

4.5. Animal studies

Female C57BL/6 mice aged at 6 weeks were purchased from CLEA Japan (Tokyo, Japan). All mice were kept under specific pathogen free conditions in animal facility of Osaka City University Graduate School of Medicine according to the institutional guidelines for the animal experiments. Twenty mice were used per group for infecting with each strain. One hundred microlitre of bacterial suspension containing 1×10^5 CFUs of MAC was inoculated into the trachea of the 7 weeks-aged mice anesthetized with pentobarbital sodium. Lungs, spleens and livers were removed on day 1 (only lungs) and 4, 8, 16 weeks after inoculation from 5-mice per strain. The organs were homogenized in 1 ml saline, and 0.1 ml of 10-fold dilutions of the homogenates was plated on 7H11-OADC agar followed by cultivating for 3 weeks. Bacterial burden was evaluated by CFUs per organ. Histological sections were made by standard methods including formalin fixation, dehydration, embedding in paraffin, and staining with hematoxylin and eosin.

4.6. Statistical analysis

Data were analyzed using the statistical analysis software package StatView 5.0 (SAS Institute, Cary, NC). The difference of mycobacterial growth in 7H9 broth, THP-1 cells, and mice was compared by a post hoc test of Scheffé among the strains tested. The difference of mycobacterial growth at defined time points during infection in THP-1 cells as well as in mice was compared by repeated measurement ANOVA with a post hoc test of Scheffé in the individual strains. Difference was considered statistically significant at $P < 0.05$.

Acknowledgement

We thank Todd P. Primm for the critical comments on the manuscript. We also thank Chihiro Inoue and Sara Matsumoto for the assistance of the experiments and for the heartfelt encouragement. This work was supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, the Ministry of Health, Labour and Welfare (Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, Health Sciences Research Grants), The Japan Health Sciences Foundation, and The United States-Japan Cooperative Medical Science Program against Tuberculosis and Leprosy.

References

- [1] Horsburgh Jr CR, Gettings J, Alexander LN, Lennox JL. Disseminated *Mycobacterium avium* complex disease among patients infected with human immunodeficiency virus, 1985–2000. *Clin Infect Dis* 2001;33:1938–43.
- [2] Field SK, Fisher D, Cowie RL. *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patients without HIV infection. *Chest* 2004;126:566–81.
- [3] Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, 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.
- [4] Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 1995;2:561–72.
- [5] Dorman SE, Picard C, Lammas D, Heyne K, van Dissel JT, Baretto R, et al. Clinical features of dominant and recessive interferon γ receptor 1 deficiencies. *Lancet* 2004;364:2113–21.
- [6] Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, et al. A mutation in the interferon- γ receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* 1996;335:1941–9.
- [7] Kampmann B, Hemingway C, Stephens A, Davidson R, Goodall A, Anderson S, et al. Acquired predisposition to mycobacterial disease due to autoantibodies to IFN- γ . *J Clin Invest* 2005;115:2480–8.
- [8] Patel SY, Ding L, Brown MR, Lantz L, Gay T, Cohen S, et al. Anti-IFN- γ autoantibodies in disseminated nontuberculous mycobacterial infections. *J Immunol* 2005;175:4769–76.
- [9] Roque S, Nobrega C, Appelberg R, Correia-Neves M. IL-10 underlies distinct susceptibility of BALB/c and C57BL/6 mice to *Mycobacterium avium* infection and influences efficacy of antibiotic therapy. *J Immunol* 2007;178:8028–35.
- [10] Ernst JD, Trevejo-Nunez G, Banaiee N. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. *J Clin Invest* 2007;117:1738–45.
- [11] Primm TP, Lucero M, Falkingham 3rd JO. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:98–106.
- [12] Pedrosa J, Florido M, Kunze ZM, Castro AG, Portales F, McFadden J, et al. Characterization of the virulence of *Mycobacterium avium* complex (MAC) isolates in mice. *Clin Exp Immunol* 1994;98:210–6.
- [13] Hoffner SE, Kallenius G, Petrini B, Brennan PJ, Tsang AY. Serovars of *Mycobacterium avium* complex isolated from patients in Sweden. *J Clin Microbiol* 1990;28:1105–7.
- [14] Birkness KA, Swords WE, Huang PH, White EH, Dezzutti CS, Lal RB, et al. Observed differences in virulence-associated phenotypes between a human clinical isolate and a veterinary isolate of *Mycobacterium avium*. *Infect Immun* 1999;67:4895–901.
- [15] Han XY, Tarrand JJ, Infante R, Jacobson KL, Truong M. Clinical significance and epidemiologic analyses of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* among patients without AIDS. *J Clin Microbiol* 2005;43:4407–12.
- [16] Maekura R, Okuda Y, Hirota A, Kitada S, Hiraga T, Yoshimura K, et al. Clinical and prognostic importance of serotyping *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients. *J Clin Microbiol* 2005;43:3150–8.
- [17] Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:463–96.
- [18] Danellshvili L, McGarvey J, Li YJ, Bermudez LE. *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. *Cell Microbiol* 2003;5:649–60.
- [19] Huttunen K, Jussila J, Hirvonen MR, Iivanainen E, Katila ML. Comparison of mycobacteria-induced cytotoxicity and inflammatory responses in human and mouse cell lines. *Inhal Toxicol* 2001;13:977–91.
- [20] Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* 1992;175:1111–22.
- [21] Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;311:1770–3.
- [22] Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engle M, Sieling PA, et al. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 2001;291:1544–7.
- [23] Abebe F, Mustafa T, Nerland AH, Bjune GA. Cytokine profile during latent and slowly progressive primary tuberculosis: a possible role for interleukin-15 in mediating clinical disease. *Clin Exp Immunol* 2006;143:180–92.
- [24] Turenne CY, Wallace Jr R, Behr MA. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:205–29.
- [25] Sarmiento AM, Appelberg R. Relationship between virulence of *Mycobacterium avium* strains and induction of tumor necrosis factor α production in infected mice and in *in vitro*-cultured mouse macrophages. *Infect Immun* 1995;63:3759–64.
- [26] Nishiuchi Y, Kitada S, Maekura R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of small-scale glycopeptidolipid preparations to identify serovars of *Mycobacterium avium*-*intracellulare* complex. *J Appl Microbiol* 2004;97:738–48.

