

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

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

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

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

1. 反復配列多型を利用した結核菌の迅速遺伝子型別法の標準化

結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス
センター結核菌情報科

前田 伸司, 村瀬 良朗

はじめに

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

大都市における結核対策には、人の移動を考慮して広

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

方 法

〔結核菌分離株とタイピング法〕

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

〔PCR法によるVNTR断片の増幅〕

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

〔アガロースゲル電気泳動〕

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

〔タイピング能力の比較〕

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

結果と考察

RFLPおよび Spoligotyping 分析

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

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

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

19カ所 (北京型結核菌をタイピング可能と考えられる) の VNTR 分析

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

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

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

日本国内株分析のための VNTR 標準法

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

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

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

ま と め

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

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

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

*Hunter-Gaston diversity index

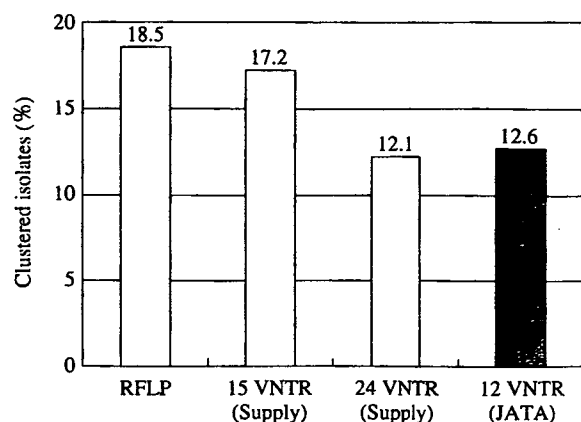


Fig. Comparison with percentage of the clustered isolates

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

2. 結核菌病原因子による病変形成と感染防御

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

はじめに

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

内因性再燃による結核発病プロセス

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

謝 辞

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

文 献

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

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

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

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

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

潜伏-休眠感染における鍵分子

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

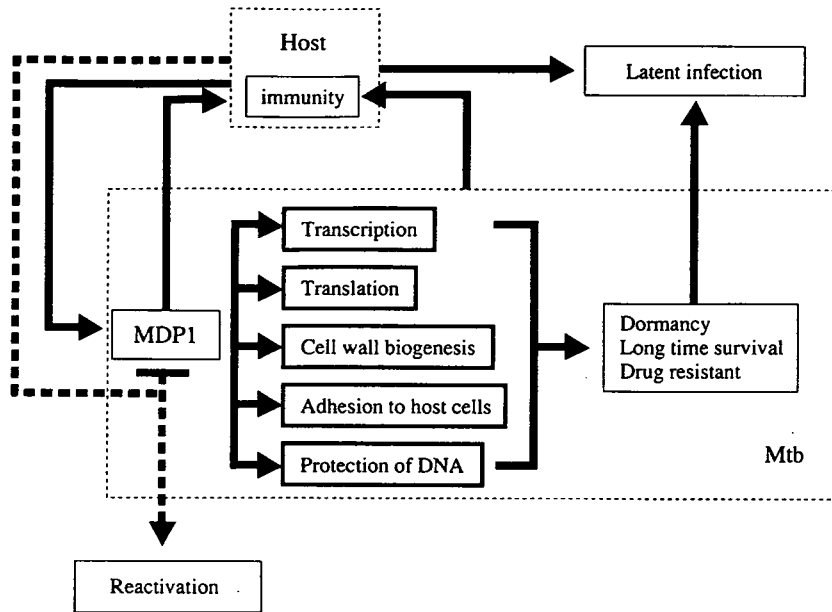


Fig 1. The role of MDP1 in the latent infection and reactivation

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

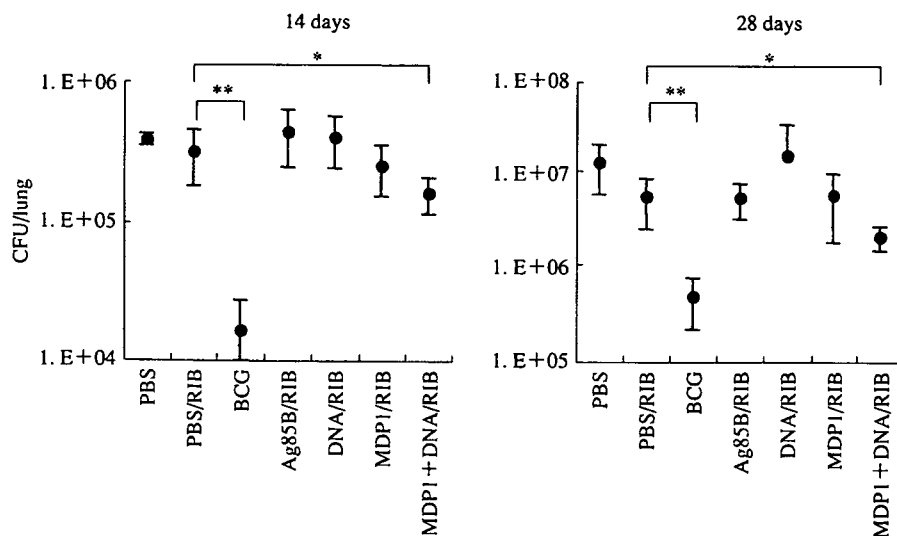


Fig 2. MDP1 induces protection against *M. tuberculosis* challenge in mice

C3H/HeJ mice were immunized with antigens as indicated below the horizontal axis and challenged i.v. with 10^6 CFU of *M. tuberculosis* Kurono strain. Fourteen (A) and 28 (B) days after the challenge, bacterial numbers in the lungs were determined by counting CFUs. * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$ (ANOVA).

