

に空洞の縮小と排菌の減少がみられてきている。初診時より三年余りに及ぶ経過を通じ、大量排菌と激しい咳嗽が持続している。

#### 患者 B

63 歳の男性で、55 歳より糖尿病があるが無治療であった。結核の既往はなし。平成 13 年 6 月より湿性咳嗽、発熱出現し、近医受診にて胸部異常影、喀痰抗酸菌塗抹陽性を指摘されたため 7 月 2 日 Y 病院入院となる。同日より INH、RFP、EB による化学療法を開始し、喀痰培養検査でも全剤感受性の結核菌と判明、順調に排菌も陰性化して 10 月 19 日退院となる。入院中患者 A とは約三ヶ月半同室であった(なお、病室は空気感染対策を施した陰圧部屋であった)。退院後は患者 A とは接触はない。退院後、徐々に生活が乱れがちとなり服薬も不規則となった。平成 14 年 2 月頃より胸部陰影の悪化を認め、入院勧められるも拒否していた。4 月 9 日左自然気胸を生じたため再入院となる。その際の喀痰培養にて多剤耐性結核菌を認めた。胸腔ドレナージにより気胸は軽快するも、5 月 6 日に大咯血を生じたため挿管、人工呼吸管理となる。その後一般状態は悪化し、肺内病変の進行を認め 6 月 28 日死亡される。

#### 患者 C

53 歳の男性で、糖尿病にて治療を受けていた。平成 9 年 10 月 15 日より平成 10 年 4 月 5 日まで X 病院にて全剤感受性肺結核にて入院加療を行い、排菌陰性化して退院となる。治療継続中の平成 12 年 10 月 5 日から平成 13 年 1 月 22 日まで糖尿病のコントロールのため同院に再入院。この時患者 A と病棟は違ったが、数回の接触歴あり。平成 13 年 9 月 12 日の画像にて右上肺 S3 に新たな陰影の出現を認め、9 月 26 日の喀痰培養にて 30 コロニーの結核菌を認めた為 11 月 1 日再入院となる。多剤耐性と判明したため、LVFX,SM,CS,PAS,TH,PZA による治療を行うも塗抹、培養ともに排菌持続するため平成 15 年 1 月 23 日当院受診、1 月 24 日入院となる。PZA、CS、EVM、CAM、CVA/AMPC にて現在も治療中である。

#### 患者 D

23 歳の女性で、既往歴に特記すべきことはない。平成 11 年 4 月より看護師として X 病院結核病棟に勤務しており、患者 A を含む複数の多剤耐性結核患者との接触があった。平成 14 年に同じ病棟の看護師が結核を発病し、定期外検診にて右 S6 に結節影を認めたため、肺結核として平成 14 年 6 月 19 日より INH、RFP、PZA、EB による抗結核療法を開始された。その後、喀痰培養にて結核菌を認め、感受性検査を行ったところ多剤

耐性であったため、手術目的にて平成 14 年 8 月 20 日近畿中央病院紹介受診、入院となる。CS, LVFX, TH, EVM にて化学療法を行った後に、10 月 24 日右肺 S6 区域切除術施行。以後化学療法を継続し、平成 15 年 7 月現在、経過は良好である。

#### 患者 E

24 歳の女性で、既往歴に特記すべきことはない。平成 12 年 4 月より看護師として X 病院結核病棟に勤務しており、患者 D と同様に多剤耐性結核患者との接触あり。平成 14 年 5 月 24 日左頸部のリンパ節腫脹あり、生検にて結核と診断され 6 月 14 日から INH、RFP、PZA、EB による治療を開始されるもリンパ節腫脹はむしろ悪化し、胸部 X 線上も陰影を認めたため、11 月 6 日に気管支鏡施行し結核菌を検出した。感受性結果で多剤耐性と判明したため、12 月より TH、PAS、SM による治療に変更され、手術目的にて近畿中央病院紹介入院となる。平成 15 年 3 月 25 日左上区部分切除術施行し、以後化学療法を継続中である。

#### 患者 F

31 歳の女性で、既往歴に特記すべきことはない。患者 A の同居家族であり、患者 A が肺結核発病後もしばしば接触していた。平成 14 年 11 月より発熱、咳嗽出現し、近医受診にて左肺の異常影を指摘され、X 病院入院となり、喀痰 PCR 検査にて結核菌陽性のため INH、RFP、EB、PZA による治療を開始される。その後培養菌の感受性検査にて多剤耐性と判明したため、平成 15 年 1 月より EVM、CS、TH、PZA、CAM による治療に変更され、外科的治療を含めた治療方針再検討のため当院転院となる。転院後も化学療法をそのまま継続したところ陰影は著明に改善し、手術の適応はないと判断されたため退院とし、現在も化学療法を継続中である。

#### 院内感染を疑うに至った経過と RFLP 分析について

今回の事例発見の端緒となったのは、患者 B が肺結核再発にて再入院となった際の検出菌が、以前に使用していない薬剤に対しても耐性である多剤耐性結核菌であり、しかもその薬剤感受性パターンが患者 A からの検出菌とほぼ同一であることが判明したことである。この二つの菌につき RFLP 分析を行ったところ同一菌であるとの結果が得られた。患者 A と患者 B が接触したのは入院中だけであったので、患者 B が感受性結核にて治療中に患者 A の菌による再感染を受けたことにより、多剤耐性結核を発病したことがほぼ確実となった。その後、患者 A と接触歴のある多剤耐性結核患者 C、D、E、F が当院入院となり薬剤感受性検査がほぼ一致したことより、全員が同一菌による感染である可能性を疑い RFLP 分析により確認した。

以上より、今回の事例が多剤耐性結核菌による院内集団感染であることが明らかとなった。時間的な経過より、患者 A が感染源であり、患者 B、C は感受性結核治療中に再感染を受け、患者 D、E は病院内で感染を受け、患者 F は家族内で感染を受けてそれぞれ発病したものと考えられた。

## 考察

本事例は、多剤耐性結核菌による院内集団感染事例である。耐性結核菌は従来から病原性が弱いのではないかと考えられてきた。これは、INH 耐性菌はではしばしばカタラーゼ活性を欠き動物実験において感受性菌より増殖が劣ることなどから推定されたものである。その後、Snider らの報告により INH/SM 耐性菌と感受性菌では感染リスクに差はないことが示されたものの、感染した後の発病リスクには差があるのではないかと、短期間に多数の患者を発病させる集団感染などは起こしにくいのではないかと考えられてきた。実際、多剤耐性結核菌による集団感染はアメリカを中心に近年多くの報告があるがそのほとんどは免疫の極度に低下した HIV 感染者におけるものである。また、HIV 感染の未だ少ないわが国においてはこれまで二事例の報告があるのみである。今回の事例では、約三年間の間に 5 名に多剤耐性結核を発病させている。全員 HIV 陰性者で、しかも 3 名は若年健康女性であった。このことから本事例の結核菌は病原性の強い菌であったと考えられる。

さらにこの菌の強い病原性を示唆するのは、患者 B と患者 C の 2 名において、感受性結核治療中に重感染して多剤耐性結核を発病させていることである。通常の成人型肺結核症の発症については、最初に感染した菌が再び増殖することによる内因性再燃と、新たに別の菌が感染することによる外来性再感染とがある。従来わが国では、ほとんどが内因性再燃によるもので、再感染はほとんどないとの考えが主流であった。近年の RFLP を用いた解析により HIV 感染者ではしばしば再感染が生じており、さらに HIV 陰性者でも再感染発病があり得ることがそれぞれ報告されているが、免疫の低下していない HIV 陰性者では一般に再感染はまれなことと考えられている。本事例の患者 B と患者 C は HIV 陰性であるにもかかわらず再感染を受けており、しかも感受性結核に対する治療中に感染したという点が注目に値する。同様の事例は、INH・SM 耐性結核で治療を受けていた HIV 陰性患者に多剤耐性結核菌が重感染したという報告が一例あるのみである。

