

Mtb 39とMtb 32の72f融合蛋白DNAを導入したr72f BCGワクチンはマウスおよびモルモットの系でBCGよりも強力なワクチンであることを示した。

[III] モルモット(結核菌吸入感染系)を用いたHsp 65 DNA+IL-12 DNAワクチンの有効性

Hsp 65 DNA+IL-12 DNAワクチンはBCGワクチンに比較して有意差をもって肺の結核肉芽腫, 病理所見の改善を認めた(granuloma indexの改善効果)。結核菌に特異的なIFN- $\gamma$ 産生T細胞数の増強をElispot Assayで明らかにした<sup>1)2)</sup>。

[IV] 新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PBL/hu [IL-2レセプター $\gamma$ 鎖ノックアウトNOD-SCIDにヒトPBLもi.p投与して作製した]を初めて開発した。これを用いてもHVJ-liposome/Hsp 65 DNA+IL-12 DNAワクチン効果を解析中である。

#### (1) 新しいヒト生体内結核免疫解析モデル

SCID-PBL/hu(ヒト結核菌ワクチン解析モデル)を用いた評価:世界に先駆け, 結核蛋白に特異的なヒトキラーT誘導を示す画期的な, ヒト結核ワクチン効果評価モデルを開発した<sup>2)</sup>。ESAT-6ペプチドを投与し, これに特異的でHLA-A2拘束性を示すヒトキラーTを生体内で誘導することに初めて成功した(Fig.)。

#### (2) 新しい結核ワクチンの臨床応用

さらに, ヒトの結核感染モデルに最も近い折り紙つきのカニクイザル(Nature Med. 1996)の結核感染モデルを用い, HVJ-liposome/Hsp 65 DNA+IL-12 DNAワクチン, r72f BCGワクチンの有効性を得た<sup>1)2)3)</sup>。カニクイザルに3回免疫し, 最終免疫4週後にヒト結核菌Erdman株を経気道投与した。体重, 体温, 血沈, 胸部X線, ツ反および生存率を解析し1年以上経過観察した。これらの群ではワクチン抗原に対する末梢血リンパ球増殖反応およびサイトカイン産生の増強が認められた。また, 胸部X線所見, 血沈の改善効果, 体重減少の阻止効果が認められた。さらに延命効果も認められた。すなわち, Hsp 65 DNA+IL-12 DNAワクチン投与群およびr72f BCGワクチンは著明な延命効果を認めた(Table)<sup>3)</sup>。Ag85B-ESAT-6融合タンパク質(Anderson博士ら)ワクシニアウイルスに85A DNAを導入したワクチンやr85B BCG(Horowitzら)もclinical trialに近い将来考えられている<sup>1)</sup>。しかしながら, 最も切れ味のするどい臨床応用ワクチン候補の筆頭としてHsp 65 DNA+IL-12 DNAワクチンがあげられる。最も有力なものとして, ①Hsp 65 DNA+IL-12 DNAワクチン, ②r72f BCGワクチン, ③72f fusion蛋白ワクチン(すでにphase I clinical trial)+BCG東京があげられる。

[VI] WHO STOP TB VACCINE Meeting

2004年4月にWHO会議が開催され新しい結核ワクチ

ンの報告がなされた。(1) Hsp 65 DNA+IL-12 DNAワクチンはきわめて高い評価を受けた。(2) r72f BCGワクチンとともに期待されている。

## 考 察

これらの新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価されWHO STOP TB PartnershipおよびWHO STOP TB VACCINE GROUP MEETINGに選出された。われわれのHsp 65 DNA+IL-12 DNAワクチンが高く評価された(Table)。当センターは呼吸器疾患(結核を含む)準ナショナルセンターであり, 日本の結核患者数の約50%の診療を行っている政策医療呼吸器ネットワークを用い, Hsp 65 DNA+IL-12 DNAワクチンおよびr72f BCGワクチンの臨床応用を計画している。

## 謝 辞

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター; 田中高生, 喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子, 金丸典子, 橋元里実, 高井寛子, 岡田知佳, 福永有可里, 坂口弥生, 古川いづみ, 山田恭子, 和泉谷美和, 井上義一, 武本優次, 坂谷光則, 自治医大; 吉田博士, ハーバード大; Mulligan教授, Lee博士, 長崎大; 山田, 大原, 内藤各博士, 阪大; 金田教授, 東大; 斎藤博士, Corixa研究所; Reed, Skeiky, Gillis各博士, Leonard Wood研究所; Gelber, Tan, Cruz各博士, Texas A & M大学; McMurphy博士らとの共同研究。厚生労働科学研究費新興・再興感染症研究事業の支援を受けた。

## 文 献

- 1) 岡田全司: 結核感染とサイトカイン. 医学のあゆみ. 2004; 209-213.
- 2) 岡田全司: 結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究: [抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン(サブユニット-DNA-リコンビナントBCG-ワクチン)・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]. 厚生科学研究費補助金実績報告書・研究報告書. 2004; 1-128.
- 3) Okada M, Tanaka T, Inoue Y, et al.: Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis. Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 2002; 171-175.
- 4) Okada M, Yoshimura N, Kaieda T, et al.: Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. Pro Nat Acad Sci USA. 1981; 78: 7718-7721.
- 5) Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, et al.: Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. Vaccine. 2005; 23: 2132-2135.

#### 4. 抗酸菌の病原性に関する分子遺伝学的研究

産業医科大学医学部微生物学教室 谷口 初美

##### はじめに

結核菌の増殖に関する因子およびその遺伝子に関しては既に多くの報告がある。また菌の休眠状態に関する増殖制御系の遺伝子群の報告も近年相次いでいる。

われわれは放線菌 *Streptomyces kasugaensis* の *orf3*, *orf5* 遺伝子が増殖の制御に関する遺伝子で、結核菌の *mIHF*, Rv1390 とアミノ酸レベルで高いホモロジーを有するという情報を得た (from K. Akagawa, personal communication)。そこで結核菌の integration host factor (*mIHF*) とその近傍遺伝子を *Mycobacterium smegmatis* J15CS 株に導入し、これらの遺伝子が J774 細胞内での *M. smegmatis* の増殖を制御するという現象を見出したので報告する。

##### 材料と方法

###### (1) 形質転換体作成

大腸菌・抗酸菌シャトルベクターとして、pYT 923<sup>1)</sup> に hygromycin 耐性を組み込んだ改良型の pYT 923hyg  $\alpha$  を、宿主には *M. smegmatis* J15CS 株を用いた。ヒト型結核菌 *M. tuberculosis* H37Rv の *mIHF*, *mIHF-gmk-Rv1390* 遺伝子を含む断片をベクター pYT923hyg  $\alpha$  に挿入し、これら組換え体を *M. smegmatis* J15CS 株に形質転換して、J15CS/pYT 923hyg  $\alpha$ , J15CS/*mIHF*, J15CS/*mIHF-gmk-Rv1390* を得た。

###### (2) *In vitro* 実験

普通寒天培地での培養と Ziehl-Neelsen 染色を行った。

Tween 80 加 L-broth, 37°C で培養し、増殖曲線を作成した。普通寒天培地上, 7 日培養のコロニーについては、走査型、透過型電子顕微鏡観察を行った。

###### (3) *Ex vivo* 実験

マウスマクロファージ系 J774 細胞を Lab-Tek chamber slide あるいは 24 well plate に monolayer に調整した。普通寒天培地で 7 日間培養した後, 5  $\mu$ m のフィルターでろ過し, 10<sup>6</sup>~7 CFU/well 感染させた。3 時間食菌後, 2 回洗浄し, amikacin 200  $\mu$ g/ml 加 RPMI 1640 medium でさらに 2 時間培養し, 細胞外の菌を殺菌した。medium 交換後, 5%CO<sub>2</sub> incubator で 37°C 3 日間培養した。Ziehl-Neelsen 染色と細胞内生菌数を計測した。また *M. smegmatis* J15CS/pYT 923hyg  $\alpha$ , J15CS/*mIHF-gmk-Rv1390* の感染 2 日目の細胞について透過型電子顕微鏡で観察した。

##### 結果

*M. smegmatis* J15CS, J15CS/pYT 923hyg  $\alpha$ , J15CS/*mIHF*, J15CS/*mIHF-gmk-Rv1390* の普通寒天培地上でのコロニーの大きさ, Ziehl-Neelsen 染色による菌の大きさ, 抗酸性, 液体培地での増殖曲線に差はなかった (Fig. 1)。走査型電子顕微鏡像に違いは認められなかったが, 透過型電子顕微鏡で菌体内微細構造を観察した結果, J15CS/*mIHF-gmk-Rv1390* の細胞壁の内側が肥厚していた。

J774 細胞感染直後の取り込みに差はなかった。しかし 1 日培養後には J15CS/*mIHF-gmk-Rv1390* 以外の形質転

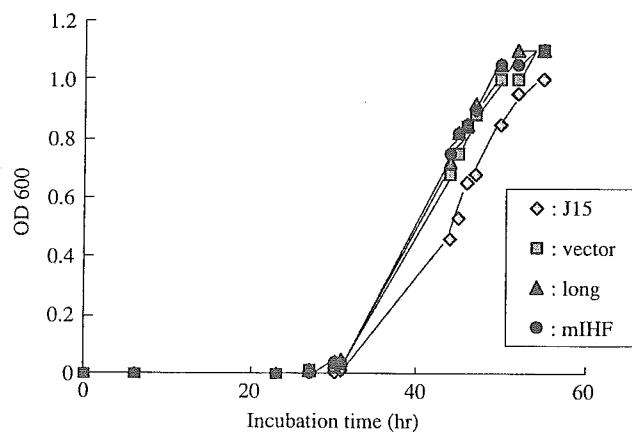


Fig. 1 Proliferation curve (Tween 80 containing L-broth)

