

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 b. rBCG30ΔureC : Hly (VPM1002) c. AERAS-407 d. rBCG30ARMF, rBCG Mtb B30, rBCG h IFN γ e. Nas L3/Htk BCG f. mc ² 6220, mc ² 6221, mc ² 6222, mc ² 6231 g. mc ² 5059	リコンビナント 85B BCG リコンビナント listeriolysin BCG リコンビナント perfringiolysin リコンビナント 85B BCG 鼻粘膜ワクチン/heat killed whole BCG コペンハーゲン株 nor-replicating, <i>M. Tuberculosis</i> strain (Δ lys A Δ pan CD) replicating pro-apoptotic <i>M. bovis</i> BCG 株 (Δ nuoG)
2. Phase I 2009 or Later	
a. HBHA (heparin-binding haemagglutinin) b. Attenuated Live Vaccine based on Phop c. paBCG (pro-apoptotic BCG)	メチル化 21-K Da 蛋白 弱毒化ヒト結核菌 (virulence gene の pho P の不活性) 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 b. M72 c. AERAS-402 d. SSI Hybrid-1 e. SSI HyVac4/AERAS-404 f. AERAS-405 g. r30 h. Nas L3/Htk BCG	リコンビナント MVA (Ag85A を発現した) Mtb32+Mtb29 の fusion 蛋白 Replication-incompetent adenovirus 35 vector expressing <i>M. Tuberculosis</i> antigens Ag85A, Ag85B, and TB 10.4. fusion 蛋白 (Ag85B-ESAT-6) fusion 蛋白 (Ag85B-TB10.4) Shigella-delivered recombinant double-stranded RNA nucleocapsid (Ag85A, 85B, Rv3407, latency antigen) リコンビナント Ag85B 蛋白
2. Phase I : 2009 or Later	
a. Hsp C TM TB Vaccine b. HBHA (heparin-binding haemagglutinin) c. NasL3/AM85B conjugate d. PP1, PP2, PP3 f. AC ₂ SGL Diacylated Sulfoglycolipids g. HVJ-liposome/Hsp65 DNA + IL-12 DNA	Heat shock protein antigen complexes (Hsp Cs) Nasal vaccine/Man capped Arabinomannan oligosaccharide BCG boosting AC ₂ SGL Mycobacterial lipids 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、しかも臨床应用到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 f. HG856-SeV g. TB Vax h. F36, F727 i. Mycobacterium vaccae Heat-Killed j. Ac2SGL Diacylated Sulfoglycolipid	naked hsp 65 DNA vaccine Chimeric ESAT6/Ag 85A DNA ワクチン Recombinant BCG overexpressing chimeric ESAT6/Ag85A fusion protein Recombinant Sendai virus overexpressing chimeric ESAT6/Ag85A fusion protein Epitope-based DNA-prime/peptide-boost vaccine (liposome と CpG アジュバント)

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, 生命科学研究の予防・環境医学への統合” (分子予防環境医学研究会編), 本の泉社, pp150-161, 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 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, “結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究. [抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン(サブユニット-DNA-リコンビナントBCG-ワクチン)・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]” 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 se; quence. 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



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)^{1)~3)}. 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(Bacille de Calmette et Guerin)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¹⁾²⁾.

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^{1)3)~5)}

表1 新しい結核ワクチンの開発

(1)DNAワクチン HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA	BCGより有効 (マウス, モルモット, カニクイザル)
(2)リコンビナントBCGワクチン ①リコンビナント72f BCG ②リコンビナント(Ag85A+85B+MPB51)BCG	BCGより有効 (マウス, モルモット, カニクイザル) BCGより有効(マウス)
(3)サブユニットワクチン Mtb 72f融合タンパク	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(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	

