專　欄

DOI: 10.6526/ICJ.202104_31(2).0005

# 重組結核病疫苗藉由活化 M1 巨噬細胞的活性增強抗分枝桿菌的免疫力

楊秀菊　葉昶慶　杜鴻運

國家衛生研究院　感染症與疫苗研究所

## 前　言

結核病是一種目前仍普遍存在於全世界，由結核分枝桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 感染所造成的傳染病，目前可將結核分枝桿菌分為北京株及非北京株，北京株流傳於全球，致病力較強且較易突變成具有抗藥性；非北京株則反之[1]。結核病是全球十大死亡原因之一，主要以影響肺部為主。自 2007 年超越 HIV/AIDS 後成為單一傳染病導致的主要死亡原因[2]，也是台灣法定傳染病中每年確定數及死亡數最多的傳染病[3]。2019 年，全球估計有 1,000 萬人患有結核病，且有 140 萬人死於肺結核。從地理分佈看，大多數結核病病例發生在東南亞 (44%)，非洲 (25%) 和西太平洋 (18%)，這些地區佔全球總數的八成以上[2]。因此，減少結核病發病率和減少結核病死亡人數為世界衛生組織「終結結核病戰略」的目標。目前預防結核病的方法為注射卡介苗 (Bacillus Calmette-Guerin, BCG)，BCG 疫苗是由減毒活牛結核分枝桿菌 (*Mycobacterium bovis*) 製備而成。在兒童時期接種時，可提供約 15 年的保護期，但這種免疫力在成年後會逐漸減弱；目前北京菌株是許多成人感染結核病的主因，顯示 BCG 疫苗不再能抵抗新出現的北京菌株[1]。且卡介苗的保護效果差異很大，從 0 到 88% [4-6]；此外，廣泛應用 BCG 疫苗數十年的國家，如印度和中國，結核病的盛行率並沒有因為 BCG 疫苗的使用而下降[2]。基於這些流行病學證據，BCG 疫苗似乎隨著時間的流逝失去了保護作用。因此目前迫切需要開發新型疫苗預防結核病。

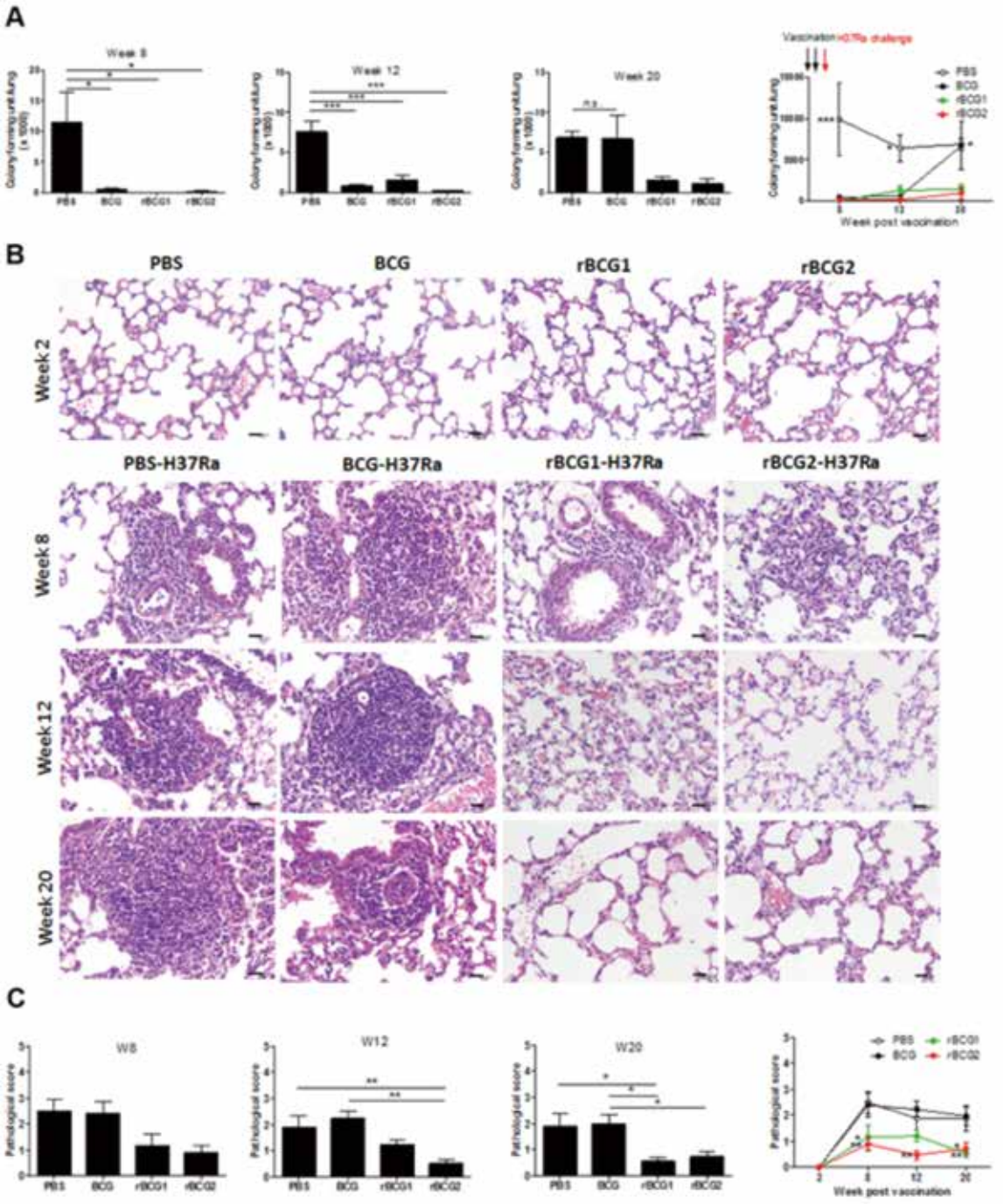
本研究中，以重組蛋白 (Recombinant protein) 技術改良 BCG 疫苗 (rBCG) 加入可誘發 T 細胞反應的結核桿菌蛋白 Ag85B (Antigen 85 complex B, Ag85B) 與 CFP-10 (Culture filtrate protein 10, CFP-10) 蛋白製成 rBCG1 和包含前兩者並加上人類介白素-12 (Interleukin-12, IL-12) 作為加強免疫反應製成 rBCG2；並同時與 BCG 疫苗給予小鼠接種後，感染結核菌 H37Ra 菌株。再評估三種疫苗與不給與疫苗組別的個別功效。本研究評估的功效包括免疫細胞的反應、細胞激素釋放的狀態以及對結核菌的長期保護。

