

図4 HVJ-リボソーム/HSP 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンによる結核予防効果

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 CD 8<sup>+</sup> 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<sup>14)</sup>(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 クロノ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- $\gamma$  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<sup>15,16)</sup>。または 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<sup>17)</sup>(図 4)。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- $\gamma$ 、IL-6 の著明な低下を認めた<sup>5,6,8-10)</sup>。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<sup>5,6,8-10)</sup>。

### 3. サイトカインと結核免疫

抗結核免疫に IFN- $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-12 が重要であることは解析されている<sup>9)</sup>。

## 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、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。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<sup>10)</sup>。

現行の BCG ワクチンの WHO 評価: 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 (Ching-leput study) では、全く有効性がないとされる結果となった(上記 WHO の報告)<sup>10)</sup>(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た新しい結核ワクチン開発が必須であることを表明した<sup>14)</sup>。

### 2. 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: われわれ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。われわれは、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)。

### 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、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。

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 HSP 65 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)<sup>6,7,9,17)</sup>。

#### 1) DNA ワクチン

われわれは、IL-12 DNA+HSP 65 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 p 35 および p 40 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 H 37 RV 由来 HSP 65 DNA ワクチンの作製に成功した(表1)<sup>17)</sup>。

HVJ リボソームをベクターに用いた場合、HSP 65 DNA 単独(HVJ リボソーム/HSP 65)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、HSP 65 DNA と IL-12 DNA 両者の DNA ワクチンを投与した HSP 65 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、HSP 65 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 HSP 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンは HSP 65 蛋白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、HSP 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンは脾臓の IFN- $\gamma$  産生細胞数の増強と IFN- $\gamma$  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<sup>17)</sup>。

さらに、結核菌に対する CD 8 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蛋白である HSP 65 蛋白抗原に対する CD 8 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 HSP 65 蛋白に対するキラー T 細胞誘導活性はほとんど認められなかった(図3, 図4)<sup>17)</sup>。

このように、HVJ-リボソーム/HSP 65 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- $\gamma$  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<sup>6,7,9)</sup>。

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+gp 130 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 Th<sub>1</sub> 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 Group Meeting に選出された。

一方、Huygen らは、Ag 85 A 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 種以上の蛋白質を分泌するが、 $\alpha$  抗原 Ag 85 B とそのファミリー(85 A, Ag 85 C) DNA をリコンビナント BCG に使用した<sup>2,6)</sup>。これらの遺伝子を PNN 2 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、BA 51(Ag 85 A+Ag 85 B+MPB 51)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<sup>6,7,9)</sup>。さらに最近、サブユニットワクチンの Mtb 72 f 融合蛋白質の<sup>18)</sup> DNA を導入した 72 f リコンビナント BCG の作製に成功した。この 72 f rBCG は BA 51 rBCG と同程度の極めて強力な結核菌に特異的な IFN- $\gamma$  産生 T 細胞数の増強を誘導することを

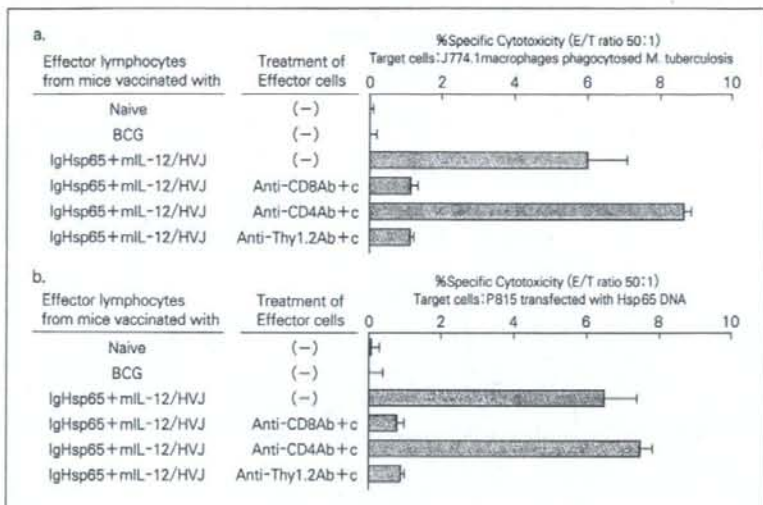


図5 HVJ-リボソーム/HSP 65 DNA+IL-12 DNA ワクチン投与による結核菌に特異的 CD 8 陽性キラー T 細胞の誘導

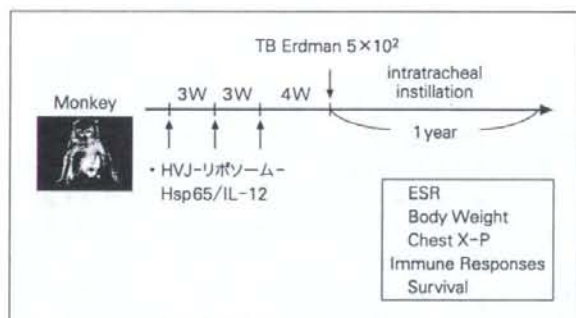


図6 実験方法：カニクイザルを用いた HVJ-リボソーム/HSP 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンの結核予防効果