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

MDP1はDNA以外の糖にも結合し、糖脂質に結合し

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

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

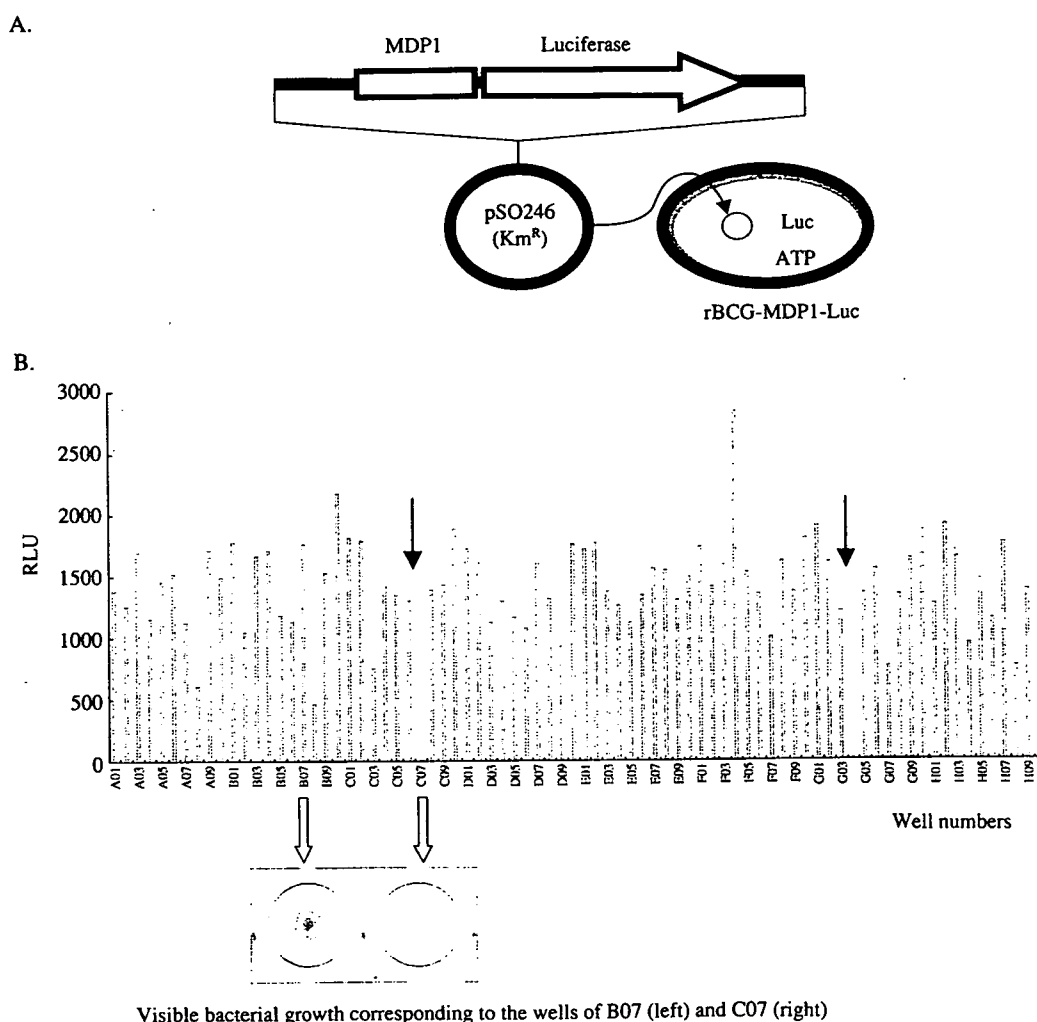


Fig 3. Screening anti-tuberculosis drug by employing MDP1 and luciferase

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

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

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

トランスレーショナルリサーチ

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

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

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

ま と め

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

文 献

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

3. MAC特異的糖蛋白脂質抗原を用いた肺MAC症の血清診断

国立病院機構刀根山病院呼吸器内科 北田 清悟, 前倉 亮治

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

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

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

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

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

血清 GPL core 抗体

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

肺 MAC 症の診断、肺結核、*M. kansasii* 症との鑑別

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

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