## rBCG1 和 rBCG2 疫苗可保護小鼠抵抗結核分枝桿菌 H37Ra 菌株

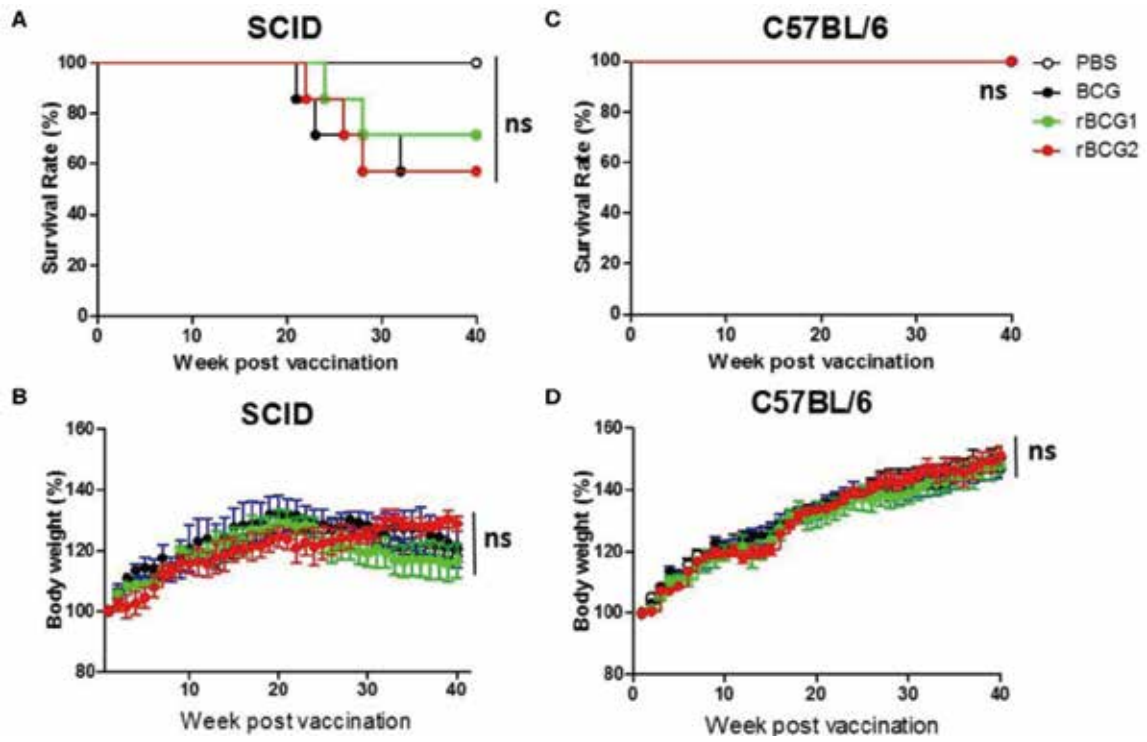
這項調查中我們於第 0 週和第 2 週給予小鼠皮下接種 BCG、rBCG1 和 rBCG2 疫苗，於第 4 週以靜脈注射感染結核菌 H37Ra。分別在第 2、8、12、20 週犧牲小鼠，採血，取出臟器做試驗評估疫苗的保護力。在疫苗接種第 2 週 (結核菌 H37Ra 感染前)，肺部無免疫細胞浸潤跡象 (圖一 B 和 C)。在疫苗接種後第 8 週，結核菌量生長測試顯示 PBS (Phosphate buffered saline) 對照組和接種 BCG、rBCG1 和 rBCG2 疫苗的組別相比，肺臟中有較高的結核菌量 (圖一A)，且在第 12 週時，PBS 對照中的結核菌量仍很高 (圖一A)；肺臟病理切片顯示 PBS 對照組的肺臟發炎比疫苗接種組更嚴重 (圖一B 和 C)。雖在 12 週時 BCG、rBCG1 和 rBCG2 組中細菌量較低 (圖一A)，但是 12 週的肺臟病理結果顯示 PBS 和 BCG 組別的細胞浸潤病變還很明顯，而 rBCG1 和 rBCG2 組的病變則幾乎快消失了 (圖一B 和 C)。特別是在 20 週肺臟結核菌生長的菌落數量上，BCG 疫苗和 PBS 控制組相差無異，而 rBCG1 和 rBCG2 仍抑制結核菌生長 (圖一 A)；同時在 20 週肺臟病理結果顯示給予 rBCG1 和 rBCG2 疫苗的小鼠肺臟淋巴細胞浸潤與給予 BCG 相比顯著減少 (圖一B 和 C)。因此，這些結果顯示 rBCG1 和 rBCG2 疫苗可在早期保護小鼠避免結核菌感染擴大。

