

Table 4. MIC values for drugs and mutations in *rpoB*, *katG*, *inhA*, *gyrA*, and *rrs* of isolates in the MDR-TB SC.

cluster	MDR isolates No.	MDR or MDR	MIC (ug/ml)										mutations				
			INH	RFP	SM	KM	EB	LVFX	SPFX	CPFX	<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>rrs</i>	<i>gyrA</i>		
OM-V02	005	XDR	8	16	32	>128	64	4	32	4	Asp 516 Val	Ser 315 Thr	none	A 1400 G	Asp 94 Ala		
	010	XDR	8	16	64	>128	64	2	1	4	Asp 516 Val	Ser 315 Thr	none	A 1400 G	Asp 94 Ala		
	019	XDR	8	32	32	>128	64	2	1	4	Asp 516 Val	Ser 315 Thr, G 944 C	none	A 1400 G	Asp 94 Ala, Thr 95 Thr/Pro		
	030	XDR	8	8	16	>128	16	2	1	2	Asp 516 Val	Ser 315 Thr	none	A 1400 G	Asp 94 Ala		
	050	MDR	8	>32	32	>128	64	0.5	0.125	0.25	Asp 516 Val	Ser 315 Thr	none	A 1400 G	none		
	051	MDR	8	32	64	>128	64	0.5	0.125	0.5	Asp 516 Val	Ser 315 Thr	none	A 1400 G	none		
	063	XDR	8	16	32	>128	32	2	1	4	Asp 516 Val	Ser 315 Thr	none	A 1400 G	Asp 94 Ala		
	073	XDR	16	8	16	>128	16	4	16	4	Asp 516 Val	Ser 315 Thr	none	A 1400 G	Asp 94 Ala		
	082	XDR	8	16	64	>128	64	2	1	2	Asp 516 Val	Ser 315 Thr	none	A 1400 G	Asp 94 Ala		
	095	XDR	32	16	>128	8	4	2	1	2	Asp 516 Val, LeuSer 533 Pro	Ser 315 Thr	none	A 1400 G	Asp 94 Ala		
004	XDR	8	4	16	>128	16	2	1	4	Asp 516 Val	Ser 315 Thr	none	A 1400 G	Asp 94 Ala			
OM-V03	013	XDR	8	>32	64	>128	16	8	4	8	Ser 531 Leu	Ser 315 Thr	none	A 1400 G	Asp 94 Gly		
	029	XDR	>32	>32	64	>128	16	8	4	8	Ser 531 Leu	Ser 315 Thr	C -15 T	A 1400 G	Asp 94 Gly/Asp		
	061*										Ser 531 Leu	Ser 315 Thr	none		Asp 94 Gly		
	064	XDR	8	>32	128	>128	16	8	4	16	Ser 531 Leu	Ser 315 Thr	none	A 1400 G	Asp 94 Gly		
OM-V04	002	MDR	4	32	4	2	8	2	1	2	Ser 531 Leu	none	C -15 T	none	Asp 94 Ala, Thr 95 Thr/Pro		
	020	MDR	4	>32	4	2	4	2	1	2	Ser 531 Leu	none	C -15 T	none	Asp 94 Ala		
	049	MDR	32	>32	>128	>128	16	0.25	0.125	0.25	His 526 Arg	none	C -15 T	A 1400 G	none		
OM-V06	044	XDR	4	1	>128	64	64	16	8	32	His 526 Ser	none	none	none	Asp 94 Gly		
	042	XDR	64	8	>128	16	32	8	4	8	Ser 531 Leu	none	none	none	none		

*MIC could not be determined because the isolate perished before we received.

doi:10.1371/journal.pone.0042505.t004

indicating that HIV is not a considerable factor involved in this high XDR/MDR ratio.

In this study, the percentage of Beijing lineage genotypes found among MDR-Mtb isolates (79/89, 88.8%) was significantly higher than that of population-based non MDR-Mtb (425/550, 77.3%) which was almost same as obtained nationwide in Japan [18]. The Beijing lineage is of particular concern because it has a high predilection for developing drug resistance [24], which may explain the high percentage of the Beijing lineage in MDR-Mtb seen in this study. Beijing strains can be classified into modern and ancient sub-lineages. Although the modern Beijing sub-lineage was reported to be disseminating worldwide [25], the ratio of modern sub-lineage of the 79 MDR-Mtb isolates belonging to Beijing lineage was 24.1%, which is similar to that reported for Japan [26,27]. These data suggest that there is no discrepancy of frequency of acquiring MDR/XDR phenotypes between ancient and modern sub-lineages.

Although the ratio of cluster-forming isolates in MDR-Mtb was significantly lower than that in population-based non MDR-Mtb (27.0% and 39.3%, respectively), 6 identical clusters were found in MDR-Mtb isolates. It was been reported that some MDR-Mtb isolates form clusters with identical genotypes [9–12,28]. Although our collection of Mtb isolates analyzed in this study did not fully cover all Mtb isolates before 2007, it is notable that four clusters consisting of 20 (22.4%) MDR-Mtb isolates showed unique MIRU-VNTR patterns that were not detected in non-MDR/XDR-Mtb isolates from Osaka Prefecture and neighboring

regions. Based on similarities of genotype, drug resistance, and mutations, we regarded all isolates belonging to OM-V02 and OM-V03, and two isolates from OM-V04 (Nos. 002 and 020; Table 4) as clones. Of these 17 isolates, 11 isolates were isolated from newly diagnosed MDR-TB patients. It was shown that at least these 11 cases were caused by infection not by result of inadequate chemotherapy. Seven of 11 cases with OM-V02 Mtb were newly diagnosed, i.e., OM-V02 Mtb isolates likely transmitted. Since insufficient epidemiological information was available, we could not predict whether the cause of the transmission of these infectious MDR-Mtb were due to social behavior of patients. Chronologically, for each OM-V02 clone, although the additional mutation was observed in No.019, it was isolated earlier than other XDR-Mtb isolates. XDR-Mtb isolates 019 and 073 were isolated before the Nos. 050 and 051 from MDR-Mtb cases. These data suggest that some MDR-V02 clones have remained multidrug resistant and some other derivatives had acquired further drug resistance and had become XDR-Mtb during the spread through multiple infectious routes.

In addition, two additional OM-V02 clones were isolated after the study period. Of these, one was isolated from a new MDR-TB case and the other was from a re-infected patient cured of a drug-sensitive Mtb infection (different from OM-V02) two years prior to reinfection. Although the infectious routes of these two additional cases were not specified, these cases support the evidence of expansion by transmission of OM-V02 Mtb. OM-V02 clones may be warned as a big problem in public health, because XDR-Mtb

Table 5. Characteristics of cases and mutations of isolates in the MDR-TB SC.

Cluster	MDR isolate No.	MDR/XDR*	Sex	Age(years)	Year of case reported	History of TB	additional mutation
OM-V02	005	XDR	Female	50–59	2004	New	
	010	XDR	Male	50–59	2006	relapsed	
	019	XDR	Male	40–49	2002	New	<i>katG, gyrA</i>
	030	XDR	Female	50–59	2007	relapsed	
	050	MDR	Male	20–29	2003	New	
	051	MDR	Female	50–59	2003	New	
	063	XDR	Male	70–79	2008	Unknown	
	073	XDR	Male	70–79	2002	Unknown	
	082	XDR	Female	20–29	2003	New	
	095	XDR	Male	80–89	2005	New	<i>rpoB</i>
	004	XDR	Male	90–99	2004	New	
OM-V03	013	XDR	Male	80–89	2000	Unknown	
	029	XDR	Female	30–39	2006	New	<i>inhA, gyrA</i>
	061		Male	Unknown	2008	Unknown	
	064	XDR	Male	60–69	2007	New	
OM-V04	002	MDR	Male	60–69	2003	New	<i>gyrA</i>
	020	MDR	Male	30–39	2002	New	

*MDR, multidrug resistant, XDR, extensively-drug resistant.
doi:10.1371/journal.pone.0042505.t005

belonging to OM-V02 was highly resistant Mtb (Table 4) and caused XDR-TB in the wide range of ages (Table 5). The systematical and rapid test of 2nd line drugs sensitivity and genotyping are needed to detect OM-V02 clones or such drug resistant strains. Furthermore, the improvement of TB control containing enforced management of patients and thorough contact investigation will be needed to prevent expansion of OM-V02 clones or such strains.

Of 89 MDR-Mtb isolates, the most frequent mutation conferring RFP resistance was S531L in *rpoB* (38/89, 42.7%; data not shown), and the D516V mutation in *rpoB* of OM-V02 Mtb was the third most frequent mutation conferring RFP resistance in 89 MDR-Mtb. The S531L mutation in *rpoB* was reported to not cause reduction of fitness, especially in the Beijing lineage [29,30], and the D516V mutation did not to impair fitness compared with drug-sensitive clinical isolates [31]. Thus, it is conceivable that the combination with the phylogenetic structures of OM-V02 MDR-Mtb and the mutations conferring resistance to OM-V02 carries a relatively low fitness deficit. Although we could not determine the veritable cause of OM-V02 predominance in this study, it is possible that some Mtb clones like OM-V02 retain or strengthen infectiousness and/or have the ability to progress to an active form of the disease following the acquisition of drug resistance.

References

1. Caminero JA (2006) Treatment of multidrug-resistant tuberculosis: evidence and controversies. *Int J Tuberc Lung Dis* 10: 829–837.
2. Jain A, Dixit P (2008) Multidrug-resistant to extensively drug resistant tuberculosis: what is next? *J Biosci* 33: 605–616.
3. Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, Pawinski R, Govender T, et al. (2006) Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* 368: 1575–1580.
4. Masjedi MR, Farnia P, Sorooch S, Pooramiri MV, Mansoori SD, et al. (2006) Extensively drug-resistant tuberculosis: 2 years of surveillance in Iran. *Clin Infect Dis* 43: 841–847.
5. Lomtadze N, Aspindzelashvili R, Janjgava M, Mirskhulava V, Wright A, et al. (2009) Prevalence and risk factors for multidrug-resistant tuberculosis in the Republic of Georgia: a population-based study. *Int J Tuberc Lung Dis* 13: 68–73.
6. Ti T, Lwin T, Mar TT, Maung W, Noc P, et al. (2002) National anti-tuberculosis drug resistance survey, 2002, in Myanmar. *Int J Tuberc Lung Dis* 10: 1111–1116.
7. Kubica T, Rusch-Gerdes S, Niemann S (2004) The Beijing genotype is emerging among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Germany. *Int J Tuberc Lung Dis* 8: 1107–1113.

In spite of the high ratio of OM-V02 among MDR/XDR Mtb isolates, we did not detect non-MDR/XDR-Mtb strains with genotypes the same as OM-V02. Thus, it is likely that a drug-sensitive ancestral clone of OM-V02 or its derivatives have lower fitness cost than OM-V02 MDR/XDR-Mtb strains. This suggests that the well-organized medical treatment of TB patients with multiple drugs in Osaka, Japan might bring about colonization by selected transmissible highly drug-resistant Mtb clones. Thus, this study highlights that the spread of highly drug-resistant Mtb is not only a problem in developing [24] countries, but also in developed countries with excellent medical care systems, such as Japan.

Acknowledgments

We are grateful to the National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, Toneyama National Hospital, and the Japan Anti-tuberculosis Association Osaka Hospital for aid in collecting the isolates.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AT CN TW RM HO YS SM. Performed the experiments: AT CN TW RK YW MI YO. Analyzed the data: AT CN TW HO KK YS SM. Wrote the paper: AT YS SM.

