

(Ag85A + Ag85B + MPB51) リコンビナント BCG は BCG よりも強力なワクチンであることを静脈感染の系および気道感染の系で明らかにした⁶⁾⁷⁾⁹⁾。さらに最近、サブユニットワクチンでサルレベルで強力な予防効果が得られた Mtb72f 融合タンパク質の DNA を導入した 72f リコンビナント BCG の作製に成功した。この 72f rBCG は BA51 rBCG と同程度の極めて強力な結核菌に特異的な IFN γ 産生 T 細胞数の増加を誘導することを Elispot Assay で明らかにした。

3. サブユニットワクチン

Mtb72f 融合タンパク質 (Mtb39 と Mtb32 の融合タンパク質) のサブユニットワクチンはマウス、モルモットの系で結核予防ワクチン効果を示した¹⁰⁾。我々はヒトの *in vitro* 系でも Mtb72f 融合タンパク質を用いて免疫応答が増強することを示した (Reed 博士らとの共同研究)。さらに多剤耐性結核患者の T 細胞免疫能をも増強した⁶⁾ (表 4)。

4. 遺伝子ノックアウト弱毒化菌体を用いた結核ワクチン

ある結核菌遺伝子を欠失させて弱毒化した結核菌をワクチンにする方法がある。我々は (浜松医大 小出教授と) さらに、*akt* 遺伝子を欠失させた無毒化リステリア菌に Ag85A-, 85B-, MPB51-DNA を導入し新しい結核ワクチンを開発した。このワクチンは経口ワクチンとして応用できる利点がある¹⁹⁾。

新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され WHO STOP TB Partnership および WHO STOP TB VACCINE GROUP MEETING メンバーに選出された。

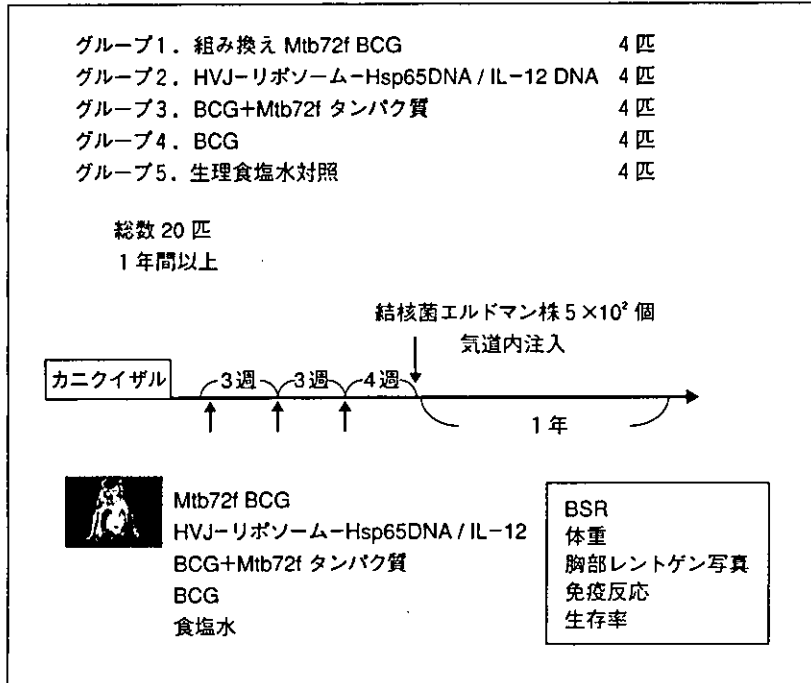
新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PBL/hu (ヒト結核ワクチン効果解析モデル) の作製

我々が世界に先駆けて開発した SCID-PBL/hu の系で結核患者リンパ球を SCID マウスに生着させ、結核菌タンパク質に特異的なヒトキラー T 細胞誘導を示す画期的な、生体内ヒト免疫解析モデル (ヒト結核ワクチン効果解析モデル) を開発した⁶⁾⁷⁾⁹⁾ (図 5)。

新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル (最もヒトの肺結核に近いモデル²⁰⁾) を用い BCG よ

図9 カニクイザル(ヒトの結核感染にもっとも近いモデル)を用いた新しい結核ワクチン予防効果研究のプロトコール



略語：巻末の「今号の略語」参照

りもはるかに強力な予防ワクチン効果（生存率，血沈，体重，肺の組織）を示すワクチン三種を開発した⁸⁾（図9）（表5）。すなわち，現在最も有力なものとして HVJ リボソーム / Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチン，r72f BCG ワクチンおよび Mtb72f fusion 融合タンパク質サブユニットワクチンが挙げられる。事実，我々はカニクイザルで結核感染後1年で，コントロール群（生食投与群）では4匹中4匹死亡（0% 生存）したが，Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチン投与群は，4匹中2匹生存（50% 生存），r72f BCG ワクチンで4匹中3匹生存（75% 生存），BCG Tokyo + 72f fusion タンパク質で4匹中4匹生存（100%）生存を認め，これらのワクチン効果をサルレベルで認めた⁸⁾（表5）。Ag85B-ESAT-6 融合タンパク質（Anderson 博士ら）も報告されているが，モルモット，サルでは効果は不明である。

一方 Huygen の Ag85A DNA ワクチンはマウス・モルモットで有効であったがサルの結核感染予防に対し有効でなかったという。72f

表5 カニクイザルにおける HVJ-リボソーム / Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチン、リコンビナント 72fBCG ワクチンおよび Mtb72f 融合タンパクサブユニットワクチンによる抗結核効果

予防ワクチン	結核予防 ワクチン効果	延命効果	血沈改善	体重増加	胸部X線 所見改善	免疫反応
						リンパ球増殖 反応増強
① HVJ-リボソーム / Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワク チン	++	++	++	+	+	+++
② リコンビナント 72f BCG ワクチン	++	++	+	+	+	+
③ 72f 融合タンパクワクチン	++	++	+	±	++	++
④ コントロール (生食)	-	-	-	-	-	-

略語：巻末の「今号の略語」参照

融合タンパク質サブユニットワクチン、ワクシニアウイルスに 85A DNA を導入したワクチンや r85B BCG (Horowitz ら) は第 I 相臨床試験となっている。

最も切れ味のするどい臨床応用ワクチン候補の筆頭として Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチンが挙げられる。リコンビナント 72fBCG も有効である。さらに、我々は Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチンやリコンビナント 72f BCG ワクチンを組み合わせ、極めて強力なワクチン開発を目指している⁵⁻⁷⁾。

新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され WHO STOP TB Partnership および WHO STOP TB VACCINE GROUP MEETING メンバーに選出された (表6)。

おわりに

当国立病院機構近畿中央胸部疾患センターは呼吸器疾患 (結核を含む) 準ナショナルセンターとなった。日本の結核患者数の 43% の診断・治療を行っている、国立病院・療養所 54 施設を統括し、国立病院・療養所政策医療呼吸器ネットワークを用い結核の新しい予防・治療法の確立が進展している。

サルにおいては 72f ワクチン Hsp65 DNA + IL-12 DNA / HVJ-リボソームワクチンが明らかにすぐれていることより、このワクチン

表6 最先端の新しい結核ワクチン4種
(WHO STOP TB VACCINE MEETING)

1. HVJ-リボソーム/Hsp65+IL-12 DNA ワクチン M. Okada
2. リコンビナント 85B BCG ワクチン Horowitz
3. 85B-ESAT6 fusion タンパク質ワクチン P. Andersen (モルモットでは BCG ワクチンよりも優れていない)
4. リコンビナント 72f fusion タンパク質ワクチン S. Reed, Y. Skeiky, S. Gillis

略語：巻末の「今号の略語」参照

が結核の発症予防や治療に役立つ日が来るであろう。

文 献

- 1) 岡田全司: 結核 “分子予防環境医学: 生命科学研究の予防・環境医学への統合” (分子予防環境医学研究会編). p150-161, 本の泉社, 東京, 2003.
- 2) 岡田全司, 他: 結核感染・新しい結核ワクチンの開発「感染症発症の分子機構-宿主と病原体の分子の攻防」. *Molecular Medicine* 39: 144-154, 2002.
- 3) Flynn JL, et al: Immunology of Tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19: 93-129, 2001.
- 4) Schluger NW, et al: The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 679-691, 1998.
- 5) 岡田全司: 新しい結核ワクチン. *最新医* 57: 1942-1952, 2002.
- 6) 岡田全司: 厚生労働科学研究費補助金実績報告書 研究報告書, “結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究: [抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン (サブユニット・DNA-・リコンビナント BCG-ワクチン)・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]” p1-140, 2004.
- 7) Okada M, et al: Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis. *Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference* 171-175, 2002.
- 8) Kita Y, et al: Novel recombinant BCG- and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine* 2005. (in press)
- 9) 岡田全司, 他 編: 結核感染とサイトカイン. *医学の歩み: サイトカイン-state of arts* (泉 孝英, 他 編). p209-213, 医歯薬出版, 東京, 2004.
- 10) 岡田全司: 結核ワクチン. *結核* 第4版. 医学書院, 2004. (in press)
- 11) Cole ST, et al: Deciphering the biology of Mycobacterium Tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544, 1998.

