

ミリーの分子は、膜貫通領域をもたず、細胞質蛋白として存在する。NOD2は、古くより菌体由来の免疫調整物質として知られていたPGNの構成成分であるムラミルジペプチド (MDP) を認識することが示された。

III. キラーT細胞と結核免疫

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)^{3,12-17}。

キラーTの一つの役割として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, LAM, phosphatidyl inositol mannoside, glucose monomycolate, isoprenoid glycolipid (Cdlcと結合)等の結核菌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。我々は結核患者, 特に多剤耐性結核患者ではキラーTリンパ球のmRNAの発現及び蛋白の発現が低下していることを明らかにした^{5,7}。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 kDa蛋白, HSP65蛋白を認識するマウスCD8⁺キラーTや19 kDa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。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AMASTEGNV, 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を生体内で誘導することに初めて成功した。

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インが必要であることをはじめ明らかにした。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。また, モノクローナル抗IL-2抗体を用いて, IL-2はキラーT細胞誘導に必須な因子の一つであることを示した¹⁴(図4)。

さらに, 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クローンを世界に先駆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分化を誘導することを明らかにした^{16,17}。筆者らは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¹⁷(図4)。多剤耐性結核患者PBLにおい

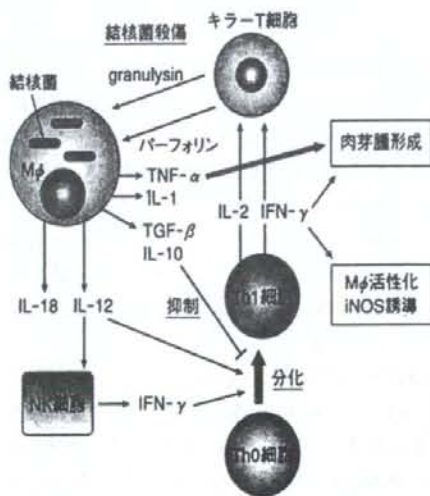


図3 抗結核免疫とマクロファージ, ヘルパーT, キラーT細胞活性化

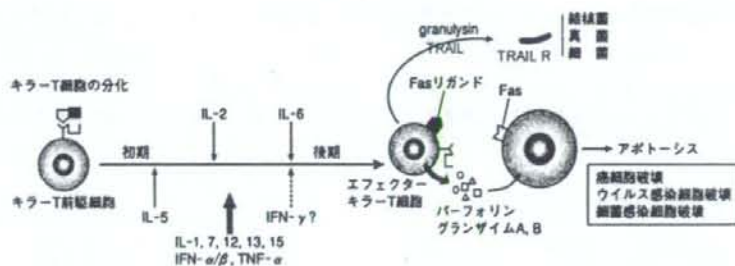


図4 キラーT細胞活性化と細胞傷害機構

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 蛋白
 - 8.5B-ESAT6 fusion 蛋白
 - α 抗原 (Antigen 85B), Ag 85A, 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等 Mtb8.8, Mtb9.9, Mtb32, Mtb39, Mtb11
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, MPT64 DNA, 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
 - 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, 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

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^{5,6,8-10}。また、糖尿病合併難治性結核患者ではPPD特異的キラーTの分化誘導の著しい低下を明らかにした^{5,6,8-10}。

3. サイトカインと結核免疫

抗結核免疫にIFN-γ, TNFα, IL-6, IL-12が重要であることは解析されている(岡田結核文献⁹参照)。

IV. BCG ワクチン

1. 生菌ワクチン菌株としてのBCG

1) BCGの発見

Pasteur研究所のCalmetteとGuerinは、Pasteurの弱毒生菌免疫論を背景に、胆汁によって結核菌を処理すると弱毒化するという知見から、13年間230

代継代培養し、1921年、動物に病原性のない菌株BCG (Bacille de Calmette et Guerin: BCG): *Mycobacterium bovis* strain BCGを得た。現在世界で年間約1億人にBCGが接種されている²⁾。

2) わが国におけるBCGの導入と経過

志賀潔は、大正14年(1925)、パスツール研究所からBCG株を持ち帰った。その後、特に今村ら(大阪大学)によってBCGの動物実験、人体接種が熱心に行われた。

1942年から集団接種が行われ、現在、Tokyo172株 (BCG Japan) (1960年にそれまで胆汁加馬鈴薯培地で継代されていた第172代の株)を凍結乾燥させ、primary seed lot (種菌株)としたものをワクチンとして用いている。

3) BCGの種類と遺伝子変異

BCGの原株はパスツール研究所由来であるが、世界各国に広まり継代されていく間に少し異なる性質となった。世界各国で固有の名称がつけられた代表的なBCG株につき、主にIS6110とmpt64をマーカーにして検べた結果、日本株やロシア株は2コピーのIS6110とmpt64を有する点でBCG原株に近く、Denmark (Copenhagen) 株やGlaxo株などは1コピーのIS6110、mpt64(-)で原株とは異なる。すでに報告された*M. tuberculosis* H37Rv株ゲノムの全配列を基準に、*M. bovis*やBCGの違いをDNAマイクロアレイで調べた最近の報告によれば、少なくとも11の領域(RD: Deletion Regions)が*M. bovis*にはみられず、さらに*M. bovis*にはみられる5つの領域が大半のBCGでは欠失している。

最近(2004年)これらの種々のBCG菌株を同一基準で比較検討し、再評価する方向性を示す会議及び新しい結核ワクチンの開発研究、臨床応用への方向性の会議がWHOによりなされた(WHO U. Fruth, 近畿中央胸部疾患センター 岡田全司, Staten 研究所 P. Andersen, 米国 FDA M. Brennan, 米国 CDC M. F. Iademarcoら)。

4) BCGの有効性

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、他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(表3)¹⁰⁾。特に10万人を超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。この結果を元にWHOはBCGワクチンは成人の結核に無効であると世界中に勧告した。日本もWHOの勧告に従った。高緯度地域に比べ低緯度地域では一般的にBCGの効果が低い傾向が1950年代から指摘されており、高温帯に多い非結核性抗酸菌による自然感作が関係するのではないかといった推測や、用いたBCG中の生菌の割合の違いによる効果の低さなどが推定されている。一方、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。動物実験では、少なくとも静脈内接種感染(血行播種モデル)に対して極めて高い菌数増殖抑制効果が得られる。

