

解析することで、その有効性を実証することである。

## B. 研究方法

2007～2008年の2年間で栃木県の医療施設で122株分離され、これらの菌株は、栃木県保健環境センターで収集し、薬剤耐性試験などの情報とともにすべての結核菌株のゲノムを抽出し、MySeq(Illumina社)を用いて、全ゲノム塩基配列を決定した。Myseqで決定した全ゲノム配列情報をオンライン解析システムCASTB(Comprehensive analysis server of Mycobacterium tuberculosis complex、キャストイービー)で解析した。解析によって、薬剤感受性の有無、スポリゴタイピング、LSP

(long sequence polymorphism) LPSで北京型の場合には、祖先型(ancient型)と新興型(modern型)などを特定した。また、CASTB解析によって、LSP系統別に菌株間の近縁関係を明らかにした。

### (倫理面への配慮)

本研究はヒトそのものを対象とせず、患者から臨床分離された細菌の薬剤耐性機構の解析等については、診療情報等を扱わない。菌株収集は「疫学研究に関する倫理指針」に基づいて、国立国際医療研究センター倫理委員会の承認(NCGM-G-001467-00)及び栃木県保健環境センター研究倫理委員会の承認(00217)を得ている。本研究で実施する病原体取扱実験は当センターのバイセイフティー委員会承認(25-M-038)を受けている。

## C. 研究結果

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、キャストイービー)と命名し、<http://castb.ri.ncgm.go.jp/CASTB/>で公開した(図1)。国立国際医療研究センターのトップページ(<http://www.ncgm.go.jp>)からもアクセスできる。

栃木県で分離された122株のゲノム配列を次世代シーケンサで決定し、そのデータをCASTBで解析した。すべての株でCASTBの結果を得ることができた。次世代シーケンサで決定した全ゲノム配列をCASTBに投入すると、約5分後に図2及び3のような回答が得られた。

CASTB解析による薬剤耐性遺伝子変異の検出においては、多剤耐性結核菌株は0株であった。リファンピシン耐性6株、イソニアジド耐性14株、ピラジナミド耐性0株、フルオロキノロン耐性12株、ストレプトマイシン耐性5株、エタンブトール耐性3株が検出された。薬剤耐性試験のデータ(リファンピシン、イソニアジド、フルオロキノロン、ストレプトマイシン、エタンブトール)と一致した。

CASTBでは、すべての株のLSP解析が可能であった。系統1(インド・オセアニア系統)に属する株が8株(9%)、系統2(東アジア系統、北京型)が58株(67%)、系統4(ユーロ・アメリカ系統)23株(27%)であり、系統2は、祖先型(ancient型)が39株

(全体の 45%)及び新興型 (modern 型)19 株 (全体の 22%) であった。

栃木県は、宇都宮地区を中心に県東、県西、県南、見北の 5 地域に分かれる。それぞれの地域で分離される結核菌の系統別の分離数を図 4 に示す。地域による偏りは特に観察されなかったが、県南地域で分離される結核菌には、比較的系統 4 に属する分離株が多い傾向にあった。

外国人から分離された結核菌とその系統も解析できた (図 4)。系統 1 に属する分離株は比較的少数ではあったが、その多く (6/8 株) が外国人由来の株であった。外国人から分離された株は 11 株 (13%) で、すべての地域で分離されていた。

結核菌の系統と分離された患者の年齢を比較した (図 5)。患者の生年はさまざまであった。系統 1 に属する株が分離された患者の年齢は比較的若く、生年で 1950-1990 年 (平均 1971 年) であった。

調べたすべての分離株で、スポリゴタイピングが決定できた。スポリゴタイピングで北京型であった株はすべて LST でも系統 2 (北京型) であった。一方、VNTR はほとんどの株で決定できなかった。

CASTB により、SNPs コンカタネーションによる近縁解析を実施した。それぞれの系統に属する株間を比較できた。特に菌株数の多い系統 2 に関する結果を図 6 に示した。今回の解析から、特にアウトブレイクを示すものは検出されなかった。実際に調べた年には、この地方で結核アウトブレイクを示す症例は報告されていなかった。

#### D. 考察

栃木県で過去 2 年間 (2007-2008 年) の臨床分離結核菌株を用いて、CASTB の有効性を検討した。その結果、地域の疫学情報として、きわめて精度の高い分子疫学情報を得ることができることを実証した。特に薬剤耐性遺伝子変異情報、スポリゴタイピング、系統の同定、SNPs コンカタネーションによる系統樹作成にはきわめてすぐれた排斥ソフトであることがわかった。本研究では、おそらく栃木県の結核疫学のベースラインが検出できたと考えられる。今後、継続的に同様な疫学調査を続けていけば、地域の結核疫学が比較的簡便に把握できるようになるであろう。

CASTB 解析の問題点もいくつか明らかとなってきた。一つは、VNTR がほとんどすべての菌株でできなかった。これは、CASTB 解析の問題ではなく、現行の次世代シーケンサ MySeq のデータのリード長が短いため、シーケンスのギャップが生じるためと考えられる。現場で使用できるリード長が比較的長いシーケンサの開発が必要であろう。CASTB では、既知の薬剤耐性変異しか特定できない。臨床分離株における未知の薬剤耐性変異の監視も今後必要である。今回は想定していなかったが、実際のアウトブレイクの解析にどの程度 CASTB 解析が有用であるのかも今後実証する必要がある。

#### E. 結論

2015 年に公開された、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、キャスティービー)を用いて、栃木県で分離された結核菌株を解析した。その結果、CASTB 解析が結核疫学にきわめて有効であることが実証された。

#### F. 健康危険情報

なし

(委託業務成果報告(業務項目)には記入せずに、委託業務成果報告(総括)にまとめて記入)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Okumura K, Kato M, Kirikae T, Kayano M, Miyoshi-Akiyama T: Construction of a virtual *Mycobacterium tuberculosis* consensus genome and its application to data from a next generation sequencer. *BMC Genomics* in press
2. Miyoshi-Akiyama T, Satou K, Kato M, Shiroma A, Matsumura K, Tamotsu H, Iwai H, Teruya K, Funatogawa K, Hirano T, Kirikae T: Complete annotated genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* (Zopf) Lehmann and Neumann (ATCC35812) (Kurono). *Tuberculosis* 95(1): 37-39, 2015
3. Kato-Miyazawa M, Miyoshi-Akiyama T, Kanno Y, Takasaki J, Kirikae T, Kobayashi N: Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from foreign-born and Japan-born residents in Tokyo. *Clin Microbiol infect* 95(1): 37-39, 2015.

