DNA ワクチンの現状と展望

——感染症制圧のための新たなアプローチ——

佐々木 津^{1,2}・福島 淳¹・奥田 研爾¹

¹ 横浜市立大学医学部細菌学講座 〒236-0004 横浜市金沢区福浦3-9
² 横浜市立大学医学部内科学第一講座 〒236-0004 横浜市金沢区福浦3-9

〔受理：1997年10月10日〕

この数年の間にワクチン研究の分野で新しいアプローチが確立された。微生物の抗原遺伝子を動物に接種すると生体内で抗原タンパクが合成され、抗原特異的な液性・細胞性免疫を誘導することができ、かつ接種を受けた動物は微生物に対する防御的免疫を獲得するというものである。この新しいワクチンの手法は DNA vaccination, genetic immunization などと呼ばれ、従来のワクチンにはない様々な特徴を備えていることから多くの研究者の関心を集め、急速に知見が蓄積されつつある。この免疫法の邦語訳はまだ定まっていないようであるが、この総説では DNA ワクチンと呼ぶ。DNA ワクチンの特徴としては強力な細胞性免疫の誘導能という生ワクチンの長所と、生きた病原体を使用しないため安全性が確保されるというペプチドワクチンの長所を具備している点があげられる。合成が容易で保存性に優れ、経済性、長期にわたる免疫反応が持続するなどの面で従来のワクチンより優れており、次世代のワクチンとして脚光を浴びている。本総説ではこの新しい免疫法に関する研究の最近の動向を総括し、われわれが進めているヒト免疫不全ウィルス (HIV) を対象とした DNA ワクチンの研究にも触れながら今後の課題と展望について述べる。

1. はじめに

1990年、Wolff らはプラスミド DNA をマウスの筋肉に注射すると、その DNA の遺伝情報に基づくタンパク質が筋細胞内で合成され、長期間発現が持続するという新知見を見いだした (77)。それから3年後、DNA ワクチンに関する研究は、米国 Merck 社の Ulmer らの報告により幕を開けた (73)。彼らはインフルエンザウィルスの

核タンパク (nucleoprotein ; NP) の遺伝子を、プロモーターと連結したプラスミド DNA の形でマウスの筋肉内に投与することで、NP 特異的な抗体と細胞障害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte ; CTL) を誘導した。さらに接種を受けたマウスはインフルエンザウィルスに曝露されても、対照群と較べて有意に感染が成立しにくいことが示された。これによって接種された遺伝子に由来する微生物の抗原が生体内で合成され、かつ感染防御に寄与しうる免疫応答を誘導できることが明らかになった。

以後、インフルエンザ (19, 73) のほかに、エイズ (5, 38, 46, 75)、ウィルス性肝炎 (14, 76)、狂犬病 (78, 79)、マラリア (29, 63)、日本住血吸虫症 (83)、リーシュマニア症 (82)、

Shin SASAKI^{1,2}, Jun FUKUSHIMA¹ and Kenji OKUDA¹
DNA Vaccination—Current Status and Future Prospect—A New Approach for Controlling Infectious Diseases

Departments of Bacteriology and First Internal Medicine,
Yokohama City University School of Medicine, Yokohama
236-0004

マイコプラズマ症 (3)、結核 (31) といった多種多様な感染症に対する DNA ワクチンの開発が試みられ、いずれも抗原特異的な免疫応答の誘導を報告している。これらの報告のうちいくつかは、免疫動物を微生物に接触させて感染成立の有無を観察し、予防的ワクチンとしての有効性を直接的に証明することにも成功している。また細胞性免疫を介した悪性腫瘍の免疫療法として、腫瘍抗原遺伝子を使用した DNA ワクチンの研究も行われており、B 細胞リンパ種 (26) と大腸ガン (11) についての報告がある。このように、新しい知見が相次いで明らかになってきており、DNA ワクチンの研究はひとつのホットなトピックとなっている。

2. DNA ワクチンの特徴

次に、DNA ワクチンが何故、期待を集めているのかを述べておきたい。現在あるワクチンは、表 1 に示すように 4 種類に大別されるが、よく知られているようにそれぞれに長所と短所を持っている。弱毒生ワクチンは本来の感染成立過程に最も近いかたちで宿主の免疫系を発動すると考え

られ、有効な免疫反応が惹起されることが期待される。反面、安全性に関する懸念は払拭しがたい。逆に死菌・ポリペプチド・組み替え型タンパクワクチンは、接種による感染を危惧する必要がないことは最大の利点であるが、細胞性免疫、特に CTL の誘導が期待しにくいのでウィルスをはじめとする細胞内寄生病原体に対するワクチンとしては力価不足である。つまり従来のワクチンは、有効性と安全性という相反する命題に挟まれて、一長一短の評価を受けてきた。この点 DNA ワクチンは、以下に詳述するように強い CTL 誘導能と安全性を具備していることから、好ましい特性を持っているといえる。また従来のワクチンに較べて大量調製が容易かつ安価に行え、品質管理がしやすいことも、大規模な予防接種を前提とした場合には大きな長所とみなされている (25, 53)。

3. 強力な細胞障害性 T リンパ球 (CTL) 誘導能

有効なワクチンを考える上で、微生物に対する宿主の免疫応答を把握しておくことは重要であ

表 1. ワクチンの分類と特徴 (文献25より引用。一部改変。)

	弱毒生 ワクチン	ウィルス ベクター型 ワクチン	死菌・ ポリペプチド ワクチン	DNA ワクチン
MHC クラス I 拘束性免疫反応 (CD8+CTL) の誘導能	あり	あり	困難	あり
MHC クラス II 拘束性免疫反応 (CD4+Th cell) の誘導能	あり	あり	あり	あり
病原体由来の全ての抗原を含むことが可能か	容易に可能	可能だが困難	可能 (死菌のみ)	可能
ベクター自体の免疫原性を考慮した場合追加免疫が可能か	該当せず	困難	該当せず	可能
免疫抑制状態の個体に安全に接種できるか	できない	できない	可能	可能
病原性 (ワクチン自体が自己増殖する可能性)	あり	あり	なし	なし
母体由来抗体による作用減弱の可能性	あり	ありうる	ありうる	なし
大量調製・品質管理が簡単か	むずかしい	むずかしい	むずかしい	容易
調製されたワクチンの均質化 (変異株混入の危険性)	困難 (あり)	困難 (あり)	可能 (少ない)	容易 (なし)
熱に対する安定性	不安定	不安定	不安定	きわめて安定
調製のコスト	高価	高価	高価	安価

る。外来抗原提示のプロセスとしては、大別して以下の2つの経路があるといわれている(20)。宿主の細胞内で生成された外来抗原は細胞内で処理されて細胞表面の主要組織適合性遺伝子複合体(major histocompatibility complex; MHC)クラス I 分子とともに提示され、CD8 陽性 CTL を活性化する。この際に抗原が細胞内の粗面小胞体で MHC クラス I 分子と結合することが重要であることが解明されつつあり、DNA ワクチンから合成された抗原もこの経路をたどると考えられる(17, 25)。他方、細胞外に存在する外来抗原は抗原提示細胞に取り込まれて処理を受け、MHC クラス II 分子とともに提示され、CD4 陽性ヘルパー T 細胞を活性化して抗体産生を誘導する。この2つの経路は、病原体に対する宿主の防衛反応という観点からみると、非常に合目的な反応であるといえる。細胞内寄生性の病原体(ウィルス、結核菌など)が感染すると、感染細胞を直接的に破壊できる CTL が誘導され、病原体を駆逐する方向にはたらく。細胞外寄生体(多くの細菌)の感染が起こればヘルパー T 細胞が活性化され、サイトカインの分泌を介して免疫応答が最適化され、細胞外の病原体の排除に有効な中和抗体産生を誘導する。