V. 新しい結核ワクチン開発

1. BCGワクチンより1万倍強力な結核予防ワクチン

BCGワクチンより1万倍強力な結核予防ワクチンを開発：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

表3 BCG接種の結核防御効果に関する主要野外調査成績

調査地域	調査年	対象例数		結核発症者数		防御率 %
		対象群	BCG群	対象群	BCG群	
カナダ	1949	303	306	29	6	80
北アメリカ	1958	1,451	1,541	372	108	75
南アフリカ	1968	17,135	20,623	74	48	37
米国	1969	2,341	2,398	3	5	0
インド (Madanapalle)	1973	5,808	5,069	46	28	31
ハイチ	1973	629	2,545	15	25	80
プエルトリコ	1974	27,338	50,634	141	186	31
米国	1976	17,854	16,913	32	26	14
米国	1977	12,867	13,958	93	56	77
インド (Chingleput)	1980	79,398	272,455	93	192	0

(文献10)より引用)

を世界に先駆けて明らかにした。このワクチンでマウスを免疫して結核菌を投与すると、マウス肺の結核菌数が BCG ワクチン投与の 1 万分の 1 以下となった。これを 1 万倍強力という。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 (表 1)。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。

2. 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。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 (表 1, 図 2)^{6,7,9,18)}。

1) DNA ワクチン

われわれは 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 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)¹⁸⁾。

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 (大阪大学医学部金田博士との共同研究) (図 2, 図 5)。

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 (図 5)。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 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¹⁸⁾。

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 5)¹⁸⁾。

このように、HVJ-リボソーム/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 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。

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 (図 6)。

新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され、WHO STOP TB VACCINE GROUP MEETING 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⇄好酸菌) 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) 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及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¹⁹⁾ 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 細胞数の増強を誘導することを Elispot Assay で明らかにし

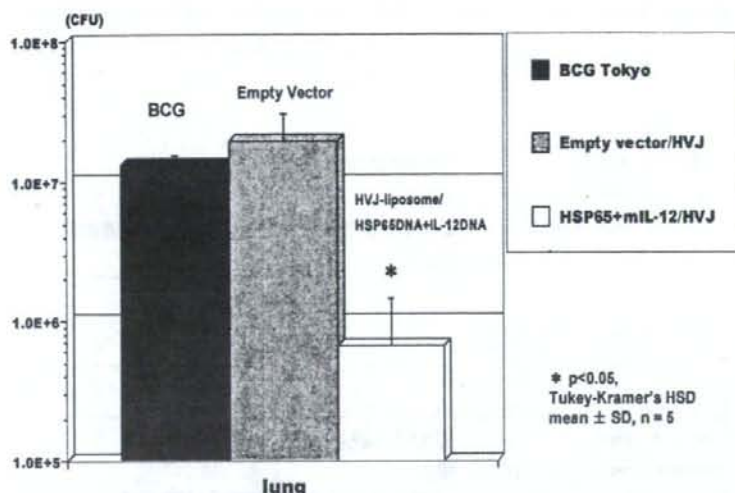


図5 Prophylactic efficacy of HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine in TB-infected mice (5weeks after TB infection)
Number of *M. tuberculosis*

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⁹⁾。

4) 我々が開発した, 新しい結核ワクチン

新ワクチンは, 前述の如く, 結核菌の HSP65 というたんぱく質と免疫力を高める働きのあるインターロイキン-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たんぱく質を作らせ, 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。

マウスの実験系: 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。

3. 新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PBL/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^{6,7,9)}。

VI. 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) を示すワクチン二種を開発した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 ワクチン及び, r72f BCG ワクチンがあげられる (図 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。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, 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)。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), 生存を認め, これらのワクチン効果をサルレベル

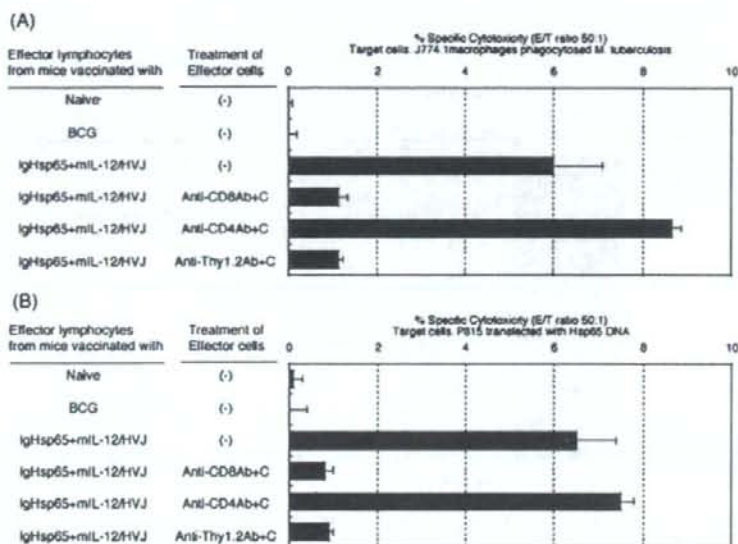


図6 Induction of CD8⁺ CTL against *M. tuberculosis* in the spleen cells from HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine

表4 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/HSP65 DNA + IL-12DNA	4	2	2	50%
BCG	4	2	2	50%
生食	4	0	4	0%

で認めた⁸⁾ (表4)。すなわち、HVJリボソーム/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4)。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5)。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 (図7, 8)。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²¹⁾。A. Hill Dr. らのワクシニアウイルス-85A DNA ワクチンは、アフリカでの第一相

表5 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/HSP65 DNA + IL-12DNA	2	3.5 ± 1.9	P < 0.01
	6		
	4		
	2		
BCG	22	11.25 ± 11.3	有意差なし
	2		
	20		
	1		
生食	50	29.75 ± 18.1	
	14		
	15		
	40		

clinical trial では、85A DNA 蛋白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、極めて強力なワクチン開発を目指している⁵⁻⁷⁾。

