

of this work was funded by a grant from the Kurozumi Medical Foundation and Grant-in-Aid for Young Scientists (B) 19790400 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

REFERENCES

- Cattoir, V., L. Poirel, V. Rotimi, C. J. Soussy, and P. Nordmann. 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**:394–397.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th informational supplement. CLSI M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- de Lorenzo, V., and K. N. Timmis. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**:386–405.
- Doi, Y., and Y. Arakawa. 2007. 16S rRNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin. Infect. Dis.* **45**:88–94.
- Hata, M., M. Suzuki, M. Matsumoto, M. Takahashi, K. Sato, S. Ibe, and K. Sakae. 2005. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:801–803.
- Hooper, D. C. 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist. Updates* **2**:38–55.
- Hooper, D. C. 2001. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg. Infect. Dis.* **7**:337–341.
- Hopkins, K. L., R. H. Davies, and E. J. Threlfall. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int. J. Antimicrob. Agents* **25**:358–373.
- Jacoby, G. A., K. E. Walsh, D. M. Mills, V. J. Walker, H. Oh, A. Robicsek, and D. C. Hooper. 2006. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1178–1182.
- Jeong, J. Y., H. J. Yoon, E. S. Kim, Y. Lee, S. H. Choi, N. J. Kim, J. H. Woo, and Y. S. Kim. 2005. Detection of *qnr* in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2522–2524.
- Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G. A. Jacoby. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**:797–799.
- Périchon, B., P. Courvalin, and M. Galimand. 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2464–2469.
- Robicsek, A., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper. 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.* **6**:629–640.
- Robicsek, A., J. Strahilevitz, D. F. Sahn, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper. 2006. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2872–2874.
- Saga, T., T. Akasaka, H. Takase, M. Tanaka, K. Sato, and M. Kaku. 2007. First detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in *Enterobacteriaceae* clinical isolates in Japan. *Int. J. Antimicrob. Agents* **29**:738–739.
- Saito, R., W. Kumita, K. Sato, T. Chida, N. Okamura, K. Moriya, and K. Koike. 2007. Detection of plasmid-mediated quinolone resistance associated with *qnrA* in an *Escherichia coli* clinical isolate producing CTX-M-9 β -lactamase in Japan. *Int. J. Antimicrob. Agents* **29**:600–602.
- Tran, J. H., and G. A. Jacoby. 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:5638–5642.
- Wang, M., J. H. Tran, G. A. Jacoby, Y. Zhang, F. Wang, and D. C. Hooper. 2003. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2242–2248.
- Warren, J. W., E. Abrutyn, J. R. Hebel, J. R. Johnsin, A. J. Schaeffer, and W. E. Stamm. 1999. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in woman. *Clin. Infect. Dis.* **29**:745–758.
- Wu, J. J., W. C. Ko, S. H. Tsai, and J. J. Yan. 2007. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1223–1227.
- Yamane, K., J. Wachino, S. Suzuki, K. Kimura, N. Shibata, H. Kato, K. Shibayama, T. Konda, and Y. Arakawa. 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:3354–3360.

KHM-1, a Novel Plasmid-Mediated Metallo- β -Lactamase from a *Citrobacter freundii* Clinical Isolate[†]

Jun-ichiro Sekiguchi,¹ Koji Morita,^{2*} Tomoe Kitao,¹ Noboru Watanabe,² Mitsuhiro Okazaki,³
Tohru Miyoshi-Akiyama,¹ Masato Kanamori,² and Teruo Kirikae¹

¹Department of Infectious Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan, Shinjuku, Tokyo 162-8655, Japan¹;

²Department of Microbiology, Kyorin University School of Health Sciences, Hachioji, Tokyo 192-8508, Japan²; and

³Department of Clinical Laboratory, Kyorin University Hospital, Mitaka, Tokyo 181-8611, Japan³

Received 17 October 2007/Returned for modification 2 December 2007/Accepted 1 August 2008

A novel gene, *bla*_{KHM-1}, encoding a metallo- β -lactamase, KHM-1, was cloned from a clinical isolate of *Citrobacter freundii* resistant to most β -lactam antibiotics. *Escherichia coli* expressing *bla*_{KHM-1} was resistant to all broad-spectrum β -lactams except for monobactams and showed reduced susceptibility to carbapenems. Recombinant KHM-1 exhibited EDTA-inhibitable hydrolytic activity against most β -lactams, with an overall preference for cephalosporins.

Acquired metallo- β -lactamases (MBLs) produced by gram-negative bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., and several enterobacteria, confer resistance to all β -lactams except the monobactams (2). Acquired MBLs are categorized on the basis of amino acid sequences into various types (2, 23). The IMP- and VIM-type enzymes are the most common and are found worldwide (2, 8, 23). Recently, four additional types, SPM, GIM, SIM, and AIM, have been found in Brazil (21), Germany (3), Korea (11), and Australia (24), respectively. We report here on the detection of a novel acquired MBL in a clinical isolate of *Citrobacter freundii* identified in Japan.

C. freundii strain KHM243 was isolated in 1997 from a patient with catheter-associated urinary tract infection at Kyorin University Hospital (Tokyo, Japan). *Escherichia coli* K-12 strain W1895 was used as the recipient in conjugation experiments. *E. coli* JM109 (Takara Bio, Shiga, Japan) was used as the host for recombinant plasmids. Plasmid pHSG396 (Takara Bio) was used for the cloning of *bla*_{KHM-1} fragments.

Susceptibility to β -lactams was determined by the microdilution method (4). The production of MBL was detected by a double-disk synergy test with disks containing sodium mercaptoacetic acid (MBL production test; Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan), as described by Arakawa et al. (1).

The transfer of resistance by conjugation was analyzed as described previously (7). *E. coli* transconjugants were selected on Penassay broth agar (antibiotic medium no. 3; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) containing rifampin (200 μ g/ml; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) and moxalactam (16 μ g/ml; Shionogi & Co., Ltd., Osaka, Japan). Plasmid DNA was extracted by an alkaline lysis procedure (9). Plasmid R100 (94.5 kb) (13) from *E. coli* CSH2, plasmid R478 (275 kb) (6) from *E. coli* J53, and three cryptic plasmids (200,

60, and 2.4 kb) from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis L119 (15) were used as molecular size markers.

PCR analysis specific for class 1 integrons was performed as described previously (12). DNA sequences flanking *bla*_{KHM-1} were determined by inverse PCR (16). Briefly, plasmid DNA extracted from *E. coli* transconjugant W1895(pCF243) was digested with EcoRV or XspI (Takara Bio). Self-ligated digests were used as the template for an inverse PCR. The upstream and downstream flanking regions of *bla*_{KHM-1} were amplified by inverse PCR with two sets of primers: primers 5'-CGATA TAACAAGAGCTATTTTCAT-3' and 5'-GGTATGCGCTG ACGATTC-3' for the upstream region and primers 5'-GGTG TACAGATAAACGCCG-3' and 5'-TTTATTTGGTGGCTG TTTTGTTC-3' for the downstream region.

The KHM-1 MBL from *E. coli* JM109(pKHM-1) was purified with HiTrap Q HP and Superdex 200 columns (GE Healthcare Bio-Sciences KK, Tokyo, Japan), as described by Franceschini et al. (5). During the purification procedure, the presence of β -lactamase activity was monitored with 100 μ M nitrocefin (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom). The protein concentration was determined with a bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). Kinetic analysis was carried out in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) at 25°C with a UV-visible spectrophotometer (V-530; Jasco, Tokyo, Japan). The K_m and k_{cat} values and the k_{cat}/K_m ratio were determined by analyzing β -lactam hydrolysis under initial-rate conditions by use of the Lineweaver-Burk plot.

Antibiotic susceptibility testing showed that *C. freundii* KHM243 was resistant to most β -lactams and showed reduced susceptibility to carbapenems (Table 1). However, KHM243 was susceptible to monobactams (carumonam and aztreonam). The isolate was positive by the MBL production test (data not shown).

C. freundii KHM243 has two plasmids, one of approximately 70 kb and one of approximately 200 kb. A conjugation experiment was done with KHM243 and *E. coli* W1895. W1895 transconjugants that were resistant to β -lactams and that contained a 200-kb plasmid, designated pCF243, were obtained. The transconjugant exhibited a profile of susceptibility to β -lactams similar to that of KHM243, although the MICs for

* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, Kyorin University School of Health Sciences, 476 Miyashita-cho, Hachioji, Tokyo 192-8508, Japan. Phone: (81) 42 691 0011, ext. 4125. Fax: (81) 42 691 1094. E-mail: moritako@kyorin-u.ac.jp.

[†] Published ahead of print on 2 September 2008.

TABLE 1. MICs of β -lactams for *C. freundii* KHM243, *E. coli* W1895(pCF243) transconjugant, *E. coli* JM109(pKHM-1) expressing the KHM-1 MBL, and *E. coli* host strains

Antibiotics ^a	MIC (μ g/ml)				
	<i>C. freundii</i> KHM243	<i>E. coli</i> W1895 (pCF243) ^b	<i>E. coli</i> W1895	<i>E. coli</i> JM109 (pKHM-1) ^c	<i>E. coli</i> JM109
Ampicillin	256	64	8	16	1
Ampicillin-sulbactam	64	64	1	16	0.5
Ticarcillin	>512	>512	2	512	2
Ticarcillin-clavulanic acid	512	>512	4	512	2
Piperacillin	4	16	2	4	0.25
Cephaloridine	512	128	2	64	1
Cefuroxime	>512	>512	2	>512	8
Ceftazidime	>512	>512	0.125	>512	0.063
Cefotaxime	64	>512	0.008	128	0.004
Cefepime	32	>512	0.002	64	0.004
Cefozopran	16	256	0.016	64	0.008
Imipenem	2	4	0.063	0.5	0.063
Meropenem	4	4	0.004	4	0.004
Aztreonam	0.25	0.063	0.031	0.063	0.031
Carumonam	0.25	0.125	0.031	0.063	0.031
Cefoxitin	512	>512	8	>512	8
Cefmetazole	512	512	0.5	>512	0.25
Cefotetan	128	512	0.125	>512	0.031
Cefbuperazone	128	256	0.063	512	0.031
Cefminox	512	>512	0.125	512	0.25
Moxalactam	256	>512	0.063	>512	0.031
Flomoxef	64	256	0.031	128	0.031

^a The ratio of the ampicillin to sulbactam was 2:1. The ratio of ticarcillin to clavulanic acid was 15:1.

