

Acknowledgements

This work was supported by a grant to K.O. from the Effective Promotion of Joint Research of Special Coordination Funds (Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan). We are grateful to the Genefrontier (Tokyo) for supporting the mutation search using the CGS technique. The *E. coli* strains used in this study were kindly provided by CGSC (the *E. coli* Genetic Stock Centre, Yale University) and the National BioResource Project (NIG, Japan): *E. coli*.

References

- Albert, T.J., Dailidienė, D., Dailidė, G., Norton, J.E., Kalia, A., Richmond, T.A., et al. (2005) Mutation discovery in bacterial genomes: metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Nat Methods* 2: 951–953.
- Andersen, N.M., and Douthwaite, S. (2006) YebU is a m⁶C methyltransferase specific for 16S rRNA nucleotide 1407. *J Mol Biol* 359: 777–786.
- Andersson, D.I., and Levin, B.R. (1999) The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2: 489–493.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., et al. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2: 2006.008.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289: 905–920.
- Böttger, E.C., Springer, B., Pletschette, M., and Sander, P. (1998) Fitness of antibiotic-resistant microorganisms and compensatory mutations. *Nat Med* 4: 1343–1344.
- Brégeon, D., Colot, V., Radman, M., and Taddei, F. (2001) Translational misreading: a tRNA modification counteracts a +2 ribosomal frameshift. *Genes Dev* 15: 2295–2306.
- Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interaction with antibiotics. *Nature* 407: 340–348.
- Cundliffe, E. (1989) How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu Rev Microbiol* 43: 207–233.
- Cundliffe, E. (1990) Recognition sites for antibiotics within rRNA. In *The Ribosome: Structure, Function and Evolution*. Hill, W.E., Dahlberg, A., Garrett, R.A., Moore, P.B., Schlessinger, D., and Warner, J.R. (eds). Washington DC: American Society for Microbiology, pp. 479–490.
- Demerec, M. (1948) Origin of bacterial resistance to antibiotics. *J Bacteriol* 56: 63–74.
- Douthwaite, S., Fourmy, D., and Yoshizawa, S. (2005) Nucleotide methylations in rRNA that confer resistance to ribosome-targeting antibiotics. In *Fine-tuning of RNA Functions by Modification and Editing*. Grosjean, H. (ed.). New York: Springer Verlag, pp. 287–309.
- Finken, M., Kirschner, P., Meier, A., Wrede, E., and Böttger, E.C. (1993) Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol* 9: 1239–1246.
- Gillespie, S.H. (2002) Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 267–274.
- Grosjean, H., Keith, G., and Droogmans, L. (2004) Detection and quantification of modified nucleotides in RNA using thin-layer chromatography. *Methods Mol Biol* 265: 357–391.
- Helser, T.L., Davies, J.E., and Dahlberg, J.E. (1972) Mechanism of kasugamycin resistance in *Escherichia coli*. *Nat New Biol* 235: 6–9.
- Honoré, N., and Cole, S.T. (1994) Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 238–242.
- Honoré, N., Marchal, G., and Cole, S.T. (1995) Novel mutation in 16S rRNA associated with streptomycin dependence in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 769–770.
- Hosaka, T., Xu, J., and Ochi, K. (2006) Increased expression of ribosome recycling factor is responsible for the enhanced protein synthesis during the late growth phase in an antibiotic-overproducing *Streptomyces coelicolor* ribosomal *rpsL* mutant. *Mol Microbiol* 61: 883–897.
- Hosoya, Y., Okamoto, S., Muramatsu, H., and Ochi, K. (1998) Acquisition of certain streptomycin-resistant (*str*) mutations enhances antibiotic production in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2041–2047.
- Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A., and Suzuki, T. (2006) Mechanistic insights into sulfur relay by multiple sulfur mediators involved in thioridine biosynthesis at tRNA wobble positions. *Mol Cell* 21: 97–108.
- Johansen, S.K., Maus, C.E., Plikaytis, B.B., and Douthwaite, S. (2006) Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using *thyA*-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. *Mol Cell* 23: 173–182.
- Kagan, R.M., and Clarke, S. (1994) Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch Biochem Biophys* 310: 417–427.
- Klein, M., and Kimmelman, L.J. (1946) The role of spontaneous variants in the acquisition of streptomycin resistance by the shigellae. *J Bacteriol* 52: 471–479.
- Korostelev, A., Trakhanov, S., Laurberg, M., and Noller, H.F. (2006) Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements. *Cell* 126: 1065–1077.
- Meier, A., Sander, P., Schaper, K.-J., Scholz, M., and Böttger, E.C. (1996) Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2452–2454.
- Melancon, P., Lemieux, C., and Brakier-Gingras, L. (1988) A mutation in the 530 loop of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA causes resistance to streptomycin. *Nucleic Acids Res* 16: 9631–9639.
- von Meyenburg, K., and Hansen, F.G. (1980) The origin of replication, *oriC*, of the *Escherichia coli* chromosome: genes near to *oriC* and construction of *oriC* deletion mutations. In *Mechanistic Studies of DNA Replication and Genetic Recombination*. New York: Academic Press, pp. 137–159.
- Miller, J.H. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and*