J15: *M. smegmatis* J15CS, vector: J15CS/pYT923hyg  $\alpha$ ,  
long: J15CS/*mIHF-gmk-Rv1390*, mIHF: J15CS/*mIHF*

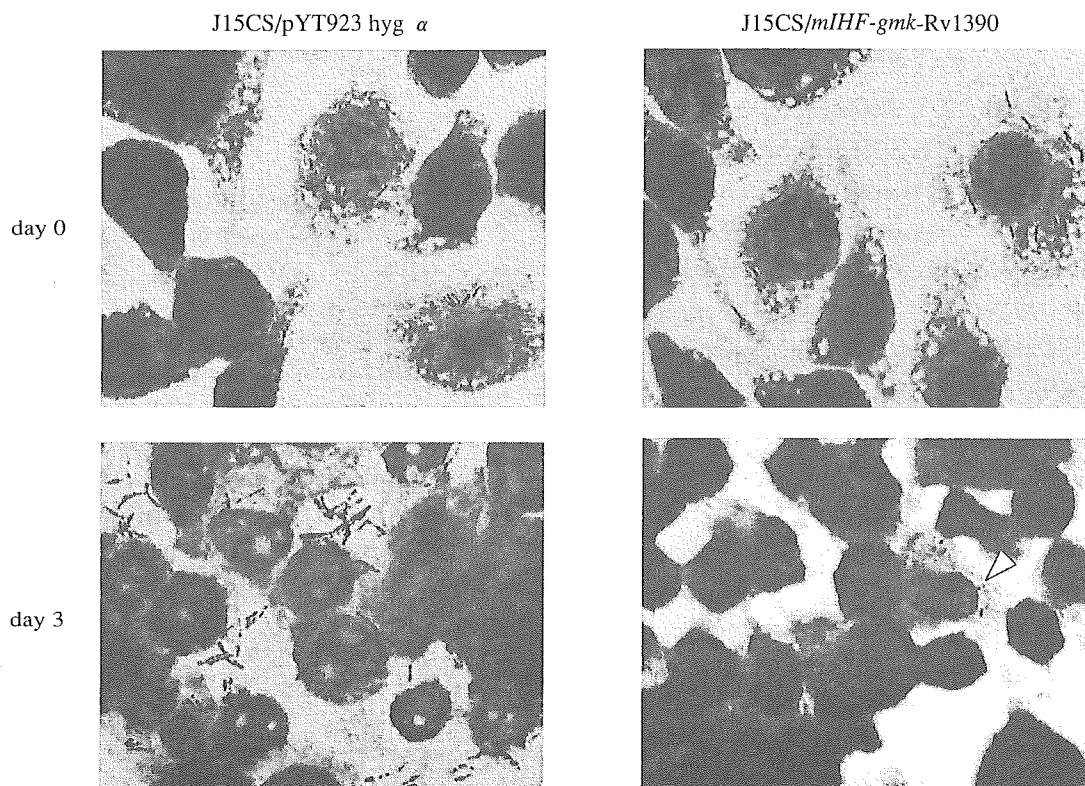


Fig. 2 Proliferation of bacteria in J774 cells (Ziehl-Neelsen staining)

換体は菌の伸長が認められ、細胞内で生残し、明瞭な抗酸性を示していたが、J15CS/*mIHF-gmk-Rv1390*は菌の伸長が認められず、抗酸性も低下していた。3日目にはこの差は顕著であった。また宿主のJ774細胞も変化していた (Fig. 2)。J15CS/pYT 923hyg  $\alpha$ 、J15CS/*mIHF-gmk-Rv1390*を透過型電子顕微鏡で観察した結果、菌がJ774細胞の食胞内に取り込まれている像が認められた。J15CS/pYT 923hyg  $\alpha$ は小さな食胞内に正常な菌が観察された。しかしJ15CS/*mIHF-gmk-Rv1390*は大きな食胞内に変化した菌が認められた。菌体内に膜様構造の形成が認められ、電子密度の低い内容構造が見られた。しかし、これらの細胞内生菌数を計測した結果、差は認められず、J15CS/*mIHF-gmk-Rv1390*はJ774細胞内で生残していることが確認された。

## 考 察

*M. smegmatis* J15CSはJ774細胞のみでなく、ヒト肺胞上皮細胞であるA549細胞でも取り込まれ、生残した。しかし、小川培地で培養した菌は容易に殺菌され、生残するためには感染させる時の菌の状態が重要であった。遺伝学的背景が同じ結核菌であっても、感染性が異なることが知られており、ヒト側の感受性遺伝子の解析等が行われているが、菌側の要因として、この現象の解明は貴重な情報を提供すると考えられる。

結核菌の*mIHF-gmk-Rv1390*の3つの遺伝子を破壊することなく*M. smegmatis* J15CSに挿入したものは、*in vitro*では差がなかったが、電子顕微鏡では細胞壁の内側が肥厚している像が観察された。この部位は結核菌の細胞壁のペプチドグリカン層の位置であった。この物質については現在解析中である。

J774細胞、A549細胞内増殖に関しては、3日目には*mIHF-gmk-Rv1390*を有する菌は空洞内で休眠状態になった結核菌の像と酷似していた。透過型顕微鏡による微細構造では、J15CS/pYT 923hyg  $\alpha$ は狭い食胞内に正常な菌体が認められ、細胞内寄生性細菌であるレジオネラが細胞内で分裂・増殖している時の像に似ていた。しかしJ15CS/*mIHF-gmk-Rv1390*の場合は、食胞が広く、その中にある菌は菌体内構造が変化し、膜様構造が形成されているものがあった。

*S. kasugaensis*のORF5はRNA polymeraseの $\omega$  subunitであると報告されている<sup>2)</sup>。 $\omega$  subunitはRNA polymeraseの立体構造維持に重要な役割をしており、 $\sigma$  factorとの相互作用にも影響を与えるものである。ストレス下では $\omega$  subunitに変化が生じ、 $\sigma$  factorも定常状態とは異なるものが選ばれ、合成されるmRNAも異なってくると思われる。結核菌のRv1390タンパクは*S. kasugaensis*のORF5と高い相同性を示し、結核菌の $\omega$  subunitではないかと考えられる。一方、*mIHF*タンパクはstationary phase

で合成が始まり、菌の生存に必須の遺伝子であることが *M. smegmatis* を用いた研究で明らかになっている<sup>3)</sup>。*S. kasugaensis* の ORF 3 タンパクは結核菌の mIHF タンパクと高い相同性を示し、増殖様式の変換に、ORF5 とともに重要であることが報告されている。結核菌の Rv1390 単独か、または *mIHF-gmk-Rv1390* の 3 つの遺伝子が関連して *M. smegmatis* の増殖を休眠状態に誘導していることが示唆され、さらに解析が必要である。

結核菌は増殖が遅く、凝集性が強く、バイオハザードの面からも実験上の制約が大きい。さらにカルタヘナ議定書の批准に伴い、組換え DNA 実験は 2004 年より法規制となった。結核菌を用いた組換え DNA 実験は大臣承認となり、さらに実験上の厳しい規制が生じた。ここで紹介した *M. smegmatis* J15CS と pYT 923hyg  $\alpha$  の宿主ベクター系を用いた結核菌の *mIHF-gmk-Rv1390* 遺伝子の研

究は、結核菌の細胞内増殖性、休眠状態への移行を分子遺伝学的に研究するうえできわめて有用な系であると考えられる。

## 文 献

- 1) Goto Y, Taniguchi H, Udou T, et al.: Development of a new host vector system in mycobacteria. FEMS Microbiol. Letters. 1991; 7 (83): 277-282.
- 2) Kojima I, Kasuga K, Kobayashi M, et al.: The *rpoZ* gene, encoding the RNA polymerase omega subunit, is required for antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces kasugaensis*. J. Bacteriol. 2002; 184 (23): 6417-6423.
- 3) Marisa L, Pedulla ML, Hatfull GF: Characterization of the *mIHF* gene of *Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol. 1998; 180 (20): 5473-5477.

## 5. 結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社 阿部千代治

### 1. 薬剤耐性結核の現状

1994 年に世界保健機関 (WHO) は国際結核肺疾患予防連合 (IUATLD) と協力し、薬剤耐性結核の広がりを調べることを目的とした世界規模のプロジェクトを開始した。これまでに WHO/IUATLD から 3 つの報告が出された<sup>1-3)</sup>。サーベイランスの成績は、薬剤耐性は世界の至る所で起こっていることを示している。

第 3 報には 62 カ国 77 地域の成績が載せられている。初回治療例で主要 4 薬剤のいずれかに耐性の頻度が 25% 以上の国または地域が 13 地域あり、これらのうち 4 地域は 35% 以上であった (カザフスタン 57.1%, ウズベキスタンのカラカルパクスタン 48.1%, 中国の遼寧省 42.1%, ロシアのトムスク州 37.3%)。耐性頻度の高い 4 地域は、治療が困難な MDR-TB の頻度も 10% 以上であった。また初回治療例で耐性頻度の高い地域は既治療例の耐性も高頻度であった。多変量解析の結果、初回治療例の全体の耐性および MDR は再治療例の割合と正、GDP などの経済的な因子と負の関連がみられた。しかし、DOTS の遂行や HIV 感染の割合と有意の関連はみられなかった。

わが国の結核療法研究協議会は 5 年毎に入院時に分離された結核菌の薬剤耐性頻度を調査してきた。2002 年のサーベイランスの成績が 2005 年 5 月に報告された<sup>4)</sup>。初回治療例の主要 4 薬剤のいずれか 1 剤に対する耐性の頻度は 8.2%, MDR は 0.7% であり、WHO/IUATLD から

