

新しい結核治療ワクチンによる臨床応用計画に関する研究及び 新規化学療法剤との併用療法計画

研究分担者 坂谷光則 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 病院長
研究協力者 螺良英郎 (財)大阪結核研究会 理事長

研究要旨

- [I] 結核治療ワクチン：HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンはマウスの系で治療効果を示した。さらに Ag85B DNA+ Ag85A DNAワクチンは強力な予防ワクチン効果を示した。したがって①HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン ②HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNA+Ag85B DNA+ Ag85A DNAワクチンの治療ワクチン効果を解析した。③この②にMPT51 DNA + granulysin DNAを追加した治療ワクチン開発計画も着手した。
- さらに、
- [II] 多剤耐性結核菌に対する治療ワクチン
多剤耐性結核菌を感染させたマウスにおいて、HVJ-エンベロープ/HSP65DNA + IL-12 DNAワクチンは、強力な結核治療効果（結核治療ワクチン）を示した。
更に、超薬剤耐性結核（XDR-TB）に対しても、治療ワクチン効果を示す画期的な成果を得た。
- [III] カニクイザルを用いた、結核治療ワクチン効果：このHVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA + IL-12 DNAワクチンを臨床応用に適したpVAXベクターに二つのこれらの遺伝子を導入したワクチンを作製した。これをあらかじめ結核菌感染させてカニクイザルに治療ワクチンとして投与した。その結果、生存率の改善及び体重増加、免疫反応の増強等治療効果が示された。さらに、同じカニクイザルモデルを用い、HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+ IL-12DNA+ Ag85BDNA+ Ag85ADNAワクチンは、生存率改善、血沈改善、体重改善、免疫反応増強の著明な結核治療効果を示すことを明らかにした。
- [IV] 新規化学療法剤との併用療法計画。
新規化学療法剤カプラザマイシン（CPZEN-45）とOPCの二種類を共同研究で開発した。
これらの新規化学療法剤と上記のワクチンの併用療法を計画中である。

A. 研究目的

結核に対するワクチンとしては、BCGが世界各国で用いられ、小児期における結核予防に関しては一定の成果を納めている。しかし、現行のBCGワクチンの追加接種が、大人（成人）の結核発病予防に効果がない見解がWHOよりなされた。

従って、BCGよりも切れ味の鋭い新しい結核ワクチンの開発が必須である。しかしながら、未だ臨床応用に有効な新しい結核ワクチンは開発されていない。我々は結核予防ワクチンとしてカニクイザルのレベルで有効な新しい結核ワクチンを開発したことより、臨床応用への計画を立案した。

さらに、治療ワクチンについては、結核治療phaseに有効なワクチンは開発されていない。したがって結核治療ワクチンについても将来的な臨床結核ワクチンについての動物モデルでの実験を行った。

B. 研究方法

結核治療ワクチン効果を判定するモデル動物として、DBA/1マウス TNF R (-/-) DBA/1マウス、IL-6 (-/-) DBA/1マウス、BALB/cマウス、を用いた。結核菌はH37Rvヒト結核菌やErdmanヒト結

核菌を使用した。また国立病院機構呼吸器疾患研究ネットワーク65施設を用いた計画も立案した(図1)。

(倫理面での配慮)

当院の倫理委員会は、大阪国際大学政経学部教授と関西学院大学学院長を含む多職種の委員により構成され、毎月1回以上開催しており、本研究は、この委員会での承認を得ている。

C. 研究結果

[I] 結核治療ワクチン

結核治療ワクチンの開発が世界的に急速に熱気を帯びてきている。すなわち、HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンはマウスの系で治療効果を示した。

またAg85B DNA+ Ag85A DNAワクチンは強力な結核ワクチン効果を示した。したがって、① Ag85B DNA+ Ag85A DNAワクチン

②HVJ /HSP65 DNA+IL-12DNAワクチンを単独又は組み合わせて、治療ワクチンの開発計画を立案した。

具体的には、HVJ /HSP65 DNA + IL-12 DNA

ワクチンはマウスの系で治療ワクチン効果を得た。したがって、これらのワクチンを組み合わせ、priming-booster法を用いより強力なワクチンの開発をスタートした。(表1)

用いる系は

- (1) マウス
- (2) モルモット (表2)
- (3) カニクイザル (表3)
- (4) ヒト免疫応答を解析できるSCID-PBL/huモデルである。(表4)

[II] 多剤耐性結核菌に対する治療ワクチン

(1) さらに多剤耐性結核菌を 5×10^5 i.v. 投与したマウスに対しても HVJ/HSP65 DNA+IL-12DNAワクチンを3回投与することにより結核治療ワクチン効果を得た。(2) RFP、INHと結核治療ワクチンを併用することにより、RFP、INH低濃度でも結核治療効果、特に多剤耐性結核に対してもRFP、INH等が有効となる可能性が大である。

[III] カニクイザルを用いた、結核治療ワクチン効果:

このHVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA + IL-12 DNAワクチンを臨床応用に適したpVAXベクターに二つのこれらの遺伝子を導入したワクチンを作製した。これをあらかじめ結核菌感染させてカニクイザルに治療ワクチンとして投与した。その結果、生存率の改善及び体重増加、免疫反応の増強等治療効果が示された。さらに、同じカニクイザルモデルを用い、HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12 DNA+ Ag85BDNA+ Ag85ADNAワクチンは、生存率改善、血沈改善、体重改善、免疫反応増強の著明な結核治療効果を示すことを明らかにした。

[IV] さらに、新しい抗結核化学療法剤OPC (大塚

松本博士らが開発) やCPZ (カプラザマイシン: 微生物科学研究所 赤松博士、三宅博士、当院岡田全司らが開発) と、このHVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNAを組み合わせ、結核治療の相乗効果及び治療期間の短縮を計画している。(表5)

