

## 結核菌に対する T 細胞誘導ワクチンの試み

永田 年<sup>1</sup>・小出 幸夫<sup>2</sup>

浜松医科大学医学部 <sup>1</sup>健康科学講座・<sup>2</sup>感染症学講座  
〒431-3192 浜松市東区半田山 1-20-1

[受理: 2010 年 1 月]

結核菌は通性細胞内寄生細菌であり、その感染防御には細胞性免疫の誘導が必須である。主なエフェクターは CD4<sup>+</sup> 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) と CD8<sup>+</sup> 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) である。結核菌抗原のうち、適切な感染防御抗原に特異的な T 細胞を効率よく誘導することが、新規の結核ワクチンに求められている。

種々の免疫方法が、結核菌に対する細胞性免疫誘導のために検討されてきた。DNA ワクチンは安全にかつ効率よく細胞性免疫、特に CD8<sup>+</sup> CTL を誘導できる。我々は、遺伝子銃法による DNA ワクチンの手法を用いて、結核菌抗原である MPT51 等に対する特異的 T 細胞エピトープを明らかにしてきた。弱毒リステリアをキャリアとした Ag85 複合体 DNA ワクチンが結核菌感染防御免疫の誘導に有効であった。また組換えレトロウイルス導入樹状細胞ワクチンが CD8<sup>+</sup> および CD4<sup>+</sup> T 細胞の誘導に有効であった。さらに組換えレンチウイルスを用いた経気道免疫が、肺局所における CD8<sup>+</sup> CTL の誘導に有効であることを示した。本稿ではこれらの我々の研究の知見を軸に、結核免疫研究の動向を概説したい。

### 1. はじめに

結核は、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) による感染症である。1882 年に Robert Koch が結核菌を発見してからすでに 130 年近くになるが、世界的にみると依然として最も重要な感染症のひとつである。世界では全人口の 3 分の 1 にあたる約 20 億人が感染しており、2006 年の統計では約 920 万人の結核患者が発生し、約 170 万人が結核で死亡し、有病者は 2,200 万人である (118)。罹患者の多くは、HIV との共感染が深刻な社会問題となっているサハラ砂漠以南のアフリカや多剤耐性結核菌が拡がっている東欧、旧ソ連の地域で発生している。これらの地域では、結核対策が緊急の課題である。

現在使われているワクチンは約 90 年前 (1921 年) に導入されたウシ結核菌 (*Mycobacterium bovis*) の弱毒株である BCG (bacille Calmette-Guérin) のみである。BCG の結核防御効果は、小児の結核性髄膜炎や粟粒結核には効果があるものの (87)、調査および使用した BCG 株の違いにより 0 ~

85% と異なり一定の評価は得られていない (23)。そこで BCG に代わる新世代のワクチン開発が求められている。

結核菌に暴露したヒトの 20 ~ 50% が感染し、感染者のうち約 5% が 2 ~ 5 年のうちに結核を発症するが、残りの 95% のツベルクリン反応陽性感染者は結核菌の潜伏感染に移行すると考えられている。そのうち約 5% に後に内在する結核菌が再燃し結核を発症すると考えられている (94)。すなわち結核菌感染者の多くでは、結核菌を排除しないものの再燃しないのには十分な感染防御免疫が働いているともいえる。新世代のワクチンは、このような感染防御免疫をより有効に機能させる必要がある。

### 2. 結核菌の感染防御免疫

#### 1) 結核菌に有効なエフェクター

結核菌は、主に肺胞マクロファージの食胞内で生き延びる細胞内寄生細菌である。このような細胞内寄生細菌に対する感染防御には、細胞性免疫が必須であることが知られている (46)。細胞性免疫のエフェクター細胞である T 細胞のうち、インターフェロン (IFN)- $\gamma$  の産生等のいわゆる 1 型免疫応答を示す CD4<sup>+</sup> 1 型ヘルパー T 細胞 (CD4<sup>+</sup> Th1) と CD8<sup>+</sup> 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が、結核菌の主要な感染防御エフェクター細胞である (46)。原則的には、食胞内寄生細菌に対しては、主要組織適合性複合体 (major histocom-

Toshi NAGATA<sup>1</sup> and Yukio KOIDE<sup>2</sup>  
T-cell-oriented vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*  
<sup>1</sup>Department of Health Science, <sup>2</sup>Department of Infectious Diseases,  
Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handa-yama,  
Higashi-ku, Hamamatsu 431-3192

patibility complex; MHC) クラス II 経路の抗原提示が行われ CD4<sup>+</sup> T 細胞が誘導されるはずであり、CD8<sup>+</sup> T 細胞の誘導の機構は不明であった。しかし結核菌などの食胞内寄生細菌は、マクロファージに取り込まれた後、食胞内でクロス・プレゼンテーションによって MHC クラス I 分子を介した抗原提示が行われることが示されている (37)。Kaufmann らのグループは、結核菌感染細胞ではアポトーシスが誘導され、それによって感染細胞から遊離したアポトーシス小胞 (apoptotic vesicles) を介したクロス・プレゼンテーションが起り、効率よく CD8<sup>+</sup> T 細胞が誘導されるのではないかと推測している (117)。なお CD8<sup>+</sup> T 細胞は、特に潜伏期の結核の制御に重要であるとの報告もある (108)。また CD4<sup>+</sup> T 細胞のサブタイプである Th17 細胞は、感染防御に重要な Th1 細胞を肺局所に誘導することにより感染防御に役立っていると考えられている (47)。いずれにしても、これらの T 細胞が認識する結核菌抗原の同定が、結核菌に対する有効な感染防御免疫の誘導にとって第 1 のステップである。

これらのエフェクター細胞が産生するサイトカインが、重要な役割を果たしていることが知られている。特にこれらの細胞が結核菌抗原に反応して産生する IFN- $\gamma$  は感染防御に重要であることが、IFN- $\gamma$  あるいは IFN- $\gamma$  受容体の欠損マウスやヒトの遺伝疾患の解析から明らかになっている (25)。そのため、結核菌特異的 T 細胞から産生される IFN- $\gamma$  量や IFN- $\gamma$  分泌 T 細胞数は、疑問も指摘されてはいるものの (1)、結核菌に対する感染防御の指標として考えられている。

なお、細胞内寄生細菌に対する感染防御において、抗体は効果がないというのが一般的な考え方であるが、結核菌表面のヘパリン結合性赤血球凝集素付着因子 (heparin-binding haemagglutinin; HBHA) (81) やアラビノマンナン (103) に対する特異抗体の投与が、結核菌の経気道感染に対して感染防御に働くことも報告されている。このような細菌表面抗原に対する抗体は、結核菌が宿主細胞に侵入するのを阻害する効果があるのかもしれない。

## 2) 結核菌の感染防御抗原

結核菌は、抗酸菌に特有な脂質に富む細胞壁を有するため、それら脂質が、抗原提示細胞上の CD1 分子に結合し特異的免疫を誘導することが知られているが、主要な感染防御抗原はやはりタンパクだと考えられている。1998 年に Cole らの結核菌 H37Rv 株のゲノム塩基配列の報告 (9) により、すべての結核菌遺伝子による DNA ワクチンは原則的に作製可能となったが、どのタンパク抗原を選択するかが重要な問題である。結核菌の死菌免疫ではなく生菌による免疫が、感染防御に有効であることから (77)、主に分泌タンパクが感染防御抗原となると考えられている。実際、結核の感染防御に有効な細胞性免疫は細胞質内のタンパクよりも分泌タンパクまたは細胞表面タンパクによって誘導されることがマウス、モルモットなどによる研究から判明している (2, 35)。記憶 T 細胞の、結核菌の電気泳動によるタンパク分画への応答性を解析することにより、主に約 20-

kDa 以下の低分子量の分泌タンパク (culture fluid proteins; CFPs) および分子量 30 kDa 付近の Antigen (Ag) 85 複合体に属するタンパク、そして分泌タンパクではないが熱ショックタンパク (heat shock proteins; Hsp) が、免疫反応性が高いことがわかってきた。次に挙げる代表的な感染防御抗原が知られている。

**Ag85 複合体タンパク**: Ag85 複合体タンパクは、30 ~ 32-kDa の主要な分泌タンパクであり、結核菌の細胞壁の脂質成分を合成するミコリルトランスフェラーゼ活性、またフィブロネクチン結合活性を有する一群のタンパクである (6, 115)。Ag85A (p32A, 32-kDa)、Ag85B (p30, MPT59,  $\alpha$  抗原; 30-kDa)、Ag85C からなる。これらのタンパクは、*Mycobacterium* 属でよく保存されており、またこれらのタンパクに相同性のあるタンパクとして MPT51 がある (66, 73)。

**低分子量分泌タンパク**: 20-kDa 以下の低分子量分泌タンパク抗原の中で特に研究されているのが ESAT6 (early secreted antigenic target 6-kDa protein) と CFP10 (culture filtrate protein 10) である。ESAT6 と CFP10 の遺伝子は、すべての BCG で欠損しているゲノム RD1 (region of deletion-1) 領域にマップされている。従って、これらの抗原をツベルクリン液 (purified protein derivative; PPD) の代わりに診断に用いることにより、結核菌感染による免疫応答と BCG による免疫応答とを識別できるため、近年、特異度・感受度の高い結核診断薬として用いられている (QuantiFERON-TB ; Cellstis 社)。

**熱ショックタンパク**: 種々の分子量を持つ熱ショックタンパクは、マウスやヒトの抗体や T 細胞の認識抗原であることが判明している。このうちワクチン候補としてよく研究されている Hsp65 (heat shock protein 65-kDa) は肺マクロファージ内の結核菌が多量に産生するストレスタンパクであり (52)、大腸菌 GroEL、ヒト Hsp60 とアミノ酸レベルで 50% 以上の相同性が報告されている。これ以外に Hsp70 と呼ばれているタンパクもあるが、これは大腸菌 DnaK、ヒト Hsp70 とアミノ酸レベルで 50% 以上の相同性が報告されている。これらの熱ショックタンパク特異的 T 細胞が結核菌感染したヒトやマウスで強力に誘導され、それが感染防御に有効であることが報告されている (52)。

**休眠期タンパク**: 上記の分泌タンパクは、主に感染の急性期 (acute stage) に結核菌が分泌するタンパクであるが、それ以外に感染の比較的后期あるいは休眠期 (dormant stage) に発現し、かつ T 細胞によって認識される抗原タンパクがわかってきた。休眠期に発現するタンパクとしては、DosR レギュロン内のタンパク (44)、あるいは DNA 結合タンパクである MDP1 (mycobacterial DNA-binding protein-1) (55) 等がある。

## 3) 結核菌の感染防御抗原 T 細胞エピトープ

結核菌抗原の T 細胞エピトープは、結核菌抗原の中で、実際に抗原提示細胞上の MHC 分子に結合し、特異的 T 細胞が認識するペプチド部分のことである。MHC 分子に結合できるペプチドの中で、T 細胞上の T 細胞受容体 (T-cell

receptor; TCR) 分子が認識して T 細胞を誘導できる抗原ペプチドのことをいう。T 細胞エピトープであるためには、MHC 分子に結合できることは必要条件であるが十分条件ではなく、通常、抗原タンパクの中で TCR が認識しうる T 細胞エピトープペプチド部分は数箇所限定される (エピトープ・セクション)。

遺伝子銃法による DNA ワクチンは、結核菌抗原の T 細胞エピトープの同定にたいへん有効である。Huygen らのグループは、この方法により Ag85 複合体抗原 (Ag85A, Ag85B, Ag85C) のマウス T 細胞エピトープを同定している (11, 18)。それによると、遺伝子銃法による DNA ワクチンにより結核菌感染に比べ、より多くの CD4<sup>+</sup> および CD8<sup>+</sup> T 細胞エピトープが同定された。すなわちより多くの抗原特異的 T 細胞集団が誘導できたと報告している。我々も遺伝子銃法による DNA ワクチンは、再現性よく安定に免疫応答が起こることを確認している (123)。DNA ワクチンにより、宿主細胞、特に抗原提示細胞内で目的遺伝子からのタンパク合成が起こるため、MHC クラス I 分子を介した抗原提示機構が働くことが推測され、特に CD8<sup>+</sup> T 細胞エピトープは非常に効率よく検出できると考えられる (49)。

我々の T 細胞エピトープ同定の方法は、結核菌抗原遺伝子を組み込んだ DNA ワクチンを純系マウスあるいは、ヒト HLA のトランスジェニックマウスに免疫した後、脾臓を取り出し、脾細胞の結核菌抗原全体を網羅する約 20 アミノ酸からなるペプチドとの反応性を指標にして T 細胞エピトープを含むペプチド領域を限定する。その後、BIMAS (BioInformatics and Molecular Analysis Section) や SYFPEITHI 等の MHC 結合タンパクの予測アルゴリズム (80, 85) を併用し、CD8<sup>+</sup> T 細胞エピトープなら 8~10 アミノ酸からなるペプチドに絞り込む方法である (図 1)。

主要な結核菌抗原の T 細胞エピトープの一部を表 1 にまとめた。感染防御抗原の T 細胞エピトープを同定することには次のような意義があると考えている。まず第 1 に、感

染防御抗原に対する T 細胞応答を正確に解析できる。T 細胞エピトープがわかれば、MHC テトラマー法 (主に CD8<sup>+</sup> T 細胞の場合) や細胞内サイトカイン染色法を用いれば簡単に特定のエピトープ特異的 T 細胞の数を計測することが可能である。たとえば Ag85A 分子は C57BL/6 マウス (H2<sup>b</sup>) では CD8<sup>+</sup> T 細胞エピトープが存在しないため、CD4<sup>+</sup> T 細胞ノックアウト (KO) マウスでは Ag85A DNA ワクチンが結核菌感染に無効であるが CD8<sup>+</sup> T 細胞 KO マウスでは有効であるとの報告がある (16)。我々も MPT51 T 細胞エピトープの解析により、MPT51 に対して BALB/c マウスでは CD8<sup>+</sup> T 細胞、C57BL/6 マウスでは CD4<sup>+</sup> T 細胞のみが応答することを示した (97)。T 細胞エピトープによっては、感染防御に非常に有効なものともそうでないもの、あるいは逆に悪影響を及ぼすもの等、ヒエラルキーが存在する (69, 113, 120)。そこで T 細胞エピトープが明らかになれば、感染防御に有効な T 細胞エピトープに特異的 T 細胞のみを誘導することが可能となる。たとえば Ag85B<sub>240-254</sub> (Ag85B の 240~254 番目のアミノ酸部分; peptide-25) は強力な IFN- $\gamma$  を誘導し、感染防御に有効であることが報告されている (45)。さらに、T 細胞エピトープワクチンを用いれば、細胞内寄生菌に対する感染防御に悪影響を及ぼす可能性のある抗体の誘導を避けることができる。

