

[ ] 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。主な成果としては、タイ国における菌体側の解析で難治性結核で北京株は 66.7%と全国平均の 20.8%に比して高い事などを報告した [Microbiol Immunol 2013 ;57(1):21-9]。更に、結核菌培養 1,333例 (1,319人より) と数を増やし、より詳細な解析法にて菌体の解析を実施した結果、臨床情報との相関で、北京株がより若年者に多く、耐性菌症例など難治性結核に多いなど上記の論文結果をより多くの数で確認・定量する結果が得られている。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 Hazard 比モデルによる単回帰解析で、EA 株による結核患者が非 EA 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 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 HM 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、HM 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るネットワークを活用した。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 HM 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 (図 1) 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 (12) 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画して、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カ所の結核医療の「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)

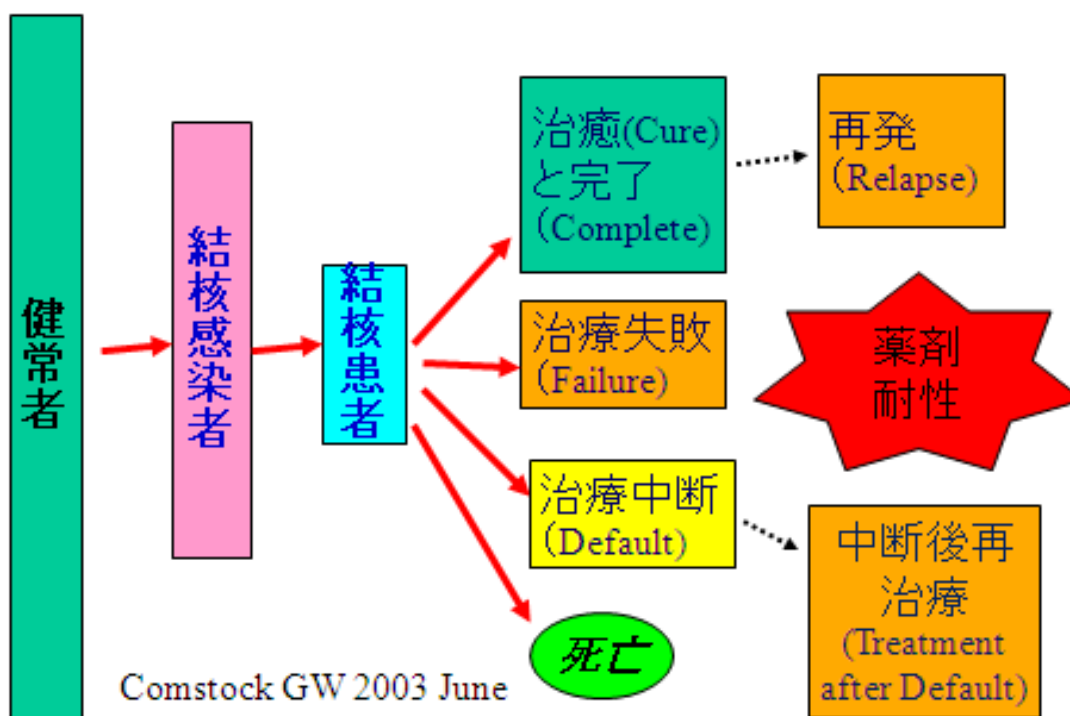
日本においては、臨床研究に関する倫理指針 (平成 20年厚生労働省告示第 415号) 疫学研究に関する倫理指針 (平成 19年文部科学省・厚生労働省告示第 1号) ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1号) に従っている。

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ールを作成し、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は厳密に管理し、参加研究者以外のものが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

図1 結核の感染・発病と治療転帰、難治化



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

日本では、複十字病院の結核登録を活用した検討をした。2007年1月1日より2013年12月末までに登録された結核患者2,748名において、外国と関連がある結核患者は5.9%の162名で、そのうち多剤耐性結核患者は49名(30.2%)であった。これは、外国と関連のない結核患者2,586名での、多剤耐性結核患者91名(3.5%)と比べて、オッズ比11.89(95%信頼区間8.01-17.65)と有意に高かった。

HIV合併結核研究としては、タイにおけるHIV感染者コホートの研究での保存血清を活用した潜在性結核感染診断法の検討を目指した、表1の様に臨床情報を整理した。

難治性結核の分子疫学解析をタイで進めて来た成果論文(Sukkasem S, et al. Microbiology and Immunology 2013 Jan;57(1):21-9)で、図2・図3に示す様に、その主な内容は、再治療の為に結核菌培養が得られた42人について検討したところ、40人は同一のRFLPパターンであったが、2人は異なるRFLPパターンがあり外因性再感染が疑われた。初回では多剤耐性が12.5%であったのが、2回目では22.5%と有意に高かった。これらの難治性結核で