従来わが国では、多剤耐性結核患者と感受性結核患者を同室にすることがしばしばあり、また結核病棟に陰圧設備を備えるようになったのはごく近年の事であるにもかかわらず

らず、今回のような事例の報告はない。従って本事例は、病原性の強い多剤耐性結核菌による例外的な院内集団感染と考えられる。しかし菌を検出した段階で病原性の強さを推定することは不可能であるため、すべての多剤耐性結核患者は陰圧設備のある個室隔離が望ましい。さらにいえば、入院当初は薬剤感受性が不明なので、すべての排菌陽性結核は、感受性が判明するまでは個室隔離が望ましいということにもなる。今後の結核病床のあり方として、感受性不明の患者及び多剤耐性結核患者は陰圧設備をもつ個室に収容し、一方で感受性と判明し治療が軌道に乗った患者は早期退院させるなど、より感染対策上実効性のある対応が求められる。

**US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM**

**THIRTY-EIGHTH TUBERCULOSIS AND LEPROSY  
RESEARCH CONFERENCE**

**National Institute of Allergy and Infectious Diseases  
National Institutes of Health**

**Newark, New Jersey  
July 21-22, 2003**

**IMPORTANT NOTICE**

**This information should not be released to other persons, quoted  
or extracted for publication without permission from the authors.**

**INDUCTION OF PROTECTIVE CELLULAR IMMUNITY AGAINST  
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS USING A DNA VACCINE ENCODING  
MPB51 ANTIGEN CARRIED BY ATTENUATED SUICIDE  
LISTERIA MONOCYTOGENES AND IDENTIFICATION OF T-CELL  
EPITOPES OF THE ANTIGEN**

Yukio Koide<sup>1</sup>, Keita Miki<sup>1,2</sup>, Toshi Nagata<sup>1</sup>, Mina Suzuki<sup>1</sup>, Taiki Aoshi<sup>1</sup>, Takao Tanaka<sup>3</sup>,  
Yeung-Hyen Kim<sup>1</sup>, Masato Uchijima<sup>1</sup>, Naoya Ohara<sup>4</sup>, Masaji Okada<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology and <sup>2</sup>Second Department of Surgery, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan, <sup>3</sup>Clinical Research Center, National Kinki-Chuo Hospital for Chest Diseases, Osaka, Japan, and <sup>4</sup>Division of Microbiology and Oral Infection, Course of Medical and Dental Sciences, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan.

**Abstract**

We are able to induce protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* employing DNA vaccines carried by recombinant attenuated *Listeria monocytogenes* strains. We constructed self-destructing attenuated *L. monocytogenes*  $\Delta 2$  strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85A, Ag85B, and MPB51. Infection of these recombinant bacteria allowed expression of the genes in J774A.1 murine macrophage cell line. The intraperitoneal vaccination of C57BL/6 mice with these recombinant bacteria was capable of inducing PPD-specific cellular immunities such as footpad reaction and proliferative response and interferon- $\gamma$  production of splenocytes. Furthermore, the vaccination of mice with these recombinant bacteria was able to confer protective immunity against infection with *M. tuberculosis* on the mice, indicating that the efficacy of the vaccination method against mycobacterial infection and that MPB51 is a major protective antigen in addition to previously known Ag85A and Ag85B. Therefore, we tried to identify T-cell epitopes of MPB51 and found two H-2<sup>b</sup>-restricted CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes and an H-2<sup>d</sup>-restricted CD8<sup>+</sup> T-cell epitope.

**Introduction**

Tuberculosis (TB) remains an urgent worldwide public health problem. Despite the staggering global impact of TB, the best vaccine available, BCG, gives variable protective efficacy against TB [1]. Therefore, there remains an urgent need for an improved vaccine. Modified BCG strains with enhanced CD8<sup>+</sup> T-cell-stimulating capacity, or endowed with type1 helper T (Th1) cell cytokines, have been developed [2]. Furthermore, modified viable mycobacterial vaccines using deletion mutants of *M. tuberculosis* sufficiently attenuated to reduce the risk of re-virulence have been engineered [3]. Plasmid DNA vaccine is one of the most promising candidate for future TB vaccine because the vaccine has potential advantage over traditional protein vaccines due to strong cellular immunity induced, supporting the idea that DNA vaccination can serve as an alternative to immunization with the live vaccines. Evidence has accumulated for the efficacy of DNA vaccination against TB in mice employing plasmids expressing Ag85 proteins, HSP65, Hsp70, 38-kDa Ag, and ESAT-6 [4]. Ag 85 complex consists of three structurally related components, A, B, and C [6]. Since Ag85 complex is produced early in the growth phase and in

large amounts (20-30%), it is suggested to be major protective antigens. Indeed, Ag85A and Ag85B but not Ag85C have been reported to stimulate B and T cell responses on TB patients [7], and immunization of Ag85A and Ag85B proteins induced protection against aerosol challenge with *M. tuberculosis* in mice and guinea pigs [8, 9]. MPB51 has been reported to belong to this Ag85 family although the immunological role remains resolve [10].

DNA vaccine can be usually inoculated by two distinctly different ways. One approach is needle injection of plasmid DNA into different tissue sites, with most common route being intramuscular injection. An alternative way is to use a biolistic device (gene gun) to propel plasmid DNA-coated gold particles into the epidermis. A more direct delivery of DNA vaccines to antigen-presenting cells (APC) can be achieved by the exploitation of intracellular bacteria such as *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, invasive *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* [11-13]. These bacteria show a pronounced preference for professional APC. Attenuated mutant strains of these bacteria harboring plasmid DNA vaccine lyse inside the APC and can therefore carry the plasmid into the host phagosome or cytosol, then release the plasmid upon intracellular disintegration. However, gram-negative carriers such as *Salmonella*, *E. coli* and *Shigella* have the disadvantage of containing abundant amounts of toxic lipopolysaccharide (LPS). Therefore, *Listeria monocytogenes*, a gram-positive bacterium, is a good candidate for the carrier. Furthermore, the bacterium is considered to be one of possible effective recombinant vaccine vectors, based on the property to escape from phagolysosome and live in the cytoplasm of the host cells. In addition, the bacterium has been reported to have an ability to induce Th1-type immune responses. These features are favorable to elicit effective cellular immunity. Here, we show the induction of protective cellular immunity against *M. tuberculosis* in vivo of this attenuated *L. monocytogenes* strain by immunization of mice with the strains carrying eukaryotic expression plasmids for Ag85A, Ag85B, and MPB51 molecules.

#### **Materials and methods**

1. *Bacteria and plasmids.* Attenuated *L. monocytogenes* strain,  $\Delta 2$  [12, 13] and plasmids, p3LOVA118 and pcDNA3L [13] were kindly donated by Drs. Guido Dietrich, Andreas Bubert, and Ivaylo Gentshev (University of Würtzburg, Germany). Attenuated *L. monocytogenes*  $\Delta 2$  was cultured in brain heart infusion (BHI) broth (Beckton Dickinson and Company, Sparks, MD) at 37°C. *E. coli* DH5 $\alpha$  strain was cultured with L-broth.

2. *Construction of recombinant plasmids, p3L118R-Ag85A, p3L118-Ag85B, and p3L118-MPB51.* *NruI-NotI* fragment of p3LOVA118 covering half of cytomegalovirus (CMV) promoter and ovalbumin epitope region was removed and replaced with corresponding region of pcDNA3L, resulting in p3L118R. This procedure removes ovalbumin epitope region from p3LOVA118 and remakes *Not I* site for future subcloning of genes of interest under CMV promoter. BCG Ag85A, Ag85B, and MPB51 genes were amplified from plasmids, pMB49 [14] and paL-1 [9], respectively, by PCR. These PCR fragments were digested with *Not I* and inserted in *Not I* site of p3L118R. The resultant plasmids were introduced into the attenuated *L. monocytogenes*  $\Delta 2$  strain, by electroporation as described below.

3. *Electroporation of plasmids to L. monocytogenes  $\Delta 2$  strain.* The procedure was basically in accordance with the protocol previously described [15].

4. *Infection of J774A.1 cells with recombinant L. monocytogenes  $\Delta 2$  strains.* J774A.1 cells were grown to  $5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> at the beginning of experiments. The medium was renewed 24 h before the experiments. Recombinant  $\Delta 2$  strains ( $10^5$  cells) were added to J774A.1 cells. After 5 h, 12.5 mg / ml of gentamicine was added to the medium to remove extracellular

bacteria. After 36-h incubation, the infected cells were harvested.

5. *Reverse transcription-PCR (RT-PCR) analysis for Ag85A, Ag85B, or MPB51 gene detection.*  $\Delta 2/p3L118R$ ,  $\Delta 2/p3L118R$ -Ag85A,  $\Delta 2/p3L118R$ -Ag85B, or  $\Delta 2/p3L118R$ -MPB51-infected J774A.1 cells were harvested and RT-PCR was performed as previously described [16].