これまで我々は先に述べた結核菌感染防御抗原のうち、MPT51 のマウスおよびヒト T 細胞エピトープ (3, 4, 97, 110)、MDP1 のマウス T 細胞エピトープ (96)、および低分子量分泌タンパク (論文投稿中) のマウス T 細胞エピトープを同定してきた。そのうち、MPT51<sub>24-32</sub> は H2-D<sup>d</sup> 拘束性の優勢 (ドミナント) マウス CD8<sup>+</sup> T 細胞エピトープであり、種々のワクチンの解析に利用している (33, 107)。

ここに挙げた T 細胞エピトープのうち、特に CFP10<sub>32-39</sub> ペプチド特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞は、C3H 系マウスの結核菌噴霧感染 3 週後、肺内 CD8<sup>+</sup> T 細胞の 30% を占めるほど増幅し (43)、かつこのエピトープ特異的 T 細胞は感染防御能があることが示されている (119)。興味あることに、ESAT6

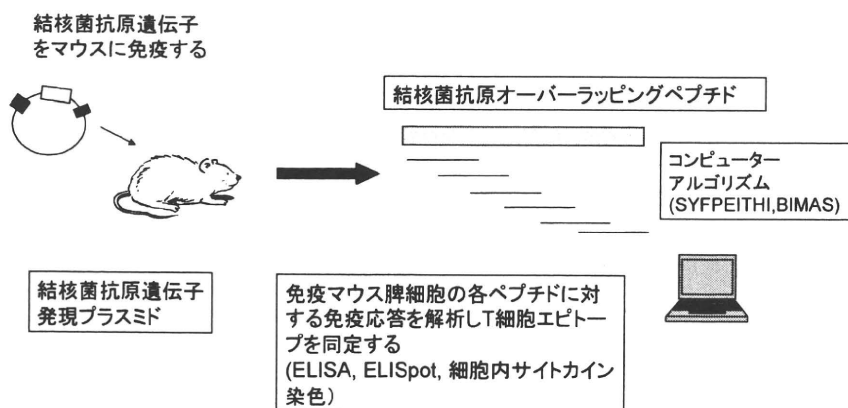


図 1. DNA ワクチンを用いた結核菌抗原 T 細胞エピトープの同定

遺伝子銃を用いた DNA ワクチンは、再現性よく特異的 T 細胞を誘導するため、抗原の T 細胞エピトープの同定に最適である。抗原全体をカバーするペプチドライブラリーと MHC 結合ペプチド推測アルゴリズム等を用いることにより効率よく T 細胞エピトープを同定できる (4, 96, 97, 110)。

表 1. 結核菌抗原の T 細胞エピートープ (一部)

| 抗原    | ペプチド              | MHC 拘束性                         | 反応性 T 細胞 | 参考文献    |
|-------|-------------------|---------------------------------|----------|---------|
| Ag85A | p60-68 (9-mer)    | K <sup>d</sup>                  | マウス CD8  | 11      |
|       | p144-152 (9-mer)  | K <sup>d</sup>                  | マウス CD8  | 11      |
|       | p101-120 (20-mer) | E <sup>d</sup>                  | マウス CD4  | 39      |
|       | p241-260 (20-mer) | A <sup>b</sup>                  | マウス CD4  | 39      |
|       | p261-280 (20-mer) | A <sup>b</sup>                  | マウス CD4  | 18      |
| Ag85B | p240-254 (15-mer) | A <sup>b</sup>                  | マウス CD4  | 45, 122 |
|       | p262-279 (18-mer) | A <sup>b</sup>                  | マウス CD4  | 18      |
|       | p143-152 (10-mer) | A*0201                          | ヒト CD8   | 27      |
|       | p199-207 (9-mer)  | A*0201                          | ヒト CD8   | 27      |
|       | p10-27 (18-mer)   | DR3, 52, 53                     | ヒト CD4   | 64      |
|       | p19-36 (18-mer)   | Promiscuous                     | ヒト CD4   | 64      |
|       | p91-108 (18-mer)  | Promiscuous                     | ヒト CD4   | 64      |
| MPT51 | p24-32 (9-mer)    | D <sup>d</sup>                  | マウス CD8  | 97      |
|       | p171-190 (20-mer) | A <sup>b</sup>                  | マウス CD4  | 97      |
|       | p51-70 (10-mer)   | A*0201                          | ヒト CD8   | 4       |
|       | p191-202 (12-mer) | Promiscuous                     | ヒト CD4   | 110     |
| Hsp65 | p489-503 (15-mer) | A <sup>d</sup>                  | マウス CD4  | 65      |
|       | p369-377 (19-mer) | A*0201                          | ヒト CD8   | 8       |
|       | p3-13 (11-mer)    | DR3                             | ヒト CD4   | 26      |
| ESAT6 | p1-20 (20-mer)    | H2 <sup>b, d</sup>              | マウス CD4  | 7       |
|       | p51-70 (20-mer)   | H2 <sup>a, k</sup>              | マウス CD4  | 7       |
|       | p72-95 (24-mer)   | DR52, DQ2                       | ヒト CD4   | 63      |
| CFP10 | p32-39 (8-mer)    | K <sup>k</sup>                  | マウス CD8  | 43      |
|       | p11-25 (15-mer)   | A <sup>k</sup>                  | マウス CD4  | 43      |
| MDP1  | p23-31 (9-mer)    | D <sup>b</sup>                  | マウス CD8  | 96      |
|       | p41-60 (20-mer)   | A <sup>d</sup> , E <sup>k</sup> | マウス CD4  | 96      |
|       | p111-130 (20-mer) | E <sup>k</sup>                  | マウス CD4  | 96      |
|       | p141-160 (20-mer) | E <sup>k</sup>                  | マウス CD4  | 96      |

の T 細胞エピートープである ESAT6<sub>1-20</sub> と ESAT6<sub>51-70</sub> ペプチドの感染防御誘導能を, C57BL/6 と CBA の F1 マウス (H2<sup>b/k</sup>) のペプチド免疫で比較したところ, 強い免疫応答性を示す ESAT6<sub>1-20</sub> ペプチド (ドミナント・エピートープ) ではなく, より弱い免疫応答性を示す ESAT6<sub>51-70</sub> ペプチド (サブドミナント・エピートープ) の免疫でのみ, 感染防御効果が認められている (75)。感染防御能の強さと免疫応答性の強さは必ずしも一致しない可能性もあり, この点に関しては今後の研究が必要である。

基本的に抗原提示分子である MHC 分子の種類によって T 細胞エピートープも異なるが, 表 1 の Ag85B および MPT51 抗原の HLA-DR 拘束性 T 細胞エピートープで認められるように多くのタイプの HLA-DR によって抗原提示される (promiscuous) T 細胞エピートープもある。多くの MHC 分子型の中で互いに似通ったペプチドを結合しうる, いわゆる MHC 分子のスーパータイプがあり, 同一のスーパータイプに属する MHC 分子では結合ペプチドも共通である可能性が高い。特に日本人の約 60% が持つ HLA-A24 に結合

する抗原ペプチドとマウス H2-K<sup>d</sup> に結合するペプチドが類似していることから, マウス H2-K<sup>d</sup> 拘束性の T 細胞エピートープは, HLA-A24 拘束性の T 細胞エピートープでもある可能性が高いことが指摘されている (74)。なおマウスで感染防御抗原として機能するタンパクは基本的にはヒトにおいても感染防御抗原であることが多い。したがってマウスの T 細胞エピートープの同定は, マウスで感染実験を行なうときに有益であるのみならずヒトの研究の基盤になると考えている。

### 3. 組換え BCG の試み

遺伝子操作を利用して BCG を改良する試みが行なわれている (95)。BCG による CD8<sup>+</sup> T 細胞応答の報告はあるものの, BCG 免疫においては, MHC クラス I 経路を介した抗原提示は, 結核菌に比べ弱いと考えられている。結核菌と対照的に, BCG の増殖は  $\beta$ 2-ミクログロブリン欠損マウスにおいて影響を受けない (24, 50)。我々も BCG 免疫により CD4<sup>+</sup> T 細胞の応答は強いが CD8<sup>+</sup> T 細胞の応答は弱い



ことを経験している。そこで Kaufmann らのグループは、BCG による CD8<sup>+</sup> CTL の誘導を増強するために、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) のリステリオリジン O (LLO) の組換え BCG を報告している (34)。LLO は、リステリアが食胞から細胞質に移行する際に働く細胞膜溶解毒素である。LLO 発現 BCG により、BCG 菌体が細胞質に移行するのを促進することはできなかったが、LLO とともに BCG に導入したオブアルブミン (OVA) に対する CTL の誘導を高めることができた。さらに彼らは、LLO に加え、*ureC* 遺伝子を欠損させた組換え BCG を作製した (rBCG  $\Delta ureC:Hly$ ) (30)。*ureC* は菌を取り込んだマクロファージの食胞の pH を高める酵素をコードしている。この酵素を欠損させることで、肺胞内の pH が低下し LLO の酵素活性を高めると考えられる。

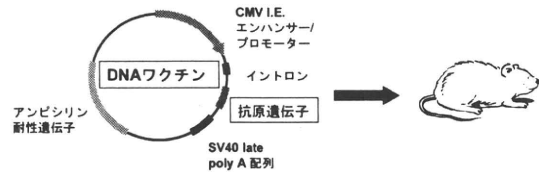
これに加え、現在臨床試験が行なわれているものに、Ag85B 遺伝子を組み込んだ BCG (rBCG30) がある (36)。Ag85B は *Mycobacterium* 属菌の主要な分泌タンパクでありもともと細菌が産生しているタンパクであるが、それを過剰産生する組換え BCG は、感染防御に、より有効であることが報告されている。

組換え BCG とは別に、弱毒結核菌の試みも多くなされている。いくつかの栄養要求株 (auxotroph) や BCG で欠損している RD1 領域の欠失体等が試みられている (32)。現在、臨床試験がなされているものに Jacobs らのグループのリジン及びパントテン酸栄養要求株がある (51)。

#### 4. DNA ワクチンの試み

DNA ワクチンは抗体の誘導のみならず細胞性免疫の誘導が行えるということで、生ワクチンに代わるより安全なワクチンとして注目されてきた。DNA ワクチンの利点は、調製の容易さ、安定性、比較的低コストであること、免疫不全者に対する安全性などがある。組換え DNA 技術を用い容易に DNA ワクチンに種々の工夫を凝らすことができ、DNA ワクチンによって希望する免疫系のみを発動することが可能となってきた (31, 68)。悪性腫瘍、感染症等に関する動物実験報告とともに最近は臨床試験の報告も増加してきている。DNA ワクチンの導入法として現在試みられている主な投与経路は、筋肉内や皮下に注射針を用いて注入する方法や金粒子にプラスミド DNA をコートした後、皮膚に遺伝子銃を用いて導入する方法のような直接導入法 (naked DNA vaccination) と、弱毒細菌やリボソームなどのキャリアを用いる方法 (carrier DNA vaccination) に分類される (図 2)。直接導入法では、一般に遺伝子銃法の方が少量の DNA 量で再現性のある結果が得られることが我々の結果も含めて報告されている (123)。しかしながら筋肉注射法が IFN- $\gamma$  の産生が指標となる 1 型免疫反応を誘導しやすいのに対し、遺伝子銃法ではインターロイキン (IL)-4, IL-5 が指標となる 2 型免疫反応が誘導しやすいことが報告されている (98)。筋肉注射法の遺伝子導入効率を高めるため、生体電気穿孔法 (in vivo electroporation) が併用される方法

### A 遺伝子銃法、筋肉注射法



### B 弱毒細菌キャリア法

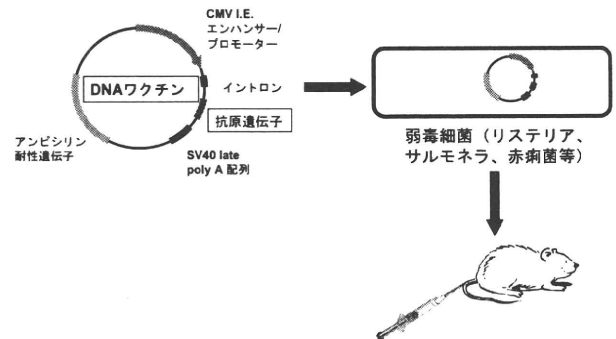


図 2. DNA ワクチン

DNA ワクチンの投与法には、遺伝子銃法、筋肉注射法等の直接導入法のほか、弱毒細菌等を DNA のキャリアとして用いる方法 (bactofection) がある。筋肉注射法は生体電気穿孔法 (in vivo electroporation) と併用するとより有効である。

も用いられている (114)。

DNA ワクチンによる抗原提示機構に関しては、DNA が直接、樹状細胞などのいわゆるプロフェッショナルな抗原提示細胞に入る、またはいったん筋肉細胞の中に入って抗原タンパクが発現し、それがクロス・プライミングの機構で樹状細胞などに取り込まれ、抗原提示されると考えられている (49)。細菌由来 DNA 内の非メチル化 GACGTT モチーフは、IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  等の共刺激サイトカインを誘導する内在性アジュバント効果があることが知られている (48, 121)。これは Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) 9 を介しておこなわれると考えられていたが、この機構よりも細胞内の未知の DNA センサー依存的な TBK1 を介した自然免疫応答が重要であることが報告されている (41)。

感染症に対する DNA ワクチンを作製する際には、抗原遺伝子発現に関するコドンの影響を考慮しなければならない。微生物と哺乳類ではアミノ酸をコードするコドンの使用頻度が異なり、微生物 DNA の塩基配列をそのまま DNA ワクチンに用いると、哺乳類の宿主細胞では翻訳効率が低いため抗原産生量が低下し、結果的に免疫誘導能も低くなる可能性がある。実際、我々はリステリアの CD8<sup>+</sup> T 細胞エピトープ LLO<sub>91-99</sub> をコードする DNA を用いて、コドンをマウスで最も高い頻度のものに適合させることによりマウス線維芽細胞での翻訳効率が高くなり、これに伴い特異的 CTL の誘導能も高くなることを観察した (67, 106)。HIV やマラリア原虫の DNA ワクチンでも、抗原の発現量を高

めるためにコドンの変換が試みられている。リステリアやマラリア原虫の遺伝子は AT-rich であり哺乳類（マウス、ヒト）の遺伝子と GC 含量が対照的であるため、マウスやヒトの DNA ワクチンを開発する際にコドン使用頻度の影響は深刻であるが、結核菌の遺伝子は GC-rich であり哺乳類の遺伝子と GC 含量がほぼ同じであり、その結果コドン使用頻度も比較的類似している (49)。このため、結核菌のような GC 含量の高い細菌に対する DNA ワクチンの作製に関しては、コドンの影響を配慮する必要がないのかもしれない。

結核 DNA ワクチンは、1996 年に Hsp65 と Ag85A 遺伝子を用いた DNA ワクチンがマウスにおいて感染防御に効果があった報告が連続して Nature Medicine 誌に掲載されたのが最初である (38, 100)。それによると Hsp65 および Ag85A は共に特異的な細胞性免疫をマウスに誘導でき、結核菌の腹腔または経気道感染に対して BCG と同等の感染抵抗性を賦与できたと報告されている。それ以来これまで、Hsp65, Hsp70, Ag85A, Ag85B, ESAT6 等種々の抗原遺伝子の DNA ワクチンが検討されている (40)。さらに休眠期に発現する DosR レギュロン遺伝子の DNA ワクチンがマウスで検討され、特異的 T 細胞の誘導が確認されている (89)。