表1

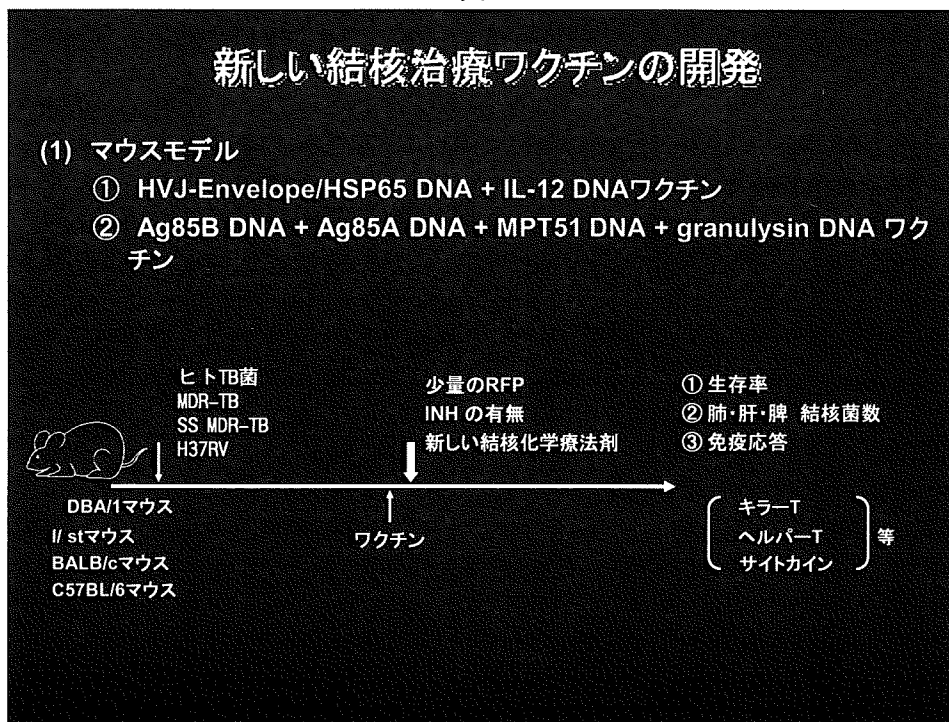


表 2

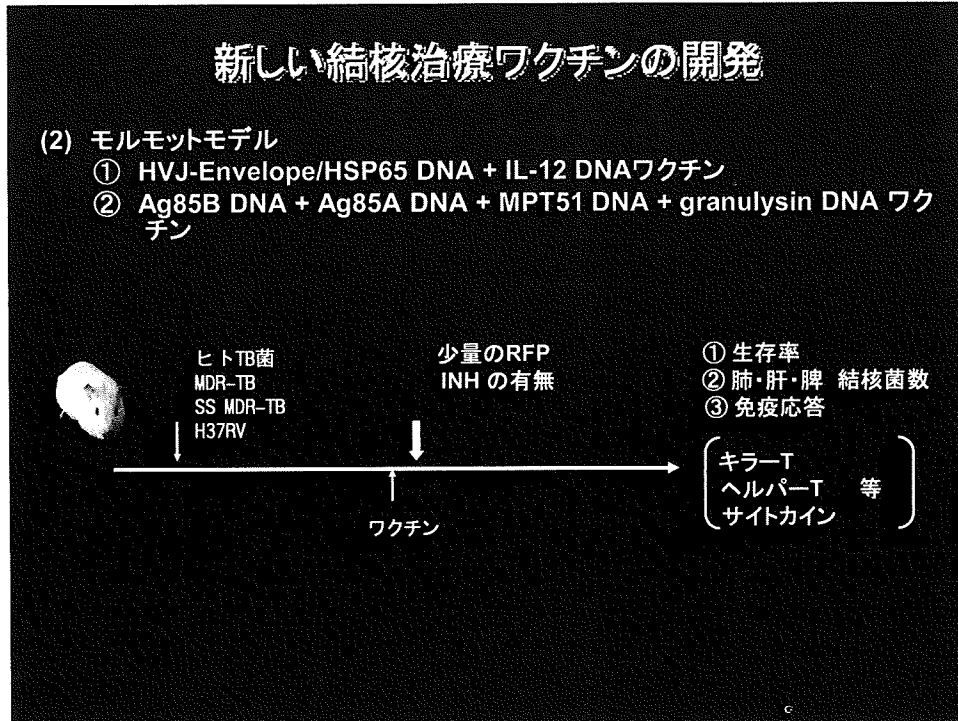


表 3

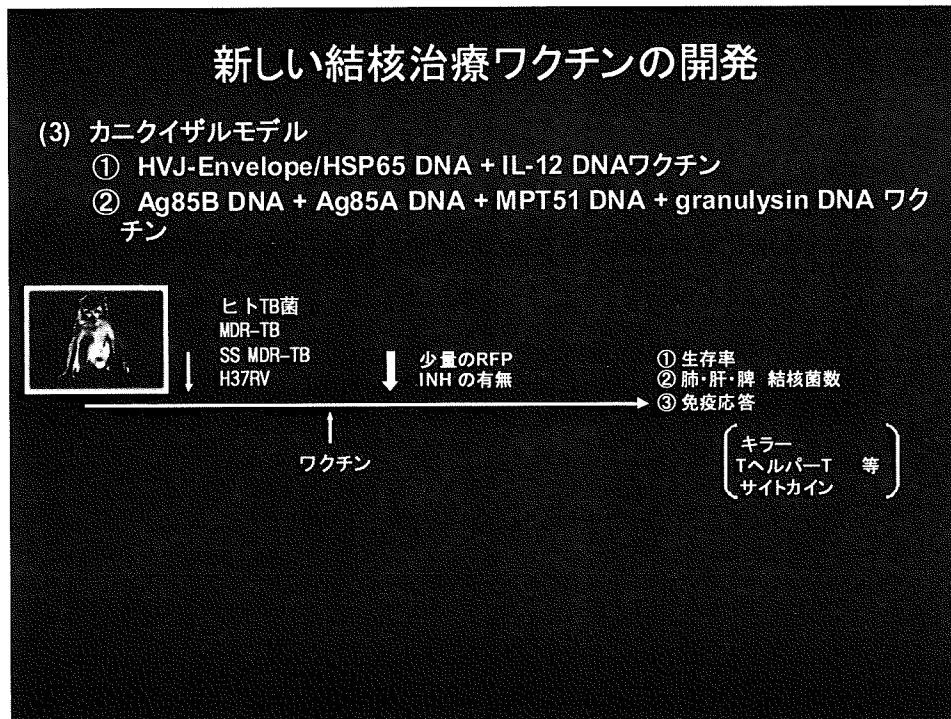


表 4

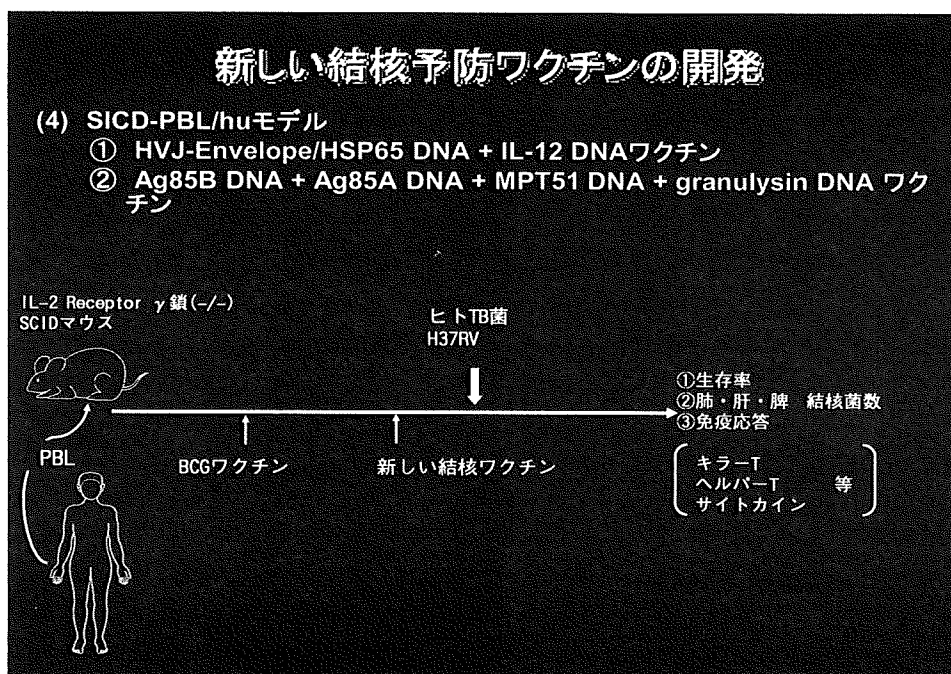


図 1

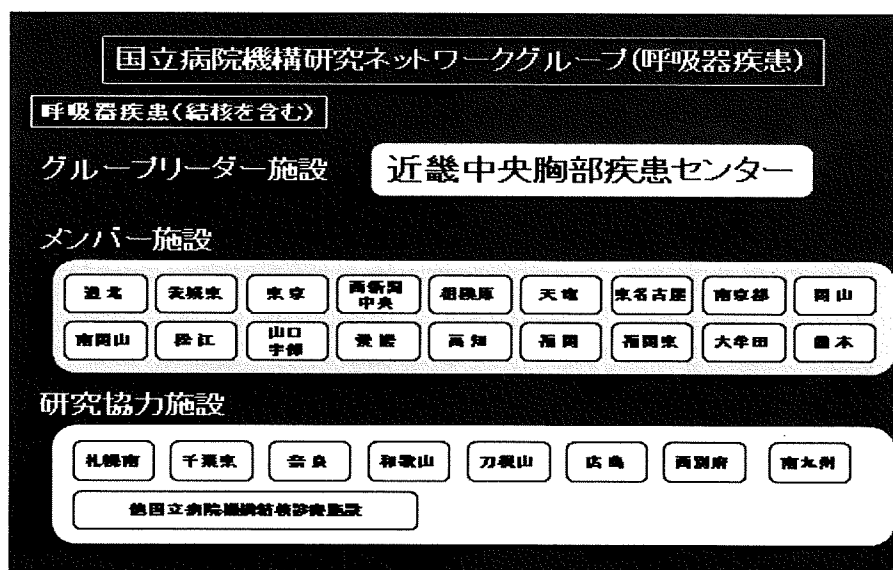


表 5

新しい化学療法剤による 多剤耐性結核の制御

(1) OPC-67683+ HVJ/HSP65DNA+ IL-12DNA ワクチン
(2) CPZ+ HVJ/HSP65DNA+ IL-12DNA ワクチン

D. 考察

[I] ~ [II] の臨床応用を国立病院機構呼吸器疾患研究ネットワークを利用して行う予定である。

E. 結論

[I] 結核治療ワクチン：HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンはマウスの系で治療効果を示した。さらにAg85B DNA+ Ag 85A DNA ワクチンは強力な予防ワクチン効果を示した。したがって①HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン ②HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNA+Ag85B DNA+ Ag 85A DNA ワクチン、を中心に治療ワクチンの開発計画を立案した。

さらに、

[II] 多剤耐性結核菌に対する治療ワクチン
多剤耐性結核菌を感染させたマウスにおいて、HVJ-エンベロープ/HSP65DNA + IL-12 DNA ワクチンは、強力な結核治療効果（結核治療ワクチン）を示した。

更に、超薬剤耐性結核（XDR-TB）に対しても、治療ワクチン効果を示す画期的な成果を得た。

[III] カニクイザルを用いた、結核治療ワクチン効果：このHVJ-エンベロープ/Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチンを臨床応用に適したpVAXベクターに二つのこれらの遺伝子を導入したワクチンを作製した。これをあらかじめ結核菌感染させてカニクイザルに治療ワクチンとして投与した。その結果、生存率の改善及び体重増加、免疫反応の増強等治療効果が示された。

[IV] 新規化学療法剤との併用療法計画。

新規化学療法カプラザマイシン（CPZEN-45）とOPCの二種類を共同研究で開発した。

これらの [I] ~ [IV] の臨床応用を国立病院機構呼吸器疾患研究ネットワークを利用して行う予定である。（図1）

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Masaji Okada, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Yasuko Nishida, Hitoshi Nakatani, Kyoko Takao, Chie Kishigami, Shiho Nishimatsu, Yoshikazu Inoue, Toshihiro Nakajima, Tetsuji Nagasawa, Yasuhumi Kaneda, Shigeto Yoshida, Makoto Matsumoto, Paul Saunderson, Esterlina V.Tan, E.