- Related Bacteria*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Montandon, P.E., Wagner, R., and Stutz, E. (1986) *E. coli* ribosomes with a C912 to U base change in the 16S rRNA are streptomycin resistant. *EMBO J* 5: 3705–3708.
- Nair, J., Rouse, D.A., Bai, G.-H., and Morris, S.L. (1993) The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 10: 521–527.
- Ochi, K., and Hosoya, Y. (1998) Genetic mapping and characterization of mutations which suppress the effect of a *relC* mutation on antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Antibiot* 51: 592–595.
- Ochi, K., Okamoto, S., Tozawa, Y., Inaoka, T., Hosaka, T., Xu, J., and Kurosawa, K. (2004) Ribosome engineering and secondary metabolite production. *Adv Appl Microbiol* 56: 155–184.
- Ogle, J.M., and Ramakrishnan, V. (2005) Structural insights into translational fidelity. *Annu Rev Biochem* 74: 129–177.
- Okamoto, S., Lezhava, A., Hosaka, T., Okamoto-Hosoya, Y., and Ochi, K. (2003) Enhanced expression of S-adenosylmethionine synthetase causes overproduction of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 185: 601–609.
- Pinard, R., Payant, C., Melancon, P., and Brakier-Gingras, L. (1993) The 5' proximal helix of 16S rRNA is involved in the binding of streptomycin to the ribosome. *FASEB J* 7: 173–176.
- Poehlsgaard, P., and Douthwaite, S. (2005) The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 3: 870–881.
- Powers, T., and Noller, H.F. (1991) A functional pseudoknot in 16S ribosomal RNA. *EMBO J* 10: 2203–2214.
- Selmer, M., Dunham, C.M., Murphy, F.V., 4th, Weixlbaumer, A., Petry, S., et al. (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* 313: 1935–1942.
- Ramaswamy, S.V., Dou, S.J., Rendon, A., Yang, Z., Cave, M.D., and Graviss, E.A. (2004) Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol* 53: 107–113.
- Romanowski, M.J., Bonanno, J.B., and Burley, S.K. (2002) Crystal structure of the *Escherichia coli* glucose-inhibited division protein B (GidB) reveals a methyltransferase fold. *Proteins* 47: 563–567.
- Sander, P., Springer, B., Prammananan, T., Sturmfeis, A., Kappler, M., Pletschette, M., et al. (2002) Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1204–1211.
- Schatz, A., and Waksman, S.A. (1944) Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc Soc Exp Bio Medical* 57: 244–248.
- Shima, J., Hesketh, A., Okamoto, S., Kawamoto, S., and Ochi, K. (1996) Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 178: 7276–7284.
- Springer, B., Kidan, Y.G., Prammananan, T., Ellrott, K., Böttger, E.C., and Sander, P. (2001) Mechanisms of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2877–2884.
- Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K.E., Williams, D.L., Kreiswirth, B.N., and Musser, J.M. (1996) Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 1024–1026.
- Suzuki, Y., Katsukawa, C., Tamaru, A., Abe, C., Makino, M., Mizuguchi, Y., et al. (1998) Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 36: 1220–1225.
- Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Jr, Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vonnheim, C., et al. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407: 327–339.
- Yim, L., Moukadiri, I., Björk, G.R., and Armengod, M.-E. (2006) Further insights into the tRNA modification process controlled by proteins MnmE and GidA of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 34: 5892–5905.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article online:

Fig. S1. Alignment of GidB homologue from various bacteria.

Table S1. *gidB* mutations in spontaneous streptomycin-resistant mutants from various bacteria.

Table S2. Mutations and drug susceptibility in *M. tuberculosis* clinical isolate (sample group I).

Table S3. Mutations and drug susceptibility in *M. tuberculosis* clinical isolate (sample group II).

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>

6. 多剤耐性結核菌検出法の進歩

鈴木 定彦*¹⁾ 田丸 亜貴** 中島 千絵*²⁾
三原 みづき*³⁾ 福島 由華里*⁴⁾ 松葉 隆司***

結核菌の迅速薬剤感受性試験は、的確な治療による多剤耐性結核菌の出現と蔓延の防止には必須である。しかしながら、従来から実施されている小川培地や寒天培地上での培養をベースとした方法では現在以上の迅速化を望むことはできない。最近では液体培地をベースとした方法により迅速化が計られている。更に培養をベースとした薬剤感受性試験法として新たな試みも見られる。その中でミコバクテリオファージを用いた方法と光学顕微鏡による観察法は有望なものと考えられる。一方、全く異なったアプローチとして遺伝子診断法も数多く開発されてきている。成長速度の著しく遅い結核菌において迅速な薬剤耐性の判定を可能にするためには、結核菌の薬剤耐性に関連する遺伝子変異について解析をすすめ、遺伝子診断へと応用することが選択肢の一つと考えられる。本稿では最近新たに開発された薬剤耐性結核菌検出法について解説する。

Key Words : 薬剤耐性結核菌 / ミコバクテリオファージ / 顕微鏡観察法 / 遺伝子変異 / DNA マイクロアレイ

I はじめに

わが国の結核症は国民病と恐れられていたが、栄養事情、衛生状態の改善や化学療法の普及、更には結核予防法に基づいた措置により、死亡数、新規登録患者数は大きく低下した。しかしながら、1985年頃より減少率が鈍化し始め、1997年には患者登録制度が実施されて以降初めて前年を上回った。その後2000年には減少傾向に戻ったものの、2004年には依然として2,328人が結核で死亡している。また、新規登録患者数29,736人、感染源となりうる塗抹陽性患者数11,445人と、共にいまだ高い水準に留まっている。

今日のわが国では結核が流行していた時期に結

核菌に感染した中高年の既感染者からの発病が多く、若年層の結核患者は減少している。結果として、結核未感染者の割合が年々増加し、中年層においても未感染者の増加が認められているのが現実である。一方では、再発患者における薬剤耐性結核の割合が増加傾向を示している。若年層の薬剤耐性結核発病の危険性が増加しているのが現実であり、実際にそのような症例も報告されている。

薬剤耐性結核の蔓延を防止するためには、的確な治療に繋がる迅速で正確な薬剤感受性試験の実施が重要である。しかしながら、従来の結核菌の薬剤感受性試験は固形培地上での培養をベースとしており、正確な耐性判定には約2カ月間を要す

Advances of methods for detection of multidrug-resistant tubercle bacilli

* Yasuhiko Suzuki, Chie Nakajima, Mizuki Nishihara, Yukari Fukushima

北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター国際疫学部門¹⁾ 教授²⁾ 博士研究員³⁾ 共同研究員⁴⁾ 研究補助員

** Aki Tamaru 大阪府立公衆衛生研究所感染症部 主任研究員

*** Takashi Matsuba 鳥取大学医学部感染制御学分野 講師

特集●多剤耐性結核の現状と今後

るという欠点がある。一方、近年開発された Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 法を用いることにより耐性判定に要する時間が大幅に短縮されたとはいえ、依然として判定までに3週間以上の期間が必要である。著しく遅い結核菌の増殖速度を考えると、MGIT 法でもこれ以上の迅速化を望むのは困難と考えられる。

現在、より迅速な薬剤耐性結核菌検出のための様々な方法が開発されてきている。本稿では、それらについて解説する。

II 生菌を用いた検査法

1. バクテリオファージを用いたアッセイ

ミコバクテリオファージを基盤とした試験は結核の診断と薬剤感受性試験の両者に用いられている。この技術は生きた結核菌に感染するバクテリオファージを用いて生物発光またはファージの増幅を指標として実施するものである。

1) 生物発光を用いた検査法¹⁾

ルシフェラーゼ遺伝子を挿入したミコバクテリオファージが結核菌に感染した場合、結核菌の中でミコバクテリオファージ由来の蛋白質をコードする遺伝子の転写と翻訳が起こる。このとき同時にミコバクテリオファージゲノム内に挿入されて

