

図1 自然免疫と獲得免疫

病原微生物の侵入は宿主細胞に発現した様々な種類の自然免疫受容体 PRRs によって認識され、短時間に自然免疫応答が誘導される。その後、誘導される抗原特異的な獲得免疫の有効な活性化には自然免疫の誘導が必須である。

本項では、アジュバントによって誘導される自然免疫応答について解説した後、実際に使用されている粘膜アジュバントを例示し、その作用機序や獲得免疫誘導能について最近の知見を含めて概説する。

アジュバント効果にかかわる自然免疫受容体—リガンドとシグナル伝達経路

粘膜ワクチンは、経鼻、経口（舌下）、経膣などさまざまな経路で投与され、獲得免疫を誘導することが可能である（12章 a~d 参照）。組織や臓器の特異性によって、それぞれの投与経路で主役となる免疫担当細胞・所属リンパ節は異なると考えられるが、基本的にはワクチンの一部として投与されたアジュバントは、粘膜の上皮細胞や抗原提示細胞によって最初に認識される。その際、多くのアジュバントが自然免疫受容体によって認識されることでアジ

ュバントとしての効果を発揮することが最近明らかになってきた。ここでは、アジュバントの認識にかかわる代表的な自然免疫受容体として TLRs, RLRs, NLRs についてそのリガンド（自然免疫受容体のリガンドは pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) と呼ばれ、いずれもアジュバントとしてのポテンシャルを有する）およびシグナル伝達経路を解説し、さらにアジュバント認識にかかわるその他の自然免疫受容体について補足する（近年膨大な数の自然免疫受容体が明らかとなり、網羅的に解説することは困難なため、ここでは代表的なもののみを示す）(図2)。

Toll-like receptors (TLRs)

TLRs は現在までヒトおよびマウスにおいて TLR1 から 11 までが機能性の受容体として知られ

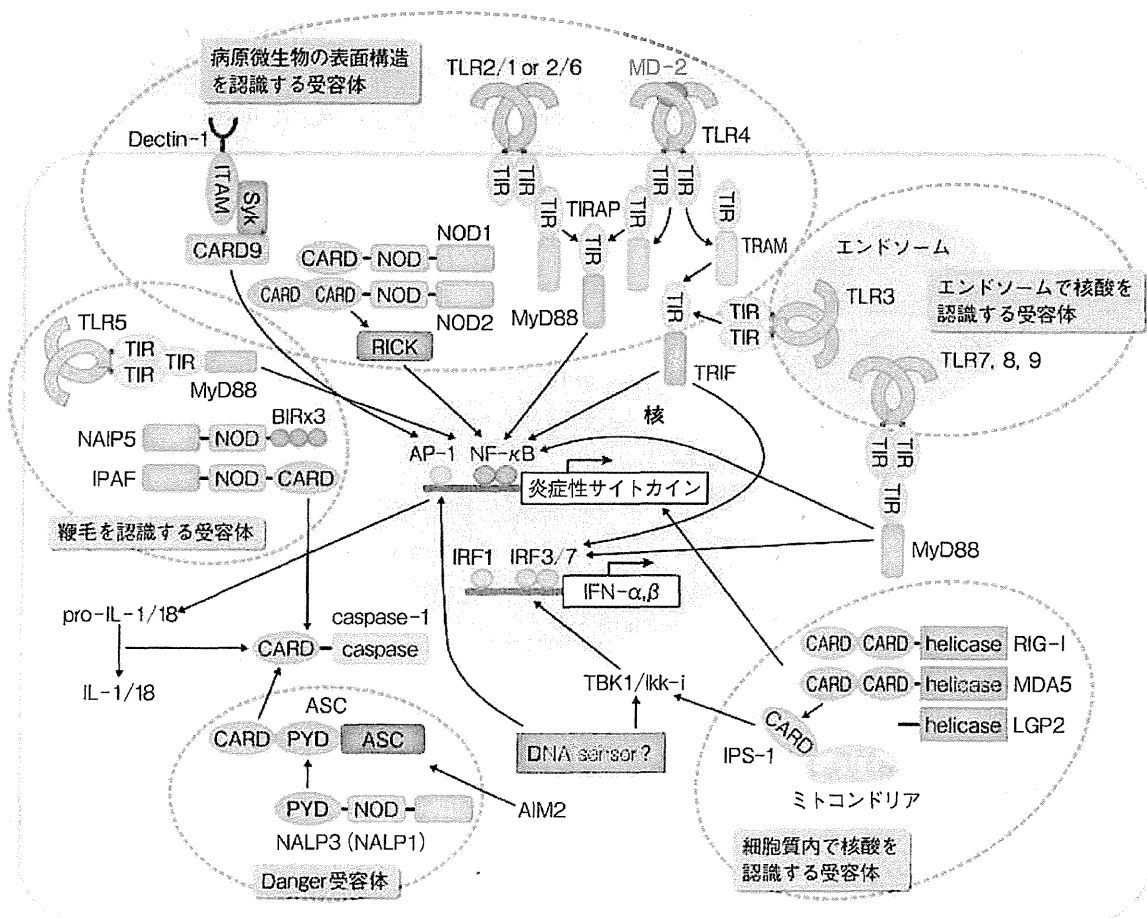


図2 自然免疫受容体とそのシグナル伝達経路

TLRは二量体を形成してPAMPsを認識し、MyD88かTRIFを介して炎症性サイトカイン・IFNの産生を誘導する。RLRsはいずれも細胞質内に存在しhelicaseドメインで核酸を認識し、IPS-1を介して免疫応答を誘導する。様々な細胞傷害ストレスの応答に関与していることが知られるようになったNLRsに属するNALP3はASCを介してcaspase-1の活性化を誘導し、IL-1、IL-18の産生を誘導する。

ている(4章a参照)。TLRsは、N末端のロイシンリッチリピートモチーフ、それに続く膜貫通領域とC末端のToll/IL-1R homology (TIR)ドメインから構成される。各TLRは、そのリガンドとしてさまざまな特異的構成成分PAMPsをN末端で認識し、C末端を介して下流にシグナルを伝えることにより免疫系を賦活化する。TLRsは細胞膜表面に発現するTLR2/1、TLR2/6、TLR4、TLR5と、エンドソームの膜に発現するTLR3、7、8、9に分けられる(図2)。それぞれが表1に示すようなリガンドをN末端で認識すると、TLR2/1、TLR2/6はアダプターとしてmyeloid differentiation primary response protein 88(MyD88)/TIR domain-con-

taining adaptor protein (TIRAP)、TLR5はMyD88を活性化する(図2)。TLR4は時間経過に応じて初めはMyD88/TIRAPを、エンドサイトーシス後はTIR domain-containing adaptor inducing IFN-β (TRIF)/Trif-related adaptor molecule (TRAM)を活性化する。また、TLR3はアダプターとしてTRIF、TLR7、8、9はMyD88を活性化する。さらにその下流では、TANK-binding kinase 1 (TBK1)、mitogen-activated protein kinases (MAPKs)、IκB kinase (Ikk)複合体を通じてinterferon regulatory factor (IRF) 3、IRF7、nuclear factor-κB (NF-κB)などの転写因子が活性化され、最終的にI型IFNや炎症性サイト

表1 自然免疫受容体とそのリガンド (非合成性)

自然免疫受容体	外来性リガンド	由来となる病原微生物	内因性リガンド
TLR2/1 TLR2/6	ペプチドグリカン, 糖脂質, diacyl or triacyl lipopeptides, phospholipomannan	Gram 陽性菌, マイコプラズマ, 麻疹ウイルス, 真菌	HSP70
TLR3	dsRNA, siRNA	ウエストナイルウイルス, マウスサイトメガロウイルス, 脳心筋炎ウイルス	mRNA
TLR4	LPS, RS ウイルス融合蛋白, phosphorylcholine, glycan, mannan	Gram 陰性菌, RS ウイルス, 炭疽菌, 蠕虫, 真菌	HSP70, β -デフェンシン, fibrinogen, fibronectin, hyaluronic acids
TLR5	フラジェリン	鞭毛をもつ細菌	-
TLR7	ssRNA	RNA ウイルス全般	autoantigens
TLR9	非メチル化 CpG, hemozoin	細菌, DNA ウイルス, マラリア	クロマチン複合体
TLR11	profilin-like molecule	トキソプラズマ	-
RIG-I	ssRNA 5' 末端 3 リン酸, 短い (~1 kb) dsRNA	センダイウイルス, VSV, インフルエンザウイルス	-
MDA5	長い (> 2 kb) dsRNA	脳心筋炎ウイルス, メンゴウイルス	-
NOD1	NOD1: diaminophilic acid (iE-DAP)	NOD1: クラミジア, 赤痢菌, カンピロバクター, ヘリコバクター・ピロリ	-
NOD2	NOD2: muramyl dipeptides	NOD2: 結核菌, サルモネラ, リステリア	-
NLRP3 (NALP3)	細菌 RNA, リポ多糖, pore-forming toxins, muramyl dipeptides, アスベスト, シリカ	細菌, 真菌, インフルエンザウイルス	uric acid/ATP, β アミロイド, ピロリン酸カルシウム
NLRC4	フラジェリン and ?	レジオネラ, サルモネラ, 緑膿菌, 結核菌	-
NAIP5	フラジェリン	レジオネラ	-
Dectin-1	β -グルカン ザイモサン	真菌 (カンジダ, アスペルギルス, ニューモシスティスなど)	-

リポ多糖: lipopolysaccharide: LPS

カインの産生が誘導される³⁾。

RIG like receptors (RLRs)

TLRs 以外に細胞質内に侵入した核酸を認識する受容体として RLRs が知られている (図 2)。RLRs は、C 末端に RNA helicase domain を持ち、それが細胞質内に侵入してきた非自己の RNA を認識する。N 末端には 2 つの caspase activation and recruitment domain (CARD) が存在する。RLRs には RIG-I, MDA5 と呼ばれる 2 つの類似した分子のほか、RIG-I の negative regulator と考えられている LGP2 の合計 3 つが存在する。RLRs の発現は免疫担当細胞に限らず、ほとんどすべての細胞に

