

インドネシアにおける活動性結核と潜在性結核感染の鑑別診断法の開発

業務主任者 服部 俊夫 東北大学 災害科学国際研究所 災害感染症学分野教授
研究協力者 Bacht Alisjahbana Padjadjaran University, Public Health Science Program
教授
白鳥 ベアタ 東北大学 災害科学国際研究所 災害感染症学分野
リサーチレジデント

I. 抗結核菌抗体を用いた研究

II. 結核感染症におけるマトリセル蛋白質の役割に関する研究

研究要旨

I.

血漿中の抗結核菌抗体の測定は容易かつ迅速であり、様々な状況に応じて実施できる。しかし、近年では結核の診断方法としての有用性は過去の研究の不正確な推定結果、矛盾など様々な原因のために制限されている。そのため血清学的診断ツールの改善に向けて、努力していくことが必要である。特に潜在性結核感染症（LTBI）診断に適切な候補抗原を同定することは最近の研究の重要な目的である。本研究では、LTBI と活動性結核の識別診断のため 10 種の結核菌抗原に対する抗体応答を調べ、その有効性の評価を行った。血漿中の抗 ACR、抗 LAM、抗 TDM-M および抗 TBGL IgG 抗体レベルは LTBI と正常人 (HC) と比較して、活動性結核の患者においてより高いことを示したが LTBI と HC との間の抗体タイターの差はなかった。MTB および非結核性マイコバクテリアは同様の細胞壁様構造物を共有するため、糖脂質抗原に対する抗体を調べる際には注意が払われるべきである。糖脂質抗原に対する抗体のいずれかは、マイコバクテリウム・アビウムコンプレックス (MAC) 陽性者の LTBI 群と MAC 陰性者の結核患者を識別できなかった。しかし、MAC 陰性の結核患者は MAC 陽性者の LTBI と HC 群より高値の抗 ACR 抗体タイターを示したので抗 ACR 抗体は MAC 感染と関連性は低いと考えられる。したがって、糖脂質抗原に対する抗体を血清学的に検出する際には MAC 混合感染の可能性を十分に考慮されるべきであり、MAC 感染を同定するための適切な診断ツールを使用すべきである。つまり、抗 ACR および糖脂質抗原に対する抗体の測定は活動性結核の血清学的診断に有望であり、その血漿中のタイターの増加は潜在性結核感染の再活性化を示すシグナルの一つであると考えられる。

II.

細胞外マトリセルラー蛋白質 (MCP) であるオステオポンチン (OPN)、ガレクチン9 (GAL-9) およびテネイシンC (TN-C) は生理学的プロセスだけでなく、感染症、炎症、または腫瘍形成の際に発現が観察される。本研究では血漿中のMCPレベルが活動性または潜在性結核 (TB) のマーカーとして有用であるかを調べた。結核患者の血漿中のOPNとTN-C濃度はLTBIと健常人に比べて高かったがLTBI群のOPNの濃度は正常人より有意に高値を示した。GAL-9においては対象グループの間に差が見られなかった。したがって、GAL-9はむしろ感染の部位に発現していることを推測し、結核肉芽

腫でGAL-9の発現を調べ、他の肉芽腫性疾患とその発現を比較した。GAL-9染色はTB肉芽腫で陽性であったが、サルコイドーシスおよびクローン病肉芽腫でのGAL-9の発現が観察されなかった。肉芽腫におけるECMの役割を調べるために、JurkatおよびTHP-1細胞を用いてin vitroアポトーシスおよび壊死性アッセイを行った。

A. 研究目的

I.
現在実施が可能な結核対策の要は、活動性結核患者とLTBIの早期発見と治療である。本研究の目的はTB患者、LTBI、HCの血漿を用いて、多数のマイコバクテリア抗原に対する体液性免疫応答を調べることとその解析によって将来の血清学的診断に使用できる有望なマーカーを同定することである。従って、現在の活動性および潜在性結核の診断方法を改善することを試みた。

II.
活動性結核と潜在性結核感染の診断には多数のバイオマーカー候補が研究されているが、活動性結核と潜在性結核感染におけるMCPの役割の解明が不十分であり、我々はその役割について洞察し、グローバルな結核介入と除去につながる有用な結核診断方法の確立を目指した。

B. 研究方法

I., II.
バンドンのPrimary Health Centre, Latent TB Clinicで2013年に診断されたHIV陰性の結核患者16人、LTBI66人、HC35人の血漿を収集し、ELISA法で血漿中の血漿総抗体価、抗TBGL IgG, IgA、または抗TDM-K, TDM-M, LAM, Rv0679c, ACR, Ag85A, Ag85B, HBHA, MDP-1抗体が測定された。MAC感染が抗GPL core IgA抗体値によって同定された。29種のサイトカイン/ケモカインはLuminex法で測定し、OPN, GAL-9とTN-Cの濃度はそれぞれのELISAキットで検出した。東北大学病院の腹膜結核の2例、

Crohn's病1例とサルコイドーシス1例の生体組織を免疫組織化学染色法で処理し、GAL-9, OPNとTN-Cの発現を調べた。MCPを加えたJurkat細胞、THP-1細胞の細胞死はMTT法またFACSのAnnexin V/7-AAD染色によって確認した。

C. 研究結果

I.
ほとんどの結核患者が男性で、HCとLTBIグループの大半が女性によって占められていた。参加者の年齢は18~54歳までの範囲であった。LTBIの76%は医療従事者または活動性結核患者の家庭内接触者であって、24%はQFT陽性でも、結核接触の既往歴がなかった。MAC感染はHCの14%、LTBIの13%、TBの6%に見られ、抗GPL core IgA抗体のタイターは群の間で異ならなかった。TB患者はHCとLTBI群と比較して有意に高い血漿中の抗TBGL IgA, IgG, 抗TDM-M, 抗TDM-K及び抗LAM抗体タイターを示したがHCとLTBI群の間で有意差は観察されなかった。MAC感染の状態に基づいて各グループを分割しても、MAC陰性群には同様のパターンが観察された。LTBIグループ内ではMAC陽性とMAC陰性群の間に抗TBGL IgAおよびIgG, 抗LAM抗体価の有意差を見出した。抗Rv0679c抗体は各グループの間に差がなかった(図1.)。蛋白質抗原に対する抗体を調べた際には抗ACR抗体はグループの間に最高の識別性を示した。さらに他の抗体に反して、MAC感染によっての影響を受けてない(図2.)。

II.

血漿中 OPN 濃度に関しては TB 群が LTBI と HC に比較して、高値を示し、また LTBI 群は HC に比べて有意に高い。TN-C の高値は TB 患者においてだけ高かった。末梢血の GAL-9 の濃度は各グループで異ならなかった (図 3.)。三つの MCP が結核患者において相関を示したが、この現象は LTBI と HC 群にはなかった (図 4.)。細胞内 GAL-9 と OPN の発現は結核・サルコイドーシス性肉芽腫に観察され、中央の乾酪壊死および線維輪には染色が見られなかった。Crohn's 病の非壊死性肉芽腫にははっきりした GAL-9 と OPN 染色は見られなかった。わずかな類上皮細胞が陽性に染色された。結核・サルコイドーシス性肉芽腫の周りの線維性のリングは TN-C で染色された。試験管内実験では GAL-9 および OPN は濃度依存的に Jurkat 細胞死を示したが、THP-1 細胞には影響を及ぼなかった。TN-C は両細胞株での壊死作用を誘発しなかった。

D. 考察

I.

