

Current Topics

ANTI-TUBERCULOSIS IMMUNITY BY CYTOTOXIC T CELLS · GRANULYSIN
AND THE DEVELOPMENT OF NOVEL VACCINES
(HSP-65 DNA + IL-12 DNA)

Masaji OKADA and Yoko KITA

Abstract CDC and ACET in U.S.A. reported that novel vaccines instead of BCG are required for the protection against infection of *Mycobacterium tuberculosis* worldwide. However, no novel vaccine for clinical use has not yet been developed in the world including U.S.A. and Europe.

We have developed a novel tuberculosis (TB) vaccine; a combination of the DNA vaccines expressing mycobacterial heat shock protein 65 (HSP65) and interleukin 12 (IL-12) delivered by the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-envelope and -liposome (HSP65 + IL-12/HVJ). This vaccine provided remarkable protective efficacy in mouse 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 also provided therapeutic efficacy against multi-drug resistant TB (MDR-TB) and extremely drug resistant TB (XDR-TB) 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. Furthermore, the BCG priming and HSP65 + IL-12/HVJ vaccine (booster)

by the priming-booster method showed a synergistic effect in the TB-infected cynomolgus monkey (100% survival). Furthermore, this vaccine exerted therapeutic efficacy (100% survival) and augmentation of immune responses in the TB-infected monkeys. These data indicate that our novel DNA vaccine might be useful against *Mycobacterium tuberculosis* including XDR-TB and MDR-TB for human therapeutic clinical trials.

The review also provides recent advances of the precise studies of induction of immunity including CD8 positive cytotoxic T cells and effector molecules such as granulysin by these vaccines, against multi-drug resistant tuberculosis and extremely drug resistant tuberculosis.

Key words: Killer T cell, Granulysin, New TB vaccine

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

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

ミニ特集「免疫と結核」

結核免疫(序論)

岡田 全司

要旨：いまだに世界の3分の1の20億人が結核菌に感染しており，その中から毎年940万人の結核患者が発症し，180万人が死亡している，最大の感染症の一つである（WHOレポート2008年）^{1)~11)}。本邦でも1998年から結核罹患率が増加・横ばいが認められ，1999年“結核緊急事態宣言”が厚生省より出された。結核症に対する宿主の抵抗性は細胞性免疫とって過言ではない。特に獲得免疫（キラーT細胞，Th1ヘルパーT細胞，M ϕ ）が重要であり，最近では自然免疫の結核への関与が再び重要視されている。一方，DBA/1マウスやBALB/cマウスがC57BL/6マウスに比較して結核菌感受性であり，特にDBA/1マウスはBALB/cマウスよりも結核菌易感受性であることも発見した。この結核菌抵抗性は各マウスストレインのキラーT細胞誘導活性と相関することを発見した。したがって，これらの「免疫と結核」の最先端の研究を行っている研究者に執筆をお願いした。(1) 結核菌抗原認識とT細胞免疫，(2) CpGモチーフと結核免疫でTLR9によるCpG認識，(3) Lipocalin 2, SLPIと結核自然免疫，(4) キラーT細胞，granulysinによる結核免疫とワクチン（HSP 65+IL-12 DNA ワクチン等）開発，(5) 結核に対する感染防御機構，をトピックとして選んだ。

キーワード：結核免疫，T細胞，獲得免疫，自然免疫

I. はじめに

結核症に対する免疫は宿主の抵抗性細胞性免疫とって過言ではない。特に獲得免疫（キラーT細胞とTh1ヘルパーT細胞）が重要であり，最近では自然免疫の結核への関与が再び重要視されている。

また，マクロファージ（M ϕ ）が結核菌増殖の場であり，M ϕ -T細胞間の相互の活性化，ヘルプにより結核感染防御に重要な抵抗性を示す。

したがって，これらの「免疫と結核」の最先端の研究を行っている研究者に執筆をお願いした。

II. 結核症

(1) 結核症の現状

結核症は最大の再興感染症で，HIV感染に伴う結核合併症や多剤耐性結核が大きな問題である。

2007年の本邦結核死亡率は10万人に1.7，罹患率は10万人に19.8人である。日本の結核罹患率は，欧米の約5

倍も高く，アジア（中国，インド等）やアフリカ地域に多い。

感染した人の5~10%の人が発病し，発病は免れた人でも3分の1以上の人は結核菌をからだの中に抱えたまま高齢に達している。結核菌はからだの抵抗力（免疫力）によって抑え込まれ冬眠状態（dormancy）になっている。高齢，糖尿病，エイズ，副腎皮質ホルモンによる治療，慢性腎不全（人工透析），抗関節リウマチ薬の抗TNF α 抗体等で免疫力が低下すると，冬眠していた結核菌が暴れ出す。

III. 獲得免疫と結核

結核感染に対する免疫力はM ϕ ，CD4⁺T細胞，NK細胞， γ/δ T細胞，キラーT細胞（CD8⁺TとCD8⁻T）および肉芽腫形成の総合的な抵抗力である（Fig. 1）。また，1998年*Nature*に結核菌H37Rvゲノム全塩基が掲載され，遺伝子レベルで結核免疫を解析しうることになった。

(1) キラーT細胞（CD8⁺T細胞）

すなわち、結核における CD8⁺T細胞はマウスで抗結核免疫に重要である (Fig. 2) (当ミニ特集・岡田、喜多のキラー T細胞・granulysin による結核免疫の項参照)。

MHCクラス I 拘束性の結核菌の 38 kDa 蛋白, HSP65 蛋白を認識するマウス CD8⁺キラー Tや 19 kDa 蛋白, Ag85, CFP10 (Mtb11) を認識するヒト CD8⁺キラー T が報告されている¹⁰⁾。ESAT-6 抗原に対するキラー T で HLA-A2 とは 82~90 位の 9 個のアミノ酸 AMASTEGNV が結合してキラー T細胞がこれらを認識する。われわれは世界に先駆けて確立した、ヒト生体内結核免疫応答解析モデル SCID-PBL/hu に、この ESAT-6 ペプチドを投与し、これに特異的で HLA-A2 拘束性を示すヒトキラー T を生体内で誘導することに初めて成功した²⁾¹²⁾。

(2) ヘルパー T細胞

CD4⁺T細胞が結核免疫に重要であることは MHC Class II (-/-)マウスや CD4 (-/-)マウス、抗 CD4 抗体投与マウスで明らかとなっている (Th1 と結核免疫につ

いては岡田総説¹⁾ 参照のこと)。

IV. 自然免疫と結核

(1) マクロファージ (Mφ)

結核菌の増殖場所は Mφ 内である。一方、Mφ は異物貪食能と細胞内殺菌能および抗原提示能をもつ。したがって結核菌が優位に立つか、ヒト (生体) が優位に立つかの戦争でもある (詳細は岡田結核文献²⁾³⁾ 参照)。殺菌性ラジカルである活性酸素、各種殺菌蛋白 ROI や NO などの RNI, TACO, Nramp も結核菌の殺傷に参与する。

(2) Toll-like 受容体および Pathogen Recognition Receptor とマクロファージ・樹状細胞活性化

最近発見された Toll-like receptor (TLR) ファミリーが innate immunity の重要な役割を果たしている¹³⁾。

TLR (TLR1~TLR10) はそのリガンドによって大きく 3 つに分類される (Fig. 3A)。

このうち菌体膜由来の糖脂質を認識する TLR としては、TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR9 である。

結核菌の cell wall (LAM, mAGP, total lipid) による応答は TLR2 を介する (Fig. 3B)。一方、結核生菌に対する反応には TLR2 と TLR4 が必要である。病原株の *M. tuberculosis* 由来の Man LAM は Mφ を活性化しないが、非病原性の抗酸菌は異なる glycolipid Ara LAM よりなり、これは TLR2 を介して Mφ を活性化する。この差が発病の差となる可能性もある。結核菌体成分 19 kDa の lipoprotein が TLR2 を介して Mφ を活性化する。また、抗酸菌 DNA から見いだされた CpG モチーフ (パリンδροーム配列) は感染防御免疫能増強することが示されていたが、CpG レセプターに対する TLR9 が審良らによりクローニングされた。