ユビキタスに発現している。

RLRs がいったん表 1 に示すようなリガンドを認識すると (LGP2 に関しては依然として不明な点が多いため、ここでは RIG-I, MDA5 について示す)、RIG-I と MDA5 の共通のアダプターである IFN- β -promoter stimulator 1 (IPS-1) (MAVS, VISA, CARDIF と呼ばれる) と CARD を介して結合しシグナル伝達を開始する。下流では、TBK1 や IKK 複合体を通じて IRF3, NF- κ B などの転写因子が活性化され、エフェクターとして I 型 IFN や炎症性サイトカインの産生が誘導される³⁾。

NOD like receptors (NLRs)

細胞内の自然免疫受容体には、核酸の認識に特化したRLRs以外にNLRsが存在する(図2)。NLRsは現在までにヒトでは23種類(蛋白レベル)、マウスにおいては34種類(遺伝子レベル)が存在することが知られている。N末端には、CARDもしくはpyrin domain (PYD)もしくはbaculovirus inhibitor domain (BIR)を有し、NOD domainを挟んで、C末端にロイシンリッチリピートモチーフを持つ。大まかには、NLRsの原型ともいえるNOD1やNOD2のようにinflammasomeを活性化しないグループと、NLRP1、NLRP3やNLRC4のようにinflammasomeの活性化を伴うグループに分類できる。それぞれのNLRsが表1のようなリガンドの刺激を受けると、前者ではアダプターとしてRICKが活性化し、後者ではASC、caspase-1から構成されるinflammasomeの活性化が生じる。RICKの下流では、mitogen-activated protein kinases (MAPKs)、I κ B kinase (Ikk)複合体を通じてnuclear factor-kappa B (NF- κ B)などの転写因子が活性化され、炎症性サイトカインの産生が誘導される。inflammasomeの活性化の下流では、caspase-1によってpro IL-1 β 、pro IL-18から活性化型のIL-1 β 、IL-18の産生が誘導される⁴⁾。

その他の自然免疫受容体 (CLRs など)

TLRs, RLRs, NLRs以外の自然免疫受容体のなかには、スカベンジャー受容体やFc受容体なども知られているが、なかでもC-type lectin receptors (CLRs)が大きなグループを占める(図2)。CLRsはその構造によってさらに17種類のグループに分けられる。ここでは詳細は割愛するが、CLRsの代表としてDectin-1を例にあげると、リガンドとして表1に示すとおり、C末端の細胞外ドメインで β -グルカンを認識すると、細胞内のimmunoreceptor tyrosine-based activation (ITAM)-likeモチーフを介してspleen tyrosine kinase (Syk)、さらにCARD9の活性化を経て炎症性サイトカインの産生が誘導される⁵⁾。

粘膜アジュバントの現状と方向性

先述のとおり、以前からワクチンとともに使用されてきたアジュバントの多くが自然免疫受容体のリガンドとして作用していることが近年明らかになった。逆にいうと、純度、安全性やTh1、Th2バランスなどを度外視すれば、すべての自然免疫受容体リガンドは、その合成が可能であれば、粘膜アジュバントとしても使用可能であると考えられる。ただし、自然免疫受容体に作用することだけがアジュバント効果を生み出すわけではなく、たとえば標的抗原を投与部分に長時間とどめておく作用や、炎症性細胞浸潤を促進することなども大切なアジュバント効果の一角を担っている。さらにターゲットは自然免疫受容体でも、組織特異的な反応を誘導するために投与経路を変更したり、ナノテクノロジーなどを利用してドラッグデリバリーシステムを巧みにコントロールすることで、自然免疫応答自体の質と量を高めることも今後のワクチンおよびアジュバント開発にとって必須の戦略である。ここでは、以前から利用されてきた粘膜アジュバントや今後使用が目玉されているアジュバントなどいくつか分類して概説する。

代表的な粘膜アジュバント

古くから利用されている粘膜アジュバントとして、ここでは細菌から抽出した3種類の構成成分、①ADP-ribosylating enterotoxin (cholera toxin <CT>) および大腸菌のheat-labile enterotoxin <LT>), ②CpGモチーフを持つ oligodeoxynucleotides (CpG ODN), ③monophosphoryl lipid A (MPLA)について説明する(図3)。

●cholera toxin (CT), heat-labile enterotoxin (LT)

CTおよびLTはAサブユニットとBサブユニットからなる。

Aサブユニットは毒素の活性を持ち、Bサブユニットが粘膜上皮のGM1ガングリオリシドに接着する。アジュバントとしての効果を維持しながら、元来有

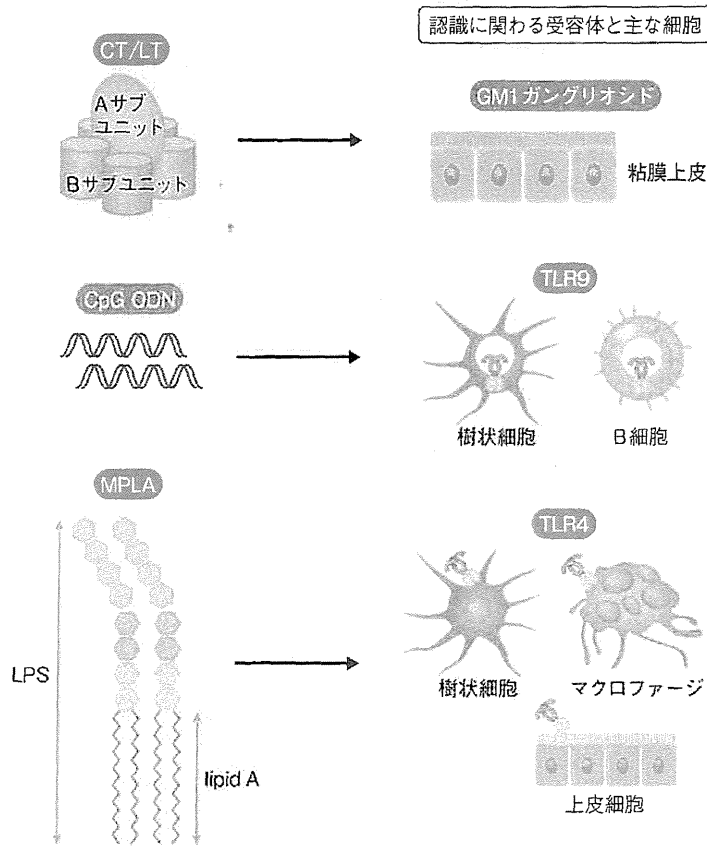


図3 代表的な粘膜アジュバント

cholera toxin (CT)・heat-labile enterotoxin (LT) は一つの A サブユニットと五量体の B サブユニットからなる。TLR9 の発現はヒトでは形質細胞様樹状細胞と B 細胞に限局している。

する腸管毒性を軽減するため A サブユニットの改変を作製するなどの方法が施行されている。改変としては LT の場合、63 番のリジンをセリンにしたもの (LT <S63K>) や 72 番のアルギニンをアラニンにしたもの (LT <A72R>) がよく知られている。CT・LT いずれも A サブユニットが ADP-リボシルトランスフェラーゼ活性を有し、CT・LT が作用するとアデニル酸シクラーゼが常に活性化された状態になり、細胞内サイクリック AMP 濃度が高まる。これを契機に粘膜上皮細胞や抗原提示細胞が活性化され、細胞透過性の亢進、炎症性サイトカインの産生、樹状細胞の成熟促進などが誘導される。類似の作用機序を有するが、アジュバントとしては CT が Th2 型の免疫反応 (IL-4, IL-5 分泌型の CD4⁺T 細胞の活性化や IgA, IgG1, IgE の産生) および Th17 を誘導するのに対して、LT は Th1, Th2 型の両方の免疫反応 (IFN- γ 分泌型の CD4⁺T 細胞活性化および IgG2 の産生) を誘導する^{6,7)}。

しかしながら、これらのアジュバントは効果が高い反面、投与経路の制限、投与部位における強い炎症や組織の壊死、アレルギー反応の誘発などの副作用の問題を依然として有する。実際 2000 年にヨーロッパにおいては LT をアジュバントとして用いたインフルエンザ経鼻ワクチンの臨床試験が実施されたが、顔面神経麻痺の副作用により毒素系アジュバントの臨床応用が難しい状況となっているのが事実である⁸⁾。

● oligodeoxynucleotides (CpG ODN)

細菌やウイルスの DNA には、哺乳類の DNA と比べると約 20 倍ほど多く非メチル化 CpG モチーフが存在する。近年の自然免疫学の進歩に伴い、CpG は現在では TLR9 のリガンドとして広く知られるようになった。免疫活性を持った CpG ODN にはその配列、構造、免疫活性の違いから、少なくとも 3 種類 (D/A 型 CpG, K/B 型 CpG, C 型 CpG) のタイプに分けられる。D/A 型 CpG は、主に pDC

の活性化, K/B 型 CpG は主に B 細胞の活性化を誘導する。C 型 CpG は両方の性質を持っているが活性はやや弱い (いずれの型の CpG も TLR9 によって認識される)。CpG ODN がそれぞれの免疫細胞に存在する TLR9 によって認識されると, I 型 IFN や炎症性サイトカインの産生が誘導され, B 細胞の増殖, 樹状細胞の成熟化のほかにもナチュラルキラー (NK) 細胞の活性化も加わり, 強力な Th1 型の獲得免疫反応 (IgG2a の産生, Th1 細胞による IFN- γ 産生, 細胞傷害性 T 細胞の細胞傷害活性) が惹起される。つまり, 何らかの抗原とともに CpG ODN をアジュバントとして使用することで, 以上のようなメカニズムから抗原単独で使用するよりもはるかに強力な Th1 型の獲得免疫が誘導できる。CpG ODN は非常に強く安全なアジュバントであるだけでなく, 単独 (抗原なし) での使用も可能である。実際にワクチンアジュバント, 抗アレルギー薬, 抗腫瘍薬としてさまざまな臨床試験が行われ, 通常の注射による投与だけでなく, 経鼻投与をはじめとする経粘膜投与⁹⁾において, その有効性が一部で証明されている^{10, 11)}。しかしながら, 生物種間の TLR9 の発現パターンの違いなどから, 依然としてヒトに対しては汎用されていない。