報告された中央値よりいくぶん低い頻度であった。既治療例のそれらは 22.8% と 9.8% であり、1997 年のサーベイランスの成績より大分改善がみられたが世界の中央値 (いずれか: 18.4%, MDR: 7.0%) と比べて高い頻度であった。これらのことは、わが国でも薬剤耐性結核は大きな問題であることを示している。

### 2. 薬剤耐性の分子機構

抗酸菌の薬剤耐性は自然に生ずる突然変異によるものと結論されている。これらの耐性菌は薬剤と接触前の結核菌集団に含まれており、抗結核剤による治療中に耐性菌が選択される。結核菌の薬剤耐性を支配する遺伝子はゲノム性と考えられており、一般細菌でみられる耐性プラスミド分離の報告はない。

多くの INH 耐性菌にカタラーゼ活性の減弱がみられること、高度耐性分離株では完全に消失していることが知られている。カタラーゼとパーオキシダーゼの両者をコードしている *katG* 遺伝子の欠失は結核菌の高度耐性と関連している<sup>5)</sup>。INH 耐性菌で *katG* 遺伝子内に変異の存在する株もみつまっている。これらのことは、prodrug である INH は活性化のために KatG が必要であり、KatG の変異は INH 耐性を導くことを示している。INH の標的として細胞壁ミコール酸生合成に関与する NADH-dependent enoyl ACP reductase をコードしている *inhA* が同定された<sup>6)</sup>。耐性の発現には *InhA* のアミノ酸置換または *inhA* オペロンの変異が関係している。

RFPは細菌のDNA-dependent RNA polymeraseに結合しmRNAの合成を妨害する。RFP耐性結核菌分離株の93%以上は*rpoB*遺伝子に変異を持ち、特にクラスターIに属する81 bpからなるホットスポット領域に変異が集中して認められる。一方RFP感受性株にはこの領域に変異がみられない。分離された地域により若干異なるが、約50%の耐性菌はSer-531に変異を持つ。続いてHis-526とAsp-516であり、耐性分離株の80%以上はこれら3アミノ酸の置換と関連している<sup>7)</sup>。

PZA耐性結核菌臨床分離株は通常ピラジナミダーゼ(PZase)活性を欠いており、PZA耐性と酵素活性の損失の間に相関がみられる。PZase陰性結核菌の95%以上はPZaseをコードしている*pncA*遺伝子に変異がみられる<sup>8)</sup>。変異は遺伝子全般に分布しており、RFP耐性菌にみられるようなホットスポット領域は認められない。PZase陽性株には変異がみられないことから、*pncA*の変異はPZase活性に関連していることが考えられる。

SMはアミノグリコシド抗生物質であり、30Sリボソームのサブユニットと作用し、タンパク合成に影響を与える。変異の主要な部位はリボソームタンパクS12をコードしている*rpsL*遺伝子である。SM耐性結核菌分離株では、S12タンパクのLys-43とLys-88のアミノ酸置換が頻度の高い部位である。SM耐性の第2の機構は*rrs*(16S rRNA)の変異である。SM耐性結核菌では、16S rRNAの530領域ループとループに近接する915領域に変異が集中して認められる。

EBは抗酸菌細胞壁の主要な多糖であるアラビノガラクトサンの細胞壁アラビナンの重合を阻止し、アラビナン生合性の中間生成物である $\beta$ -D-arabinofuranosyl-*p*-decaprenolを蓄積する。EB耐性結核菌の65%はアラビノガラクトサンの重合を仲介するarabinosyl transferaseをコードしている遺伝子*embB*に変異が認められ、EmbBの変異は高レベル耐性と関連している。EmbBのコドン306領域の変異は明らかにEB耐性と関連している。

オフロキサシン耐性結核菌ではDNA gyrase Aサブユニットの構造遺伝子である*gyrA*に点突然変異がみられる。CS耐性*Mycobacterium smegmatis*ではD-alanine racemaseをコードしている*alrA*のプロモーター部に変異が認められる。KM耐性に*rrs*遺伝子、TH耐性に*inhA*遺伝子の関与が知られている。*Mycobacterium avium*や*Mycobacterium intracellulare*に有効な薬剤であるCAM耐性に23S rRNAの変異が関与していることも報告されている。

複数の薬剤に耐性を持つ臨床分離株では耐性の発現に少なくとも2つ以上の遺伝子が関与している<sup>10)</sup>。これまで複数の薬剤に耐性を付与する遺伝子の報告がないことから、1つの細胞で個々の薬剤に対する耐性の発現が独立して起こるものと考えられている。

### 3. 遺伝子を用いる薬剤感受性検査

結核菌の遺伝子変異の検出法として、ラインプローブ法、DNAチップ法、分子ビーコン法などが開発されている。一部の薬剤についてはキットによる検出も可能となった。フィノス LiPA・Rif TB (ニプロ)はラインプローブ法を採用した結核菌*rpoB*遺伝子の変異、すなわち、RFP耐性結核菌を検出する試薬である<sup>11)</sup>。結核菌群の検出でみた感度と特異性は100%であり、RFP耐性菌の検出でみた感度と特異性は96.1%と99.6%である。RFP耐性菌の80%以上はINHにも耐性、すなわち治療困難なMDR-TBであることから、早急にRFP耐性菌を検出する意義はある。研究試薬としてOligoArray(日清紡)が開発された<sup>12)</sup>。DNAチップにより遺伝子変異を検出する方法であり、このキットで検出可能な耐性菌の割合は、INH 80%、RFP 95%、SM 80%、EB 70%、KM 70%とされている。

結核菌の薬剤感受性検査では結核菌集団に占める耐性菌の割合が1%以上の場合を耐性、1%未満の場合を感受性と判定している。しかし上記のキットではその臨界点の判定は不可能である。さらに、耐性菌の検出感度も臨床に用いるには十分とはいえない。このように現段階では、遺伝子による薬剤感受性検査を採用したとしても同時に培養法による検査も行う必要があり、今後の研究開発の進展が望まれる。

### 文 献

- 1) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance: WHO/TB/97. 229. Geneva: WHO, 1998.
- 2) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance: WHO/CDS/TB/2000. 278. Geneva: WHO, 2000.
- 3) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance: WHO/HTM/TB/2004. 343. Geneva: WHO, 2004.
- 4) 結核療法研究協議会: 入院時薬剤耐性に関する研究. 平成16年度療研研究報告書, 2005.
- 5) Zhang Y, Heym B, Allen B, et al.: The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Nature. 1992; 358: 591-593.
- 6) Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al.: *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science. 1994; 263: 227-230.
- 7) Hirano K, Abe C, Takahashi M: Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. J Clin Microbiol. 1999; 37: 2663-2666.
- 8) Scorpio A, Zhang Y: Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the

- antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature Med.* 1996 ; 2 : 662-667.
- 9) Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, et al.: Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Lung Dis.* 1998 ; 78 : 117-122.
- 10) Morris S, Bai GH, Suffys P, et al.: Molecular mechanisms

of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 1995 ; 171 : 954-960.

- 11) 阿部千代治, 尾形英雄, 河田兼光, 他: Line probe assay によるリファンピシン耐性結核菌の検出. *結核.* 2000 ; 75 : 575-581.
- 12) 鈴木定彦, 市原竜生, 田丸亜貴, 他: DNAチップによる結核菌の耐性診断. *Bio Industry.* 2000 ; 17 : 36-44.

## 6. Toll-like receptorと結核感染

九州大学生体防御医学研究所発生工学分野 竹田 潔

### はじめに

感染防御の中心を担う免疫系は、自然免疫系 (Innate Immunity) と獲得免疫系 (Acquired Immunity) の2種の免疫系から成り立っている。どちらの免疫系も、病原体の生体内侵入を非自己として識別し、それを排除するシステムであるが、20世紀までは獲得免疫系を中心とした非自己の認識機構が詳細に解析されてきた。獲得免疫系では、脊椎動物にのみ存在するB細胞やT細胞がそれぞれ免疫グロブリン (Immunoglobulin), T細胞受容体により、樹状細胞などの抗原提示細胞によって提示されたペプチド由来の抗原 (antigen) を非自己として認識する。これに対し、自然免疫系が認識する非自己は外界の異物そのものであり、例えばグラム陰性菌の細胞壁の構成成分のリポポリサッカライド (LPS) のように病原体の構成成分によりマクロファージや樹状細胞などの自然免疫担当細胞が活性化される。しかしながら、自然免疫系による病原体の認識機構は、獲得免疫系における抗原認識機構のように理解されていなかった。20世紀の終わりに Toll-like receptor (TLR) が発見され、その機能解析から、TLRが自然免疫系における非自己の認識受容体であることが明らかになった。そしてTLRを介した自然免疫系の活性化機構が急速に明らかになった。

### 自然免疫系の活性化機構

1996年に獲得免疫系の存在しないショウジョウバエのToll受容体の変異体の解析から、Tollを介したシグナルが真菌感染防御に必須の役割を果たすことが明らかになった。続いて、哺乳類のTollホモログが1997年に初めて同定され、このシグナルが種々の炎症に関与した遺伝子を誘導することが示された<sup>2)</sup>。その後、ファミリー分子がToll-like receptor (TLR) として次々と発見され、現在までに11種 (TLR1-TLR11) が論文に報告されている。そしてTLRファミリーが、病原体の構成成分を特異的に認識することが、おもにノックアウトマウスを用いた解析から明らかになってきた (Fig. 1)<sup>3)</sup>。