4. Ando H, Miyoshi-Akiyama T, Watanabe S, Kirikae T: A silent mutation of *mabG1* confers isoniazid resistance on *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 91(3): 538-547, 2014.

##### 2. 学会発表

1. Okumura K, Kato M, Kirikae T, Kayano M, Miyoshi-Akiyama T: Construction of a virtual *Mycobacterium tuberculosis* consensus genome and its application to data from next generation sequencers. American society of microbiology, 114th General meeting, Boston, USA, May17-20, 2014.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

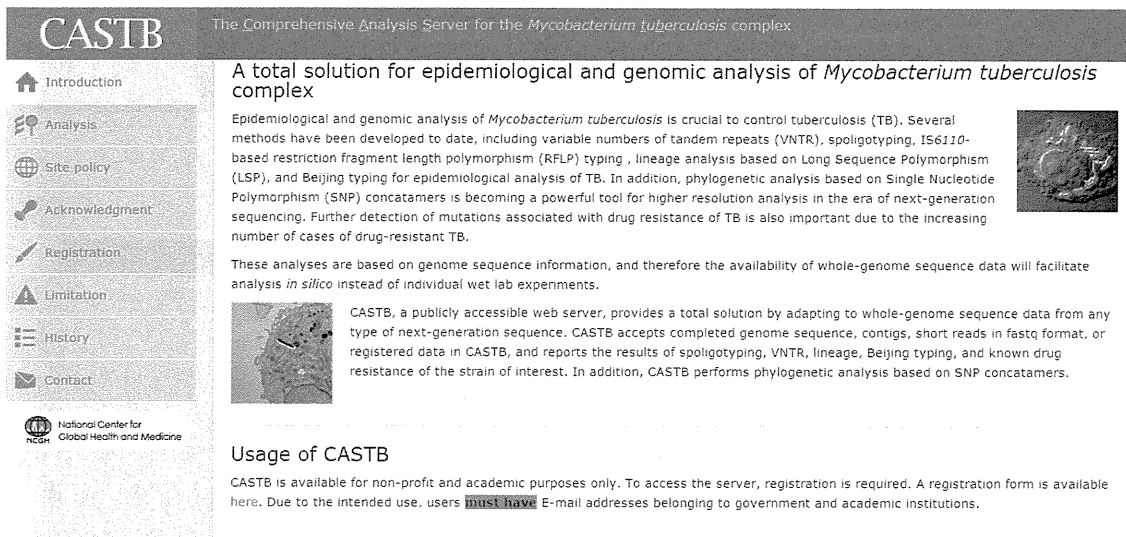


図1. インターネットで公開された結核菌オンライン解析システム CASTB のトップページ



図2. CASTB の解析結果例 (1)

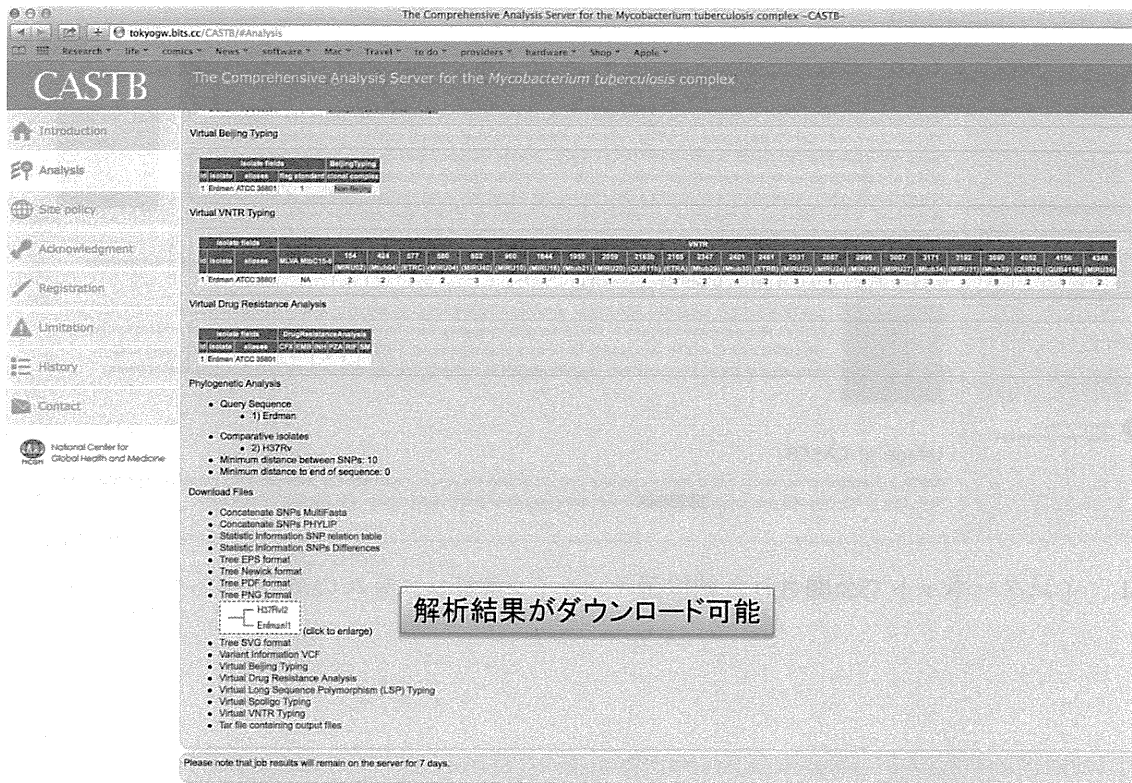
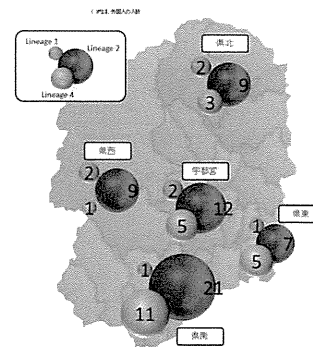


図 3. CASTB の解析結果例 (2)