● monophosphoryl lipid A (MPLA)

MPLA はもともとサルモネラ菌のリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) から抽出された物質で, TLR4 がそのアジュバント効果に必須であることが知られている (ヒトの細胞では TLR2 も認識に関与することが報告されている)。MPLA のアジュバント効果はリポ多糖に匹敵するにもかかわらず, 有害な副作用が生じにくいことが特徴でもある。その理由としてリポ多糖と比較して MPLA が, MyD88 依存性の経路をほとんど刺激せず TRIF 依存性の経路を主に刺激すること¹²⁾, 免疫抑制的に作用する IL-10 を多く産生する一方で炎症性サイトカインの IL-1 β は誘導しにくいことなどが報告されている。MPLA は強力に CD4 T 細胞のプライミング・活性化を誘導するのが特徴で, 主に Th1 型の反応を惹起する。グラクソ・スミスクラインは, MPLA を用いたコンビネーションアジュバントの

表2 ワクチンアジュバント (合成)

合成アジュバント	自然免疫受容体
monophosphoryl lipid A (MPLA)	TLR2, TLR4
CpG ODN	TLR9
Pam3Cys-SK4	TLR1/2
MALP2	TLR2/6
poly I:C	TLR3, MDA5
imiquimod, resiquimod	TLR7, TLR8
aluminium based salts	NALP3
chitosan	NALP3
細菌性類毒素 (e.g. CT, LT)	?
サポニン (e.g. QS-21)	NALP3 ?
エマルジョン (e.g. MF59)	?

MALP2: macrophage-activating lipopeptide 2
poly I:C: polyinosinic-polycytidylic acid

開発に着手し, AS01 (MPLA と QS21 をリポソームで包んだもの), AS02 (MPLA と QS21 をエマルジョンで包んだもの), AS04 (MPLA + alum) を作製している (QS21, alum については後述する)。ヨーロッパでは AS04 を用いた hepatitis B virus (HBV) ワクチンとして FENDrix[®] やオーストラリアでは同じく AS04 を用いた human papilloma virus ワクチン, サーバリックス[®] が認可されている⁶⁾。FENDrix[®] もサーバリックス[®] も筋肉注射にて投与されているが, MPLA は注射型だけではなく経粘膜免疫においてもアジュバント効果を発揮する。例えば, 動物実験レベルでは経口もしくは経鼻ワクチンのアジュバントとしても効果が確認されている¹³⁾。

自然免疫受容体によって認識される 粘膜アジュバント

先述のとおり, 自然免疫受容体のリガンドは, 理論的にはすべてアジュバントとして使用できる可能性を有する。現在ヒトや動物で使用されているアジュバントで自然免疫受容体との関係が明らかにされているものは, まだわずかではあるが (表2), 前述した「アジュバント効果にかかわる自然免疫受容体」で示したように, 近年急速な勢いで自然免疫受容体とそのシグナル伝達経路が明らかになり, さらに

にTLRについてはリガンドと接する部分の結晶構造も同定された。これらの事実は、今後バイオテクノロジーを駆使することで、結晶構造からの創薬など積極的に自然免疫を制御できるアジュバントの製造が可能であることを示唆している。

たとえばTLRに作用することが示されている合成のリガンド Pam3Cys-SK4, MALP2, imiquimod, resiquimod, poly I:C は、それぞれTLR1/2, TLR2/6, TLR7・8, TLR3+MDA5によって認識されることが示されている(表2)。poly I:Cの場合、前述のとおりTLR3とMDA5によって認識されるが、アジュバント効果のメカニズムについては、主に抗体産生やTh1型CD4T細胞の活性化にはMDA5の経路がより重要である一方、CD8T細胞の活性化にはいずれの経路も同等に関与しているということが最近明らかになった¹⁴⁾。ほかにも以前から使用されてきたaluminium based salts, chitosanなどのアジュバントが次々にNALP3依存的にinflammasomeの活性化を誘導することが示され、そのアジュバント効果の発現に必須であることが報告された^{15, 16)}。以上のようなPRRsに作用しうるアジュバントは、一般的な注射型のワクチン投与の際に用いられるだけでなく、動物実験レベルではpoly I:Cがインフルエンザの経鼻ワクチンとして¹⁷⁾、imiquimod, resiquimodがヘルペスやパピローマウイルスの経腔ワクチンとして¹³⁾効果を発揮している。

自然免疫受容体リガンド以外のアジュバント

● サイトカイン

サイトカインは抗原の侵入に際し宿主側から内因性に分泌され、免疫反応を惹起するだけでなく反応を増強したり修飾したりする作用があることから、アジュバントとしても使用されている¹⁸⁾。現在では毒性や非特異的な免疫活性などを考慮し、標的抗原に対しより選択的に作用できるように粘膜ワクチンやDNAワクチンに応用されている。なかでもIL-12はNK細胞や細胞傷害性T細胞の活性化やTh1型の免疫誘導、T細胞非依存的なIFN- γ 産生などに必須のサイトカインであることから、最も汎

用されている。さらにIL-2もNK、細胞傷害性T細胞の活性化を誘導することから、IL-12やIL-2をアジュバントとして用いたワクチンは、HBV, herpes simplex virus (HSV)などのウイルス感染症以外にも悪性腫瘍に対するワクチンとしても有効性が報告されている^{19, 20)}。

● 界面活性剤

界面活性剤が免疫原性を持つという事実は古くから知られており、なかでも植物由来の成分サポニンも現在でも利用されている。1984年にMoreinらが、*Quillaja saponaria*の樹皮から抽出したQuilAというサポニンをウイルス抗原とミセル化して初めてアジュバントとして使用した。このようなサポニンとウイルス抗原をミセル化したものをimmunostimulating complex (ISCOM)として使用し、動物実験ではインフルエンザウイルス、ロタウイルス、RSウイルスなどに対してアジュバント効果が報告されている²¹⁾。実際ヒトに対してはより安全なQS-21が使用され、細胞傷害性T細胞およびTh1型CD4T細胞の活性、IgG2a優位の抗体産生を誘導することが可能である。乳癌や卵巣癌などの癌治療にも適応が検討され、認容性が確かめられている。サポニンはコレステロールと相互作用し、細胞膜に穴を開けることによって効果を発揮すると考えられている。最近の報告によるとQuilAがNALP3依存的にinflammasomeを活性化することが示されたが、その詳細なアジュバント効果のメカニズムは依然として不明である^{19, 20)}。

● エマルジョン

アジュバントとして利用されるエマルジョンは大きく2つに分類される。1つはFreund's incomplete adjuvant (FIA)やMontanideなどのwater-in-oil型、もう1つはMF59などが属するoil-in-water型。FIAの臨床試験は今から50年前にもさかのぼり、ポリオワクチンやインフルエンザワクチンとの併用が試されたものの副作用の問題から、これまで動物実験レベルに限られていた。しかしながら、製造工程の改善や癌・HIVなどのより重篤な疾患への適応拡大などから再び注目されるようになってきている。Montanide, CSA 720は新世代

の water-in-oil 型のエマルジョンで、Epstein-Barr virus, C 型肝炎ウイルス, 麻疹ウイルスなどのウイルス感染症のほか, IV 期メラノーマに対してすでに臨床試験が始まっている。MF59 はヨーロッパですでに認可されており, Th1 型の抗体反応を誘導することから, 主に H5N1 のプレパンデミックワクチンを含めたインフルエンザワクチンのアジュバントとして期待されているが, そのアジュバント効果は, 標的抗原を投与局所にとどめておき, 徐々にそこから放出することで発揮されると考えられているが, その詳細は明らかではない^{19, 20)}。

ドラッグデリバリーに着目したアジュバント

●リボソーム

リボソームは標的抗原を脂質二重膜で覆い, 抗原を目的細胞まで運ぶ機能だけでなく, それ自体がアジュバントとしても効果を発揮することが知られている (12 章 g 参照)。リボソームにウイルスの抗原を取り込んだものは virosome と呼ばれる。リボソームは, その構造から抗原提示細胞に取り込まれると, 低い pH の状況下でも容易にエンドソーム膜と融合するため, 抗原提示細胞の細胞質内に抗原を大量に放出することになる。この作用がプロセシングの過程を促進し, MHC クラス I による抗原提示を誘導しクロスプレゼンテーションを促進する (細胞傷害性 T 細胞が活性化する)。実際, 非小細胞型肺癌に対する臨床試験が進み, 第 II 相 B で生存率の改善が示されたことから, 現在第 III 相の試験が始まっている。近年リボソームによってプラスミド DNA と標的蛋白を一緒に取り込んだ (この場合 DNA 自身もアジュバントとして作用する) 手法が開発され, 新たなワクチン形態として注目されている^{19, 20, 22)}。

●ナノビーズ

もともと径が 0.5~1.0 μm 前後のビーズは細胞傷害性 T 細胞活性を誘導することが知られていたが, 近年の生産技術の進歩に伴い, 40~50 nm のサイズのビーズが最も抗原提示細胞 (特に所属リンパ節の DEC205⁺CD40⁺CD86⁺ 樹状細胞) に効率的に抗原を運搬し, 液性免疫および細胞傷害性 T 細胞の

活性の両方を誘導することがわかったほか, サイズによって Th1 型と Th2 型の誘導のバランスが変化することも報告された。このようにナノビーズは特に細胞傷害性 T 細胞を効率よく誘導できることから, 腫瘍の抗原を結合させたビーズを投与した際, 抗腫瘍活性が誘導されることが証明されている。またその作用機序から, 細胞内に寄生する病原体に対しても効果が期待されている^{19, 20, 22)}。

