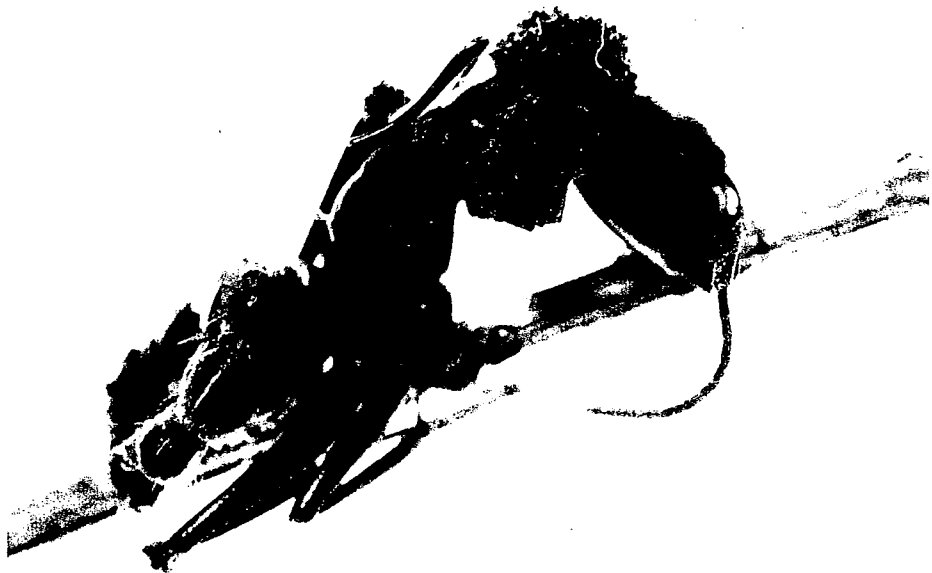


2007

# The Infection

No. **1**  
VOL. 37



▲コブガタアリタケ  
*Torrubiella collaratus* sp.

解説[ I ]

# 新しい結核ワクチン

岡田 全司\*

結核は世界の人口の1/3約20億人が感染し、900万人が毎年結核を発症し、200万人が死亡している世界の最大の感染症である。

BCGワクチンは、成人に対する結核予防ワクチンとしては有効でない。したがって、新しい結核ワクチン開発を行った。HSP65DNA + IL-12DNA ワクチンは、BCGよりも1万倍強力な結核予防ワクチン効果をマウスで示した。さらに、ヒトの結核感染に最も近いモデルのサルにも有効であり、臨床応用を計画中である。一方多剤耐性結核(特に超薬剤耐性結核XDR-TB等)が大問題となっている。

この結核ワクチンは、結核治療効果も示し、多剤耐性結核にも有効性が示唆された。他の結核ワクチン開発(r72fBCG等)についても述べる。

## はじめに

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880万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、最大の感染症の一つである(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結核ワクチン開発の必要性を強く主張する発表をした。また、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。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ワクチンやリコンビナントBCGワクチンの開発に成功した(表1, 図1)<sup>5-8)</sup>。新しい抗結核

ワクチン開発と結核感染免疫におけるキラーTの機能解明についても述べる<sup>9, 10)</sup>。

## I. 新しい結核ワクチン開発

### 1. 現行のBCGワクチンの有用性

現行のBCGワクチンのWHO評価: BCGワクチンの評価がWHOによりなされた。すなわち大人(成人)の結核に対しては、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)<sup>10)</sup>。(ただし、小児における結核性髄膜炎や粟粒結核など播種性のものには十分な予防効果がある。)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。事実1998年米国政府・ACET, CDCは政府, 研究所, 大学・企業の三者が一体となって、新しい結核ワクチン開発が必須であることを表明した<sup>1, 6)</sup>。

\*Masaji OKADA 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/センター長

表1 The Development of Novel Vaccines for M. tuberculosis

(1) DNA vaccine HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA	more effective than BCG (mouse, guinea pig, cynomolgus monkey)
(2) DNA vaccine HVJ-Envelope/HSP65DNA + IL-12 DNA	extremely stronger effect than BCG
(3) recombinant BCG vaccine ① recombinant 72f BCG	more effective than BCG (mouse, guinea pig, cynomolgus monkey)
② recombinant (Ag85A + 85B + MPB51) BCG	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 Listeria	
(7) Novel vectors AAV vector (1000 fold effective expression vector ↑), Adenovirus vector	

Selected as WHO STOP TB Partnership and WHO STOP TB Vaccines Working Group

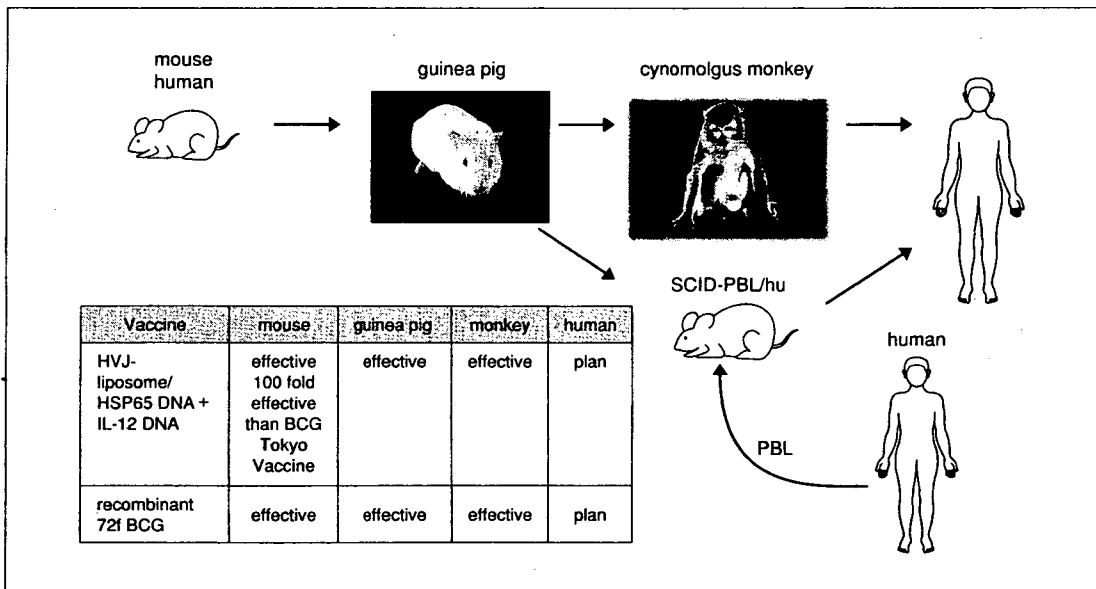


図1 The Development of Novel Vaccines for M. tuberculosis using animal models

2. BCGワクチンより1万倍強力な結核予防ワクチン

BCGワクチンより1万倍強力な結核予防ワクチンを開発

われわれの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、画期的な結核の新しい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。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。

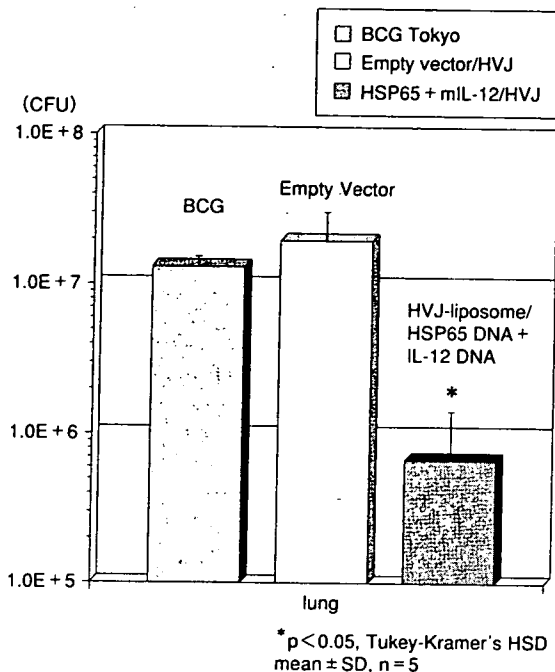


図2 Prophylactic efficacy of HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine on TB-infected mice (5 weeks after TB infection)  
Number of *M. tuberculosis*

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(世界保健機関)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。

マウスでは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。われわれはHSP65 DNA + IL-12 DNA予防ワクチンにてBCGワクチンの100倍強力なワクチンの開発に成功した(表1, 図1, 2)<sup>6, 7, 9, 11)</sup>。

#### 1) DNAワクチン

われわれが開発した、新しい結核ワクチン、新ワクチンは、前述の如く、結核菌のHSP65という

たんぱく質と免疫力を高める働きのあるインターロイキン-12を作る遺伝子(DNA)を注射するDNAワクチンと呼ばれるものである。HVJウイルスの殻を利用して、DNAを体内の細胞内に送り込んでこれらのたんぱく質を作らせ、強い免疫反応の誘導を狙った。この新しいワクチンは、結核免疫に最も重要と考えられている(結核菌に対する)CD8陽性キラーT細胞の分化を増強した。さらにIFN- $\gamma$ 産生T細胞の分化を増強した。

マウスの実験系：マウスに新ワクチンを接種した後、結核菌を感染させ、5週間後の結核菌の数を調べた。すると、新ワクチンを接種したマウスの菌数はBCG接種のマウスの約1千分の1で発症を抑えられる程度だった。さらに、あらかじめBCGを接種してから新ワクチンを打つと、菌数は約1万分の1まで抑えられていた。

新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され、WHO STOP TB VACCINE GROUP MEETINGに選出された。