## rBCG1 和 rBCG2 疫苗在 SCID 小鼠以及 C57BL/6 野生型小鼠中都是安全的

此外研究團隊測試 rBCG1 和 rBCG2 疫苗的安全性，於免疫缺陷 (Severe combined immunodeficiency, SCID) 和 C57BL/6 野生型小鼠在第 0 周和第 2 週皮下注射了相同劑量的 BCG 和 rBCG 疫苗。每週記錄一次小鼠體重，直到第 40 週或更早的人道終點為止。SCID 和野生型小鼠接種疫苗後均未顯示任何不利的體徵。兩組的體重每週略有增加，但兩組之間的差異並不顯著 (圖二B 和 D)。從第 21 週開始，基於人道原因將




**圖一　重組 BCG 疫苗 rBCG1 和 rBCG2 對小鼠感染結核菌 H37Ra 的保護作用**
**在 8, 12 和 2 0週 H37Ra 細菌於 PBS, BCG, rBCG1 和 rBCG2 各組小鼠肺臟中的 (A) 細菌量 (B) 和肺臟的病理切片 (C) 以及病理判讀分數。*：p 值 < 0.05；**：p 值 < 0.01；***：p 值 < 0.001。**




**圖二　在免疫缺陷和免疫健全的小鼠中測試 rBCG 疫苗的安全性**
**於第 0 週和第 2 週在小鼠皮下注射 PBS, BCG, rBCG1 和 rBCG2 後觀測 40 週 (A) 免疫缺陷小鼠的生存率，(B) 體重變化和 (C) 免疫建全小鼠的生存率，(D) 體重變化。ns：統計不顯著。**

BCG、rBCG1 和 rBCG2 組中的各一隻 SCID 小鼠實施安樂死，但 PBS 組 (圖二A) 或任何野生型小鼠 (圖二C) 均無死亡。顯示即使在免疫缺陷的個體中，rBCG1 和 rBCG2 疫苗也是安全的。

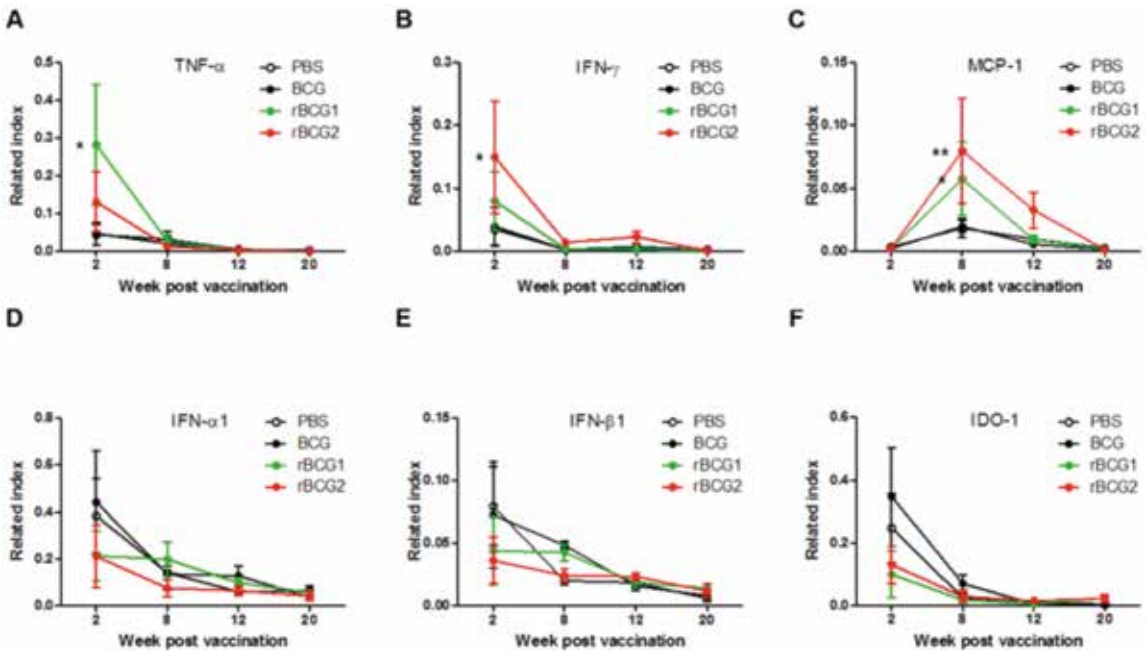
## BCG、rBCG1 和 rBCG2 疫苗接種後，能增加小鼠肺臟中 Th1 細胞激素的 mRNA 表達