C.Dela Cruz, David McMurray, Mitsunori Sakatani. A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccine (HVJ-Envelope/Hsp65 DNA+ IL-12 DNA) against Tuberculosis Using The Cynomolgus Monkey Model. *Procedia in Vaccinology* Vol.2. 2010 (in press)

2. Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, Nakata K, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M, Sakurada S, Sasazuki T, Inoko H. Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary Mycobacterium avium complex infection. *J Infect Dis.* 2009 Jun 1;199(11):1707-15.
3. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Inoue Y, Matsumoto M, McMurray DN, Dela Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Burgos JA, Saunderson P, Sakatani M. Novel prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis. *Vaccine.* 2009 May 26;27(25-26):3267-70.
4. Masaji Okada, Yoko Kita, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Yasuko Nishida, Hitoshi Nakatani, Kyoko Takao, Chie Kishigami, Shiho Nishimatsu, Yoshikazu Inoue, Toshihiro Nakajima, Tetsuji Nagasawa, Yasuhumi Kaneda, Shigeto Yoshida, Makoto Matsumoto, Paul Saunderson, Esterlina V.Tan, E.C.Dela Cruz, David McMurray, Mitsunori Sakatani. A novel therapeutic and prophylactic vaccine against tuberculosis. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 2009. 154-158.
5. Yoshida S, Suzuki K, Tsuyuguchi K, Iwamoto T, Tomita M, Okada M, Sakatani M.: Evaluation of the Inno-Lipa Mycobacteria v2 for Mycobacterial identification, *Kekkaku.* 2009. 84:15-21.

(2) 学会発表

1. Okada M, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Inoue Y, Nakajima T, Nagasawa T,

- Kaneda Y, Yoshida S, Matsumoto M, Saunderson P, E V.Tan, E.C.Dela Cruz, McMurray D, Sakatani M. A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccine (HVJ-Envelope/ Hsp65 DNA+ IL-12 DNA) against Tuberculosis Using The Cynomolgus Monkey Model. 3rd World Vaccine Meeting Oct.4-7 Singapore
2. M Okada, Y Kita, N Kanamaru, S Hashimoto, Y Nishida, H Nakatani, K Takao, C Kishigami, S Nishimatsu, Y Sekine, T Nakajima, Y Kaneda, P Saunderson, E V.Tan, D McMurray, M Sakatani. A novel therapeutic vaccine (HVJ-Envelope/ HSP65 DNA+ IL-12 DNA) against Tuberculosis using the Cynomolgus monkey model. 49th ICCAC (Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy). Sep 12~15 San Francisco
 3. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Matsumoto M, E.V. Tan, Saunderson P, Sakatani M. Novel therapeutic and prophylactic vaccine (HVJ-Envelope/ Hsp65DNA+ IL-12DNA) against tuberculosis using cynomolgus monkey. 第 15 回 遺伝子治療学会 2009.7.9 大阪
 4. 岡田全司、喜多洋子、金丸典子、井上義一、坂谷光則. 新しい結核治療ワクチン (HVJ-エンベロープ/Hsp65+ IL-12 DNA) の開発. 第 84 回結核病学会総会 2009 年 7 月 2, 3 日 北海道. 結核 (2009.05)84 巻 5 号 Page403
 5. 喜多洋子・金丸典子・井上義一・坂谷光則・岡田全司. ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しい治療ワクチン開発: HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン. 第 84 回結核病学会総会 2009 年 7 月 2, 3 日 北海道. 結核 (2009.05)84 巻 5 号 Page403
 6. 吉田志緒美、鈴木克洋、露口一成、岡田全司、富田元久、和田崇之、岩本朋忠、坂谷光則. リファンピシンとリファブチンの抗抗酸菌活性ならびに rpoB 遺伝子変異の関係. 第 84 回結核病学会総会 2009 年 7 月 2, 3 日 北海道
 7. 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、西松志保、井上義一、坂谷光則、岡田全司. 新しい結核治療ワクチン (HVJ-エンベロープ/Hsp65+ IL-12 DNA) の開発 (カニクイザル感染系を用いて). 第 79 回実験結核研究会総会 2009 年 7 月 1 日 北海道
 8. 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、井上義一、吉田栄人、中島俊洋、金田安史、坂谷光則. 結核に対する新しい治療ワクチン (Hsp65+ IL-12 DNA) の開発. 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会 2009 年 6 月 12 日-14 日 東京. 日本呼吸器学会雑誌(2009.05)47 巻増刊 Page291
 9. 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、吉田栄人、中島俊洋、坂谷光則、金田安史、E. V. Tan, D.L.C. Paul Saunderson, , 岡田全司 ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた新しい結核治療ワクチン開発: HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会 2009 年 6 月 12 日-14 日 東京 日本呼吸器学会雑誌 (1343-3490)47 巻増刊 (2009.05) Page291
 10. 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、西松志保、井上義一、吉田栄人、中島俊洋、金田安史、坂谷光則. 超薬剤耐性結核に対する新しい結核治療ワクチン (HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチン) 開発. 第 63 回国立病院総合医学会 2009 年 10 月 23 日~24 日 仙台
 11. 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、西松志保、井上義一、吉田栄人、中島俊洋、坂谷光則、金田安史、E.V.Tan、E.L.C.DelaCruz 5)、Paul Saunderson、岡田全司. ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた、新しい結核治療ワクチン (HSP65 DNA + IL-12 DNA) 開発研究. 第 63 回国立病院総合医学会

2009年10月23日～24日 仙台

12. Okada M, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Inoue Y, Nakajima T, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Matsumoto M, Saunderson P, E V.Tan, E.C.Dela Cruz, McMurray D, Sakatani M. A novel therapeutic and prophylactic vaccine (HVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA) against Tuberculosis using the Cynomolgus monkey model. 第44回日米合同会議
2009年7月29、30日 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得（出願中）
2. 実用新案登録
3. その他

在留外国人結核の推移とその背景の検討

研究協力者 星野斉之 財団法人結核予防会結核研究所 企画・医学科長

研究要旨

- 1) 在留外国人の結核患者数は増加傾向にあり、在留外国人数（主に労働者と学生）の増加が主な要因と考えられた。今後、就業状況別の在留外国人人口の動向に対応して、外国人結核対策を強化することが望まれる。
- 2) 就業状況別の罹患率では、学生、労働者、家事従事者の順であり、健康診断の受診状況、在留期間の違いが要因として示唆された。
- 3) 学生と家事従事者の罹患率を1998年と2008年で比較すると、低下しており、母国の罹患率の低下傾向、在留期間の長い者の増加が要因として考えられた。
- 4) 罹患率は低下傾向にあると言っても、日本人の同じ就業状況の罹患率の数倍を示しており、それぞれの就業状況における患者発見の推進の努力は、今後も重要な方策となると思われる。特に、罹患率の高い外国人の学生や労働者（特に臨時・日雇い）に対する定期的健康診断の実施や外国人家事従事者が有症状時に早期に医療機関を受診できる体制作り、そして長期滞在予定者に対するQFT検査による潜在結核感染者の積極的な発見・治療の有効性の検討等が望まれる。

A. 研究目的

日本における外国人結核の発生状況と診断、治療の実態把握と今後の方策を展望することを目的とする。

B. 研究方法

就業状況別の在留外国人結核患者数と、該当する就業状況にある在留外国人の人数を各種の統計から入手して推移の検討を行った。就業状況別の在留外国人結核患者数は、結核登録者調査年報から入手した。外国人労働者数の推計は外国人労働者数の推移から得た。学生（留学生と就学生）、配偶者、定住者、永住者等の人数は、在留外国人統計から得た。

また、近年における在留外国人結核患者の就業状況別の状況を検討するために、結核登録者調査年報から、2007年から2008年の外国籍結核患者の情報をを用いて、就業状況別に、性比、在留年数、出身国、発見方法を検討した。また、上記の就業状況別の結核患者数と推計した在留外国人数を用いて罹患率を計算しその推移を分析した。

