

坂谷光則	Molecular epidemiological analysis of <i>Mycobacterium kansasii</i> isolates.	Kekkaku.	82(2)	103-110	2007
坂谷光則	Novel Vaccination (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) Against Tuberculosis Using Cynomolgus Monkey.	" 13 th International Congress of Immunology " Edit Jorge Kalil, Edecio Cunha-Neto, Luiz Viente Rizzo, MEDIMOUUD Intern		119-122	2007
鈴木克洋	Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strains predominated by the Beijing family.	FEMS Microbiol Lett.	270(1)	67-74	2007
鈴木克洋	バクテックMGIT960結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ(MGIT AST)および小川標準法によるイソニアジド低濃度薬剤感受性検査の判定不一致に関する検討.	結核	82(5)	449-454	2007
鈴木克洋	結核菌の分子疫学的解析－多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌の比較－	結核	82	531-550	2007
鈴木克洋	わが国における結核の現状とクオンチフェロン検査.	Schneller	62	20-25	2007
鈴木克洋	結核患者院内発生時の対応－ QuantiFERONの可能性も含めて.	感染症	37(3)	105-108	2007
鈴木克洋	肺結核の典型像、非典型像	日本医事新報	4358	53-56	2007
鈴木克洋	肺非結核性抗酸菌症の画像所見	日本医事新報	4362	53-58	2007
鈴木克洋	非結核性抗酸菌症	小児科診療	71(1)	83-88	2007
中島俊洋	M.Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB.	Vaccine	25(16)	2990-2993	2007
小出幸夫	Identification of HLA-A*0201-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , using combination of MPT51 overlapping peptide library and computer algorithms.	Infect Immun			in press
小出幸夫	Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> induces specific CD8+ T-cell responses in the lung.	Vaccine			in press

小出幸夫	Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal phagocytic cells.	Cancer Letters			in press
小出幸夫	In vivo hierarchy of individual T-cell epitope-specific helper T-cell subset against an intracellular bacterium.	Vaccine			in press
小出幸夫	Chemokine receptor-mediated delivery of mycobacterial MPT51 protein efficiently induces antigen-specific T-cell responses.	Vaccine			in press
小出幸夫	Intracytosolic Listeria monocytogenes induces cell death through caspase-1 activation in murine macrophages.	Cell Microbiol			in press
小出幸夫	Anti-infective vaccine strategies In: Liu Ded.	Handbook of Listeria monocytogenes.			in press
小出幸夫	Immunization with dendritic cells loaded with α -galactosylceramide at priming phase, but not at boosting phase, enhances cytotoxic T-lymphocyte activity against infection of intracellular bacteria.	FEMS Immunol Med Microbiol	51	350-362	2007
小出幸夫	Treatment with anti-TNF- α antibody infliximab reduces serum IL-15 levels in patients with rheumatoid arthritis.	Clin Rheumatol	26(4)	505-509	2007
小出幸夫	Curcumin for maintenance therapy in ulcerative colitis (Letter).	Clin Gastroenterol Hepatol	5	642	2007
小出幸夫	私達の研究(56)「細胞内寄生細菌感染症をめぐってーワクチン研究およびイメージング解析による感染機構の解明ー」	化学療法の領域	23(11)	101-112	2007
吉田栄人	Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development.	PLoS Pathogens			2007 in press
吉田栄人	Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline anti-platelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito.	Blood	111	2007-2014	2007
吉田栄人	Novel approach toward infectious diseases--combating malaria by using genetically engineered mosquitoes.	Nippon Rinsho	5	1715-1726	2007

吉田栄人	Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models.	Vaccine	25	3038-3040	2007
吉田栄人	マラリア防圧——遺伝子操作蚊からのアプローチ——(総説)	治療			2007 in press.
吉田栄人	マラリアコントロールへの新たな挑戦——遺伝子操作によるマラリア非媒介蚊作製——(総説).	Medical Bio	4	70-77	2007
大原直也	TNF-alpha, lipopolysaccharide, and peptidoglycan induce cell fusion independently of RANKL at the latest step of differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells,	J Cell Biochem	101	122-134	2007
大原直也	Evidence for association between a Toll-like receptor 4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population,	J Periodont Res	42	541-545	2007
大原直也	Efficacy of Recombinant BCG Vaccine Secreting IL-15/Ag85B fusion protein on Protection against Mycobacterium tuberculosis,	J Infect Dis			2007 in press
大原直也	結核, 保健の科学		49	691-697	2007
倉島篤行	Pulmonary Mycobacterium avium complex infection associated with the IVS8-T5 allele of the CFTR gene.	Int J Tuberc Lung Dis	11(7)	808-813	2007
倉島篤行	Pulmonary Mycobacterium avium complex infection: association with NRAMP1 polymorphisms.	Eur Respir J	30(1)	90-96	2007
倉島篤行	Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory samples by transcription-reverse transcription concerted reaction with an automated system.	J Clin Microbiol	43(11)	5435-5439	2007
倉島篤行	非侵襲性肺アスペルギルス症治療の新たな展開.	結核	82	143-147	2007
倉島篤行	非結核性抗酸菌症の治療	診断と治療	95(11)	2008-2014	2007
倉島篤行	気管支結核の現状 103例の解析	結核	82(8)	647-654	2007
倉島篤行	HIV感染症における結核感染診断に対してのQuantiFERON-TB第2世代の有用性についての検討.	結核	82(8)	635-640	2007
倉島篤行	高齢者の抗酸菌感染症	日本臨床	65 増刊3	490-494	2007
倉島篤行	リファンピシンを含む結核治療におけるシクロスポリン投与量の検討	結核	82(7)	563-567	2007

倉島篤行	非結核性抗酸菌症の治療	日本胸部臨床	66(7)	549-557	2007
倉島篤行	肺癌と活動性肺抗酸菌症の合併 特徴と推移	日本呼吸器学会雑誌	45(5)	382-393	2007
倉島篤行	抗結核薬副作用への対応.	呼吸器科	11(4)	383-389	2007
倉島篤行	非結核性抗酸菌症治療の展望.	結核	82(3)	195-199	2007
倉島篤行	非結核性抗酸菌症の診断と治療.	日本医事新報	4321	105	2007
矢野郁也	Identification of trehalose dimycolate (cord factor) in <i>Mycobacterium leprae</i> .	FEBS Lett,	581	3345-3350	2007
矢野郁也	Characterizaion of the fucosylation pathway in the biosynthesis of glycopeptidolipids from <i>Mycobacterium avium</i> complex.	J Bacteriol,	188	5515-5522	2007
矢野郁也	Evaluation of membrane protein II as a tool for serodiagnosis of leprosy.	FEMS Microbiol Lett,	272	202-205	2007
矢野郁也	New packaging method of mycobacterial cell wall using octaarginine-modified liposomes; Enhanced uptake by and immunostimulatory activity of dendritic cells.	J. Controlled Res.	120	60-69	2007
矢野郁也	Molecular and supramolecular structure related differences in toxicity and granulomatogenic activity of mycobacterial cord factor in mice.	Mycrob. Pathog.	43(1)	10-21	2007
矢野郁也	Serological test and chest computed tomography findings in patients with MAC lung disease.	Eur. Respir. J.	29	1217-1223	2007
矢野郁也	Structural characterization of a specific glycopeptidolipid containing a novel N-acyl-deoxy sugar from <i>Mycobacterium Intracellulare</i> serotype 7 and genetic analysis of its glycosylation pathway.	J. Bacteriol	189(3)	1099-1108	2007

Evaluation of a novel vaccine (HVJ–liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB

Masaji Okada^{a,*}, Yoko Kita^a, Toshihiro Nakajima^b, Noriko Kanamaru^a, Satomi Hashimoto^a, Tetsuji Nagasawa^b, Yasufumi Kaneda^c, Shigeto Yoshida^d, Yasuko Nishida^a, Reiko Fukamizu^a, Yoshie Tsunai^a, Ruriko Inoue^a, Hitoshi Nakatani^a, Yumi Namie^a, Junko Yamada^a, Kyoko Takao^a, Ritsuko Asai^a, Ryoko Asaki^a, Makoto Matsumoto^e, David N. McMurray^f, E.C. Dela Cruz^g, E.V. Tan^g, R.M. Abalos^g, J.A. Burgos^g, Robert Gelber^g, Mitsunori Sakatani^a

^a Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone, Kitaku, Sakai, Osaka 591-8555, Japan

^b Ikeda Laboratory Genomidea Inc., 1-8-31, Midorigaoka, Ikeda, Osaka 530-0043, Japan

^c Division of Gene Therapy Science Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^d Department of Medical Zoology, Jichi-Med.Sch, 3311-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi, Tochigi 329-0498, Japan

^e Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd., 463-10 Kagasuno, Kawauchi-cho, Tokushima 771-019, Japan

^f Texas A & M University, System Health Science Center, College of Medicine, College Station, TX 77843-1114, USA