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

化学療法と抗体価の相関

化学療法を行った肺 MAC 症患者で、治療前後で抗体価の推移を検討した⁴⁾。化学療法によって排菌が陰性化した群では抗体価は有意に低下したが、排菌が陰性化しなかった群では抗体価に変化は認められなかった。また、手術症例において、手術前後で抗体価の急峻な低下が認められた (Fig.)。これらのことから抗体価が疾患の活動性を反映する可能性が示唆された。

画像所見と抗体価の相関

47 例の肺 MAC 症患者において、胸部 CT 画像と抗体価の関連を検討した⁵⁾。胸部 CT は、小結節陰影 (<10 mm)、結節陰影 (10~30 mm)、大結節陰影 (>30 mm) または浸潤陰影、気管支拡張、空洞、および無気肺の有無を検討した。また、病巣の拡がりには CT を解剖学的に 18 segment に分け、所見を認めた segment 数によって評価した。血清 GPL core IgA 抗体価は 10 mm 以上の結節陰影を呈する症例群で有意に高値を示した。また病変の拡がりとの正の相関性を認めた ($p=0.0183$)。すなわち、より広範囲に病変を認め、大きな結節を形成すると抗体価は高い傾向にあった。

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

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

*Enzyme immunoassay

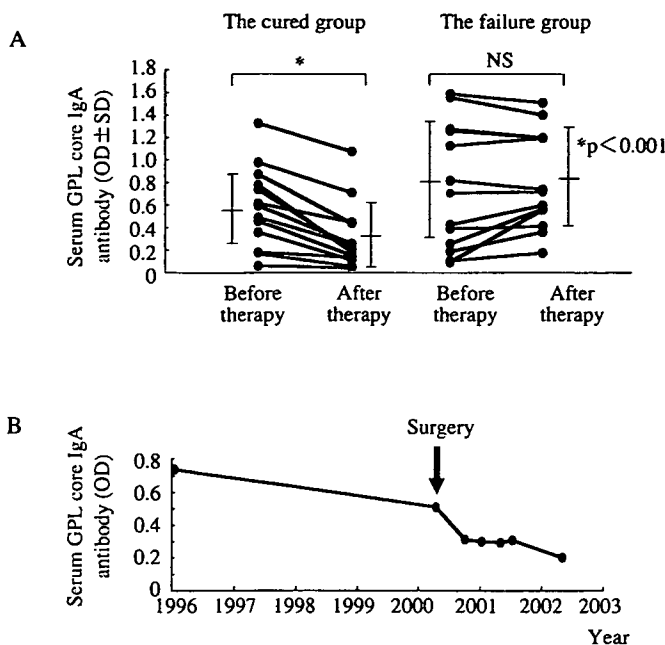


Fig Disease activity and the level of antibodies to MAC GPL core. The levels of serum IgA antibodies to GPL core are shown before beginning and after the completion of antimycobacterial chemotherapy for both the cured (14 MAC patients) and the failure groups (13 MAC patients). In the cured group, the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

早期診断に対する有用性

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

文 献

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

ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of Nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175: 367-416.