後に詳述するが、接種される DNA に含まれる CpG モチーフ(35, 55, 61)も独自の機序を介して免疫応答の誘導に大きく貢献していることが報告され、CTL は複数の系を介して誘導されていると考えられる。

4. 安全性に関する問題

次に DNA ワクチンの安全性について述べておきたい。外来の DNA を個体に投与する場合にまず考慮しなければならないのは、宿主の遺伝子に組み込まれて突然変異の原因となることである。しかし、今までのところ宿主の遺伝子に組み込まれる確率は低く(65)、自然に起こる変異の確率を超えるものではないと考えられている(44)。抗 DNA 抗体の産生とそれに引き続く自己免疫疾患の発症も懸念される問題であろう。実際、著者らのグループが開発中の DNA ワクチンもマウスに抗 DNA 抗体を誘導する(60)。しかし抗体価の上昇は一過性で、自己免疫疾患を惹起しないこ

とが米国食品医薬品局の Klinman らとのマウスモデルを使った共同研究で確認されており(42)、同様の報告は別のグループによってもなされている(21)。

さらに、スウェーデンの Wahren らは臨床第 1 相試験に着手したが(74)、現段階では副作用の報告は皆無である。より詳細な検討と長期の観察を経るまではこの問題に結論を出すのは時期早尚であろうが、今のところ安全性に疑念をいだかせる材料は見いだせない。

5. DNA ワクチンが全身性免疫応答を惹起するメカニズム

DNA ワクチンは様々な投与経路を介して接種することが可能である。筋肉内注射、腹腔内注射、皮内注射、経鼻投与、経口投与などが有効であることが明らかになっている(19, 36, 45)。また DNA ワクチンのみに適用可能な接種方法として、微細な金粒子に DNA を付着させ、高圧のガスで粒子を皮内に射出して遺伝子を導入する方法(遺伝子銃による particle bombardment)がある(19, 27)。これらの方法によって DNA の遺伝情報に基づいて合成されたタンパクが接種部位に存在することは疑う余地がなく(図 1)(9, 77)、それに対する免疫応答が惹起されていることも明白である。しかし、この2つの事実がどのように結びついているのかを説明する、DNA ワクチンの作用機序の詳細は未だ解明されていない。現在までに明らかになっている知見を以下に述べておく。

メカニズムに関する研究で、最も力が注がれているのはどの細胞によって抗原提示がなされているのか、および筋細胞はどのような役割を果たしているかという問題である(図 1)。筋注の場合、筋細胞は DNA に由来するタンパクを合成するが、それ自身が十分な抗原提示能を持つとは考えにくい。なぜなら、筋細胞には MHC クラス I 分子はわずかに発現しているものの MHC クラス II 分子と costimulatory factor を欠いている(30)。最近、CTL 誘導に関する抗原提示は、筋細胞ではなく骨髄由来の抗原提示細胞(antigen presenting cell; APC)が担っていることが示された(12, 34)。筋組織内にたまたま存在するマ

図 1. (A) HIV-1 DNA ワクチン筋肉内接種後の筋組織における抗原タンパクの発現。接種10日後に抗 gp120 抗体をもちいて免疫組織化学染色を行った。黒く染まっている部分に gp120 が存在する (文献46より)。(B) HIV-1 DNA ワクチン経鼻接種後の肺胞における抗原タンパクの発現。接種 5 日後に抗 gp160 抗体をもちいて免疫蛍光染色を行った。白く見える部分に gp160 が存在する。

クロファージなどの少数の APC に DNA が導入されて抗原提示がなされるのであろうか。あるいは筋細胞から漏出した抗原タンパクが APC に取り込まれるのであろうか。彼らの研究もこの点については結論を出しておらず、この点に関しては、下記のように一見矛盾するようなデータが集積されつつある。抗原となる DNA を APC に生

体外で導入し、生体に戻すことで抗原特異的な免疫応答が惹起できることが、複数のグループによって報告されている (10, 18)。また Ulmer らは DNA を導入した筋細胞のみを移植することにより、CTL と抗体が誘導できることを述べている (72)。さらに、Torres らはマウスに DNA ワクチンを筋注で接種し、その直後に筋肉を外科的

図2. DNA ワクチンの筋肉内接種における抗原特異的免疫応答の誘導機序

に摘除しても CTL と抗体が検出できることを示している (67)。加えて Davis らは DNA に由来する抗原に対する抗体は70週間以上にわたり検出されているが、抗原タンパクを発現している筋細胞は接種後10日ほどで免疫学的に破壊されていることを報告している (15)。われわれもアジュバントを併用すると筋肉内での抗原タンパクの発現が低下するにもかかわらず、免疫応答が増強されることを見いだした (60)。これらの知見を一元的に説明することは難しく、筋細胞がどのような役割を果たしているのかという点については今後の研究の進展が待たれる。なお、メカニズムの問題に関しては Robinson らの総説 (53) に詳述されている。

6. 動物実験モデルにおける感染防御効果、および他のワクチンとの比較

表2に示すように、多くの微生物について感染実験モデルが作られて DNA ワクチンの効果が試されてきた。これらのうち、臨床的に重要ないくつかの感染症のワクチンの効果について触れておく。最も詳細に幅広くその有効性が確かめられているのはインフルエンザである。現在すでに臨床的に使用可能なインフルエンザワクチンは存在するが、ヘモアググチニン (HA)、ノイラミニ

ダーゼ (NA) などを抗原として使用しており、抗原変異のために毎年新たなワクチンを準備しなければならないのが難点である。加えて実際に流行する株がワクチンに対応したものととは限らないために、その有効性が不確定であることもよく知られている。Donnelly らはシロイタチの感染モデルで、ヒトのインフルエンザの臨床分離株を用い、現行の臨床使用が認可されたインフルエンザワクチンと DNA ワクチンとの比較検討を行った (16)。感染防御効果は DNA ワクチンが有意に高く、かつ DNA ワクチンではヘテロ抗原のウィルスに対しても効果が証明され、実用化への期待が高まっている。彼らは上述の抗原変異の現状を考慮して、株による変異のほとんどない NP の DNA を免疫原として利用して CTL を誘導し、ウィルス亜群間での交叉的感染防御に成功している。このようなアプローチは HIV などの、株による抗原変異が大きい他のウィルスに対するワクチンをデザインする上で示唆に富むものである。

Huygen らは *Mycobacterium tuberculosis* の抗原からなる DNA ワクチンをマウスに接種し、*M. tuberculosis* の感染実験を行っているが、感染防御効果は *M. bovis* の BCG を接種した場合と同等であったという (31)。HIV に関しては、Boyer らがチンパンジーに DNA ワクチンを接種