^g Leonard Wood Memorial, Jagobiao, Mandaue City, Cebu 6000, Philippines

Available online 22 January 2007

Abstract

We have developed a novel tuberculosis (TB) vaccine; a combination of the DNA vaccines expressing mycobacterial heat shock protein 65 (HSP65) and interleukin 12 (IL-12) delivered by the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome (HSP65 + IL-12/HVJ). This vaccine provided remarkable protective efficacy in mouse and guinea pig models compared to the BCG vaccine, on the basis of an induction of the CTL activity and improvement of the histopathological tuberculosis lesions, respectively. Furthermore, we extended our studies to a cynomolgus monkey model, which is currently the best animal model of human tuberculosis. This novel vaccine provided a higher level of the protective efficacy than BCG based upon the assessment of mortality, the ESR, body weight, chest X-ray findings and immune responses. Furthermore, the combination of HSP65 + IL-12/HVJ and BCG by the priming-booster method showed a synergistic effect in the TB-infected cynomolgus monkey (100% survival). These data indicate that our novel DNA vaccine might be useful against *Mycobacterium tuberculosis* for human clinical trials.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine; Tuberculosis; Monkey

1. Introduction

Tuberculosis is a major global threat to human health, with about 2 million people dying every year from *Mycobacterium tuberculosis* (TB) infections. The only tuberculosis vaccine currently available is an attenuated strain of *Mycobacterium*

bovis BCG (BCG), although its efficacy against adult TB disease remains controversial. Therefore, we have recently developed a novel TB vaccine, a DNA vaccine expressing mycobacterial heat shock protein 65 (Hsp65) and interleukin-12 (IL-12) delivered by the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome (HSP65 + IL-12/HVJ). The vaccine was 100 fold more efficient than BCG in the mouse model on the basis of the elimination of *M. tuberculosis* mediated by the induction of CTL [1]. A nonhuman primate model of TB

* Corresponding author. Tel.: +81 72 252 302; fax: +81 72 21 2153.

E-mail address: okm@kch.hosp.go.jp (M. Okada).

will provide critical information for vaccine development. In fact, in the previous study we evaluated the protective efficacy of HSP65 + IL-12/HVJ in the cynomolgus monkey model, which is an excellent model of human tuberculosis [2,3]. In the present study, we evaluated the synergistic effect of the HSP65 + IL-12/HVJ and BCG using a priming-booster method in the TB-infected cynomolgus monkey. The combination of the two vaccines showed a very strong prophylactic effect in monkeys challenged with *M. tuberculosis* (100% survival), as we have seen previously in the mouse model of TB.

2. Materials and methods

DNA vaccines encoding *M. tuberculosis* HSP65 and human IL-12 were encapsulated into HVJ-liposomes [4]. CTL activity was assessed by 51Cr-release [3,5]. A total of 44 cynomolgus monkeys were housed in a BL 3 animal facility of the Leonard Wood Memorial Research Center. 12 monkeys population in first experiment and 32 monkeys population in second experiment are different. The animals were vaccinated three times with either the HVJ-liposome with expression plasmids of HSP65 and human IL-12(HSP65 + hIL-12/HVJ: 400 µg i.m.); BCG Tokyo (1 × 10⁶ CFU i.d), or saline (Fig. 1A). One month after the third vaccination, the mon-

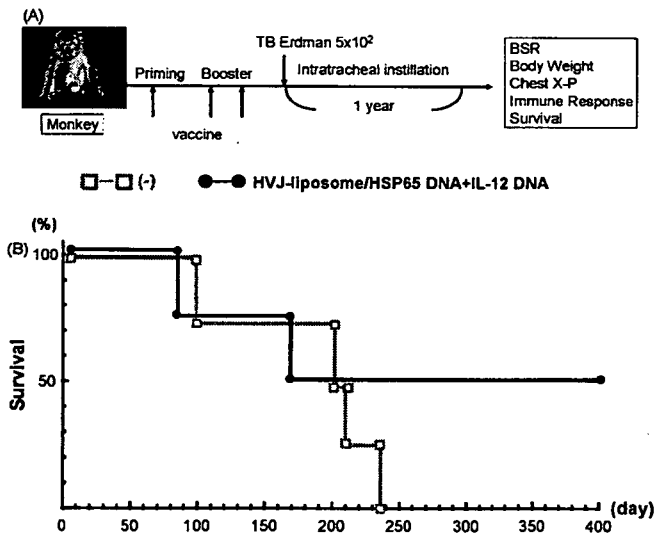


Fig. 1. (A) Evaluation of vaccine efficacy using cynomolgus monkey. Groups of animals were vaccinated three times with either the HVJ-liposome combination with HSP65 DNA plus human IL-12 DNA (HSP65 + hIL-12/HVJ: 400 µg i.m.), BCG Tokyo (1 × 10⁶ CFU i.d), or saline (A). One month after the third vaccination, monkeys were challenged with the *M. tuberculosis* Erdman strain (5 × 10²) by intratracheally instillation, erythrocyte sedimentation rate (ESR), body weight, chest X-ray, immune responses, DTH reaction against PPD, and survival periods were examined during 12–16 months. (B) Survival of cynomolgus monkeys immunized with HVJ-liposome/HSP65 + IL-12DNA vaccine. Cynomolgus monkey (4 monkeys/group) were immunized three times (every 3 weeks) with (1) HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine (●-●), (2) saline(□-□) as control group as described in Section 2. One month after last immunization, *M. tuberculosis* (Erdman strain 5 × 10²) was challenged by intratracheally instillation. Survival was studied more than 14 months.

keys were challenged with the *M. tuberculosis* Erdman strain (5 × 10²) by intratracheal instillation. Erythrocyte sedimentation rate (ESR), body weight, chest X-rays, immune responses, DTH reaction against PPD, and survival periods were examined for 12–16 months [2,3].

3. Results

The purpose of this study was to evaluate a TB vaccine we have developed in a nonhuman primate TB model infected with *M. tuberculosis*. To this end, a total of 12 monkeys were in the first experiment vaccinated either with HSP65 + hIL-12/HVJ, BCG, or saline, followed by the TB challenge by intratracheal instillation. Fig. 1B shows the survival rate of the vaccinated monkeys after infection. All monkeys in the control group (saline, n=4) died within 8 months, while 2 monkeys in the HSP65 + hIL-12/HVJ group (n=4) as well as BCG group (n=4) survived more than 14 months post-infection (the termination period of the experiment). Furthermore, in the second experiment using 32 monkeys the protective efficacy of the HSP65 + IL-12/HVJ and BCG using the priming-booster method in the TB infected cynomolgus monkeys was very strong. All four monkeys from the group of BCG-priming and the DNA vaccine (HVJ-liposome/HSP65 + IL-12 DNA vaccine) booster were alive more than 12 months post-infection (Fig. 2). In contrast, only 2 monkeys out of 6 from the BCG Tokyo group

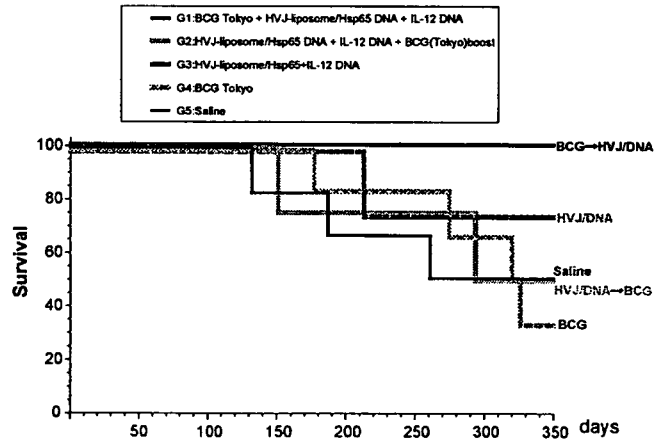
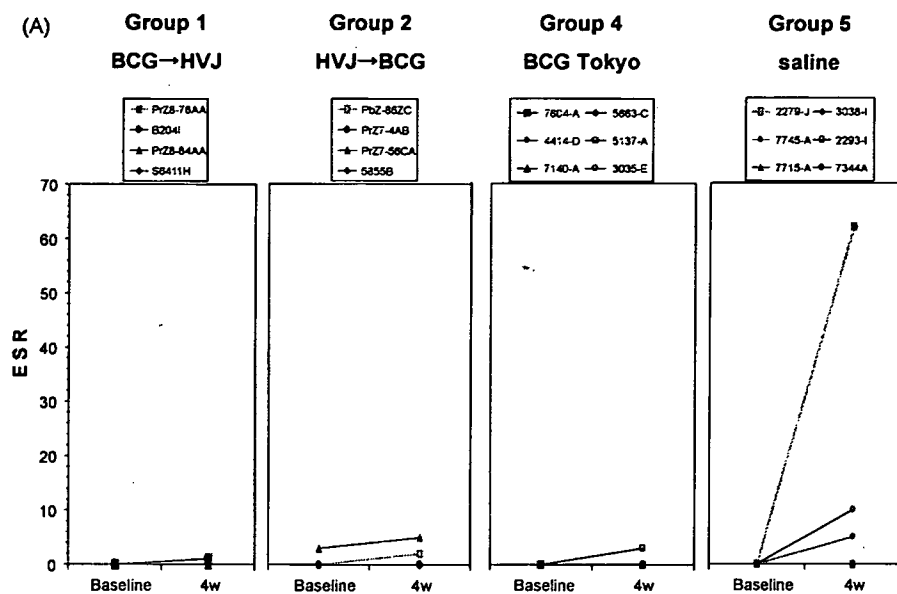