活動性結核と LTBI では病期に応じて抗原の発現が異なり、それによって体液性免疫応答が影響を受け、病期に依存した特異的な抗体の産生につながる。さらに特異的な抗体の産生は、結核菌負担、抗原のアクセシビリティ、抗原の化学構造及び局在などのいくつかの要因に依存することに留意すべきである。MTB 蛋白質抗原が TB における強力な免疫応答を誘発し、糖脂質に対する抗体検出の組合せによって血清診断

の改善が期待される。

II.

疾患活動性に関連する OPN 上昇の概念は報告され、我々は OPN 濃度と疾患の重症度との関連を明らかにした。血漿中の OPN 濃度の変動は TB 感染だけではなく、再活動化のシグナルのひとつであると考え。TN-C の上昇がグローバル炎症反応マーカーとして報告され、最近の研究は TN-C の発現は微生物抗原によって誘導されることを示した。本研究の高値の血漿 TN-C は肉芽腫形成、特に線維化を反映すると考える。予想外に血漿中の GAL-9 の測定することによっては LTBI と活動性結核を識別できなかった。考えられる理由としては GAL-9 が末梢血への産生より肉芽腫で局在し、感染部位での特異的な役割を果たしている。

E. 結論

I.

ACR と糖脂質抗原に対する抗体の測定は活動性結核の有望な血清学的診断の方法と期待され、そのタイトルの増加は潜在性結核感染の再活性化のシグナルであると考えられる。

II.

血漿中 OPN および TN-C レベルは結核の活動を反映し、血漿中の濃度の変動は病期を表すと考えられる。TB 肉芽腫での GAL-9 局在を示し、病理組織学的診断に有用なマーカーであり得ることを示唆した。In vitro で細胞死を調べた結果によって、GAL-9 は肉芽腫形成に関与する因子の一つであると考え。