●virus-like particles (VLPs)

ウイルス様粒子 (VLPs) には, ウイルスからゲノム DNA や RNA を取り去った外郭 (キャプシド) だけのものや, 遺伝子工学の技術によって抗原を含めウイルスに似せて人工的に作製したものが含まれる。後者は, 当初 vaccinia virus を用いた発現系によって作製されていたが, 現在では baculovirus や酵母を用いた発現系が主流となっている。VLPs は樹状細胞に特異的に取り込まれたり, B 細胞と相互作用したりすることで液性免疫・細胞性免疫いずれの反応も惹起することができる。2006 年に HPV6, 11, 16, 18 の VLPs と alum を混合した HPV ワクチンが米国で承認された^{19, 20, 22)}。

おわりに

本項では, 実際に粘膜アジュバントとして使用されているもの以外のアジュバントについても今後使用される可能性があることから概説した。最初に述べたように, ワクチンによる粘膜免疫の制御はさまざまな疾患の病態解明・予防・治療につながる可能性があり, そのツールとしてアジュバントの理解は必要不可欠である。自然免疫学の進歩に伴い, アジュバント効果のメカニズムが解明されるようになったのはごく最近の出来事であり, 依然として不明な点が多く残されている。さらに精製技術やバイオテクノロジーの急速な進歩に伴い, これまで不可能であった極小粒子や人工的なウイルスの類似物質の作製も可能となり, アジュバント効果のメカニズムも, 単純に自然免疫受容体を刺激するだけでなく, ドラッグデリバリーをも考慮したものが開発されている。アジュバントそれぞれの特性を生かしたコン

ビネーションアジュバントや組織特異性を生かした投与経路など、今後の粘膜アジュバントの開発はさまざまな可能性を秘めている。

(小山正平, 石井 健)

●引用文献

- Pulendran B, Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* 2006; 124: 849-863.
- Pashine A, Valiante NM, Ulmer JB. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med* 2005; 11: S63-68.
- Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, et al. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe* 2008; 3: 352-363.
- Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 2009; 10: 241-247.
- Willment JA, Brown GD. C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends Microbiol* 2008; 16: 27-32.
- Freytag LC, Clements JD. Mucosal adjuvants. *Vaccine* 2005; 23: 1804-1813.
- Lee JB, Jang JE, Song MK, et al. Intranasal delivery of cholera toxin induces th17-dominated T-cell response to bystander antigens. *PLoS ONE* 2009; 4: e5190.
- Couch RB. Nasal vaccination, Escherichia coli enterotoxin, and Bell's palsy. *N Engl J Med* 2004; 350: 860-861.
- Sun G, Pal S, Weiland J, et al. Protection against an intranasal challenge by vaccines formulated with native and recombinant preparations of the Chlamydia trachomatis major outer membrane protein. *Vaccine* 2009; 27: 5020-5025.
- Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 471-484.
- Klinman D, Shirota H, Tross D, et al. Synthetic oligonucleotides as modulators of inflammation. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 958-964.
- Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, et al. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science* 2007; 316: 1628-1632.
- Fraillery D, Zosso N, Nardelli-Haeffliger D. Rectal and vaginal immunization of mice with human papilloma-virus L1 virus-like particles. *Vaccine* 2009; 27: 2326-2334.
- Kumar H, Koyama S, Ishii KJ, et al. Cutting edge: co-operation of IPS-1- and TRIF-dependent pathways in poly IC-enhanced antibody production and cytotoxic T cell responses. *J Immunol* 2008; 180: 683-687.
- Li H, Willingham SB, Ting JP, et al. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol* 2008; 181: 17-21.
- Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, et al. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 2008; 453: 1122-1126.
- Ichinohe T, Ainal A, Tashiro M, et al. PolyI: polyC12U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* 2009; 27: 6276-6279.
- Bertley FM, Kozlowski PA, Wang SW, et al. Control of simian/human immunodeficiency virus viremia and disease progression after IL-2-augmented DNA-modified vaccinia virus Ankara nasal vaccination in non-human primates. *J Immunol* 2004; 172: 3745-3757.
- Ebensen T, Guzmán CA. Immune modulators with defined molecular targets: cornerstone to optimize rational vaccine design. *Hum Vaccin* 2008; 4: 13-22.
- McKee AS, Munks MW, Marrack P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. *Immunity* 2007; 27: 687-690.
- Pearse MJ, Drane D. ISCOMATRIX adjuvant for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 465-474.
- Peek LJ, Middaugh CR, Berkland C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 915-928.

アジュヴァント小史

鉄谷 耕平, 石井 健 独立行政法人 医薬基盤研究所 アジュヴァント開発プロジェクト
大阪大学 免疫学フロンティア研究センター

〔論文要旨〕

感染症ワクチンのためのアジュヴァントの歴史は、20世紀初めに生まれてから常に有効性と安全性とのジレンマであった。現在に至るまでOil emulsion・アルミニウム塩・微生物由来因子がアジュヴァント開発における3つの潮流をなし、効果を増強しつつも安全性を担保する努力が続けられている。安全性が歴史的にも担保され、現時点ではほぼ唯一臨床使用されるアルミニウム塩はTh2型の液性免疫を増強するが、細胞性免疫あるいはTh1型液性免疫を誘導することができないため、新たなTh1型アジュヴァントの開発が望まれている。臨床試験、審査行政においては新規アジュヴァント・新規ワクチンの安全性を担保するための評価法の限界も指摘されている。全世界で多種多様なアジュヴァントが研究されており、これらの課題を乗り越えられれば受益者の多様性にきめ細かく対応できる、有効かつ安全なワクチン製剤の開発が夢ではなくなりつつある。本稿は温故知新、アジュヴァント開発の歴史を振り返り、現在の課題の解決に生かすべく考察したい。

1. はじめに

1989年のコールドスプリングハーバー・シンポジウムにおいて、イェール大のC.A. Janeway Jr. は¹⁾Complete Freund's adjuvant (CFA)・百日咳死菌・アルミニウム塩を例に挙げ、アジュヴァントは「免疫学者のちんけな秘伝 immunologists' dirty little secret」だと言い、接種前にワクチン抗原をアジュヴァントと混ぜ合わせる作業を「ぐちゃぐちゃした下準備 messy preparation」と躊躇なく言った。(Janewayは続けて、アジュヴァントは「抗原提示細胞による抗原取り込みを促進させる効果」と、「エフェクター細胞に対する共刺激効果」の一方ないし両方を持つだろう、と仮説して先見の明を示した。)

事実、実験室においてさえCFA及びアルミ

ニウム塩を主なアジュヴァントとしていた例えば1974年当時、アジュヴァントは以下のような基準で判断された²⁾。すなわち、

- 抗原性が全くない、あるいはあっても弱いものを、ワクチン効果（恐らく感染予防効果と思われる。筆者註）のあるものに変化させるもの
- 抗原だけを投与する場合に比べ、賦与できる抗体の量を上昇させるもの
- 外来性タンパクに対する遅延型過敏症を増強するもの
- 適当な抗原とともに生体に投与することによって、甲状腺炎・副腎炎・実験的脳脊髄炎・関節炎などの実験的自己免疫疾患を惹起するもの

のいずれかを満たす物質、である。Janewayの

A brief history of vaccine adjuvant ; research and development

Kohhei TETSUTANI, Ken J. ISHII, Laboratory of Adjuvant Innovation, National Institute of Biomedical Innovation, Laboratory of Vaccine Science, Immunology Frontier Research Center, Osaka University

別刷請求先：鉄谷耕平 〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8

Tel : 072-641-8043

言うとおりに「経験則的 empiric すぎ、なぜ必要なのかの理論付けを欠いて」いた。

しかし、発表論文数動向（図1）に現れるとおり特に1990年代以降、アジュヴァントの機能解析は飛躍的に進んだ。重要だったのが、それまで微生物由来アジュヴァントと概括されていた一群から、宿主側の pattern recognition receptors (PRR) に特異的なリガンドが次々と同定されたことである。Toll 様受容体 (TLR), NOD 様受容体など PRR は自然免疫系のシグナル伝達を担う。自然免疫学者たちは Janeway の叱咤に、少なくとも一部、応えたのだ。

2. アジュヴァントの誕生

天然痘 (1798年, 生ワクチン)・狂犬病 (1885年, 生ワクチン)・腸チフス (1896年, 全死菌体)・コレラ (1896年, 全死菌体)・腺ペスト (1897年, 全死菌体), と1900年以前に開発されたワクチンはすべて弱毒生ワクチンないし死菌体ワクチンである³⁾。20世紀に入ってから破傷風・ジフテリアを対象に、培養上清を用いるトキシドが研究されたが、これらの処理済外毒素は単独では低い抗体価しか誘導しないことが大きな課題だった。さまざまな試行錯誤, 例えばジフテリアトキシドにおいて、寒天・タピオカ・レシチン・でんぷん・油・界面活性剤 (サポニン)・カルシウム塩やマグネシウム塩などが、誘導を増強するかもしれない添加物として試された⁴⁾。錬金術的な、と言ってもいいこの時期

の三つの出来事が、その後のアジュヴァント開発の源流となる。すなわち、oil emulsion・アルミニウム塩及び微生物由来因子である。

3. Oil emulsion と particulates アジュヴァント

1916年 Le Moignic と Pinoy が、ミネラルオイルをサルモネラ死菌に加えたものにアジュヴァント効果を見出した⁵⁾。1923年に Landsteiner は、別のグループが行った実験を評して、アルコール可溶成分をタンパクとともに接種することで抗体産生が強まった観察から、前者、すなわち脂質がアジュヴァント効果をもつのではと推測した⁶⁾。1937年 Freund がラノリン・パラフィン油及び結核死菌を含有する Complete Freund's Adjuvant (CFA)⁷⁾を開発し、oil emulsion アジュヴァントに結実した。