表2 HVJ-リボソーム/HSP 65 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-リボソーム/ HSP 65 DNA+IL-12 DNA	4	2	2	50%
BCG	4	2	2	50%
生食	4	0	4	0%

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。われわれは、さらに akt 遺伝子を欠失させた無毒化リステリア菌に Ag 85 A-, 85 BB-, MPB 51-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(浜松医科大学小出幸夫教授と共同研究)<sup>9)</sup>。

### 4) われわれ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 HSP 65 という蛋白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

表3 HVJ-リボソーム/HSP 65 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-リボソーム/ HSP 65 DNA+IL-12 DNA	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	

用してDNAを体内の細胞内に送り込んでこれらの蛋白質を作らせ、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- $\gamma$ 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。

#### 4. 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<sup>6,7,9)</sup>。

#### 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

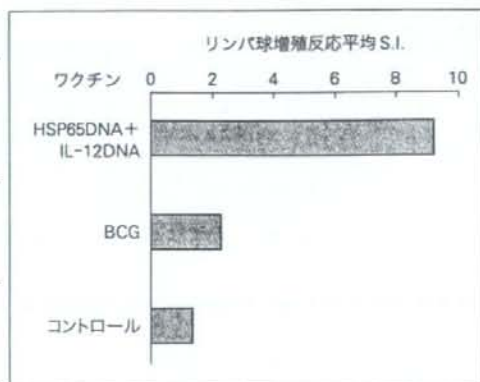


図7 ワクチン投与カニクイザルの末梢リンパ球増殖反応

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<sup>9)</sup>。すなわち、現在最も有力なものとして HVJ リボソーム/HSP 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンおよび, r72f BCG ワクチンが挙げられる(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  $5 \times 10^2$  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<sup>3)</sup>、HSP 65 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<sup>9)</sup>(表2)。すなわち、HVJ リボソーム/HSP 65 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(表2)。また、HSP 65 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(表3)。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 HSP 65 抗原に対し、増殖増強反応を示した(図7)。Ag 85 B-ESAT-6 融合蛋白質 (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、

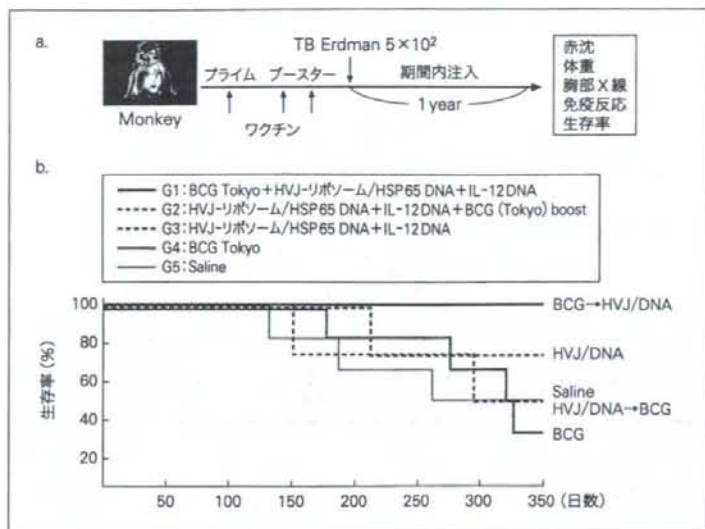


図8 ヒトの結核感染に最も近い  
 カニクイザルを用いた HVJ-リボ  
 ソーム/HSP-65 DNA+IL 12  
 DNA ワクチンの結核予防効果

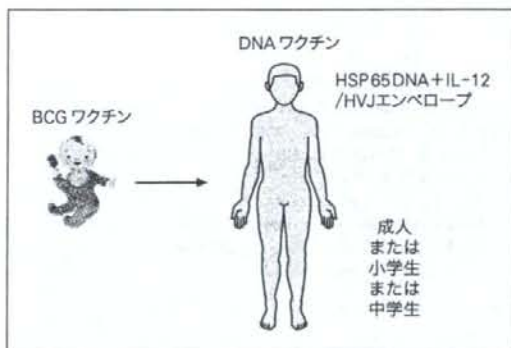


図9 新しい結核予防ワクチン(案)(DNA ワクチン)

Huygen の Ag 85 A 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。72 f 融合蛋白サブユニットワクチン、ワクシニアウイルスに 85 A DNA を導入したワクチンや r 85 B BCG (Horowitz ら) は第 I 相 clinical trial となっている<sup>20)</sup>。Hill らのワクシニアウイルス-85 A DNA ワクチンは、アフリカでの第 I 相 clinical trial では、85 A DNA 蛋白に対する免疫応答増強が認められた。最も切れ味の鋭い臨床応用ワクチン候補の筆頭として HSP 65 DNA+IL-12 DNA ワク

チンが挙げられる。リコンビナント 72 f BCG も有効である。さらに、われわれは HSP 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンやリコンビナント 72 f 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<sup>5-7)</sup>。

## 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<sup>13)</sup>(図 8)。一方、BCG ワクチン単独投与群は 33% の生存率であった<sup>13)</sup>。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)として切れ味の鋭いわれわれが開発したこの 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 9)。

