

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Spoligotyping法

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

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

ま と め

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

文 献

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

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

————— Original Article —————

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

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

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

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

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

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

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

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

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

最新医学・第62巻・第11号 (2007年11月号 別刷)

トピックス

新しい結核ワクチンの新展開

岡田全司

最新医学社

新しい結核ワクチンの新展開

岡田 全司*

はじめに

結核は、世界の1/3の20億人がいまだに結核菌に感染しており、その中から毎年880万人の患者が発症し、200万人が毎年結核で死亡している、最大の感染症の1つである（WHOレポート2002年）¹⁾²⁾。結核症に対する宿主の抵抗性は細胞性免疫と言っても過言ではない。特に獲得免疫（細胞傷害性T細胞とTh1細胞）が重要であり、最近では自然免疫の結核への関与が再び重要視されている。1998年、米国疾病対策センター（CDC）は結核に対し、政府・学術機関・企業が一体となった新世代のワクチン開発の必要性を強く主張する発表をした。また結核撲滅対策委員会（ACET）は、国民の健康に対する大敵である結核撲滅のためにはBCGに代わる有効なワクチンが必要であることを示した。

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

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

新しい結核ワクチン開発

1. 現行のBCGワクチンの有用性

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

2. BCGワクチンより極めて強力な結核予防ワクチン

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

3. 新しい結核ワクチン

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

* 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
臨床研究センター長

表1 新しい結核ワクチンの開発

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

略語: 巻末の「今月の略語」参照

1) DNA ワクチン

IL-12 の p35 および p40 を CMV プロモーター下流域に挿入した発現プラスミドを作製した。さらに、ヒト型結核菌 H37RV 由来 HSP65 DNA ワクチンの作製に成功した (表 1, 図 1)⁴⁾。HVJ-リボソームをベクターに用いた場合、HSP65 DNA と IL-12 DNA 両者の DNA ワクチンを投与した HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンマウスでは、BCG 東京ワクチンマウスの肺・肝・脾の結核菌数の 100 倍以上の減少が認められた⁵⁾ (図 2)。このワクチンは、結核菌に対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 分化誘導、IFN γ 産生細胞分化誘導を介して、BCG ワクチンより強力な結核予防ワクチン効果を発揮することが示された。すなわち、結核菌に対する CD8 陽性 CTL の分化誘導を増強した。また、結核菌抗原の主要な抗原タンパク質である HSP65 タンパク質抗原に対する CD8 陽性 CTL の分化誘導を著明に増強した。一方 BCG ワクチンは、結核菌に対する CTL や HSP65 タンバ

ク質に対する CTL 誘導活性はほとんど認められなかった¹⁾⁵⁾。このワクチンは BCG ワクチンに比較して、有意差をもって肝臓および肝臓の結核肉芽腫、病理所見の改善を認めた (granuloma index の改善⁵⁾)。

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

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

図1 新しい結核ワクチンの開発

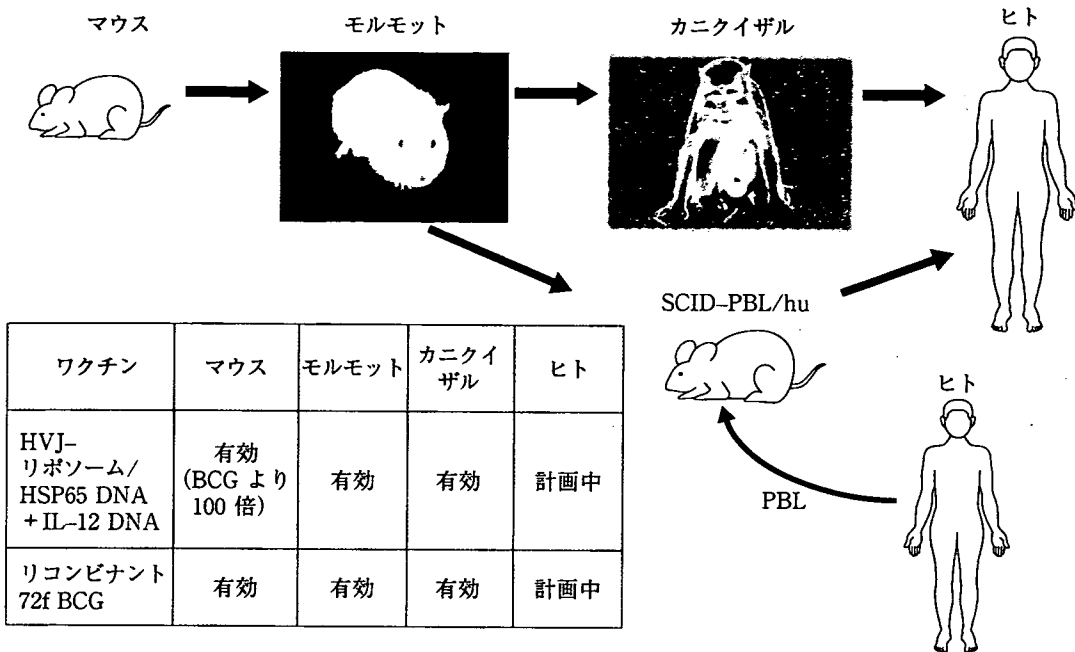
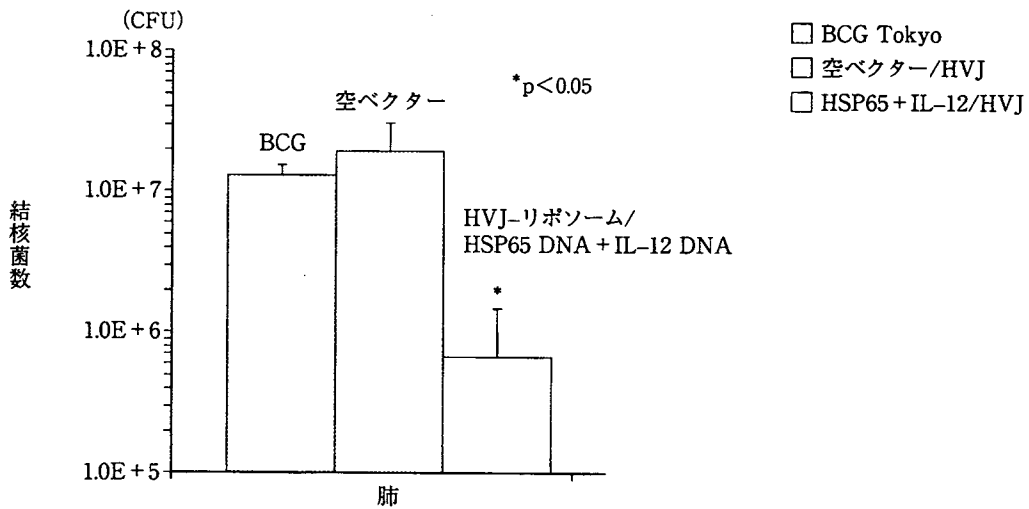