- 12) Stenger S, et al: An Antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282: 121-125, 1998.
- 13) Tanaka F, et al: The anti-human tumor effect and generation of human cytotoxic T cells in SCID mice given human peripheral blood lymphocytes by the *in vivo* transfer of the Interleukin-6 gene using adenovirus vector. *Cancer Res* 57: 1335-1343, 1997.
- 14) Okada M, et al: Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7718-7721, 1981.
- 15) Okada M, et al: B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas. Two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation. *J Exp Med* 157: 583-590, 1983.
- 16) Okada M, et al: IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the *in vitro* induction of cytotoxic T cells. *J Immunol* 141: 1543-1549, 1988.
- 17) Akira S: Toll-like receptor and innate immunity. *Adr in Immunol* 78: 1-56, 2001.
- 18) Skeiky Y A, et al: 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 (12): 7618-7628, 2004.
- 19) Miki K, et al: 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. *Infection and Immunity* 72 (4): 2014-2021, 2004.
- 20) Igarashi T, et al: Adjuvant activity of synthetic N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine and related compounds on cell-mediated cytotoxicity in syngenic mice. *Cell Immunol* 34: 270-278, 1977.
- 21) 山本, 他: TLR を介するシグナル伝達機構における TRIF/TRAM の役割. (奥村 康, 他 編), *Annual Rev* p62-69. 中外医学社, 東京, 2005.
- 22) Walsh G P, et al: Philippin cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med* 2 (4): 430-436, 1996.

Innate Immunity and Acquired Immunity in Tuberculosis

Masaji Okada

Clinical Research Center, National Hospital Organization,
Kinki - Chuo Chest Medical Center



解説

結核ワクチン*

岡田全司** 田中高生** 喜多洋子** 桑山さち子**
 金丸典子** 村木裕美子** 橋元里実** 岡田知佳**
 福永有可里** 高井寛子** 坂口弥生** 古川いづみ**
 山田恭子** 和泉谷美和**

Key Words : TB vaccine, DNA vaccine, recombinant BCG vaccine, cytotoxic T cell, cynomolgus monkey

はじめに

いまだに世界の人口の1/3が結核菌の感染を受け、そのなかから毎年800万人の結核患者が発生し、200万人が毎年結核で死亡している。結核は最大の感染症のひとつである^{1)~4)}。本邦でも1998年から結核罹患率の増加・横ばいが認められ、1999

年“結核緊急事態宣言”が厚生省より出された。1998年、米国疾病予防管理センター(CDC)は結核に対し、政府・学術機関・企業が一体となって新世代の結核ワクチン開発の必要性を強く主張する発表をした。また、Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis (ACET)は国民の健康に対する大敵である結核撲滅のためには、BCGに代

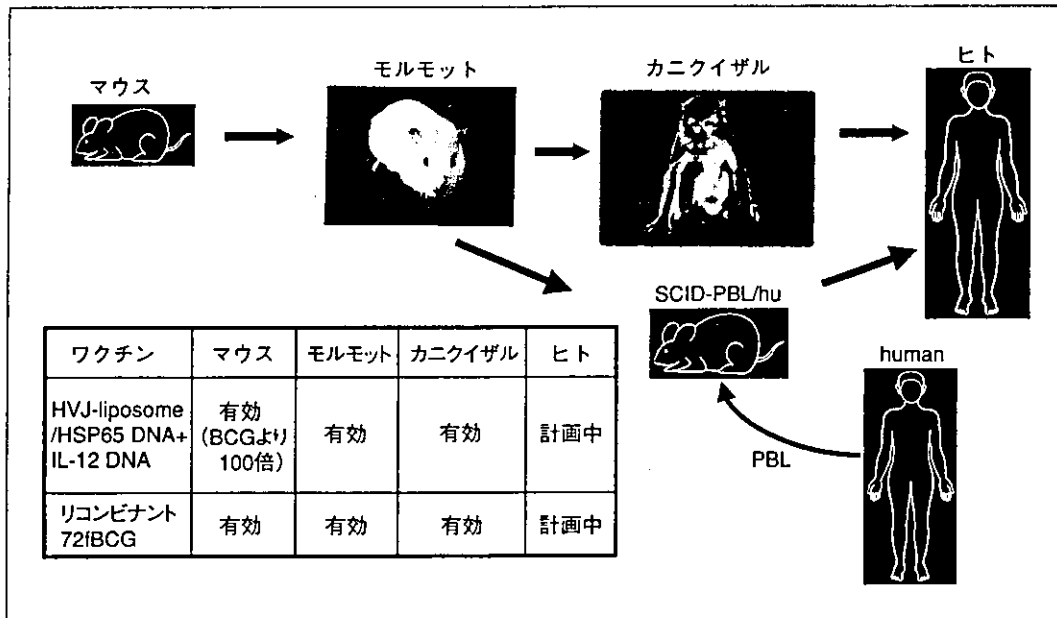


図1 新しい結核ワクチンの開発

* Novel vaccines against tuberculosis.
 ** Masaji OKADA, M.D., Ph.D., Takao TANAKA, Yoko KITA, Ph.D., Sachiko KUWAYAMA, Noriko KANAMARU, Yumiko MURAKI, Satomi HASHIMOTO, Chika OKADA, Yukari FUKUNAGA, Hiroko TAKAI, Yayoi SAKAGUCHI, Izumi FURUKAWA, Kyoko YAMADA & Miwa IZUMIYA: 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター [〒591-8555 堺市長曾根町1180]; Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, Sakai 591-8555, JAPAN

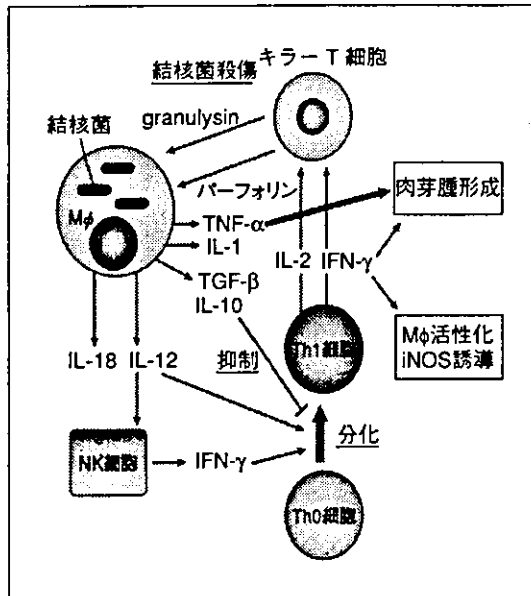


図2 抗結核免疫とマクロファージ, ヘルパーTキラーT細胞活性化

わる有効なワクチンが必要であることを示した。しかしながら、BCGに代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。われわれはBCGよりもはるかに強力なDNAワクチンやリコンビナントBCGワクチンの開発に成功した(図1)^{5)~8)}。そこで、新しい抗結核ワクチン開発について述べ、また、結核感染免疫におけるキラーTの機能解明についても述べる⁹⁾¹⁰⁾。

結核感染とサイトカイン

結核感染に対する免疫力はMφ, CD4⁺T細胞, NK細胞, γ/δ T細胞, キラーT細胞(CD8⁺TとCD8⁻T)および肉芽腫形成の総合的な抵抗力である(図2)。また、1998年Natureに結核菌H37Rvゲノム全塩基が掲載され、遺伝子レベルで結核免疫を解析しうることになった¹¹⁾。

1. キラーT細胞(CD8⁺T細胞)

CD8あるいはβ₂ミクログロブリン遺伝子やTAP遺伝子ノックアウトマウスでは抗結核免疫が十分でなく、動物は死亡する。すなわち、結核におけるCD8⁺T細胞はマウスで抗結核免疫に重要である(図3)。

キラーTのひとつの役割としてIFN-γを分泌して抗結核免疫に寄与するが、次に述べる結核感

染Mφを殺して、結核菌の増殖の場をなくし結核菌を殺す役割の方が重要である。最近、CD8⁺T細胞が結核菌に感染したMφをFas-independent, granule-dependentの機構で溶かし、最終的には結核菌を殺すことが報告されている¹²⁾。このキラーTの顆粒内の蛋白であるgranulysinは直接細胞外の結核菌を殺す。われわれは結核患者、とくに多剤耐性結核患者ではキラーTリンパ球のmRNAの発現および蛋白の発現が低下していることを明らかにした⁵⁾。

2. キラーT細胞分化とサイトカイン(キラーT細胞分化因子)

筆者らはCD8⁺キラーT細胞(Tc)の誘導にはヘルパーT細胞(Th細胞)から産生されるサイトカインが必要であることをはじめて明らかにした¹⁴⁾。IL-2はキラーT細胞誘導に必須な因子のひとつであることを示した¹³⁾(図2)。さらに、IL-6, IFN-γがキラーT細胞分化因子として強力なキラーT分化を誘導することをはじめて明らかにした^{14)~17)}(図3)^{5)6)8)~10)}。

3. サイトカインと結核免疫

抗結核免疫にIFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-12が重要である。IL-12とIFN-γ産生の間にはポジティブフィードバック機構が働いてIFN-γはMφからのIL-12産生を誘導し、IL-12はT細胞からのIFN-γ産生をさらに増殖し、初期防御反応では感染局所にMφを集め、特異的防御免疫が成立する(図2)¹⁾。