* 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

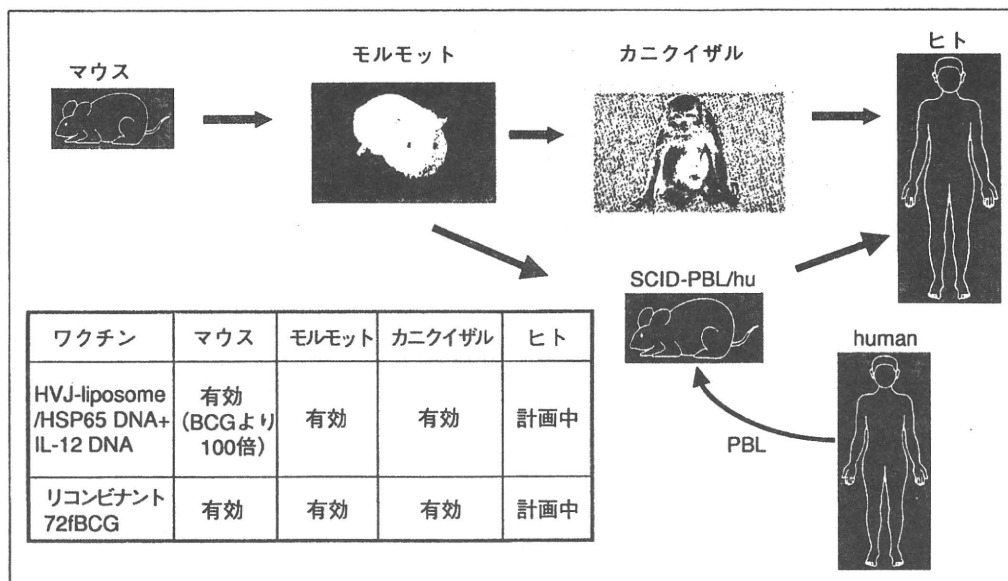


図1 新しい結核ワクチンの開発

(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^{3)~5)}.

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⁶⁾。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⁷⁾。

(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。

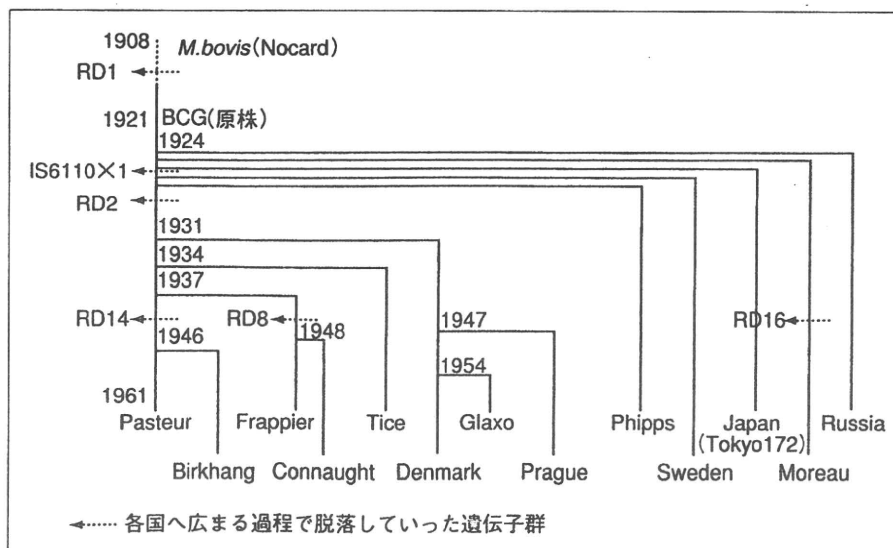


図2 BCGの各国への分布と各菌株の分子遺伝学的相違
RD: deletion region(s). Nocard株から1921年に確立されたBCGの、その後の各国への広がり
と遺伝子の脱落を示す。(文献²⁾より引用)

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⁸⁾⁹⁾。

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¹⁰⁾。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圏諸国の大半 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, キリシヤ, (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+	スイス(5, 12歳), イギリス(11, 12歳)
特定年齢(かっこ内)で一律 接種なし	アメリカ合衆国(勧告基準あり: 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²⁾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²⁾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の効果が高い傾向が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が報告された。35例の死亡例の大部分はAIDS, HIV感染, SCID, IFN- γ 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、スタンブ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)²⁾。