8. Shah NS, Pratt R, Armstrong L, Robison V, Castro KG, et al. (2009) Extensively drug-resistant tuberculosis in the United States, 1993–2007. *JAMA* 300: 2153–2160.
9. Vazquez-Gallardo R, Anibarro L, Fernandez-Villar A, Diaz-Cabanela D, Cruz-Ferro E, et al. (2007) Multidrug-resistant tuberculosis in a low-incidence region shows a high rate of transmission. *Int J Tuberc Lung Dis* 11: 429–435.
10. Sun YJ, Lee AS, Wong SY, Heersma H, Kremer K, et al. (2007) Genotype and phenotype relationships and transmission analysis of drug-resistant tuberculosis in Singapore. *Int J Tuberc Lung Dis* 11: 436–442.
11. Kubica T, Agzamova R, Wright A, Aziz MA, Rakishev G, et al. (2005) The Beijing genotype is a major cause of drug-resistant tuberculosis in Kazakhstan. *Int J Tuberc Lung Dis* 9: 646–653.
12. Devaux I, Kremer K, Heersma H, Van Soolingen D (2009) Clusters of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* cases, Europe. *Emerg Infect Dis* 15: 1052–1060.
13. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, et al. (1995) Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 33: 3234–3238.
14. European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis. (2006) Beijing/W genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. *Emerg Infect Dis* 12: 736–743.
15. Ministry of Health Labour and Welfare. (2011) Statistics of tuberculosis 2010 [in Japanese]. Tokyo: Japan Anti-Tuberculosis Association.
16. Ministry of Health Labour and Welfare. (2011) Statistics of AIDS 2010 [in Japanese]. AIDS Prevention Information Network.
17. Tuberculosis Research Committee (Ryoken) (2002) [Anti-tuberculosis drug resistance survey in Japan, 2002: external quality assessment of results]. *Kekkaku* 82: 155–164.
18. Murase Y, Mitarai S, Sugawara I, Kato S, Maeda S (2008) Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol* 57: 873–880.
19. Kozak M (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15: 8125–8148.
20. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, et al. (2006) Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 44: 4498–4510.
21. Warren RM, Victor TC, Streicher EM, Richardson M, Beyers N, et al. (2004) Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 610–614.
22. Wada T, Iwamoto T, Maeda S (2009) Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis. *FEMS Microbiol Lett* 291: 35–43.
23. Plikaytis BB, Marden JL, Crawford JT, Woodley CL, Butler WR, et al. (1994) Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 32: 1542–1546.
24. Shah NS, Wright A, Bai GH, Barrera L, Boulahbal F, et al. (2007) Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis. *Emerg Infect Dis* 13: 380–387.
25. Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, Ndabambi SL, McEvoy CR, et al. (2007) A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. *J Clin Microbiol* 45: 1483–1490.
26. Wada T, Fujihara S, Shimouchi A, Harada M, Ogura H, et al. (2009) High transmissibility of the modern Beijing *Mycobacterium tuberculosis* in homeless patients of Japan. *Tuberculosis (Edinb)* 89: 252–255.
27. Iwamoto T, Fujiyama R, Yoshida S, Wada T, Shirai C, et al. (2009) Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan. *J Clin Microbiol* 47: 3340–3343.
28. Murase Y, Maeda S, Yamada H, Ohkado A, Chikamatsu K, et al. (2010) Clonal expansion of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis, Japan. *Emerg Infect Dis* 16: 948–954.
29. Billington OJ, McHugh TD, Gillespie SH (1999) Physiological cost of rifampin resistance induced in vitro in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1866–1869.
30. Mariam DH, Mengistu Y, Hoffner SE, Andersson DI (2004) Effect of rpoB mutations conferring rifampin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1289–1294.
31. O'Sullivan DM, McHugh TD, Gillespie SH (2010) Mapping the fitness of *Mycobacterium tuberculosis* strains: a complex picture. *J Med Microbiol* 59: 1533–1535.

Protection by a Recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Vaccine Expressing Shiga Toxin 2 B Subunit against Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Mice

Jun Fujii,^a Mariko Naito,^b Takashi Yutsudo,^c Sohkiichi Matsumoto,^d Daniel P. Heatherly,^e Takeshi Yamada,^b Hideyuki Kobayashi,^f Shin-ichi Yoshida,^a and Tom Obrigg^g

Department of Bacteriology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan^a; Microbiology and Oral Infection, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki, Japan^b; Discovery Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd., Toyonaka City, Osaka, Japan^c; Department of Bacteriology, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan^d; Department of Internal Medicine/Nephrology, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, USA^e; Department of Chemistry, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu City, Japan^f; and Department of Microbiology and Immunology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA^g

We have developed a novel vaccine against Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) infection using a recombinant *Mycobacterium bovis* BCG (rBCG) system. Two intraperitoneal vaccinations with rBCG expressing the Stx2 B subunit (Stx2B) resulted in an increase of protective serum IgG and mucosal IgA responses to Stx2B in BALB/c mice. When orally challenged with 10³ CFU of STEC strain B2F1 (O91:H21), the immunized mice survived statistically significantly longer than the nonvaccinated mice. We suggest that intraperitoneal immunization with rBCG expressing Stx2B would be a potential vaccine strategy for STEC.

Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) or enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is a causative agent of hemorrhagic diarrhea (33), hemolytic uremic syndrome (HUS) (12), and neurological damage (36). In Sakai City, Japan, 7,892 schoolchildren and 74 teachers were affected in a large outbreak in 1996 (25). One hundred twenty-one individuals developed HUS, and three females died with complications of the central nervous system. A large outbreak of Shiga toxin 2-producing enteroaggregative *E. coli* (EAEC) O104:H4 occurred in northern Germany in May 2011. In total, 16 countries in Europe and North America reported 3,222 infectious cases resulting in 810 (25%) cases of HUS and 50 deaths (7). In Japan, between late April and early May 2011, an outbreak of Stx2-producing EHEC O111 infection occurred in Toyama, Fukui prefecture, and Yokohama. A total of 169 people developed diarrhea, 30 (17.8%) developed HUS, and surprisingly, encephalopathy developed in 47% (fourteen cases) of the HUS patients; five patients died with neurological manifestations, including somnolence, coma, and convulsions (21). In the town of Walkerton, Ontario, Canada, in 2000, approximately 2,300 people became seriously ill and seven died from exposure to STEC-contaminated drinking water. These outbreaks emphasize the need for a protective vaccine for EHEC in the general population as well as in the case of possible bioterrorist attacks.

The Stx family includes Shiga toxins (Stxs) produced by *Shigella dysenteriae* and by *E. coli* (Stx1, Stx1c, Stx1d, Stx2, Stx2c2, Stx2d, Stx2e, or Stx2f) (26). Strains producing Stx1, Stx1c, Stx2, Stx2c, Stx2d, and Stx2e have been isolated from human infections, and Stx2e-producing strains have been isolated from pigs. Stx2d is the most potent of the Stxs in mouse lethality due to increased toxicity after toxin activation by mouse intestinal mucus (14). There is a high (86.6%) nucleotide sequence identity among the B subunits of the Stx2 variants (32). However, a lower proportion of patients developed HUS after infection with Stx2d-producing STEC versus Stx2- or Stx2c-producing STEC (8). All members of the Stx family are comprised of 1A and 5B subunit proteins (29). The A subunit is an N-glycosidase, which removes adenine from

nucleotide 4324 of 28S RNA of the 60S ribosomal subunit (5), rendering ribosomes inactive for protein synthesis (30). Each B subunit binds with high affinity to the glycosphingolipid globotriaosylceramide (Gb3), which is expressed on the surface of eukaryotic cells (18).

Bosworth et al. reported that vaccination of pigs with a genetically modified nontoxic form of Stx2e (E167Q) induced antibodies to Stx2e (2). Pigs vaccinated with Stx2e (E167Q) had a reduced incidence of subclinical edema disease and never developed clinical edema disease. Acheson et al. reported that oral administration of an Stx1 B-subunit-expressing *Vibrio cholerae* vaccine strain [CVD 103-HgR(pDA60)] caused development of neutralizing serum antibodies to Stx1 in rabbits (1). Rabbits immunized with Stx2 toxoid were fully protected from the intravenous administration of 10 and 50 50% lethal doses (LD₅₀) of Stx1, and this correlated directly with protection from binding of this toxin to target organs (19).

Bacillus Calmette-Guérin (BCG) is a live attenuated strain of *Mycobacterium bovis* that offers potential advantages as a vector for mucosal delivery of antigens. Recombinant BCG (rBCG) elicits protective humoral immune responses to a variety of antigens. A single intranasal vaccination with rBCG expressing the outer surface protein A antigen from *Borrelia burgdorferi* resulted in a protective systemic IgG response and a highly sustained secretory IgA response, and, surprisingly, prolonged effects lasted more than 1 year (15). Protective responses have been achieved with

Received 30 July 2012 Returned for modification 23 August 2012

Accepted 24 September 2012

Published ahead of print 3 October 2012

Address correspondence to Jun Fujii, junfujii@bact.med.kyushu-u.ac.jp.

Supplemental material for this article may be found at <http://cvi.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/CVI.00473-12

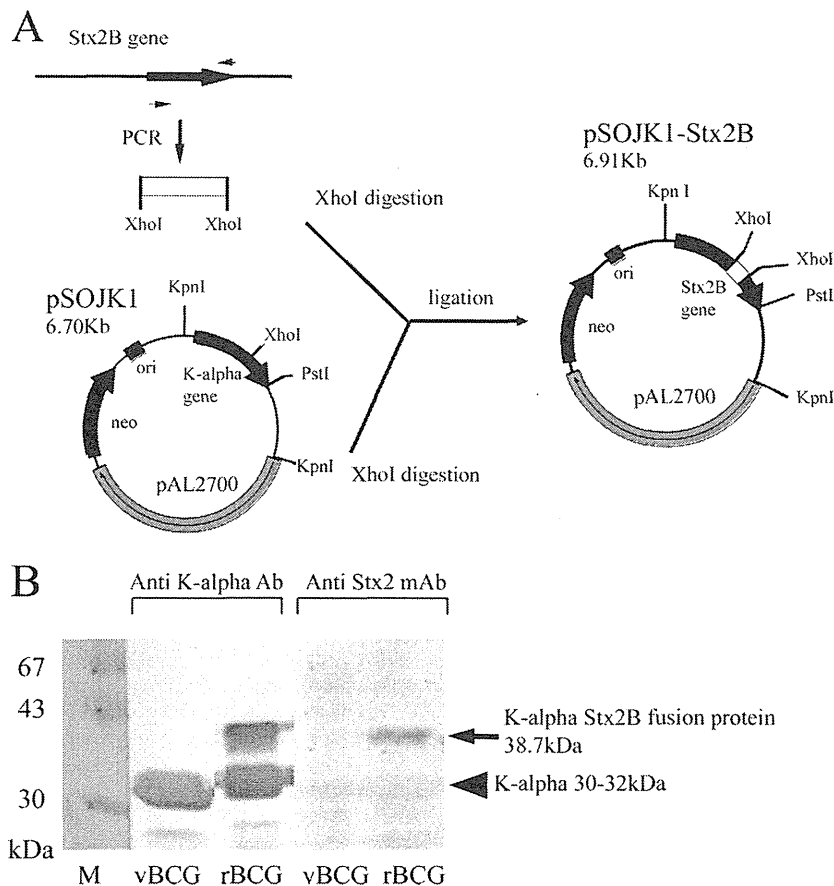


FIG 1 Recombinant BCG expressing Stx2B. (A) Schematic representation of rBCG-Stx2B. ori, origin of replication for BCG; neo, neomycin resistance gene. Endonuclease restriction sites are indicated by lines. (B) Expression of K-alpha-Stx2B fusion protein and K-alpha complex protein in the supernatant of rBCG-Stx2. Lanes: M, molecular mass marker; rBCG-SV, 20 μ g of secreted protein from BCG transformed with empty plasmid; rBCG-Stx2B, 20 μ g of secreted protein from BCG transformed with pSOJK1-Stx2B. Western blot analysis was done with polyclonal anti-K-alpha antibody and monoclonal anti-Stx2 antibody. The arrow and arrowhead show the K-alpha-Stx2B fusion protein and K-alpha complex protein, respectively.