結核性肉芽腫の形成にTNF-αの存在がもっとも重要である。

4. マクロファージ(Mφ)

結核菌の増殖場所はMφ内である。一方、Mφは異物貪食能と細胞内殺菌能および抗原提示能をもつ。したがって、結核菌が優位になつか、ヒト(生体)が優位になつかの戦争でもある(詳細は文献²⁾参照)。

5. Toll-like受容体とマクロファージ活性化

最近発見されたToll-like receptor (TLR)ファミリーがinnate immunityの重要な役割を果たしている¹⁸⁾。結核菌のcell wall (LAM, mAGP, total lipid)による応答はTLR2を介する。一方、結核生菌に対する反応にはTLR2とTLR4が必要である。

6. Th1リンパ球, Th2リンパ球

CD4⁺T細胞が結核免疫に重要であることはMHC

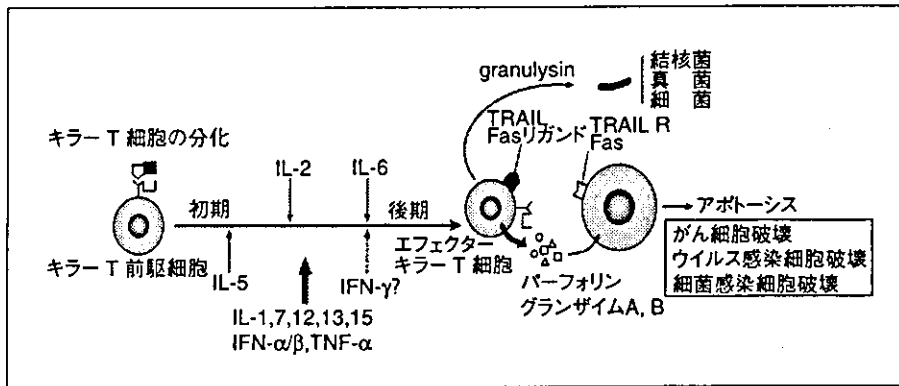


図3 キラー T 細胞活性化と細胞傷害機構

class II^{-/-}マウスやCD4^{-/-}マウス抗CD4抗体投与マウスで明らかとなっている¹⁹⁾(Th1細胞と結核免疫については文献²⁾参照)。

新しい結核ワクチン

結核ワクチンは①サブユニットワクチン、②DNAワクチン、③リコンビナントBCGワクチン(弱毒化結核菌を含む)、その他に大別される(表1)。

DNAワクチンのベクターとしては、①gene gun ②プラスミド ③アデノウイルスベクター ④HVJリボソーム ⑤改良型HVJエンベロープベクターを計画中である^{6)~9)19)}。α抗原(Ag85B)、ESAT-6、種々のサイトカイン、HSP65、38kDa、Mtb32、Mtb39、MDP1等について、サブユニットワクチン、DNAワクチン、リコンビナントBCGワクチンの形で、多くの報告が主にマウスの結核感染の系でなされている²⁰⁾²¹⁾。

マウスではBCGワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチンはきわめて少ない。われわれはHSP65 DNA+IL-12 DNA予防ワクチンにてBCGワクチンの100倍強力なワクチンの開発に成功した⁶⁾⁷⁾⁹⁾(表2)。

1. DNAワクチン

われわれはHSP65 DNA+IL-12 DNAのワクチンが相乗効果を示し、gene gunを用いた遺伝子投与でBCGよりもきわめて強力な(約100倍)結核予防ワクチンであることを明らかにした(表2)。また、IL-12のp35およびp40をCMVプロモーター下流域に挿入した発現プラスミドを作製した。

さらに、ヒト型結核菌H37Rv由来HSP65 DNAワクチンの作製に成功した(図4, 表2)。

HVJリボソームをベクターに用いた場合、HSP65 DNA単独(HVJリボソーム/HSP65)でBCGよりも有効であることをマウスの系で明らかにした(表2)。また、後述のHSP65リコンビナントBCGで初回免疫しHVJリボソーム/HSP65 DNAで追加免疫をかけるpriming-booster法がより有効であることを明らかにした。

アデノウイルスベクターに導入したIL-6関連遺伝子(IL-6遺伝子+IL-6レセプター遺伝子+gp130遺伝子)ワクチンは、BCGよりも強力な治療ワクチン効果を示した。IL-6関連遺伝子ワクチンは、結核菌に対するキラー T 細胞の分化・誘導およびTh1サイトカイン(IL-2およびIFN-γ)の産生誘導を介して抗結核効果を発揮した⁶⁾⁷⁾⁹⁾。

以上4つのワクチン効果は、キラー T 細胞やTh1細胞の分化誘導を増強することによって発揮されることが示された。ワクチン効果とキラー活性は見事な相関が認められることを明らかにした。

一方、Huygenらは、Ag85AのDNAワクチンを用い、マウスで抗原特異的キラー T 細胞(CTL)が誘導されることや、BCG免疫と同等の防御効果が得られることを明らかにした²²⁾。

2. リコンビナントBCGワクチン

結核菌は300種以上の蛋白質を分泌する。これらの遺伝子をPNN2シャトルベクター(大腸菌⇄抗酸菌)に組み込みBCG東京菌に、遺伝子を導入した。われわれはBA51(Ag85A+Ag85B+MPB51)

表1 新しい結核ワクチン

1. サブユニットワクチン
Mtb 72f fusion蛋白
85B-ESAT6 fusion蛋白
α抗原(Antigen 85B), Ag85A, MPB51, ESAT-6, Hsp65
19kd lipoprotein
リコンビナントサイトカイン(吸入・注射)(γ-IFN, など)
新しい結核蛋白抗原Mtb8.8, Mtb9.9, Mtb32, Mtb39, Mtb11等
2. DNAワクチン
Hsp65 DNA, IL-12遺伝子, Hsp70 DNA, ESAT-6 DNA, IL-6遺伝子, IL-6遺伝子+IL-6レセプター遺伝子+gp130
遺伝子, γ-IFN遺伝子, Mtb72f遺伝子, IL-15遺伝子, IL-18遺伝子, M-CSF遺伝子, 38kd DNA, キラーT誘
導蛋白遺伝子, CD40L遺伝子, MPT64DNA, MPT63 DNA, Kat G DNA, 上記の新しい結核蛋白抗原遺伝子
3. リコンビナントBCGワクチン
①Mtb72f遺伝子
②Antigen 85A-, 85B-, 85C-, MPB51-遺伝子, MDP-1遺伝子, ESAT-6遺伝子, HSP65遺伝子
③IL-6遺伝子, γ-IFN遺伝子, IL-2遺伝子, IL-12遺伝子, IL-18遺伝子
④キラーT誘導結核蛋白遺伝子
4. attenuated結核菌
attenuatedサルモネラ菌に結核免疫増強DNA導入
attenuatedリステリア菌に結核免疫増強DNA導入
5. キラーT細胞移入

表2 われわれの研究室の新しい結核ワクチン効果のまとめ

新しい結核ワクチンの開発	
(1)DNAワクチン	BCGより有効
HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA	(マウス, モルモット, カニクイザル)
(2)リコンビナントBCGワクチン	BCGより有効
①リコンビナント72f BCG	(マウス, モルモット, カニクイザル)
②リコンビナント(Ag85A+85B+MPB51)BCG	BCGより有効(マウス)
(3)サブユニットワクチン	BCGより有効(カニクイザル)
Mtb72f融合蛋白	多剤耐性結核患者T細胞機能増強活性(+)
	Phase I Study
(4)治療ワクチン	
IL-6 related DNA(マウス)	
(5)Priming-Booster Method	
BCG(priming)+新しいワクチン(booster)(カニクイザル)	
(6)遺伝子ノックアウトattenuatedリステリアを用いた新しい結核ワクチン(経口)	
(7)新しいベクター	
AAVベクター(1,000倍発現効率↑), Adenovirusベクター	
→WHO STOP TB PartnershipおよびWHO STOP TB Vaccines Working Groupに選出	

リコンビナントBCGはBCGよりも強力なワクチンであることを静脈感染の系および気道感染の系で明らかにした。さらに最近、サブユニットワクチンでサルレベルで強力な予防効果が得られたMtb72f融合蛋白のDNAを導入した72fリコンビナントBCGの作製に成功した。この72f rBCGはBA51 rBCGと同程度のきわめて強力な結核菌に特異的なIFN-γ産生T細胞数の増強を誘導することをElispot Assayで明らかにした。

3. サブユニットワクチン

Mtb72f融合蛋白(Mtb39とMtb32の融合蛋白)のサブユニットワクチンはマウス, モルモットの系で結核予防ワクチン効果を示した²³⁾。われわれはヒトの*in vitro*系でもMtb72f融合蛋白を用いて免疫応答が増強することを示した(Reed博士らとの共同研究)。多剤耐性結核患者のT細胞免疫能が増強した⁶⁾(表2)。