TLR2 の場合、細胞内領域の 2 つの変異 (Arg753 Gln と Arg677 Trp) が認められ、Arg753 Gln は敗血症にかか

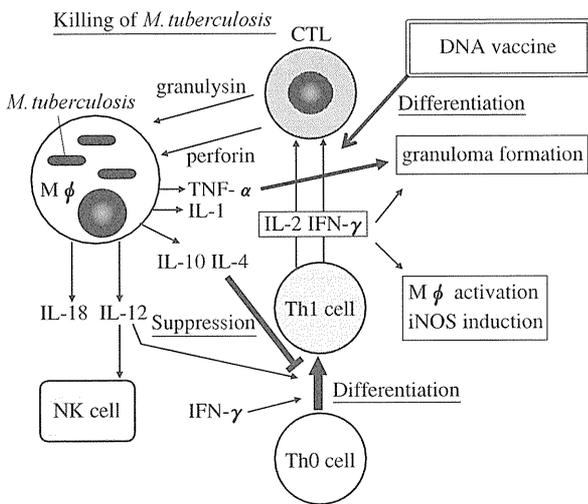


Fig. 1 Mφ and T cell immunity against tuberculosis

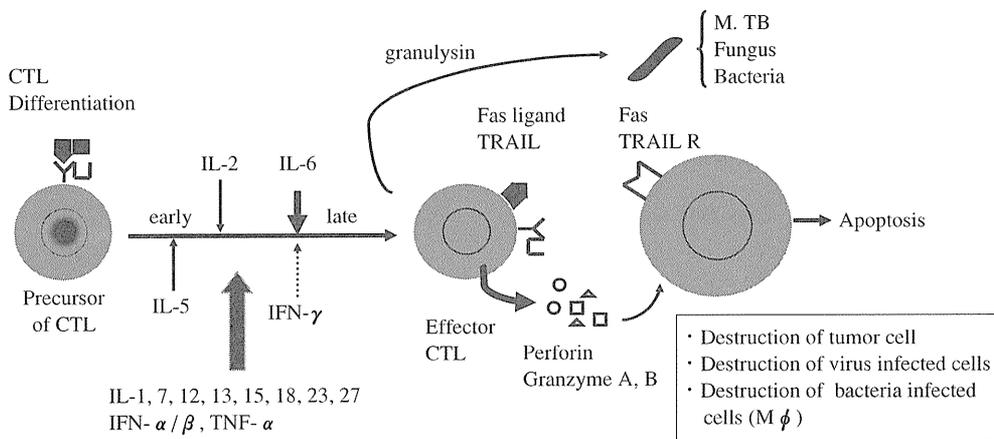


Fig. 2 Induction of CTL and granulysin

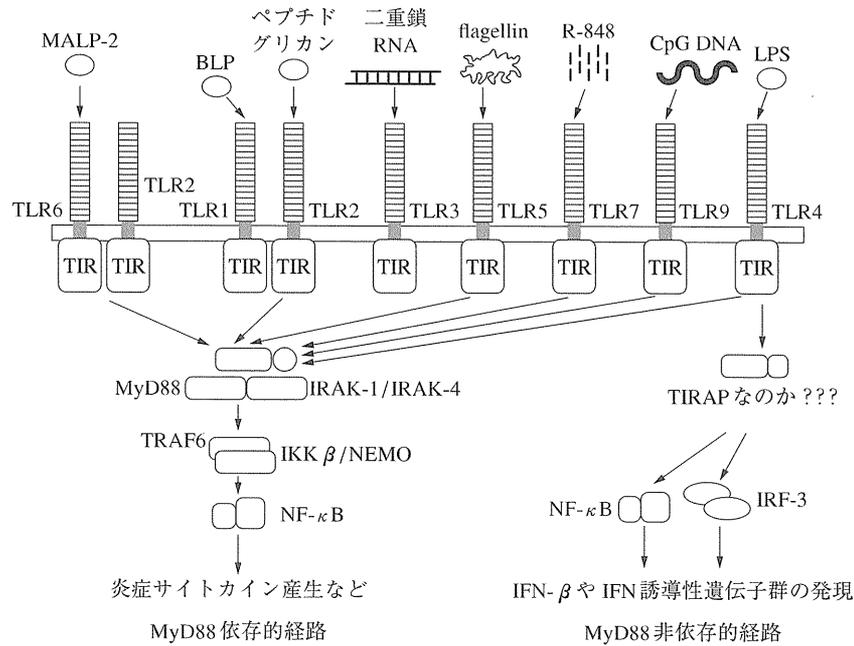


Fig. 3A TLR and pathogens

りやすく, Arg677 Trpはアジア人において *M. leprae* による結節性ハンセン症と関連している。

TLRはそれぞれ病原微生物由来の構成成分を認識する。TLRシグナルを介するシグナル伝達経路にはMyD88を介するMyD88依存経路とMyD88を介さないMyD88非依存経路の2つが存在する。主に前者はすべてのTLRを介した炎症性サイトカインの産生を、後者は主にTLR3・TLR4を介したインターフェロン(IFN)およびIFN誘導性遺伝子群の産生を担う。

このMyD88非依存経路を担うアダプター分子がTRIFである。TRIFがTLR3とTLR4のMyD88非依存経路に共有されているのに対し、TRAMはMyD88非依存(TRIF依存)経路をTLR4シグナルに特異的にだけ与えるアダプター分子である。また、TIRAPはすべてのTLRに共有されたMyD88依存経路を、TLR1/2/6とTLR4シグナル特異的に与える役割をもつ。われわれは竹田との共同研究でTRIF(-/-)×MyD88(-/-)ダブルノックアウトマウスを用い、結核菌に対する易感染性を解析しつつある。

TLR以外にもPRR(pathogen recognition receptor)としてDC-SIGN, NODファミリー, マンノース受容体, スカベンジャー受容体, dectin-1があげられる。HIVや*M. tuberculosis*はDC-SIGNに結合して樹状細胞に入り込むが、その際、そのTLRによる自然免疫機構の活性化を抑制し、これらの病原体の生存を有利にする機構が働いていることが示された。NOD1, NOD2を中心とするCARDファミリーの分子は、膜貫通領域をもたず、細胞

Fig. 3B TLRと結核菌成分

結核菌成分	レセプター
LAM	TLR2
CWS	TLR2/4
peptidoglycan	TLR2/4
19 kDa lipoprotein	TLR2
CpG repeat	TLR9

質蛋白として存在する。NOD2は、古くより菌体由来の免疫調整物質として知られていたPGNの構成成分であるムラミルジペプチド(MDP)を認識することが示された⁸⁾。

(3) RNAヘリケース(RIG-I, MDA5, LGP1)

TLR-3, -4, -7はそれぞれウイルス核酸成分である二本鎖RNA, 一本鎖RNA, 非メチル化DNAなどのウイルス構成成分を認識しI型IFN産生を誘導する。TLRはウイルスセンサーであると考えられている。一方、細胞内に存在するRNAヘリケースRIG-I(retinoic acid inducible gene I)およびMDA5(melanoma differentiation associated gene 5)は、細胞内に侵入したウイルスを感知するシステムであり、ウイルスに特徴的な二本鎖RNAや一本鎖RNAの5'-triphosphate構造などを認識し、I型IFN産生を誘導する¹⁴⁾。

(4) 細胞内ウイルスセンサー～RNAヘリケース(RIG-I, MDA5, LGP2)

RIG-Iはレチノイン酸で誘導されるDEXD/boxRNAヘリケースであるが、ウイルス認識にかかわる分子として

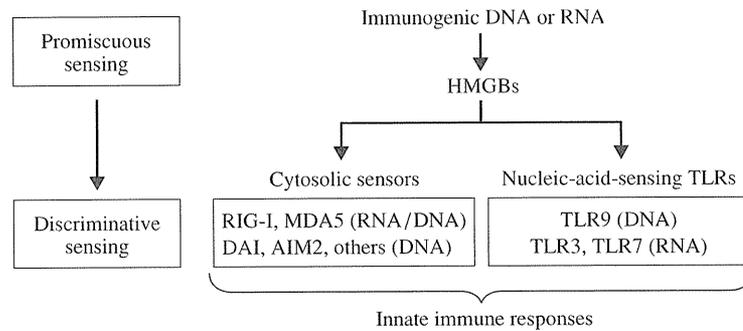


Fig. 3C Intracellular DNA sensor

発見された¹⁴⁾。細胞質に存在する RIG-I は、C 末のヘリケースドメインでウイルスの複製過程でできる二本鎖 RNA を認識し、N 末に存在する 2 つの CARD ドメインから IFN 誘導シグナルを下流へと伝達すると考えられている。MDA5 は RIG-I 同様、N 末に 2 つの CARD および C 末にヘリケースドメインをもつ分子で、RIG-I と相補的にウイルス認識に関与することが報告されている。今のところ人工二本鎖 RNA である polyinosine-polycytidylic acid (poly I:C) が MDA5 のリガンドとして同定されている。LPG2 は負の制御を行う。HVJ-エンベロープベクターはこの RIG-I をより刺激する可能性が示唆されている (Fig. 3C)。

(5) 細胞内 DNA センサー DAI, AIM2, High Mobility Group Box (HMGB)

細胞内 DNA センサーとして、DAI (DNA-dependent activator of IRFs) と AIM2 (absent in melanoma 2) が発見され、自然免疫と獲得免疫を誘発する。また、RLRs (RIG-I like receptor) も細胞内 DNA センサーとして作用する。

HMGB タンパク質でできる HMGB1, HMGB2 および HMGB3 が核酸の万能監視役として機能することが示された。HMGB が存在しないと、核酸による TLR3, TLR7, TLR9 の活性化も低下する。HMGB は乱雑な核酸センサーであり、TLR3, 7, 9, RIG-I, MDA5, DAI, AIM2 は細かい識別力のある核酸センサーである。DNA ワクチンが強力な免疫活性を示すのがこの経路と関与するかどうか興味深い (Fig. 3C)¹⁵⁾。

(6) 樹状細胞

ウイルス感染時において、免疫担当細胞の 1 つである樹状細胞 dendritic cell (DC) は大量の I 型 IFN を産生することが知られている。さらに、DC の中でもプラズマサイトイド DC (pDC) とよばれる集団が特に IFN- α 産生能が高いことが明らかとなってきた。DC はこの pDC とそれ以外のコンベンショナル DC (cDC) の 2 つのサブセットに大きく分けることができる。cDC は GM-CSF 存在下に骨髓細胞より誘導することができる。pDC は