#### 2) リコンビナントBCGワクチン

結核菌は300種以上のタンパク質を分泌するが、 $\alpha$ 抗原Ag 85Bとそのファミリー(85A, Ag85C) DNAをリコンビナントBCGに使用した<sup>2, 5)</sup>。これらの遺伝子をPNN2シャトルベクター(大腸菌⇄好酸菌)に組み込みBCG東京菌に、遺伝子を導入した。

最近、サブユニットワクチンのMtb72f融合タンパク質<sup>12)</sup>のDNAを導入した72fリコンビナントBCGの作製に成功した。この72f rBCGは、BA51 rBCGと同程度の極めて強力な結核菌に特異的なIFN- $\gamma$ 産生T細胞数の増強を誘導することをElispot Assayで明らかにした。

#### 4. 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の系で結核患者リンパ球をSCIDマウスに生着させ、結核菌タンパク質に特異的なヒトキラーT細胞誘導を示す画期的な、生体内ヒト免疫解析モデル(ヒト結核ワクチン効果解析モデル)を開発した<sup>6, 7, 9)</sup>。

表2 Improvement of cynomolgus monkeys infected with *M. tuberculosis* by the vaccination with HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA

Vaccine	number	survival	dead	%survival
HVJ-liposome/ HSP65DNA+ IL-12DNA	4	2	2	50%
BCG	4	2	2	50%
Control (saline)	4	0	4	0%

II. 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。Nature Medicine 2, 430, 1996参照)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)を示すワクチン二種を開発した<sup>8)</sup>。すなわち, 現在最も有力なものとして, HVJリボソーム/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンおよび, r72f BCGワクチンがあげられる(表1)。すなわち, カニクイザルに3回ワクチン投与を3週間隔で行った。最終免疫より, 4週間後にヒト結核菌エルドマン株  $5 \times 10^2$  CFUを気道内注入した。事実, われわれはカニクイザルで結核感染後1年で, 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), r72f BCGワクチンで4匹中3匹生存(75%生存)を認め, これらのワクチン効果をサルレベルで認めた<sup>8)</sup>(表2)。すなわち, HVJリボソーム/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(表2)。また, HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは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( $p < 0.05$ )をもって, HSP65抗原に対し, 増殖増強反応を示した<sup>8)</sup>。Ag85B-ESAT-6融合タンパク質についてAndersonらも報告しているが, モルモット, サルでは効果は不明である。一方,

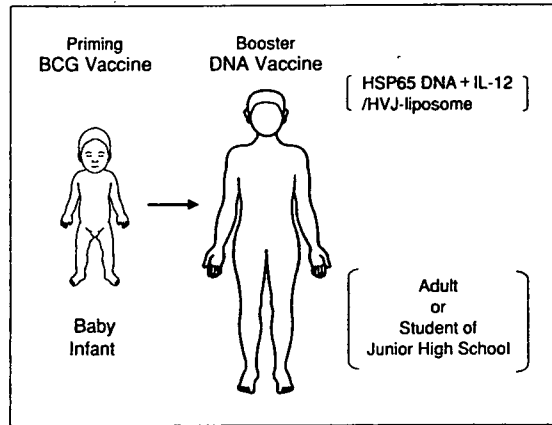


図3 Novel Prophylactic Vaccine(DNA Vaccine against TB)

HuygenのAg85A DNAワクチンはマウス・モルモットで有効であったが, サルの結核感染予防に対し有効でなかったという。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<sup>12)</sup>。A. Hillらのワクシニアウイルス-85A DNAワクチンは, アフリカでの第一相clinical trialでは, 85A DNA蛋白に対する免疫応答増殖が認められた。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。リコンビナント72f BCGも有効である。さらに, われわれはHSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンやリコンビナント72f BCGワクチンを組み合わせ, 極めて強力なワクチン開発を目指している<sup>5-7)</sup>。

2. プライミング-ブースター法(乳幼児BCG-成人HVJ/HSP65DNA + IL-12DNAワクチン)

さらにBCGワクチンと新ワクチンのプライミング-ブースター法で100%の生存を示した。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(小学生, 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HVJ/HSP65 DNA + IL-12 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(図3).

### おわりに

当国立病院機構近畿中央胸部疾患センターは, 呼吸器疾患(結核を含む)準ナショナルセンターとなった. 日本の結核患者数の60%の診断・治療を行っている, 国立病院・療養所54施設を統括し, 国立病院・療養所政策医療呼吸器ネットワークを用いて結核の新しい予防・治療法の確立が進展している.

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.

### 文献

- 1) 岡田全司: 結核 “分子予防環境医学: 生命科学研究の予防・環境医学への統合”(分子予防環境医学研究会編). p.150-161, 本の泉社, 2003.
- 2) 岡田全司ほか: 結核感染・新しい結核ワクチンの開発「感染症発症の分子機構-宿主と病原体の分子の攻防」. *Molecular Medicine* 2002; 39: 144~154.
- 3) Flynn JL, et al.: *Immunology of Tuberculosis*. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 93~129.
- 4) Schluger NW, et al.: The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 679~691.
- 5) 岡田全司: 新しい結核ワクチン. p1942-1952, *最新医学*57, 2002.
- 6) 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: [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]”, 2004.
- 7) Okada M, et al.: Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis. Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 171~175, 2002.
- 8) Kita Y, et al.: Novel recombinant BCG- and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine* 2005; 23: k2269~2272, 2005.
- 9) 岡田全司ほか: 結核感染とサイトカイン. 医学の歩み: サイトカイン-state of arts(編集 泉孝英, 網谷良一), p.209-213, 医歯薬出版, 2004.
- 10) 岡田全司: 結核ワクチン. 結核 第4版(in press), 医学書院, 2006.
- 11) 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* 2006; 24: 1191~1204.
- 12) Skeiky YA, 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): 7618~7628.
- 13) McShane H, et al.: Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med* 2004; 10(11): 1240~1244.

特集II 感染免疫における新知見

新たな結核ワクチン開発\*

岡田全司\*\* 田中高生\*\*  
 喜多洋子\*\* 桑山さち子\*\*  
 金丸典子\*\* 村木裕美子\*\*  
 橋元里実\*\* 岡田知佳\*\*  
 福永有可里\*\* 高井寛子\*\*

**Key Words** : novel tuberculosis vaccine, DNA vaccine, recombinant BCG vaccine, cytotoxic T cell, clinical trial

はじめに

いまだに世界の人口の1/3が結核菌の感染を受け、その中から毎年800万人の結核患者が発生し、200万人が毎年結核で死亡している、最大の感染症のひとつである(図1)<sup>1)~4)</sup>。本邦でも1998年から結核罹患率の増加が認められ、1999年7月26日“結核緊急事態宣言”が厚生省より出された。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結核ワクチン開発の必要性を強く主張する発表をした。また、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。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新しいサブユニットワクチン、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<sup>5)~8)</sup>。したがって、新しい抗結核ワクチン開発と結核感染免疫におけるキラーTの機能解明についても述べる<sup>9)10)</sup>。

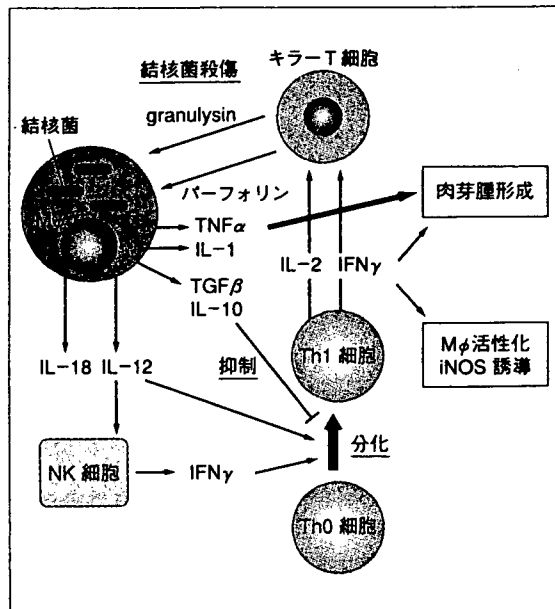


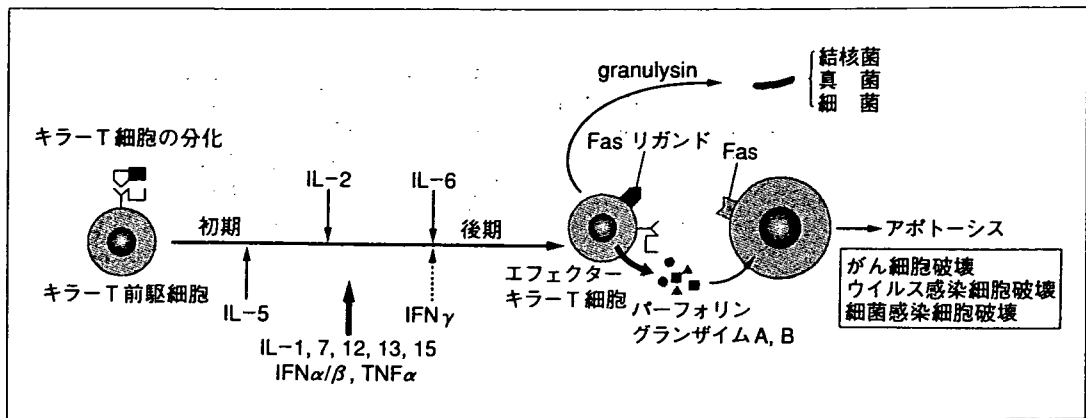
図1 抗結核免疫とマクロファージ、ヘルパーT細胞、キラーT細胞活性化<sup>1)2)</sup>  
 Mφ: マクロファージ

結核感染と免疫

結核感染に対する免疫力はMφ, CD4<sup>+</sup>T細胞, NK細胞, γ/δT細胞, キラーT細胞(CD8<sup>+</sup>TとCD8<sup>-</sup>T)および肉芽腫形成の総合的な抵抗力である(図1)。また、1998年Natureに結核菌H37Rvゲ

\* The development of novel vaccines against tuberculosis.