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

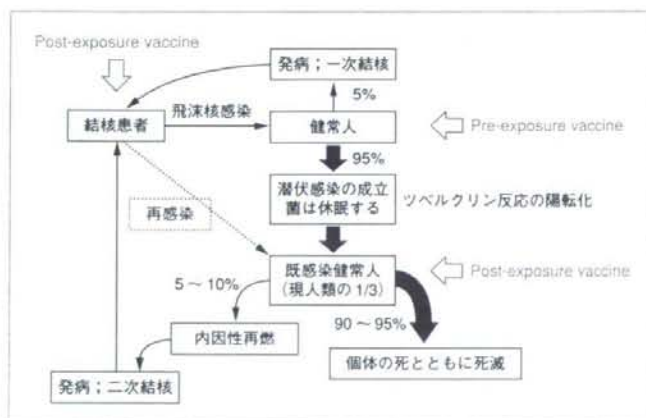


図1 結核菌の伝播と結核の発症

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症する(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

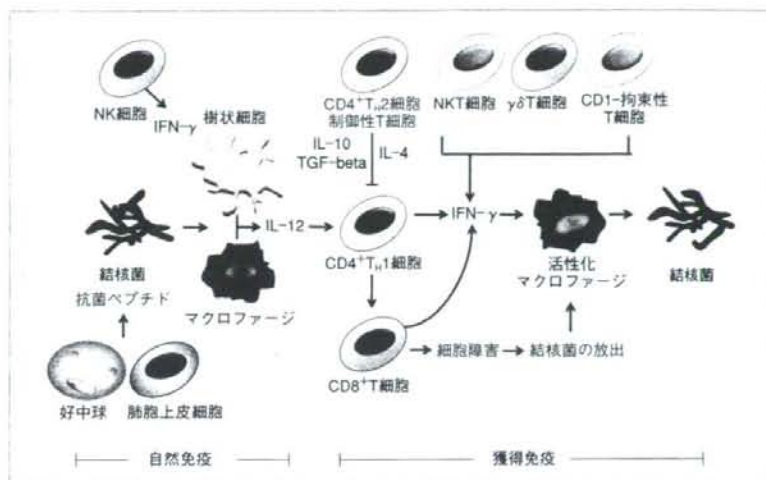


図2 結核菌感染と宿主応答

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 (Th1) 細胞である(図 2)。活性化された Th1 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 Th1 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。

Th1 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 Th2 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、抗原提示細胞内では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との考えがある。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との考えによる。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 遺伝子をリボソームに封入した 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、内在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 ワクチンをリボ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 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* 175: 441-449, 2005
- 10) Skeiky YA, Alderson MR, Ovendale 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

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」(分冊、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亡者数(2005年)は1,400万人(総死亡者数: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)

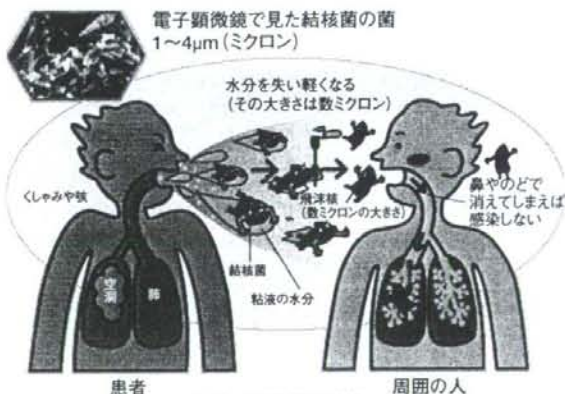


図1 結核菌の感染

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亡者数 (2006)

感染症	死亡者数(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/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/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、治療させることであり、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)遺伝子の解説などがある。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、一生涯、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/aboutTB/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)ー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。

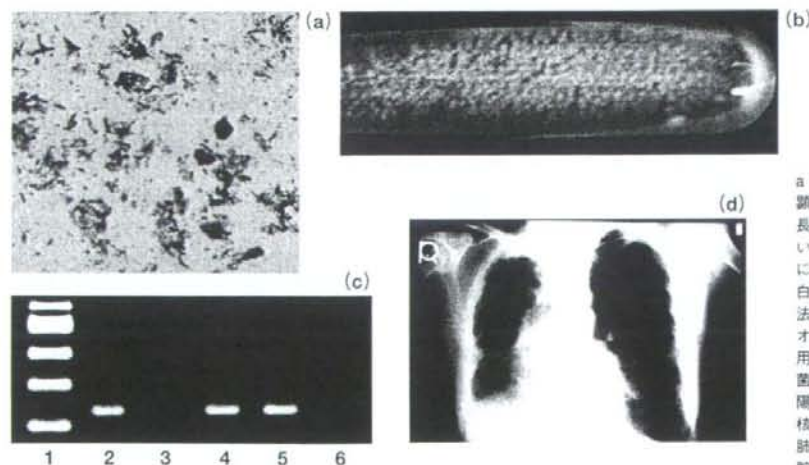
ツベルクリン皮内反応の陽性(日本:紅斑 \geq 直径10mm以上、欧米:硬結 \geq 直径5mm以上)は結核菌感染のみならず、弱毒ウシ型結核菌ワクチン(bacillus Calmette-Guérin:BCG)接種や非結核性抗酸菌感染でも見られ、逆に、活動性結核の約25%は陰性である。陰性は真の陰性(結核菌未感染)や偽陰性(結核菌既感染にもかかわらず、陰性)を包含する。偽陰性として、栄養障害、高齢者、免疫疾患、リンパ系悪性腫瘍、副腎皮質ステロイド薬療法、慢性腎不全、サルコイドーシス、ヒト免疫不全

