

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ando H, Mitarai S, Kondo Y, Suetake T, Sekiguchi JI, Kato S, Mori T, Kirikae T.	Pyrazinamide resistance in multidrug-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolates in Japan.	<i>Clin Microbiol Infect</i>	16(8)	1164-1168, 2010	2010
Ando H, Kondo Y, Suetake T, Toyota E, Kato S, Mori T, Kirikae T.	Identification of <i>katG</i> mutations associated with high-level isoniazid resistance in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	<i>Antimicrob Agents Chemother</i>	54(5)	1793-1799	2010
徳永 修、宮野前健	小児へのQFT等の適用とその課題	結核	85	21-23	2010
徳永 修	小児における潜在性結核感染症の診断と治療	小児科	51	1221-1226	2010
徳永 修、森 亨	小児結核診療の最前線-最近の傾向と症例からみた対策の課題-	小児科	51	1807-1814	2010
加藤誠也、徳永 修、吉山 崇	日本のコッホ現象報告の分析	結核	85	777-782	2010
山内祐子	結核看護の質の向上をめざして・・・「コホート観察」による治療・患者支援の評価	保健師・看護師の結核展望	Vol.48.1	68-78	2010
稲垣智一、加藤誠也、伊藤智朗、伊藤邦彦、重藤えり子、味澤篤、阿彦忠之。	結核医療体制の整備	結核	87	421-432	2012
伊藤邦彦、永田容子、浦川美奈子、加藤誠也。	結核病床の施設整備状況に関する全国アンケート調査	結核	87	51-55	2012

#### IV 研究成果の刊行物・別刷(一部)

# 遺伝子を用いた抗酸菌鑑別同定試薬 INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 の有用性の検討

<sup>1</sup>吉田志緒美   <sup>1</sup>鈴木 克洋   <sup>1</sup>露口 一成   <sup>4</sup>岩本 朋忠  
<sup>2</sup>富田 元久   <sup>1</sup>岡田 全司   <sup>3</sup>坂谷 光則

**要旨:**〔目的〕 遺伝子を用いた抗酸菌鑑別同定試薬 INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (INNO-LiPA 法) のわが国における有用性の検討。〔対象〕 NHO 近畿中央胸部疾患センターにおいて新規に分離された抗酸菌 122 株。〔方法〕 INNO-LiPA 法と 3 種類の同定キット (コバス アンプリコア マイコバクテリウム法, アキュプローブ法と DDH 法) との結果を比較検討した。同定不能もしくはデータ間で違う結果を示した株についてはシーケンス解析を行った。〔結果〕 122 株のうち 112 株が 3 種類の同定キットのいずれかと INNO-LiPA 法の結果が一致した (91.8%)。相違を認めた 10 株のうち 6 株は INNO-LiPA 法とシーケンス解析の結果が一致した。しかし 2 株のうち 1 株は DDH 法の結果と一致し *M. fortuitum*, もう 1 株はコバス アンプリコア マイコバクテリウム法とアキュプローブ MAC 法の結果と一致し *M. intracellulare* と判定された。INNO-LiPA 法と 3 種類の同定キットの結果がともにシーケンス解析結果と異なる株は 2 株認められた (*M. paraffinicum*, *M. mucogenicum* 近縁種)。〔考察〕 INNO-LiPA 法は正確性, 迅速性に優れており有益性が証明された。培養および生化学的性状試験と併行して実施することにより総合的な抗酸菌同定が可能であると考えられた。

**キーワード:** 抗酸菌, INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2, 同定検査, 16S rRNA 遺伝子, ITS シーケンス解析

## はじめに

抗酸菌同定検査において生化学的同定検査を実施するには多大な労力と菌量が必要である。また培養にかかる期間も結核菌だと小川培地で 3~8 週間は必要であり, 治療方針を決定するうえでも迅速な同定検査は必須である。近年, 遺伝子検査の手法を応用した抗酸菌の迅速同定検査が日常的に用いられるようになり, さまざまな測定原理から開発された菌同定用キットが市販されている。抗酸菌を正確かつ迅速に同定する性能を兼ね備えたこれらのキットは, 先人により高い評価と共に各種問題点も報告されている<sup>1)~7)</sup>。

コバス アンプリコア マイコバクテリウム法は polymerase chain reaction (PCR) を用いて DNA を増幅後, ハイブリダイゼーションすることで臨床検体や菌株を対象

として *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare* の 3 菌種が同定できる<sup>1)~3)</sup>。前倉らによると肺結核患者における塗抹陽性検体の 94.4% はコバス アンプリコア マイコバクテリウム法で陽性であったが, 塗抹陰性検体の場合は 70.8% が陽性となった<sup>4)</sup>。

アキュプローブ法は検体の 16S rRNA をターゲットとして, 菌種特異的 DNA プローブとハイブリダイゼーションさせてから, 専用の検出器を用いて化学発光を検出するキットである<sup>5)</sup>。結核菌群と *M. avium* complex (MAC), *M. kansasii*, *M. gordonae* の 4 種類のキットがあり, アキュプローブ陽性となる感度は結核菌群と *M. gordonae* で 100%, MAC 95.2%, *M. kansasii* 44.0% という報告<sup>5)</sup>や, 結核菌群 87.2%, MAC 78.6%, *M. kansasii* 91.7%, *M. gordonae* 85.9% とする報告<sup>6)</sup>などがある。

DDH 法は核酸の相同性を利用し, ハイブリダイズし

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター<sup>1</sup>臨床研究センター, <sup>2</sup>研究検査科, <sup>3</sup>内科, <sup>4</sup>神戸市環境保健研究所

連絡先: 吉田志緒美, 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター, 〒591-8555 大阪府堺市北区長曾根町 1180 (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)  
(Received 28 Aug. 2008 / Accepted 30 Oct. 2008)

たDNAの比率をピオチン-アビジン反応を用いてそれぞれの基準DNA株と被検菌DNAのDNA塩基配列の相同性を測定するキットで18菌種の同定を一度に行うことが可能である<sup>7)</sup>。同法は「全染色体DNAの類似度(similarity)が70%以上であれば、同じ菌種としてよい」という細菌分類学の菌種同定基準を利用している。そのため相対類似度で算出された数値から供試菌がどの菌種の基準株に最も近いかという結果は得られるが、同定不能となる菌種が多い傾向がある<sup>8)9)</sup>。また「肉眼的に明らかな発色が確認された場合には吸光度を測定せずにウェルの菌種と同定してもよい」としていることも誤判定を生じやすい原因である。

INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (INNO-LiPA法)は16S-23S internal transcribed spacer (ITS) 領域をターゲットとしPCR法で増幅されたDNAを対象に、ラインプローブアッセイを用いて検出する。一度に15菌種の同定と*Mycobacterium*属に共通の*Mycobacterium* genusのプローブがあることから抗酸菌の確定が可能である<sup>10)</sup>。

INNO-LiPA法の検討はこれまでにいくつか報告はあるが<sup>10)~13)</sup>、現時点でわが国における検討報告はなされていない。今回われわれはINNO-LiPA法の迅速性ならびに正確性について上記の先に市販されている同定キットの結果と比較しその有用性を検討した。

## 方 法

### 対象

独立行政法人近畿中央胸部疾患センターにおいて新規に分離培養される菌株のうち大半を占める抗酸菌は結核菌群であるが、多くの菌種が存在し、日常検査で判定に苦慮する割合が高いのは非結核性抗酸菌 (NTM) である。今回NTMに対する同定結果の比較に重点をおき、結核菌群の菌株数を絞って検討を試みた。したがって2006年2月1日から6月30日までの期間に分離された結核菌群7株、NTM 115株の合計122株を対象とした。すべての菌株同定は同定検査結果とあわせて小川培地上でのコロニー性状の観察をもって最終判定とした。

検体内に複数の菌が混在する場合に同時に鑑別が可能かどうかを検討するため、臨床検体から複数の菌種が認められた3つの混合培養も検討に加えた。これらはあらかじめ固形培地上で異なるコロニー性状をもつと判定され、おのおの純培養を行って3種類の同定キットにて同定検査を実施、複数菌混在であることを確認した。

### 同定キット

NHO近畿中央胸部疾患センターにおいて日常検査に使用している遺伝子を用いた同定キットを使用した。

結核菌群の同定には結核菌群同定用アキュプローブ結核菌群同定キット (極東製薬工業) と結核菌群同定試薬

キャピリアTB (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いた。*M. avium*と*M. intracellulare*の同定にはコバス アンプリコア マイコバクテリウム アビウムとコバス アンプリコア マイコバクテリウム イントラセルラー (コバス アンプリコア マイコバクテリウム法: ロシュ・ダ イアグノスティクス), MACの同定にはアキュプローブ マイコバクテリウム アビウム コンプレックス (アキュプローブ MAC法: 極東製薬工業) を用いた。*M. kansasii*および*M. gordonae*の同定には、研究用試薬であるアキュプローブ マイコバクテリウム カンサシとアキュプローブ マイコバクテリウム ゴルドネ (共に極東製薬工業) を用いた。上記以外の菌種の同定にはDDH マイコバクテリア '極東' (DDH法: 極東製薬工業) を用いた。すべての方法は添付の仕様説明書に準拠して行った。DDH法はDNAの精製が不十分な場合に同定不能の結果が得られることもあるため同定不能の結果が得られた場合には再検査を行った。

### DNAの抽出

小川培地発育菌から白金耳で径2~3mmのコロニー2個分の菌量を採取し、1.5mlマイクロチューブに分注したインスタジーンDNA精製マトリックス (BIO-RAD) 200 $\mu$ lに懸濁した。56 $^{\circ}$ C、15~30分処理後10秒間 vortex し、正確に100 $^{\circ}$ C、8分間処理した後直ちに氷水中で急冷した。10秒間 vortex し、12000 rpm、3分遠心した上清をINNO-LiPA法ならびにシーケンス解析法に用いた。