\*\* Masaji OKADA, M.D., Ph.D., Takao TANAKA, Yoko KITA, Sachiko KUWAYAMA, Noriko KANAMARU, Yumiko MURAKI, Satomi HASHIMOTO, Chika OKADA, Yukari FUKUNAGA, & Hiroko TAKAI: 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 堺市長曾根町1180); Clinical Research Center, National Hospital Organization, Kinki-Chuo Chest Medical Center, Sakai 591-8555, JAPAN

図2 キラー-T細胞活性化と細胞傷害機構<sup>2)</sup>

ノム全塩基が掲載され、遺伝子レベルで結核免疫を解析しうることになった<sup>11)</sup>。

### 1. キラー-T細胞(CD8<sup>+</sup>T細胞)

CD8あるいは $\beta_2$ ミクログロブリン遺伝子やTAP遺伝子ノックアウトマウスでは抗結核免疫が十分でなく、動物は死亡する。すなわち、結核におけるCD8<sup>+</sup>T細胞はマウスで抗結核免疫に重要である(図2)。

キラー-Tのひとつの役割として $\gamma$ -IFNを分泌して抗結核免疫に寄与するが、次に述べる結核感染M $\phi$ を殺して、結核菌の増殖の場をなくし結核菌を殺す役割の方が重要である。最近、CD8<sup>+</sup>T細胞が結核菌で感染したM $\phi$ をFas-independent, granule-dependentの機構で溶かし、最終的には結核菌を殺すことが報告されている<sup>12)13)</sup>。このT細胞はCD1-restrictedでミコール酸, LAM, phosphatidyl inositol mannoside, glucose monomycolate, isoprenoid glycolipid (Cd1cと結合)などの結核菌lipidとlipoglycanを認識する。このキラー-Tの顆粒内の蛋白であるgranulysinは直接細胞外の結核菌を殺す。この機序は結核菌細胞膜を不完全な状態にすることによる。Granulysinは病原細菌, 真菌, 寄生虫の生存を減少させる。さらにパーフォリンとの共存下でM $\phi$ 内の結核菌も殺すと考えられている。これはパーフォリンよりM $\phi$ に穴が開き, M $\phi$ 内の結核菌に直接granulysinが作用するためと思われる。われわれは結核患者, とくに多剤耐性結核患者ではキラー-Tリンパ球のmRNAの発現および蛋白の発現が低下して

いることを明らかにした<sup>5)</sup>。すなわち、われわれはキラー-T細胞のgranulysin(分子量9,000)産生低下が多剤耐性結核症と大きな関連があるのではないかと考えている。一方、キラー-TのTRAILとパーフォリンが抗結核免疫に重要である興味深い結果を得た。

一方、MHCクラスI拘束性の結核菌の38kDa蛋白, HSP65蛋白を認識するマウスCD8<sup>+</sup>キラー-Tや19kDa蛋白, Ag85, CFP10(Mtb11)を認識するヒトCD8<sup>+</sup>キラー-Tが報告されている<sup>3)</sup>。ESAT-6抗原に対するキラー-TでHLA-A2とは82~90位の9個のアミノ酸AMASTEAGNVが結合してキラー-T細胞がこれらを認識する。われわれは世界に先駆けて確立した、ヒト生体内結核免疫応答解析モデルSCID-PBL/huに、この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<sup>2)7)14)</sup>(図3)。

Reed S, Alderson MRらは結核菌に対するヒトCD8キラー-Tクローンを確立したが、HLA-A, B, C, DR, DQ, CD1に拘束性を示さないnonclassically restrictedキラー-Tとclassically restrictedなキラー-Tクローンの二種を確立した。またI-E領域に拘束性の結核特異的キラー-Tも報告された。

### 2. キラー-T細胞分化とサイトカイン(キラー-T細胞分化因子)

筆者らはCD8<sup>+</sup>キラー-T細胞(Tc)の誘導にはヘルパー-T細胞(Th細胞)から産生されるサイトカ



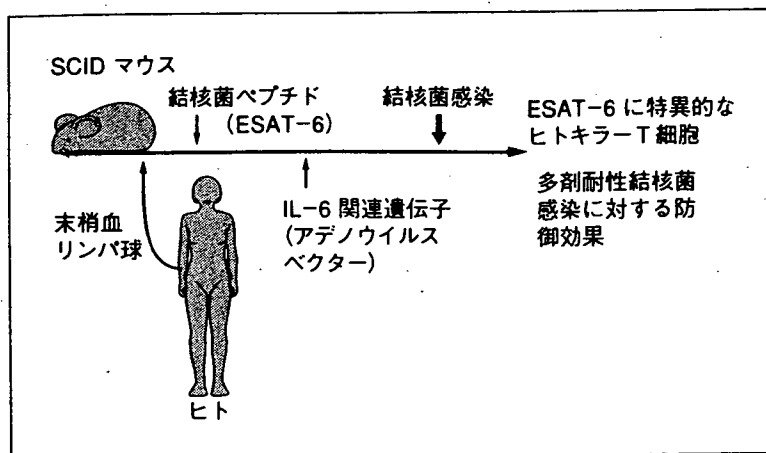


図3 SCID-PBL/huマウスを用いた結核菌ペプチドに特異的なヒトキラーT細胞のin vivoにおける誘導<sup>2)</sup>

インが必要であることをはじめに明らかにした。クラスII抗原を認識しキラーT細胞分化因子を産生するTh細胞はCD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>であり、クラスI抗原を認識しキラーT細胞分化因子を産生するTh細胞はCD8<sup>+</sup>である。また、モノクローナル抗IL-2抗体を用いて、IL-2はキラーT細胞誘導に必要な因子のひとつであることを示した<sup>15)</sup>(図2)。

さらに、IL-2とは異なるサイトカインもT細胞分化誘導に必要であることをキラーT細胞分化因子を産生するヒトT細胞ハイブリドーマ、およびIL-2依存性ヒトThクローンを世界に先駆けて確立し明らかにした。その解析の結果、IL-6, IFN- $\gamma$ がキラーT細胞分化因子として強力なキラーT分化を誘導することを明らかにした<sup>16)~18)</sup>。筆者らはIL-6がTc誘導の後期の分化段階に作用することを解明した<sup>18)</sup>(図2)。多剤耐性結核患者PBLにおいて、これらのキラーT細胞分化因子すなわちIL-2,  $\gamma$ -IFN, IL-6の著明な低下を認めた<sup>5)6)8)~10)</sup>(表1)。また、糖尿病合併難治性結核患者ではPPD特異的キラーTの分化誘導の著しい低下を明らかにした<sup>5)6)8)~10)</sup>。

### 3. サイトカインと結核免疫

抗結核免疫にIFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12が重要であることは解析されている(岡田結核文献<sup>2)</sup>参照)。

### 4. マクロファージ(M $\phi$ )

結核菌の増殖場所はM $\phi$ 内である。一方、M $\phi$ は異物貪食能と細胞内殺菌能および抗原提示能をもつ。したがって結核菌が優位に立つか、ヒ

ト(生体)が優位に立つかの戦争でもある(詳細は岡田結核文献<sup>2)</sup>と文献<sup>3)</sup>参照)。

### 5. Toll-like受容体とマクロファージ活性化

最近発見されたToll-like receptor (TLR)ファミリーがinnate immunityの重要な役割を果たしている<sup>19)</sup>。結核菌のcell wall (LAM, mAGP, total lipid)による応答はTLR2を介する。一方、結核生菌に対する反応にはTLR2とTLR4が必要である。病原株の*M. tuberculosis*由来のMan LAMはM $\phi$ を活性化しないが、非病原性の抗酸菌は異なるglycolipid Ara LAMよりなり、これはTLR2を介してM $\phi$ を活性化する。この差が発病の差となる可能性もある。結核菌体成分19kDaのlipoproteinがTLR2を介してM $\phi$ を活性化する<sup>20)</sup>。また、抗酸菌DNAから見出されたCpGモチーフ(パリンドローム配列)は感染防御免疫能増強することが示されていたが、CpGレセプターに対するTLR9が善良によりクローニングされた。

### 6. Th1リンパ球, Th2リンパ球

CD4<sup>+</sup>T細胞が結核免疫に重要であることはMHCクラスII<sup>-/-</sup>マウスやCD4<sup>-/-</sup>マウス抗CD4抗体投与マウスで明らかとなっている<sup>21)</sup>(Th1細胞と結核免疫については岡田結核文献<sup>2)</sup>参照)。

### 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)、そのほかに大別され

る(表1)。

DNAワクチンのベクターとしては, ①gene gun  
②プラスミド③アデノウイルスベクター④HVJ  
リポソーム④改良型HVJエンベロープベクター  
を計画中である<sup>2-8)21)</sup>。α抗原(Ag85B), ESAT-  
6, 種々のサイトカイン, HSP65, 38kDa,  
Mtb32, Mtb39, MDP1などについて, サブユニッ  
トワクチン, DNAワクチン, リコンビナントBCG  
ワクチンの形で, 多くの報告が主にマウスの結  
核感染の系でなされている<sup>22)23)</sup>。