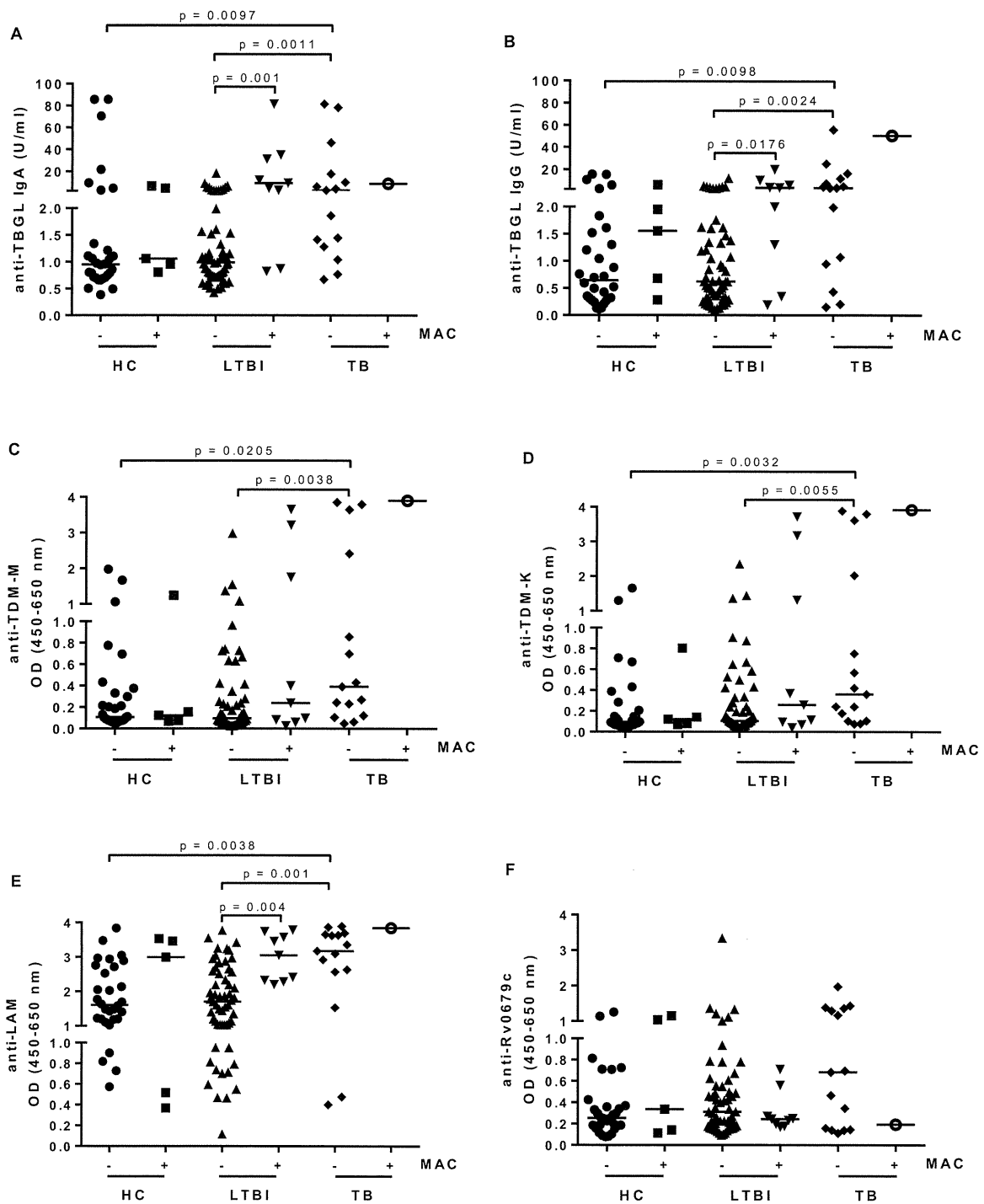


図1. マイコバクテリア糖脂質抗原と Rv0679c に対する抗体の血漿中のタイター。

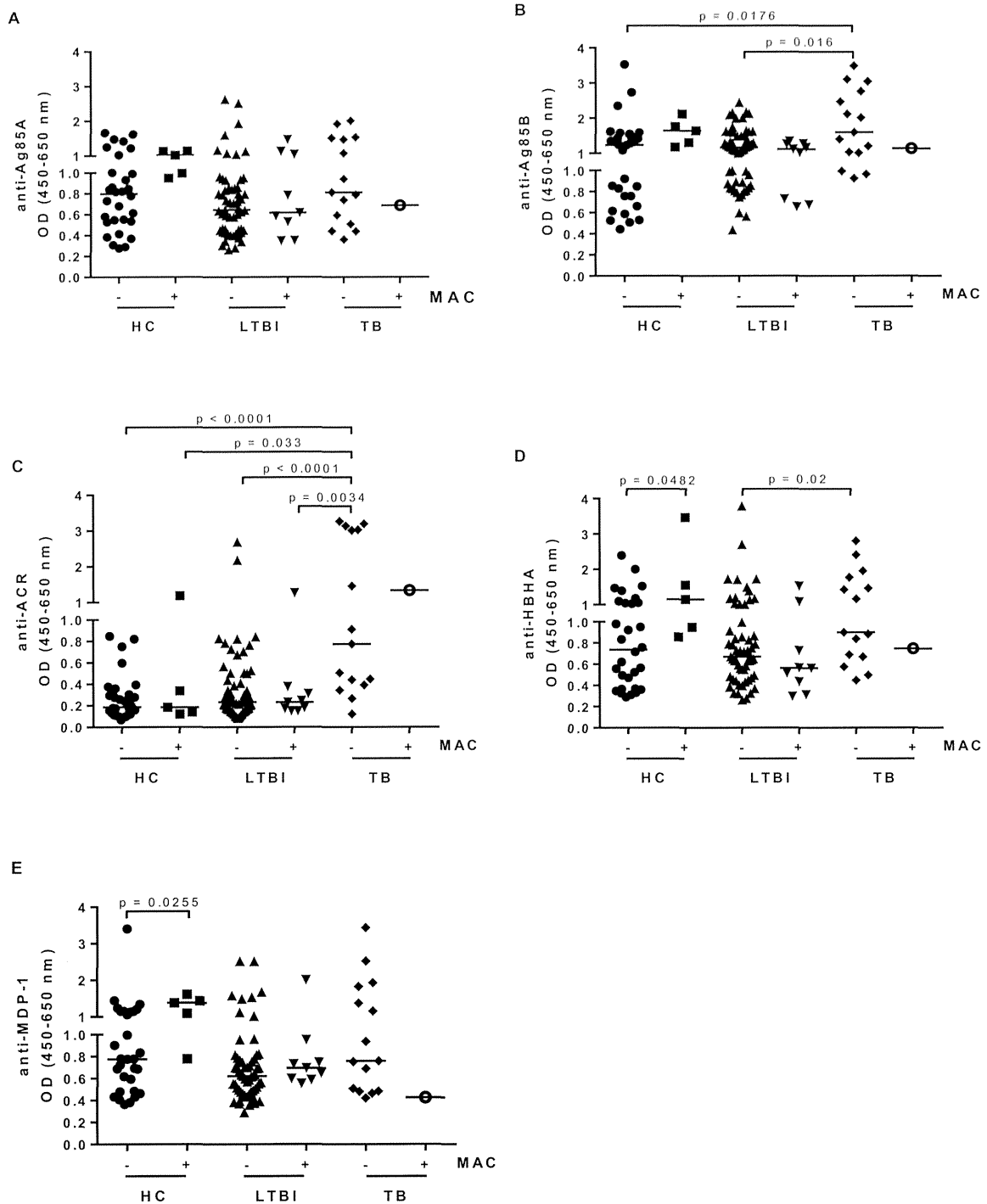


図2. マイコバクテリアのタンパク質抗原に対する抗体の血漿中のタイトル。

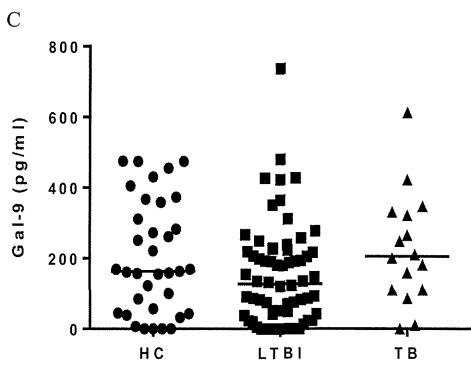
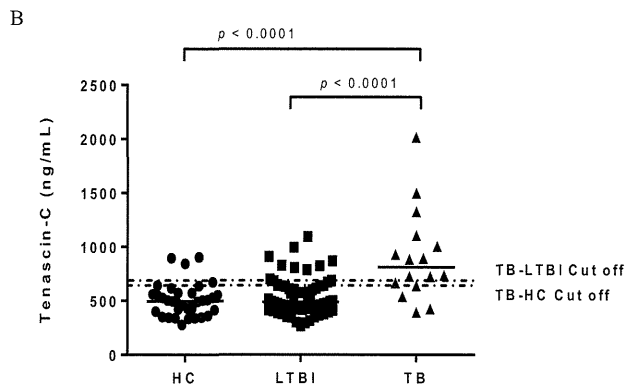
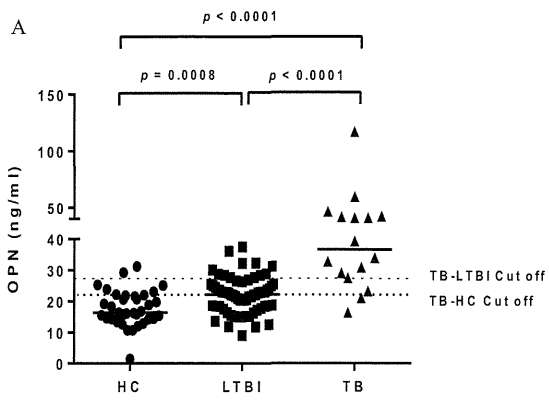


図 3. HC, LTBI, と TB 患者における血漿中 OPN, TN-C と GAL-9 の濃度。

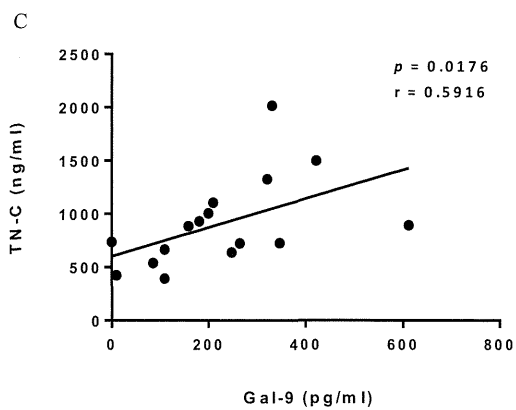
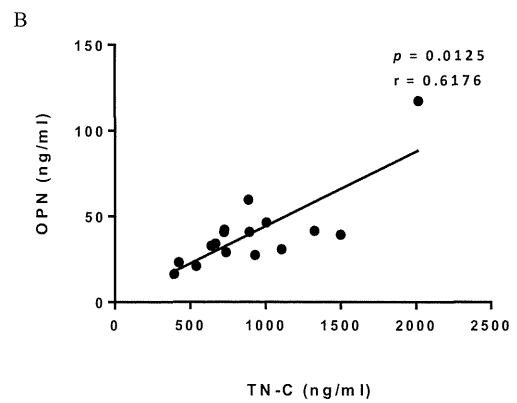
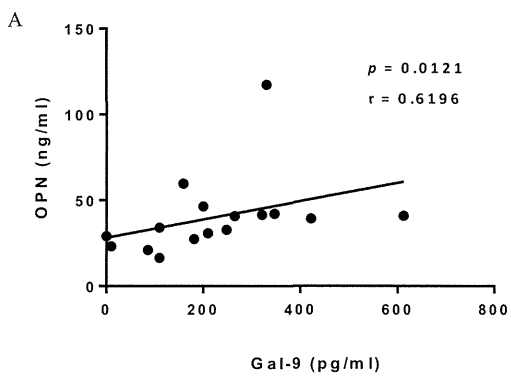


図 4. TB 患者におけるマトリセル蛋白質の相関。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Chagan-Yasutan, H., Lacuseta, T-L., Ndhlovu, L. C., Pguma, S., Leano, P.S.A., Telan, E.F.O., Kubo, T., Morita, K., Uede, T., Dimaano, E.M., and Hattori T. Elevated levels of full-length and cleaved osteopontin during acute dengue virus infection. *Thrombosis Research* PMID: 24861695 *Thrombosis research* 2014, 134(2)449-454.
2. Kadota, J., Kohno, S., Amitani, M., Keicho, N., Takeyama, H., Chonabayashi, N., Hase, M., Hattori, T., and Fujita, M. REPORT FROM THE COMMITTEE OF THE JAPANESE SOCIETY FOR TUBERCULOSIS: A STUDY OF TUBERCULOSIS AMONG FOREIGNERS RESIDENT IN JAPAN, 2008 *Kekkaku* Vol. 89, No. 1 : 5-12, 2014.
3. Usuzawa, M., Telan, E., Kawano, R, Dizon, C., Alisjahbana, B., Ashino, Y., Egawa, S., Fukumoto, M., Izumi, T., Ono, Y., and Hattori, T. Awareness of disaster reduction frameworks and risk perception of natural disaster: a questionnaire survey among Philippine and Indonesian health care personnel and public health students. *Tohoku J Exp Med.* 2014; 233(1):43-8.
4. Shiratori, B., Usami, O., Hattori, T., and Ashino, Y. A man from South Asia presenting with abdominal pain, *BMJ case reports* 2014. doi: 10.1136/bcr-2013-

201716.