rBCG in pneumococcal infection (16), leishmaniasis (4), and rodent malaria (23). Here, we have constructed an rBCG that expresses and secretes the Stx2 B subunit (Stx2B) to efficiently elicit host humoral immune responses against STEC infection. Our rBCG system expressed the Stx2B as a fusion protein in live BCG and caused humoral responses against Stx2B as serum IgG and mucosal IgA in mice. We have constructed a shuttle vector expressing Stx2B (pSOJK1-Stx2B) and transformed BCG with vector pSOJK1 or pSOJK1-Stx2B by electroporation. Finally, a streptomycin-treated mouse model infected with Stx2d-producing STEC strain B2F1, which is highly virulent in mice, was used to confirm the effects of rBCG in a challenge test.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial culture. BCG Tokyo was used as a host for plasmid pSOJK1 (22) and its derivatives. BCG Tokyo and its transformants were grown in Middlebrook 7H9 broth (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) supplemented with 10% albumin-dextrose-catalase (ADC) enrichment (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) and 0.05% Tween 80 (7H9 ADC medium). For immunization of mice, rBCG-Stx2B or rBCG with shuttle vector (rBCG-SV) was grown with shaking (100 rpm) at 37°C in 7H9 ADC. After 3 days of incubation with shaking, rBCG was pelleted at 4,000 \times g and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS). The optical density at 600 nm (OD_{600}) was measured, where 1.0 OD_{600} unit was estimated to be

10^8 CFU/ml of rBCG. Also, to confirm the bacterial count obtained using the OD_{600} , rBCG was counted by the colony assay method on Middlebrook 7H10 agar plates.

EHEC O91:H21 strain B2F1 producing Stx2d (provided by Alison O'Brien) was grown in Luria broth (L broth) (Bacto tryptone, 10 g; Bacto yeast extract, 5 g; NaCl, 5 g; glucose, 1 g; H₂O, 1 liter) at 37°C overnight, after which the organism was washed once with PBS by centrifugation (6,000 \times g for 20 min). The bacterial suspension of B2F1 producing Stx2d was adjusted to approximately 10^3 CFU/ml in PBS.

Purification of Stx2. Stx2 used in this study was purified as described previously (37) and was determined to be free of detectable lipopolysaccharide by the amebocyte lysate test. Purity was also confirmed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and cytotoxic potency in a Vero cell assay.

Construction of an *Escherichia coli*-mycobacterium shuttle vector that expresses the Stx2 B subunit. The gene encoding *E. coli* Stx2B was designed from the B subunit of bacteriophage 933W (accession no. X07865; positions 1210 to 1476) and amplified from *E. coli* 933W by PCR using designed primers. The nucleotide sequences of the oligonucleotides were as follows: forward primer, 5'-CCCCTCGAGTGC GGATTGTGCT AAAG-3', and reverse primer, 5'-CCCCTCGAGGGGTCATTATTAAC TGCA-3' (restriction sites for XhoI are underlined). These primers contained the sequences for XhoI restriction sites to facilitate ligation into pSOJK1. The amplified DNA was cloned in pGEM-T Easy vector (Promega Co, Madison, WI). The DNA sequence of the Stx2B gene and addi-

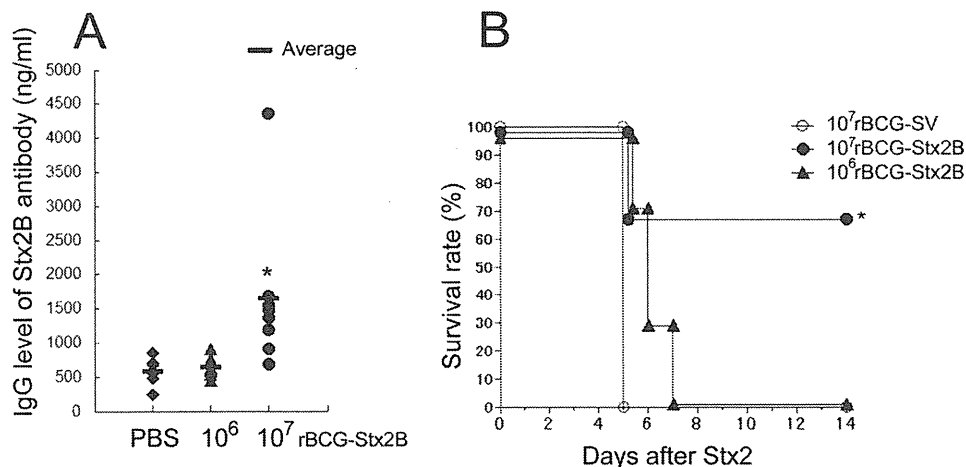


FIG 2 Two immunizations of rBCG-Stx2B, serum IgG antitoxin response, and challenge test with purified Stx2. (A) On day 0 and day 14, BALB/c mice were immunized i.p. with rBCG-Stx2B; each group received 10^6 ($n = 7$) or 10^7 ($n = 8$) CFU of rBCG-Stx2B or PBS ($n = 6$). On day 28, anti-Stx2B serum IgG antibody was measured using ELISA. *, $P < 0.05$. (B) On day 28, the challenge test with purified Stx2 was performed. The survival rates are shown. *, $P < 0.05$.

tional XhoI sites were confirmed by DNA sequencing with an ABI 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) to be matched with the Stx2 B-subunit gene under accession no. X07865 (see Fig. S1 in the supplemental material). The Stx2B gene fragment was digested with XhoI and was cloned into the XhoI site of the *Mycobacterium kansasii* K-alpha (antigen 85B) gene in pSOJK1 (22). The resulting plasmid, pSOJK1-Stx2B or pSOJK1, was transformed into BCG by electroporation as described previously (23) (Fig. 1A). rBCG-Stx2B was selected on Middlebrook 7H10-oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC) agar (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) containing 20 μ g/ml kanamycin (Meiji Seika Co. Ltd., Tokyo, Japan) and by culturing at 37°C for 4 weeks. Kanamycin-resistant colonies were then transferred to Sauton medium as described by Gheorghiu et al. (9) and grown at 37°C for 3 weeks. Culture supernatants were then obtained by filtration of the culture medium of rBCG through a membrane filter with a pore size of 0.45 μ m (Nihon Millipore K.K., Tokyo, Japan) and then concentrated by ammonium sulfate precipitation. Twenty micrograms of secreted protein was examined by SDS-PAGE and by immunoblotting as described previously (24). The membrane was then reacted with polyclonal anti-K-alpha antibody or anti-monoclonal Stx2B antibody (ViroStat Inc. Portland, ME). K-alpha was purified from the supernatant of rBCG-SV that was transformed with only pSOJK1 as described previously (28). Polyclonal anti-K-alpha sera were obtained from female rabbits (Japan SLC, Shizuoka, Japan) after multiple injections of K-alpha emulsified with incomplete Freund's adjuvant (Sigma, St. Louis, MO).

i.p. immunization. Ten-week-old female BALB/c mice were purchased from JAX Mice and Services (Bar Harbor, ME). Mice were immunized by intraperitoneal (i.p.) injection of 10^6 or 10^7 CFU of rBCG-Stx2B or 10^7 CFU of rBCG-SV followed by one booster 2 weeks later. This experiment was approved by the Animal Care and Use Committee, Kyushu University.

The first protocol for the immune response and Stx2 i.p. challenge test is shown in Fig. 2. Ten-week-old BALB/c mice were immunized with 10^6 or 10^7 CFU rBCG-Stx2B or with PBS. The second protocol, to test a lasting immune response, is shown in Fig. 3. Ten-week-old BALB/c mice were immunized with 10^6 or 10^7 CFU rBCG-Stx2B or PBS i.p.

Oral challenge with strain B2F1 in streptomycin-treated mice. Immunized mice were given water containing streptomycin (5 g/liter) (Meiji Seika Co. Ltd., Tokyo, Japan) *ad libitum* for 3 days to reduce the level of normal intestinal flora before oral inoculation with B2F1 (27). On day 3 of streptomycin treatment, the mice were starved for one-half day, giving water containing streptomycin, and then orally inoculated with 0.5 ml of B2F1 suspension (10^3 CFU). After the inoculation, food was resumed.

B2F1 is the most virulent of all EHEC strains after oral infection of streptomycin-treated mice (LD_{50} of 10 CFU after oral infection) (17). The mice were observed for 2 weeks after oral inoculation of the B2F1 strain.

Challenge of mice with purified Stx2. Ten-week-old female BALB/c mice were immunized by i.p. injection of 10^6 or 10^7 of rBCG-Stx2B or 10^7 CFU of rBCG-SV followed by one booster 2 weeks later. The numbers of mice per test group for mice inoculated with 10^6 or 10^7 CFU rBCG-Stx2B or 10^7 CFU rBCG-SV were 7, 6, and 5, respectively. Two weeks after vaccine administration, a dose of 2.9 ng/mouse (approximately 2 LD_{50}) of purified Stx2 was injected i.p., and the mice were then observed for 2 weeks.

ELISA of serum IgG and mucosal IgA anti-Stx2B antibodies. Antitoxin responses in serum and stool were determined by enzyme linked immunoassay (ELISA) under conditions similar to those previously described (10). Briefly, 96-well ELISA plates (Costar, Cambridge, MA) were coated overnight at room temperature with 1.5 mg/ml of purified Stx2 in PBS. Nonspecific sites were blocked by incubation with 1.0% bovine serum albumin (Sigma, St. Louis, MO), 5.0% sucrose, and 0.05% NaN_3 . After washing, the plates were incubated at room temperature for 2 h with 1:500-diluted serum samples. The bound Stx2-specific IgG was determined with sheep anti-mouse IgG horseradish peroxidase-conjugated antibody (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ) and subsequently developed with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate solution (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL). After addition of stop solution (2 N H_2SO_4), the wells were read at 450 nm. IgG concentrations were determined by plotting the sample values against a standard curve.