接下來，我們使用定量 PCR (Quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 檢查肺中細胞激素的表達，以確定 rBCG 疫苗是否會刺激輔助 T 細胞 Th (T helper cells, Th) 1 的細胞激素產生。在 H37Ra 感染前後，於第 2、8、12 和 20 週，從 PBS 對照組和疫苗接種組的肺臟中抽取 RNA (Ribonucleic acid, RNA)，並進行 qPCR 去檢測肺組織中細胞激素的基因表達。與 PBS 對照組相比，BCG、rBCG1 和 rBCG2 組別的 TNF-$\alpha$ (Tumor necrosis factor-alpha, TNF-$\alpha$)、IFN-$\gamma$ (Interferon-gamma, IFN-$\gamma$) (第 2 周) 和 MCP-

1 (Monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) (第 8 週) 均升高 (圖三 A~C)，這些細胞激素是 Th1 誘導的免疫反應。在第 12 周和第 20 週，所有組別的 TNF-α、IFN-γ和 MCP-1 均降低 (圖三A~C)。推測這現象反應了結核菌清除後，Th-1 的細胞激素停止產生並且恢復到正常的水平。相較之下在第 2~8 週時，與 rBCG1 和 rBCG2 組別相比，PBS 和 BCG 組別中感染的免疫細胞表現的 IFN-α1，IFN-β1 和 IDO-1 (Indoleamine 2, 3-dioxygenase 1, IDO-1) 的量更高 (圖三D~F)。而細胞激素 IL-1β，IL-4，IL-6，IL-10，IL-12，IL-17 和 IDO-2 在所有組別中均未改變或無法檢測到 (數據未顯示)。這些結果顯示，rBCG1 和 rBCG2 可以在早期誘導宿主 Th1免疫反應，以清除結核菌。

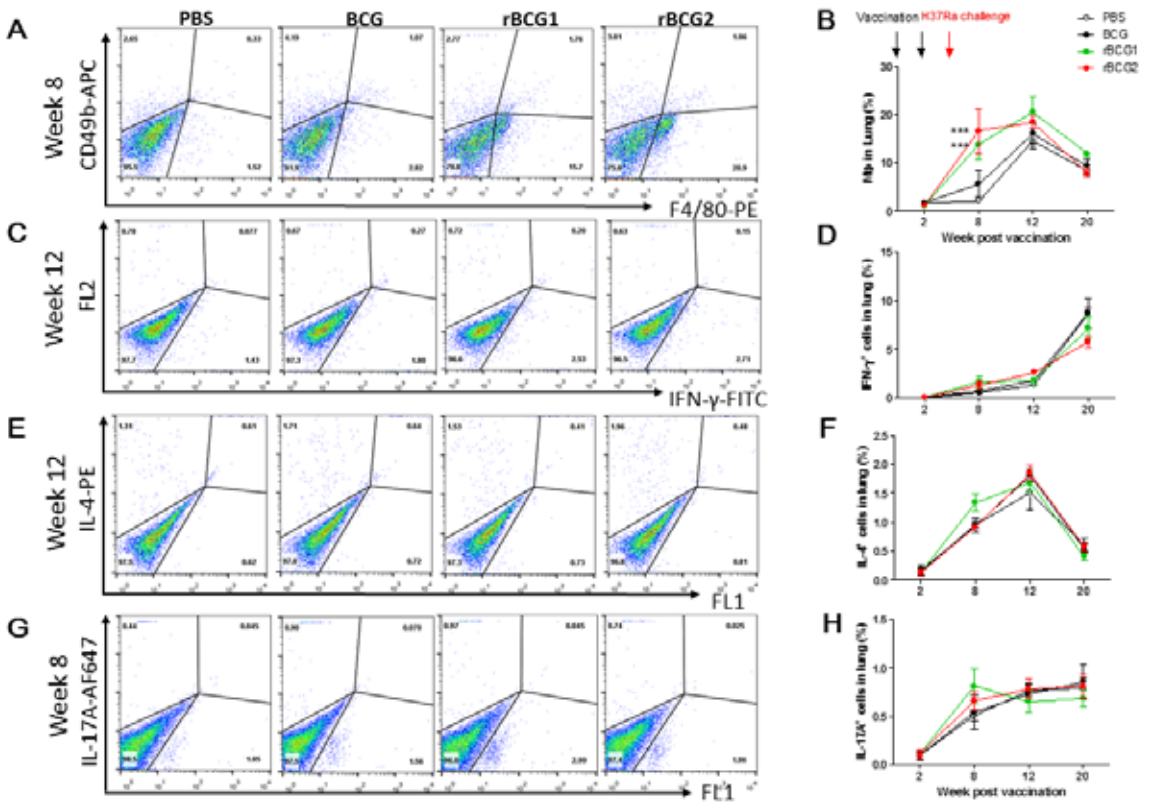
## BCG、rBCG1 和 rBCG2 疫苗接種後，巨噬細胞、Th1 細胞和 Th17 細胞為主要的免疫細胞

為了瞭解疫苗接種對於細胞免疫的影響，使用流式細胞儀 (Fluorescence-activated cell sorting, FACS) 去分析小鼠肺臟組織中的免疫細胞族群。在 H37Ra 感染前後，於第 2、8、12 和 20 週，從小鼠肺臟中




**圖三　接種 rBCG1 或 rBCG2 疫苗後在小鼠肺中表達的 Th1 細胞激素狀態**
**C57BL/6 小鼠在第 0 和 2 週接種 PBS, BCG, rBCG1 和 rBCG2 疫苗，於第 4 週感染 H37Ra。分別在第 2, 8, 12 和 20 週犧牲小鼠取其肺臟抽取 RNA，用 qPCR 分析 (A) TNF-α, (B) IFN-γ, (C) MCP-1, (D) IFN-α1, (E) IFN-β1, 和 (F) IDO-1 細胞激素表達量。*：p 值 < 0.05；**：p 值 < 0.01。**