2) Maekura R, Okuda Y, Hirofumi A, et al.: Clinical and prognostic importance of serotyping *Mycobacterium avium-mycobacterium intracellulare* complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 3150-3158.

3) Kitada S, Maekura R, Toyoshima N, et al.: Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex with an enzyme immunoassay that uses a mixture of glycopeptidolipid antigens. *Clin Infect Dis.* 2002; 35: 1328-1335.

4) Kitada S, Maekura R, Toyoshima N, et al.: Use of glycopeptidolipid core antigen for serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in immunocompetent patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12: 44-51.

5) Kitada S, Nishiuchi Y, Hiraga T, et al.: Serological test and chest computed tomography findings in patients with *Mycobacterium avium* complex lung disease. *Eur Respir J.* 2007; 29: 1217-1223.

4. 新規抗結核薬である OPC-67683の研究開発

大塚製薬株式会社微生物研究所 松本 真

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

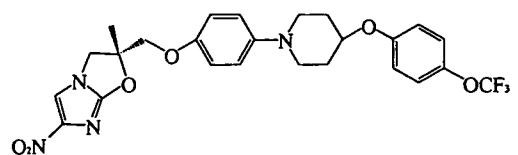
このような現状を踏まえ、結核菌にのみ効力を示し、他の細菌には影響を及ぼさない新規抗結核薬の探索研究を試みた。結核菌はワックスに例えられるように、脂質に富んだ構造を有している。このことは、結核菌のゲノム解析から明らかにされたように、約250もの遺伝子が、脂質の代謝に関係していることも裏づけている。その脂質成分の主成分はミコール酸であり、抗酸菌に特有な長鎖脂肪酸である。すなわち、ミコール酸の生合成を阻害できれば、結核菌特異的に効力を有する抗結核薬を見出すことが可能であると考えられた。このような背景から、ミコール酸合成阻害活性を有した化合物の探索を最小発育阻止濃度の測定に加えて実施することで、有望な候補の探索を行った³⁾。その結果、ミコール酸合成阻害活性をもつものとして、ニトロイミダゾキサゾール誘導体を見出した。本構造は、ヒトや動物病原菌に対して効力を示すことが知られていたが、変異原性が懸念される構造を有していることより、積極的な展開がされなかった。われわれは、これらの構造の中でも変異原性を有さない構造に注目することで、最終的に変異原性を懸念することなく展開できる構造への変換に成功した。

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

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

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

WHOが定める結核治療の短期標準療法として、RFP、



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

Fig 1. Chemical structure of OPC-67683

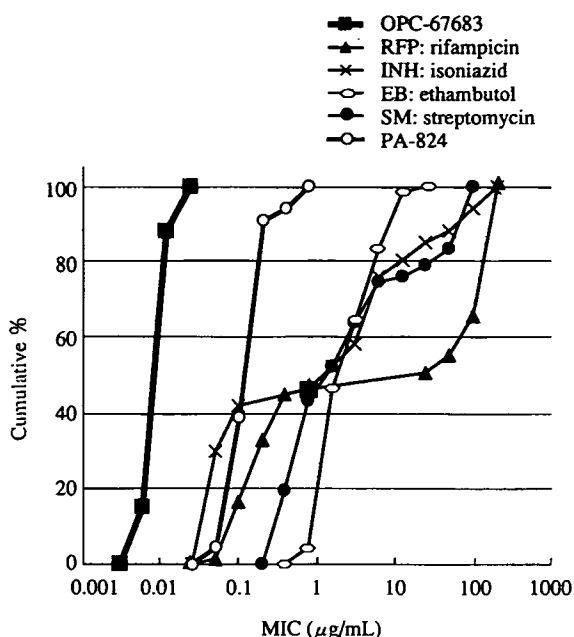


Fig 2. Cumulative % of OPC-67683 and conventional used drugs against clinically isolated strains (67 strains)