^b Natural plasmid carrying the *bla*_{KHM-1} gene.

^c Recombinant plasmid constructed by insertion of DNA fragment containing the *bla*_{KHM-1} gene into the cloning vector pHSG396.

some cephalosporins, including cefotaxime, cefepime, and ceftazopran, were significantly higher in the transconjugant than in KHM243 (Table 1).

EcoRI-digested fragments of pCF243 were subcloned into pHSG396 and were transformed into *E. coli* JM109 cells, and transformants were selected on agar medium containing moxalactam (1 μ g/ml). Strain JM109 carrying the plasmid that conferred resistance to moxalactam, named pKHM-1, exhibited a profile of susceptibility to β -lactams similar to the susceptibility profiles of KHM243 and the *E. coli* W1895 transconjugant carrying pCF243 (Table 1). However, the MICs of some antibiotics, including cefotaxime and cefepime, were lower for the transformant carrying pKHM-1 than the transconjugant. This might be explained by insufficient expression of the gene due to insertion of the DNA fragment with a small 5'-flanking region.

pKHM-1 contained an 837-bp insert with a complete open reading frame (ORF) (data not shown). The 726-bp ORF encoded a putative protein of 241 amino acids. The protein was similar to MBLs, such as Uvs123 from an uncultured bacterium (82% identity) (22), IMP-1 (59% identity) (17), and SIM-1 (59% identity) (11) (Fig. 1). The protein was somewhat less similar to VIM-1 (38% identity) (10), GIM-1 (50% identity) (3), and SPM-1 (46% identity) (21) (Fig. 1). We named the ORF encoding the protein *bla*_{KHM-1} and designated the protein KHM-1 (Kyorin Health Science MBL 1), *bla*_{KHM-1} was different from the *Citrobacter freundii* genome in its GC contents (GC contents, 50.27% and 44.63%, respectively) and codon usage (data not shown). KHM-1 contained amino acid motifs conserved in MBL enzymes, including a zinc-binding

motif (HXHXD, residues 97 to 101) and three other residues involved in zinc binding (residues 159, 178, and 217) (Fig. 2) (18, 23).

The DNA sequences flanking *bla*_{KHM-1} were determined from 774 bp upstream to 806 bp downstream of it. No sequence homologies for site-specific coinTEGRATION events, ORFs, or transmissible elements were detected within the 774-bp upstream of *bla*_{KHM-1}. A 360-bp ORF encoding a putative protein of 119 amino acids with 77% identity to hypothetical protein VP1798 of *Vibrio parahaemolyticus* (14) was located in the fragment 21 to 380 bp downstream of *bla*_{KHM-1}. Strain KHM243 carried a class I integron with an array of two gene cassettes, which carried the *aadA2* (20) and *aac(6')-Iae* (19) aminoglycoside resistance determinants; however, *bla*_{KHM-1} was not detected in this integron.

Analysis of the purified KHM-1 protein by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis showed a single 25-kDa band. The activity of KHM-1 against various β -lactams was analyzed with the purified protein. It showed hydrolytic activity against all β -lactams tested except aztreonam (Table 2). Enzymatic activity against aztreonam was undetectable un-

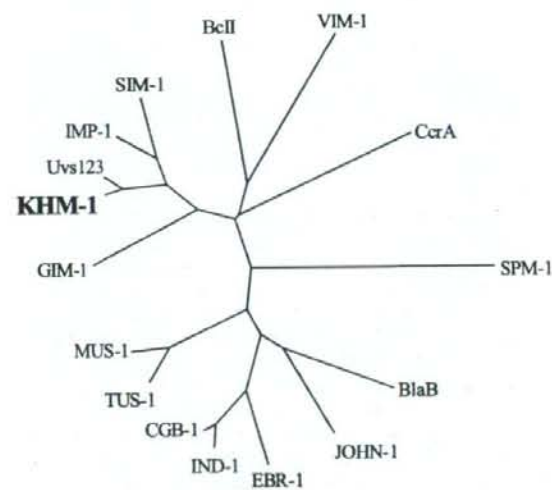


FIG. 1. Dendrogram showing the similarity of KHM-1 to other MBLs. KHM-1 and MBLs from a variety of organisms were tested. The dendrogram was created with the ClustalW program. Branch lengths correspond to the number of amino acid exchanges of the following MBL proteins (GenBank accession numbers, source organism) of BclI (P04190, from *Bacillus cereus*), BlaB (CA65601, from *Elizabethkingia meningoseptica*), CcrA (P25910, from *Bacteroides fragilis*), CGB-1 (AAL5263, from *Chryseobacterium gleum*), EBR-1 (AAN32638, from *Empedobacter brevis*), GIM-1 (CAF05908, from *Pseudomonas aeruginosa*), IMP-1 (AAB30289, from *Serratia marcescens*), IND-1 (AAD20273, from *Chryseobacterium indologenes*), JOHN-1 (AAK38324, from *Flavobacterium johnsoniae*), MUS-1 (AAN63647, from *Myroides odoratimimus*), SIM-1 (AAK76774, from *Acinetobacter baumannii*), SPM-1 (CAD37801, from *P. aeruginosa*), TUS-1 (AAN63648, from *Myroides odoratus*), Uvs123 (AAP70377, from uncultured bacterium), and VIM-1 (CAB46686, from *P. aeruginosa*).

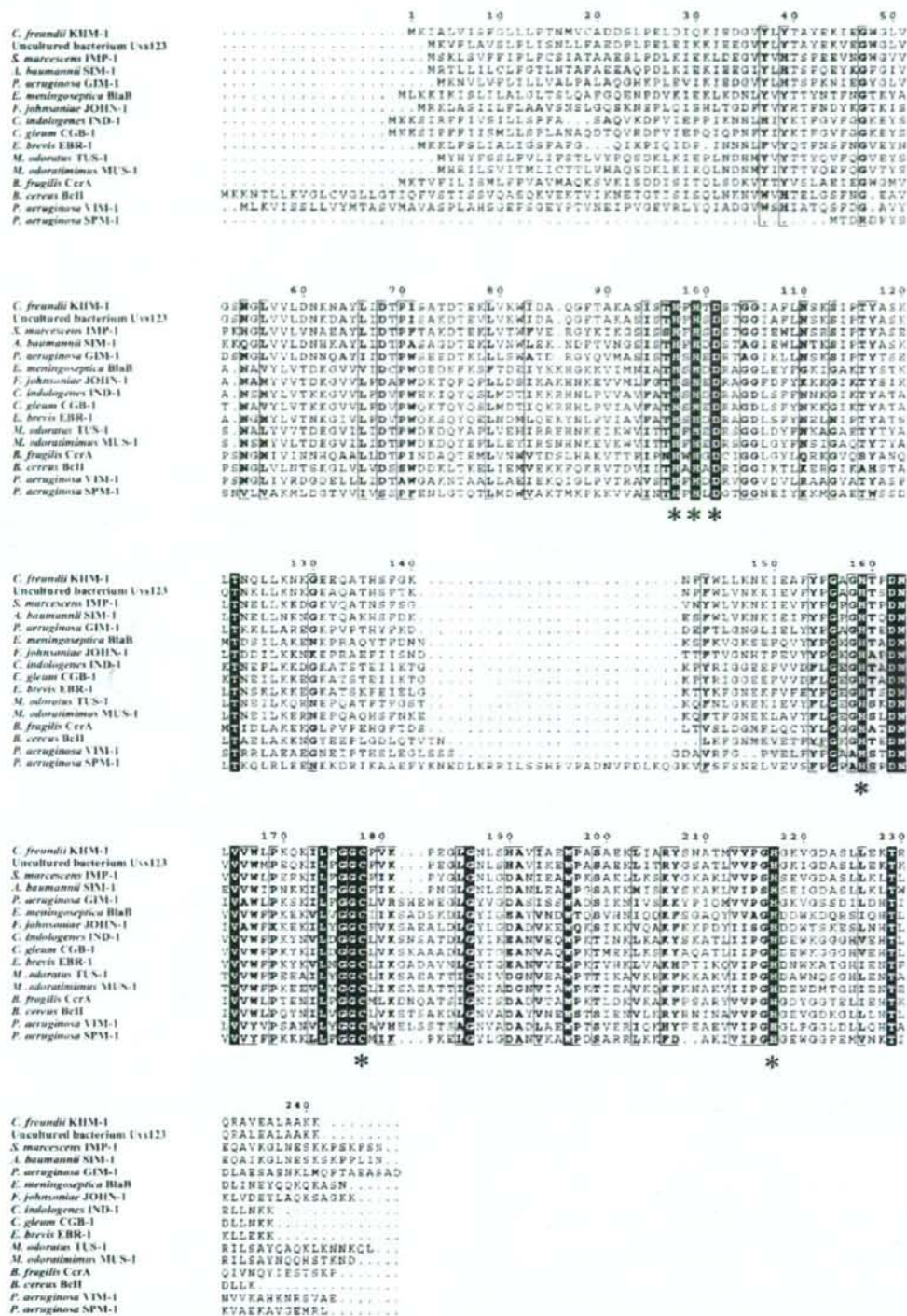


FIG. 2. Multiple-sequence alignments of the amino acid sequence of KHM-1 from *Citrobacter freundii* isolate KHM243 with those of other MBLs. The sequence sources are the same as those indicated in the legend to Fig. 1. Sequence comparison was performed by aligning the protein amino acid sequences by use of the ClustalW program (<http://clustalw.dnbg.jp/top-e.html>). The residues known to be involved in metal binding are indicated by asterisks. Identical residues are shaded.