北京株は66.7%と全国平均の20.8%に比して高かった。

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。

Spoligotyping (polymorphisms of the direct repeat (DR) region) による1,123株の菌体分類では、北京株が548例(48.8%)、EAI株が406例(36.2%)、Euro-American株が157例(14.0%)、CAS株が11例(0.98%)、その他1株(0.09%)で、LSP/RD法と相関していた。

菌の分類と臨床情報との相関の検討では、前述のRFLPの研究と同様に、年齢共に薬剤耐性が相関を示した。45歳で区別した場合、若年者での北京株は51.0%(353/692)と年配者での37.8%(242/641)とくらべオッズ比1.72(95%信頼区間1.38-2.14,  $p < 0.0001$ )と有意に高かった。また、多剤耐性菌の主であるRFP耐性菌での北京株の割合は56.5%(35/62)とRFP感受性菌での割合の44.0%(519/1180)とくらべオッズ比1.65(95%信頼区間0.99-2.76)と高かった。体重、結核病変の部位(肺外病変の有無等)胸部レントゲン所見(空洞の有無、広がり)、喀痰塗抹検査での菌量は、菌の分類と相関はなかった。

表2に、この結核患者1319人での1年間での死

**表1 HIVコホートの中でQFTまたは保存血漿のある群の属性**

特徴	QFTあり		特徴	QFTなし(n=246)	
	(n=247)	QFTなし(n=246)		QFTあり(n=247)	QFTなし(n=246)
<b>Gender</b>			<b>CD4 at enrollment</b>		
Male	21	87	<100	19	93
Female	32	107	100-149	8	13
<b>Age</b>			150-199	6	20
<15	5	8	200-249	6	10
15-34	12	79	250-299	3	11
35-59	36	104	300-349	2	10
60+	0	3	350+	9	37
<b>BMI</b>			<b>ARV at enrollment</b>		
<16	4	15	ARV	35	131
16-18.5	9	48	No ARV	18	63
18.5+	32	124	Missing	0	0
Missing	8	7	<b>TB at enrollment</b>		
<b>TST</b>			TB before enrollment	6	14
0	37	134	TB at enrollment	1	12
2-4	2	14	Non TB	46	168
5-9	4	13	<b>Survival by April 2011</b>		
10+	1	3	Dead	13	43
No TST	9	30	Alive	40	151

**表2 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
<b>菌分類</b>	非EAI株	Reference		Reference	
	EAI株	2.74 (1.95-3.86)	<0.001	1.75 (1.23-2.48)	0.002
<b>Gender</b>	Female	Reference		Reference	
	Male	1.20 (0.83-1.74)	0.335	1.21 (0.82-1.79)	0.327
<b>Age group</b>	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
<b>HIV status</b>	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)	
<b>Body Weight</b>	>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

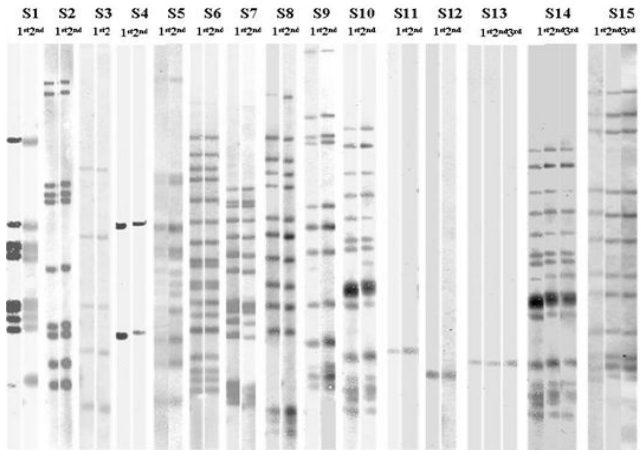
## 図2 難治性結核の分子疫学解析 - タイ(1)

●難治性結核の分子疫学解析をタイで進めて来た成果論文が一つ受託された。(Sukkasem S, et al. *Microbiol Immunol* 2013 Jan;57(1):21-29)

●再治療の為に結核菌培養が得られた42人について検討したところ、40人は同一のRFLPパターンであったが、2人は異なるRFLPパターンがあり外因性再感染が疑われた。