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。培養を卵培地に接種し、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結核菌遺伝子を検出した。分子基準標準: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。

治療の原則は、確実な多剤併用抗結核化学療法(服薬期間は約6か月[毎日]、最初の2か月が4剤：イソニアジド、リファンピシン、エタンブトール、ピラジナミド、その後4か月が2剤：イソニアジドおよびリファンピシン)である。1薬剤当たりの耐性菌出現頻度は $1/10^6 \sim 10^9$ であるため、薬剤を併用することにより、耐性菌の出現頻度を低下させることが可能となる。ただし、確実な服用は絶対条件であり、世界保健機関は直接監視下短期抗結核化学療法(DOTS)を推進している。直接監視下短期抗結核化学療法とは、結核患者を見つけて治すために利用されている保健福祉の包括的計画の名称で、世界保健機関が提唱した結核対策戦略である。そのおもな5要素は、1) 政府が結核を重要課題と認識し適切な指導性を発揮すること、2) 結核菌検査による診断、病状経過観察の推進、3) 結核患者が薬を飲み忘れないよう医療従事者の前で内服すること、4) 薬の安定供給、5) 菌検査結果の記録監視・調査である。

薬剤耐性結核の原因は、不適切な結核医療、すなわち、抗結核化学療法薬の不適切な選択や使用、治療中断や脱落であり、医療関係者や患者の対応に起因する人原病(man-made disease)である。全世界で5,000万人以上が多剤耐性結核菌(イソニアジドおよびリファンピシンに同時耐性)に既感染し、医療費は薬剤感受性結核に比し、3～100倍を要し、再発率(28%)がきわめて高く、結核制圧対策の大きな課題である。加えて、超多剤耐性結核菌の出現は抗結核化学療法をきわめて困難にしている。

予防

予防は、感染源対策として患者の早期発見・治療、接触者(家族、学校、会社など)の調査、さらに、予防接種や潜在性結核菌感染の治療(化学予防)がある。予防接種はBCGが汎用されている。現行の結核発病予防ワクチンであるBCGは乳幼児結核(結核性髄膜炎など播種性結核)に有効であるが、成人肺結核に対するBCG接種の効果は疑問視されている。BCGは乳幼児期(原則として、生後6か月までにツベルクリン皮内反応を省略したBCGの初回接種)のみに限定している。

潜在性結核菌感染の治療(化学予防)は、抗結核化学療法薬(イソニアジドなど)を服用し、発症を防止する(効果：70～80%)。ただし、感染結核菌が化学療法薬に感受性であることが不可欠である。

結核予防法の統廃合

2007年4月の改正感染症法の施行に伴い、結核予防法は「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」に統廃合された。結核は二類感染症に位置づけられ、結核を診断した場合、医師は直ちに最寄りの保健所長を経由し都道府県知事に届け出なければならない。また、生物テロ対策として、2007年6月から、「特定病原体等(一～四種)の管理規制」が施行されている。結核菌は空気感染病原体、かつ、個体に対する高い危険度を示すため、施設や保管の基準が定められた。多剤耐性結核菌は三種病原体であり、施設や保管の基準に加え、所持に際し、厚生労働大臣へ届出、また、運搬に際し、都道府県公安委員会へ届出が必要である。結核菌(多剤耐性結核菌を除く)は四種病原体であり、施設や保管の基準の遵守が必要である。

おわりに

結核は、代表的な再興感染症であり、現在でも、人類に甚大な健康被害を及ぼしている。結核対策には多くの課題が山積しているが、科学的根拠に基づいた「感染源、感染経路、感受性宿主」対策や「診断、治療、予防」が実施され、結核が制圧されることを期待している。

謝辞

本稿で紹介した研究は、厚生労働省・厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)および文部科学省・科学研究費補助金により支援された。

【参考文献】

- 1) 小林和夫：標準微生物学 第9版 山西弘一監修、平松啓一、中込治編、医学書院、279-292、2005。
- 2) 厚生労働省：結核・感染症に関する情報 (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansen-shou.html>)。
- 3) 厚生労働省：平成19年結核発生動向調査年報集計結果 (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansen-shou03/07.html>)。
- 4) ストップ結核パートナーシップ日本 (<http://www.stoptb.jp/index.html>)。
- 5) 財団法人結核予防会 結核研究所：結核の常識；新結核用語辞典 (<http://www.stoptb.jp/index.html>)。
- 6) 国立感染症研究所感染症情報センター：感染症の話「結核」 (http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/k03/k03-07/k03_07.html)。

第83回総会ミニシンポジウム

I. ワクチン研究の現在と将来

座長¹小林 和夫²菅原 勇

キーワード：改良 BCG, 弱毒結核菌, 成分ワクチン, DNA ワクチン, 感染曝露前 (予防) ワクチン, 感染曝露後 (治療) ワクチン

発表者：

1. 新しい結核 DNA ワクチン
岡田全司 (国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
臨床研究センター)
2. BCG vaccine trials in South Africa
Gregory HUSSEY (South African Tuberculosis Vaccine
Initiative, University of Cape Town, Cape Town, South
Africa)
3. Present and future of TB vaccine development research
Peter ANDERSEN (Statens Serum Institute, Copenha-
gen, Denmark)
4. Comments and directions in research and development of
TB vaccines
Jerald C. SADOFF (Aeras Global TB Vaccine Founda-
tion, Bethesda, Maryland, USA)

全世界で約20億人 (全人口の3分の1) が結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) に既感染, すなわち, 無症候性潜伏感染し, 毎年920万人が結核を発病, 170万人 (後天性免疫不全症候群合併23万人を含む) が死亡している (<http://www.who.int/tb/en/>)。今後10年間に, 少なくとも8000万人が結核を発病, 2000万人が死亡することが推定されている。