表4 プライム結核ワクチン

A. Priming, Pre-Exposure	
1. Phase I : 現在~2008年	特徴
a. rBCG30	リコンビナント 85B BCG
b. rBCG30ΔureC : Hly (VPM1002)	リコンビナント listeriolysin BCG
c. AERAS-407	リコンビナント perforingiolysin
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 <sup>2</sup> 6220, mc <sup>2</sup> 6221, mc <sup>2</sup> 6222, mc <sup>2</sup> 6231	non-replicating, <i>M. Tuberculosis</i> strain (Δlys A Δpan CD)
g. mc <sup>2</sup> 5059	replicating pro-apoptotic <i>M. bovis</i> BCG 株 (ΔnuoG)
2. Phase I 2009 or Later	
a. HBHA (heparin-binding haemagglutinin)	メチル化 21-K Da 蛋白
b. Attenuated Live Vaccine based on Phop	弱毒化ヒト結核菌 (virulence gene の pho P の不活性)
c. paBCG (pro-apoptotic BCG)	anti-apoptotic 酵素活性を減弱

表5 ブースター結核ワクチン

B. Boosting, Pre-Exposure	
1. Phase I : 現在~2008年	特徴
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 <i>M. Tuberculosis</i> 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 <sup>TM</sup> TB Vaccine	Heat shock protein antigen complexes (Hsp Cs)
b. HBHA (heparin-binding haemagglutinin)	
c. NasL3/AM85B conjugate	Nasal vaccine/Man capped Arabinomannan oligosaccharide BCG boosting
d. PP1, PP2, PP3	BCG boosting
f. AC <sub>2</sub> SGL Diacylated Sulfoglycolipids	AC <sub>2</sub> 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

### WHO Stop TB Partnership (WHO)

TB VACCINE PIPELINE (New TB Vaccine Working Group, November 2007) として、Stop TB Partnership (WHO) は 2008 年 2 月 7

日、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。われわれの HVJ/Hsp 65 DNA+IL-12 DNA ワクチンも候補の一つとしてそのなかに推奨されている (表 4~6)。

表6 結核治療ワクチン

C. Post Exposure-Immunotherapy	
1. Phase I: 現在~2008年	特徴
a. Mycobacterium vaccae Heat-Killed b. MVA85A c. RUTI d. Nas L3/Htk BCG	Fragmented <i>M. Tuberculosis</i> cells
2. Phase I: 2009 or Later	
a. NasL3/AM85B conjugate b. hspDNA vaccine c. HG856A d. HBHA (heparin-binding haemagglutinin) e. HG856-BCG	naked hsp 65 DNA vaccine Chimeric ESAT6/Ag 85A DNA ワクチン
f. HG856-SeV	Recombinant BCG overexpressing chimeric ESAT6/Ag85A fusion protein 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. AczSGL Diacylated Sulfoglycolipid	

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と2050年までに結核撲滅がWHOの目標である。

これらのワクチンは下記の分類がなされている。

#### 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

#### 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

#### おわりに

HSP 65 DNA + IL-12 DNA/HVJ-エンベロープワクチンが明らかに優れていることより、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。

#### 文献

- 1) 岡田全司: 結核「分子予防環境医学, 生命科学研究所 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, pp150-161, 2003
- 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 39: 144-154, 2002
- 3) Flynn JL, Chan J: Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol 19: 93-129, 2001
- 4) Schluger NW, Rom WN: 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] pp1-140, 2004
- 7) Okada M, Tanaka T, Inoue Y, et al: Novel (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, pp209-213, 2004
  - 10) 岡田全司: 結核ワクチン, 結核(第4版), 泉 孝英, 網谷良一(編), 医学書院, 東京, 2004
  - 11) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al: Deciphering the biology of *Mycobacterium Tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 93: 537-544, 1998
  - 12) Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282: 121-125, 1998
  - 13) 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* 57: 1335-1343, 1997
  - 14) 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
  - 15) 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
  - 16) 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
  - 17) 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* 24: 1191-1204, 2006
  - 18) Skeiky YA, Alderson MR, Ovendale PJ, et al: Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis poly-protein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J Immunol* 172: 7618-7628, 2004
  - 19) 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* 72: 2014-2021, 2004
  - 20) McShane H, Pathan AA, Sander CR, et al: Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med* 10: 1240-1244, 2004



Lecture



## 解説

## BCGと新たな結核ワクチン\*

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\*\* 栖原 里佳\*\* 岸上 知恵\*\*

Key Words : novel TB vaccine, BCG, DNA vaccine, tuberculosis, cytotoxic T cell

## 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、最大の感染症のひとつである(WHOレポート2002年)<sup>1)~3)</sup>。結核症に対する宿主の抵抗性は細胞性免疫といって過言ではない。とくに獲得免疫(キラーT細胞とTh<sub>1</sub>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(Bacille de Calmette et Guérin)に代わる有効なワクチンが必要であることを示した。

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(世界保健機関)によって報告された。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<sup>1)2)</sup>。

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<sup>1)3)~5)</sup>

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	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 Mtb 72f融合タンパク	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(胚口)	
(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	

\* BCG and novel vaccines against tuberculosis.