Flt-3-L により骨髓細胞から誘導することができ、TLR7, TLR9 を高発現しているという特徴をもつ。

V. 結核菌抵抗性と宿主免疫

(1) マウスの系統と結核菌抵抗性

結核菌に対する感染性抵抗性はマウスの系統により大きく異なる。結核実験によく使われる C57BL/6 マウスは結核菌抵抗性である。一方 BALB/c マウスは結核菌感受性であることはよく知られた事実である。その理由として、C57BL/6 は I 型ヘルパー T 細胞 (Th1) 優位のマウスであり、BALB/c マウスは II 型ヘルパー T (Th2) 優位のマウスであることがあげられる。C57BL/6 マウスの Th1 機能は BALB/c マウスの Th1 機能の 200 倍であると報告されている。

われわれは種々の系統のマウスのキラー T 細胞誘導機能と結核菌感染抵抗性が相関する結果を最近得たので報告する。特に DBA/1 マウスは BALB/c マウスよりも強い結核菌感受性を発見したので、その実験結果を報告する (Fig. 4, 5, 6)。

DBA/1 マウス脾細胞、BALB/c マウス脾細胞、および C57BL/6 脾細胞をそれぞれ PPD 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 結核死菌 H37Ra 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で刺激して *in vitro* 培養し、5 日後の結核菌抗原 HSP65 に対するキラー T 細胞活性を ⁵¹Cr 遊離法で測定した。

その結果、DBA/1 マウスと BALB/c マウス脾細胞中のキラー T 活性は C57BL/6 脾細胞中のキラー T 活性に比較して著明に低下していた (Fig. 5A)。さらに、メモリーキラー T 細胞活性の系では、BALB/c マウス由来のメモリーキラー T 誘導は認められたのに比較し、DBA/1 マウス由来のメモリーキラー T 細胞誘導はほとんど認められなかった (Fig. 4)。一方 IFN- γ 産生においては、DBA/1 マウスの脾細胞のほうが、BALB/c よりも IFN- γ 産生増強が強いことが示された (Fig. 6)。IL-2 産生においては BALB/c が最も低く、C57BL/6 よりやや低下するものの、DBA/1 は強い産生が認められた。これら

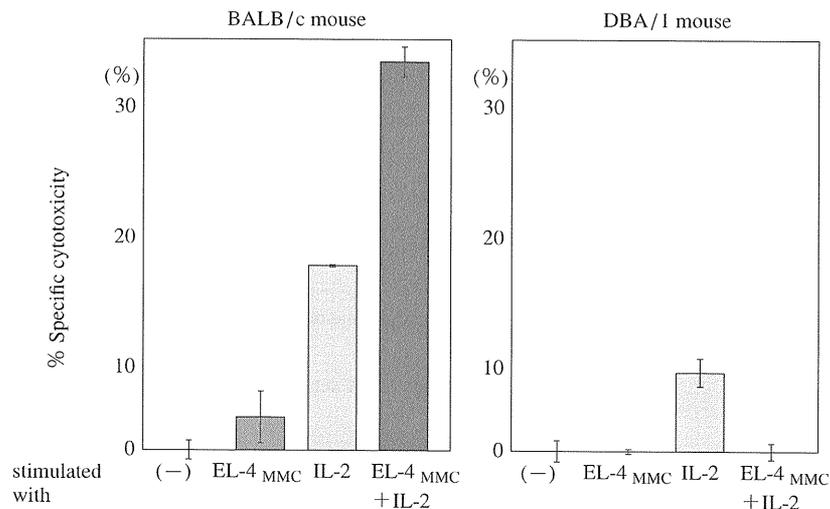


Fig. 4 Comparison of CTL induction *in vitro* against *M. tuberculosis* antigens between DBA/1 mouse and BALB/c mouse (Target EL-4)

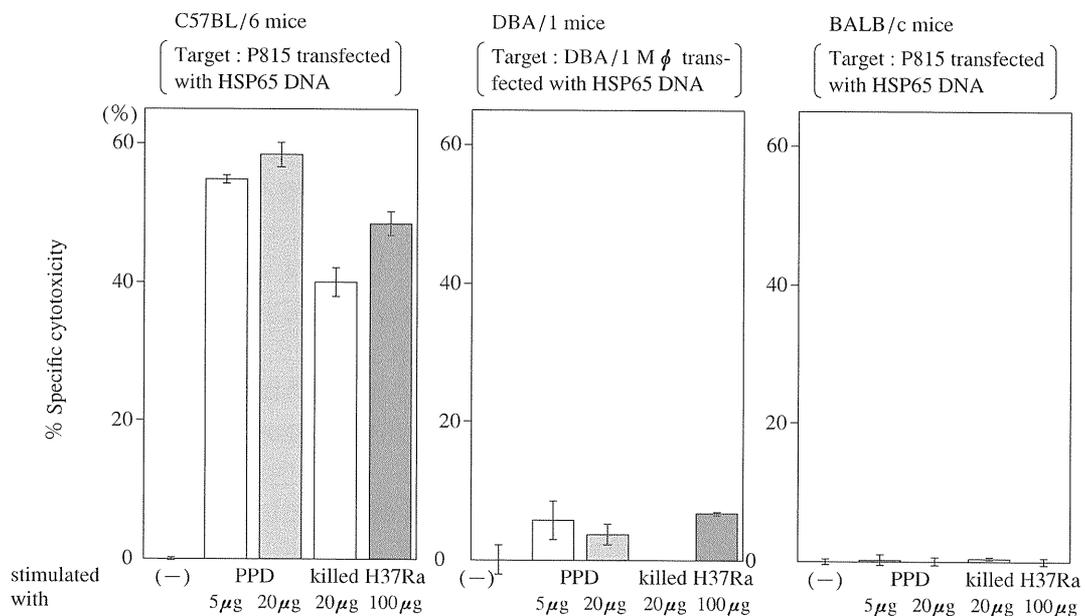


Fig. 5A Comparison of CTL induction *in vitro* against *M. tuberculosis* antigens among DBA/1, BALB/c and C57BL/6 mice

の結果より、結核菌抵抗性とキラー T細胞活性が最も相関することを明らかにした (Fig. 5B)。

VI. サイトカインと結核

(1) キラー T細胞分化とサイトカイン (キラー T細胞分化因子)

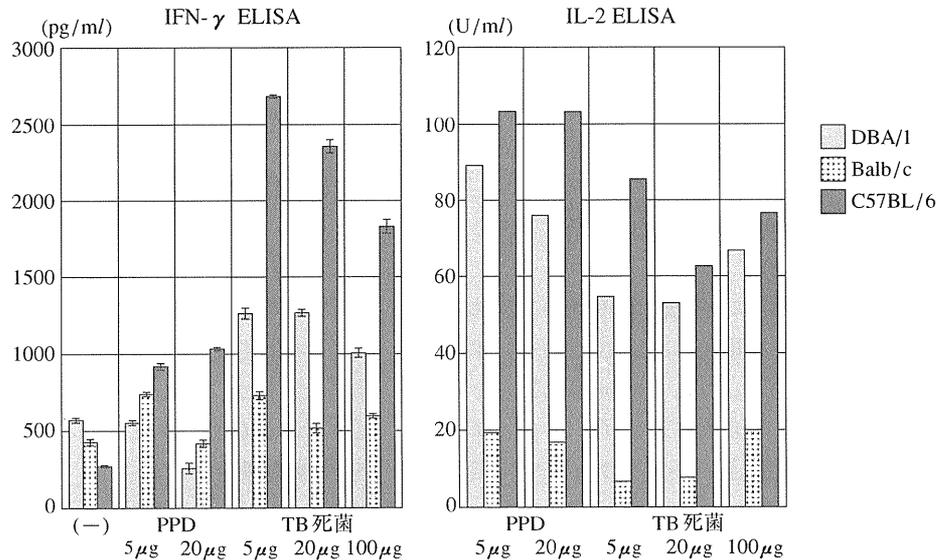
筆者らは CD8⁺ キラー T細胞 (Tc) の誘導にはヘルパー T細胞 (Th細胞) から産生されるサイトカインが必要であることをはじめに明らかにした。クラス II 抗原を認識しキラー T細胞分化因子を産生する Th細胞は CD4⁺ CD

8⁺であり、クラス I 抗原を認識しキラー T細胞分化因子を産生する T細胞は CD8⁺である。また、モノクローナル抗 IL-2 抗体を用いて、IL-2 はキラー T細胞誘導に必要な因子の一つであることを示した (Fig. 2)^{16)~18)}。

さらに、IL-2 とは異なるサイトカインも T細胞分化誘導に必要であることをキラー T細胞分化因子を産生するヒト T細胞ハイブリドーマ、および IL-2 依存性ヒト Th クローンを世界に先駆けて確立し明らかにした。その解析の結果、IL-6、IFN- γ がキラー T細胞分化因子として強力なキラー T分化を誘導することを明らかにした^{15) 16)}。

Fig. 5B mouse strain と結核菌感受性

マウス strain	結核菌感受性免疫能			
	結核菌感受性	結核菌 5×10^5 i.v. 後生存菌数	メモリーキラー T誘導	IFN- γ 産生能
C57BL/6	+	>300日	++++	++++
BALB/c	++	250日	+	+
DBA/1	++++	25日	-	+++

Fig. 6 IFN- γ and IL-2 productions from DBA/1, Balb/c or C57BL/6 mouse spleen cells