### INNO-LiPA法

INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (INNO-LiPA法: INNOGENETICS) は、発色確認用コントロールと抗酸菌特異的プローブ (MYC genus) および菌種鑑別のための22本のITS遺伝子プローブが固相化されたストリップ状のキットである。プローブは12菌種のプローブに加えて、3種類の subtypeが鑑別可能な*M. kansasii* プローブ、4種類のMAIS complex プローブ、*M. abscessus*を含んだ3種類の*M. chelonae* complex プローブが配置されている。同キットの使用説明書に準拠して16S-23S ITS領域の遺伝子のPCR増幅を行い、得られたPCR増幅産物をLiPA検体として使用した。LiPA検体をハイブリダイズさせ、得られた発色パターンによって抗酸菌の同定を行った (Table 1)。

INNO-LiPA法においてはPCRの後、すべてのPCR産物を電気泳動し得られたバンドから増幅の確認を行った。またDDH法と同様にMYC genusにしか発色が見られない場合、再検査を行った。

### 16S rRNA 遺伝子、ITS領域のシーケンス解析

3種類の同定キットとINNO-LiPA法により同定不能であった株、ならびに結果の乖離が認められた株に対し

**Table 1** Interpretation of *Mycobacterium* species by using the INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2

Line	Probe	Taxa reacting with the probe
1	Conjugate Control	
2	MYC genus	Presence of <i>Mycobacterium</i> in the test sample
3	MTB	<i>M. tuberculosis</i> complex: <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. microti</i> , <i>M. africanum</i>
4	MKA-1	<i>M. kansasii</i> (group I)*
5	MKA-2	<i>M. kansasii</i> (group II)*
6	MKA-3	<i>M. kansasii</i> (group III, V, VI)*, <i>M. gastri</i>
7	MXE	<i>M. xenopi</i>
8	MGO	<i>M. gordonae</i>
9	MGV	<i>M. genavense</i>
10	MSI	<i>M. simiae</i>
11	MMU	<i>M. marinum</i> + <i>M. ulcerans</i>
12	MCE	<i>M. celatum</i>
13	MAIS	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , MAC, <i>M. malmoeense</i>
14	MAV	<i>M. avium</i> , <i>M. paratuberculosis</i> , <i>M. silvaticum</i>
15	MIN-1	<i>M. intracellulare</i> (sqv. Min-A, -B, -C, and-D)
16	MIN-2	<i>M. intracellulare</i> (sqv. Mac-A)
17	MSC	<i>M. scrofulaceum</i>
18	MML	<i>M. malmoeense</i>
19	MHP	<i>M. haemophilum</i>
20	MCH-1	<i>M. chelonae</i> complex (group I, II, III, IV, <i>M. abscessus</i> )*
21	MCH-2	<i>M. chelonae</i> complex (group III, <i>M. abscessus</i> )*
22	MCH-3	<i>M. chelonae</i> complex (group I)*
23	MFO	<i>M. fortuitum</i> – <i>M. peregrinum</i> complex
24	MSM	<i>M. smegmatis</i>

\*group is based on sequevar derived from 16S–23S nucleotide sequences. sqv., sequevar

て、データベースが豊富な 16S rRNA 遺伝子のシーケンスを、さらに 16S rRNA 遺伝子の相同性解析で同定が困難な菌株に対しては ITS シーケンス解析を追加し菌種を決定した。PCR 反応は岩本らの方法<sup>14)</sup>に準じ、Takara Ex Taq (タカラバイオ) を用いて、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分を 35 サイクル行った。16S rRNA 遺伝子の超可変部 A と B を含む領域をプライマー 285F [5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3'] と 264R [5'-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA-3'] を用いて PCR 増幅産物を得た。ITS 領域全長の増幅には ITS1 [5'-GAT TGG GAC GAA GTC GTA AC-3'] と ITS2 [5'-AGC CTC CCA CGT CCT TCA TC-3'] を用いた。PCR 産物を精製した後 BigDye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Japan) を用いて 16S rRNA 遺伝子の部分配列と ITS 全長の塩基配列を得た。得られた塩基配列は、Ribosomal Differentiation of Microorganisms: RIDOM を用いて相同性検索を行い、99% 以上の塩基配列一致をもって同一菌種と決定した。

## 結 果

供試菌 122 株のうち 112 株において INNO-LiPA 法と 3 種類の同定キットの結果が一致した。対象菌株のうち結核菌群の 7 株はすべて、結核菌群同定用アキュプローブ結核菌群同定キット、キャピリア TB と INNO-LiPA 法の結果が一致した。NTM 115 株のうちアキュプローブ

MAC 法で MAC と同定され、コバス アンプリコア マイコバクテリウム法により *M. avium* と同定された 24 株は INNO-LiPA 法では MAIS と MAV プローブのバンドを認めた。一方アキュプローブ MAC 法で MAC、コバス アンプリコア マイコバクテリウム法により *M. intracellulare* と同定された 7 株が MAIS と MIN-1 プローブに反応していたが、菌株 23 のみ MIN-1 に反応を示さず結果に乖離が見られた。DDH 法を実施した 83 株のうち再検査を実施しても同定不能となった株は 6 株認められた。これら 6 株のうち 3 株は INNO-LiPA 法でも MYC genus にしか反応が見られなかった。一方 DDH 法で菌種同定ができたが INNO-LiPA 法との間に結果の食い違いが見られた株は 3 株認められた。したがって 3 種類の同定キットのいずれかと INNO-LiPA 法との間で同定不能や結果が異なった 10 株に対してシーケンス解析を行った。

6 株 (菌株 2, 19, 14, 22, 7, 6) はシーケンス解析結果と INNO-LiPA 法の結果が一致した。菌株 2 と 19 は INNO-LiPA 法で MKA-3 の反応を認め *M. kansasii* 3 と判定され、シーケンス解析からそれぞれアキュプローブ カンサシで陰性となる *M. kansasii* sqv. III と VI と判定された。菌株 14 は INNO-LiPA 法、シーケンス解析ともに *M. gordonae* と判定された。一方、菌株 5 と 23 の 2 株は同定キットの結果とシーケンス解析結果が一致した。菌株 5 は、INNO-LiPA 法で MYC genus に反応が認

Table 2 Discrepant and unidentified results in identification of *Mycobacterium* species, including 9 isolates of *M. lentiflavum*.

Isolate No.	Cobas Amplicor system	AccuProbe	DDH	INNO-LiPA	16S rRNA gene		ITS
					Identity (%)	Identity (%)	
9 isolates	Negative	Negative	Unidentified**	MYC genus	<i>M. lentiflavum</i> DSM44418T		
2	Negative	Negative	Unidentified**	<i>M. kansasii</i> 3	<i>M. kansasii</i> Borsite 8875/99, sqv. VI-3		<i>M. kansasii</i> , MkaF 277/277 (100)
19	Negative	Negative	Unidentified**	<i>M. kansasii</i> 3	<i>M. kansasii</i> Borsite 539/99, sqv. III		<i>M. kansasii</i> , MkaC 279/279 (100)
14	Negative	NT	Unidentified**	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i> Borsite 11340/99, sqv. III		<i>M. gordonae</i> , MgoC 270/270 (100)
22	Negative	NT	Unidentified**	MYC genus	<i>M. interjectum</i> ATCC51457T		
7	Negative	NT	Unidentified***	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> or <i>M. chelonae</i> ( <i>M. abscessus</i> by ITS)		<i>M. abscessus</i> DSM44196 294/294 (100)
6	Negative	NT	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. abscessus</i> or <i>M. chelonae</i> ( <i>M. chelonae</i> by ITS)		<i>M. chelonae</i> Mche B 293/294 (99.7)
5	Negative	NT	<i>M. fortuitum</i>	MYC genus	<i>M. fortuitum</i> DSM46621T		
23	<i>M. intracellulare</i> MAC*	MAC*	NT	MAIS	<i>M. intracellulare</i> ATCC35770 sqv. III		428/428 (100) 442/442 (100)
13	Negative	NT	Unidentified***	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. mucogenicum</i> ATCC49650T		423/428 (98.8)
18	Negative	NT	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. intracellulare</i> 2	<i>M. paraffinicum</i> DSM44181T		439/439 (100)

\**M. avium* complex \*\*slow growers \*\*\*rapid growers NT: not tested T: Type strain sqv.: sequevar

められたが菌種の特定には至らず、DDH法とシーケンス解析では *M. fortuitum* と同定された。菌株23はコバスアンプリコア マイコバクテリア法で *M. intracellulare*, アキュプローブ MAC法で MAC, INNO-LiPA法で MAIS と判定され、シーケンス解析で *M. intracellulare* ATCC 35770 sqv. III (Mac-D) と100%相同と判定された。

シーケンス解析結果といずれかの方法の結果が異なった株(菌株13, 18)は各々 *M. mucogenicum* 近縁種と *M. paraffinicum* と同定された。

小川培地上で遅発菌と観察され、コバス アンプリコア マイコバクテリア法, アキュプローブ法, DDH法でも同定不能となり、INNO-LiPA法で MYC genus にしかバンドの発色が見られなかったがシーケンス解析で *M. lentiflavum* と同定された株が9株認められた (Table 2)。

複数菌種が混在していた3混合培養は INNO-LiPA法でも複数のバンドパターンが認められた (*M. tuberculosis* + *M. gordonae*, *M. avium* + *M. fortuitum*, *M. kansasii* + *M. gordonae*)。

## 考 察

分子遺伝学的に近縁な菌種であり16S rRNA 遺伝子に違いが見られない場合、ITS領域のほうが進化速度は速いため、より多様性のある配列結果が得られる。ITS領域をターゲットとした INNO-LiPA法はITS領域で高い多型性が知られているMACに対して4種類の亜型プローブを使って亜型判定を可能としている。菌株23はアキュプローブMAC法でMAC, コバス アンプリコア マイコバクテリア法で *M. intracellulare*, シークエンス解析で *M. intracellulare* ATCC 35770 sqv. III (Mac-D) と判定された。INNO-LiPA法では同タイプに対応する亜型プローブは設計されていないためにMAISプローブのみの反応となった。LebrunらもATCC 35770の検討で同じくMAISプローブにのみ発色が認められたと報告している<sup>13)</sup>。したがって、ITS領域において菌種内多型性を示す菌種に対しては、シーケンス解析で相同性を確認することが重要となってくる。

