

Fig Disease activity and the level of antibodies to MAC GPL core. The levels of serum IgA antibodies to GPL core are shown before beginning and after the completion of antimycobacterial chemotherapy for both the cured (14 MAC patients) and the failure groups (13 MAC patients). In the cured group, the culture results indicated conversion from positive to negative after successful chemotherapy, and in the failure group, the culture results indicated no conversion to negative despite treatment. All results are expressed as individual data (\bullet), and the bars show mean \pm SD for each group. The OD levels decreased significantly ($*p < 0.001$) in the cured group of patients but were not changed ($p = 0.381$) in the treatment failure patient group. The changes of serum IgA antibodies levels of to GPL core in a 61 year old female MAC patient who had undergone lobectomy is shown in (B). IgA levels decreased rapidly after the surgery and sputum cultures converted from positive to negative.

早期診断に対する有用性

画像的に気管支拡張像 and/or 小結節陰影を呈する患者において、喀痰検査で診断がつかなかった56例について血清抗体価と気管支鏡でのMACの検出に関する検討を行った。気管支鏡検査にてMAC陽性患者28例、MAC陰性患者28例であった。MAC陽性例は全例女性で、MAC陰性例は28例中10例が男性であった。MAC陰性例では *P. aeruginosa*, *H. influenzae* などが検出された。血清抗体価はMAC陽性例で有意に上昇し、カットオフ値を0.5 U/ml とすると、MAC症診断の感度は78.6%、特異度96.5%、陽性反応的中率 (positive predictive value) 95.7%、陰性反応的中率 (negative predictive value) 81.8% であった。すなわち、血清診断陽性であれば高い確率でMAC菌検出を推定でき、気管支鏡検査を行わなくても、早期の肺MAC症診断が可能であると考えられた。

文 献

- 1) Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al.: An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of Nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175: 367-416.
- 2) Maekura R, Okuda Y, Hirofumi A, et al.: Clinical and prognostic importance of serotyping *Mycobacterium avium-mycobacterium intracellulare* complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 3150-3158.
- 3) Kitada S, Maekura R, Toyoshima N, et al.: Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex with an enzyme immunoassay that uses a mixture of glycopeptidolipid antigens. *Clin Infect Dis.* 2002; 35: 1328-1335.
- 4) Kitada S, Maekura R, Toyoshima N, et al.: Use of glycopeptidolipid core antigen for serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in immunocompetent patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12: 44-51.
- 5) Kitada S, Nishiuchi Y, Hiraga T, et al.: Serological test and chest computed tomography findings in patients with *Mycobacterium avium* complex lung disease. *Eur Respir J.* 2007; 29: 1217-1223.

1) Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al.: An official

4. 新規抗結核薬である OPC-67683の研究開発

大塚製薬株式会社微生物研究所 松本 真

結核菌は世界の総人口の3分の1に当たる約20億人の人に感染しており、近年の HIV/AIDS の増加に伴い、再燃が世界的に大きな問題となってきている¹⁾。結核患者数も増加に転じており、過去のどの時代よりも多い人が結核に感染している状況となっている。また、HIV と結核の混合感染者が1200万人にも達しており、結核感染は HIV 感染者の死亡の主な原因となっている。結核菌が潜伏感染している人に HIV が感染することで、発病へ至る危険性は30~50倍に増加するといわれている²⁾。さらに、多剤耐性結核菌の増加が治療を難治化している。多剤耐性菌の治療には、二次抗結核薬などを使用することになり、効力が不十分であるばかりでなく、副作用も強く、長期療養が必要となる。結核は、今や過去の病気ではなく、このままの状態が続くと今後20年間で10億人が新規に感染し、3600万人が死亡するであろうと考えられている³⁾。このような中、新しい治療薬の開発が切望されていることは必然なことである。新しい治療薬には、①短期化学療法を実現できる薬剤、②多剤耐性結核菌に有効な薬剤、③薬物相互作用がなく抗 HIV 薬などと併用服薬可能な薬剤、④潜伏感染している結核菌に有効な薬剤、などのプロファイルを有する新薬の開発が望まれている。

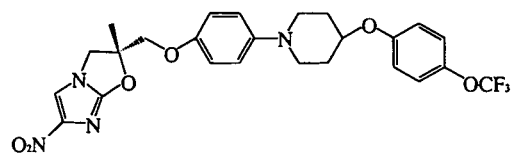
このような現状を踏まえ、結核菌にのみ効力を示し、他の細菌には影響を及ぼさない新規抗結核薬の探索研究を試みた。結核菌はワックスに例えられるように、脂質に富んだ構造を有している。このことは、結核菌のゲノム解析から明らかにされたように、約250もの遺伝子が、脂質の代謝に関係していることも裏づけている。その脂質成分の主成分はミコール酸であり、抗酸菌に特有な長鎖脂肪酸である。すなわち、ミコール酸の生合成を阻害できれば、結核菌特異的に効力を有する抗結核薬を見出すことが可能であると考えられた。このような背景から、ミコール酸合成阻害活性を有した化合物の探索を最小発育阻止濃度の測定に加えて実施することで、有望な候補の探索を行った⁴⁾。その結果、ミコール酸合成阻害活性をもつものとして、ニトロイミダゾキサゾール誘導体を見出した。本構造は、ヒトや動物病原菌に対して効力を示すことが知られていたが、変異原性が懸念される構造を有していることより、積極的な展開がされていなかった。われわれは、これらの構造の中でも変異原性を有さない構造に注目することで、最終的に変異原性を懸念することなく展開できる構造への変換に成功した。

また、本構造物の誘導体の MIC 値とミコール酸阻害活性の相関を調べた結果、メトキシ-およびケト-ミコール酸合成阻害活性が、MIC 値とよく相関することがわかった。これらのスクリーニングを経て、最終開発候補化合物として見出された新規抗結核薬が OPC-67683 である (Fig. 1)⁴⁾⁵⁾。

OPC-67683 の抗結核菌活性を、*M. tuberculosis* H37Rv、および H37Rv 株から誘導した各種抗結核薬〔リファンピシン (RFP)、イソニアジド (INH)、エタンブトール (EB)、ストレプトマイシン (SM)、ピラジナミド (PZA)〕耐性結核菌を用い、*in vitro* で最小発育阻止濃度 (MIC 値) を測定した結果、既存薬に交差耐性を示さず、H37Rv 株および各種抗結核薬耐性結核菌に対する MIC 値に差がなかった。この結果は、臨床分離株67株を用いた試験結果においても同様の結果が得られており、約半数の多剤耐性結核菌に対しても、まったく交差することなく、感受性結核菌と同様に 24 ng/ml 以下の MIC 値で試験に供したすべての結核菌の発育を阻止することが確認できた (Fig. 2)。

結核菌は、細胞内に寄生し増殖することが知られており、また既存薬剤の細胞内結核菌に対する効力が十分ではないことなどから、前述したように細胞内結核菌に対する効力を有することが、結核治療薬の1つの大きなプロファイルとして必要であると考えている。OPC-67683 の細胞内結核菌に対する活性を、ヒト単球由来の THP-1 細胞をマクロファージに分化誘導し、結核菌標準株である H37Rv 株を感染させ、効力を測定した結果、4時間という短時間の作用においても強い効力を示すことを確認することができた (Fig. 3)。OPC-67683 を 0.1 μg/mL 作用させたときの効力と、RFP を 3 μg/mL 作用させたときの効力がほぼ同等であった。

WHO が定める結核治療の短期標準療法として、RFP、



OPC-67683 : (R)-2-Methyl-6-nitro-2-[4-[4-(4-trifluoromethoxyphenoxy)piperidin-1-yl]phenoxy)methyl]-2,3-dihydroimidazo [2,1-b] oxazole

Fig 1. Chemical structure of OPC-67683

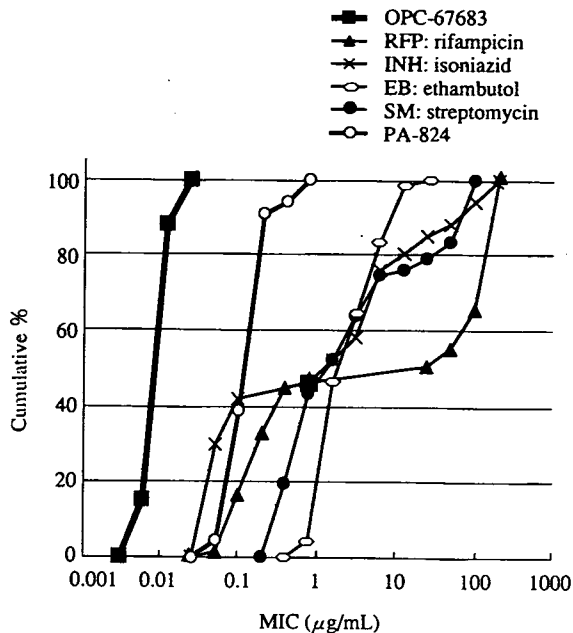


Fig 2. Cumulative % of OPC-67683 and conventional used drugs against clinically isolated strains (67 strains)