5. Shiratori, B., Leano, S., Nakajima, C., Chagan-Yasutan, H., Niki, T., Ashino, Y., Suzuki, Y., Telan, E., and Hattori, T. Elevated OPN, IP-10, and Neutrophilia in Loop-Mediated Isothermal Amplification Confirmed Tuberculosis Patients, *Mediators of inflammation* 2014, 513263. doi: 10.1155/2014/513263.

2. 学会発表

1. Hattori T, Iwasaki H, Leano S, Telan B, Koizumi N, Nakajima C, Suzuki Y, Chagan-Yasutan H: Combination of Antibody And DNA Detection to Improve Diagnosis of Leptospirosis. 114th General Meeting ASM 2014 (American Society for Microbiology) Boston, USA, 17-20th May 2014.
2. 芦野有悟, 齋藤弘樹, 服部俊夫, 賀来満夫: 急性発熱患者におけるサイトカインの検討。第88回日本感染症学会学術講演会・第62回日本化学療法学会総会合同学会。福岡市ヒルトン福岡シーホーク 2014年06月19日。
3. Chagan-Yasutan H, Lacuesta TL, Ndhlovu LC, Leano PSA, Telan EFO, Dimaano EM, Hattori T: デングウイルス感染症における炎症及び凝固関連マーカー研究。2014年度海外学術調査フォーラム プログラム 東京 2014年6月28日。
4. 服部俊夫: 「人間の安全保障」に基づく国際的災害医学教育研究連携体制構築。平成25年度 特定プロジェクト研究成果報告会 仙台

2014年7月13日

5. 芦野有悟、服部俊夫：潜在性結核患者と結核患者の Galectin-9 発現様式の相違の検討。平成 25 年度 特定プロジェクト研究成果報告会仙台 2014 年 7 月 13 日。

6. 浩日勤、服部俊夫：災害関連発熱疾患の早期発見のためのバイオ・マーカー研究。平成 25 年度 特定プロジェクト研究成果報告会 仙台 2014 年 7 月 13 日。

7. 浩日勤、服部俊夫：ハワイ大との学際的リスク研究推進のためのネットワーク構築。平成 25 年度 特定プロジェクト研究成果報告会 仙台 2014 年 7 月 13 日。

8. Hattori T : Anti-retroviral therapy against HIV infected individuals after the great east Japan earthquake. The 10th China-Japan international conference of VIROLOGY. 長春. 25-28th August 2014.

9. Chagan-Yasutan H, Hattori T: Elevation of matricellular proteins in dengue virus infection. The 10th China-Japan international conference of VIROLOGY. 長春. 25-28th August 2014.

10. Hasibuan FM, Senoputra MA, Shiratori B, Chagan-Yasutan H, Cundarani R, Apriani L, Alisjahbana B, Hattori T: The Levels of Matricellular Proteins in Plasma of Active Tuberculosis and Latent Tuberculosis in the Setting of Helicobacter Pylori Co-infection. 4th Annual Conference of Japan Association for Human Security Studies. Sendai, Japan. 6-7th September 2014.

11. Senoputra MA, Hasibuan FM, Shiratori B, Chagan-Yasutan H, Cundarani R, Apriani L, Setiawati EP, Alisjahbana B, Hattori T: Antibody Responses against Multiple Antigens of Mycobacterium Tuberculosis to

Differentiate Active TB infection from Latent Form. 4th Annual Conference of Japan Association for Human Security Studies. Sendai, Japan. 6-7th September 2014.

12. Chagan-Yasutan H, Leano S, Telan E, Iwasaki H, Nakajima C, Koizumi N, Suzuki Y, and Hattori T: Analysis of Biomarkers in Plasma and Urine of Leptospirosis Patients. The 12th Asia Pacific Conference on Disaster Medicine. Tokyo, Japan. 17-19th September 2014.

13. Zhao JG, Zhu ZQ, Zhang XY, Suzuki Y, Chagan-Yasutan H, Chen HL, Wan YM, Xu JQ, Hattori T, Matsuba T: Immune responses against Mycobacterium tuberculosis dimorphic antigen Rv0679c (Beijing type/non-Beijing type) in tuberculosis patients. The 43rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Kyoto, Japan. 12th December 2014.

14. Chagan-Yasutan H, Hattori T: Galectin-9は重症敗血症の免疫・炎症反応に関連する可能性がある。第19回エンドトキシン血症救命治療研究会。平成27年度1月23-24日。

15. 服部 俊夫 : Workshop on disaster management, 27th June 2014. 仙台・東北大学医学部。主催。

16. Toshio Hattori, Beata Shiratori, Muhammad Andrian Senoputra, Fakhrial Mirwan Hasibuan, Cundarani Raspati, Apriani Lika, Bacht Alisjahbana, Makoto Matsumoto, and Yasuhiko Suzuki: Antibody responses against multiple antigens of Mycobacterium tuberculosis to differentiate active tuberculosis from latent form. National Tuberculosis

Research Parade (The 4th Indonesia TB Research Parade). Jakarta, Indonesia. 11-12th March 2015.

17. Toshio Hattori, Beata Shiratori, Fakhrial Mirwan Hasibuan, Muhammad Andrian Senoputra, Haorile Chagan-Yasutan, Cundarani Raspati, Apriani Lika, Yayoi Takahashi, Toshiro Niki, and Bacht Alisjahbana: High levels of matricellular proteins in active tuberculosis and their role in granuloma formation. National Tuberculosis Research Parade (The 4th Indonesia TB Research Parade). Jakarta, Indonesia. 11-12th March 2015.

18. Beata Shiratori, Fakhrial Mirwan Hasibuan, Muhammad Andrian Senoputra, Haorile Chagan-Yasutan, Cundarani Raspati, Apriani Lika, Yayoi Takahashi, Toshiro Niki, Bacht Alisjahbana, Toshio Hattori: Different expression of galectin-9, osteopontin and tenascin-C in granulomatous diseases. NIH-Japan-JSPS Joint Symposium. Washington DC, USA. 23-24th October 2014.

19. Beata Shiratori, Haorile Chagan-Yasutan, Toshio Hattori: Diversity of matricellular protein secretion in active and latent tuberculosis infection. The 63th Annual Meeting of Japanese Association for Infectious Diseases. Tokyo, Japan. 29-31st October 2014.

20. Beata Shiratori, Fakhrial Mirwan Hasibuan, Muhammad Andrian Senoputra,

Haorile Chagan-Yasutan, Bacht Alisjahbana, Toshio Hattori: Role of matricellular proteins in systemic and local immune response to Mycobacterium tuberculosis infection. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance. Vienna, Austria 31st October-3rd November 2014.

21. Beata Shiratori, Haorile Chagan-Yasutan, Toshio Hattori: Expression of matricellular proteins in latent and active tuberculosis. The 43rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Kyoto, Japan. 10-12th December 2014.