Ag85 複合体のうち Ag85A および Ag85B DNA が細胞性免疫 (Th1, CTL) を誘導し、結核菌に対する感染抵抗性を誘導でき、Ag85C にはこれらの免疫誘導能が強くない。これはタンパクの発現量が関係しているものと考えられている。ESAT6 DNA ワクチンでもマウスに感染抵抗性を誘導できることが報告されている。ESAT-6 DNA ワクチンを BALB/c マウスに筋肉注射法で免疫した場合、IFN- $\gamma$  産生が指標となる 1 型免疫応答を誘導した (60)。Ag85B, ESAT6, MPT64 を発現する DNA ワクチンをマウスに筋肉注射しその感染防御能を比較したところ、Ag85B が最も強く、次に ESAT6, MPT64 の順であったとの報告もある (42)。さらに単一の抗原のみならず、ESAT6 や Ag85B を含む複数の抗原遺伝子を用いた DNA ワクチンを同時に免疫するもの (DNA ワクチンカクテル) (62, 86) や ESAT6-Ag85B 等の融合遺伝子 DNA ワクチン (12) も検討されており、個々の単一抗原 DNA ワクチンに比べ、これらの多価 DNA ワクチンは感染防御能の誘導に優れていることが報告されている。

Lowrie らのグループは、Hsp65 DNA ワクチンを結核の予防および治療ワクチンとして有望であることを報告している (54, 100)。抗酸菌の熱ショックタンパクは、哺乳類の熱ショックタンパクとの交差反応により自己免疫疾患の誘発が懸念されてきた。この点に関しては相反する報告がある。Hsp65 DNA ワクチンは自己免疫疾患を抑制するように働いているという報告 (83) がある一方、自己免疫疾患様の皮膚反応を認めたという報告もある (101)。Hsp65 DNA ワクチンに関しては、岡田らのグループが、HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan) リボソーム法を用いた Hsp65 DNA ワクチンを報告している。HVJ リボソーム法により、従来の遺伝子銃法に比べ感染防御能の増強を認めて

いる。さらに IL-12 DNA を併用し免疫効果を高めている (124)。

なお DNA ワクチンが結核菌感染の予防ではなく治療にも有効であるかどうかに関しては議論のあるところである。Lowrie らは、結核菌の静脈注射 8 週間後、Hsp65, Hsp70, ESAT-6, MPT70 DNA ワクチンを筋肉注射したところ、Hsp65 および MPT70 DNA ワクチンを投与した群の脾臓、肺内結核菌数が  $1 \sim 2 \text{ Log}_{10}$  程減少したことを報告した (54)。さらに、結核菌感染後 12 週間の化学療法 (イソニアジド + ピラジナミド) を経て、免疫抑制剤のデキサメタゾンを投与する結核の再燃モデル (Cornell 型モデル) で検討した結果、Hsp65 DNA ワクチンの 3 回投与 (2 週間隔) で脾臓、肺内の結核菌数はほぼ検出できなくなった (54)。しかしながら Orme らのグループは、感染予防効果のある Ag85A DNA ワクチンを結核菌の噴霧感染後、治療用ワクチンとして用いても効果がなかった (105)。さらに肺結核のモデルである結核菌の噴霧感染後においては Hsp65 DNA ワクチンはいわゆるコッホ現象を起こし重症な肺壊死を引き起こすと報告している (101)。また Cornell 型モデルでも肺の菌数を減少させることはできなかった。Morris のグループも予防ワクチンとしては高い感染防御効果の認められた 10 種の遺伝子からなる DNA ワクチンカクテルでも、結核菌の再燃を防ぐ効果を認めていない (86)。これらのことは、すでに結核菌に対する免疫が成立している場合、治療用 DNA ワクチン接種には注意を払う必要があることを示唆している。

結核 DNA ワクチンの免疫効果を増強するため、種々の工夫も試みられている。紙面の都合上詳しくは触れないが、たとえば IL-12 などのサイトカインの発現プラスミドをアジュバントとして併用する方法 (79, 124, 125)、陽電荷をもつ脂質二重膜小胞 (リボソーム) と混ぜて免疫する試み (17, 124) や筋肉注射後に生体電気穿孔法を行なう試みである (53, 104, 125)。これらにより免疫効果の増強が認められている。

## 5. 弱毒リステリアキャリア DNA ワクチンの試み

DNA ワクチンの方法として、プラスミド DNA を直接生体に導入する方法の他に、弱毒細菌を DNA ワクチン用のプラスミドのキャリアとして用いる方法がある。このような細菌を媒介した遺伝子導入の方法は Bactofection とも言われる (図 2)。これに用いられるプラスミドは、哺乳類細胞で転写が可能なエンハンサー・プロモーターにドライヴされた抗原遺伝子とともに、細菌で機能する複製ユニットを保持していなければならない。この方法でキャリアとして試みられた細菌種には、サルモネラ (*Salmonella enterica* serovar. Typhimurium), 赤痢菌 (*Shigella flexneri*), リステリア (*L. monocytogenes*) 等がある (14)。これらの細菌の栄養要求株 (auxotroph) に真核細胞の発現プラスミドを使った DNA ワクチンを導入し動物に接種するものである。サルモネラをキャリアにした場合は宿主細胞の食胞に取り込

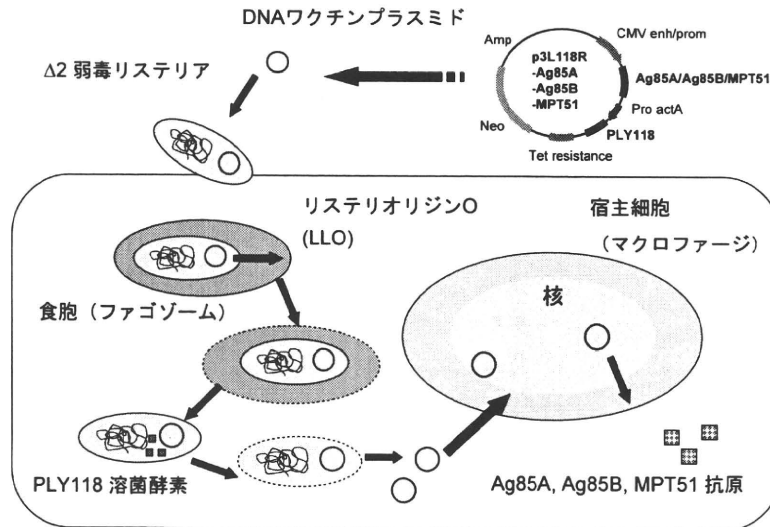


図3. 弱毒リステリアキャリア DNA ワクチン

Ag85複合体発現プラスミドを弱毒リステリアに導入したDNAワクチンを検討した。リステリアがLLOの働きで感染マクロファージ細胞質に移行したのちプラスミドが核に移行し抗原タンパクが発現すると考えられる(59)。

まれ、クロス・プライミングに関わる機構(37)を介して、細胞質・核内に移行し、DNAワクチン(プラスミド)の遺伝子発現が行われると考えられる。Mollenkopfら(61)は、*S. Typhimurium*弱毒株をキャリアとしてESAT-6を哺乳類発現プラスミドに組み込んだDNAワクチンをマウスに免疫した。その結果、結核に対する感染防御能を誘導できたと報告している。

リステリア・モノサイトゲネス(*L. monocytogenes*)は、抗原提示細胞(マクロファージ等)に直接感染すること、宿主細胞に貪食された後LLOの働きで食胞から細胞質に逃れることができることから、DNAワクチンのキャリアとして有望である。なお赤痢菌も同様に細胞質に移行する性質をもっている。Dietrichらは、弱毒リステリアを用いたDNAワクチンキャリアシステムを報告している(13)。彼らは、リステリア病原因子である*actA*, *mpl*, *plcB*等の遺伝子を含むレシチナーゼオペロンを欠失したリステリア変異体であるΔ2株を用いた。この細菌株は、マクロファージに感染した後、細胞質に移行しそこで複製可能であるが、上記遺伝子欠損のため隣接細胞に拡がるができなくなったものである。この細菌株に、DNAワクチン用プラスミドであるp3L118に抗原遺伝子を導入する。このプラスミドにはリステリアのバクテリオファージ由来のPLY118という溶菌酵素をコードする遺伝子がリステリア*actA*プロモーターの下流に挿入されておりリステリアが細胞質に移行するとこのプロモーターのスイッチがオンになるようになっている。したがってリステリアがLLOの働きで細胞質に移行するとこの酵素が働き、菌が溶解し、プラスミドDNAが宿主細胞の細胞質に放出され、抗原遺伝子の転写・翻訳が起こり、抗原タンパクが産生されるという仕組みになっている。我々は、この系を基本とした弱毒リステリアをキャリアとした結核DNAワクチンを試みた(59)(図3)。抗原と

して結核菌抗原Ag85A, Ag85B, MPT51を用いた。これら抗原のいずれかを組み込んだリステリア菌体内で複製可能なプラスミドDNAを弱毒リステリアに導入し、それをC57BL/6マウスに腹腔免疫することにより1型免疫応答、すなわち抗原特異的な強いIFN-γの産生を認めた。さらにBALB/cマウスに経静脈免疫した後、結核菌H37Rv株で感染させた後の肝臓、脾臓、肺中の結核菌数が1 Log<sub>10</sub>程度減少していることを確認した。

## 6. 樹状細胞ワクチンの試み

樹状細胞(DC)は生体の中で最も強い抗原提示細胞である。生体の種々の場所にいる樹状細胞が細菌等の病原体およびアポトーシスに陥った細胞をとらえ、その後所属リンパ節に遊走し、そこでナイーブT細胞に抗原提示をおこなう。したがって、このような樹状細胞をワクチンのツールとして使用するのには、効率よく結核菌抗原特異的T細胞誘導のため有効と考えられる。これまで樹状細胞は、悪性腫瘍や感染症に対するワクチンとして研究されてきている。樹状細胞ワクチンには、抗原ないし抗原ペプチド(T細胞エピートプ)をパルスした樹状細胞を用いる方法、および抗原遺伝子を組換えウイルス等を利用して導入した樹状細胞を用いる方法等がある。また免疫経路として経気道的や経鼻的に投与し、粘膜免疫を誘導することも試みられている。結核菌に対する実験的樹状細胞ワクチンとして、Demangelら(10)は、BCGを感染させた樹状細胞を経気道的に導入することにより肺の所属リンパ節である縦隔リンパ節細胞で結核菌特異的IFN-γの産生を検出し、また結核菌の噴霧感染に対して、BCG免疫と同程度の感染防御効果を報告している。またMcShaneらによるAg85A抗原のCD8<sup>+</sup>ないしCD4<sup>+</sup>T細胞エピートプでパルスした樹状細胞を用いた報告もある(57)。彼らは、有効な免疫誘導のためには

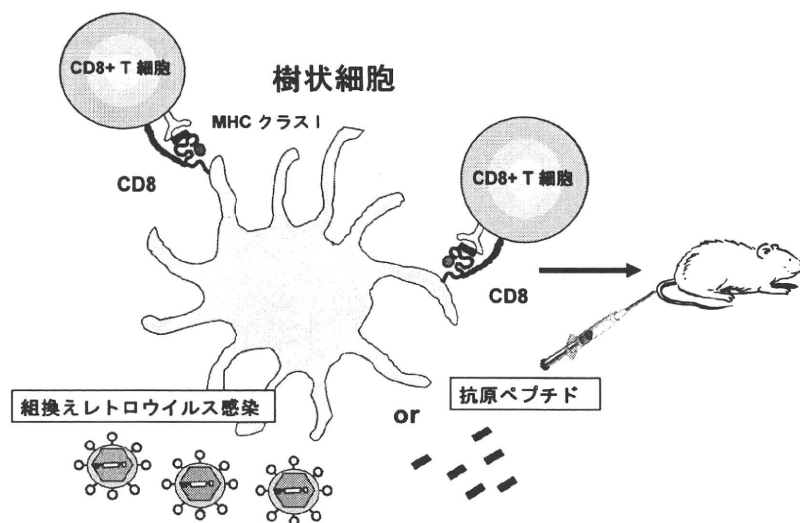


図4. 樹状細胞ワクチン

生体内の最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞を用いて特異的 T 細胞を誘導する試みがなされている。樹状細胞で抗原提示させる方法として、T 細胞エピトープペプチドを樹状細胞に *in vitro* でパルスする方法やレトロウイルス等を用いて抗原遺伝子を樹状細胞に形質導入する方法がある (70, 71, 78)。

CD8<sup>+</sup> および CD4<sup>+</sup> T 細胞エピトープが同一の樹状細胞上にパルスされる必要があることを示した。

レトロウイルスを用いた抗原遺伝子導入樹状細胞ワクチンは、抗原タンパクが比較的長期間発現するという利点が考えられる。我々は、CD8<sup>+</sup> T 細胞エピトープを組み込んだレトロウイルスを樹状細胞に導入した後、その細胞をマウスに免疫することを試みた (70) (図4)。プラスミド pMX とパッケージ細胞株 Phoenix を用いてリステリアの CD8<sup>+</sup> T 細胞エピトープ LLO<sub>91-99</sub> を発現するレトロウイルスを作製した。これを BALB/c マウスの骨髄由来樹状細胞に感染させマウスに経静脈投与した。レトロウイルスの樹状細胞への導入効率率は 35% 程度であった。この免疫法で誘導される特異的 IFN- $\gamma$  産生能、CTL 活性および感染防御能は LLO<sub>91-99</sub> DNA ワクチンによるものより強力であった。

また、我々は、Ag85A 遺伝子をレトロウイルスで形質導入した樹状細胞免疫により抗原特異的 CD8<sup>+</sup> ならびに CD4<sup>+</sup> T 細胞の誘導、結核菌感染後の肺・肝臓内での結核菌数の低下を確認した (71) (図4)。樹状細胞内で発現した Ag85A タンパクは、直接 MHC クラス I 経路を介して CD8<sup>+</sup> T 細胞に抗原提示されるのとともに、分泌された Ag85A タンパクが MHC クラス II 経路を介して抗原提示され、効率よく CD8<sup>+</sup> ならびに CD4<sup>+</sup> T 細胞の誘導が起こるものと推測される。

このような樹状細胞ワクチンは、Badvinac ら (5) が LLO<sub>91-99</sub> をパルスした樹状細胞免疫で報告しているように、短期間 (免疫後 4 ~ 6 日後) のうちに記憶 T 細胞の性質と機能をもった CD8<sup>+</sup> T 細胞が誘導されること、この早期に誘導された記憶 CD8<sup>+</sup> T 細胞は、種々の追加免疫刺激に反応して強力な 2 次免疫応答を起こし、エフェクターおよび記憶 T 細胞を誘導し有効な感染防御効果を誘導する、等の利点がある。これは主に樹状細胞免疫の場合、初回免