分離出細胞。在進行細胞表面標記和細胞內染色後，以 FACS 分析免疫細胞群。結果發現在第 2 週，所有免疫細胞數量都非常低，四組之間沒有差異 (圖四B，D，F，H)。但在第 8 週 (即 H37Ra 感染後 4 週)，與 PBS 對照和 BCG 組相比，rBCG1 和 rBCG2 組別的巨噬細胞數量 (F4/80+ 細胞) 卻顯著增加 (圖四A 和 B)。而在 2 週時，所有組別中都有少許自然殺手 (Nature killer cells, NK) 細胞 (CD49b+ 細胞) 和常駐巨噬細胞 (數據未顯示)。雖在所有 BCG 疫苗接種組中發現 IFN-γ+T 細胞 (圖四C 和 D) 和 IL-17A+T 細胞 (圖四G 和 H) 的持續增加 (但 IL-4+T 細胞則沒有持續上升，圖四E 和 F)，而在第 8~12 週時 rBCG1 和 rBCG2 組別中，IFN-γ+T



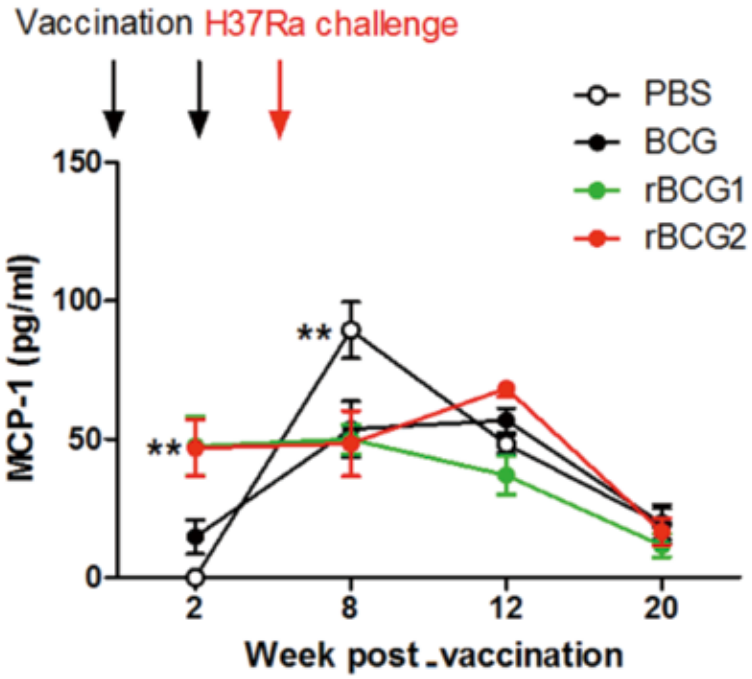

圖四　接種 BCG、rBCG1 或 rBCG2 疫苗的小鼠感染結核菌產生的先天和後天免疫細胞族群分析

C57BL/6 小鼠在第 0 和 2 週接種 PBS, BCG, rBCG1 和 rBCG2 疫苗，於第 4 週感染 H37Ra。分別在第 2, 8, 12 和 20 週犧牲小鼠取其肺臟均質分離成單顆細胞，用 FACS 分析免疫細胞族群。(A) 8 週時各組小鼠肺臟中 CD49b+ 和 F4/80+ 的免疫細胞，(B) 量化各組小鼠在第 2, 8, 12 和 20 週肺臟中 F4/80+ 的巨噬細胞，(C) 12 週各組小鼠肺臟中 IFN-γ+ 的免疫細胞和 (D) 2~20 週的趨勢變化，(E) 12 週各組小鼠肺臟中 IL-4+ 的免疫細胞和 (F) 2~20 週的趨勢變化；(G) 8 週各組小鼠肺臟中 IL-17A+ 的免疫細胞和 (H) 2~20 週的趨勢變化。***：p 值 < 0.001。