C. 結果、D. 考察

労働者と学生の患者数は増加傾向を示したが、家事従事者は一定の傾向は見られなかった。増加の要因としては、在留外国人労働者と外国人学生の増加が示唆された。家事従事者では、永住者数は増加傾向にあったが、配偶者等の数は横ばいであり、永住者数の患者発生への影響は少ないと考えられた。また、罹患率の推移では、労働者はほぼ不変で、学生と家事従事者は低下傾向にあり、罹患率の変化が患者数増加の要因ではなかった。なお、罹患率低下の

要因として、長期在留者の増加や出身国の罹患率の低下が考えられた。在留外国人の結核罹患率は低下傾向にあるが、日本人の同じ就業状況者罹患率の数倍を示しており、各就業状況における患者発見は重要な方策である。具体的には、外国人の学生や労働者（特に臨時・日雇い）への定期健康診断の強化や家事従事者における有症状時の医療機関受診勧奨による患者発見の強化などが挙げられる。治療成績（2007年登録者コホート）では、治療成功率は変わらず（外国人50%対日本人46.9%）、脱落率も変わらず（10.0%対9.7%）日本人に死亡が多く（1%対14.0%）、外国人に転出が多かった（11%対2.2%）。脱落例や転出例に対する治療継続の確認および服薬支援が必要と思われる。

E. 結論

- 1) 在留外国人の結核患者数は増加傾向にあり、在留外国人数（主に労働者と学生）の増加が主な要因と考えられた。今後、就業状況別の在留外国人人口の動向に対応して、外国人結核対策を強化することが望まれる。
- 2) 就業状況別の罹患率では、学生、労働者、家事従事者の順であり、健康診断の受診状況、在留期間の違いが要因として示唆された。
- 3) 学生と家事従事者の罹患率を1998年と2008年で比較すると、低下しており、母国の罹患率の低下傾向、在留期間の長い者の増加が要因として考えられた。
- 4) 罹患率は低下傾向にあると言っても、日本人の同じ就業状況の罹患率の数倍を示しており、それぞ

れの就業状況における患者発見の推進の努力は、今後も重要な方策となると思われる。特に、罹患率の高い外国人の学生や労働者（特に臨時・日雇い）に対する定期の健康診断の実施や外国人家事従事者が有症状時に早期に医療機関を受診できる体制作り、そして長期滞在予定者に対するQFT検査による潜在結核感染者の積極的な発見・治療の有効性の検討等が望まれる。

5) 出身国の結核蔓延状況の改善が、入国者の結核罹患率の低下に寄与している可能性がある。周辺国（中国、韓国、フィリピン等）への結核対策の技術的支援が、日本国内の在留外国人の結核対策に寄与する可能性もある。

6) 治療成績では、日本人に比して死亡は少ないが転出が多く、転出後の治療継続の支援システムの確立が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 星野齊之：就業状況別の在留外国人結核の推移とその背景

2. 学会発表

1. 星野齊之：第84回日本結核病学会総会
在日外国人結核患者数の推移とその背景

輸入感染症としての多剤耐性結核の対策・制御に関する研究

研究協力者 中島俊洋 ジェノメディア株式会社 代表取締役社長

研究要旨

多剤耐性結核の制御を目的として開発している新規ワクチンのアジュバント兼DDSでワクチン成分であるHVJ-Eについて、安全性試験、安定性試験、GMP製造技術確立を進めた。その結果、重篤な毒性は認められない事、12ヶ月の有効期限の設定ができる事、GMP製造が的確である事が明らかとなった。

A. 研究目的

多剤耐性結核を制御するには、耐性菌にも有効な新規化学療法剤の開発に加え、予防・治療に有効な新規ワクチンなどの治療法を開発する必要がある。特に、主に乳児期に接種されるBCGと相乗効果を認める新規ワクチンの開発に成功すれば、多剤耐性結核を含む成人結核の制御に有用な治療法となる。そこで、本事業では多剤耐性結核の制御に有効な新規治療用ワクチンを開発する事を目的として研究を行った。

これまでの研究により、抗原遺伝子であるHSP65遺伝子と免疫活性化遺伝子であるIL-12を同時に発現するDNAワクチン（プラスミドDNA）をアジュバント兼DDSであるHVJ-Eに封入した組成物が、マウス、モルモット、カニクイザル、ヒト骨髄細胞を移植したマウス(SCID/hu)のそれぞれの結核モデル動物において有効性を示す事が明らかとなっている。そこで、本年度は臨床応用を目指して前臨床試験のデータ取得と、臨床研究用のGMP製造を実施できるレベルの技術を確立する事を目的として研究開発を行う事とした。

B. 研究方法

臨床応用を開始するには、安全性試験、有効性試験、安定性試験などの前臨床試験データの取得が必要である。また、臨床応用のためのGMP製造を開始するには、製造工程、品質管理工程、施設・機器のバリデーション（性能、品質の実証）をガイドラインに従って実施する必要がある。

そこで、前臨床試験については、薬効の実証、薬理メカニズムについては既に解析が進んでいるため、GLPグレードの安全性試験とGMPグレードの安定性試験についてそれぞれ必要なガイドラインに従ってデータの取得を進めることとした。

また、GMP製造については、治験薬GMP製造のためのガイドラインに準拠して手順書・組織の整備を進めた上で、バリデーション（施設・機器につい

てはクオリフィケーション、工程についてはベリフィケーションとも表現する）を進め、実際に臨床応用（臨床研究）のためのGMP製造を実施する事とした。

C. 研究結果

前臨床試験としては、アジュバント兼DDSでワクチン成分であるHVJ-Eについて安全性試験を行った。国内の非臨床試験のガイドラインに従って、ラット（げっ歯類）、カニクイザル（非げっ歯類）の2種の動物を選択し、一般毒性試験（単回投与、2週間間歇投与）、安全性薬理試験（中枢神経系：FOB、呼吸器系）、トキシコキネティクス（TK）試験、特殊毒性試験について試験を実施した。

単回投与試験の結果、投与可能な最高用量においても死亡する動物は認められず、概略の致死量が投与可能な最高用量を上回る用量であることが明らかとなった。また、ラット（げっ歯類）とカニクイザル（非げっ歯類）の2種の動物いずれにおいても毒性学的に意義のある所見は認められなかった。

間歇投与試験の結果、ラット（げっ歯類）とカニクイザル（非げっ歯類）の2種の動物いずれにおいても、投与部位の軽度な炎症反応のみで重篤な毒性所見は認められなかった。

また、実施した安全性薬理試験においても異常は認められなかった。また、ラットの間歇投与試験にサテライト群として組み込んだトキシコキネティクス（TK）試験においては、被験物質の皮下投与後に血清移行は観察されない事（検出限界以下）が明らかとなった。

更に、安全性薬理試験においては、被験物質に起因する一般薬理的な影響は認められなかった。

一方、アジュバント兼DDSでワクチン成分であるHVJ-Eを凍結乾燥により安定化したものを用いて安定性試験を実施した結果、数種類の温度条件（苛酷条件、加速条件、想定保存条件）のいずれにおいても、検討を行った期間中（1ヶ月～6ヶ月）は安定である事が明らかとなった。

臨床応用に向けたGMP製造については、バイオ医

薬製造、及び治験薬製造のためのガイドラインに準拠した方法で研究開発を行った。基本的には治験薬GMP製造に関する通知書(厚労省医薬食品局長の薬食発第0709002号(平成20年7月9日付け通知)「治験薬の製造管理及び品質管理等に関する基準(治験薬GMP)について」)に準拠して、手順書、組織を整備し、それに従って作成した計画書の通りにバリデーション(品質試験法)、クオリフィケーション(設備・機器)、ベリフィケーション(製造工程)を進めて、品質試験、設備・機器、製造工程のそれぞれについて適切な性能である事を実証した。

D. 考察

安全性試験においては、ラット(げっ歯類)とカニクイザル(非げっ歯類)の2種の動物を選択して一般毒性試験、安全性薬理試験、TK試験など臨床応用の開始に必要なGLPレベルの試験を実施した結果、アジュバント兼DDSでワクチン成分であるHVJ-Eには重篤な毒性がない事が明らかとなった。また、TK試験において皮下投与後の血清への移行は検出限界未満のレベルであった事から、全身性被曝は投与した被験物質量においては検出限界以下の少量であるか、或いは移行しない可能性も考えられた。これらの、安全性試験の結果から、投与可能な範囲内ではアジュバント兼DDSでワクチン成分であるHVJ-Eの安全性が高い事が示唆された。

また、苛酷試験、加速試験、長期安定性試験の結果から、ワクチン成分であるHVJ-Eについては、加速条件でも6ヶ月の安定性が実証されたため、ICH(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use:日米欧医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議)の安定性評価ガイドラインに従って、想定される冷蔵の保存条件下では12ヶ月の有効期間設定が示唆された。