Analysis of mucosal IgA was performed as described previously (10). Briefly, stool was collected from animals in each group and rehydrated in PBS containing 3% bovine serum albumin and 10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma, St. Louis, MO) overnight. Samples were centrifuged at $10,000 \times g$, and the supernatant stored at $-20^\circ C$ until required. For IgA analysis, the wells for the test samples were coated with 2.0 mg/ml of purified Stx2 in PBS. For the standard curves, the wells were coated with goat anti-mouse IgA affinity-purified antibody (Bethyl Laboratories, TX). ELISA was performed as described above. The bound Stx2B-specific IgA was determined with goat anti-mouse IgA horseradish peroxidase-conjugated antibody (Bethyl Laboratories, TX) diluted 1:5,000, added to all of the wells, and incubated at room temperature for 2 h. The concentration of immunoglobulin was calculated from the optical density at 450 nm with standard curves. ELISA was performed on the three test groups (i.e., 10^6 or 10^7 of rBCG-Stx2B or 10^7 CFU of rBCG-SV), with serum or stool samples from PBS-injected mice as controls for each ELISA run. The ELISA results for each group were divided by the result for

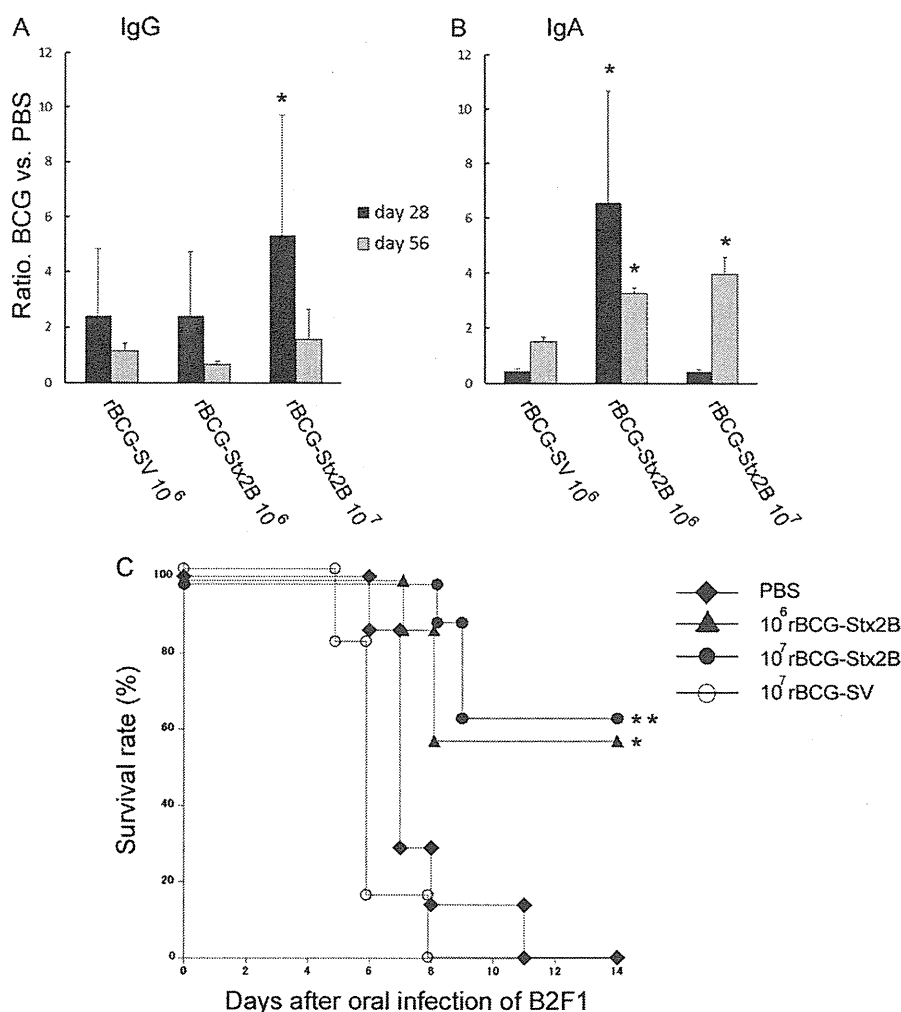


FIG 3 Immune response to Stx2B and oral challenge with strain B2F1 in streptomycin-treated mice. On day 0 and day 14, BALB/c mice were immunized i.p. with either PBS ($n = 9$), 10^6 CFU of rBCG-SV ($n = 6$), or 10^7 CFU of rBCG-Stx2B ($n = 6$). (A and B) The IgG (A) and IgA (B) ratios were obtained as the sample $OD_{450}/control\ OD_{450}$ with PBS-treated mice. *, $P < 0.05$. (C) On day 0 and day 14, BALB/c mice were immunized i.p. with rBCG-Stx2B, and each group received 10^6 ($n = 7$) or 10^7 ($n = 8$) CFU of rBCG-Stx2B or 10^7 ($n = 6$) CFU of rBCG-SV. The challenge test of oral inoculation of 10^3 CFU of B2F1 was performed on day 28. The survival rates are shown. **, $P < 0.001$; *, $P < 0.05$.

the control. Since the IgG or IgA concentration for PBS-injected control mice was different for each ELISA plate of the three groups, the results shown are a ratio of IgG or IgA concentration in serum and stool samples from PBS-injected mice compared to that in the three groups.

Statistical analysis. Statistical analysis involved analysis of variance, which was followed by unpaired Student t , Bonferroni, and log rank (Mantel-Cox) tests with SPSS 19. Statistical differences were considered to be significant at a P value of < 0.001 (**) or < 0.05 (*).

RESULTS

Antigen production by rBCG-Stx2B. rBCG harboring pSOJK1-Stx2B expressed the K-alpha-Stx2B fusion protein (38.7 kDa) in culture supernatants (Fig. 1B). The expression of fusion protein was observed only in the supernatant of rBCG-Stx2B. The fusion protein reacted with both anti-K-alpha serum and anti-Stx2B monoclonal antibody. There were also additional bands of 22 and 14 kDa that were recognized by anti-K-alpha rabbit sera (Fig. 1B).

Immune response of mice to Stx2B and challenge with Stx2B. On days 0 and 14, 10-week-old female BALB/c mice were immunized with rBCG i.p., and each group received either 10^6 or 10^7

CFU of rBCG-Stx2B or PBS. On day 28, the increase of serum IgG antibody to Stx2B was checked by ELISA. The serum IgG levels in mice immunized with 10^7 CFU rBCG-Stx2B were higher than those in mice treated with PBS or 10^6 CFU of rBCG-Stx2B ($P = 0.04$) (Fig. 2A). No significant differences were detected between mouse groups immunized with 10^6 rBCG-Stx2B and PBS. To confirm the high IgG levels in the sera from mice immunized with 10^7 rBCG-Stx2B, a challenge test was performed with purified Stx2B in the mice at day 30. The group inoculated with 10^7 CFU of rBCG-Stx2B survived statistically significantly longer than control mice inoculated with rBCG-SV and 10^6 CFU of rBCG-Stx2B (Fig. 2B).

Immune response to Stx2B and oral challenge with strain B2F1 in streptomycin-treated mice. A long-lasting serum IgG and mucosal IgA response was observed following i.p. immunization with rBCG-Stx2B. The levels of serum IgG and mucosal IgA generated against Stx2B were followed for 2 months after the first immunization. Statistically significantly strong IgG antibody responses were observed in mice immunized with 10^7 rBCG-Stx2B (Fig. 3A) compared with rBCG-SV at day 28, but this response did

not last for 2 months. IgA antibody responses lasted for 2 months in mice immunized with 10^6 or 10^7 rBCG (Fig. 3B).

For the challenge test, we used a streptomycin-treated mouse model of infection with the most virulent strain of Stx2d-producing *E. coli*, strain B2F1. Forty-two days after the first of two immunizations, mice were challenged with 10^3 CFU of B2F1 for protection against STEC infection. The 14-day survival rates for the 10^6 and 10^7 CFU rBCG-Stx2B inoculation groups were 57% and 63%, respectively. In addition, the group inoculated with 10^6 or 10^7 CFU of rBCG-Stx2B survived statistically significantly longer than control mice inoculated with rBCG-SV ($P = 0.04$ [*] or $P < 0.001$ [**), respectively, by the log rank test (Fig. 3C).

DISCUSSION

Alpha antigen (antigen 85B) is the most potent immunodominant and secreted antigen of mycobacteria. Previously, our group had succeeded in expressing foreign antigens in BCG as a fusion protein with K-alpha. The rBCG system has advantages, and BCG is perhaps the safest vaccine that has been used in humans (31). In this study, we inserted the Stx2B gene into the K-alpha gene and constructed an rBCG strain expressing Stx2B. In the first protocol (Fig. 2A), we did not expect a longer survival time for the group inoculated with 10^6 CFU rBCG-Stx2B because the group did not have a good serum IgG antibody response to Stx2B following the immunization with rBCG-Stx2B. In the second protocol (Fig. 3A), the immunization with 10^6 CFU rBCG-Stx2B induced a high mucosal IgA response that lasted for 2 months. It was determined whether the mucosal IgA response induced by 10^6 CFU rBCG-Stx2B could neutralize purified Stx2d. The group inoculated with 10^6 CFU of rBCG-Stx2B survived statistically significantly longer than control mice inoculated with rBCG-SV (Fig. 3C). We conclude that an increase of serum IgA antibody against Stx2B required 10^7 and 10^6 CFU of rBCG-Stx2B and the mucosal IgA response induced by 10^6 CFU rBCG-Stx2B had an inhibitory effect, absorbing Stx2d produced by the B2F1 from mouse intestines. Importantly, at day 28, higher IgA levels were observed in the mice inoculated with 10^6 than in those inoculated with 10^7 CFU of rBCG-Stx2. Inoculation with 10^8 CFU rBCG-Stx2B did not result in a high serum IgG or IgA response, and this group did not survive longer following an oral challenge with B2F1 (data not shown). It appears that this high dose of rBCG-Stx2B may interfere with the production of functional IgA antibody to Stx2B at day 28. Additionally, a high dose of purified Stx2B (361 ng/mouse) with adjuvant had the same result in that the IgA mucosal response to Stx2 reached an 8.27-fold level but no IgG response was observed at 56 days (data not shown). The IgA, but not IgG, response may be easily induced by Stx2B. Langermann et al. reported that a single intranasal vaccination with rBCG expressing OspA, an outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*, resulted in a prolonged protective systemic IgG response for more than 1 year (15). On the other hand, a single i.p. inoculation of rBCG expressing *E. coli* heat-labile enterotoxin induced IgA and IgG antibodies for 5 months (10). These studies show that effective routes of rBCG inoculation should be considered and selected. Kawahara et al. reported that oral inoculation with freeze-dried rBCG-pSOV3J1 induced HIV-1-specific mucosal and systemic immune responses in guinea pigs (13). When Stx1B was used together with cholera toxin for the intranasal immunization of BALB/c mice, strong enhancement of the immune response was observed (11). Recently, Tsuji et al. reported that intranasal vaccination with His-

tagged StxB plus a mutant heat-labile enterotoxin is effective for preventing Stx1 or Stx2 toxemia in mice (35). For intranasal or oral immunization with rBCG-Stx2B, further studies will be needed.

Recently, Western blotting and ELSA were used to detect antibody to Stx2B in plasma specimens from HUS patients (6). Cohen et al. reported that B lymphoid cells are susceptible to Stx1 and that the vast majority of Stx1-sensitive B cells belong to the IgG- and IgA-committed subset, whereas most IgM-producing cells are resistant to Stx (3). Susceptibility of mouse B lymphoid cells to Stx2 has yet to be reported. Not only Stx holotoxin but also extracellular recombinant StxB (20) and anti-CD77 monoclonal antibody (34) induced apoptosis in a Burkitt's B-cell lymphoma cell line. It is possible that a very high production of IgG in response to Stx2B might make a murine immune system imbalanced, and as a result, the IgG response in the present study did not last for more than 2 months. In conclusion, intraperitoneal immunization with rBCG expressing Stx2B was protective in the streptomycin-treated mouse model of STEC infection with the virulent strain of Stx2d-producing *E. coli*, strain B2F1. The production of antibodies against Stx2B, serum IgG and mucosal IgA, was maintained for 2 months in BALB/c mice.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by U.S. Public Health Service grants AI24431 and DK52073 to T.O., in part by Health and Labor Sciences research grants for research on global health issues from the Ministry of Health, Labor and Welfare, and by JSPS KAKENHI grant 23500479 and 22590256 in Japan.

We thank Alison O'Brien (Uniformed Services University of the Health Sciences) for *E. coli* strain B2F1.