6. *Immunization procedures.* Mice were immunized intraperitoneally with recombinant attenuated *L. monocytogenes*  $\Delta 2$  strain twice at two-weeks intervals. Mice sera were collected one month after the last immunization.

7. *Delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction.* Purified protein derivative (PPD) was purchased from Japan BCG Inc. (Tokyo, Japan). Mice were injected with 5  $\mu$ g PPD in 50  $\mu$ l PBS in the left hind footpad. As controls, mice were injected with 50  $\mu$ l PBS in the right hind footpad. The swelling of footpads was measured with a calipermeter (Mitutoyo Corp., Osaka, Japan) after 48 h.

8. *Lymphocyte proliferation assay.* Spleen cells ( $1 \times 10^5$ /well) from the immunized mice were incubated for 48 h at 37°C in 96-well round-bottom tissue culture plates in the presence or absence of 5  $\mu$ M of PPD. After 48 h in culture, de novo DNA synthesis was assessed by uptake of [methyl- $^3$ H] thymidine

9. *Cytokine enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Semiquantitative RT-PCR for IFN- $\gamma$  gene.* These have been performed as described elsewhere [16].

10. *In vivo protection assay.* Mice vaccinated with recombinant *Listeria* DNA vaccines were infected with *M. tuberculosis* H37Rv intravenously one month after the last immunization. Mice were sacrificed 10 weeks later and the bacterial number in the lung, the spleen, and the liver were counted as CFUs on Ogawa medium (Nihon BCG, Tokyo).

11. *Synthesis of MPB51 overlapping peptide library.* Twenty-six 20-mer peptides overlapping with 10 amino acids and a final overlapping 12-mer synthetic peptide covering the entire 266 amino acid were produced by standard peptide synthesis technique (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA).

## Results and Discussion

### *Infection of the recombinant L. monocytogenes allowed expression of the genes in J774A.1 murine macrophage cell line*

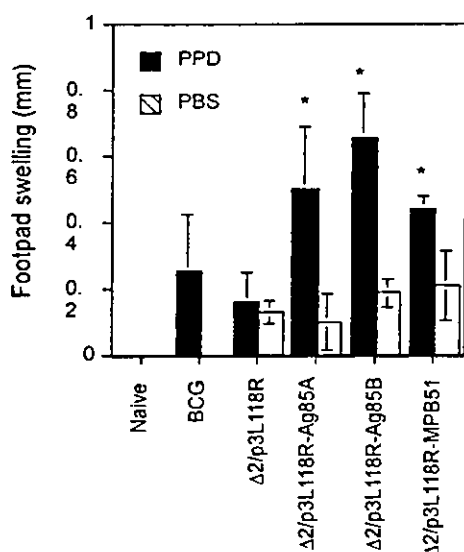
J774A.1 murine macrophage-like cell line was infected with *L. monocytogenes*  $\Delta 2$  mutant carrying the plasmids, p3L118R-Ag85A, p3L118R-Ag85B, and p3L118R-MPB51. Five hours after infection, the infected cells were harvested for isolation of total RNA. Then, RT-PCR was performed to confirm the expression of Ag85A, Ag85B, or MPB51 mRNA in the cells. Clear bands for these mRNA were detected after reverse transcription of total RNA solutions, but not before the reverse-transcriptase treatment (data not shown).

### *PPD-specific delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction with recombinant attenuated L. monocytogenes vaccination*

For the effective protective immunity against *M. tuberculosis*, specific cellular immunity against the bacterium plays a critical role. First, we examined DTH responses of mice immunized with  $\Delta 2/p3L118R$ -Ag85A,  $\Delta 2/p3L118R$ -Ag85B, or  $\Delta 2/p3L118R$ -MPB51. As shown in Fig. 1, mice immunized with these recombinant *Listeria* significantly responded to PPD, but not to PBS alone. Similar, but lower responses were obtained for mice immunized with *M. bovis* BCG. Mice immunized with  $\Delta 2/p3L118R$  control recombinant *L. monocytogenes* strain failed to show specific DTH reactions to PPD. These results indicate that mice immunized with  $\Delta 2/p3L118R$ -Ag85A,  $\Delta 2/p3L118R$ -Ag85B, or  $\Delta 2/p3L118R$ -MPB51 successfully elicited



cellular immunity against *M. tuberculosis*.



**FIGURE 1.** Footpad swelling responses of mice immunized with  $\Delta 2/p3L118R$ -Ag85A,  $\Delta 2/p3L118R$ -Ag85B, or  $\Delta 2/p3L118R$ -MPB51. C57BL/6 mice were immunized with  $\Delta 2/p3L118R$ ,  $\Delta 2/p3L118R$ -Ag85A,  $\Delta 2/p3L118R$ -Ag85B, or  $\Delta 2/p3L118R$ -MPB51 three times at two-weeks intervals. The data of mice immunized once with *M. bovis* BCG were also shown as a control. One month after the last immunization, footpad swelling responses directed to PPD were examined. Filled lines indicate footpad swelling after in vivo PPD stimulation. Hashed lines indicate footpad swelling by PBS alone. The means  $\pm$  SD of 4-5 mice per each group are shown. Asterisks indicate statistically significant ( $p \leq 0.001$ ) compared with the value with control  $\Delta 2/p3L118R$  immunization.

#### *PPD-specific lymphocyte proliferation after recombinant attenuated L. monocytogenes vaccination*

Then, we examined proliferative responses of splenocytes derived from the immunized mice in response to in vitro PPD stimulation. A high proliferative response was observed in control BCG-immunized mice. Immunization with  $\Delta 2/p3L118$ -Ag85A,  $\Delta 2/p3L118$ -Ag85B, or  $\Delta 2/p3L118$ -MPB51 recombinant *L. monocytogenes* also gave significant proliferative responses (data not shown). But, the levels of specific proliferation were lower than that evoked by immunization with *M. bovis* BCG. Mice immunized with  $\Delta 2/p3L118R$  control recombinant *L. monocytogenes* strain did not give a significant response.

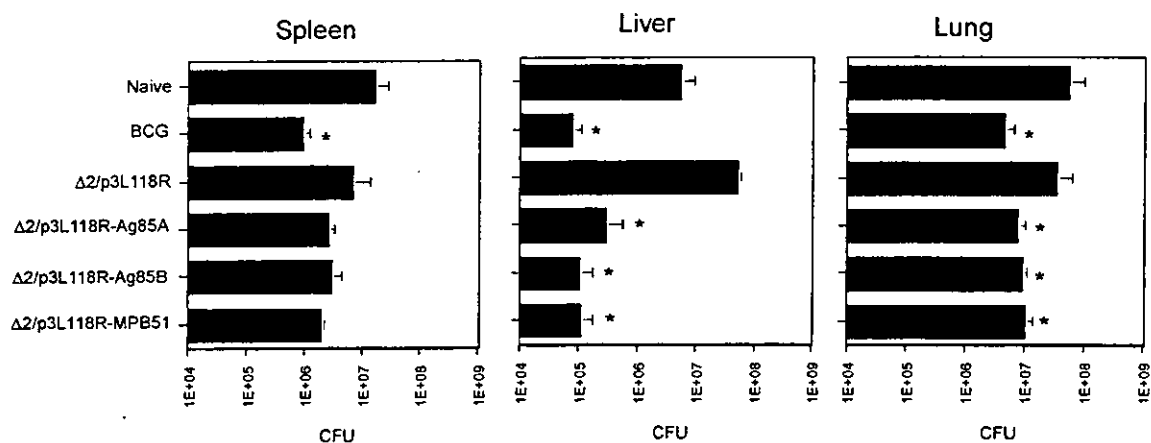
#### *PPD-specific cytokine production with recombinant attenuated L. monocytogenes vaccination*

Since IFN- $\gamma$  produced by effector T cells plays a pivotal role in protection against TB, the IFN- $\gamma$  producing activity of effector T cells derived was examined. First, we semiquantitatively assessed IFN- $\gamma$  mRNA expression from splenocytes of the immunized mice upon PPD stimulation. IFN- $\gamma$  mRNA-specific bands were clearly detected in PPD-stimulated splenocytes of mice immunized with  $\Delta 2/p3L118$ -Ag85A,  $\Delta 2/p3L118$ -Ag85B, or  $\Delta 2/p3L118$ -MPB51 recombinant *Listeria* (data not shown). The strength of the bands was comparable to that of mice immunized with *M. bovis* BCG.