Virtual LSP	東京都	県西	県東	県南	県北	外国人
Lineage 1 (Indo-Oceanic lineage)	2 (2)	2 (2)	1	1	2 (1)	宇都宮市; Philippines(1), Thailand(1) 県西; Thailand(1), Viet Nam(1) 県北; Philippines(1)
Lineage 2 (East-Asian lineage)	12 (2)	9	7	21 (1)	9	宇都宮市; Korea(1), Taiwan(1) 県南; China
Lineage 4 (Euro-American lineage)	5	1	3 (2)	11 (1)	3	県東; Korea(1), Taiwan(1) 県南; Peru(1)

図 4. 結核菌の系統と菌株・分離された地域及び外国籍の患者からの分離状況

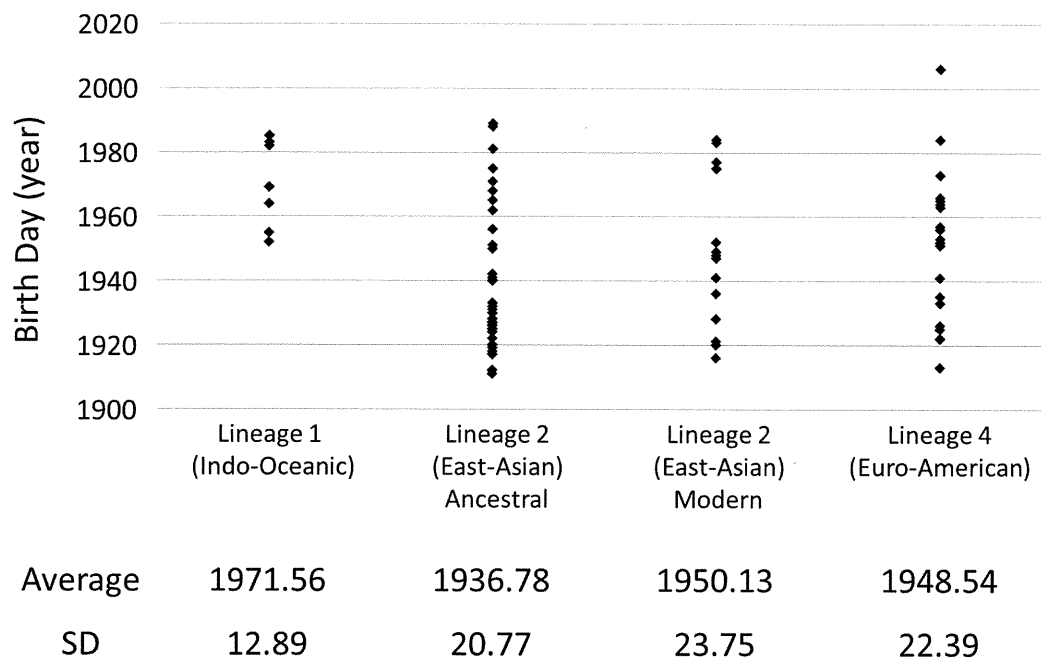


図5. 結核菌の系統と分離された患者の年齢

## Lineage 2

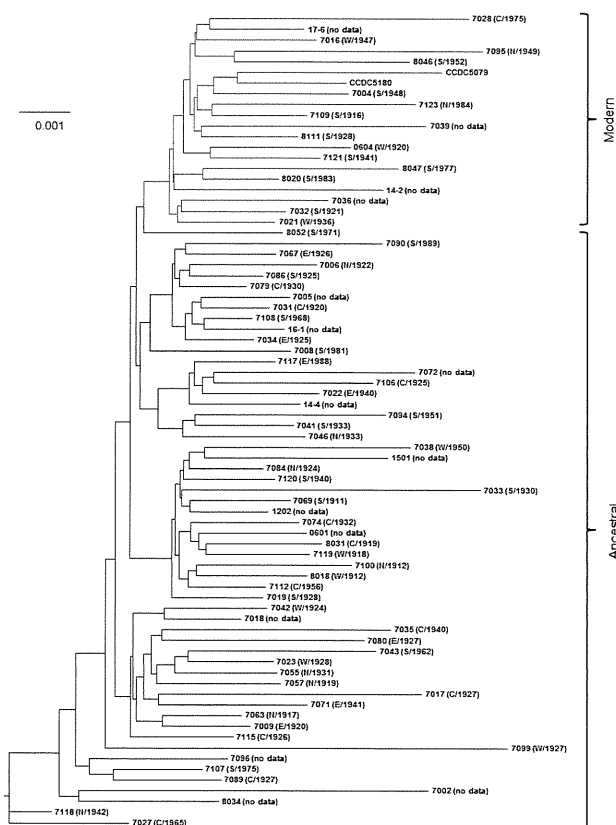


図6. SNPs コンカタネーションによる近縁解析 (系統2)

研究課題名：  
多剤耐性結核の分子疫学的解析、診断・治療法の開発に関する研究

分担研究項目：  
スリランカ、ネパール、バングラデシュ、ミャンマーおよびタイとの  
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

担当責任者 鈴木定彦・北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・教授

## 研究要旨

対象国としているスリランカ、ネパール、バングラデシュ、ミャンマーおよびタイのうち特に結核対策が重要なミャンマーにおいて研究を展開した。従来法により多剤耐性と判定された結核菌株の *katG* 遺伝子、*inhA* 遺伝子並びに *rpoB* 遺伝子の断片をポリメラーゼ連鎖反応法にて増幅させ、その塩基配列を分析した。解析した 178 株の多剤耐性結核菌株のうち約 29.5%において *katG* 遺伝子、*inhA* 遺伝子の両方に遺伝子変異が見出されず、33.1%の株において *rpoB* 遺伝子上に変異が見出されなかった。周辺国より報告されている同様なデータでは、ほとんどの多剤耐性結核菌において薬剤耐性関連遺伝子変異が検出されている事を考え合わせると、ミャンマーにおける結核菌の薬剤感受性試験法の精度が高くないことが推察された。

## A. 研究目的

世界の人口の 3 分の 1 が結核菌に感染しており、結核の年間の新規発症者数は 860 万人と推定されている。この事実は、様々な見地からの結核研究を通じた対策への貢献の重要性を示すものである。本研究課題では、アジア地域のうち特にミャンマーに焦点を当てて、多剤耐性結核菌における薬剤耐性関連遺伝子変異の存在様式と存在割合を明らかにする事を目的とした。