平成21年度は、上記のようにして取得したデータを利用して、実際にHVJ-Eを用いた臨床研究のためのGMP製造を実施した。製造後は、バリデーションを実施した品質試験において設定規格に適合する事を確認した上、製造物である凍結乾燥HVJ-Eを院内製造用の原料として出荷した。現在、院内製造を行った被験物質を用いて、大阪大学医学部附属病院において進行性悪性黒色腫を対象とした臨床研究が進められている。

E. 結論

平成21年度の動物での安全性試験により、アジュバント兼DDSでワクチン成分であるHVJ-Eの安全性が実証された。また、安定性に関する研究の結果、冷蔵の保存条件で12ヶ月以上の有効期限を設定できる事が明らかとなった。更に、製造に関するバリ

デーション(品質試験法)、クオリフィケーション(設備・機器)、ベリフィケーション(製造工程)により、製造体制・製造工程の適格性を実証した結果、凍結乾燥HVJ-Eを院内製造用の原料として出荷し、大阪大学医学部附属病院が臨床研究を開始した。

F. 健康危険情報(総括研究報告書にまとめて記入)

本研究を実施するにあたり、ジェノメディア株式会社は、池田ラボラトリーの所在地である独立法人 産業技術総合研究所の規定に従い、国で定められている、組換えDNA実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業技術総合研究所で開催される各委員会の実験許可を受けてから実験を行った。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Inoue Y, Matsumoto M, McMurray DN, Dela Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Burgos JA, Saunderson P, Sakatani M., Novel prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis., *Vaccine*. 2009 May 26;27(25-26):3267-3270.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
岡田全司	A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccine (HVJ-Envelope/Hsp65 DNA+ IL-12 DNA) against Tuberculosis Using The Cynomolgus Monkey Model	Procedia in Vaccinology	2		2010 in press
岡田全司	Special Focus on Tuberculosis Prevention and Immunotherapy Tuberculosis Vaccine Development The development of novel (preclinical) DNA vaccine.	Human Vaccines			in press
岡田全司	Novel prophylactic and therapeutic vaccine against Tuberculosis.	Vaccine		3267-3270	2009
岡田全司	Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary Mycobacterium avium complex infection.	J.Infect. Dis.	199 (11)	1707-1715	2009
岡田全司	A novel therapeutic and prophylactic vaccine against tuberculosis.	44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference.		154-15	2009
岡田全司	キラーT細胞、granulysin結核免疫とワクチン(HSP65 + IL-12 DNAワクチン等)開発	結核			出版中
岡田全司	結核免疫(序論)	結核			出版中
岡田全司	遺伝子を用いた抗酸菌鑑別同定試薬 INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2の有 用性の検討	結核	84(1)	15-21	2009
岡田全司	わが国の結核対策の現状と課題 結核予防ワクチンの開発状況とその応用の可能性	日本公衆衛生雑誌	56(4)	266-270	2009
加藤誠也	Transmission of specific genotype streptomycin resistant strains of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in the Tokyo Metropolitan Area in Japan.	BMC Infect Dis.	9	138	2009
小林信之	Pyrazinamide resistance in mult idrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Japan.	Clin. Microbio l.Infect.		DOI: 10. 1111/j.14 69-0691	2009

服部俊夫	Procyanidins and butanol extract of Cinnamomi Cortex inhibit SARS-CoV infection.	Antiviral Research	82(1)	73-81	2009
服部俊夫	Peltophorum africanum, a traditional South African medicinal plant that contains an anti HIV-1 constituent, betulinic acid.	The Tohoku Journal of Experimental Medicine	217 (2)	93-99	2009
服部俊夫	Regulation of adenosine 5'-triphosphate (ATP)-gated P2X(4) receptors on tracheal smooth muscle cells. Respir Physiol.	Neurobiol	66(1)	61-67	2009
服部俊夫	Persistent elevation of plasma osteopontin levels in HIV patients despite highly active antiretroviral therapy.	Tohoku J Exp Med.	217 (2)	93-99	2009
服部俊夫	Transactivation of human osteopontin promoter by human T cell leukemia virus type 1-encoded Tax protein.	Leuk Res			In press
服部俊夫	A sensitive HIV-1 envelope induced fusion assay identifies fusion enhancement of thrombin.	Biochem Biophys Res Commun.			2009
服部俊夫	Increased Synthesis of Anti-tuberculous glycolipid immunoglobulin in Active compared to Latent tuberculosis Infection and its relation with T-cell Interferon.	Gamma production Tohoku J Exp Med.	220 (1)	21-25	2009
高鳥毛敏雄	米国、イギリス、ドイツにおける結核医療の提供体制	結核	85(2)	98-101	2010
高鳥毛敏雄	わが国の結核対策の現状と課題 結核対策の及ばない人々に対する対策 あいりん地区における実践活動から	日本公衛誌	56(6)	418-421	2009
慶長直人	Quality assessment of an interferon-gamma release assay for tuberculosis infection in a resource-limited setting.	BMC Infect Dis	9	66	2009
慶長直人	Association of HLA-class II alleles with SARS in the Vietnamese population.	Hum Immunol	70	527-531	2009
慶長直人	Prevalence and risk factors for tuberculosis infection among hospital workers in Hanoi, Viet Nam.	PLoS One	4(8)	6798	2009
慶長直人	Genome-wide SNP-based linkage analysis of tuberculosis in Thais	Genes Immun	10(1)	77-83	2009
慶長直人	Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary Mycobacterium avium complex infection.	J Infect Dis	199 (11)	1707-1715	2009
慶長直人	Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor Autoantibodies and Myeloid Cell Immune Functions in Healthy Individuals.	Blood	113 (11)	2547-2556	2009

慶長直人	No evidence for association between the interferon regulatory factor 1 (IRF1) gene and clinical tuberculosis.	Tuberculosis	89(1)	71-76	2009
竹田 潔	A single polymorphic amino acid on <i>Toxoplasma gondii</i> kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3.	J. Exp.Med.	206	2747-2760	2009
竹田 潔	Induction of Intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria.	Cell	139	485-498	2009
竹田 潔	Increased atherosclerotic lesions and Th17 in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice fed high-fat diet.	Mol Immunol.	47	37-45	2009
竹田 潔	Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by deoxynucleic acids from <i>Candida albicans</i> .	Infect. Immun.	77	3056-3064	2009
竹田 潔	NFATc1 mediates Toll-like receptor-independent innate immune responses during <i>Trypanosoma cruzi</i> infection.	PLoS Pathogens	5	1000514	2009
竹田 潔	C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, <i>Malassezia</i> . Proc. Natl.	Acad. Sci. USA.	106	1897-1902	2009
竹田 潔	Fra-1 negatively regulates lipopolysaccharide-mediated inflammatory responses.	Int. Immunol.	21	457-465	2009
竹田 潔	The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1(PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation.	Hepatology	49	204-214	2009
坂谷光則	A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccine (HVJ-Envelope/Hsp65 DNA+ IL-12 DNA) against Tuberculosis Using The <i>Cynomolgus</i> Monkey Model.	Procedia in accinology	2		2010 in press
坂谷光則	A novel therapeutic and prophylactic vaccine against tuberculosis.	44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference		154-158	2009
坂谷光則	Novel prophylactic and therapeutic vaccine against Tuberculosis.	Vaccine		3267-3270	2009
坂谷光則	Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary <i>Mycobacterium avium</i> complex infection.	J.Infect. Dis.	199 (11)	1707-1715	2009

坂谷光則	遺伝子を用いた抗酸菌鑑別同定試薬 INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2の有用性の検討	結核	84(1)	15-21	2009
星野斉之	就業状況別の在留外国人結核の推移とその背景	結核			出版中
中島俊洋	Novel prophylactic and therapeutic vaccine against Tuberculosis.	Vaccine	27 (25-26)	3267-3270	2009
鈴木克洋	Comparison of rifabutin susceptibility and rpoB mutations in multi-drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by DNA sequencing and the line probe assay	J.Infect Chemother.			2010
鈴木克洋	遺伝子を用いた抗酸菌鑑別同定試薬 INNO-LiPA MYCOBACTERIAの有用性の検討	結核	84	15-21	2009
鈴木克洋	肺MAC症の診断と治療	MEDICANENT NEWS	1969	4	2009
鈴木克洋	質疑応答「多剤耐性結核の定義・現状と対策」	日本医事新報	4424	96-97	2009

Tuberculosis vaccine development

The development of novel (preclinical) DNA vaccine

Masaji Okada* and Yoko Kita

Clinical Research Center; National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center; Kita-ku; Sakai-City, Osaka Japan

Keywords: MDR-TB therapy, monkey, CTL, recombinant DNA

A third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*, and 2 million people die from tuberculosis every year. The only tuberculosis vaccine currently available is an attenuated strain of *Mycobacterium bovis* BCG, although its efficacy against adult tuberculosis disease remains controversial. Furthermore multi-drug resistant tuberculosis is becoming big problems in the world. Therefore, the development of novel therapeutic vaccine as well as novel prophylactic vaccine against tuberculosis is required.