REFERENCES

- Acheson DW, Levine MM, Kaper JB, Keusch GT. 1996. Protective immunity to Shiga-like toxin I following oral immunization with Shiga-like toxin I B-subunit-producing *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR. *Infect. Immun.* 64:355–357.
- Bosworth BT, et al. 1996. Vaccination with genetically modified Shiga-like toxin IIe prevents edema disease in swine. *Infect. Immun.* 64:55–60.
- Cohen A, et al. 1990. Expression of glycolipid receptors to Shiga-like toxin on human B lymphocytes: a mechanism for the failure of long-lived antibody response to dysenteric disease. *Int. Immunol.* 2:1–8.
- Connell ND, Medina-Acosta E, McMaster WR, Bloom BR, Russell DG. 1993. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guerin expressing the Leishmania surface proteinase gp63. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:11473–11477.
- Endo Y, et al. 1988. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur. J. Biochem.* 171:45–50.
- Fernandez-Brando RJ, et al. 2011. Antibody response to Shiga toxins in Argentinean children with enteropathic hemolytic uremic syndrome at acute and long-term follow-up periods. *PLoS One* 6:e19136. doi:10.1371/journal.pone.0019136.
- Frank C, et al. 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N. Engl. J. Med.* 365:1771–1780.
- Friedrich AW, et al. 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J. Infect. Dis.* 185:74–84.
- Gheorghiu M, Lagrange PH, Fillastre C. 1988. The stability and immunogenicity of a dispersed-grown freeze-dried Pasteur BCG vaccine. *J. Biol. Stand.* 16:15–26.
- Hayward CM, et al. 1999. Construction and murine immunogenicity of recombinant Bacille Calmette Guerin vaccines expressing the B subunit of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *Vaccine* 17:1272–1281.
- Imai Y, et al. 2005. Production of IgA monoclonal antibody against Shiga

- toxin binding subunits employing nasal-associated lymphoid tissue. *J. Immunol. Methods* 302:125–135.
12. Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* i:619–620.
 13. Kawahara M, Hashimoto A, Toida I, Honda M. 2002. Oral recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin expressing HIV-1 antigens as a freeze-dried vaccine induces long-term, HIV-specific mucosal and systemic immunity. *Clin. Immunol.* 105:326–331.
 14. Kokai-Kun JF, Melton-Celsa AR, O'Brien AD. 2000. Elastase in intestinal mucus enhances the cytotoxicity of Shiga toxin type 2d. *J. Biol. Chem.* 275:3713–3721.
 15. Langermann S, Palaszynski S, Sadziene A, Stover CK, Koenig S. 1994. Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing outer-surface protein A of *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 372:552–555.
 16. Langermann S, et al. 1994. Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin vaccines expressing pneumococcal surface protein A. *J. Exp. Med.* 180:2277–2286.
 17. Lindgren SW, Melton AR, O'Brien AD. 1993. Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. *Infect. Immun.* 61:3832–3842.
 18. Lingwood CA, et al. 1987. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J. Biol. Chem.* 262:8834–8839.
 19. Ludwig K, Karmali MA, Smith CR, Petric M. 2002. Cross-protection against challenge by intravenous *Escherichia coli* verocytotoxin 1 (VT1) in rabbits immunized with VT2 toxoid. *Can. J. Microbiol.* 48:99–103.
 20. Mangeney M, et al. 1993. Apoptosis induced in Burkitt's lymphoma cells via Gb3/CD77, a glycolipid antigen. *Cancer Res.* 53:5314–5319.
 21. Matano S, et al. 2012. Encephalopathy, disseminated intravascular coagulation, and hemolytic-uremic syndrome after infection with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111. *J. Infect. Chemother.* 18:558–564.
 22. Matsumoto S, et al. 1996. A stable *Escherichia coli*-mycobacteria shuttle vector 'pSO246' in *Mycobacterium bovis* BCG. *FEMS Microbiol. Lett.* 135:237–243.
 23. Matsumoto S, Yukitake H, Kanbara H, Yamada T. 1998. Recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin secreting merozoite surface protein 1 (MSP1) induces protection against rodent malaria parasite infection depending on MSP1-stimulated interferon gamma and parasite-specific antibodies. *J. Exp. Med.* 188:845–854.
 24. Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Yamada T. 1988. Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular alpha antigen. *J. Bacteriol.* 170:3847–3854.
 25. Michino H, et al. 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am. J. Epidemiol.* 150:787–796.
 26. Muthing J, Schweppe CH, Karch H, Friedrich AW. 2009. Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. *Thromb. Haemost.* 101:252–264.
 27. Myhal ML, Laux DC, Cohen PS. 1982. Relative colonizing abilities of human fecal and K 12 strains of *Escherichia coli* in the large intestines of streptomycin-treated mice. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1:186–192.
 28. Naito M, Ohara N, Matsumoto S, Yamada T. 1998. Immunological characterization of alpha antigen of *Mycobacterium kansasii*: B-cell epitope mapping. *Scand. J. Immunol.* 48:73–78.
 29. O'Brien AD, Holmes RK. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 51:206–220.
 30. Obrig TG, Moran TP, Brown JE. 1987. The mode of action of Shiga toxin on peptide elongation of eukaryotic protein synthesis. *Biochem. J.* 244:287–294.
 31. Ohara N, Yamada T. 2001. Recombinant BCG vaccines. *Vaccine* 19:4089–4098.
 32. Pierard D, Muyltermans G, Moriau L, Stevens D, Lauwers S. 1998. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36:3317–3322.
 33. Riley LW, et al. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681–685.
 34. Taga S, et al. 1997. Intracellular signaling events in CD77-mediated apoptosis of Burkitt's lymphoma cells. *Blood* 90:2757–2767.
 35. Tsuji T, et al. 2008. A nasal vaccine comprising B-subunit derivative of Shiga toxin 2 for cross-protection against Shiga toxin types 1 and 2. *Vaccine* 26:2092–2099.
 36. Yasuhara A, Araki A, Ochi A, Kobayashi Y. 2000. Magnetic resonance imaging of brain lesions of a patient with hemolytic uremic syndrome following *Escherichia coli* O157 infection. *Pediatr. Int.* 42:302–305.
 37. Yutsudo T, Nakabayashi N, Hirayama T, Takeda Y. 1987. Purification and some properties of a Vero toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically unrelated to Shiga toxin. *Microb. Pathog.* 3:21–30.

基礎各論

新しい結核ワクチン開発の展望

MATSUMOTO SOHKICHI / OZEKI YURIKO / KOBAYASHI KAZUO

松本壮吉*¹/尾関百合子*²/小林和夫*³

*¹◎大阪市立大学大学院医学研究科細菌学分野

*²◎園田学園女子大学人間健康学部食物栄養学科

*³◎国立感染症研究所免疫部

要旨 結核は、代表的な再興感染症であり、AIDSやマラリアと並ぶ三大感染症として知られる。2010年には880万人が結核を発症、有病者数1200万人を数え、140万人の死をもたらした。WHOは、2050年までに結核問題を解決する（罹患率が100万人対1人以下）という高い目標を掲げている。その実現には、迅速で正確な診断法や多剤・超多剤耐性結核の治療薬に加え、成人型肺結核の予防に有効なワクチンの開発が希求される。結核対策は、世界的な優先課題であり、諸機関の連携に加え、国や政府の積極的な支援も必要としている。

■現 状

結核は感染症の死因でAIDSに次ぐ第2位で、全感染症による死亡者数の約1/7を占める。結核は、グラム陽性桿菌である結核菌感染による疾患である。結核菌は現在も細菌の中で最もヒトを死に至らしめている病原体であり、WHOの統計(2012年1月5日現在)によると2010年の結核患者発生数は880万人、死亡者数140万人を数えた¹⁾。

結核には菌の感染後即発症する一次結核と、潜伏期を経て発症する二次結核がある(図1)。我が国を含め、低-中蔓延地域における成人肺結核の多くは二次結核である。結核菌は現在人類の1/3に潜伏感染しており、既感染者の5~10%が終生の間に二次結核を発症する。HIV感染は発症を加速し、HIV-結核菌共感染者の約10%が毎年結核を発症する。したがって、結核ワクチン開発においては、感染暴露前(pre-exposure

vaccine)のみならず、感染暴露後(治療補助を含む)ワクチン(post-exposure vaccine)の開発が希求される(図1)。

■結核のワクチン効果を担う細胞

結核菌抗原によって活性化されたCD4陽性の1型ヘルパーT(T_H1)細胞やCD8陽性T細胞がエフェクターT細胞に分化してIFN- γ を産生する。ワクチン効果はこのエフェクターT細胞が病原体の駆逐による抗原消失後、記憶T細胞に分化し長期間の免疫記憶が成立することによるものである。

T_H1細胞や細胞傷害性CD8陽性T細胞以外にも、結核菌糖脂質を認識するCD1拘束性T細胞、IL-17を産生するTH17細胞や $\gamma\delta$ T細胞も感染防御免疫に一定の役割を果たす²⁾。一方、IL-4を産生するTh2細胞や制御性T細胞は防御免疫の抑制にかかわる記憶T細胞である。細胞内寄生菌である結核菌に対して抗体産生記憶細胞(B細

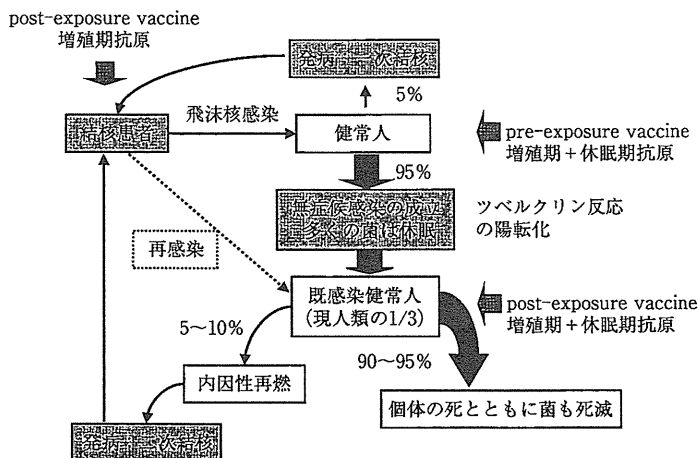


図1 結核の発症とワクチン戦略

結核患者由来の飛沫が空中にて乾燥し菌を含んだ飛沫核となり、健康人もしくは既感染者（再感染）の肺胞に到達して感染が成立する。この時、感染者の5%未満が一次結核を発症する。残る95%は発病しないが、菌は生体から排除されずに無症候感染が成立する。現在、無症候感染の正確な診断法は確立されていないが、ツベルクリン試験、もしくはクオンティフェロン試験陽性者で、胸部X線所見で異常が認められない場合を潜在性結核と呼ぶ。無症候感染者は現人類の1/3にのぼり、その5~10%が終生の間に結核を発病する（二次結核）。また、HIVの感染は二次結核の発症率を約10倍まで上昇させる。初感染時の感染や発病を抑制する pre-exposure vaccine と既感染者の発症を予防する、もしくは免疫介入療法に用いる post-exposure vaccine の両方が結核ワクチン開発において求められる。喀痰を含む結核病巣には、増殖菌と休眠菌が併在するため、両増殖期の防御抗原を結核ワクチンに利用する必要がある。

胞)の役割は軽微とされる。

■現行の結核ワクチン BCG とその問題点

結核菌の発見者である Koch は、結核菌の培養濾液に予防効果があると考えた。これが現在、感染診断に用いられているツベルクリンの起源である。一方、パスツール研究所の Calmette と Guérin が、ウシ型結核菌 *Nocard* 株を13年間230代にわたって継代培養を行った結果、弱毒菌株を得た。これが現行の結核ワクチン *bacillus Calmette-Guérin* (BCG) の原型となった。Pasteur らが当時確立した“自然発生的な弱毒病原体の取得”によるワクチン開発に準じたものである。日本で接種されている BCG Tokyo172 は、1924年に志賀 潔がパスツール研究所から持ち帰った菌株に由来する³⁾。結核に対する予防効果は、BCG接種で得られるのに対し、ツベルクリン接種では得られないことから防御免疫は生菌免疫でのみ獲得されるとの考えが定着する。