これまでの様々な国での研究により、イソニアジド (INH) 耐性結核菌の多くにおいて *katG* 遺伝子、*inhA* 遺伝子の何れかまたは両方に特定の遺伝子変異が見出されている。更に、リファンピシン (RFP) 耐性結核菌の多くにおいて *rpoB* 遺伝子に特定の遺伝子変異が見出されている。本研究課題では、ミャンマーにおいて従来法により多剤耐性と判定された結核菌株の *katG* 遺伝子、*inhA* 遺伝子並びに *rpoB* 遺伝子の分析を実施した。

## B. 研究方法

### 1. 分離結核菌株

ミャンマー保健省医学研究局、並びにミャンマー国家結核プロジェクトにおいて 2010 年に分離された結核菌のうち全卵固形

培地である Löwenstein-Jensen (LJ) 培地を用いた培養法により多剤耐性と判定された 178 株を用いた。耐性判定には、INH、エタンプトール (EMB)、ストレプトマイシン (SM) および RFP をそれぞれ 0.2, 2, 4, 40  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で含有する培地を作成し、これらを用いた。

### 2. 遺伝子変異の検出

DNA 抽出は常法に従って実施した。LJ 培地上に生育したコロニーの 1 白金耳分を TE バッファー (10 mM Tris-HCl, pH8.0, 1 mM EDTA) 0.1 ml を含むスクリーキャップバイアルに取り、キャップをした後、ボルテックスミキサーにて良く懸濁した。95°C、10 分間の加熱の後、0.1 ml のクロロフォルムを加えて良く攪拌し、15,000 rpm、5 分間の遠心分離による上層を取り出した。この上層より、エタノール添加により DNA を沈渣として収集し、これを 0.1 ml の TE バッファーに懸濁して鋳型として用いた。PCR 法により *katG* 遺伝子、*inhA* 遺伝子並びに *rpoB* 遺伝子を増幅した後、サンガー法により塩基配列を決定し、感受性菌株の遺伝子配列と比較する事により、遺伝子変異を同定した。

(倫理面への配慮)

臨床分離菌株を対象とした研究であることから、本項目には該当しない。

### C. 研究結果

2010年にミャンマー保健省医学研究局、並びにミャンマー国家結核プロジェクトにおいて分離された178株の多剤耐性結核菌株の*katG*遺伝子、*inhA*遺伝子並びに*rpoB*遺伝子の塩基配列を分析し、INH並びにRFP耐性に係る遺伝子変異の存在様式と存在割合を明らかにした。その結果、約60.5%の株において*katG*遺伝子、*inhA*遺伝子の何れかまたは両方に遺伝子変異が見出された

遺伝子上に変異が見出された (Table 2)。

### D. 考察

解析した178株の多剤耐性結核菌株のうち約29.5%において*katG*遺伝子、*inhA*遺伝子の両方に遺伝子変異が見出されず、33.1%の株において*rpoB*遺伝子上に変異が見出されなかった。バングラデシュにおいて分担研究者が実施した同様の研究においては、*katG*遺伝子または*inhA*遺伝子の何れかまたは両方に遺伝子変異が見出された株は94%、*rpoB*遺伝子上に変異が見出された株は95%であった。また、ネパールにおいて

Table 1. Distribution of mutations in *KatG* gene and the *inhA* regulatory region of 178 MDR- isolates from Myanmar

Affected codon	Kat G				<i>inhA</i> regulatory region			Number of isolates	Ratio (%)												
	Amino acid change		Nucleotide change		mutated position	Nucleotide change															
	From	To	From	To		From	To														
285	Gly	Arg	GGC	CGC	-15	C	T	1	0.6												
315	Ser	Thr	AGC	ACC	none	none	none	105	59.0												
										Asn	AAC	none	none	3	1.7						
																Ile	ATC	none	none	1	0.6
none	none	none	none	-15	C	T	13	7.3													
none	none	none	none	-8/-15	T/C	C/T	1	0.6													
none	none	none	none	-17	G	T	1	0.6													
none	none	none	none	none	none	none	49	27.5													

Table 2. Distribution of mutations in the *rpoB* RRDR of 178 MDR- isolates from Myanmar

Affected codon (s)	Nucleotide change		Amino acid change		Number	ratio (%)
	From	To	From	To		
510	CAG	CCG	Gln	Arg	1	0.6
513	CAA	CCA	Gln	Pro	2	1.1
516	GAC	GTC	Asp	Val	3	1.7
				Tyr	1	0.6
517	CAG	CCG	Gln	Pro	1	0.6
526	CAC	TAC	His	Tyr	5	2.8
				Asp	9	5.1
				Arg	5	2.8
				Leu	4	2.2
				Leu	84	47.2
531	TCG	TTG	Ser	Leu	1	0.6
				Trp	1	0.6
				Phe	1	0.6
533	CTG	CCG	Leu	Pro	6	3.4
516/518	GAC/AAC	TAC/GAC	Asp/Asn	Tyr/Asp	1	0.6
516/533	GAC/CTG	GGC/CCG	Asp/Leu	Gly/Pro	1	0.6
526/527	CAC/AAG	CCC/CAG	His/Lys	Pro/Gln	1	0.6
526/533	CAC/CTG	CAA/CCG	His/Leu	Gln/Pro	1	0.6
none	none	none	none	none	51	28.7

(Table 1)。また、66.5%の株において*rpoB* 実施した同様の実験においても、*katG*遺伝



子または *inhA* 遺伝子の何れかまたは両方に遺伝子変異が見出された株は 95%、*rpo* 遺伝子上に変異が見出された株は 97%であった。周辺国（インド、タイ、その他）より報告されている同様な実験により得られたデータにおいてもバングラデシュ、ネパールと同様の高い割合で薬剤耐性関連遺伝子変異が検出されていた。以上の情報を総合して考えると、ミャンマーにおける結核菌の薬剤感受性試験法の精度が高くないものと推察された。

#### 結論

本研究で得られたデータは、ミャンマーにおいて実施されている薬剤感受性試験法の精度管理に問題がある可能性を示唆するものであった。当該情報は、ミャンマー保健省医学研究局、並びにミャンマー国家結核プロジェクトの関係者と共有し、原因の究明を通じて今後の精度管理の向上に役立つ事とする。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