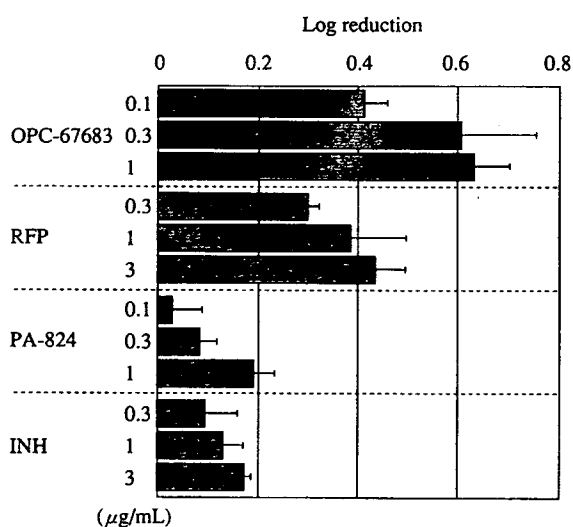


Fig 3. OPC-67683 activities on intracellular TB

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

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

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

以上の評価試験より, OPC-67683は新規作用メカニズ

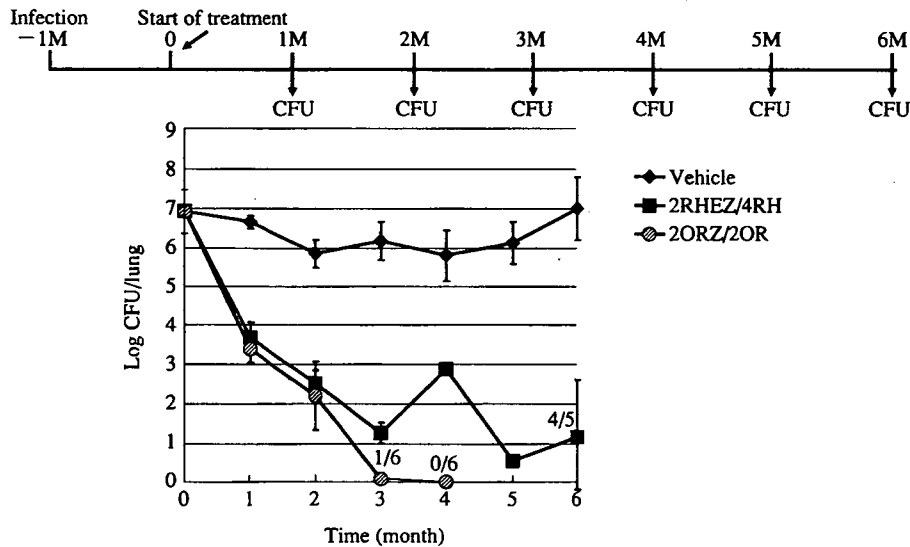


Fig 4. Three-drug combination containing OPC-67683 vs. standard regimen

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

文 献

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

5. 新しい結核ワクチン開発

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター 岡田 全司

1. はじめに

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

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

2. 新しい結核ワクチン開発

(1) BCGワクチンよりきわめて強力な結核予防ワクチン

マウスの実験で現行のBCGワクチンを超えるきわめ

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

(2) 新しい結核ワクチン

結核ワクチンは、①サブユニットワクチン、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 (Table)。