図2 HVJ-リボソーム/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンによる結核予防ワクチン効果 (結核感染5週後)

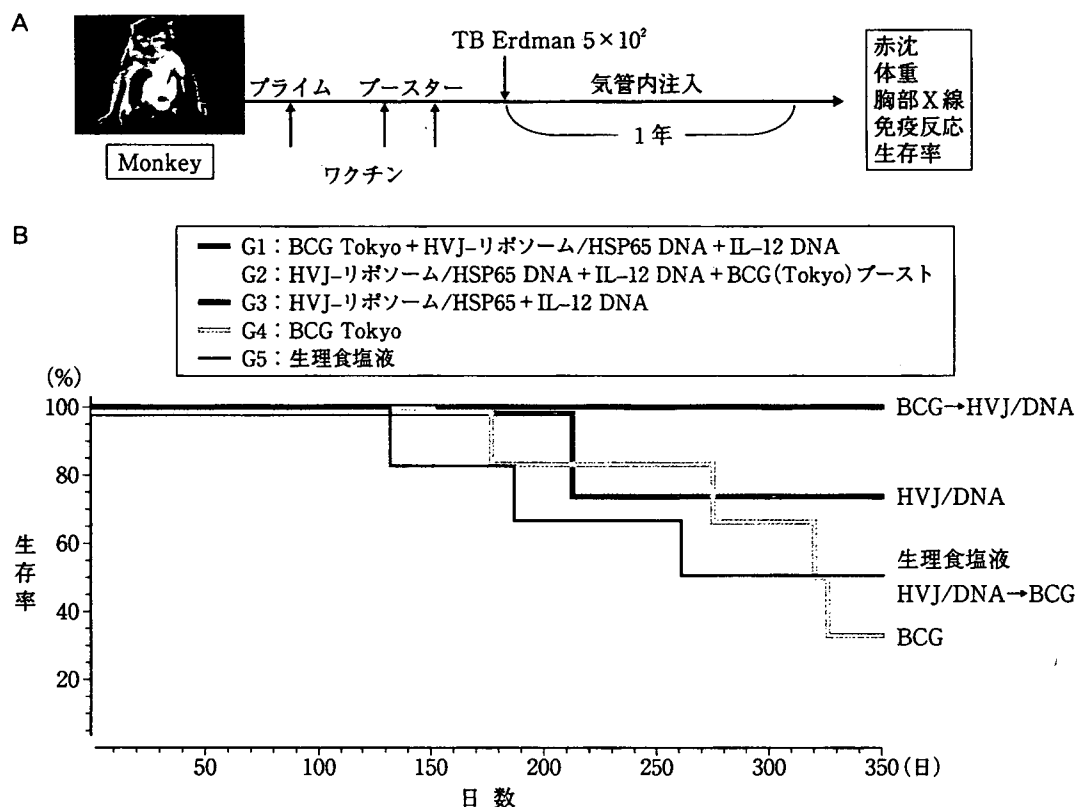


クチン効果を示した¹⁾。

2) リコンビナント BCG (rBCG) 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 rBCG の作製に成

功した²⁾。この 72f rBCG は、マウス、モルモットの系のみならず、カニクイザルを用いた系でも結核予防ワクチン効果を示した³⁾。

図3 ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いた HVJ-リボソーム/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンの結核予防効果