TABLE 2. Kinetic parameters of β -lactamase KHM-1 with various substrates

Substrate	K_m (μ M) ^a	k_{cat} (s ⁻¹) ^a	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ · s ⁻¹)
Penicillin G	1,340 ± 56	23 ± 0.9	1.7 × 10 ⁴
Ampicillin	978 ± 111	19 ± 2	1.9 × 10 ⁴
Cephaloridine	4.4 ± 0.95	686 ± 12	1.6 × 10 ⁸
Cefoxitin	81 ± 4	1,178 ± 164	1.4 × 10 ⁷
Cefotaxime	13 ± 1.5	2,181 ± 208	1.7 × 10 ⁸
Ceftazidime	8 ± 0.4	118 ± 3	1.5 × 10 ⁷
Moxalactam	71 ± 8	2,794 ± 260	3.9 × 10 ⁷
Aztreonam	— ^b	—	—
Meropenem	12 ± 3	0.4 ± 0.015	3.3 × 10 ⁴
Imipenem	268 ± 53	15 ± 3	5.6 × 10 ⁴

^a The K_m and k_{cat} values represent the means of three independent experiments ± standard deviations.

^b —, no hydrolysis was detected under conditions with a substrate concentration of up to 1 mM and an enzyme concentration of up to 840 nM.

der the experimental conditions adopted. This activity was inhibited by EDTA but was recovered by addition of Zn²⁺ (data not shown). The kinetic parameters, including K_m , k_{cat} , and the k_{cat}/K_m ratio, were determined for several different β -lactams (Table 2). Relatively higher values of the k_{cat}/K_m ratio (>10⁷ M⁻¹ · s⁻¹), as a result of low values of K_m and high values of k_{cat} , were observed with the cephalosporins tested (cephaloridine, cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime, and moxalactam); and lower values of the k_{cat}/K_m ratio (<10⁵ M⁻¹ · s⁻¹) were observed with penicillin G, ampicillin, meropenem, and imipenem.

During 1997 and 1998, 104, 13, and 5 clinical isolates of *C. freundii*, *C. koseri*, and other *Citrobacter* spp., respectively, were collected in the hospital and were screened for imipenem resistance. Of these, four isolates of *C. freundii* showed reduced susceptibilities to imipenem (MICs, >8 μ g/ml). However, *bla*_{KHM-1} was not detected in any of these isolates except the one from the patient infected with strain KHM243. A laboratory-based survey of other isolates of the family *Enterobacteriaceae* is in progress to detect *bla*_{KHM-1}.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence data for *bla*_{KHM-1} and its flanking region from 774 bp upstream to 806 bp downstream reported here have been deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ databases under accession number AB443628.

This study was supported in part by the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan (grants H18-Shinko-011, H19-Shinko-011, and H20-Shinko-011).

We thank M. Nakano (Jichi Medical School, Tochigi, Japan) for helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

- Arakawa, Y., N. Shibata, K. Shibayama, H. Kurokawa, T. Yagi, H. Fujiwara, and M. Goto. 2000. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J. Clin. Microbiol.* 38:40–43.
- Bush, K. 2001. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and

- impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.* 32:1085–1089.
- Castanheira, M., M. A. Toleman, R. N. Jones, F. J. Schmidt, and T. R. Walsh. 2004. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{KHM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4654–4661.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Franceschini, N., B. Caravelli, J. D. Doquier, M. Galleni, J. M. Frère, G. Amicosante, and G. M. Rossolini. 2000. Purification and biochemical characterization of the VIM-1 metallo- β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:3003–3007.
- Gilmour, M. W., N. R. Thomson, M. Sanders, J. Parkhill, and D. E. Taylor. 2004. The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. *Plasmid* 52:182–202.
- Inoue, M., J. Itoh, and S. Mitsuhashi. 1983. pMS76, a plasmid capable of amplification by treatment with chloramphenicol. *Plasmid* 9:86–97.
- Jacoby, G. A., and L. S. Munoz-Price. 2005. The new β -lactamases. *N. Engl. J. Med.* 352:380–391.
- Kado, C. I., and S. T. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145:1365–1373.
- Lauretto, L., M. L. Riccio, A. Mazzariol, G. Cornaglia, G. Amicosante, R. Fontana, and G. M. Rossolini. 1999. Cloning and characterization of *bla*_{VIM-1}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1584–1590.
- Lee, K., J. H. Yum, D. Yong, H. M. Lee, H. D. Kim, J. D. Doquier, G. M. Rossolini, and Y. Chong. 2005. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*_{VIM-1}, in a class I integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4485–4491.
- Levesque, C., L. Piche, C. Larose, and P. H. Roy. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:185–191.
- Liebert, C. A., R. M. Hall, and A. O. Summers. 1999. Transposon Tn27, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:507–522.
- Makino, K., K. Oshima, K. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Uda, K. Tagomori, Y. Iijima, M. Najima, M. Nakano, A. Yamashita, Y. Kubota, S. Kimura, T. Yasunaga, T. Honda, H. Shinagawa, M. Hattori, and T. Iida. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholera*. *Lancet* 361:743–749.
- Nakamura, M., S. Sato, T. Ohya, A. Suzuki, and S. Ikeda. 1985. Possible relationship of a 36-megadalton *Salmonella* Enteritidis plasmid to virulence in mice. *Infect. Immun.* 47:831–833.
- Ochman, H., A. S. Gerber, and D. L. Hartl. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120:621–623.
- Osano, E., Y. Arakawa, R. Wacharotayankun, M. Ohta, T. Horii, H. Ito, F. Yoshimura, and N. Kato. 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:71–78.
- Rasumussen, B. A., and K. Bush. 1997. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:223–232.
- Sekiguchi, J., T. Asagi, T. Miyoshi-Akiyama, T. Fujino, I. Kobayashi, K. Morita, Y. Kikuchi, T. Kuratsuji, and T. Kirikae. 2005. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain that caused an outbreak in a neurosurgery ward and its *aac(6)-Iac* gene cassette encoding a novel aminoglycoside acetyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3734–3742.
- Taito, R. C., H. Rempel, R. L. Rodriguez, and C. I. Kado. 1985. The aminoglycoside-resistance operon of the plasmid pSa: nucleotide sequence of the streptomycin-spectinomycin resistance gene. *Gene* 36:97–104.
- Toleman, M. A., A. M. Simm, T. A. Murphy, A. C. Gales, D. J. Biedenbach, R. N. Jones, and T. R. Walsh. 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial programme. *J. Antimicrob. Chemother.* 50:673–679.
- Voget, S., C. Leggewie, A. Uesbeck, C. Raasch, K.-E. Jaeger, and W. R. Streit. 2003. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6235–6242.
- Walsh, T. R., M. A. Toleman, L. Poirel, and P. Nordmann. 2005. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 18:306–325.
- Young, D., J. M. Bell, B. Ritchie, R. Pratt, M. A. Toleman, and T. R. Walsh. 2007. A novel sub-group metallo- β -lactamase (MBL). AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. *Abstr. C1-593*, p. 75. *Abstr. 47th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.* American Society for Microbiology, Washington, DC.

V. 資料

今月の主題 結核

トピックス

結核ワクチン研究の現状と展望

松本 壮吉 小林 和夫

臨床検査

第52巻 第10号 別刷

2008年10月15日 発行

医学書院

結核ワクチン研究の現状と展望

松本壮吉¹⁾/小林和夫²⁾

(KEYWORDS) 結核, 細菌感染症, ワクチン

1. 結核(症)の現状

世界の年間死亡総数の約1/4を占める感染症において、結核は感染症の死因で後天性免疫不全症候群(AIDS)に次ぐ第二位で、全感染症による死亡者数の約1/7を占める。世界保健機関の統計(2008年5月23日現在)によると2005年の結核患者発生数は881.1万人、死亡者数が157.7万人である。AIDS患者における結核死亡を考慮した場合、毎年約200万人が結核によって死亡している。このように現在でも結核は甚大な健康被害を招来している。

結核には菌の感染後即発症する一次結核と、潜

伏期を経て発症する二次結核がある(図1)。わが国を含め、結核の低一中蔓延地域における成人肺結核の多くは二次結核である。結核菌は現在人類の1/3(20億人)に潜伏感染しており、既感染者の5~10%が終生の間に二次結核を発症する。ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染は内因性再燃を加速し、HIV-結核菌重複感染者の約10%が毎年結核を発症する。したがって、結核ワクチン開発においては、感染暴露前(pre-exposure vaccine)のみならず、感染暴露後(治療的)ワクチン(post-exposure vaccine)の開発が希求される。