シーケンス解析といずれの方法とも結果が食い違った2株のうち菌株18はアキュプローブMAC法陰性、DDH法で *M. scrofulaceum* となり、INNO-LiPA法でMAISとMIN-2に発色が見られ *M. intracellulare* sqv. Mac-A と判定された。遅発菌である同菌株は16S rRNA解析では100%の相同性で *M. paraffinicum* DSM 44181 と判定され、同じく *M. scrofulaceum* DSM 43992 とは99%の相同性が見られた。Tortoliらも *M. paraffinicum* はMAISとMIN-2に発色が見られたがアキュプローブMAC法は陰性であったと報告している<sup>10)</sup>。一方Lebrunらはアキュロー

ブ MAC 法陰性、INNO-LiPA 法では MAIS のみにバンドに発色があり、シークエンス解析で *M. paraffinicum* と判定されたが同時に *M. scrofulaceum* DSM 43992 と 98.9% の相同性があったと報告している<sup>13)</sup>。今回アキュプローブ MAC 法で MAC, コバス アンプリコア マイコバクテリウム法により *M. avium* と同定された菌株はすべて INNO-LiPA 法で明確に MAV に発色が見られ、アキュプローブ MAC 法で MAC, コバス アンプリコア マイコバクテリウム法により *M. intracellulare* と判定された菌株も上記の菌株 23 以外は MIN-1 に発色が見られた。したがって唯一 MIN-2 にバンドを示した菌株 18 は *M. intracellulare* sqv. Mac-A とかなり相同性が高い近縁菌種と考えられた。

菌株 13 は 16S rRNA シークエンス解析で *M. mucogenicum* ATCC 49650T と 5 bp の違い (98.8% の相同性) が見られ *M. mucogenicum* の近縁種と推定された。小川培地上で迅速に発育し DDH 法で同定不能、INNO-LiPA 法で *M. fortuitum* と判定されており、結果に乖離が見られた。*M. mucogenicum* は古くは *M. chelonae*-like として知られていたが、16S rRNA 遺伝子では *M. chelonae* よりも *M. fortuitum* に近い系統に位置しており<sup>15)</sup>、現在では *M. chelonae-abscessus* グループと *M. fortuitum* グループに近縁の迅速発育菌として独立したグループと定義されている。Ballard らは同じく ATCC 49650T と 5 bp 違いでなおかつ ATCC 49649 と 1 bp 違いの *M. mucogenicum* N248 を解析しており、新しい subspecies の可能性があると報告している<sup>16)</sup>。迅速発育菌は多様性に富んでおり、菌株 13 も *M. mucogenicum* の variant type の可能性が考えられた。

同じく迅速発育菌であった菌株 5 は INNO-LiPA 法では MYC genus のみ発色が見られ、DDH 法で *M. fortuitum*、シークエンス解析で *M. fortuitum* DSM46621 と DSM44220 に 100% の相同性が認められた。Padilla らは INNO-LiPA 法で同じタイプの DSM46621 株は *M. fortuitum* と同定されたと報告している<sup>12)</sup>。われわれの検討では同菌種の DSM44220 株 (*M. fortuitum* subspecies *acetamidolyticum*) は DDH 法と INNO-LiPA 法で *M. fortuitum* と同定できた (データ未掲載)。*M. fortuitum* は ITS シークエンス解析で sqv. I ~ IV が認められており高い多型性を示すため<sup>17)</sup>、迅速発育菌の詳細な亜型解析にはシークエンス解析が重要であると思われた。

遺伝子を用いた同定キットによる判定と併行して従来法やコロニー性状から菌種を鑑別することは非常に重要である。菌株 22 はコバス アンプリコア マイコバクテリウム法、アキュプローブ法、DDH 法で同定不能となった遅発育菌である。INNO-LiPA 法では MYC genus の反応が見られたが、シークエンス解析では *M. interjectum* と判定された。*M. interjectum* は非光発色性の遅発育菌でかつ 16S rDNA 配列が特異的であり、遺伝子を用いた同

定キットによる菌種同定は困難である<sup>18)</sup>。INNO-LiPA 法においても該当プローブが固相化されていないため同菌種の同定はできず、培養でのコロニー性状の観察や生化学的性状試験が鑑別上重要になってくる。同様に菌株 2 と 19 は、3 種類のプローブで *M. kansasii* の亜型を判別可能である INNO-LiPA 法で MKA-3 に発色した。16S rRNA 遺伝子のシークエンス解析から *M. kansasii* sqv. III と VI とに判定されたが研究用試薬アキュプローブ カンサシで陰性となるため *M. kansasii* と判定されなかった。日常検査では光発色試験に及んでいなかったが、改めて実施した結果 *M. kansasii* と同定できた。

コロニーの光発色試験での光発色菌、暗発色菌、非光発色菌の鑑別は純培養を用いるため可変的、主観的であり、熟練を要する。*M. szulgai* は 37℃ で暗発色性、25℃ 培養で光発色性になる。*M. simiae* の光発色性の出現は通常 1 時間の光照射のところ 6~24 時間の光照射が必要であり注意を要する。培養時のコロニー性状の観察において、S 型、R 型、その移行型 (SR 型、RS 型) の性状が継代を重ねることで変化してくることがある。また発育速度の観察は、遅発育菌でも大量の菌を接種すれば 7 日ぐらいで発育は見られる場合はあるし、迅速発育菌での分離培養の時にはコロニーの発生までに時間がかかる場合もある。したがって培養条件により変化する菌の性状を十分考慮して、なるべく初代分離菌について詳細に観察することが望ましい。

INNO-LiPA 法の製造元である INNOGENETICS 社の本社がベルギーに位置するため、欧米の AIDS 患者から分離された *M. genavense*<sup>19)</sup> や、イギリス、スコットランド、ウェールズ、スウェーデン、フランスで分離が増えている *M. malmoense*<sup>20)</sup> といった菌種に対する同定が可能となっている。わが国では現時点でのこれらの菌種による感染症の報告は非常にまれであるため、今後これら稀少菌種の同定の際には大きな威力を発揮すると思われる。一方、最近わが国で分離の報告が増加している遅発育菌の *M. lentiflavum*<sup>14)</sup> が今回シークエンス解析により 9 株確認されたが、対応プローブが配置されていない INNO-LiPA 法では MYC genus にしかバンドの発色が見られず同定に至らなかった。臨床での有用性をより高めるために、わが国の抗酸菌分離状況にあわせた INNO-LiPA 法の仕様改良を切望したい。

今回有用性が認められた INNO-LiPA 法は手技面でも PCR 増幅後約 3 時間で判定可能であり、迅速性が証明された。ハイブリダイゼーションから洗浄、発色までを行う自動化ハイブリダイゼーション装置 Auto-LiPA を利用すれば労力の軽減が可能であると思われる。また INNO-LiPA 法はストリップ上に得られるバンドの有無で判定するため、DDH 法のような読み取り時の測定誤差は少

なくなると考えられる。複数菌混合培養における複数菌種同定も可能であることから、単一分離培養に要する時間や手間が省かれ、迅速に同定結果が得られることが明らかとなった。

抗酸菌における遺伝子検査の進歩は特に目覚ましく、今回用いた検査法も含めて多様な検査キットが市販されている。各種キットの特徴を熟知したうえでそれぞれの施設に適した検査法を選択し、各キット間に生じる結果の乖離や同定不能な株が存在する場合を考慮して菌種同定を行うことが望まれる。またこれらキットは定性用検査であり、検体内の菌量を反映できないため、塗抹・培養検査の結果と同定結果とを鑑みて治療方針を決定することが重要である。特にNTMを分離した場合には非結核性抗酸菌症の診断基準<sup>21) 22)</sup>と合わせて総合的に判断すべきである。

## 文 献

- 1) Ichiyama S, Iinuma Y, Tawada Y, et al.: Evaluation of Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test and Roche PCR-microwell plate hybridization method (AMPLICOR MYCOBACTERIUM) for direct detection of mycobacteria. J Clin Microbiol. 1996; 34: 130-133.
- 2) Abe C, Hirano K, Wada M, et al.: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test. J Clin Microbiol. 1993; 31: 3270-3274.
- 3) Wobeser WL, Krajden M, Conly J, et al.: Evaluation of Roche Amplicor PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1996; 34: 134-139.
- 4) 前倉亮治, 横田総一郎, 小倉 剛: 抗酸菌感染症診断の進歩. 分子呼吸病. 1998; 2: 346-352.
- 5) Lebrun L, Espinasse F, Poveda JD, et al.: Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. J Clin Microbiol. 1992; 30: 2476-2478.
- 6) Reisner BS, Gatson AM, Woods GL: Use of Gen-Probe AccuProbes to identify *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium gordonae* directly from BACTEC TB broth cultures. J Clin Microbiol. 1994; 32: 2995-2998.
- 7) Kusunoki S, Ezaki T, Tamesada M, et al.: Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 *Mycobacterium* species. J Clin Microbiol. 1991; 29: 1596-1603.
- 8) 山崎利雄, 高橋 宏, 中村玲子: マイクロプレートハイブリダイゼーション法による抗酸菌同定法の検討. 結核. 1993; 68: 5-11.
- 9) 斉藤 宏, 長友雅彦, 中島雅信, 他: DNA-DNA Hybridizationを原理とする「DDHマイコバクテリア「極東」」を用いた抗酸菌同定とその同定精度の検討. JARMAM. 1994; 6: 23-28.
- 10) Tortoli E, Mariottini A, Mazzarelli G: Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. J Clin Microbiol. 2003; 41: 4418-4420.
- 11) Miller N, Infante S, Cleary T: Evaluation of the LiPA MYCOBACTERIA assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. J Clin Microbiol. 2000; 38: 1915-1919.
- 12) Padilla E, González V, Manterola JM, et al.: Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA Mycobacteria and GenoType Mycobacterium assays for identification of *Mycobacterium* species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with mycobacterial strains. J Clin Microbiol. 2004; 42: 3083-3088.
- 13) Lebrun L, Weill FX, Lafendi L, et al.: Use of the INNO-LiPA-MYCOBACTERIA assay (version 2) for identification of *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare*-*Mycobacterium scrofulaceum* complex isolates. J Clin Microbiol. 2005; 43: 2567-2574.
- 14) 岩本朋忠, 中永和枝, 石井則久, 他: *Mycobacterium lentiflavum*の菌種内塩基配列変異に関する研究. 結核. 2008; 83: 417-422.
- 15) Springer B, Böttger EC, Kirschner P, et al.: Phylogeny of the *Mycobacterium chelonae*-like organism based on partial sequencing of the 16S rRNA gene and proposal of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1995; 45: 262-267.
- 16) Ballard J, Turenne CY, Wolfe JN, et al.: Molecular characterization of nontuberculous mycobacteria isolated from human cases of disseminated disease in the USA, Thailand, Malawi, and Tanzania. J Gen Appl Microbiol. 2007; 53: 153-157.
- 17) Richter E, Niemann S, Rüscher-Gerdes S, et al.: Identification of *Mycobacterium kansasii* by using a DNA probe (Accu Probe) and molecular techniques. J Clin Microbiol. 1999; 37: 964-970.
- 18) Tortoli E: Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clin Microbiol Rev. 2003; 16: 319-354.
- 19) Bogdan C, Kern P, Richter E, et al.: Systemic infection with *Mycobacterium genavense* following immunosuppressive therapy in a patient who was seronegative for human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis. 1997; 24: 1245-1247.
- 20) The Research Committee of the British Thoracic Society: Pulmonary disease caused by *M. malmoense* in HIV negative patients: 5-yr follow-up of patients receiving standardised treatment. Eur Respir J. 2003; 21: 478-482.
- 21) Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al., on behalf of the ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee: An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2007; 175: 367-416.
- 22) 日本結核病学会非結核性抗酸菌症対策委員会, 日本呼吸器学会感染症・結核学術部会: 肺非結核性抗酸菌症診断に関する指針—2008年. 結核. 2008; 83: 525-526.