#### *Recombinant attenuated L. monocytogenes vaccination conferred protective immunity against M. tuberculosis infection comparable to M. bovis BCG immunization in BALB/c mice*

Then, we evaluated the effects of recombinant attenuated *Listeria* vaccination on the protective immunity against *M. tuberculosis* H37Rv infection and compared with those of *M. bovis* BCG vaccination. Ten weeks after the *M. tuberculosis* H37Rv challenge, spleens, livers, and lungs were prepared from the immunized mice and the numbers of CFUs of *M. tuberculosis* H37Rv in these tissues was evaluated. As shown in Fig. 2, viable colony counts in these tissues of mice immunized with  $\Delta 2/p3L118$ -Ag85A,  $\Delta 2/p3L118$ -Ag85B, or  $\Delta 2/p3L118$ -MPB51 recombinant *Listeria* compared with those of naïve mice and mice immunized with control plasmid-carrying recombinant *Listeria*. Protective effects of these recombinant *Listeria* immunization was obvious in the liver and the lung. The effects of these recombinant *Listeria* vaccination were

comparable to the effects of live BCG vaccination. Especially in the liver, we detected approximately two order reduction of the CFUs in Ag85A and MPB51 DNA vaccine-carrying immunization. *Listeria*-, and live BCG-immunized mice.

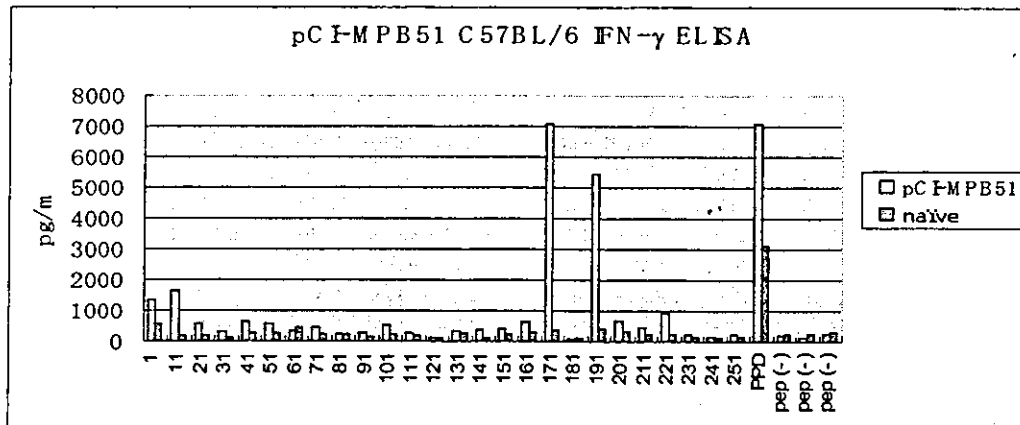


**FIGURE 2.** In vivo protective activity of mice immunized with  $\Delta 2/p3L118R$ -Ag85A,  $\Delta 2/p3L118R$ -Ag85B, or  $\Delta 2/p3L118R$ -MPB51 against virulent *M. tuberculosis*. BALB/c mice were immunized with  $\Delta 2/p3L118R$ ,  $\Delta 2/p3L118R$ -Ag85A,  $\Delta 2/p3L118R$ -Ag85B, or  $\Delta 2/p3L118R$ -MPB51 three times at two-weeks intervals. The data of mice immunized once with *M. bovis* BCG were also shown as a control. These mice were challenged i.v. with live *M. tuberculosis* H37Rv. Numbers of CFUs in the spleens, the livers, and the lungs were determined 10 wk later. The means  $\pm$  SD of 6 mice are shown. Asterisks indicate statistically significant ( $p < 0.05$ ) compared with the value with control  $\Delta 2/p3L118R$ .

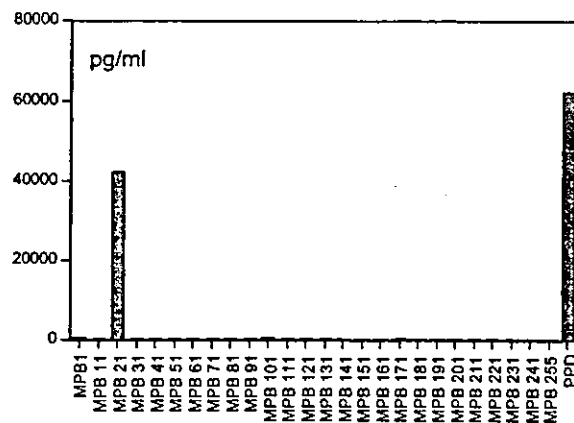
*IFN- $\gamma$ -inducing T-cell epitopes of MPB51 in spleen cell cultures from C57BL/6 mice and BALB/c mice vaccinated with a DNA vaccine encoding MPB51*

Since we demonstrated that MPB51, which is secreted from BCG and identical to MTP51 secreted from *M. tuberculosis*, is one of major protective antigens against TB infection, we attempted to identify T-cell epitopes. First, we immunized C57BL/6 mice with a DNA vaccine encoding MPB51 employing gene gun. As shown in Fig.3A, spleen cells from the immunized mice produced significant levels of IFN- $\gamma$  to the peptide composed of residues 171 to 190 and 191 to 210 of mature MPB51, suggesting that these two regions contain T-cell epitopes. Then, we determined T-cell subset responsible for the production of IFN- $\gamma$ . Depletion of CD4<sup>+</sup> T cells but not CD8<sup>+</sup> T cells substantially decreased IFN- $\gamma$  production against both peptides (data not shown), indicating that both amino acid residues 171 to 190 and 191 to 210 contain CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes. As CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes are usually composed of 12 to 24 amino acids, we suppose that 20 amino acids are sufficient for identification of CD4<sup>+</sup> T-cell epitope and that there is no sense in reducing the size further. Since C57BL/6 mice do not express I-E molecules, these epitopes should be presented by I-A<sup>b</sup> molecules. Spleen cells of immunized BALB/c mice strongly reacted to the peptide composed of amino acid 21 to 40 (Fig.3B). Double staining experiments against intracellular IFN- $\gamma$  and CD4 or CD8 molecules revealed that IFN- $\gamma$ -producing T-cell subset in response to peptide 21 (21-49) is CD8<sup>+</sup> cells (data not shown). As CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes usually consists of 8-9 amino acids, we have to identify the epitope in the peptide 21. Such studies are now under way in our laboratory.

A



B



**FIGURE 3.** IFN- $\gamma$  inducing epitopes of MPB51 in DNA- vaccinated C57BL/6 (A) or BALB/c mice (B). Spleen cells from immunized C57BL/6 or BALB/c mice were stimulated in vitro with synthetic overlapping peptides covering the mature sequences of MPB51. IFN- $\gamma$  levels in the culture supernatant were detected by ELISA.

Furthermore, employing H-2 class I knockout, HLA-A\*0201-transgenic mice, we found HLA-A\*0201-restricted CD8<sup>+</sup> T-cell epitope of MPB51. Characterization of T-cell epitopes may help to elucidate the exact role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in protection against TB and may assist in the development of novel tuberculosis vaccines.

#### Conclusion

From the findings described in this paper, we drew the following conclusions. (1) The inoculation with recombinant *L. monocytogenes* harboring plasmid DNA vaccines for Ag85 family molecules is able to induce specific type 1 cellular immunities in spleen cells of the mice. (2) The inoculation can confer protective immunity against TB. (3) MPB51 molecules belonging to Ag85 family appeared to be a major protective antigen in addition to Ag85A and Ag85B molecules. (4) Mature MPB51 molecule contains I-A<sup>b</sup>-restricted CD4 epitopes at both amino acid residues 171 to 190 and 191 to 210 and H-2<sup>d</sup>-restricted CD8 epitope at amino acid 21 to 40.

#### Acknowledgement

We are very grateful to Drs. Guido Dietrich, Andreas Bubert, and Ivaylo Gentshev (University of Würzburg, Germany) for providing attenuated *L. monocytogenes* strain,  $\Delta 2$  and plasmids,

p3LOVA118 and pcDNA3L. This work was supported by grant-in-aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and Regional Science Promotion Program of Japan Science Technology Corporation, Shizuoka Research and Education Foundation.