BCGは、これまでに世界で40億人以上に接種

されてきた実績がある。しかしながら、その効果が不十分であることは、アフリカや東南アジアなど結核蔓延地域において BCG 接種が施行されているにもかかわらず、年間900万人以上が結核を発症する事実から明らかである。動物モデルで顕著な効果が認められることから、半ば惰性で効果が信じられてきたきらいがあったが、10万人を超えるインドの農民を調査した結果、BCGの結核発病に対する予防効果は皆無と判定された⁴⁾ことから再評価の機運が高まった。現在 BCG は、小児の結核性髄膜炎や粟粒結核に対しては約80%の予防効果があるが、成人の肺結核に対する効果は一定せず限定的であるとの考えが一般的である。また、HIV感染者に対して生ワクチンである BCG の接種は有害事象を惹起する可能性があり、原則禁忌である。このような現状から成人の肺結核に有効、かつ安全なワクチン開発が希求される。

成人の肺結核に対する低調な BCG 効果に関する説明として、使用する BCG の変異の問題、

BCG ワクチンの保存の問題、非結核性抗酸菌感染による防御免疫の攪乱などの指摘がある⁵⁾。BCG の効果は動物モデルで顕著であるが、昨今、我々や京都大学の酒井らによって、動物のワクチン接種からの時間に比例して効果が減衰することが示された^{6,7)}。十分な人数を揃えたヒトのコホート研究でも、経時的な効果の減衰が示唆される⁸⁾。効果減衰のメカニズムは不明であるが、実績のある BCG (もしくは組換え BCG) の効果を追加免疫によって回復させるプライム-ブーストワクチンのストラテジーが今後のワクチン開発に有望であるかもしれない。

■結核ワクチン開発の現状

現在試作中の新しい結核ワクチンは、①組換え BCG, ②組換え弱毒結核菌, ③成分ワクチン, ④ウイルスベクター組換えワクチン, ⑤不活化菌体ワクチンに分類することができる。以下に開発の現状を抜粋して紹介する (表 1)。

1. 組換え BCG (recombinant BCG)

BCG に特定の防御抗原や免疫賦活分子を発現させる、もしくは BCG が欠失した結核菌抗原を再度入れ戻すことで BCG を改良する試みである。最初に結核ワクチンを想定して作成されたのが、Antigen 85B を発現させた組換え BCG, rBCG30 である。2004 年に第 I 相試験を終えている。

BCG は、Region of deleted 1 (RD1) 領域を欠いているため、抗原提示細胞内でほとんどの菌体抗原はファゴソーム内にとどまっている。結果として十分な CD8 陽性 T 細胞を活性化することができない。Kaufmann らは、低 pH でファゴソーム膜を障害するリステリアの毒素をウレアーゼの欠失した BCG に発現させた組換え BCG, rBCG Δ UreC:Hly+(VPM1002) を作成した。rBCG Δ UreC:Hly+ は CD4 陽性細胞とともに CD8 や T_H 17 細胞の活性化を促し、BCG 親株を超える効果のあることが判明している⁹⁾。現在、第 II 相試験が南アフリカ共和国で進行中である。

2. 組換え弱毒結核菌 (attenuated auxotroph *Mycobacterium tuberculosis*)

結核菌の弱毒株を作成することができれば、病原体そのものに近い抗原で免疫をつけることが可能になる。結核菌を使用するため少なくともゲノム上離れた 2 種以上の遺伝子を欠失させ病原性の回帰を阻止した組換え弱毒結核菌が作成されている。結核菌 H37Ra 株の病原性の消失に強くかわる二成分制御系分子の *phoP*, ビタミン B5 の合成酵素 (*panC*, *panD*), *fadD26*, *secA* などを欠失させた結核菌株の第 I 相試験が始まっている¹⁰⁾。

3. 成分ワクチンとアジュバント (component vaccine)

成分ワクチンは生ワクチンに比べ安全性に優れ、HIV 感染者にも対応可能である。加えて、抗原は投与後しばらくして消失するために、記憶 T 細胞を誘導しやすい利点がある。成分ワクチン抗原の探索は当初、分泌蛋白質を標的として行われた。これは生菌免疫の効果が、分泌する蛋白質に依存するとの考察による。防御免疫を誘導する結核菌分泌蛋白質は、Antigen 85B (a 抗原) をさきがけとして、Antigen 85 complex, ESAT6, MPT51, MPT64, HBHA, Mtb32 などが同定されている。しかしながら、Dnak, Mtb39, HSP65, MDPI¹¹⁾ など、非分泌性蛋白質にも防御免疫を誘導する抗原も多数同定されている。

複数の抗原をハイブリッドさせることでより強い免疫応答を惹起できる融合蛋白質ワクチンが試作されている。Mtb72f は、Rv1196 と Rv0125, Hybrid1 は、Antigen 85B に ESAT6 を加えたもの、HyVac-4 は Antigen 85A と B に TB10.4 を加えた融合ワクチンで、第 I 相臨床試験を終え、Mtb72f については第 II 相試験が進行中である¹⁰⁾。

成人の肺結核菌の多くが内因性再燃によることから、結核菌の休眠期抗原を利用したワクチンが検討されている。増殖期抗原である ESAT-6 や Antigen 85 に加え、潜在期に継続的に発現する抗原 Rv2660c を加えた H56 ワクチンが作成され、

表1 現在開発中の主な結核ワクチン

ワクチン	施設, 施行者	備考
組換え BCG		
rBCG30	カリフォルニア大学, Horwitz ら	Antigen 85B を BCG より発現. 第 I 相試験済み
BCG::RD1	パスツール研究所, Cole ら	結核菌の RD1 領域を BCG に入れ戻したもの
rBCGΔUreC:Hly+	マックスプランク研究所, Kaufmann ら	第 II 相試験中
組換え弱毒結核菌		
<i>M. tuberculosis</i> mc ² 6030	ニューヨーク大学, Jacobs ら	panCD と RD1 領域を欠失させた結核菌. 第 I 相試験中
<i>M. tuberculosis</i> PhoP	ニューヨーク大学, Jacobs ら	PhoP を欠失させた結核菌. 第 I 相試験中
成分ワクチン		
Mtb72f	Corixa 社, Reed ら	Mtb39 と Mtb32 の融合蛋白質. 第 II 相試験中
Hybrid-1	Statens Serum Institutes, Andersen ら	Antigen 85B と ESAT6 の融合蛋白質. 第 I 相試験済み
HyVac-4	Statens Serum Institutes, Andersen ら	Antigen 85B と TB10.4 の融合蛋白質. 第 I 相試験済み
ウイルスベクター組換えワクチン		
HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA	近畿中央病院, 岡田ら	結核菌由来 HSP65 と IL-12 遺伝子をリボソームに封入したワクチン
MVA85A	オックスフォード大学, Hill ら	ワクシニアウイルスを用いて Antigen 85A を発現させたもの
Ad35 TB-S	Aeras 社, Goudsmit ら	アデノウイルスベクターを用いて Antigen 85A, 85B, TB10.4 を発現させたもの
不活化菌体ワクチン		
<i>M. vaccae</i>	ダートマス大学, Pallagyo ら	第 II 相試験済
<i>M. w</i>	Institute for Leprosy and Other Mycobacterial Diseases, Katoch ら	第 II 相試験済

マウスやカニクイザルモデルにおいて内因性再燃を高効率に抑制することが示されている^{12,13}。

一般に成分ワクチンの免疫原性は生菌ワクチンに劣るため免疫賦活物質であるアジュバントを必要とする。アジュバントは自然免疫を活性化する。自然免疫はマクロファージや樹状細胞のパターン認識受容体の活性化を介して惹起され、T 細胞への抗原提示が行われることで獲得免疫の発動と免疫記憶が形成される。結核菌の菌体成分は、Toll-like receptor (TLR) 2 や TLR9 (それぞれリポ蛋白質と CpG-DNA) を刺激し、これらの受容体は感染防御免疫の誘導に必須な役割を果たすことが明らかとなっている。

Mtb72F など試作中の成分ワクチンは、AS02 などの TLR4 のアゴニストをアジュバントとし

046 ● 134 — 臨床と微生物 Vol.39 No.2 2012.3.

て利用している。また結核菌の主要細胞壁成分であるコードファクター (トレハロースジミコール酸) のリガンドが C 型レクチンの Mincle という分子であることが明らかとなったが¹⁴、コードファクター類似物質 [synthetic analog trehalose-6, 6-dibehenate (TDB)] をアジュバントとして利用する試みがある¹⁵。国内では、日本 BCG 中央研究所の山本らが、DNA のアジュバント活性を利用した¹⁶ワクチン開発を実施している。

4. ウイルスベクター組換えワクチン (inactivated virus-based vaccine)

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

これまでヒトでの実績がなく安全性を慎重に検討しなければならないが、内在性抗原として蛋白質を提示するため CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の誘導に優れる。また DNA 取扱い技術の発達により簡便かつ安価にワクチンを作成できる。

ワクシニアウイルスベクターから Antigen 85A を発現させる MVA85A¹⁷⁾や、粘膜免疫の惹起に勝るアデノウイルスベクターより Antigen 85A, Antigen 85B, TB10.4 を発現する Ad35 が作成され、現在、第 II 相臨床試験中である。日本では、国立病院機構近畿中央胸部疾患センターの岡田らによって、ヘマグルチニンウイルスベクターを利用したサイトカイン IL-12 と結核菌抗原 HSP65 を同時産生するワクチンが作成され、カニクイザルモデルで予防効果のあることが示されている¹⁸⁾。

5. 不活化菌体ワクチン

Mycobacterium vaccae, *Mycobacterium w*, *Mycobacterium smegmatis* などの非病原性速育型抗酸菌を用いた不活化菌体ワクチンの効果も検討されている。結核菌との抗原類似性を利用したワクチン開発である。*M. vaccae* についてはタンザニアで HIV 感染者 53 名を対象に第 II 相臨床試験が実施されたが、37%の効果（統計的には有意差なし）であった。*M. w* についてはインドにて第 II 相臨床試験が行われ、BCG 単独投与に勝る効果が確認されている¹⁹⁾。

■ワクチン効果のサロゲートマーカー探索

第 III 相ワクチン試験に向け、効果をモニターできるサロゲートマーカーが望まれる。T 細胞から産生される IFN- γ は、防御免疫に必須であるが²⁰⁾、結核発症者にクオンティフェロン試験（結核菌抗原反応性 T 細胞由来 IFN- γ 産生を検出）陽性者が多いことから推定されるように、その産生で宿主の抵抗性を推し計ることはできない。記憶 T 細胞が産生する IL-2 をはじめ、複数のサイトカイン応答を検討する必要がある。網羅的探索

として、リンパ球のトランスクリプトーム解析や、血清中のプロテオミクス解析も試行されている。

T 細胞の刺激抗原については、増殖期の結核菌抗原のみならず、休止期 (dormant) 抗原を組み合わせ、活動性結核と潜在性結核を含む無症候性結核を識別することが重要である¹²⁾。筆者らは、厚生労働科学研究により、無症候の結核菌感染において宿主応答を惹起する潜在期抗原を特定している（国立病院機構刀根山病院の前倉らとの共同研究）。宿主の防御免疫が効果的であれば、結核菌は生体内で休眠し、無症候感染が成立するため、休止期抗原に対する応答で宿主の結核抵抗性を推定できる可能性がある。