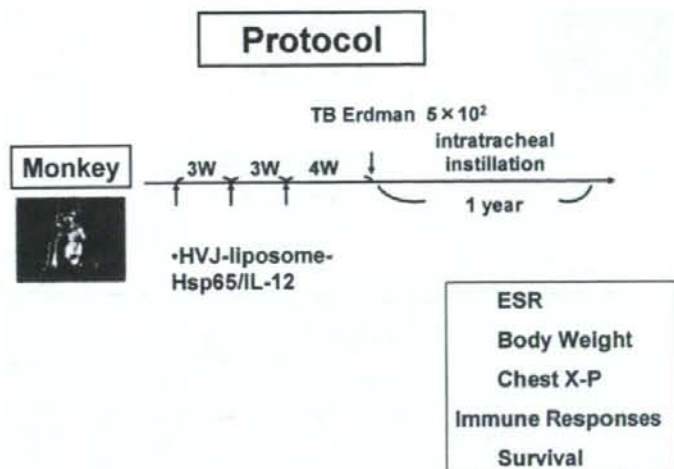


図7

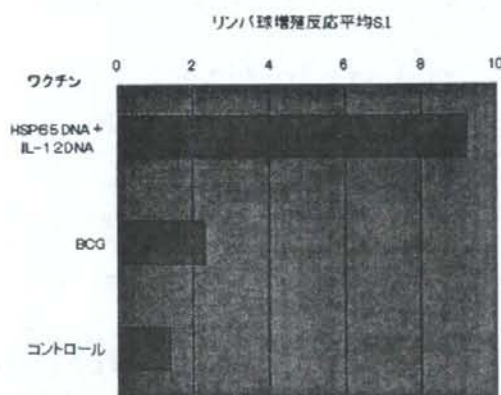


図8 ワクチン投与カニクイザルの末梢リンパ球増殖反応

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 ワクチンをプライムし、新しいワクチンをブースターする方法を用いた。このプライミングブースター法で 100% の生存を示した²¹⁾ (図 9)。一方、BCG ワクチン単独投与群は 33% の生存率であった²²⁾。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 (中学生、成

人、老人) として切れ味のするどい我々が開発したこの DNA 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 (図 10)。

VII. Stop TB Partnership

TB VACCINE PIPELINE (New TB Vaccine Working Group, November 2007) として、Stop TB Partnership (WHO) は 2008 年 2 月 7 日に現在進行中で、しかも臨床応用に有望な新しい結核ワクチン開発のリストを発表した。

我々の HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンも候補の一つとしてその中に推奨されている (表 5, 6, 7)。

2006-2015 年 Global Plan to Stop TB として新しい有効な結核ワクチン開発。

2050 年までに結核撲滅。が WHO の目標である。これらのワクチンについて概略する。

1. 結核ワクチンの方法

- (1) Prevent infection
- (2) Prevent disease
- (3) Prevent reactivation of latent TB infection
- (4) Shorten the course and improve the response to chemotherapy

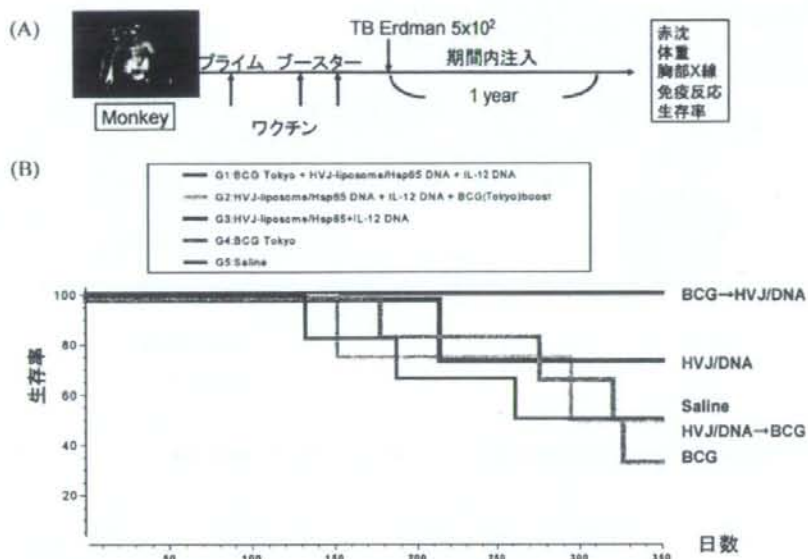


図9 ヒトの結核感染に最も近いカンキウザルを用いたの末 Hsp65 蛋白をコードする DNA を用いた。HVJ-リボソーム/HSP-65 DNA + IL-12 DNA ワクチンの結核予防効果

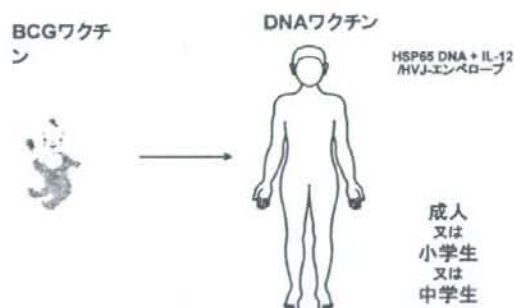


図10 新しい結核予防ワクチン(案)(DNA ワクチン)

2. 三つのカテゴリーに結核ワクチンは分類される

- (1) Priming, Pre-Exposure
- (2) Boosting, Pre-Exposure
- (3) Post Exposure-Immunotherapy

VIII. おわりに

HSP65 DNA + IL-12 DNA/HVJ エンベロップワクチンが明らかにすぐれていることにより、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だろう。

これらの研究は、厚生労働省、厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業、文部科学研究

費、大阪結核予防会等により支援を受けた。

文 献

- 1) 岡田全司：結核「分子予防環境医学：生命科学研究所の子防・環境医学への統合」(分子予防環境医学研究会編)。本の泉社，pp. 150-161, 2003.
- 2) 岡田全司，田中高中生，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* 39: 144-154, 2002.
- 3) Flynn, J. L., Chan, J.: Immunology of Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 93-129, 2001.
- 4) Schluger, N. W., Rom, W. N.: 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. *最新医学* 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, Tanaka T, Inoue Y, et al.: Novel

表 6

A. Priming, Pre-Exposure	
	特徴
1. Phase I : 現在-2008 年	
a. rBCG30	リコンビナント 85B BCG
b. rBCG30.Δ ureC : Hly (VPM1002)	リコンビナント listeriolysin BCG
c. AERAS-407	リコンビナント perfringiolysin
d. rBCG30ARMF, rBCG Mtb B30, rBCG h IFNy	リコンビナント 85B BCG
e. Nas L3/Htk BCG	鼻粘膜ワクチン/heat killed whole BCG コペンハーゲン株
f. mc ² 6220, mc ² 6221, mc ² 6222, mc ² 6231	non-replicating, M. Tuberculosis strain (Δlys A Δ pan CD)
g. mc ² 5059	replicating pro-apoptotic M. bovis BCG 株 (Δnuo G)
2. Phase I 2009 or Later	
a. HBHA (heparin-binding haemagglutinin)	メチル化 21-K Da 蛋白
c. Attenuated Live Vaccine based on Phop	弱毒化ヒト結核菌 (virulence gene の pho P の不活性)
b. paBCG (pro-apoptotic BCG)	anti-apoptotic 酵素活性を減弱