いるルシフェラーゼ遺伝子の転写と翻訳も起こり、結核菌内にルシフェラーゼが蓄積されることになる(図1)。結核菌が存在しない場合にはその限りではない。ルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定することにより生きた結核菌存在の有無が判定できる。抗結核剤の存在下に本法を実施した場合、耐性菌ではルシフェラーゼ活性が見られ、感受性菌ではこれが見られないことになる。現在米国の Sequella 社が Bronx Box という名称で本法の実用化に関する検討を行っている。

2) ファージの増殖を基盤とした検査法²⁾

本法ではミコバクテリオファージが結核菌に感染し、結核菌内で子孫ファージが増殖するのを見るものである。結核菌そのものでファージによるプラーク形成を見るためには2~3週間の期間を要するため、検出には迅速発育抗酸菌の一種のスメグマ菌 (*Mycobacterium smegmatis*) を用いる。原理を図2に示した。この方法により結核菌の検出が3~4日に短縮された。実際の耐性検査では 0.75×10^5 CFU の結核菌懸濁に被検抗結核剤を加え、72時間 37℃ で培養した後 5×10^8 PFU のミコバクテリオファージ D29 を添加し、37℃ で90分間培養する。感染できなかったミコバクテリオファージは硫酸第一鉄アンモニウムにて不

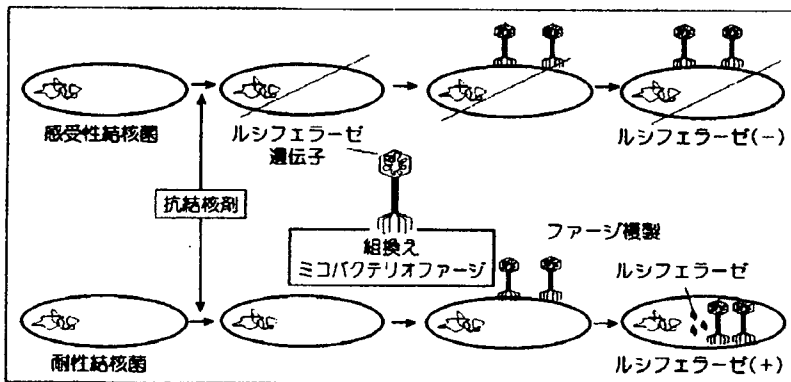


図1 生物発光を用いた薬剤感受性試験法

ルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれた組換えミコバクテリオファージが結核菌に感染すると、結核菌内でミコバクテリオファージの複製が起こる。このときミコバクテリオファージゲノムに組み込まれているルシフェラーゼ遺伝子も同時に発現し、ルシフェラーゼ蛋白質が生産される。薬剤感受性菌の場合は結核菌自体が薬剤存在下には生存できないためルシフェラーゼ蛋白質は生産されない。ルシフェラーゼ蛋白質による生物発光が見られれば耐性と判定する。

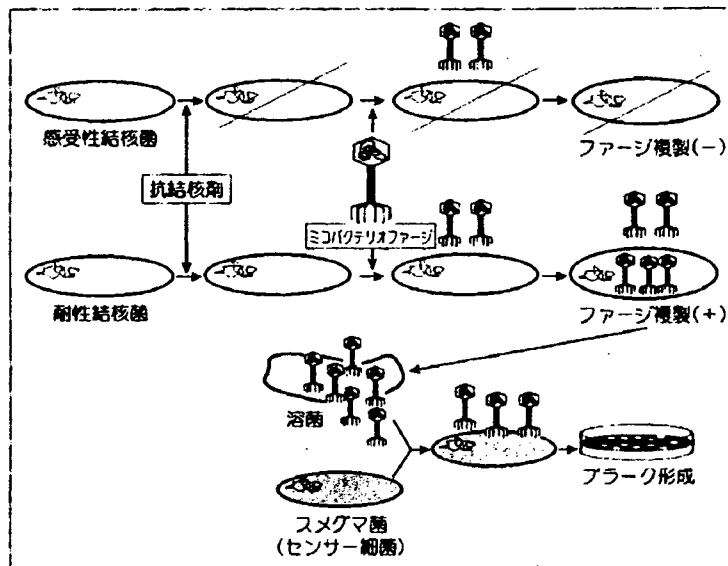


図2 ファージの増殖を基盤とした薬剤感受性試験法

ミコバクテリオファージが結核菌に感染すると、結核菌内でミコバクテリオファージが増殖する。この結核菌と迅速発育抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* (スメグマ菌) を混合し平板上に蒔く。結核菌内で増殖したミコバクテリオファージはスメグマ菌にも感染し、スメグマ菌の菌膜上でプラークを形成する。薬剤感受性菌の場合は結核菌自体が薬剤存在下には生存できないためミコバクテリオファージは増殖しない。プラーク形成が見られれば耐性と判定する。

活化する。結果として得られた懸濁液の一部をスメグマ菌を敷き詰めた寒天平板に蒔き 37℃、一晚培養することで結果が得られる。従って薬剤感受性試験が4日間を終了する(図2)。本法は既に英国 Biotec Laboratory より FASTPlaque-TB[®] という名称で市販されている。

上記2つの方法が様々な研究室で試験された結果、どちらの方法も臨床分離菌に対しては十分な感度および特異性を有しているといった評価を受けた。しかしながら、喀痰等の臨床検体を用いた評価も複数実施されているが現在のところ一致した結論には至っていない。つまり、現状ではミコバクテリオファージを基盤とした薬剤感受性試験法は分離菌に限定して使用されるべきであると考えられる。

2. 顕微鏡観察をベースとした薬剤感受性試験 (Microscopic observation drug-susceptibility assay (MODS))

Microscopic observation drug-susceptibility assay (MODS) は倒立光学顕微鏡を用いて液体培地 (Middlebrook 7H9) 中での結核菌の増殖を観察することにより薬剤感受性を判定する方法である。液体培地中で結核菌はコードファクターの関与による紐状の増殖 (Cord formation) を見せる。本法では抗結核剤を含む培地と含まない培地中での結核菌の紐状増殖を光学顕微鏡で観察するという単純なものである。最近この方法の有効性に関するいくつかの評価結果が報告されている^{3, 4)}。中でも Moore らの研究では数多くの検体についてその有効性が示されている。彼らは MODS 法と従来法である Lowenstein-Jensen (LJ) 培地を用いた培養試験を行い、検出率が MODS 法では 94% であるのに対して LJ 培地法では 86.9% と MODS 法が明らかに優れていたと報告している。