●初回で多剤耐性が12.5%であったのが、2回目で22.5%と有意に高。

●難治性結核で北京株は66.7%と全国平均の20.8%に比して高かった。



## 図3 難治性結核の分子疫学解析 - タイ(2)

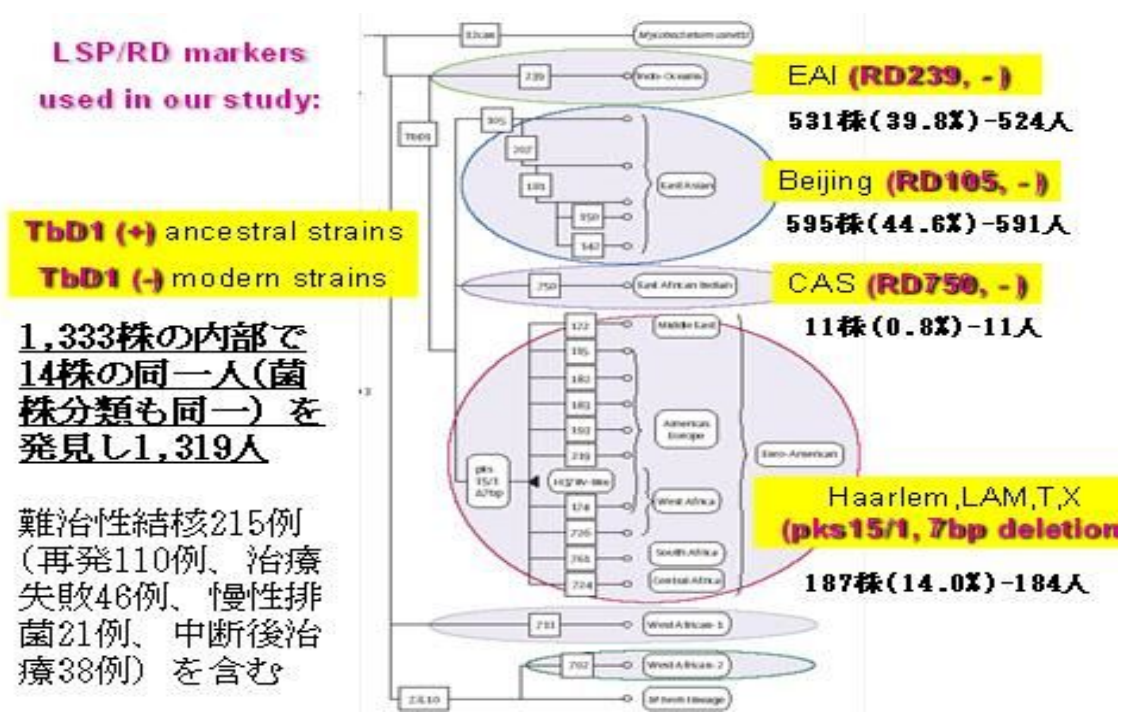
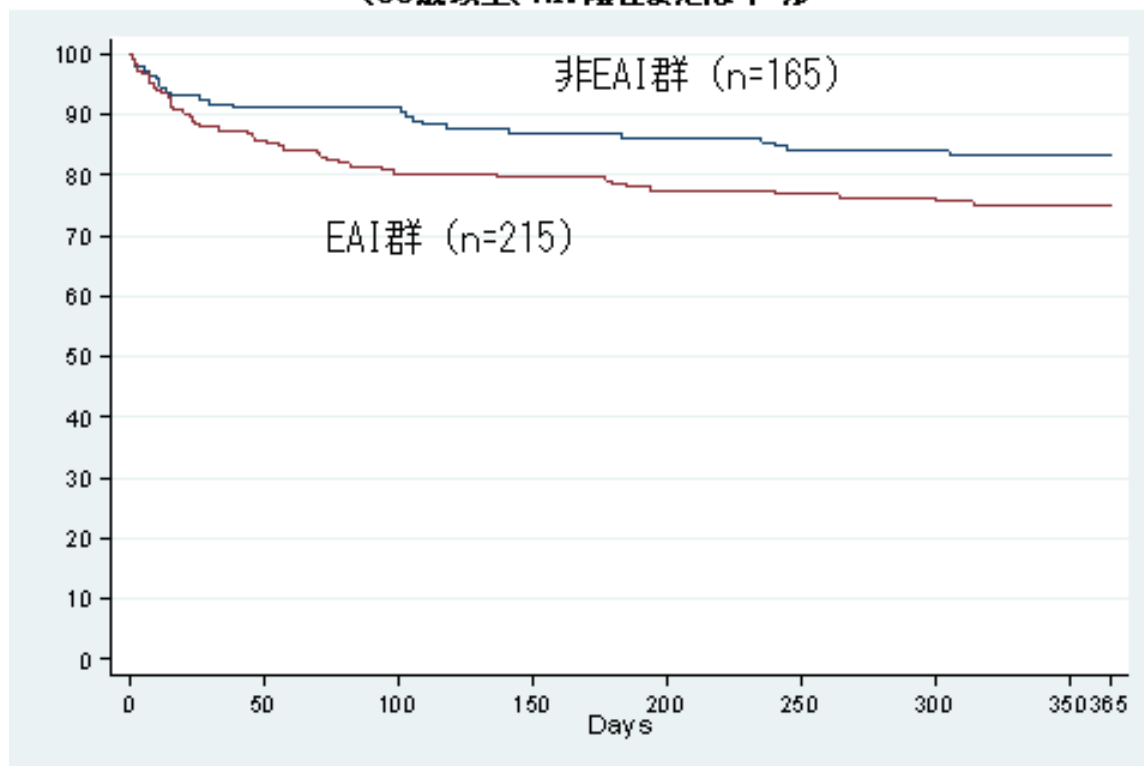