表2. 種々の微生物に対する DNA ワクチンの免疫誘導能と感染防御効果

病原体	抗原	実験動物種	誘導された免疫反応		
			液性免疫	細胞性免疫	感染防御
influenza virus	NP, HA, M1	mouse, chickens, ferrets, monkeys	+	+	+
HIV	env, gag, rev	mouse macaque rabbits chimpanzees	+	+	+
bovine herpes virus	gIV	mouse	+	—	+
hepatitis B virus	HBs, HBc	mouse	+	+	+
rabies virus	gp, NP	mouse	+	+	+
<i>Plasmodium spp.</i>	circumsporozoite protein	mouse	+	+	+
<i>Leishmania major</i>	gp 63	mouse	+	—	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	HSP65, Ag85	mouse	+	+	+
hepatitis C virus	nucleocapsid, core protein	mouse	+	+	—
herpes simplex virus	gB, gD, ICP27	mouse guinea pig	+	+	+
papilloma virus	L1	mouse	+	—	+
HTLV-I	env	mouse	+	—	—
lymphocytic choriomeningitis virus	NP	mouse	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i>	delta endotoxin	mouse	+	—	—
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	all antigens	mouse	+	—	+
<i>Salmonella typhi</i>	OmpC porin	mouse	+	—	—

して HIV-1 の感染阻止を報告した (5)。彼らはチンパンジーを感染させるのにワクチンに対してヘテロ抗原となる株を使っているがそれは比較的弱毒の実験室分離株のみであり、毒性の強い臨床分離株は使っていない。サル免疫不全ウィルス (simian immunodeficiency virus ; SIV) の強毒株を使った Lu らのトライアルでは、DNA ワクチンを複数の投与経路で複数回投与しても、感染の成立は防げず、ウィルス量の減少のみが可能であった (37)。したがって HIV ワクチンについてはインフルエンザに較べて解決すべき課題が多く残されており、強毒株の感染を阻止しうるワクチ

ンを実現するための今一段の工夫が必要と考えられている。

また、ウィルス性肝炎は感染が遷延して慢性化することが多いため、感染細胞を駆逐するためには CTL の誘導能が強い DNA ワクチンの良い適応になると考えられる。実際、Davis らは DNA ワクチンが他のワクチンに較べて最も強力に免疫反応を誘導することをチンパンジーを使って示しており (14)、Prince らは B 型肝炎ウィルスに感染したチンパンジーに DNA ワクチンを 4 回免疫することでウィルスが検出できなくなることを見いだした (Prince ら、私信)。慢性活動性肝炎か

ら肝硬変・肝細胞ガンへの移行は深刻な問題であり、インターフェロン療法の効果にも限界があるため、DNA ワクチンを治療的に投与するというアプローチには大いに期待が持たれる。

7. 改良にむけた取り組み —免疫応答の修飾と最適化—

DNA ワクチンは接種された個体に免疫応答を惹起し、ある種の微生物に対する感染防御能をも付与することが可能である。HIV・SIVをはじめとする、現状では感染防御効果が不十分な病原体に対して有効なワクチンを完成させるには、感染防御がどの免疫反応に依存しているのか—ヘルパー T 細胞・抗体の誘導が重要なのか、CTL の存在が必須なのか、あるいは両方必要なのか—という点を個々の感染症ごとに検討し、必要な免疫反応を最大限に引き出す方向にワクチンの免疫原性を修飾することが重要である。

実際、大部分のウィルスを対象とした DNA ワクチンでは抗体が感染防御に貢献しているとされるが、インフルエンザウィルスと lymphocytic choriomeningitis virus の NP タンパクを抗原とした場合には、感染防御能は CTL のみに依存しているとされる (17)。また、ある種のヘルペスウィルスでは CTL ではなくヘルパー T 細胞 (Th) が必要であったり (39)、抗体のみで防御的免疫を得ることが可能である場合もある (4, 39)。

今後は DNA ワクチンにより単に抗原特異的な免疫反応を誘導するのみならず、合目的な免疫学的修飾 (immunomodulation) を加えるというアプローチが重要になっていくものと思われる。その基盤となる免疫学的機構について、簡単に触れておきたい。

非自己抗原が APC から免疫系に提示される時点免疫応答の源流と考えると、図 2 に示すように MHC クラス I を介する CD8 陽性 CTL の活性化と、MHC クラス II を介しての CD4 陽性ヘルパー T 細胞 (Th) の活性化という 2 つの流れが存在する。後者の流れをたどると抗原提示を受けたナイーブ T 細胞 (Th0) は、サイトカインの制御により分化・増殖の方向がさらに 2 つに分岐する (図 3)。ひとはインターロイキン

図 3. Th1/Th2 型免疫反応の誘導機序

12 (interleukin 12 ; IL-12) の存在下に方向づけられる Th1 型免疫応答であり (62), もう一つは IL-4 によって誘導される Th2 型免疫応答である (7)。Th1 細胞は IL-2, インターフェロンガンマ (interferon γ , IFN- γ) を分泌し、それらのサイトカインは B 細胞のクラススイッチングを惹起して IgG2a サブタイプの産成を誘導し、またヘルパー T 細胞自身にも作用して抗原特異的な遅延型過敏反応 (delayed-type hypersensitivity reaction ; DTH 反応) を招来する。加えて IL-2 と IFN- γ は CTL の活性化に欠くことができないサイトカインであり (40), Th1 の活性化は CTL の誘導にも貢献すると考えられる。一方, Th2 細胞は IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 を分泌して B 細胞に IgG1, IgE, IgA サブタイプの分泌を誘導する (43)。

上述の Th1 と Th2 という 2 つのヘルパー T 細胞サブセットが感染に対する免疫応答において重要な役割を果たすことがわかってきたのは、マウスに *Leishmania*, *Mycobacterium* を感染させる実験系を使った一連の研究によってである (7, 54, 62)。これらの研究を概括すると、細胞内寄生性細菌の感染はサイトカインの制御の下に Th1 型免疫応答を惹起する。その結果細胞性免疫が誘導されるが、宿主を細胞内寄生性病原体から防御する上で Th1 型免疫応答は不可欠であることが明らかになった。

表 3. 種々の免疫修飾性分子発現プラスミドおよびアジュバントの DNA ワクチンに対する効果
(未公開データを含む)

	投与経路	抗体産成能	DTH 反応	CTL 活性	文 献
免疫修飾性分子 発現プラスミド					
IL-12	筋注・経鼻	不変	上昇	上昇	45, 69
GM-CSF	筋注・経鼻	上昇	上昇	上昇	45, 78
IL-2	筋注・経鼻	不変	上昇	上昇	8
TCA3	筋注	不変	上昇	上昇	68
B7.2	筋注	不変	上昇	上昇	70
CD40 ligand	筋注	上昇	上昇	上昇	
MIP1- α	筋注・経鼻	不変	上昇	上昇	
免疫修飾性物質 (アジュバント)					
MPL	筋注・経鼻	上昇	上昇	上昇	57, 60
QS-21	筋注・経鼻	上昇	上昇	上昇	59
ubenimex	筋注	上昇	上昇	上昇	58
alumimum hydroxide	筋注	上昇	不変	低下	
calcium phosphate	筋注	上昇	不変	低下	
DC-Chol: DOPE liposome	筋注	上昇	上昇	上昇	33
マンナン被覆 DC-Chol: DOPE liposome	筋注	上昇	上昇	上昇	66
diC14-amidine	筋注・経鼻	上昇	上昇	上昇	56
マンナン被覆 diC14-amidine	筋注・経鼻	上昇	上昇	上昇	56

a. 免疫応答を修飾・最適化するための試み —免疫修飾性分子の利用

それでは DNA ワクチンの接種に際し、どのような手段で Th1 サブセットを活性化することができるのだろうか。この課題はわれわれが現在最も力を注いでいるテーマであり、多くの実践的なデータを蓄積しつつある。図 2 から推察されるように、免疫応答の場に IL-12 を人為的に存在させることは有効であると考えられる。そこでわれわれは IL-12 のプラスミド DNA とともに免疫原の DNA を投与した。これにより筋肉内注射 (69), 経鼻投与 (45) のいずれでも強力な Th1 型細胞性免疫を誘導することができることが示された。また、この方法はペプチドワクチンにも応用できることを明らかにした (24)。IL-12 に限