22. Beata Shiratori: Extracellular milieu in *Mycobacterium tuberculosis* infection. The 4th Eco-Bio Forum. Sendai, Japan. 17th March 2015.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

・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

特願 2014-552995

・アミド誘導体

特願 2014-038919

2. 実用新案登録

該当するものなし

3. その他

該当するものなし

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告

一塩基多型（SNP）法による結核菌の sublineage 分析
ー 日本、中国、韓国、台湾で分離された結核菌の比較 ー

担当責任者 加藤誠也 結核予防会結核研究所 副所長
研究協力者 前田伸司 結核予防会結核研究所 抗酸菌部
結核菌情報科 科長

研究要旨

近年、多くの人々が観光・ビジネスで東アジア地域（中国、韓国、台湾、日本）を訪れている。これら人の移動に伴い感染症も輸入・輸出されている可能性がある。東アジアの国や地域では、台湾を除き北京型結核菌の割合が高いことや結核罹患率が先進諸国に比べて高いなどの共通な特徴がある。そこで、それぞれの地域で広まっている結核菌の特徴を明らかにし、比較するための共同研究を開始した。各地域で広まっている結核菌の遺伝的系統をより詳細に調べるために、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。今までは、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、SNP 分析で ancient 型は 7 箇所、modern 型は 4 箇所の部位を調べることで ancient 型は 4 グループ、modern 型も 3 グループに分けることができた。各地域において SNP 型別による各遺伝型グループの存在比は異なるが、北京型 ancient タイプは BJ02.1-I 及び BJ06-II が主要な遺伝型であることがわかった。また、北京型 modern タイプでは、BJ09 と BJ11-III が主要な遺伝型だった。

研究参加協力者

韓国

韓国結核研究所

研究開発部 Dr. Kim, Kyungjong

中国

中国疾病管理予防センター (China CDC)

結核研究部長 Dr. Zhao, Yan-Lin

上海疾病管理予防センター

(Shanghai CDC)

結核部門長 Dr. Zhu, Guofeng

Fudan 大学 微生物教室

Dr. Luo, Tao

台湾

台湾疾病管理予防センター(CDC)

抗酸菌部長 Dr. Jou, Ruwen

日本

神戸市環境保健研究所

岩本朋忠

長崎大学熱帯医学研究所

国際保健学分野

和田崇之

A. 研究目的

人の移動に伴って結核がアジア地域内の国や地域に広まる可能性が考えられる。特に多剤耐性結核菌の場合、広がりを抑えるための対策を迅速にとる必要があり、国際的な連携が重要になると考えられる。そのため、結核研究所では、2007年から近隣地域の結核分子疫学担当の研究者と共同研究を開始した。これらの地域では、台湾を除き、広まっている結核菌の主要な遺伝系統が北京型結核菌であるという共通の特徴がある。また、北京型結核菌は、欧米における研究で高病原性や多剤耐性菌と関連していることが報告されている。

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 2006 年に報告されている。しかし、東アジアの国々では、欧米で主流となっている遺伝型結核菌とは異なる北京型結核菌の割合が高く、提唱されている国際標準 VNTR システムでの北京型結核菌の型別能は低いことがわかっている。

そのため、北京型結核菌を効率よく型別できる VNTR システムの構築だけでなく、次世代シーケンサー (NGS) 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) を用いた新しい型別システムの構築を進めた。SNP は結核菌の遺伝系統の分岐に応じて発生し、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) が得られるものと期待されている。

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 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構築することができる。

B. 研究方法

リアルタイム PCR を利用した変異検出

(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 (TaqMan MGB probe 法あるいはサイクリングプローブ法) で SNP 部位の変異を検出した。

日中韓台分子疫学研究会議

平成 26 年 11 月 21 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。論文作成に当たって必要なデータについて話し合った。

各地域から分離された結核菌の型別

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。東京 219 株、韓国 293 株、台湾 211 株、中国 (四川省) 130 株について SNP 型別したデータを得た。

C. 研究結果

1. SNP 変異検出用のプローブ

リアルタイム PCR で SNP 分析する 23 箇所について、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 プローブを合成した。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 SNP を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試みた。そして 23 箇所すべての SNP サイトの変異を検出できる分析系 (サイクリングプローブ: 7 箇所、TaqMan MGB プローブ: 16 箇所) を構築した (図 1)。野生型塩基の検出コントロールとして H37Rv ゲノム DNA が使用し、変異型塩基検出コントロールは臨床分離株の中から選択した。しかし、コントロール用の変異型 DNA が得られなかった場合は、対応した変異を持った DNA を化学合成しコントロールを準備した。

2. SNP 法による分析と遺伝型

779615 位の変異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。日本で分離された結核菌 219 株の場合、非北京型、北京型 ancient、北京型 modern は、それぞれ 62 (28.3%)、107 (48.9%)、50 (22.8%) だった。韓国からの 293 株では、49 (16.7%)、172 (58.7%)、72 (24.6%)、台湾からの 211 株では、123 (58.3%)、20 (9.5%)、68 (32.2%) だった。また中国四川省からの 130 株では、39 (30.0%)、32 (24.6%)、59 (45.4%) の割合だった。各グループはさらに非北京型は 7 箇所、北京型 ancient は 10 箇所、北京型 modern は 4 箇所の SNP 部位の分析を行い、得られた各サブグループの割合を地域ごとに比較した。

非北京型結核菌は、菌が分離された地域によって、各 SNP 遺伝型の割合が異なることがわかった。北京型 ancient タイプの結核菌に関しては、韓国の株のように BJ02.1-I 型が 65% 以上占め、BJ06-II 型は 5% 程度という地域もあるが、概ね調べた地域では、BJ02.1-I 及び BJ06-II が主要な遺伝型であることがわかった (図 2-a)。北京型 modern タイプでは、BJ09 と BJ11-III が主要な遺伝型だった (図 2-b)。

今までの型別法では NTF 領域への IS6110 の挿入の有無で、北京型結核菌は 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 分析システムで北京型結核菌を分析すると、少なくとも ancient 型は 4 グループ (BJ02.1-I、BJ03.1-I、BJ06-II 及び BJ07-III)、modern 型も 3 グループ (BJ09、BJ09.1 及び BJ11-III) に分けることができた。

3. 会議での合意事項

各地域で SNP 分析システム及び集団感染事例関連株を検出する目的で Supply(15)の VNTR 分析データを 2 月下旬までに集めることで合意が得られた。

D. 考察

今回用いた SNP 部位の分析では、国や地域が違って北京型の ancient 型や modern 型における主要な遺伝型は変わらないことがわかった。しかし、マイナーなサブグループが存在し、特定の地域だけに存在するサブグループもあることから、適切に SNP 部位を選択すれば、より有用な型別ができると考えられる。

各地域の結核菌は、日本と四川省の株は人口ベースで、韓国と台湾は全国レベルで集めた株から選択した株で収集方法が異なった。しかし、非北京型、北京型 ancient、北京型 modern 存在割合を調べると、台湾は非北京型結核菌が 6 割程度占めていること、日本、韓国は北京型 ancient が多いこと、また中国は modern 型が主要な遺伝型であること、など既に報告されている各地域の特徴を反映したものであった。

共同研究により共通の手法を利用してこれらの株を解析することで、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、それぞれの地域での特徴を明らかにすることができる。今後、本システムの有用性が確認され、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、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

会議への参加国だけでなくアジアの国や地域で共通で利用できる型別法が開発され、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ることができれば、感染場所 (国や地域) を推定できると考えられる。多くの国や地域との共同研究を通して、コアとなる共通の分析法を樹立し、情報を共有できるシステムができれば、高病原性結核菌等の流入を早期に把握することも可能となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表
なし