Reed博士らはT細胞結核免疫を誘導する蛋白  
質抗原遺伝子のクローニングを迅速かつ, 絨緞  
爆撃に行える画期的な系を開発した<sup>24)</sup>。

マウスではBCGワクチンをはるかに凌駕する  
新しい結核ワクチンはきわめて少ない。われわ  
れはHSP65 DNA+IL-12 DNA予防ワクチンにて  
BCGワクチンの100倍強力なワクチンの開発に成  
功した<sup>6)7)9)</sup>(表2)。一方, 長崎大学山田博士, 大  
原博士らは, キラーT細胞誘導結核菌蛋白質抗  
原遺伝子やサイトカイン遺伝子をBCG菌に導入

表1 新しい結核ワクチン<sup>2)</sup>

1. サブユニットワクチン	Mtb72f融合タンパク質 85B-ESAT-6融合タンパク質 α抗原(Ag85B), Ag85A, MPB51, ESAT-6, Hsp65 リコンビナントサイトカイン(IFNγなど)(吸入・注射) 新しい結核菌タンパク質抗原 Mtb32, Mtb39 その他
2. DNAワクチン	Hsp65 DNA, IL-12遺伝子, Hsp70 DNA, ESAT-6DNA, IL-6遺伝子, IL-6遺伝子+IL-6R遺伝子+gp130遺伝子, IFNγ遺伝子, Mtb72f遺伝子, IL-15遺伝子, IL-18遺伝子, M-CSF遺伝子, 38kD DNA, キラーT細胞誘導結 核菌タンパク質抗原遺伝子, CD40L遺伝子, MPT64 DNA, MPT63 DNA, Kat G DNA, 上記の新しい結核菌タ ンパク質抗原遺伝子
3. リコンビナントBCGワクチン	Mtb72f遺伝子 Ag85A遺伝子, Ag85B遺伝子, Ag85C遺伝子, MPB51遺伝子, MDP-1遺伝子, HSP65遺伝子 IL-6遺伝子, IFNγ遺伝子, IL-2遺伝子, IL-12遺伝子, IL-18遺伝子 キラーT細胞誘導結核菌タンパク質遺伝子
4. 弱毒化結核菌	弱毒化サルモネラ菌に結核免疫増強DNA導入し, 経口ワクチン 弱毒化リステリア菌に結核免疫増強DNA導入し, 経口ワクチン
5. キラーT細胞移入	

表2 新しい結核ワクチンの開発

(1) DNAワクチン HVJ-liposome/HSP66 DNA+IL-12 DNA	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BCGワクチン	BCGより有効
①リコンビナント72f BCG	(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)
(3) サブユニットワクチン Mtb 72f融合タンパク	BCGより有効(カニクイザル) 多剤耐性結核患者T細胞機能増強活性(+) Phase I Study
(4) 治療ワクチン IL-6 related DNA(マウス)	
(5) Priming-Booster Method BCG(priming)+新しいワクチン(booster)(カニクイザル)	
(6) 遺伝子ノックアウトattenuated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(1000倍発現高率↑), Adenovirusベクター —WHO STOP TB Partnership及びWHO STOP TB Vaccines Working Groupに選出	

するPNN2シャトルベクター(大腸菌⇄好酸菌)を用いてリコンビナントBCGワクチンを作製した。この方法はBCG自身にアジュバント作用があり、BCGがベクターとしての働きもかねている。

1. DNAワクチン

われわれは①HSP65 DNA+IL-12 DNAのワクチンが相乗効果を示し、gene gunを用いた遺伝子投与でBCGよりもきわめて強力な(約100倍)結核予防ワクチンであることを明らかにした(自治医科大学吉田博士との共同研究)(表2)。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(図4)。

HVJリボソームをベクターに用いた場合、HSP65

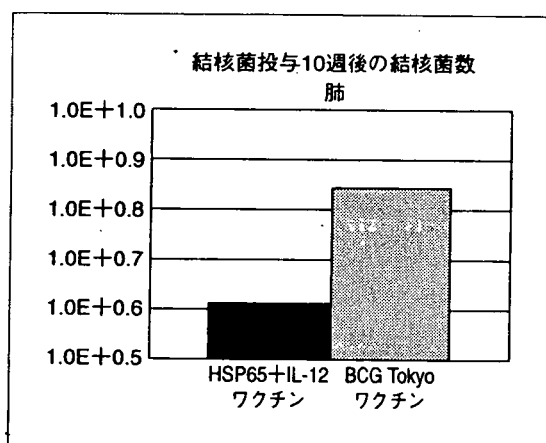


図4 HSP65DNA+IL-12 DNAワクチンによるBCGより100倍強力な抗結核ワクチン効果(マウス)<sup>2)</sup>

DNA単独(HVJリボソーム/HSP65)でBCGよりも有効であることをマウスの系で明らかにした(大阪大学医学部金田博士との共同研究)(表3)。また、後述のHSP65リコンビナントBCGで初回免疫しHVJリボソーム/HSP65 DNAで追加免疫をかけるpriming-booster法がより有効であることを明らかにした。

アデノウイルスベクター(E1a, E1b, E3領域を欠損させたヒト5型アデノウイルスベクター)で、非増殖性・非感染性に優れたベクター)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)ワクチンは、BCGよりも強力な治療ワクチン効果を示した(図5)。IL-6関連遺伝子ワクチンは、結核菌に対するキラーT細胞の分化・誘導およびTh1サイトカイン(IL-2およびIFN-γ)の産生誘導を介して抗結核効果を発揮した<sup>6)7)9)</sup>。

アデノウイルスベクターに導入したIFN-γ DNAもBCGよりも強力な治療・予防ワクチン効果を示した<sup>6)7)9)</sup>。

以上4つのワクチン効果は、キラーT細胞やTh1細胞の分化誘導を増強することによって発揮されることが示された<sup>6)7)9)</sup>。まとめると、結核死菌を貪食させたJ774.1Mφを標的細胞とし、ワクチン投与後結核感染させたBALB/cマウスの脾細胞をPPDや結核菌で*in vitro*で再刺激し、エフェクター細胞として反応させ、IFN-γの産生でキラー活性を測定した。その結果、ワクチン効果とキラー活性は見事な相関が認められることを明らかにした。

表3 カニクイザルにおけるHVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン、リコンビナント72fBCGワクチンおよびMtb72f融合タンパクサブユニットワクチンによる抗結核効果

予防ワクチン	結核予防ワクチン効果	延命効果	血沈改善	体重増加	胸部X線所見改善	免疫反応
						リンパ球増殖反応増強
①HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン	++	++	++	+	+	++ +
②リコンビナント72f BCGワクチン	++	++	+	+	+	+
③72f融合タンパクワクチン	++	++	+	±	++	++
④コントロール(生食)	-	-	-	-	-	-

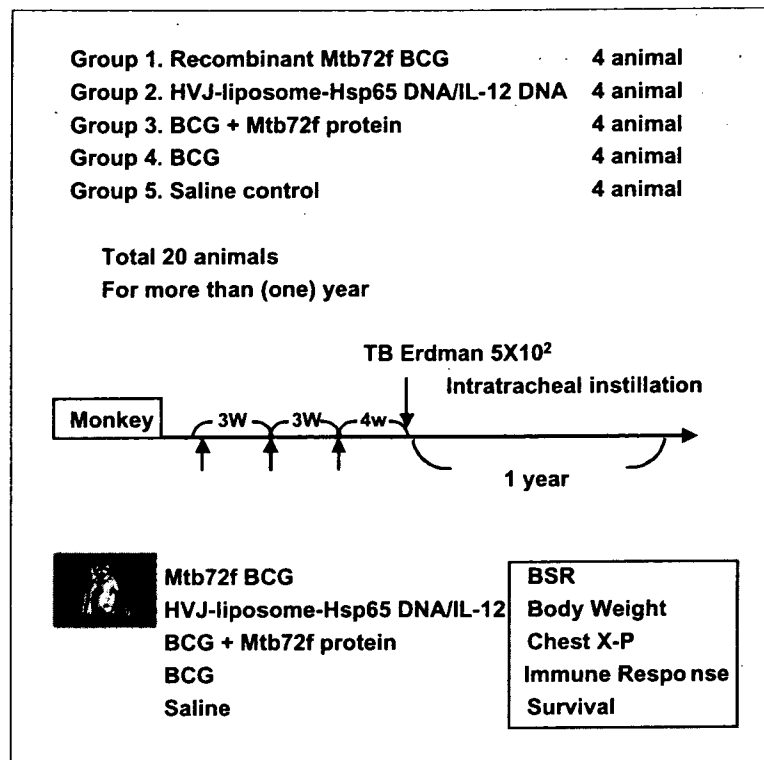


図5 カニクイザル(ヒトの結核感染にもっとも近いモデル:文献<sup>26)</sup>)を用いた新しい結核ワクチン予防効果研究のプロトコール

一方, Huygenらは, Ag85AのDNAワクチンを用い, マウスで抗原特異的キラーT細胞(CTL)が誘導されることや, BCG免疫と同等の防御効果が得られることを明らかにした<sup>26)</sup>.

## 2. リコンビナントBCGワクチン

結核菌は300種以上の蛋白質を分泌するが,  $\alpha$ 抗原Ag 85Bとそのファミリー(85A, Ag85C)DNAをリコンビナントBCGに使用した. Ag85Bは285アミノ酸からなり40アミノ酸のシグナルペプチドをもつ<sup>25)</sup>.