TLRが病原体を認識すると、自然免疫系に属する樹状細胞やマクロファージは種々の遺伝子発現を誘導する。その中には、IL-12などの炎症性サイトカイン、CD40などの副刺激分子の遺伝子が含まれる。樹状細胞やマクロファージは従来病原体を貪食する細胞として知られていた。これらのことから、自然免疫系の細胞は、貪食による病原体由来の抗原のナイーブT細胞への提示、そしてTLRを介した炎症性サイトカインや副刺激分子の遺伝子発現により、抗原特異的な獲得免疫系、特にTh1細胞分化を誘導することが明らかになった (Fig. 2)<sup>4)</sup>。このように、TLRによる自然免疫系の活性化が、感染防御応

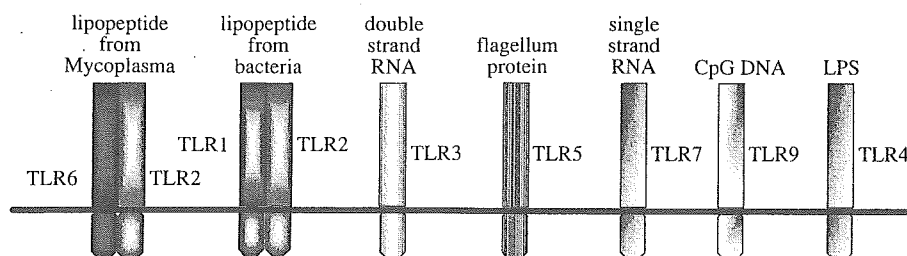


Fig. 1 Activation of innate immunity through TLR

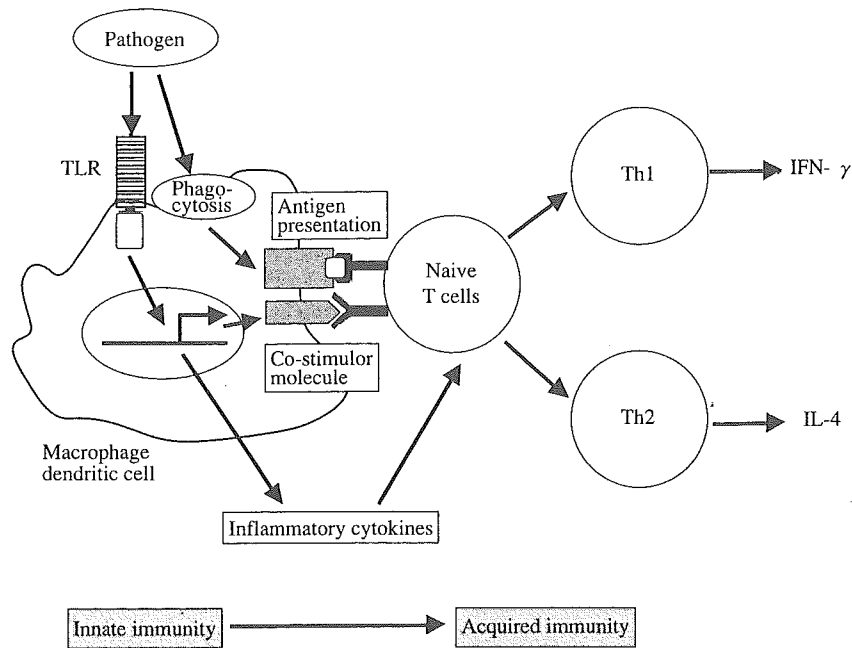


Fig. 2 Innate immunity system and Acquired immunity system

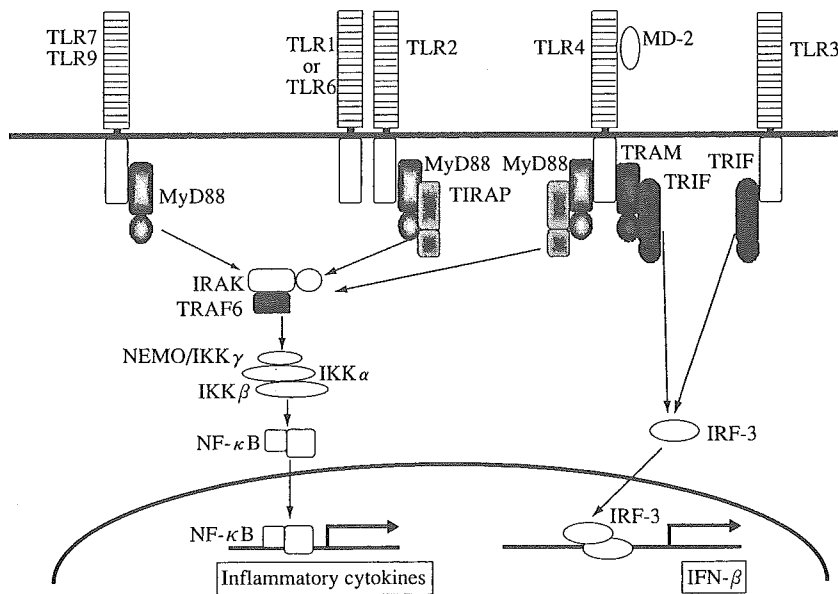


Fig. 3 Pathway of signal transduction through TLR

答のトリガーとしてきわめて重要な役割を担っていることが明らかになってきた。

**TLRを介したシグナル伝達経路**

そこでTLRによる病原体の認識から遺伝子発現にいたる分子機構を解析するため、TLRを介したシグナル伝達経路を解析した。TLRを介したシグナルは、すべて各TLRの細胞質内に保存されたTIRドメインから開始される。その下流でも、同じTIRドメインを持った分子群

(MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM)が重要な役割を担っていることがノックアウトマウスの解析から明らかになってきた。

MyD88は、すべてのTLRを介した炎症性サイトカインの誘導シグナルに必須である。しかしその後の解析から、TLR4を介したシグナルには、MyD88依存性の炎症性サイトカインの産生に必須のシグナルと、MyD88非依存性のシグナルが存在し、このシグナルではIFN-βおよびIFN誘導性遺伝子が転写因子IRF3の活性化を通

して誘導されることが明らかになった。また、TLR3を介したシグナルでも、MyD88非依存性にIRF3の活性化が誘導され、IFN- $\beta$ が産生される。TRIFは、TLR3、TLR4を介したMyD88非依存性の経路に必須の役割を果たす。TIRAPは、TLR2とTLR4によるMyD88を介したシグナルに特異的に関与している。TRAMはMyD88非依存性（TRIF依存性）経路の中で、TLR4を介したシグナルに特異的に関与している。このように、TIRドメインを有する分子群が、TLRを介した細胞内シグナル伝達経路において極めて重要な役割を担っていることが明らかになった（Fig. 3）。

#### TLRを介したシグナルの結核感染防御における役割

このような中で、TLRによる自然免疫系活性化の、生体レベルでの結核感染防御における役割について現在解析している。これまでに、MyD88欠損マウスで、結核菌やBCGの感染に対し感受性がやや高まることが報告されている。私たちは、TLRを介した自然免疫系の活性化が消失するMyD88/TRIF二重欠損マウスを用いて、結核感染における自然免疫系の関与について検討した。正常マウス、MyD88欠損マウス、TRIF欠損マウスではBCG感染による肺病変は観察されないが、MyD88/TRIF二重欠損マウスの肺では、多数の壊死性病変が観察された。この結果は、TLRを介した自然免疫系の活性化が結核感染防御にも生体レベルで重要な役割を担っていることを示している。BCG感染においては、Th1応答が感染

防御に重要な役割を担っている。MyD88欠損マウスでは、BCG感染後のTh1応答が正常と比べて3分の1程度に低下するが、MyD88/TRIF二重欠損マウスでもTh1応答の障害は同程度しか認められなかった。この結果は、TLRを介した自然免疫シグナル以外にもTh1誘導機構が存在し、さらに自然免疫系がTh1誘導以外の分子機構により結核感染を制御していることを示唆している。

#### ま と め

以上、TLRを介した自然免疫系の活性化が結核感染防御に関わっていることが明らかになってきた。しかし、TLR非依存性のTh1誘導機構も結核感染ではあることが示され、今後の解析の進展が待たれる。

#### 文 献

- 1) Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al.: The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996; 86: 973-983.
- 2) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388: 394-397.
- 3) Takeda K, Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21: 335-376.
- 4) Akira S, Takeda K: Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4: 499-511.



———— The 80th Annual Meeting Symposium ————

FRONTIER OF MYCOBACTERIUM RESEARCH

—— Host vs. Mycobacterium ——

Chairpersons: <sup>1</sup>Masaji OKADA and <sup>2</sup>Taro SHIRAKAWA

**Abstract** During the past decade, we have observed advance in tuberculosis research including novel vaccines, innate immunity (TLR), SNP analysis and molecular mechanism of drug resistance. Worldwide genome project enabled the whole genome sequence of host resistant against tuberculosis as well as the whole genome sequence of *M. tuberculosis* H37Rv. DNA technology has also provided a great impact on the development of novel vaccine against TB.

In this symposium, we have invited leading researchers in the field of the frontier study of Mycobacterium research in order to provide general overview of the cutting edge of frontier research.

Molecular mechanism of drug resistance of *M. tuberculosis* has been clarified. On the other hand, molecular mechanism of host-defence (insusceptibility of host) against *M. tuberculosis* has not yet elucidated. Dr. Taro Shirakawa (Kyoto University) reviewed the susceptibility genes of host in TB infection and presented candidate genes associated with multi-drug resistant tuberculosis. Dr. Naoto Keicho (International Medical Center of Japan) tried to identify host genetic factors involved in susceptibility to pulmonary *Mycobacterium avium* complex (MAC) infection by candidate gene approach and genome-wide approach.