#### References

1. World Health Organization. Tuberculosis. Fact Sheet No.104, WHO (<http://www.who.org>) 2000.
2. Hess J, Miko D, Catic A, Lehmsiek V, Russell DG, Kaufmann SH: *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin strains secreting listeriolysin of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 5299-304, 1998.
3. Berthet FX, Lagranderie M, Gounon P *et al.* :Attenuation of virulence by disruption of the *Mycobacterium tuberculosis* *erp* gene. *Science*, **282**: 759-62, 1998.
4. Lowrie, DB, Silva CL, Tascon RE: Genetic vaccination against tuberculosis. In *Gene vaccination: Theory and Practice*. E. Raz, ed. Springer, Berlin, p. 59, 1998.
5. Wiker HG, Harboe M. : The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev* **56**: 648, 1992.
6. Launois P., DeLeys R, Niang MN, Drowart A, Andrien M, Dierckx P, Sarthou J-L, Van Vooren J-P, Huygen L.: T-cell-epitope mapping of the major secreted mycobacterial antigen Ag85A in tuberculosis and leprosy. *Infect Immun* **62**: 3679, 1994.
7. Horwitz, MA, Lee B-WE, Dillon BJ, Harth G: Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins against *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1530, 1995.
8. Baldwin, SL, D'Souza C, Roberts AD, Kelly BP, Frank AA, Lui MA, Ulmer JB, Huygen K, D. M. McMurray DM, Orme IM: Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis. *Infect Immun*. **66**: 2951, 1995.
9. Ohara, N, Kitaura H, Hotokezawa H, Nishikawa T, Wada N, Matsumoto A, Matsuo T, Naito N, Yamada T. Characterization of the gene encoding the MPB51, one of the major secreted protein antigens of *Mycobacterium bovis* BCG, and identification of the secreted protein closely related to the fibronectin binding 85 complex. *Scand. J. Immunol*. **41**: 433, 1995.
10. Sizemore DR, Branstrom AA, Sadoff JC: Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* **270** : 299, 1995.
11. Darji A, Guzman CA, Gerstel B, Wachholz P, Timmis KN, Wehland J, Chakraborty T, Weiss S: Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* **91**: 765-775, 1997.
12. Dietrich G, Bubert A, Gentschev I, Sokolovic Z, Simm A, Catic A, Kaufmann SHE, Hess J, Szalay AA, Goebel W: Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat Biotechnol* **16** :181-186, 1998.
13. Hauf N, Goebel W, Fiedler F, Sokolovic Z, Kuhn M: *Listeria monocytogenes* infection of P388D1 macrophages results in a biphasic NF- $\kappa$ B (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\beta$  degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9394, 1997.
14. Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Yamada T: Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular  $\alpha$  antigen. *J Bacteriol* **170**: 3847, 1998.
15. Park SF, Stewart BSAB: High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells. *Gene* **94**: 129, 1990.
16. Yoshida A., Koide Y, Uchijima M, Yoshida TO: Dissection of strain difference in acquired protective immunity against *Mycobacterium bovis* Calmette-Guérin Bacillus (BCG). *J. Immunol*. **155**: 2057, 1995.

**US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM**

**THIRTY-EIGHTH TUBERCULOSIS AND LEPROSY  
RESEARCH CONFERENCE**

**National Institute of Allergy and Infectious Diseases  
National Institutes of Health**

**Newark, New Jersey  
July 21-22, 2003**

**IMPORTANT NOTICE**

**This information should not be released to other persons, quoted  
or extracted for publication without permission from the authors.**

**NOVEL (RECOMBINANT BCG-AND DNA-) VACCINATION AGAINST TUBERCULOSIS**

<sup>1</sup>Masaji Okada, <sup>1</sup>Takao Tanaka, <sup>1</sup>Yoshikazu Inoue, <sup>1</sup>Yuji Takemoto, <sup>2</sup>Shigeto Yoshida, <sup>3</sup>Naoya Ohara, <sup>3</sup>Mariko Naito, <sup>3</sup>Takeshi Yamada, <sup>4</sup>Yasufumi Kaneda, <sup>5</sup>Makoto Matsumoto, <sup>6</sup>E.C.Dela Cruz, <sup>6</sup>E.V.Tan, <sup>6</sup>Dr. R.M. Abalos, <sup>6</sup>Dr. L.J. Young, <sup>6</sup>Dr. J.A. Burgos, <sup>7</sup>Yasir Skeiky, <sup>7</sup>Steven Reed, <sup>1</sup>Mitsunori Sakatani

<sup>1</sup> Clinical Research Center, National Kinki-Chuo Hospital for Chest Disease., <sup>2</sup> Dep. Med. Zoology, Jichi-Med. Sch, <sup>3</sup> Nagasaki Univ. Grad. Sch. Biomed. Sci. Div. of Microbiol. Oral Infect., <sup>4</sup> Div. of Gene Ther. Sci. Grad.Sch. of Med. Osaka, <sup>5</sup> Otsuka Pharma. Co., Ltd., <sup>6</sup> Leonard Wood Memorial, <sup>7</sup> Corixa Corp.

The development of novel vaccines against tuberculosis was studied in murine and cynomolgus monkey systems. Four distinct methods; DNA vaccination (1.plasmid 2.adenovirus vector), 3.recombinant BCG, and 4.subunit (recombinant protein) were used for the development of novel vaccines.

Genes (HSP65 gene, IL-12 gene as well as Ag 85A-, 85B-, MPB51-gene and IL-6 related genes (IL-6 gene +IL-6R gene + gp130 gene) were administered into the Balb/c mice infected (i.v. or intra-tracheal injection) with Mycobacterium tuberculosis (M.tuberculosis). Elimination of M.tuberculosis in lungs, liver, and spleen of these mice and survival were studied in these models. HSP65 gene + IL-12 gene vaccination, or recombinant BCG (BAS1: Antigen 85B-+Antigen 85A-+MPB51-gene recombinant BCG) were more prophylactically efficient than parental BCG Tokyo vaccination. In contrast, IL-6 related genes vaccination using adenovirus vector showed therapeutic effect on M. tuberculosis infected mice. Cytotoxic T cells (CTL) activity against M. tuberculosis in the spleen cells from mice treated with IL-6 related genes vaccination were significantly augmented.

Recently, it has been demonstrated that fusion protein Mtb72f (fusion protein of Mtb39 and Mtb32 derived from M.tuberculosis) showed extremely stronger prophylactic effect than BCG Tokyo using the cynomolgus monkey models (Nature Med., Walsh, Tan et al. 1996) by Drs. Reed and Skeiky. Mtb72 f showed good protection in the monkey model when it was used to boost BCG-immunized monkeys, showing protection superior to BCG alone.

Therefore, the recombinant(r) Mtb72f BCG vaccine was recently established. It showed stronger anti-tuberculosis immunity than BCG Tokyo. rMtb72f BCG augmented the frequency of T cells producing  $\gamma$ -IFN specific against the PPD and M. tuberculosis by Elispot assay in the mice. Furthermore, by the histopathological examination using guinea pig -TB bronchial instillation model, rMtb72f BCG exerted anti-tuberculosis effect in the lungs.

By using these new vaccines (rMtb 72f BCG, HVJ-liposome/HSP65+IL-12 and Mtb72f fusion protein + BCG) and the cynomolgus monkey models which are very similar to human tuberculosis, the prophylactic effect of vaccines are now being studied.