2. 結核ワクチンの歴史とBCG

結核菌は、1882年にRobert Kochによって同定されたグラム陽性桿菌である。当時、Kochは結核菌の培養濾液に予防効果があると信じた。こ

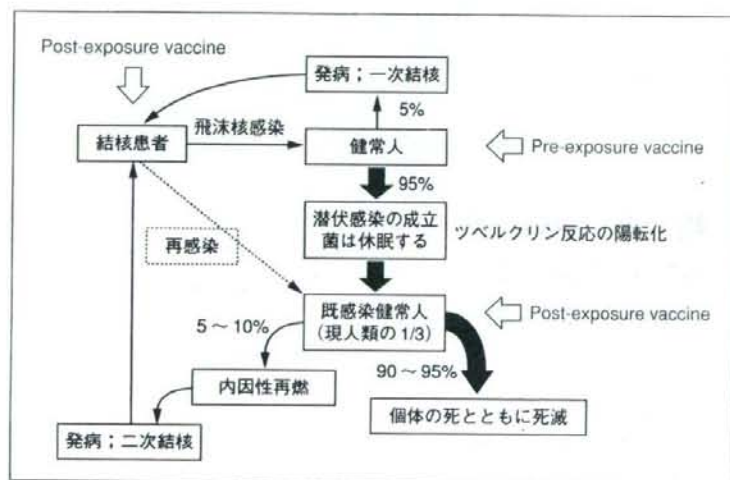


図1 結核菌の伝播と結核の発症

結核患者由来の飛沫核が空中にて乾燥し菌を含んだ飛沫核となり、健康人もしくは既感染者(再感染)の肺胞に届いて感染が成立する。この時、感染者の5%未満が一時結核を発症する。残る95%は発症しないが、菌は生体から排除されずに潜伏感染が成立する。既感染者は現人類の1/3にのぼる。既感染者の5~10%が終生の間に結核を発病する(二次結核)。また、HIVの感染は二次結核発症率を顕著に上昇させる。初感染時の感染や発病を抑制するpre-exposure vaccineと既感染者の発症を予防する、もしくは免疫介入療法に用いるpost-exposure vaccineの両方が結核ワクチンに開発において求められる。

1) MATSUMOTO Soukichi 大阪市立大学大学院医学研究科細菌学分野・准教授

2) KOBAYASHI Kazuo 国立感染症研究所免疫部・部長

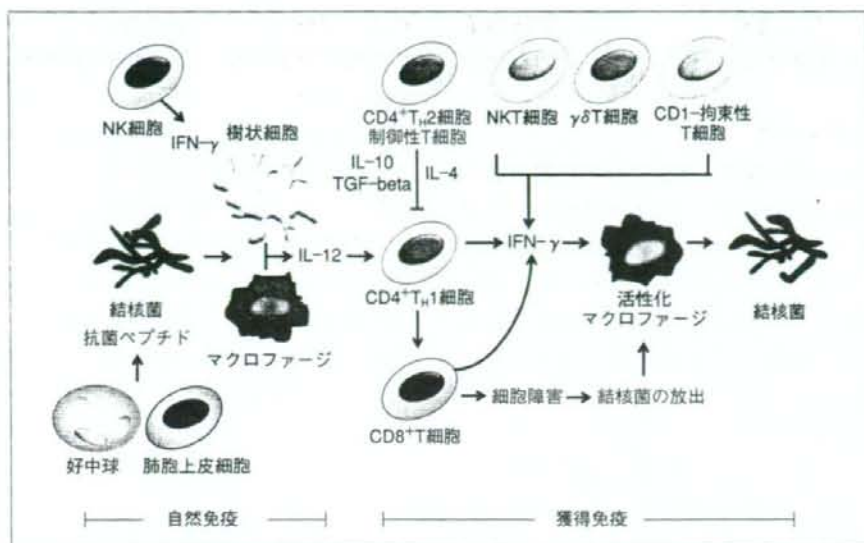


図2 結核菌感染と宿主応答

肺に侵入した結核菌は、肺胞マクロファージに貪食されるか、II型肺胞上皮細胞に感染する。感染初期には好中球の浸潤があり、II型肺胞上皮細胞とともに抗菌ペプチドによって結核菌を攻撃する。またNK細胞はIFN- γ を生産し、細胞性免疫の誘導を促す。マクロファージや樹状細胞が結核菌抗原をIL-12の存在下において提示することで、CD4陽性T細胞はTh1細胞に分化する。Th1細胞はIFN- γ を生産し、マクロファージを活性化することで結核菌の増殖停止や殺傷を促す。Th1細胞以外にも、CD8陽性T細胞、NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、CD1-拘束性T細胞もIFN- γ を生産しマクロファージを活性化する。これを抑制するのが、Th2細胞や制御性T細胞である。CD8陽性T細胞は細胞傷害性を有するキラー細胞でもあり、活性化マクロファージによる結核菌の再貪食を誘導する。

れが現在、結核菌など抗酸菌感染の診断に用いられているツベルクリンの起源である。

一方、Louis Pasteurらが当時確立したワクチン開発法(すなわち、自然発生的な弱毒病原体の取得)をPasteur研究所のCalmetteとGuérinが実践し、牛型結核菌Nocard株を13年間230代に渡って継代培養を行った結果、弱毒菌株を得た。これが現行の結核ワクチンbacillus Calmette-Guérin(BCG)の原型である。日本で接種されているBCG Tokyo 172は、1924年に志賀潔がPasteur研究所から持ち帰った菌株に由来する¹⁾。結核に対する予防効果は、BCG接種で得られるのに対し、ツベルクリン接種では得られないことから防御免疫は生菌免疫でのみ獲得されるとの考えが定着する。

現行ワクチンBCGは乳幼児結核(全身播種性結核や髄膜結核)の予防に効果(70~80%)が認められている。しかしながら、成人型肺結核の予防効果は疑問視されている。また、HIV感染者に

BCGを含む生ワクチンの接種は有害事象を惹起する可能性があり、原則禁忌である。このような現状は、肺結核に有効かつ、安全な新規ワクチンの必要性を示唆している

3. 自然免疫と結核

免疫賦活物質であるアジュバントは自然免疫の活性化物質であり、特に成分ワクチンの開発に欠かせない。自然免疫はマクロファージや樹状細胞のパターン認識受容体の活性化を介して活性化され、T細胞への円滑な抗原提示を促すことで獲得免疫の発動と免疫記憶を誘導する(図2)。しかしながら、結核菌は樹状細胞の活性化をC型レクチンを介して抑制する機構を有している。また、結核菌菌体成分は自然免疫の賦活化において最も主要なレセプターToll-like receptor(TLR)4をほとんど活性化しない。これらは結核菌の巧妙な寄生戦略の一端を示すものであり、ワクチン開発において憂慮すべき問題である。一方、結核菌の菌体成分は、TLR2やTLR9(それぞれリポ蛋

白質と CpG-DNA) を刺激し、これらの受容体は結核の防御に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。

4. 獲得免疫と結核

結核菌は感染後対数的に増殖するが、健常宿主においては獲得免疫(特に、マクロファージと T 細胞から構成される細胞性免疫)の発動により増殖は阻止される。この防御免疫の主役を担う細胞が CD4 陽性の 1 型ヘルパー T (T_H1) 細胞である(図 2)。活性化された T_H1 細胞はエフェクター T 細胞に分化して interferon- γ (IFN- γ)³⁾ を産生し菌の増殖抑制や殺菌を促す。ワクチン効果の主体はこのエフェクター T 細胞が病原体の駆逐による抗原消失後、記憶 T 細胞に分化し長期間の免疫記憶が成立することで形成される。しかしながら、結核菌は潜伏感染して宿主から排除されることがないため、多くの T_H1 細胞がエフェクター細胞のまま次第に死滅してしまう。BCG も生体内に持続感染するため記憶 T 細胞の誘導能に乏しく、この機構が成人接種者における効果の減衰にかかわっている。

T_H1 細胞以外にも、免疫記憶を担う CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞や結核菌糖脂質を認識する CD1 拘束性 T 細胞も感染防御に重要な役割を果たす。他方、interleukin 4 (IL-4) を産生する T_H2 細胞や制御性 T 細胞 (Treg) は防御免疫の抑制にかかわる記憶 T 細胞である。細胞内寄生菌である結核菌に対し、抗体など液性免疫の防御的役割はマイナーとされる。

5. 結核ワクチン開発の現状

成人型肺結核に対する有効で安全な結核ワクチンの成功は未了であるが、①遺伝子組み換え BCG、②組み換え弱毒結核菌、③成分ワクチン、④DNA ワクチンやウイルスベクター組み換えワクチンなど、世界的に結核ワクチン研究・開発が進行中である⁴⁾。以下に抜粋して紹介する(表)。

1) 組み換え BCG

BCG に特定の防御抗原や免疫賦活分子を発現させる、もしくは BCG が欠失した結核菌抗原を再度入れ戻すことで BCG を改良する試みである。Antigen 85B などの抗原や、IL-2、IFN- γ などのサイトカインを発現させた BCG が作成されているが、特に注目すべきは IL-15 を組み入れた

BCG であろう⁵⁾。IL-15 は記憶 CD8 陽性 T 細胞の維持にかかわり、防御免疫の持続を可能にするかもしれない。

BCG は、region of deleted 1 (RD1) 領域を欠いているため、抗原提示細胞内でほとんどの菌体抗原はファゴゾーム内にとどまっている。結果として十分な CD8 陽性 T 細胞を活性化することができない。Kaufmann らは、低 pH でファゴゾーム膜を障害するリステリアの毒素をウレアーゼの欠失した BCG に発現させた組み換え BCG、rBCG Δ UreC : Hly+ を作成した。rBCG Δ UreC : Hly+ は CD4 陽性細胞とともに CD8T 細胞の活性化を促し、BCG 親株を超える効果のあることが判明している⁶⁾。

2) 組み換え弱毒結核菌

結核菌の弱毒株を作成して、より病原体そのものに近い抗原で免疫することが効果的なワクチンの作成に繋がるものと考えがある。結核菌そのものを使用するため少なくともゲノム上離れた二種の遺伝子を欠失させ病原性の回帰を阻止している。結核菌 H37Ra 株の病原性の消失に強くかかわる二成分制御系分子の PhoP⁷⁾ やビタミン B5 の合成酵素 (PanC, PanD)⁸⁾ を欠失させた結核菌株の臨床試験が始まっている。