In Japan, Dr. Masaji Okada (National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center) has been engaged actively in the development of new tuberculosis vaccines (HVJ-liposome/Hsp65 DNA + IL-12 DNA vaccine and recombinant 72f BCG vaccine). He showed basic strategy for construction of new candidate vaccines and also showed significant efficacy on the protection of tuberculosis infection using cynomolgus monkeys, which are very similar to human tuberculosis.

Dr. Hatsumi Taniguchi (University of Occupational and Environmental Health) presented that *M. tuberculosis* *mIHF* and the neighbor genes went into a dormancy-like state of *M. smegmatis* in J774 macrophage cells. This study might provide a weapon for elucidating the mechanism of dormancy of *M. tuberculosis* and the development of novel therapy.

Dr. Chiyoji Abe (Nippon Becton Dickinson Co.) reviewed the molecular basis of the resistance to anti-tuberculosis drugs. Most cases of resistance are related to simple nucleotide substitutions rather than to acquisition of new elements.

Dr. Kiyoshi Takeda (Kyushu University) showed interesting finding. He analyzed whether Toll-like receptor (TLR)-mediated activation of innate immunity in host defense against mycobacterial infection. MyD88/TRIF double deficient mice showed high sensitivity to mycobacterial infection,

indicating that innate immunity is involved in anti-mycobacterial infection.

1. SNP (single nucleotide polymorphism) analysis in association with *Mycobacterium tuberculosis*: Taro SHIRAKAWA (Department of Health Promotion & Human Behavior, Kyoto University Medical School, and RIKEN SRC Center)

Candidate gene approach was made on 18 SNPs in 11 genes in association with *M. tuberculosis*. Patients with multi-drug resistance against *M. tuberculosis* are also subjected. SNPs in *NRAMP1* gene were associated with the disease, and drug resistance, its mechanisms remain unknown.

2. Search for genes susceptible to pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection: Naoto KEICHO (Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan)

Interaction among pathogens and host factors is important for development of infectious diseases. We are trying to identify host genetic factors involved in susceptibility to non-immunocompromized pulmonary *Mycobacterium avium* complex (MAC) infection by candidate gene approach and genome-wide approach. Elucidation of functional significance of susceptibility gene polymorphisms will lead to a new strategy for control and prevention of the disease.

3. T cell immunity against Tuberculosis in host and the establishment of novel vaccine: Masaji OKADA (Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center)

T cell (CTL, Th1) immunity including granulysin play an important role in host defense against tuberculosis (TB) in human. Patients with TB or Multi-drug resistant TB showed suppression of all these immunities.

HVJ-liposome/Hsp65 DNA + IL-12 DNA vaccination was 100 fold more efficient than BCG on the elimination of *Mycobacterium tuberculosis* (M.TB) in the BALB/c mice. Cytotoxic T cells activity against M.TB was augmented. By using these new vaccines (Hsp 65 DNA + IL-12 DNA, recombinant 72f BCG) and the cynomolgus monkey models which are very similar to human tuberculosis, the prophylactic effect of vaccines was observed. Thus, these novel vaccines should provide a useful tool for the prevention of human TB infection.

4. *Mycobacterium tuberculosis* *mIHF* and the neighbor genes go into a dormancy-like state of *M. smegmatis* J15CS in J774

cells: Hatsumi TANIGUCHI (Department of Microbiology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health)

*Mycobacterium smegmatis* J15CS transformants harboring the *mIHF* gene or the *mIHF-gmk-Rv1390* genes showed no difference in *in vitro* growth and acid-fastness. However, transformants harboring *mIHF-gmk-Rv1390* formed short-rod cell morphology and decreased acid-fastness in the mouse macrophage-like cell line J774 compared to those of the other transformants, and the nuclei of the infected J774 cells also changed. Nevertheless, the colony forming units were similar.

These indicate that *mIHF* and the neighbor genes of *M. tuberculosis* might regulate a growth of mycobacteria in macrophages.

5. Molecular basis of the resistance to anti-tuberculosis drugs: Chiyoji ABE (Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.)

Considerable progress has been made toward understanding the molecular basis of the resistance to anti-tuberculosis drugs. Most cases of resistance are related usually to simple nucleotide substitutions rather than to acquisition of new elements. Multi-drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* arise a consequence of sequential accumulation of mutation conferring resistance to single therapeutic agents. The basis of resistance is not able to be explained yet in a substantial percentage of strains for other anti-tuberculosis drugs than rifampin and pyrazinamide. Further studies are required to fully understand the molecular mechanisms of resistance.

6. Toll-like receptors in anti-mycobacterial immune responses:

Kiyoshi TAKEDA (Department of Molecular Genetics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University)

Toll-like receptors (TLRs) play an essential role in the recognition of specific patterns of microbial components. TLRs mediate activation of innate immunity and further development of antigen-specific adaptive immunity. In TLR signaling pathways, Toll/IL-1 receptor (TIR) domain-containing adaptors, such as MyD88, TIRAP, TRIF, and TRAM, have been shown to play pivotal roles. Thus, the molecular mechanisms for TLR-mediated activation of innate immunity have been largely understood. We analyzed whether TLR-mediated activation of innate immunity is involved in host defense against mycobacterial infection. MyD88/TRIF double deficient mice, in which TLR-dependent activation of innate immunity is abolished, showed high sensitivity to mycobacterial infection, indicating that innate immunity is critically involved in anti-mycobacterial responses.

**Key words:** Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Frontier study

<sup>1</sup>General Director, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, <sup>2</sup>Kyoto University Graduate School of Medicine

Correspondence to: Masaji Okada, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Sakai-shi, Osaka 591-8555 Japan. (E-mail: okm@kch.hosp.go.jp)

ゆえに結核病棟内での再感染が判明した事実をもとに、国内外の文献の考察も含め、宿主側の因子、菌側の因子および結核菌の再曝露程度により、外来性再感染が普遍的に起こり得ることを、分子疫学的解析により実証し

た。低蔓延国に近づいている本邦では、外来性再感染は結核入院病棟を中心に起こるので、これを意識した入院患者・職員への感染防止対策が必要であることを各演者は警告した。

## 1. 多剤耐性結核の再感染

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター

露口 一成, 吉田志緒美, 鈴木 克洋  
岡田 全司, 坂谷 光則

### はじめに

わが国の結核医療は、長年にわたってそのほとんどが隔離入院治療という形で行われてきた。しかし、結核病棟が特に他の一般病棟と比べて特別な感染対策が施されていたわけではなく、空気感染防止のための空調管理設備を備えた病室が整備され始めたのもごく近年のことである。結核病室の多くは大部屋であり、感受性結核患者と耐性結核患者が同室となることも多かった。これは、①結核患者が新たに他の結核菌の感染を受ける(再感染)ことは稀である、②耐性結核菌は変異菌であるので毒力は弱い、という漠然とした認識があったからと考えられる。すなわち、感受性結核患者が耐性結核菌の外来性再感染を受けることはまずあり得ないと想定されていたのである。

しかし近年分子疫学の進歩により結核の再感染発病を確実に証明することが可能となり、耐性結核菌による再感染発病が起こり得ることも報告されている。ここでは、われわれが経験した多剤耐性結核菌による再感染発病と考えられる2事例について概説し、今後の結核感染対策のあり方について考えてみたい。

### 事例 1

本事例は多剤耐性結核の院内集団感染事例である。初発患者 A は56歳の男性で、平成12年3月発症の初回多剤耐性結核患者である。発症時の分離結核菌の薬剤感受性検査で isoniazid (INH), rifampicin (RFP) を含む多剤に既に耐性を示しており、近医入院にて化学療法を施行されるも大量排菌持続していた。平成14年6月に他患者とのトラブルのため当院転院となる。

当院転院までの約2年間における患者 A の接触者から後に5名の多剤耐性結核患者が発生し、5名の分離菌株は RFLP 分析により患者 A の菌株と同一であると考えられた。うち3名は特に基礎疾患のない若年女性であった。他の2名は63歳男性と53歳男性であり、基礎疾患として肺気腫、糖尿病を有していた。2名とも全剤感受

性肺結核にて入院加療を受けており、入院中にのみ患者 A と接触歴があった。2名とも感受性肺結核治療後に多剤耐性肺結核を発症している。従って感受性結核罹患中に多剤耐性結核菌の再感染を受けたと考えられる。なお、2名とも感受性肺結核罹患時の分離菌は保存されておらず、RFLP 分析は行えなかった。本事例の患者は6名全員 HIV 陰性であった。

### 事例 2

本事例は当院で経験した多剤耐性結核菌による再感染発病事例である。患者 X は特に基礎疾患を有さない28歳男性で、平成13年1月より全剤感受性結核にて当院入院し化学療法を行った。入院中の一時期、多剤耐性肺結核に罹患していた患者 Y と同室であった。順調に排菌陰性化して退院し、化学療法にて治療に至ったが、その後、平成16年6月に再発し、そのときの検出菌の薬剤感受性検査では INH, RFP, ethambutol (EB), streptomycin (SM) を含む多剤に対して耐性を示していた。RFLP 分析を行ったところ、再発時の検出菌は初回治療時の検出菌とはパターンが異なっており、患者 Y の検出菌と同一パターンであった。すなわち、感受性結核治療中に多剤耐性結核菌の再感染を生じて、後に多剤耐性結核による再発を生じたと考えられた。なお、患者 X も HIV 陰性であった。