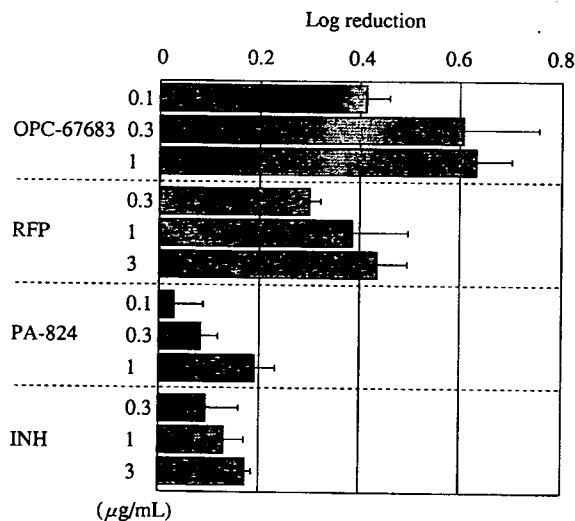


Fig 3. OPC-67683 activities on intracellular TB

INH, EBまたはSM, およびPZAの4剤併用を2カ月投与する強化療法に引き続き, RFPとINHの2剤を4カ月併用する維持療法の6カ月に及び治療が行われている。喀痰中への結核菌の排菌は, 先進諸国では2カ月目において80%以上が陰性化しているにもかかわらず, 長期維持療法が必要とされる。その原因として, 考えられているのは, 代謝・増殖が緩慢になった結核菌, すなわちDormantな結核菌が存在しており, 2カ月間ではこれらの結核菌を叩くことができないことに起因する。従って, Dormant菌に対する効力をもつことが, 短期化学療法に繋がると考えられる。Dormant菌の生態につい

ては, いろいろな説が提唱されているが, 現時点で広く受け入れられている説は, 低酸素状態により誘導されるDormant菌である⁶⁾⁷⁾。結核菌の肺内での病変部位においては, 低酸素状態になっており, その状態で誘導されるDormant菌に対する既存の抗結核薬の効力が不十分であるとの考え方である。われわれは, *in vitro*において低酸素条件を作成することでDormantな結核菌を誘導し, この菌に対するOPC-67683の効力を測定した。その結果, 既存の好気条件で最も強い効力を発揮するINHが, この条件では全く効力を示さないにもかかわらず, OPC-67683は強い効力を示すことが確認された。この結果は, 肺病変内にて低酸素状態で誘導されたDormant菌に対して, OPC-67683が効力を発揮する可能性を示したものであり, 既存薬との併用で短期化の実現ができる可能性を示唆する結果であると考えられた。

次にOPC-67683の治療効果を判断するため, 実験的マウス結核症モデルを用いて評価した。結核菌をマウスに接種すると肺内での増殖は3週目までは増殖を続け, 3週目以降は, 増殖が緩慢になってくる。生体の防御反応と病原体である結核菌との均衡関係が成立した結果であると考えられる。われわれは, ヒト結核症により近いモデルとして, マウスに結核菌を接種後, 4週間放置することで慢性結核症モデルを作製し, OPC-67683および各種抗結核薬(RFP, INH, EB, SM, PZA, および現在Global Alliance for TB Drug Developmentが開発中のPA-824)の1日1回強制経口投与を4週間行い, 投与終了後の肺内生菌数を測定することで, 各薬剤の効力の評価を行った。その結果, OPC-67683が最も低い用量において, 最も強い効力を発揮することが確認できた。また, 結核症の治療は, 耐性菌出現を抑えるため, 単剤での治療を行うことはない。従って, 既存薬剤との併用効果が重要であると考え, 既存薬との併用下での治療効果について, 同実験的マウス結核症モデルを用いて評価した。その結果, RFPおよびPZAとの併用において強い治療効果が確認できることが判明した。これらの結果をもとに, 臨床レジメと同様の治療スケジュールを組み, OPC-67683, RFPおよびPZAの3剤併用レジメと既存の4剤併用レジメを比較した。その結果, OPC-67683を含むレジメでは, Fig. 4に示すように, 3カ月までほぼストレートに結核菌が減少し, 3カ月目で6例中1匹のマウスのみが肺内に結核菌が確認され, 4カ月目にはすべてのマウスにおいて, 肺内結核菌が全く観察されなかった。一方, 標準療法では6カ月目においても5例中4例のマウスにおいて結核菌が観察された。この結果から, OPC-67683を含むレジメでは, 標準療法を少なくとも2カ月以上短期化できる可能性があることがわかった。

以上の評価試験より, OPC-67683は新規作用メカニズ

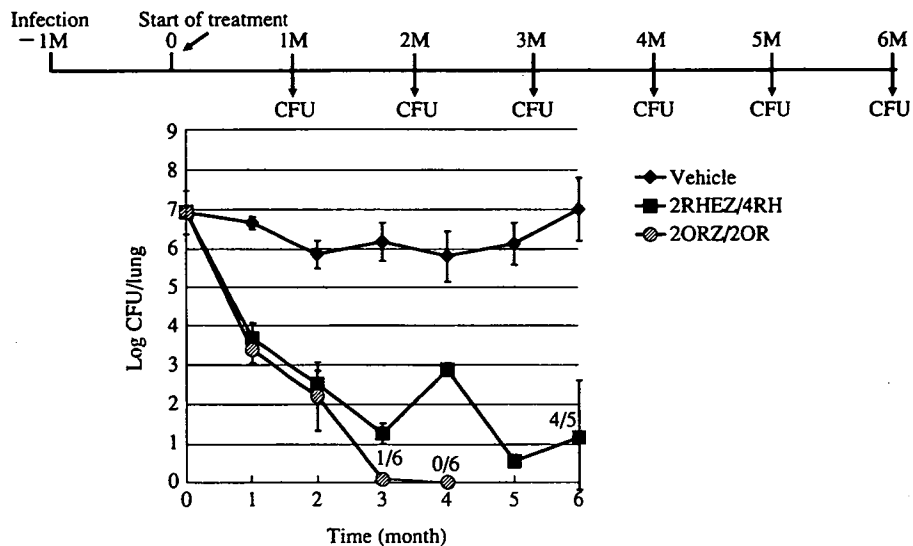


Fig 4. Three-drug combination containing OPC-67683 vs. standard regimen

ムを有する抗結核薬として、現在の6カ月の短期化学療法の期間をより短期化できる可能性、ならびにMDR-TBをはじめとする耐性結核菌に有効な抗結核薬としての可能性が期待できる化合物であると判断することができた。

文 献

- 1) Dye C, Scheele S, Dolin P, et al.: Global burden of tuberculosis: Estimated incidence, prevalence, and mortality by country. JAMA. 1999; 282: 677-686.
- 2) Global Alliance for TB Drug Development, Annual Report. 2002-2003.
- 3) Matsumoto M, Hashizume H, Tsubouchi H, et al.: Screening for novel antituberculosis agents that are effective against multidrug resistant tuberculosis, Curr Top Med Chem. 2007; 7: 499-507.
- 4) Matsumoto M, Hashizume H, Tomoshige T, et al.: OPC-67683, a nitro-Dihydro-imidazooxazole Derivative with promising Action against Tuberculosis in vitro and in mice. PLoS Med. 2006; 3: 2131-2144.
- 5) Sasaki H, Haraguchi Y, Itotani M, et al.: Synthesis and antituberculosis activity of a novel series of optically active 6-nitro-2, 3-dihydroimidazo [2, 1-b] oxazoles. J Med Chem. 2006; 49: 7854-7860.
- 6) Wayne LG, Hayes LG: An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of non-replicating persistence. Infect Immun. 1996; 64: 2062-2069.
- 7) Voskuil MI, Visconti KC, Schoolnik GK: *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy. Tuberculosis. 2004; 84: 218-227.