\*\* Masaji OKADA, M.D., Ph.D., Yoko KITA, Ph.D., Noriko KANAMARU, Satomi HASHIMOTO, Yasuko NISHIDA, Hitoshi NAKATANI, Kyoko TAKAO, Rika SUHARA & Chie KISHIGAMI : 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 堺市北区長曾根町1180〕; Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, Sakai 591-8555, JAPAN

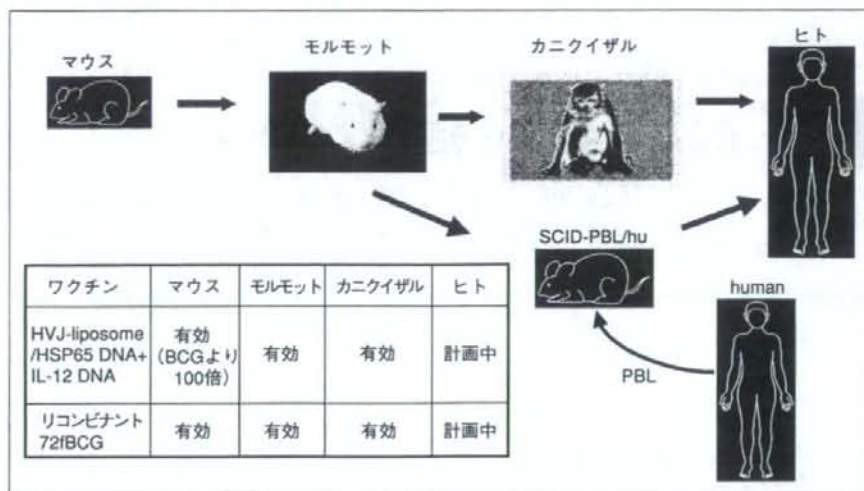


図1 新しい結核ワクチンの開発

(表1, 図1). 新しい抗結核ワクチン開発と臨床応用の可能性についても述べる<sup>3)-5)</sup>.

## 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、1906年、ウシ型結核菌を5%グリセリン肉汁加ウシ胆汁に浸した馬鈴薯培地に、14日ごとに移植する作業を開始した<sup>6)</sup>。3年後の1908年には、ウシ、モルモットには病原性なく、ウサギ、ウマに対してのみ病原性のある菌株を得た。さらに13年間230代継代培養し、1921年、動物に病原性のない菌株BCG: *Mycobacterium bovis* strain BCGを得た。BCGの人体への投与は、1921年Well-Halle(フランス)らによって、母親が結核の新生児に経口投与されたことに始まる。その後、欧米で広く追試が行われるようになった。現在世界で年間約1億人にBCGが接種されている<sup>7)</sup>。

#### (2) わが国におけるBCGの導入と経過

志賀潔は大正14(1925)年、パスツール研究所からBCG株をもち帰った。その後、とくに今村ら(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、1943年から凍結乾燥が試みられ、1950年からBCG Tokyoとして凍結乾燥ワクチンが用いられた。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をマーカーにして調べた結果、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(図2)。BCG Pasteurは1961年に1173Pという株を凍結乾燥させたもので、BCGの原株ではない。

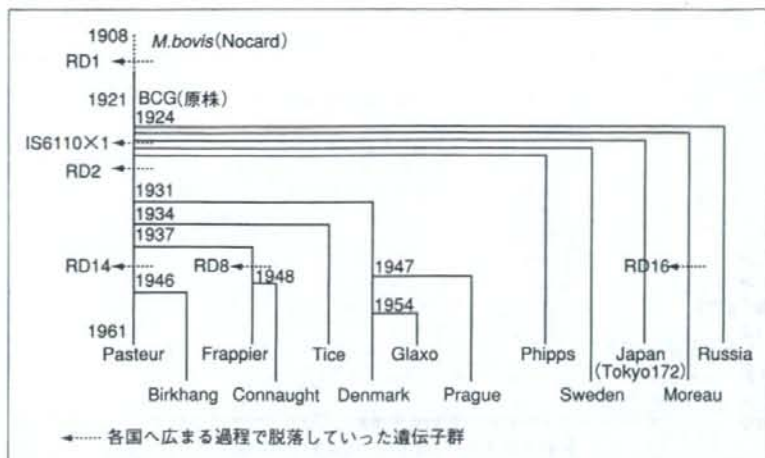


図2 BCGの各国への分布と各菌株の分子遺伝学的相違

RD: deletion region(s). Nocard株から1921年に確立されたBCGの、その後の各国への広がり  
と遺伝子の脱落を示す。(文献<sup>2</sup>より引用)

マウスに対する病原性にもBCGの株間には違いがみられ、BCG Tokyo172株は体内増殖力が弱くマウスに対する防御免疫誘導能が低い。一方、モルモットでの結核菌噴霧(経気道)感染で、その有効性はCopenhagen株と大差がなかったという<sup>8)9)</sup>。

なお、ごく最近(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およ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・Fruth U, 近畿中央胸部疾患センター・岡田全司, Staten研究所・Andersen P, 米国FDA・Brennan M, 米国CDC・Iademarco MFら)。

## 2. BCGの結核感染防御効果

### (1)本邦(日本)のBCG接種の見直し

結核予防法施行令および結核予防法施行規則が改正され、平成15(2003)年4月から小学1年生時および中学1年生時のツベルクリン反応(ツ反)検査・BCG接種が廃止されることになった。