細胞和 IL-17A+T 細胞有略多一點的趨勢。因此這些結果顯示與 BCG 相比，接種 rBCG1 和 rBCG2 疫苗的小鼠所誘導的細胞免疫更高。

## 在 rBCG1 和 rBCG2 疫苗接種後，MCP-1 是血清中主要產生的細胞激素

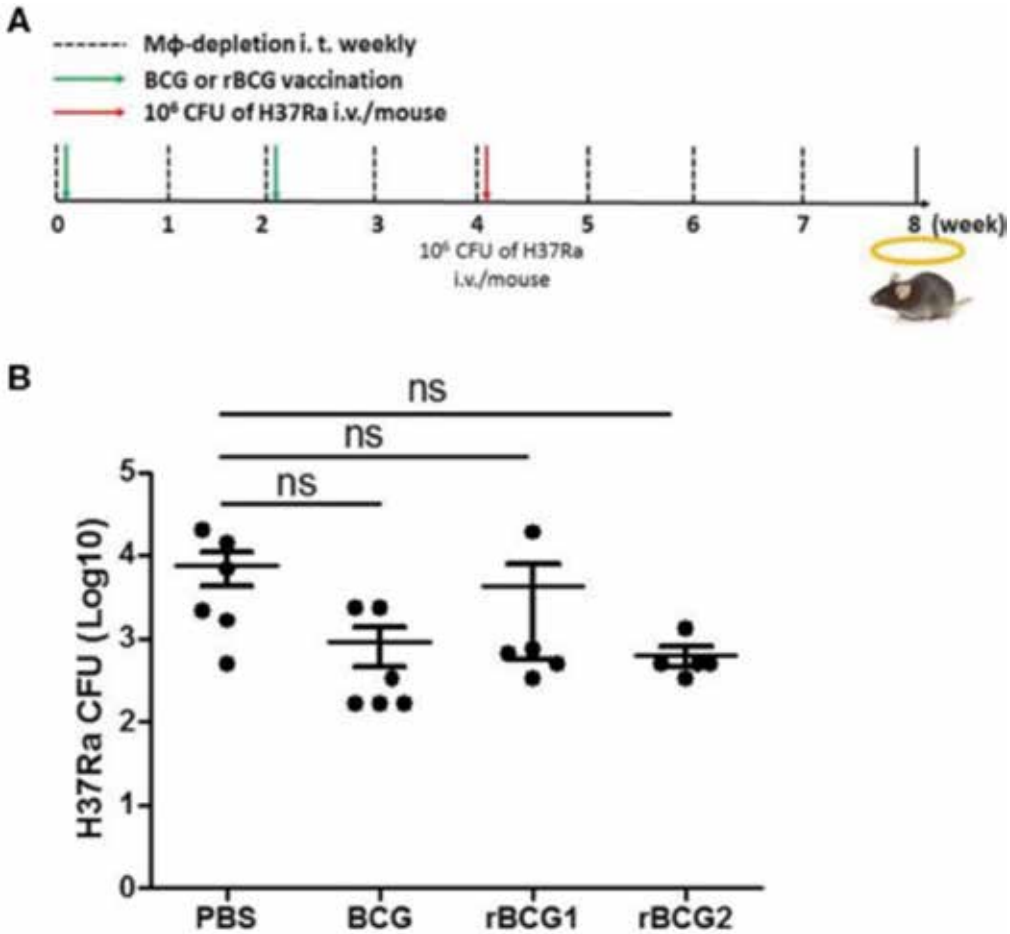
使用多種細胞激素檢測試劑組 (multiple cytokine inflammation kit, BD Biosciences) 去測量血清和組織 (肺和脾臟) 的發炎性細胞激素產量。測量的細胞激素包括 TNF-$\alpha$，IFN-$\gamma$，IL-6，IL-10，IL-12 和 MCP-1。在組織培養上清液中並未測得細胞激素 (數據未顯示)，因為它們低於檢測極限。但有趣的是，在血清檢體中 MCP-1 是唯一檢測到的細胞激素。並且在第 2 週和第 8 週，接種 rBCG1 和 rBCG2 疫苗的小鼠血清中，MCP-1 就已開始升高 (圖五)。雖 PBS 對照組和 BCG 組別的 MCP-1 從第 8 週也開始增加並持續到第 12 週 (在第 20 週所有組別均下降)，但在第 2~8 週 rBCG1 和 rBCG2 組別中的 MCP-1 升高與肺部結核菌減少 (圖一A) 和巨噬細胞數量增加 (圖四A 和 B) 同時發生。此結果也反應 rBCG1 與 rBCG2 能在感染初期控制肺部結核菌數量可能和巨噬細胞有關。




**圖五　在接種重組 BCG 疫苗初期，能增加血清中的 MCP-1 濃度**
**C57BL/6 小鼠在第 0 和 2 週接種 PBS, BCG, rBCG1 和 rBCG2 疫苗，於第 4 週感染 H37Ra。在第 2, 8, 12 和 20 週小鼠血清中 MCP-1 的濃度變化。**：p 值 < 0.01。**