4. 新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PBL/hu

我々が世界に先駆けて開発した SCID-PBL/hu の系でも、ヒト CTL 分化を介して結核予防ワクチン効果を示した¹⁰⁾¹¹⁾。

結核ワクチンの展望

1. 新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル (cynomolgus monkey, 最もヒトの肺結核に近いモデル⁴⁾⁸⁾¹²⁾¹³⁾ 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, 赤沈, 体重, 肺の組織) を示すワクチン2種を開発した⁴⁾。我々はカニクイザルに対し、結核感染後1年でコントロール群 (生理食塩液投与群) 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

では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⁴⁾。すなわち、HVJ-リボソーム/HSP65 DNA + IL-12 DNA 予防ワクチン投与による結核感染カニクイザル生存率改善効果を得た。また、赤沈改善効果を有意差をもって示した。さらにこのワクチンを投与したカニクイザルでは、コントロール群に比較し有意差 (p<0.01) をもって HSP65 抗原に対して増殖増強反応を示した。72f 融合タンパク質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 相臨床試験となっている¹⁴⁾¹⁵⁾。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 ワクチンが挙げられる⁴⁾⁵⁾¹³⁾。

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 ワクチンをプライミングし、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¹⁹⁾ (図 3)。一方、BCG ワクチン単独投与群は 33% の生存率であった¹⁹⁾。このように、ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いた実験系で、強力な新しい結核ワクチンを我々は世界に先駆けて開発した。すなわち、本邦では乳幼児に BCG 接種が義務づけられていることより、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) として我々が開発した切れ味のするどいこの 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。

おわりに

HSP65 DNA + IL-12 DNA/HVJ-エンベロープワクチンが明らかに優れていることより、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: 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], 厚生労働科学研究費補助金実績報告書 研究報告書, p1-140, 2004.
- 2) 岡田全司: 結核ワクチン. 結核 第 4 版, p50-58. 医学書院, 東京, 2006.
- 3) 岡田全司, 他: 結核感染とサイトカイン. 別冊医学のあゆみ: サイトカイン-state of arts (泉孝英, 他 編), p209-213. 医歯薬出版, 東京, 2004.
- 4) Kita Y, et al: Novel recombinant BCG- and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine* 23: 2269-2272, 2005.
- 5) 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.
- 6) 岡田全司: 新しいワクチン開発 シンポジウム IV 抗酸菌研究の最前線. 結核. (in press)
- 7) Okada M, et al: Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7718-7721, 1981.
- 8) Okada M, et al: B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas. Two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation. *J Exp Med* 157: 583-590, 1983.
- 9) Okada M, et al: IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the *in vitro* induction of cytotoxic T cells. *J Immunol* 141: 1543-1549, 1988.
- 10) Okada M, et al: The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. *Vaccine* 23: 2269-2272, 2005.
- 11) Tanaka F, et al: The anti-human tumor effect and generation of human cytotoxic T cells in SCID mice given human peripheral blood lymphocytes by the *in vivo* transfer of the Interleukin-6 gene using adenovirus vector. *Cancer Res* 57: 1335-1343, 1997.
- 12) Walsh G.P, et al: The Philippine cynomolgus monkey provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med* 2: 430-436, 1996.
- 13) Okada M, et al: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey

-
- model of TB. *Vaccine* 25: 2990-2993, 2007.
- 14) Skeiky Y A, et al: Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J Immunol* 172 (12): 7618-7628, 2004.
- 15) McShane H, et al: Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med* 10 (11): 1240-1244, 2004.
-

New Development of Novel Vaccines against Tuberculosis

Masaji Okada

Clinical Research Center, National Hospital Organization, Kinki-Chuo Chest Medical Center

新しい結核ワクチン

岡田 全司*

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

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

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

はじめに

いまだに世界の1/3の20億人が結核菌に感染しており、その中から毎年880万人の結核患者が発症し、200万人が毎年結核で死亡している、最大の感染症の一つである(WHOレポート2002年)¹⁻⁴⁾。本邦でも1998年から結核罹患率の増加・横ばいが認められ、1999年“結核緊急事態宣言”が厚生省より出された。結核症に対する宿主の抵抗性細胞性免疫とって過言ではない。特に獲得免疫(キラーT細胞とTh1ヘルパーT細胞)が重要であり、最近では自然免疫の結核への関与が再び重要視されている。1998年、米国CDCは結核に対し、政府・学術機関・企業が一体となって新世代の結核ワクチン開発の必要性を強く主張する発表をした。また、ACETは国民の健康に対する大敵である結核撲滅のためには、BCGに代わる有効なワクチンが必要であることを示した。しかしながら、BCGに代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。われわれはBCGよりもはるかに強力なDNAワクチンやリコンビナントBCGワクチンの開発に成功した(表1, 図1)⁵⁻⁸⁾。新しい抗結核

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

I. 新しい結核ワクチン開発

1. 現行のBCGワクチンの有用性

現行のBCGワクチンのWHO評価: BCGワクチンの評価がWHOによりなされた。すなわち大人(成人)の結核に対しては、BCGワクチンは予防効果がないという結論がWHOによって報告された。10万人を超す南インド農民を対象として実施された大規模なcontrolled trial(Chingleput study)では、全く有効性が否定される結果となった(上記WHOの報告)¹⁰⁾。(ただし、小児における結核性髄膜炎や粟粒結核など播種性のものには十分な予防効果がある。)したがって、成人の結核に対し有効な新しい結核ワクチンの開発が必須である。事実1998年米国政府・ACET, CDCは政府, 研究所, 大学・企業の三者が一体となって、新しい結核ワクチン開発が必須であることを表明した^{1, 6)}。