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

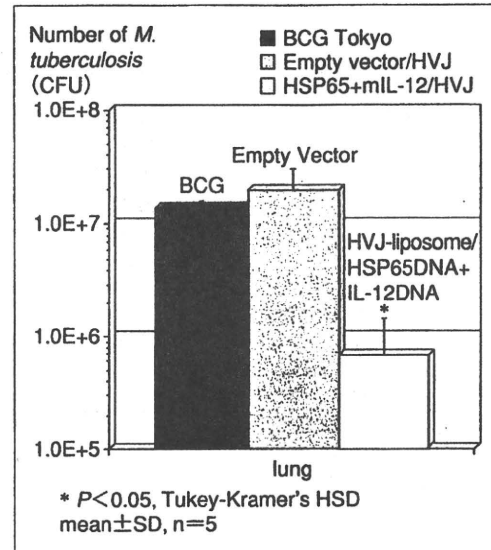


図3 Prophylactic efficacy of HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA vaccine on TB-infected mice (5 weeks after TB infection)

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³⁾(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⁵⁾。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- γ 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¹⁾⁵⁾。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⁵⁾)。

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⁶⁾。欧米では治療ワクチンは未開発である¹¹⁾。

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¹²⁾~¹⁴⁾、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¹⁾。

(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 rBCGの作製に成功した³⁾。この72f rBCG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³⁾。

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¹⁵⁾¹⁶⁾。

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³⁾¹⁷⁾¹⁸⁾)を用い、BCGよりもはるかに強力な予防ワクチン効果(生存率、血沈、体重、肺の組織)を示すワクチン2種を開発した³⁾。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³⁾(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85B BCG(Horowitzら)は第I相clinical trialとなっている¹⁹⁾²⁰⁾。もっとも切れ味のするどい臨床応用ワクチン候補の筆頭としてHSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンがあげられる⁴⁾⁵⁾¹⁸⁾。

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¹⁸⁾(図4)。一方、BCGワクチン単独投与群は33%の生存率であった¹⁸⁾。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ど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-リボソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNA予防ワクチンによる結核感染カニクイザルの血沈改善効果

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

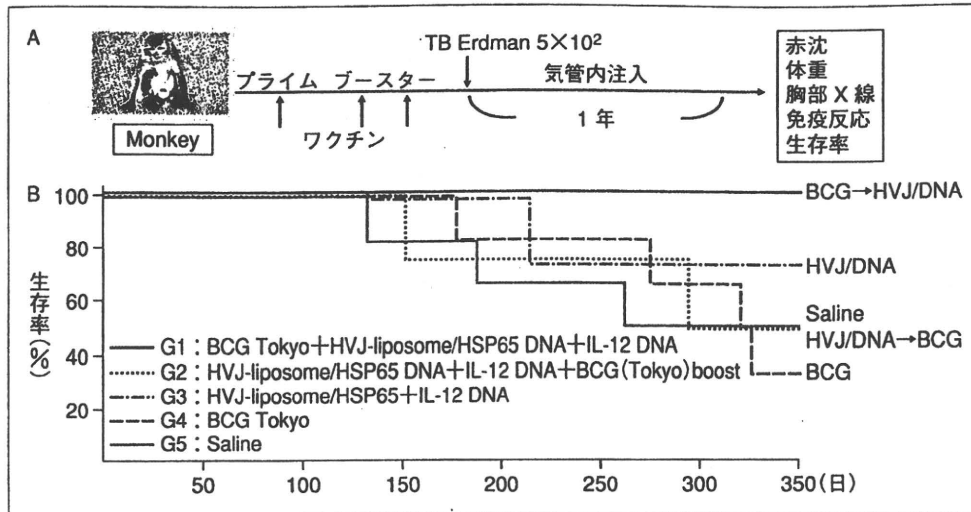


図4 ヒトの結核感染にもっとも近いカニクイザルを用いたHVJ-リボソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンの結核予防効果

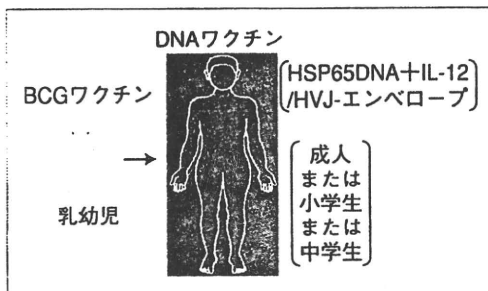


図5 新しい結核予防ワクチン(案)(DNAワクチン)

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

1) 岡田全司. 結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究: [結核ワクチン]. In: 厚生労働科学研究費補助金実績報告書研究報告書. 2004. p. 1.
 2) 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.