### 多剤耐性結核菌のクラスター解析

2001年から2004年までに当院で分離した多剤耐性結核菌株115株を対象に、RFLP法、spoligotyping法により解析を行った。RFLP法では48株(42%)が10群のクラスターを形成していた。5株以上からなる大きなクラスターが3群あり、クラスター a (12株)、クラスター b (11株)、クラスター c (7株)とした。事例1の株はクラスター c、事例2の株はクラスター a に属していた。spoligotyping法でクラスター a、クラスター b は Beijing strain と判定されたが、クラスター c は Beijing strain ではなかった。

多剤耐性結核は、一般にはその多くが不十分な治療による耐性の誘導が原因と考えられているので、クラスター形成率は低くなることが予想される。しかし、今回の検討ではクラスター形成率は42%であった。また、大きなクラスターを形成するクラスター a, b, c の株は、広く蔓延する強毒株であることが示唆された。

#### 再発時に多剤耐性を示した結核における再感染の頻度

当院において、いったん結核にて化学療法を行い治癒した後、少なくとも排菌陰性期間が6カ月以上持続した後、多剤耐性結核を発症した例につき、前後の菌株が入手できた8症例に対してRFLP分析を行った。8例中6例は前後の菌株のRFLPパターンが一致し内因性再燃であると考えられたが、残り2例(事例2を含む)はパターンが異なり再感染発病であると考えられた。この2例の再発時の耐性菌はクラスター a (事例2) とクラスター c に属する大クラスター形成株であった。

#### 考 察

近年RFLPをはじめとする分子疫学的手法の進歩により結核の再感染発病について幅広い検討がなされている。当初はHIV感染者での報告が相次ぎ、再感染発病の宿主側の危険因子としてHIV感染が注目されたが、その後HIV陰性者を含めて様々な状況下での再感染発病事例が報告された。伊藤はこれまでの報告の分析により、かつて考えられていたほど再感染発病は稀なものではなく、宿主側の因子、菌側の因子および曝露程度により普遍的に起こり得ることを指摘している<sup>3)</sup>。

今回の事例1では、2年間に基礎疾患をもたない若年女性3人が発病し、また、2人の中高年男性が再感染を受けて発病している。また、事例2では基礎疾患をもたないHIV陰性若年男性が再感染を受けて発病している。以上よりこの2事例の菌は強毒菌であったことがうかがわれる。いずれも大きなクラスターを形成する菌であったこともその裏付けとなる。

かつて動物実験でカタラーゼ活性を欠くINH耐性菌の増殖が感受性菌に比べて劣ることが示されたことから、変異株である耐性菌は感受性菌に比べて毒力が弱いと漠然と信じられてきた。しかし、今回われわれが経験したように、多剤耐性結核菌といえども再感染発病を引き起こす病原性の高い菌も存在する。それでは、病原性を規定するものは何であろうか? NiemannやNarvskayaもHIV陰性者における多剤耐性結核再感染事例を報告しており<sup>2)</sup>、いずれも菌はBeijing strainであった。欧米では、集団感染や再感染発病の原因となる強毒菌としてBeijing strainが関与しているとの報告が多い<sup>4)</sup>。しかし、

わが国や中国ではもともと半数以上がBeijing strainである<sup>5)</sup>。一方、事例1の菌はBeijing strainではなかった。結局、Beijing strainであることも必ずしも決め手とはならず、現時点で菌の病原性を決定するのは困難であると言わざるを得ない。あえて言えば、クラスター解析で大きなクラスターを形成する菌が強毒菌であると言えるかもしれない。

多剤耐性結核の再感染は、結核の感染対策上大きな影響を与える。多剤耐性結核菌による再感染が起こり得、しかもどの菌が再感染し得るか予測することが不可能な以上、すべての排菌陽性耐性結核患者は感受性結核患者と同室に収容すべきではない。さらに、初回耐性結核の可能性も考えると、感受性不明の排菌陽性結核患者は全員陰圧個室収容が望ましい。CDCの結核院内感染防止ガイドラインではこの点を考慮に入れ、薬剤感受性パターンが同一であると判明し有効な化学療法が行われている場合に限り患者同士を同室にしてよいとしている<sup>6)</sup>。わが国の現状では、これを守るのはインフラの面からもコストの面からもきわめて困難である。しかし、結核患者の減少、在院日数の短縮化により結核病棟の稼働率が下がっていく中で、思い切った対策の転換を考慮する必要があるのではないだろうか。多剤耐性結核は、その医療にかかる金銭的・時間的コストの膨大さ、さらに、院内感染が生じたときの社会的なインパクトの大きさなどを考慮に入れると、その発生防止に最善の対策が講じられるべきである。

#### 文 献

- 1) 伊藤邦彦: HIV陰性者における結核の外来性再感染発病. 結核. 2005; 80: 365-379.
- 2) Niemann S, Richter E, Rüscher-Gerdes S, et al.: Double infection with a resistant and multidrug resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. Emerg Infect Dis. 2000; 6: 548-551.
- 3) Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E, et al.: Nosocomial outbreak of multidrug resistant tuberculosis caused by a strain of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family in St. Petersburg, Russia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002; 21: 596-602.
- 4) Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, et al.: Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. Emerg Infect Dis. 2002; 8: 843-849.
- 5) Qian L, Abe C, Lin TP, et al.: rpoB genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from East Asian countries. J Clin Microbiol. 2002; 40: 1091-1094.
- 6) CDC: Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Health-Care Facilities. MMWR. 1994; 43, RR-13.

- 号：185-194.
- 6) Braden CR, Crawford JT, Schable BA: Quality assessment of *Mycobacterium tuberculosis* genotyping in a large laboratory network. *Emerg Infect Dis.* 2002 ; 8 : 1210-1215.
- 7) 西森 敬, 内田郁夫, 田中 聖, 他: VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル. 動物衛生研究所報告書. 2003 ; 109 : 25-32.
- 8) Frothingham R, Meeker-O'Connell WA: Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology.* 1998 ; 144 (Pt 5) : 1189-1196.
- 9) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al.: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* 2000 ; 36 : 762-771.
- 10) Roring S, Scott A, Brittain D, et al.: Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: Comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology.* 2002 ; 40 : 2126-2133.

————— The 80th Annual Meeting Mini-Symposium —————

EXOGENOUS RE-INFECTION IN TUBERCULOSIS

Chairperson: Toshiaki TSUCHIYA

**Abstract** Patients infected by tuberculosis (TB) had been thought to never experience exogenous re-infection. However, exogenous re-infection in HIV-positive patients is well known. Thanks to the introduction of histopathological examination, analysis of similarities in drug-resistance patterns and epidemiological surveys of genetic phage typing for TB infection, we have begun to understand that even people with a normal immune system can experience re-infection.

Recent advances in the techniques of restriction fragment length polymorphism (RFLP) and spoligotyping allow determination of similarities in tubercle bacilli, revealing a high ratio of exogenous re-infection.

In this mini-symposium, Dr. Kazunari Tsuyuguchi reported cases of nosocomial multidrug-resistant tuberculosis (MDRTB) infection, as exogenous re-infection, at 3 tuberculosis hospitals in the Osaka area. Although the virulence of MDRTB as a variant strain has generally been regarded as weaker than that of drug-sensitive strains, he reported even non-Beijing strain MDRTB, which displays strong virulence, could possess possible infectivity with a 42% ratio of clustering formation and 2 of 8 patients with MDRTB exhibiting exogenous re-infection, as analyzed by RFLP.

Dr. Hideo Ogata reported the actual condition of exogenous re-infection, having cited a large number of reports at home and abroad. In his report he indicated that even among hosts without serious hypimmunity, re-infection rate is high in high-prevalence countries. Conversely, endogenous TB reactivation is high in low-prevalence countries. As Japan has become a low-prevalence country, endogenous reactivation might be seen in TB wards.

Dr. Katsuhiko Kuwabara reported on his study about exogenous re-infection of *Mycobacterium avium*, which represented resident flora in the environment, using IS1245 RFLP analysis. He demonstrated that re-infection and multiple infections were frequently observed in *M. avium* infection.

Dr. Tomoshige Matsumoto finally added that about 90% of patients with recurrence in the Osaka area exhibit endogenous reactivation, as found using molecular epidemiologic analysis of bacterial strains from initially treated and retreated patients. Compared with reports from other countries, the ratio of exogenous re-infection in Japan is lower than elsewhere. Thanks to the public health service about TB, sources of TB infection are not present, so patients with TB do not experience exogenous re-infection, he concluded. He also discussed the variable number of tandem repeats (VNTR)-typing method that has been taking the place of the IS6110 RFLP.

In this mini-symposium referring to molecular epidemiological analyses and reports from Japan and overseas, we showed that depending on factors involving hosts, parasites and the density of TB re-exposure, the possibility of universal exogenous nosocomial re-infection exists. Each presenter alerted us to the fact that as exogenous re-infection occurs mainly in TB inpatient wards, prevention of TB infection is crucial for inpatients and medical staff in Japan as a low-prevalence country.

1. Exogenous re-infection by multidrug-resistant tuberculosis: Kazunari TSUYUGUCHI, Shiomi YOSHIDA, Katsuhiko SUZUKI, Masaji OKADA, Mitsunori SAKATANI (NHO Kinki-chuo Chest Medical Center)

We describe three recurrent cases of multidrug-resistant (MDR) tuberculosis (TB) nosocomially re-infected with MDRTB strain during treatment for drug-sensitive TB. The first and the second patients, both of whom were middle-aged heavy smoker men, were associated with the outbreak caused by non-Beijing MDRTB strain. The third patient was a immunocompetent young man and the isolated strain was Beijing MDRTB strain. All the patients were HIV-seronegative. We conclude that exogenous re-infection by

MDRTB can occur on various situations. These results underscore the importance of placing MDRTB patients separately from drug-sensitive TB patients.