# Kekkaku 結核

Vol. 78 No.1 January 2003

- 論 壇 1……小児結核，特に0歳児結核の治療 ■近藤信哉他  
原 著 5……成人集団における肺結核硬化巣有所見者の罹患率 ■下内 昭他  
15……抗結核薬による薬剤性肝炎に対するグリチルリチン製剤の効果 ■宮沢直幹他  
資 料 21……結核統計資料 その1. 性，年齢階級別結核患者届出率の年次推移 ■島尾忠男他  
症例報告 27……SIADHを契機に発見された軽症肺結核の1例 ■西澤依小他  
短 報 33……Antisense oligo DNAによる酸素依存性マクロファージ殺菌系および抗菌薬の  
*Mycobacterium avium* complexに対する活性発現増強の試み ■清水利朗他  
第77回総会招請講演 37……21世紀のアジア結核制圧戦略—西太平洋地域における結核対策— ■尾身 茂  
第77回総会教育講演 45……HIV感染者における結核 ■永井英明  
第77回総会シンポジウム 51……結核免疫学の動向と課題 ■座長：光山正雄，赤川清子  
委員会報告 57……結核治療の成功のために ■座長：桜山豊夫，山下武子  
61……抗酸菌検査の精度管理(1)市販培地の発育試験成績について  
■日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会

- 1……Difficulties in the Treatment of Tuberculosis in Infants ■Shinya KONDO et al.  
5……The Incidence Rate of Active Pulmonary Tuberculosis among Adult Population  
with Fibrotic Lesions ■Akira SHIMOUCI et al.  
15……Effect of Glycyrrhizin on Anti-Tuberculosis Drug-Induced Hepatitis  
■Naoki MIYAZAWA et al.  
21……Notification Rate of TB in Japan (1949–2001) ■Tadao SHIMAO et al.  
27……A Case of Pulmonary Tuberculosis Initially Presented with Syndrome of  
Inappropriate Secretion of Antidiuretic Hormone (SIADH) ■Yoriko NISHIZAWA et al.  
33……Effects of Antisense Oligo DNA on the Antimicrobial Activity of Reactive Oxygen  
Intermediates and Antimycobacterial Agents against *Mycobacterium avium* Complex  
■Toshiaki SHIMIZU et al.  
37……Tuberculosis Control Strategy in Asia for the 21st Century—Tuberculosis Control  
in the Western Pacific Region of World Health Organization— ■Shigeru OMI  
45……HIV Infection and Tuberculosis ■Hideaki NAGAI  
51……Up-to-Date Understanding of Tuberculosis Immunity  
■Chairpersons: Masao MITSUYAMA and Kiyoko AKAGAWA  
57……Towards Success of Tuberculosis Treatment  
■Chairpersons: Toyob SAKURAYAMA and Takeko YAMASHITA

日本結核病学会  
THE JAPANESE SOCIETY FOR TUBERCULOSIS

## 第77回総会シンポジウム

## 結核免疫学の動向と課題

座長 <sup>1</sup>光山 正雄 <sup>2</sup>赤川 清子

キーワード：結核免疫，TH1，サイトカイン，ワクチン

## このシンポジウムの狙い

結核は免疫学的疾患であるといっても過言ではない。遅延型過敏反応の成立，肉芽腫性炎症，空洞形成のいずれにもマクロファージやTH1細胞が深く関与している。BCGワクチンは確かにPPD特異的な免疫応答を誘導するが，それがどこまで防御免疫に役立つかについては必ずしも明確ではなく，CTLの関与についてもコンセンサスは得られていない。結核における病態形成と宿主防御には，サイトカインを中心としたT細胞応答のどのような発現のバランスがからんでいるのであろうか？ このシンポジウムでは，結核に関わる免疫学的研究が現在どのような地点にあり，何が明らかで今後何が解明されなければならないかを明確にすることを目的とし，現在のわが国においてそれぞれ中心的立場で研究を推進している方々に分担テーマに関連した新しい知見の紹介を頂いた。

## 1. 結核菌菌体成分に対する炎症および免疫応答

小林和夫 (大阪市大・医)

生物活性を示す結核菌菌体成分として脂質，糖脂質や蛋白質が知られている。結核菌ゲノム解析から脂質や脂肪酸代謝に関連する酵素は約250種存在し，大腸菌では約50種であることを考慮すると，脂質/糖脂質は結核菌に特徴的である。そこで，結核菌/抗酸菌に特徴的な細胞壁脂質成分が惹起する宿主炎症・免疫応答の分子機序を明らかにする目的で，細胞壁由来糖脂質 (trehalose dimycolate: TDMや sulfolipid: SL) を実験動物に投与し，宿主炎症・免疫応答 (遅延型足蹠腫脹反応，肉芽腫炎症，

血管新生や機能分子：サイトカイン/ケモカイン) を解析した。

TDMはマウスに遅延型足蹠腫脹反応を惹起し，かつ，免疫群において非免疫群に比し，増強していた。無胸腺マウスにおける足蹠腫脹反応は免疫群と非免疫群間で差異を認めなかった。TDM静脈内投与は肉芽腫炎症を誘導したが，免疫群は非免疫群に比し，顕著であった。他方，無胸腺マウスでは免疫機作による肉芽腫炎症の増強を認めなかった。病変構成細胞として，免疫群でCD4陽性細胞が増加していた。病変部サイトカイン解析では早期に単球走化性ケモカインおよび炎症惹起性サイトカイン，その後，1型ヘルパーT (Th1) /細胞性免疫誘導性サイトカイン (interleukin-12: IL-12や interferon- $\gamma$  : IFN- $\gamma$ ) 蛋白発現を認めたが，いずれのサイトカイン発現も免疫群は非免疫群に比し，顕著であった。しかし，Th2サイトカイン (IL-4) は両群共に発現せず，実際，液性 (Th2) 免疫応答の指標である抗TDM抗体を産生しなかった。すなわち，結核菌細胞壁由来糖脂質TDMは炎症および細胞性 (Th1) 免疫応答を選択的に誘導する。TDMは血管新生因子 (IL-8や血管内皮増殖因子) を発現させ，その結果，肉芽腫炎症周囲血管新生を惹起した。家兔TDM誘導肉芽腫は類上皮細胞や多核巨細胞を多数含み，ヒト結核病変に類似し，かつ，免疫担当細胞 (胸腺や脾) にアポトーシスを誘導した。他方，SLは肉芽腫や血管新生をほとんど誘導せず，SLの炎症惹起性は軽度であった。

結核菌由来糖脂質，特に，TDMは非特異的炎症応答，加えて，特異性および記憶を特徴とするTh1細胞性免疫応答も惹起すること，さらに，T細胞依存性抗原である。すなわち，結核性肉芽腫炎症は異物性および過敏性機序

<sup>1</sup>京都大学大学院医学研究科微生物感染症学，<sup>2</sup>国立感染症研究所細胞免疫部

連絡先：光山正雄，京都大学大学院医学研究科微生物感染症学，〒606-8501 京都府京都市左京区吉田近衛町 (E-mail: mituyama@mb.med.kyoto-u.ac.jp)  
(Received 3 Oct. 2002)



の関与した混合性病変である。TDMは、肉芽腫炎症に加えて、血管新生やアポトーシスも誘導し、結核菌-宿主関係における多機能分子である。TDMが抗結核免疫の主要な機能分子である Th1 関連サイトカイン: IL-12 や IFN- $\gamma$  を誘導したことは、TDMが防御抗原の側面も有し、ワクチンなど免疫介入療法の候補になる可能性を示している。結核菌由来糖脂質の医学応用には、その構造-活性連関を解明し、機能的に抗菌防御と病変形成誘導活性を分離することが必要である。

## 2. 結核感染防御免疫におけるサイトカインの役割

菅原 勇 (結核研)

結核菌感染肺組織から単核細胞を得、経時的に出現してくる細胞をフローサイトメータで同定すると、CD4、CD8陽性細胞、NK細胞、顆粒球、肺胞マクロファージが様々な割合で現れる。結核菌で刺激されたこれらの細胞はサイトカインを分泌し、慢性特異性炎症である結核の病像を複雑にしている。結核の初期病変にサイトカインがどのように関与しているかを明らかにするために、マウス結核モデルを用いた実験を行い、以下の知見が得られた。

(1) 結核の発病には IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  が重要である。IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  をそれぞれ欠損したマウスに毒性の強い結核菌(黒野株)で吸入感染を施行したところ、結核菌誘導肉芽腫が誘導されずに多発性壊死病変が誘導された。灰白色の小結節でヒトの粟粒結核に対応すると考えられる。これらの病変から RNA を抽出し IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  以外の主要なサイトカイン mRNA 発現を調べても、発現レベルに野生マウスと有意差はなかったため IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  単独欠損で非常に重篤な結核病変を引き起こすことが明らかになった。IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  が肺胞マクロファージを刺激し、一酸化窒素(NO)を産生させて結核菌を殺すと考えられる。事実、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  欠損マウス由来肺胞マクロファージを単離して結核菌を加えても NO がほとんど産生されないことが証明できた。このように、結核菌感染における TNF- $\alpha$  の重要性について TNF- $\alpha$  欠損マウスを用いて初めて明らかにされた。