Fig. 2. Protective efficacy of HSP65 + IL-12/HVJ and BCG using priming-booster method against TB challenged cynomolgus monkeys. Group of animals were vaccinated three times (every 3 weeks) with (1st) BCG Tokyo, (2nd) Hsp65 + IL-12/HVJ, (3rd) Hsp65 + IL-12/HVJ = G1 (—) BCG prime-HVJ/DNA booster group; (1st) Hsp65 + IL-12/HVJ, (2nd) Hsp65 + IL-12/HVJ, (3rd) BCG = G2 (---) HVJ/DNA prime-BCG booster group; (1st) Hsp65 + IL-12/HVJ, (2nd) Hsp65 + IL-12/HVJ, (3rd) Hsp65 + IL-12/HVJ = G3 (—); (1) BCG, (2nd) saline, (3rd) saline = G4 (---) G4 group animals were vaccinated with BCG once; (1st) saline, (2nd) saline, (3rd) saline = G5. (—) One month after the third vaccination, monkey were challenged with the *M. tuberculosis*. Kaplan-Meier's method (Logrank test) was used to compare the survival of each groups. (G1–G4, p 0.05; G1–G2, p 0.13; G1–G3, p 0.32; G1–G5, p 0.12; G2–G4, p 0.82; G3–G4, p 0.30; G3–G5, p 0.44; G4–G5, p 0.88).



The Development of Novel Vaccines for M.tuberculosis using animal models

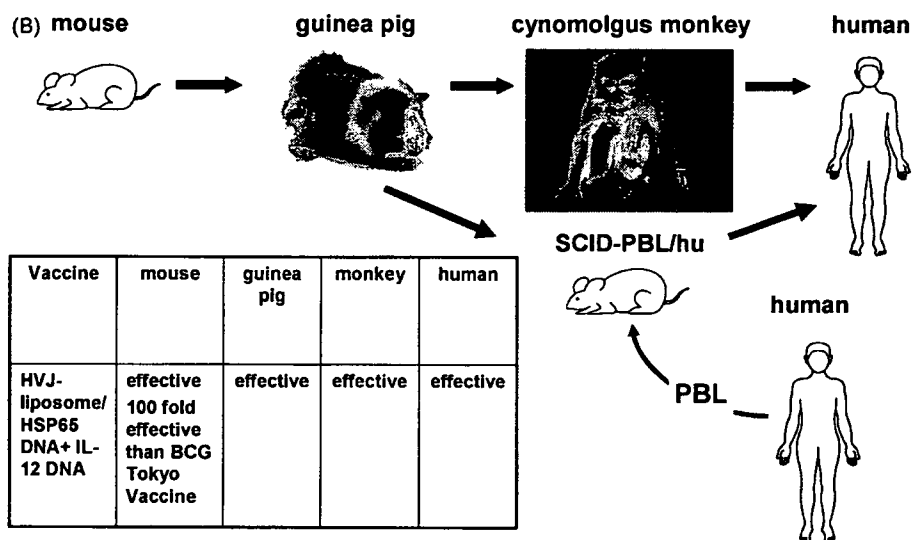


Fig. 3. (A) Improvement of erythrocyte sedimentation rate (ESR) in the cynomolgus monkeys immunized with HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine. Cynomolgus monkeys were immunized and challenged as described in Fig. 2. Elevation of ESR of all monkeys was evaluated every month and maximum values of BSR in each monkeys were shown. (B) The development of novel vaccines for *M. tuberculosis* using animal models.

were alive (33% survival). 50% of the monkeys from the saline control group and DNA vaccine-priming and the BCG Tokyo vaccine booster group, respectively, were alive more than 12 months in the study. In addition, both HSP65 + hIL-12/HVJ improved ESR and chest X-ray findings (Fig. 3A). IL-2 and IFN- γ production were augmented in the group vaccinated with HSP65 + hIL-12/HVJ (data not shown). Furthermore, proliferation of PBL was strongly enhanced. Taken together, these results clearly demonstrate that BCG prim-

ing and the HSP65 + hIL-12/HVJ booster could provide extremely strong protective efficacy against *M. tuberculosis* in the cynomolgus monkey model.

4. Discussion

The HSP65 + hIL-12/HVJ vaccine exerted a significant prophylactic effect against TB, as indicated by: (1) extension

of survival for over a year; (2) improvement of ESR and chest X-ray findings; (3) increase in the body weight; (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 is usually accompanied by a progression of the disease [6].

In the guinea pig model, HSP65 + gpIL-12/HVJ provided better protection against the pulmonary pathology caused by pulmonary infection with TB than BCG vaccination (data not shown) (Fig. 3B). In the present study, it was demonstrated that BCG vaccine priming and HSP65 + hIL-12/HVJ booster could provide extremely strong (100% survival) efficacy against *M. tuberculosis* compared to BCG alone (33% survival) in the cynomolgus monkey model. In Japan and other countries, the BCG vaccine is inoculated into human infants (0–6 months after birth). Therefore, BCG priming in infants and HSP65 + hIL-12/HVJ boosters for adults (including junior high school students, high school students and old persons) may be required for the significant improvement of clinical protective efficacy against TB. 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. 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 (H11-shinko-2, H14-shinko-1, H17-shinko-5), International Collaborative Study Grants from Human Science foundation and Grant-in-Aid for Scientific Research(B) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

References

- [1] Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Kanamaru N, Muraki Y, et al. DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* by T cell activation. *Vaccine* 2006;24:1191–204.
- [2] Walsh GP, Tan EV, Dela Cruz EC, Abalos RM, Villahermosa LG, Young LJ, 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.
- [3] Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, Ohara N, Kaneda Y, Kuwayama S, et al. Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine* 2005;23:2132–5.
- [4] Saeki Y, Matsumoto N, Nakano Y, Mori M, Awai K, Kaneda Y. Development and characterization of cationic liposomes conjugated with HVJ (Sendai virus). *Hum Gene Ther* 1997 Nov 20;8(17):2133–41.
- [5] Okada M, Yoshimura N, Kaieda T, Yamamura Y, Kishimoto T. Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78(12):7717–21.
- [6] Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;19:93–129.

Novel Vaccination (HVJ-liposome/ HSP65 DNA+ IL-12 DNA) Against Tuberculosis Using Cynomolgus Monkey

**M. Okada¹, Y. Kita^{a 1}, T. Nakajima², N. Kanamaru¹,
S. Hashimoto¹, T. Nagasawa², Y. Kaneda³, Y. Nishida¹,
H. Nakatani¹, K. Takao¹, R. Asai¹, R. Suhara¹, E.C. Dela Cruz⁴,
E.V. Tan⁴, R.M. Abalos⁴, R. Gelber⁴, P. Sauderson⁴,
S. Yoshida⁵, M. Matsumoto⁶, D. McMurray⁷ and M. Sakatani¹**

¹*Clinical Research Center, National Kinki-Chuo
Hospital for Chest Disease., Sakai, Osaka, Japan,*

²*Ikeda Laboratory GenomIdea Inc., Ikeda, Osaka, Japan,*

³*Division of Gene Therapy Science Graduate School of
Osaka University, Suita, Osaka, Japan,*

⁴*Leonard Wood Memorial, Jagobiao, Mandaue City, Cebu, Philippine,*

⁵*Department of Medical Zoology, Jichi-Medical School, Tochigi, Japan,*

⁶*Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd., Tokushima, Japan,*

⁷*Texas A&M University, Texas, USA*

Summary

The DNA vaccine expressing mycobacterial heat shock protein 65 (HSP65) and IL-12 delivered by the HVJ-liposome (HSP65+IL-12/HVJ), provided remarkable protective efficacy by the in vivo CD8 and CD4 T cells, in mouse models. We extended our studies to a cynomolgus monkey model, which is currently the best animal model of human tuberculosis. This novel vaccine provided a higher level of the protective efficacy than BCG based upon the assessment of mortality. The combination of HSP65 + IL-12/HVJ and BCG showed a synergistic effect in the monkey (100% survival). Furthermore, this DNA vaccine could provide therapeutic efficacy against *M. tuberculosis* both in monkey and mouse models. These data indicate that this vaccine might be useful against *M.tuberculosis* for human clinical trials.