2. Reviews of the exogenous re-infection in tuberculosis: Hideo OGATA (Fukujiji Hospital, JATA)

In Japan, they have thought that a tubercular relapse is based on endogenous reactivation in almost all cases. However, there are many studies which prove exogenous re-infection using tuberculin test or drug susceptibility test. The technique of developed strain typing contributed exogenous re-infection to clarifying greatly in a real proof and its frequency in recent years.

3. Multiple and repeated polyclonal infections in patients with *Mycobacterium avium* lung diseases: Katsuhiko KUWABARA (NHO Nishi-Niigata Chuo National Hospital)

The routes of transmission and environmental reservoirs of *Mycobacterium avium* infections have been unclear. IS1245 based RFLP analysis showed genetic diversity of *Mycobacterium avium* clinical isolates and the relation between clinical subtype and polyclonal infection. Our study demonstrates that polyclonal infections are common in *Mycobacterium avium* lung diseases, especially nodular bronchiectasis type. In addition, not only simultaneous polyclonal infections but also repeated polyclonal infections were observed in some patients. The knowledge of polyclonal infection will lead to

better understanding of *Mycobacterium avium* pathogenesis and epidemiology.

Special commentaries: Consideration of exogenous re-infection of tuberculosis in Osaka, Japan, by using molecular epidemiologic tools: Tomoshige MATSUMOTO (Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases)

By using IS6110 RFLP, we showed that 9.5% of TB recurrence was caused by re-infection in the middle-eastern area of Osaka Prefecture, Japan. The molecular typing tools are now being applicable not only to epidemiological but also to clinical fields by an introduction of PCR-based method, such as Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) typing. We showed some examples about usefulness of the clinical application of molecular epidemiology, using VNTR.

**Key words:** Exogenous re-infection, Endogenous reactivation, Multidrug-resistant tuberculosis, Nosocomial infection, *Mycobacterium avium* infection, Molecular epidemiology.

Department of Respiratory Center, National Hospital Organization (NHO) Nishi-Niigata Chuo National Hospital

Correspondence to: Toshiaki Tsuchiya, NHO Nishi-Niigata Chuo National Hospital, 1-14-1, Masago, Niigata-shi, Niigata 950-2085 Japan. (E-mail: [tsuchiya@masa.go.jp](mailto:tsuchiya@masa.go.jp))

## NOVEL VACCINATION (HVJ-LIPOSOME / HSP65 DNA+ IL-12 DNA AND RECOMBINANT 72F BCG) AGAINST TUBERCULOSIS USING CYNOMOLGUS MONKEY

\*Masaji Okada<sup>1)</sup>, Takao Tanaka<sup>1)</sup>, Shigeto Yoshida<sup>2)</sup>, Yoko Kita<sup>1)</sup>, Noriko Kanamaru<sup>1)</sup>, Satomi Hashimoto<sup>1)</sup>, Yasufumi Kaneda<sup>3)</sup>, Toshihiro Nakajima<sup>4)</sup>, Naoya Ohara<sup>5)</sup>, Hiroko Takai<sup>1)</sup>, Yukari Fukunaga<sup>1)</sup>, Yoshikazu Inoue<sup>1)</sup>, Makoto Matsumoto<sup>6)</sup>, Robert Gelber<sup>7)</sup>, Esterlina V.Tan<sup>7)</sup>, E.C.Dela Cruz<sup>7)</sup>, R.M.Abalos<sup>8)</sup>, L.J.Young<sup>8)</sup>, J.A.Burgos<sup>8)</sup>, David McMurray<sup>8)</sup>, Yasir Skeiky<sup>9)</sup>, Steven Reed<sup>9)</sup>, Mitsunori Sakatani<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, <sup>2)</sup>Jichi Medical School, <sup>3)</sup>Osaka University, <sup>4)</sup>GenomIdea Co., <sup>5)</sup>Nagasaki University, <sup>6)</sup>Otsuka Pharmaceutical Co., <sup>7)</sup>Leonard Wood Memorial Institute, <sup>8)</sup>Texas A&M University, <sup>9)</sup>Corixa Co.

### [Abstract]

Two novel TB vaccines; a DNA vaccine combination expressing mycobacterial heat shock protein 65 (HSP65) and interleukin-12 (IL-12) by using the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome (HSP65+IL-12/HVJ), and a recombinant BCG harboring the 72f fusion gene (72f rBCG) have been developed. These vaccines provide remarkable protective efficacy in mouse and guinea pig models, as compared to the current by available BCG vaccine. HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccination were 100 fold more efficient than parental BCG Tokyo vaccination, on the elimination of M. TB in lungs, liver, and spleen of BALB/c mice. In the present study, our studies were extended to a cynomolgus monkey model, which is currently the best animal model of human tuberculosis, to evaluate the HSP65+IL-12/HVJ and 72f rBCG vaccines. Vaccination with HSP65+IL-12/HVJ as well as 72f rBCG vaccines provided better protective efficacy as assessed by the Erythrocyte Sedimentation Rate, chest X-ray findings, body weight and immune responses (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6 production, and lymphocyte proliferation of cynomolgus monkey), than BCG. Most importantly, HSP65+IL-12/HVJ resulted in an increased survival for over a year. This is the first report of successful DNA vaccination and recombinant BCG vaccination against M. tuberculosis in the monkey model.

### [Introduction]

In order to explore the preclinical use of tuberculosis DNA vaccine combinations of IL-12 DNA with Hsp65 DNA, we choose the viral-based hybrid antigen delivery system hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome because this delivery system results in a high transfection efficacy, repeated gene transfection without reduction of gene transfer efficiency *in vivo*, and no apparent toxicity. These characteristics of HVJ-liposomes support the feasibility of its clinical application not only for cancer gene therapy but also for DNA vaccinations.

Researchers have recognized that a nonhuman primate model of TB will be able to provide critical information for vaccine development.

In the present study, we evaluated the protective efficacy of HSP65+IL-12/HVJ and r72f BCG

in the cynomolgus monkey model, which is an excellent model of human tuberculosis [1]. These vaccines provided a strong prophylactic effect in monkeys challenged with *M. tuberculosis* as we have seen previously in mice.

### **[Materials and Methods]**

DNA vaccines encoding *M. tuberculosis* HSP65, mouse IL-12 and guinea pig IL-12 were encapsulated with HVJ- liposomes [2]. Groups of animals (mice and guinea pigs) were vaccinated intramuscularly with HVJ-liposome DNA vaccines. Female BALB/c mice and C57BL/6 mice aged 6~8 weeks were infected by intravenous injection with *M.tuberculosis* H37Rv. DNA vaccination using adenovirus vector was initiated 3-7 days before the i.v. injection of M.Tb. DNA vaccination using gene gun ( HSP65 DNA + IL-12 DNA ) was initiated 14 days before the i.v. injection of M.Tb. IL-12 gene or heat shock protein ( HSP65 ) gene derived from *M. tuberculosis* was constructed as DNA vaccine into plasmid using CMV promoter. HSP65 gene was also constructed with HVJ-liposome by Professor Kaneda of Osaka University, CTL activity was assessed by <sup>51</sup>Cr-release and IFN-activity [3, 4]. A total of 16 cynomolgus monkeys were housed in a BL 3 animal facility of the Leonard Wood Memorial. Groups of animals were vaccinated three times with either the HVJ-liposome combination with HSP65 DNA plus human IL-12 DNA (HSP65 + hIL-12/HVJ: 400 µg i.m.), r72f BCG (1×10<sup>6</sup> CFU i.d.), BCG Tokyo (1×10<sup>6</sup> CFU i.d.) or saline. One month after the third vaccination, monkeys were challenged with the *M. tuberculosis* Erdman strain (5×10<sup>2</sup>) by intratracheally instillation, Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR), body weight, chest X-ray, immune responses, DTH reaction against PPD and survival periods were examined during 14 months [1].

### **[Results]**

Mice vaccinated with HSP65 + mL-12/HVJ had significantly reduced numbers of CFU [5] in the lungs, liver and spleen as compared with mice vaccinated with BCG (Yoshida et al., submitted for publication). CTL activity correlated with the protective efficacy of vaccination (Fig 1). The fusion protein Mtb72f (Mtb39 + Mtb32) vaccine was developed by Skeiky et al. [6]. To improve its vaccine efficacy, a recombinant BCG harboring the 72f fusion gene (r72f BCG) was generated [7]. The ELISPOT assay showed that r72f BCG induced a greater number of IFN-γ producing T-cells than BCG in the mouse model. In the guinea pig model, r72f BCG as well as HSP65 + gpIL-12/HVJ provided better protection against the pulmonary pathology caused by pulmonary challenge with TB than BCG vaccination (data not shown).

The purpose of this study was to evaluate two TB vaccines we have developed in a nonhuman primate model of *M. tuberculosis* infection. To this end, a total of 16 monkeys were vaccinated either with HSP65 + hIL-12/HVJ, r72f BCG, BCG or saline, followed by TB challenge by intratracheally instillation. Table 1 shows survival periods of vaccinated monkeys after TB challenge. All four monkeys in the control (saline) group died of TB infection within 8 months. In contrast, three and two monkeys from the r72f BCG and HSP65 + hIL-12/HVJ groups, respectively, were alive more than 14 months post-infection (the termination period of the experiment). Survival periods of the remaining



monkeys in the both groups were much longer than those of saline control group. In addition, both HSP65 + hIL-12/HVJ and r72f BCG significantly improved ESR and chest X-ray findings. Body weights of the HSP65 + hIL-12/HVJ group also increased significantly, as compared to saline control group. IL-2 and IFN- $\gamma$  production were augmented in the two groups vaccinated with HSP65 + hIL-12/HVJ and r72f BCG (data not shown). Furthermore, proliferation of PBL was strongly enhanced in the group vaccinated with HSP65 + hIL-12/HVJ in response to HSP65 protein 4 weeks after TB challenge. Taken together, these results clearly demonstrate that both HSP65 + hIL-12/HVJ and r72f BCG could provide protective efficacy against *M. tuberculosis* in the cynomolgus monkey model.