一方、85B-ESAT6のfusion蛋白ワクチンがマウスとモルモットでBCGよりやや劣るが同程度に

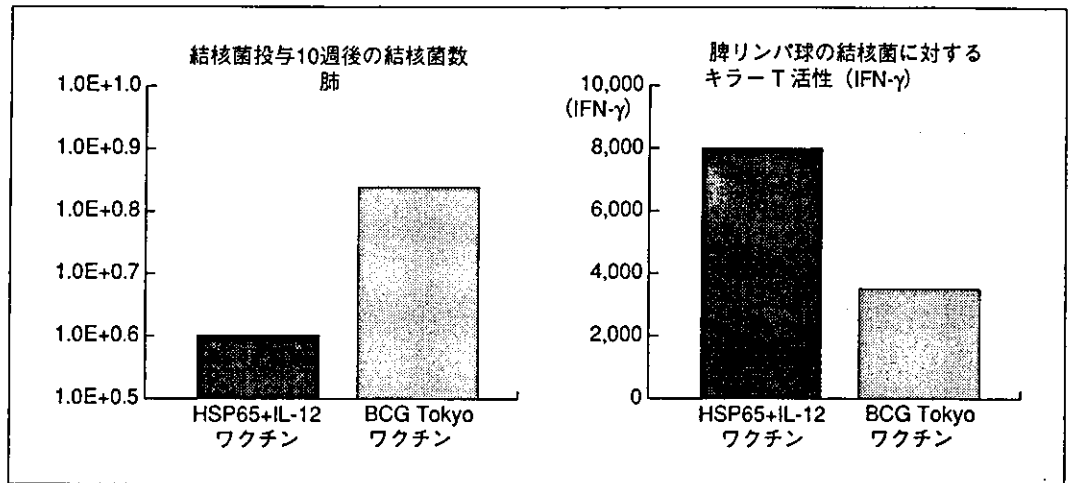


図4 HSP65+IL-12 DNAワクチンによるBCGより100倍強力な抗結核ワクチン効果(マウス)とサイトカイン(IFN-γ)産生キラーT細胞増強効果

有効であることが報告されている。

4. 遺伝子ノックアウトattenuated(弱毒化)菌体を用いた結核ワクチン

ある結核菌遺伝子を欠失させて弱毒化した結核菌をワクチンにする方法がある。われわれは(浜松医大・小出教授と)さらに、akt遺伝子を欠失させた無毒化リステリア菌にAg85A-DNAを導入し新しい結核ワクチンを開発した²⁴⁾。このワクチンは経口ワクチンとして応用できる利点がある。

これらの1~4.の新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価されWHO STOP TB PartnershipおよびWHO STOP TB Vaccine Group Meetingに選出された。

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

われわれが世界に先駆けて開発したSCID-PBL/huの系で結核患者リンパ球をSCIDマウスに生着させ、結核菌蛋白質に特異的なヒトキラーT細胞誘導を示す画期的な、生体内ヒト免疫解析モデル(ヒト結核ワクチン効果解析モデル)を開発した(図5)⁶⁾⁷⁾¹³⁾。

新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル(cynomolgus monkey, もっともヒトの肺結核に近いモデル, Nature Medicine1996;

2:430. 参照)を用いBCGよりもはるかに強力な予防ワクチン効果(生存率, 血沈, 体重, 肺の組織)を示すワクチン3種を開発した(図6)。すなわち, 現在もっとも有力なものとしてHVJリボソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン, r72f BCG ワクチンおよびMtb72f融合蛋白質サブユニットワクチンがあげられる。(岡田, Reed博士, Tan博士ら, カニクイザルで共同研究)。事実, われわれはカニクイザルで結核感染後1年で, コントロール群(生理食塩水投与群)では4匹中4匹死亡(0%生存)したが, HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン投与群は, 4匹中2匹生存(50%生存), r72f BCGワクチンで4匹中3匹生存(75%生存), BCG Tokyo+72f fusion蛋白で4匹中4匹生存(100%生存)を認め, これらのワクチン効果をサルレベルで認めた(2003年第1回国際結核ワクチン学会)。Ag85B-ESAT6融合蛋白質も報告されているが, モルモット, サルでは効果は不明である。一方Ag85A DNAワクチンはマウス・モルモットで有効であったがサルの結核感染予防に対し有効でなかったという(2002年第4回World Congress on Tuberculosis)一方, ワクシニアウイルスに85A DNAを導入したワクチンやr85B BCG (Horowitzら)もclinical trialに近い将来考えられている。もっとも切れ味のするどい臨床応用ワクチン候補の筆頭としてHSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンがあげられる。一方, BCG+Mtb72f融

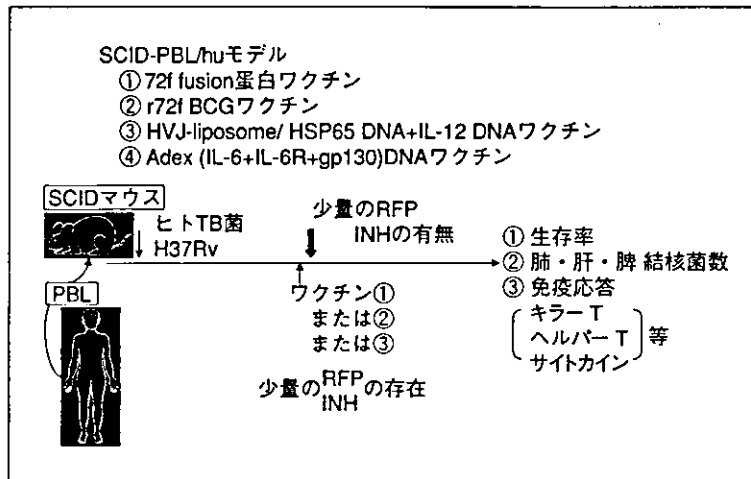


図5 新しい結核治療ワクチンの開発

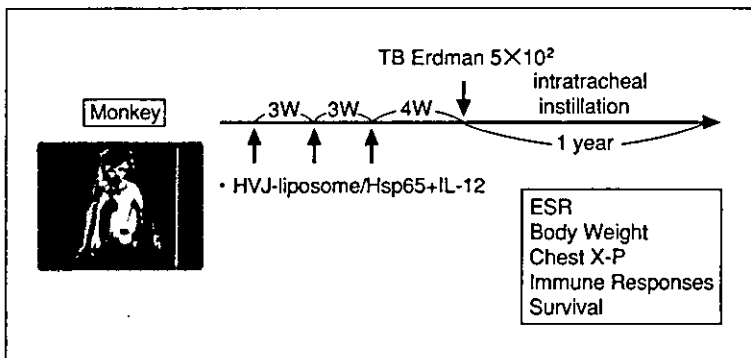


図6 プロトコール

表3 最先端の新しい結核ワクチン4種(WHO STOP TB Vaccine Meeting)

1. HVJ-liposome/HSP65+IL-12 DNAワクチン (Okada M)
2. recombinant 85B BCGワクチン (Horowitz)
3. 85B-ESAT6 fusion蛋白ワクチン (Andersen P)
(モルモットではBCGワクチンよりも優れていない)
4. recombinant 72f fusion蛋白ワクチン (Reed S, Skeiky Y, Gillis S)

合蛋白質サブユニットワクチンは、第I相臨床試験が計画されている。さらに、われわれはHSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンと72f融合蛋白ワクチンやリコンビナント72f BCGワクチンを組み合わせ、きわめて強力なワクチン開発を目指している^{5)~7)}。

このように、著者らはカニクイザルで結核感染後1年2か月経過観察し、コントロール群より著しく有効な、①HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン、②r72f BCGワクチン、③BCG Tokyo+72f fusion蛋白ワクチンを開発した。Ag85B-ESAT6融合蛋白質ワクチン、ワクシニアウイルスに85A DNAを導入したワクチンやr85B BCGも clinical trialの候補ワクチンであるが、もっとも切れ味のするとい臨床応用ワクチン候補の筆頭としてHSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンがあげられる(表3)¹⁾²⁵⁾。

(WHO STOP TB Vaccine Group Meeting およびWHO STOP TB Partnership)

これらの新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価されWHO STOP TB PartnershipおよびWHO STOP TB Vaccine Group Meetingに選出された。HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA

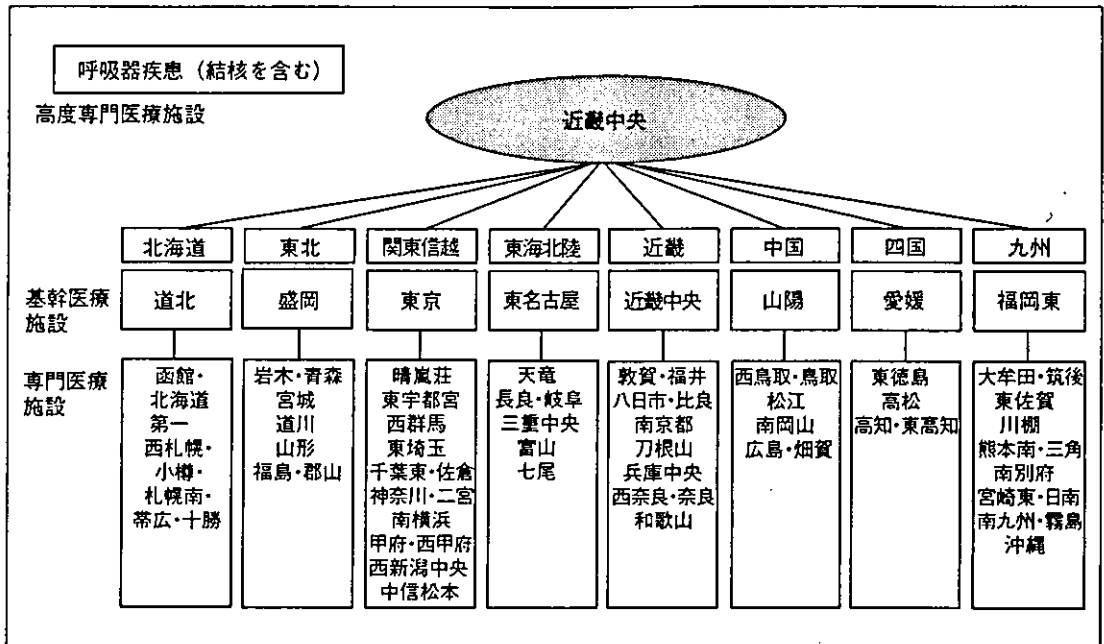


図7 国立病院機構政策医療呼吸器ネットワーク

ワクチンが高く評価された。当センターは呼吸器疾患(結核を含む)準ナショナルセンターであり、日本の結核患者数の約50%の診療を行っている政策医療呼吸器ネットワークを用い、サイトカインDNAワクチン(HSP65 DNA+IL-12 DNA)およびr72f BCGワクチンの臨床応用を計画している(表3)。

おわりに

当近畿中央胸部疾患センターは呼吸器疾患(結核を含む)準ナショナルセンターとなった。日本の結核患者数の43%の診断・治療を行っている、国立病院機構呼吸器専門54施設を統括し、国立病院機構政策医療呼吸器ネットワークを用い結核の新しい予防・治療法の確立が進展している(図7)。

HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンがBCGワクチンより1万倍強力な結核予防ワクチン効果を示す画期的な成果を得た。したがって、このワクチンを最優先で結核の発症予防や治療に対して臨床応用する計画が進んでいる。

文 献

1) 岡田全司. 結核. In: 分子予防環境医学研究会・

編. 分子予防環境医学: 生命科学研究の予防・環境医学への統合. 東京: 本の泉社; 2003. p. 150.
 2) 岡田全司, 田中高生, 喜多洋子. 結核感染・新しい結核ワクチンの開発「感染症発症の分子機構-宿主と病原体の分子の攻防」. *Molecular Medicine* 2002; 39: 144.
 3) Flynn JL, Chan J. *Immunology of Tuberculosis. Annu Rev Immunol* 2001; 19: 93.
 4) Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 679.
 5) 岡田全司. 新しい結核ワクチン. *最新医学* 2002; 57: 1942.
 6) 岡田全司. 結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究: [抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン(サブユニット・DNA・リコンビナントBCG-ワクチン)・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]. In: 厚生労働科学研究費補助金実績報告書・研究報告書 2004. p. 1.
 7) Okada M, Tanaka T, Inoue Y, et al. Novel(recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis. *Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy*

- Research Conference ; 2002 Aug 21-23 ; Kyoto, Japan. 2002. p. 171.
- 8) Gillis S, Okada M. New therapy, diagnosis and protection using recombinant BCG, DNA- Vaccination and cytotoxic T lymphocytes against *Mycobacterium tuberculosis*. New vaccine and new diagnosis. In : 平成12年度新興・再興感染症研究推進事業研究報告集. 東京：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団；2001. p. 355.
 - 9) 岡田全司, 岸本忠三. リンホカインとモノカイン. In : 山村雄一, 織田敏次, 黒岩義五郎, ほか・監. 新内科学体系；年刊版 '84-C. 東京：中山書店；1984. p. 221.
 - 10) 岡田全司. サイトカインと腫瘍免疫. In : 石井威望, 岡 博, 岸本忠三, ほか・編. 新医科学大系 8B；免疫応答－生体の防御機構Ⅱ. 東京：中山書店；1996. p. 269.
 - 11) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 1998 ; 93 : 537.
 - 12) Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al. An Antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science 1998 ; 282 : 121.
 - 13) Okada M, Klimpel GR, Kuppers RC, et al. The differentiation of cytotoxic T cells *in vitro*, I. Amplifying factor (s) in the primary response is Lyt1 + cell dependent. J Immunol 1997 ; 122 : 2527.
 - 14) Tanaka F, Abe M, Akiyoshi T, et al. The anti-human tumor effect and generation of human cytotoxic T cells in SCID mice given human peripheral blood lymphocytes by the *in vivo* transfer of the Interleukin-6 gene using adenovirus vector. Cancer Res 1997 ; 57 : 1335.
 - 15) Okada M, Yoshimura N, Kaieda T, et al. Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. Proc Natl Acad Sci USA 1981 ; 78 : 7718.
 - 16) Okada M, Sakaguchi N, Yoshimura N, et al. B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas. Two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation. J Exp Med 1983 ; 157 : 583.
 - 17) Okada M, Kitahara M, Kishimoto S, et al. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the *in vitro* induction of cytotoxic T cells. J Immunol 1988 ; 141 : 1543.
 - 18) Akira S. Toll-like receptor and innate immunity. Adv Immunol 2001 ; 78 : 1.
 - 19) Hess J, Schaible U, Raupach B, et al. Exploiting the immune system. Toward new vaccines against intracellular bacteria. Adv Immunol 2000 ; 75 : 1.
 - 20) Anderson P. TB vaccines. Progress and problems. Trends Immunol 2001 ; 22. 160.
 - 21) Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. Nature 1999 ; 400 : 269.
 - 22) Huygen K, Content J, Denis O, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. Nature Med 1996 ; 2 : 893.
 - 23) Reed S, Alderson M, Campos-Neto A, et al. Development of a recombinant tuberculosis vaccine. Thirty-Fifth research conference on tuberculosis and leprosy ; 2000 July 1-19 ; Yokohama, Japan. 2000. p. 159.
 - 24) Miki K, Nagata T, Tanaka T, et al. 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 2004 ; 72(4) : 2014.
 - 25) Kita Y, Tanaka T, Okada M, et al. Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. Vaccine. In press 2004.

* * *

サイトカインの病態への関与

感染症

結核感染とサイトカイン

—新しい結核ワクチン

Tuberculosis and cytokine

— Novel vaccines against tuberculosis

Key point

●結核免疫は細胞性（T細胞、マクロファージ）免疫そのものであり、T細胞やマクロファージから産生、またはこれらの細胞に作用するサイトカインが重要な役割を果たしている。

●IFN- γ 、IL-12、IL-6、IL-2は結核抗原を認識するCD4⁺ヘルパーT細胞やCD8⁺キラーT細胞の分化、増殖、マクロファージの活性化に関与し、TNF- α は結核の肉芽腫形成に必須であり、それぞれ結核菌の排除や封じ込めに寄与する。

●これらのサイトカイン産生を増強し、しかもBCGワクチンよりも有効な新しい結核ワクチンの研究がいまや結核研究の主流である。

●著者らのHVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンやr72f BCGワクチンはキラーT細胞を分化誘導し、BCGより強力なワクチンであることをヒトの結核感染にもっとも近いカニクイザルで明らかにした。

いまだに世界の人口の1/3が結核菌の感染を受け、そのなかから毎年800万人の結核患者が発生し、200万人が毎年結核で死亡している。結核は最大の感染症のひとつである^{1,2)}。わが国でも1998年から結核罹患率の増加が認められ、1999年“結核緊急事態宣言”が厚生省よりだされた。1998年、アメリカCDC、ACETは結核に対し政府・学術機関・企業が一体となって新世代の結核ワクチン開発の必要性を強く主張する発表をした。しかし、BCGに代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。著者らは、BCGよりもはるかに強力なDNAワクチン、リコンビナントBCGワクチンや新しいサブユニットワクチンの開発に成功した^{1,3,4)}。結核免疫は細胞性〔T細胞、マクロファージ(M ϕ)〕免疫であり、T細胞、M ϕ より産生されるサイトカインやこれらの細胞に作用するサイトカインが結核感染や防御に重要な役割を果たしている。事実ワクチン効果は、キラーT細胞活性、

岡田全司/国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター

Masaji OKADA

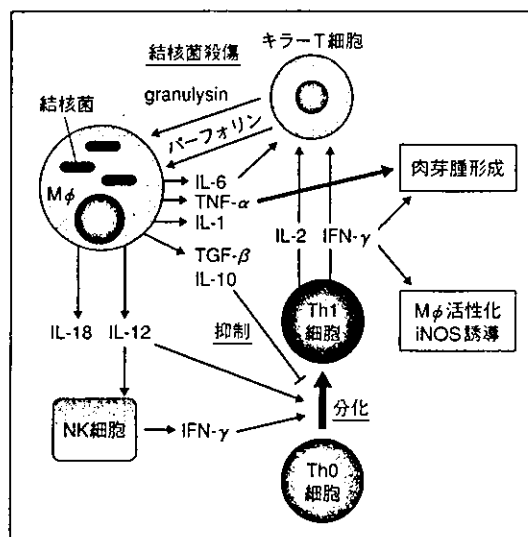


図1 抗結核免疫とマクロファージ、ヘルパーT細胞、キラーT細胞活性化

サイトカイン活性と相関する。

結核感染と免疫

結核感染に対する免疫力は、M ϕ 、CD4⁺T細胞、キラーT細胞、NK細胞、 γ/δ T細胞および肉芽腫形成の総合的な抵抗力である(図1)^{1,2)}。また、結核菌H37Rvゲノム全塩基が解読され、遺伝子レベルで結核免疫を解析しうるようになった。