筆者らは IL-6 が Tc 誘導の後期の分化段階に作用することを解明した¹⁶⁾。多剤耐性結核患者 PBL において、これらのキラー T 細胞分化因子すなわち IL-2, IFN- γ , IL-6 の著明な低下を認めた⁸⁾。また、糖尿病合併難治性結核患者では PPD 特異的キラー T の分化誘導の著しい低下を明らかにした⁸⁾。

(2) サイトカインと結核免疫

細胞内寄生細胞（とくに結核菌）は M ϕ に貪食されても殺菌処理されず、細胞内増殖が可能な菌である。種々の機構で M ϕ の殺菌から逃れ、結果的に慢性持続性炎症（慢性感染症）および肉芽腫形成を誘発する。抗結核菌免疫に IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12 が重要であることは解析されている。

(3) IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-15 と結核免疫

細菌の貪食に伴って M ϕ が産生するサイトカインのうち、IL-12, IL-18, TNF- α や IL-1 は、T 細胞, NK 細胞および $\gamma\delta$ 型 T 細胞からの IFN- γ 産生誘導に関与している。IFN- γ は、M ϕ を活性化し貪食した菌の殺菌処理を促進するヘルパー T 細胞, キラー T 細胞の分化因子としても作用する。IL-12 と IFN- γ 産生の間にはポジティブフィードバック機構が働いて IFN- γ は M ϕ からの

IL-12 産生を誘導し、IL-12 は T 細胞からの IFN- γ 産生をさらに増幅し、初期防御反応では感染局所に M ϕ を集め、特異的防御免疫が成立する³⁾。

IL-12, IL-18, IFN- γ は $\alpha\beta$ 型 T 細胞の Th1 への分化に重要なサイトカインで、IL-6 や TNF- α と強調して抗原特異的な Th1 を誘導する。Th1 の分化誘導には樹状細胞 (dendritic cells: DC) が重要で、M ϕ よりも高い T 細胞からの IFN- γ 産生誘導活性を示す。DC が末梢リンパ組織に移行して感染抵抗性 T 細胞の分化を誘導する。ファゴソーム内で処理された細菌由来の抗原は class II 分子に結合し CD4⁺ Th1 型 T 細胞により認識される。細胞質に存在する細菌由来抗原はプロテオソームにより分解され class I 分子と会合し、CD8⁺ T 細胞により認識される。CD8⁺ T 細胞は IFN- γ を産生するとともに、殺菌能の低下した M ϕ や菌が感染した非食細胞系細胞を破壊し、あらたに動員されてくる活性化 M ϕ に菌を処理させ、感染防御に関与している。また、IL-15 はメモリーキラー T 細胞を活性化して結核免疫に寄与する。一方、IL-10 は結核免疫の M ϕ 機能を抑制する。そのほか IL-10, ファミリーサイトカインとして IL-19, IL-22, IL-28, IL-29 が報告されているが、IL-10 と同様の機能

をもつのか、または、IL-28, IL-29はIFN- γ とホモロジーがあり、抗ウイルス活性をもつことよりもIL-10と逆の結核免疫機能を示すか興味がある。IL-10, TGF- β , IL-4も結核に対する免疫応答を抑制する。IL-25は、IL-4, IL-5, IL-13の産生を誘導する。

結核性肉芽腫の形成にTNF- α の存在が最も重要である。

(4) IL-23, IL-27, IL-31, IL-32と結核免疫

IL-7, IL-15, IL-17, IL-23, IL-27, IL-31はキラーT分化を誘導した。一方、DNAワクチン(HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン)は、特にIL-32(結核菌刺激特異的に産生。Plos Path 2006)と強いキラーT分化相乗効果を示した。

(5) ヒトサイトカイン産生異常症およびサイトカインレセプター異常と結核感染

ヒトにおいて、IFN- γ 受容体遺伝子に変異がみられた先天性IFN- γ レセプター欠損児に、BCGワクチン注射で重症全身性感染が認められたり、*M. avium*感染症をきたした。マウスにおいてもIFN- γ 遺伝子ノックアウトマウスやIFN- γ 受容体遺伝子ノックアウトマウスでは結核易感染性である³⁾。

TNF- α は肉芽腫形成のみでなく慢性の長期感染結核に重要であり、抗TNF- α 抗体投与マウスや、TNFレセプター(TNF-Rp55)欠失マウス、TNF^{-/-}マウスでは結核菌感染の死亡率が著増し、肉芽腫形成も損なわれた重症の肺結核病理像を示した。さらに、IL-6遺伝子ノックアウトマウスでも結核感染の増悪をきたしたりIFN- γ の産生誘導の欠損がみられ、IL-6も非特異的防御、とくにM ϕ の活性化やキラーT細胞分化を介して特異的な結核免疫に関与している可能性もある。著者らは世界に先駆けてIL-6産生能欠損患者IL-6^{-/-}患者を発見した。この患者は易感染性で肺炎を繰り返し発症した。興味深いことに肺炎感染時CRP陰性で発熱も認められなかった。

IL-12レセプター欠損マウスやIL-12欠損患者では結核菌感染・増殖を抑制できなかった。すなわち、IL-12も抗結核免疫に重要なサイトカインであることが示された。また、rIL-12の投与にてBALB/cマウスの結核菌抵抗性が増し、IL-12の生体内中和で感染増悪をきたす。IL-12p40とIL-12R β 1欠損患者ではIL-12とホモロジーのあるIL-23やIL-23R欠損を伴うことが多い。IL-12欠損、IL-12R欠損患者の易結核菌感染性がIL-23^{-/-}に起因する可能性がある。

(6) サイトカインと結核治療

①マウスの系において、著者らはアデノウイルスベクターにIL-6関連遺伝子(IL-6 DNA+IL-6レセプターDNA+gp130 DNA)を導入し、結核感染治療効果を世界

に先駆けて明らかにした(いままで治療効果を示す治療ワクチンの報告はない)。結核菌に特異的キラーT細胞誘導活性、IL-2産生増強と相関した(IFN- γ DNAも治療ワクチン効果)。

②Condosらは多剤耐性結核の5症例に対して、IFN- γ の吸入治療を試みた。5例中4例で喀痰塗抹で菌陰性化した。しかし、治療中止1カ月後より再度陽性となった。また、胸部CTでは1例で有意な改善、1例で軽度改善、3例で空洞の縮小が観察された。

③肺結核患者に、IL-12投与を行い有効例が報告されている。

④サイトカインIFN- γ , IL-2, IFN- α やG-CSFを多剤耐性結核患者に投与し、投与期間中のみ排菌数が減少した。

(7) 肉芽腫形成とサイトカイン

結核性肉芽腫の形成にTNF- α の存在が最も重要である。近年新しい抗リウマチ薬としてモノクローナル抗TNF- α 抗体がRAに有効であるが、多数の結核患者が発症することが報告されている。MCP-1やRANTESも肉芽腫形成に関与する。

VII. おわりに

最近の獲得免疫と結核、自然免疫と結核、サイトカインと結核についてレビューした。Th17やregulatory T等については各論を参照されたい。

文 献

- 岡田全司:結核ワクチン。「結核」第4版、医学書院、東京、2006、50-58.
- 岡田全司:自然・獲得免疫と疾患:結核. 最新医学. 2005; 60: 678-696.
- 岡田全司:医学のあゆみ「サイトカイン」state of arts, 医歯薬出版、東京、2004、209-213.
- Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: Novel prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis. *Vaccine*. 2009; 27: 3267-3270.
- 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.
- 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.
- 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.
- Okada M, Kita Y: Tuberculosis vaccine development: The

- development of novel (preclinical) DNA vaccine. *Human Vaccine*. 2010 ; 6 : 1-12.
- 9) Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccine (HVJ-Envelope/Hsp65 DNA+IL-12 DNA) against Tuberculosis Using the Cynomolgus Monkey Model. *Procedia in Vaccinology*. 2010 ; 2 : 34-39.
 - 10) Flynn JL, Chan J : Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2001 ; 19 : 93-129.
 - 11) Schluger NW, Rom WN : The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 ; 157 : 679-691.
 - 12) 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.
 - 13) Akira S : Toll-like receptors and innate immunity. *Adv Immunol*. 2001 ; 78 : 1-56.
 - 14) 加藤博巳, 審良静男 : RNAウイルス認識におけるMDA5とRIG-Iヘリケースの役割. 「Annual Review免疫」. 中外医学社, 東京, 2008, 57-60.
 - 15) Yanai H, Ban T, Wang Z, et al. : HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature*. 2009 ; 462 : 99-103.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) 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.

—————Current Topics—————

IMMUNITY AGAINST *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* (INTRODUCTION)

Masaji OKADA

Abstract A third of world's population infected with *Mycobacterium tuberculosis*, and 2 million people die from tuberculosis every year. It is well established that protective to *M. tuberculosis* depends on both CD4⁺ and CD8⁺ T cells^{1)~8)}.

In particular, acquired immunity (cytotoxic T cell, Th1 helper T cell and M ϕ) play an important role for TB infection. Recently, natural immunity also play a very attractive role for the development of TB immunity.

We found that memory CTL is most important for the protection against TB using several kinds of mice. It was demonstrated that DBA/1 mice are more sensitive to TB infection than BALB/c mice (Th2 prone mice). Induction of memory CTL in DBA/1 mice was lower than BALB/c. In contrast, IFN- γ production of DBA/1 mice was higher than BALB/c.