添付の表を参照

- 1) Paudel S, Mikota SK, Nakajima C, Gairhe KP, Maharjan B, Thapa J, Poudel A, Shimozuru M, Suzuki Y, Tsubota T. (2014) Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from elephants of Nepal. *Tuberculosis*, 94 (3): 287-292
- 2) Nishiuchi Y, Tamaru A, Suzuki Y, Kitada S, Maekura R, Tateishi Y, Niki M, Ogura H, Matsumoto S. (2014) Direct detection of *Mycobacterium avium* in environmental water and scale samples by loop-mediated isothermal amplification. *J Water Health*, 12(2):211-219
- 3) Iwamoto T, Arikawa K, Nakajima C,

Nakanishi N, Nishiuchi Y, Yoshida S, Tamaru A, Tamura Y, Hoshino Y, Yoo H, Park YK, Saito H, Suzuki Y. (2014) Intra-subspecies sequence variability of the MACPPE12 gene in *Mycobacterium avium* subsp. *Hominissuis*. *Infect Genet Evolu*, 21:479-83

- 4) Li D, Dong CB, Cui JY, Nakajima C, Zhang CL, Pan XL, Sun GX, Dai EY, Suzuki Y, Zhuang M, Ling H. (2014) Dominant modern sublineages and a new modern sublineage of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family clinical isolates in Heilongjiang Province, China. *Infect Genet Evolu*, 27:294-9
  - 5) Mwikuma G, Kwenda, Hang'ombe M B, Simulundu E, Kaile T, Nzala S, Siziya S, Suzuki Y. Molecular identification of non-tuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens in Zambia. *Annals Clin Microb Antimicrob*, in press. doi:10.1186/s12941-014-0059-8
- #### 2. 学会発表
- 1) 鈴木定彦、山口智之、金玄、横山和正、中島千絵 結核研究からハンセン病研究へ：分子生物学的見地から（口頭）第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会
  - 2) 山口智之、中島千絵、鈴木定彦 らい菌にキノロン系抗菌薬耐性を与える酵素内アミノ酸置換がもたらす DNA ジャイレース活性低下の解析（口頭）第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究委託事業（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

### 難治性結核の分子疫学解析

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

担当責任者 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。

今年度より、結核菌の耐性に関して検討を開始した。北京株ではストレプトマイシン耐性の比率が 16.1%と非常に高く、EAI 株の 3.7%と比してオッズ比=4.98(95%信頼区間 2.95-8.37) 関連が強いので、最初の検討薬剤とした。ストレプトマイシン耐性は *rrs*、*rpsL*、*gidB* 遺伝子の突然変異に原則、関連しているが、これらの突然変異の頻度は地域により大きく異なる。ストレプトマイシン耐性株 112(北京株 83、EAI 株 16 含む) と薬剤感受性株 52(北京株 17、EAI 株 16 含む) に関して *rpsL*、*rrs*、*gidB* 遺伝子変異を同定した。*rpsL* 遺伝子変異 68 株中 65 株(95.6%)が北京株で強い関連が認められた。*gidB* 遺伝子変異の場所は菌株により非常に異なり、北京株と EAI 株で特異的な変異と考えられる場所もあった。ストレプトマイシン耐性 22 菌株に関しては、これら 3 遺伝子で耐性に関与する変異は認められなかった。感受性検査の再確認の後、次世代シーケンサーを活用した新たな変異の探索を進める。

#### 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。

服部班本体「多剤耐性結核の分子疫学的解析、診断・治療法の開発に関する研究」

が掲げる目的に対応し、タイ保健省医科学局という日本が建設してアジアの中心研究機関に育てたネットワークを活用する。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、慢性桿菌例)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)の要因に関して多角的にみる研究を研究協議で 2002 年 1 月に構想して以来継続している。

(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しての種々の要因検討、(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、現在はタイ医科学局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。

(公財)結核予防会・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 ヶ所の結核医療の「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には厳密に管理し、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 等を選び、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

(公財)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メ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12月現在426名より同意が得られている。再発31例、治療失敗14例、治療中断後再治療3例、多剤耐性39例(外国居住歴18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。

昨年、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、EAI 株と非 EAI 株(主に北京株)を分類し、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3.33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たが、調整ハザード比は1.72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)。論文投稿後、査読者から菌体解析をしている群としてない群の比較を要請された。表1-3に示す様に HIV 感染状況が若干違うが、大きくは変わらず、結論に変化は与えられないと確認された。

更に、菌株群毎に結核菌の耐性に関して検討を開始した。北京株ではストレプトマイシン耐性の比率が16.1%と非常に高く、EAI 株の3.7%と比してオッズ比

=4.98(95%信頼区間 2.95-8.37)関連が強  
いので、最初の検討薬剤とした。ストレプト  
マイシン耐性は *rrs*、*rpsL*、*gidB* 遺伝  
子の突然変異に原則、関連しているが、こ  
れらの突然変異の頻度は地域により大き  
く異なる。本年度は、ストレプトマイシン  
耐性株 112(北京株 83、EAI 株 16 含む)と  
薬剤感受性株 52(北京株 17、EAI 株 16 含  
む)に関して *rpsL*、*rrs*、*gidB* 遺伝子変異  
を同定した。*rpsL* 遺伝子変異 68 株中 65  
株(95.6%)が北京株で強い関連が認めら  
れた。*gidB* 遺伝子変異の場所は菌株によ  
り非常に異なり、北京株と EAI 株で特異  
的な変異と考えられる場所もあった。ス  
トレプトマイシン耐性 22 菌株に関して  
は、これら 3 遺伝子で耐性に関与する変  
異は認められなかった。感受性検査の再  
確認の後、次世代シーケンサーを活用  
した新たな変異の探索を進める。

#### D. 考察

本年度にストレプトマイシンで開始した  
耐性遺伝子の同定と結核菌分類との関連  
について次世代シーケンサーを活用し  
て完遂させると共に、他の薬剤の耐性変  
異でも同様な検討を進める。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 Spoligotyping  
で確認してるが、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 EAI 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  
国との関連が強くなり、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伝播していると思  
えらる。実際、服部班長との共同研究  
の参加者で、フィリピンで流行して  
いる菌株が日本人にも認められて  
いる。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、服部班長からの  
要請の菌体要因の検討の為に  
菌体回復も実施できた。貴重な  
結核の臨床疫学研究の場として  
整備を続けたい。

2017 年 3 月 22-25 日に結核病学会  
と同時開催される結核予防会(森  
亨会長)担当のアジア太平洋結  
核会議(IUATLD Asia-Pacific  
regional conference)を目標と  
する。