水と油という本来交じり合わないものを互いに分散させて乳濁液 (emulsion) とする。乳濁の安定化を目的に界面活性剤を添加するが、界面活性剤分子の親水基と疎水基とのバランスが前者に傾くものを用いれば oil in water emulsion (O/W) に、後者に傾けば water in oil emulsion (W/O) となる⁸⁾。当初、生体内で代謝されない油を用いることが必要だと認識され、ドラケオールとアラセル A との組合せが用い続けられた。また Mckinney と Davenport が、植物油アジュヴァントが接種部位に1ヶ月以上とどまり抗原が接種部位から時間を掛けて分散されることが、接種後中長期的に高い抗体を誘導し続

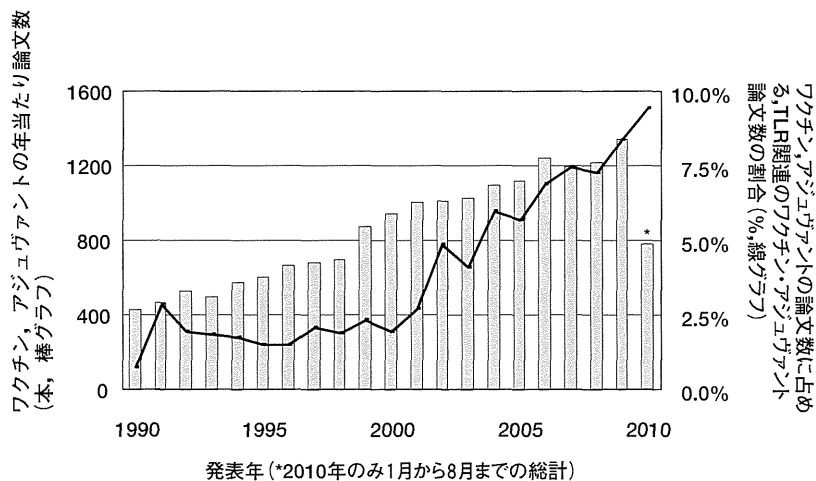


図1 PubMed 検索に見る、年別ワクチン・アジュヴァント関連論文発表数の動向

けると報告した⁹⁾。

しかしアジュヴァントとしての有効性とは裏腹にさまざまな副反応が観察される。Landsteiner は分子量247.55という小さな塩化ピクリルを CFA とともに腹腔内投与したところ、単独投与では惹起されなかった皮膚感受性が惹起されたことを観察した¹⁰⁾、Freund は 2, 4 ジニトロクロロベンジン (分子量202.55) でも同様の現象が観察されたとし、単純な小分子でもアジュヴァントを用いることで過剰な免疫応答を誘導しかねないとした¹¹⁾。また Freund はモルモットにおいて homologous な精巣組織を CFA とともに接種することで、結核死菌を含まない Incomplete Freund's adjuvant (IFA)¹²⁾ との接種では認められなかった無精子症が引き起こされることを観察した¹³⁾。また IFA を添加したインフルエンザワクチンが1950年代に世界中で使用され、その長期間観察の結果、製剤に混在したペニシリン他に対するアレルギーが増加したこと、及び接種局所にアラセル A によると思われる嚢胞形成、が多く観察された¹⁴⁾。動物実験において、多発性関節炎・アミロイドーシス・ネフローゼ・さまざまな臓器における肉芽腫が報告された¹⁵⁾。これら安全性の点から IFA は医薬品として承認されず、Oil emulsion は一旦途絶え、1990年代に Seppic 社が Montanide[®]として複数種開発するのを待つことになる。なお、IFA 添加インフルエンザワクチンに明白な発癌性はなかったことが後に確認されたが、それは35年の超長期観察を経た1990年代である¹⁶⁾。

現在使用されている oil emulsion アジュヴァントにはスクワレンや Montanide[®]の複数のアジュヴァント⁸⁾がある。我が国ではインフルエンザワクチンにおいて2製品が存在する (表1)。

Freund が1947年に早くもスケッチしたとおり¹²⁾、Oil emulsion は脂質膜の粒子を形成し、その内側に水溶性抗原を含む。結果的にそれを人工的に模倣するようにして、微粒子アジュヴァントが生まれた。ポリマー¹⁷⁾、リポソーム¹⁸⁾が1970年代に生まれ、immunostimulating complexes¹⁹⁾が1980年代に生まれた。少なくとも動物実験では有望であり、感染症ワクチンにおいて治験が進んでいる²⁰⁾リポソーム²¹⁾。

4. アルミニウム塩アジュヴァント

1926年 Glenny・Pope・Waddington・Wallace が、ジフテリアトキソイドを沈降させるためにアルミニウム塩を添加した結果、モルモットにおいてより高い抗毒素誘導を見出し²²⁾、1934年、この製法によって作られたジフテリアトキソイドがヒトに初めて用いられたアジュヴァントワクチンとなった²³⁾。アルミニウム添加ジフテリアトキソイド接種後最長で7週のモルモットの接種局所部位を切り出して処理ののち、別のモルモット個体に接種することでジフテリアトキソイド特異的抗体を誘導できた²⁴⁾ことから、アルミニウム塩アジュヴァントの機構として「抗原の depot 効果」が仮説された。

通称「水酸化アルミニウム」は $\text{AlO}(\text{OH})$ の結晶構造を作り、正確にはオキシ水酸化アルミニウムである。リン酸アルミニウムは $\text{Al}(\text{OH})_x(\text{PO}_4)_y$ の非晶質で定形をとらない²⁵⁾。これらの特徴は、抗原タンパクを吸着する能力が優れており (静電力、疎水結合と、いずれのアルミニウム塩も表面に持つ水酸基をめぐっての ligand exchange によるものとされるが、Vogel と Hem は静電力の影響が恐らく最大であろうと推測する²⁶⁾) (接種部位において抗原を長期間放出しつづけること) depot 効果である。接種局所に炎症を引き起こすことによる抗原提示細胞の誘導や、溶解している抗原を結晶化することで抗原提示細胞による取り込みを促進させることなども、アルミニウム塩がもつアジュヴァント効果として提示されている²⁶⁾。また近年、細胞質でインフラマソームを構成する NLR のうち、NLRP3 と関連して炎症性サイトカイン分泌を促進することが示された²⁷⁾。

他のアジュヴァントに比較して安全であり、以後現在に到るまで最も長時間かつ多用途に使い続けられる (表1) ことになるアルミニウム塩であるが、1940年代の早くからさまざまなワクチンにおいて、そのアジュヴァント効果に疑問が投げかけられた。例えば、ジフテリア・破傷風トキソイドの成人に対する追加免疫接種²⁸⁾、インフルエンザ HA ワクチン²⁹⁾、インフルエンザ菌 b 型の CPS - 破傷風トキソイドワクチン³⁰⁾、口蹄疫ワクチン³¹⁾ においてアルミニウム塩の効果

表1 日本国内で販売される、アジュヴァント添加ワクチン (PMDA 資料をもとに2010年8月筆者作成)

対象疾患	ワクチン製品名	アジュヴァント	製造販売	販売開始
ジフテリア	成人用沈降ジフテリアトキソイド“ジフトキ「ビケンF」”	リン酸アルミニウム	阪大微研・田辺三菱	2008.2
破傷風	沈降破傷風トキソイド「生研」	塩化アルミニウム	デンカ・田辺三菱	1967.11
	沈降破傷風トキソイド“化血研”	塩化アルミニウム	化血研・アステラス	1996.4
	沈降破傷風トキソイド「タケダ」	アルミニウム塩	武田	2002.3
	沈降破傷風トキソイド“破トキ「ビケンF」”	水酸化アルミニウム	阪大微研・田辺三菱	2006.11
	沈降破傷風トキソイド「S北研」	塩化アルミニウム	北里・第一三共	2006.8
DT	沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド「生研」	塩化アルミニウム	デンカ	1975.7
	沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド「タケダ」	アルミニウム塩	武田	1976.2
	沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド「北研」	塩化アルミニウム	北里・第一三共	1987.5
	沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド“化血研”	塩化アルミニウム	化血研・アステラス	1996.4
	沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド“DT ビック”	リン酸アルミニウム	阪大微研・田辺三菱	2006.12
DTP	沈降精製百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチン	塩化アルミニウム	デンカ	1981.6
	沈降精製百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチン	塩化アルミニウム	化血研・アステラス	1996.3
	沈降精製百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチン「タケダ」	アルミニウム塩	武田	2002.3
	沈降精製百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチン“化血研シリンジ”	塩化アルミニウム	化血研・アステラス	2003.6
	沈降精製百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチン「S北研」	塩化アルミニウム	北里・第一三共	2004.1
	沈降精製百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチン“トリビック”	リン酸アルミニウム	阪大微研・田辺三菱	2006.8
	沈降精製百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチン「S北研」	塩化アルミニウム	北里・第一三共	2007.2
B型肝炎	ビームゲン	水酸化アルミニウム	化血研・アステラス	1988.6
	ヘプタバックスーII	硫酸アルミニウム	萬有	1988.6
HPV	サーバリックス	水酸化アルミニウム	GSK	2009.12
肺炎球菌	プレバナー水性懸濁皮下注	リン酸アルミニウム	ファイザー・武田	2010.2
インフルエンザ	乳濁細胞培養A型インフルエンザHAワクチン (H1N1株)	MF59(スクワレンを含む)	ノバルティス	2010.2
	アレパンリックス (H1N1) 筋注	AS03(スクワレンを含む)	GSK	2010.1

に疑問が呈された。また接種部位に肉芽腫³²⁾形成がしばしば見られること、高IgE血症を引き起こすこと³³⁾など、安全面においても万能ではないことが知られた。

5. 微生物由来のアジュヴァント

ラテン語 *Adjuvare* から *Adjuvant* と名付けることになる Ramon が1926年、ジフテリアトキ

ソイド接種部位に膿瘍をたまたま形成した馬がより高い抗毒素を産生したことを報告した³⁴⁾。同時期になされた重要な報告として、結核他の慢性感染モルモットにおいて免疫応答が増強することが観察された³⁵⁾。これらのことは、病原体由来因子がアジュヴァント機能を持つというアイデアを生み、結核死菌を含有する CFA 及び有さない IFA と、*S.typhosa* のエンドトキシ