#### 1)乳幼児

原則として生後6か月までにツ反検査を省略したBCG接種を実施する。

改正の理由; ①乳幼児のツ反検査を用いた健

康診断は患者発見率がきわめて低い。②偽陽性による不必要な再ツ反検査・予防内服・精密検査をすることがなくなる。③偽陽性のためBCG接種の機会を失うことがなくなる。④既感染者への接種によるコッホ現象は、それほど強いものではない。⑤乳児への正しいツ反検査は技術的に困難である。

#### 2)小学1年生および中学1年生

ツ反検査、BCG接種ともに廃止する。

改正の理由; ①小学1年生および中学1年生のツ反検査を用いた健康診断は患者発見率がきわめて低い。②BCG再接種の医学的効果は証明されていない。③再接種によるツ反の陽転化が結核感染の診断の妨げになっている。④諸外国では再接種を廃止する国が多くなっている。⑤結核に感染していないにもかかわらず、ツ反が強陽性検査である中学1年生に対する必要以上の精密検査や予防投薬が削減される。⑥中学1年生でのツ反検査がブースター刺激になり、その後のツ反が増強するため、接触者健診におけるツ反結果の解釈が困難となっている。

#### (2)日本以外でのBCG接種状況

世界各国におけるBCG接種状況を表2に示した<sup>10)</sup>。WHOは全世界の新生児に生後できるだけ

表2 世界各国におけるBCG接種状況

特定年齢で一律接種 出生直後～1週	ロシア、ハンガリーなど東欧諸国の大半 フィンランド、ポルトガル エジプト、イランなど東地中海地域20か国 南アフリカ、ウガンダなどアフリカ地域46か国 インド、インドネシアなど東南アジア地域5か国 中国、ベトナム、フィリピンなど西太平洋地域27か国
生後4週	大韓民国
生後8週	トルコ
生後1歳(まで)	旧ユーゴ、(タイ、ミャンマー)
5～6歳(まで)	フランス、ギリシャ、(スリランカ)
12～14歳	ノルウェー、マルタ
高リスク群のみ接種	ドイツ、オーストリア、オランダ、スウェーデンなど
高リスク群のみ出生時+ 特定年齢(かっこ内)で一律 接種なし	スイス(5,12歳)、イギリス(11,12歳) アメリカ合衆国(報告基準あり:感染性肺結核患者(とくに薬剤耐性結核患者)と接触するツ反(-)の子供、多剤耐性結核菌感染リスクが高い医療従事者)

(文献<sup>2)</sup>より引用改変)

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
英国	1977	12,867	13,358	93	56	77
インド(Chingleput)	1980	79,398	272,455	93	192	0

(文献<sup>2)</sup>より引用)

早期にBCG接種を行うように勧告しているが、国によって大きな違いがみられる。結核の蔓延度の違い、BCG接種の予防効果に定まった評価がないことに起因している。

### (3) 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、ほかになん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2)。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。とくに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、まったく有効性が否定される結果となった(表3)。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染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)に対してきわめて高い菌数増殖抑制効果が得られる。

#### (4) BCGの副作用

BCGの副作用でもっとも重大なものは、BCGによる全身播種性感染症である。4億7,850万人中66例の全身播種性感染症が報告された。35例の死亡例の大部分はAIDS, HIV感染, SCID, IFN- $\gamma$ 受容体欠損の免疫不全である。その他、リンパ節病変、ループス様反応、骨炎の報告例などがある。わが国ではBCG接種による局所の化膿やリンパ節炎、瘢痕を少なくするため、スタンプ式管針以内接種が用いられている。

### 新しい結核ワクチン開発

#### 1. 現行のBCGワクチンの有用性

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(上記WHOの報告)<sup>2)</sup>。

#### 2. BCGワクチンよりきわめて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：われわれ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ワクチンを超えるきわめて強力な有効性(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きわめて少ない。われわれは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きわめて高く評価され、当臨床研究センターはWHO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。

#### 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、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)。

##### (1) DNAワクチン

IL-12のp35およびp40をCMVプロモーター下

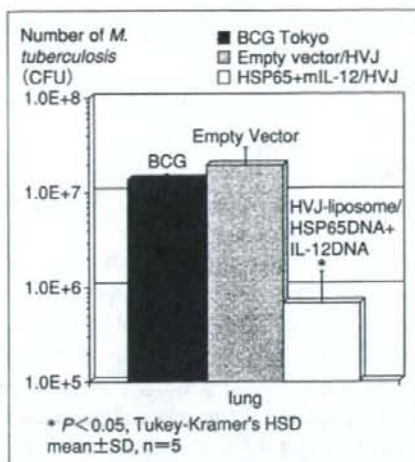


図3 Prophylactic efficacy of HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA vaccine on TB-infected mice (5 weeks after TB infection)

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<sup>3)</sup>(表1, 図3)。HVJリポソームをベクターに用いた場合、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<sup>3)</sup>。このワクチンは結核菌に対するキラーT細胞分化誘導、IFN- $\gamma$ 産生細胞分化誘導を介して、BCGワクチンより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。すなわち、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蛋白であるHSP65蛋白抗原に対する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蛋白に対するキラーT細胞誘導活性はほとんど認められなかった<sup>1)5)</sup>。このワクチンはBCGワクチンに比較して有意差をもって肝臓および肝臓の結核肉芽腫、病理所見の改善を認めた(granuloma indexの改善<sup>5)</sup>)。