これらの遺伝子をPNN2シャトルベクター(大腸菌 $\leftrightarrow$ 好酸菌)に組み込みBCG東京菌に, 遺伝子を導入した. われわれはBA51(Ag85A+Ag85B+MPB51)リコンビナントBCGはBCGよりも強力なワクチンであることを静脈感染の系および気道感染の系で明らかにした. さらにAg85BリコンビナントBCGワクチン, Ag85AリコンビナントBCGワクチンやMDP1リコンビナントBCGワクチンでもBCG東京菌よりも強力なワクチン効果

を得た<sup>6)7)9)</sup>. また, 結核菌の増殖がきわめて遅いことを調節するDNA結合蛋白質MDP1(結核免疫抗原性もAg85Bより強い)をコードする遺伝子をBCGに組み込みrBCGを作製し, BCG東京菌よりも強力なワクチン効果を得た. さらに最近, サブユニットワクチンでサルレベルで強力な予防効果が得られたMtb72f融合蛋白質のDNAを導入した72fリコンビナントBCGの作製に成功した. この72f rBCGはBA51 rBCGと同程度のきわめて強力な結核菌に特異的なIFN- $\gamma$ 産生T細胞数の増強を誘導することをELISPOT(enzyme-linked immunospot) assayで明らかにした.

## 3. サブユニットワクチン

Mtb72f融合蛋白質(Mtb39とMtb32の融合蛋白質)のサブユニットワクチンはマウス, モルモットの系で結核予防ワクチン効果を示した<sup>25)</sup>. われわれはヒトの*in vitro*系でもMtb72f融合蛋白質を用いて免疫応答が増強することを示した(Reed博士らとの共同研究). そのほかにも種々の結核菌

蛋白質抗原遺伝子のクローニングに成功し、サブユニットワクチン (Mtb72f, 39, 32, 8.4, 11, 41.9.9.16, 40, 31f, 71f) で *in vitro* 刺激したところ、多剤耐性結核患者の T 細胞免疫能が増強した<sup>6)</sup> (表 2)。

また、多剤耐性結核患者に IFN- $\gamma$  吸入療法を行い、投与期間中の多剤耐性結核菌の消失を認めている。しかしながら、IFN- $\gamma$  投与を中止すると再び多剤耐性結核菌が喀痰中に認められた。

一方、Anderson Pらは85B-ESAT51のfusion蛋白ワクチンがマウスとモルモットでBCGよりやや劣るが同程度に有効であることを報告している。

#### 4. 遺伝子ノックアウトattenuated(弱毒化)菌体を用いた結核ワクチン

ある結核菌遺伝子を欠失させて弱毒化した結核菌をワクチンにする方法がある。われわれは(浜松医科大学小出教授と)さらに、akt遺伝子を欠失させた無毒化リステリア菌にAg85A-, 85BB-, MPB51-DNAを導入し新しい結核ワクチンを開発した<sup>20)</sup>。このワクチンは経口ワクチンとして応用できる利点がある。

これらの1.~4.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 VACCIENE GROUP MEETINGに選出された。

#### 新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデルSCID-PBL/hu (ヒト結核ワクチン解析モデル)の作製

われわれが世界に先駆けて開発したSCID-PBL/huの系で結核患者リンパ球をSCIDマウスに生着させ、結核菌蛋白質に特異的なヒトキラーT細胞誘導を示す画期的な、生体内ヒト免疫解析モデル(ヒト結核ワクチン効果解析モデル)を開発した<sup>6)7)9)22)</sup> (図4)。

#### 新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル(cynomolgus monkey, もっともヒトの肺結核に近いモデル, 文献<sup>28)</sup>参照)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3種を開発した(図5, 表3)。すなわち, 現在もっとも有力なものとしてHVJリポソーム/HSP65

DNA+IL-12 DNAワクチン, r72f BCGワクチンおよびMtb72f fusion融合蛋白質サブユニットワクチンがあげられる。(岡田, Reed博士, Tan博士ら, カニクイザルで共同研究)。事実, われわれはカニクイザルで結核感染後1年で, 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), r72f BCGワクチンで4匹中3匹生存(75%生存), BCG Tokyo+72f fusion蛋白で4匹中4匹生存(100%)生存を認め, これらのワクチン効果をサルレベルで認めた(2003年第1回国際結核ワクチン学会)(表3)。Ag85B-ESAT-6融合蛋白質(Anderson博士ら)も報告されているが, モルモット, サルでは効果は不明である。一方HuygenのAg85A DNAワクチンはマウス・モルモットで有効であったがサルの結核感染予防に対し有効でなかったという(2002年第4回World Congress on Tuberculosis)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。もっと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。BCG+Mtb72f融合蛋白質サブユニットワクチンは, 第I相臨床試験が計画されている。さらに, われわれはHSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンと72f融合蛋白ワクチンやリコンビナント72f BCGワクチンを組み合わせ, きわめて強力なワクチン開発を目指している<sup>5)~7)</sup>。

#### おわりに

当国立療養所近畿中央病院は呼吸器疾患(結核を含む)準ナショナルセンターとなった。日本の結核患者数の43%の診断・治療を行っている, 国立病院・療養所54施設を統括し, 国立病院・療養所政策医療呼吸器ネットワークを用い結核の新しい予防・治療法の確立が進展している。

サルにおいては72fワクチンHSP65 DNA+IL-12 DNA/HVJ-liposomeワクチンおよびr72f BCGワクチン72f融合蛋白ワクチンが明らかに優れていることより, これら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。

## 文 献

- 1) 蝶良英郎, 山中正彰, 岡田全司. 結核菌の逆襲, 再興感染症としての結核症(解説). 感染・炎症・免疫 1998 ; 3 : 192.
- 2) 岡田全司, 田中高生, 喜多洋子. 結核感染・新しい結核ワクチンの開発「感染症発症の分子機構—宿主と病原体の分子の攻防」. Molecular Medicine 2002 ; 39 : 144.
- 3) Flynn JL, Chan J. Immunology of Tuberculosis. Annu Rev Immunol 2001 ; 19 : 93.
- 4) Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 1998 ; 157 : 679.
- 5) 岡田全司. 新しい結核ワクチン. 最新医学 2002 ; 57 : 1942.
- 6) 岡田全司. 抗結核キラー T リンパ球とリコンビナント BCG・DNA-ワクチンの開発による新しい予防・診断・治療法(H-11-新興-2), 厚生科学研究費補助金実績報告書・研究報告書. 2001. p. 1.
- 7) Okada M, Tanaka T, Inoue Y, et al. Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis. Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference [abstract] 2002 ; 171.
- 8) Gillis S, Okada M. New therapy, diagnosis and protection using recombinant BCG, DNA- Vaccination and cytotoxic T lymphocytes against Mycobacterium Tuberculosis. New vaccine and new diagnosis. 平成12年度新興・再興感染症研究推進事業研究報告集, 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団. 2001. p. 355.
- 9) 岡田全司, 岸本忠三. リンホカインとモノカイン. In ; 山村雄一, 織田敏次, 黒岩義五郎, ほか・監. 新内科学体系 ; 年刊版 '84-C. 東京 : 中山書店 ; 1984. p. 221.
- 10) 岡田全司. サイトカインと腫瘍免疫. In ; 石井威望, 岡 博, ほか・編. 新医学大系8B ; 免疫応答—生体の防御機構II. 東京 : 中山書店 ; 1996. p. 269.
- 11) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium Tuberculosis from the complete genome sequence. Nature 1998 ; 393 : 537.
- 12) Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, et al. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. Science 1997 ; 276 : 1684.
- 13) Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al. An Antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science 1998 ; 282 : 121.
- 14) Tanaka F, Abe M, Akiyoshi T, et al. 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 Res 1997 ; 57 : 1335.
- 15) Okada M, Klimpel GR, Kuppers RC, et al. The differentiation of cytotoxic T cells in vitro. I. Amplifying factor(s) in the primary response is Lyt1 + cell dependent. J Immunol 1997 ; 122 : 2527.
- 16) 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 : 7718.
- 17) Okada M, Sakaguchi N, Yoshimura N, et al. B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas. Two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation. J Exp Med 1983 ; 157 : 583.
- 18) Okada M, Kitahara M, Kishimoto S, et al. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the *in vitro* induction of cytotoxic T cells. J Immunol 1988 ; 141 : 1543.
- 19) Akira S. Toll-like receptor and innate immunity. Adv Immunol 2001 ; 78 : 1.
- 20) Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. Science 1999 ; 285 : 732.
- 21) Hess J, Schaible U, Raupach B, et al. Exploiting the immune system: toward new vaccines against intracellular bacteria. Adv Immunol 2000 ; 75 : 1.
- 22) Anderson P. TB vaccines. progress and problems. Trends Immunol 2001 ; 22 : 160.
- 23) Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. Nature 1999 ; 400 : 269.

- 24) Alderson MR, Bement T, Day CH, et al. Expression cloning of an immunodominant family of Mycobacterium tuberculosis antigens using human CD4(+) T cell. *J Exp Med* 2000 ; 191 : 551.
- 25) Reed S, Alderson M, Campos-Neto A, et al. Development of a recombinant tuberculosis vaccine. Thirty-Fifth research conference on tuberculosis and leprosy ; 2000 Jun 18-20 ; Yokohama, Japan. 2000 ; 159.
- 26) Huygen K, Content J, Denis O, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med* 1996 ; 2 : 893.
- 27) Miki K, Nagata T, Tanaka T, et al. Induction of Protective Cellular Immunity against Mycobacterium tuberculosis by Recombinant Attenuated Self-Destructing *Listeria monocytogenes* Strains Harboring Eukaryotic Expression Plasmids for Antigen 85 Complex and MPB/MPT51. *Infect Immun* 2004 ; 72 : 2014.
- 28) Walsh GP, Tan EV, dela Cruz EC, et al. The Philippine cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med* 1996 ; 2 : 430.