■今後の展望

結核は“二度がかりあり”の慢性疾患である。これまでのワクチンが著効を示したのは、天然痘や麻疹に代表されるような“二度がかりなし”の急性疾患のみである。従来のワクチン開発戦略のみでは結核ワクチンの開発は困難であり、安易な抗原の組合せや一時的な免疫応答の惹起のみでは有効なワクチン開発に至らないと推定される。しかしながら人類の 1/3 が結核菌無症候感染者であるが、感染者の 90% 以上が終生発病を免れているという事実は、ワクチンの開発が可能であることを示唆している。したがって無症候感染の成立機構の解析はワクチン開発に大きく寄与するものであり、感染防止ワクチンに加え、再燃を含む発症抑止ワクチンの作成が戦略の鍵と考えられる（図 1）。

昨今の惨状をみるに、結核の制圧は、世界的な優先課題である。WHO は、2050 年までに結核の公衆衛生的な問題を解決する、具体的には罹患率を 100 万人当たり 1 人以下にすることを目標に掲げている。その実現には、成人に効果的なワクチンの開発が所望される。結核対策は、一研究室や一機関で成し遂げられるものではない。施設間のネットワークに加え、国や政府の積極的な援助も必要としている。

謝 辞：紹介した筆者らの研究の一部は、文部科学省科学研究費と厚生労働省科学研究費により支援された。

文 献

- 1) WHO-Global-TB-Control-11. TB fact. 2011.
- 2) Umemura M, Yahagi A, Hamada S *et al.* : IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin infection. *J Immunol* 178 : 3786-3796, 2007.
- 3) Yamamoto S, Yamamoto T : Historical review of BCG vaccine in Japan. *Jpn J Infect Dis* 60 : 331-336, 2007.
- 4) MacGregor GA : BCG : bad news from India. *Lancet* 1 : 318, 1980.
- 5) Clemens JD, Chuong JJ, Feinstein AR : The BCG controversy. A methodological and statistical reappraisal. *JAMA* 249 : 2362-2369, 1983.
- 6) Ozeki Y, Hirayama Y, Takii T *et al.* : Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Vaccine* 29 : 6881-6887, 2011.
- 7) Sakai S, Kawamura I, Okazaki T *et al.* : PD-1-PD-L1 pathway impairs T(h)1 immune response in the late stage of infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Int Immunol* 22 : 915-925, 2010.
- 8) Comstock GW, Palmer CE : Long-term results of BCG vaccination in the southern United States. *Am Rev Respir Dis* 93 : 171-183, 1966.
- 9) Grode L, Seiler P, Baumann S *et al.* : Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest* 115 : 2472-2479, 2005.
- 10) Parida SK, Kaufmann SH : Novel tuberculosis vaccines on the horizon. *Curr Opin Immunol* 22 : 374-384, 2010.
- 11) Matsumoto S, Matsumoto M, Umemori K *et al.* : DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* 175 : 441-449, 2005.
- 12) Aagaard C, Hoang T, Dietrich J *et al.* : A multi-stage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. *Nat Med* 17 : 189-194, 2011.
- 13) Lin PL, Dietrich J, Tan E *et al.* : The multistage vaccine H56 boosts the effects of BCG to protect cynomolgus macaques against active tuberculosis and reactivation of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Invest* 122 : 303-314, 2011.
- 14) Ishikawa E, Ishikawa T, Morita YS *et al.* : Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med* 206 : 2879-2888, 2009.
- 15) Schoenen H, Bodendorfer B, Hitchens K *et al.* : Cutting edge : Mincle is essential for recognition and adjuvanticity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. *J Immunol* 184 : 2756-2760, 2010.
- 16) Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T *et al.* : Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J Immunol* 148 : 4072-4076, 1992.
- 17) Brookes RH, Hill PC, Owiafe PK *et al.* : Safety and immunogenicity of the candidate tuberculosis vaccine MVA85A in West Africa. *PLoS One* 3 : e2921, 2008.
- 18) Okada M, Kita Y, Nakajima T *et al.* : Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine* 25 : 2990-2993, 2007.
- 19) Katoch K, Singh P, Adhikari T *et al.* : Potential of Mv as a prophylactic vaccine against pulmonary tuberculosis. *Vaccine* 26 : 1228-1234, 2008.
- 20) Kawamura I, Tsukada H, Yoshikawa H *et al.* : IFN-gamma-producing ability as a possible marker for the protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. *J Immunol* 148 : 2887-2893, 1992.

* * *



解説

結核および 非結核性抗酸菌感染症の診断*

松村隆之** 阿戸 学** 小林和夫**

Key Words : tuberculosis, nontuberculous mycobacterial disease, latent infection, diagnosis, control strategies

はじめに

結核は単一病原体による感染症として世界最大であり、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症/後天性免疫不全症候群(AIDS)、マラリアとともに世界3大感染症と呼ばれている。全世界で約20億人(全人口の約1/3)が結核菌に既感染しており、2010年には880万人(うち110万例はHIVと重複感染)が結核を発病し、140万人(うち35万例はHIVと重複感染)が死亡した¹⁾。現在、有病者は2,200万人といわれている。日本において約2,500万人が既感染していると推定され、2010年には約23,000人が結核を発病、2,100人が死亡した²⁾。近年、HIV-結核重複感染、薬剤耐性結核、潜在性結核菌感染、漸増する非結核性抗酸菌感染症、リウマチ性疾患と抗酸菌感染症(特に、サイトカイン阻害薬療法による発病)など、結核対策の課題が山積している。正確な診断は治療・予防・感染伝播の防止などに必須であり、結核対策にきわめて重要である。

結核の診断

1. 活動性結核と潜在性結核菌感染

結核は、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* (感染症法二類感染症) を含む飛沫核と呼ばれる空気中の粒子により伝播する空気感染症である。この粒子は、肺結核や喉頭結核の患者が咳、くしゃみ、会話、歌唱した際に産生される。そのため、結核

患者と同じ空間を共有した者は、感染リスクが最も高い。結核菌曝露者が、飛沫核を吸入し、結核菌が肺胞内に定着し、全身に広がることで感染が成立する(曝露者の約30%)。また、感染者の約10%が活動性結核を発症するが、残りの約90%では感染した結核菌は休眠状態(dormancy)、すなわち、無症候潜在感染状態で宿主の体内にとどまる(潜在性結核菌感染)。潜在感染した結核菌は、老化、糖尿病、免疫抑制療法[免疫抑制薬、ステロイド薬、抗サイトカイン療法:腫瘍壊死因子- α (TNF- α)阻害薬など]、栄養障害、HIV感染/AIDSなどの宿主免疫機能の低下により、発育、増殖を再開し、活動性結核を発症する。これを内因性再燃と呼ぶ。成人の場合、潜伏感染の内因性再燃により活動性結核を発症することが多い(約70%)。他方、小児や日和見宿主(HIV感染症/AIDSや免疫抑制療法など)では、初感染によって活動性結核を発症しうる。

2. 病原体

結核菌の生物学的特徴として、①細胞内寄生性、②脂質成分に富む細胞壁、③好気性、④遅発育性などがある(表1)。結核菌は好気性グラム陽性桿菌、細胞内寄生病原体であるが、細胞壁が長炭素鎖脂肪酸(ミコール酸)に富み、グラム染色では難染色性を示す。そのため、抗酸性染色(Ziehl-Neelsen染色、Kinyoun染色や蛍光染色)が用いられる。抗酸性染色は石炭酸フクシンで加温染色後、塩酸アルコールで脱色、メチレ

* Diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial diseases.

** Takayuki MATSUMURA, Ph.D., Manabu ATO, M.D., Ph.D. & Kazuo KOBAYASHI, M.D., Ph.D.: 国立感染症研究所免疫部(〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1); Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, JAPAN

表1 結核菌の特徴

細胞内寄生性	桿菌(0.2~0.6×1~10 μm). 宿主細胞, 特に, マクロファージ内で抗菌機構から逃れて増殖
細胞壁	脂質成分が豊富なため, 疎水性であり, 化学物質にも安定. グラム染色に難染色性. 抗酸性
好気性	酸素分圧の高い臓器(肺など)で増殖し, 病変を形成
遅発育性	至適温度: 37℃. 倍加時間: 約12~15時間. 培養集落形成に4~8週間
感染型式	飛沫核/空気感染
病原性	慢性炎症, 肉芽腫, 乾酪壊死, 空洞形成, 線維化
遺伝子	全ゲノム(約4.41Mb)の解読

表2 肺外結核の所見

病変部位	好発	臨床症状	診断
リンパ節	若年者~成人初期 女性>男性	通常片側性, 疼痛はない	生検や培養
胸膜	若年者~成人	胸水, 乾性咳嗽	胸水単核細胞浸潤 胸水-結核菌塗抹検査: 陰性が多い 胸膜生検および培養
泌尿生殖器	若年者では稀 女性>男性	腎臓, 尿管, 膀胱, 精巣, 精巣上体, 子宮, 卵管	尿培養, 生検-培養, 子宮内容 掻爬物-培養
骨・関節	全年齢にみられる が, 高齢者に好発	高齢者: 下部胸椎や腰椎 若年者: 上部胸椎 関節可動域の制限や変形(亀背)	生検および培養
髄膜/中枢神経系	乳幼児や小児	発熱, 頭痛, 倦怠感, 意識 障害, 痙攣, 昏睡	腰椎穿刺による脳脊髄液検査 塗抹や培養
腹膜/消化管	成人や高齢者	腹部膨満や腹痛, Crohn病 に類似	内視鏡による生検や培養
播種性	幼年者や高齢者	発熱や衰弱	罹患臓器の塗抹や培養 ツベルクリン皮内反応: 約半数 が陰性 胸部X線異常所見: 初期に欠 き, 遅れて出現

ンブルーで後染色する。抗酸菌は“赤い桿菌”として観察される。抗酸菌以外の通常細菌やヒト組織・細胞は後染色のメチレンブルーにより“青く”対比染色される。抗酸菌をオーラミンやローダミンなどの蛍光色素を用いて染色し、塩酸アルコールで脱色後、蛍光顕微鏡で観察する蛍光染色法も広く用いられている。蛍光顕微鏡で観察すると、暗い背景下には抗酸菌は“緑青—橙—黄色”の蛍光を発する。分裂倍加時間は約12~15時間の遅発育菌である。

3. 活動性結核の臨床症状

活動性結核は肺結核と肺外結核に分類されるが、80%以上は肺結核である。肺結核の症状と

しては咳嗽や喀痰(持続性, 2週間以上), 血痰, 胸痛, 軽度の発熱, 体重減少があるが, 特に, 持続性咳嗽と喀痰は重要である。肺外結核としては, リンパ節, 胸膜, 泌尿生殖器, 骨・関節, 髄膜・中枢神経系, 腹膜・消化管や心外膜などの感染がある(表2)。

4. 活動性結核の診断

診断として病原体診断(表3)および補助診断(表4)がある³⁾。病原体診断には, 菌の塗抹, 培養および遺伝子があり, 補助的診断には, 画像(X線やCT), 病理組織学や免疫学的検査〔ツベルクリン皮内反応や末梢血単核細胞を用いたインターフェロン(IFN)- γ 遊離試験〕がある。

表3 結核病原体診断の長所と短所

病原体診断法	時間(回数)	長所	短所
塗抹検査	2時間 (3回)	約40%の肺結核を検出。迅速・安価。広く普及	熟練が必要。35~70%で陰性(特にHIV感染者, 小児, 肺外結核患者)。薬剤耐性菌と感受性菌を区別できない。複数回通院が必要。低感度(生菌5,000~10,000/喀痰1mLで検出可)
培養検査	2~6週間 (3回)	高感度(生菌10~100/喀痰1mLで検出可)。半定量的。種属同定可。薬剤感受性試験可	診断までに2~6週間必要。専門家や機器が必要
核酸増幅検査(NAA)	2.5~3.5時間 (1回)	迅速。高特異度(98~100%)。高感度。喀痰以外の検体でも見込みあり。薬剤耐性遺伝子の検出	高価。生菌と死菌を判別できない。非定量的。技術的な問題がある(熟練, 偽陽性・偽陰性, 夾雑物混入, 遺伝子増幅系に対する抑制物質の混入など)