ン由来の lipopolysaccharide (LPS)³⁶⁾ に到った。

しかし、Freund アジュヴァントについて上に述べたさまざまな報告が続いたこともあり、当時からこれらは「弱毒化結核菌は、ワクチンとして実際に用いられるのを見てもわかるように、抗原として用いる分には安全だが、アジュヴァントとして用いるのには毒性が余りにも強いと認識された」³⁷⁾。そのため、CFA・LPSのそれぞれを分離・分解・精製して、アジュヴァント効果を増強しかつ安全性を担保できるように努力が続けられた結果、前者から Muramyl dipeptide (MDP)³⁸⁾ が、後者から Lipid A³⁹⁾ が生まれた。

1990年代に入って自然免疫学において PRR とそれらのリガンドの同定が行われた。これまで作用機序不明のまま経験的に用いられてきた微生物由来のアジュヴァントがそれぞれ宿主の特異的な PRR を介して認識され自然免疫系を刺激することがつぎつぎに報告された^{26,40)}。MPL[®] (monophosphoryl lipid A. TLR4 のリガンド)・RC529 (LPS-based synthetic compounds. TLR4 のリガンド)・R839 (Imiquimod. TLR7 のリガンド)・R848 (Resiquimod. TLR7/8 のリガンド)・CPG7909 (CpG-oligodeoxynucleotide. TLR9 のリガンド)・FK565 (Diaminopimelic acid. NOD1 のリガンド) などがあり、既存アジュヴァントとの各種組合せも含め、現在多様に臨床治験が行われている。

6. アジュヴァントを使用する利点

弱毒生ワクチン、病原体培養液を原料とするトキソイド、そして熱やホルマリンなどで処理して得る全死菌体ワクチン、の3つのワクチン開発戦略は、1980年までにかかりののところまで推し進められていた。現在知られている弱毒生ワクチン14種のうち9種が、また全死菌体・不活化ウイルス全粒子ワクチン12種のうち9種が1960年代までに開発され、以後のものは1990年代まで待たねばならなかった⁴¹⁾。そのようななか1984年、イーストで発現させた遺伝子組み換えタンパク質ワクチンである B 型肝炎ワクチンが複数の研究者によって開発され、例えばドイツのグループは臨床試験で、既存の HBV キャリア由来の血液を処理した「HBV 不活化ウイ

ルス全粒子ワクチン」とほぼ同程度の頻度及び抗体価での抗 HBs 抗体陽転を、遺伝子組替えワクチン接種群において観察した⁴²⁾。ほぼ同時期に AIDS 原因ウイルスの存在が知られ、「ヒト血液由来のワクチン」製剤からの脱却が急がれたこともあり、従来の方法ではワクチン開発が困難だった疾患に限らず、サブユニットワクチン開発競争の時代の幕が上がった。

トキソイド同様サブユニットワクチンの多くはアジュヴァントがないと十分な免疫賦活能を発揮しない。また先に触れたとおり、比較的安安全とされるアルミニウム塩アジュヴァントにでさえそぐわない対象疾患があることから、アジュヴァントの使い分けの必要性が提唱され始めた。

例えば結核感染防御能は Th1 型免疫誘導と相関し、Th2 型免疫誘導と逆相関するが、実験室でのサブユニットワクチンの開発において、用いるアジュヴァントを QuilA・水酸化アルミニウム・MPL・MPL + スクワレン・MPL + QuilA・MPL + 水酸化アルミニウムの6群間で比較したところ⁴³⁾、水酸化アルミニウム単独では Th2 型の免疫応答が誘導され、いかなる防御効果も見られなかったのに対し、MPL + スクワレン及び MPL + QuilA は Th1 型の免疫応答を誘導し、最も優れた結核感染防御を示した。また別の結核サブユニットワクチン開発において、接種マウス脾細胞による抗原特異的 IFN- γ の *in vitro* 産生誘導は、水酸化アルミニウムをアジュヴァントとしたワクチンは、IFA および MPL に比べて低く、BCG やサポニン添加ワクチンと同程度にとどまるなど、細胞性免疫応答を誘導しなかった⁴⁴⁾。

このように、アルミニウム塩が Th2 の液性免疫を誘導し depot 効果を持つものに対し、QuilA などのサポニン及び MPL は depot 効果がないものの Th1 を選択的に誘導するアジュヴァントである。またサイトカインをアジュヴァントとして用いる場合、Th1、Th2 をほぼ意のままに選択できる⁴⁵⁾。微生物由来アジュヴァントでは、LPS/MPL や CpG が Th1 を選択的に誘導するが、後者については Indoleamine 2,3 dioxygenase を誘導して免疫制御の方向にも誘導することが示唆される⁴⁶⁾ など、まだ議論が固まっていない。

アジュヴァント使い分け戦略の延長として現在、ワクチン開発が困難な疾患においては複数のアジュヴァントの組み合わせが潮流である。アジュヴァントの組合せは hCG-βC 末端ペプチドを抗原とし CGP-11637+アラセル A をアジュヴァントとしたもの⁴⁷⁾ を嚆矢とし、TLR リガンドとアルミニウム塩の組合せ・アルミニウム塩+リポソーム+LipidA が HIV ワクチン開発とマラリアワクチン開発で試用された⁴⁸⁾ 他、アルミニウム塩+MPL、スクワレン+copolymer、MTP+PE、MF59+CpG、MPL+スクワレン、RC529+SE、microsphere の表面に CpG を結合させたもの、MPL をリポソームなど微粒子アジュヴァント内に封入するもの、抗原をリポソーム内に封入し、アルミニウム塩と混合したもの、リポソーム上にサイトカインを結合したもの等々⁴⁾ が非臨床及び臨床において試験され、百花斉放千紫万紅である。

7. アジュヴァントの危険性

これまで見たとおり、アジュヴァントは常に、その効果とともに安全性が注意検討されてきた。1960~70年代にかけての IFA 添加インフルエンザワクチンの副反応以降⁴⁴⁾、概してアジュヴァントの安全性に特に厳しい視線が注がれるようになったと米国 NIAID 臨床研究部の Edelman は1980年に書き、続けてワクチンアジュヴァントの安全性について、アジュヴァント単独及び抗原との組合せの双方に関し、個々の事例を挙げつつ次の12点を挙げている⁴⁹⁾。

- 1) アジュヴァントが与える免疫賦与は、宿主に自己免疫応答を誘発しない程度に抑えるべきである。
- 2) ヒトの抗原との交叉反応性を持つ抗原をアジュヴァントは含むべきでない。
- 3) アジュヴァントは自己に対するアレルギー性過敏反応を誘発してはならない。
- 4) 製造工程の再現性を担保するために、アジュヴァントは化学的に純粋な物質であるべきである。製造工程で汚染があってはならない。
- 5) アジュヴァントは発癌性を持ってはならない。
- 6) 目的とする免疫応答以外の幅広い免疫応

答をアジュヴァントは誘導してはならない。

- 7) アジュヴァントは生体内で速やかに代謝される物質であるべきだ。
- 8) 皮下ないし筋肉内などの投与法に関わらずワクチンは安全であるべきだ。
- 9) アジュヴァントは催奇形性・生殖毒性を持ってはならないし、妊娠に危険な低血糖を誘発してはならない。
- 10) アジュヴァントは1年以上の保存可能期間を有する安定性をもつべきだ。
- 11) ワクチンの目的に沿って注意深くアジュヴァントは選択されるべきだ。
- 12) 低い頻度で発生しうる副反応は、たとえ起こったとしても受容されるべきだ。
- 13) ワクチンアジュヴァントの研究開発と同時に進行で、ワクチン副作用による健康被害の補償制度を早急に整えるべきだ。

一方、ワクチンアジュヴァントに関するガイドラインとして本稿執筆時唯一のものであるヨーロッパ連合 (EU) のワクチン審査担当機構である EMEA によるガイドライン⁵⁰⁾ は、多様なアジュヴァントに対し画一的なガイドラインを作成することの限界を指摘しつつも、臨床試験に先立って行うべき非臨床試験を推奨している。すなわち、アジュヴァント単独での毒性試験として、

- 1) 接種局所における組織障害・肉芽腫形成
 - 2) 過敏性反応・アナフィラキシー
 - 3) 発熱性試験
 - 4) 全身毒性 (体内主要臓器、皮膚、免疫臓器等に対する影響を用量可変的に試験)
 - 5) 生殖機能毒性
 - 6) 遺伝毒性は合成アジュヴァントのみ
- を、また、抗原と組み合わせるワクチン剤型としての毒性試験は、通常ワクチンの毒性試験と同様になされるべきだとし、
- 1) 単回投与毒性試験
 - 2) 反復投与毒性試験、
 - 3) 安全性薬理試験 (循環器系・呼吸器系などへの影響)
 - 4) 接種局所における組織障害
- を挙げている。
- そして、非臨床試験のモデル選択について

EMA は、「理想的には、対象病原体の致死量感染実験が、それにふさわしい動物モデルにおいて行われるべきである。もし適切なモデルが存在しないならば、ヒトにおいて起こると予想される免疫応答に似た免疫応答を引き起こす動物種が選択されるべきである」⁵⁰⁾ とし、非臨床試験において試験系の選択に注意すべきとしている。

生物学的な類似性から、医薬品開発のための非臨床試験に非ヒト霊長類 (Non Human Primates ; NHP) を用いることが正当化される⁵¹⁾。薬物動態試験⁵²⁾・サイトカインなど小分子に対する代謝や免疫毒性⁵³⁾において NHP が種特異的に選択されるし、生殖毒性・発生における免疫毒性⁵⁴⁾は Macaque が最もヒトに類似するとして推奨される。しかし、国内外のワクチンガイドラインのすべてが「NHP における試験が必要である」と推奨するわけではなく、その多くが「最適とされる 1 動物種を用いて試験すること」を最低限として定めていることから、動物実験の倫理上特に NHP の試験使用は、厳格な正当化がなされる場合のみ、最小頭数でなされるべきだろう。