This review provides a summary of novel vaccines (especially DNA vaccines) in preclinical stage using mouse, guinea pig and monkey models. In several promising novel vaccines, the studies were extended to a cynomolgus monkey model, which is currently the best animal model of human tuberculosis. The review also provides recent advances of the precise studies of induction of immunity including CD8 positive cytotoxic T cells and effector molecules such as granulysin by these vaccines, against multi-drug resistant tuberculosis and extremely drug resistant tuberculosis.

Introduction

Tuberculosis is a major global threat to human health, with about 2 million people dying every year from *Mycobacterium tuberculosis* (TB) infection. The only tuberculosis vaccine currently available is an attenuated strain of *Mycobacterium bovis* BCG (BCG), although its efficacy against adult TB disease was not effective. Furthermore, multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) and extremely drug resistant TB (XDR-TB) are becoming big problems in the world. In such circumstances, the development of therapeutic vaccine as well as prophylactic vaccine against TB is required. TB vaccines were classified into four main vaccines (1) DNA vaccines (2) recombinant BCG vaccines (3) subunit vaccines (4) attenuated TB vaccines.

It is well established that protective immunity to *M. tuberculosis* depends on both CD4⁺ and CD8⁺ T cells.¹⁻⁸ Because DNA vaccination results in the generation of cellular immune responses, including those of a Th-1-type response, and protection in animal models of infectious diseases.^{9,10} In fact, several human

clinical trials have recently been initiated to test the efficacy of DNA vaccines against emerging and re-emerging infectious diseases including hepatitis B,¹¹ malaria^{12,13} and HIV infections.¹⁴ DNA vaccination has also shown potential for the development of tuberculosis vaccines in the mouse model.¹⁵⁻¹⁸ However, in a guinea pig model, which is arguably one of the most biologically relevant systems available for studying human pulmonary tuberculosis, DNA vaccines has not been proven more efficacious than BCG.¹⁹ The efficacy of any experimental tuberculosis vaccine remains to be evaluated in human clinical trials and, thus, a vaccine against tuberculosis is still anxiously awaited.

Vaccines for TB (DNA Vaccines)

DNA vaccines are a relatively new approach to immunization for infectious diseases.^{1,2,15,16,20-23} Many gene therapies including DNA vaccines have been used for the treatment of several kinds of cancers for more than twenty years, via the activation of CD8⁺ cytotoxic T cells.²⁴⁻²⁶ Plasmids containing genes have been also used to induce protection against a variety of bacterial, viral (such as SARS corona virus), protozoal and helminth infection in animal models.^{27,28} DNA vaccines by the use of several kinds of vectors including HVJ-envelope, HVJ-liposome, adenovirus vector and AAV vector were established.

DNA vaccines can induce strong cellular immunity against TB and can invoke both CD4 and CD8 T cell responses.^{2,29} The first data showing significant protection against *M. tuberculosis* came from naked DNA immunization in mice. Several mycobacterial antigens delivered as naked DNA have elicited protection against *M. tuberculosis*. Hsp65 antigens (derived from H37Rv *M. tuberculosis*)-, Ag 85B-, Ag 85A-, M.tb8.4-, M.tb41-, PPT39-, MPT51-, MPT63-, MPT64-, MPT83-, ESAT-6-, Pst-3- and the 38 kDa lipoprotein-DNA vaccines were studied (Table 1).^{1,20,30-44}

Ag85A antigen has been used to prime immune responses followed by homologous or heterologous boosting vaccines in mice. Protection as defined by a reduction in the numbers of bacteria recovered from the lungs was observed. Antigen Ag85B, an abundant 30 kDa secreted protein of *M. tuberculosis*, has shown protection in mice as well as in guinea pigs against TB.³⁴ Similarly DNA vaccines encoding secreted proteins Ag85B and MPT64 have also been reported to protect mice from *M. tuberculosis* H37Rv challenge by prompting a Th1 response. The effectiveness of DNA vaccines can be increased by codelivery of multiple DNA plasmids or chimeric DNA vaccines.⁴⁵⁻⁴⁷ Derrick et al. used a DNA vaccine cocktail consisting of Ag85B, ESAT. KatG,

*Correspondence to: Masaji Okada; Email: okm@kch.hosp.go.jp

Submitted: 12/22/08; Accepted: 09/24/09

Previously published online:

www.landesbioscience.com/journals/vaccines/article/10172

Table 1. Mycobacterial antigens and cytokines delivered as DNA vaccine

DNA Vaccines
HSP65
IL-12
Ag 85A
Ag 85B
MPT51
HSP70
ESAT-6
IL-6 + IL-6 Receptor + gp130
γ IFN
Mtb8.4
Mtb41
Mtb39
MPT63
MPT64
Psts-3
38 kDa lipoprotein
MPT12
IL-15
IL-23
IL-27

Table 2. Vectors for DNA vaccines against tuberculosis

Types	Characteristics
(1) HVJ-Envelope	Very Good Expression (GMP Level)
(2) HVJ-liposome	Good Expression
(3) Adenovirus	Good Expression. Transient
(4) Adeno Associated Virus (AAV) Vector	AAV 2/5 Good Expression. Long Term
(5) Lentivirus	Non-proliferating cell
(6) Liposome	safety
(7) Sendai virus Vector	Good Expression
(8) Gene Gun	safety
(9) Vaccinia Virus (Attenuated: MVA)	
(10) BCG (recombinant BCG)	
(11) Attenuated Listeria	

MPT8.4, MPT12, MPT63, MPT64 and MPT83 to reduce the bacterial burden in the lungs of normal mice as well as mice lacking CD4 T cells after aerosol challenge.

DNA vaccines are safe, cheap, stable and effective for inducing cellular immunity (helper T cell, cytotoxic T cell, macrophages) and humoral immunity in preclinical models of

infectious diseases.⁴⁸⁻⁵⁰ These vaccines are also able to activate innate immune responses. They interact with Toll-like receptor 9 (TLR 9: the pattern recognition receptor) through unmethylated CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODNs9),^{51,52} resulting in the upregulation of cytokines gene expression through MyD88 molecule.⁵³⁻⁵⁶

DNA vaccines have been in general proved to be safe and well tolerated in preclinical and clinical studies.^{57,58} The naked plasmid DNA molecules have not caused any adverse effects on the biochemical and hematological blood values and have caused neither detectable organ pathology nor systemic toxicity. Furthermore, there has been no evidence of autoimmunity, development of anti-nuclear or anti-DNA antibodies, or plasmid DNA integration into chromosomes.

TB Vaccine Strategies

Pre-infection vaccination strategy. From a public health perspective, delivering a vaccine prior to mycobacterial infection and soon after birth makes most sense.

Booster vaccination strategy (prophylactic). A second option would be to use a new TB vaccine as a booster sometime after neonatal BCG vaccination.

Post-infection vaccine strategy. A third option is to prevent disease by enhancing or boosting immunity in persons already infected a post-infection vaccine strategy. This approach is attractive because more than 2 billion persons worldwide are already infected and therefore at risk of progression to disease.

Therapeutic vaccine. A fourth option would be to use a vaccine as an adjunct to anti-TB treatment, to shorten therapy or reduce the risk of relapse, a therapeutic vaccine. This may be particularly relevant in situations where multi-drug resistant TB cases are common.

Vector and Adjuvant

Prophylactic and therapeutic DNA vaccines were established by using several kinds of vectors such as HVJ-liposome, HVJ-envelope, adenovirus vector, adeno-associated virus vector (AAV), lenti-virus vector, vaccinia-virus vector, poliovirus vector, BCG, attenuate Listeria^{1,2,20,24,59-61} (Table 2).