## 巨噬細胞是結核菌感染初期參與免疫反應的關鍵細胞

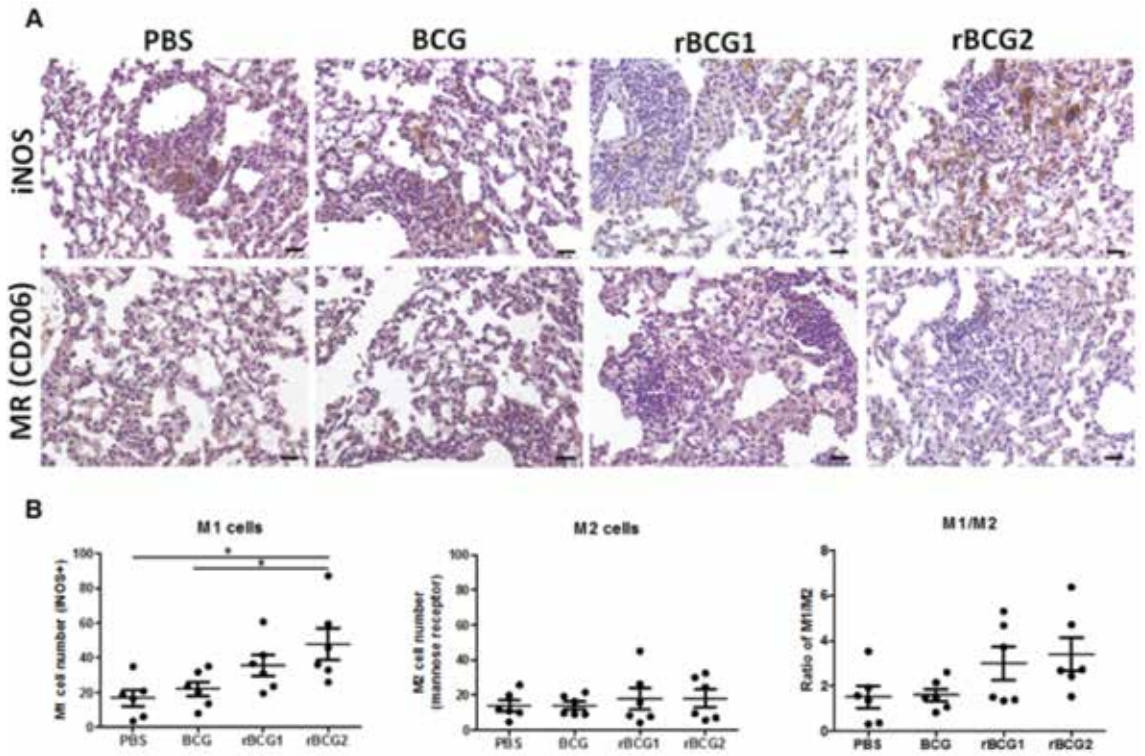
根據 rBCG1 和 rBCG2 疫苗接種後，肺部 Th1 的細胞激素上升 (圖三 A~C) 和血清中 MCP-1 的增加 (圖五) 以及肺臟內巨噬細胞數量變多 (圖四 A 和 B)，推測巨噬細胞功能顯然對結核菌感染的免疫反應至關重要，為了評估巨噬細胞在感染早期的作用。研究團隊在疫苗接種和結核菌感染前後，每週從氣管給予脂質體載運的氯膦酸鹽 (clodronate) 來剔除肺部巨噬細胞 (圖六A)。8 週後，計算各組之間的細菌量。結果每個疫苗接種組的細菌量與 PBS 組相比無顯著差異 (圖六B)。此結果顯示巨噬細胞是早期參與免疫反應針對結核菌感染的主要保護細胞。巨噬細胞消耗後，它們不再受到疫苗的保護。




**圖六　巨噬細胞對於預防結核菌感染扮演重要角色**
**C57BL/6 小鼠在第 0 和 2 週接種 PBS, BCG, rBCG1 和 rBCG2 疫苗，於第 4 週感染 H37Ra。每週從氣管給予 clodronate 剔除肺部巨噬細胞，8 週後犧牲小鼠取其肺臟均質液培養，觀察各組 H37Ra 細菌量。ns：統計不顯著。**

## 接種 rBCG1 和 rBCG2 疫苗能增加小鼠肺臟中的巨噬細胞分化為殺菌力強的M1表現型

因巨噬細胞能適應疾病微環境並分化成不同的功能的表現型。例如，M1 巨噬細胞可表現較高的發炎激素，並有強大的殺菌能力。相反，M2 巨噬細胞參與寄生蟲的清除，組織重塑和免疫調節[7]。所以推測 rBCG1 和 rBCG2 增強了 M1 巨噬細胞清除病菌的能力。研究團隊以免疫組織染色，分別染誘導型一氧化氮合成酶 (Inducible nitric oxide synthase, iNOS，M1 巨噬細胞標誌物) 和甘露糖受體 (Mannose receptor, MR，M2 巨噬細胞標誌物) 於第 8 週的肺臟切片去比較各組中 M1 與 M2 巨噬細胞的數量，因為此時間點肺臟含有最多的巨噬細胞數和在血清中的 MCP-1 產量最高。結果顯示在 rBCG1 和 rBCG2 組別中，iNOS 的表現升高 (圖七A 和 B)。MR 在所有組別的表達均相似 (圖七A 和 B)。這些結果顯示在所測試的疫苗中，rBCG2 誘導的 M1 巨噬細胞數量增加最多，以清除肺部細菌進而在病程後期減低嚴重免疫反應造成的肺臟損傷。




**圖七　接種rBCG1或rBCG2的小鼠肺臟切片中分化為M1巨噬細胞的數量增加**
**C57BL/6小鼠在第0和2週接種PBS, BCG, rBCG1和rBCG2疫苗，於第4週感染H37Ra。8週時犧牲各組小鼠取其肺臟做免疫組織染色，分別染(A)iNOS和MR (CD206)，(B)量化肺臟免疫組織染色M1 (iNOS)，M2 (MR)細胞數量和M1/M2的比值。*：p值<0.05。**