5. 新しい結核ワクチン開発

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 岡田 全司

1. はじめに

大人(成人)結核に対しては、BCGワクチンは予防効果がないという結論がWHOによって報告された。したがって、成人の結核に対し有効な新しい結核ワクチンの開発が必須である¹⁾²⁾。しかしながら、BCGに代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。われわれはBCGよりもはるかに強力なDNAワクチンやリコ

ンピナントBCGワクチンの開発に成功した(Table, Fig. 1)¹⁾³⁾⁴⁾。新しい抗結核ワクチン開発と臨床応用の可能性についても述べる³⁾⁴⁾⁷⁾。

2. 新しい結核ワクチン開発

(1) BCGワクチンよりきわめて強力な結核予防ワクチン
マウスの実験で現行のBCGワクチンを超えるきわめ

て強力な有効性を確認した。われわれは HSP65 DNA + IL-12 DNA (HVJ-エンベロープベクター) のワクチンが BCG ワクチンよりも強力な結核予防ワクチンであることを世界に先駆けて明らかにした。これらより WHO STOP TB Partnership に選ばれた。

(2) 新しい結核ワクチン

結核ワクチンは、①サブユニットワクチン、② DNA ワクチン、③リコンビナント BCG ワクチン (弱毒化結核菌を含む)、その他に大別される (Table)。

(a) DNA ワクチン

IL-12 の p35 および p40 を CMV プロモーター下流域に挿入した発現プラスミドを作製した。さらに、ヒト型結核菌 H37RV 由来 HSP65 DNA ワクチンの作製に成功し

た (Table, Fig. 1) ⁴⁾。HVJ リポソームをベクターに用いた場合、HSP65 DNA と IL-12 DNA 両者の DNA ワクチンを投与した、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンマウスでは、BCG 東京ワクチンマウスの肺、肝、脾の結核菌数の 100 倍以上の減少が認められた ⁴⁾。このワクチンは結核菌に対するキラー T 細胞分化誘導、IFN- γ 産生細胞分化誘導を介して、BCG ワクチンより強力な結核予防ワクチン効果を発揮することが示されたり ⁴⁾。このワクチンは BCG ワクチンに比較して有意差をもって肝臓および脾臓の結核肉芽腫、病理所見の改善を認めた (granuloma index の改善 ⁴⁾)。

さらにこのワクチンは治療結核ワクチン効果も示した。すなわち結核菌をあらかじめ投与したマウスにおい

Table The development of novel vaccines for *M. tuberculosis*

1. DNA vaccine HVJ-liposome/HSP 65 DNA + IL-12 DNA	more effective than BCG (mouse, guinea pig, cynomolgus monkey)
2. DNA vaccine HVJ-Envelope/HSP 65 DNA + IL-12 DNA	extremely stronger effect than BCG
3. Recombinant BCG vaccine (1) recombinant 72f BCG (2) recombinant (Ag85A + 85B + MPB51) BCG	more effective than BCG (mouse, guinea pig, cynomolgus monkey) more effective than BCG (mouse)
4. Therapeutic vaccine IL-6 related DNA	(mouse)
5. Priming-Booster Method BCG (priming) + Novel vaccine (booster)	(cynomolgus monkey)
6. Novel vaccine (per os) using gene-knock out attenuated <i>Listeria</i>	
7. Novel vectors AAV vector (1000 fold effective expression vector \uparrow), Adenovirus vector	
→ Selected as WHO STOP TB Partnership and WHO STOP TB Vaccines Working Group	

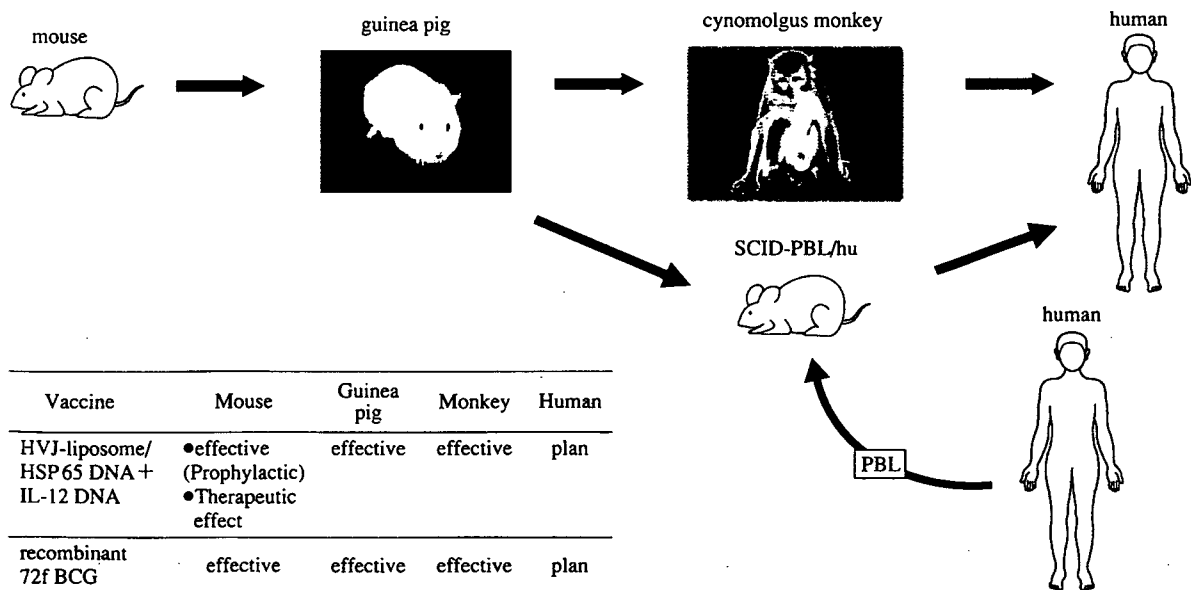


Fig. 1 The development of novel vaccines for *M. tuberculosis* using animal models

てHVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンを3回治療投与すると、コントロール群に比較して有意差をもって肺・肝・脾の結核菌数の減少を認めた。多剤耐性結核菌や超薬剤耐性結核(XDR-TB)に対しても治療ワクチン効果を示した。欧米では治療ワクチンは未開発である。

アデノウイルスベクターに導入したIL-6関連遺伝子(IL-6遺伝子+IL-6レセプター遺伝子+gp130遺伝子)ワクチンも強力な治療ワクチン効果を示した。

(b) リコンビナントBCGワクチン

サブユニットワクチンのMtb72f融合タンパク質のDNAを導入した72fリコンビナントBCGの作製に成功した³⁾。この72f rBCGは、マウス、モルモットの系のみならず、カニクイザルを用いた系でも結核予防ワクチン効果を示した³⁾。

(3) 新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PDL/hu

われわれが世界に先駆けて開発したSCID-PBL/huの系でも、ヒトキラーT分化を介し、結核予防ワクチン効果を示した¹⁾⁵⁾。

3. 結核ワクチンの展望

(1) 新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル(cynomolgus monkey, 最もヒトの肺結核に近いモデル⁶⁾)を用いBCGよりもはるかに強力な予

防ワクチン効果(生存率, 血沈, 体重, 肺の組織)を示すワクチン2種を開発した³⁾。われわれはカニクイザルで結核感染後1年に、コントロール群(生食投与群)では4匹中4匹死亡(0%生存)したが、HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン投与群は、4匹中2匹生存(50%生存)を認め、ワクチン効果をサルレベルで認めた³⁾。すなわち、HVJリポソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNA 予防ワクチン投与による結核感染カニクイザル生存率改善効果を得た。また、血沈改善効果を有意差をもって示した。さらに、このワクチンを投与したカニクイザルでは、コントロール群に依存し有意差($p<0.01$)をもって、HSP65抗原に対し、増殖増強反応を示した。72f融合タンパクサブユニットワクチン、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)は第I相clinical trialとなっている。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HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンがあげられる³⁾⁴⁾⁷⁾。

(2) プライミング-ブースター法(乳幼児BCG-成人HVJ/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン)

さらにBCGワクチンをプライムし、新しいワクチンをブースターする方法を用いた。このプライミング-ブースター法で100%の生存を示した⁷⁾(Fig. 2)。一方、BCGワクチン単独投与群は33%の生存率であった⁷⁾。このように、ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いた実験系で、強力な新しい結核ワクチンをわれわれは

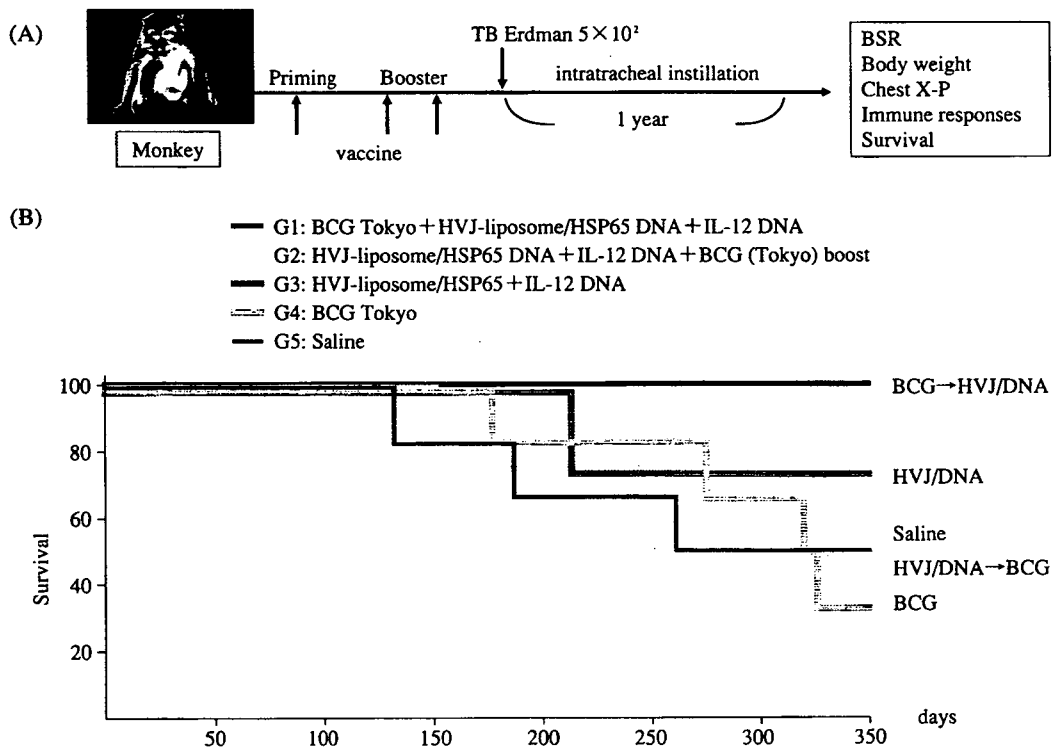


Fig. 2 Protective efficacy of HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA Vaccine