## 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た。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Srilohasin P, Chaiprasert A, Tokunaga K, Nishida N, Prammananan T, Smittipat N, Mahasirimongkol S, Chaiyasirinroje B, Yanai H, Palittapongarnpim P. Genetic Diversity and Dynamic Distribution of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Causing Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis in Thailand. *J Clin Microbiol.* 2014 Dec;52(12):4267-74. doi: 10.1128/JCM.01467-14. (2013IF=4.232)

### 2. 学会発表

野内英樹、吉山崇、樋口一恵、奥村昌夫、佐藤厚子、森本耕三、佐々木結花、工藤翔二、原田登之、尾形英雄 結核菌特異的インターフェロン $\gamma$ 産生能検査(IGRA)のクオンティフェロン TB 検査(QFT)精度管理

マニュアル作成と T-スポット TB 検査(T-spot TB)の初期経験 第 89 回日本結核病学会総会 (ワークショップ:要望演題、演題番号 WS1-1)、2014 年 5 月 9 日、岐阜県長良川国際会議場

## 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

図1 感染結核菌株ごとの結核症患者の生存曲線（治療開始1年間）

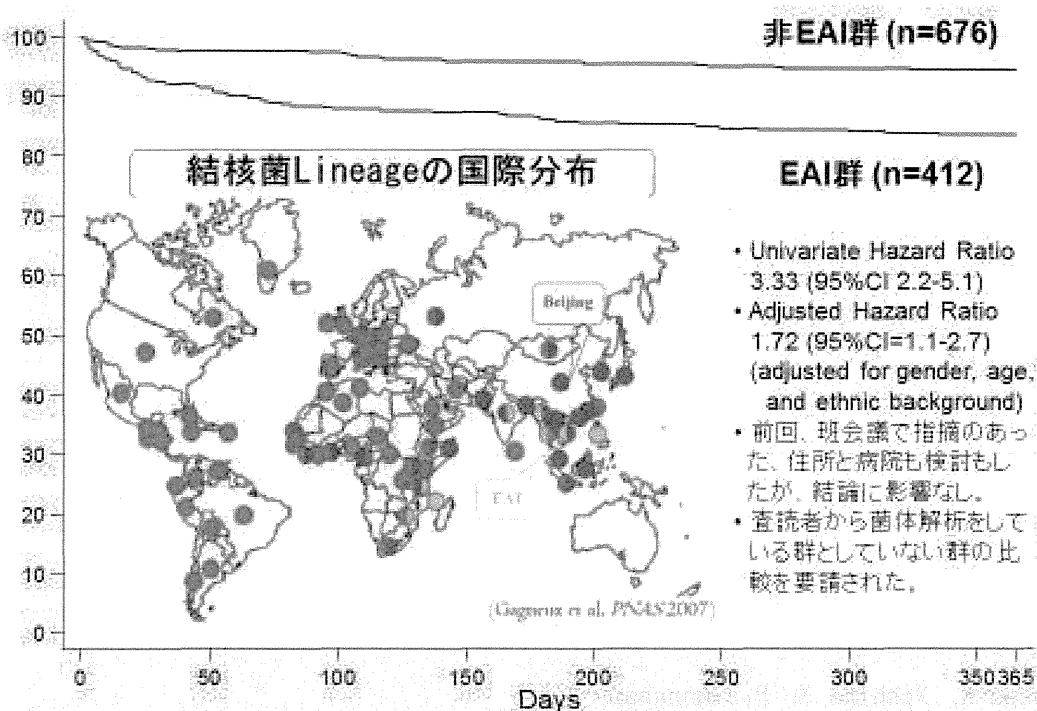


表1 Patient characteristics 比較 (1)

Characteristics	菌体解析あり 1304	菌体解析なし 9934	P-value
<b>Gender</b>	n(%)	n(%)	
Female	394 (30.2)	2658 (30.8)	0.670
Male	910 (69.8)	5972 (69.2)	
<b>Age (years)</b>			
0-34	380 (29.1)	2755 (31.9)	
35-49	418 (32.1)	2655 (30.8)	
50-64	291 (22.3)	1736 (20.1)	
65+	215 (16.5)	1478 (17.1)	
Mean(Age)	45.7(44.8-46.6)	45.2(44.9-45.6)	

表2 Patient characteristics 比較 (2)

Characteristics	菌体解析あり 1304	菌体解析なし 9934
HIV status	n(%)	n(%)
Negative	1059 (81.2%)	5613 (65%)
Positive	232 (17.8%)	2318 (26.9%)
Unknown	13 (1%)	699 (8.1%)
Race		
Thai	940 (72.1%)	6109 (70.8%)
Hilltribe	289 (22.2%)	1421 (16.5%)
Non-Thai	75 (5.8%)	1100 (12.7%)

表3 Patient characteristics 比較 (3)

Characteristics	菌体解析あり 1304	菌体解析なし 9934	菌体解析あり n(%)	菌体解析なし n(%)
Marital status	n(%)	n(%)	1004 (77%)	5597 (56%)
Single	189 (14.5%)	791 (9.2%)	189 (18.8%)	791 (18.4%)
Married	604 (46.3%)	2671 (31%)	604 (60.2%)	2671 (62.2%)
Divorce	81 (6.2%)	274 (3.2%)	81 (8.1%)	274 (6.4%)
Widow	130 (10%)	557 (6.5%)	130 (12.9%)	557 (13%)
Missing	300 (23%)	4337 (50.3%)		
Education			873 (87%)	4481 (45%)
Illiterate	291 (22.3%)	1074 (12.4%)	291 (33.3%)	1074 (33.8%)
Primary school	382 (29.3%)	1559 (18.1%)	382 (43.8%)	1559 (49.1%)
Secondary school	156 (12%)	446 (5.2%)	156 (17.9%)	446 (14%)
Higher	44 (3.4%)	98 (1.1%)	44 (5%)	98 (3.1%)
Missing	431 (33.1%)	5453 (63.2%)		
Occupation			946 (73%)	5153 (52%)
Unemployed	280 (21.5%)	694 (8%)	280 (29.6%)	694 (18%)
Agriculture	201 (15.4%)	1209 (14%)	201 (21.2%)	1209 (31.4%)
Labor	327 (25.1%)	1578 (18.3%)	327 (34.6%)	1578 (41%)
Employee	27 (2.1%)	184 (2.1%)	27 (2.9%)	184 (4.8%)
Merchant/ business	48 (3.7%)	107 (1.2%)	48 (5.1%)	107 (2.8%)
Prisoner	63 (4.8%)	77 (0.9%)	63 (6.7%)	77 (2%)
Missing	358 (27.5%)	4781 (55.4%)		