Therefore, famous researchers in the fields of TB immunity reviewed the recent advances of TB immunity, such as (1) T cell immunity and recognition against TB antigen, (2) TLR9

and CpG motif, (3) lipocalin2 and SLPI in natural TB immunity, (4) acquired immunity (CTL) and granulysin. The development novel vaccine (HSP65+IL-12 DNA vaccine), (5) The mechanism of protection against TB, in this mini-review series.

Key words: Immunity against M. TB, T cell, Acquired immunity, Innate immunity

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

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

小児結核の現状と対策

～小児結核症例検討会からみえてくるもの～

大阪府豊中保健所長 永井仁美

はじめに

わが国の小児結核患者数の減少は著しい。1960年には14歳以下の小児の新登録患者数は6万人を超えていたが、2000年には220名となり、その後も2007年には92名まで減少している。同年に小児結核の患者登録が1例もなかった都道府県は16県にのぼり、さらにはこの数年間小児結核の登録がみられない県も複数あり、地域格差は否定できない。また、2008年・2009年と続いて、近畿地方においては産科病棟における結核患者発生があり、新生児を含めた接触者健診が実施された。

小児の患者数が減少したとはいえ、結核を発病した小児の健康問題は重大な問題であり小児結核対策の後進があってはならない。今、より一層個別・重点的な対策をすべき時期にきている。そこで、大阪地区では2003年度より医療機関と保健所（行政）が一堂に会して「医療機関・保健所の合同症例検討会」を毎年開催してきた。症例を通して、それぞれ両者の立場から課題や疑問点があげられ、当日の参加者全員で考察を重ねてきた。このような検討会が今後の小児結核対策に貢献できると考えられるの

で報告する。

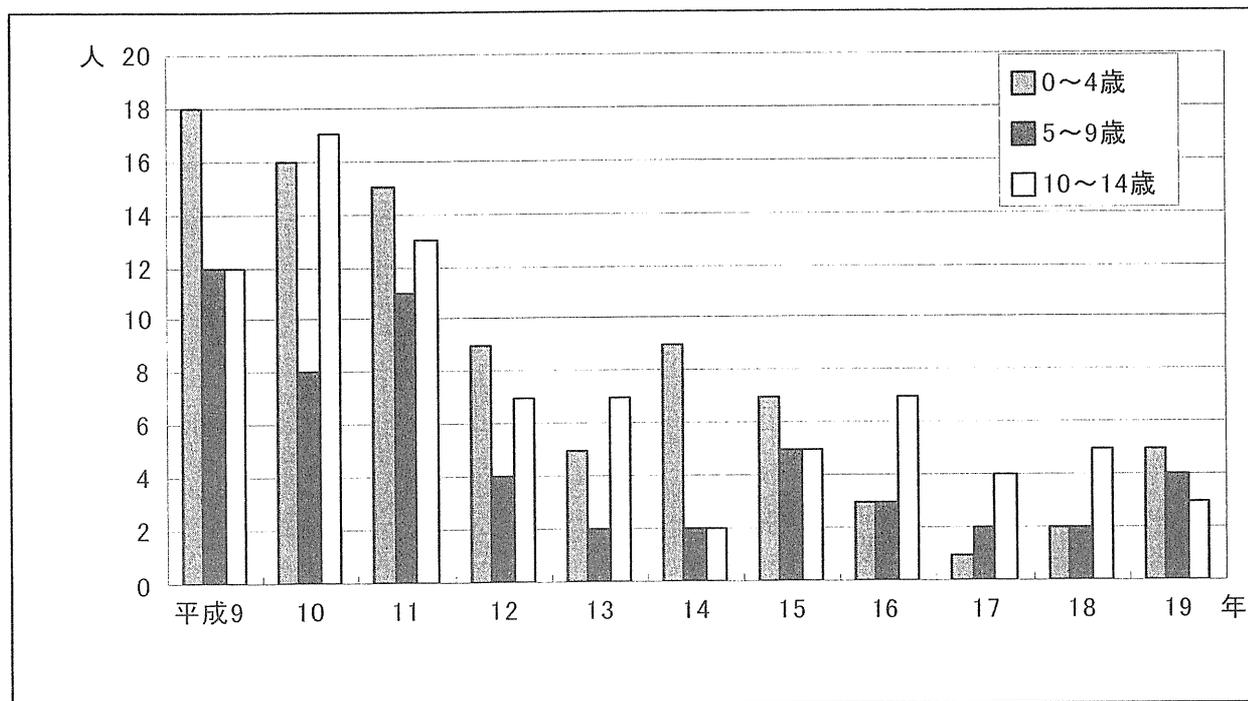
方法および対象

毎回、土曜日の午後半日で開催し、症例検討会形式で実施した。検討の対象は、第4回まではその年度に大阪府および府下の保健所設置市（大阪市・堺市・東大阪市・高槻市）の保健所に新登録された小児結核症例（14歳以下）としていたが、第5回以降（2007年度以降）は京都府・兵庫県・奈良県などの近畿地方にも対象を広げた。

検討会では、前半に大阪地区の小児結核の統計や、登録症例全体の特徴の提示を行った。その後、新登録症例数例を各々20～30分ずつ、医療機関と保健所から合同で症例提示した。医療機関側は患児の診断や治療上の問題点、院内感染対策上の課題などを述べ、保健所側は健診や予防可能要因についての問題点、医療機関との連携上の課題などを提示した。

後半では、毎回結核に関する新たな話題として、「BCG直接接種導入に際しての各市町村の体制」や「QFT検査に関すること」などについて関係者、専門家を交えての検討会・情報交換を重ねてきた。

図1 年齢階級別小児結核患者数の推移



参加者数は第1回が50名であったが毎年増加がみられ、第6回では90名以上の参加となった。参加職種では、医師・看護師・保健師以外にも検査技師や診療放射線技師、事務職など多岐にわたる。

登録患者の推移

年齢階級別小児結核患者数の推移を図1に示す。平成10年までは大阪府下で40名以上の小児結核の登録があったが、近年は減少傾向であり平成17年・18年は10名以下となった。しかし、平成19年には再び12名となっている。年齢階級を0～4歳・5～9歳・10～14歳と3階級に分けると、以前は0～4歳以下の乳幼児群が多かったが、近年は10～14歳の小学校高学年～中学生症例の占める割合が多くなる傾向があった。平成19年においては乳幼児の同胞での発症な

どもあり、4歳以下が5例登録されていた。

この間、平成15年度には小学1年生・中学1年生でのBCG再接種が廃止され、平成17年度には乳児のBCG直接接種が導入されるなど、小児を取り巻く結核対策において大きな変動の期間であった。

検討症例の概要

第1回～第6回までに合計30症例の検討をおこなった。30症例のうち0～4歳児が15例で、そのうちBCG接種歴があったのは3例のみであった。また5～14歳児は15例で、そのうちBCG接種歴があったのは12例であった。30症例中感染源が確認・推測されていたのは28例(93%)であり、そのほとんどが家族や同居人の身近な人からの感染であり、1例は親の友人であった(表1)。

