫反応の解析をフィリピンと中国の検体を用いて行った。中国の検体では北京型特異的な抗体反応の存在を認めた。抗 PCR 法も用いた。フィリピンではフィリピンの患者の喀痰を用いて結核菌を LAMP 法で確認し、spoligotyping 法で遺伝子型を同定した。

A. 研究目的

中国東北部（ハルビン医科大学）、南部（上海・復旦大学）、フィリピン（マニラ・サンラザロ病院）との共同研究を通して同地の結核菌の分子遺伝子学的に特性、薬剤耐性、免疫応答性の解析によって日本に輸入感染症としての危険性を把握し対策を立案する。

北京/非北京型の結核菌を新たな Rv0679c multiplex PCR 法を用いて平易で、さらに低価格でモニターできる方法の開発を目指した。さらに Rv0679c 抗体を測定することによって血清学的に活動性結核患者と潜在性結核感染者の結核菌の遺伝子型を同定する。

フィリピンに loop isothermal amplification assay (LAMP) を導入し、その有効性を実証する。Spoligotyping 法を用いてアジアに多く流布する北京型結核菌感染をマニラにおいて確認する。各遺伝子型の特徴な免疫反応を 40 種以上のバイオマーカーを用いて明らかにする。さらに適切なカットオフを同定し、将来の診断方法に用いられるマーカーとマーカーの組み合わせを明示する。

B. 研究方法

1. ハルビン医科大学で収集した 44 例の喀痰からの結核菌を培養し、抽出した DNA の分析が日本で行った。PCR を用いて Rv0679c, RD105, RD207, TbD1 の領域を調べた。復旦大学で肺結核 45 人、肺外結核 26 人、AIDS 結核 16 人を含め、87 例の結核患者 39 例健康者ともに血漿中の Rv0679c IgG と IgA 抗体を ELISA 法で測定した。

2. サンラザロ病院の未治療結核患者（37 例）の喀痰と血漿を集めた。喀痰から DNA を抽出し、現場で LAMP 法を用いて MTB complex を確認した。また日本において spoligotyping 法で結核菌遺伝子型を同定した。血漿中の 38 種のサイトカインとケモカインを Luminex 法で、osteopontin (OPN), galectin-9 (gal-9) と TBGLIgG・IgA を ELISA 法で測定した。

C. 研究結果

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した。他の 2 例(5%)はまだ分類されていない新たな非北京型のサブタイプであった。さらに薬剤耐性結核の解析を行い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。

さらに Rv0679c 点突然変異を検出するため単純な multiplex PCR 法を開発し、619 臨床分離株に適用した。この法によって非北京型と北京型の株を 100% の正確さで鑑別できる。この迅速なかつ費用対効果の高い multiplex PCR 法を北京型結核菌感染の有病率を監視するために使用することができた。

復旦大学に所属する上海公衆衛生臨床センターで 200 検体の結核患者及び正常人のサンプルを検索した。肺結核中 TBGL-IgG 抗体の検出感度及び特異度はそれぞれ 67.4% と 81.0% であった。また TBGL IgA 抗体の検出感度及び特異度はそれぞれ 45.7% と 89.7% である。Rv0679c 蛋白の BCG 型 (Asn) と北京型 (Lys) との IgG・IgA 抗体を検索した。肺結核患者中に Rv0679c-Asn IgA 及び Rv0679c Lys IgA の高値を検出した。空洞と胸水のある症例では Rv0679c-Asn IgA 及び Rv0679c Lys IgA が低い傾向があった。上海での 45 例の肺結核中の 24 例(53.3%)は Rv0679c Lys142 に対する IgG 抗体を検出した一方、4 例(8.9%)は Rv0679c Asn142 IgG を検出しなかった。Lys142 IgG と C-Reactive Protein (CRP) の相関を初めて発見した。

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 であることを LAMP 法で確認した。Spoligotyping によって結核菌の遺伝子型は全てマニラ型であることを明らかにした。判別関数解析およびレシーバオペレータ特性曲線分析によってバイオマーカーの予測能力を評価し、最大限に検討グループ間を区別検体のセットを選択するカットオフ値を同定した。OPN, IP-10 と好中球は結核発症のマーカーとして使用できた。また OPN, IP-10, 好中球, IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, 血小板, gal-9, 及び白血球数との組み合わせで結核を 96.3% 正確に予測できた。フィリピンにおいては TBGL IgG の適切なカットオフは 4 U/ml が妥当と思われた。