特集●多剤耐性結核の現状と今後

また、検出に要する期間も MODS 法では 8 日間と LJ 培地法 (塗抹陽性: 16 日間, 塗抹陰性: 28 日間) に対して優れたものであった。MODS 法を用いてイソニコチン酸ヒドラジド (INH)、リファンピシリン (RFP)、これら両剤、エタンプトール (EB)、およびストレプトマイシン (SM) に対する感受性試験が実施され、INH、RFP、これら両剤に対する感受性試験においては従来法と良好な一致が見られたが、EB、および SM 感受性試験における MODS 法の有用性は示されなかった。

3. 新規検出系を用いた迅速薬剤感受性試験

新規検出試薬を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験には ATP (adenosine triphosphate) 測定法、アラモア-ブルー法等がある。ATP 測定法は生菌中の ATP を測定することでこれまでにない迅速な薬剤感受性試験を可能としたものである。微生物をはじめとする生細胞はエネルギー源として ATP を含有している。従って、ATP を測定することにより生死の判定ができることになる。抗結核剤存在下で 5 日間培養した被検菌株の持つ ATP を測定し、生死を判定することにより薬剤に対する感受性を判定するのが本法である⁹⁾。

Ⅲ 遺伝子増幅を基盤とした迅速薬剤耐性結核菌検出法

細菌が薬剤耐性を獲得する場合、プラスミド、トランスポゾン、インテグロンあるいは染色体に存在する遺伝子により決定されると考えられている。プラスミドやトランスポゾンによって決定される耐性では、抗生物質を分解または修飾して不活化する酵素をコードする遺伝子がよく研究されている。一方、染色体遺伝子上に存在する薬剤耐性形質はおもに薬剤の標的となる蛋白質をコードする遺伝子の突然変異によって決定されている。通常の細菌では上記の様々な機構で薬剤耐性を獲得することが知られているが、結核菌での薬剤耐性獲得は染色体上の遺伝子変異によって決定されている。結核菌は自然突然変異と選択によって、耐性を獲得するのである。つまり、抗結核剤による治療により感受性菌が全て死滅した後も低い頻度で自然に起こった耐性変異を持った菌が生き残り、増殖することにより全て耐性菌となるもので

ある。

抗結核剤の作用機序と耐性を決定する変異について数多くの報告がなされている。抗結核剤のうち INH はカタラーゼにより活性化され、ミコール酸の生合成を阻害することが報告されている。INH 耐性を引き起こす原因の一部が *katG* 遺伝子の全体欠損あるいは部分欠損にあることが Zhang ら¹⁰⁾ により 1993 年に報告された。次いで、*katG* 遺伝子上の塩基置換、挿入等によっても INH 耐性となることが判明した⁷⁾。さらに、INH 耐性に関与する *inhA*、*kasA*、*aphC*、*ndh* 遺伝子上の変異が次々と明らかとなった。RFP は原核生物の DNA 依存 RNA ポリメラーゼの β サブユニットに結合して、RNA 合成開始の過程を特異的に阻害する。Telenti ら¹¹⁾ は結核菌の RNA ポリメラーゼ β サブユニットをコードする *rpoB* 遺伝子上の点突然変異と RFP 耐性の間に強い相関性があることを見出した。筆者ら⁹⁾ は日本で分離された結核菌においても同様な現象を見出した。その後様々な研究室から出されたデータを総合して考えると、95%以上の RFP 耐性結核菌において *rpoB* 上に点突然変異が存在することになる。ピラジナミド (PZA) は結核菌自身の持つピラジナミダーゼ活性によりピラジン酸へと変換され、結果として脂肪酸合成酵素 I (FAS- I) に作用し、短鎖脂肪酸の合成を阻害することが報告された。Scorpio ら¹⁰⁾ は結核菌のピラジナミダーゼをコードする *pncA* 遺伝子上の点突然変異と PZA 耐性の間に強い相関性があることを見出した。93%以上の PZA 耐性結核菌において *pncA* 上に点突然変異が存在することも報告された。EB を低濃度で結核菌と同属の菌に作用させて培養した場合に、菌体の表面に存在するアラビノガラクトタン (AG) とリポアラビノマンナン (LAM) の分子量が著しく低下する現象が見られた。この結果から耐性に関与する遺伝子としてアラビノース転移酵素をコードする *embB* 遺伝子が同定された¹¹⁾。SM はリボゾームに不可逆的に結合し、蛋白質合成開始の阻害を引き起こす。Finken ら¹²⁾ は SM 耐性結核菌の *rrs* 遺伝子および S12 リボゾーム蛋白質をコードする遺伝子 (*rpsL*) の塩基配列を分析し、約 80%の耐性菌においてこれらどちらかあるいは両方の遺

表1 主要抗結核剤の作用点と耐性に関する遺伝子

薬剤	作用機序	耐性に関する遺伝子
PZA	C16 ~ 24 脂肪酸 合成阻害	<i>pncA</i> : pyrazinamidase 遺伝子 <i>fas I</i> : fatty acid synthase I 遺伝子
RFP	RNA 合成阻害	<i>rpoB</i> : RNA polymerase β サブユニット 遺伝子
INH	ミコール酸合成阻害	<i>katG</i> : catalase 遺伝子 <i>inhA</i> : enoyl acyl carrier protein reductase 遺伝子 <i>kasA</i> : β -ketoacyl acyl carrier protein synthase 遺伝子 <i>ahpC</i> : alkyl hydroperoxide reductase 遺伝子 <i>ndh</i> : NADH dehydrogenase 遺伝子
EB	アラビノガラクトン 合成阻害	<i>embB</i> : arabinosyltransferase 遺伝子 <i>embR</i> : arabinosyltransferase regulator 遺伝子
SM	蛋白質合成阻害	<i>rrs</i> : 16S rRNA 遺伝子 <i>rpsL</i> : ribosomal protein S12 遺伝子
KM	蛋白質合成阻害	<i>rrs</i> : 16S rRNA 遺伝子
CS	ペプチドグリカン 合成阻害	<i>alaA</i> : D-アラニンラセマーゼ遺伝子
PAS	核酸合成阻害	<i>thyA</i> : チミジレート合成酵素遺伝子
キノロン	DNA 複製阻害	<i>gyrA</i> : DNA gyrase A サブユニット 遺伝子