Introduction

Tuberculosis is a major global threat to human health, with about 2 million people dying every year from *M.tuberculosis* (TB) infections. The only tuberculosis vaccine currently available is an attenuated strain of *M.bovis* BCG (BCG), although its efficacy against adult TB disease remains controversial. Therefore, we have recently developed a novel TB vaccine, a DNA vaccine expressing mycobacterial heat shock protein 65 (Hsp65) and interleukin-12 (IL-12) delivered by the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome (HSP65+IL-12/HVJ).

The vaccine was 100 fold more efficient than BCG in the mouse model on the basis of the elimination of *M. tuberculosis* mediated by the induction of CTL (1). In the present paper, HVJ-liposome / HSP65 DNA+ IL-12 DNA showed the prophylactic effect and therapeutic effect in the cynomolgus monkey (2) as well as mice challenged with *M.TB*.

Materials and Methods

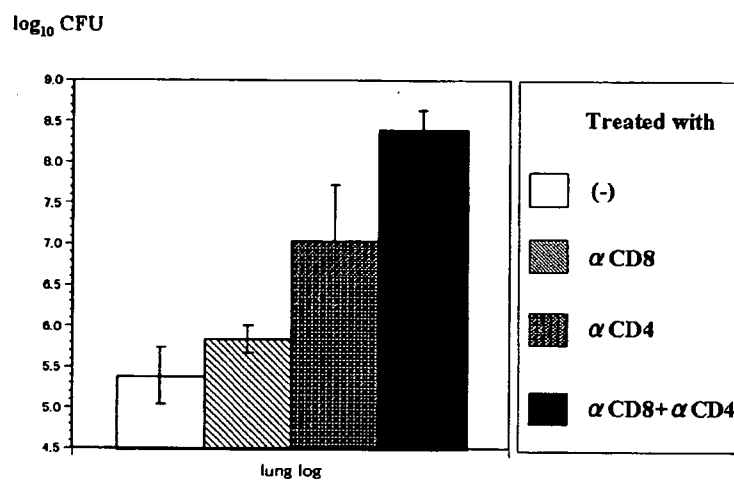
IL-12 gene or heat shock protein (HSP65) gene derived from *M.TB* was constructed as DNA vaccine into plasmid using CMV promoter. DNA vaccination into female BALB/c (8 weeks, CEA Japan Inc., Japan) was performed using HVJ-liposome.DNA vaccines encoding *M. tuberculosis* HSP65 and human IL-12 were encapsulated into HVJ-liposomes (1). Monkeys were housed in a BL 3 animal facility of the Leonard Wood Memorial Research Center. The animals were vaccinated three times with either the HVJ-liposome with expression plasmids of HSP65 and human IL-12(HSP65+hIL-12/HVJ: 400 µg i.m.), BCG Tokyo (1×10^6 CFU i.d), or saline. One month after the third vaccination, the monkeys were challenged with the *M. tuberculosis* Erdman strain (5×10^2) by intratracheal instillation. Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR), body weight, chest X-rays, immune responses, DTH reaction against PPD, and survival periods were examined for 12 ~ 16 months (2,3).

Results

Mice vaccinated with HVJ-liposome/HSP65DNA+IL-12DNA had significantly reduced number of CFU in the all three organs (lungs, liver, spleen) as compared with mice immunized with *Mycobacterium bovis* BCG vaccine. In vivo treatment of these mice with anti-CD8 antibody and/or anti-CD4 antibody during the whole vaccinated period, the increase in the number of TB was observed. Thus, both CD8 positive T cells(4) and CD4 positive T cell were required for the in vivo protective immunity against TB.(Fig1)

Furthermore, in the experiment using 32 monkeys the protective efficacy of the HSP65+IL-12 /HVJ and BCG using the priming-booster method in the TB infected cynomolgus monkeys was very strong. All four monkeys from the group of BCG-priming and the DNA vaccine (HVJ-liposome/HSP65+IL-12 DNA vaccine) booster were alive more than 12 months post-infection. In contrast, only 2 monkeys out of 6 from the BCG Tokyo group were alive (33% survival). 50% of the monkeys from the saline control group and DNA

Fig 1



Effect of *in vivo* treatment of anti-CD8 antibody and/or anti-CD4 antibody on the prophylactic efficacy of HVJ-Envelope/HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine in murine model.

vaccine-priming and the BCG Tokyo vaccine booster group, respectively, were alive more than 12 months in the study. In addition, both HSP65+hIL-12/HVJ improved ESR and chest X-ray findings. Furthermore, therapeutic effect of this HVJ-Envelope/Hsp65DNA+IL-12DNA vaccine on TB infection in mice was observed. Mice of the group, which TB were *ieyv* injected and then treated with the DNA vaccine 3 times *ieym*, showed the decrease in the number (CFU) of TB in lungs, spleen and liver, compared to BCG-treated group and non-vaccinated group. The therapeutic efficacy of this DNA vaccine was also observed in the survival and body weight of monkeys which were challenged with TB *ieyt* instillation (5×10^2 CFU) and then treated with HVJ-Envelope/Hsp65DNA+IL-12

DNA 9 times. (Table1) Taken together, these results clearly demonstrate that the HSP65+hIL-12/HVJ could provide therapeutic efficacy and protective efficacy against *M. tuberculosis* in the cynomolgus monkey model as well as murine model.

Conclusions

The Hsp65+IL-12/HVJ vaccine exerted a therapeutic effect as well as prophylactic effect against TB in the model using cynomolgus monkeys and mice, as indicated 1) extension of survival of those experimental animals by therapeutic and prophylactic treatment; 2) decrease in the number of TB in

Table 1

**Therapeutic effect of HVJ-Envelope/HSP65 DNA+
IL-12 DNA vaccine on cynomolgus monkeys infected
with M. Tuberculosis**

	Therapeutic Vaccine	ID of monkeys	Increase in the Body Weight	The number of monkey increasing in the Body weight out of 5 monkeys	Survival on 16 weeks after TB challenge
G1	HVJ-Envelope/Hsp65 DNA + IL-12 DNA	Z12-10D B47-H Z1-16BA Z7-93BA 2918-I	+ (Increase) 0 (Same) - (Decrease) + +	3/5	5/5
G2	(-)	6847D 8018B 5368B PbB2-4F PrZ7-51AC	- + 0 - -	1/5	3/5

lungs, spleen and liver of mice; 3) improvement of ESR and chest X-ray findings; 3) increase in the body weight; 4) augmentation of immune responses in a cynomolgus monkey model which closely mimics human TB disease; 5) augmentation of CD8⁺CTL, TH₁ cell and IFN- γ producing cells; 6)

Our results with the Hsp65+IL-12/HVJ vaccine in the cynomolgus monkey model should provide a significant rationale for moving this vaccine into clinical trials. Thus, we are taking advantage of the availability of multiple animal models (mouse, guinea pig, and monkey) to accumulate essential data on the HVJ-envelope DNA vaccine in anticipation of a Phase I clinical trial.

References

- 1 Yoshida S, et al. DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against Mycobacterium tuberculosis by T cell activation. *Vaccine*, 24: 1191-1204, 2006.
- 2 Walsh GP, et al. The Philippine cynomolgus monkey provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med*, 2(4):430-6, 1996.
- 3 Kita Y, et al. Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine*, 23: 2132-2135, 2005.
- 4 Okada M, et al. Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12):7717-21, 1981.

第82回総会シンポジウム

IV. 抗酸菌研究の最前線

座長 ¹岡田 全司 ²小林 和夫

キーワード：分子疫学，潜伏感染，血清診断，新規抗結核薬，ワクチン開発

発表者：

1. 反復配列多型を利用した結核菌の迅速遺伝子型別法の標準化
*前田伸司，村瀬良朗（結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター結核菌情報科）
2. 結核菌病原因子による病変形成と感染防御
*松本杜吉（大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学），小林和夫（国立感染症研究所免疫部）
3. MAC特異的糖蛋白脂質抗原を用いた肺 MAC症の血清診断
*北田清悟，前倉亮治（国立病院機構刀根山病院呼吸器内科）
4. 新規抗結核薬である OPC-67683 の研究開発
松本 真（大塚製薬株式会社微生物研究所）
5. 新しい結核ワクチン開発
岡田全司（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）

全世界で約20億人（全人口の3分の1）が結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）に既感染，毎年880万人が結核を発病，200万人（AIDS合併を含む）が死亡している。今後10年間で8000万人が結核を発病，2000万人が死亡することが推定されている。日本（2005年）では年間2万8000人が発病，2300人が死亡し，日本においても結核対策は重要な課題である。

シンポジウム「抗酸菌研究の最前線」を企画し，発生動向，病態，診断，治療，予防の視点から，気鋭の研究者が最新の研究成果や将来展望を発表し，結核など抗酸菌感染症対策に新戦略を提供した。

発生動向，特に，分子疫学に関し，前田伸司博士らは

「反復配列多型（VNTR）を利用した結核菌の迅速遺伝子型別法の標準化」について，12-locus VNTR分析法の有用性を示した。12-locus VNTR分析法は日本国内で分離された結核菌株の分子疫学に，加えて，IS6110-RFLP法より，優れた分析法であることを証明した。