MPL + QS21 + Squallene (AS101), or cationic liposome dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA) is promising adjuvant for TB vaccines.⁶² Lipopolysaccharide (LPS), a component of bacterial cell walls, is driven by the adaptor proteins myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter inducing interferon- β (TRIF), which together mediate signaling by the endotoxin receptor Toll-like receptor 4 (TLR4). Monophosphoryl lipid A (MPLA) is a low-toxicity derivative of LPS with useful immunostimulatory properties, which is nearing regulatory approval for use as a human vaccine adjuvant. Mata-Havo et al. reported that, in mice, the low toxicity of MPLA's adjuvant function is associated with a bias toward TRIF signaling which is likely caused by the active suppression, rather than passive loss, of proinflammatory activity of this LPS derivative. This finding

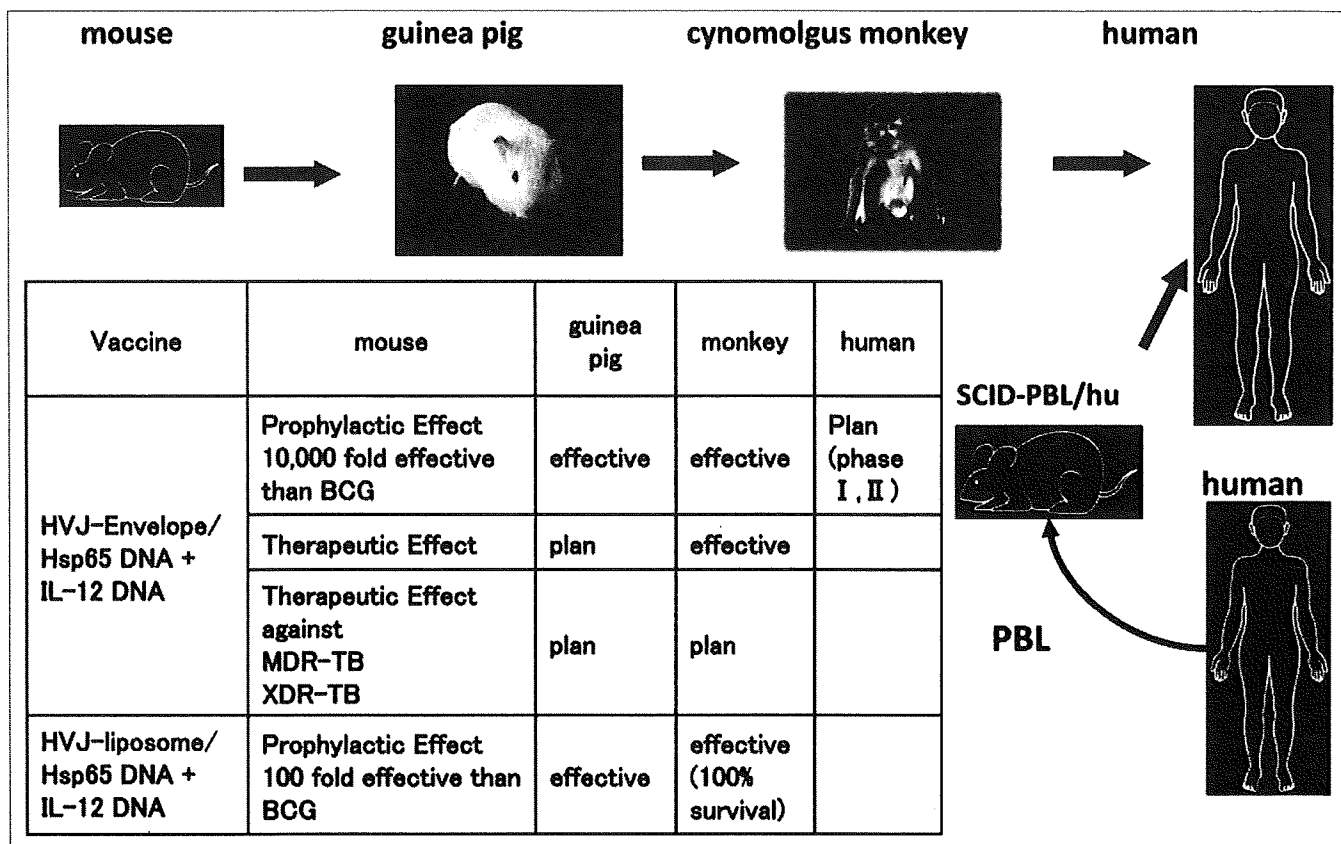


Figure 1. The Development of Novel Vaccines for *M. tuberculosis* using animal models.

may have important implication for the development of future vaccine adjuvants.⁶³

Animal Model

Murine models are usually used for the first screening of novel TB vaccines, because (1) genetic background of mice is homogeneous, (2) only small spaces are required for the experiments (3) we can use TB-resistant C57BL/6 mice and TB sensitive BALB/C mice.^{1,2}

Guinea pig models are also used for the evaluation of efficacy of novel TB vaccines. Guinea pig is sensitive to TB and makes granulomatous TB lesions in the lungs.¹⁹

Cynomolgus monkey model is the best animal TB model as reported by Walsh and E.V. Tan in Leonard Wood Memorial Institute. TB infection in the cynomolgus monkeys is very similar to human TB disease^{1,20,21,64} (Fig. 1). Monkeys make caseous necrosis in TB granulomas in the lungs as human make caseous necrosis.

HVJ-Envelope/HSP65 DNA + IL-12 DNA Vaccine

DNA vaccines against TB using murine models. *Prophylactic DNA vaccines.* We investigated the immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccine combinations expressing mycobacterial heat shock protein 65 (Hsp65) and interleukin-12 (IL-12) using

gene gun bombardment and the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome method.⁶⁵ A mouse IL-12 expression vector (mIL-12 DNA) encoding single-chain IL-12 proteins comprised of p40 and p35 subunits were constructed. In a mouse model, a single gene gun vaccination with the combination of Hsp65 DNA and mIL-12 DNA provided a remarkably high degree of protection against challenge with virulent *M. 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 Hsp65 DNA and mIL-12DNA (Hsp65 + mIL-12/HVJ). The HVJ-liposome method improved the protective efficacy of the Hsp65 DNA vaccine compared to gene gun vaccination. Hsp65 + mIL-12/HVJ induced CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte activity against Hsp65 antigen.⁶⁶⁻⁷⁰ Most importantly, Hsp65 + mIL-12/HVJ vaccination resulted in a greater degree of protection than that evoked by BCG. This protective efficacy was associated with the emergence of IFN γ -secreting T cells and activation of proliferative T cells and cytokines (IFN γ and IL-2) production upon stimulation with Hsp65 and antigens from *M. tuberculosis* (Fig. 2). These results suggest that Hsp65 + IL-12/HVJ could be a promising candidate for a new tuberculosis DNA vaccine, which is superior to BCG vaccine.²

The in vivo necessity of CD8 positive T cells as well as CD4 positive T cells to exert the prophylactic efficacy of the HVJ-envelope/HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine was demonstrated in mice.

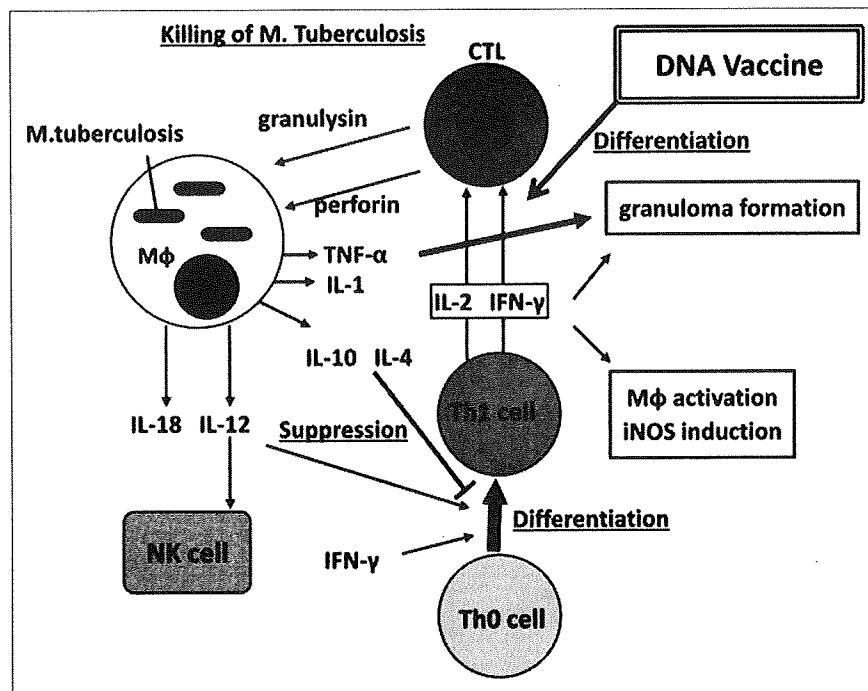


Figure 2. Induction of CTL and Prophylactic Effect by DNA vaccines against *Mycobacterium tuberculosis*.

Furthermore, by using BCG priming-DNA vaccine booster method, *M. tuberculosis* numbers in the lungs of DNA vaccinated mice were 10,000 (ten thousand) lower compared to BCG alone vaccinated mice (Fig. 1).

Therapeutic DNA vaccines. MDR-TB and XDR-TB are becoming big problems in the world. About 500,000 new patients with MDR-TB are shown every year. However, the effective drugs against MDR-TB are few.

Figure 1 shows the therapeutic efficacy of HVJ-Envelope/Hsp65DNA + IL-12DNA vaccine against XDR-TB (extremely drug resistant TB).¹ Mice treated with this DNA vaccine prolonged the survival periods significantly by statistical analysis. The vaccine exerted the therapeutic activity even against XDR-TB, which is resistant to RFP, INH, SM, EB, KM, EVM, TH, PAS, LVFX, PZA and only sensitive to CS.