3) 成分ワクチン

成分ワクチンは生ワクチンに比べ安全性に優れ、HIV 感染者にも対応可能である。加えて、抗原は投与後しばらくして消失するために、記憶 T 細胞を誘導しやすい利点がある。一方、免疫原性は生菌ワクチンに劣るため一般的にアジュバントや追加免疫を必要とする。現行のアジュバントの多くが体液性免疫の賦活を念頭に開発されてきたため、細胞性免疫の誘導に優れるアジュバントの開発も必要である。

ワクチン抗原は当初、分泌蛋白質を標的として行われた。これは生菌免疫の効果が、分泌する蛋白質に依存するものと考えによる。防御免疫を誘導する結核菌分泌蛋白質は、Antigen 85B (α 抗原) をさきがけとして、Antigen 85 complex, ESAT6, MPT51, MPT64, HBHA, Mtb32 などが同定されている。しかしながら、DnaK, Mtb39, HSP65, MDP1⁹⁾ など、非分泌性蛋白質にも防御免疫を誘導する抗原が多数同定されている。蛋白質成分ワ

表 現在開発中の主な結核ワクチン

ワクチン	施設・施行者	備考
組み換え BCG		
rBCG-Ag85B-IL15	九州大学・吉開ら	Antigen 85B と IL-15 を BCG より発現。
rBCG30	カリフォルニア大学・Horwitz ら	Antigen 85B を BCG より発現。Phase1 済み。
BCG = RD1	パスツール研究所・Cole ら	結核菌の RD1 領域を BCG に入れ戻したものの。
rBCGΔUreC : Hly +	マックスプランク研究所・Kaufmann ら	本文参照。Phase1 済み。
組み換え結核菌		
<i>M. tuberculosis</i> mc ² 6030	ニューヨーク大学・Jacobs ら	panCD と RD1 領域を欠失させた結核菌。
<i>M. tuberculosis</i> PhoP	ニューヨーク大学・Jacobs ら	PhoP を欠失させた結核菌。
その他の生菌ワクチン		
組み換えリステリア	浜松医科大学・小出ら	リステリアに Antigen 85A, 85B, MPT51 を発現させたもの。
成分ワクチン		
Mtb72f	Corixa 社・Reed ら	Mtb39 と Mtb32 の融合蛋白質。Phase1 済み。
Hybrid-1	Statens Serum Institutes Andersen ら	Antigen 85B と ESAT6 の融合蛋白質。Phase1 済み。
HyVac-4	Statens Serum Institutes Andersen ら	Antigen 85B と TB10.4 の融合蛋白質。
DNA やウイルスベクターを利用したワクチン		
HSP65DNA	英国国立医学研究所・Lowrie ら	ライ菌由来 HSP60 遺伝子を用いた DNA ワクチン。
HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA	近畿中央病院・岡田ら	結核菌由来 HSP65 と IL-12 遺伝子をリポソームに封入した DNA ワクチン。
MVA85A	オックスフォード大学・Hill ら	ワクシニアウイルスを用いて Antigen 85A を発現させたもの。
Aeras-402	Aeras 社	アデノウイルスベクターを用いて Antigen 85A, 85B, TB10.4 を発現させたもの。

ワクチン開発においては、Mtb72f¹⁰⁾, Hybrid1, HyVac-4 など、複数の抗原をハイブリッドさせることでより強い免疫応答を惹起できる融合蛋白質ワクチンも作成され試験中である。

一方、脂質抗原が CD1 分子拘束性の T 細胞の分化を促すことが判明している¹¹⁾。結核菌細胞壁の 40% は脂質であり、結核菌感染においては脂質抗原に対する免疫応答が活発である。脂質抗原は蛋白質に比べ生産効率や操作性に劣ることから、ワクチンへの応用は現在のところ低調であるが、特にアジュバントとしての利用価値は高い。将来のワクチン設計において脂質抗原も加えて検討すべきと考えられる。

4) DNA ワクチンやウイルスベクター組み換えワクチン

抗原そのものを接種するのではなく、蛋白質抗原の遺伝子を発現ベクターやウイルスベクターに導入し生体内で発現させる手法である。これらのワ

クチンは、これまでヒトでの実績がなく安全性を慎重に検討しなければならないが、内源性抗原として蛋白質を提示するため CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の誘導に優れる。また、DNA 取り扱い技術の発達により簡便かつ安価にワクチンを作成できる。一方、生体内における DNA の分解を防ぐ必要があり、DNA ワクチンをリポソームに封入したり¹²⁾、病原性を失活させたウイルス粒子を用いることで対応している。現在、結核菌の主要防御抗原やサイトカインを発現するワクチンが作成され検討されている(表)。

6. 今後の展望

人類の 1/3 に結核菌が潜伏感染している。天然ワクチンの接種者である結核菌既感染者に再感染が生じるように、結核は“二度がかり有り”の慢性疾患である。これまでのワクチンが著効を示してきたのは、天然痘や麻疹に代表されるような“二度がかり無し”の急性疾患のみである。従来

のワクチン開発戦略のみでは結核ワクチンの開発は困難であり、安易な抗原の組み合わせや一時的な免疫応答の惹起のみでは最終的な成功に至らぬことは明白である。加えて、ワクチンの評価は成人の肺結核に効果の乏しい native BCG を実験対照として用いているため、評価系自体にも問題がある。ヒトの一次結核と二次結核、それぞれの病態を表現するモデルを確立し、検討することが重要と考えられる。

一方、“ヒト”に立ち返れば、結核菌に感染しても終生発病を免れるヒトが約90%である事実は、優れたワクチンの開発が可能であることを示している。結核菌既感染者における“菌の増殖を制御する機構”の解明はワクチン開発に寄与するであろう。“二度がかり有り”の慢性疾患に対して有効・安全なワクチンを作成することは、これまでに人類が成しえていない大きな挑戦である。今後、免疫理論と実践の蓄積により、結核ワクチン開発は成し遂げられるものであろう。

文 献

- 1) Yamamoto S, Yamamoto T: Historical review of BCG vaccine in Japan. *Jpn J Infect Dis* 60: 331-336, 2007
- 2) Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, et al: Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J Immunol* 148: 4072-4076, 1992
- 3) Kawamura I, Tsukada H, Yoshikawa H, et al: IFN-gamma-producing ability as a possible marker for the protective T cells against *Mycobacterium bovis*

- BCG in mice. *J Immunol* 148: 2887-2893, 1992
- 4) Young DB, Perkins MD, Duncan K, et al: Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. *J Clin Invest* 118: 1255-1265, 2008
 - 5) Tang C, Yamada H, Shibata K, et al: Efficacy of recombinant bacille Calmette-Guérin vaccine secreting interleukin-15/antigen 85B fusion protein in providing protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 197: 1263-1274, 2008
 - 6) Grode L, Seiler P, Baumann S, et al: Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest* 115: 2472-2479, 2005
 - 7) Lee JS, Krause R, Schreiber J, et al: Mutation in the transcriptional regulator PhoP contributes to avirulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra strain. *Cell Host Microbe* 3: 97-103, 2008
 - 8) Sambandamurthy VK, Wang X, Chen B, et al: A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nat Med* 8: 1171-1174, 2002
 - 9) Matsumoto S, Matsumoto M, Umemori K, et al: DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein I and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* 175: 441-449, 2005
 - 10) Skeiky YA, Alderson MR, Owendale PJ, 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: 7618-7628, 2004
 - 11) Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, et al: Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta + T cells. *Nature* 372: 691-694, 1994
 - 12) 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* 25: 2990-2993, 2007

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

青木 眞

A5 頁1464 2008年
定価10,500円(本体10,000円+税5%)
[ISBN978-4-260-00387-2]

初版発行から7年。第2版は頁数を倍以上に増やし、新版と見まがうほどの大改訂となった。最新エビデンスを明示し、臓器別・原因微生物別のアプローチを充実させ、臨床での問題解決のための生きた知識・考え方を網羅。「感染症は全診療科に共通の問題なので、研修医は感染症診療の基本原則を身につけることが重要」という理念はぶれることなく、研修医および指導医が困ったときに最初に頼りき本という位置付けに変わりはない。

院内感染を防ぐ細菌院内拡散自動検出法

はじめに

本技術（「菌の異常集積の自動検出」）は、日常の細菌検査の結果のみを用い、①菌の院内拡散の早期発見、②院内感染アウトブレイクの防止を実現する。さらに、③細菌感染対策上の問題点を指摘する。

二項分布

菌の分離が偶然だけに支配され、時間的にも空間的にも偏りがない場合、1) 細菌検査を受けた人の数、2) ある菌が陽性だった人の数、3) その菌の患者一人当りの分離率がわかれば、そのような（たとえば、8人中3人が陽性だったというような）菌の分離が起こる確率を簡単に求めることができる。

①菌の分離は、その菌が陽性か陰性かという二つの値のみをとり、②分離が偶然だけに支配されている場合、それぞれの分離は場所や時間、順序にかかわらず分離率にのみ支配され、毎回の分離（試行）は独立である。これらの条件を満たす場合、確率は二項分布（図1）によって求まる¹⁾。

帰無仮説

菌の分離が偶然のみに支配されたと仮定した帰無仮説のもとに確率を計算し、確率が非常に小さい場合、仮説を否定（棄却）し、何らかの集積、人為的な介入があったと判断する。