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

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/ HSP65DNA+IL-12DNA	4	2	2	50%
BCG	4	2	2	50%
生食	4	0	4	0%

与したマウスにおいてHVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12DNA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<sup>6)</sup>。欧米では治療ワクチンは未開発である<sup>11)</sup>。

われわれは世界に先駆けて、ヒトT細胞ハイブリドーマを確立し、キラーT細胞分化因子の発見やB細胞B化因子(のちのIL-6)の存在を明らかにした<sup>12)~14)</sup>。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)ワクチンも強力な治療ワクチン効果を示した<sup>1)</sup>。

#### (2) リコンビナントBCGワクチン

サブユニットワクチンのMtb72f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<sup>3)</sup>。この72fBCGはマウス、モルモットの系のみならず、カニクイザルを用いた系でも結核予防ワクチン効果を示した<sup>3)</sup>。

#### 4. 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の系でも、ヒトキラーT分化を介し、結核予防ワクチン効果を示した<sup>15)16)</sup>。

### 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, もっともヒトの肺結核に近いモデル<sup>3)17)18)</sup>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<sup>3)</sup>。われわれは、カニクイザルで結核感染後1年に、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)を認め、ワクチン効果をサルレベルで認めた<sup>3)</sup>(表4)。すなわち、HVJリボソーム/HSP65DNA+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。また、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。72f融合蛋白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<sup>19)20)</sup>。もっとも切れ味のする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<sup>4)5)18)</sup>。

#### 2. プライミングーブースター法(乳幼児BCG—成人HVJ/HSP65DNA+IL-12DNA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。このプライミングーブースター法で100%の生存を示した<sup>18)</sup>(図4)。一方、BCGワクチン単独投与群は33%の生存率であった<sup>18)</sup>。このように、ヒトの結核感染にもっと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といわれわれが開発したこの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5)。

### おわりに

HSP65 DNA+IL-12 DNA/HVJ-エンベロープワクチンが明らかに優れていることより、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 井上、坂谷各博士、Saunderson P博士、Gelber R博士、Tan B博士、中島俊洋博士、吉田栄人博士、松本博士、金

表5 HVJ-リポソーム/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	

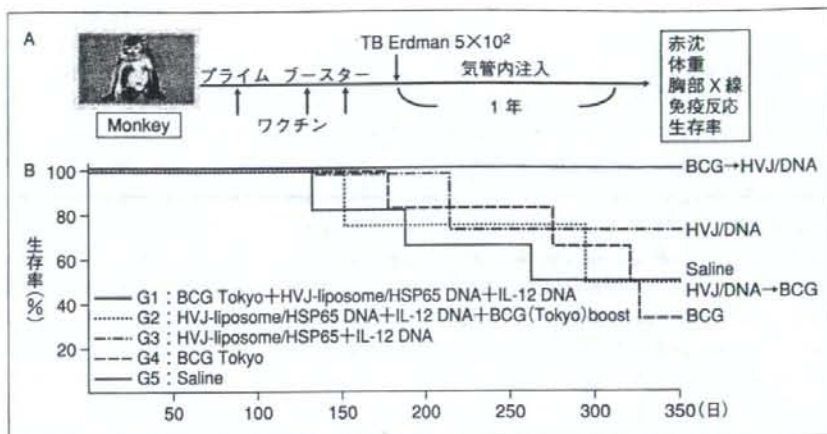


図4 ヒトの結核感染にもっとも近いカニクイザルを用いたHVJ-リポソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンの結核予防効果

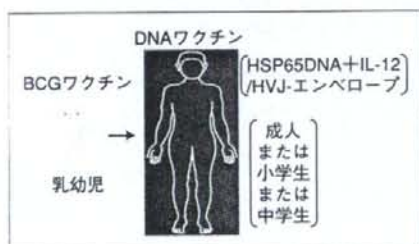


図5 新しい結核予防ワクチン(案)(DNAワクチン)

田安史博士, McMurray D博士, 厚生労働科学研究費の支援による)

## 文献

- 岡田全司. 結核菌の病態解明に基づく新たな治療法の開発に関する研究: [結核ワクチン]. In: 厚生労働科学研究費補助金実証報告書研究報告書. 2004. p. 1.
- 岡田全司. 結核ワクチン. In: 泉 孝英・監, 富岡洋海・編. 結核. 第4版. 東京: 医学書院; 2006. p. 50.
- Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, et al. Novel recombinant BCG- and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine* 2005; 23 : 2269.
- 岡田全司. 結核感染とサイトカイン—新しい結核ワクチン. In: 泉 孝英, 網谷良一・編. 別冊・医学のあゆみ. サイトカイン—state of arts. 東京: 医歯薬出版; 2004. p. 209.
- 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.
- Calmette A. Preventive vaccination against tuberculosis with BCG. *Proc Roy Soc Med* 1931 ; 24 : 85.
- 徳地清六. 新BCG接種の理論と実際. In: JATABOOKS.