*Masaji OKADA 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター/センター長

表1 The Development of Novel Vaccines for M. tuberculosis

(1) DNA vaccine HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA	more effective than BCG (mouse, guinea pig, cynomolgus monkey)
(2) DNA vaccine HVJ-Envelope/HSP65DNA + IL-12 DNA	extremely stronger effect than BCG
(3) recombinant BCG vaccine	more effective than BCG
① recombinant 72f BCG	(mouse, guinea pig, cynomolgus monkey)
② recombinant (Ag85A + 85B + MPB51) BCG	more effective than BCG (mouse)
(4) Therapeutic vaccine IL-6 related DNA (mouse)	
(5) Priming-Booster Method BCG (priming) + Novel vaccine (booster) (cynomolgus monkey)	
(6) Novel vaccine (per os) using gene-knock out attenuated Listeria	
(7) Novel vectors AAV vector (1000 fold effective expression vector ↑), Adenovirus vector	

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

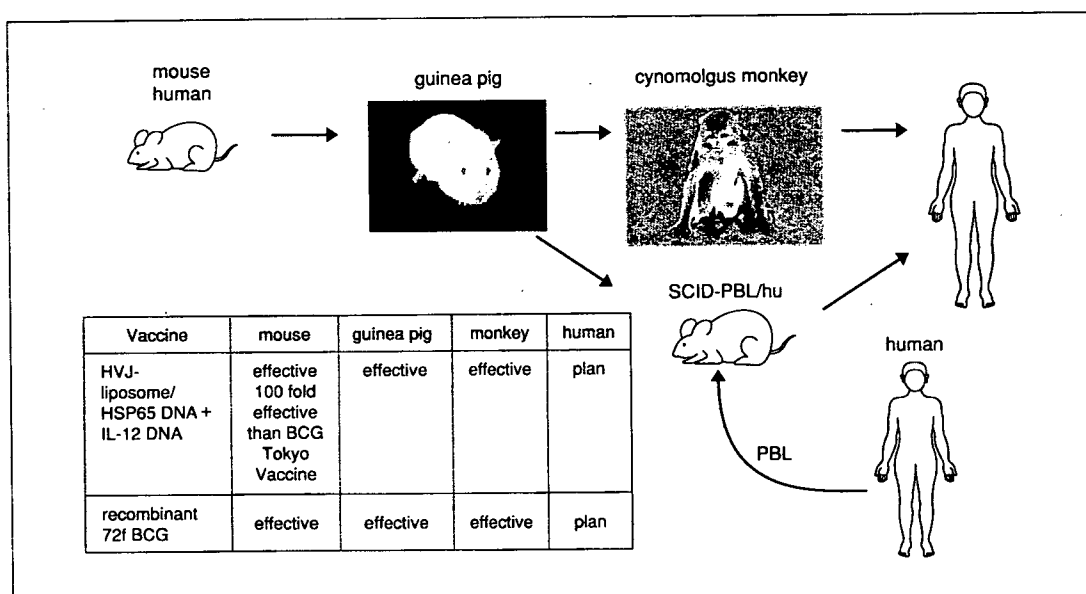


図1 The Development of Novel Vaccines for M. tuberculosis using animal models

2. BCGワクチンより1万倍強力な結核予防ワクチン

BCGワクチンより1万倍強力な結核予防ワクチンを開発

われわれの国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センターが、画期的な結核の新しいワクチンを開発した。マウスの実験で現行のBCG

ワクチンを超える極めて強力な有効性(1万倍の効果)を確認した。マウスの結核感染系ではBCGワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチンは極めて少ない。われわれは、HSP65 DNA + IL-12 DNA (HVJ-エンベロープベクター)のワクチンはBCGワクチンよりも1万倍強力な結核予防ワクチンであることを世界に先駆けて明らかにした。

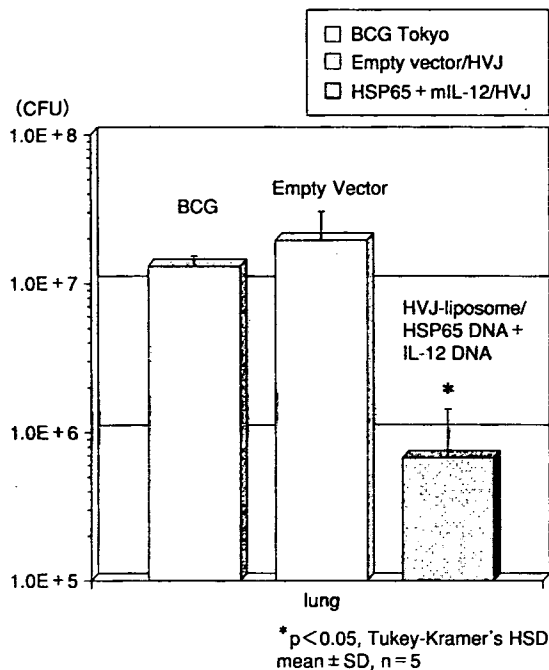


図2 Prophylactic efficacy of HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine on TB-infected mice (5 weeks after TB infection)
Number of *M. tuberculosis*