計算法

個々の確率の計算は簡単であるが、実用的に行うためには、毎日、すべての菌について、すべてのユニット（病棟など）ごとに、さらに、異なった観察幅（たとえば1日、7日、14日、30日）で集計を行うことが必要で、これを実現するためには、①自動的に細菌検査結果を収集できること、②収集したデータを自動的に集計する仕組みがあることが必要である。

$$P_{(n,m)} = nC_m p^m (1-p)^{n-m} \dots\dots\dots ①$$

$$P_{(n,m \geq k)} = \sum_{m=k}^n nC_m p^m (1-p)^{n-m} \dots\dots\dots ②$$

図1 二項分布による確率の計算

菌の分離が偶然のみに支配されている場合、ある菌の分離率（ベースラインレート）が患者一人当り p であるならば、細菌検査を行った n 人のうち、ちょうど m 人からその菌が分離される確率 $P(n, m)$ 、 k 人以上から分離される確率 $P(n, m \geq k)$ は、二項分布によってそれぞれ式①、②で与えられる。たとえば、8人を検査して3人が陽性であった場合、偶然のみに支配されて3人以上が陽性になる確率を式②で計算し、確率が小さければ、偶然だけに支配されている可能性は低いと結論できる。

警告と対応

本技術は、細菌の院内拡散を感度、特異性よく検出する。システムは、統計的に菌の分離に偏りがあつたと判断できる分離に対して警告を出す。現在稼働しているシステムでは、確率の値によりレベル1（軽微）、2（中程度）、3（重大）の警告を出す^{2,3)}。警告が出た場合、利用者は、たまたま持ち込みが重なっただけなのか、院内で拡散があつたのかをアンチバイオグラムや患者の動線を参考に調査する。菌の異常集積の自動検出を実装するシステムは、アンチバイオグラム作成やベッドマップ表示など、疫学解析のためのツールを提供している³⁾。

警告スコア累積と対策

警告レベルを1カ月ごとに合計して指標とした。個々の警告には、たまたま起きたまれな現象も含まれるが、そのような現象が繰り返し起こる確率はきわめて低い。したがって、警告の合計（警告スコア累積）は、菌の院内拡散の指標として信頼性が高い（図2）。

警告スコア累積を用いてアウトブレイク事例の解析を行った。アウトブレイクの数年前から、アウトブレイクを起こした菌が潜在的な院内拡散を繰り返していたことが明らかになり、本技術に

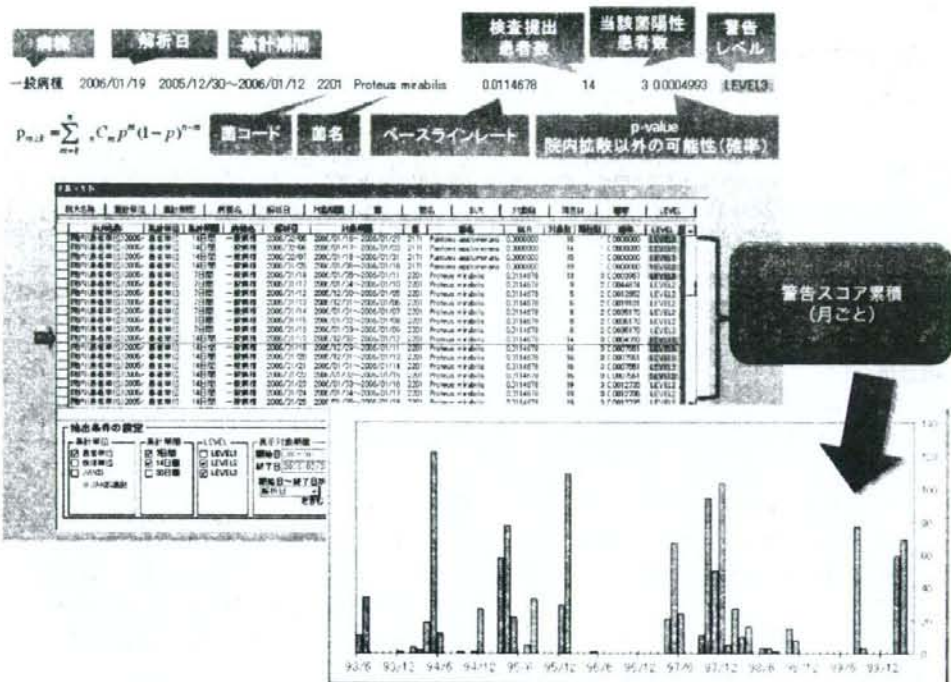


図 2 菌の異常集積の自動検出警告画面と警告スコア累積

左上：菌の異常集積自動検出の警告画面の例 (SHIPL: small and medium-size hospital infection primary lookout の画面)。矢印の行を上部に拡大してある。*Proteus mirabilis* の分離率 (ベースラインレート) が患者一人当たり約 0.01 の施設で、12 月 30 日から翌年の 1 月 12 日までの 14 日間に、一般病棟で 14 名の患者から検体が提出され、そのうち 3 名が *P. mirabilis* 陽性であった。このような菌の分離が偶然だけに支配されたと仮定して確率を計算すると、5/10,000 程度で偶然である可能性は非常に低い。院内拡散の可能性があるととしてレベル 3 の警告が出ている。警告スコア累積は、菌の異常集積自動検出の警告のレベル値 (例 1~3) を加算したもので、長期間の菌の院内拡散を評価する指標となる。

右下：グラフは 6 年間の警告スコア累積を月ごとに集計したもので、長期間の状態を俯瞰することができる。棒グラフの高さが高い期間は、対象となっている菌が異常集積を繰り返した時期に相当する。

よってこのような事故を防止できることが証明された⁴⁾。さらに、警告累積スコアが高値を示す菌種の解析で、細菌感染対策の問題点を把握できることが明らかになっている。

参考文献

- 1) 薩摩順吉: 確率・統計 (理工系の数学入門コース), 岩波書店, 1989.
* 確率, 統計の本は多数出版されている (上記は一例)。なかなかこれという一冊に巡り会えない。基礎から述べてあって、各自が読みやすいと感じる一冊を買ってほしい。
- 2) 藤本修平, 富田治芳, 池 康嘉: サーベイランス

の電子化. *Medical Technology*, 35 (5): 449-455, 2007.

3) 八東真一: 中小規模病院で実施可能なサーベイランス. *Medical Technology*, 35 (5): 456-462, 2007.

4) Fujimoto, S., Ike, Y., Yamaguchi, K., et al.: A novel computerized algorithm for real-time detection of intra-hospital bacterial dissemination for the prevention of nosocomial outbreaks in Japanese hospitals. 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007.

(群馬大学大学院 医学系研究科 細菌学講師 藤本修平)

生命科学の未来を考える

Biophilia

季刊 ビオフィリア

16

Vol.4 No.4 2008

別刷

株式会社アドスリー

〒164-0003 東京都中野区東中野 4-27-37 TEL: 03-5925-2840 FAX: 03-5925-2913

E-Mail: info@adthree.com URL: <http://www.adthree.com>

再興した感染症「結核」の 診断・治療・予防法

国立感染症研究所 免疫部

小林 和夫



小林 和夫

国立感染症研究所 免疫部長
(厚生労働技官)

昭和大学医学部第一内科学講師、大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学分野教授を経て、2006年より現職。専門は、感染症学、臨床免疫学、結核病学。結核など抗酸菌感染症の分子医学、基礎-臨床医学の橋渡し研究に従事。サイトカインの病因的役割、抗酸菌病原因子の解明、抗酸菌感染症の血清診断の開発などで成果を挙げている。持田記念医学薬学振興財団研究奨励賞受賞。著書に、「標準微生物学 第9版」(分担、医学書院、2005年)など。

はじめに—結核とは—

結核とは、結核菌感染によっておもに肺に炎症を起こす疾患である。結核患者が咳やくしゃみをした時に飛散する「しぶき(飛沫核)」に存在する結核菌を吸入することにより感染・発病する(図1)。結核は人類に甚大な健康被害を及ぼしている。世界の感染症による年間死者数(2005年)は1,400万人(総死者数:5,800万人の4分の1弱)を占める(表1)。

痰に結核菌を排出していない結核の場合、他人に伝播することはほとんどない。結核菌を吸い込んでも、免疫防御機能により、結核菌の活動が抑制され、発病は感染者の約10%である。結核は、6か月間毎日確実に薬を服用すれば、ほとんど治癒する。

世界保健機関(WHO)やG8頂上会議は、1)ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染/後天性免疫不全症候群(エイズ)、2)

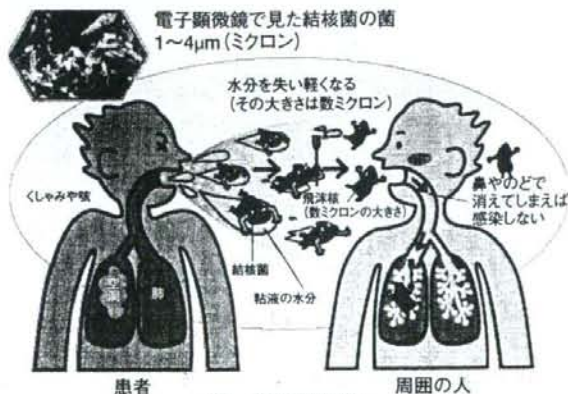


図1 結核菌の感染

財団法人結核予防会: 結核の常識 2006 (<http://www.jatahq.org/aboutTB/2006/joshiki2006-2.html>)

表1 世界における感染症による死者数 (2006)

感染症	死者数(万人)
全感染症	1,400
肺炎など急性呼吸器感染症	376
後天性免疫不全症候群(結核合併を含む)	210
結核	170
下痢性疾患	168
マラリア	89

結核、および3)マラリアによる死亡が年間約500万人、患者発生が3億人であることから、これら3大疾患を最重要感染症に認定し、世界が協調して対策を構築することを宣言している。

