

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、サブユニットワクチンの 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³⁾。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。

(c) 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-, 85BB-, 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⁷⁾。

(4) 新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PDL/hu

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^{1) 5) 6) 8) 9)}。

3. 結核ワクチンの展望

(1) 新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル (cynomolgus monkey, 最もヒトの肺結核に近いモデル, Nature Medicine 2, 430, 1996 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 2 種を開発した³⁾。すなわち, 現在最も有力なものとして HVJ リポソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンおよび, r72f BCG ワクチンがあげられる。すなわち, カニクイザルに 3 回ワクチン投与を 3 週間隔で行った (Fig. 4)。最終免疫より, 4 週間後にヒト結核菌エルドマン株 5×10^2 CFU を気道内注入した。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) を認め, これらのワクチン効果をサルレベルで認めた³⁾ (Table 2)。すなわち, HVJ リポソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNA 予防ワクチン投与による結核感染カニクイザル生存率改善効果を得た (Table 2)。また, HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンは血沈改善効果を有意差をもって示した (Table 2)。さらに, このワクチンを投与したカニクイザルでは, コントロール群に依存し有意差 ($p < 0.01$) をもって, HSP65 抗原に対し, 増殖増強反応を示した (Fig. 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 融合タンパク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 clinical trial となっている⁹⁾。Dr. A. Hill らのワクシニアウイルス-85A DNA ワクチンは, アフリカでの第 I 相 clinical trial では, 85A DNA 蛋白に対する免疫応答増強が認められた。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 ワクチンがあげられる。リコンビナント 72fBCG も有効である。さらに, われわれは 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, きわめて強力なワクチン開発を目指している^{3)~6)}。

(2) プライミング-ブースター法 (乳幼児 BCG-成人 HVJ/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン)

さらに BCG ワクチンと新ワクチンのプライミング-ブースター法で 100% の生存を示した。このように, ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いた実験系で, 強力な新しい結核ワクチンをわれわれは世界に先駆けて開発した。すなわち, 本邦では乳幼児に BCG 接種が義

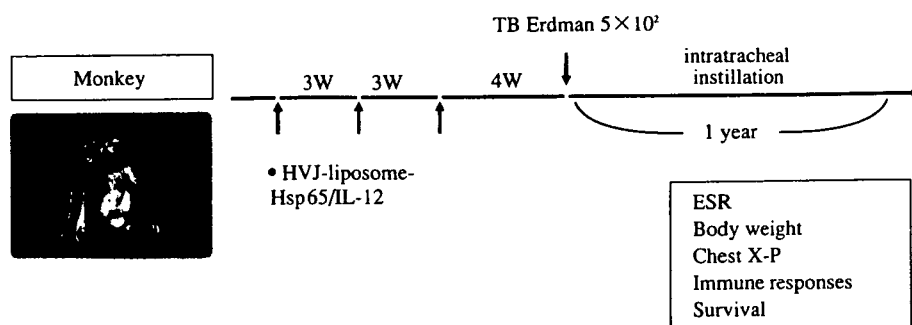


Fig. 4 Protocol

Table 2 (A) Improvement of cynomolgus monkeys infected with *M. tuberculosis* by the vaccination with HVJ-liposome/HSP 65 DNA + IL-12 DNA

Vaccine	Number	Survival	Dead	% survival
HVJ-liposome/ HSP 65 DNA + IL-12 DNA	4	2	2	50
BCG	4	2	2	50
Control (saline)	4	0	4	0

Table 2 (B) Improvement of Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) in the cynomolgus monkeys immunized with HVJ-liposome/HSP 65 DNA + IL-12 DNA

Vaccine	ESR (mm/hr)	Mean ± S.D	Statistical significance P.value compared to saline group (Student t test)
HVJ-liposome/ HSP 65 DNA + IL-12 DNA	2	3.5 ± 1.9	P<0.01
	6		
	4		
	2		
BCG	22	11.25 ± 11.3	Not significant
	2		
	20		
	1		
Control (saline)	50	29.75 ± 18.1	
	14		
	15		
	40		

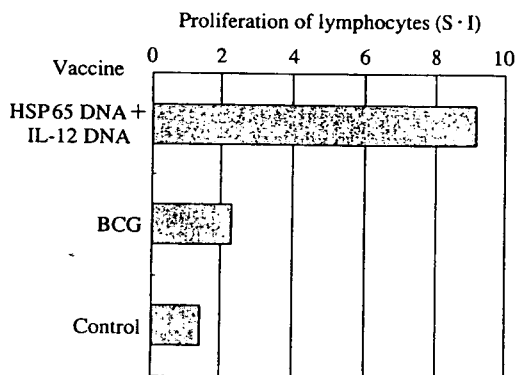


Fig. 5 Proliferation of peripheral blood lymphocytes from cynomolgus monkey with vaccine

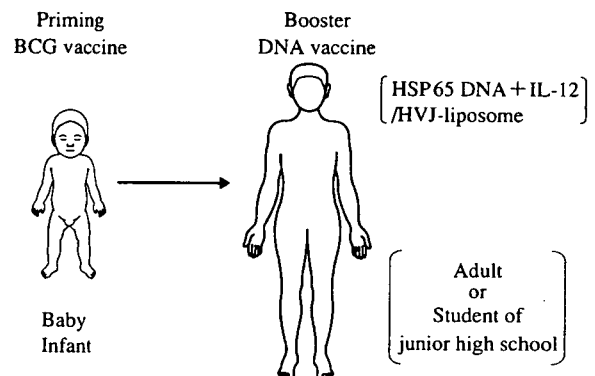


Fig. 6 Novel prophylactic vaccine (DNA vaccine against TB)