(2) IL-1、IL-18 も結核菌感染防御に一定の防御的役割を演じている。IL-1、IL-18 は活性化マクロファージより産生されるサイトカインである。これらの欠損マウスに結核菌感染を誘導させても壊死病変は誘導されず、より大きな肉芽腫が認められた。培養上清中の TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  レベルも正常範囲内で、病変組織でも TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  mRNA 発現が野生マウスと比べて正常に保たれていた。従って、IL-1、IL-18 欠損マウスで重篤な結核が誘導できないのは、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  レベルが正常だか

らと考えられる。IL-18 欠損マウスでは IL-12 が正常に産生されており、このことも IL-18 欠損マウスで結核が重篤化しない原因と考えられた。

(3) IFN- $\gamma$  欠損マウスに少量の BCG を吸入感染させると初期空洞結核が誘導でき、ヒト結核に類似する。通常のマウスを用いて結核を誘導すると肉芽腫はできるが中心性壊死を欠いている。空洞性結核も誘導できないという弱点があった。このマウス結核研究における難点を克服すべく、IFN- $\gamma$  欠損マウスに 10,000 cfu の少量 BCG を感染させて経過観察したところ、中心性壊死を伴う肉芽腫が作製できた。膠原線維に囲まれた初期結核空洞をも認めた。繁殖性炎の段階にある肉芽腫に、ヒト結核で認められる Langhans 型多核巨細胞も認められた。多核巨細胞が形成される機序は不明である。IFN- $\gamma$  欠損マウスに結核菌を感染させたときに認められたが、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-18 欠損マウスに結核菌を感染させたとき、多核細胞は認められなかった。多核巨細胞形成には IFN- $\gamma$  の低下が関係することは確かである。このように、IFN- $\gamma$  欠損マウスを用いればヒト結核と類似した病変を誘導することができた。

## 3. 結核感染と TH1 応答: 基礎実験成績から臨床への展開

川上和義 (琉球大・医)

ツベルクリン反応を代表とする結核免疫の主体が細胞性免疫であることは周知の事実である。また、Mossmann らによる Th1-Th2 パラダイムの発見以来、細胞性免疫の分子基盤が Th1 サイトカインであることもコンセンサスの得られているところであろう。マウスと異なりヒトの結核防御における IFN の役割が混沌としていた時期も以前にはあったが、近年になって、IFN- $\gamma$  受容体遺伝子に変異を起こし IFN- $\gamma$  がうまく作用しない症例が見出され、このような患者では抗酸菌感染に対する感受性が極めて先進していることが明らかにされた。このことから IFN- $\gamma$  は、マウスのみならずヒトにおいても抗酸菌感染防御の中心的な役割を担うサイトカインであることが認識された。同様な現象は、IL-12 受容体異常症の症例でも報告されている。

最近 10 年間に 3 つの IFN- $\gamma$  誘導性サイトカイン、IL-12、IL-18、そして IL-23 が発見された。IL-12 は Th1 細胞の分化誘導において必須なサイトカインである。IL-18 はそれ自体 Th1 細胞分化を誘導しないが、IL-2 の作用を増強することで働くと考えられている。しかし、IL-18 が Th2 サイトカインの産生にも関与するとの報告もみられるようになり、その作用はもう少し複雑なようである。IL-23 は IL-12 と p40 サブユニットを共有してお

り、両者間で生物活性の類似性が予測されているが詳細は今後の解析を待ちたい。また、骨や腎臓の分野で研究されてきたオステオポンチン (OPN) が IL-12 の産生誘導能を有するとの報告がなされ注目されている。OPN 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いた検討では BCG やリステリア感染の悪化が観察されている。

われわれは遺伝子欠損マウスを用いて結核感染防御における各種 Th1 関連サイトカインの役割を解析している。IFN- $\gamma$  誘導サイトカインの中で、IL-12p40, IL-18 遺伝子を単独 (12p40KO, 18KO) または同時に欠損 (DKO) したマウスを用いて結核感染に対する感受性を比較したところ、野生型 (WT) < 18KO << 12p40KO < DKO の順であった。このことから、IL-12 が最も重要であり、IL-18 の役割は IL-12 に比べると限定して考えざるを得ない。しかし、IFN- $\gamma$  産生および Th1 細胞分化が WT マウスに比べ 18KO で明らかに低下していること、IL-18 トランスジェニックマウスでは感染防御能が亢進していることから IL-18 を無視して考えることはできない。ここで、12p40KO マウスは IL-12 のみならず IL-23 も産生しないため、IL-23 がどの程度関与してくるのかは今後の検討課題となる。BCG およびリステリアで報告のあった OPN-KO マウスでは、われわれは今のところ結核感染の悪化を観察できていない。

結核症例では IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-18 の産生が亢進していることが知られている。われわれの検討では、治療反応群と難治化群との比較で、後者において IFN- $\gamma$  産生が低下していた。また、血漿 OPN 濃度あるいは IFN- $\gamma$  によって産生誘導される ELR-CXC ケモカイン IP-10 の濃度は健常群に比べ肺結核患者において有意に上昇しており、その値は病変の拡がりによく相関していた。さらに、IP-10 は化学療法によって有意に低下を示した。これらの結果は、ヒトにおいても Th1 関連サイトカインが結核の病態に深く関わっていることを強く示唆するものである。

基礎研究から得られた成果が臨床の場に盛んに取り入れられようとしている。IFN- $\gamma$  を用いたアジュバント療法が非結核性抗酸菌症や難治性結核症例で試みられ始めており有効とする報告もみられる。昨年には、IL-12 がヒトの結核治療に有効であったとする報告がなされた。今後、Th1 関連サイトカインが結核治療に応用される機会も増えてくるものと予想される。そのためにも安全な投与方法がより一層模索されなければならない。

#### 4. 結核菌 DNA による免疫賦活の機序と応用

山本三郎 (国立感染症研)

カルメットとゲランがウシ型強毒結核菌から 13 年間

に及ぶ長期培養を行って弱毒化した BCG ワクチンは、結核に対する唯一のワクチンとして 80 年近くにわたり使用されている。この BCG 生菌を癌の免疫療法に用いる試みが 60 年代後半から世界的に行われたが、その結果、膀胱癌の治療剤として実用化された。一方、BCG 菌体から抗腫瘍活性を持つ水溶性画分を得ようとの研究の中から、核酸画分 (MY-1) が見出され、さらに核酸のうち CpG モチーフを持つオリゴ DNA が活性の中心であることが解明されてきた。一方、動物や植物 DNA は免疫活性がなく、また CpG モチーフもメチル化の頻度が高いことから、細菌 DNA あるいは非メチル化 CpG-DNA が免疫増強活性を持つ DNA として広く認知されることとなった。たとえば 5'-AACGTT-3' のような免疫増強性配列を遺伝子上流に組み込んだプラスミドを投与すると、有効配列が分子内アジュバントとして Th1 免疫応答の増強と Th2 応答の抑制をもたらすことから、喘息や花粉症などでは IgE の減少、IFN- $\gamma$  の誘導、IgG2a 産生の増加が報告されている。また免疫増強性配列を含んだミコバクテリア抗原プラスミドでモルモットを免疫すると有毒結核菌噴霧感染に対し臓器内菌数の減少、モルモット IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  産生誘導等の感染抵抗性の増強がみられた。免疫増強性 CpG-DNA がどのように細胞へ結合し、取り込まれ、エンドソームへ移行し、サイトカイン産生誘導をもたらすか、詳細なメカニズムはいまだに明らかではないが、オリゴ DNA をリポフェクションによって細胞に取り込ませると、IFN $\alpha/\beta$  の産生を著しく増加させること、細胞上の Mac-1 分子やスカベンジャーレセプターへの結合は非活性なオリゴヌクレオチドを共存させると阻害されることより、細胞への結合と取り込みに塩基特異性はないことが示唆される。また取り込まれた免疫増強性 DNA は NF- $\kappa$ B の活性化を起こしてサイトカイン mRNA の転写が開始されるが、クロロキンなどのエンドソーム阻害剤は、免疫増強性 DNA による NF- $\kappa$ B 活性化を完全に抑制することが見出されている。一方、いくつかの微生物関連分子パターン (PAMPs) が Toll Like Receptor (TLR) によって認識されることが明らかとなり、CpG-DNA は TLR9 のリガンドである可能性が示されている。このように免疫増強性 DNA の作用機構解明に向け精力的な研究が進められていることから、今後、臨床医学へのさらに多くの応用が期待されている。