(文献³⁾より引用改変)

表4 結核補助診断の長所と短所

補助診断法	時間(回数)	長所	短所
胸部X線検査	1時間 (1回)	簡便。迅速。高感度	単独診断では非特異的。高価。機器や電源が必要。HIV感染者では特に不確実
病理学的検査	2~3日 (1回)	乾酪壊死を伴う肉芽種を検出	単独診断では非特異的。専門家や機器が必要
免疫学的検査			
ツベルクリン皮内反応(TST)	48時間 (1回)	BCG非接種者の診断補助	感度や特異度が民族やカットオフ値に左右される。48時間後の再診が必要。BCG接種や非結核性抗酸菌感染で陽性。進行性HIV感染者の50%以上で偽陰性。活動性結核患者の約25%で陰性など。偽陰性の対象が多い
末梢血IFN- γ 遊離試験	48時間 (1回)	ツベルクリン皮内反応より客観性あり。多重抗原で評価。BCG接種に左右されない。結核感染と非結核性抗酸菌感染を区別できる	高価。採血が必要。新鮮なサンプルが必要。診断確定のために追加検査が必要。既感染と活動性結核を区別できない。免疫抑制状態にある患者では診断精度低下。小児での診断精度低下

(文献³⁾より引用改変)

病原体診断は確定的であるが、抗酸性染色による塗抹(集菌)検査陽性の場合、結核菌のみならず、非結核性抗酸菌も考慮する必要がある(後述)。また、検出に必要な菌数が5,000~10,000/喀痰1mLと低感度なため、3回の検査が推奨される。さらに、HIV感染/AIDS患者、小児、肺外結核患者では陰性になりやすい。最も信頼性の高い検査は培養検査であり、検出に必要な生菌数が10~100/喀痰1mLと高感度であるが、培養に長期間を要することが欠点である[固形培地(卵

培地:小川, Lowenstein-Jensen, 寒天培地: Middlebrook 7H10, 7H11): 4~8週間, 液体培地: 10~14日間](図1)。アメリカ合衆国疾病対策防疫センター(CDC)は、喀痰塗抹顕微鏡結果を24時間以内、結核菌の分離および同定結果を10~14日以内、結核菌の薬剤感受性試験結果を15~30日以内に診断することを勧告している。遺伝子検査(PCRなどの核酸増幅法)は迅速性、感度や特異性に優れるが、生菌と死菌を判別できないことや非定量的であること、技術的問題

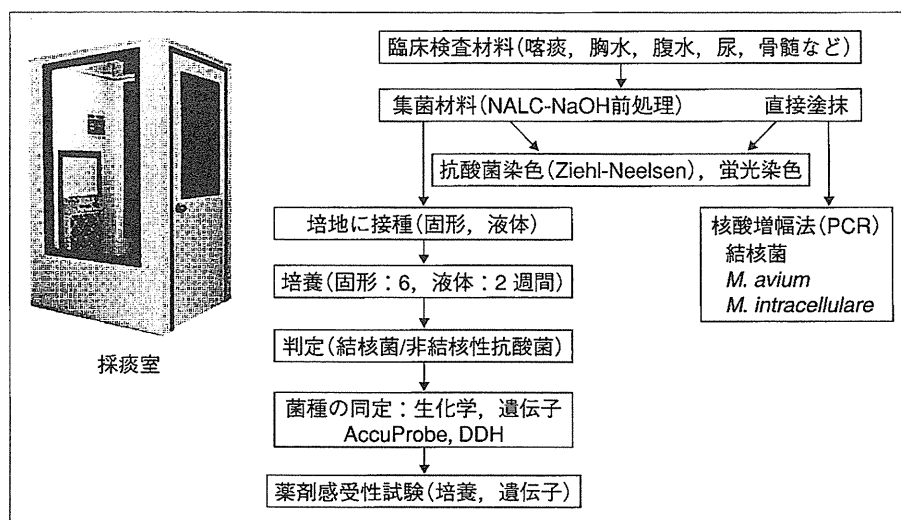


図1 採痰室と検査の流れ

(熟練、偽陽性・偽陰性、夾雑物混入、遺伝子増幅系に対する抑制物質の混入)などの短所がある。最近、短時間(2時間以内)、高感度・特異度で結核菌とリファンピシン耐性結核菌を同時検出可能な全自動遺伝子検出系(Xpert® MTB/RIF)が開発され、簡便な操作や安全性も確保され、その高い臨床的有用性が示された⁴⁾。Xpert® MTB/RIFは多剤耐性結核対策に威力を発揮することが期待される⁵⁾。検体採取から検査までの流れは図1に示す。なお、採痰に際し、感染伝播を防止するため、採痰室の設置が望まれる(図1)。

補助診断(表4)として、胸部X線検査の陽性所見は浸潤影、結節、空洞、線維化、肺門リンパ節腫大や石灰化、無気肺や胸膜肥厚・癒着、胸水貯留など多彩である。好発部位は酸素分圧の高い肺尖を含む上・中肺野である。多発性びまん性結節陰影は播種(粟粒)性結核でみられる。これらの所見は他の炎症性や腫瘍性肺疾患にも認められる所見であり、結核に特異的でなく、注意を要する。

結核の免疫学的補助診断法として、ツベルクリン皮内反応(tuberculin skin test; TST)は特異性に問題がある。TSTで用いられている結核菌培養上清に分泌される抗原蛋白質(purified protein derivative; PPD)はすべての抗酸菌(bacillus Calmette-Guérin: BCGや非結核性抗酸菌)に共通であるため、TST陽性(わが国: 紅斑長径 ≥ 10

mm, 欧米: 硬結長径 ≥ 5 mm)は結核菌感染のみならず、BCG接種や非結核性抗酸菌感染でも陽性を示す。逆に、活動性結核患者の約25%はTST陰性である。TST陰性には真の陰性(結核菌未感染)と偽陰性(結核菌既感染にもかかわらず陰性)があり、偽陰性の原因として、栄養障害、高齢者、免疫疾患、リンパ系悪性腫瘍、副腎皮質ステロイド薬療法、慢性腎不全、サルコイドーシス、HIV感染(AIDSを含む)や重症結核(播種性)などがある。また、TST陽性は感染防御の指標にもならないことに留意する。

近年、結核菌特異的蛋白質抗原を用いた免疫学的補助診断法(末梢血単核細胞を用いたIFN- γ 遊離試験, IGRA)が臨床応用されている⁶⁾。末梢血単核細胞を用いたIGRAにはQuantiFERON®; QFTやT-SPOT®.TBがある。QFT-3Gは抗原として結核菌特異的蛋白質抗原(early secreted antigenic target 6; ESAT-6, culture filtrate protein 10; CFP-10とTB7.7)が用いられ、診断精度が向上している。これらの抗原はBCGやほとんどの非結核性抗酸菌に存在しないため、結核菌特異的蛋白質に対する宿主応答により結核菌感染(潜在性結核菌感染症や活動性結核)を特異的に検出できる。原理は、末梢全血を試験管内で3種類の結核菌特異的抗原(ESAT-6, CFP-10, TB7.7)で刺激し、16~24時間培養後、血漿に産生・遊離されたIFN- γ をenzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA法)で定量する(陽性:0.35IU/mL以上, 感度92.6%, 特異度98.8%)。なお, 諸外国では結核感染の体外診断キットとしてT-SPOT®.TBも採用されている。T-SPOTの原理は, 末梢血単核細胞を分離し, 抗ヒトIFN- γ 抗体を被覆した培養プレートに分注後, 結核菌特異抗原(ESAT-6およびCFP-10)を添加して20時間培養し, その後, IFN- γ 産生細胞数をenzyme-linked immunospot assay (ELISPOT法)で計測する。活動性結核の診断の原則は, 病原体診断(喀痰塗抹, 培養や遺伝子検査)による結核菌の検出であるが, 各種検査においても結核菌検出が困難で確定診断に至らない場合, IGRAは補助診断として有用である。ただし, IGRAは診断の補助であって, IGRAだけの結果で確定診断をしてはならない。

2010年6月に米国CDCからIGRAの運用指針が公表された⁷⁾。QFTやT-SPOTの有用性はすでに評価されているが, ①接触者検診における陽性者からの活動性結核へ進行確率, ②免疫抑制状態患者における診断の精度, ③小児(特に5歳未満)を対象とした場合の診断精度などにおける有用性はいまだ課題とされている。なお, 2011年7月に世界保健機関(WHO)は診断の不正確(感度, 特異度, 誤判定)を理由として, 抗体検出による活動性結核の血清診断の中止を勧告した。この検査は血清抗結核菌抗体を測定するものであり, IGRAとはまったく異なる検査法であるので注意する。

QFTは潜在性結核菌感染の診断目的で積極的に使用することが推奨されている。活動性結核患者と接触して結核に感染した場合, 感染した大多数においてQFTが陽性になるまでの期間は2~3か月と考えられる⁸⁾。したがって, 接触者健診でのQFTは原則的に最終接触からこの期間を経た時期に実施する。前述のTSTは結核菌感染に特異的でなく, 結核のみならず, BCG接種や非結核性抗酸菌感染でも陽性を示すため, TST陽性は潜在性結核菌感染対象者を過剰に選択することが問題であったが, QFTはこの問題を改善した。潜在性結核菌感染を疑う場合は, 被験者の年齢, 基礎疾患, BCG接種歴, 感染源の情報(病型や排菌状況), 接触の程度, 周囲の発病・感染者の出現状況などを調べ, 感染した可能性

や感染した場合の発病リスクを考慮しておくことが必要である。

小児の活動性結核では, 乳幼児でも高い感度を示すと考えられており, QFTは有用な診断ツールである。しかし, 潜在性結核菌感染の診断には以下のような問題があるので注意を要する。小児, 特に5歳未満の乳幼児では細胞性免疫が未熟であり, QFT施行の際, 細胞性免疫の指標として同時に用いられる非特異的phytohemagglutinin (PHA)刺激に対するIFN- γ 応答が弱いために「判定不可」になる例が多く認められる。また, 結核菌特異抗原に対する免疫応答が弱いことにより偽陰性になる可能性もある。喀痰塗抹陽性感染源と同居していた小児を対象とした接触者健診例で, 乳幼児におけるQFTの陽性率がそれ以上の年齢群に比較して非常に低いことも明らかになっており, 小児, 特に5歳未満の乳幼児においてはQFT陰性のみを根拠に結核菌感染を否定することは不適切である。さらにTSTの方がQFTよりも感度が高いとする報告もあり⁹⁾, 乳幼児や小学生を対象とした接触者健診では, TST結果を優先して感染判断を行うことが適当である。なお, 中学生以上であればQFTが適用されるべきである。

また, 医療施設の新規職員の採用に際し, QFT検査を実施することが推奨される。特に, 結核患者と常時接触する職場・業務や, その他結核感染リスクの高い部署には強く勧められる。新規採用職員へのQFT検査は, 潜在性結核菌感染のスクリーニングであるとともに, QFTベースラインとして有用である。予期せぬ患者が結核と判明した場合は, 早急に濃厚接触者をリストアップする。雇用時のQFT検査値がない者で, 活動性結核患者との接触期間が短い場合には, ただちにQFT検査を実施することにより, ベースラインの代用資料とすることが可能である。その後, 改めて接触後2~3か月以降にQFTによる接触者健診を行う。

結核の免疫学的診断法としてQFTはTSTよりも優れた検査という位置づけで議論されることが多いが, それは, わが国ではBCG接種率が高く, TSTの診断価値(特異度)が低いからである。一方, TSTの有用性についてはコホート研究による多く