\* \* \*

# Emergence of Ofloxacin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from China as Determined by *gyrA* Mutation Analysis Using Denaturing High-Pressure Liquid Chromatography and DNA Sequencing<sup>∇</sup>

Ruiru Shi,<sup>1,2</sup> Jianyuan Zhang,<sup>3</sup> Chuanyou Li,<sup>3</sup> Yuko Kazumi,<sup>1</sup> and Isamu Sugawara<sup>1\*</sup>

*Mycobacterial Reference Center, The Research Institute of Tuberculosis, Tokyo, Japan<sup>1</sup>; Henan Provincial Research Institute of Tuberculosis, Zhengzhou, China<sup>2</sup>; and Beijing Tuberculosis and Lung Tumor Research Institute, Beijing, China<sup>3</sup>*

Received 14 September 2006/Accepted 29 September 2006

**A high rate of double point mutations in *gyrA* (56% of 87 ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates) indicates the emergence of fluoroquinolone resistance. This is the first report to describe denaturing high-pressure liquid chromatography analysis of mutations in *gyrA* of *M. tuberculosis* in a large number of clinical isolates.**

Up to the present, fluoroquinolones have been studied as a first-line treatment for tuberculosis (9). However, fluoroquinolone resistance among *Mycobacterium tuberculosis* strains is emerging, with important implications for treatment (4, 6). Fluoroquinolones have been widely used for tuberculosis treatment in China for more than 10 years and have been given routinely as monotherapy for the empirical treatment of numerous outpatient infections. Thus, China may be one of the countries with the highest rate of fluoroquinolone abuse and resistance in the world. The goal of this work was to identify quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of *gyrA* in ofloxacin-resistant isolates from China by denaturing high-pressure liquid chromatography (DHPLC) and DNA sequencing methods.

(Most of this study was presented at the 41st US-Japan Cooperative Medical Science Program Tuberculosis and Leprosy Research Conference at Kagoshima, Japan, in July 2006.)

The 109 clinical isolates (87 shown to be ofloxacin resistant and 22 shown to be susceptible by a routine proportional method) were collected from patients with pulmonary tuberculosis (65 males and 44 females, aged 17 to 73 years, with 2 to 6 months of fluoroquinolone treatment) over a period of 2 years (2002 to 2003) at the Beijing Tuberculosis and Lung Tumor Research Institute, Tongzhou, China. MICs of ofloxacin were detected by an absolute concentration method in Lowenstein-Jensen medium, and the concentrations were 0.125, 0.25, 1, 2, 4, 8, 10, 16, 20, and 32 µg/ml. For DHPLC analysis, *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618) and *M. tuberculosis* Erdman (ATCC 35801) were used as reference strains. DHPLC was performed with a WAVE DNA fragment analysis system (Transgenomic Inc.). The melting temperature for *gyrA* analysis was 67.7°C. The conditions for DNA hybridization and DHPLC analysis have been described in detail elsewhere (10). For DNA sequencing, a 227-bp DNA fragment corresponding

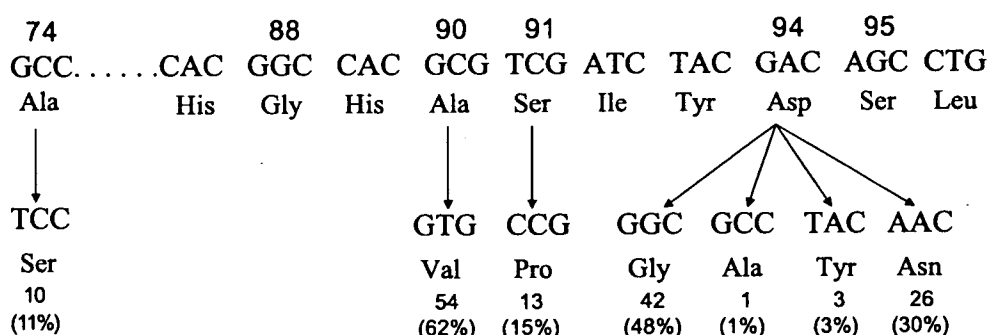


FIG. 1. Nucleotide sequence and missense mutations within the QRDRs of *gyrA*. All the isolates contain a naturally occurring polymorphism, codon 95 AGC→ACC. Seventy-three (84%) of the 87 ofloxacin-resistant clinical isolates were found to carry a codon 94 mutation, and 49 (56%) were found to harbor a double point mutation.

\* Corresponding author. Mailing address: Mycobacterial Reference Center, The Research Institute of Tuberculosis, 3-1-24 Matsuyama, Kiyose, Tokyo 204-0022, Japan. Phone: 81 42 493 5075. Fax: 81 42 492 4600. E-mail: sugawara@jata.or.jp.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 11 October 2006.



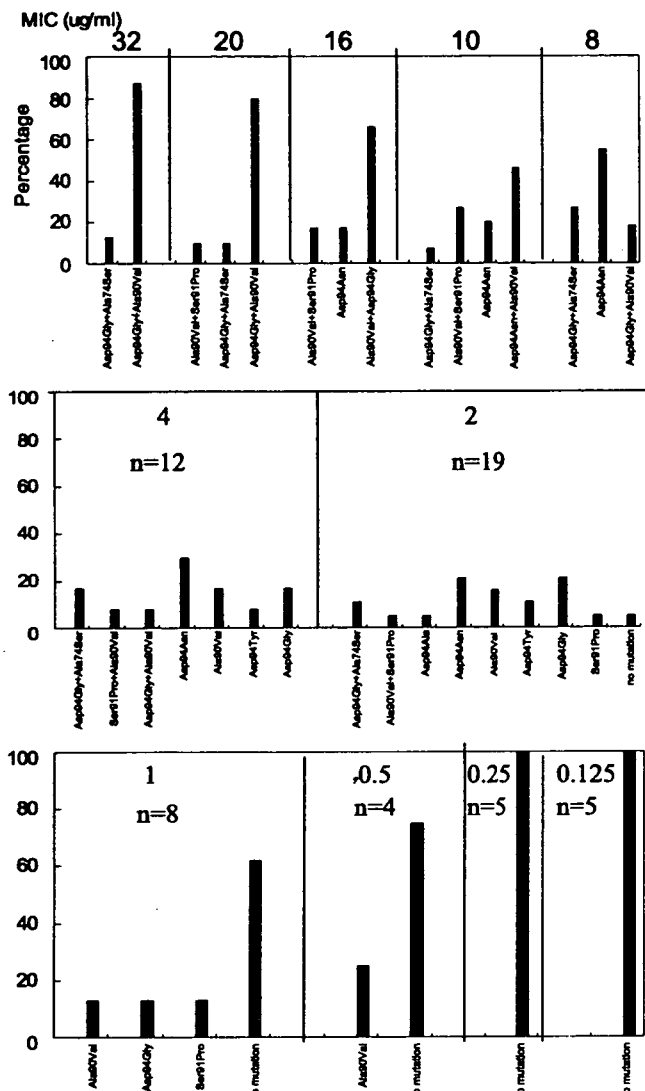


FIG. 2. Ofloxacin MIC relative to the *gyrA* QRDR allele spectrum. Ofloxacin MICs are given above each panel. n, number in each MIC group. Bars indicate the percentage represented by each allele.

to the QRDR was generated by PCR with the following primer set: forward, 5'-GACCGCAGCCACGCCAAG-3', and reverse, 5'-AGCATCACCATCGCCAACG-3'. After purification, the PCR product (5 ng) was used as a template for TaqCycle sequencing using ABI Prism BigDye Terminator sequencing kits (Applied Biosystems). Cycle sequencing products were subsequently analyzed on an ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems).

*gyrA* mutations were found to occur predominantly at codons 90, 91, and 94 and in four types of codon 94 mutation (94Asp→Gly, Ala, Tyr, and Asn) (Fig. 1), largely confirming the findings of other researchers (1, 2, 7, 11, 12). The previously reported mutation involving codon 88 was not found (5). All of the 109 clinical isolates had a codon 95 ACC natural polymorphism, which paralleled the results for 138 other isolates from China (2). However, two new findings were unexpected. One was that 49 of the 87 ofloxacin-resistant isolates (56%) carried double point mutations, and the other was that among these double-mutated isolates, 20% (10/49) harbored an Ala<sup>74</sup>Ser mutation (Fig. 2), which has not been reported previously for *M. tuberculosis*. Double point mutation of *gyrA* is relatively rare (2, 5, 12) and is generally thought to be uncommon in clinical isolates. The Ala<sup>74</sup>Ser mutation has been reported only for other bacteria (8, 12). This indicates that fluoroquinolone resistance is already emerging in China.