またたとえ NHP を用いたとしても、現行のワクチン毒性試験の場合約 3 ヶ月ないし 1 年などの観察期間が標準であろう。前述の IFA 添加インフルエンザワクチンについて 3 次にわたり 35 年分の記録解析を行った Page らが、「2 次調査がなされた時はワクチン接種後わずか 16 年しかたっており、発癌性を検討するには少なすぎる癌患者数しか発生しなかった¹⁶⁾」と控えめに自賛しているとおおり、臨床における副作用の潜在性の把握には超長期における綿密な観察が必要で、特に発生頻度が著しく低い副作用については、対象集団サイズや観察期間の点から市販後の調査で初めて明らかにされるものもある^{55)及び本稿脚注参照)}。

上に紹介した Edelman は 30 年前、アジュバントの発癌性・自己免疫誘導を今よりも大きな問題と捉えた一方、低い頻度で発生しうるワクチン副作用に関してはむしろ寛容であるべきだという意識であったようだ。安全性意識に現代の我々とはいささかずれがあるものの、いかに非臨床試験を行っても臨床使用において新たな

副作用が発見されること、ワクチン製剤の安全性を非臨床試験が完全に担保できないことに、Edelman が真摯に向き合ったことは間違いないだろう。我々がなすべきは、ワクチンによる健康被害リスクを最小限にとどめることは当然ながら、Edelman が最後に述べた通り、たとえ健康被害が生じたとしても充分かつ迅速な補償がなされるよう、セーフティネットとして制度を一層充実させることであろう。

8. 効果のある安全なワクチンの開発を目指して

医薬品は副作用と効用とのバランスが重要であるが、なかでも予防手段であるワクチンにおいては、治療を目的とする医薬品とは異なる独自のバランスが求められる。EMA は「ワクチンが健常人を対象とする以上安全性を有効性よりも重視するムードが現在は支配的だ」とする⁵⁰⁾。Wilson は 2010 年に「先進国におけるワクチンの安全性基準はこの二、三十年でかつてなく厳格なものになったが、恐らくこれは、先進国ではワクチンによって予防できる疾患はもはや重要な疾患ではなくなり、副作用と効用のバランスなどということ自体考える意識が薄れているからかもしれない⁵⁵⁾」と評論している^{脚注)}。

我が国における予防接種に対する見解も、集団防衛・社会防衛を根拠に義務接種であったかつてのものから、現在の個人防衛の観点に重点を移している⁵⁶⁾。昭和 23 年に制定された我が国の予防接種法は、当時の混乱した社会情勢を背景に、伝染病から社会全体を強力に防衛することを目指した。事実昭和 30 年代にかけて感染症対策は進み、たとえばジフテリア発病率が最大であった昭和 10 年代後半の 10 分の 1 未満にまで下がる⁵⁷⁾など成果を挙げた。しかし種痘・3 種混合・インフルエンザ・ポリオなどのワクチンにおいて昭和 40 年前後からいわゆる種痘禍と呼ばれる予防接種事故が続出し、大きな社会問題となった。予防接種被害者救済のための訴訟が続き⁵⁸⁾、国の損害賠償責任や損失補償責任とともに、予防接種制度そのものの再検討が迫られた。

例えば、いまだに予防接種が義務とされていた平成 5 年に福岡高等裁判所が「予防接種が一定の危険性を伴うものであるにもかかわらず、

これが法をもって国民に義務付けられているのは、主として、一定割合以上の住民が予防接種を受けていれば、それが伝染病の発生及び蔓延の防止にとって大きな効果があるという、社会防衛の見地に由来するものであるということが出来る（もちろん、接種を受けた個人にとっても当該伝染病に罹患することから免れられるが、法が予定する強制接種制度は右のような社会防衛という公益を重視したものとするべきである⁵⁹⁾」と述べたとおり、確率論的に不可避であるワクチン副作用が引き起こす、受益者個人に対する健康被害を公共のための犠牲とみるのか。しかし、「生命身体はいかに補償を伴ってもこれを公共のために用いることは出来ない⁶⁰⁾」。「接種を受ける個々の国民に、(軽度の発熱、発赤、発疹といったそれほど症状の重くない副反応はともかくとして)、生命にも関わるとような重篤な副反応が生ずることを受忍することまでを強制することができないのは当然⁵⁹⁾」であり、安全性を重視した個人防衛に予防接種のあり方が変遷したのである。

予防接種法は昭和23年制定の「罰則付き義務接種」から「罰則なし義務接種(昭和51年改正)」へ、さらに「接種は努力義務(平成6年改正)」へと変遷した。そして予防接種法の定めるワクチンについては予防接種法の定める予防接種健康被害救済給付制度が昭和51年に、任意接種ワクチンについては医薬品副作用被害救済基金(元、医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構、現在の独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)による「医薬品副作用被害救済制度」が昭和54年にそれぞれ創設された。これらは変遷を経て、無過失補償制度として現在機能している⁶¹⁾。前者が対象とするものは現在予防接種法1類疾患に対するワクチン(ジフテリア・百日咳・ポリオ・麻疹・風疹・日本脳炎・破傷風・BCG)及び定期のインフルエンザワクチンであり、後者はそれ以外の任意接種ワクチンである。ただしこれらの無過失補償制度の改善、特に認知度⁶²⁾・補償額の充実を求める声が多い。また免責事項がないことから、補償を受けかつ損害賠償訴訟を行えるため、制度の「無過失」性に疑問を呈する意見もある。

(脚注) Wilson は先進国の安全性基準に触れた後、「途上国は、先進国における基準とはことなるワクチン安全性基準を設けようとするかもしれないが、恐らくそれは技術的にも政治的にも難しい問題である。例えば、1998年アメリカ合衆国において認可されたロタウイルスワクチンが、上市後に15人の重篤な腸重積の副作用を引起し、米国疾病予防管理センターから使用の一時中止が勧告され⁶³⁾、自主的に回収された⁶⁴⁾。その影響で、ロタウイルス感染により年50万人の小児死亡がある途上国⁶⁵⁾においては、このワクチンを使用することが出来なかった(バングラディシュ・インド・ガーナ・南アフリカにおける治験が中止された⁶⁵⁾。厳しすぎる安全基準の代償は、その特定のワクチン製剤が市場に出回らなくなるだけでなく、ワクチンがより高価になることである。なぜならこのような稀な副作用を鑑別するために、製薬会社は非常に大規模な臨床治験を行わねばならないからである。この事例からワクチン開発業者は、余りにも稀すぎて通常規模の治験では拾いきれない副作用によって、その製剤を市場から撤退せざるを得なくなるリスクを理解した」^{(55. なお「」中の文献参照63-65)は} 狭谷・石井が補った。」と述べている。

9. 効果のある安全な予防接種の普及を目指して

生活習慣を改善することがメタボリックシンドロームの1次予防(発症予防)・2次予防(発症後の増悪予防)および3次予防(生活の質改善および合併症予防)となるように、予防の1ペニーは治療の1オンスに勝るの古諺は、充分現代性を持った金言である。感染症ワクチンは上下水道整備とともに、感染症による死亡・罹患を最も有効かつ最大の費用対効果でもって減少させる公衆衛生施策であり⁶⁶⁾、WHOは2020年へ向けた10年計画の中で、vaccination as an element of health security とし、貧困関連疾患(HIV/AIDS, 結核, マラリア)のワクチン開発、全年齢層に対するワクチンの充実を進めるとしている⁶⁷⁾。

現在我が国で推奨される予防接種では、「一般に生ワクチンは胎児への影響を考慮して前妊娠期間で接種は行わない」、「HIV感染者及びエイズ患者に対してポリオ及びBCGの予防接種を行ってはならない」とし、接種要注意者とさ

れる受益者に「心筋炎・心膜炎・川崎病・心内膜炎・リウマチ熱に罹患している者」「急性腎不全の者、急性期・増悪期の者」が含まれる⁶⁸⁾。これらの受益者に対しても、その個人背景にとってよりふさわしいワクチンを投与できるよう、きめ細かい予防接種デザインが必要だと筆者らは考える。

すなわち、対象疾患の性質（ワクチン以外の予防策や、罹患時の治療法があるかどうか、その地域におけるその疾患の影響）、受益者の背景（健常人、乳幼児や高齢者、妊産婦、免疫不全状態の罹患患者など）、予防接種の目的（個人感染予防、集団免疫目的、重症化予防、感染伝播予防）の3点に着目する。例えば、妊婦を対象とした、治療法の存在する疾患の感染成立予

防を目的とする予防接種であれば、安全性が最大限優先されるべきである（あるいは、ワクチン接種を行わない選択もありえる）。一方、肺気腫患者に対する肺炎球菌ワクチンや季節性インフルワクチン、インフルエンザウイルス強毒株感染症に対する“パンデミックワクチン”や、難民キャンプ設立時における麻疹ワクチン⁶⁹⁾の場合、妊婦対象の上記ワクチンに比べ、副作用のリスクを多少許容してでもワクチン効果を追及するという選択肢も検討すべきではないだろうか。（尤もこの場合肺炎球菌やインフルエンザの場合治療法（抗生剤や抗インフルエンザ薬）が存在するため、安全性に対する要求は難民キャンプにおける麻疹ワクチンよりも厳しくなるかもしれない。）

	対象疾患	受益者背景	目的
予防接種 デザイン	ウイルス感染症 細菌感染症 (寄生虫感染症)	<ul style="list-style-type: none"> ・健常成人 ・妊産婦・授乳婦 ・乳幼児 ・高齢者 ・アレルギー・自己免疫疾患罹患患者 ・免疫不全者（担癌患者・透析患者・免疫抑制剤使用者など） ・臓器移植患者 ・心肺肝腎他の基礎疾患を有する者 ・短期間暴露（旅行者など） ・高暴露（医療従事者など） 上記の組み合わせ 	感染成立予防 発症予防 重症化予防 伝播予防 緊急集団予防接種 暴露後予防 ブースター接種
			誘導すべき免疫応答 細胞性免疫・液性免疫 Th1・Th2・制御性 臓器（呼吸器・腸管・生殖器・リンパ組織）・全身