病態に関し，松本杜吉博士らは「結核菌病原因子による病変形成と感染防御」について，抗酸菌由来蛋白質分子（MDP1）の生物学的意義を発表した。MDP1はDNAの保護，増殖制御，宿主細胞への接着，防御免疫の誘導など多彩な活性を示し，菌および宿主の双方に多機能分子であることを証明した。MDP1は潜在性結核菌感染に役割を演じ，さらに，新規ワクチン開発において分子標的候補の可能性を言及した。

診断に関し，北田清悟博士らは「MAC特異的糖蛋白脂質抗原を用いた肺 MAC症の血清診断」について，*Mycobacterium avium* complex (MAC) 特異的細胞壁抗原：glycopeptidolipid (GPL) を用いた血清診断：抗 GPL 抗体の測定およびキットの開発など，MAC感染症に臨床応用した。血清診断は従来の診断基準で実現不可能な迅速・簡便，高感度・特異度，加えて，疾患活動性と相関を示し，MAC感染症の診断にきわめて有用である。

治療に関し，松本真博士は世界から注目されている「新規抗結核薬である OPC-67683 の研究開発」について発表した。Nitroimidazole 誘導体である「OPC-67683」は結核菌のミコール酸合成を阻害し，抗菌活性を示すこと，既存の抗結核薬と交差耐性を示さないこと（すなわち，多剤耐性結核菌にも有効），細胞内寄生菌にも有効であること，代謝活性の低下した休眠菌にも有効であることを証明した。さらに，マウス感染モデルを用い，現行抗結核薬より優れた抗菌活性を示し，かつ，治療期間

¹NHO 近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター，²国立感染症研究所免疫部

連絡先：小林和夫，国立感染症研究所免疫部，〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1 (E-mail: kobayak@nih.go.jp)
(Received 30 Jul. 2007)

を短縮できた。OPC-67683は安全性にも優れ、きわめて有望な新規抗結核薬候補である。

予防に関し、岡田全司博士は「ワクチン開発」について、BCGを凌駕するワクチン候補を発表した。新規抗結核DNAワクチン(HVJ-リボソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNA, HVJ-エンペローブ/HSP65 DNA+IL-12 DNA)やリコンビナント72f BCGワクチンは結核菌抗原特異的キラーT細胞を誘導し、予防のみならず、治療(感染曝露後)効果も発揮した。カニクイザル感染モデルで

HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンはBCGよりも強力な生存率改善・延命効果を発揮し、priming-booster法(BCG→HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン)で100%の生存率を示したことから、臨床試験が期待される。

シンポジウム「抗酸菌研究の最前線」が会員諸氏に有用な情報を提供、そして、研究室から臨床に迅速・効率的に“橋渡し(Translation)”し、究極的に人類に甚大な健康被害を提供し続けている結核の制圧に寄与することを祈念している。

1. 反復配列多型を利用した結核菌の迅速遺伝子型別法の標準化

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス
センター結核菌情報科

前田 伸司, 村瀬 良朗

はじめに

感染源特定のための結核菌のタイピング方法としては、①Restriction fragment length polymorphism (RFLP)分析法、②Spoligotyping法、③Variable numbers of tandem repeats (VNTR)分析法などがある。現在のタイピングの標準法は、RFLP分析である。これは、結核菌群がもつトランスポゾン上に存在する挿入配列(IS)6110のコピー数と染色体上での挿入位置の多様性を利用して結核菌を分類する方法である。しかし、RFLP分析では次のような欠点がある。①サザンブロッティングが可能な量(1 μ g以上)と純度のDNAが必要なため、菌を培養しなければならないため時間がかかる(2~3週間)、②IS6110のコピー数が少ない時には使えない、③バンドの差異を肉眼で判断するので、電気泳動やゲルの状態により結果が変動する。そのため、多施設間でのデータ比較および共有はできない。RFLP分析法が、結果を得るのに4日(調製済みのDNAから)かかるのに対して、Spoligotyping法では、2日で結果が得られる。しかし、欧米諸国とは異なり、国内では結核菌の分子多様性が低く分類可能な結核菌株数が少ないという欠点がある。VNTR分析法は、パスツール研究所で進められた結核菌のゲノムプロジェクトで明らかになったMycobacterial interspersed repetitive units (MIRU)および他部位の繰り返し配列のコピー数を調べ、結核菌の分類を行う方法である。Mycobacterium tuberculosis H37Rv株では、41カ所のMIRUが存在し、そのうち12カ所は、多様性があることが報告されている¹⁾。また、この方法は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を利用して核酸を増幅するため、少量の未精製のDNAを検体として使うことができる。

大都市における結核対策には、人の移動を考慮して広

域での結核疫学調査が必要となる。RFLP分析法は、解析能力が高いが、地域衛生研究所間でのデータ比較は難しい。そのため、広域調査には、結果がデジタルで表されるVNTR法を適応する必要がある。しかし、米国疾病予防管理センター(CDC)が採用している12カ所のMIRU分析で、日本国内の株を分析すると約23%の株が同一プロフィールに分類されるため、直接この方法を国内に適応することはできない²⁾。本研究では、どのlocusを何カ所分析すると、IS6110 RFLP分析法と同程度の分解能になるかを明らかにすることによって、国内での結核菌分析におけるVNTR標準分析法の確立を目指した。

方 法

〔結核菌分離株とタイピング法〕

結核療法研究協議会が2002年収集した菌株の中から都道府県ごとに、ランダムに3~10株選択した。これら合計325株について、IS6110 RFLP, SpoligotypingおよびVNTR分析を行った。VNTR分析は、代表的なMIRUの12カ所, Exact tandem repeats (ETR)の4カ所およびその他19カ所の合計35カ所について分析を行った。

〔PCR法によるVNTR断片の増幅〕

結核菌DNA(5 ng), 0.5 μ Mのプライマー混合液, GC buffer I (Takara Bio), 0.2 μ M dNTP, Takara Ex Taq (0.25 U)を混合し、H₂Oで全量10 μ lとしてPCRを行った。反応の条件は、95 $^{\circ}$ Cで5分加熱した後、95 $^{\circ}$ C 15秒、65 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 2分のサイクルを30回繰り返し、72 $^{\circ}$ Cで7分加熱し、その後4 $^{\circ}$ Cとした。

〔アガロースゲル電気泳動〕

反応液は、TBE緩衝液を用いた2.5%または1.5%アガロースゲルで電気泳動を行い分子量を算出し、タンデムリピートのコピー数に換算を行った。

〔タイピング能力の比較〕

各ローカスにおける分解能力は Polymorphism information content (PIC) を、各分析法による結核菌のタイピング能力は、Hunter-Gaston discrimination index (HGDI) を用いて比較を行った。

結果と考察

RFLPおよび Spoligotyping 分析

分離株 (合計 325 株) について IS6110 RFLP 分析を行い、クラスター率を算出すると 18.5% (60/325) であった。都道府県ごとに無作為に選んだ株から得られたこの値は、国内の IS6110 RFLP 分析での平均的なクラスター率に近いと考えられる。Spoligotyping では、32 株が独立した株と区別され、最大クラスターは 228 株からなる北京型結核菌だった (Table)。さらに、北京型株の一部のダイレクトリピートが欠損した北京型類似株 (Beijing-like strain) が 12 株存在したことから、これらを含めた北京型結核菌数は、240 株 (73.8%) であった。

16カ所 (12カ所の MIRU と 4カ所の ETR) の VNTR 分析

12カ所の MIRU と 4カ所の ETR、合計 16カ所の分析では、MIRU-2, 20, 24 のように非常にコピー数の分布が狭く、PIC の値が 0.018~0.081 と低い locus と MIRU-10, 26, 31 のように分布が広く、PIC 値が 0.545~0.588 となる locus があった。米国 CDC が採用している標準 MIRU 分析法に ETR の 4カ所を加えても、日本国内の株を分析した場合、RFLP 法に比べて分解能が低かった²⁾。そこで、Smittipat らの論文³⁾を参考にして、北京型結核菌を効率よくタイピング可能な locus を選び分析を行った。

19カ所 (北京型結核菌をタイピング可能と考えられる) の VNTR 分析

19カ所の新しい locus の分析では、MIRU や ETR に比べてコピー数の分布が広く、また PIC 値も高いことがわかった。Supply らのヨーロッパ諸国での VNTR 標準法の提唱論文⁴⁾では、PCR 産物が得られない locus は除外されている。しかし、PCR 産物が得られないということは、プライマーの結合部位が欠損しているか、その部分