表 7

B. BOOSTING, PRE-Exposure	
	特徴
1. Phase I : 現在-2008 年	
a. MVA85A	リコンビナント MVA (Ag85A を発現した)
b. M72	Mtb32 + Mtb29 の fusion 蛋白
c. AERAS-402	Replication-incompetent adenovirus 35 vector expressing M. Tuberculosis antigens Ag85A, Ag85B, and TB 10.4.
d. SSI Hybrid-1	fusion 蛋白 (Ag85B-ESAT-6)
e. SSI HyVac4/AERAS-404	fusion 蛋白 (Ag85B-TB10.4)
f. AERAS-405	Shigella-delivered recombinant double-stranded RNA nucleocapsid (Ag85A, 85B, Rv3407, latency antigen)
g. r30	リコンビナント Ag85B 蛋白
h. Nas L3/Htk BCG	
2. Phase I : 2009 or Later	
a. Hsp C TM TB Vaccine	Heat shock protein antigen complexes (Hsp Cs)
b. HBHA (heparin-binding haemagglutinin)	
c. NasL ₃ /AM85B conjugate	Nasal vaccine/Man capped Arabinomannan oligosaccharide
d. PP1, PP2, PP3	BCG boosting
f. AC ₂ SGL Diacylated Sulfoglycolipids	AC ₂ SGL Mycobacterial lipids
g. HVJ-liposome/Hsp65 DNA + IL-12 DNA	M. Okada, 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター

- (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis. Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference 171-175, 2002.
- 8) Kita, Y., Tanaka, T., Yoshida, S., et al. : Novel recombinant BCG- and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine* 23 : 2269-2272, 2005.
- 9) 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, 宮坂信之, 宮島篤編 (医歯薬出版). pp. 209-213, 2004.
- 10) 岡田全司 : 結核ワクチン. 結核 第4版 (医学書院) (編集 泉孝英, 網谷良一) 2004 (in press).
- 11) Akira, S. : Toll-like receptor and innate immunity, *Adv. in Immunol.* 78 : 1-56, 2001.
- 12) Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., et al. : Deciphering the biology of Mycobacterium Tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 93 : 537-544, 1998.
- 13) Stenger, S., Hanson, D. A., Teitelbaum, R., et al. : An Antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282 : 121-125, 1998.
- 14) Tanaka, F., Abe, M., Akiyoshi, T., et al. : The anti-human tumor effect and generation of

表 8

C. POST EXPOSURE-Immunotherapy	
1. Phase I : 現在-2008 年	特徴
a. Mycobacterium vaccae Heat-Killed	
b. MVA85A	
c. RUTI	Fragmented M. Tuberculosis cells
d. Nas L3/Htk BCG	
2. Phase I : 2009 or Later	
a. NasL ₃ /AM85B conjugate	
b. hspDNA vaccine	naked hsp 65 DNA vaccine
c. HG856A	Chimeric ESAT6/Ag 85A DNA ワクチン
d. HBHA (heparin-binding haemagglutinin)	
e. HG856-BCG	Recombinant BCG overexpressing chimeric ESAT6/Ag85A fusion protein
f. HG856-SeV	Recombinant Sendai virus overexpressing chimeric ESAT6/Ag85A fusion protein
g. TB Vax	Epitope-based DNA-prime/peptide-boost vaccine. (liposome と CpG アジュバント)
h. F36, F727	
i. Mycobacterium vaccae Heat-Killed	
j. Ac ₂ SGL Diacylated Sulfolipid	

- 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.
- 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.* **78** : 7718-7721, 1981.
- 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.* **157** : 583-590, 1983.
- 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.* **141** : 1543-1549, 1988.
- 18) 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.
- 19) Skeiky, Y. A., Alderson, M. R., Owendale, P. J., 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.
- 20) 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* **72**(4) : 2014-2021, 2004.
- 21) McShane, H., Pathan, A. A., Sander, C. R., Keating, S. M., Gilbert, S. C., Huygen, K., Fletcher, H. A., Hill, A. V. : 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.
- 22) Okada, M., Kita, Y., Nakajima, T., et al. : Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine* **25** : 2990-2993, 2007.)

第83回総会ミニシンポジウム

I. ワクチン研究の現在と将来

座長 ¹小林 和夫 ²菅原 勇

キーワード：改良BCG，弱毒結核菌，成分ワクチン，DNAワクチン，感染曝露前（予防）ワクチン，感染曝露後（治療）ワクチン

発表者：

1. 新しい結核 DNA ワクチン
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）
2. BCG vaccine trials in South Africa
Gregory HUSSEY (South African Tuberculosis Vaccine
Initiative, University of Cape Town, Cape Town, South
Africa)
3. Present and future of TB vaccine development research
Peter ANDERSEN (Statens Serum Institute, Copenha-
gen, Denmark)
4. Comments and directions in research and development of
TB vaccines
Jerald C. SADOFF (Aeras Global TB Vaccine Founda-
tion, Bethesda, Maryland, USA)

全世界で約20億人（全人口の3分の1）が結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）に既感染，すなわち，無症候性潜伏感染し，毎年920万人が結核を発病，170万人（後天性免疫不全症候群合併23万人を含む）が死亡している（<http://www.who.int/tb/en/>）。今後10年間に，少なくとも8000万人が結核を発病，2000万人が死亡することが推定されている。

日本（2006年）では年間2.6万人（罹患率人口10万対：20.6）が結核を発病し，2.3千人（死亡率：1.8）が死亡し，日本においても結核対策は重要な課題である。Robert Kochが1882年に「結核菌」を発見，爾来，120年余が経過した現在でも，国内外を問わず，結核は人類に甚大な

健康被害を提供し続けている。

結核対策における世界的課題として，①薬剤耐性結核菌の出現や蔓延および②HIV-結核菌の重複感染がきわめて重要である。これらの課題を克服する科学的戦略は「安全で有効な結核ワクチン」である。現行結核ワクチンである bacillus Calmette-Guérin (BCG) は乳幼児結核に有効であるが，潜在性結核菌感染を基盤とした多くの成人肺結核や内因性再燃結核に対する BCG 接種の有効性は疑問視されている。