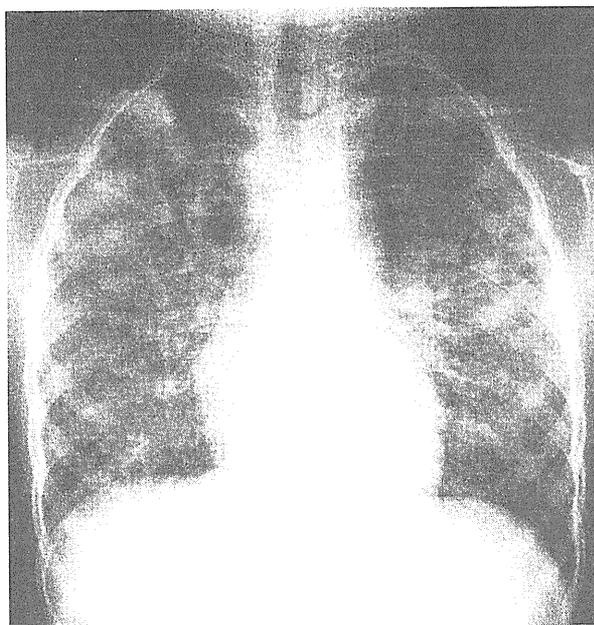
表1 症例の概要（H15～H20年度検討会分）

年齢(歳)	性	登録病名	学会分類	感染源(病型、塗抹)	BCG歴
0	女	肺門リンパ節結核・コッホ現象陽性	IH	母(rⅡ2、3+)	コッホ現象
0	女	肺結核・肺門リンパ節結核	H	祖父(2+)祖母(1+)	無
0	女	粟粒結核・結核性髄膜炎・肺結核	bⅢ3	母(粟粒結核+肩関節結核+脳結核+bⅢ3、1+)	無
0	女	結核性髄膜炎・肺結核	bⅢ2	父(bⅡ2、1+)	無
0	男	肺結核・肺門リンパ節結核	bⅢ2 +IH	父(bⅡ2、1+)	無
1	女	肺門リンパ節結核・気管支結核	rH	母(rⅡ2、2+)	無
1	女	肺門リンパ節結核	rH	母(IⅡ1、1+) 祖母(bⅡ2、3+)	無
1	男	肺結核・結核性髄膜炎	IⅢ2	祖父の姉の夫(bⅡ3、1+)	無
2	男	肺結核・肺門リンパ節結核	bⅢ2 + bH	父(rⅡ2、2+)	有
2	男	肺結核	IⅡ2	父(rⅡ2、2+)	有
2	女	肺門リンパ節結核	IH	祖母(bⅠ3、3+)	無
2	男	結核性髄膜炎	0型	祖父(bⅡ3、1+)	無
3	男	肺結核	rⅢ1	母(bⅡ3、2+)	無
3	女	肺結核	IⅢ1	母(rⅡ2、2+)	無
4	男	肺結核・肺門リンパ節結核	rⅢ1+rH	父(rⅢ2、3+)	有
5	女	肺結核	rⅢ1	母(bⅡ3、2+)	無
6	男	結核性胸膜炎	rpl	同居人(bⅡ2、1+)	有
6	女	肺結核	rⅡ1	不明	有
7	女	肺結核・喉頭結核	bⅢ3	祖父(IⅢ2、-)	有
8	男	結核性胸膜炎	rpl	おじ(bⅡ2、3+)	有
9	女	肺門リンパ節結核	IH	父(rⅢ2、3+)	有
11	男	肺結核	rⅢ1	父(bⅡ3、2+)	不明
11	男	結核性胸膜炎	rpl	母(bⅠ3、+)	有
12	女	肺結核	IⅢ1	不明	有
12	女	肺結核	IⅢ1	同居人(bⅡ2、rpl、3+)	有
12	女	結核性胸膜炎	rpl	父(bⅡ3、±)	有
12	女	肺結核・頸部リンパ節結核	IⅢ2	祖父(3+)	有
14	男	肺結核・肺門リンパ節結核・ 腹腔リンパ節結核	rⅢ1+rH	父?(8年前登録歴あり)	有
14	女	肺結核	bⅡ2	親の友人(+)	有
14	男	肺結核	IⅢ1	父(bⅡ2、2+)	無

結核患者や接触者における感染者が発生した場合、医療機関と保健所が連携して治療や服薬支援を行う必要があるが、その対象者が小児の場合はさらに学校や養護施設

もかかわってくることもある。小児結核の患児においては家庭環境が複雑なことも往々にしてあるので、小児結核にかかわる多くの機関がともに連携する必要がある。

図2 入院時胸部X-P (症例1)



両側全肺野にびまん性に拡がる粒状陰影を認める

そこで、今回はそのような観点から興味深い2症例を経験したので提示する。

【症例1】

7歳女児 (小学1年生)

登録病名 (学会分類)；

肺結核 (bⅢ3) および喉頭結核

排菌状況；

喀痰集菌塗抹：2+ 培養 (+30)

BCG歴；

あり

感染源 (疑)；

祖父 肺結核 (塗抹・培養ともに陰性)

経過；

祖父発病時の家族健診にてツベルクリン反応検査 (以下ツ反) が発赤径32mm (+++), 胸部X-P異常なしにてフォロー終了となる。家族健診から2年4カ月経過した頃より、嘔声・咳・発熱などが出現し

複数の医療機関を受診するも結核との診断に至らず、そのまま7カ月間が経過した。その後さらに症状が悪化し、家族健診から2年11カ月後に胸部X-Pおよび喀痰検査を施行され肺結核と診断される。

入院時現症；

顔色不良, 眼瞼結膜貧血様, 聴診にて軽度の吸気時狭窄音 (+)

入院時検査所見；

SpO₂ 91%, ESR 97mm (1hr), CRP 20.13mg/dl, Hb 8.4mg/dl, ツ反 0×0 / 0×0 mm (-),

入院時X線写真；

(図2)

入院後経過；

抗結核薬4剤による治療に加え一時期はステロイド投与の併用も行った。治療開始2週目以降は菌の陰性化が認められた。2HRSZ / 1HRS / 9HRの計12カ月治療にて

終了となる。

課題；

①接触者健診における予防内服の適応

感染源と思われる祖父が発病時に本児も接触者健診を受けているが、「若年者における化学予防の適応基準（平成元年旧厚生省エイズ結核感染症室長通知による）」に従い、ツ反発赤径32mmは予防内服の適応外と判断された。また、その後の健診フォローについても初発患者（祖父）が菌塗抹陰性者であったため重要度ランクが「その他」扱いとされ、6カ月以降のX-Pも不要とされた。このように接触者健診ガイドライン²⁾を機械的に適用することの問題点が浮かぶと同時に、症例ごとの接触状況や排菌状況に合わせた慎重なフォローの重要性が再確認された。特に、初発患者が菌塗抹陰性の場合、多くの保健所や医療機関では感染性が「無い」に等しいと考えられており、接触者健診が不要と扱われる場合も少なくない。若年者、特に乳幼児が接触していた場合には、初発患者の排菌量のみにとらわれることなく慎重な検討が必要である。

②診断の遅れによる重症化

嘔声や咳などの呼吸器症状が遷延し頻回に医療機関を受診していたにもかかわらず、9カ月もの間に一度も胸部X-Pが撮影されないなど、診断の遅れにより重症化（多量排菌・高度貧血・低栄養状態）に至った症例である。このように遅延する呼吸器症状の原因が明らかでない場合や、当初の治療で改善が乏しい場合は、画像的評価も積極的に用いるべきである。

【症例2】

11歳男児（小学5年生）

登録病名（学会分類）；

肺結核（rⅢ1）

排菌状況；

塗抹・培養ともに（-）

BCG歴；

不明（針痕も認めず）

感染源；

父親 肺結核 bⅡ3 喀痰集菌塗抹：
2+

治療開始時X線写真およびCT画像；

（図3，図4）

生活背景；

両親が離婚。父子家庭で府外より叔父宅へ転入

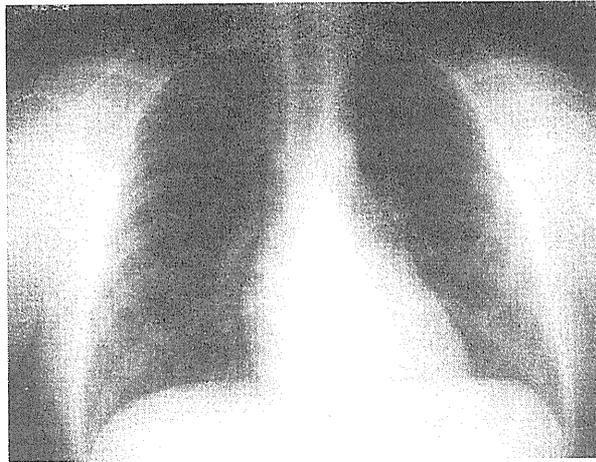
経過；

父親：呼吸器症状が続いていたが医療機関を受診せず放置していた。職場の定期健診にて胸部X-P上の異常を指摘されていたが、仕事が休めないとの理由で4カ月放置となる。しかしその2カ月後、さらなる症状の悪化がみられ、医療機関を受診した時点では喀痰より塗抹G7号の排菌が判明した。すぐに結核専門病院へ紹介されたが受診はせずにいた。結核を診断した医療機関から出された結核患者発生届けを受理した保健所により、再三受診勧奨を行い何とか受診には至ったが入院は固く拒否しやむを得ず外来にて治療を行うことになった。

同居叔父：上記父親の家族健診を保健所が実施し、すでに結核を発病していることが判明。

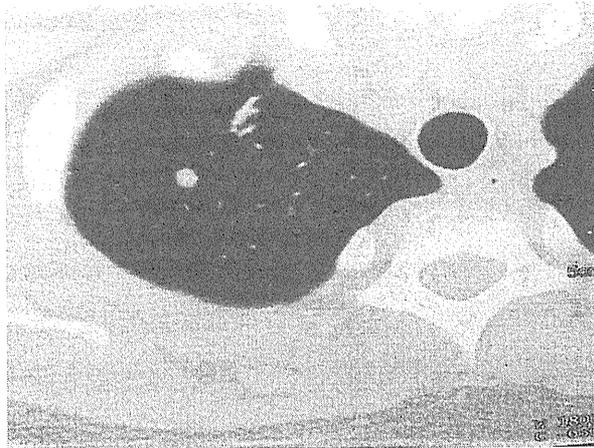
肺結核（bⅢ2）塗抹（-）培養（+）

図3 治療開始時胸部X-P (症例2)



明らかな異常はなし

図4 治療開始時胸部CT



右上葉に小結節影および周囲に索状陰影を認める

アルコール依存症にて治療中

本児：上記父親の家族健診にてツ反(+++), 胸部X-Pでは異常なしのため予防内服開始となるが, 1カ月後のX-P・CTにて右肺に結節陰影が認められたため, 肺結核発病と診断され治療開始となる。

本児は排菌がないため外来での治療が開始された。服薬支援の方法として保健所保健師によるDOTSを提案するも父親が強く拒否し, 学校養護教諭によるDOTSも同じ

く拒否した。本児が外来受診をする時にあわせて保健師が同伴受診することのみ可能となり, フォローを続けた。

しかし本児の治療中に父親が転落死し, 父親の死亡以降は服薬中断がみられるようになった。養育者不在のため児童養護施設へ措置入所となり, 以後施設職員による毎日DOTSを実施し2HRZ/4HRにて治療終了となった。