伝子上に点突然変異が見出されることを報告した。筆者ら¹³⁾は日本で分離された結核菌においても同様な変異が見られることを報告した。カナマイシン (KM) は 16S リボソーム RNA 上の塩基に結合し、伸長因子 G のリボソームへの結合を阻害することが知られている。筆者ら¹⁴⁾は臨床分離結核菌の KM 耐性菌株の 16S リボソーム RNA 遺伝子において一定領域に点突然変異が見られることを発見した。サイクロセリン (CS) は D-アラニンのアナログとして働きペプチドグリカンの生合成を阻害することが知られている。CS 耐性菌における D-アラニンラセマーゼ遺伝子の変異と耐性の関係が報告された。ニューキノロン (FQ) は DNA ジャイレースを阻害し、結果として DNA 複製を阻害する薬剤である。FQ 耐性菌における *gyrA* 遺伝子の変異が報告されている。パラアミノサリチル酸 (PAS) はチミジレートシンターゼを阻害することが明らかとなっている。PAS 耐性菌においてチミジレートシンターゼをコードする *thyA* 遺伝子の変異が報告されている。

これまでに明らかとなっている主な抗結核剤の作用機序と耐性獲得に関する遺伝子について表

1 にまとめた。これらの情報を基にして遺伝子変異検出による様々な迅速薬剤耐性結核検出法が考案された。それらどの方法も長所と短所を併せ持つものであった。

1. ラインプローブアッセイ

ラインプローブアッセイは PCR (polymerase chain reaction) とリバースハイブリダイゼーションを組み合わせた方法である。図3にラインプローブアッセイの概要を示した。リバースハイブリダイゼーション法とは固相化したプローブに対して標的 DNA をハイブリダイズさせるものである。ラインプローブアッセイではメンブレンフィルター上に固定したプローブに対してビオチンで標識した PCR 産物をハイブリダイズさせた後、メンブレンフィルター上のビオチンをアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンにて検出するものである。この方法により特定の遺伝子上の変異を検出し、薬剤耐性結核菌を検出する。市販品として入手可能なものには INNO-LiPA-Rif. TB kit (Innogenetics NV, ベルギー) と GenoType® MTBDR assay (Hain Lifescience GmbH, ドイツ) がある。INNO-LiPA-Rif. TB

(1709) 63

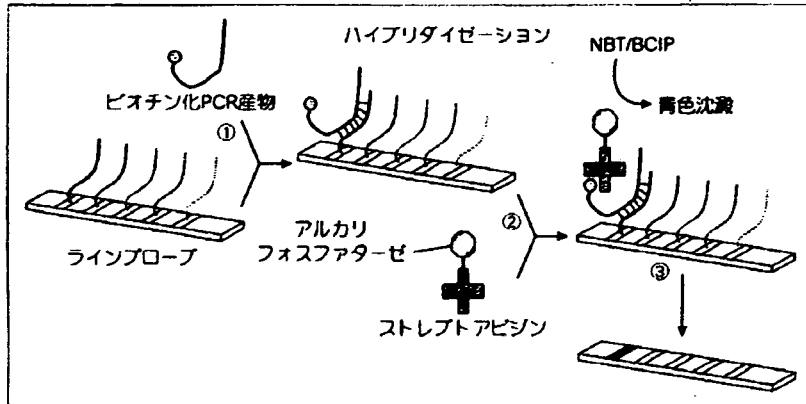


図3 ラインプローブアッセイ

① メンブレンフィルター上に固定したプローブに対してビオチン標識した PCR 産物をハイブリダイズさせる。② ハイブリダイズした DNA 上のビオチンにアルカリフォスファターゼ標識したストレプトアビジンを反応させる。③ メンブレンフィルター上のアルカリフォスファターゼ活性を NBT/BCIP の発色反応で検出する。

kit では RFP 感受性試験の結果のみが得られるが, GenoType® MTBDR assay では RFP と INH に対する感受性試験の成績が得られる。最近の RFP 耐性を対象としたメタ分析により INNO-LiPA -Rif. TB kit は臨床分離株を対象とした場合に 95 ~ 100% という高い感受性と特異性を有していることが示された¹⁵⁾。しかしながら、略痰等の臨床検体を対象とした場合には正確性が大幅に減少することも報告された。GenoType® MTBDR assay においても INNO-LiPA -Rif. TB kit と同様な結果が得られた¹⁶⁾。

2. DNA マイクロアレイ

一方、我々は DNA マイクロアレイ技術を応用することにより 5 薬剤に対する感受性判定を同時に可能とするシステムを開発した (オリゴアレイ® TB, 日清紡, 日本)。図 4 A にオリゴアレイ® TB の操作手順を示した。また図 4 B および図 4 C にはそれぞれオリゴアレイ® TB 上のキャプチャーオリゴヌクレオチドの配置および本法により得られた結果の一例を示した。本法による判定結果と従来の小川培地を用いた薬剤感受性試験の一致率について検討した。その結果、本法では感受性結核菌における一致率は 96% 以上と総じて高いものの、耐性菌においては一致率が RFP で 93%、INH で 69%、SM で 69%、EB で 61%、KM で

80% であった¹⁷⁾。DNA マイクロアレイ技術を応用した感受性試験法は他にもいくつか報告されているが、感度、特異性共に我々が開発したオリゴアレイ® TB と同様なものであった¹⁸⁾。

3. 分子ビーコン

分子ビーコンはステム-ループ構造を形成する一本鎖オリゴヌクレオチドで、両末端にはそれぞれ蛍光色素と消光のためのクエンチャーが結合してある。標的となる DNA が存在しない場合には蛍光色素を持ったステムの一方がクエンチャーを持ったもう一方のステムと結合し、結果として蛍光色素とクエンチャーが物理的に接近するために蛍光が観察されることはない。一方、標的 DNA が存在している場合には分子ビーコンは標的 DNA と結合する。この場合は蛍光色素とクエンチャー間の物理的位置が遠くなるため、もはやクエンチャーは蛍光色素に影響を及ぼすことができなくなり蛍光が検出できるようになる (図 5)。本法の短所は蛍光の検出に高価なリアルタイム PCR 用の機器を必要とすることである。最近分子ビーコン法を用いた 1 塩基置換検出による迅速薬剤感受性試験法の評価に関する報告がなされた。その報告によると分子ビーコン法は RFP 感受性試験では高い感度 (89 ~ 98%) と特異性 (99 ~ 100%) を示したが、INH 耐性検出に関する感度は