平成 26 年度

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）

分担研究報告書

多剤耐性結核の分子疫学的解析、診断・治療法の開発に関する研究

大阪市における多剤耐性結核の分析：患者支援強化の効果および外国人結核患者の治療支援強化

担当責任者： 下内 昭

研究協力者： 小向 潤、松本健二、津田侑子、蕨野由佳里

## 研究要旨

大阪市では、日本出生の結核患者と比較し外国人結核患者で多剤耐性結核の割合が高い。また、外国人結核患者では治療中断および治療途中での転出が多い。大阪市における外国人結核患者の支援として、医療通訳を派遣することにより外国人結核患者が治療中断することなく治療を全うすることができると考えられる。

### (1) 医療通訳派遣システムの構築

2014年9月1日より1人あたり原則3回まで、NPO法人の医療通訳者を派遣する事業を開始した。費用は90分1万円、60分8千円（交通費実費負担）で、利用可能言語は、英語、中国語、韓国語、フィリピン語、タイ語、ベトナム語、ポルトガル語、スペイン語である。利用場所は患者宅、薬局、勤務先、学校などで、保健師や服薬支援者の説明時に同席した。

2014年に大阪市で登録された外国人結核31名のうち、3名（9.7%）に医療通訳を導入した。すべての事例でDOTSを導入することができた。

保健師が医療通訳不要と判断したケースでも、その後DOTSが導入できなかったケースがみられた。患者や個別通訳が医療用語、診断までの経過、治療の必要性、公費負担制度などを母国語と同等に理解することは困難と思われるため、保健師が医療通訳不要と判断しても医療通訳を利用することが重要である。

### (2) 大阪市における多剤耐性肺結核の状況

2009～13年の大阪市における肺結核のうち、INHおよびRFPの感受性が判明していた3534名中、MDRは1.2%を占めていた。再治療の割合をみると、非MDR群では326名（9.3%）、MDR群では18名（41.9%）であり、MDR群で有意に高かった。外国人の割合をみると、初回治療では非MDR群70名（2.2%）、MDR群4名（16.0%）、再治療では非MDR群5名（1.5%）、MDR群4名（22.2%）であり、初回治療・再治療ともにMDR群で外国人の割合が有意に高かった。

大阪市の肺結核では再治療、外国人にMDRが多く、外国人結核の早期発見・治療支援がMDR対策にもつながると考えられた。日本人ではXDRが約3割認められたのに対し、外国人では1例もみとめられなかったことより、KMやLVFXなどの2次抗結核薬について適切に使用されるよう医療機関へ啓発する必要性がある。

## A. 研究目的

大阪市では、日本出生の結核患者と比較し外国人結核患者で多剤耐性結核の割合が高い。また、外国人結核患者では治療中断および治療途中での転出が多い。外国人結核の治療完遂を支援することにより、多剤耐性結核のまん延を防ぐことができる。大阪市における外国人結核患

者の支援として、医療通訳を派遣することにより、外国人結核患者が治療中断することなく治療を全うすることができる。

## B. 研究方法

### (1) 医療通訳派遣システムの構築

#### ① 事業の概要

2014年9月1日より1人あたり原則3回まで、NPO 法人の医療通訳者を派遣する事業を開始した。費用は90分1万円、60分8千円（交通費実費負担）で、利用可能言語は、英語、中国語、韓国語、フィリピン語、タイ語、ベトナム語、ポルトガル語、スペイン語である。利用場所は患者宅、薬局、勤務先、学校などで、保健師や服薬支援者の説明時に同席した。

② 電話通訳を利用したアポイントメント取得  
利用回数の制限はなく、各区保健福祉センターにある三者通話可能な「トリオフオン」を利用し、公益財団法人が通訳者として患者と保健師・服薬支援者の面接アポイントメントをとる事業を同時に開始した。費用は無料で、利用可能言語は医療通訳事業と同じ8か国語である。

③ 実施手順（入院中の患者）

結核の発生届受理後3日以内に保健師が病院を訪問したのち、①治療開始2～3週間後に保健師と医療通訳が病院を訪問。②退院前DOTS同意面接時（治療開始1～2ヶ月後）に保健師と医療通訳が再度病院を訪問。退院後に保健福祉センターが電話通訳を通じて初回DOTSの約束をとりつけ、③初回DOTS時、保健師・服薬支援者・医療通訳が患者と面接する（①～③の計3回医療通訳を利用）。

④ 実施手順（外来通院中の患者）

結核公費負担申請面接時、電話通訳を利用し面接のアポイントメントを取る。①治療開始1～2週間後に保健師と医療通訳が患者と面接。②初回DOTS時（おおむね治療開始1か月後）、保健師、服薬支援者、医療通訳が患者面接。（①、②の計2回医療通訳を利用）

（定義）

医療通訳…結核に関する研修を修了した者で、本事業において派遣を依頼した通訳者

個別通訳…家族や友人、勤務先・学校から派遣された通訳などで、結核に関する研修を受けていない者。

(2) 大阪市における多剤耐性肺結核の状況

平成21～25年に大阪市において登録された肺結核患者を対象とし、MDRと非MDRの2群に分けて検討を行った。

（倫理面への配慮）

本研究はすべて、保健所が大阪市において行

う保健事業の一環として実施した内容についてまとめており、倫理面については問題がない。

## C. 研究結果

(1) 医療通訳派遣システムの構築

① 外国人結核患者数と医療通訳利用割合

2012年から2014年までの期間、外国人結核患者はそれぞれ36名、43名、31名が登録され、医療通訳利用はそれぞれ1名(2.8%)、2名(4.7%)、3名(9.7%)と年々増加していた。

② 2014年の外国人結核患者の状況と通訳利用状況

2014年登録の31名(2015年2月現在)の出身国は、中国45.2%、韓国29.0%、ベトナム9.7%と続き、フィリピン、インドネシア、タイ、ペルーがそれぞれ1名ずつ(3.2%)であった。