1. キラーT細胞(CD8⁺)T細胞

CD8あるいは $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子やTAP遺伝子ノックアウトマウスでは抗結核免疫が十分でなく、動物は死亡する。すなわち、結核におけるCD8⁺T細胞はマウスで抗結核免疫に重要である¹⁾(サイドメモ)。

2. キラーT細胞分化とサイトカイン
(キラーT細胞分化因子)

著者らはCD8⁺キラーT細胞(Tc)の誘導にはヘルパーT細胞(Th)から産生されるサイトカインが必要であることをはじめて明らかにした。クラスII抗原を認識しキラーT細胞分化因子を産生するTh細胞はCD4⁺CD8⁻であり、クラスI抗原を認識しキラーT細胞分化因子を産生するTh細胞はCD8⁺である。IL-2はキラーT細胞誘導に必須な因子のひとつであり、IL-2とは異なるサイトカインもT細胞分化誘導に必要であることをキラーT細胞分化因子を産生するヒトT細胞ハイブリドーマ、およびIL-2依存性ヒトTh細胞クローンを世界に先がけて確立し明らかにした。その解析の結果、IL-6、IFN- γ がキラーT細胞分化因子として強力なキラーT細胞分化を誘導す

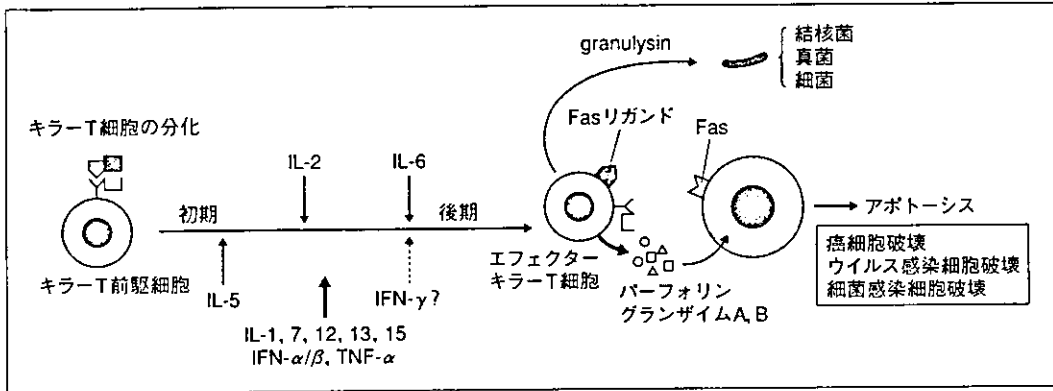


図2 キラーT細胞活性化と細胞傷害機構

表1 新しい結核ワクチンの開発

(1) DNA ワクチン HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA	BCG より有効 (マウス, モルモット, カニクイザル)
(2) リコンビナント BCG ワクチン ① リコンビナント 72f BCG ② リコンビナント (AG85A+85B+MPB51) BCG	BCG より有効 (マウス, モルモット, カニクイザル) BCG より有効 (マウス)
(3) サブユニットワクチン Mtb 72f 融合蛋白	BCG より有効 (カニクイザル) 多剤耐性結核患者 T細胞機能増強活性 (+) phase I study
(4) 治療ワクチン IL-6 related DNA (マウス)	
(5) Priming-booster method BCG (priming) + 新しいワクチン (booster) (カニクイザル)	
(6) 遺伝子ノックアウト attenuated リステリアを用いた新しい結核ワクチン (経口) [文献 ¹¹⁾]	
(7) 新しいベクター AAV ベクター (1,000 倍発現効率↑), adenovirus ベクター → WHO STOP TB Partnership および WHO STOP TB Vaccines Working Group に選出	

サイド メモ

キラーT細胞・granulysinと 結核免疫

キラーT細胞のひとつの役割としてIFN- γ を分泌して抗結核免疫に寄与するが、結核感染M ϕ を殺して結核菌の増殖の場をなくし結核菌を殺す役割のほうが重要である。最近、CD8⁺T細胞が結核菌で感染したM ϕ をFas-independent, granule-dependentの機構で溶かし、最終的には結核菌を殺すことが報告されている (Stenger, S. et al.: *Science*, 282: 121-125, 1998)。このキラーT細胞の顆粒内の蛋白であるgranulysinは直接細胞外の結核菌を殺す。さらに、パーフォリンとの共存下でM ϕ 内の結核菌も殺すと考えられている。著者らは、結核患者、とくに多剤耐性結核患者ではキラーT細胞リンパ球のmRNAの発現および蛋白の発現が低下していることを明らかにした^{1, 3, 4)}。すなわち、著者らはキラーT細胞のgranulysin (分子量9,000) 産生低下が多剤耐性結核症と大きな関連があるのではないかと考えている (図2)¹⁾。

ることを明らかにした^{5, 6, 8, 9)}。著者らはIL-6がTc誘導の後期の分化段階に作用することを解明した (図2)。多剤耐性結核患者PBLにおいて、これらのキラーT細胞分化因子、すなわちIL-2, IFN- γ , IL-6の著明な低下を認めた (表1)^{1, 3, 4)}。また、糖尿病合併難治性結核患者ではPPD特異的キラーT細胞の分化誘導の著しい低下を明らかにした^{1, 3, 4)}。

3. マクロファージ (M ϕ)

結核菌の増殖場所はM ϕ 内である。一方、M ϕ は異物貪食能と細胞内殺菌能および抗原提示能をもつ。したがって、結核菌が優位に立つか、ヒト (生体) が優位に立つかの戦争でもある。殺菌性ラジカルである活性酸素、各種殺菌蛋白ROIやNOなどのRNI, TACO, Nrampも結核菌の殺傷に関与する¹⁾。

4. Toll-like 受容体とマクロファージ活性化

最近発見されたToll-like receptor (TLR)ファミリーがinnate immunityの重要な役割を果たしている¹⁾。結核菌のcell wallによる応答はTLR2を介する。一方、

結核生菌に対する反応には TLR2 と TLR4 が必要である。結核菌体成分 19kDa の lipoprotein が TLR2 を介して Mφ を活性化する。また、抗酸菌 DNA から見出された CpG モチーフ（パリンドローム配列）は感染防御免疫能を増強することが示されていたが、CpG レセプターは TLR9 である。

5. ヘルパー T 細胞

CD4⁺ T 細胞が結核免疫に重要であることは MHC class II^{-/-}マウスや CD4^{-/-}マウス抗 CD4 抗体投与マウスで明らかとなっている（Th1 と結核免疫については岡田総説¹¹ 参照のこと）。

結核感染とサイトカイン

1. サイトカインと結核免疫

細胞内寄生細菌（とくに結核菌）は Mφ に貪食されても殺菌処理されず、細胞内増殖が可能な菌である。種々の機構で Mφ の殺菌から逃れ、結果的に慢性持続性炎症（慢性感染症）および肉芽腫形成を誘発する。抗結核免疫に IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-12 が重要であることは解析されている。

2. IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-12 と結核免疫

細菌の貪食に伴って Mφ が産生するサイトカインのうち、IL-12、IL-18、TNF- α や IL-1 は、T 細胞、NK 細胞および $\gamma\delta$ 型 T 細胞からの IFN- γ 産生誘導に関与している。IFN- γ は、Mφ を活性化し貪食した菌の殺菌処理を促進するヘルパー T 細胞、キラー T 細胞の分化因子としても作用する。IL-12 と IFN- γ 産生の間にはポジティブフィードバック機構が働いて IFN- γ は Mφ からの IL-12 産生を誘導し、IL-12 は T 細胞からの IFN- γ 産生をさらに増幅し、初期防御反応では感染局所に Mφ を集め、特異的防御免疫が成立する（図 1）¹²。

IL-12、IL-18、IFN- γ は $\alpha\beta$ 型 T 細胞の Th1 への分化に重要なサイトカインで、IL-6 や TNF- α と協調して抗原特異的な Th1 を誘導する。Th1 の分化誘導には樹状細胞（dendritic cells : DC）が重要で、Mφ よりも高い T 細胞からの IFN- γ 産生誘導活性を示す。DC が末梢リンパ組織に移行して感染抵抗性 T 細胞の分化を誘導する。ファゴソーム内で処理された細菌由来の抗原は class II 分子に結合し CD4⁺ Th1 型 T 細胞により認識される。細胞質に存在する細菌由来抗原はプロテオソームにより分解され class I 分子と会合し、CD8⁺ T 細胞により認識される。CD8⁺ T 細胞は IFN- γ を産生するとともに、殺菌能の低下した Mφ や菌が感染した非食細胞系細胞を破壊し、あらたに動員されてくる活性化 Mφ に菌を処理させ、感染防御に関与している。また、IL-15 はメモリーキラー T