世界保健機関（WHO）は2015年までに現行 BCG を凌駕する新規結核ワクチンの開発を目指している。新規結核ワクチンの開発戦略は「予防・治療：感染曝露前（予防的）や感染曝露後（治療的）ワクチン」，「ワクチン製剤：改良型 BCG，弱毒結核菌，成分ワクチンや DNA など遺伝子ワクチン」，「接種方法：Prime や Prime-boost ワクチン」などの視点から進捗しており，前臨床試験，さらに，第1相など臨床試験で評価され，有望なワクチン候補が開発されつつある。

第83回日本結核病学会総会（石川信克会長）において，ミニシンポジウム「ワクチン研究の現在と将来」を企画し，世界の第一線で活躍されている気鋭の結核ワクチン研究者が結核ワクチン開発の現況や将来展望を発表した。ミニシンポジウム「ワクチン研究の現在と将来」が会員諸氏に有用な情報を提供，そして，研究室から臨床に迅速・効率的に“橋渡し（Translation）”し，究極的に人類に甚大な健康被害を提供し続けている結核の制圧に寄与することを祈念している。

¹国立感染症研究所免疫部，²結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンター

連絡先：小林和夫，国立感染症研究所免疫部，〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1（E-mail: kobayak@nih.go.jp）
（Received 16 Jul. 2008）

1. 新しい結核 DNA ワクチン

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 岡田 全司

1998年、アメリカ合衆国疾病対策予防センター (Centers for Disease Control and Prevention: CDC) および Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis (ACET) は新世代の結核ワクチン開発の必要性を発表した。しかしながら、BCG ワクチン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。結核ワクチンは、DNA ワクチン、リコンビナント BCG ワクチン、サブユニットワクチンに大別される。DNA ワクチンは予防ワクチン効果の切れ味でははかより優れていることが多く、安定性・経済的にも優れている。われわれは BCG ワクチンをはるかに凌駕する 1 万倍強力な結核予防ワクチン効果を示す新しい DNA ワクチン (HVJ-エンベロープ/HSP 65+IL-12 DNA ワクチン) を開発した。

[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きわめて少ない。われわれはプライム・ブースター法を用い、HSP 65 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。このワクチンは、結核菌由来の HSP 65 蛋白抗原特異的な、CD8 陽性キラー T 細胞および interferon: IFN-gamma 産生 T 細胞の分化も増強した。肺の結核病理像の改善効果も示した。さらに生体内において、CD8 陽性 T 細胞と CD4 陽性 T 細胞の両者がこの結核予防ワクチンに必要であることを明らかにした。

[治療ワクチン] さらに、このワクチンは治療結核ワクチン効果も示した。すなわち結核菌をあらかじめ投与したマウスにおいて HVJ-エンベロープ/HSP 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンを 3 回治療投与すると、コントロール群に比較して有意差をもって肺・肝・脾の結核菌数の減少を認めた。多剤耐性結核菌や超薬剤耐性結核 (XDR-TB) に対しても治療ワクチン効果を示した。欧米では治療ワクチンは未開発である。モルモット (結核菌吸入感染系) の系でもこのワクチンは BCG より有効であった。[新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PBL/hu] を用いてもワクチン効果を示した。

さらに、[ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザル] (Nature Med. 1996) を用い、HSP 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンの強力な有効性を得た。カニクイザルに 3 回ワクチン接種後 4 週間後にヒト結核菌を経気道投与し、1 年以上経過観察した。リンパ球増殖反応・サイトカイン (IFN-gamma, IL-2 等) 産生の増強および胸部 X

線所見・血沈、体重の改善効果が認められた。さらに、生存率改善・延命効果も認められた。DNA ワクチン投与群は 50% の生存率であり、コントロール群は生存率 0% であった。さらに、サル系の系でプライム-ブースター法を用いて、より強力なワクチン開発を行った。その結果、BCG ワクチン・プライム-DNA ワクチン・ブースター法を用いた群は 100% の生存率を示した。一方、BCG ワクチン単独群は 33% の生存率であった。成人に対して切れ味の鋭い強力な新しい結核ワクチンが有望されているが、BCG ワクチンは乳幼児ではほぼ全員に実施されていることより HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンが強力な成人ワクチンとなることが示唆された。WHO STOP TB VACCINE Meeting でこのワクチンはきわめて高い評価を受けた。さらに、このワクチンを鼻粘膜または気道内ワクチンとして投与を試みつつある。さらに、カニクイザルの系で治療ワクチン効果およびプライムとブースターの期間を長期間とって、プライム-ブースター法を研究中である。(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, 西田, 仲谷, 高尾, 栖原, 岸上 各研究員, R.Gelber 博士, B.Tan 博士, 中島俊洋博士, 長澤鉄二博士, 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補助金の支援による)

We have developed a novel tuberculosis (TB) vaccine; a combination of the DNA vaccines expressing mycobacterial heat shock protein 65 (HSP 65) and interleukin 12 (IL-12) delivered by the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-envelope and -liposome (HSP 65+IL-12/HVJ). This vaccine provided remarkable protective efficacy in mouse and guinea pig models compared to the BCG vaccine on the basis of C.F.U of number of TB, survival, an induction of the CD8 positive CTL activity and improvement of the histopathological tuberculosis lesions. This vaccine provided therapeutic efficacy against multi-drug resistant TB (MDR-TB) and extensively drug resistant TB (XDR-TB) (prolongation of survival time and the decrease in the number of TB in the lung) as well as protective efficacy in murine models. Furthermore, we extended our studies to a cynomolgus monkey model, which is currently the best animal model of human tuberculosis. This novel vaccine provided a higher level of the protective efficacy than BCG based upon the assessment of mortality, the ESR, body weight, chest X-ray findings and immune responses (IFN- γ , IL-2, IL-6 produc-

tion, and lymphocyte proliferation of cynomolgus monkey). All monkeys in the control group (saline) died within 8 months, while 50% of monkeys in the HSP 65+IL-12/HVJ group survived more than 14 months post-infection (the termination period of the experiment). Furthermore, the combination of HSP 65+IL-12/HVJ and BCG by the priming-booster method showed a synergistic effect in the TB-infected cynomolgus monkey (100% survival). In contrast, 33% of monkeys from BCG Tokyo alone group were alive (33% survival). Furthermore, this vaccine exerted therapeutic efficacy in the TB-infected monkeys. These data indicate that our novel DNA vaccine might be useful against *Mycobacterium tuberculosis* for human clinical trials.