E. 考察と D. 結論

中国とフィリピンにおける結核の共同研究体制を確立した。この3年間のデータをもとに、結核菌の北京型同定のための抗 Rv0679c 抗原に対する血清診断の試みと IgA 抗体産生機序とその意義についてさらに研究を行う。さらにインドネシアの検体も Human security course の教育経由で入手が可能であり、既に LTBI, TB 患者由来の血漿は入手済みである。さらにインドネシアの留学生結核患者の結核菌も現在解析中であり、その遺伝子型の解析にも努める。また東北地方はの外来結核菌の侵入程度を検索するための東北地方の結核菌の遺伝子型も検索する。

この研究において、中国における北京型・薬剤耐性の頻度が極めて高いことが再確認された。またフィリピンにおいては北京型がいまだに確認されており、その理由の解明も必要である。今後我が国の結核菌型も同定しながら、我が国に留まらず近隣諸国の結核感染阻止対策を提言したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. 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, 2013

2. 学会発表

1. Shiratori, B., Okumura, M., Yanai, H., Yoshiyama, T., Chagan-Yasutan, H., Tanaka, M., Matsumoto, M., and Hattori, T.: Attempt to distinguish between LTBI and active TB by latency-related antigens and biomarkers. The Third Bizan Immunology Symposium at The University of Tokushima (BISUT3) "Immune System Development, Deviation, and Regulation". Tokushima, Japan. 13-14th February 2014.

2. Shiratori, B., Hasibuan, FM., Senoputra, AM., Alisjahbana B., and Hattori, T.: Attempt

to find novel biomarkers for LTBI diagnosis - Indonesia study. The 3rd Conference on Otsuka-Biotec Collaborative Research of the Strategic Japanese-Thailand Cooperative Programme "Development of new diagnostic and drug for latent tuberculosis or non-replicating tuberculosis". Tokushima, Japan. 15th February 2014.

3. Shiratori, B., Leano, S., Nakajima C., Chagan-Yasutan, H., Niki, T., Suzuki, Y., Telan, E., and Hattori, T.: High levels of OPN, IP-10 and neurophilia in LAMP confirmed TB patients in Manila. 87th Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology. Tokyo, Japan. 26-28th March 2014.
4. Shiratori, B., Leano, S., Zhao, J., Chagan-Yasutan, H., Niki, T., Hirashima, M., Telan, E., and Hattori, T.: Increased production of galectin-9 in treatment naive pulmonary TB patients in Metro Manila. NIH-Tohoku University-JSPS Symposium. Sendai, Japan. 9-11th May 2013.
5. Shiratori, B. and Hattori, T.: Immunological status of treatment-naïve sputum positive TB patients in Manila. The 1st meeting of Ministry of Health, Labour and Welfare science research grants (Emerging and re-emerging infectious disease research project). Osaka, Japan. 5th July 2013.
6. Shiratori, B., Leano, S., Zhao, J., Chagan-Yasutan, H., Niki, T., Hirashima, M., Telan, E., and Hattori, T.: Immunological status of Treatment-Naïve Sputum Positive Pulmonary TB Patients in Metro Manila. US-JAPAN Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel. Sapporo, Japan. 17th August 2013.
7. Shiratori, B., Leano, S., Chagan-Yasutan, H., Niki, T., Okada, M., Nakajima C., Suzuki, Y., Telan, E., and Hattori, T.: Molecular and immunological status of sputum positive TB in Philippines. 67th Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology. Tohoku Branch. Sendai, Japan. 30-31st August 2013.

その他

DVD 教材

サハラ以南アフリカにおける感染症 - グローバル感染症入門 -

【企画】厚生労働科学研究費補助金 地球規模保健課題推進事業

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構築に関する研究班

【原案監修】服部俊夫 (東北大学 教授)

【学術協力】鈴木定彦 (北海道大学 教授)

井戸栄治 (東京医科歯科大学 特任教授)

松岡正典 (国立感染症研究所 ハンセン病研究センター)

後藤正道（鹿児島大学鹿児島大学大学院医歯学総合
研究科 国立療養所星塚敬愛園 園長）
圓純一郎（鹿児島大学鹿児島大学大学院医歯学総合
研究科 国立療養所星塚敬愛園）
【企画協力】喜田宏（北海道大学 特任教授）
【制作】（株）医学映像教育センター

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願番号：特願 2013-046197

発明者：大島吉輝 服部俊夫 他6名

発明の名称：ジクチオピロン誘導体又はジヒドロ
ジクチオピロン誘導体を有効成分とする
オステオポンチン産生阻害剤

出願人：国立大学法人東北大学 国立大学法人群
馬大学 扶桑薬品工業株式会社

出願日：2013年3月8日

〔Ⅵ〕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

研究分担者 下内 昭 結核研究所
研究協力者 小向 潤 大阪市保健所
松本健二 大阪市保健所

研究要旨

(1) 大阪市における外国出生結核患者の発生動向

2008～2012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。性別は女性が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) 日本語学校に在籍する外国人に対する結核健診