3) 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.
 4) 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.
 5) 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.
 6) Calmette A. Preventive vaccination against tuberculosis with BCG. *Proc Roy Soc Med* 1931; 24: 85.
 7) 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, Owendale 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〕^{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)^{5)~8)}。新しい抗結核ワクチン開発と結核感染免疫におけるキラーT細胞の機能解明についても述べる⁹⁾¹⁰⁾。

結核ワクチンの免疫理論

1. キラーT細胞(CD8⁺T細胞)と結核免疫
CD8あるいはβ₂ミクログロブリン遺伝子やTAP遺伝子ノックアウトマウスでは抗結核免疫が十分でなく, 動物は死亡する。すなわち, 結核におけるCD8⁺T細胞はマウスで抗結核免疫に重要である(図2)^{3)11)~16)}。

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⁺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 ①リコンビナント72fBCG ②リコンビナント(Ag85A+85B+MPB51)BCG	BCGより有効 (マウス, モルモット, カニクイザル) BCGより有効(マウス)
(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

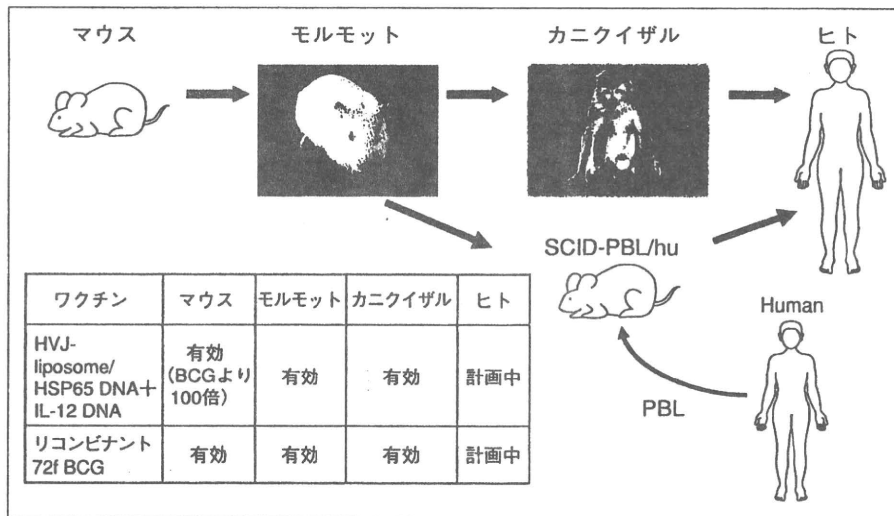


図1 新しい結核ワクチンの開発(2)

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⁵⁾⁷⁾。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

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+キラーT細胞や19kDa蛋白、Ag85, CFP10(Mtb11)を認識するヒトCD8+キラーT細胞が報告されている。ESAT-6抗原に対するキラーT細胞でHLA-A2とは82~90位の9個のアミノ酸AMASTEAGNV、が結合してキラーT細胞がこれらを認識する。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⁺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ヘルパーT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ヘルパーT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- γ がキラーT細胞分化因子として強力なキラーT細胞分化を誘導することを明らかにした¹⁵⁾¹⁶⁾。筆者らは、IL-6がCD8⁺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¹⁶⁾(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- 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細胞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 , TNF- α , IL-6, IL-12が重要であることは解析されている(文献⁹⁾参照)。

4. 自然免疫と結核

(1)マクロファージ(M ϕ)

結核菌の増殖場所はM ϕ 内である。一方、M ϕ は異物貪食能と細胞内殺菌能および抗原提示能をもつ。したがって、結核菌が優位に立つか、ヒト(生体)が優位に立つかの戦争でもある(文献¹²⁾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-