## Original Article

EVALUATION OF THE INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2  
FOR MYCOBACTERIAL IDENTIFICATION

<sup>1</sup>Shiomi YOSHIDA, <sup>1</sup>Katsuhiro SUZUKI, <sup>1</sup>Kazunari TSUYUGUCHI, <sup>4</sup>Tomotada IWAMOTO,  
<sup>2</sup>Motohisa TOMITA, <sup>1</sup>Masaji OKADA, and <sup>3</sup>Mitsunori SAKATANI

**Abstract** [Purpose] Evaluation of the INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (the INNO-LiPA assay) for mycobacterial identification.

[Materials and Methods] The laboratory identifications consisting of Cobas Amplicor systems, AccuProbe, and DDH, are commonly used to identify mycobacterial isolates in Japan. We compared the results between the INNO-LiPA assay and the common methods. A total of 122 clinical isolates from NHO Kinki-chuo Chest Medical Center from 1 February to 30 June 2006 were tested.

[Results] There was agreement between the INNO-LiPA assay and the common methods for 112 mycobacterium isolates. The six discordant isolates have showed same results between sequencings and the INNO-LiPA assay. The one *M. fortuitum* isolates was indicated correctness by DDH and the one *M. intracellulare* isolates was recognized by Cobas Amplicor systems and as MAC by AccuProbe MAC. Moreover, discrepant results between sequencings and mycobacterial identifications including the INNO-LiPA assay

were 2 isolates (*M. paraffinicum*, *M. mucogenicum* variant type).

[Conclusion] The INNO-LiPA assay could provide rapid and correct identification results with clear-cut and easy interpretation.

**Key words**: Mycobacteria, INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2, Identification, 16S rRNA gene, ITS sequencing

<sup>1</sup>Clinical Research Center, <sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory, <sup>3</sup>Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization (NHO) Kinki-chuo Chest Medical Center, <sup>4</sup>Kobe Institute of Health

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

## Comparison of rifabutin susceptibility and *rpoB* mutations in multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by DNA sequencing and the line probe assay

Shiomi Yoshida · Katsuhiko Suzuki ·  
Tomotada Iwamoto · Kazunari Tsuyuguchi ·  
Motohisa Tomita · Masaji Okada · Mitsunori Sakatani

Received: 4 November 2009 / Accepted: 1 March 2010 / Published online: 31 March 2010  
© Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases 2010

**Abstract** We compared rifabutin susceptibility and *rpoB* mutations in 98 multi-drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) by DNA sequencing and with a line probe assay using the commercially available INNO-LiPA Rif. TB kit (the LiPA). Our results indicated that rifabutin continues to remain active against MDR-TB strains harboring certain genetic alterations and also that the LiPA might be useful in identifying MDR-TB strains susceptible to rifabutin.

**Keywords** Tuberculosis · Drug resistance · Rifabutin · *rpoB* · Line probe assay

The recent global expansion of multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) poses a serious threat to human health. Numerous previous studies have shown that the majority of rifampicin-resistant isolates of *M. tuberculosis* are also isoniazid resistant [1]. The

detection of rifampicin resistance therefore has the potential benefit of simultaneously detecting MDR-TB [1, 2]. One of the commercial kits used to determine drug resistance is the INNO-LiPA Rif. TB kit (the LiPA; Innogenetics, Ghent, Belgium). This assay is an excellent tool for detecting mutations in hot-spot regions of *rpoB*, a gene that encodes a subunit of RNA polymerase. Such mutations occur in up to 95% of rifampicin-resistant strains [2].

Rifabutin is a semisynthetic spiroperidyl derivative of rifampicin, which is more active than rifampicin itself against *M. tuberculosis* in immunocompromised patients [3]. Rifabutin is also useful as an alternative to rifampicin when serious side effects occur during tuberculosis treatment [4]. Moreover, the minimum inhibitory concentration (MIC) of rifabutin in rifampicin-resistant strains of *M. tuberculosis* carrying *rpoB* mutations varies depending on the specific site of the mutation in the *rpoB* gene [5–10]. Rifabutin might therefore be active against some MDR-TB strains. However, rifabutin susceptibility testing using the time-consuming proportional method on Middlebrook 7H10 medium or by 7H9 microdilution could postpone the effective treatment of patients infected with MDR-TB.

This study aimed to determine the MICs of rifampicin and rifabutin for MDR-TB isolates with known *rpoB* sequences and also to assess results of the LiPA, thereby helping to establish whether this test enables detection of rifabutin susceptibility in MDR-TB strains.

A total of 128 *M. tuberculosis* strains retrieved from a culture collection of the Kinki-chuo Chest Medical Center were tested by the mycobacterial growth-indicator tube–aspartate aminotransferase (MGIT-AST) method (Becton–Dickinson and Company, Fukushima, Japan), and WelPack method (Nihon BCG Inc, Tokyo, Japan) that was established by the egg-based Ogawa medium in commercial susceptibility test systems. Ninety-eight of these strains

S. Yoshida (✉) · K. Suzuki · K. Tsuyuguchi · M. Okada  
Clinical Research Center, National Hospital Organization,  
Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho,  
Sakai 591-8555, Japan  
e-mail: dustin@kch.hosp.go.jp

M. Tomita  
Department of Clinical Microbiology, National Hospital  
Organization, Kinki-chuo Chest Medical Center, Sakai, Japan

T. Iwamoto  
Department of Microbiology, Kobe Institute of Health,  
4-6 Minatojima-nakamachi, Chuo-ku, Kobe 650-0046, Japan

M. Sakatani  
Department of Respiratory Medicine, National Hospital  
Organization, Kinki-chuo Chest Medical Center,  
1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai 591-8555, Japan

were considered to be resistant to rifampicin as determined by these media. Thirty pan-drug-sensitive (DS) strains were collected between 1 and 31 August 2008, and 98 MDR strains were collected between 1 January 2001 and 31 December 2008. All patients from whom the strains were derived were negative for both human immunodeficiency virus (HIV)-1 and HIV-2. With the exception of one MDR patient, these patients represent all of the DS- and MDR-TB patients treated in this hospital during the strain collection periods.

The MICs for these strains were determined by the validation protocol, performing the commercial and the in-house-prepared microdilution method in parallel for a series of these strains. We elected to use the BrothMIC MTB-1 (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co. Ltd., Tokyo, Japan) and a similar system for slowly growing mycobacteria by using 7H9 broth [11]. BrothMIC MTB-1 susceptibility test system with a shorter incubation period has been previously demonstrated to determine MICs that correlate with those obtained from the standardized agar proportion method. According to the manufacturer's instructions, the proposed breakpoints for rifampicin are  $\leq 0.06$   $\mu\text{g/ml}$  (susceptible),  $0.125$ – $2$   $\mu\text{g/ml}$  (intermediate), and  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$  (resistant). For the microdilution method using 7H9 broth, 100  $\mu\text{l}$  of serial twofold dilutions of rifampicin or rifabutin were dispensed into each well. The final concentrations of the test drugs ranged from 0.015 to 256  $\mu\text{g/ml}$ . All microdilution plates were incubated at 37°C in plastic bags to increase carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) and were read after 7, 14, and 21 days by looking for macroscopic growth with an indirect light source. MICs were the lowest dilutions exhibiting no growth. Quality control testing using *M. tuberculosis* H37Rv was performed once each testing. Each microdilution plate included basal medium without antimicrobial agents to assess viability of the test organisms. Each microdilution testing was performed in duplicate on different days.

The MDR-TB strains were analyzed for the presence of mutations in the rifampicin-resistance-determining region (RRDR). A set of primers described by Kim et al. [12], MF (5'-CGACCACTTCGGCAACCG) and MR (5'-TCGATCGGGCACATCCGG), were used to amplify a 342-bp fragment of the *rpoB* gene containing the 81-bp RRDR. The polymerase chain reaction (PCR) product was sequenced using an automated DNA sequencer (ABI Genetic Analyzer 310, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with MF and MR primers. The LiPA we employed was used in accordance with the manufacturer's instructions. This kit comprises the *M. tuberculosis* complex-specific probe, five overlapping sensitive probes (wild-type S: 19–23 bases long), and four resistance probes (R-type) from a region of the *rpoB* gene encoding amino acids 509–534. The lack of reactivities of an amplified

fragment with the wild-type S probes (probes S1 through S5) was used to detect mutations that lead to rifampicin resistance. Furthermore, R-type probes were specifically designed to hybridize to the sequences of the four most frequently observed mutations: R2 (Asp-516-Val), R4a (His-526-Tyr), R4b (His-526-Asp), and R5 (Ser-531-Leu). When all the wild-type S probes gave a positive signal and all the R-type probes reacted negatively (wild-type profile), the *M. tuberculosis* isolate was considered susceptible to rifampicin. When at least one negative signal was obtained with the wild-type S probes, the isolate was considered rifampicin resistant ( $\Delta\text{S}$  profiles). When the resistance to rifampicin was due to one of the four most frequently observed mutations described above, a positive reaction was obtained with one of the four R-type probes and was always accompanied by a negative reaction with the corresponding wild-type S probe (R profiles). We used *M. tuberculosis* strain H37RV as a positive control.