日本 (2006年) では年間2.6万人 (罹患率人口10万対: 20.6) が結核を発病し, 2.3千人 (死亡率: 1.8) が死亡し, 日本においても結核対策は重要な課題である。Robert Kochが1882年に「結核菌」を発見, 爾来, 120年余が経過した現在でも, 国内外を問わず, 結核は人類に甚大な

健康被害を提供し続けている。

結核対策における世界的課題として, ①薬剤耐性結核菌の出現や蔓延および②HIV-結核菌の重複感染がきわめて重要である。これらの課題を克服する科学的戦略は「安全で有効な結核ワクチン」である。現行結核ワクチンである bacillus Calmette-Guérin (BCG) は乳幼児結核に有効であるが, 潜在性結核菌感染を基盤とした多くの成人肺結核や内因性再燃結核に対する BCG 接種の有効性は疑問視されている。

世界保健機関 (WHO) は2015年までに現行 BCG を凌駕する新規結核ワクチンの開発を目指している。新規結核ワクチンの開発戦略は「予防・治療: 感染曝露前 (予防的) や感染曝露後 (治療的) ワクチン」, 「ワクチン製剤: 改良型 BCG, 弱毒結核菌, 成分ワクチンや DNA など遺伝子ワクチン」, 「接種方法: Prime や Prime-boost ワクチン」などの視点から進捗しており, 前臨床試験, さらに, 第1相など臨床試験で評価され, 有望なワクチン候補が開発されつつある。

第83回日本結核病学会総会 (石川信克会長) において, ミニシンポジウム「ワクチン研究の現在と将来」を企画し, 世界の第一線で活躍されている気鋭の結核ワクチン研究者が結核ワクチン開発の現況や将来展望を発表した。ミニシンポジウム「ワクチン研究の現在と将来」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国立感染症研究所免疫部, ²結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター

連絡先: 小林和夫, 国立感染症研究所免疫部, 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1 (E-mail: kobayak@nih.go.jp)

(Received 16 Jul. 2008)

1. 新しい結核 DNA ワクチン

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

1998年、アメリカ合衆国疾病対策予防センター (Centers for Disease Control and Prevention: CDC) および Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis (ACET) は新世代の結核ワクチン開発の必要性を発表した。しかしながら、BCG ワクチン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。結核ワクチンは、DNA ワクチン、リコンビナント BCG ワクチン、サブユニットワクチンに大別される。DNA ワクチンは予防ワクチン効果の切れ味でははるかに優れていることが多く、安定性・経済的にも優れている。われわれは BCG ワクチンをはるかに凌駕する 1 万倍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-エンベロープ/HSP 65+IL-12 DNA ワクチン) を開発した。

〔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きわめて少ない。われわれはプライム・ブースター法を用い、HSP 65 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。このワクチンは、結核菌由来の HSP 65 蛋白抗原特異的な、CD8 陽性キラー T 細胞および interferon: IFN-gamma 産生 T 細胞の分化も増強した。肺の結核病理像の改善効果も示した。さらに生体内において、CD8 陽性 T 細胞と CD4 陽性 T 細胞の両者がこの結核予防ワクチンに必要であることを明らかにした。

〔治療ワクチン〕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/HSP 65 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。モルモット (結核菌吸入感染系) の系でもこのワクチンは BCG より有効であった。〔新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PBL/hu〕を用いてもワクチン効果を示した。

さらに、〔ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザル〕 (Nature Med. 1996) を用い、HSP 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンの強力な有効性を得た。カニクイザルに 3 回ワクチン接種後 4 週間後にヒト結核菌を経気道投与し、1 年以上経過観察した。リンパ球増殖反応・サイトカイン (IFN-gamma, IL-2 等) 産生の増強および胸部 X

線所見・血沈、体重の改善効果が認められた。さらに、生存率改善・延命効果も認められた。DNA ワクチン投与群は 50% の生存率であり、コントロール群は生存率 0% であった。さらに、サル系の系でプライム-ブースター法を用いて、より強力なワクチン開発を行った。その結果、BCG ワクチン・プライム-DNA ワクチン・ブースター法を用いた群は 100% の生存率を示した。一方、BCG ワクチン単独群は 33% の生存率であった。成人に対して切れ味の鋭い強力な新しい結核ワクチンが切望されていることより HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンが強力な成人ワクチンとなることが示唆された。WHO STOP TB VACCINE Meeting でこのワクチンはきわめて高い評価を受けた。さらに、このワクチンを鼻粘膜または気道内ワクチンとして投与を試みつつある。さらに、カニクイザルの系で治療ワクチン効果およびプライムとブースターの期間を長期間とって、プライム-ブースター法を研究中である。(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, 栖原, 岸上 各研究員, R.Gelber 博士, B.Tan 博士, 中島俊洋博士, 長澤鉄二博士, 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補助金の支援による)

We have developed a novel tuberculosis (TB) vaccine; a combination of the DNA vaccines expressing mycobacterial heat shock protein 65 (HSP 65) and interleukin 12 (IL-12) delivered by the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-envelope and -liposome (HSP 65+IL-12/HVJ). This vaccine provided remarkable protective efficacy in mouse and guinea pig models compared to the BCG vaccine on the basis of C.F.U of number of TB, survival, an induction of the CD8 positive CTL activity and improvement of the histopathological tuberculosis lesions. This vaccine provided therapeutic efficacy against multi-drug resistant TB (MDR-TB) and extensively drug resistant TB (XDR-TB) (prolongation of survival time and the decrease in the number of TB in the lung) as well as protective efficacy in murine models. Furthermore, we extended our studies to a cynomolgus monkey model, which is currently the best animal model of human tuberculosis. This novel vaccine provided a higher level of the protective efficacy than BCG based upon the assessment of mortality, the ESR, body weight, chest X-ray findings and immune responses (IFN- γ , IL-2, IL-6 produc-

tion, and lymphocyte proliferation of cynomolgus monkey). All monkeys in the control group (saline) died within 8 months, while 50% of monkeys in the HSP 65+IL-12/HVJ group survived more than 14 months post-infection (the termination period of the experiment). Furthermore, the combination of HSP 65+IL-12/HVJ and BCG by the priming-booster method showed a synergistic effect in the TB-infected cynomolgus monkey (100% survival). In contrast, 33% of monkeys from BCG Tokyo alone group were alive (33% survival). Furthermore, this vaccine exerted therapeutic efficacy in the TB-infected monkeys. These data indicate that our novel DNA vaccine might be useful against *Mycobacterium tuberculosis* for human clinical trials.