**DHPLC analysis.** First, *M. tuberculosis* H37Rv was routinely used as a reference strain, and this revealed that all 109 isolates carried mutations (aberrant peak patterns in Fig. 3). DNA sequencing showed that all the strains possessed a natural codon 95 AGC→ACC (Ser→Thr) polymorphism, which did not have a significant impact on fluoroquinolone susceptibility (4). To improve the DHPLC detection capacity, the other reference strains were selected from H37Ra, *M. tuberculosis* Kuruno, *M. tuberculosis* Erdman, and *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur (data not shown). We found that *M. tuberculosis* Erdman (fluoroquinolone susceptible, with codon 95 ACC in *gyrA* QRDRs) was the best as the second reference strain in this study. Those isolates with only the codon 95 AGC→ACC polymorphism showed a normal peak (Fig. 3). Thus, the influence of this natural polymorphism was successfully avoided. When *M. tuberculosis* H37Rv and *M. tuberculosis* Erdman ref-

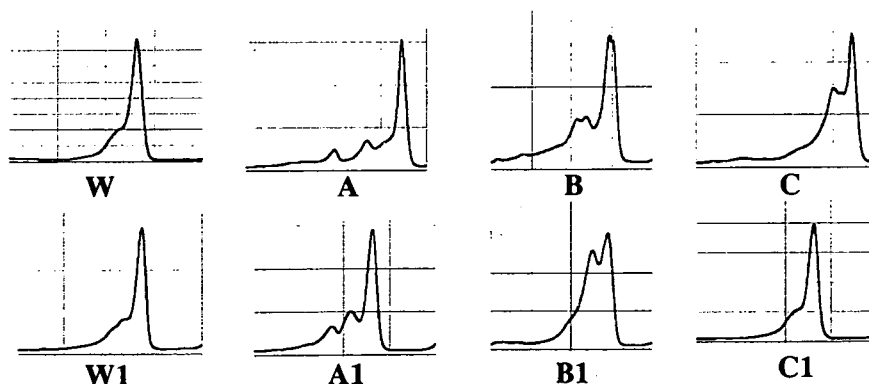


FIG. 3. DHPLC patterns of *gyrA* genes of the 109 clinical isolates when *M. tuberculosis* H37Rv was used as a reference strain. Patterns A, B, and C are shown as examples (details are shown in Fig. 4). W, H37Rv wild type. When *M. tuberculosis* Erdman was used as a reference strain, A, B, and C were changed to A1, B1, and C1, respectively. W1 indicates the *M. tuberculosis* Erdman wild type. Isolates (MIC less than 2 μg/ml) that harbored only the codon 95 ACC natural polymorphism with no other mutation in *gyrA* QRDRs showed the wild-type pattern C1.

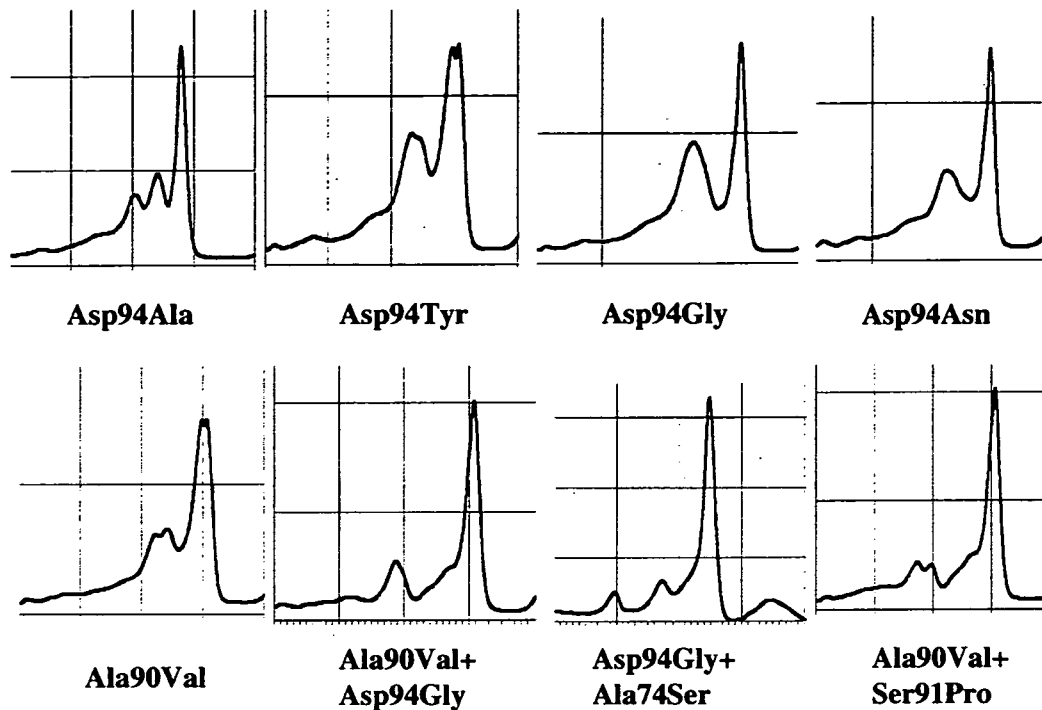


FIG. 4. Specific DHPLC pattern of each *gyrA* QRDR mutation type.

erence strains were used, a wild-type peak pattern appeared, indicating no point mutation in *gyrA* QRDRs. Of course, if an isolate carries any point mutation at a codon except codon 95, an aberrant peak pattern will appear. One interesting thing is that most of the isolates with the same mutation showed the same DHPLC patterns. The peak profiles of each mutant are shown in Fig. 4. Asp<sup>94</sup>Gly and Asp<sup>94</sup>Asn changes revealed similar patterns that were difficult to distinguish from each other. Other mutations had their own peak patterns. Therefore, it is thought that, to some extent, specific DHPLC patterns may predict the types of resistance.

DHPLC is a relatively new technique utilizing heteroduplex formation between wild-type and mutated DNA strands to identify mutations and was predicted to be a potentially useful genotypic screening method for gene mutations conferring drug resistance in *M. tuberculosis* (3, 8, 10). In this study, by introducing *M. tuberculosis* H37Rv and *M. tuberculosis* Erdman as two reference strains, the interference from the codon 95 AGC→ACC natural polymorphism was successfully avoided. Since no other polymorphism has been found in *gyrA* QRDRs except for that in codon 95, and all the point mutations in codons 74, 88, 90, and 91 correlate with fluoroquinolone resistance, the DHPLC method devised in this study can be regarded as a useful and powerful tool for analysis of *gyrA* mutation in tuberculosis.

Ruiru Shi is a recipient of The Japan-China Medical Association Fellowship sponsored by the Sasagawa Memorial Foundation.

#### REFERENCES

- Alangaden, G. J., E. K. Manavathu, S. B. Vakulenko, and S. A. Lerner. 1995. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutant strains of *Mycobacterium tuberculosis* selected in the laboratory and isolated from patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1700–1703.
- Cheng, A. F., W. W. Yew, E. W. Chan, and R. C. Chan. 2004. Multiplex PCR amplicon conformation analysis for rapid detection of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:596–601.
- Cooksey, R. C., G. P. Morlock, B. P. Holloway, J. Limer, and M. Hepburn. 2002. Temperature-mediated heteroduplex analysis performed by using denaturing high-performance liquid chromatography to identify sequence polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *J. Clin. Microbiol.* 40:1610–1616.
- Ginsburg, A. S., J. H. Grosset, and W. R. Bishai. 2003. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infect. Dis.* 3:432–442.
- Ginsburg, A. S., R. Sun, H. Calamita, W. R. Bishai, and J. H. Grosset. 2005. Emergence of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* during continuously dosed moxifloxacin monotherapy in a mouse model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3977–3979.
- Hooper, D., and J. Wolfson. 1993. Mechanisms of bacterial resistance to quinolones, p. 97–118. In D. Hooper and J. Wolfson (ed.), *Quinolone antimicrobial agents*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Kocagöz, T. C., J. Hackbarth, I. Unsal, H. Nikaido, and H. F. Chambers. 1996. Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1768–1774.
- Mohamed, A. M., D. R. Bastola, G. P. Morlock, R. C. Cooksey, and S. H. Hinrichs. 2004. Temperature-mediated heteroduplex analysis for detection of mutations associated with pyrazinamide resistance and differentiation between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by denaturing high-performance liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.* 42:1016–1023.
- O'Brien, R. J. 2003. Development of fluoroquinolones as first-line drugs for tuberculosis—at long last. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168:1266–1268.
- Shi, R., K. Otomo, H. Yamada, T. Tatsumi, and I. Sugawara. 2006. Temperature-mediated heteroduplex analysis for the detection of drug-resistant gene mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by denaturing HPLC, SURVEYOR nuclease. *Microbes Infect.* 8:128–135.
- Takiff, H., L. Salazar, C. Guerrero, S. T. Cole, and A. Telenti. 1994. Cloning and nucleotide sequence of the *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:773–780.
- Xu, C., B. N. Kreiswirth, S. Sreeratsan, J. M. Musser, and K. Drlica. 1996. Fluoroquinolone resistance associated with specific gyrase mutations in clinical isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 174:1127–1130.

## Short Communication

# Imaging of Pulmonary Granulomas Using a Photon Imager

Isamu Sugawara\*, Satoru Mizuno, Taiga Tatsumi<sup>1</sup> and Tadayoshi Taniyama<sup>2</sup>

*Mycobacterial Reference Center, The Research Institute of Tuberculosis;*

*<sup>1</sup>Sowa Trading Co., Inc., Tokyo 204-0022; and <sup>2</sup>National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan*

(Received April 21, 2006. Accepted July 13, 2006)

**SUMMARY:** To clarify the location of pulmonary granulomas in vivo, we prepared a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv mutant in which the gene for a green fluorescent protein (GFP) (GFP-H37Rv) was introduced. Five weeks after aerosol infection with GFP-H37Rv, the infected lungs from guinea pigs and mice were subjected to imaging using a photon imager. Pulmonary granulomas more than 1 mm in diameter were localized clearly by the photon imager. Therefore, if a method for binding a dye (GFP, fluorescein isothiocyanate [FITC], etc.) specifically to *M. tuberculosis* can be developed, it will be possible to visualize granulomas using a photon imager.