The ranges of the MICs in DS-TB strains were  $\leq 0.03$   $\mu\text{g/ml}$  for rifampicin and  $\leq 0.015$   $\mu\text{g/ml}$  for rifabutin. The corresponding ranges of the MICs in MDR-TB strains were 0.5 to  $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$  and  $\leq 0.015$  to  $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$ , respectively. Whereas rifabutin MICs for 78 of the 98 MDR-TB strains ranged between 0.5 and  $\geq 256$   $\mu\text{g/ml}$ , which were threefold lower than or equal to those of rifampicin, the other 20 MDR-TB strains had rifabutin MICs ranging between  $\leq 0.015$  and  $\leq 0.25$   $\mu\text{g/ml}$ , which were 4- to 15-fold lower than those of rifampicin. As shown in Table 1, our study revealed 20 mutations in the *rpoB* gene. Single-point mutation at codon 513, 525, 526, 531, 533, or 572, which was detected in 72 MDR-TB strains, influenced susceptibility to rifabutin. We also demonstrated that novel mutations such as two strains with double-point mutations (Asp516Ala and Leu533Pro, or Ser512Ile and His526Pro), one strain with an insertion (at codon 525), and one strain with an His526Ser mutation showed rifabutin resistance. In contrast, 20 (20.4%) of the MDR-TB strains that had single-point mutation at codon 511, 516, or 522 and double-point mutation (Asp516Gln and Ser522Leu) were susceptible to rifabutin (MIC,  $< 0.5$   $\mu\text{g/ml}$ ). The observations that some rifampicin-resistant strains remained susceptible to rifabutin suggest that *rpoB* mutation position and type of amino acid change influence rifabutin susceptibility.

In this study, four MDR-TB strains with a wild-type profile by the LiPA exhibited rifabutin resistance as well. Moreover, 72 strains exhibiting R4a, R4b, R5,  $\Delta\text{S}4$ ,  $\Delta\text{S}5$ ,  $\Delta\text{S}1 + \Delta\text{S}4$ , or  $\Delta\text{S}2 + \Delta\text{S}4 + \text{R}5$  profiles were also resistant to rifabutin. Conversely, 19 strains that exhibited R2 (one of the four most frequently observed mutations),  $\Delta\text{S}3$ , or  $\Delta\text{S}2 + \Delta\text{S}3$  profiles were characterized by low rifabutin MICs. The susceptibility of rifabutin conflicted among the remaining three strains that exhibited  $\Delta\text{S}1$  profile. In detail, one strain had a mutation at codon 511

**Table 1** Comparison of *rpoB* genotype, susceptibility of rifampicin and rifabutin, and the LiPA profiles

Isolate phenotype and mutation position <sup>a</sup>	Isolates ( <i>n</i> )	MIC (μg/ml)		LiPA
		Rifampicin	Rifabutin	
DS-TB				
Wild type	30	≤0.03 to 0.03	≤0.015	WT
MDR-TB <sup>b</sup>				
511Leu → Pro	1	0.5	0.03	ΔS1
513Gln → Lys	2	8, 16	4, 16	ΔS1
516Asp → Val	17	4 to ≥256	0.015 to 0.25	R2
522Ser → Leu	1	2	0.06	ΔS3
525ACG insertion	1	32	32	WT <sup>c</sup>
526His → Tyr	2	32, 64	8, 64	R4a
526His → Asp	3	64, 128, 128	16, 64, 128	R4b
526His → Ser	3	2, 4, 64	2, 4, 32	ΔS4
526His → Arg	1	32	32	ΔS4
526His → Pro	2	8, 64	4, 32	ΔS4
526His → Leu	1	256	64	ΔS4
526His → Cys	1	4	1	ΔS4
526His → Arg, 529Arg → Gln	1	64	64	ΔS4
531Ser → Leu	54	0.5 to ≥256	0.5 to ≥256	R5
533Leu → Pro	1	32	32	ΔS5
512Ser → Ile, 526His → Pro	1	≥256	≥256	ΔS1 + ΔS4
516Asp → Glu, 522Ser → Leu	1	128	0.25	ΔS2 + ΔS3
516Asp → Ala, 533Leu → Pro	1	128	64	ΔS5 <sup>c</sup>
Mixed peak in 516 (GAC (Asp) → GTC (Val)), 526 (CAC (His) → CAA (His), 530 (CTG (Leu) → ATG (Met)), and 531 (TCG (Ser) →, TTC (Leu))	1	256	256	ΔS2 + ΔS4 + R5 <sup>c</sup>
572Ile → Phe	1	1	1	WT
Non-RRDR	2	16, 128	2, 128	WT

WT wild-type S profile, DS-TB drug-sensitive tuberculosis, MDR-TB multi-drug-resistant tuberculosis

<sup>a</sup> Numbers correspond to *Escherichia coli* RNA polymerase amino acid positions

<sup>b</sup> Resistant to rifampicin at 1.0 μg/ml by the Clinical and Laboratory Standards Institute method of proportion in 7H10 agar and mycobacterial growth-indicator tube–aspartate aminotransferase (MGIT-AST) method or 40 μg/ml by WelPack method

<sup>c</sup> The LiPA also did not reveal the correct type of mutation

and appeared to have a low rifabutin MIC, but the remaining two strains, at codon 513, were characterized by high rifabutin MICs. Thus, except for ΔS1, profiles of the LiPA could predict rifabutin susceptibility rather faithfully (Table 1).

According to previous studies, rifabutin MICs against rifampicin-susceptible strains were ≤0.06 μg/ml [13], and all strains susceptible to 1 μg/ml of rifampicin and 12% of the strains resistant to 10 μg/ml of rifampicin were susceptible to 0.5 μg/ml of rifabutin [14]. In the study by Uzun et al. [15], all rifampicin-susceptible strains and 12% of rifampicin-resistant strains were also susceptible to rifabutin (MIC, ≤1 μg/ml). All 30 DS-TB strains and 20 of 98 MDR-TB strains were susceptible to rifabutin (MIC, <0.5 μg/ml) in our study. Clinical outcome regarding the efficacy of rifabutin therapy for isolates of MDR-TB with the MICs of ≤0.5 μg/ml has not yet been obtained, but the proposed critical concentration for rifabutin (≤0.5 μg/ml) in this study was the same as that recommended by The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) using

agar-plate testing. However, the relevant critical concentration of rifabutin should be determined by future clinical outcome study.

Our data indicated that all MDR-TB strains with an R2 profile, which was associated with a specific point mutation (Asp516Val), were almost always identified as rifabutin susceptible. The LiPA may offer improvement in the management of MDR-TB, as these vulnerable patients can commence treatment with rifabutin before the strain's isolation. This study further confirmed that rifabutin remains active against MDR-TB strains harboring certain genetic alterations. We also indicate that the LiPA is useful for rapid detection of strains susceptible to rifabutin in MDR-TB before examining susceptibility testing.

**Acknowledgments** This work was supported by a Health and Labour Science Research Grant for Research on Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, and a Grant for a National Hospital Organization respiratory network study "Study of Respiratory Diseases (Tuberculosis, Lung Cancer, Diffuse Lung Diseases and Respiratory

Insufficiency) using a Network of 54 Hospitals of National Chest Diseases in Japan”.

**Conflict of interest statement** None of the authors has any financial interest or financial conflict with the subject matter or materials discussed in this manuscript.

## References

1. Drobniewski FA, Wilson SM. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*—a molecular story. *J Med Microbiol.* 1998;47:189–96.
2. Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijls W, Jannes G, de Rijk P, et al. Evaluation of the INNO-LiPA Rif.TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:2093–8.
3. Davies G, Cerri S, Richel L. Rifabutin for treating pulmonary tuberculosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 17: (4) CD005159.
4. Luna-Herrera J, Reddy MV, Gangadharam PR. In vitro and intracellular activity of rifabutin on drug-susceptible and multiple drug-resistant (MDR) tubercle bacilli. *J Antimicrob Chemother.* 1995;36:355–63.
5. Bodmer T, Zürcher G, Imboden P, Telenti A. Mutation position and type of substitution in the  $\beta$ -subunit of the RNA polymerase influence in vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother.* 1995;35:345–8.
6. Cavusoglu C, Hilmioglu S, Guneri S, Bilgic A. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4435–8.
7. Saribaş Z, Kocagöz T, Alp A, Günalp A. Rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates by heteroduplex analysis and determination of rifampicin cross-resistance in rifampin-resistant isolates. *J Clin Microbiol.* 2003;41:816–8.
8. Williams DL, Spring L, Collins L, Miller LP, Heifets LB, Gangadharam PRJ, et al. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifampicin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:1853–7.
9. Yang B, Koga H, Ohno H, Ogawa K, Fukuda M, Hirata Y, et al. Relationship between antimycobacterial activities of rifampicin, rifabutin and KRM-1648 and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother.* 1998;42:621–8.
10. Cavusoglu C, Karaca-Derici Y, Bilgic A. In vitro activity of rifabutin against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10:662–5.
11. Wallace RJ Jr, Nash DR, Steele LC, Steingrube V. Susceptibility testing of slowly growing mycobacteria by a microdilution MIC method with 7H9 broth. *J Clin Microbiol.* 1986;24:976–81.
12. Kim B-J, Lee S-H, Lyu M-A, Kim S-J, Bai G-H, Kim S-J, et al. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol.* 1999;37:1714–20.
13. Heifets LB, Lindholm-Levy PJ, Iseman MD. Rifabutine: minimal inhibitory and bactericidal concentrations for *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis.* 1988;137:719–21.
14. Heifets LB, Iseman MD. Determination of in vitro susceptibility of mycobacteria to ansamycin. *Am Rev Respir Dis.* 1985;132:710–1.
15. Uzun M, Erturan Z, Anđ O. Investigation of cross-resistance between rifampin and rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002;6:164–5.