らず、サイトカインをはじめとする免疫修飾性分子をタンパクではなくプラスミド DNA の形で投与することには以下のような利点がある。タンパクは生体内では不安定で半減期が短いため、長期にわたって作用させるには補充投与が必要である。DNA の形で投与すればタンパク合成が生体内でなされるため、少量を長期間存在させることは容易となる (69)。DNA はタンパクに比して簡便かつ安価に必要な量を調製できるのも魅力である。またわれわれは、ケモカインのひとつである TCA3 (68) や抗原提示に不可欠な costimulatory factor (B7-2) (70) の DNA を同時投与することで DNA ワクチンの細胞性免疫応答のみを特異的に増強できることを明らかにしている。また、同様のアプローチで顆粒球・マクロファージ

コロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF) や IL-2 が有効であることも報告されている (8, 45, 78)。現在われわれは MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 α), IL-15, IL-18, CCR-4 (CXC-chemokine receptor-4) (64) について, DNA ワクチンに対する免疫調節効果を検討中である。

b. 免疫応答を修飾・最適化するための試み —アジュバントの利用

アジュバントは, ワクチンの免疫原性を高めるための有効な手段として古くから使われてきた。その種類・作用機序は多岐におよび, ペプチドや組み替え型ウィルスベクターワクチンに広く応用されているが (52), DNA ワクチンにおける有効性の検討は始まったばかりである。われわれは当初, DNA の細胞内への取り込みを高めるためにカチオニック・リポソームで DNA を包んで投与したところ, 液性・細胞性免疫の増強が認められた (33)。同様の報告は別のグループによってもなされている (22)。次に, このリポソームのマクロファージへの親和性を高めるためにマンノース被覆型リポソームを調製してアジュバントとして使用したところ, リポソーム単独よりも高い免疫反応を惹起することができた (56, 66)。

この機序としては, リポソームが DNA の細胞膜通過を助け, さらに種々の微生物の表面抗原として含まれるマンノースがマクロファージのマノースレセプターに結合するためと推察している。このようなドラッグデリバリーの工夫は, DNA ワクチンが細胞内に効率よく取り込まれなければ効果を発揮できないという宿命を負っている以上, より強い免疫反応を追求する上で十分に考慮される必要があろう。

そのほかにマクロファージを活性化させたり, サイトカインを誘導する物質もアジュバントとして非常に有望である。われわれはいくつかのアジュバントの有効性を検討しているが, *Salmonella minnesota* の lipopolysaccharide の抽出物である monophosphoryl lipid A (MPL) と DNA ワクチンを同時に筋肉内投与すると細胞性免疫と, ウィルス中和抗体価の両者を高めることが明らかになった (60)。加えて MPL は経鼻投与により粘膜アジュバントとしての作用も持つ (57)。また, 南米のナデシコ科の植物, *Quillaja saponaria* に由来する saponin を精製した QS-21 は強力なアジュバント活性を持つが, これを DNA ワクチンとともに投与することで全身と腸管粘膜局所の細胞性・液性免疫応答を増強することができた

図4. HIV-1 DNA ワクチンの筋肉内および経鼻接種における, 血清, 糞便, 陰洗浄液中の HIV-1 特異的抗体価および免疫グロブリンアイソタイプ (文献45より)。BALB/c マウスに3回の接種を行って5日後に検体を採取し, 抗体価を測定した。A と A', B と B', C と C', D と D', および E と E' の間では有意差が認められた。(各群4から6匹, $p < 0.05$)

(59)。QS-21 の効果は Th1 型サイトカインの作用を介したものであることも明らかとなった。そのほかに、既に臨床的に使用されている免疫賦活型の抗悪性腫瘍剤である ubenimex も Th1 型免疫反応を優位に誘導することを見いだしている (58)。他のグループはコレラトキシンを DNA ワクチンに併用すると Th2 型免疫反応と分泌型 IgA が誘導できることを報告している (36)。

c. 免疫応答を修飾・最適化するための試み —接種方法の改良

すでに述べたように DNA ワクチンは様々な方法で接種することが可能であるが、接種方法によって惹起される免疫反応が異なることも知られてきている。たとえば、理由は明らかではないが筋注では Th1 型の、遺伝子銃を使っての接種では Th2 型の免疫反応が優位に誘導されることが知られている (51, 53)。またわれわれおよび他のグループは、DNA ワクチンの経鼻・経口投与では接種部位近傍の口腔内のみならず、腸管、膣などの遠隔臓器にも分泌型 IgA を誘導しやすく、かつ全身性の細胞性免疫も筋注に遜色なく誘導できることを明らかにした。(36, 45, 56, 59)。マウスの鼻孔・口腔に DNA を滴下するという簡便な手技によって窒息や肺炎などの問題もなく、

図5. HIV-1 DNA ワクチン接種時の種々のアジュバントおよびサイトカイン発現プラスミド併用における糞便中 HIV-1 特異的分泌型 IgA 抗体価の変化 (文献45より)。BALB/c マウスに3回の接種を行って7日後に検体を採取し、抗体価を測定した。++ は両群間の有意差を示す。(各群6から8匹, $p < 0.05$)

免疫反応を誘導することができる。特に注目されることは、この方法により腸管、膣に分泌型 IgA を主とした粘膜抗体が筋注よりも強く誘導されることである (図4)。さらに糞便中の分泌型 IgA

図6. HIV-1 DNA ワクチン接種時の接種経路によるサイトカイン分泌パターンの相異 (文献45より)。BALB/c マウスに DNA ワクチンを IL-12 発現プラスミドとともに3回の接種を行って7日後にリンパ球を採取し、その培養上清中のサイトカインを定量した。*は両群間の有意差を示す。(各群6から8匹, $p < 0.05$)

抗体価は IL-4・GM-CSF 発現プラスミドおよびカチオニック・リポソームの併用によりさらに上昇する (図5)。DNA ワクチンの経鼻免疫における免疫応答惹起の機序については未だ明らかではないが、抗原再刺激を受けたリンパ球のサイトカイン分泌パターンは経鼻と筋注では異なっている (図6)。このような差異が生じる理由は現在では不明であるが、特に HIV, ヘルペスウイルスなどの粘膜から侵入して感染を起こすウイルスに対しては経鼻・経口接種が有効であることが示唆される。さらに詳細な検討は現在鋭意進めており、その結果が待たれるところである。