- No.10. 東京：結核予防会；1998. p. 1.
- 8) Behr MA, Wilson MA, Gill WP, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999 ; 284(5419) : 1520.
  - 9) 光山正雄, 角 泰人. 【最近のワクチン】BCGの功罪. *最新医学* 2002 ; 57 : 1933.
  - 10) 戸井田一郎. 世界におけるBCG接種の状況. *結核* 2000 ; 75 : 1.
  - 11) 岡田全司. 新しいワクチン開発—シンポジウムIV. 抗酸菌研究の最前線結核. In press 2008.
  - 12) 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.
  - 13) 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.
  - 14) 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.
  - 15) 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.
  - 16) 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.
  - 17) Walsh GP, Tan EV, Dela Cruz EC, et al. The Philippine cynomolgus monkey provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med* 1996 ; 2 : 430.
  - 18) 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* 2007 ; 25 : 2990 .
  - 19) Skeiky YA, Alderson MR, Ovendale PJ, 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* 2004 ; 172 : 7618.
  - 20) McShane H, Pathan AA, Sander CR, et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med* 2004 ; 10 : 1240.

\* \* \*



## 特集I 感染症に対するワクチンの開発とその免疫理論

結核に対するワクチン開発と  
その免疫理論\*

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\*\*

**Key Words:** *Mycobacterium tuberculosis*, vaccine, cytotoxic T cell, cynomolgus monkey, HSP65 DNA+IL-12 DNA

## 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。結核は最大の感染症の一つである〔世界保健機関(WHO)レポート2007年〕<sup>1)~4)</sup>。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免疫抵抗性はT細胞性免疫といって過言ではない。とくに、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)<sup>5)~8)</sup>。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<sup>9)10)</sup>。

## 結核ワクチンの免疫理論

1. キラーT細胞(CD8<sup>+</sup>T細胞)と結核免疫  
CD8あるいはβ<sub>2</sub>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<sup>+</sup>T細胞はマウスで抗結核免疫に重要である(図2)<sup>3)11)~16)</sup>。

キラーT細胞の一つの役割としてインターフェロン(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(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。CD8<sup>+</sup>T細胞が結核菌で感染した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。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細胞の顆粒内の蛋白であるgranulysinは直接細胞外の結核菌

\* The development of novel vaccines against tuberculosis and augmentation of immune responses against tuberculosis.

\*\* Masaji OKADA, M.D., Ph.D., Yoko KITA, Ph.D., Noriko KANAMARU, Satomi HASHIMOTO, Yasuko NISHIDA, Hitoshi NAKATANI, Kyoko TAKAO & Chie KISHIGAMI: 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 堺市北区長曾根町1180); Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, Sakai 591-8555, JAPAN

表1 新しい結核ワクチンの開発(1)

(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/HSP65 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	BCGより有効
①リコンビナント72fBCG	(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)
(4) 治療ワクチン IL-6 related DNA(マウス)	
(5) Priming-Boostet Method BCG(priming)+新しいワクチン(boostet)(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	

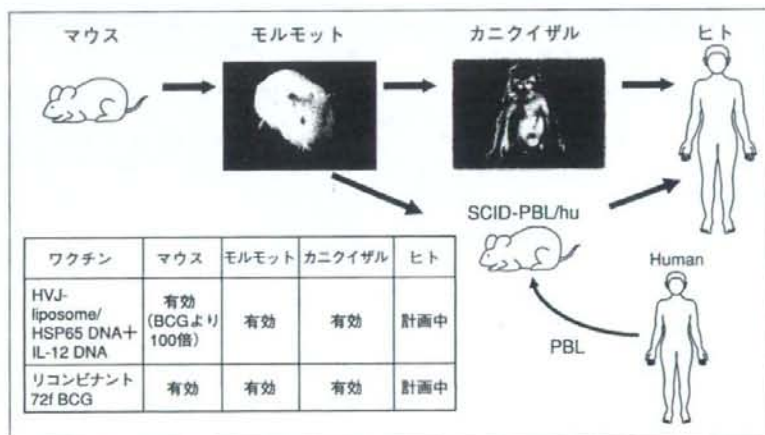


図1 新しい結核ワクチンの開発(2)

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、とくに多剤耐性結核患者ではキラーT細胞のmRNAの発現および蛋白の発現が低下していることを明らかにした<sup>97)</sup>。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2)。

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<sup>+</sup>キラーT細胞や19kDa蛋白、Ag85, CFP10(Mtb11)を認識するヒトCD8<sup>+</sup>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。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細胞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<sup>+</sup>キラーT細胞の誘導にはヘルパーT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に明らかにした。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ヘルパーT細胞はCD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>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ヘルパーT細胞はCD8<sup>+</sup>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<sup>14)</sup>(図3)。

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依存性ヒトヘルパーT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- $\gamma$ がキラーT細胞分化因子として強力なキラーT細胞分化を誘導することを明らかにした<sup>15)16)</sup>。筆者らは、IL-6がCD8<sup>+</sup>キラーT細胞誘導の後期の分化段階に作用することを解明した<sup>16)</sup>(図3)。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- $\gamma$ 、IL-6の著明な低下を認めた<sup>5)6)8)~10)</sup>。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<sup>5)6)8)~10)</sup>。

## 3. サイトカインと結核免疫

抗結核免疫にIFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12が重要であることは解析されている(文献<sup>9)</sup>参照)。

## 4. 自然免疫と結核

### (1) マクロファージ(M $\phi$ )

結核菌の増殖場所はM $\phi$ 内である。一方、M $\phi$ 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(文献<sup>12)</sup>参照)。