## ミニ特集「免疫と結核」

キラー T細胞・granulysin による結核免疫とワクチン  
(HSP65+IL-12 DNA ワクチン等) 開発

岡田 全司 喜多 洋子

**要旨:** 1998年, 米国 CDC および 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。われわれは BCG ワクチンをはるかに凌駕する 10,000 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/Hsp65+IL-12 DNA ワクチン) やリコンビナント BCG ワクチンを開発した。このワクチンはマウスで長期にわたり, 結核菌由来の HSP65 蛋白抗原および結核菌抗原に対して特異的な CD8 陽性キラー T 細胞の分化を増強した。一方, BCG ワクチンはキラー T 細胞の分化をほとんど誘導しなかった。さらに, 結核治療ワクチン効果も示した。多剤耐性結核のみならず超薬剤耐性結核に対しても治療効果 (延命効果・結核菌数減少) 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, HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンの強力な有効性を得た。カニクイザルにワクチン接種後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。プライム-ブースター法を用い, この DNA ワクチン投与群は 100% の生存率を示した。一方, BCG 投与群は 33% の生存率であった。さらに, サルの系で世界に先駆けて結核治療ワクチン効果を得た。この DNA ワクチン治療群では 100% の生存を示したが, 生食投与群では 60% の生存率であった。一方, キラー T 細胞から産生される結核菌殺傷タンパク granulysin は結核治療ワクチン効果を発揮した。さらに granulysin transgenic mice は結核菌殺傷効果を発揮した。これらについての概要を述べる。

**キーワード:** キラー T 細胞, グラニューライシン, 新規結核ワクチン

## I. はじめに

1998 年, 米国 CDC は結核に対し, 政府・学術機関・企業が一体となって新世代の結核ワクチン開発の必要性を強く主張する発表をした。また, ACET は国民の健康に対する大敵である結核撲滅のためには, BCG に代わる有効なワクチンが必要であることを示した。しかしながら, BCG に代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない<sup>1)~4)</sup>。われわれは BCG よりもはるかに強力な DNA ワクチンやリコンビナント BCG ワクチンの開発に成功した (Fig. 1)<sup>5)~8)</sup>。したがって, 新しい抗結核ワクチン開発と結核感染免疫におけるキラー T 細胞

および granulysin (キラー T 細胞より産生される結核菌殺傷タンパク) の機能解明についても述べる。

## II. キラー T 細胞と結核

CD8 あるいは  $\beta_2$  ミクログロブリン遺伝子や TAP 遺伝子ノックアウトマウスでは抗結核免疫が十分でなく, 動物は死亡する。すなわち, 結核における CD8<sup>+</sup>T 細胞はマウスで抗結核免疫に重要である (Fig. 2)<sup>1) 3) 4) 8)~13)</sup>。

キラー T 細胞の一つの役割として IFN- $\gamma$  を分泌して抗結核免疫に寄与するが, 次に述べる結核感染 M $\phi$  を殺して, 結核菌の増殖の場をなくし結核菌を殺す役割のほうに重要である。CD8<sup>+</sup>T 細胞が結核菌で感染した M $\phi$

を Fas-independent, granule-dependent の機構で溶かし、最終的には結核菌を殺すことが報告されている<sup>9)</sup>。この T 細胞は CD1-restricted でミコール酸, LAM, phosphatidyl inositol mannoside, glucose monomycolate, isoprenoid glycolipid (Cd1c と結合) 等の結核菌 lipid と lipoglycan を認識する。このキラー T の顆粒内の蛋白である granulysin は直接細胞外の結核菌を殺す。

一方, キラー T の TRAIL とパーフォリンが抗結核免

疫に重要である興味深い結果を得た (Fig. 2)。

### III. granulysin と結核

キラー T の顆粒内の蛋白である granulysin は直接細胞外の結核菌を殺す。この機序は結核菌細胞膜を不完全な状態にすることによる。granulysin は病原細菌, 真菌, 寄生虫の生存を減少させる。さらにパーフォリンとの共存下で Mφ 内の結核菌も殺すと考えられている。これ

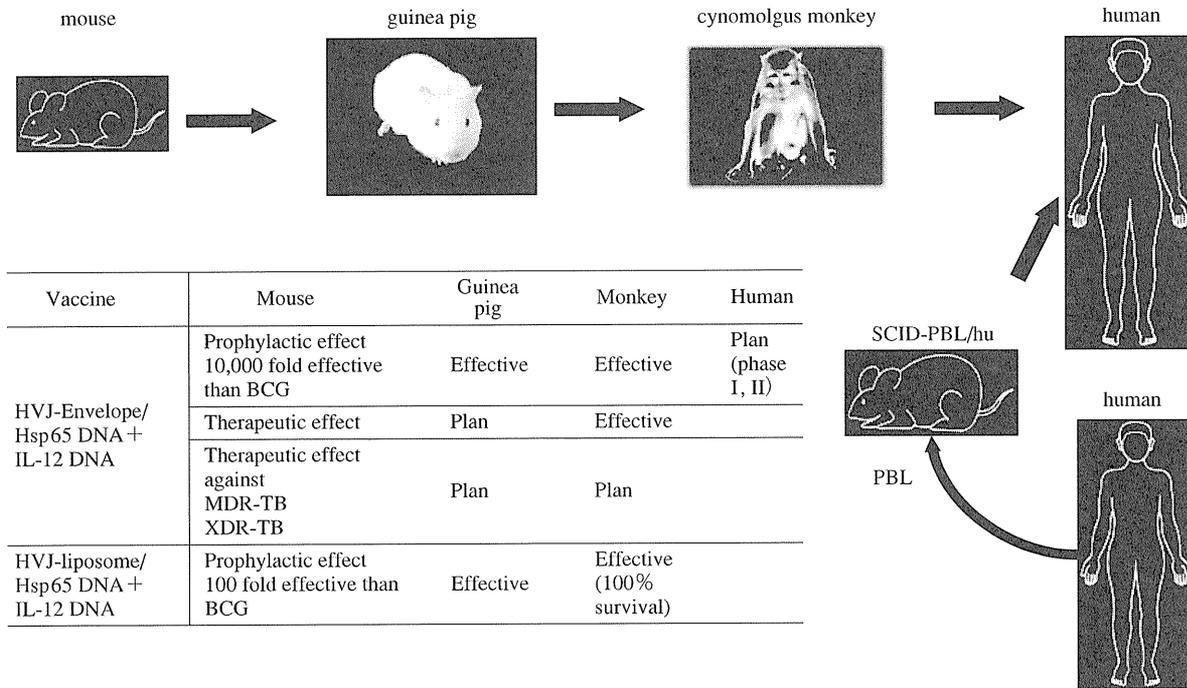


Fig. 1 The development of novel vaccines for *M. tuberculosis* using animal models

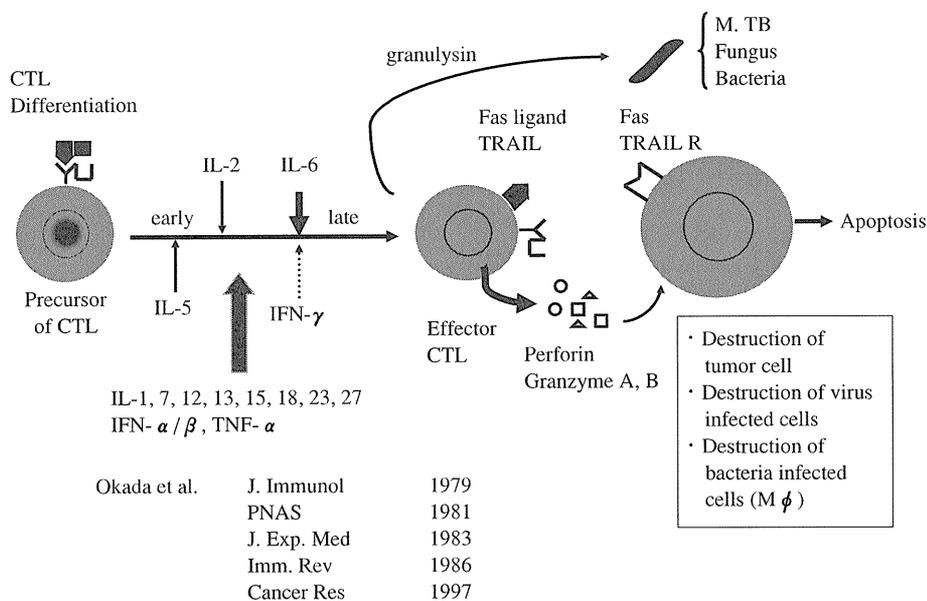


Fig. 2 Induction of cytotoxic T cells and killing mechanism

**Table 1** Induction of decrease in TB number *in vivo* and CTL differentiation by 15K Granulysin and 9K Granulysin

Two kinds of Granulysin Function	Decrease in TB number	Induction of CTL against TB	Proliferation of T cells against TB	IFN- $\gamma$ production	Granulysin expression in CD8 <sup>+</sup> T	
					Patients with MDR-TB	Patients with Drug-sensitive TB
15K Granulysin	++ (strong augmentation)	++	++	++	↓↓	↓
9K Granulysin	++	+ (augmentation)	+	++	N.D	N.D

++; strong augmentation, +; augmentation  
 ↓↓; strong suppression, ↓; suppression

はパーフォリンより M $\phi$  に穴が開き、M $\phi$  内の結核菌に直接 granulysin が作用するためと思われる。われわれは結核患者、特に多剤耐性結核患者ではキラー T リンパ球の mRNA の発現および蛋白の発現が低下していることを明らかにした<sup>14)16)</sup>。すなわち、われわれはキラー T 細胞の granulysin (分子量 9000) 産生低下が多剤耐性結核発症と大きな関連があるのではないかと考えている。