さらに、細胞内への遺伝子導入、DNA プラスミドの分解阻止、転写の促進、抗原タンパク発現の増強など、外来遺伝子の導入から発現にいたるまでの各ステップを効率的かつ安定したものにすることも重要であろう。遺伝子導入法の改良に関してはカチオニック・リポソームの利用、遺伝子

銃の使用はその一例であるが、細胞膜に電気刺激で多数の小孔をあけて DNA を細胞内に導入する *in vivo* electroporation も接種方法として試みられるべき方法であり、現在その効果を検討中である。また、アデノウイルス、ワクチニアウイルス、カナリポックスウイルスなどを利用したウィルスベクターはプラスミド DNA に較べて遺伝子の導入効率が格段に良いことが知られている。反面、安全性・簡便性の点では冒頭に述べたように DNA ワクチンが明らかに優れている。つまり一長一短であるが、両者の長所を生かした複合型ワクチン (50) (たとえば初回免疫はウィルスベクターを使用し、ベクターに対する免疫反応が懸念される2回目以降はプラスミド DNA で追加免疫を行うなど) も視野に入れて最も有効なワクチンを追求していく必要があると考えている。

図7. CpG モチーフによる免疫刺激作用

8. DNA 自体の持つアジュバント作用 —CpG モチーフ—

DNA ワクチンは単独でも防御的免疫を誘導し得るし、サイトカインやアジュバントの同時投与で免疫反応を増強することもできるが、興味深いことに DNA それ自体にもアジュバント作用があることがわかってきた。

Krieg らは細菌の DNA に由来するある特定のヌクレオチド配列が B 細胞を活性化することを見いだした (35)。CpG モチーフと呼ばれるこの配列は、リン酸 (phosphate; P) を挟む非メチル化シトシン (C) とグアニン (G) の 5' 末端に 2 つのプリン (GpA がのぞましい), 3' 末端に 2 つのピリミジン (TpC または TpT がのぞましい) を有する 6 塩基のオリゴヌクレオチドである。CpG という配列は微生物の DNA には 32 個の塩基に 1 個の割合で存在するが、脊椎動物ではこのような配列ははるかに少なく、しかもシトシンが高率にメチル化されている。細菌の CpG をメチル化すると B 細胞活性化作用が失われることから、これは本来、脊椎動物の免疫系が真核生物と原核生物を識別する際の標識になっていると考えられる。さらに Sato ら (61) は CpG モチーフが Th1 サブセットの活性化と CD8⁺CTL の誘導能を担っていることを、Roman ら (55) はこの作用は IFN- α , IFN- β , IFN- γ および IL-12 の誘導を介したものであることを示した (図 7)。彼らは、この配列を immunostimulatory DNA sequence (ISS) と呼ぶことを提唱してい

る。実際、われわれが使用している大腸菌から抽出・精製した DNA は CpG モチーフ (ISS) を含んでいる。DNA ワクチンの持つ細胞性免疫誘導能がこのような部分にも大きく依存していることが明らかになったことは、有効なワクチンの開発に大きく貢献するものと思われる。

9. われわれの研究の現状

われわれは現在 HIV-1, インフルエンザ, および緑膿菌に対する DNA ワクチンの研究を行っている。特にエイズに関しては約 10 年ほど前よりタイ, 米国, および日本における HIV-1 の抗原性について検討を進め (13, 32, 41, 47, 71, 80, 81), 高分子多価ペプチドワクチンの開発・改良を重ねてきた (6, 23, 48~50)。近年は HIV-1 のいくつかの遺伝子をもとに複数の DNA ワクチンを作成してその免疫原性を評価している (1, 2, 46)。そのなかでも HIV-1 の *env* および *rev* 遺伝子をもとにした DNA ワクチン (46) の改良には特に力を入れて取り組んでいる。エイズに有効なワクチンということ考えたとき、HIV から宿主を防御するには、図 8 に示すように HIV の侵入のそれぞれの段階に免疫学的バリアーを配置することが必要と考えている。そのために免疫修飾性分子やアジュバントを併用することや、接種方法を改良するというアプローチで臨んできた (33, 45, 50, 56~60, 66, 68~70)。エイズワクチンの開発の困難さは分離株ごとの抗原の多様性と、抗原変異にあることはよく知られているが、この点に関しては株ごとの変異が比較

図 8. エイズワクチンによる 3 段階からなる HIV の感染防御戦略。粘膜組織における分泌型 IgA 中和抗体, 血中の IgG 中和抗体, 細胞障害性 T リンパ球活性のいずれも感染防御には重要な役割を果たすだろう。

的少なく、サイズの小さい *nef*, *vif*, *tat* などの構造遺伝子と呼ばれる一群の遺伝子、または *gag-pol* などの大型の遺伝子を抗原にした DNA ワクチンの開発を試みている (1, 28)。また、HIV はヒト以外ではチンパンジーにしか感染しないために、マウスの実験で得られた免疫応答がどれほど感染防御に寄与するかを直接に評価しにくいという問題がある。チンパンジーの実験については、米国の施設に委託して行っているがその飼育には莫大なコストがかかるため例数に限りがあり、マウスで有効性が確認された方法が多数あってもそれを全てチンパンジーに試みることはできない。そのため、SCID マウスにヒトリンパ球を移植した SCID/hu マウスの感染モデルを利用する系と、HIV とマウス白血病ウィルス (murine leukemia virus; MuLV) のキメラウィルス (HIV/MLV) を作成して通常のマウスで感染実験が行える系を作る試みを、スウェーデンのカロリンスカ研究所の Wahren らとの共同研究で行っている。現在のところ、われわれの DNA ワクチンはこれらの系においては HIV-1 および HIV/MLV の感染を防御する効果を持つことが明らかになっている。

インフルエンザウィルスでは、マウスでも容易に感染実験モデルを作成できるのが利点である。インフルエンザ DNA ワクチンの感染防御効果については既に数多くの報告があるが、それらの全てがプラスミド DNA 単独の接種を行っている。われわれのような免疫修飾性分子・アジュバントを利用した接種法は報告されておらず、これらを用いてさらにワクチンを強力なものとするのも今後の重要な課題と考えて実験を進めている。

また、緑膿菌は日和見感染の病原体として臨床で重要なものであるが、いったん感染を起こすと宿主の感染防御能が低下しているために重篤な病態を招来しやすい。このため、入院中の *compromised host* にあらかじめ接種するワクチンがあれば原疾患の治療を円滑に進めることができると考えられる。このような観点から *Pseudomonas aeruginosa* の鞭毛抗原を使用した DNA ワクチンも開発中であり、接種を受けたマウスは良好な感染防御能を獲得しうることが確認された。

10. お わ り に

このように DNA ワクチンは従来のものにはない多くの長所を持つ、大きな可能性を秘めた次世代のワクチンである。このワクチンの効果をさらに高め、実用化にこぎつけるには越えなければならないいくつかの課題があり、有効なワクチンを手にするためにより一層の研究の進歩が必要である。われわれは DNA ワクチンがさらに改良を受けて洗練されたものとなり、十分な効果を持つ素晴らしいワクチンとして完成する日が来ることを信じて研究を続けている。

最後に本稿を発表するにあたり、われわれの研究に終始アドバイスを頂いているウィルス肝炎研究財団西岡久寿彌理事、スウェーデン王立カロリンスカ研究所臨床ウィルス学部門 B. Wahren 教授、米国食品医薬品局ウィルス学部門 D. Klinman 部長、米国 United Biomedical Institute 社 W. Koff 副社長ら諸先生方に感謝いたします。