これらの研究が国内外より極めて高く評価され、当臨床研究センターはWHO(世界保健機関)よりWHO STOP TB Partnershipに選ばれた。また、大阪大学大学院(医学系研究科)・連携大学院にも選ばれた(表1)。

3. 新しい結核ワクチン

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

マウスではBCGワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチンは極めて少ない。われわれはHSP65 DNA + IL-12 DNA予防ワクチンにてBCGワクチンの100倍強力なワクチンの開発に成功した(表1, 図1, 2)^{6, 7, 9, 11)}。

1) DNAワクチン

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

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

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

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

2) リコンビナントBCGワクチン

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

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

4. 新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデルSCID-PDL/hu

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

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

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

II. 結核ワクチンの展望

1. 新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル(cynomolgus monkey, 最もヒトの肺結核に近いモデル。Nature Medicine 2, 430, 1996参照)を用いBCGよりもはるかに強力な予防ワクチン効果(生存率, 血沈, 体重, 肺の組織)を示すワクチン二種を開発した⁸⁾。すなわち, 現在最も有力なものとして, HVJリボソーム/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンおよび, r72f BCGワクチンがあげられる(表1)。すなわち, カニクイザルに3回ワクチン投与を3週間隔で行った。最終免疫より, 4週間後にヒト結核菌エルドマン株 5×10^2 CFUを気道内注入した。事実, われわれはカニクイザルで結核感染後1年で, コントロール群(生食投与群)では4匹中4匹死亡(0%生存)したが, HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン投与群は, 4匹中2匹生存(50%生存), r72f BCGワクチンで4匹中3匹生存(75%生存)を認め, これらのワクチン効果をサルレベルで認めた⁸⁾(表2)。すなわち, HVJリボソーム/HSP65 DNA + IL-12 DNA予防ワクチン投与による結核感染カニクイザル生存率改善効果を得た(表2)。また, HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは血沈改善効果を有意差をもって示した。さらに, このワクチンを投与したカニクイザルでは, コントロール群に依存し有意差($p < 0.05$)をもって, HSP65抗原に対し, 増殖増強反応を示した⁸⁾。Ag85B-ESAT-6融合タンパク質についてAndersonらも報告しているが, モルモット, サルでは効果は不明である。一方,

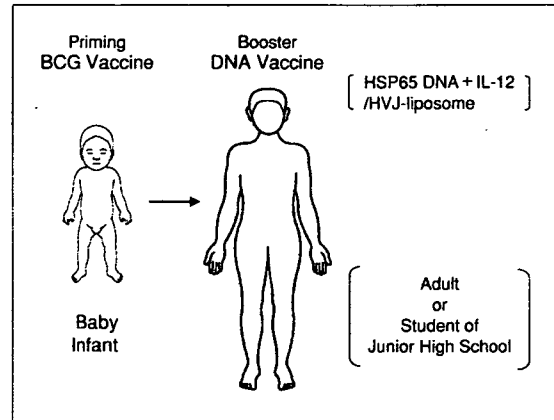


図3 Novel Prophylactic Vaccine(DNA Vaccine against TB)

HuygenのAg85A DNAワクチンはマウス・モルモットで有効であったが, サルの結核感染予防に対し有効でなかったという。72f融合タンパクサブユニットワクチン, ワクシニアウイルスに85A DNAを導入したワクチンやr85B BCG(Horowitzら)は第I相clinical trialとなっている¹²⁾。A. Hillらのワクシニアウイルス-85A DNAワクチンは, アフリカでの第一相clinical trialでは, 85A DNA蛋白に対する免疫応答増殖が認められた。最も切れ味のするどい臨床応用ワクチン候補の筆頭として, HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンがあげられる。リコンビナント72f BCGも有効である。さらに, われわれはHSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンやリコンビナント72f BCGワクチンを組み合わせ, 極めて強力なワクチン開発を目指している⁵⁻⁷⁾。

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

さらにBCGワクチンと新ワクチンのプライミング-ブースター法で100%の生存を示した。このように, ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いた実験系で, 強力な新しい結核ワクチンを, われわれは世界に先駆けて開発した。すなわち, 本邦では乳幼児にBCG接種が義務づけられていることにより, プライミングワクチンとしてBCGワクチンを用い, 成人ワクチン(小学生, 中学生,

成人、老人)として、切れ味のするどいわれわれが開発したHVJ/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンをブースターワクチンとして用いることにより、強力な新しい結核ワクチンの臨床応用が可能となる案を計画中である(図3)。