に変異が存在する株であることを示唆している。このような菌の特徴もタイピングに十分利用できると考えられるので、これらの locus も分析から除外しなかった。

一方、VNTR-2163a, 2163b, 1895, 3336, 3232, 3820 および 4120 では反復配列のコピー数が 15 以上である株が多く含まれることがわかった。コピー数が多い場合、得られる PCR 産物の分子量が 1 kbp 以上となり、反復配列のコピー数の相違をアガロースゲル電気泳動で判定することが難しい。そのため、PCR 産物からコピー数に換算する際に間違いが生じやすいと考えられる。そこで、これらの locus のうち、コピー数が 15 以上となる株の割合が全体の 5% 以上含まれる VNTR-2163a, 3232, 3820 および 4120 は、分析から除外した。

日本国内株分析のための VNTR 標準法

除外した 4カ所以外の 31カ所について PIC の値が高いものから順番に並べて、分析ローカスの組合せを作り、RFLP 分析法と分解能を比較した。クラスター形成率およびタイピング可能な株数などを参考にして解析を行った結果、上位 12カ所 (VNTR-2163a, 4052, 3336, 1955, 4156, 2372, 0424, 2074, 2996, 3155, 0960 および 3192) を選択すると、RFLP 分析結果とほぼ同じ分解能であることがわかった。このプライマーの組合せを VNTR (Japan Anti-Tuberculosis Association: JATA) として国内株分析の標準法とした。

ヨーロッパで提唱されている 15-locus および 24-locus の VNTR 分析結果の比較

この VNTR (JATA) はクラスター形成率、最大クラスター形成株数などの指標において、現在の標準法である RFLP 分析より優れていた。また、クラスター形成率で比較すると、本分析法は、昨年 Supply らによって提唱されているヨーロッパ諸国での VNTR 分析標準法⁴⁾の 24-locus 分析には及ばないものの、15-locus 分析よりも優れていた (Fig.)。

ま と め

本研究で樹立した国内株分析に最適化した 12-locus VNTR 分析法は、ヨーロッパで提唱されている 15-locus

Table Comparison of discriminatory power of IS6110 RFLP, spoligotyping and VNTR analyses

Typing method	Total no. of type patterns	No. of unique types	No. of clusters	No. of clustered isolates (%)	Maximum no. of isolates in a cluster	HGDI*
IS6110 RFLP	283	265	18	60 (18.5)	8	0.998
Spoligotyping	45	32	13	293 (90.0)	228	0.501
12-locus MIRU-VNTR	127	89	38	236 (72.6)	61	0.944
16-locus VNTR (12 MIRU and 4 ETR)	165	121	44	204 (62.8)	44	0.967

*Hunter-Gaston diversity index

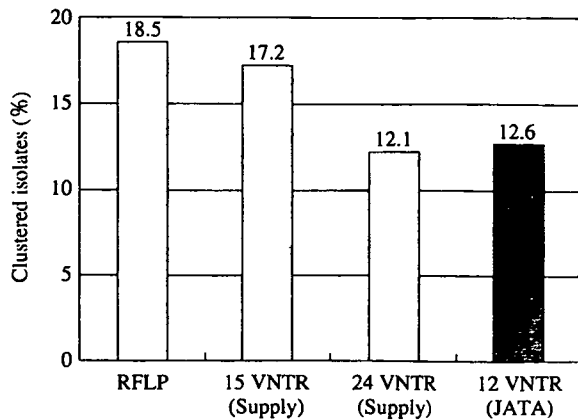


Fig. Comparison with percentage of the clustered isolates

VNTR分析法よりも優れていた。さらに、IS6110 RFLP分析よりも分解能が高いことが明らかになった。今後は、接触者調査から関連が疑われる株を使ってRFLP分析結果と本VNTR分析結果の比較および各ローカスの安定性を調査する予定である。

2. 結核菌病原因子による病変形成と感染防御

大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学 松本 壮吉
 国立感染症研究所免疫部 小林 和夫

はじめに

Nature Medicine誌は本年度(2007)、抗結核薬開発において重要かつchallengingな研究として、菌の休眠-潜伏感染機構の解明を筆頭に挙げたり。休眠(dormant)菌を殺傷することができれば、現在の結核治療期間を大幅に短縮することができる。さらに休眠-潜伏感染菌を駆逐することで結核の制圧が可能である。われわれは早くから休眠菌対策の重要性を認識し解析を行ってきた。本シンポジウムでは、われわれのこれまでの成果、すなわちmycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)という抗酸菌に特異的なヒストン様蛋白質が結核菌の休眠をはじめとする病変形成や病態の推移に密接に関わるという分子論的証拠を紹介した。また、われわれの研究成果に基づいた新しい抗結核薬探索の取り組みについても紹介した。

内因性再燃による結核発病プロセス

結核菌は現在、人類の3分の1に一部休眠状態で潜伏感染している。休眠菌は長期の生存が可能で、かつ化学

謝 辞

本研究では、結核療法研究協議会が全国から集めた結核菌の一部を分析に利用させて頂きました。利用に関して承諾を頂いた諸先生方に心より感謝致します。

文 献

- 1) Supply P, Mazars E, Lesjean S, et al.: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* 2000; 36: 762-771.
- 2) Wada T, Maeda S, Hase A, et al.: Evaluation of variable numbers of tandem repeat as molecular epidemiological markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J Med Microbiol.* 2007; 56: 1052-1057.
- 3) Smittipat N, Billamas P, Palittapongpim M, et al.: Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple loci in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5034-5043.
- 4) Supply P, Allix C, Lesjean S, et al.: Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 4498-4510.

療法薬に対し抵抗性を示す。宿主の防御能の低下に伴い菌は再び増殖を開始し(内因性再燃)、病気が発症する。これを二次結核と呼ぶが、多くの成人型肺結核はこの機序で発症する。

現在の結核治療は世界保健機関の推奨する主力2薬剤(イソニアジドとリファンピシン)を含む複数薬の直接監視下短期化学療法(DOTS)によってなされているが、それでも最低6カ月の投薬期間が必要である。長期にわたる治療は、患者の精神的苦痛を伴うことから中断を余儀なくされる場合があり、それが薬剤耐性菌の出現を促す。結果として多剤耐性結核菌(MDR-TB)や超多剤耐性結核菌(XDR-TB)が出現し結核治療を困難にしている。

結核治療が長期の投薬期間を必要とするのは、菌の増殖が緩慢で代謝が比較的緩やかなうえに、結核菌が一定の割合で薬剤の標的代謝が停止した休眠状態に移行するからである。休眠菌に対して現行の結核薬は効果をあらわさず、増殖時にも一定の割合で生じる休眠菌を殺傷できないため長期間の薬剤投与を余儀なくされている。さらに潜伏感染する結核菌はほとんどが休眠状態であり、

既存の薬剤で結核予備軍である既感染健康人の処置を行うことは現在、不可能である。しかしながら人類に潜伏感染する結核菌を駆逐することで理論的には結核の制圧も可能である。このような状況から、結核菌の休眠-潜伏感染から内因性再燃にいたる分子機構を明らかにし対策を講ずる必要がある。

潜伏-休眠感染における鍵分子

われわれは休眠菌が最も大量に発現する蛋白質 mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) を同定し解析を行ってきた。MDP1 は分子量約 21 kDa の蛋白質で、N 末端部と C 末端部がそれぞれ細菌の HU 蛋白質および哺乳

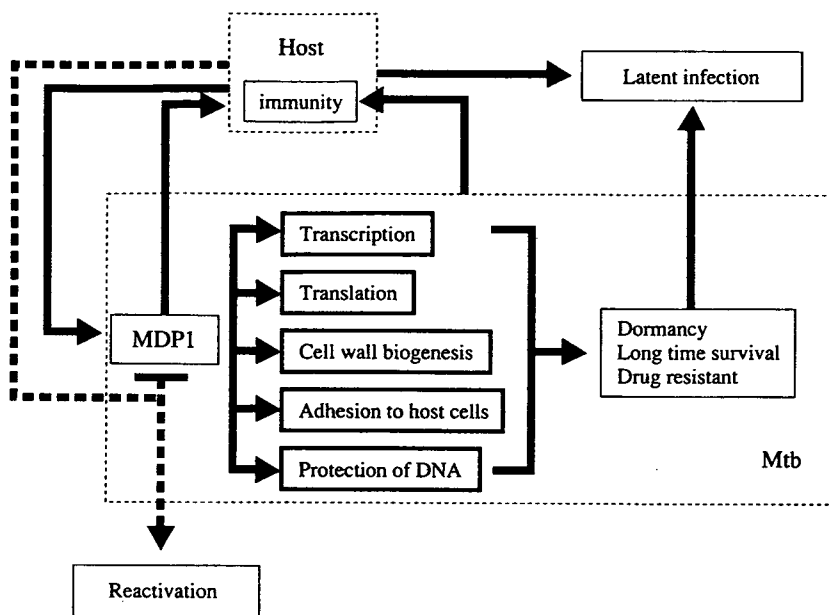


Fig 1. The role of MDP1 in the latent infection and reactivation *M. tuberculosis* (Mtb) stimulates cellular immune responses, which trigger bacterial dormancy. In dormant phase MDP1 negatively regulate transcription, translation, cell wall biogenesis. MDP1 is a histone-like DNA binding protein and protects DNA from oxidative stresses. In addition, MDP1 mediates mycobacterial entry to host cells, where Mtb persists. To the contrary, not determined host response may cancel the activity of MDP1 and consequently Mtb grows again, leading reactivation.