2011～13年に実施した日本語学校に在籍する外国出生者への結核健診受診者のうち、再受診者546名を除く4529名を対象として分析を行った。平均年齢は23.3歳であり、男性は2394名（52.9%）であった。出身国は、中国2378名（52.5%）、韓国920名（20.3%）、ベトナム739名（16.3%）、インドネシア101名（2.2%）、タイ68名（1.5%）、モンゴル44名（1.0%）、その他279名（6.2%）であった。入国時期不明1384名を除く3145名の入国から健診受診日までの期間は中央値63日であった。最終的に活動性結核と診断された者は19名（0.4%）であり、平成23年の大阪市の一般人口での健診発見率（0.08%）に比べて有意に高く、同年のホームレスなどを対象としたあいりん地域での健診発見率（0.6%）に近かった。入国から健診受診までの期間は中央値137日（17～401日）であった。健診時の胸部X線で空洞を認めた者は2名（10.5%）であり、2名とも塗抹陽性であった。塗抹陰性は16名中14名（87.5%）であり、より軽症で発見されていた。以上より日本語学校における健診は結核の早期発見に寄与していると考えられた。

(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。2010年～2013年に登録された外国出生結核患者のうちVNTR解析を実施した54名と、40歳未満の日本出生216名を比較した。VNTR解析は、JATA12-VNTRを行い、完全一致した場合にはHV4領域を含む12追加領域を解析した。年齢の中央値は、外国出生群30.5歳、日本出生群31歳、男女比はそれぞれ1.8、1.6であった。外国出生群と日本出生群の間で追加領域を含む24領域すべて一致したものはなかった。外国出生群内で、追加領域を含む24領域すべて一致したものはなく、JATA12一致かつ追加領域不一致は15例（27.8%）、JATA12一致かつ追加領域不明は1例（1.9%）、JATA12不一致は38例（70.4%）であった。

一方、日本出生群内で追加領域を含む24領域すべて一致したのは44例（20.4%）、JATA12一致かつ追加領域不一致は43例（19.9%）、JATA12一致かつ追加領域不明は37例（17.1%）、JATA12不一致は92例（42.6%）であった。外国出生群の型別一致率は日本出生群より有意に低かった。外国出生者と日本出生者との型別を比較したところ、追加領域を含む24領域すべて一致したのは2例（3.7%）であった。この2組は、①49歳ブラジル出生者1名（入国8年）と29歳日本出生者1名、②64歳ペルー出生者1名（入国3年）と24歳日本出生者1名であったが、疫学的なつながりはみいだせなかったため、外国人由来株が日本人由来株同様に国内で感染伝播しているとはいえなかった。

A. 研究目的

(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、全年齢でみると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。

B. 研究方法

(1) 大阪市における外国出生結核患者の発生動向

2008年～2012年に大阪府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・職業について分析した。

(2) 日本語学校に在籍する外国出生者に対する結核健診

2011～13年に日本語学校19校に所属する外国出生者に対し結核健診を実施した。日本出生者、国籍不明、再受診者を除いて分析を行った。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については、来日から健診受診までの期間・症状・結核既往・病型・菌情報などについて分析した。

(3) 外国出生結核患者由来菌株のVNTR解析

2010年～2013年に登録された外国出生結核患者は141名であり、うち培養陽性は74名（52.5%）であった。そのうちVNTR解析を実施した者は54名（73.0%）であった。対照として、2010年～2013年に登録された40歳未満の日本出生培養陽性結核患者338名の中でJATA12-VNTRを実施した216名（63.9%）と比較した。VNTR解析は、JATA12-VNTRを行い、完全一致した場合にはHV4領域を含む12追加領域を解析した。

C. 結果

(1) 大阪市における外国出生結核患者の発生動向

外国人患者は、2008年の33名以降毎年30名余りで推移しており、2012年は34名であった。性別は女性が約半数を占めており、2012年は15名（44.1%）であった。年齢の中央値は、2008年33.0歳から2012年27.5歳へと推移していた。出身国を見ると、2008年は中国10名（30.3%）、韓国9名（21.2%）、次いでフィリピン、タイがともに3名（9.1%）であった。その後中国の割合が増え、韓国の割合が減少し、2012年には中国が19名（56.3%）を占め、韓国は2名（6.3%）まで減少した。また入国から登録までの期間は、1年未満が43名（25.1%）、1～4年が48名（28.1%）であった。日本語学校に所属していた者の割合は、2008年4名（12.1%）から2012年8名（23.5%）へと増加傾向にあった。