疫後の IFN- $\gamma$  産生を伴う局所の「炎症」を低く抑え、特異的 T 細胞の減衰を抑えるためと推測されている。すなわち、なんらかの方法で初回免疫後の「炎症」を低く抑えることが記憶 T 細胞の誘導に有効かもしれない。樹状細胞免疫の場合も、免疫する細胞を多く導入すると過剰な免疫応答 (炎症反応) が起こり感染防御能が低下することを我々も経験している。Orme らのグループ (28) も、Ag85A タンパクをパルスした樹状細胞を経鼻的に免疫すると CD4<sup>+</sup> T 細胞による抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生を認めたがかえって感染防御能の低下を報告している。これも IFN- $\gamma$  産生を伴う「炎症」を誘導したためであろう。免疫する樹状細胞の数とともに、免疫する樹状細胞の状態も重要である。我々は、LLO<sub>91-99</sub> パルス樹状細胞を経気道的に導入し、肺局所でのリステリア感染防御能を検討したところ、リポ多糖 (LPS) で前もって刺激しておいた樹状細胞を免疫したときにのみ有効な感染防御能を認めた (78)。樹状細胞免疫は最適な条件で免疫すると非常に有効に局所の細胞性免疫を誘導できる。その煩雑さから感染症対策としてはあまり実際的ではないが、効率よく特定の特異的 T 細胞を誘導できることから実験的意義は大きいといえる。

## 7. 組換えウイルスワクチンの試み

組換えウイルスシステムを用いた樹状細胞への直接遺伝子導入や、免疫反応の誘導が試みられてきている。組換えウイルスシステムとして現在、結核菌に対して試みられているものに、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス等がある。

ワクシニアウイルスに関しては、Zhu らが結核菌 19-kDa タンパクおよび 38-kDa タンパクを分泌するワクシニアウイルスをマウスに腹腔免疫することによって結核菌感染に対して肺内の結核菌数が BCG 免疫と同程度減少している

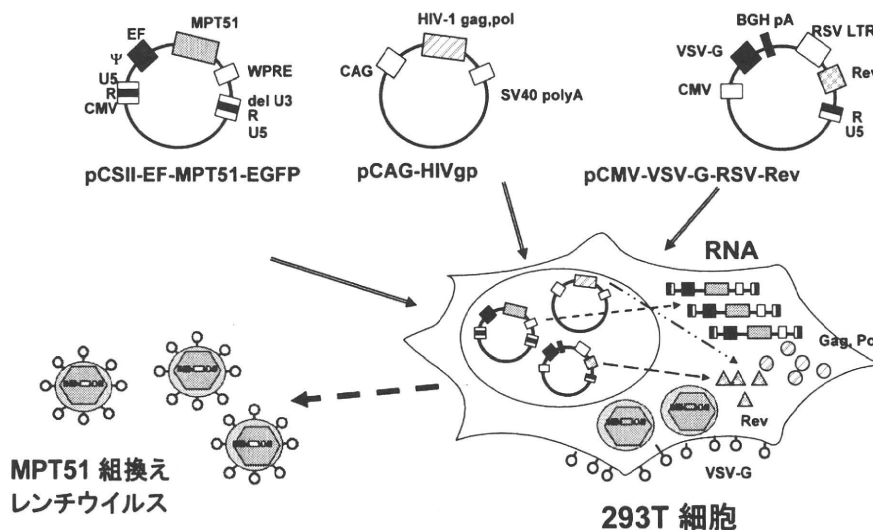


図5. 組換えレンチウイルスワクチン

レンチウイルスは、分裂細胞のみならず非分裂細胞にも感染可能のため、ワクチン用ベクターとして有用である。我々は結核菌抗原 MPT51 を導入した第3世代のレンチウイルスシステムを用いて肺局所での特異的 T 細胞誘導を試みた (33)。

のを報告したのが最初である (126)。その後、高度に弱毒化した改変ワクシニアウイルス Ankara 株 (modified vaccinia virus Ankara; MVA) に Ag85A 遺伝子を組み込んだ組換えワクシニアウイルス (MVA85A) が詳細に研究されている (29, 56, 58)。基本的に、組換えワクシニアウイルスワクチンは、単独で使われるのではなく追加免疫（ブースト用）に用いられている。

アデノウイルスも、ワクチンのみならず遺伝子治療等にも頻繁に用いられている。しかしながらアデノウイルスは市中にありふれたウイルスであるため、このウイルスに対する免疫記憶が有効な免疫応答を阻害することが懸念される。そこでヒトの間で広まっている野生型 Ad5 タイプの代わりに、ヒトの間で広まっていない Ad35 タイプのアデノウイルスを用いたワクチンが開発されている。Ad35 タイプのワクチンは、Ad5 タイプのウイルスに対する中和抗体を持ってもその免疫効果が影響を受けない (72)。なおアデノウイルスによる結核ワクチンの試みには、Xing らのグループによって精力的に行なわれてきた (90, 109)。

マウス白血病レトロウイルスシステムも生体への抗原遺伝子導入に用いられている。このシステムを用いて脾樹状細胞に効率よく抗原遺伝子が導入されることが報告されている。しかし、レトロウイルスシステムは分裂細胞にのみ感染し静止期の細胞には感染できないため、感染細胞が限定されてしまう。レトロウイルスシステムに対し、レンチウイルスシステムは樹状細胞を含め種々の非分裂細胞に効率よく遺伝子導入できる。またフィロウイルスエンベロープを用いた改良型レンチウイルスではマウス肺に効率よく遺伝子導入できることが報告されている。第3世代の自己非活性型レンチウイルスシステムは、その安全性、遺伝子導入の効率性、またレンチウイルスに対する免疫記憶が存在しないこと等により、有効なワクチンシステムであると

考えられる。

Esslinger らは、組換えレンチウイルスをマウスの足底に免疫したところ、ウイルスが導入された樹状細胞が所属リンパ節および脾臓で検出されたことを報告している (20)。彼らは、組換えレンチウイルスワクチンは、レンチウイルス導入樹状細胞そのものの免疫やペプチド / アジュバントの免疫に比べ、長期にわたる強い CTL 応答を誘導できることを示した。我々は、MPT51 抗原遺伝子を組み込んだ第3世代レンチウイルスを経気道免疫し、その免疫誘導能を検討した (図5)。その結果、1回の経気道免疫により効率よく MPT51 特異的 CD8<sup>+</sup> CTL が肺組織内で誘導できることがわかった (33)。これらの結果は、レンチウイルスシステムは、肺組織における結核菌に対する特異的細胞性免疫誘導のためのワクチンとしてたいへん有効であることを示唆している。

## 8. 免疫プロトコルの改良：プライム・ブースト法

これまでのワクチン研究により、細胞性免疫、すなわち特異的 T 細胞の誘導に関して同一の免疫のみを何回も繰り返しても、免疫誘導能に限界があることがわかってきた。特に、DNA ワクチンはマウス等のげっ歯類では比較的効率的に免疫誘導が起こるが、霊長類では予想以上に有効ではない (112)。その代わりに、いくつかの異なった免疫方法を組み合わせることにより、より強力な細胞性免疫が誘導されることがわかってきた。プライム・ブーストヘテロ免疫法とは、感作（プライム）と追加免疫（ブースト）を、同じ抗原を含む、異なった（組換え）ワクチンで行なう方法である (84)。プライム・ブーストヘテロ免疫法は主に HIV、マラリア原虫等の感染に対するワクチンで研究されており、通常、DNA ワクチンで感作した後、組換えワクシニアウイルス (MVA) やアデノウイルス等の組換えウイルスワ



クチンで追加免疫が行なわれる。

このいわゆるプライム・ブースト法は、まず DNA ワクチンにより、比較的弱い持続的な特定抗原に対するプライミングの後、炎症を伴うような比較的強い組換えウイルスワクチンにより特定抗原に対する免疫を増強するというものである。このように「DNA ワクチンによる初回免疫と組換えウイルスワクチンなどによる追加免疫」がプライム・ブースト法の基本型であるが、Eo ら (19) は粘膜ワクチンの場合は「組換えワクシニアウイルスによる初回免疫と DNA ワクチンによる追加免疫」が有効であったと報告している。これは粘膜におけるプライミングには、DNA ワクチンでは十分ではなく、組換えワクシニアウイルスによる強力なプライミングが必要であるためだと推測される。

結核に対するワクチンでも同様の試み、すなわちプライムを DNA ワクチンで行い、ブーストに別のワクチンを用いる試みが行なわれている。Tanghe ら (99) は Ag85A DNA ワクチンで C57BL/6 マウスを感作し、その後に Ag85A タンパクでブーストすることで DNA ワクチン単独よりも強い Th1 細胞の誘導と結核菌の経静脈感染に対する感染防御能を得ている。しかし Tanghe らの方法で誘導された感染防御能は BCG 免疫で得られたものと同程度であった。同様に、ESAT6 DNA ワクチンの効果が、ESAT6 タンパクの追加免疫で高まった (111)。McShane らは、ESAT6 と MPT63 の DNA ワクチンで感作し Ag85A 導入ワクシニアウイルスワクチン (MVA85A) でブーストを行なうと、BCG 免疫と同等の結核菌感染防御を得ている (56)。しかしながら、すべてのワクチンがこのプライム・ブースト法でより効果を増すというわけでもない。Mollenkopf らは、ESAT6 を発現する弱毒サルモネラキャリア DNA ワクチンをプライム・ブースト法に用いたが、その順番を入れ替えても感染防御効果の改善を認めていない (61)。

前記したように BCG ワクチンは成人結核に対する有効性は疑問視されているが、小児の粟粒結核や結核性髄膜炎の予防には有効である (87)。また結核対策が特に重要である発展途上国を含め多くの国で BCG ワクチンが広く使われているため、実際的には BCG ワクチンを新たな結核ワクチンに完全に置換するのは不适当であろう。そこで BCG ワクチンを組み込んだプライム・ブーストプロトコルが試されている。まずプライムとして DNA ワクチンを用いて、BCG をブーストで用いるものである。Feng らは Ag85B DNA ワクチンをプライムに用いた場合、その後の BCG 免疫の感染防御効果、すなわち臓器内結核菌数が  $1 \sim 2 \text{ Log}_{10}$  程度低下しているのを報告している (21)。この感染防御効果は、ブーストとして Ag85B 組換えワクシニアウイルスや Ag85B DNA ワクチンを用いた場合に比べ BCG を用いた場合のほうが顕著であった。引き続き Skinner らは、ESAT6 と Ag85A の DNA ワクチンでプライムし BCG でブーストしたところ、特異的 IFN- $\gamma$  産生は、DNA ワクチンまたは BCG 単独よりも増強したことを報告している (93)。しかし結核菌の噴霧感染に対する防御能は BCG 単独免疫で誘導

されるものと差がなかった。また Ferraz らも Hsp65, Hsp70, Apa 遺伝子の DNA ワクチンは、ブーストで用いた BCG の感染防御効果を若干増強したことを報告している (22)。さらに Romano らは、Ag85A DNA ワクチンで BALB/c マウスを感作し BCG でブーストすることで DNA ワクチン単独よりも強い感染防御効果を得ている (88)。これらの結果から DNA ワクチン—BCG のプライム・ブースト法は、BCG の感染防御効果を増強するといえる。

次に、プライムとして BCG を用いて組換えウイルスワクチンかタンパク免疫でブーストするものである。マウスで、BCG (プライム) と MVA85A (ブースト) を経鼻的に免疫したところ、BCG のみの免疫に比べ、肺の所属リンパ節で Ag85A 特異的 CD4<sup>+</sup> および CD8<sup>+</sup> T 細胞が増強され、結核菌の噴霧感染に対する感染防御能が増加した (29)。BCG と MVA85A のプライム・ブースト免疫はヒトでも検討されている。McShane らは、0.5 ～ 38 年前に BCG ワクチンを投与されたヒトに MVA85A を追加免疫した。その結果、MVA85A 投与 24 週後も、非免疫群に比べ 5 ～ 30 倍多い数の抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生 T 細胞数が観察され、その有効性が確認された (58)。またマウスより結核菌に対する感受性の高いモルモットを用いて、BCG—Ag85A 導入鶏痘 (fowlpox) ウイルスワクチンのプライム・ブースト免疫により BCG 免疫単独に比べ、結核菌の噴霧感染に対し非常に高い (免疫群で 100% の生存率) 感染防御が得られている (116)。さらに Ag85A 導入アデノウイルスワクチンも、BCG の追加免疫として試みられている。Santosuosso らは、BCG の皮下免疫後、Ag85A 導入アデノウイルスを筋肉免疫あるいは経鼻免疫したところ、経鼻免疫した場合にのみ、肺での Ag85A 特異的 CD4<sup>+</sup> および CD8<sup>+</sup> T 細胞が誘導され、結核菌の経気道感染に対し感染防御効果を示した (90)。なお Romano らは、BCG で BALB/c マウスを免疫した後に Ag85A DNA ワクチンでブーストしても BCG の感染防御効果が強くなることはないと報告している (88)。しかしながら ESAT6-Ag85B 融合遺伝子の DNA ワクチンをブーストに用いるとプライムに用いた BCG の感染防御効果を持続させる効果を認めたとの報告もある (12)。DNA ワクチンを BCG 免疫後のブーストとして用いる場合には、単一抗原ではなく複数の抗原遺伝子を用いる必要があるようである。

## 9. プライム・ブースト法に基づいた世界の結核ワクチンの趨勢

WHO は、結核ワクチンパイプラインとして臨床応用に有望な新しい結核ワクチンの開発リストを発表している (<http://www.stoptb.org/retooling/>)。WHO の目標は、2006 年から 2015 年までに新規の有効な結核ワクチンを開発し 2050 年までに結核を撲滅することである。基本的にパイプラインの考え方はプライム・ブースト法に基づいている。それによると、結核ワクチンを 3 つのカテゴリーに分けている。すなわち、結核菌ないし BCG 暴露前の初回免疫 (プライム) 用ワクチン、結核菌ないし BCG 暴露後の追加免