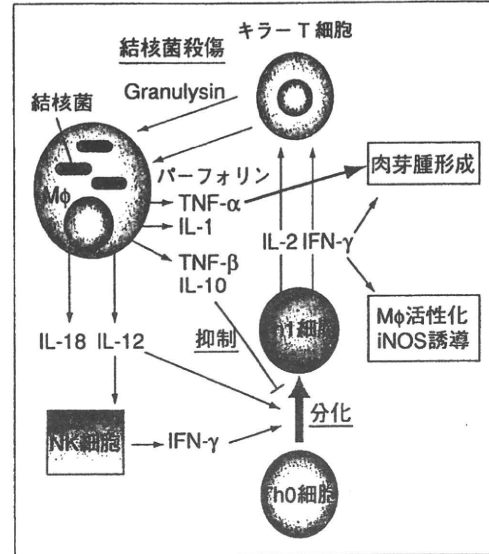


図2 抗結核免疫とマクロファージ, ヘルパーT, キラーT細胞活性化

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 ϕ 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 ϕ 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 ϕ 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

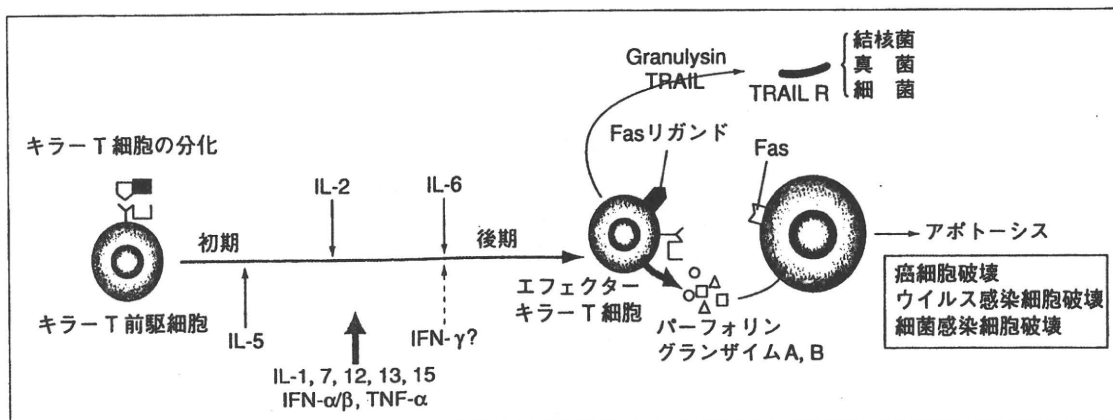


図3 キラーT細胞活性化と細胞傷害機構

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
①Mtb72f遺伝子
②Antigen 85A-, 85B-, 85C-, MPB51-遺伝子, MDP-1遺伝子, ESAT-6遺伝子, HSP65遺伝子
③IL-6遺伝子, 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^{-/-}×MyD88^{-/-}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

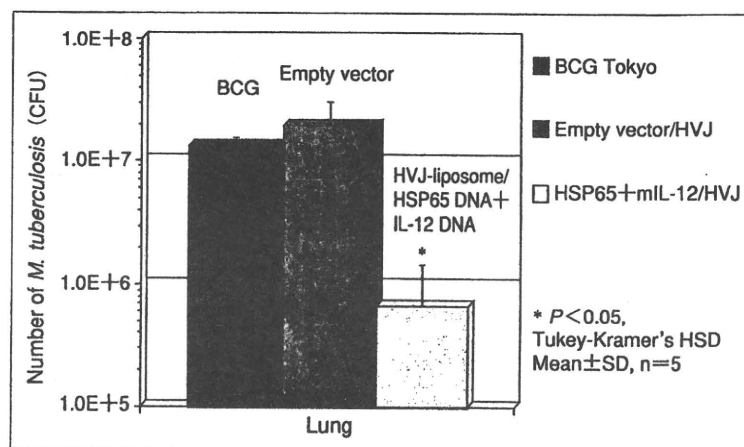


図4 Prophylactic efficacy of HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA vaccine on TB-infected mice (5 weeks after TB infection)