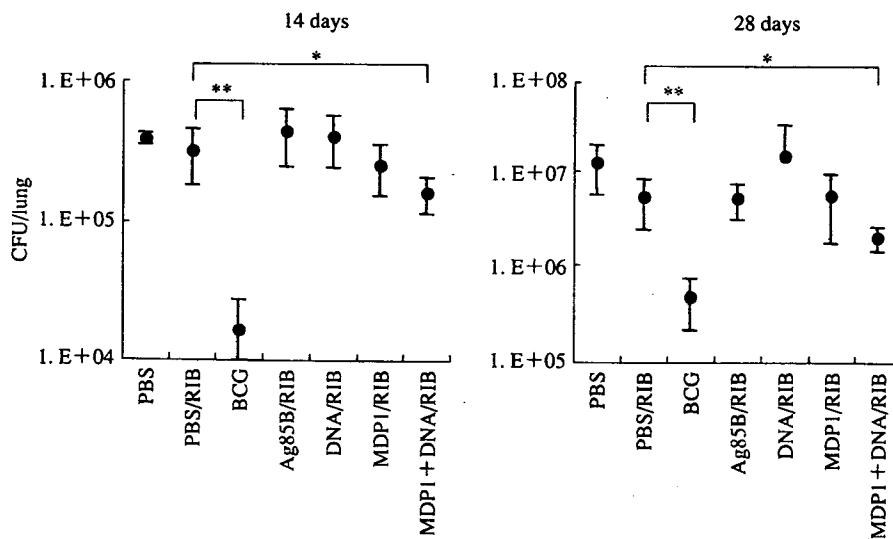


Fig 2. MDP1 induces protection against *M. tuberculosis* challenge in mice C3H/HeJ mice were immunized with antigens as indicated below the horizontal axis and challenged i.v. with 10⁶ CFU of *M. tuberculosis* Kurono strain. Fourteen (A) and 28 (B) days after the challenge, bacterial numbers in the lungs were determined by counting CFUs. *P < 0.05; **P < 0.005 (ANOVA).

類のヒストンH1蛋白質と相同性を有するヒストン様蛋白質である。実際にMDP1はGC-richなDNA領域に結合してDNAを酸化ストレスなどから保護するとともに、転写を制御し生体高分子合成を調節する (Fig. 1)。休眠菌には大量のMDP1が含まれることからMDP1は休眠菌DNAを保護する一方、転写-翻訳を抑制して菌の増殖停止を演出している。休眠は、生体内で細胞性免疫の誘導に伴って誘導され、その主要なエフェクターの1つが酸素分圧である。結核菌が潜伏する細胞内の酸素分圧は低く、低酸素はMDP1の発現を増強させることが知られている。

MDP1はDNA以外の糖にも結合し、糖脂質に結合し

て結核菌細胞壁にも存在する。定常期以降、MDP1は細胞壁にも蓄積し、結核菌の病原性に強く関わるミコール酸の糖への転移を抑制する。このことはMDP1が菌体内で遺伝子発現を抑制すると同時に、休眠菌の細胞壁合成の停止にも関わることを示唆する (Katsube T et al. 論文投稿中)。一方、細胞壁のMDP1は宿主細胞の糖、特にヒアルロン酸などのムコ多糖に結合することで感染細胞の一つであるII型肺上皮細胞への感染を促す²⁾。

潜伏感染時に結核菌が大量に発現しているMDP1に対して、宿主がどのような応答を示すのかをマウスモデルを用いて解析した。われわれの仮説は、MDP1が菌の生存を保障するために免疫応答を不活化するのではない

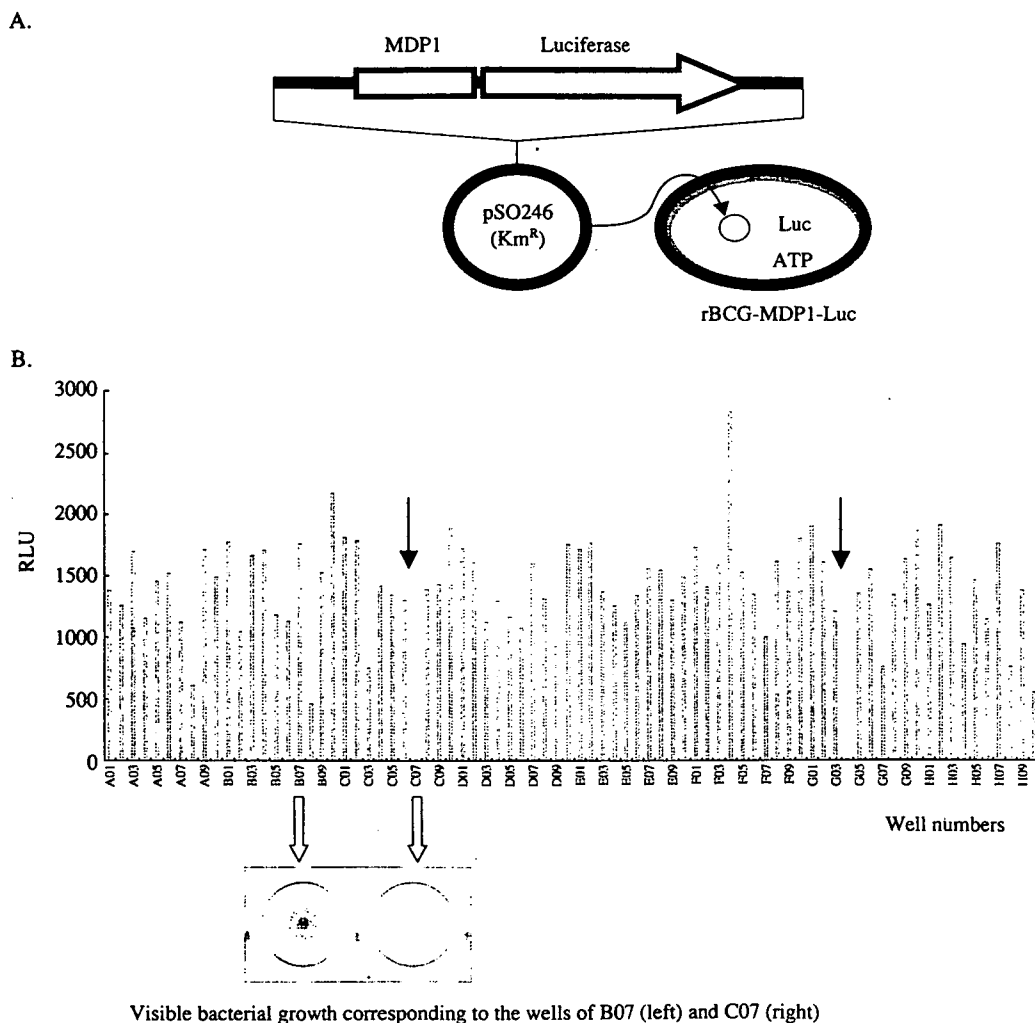


Fig 3. Screening anti-tuberculosis drug by employing MDP1 and luciferase

A. Construction of luciferase-expressing recombinant BCG. The MDP1 gene was inserted into pSO-Luc. And this construct was introduced into BCG by electroporation and luciferase-expressing recombinant BCG (rBCG-MDP1-Luc) was selected on the agar containing kanamycin.

B. Upper figure. rBCG-MDP1-Luc was cultured in 96-round bottom plate at 37°C. The libraries of crude extracts derived from *Actinomyces* were added. After 2 days incubation, luciferase activity (RLU) was measured by luminometer. Two extracts obliterated luciferase activity (narrow arrows). Lower figure. After 14 days later, bacterial growth was visible by the eyes and the results were correlated with that of luciferase activity (thick arrows).