細胞を活性化して結核免疫に寄与する。一方、IL-10 は結核免疫の Mφ 機能を抑制する。そのほか IL-10 ファミリーサイトカインとして IL-19、IL-22、IL-28、IL-29 が報告されているが、IL-10 と同様の機能をもつのか、または、IL-28、IL-29 は IFN- γ とすこしホモロジーがあり、抗ウイルス活性をもつことより IL-10 と逆の結核免疫機能を示すか興味がある。IL-10、TGF- β 、IL-4 も結核に対する免疫応答を抑制する。IL-25 は、IL-4、IL-5、IL-13 の産生を誘導する。

3. ヒトサイトカイン産生異常症およびサイトカインレセプター異常と結核感染

ヒトにおいて、IFN- γ 受容体遺伝子に変異がみられた先天的 IFN- γ レセプター欠損児に、BCG ワクチン注射で重症全身性感染が認められたり *M. avium* 感染症をきたした。マウスにても IFN- γ 遺伝子ノックアウトマウスや IFN- γ 受容体遺伝子ノックアウトマウスでは結核易感染性である。

TNF- α は肉芽腫形成のみでなく慢性の長期感染結核に重要であり、抗 TNF- α 抗体投与マウスや、TNF レセプター（TNF-Rp55）欠失マウス、TNF^{-/-}マウスでは結核菌感染の死亡率が著増し、肉芽腫形成も損なわれた重症の肺結核病理像を示した。さらに、IL-6 遺伝子ノックアウトマウスでも結核感染の増悪をきたしたり IFN- γ の産生誘導の欠損がみられ、IL-6 も非特異的防御、とくに Mφ の活性化やキラー T 細胞分化を介して特異的な結核免疫に関与している可能性もある。著者らは世界に先がけて IL-6 産生能欠損患者 IL-6^{-/-}患者を発見した。この患者は易感染性で肺炎を繰り返し発症した。興味深いことに肺炎感染時 CRP 陰性で発熱も認められなかった^{13,14}。

IL-12 レセプター欠損マウスや IL-12 欠損患者では結核菌感染・増殖を抑制できなかった。すなわち、IL-12 も抗結核免疫に重要なサイトカインであることが示された。また、rIL-12 の投与にて BALB/c マウスの結核菌抵抗性が増し、IL-12 の生体内中和で感染増悪をきたす。IL-12p40 と IL-12R β_1 欠損患者では IL-12 とホモロジーのある IL-23 や IL-23R 欠損を伴うことが多い。IL-12 欠損、IL-12R 欠損患者の易結核菌感染性が IL-23^{-/-}に起因する可能性がある。

4. サイトカインと結核治療

① マウスの系において、著者らはアデノウイルスベクターに IL-6 関連遺伝子（IL-6 DNA + IL-6 レセプター DNA + gp130 DNA）を導入し、結核感染治療効果を世界に先がけて明らかにした（いままで治療効果を示す治療ワクチンの報告はない）。結核菌に特

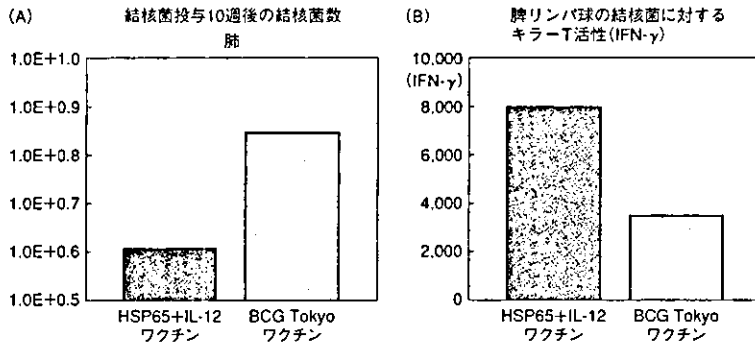


図3 HSP65 + IL-12 DNA ワクチンによる BCG より 100 倍強力な抗結核ワクチン効果 (マウス) とサイトカイン (IFN- γ) 産生キラー T 細胞増強効果

異的キラー T 細胞誘導活性, IL-2 産生増強と相関した^{1,3,5)} (IFN- γ DNA も治療ワクチン効果)。

② Condos らは多剤耐性結核の 5 症例に対して, IFN- γ の吸入療法を試みた。5 例中 4 例で喀痰塗抹で菌陰性化した。しかし, 治療中止 1 カ月後より再度陽性となった。また, 胸部 CT では 1 例で有意な改善, 1 例で軽度改善, 3 例で空洞の縮小が観察された。

③ 肺結核患者に, IL-12 投与を行い有効例が報告されている。

④ サイトカイン IFN- γ , IL-2, IFN- α や G-CSF を多剤耐性結核患者に投与し, 投与期間中のみ排菌数が減少した。

5. 肉芽腫形成とサイトカイン

結核性肉芽腫の形成に TNF- α の存在がもっとも重要である。近年新しい抗リウマチ薬としてモノクローナル抗 TNF- α 抗体が RA に有効であるが, 多数の結核患者で発症することが報告されている。MCP-1 や RANTES も肉芽腫形成に関与する。

新しい結核ワクチン

結核ワクチンは, ① サブユニットワクチン, ② DNA ワクチン, ③ リコンビナント BCG ワクチン (弱毒化結核菌を含む), その他に大別される (表 1)^{10,11)}。

1. DNA ワクチン

マウスでは BCG ワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチンはきわめて少ない。著者らは HVJ-リポソーム/HSP65 DNA + IL-12 DNA 予防ワクチンにて BCG ワクチンの 100 倍強力なワクチンの開発に成功した。このワクチン効果は, IFN- γ , IL-2, IL-6 の産生増強およびキラー T 細胞分化誘導効果と相関した (図 3)^{1,3,4)}。さらに, モルモットの結核菌エアゾルの感染の系でも BCG よりも強力な結核予防ワクチン効果を示すことを明らかにした。

2. リコンビナント BCG ワクチン

PNN₂ シャトルベクター (大腸菌 \leftrightarrow 好酸菌) に遺伝子を組み込み, BCG 東京菌に遺伝子を導入した, BA51 (Ag85A + Ag85B + MPB51) リコンビナント BCG や 72f 融合蛋白質の DNA を導入した 72f リコンビナント BCG の作製に成功した。この 72f rBCG は BA51rBCG と同程度のきわめて強力な結核菌に特異的な IFN- γ 産生 T 細胞数の増強を誘導することを Elispot assay (KS-Elispot) で明らかにした^{1,3,4)}。

3. サブユニットワクチン

72f 融合蛋白質 (Mtb39 と Mtb32 の融合蛋白質) のサブユニットワクチンは結核予防ワクチン効果を示し, ヒトの *in vitro* 系でも Mtb72f 融合蛋白質は多剤耐性結核患者 T 細胞からの IFN- γ , IL-2, IL-6 産生を増強することを明らかにした^{1,3,4)}。

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

著者らが世界に先がけて開発した SCID-PBL/hu の系で結核患者リンパ球を SCID マウスに生着させ, IL-6 関連遺伝子を投与し, 結核菌に特異的なヒトキラー T 細胞誘導を示す画期的な, 生体内ヒト免疫解析モデルを開発した^{1,3,4,7)}。

5. 新しいサイトカイン DNA 結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル (cynomolgus monkey) で, もっともヒトの肺結核に近いモデルを用い BCG よりもはるかに強力な予防ワクチン効果 (生存率, 赤沈, 体重, 肺の組織) を示すワクチン 3 種を開発した (図 3)^{1,3,4)}。すなわち, 現在もっとも有力なものとして HVJ リポソーム/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン, r72f BCG ワクチンおよび 72f fusion 蛋白質サブユニットワクチンがあげられる。事実, 著者らはカニクイザルで結核感染後 1 年 2 カ月経過観察し, コントロール群

より著しく有効な, ① HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン, ② r72f BCG ワクチン, ③ BCG Tokyo + 72f fusion 蛋白ワクチンを開発した. Ag85B-ESAT-6 融合蛋白ワクチン, ワクシニアウイルスに 85A DNA を導入したワクチンや r85B BCG も clinical trial の候補ワクチンであるが, もっとも切れ味のするどい臨床応用ワクチン候補の筆頭として HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンがあげられる^{1,3,4)}.

WHO STOP TB Vaccine Group Meeting

これらの新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され WHO STOP TB Partnership および WHO STOP TB Vaccine Group Meeting に選出された, HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンが高く評価された. 当センターは呼吸器疾患(結核を含む)準ナショナルセンターであり, 日本の結核患者数の約 50% の診療を行っている政策医療呼吸器ネットワークを用い, サイトカイン DNA ワクチン (HSP65 DNA + IL-12 DNA) および r72f BCG ワクチンの臨床応用を計画している.