When tubercle bacilli enter lung alveoli, they eventually induce granulomas unless they are killed. Such granulomas are similar to carcinomas in that they are solid and spread to other organs hematogenously. Therefore, for the diagnosis of granulomas, it is useful if their locations within organs can be pinpointed. As a first step toward this goal, we prepared H37Rv in which the gene for a green fluorescent protein (GFP) was introduced (GFP-H37Rv). Briefly, a BCG hsp60 promoter-GFP mut 3.1 was prepared by using the pCR 2.1-BCG hsp60 promoter and pGFP mut 3.1 (Clontech Labs., Inc., Pal Alto, Calif., USA). Then, a pHSP 60 promoter-GFP mut 3.1 was constructed by utilizing pHSP 60 promoter-GFP mut 3.1 B and pGFM-12 (kindly supplied by Dr. C. Locht) (1). *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain (ATCC25618) was then transformed with the pHSP 60 promoter-GFP mut 3.1 M to obtain a stable GFP-H37Rv mutant. This mutant was shown to remain stable for a year after subcutaneous administration to C57BL/6 mice. There was no statistically significant difference in in vitro growth between H37Rv and the GFP-H37Rv mutant (Fig. 1).

Next, the GFP-H37Rv mutant was smeared on glass slides and fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min. The slides were then observed using a confocal laser microscope (Digi-

tal Eclipse C1; Nikon Optical Co., Tokyo, Japan). As shown in Fig. 2, clustered GFP-H37Rv tubercle bacilli emitted intense green fluorescence. We then used the RAW264.7 mouse macrophage cell line to determine whether the GFP-H37Rv



Fig. 2. GFP-H37Rv mutant emitting green fluorescence. After the GFP-H37Rv mutant had been smeared on glass slides and fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min, it was observed by confocal laser microscopy.  $\times 600$ .

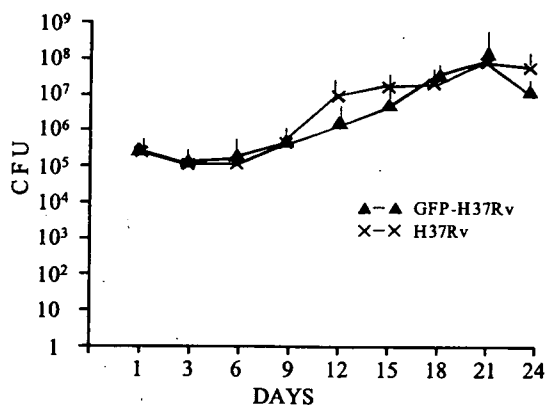


Fig. 1. Growth curve of GFP-H37Rv and H37Rv (parental strain).

\*Corresponding author: Mailing address: Mycobacterial Reference Center, The Research Institute of Tuberculosis, 3-1-24 Matsuyama, Kiyose, Tokyo 204-0022, Japan. Tel: +81-424-93-5075, Fax: +81-424-92-4600, E-mail: sugawara@jata.or.jp



Fig. 3. GFP-H37Rv mutant in phagosomes of the RAW264.7 murine macrophage cell line. After the GFP-H37Rv mutant had been added to RAW cells (multiplicity of infection, 50:1) they were fixed with 4% paraformaldehyde for 60 min, and observed by confocal laser microscopy.  $\times 600$ .

mutant maintained its green fluorescence intracellularly. The GFP-H37Rv mutant was added to a culture of RAW264.7 cells (multiplicity of infection, 50:1) and cultured in RPMI 1640 with 10% heat-inactivated fetal bovine serum overnight. After fixation with 4% paraformaldehyde for 60 min, the cells were observed using a confocal laser microscope. As shown in Fig. 3, the GFP-H37Rv mutant in macrophages still emitted intense green fluorescence.

We next attempted to determine the fate of the GFP-H37Rv mutant in vivo. Permission for animal experimentation was given by the Animal Experiment Committee of The Tuberculosis Research Institute. Female guinea pigs and BALB/c female mice were infected with the GFP-H37Rv mutant ( $1 \times 10^6$  CFU) by an airborne infection apparatus (Model 099CA424; Glas-Col, Inc., Terre Haute, Ind., USA). The concentration was calculated to result in the uptake of around 200 viable bacilli by guinea pig lungs and around 70 viable bacilli by mouse lungs after inhalation exposure for 90 min under the experimental conditions employed (2). Five weeks later, the lungs were removed and fixed with 4% paraformaldehyde for 2 days. The guinea pig and mouse lungs were scanned for green fluorescence using a  $\Phi$  imager (photon imager; Biospace Mesures, Paris, France). This imager is

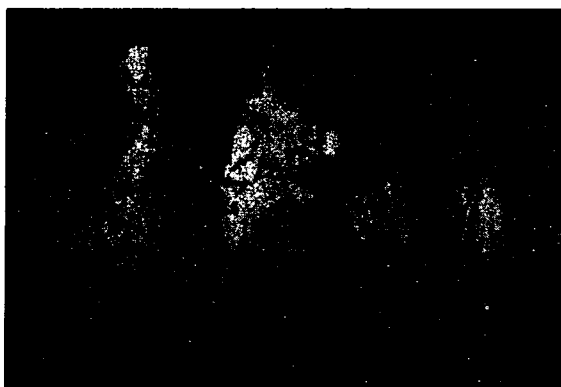


Fig. 4. Pulmonary granulomas visualized by a photon imager. Guinea pigs and BALB/c mice were infected with *M. tuberculosis* Kurono strain by aerosol infection. Five weeks after infection, lung tissues from guinea pigs (large) and mice (small) were visualized by a photon imager. Granulomas of various sizes were localized in the lungs.  $\times 10$ .



Fig. 5. Histopathology of infected lung tissues of guinea pigs (A) and mice (B). Pulmonary granulomas of various sizes are shown in this picture. Hematoxylin & eosin stain.  $\times 20$ .

based on a 3rd generation GaAs intensified charge-coupled device (ICCD) camera that allows real-time photon counting over a wide spectral range (400-900 nm). This imager amplifies every photon up to  $10^6$  light spots in a detector using an ICCD chip. The detection conditions of this imager were as follows: spatial resolution, equivalent to  $1,080 \times 1,440$  pixels CCD; dynamics, 2,000 counts/pixel/min; excitation, 485 nm; emission, 535 nm. As shown in Fig. 4, signals with green fluorescence were recognized to varying degrees in both guinea pig and mouse lungs. No signal was detected in exudative inflammation. Fig. 5 shows that the signals corresponded to granulomas (proliferative inflammation) of various sizes. The granulomas contained significant numbers of tubercle bacilli (GFP-H37Rv mutant) as evaluated by Ziehl-Neelsen staining for acid-fast bacilli (data not shown).

The spatial visualization technique (tumor imaging) is commonly utilized in the diagnosis of lung cancer (3-8). So far, however, there has been no research report on pulmonary granuloma imaging. The present study showed that it is possible to detect pulmonary granulomas by green fluorescence emission. This system detects signals from cyanin, fluorescein isothiocyanate (FITC), and rhodamine as well as GFP. If a technique for binding a dye specifically to tubercle bacilli could be developed, it would be possible to visualize granulomas (proliferative inflammation) in other organs as well as the lungs.

## REFERENCES

1. Srivastava, R., Deb, D.K., Srivastava, K.K., Loch, C. and Srivastava, B.S. (1998): Green fluorescent protein as a reporter in rapid screening of antituberculosis compounds in vitro and in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 253, 431-436.
2. Sugawara, I., Udagawa, T. and Yamada, H. (2004): Rat neutrophils prevent the development of tuberculosis. *Infect. Immun.*, 72, 1804-1806.
3. Burvenich, I., Schoonooghe, S., Cornelissen, B., Blanckaert, P., Coene, E., Cuvelier, C., Mertens, N. and Slegers, G. (2005): In vitro and in vivo targeting properties of iodine-123- or iodine-131-labeled monoclonal antibody 14C5 in a non-small cell lung cancer and colon carcinoma model. *Clin. Cancer Res.*, 11, 7288-7296.
4. Goldberg, D.M., Sharkey, R.M., Paganelli, G., Barbet, J. and Chatal, J.F. (2005): Antibody pretargeting advances cancer radioimmunodetection and radioimmunotherapy. *J. Clin. Oncol.*, 24, 823-834.
5. Mulshine, J.L. (2005): Current issues in lung cancer screening. *Oncology*, 19, 1724-1730.
6. Scopinaro, F., DiSanto, G.P., Tofani, A., Massari, R., Trotta, C., Ragone, M., Archimandritis, S. and Varvarigou, A.D. (2005): Fast cancer uptake of  $^{99m}\text{Tc}$ -labelled bombesin ( $^{99m}\text{Tc}$  BN1). *In Vivo*, 19, 1071-1076.
7. Shim, S.S., Lee, K.S., Kim, B.T., Chi, J.Y., Shim, Y.M., Chung, M. J., Kwon, O.J. and Lee, E.J. (2006): Integrated PET/CT and the dry pleural dissemination of peripheral adenocarcinoma of the lung: diagnostic implications. *J. Comput. Assist. Tomogr.*, 30, 70-76.
8. Yap, C.S., Czernin, J., Fishbein, M.C., Cameron, R.B., Schiepers, C., Phelps, M.E. and Weber, W.A. (2006): Evaluation of thoracic tumors with  $^{18}\text{F}$ -fluorothymidine and  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose-positron emission tomography. *Chest*, 129, 393-401.