務づけられていることにより、プライミングワクチンとしてBCGワクチンを用い、成人ワクチン(小学生, 中学生, 成人, 老人)として切れ味のするどい、われわれが開発したHVJ/HSP65 DNA + IL-12DNAワクチンをブースターワクチンとして用いることにより強力な新しい結核ワクチンの臨床応用が可能となる案を計画中である (Fig. 6)。

4. 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60%の診断・治療を行っている、国立病院機構の専門病院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。

サルにおいては、HSP 65 DNA + IL-12 DNA/HVJ-エンベロープワクチンが明らかにすぐれていることより、このワクチンが結核の発症予防や治療に役立つ日が来るであろう。

(共同研究者: 当臨床研究センター 喜多, 井上, 坂谷,

各博士, 金丸, 橋元, 福永, 古川, 中島, 和泉谷, 高谷, 寺元, 西田, 浪江, 綱井, 山田, 仲谷, 高尾, 浅井, 各研究員, R. Gelber博士, B. Tan博士, 中島俊洋博士, 吉田栄人博士, 松本真博士, 金田安史博士, D. McMurray博士, 厚生労働科学研究費の支援による)

文 献

- 1) 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]”, 2004, 1-140.
- 2) Okada M, Kita Y, Kanamaru N, et al.: Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis. Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 2002, 171-175.
- 3) Kita Y, Kanamaru N, Okada M, et al.: Novel recombinant BCG- and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine*. 2005 ; 23 : k2269-2272.
- 4) Yoshida S, Kita Y, Okada M, et al.: 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*. 2006 ; 24 : 1191-1204.
- 5) 岡田全司: 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, 網谷良一編, 医歯薬出版, 東京, 2004, 209-213.
 - 6) 岡田全司: 結核ワクチン. 「結核」第4版 (in press), 医学書院, 東京, 2006.
 - 7) 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. *Infection and Immunity*. 2004 ; 72 : 2014-2021.
 - 8) Tanaka F, Abe M, Okada M, 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 : 1335-1343.
 - 9) Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, et al.: The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. *Vaccine*. 2005 ; 23 : 2269-2272.
 - 10) McShane H, Huygen K, Hill A, et al.: Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med*. 2004 ; 10 (11) : 1240-1244.

The 81st Annual Meeting Educational Lecture

NOVEL VACCINES AGAINST *M. TUBERCULOSIS*

Masaji OKADA

Abstract CDC and ACET in U.S.A. reported that novel vaccines instead of BCG are required for the protection against infection of *Mycobacterium tuberculosis* worldwide. However, no novel vaccine for clinical use has not yet been developed in the world including U.S.A. and Europe.

We have developed two novel tuberculosis (TB) vaccines; a DNA vaccine combination expressing mycobacterial heat shock protein 65 (HSP 65) and interleukin-12 (IL-12) by using the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome (HSP 65+IL-12/HVJ). A mouse IL-12 expression vector (mIL-12 DNA) encoding single-chain IL-12 proteins comorised of p40 and p35 subunits were constructed. In a mouse model, a single gene gun vaccination with the combination of HSP 65 DNA and mIL-12 DNA provided a remarkably high degree of protection against challenge with virulent *Mycobacterium tuberculosis*; bacterial numbers were 100 fold lower in the lungs compared to BCG-vaccinated mice. To explore the clinical use of the DNA vaccines, we evaluated HVJ-liposome encapsulated HAP 65 DNA and mIL-12 DNA (HSP 65+mIL-12/

HVJ). The HVJ-liposome method improved the protective efficacy of the HSP 65 DNA vaccine compared to gene gun vaccination. This vaccine provide remarkable protective efficacy in mouse and guinea pig models, as compared to the current by available BCG vaccine. HSP 65 + IL-12/HVJ vaccine induced CD8 + cytotoxic T lymphocyte activity against HSP 65 antigen. Protective efficacy of this vaccine was associated with the emergence of IFN- γ -secreting T cells and activation of proliferative T cells as well as CTL induction upon stimulation with the HSP 65 and antigens from *M. tuberculosis*. Furthermore, we extended our studies to a cynomolgus monkey model, which is currently the best animal model of human tuberculosis, to evaluate the HSP 65 + IL-12/HVJ vaccine. Vaccination with HSP 65 + IL-12/HVJ provided better protective efficacy as assessed by the Erythrocyte Sedimentation Rate, chest X-ray findings, and immune responses than BCG. Most importantly, HSP 65 + IL-12/HVJ resulted in an increased survival for over a year. This is the first report of successful DNA vaccination against *M. tuber-*

culosis in the monkey model. Novel TB vaccines using the monkey model will be discussed in this issue.

The development of novel vaccines against tuberculosis was also studied in murine and cynomolgus monkey systems. Four distinct methods; DNA vaccination (1. plasmid, 2. adenovirus vector, 3. adenoassociated virus), 4. recombinant BCG, and 5. subunit (recombinant protein) were used for the development of novel vaccines.