References

- 1) Okada M, Kita Y, Nakajima T, et al.: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP 65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine*. 2007; 25: 2990-3.
- 2) Nakano H, Nagata T, Suda T, et al.: Immunization with

dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to an epitope on antigen 85A. *Vaccine*. 2006; 24: 2110-9.

- 3) Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, 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: 1191-204.
- 4) Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, et al.: Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine*. 2005; 23: 2132-5.
- 5) 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/MP75. *Infect Immun*. 2004; 72: 2014-21.

2. BCG vaccine trials in South Africa

South African Tuberculosis Vaccine Initiative, University of Cape Town Gregory HUSSEY

The South African Tuberculosis Vaccine Initiative, located within the University of Cape Town, has been involved in a number of BCG vaccine trials over the last few years and in this presentation I will highlight results from some of our studies.

A randomized trial comparing the efficacy of percutaneous versus intradermal BCG in the prevention of tuberculosis disease in infants and young children

Intradermal BCG vaccine is currently recommended by the World Health Organization (WHO). Prior to this study, no randomized trial comparing the relative incidence of tuberculosis following intradermal as opposed to percutaneous BCG vaccination had been conducted. 11680 South African newborns were randomized to receive Tokyo 172 BCG vaccine via either the percutaneous (n=5775) or the intradermal (n=5905) route within 24 hours of birth and then followed up for 2 years to document and investigate adverse events and suspected tuberculosis (TB) disease. The cumulative incidence of tuberculosis over two years of follow up was 6.13% [95.5% CI: 5.52-6.79%] in the intradermal group and 6.49% [5.86-7.18%] in the percutaneous group. No significant differences were found between the routes in the cumulative incidence of adverse events. Our results suggest that the WHO should consider revising its policy of preferential intradermal vaccination to allow national immunization programs to

choose percutaneous vaccination if that is more practical.

Determining BCG-induced immune correlates of protection against childhood tuberculosis disease

This study aims to determine what we can measure in the blood of a BCG-vaccinated baby to tell us whether that infant has either been protected, or not protected, against future tuberculosis disease. Defining these "immune correlates" is critical for studies of new tuberculosis vaccines. 5675 infants, routinely vaccinated with BCG at birth were enrolled. Blood was collected, processed and cryopreserved at 10 weeks of age, and the infants were followed for at least 2 years. 45 infants developed culture-positive lung tuberculosis over this period (i.e., not protected by BCG). 91 infants did not develop tuberculosis disease despite exposure to adults with tuberculosis in the households (i.e., protected by BCG). We are now in the process of retrieving blood products stored at 10 weeks of age, to compare BCG-induced immunity in the 2 groups. Our comprehensive approach to analysis includes: determining cytokine levels in plasma, evaluating cytokine expression and the memory phenotype of specific T cells, determining specific T cell proliferative and cytokine-producing capacity, assessing the pattern of mRNA expression, and determining whether BCG-induced antibody production patterns may correlate with protection. Results will be presented.

The effect of BCG strain and route of administration on the immune responses caused by the vaccine in infants

At present, we do not know whether BCG strain or route of administration determine efficacy. We evaluated antigen-specific immunity after percutaneous or intradermal administration of Japanese BCG or intradermal administration of Danish BCG. Ten weeks after vaccination of neonates, percutaneous Japanese BCG had induced significantly higher frequencies of BCG-specific IFN- γ -producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in BCG-stimulated whole blood; significantly greater secretion of the T helper 1-type cytokines IFN- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL) 2; and significantly lower secretion of the T helper 2-type cytokine IL-4; and greater CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation than did intradermal Danish BCG. Thus, BCG strain and route of vaccination confer different levels of immune activation, which may affect the efficacy of the vaccine.

Immune response to BCG vaccination in HIV-infected newborns

We have evaluated the risks and benefits of BCG vaccination in HIV-infected infants. However, we do not know whether BCG does protect HIV-infected children against the disease; rather BCG may itself cause disease in this population. Sequential BCG-induced immune responses were determined in 22 HIV-positive infants compared with that in 25 healthy infants born to mothers not infected with HIV and in 25 HIV-negative infants born to HIV-positive mothers. Results will be presented in the near future.

References

- 1) Hawkrige T, Scriba TJ, Gelderbloem S, et al.: Safety and

immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa. *J Infect Dis.* 2008; 198: 544-52.

- 2) Soares AP, Scriba TJ, Joseph S, et al.: Bacillus Calmette-Guérin vaccination of human newborns induces T cells with complex cytokine and phenotypic profiles. *J Immunol.* 2008; 180: 3569-77.
- 3) Hussey G, Hawkrige T, Hanekom W: Childhood tuberculosis: old and new vaccines. *Paediatr Respir Rev.* 2007; 8: 148-54.
- 4) Moyo S, Hawkrige T, Mahomed H, et al.: Determining causes of mortality in children enrolled in a vaccine field trial in a rural area in the Western Cape Province of South Africa. *J Paediatr Child Health.* 2007; 43: 178-83.
- 5) Hatherill M, Hawkrige T, Whitelaw A, et al.: Isolation of non-tuberculous mycobacteria in children investigated for pulmonary tuberculosis. *PLoS ONE.* 2006; 1: e21.
- 6) Mahomed H, Kibel M, Hawkrige T, et al.: The impact of a change in bacille Calmette-Guérin vaccine policy on tuberculosis incidence in children in Cape Town, South Africa. *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25: 1167-72.
- 7) Murray RA, Mansoor N, Harbacheuski R, et al.: Bacillus Calmette Guérin vaccination of human newborns induces a specific, functional CD8⁺ T cell response. *J Immunol.* 2006; 177: 5647-51.
- 8) Davids V, Hanekom WA, Mansoor N, et al.: The effect of bacille Calmette-Guérin vaccine strain and route of administration on induced immune responses in vaccinated infants. *J Infect Dis.* 2006; 193: 531-6.