クチンは予防効果がないという結論がWHOによって報告された。10万人を越す南インド農民を対象として実施された大規模なcontrolled trial (Chingleput study)では、まったく有効性が否定される結果となった(上記WHOの報告)¹⁰⁾(ただし、小児における結核性髄膜炎や粟粒結核など播種性のものには十分な予防効果がある)。したがって、成人の結核に対し有効な新しい結核ワクチンの開発が必須である。事実、1998年米国政府・ACET, CDCが政府、研究所、大学・企業の3者が一体となって新しい結核ワクチン開発が必須であることを表明した¹¹⁾。

2. BCGワクチンより1万倍強力な結核予防ワクチンを開発

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きわめて少ない。われわれは、HSP65 DNA+IL-12 DNA予防ワクチンにより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4)⁶⁾⁷⁾⁹⁾¹⁷⁾。

(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よりもきわめて強力な(約100倍)結核予防ワクチンであることを明らかにした(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)¹⁷⁾。

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)。

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

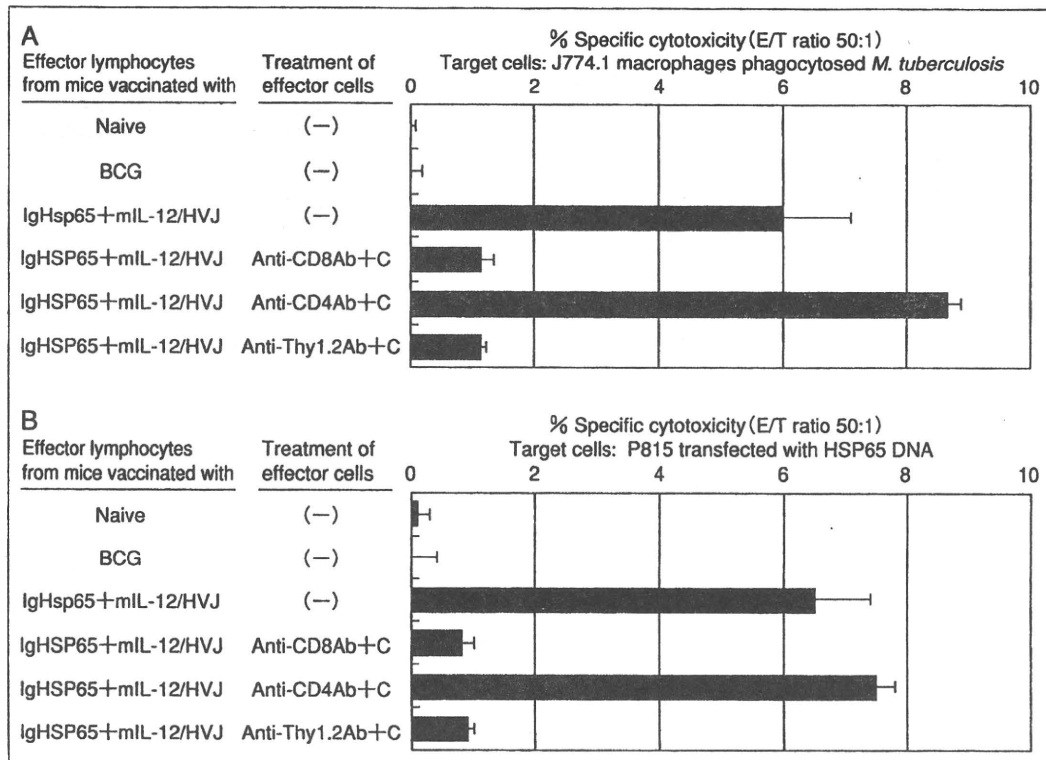


図5 Induction of CD8⁺ CTL against *M. tuberculosis* in the spleen cells from HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA vaccine

の肺、肝、脾の結核菌数の100倍以上の減少が認められた。すなわち、HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンはBCGに比較して100倍以上強力な結核予防ワクチン効果を示した。さらに、このHSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンはHSP65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、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¹⁷⁾。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(図5)¹⁷⁾。