一方、granulysin がキラー T 分化因子の一つであることを発見し、マウスで結核治療効果を示した(特許取得)。granulysin 遺伝子導入マウスを作製した。

#### IV. 新しい結核ワクチン (HSP 65 DNA+IL-12 DNA ワクチン, granulysin ワクチン等) 開発

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

(1) DNA ワクチン: BCG ワクチンより 1 万倍強力な結核予防ワクチン

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 Hsp65 DNA+IL-12 DNA (HVJ-エンベロープベクター) のワクチンは BCG ワクチンよりも 1 万倍強力な結核予防ワクチンであることを世界に先駆けて明らかにした。

この HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンでマウスを免疫して結核菌を投与すると、マウス肺の結核菌数が BCG ワクチン投与の 1 万分の 1 以下となった。これを 1 万倍強力という。

さらに、結核菌に対する CD8 陽性キラー T 細胞の分化誘導を増強した<sup>4)</sup>。この強力なワクチン効果とキラー T 活性が相関した。また Th1 細胞の分化誘導、IFN- $\gamma$  産生の増強をこのワクチンが発揮することも明らかにした。

この新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され、WHO STOP TB Partnership および WHO STOP TB WGND (Working Group on New Drugs) に選出された。

(2) リコンビナント BCG ワクチン

**Table 2** Therapeutic efficacy against tuberculosis by 15K granulysin Transgenic mice and 9K granulysin Transgenic mice

Tg mouse	CFU of TB (log)
15K Granulysin Tg mouse	5.3 $\pm$ 0.1*
wild type C57BL/6 mouse	5.9 $\pm$ 0.2
9K Granulysin Tg mouse	5.8 $\pm$ 0.4*
wild type C57BL/6 mouse	6.7 $\pm$ 0.2
Secreted 9K Granulysin Tg mouse	5.7 $\pm$ 0.6*
wild type C57BL/6 mouse	6.7 $\pm$ 0.2

CFU; Colony Forming Unit

\*; significant (P<0.05) by Student's Test

BCG 東京菌に、種々の遺伝子を導入しリコンビナント BCG を作製した。われわれは Ag85A+Ag85B+MPB 51 リコンビナント BCG は BCG よりも強力なワクチンであることを明らかにした<sup>5)</sup>。

さらに、サブユニットワクチンでサルレベルで強力な予防効果が得られた Mt672f 融合タンパク質の DNA を導入した 72f リコンビナント BCG の作製に成功した。この 72f rBCG ワクチンはサルでも結核予防効果を示した (Fig. 1)<sup>6)</sup>。

(3) granulysin ワクチン (Table 1, Table 2)

キラー T 細胞は結核感染防御に重要な働きをする<sup>3)4)</sup> (Fig. 2)。granulysin 蛋白発現を多剤耐性結核や糖尿病患者の難治性結核の PBL の培養上清中の活性で検討した。その結果 IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-2 のキラー T 細胞分化因子のみでなく granulysin (15K Granulysin) の産生低下を認められた<sup>14)15)</sup>。

さらにわれわれは 15K Granulysin が CD8<sup>+</sup> キラー T 細胞から直接分泌され、ヒトの M $\phi$  に直接入り、M $\phi$  内の結核菌を殺傷することを明らかにした<sup>14)15)</sup>。薬剤感受性結核患者 PBL 中の CD8 陽性 T 細胞の 15K Granulysin 蛋白発現と mRNA の発現は健常人よりも有意に低下していた<sup>14)15)</sup> (Table 1)。さらに、多剤耐性結核患者 PBL 中の CD8 陽性 T 細胞の 15K Granulysin 蛋白発現と mRNA の発現は、有意差をもって、薬剤感受性結核患者のそれらよりも低下していた (Table 1)。また、多剤耐性結核患者の PBL を PHA-P, ConA, アロ抗原 (CESS), PPD 抗

原で刺激すると、15K Granulysin の培養上清中への分泌が低下していることを明らかにした (Table 1)。

15K Granulysin の遺伝子導入マウスと 9K granulysin 遺伝子導入マウスをそれぞれ作製し、*in vivo* の抗結核作用を解析した。Table 2 に示したごとく、15K Granulysin transgenic (Tg) マウスの結核菌感染 4 週間後の肺結核菌数 (CFU) は wild type マウスに比較して低下が認められ

た。また 9K Granulysin Tg マウスの肺内結核菌数も wild type マウスに比較して低下していた (Table 2)。さらに、これらの 2 つの Tg マウス (15K Granulysin Tg と 9K Granulysin Tg) は *in vivo* のキラー T 誘導 (結核に対する) の増強、結核に対する T 細胞増殖反応の増強や IFN- $\gamma$  産生の増強等を示した。これらの生体内における 15K Granulysin と 9K Granulysin の結核感染に対する効果は世

Table 3

A. Priming, Pre-Exposure	
1. Phase I: 現在—2008 年	特徴
a. <b>rBCG30</b>	リコンビナント 85B BCG
b. <b>rBCG30<math>\Delta</math>ureC: Hly</b> (VPM1002)	リコンビナント listeriolyisin BCG
c. AERAS-407	リコンビナント perfringiolysin
d. rBCG30ARMF, rBCG Mtb B30, rBCG h IFN $\gamma$	リコンビナント 85B BCG
e. Nas L3/Htk BCG	鼻粘膜ワクチン/heat killed whole BCG コペンハーゲン株
f. mc <sup>2</sup> 6220, mc <sup>2</sup> 6221, mc <sup>2</sup> 6222, mc <sup>2</sup> 6231	nor-replicating, <i>M. tuberculosis</i> strain ( $\Delta$ lys A $\Delta$ pan CD)
g. mc <sup>2</sup> 5059	replicating pro-apoptotic <i>M. bovis</i> BCG 株 ( $\Delta$ nuoG)
2. Phase I 2009 or Later	メチル化 21-K Da 蛋白
a. HBHA (heparin-binding haemagglutinin)	弱毒化ヒト結核菌 (virulence gene の pho P の不活性)
b. Attenuated Live Vaccine based on Phop	anti-apoptotic 酵素活性を減弱
c. paBCG (pro-apoptotic BCG)	
B. Boosting, Pre-Exposure	
1. Phase I: 現在—2008 年	特徴
a. <b>MVA85A</b>	リコンビナント MVA (Ag85A を発現した)
b. <b>M72</b>	Mtb32 + Mtb29 の fusion 蛋白
c. AERAS-402	Replication-incompetent adenovirus 35 vector expressing <i>M. tuberculosis</i> antigens Ag85A,
d. SSI Hybrid-1	Ag85B, and TB 10.4.
e. <b>SSI HyVac4/AERAS-404</b>	fusion 蛋白 (Ag85B-ESAT-6)
f. AERAS-405	fusion 蛋白 (Ag85B-TB10.4)
g. r30	Shigella-delivered recombinant double-stranded RNA nucleocapsid (Ag85A,
h. Nas L3/Htk BCG	85B, Rv3407, latency antigen)
2. Phase I: 2009 or Later	リコンビナント Ag85B 蛋白
a. Hsp C <sup>TM</sup> TB Vaccine	Heat shock protein antigen complexes (Hsp Cs)
b. HBHA (heparin-binding haemagglutinin)	Nasal vaccine/Man capped
c. NasL3/AM85B conjugate	Arabinomannan oligosaccharide
d. PP1, PP2, PP3	BCG boosting
f. AC <sub>2</sub> SGL Diacylated Sulfoglycolipids	AC <sub>2</sub> SGL Mycobacterial lipids
g. <b>HVJ-liposome/Hsp65 DNA + IL-12 DNA</b>	M.Okada, 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
C. Post Exposure — Immunotherapy	
1. Phase I: 現在—2008 年	特徴
a. Mycobacterium vaccae Heat-Killed	Fragmented <i>M. tuberculosis</i> cells
b. MVA85A	naked hsp 65 DNA vaccine
c. RUTI	Chimeric ESAT6/Ag 85A DNA ワクチン
d. Nas L3/Htk BCG	Recombinant BCG overexpressing chimeric ESAT6/Ag85A fusion protein
2. Phase I: 2009 or Later	Recombinant Sendai virus overexpressing chimeric ESAT6/Ag85A fusion protein
a. NasL3/AM85B conjugate	Epitope-based DNA-prime/peptide-boost vaccine. (liposome と CpG アジュバント)
b. hspDNA vaccine	
c. HG856A	
d. HBHA (heparin-binding haemagglutinin)	
e. HG856-BCG	
f. HG856-SeV	
g. TB Vax	
h. F36, F727	
i. Mycobacterium vaccae Heat-Killed	
j. AC <sub>2</sub> SGL Diacylated Sulfoglycolipid	

界に先駆けての発見である。実際リコンビナント granulysin ワクチンや granulysin DNA ワクチンはマウスで結核治療効果を示した<sup>14)15)</sup>。したがって granulysin ワクチン治療は MDR-TB や XDR-TB に対しきわめて有用な治療法となるであろう。

V. 新しい結核ワクチンの開発状況 (臨床応用)

(1) Stop TB Partnership

Stop TB Partnership (WHO) は2008年に現在進行中で、しかも臨床応用に有望な新しい結核ワクチン開発のリストを発表した。

われわれの HVJ/Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチンも

候補の一つとしてその中に推奨されている (Table 3)。表内で太字で示したワクチンが評価されている。

2006~2015年 Global Plan to Stop TB として新しい有効な結核ワクチン開発, 2050年までに結核撲滅, が WHO の目標である。

(2) 結核ワクチンの応用の可能性

①新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル (cynomolgus monkey, 最もヒトの肺結核に近いモデル, Nature Medicine 2, 430, 1996参照) を用い BCG よりもはるかに強力な予防ワクチン効果 (生存率, 血沈, 体重, 肺の組織) を示すワクチン2種を開発した<sup>6)8)</sup>。すなわち, 現在最も有力なものとしてHVJリ