結核の発生動向

世界では約20億人(全人口の3分の1)が結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)に既感染(ほとんどは潜在性)、毎年920万人(ヒト免疫不全ウイルス感染合併:71万人を含む)が結核を発病、170万人(後天性免疫不全症候群合併:20万人を含む)が死亡している。1人の無治療結核患者が年間10~15名の感染者を生じさせている。なお、結核菌感染後の発病率は10%である。世界保健機関は、今後20年間に10億人の新規感染者が発生、1億5,000万人が結核を発病、そして、3,600万人の結核死亡を予測している。

1951(昭和26)年、結核予防法(2007年「感染症の予防及び感染症患者に対する医療に関する法律」に統廃合)は施行されたが、当時の日本における結核罹患率は人口10万人対698.4、死亡率は111.1であり、結核は甚大な健康被害であった。その後、抗結核化学療法や検診の発達・普及、また、衛生行政の整備により、結核は減少した。しかし、1997年、罹患率や発生患者数ともに38年ぶりに増

表2 世界および日本の結核発生動向

	結核菌既感染者数	年間死亡数(死亡率)	新規登録患者数(罹患率)
世界	20億人	170万人(2.5)	920万人(139)
日本	0.25億人	0.22万人(1.7)	2.5万人(19.8)

表3 結核の増加要因

社会的	人口の集中/都市化、国際化/移動・移民、貧困、感染症対策の行政的不備
宿主的	易感染性宿主の増加(高齢者、糖尿病、慢性腎不全、ヒト免疫不全ウイルス感染、免疫抑制薬/臓器移植、免疫疾患、抗サイトカイン療法:関節リウマチやクローン病治療薬)
微生物学的	薬剤耐性抗酸菌の出現、病原性の変化

加し、結核は「再興感染症」として注目されている。日本における増加要因は、1)70歳以上の高齢患者の増加、2)集団感染、さらに、3)貧困など経済的弱者の結核の増加が挙げられる。加えて、国際的には、4)薬剤耐性結核や5)ヒト免疫不全ウイルス感染症/後天性免疫不全症候群の合併も増加要因である。

日本では、2007年に年間2万5,000人(罹患率人口10万対:19.8)が結核を発病、2,200人(死亡率:1.7)が死亡している(平成19年結核登録者情報調査年報集計結果—概況、厚生労働省健康局結核感染症課【<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou03/07.html>】)(表2)。

日本における結核対策の課題として、1)急速な人口の高齢化に伴う高齢者結核の増加(70歳以上の占める割合:48%)、2)国内地域格差の拡大(最高罹患率は大阪市:52.9、最低は長野県:10.3)、3)薬剤(とくに、多剤や超多剤)耐性結核菌の出現、4)特異的、迅速かつ簡便な結核菌感染の検査法の開発や5)潜在性結核菌感染対策などがある。

結核の増加要因は、社会要因、宿主要因および病原体要因に大別される。社会的要因として、都市化による過密、貧困、交通機関の発達による高速移動、国際化や感染症対策の軽視などが寄与している。宿主要因として、感染抵抗力の減弱(高齢化、糖尿病、慢性腎不全、ヒト免疫不全ウイルス感染症/後天性免疫不全症候群、免疫抑制薬/臓器移植や免疫疾患など)が易感染性を招来している。また、病原体要因として、薬剤耐性結核菌の出現および病原性の変化などが結核の増加に関与している(表3)。

とくに、世界と共通した重要な要因や課題は、1)多剤耐性(MDR)結核菌(抗結核薬であるイソニアジドおよびリファンピシンに同時耐性)の出現、2)ヒト免疫不全ウイルス感染/後天性免疫不全症候群、および3)潜在性結核菌感染対策である。最近、超多剤耐性(XDR)結核菌(多剤耐性に加え、フルオロキノロン耐性+カナマイシン、カプレオマイシン、アミカシンの1剤以上に耐性)も出現している。薬剤耐性結核の出現を防止する効果的な戦略は、薬剤感受性結核を確実に治療、そして、治癒させることであり、世界保健機関は直接監視下短期抗結核化学療法(directly observed treatment, short course: DOTS)を推奨している。

世界のヒト免疫不全ウイルス感染者(後天性免疫不全症候群を含む)は3,320万人、結核菌とヒト免疫不全ウイルスの重複感染は約71万人、結核を発症した患者(920万

人)でヒト免疫不全ウイルス陽性は約8%を占めている。結核菌感染に対する防御は細胞性免疫に依存しているが、ヒト免疫不全ウイルス感染症/後天性免疫不全症候群は細胞性免疫を破壊するため、結核菌感染や発病を惹起しやすくする。実際、ヒト免疫不全ウイルス感染陽性者における発病の相対危険度はヒト免疫不全ウイルス感染陰性者の約10倍である。また後天性免疫不全症候群死亡の約10%が結核を直接原因としている。世界の人口の3分の1が結核菌に既感染、ほとんどは無症候性潜在性感染であり、大部分の結核は潜在性結核菌感染から発病に至る。したがって潜在性結核菌感染対策は結核の制圧に重要である。

結核菌の生物学的特徴や病原性

結核菌の生物学的特徴として、1)細胞内寄生性、2)脂質成分に富む細胞壁、3)好気(酸素)性、4)遅発育性、5)飛沫核(空気)感染、6)慢性炎症、および7)遺伝子の解読などがある。分裂倍加時間は約12~15時間(参考:大腸菌は約20分間)の遅発育菌であり、感染伝播は、飛沫核(空気)感染による。結核菌感染により、菌は消失することなく、一生を、体内に残存する。一般的に、活動性結核患者と接触した者の約30%が感染する。宿主防御機構では細胞性免疫が役割を演じ、その結果、結核菌初感染者の10%が結核を発病、潜在性結核菌感染者の20%が免疫力の低下に伴い発病する(図2)。

病変は、慢性炎症、肉芽腫、乾酪壊死(結核病変の中

心部が壊死し、黄色乳成分凝固物[チーズ状塊]を形成すること。乾酪壊死巣内の結核菌は減少し、生菌として残存する)、空洞形成や線維化などが特徴的である。結核菌の遺伝子、全遺伝子塩基配列が解明された。今後、遺伝子解析を基盤とした科学的戦略が推進され、分子/遺伝子標的を視点とした新規診断法、抗結核薬の開発、薬剤耐性獲得機構の解明や新規ワクチン開発が展開されるであろう。

結核の診断

結核は、肺結核と肺外結核(肺あるいは気管支以外の臓器を主要罹患臓器とする結核および播種性結核)に分類されるが、85%以上は肺結核である。肺結核の症状として、咳(咳嗽)や痰(喀痰)(持続性、2週間以上)、血痰、胸痛、軽度発熱、体重減少、とくに、持続性咳嗽と喀痰は重要である(表4)。

肺外結核部位として、喉頭、リンパ節、胸膜、泌尿生殖器、骨・関節、髄膜・中枢神経系、腹膜・消化管や心外膜などがある。喉頭結核は、肺結核に続発することが多く、症状として、嚥下痛、しわがれ声(嗄声)や呼吸困難が見られる。全身播種性(粟粒性)結核は少なくとも2臓器以上に活動性病変があり、全身散在性病変が形成されるものをいう。乳幼児や免疫不全者(副腎皮質ステロイド薬や免疫抑制薬の投与、慢性腎不全:血液・腹膜透析、ヒト免疫不全ウイルス感染症/後天性免疫不全症候群)などに起こりやすい。発熱、全身倦怠、衰弱、咳、胸痛、息切れ、頭痛などの症状があり、全身性に小結節病変が出現する。腸結核は結核菌を含んだ痰を嚥下することにより発症し、症状として下痢、腹痛、腹部膨満、悪心や嘔吐がある。

診断には、病原体および補助診断がある(表4)。病原体の検出は診断に確定的であるが、痰塗抹検査陽性(図3a)の場合、結核菌のみならず、類縁の非結核性抗酸菌(非結核性抗酸菌感染症は結核を含む抗酸菌感染症の約20%を占める)を考慮する必要がある。現在、最も信頼性の高い検査は培養法(図3b)であるが、欠点として、長期間を要することである(10~14日間以上)。核酸増幅による遺伝子診断は迅速性、感度や特異性に優れるが、生死菌の識別や技術的問題(熟練、偽陽性/偽陰性)がある(図3c)。

胸部X線所見では、浸潤影(水様物質が肺胞腔に蓄積することで呈する境界不鮮明な陰影)、結節(境界明瞭な円形状陰影)、空洞(病変部に穴がある陰影)、線維化、肺



図2 結核の発病

財団法人結核予防会:結核の常識 2006

(<http://www.jatahq.org/about/TB/2006/joshiki2006-2.html>)

表4 結核の症状や診断

症状	持続性咳嗽や喀痰(2週間以上) その他:発熱、血痰、胸痛、体重減少など	
病原体診断	塗抹検査	抗酸菌染色、蛍光染色
	培養検査	10~14日以上、薬剤感受性試験
	遺伝子検出	核酸増幅法:ポリメラーゼ連鎖反応(PCR) デオキシリボ核酸(DNA)-デオキシリボ核酸交差形成
補助診断	胸部X線	中および上肺野病変(浸潤、結節や空洞) リンパ節腫大や石灰化 胸膜炎/胸水貯留
	病理学的検査	乾酪壊死を伴う肉芽腫
	ツベルクリン皮内反応	48時間後判定 陽性:結核菌感染、BCG陽転、非結核性抗酸菌感染 陰性:未感染、BCG未接種、免疫不全 (ヒト免疫不全ウイルス感染症/後天性免疫不全症候群、重症結核、薬物性)
	クオンティフェロン:QFT	末梢血細胞インターフェロンガンマ産生・遊離試験(クオンティフェロン [®])