文 献

- 1) Asakura, Y., Hamajima, K., Fukushima, J., Mohri, H., Okubo, T., Okuda, K. (1996): Induction of HIV-1 *nef*-specific cytotoxic T lymphocytes by *nef*-expressing DNA vaccine. *Am. J. Hematol.*, **53**, 116-117.
- 2) Asakura, Y., Hinkula, J., Leandersson, A.C., Fukushima, J., Okuda, K., Wahren, B. (1997): Induction of HIV-1 specific mucosal immune responses by DNA vaccination. *Scand. J. Immunol.*, **46**, 326-330.
- 3) Barry, M.A., Lai, W.C., Johnston, S.A. (1995): Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature*. **377**, 632-635.
- 4) Bourne, N., Stanberry, L.R., Bernstein, D.I., Lew, D. (1996): DNA immunization against experimental genital herpes simplex virus infection. *J. Infect. Dis.*, **173**, 800-807.
- 5) Boyer, J.D., Ugen, K.E., Wang, B., Agadjanyan, M., Gilbert, L., Bagarazzi, M.L., Chattergoon, M., Frost, P., Javadian, A., Williams, W.V., Refaelli, Y., Ciccarelli, R.B., McCallus, D., Coney, L., Weiner, D.B. (1997): Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nature Med.*, **3**, 526-532.

- 6) Bukawa, H., Sekigawa, K., Hamajima, K., Fukushima, J., Yamada, Y., Kiyono, H., Okuda, K. (1995): Neutralization of HIV-1 by secretory IgA induced by oral immunization with a new macromolecular multicomponent peptide vaccine candidate. *Nature Med.*, **1**, 681-685.
- 7) Chatelain, R., Varkila, K., Coffman, R.L. (1992): IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. *J. Immunol.*, **148**, 1182-1187.
- 8) Chow, Y.-H., Huang, W.-L., Chi, W.-K., Chu, Y.-D., Tao, M.-H. (1997): Improvement of hepatitis B virus DNA vaccine by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. *J. Virol.*, **71**, 169-178.
- 9) Ciernik, I.F., Krayenbuhl, B.H., Carbone, D.P. (1996): Puncture-mediated gene transfer to the skin. *Hum. Gene Ther.*, **7**, 893-899.
- 10) Condon, C., Watkins, S.C., Celluzzi, C.M., Thompson, K., Falo, L.D., Jr. (1996): DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nature Med.*, **2**, 1122-1128.
- 11) Conry, R.M., Lobuglio, A.F., Kantor, J., Scholom, J., Loechel, F., Moore, S.E., Sumerel, L.A., Barlow, D.L., Abrams, S., Curiel, D.T. (1994): Immune-response to a carcinoembryonic antigen polynucleotide vaccine. *Cancer Res.*, **54**, 1164-1168.
- 12) Corr, M., Lee, D.J., Carson, D.A., Tighe, H. (1996): Gene vaccination with naked plasmid DNA: Mechanism of CTL priming. *J. Exp. Med.*, **184**, 1555-1560.
- 13) Dairaku, M., Tsuchie, H., Ushijima, H., Aoki, I., Okuda, K., Honda, M., Ikegami, N., Hachimori, K., Matsuda, J., Kitamura, T. (1989): Incidence and titer of anti-rev antibody in HIV infection. *AIDS*, **3**, 765-766.
- 14) Davis, H.L., McCluskie, M.J., Gerin, J.L., Purcell, R.H. (1996): DNA vaccine for hepatitis B—evidence for immunogenicity in chimpanzees and comparison with other vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 7213-7218.
- 15) Davis, H.L., Millan, C., Watkins, S.C. (1997): Immune-mediated destruction of transfected muscle fibers after direct gene transfer with antigen-expressing plasmid DNA. *Gene Ther.*, **4**, 181-188.
- 16) Donnelly, J.J., Friedman, A., Martinez, D., Montgomery, D.L., Shiver, J.W., Motzel, S.L., Ulmer, J.B., Liu, M.A. (1995): Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine: enhanced protection against antigenic drift in influenza virus. *Nature Med.*, **1**, 583-587.
- 17) Donnelly, J.J., Ulmer, J.B., Shiver, J.W., Liu, M.A. (1997): DNA VACCINES. *Ann. Rev. Immunol.*, **15**, 617-648.
- 18) Fox, B.S., Kantak, K.M., Edwards, M.A., Black, K.M., Bollinger, B.K., Botka, A.J., French, T.L., Thompson, T.L., Schad, V.C., Greenstein, J.L., Geffer, M.L., Exley, M.A., Swain, P.A., Briner, T.J. (1996): DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nature Med.*, **2**, 1122-1128.
- 19) Fynan, E.F., Webster, R.G., Fuller, D.H., Haynes, J.R., Santoro, J.C., Robinson, H.L. (1993): DNA vaccines—protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11478-11482.
- 20) Germain, R.N. (1986): The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature.*, **322**, 687-689.
- 21) Gilkeson, G.S., Ruiz, P., Pippen, A.M., Alexander, A.L., Lefkowitz, J.B., Pisetsky, D.S. (1996): Modulation of renal disease in autoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA. *J. Exp. Med.*, **183**, 1389-1397.
- 22) Gregoriadis, G., Saffie, R., de Souza, J.B. (1997): Liposome-mediated DNA vaccination. *FEBS Lett.*, **402**, 107-110.
- 23) Hamajima, K., Bukawa, H., Fukushima, J., Kawamoto, S., Kaneko, T., Sekigawa, K., Tanaka, S., Tsukuda, M., Okuda, K. (1995): A macromolecular multicomponent peptide vaccine prepared using the glutaraldehyde conjugation method with strong immunogenicity for HIV-1. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **77**, 374-379.
- 24) Hamajima, K., Fukushima, J., Bukawa, H., Kaneko, T., Tsuji, T., Asakura, Y., Sasaki, S., Xin, K.-Q., Okuda, K. (1997): Strong augment effect of IL-12 expression plasmid on the induction of HIV specific cytotoxic lymphocyte (CTL) activity by peptide vaccine candidate. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **83**, 179-184.
- 25) Hasset, D.E., Whitton, J.L. (1996): DNA immunization. *Trend Microbiol.*, **4**, 307-312.
- 26) Hawkins, R.E., Zhu, D.L., Ovecka, M., Winter, G., Hamblin, T.J., Long, A., Stevenson, F.K. (1994): Idiotypic vaccination against human B-cell lymphoma-rescue of variable region-sequences from biopsy material for assembly as single-chain Fv personal vaccines. *Blood*, **83**, 3279-3288.
- 27) Haynes, J.R., Fuller, D.H., Eisenbraun, M.D.,