3. Present and future of TB vaccine development research

Department of Infectious Disease Immunology and the SSI Centre for Vaccine Research, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark

Peter ANDERSEN

Tuberculosis (TB) kills 2-3 million people every year. The current tuberculosis (TB) vaccine *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) is the most widely used vaccine worldwide, but it does not prevent the establishment of latent TB or reactivation of pulmonary disease in adults. The development of subunit vaccines has now reached the point where single antigens as well as poly-protein fusion molecules have been evaluated in animal models and found to provide efficient protection against tuberculosis. The most advanced of these vaccines such as the fusion between ESAT6/TB 10.4 and Ag85B are now in clinical trials. Currently the focus is on evaluating the influence of different adjuvants, live delivery systems, routes and prime-boost

regimes for optimal expression of immunity in the lung, boosting of BCG and maintenance of immunological memory. Subunit vaccines can be used to boost BCG immunity either administered together (Tandem administration), shortly after BCG (early boost) or in adolescence when BCG immunity starts to wane (Late boost). A late BCG boost would frequently be administered post-exposure to latently infected individuals and ongoing efforts are focused on understanding the impact this would have on existing vaccines and for the design of efficient booster vaccines.

References

- 1) Dietrich J, Billeskov R, Doherty TM, et al.: Synergistic

- effect of bacillus Calmette-Guérin and a tuberculosis subunit vaccine in cationic liposomes: increased immunogenicity and protection. *J Immunol.* 2007; 178: 3721-30.
- 2) Andersen P: Vaccine strategies against latent tuberculosis infection. *Trends Microbiol.* 2007; 15: 7-13.
 - 3) Dietrich J, Andersen C, Rappuoli R, et al.: Mucosal administration of Ag85B-ESAT-6 protects against infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts prior bacillus Calmette-Guérin immunity. *J Immunol.* 2006; 177: 6353-60.
 - 4) Dietrich J, Lundberg CV, Andersen P: TB vaccine strategies — what is needed to solve a complex problem? *Tuberculosis (Edinb.)*. 2006; 86: 163-8.
 - 5) Agger EM, Rosenkrands I, Olsen AW, et al.: Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine.* 2006; 24: 5452-60.
 - 6) Doherty TM, Andersen P: Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18: 687-702.
 - 7) Andersen P, Doherty TM: The success and failure of BCG. Implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3: 656-62.
 - 8) Andersen P, Doherty TM: TB subunit vaccines — putting the pieces together. *Microbes Infect.* 2005; 7: 911-21.
 - 9) Dietrich J, Aagaard C, Leah R, et al.: Exchanging ESAT6 with TB 10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. *J Immunol.* 2005; 174: 6332-9.

4. Comments and directions in research and development of TB vaccines

Aeras Global TB Vaccine Foundation, Bethesda, Maryland, USA Jerald C. SADOFF

The 83rd Annual Meeting Mini-symposium

RESEARCH AND DEVELOPMENT OF VACCINES AGAINST TUBERCULOSIS

Chairpersons: ¹Kazuo KOBAYASHI and ²Isamu SUGAWARA

Speakers:

1. Novel DNA vaccines against tuberculosis: Masaji OKADA (Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center)
2. BCG vaccine trials in South Africa: Gregory HUSSEY (South African Tuberculosis Vaccine Initiative, University of Cape Town, Cape Town, South Africa)
3. Present and future of TB vaccine development research: Peter ANDERSEN (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark)
4. Comments and directions in research and development of TB vaccines: Jerald C. SADOFF (Aeras Global TB Vaccine Foundation, Bethesda, Maryland, USA)

Mycobacterium tuberculosis is one of the most successful bacterial parasites of humans, infecting over one-third of the population of the world as latent infection without clinical manifestations. Over 9.2 million new cases and nearly 1.7 million deaths by tuberculosis (TB) occur annually (<http://www.who.int/tb/en/>). TB poses a significant health threat to the world population. Global tuberculosis control is facing major challenges today. In general, much effort is still required

to make quality care accessible without barriers of gender, age, type of disease, social setting, and ability to pay. Coinfection with *M. tuberculosis* and human immunodeficiency virus (TB/HIV), and multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR)-TB in all regions, make control activities more complex and demanding. Treating and preventing TB is challenging, even in developed countries where there is a modern health care system and infrastructure. Current treatment regimens last six to nine months, and erratic or inconsistent treatment breeds MDR (490,000 new cases/year) and even XDR-TB (40,000 new cases/year), which means that this pandemic could become even more difficult to control throughout the world. TB is a leading cause of death among people who are also infected with HIV, according to the World Health Organization. One-third of the 33.2 million people living with HIV also suffer from TB. The coinfection causes 230,000 deaths annually worldwide. Without proper treatment, approximately 90 percent of people living with HIV die within two to three months of contracting TB (http://www.stoptb.org/wg/tb_hiv/default.asp). The goal of this symposium is to understand the current situation of research and development of novel TB vaccines and the future perspective.

To win the fight against TB, a comprehensive approach is needed that includes new and more effective vaccines as well as improved diagnostics and treatment. The bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine, created in 1921, is the only existing vaccine against TB. Unfortunately, it is only partially effective. It provides some protection against severe forms of pediatric TB, namely disseminated and meningeal tuberculosis occurring in the first year of life, but is unreliable against adult pulmonary TB, which accounts for most of the disease burden worldwide. Although BCG is the most widely administered vaccine in the world, there have never been as many cases of TB on the planet. There is therefore an urgent need for a modern, safe and effective vaccine that would prevent all forms of TB, including the drug-resistant strains, in all age groups and among people with human immunodeficiency virus (HIV).

Strategies for the research and development (R&D) are included 1) pre-exposure (prophylactic) and 2) post-exposure (therapeutic) vaccines. Based on the preparation, there are 4 types, such as 1) improved BCG, 2) attenuated *M. tuberculosis*, 3) subunit/component vaccines, and 4) DNA vaccines. Speakers have presented and discussed "R&D of novel vaccines against TB" better than current BCG.

To control TB and overcome the issues, such as drug-resistant TB and HIV-TB coinfection, we hope the presentation in the Mini-symposium promotes a more adventurous

approach to develop a novel, effective and safe TB vaccine.

References

- 1) Kaufmann SHE: Robert Koch, the Nobel prize, and the ongoing threat of tuberculosis. *N Engl J Med.* 2005; 353: 2423-6.
- 2) Young DB, Perkins MD, Barry CE III: Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. *J Clin Invest.* 2008; 118: 1255-65.
- 3) Skeiky YAW, Sadoff JC: Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2006; 4: 469-76.