おわりに

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

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

文献

- 岡田全司：結核“分子予防環境医学：生命科学研究の予防・環境医学への統合”(分子予防環境医学研究会編)。p.150-161, 本の泉社, 2003.
- 岡田全司ほか：結核感染・新しい結核ワクチンの開発「感染症発症の分子機構-宿主と病原体の分子の攻防」。Molecular Medicine 2002 ; 39 : 144~154.
- Flynn JL, et al. : Immunology of Tuberculosis. Annu Rev Immunol 2001 ; 19 : 93~129.
- Schluger NW, et al. : The host immune response to tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 1998 ; 157 : 679~691.
- 岡田全司：新しい結核ワクチン。p1942-1952, 最新医学57, 2002.
- 岡田全司：厚生労働科学研究費補助金実績報告書 研究報告書, “結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究：[抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン(サブユニット・DNA・リコンビナントBCG-ワクチン)・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]”, 2004.
- Okada M, et al. : Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis. Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 171~175, 2002.
- Kita Y, et al. : Novel recombinant BCG- and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. Vaccine 2005 ; 23 : k2269~2272, 2005.
- 岡田全司ほか：結核感染とサイトカイン。医学の歩み：サイトカイン-state of arts(編集 泉孝英, 網谷良一), p.209-213, 医歯薬出版, 2004.
- 岡田全司：結核ワクチン。結核 第4版(in press), 医学書院, 2006.
- Yoshida S, et al. : DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against Mycobacterium tuberculosis by T cell activation. Vaccine 2006 ; 24 : 1191~1204.
- Skeiky YA, et al. : Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. J Immunol 2004 ; 172(12) : 7618~7628.
- McShane H, et al. : Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. Nat Med 2004 ; 10(11) : 1240~1244.

学会 レポート

第5回 国際ワクチン学会

FIFTH WORLD CONGRESS ON VACCINES, IMMUNIZATION AND IMMUNOTHERAPY

■
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・臨床研
究センター長*

岡田全司



第5回国際ワクチン学会(WC-VII ; Fifth World Congress on Vaccines, immunization and immunotherapy)は2006年11月6日から9日にかけて、モントリオール大学医学部Edouard Kurstak教授をWCVII会長として、カナダ・モントリオール市フェアモント・クイーン・エリザベスホテルを会場として開催された。

プレナリーセッション4テーマ・28題、シンポジウム8テーマ・67題、ラウンドテーブル1テーマ・3題、ポスター14題と多くの演題数であった。

参加者数は約400名にのぼり、世界各国からの参加者であった。

主催国カナダ・ナショナル・チームとして、グリフィス博士などが参加、当学会委員会メンバーとして、ウェール医大・アダムス教授、米国・ブラウン大学・DeGroot教授、日本・岡田全司、米国・Mayo Clinic・G.A. ポーランド教授、米国・メルク社研究所長・シバー博士らが参加した。

本学会のテーマは「新しいワクチンの臨床開発研究、高免疫原性かつ安全なワクチン・免疫療法(遺伝子工学を活用した)」であり、まさしくこのテーマに沿った極めて興味深い発表が数多くなされた。

ウェルカム・オープニング・リマークでは有名なポーランド博士が、現在世界中を震撼させているトリ・インフルエンザワクチンについてレビューした。トリ・インフルエンザA/H5N1が200例以上、世界でヒトに感染し、50%致死率、pandemic感染の危険性を示し、さらに新しいA/H5N1の出現も報告した。米国で200万人以上が死亡し、全労働者の40%がインフルエ

ンザに罹患することを計算した。

1. プレナリー・セッション「新規ワクチンと免疫方法」において

- (1)シバー博士は非増殖性・非成果性のアデノウィルスベクター5型を用いたHIV-2ワクチンを開発し、臨床応用中である。
- (2)コレラ、腸チフス、髄膜炎菌、麻疹、ウエストナイルなどに対する優れたワクチンの発表が多くのグループよりなされた。
- (3)アミロイド-βペプチド(Aβ)のN末アミノ酸1-14をアルツァイマー病の治療ワクチンとして開発中。
- (4)ヒト子宮頸癌の原因のヒトパピローマウイルス16型、18型、のカプシド蛋白のウイルス様粒子(VLP_S)が作製され、10年間の臨床治験の結果、子宮頸部の癌化を抑制した。同様の報告がアダムス博士などにより第I・II相臨床試験を行い、子宮頸癌予防に95~100%の効果を得た。

2. シンポジウム〔遺伝子ワクチン、免疫修飾(活性)物質、デリバリーシステム〕において

DNAワクチンはマウスなどの小動物に強い免疫原性を示すが、non-human primateモデルにおいても免疫原性が同じか否かまだ解析されていない。したがって、ワイナー博士は、サルモデルで種々のサイトカインIL-1~IL-27のDNAワクチンの中で、IL-12 DNAワクチンがサルの系で最も強力にキラーT細胞やヘルパーT細胞抗体産生を誘導した。また、IL-15

DNAワクチンも優れていた。また、ベクターとしてサルノ系ではアデノウイルスベクターが極めて優れていた。

・田代博士は日本のヒトインフルエンザH5N1ワクチン開発とclinical trialについて発表した。奥野博士らはモノクローナル抗体を製し、これが他の多くの型のインフルエンザに対しても中和活性を示した。

3. [シンポジウム6：新興・再興感染症に対するワクチン]において

筆者はアエラス・グローバルTBワクチン財団のJ.C. Sadoff博士と二人でこのシンポジウムの座長を行った。さらに筆者等はこのシンポジウムで「カニクイザルを用いた新しい結核ワクチン(HVJ-エンペロープ/HSP65DNA + IL-12DNA)の開発」の発表と「SCID-PBL/huマウスモデルを用いたSARSコロナウイルスに対するDNAワクチンとヒト型モノクローナル抗体を用いた治療法の開発」の2つの課題のシンポジストに選ばれる栄誉を得た。