- Ford, M.J., Pertmer, T.M. (1994): Accell particle-mediated DNA immunization elicits humoral, cytotoxic, and protective immune responses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **10** Suppl 2, S43-45.
- 28) Hinkula, J., Svanholm, C., Schwartz, S., Lundholm, P., Brytting, M., Engstrom, G., Benthin, R., Glaser, H., Sutter, G., Kohleisen, B., Erfle, V., Okuda, K., Wigzell, H., Wahren, B. (1997): Recognition of prominent viral epitopes induced by immunization with human immunodeficiency virus type 1 regulatory genes. *J. Virol.*, **71**, 5528-5535.
 - 29) Hoffman, S.L., Sedegah, M., Hedstrom, R.C. (1994): Protection against malaria by immunization with a *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein nucleic acid vaccine. *Vaccine*, **12**, 1529-1533.
 - 30) Hohlfeld, R., Engel, A.G. (1994): The immunobiology of muscle. *Immunol. Today*, **15**, 269-274.
 - 31) 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, V.J., Liu, M.A., Ulmer, J.B. (1996): Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nature Med.*, **2**, 893-898.
 - 32) Inami, S., Taniguchi, N., Ishibashi, K., Nagao, T., Aoki, I., Ishii, N., Okuda, K. (1991): Serum antibody directed against synthetic peptides derived from HIV-1 protein sequence obtained from 26 Japanese HIV-1-infected individuals. *AIDS*, **5**, 1140-1141.
 - 33) Ishii, N., Fukushima, J., Kaneko, T., Okada, E., Tani, K., Tanaka, S.-I., Hamajima, K., Xin, K.-Q., Kawamoto, S., Koff, W., Nishioka, K., Yasuda, T., Okuda, K. (1997): Cationic liposomes are a strong adjuvant of DNA vaccine for a human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **13**, 1421-1428.
 - 34) Iwasaki, A., Torres, C.A., Ohashi, P.S., Robinson, H.L., Barber, B.H. (1997): The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites. *J. Immunol.*, **159**, 11-14.
 - 35) Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A., Klinman, D.M. (1995): CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, **374**, 546-549.
 - 36) Kuklin, N., Daheshia, M., Karem, K., Manickan, E., Rouse, B.T. (1997): Induction of mucosal immunity against herpes simplex virus by plasmid DNA immunization. *J. Virol.*, **71**, 3138-3145.
 - 37) Lu, S., Arthos, J., Montefiori, D.C., Yasutomi, Y., Manson, K., Mustafa, F., Johnson, E., Santoro, J.C., Wissink, J., Mullins, J.I., Haynes, J.R., Letvin, N.L., Wyand, M., Robinson, H.L. (1996): Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *J. Virol.*, **70**, 3978-3991.
 - 38) Lu, S., Santoro, J.C., Fuller, D.H., Haynes, J.R., Robinson, H.L. (1995): Use of DNAs expressing HIV-1 Env and noninfectious HIV-1 particles to raise antibody responses in mice. *Virology*, **209**, 147-154.
 - 39) Manickan, E., Rouse, R.J., Yu, Z., Wire, W.S., Rouse, B.T. (1995): Genetic immunization against herpes simplex virus: Protection is mediated by CD4⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.*, **155**, 259-265.
 - 40) Maraskovsky, E., Chen, W.-F., Shortman, K. (1989): IL-2 and IFN- γ are two necessary lymphokines in the development of cytolytic T cells. *J. Immunol.*, **143**, 1210-1214.
 - 41) Mohri, H., Asakura, Y., Fukushima, J., Kawamoto, S., Okubo, T., and Okuda, K. (1997): Synthetic peptide from the V3 loop consensus motif with a potent anti-HIV activity inhibits ristocetin-mediated vWF-GPIb interaction. *Peptides*, **18**, 1289-1293.
 - 42) Mor, G., Singla, M., Steinberg, A.D., Hoffman, S.L., Okuda, K., Klinman, D.M. (1997): Do DNA vaccines induce autoimmune disease? *Hum. Gene Ther.*, **8**, 293-300.
 - 43) Mosmann, T.R., Coffman, R.L. (1989): Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokines secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.*, **7**, 145.
 - 44) Nichols, W.W., Ledwith, B.J., Manam, S.V., Troilo, P.J. (1995): Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann NY Acad. Sci.*, **772**, 30-39.
 - 45) Okada, E., Sasaki, S., Ishii, N., Aoki, I., Yasuda, T., Nishioka, K., Fukushima, J., Wahren, B., Okuda, K. (1997): Intranasal immunization of a DNA vaccine with interleukin 12 and granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) expressing plasmids in liposomes induce strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigen. *J. Immunol.*, **159**,

3638-3647.

- 46) Okuda, K., Bukawa, H., Hamajima, K., Kawamoto, S., Sekigawa, K., Yamada, Y., Tanaka, S., Ishi, N., Aoki, I., Nakamura, M., Yamamoto, H., Cullen, B.R., Fukushima, J. (1995): Induction of potent humoral and cell-mediated immune responses following direct injection of DNA encoding the HIV type 1 env and rev gene products. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **11**, 933-943.
- 47) Okuda, K., Bukawa, H., Kawamoto, S., Imai, M., Saito, T., Phanuphak, P., Hamajima, K. (1994): A serologic analysis and the amino acid sequence of the V3 region of human immunodeficiency virus from carriers in Bangkok. *J. Infect. Dis.*, **169**, 227-228.
- 48) Okuda, K., Kaneko, T., Yamakawa, T., Tanaka, S., Hamajima, K., Shigematsu, T., Yamamoto, A., Kawamoto, S. (1993): Strong synergistic effects of multicomponent vaccine for human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Lab. Immunol.*, **40**, 97-113.
- 49) Okuda, K., Kaneko, T., Yamakawa, T., Tanaka, S., Shigematsu, T., Yamamoto, A., Hamajima, K., Nakajima, K., Kawamoto, S., Phanuphak, P. (1993): Strong immunogenicity of a multicomponent peptide vaccine developed with the branched lysine oligopeptide method for human immunodeficiency virus infection. *J. Mol. Recognit.*, **6**, 101-109.
- 50) Okuda, K., Xin, K.-Q., Tsuji, T., Bukawa, H., Tanaka, S.-I., Koff, W.C., Tani, K., Okuda, K., Honma, K., Kawamoto, S., Hamajima, K., Fukushima, J. (1997): DNA vaccination followed by macromolecular multicomponent peptide vaccination against HIV-1 induces strong antigen-specific immunity. *Vaccine*, **15**, 1049-1056.
- 51) Pertmer, T.M., Roberts, T.R., Haynes, J.R. (1996): Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J. Virol.*, **70**, 6119-6125.
- 52) Powell, M.F., Newman, M.J. (1995). *Vaccine Design: The subunit and adjuvant approach*, vol. 6. Plenum Press, New York.
- 53) Robinson, H.L., Torres, C.A. (1997): DNA vaccines. *Seminars Immunol.*, **9**, 271-283.
- 54) Romagnani, S. (1994): Lymphokine production by human T cells in disease states. *Ann. Rev. Immunol.*, **12**, 227-257.
- 55) Roman, M., Martin-Orozco, E., Goodman, J. S., Nguyen, M.D., Sato, Y., Ronaghy, A., Kornbluth, R.S., Richman, D.D., Carson, D.A., Raz, E. (1997): Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nature Med.* **3**, 849-854.
- 56) Sasaki, S., Fukushima, J., Arai, H., Kusakabe, K., Hamajima, K., Ishii, N., Okuda, K., Wahren, B., Ruyschaert, J.-M., Vandenbranden, M., Kawamoto, S., Okuda, K. (1997): Human immunodeficiency virus type 1 specific immune responses induced by DNA vaccination are greatly enhanced by mannan-coated diC14-amidine. *Eur. J. Immunol.*, **27**, 3121-3129.
- 57) Sasaki, S., Hamajima, K., Fukushima, J., Ihata, A., Ishii, N., Gorai, I., Hirahara, H., Mohri, H., Okuda, K. (1998): Comparison of intranasal and intramuscular immunization against human immunodeficiency virus type 1 with a DNA-monophosphoryl lipid A adjuvant vaccine. *Infect. Immun.*, **66**, 823-826.
- 58) Sasaki, S., Hamajima, K., Fukushima, J., Tsuji, T., Xin, K.-Q., Ishii, N., Mohri, H., Okuda, K. (1998): Adjuvant effect of ubenimex on the responses induced by DNA vaccine for human immunodeficiency virus type-1. *Clin. Exp. Immunol.*, **111**, 30-35.
- 59) Sasaki, S., Sumino, K., Hamajima, K., Fukushima, J., Ishii, N., Kawamoto, S., Mohri, H., Kensil, C.R., Okuda, K. (1998): Induction of systemic and mucosal immune responses to human immunodeficiency virus type 1 by a DNA vaccine formulated with QS-21 saponin adjuvant via intramuscular and intranasal routes. *J. Virol.*, **72**, (in press).
- 60) Sasaki, S., Tsuji, T., Hamajima, K., Fukushima, J., Ishii, N., Kaneko, T., Xin, K.-Q., Mohri, H., Aoki, I., Okubo, T., Nishioka, K., Okuda, K. (1997): Monophosphoryl lipid A enhances both humoral and cell-mediated immune responses to DNA vaccination against human immunodeficiency virus type 1. *Infect. Immun.*, **65**, 3520-3528.
- 61) Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M.D., Silverman, G.J., Lotz, M., Carson, D.A., Raz, E. (1996): Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science*, **273**, 352-354.
- 62) Scott, P. (1993): IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science*, **260**, 496-497.