表 2. 臨床試験が開始されている結核ワクチン候補 (WHO TB ワクチンパイプラインより一部抜粋)

| ワクチン                                   | 開発元                                     | 説明                                                        | 参考文献       |
|----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------|
| プライミング・ワクチン                            |                                         |                                                           |            |
| rBCG30                                 | UCLA (M. Horwitz) /NIAID                | Ag85B 組換え BCG                                             | 36         |
| rBCG $\Delta$ ureC:hly (VPM1002)       | Max Planck Inst. (S. Kaufmann)/VPM/TBVI | Listeriolysin O (LLO) 組換え BCG                             | 30, 102    |
| mc <sup>2</sup> 6220, 6221, 6222, 6231 | Albert Einstein College of Med.         | $\Delta$ lysA $\Delta$ panCD (リジン/パントテン酸<br>栄養要求性) 弱毒結核菌  | 67         |
| ブースター・ワクチン                             |                                         |                                                           |            |
| MVA85A/AERAAS-485                      | Oxford/Isis/Aeras/Ermergent             | Ag85A 組換え ワクシニアウイルス                                       | 29, 56, 58 |
| AERAS-402/Crucell Ad35                 | Crucell/Aeras                           | Ag85A, Ag85B, TB10.4 組換え<br>アデノウイルス 35 型                  | 82         |
| GSK M72                                | GSK/Aeras                               | PPE ファミリータンパク Rv1196 と,<br>Rv0125 の融合タンパク +AS01<br>アジュバント | 91         |
| SSI Hybrid I                           | Statens Serum Inst. (SSI)               | Ag85B と ESAT6 の融合タンパク +IC31<br>アジュバント                     | 76         |
| SSI HyVac 4/AERAS-404                  | SSI/Sanofi Pasteur/Intercell/Aeras      | Ag85B と TB10.4 の融合タンパク +IC31<br>アジュバント                    | 15, 92     |
| rBCG30                                 | UCLA (M. Horwitz) /NIAID                | Ag85B 組換え BCG                                             | 36         |
| HVJ-liposome/Hsp65<br>DNA+IL-12 DNA    | 近畿中央胸部疾患センター (岡田)                       | Hsp65 DNA+IL-12 DNA を HVJ-liposome                        | 124        |
| 治療用ワクチン                                |                                         |                                                           |            |
| MVA85A                                 | Oxford                                  | Ag85A 組換え ワクシニアウイルス                                       | 29, 56, 58 |
| Hsp65 DNA vaccine                      | Cardiff Univ. (D. Lowrie)               | hsp65 DNA ワクチン                                            | 54         |

疫 (ブースト) 用ワクチン, そして潜伏結核菌感染ないし結核患者用の治療用ワクチンである。それぞれにワクチン候補を掲げ重点的に研究が遂行されている。このリスト中の主なものについて表 2 に示した。

初回免疫 (プライム) 用ワクチンとしては現行 BCG あるいは組換え BCG が考えられている。組換え BCG としては前述の rBCG30 (Ag85B 発現 BCG) や  $\Delta$ ureC hly+BCG (LLO 発現 ureC 欠損 BCG) が検討されている。追加免疫 (ブースト) 用ワクチンとしては, MVA85A や, Ag85B と ESAT6 ないし TB10.4 との融合タンパク等が検討されている。治療用ワクチンとしては Hsp65 DNA ワクチンや MVA85A 等が検討されている。

実際, これらの結核ワクチン候補を用いたプライム・ブースト法の効果について報告がなされつつある。Tchilian ら (102) は, プライムに  $\Delta$ ureC hly+ BCG を, ブーストに MVA85A を用いた場合の感染防御効果を報告している。彼らによると,  $\Delta$ ureC hly+ BCG の感染防御効果は BCG 親株よりも有意に高かった。MVA85A 皮内投与のブーストの効果をみると Ag85A 特異的 T 細胞応答は顕著に増加したものの, 結核菌 (H37Rv 株と Erdman 株) の噴霧感染後の肺内菌数はブーストの有無に影響を受けなかった。

## 10. 終わりに

種々の免疫方法が, 結核菌に対する細胞性免疫誘導のために検討されている。組換え BCG, 弱毒結核菌, DNA ワクチン, タンパク抗原による成分ワクチン, 樹状細胞ワクチン, 組換えウイルスワクチン等である。さらに, これら

のワクチンを組み合わせた種々のプライム・ブースト法が試みられている。BCG ないし組換え BCG 免疫後に用いる種々のブーストワクチンにより結核菌の感染防御抗原特異的 T 細胞応答を増強するという戦略が基本的考え方である。ワクチンで誘導される T 細胞応答を解析するためには, 感染防御抗原内の T 細胞エピトープを同定し, それに反応する T 細胞の動態を解析することが必要である。ブーストワクチンの投与経路や量, プライムとブーストの時間間隔等の要因をさらに検討していく必要があろう。

## 謝 辞

浜松医科大学感染症学講座 (旧微生物学講座) で, 本稿に記載した研究に携わった方々に深謝します。なお本稿に記載した研究は, 日本学術振興会による科学研究費, 文部科学省による戦略的研究推進経費, 厚生労働省による科学研究費, Broad Medical Foundation (米国, LA), 日米医学協力プログラムの助成を受けて行なわれたことを付記します。

## 文 献

- 1) Agger, E.M., Andersen, P. (2001): Tuberculosis subunit vaccine development: on the role of interferon- $\gamma$ . Vaccine 19, 2298–2302.
- 2) Andersen, P. (1994): Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. Infect. Immun. 62, 2536–2544.
- 3) Aoshi, T., Suzuki, M., Uchijima, M., Nagata, T., Koide, Y. (2005): Expression mapping using a retroviral vector for CD8<sup>+</sup> T cell

- epitopes: Definition of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide presented by H2-D<sup>a</sup>. *J. Immunol. Methods* **298**, 21–34.
- 4) Aoshi, T., Nagata, T., Suzuki, M., Uchijima, M., Hashimoto, D., Rafiei, A., Suda, T., Chida, K., Koide, Y. (2008): Identification of an HLA-A\*0201-restricted T-cell epitope on the MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis*, by MPT51 overlapping peptide screening. *Infect. Immun.* **76**, 1565–1571.
  - 5) Badovinac, V.P., Messingham, K.A.N., Jabbari, A., Haring, J.S., Harty, J.T. (2005): Accelerated CD8<sup>+</sup> T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat. Med.* **11**, 748–756.
  - 6) Belisle, J.T., Vissa, V.D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P.J., Besra, G.S. (1997): Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **276**, 1420–1422.
  - 7) Brandt, L., Oettinger, T., Holm, A., Andersen, Å.B., Andersen, P. (1996): Key epitopes on the ESAT-6 antigen recognized in mice during the recall of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* **157**, 3527–3533.
  - 8) Charo, J., Geluk, A., Sundbäck, M., Mirzai, B., Diehl, A.D., Malmberg, K.-J., Achour, A., Huriguchi, S., van Meijgaarden, K.E., Drijfhout, J.-W., Beekman, N., van Veelen, P., Ossendorp, F., Ottenhoff, T.H.M., Kiessling, R. (2001): The identification of a common pathogen-specific HLA class I A\*0201-restricted cytotoxic T cell epitope encoded within the heat shock protein 65. *Eur. J. Immunol.* **31**, 3602–3611.
  - 9) Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garunier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglemeier, K., Gas, S., Barry III, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.-A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G. (1998): Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537–544.
  - 10) Demangel, C., Bean, A.G.D., Martin, E., Feng, C.G., Kamath, A.T., Britton, W.J. (1999): Protection against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection using *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin-infected dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **29**, 1972–1979.
  - 11) Denis, O., Tanghe, A., Palfliet, K., Jurion, F., van den Berg, T.-P., Vanonckelen, A., Ooms, J., Saman, E., Ulmer, J.B., Content, J., Huygen, K. (1998): Vaccination with plasmid DNA encoding mycobacterial antigen 85A stimulates a CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell epitopic repertoire broader than that stimulated by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infection. *Infect. Immun.* **66**, 1527–1533.
  - 12) Derrick, S.C., Yang, A.L., Morris, S.L. (2004): A polyvalent DNA vaccine expressing an ESAT6-Ag85B fusion protein protects mice against a primary infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts BCG-induced protective immunity. *Vaccine* **23**, 780–788.
  - 13) Dietrich, G., Bubert, A., Gentschev, I., Sokolovic, Z., Simm, A., Catic, A., Kaufmann, S.H.E., Hess, J., Szalay, A.A., Goebel, W. (1998): Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat. Biotechnol.* **16**, 181–185.
  - 14) Dietrich, G., Gentschev, I., Hess, J., Ulmer, J.B., Kaufmann, S.H.E., Goebel, W. (1999): Delivery of DNA vaccines by attenuated intracellular bacteria. *Immunol. Today* **20**, 251–253.
  - 15) Dietrich, J., Aagaard, C., Leah, R., Olsen, A.W., Stryhn, A., Doherty, T.M., Andersen, P. (2005): Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. *J. Immunol.* **174**, 6332–6339.
  - 16) D'Souza, S., Denis, O., Scorza, T., Nzabintwali, F., Verschuere, H., Huygen, K. (2000): CD4<sup>+</sup> T cells contain *Mycobacterium tuberculosis* infection in the absence of CD8<sup>+</sup> T cells in mice vaccinated with DNA encoding Ag85A. *Eur. J. Immunol.* **30**, 2455–2459.
  - 17) D'Souza, S., Rosseels, V., Denis, O., Tanghe, A., De Smet, N., Jurion, F., Palfliet, K., Castiglioni, N., Vanonckelen, A., Wheeler, C., Huygen, K. (2002): Improved tuberculosis DNA vaccines by formulation in cationic lipids. *Infect. Immun.* **70**, 3681–3688.
  - 18) D'Souza, S., Rosseels, V., Romano, M., Tanghe, A., Denis, O., Jurion, F., Castiglione, N., Vanonckelen, A., Palfliet, K., Huygen, K. (2003): Mapping of murine Th1 helper T-cell epitopes of mycolyl transferases Ag85A, Ag85B, and Ag85C from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **71**, 483–493.
  - 19) Eo, S.K., Gierynska, M., Kamar, A.A., Rouse, B.T. (2001): Prime-boost immunization with DNA vaccine: mucosal route of administration changes the rules. *J. Immunol.* **166**, 5473–5479.
  - 20) Esslinger, C., Chapatte, L., Finke, D., Miconner, I., Guillaume, P., Lévy, F., MacDonald, H.R. (2003): In vivo administration of a lentiviral vaccine targets DCs and induces efficient CD8<sup>+</sup> T cell responses. *J. Clin. Invest.* **111**, 1673–1681.
  - 21) Feng, C.G., Palendira, U., Demangel, C., Spratt, J.M., Malin, A.S., Britton, W.J. (2001): Priming by DNA immunization augments protective efficacy of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin against tuberculosis. *Infect. Immun.* **69**, 4174–4176.
  - 22) Ferraz, J.C., Stavropoulos, E., Yang, M., Coade, S., Espitia, C., Lowrie, D.B., Colston, M.J., Tascon, R.E. (2004): A heterologous DNA priming-*Mycobacterium bovis* BCG boosting immunization strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, and Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice. *Infect. Immun.* **72**, 6945–6950.
  - 23) Fine, P.E.M. (1995): Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* **346**, 1339–1345.
  - 24) Flynn, J.L., Goldstein, M.M., Triebold, K.J., Koller, B., Bloom, B.R. (1992): Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 12013–12017.
  - 25) Flynn, J.L., Chan, J. (2001): Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 93–129.
  - 26) Geluk, A., Bloemhoff, W., De Vries, R.R.P., Ottenhoff, T.H.M. (1992): Binding of a major T cell epitope of mycobacteria to a specific pocket within HLA-DRw17 (DR3) molecules. *Eur. J. Immunol.* **22**, 107–113.
  - 27) Geluk, A., van Meijgaarden, K.E., Franken, K.L.M.C., Drijfhout, J.W., D'Souza, S., Neeker, A., Huygen, K., Ottenhoff, T.H.M. (2000): Identification of major epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* AG85B that are recognized by HLA-A\*0201-restricted CD8<sup>+</sup> T cells in HLA-transgenic mice and humans. *J. Immunol.* **165**, 6463–6471.
  - 28) González-Juarrero, M., Turner, J., Basaraba, R.J., Belisle, J.T., Orme, I.M. (2002): Florid pulmonary inflammatory responses in mice vaccinated with antigen-85 pulsed dendritic cells and challenged by aerosol with *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell. Immunol.* **220**, 13–19.
  - 29) Goonetilleke, N.P., McShane, H., Hannan, C.M., Anderson, R.J., Brooks, R.H., Hill, A.V.S. (2003): Enhanced immunogenicity and

- protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* of bacille Calmette-Guerin vaccine using mucosal administration and boosting with a recombinant modified vaccinia virus Ankara. J. Immunol. **171**, 1602–1609.
- 30) Grode, L., Seiler, P., Baumann, S., Hess, J., Brinkmann, V., Eddine, A.N., Mann, P., Goosmann, C., Bandermann, S., Smith, D., Bancroft, G.J., Reytrat, J.-M., van Soolingen, D., Raupach, B., Kaufmann, S.H.E. (2005): Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. J. Clin. Invest. **115**, 2472–2479.
  - 31) Grunathan, S., Klinman, D.M., Seder, R.A. (2000): DNA vaccines: immunology, application, and optimization. Annu. Rev. Immunol. **18**, 927–974.
  - 32) Guleria, I., Teitelbaum, R., McAdam, R.A., Kalpana, G., Jacobs Jr, W.R., Bloom, B.R. (1996): Auxotrophic vaccines for tuberculosis. Nat. Med. **2**, 334–337.
  - 33) Hashimoto, D., Nagata, T., Uchijima, M., Seto, S., Suda, T., Chida, K., Miyoshi, H., Nakamura, H., Koide, Y. (2008): Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis* induces specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses in the lung. Vaccine **26**, 5095–5100.
  - 34) Hess, J., Miko, D., Catic, A., Lehmensiek, V., Russell, D.G., Kaufmann, S.H.E. (1998): *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin strains secreting listeriolysin of *Listeria monocytogenes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 5299–5304.
  - 35) Horwitz, M.A., Lee, B.-W.E., Dillon, B.J., Harth, G. (1995): Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 1530–1534.
  - 36) Horwitz, M.A., Harth, G., Dillon, B.J., Masleša-Galić, S. (2000): Recombinant bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 13853–13858.
  - 37) Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D., Desjardins, M. (2003): Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. Nature **425**, 402–406.
  - 38) Huygen, K., Content, J., Denis, O., Montgomery, D.L., Yawman, A.M., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Orme, I.M., Baldwin, S., D'Souza, C., Drowart, A., Lozes, E., Vandenbussche, P., Van Vooren, J.-P., Liu, M.A., Ulmer, J.B. (1996): Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. Nat. Med. **2**, 893–898.
  - 39) Huygen, K., Lozes, E., Gilles, B., Drowart, A., Palfliet, K., Jurion, F., Roland, I., Art, M., Dufaux, M., Nyabenda, J., de Bruyn, J., van Vooren, J.-P., DeLeys, R. (1994): Mapping of TH1 helper T-cell epitopes on major secreted mycobacterial antigen 85A in mice infected with live *Mycobacterium bovis* BCG. Infect. Immun. **62**, 363–370.
  - 40) Huygen, K. (2003): On the use of DNA vaccines for the prophylaxis of mycobacterial diseases. Infect. Immun. **71**, 1613–1621.
  - 41) Ishii, K.J., Kawagoe, T., Koyama, S., Matsui, K., Kumar, H., Kawai, T., Umetsu, S., Takeuchi, O., Takeshita, F., Coban, C., Akira, S. (2008): TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. Nature **451**, 725–730.
  - 42) Kamath, A.T., Feng, C.G., MacDonald, M., Briscoe, H., Britton, W.J. (1999): Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. **67**, 1702–1707.
  - 43) Kamath, A.B., Woodworth, J., Xiong, X., Taylor, C., Weng, Y., Behar, S.M. (2004): Cytolytic CD8<sup>+</sup> T cells recognizing CFP10 are recruited to the lung after *Mycobacterium tuberculosis* infection. J. Exp. Med. **200**, 1479–1489.
  - 44) Karakousis, R.C., Yoshimatsu, T., Lamichhane, G., Wookwine, S.C., Nuermberger, E.L., Grosset, J., Bishai, W.R. (2004): Dormancy phenotype displayed by extracellular *Mycobacterium tuberculosis* within artificial granulomas in mice. J. Exp. Med. **200**, 647–657.
  - 45) Kariyone, A., Tamura, T., Kano, H., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., Takatsu, K. (2003): Immunogenicity of peptide-25 of Ag85B in Th1 development: role of IFN- $\gamma$ . Int. Immunol. **15**, 1183–1194.
  - 46) Kaufmann, S.H.E. (2003): Immunity to intracellular bacteria, p. 1229–1261. In Paul, W.E. (ed), Fundamental Immunology, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia.
  - 47) Khader, S.A., Bell, G.K., Pearl, J.E., Fountain, J.J., Rangel-Moreno, J., Cilley, G.E., Shen, F., Eaton, S.M., Gaffen, S.L., Swain, S.L., Locksley, R.M., Haynes, L., Randall, T.D., Cooper, A.M. (2007): IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4<sup>+</sup> T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. Nat. Immunol. **8**, 369–377.
  - 48) Klinman, D.M., Yi, A.-K., Beaucage, S.L., Conover, J., Krieg, A.M. (1996): CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon  $\gamma$ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 2879–2883.
  - 49) 小出幸夫, 永田 年, 内嶋雅人, 吉田篤司, 青枝大貴 (1999): 細胞内寄生菌感染に対する DNA (遺伝子) ワクチン. 日本細菌学雑誌, **54**, 773–793.
  - 50) Ladel, C.H., Dangelat, S., Kaufmann, S.H.E. (1995): Immune response to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guérin infection in major histocompatibility complex class I- and II-deficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance. Eur. J. Immunol. **25**, 377–384.
  - 51) Larsen, M.H., Biermann, K., Chen, B., Hsu, T., Sambandamurthy, V.K., Lackner, A.A., Aye, P.P., Didier, P., Huang, D., Shao, L., Wei, H., Letvin, N.L., Frothingham, R., Haynes, B.F., Chen, Z.W., Jacobs Jr, W.R. (2009): Efficacy and safety of live attenuated persistent and rapidly cleared *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates in non-human primates. Vaccine **27**, 4709–4717.
  - 52) Lee, B.-Y., Horwitz, M.A. (1995): Identification of macrophage and stress-induced proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Invest. **96**, 245–249.
  - 53) Li, Z., Zhang, H., Fan, X., Zhang, Y., Huang, J., Liu, Q., Tjelle, T.E., Mathiesen, I., Kjekken, R., Xiong, S. (2006): DNA electroporation prime and protein boost strategy enhances humoral immunity of tuberculosis DNA vaccines in mice and non-human primates. Vaccine **24**, 4565–4568.
  - 54) Lowrie, D.B., Tascon, R.E., Bonato, V.L.D., Lima, V.M.F., Faccioli, L.H., Stavropoulos, E., Colston, M.J., Hewinson, R.G., Moelling, K., Silva, C.L. (1999): Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. Nature **400**, 269–271.
  - 55) Matsumoto, M., Matsumoto, M., Umemori, K., Ozeki, Y., Furugen, M., Tatsuo, T., Hirayama, Y., Yamamoto, S., Yamada, T., Kobayashi, K. (2005): DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 confers protection against

- Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J. Immunol.* **175**, 441–449.
- 56) McShane, H., Brookes, R., Gilbert, S.C., Hill, A.V.S. (2001): Enhanced immunogenicity of CD4<sup>+</sup> T-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus Ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis. *Infect. Immun.* **69**, 681–686.
  - 57) McShane, H., Behboudi, S., Goonetilleke, N., Brookes, R., Hill, A.V.S. (2002): Protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* induced by dendritic cells pulsed with both CD8<sup>+</sup>- and CD4<sup>+</sup>-T-cell epitopes from antigen 85A. *Infect. Immun.* **70**, 1623–1626.
  - 58) McShane, H., Pathan, A.A., Sander, C.R., Keating, S.M., Gilbert, S.C., Huygen, K., Fletcher, H.A., Hill, A.V.S. (2004): Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired anti-mycobacterial immunity in humans. *Nat. Med.* **10**, 1240–1244.
  - 59) Miki, K., Nagata, T., Tanaka, T., Kim, Y.-H., Uchijima, M., Ohara, N., Nakamura, S., Okada, M., Koide, Y. (2004): Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and MPB/MPT51. *Infect. Immun.* **72**, 2014–2021.
  - 60) Minion, F.C., Menon, S.A., Mahairas, G.G., Wannemuehler, M.J. (2003): Enhanced murine antigen-specific gamma interferon and immunoglobulin G2a responses by using mycobacterial ESAT-6 sequences in DNA vaccines. *Infect. Immun.* **71**, 2239–2243.
  - 61) Mollenkopf, H.-J., Groine-Triebkorn, D., Andersen, P., Hess, J., Kaufmann, S.H.E. (2001): Protective efficacy against tuberculosis of ESAT-6 secreted by a live *Salmonella typhimurium* vaccine carrier strain and expressed by naked DNA. *Vaccine* **19**, 4028–4035.
  - 62) Morris, S., Kelley, C., Howard, A., Li, Z., Collins, F. (2000): The immunogenicity of single and combination DNA vaccines against tuberculosis. *Vaccine* **18**, 2155–2163.
  - 63) Mustafa, A.S., Oftung, F., Amoudy, H.A., Madi, N.M., Abal, A.T., Shaban, F., Krands, I.R., Andersen, P. (2000): Multiple epitopes from the *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen are recognized by antigen-specific human T cell lines. *Clin. Infect. Dis.* **30** (Suppl 3), S201–205.
  - 64) Mustafa, A.S., Shaban, F.A., Abal, A.T., Al-Attayah, R., Wiker, H.G., Lundin, K.E.A., Oftung, F., Huygen, K. (2000): Identification and HLA restriction of naturally derived Th1-cell epitopes from the secreted *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85B recognized by antigen-specific human CD4<sup>+</sup> T-cell lines. *Infect. Immun.* **68**, 3933–3940.
  - 65) Nagabhushanam, V., Purcell, A.W., Mannering, S., Germano, S., Praszker, J., Cheers, C. (2002): Identification of an I-A<sup>d</sup> restricted peptide on the 65-kilodalton heat shock protein of *Mycobacterium avium*. *Immunol. Cell Biol.* **80**, 574–583.
  - 66) Nagai, S., Wiker, H.G., Harboe, M., Kinomoto, M. (1991): Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **59**, 372–382.
  - 67) Nagata, T., Uchijima, M., Yoshida, A., Kawashima, M., Koide, Y. (1999): Codon optimization effect on translational efficiency of DNA vaccine in mammalian cells: analysis of plasmid DNA encoding a CTL epitope derived from microorganisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 445–451.
  - 68) Nagata, T., Aoshi, T., Uchijima, M., Suzuki, M., Koide, Y. (2004): Cytotoxic T-lymphocyte-, and helper T-lymphocyte-oriented DNA vaccination. *DNA Cell Biol.* **23**, 93–106.
  - 69) Nagata, T., Aoshi, T., Uchijima, M., Koide, Y. (2008): In vivo hierarchy of individual T-cell epitope-specific helper T-cell subset against an intracellular bacterium. *Vaccine* **26**, 5123–5127.
  - 70) Nakamura, Y., Suda, T., Nagata, T., Aoshi, T., Uchijima, M., Yoshida, A., Chida, K., Koide, Y., Nakamura, H. (2003): Induction of protective immunity to *Listeria monocytogenes* with dendritic cells retrovirally transduced with a cytotoxic T lymphocyte epitope minigene. *Infect. Immun.* **71**, 1748–1754.
  - 71) Nakano, H., Nagata, T., Suda, T., Tanaka, T., Aoshi, T., Uchijima, M., Kuwayama, H., Kanamaru, N., Chida, K., Nakamura, H., Okada, M., Koide, Y. (2006): Immunization with dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to an epitope on antigen 85A. *Vaccine* **24**, 2110–2119.
  - 72) Nanda, A., Lynch, D.M., Goudsmit, J., Lemckert, A.A.C., Ewald, B.A., Sumida, S.M., Truitt, D.M., Abbink, P., Kishko, M.G., Gorgone, D.A., Lifton, M.A., Shen, L., Carville, A., Mansfield, K.G., Havenga, M.J.E., Barouch, D.H. (2005): Immunogenicity of recombinant fiber-chimeric adenovirus serotype 35 vector-based vaccines in mice and Rhesus monkeys. *J. Virol.* **79**, 14161–14168.
  - 73) Ohara, N., Kitaura, H., Hotokezaka, H., Nishiyama, T., Wada, N., Matsumoto, S., Matsuo, T., Naito, M., Yamada, T. (1995): 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**, 433–442.
  - 74) Okunaga, T., Ikuta, Y., Takahashi, Y., Obata, H., Tanida, K., Watanabe, M., Imai, S., Furugen, R., Nagata, Y., Toyoda, N., Shiku, H. (2000): A novel human HER2-derived peptide homologous to the mouse K<sup>d</sup>-restricted tumor rejection antigen can induce HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes in ovarian cancer patients and healthy individuals. *Eur. J. Immunol.* **30**, 3338–3346.
  - 75) Olsen, A.W., Hansen, P.R., Holm, A., Andersen, P. (2000): Efficient protection against *Mycobacterium tuberculosis* by vaccination with a single subdominant epitope from ESAT-6 antigen. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1724–1732.
  - 76) Olsen, A.W., Williams, A., Okkels, L.M., Hatch, G., Andersen, P. (2004): Protective effect of a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion of antigen 85B and ESAT-6 in the aerosol guinea pig model. *Infect. Immun.* **72**, 6148–6150.
  - 77) Orme, I.A. (1988): Induction of nonspecific acquired resistance and delayed-type hypersensitivity, but not specific acquired resistance, in mice inoculated with killed mycobacterial vaccines. *Infect. Immun.* **56**, 3310–3312.
  - 78) Ozawa, Y., Suda, T., Nagata, T., Hashimoto, D., Nakamura, Y., Enomoto, N., Inui, N., Koide, Y., Nakamura, H., Chida, K. (2009): Mucosal vaccine using CTL epitope-pulsed dendritic cell confers protection for intracellular pathogen. *Am. J. Cell. Mol. Biol.* **41**, 440–448.
  - 79) Palendira, U., Kamath, A.T., Feng, C.G., Martin, E., Chaplin, P.J., Triccas, J.A., Britton, W.J. (2002): Coexpression of interleukin-12 chains by a self-splicing vector increases the protective cellular immune response of DNA and *Mycobacterium bovis* BCG vaccines against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **70**, 1949–1956.
  - 80) Parker, K.C., Bednarek, M.A., Coligan, J.E. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent

- binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.* **152**, 163–175.
- 81) Pethe, K., Alonso, S., Blet, F., Delogu, G., Brennan, M.J., Loch, C., Menozzi, F.D. (2001): The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature* **412**, 190–194.
  - 82) Radošević, K., Wieland, C.W., Rodriguez, A., Weverling, G.J., Mintardjo, R., Gillissen, G., Vogels, R., Skeiky, Y.A.W., Hone, D.M., Sadoff, J.C., van der Poll, T., Havenga, M., Goudsmit, J. (2007): Protective immune responses to a recombinant adenovirus type 35 tuberculosis vaccine in two mouse strains: CD4 and CD8 T-cell epitope mapping and role of gamma interferon. *Infect. Immun.* **75**, 4105–4115.
  - 83) Ragno, S., Colston, M.J., Lowrie, D.B., Winrow, V.R., Blake, D.R., Tascon, R. (1997): Protection of rats from adjuvant arthritis by immunization with naked DNA encoding for mycobacterial heat shock protein 65. *Arthritis Rheum.* **40**, 277–283.
  - 84) Ramshow, I.A., Ramsay, A.J. (2000): The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol. Today*, **21**, 163–165.
  - 85) Rammensee, H.-G., Bachmann, J., Emmerich, N.P.N., Bacher, O.A., Stevanović, S. (1999): SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide. *Immunogenetics*, **50**, 213–219.
  - 86) Repique, C.J., Li, A., Collins, F.M., Morris, S.L. (2002): DNA immunization in a mouse model of latent tuberculosis: effect of DNA vaccination on reactivation of disease and on reinfection with a secondary challenge. *Infect. Immun.* **70**, 3318–3323.
  - 87) Rodrigues, L.C., Diwan, V.K., Wheeler, J.G. (1993): Protective effect of BCG against tuberculosis meningitis and miliary tuberculosis: a meta-analysis. *Int. J. Epidemiol.* **22**, 1154–1158.
  - 88) Romano, M., D'Souza, S., Adnet, P.-Y., Laali, R., Jurion, F., Palfliet, K., Huygen, K. (2006): Priming but not boosting with plasmid DNA encoding mycolyl-transferase Ag85A from *Mycobacterium tuberculosis* increases the survival time of *Mycobacterium bovis* BCG vaccinated mice against low dose intravenous challenge with *M. tuberculosis* H37Rv. *Vaccine* **24**, 3353–3364.
  - 89) Roupie, V., Romano, M., Zhang, L., Korf, H., Lin, M.Y., Franken, K.L.M.C., Ottenhoff, T.H.M., Klein, M.R., Huygen, K. (2007): Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice. *Infect. Immun.* **75**, 941–949.
  - 90) Santosuosso, M., McCormick, S., Zhang, X., Zganiacz, A., Xing, Z. (2006): Intranasal boosting with an adenovirus-vectored vaccine markedly enhances protection by parenteral *Mycobacterium bovis* BCG immunization against pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* **74**, 4634–4643.
  - 91) Skeiky, Y.A.W., Alderson, M.R., Overndale, P.J., Guderian, J.A., Brandt, L., Dillon, D.C., Campos-Neto, A., Lobet, Y., Dalemans, W., Orme, I.M., Reed, S.G. (2004): Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J. Immunol.* **172**, 7618–7628.
  - 92) Skeiky, Y.A.W., Diethrich, J., Lasco, T.M., Stagliano, K., Dheenadhayalan, V., Goetz, M.A., Cantarero, L., Basaraba, R.J., Bang, P., Kromann, I., McMclain, J.B., Sadoff, J.C., Andersen, P. (2009): Non-clinical efficacy and safety of HyVac4:IC31 vaccine administered in a BCG prime-boost regimen. *Vaccine* in press.
  - 93) Skinner, M.A., Ramsay, A.J., Buchan, G.S., Keen, D.L., Ranasinghe, C., Slobbe, L., Collins, D.M., De Lisle, G.W., Buddle, B.M. (2003): A DNA prime-live vaccine boost strategy in mice can augment IFN- $\gamma$  responses to mycobacterial antigens but does not increase the protective efficacy of two attenuated strains of *Mycobacterium bovis* against bovine tuberculosis. *Immunology* **108**, 548–555.
  - 94) Smith, P.G., Moss, A.R. (1994): Epidemiology of tuberculosis. p. 47–59. In Bloom, B.R. (ed), *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*, Washington, D. C., ASM Press.
  - 95) Stover, C.K., de la Cruz, V.F., Fuerst, T.R., Burlein, J.E., Benson, L.A., Bennett, L.T., Bansal, G.P., Young, J.F., Lee, M.H., Hatfull, G.F., Snapper, S.B., Barletta, R.G., Jacobs Jr, W.R., Bloom, B.R. (1991): New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**, 456–460.
  - 96) Suzuki, D., Nagata, T., Eweda, G., Matsumoto, S., Matsumoto, M., Tsujimura, K., Koide, Y. (2009): Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) using DNA vaccination. *Vaccine* in press.
  - 97) Suzuki, M., Aoshi, T., Nagata, T., Koide, Y. (2004): Identification of murine H2-D<sup>d</sup>- and H2-A<sup>b</sup>-restricted T-cell epitopes on a novel protective antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **72**, 3829–3837.
  - 98) Tanghe, A., Denis, O., Lambrecht, B., Motte, V., van den Berg, T., Huygen, K. (2000): Tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85A is immunogenic and protective when administered by intramuscular needle injection but not by epidermal gene gun bombardment. *Infect. Immun.* **68**, 3854–3860.
  - 99) Tanghe, A., D'Souza, S., Rosseels, V., Denis, O., Ottenhoff, T.H.M., Dalemans, W., Wheeler, C., Huygen, K. (2001): Improved immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85 by protein boosting. *Infect. Immun.* **69**, 3041–3047.
  - 100) Tascon, R.E., Colston, M.J., Ragno, S., Stavropoulos, E., Gregory, D., Lowrie, D.B. (1996): Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nat. Med.* **2**, 888–892.
  - 101) Taylor, J.L., Turner, O.C., Basaraba, R.J., Belisle, J.T., Huygen, K., Orme, I.M. (2003): Pulmonary necrosis resulting from DNA vaccination against tuberculosis. *Infect. Immun.* **71**, 2192–2198.
  - 102) Tchilian, E.Z., Desel, C., Forbes, E.K., Bandermann, S., Sander, C.R., Hill, A.V.S., McShane, H., Kaufmann, S.H.E. (2009): Immunogenicity and protective efficacy of prime-boost regimens with recombinant  $\Delta$ ureC hly<sup>+</sup> *Mycobacterium bovis* BCG and modified vaccinia virus Ankara expressing *M. tuberculosis* antigen 85A against murine tuberculosis. *Infect. Immun.* **77**, 622–631.
  - 103) Teitelbaum, R., Gratman-Freedman, A., Chen, B., Robbins, J.B., Unanue, E., Casadevall, A., Bloom, B.R. (1998): A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15688–15693.
  - 104) Tollefsen, S., Tjelle, T.E., Schneider, J., Harboe, M., Wiker, H.G., Hewinson, G., Huygen, K., Mathiesen, I. (2002): Improved cellular and humoral immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* antigens after intramuscular DNA immunisation combined with muscle electroporation. *Vaccine* **20**, 3370–3378.
  - 105) Turner, J., Rhoades, E.R., Keen, M., Belisle, J.T., Frank, A.A., Orme, I.M. (2000): Effective preexposure tuberculosis vaccines fail to protect when they are given in an immunotherapeutic mode. *Infect. Immun.* **68**, 1706–1709.
  - 106) Uchijima, M., Yoshida, A., Nagata, T., Koide, Y. (1998): Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restricted T cell responses against an intracellular bacterium. *J. Immunol.* **161**, 5594–5599.
  - 107) Uchijima, M., Nagata, T., Koide, Y. (2008): Chemokine receptor-