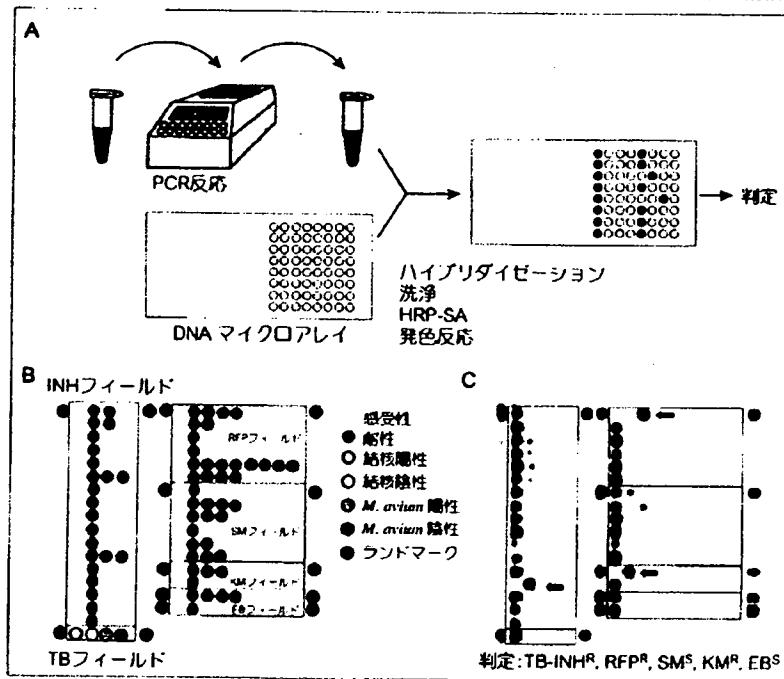


図4 DNA マイクロアレイによる迅速薬剤感受性試験

A. DNA マイクロアレイの操作手順。PCRにより増幅させたビオチン標識 DNA 断片を DNA マイクロアレイ上のキャプチャーオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせたのち発色反応により検出する。B. オリゴアレイ® TB 上のキャプチャーオリゴヌクレオチドの配置。C. オリゴアレイ® TB による迅速薬剤感受性試験結果の一例。この検体は INH 耐性、RFP 耐性、SM 感受性、KM 耐性、EB 感受性と判定された。

HRP-SA : horseradish peroxidase-streptavidin

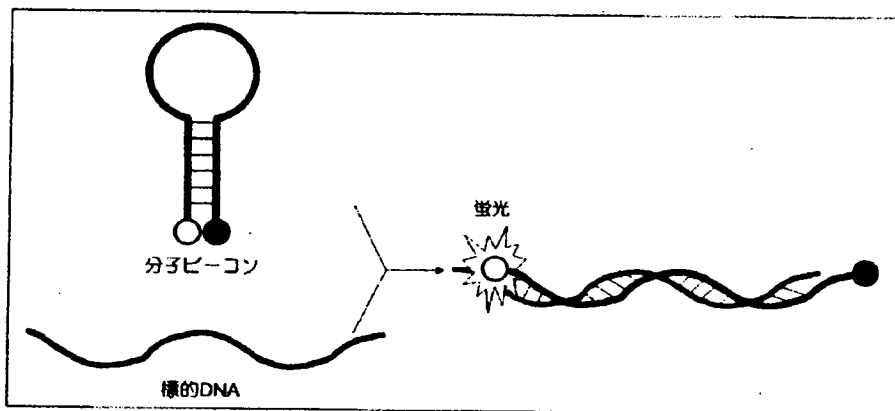


図5 分子ビーコンによる特異配列検出

分子ビーコンは両末端にそれぞれ蛍光色素とクエンチャーを結合させたステム-ループ構造を形成する一本鎖オリゴヌクレオチドで、標的となる DNA が存在している場合に蛍光色素とクエンチャー間の物理的位置が遠くなるため蛍光検出が可能となる。

特集●多剤耐性結核の現状と今後

相対的に低いものであった¹⁹⁾。

他にもリアルタイム PCR を基盤とした薬剤耐性菌検出法は報告されているが高価な機器を必要とすることが分子ビーコン法との共通の欠点となっている。

4. PCR をベースとした試験管内ピラジナミダーゼ試験

PZA は酸性条件下で強い抗結核作用を発揮する抗結核剤であるため感受性試験も酸性条件下で培養を実施する必要があるが、その再現性に問題があることが知られている。従って現行の PZA 感受性試験は培養ではなくピラジナミダーゼ活性を測定することにより実施されている。本試験は臨床分離株を用いて実施しなければならないため、結果が得られるまでに長期間を要する。筆者らは迅速な PZA 感受性試験を実現するためにピラジナミダーゼをコードする *pncA* 遺伝子を PCR により増幅し、これを試験管内転写-翻訳系にて蛋白質へと合成し、ピラジナミダーゼ活性を測定する系を構築した。この方法により、臨床分離株から 90% 以上の感度と特異性でピラジナミド耐性結核菌の検出が可能であった²⁰⁾。

IV おわりに

以上、新しい薬剤耐性結核菌検出法について解説してきた。これらの方法はどれも臨床検体からの直接薬剤感受性試験をめざして開発されてきたものであるが、現在のところ満足できる結果が得られている訳ではない。しかしながら、臨床分離菌を対象とした場合には感度、特異性共に優れていると言っても過言ではない。生菌を用いた検査法のうちでは倒立顕微鏡さえあれば実施可能な MODS 法が特に期待できるものと考えられる。この方法は、結核菌を扱っている検査室で容易にできるため世界中の至る所で実施することが可能である。しかしながら、臨床検体からの直接的な薬剤感受性試験を可能とするための改良の余地が残されているものと考えられる。

一方、遺伝子変異の検出による薬剤感受性試験は、DNA が得られればその日のうちに感受性判定ができるという迅速性にメリットがある。しかしながら、RFP と FQ をのぞいては耐性菌の検出率

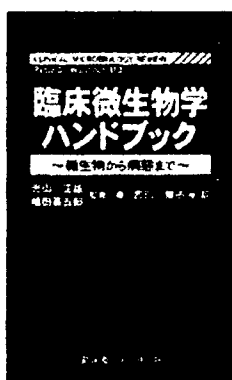
が十分であるとは言い難い。これは耐性に関与する遺伝子変異の一部が未だに解明されていないことに起因する。今後の研究により耐性に関与する遺伝子変異が全て解明され、これらを網羅できるシステムが開発されれば、迅速で精度の高い薬剤感受性試験法となるものと期待される。