References

- 1) Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP 65 DNA+IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine*. 2007; 25: 2990-3.
- 2) Nakano H, Nagata T, Suda T, et al.: Immunization with

dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to an epitope on antigen 85A. *Vaccine*. 2006; 24: 2110-9.

- 3) Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, et al.: DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* by T cell activation. *Vaccine*. 2006; 24: 1191-204.
- 4) Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, et al.: Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine*. 2005; 23: 2132-5.
- 5) Miki K, Nagata T, Tanaka T, et al.: Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and MPB/MPT51. *Infect Immun*. 2004; 72: 2014-21.

2. BCG vaccine trials in South Africa

South African Tuberculosis Vaccine Initiative, University of Cape Town Gregory HUSSEY

The South African Tuberculosis Vaccine Initiative, located within the University of Cape Town, has been involved in a number of BCG vaccine trials over the last few years and in this presentation I will highlight results from some of our studies.

A randomized trial comparing the efficacy of percutaneous versus intradermal BCG in the prevention of tuberculosis disease in infants and young children

Intradermal BCG vaccine is currently recommended by the World Health Organization (WHO). Prior to this study, no randomized trial comparing the relative incidence of tuberculosis following intradermal as opposed to percutaneous BCG vaccination had been conducted. 11680 South African newborns were randomized to receive Tokyo 172 BCG vaccine via either the percutaneous (n=5775) or the intradermal (n=5905) route within 24 hours of birth and then followed up for 2 years to document and investigate adverse events and suspected tuberculosis (TB) disease. The cumulative incidence of tuberculosis over two years of follow up was 6.13% [95.5% CI: 5.52-6.79%] in the intradermal group and 6.49% [5.86-7.18%] in the percutaneous group. No significant differences were found between the routes in the cumulative incidence of adverse events. Our results suggest that the WHO should consider revising its policy of preferential intradermal vaccination to allow national immunization programs to

choose percutaneous vaccination if that is more practical.

Determining BCG-induced immune correlates of protection against childhood tuberculosis disease

This study aims to determine what we can measure in the blood of a BCG-vaccinated baby to tell us whether that infant has either been protected, or not protected, against future tuberculosis disease. Defining these "immune correlates" is critical for studies of new tuberculosis vaccines. 5675 infants, routinely vaccinated with BCG at birth were enrolled. Blood was collected, processed and cryopreserved at 10 weeks of age, and the infants were followed for at least 2 years. 45 infants developed culture-positive lung tuberculosis over this period (i.e., not protected by BCG). 91 infants did not develop tuberculosis disease despite exposure to adults with tuberculosis in the households (i.e., protected by BCG). We are now in the process of retrieving blood products stored at 10 weeks of age, to compare BCG-induced immunity in the 2 groups. Our comprehensive approach to analysis includes: determining cytokine levels in plasma, evaluating cytokine expression and the memory phenotype of specific T cells, determining specific T cell proliferative and cytokine-producing capacity, assessing the pattern of mRNA expression, and determining whether BCG-induced antibody production patterns may correlate with protection. Results will be presented.

The effect of BCG strain and route of administration on the immune responses caused by the vaccine in infants

At present, we do not know whether BCG strain or route of administration determine efficacy. We evaluated antigen-specific immunity after percutaneous or intradermal administration of Japanese BCG or intradermal administration of Danish BCG. Ten weeks after vaccination of neonates, percutaneous Japanese BCG had induced significantly higher frequencies of BCG-specific IFN-gamma (-producing CD4+ and CD8+ T cells in BCG-stimulated whole blood; significantly greater secretion of the T helper 1-type cytokines IFN- γ , tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interleukin (IL) 2; and significantly lower secretion of the T helper 2-type cytokine IL-4; and greater CD4+ and CD8+ T cell proliferation than did intradermal Danish BCG. Thus, BCG strain and route of vaccination confer different levels of immune activation, which may affect the efficacy of the vaccine.

Immune response to BCG vaccination in HIV-infected newborns

We have evaluated the risks and benefits of BCG vaccination in HIV-infected infants. However, we do not know whether BCG does protect HIV-infected children against the disease; rather BCG may itself cause disease in this population. Sequential BCG-induced immune responses were determined in 22 HIV-positive infants compared with that in 25 healthy infants born to mothers not infected with HIV and in 25 HIV-negative infants born to HIV-positive mothers. Results will be presented in the near future.

References

- 1) Hawkrigde T, Scriba TJ, Gelderbloem S, et al.: Safety and

immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa. *J Infect Dis.* 2008; 198: 544-52.

- 2) Soares AP, Scriba TJ, Joseph S, et al.: Bacillus Calmette-Guérin vaccination of human newborns induces T cells with complex cytokine and phenotypic profiles. *J Immunol.* 2008; 180: 3569-77.
- 3) Hussey G, Hawkrigde T, Hanekom W: Childhood tuberculosis: old and new vaccines. *Paediatr Respir Rev.* 2007; 8: 148-54.
- 4) Moyo S, Hawkrigde T, Mahomed H, et al.: Determining causes of mortality in children enrolled in a vaccine field trial in a rural area in the Western Cape Province of South Africa. *J Paediatr Child Health.* 2007; 43: 178-83.
- 5) Hatherill M, Hawkrigde T, Whitelaw A, et al.: Isolation of non-tuberculous mycobacteria in children investigated for pulmonary tuberculosis. *PLoS ONE.* 2006; 1: e21.
- 6) Mahomed H, Kibel M, Hawkrigde T, et al.: The impact of a change in bacille Calmette-Guérin vaccine policy on tuberculosis incidence in children in Cape Town, South Africa. *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25: 1167-72.
- 7) Murray RA, Mansoor N, Harbacheuski R, et al.: Bacillus Calmette Guérin vaccination of human newborns induces a specific, functional CD8+ T cell response. *J Immunol.* 2006; 177: 5647-51.
- 8) Davids V, Hanekom WA, Mansoor N, et al.: The effect of bacille Calmette-Guérin vaccine strain and route of administration on induced immune responses in vaccinated infants. *J Infect Dis.* 2006; 193: 531-6.