#### 5. 新しい抗結核ワクチン開発の現状

岡田全司 (近畿中央病院)

1998 年、米国 CDC は結核に対する政府・学術機関・企業が一体となって新世代のワクチン開発の必要性を強

く主張する発表をした。また、ACETは国民の健康に対する大敵である結核撲滅のためには、有効なワクチンが必要であることを示した。しかしながら、BCGに代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。われわれはBCGよりも強力な新しいサブユニットワクチン、DNAワクチンやリコンビナントBCGワクチンの開発に成功した。新しい抗結核ワクチン開発の現状は、以下のようにまとめることができる。

#### (1) 結核ワクチンの種類

サブユニットワクチン、DNAワクチン、リコンビナントBCGワクチン(弱毒化結核菌を含む)に大別される。DNAワクチンのベクターとして、gene gun, plasmid, adenovirus vector, HVJ-liposome, 改良型HVJエンベロープベクターも計画中。ワクチンとして $\alpha$ 抗原 [Antigen 85 B], ESAT-6, 種々のサイトカイン ( $\gamma$ -IFN—多剤耐性結核患者に症例報告あり), HSP65, 38kd, 19kd lipoprotein, Mtb-8.8,-9.9,-32,-39,MDP1等, サブユニット-, DNA-, rBCG-ワクチンの形で多くの報告が主にマウスの結核感染の系でなされている。マウスではBCGワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチンはきわめて少ない。われわれはHSP65DNA+IL-12DNA治療にてBCGワクチンの100倍強力なワクチンの開発に成功した。

#### (2) サブユニットワクチン

Corixa研究所Dr. Reedらは72f fusion蛋白 (Mtb39とMtb32のfusion蛋白)のサブユニットワクチンがカニケイザルのレベルでBCGよりもはるかに強力な予防ワクチン効果を示すことを明らかにした。ヒトの*in vitro*系でも72fを用いて免疫応答が増強し、ヒトへの臨床応用が最も近い結核ワクチンの開発に成功した。種々の結核蛋白geneのクローニングに成功し、サブユニットワクチンで*in vitro*刺激することにより多剤耐性結核患者の

T細胞免疫能の増強がみられている。

#### (3) DNAワクチン

HVJ-liposomeをベクターに用いた場合Hsp65DNA単独でBCGよりも有効であることをマウスの系で明らかにした。IL-12 DNA+Hsp65 DNAのワクチンは相乗効果を示し、gene gun投与によりBCGよりも強力な結核予防ワクチンであることを明らかにした。アデノウイルスベクターに導入したIL-6関連遺伝子 (IL-6 gene+IL-6レセプター gene+gp130 gene) および $\gamma$ -IFN DNAもBCGよりも強力な治療・予防ワクチン効果を示した。これらの効果はキラーT細胞の分化誘導を増強することによって発揮されることが示された。

#### (4) リコンビナントBCGワクチン

BA51 (Ag85A+Ag85B+MPB51) リコンビナントBCGはBCGよりも強力なワクチンであることを気道感染の系で明らかにした。また、IL-2 rBCG, IL-6 rBCG,  $\gamma$ -IFN rBCG, HSP65 rBCGの作製に成功した。

#### (5) 新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PBL/hu (ヒト結核ワクチン解析モデル) の作製

世界に先駆けて開発したSCID-PBL/huマウスの系で、ESAT-6ペプチドによる免疫でESAT-6特異的なヒトキラーT誘導を示す、生体内ヒト免疫解析モデルを開発することができた。

(6) 最も有力なものとして、Mtb72f fusion蛋白サブユニットワクチン、われわれのHVJ-liposome/HSP65DNA+IL-12DNA (カニケイザルで解析計画), 85B-ESAT-6 fusion蛋白が上げられる。臨床応用ワクチン候補の筆頭としてMtb72fサブユニットワクチンがあげられ、1年以内に臨床応用 phase I studyが計画されている。さらに、われわれはMtb72f DNAをBCGまたはHVJ-liposomeに組み込み、きわめて強力なワクチン開発を目指している。

## UP-TO-DATE UNDERSTANDING OF TUBERCULOSIS IMMUNITY

Chairpersons: <sup>1</sup>Masao MITSUYAMA and <sup>2</sup>Kiyoko AKAGAWA

**Abstract** This symposium was organized to provide the up-to-date knowledge on tuberculosis immunity, especially on the understanding of cytokines or Th1 cells involved in pathophysiology/protective immunity and vaccine development.

Dr. Kazuo Kobayashi (Osaka City Univ.) reported their findings on the immune response to bioactive lipid component from *M. tuberculosis*, trehalose-dimycolate (TDM) and sulfolipid (SL) in mice. Their unique and novel finding was that TDM is capable of inducing T-dependent immune response in euthymic mice. The specific immune response in TDM-immune mice was consisting of CD4+ cell response and expression of chemokines, inflammatory cytokines and then TH1-related cytokines. In contrast, SL did not show such an activity. TDM may be one of the protective antigens and may modulate the specific immune response of the host.

Dr. Isamu Sugawara's group (JATA) has examined the involvement of various cytokines in the host response to aerosolic infection with virulent strain of *M. tuberculosis* by using cytokine-knockout mice. The single deletion of IFN- $\gamma$  or TNF  $\alpha$  resulted in a severe lesion of multiple necrosis without granuloma, and cytokine mRNA level other than knocked out cytokine was normal, suggesting that IFN- $\gamma$  and TNF  $\alpha$  are principally important cytokines. In knockout mice for IL-12 or IL-18, necrotic lesion was not induced after infection and the pathological change was not so significant as in IFN- $\gamma$  / TNF  $\alpha$  knockout mice. By using IFN- $\gamma$  knockout mice, it became possible to generate a granulomatous lesion with central necrosis and cavity resembling the lesion in humans. These mouse model appeared to be useful in the analysis of pathophysiology of human tuberculosis.

Dr. Kazuyoshi Kawakami (Ryukyu Univ.) reported the importance of TH1 cytokines in anti-tuberculous immunity. By using IL-12, IL-18 knockout mice or double knockout mice, it was shown that IL-12 exhibits more important role than IL-18 in the protection. A possible contribution of IL-23 was also suggested. In most of the clinical cases of tuberculosis, the production of IL-12, IL-18 and IFN- $\gamma$  is increased, however, the group of relatively lower cytokine production did not respond well to the treatment. In addition, the plasma level of one of the chemokines, IP-10, was shown to be an indicator for the severity of the disease. Thus, some cytokines

appear to be employable for the novel treatment in the near future.

Dr. Saburo Yamamoto (NIH) summarized the recent advance in the understanding of biological function of CpG motifs. Immunostimulatory DNA is effective in the modulation of TH1/TH2 polarity and the enhancement of protective immunity to *M. tuberculosis* in animals. CpG motif (immunostimulatory DNA) appears to exert its activity by signaling cascade via TLR9 resulting in NF- $\kappa$ B activation and cytokine gene expression. Analysis of basic mechanism of action by CpG motif should pave the way to the clinical application in the future.

Dr. Masaji Okada (Kinki Chuo Hospital) reported the current situation in the development of novel vaccines against tuberculosis. They have extensively constructed and examined the efficacy of various types of vaccines including subunit, DNA and recombinant BCG vaccines. Various vector systems have been tested for DNA vaccine. As immunizing antigens, a-Ag, ESAT-6, HSP65, 38kD-lipoprotein and so on have been employed. A large body of experimental data are accumulating for final evaluation, and among them, it is noteworthy to mention that HSP65DNA+IL-12DNA was 100 times more effective than conventional BCG in animal model. Among subunit vaccines, Mtb72f vaccine appears to be one of the promising candidates. In addition to the trial with various candidates, they have established a new mouse model, SCID/human PBL. This model animal has been employed for the development of vaccine effective for the induction of ESAT-6-specific human T cells.

**Key words:** Anti-tuberculous immunity, TH1, Cytokine, Vaccine

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Kyoto University Graduate School of Medicine, <sup>2</sup>Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases

Correspondence to: Masao Mitsuyama, Department of Microbiology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Yoshida-Konocho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8501 Japan. (E-mail: mituyama@mb.med.kyoto-u.ac.jp)