文献

- 1) 岡田全司: 結核 “分子予防環境医学: 生命科学研究所の予防・環境医学への統合” (分子予防環境医学研究会編). 本の泉社, 2003, pp.150-161.
- 2) Flynn, J. L. and Chan, J.: *Ann. Rev. Immunol.*, **19**: 93-129, 2001.
- 3) 岡田全司: 厚生労働科学研究費補助金実績報告書 研究報告書, 2004, pp. 1-140.
- 4) Okada, M. et al.: Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 2002, pp. 171-175.
- 5) 岡田全司, 岸本忠三: リンホカインとモノカイン. 新内科学体系: 年刊版'84-C (山村雄一・他監). 中山書店, 1984, p.221.
- 6) 岡田全司: サイトカインと腫瘍免疫. 新医学大系 8B: 免疫応答-生体の防御機構 II (石井威望・他編). 中山書店, 1996, p.269.
- 7) Tanaka, F. et al.: *Cancer Res.*, **57**: 1335-1343, 1997.
- 8) Okada, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 7718-7721, 1981.
- 9) Okada, M. et al.: *J. Exp. Med.*, **157**: 583-590, 1983.
- 10) Hess, J. et al.: *Adv. Immunol.*, **75**: 1-88, 2000.
- 11) Milki, K. et al.: *Infect. Immun.*, **72**(4): 2014-2021, 2004.

* * *

特集II 感染免疫における新知見

新たな結核ワクチン開発*

岡田全司** 田中高生**
 喜多洋子** 桑山さち子**
 金丸典子** 村木裕美子**
 橋元里実** 岡田知佳**
 福永有可里** 高井寛子**

Key Words : novel tuberculosis vaccine, DNA vaccine, recombinant BCG vaccine, cytotoxic T cell, clinical trial

はじめに

いまだに世界の人口の1/3が結核菌の感染を受け、その中から毎年800万人の結核患者が発生し、200万人が毎年結核で死亡している、最大の感染症のひとつである(図1)^{1)~4)}。本邦でも1998年から結核罹患率の増加が認められ、1999年7月26日“結核緊急事態宣言”が厚生省より出された。1998年、米国CDCは結核に対し、政府・学術機関・企業が一体となって新世代の結核ワクチン開発の必要性を強く主張する発表をした。また、ACETは国民の健康に対する大敵である結核撲滅のためには、BCGに代わる有効なワクチンが必要であることを示した。しかしながら、BCGに代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。われわれはBCGよりもはるかに強力な新しいサブユニットワクチン、DNAワクチンやリコンビナントBCGワクチンの開発に成功した^{5)~8)}。したがって、新しい抗結核ワクチン開発と結核感染免疫におけるキラーTの機能解明についても述べる⁹⁾¹⁰⁾。

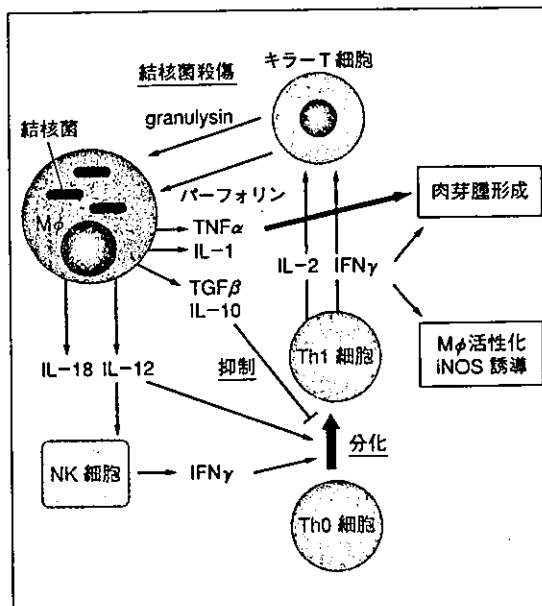


図1 抗結核免疫とマクロファージ、ヘルパーT細胞、キラーT細胞活性化¹⁾²⁾
 Mφ: マクロファージ

結核感染と免疫

結核感染に対する免疫力はMφ, CD4⁺T細胞, NK細胞, γ/δ T細胞, キラーT細胞(CD8⁺TとCD8⁻T)および肉芽腫形成の総合的な抵抗力である(図1)。また、1998年Natureに結核菌H37Rvゲ

* The development of novel vaccines against tuberculosis.

** Masaji OKADA, M.D., Ph.D., Takao TANAKA, Yoko KITA, Sachiko KUWAYAMA, Noriko KANAMARU, Yumiko MURAKI, Satomi HASHIMOTO, Chika OKADA, Yukari FUKUNAGA, & Hiroko TAKAI: 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター(☎591-8555 堺市長曾根町1180); Clinical Research Center, National Hospital Organization, Kinki-Chuo Chest Medical Center, Sakai 591-8555, JAPAN

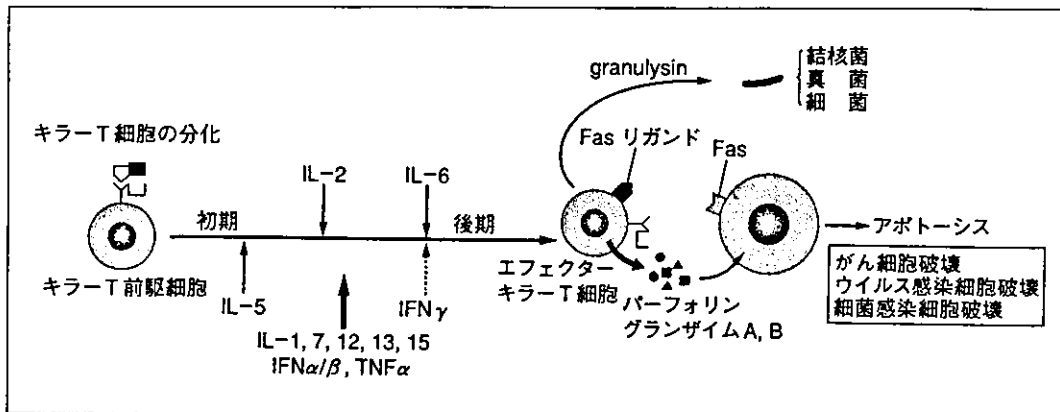


図2 キラーT細胞活性化と細胞傷害機構²⁾

ノム全塩基が掲載され、遺伝子レベルで結核免疫を解析しうることになった¹¹⁾。

1. キラーT細胞(CD8⁺T細胞)

CD8あるいは β_2 ミクログロブリン遺伝子やTAP遺伝子ノックアウトマウスでは抗結核免疫が十分でなく、動物は死亡する。すなわち、結核におけるCD8⁺T細胞はマウスで抗結核免疫に重要である(図2)。

キラーTのひとつの役割として γ -IFNを分泌して抗結核免疫に寄与するが、次に述べる結核感染M ϕ を殺して、結核菌の増殖の場をなくし結核菌を殺す役割の方が重要である。最近、CD8⁺T細胞が結核菌で感染したM ϕ をFas-independent, granule-dependentの機構で溶かし、最終的には結核菌を殺すことが報告されている¹²⁾¹³⁾。このT細胞はCD1-restrictedでミコール酸, LAM, phosphatidyl inositol mannoside, glucose monomycolate, isoprenoid glycolipid(Cd1cと結合)などの結核菌lipidとlipoglycanを認識する。このキラーTの顆粒内の蛋白であるgranulysinは直接細胞外の結核菌を殺す。この機序は結核菌細胞膜を不完全な状態にすることによる。Granulysinは病原細菌, 真菌, 寄生虫の生存を減少させる。さらにパーフォリンとの共存下でM ϕ 内の結核菌も殺すと考えられている。これはパーフォリンよりM ϕ に穴が開き、M ϕ 内の結核菌に直接granulysinが作用するためと思われる。われわれは結核患者、とくに多剤耐性結核患者ではキラーTリンパ球のmRNAの発現および蛋白の発現が低下して

いることを明らかにした⁵⁾。すなわち、われわれはキラーT細胞のgranulysin(分子量9,000)産生低下が多剤耐性結核発症と大きな関連があるのではないかと考えている。一方、キラーTのTRAILとパーフォリンが抗結核免疫に重要である興味深い結果を得た。

一方、MHCクラスI拘束性の結核菌の38kDa蛋白, HSP65蛋白を認識するマウスCD8⁺キラーTや19kDa蛋白, Ag85, CFP10(Mtb11)を認識するヒトCD8⁺キラーTが報告されている³⁾。ESAT-6抗原に対するキラーTでHLA-A2とは82~90位の9個のアミノ酸AMASTEAGNVが結合してキラーT細胞がこれらを認識する。われわれは世界に先駆けて確立した、ヒト生体内結核免疫応答解析モデルSCID-PBL/huに、このESAT-6ペプチドを投与し、これに特異的でHLA-A2拘束性を示すヒトキラーTを生体内で誘導することに初めて成功した²⁾⁷⁾¹⁴⁾(図3)。

Reed S, Alderson MRらは結核菌に対するヒトCD8キラーTクローンを確立したが、HLA-A, B, C, DR, DQ, CD1に拘束性を示さないnonclassically restrictedキラーTとclassically restrictedなキラーTクローンの二種を確立した。またI-E領域に拘束性の結核特異的キラーTも報告された。

2. キラーT細胞分化とサイトカイン(キラーT細胞分化因子)

筆者らはCD8⁺キラーT細胞(Tc)の誘導にはヘルパーT細胞(Th細胞)から産生されるサイトカ