## 討　論

Ag85B 和 CFP-10 是研究透徹的結核菌抗原，可強烈誘導宿主產生 IFN-γ 並增強 T 細胞增殖[8]。兩種蛋白質均被認為是結核病的良好候選疫苗。值得注意的是，IL-12 在誘導細胞免疫上扮演重要角色，可透過活化 T 細胞和 NK 細胞進而對抗感染。最近的研究發現，IL-12 可以在細胞內感染期間有效活化巨噬細胞，這種活化作用主要是透過其對巨噬細胞 IFN-γ 釋放的影響所導致的[9]。因此，本研究以結核分枝桿菌特異性抗原 Ag85B 和 CFP-10 與人類 IL-12 結合並建構了 rBCG2 疫苗。在之前的研究中，透過使用 *ex vivo* (離體) 方式，將疫苗接種後的小鼠脾臟細胞與小鼠骨髓衍生的巨噬細胞共同培養以測量結核菌的存活能力，來測試保護效果[10]。結果顯示與 BCG 相比，rBCG2 疫苗對於結核菌感染提供更好的免疫反應[10]。在本研究中，接種 rBCG1 和 rBCG2 疫苗後小鼠肺組織中 TNF-α、IFN-γ 和 MCP-1 的 mRNA 表現上升並且增加肺臟中巨噬細胞、IFN-γ+細胞和 IL-17+ 細胞的數量，進一步支持了這兩種候選疫苗的免疫保護力。當感染發生時，因應感染產生的 MCP-1 可將單核細胞，樹突細胞和 T 細胞聚集到引起發炎的感染部位。很重要的是，在疫苗接種初期 MCP-1 是 rBCG1 和 rBCG2 在小鼠血清中唯一可檢測到的細胞激素。儘管在 8 週時 PBS 對照組中 MCP-1 的表達也增加，但這是在自然感染過程中是可以預期的現象。這些結果也與我們發現 rBCG1 和 rBCG2 疫苗接種後肺組織巨噬細胞增加的發現吻合。因此，與 BCG 疫苗相比，接種 rBCG1 和 rBCG2 疫苗後主要能在病程早期藉由增加宿主巨噬細胞控制結核菌感染，並快速降低肺臟中免疫細胞浸潤的病變。此外，以 clodronate 來剔除肺泡巨噬細胞後，所有疫苗接種組肺臟的結核菌生長量顯著增加，這證明了巨噬細胞在結核菌感染早期的保護作用很重要。此外，與 PBS 對照組和 BCG 組相比，在 rBCG1 和 rBCG2 組別中還發現了更多殺菌力強的 M1 巨噬細胞。這個發現支持我們的論點，即先天免疫對結核菌感染初期扮演著比以往認為更重要的作用。但仍需 M1 巨噬細胞功能性實驗進一步證明其作用。最近的研究發現，免疫記憶不再是後天免疫特有的現象，先天免疫的細胞在感染或接種疫苗後可表現出長期的免疫活化作用，稱為「訓練免疫」(trained immunity)。在疫苗產生的免疫作用中，受過訓練的免疫 (尤其是涉及巨噬細胞的免疫) 可能比後天免疫的 T 細胞發揮更重要的作用[11-13]，可為疫苗開發創造新的前景。若能同時活化先天免疫和後天免疫則可提供更好且長期的保護力。

值得注意的是，這項研究顯示我們的 rBCG 疫苗在 SCID 小鼠中也是安全的，還能在免疫健全的小鼠中增加分化成 M1 表現型的巨噬細胞數

量。為了進一步驗證疫苗的有效性，之後應進一步用毒性較強的結核菌株 (例如：普遍流行的北京株) 建立動物模型，結合保護力試驗加以驗證。總而言之，我們的結果表明，rBCG1 和 rBCG2 可能是預防結核病的良好候選疫苗。

## 結　語

在本研究中，在感染初期階段 (第 8~12 週)，所有三種測試疫苗 (BCG，rBCG1 和 rBCG2) 均抑制結核菌 H37Ra 的生長。但是在第 20 週時，BCG 組別的細菌量反彈並增加。相反地，rBCG1 和 rBCG2 組別中的細菌量仍然很低。如果將小鼠年齡轉換為人類年齡，本研究中的 BCG 疫苗保護期 (鼠齡 20 週) 將相當於 15~20 年；這一發現與先前對人類接種卡介苗的流行病學研究一致[4]。因此，本研究調查結果顯示與 BCG 相比，rBCG1 和 rBCG2 可以針對結核病提供更有效和更長的保護力。

## 參考文獻


1. Yang SJ, Chen YY, Hsu CH, et al: Activation of M1 macrophages in response to recombinant TB vaccines with enhanced antimycobacterial activity. Front Immunol 2020;11:1298-309.
2. 世界衛生組織 (2020，10 月 14 日)。Global tuberculosis report 2020。世界衛生組織網路。摘自 https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/。
3. 衛生福利部疾病管制署 (2019，12 月 31 日)。台灣結核病防治年報 2018。衛生福利部疾病管制署網站。摘至 https://www.cdc.gov.tw/InfectionReport/Info/uKmf00HvSmkNaX9lNY-raQ?infoId=OGFfElHCFaaPSKME03dAzA.
4. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, et al: Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. JAMA 1994;271:698-702.
5. Fine PE: Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. Lancet 1995;346:1339-45.
6. Brewer TF: Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature. Clin Infect Dis 2000;31:S64-7.
7. Martinez FO, Gordon S: The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime Rep 2014;6:13.
8. Arend SM, Andersen P, van Meijgaarden KE, et al: Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. J Infect Dis 2000;181:1850-4.
9. Xing Z, Zganiacz A, Santosuosso M: Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction. J Leukoc Biol 2000;68:897-902.
10. Chen YY, Lin CW, Huang WF, et al: Recombinant bacille Calmette-Guerin coexpressing Ag85b, CFP10, and interleukin-12 elicits effective protection against *Mycobacterium tuberculosis*. J Microbiol Immunol Infect 2017;50:90-6.
11. Kaufmann E, Sanz J, Dunn JL, et al: BCG educates hematopoietic stem cells to generate protective innate immunity against tuberculosis. Cell 2018;172:176-90.
12. Cheng SC, Quintin J, Cramer RA, et al: mTOR- and HIF-1alpha-mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. Science 2014;345:1250684.
13. Yoshida K, Maekawa T, Zhu Y, et al: The transcription factor ATF7 mediates lipopolysaccharide-induced epigenetic changes in macrophages involved in innate immunological memory. Nat Immunol 2015;16:1034-43.