(2) 日本語学校に在籍する外国出生者に対する結核健診

日本語学校において2011～13年の3年間で5091名に健診を実施した。日本出生および出身国不明であった16名、および外国出生者で再受診者546名を除く4529名を対象として分析を行った。平均年齢は23.3±4.4歳、14～70歳であった。男性は2394名（52.9%）であり、20代が全体の73.9%を占めていた。出身国は、中国2378名（52.5%）、韓国920名（20.3%）、ベトナム739名（16.3%）、インドネシア101名（2.2%）、タイ68名（1.5%）、モンゴル44名（1.0%）、その他279名（6.2%）であった。入国時期不明1384名を除く3145名の入国から健診受診日までの平均日数は145.9±167.9日、中央値63（3-3877）日であった。健診の結果、

結核が疑われた者は71名（1.6%）であった。精密検査の結果、最終的に活動性結核と診断された者は19名（0.4%）であった。19名の性別は、男性14名（73.7%）、女性5名（26.3%）であり、年齢は中央値23歳、18～29歳であった。出身国は中国12名（63.2%）、韓国2名（10.5%）、ネパール3名（15.8%）、ベトナム1名（5.3%）、フィリピン1名（5.3%）であり、入国から健診受診までの期間は中央値137日（17～401日）であった。健診時の胸部X線で空洞を認めた者は2名（10.5%）であり、2名とも塗抹陽性であった。他は塗抹陰性培養陽性が2名（10.5%）、塗抹陰性培養陰性は9名（47.4%）、塗抹陰性培養不明、菌情報不明ともに3名（15.8%）であった。

(3) 外国出生結核患者由来菌株のVNTR解析

平均年齢は、外国出生群37.1±18.7歳、日本出生群29.8±6.8歳、年齢の中央値はそれぞれ30.5、31歳、男女比はそれぞれ1.8、1.6であった。外国出生群内で、追加領域を含む24領域すべて一致したものはなく、JATA12一致かつ追加領域不一致は15例（27.8%）、JATA12一致かつ追加領域不明は1例（1.9%）、JATA12不一致は38例（70.4%）であった。一方、日本出生群内で追加領域を含む24領域すべて一致したのは44例（20.4%）、JATA12一致かつ追加領域不一致は43例（19.9%）、JATA12一致かつ追加領域不明は37例（17.1%）、JATA12不一致は92例（42.6%）であった。

外国出生者と日本出生者との型別を比較したところ、追加領域を含む24領域すべて一致したのは2例（3.7%）、JATA12一致かつ追加領域不一致は12例（22.2%）、JATA12一致かつ追加領域不明は2例（3.7%）、JATA12不一致は38例（70.4%）であった。24領域が一致した2組は、①49歳ブラジル出生者1名（入国8年）と29歳日本出生者1名、②64歳ペルー出生者1名（入国3年）と24歳日本出生者1名であった。

D. 考察

(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人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く、2012年には29.3%に達していた。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) 日本語学校に在籍する外国出生者に対する結核健診

2011-13年の日本語学校健診において発見された活動性結核は19名（0.4%）であり、2014年大阪市の定期・住民健診における患者数6名（0.09%）より発見率は有意に高かった（ $p < 0.001$ ）。結核と診

断された 19 名のうち、入国後 1 年未満である者は不明 2 名を除く 17 名中 16 名 (94.1%) を占めていた。これは大阪市における外国人結核 (2007~11 年、20~29 歳 79 名) で入国後 1 年未満である者の割合 38.0% より高かった。また、塗抹陰性は 16 名中 14 名 (87.5%) であり、より軽症で発見されていた。以上より日本語学校における健診は結核の早期発見に寄与していると考えられた。

(3) 外国出生結核患者由来菌株の VNTR 解析

外国出生者と日本出生者の間で、24 領域一致したものは 1 例もなかった。外国出生者内で 24 領域一致したものは 1 例もなかったが、日本出生者内では 44 例 (20.4%) と日本出生のほうが有意に高く、外国人由来株が日本人由来株同様に国内で感染伝播しているとはいえなかった。日本出生と外国出生で 24 領域が一致していたのは 2 組 4 名であったが、疫学的なつながりは見いだせなかった。

E. 結論

(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人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

2011~13 年に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、19 名 (0.4%) の結核患者を発見した。これらのうち塗抹陰性は 16 名中 14 名 (87.5%) であり、日本語学校における健診は結核の早期発見に寄与していると考えられた。

(3) 外国出生結核患者由来菌株の VNTR 解析

外国出生者と日本出生者の間で、24 領域一致したものは 1 例もなかった。外国出生者内で 24 領域一致したものは 1 例もなかったが、日本出生者内では 44 例 (20.4%) と日本出生のほうが有意に高く、外国人由来株が日本人由来株同様に国内で感染伝播しているとはいえなかった。