(a) DNA ワクチン

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

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

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

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

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

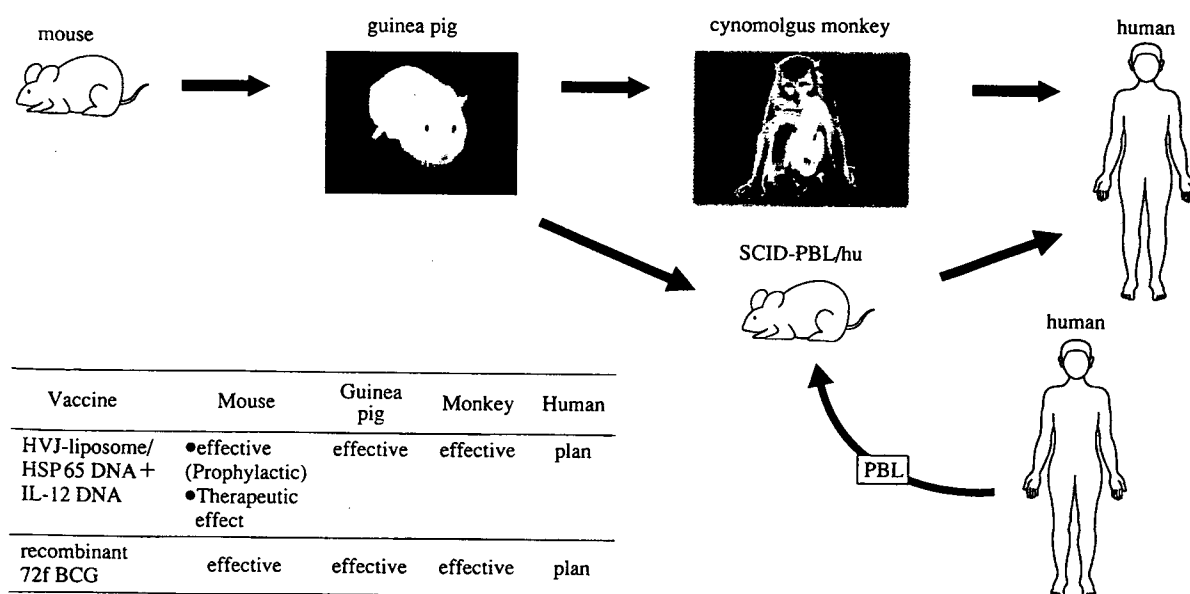


Fig. 1 The development of novel vaccines for *M. tuberculosis* using animal models

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

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

(b) リコンビナント BCG ワクチン

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

(3) 新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PDL/hu

われわれが世界に先駆けて開発したSCID-PBL/huの系でも、ヒトキラーT分化を介し、結核予防ワクチン効果を示した¹⁾³⁾。

3. 結核ワクチンの展望

(1) 新しい結核ワクチンの臨床応用

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

防ワクチン効果 (生存率, 血沈, 体重, 肺の組織) を示すワクチン2種を開発した³⁾。われわれはカンクイザルで結核感染後1年に、コントロール群 (生食投与群) では4匹中4匹死亡 (0%生存) したが、HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン投与群は、4匹中2匹生存 (50%生存) を認め、ワクチン効果をサルレベルで認めた³⁾。すなわち、HVJリポソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNA 予防ワクチン投与による結核感染カンクイザル生存率改善効果を得た。また、血沈改善効果を有意差をもって示した。さらに、このワクチンを投与したカンクイザルでは、コントロール群に依存し有意差 ($p < 0.01$) をもって、HSP65抗原に対し、増殖増強反応を示した。72f融合タンパクサブユニットワクチン、ワクシニアウイルスに85A DNAを導入したワクチンやr85B BCG (Horowitzら) は第I相 clinical trialとなっている。最も切れ味のするどい臨床応用ワクチン候補の筆頭としてHSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンがあげられる³⁾⁴⁾⁷⁾。