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(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 VACCINE GROUP MEETINGに選出された。

(2) リコンビナントBCGワクチン

遺伝子をPNN2シャトルベクター(大腸菌 \leftrightarrow 好酸菌)に組み込みBCG東京菌に、遺伝子を導入し

た。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および気道感染の系で明らかにした⁶⁾⁷⁾⁹⁾。さらに最近、サブユニットワクチンのMtb72f融合蛋白質の¹⁸⁾DNAを導入した72fリコンビナント(r)BCGの作製に成功した。この72f rBCGはBA51 rBCGと同程度のきわめて強力な結核菌に特異的なIFN- γ 産生 T細胞数の増強を誘導することをElispot Assayで明らかにした。

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⁶⁾⁷⁾⁹⁾。

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, 文献²¹⁾参照)を用いBCGよりもはるかに強力な予防ワクチン効果(生存率, 血沈, 体重, 肺の組織)を示すワクチン2種を開発した⁸⁾。すなわち, 現在もっとも有力なものとしてHVJ-リボソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンおよび, 72f rBCGワクチンがあげられる(図1)。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 5×10^6 CFUを気道内注入した。事実, われわれはカニクイザルで結核感染後1年で, コントロール群(生食投与群)では4匹中4匹死亡(0%生存)したが, HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン投与群は, 4匹中2匹生存(50%生存), 72f rBCG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⁸⁾。すなわち, 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を得た。また, HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンは血沈改善効果を有意差をもって示した。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($P <$

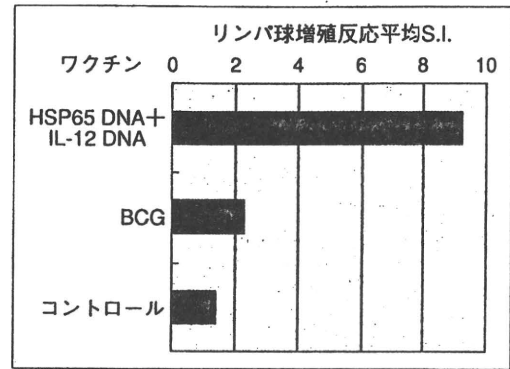


図6 ワクチン投与カニクイザルの末梢リンパ球増殖反応

0.01)をもって, HSP65抗原に対し, 増殖増強反応を示した(図6)。Ag85B-ESAT-6融合蛋白質 (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, 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¹⁹⁾。Hillらのワクシニアウイルス-85A DNAワクチンは, アフリカでの第I相clinical trialでは, 85A DNA蛋白質に対する免疫応答増殖が認められた。もっとも切れ味のするどい臨床応用ワクチン候補の筆頭としてHSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンがあげられる。72f rBCGも有効である。さらに, われわれはHSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンや72f rBCGワクチンを組み合わせ, きわめて強力なワクチン開発を目指している^{5)~7)}。

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²⁰⁾(図7)。一方, BCGワクチン単独投与群は33%の生存率であった²⁰⁾。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