世界に先駆けて開発した。すなわち、本邦では乳幼児にBCG接種が義務づけられていることにより、プライミングワクチンとしてBCGワクチンを用い、成人ワクチン(中学生、成人、老人)として切れ味のするどい、われわれが開発したこのDNAワクチンをブースターワクチンとして用いることにより、強力な新しい結核ワクチンの臨床応用が可能となる案を計画中である。

4. まとめ

われわれはBCGをはるかに凌駕する強力な結核予防ワクチン効果を示す新しいDNAワクチン(HVJ-リポソーム/HSP65+IL-12 DNA, HVJ-エンベロープ/HSP65+IL-12 DNAや、リコンビナント72f BCGワクチン)を開発した。このワクチンは結核菌抗原特異的なキラーT細胞の分化増強効果を示した。このDNAワクチンは治療結核ワクチン効果も示した。

さらに、ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用い、HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンはBCGよりも強力な生存率改善・延命効果を示した。一方、このDNAワクチン投与群はpriming-booster法(BCG-プライム—このDNAワクチンブースト)で100%の生存率を示した。一方、BCGワクチン単独では33%の生存率であった。このワクチンの臨床応用を計画中である。

5. おわりに

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、さらに発展させたい。

ヒト結核感染モデルに最も近いサルにおいては、HSP65 DNA+IL-12 DNA/HVJ-エンベロープワクチンが明らかにすぐれていることより、このワクチンが結核の発症予防や治療に役立つ日が来るであろう。

(共同研究者:当臨床研究センター 喜多, 井上, 坂谷,

各博士, 金丸, 橋元, 西田, 仲谷, 高尾, 浅井, 栖原, 岸上, 各研究員, P. Saunderson博士, R. Gelber博士, B. Tan博士, 中島俊洋博士, 吉田栄人博士, 松本真博士, 金田安史博士, D. McMurray博士, 厚生労働科学研究費の支援による)

文 献

- 1) 岡田全司: 厚生労働科学研究費補助金実績報告書 研究報告書, “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: [結核ワクチン]”. 2004, 1-140.
- 2) 岡田全司: 結核ワクチン. 「結核」第4版, 医学書院, 東京, 2006, 50-58.
- 3) Kita Y, Kanamaru N, Okada M, et al.: Novel recombinant BCG- and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine*. 2005; 23: 2269-2272.
- 4) Yoshida S, Kita Y, Okada M, 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: 1191-1204.
- 5) Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, et al.: The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. *Vaccine*. 2005; 23: 2269-2272.
- 6) 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: 430-436.
- 7) Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine*. 2007; 25: 2990-2993.

RECENT PROGRESS IN MYCOBACTERIOLOGY

Chairpersons: ¹Masaji OKADA and ²Kazuo KOBAYASHI

Abstract *Mycobacterium tuberculosis* is one of the most successful bacterial parasites of humans, infecting over one-third of the population of the world as latent infection without clinical manifestations. Over 8.8 million new cases and nearly 2 million deaths by tuberculosis (TB) occur annually. TB poses a significant health threat to the world population. The goal of this symposium is to open new avenues for combating tuberculosis. The speakers have presented their data and provided control strategies against tuberculosis and pulmonary disease due to *M. avium* complex (MAC) from aspects of molecular epidemiology, pathogenesis, serodiagnosis, new anti-TB drugs, and vaccine development.

Drs. Maeda and Murase have reported that the 12-locus VNTR analysis is very useful for molecular epidemiology of *M. tuberculosis* strains isolated in Japan better than IS6110-RFLP and suggested that the analysis is powerful tool for the molecular epidemiology.

Drs. Matsumoto and Kobayashi have discovered a protein, mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1), overproduced in dormant *M. tuberculosis* that plays key roles in latent/persistent infection, disease progression, and host protection. They have concluded that MDP1 may be a possible target for anti-tuberculosis drugs and vaccines.

Drs. Kitada and Maekura have developed serodiagnosis of MAC disease based on enzyme immunoassay (EIA) by detecting anti-glycopeptidolipid (GPL) antibody in sera of human patients. GPL is specific for MAC. The EIA is a simple, rapid and accurate measure with high sensitivity and specificity. The levels of antibody also reflect disease activity. A large-scale clinical multicenter study is currently in progress.

Dr. Makoto Matsumoto has discovered an innovative new anti-TB drug, OPC-67683 that is a derivative of nitroimidazole compounds. OPC-67683 inhibited mycolic acid synthesis and exerted potent antimycobacterial activity, including multidrug-resistant *M. tuberculosis*. Multidrug therapy using OPC-67683 could also shorten the course of chemotherapy. The drug is clearly the most promising new anti-TB agent that has been identified in many years.

Dr. Okada has presented the vaccine candidates for TB, such as HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA and HVJ-envelope/HSP65 DNA + IL-12 DNA. The candidates exhibited an excellent protective efficacy in mice compared to current BCG vaccine, and improved histopathologic lesions induced by *M. tuberculosis* infection. The candidates also exerted the therapeutic effect in mice against both drug-susceptible TB and extensively drug-resistant TB. Using the cynomolgus monkey model (similar to human TB), HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA provided higher protective effica-

cy than BCG assessed by mortality. The combination of BCG and HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA by the prime-booster procedure could lead to a synergistic effect of 100% survival in infected monkeys. These data suggest that the novel DNA vaccine is a possible candidate for human clinical trials.

This symposium has highlighted new advances in our understanding of molecular epidemiology and pathogenesis of "Mycobacteriology" and development of new serodiagnostics, anti-TB drugs, and vaccines.

1. The establishment of the quick genotyping method for TB in Japan using the variable numbers of tandem repeats (VNTR): Shinji MAEDA, Yoshiro MURASE (Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association)

The 12-locus VNTR analysis that we have established optimally for *Mycobacterium tuberculosis* in Japan was superior to the proposed 15-locus VNTR method in European countries. The discriminatory power of our system was also higher than that of IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis. In future, we will investigate the stability of copy number in each locus by using the strains that suspected epidemiological links in contact investigations.

2. A virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*, which contributes to persistent infection, reactivation, and host protection: Sohkiichi MATSUMOTO (Department of Host Defense, Osaka City University Graduate School of Medicine), Kazuo KOBAYASHI (Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases)

Majority of adult tuberculosis is caused by reactivation of previously implanted *Mycobacterium tuberculosis*. During latent infection, some bacilli are in dormant state, which confers some survival advantage to not only bacteria but also the host. We presented that a protein overproduced in dormant *M. tuberculosis* plays key roles in persistent infection, disease progression, and host protection. We also presented utility of this protein, such as development of anti-tuberculosis drug and vaccine.

3. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease by enzyme immunoassay using glycopeptidolipid antigen: Seigo KITADA, Ryoji MAEKURA (Department of Internal Medicine, National Hospital Organization National Toneyama Hospital)

The diagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease (MAC-PD) and/or its discrimination from pulmonary tuberculosis is sometimes complicated and time consuming.

We have developed serological test by enzyme immunoassay that detect serum antibody to glycopeptidolipid antigen. The serodiagnosis is useful for the rapid diagnosis of MAC-PD and differential diagnosis from pulmonary TB. The antibody levels reflected the disease activity including radiographic severity.

4. A novel antituberculous agent, OPC-67683: Research and development: Makoto MATSUMOTO (Microbiological Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.)

We initiated a program to screen new antituberculous agents that have potential to shorten the total duration of treatment, provide improved efficacy against MDR-TB, be useful in treating HIV co-infected patients, and target latent TB infections. Our efforts led to the discovery of OPC-67683, a novel oxazo-imidazole derivative with a distinctive characteristic as a subclass mycolic acid inhibitor. Our evaluation studies confirmed OPC-67683 to possess potent *in vitro* and *in vivo* antituberculous activity, suggesting potential usefulness in alleviating the current TB problems.

5. The development of novel vaccines against *M. tuberculosis*: Masaji OKADA (Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center)

We have developed a novel tuberculosis (TB) vaccine (HVJ-liposome/ or HVJ-envelope/HSP65 DNA + IL-12 DNA). The

vaccine provided remarkable protective efficacy in mouse compared to BCG vaccine, and improved the histopathological tuberculosis lesions. This vaccine also exerted therapeutic effect *in vivo* against XDR-TB as well as drug-sensitive TB in mice.

Furthermore, by using the cynomolgus monkey (similar to human tuberculosis), this novel vaccine provided higher protective efficacy (mortality) than BCG mortality. 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 TB for human clinical trials.