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

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

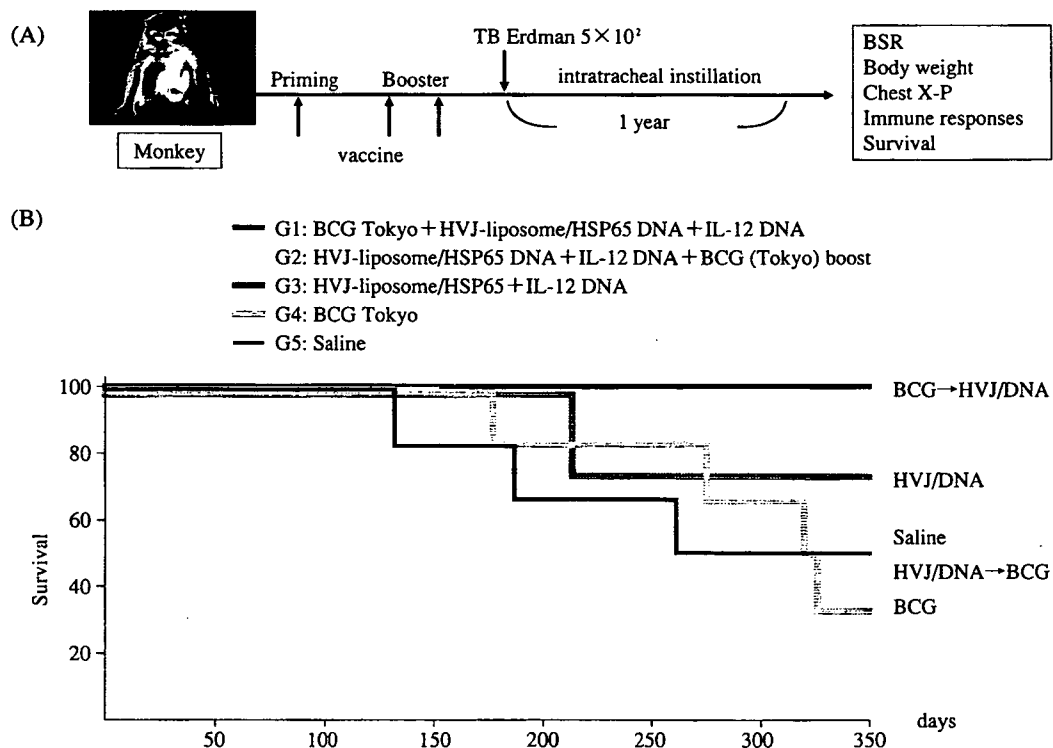


Fig. 2 Protective efficacy of HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA Vaccine

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

4. まとめ

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

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

5. おわりに

当センターは呼吸器疾患(結核を含む)準ナショナルセンターであり、さらに発展させたい。

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

(共同研究者: 当臨床研究センター 喜多, 井上, 坂谷,

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

文 献

- 1) 岡田全司: 厚生労働科学研究費補助金実績報告書 研究報告書, “結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究: [結核ワクチン]”. 2004, 1-140.
- 2) 岡田全司: 結核ワクチン. 「結核」第 4 版, 医学書院, 東京, 2006, 50-58.
- 3) Kita Y, Kanamaru N, Okada M, et al.: Novel recombinant BCG- and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine*. 2005 ; 23 : 2269-2272.
- 4) Yoshida S, Kita Y, Okada M, et al.: DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* by T cell activation. *Vaccine*. 2006 ; 24 : 1191-1204.
- 5) Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, et al.: The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. *Vaccine*. 2005 ; 23 : 2269-2272.
- 6) Walsh GP, Tan EV, dela Cruz EC, et al.: The Philippine cynomolgus monkey provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med*. 1996 ; 2 : 430-436.
- 7) Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine*. 2007 ; 25 : 2990-2993.

———— The 82nd Annual Meeting Symposium ————

RECENT PROGRESS IN MYCOBACTERIOLOGY

Chairpersons: ¹Masaji OKADA and ²Kazuo KOBAYASHI

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Furthermore, by using the cynomolgus monkey (similar to human tuberculosis), this novel vaccine provided higher protective efficacy (mortality) than BCG mortality. Furthermore, the combination of HSP65 + IL-12/HVJ and BCG by the priming-booster method showed a synergistic effect in the TB-infected cynomolgus monkey (100% survival). These data indicate that our novel DNA vaccine might be useful against TB for human clinical trials.

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

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

Correspondence to: Kazuo Kobayashi, Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640 Japan.