課題；

①複雑な家庭背景の中での信頼関係構築の困難さ

両親の離婚後、父親とアルコール依存症の叔父と本児の3人での生活という複雑な家庭環境の中、一家全員の発病事例である。またこれまでの生活においても外部者との関係を好意的に思わない父親であったため、保健師と父親との信頼関係の構築が困難であった。このような症例に対して保健所がどう寄り添うか、どこから信頼関係を築くかといった課題に直面した。

②感染源である父親の有症状・有所見の長期間放置

父親が定期健康診断にて有所見であり、また自覚症状も続いていたにもかかわらず4カ月間放置していた。その後何とか受診した医療機関では当初「感冒」との診断であり、その後さらに症状の悪化があり結核との診断に至った症例である。受診の遅れ・診断の遅れは6カ月間にもおよび早い時期に父親が治療に結びついていれば本児への感染・発病が予防可能であったかもしれない。しかし、父親としても子どもの養育に加え、アルコール依存症の弟（本児の叔父）も養わなければならない、何よりも「生活」が優先であったのは事実であろう。

③父親死亡後の本児への服薬支援・精神的支援の必要性

本児にとって唯一の養育者である父親の突然の死、それにとまなう自分の施設入所、これらの出来事はまだ11歳という年齢の子どもの大きな精神的ダメージを与えたものと思われる。保健所や医療機関、そして施

設のスタッフによる結核治療だけではない生活全般の支援が不可欠であった。

まとめ

小児結核患者の家庭背景は複雑であることが多い³⁾。検討会に提示される症例の中にも、親をはじめとする成人の受診の遅れが多くみられる。児の発病をきっかけに家族健診を実施し、その時点で初めて感染源である両親など成人の発病が判明した事例も複数みられる（表1）。また、家族内での複数発病事例も多い。経済的な理由から受診ができないといった家庭環境にある子どもたちの感染・発病が多く、医療よりも生活をまず優先といった状況であろう。そのような家族や患児に対して、医療機関と保健所・関係機関がどう連携していくか、検討会の回数を重ねることでお互いの役割や連携体制も強くなってきたと考える。この検討会を開始してからは、それまで以上に医療機関と保健所間で互いに相談しやすい関係になったことは事実であり、患児の治療に関することだけでなく生活背景や保護者への支援など、さまざまな問題を視野に入れきめ細かく対策を考えてきた。当日、参加しているさまざまな機関や職種で検討・意見交換を行うことにより、今後同様の事例に直面した時に生かされる教訓は多い。

また小児結核の症例の中には、発病予防可能例と思われるものが多い。高松の報告によると結核治療を行った患児86例中26例（30.2%）は発病予防可能例であったとさ

れている⁴⁾。必要な事例に対する予防内服の未実施や中断，また接触者健診の不徹底などが考えられるが，発病児1例ずつを振り返ることは非常に有用である。実際，小児における予防内服にもDOTSを導入したり，感染源となった患者に排菌がみられない場合でもその接触者が乳幼児の場合には，慎重に接触者健診を実施するようになるなど，検討会で得られた教訓を生かして対策をすすめるようになった保健所も多くみられる。保健所は患者や患児への直接的支援だけでなく，医療機関や福祉部門，また学校・施設など複数の機関の中心でコーディネーター的な役割もしっかりと果たさなければならない。

一方，医療機関における診断能力の向上についても多くの意見が交わされた。呼吸器症状を長期間呈している小児に対して，「結核」を鑑別診断の一つとして疑うことやX-P・CTなど画像検査の読影能力の向上，また新しい検査法としてのQFT検査の有用性についても討論がなされた。複数の症例については感染源である両親などが排菌をしながら小児科病棟を出入りしていたことなども判明し，院内感染防止対策をどのように進めるべきかといった点も議論された。

さらには，乳児のBCG接種後のコッホ現象から，感染源である母親の発病が確認された事例もみられ，コッホ現象についての正しい知識と経過を観察する上でのポイントなども議論された。

このような検討会方式の対策は，医療機関にとっても行政にとっても教訓となる観点も多く，近畿地方だけではなく，さらに全国の大都市部の小児結核対策への拡大が可能であり，今後の行政施策に大きく貢献できる可能性がある。

文 献

- 1) 結核予防会編. 結核の統計2008. 東京：結核予防会，2008.
- 2) 森亨編. 保健所における結核対策強化の手引きとその解説. 東京：結核予防会，2000：31-3.
- 3) 永井仁美，高松 勇，ほか. 平成17年度厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「小児結核及び多剤耐性結核の予防，診断，治療における技術開発に関する研究」分担研究報告書. 2006. 3.
- 4) 高松 勇. BCG再接種廃止・学校健診廃止に際して. 日本小児呼吸器疾患学会雑誌2002；13：115-30.

Downregulation of *katG* expression is associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*

Hiroki Ando,¹ Tomoe Kitao,¹
Tohru Miyoshi-Akiyama,¹ Seiya Kato,² Toru Mori²
and Teruo Kirikae^{1*}

¹National Center for Global Health and Medicine, 1-21-1
Toyama, Shinjuku, Tokyo 162-8655, Japan.

²Research Institute of Tuberculosis, Japan
Anti-Tuberculosis Association, Matsuyama 3-1-24,
Kiyose, Tokyo 204-8533, Japan.

Summary

Isoniazid (INH) is a key agent in the treatment of tuberculosis. In *Mycobacterium tuberculosis*, INH is converted to its active form by KatG, a catalase-peroxidase, and attacks InhA, which is essential for the synthesis of mycolic acids. We sequenced *furA*–*katG* and *fabG1*–*inhA* in 108 INH-resistant (INH^r) and 51 INH-susceptible (INH^s) isolates, and found three mutations in the *furA*–*katG* intergenic region (Int^{g-7a}, Int^{g-10c} and Int^{g-12a}) in four of 108 INH^r isolates (4%), and the *furA*^{c41t} mutation with an amino acid substitution in 18 INH^r isolates (17%). These mutations were not found in any of 51 INH^s isolates tested. We reconstructed these mutations in isogenic strains to determine whether they conferred INH resistance. We found that the Int^{g-7a}, Int^{g-10c} and Int^{g-12a} single mutations in the *furA*–*katG* intergenic region decreased *katG* expression and conferred INH resistance. In contrast, the *furA*^{c41t} mutation was not sufficient to confer INH resistance. These results suggested that downregulation of *katG* is a mechanism of INH resistance in *M. tuberculosis* and that mutations in the *furA*–*katG* intergenic region play a role in this resistance mechanism.

Introduction

Isoniazid (INH) is one of the most effective and specific antituberculosis drugs, which has been a key to treatment since its introduction in 1952 (Bernstein *et al.*, 1952). However, the continued utility of INH is being

jeopardized by the emergence of INH-resistant (INH^r) and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (Espinal *et al.*, 2001). Furthermore, INH resistance is often the first type of resistance that occurs on the way to multidrug resistance (Caminero, 2010). Thus, there is considerable interest in determining the molecular basis of INH resistance in clinical *M. tuberculosis* isolates.

INH enters the mycobacterial cell by passive diffusion (Bardou *et al.*, 1998). INH is a prodrug that is activated by the mycobacterial enzyme KatG (Zhang *et al.*, 1992). Although mutations in *katG* have been shown to be responsible for INH resistance (Zhang and Telenti, 2000), it is not clear whether the regulation of *katG* expression plays a role in INH resistance. The *katG* gene encodes a bifunctional catalase-peroxidase that converts INH to its active form (Zhang *et al.*, 1992). Activated INH inhibits the synthesis of essential mycolic acids by inactivating the NADH-dependent enoyl-acyl carrier protein reductase encoded by *inhA* (Banerjee *et al.*, 1994; Vilcheze *et al.*, 2006). We have developed a DNA sequencing-based method to detect mutations in eight genome regions associated with drug resistance in *M. tuberculosis*, including *katG* (Sekiguchi *et al.*, 2007). This led to the identification of 18 novel *katG* mutations, which caused loss of catalase and INH oxidation activities (Sekiguchi *et al.*, 2007; Ando *et al.*, 2010). However, no mutations in *katG* were found during screening of a significant population of INH^r *M. tuberculosis* isolates.

We describe here the identification of three novel mutations in the *furA*–*katG* intergenic region, which are associated with INH resistance in *M. tuberculosis*. To our knowledge, no previous reports have identified mutations in the *furA*–*katG* intergenic region related to INH resistance in *M. tuberculosis*. A polypurine sequence in the *furA*–*katG* intergenic region complementary to 16S rRNA has been found to act as the *katG* ribosome binding site (Sala *et al.*, 2008). Mutations altering complementarity to 16S rRNA decreased the level of transcription (Sala *et al.*, 2008). We found that single mutations in these polypurine sequences decreased *katG* expression and conferred INH resistance in *M. tuberculosis*.

Accepted 5 January, 2011. *For correspondence. E-mail tkirikae@ri.ncgm.go.jp; Tel. (+81) 3 3202 7181; Fax (+81) 3 3202 7364.