Genes (HSP 65 gene, IL-12 gene as well as Ag 85A-, 85B-, MPB51-gene) and IL-6 related genes (IL-6 gene + IL-6R gene + gp130 gene) were administered into the Balb/c mice infected (i.v. or intra-tracheal injection) with *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Elimination of *M. tuberculosis* in lungs, liver, and spleen of these mice and survival were studied in these models. HSP 65 gene + IL-12 gene vaccination, or recombinant BCG (BA51 : Antigen 85B- + Antigen 85A- + MPB51-gene recombinant BCG) were more prophylactically efficient than parental BCG Tokyo vaccination. In contrast, IL-6 related genes vaccination using adenovirus vector showed therapeutic effect on *M. tuberculosis* infected mice. Cytotoxic T cells (CTL) activity against *M. tuberculosis* in the spleen cells from mice treated with IL-6 related genes vaccination were significantly augmented.

Furthermore, NOD-SCID-PBL/hu mice treated with anti-IL-2 receptor β -chain antibody provide a useful tool for analyzing *in vivo* human T cell immunity against tuberculosis.

In conclusion, we demonstrate the development of a novel HVJ-liposome DNA vaccine encapsulating HSP 65 DNA plus IL-12 DNA. These results suggest that HSP 65 + IL-12/HVJ could be a promising candidate for a new tuberculosis DNA vaccine, which is superior to the currently available BCG vaccine. The goal of our study is to develop a new tuberculosis vaccine superior to BCG. To this aim, we believe that the protective efficacy and protective immune responses for vaccine

candidates should be addressed in larger animals, such as non-human primates, before proceeding to human clinical trials. Although other DNA vaccine candidates that appear to protect against virulent *M. tuberculosis* in mice better than BCG have failed to provide better protection than BCG in guinea pigs against aerosol challenge of a low dose of virulent *M. tuberculosis*, some of them are being prepared to enter early human clinical trials. More recently, we evaluated the HSP 65 + hIL-12/HVJ vaccine in the cynomolgus monkey model, which is currently the best non-human primate animal model of human tuberculosis. Monkeys were subsequently challenged with virulent *M. tuberculosis* by the intra-tracheal route after the third vaccination. This challenge dose normally causes death from acute respiratory infection within 4–6 months. In this particular experiment, monkeys vaccinated with HSP 65 + hIL-12/HVJ induced HSP 65-specific T-cell proliferation and improvement of chest X-P findings, resulting in an increased survival for over a year, superior to BCG group. Thus, we are taking advantage of the availability of multiple animal models (mouse, guinea pig, and monkey) to accumulate essential data of the HVJ-liposome DNA vaccine, including the vaccine efficacy and safety, for up-coming Phase I clinical trials.

Key words: TB vaccine, HSP 65 DNA + IL-12 DNA vaccine, Recombinant BCG vaccine, Clinical application, Cytotoxic T cells, Cynomolgus monkey

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

Correspondence to: Masaji Okada, Clinical Research Center,
National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical
Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591-
8555 Japan. (E-mail: okm@kch.hosp.go.jp)

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

**アジア地域との研究ネットワークの活用
による多剤耐性結核の制御に関する研究**

**平成17年度～19年度 総合研究報告書
vol. 2**

主任研究者 岡田 全司

平成20 (2008) 年3月

最新医学・別冊 新しい診断と治療のABC 41 (別刷)

呼吸器 6 結核・非結核性抗酸菌症

結核ワクチン開発の現況と展望

岡 田 全 司

最 新 医 学 社

第4章 管理・治療・予防

結核ワクチン開発の現況と展望

要旨

BCG ワクチンは、成人に対する結核予防ワクチンとしては有効でない。したがって、新しい結核ワクチン開発を行った。HSP65DNA + IL-12DNA ワクチンは、BCG よりも 1 万倍強力な結核予防ワクチン効果をマウスで示した。さらに、ヒトの結核感染に最も近いモデルのサルにも有効であり、臨床応用を計画中である。また、結核治療効果も示した。他の結核ワクチン開発（リコンビナント 72f BCG など）についても述べる。

はじめに

いまだに世界の 1/3 の 20 億人が結核菌に感染しており、その中から毎年 880 万人の結核患者が発症し、200 万人が毎年結核で死亡している、最大の感染症の 1 つである（WHO レポート 2002 年）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。結核症に対する宿主の抵抗性細胞性免疫と言って過言ではない。特に獲得免疫（キラー T 細胞と Th₁ ヘルパー T 細胞）が重要であり、最近では自然免疫の結核への関与が再び重要視されている。1998 年、米国疾病対策センター（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、結核撲滅対策委員会（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。我々は 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（表 1, 図 1）⁵⁻⁸⁾。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⁾。