This DNA vaccine exerted a significant therapeutic effect against TB, as indicated by: (1) extension of survival of mice infected with XDR-TB, (2) decrease in the CFU of TB in lungs, liver and spleen of mice infected with MDR-TB as well as drug-sensitive TB (H37Rv), (3) decrease in the CFU of TB in these organs of mice challenged with TB in the in vivo humanized immune model of SCID-PBL/hu (Fig. 1).

Furthermore, we have established chronic TB disease model using mouse infected with TB in the aerosol chamber (data not shown).¹ By using this model, therapeutic efficacy of this vaccine was also observed.

DNA vaccines against TB using guinea pig models. In the guinea pig model, HSP65 + gpIL-12/HVJ provided better protection against the pulmonary pathology caused by pulmonary infection with TB than BCG vaccination (data not shown) (Fig. 1).

DNA vaccines against TB using cynomolgus monkey models.

Prophylactic DNA vaccines. We have developed two novel TB vaccines: HSP65 + IL-12/HVJ and a recombinant BCG harboring the 72f fusion gene (72f rBCG).^{21,71} We extended our studies to a cynomolgus monkey model,⁶⁴ which is currently the best animal model of human tuberculosis, to evaluate the HSP65 + IL-12/HVJ and 72f rBCG vaccines. Vaccination with HSP65 + IL-12/HVJ as well as 72f rBCG vaccines provided better protective efficacy as assessed by the Erythrocyte Sedimentation Rate, chest X-ray findings and immune responses than BCG. Most importantly, HSP65 + IL-12/HVJ resulted in an increased survival for over a year. This is the first report of successful DNA vaccination and recombinant BCG vaccination against *M. tuberculosis* in the monkey model which closely mimics human TB disease²¹ (Fig. 3).

It is very important to evaluate the long survival period in a monkey model, as human TB is a chronic infection disease. Furthermore, the decrease in the body weight of TB patients with TB is usually accompanied by progress of TB disease.

Furthermore, the protective efficacy of the HSP65 + IL-12/HVJ and BCG using the priming-booster method in the TB infected cynomolgus monkeys was very strong. All four monkeys from the group of BCG-priming and the DNA vaccine (HVJ-liposome/HSP65 + IL-12 DNA vaccine) booster were alive more than 12 months post-infection (Fig. 3).²⁰ In contrast, only 2 monkeys out of 6 from the BCG Tokyo alone group were alive (33% survival).²⁰ 50% of the monkeys from the saline control group and DNA vaccine-priming and the BCG Tokyo vaccine booster group, respectively, were alive more than 12 months in the study. Furthermore, IFN γ production and proliferation of PBL from monkeys vaccinated with these vaccines were strongly enhanced. Taken together, these results clearly demonstrated that

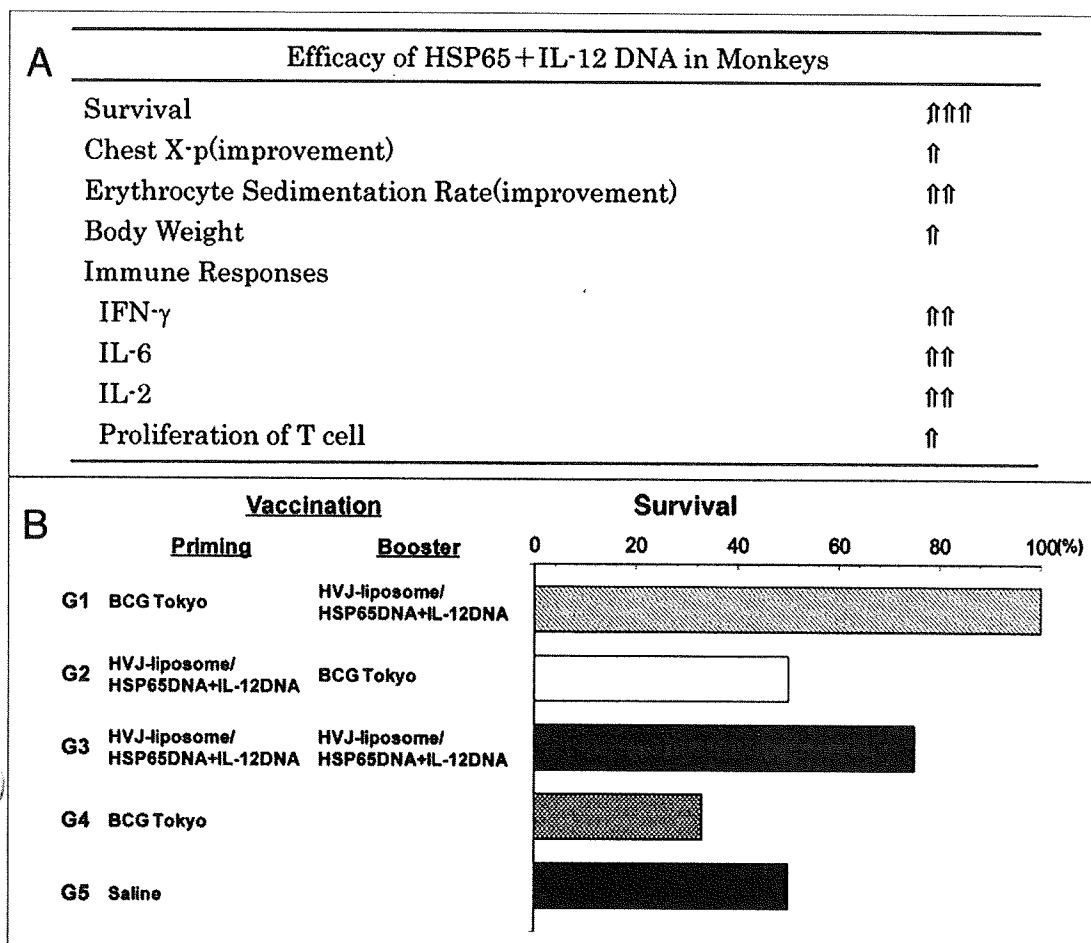


Figure 3. (A) Efficacy of HSP65 + IL-12 DNA in Monkeys. (B) Protective efficacy (survival) of HSP65 + IL-12/HVJ and BCG using priming-booster method against TB challenged cynomolgus monkey 350 days after TB infection.

BCG priming and the HSP65 + hIL-12/HVJ booster could provide extremely strong protective efficacy against *M. tuberculosis* in the cynomolgus monkey model.²⁰

In Japan and other countries, the BCG vaccine is inoculated into human infants (0–6 months after birth). Therefore, BCG priming in infants and HSP65 + hIL-12/HVJ boosters for adults (including junior high school students, high school students and old persons) may be required for the significant improvement of clinical protective efficacy against TB.

Our results with the HSP65 + hIL-12/HVJ vaccine in the cynomolgus monkey model should provide a significant rationale for moving this vaccine into clinical trials. In fact, the 72f fusion protein vaccine entered Phase I testing after its evaluation in cynomolgus monkeys in Leonard Wood Memorial⁶⁴ by Reed and Skeiky.

Therapeutic DNA vaccines. Furthermore, the therapeutic activity of this vaccine was evaluated in a nonhuman primate model infected with *M. tuberculosis*.¹

Figure 4 shows the results of immune responses of cynomolgus monkey at 11 weeks after challenge of *M. tuberculosis* Erdman strain (5×10^2) by intratracheal instillation. The proliferation of PBL in therapeutic vaccination of monkeys in the group with HVJ-Env/HSP65 DNA + IL-12 DNA was

augmented (Fig. 4B). This vaccine also improved the survival of monkeys, compared to the saline (control) group after TB challenge (Fig. 4C).¹

This vaccine exerted a significant therapeutic effect against TB, as indicated by augmentation of survival and immune responses, in a cynomolgus monkey model. It is important to evaluate the survival of monkey.^{20,21}

Thus, our results with this DNA vaccine in the murine therapeutic model and cynomolgus monkey therapeutic model should provide a significant rationale for moving this vaccine into clinical trial.

Thus, we are taking advantage of the availability of multiple animal models (mouse, guinea pig and monkey) (Fig. 1) to accumulate essential data on the HVJ-envelope DNA vaccine in anticipation of a phase I clinical trial.

DNA vaccines against TB using SCID-PBL/hu model. Therapeutic efficacy of HVJ-Envelope/HSP65 DNA + IL-12 DNA was also observed, using in vivo humanized immune models of IL-2 receptor γ -chain disrupted NOD-SCID mice constructed with human PBL (SCID-PBL/hu).^{21,24,59} This DNA vaccine resulted in significantly therapeutic activity even in SCID-PBL/hu mice which exerted human T cell immune responses (Fig. 1).