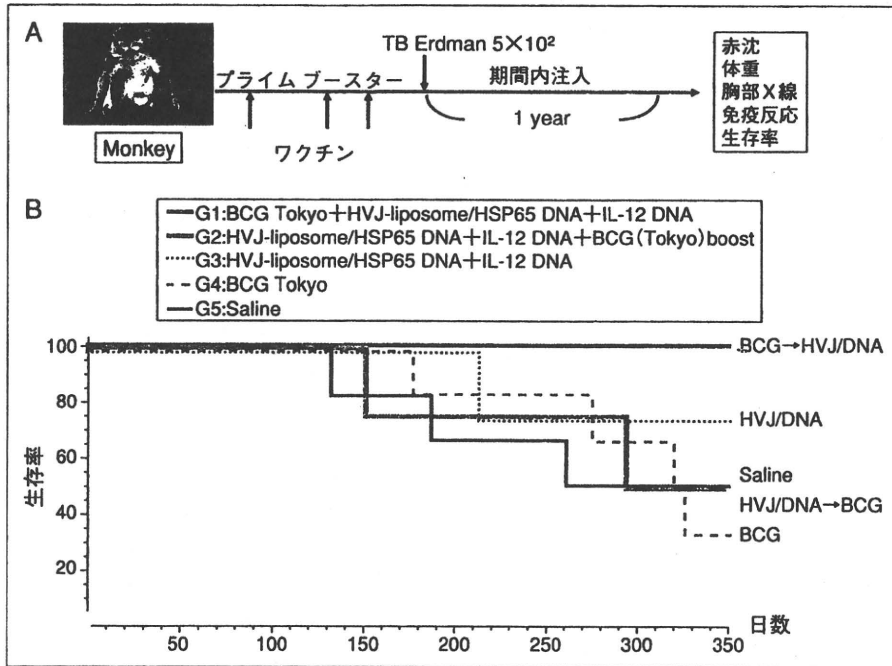


図7 ヒトの結核感染にもっとも近いカニクイザルを用いたHVJ-リボソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンの結核予防効果

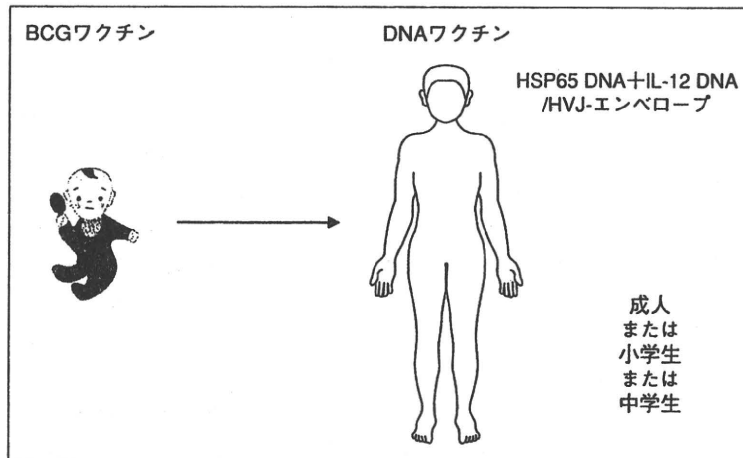


図8 新しい結核予防ワクチン(案)(DNAワクチン)

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8)。

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。

われわれの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。

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すぐれていることより、このワクチンが結核の発症予防や治療に役立つ日が来るであろう。

文 献

- 1) 岡田全司. 結核. In: 分子予防環境医学研究会・編. 分子予防環境医学: 生命科学の予防・環境医学への統合. 東京: 本の泉社; 2003. p. 150.
- 2) 岡田全司, 田中高生, 喜多洋子. 結核感染・新しい結核ワクチンの開発「感染症発症の分子機構—宿主と病原体の分子の攻防」. *Molecular Medicine* 2002; 39: 144.
- 3) Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 93.
- 4) Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 679.
- 5) 岡田全司. 新しい結核ワクチン. *最新医学* 2002; 57: 1942.
- 6) 岡田全司. 厚生労働科学研究費補助金実績報告書 研究報告書, “結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究: [抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン(サブユニット・DNA—リコンビナントBCG—ワクチン)・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]”. 2004. p. 1.
- 7) Okada M, Tanaka T, Inoue Y, et al. Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis. *Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference* 2002: 171.
- 8) 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.
- 9) 岡田全司. 結核感染とサイトカイン. In: 宮坂信之, 宮島 篤・編. 医学の歩み: サイトカイン—state of arts. 東京: 医歯薬出版; 2004. p. 209.
- 10) 岡田全司. 結核ワクチン. In: 泉 孝英, 網谷良一・編. 結核. 第4版. 東京: 医学書院; 2006. p. 50.
- 11) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393: 537.
- 12) Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998; 282: 121.
- 13) 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.
- 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* 1981; 78: 7718.
- 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* 1983; 157: 583.
- 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* 1988; 141: 1543.
- 17) 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.
- 18) Skeiky YA, Alderson MR, Owendale 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.
- 19) 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.