● キーワード

結核ワクチン

HSP65 DNA +
IL-12 DNA ワクチンリコンビナント BCG
ワクチン

DNA ワクチン

キラー T 細胞

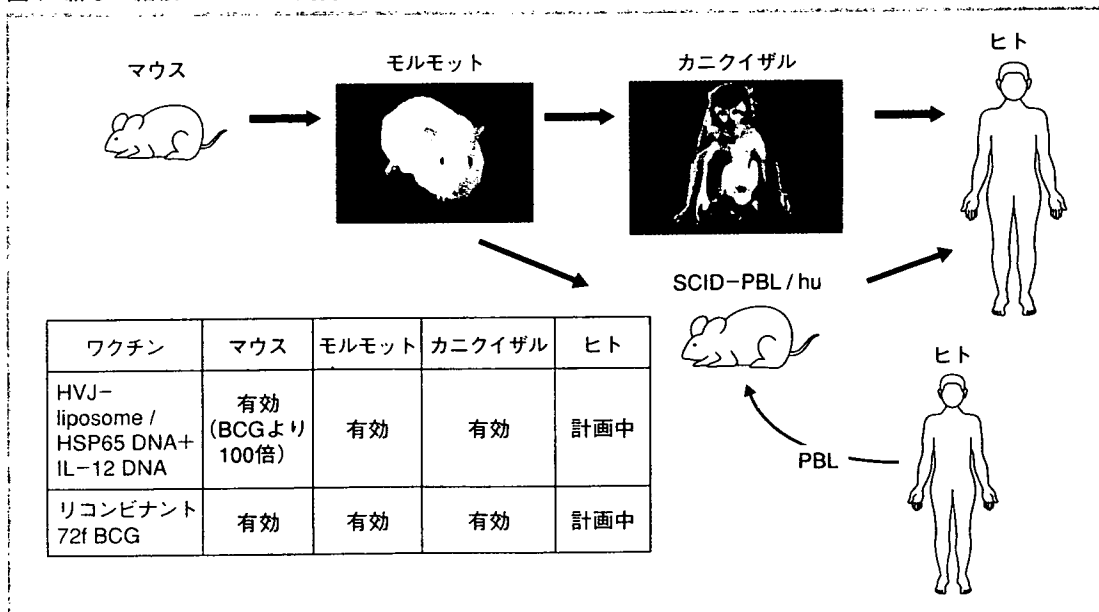
表1 新しい結核ワクチンの開発

(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) DNA ワクチン HVJ-エンベロープ / HSP65DNA + IL-12 DNA	BCG よりはるかに有効 (マウス)
(3) リコンビナント BCG ワクチン	BCG より有効 (マウス, モルモット, カニクイザル)
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)
(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

略語：巻末の略語集参照

図1 新しい結核ワクチンの開発



新しい結核ワクチン開発

1. 現行の BCG ワクチンの有用性

BCG ワクチンの評価は困難である。結核が地球規模での脅威であり、ほかに何ら予防法も治療法も確立されていなかった 70 年以上も前から広範に用いられ、多くの先進国ではその導入と結核の減少に平行関係がみられたこと、安全なワクチンであることより、感染予防効果に厳密な疫学的証拠があるか否かが明確でないままに、長年用いられてきたことがその理由である。1940 年代後半から BCG の結核予防効果に関する野外調査の報告がみられる。高いものは 80% の予防効果から低いものは 0% までの相反する結果が得られている¹⁰⁾。

現行の BCG ワクチンの評価が WHO によりなされた。すなわち、大人（成人）結核に対しては BCG ワクチンは予防効果がないという結論が WHO によって報告された。10 万人を越す南インド農民を対象として実施された大規模な controlled trial (Chingleput study) では、全く有効性が否定される結果となった（上記 WHO の報告¹⁰⁾。（ただし、小児における結核性髄膜炎や粟粒結核など播種性のものには十分な予防効果がある。）したがって、成人の結核に対し有効な新しい結核ワクチンの開発が必須である。事実 1998 年米国政府・ACET, CDC が政府、研究所、大学・企業の三者が一体となって新しい結核ワクチン開発が必須であることを表明した¹¹⁾。

2. BCG ワクチンより 1 万倍強力な結核予防ワクチン

我々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が、画期的な結核の新しいワクチンを開発した。マウスの実験で現行の BCG ワクチンを超える極めて強力な有効性（1 万倍の効果）を確認した。マウスの結核感染系では、BCG ワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチンは極めて少ない。我々は、HSP65 DNA + IL-12 DNA (HVJ-エンベロープベクター) のワクチンは BCG ワクチンよりも 1 万倍強力な結核予防ワクチンであることを世界に先駆けて明らかにした。これらの研究が国内外より極めて高く評価され、当臨床研究センターは WHO（世界保健機関）より WHO STOP TB Partnership に選ばれた。また、大阪大学大学院（医学系研究科）・連携大学院にも選ばれた（表 1）。

表2 新しい結核ワクチン

1. サブユニットワクチン
Mtb 72f fusion タンパク
85B-ESAT6 fusion タンパク
α 抗原 (Antigen 85B), Ag 85A, MPB51, ESAT-6, HSP65
19 kd lipoprotein
リコンビナントサイトカイン (吸入・注射) (IFN γ など)
新しい結核タンパク抗原 Mtb8.8, Mtb9.9, Mtb32, Mtb39, Mtb11 など
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, IFN γ 遺伝子, Mtb72f 遺伝子, IL-15 遺伝子, IL-18 遺伝子, M-CSF 遺伝子, 38 kd DNA, キラーT誘導タンパク遺伝子, CD40L 遺伝子, MPT64 DNA, MPT63 DNA, Kat G DNA, 上記の新しい結核タンパク抗原遺伝子
3. リコンビナント BCG ワクチン
① Mtb 72f 遺伝子
② Antigen 85A-, 85B-, 85C-, MPB51- 遺伝子, MDP-1 遺伝子, ESAT-6 遺伝子, HSP65 遺伝子
③ IL-6 遺伝子, IFN γ 遺伝子, IL-2 遺伝子, IL-12 遺伝子, IL-18 遺伝子
④ キラーT誘導結核タンパク遺伝子
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