### (2) Toll-like receptor (TLR) および pathogen recognition receptor (PRR) とマクロファージ・樹状細胞活性化

最近発見されたTLRファミリーがinnate immu-

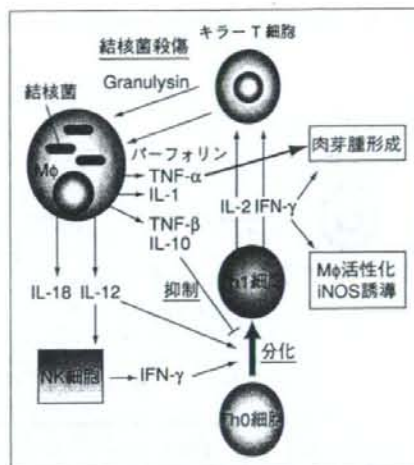


図2 抗結核免疫とマクロファージ、ヘルパーT、キラーT細胞活性化

nityの重要な役割を果たしている。

TLR(TLR1~10)はそのリガンドによって大きく3つに分類される。このうち菌体膜由来の糖脂質を認識するTLRとしては、TLR1、TLR2、TLR4、TLR6、TLR9である。

結核菌のcell wall (LAM, mAGP, total lipid)による応答はTLR2を介する。一方、結核菌に対する反応にはTLR2とTLR4が必要である。病原株の*M. tuberculosis*由来のMan LAMはM $\phi$ を活性化しないが、非病原性の抗酸菌は異なるglycolipid Ara LAMよりなり、これはTLR2を介してM $\phi$ を活性化する。この差が発病の差となる可能性もある。結核菌体成分19kDaのlipoproteinがTLR1/TLR2を介してM $\phi$ 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)は感染防御免疫能増強することが示されていたが、CpGレセプターに対するTLR9が審良らによりクローニングされた。

TLR2の場合、細胞内領域の2つの変異(Arg753GlnとArg677Trp)が認められ、Arg753Glnは敗血症にかかりやすく、Arg677Trpはアジア人において*M. leprae*による結節性ハンセン症と関連している。

TLRはそれぞれ病原微生物由来の構成成分を認識する。TLRシグナルを介するシグナル伝達経路

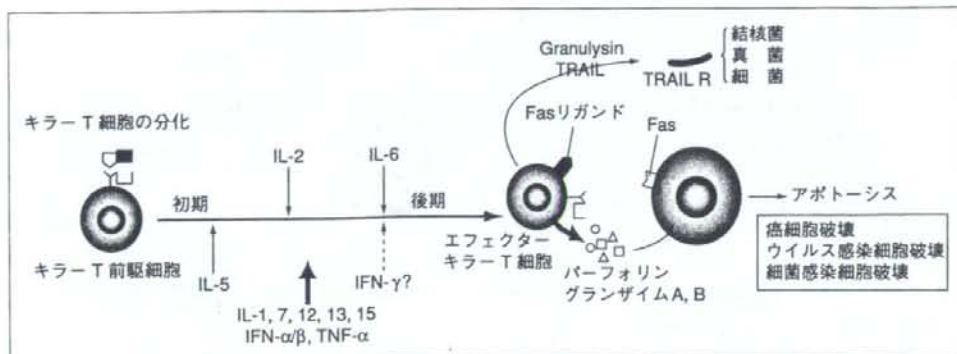


図3 キラー T 細胞活性化と細胞傷害機構

表2 新しい結核ワクチン

1. サブユニットワクチン
Mtb72f fusion 蛋白
85B-ESAT-6 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) (IFN-γ など)
新しい結核蛋白抗原 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, 38kD DNA, キラー T 細胞誘導蛋白遺伝子, 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 Mtb72f 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 細胞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

には MyD88 を介する MyD88 依存的経路と MyD88 を介さない MyD88 非依存的経路の 2 つが存在する。主に前者はすべての TLR を介した炎症性サイトカインの産生を、後者は主に TLR3・TLR4 を介

した IFN および IFN 誘導性遺伝子群の産生を担う。

この MyD88 非依存的経路を担うアダプター分子が TRIF である。TRIF が TLR3 と TLR4 の MyD88 非依存的経路に共有されているのに対し、TRAM は MyD88 非依存的 (TRIF 依存的) 経路を TLR4 シグナルに特異的にだけ与えるアダプター分子である。また、TIRAP はすべての TLR に共有された MyD88 依存的経路を、TLR1/2/6 と TLR4 シグナル特異的に与える役割をもつ。竹田らは TRIF<sup>-/-</sup> × MyD88<sup>-/-</sup> ダブルノックアウトマウスを用い、結核菌に対する易感染性を解析しつつある。

TLR 以外にも PRR として DC-SIGN, NOD ファミリー, マンノース受容体, スカベンジャー受容体, dectin-1 があげられる。HIV や *M. tuberculosis* は DC-SIGN に結合して樹状細胞に入り込むが、その際、その TLR による自然免疫機構の活性化を抑制し、これらの病原体の生存を有利にする機構が働いていることが示された。NOD1, NOD2 を中心とする CARD ファミリーの分子は、膜貫通領域をもたず、細胞質蛋白として存在する。NOD2 は、古くから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。

### 新しい結核ワクチン開発

1. 現行の BCG ワクチンの有用性—WHO 評価  
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