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

3. その他

1. 特許取得

該当なし

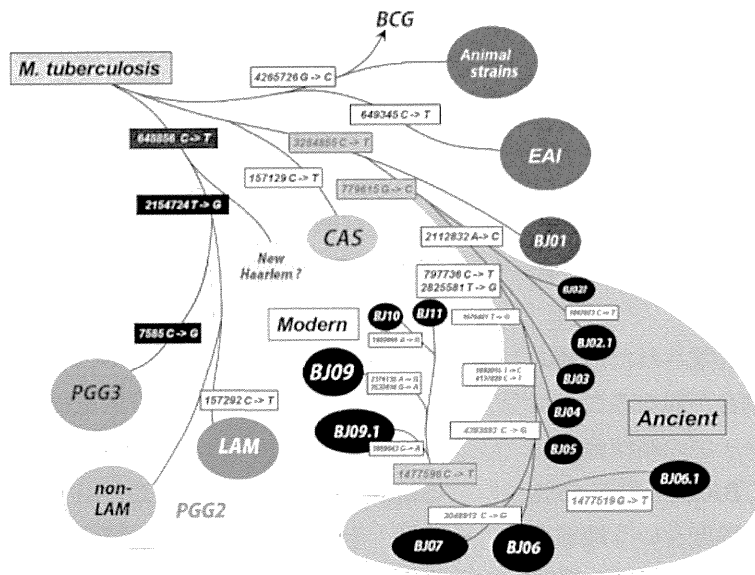
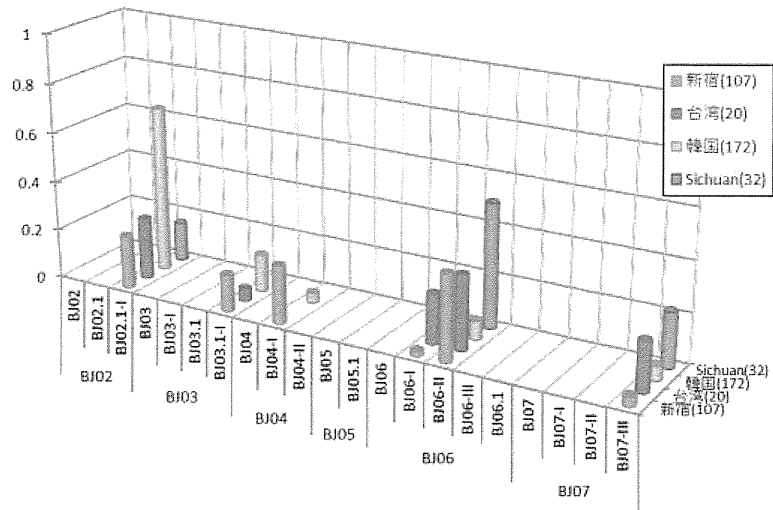


図1. SNPs を利用した結核菌の系統解析

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

(a)



(b)

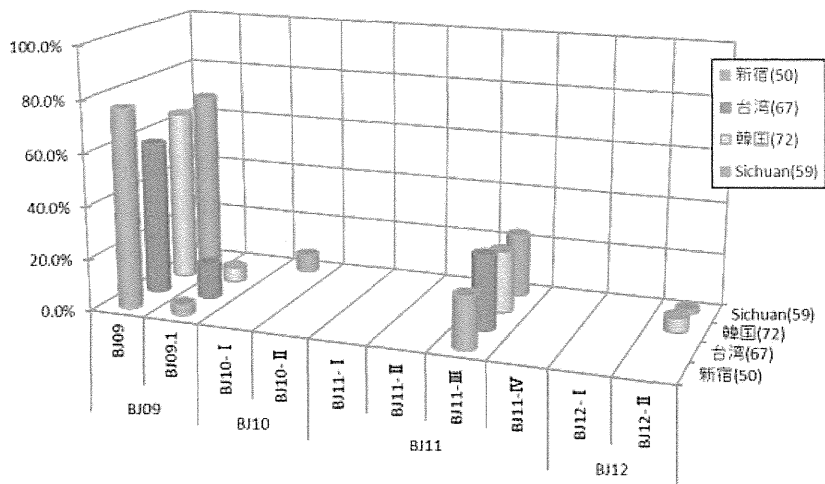


図 2. 樹立した SNP 分析システムを用いた結核菌の分析

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 解析により型別できたサブグループの割合を示した。

東京における外国人結核・多剤耐性結核に関する研究

担当責任者	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
	高崎 仁	国立国際医療研究センター 国際疾病センター/呼吸器内科

研究要旨

わが国における外国人結核患者の多くは結核蔓延国を母国としているため、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、東京における最近の外国人結核の特徴を明らかにすることを目的として、2010年から2013年の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116名の臨床像について検討した。2013年にはベトナムおよびネパール出身者が増え、その多くは日本語学生であり、入国後6ヵ月以内の診断例が多かった。薬剤耐性については、外国人結核では日本人結核と比較して、RFP耐性率($p=0.027$)と多剤耐性率($p=0.012$)が有意に高値であった。新宿区保健所との共同研究として、同保健所に登録された最近の外国人結核症例について、国籍、年次推移、薬剤耐性等について検討した結果、多剤耐性結核は3年間で8例にみられ、いずれも外国人であることが判明した。東京都にある2つの病院における多剤耐性結核患者は5年間で19例であった。そのうち外国人は9例(47%)であり、日本全体の結核登録者数の中における外国人の占める割合(約5%)に比べて明らかに高率であった。東京における外国人由来結核菌の分子疫学的特性および耐性遺伝子を明らかにすることを目的に、次世代シーケンサーを用いて結核菌の全ゲノム情報を取得し、網羅的な解析を実施した。外国人由来91株および日本人由来168株、計259株の結核菌は4つの遺伝系統に分類され、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ていた。系統樹解析の結果、東京在住の外国人結核株は日本人株と比べて多様性があり、世界的に多様な結核菌を国内に持ち込んでいること、日本人は外国人からの結核感染のリスクのあることが示唆された。

A. 研究目的

わが国における外国人結核患者の多くは結核蔓延国を母国としており、その母国では薬剤耐性が多いため、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。厚生労働科学研究岡田班により2009-2011年に実施された外国人結核の全国調査では、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。一方、わが国における多剤耐性結核は、年間、新たに100名ほどが発症しているとされており、詳細は明らかになっていないが、その中に外国人の占める割合は大きいと推定される。国立国際医療研究センターは東京都新宿区に位置し、典型的な都市型結核の診療を担っており、ホームレス、若年、外国人の割合の多いのが特徴で

ある。近年、新宿区周辺では東南アジア、西アジアから語学研修目的で渡航してくる外国人が増加しており、日本語学校健診により、毎年15名程度の結核患者が発見されている。

本研究では、東京における最近の外国人結核の臨床像を明らかにすることを目的として、国立国際医療研究センターにおいて診療を行った外国人の活動性結核患者の診療情報について、同時期に診療した日本人結核患者を対照として比較検討した。また、新宿区保健所との共同研究として、同保健所に登録された外国人結核患者とその薬剤耐性について検討を行った。さらに、国立国際医療研究センターおよび国立病院機構東京病院における、最近の多剤耐性結核症例についての臨床的検討を行った。そして、東京における外国人由来結核菌の分子疫学的特性および耐性遺伝子を明らかにすることを目的に、次世代シーケンサーを用いて結核菌の全ゲノ