(E-mail: kobayak@nih.go.jp)

結核菌の分子疫学的解析

— 多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌との比較 —

¹吉田志緒美 ¹鈴木 克洋 ¹露口 一成 ¹岡田 全司
²坂谷 光則

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

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

はじめに

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

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

方 法

〔対象〕

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

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター¹臨床研究センター、²内科

連絡先：吉田志緒美、独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター、〒591-8555 大阪府堺市北区長曾根町1180 (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)
(Received 16 Nov. 2006/ Accepted 28 Feb. 2007)

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

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

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

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

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

〔方法〕

同定

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

薬剤感受性試験

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

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

RFLP法

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

Spoligotyping法

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

結 果

RFLP法

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

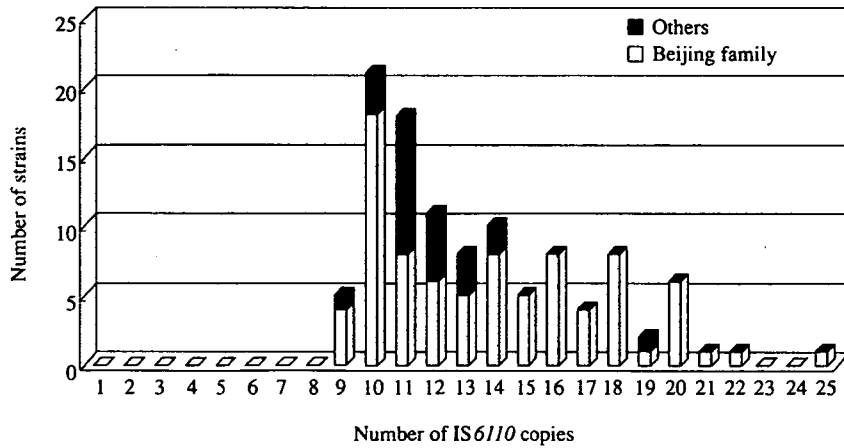


Fig. 1 Distribution by number of IS6110 copies: multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains

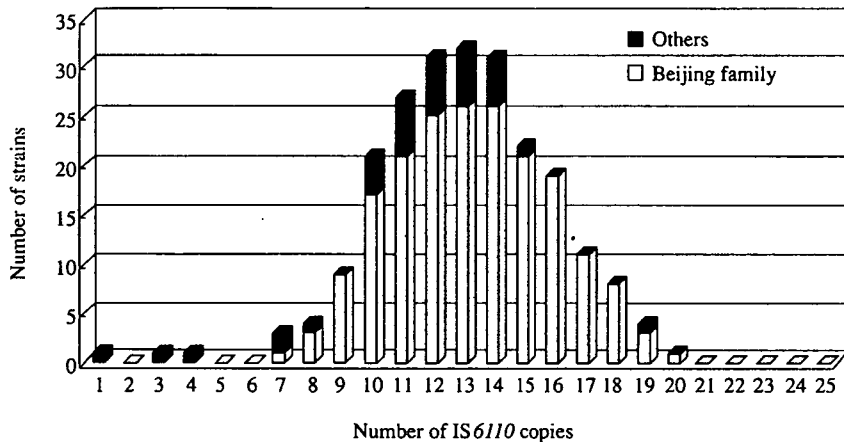


Fig. 2 Distribution by number of IS6110 copies: susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains

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

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

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

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

Spoligotyping 法

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

43配列を有する典型的な Beijing型に加え、Mokrousovら¹²⁾の定義による Beijing型のパターンに類似した Beijing-likeも Beijing familyとして全株を分類した。その結果、Beijing familyはMDR-TB群で84株 (77.1%)、S-TB群では191株 (84.5%)、全体で275株 (82.1%)を占めた。一方 Beijing family以外の遺伝子型をもつ株で International Spoligotyping database SpolDB3分類¹³⁾に示される familyに分類された株はMDR-TB群の25株中13株と、S-TB群35株中の24株と判定された。それ以外の24株 (MDR-TB群12株、S-TB群12株)はSpolDB3の family definitionに分類されない Unique 株と判定された (Table 1)。また Uniqueパターンを示した株の中に IS6110コピー数5本以下を示したS-TB群の3株が含まれていた (Table 3)。

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

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

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

*ancient Beijing strains and Beijing-like spoligoprofiles

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

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

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

Superscript letters: classes of *Mycobacterium tuberculosis* excerpted from SpolDB3

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

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

*Beijing family

**LAM1 family

^{T1}T1 family^{T2}T2 family