3. Present and future of TB vaccine development research

Department of Infectious Disease Immunology and the SSI Centre for Vaccine Research, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark

Peter ANDERSEN

Tuberculosis (TB) kills 2-3 million people every year. The current tuberculosis (TB) vaccine *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) is the most widely used vaccine worldwide, but it does not prevent the establishment of latent TB or reactivation of pulmonary disease in adults. The development of subunit vaccines has now reached the point where single antigens as well as poly-protein fusion molecules have been evaluated in animal models and found to provide efficient protection against tuberculosis. The most advanced of these vaccines such as the fusion between ESAT6/TB 10.4 and Ag85B are now in clinical trials. Currently the focus is on evaluating the influence of different adjuvants, live delivery systems, routes and prime-boost

regimes for optimal expression of immunity in the lung, boosting of BCG and maintenance of immunological memory. Subunit vaccines can be used to boost BCG immunity either administered together (Tandem administration), shortly after BCG (early boost) or in adolescence when BCG immunity starts to wane (Late boost). A late BCG boost would frequently be administered post-exposure to latently infected individuals and ongoing efforts are focused on understanding the impact this would have on existing vaccines and for the design of efficient booster vaccines.

References

- 1) Dietrich J, Billeskov R, Doherty TM, et al.: Synergistic

- effect of bacillus Calmette-Guérin and a tuberculosis subunit vaccine in cationic liposomes: increased immunogenicity and protection. *J Immunol.* 2007; 178: 3721–30.
- 2.) Andersen P: Vaccine strategies against latent tuberculosis infection. *Trends Microbiol.* 2007; 15: 7–13.
 - 3.) Dietrich J, Andersen C, Rappuoli R, et al.: Mucosal administration of Ag85B-ESAT-6 protects against infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts prior bacillus Calmette-Guérin immunity. *J Immunol.* 2006; 177: 6353–60.
 - 4.) Dietrich J, Lundberg CV, Andersen P: TB vaccine strategies — what is needed to solve a complex problem? *Tuberculosis (Edinb.)*. 2006; 86: 163–8.
 - 5.) Agger EM, Rosenkrands I, Olsen AW, et al.: Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine.* 2006; 24: 5452–60.
 - 6.) Doherty TM, Andersen P: Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18: 687–702.
 - 7.) Andersen P, Doherty TM: The success and failure of BCG. Implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3: 656–62.
 - 8.) Andersen P, Doherty TM: TB subunit vaccines—putting the pieces together. *Microbes Infect.* 2005; 7: 911–21.
 - 9.) Dietrich J, Aagaard C, Leah R, et al.: Exchanging ESAT6 with TB 10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. *J Immunol.* 2005; 174: 6332–9.

4. Comments and directions in research and development of TB vaccines

Aeras Global TB Vaccine Foundation, Bethesda, Maryland, USA Jerald C. SADOFF

The 83rd Annual Meeting Mini-symposium

RESEARCH AND DEVELOPMENT OF VACCINES AGAINST TUBERCULOSIS

Chairpersons: ¹Kazuo KOBAYASHI and ²Isamu SUGAWARA

Speakers:

1. Novel DNA vaccines against tuberculosis: Masaji OKADA (Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center)
2. BCG vaccine trials in South Africa: Gregory HUSSEY (South African Tuberculosis Vaccine Initiative, University of Cape Town, Cape Town, South Africa)
3. Present and future of TB vaccine development research: Peter ANDERSEN (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark)
4. Comments and directions in research and development of TB vaccines: Jerald C. SADOFF (Aeras Global TB Vaccine Foundation, Bethesda, Maryland, USA)

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 9.2 million new cases and nearly 1.7 million deaths by tuberculosis (TB) occur annually (<http://www.who.int/tb/en/>). TB poses a significant health threat to the world population. Global tuberculosis control is facing major challenges today. In general, much effort is still required

to make quality care accessible without barriers of gender, age, type of disease, social setting, and ability to pay. Coinfection with *M. tuberculosis* and human immunodeficiency virus (TB/HIV), and multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR)-TB in all regions, make control activities more complex and demanding. Treating and preventing TB is challenging, even in developed countries where there is a modern health care system and infrastructure. Current treatment regimens last six to nine months, and erratic or inconsistent treatment breeds MDR (490,000 new cases/year) and even XDR-TB (40,000 new cases/year), which means that this pandemic could become even more difficult to control throughout the world. TB is a leading cause of death among people who are also infected with HIV, according to the World Health Organization. One-third of the 33.2 million people living with HIV also suffer from TB. The coinfection causes 230,000 deaths annually worldwide. Without proper treatment, approximately 90 percent of people living with HIV die within two to three months of contracting TB (http://www.stoptb.org/wg/tb_hiv/default.asp). The goal of this symposium is to understand the current situation of research and development of novel TB vaccines and the future perspective.

To win the fight against TB, a comprehensive approach is needed that includes new and more effective vaccines as well as improved diagnostics and treatment. The bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine, created in 1921, is the only existing vaccine against TB. Unfortunately, it is only partially effective. It provides some protection against severe forms of pediatric TB, namely disseminated and meningeal tuberculosis occurring in the first year of life, but is unreliable against adult pulmonary TB, which accounts for most of the disease burden worldwide. Although BCG is the most widely administered vaccine in the world, there have never been as many cases of TB on the planet. There is therefore an urgent need for a modern, safe and effective vaccine that would prevent all forms of TB, including the drug-resistant strains, in all age groups and among people with human immunodeficiency virus (HIV).