ム情報を取得し、網羅的な解析を実施した。

B. 研究方法

国立国際医療研究センターにおいて、2010年1月から2013年12月の4年間に入院および外来で診療した外国人の活動性結核患者、および同時期に入院した日本人の活動性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、転帰など臨床的特徴について調査し、比較検討した。結核菌の薬剤感受性に関しては、同期間における外国人入院患者の菌株と日本人結核菌株を比較した。

東京病院および国立国際医療研究センターにおいて最近5年間に経験した多剤耐性結核症例の診療情報について検討した。また、新宿区保健所（渡部裕之保健予防課長）との共同研究として、同保健所に登録された最近の外国人結核症例について、国籍、年次推移、薬剤耐性等について検討を行った。

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では、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。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 (typical)型とancestral (atypical)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)

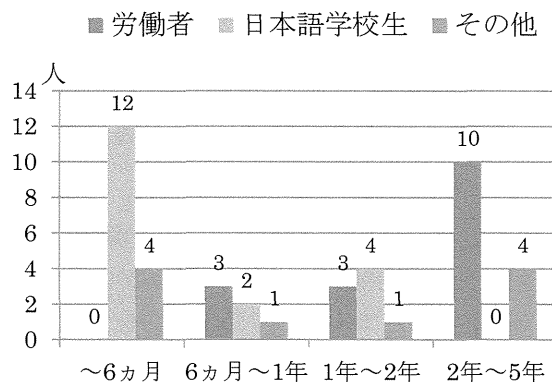
外国人結核の臨床像の推移に関しては後ろ向き研究となり、国立国際医療研究センターの倫理審査委員会の承認を得た。外国人結核の分子疫学解析の研究計画については同センターの倫理審査委員会の承認 (NCGM-G-001467-00) を得てから開始した。

C. 研究結果

1) 外国人結核と日本人結核の臨床像について

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2010年以降の4年間で116名であり、とくに2013年には増加がみられ、国籍別ではベトナムおよびネパール出身者が増えた。塗抹陽性の入院患者に限っても同様の傾向がみられた。増加した多くは日本語学生であり、入国後6ヵ月以内の診断例が多かった。入国後5年以降の外国人結核患者は労働者の割合が多かった (図1)。入院患者のみの比較では、外国人結核では日本人結核に比べて年齢が低く、女性が多く、糖尿病が少なく、HIV陽性が多かったが、胸部X線所見、空洞の率には差がみられなかった。薬剤耐性については、外国人結核では日本人結核と比較して、RFP耐性率 ($p=0.027$) と多剤耐性率 ($p=0.012$) が有意に高値であった。

図1 入国後の診断時期 (塗抹陽性者)



2) 新宿区における外国人結核

平成25年新宿区の年次別結核新登録状況では、一般110名、外国人34名、ホームレス15名で、外国人は増加傾向、ホームレスは減少傾向であった。外国人の国籍別では中国が最も多く、韓国、ベトナム、ミャンマーの順であった。外国人は20歳代の31例中20例、10歳代の6例中5例を占めていた。多剤耐性は3年間で8例にみられたが、いずれも外国人であった (中国4名、韓国1名、フィリピン1名、ミャンマー1名、ベトナム1名) (表1)。8名のうち7名は学生で、再治療は5名であった。

表1 薬剤耐性(新宿区保健所 平成23-25年)

	一般	外国人	ホームレス	合計
INH+RFP	0	8	0	8
INH	0	1	0	1
INH(+他)	5	2	1	8
RFP	0	0	0	0
他の耐性	14	4	6	24
耐性なし	199	30	51	280
不明	9	9	0	18
合計	227	54	58	339

3) 多剤耐性結核症例

東京病院における多剤耐性結核症例は最近5年間で12例であり、うち初回治療が4例、再治療が8例、塗抹陽性が9例、外国人が4例、HIV陽性が1例であった。超多剤耐性はみられなかった。治療、予後については、治療完遂が2例、外来治療中が2例、他院で治療継続が6例、他疾患で死亡が2例であった。国立国際医療研究センターでは5年で7例の多剤耐性結核を診療しており、初回治療3例、再治療4例、外国人は5例、治療経過については化療中3例、転院2例、帰国2例であった。

4) 結核菌全ゲノム解読による分子疫学解析

結核菌の分子疫学解析に関しては、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株の全配列を決定した。外国人由来株数は、中国が22株で最も多く、以下、韓国18、フィリピン10、ミャンマー8、ネパール7、ベトナム4、インドネシア3、インド3、モンゴル3、台湾2、フランス2、ペルー2、その他イラン、英国、ロシア、エチオピア、ソマリア、ナイジェリア、米国が各1株であった。本研究で解析した全臨床分離結核菌259株は、lineage 2 (Beijing) (70.3%)、lineage 4 (17.8%)、lineage 1 (8.9%) および lineage 3 (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2)。とくに外国人由来株の大部分は lineage 2 (47.3%)、lineage 4 (25.3%) および lineage 1 (20.9%) であったが、日本人由来株は82.7%が lineage 2 であった。また、lineage 2 の中で、

外国人由来株では67%が typical Beijing であるのに対し、日本人由来株では63%が atypical Beijing であった。図2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。臨床株は記載されている各系統 (lineage) に属した。薬剤感受性遺伝子の解析では、INH耐性が15例、RFP耐性が1例、LVFX耐性が2例に検出されたが、MDR株はみられなかった。また、Lineage 2 では non-Lineage 2 と比べて有意に耐性率が高いことが明らかとなった。

表2 Distribution of isolates from foreign- and Japan-born patients among *Mycobacterium tuberculosis* lineages.

Lineage	Foreign-born (n=91)		Japan-born (n=168)		p*
Lineage 2	43	47.3%	139	82.7%	5.80E-09
Typical	29	67.4%	52	37.2%	1.01E-03
Atypical	14	32.6%	87	62.8%	
Lineage 4	23	25.3%	23	13.7%	0.031
Lineage 1	19	20.9%	4	2.4%	1.87E-06
Lineage 3	6	6.6%	2	1.2%	0.043

D. 考察

1) 東京における外国人結核

平成25年には、途上国、とくにベトナムからの日本語学校の学生の結核発症が目立ち、入国後まもない時期の発見であるため、母国からの日本への持ち込み例と考えられる。現在、日本では入国時の胸部X線健診が行われておらず、多くの日本語学校は学校法人ではないため、各自治体を実施している学校健診が結核の発見に有効である。新宿区保健所では以前から外国人結核患者の登録は多いが、多剤耐性結核はほとんどみられなかった。しかし、最近3年間で8例の多剤耐性結核の発症がみられ、しかも、いずれも結核蔓延国出身の外国人であった。治療歴のある再発例では、初回の治療内容や薬剤感受性検査結果についての正確な情報を得ることは困難なことが多い。また、菌陰性結核として標準治療が行われた後に再発した例では、治療

開始時の薬剤感受性検査は行われていない。とくに母国にて治療歴のある例では、日本に入国した後も再発に関して慎重に経過を追う必要があると思われる。

2) 東京における多剤耐性結核

東京都にある2つの病院における多剤耐性結核患者は5年間で19例であった。そのうち外国人は9例(47%)であり、日本全体の結核登録者数の中における外国人の占める割合(約5%)に比べて明らかに高率であった。しかし、新宿区の病院では7例中5例(71%)が外国人であるのに対し、清瀬市の病院では12例中4例(33%)が外国人であり、同じ東京でもその割合に違いがあることが窺われた。また、治療歴については、初回治療が7例(うち外国人は3例)、再治療例は12例(うち外国人は6例)であった。予後に関しては、死亡2例(10.5%)で、いずれも基礎疾患による死亡であり、その他の症例は治療完遂、転院、化療中であった。母国へ帰国した例は2例であり、転院症例を含めて、治療による転帰を把握できていない例が多いのが問題と思われた。また、多剤耐性結核といっても地域による差があると考えられ、全国規模の疫学調査が必要であると思われる。