Key words: Improved BCG, Attenuated *Mycobacterium tuberculosis*, Subunit/component vaccines, DNA vaccines, Pre-exposure (prophylactic) vaccines, Post-exposure (therapeutic) vaccines

¹Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, ²Mycobacterial Reference Center, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

Correspondence to: Kazuo Kobayashi, Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640 Japan.
(E mail: kobayak@nih.go.jp)

特集

結核対策の現状を考える

新しい結核ワクチンの開発

岡田 全司 喜多 洋子 金丸 典子 橋元 里実
西田 泰子 仲谷 均 高尾 京子 岸上 知恵

呼吸と循環

第56巻 第7号 別刷

2008年7月15日 発行

医学書院

特集 結核対策の現状を考える

新しい結核ワクチンの開発*

岡田 全司¹ 喜多 洋子 金丸 典子 橋元 里実
西田 泰子 仲谷 均 高尾 京子 岸上 知恵

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、そのなかから毎年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、最大の感染症の一つである(WHOレポート2007年, 図1)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Centers for Disease Control and Prevention (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(表1, 図2)⁵⁻⁸⁾。本稿では、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細胞の機能解明についても述べる^{9,10)}。

キラーT細胞と結核免疫

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、結核に対するCD8⁺T細胞はマウスの系で抗結核免疫に重要である(図3)^{2,11-16)}。

キラーTの一つの役割として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。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, 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

* The Development of Novel Vaccine for Tuberculosis

¹ 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 大阪府堺市長曾根町1180) Masaji Okada, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Yasuko Nishida, Hitoshi Nakatani, Kyoko Takao, Chie Kishigami: Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center

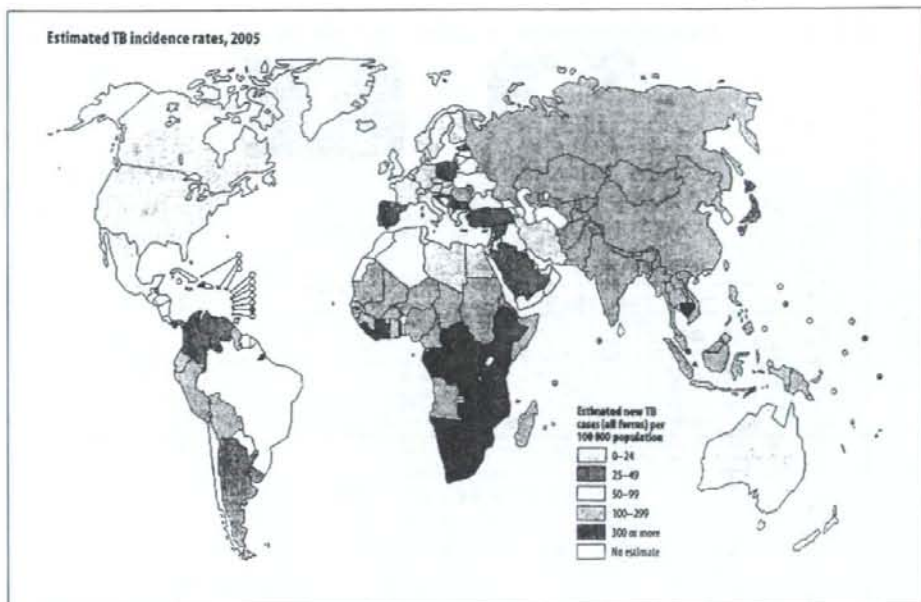


図1 推定結核発生頻度(2005年)

表1 新しい結核ワクチンの開発

(1) DNA ワクチン HVJ-リボソーム/HSP 65 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-エンペロープ/Hsp 65 DNA+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 ①リコンビナント 72 f BCG ②リコンビナント (Ag 85 A+85 B+MPB 51) 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)
(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	

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Mφ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Mφに穴が開き, Mφ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, 特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⁵⁷⁾。すなわち, われわれはキラーT細胞のgranulysin(分子量9000)産生低下が多剤耐性結核発症と大

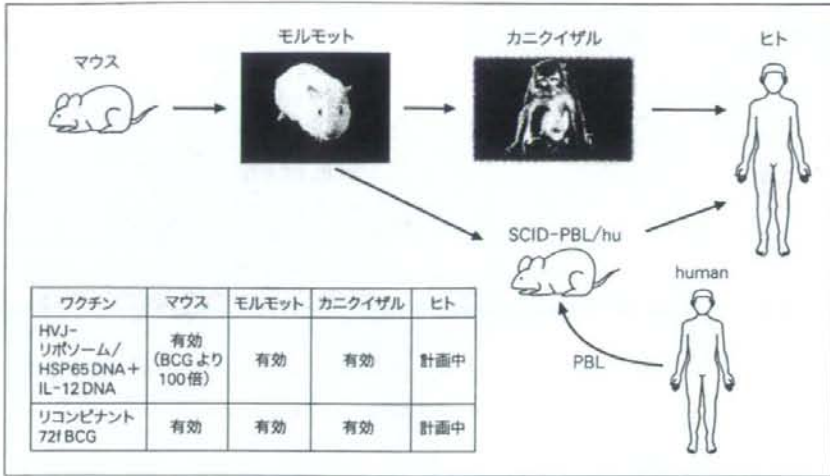


図2 新しい結核ワクチンの開発

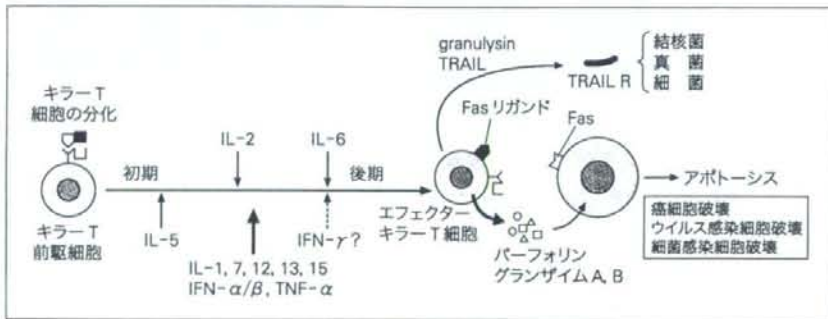


図3 キラーT細胞活性化と細胞傷害機構

きな関連があるのではないかと考えている。また、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という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 kDa 蛋白、HSP 65 蛋白を認識するマウス CD8⁺ キラーTや19 kDa 蛋白、Ag 85, CFP 10(Mtb 11)を認識するヒト CD8⁺ キラーTが報告されている。ESAT-6 抗原に対するキラーTにおいてはHLA-A2とESAT-6蛋白の82~90位の9個のアミノ酸AMASTEГNV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. 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)

われわれは、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初めて明らかにした。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