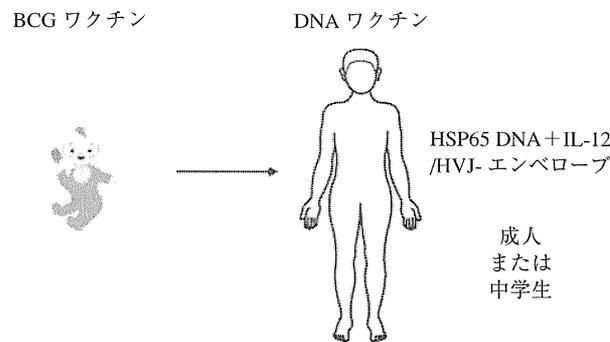


Fig. 3 新しい結核予防ワクチン (案) (DNA ワクチン)

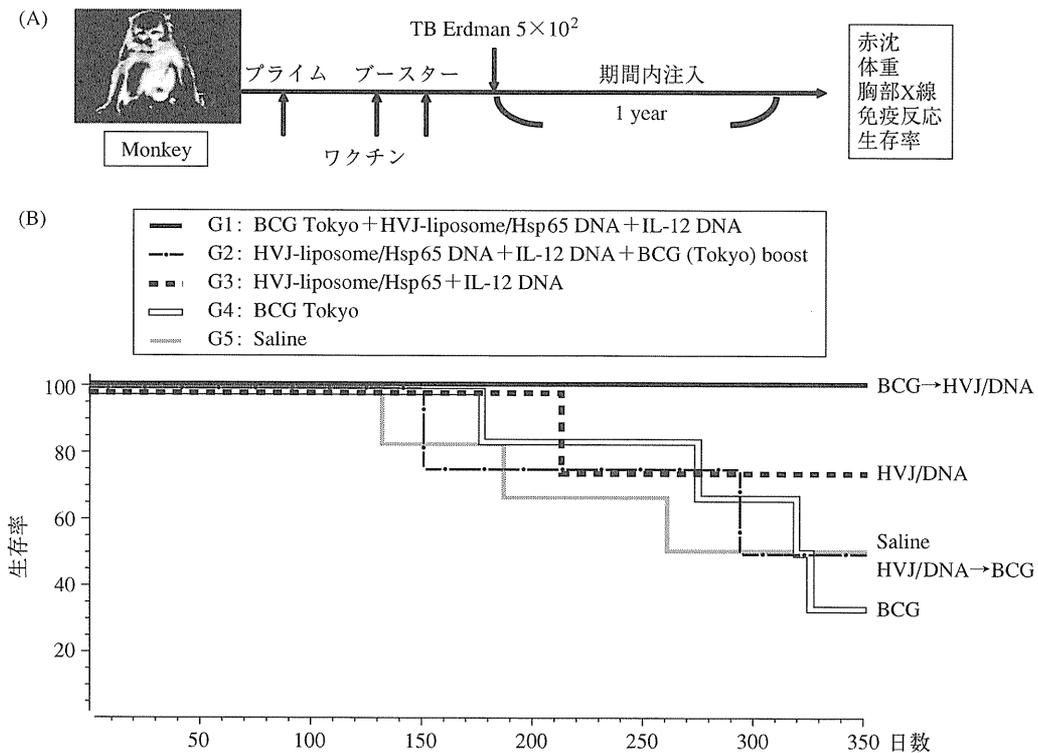


Fig. 4 ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いた HVJ-リポソーム/HSP-65 DNA + IL12 DNA ワクチンの結核予防効果

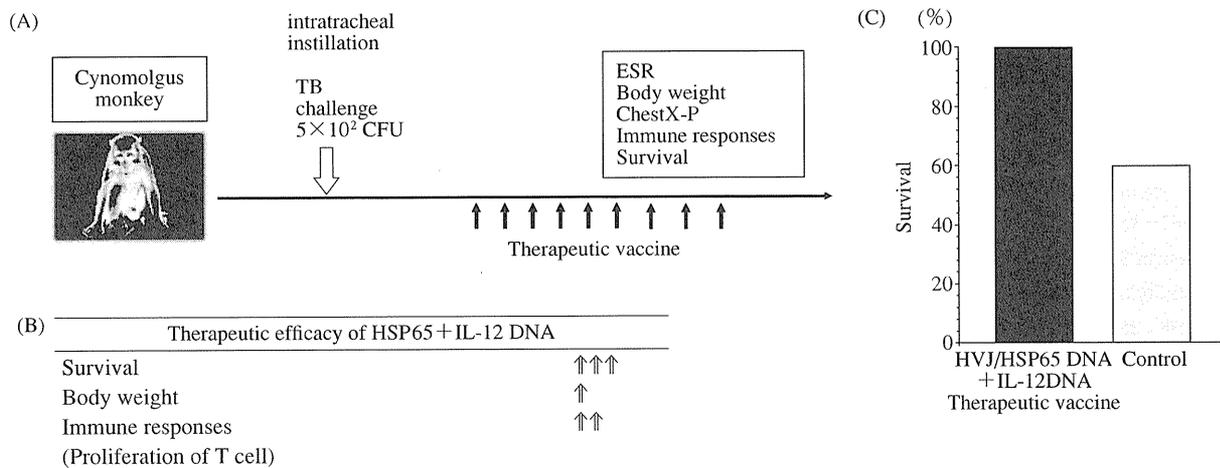


Fig. 5 Therapeutic effect of HVJ-Envelope/HSP65 DNA + IL-12DNA vaccine on TB-infected cynomolgus monkeys

ポソーム/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンおよび, r72f BCG ワクチンがあげられる。Ag85B-ESAT-6 融合タンパク質 (Anderson 博士ら) も報告されているが, モルモット, サルでは効果は不明である。一方 Huygen の Ag85A DNA ワクチンはマウス・モルモットで有効であったがサルの結核感染予防に対し有効でなかったという。72f 融合タンパクサブユニットワクチン<sup>16)</sup>, ワクシニアウイルスに 85A DNA を導入したワクチンは第 II 相, r85B BCG (Horowitz ら) は第 I 相 clinical trial となっている<sup>16)</sup>。Dr. A. Hill らのワクシニアウイルス-85A DNA ワクチンは, アフリカでの第 I 相 clinical trial では, 85A DNA 蛋白に対する免疫応答増強が認められた<sup>17)</sup>。

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

さらに BCG ワクチンをプライムし, 新しいワクチンをブースターする方法を用いた。サルでこのプライミング-ブースター法で 100% の生存を示した<sup>3)</sup> (Fig. 2)。一方, BCG ワクチン単独投与群は 33% の生存率であった<sup>3)</sup>。このように, ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いた実験系で, 強力な新しい結核ワクチンをわれわれは世界に先駆けて開発した。すなわち, 本邦では乳幼児に BCG 接種が義務づけられていることにより, プライミングワクチンとして BCG ワクチンを用い, 成人ワクチン (中学生, 成人, 老人) としてこの DNA ワクチンをブースターワクチンとして用いる結核ワクチンの臨床応用案である (Fig. 3)。

#### ③ 治療ワクチン (Fig. 4, Fig. 5)

感染したカニクイザルの系で HVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA + ヒト IL-12 DNA ワクチンを投与した。この群では 5 頭中 5 頭 100% の生存率が認められた。一方コントロール群の生食投与群では, 60% の生存率であっ

た。この DNA ワクチン投与群では, 体重増加が認められ, 末梢血 T 細胞の増殖増強反応が認められた。Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは最もヒトの結核感染症モデルに近いカニクイザルの系において予防ワクチンならびに治療ワクチン効果を示した。生存率・免疫能を増強した。したがってこのワクチンはヒト MDR-TB, XDR-TB の治療剤としてきわめて有用であることが示された。

#### VI. おわりに

HSP65 DNA + IL-12 DNA/HVJ エンベロープワクチンが優れていることより, このワクチンが結核の発症予防や治療に役立つ日を夢見ている。厚生科研, 文部科研, 大阪結核予防会研究費等により支援を受けた。

#### 文 献

- 1) 岡田全司: 結核 “分子予防環境医学: 生命科学研究の予防・環境医学への統合” (分子予防環境医学研究会編). 本の泉社, 東京, 2003, 150-161.
- 2) Flynn JL, Chan J: Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 93-129.
- 3) Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine.* 2007; 25: 2990-2993.
- 4) 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: 1191-1204.
- 5) 岡田全司: The development of novel vaccines against tuberculosis. *Jpn J Clin Immunol.* 2008; 31: 356-368.
- 6) Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, et al.: Novel recombinant BCG

- and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine*. 2005 ; 23 : 2132–2135.
- 7) 岡田全司：結核ワクチン。「結核」第4版，泉 孝英，網谷良一編，医学書院，東京，2006，50–58.
  - 8) Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: Novel prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis. *Vaccine*. 2009 ; 27 : 3267–3270.
  - 9) Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al.: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*. 1998 ; 282 : 121–125.
  - 10) Tanaka F, Abe M, Akiyoshi T, et al.: The anti-human tumor effect and generation of human cytotoxic T cells in SCID mice given human peripheral blood lymphocytes by the *in vivo* transfer of the Interleukin-6 gene using adenovirus vector. *Cancer Res*. 1997 ; 57 : 1335–1343.
  - 11) Okada M, Yoshimura N, Kaieda T, et al.: Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981 ; 78 : 7718–7721.
  - 12) Okada M, Sakaguchi N, Yoshimura N, et al.: B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas. Two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation. *J Exp Med*. 1983 ; 157 : 583–590.
  - 13) Okada M, Kitahara M, Kishimoto S, et al.: IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the *in vitro* induction of cytotoxic T cells. *J Immunol*. 1988 ; 141 : 1543–1549.
  - 14) Okada M, Kita Y: Tuberculosis vaccine development: The development of novel (preclinical) DNA vaccine. *Human Vaccine*. 2010 ; 6 : 1–12.
  - 15) Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: *Procedia in Vaccinology*. Vol. 2, 3rd. Vaccine Global Congress, Singapore, 2009.
  - 16) 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*. 2004 ; 172 : 7618–7628.
  - 17) McShane H, Pathan AA, Sander CR, et al.: Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med*. 2004 ; 10 : 1240–1244.