3) 結核菌全ゲノム解読による分子疫学解析

本研究では、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、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。薬剤耐性率については日本人由来株と外国人由来株では有意差はみられなかったが、更に株数を増やして検討する必要がある。

E. 結論

東京都新宿区における最近の外国人結核の特徴としては、多剤耐性結核が増加しており、菌は母国からの流入によるものと考えられる。

東京在住の外国人結核株は日本人株と比べて遺伝子的な多様性があり、世界的に多様な結核菌を国内に持ち込んでいる。日本人にとって、外国人からの結核感染のリスクのあることを示唆している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato-Miyazawa M, Miyoshi-Akiyama T, Kanno Y, Takasaki J, Kirikae T, Kobayashi N. Genetic Diversity of Mycobacterium tuberculosis Isolates from Japan-Born and Foreign-Born Residents in Tokyo. Clin Microbiol Infect. 2014 Oct 13. pii: S1198-743X(14)00049-4. doi: 10.1016/j.cmi.2014.09.013. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) Kobayashi N, Kato M, Miyoshi-Akiyama T, Takasaki J, Okada M, Kirikae T. Tuberculosis among foreign-born persons in Japan: whole genome sequencing analysis of Mycobacterium tuberculosis isolates from residents in Tokyo. 45th Union World Conference on Lung Health, Barcelona, Spain, Oct 2014.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

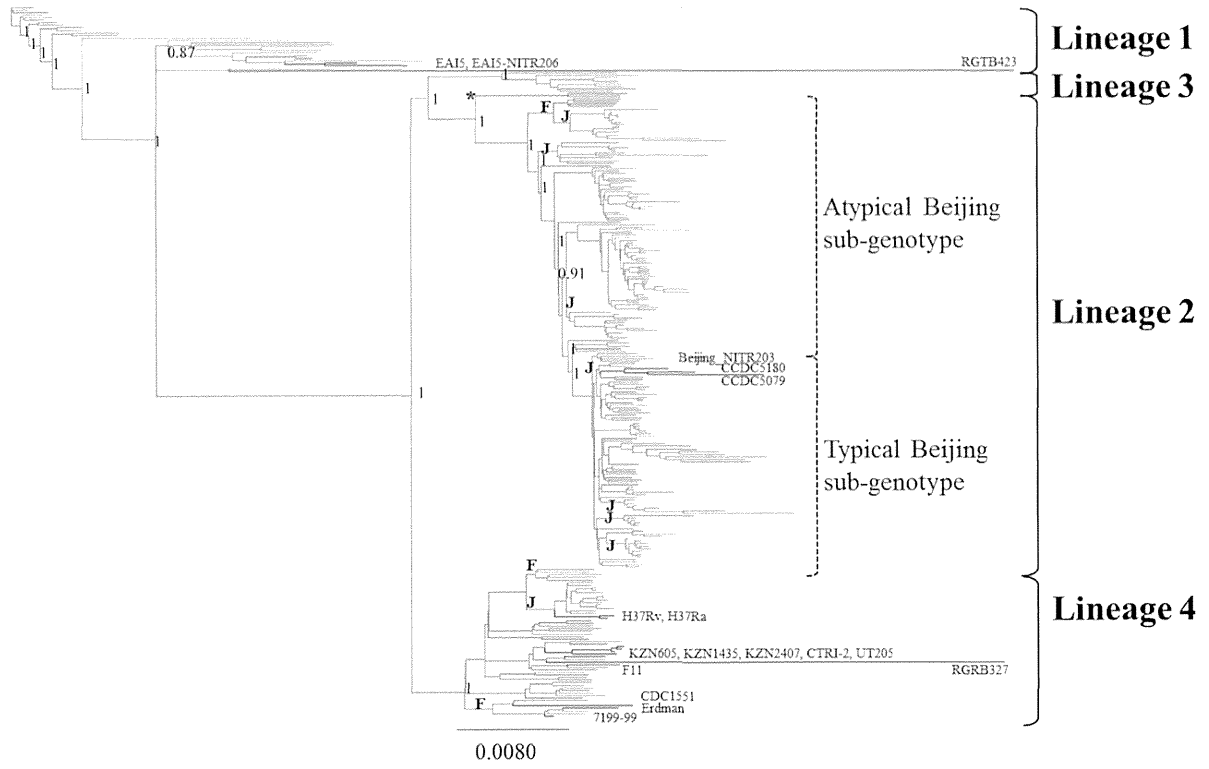
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

图 2 Whole genome phylogeny of all 259 isolates and 18 published strains.



結核菌の薬剤耐性・疫学検査の次世代シーケンサによる包括的解析法の開発と応用

担当責任者 切替照雄 独立行政法人国立国際医療研究センター研究所感染症制御研究部部长

研究要旨

結核は世界の重要感染症であり、多剤耐性菌出現が問題となっている。本研究では、従来の労力を要する手法で行われてきた結核菌の薬剤耐性検査、そして疫学的検査を包括的に解析可能とする次世代シーケンサを駆使した手法を用い、全国レベルで結核菌疫学解析を行うための基盤構築を実施することである。2015年1月、次世代シーケンサで取得した結核菌全ゲノム情報から、結核菌のタイピングと薬剤耐性の判定、そして菌株の間の関係を自動で解析するオンライン解析システム CASTB (Comprehensive analysis server of *Mycobacterium tuberculosis* complex、キャスティーバー) と命名し、<http://castb.ri.ncgm.go.jp/CASTB/> で公開した。国立国際医療研究センターのトップページ (<http://www.ncgm.go.jp>) からアクセスできる。この CASTB を用いて、栃木県保健環境センターと共同で、栃木県で分離された結核菌 88 株の全ゲノム情報を取得し、薬剤耐性遺伝子の有無及び分子疫学解析を実施し CASTB 解析が地域の結核分子疫学情報の基盤となれることを実証した。

A. 研究目的

結核菌は年間、国内で 2 万人、世界では 800 万人が罹患する重要な感染症である。通常の抗結核薬が有効でない多剤耐性結核の新興は大きな問題となってきた。近年の分子疫学解析から、結核は人類の進化と共に変化を続けており、流行型が存在していることが明らかとなってきた。このため、結核菌の菌株毎の性状や薬剤耐性、そして菌株間の関係を理解することは以前にも増して重要になっている。これまでは、結核菌株ごとの性状解析はいくつかのタイピング法によって実施されてきた。これらは結核菌株における特定遺伝子の有無や位置を遺伝子増幅やハイブリダイゼーションにより調べることで実施されている。これらのタイピ

ング法は、一部の結核菌専門でなければ実施できず、また類縁性の高い菌株の識別が困難である、という問題を抱えている。これらの分子疫学解析はすべて遺伝情報に基づいている。従って、それぞれの実験を実際に行わずとも、理論的には各菌株の全ゲノム情報があれば、コンピュータ上で解析可能である。次世代シーケンサの出現により結核菌の全ゲノム情報を取得することは容易になってきている。次世代シーケンサで取得した結核菌全ゲノム情報から、結核菌のタイピングと薬剤耐性の判定、そして菌株の間の関係を自動で解析するオンライン解析システムを開発した。本研究では、次世代シーケンサで取得した結核菌全ゲノム情報を開発したオンライン解析システムで