- mediated delivery of mycobacterial MPT51 protein efficiently induces antigen-specific T-cell responses. *Vaccine* **26**, 5165–5169.
- 108) van Pinxteren, L.A.H., Cassidy, J.P., Smedegaard, B.H.C., Agger, E.M., Anersen, P. (2000): Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection is dependent on CD8 T cells. *Eur. J. Immunol.* **30**, 3689–3698.
  - 109) Wang, J., Thorson, L., Stokes, R.W., Santosuosso, M., Huygen, K., Zganiacz, A., Hitt, M., Xing, Z. (2004): Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis. *J. Immunol.* **173**, 6357–6365.
  - 110) Wang, L.-X., Nagata, T., Tsujimura, K., Uchijima, M., Seto, S., Koide, Y. (2009): Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptides screening. *Vaccine* in press.
  - 111) Wang, Q., Sun, S., Hu, Z., Yin, M., Xiao, C., Zhang, J. (2004): Improved immunogenicity of a tuberculosis DNA vaccine encoding ESAT6 by DNA priming and protein boosting. *Vaccine* **22**, 3622–3627.
  - 112) Wang, R., Doolan, D.L., Le, T.P., Hedstrom, R.C., Coonan, K.M., Charoenvit, Y., Jones, T.R., Hobart, P., Margalith, M., Ng, J., Weiss, W.R., Sedegah, M., De Taisne, C., Norman, J.A., Hoffman, S.L. (1998): Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* **282**, 476–480.
  - 113) Welsh, R.M., Fujinami, R.S. (2007): Pathogenic epitopes, heterologous immunity and vaccine design. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 555–563.
  - 114) Wiedera, G., Austin, M., Rabussay, D., Goldbeck, C., Barnett, S.W., Chen, M., Leung, L., Otten, G.R., Thudium, K., Selby, M.J., Ulmer, J.B. (2000): Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *J. Immunol.* **164**, 4635–4640.
  - 115) Wiker, H.G., Harboe, M. (1992): The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Rev.* **56**, 648–661.
  - 116) Williams, A., Goonetilleke, N.P., McShane, H., Clark, S.O., Hatch, G., Gilbert, S.C., Hill, A.V.S. (2005): Boosting with poxviruses enhances *Mycobacterium bovis* BCG efficacy against tuberculosis in guinea pigs. *Infect. Immun.* **73**, 3814–3816.
  - 117) Winau, F., Weber, S., Sad, S., de Diego, J., Hoops, S.L., Breiden, B., Sandhoff, K., Brinkmann, V., Kaufmann, S.H.E., Schaible, U.E. (2006): Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity* **24**, 105–117.
  - 118) World Health Organization. WHO Report 2009 Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. Geneva, 2009 [Online]. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2009/pdf/full\\_report.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/pdf/full_report.pdf).
  - 119) Wu, Y., Woodworth, J.S., Shin, D.S., Morris, S., Behar, S.M. (2008): Vaccine-elicited 10-kilodalton culture filtrate protein-specific CD8<sup>+</sup> T cells are sufficient to mediate protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect. Immun.* **76**, 2249–2255.
  - 120) Yamada, T., Uchiyama, H., Nagata, T., Uchijima, M., Suda, T., Chida, K., Nakamura, H., Koide, Y. (2001): Protective cytotoxic T lymphocyte responses induced by DNA immunization against immunodominant and subdominant epitopes of *Listeria monocytogenes* are noncompetitive. *Infect. Immun.* **69**, 3427–3430.
  - 121) Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., Kuramoto, E., Yano, O., Tokunaga, T. (1992): Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment IFN-mediated natural killer activity. *J. Immunol.* **148**, 4072–4076.
  - 122) Yanagisawa, S., Koike, M., Kayiyone, A., Nagai, S., Takatsu, K. (1997): Mapping of Vβ11<sup>+</sup> helper T cell epitopes on mycobacterial antigen in mouse primed with *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. Immunol.* **9**, 227–237.
  - 123) Yoshida, A., Nagata, T., Uchijima, M., Higashi, T., Koide, Y. (2000): Advantage of gene gun-mediated over intramuscular inoculation of plasmid DNA vaccine in reproducible induction of specific immune responses. *Vaccine* **18**, 1725–1729.
  - 124) Yoshida, S., Tanaka, T., Kita, Y., Kuwayama, S., Kanamaru, N., Muraki, Y., Hashimoto, S., Inoue, Y., Sakatani, M., Kobayashi, E., Kaneda, Y., Okada, M. (2006): DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* by T cell activation. *Vaccine* **24**, 1191–1204.
  - 125) Zhang, X., Divangahi, M., Ngai, P., Santosuosso, M., Millar, J., Zganiacz, A., Wang, J., Bramson, J., Xing, Z. (2007): Intramuscular immunization with a monogenic plasmid DNA tuberculosis vaccine: Enhanced immunogenicity by electroporation and co-expression of GM-CSF transgene. *Vaccine* **25**, 1342–1352.
  - 126) Zhu, X., Benkataprasad, N., Ivanyi, J., Vordermeier, H.M. (1997): Vaccination with recombinant vaccinia viruses protects mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* **92**, 6–9.

(担当編集委員 鈴木敏彦)

## ミニ特集「免疫と結核」

## 結核菌抗原認識と T細胞免疫

<sup>1</sup>辻村 邦夫    <sup>2</sup>小出 幸夫

**要旨：**結核菌感染者の5～10%が初感染で結核を発症するが、残りは宿主の免疫応答によって潜伏感染が成立する。潜伏感染の成立と維持には、マクロファージとT細胞が重要な役割を果たす。CD4<sup>+</sup> Th1細胞はIFN- $\gamma$ を産生してマクロファージを活性化し、CD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞は結核菌が感染した細胞を破壊する。Th17はIL-17を産生して感染局所への細胞動員を促進すると同時に肉芽腫の形成および維持に関与する。その他、リン酸抗原を認識する $\gamma\delta$ T細胞やCD1拘束性に糖脂質抗原を認識するT細胞も結核の防御免疫に寄与している。一方、調節性T細胞群やTh2細胞は抗結核免疫に対して抑制的に働く。

**キーワード：**結核菌，潜伏感染，細胞性免疫，Th1，IFN- $\gamma$

## 1. はじめに

世界保健機関の統計によると、2008年には940万人が結核を発症し180万人が死亡しており<sup>1)</sup>、結核は人類に甚大な健康被害を与え続けている。結核には感染直後に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が、感染者のうち約5%が一次結核を発症し、残りの95%は潜伏感染状態となる。現在、人類の約3分の1(20億人)が結核菌に感染(無症候性潜伏感染)しており、その約5～10%が内因性再燃によって二次結核を発症するが、残りは終生発症しない。わが国を含む結核の低～中蔓延国で発症する成人肺結核の多くは内因性再燃による二次結核である。宿主免疫機構の破綻〔ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染、免疫抑制薬の投与、栄養障害、老化など〕により二次結核の発症率が上昇することから、潜伏感染の維持には宿主側の免疫能が重要と考えられている<sup>2)~4)</sup>。本稿では結核菌に対する免疫応答に関与する様々なT細胞群の役割とその認識抗原について概説する。

## 2. 結核菌に対する免疫応答の概要

結核菌に対する免疫応答の概要をFig.に示した。

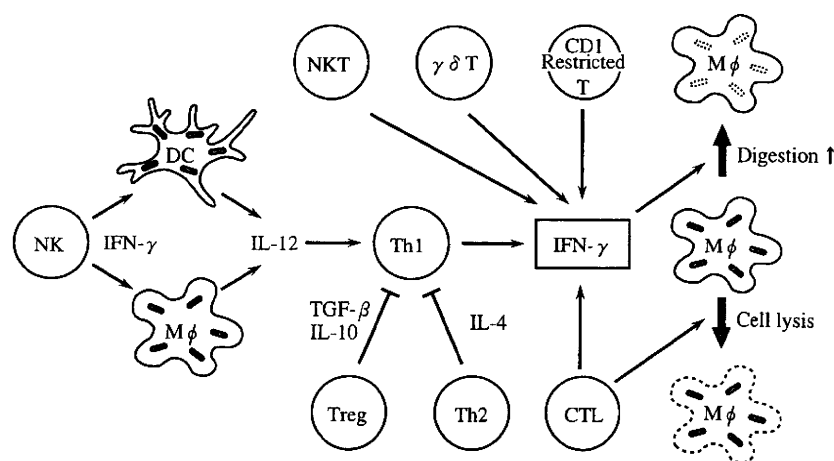
肺に侵入した結核菌は、まず肺胞マクロファージに

よって貪食されるか、II型肺胞上皮細胞に感染する。感染初期においては、自然免疫系による生体防御機構が働き、感染部位には好中球が浸潤してII型肺胞上皮細胞とともに抗菌ペプチドを産生して結核菌を攻撃する。結核菌を貪食した肺胞マクロファージは菌の消化を試みるが、結核菌はエンドソーム-ファゴソーム融合の阻害や殺菌作用をもつ活性酸素の産生阻止など、様々な手段を用いて消化を免れることが知られている。感染した肺胞マクロファージや結核菌由来の抗原を取り込んだ樹状細胞は肺門リンパ節に遊走して抗原提示を行い、T細胞による免疫応答が開始される。抗原提示を受けて活性化されたT細胞は感染局所へ遊走し、各々のエフェクター機能を発揮する<sup>2)3)</sup>。

この免疫応答において、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞亜群であるTh1(Th1)細胞によって産生されるInterferon(IFN)- $\gamma$ は、結核菌を取り込んだマクロファージを活性化して菌の消化を促進するのに中心的な役割を果たす。さらにCD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞、 $\gamma\delta$ 型のT細胞レセプター(TCR)を発現するT細胞( $\gamma\delta$ T細胞)および $\alpha\beta$ 型のTCRを発現するCD1拘束性T細胞もIFN- $\gamma$ を産生してマクロファージの活性化に寄与している。さらに、これらの細胞群は結核菌を取り込んだマクロファージを傷害し、中でもCD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞がその中

<sup>1</sup> 浜松医科大学感染症学講座生体防御分野，<sup>2</sup> 浜松医科大学理事

連絡先：小出幸夫，浜松医科大学，〒431-3192 静岡県浜松市東区半田山1-20-1 (E-mail: koidelb@hama-med.ac.jp)  
(Received 1 Mar. 2010)



**Fig.** The immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *M. tuberculosis* is transmitted via the aerosol route of infection. Infected alveolar macrophages and dendritic cells migrate to regional lymph nodes where mycobacterial antigens are presented. Macrophages and dendritic cells are activated by IFN- $\gamma$  from NK cells and produce IL-12. Th1 response is then initiated in the presence of IL-12 and activate macrophages to promote their digestion of the bacteria within them. IFN- $\gamma$  produced by Th1 cells plays a pivotal role in the activation of macrophages. CD8 $^{+}$ ,  $\gamma\delta$  and CD1-restricted T cells as well as NKT cells are also the source of IFN- $\gamma$  and participate the orchestrated responses to suppress the bacterial growth, whereas Th2 cells and Tregs interfere the protective Th1 responses.