略語：巻末の略語集参照

3. 新しい結核ワクチン

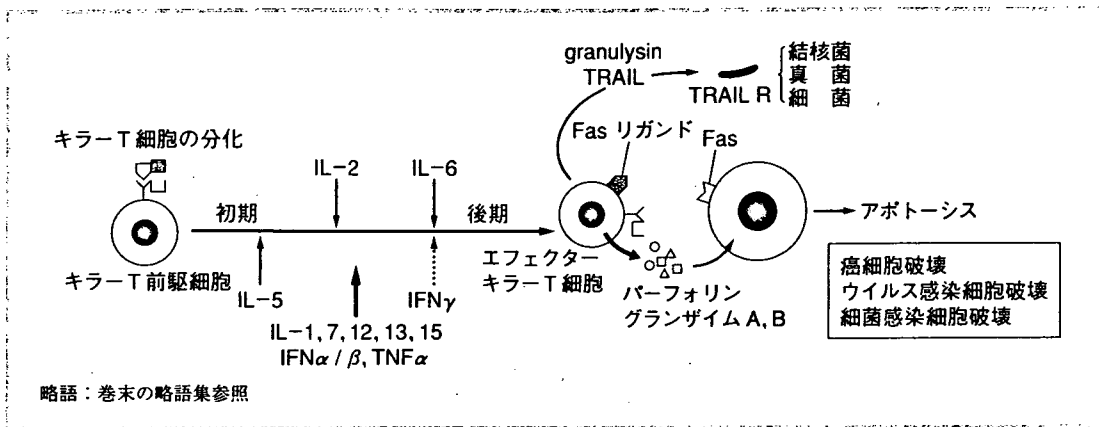
結核ワクチンは ① サブユニットワクチン, ② DNA ワクチン, ③ リコンビナント BCG ワクチン (弱毒化結核菌を含む), その他に大別される (表2).

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極めて少ない。我々は HVJ-liposome / 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 (表1, 図2)⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁹⁾⁽¹¹⁾.

(1) DNA ワクチン

我々は IL-12 DNA + HSP65 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 よりも極めて強力な (約 100

図2 キラーT細胞活性化と細胞傷害機構



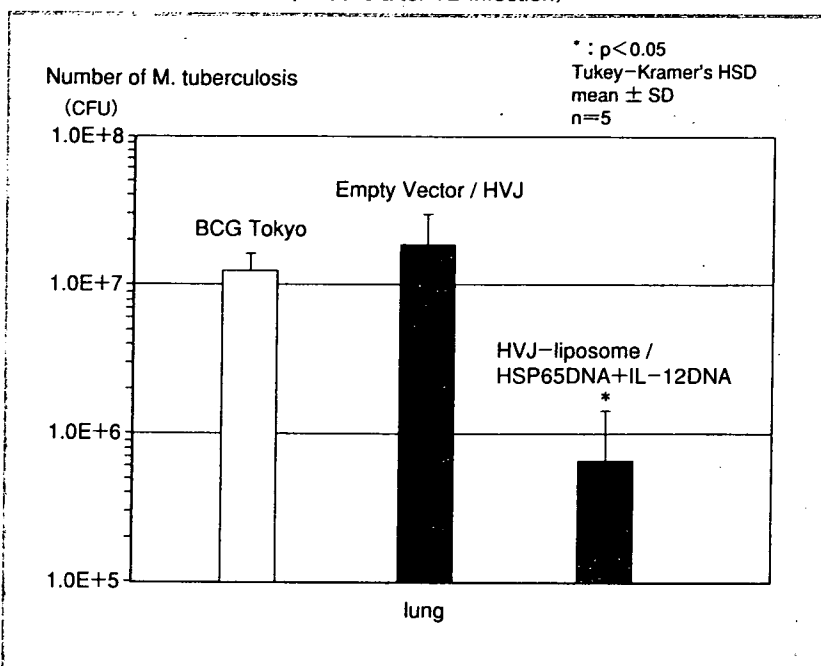
倍) 結核予防ワクチンであることを明らかにした(自治医科大学吉田博士との共同研究)。IL-12 の p35 および p40 を CMV プロモーター下流域に挿入した発現プラスミドを作製した。さらに、ヒト型結核菌 H37RV 由来 HSP65 DNA ワクチンの作製に成功した(表1)¹¹⁾。

HVJ リポソームをベクターに用いた場合、HSP65 DNA 単独(HVJ リポソーム/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(大阪大学医学部金田博士との共同研究)(図2)。

さらに、HSP65 DNA と IL-12 DNA 両者の DNA ワクチンを投与した、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンマウスでは、BCG 東京ワクチンマウスの肺、肝、脾の結核菌数の 100 倍以上の減少が認められた。すなわち、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは、BCG に比較して 100 倍以上強力な結核予防ワクチン効果を示した。さらに、この HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは、HSP65 タンパク抗原に対する脾リンパ球増殖反応を著明に増幅した(BCG ワクチンよりはるかに強い増殖反応)。また、KS-Elispot Assay 自動計測器(ELISA Assay の 200 倍以上の感度)を用いて、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは脾臓のインターフェロン(IFN) γ 産生細胞数の増強と IFN γ 産生細胞の著しい分化増強を誘導することを明らかにした¹¹⁾。