- 63) Sedegah, M., Hedstrom, R., Hobart, P., Hoffman, S.L. (1994): Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 9866-9870.
- 64) Tanabe, S., Heesen, M., Yoshizawa, I., Berman, M.A., Luo, Y., Bleul, C.C., Springer, T.A., Okuda, K., Gerard, N., Dorf, M.E. (1997): Functional expression of the CXCR-4 chemokine receptor-4/fusin on mouse microglial cells and astrocytes. *J. Immunol.*, **159**, 905-911.
- 65) Temin, H.M. (1990): Overview of biological effects of addition of DNA molecules to cells. *J. Med. Virol.*, **31**, 13-17.
- 66) Toda, S., Ishii, N., Okada, E., Kusakabe, K.-I., Arai, H., Hamajima, K., Gorai, I., Nishioka, K., Okuda, K. (1997): HIV-1 specific cell-mediated immune responses induced by DNA vaccination are enhanced by mannan-coated liposomes and inhibited by anti-interferon (IFN)- γ antibody. *Immunology*, **92**, 111-117.
- 67) Torres, C.A., Iwasaki, A., Barber, B.H., Robinson, H.L. (1997): Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunization. *J. Immunol.*, **158**, 4529-4532.
- 68) Tsuji, T., Fukushima, J., Hamajima, K., Ishii, N., Aoki, I., Xin, K.-Q., Bukawa, H., Ishigatsubo, Y., Tani, K., Okubo, T., Dorf, M.E., Okuda, K. (1997): HIV-1-specific cell-mediated immunity is enhanced by co-inoculation of TCA3 expression plasmid with DNA vaccine. *Immunology*, **90**, 1-6.
- 69) Tsuji, T., Hamajima, K., Fukushima, J., Xin, K.-Q., Ishii, N., Aoki, I., Ishigatsubo, Y., Tani, K., Kawamoto, S., Nitta, Y., Miyazaki, J., Koff, W.C., Okubo, T., Okuda, K. (1997): Enhancement of cell-mediated immunity against HIV-1 induced by coinoculation of plasmid-encoded HIV-1 antigen with plasmid expressing IL-12. *J. Immunol.*, **158**, 4008-4014.
- 70) Tsuji, T., Hamajima, K., Ishii, N., Aoki, I., Fukushima, J., Xin, K.-Q., Kawamoto, S., Sasaki, S., Matsunaga, K., Ishigatsubo, Y., Tani, K., Okubo, T., Okuda, K. (1997): Immunomodulatory effects of a plasmid expressing B7-2 on human immunodeficiency virus-1-specific cell-mediated immunity induced by a plasmid encoding the viral antigen. *Eur. J. Immunol.*, **27**, 782-787.
- 71) Ubolyam, S., Ruxrungtham, K., Sirivichayakul, S., Okuda, K., Phanuphak, P. (1994): Evidence of three HIV-1 subtypes in subgroups of individuals in Thailand. *Lancet.*, **344**, 485-486.
- 72) Ulmer, J.B., Deck, R.R., Dewitt, C.M., Donnelly, J.J., Liu, M.A. (1996): Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology*, **89**, 59-67.
- 73) Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dworki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A., Hawe, L.A., Leander, K.R., Martinez, D., Perry, H.C., Shiver, J.W., Montgomery, D.L., Liu, M.A. (1993): Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, **259**, 1745-1749.
- 74) Wahren, B., Brytting, M.M., Engstrom, G. (1996): Immune response to the HIV rev regulatory gene, p. 105-112. In Giraldo, G., Bolognesi, D.P., Salvatore, M., Beth-Giraldo, E. (ed.), *Development and applications of vaccines and gene therapy in AIDS*, vol. 48. Basel, Karger Press.
- 75) Wang, B., Ugen, K.E., Srikantan, V., Agadjanyan, M.G., Dang, K., Rafaei, Y., Sato, A.I., Boyer, J., Williams, W.V., Weiner, D.B. (1993): Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 4156-4160.
- 76) Whalen, R.G., Leclerc, C., Deriaud, E., Schirmbeck, R., Reinmann, J., Davis, H.L. (1995): DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen—Activation and entrainment of the immune response—. *Ann NY Acad. Sci.* **772**, 64-76.
- 77) Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., Felgner, P.L. (1990): Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, **247**, 1465-1468.
- 78) Xiang, Z.Q., Ertl, H.C.J. (1995): Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity*, **2**, 129-135.
- 79) Xiang, Z.Q., Spitalnik, S.L., Cheng, J., Erikson, J., Wojczyk, B., Ertl, H.C.J. (1995): Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus. *Virology*, **209**, 569-579.
- 80) Xin, K.-Q., Ma, X.H., Crandall, K.A., Bukawa, H., Ishigatsubo, Y., Kawamoto, S., Okuda, K. (1995): Dual infection with HIV-1 Thai subtype B and E. *Lancet.*, **346**, 1372-1373.
- 81) Xin, K.-Q., Shapshak, P., Kawamoto, S., Nagano, I., McCoy, C.B., Okuda, K. (1995): Highly

- divergent env sequences of HIV-1 B subtype with two novel V3 loop motifs detected in an AIDS patient in Miami, Florida. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **11**, 1139–1141.
- 82) Xu, D., Liew, F.Y. (1995): Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology.*, **84**, 173–176.
- 83) Yang, W., Waine, G.J., McManus, D.P. (1995): Antibodies to *Schistosoma japonicum* (asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**, 1029–1039.