Strategies for the research and development (R&D) are included 1) pre-exposure (prophylactic) and 2) post-exposure (therapeutic) vaccines. Based on the preparation, there are 4 types, such as 1) improved BCG, 2) attenuated *M. tuberculosis*, 3) subunit/component vaccines, and 4) DNA vaccines. Speakers have presented and discussed "R&D of novel vaccines against TB" better than current BCG.

To control TB and overcome the issues, such as drug-resistant TB and HIV-TB coinfection, we hope the presentation in the Mini-symposium promotes a more adventurous

approach to develop a novel, effective and safe TB vaccine.

References

- 1) Kaufmann SHE: Robert Koch, the Nobel prize, and the ongoing threat of tuberculosis. *N Engl J Med.* 2005; 353: 2423-6.
- 2) Young DB, Perkins MD, Barry CE III: Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. *J Clin Invest.* 2008; 118: 1255-65.
- 3) Skeiky YAW, Sadoff JC: Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2006; 4: 469-76.

Key words: Improved BCG, Attenuated *Mycobacterium tuberculosis*, Subunit/component vaccines, DNA vaccines, Pre-exposure (prophylactic) vaccines, Post-exposure (therapeutic) vaccines

¹Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, ²Mycobacterial Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

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)

結核診断法の進歩

まえくらりようじ おどりなかつひろ
前倉 亮治*1・田栗貴博*2

過去10年間で結核診療とそれを取り巻く環境は、大きく変化・進歩してきている。具体的には、遺伝子を使った診断法の確立、液体培地の導入、新しい治療戦略である直接監視下短期化学療法(directly observed therapy short course, DOTS)の開始、退院基準の作成、さらに結核予防法から感染症法への取り扱う法律の変更などである。

この間、結核の罹患率は10万人当たり20~30人程度に減少したが、非結核性抗酸菌症は増加傾向にある。かつて喀痰塗抹抗酸菌陽性であれば、肺結核として命令入所し化学療法を開始していたが、今や塗抹抗酸菌陽性の約半数が非結核性抗酸菌であることから結核迅速診断の重要性が高まっている。また、多剤耐性結核菌が一般の肺結核患者へ感染するとの報告があり、多剤耐性結核患者は陰圧病棟へ収容する必要性から耐性結核菌の迅速な診断も重要となっている。

■ 遺伝子検査の迅速化

核酸増幅法(polymerase chain reaction, PCR法)は、塗抹陽性検体の95%で同定可能であり抗酸菌の同定法として広く普及しているが、検査所要時間が約9時間かかり、喀痰採取から結果が得られるまでにほぼ1日が必要である。一般病棟に入院中の場合は、結果が得られるまで個室に隔離することになるが、検査

を外注している施設では結果が得られるまでに数日を要する。

最近、RNAを抽出増幅する核酸増幅法(transcription-reverse transcription concerted reaction, TRC法)が保険取載され、約3時間で結果が得られるようになった。菌種は、*Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium-intracellulare* complex(MAC), *M. kansasii*が同定可能であるが、*M. avium*と*M. intracellulare*との鑑別はできない。PCR法と比較したTRC法の成績はほぼ同等であった(表1)。これを用いると、呼吸器外来初診日に結核菌の検出・同定が可能になる。

■ 薬剤感受性検査

治療を開始する際に、結核菌の薬剤感受性結果が必要となる。液体培地(*Mycobacteria* growth incubation tube, MGIT)を使うことによって塗抹陽性例ではほとんどが2週間以内に培養陽性となり、さらにプロシミック法(液体培地)を用いると診断から1か月以内に薬剤感受性結果が得られる(表2)。塗抹陽性者の化学療法後菌陰性化までの期間は平均7週間であり、薬剤感受性検査に小川培地を用いると結果が得られるまでに2か月以上かかるので、化学療法の結果が出た後で薬剤感受性結果が得られる。

また、小川培地で多剤耐性菌と判定された菌が、プロシミック法ではリファンピシン(rifampicin, RFP)の最小発育阻止濃度(minimum inhibitory concentration, MIC)が0.25 µg/ml以下の感受性菌と判定された(表3)。これらの症例で実際に治療効果も得られた。MICを測定することは、適切な薬剤用量を決定するのに有用であり、今の副作用を無視した標準治

表1 TRC法のPCR法と液体培養(MGIT法)との結核菌検出率の比較

患者検体:412検体(喀痰365, BALF 24, その他穿刺液23)

	PCR		計	TRCの成績 感度:89.9% 特異度:98.3%
	+	-		
TRC	+	107	5	112
	-	12	288	300
計		119	293	412

	MGIT+同定		計	MGIT+同定	計
	+	-			
TRC	+	110	2	112	119
	-	19	281	300	293
計		129	283	412	412

感度:85.3%,
特異度:99.3%。感度:89.1%,
特異度:98.6%。

BALF: bronchoalveolar lavage fluid, 気管支肺胞洗浄液。

表2 MGITを用いた塗抹結果と菌検出までの日数

時間 (日)	塗抹検査の結果																				
	<i>M. tuberculosis</i>			MAC			<i>M. kansasii</i>			<i>M. abscessus</i>		<i>M. fortitum</i>									
	-	±	1+	2+	3+	-	±	1+	2+	3+	-	±	1+	2+	3+	-	±	1+	2+	3+	
3					5					2											
4				2	8			2	1	1											1
5			1	3	6			5	1												
6				2	5	6			3	2	2				1						
7			1	6	9			6	2	2	1										
8			3	11	5			2	2												
9			2	9	5	1	1	2													
10			4	5	4			2													
11			8	10	4	1		5													
12			4	2	4			2													
13			10	2	1			1													
14			5	1		1		1													
15			7		1			2													
16			5																		
17			6																		
18			4																		
19			5																		
20			2																		
>21			5	1	1	1															