Key words: Molecular epidemiology, Latent infection with mycobacteria, Serodiagnosis, Novel anti-tuberculous chemotherapeutic agents, Vaccine development

¹Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, ²Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases

Correspondence to: Kazuo Kobayashi, Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640 Japan.
(E-mail: kobayak@nih.go.jp)

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との比較 —

¹吉田志緒美 ¹鈴木 克洋 ¹露口 一成 ¹岡田 全司
²坂谷 光則

要旨：〔目的〕多剤耐性結核菌株と全剤感受性結核菌株の分子疫学的解析。〔対象〕国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにて分離、同定された多剤耐性結核菌109株（MDR-TB群）と、全剤感受性結核菌226株（S-TB群）。〔方法〕IS 6110を用いたRFLP法およびSpoligotyping法。〔結果〕RFLP法の結果、クラスター形成率はMDR-TB群、S-TB群ともに約43%を占め有意差は認められなかった（ χ^2 検定 $p=0.51>0.05$ ）。Spoligotyping法の結果、Beijing familyはMDR-TB群で77.1%（84株）、S-TB群で84.5%（191株）認め、有意な差はなかった（ χ^2 検定 $p=0.09>0.05$ ）。〔結論〕MDR-TB群とS-TB群では、RFLPクラスター形成率、Spoligotyping法におけるBeijing familyの占める割合はほぼ同程度に認められ、両群の感染伝播力に大きな差がない可能性が支持された。

キーワード：結核菌、RFLP法、Spoligotyping法、多剤耐性、全剤感受性

はじめに

近年結核の感染状況を把握するために、様々な方法による分子疫学的解析が行われてきた。現在、菌株の識別能が高く多型性に富んだ方法として、結核菌染色体上の比較的安定した挿入配列IS 6110をプローブとしたRestriction fragment length polymorphism (RFLP)法が世界的に標準化されている¹⁾²⁾。しかし、IS 6110コピー数が1～5本以下の菌株では識別能が低いことと、煩雑な手技と大量のDNAが必要となる欠点から、より簡便かつ短時間で解析可能な別の遺伝子マーカーによる二次的型別が必要になってくる。Spacer oligonucleotide typing (Spoligotyping)法はRFLP法の二次的解析のひとつとして³⁾、アジアを中心として広汎に分布し強い感染伝播力を有したBeijing familyの鑑別が可能であり、広範囲の感染状況の解明に有益である。これらRFLP法とSpoligotyping法を用いて結核菌を分子疫学的に解明した報告は多いが^{4)～8)}、結核菌を多剤耐性結核菌（MDR-TB）群と全剤感受性結核菌（S-TB）群とに分類した比較検討は報告されておらず、単独薬剤耐性菌（isoniazid (INH),

streptomycin (SM))についての検討がなされているのみである⁹⁾。また従来感染伝播力が低いといわれてきたMDR-TBによる集団感染事例が近年報告されている¹⁰⁾。したがって今回、RFLP法、Spoligotyping法を用いて、当センターにおいて分離、同定された結核菌を対象に、薬剤感受性の違いによるクラスター形成率とBeijing familyの割合の比較を試みた。

方 法

〔対象〕

2001年1月1日から2005年12月31日の期間、独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センターにて分離、同定された結核菌2827株中、下記の方法で示した2種類の薬剤感受性試験で少なくともINHとrifampicin (RFP)に対して耐性を示した多剤耐性結核菌109株をMDR-TB群とした（3.9%）。そのうちINH、RFPのみに耐性を示した株は4株（すべてのMDR-TBに占める割合は3.7%）であった。またethambutol (EB)を加えた3薬剤に耐性を示した株は61株（56%）、pyrazinamide (PZA)を加えた4薬剤に耐性を示した株は1株（0.9%）、SM

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター¹臨床研究センター、²内科

連絡先：吉田志緒美，独立行政法人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，〒591-8555 大阪府堺市北区長曾根町1180 (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)
(Received 16 Nov. 2006/Accepted 28 Feb. 2007)

を加えた5薬剤に耐性を示した株は2株(1.8%)であり、残りの41株(37.6%)は上記5薬剤に加えて二次抗結核薬のいずれかに対しても耐性を示していた。また世界保健機関(WHO)は2006年11月に招集したExtensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB) 専門委員会においてINHとRFPだけでなく特定のSecond-line drugs(少なくともfluoroquinoloneの中の1種と、注射薬のcapreomycin, kanamycin, amikacinの中の1種)にも耐性をもつ結核菌をXDR-TBと定義しているが¹⁾、今回35株(MDR-TBの32.1%)に認められた。

MDR-TB群と比較するために必要な相当数の全剤感受性結核菌として2003年1月1日から8月31日の一定期間、当センターにて分離、同定された226株をS-TB群とした。

性別はMDR-TB群では男性81名(74.3%)、女性28名(25.7%)であり、S-TB群では男性163名(72.1%)、女性63名(27.9%)であった。平均年齢は、MDR-TB群では55.5±15.6歳、S-TB群では57.2±19.2歳であった。

治療歴は、MDR-TB群では初回治療37名(33.9%)、再治療72名(66.1%)であり、またXDR-TB患者のうち7名(XDR-TBの20%)は初回治療例であった。S-TB群では初回治療190名(84.1%)、再治療36名(15.9%)であった。

当センターは大阪府堺市に属しており、今回対象とした335菌株由来の患者の居住地は当センター周辺の堺市を中心とした大阪湾沿岸の泉州地域から和歌山県北部までの比較的広範囲にまたがる地域であった。また結核罹患率の高い大阪市西成区および浪速区からの患者はMDR-TB群で1名(0.9%)、S-TB群で22名(9.7%)であった。外国籍をもつ患者はMDR-TBで4名(3.7%)認められ、すべて中国籍であったが、S-TB群に外国籍をもつ患者は認められなかった。すべての患者の疫学調査は初診時の聞き取り調査用紙に基づいて行った。発症状況から明らかに家族内感染と思われる事例はMDR-TB群では認められず、S-TB群で4事例(構成員各2名)認められた。集団感染と思われる事例はMDR-TB群で3事例(構成員5名、3名、2名)認められたが、S-TB群での事例はなかった。すべての患者間での地域内感染と見られる事例は認められなかった。

〔方法〕

同定

菌株の同定は結核菌群同定用アキュプロープ結核菌群同定キット(極東製薬)と結核菌群同定試薬キャピリアTB(日本ベクトン・ディッキンソン)で行った。

薬剤感受性試験

薬剤感受性試験にはバクテックMGIT 960結核菌薬剤感受性試験用ミジットシリーズ(MGIT-AST法:日本ベ

クトン・ディッキンソン)と結核菌感受性ビットスペクトル-SR法(極東製薬)を用いた。PZAの薬剤感受性試験は結核菌感受性試験PZA液体培地法(極東製薬)を用いた。耐性の判定基準濃度はMGIT-AST法でINH 0.1 µg/ml, RFP 1.0 µg/ml, EB 5.0 µg/ml, SM 1.0 µg/mlとし、ビットスペクトル-SR法でINH 0.2 µg/ml, RFP 40 µg/ml, EB 2.5 µg/ml, SM 10 µg/mlとした。PZAは400 µg/mlとした。

RFLP法

van Embdenらの方法²⁾に準拠して行った。結核菌からのDNA抽出には0.1 mmのガラスビーズを用いて、Beads-beaterによるフェノールクロロホルム・インプロパノール処理を行った。得られたゲノムを制限酵素Pvu II(TAKARA BIO)で消化、電気泳動後サザンブロッティングを行い、IS6110をプローブとして、ハイブリダイゼーションさせ、ジゴキシゲニン発色でIS6110のバンドを検出した。バンドの解析にはMolecular Analyst Software(Bio-Rad)のDouble gel analysis法を用い、各々のレーンごとの補正として、λ/Hind IIIとφX174/Hae IIIの2種類のマーカーを使用した。メンブレン間の補正はH37Rvを標準株として用いた。

Spoligotyping法

結核菌DNAのSpacer配列を、directly repeated sequence(DR)のもとにデザインされた2種類のプライマー(ピオチン標識)を用いてpolymerase chain reaction(PCR)にて増幅し、43の合成オリゴヌクレオチドを固相化したメンブレン(Isogen Bioscience BV)に、Immunetics社のMiniblotter 45を用いてハイブリダイズさせた³⁾。パターンを検出にはECL発色システムを用いて個々のSpacer配列の有無を解析した。

結 果

RFLP法

IS6110コピー数は全対象結核菌335株において1~25本の分布を示し、11本にピークを認めた。そのうちMDR-TB群では9~25本のコピー数が認められ、10本にピークを認めた。一方S-TB群では1~20本の間に分布し、ピークは13本に認められ、両群ともに多型性が認められた。またコピー数5本以下の菌株はS-TB群にのみ3株(コピー数1, 3, 4本)認められた(Fig. 1, 2)。同一のバンドパターンを示すクラスターはMDR-TB群では12種類(47株)、S-TB群は20種類(99株)が認められた。クラスターの大きさ(構成員数)はMDR-TB群で2~11を示し、構成員11名のクラスターaグループと、構成員7名のクラスターeグループには両グループ内での患者の間に疫学的関連はなかった。一方S-TB群では2~16を示し、構成員6名が2つ、8名が2つ、