かというものであったが、結果は逆であった。MDP1はDNAと結合することでTh1細胞からIFN-gammaの産生を促し、Ag85Bを凌駕するほどのワクチン効果があることが判明した (Fig. 2)³⁾。前述のように細胞性免疫によって休眠が誘導される。MDP1はその他の結核菌抗原とともにTh1型の細胞性免疫を誘導することで、宿主応答を介した菌の休眠の維持にも関わるようだ。また、宿主に一定の防御免疫を付与することで宿主の生存も確保しているように思われる。

トランスレショナルリサーチ

これまでの解析成果から、MDP1の発現をモニターすることで休眠を解除したり、菌を殺傷する新規の化合物の同定が可能ではないかとわれわれは考えた。すなわち、休眠菌内でMDP1の発現を阻害し休眠を解除することで現行の抗結核薬の補助的療法の確立が可能であり、さらにMDP1発現の完全な消失は (MDP1は結核菌の生存自体にも必須である) 菌の死を示唆する。

われわれはMDP1の発現をルシフェラーゼの活性によってモニターする組み換えBCGを作成した。この組み換えBCGを利用することで菌の生死を2~4日で判定することができた (Fig. 3)。われわれは、微生物化学研究会の五十嵐雅之博士や、園田学園女子大学の尾関百合子博士等と共同でルシフェラーゼ活性を指標にBCGの増殖を抑制する生物資源の探索を始めた。これまでに約3000あまりの土壌放線菌由来抽出物を試験した結果、20あまりの活性物質を検出した。これらの活性物質は

BCGの増殖のみならず、大阪市で分離された複数の多剤耐性結核菌に対しても同等の効果を示した (大阪府立公衆衛生研究所の田丸亜貴先生との共同研究)。われわれはスクリーニングと活性解析を続け休眠菌をも殺傷する新規結核薬の創薬を目指している。

ま と め

MDP1は抗酸菌特異的なヒストン様蛋白質で、DNAの保護、増殖制御、宿主細胞への接着活性、防御免疫の誘導能など複数の活性を有し、結核における潜伏感染の成立と解除 (内因性再燃) に重要な役割を果たす。このことはMDP1の結核ワクチンのコンポーネントとしての有用性を示している。またわれわれの研究成果に基づいた新規抗結核薬の探索研究を紹介した。

文 献

- 1) Ginsberg AM, Spigelman M: Challenges in tuberculosis drug research and development. *Nat Med.* 2007; 13: 290-294.
- 2) Aoki K, Matsumoto S, Hirayama Y, et al.: Extracellular mycobacterial DNA-binding Protein 1 participates in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J Biol Chem.* 2004; 279: 39798-39806.
- 3) Matsumoto S, Matsumoto M, Umemori K, et al.: DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol.* 2005; 175: 441-449.

3. MAC特異的糖蛋白脂質抗原を用いた肺MAC症の血清診断

国立病院機構刀根山病院呼吸器内科 北田 清悟, 前倉 亮治

非結核性抗酸菌 (NTM) 感染症は増加傾向にある。実際、当院のような日本有数の結核病床を有する病院でさえ、今日、喀痰塗抹抗酸菌陽性外来患者の大部分はNTM患者が占めるようになってきている。本邦ではそのNTMの約70%は *Mycobacterium avium* complex (MAC) が占める。最近、MACはHIV陰性の患者においても慢性で進行性の肺疾患を生じることは広く認識されてきている。また、MACによる急性過敏性肺臓炎を呈する病態が新たに報告されている。呼吸器科医がMACによる肺疾患に接する機会は増えており、その診断、治療、管理に対する関心が高まっている。

肺MAC症の診断は時に煩雑である。なぜならば肺結核とは異なり、MAC菌は水、塵埃、土など環境中から臨床検体に混入する可能性があり、侵襲的疾患ではなく

気道にコロナイズすることがありうるからである。したがって痰からの一度のMAC菌検出は肺感染症と診断するには不十分である。2007年2月に10年ぶりに米国胸部疾患学会 (ATS) より非結核性抗酸菌感染症の診断・治療に関するガイドラインが改訂・刊行された¹⁾。診断は、臨床的基準と細菌学的基準から成り、その両者を満たす必要がある。細菌学的基準は1997年のガイドラインよりも条件が緩和されているものの、複数回の痰または気管支洗浄液、組織からのMAC菌培養陽性が必要であり、基準を満たすまでに労力、費用と時間を要する。特に、軽症 (早期) の肺MAC症患者では、喀痰採取が困難な例も多く、全症例に気管支鏡検査を実施するのも困難である。また、臨床症状とエックス線画像所見は非特異的であり、他の抗酸菌感染症との鑑別は、菌の証明

が困難な場合には診断に難渋することがある。特に肺結核との鑑別は、感染予防の観点からも重要である。肺結核は感染予防対策のため即座に入院勧告を考慮し、治療を開始しなければならない。一方、肺 MAC 症は人から人への感染はないとされ、確定診断が即治療開始を必要とするわけではない。個々の患者にとって治療の利益、不利益を考慮し、治療時期を決定すべきである¹⁾。

これらの課題を克服すべく、新たな診断法を提案したい。われわれは MAC 表層に存在する糖蛋白脂質 (glycopeptidolipids : GPLs) 抗原を用いた MAC 特異的血清診断を開発してきた。本シンポジウムでは MAC 特異的血清診断の有用性、臨床応用について報告した。

血清 GPL core 抗体

GPLs は MAC 血清型を決定する糖蛋白脂質であり、現時点では 31 種類の GPLs が報告されている。GPLs は、肺結核、*M. kansasii* には存在しない。GPL は各血清型共通構造である GPL core と血清型特異的 oligosaccharide からなる。MAC は血清型によってその毒性が異なり臨床経過に影響を与えている可能性が示唆されている²⁾。当初われわれは 11 種類の血清型特異的 GPLs を混合し、whole の GPLs を抗原として用いた³⁾。その後、GPL core に優位な epitope があることを発見し、これを抗原とした血清診断を開発した⁴⁾。

肺 MAC 症の診断、肺結核、*M. kansasii* 症との鑑別

ATS 診断基準を満たす肺 MAC 症 106 例、環境中からの MAC の汚染と考えられた MAC colonization 群 11 例、*M. kansasii* 症 30 例、肺結核 77 例、健常人 126 例の血清中 GPL core 抗体価の測定を行った。肺 MAC 症患者において、血清抗体価は有意に上昇していた。血清診断によって、肺 MAC 症と colonization、健常人との鑑別が可能であり診断に有用であることが確認された。Immunoglobulin class の中では、IgA が最もよい感度、特異度を示し、肺 MAC 症の診断における感度 92.5%、特異度 95.1%であった (Table)。この結果から、この血清診断は肺 MAC 症

の迅速な診断に有用であることが示された。また、他の主要な抗酸菌感染症である肺結核、肺 *M. kansasii* 症との鑑別にも有用であった。

この結果を受け、GPL core IgA 抗体測定のエIA kit を開発した。血清抗体価は患者標準血清を用い、U/ml に標準化し、より安定した結果を得ることができ、優れた再現性、安定性を確認した。6 施設が参加した多施設研究においても同様の結果が得られた。血清材料は 70 例の肺 MAC 症、18 例の MAC colonization、36 例の肺結核、45 例の他の肺疾患、そして 76 例の健常人から集められた。Cut off 値を 0.7 U/ml と設定すると、EIA kit の肺 MAC 症の診断における感度、特異度はそれぞれ 84.3%、100%であった。

化学療法と抗体価の相関

化学療法を行った肺 MAC 症患者で、治療前後で抗体価の推移を検討した⁵⁾。化学療法によって排菌が陰性化した群では抗体価は有意に低下したが、排菌が陰性化しなかった群では抗体価に変化は認められなかった。また、手術症例において、手術前後で抗体価の急峻な低下が認められた (Fig.)。これらのことから抗体価が疾患の活動性を反映する可能性が示唆された。

画像所見と抗体価の相関

47 例の肺 MAC 症患者において、胸部 CT 画像と抗体価の関連を検討した⁶⁾。胸部 CT は、小結節陰影 (<10 mm)、結節陰影 (10~30 mm)、大結節陰影 (>30 mm) または浸潤陰影、気管支拡張、空洞、および無気肺の有無を検討した。また、病巣の拡がりには CT を解剖学的に 18 segment に分け、所見を認めた segment 数によって評価した。血清 GPL core IgA 抗体価は 10 mm 以上の結節陰影を呈する症例群で有意に高値を示した。また病変の拡がりとは正の相関性を認めた ($p=0.0183$)。すなわち、より広範囲に病変を認め、大きな結節を形成すると抗体価は高い傾向にあった。

Table Sensitivity and specificity of EIA* for serodiagnosis of pulmonary MAC disease

Clinical Condition	n	Immunoglobulin class					
		Ig G		Ig A		Ig M	
		Sensitivity (number of seropositives)	Specificity (number of seronegatives)	Sensitivity (number of seropositives)	Specificity (number of seronegatives)	Sensitivity (number of seropositives)	Specificity (number of seronegatives)
MAC disease	106	72.6 (77)	27.4 (29)	92.5 (98)	7.5 (8)	78.3 (83)	21.7 (23)
MAC colonization	11	9.1 (1)	90.9 (10)	9.1 (1)	90.9 (10)	18.2 (2)	81.8 (9)
<i>M. kansasii</i> disease	30	6.7 (2)	93.3 (28)	10.0 (3)	90.0 (27)	16.7 (5)	83.3 (25)
TB	77	10.4 (8)	89.6 (69)	5.2 (4)	94.8 (73)	5.2 (4)	94.8 (73)
Healthy subjects	126	6.3 (8)	93.7 (118)	3.2 (4)	96.8 (122)	8.7 (11)	91.3 (115)

*Enzyme immunoassay