さらに、結核菌に対する CD8 陽性キラーT細胞の分化誘導を増強した。また、結核菌抗原の主要な抗原タンパクである HSP65 タンパク抗原に対する CD8 陽性キラーT細胞の分化誘導を著明に増強し

図3 Prophylactic efficacy of HVJ-liposome / HSP65 DNA+IL-12 DNA vaccine on TB-infected mice (5weeks after TB infection)



た。一方、BCG ワクチンは結核菌に対するキラーT細胞や HSP65 タンパクに対するキラーT細胞誘導活性はほとんど認められなかった(図3, 図4)¹¹⁾。

このように、HVJ-リポソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンは結核菌に対するキラーT細胞分化誘導、IFN γ 産生細胞分化誘導、T細胞増殖反応増強を介して、BCG ワクチンより 100 倍以上強力な結核予防ワクチン効果を発揮することが示された⁶⁾⁷⁾⁹⁾。

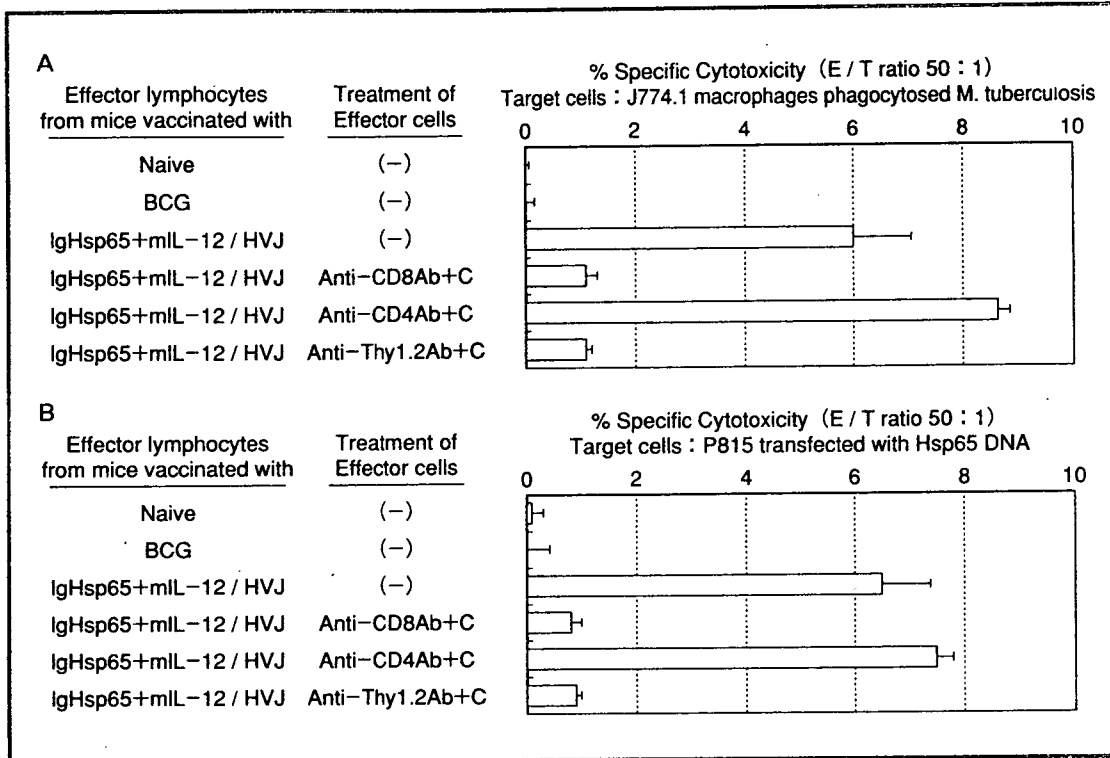
アデノウイルスベクターに導入した IL-6 関連遺伝子 (IL-6 遺伝子+IL-6 受容体遺伝子+gp130 遺伝子) ワクチンは、BCG よりも強力な治療ワクチン効果を示した。

以上のワクチン効果は、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(表1)。

新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され、WHO STOP TB Vaccines Working Group に選出された。

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

図4 Induction of CD8⁺CTL against *M. tuberculosis* in the spleen cells from HVJ-liposome / HSP65 DNA+ IL-12 DNA vaccine



同等の防御効果が得られることを明らかにした。

(2) リコンビナント BCG ワクチン

結核菌は 300 種以上のタンパク質を分泌するが、 α 抗原 Ag 85B とそのファミリー (85A, Ag85C) DNA をリコンビナント BCG に使用した²⁾⁵⁾。

これらの遺伝子を PNN2 シャトルベクター (大腸菌 \leftrightarrow 好酸菌) に組み込み、BCG 東京菌に遺伝子を導入した。我々は BA51 (Ag85A+Ag85B+MPB51) リコンビナント BCG は BCG よりも強力なワクチンであることを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の Mtb72f 融合タンパク質の¹²⁾ DNA を導入したリコンビナント 72f BCG の作製に成功した。このリコンビナント 72f BCG 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 細胞数の増強を誘導することを Elispot Assay で明らかにした。