文献

- 1) Hazbon MH, et al.: Photographic and luminescent detection of luciferase reporter phages for drug susceptibility testing of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 41: 4865-4869, 2003
- 2) Eltringham IJ, et al.: Evaluation of a bacteriophage-based assay (phage amplified biologically assay) as a rapid screen for resistance to isoniazid, ethambutol, streptomycin, pyrazinamide, and ciprofloxacin among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 37: 3528-3532, 1999
- 3) Moore DA, et al.: Tuberculosis Working Group in Peru. Microscopic observation drug susceptibility assay, a rapid, reliable diagnostic test for multidrug-resistant tuberculosis suitable for use in resource-poor settings. *J Clin Microbiol* 42: 4432-4437, 2004
- 4) Caviedes L, et al.: Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Peru. *J Clin Microbiol* 38: 1203-1208, 2000
- 5) 山崎利雄ほか: 生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験法 (第Ⅲ法). *臨床病理* 48: 167-173, 2000
- 6) Zhang Y, Young DB: Molecular mechanisms of isoniazid: a drug at the front line of tuberculosis control. *Trends Microbiol* 1: 109-113, 1993
- 7) Altamirano M, et al.: Mutations in the catalase-peroxidase gene from isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis* 169: 1162-1165, 1994
- 8) Telenti A, et al.: Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*.

6. 多剤耐性結核の菌検出法の進歩

- Lancet **341**: 647-650, 1993
- 9) Suzuki Y, et al.: Mutations in *rpoB* gene of rifampicin resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. 感染症学雑誌 **69**: 413-419, 1995
- 10) Scorpio A, Zhang Y: Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat Med **2**: 662-667, 1996
- 11) Telenti A, et al.: The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. Nat Med **3**: 567-570, 1997
- 12) Finken M, et al.: Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. Mol Microbiol **9**: 1239-1246, 1993
- 13) Katsukawa C, et al.: Characterization of the *rpsL* and *rrs* genes of streptomycin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. J Appl Microbiol **83**: 634-640, 1997
- 14) Suzuki Y, et al.: Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. J Clin Microbiol **36**: 1220-1225, 1998
- 15) Morgan M, et al.: A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis **5**: 62, 2005
- 16) Cavusoglu C, et al.: Evaluation of the Genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol **44**: 2338-2342, 2006
- 17) 吉川陽子ほか: DNA マイクロアレイを用いた臨床分離結核菌の薬剤耐性判定. 臨床微生物迅速診断研究会誌 **14**: 45-50, 2003
- 18) Kim SY, et al.: Evaluation of the CombiChip Mycobacteria Drug-Resistance detection DNA chip for identifying mutations associated with resistance to isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis*. Diagn Microbiol Infect Dis **54**: 203-210, 2006
- 19) Lin SY, et al.: Rapid detection of isoniazid and rifampin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex from cultures or smear-positive sputa by use of molecular beacons. J Clin Microbiol **42**: 4204-4208, 2004
- 20) Suzuki Y, et al.: Rapid detection of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by a PCR-based *in vitro* system. J Clin Microbiol **40**: 501-507, 2002



臨床微生物学ハンドブック ～微生物から病態まで～

監修 聖マリアンナ医科大学・昭和薬科大学客員教授 嶋田基五郎
京都大学大学院医学研究科微生物感染症学教授 光山 正雄
新潟市民病院感染症担当医 吉川 博子 他 訳

B 6 変型判 412頁 定価 4,095円(本体 3,900円+税 5%) 送料実費
ISBN4-7532-1893-7 C3047

- ◎微生物学を学ぼうとする全ての方に!
- ◎米国最新知見を盛り込んだテキストブックを、完全翻訳!
- ◎微生物の名前、特徴から予防ワクチンなどの臨床的側面までを、見開きで見やすく掲載。

株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 (届出番号)
〒101-0065 東京都千代田区二軒町3丁目3番1号・TKビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)6359 \ 0910-1-13351

(1713) 67

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, Midoriguoka, 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-

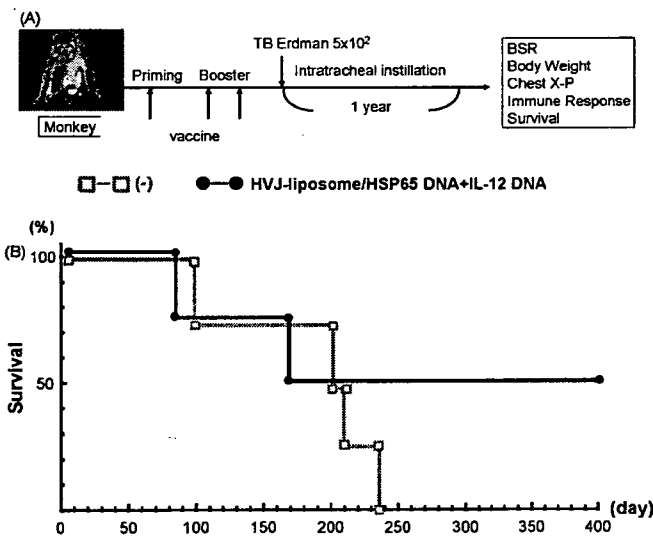


Fig. 1. (A) Evaluation of vaccine efficacy using cynomolgus monkey. Groups of animals were vaccinated three times with either the HVJ-liposome combination with HSP65 DNA plus human IL-12 DNA (HSP65 + hIL-12/HVJ: 400 µg i.m.), BCG Tokyo (1 × 10⁶ CFU i.d), or saline (A). One month after the third vaccination, 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