- 課題1：免疫系をめぐり、メタ・ネットワークとして生体を理解
- 課題2：免疫現象をネットワークとして理解
- 課題3：抗原提示過程における免疫情報の流れを、分子生物学用語で記述
- 課題4：ワクチン・アジュヴァントの物理化学的構造の理解

	抗原	投与方法	アジュヴァント
ワクチン 製剤 デザイン	弱毒化生菌 死菌・不活化全粒子 スプリット抗原 サブユニット抗原 (トキシノイド)	全身：経血流 筋肉内 皮下 皮内 舌下 経口 局所：経口 経鼻 経気管支 投与プロトコル： 用量 頻度 スケジュール	無機塩・ゲル（アルミニウムゲルなど） Oil emulsion (スクアレンなど) 微粒子 (ISCOM など) 微生物由来因子 (PRR リガンドなど) 人体内因子 (サイトカインなど) 活性を持たない vehicle (DNA ワクチン における金粒子など) 上記の組み合わせ

図2 感染症のための予防接種デザインに基づく、ワクチン製剤デザイン

そのなかで、Edelman の言う「ワクチンの目的にそったアジュヴァントの選択」は極めて重要である。先に Th1アジュヴァントを紹介した通り、アジュヴァントの比較検討によって、どのアジュヴァントがどういった免疫応答を惹起するかといった傾向が、現在徐々に明らかになりつつある。このようなアジュヴァント効果はかならずしも普遍的なく、抗原との組合せによる影響を慎重に検討せねばならないが、将来、求める免疫応答にあわせてアジュヴァントを組合せ・選択して、ワクチン製剤をデザインできるようになるかもしれない。すなわち予防接種デザインに基づいてワクチン製剤を設計するオーダーメイド・ワクチンである。

そこではまず、公衆衛生デザインに沿って予防接種デザインが設定される。設定要素は、対象疾患・受益者背景・目的及び誘導すべき免疫応答である。予防接種デザインを満足させるべくワクチン製剤が設計されるべきだが、現状では両者の橋渡しは多くが残念ながら、いまだ Janeway の言うとおりの empiric である。橋渡し課題として筆者は図 2 の 4 点を挙げる。

参考文献

- 1) Janeway CA : Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harbor Symposia Quantitat Biolog 24 : 1-13, 1984
- 2) Myrvik QN : Adjuvants. Ann NY Acad Sci 221 : 324-330, 1974
- 3) Plotkin SL, Plotkin SA : A short history of vaccination. *In Vaccines* : Expert Consult, 5th edition. Eds. Plotkin S, Orenstern U, Offit P. Elsevier Inc. 2008, pp. 5-16
- 4) Ott G, van Nest G : *In Vaccine adjuvants and delivery systems*. Singh M edit. John Wiley & Sons Inc. New Jersey, 2007, pp.2-31
- 5) Le Moignic, Pinoy : Applications to man of vaccines consisting of emulsions in fatty substances (lipo-vaccines) . Comp Rend Soc Biol 79 : 352-354, 1916
- 6) Landsteiner K, Simms S : Production of heterogenetic antibodies with mixtures of the binding part of the antigen and protein. J Exp Med 38 : 127-138, 1923
- 7) Freund J, Casals J, Hosmer EP : Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. Proc Soc Exp Biol Med 37 : 509-513, 1937
- 8) Aucouturier J, Dupuis L, Deville S, Ascarateil S, Ganne V : Montanide ISA720 and 51 : a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. Exp Rev Vaccine 1 : 111-118, 2002
- 9) Mckinney RW, Davenport FM : Studies on the mechanism of action of emulsified vaccines. J Immunol 86 : 91-100, 1961
- 10) Landsteiner K, Chase MW : Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. J Exp Med 711 : 237-245, 1940
- 11) Freund J : The mode of action of immunologic adjuvants. Adv Tuberc Res 7 : 130-148, 1956
- 12) Freund J : Some aspects of active immunization. Ann Rev Microbiol 1 : 291-308, 1947
- 13) Freund J, Thompson GE, Lipton MM : Aspermatogenesis, anaphylaxis, and cutaneous sensitization induced in the guinea pig by homologous testicular extract. J Exp Med 101 : 591-604, 1955
- 14) Beebe GB, Simon AH, Viviona S : Follow-up study on army personnel who received adjuvant influenza virus vaccine 1951-1953. Am J Med Sci 247 : 385-405, 1964
- 15) Hilleman MR : Critical appraisal of emulsified oil adjuvants applied to viral vaccines. Prog Med Virol 8 : 131-182, 1966
- 16) Page WF, Norman JE, Benenson AS : Long-term follow-up of army recruits immunized with Freund's incomplete adjuvanted vaccine. Vaccine Res 2 : 141-149, 1993
- 17) Preis I, Langer RS : A single-step immunization by sustained antigen release. J Immunol Methods 28 : 193-197, 1979
- 18) Papahadjopoulos D, Mayhew E, Poste G, Smith S, Vail WJ : Incorporation of lipid vesicles by mammalian cells provides a potential method for modifying cell behaviour. Nature 252 : 163-168, 1974
- 19) Lovgren K., Morein B : The requirement of lipids for the formation of immunostimulating complexes (Iscoms) . Biotechnol Appl Biochem 10 : 161-172,

- 1988
- 20) Drane D, Maraskovsky E, Gibson R, Mitchell S, Barnden M, Moskwa A, Shaw D, Gervase B, Coates S, Houghton M, Bassler R : Priming of CD4+ and CD8+ T cell responses using a HCV core ISCOMATRIX™ vaccine : a phase I study in healthy volunteers. *Hum Vaccin* 5 : 151-157, 2009
- 21) Lell B, Agnandji S, von Glasenapp I, Haertle S, Oyakhromen S, Issifou S, Vekemans J, Learch A, Lievens M, Dubois MC, Demoite MA, Carter T, Villafana T, Ballou WR, Cohen J, Kremsner PG : A randomized trial assessing the safety and immunogenicity of AS01 and AS02 adjuvanted RTS,S malaria vaccine candidates in children in Gabon. *PLoS One* 4 : e7611, 2009
- 22) Glennly AT, Pope CG, Waddington H, Wallace U : The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol* 29 : 38-40, 1926
- 23) White JL, Schlageter EA, Diphtheria toxoid. *JAMA* 102 : 915, 1934
- 24) Harrison WT : Some observations on the use of alum precipitated diphtheria toxoid. *Am J Pub Health* 25 : 298-300, 1935
- 25) Shirodkar Hutchinsn RL, Perry DL, White JL, Hem SL : Aluminum compounds used as adjuvant in vaccines *Pharm Res* 7 : 1282-1288, 1990
- 26) Vogel F, Hem SL : Immunologic adjuvants. *In Vaccines:Expert Consult*, 5th edition. Eds. Plotkin S, Orenstern U, Offit P. Elsevier Inc. 2008, pp. 59-71
- 27) Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA : Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453 : 1122-1126, 2008
- 28) Ipsen J : Immunization of adults against diphtheria and tetanus. *N Eng J Med* 251 : 459-466, 1954
- 29) Davenport FM, Hennessy AV, Askin FB : Lack of adjuvant effect of AlPO₄ on purified influenza virus hemagglutinins in man. *J Immunol.* 100 : 1139-1140, 1968
- 30) Claesson BA, Trollfors B, Lagergard T, Taranger J, Bryla D, Otterman G, Cramton T, Yang Y, Reimer CB, Robbins JB, Schneerson R : Clinical and immunologic responses to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b alone or conjugated to tetanus toxoid in 18- to 23-month-old children. *J Paediatr* 112 : 695-702, 1988
- 31) Francis MJ, Fry Cm, Rowlands DJ, Bittle JL, Houghten RA, Lerner RA, Brown F : Immune response to uncoupled peptides of foot-and-mouth disease virus. *Immunology* 61 : 1-6, 1987
- 32) White RG, Coons AH, Connolly JM : Studies on antibody production III . The alum granuloma. *J Exp Med* 102 : 73-82, 1955
- 33) Nagel J, Svec D, Waters T, Fireman P : IgE synthesis in man. *J Immunol* 118 : 334-341, 1977
- 34) Ramon G : Procèdes pour accroître la production des antitoxines. *Ann Inst Pasteur* 40 : 1-10, 1926
- 35) Lewis PA., Loomis D : Allergic Irritability III . The influence of chronic infections and of trypan blue on the formation of specific antibodies. *J Exp Med* 43 : 263-272, 1926
- 36) Johnson AG, Gaines S, Landy M : Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa* V. Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *J Exp Med* 103 : 225-246, 1956
- 37) Guputa RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Ben-Efraim S, Guputa CK : Adjuvants — a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* 11 : 293-306, 1993
- 38) Ellouz F, Adam A, Ciorbaru R, Lederer E : Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 59 : 1317-1325, 1974
- 39) Ribi E : Beneficial modification of the endotoxin molecule. *J Biol Res Mod* 3 : 1-9, 1984
- 40) Kwissa M, Kasturi SP, Pulendran B : The science of adjuvants. *Exp Rev Vaccines* 6 : 673-684, 2007
- 41) Flower DR : *Bioinformatics for vaccinology*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex. 2008, p. 41
- 42) Jilg W, Lorbeer B, Schmidt M, Wilske B, Zoulek G, Deinhardt F : Clinical evaluation of a recombinant hepatitis B vaccine. *Lancet* 8413 : 1174-1175, 1984
- 43) Elhay MJ, Anderson P : Immunological requirements for a subunit vaccine against tuberculosis. *Immunol Cell Biol* 75 : 595-603, 1997