(3) 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。我々は(浜松医科大学 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-, 85BB-, 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¹³⁾。

(4) 我々が開発した新しい結核ワクチン

新ワクチンは, 前述のごとく, 結核菌の HSP65 というタンパク質と免疫力を高める働きのある IL-12 を作る遺伝子 (DNA) を注射する DNA ワクチンと呼ばれるものである。HVJ ウイルスの殻を利用して DNA を体内の細胞内に送り込んでこれらのタンパク質を作らせ, 強い免疫反応の誘導を狙った。この新しいワクチンは結核免疫に最も重要と考えられている(結核菌に対する) CD8 陽性キラー T 細胞の分化を増強した。さらに, IFN γ 産生 T 細胞の分化を増強した。

マウスに新ワクチンを接種した後, 結核菌を感染させ, 5週間後の結核菌の数を調べた。すると, 新ワクチンを接種したマウスの菌数は BCG 接種のマウスの約 1 千分の 1 で発症を抑えられる程度だった。さらに, あらかじめ BCG を接種してから新ワクチンを打つと, 菌数は約 1 万分の 1 まで抑えられていた。

4. 新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PBL/hu

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⁾。

結核ワクチンと獲得免疫・キラー T 細胞

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 3)³⁾¹⁴⁻¹⁹⁾。

キラーTの1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マクロファージ (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。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。このT細胞は CD1-restricted でミコール酸, リポ・アラビノマンナン (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の顆粒内のタンパクである 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により 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。我々は結核患者、特に多剤耐性結核患者ではキラーT細胞の mRNA の発現およびタンパクの発現が低下していることを明らかにした⁵⁷⁾。すなわち、我々はキラーT細胞の granulysin (分子量 9000) 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細胞の 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 (図3)。

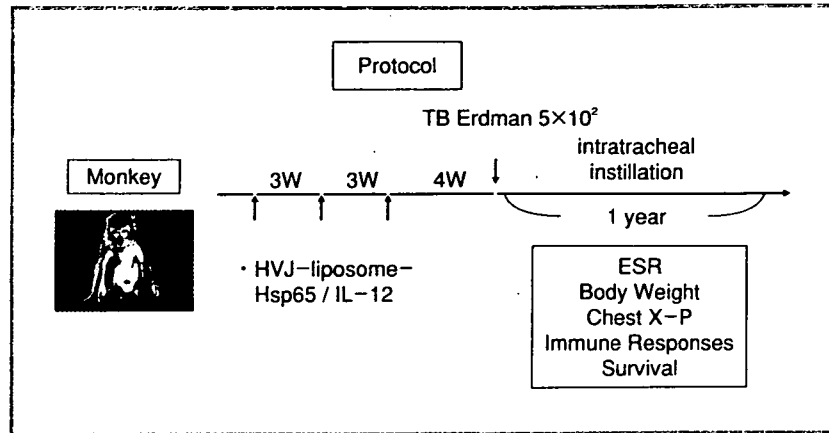
一方、MHC クラス I 拘束性の結核菌の 38 kD タンパク、HSP65 タンパクを認識するマウス CD8 $^+$ キラーT細胞や、19 kD タンパク、Ag85, CFP10 (Mtb11) を認識するヒト CD8 $^+$ キラーT細胞が報告されている。ESAT-6 抗原に対するキラーT細胞で HLA-A2 とは 82~90 位の9個のアミノ酸 AMASTEAGNV が結合してキラーT細胞がこれらを認識する。我々は世界に先駆けて確立したヒト生体内結核免疫応答解析モデル SCID-PBL/hu に、この ESAT-6 ペプチドを投与し、これに特異的で HLA-A2 拘束性を示すヒトキラ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

結核ワクチンの展望

1. 新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル (cynomolgus monkey, 最もヒトの肺結核に近いモ

図5 カニクイザルのワクチン投与実験



デル, Nature Medicine 2,430, 1996 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 2 種を開発した⁸⁾. すなわち, 現在最も有力なものとして HVJ リポソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンおよびリコンビナント 72f BCG ワクチンが挙げられる (表 2). すなわち, カニクイザルに 3 回ワクチン投与を 3 週間隔で行った (図 5). 最終免疫より 4 週間後にヒト結核菌エルドマン株 5×10^2 CFU を気道内注入した. 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) を認め, これらのワクチン効果をサルレベルで認めた (表 3)⁹⁾. すなわち, HVJ リポソーム/HSP65DNA+IL-12DNA 予防ワクチン投与による結核感染カニクイザル生存率改善効果を得た (表 3). また, HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンは血沈改善効果を有意差をもって示した (表 4). さらに, このワクチンを投与したカニクイザルでは, コントロール群に依存し有意差 (pcool) をもって HSP65 抗原に対し増殖増強反応を示した (図 6). 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言う. 72f 融合タンパクサブユニットワクチン, ワクシニアウイ

表3 HVJ-リボソーム / HSP65 DNA + IL-12 DNA 予防ワクチン投与による結核感染カニクイザル生存率改善効果

ワクチン	匹数	生存	死亡	生存率
HVJ-liposome / HSP65DNA + IL-12DNA	4	2	2	50%
BCG	4	2	2	50%
生食	4	0	4	0%