門リンパ節腫大や石灰化、無気肺(気管支などが閉塞され、一部の肺の空気が消失している状態)、胸膜肥厚・癒着(胸膜炎が治癒し、胸膜が肥厚・癒着した状態)、胸水貯留など、多彩である(図3d)。好発部位は、酸素濃度の高い上肺や中肺野である。多発性びまん性結節陰影は播種(粟粒)性結核で見られる。これらの所見は他の炎症性や腫瘍性肺疾患(肺がんなど)にも認められる所見であり、結核特異的でなく、注意を要し、胸部X線所見は結核の補助的診断法である。

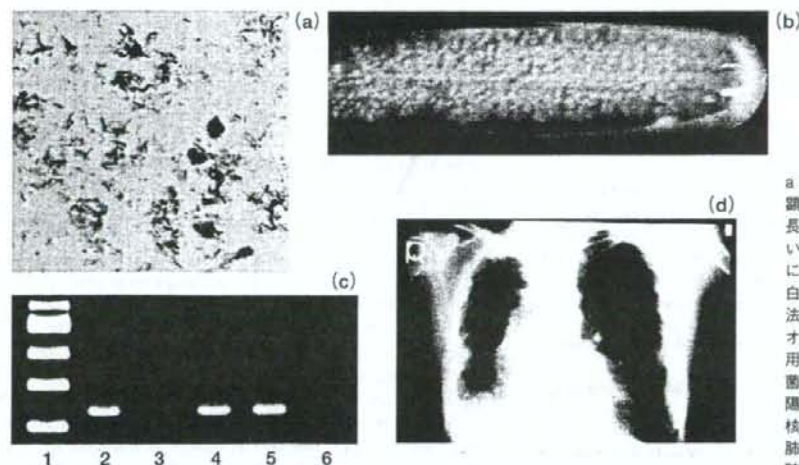
ツベルクリン皮内反応の陽性(日本:紅斑 \geq 直径10mm以上、欧米:硬結 \geq 直径5mm以上)は結核菌感染のみならず、弱毒ウシ型結核菌ワクチン(bacillus Calmette-Guérin:BCG)接種や非結核性抗酸菌感染でも見られ、逆に、活動性結核の約25%は陰性である。陰性は真の陰性(結核菌未感染)や偽陰性(結核菌既感染にもかかわらず、陰性)を包含する。偽陰性として、栄養障害、高齢者、免疫疾患、リンパ系悪性腫瘍、副腎皮質ステロイド薬療法、慢性腎不全、サルコイドーシス、ヒト免疫不全

ウイルス感染者(後天性免疫不全症候群を含む)や重症結核(播種性)などがある。したがって、ツベルクリン皮内反応も結核の補助診断である。ツベルクリン皮内反応陽性は感染防御の指標とならないことも留意する。

近年、結核菌特異的タンパク質抗原を用いた免疫学的診断法が開発され、臨床応用されている(インターフェロンガンマ遊離試験:クオンティフェロン[®]:QFT)。これらの抗原は、結核ワクチンであるBCGや多くの非結核性抗酸菌に存在しないため、結核菌感染を特異的に検出できる。原理は、末梢血に特異的タンパク質抗原を加え、培養後、産生・遊離されるインターフェロンガンマを定量する(陽性:0.35 IU/mL以上)。検査対象として、1)潜在性結核菌感染や、2)活動性結核の補助診断に応用されている。

治療法

結核は、薬をきちんと服用すれば治る。痰の中に結核菌が出なくなれば外来通院治療も可能である。

図3 結核の診断¹⁾

a:痰の結核菌塗抹検査(特殊な染色をし、顕微鏡で観察)。結核菌は赤染されている細長い(桿)菌であり、ヒト組織は青染されている。b:結核菌の培養所見。喀痰を卵培地に接種し、6週間後に多数の結核菌集落(乳白色一薄黄色)形成を認めた。c:核酸増幅法による結核菌遺伝子の検出。結核菌のデオキシリボ核酸(DNA)に特異的DNA断片を用い、核酸重合酵素連鎖反応で喀痰の結核菌遺伝子を検出した。分子基準標識:列1、陽性:列2、4、5、陰性:列3、6。d:肺結核の胸部X線所見。浸潤影、結節、線維化、肺門リンパ節腫大、胸膜肥厚・癒着や胸水貯留など、多彩な所見を認めた。

Serodiagnosis of *Mycobacterium avium*-Complex Pulmonary Disease Using an Enzyme Immunoassay Kit

Seigo Kitada¹, Kazuo Kobayashi², Satoshi Ichiyama³, Shunji Takakura³, Mitsunori Sakatani⁴, Katsuhiro Suzuki⁴, Tetsuya Takashima⁵, Takayuki Nagai⁵, Ikonosuke Sakurabayashi⁶, Masami Ito⁷, Ryoji Maekura¹, for the MAC Serodiagnosis Study Group

¹Department of Internal Medicine, National Hospital Organization (NHO) National Toneyama Hospital, Toyonaka-shi, Osaka, Japan; ²Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan; ³Department of Clinical Laboratory Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto-shi, Kyoto, Japan; ⁴Department of Internal Medicine, NHO Kinki-chuo Chest Medical Center, Sakai-shi, Osaka, Japan; ⁵Department of Medicine, Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases, Habikino-shi, Osaka, Japan; ⁶Department of Laboratory Medicine, Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama-shi, Saitama, Japan; and ⁷Department of Internal Medicine, Sakamoto Hospital, Toyonaka-shi, Osaka, Japan

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

Objectives: We investigated in a six-institution multicenter study whether a serologic test based on an enzyme immunoassay (EIA) kit was useful for diagnosing MAC-PD and for distinguishing it from other lung diseases.

Methods: An EIA kit detecting serum IgA antibody to glycopeptidolipid core antigen specific for MAC was developed. Antibody levels were measured in sera from 70 patients with MAC-PD, 18 with MAC contamination, 37 with pulmonary TB, 45 with other lung diseases, and 76 healthy subjects.

Measurements and Main Results: Significantly higher serum IgA antibody levels were detected in patients with MAC-PD than in the other groups ($P < 0.0001$). Setting the cutoff point at 0.7 U/ml resulted in a sensitivity and specificity of the kit for diagnosing MAC-PD of 84.3 and 100%, respectively. Significantly higher antibody levels were also found in patients with nodular-bronchiectatic disease compared with fibrocavitary disease in MAC-PD ($P < 0.05$). There was a positive correlation between the extent of disease on chest computed tomography scans and the levels of antibody ($r = 0.43$, $P < 0.05$) in patients with MAC-PD.

Conclusions: The EIA kit is useful for the rapid diagnosis of MAC-PD and for differentiating MAC-PD from pulmonary TB and, if validated by studies in other populations, could find wide application in clinical practice.

Keywords: nontuberculous mycobacteria; immunocompetence; sensitivity and specificity

The prevalence of disease due to nontuberculous mycobacteria has been increasing recently (1–5). In Japan, *Mycobacterium avium* complex (MAC) accounts for approximately 70% of nontuberculous mycobacterial disease (6). MAC is now widely recognized as an important pathogen that causes chronic and progressive pulmonary disease even in immunocompetent

AT A GLANCE COMMENTARY

Scientific Knowledge on the Subject

The diagnosis of pulmonary disease due to ubiquitous *Mycobacterium avium* complex (MAC) is complicated, and requires clinical findings together with repeatedly positive sputum culture.

What This Study Adds to the Field

An enzyme immunoassay kit for measuring human serum antibody to glycopeptidolipid core antigen specific for MAC was developed. The kit is useful for the serodiagnosis of MAC pulmonary disease and could find wide application in clinical practice.

patients and not only in those who are immunosuppressed. The diagnosis of MAC-PD is complicated because, in contrast to *Mycobacterium tuberculosis*, MAC contamination of clinical specimens can come from environmental sources such as water, dust, and soil, and because this organism may colonize the respiratory tract without any accompanying invasive disease (4). Thus, isolation of MAC from sputa is often of no clinical significance. Diagnosis of pulmonary disease due to MAC is complicated and time consuming when made according to the guidelines of the American Thoracic Society (ATS) (1), because MAC is ubiquitous in nature and the diagnosis requires clinical findings and its repeated isolation from sputum. In addition, it is also difficult to discriminate MAC-PD from infection due to other mycobacteria in the absence of culture results, because clinical features, such as symptomatic or radiographic findings, are very similar in mycobacterial diseases. In the context of infection control, it is particularly important to distinguish between MAC-PD and pulmonary tuberculosis (TB).

To overcome these difficulties, we have developed a serologic test for the glycopeptidolipid (GPL) antigen specific for MAC, and have reported its clinical usefulness (7–9). The levels of antibody to GPL core were measured by an enzyme immunoassay (EIA) using sera of immunocompetent patients with MAC-PD. MAC-PD could be discriminated from pulmonary TB, *Mycobacterium kansasii* pulmonary disease and MAC colonization/contamination using this serologic test. Healthy subjects were seronegative. Of the different immunoglobulin (Ig) subclasses, best results were obtained by the measurement of IgA, with a sensitivity of 92.5% and specificity of 95.1%. These results suggest that the test is useful as a diagnostic aid. In the present study, to apply this test widely in clinical practice, we

(Received in original form May 25, 2007; accepted in final form December 13, 2007)

Supported by grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare (Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, Health Sciences research grants); the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology; Taun's Laboratory, Inc.; and the Osaka Tuberculosis Research Foundation.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Seigo Kitada, M.D., Department of Internal Medicine, National Hospital Organization Toneyama Hospital, 5-1-1 Toneyama, Toyonaka-shi, Osaka 560-8552, Japan. E-mail: kitadas@toneyama.hosp.go.jp

This article contains an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org

Am J Respir Crit Care Med Vol 177, pp 793–797, 2008

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.200705-7710C on December 13, 2007
Internet address: www.atsjournals.org