言語レベルと医療通訳導入の状況を見ると、日本語が全く理解できない者は6名おり、医療通訳の利用者はそのうち2名(33.3%)であった。残る4名にはすべて、個別通訳(家族や派遣元会社職員、日本語学校教師など)が同席していた。日常会話可能と考えられた者は12名おり、医療通訳の利用者は1名(8.3%)であり、個別通訳を含め全く通訳のない者が7名(58.3%)であった。言語に問題がないと判断されていた13名では個別通訳を含め全く通訳の同席はなかった。

医療通訳を導入した3名ではすべてDOTSを導入することができた。一方、初回面接時に保健師は医療通訳の必要性を感じなかった事例では、日本語理解は良好とみられていたが、週1回のDOTSにつながらなかったケースがみられた。

(2) 大阪市における多剤耐性肺結核の状況

2009～13年に登録された肺結核(INHおよびRFPの感受性が判明しており総合患者分類が肺結核のもの)のうち、非MDRは3491名、MDRは43名(1.2%)であった。

再治療の割合をみると、非MDR群では326名(9.3%)、MDR群では18名(41.9%)であり、MDR群で有意に高かった( $p<0.001$ )。

平均年齢は、初回治療では非MDR群 $63.2\pm 18.3$ 歳、MDR群 $58.1\pm 19.9$ 歳であり、再治療では非MDR群 $65.8\pm 15.0$ 歳、MDR群 $58.9\pm 21.2$ 歳といずれもMDR群の方が若かったが有意差を認めなかった。

出身国別に平均年齢をみると、初回治療の

MDR 群では日本人 62.6±18.0 歳、外国人 34.3±10.8 歳 ( $p<0.01$ )、再治療の MDR 群では日本人 68.6±11.1 歳、外国人 25.0±6.8 歳 ( $p<0.001$ ) であり、いずれも外国人の方が有意に若かった。

外国人の割合をみると、初回治療では非 MDR 群 70 名 (2.2%)、MDR 群 4 名 (16.0%)、再治療では非 MDR 群 5 名 (1.5%)、MDR 群 4 名 (22.2%) であり、初回治療・再治療ともに MDR 群で外国人の割合が有意に高かった (いずれも  $p<0.001$ )。

MDR のうち KM/LVFX の感受性が不明の 11 名を除く 32 名における XDR の状況を見ると、XDR が 7 名 (21.9%) を占めていた。外国人はすべて非 XDR 群に属し、外国人の割合は初回治療・再治療でそれぞれ 26.7%、30.0%であった。XDR 群はすべて日本人であった。

再治療の前回治療年をみると、非 MDR 群では不明 17 名を除くと、1952 年以前が 30 名 (9.7%)、1953～1971 年が 62 名 (20.1%)、1972 年以降は 217 名 (70.2%) であった。一方 MDR 群では、すべて 1972 年以降の治療であった。

## D. 考察

### (1) 医療通訳派遣システムの構築

#### ① 医療通訳導入の対象

医療通訳利用の是非は、担当保健師が当該患者と面接した際の印象をもとに決定した。保健師が医療通訳不要と判断したケースでも、その後十分な治療支援ができなかったケースがみられた。患者や個別通訳が医療用語、診断までの経過、治療の必要性、公費負担制度などを母国語と同等に理解することは困難と思われるため、保健師が医療通訳不要と判断しても医療通訳を利用するシステムへと変更していくことが重要である。

#### ② 患者と個別通訳との関係

たとえば疫学調査のため、勤務先の個別通訳が患者と保健師との面談に同席し、患者が接触者について話すことにより患者が解雇等不利益を被るのではないかと危惧し、その情報を保健師に伝えない可能性がある。そのため、たとえ個別通訳がいたとしても、場合によっては個別通訳に席をはずしてもらい、第三者である医療通訳が同席して面接することも必要である。医

療通訳には結核に関する知識とともに、個人情報保護の責任があることを研修の中で伝えており、このような専門性の高い医療通訳を利用して患者面接を実施することは重要である。

### (2) 大阪市における多剤耐性肺結核の状況

2009～2013 年の肺結核では、MDR は再治療、外国人で有意に高かった。MDR の平均年齢をみると、初回治療、再治療ともに日本人では平均年齢 60 歳代に対し、外国人では 30 歳前後と若年者が多かった。これは外国人全体で見ても日本人と比べ外国人結核患者が若年であることを反映していると考えられた。

XDR は日本人では 3 割近くを占めているのに対し、外国人では 1 例もみられなかった。これは KM や LVFX の日本での使用状況が影響していると考えられ、特に LVFX を適切に使用するよう医療機関に啓発していく必要があると考えられた。

再治療者の前回治療年をみると、MDR 群ではすべて、RFP が導入された 1972 年以降に治療されていたことより、HR を含む初回治療を適切に完了することが MDR の発生予防に重要であることを示唆していた。

## E. 結論

外国人結核では、治療中断および国外転出が多い。中断を防ぐために医療通訳をすべての外国人結核患者に導入し、結核に関する説明を入念に行い、DOTS の必要性を理解してもらうことが重要である。患者や個別通訳が医療用語、診断までの経過、治療の必要性、公費負担制度などを母国語と同等に理解することは困難と思われるため、保健師が医療通訳不要と判断しても医療通訳を利用することが重要である。

また大阪市の肺結核では再治療、外国人に MDR が多く、外国人結核の早期発見・治療支援が MDR 対策にもつながると考えられた。日本人では XDR が約 3 割認められたのに対し、外国人では 1 例もみとめられなかったことより、KM や LVFX などの 2 次抗結核薬について適切に使用されるよう医療機関へ啓発する必要があると考えられた。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

津田侑子、松本健二、小向潤、笠井幸、蕨野由佳里、廣田理、甲田伸一、下内昭： 外国人肺結核の治療成績と背景因子の検討。 結核；90：(印刷中)。

### 2. 学会発表

津田侑子、松本健二、小向潤、他： 外国人結核の治療成績と背景因子の検討。 第89回日本結核病学会総会、岐阜。 2014年5月10日

Akira Shimouchi: Tuberculosis control in Japan, experience & perspective. International Forum, Symposium "Innovative TB control strategies to reach the goal of TB elimination by 2035" held by Taiwan CDC, Taipei. March 14, 2015.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

### <研究協力者>

津田侑子、小向潤、松本健二、蕨野由佳里、芦達麻衣子、池田暁美、宇田瑛子、笠井幸、倉田哲也、竹川美穂、古川香奈江、富森由紀恵、齊藤和美、足立礼子、吉村高尚：大阪市保健所