表4 HVJ-リボソーム / HSP65 DNA + IL-12 DNA 予防ワクチンによる結核感染カニクイザルの血沈改善効果

ワクチン	血沈 (mm / hr)	平均 ± S.D	生食投与群に対する有意差検定 (Student t test)
HVJ-liposome / HSP65DNA + IL-12DNA	2 6 4 2	3.5 ± 1.9	P < 0.01
BCG	22 2 20 1	11.25 ± 11.3	有意差なし
生食	50 14 15 40	29.75 ± 18.1	

ルスに 85A DNA を導入したワクチンや r85B BCG (Horowitz ら) は第 I 相 clinical trial となっている²⁰⁾。A. Hill Dr. らのワクシニアウイルス- 85A DNA ワクチンは、アフリカでの第 I 相 clinical trial では、85A DNA タンパクに対する免疫応答増殖が認められた。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)}。

図6 ワクチン投与カニクイザルの末梢リンパ球増殖反応

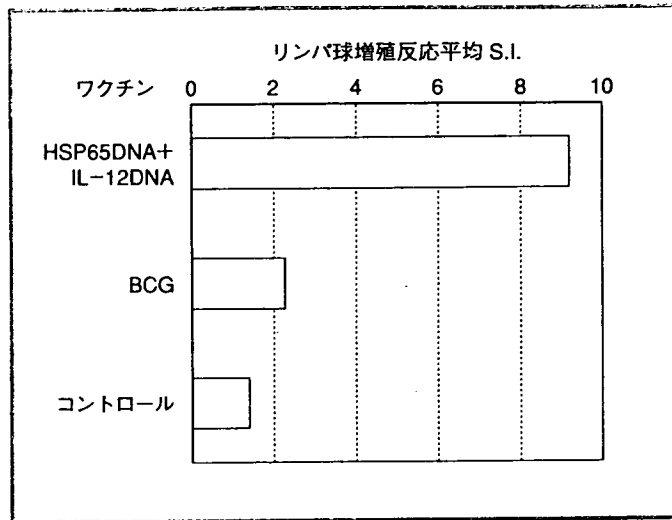
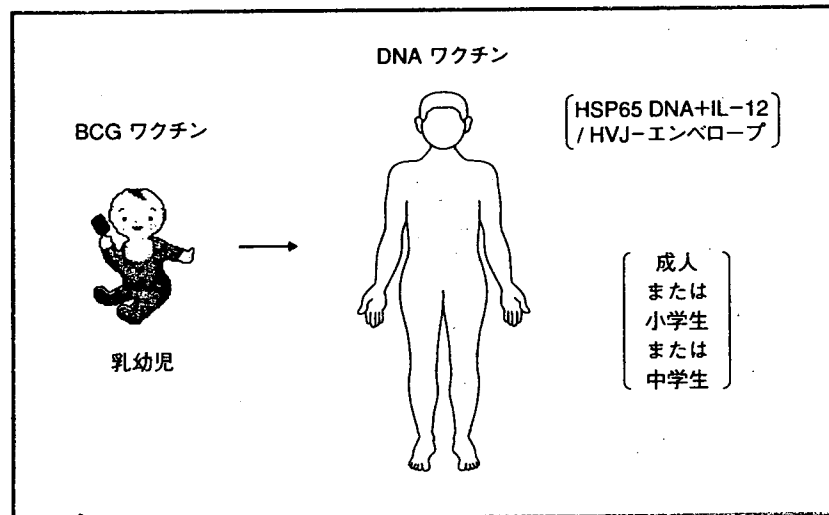


図7 新しい結核予防ワクチン(案) (DNA ワクチン)



2. プライミングブースター法 (乳幼児 BCG-成人 HVJ/HSP65 DNA+IL-12DNA ワクチン)

さらに BCG ワクチンと新ワクチンのプライミングブースター法で 100% の生存を示した。このように、ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いた実験系で、強力な新しい結核ワクチンを我々は世界に先駆けて開発した。すなわち、本邦では乳幼児に BCG 接種が義務づけられていることにより、プライミングワクチンとして BCG

ワクチンを用い、成人ワクチン（小学生、中学生、成人、老人）として切れ味の鋭い我々が開発した HVJ/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチンを、ブースターワクチンとして用いることにより強力な新しい結核ワクチンの臨床応用が可能となる案を計画中である。

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60%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 HSP65 DNA+IL-12 DNA/HVJ-エンベロープワクチンが明らかにすぐれていることより、このワクチンが結核の発症予防や治療に役立つ日が来るであろう。

岡田 全司

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), p.150-161, 本の泉社, 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]», pp.1-140, 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* 23: k2269-2272, 2005.
- 9) 岡田全司, 他: 結核感染とサイトカイン. 医の歩み: サイトカイン-state of arts (泉孝

- 英, 他 編), p.209-213. 医歯薬出版, 東京, 2004.
- 10) 岡田全司: 結核ワクチン. 結核 第4版 (in press), 医学書院, 2006.
 - 11) Yoshida S, et al: 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, 2006.
 - 12) 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.
 - 13) 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. *Infect Immun* 72: 2014-2021, 2004.
 - 14) Cole S T, et al: Deciphering the biology of *Mycobacterium Tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544, 1998.
 - 15) Stenger S, et al: An Antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282: 121-125, 1998.
 - 16) 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.
 - 17) Okada M, et al: Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7718-7721, 1981.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) McShane H, et al: Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med* 10 (11): 1240-1244, 2004.