Results

Genetic mutations in INH^r isolates

We sequenced *furA*–*katG* and *fabG1*–*inhA* in 108 INH^r resistant (INH^r) and 51 INH^s susceptible (INH^s) isolates. The details of the results for all INH^r isolates have been reported previously (Ando *et al.*, 2010). These regions included *katG*, the upstream region of *fabG1*–*inhA* (P_{inhA}), and *inhA*, which are responsible for INH resistance (Zhang and Telenti, 2000). We found three mutations in the *furA*–*katG* intergenic region (Int^{g-7a}, Int^{a-10c} and Int^{g-12a}) in four (4%) of the 108 INH^r isolates, a *furA*^{c41t} mutation with an amino acid substitution in 18 INH^r isolates (17%), and a *furA*^{Δ34c} mutation with a frameshift in one INH^r isolate (1%) (Table 1). None of these mutations was found in any of the 51 INH^s isolates tested (data not shown). In addition, we sequenced *ndh*, *ahpC* and *kasA*–*kasB* in all the INH^r isolates tested. Mutations in *ndh* (Zhang and Telenti, 2000; Lee *et al.*, 2001), *ahpC* (Zhang and Telenti, 2000) and *kasA* (Lee *et al.*, 1999; Zhang and Telenti, 2000) have been found in INH^r clinical isolates of *M. tuberculosis*. Mutations in *ndh* have been found to mediate INH resistance by increasing NADH cellular concentration in mycobacteria (Vilcheze *et al.*, 2005), whereas the roles of *ahpC* and *kasA* in INH resistance have not yet been determined (Zhang and Telenti, 2000). Of the four isolates containing mutations in the *furA*–*katG* intergenic region (Int^{g-7a}, Int^{a-10c} and Int^{g-12a}), the isolate with the Int^{g-12a} mutation also had a mutation in the P_{inhA} (P_{inhA}^{c-15t}) (Table 1). Of the 18 isolates containing the *furA*^{c41t} mutation, seven had no other mutation, six had a P_{inhA}^{c-15t} mutation, one had a *katG*^{g1624c} mutation and a mutation in the region upstream of *ahpC*, three had a *katG*^{g944c} mutation, and one had *katG*^{a290g} and *fabG1*^{g609a} mutations. The isolate with the *furA*^{Δ34c} mutation also had three other mutations, *katG*^{g368a}, *katG*^{g895a} and P_{inhA}^{t-8c} . Two drug-susceptible control strains, H37Rv and NCGM2898, had no mutation (Table 1). An INH^r strain of NCGM2828 had the P_{inhA}^{c-15t} mutation. An INH^r strain of NCGM2836 had a large-scale deletion of *furA*–*katG*, as described previously (Ando *et al.*, 2010). All isolates tested except H37Rv had a g1388t mutation in *katG*, which is a neutral mutation that is not associated with INH resistance (Zhang and Telenti, 2000).

IS6110-probed restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of isolates harbouring mutations in the *furA*–*katG* intergenic region or *furA*

The results of IS6110-probed fingerprinting of the 159 isolates, the 108 INH^r isolates and the 51 INH^s isolates, are shown in Fig. S1. Mutations in the *furA*–*katG* intergenic region and *furA* are also shown in Fig. S1. Six clusters were detected by restriction fragment length poly-

morphism (RFLP) analysis, with 65 INH^r isolates (60%) belonging to these clusters. Of the four isolates with mutations in the *furA*–*katG* intergenic region, one belonged to cluster III, one to cluster IV, and the remaining two did not belong to any cluster. Among the 18 isolates with *furA*^{c41t}, 12 (67%) belonged to cluster II, and the remaining six did not belong to any cluster. Of the 12 isolates belonging to cluster II, five (NCGM2806, 2807, 2833, 2853 and 2945) had another mutation, P_{inhA}^{c-15t} ; four (NCGM2823, 2829, 2846 and 2881) had a *katG* mutation; and three (NCGM2790, 2812 and 2821) did not have any other mutation (Table 1). These findings suggest that the majority of INH^r isolates expanded in a clonal manner in Japan. The isolates with Int^{g-7a}, Int^{a-10c} and Int^{g-12a} expanded sporadically in Japan; about two-thirds of the isolates with *furA*^{c41t} mutations expanded clonally, while the others did so sporadically.

Construction of isogenic strains with Int^{g-7a}, Int^{a-10c}, Int^{g-12a} and *furA*^{c41t}

The NCGM2836 strain was resistant to INH (1.0 µg ml⁻¹) and had deletions of *furA* and *katG* (Ando *et al.*, 2010). This strain had a deletion of 5603 bp, extending from position 2 152 072 to 2 157 675 of the H37Rv sequence. This was predicted to result in the complete loss of *furA*, *katG*, and the adjacent genes *rv1906c*, *rv1907c* and *rv1910c*, as well as the disruption of *aao* and *lppC* (Fig. 1A).

We assembled a series of constructs to complement the Δ (*furA*–*katG*) mutant strain NCGM2836 with pMV306 (Fig. 1B and C), by site-specific integration into the chromosomal *attB* site (Stover *et al.*, 1991; Kong and Kunimoto, 1995). The constructs had no *furA*–*katG* (NCGM2836/Vector); or *furA*–*katG* harbouring no mutation (NCGM2836/WT), *furA*^{c41t} (NCGM2836/*furA*^{c41t}), Int^{g-7a} (NCGM2836/Int^{g-7a}), Int^{a-10c} (NCGM2836/Int^{a-10c}) or Int^{g-12a} (NCGM2836/Int^{g-12a}).

Reduced *katG* expression in the complemented strains with a mutation in the *furA*–*katG* intergenic region

We found that H37Rv expressed KatG, whereas the Δ (*furA*–*katG*) mutants NCGM2836 and NCGM2836/Vector did not (Fig. 2A). NCGM2836/WT and NCGM2836/*furA*^{c41t} expressed KatG at levels similar to that of H37Rv, whereas NCGM2836/Int^{g-7a} and NCGM2836/Int^{a-10c} expressed KatG at levels 17% and 19%, respectively, that of NCGM2836/WT. The strain NCGM2836/Int^{g-12a} produced KatG, but its expression level was slightly lower (66%) than that of NCGM2836/WT.

The INH oxidase activities of these strains were correlated with their levels of KatG expression (Fig. 2B). H37Rv showed INH oxidase activity, while NCGM2836

Table 1. The drug susceptibility and mutation(s) of *M. tuberculosis* clinical isolates.

Isolate	Drug susceptibility		Mutations														
	Agar proportion method	MIC of INH ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	<i>furA–katG</i>					<i>fabG1–inhA</i>			<i>ahpC</i>		<i>ndh</i>		<i>kasA–kasB</i>		
	by Vit Spectrum-SR	by BrothMIC MTB-I	Up	<i>furA</i>	Int	<i>katG</i>	Up	<i>fabG1</i>	Int	<i>inhA</i>	Up	<i>ahpC</i>	Up	<i>ndh</i>	<i>kasA</i>	Int	<i>kasB</i>
NCGM2874	INH(0.2), SM	1.0	–	–	g-7a	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2875	INH(0.2), SM	1.0	–	–	g-7a	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2930	INH(1.0), RIF, SM, KM, EB, TH, PAS, LVFX	16.0	–	–	a-10c	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2934	INH(0.2), RIF, SM, EB	2.0	–	–	g-12a	–	c-15t	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2790	INH(0.2), SM, KM, PAS	2.0	–	c41t	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2795	INH(0.2), SM	1.0	–	c41t	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2812	INH(0.2)	1.0	–	c41t	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2821	INH(1.0)	1.0	–	c41t	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2906	INH(0.2), LVFX	0.5	–	c41t	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2907	INH(0.2)	1.0	–	c41t	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2911	INH(0.2)	1.0	–	c41t	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2806	INH(0.2), SM	2.0	–	c41t	–	–	c-15t	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2807	INH(0.2), SM	2.0	–	c41t	–	–	c-15t	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2833	INH(0.2), SM	2.0	–	c41t	–	–	c-15t	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2853	INH(0.2), SM	2.0	–	c41t	–	–	c-15t	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2858	INH(0.2), SM	2.0	–	c41t	–	–	c-15t	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2945	INH(0.2)	1.0	–	c41t	–	–	c-15t	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2823	INH(1.0)	> 32.0	–	c41t	–	g1624c	–	–	–	c-81t	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2829	INH(1.0)	> 32.0	–	c41t	–	g944c	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2846	INH(1.0)	> 32.0	–	c41t	–	g944c	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2881	INH(0.2), KM, EVM, TH	16.0	–	c41t	–	a290g	–	g609a	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2895	INH(1.0)	> 32.0	–	c41t	–	g944c	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2835	INH(1.0), RIF, SM, EB, CS, TH, PAS, LVFX	> 32.0	–	Δ 34c	–	g368a, g895a	t-8c	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
(Controls)																	
H37Rv	Pan-sensitive	0.125	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2898	Pan-sensitive	0.125	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NCGM2828	INH(0.2)	2.0	–	–	–	–	c-15t	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
(A host for re-construction of a mutation)																	
NCGM2836	INH(1.0), PAS	> 32.0	–	Deletion	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

INH(0.2), resistant to INH (0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and susceptible to INH (1.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$); INH(1.0), resistant to INH (1.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$); RIF, rifampin; EB, ethambutol; KM, kanamycin; PAS, *p*-aminosalicylic acid; SM, streptomycin; TH, ethionamide; EVM, enviomycin; CS, cycloserine; LVFX, levofloxacin; Up, upstream region; Int, intergenic region; –, no mutation. Excluding the *katG* g1388t (KatG R463L) polymorphism.