カニクイザル(最もヒトの肺結核に近いモデル)を用いBCGよりもはるかに強力(マウスの系でBCGより1万倍)な予防ワクチン効果(100%の生存率)を示すワクチンを開発した。

Sadoff博士はビル・ゲイツ財団より支援の多額の研究費を用い、結核ワクチンの臨床試験第I期を行っている。①リコンビナント72f蛋白によるサブユニットワクチン(GSK社)②リコンビナントAg85B BCGワクチン③リコンビナントストレプトリジンBCGワクチン④MVA85A(ワクシニアウイルスベク



写真1 WCVII会長Karstak教授と



写真2 ウェルカム・オープニング・リマーク



写真3 コーヒーブレイクでの情報交換

ター)などである。

- ・ヒト生体内免疫応答解析モデル SCID-PBL/huを用い我々のSARS (M) DNAワクチンがSARSウイルスに対する中和抗体生産を誘導する初めての発見をした。
- ・堀井博士はすぐれたマラリアワクチン リコンビナントSE36蛋白ワクチン(第I相)を開発した。
- ・植物に遺伝子を導入して栽培し、大量のDNAを取る方法の興味深い発表があった。
- ・23年前、B型肝炎まん延地区の南イタリーでB型肝炎ワクチンが開始された。開始前HB抗原キャリアが13.4%であったのが2006

年には0.9%と著明に減少した。

この国際ワクチン学会に出席し、新しいワクチン開発の進展に感銘を受けた。しかしながら、遺伝子学や免疫学等の進展により、B型肝炎やパピローマウイルスワクチンによる肝癌や子宮頸癌の制御がなされつつあるが、パンドラの箱は空になるにはほど遠い。すなわち、SARSやトリ・インフルエンザなどの新しい病気がつぎからつぎへ出てくる。したがって、ワクチン研究者は、いつでも新しい技術開発やワクチン開発に精進する必要がある感想を得た。次回の2年後、オランダ ハーグが楽しみである。

Original article

Detection of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China as determined by denaturing HPLC analysis and DNA sequencing

Ruiru Shi ^{a,b}, Jianyuan Zhang ^c, Chuanyou Li ^c, Yuko Kazumi ^a, Isamu Sugawara ^{a,*}

^a *Mycobacterial Reference Center, The Research Institute of Tuberculosis, 3-1-24 Matsuyama, Kiyose, Tokyo 204-0022, Japan*

^b *Henan Provincial Chest Hospital, Zhengzhou, China*

^c *Beijing Tuberculosis and Lung Tumor Research Institute, Beijing, China*

Received 1 May 2007; accepted 27 August 2007

Available online 6 September 2007

Abstract

China is regarded by the World Health Organization as a major hot-spot region for *Mycobacterium tuberculosis* infection. Streptomycin has been deployed in China for over 50 years and is still widely used for tuberculosis treatment. We have developed a denaturing HPLC (DHPLC) method for detecting various gene mutations conferring drug resistance in *M. tuberculosis*. The present study focused on *rpsL* and *rrs* mutation analysis. Two hundred and fifteen *M. tuberculosis* clinical isolates (115 proved to be streptomycin-resistant and 100 susceptible by a routine proportional method) from China were tested to determine the streptomycin minimal inhibitory concentration (MIC), and subjected to DHPLC and concurrent DNA sequencing to determine *rpsL* and *rrs* mutations. The results showed that 85.2% (98/115) of streptomycin-resistant isolates harbored *rpsL* or *rrs* mutation, while *rpsL* mutation (76.5%, 88/115) dominated. MIC of 98 mutated isolates revealed no close correlation between mutation types and levels of streptomycin resistance. No mutation was found in any of the susceptible isolates. The DHPLC results were completely consistent with those of sequencing. The DHPLC method devised in this study can be regarded as a useful and powerful tool for detection of streptomycin resistance. This is the first report to describe DHPLC analysis of mutations in the *rpsL* and *rrs* genes of *M. tuberculosis* in a large number of clinical isolates.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Streptomycin resistance; DHPLC; *rpsL*; *rrs*; MIC

1. Introduction

Tuberculosis has continued to be the most common infectious cause of death, and still has a serious impact medically, socially and financially [1]. Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), caused by tubercle bacilli that are resistant to at least isoniazid and rifampicin, is one of the most worrisome elements of the antibiotic resistance pandemic, because TB

patients for whom treatment has failed have a high risk of death [1]. The global number of incident cases of MDR-TB in 2004 was estimated to be 424,203. Three countries, China, India and the Russian Federation, accounted for 261,362 MDR-TB cases, or 62% of the estimated global burden [2]. Very recently, XDR-TB has been proposed as a result of a global survey by the WHO, although its exact incidence is not known in the world. Streptomycin was the first antibiotic shown to be active against the etiologic agent of TB, *Mycobacterium tuberculosis*, and was used in control programs for many years. However, as a result of significant levels of resistance when streptomycin was used as monotherapy, and some side effects, streptomycin usage declined greatly in industrialized countries in the 1960s [3]. Recently, the emergence of

Abbreviations: MDR, multidrug-resistant; MIC, minimal inhibitory concentration; *M. tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*; TB, tuberculosis; Denaturing HPLC, denaturing high-performance liquid chromatography.

* Corresponding author. Tel.: +81 42 493 5075; fax: +81 42 492 4600.