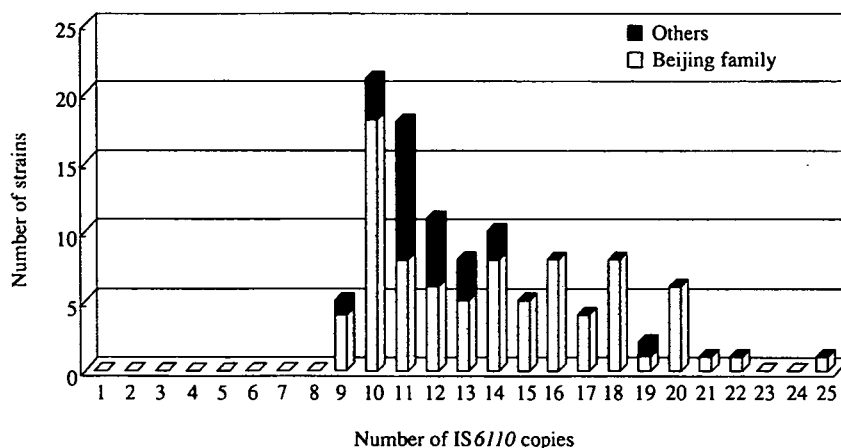


Fig. 1 Distribution by number of IS6110 copies: multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains

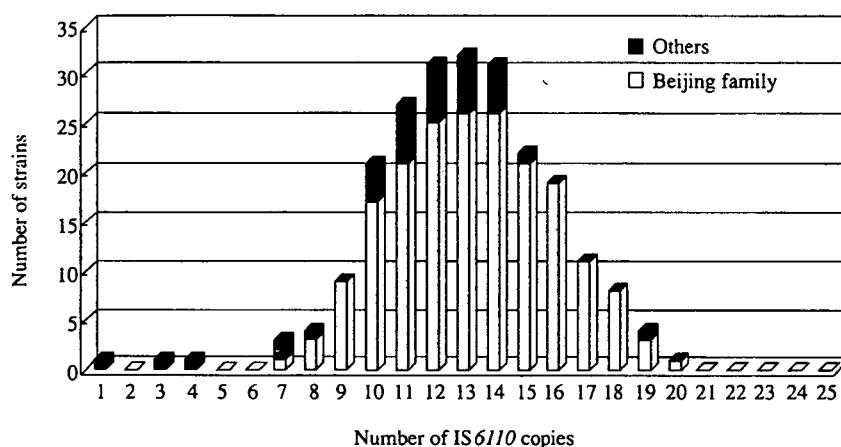


Fig. 2 Distribution by number of IS6110 copies: susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains

9名が1つ、14名、16名が各1つであった。家族内感染は構成員3名のtグループで2名、6名のaグループで2名、14名のcグループで2名、16名のfグループで2名に認められた (Table 2)。

クラスター形成率はMDR-TB群で43.1%、S-TB群は43.8%、全体で43.6%を示した (Table 1)。そのうち、MDR-TB群クラスターのパターンaはS-TB群クラスターのパターンaと同じパターンを示し、MDR-TB群クラスターのパターンiはS-TB群クラスターのパターンiと同じパターンを示した (Table 2)。

西成区および浪速区に居住地をもつ患者由来の22株 (S-TB群) のうち6株が5種類のクラスターに属し、残り16株はクラスターを形成しなかった。

外国籍をもつ患者由来のMDR-TB群に属する4株はクラスターを形成しなかった。

Spoligotyping法

今回われわれは、Spacer配列1~34の発色を認めない Beijing familyの占める割合を求めるにあたって、35~

43配列を有する典型的な Beijing型に加え、Mokrousovら¹²⁾の定義による Beijing型のパターンに類似した Beijing-likeも Beijing familyとして全株を分類した。その結果、Beijing familyはMDR-TB群で84株 (77.1%)、S-TB群では191株 (84.5%)、全体で275株 (82.1%)を占めた。一方 Beijing family以外の遺伝子型をもつ株で International Spoligotyping database SpolIDB3分類¹³⁾に示される familyに分類された株はMDR-TB群の25株中13株と、S-TB群35株中の24株と判定された。それ以外の24株 (MDR-TB群12株、S-TB群12株)は SpolIDB3の family definitionに分類されない Unique株と判定された (Table 1)。また Uniqueパターンを示した株の中に IS6110コピー数5本以下を示したS-TB群の3株が含まれていた (Table 3)。

RFLP法でクラスター形成を認めた Beijing familyはMDR-TB群で35株 (32.1%)、S-TB群で86株 (38.1%)であった。一方 Beijing family以外のクラスター形成グループとしてMDR-TB群ではLAM1 (Latin American and Mediterranean) familyのbグループ (7株)、T2 family

Table 1 Comparison of MDR-TB and S-TB by RFLP and Spoligotyping

		Cluster	Others	Total	Cluster %
RFLP	MDR-TB	47	62	109	43.1
	S-TB	99	127	226	43.8
	Total	146	189	335	43.6
		Beijing family*	Others	Total	Beijing %
Spoligotyping	MDR-TB	84	25	109	77.1
	S-TB	191	35	226	84.5
	Total	275	60	335	82.1
		Class**	Unique	Total	
Non-Beijing family	MDR-TB	13	12	25	
	S-TB	24	12	35	
	Total	37	24	60	

* ancient Beijing strains and Beijing-like spoligoprofiles

** major classes of *M. tuberculosis* in SpolDB3

Table 2 DNA fingerprinting results for MDR-TB and S-TB isolates by RFLP and Spoligotyping

MDR-TB				S-TB							
Strains	cluster	Strains	cluster	Strains	cluster	Strains	cluster	Strains	cluster	Strains	cluster
1010016	a*	2011505	f*	3070599	a*	3080908	e ^{T1}	3080070	g*	3080951	m
1011097	a*	1100583	f*	3030861	a*	3070182	e ^{T1}	3081137	g*	3070657	m
1051148	a*	3040439	f*	3110253	a*	3070919	e ^{T1}	3030853	g*	3070044	n*
1020193	a*	2050419	g*	3020215	a*	3080723	e ^{T1}	3020287	g*	3070658	n*
2070344	a*	3060933	g*	3010525	a*	3010626	e ^{T1}	3070708	g*	3020048	o*
2010894	a*	1012035	g*	3010925	a*	3010007	e ^{T1}	3011132	g*	3020024	o*
3070308	a*	1040969	h*	3071163	b*	3030100	e ^{T1}	3010820	g*	3020124	p*
2100456	a*	2020438	h*	3080532	b*	3030834	e ^{T1}	3020779	g*	3010501	p*
1010518	a*	1070653	i*	3070045	c*	3020017	e ^{T1}	2100603	h*	3080765	p*
1060866	a*	3060032	i*	3070400	c*	2120831	f*	2100985	h*	3031049	p*
2071004	a*	2100509	j ^{T2}	3070543	c*	2060904	f*	3070421	h*	3080540	q
2101128	b**	3071249	j ^{T2}	3080792	c*	3071093	f*	3070878	h*	3030993	q
3020418	b**	2011515	j ^{T2}	3022013	c*	3090992	f*	3080597	h*	3010419	r*
2060497	b**	1011111	k ^{T1}	3022069	c*	3070512	f*	3080475	h*	3010785	r*
3030886	b**	2020473	k ^{T1}	3030607	c*	3070215	f*	3030726	h*	3010395	r*
3020454	b**	2011505	l*	3071172	c*	3080936	f*	3030794	h*	4010937	s*
3010929	b**	2060287	l*	3070737	c*	3030206	f*	2110964	i*	3110253	s*
2011514	b**			3031018	c*	3040093	f*	3070025	i*	3030039	s*
3050944	c*			3030796	c*	3040033	f*	3071118	i*	2061106	t*
3020288	c*			3020810	c*	3030165	f*	3070116	j*	3100905	t*
2091054	c*			3031022	c*	3020391	f*	3010231	j*	3080817	t*
1070018	d*			3030837	c*	3010178	f*	3030083	k*		
1080214	d*			3030316	d*	3020757	f*	3030553	k*		
2060548	e*			3070021	d*	3010746	f*	3090365	l*		
2060510	e*					4011101	f*	3030634	l*		
2060423	e*							3070977	l*		
3060080	e*							3081099	l*		
3060868	e*							3030156	l*		
3060247	e*							3020920	l*		
1030685	e*										

*Beijing family

**LAM1 family

^{T1}T1 family^{T2}T2 familySuperscript letters: classes of *Mycobacterium tuberculosis* excerpted from SpolDB3

The a pattern in MDR-TB was similar of the a pattern in S-TB by RFLP.

The i pattern in MDR-TB was also similar of the i pattern in S-TB by RFLP.