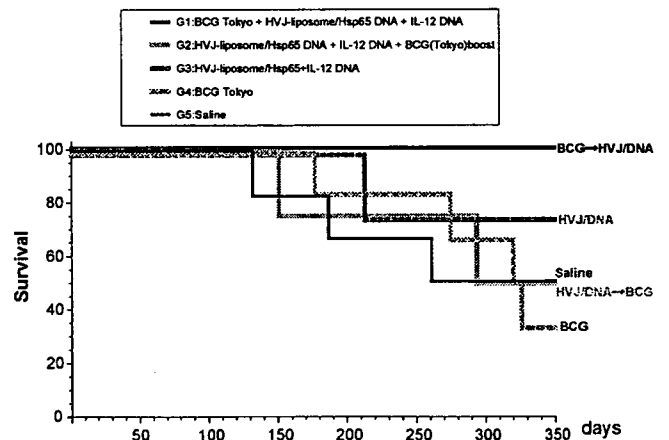
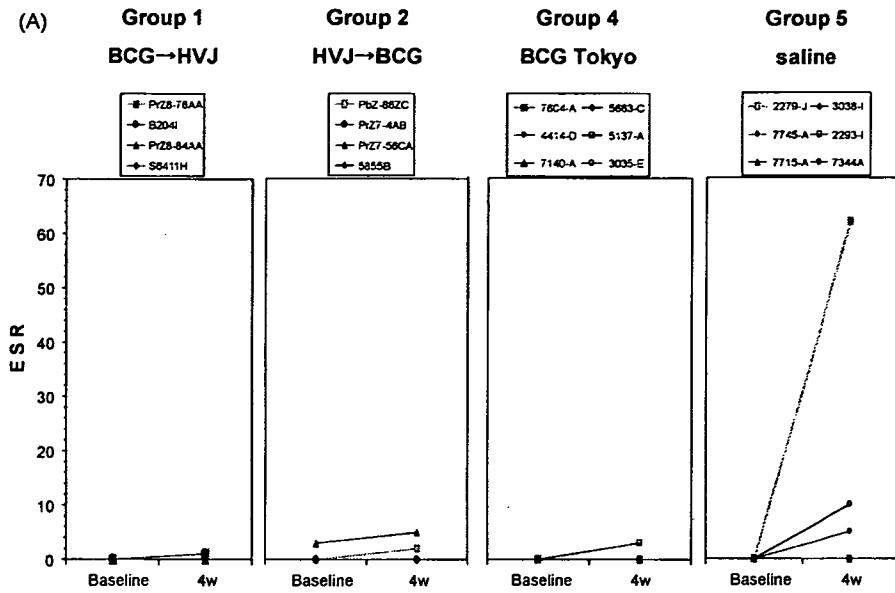


Fig. 2. Protective efficacy of HSP65 + IL-12/HVJ and BCG using priming-booster method against TB challenged cynomolgus monkeys. Group of animals were vaccinated three times (every 3 weeks) with (1^o) BCG Tokyo, (2^o) Hsp65 + IL-12/HVJ, (3^o) Hsp65 + IL-12/HVJ = G1 (—) BCG prime-HVJ/DNA booster group; (1^o) Hsp65 + IL-12/HVJ, (2^o) Hsp65 + IL-12/HVJ, (3^o) BCG = G2 (---) HVJ/DNA prime-BCG booster group; (1^o) Hsp65 + IL-12/HVJ, (2^o) Hsp65 + IL-12/HVJ, (3^o) Hsp65 + IL-12/HVJ = G3 (—); (1) BCG, (2^o) saline, (3^o) saline = G4 (---) G4 group animals were vaccinated with BCG once; (1^o) saline, (2^o) saline, (3^o) 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

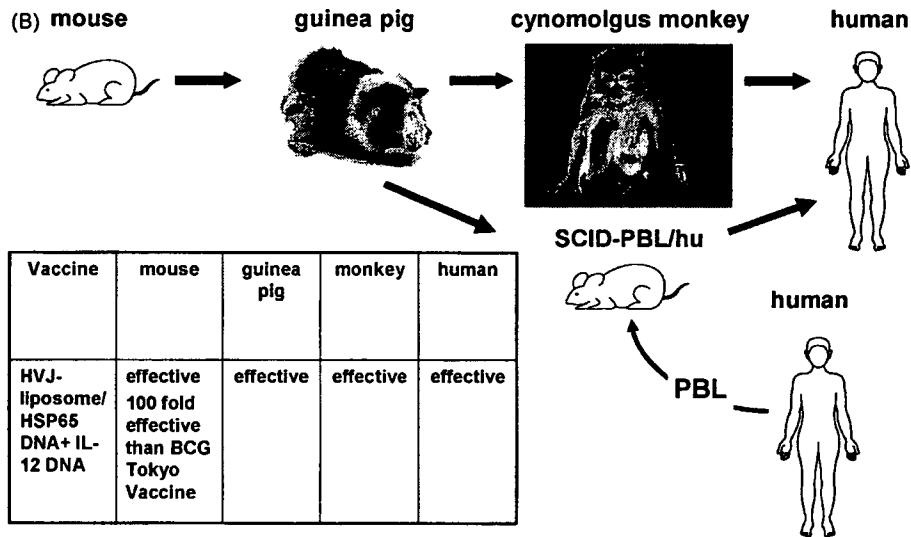


Fig. 3. (A) Improvement of erythrocyte sedimentation rate (ESR) in the cynomolgus monkeys immunized with HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine. Cynomolgus monkeys were immunized and challenged as described in Fig. 2. Elevation of ESR of all monkeys was evaluated every month and maximum values of 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 + h IL-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 + h IL-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

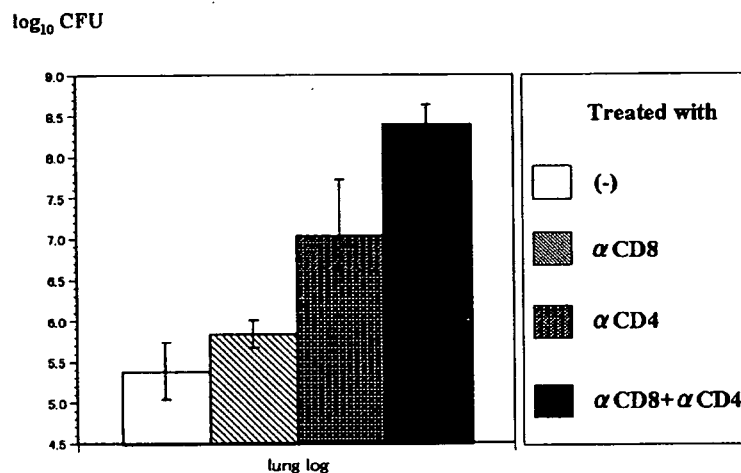
IL-12 gene or heat shock protein (HSP65) gene derived from M.TB was constructed as DNA vaccine into plasmid using CMV promoter. DNA vaccination into female BALB/c (8 weeks, CEA Japan Inc., Japan) was performed using HVJ-liposome. DNA vaccines encoding *M. tuberculosis* HSP65 and human IL-12 were encapsulated 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 PbE2-4F 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.



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
*松本壮吉（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，松本壮吉博士らは「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）