E-mail address: sugawara@jata.or.jp (I. Sugawara).

1286-4579/\$ - see front matter © 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

doi:10.1016/j.micinf.2007.08.009

strains of *M. tuberculosis* displaying resistance to some or all of the major anti-tuberculosis drugs (isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamide and fluoroquinolones) has led to renewed interest in streptomycin and its derivatives, kanamycin and amikacin. However, in some countries including China, streptomycin has continued to be used commonly for tuberculosis treatment.

Streptomycin has been shown to interact directly with the 30S subunit of the ribosome, thereby interfering with protein biosynthesis [18]. The ribosome accuracy center is a highly conserved component of the translational apparatus, comprising a 16S rRNA domain and several polypeptides including the ribosomal protein S12. RNAs for ribosomal protein S12 (encoded by the *rpsL* gene) and 16S (encoded by the *rrs* gene) are the main targets of streptomycin [4]. It is now known that streptomycin binds tightly to the phosphate backbone of 16S rRNA in four different domains – helix 1, the 530 loop, the 912 loop and the 1400 region – thereby also forming both salt bridges and hydrogen bonds, and making contact with the S12 ribosomal protein [19,20], eventually leading to misreading of the genetic code during translation [20]. Mutations in genes encoding the rRNAs for ribosomal protein S12 (*rpsL* gene) and 16S (*rrs* gene, within which the parts encoding the 530 loop, the 912 loop and the 1400 region of 16S rRNA are named *rrsA*, *rrsB* and *rrsC*, respectively, in this work) lead to streptomycin resistance. This work was carried out to explore *rpsL* and *rrs* mutation in streptomycin-resistant clinical isolates from China.

There are several methods to detect various gene mutations. DNA sequencing is a good method for detecting mutation, but cannot be used routinely by many laboratories because of its relatively high cost. PCR-single-stranded conformational polymorphism (SSCP) is often used, but has a major disadvantage in that the technique is empirical and it is difficult to optimize the experimental conditions. Temperature-mediated heteroduplex analysis by denaturing high-performance liquid chromatography (TMHA-DHPLC) is a relatively new technique that uses heteroduplex formation between wild-type and mutated DNA strands to identify mutations. DHPLC was predicted to be a potentially useful genotypic screening method for gene mutations conferring drug resistance in *M. tuberculosis* [5–7] and it is cost-effective. We have developed the DHPLC method for detecting various gene mutations in *M. tuberculosis* [8,9]. The present study was focused on

rpsL and *rrs* mutation analysis. The DHPLC method devised in this study can be regarded as a useful tool for clinical analysis of streptomycin resistance in tuberculosis. This is the first report to describe DHPLC analysis of mutations in the *rpsL* and *rrs* genes of *M. tuberculosis* in a large number of clinical isolates.

2. Materials and methods

2.1. Clinical isolates and drug susceptibility tests

M. tuberculosis H37Rv (ATCC 25618) was used as a reference strain. Streptomycin-dependent strain 18b was from the Mycobacterial Reference Center of The Research Institute of Tuberculosis. Two hundred and fifteen clinical isolates (115 proved to be streptomycin-resistant by a routine proportional method, and 100 streptomycin-susceptible) were collected from different patients with pulmonary tuberculosis (123 males and 92 females, aged 15–75 years) over a period of 3 years (2002–2004) at Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, China. Forty-three (37.3%) of 115 streptomycin-resistant isolates were MDR. MICs of streptomycin were detected by an absolute concentration method in L–J medium at concentrations of 1, 2, 5, 10, 20, 50, 80, 100, 200, 400, and 800 µg/ml.

2.2. DNA isolation and PCR amplification

Chromosomal DNA was extracted from *M. tuberculosis* H37Rv and clinical isolates by the method described previously [8,10]. For the *rpsL* gene, a 300-bp DNA fragment was generated by PCR with the primer set SM1, SM2. For the *rrs* gene, three primer sets were used to amplify regions corresponding to the 530 loop, 912 loop and 1400 region of 16S rRNA, respectively (Table 1). TaKaRa Ex *Taq* was the polymerase used for the PCR reaction.

2.3. DHPLC analysis

DNA from the reference strain was used for individual hybridization with each test isolate. DHPLC was performed with the WAVE DNA fragment analysis system (Transgenomic Inc.). The melting temperature for each gene is shown in

Table 1
Primer sets and predicted PCR products of *rpsL* and *rrs* genes

Accession number (GenBank)	Primer set (F: forward, R: reverse)	Size (bp)	Melting temperature (°C)
<i>rpsL</i> X80124	F 5'-ATG CCA ACC ATC CAG CAG CT R 5'-ACC GCG GAT GAT CTT GTA GC	300	65.8
<i>rrs</i> BX842576			
<i>rrsA</i> (530 loop)	F 5'-GAT GAC GGC CTT CGG GTT GT R 5'-TCT AGT CTG CCC GTA TCG CC	238	63.2
<i>rrsB</i> (912 loop)	F 5'-GTA GTC CAC GCC GTA AAC GG R 5'-AGG CCA CAA GGG AAC GCC TA	240	62.3
<i>rrsC</i> (1400 region)	F 5'-TTA AAA GCC GGT CTC AGT TC R 5'-TAC GCC CCA CCA GTT GGG GC	300	63.3