心的役割を担っている。しかしながら多くの場合、結核菌は完全には除去されず、結核菌を取り込んだマクロファージを中心として肉芽腫が形成される。肉芽腫形成の初期にはCD4 $^{+}$ およびCD8 $^{+}$ T細胞が関与するが、その後、これらのT細胞に加えて $\gamma\delta$ T細胞やCD1拘束性T細胞も参画する。さらに肉芽腫形成が進行すると、肉芽腫は線維化された組織とリンパ球で周辺を覆われる。肉芽腫は数十年存在し、結核菌への酸素や栄養の供給を遮断して潜伏感染状態が保たれるが、この均衡が宿主の免疫応答能の低下等が原因で破綻すると、内因性再燃による二次結核が発症する<sup>2)~4)</sup>。

### 3. 結核菌に対する免疫応答に関与するT細胞とその認識抗原

Tableに結核菌に対する免疫応答に関与するT細胞群について、その機能と認識する抗原を示した。

#### (1) Th1細胞とTh2細胞

CD4やMHC class IIを欠損させたマウスや抗体によってCD4 $^{+}$ T細胞を除去したマウスは、感染させた結核菌の増殖を阻止できない。また、結核菌特異的CD4 $^{+}$ T細胞を養子移入したマウスは結核菌に対して抵抗性を示す。これらの動物実験に加え、CD4 $^{+}$ T細胞数が減少したAIDS患者では、HIV陰性者に比べて結核の発症率が顕著に上昇する。これらの報告はすべて結核菌に対する免疫応答におけるCD4 $^{+}$ T細胞の重要性を示している<sup>2)3)</sup>。

CD4 $^{+}$ T細胞は外来性に取り込まれた抗原や、細胞内小胞の中に存在する抗原をMHC class II拘束性に認識する<sup>5)</sup>。MHC class IIは切断された10~15個のペプチドを提示するので、その抗原の由来はタンパク質であり、結核菌が貪食された後、分解された構成タンパク質がMHC class IIによって提示される。一方、結核菌は免疫系からのエスケープ機構としてファゴソームとリソソームの融合を阻害する<sup>6)</sup>。

抗原提示細胞によって抗原刺激と副刺激を受けたナイーブCD4 $^{+}$ T細胞は、サイトカイン環境の違いによってTh1細胞、Th2細胞、IL-17産生性T helper (Th17)細胞、調節性T細胞(regulatory T cells: Tregs)などに分化する<sup>7)8)</sup>。Th1細胞とTh2細胞が産生するサイトカインは互いの系列への分化を抑制するため、そのバランスが自己免疫疾患や感染症の病態に影響を与える<sup>7)8)</sup>。Th1細胞はInterleukin (IL) -12やIL-18によって分化が促進されるヘルパーT細胞亜群で、IFN- $\gamma$ やIL-2などを産生し、結核菌を取り込んだマクロファージの活性化や肉芽腫の形成および維持に関与している<sup>2)~4)</sup>。

一方、Th2細胞はIL-4、IL-5、IL-10、IL-13などを産生して抗体産生やI型アレルギー反応に関与し、Th1細胞の分化を抑制する<sup>7)8)</sup>。したがってTh2細胞は結核に対する免疫応答に対して抑制的に働き、感染時にサイトカイン環境がTh2に偏向すると、宿主の結核菌に対する感受性が増大する。また、IL-4 $\delta$ 2 (IL-4の競合的抑制性アイソフォーム)の発現と結核感染者の病態との関

**Table** T cell subsets involved in tuberculosis immunity

| Subset                                | TCR            | CD4 / CD8                               | MHC-restriction   | Antigen                         | Functions in tuberculosis immunity                                                                                                                                                      |
|---------------------------------------|----------------|-----------------------------------------|-------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Protective</b>                     |                |                                         |                   |                                 |                                                                                                                                                                                         |
| T helper 1 (Th1) cells                | $\alpha\beta$  | CD4                                     | MHC class II      | Protein                         | Cytokine-mediated macrophage activation<br>Helper functions for CTL and antibody production<br>Inhibition of Th2 response                                                               |
| IL-17-producing T helper (Th17) cells | $\alpha\beta$  | CD4                                     | MHC class II      | Protein                         | Enhancement of neutrophil reaction<br>Granuloma formation                                                                                                                               |
| Cytotoxic T cells (CTL)               | $\alpha\beta$  | CD8                                     | MHC class Ia / Ib | Protein / Various               | Destruction of infected macrophages<br>Inhibition of intracellular mycobacterial replication                                                                                            |
| CD1-restricted T cells                | $\alpha\beta$  | CD4, CD8 or DN                          | CD1               | Lipid                           | Cytokine-mediated macrophage activation<br>Helper functions for CTL and antibody production<br>Destruction of infected macrophages                                                      |
| $\gamma\delta$ T cells                | $\gamma\delta$ | Most are DN<br>iIEL: CD8 $\alpha\alpha$ | No restriction    | Various (phospho-antigen, etc.) | Cytokine-mediated macrophage activation<br>Helper functions for CTL and antibody production<br>Destruction of infected macrophages<br>IL-17 mediated enhancement of neutrophil reaction |
| <b>Non-protective (inhibitory)</b>    |                |                                         |                   |                                 |                                                                                                                                                                                         |
| T helper 2 (Th2) cells                | $\alpha\beta$  | CD4                                     | MHC class II      | Protein                         | Helper functions for antibody production<br>Inhibition of Th1 response                                                                                                                  |
| Regulatory T cells (Tregs)            | $\alpha\beta$  | CD4 or CD8                              | MHC class I or II | Protein                         | Inhibition of immune responses                                                                                                                                                          |

DN: CD4/CD8 double negative, iIEL: intestinal intraepithelial lymphocytes

連が示唆されている<sup>9)</sup>。

## (2) Th17細胞

Th17はCD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞の亜群で、Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , IL-6, IL-23などのサイトカイン存在下で分化してIL-17を産生する<sup>10)</sup>。IL-17はケモカインの産生を介してTh1細胞、好中球および単球（マクロファージ）の感染局所への遊走を促進し、肉芽腫の形成・維持にも関与している<sup>10)</sup>。

## (3) CD8<sup>+</sup>T細胞（細胞傷害性T細胞：CTL）

CD8<sup>+</sup>T細胞はMHC class Ia（古典的MHC class I）あるいはMHC class Ib（非古典的MHC class I）によって提示された抗原を認識する<sup>11)12)</sup>。MHC class Ia（狭義のMHC class I）は多型性に富み、主に細胞質内のタンパク由来のペプチドを提示する。したがってウイルスやファゴソームから細胞内へエスケープした病原体由来のタンパクが対象になると考えられている<sup>5)12)</sup>。結核菌は生菌・死菌ともにファゴソームに取り込まれるが、cross-presentation機構により結核菌由来の抗原がMHC class Iaに提示され、CD8<sup>+</sup>T細胞が活性化される<sup>2)3)</sup>。一方、MHC class Ibは多型性が少なく、分子ごとに限られた分子を提示する傾向にあり、後述するCD1のようにペプチド以外の分子を提示するものもある<sup>12)</sup>。CD1以外のMHC class Ib拘束性で結核菌抗原反応性のCD8<sup>+</sup>T細胞も報告されている<sup>13)</sup>。

抗原提示を受けて活性化されエフェクターとなったCD8<sup>+</sup>T細胞は、感染細胞を直接傷害する。CD8やMHC class Iを欠損させたマウスでは、結核菌に対する感受性が増大し、CD8<sup>+</sup>T細胞が潜伏感染の維持に必要

であることが示されている<sup>2)3)</sup>。また、ヒトのCD8<sup>+</sup>T細胞が産生するgranulysinは、細胞内外の結核菌を直接傷害する<sup>14)</sup>。

## (4) CD1拘束性T細胞

CD1拘束性にマイコバクテリア由来の糖脂質（リポアラビノマンナンやミコール酸など）を認識するTCR  $\alpha\beta$ 型のヒトT細胞が報告されている<sup>15)</sup>。これらの細胞群の表面形質はCD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>またはCD4<sup>-</sup>、CD8<sup>-</sup>で、CD1に提示された糖脂質抗原によって活性化されると、サイトカイン産生や細胞傷害性などのエフェクター機能を発揮する。特にCD8<sup>+</sup>の表面形質をもつ細胞群は、granulysinを産生して強い傷害活性をもつ<sup>14)</sup>。またCD1拘束性でマイコバクテリアに由来する脂質抗原特異的なメモリーT細胞がモルモットで報告されている<sup>16)</sup>。同様のT細胞応答は、ツベルクリン反応陽性者のほうが陰性者よりも強いことが報告されており、ヒトでもT細胞メモリーの誘導が示唆されている<sup>17)</sup>。

## (5) $\gamma\delta$ T細胞

TCR  $\alpha\beta$ 型のT細胞が末梢血中や末梢リンパ組織に多く存在するのに比べ、 $\gamma$ 鎖と $\delta$ 鎖のヘテロダイマーを抗原レセプターとして発現するTCR  $\gamma\delta$ 型のT細胞（ $\gamma\delta$ T細胞）の多くは上皮間に局在し、侵入する病原体に対する初期防御に関与していると考えられている<sup>18)</sup>。一方、末梢血中での $\gamma\delta$ T細胞の割合は5%以下と少ない。 $\gamma\delta$ T細胞の表面形質は大部分がCD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>であるが、CD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>の表面形質をもつものもある。特に腸上皮間リンパ球（iIEL）の多くはCD8 $\alpha$ 鎖のホモダイマー（CD8 $\alpha\alpha$ ）を発現している。また、 $\gamma\delta$ T細胞

が認識する抗原として、MHCやリン酸抗原などが報告されているが、 $\alpha\beta$ 型のTCRがMHCと抗原ペプチドの複合体を認識するのに対し、 $\gamma\delta$ 型のTCRは抗原分子を直接認識する(MHCを認識する場合もそのフレームワークを認識する)<sup>11)</sup>。結核菌に感染あるいはBCGの接種を受けたヒトおよびサルで、 $V\gamma 9$ と $V\delta 2$ から成るTCRを発現する $\gamma\delta$ T細胞の増加が報告されている<sup>19)20)</sup>。これらの細胞群はTh1に類似したサイトカインの分泌パターンを示し、結核菌に感染した細胞を傷害する。これらのマイコバクテリア特異的な $V\gamma 9V\delta 2$ T細胞が、非ペプチド抗原(リン酸抗原)を認識することが報告されている。また、 $\gamma\delta$ T細胞は結核菌の初期感染におけるIL-17の主要産生細胞であり、自然免疫系の反応において感染局所へ好中球を誘導する重要な役割も担っている<sup>10)</sup>。

#### (6) Tregおよび他の抑制性T細胞群

Tregsは転写因子であるFoxp3を発現するCD4<sup>+</sup>T細胞亜群で、細胞間接着を介した抑制シグナル伝達およびIL-10やTGF- $\beta$ などの抑制性サイトカインによってエフェクターT細胞の機能を抑制する<sup>21)</sup>。最近、Tregsの免疫抑制活性と結核菌の持続感染との相関を示唆する知見が、ヒトおよびマウスで報告されて注目を集めている<sup>22)~24)</sup>。また、TregsのほかにもTh3、Tr1、CD8<sup>+</sup>regulatory T cellsなどの抑制性T細胞群が報告されている<sup>25)</sup>。各々の細胞群と結核の病態については明らかにされていないが、これらの細胞群やTregおよびTh2が産生するIL-10によって結核菌に対する免疫応答が調節されていることを示唆する知見がヒトおよびマウスで報告されている<sup>23)</sup>。

#### 4. T細胞が認識しワクチン開発や診断に応用が試みられているタンパク抗原

これまでにT細胞が認識する結核菌由来のタンパク質抗原が多数同定されており、それらを標的としてワクチンや診断法の開発が試みられている<sup>26)~28)</sup>。本稿ではそれらの代表的なものについて概説する。

##### (1) Antigen 85 (Ag85) 複合体

Ag85複合体は結核菌の主要分泌タンパク質であるAg85A、BおよびCの相同タンパク質で構成され、各々のタンパク質は30~32kDaと近似した分子量をもち、等電点も非常に近い<sup>29)</sup>。これらのタンパク質を用いたワクチンは、動物実験で良好な結果が得られており、臨床試験が開始されている<sup>26)~28)</sup>。また、Ag85複合体構成タンパク質の類縁タンパクであるMPT51も結核防御抗原であることが示されている<sup>30)</sup>。

##### (2) ESAT-6/CFP10

ESAT-6とCFP10は、結核菌が分泌する低分子量タン

パクで、強い抗原性をもつ。その遺伝子はRD-1領域にコードされており、すべての*M. bovis* BCG亜株と大部分の非結核性抗酸菌には存在せず、*M. tuberculosis*、BCG以外の*M. bovis*と*M. africanum*を含む結核菌群やごく一部の非結核性抗酸菌のみで発現している<sup>31)32)</sup>。これらの知見を基に、BCGと大多数の非結核性抗酸菌には存在しない両抗原でT細胞を刺激し、産生されるIFN- $\gamma$ の量を指標に結核感染を診断するクオンティフェロン法(QuantiFERON®-TB Gold (2G))が開発された<sup>33)</sup>。潜在性結核感染にはツベルクリン反応が長く用いられてきたが、使用されるPPDに含まれる結核菌抗原のほとんどがBCGや非結核性抗酸菌の抗原と高い交差性をもち、結核菌に感染していないPPD被投与者でも反応が陽性になる場合がある。したがって、BCG接種が広範に行われているわが国では、ツベルクリン反応によって正確な結核菌の感染診断を行うことはきわめて困難であった。その点において、クオンティフェロン法は、BCG接種や非結核性抗酸菌感染の影響を受けない優れた診断法であり、ESAT-6とCFP10にTB7.7を加えた新しいクオンティフェロン法(QuantiFERON®-TB Gold In Tube (3G))も実用化されている<sup>34)</sup>。また、ESAT-6とCFP10を成分に加えたワクチンも臨床研究が開始されている<sup>26)~28)</sup>。

##### (3) DosR regulonで発現調節を受けるタンパク質群

結核菌は約4,000の遺伝子をもつが、増殖期に発現する遺伝子と潜伏期に発現する遺伝子は異なり、結核菌は潜伏期に*hspX*を含むDosR regulonで制御される遺伝子が発現する<sup>35)~37)</sup>。最近、これらのタンパク質群のいくつかは、ヒトまたはマウスで免疫原性を示すことが明らかとなり<sup>38)~41)</sup>、潜伏期の結核菌を標的としたワクチンの候補抗原として注目されている。

##### (4) その他

上述したほかにも、熱ショック・タンパク質群(HSP65など)やセリンプロテアーゼ(Mtb39およびMtb32)をはじめ、多くの結核菌由来のタンパク質が免疫原性をもつことが報告されており、臨床試験が開始されている。それらについては優れた総説があるので参照されたい<sup>26)~28)</sup>。

#### 5. まとめ

結核菌に対するT細胞免疫応答と認識抗原について概説した。宿主の免疫応答を利用して結核を予防・治療するためには、このような宿主側の応答に加え、結核菌の性状や宿主免疫系からのエスケープ機構なども考慮に入れ、宿主と結核菌の相互作用を包括的に理解したうえで戦略を構築していく必要がある。