していた沖縄県での報告¹⁶⁾や、大島らの1~17本の分布で10と12本にピークが見られた岡山県の報告¹⁷⁾と同様の分布状況であった。したがって当センター周辺地域と他の地域での結核菌感染伝播に大きな違いは見られなとと考えられた。

クラスター形成率は最近の感染からの発病を反映しているという定義が分子疫学を応用した感染対策の原則である。オランダ(1995年)、デンマーク(1998年)でのクラスター形成率は46.0%(結核罹患率:人口10万対10.4)、50.0%(10万対9.6)と報告されており¹⁸⁾、結核の低蔓延地域(10万対10未満)では比較的高いクラスター形成率を形成するものと考えられている。一方ニューヨークにおける1989年の結核罹患率は10万対36(全米平均は10万対9.2)となっているにもかかわらず、Allandら¹⁹⁾の1989~1991年での報告によるとクラスター形成率は37.5%であった。わが国では、阿野ら²⁰⁾の2001年の報告で大阪中南部地域のクラスター形成率は32.0%で中蔓延地域であるとしている。財団法人結核予防会から出版されている「結核の統計2002」²¹⁾によると2001年の大阪府における結核罹患率51.9は、全国平均の27.9より高値であった。したがって、大都市では地方に比べると結核罹患率が高いという地域間格差が見られ、また高いクラスター形成率が都市部における最近の感染状況を示唆していると考えられている。

今回の検討によるクラスター形成率は43.6%であった。そこで当センター周辺地域の結核罹患率を推定するために、まず西成区および浪速区に居住する患者由来菌株22株の対象菌株に占める割合は低い値を示していたこと(9.7%)から、大阪府の罹患率を今回の当センター周辺地域の罹患率と仮定した。結核罹患率は年度ごとに変動があるため、長期にわたって集められたMDR-TB群のサンプリング期間の中央値であり、S-TB群のサンプリング期間である2003年のデータを用いた。「結核の統計2004」²²⁾によると大阪府の2003年の結核罹患率は人口10万対44.0であり、全国平均(10万対24.8)よりも高かった。したがって当センター周辺地域は世界の高蔓延地域に比べると低い中蔓延地域ではあるが、ニューヨーク¹⁹⁾や大阪中南部²⁰⁾で示されたのと同様に、都市における比較的最近の感染発病を反映していると考えられた。

高鳥毛ら²³⁾は1996年から2000年までに結核高蔓延地域(西成区および浪速区)を含む大阪市内在住患者によるRFLP法を実施した結果、高蔓延地域と他の地域とでクラスター形成率は差が見られなかったとしている。そこで彼らはクラスター形成率と地域の罹患率水準の間には相関がなく、高結核罹患率は最近の感染伝播によるものではなく古い感染の内因性再燃発病による可能性が高

いと述べている。今回の検討から比較的高いクラスター形成率と高蔓延地域とはいいがたい結核罹患率が示され、クラスター形成率と結核罹患率との間に関連性が見られないという高鳥毛らの考えが支持できた。

しかし、結核においては「クラスター形成率=最近の感染の反映」とは必ずしもいえないという報告がBradenら²⁴⁾による米国アーカンソー州での地域結核分子疫学的研究で示されている。それによると33%の患者がクラスターを形成していたが、疫学的関連が確認されたのはそのうちの42%にすぎなかったとしている。高橋ら¹⁶⁾も沖縄県における地域流行株の存在を示唆している。今回、疫学的関連性が認められた事例は家族内感染の4事例(S-TB群)と集団感染と思われる事例の3事例(MDR-TB群)のみであり、疫学的につながりがないと思われる感染がほとんどであった。同様にクラスターの大きさ(構成員数)はMDR-TB群とS-TB群とで同程度に認められ、両群ともに構成員の大きいクラスターグループが存在していたが、多くの患者間での相互接触関係が証明されなかった。構成員数が大きいグループの中で疫学的関連が低い場合には幾世代か前の流行を反映する地域特有な株と推定されることから¹⁶⁾、過去に起きた流行株による内因性再燃発病によるものと考えられている。しかし最近に起こった患者間の偶発的な伝播による感染発病もありうることから、このような場合、患者に対して綿密な接触調査を実施することが必要となってくる。当センターのような広範囲な地域から結核症患者を受け入れる医療機関においては、患者情報を管轄する保健所が多岐にわたってしまい、個人のプライバシーの保護のうえからも患者情報の詳細な把握は非常に困難である。したがって現時点での解析結果からは、感染伝播力の強い結核菌による最近の感染発病と、地域的に流行している菌による内因性再燃発病の両方が混在して、クラスターを形成している可能性が考えられた。

MDR-TB群とS-TB群との間のクラスター形成率に有意差は認められなかった。従来薬剤耐性結核菌の感染伝播力は弱いとされてきたが⁹⁾²⁵⁾、近年、阿野ら²⁰⁾は大阪中南部地域を対象としたRFLP法の結果、薬剤感受性患者群とINH、RFP、EB、SMいずれかの薬剤に耐性の患者群とのクラスター形成率に有意差はなかったと報告している。われわれもMDR-TBの感染伝播力が必ずしも弱いとはいえないことを示すMDR-TBによる集団感染事例¹⁰⁾を報告している。したがって結核菌の感染伝播力は薬剤感受性に関係しないとの考えを今回支持できたことは意義があると考えられた。

MDR-TB群とS-TB群で共通のパターンを示すクラスターが2組認められた。すなわち感染伝播力の強い感受性菌が感染伝播力を保ちながら多剤耐性化し流行した可

能性と、全剤感受性の流行株が不適切な治療で多剤耐性化（獲得耐性）してクラスターを形成した可能性が、両群における共通パターンの存在から示唆された。

Spoligotyping 法

今回の検討では MDR-TB 群、S-TB 群ともに Beijing family が約 75% 以上を占め、両群に有意差は認められなかった。また RFLP 法でクラスターを形成したグループは大部分が Beijing family に属していた (Table 2)。Beijing family は感染伝播力が強く、薬剤耐性を獲得しやすいとされており^{6), 26)}、今回両群が同じ割合で Beijing family に属していたことは、薬剤感受性の違いによる結核菌の感染伝播力に差はない可能性をさらに支持する結果と考えられる。

RFLP 法と Spoligotyping 法のクラスターから推定した最近の結核感染発病率は、今回全対象結核菌 336 株において、大角ら¹⁵⁾が報告している 30.0% とほぼ同程度の 34.0% を示し、MDR-TB 群においては 32.1%、S-TB 群においては 35.0% であった。したがって最近における感染発病率も薬剤感受性に左右されない可能性が支持された。

ま と め

薬剤感受性の違いによる結核菌の感染伝播力の違いについて、遺伝子学的手法を用いた分子疫学的解析を行った結果、RFLP 法では MDR-TB と S-TB 群の間のクラスター形成率に有意差はなく (χ^2 検定 $p=0.51 > 0.05$)、Spoligotyping 法でも両群間の Beijing family の占める割合に有意差がないことを証明できた (χ^2 検定 $p=0.09 > 0.05$)。今回のデータは当センター周辺地域における結核対策の活動に役立つ基礎的データとして有用であると考えられた。

文 献

- 1) van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, et al.: Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 2578-2586.
- 2) van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al.: Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 406-409.
- 3) Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al.: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 907-914.
- 4) Cowan LS, Crawford JT.: Genotype analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a sentinel surveillance population. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 1294-1302.
- 5) Toungousova OS, Mariandyshev A, Bjune G, et al.: Molecular epidemiology and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the archangel prison in Russia: predominance of the W-Beijing clone family. *Clin Infect Dis.* 2003; 37: 665-672.
- 6) Diaz R, Kremer K, de Haas PEW, et al.: Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994-June 1995: utility of Spoligotyping versus IS 6110 restriction fragment length polymorphism. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 2: 743-750.
- 7) Kubica T, Rüscher-Gerdes S, Niemann S.: The Beijing genotype is emerging among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Germany. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004; 8: 1107-1113.
- 8) Krüüner A, Hoffner SE, Sillastu H, et al.: Spread of drug-resistant pulmonary tuberculosis in Estonia. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3339-3345.
- 9) van Soolingen D, Borgdorff MW, de Haas PEW, et al.: Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis.* 1999; 180: 726-736.
- 10) 露口一成: 外来性再感染も含む多剤耐性結核菌による院内集団感染事例について. 複十字. 2003; 293: 8-11.
- 11) WHO: Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): recommendation for prevention and control. *Wkly Epidemiol Rec.* 2006; 45: 430-432.
- 12) Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, et al.: Analysis of the allelic diversity of the Mycobacterial interspersed repetitive units in *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 2438-2444.
- 13) Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, et al.: Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 1347-1349.
- 14) Goguet de la Salmonière YO, Li HM, Torrea G, et al.: Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 2210-2214.
- 15) 大角晃弘, 高橋光良, 内村和広, 他: 結核菌 DNA 指紋法を用いた結核対策改善事業成績 (1996年4月~2004年5月の概略). 資料と展望. 2004; 51: 77-83.
- 16) 高橋光良: 結核分子疫学の成果と展望. 結核. 2002; 77: 741-752.
- 17) 大島律子, 多田敦彦: 岡山県内で分離された結核菌 DNA の IS 6110-RFLP パターン分析. 結核. 2002; 77: 629-637.
- 18) Bauer J, Yang Z, Poulsen S, et al.: Results from 5 years of nationwide DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in a country with a low incidence of *M. tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 305-308.
- 19) Alland D, Kalkut GE, Moss AR, et al.: Transmission of tuberculosis in New York City—An analysis by DNA

- fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med.* 1994 ; 330 : 1710-1716.
- 20) 阿野裕美, 森山和郎, 松本智成, 他: RFLP分析に基づく, 結核感染状況の疫学的検討—当院医療圏である大阪中南部地域の場合—. *結核.* 2002 ; 77 : 783-788.
- 21) 厚生労働省健康局結核感染症課監修: 「結核の統計2002」. 結核予防会, 東京, 2002, 4.
- 22) 厚生労働省健康局結核感染症課監修: 「結核の統計2004」. 結核予防会, 東京, 2004, 4.
- 23) 高鳥毛敏雄: 社会経済弱者における結核対策の強化に関する研究. 厚生科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「再興感染症としての結核対策確立のための研究」平成14年度分担研究報告. 2003 ; 49-213.
- 24) Braden CR, Templeton GL, Cave MD, et al.: Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *J Infect Dis.* 1997 ; 175 : 1446-1452.
- 25) Middlebrook G: Diagnosis and biological problems of isoniazid-resistant tubercle bacilli. *Bull IUATLD.* 1956 ; 26 : 179-205.
- 26) Niemann S, Rüsche-Gerdes S, Richter E: IS 6110 fingerprinting of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Germany during 1995. *J Clin Microbiol.* 1997 ; 35 : 3015-3020.

————— Original Article —————

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
— Comparison between Multidrug-Resistant Strains and Susceptible Strains —

¹Shiomi YOSHIDA, ¹Katsuhiro SUZUKI, ¹Kazunari TSUYUGUCHI, ¹Masaji OKADA,
and ²Mitsunori SAKATANI

Abstract [Purpose] Comparing multidrug-resistant *M. tuberculosis* strains with susceptible strains by molecular epidemiological methods.

[Methods] We examined 109 multidrug-resistant strains (MDR-TB) and 226 susceptible strains (S-TB) derived from National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center by restriction fragment length polymorphism (RFLP) with IS6110, and Spacer oligonucleotide typing (Spoligotyping).

[Results] In the case of MDR-TB, 47 strains (43.1%) belonged to 12 descriptions of clusters and the number of IS6110 copies per isolate ranged from 9 to 25. Similarly, 99 strains (43.8%) belonged to 20 descriptions of clusters in S-TB and the distribution of IS6110 copies were from 1 to 20. On the other hand, 84 strains of MDR-TB (77.1%) and 191 strains of S-TB (84.5%) belonged to Beijing family by Spoligotyping.

[Conclusion] MDR and susceptible *M. tuberculosis* strains were characterized similarities in ratio of clusters by RFLP patterns and high proportion of Beijing family by Spoligotyping. These finding supported the possibility that infectiousness of MDR-TB might be similar to that of S-TB.

Key words : *M. tuberculosis*, IS6110-RFLP, Spoligotyping, Multidrug-resistant, Susceptible

¹Clinical Research Center, ²Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center

Correspondence to: Shiomi Yoshida, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591-8555 Japan. (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)

最新医学・第62巻・第11号 (2007年11月号 別刷)

トピックス

新しい結核ワクチンの新展開

岡田全司

最新医学社

新しい結核ワクチンの新展開

岡田全司*

はじめに

結核は、世界の1/3の20億人がいまだに結核菌に感染しており、その中から毎年880万人の患者が発症し、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（WHOレポート2002年）¹⁾²⁾⁴⁾。結核症に対する宿主の抵抗性は細胞性免疫と言っても過言ではない。特に獲得免疫（細胞傷害性T細胞とTh1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、米国疾病対策センター（CDC）は結核に対し、政府・学術機関・企業が一体となった新世代のワクチン開発の必要性を強く主張する発表をした。また結核撲滅対策委員会（ACET）は、国民の健康に対する大敵である結核撲滅のためにはBCGに代わる有効なワクチンが必要であることを示した。

大人（成人）結核に対しては、BCGワクチンは予防効果がないという結論が世界保健機構（WHO）によって報告された。したがって、成人の結核に対し有効な新しい結核ワクチンの開発が必須である¹⁾²⁾。

しかしながらBCGに代わる結核ワクチンは、欧米でも臨床応用には至っていない。我々は、BCGよりもはるかに強力なDNAワクチンやリコンビナントBCGワクチンの開発に成功した（表1、図1）¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾。新しい抗結核ワクチン開発と臨床応用の可能性についても述べる³⁻⁵⁾。

新しい結核ワクチン開発

1. 現行のBCGワクチンの有用性

大人（成人）結核に対しては、BCGワクチンは予防効果がないという結論がWHOによって報告された。10万人を超す南インド農民を対象として実施された大規模なcontrolled trial（Chingleput Study）では、全く有効性が否定される結果となった（上記WHOの報告）²⁾。

2. BCGワクチンより極めて強力な結核予防ワクチン

我々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が、画期的な新しい結核予防ワクチンを開発した。マウスの実験で、現行のBCGワクチンを超える極めて強力な有効性（1万倍の効果）を確認した。マウスの結核感染系では、BCGワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチンは極めて少ない。我々は、HSP65 DNA+IL-12 DNA（HVJ-エンベロープベクター）のワクチンはBCGワクチンよりも1万倍強力な結核予防ワクチンであることを、世界に先駆けて明らかにした。これらの研究が国内外より極めて高く評価され、当臨床研究センターはWHOよりWHO STOP TB Partnershipに選ばれた。また、大阪大学大学院（医学系研究科）連携大学院にも選ばれた（表1）。

3. 新しい結核ワクチン

結核ワクチンは①サブユニットワクチン、②DNAワクチン、③リコンビナントBCGワクチン（弱毒化結核菌を含む）、その他に大別される（表1）。

* 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
臨床研究センター長

表1 新しい結核ワクチンの開発

(1) DNA ワクチン	HVJ-リボソーム/HSP65 DNA + IL-12 DNA	BCG より有効 (マウス, モルモット, カニクイザル)
(2) DNA ワクチン	HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNA	BCG よりはるかに有効 (マウス)
(3) リコンビナント BCG ワクチン		
① リコンビナント 72f BCG		BCG より有効 (マウス, モルモット, カニクイザル)
② リコンビナント (Ag85A + 85B + MPB51)		BCG BCG より有効 (マウス)
(4) 治療ワクチン	IL-6 関連 DNA (マウス)	
(5) プライミング-ブースター法	BCG (プライミング) + 新しいワクチン (ブースター) (カニクイザル)	
(6) 遺伝子ノックアウト弱毒化リステリアを用いた新しい結核ワクチン (経口)		
(7) 新しいベクター	AAV ベクター (1,000 倍発現効率↑), アデノウイルスベクター	
→ WHO STOP TB Partnership および WHO STOP TB Vaccines Working Group に選出		

略語：巻末の「今月の略語」参照

1) DNA ワクチン

IL-12 の p35 および p40 を CMV プロモーター下流域に挿入した発現プラスミドを作製した。さらに、ヒト型結核菌 H37RV 由来 HSP65 DNA ワクチンの作製に成功した (表 1, 図 1)⁹⁾。HVJ-リボソームをベクターに用いた場合、HSP65 DNA と IL-12 DNA 両者の DNA ワクチンを投与した HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンマウスでは、BCG 東京ワクチンマウスの肺・肝・脾の結核菌数の 100 倍以上の減少が認められた⁹⁾ (図 2)。このワクチンは、結核菌に対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 分化誘導、IFN γ 産生細胞分化誘導を介して、BCG ワクチンより強力な結核予防ワクチン効果を発揮することが示された。すなわち、結核菌に対する CD8 陽性 CTL の分化誘導を増強した。また、結核菌抗原の主要な抗原タンパク質である HSP65 タンパク質抗原に対する CD8 陽性 CTL の分化誘導を著明に増強した。一方 BCG ワクチンは、結核菌に対する CTL や HSP65 タンパ

ク質に対する CTL 誘導活性はほとんど認められなかった¹³⁾。このワクチンは BCG ワクチンに比較して、有意差をもって肝臓および肝臓の結核肉芽腫、病理所見の改善を認めた (granuloma index の改善⁹⁾)。

さらに、このワクチンは治療結核ワクチン効果も示した。すなわち、結核菌をあらかじめ投与したマウスにおいて、HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンを 3 回治療投与すると、コントロール群に比較して有意差をもって肺・肝・脾の結核菌数の減少を認めた。多剤耐性結核菌や超薬剤耐性結核 (XDR-TB) に対しても、治療ワクチン効果を示した⁶⁾。欧米では治療ワクチンは未開発である⁶⁾。

筆者らは世界に先駆けてヒト T 細胞ハイブリドーマを確立し、CTL 分化因子の発見や B 細胞分化因子 (後の IL-6) の存在を明らかにしたが⁷⁻⁹⁾、アデノウイルスベクターに導入した IL-6 関連遺伝子 (IL-6 遺伝子 + IL-6 受容体遺伝子 + gp130 遺伝子) ワクチンも強力な治療ワ