2週間

表3 患者から分離された結核菌の薬剤感受性

抗結核剤	MIC($\mu\text{g/ml}$)									
	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	>32
RFP	56	1	1	2	1					
	9(2)	4(3)	1	1	1	1	1	1	6	6
INH	45	5	1	2	5					1
	1		2	1	3(1)	7(6)	6	1	4	6
SM		1	3	26	23	5			1	2
	1		1	3	4	1	5	1	1	14
EB			2	10	29	19	1			
			1	3	8	5	8		1	5
KM			1	11	33	14	1			1
			1	3	7	6	4	2	3	5

M. tuberculosis: n=61(治療反応菌:上段), n=31(持続排菌:下段, ()内小川培地多剤耐性菌を含む).

INH:イソニアジド(isoniazid), SM:ストレプトマイシン(streptomycin), EB:エタンブトール(ethambutol), KM:カナマイシン(kanamycin).

療から個々の患者の病態に適した臨床的治療への道を開く必要があり, 薬剤感受性検査には, 小川培地ではなく液体培地を用いることを推奨する.

結核菌の耐性遺伝子の研究も進歩し, RFPの耐性

遺伝子を検索する市販キットも保険収載され, 日常臨床検査のなかで使われている¹⁾. RFP耐性結核菌の約95%は, RNAポリメラーゼ β サブユニットをコードしている遺伝子(*rpoB* 遺伝子)に変異が認められ, そ

表4 RFP耐性遺伝子(line probe assay(LiPA))の臨床応用

1) 喀痰検体 130 例

	LiPA・Rif TB	
	陽性	陰性
結核菌陽性	82	2*
結核菌陰性	0	46

結核菌陽性: 84例(培養のみ陽性例42例),
結核菌陰性: 46例(非定型抗酸菌: 10例を含む),
陽性的中率: 97.6%(82/84),
陰性的中率: 100%(48/48).

*: 培養のみ陽性.

2) PCR または TRC-TB 陽性検体: 111 例

	LiPA・Rif TB	
	陽性	陰性
塗抹陽性	88	2*
塗抹陰性	15	6**

(喀痰 92, 膿 8, BALF 6, 胸水 2, 組織 2, 胃液 1),
陽性的中率: 92%(103/111).

(*: 塗抹(±)痰 1, 膿 1, **: 痰 6).

3) 薬剤感受性検査との比較

	LiPA・Rif TB	
	感受性	耐性
培養による感受性検査	RFP 感受性 70	2*
	RFP 耐性 0	35

陽性(感受性)的中率: 98.0%(70/72).

陰性(耐性)的中率: 100%(35/35).

(*: MIC=0.25 µg/ml).

の変異部位は狭い領域(69 bp)に集中している。この耐性遺伝子の臨床応用結果を(表4)に示す。結核菌塗抹陽性または培養陽性検体では、97.6%で遺伝子増幅が可能であった。結核菌陰性検体或非結核性抗酸菌検体では、全例で検出されなかった。

従来の遺伝子増幅法(PCR法・TRC法)との比較では、塗抹陰性検体で陽性率がやや劣っていた。薬剤感受性との比較では、耐性菌の全例で耐性遺伝子の異変が認められた。感受性菌のなかで2例は、耐性遺伝子の異変と認めたが、この菌のMICは0.25 µg/mlとプロスミック法では中間領域であった。この検査法を用いることで、入院後数日でRFPに対する薬剤感受性結果が判明することから、抗結核剤の選択と投与方法をより適切に行うことができることになる。結核菌が検出できない場合の結核診断は、胸部X線とツベルクリン反応が用いられてきたが、抗結核剤を投与してその結果により治療的診断によることもあった。

■ 診断法の最近の動向

近年、血液を使った結核感染の診断法が開発されて

表5 結核菌が検出できないときの血液を使った診断法(肺結核・非結核性抗酸菌症における補助診断法の有用性)

診断法	肺結核	肺 MAC 症	肺 <i>M. kansasii</i> 症	肺炎・BE
TBGL	+	+	+	-
LAM	+	+	+	-
GPL-core	-	+	-	-
QFT	+	-	+	-

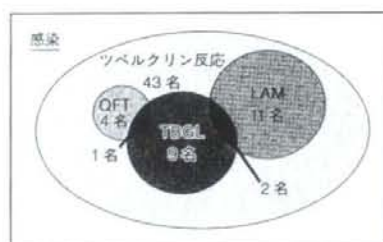


図 結核菌検出者のQFT, TBGL, LAM, ツベルクリン反応陽性者の相互関係

きたので、これを紹介する。結核菌特異抗原を抗原とし、細胞性免疫反応を利用してT細胞からのインターフェロン(interferon, IFN)- γ の産生を測定するQuantiFERON-TB(QFT)と、血清抗体を測定するTBGL(tuberculous glycolipids)法・マイコドット法(抗LAM(lipoarabinomannan)抗体を測定)が保険収載されている。MACに特異的なGPL(glycopeptidolipid)-coreを抗体としたキャピリアMAC法も、現在製造承認中である。これらの診断法の弱点は塗抹陽性患者でも感度が100%ではなく60~80%ということである。これは、結核菌細胞壁組成が非常に多様かつ複雑であり、培養環境でその組成も変化することに加え、宿主側の要因でどの物質を抗原として認識するかが異なるためである(individual variation)。

このことから異なった抗原物質を複数組み合わせることにより、感度は100%に近づく²⁾。さらに、このような血液を使った補助診断法を組み合わせることにより、結核周辺の呼吸器感染症をより適確に診断することが可能になる(表5)^{3,4)}。これらの診断法は、どれも特異度が90%以上と高く、潜在感染を検出する方法としても有用であると考えられるが、図に示すように各検査法により陽性者が異なることから、これらの診断法の結果の解釈には、今後の検討が必要と考える。

以上、紹介した検査法を使うことで、結核の迅速診断、非結核性抗酸菌(肺MAC症)の鑑別診断とRFP