図4. EAI群と非EAI群の結核患者の治療開始1年間の生存曲線①  
(55歳以上、HIV陰性または不明)



亡に關しての危険因子を示す。Cox-Proportional Hazard比モデルによる単回帰解析で、EA株による結核患者が非EA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HM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4にEA株の比率が高い55歳以上のHM陰性(稀に不明)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。この群でもEA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

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。

タイでの大規模でより詳細な菌解析は、論文報告した古典的なRFLP解析による少数の解析による北京型菌株がより難治性に関与するという仮説を検証

する結果が得られている。多剤耐性に対する検討や、多変量解析を使用するなどの詳細な検討を進め、論文化を進めている。

日本の複十字病院での検討は、輸入感染症としての多剤耐性結核の重要性が明らかになった。2011年度は日本国籍であるが米国滞在42歳、タイ在住42歳、19歳、2012年度はインドネシアに長期在住していた66歳、2013年度はフィリピンでボランティアをしていた2名を経験しており、海外渡航歴の聴取が重要と考えられる。

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。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。菌体の分子疫学解析に先立つ疫学因子解析の結果を報告する。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。

HM合併結核に関して、WHOのTB/HM専門委員会がHM感染者の潜在性結核感染治療に関して再度の国際レビューを実施し、Efficacyに関して、HAART時代においてもNH等の抗結核薬が結核の予防に効果がある事を、結核研究所・山田国際部長のチェンライの解析データも含む確認後、HM感染者に対し推奨している。WHOより結核血清診断の限界が指摘された影響にて、倫理委員会よりHM陰性結核患者にて十分な結果が得られるか、細胞性免疫を活用した診断法を考える様に示唆された。複十字病院で、結核症の診断の一部で積極的な結核診断

法の活用をしており、精度管理について研究した。

## E. 結論

北タイ・チェンライ県において、HIV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ている。

## 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, Palittapongarn P, Khusmith S. : Drug resistance and IS6110-RFLP patterns of Mycobacterium tuberculosis from recurrent tuberculosis patients in northern Thailand. Microbiology and Immunology. 57(1):21-9, 2013 Jan. 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、薙田泰誠、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 P 2061) 仙台、2014 年 1 月
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
3. 野内英樹、関谷幸江、窪田素子、樋口一恵、吉山崇、尾形英雄、工藤翔二、原田登之 : クオンティフェロン TB 検査 (QFT-2G および 3G) における陰性コントロール値について . NPO 法人結核感染診断研究会・第 1 回総会・研究会 (一般口頭演題 演題番号 5) 2012 年 5 月、広島
4. 野内英樹、水野和重、青野昭男、吉山崇、倉島篤行、奥村昌夫、森本耕三、窪田素子、青木美砂子、上山雅子、早乙女幹朗、尾形英雄、工藤翔二 : 臨床検査残余検体を活用した菌と人の検体バンクによる難治性結核の研究 . 第 87 回日本結核病学会総会 (一般口頭演題、診断 (細菌学的診断、鑑別診断) 2、演題番号 127) 2012 年 5 月、広島
5. 野内英樹、出井禎 : 菌と人のコホート検体バンクによる結核の発症と難治化に関する要因研究 (第 3 報). 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 (一般口頭演題、遺伝子、感染症 演題番号

O-112) 京都、2012 年 11 月日

6. 野内英樹、吉山崇、倉島篤行、出井禎、水野和重、石井加津恵、青野昭男、奥村昌夫、佐々木結花、尾形英雄、薙田泰成、徳永勝士、工藤翔二 : 薬理遺伝学を含む難治性要因研究の基盤作成を目指した結核患者コホート研究 . 第 57 回日本人類遺伝学会 (一般演題 薬理遺伝学 P-18) 2012 年 10 月 25 日、東京
7. 野内英樹、出井禎 : 菌と人の検体バンクによる結核の発症に関する要因研究 (第 2 報). 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会 (一般口頭演題、抗酸菌 演題番号 O-167) 岡山、2011 年 11 月

## 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