Furthermore, the new experimental models using SCID-PBL/hu mice and PBL from the patients with tuberculosis capable of analyzing the in vivo human CTL against tuberculosis were used for the assay of in vivo human T cell immunity induced by these vaccinations. In Cancer Research of 1997, we reported that the experimental models using SCID-PBL/hu mice and the IL-6 gene delivered in vivo by an adenovirus vector provide a new strategy capable of analyzing an anti-tumor effect and the in vivo induction of human CTL by cytokine gene therapy without using human body[8]. Therefore, we tried to apply these methods to the development of new vaccine (HSP65DNA+IL-12DNA vaccine) against tuberculosis. In preliminary experiment, HSP65DNA+IL-12DNA vaccine reduced number of CFU in the lung, liver and spleen in SCID-PBL/hu mice infected with H37Rv.

Taken together, these results indicate that the experimental models using cynomolgus monkeys as well as SCID-PBL/hu mice and HSP65+IL-12DNA vaccine might provide new strategies capable of developing new vaccines against tuberculosis.

#### **[Discussion]**

HSP65 + hIL-12/HVJ vaccine as well as r72f BCG vaccine exerted the significant prophylactic effect against TB, as indicated by: (1) prolongation of survival for over a year, (2) improvement of ESR and chest X-ray findings, (3) increase in the body weight and (4) augmentation of immune responses, in a cynomolgus monkey model which closely mimics human TB disease. It is very important to evaluate the long survival period in a monkey model, as human TB is a chronic infection disease. Furthermore, the decrease in the body weight of TB patients with TB is usually accompanied by progress of TB disease. Suppression of IFN- $\gamma$  production, CTL activity and T-cell proliferation has also been observed in patients with TB [9].

Our results with the HSP65 + hIL-12/HVJ vaccine in the cynomolgus monkey model should provide a significant rationale for moving this vaccine into clinical trials. In fact, the 72f fusion protein vaccine entered Phase I testing after its evaluation in cynomolgus monkeys in Leonard Wood Memorial [4] by Reed and Skeiky. Thus, we are taking advantage of the availability of multiple animal models (mouse, guinea pig, and monkey) to accumulate essential data on the HVJ- liposome DNA vaccine in anticipation of a Phase I clinical trial.

#### **[Acknowledgements]**

This study was supported by a Health and Labour Science Research Grant from MHLW

H17-shinko-2, H14-shinko- 1, H17-shinko- 5) and international collaborative study grants from Human Science foundation.

#### [References]

- [1] Walsh GP, Tan EV, dela Cruz EC, et al. The Philippine cynomolgus monkey provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med* 1996;2(4):430–6.
- [2] Saeki Y, Matsumoto N, Nakano Y, et al. Development and characterization of cationic liposomes conjugated with HVJ (Sendai virus): reciprocal effect of cationic lipid for in vitro and in vivo gene transfer. *Hum Gene Ther* 1997;8(17 (November)):2133–41.
- [3] Okada M, Yoshimura N, Kaieda T, et al. Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78(12):7717–21.
- [4] Okada M, Tanaka T, Inoue Y, et al. New (DNA-rBCG-and Subunit-) vaccination against tuberculosis. In: *Thirty-Sixth (US–JAPAN) Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 2001*. p. 127–32.
- [5] Miki K, Nagata T, Tanaka T, et al. Induction of protective cellular immunity against *M. tuberculosis* by attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and MPB/MPT51. *Infect Immun* 2004;72(4):2014–21.
- [6] Skeiky YA, Alderson MR, Owendale PJ, et al. Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J Immunol* 2004;172(12 (June)):7618– 28.
- [7] Ohara N, Yamada T. Recombinant BCG vaccines. *Vaccine* 2001;19(30):4089–98.
- [8] Tanaka F, Abe M, Akiyoshi T, Nomura T, Sugimachi K, Kishimoto T, Suzuki T, and Okada M: The anti-human tumor effect and generation of human cytotoxic T cells in SCID mice given human peripheral blood lymphocytes by the in vivo transfer of the Interleukin-6 gene using adenovirus vector. *Cancer Research* 1997; 57: 1335-1343.
- [9] Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;19:93–129.

Fig.1

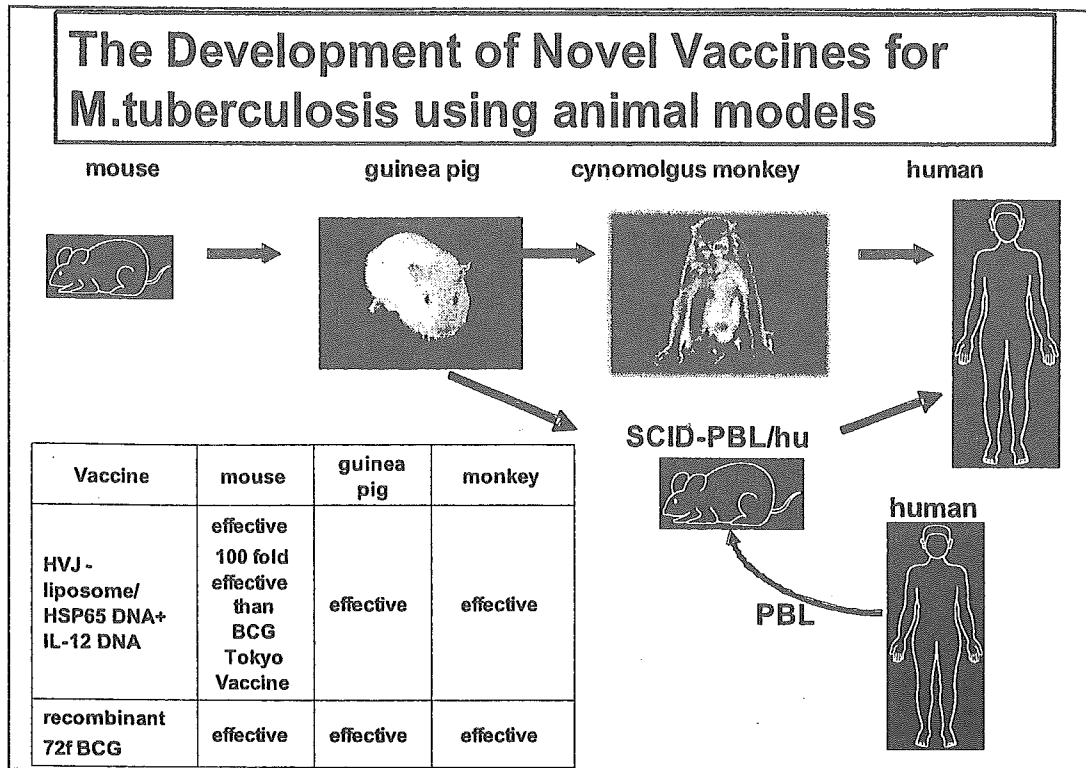


Table 1

Survival of cynomolgus monkeys immunized with HVJ-liposome/HSP65DNA+ IL-12 DNA vaccine and recombinant 72f BCG vaccine

Vaccination	Total monkeys	Survival	% Survival
HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNA	4	2	50
Recombinant 72f BCG	4	3	75
BCG Tokyo	4	2	50
Saline	4	0	0

Cynomolgus monkey (4 monkeys/group) were immunized three times (every 3 weeks) with (1) HVJ-liposome/ HSP65 DNA+ IL-12 DNA vaccine, (2) r72f BCG vaccine, (3) BCG Tokyo and (4) saline as control group as described in Section 2. One month after last immunization, M.TB (Erdman strain  $5 \times 10^7$ ) was challenged by intratracheally instillation. Survival was studied more than 14 months.

## ● 自然・獲得免疫と疾患

## 結 核

\* 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター 結核研究部長

岡 田 全 司\*

## || 要 旨 ||

結核症は毎年 800 万人発症、200 万人が死亡の世界最大の感染症である。結核に対する宿主抵抗性は獲得免疫の T 細胞免疫、特にキラー T、Th1 細胞、我々が示した結核菌殺傷タンパク質 granulysin が重要である。一方、TLRなどを介する結核自然免疫も明らかとなりつつある。我々は世界に先駆けて BCG より 100 倍強力な Hsp65 + IL-12 DNA ワクチンを開発した。T 細胞免疫を介する結核予防ワクチン効果を示した。

## はじめに

結核は、いまだに世界の 1/3 の 20 億人が結核菌に感染しており、その中から毎年 800 万人の結核患者が発症し、200 万人が毎年結核で死亡している最大の感染症の 1 つである（図 1 WHO レポート 2002 年）<sup>1-4)</sup>。本邦でも 1998 年から結核罹患率の増加・横ばいが認められ、1999 年“結核緊急事態宣言”が厚生省より出された。結核症に対する宿主の抵抗性イコール細胞性免疫とって過言ではない。特に獲得免疫（キラー T 細胞と Th1 ヘルパー T 細胞）が重要であり、最近では自然免疫の結核への関与が再び重要視されている。1998 年、米国 CDC は結核に対し、政府・学術機関・企業が一体となって新世代の

キーワード：キラー T 細胞, granulysin, 結核ワクチン, 結核症,  
Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチン