

自然免疫と次世代ワクチン開発

独立行政法人医薬基盤研究所・アジュバント開発プロジェクト*¹⁾ 大阪大学免疫学フロンティア研究センター・ワクチン学*²⁾

青枝 大貴*¹⁾²⁾, 石井 健*¹⁾²⁾

Innate immunity and next-generation vaccine

Recent proceedings in the research of molecular mechanism of innate immune system enable us to design and construct more safe and effective vaccine based on the scientific rationale instead of empirical way. We describe here an overview of the current understanding of how innate immunity elicit and enhance adaptive immune responses, including CD4T cell differentiation to Th1, Th2, and Th17. We also discuss possible application of drug delivery system for next-generation vaccine development.

近年、自然免疫の分子機構が明らかになるにつれて、これまで経験則によって用いられていたワクチンやワクチンアジュバントの作用機序を科学的に理解することが可能になりつつある。本稿では、これまでに明らかになっている自然免疫応答による樹状細胞活性化とそれに伴う獲得免疫応答の過程、様々な疾患/病態に關与する Th1, Th2, Th17 などの異なる CD4T 細胞サブセットへの分化制御に自然免疫シグナルが及ぼす影響などについて概説し、抗原及びアジュバントを適切な樹状細胞に標的することによる次世代ワクチン開発の可能性について述べる。

Taiki Aoshi*¹⁾²⁾, Ken Ishii*¹⁾²⁾

Keywords: innate immunity, adaptive immunity, adjuvant, vaccine, dendritic cells

次世代ワクチンへのアプローチ

ジェンナーやパスツールに始まるワクチンは天然痘の撲滅や世界の大部分の地域におけるポリオ根絶宣言に見られるように、公衆衛生としての感染症対策に大きな役割を果たしてきた。しかしながら、3大感染症として対策が求められている AIDS、結核、マラリア、またエボラ出血熱などの新興感染症、さらに平均余命が伸びることによるガンや認知症など、いわば現代型の疾患や病態に対しても、従来の枠組みをこえた新たなワクチン開発が求められている¹⁾。また、重篤なケースはまれであるがワクチン接種によって引き起こされる様々な程度の副反応や健康被害も、公衆衛生的な感染症対策の進展に伴い現在大きな問題となっている。これらの課題を解決

し、またそれぞれの病態に適した免疫応答を誘導できる有効性と安全性を兼ね備えた次世代のワクチン開発には、現代免疫学の知見に基づいた科学的なアプローチが不可欠である。

免疫とは

免疫学はワクチンのメカニズムを明らかにすることに端を発して派生した学問分野であり、その研究は近年めざましい進展をとげ、複雑な免疫システムの詳細が少しずつ明らかになって来ている。現在ではいわゆる「免疫」と呼ばれる現象も従来の炎症反応を含む「自然免疫」と「二度無し」の主体となる「獲得免疫」の二つの枠組みで理解されるようになっていく。自然免疫 (innate immunity) とは病原体やワクチンを含む外来異物に対して早期に働く免疫反応のことで、主に好中球やマクロファージなどの貪食細胞や、補体の活性化などからなる。貪食細胞などに発現する自然免疫受容体が細菌やウイルス

*¹⁾Laboratory of Adjuvant Innovation, National Institute of Biomedical Innovation

*²⁾Laboratory of Vaccine Science, Immunology Frontier Research Center

由来の構成物を認識することによって様々なサイトカインやケモカインが誘導され、炎症や発熱、免疫系細胞の遊走などが惹起され、抗原非特異的な生体防御機構として機能する。それに対して、獲得免疫 (adaptive immunity) は、T細胞やB細胞によって担われ、抗原を特異的に認識しその排除に働く。また一度抗原特異的に活性化したT細胞やB細胞の一部はメモリー細胞として生体内に残り、二回目の感染などに対しては迅速かつ強力に感染や異物を排除する。このような獲得免疫を誘導することが"二度無し"といわれる免疫の主体をなしている。獲得免疫応答は強力かつ抗原特異的であるため、感染に際しては非常に効果的に感染防御に働くが、一度自己の抗原に対してこのような獲得免疫系が活性化してしまうと重篤な自己免疫疾患を引き起こすことにもなるため、後に述べるように生体内では獲得免疫の活性化は厳密に制御されている。

自然免疫シグナルと獲得免疫誘導

獲得免疫応答を誘導するためには、多くの場合、樹状細胞などの抗原提示細胞の自然免疫レセプターがリガンドによって刺激され細胞内のシグナルカスケードによって樹状細胞が活性化することが必要である。実際にLPSなどのTLRリガンドを含まない非常に精製度が高い蛋白質抗原をマウスに免疫しても、その抗原に対する抗体産生やT細胞応答はほぼ認めない。このことを図示すると、図1のようになる。樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれた抗原は、8~15アミノ酸からなる抗原由来ペプチドにプロセッシングされ、主要組織適合抗原(Major Histocompatibility complex; MHC)と結合した状態でT細胞に提示される (Signal-1)。しかしながら、このようなSignal-1および弱いSignal-2だけではT細胞の活性化は不十分でT細胞は活性化さ

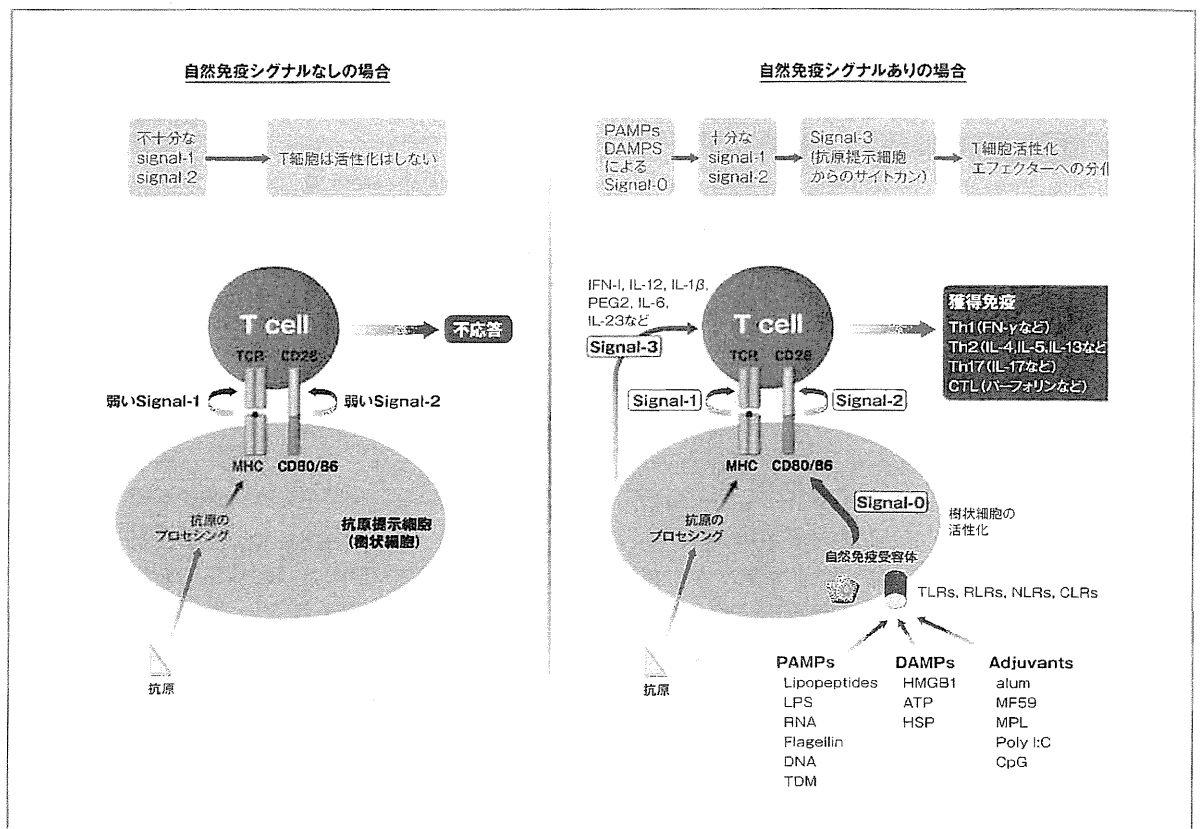


図1 自然免疫シグナルによる獲得免疫誘導

れず、むしろアナジーやトレランスと呼ばれる状態になる^{2,3)}。これとは対照的に、実際の病原体感染やアジュバントを含むワクチン接種の場合には抗原蛋白質とともに自然免疫を活性化するリガンド刺激が抗原提示細胞に入り (Signal-0)、抗原プロセッシングが促進される (Signal-1) だけでなく、T 細胞応答を促進する CD80/86 などからなる補助刺激分子も抗原提示細胞上に多く発現するようになり (Signal-2)、T 細胞が活性化され、抗体産生や細胞性免疫の誘導など獲得免疫が誘導される^{2,3)}。また後にも述べるが、樹状細胞の受け取った自然免疫シグナルに応じて IL-12 などのサイトカインが産生され (Signal-3)、活性化したナイーブ T 細胞をエフェクター T 細胞へ分化誘導し⁴⁻⁶⁾、エフェクター細胞やメモリー細胞として生体防御の役割を果たす。このようにナイーブ T 細胞の活性化による獲得免疫誘導は、自然免疫シグナルによって活性化した樹状細胞が外来抗原を提示することによってはじめて成立する。そのような意味で、樹状細胞は自然免疫と獲得免疫を橋渡しするのに重要な細胞集団であり、また自然免疫反応は獲得免疫応答を誘導するためにほぼ必須であると言える。ナイーブ T 細胞の活性化はこれまで見てきたように多段階で厳密に制御されており、

このことは自己免疫反応を抑制しながらも、病原体などの外来異物に対しては免疫応答を維持するために大切であると考えられている。そのような意味で、自然免疫シグナルを惹起するアジュバントは免疫応答にいわば“GO”サインを出しているとも言える。また付則であるが、メモリー T 細胞の活性化にはここに述べたような補助刺激分子 (Signal-2) はほとんど必要無いことも知られており、メモリー T 細胞を再活性化するためには、抗原因来の Signal-1 のみで十分であると考えられている。

自然免疫受容体

近年、次々と自然免疫受容体及びそのリガンドが同定されたことで、自然免疫系が非自己である外来異物や病原体を認識する仕組みが分子レベルで明らかになってきている^{7,8)}。これまでに同定されている代表的な自然免疫受容体としては、その分子構造に基づいて Toll-like receptor (TLR), RIG-like receptor (RLR), Nod-like receptor (NLR), C-type lectin receptor (CLR), AIM2-like receptor (ALR) の大きく 5 つに分類されている (表 1)。これらの受容体は病原体 (ウイルス、細菌、真菌、寄生虫)

自然免疫受容体 (PRRs)	リガンド (PAMPs)	合成・精製リガンド (アジュバント)	細胞内局在	
TLRs	TLR1/2	Triacyl lipopeptide	Pam3CSK4	細胞膜
	TLR2/6	Diacyl lipopeptide	Macrophage-activating lipopeptide 2 (MALP-2)	細胞膜
	TLR3	dsRNA	Poly I:C	エンドゾーム
	TLR4	LPS	Monophosphoryl lipid A (MPL)	細胞膜
	TLR5	Bacterial flagellin	Flagellin-protein fusions	細胞膜
	TLR7, TLR8	ssRNA (RNA viruses)	Imiquimod (R-837), Resiquimod (R-848)	エンドゾーム
	TLR9	非メチル化 CpG DNA	CpG-ODNs (Type-A, Type-B, Type-C, Type-P)	エンドゾーム
	TLR11	Profilin-like protein (T. gondii)	unknown	細胞膜
RLRs	RIG-I	5'-PPP ssRNA or 短い (~1 kb) dsRNA	unknown	サイトゾル
	MDA5	長い (> 2 kb) dsRNA	Poly I:C	サイトゾル
NLRs	NOD1	Peptideglycans, Diaminopimelic acid (iE-DAP)	FK156, FK565	サイトゾル
	NOD2	Peptideglycans, Muramyl dipeptides (MDP)	Muramyl dipeptides (MDP)	サイトゾル
	NLRP3	Cellular stress, lysosomal damage	Aluminum salts, MSU, Silica	サイトゾル
	NAIP5	Bacterial flagellin	Flagellin-protein fusions	サイトゾル
CLRs	Dectin-1	β 1,3-glucan	Curdlan, lentinan, schizophyllan	細胞膜
	Dectin-2	High mannose structures	Man9GlcNAc2	細胞膜
	Mincle	Trehalose-6,6-dimycolate (TDM)	Trehalose-6,6-dibehenate (TDB)	細胞膜
ALRs	AIM-2	dsDNA	unknown	サイトゾル
	IFI16	dsDNA	unknown	サイトゾル

表 1 自然免疫受容体とリガンド (PAMPs) および合成・精製リガンド (アジュバント)

の様々な構成成分（膜成分、鞭毛、核酸）を認識する。これらの病原体成分は宿主には存在しないため Pathogen-associated molecular patterns; PAMPs あるいは Microbe-associated molecular patterns; MAMPs と呼ばれ、自然免疫系が自己と非自己を識別する指標になっている。TLR4 や dectin-1 などは宿主細胞の形質膜に存在して病原体膜由来のリポ蛋白質や糖鎖成分を認識する、また Nod1 や Nod2 などは細胞内で細菌膜由来のペプチドグリカンを認識する。病原体由来の DNA や RNA などの核酸を認識する TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 はエンドゾームに局在し、RIG-I, MDA5, AIM-2, IFI16 などは細胞質内の非自己外来核酸を認識する。また興味深いことに、TLR5 リガンドの flagellin と TLR11 リガンドの Profilin-like protein を除いて、ほとんどの自然免疫受容体リガンドは非タンパク性であり、脂質、糖鎖、核酸などの化学構造を認識している。このことは、獲得免疫系を構成する T 細胞や B 細胞がそれぞれ外来タンパク質抗原由来のペプチド（8～15 アミノ酸）や抗原タンパクの立体構造を認識していることと対照をなしている。また自然免疫受容体は外来性のリガンド認識だけでなく、炎症や組織障害によって修飾されたり放出されたりする宿主由来成分（Damage associated molecular patterns; DAMPs）も認識することが知られ、アレルギーや自己免疫疾患などの病態への関与も示唆されている⁹⁾。

自然免疫シグナルと Th 細胞分化

これらの自然免疫受容体リガンドを認識すると、宿主細胞内で細胞内シグナルカスケードが進行し、IL-1, IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインや I 型インターフェロン、ケモカインなどの産生が起こる¹⁰⁾。これらのサイトカインによって炎症や発熱などが惹起され、外来異物や病原体感染によって傷害された細胞を貪食する好中球、マクロファージ、炎症性単核球などの遊走・集積を促すと共に、のちに続く獲得免疫の誘導や方向付け（Th1, Th2, Th17 など）にも重要な役割を果たしている¹¹⁾。自然免疫受容体からのシグナルカスケードは非常に複雑で、

それぞれの受容体シグナル間でのクロストークや細胞集団による違いも存在し、互いに相違するような報告も多い。多くの例外や異なる事例も存在することを前提に、リガンドからの自然免疫受容体シグナルカスケードとそれに相関する Th 細胞分化を極端に簡潔化して図示すると図 2 のようになる。

TLR や RLR からのシグナルはそれぞれ MyD88/TRIF や IPS-1 を介して伝達され、IRF3 や IRF7 などの転写因子を活性化して I 型インターフェロン産生を誘導する^{12,13)}。またここには示していないが NF κ B を介して IL-6, TNF- α , IL-12 などの炎症性サイトカイン産生も誘導する。これらのサイトカインが共同的に働くことで TLR や RLR による自然免疫応答は主に Th1 免疫応答を誘導することが知られている。Th1 は、特徴的に IFN- γ を産生し主にマクロファージの活性化を通して結核に代表される細胞内寄生菌の感染防御やウイルスの排除などに関わっている。

NLR は LRR ドメインを持つ細胞内自然免疫レセプターで、インフラマゾーム活性化に大きくは関与しない Nod1 や Nod2¹⁴⁾ と、インフラマゾーム形成を介して Caspase-1 依存的な IL-1 β や IL-18 の産生を誘導する NLRP3 などがある^{15,16)}。Nod1 はグラム陰性菌の細胞壁に存在する diaminopimelic acid (DAP) を認識する細胞内センサーであるが、Nod1 特異的な合成リガンドである FK156 を単独でアジュバントとしてマウスに免疫すると、Th2 タイプの免疫が誘導されることが報告されている¹⁷⁾。Nod2 は広く細菌の細胞壁に存在する muramyl dipeptide (MDP) を認識し、CARD9 を介して MAPK 経路によって IL-17 を特徴的に産生する Th17 細胞を誘導することが知られている^{18,19)}。NLRP3 は alum や silica などの粒子状異物や細胞ストレスなど各種の Danger signal を認識する細胞内自然免疫受容体で、リガンドによる活性化を受けると ASC を介してインフラマゾームを活性化することで caspase-1 依存的な IL-1 β や IL-18 産生を引き起こす。また近年、上記の ASC を介した NLR シグナル経路とは独立に、alum, silica, monosodium urate (MSU) などの粒子状異物は自然免疫受容体を介さずに形質膜内側に存在する Syk の活性化を

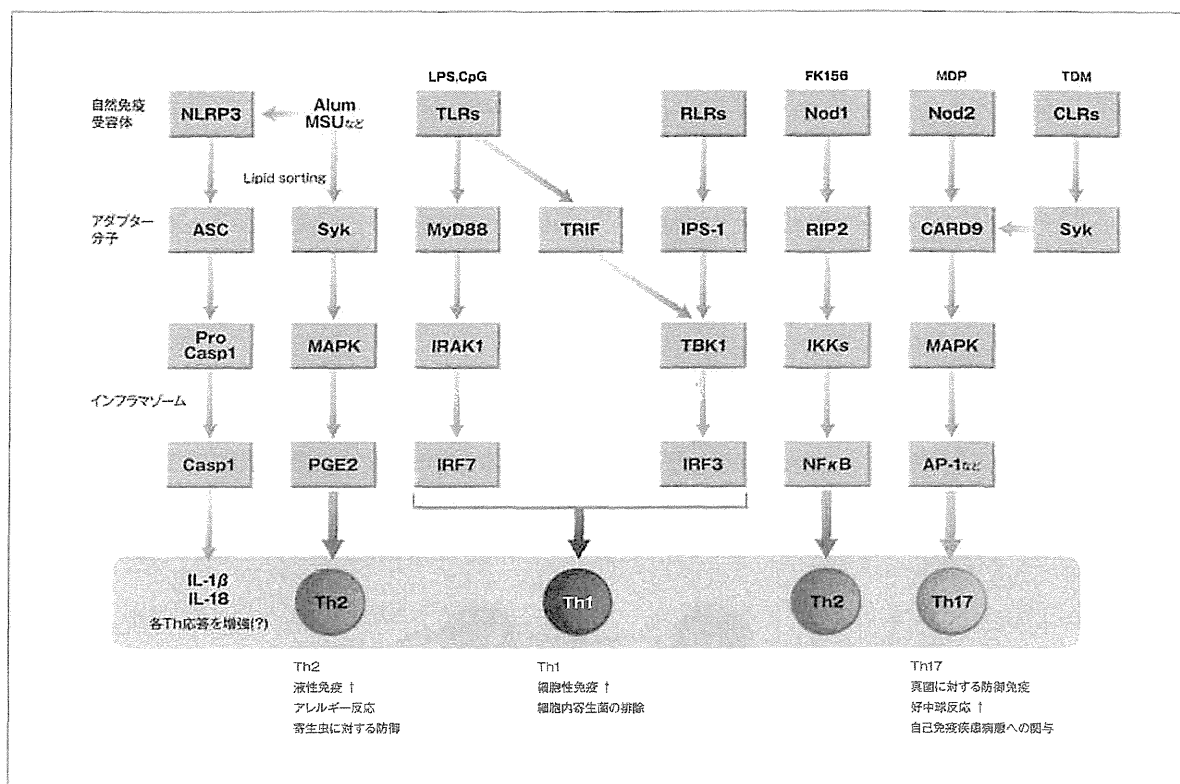


図2 自然免疫シグナルと Th 細胞分化

誘導し MAPK (p38) 経路で PGE2 産生を起こすことが報告された²⁰⁾。数年前に Alum の Th2 誘導アジュバント効果が NLRP3 に依存するという報告²¹⁾があり注目を集めたが、現在は NLRP3 非依存的な Syk/MAPK/PGE2 を介した経路が Th2 誘導により重要な役割を果たしていると考えられている^{20,22,23)}。Th2 タイプの免疫応答は IL-4, IL-5, IL-13 などのサイトカインを特徴的に産生する CD4T 細胞からなり、主に抗体産生による液性免疫反応を促すことで、腸管寄生虫感染防御に関わると同時に IgE 高値や好酸球浸潤を伴うアレルギー反応に関与している。

また、近年 TLR とは異なるシグナル伝達経路をもつ宿主細胞形質膜に存在する自然免疫受容体として CLR が注目されている²⁴⁻²⁷⁾。CLR には dectin-1 や mincle などが含まれ、それぞれ ITAM モチーフおよび FcRγ を介して Syk を活性化し、CARD9/

MAPK 経路で Th17 を誘導することが知られるようになった²⁸⁻³⁰⁾。Th17 は Th1, Th2 とは異なる機能的役割を果たす CD4T 細胞サブセットであり、カンジダ症などの真菌感染やリウマチのような自己免疫疾患に関与することが報告され近年注目を集めている³¹⁾。

Th1, Th2, Th17 などの CD4T 細胞サブセット分化は、それぞれの CD4T 細胞サブセットに特徴的なサイトカインが自身の分化を促進すると同時に他の CD4T 細胞サブセットへの分化を抑制することが知られている³²⁾。また NLRP3 に代表される ASC/inflammasome/caspase-1 による IL-1β や IL-18 の産生は、Th1, Th2, Th17 などのエフェクター細胞に分化途中の CD4T 細胞がさらされるサイトカインとの組み合わせによってはそれぞれの Th 細胞の分化や活性化を増強する役割も果たすことが報告されている³³⁻³⁵⁾。

樹状細胞サブセット

これまで樹状細胞としてひとくりに記述してきた樹状細胞にも複数のサブセットが存在している³⁶⁻³⁸⁾。樹状細胞は特にマウスでの知見を基に conventional 樹状細胞 (cDC) と形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC; pDC) の二つに大きく分類され、cDC はさらに細胞表面に CD8 α を発現する CD8 α 陽性樹状細胞と CD8 α を発現せず CD4 や DCIR2 を発現する樹状細胞に分かれている。これらの樹状細胞サブセットの造血幹細胞からの細かい分化経路も明らかになってきている^{39,40)} (図 3)。造血幹細胞から

は大きく骨髓系幹細胞とリンパ球系幹細胞に分かれるが、樹状細胞は骨髓系幹細胞に由来し cDC, pDC 共に common DC progenitor (CDP) と呼ばれる共通前駆細胞から由来し、cDC や pDC への分化には Flt3L が必要であることが知られている。また、従来の骨髓細胞から GM-CSF によって分化誘導された樹状細胞は、現在では inflammatory DC と呼ばれる単核球 (monocyte) に由来する炎症性樹状細胞に相当すると考えられている。このような樹状細胞サブセットは単に細胞表面の発現マーカーが異なるだけでなく、機能的にもそれぞれ特徴を有している (表 2)。CD8 α 陽性樹状細胞は TLR3 や Clec9A

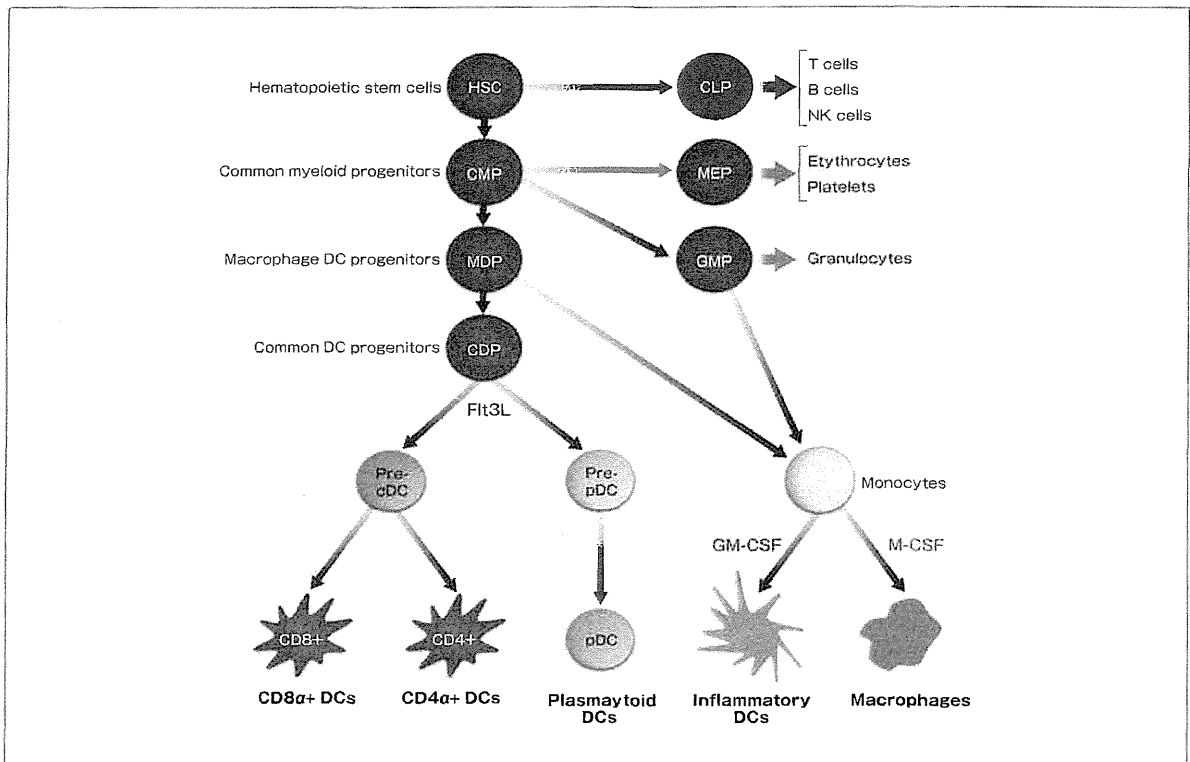


図 3 造血幹細胞からの樹状細胞サブセット分化

DC サブセット	CD8 α + DCs	CD4+DCs	pDCs
表面マーカー	CD11c+, CD11b-, CD8 α +	CD11c+, CD11b+, CD8 α -	CD11cint, CD11b-, B220+, Siglec-H+, BST2+
サイトカイン	IL-12p70		IFN- α
T 細胞応答	CD8 > CD4	CD4 > CD8	Th1 or Treg
特徴的な自然免疫レセプター	TLR3, Clec9A(DNGR-1)		TLR7, TLR9

表 2 樹状細胞サブセットと免疫応答

を発現しており、抗原由来ペプチドを MHC-I に提示するための TAP などの分子を他の樹状細胞よりも多く発現しており、実際に CD4T 細胞よりも CD8T 細胞に抗原を提示しやすいことが知られている⁴¹⁾。逆に CD4 陽性樹状細胞は MHC-II による抗原提示に優れ CD4T 細胞の活性化をより誘導する⁴¹⁾。pDC は TLR7 や TLR9 を発現し、これらの刺激に対して大量の IFN- α を産生する。IFN- α は強力な抗ウイルス作用をもつサイトカインでウイルス増殖を抑制する。pDC が cDC のような抗原提示を行うかどうかは様々な報告があるが、少なくとも *in vitro* ではあまり T 細胞に対する抗原提示には優れていないとの報告が多い^{42,43)}。また、pDC は Treg を誘導して免疫寛容に関与しているとの報告もある^{44,45)}。Inflammatory DC は、炎症に伴って 2 次的に遊走し集積する単核球が様々な炎症に伴うサイトカインによって樹状細胞に分化した細胞と考えられ、cDC によって引き起こされた CD4 および CD8T 細胞応答をさらに増強していると考えられている⁴⁶⁾。Inflammatory DC における機能的サブセットは今後の研究課題である。また、これまで述べてきたこれらの樹状細胞サブセットは、マウスだけでなくヒトにもほぼ同様の樹状細胞サブセットが存在することが明らかになっている。しかしながら、これら樹状細胞が発現する TLR などの自然免疫受容体はヒトとマウスでやや異なることが知られており、様々なアジュバントの効果をマウスからヒトへと適応使用とする際には注意が必要である⁴⁷⁾。

本稿では、基礎免疫学の視点から、自然免疫、獲得免疫、アジュバントによる獲得免疫の増強および方向付け、それらにおける樹状細胞の役割などを概説してきたが、現在も未だその全容は明らかになっているとは言いがたく、今後さらなる研究が必要と考えられる。

現在日本国内で臨床使用されているアジュバントとしては表 3 に示したようなものがあるが、その多くはアルミニウム塩あるいはスクアレンを主体とした Oil-in-water アジュバントである。アルミニウム塩や Oil アジュバントは単独では Th2 タイプの免疫応答を誘導しやすいことが知られており、その意味で、現在実際に使用されているワクチンアジュバントによる免疫応答は Th2 反応あるいは Th2 と Th1 の混合反応となっていると考えられる。これまで見てきたように、病態によっては Th2 反応よりも Th1 反応の方が望ましいと考えられるものも数多く存在し、現在使用可能なワクチンアジュバントはそれらの要請には十分に答えていない。対して、代表的な研究開発中のアジュバントとしては、表 4 に示したように、PolyI:C、Imiquimod、CpG^{48,49)} などのように TLR を刺激して Th1 応答を誘導可能なものが多い。しかしながら、TLR 刺激は SLE などの自己免疫疾患病態にも密接な関連が指摘され、TLR 刺激作用をもつアジュバントは潜在的に自己免疫疾患を誘発する可能性を有してお

アジュバント名	主要な成分	使用されているワクチン	自然免疫受容体・シグナル分子	誘導される獲得免疫
Alum	アルミニウム塩 (水酸化アルミニウムなど)	B型肝炎ワクチン、 破傷風、DT、DTP	NLRP3 inflammasome (?) Syk → MAPK → PGE2	抗体、Th2
AS04	Alum + MPL (3-O-desacyl-4'- monophosphoryl lipid A)	子宮頸がんワクチン (サーバリックス; GSK)	MPL → TLR4 → TRIF NLRP3 inflammasome (?)	抗体、Th1
MF59	Squalene (oil-in-water emulsion)	H1N1 インフルエンザワクチン (CELTURA; ノバルティス) * 特例承認	ASC (?)	抗体、Th2/Th1
AS03	Squalene + DL- α -tocopherol (oil-in-water emulsion)	H1N1 インフルエンザワクチン (アレバンリックス; GSK) * 特例承認	不明	抗体、Th2/Th1

表 3 臨床使用されているアジュバント

り、その臨床応用については、慎重に安全性を見極める必要がある³⁰⁾。

副反応を極力抑えながらも十分なワクチン効果をもつ次世代ワクチンの開発の一つの鍵は、作用機序に基づいて、ワクチン抗原およびアジュバントを適

切な樹状細胞サブセットにより選択的にデリバリーし、その対象疾患・病態に適した Th タイプの獲得免疫応答を誘導することにあると考えられる。今後の免疫学知識に裏付けられた次世代ワクチン開発の進展には DDS が不可欠と思われる。

アジュバント	成分	自然免疫受容体・シグナル分子	誘導される獲得免疫
Poly I:C	Synthetic dsRNA analogue	TLR3 MDA5	抗体, Th1, CD8
Flagellin	Flagellin	TLR5	抗体, Th1 or Th2
Imiquimods	Synthetic ssRNA analogue	TLR7, TLR8	抗体, Th1, CD8
CpG	Synthetic CpG-ODNs	TLR9	抗体, Th1, CD8
QS-21	Saponin	不明	抗体, Th1, Th2, CD8
TDM	Trehalose dimycolate	Mincle	抗体, Th1, Th17
Curdian	β 1,3-glucan	Dectin-1	抗体, Th1, Th17, CD8
Hemozoin	β -hematin crystals	MyD88	抗体, Th1 or Th2

表 4 代表的な研究開発中のアジュバント

文献

- Rappuoli R, Mandl CW, Black S, et al.: Vaccines for the twenty-first century society. *Nat Rev Immunol*, 11: 865-872, 2011.
- Perrie Y, Mohammed AR, Kirby DJ, et al.: Vaccine adjuvant systems: Enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *International Journal of Pharmaceutics*, 364: 272-280, 2008.
- Guy B: The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat. Rev. Microbiol*, 5: 505-517, 2007.
- Joffre O, Nolte MA, Sporri R, et al.: Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunological Reviews*, 227: 231-247, 2009.
- Sporri R and Sousa CRE: Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4(+) T cell populations lacking helper function. *Nature Immunology*, 6: 163-170, 2005.
- Kratky W, Sousa CRE, Oxenius A, et al.: Direct activation of antigen-presenting cells is required for CD8(+) T-cell priming and tumor vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 17414-17419, 2011.
- Akira S, Uematsu S, and Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124: 783-801, 2006.
- Kawai T and Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11: 373-384, 2010.
- Mills KH: TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 11: 807-822, 2011.
- Kawai T and Akira S: The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology*, 21: 317-337, 2009.
- Zhu JF and Paul WE: Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Research*, 20: 4-12, 2010.
- Akira S and Takeda K: Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4: 499-511, 2004.
- Yoneyama M and Fujita T: RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunological Reviews*, 227: 54-65, 2009.
- Franchi L, Warner N, Viani K, et al.: Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunological Reviews*, 227: 106-128, 2009.
- Lamkanfi M, Walle LV, and Kanneganti TD: Deregulated inflammasome signaling in disease. *Immunol Rev*, 243: 163-173, 2011.
- Schroder K and Tschopp J: The Inflammasomes. *Cell*, 140: 821-832, 2010.
- Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, et al.: Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity*, 26: 445-459, 2007.
- Manni M, Ding W, Stohl LL, et al.: Muramyl dipeptide induces Th17 polarization through activation of endothelial cells. *J Immunol*, 186: 3356-3363, 2011.
- van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, et al.: Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity*, 27: 660-669, 2007.
- Kuroda E, Ishii KJ, Uematsu S, et al.: Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms. *Immunity*, 34: 514-526, 2011.
- Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, et al.: Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*, 453: 1122-1126, 2008.
- Pelka K and Latz E: Getting closer to the dirty little secret. *Immunity*, 34: 455-458, 2011.
- Kool M, Willart MA, van Nimwegen M, et al.: An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma. *Immunity*, 34: 527-540, 2011.
- Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, et al.: Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol*, 7: 1258-1265, 2006.

- 25) Lang R, Schoenen H, and Desel C: Targeting Syk-Card9-activating C-type lectin receptors by vaccine adjuvants: findings, implications and open questions. *Immunobiology*, 216: 1184-1191, 2011.
- 26) Geijtenbeek TB and Gringhuis SI: Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9: 465-479, 2009.
- 27) Osorio F and Reis e Sousa C: Myeloid C-type lectin receptors in pathogen recognition and host defense. *Immunity*, 34: 651-664, 2011.
- 28) LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, et al.: Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol*, 8: 630-638, 2007.
- 29) Schoenen H, Bodendorfer B, Hitchens K, et al.: Cutting edge: Mincle is essential for recognition and adjuvanticity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. *J Immunol*, 184: 2756-2760, 2010.
- 30) Agrawal S, Gupta S, and Agrawal A: Human dendritic cells activated via dectin-1 are efficient at priming Th17, cytotoxic CD8 T and B cell responses. *Plos One*, 5: e13418, 2010.
- 31) Crome SQ, Wang AY, and Levings MK: Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol*, 159: 109-119, 2010.
- 32) Zhu J and Paul WE: Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev*, 238: 247-262, 2010.
- 33) Ben-Sasson SZ, Caucheteux S, Crank M, et al.: IL-1 acts on T cells to enhance the magnitude of in vivo immune responses. *Cytokine*, 56: 122-125, 2011.
- 34) Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, et al.: Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*, 30: 576-587, 2009.
- 35) Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, et al.: Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev*, 12: 53-72, 2001.
- 36) Pulendran B, Tang H, and Denning TL: Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. *Current Opinion in Immunology*, 20: 61-67, 2008.
- 37) Coquerelle C and Moser M: DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunological Reviews*, 234: 317-334, 2010.
- 38) Helft J, Ginhoux F, Bogunovic M, et al.: Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunological Reviews*, 234: 55-75, 2010.
- 39) Schmid MA, Kingston D, Boddupalli S, et al.: Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment. *Immunol Rev*, 234: 32-44, 2010.
- 40) Satpathy AT, Murphy KM, and Kc W: Transcription factor networks in dendritic cell development. *Semin Immunol*, 23: 388-397, 2011.
- 41) Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, et al.: Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science*, 315: 107-111, 2007.
- 42) Colonna M, Trinchieri G, and Liu YJ: Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol*, 5: 1219-1226, 2004.
- 43) Villadangos JA and Young L: Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*, 29: 352-361, 2008.
- 44) Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, et al.: Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 173: 4433-4442, 2004.
- 45) Matta BM, Castellaneta A, and Thomson AW: Tolerogenic plasmacytoid DC. *Eur J Immunol*, 40: 2667-2676, 2010.
- 46) Dominguez PM and Ardavin C: Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunological Reviews*, 234: 90-104, 2010.
- 47) Mestas J and Hughes CC: Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, 172: 2731-2738, 2004.
- 48) Klinman DM: Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol*, 4: 249-258, 2004.
- 49) Vollmer J and Krieg AM: Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv Drug Deliv Rev*, 61: 195-204, 2009.
- 50) Krieg AM and Vollmer J: Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunol Rev*, 220: 251-269, 2007.

II. ワクチン基礎研究の最新動向と展望

ワクチンアジュバント

青枝大貴^{1,2} 石井 健^{1,2}

Vaccine adjuvant

^{1,2}Taiki Aoshi, ^{1,2}Ken J. Ishii¹Laboratory of Adjuvant Innovation, National Institute of Biomedical Innovation²Laboratory of Vaccine Science, Immunology Frontier Research Center,
Osaka University

Abstract

Inducing adaptive immune responses with vaccination requires prior innate immune responses. Adjuvants have been used empirically to enhance and modulate the adaptive immune responses elicited by the vaccination. Advances in the innate immune system revealed that many adjuvants act through the innate immune receptors including TLRs, NLRs, RLRs, and CLRs. Recently it has been shown that some particulate adjuvants directly activate dendritic cells in a receptor-independent manner. In this review, we discuss how adjuvants activate dendritic cells, directing adaptive immune responses to Th1, Th2, and Th17 cells. We also discuss a differential requirement of adjuvant between priming and boosting administration of vaccine, and appropriate use of adjuvants to reduce the side effect of vaccine.

Key words: vaccine, adjuvant, antigen presentation, innate immunity, adaptive immunity

1. ワクチンアジュバントの現状

アジュバント(adjuvant)はワクチンの効果を増強し方向付けする物質の総称でラテン語の *adjuvare* (=to help) に由来する。現在、臨床使用されているアジュバントとしては、表1のようなものがある。水酸化アルミニウム(alum)はヒトで最もよく用いられているアジュバントで、市販の国産ワクチンではB型肝炎ワクチンやDPTワクチンに添加されている。またグラ

クソスミスクライン社(GSK)のヒトパピローマウイルス(HPV)による子宮頸癌予防ワクチンサーバリックス(Cervarix)にもAS04³⁾としてalumが用いられている。他方alumに代わるものとしては、oil-in-waterエマルジョンが臨床使用されており、2009年の新型インフルエンザ(H1N1pdm)流行に際して特例承認された輸入インフルエンザワクチンCeltura(ノバルティスファーマ)やアレパンリックス(Arepanrix: GSK)には、それぞれMF59²⁾やAS03³⁾としてス

¹独立行政法人医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクト ²大阪大学免疫学フロンティア研究センター ワクチン学

表 1 臨床使用されているアジュバント

アジュバント	主要な成分	使用されているワクチン	自然免疫受容体・シグナル分子	誘導される獲得免疫
alum	アルミニウム塩 (水酸化アルミニウムなど)	B型肝炎ワクチン, 破傷風, DT, DTP	NLRP3(?) lipid sorting and Syk ¹⁰	抗体, Th2
AS04	alum+MPL(3-O-desacyl- 4'-monophosphoryl lipid A)	子宮頸癌ワクチン (サーバリックス: GSK)	MPL→TLR4 alum→inflammasome(?)	抗体, Th2
MF59	squalene (oil-in-water emulsion)	H1N1 インフルエンザワクチン (Celtura: ノバルティスファーマ)	ASC ¹¹⁾	抗体, Th2
AS03	squalene+DL- α -tocopherol (oil-in-water emulsion)	H1N1 インフルエンザワクチン (アレバリックス: GSK)	不明	抗体, Th2

表 2 研究使用されているアジュバント

アジュバント	主要な成分	自然免疫受容体・シグナル分子	誘導される獲得免疫
IFA	mineral or paraffin oil (water-in-oil emulsion)	NOD2 ¹²⁾	抗体, Th2
CFA	IFA+結核菌成分 (water-in-oil emulsion)	NLR, inflammasome, mincle, TLR?	抗体, Th1, Th17, CD8
poly I:C	synthetic dsRNA analogue	TLR3, MDA5	抗体, Th1, CD8
flagellin	flagellin	TLR5	抗体, Th1 or Th2
imiquimods	synthetic ssRNA analogue	TLR7, TLR8	抗体, Th1, CD8
CpG	synthetic CpG-ODNs	TLR9	抗体, Th1, CD8
QS-21	saponin	不明	抗体, Th1, Th2, CD8
TDM	trehalose dimycolate	mincle ¹³⁾	抗体, Th1, Th17
curdlan	β 1,3-glucan	dectin-1	抗体, Th1, Th17, CD8
hemozoin	β -hematin crystals	MyD88	抗体, Th1 or Th2

クアレンを主体とする oil-in-water エマルジョンが使用されている。これら以外にも多数のアジュバントが研究開発されているが(表 2), まだ広く臨床に用いられるには至っていない。個々のアジュバントの詳細については, 優れた総説⁴⁻⁶⁾を参照されたい。

2. アジュバントと獲得免疫誘導

これまで全く曝露されたことのない病原体に対して, ワクチンによって獲得免疫を誘導するには, ワクチン抗原となるタンパク質とともにアジュバントの添加が必須である。ワクチンにおける獲得免疫誘導を図 1 に示す。獲得免疫反応は, 抗原を取り込み, また各種の自然

免疫受容体を介して活性化した主に樹状細胞 (dendritic cell: DC) からなる抗原提示細胞が MHC 上に抗原由来のペプチドを提示し, それを T 細胞が TCR を介して認識することで開始される。T 細胞の活性化には MHC-peptide/TCR による signal-1 と B7/CD28 による signal-2 の両方が必要であり, signal-1 のみではアナジーマまたはトレランスと呼ばれる免疫寛容が誘導されることが知られている。ワクチンでは, ワクチン抗原を DC に標的することによって signal-1 を, アジュバントによって DC を活性化することで signal-2 をそれぞれ T 細胞に送ることが重要である。また広い意味では signal-2 は活性化した DC 上の補助刺激分子群

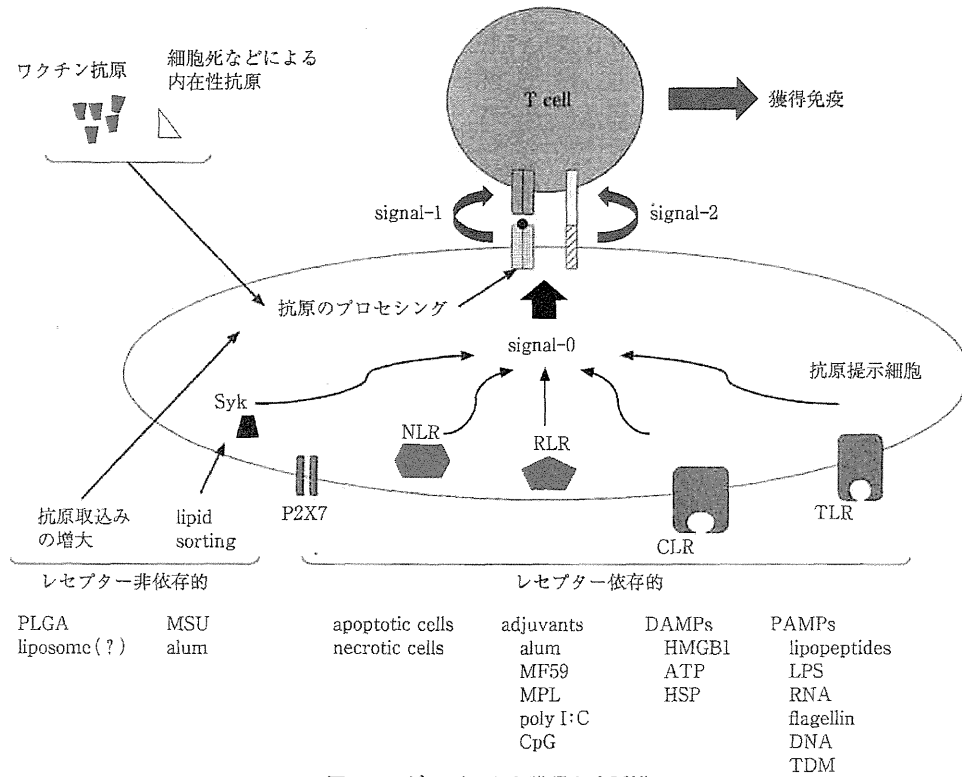


図1 アジュバントと獲得免疫誘導

(costimulatory molecules)だけでなく周囲の細胞あるいはDC自身によって産生されるサイトカイン(IFN- γ , IL-12, IL-4, IFN-Iなど)も含めて考えることができ, signal-2の強さや種類がその後のT細胞応答の方向付け(Th1, Th2, Th17, CTLなど)に少なくない影響を及ぼすことも知られている(表3). このような意味でDCは獲得免疫誘導を起こすか起こさないか(self or non-self), また起こすとしたらどのような免疫応答か(direction of immune responses)の2つを決定する要となっている. DCは微生物や組織損傷を認識する様々な自然免疫レセプター(TLR, CLR, RLR, NLRなど)を発現しており, それらが pathogen associated molecular patterns(PAMPs)や damage associated molecular patterns(DAMPs)⁹⁾として知られるモチーフを認識してDCの活性化を引

き起こす(図1). また最近これら自然免疫レセプターを介さず, DCの細胞膜脂質を直接活性化する機構も報告された⁹⁾. この機構はlipid sorting⁹⁾と呼ばれ, alumや monosodium urate (MSU)などの粒子状物質が細胞膜に接触してコレステロールを主体とする膜脂質の凝集を起こすことで, lipid raftに存在するITAMモチーフをもつシグナル分子の活性化に続きSykキナーゼを介した細胞内シグナルカスケードの活性化が起こる(図1). このような複数の受容体依存的・非依存的なDC活性化刺激がsignal-0^{4,10,11)}として統合され, signal-1およびsignal-2の両方を増強し, T細胞活性化による獲得免疫応答に至る. そのような意味で, DCにsignal-0を誘導する物質はすべてワクチンアジュバントとして機能する可能性があり, 現在知られているアジュバント物質のほとんどはsignal-0を送

表3 アジュバントと免疫応答

<ul style="list-style-type: none"> ・ 自然免疫受容体依存的 <ul style="list-style-type: none"> TLR→Myd88/trif→IFN-α/β, IL-12→Th1 response RLR→IPS-1→IFN-β→Th1 response NLR→ASC→inflammasome activation→IL-1→inflammation, Th2 response(?) CLR→CARD9→IL-23→Th17 response²⁰⁾ ・ 受容体非依存的(alum, MSU, liposome, PLGA など) <ul style="list-style-type: none"> depot effect <ul style="list-style-type: none"> 局所で炎症の持続 炎症性細胞の集積 抗原取り込みの増加 抗原の slow release Syk activation→Th2(?)
--

表4 樹状細胞サブセットと免疫応答

DC サブセット	CD8 α ⁺ DCs	CD8 α ⁻ DCs	pDCs
表面マーカー	CD11c ⁺ , CD11b ⁻ , CD8 α ⁺	CD11c ⁺ , CD11b ⁺ , CD8 α ⁻	CD11c ^{int} , CD11b ⁻ , B220 ⁺ , Siglec-H ⁺ , BST2 ⁺
サイトカイン	IL-12p70		IFN- α
T細胞応答	CD8>CD4	CD4>CD8	Th1 or Treg
特徴的な自然免疫レセプター	TLR3, Clec9A		TLR7, TLR9

る物質として理解されている。

3. 樹状細胞サブセットとワクチン

DCには少なくとも3種類のサブセットがマウスで知られる^{12,13)}(表4)。CD8 α ⁺ DCはcross-presentationによるCD8T細胞応答を、CD8 α ⁻ DCはCD4T細胞応答をより誘導しやすいことが知られている¹⁴⁾。また形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cell: pDC)は大量のIFN- α を産生しウイルス排除や獲得免疫誘導に重要な役割を果たしている。今後、詳細な検討が必要だが、ヒトでもほぼ同様のDCサブセットの存在が示されている¹⁵⁾。生体の示す免疫応答は非常に多様であるが、この多様性の一部は、生体に存在する複数の機能的に異なるDCサブセットとそれらが発現する自然免疫レセプターの組み合わせによって由来すると考えられ(表3, 4)、ワクチン免疫において、適切な免疫応答を誘導するためには、抗原とアジュバントをそれぞれのワクチンに適したDCサブセットと自

然免疫レセプターに標的させることが重要である。

4. アジュバントの必要性

ここでは不活化インフルエンザワクチンを例に、実際のワクチンでアジュバント、自然免疫反応、獲得免疫反応がお互いにどのような関係になっているのかをマウスでの実験結果を含めて概説する¹⁶⁾。不活化インフルエンザワクチンにはHAワクチン(スプリットワクチン)と全粒子ワクチンの2種類がある。季節性インフルエンザ(H1N1, H3N2)に対してはHAワクチンが用いられ、ヒトでの流行が危惧されているH5N1型インフルエンザに対しては全粒子ワクチンの準備が進められている。HAワクチンはインフルエンザウイルスをエーテルなどで処理してウイルス粒子を破碎した後、HAタンパク質を高度に精製したもので、ウイルス由来の核酸や脂質などの成分はほとんど含まれていない。それに対して全粒子ワクチンは、インフルエン

表5 マウスでの致死性インフルエンザに対する生存率

	B6 WT マウス	TLR7-KO マウス
HA ワクチン免疫群 (抗原のみ)	0%	0%
全粒子ワクチン免疫群 (抗原+アジュバント)	90%	0%

ザウイルスのウイルス粒子をそのままホルマリ
ンで固定したもので、HA 抗原だけでなくウイル
スゲノム由来の一本鎖 RNA も含んだウイル
ス粒子をワクチンとして用いている。一本鎖
RNA は自然免疫受容体のうちの TLR7 を介して
認識されアジュバントとして働くため、全粒子
ワクチンはそれ自身でアジュバント添加ワクチ
ンとして機能し、HA ワクチンは抗原のみのワ
クチンとして機能する。

HA ワクチンと全粒子ワクチンをそれぞれマ
ウスに免疫した場合、全粒子ワクチンで免疫し
た群では、致死量のインフルエンザウイルスに
対して感染防御が成立するが、HA ワクチン群
では成立しない。また、TLR7 遺伝子欠損マ
ウスを用いて同様の実験を行うと、TLR7 遺伝子
欠損マウスでは、全粒子ワクチンを用いても感
染防御免疫を誘導しない(表5)。更に、マウス
をこれらのワクチンで免疫する際に、TLR7 依
存的に一本鎖 RNA を認識し大量の IFN- β を産
生する pDC をデブリーション抗体で1回目あ
るいは2回目の免疫時に取り除くと、1回目の
免疫時に pDC を除いたマウスでは、獲得免疫
が誘導されないのに対して、2回目の免疫時に
pDC を除いたマウスでは、獲得免疫が誘導され
た。このことは、ワクチンで獲得免疫応答を誘
導するには、初回免疫時の自然免疫反応は必須
だが、それ以降の自然免疫反応は必ずしも必要
ではないことを示唆している。

現行の HA ワクチンには、自然免疫を活性化
する成分はほとんど含まれていないにもかかわらず、
公衆衛生の観点から一定程度の有効性が
確認されている。このことは、上に挙げたマウ
スでの実験結果と相反するようであるが、実験

動物モデルとしてのマウスは完全に‘ナイーブ’
で免疫以前に全くインフルエンザに曝露される
ことはなく、そのためアジュバントによる自然
免疫活性化が防御的な獲得免疫応答の誘導に必
須であるが、ヒトの場合は、ほとんどの人が顕
性・不顕性を問わず過去に何らかの形でインフ
ルエンザウイルスに曝露されており、既にイン
フルエンザウイルスに対するメモリー T 細胞・
B 細胞が準備されている。そのためアジュバン
トを含まない HA ワクチンであっても、ヒトで
は十分なブースト効果が発揮できる。

5. アジュバントと副反応

これまで見てきたように、アジュバントは
signal-0 を送ることでナイーブな免疫細胞にそ
の抗原が‘non-self’であることを教え、獲得免
疫応答を成立させる役割を果たすが、アジュバ
ントによる signal-0 は炎症反応を惹起し、それ
がワクチン投与による発熱・発赤などの副反応
の原因の一部ともなっている。先に述べたイン
フルエンザ全粒子ワクチンも、1970 年頃まで
日本でも臨床使用されていたが、効果が高い反
面、発熱などの副反応が高頻度に認められたこ
とで、現行の HA ワクチンに切り替えられた経
緯が存在する。今後の研究で自然免疫による炎
症誘導と獲得免疫誘導の詳細が明らかになれば、
副反応がほとんどなくかつ免疫効果の高いワク
チンの実現が可能になると信じているが、現時
点ではワクチンの効果を犠牲にせず副反応をす
べて取り除くことは難しいといわざるを得ない。
インフルエンザワクチンの例でも見たように、
宿主にとって全く未知の抗原に対して獲得免疫
を誘導するには、アジュバントによる自然免疫
反応は必須であるが、既に存在している記憶免
疫を再活性化するにはアジュバントは必ずし
も必要ではない。ワクチンに対するアジュバン
トの添加は、ワクチン効果を高めると同時に常
に一定程度の自己免疫やアレルギーなどのリス
クを伴い、目的に合わせて適切な選択が必要で
ある。

6. 今後の展望

アジュバントは病原体感染における signal-0 を人工的に補い、ワクチンによって誘導される獲得免疫の性質を方向付ける役割を果たしている。近年の目覚ましい自然免疫学の進展は、signal-0 のワクチンにおける重要性を示している。多くの微生物感染においては、signal-0 として複数の PAMPs あるいは DAMPs が同時にそれぞれのシグナルを活性化し、ある組み合わせでは防御的な獲得免疫が促進され、また他の組み合わせではお互いのシグナルが抑制しあい感染防御に適切な免疫誘導が妨げられることも起こりうる。実際にウイルスはサイトカインなどを模倣した様々な免疫抑制分子で宿主の免疫

から免れていることが知られている。多くの自然免疫受容体が同定され個々の PAMPs/DAMPs によるシグナルとその獲得免疫に対する影響に対する理解は格段に進展したが、多様な自然免疫シグナル間のクロストークについては、不明な部分も多い。安全性と有効性をともに兼ね備えたワクチンの開発には、それぞれの標的疾患に対して最も適切な signal-0 を理解し、その誘導を実現できるアジュバントの開発が必須である。近年の免疫学・ワクチン学・アジュバント学の進展は、科学的な根拠に基づいたより安全で有効な次世代ワクチン開発の可能性を示しており、今後の更なる研究でその実現が期待される¹⁷⁻²⁰⁾。

■ 文 献

- 1) Didiclaurent AM, et al: AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol* **183**: 6186-6197, 2009.
- 2) Schultze V, et al: Safety of MF 59(TM) adjuvant. *Vaccine* **26**: 3209-3222, 2008.
- 3) Roman F, et al: Immunogenicity and safety in adults of one dose of influenza A H1N1v 2009 vaccine formulated with and without AS03(A)-adjuvant: Preliminary report of an observer-blind, randomised trial. *Vaccine* **28**: 1740-1745, 2010.
- 4) Reed SG, et al: New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* **30**: 23-32, 2009.
- 5) Gupta RK, Siber GR: Adjuvants for human vaccines—current status, problems and future—prospects. *Vaccine* **13**: 1263-1276, 1995.
- 6) Coffman RL, et al: Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* **33**: 492-503, 2010.
- 7) Bianchi ME: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* **81**: 1-5, 2007.
- 8) Flach TL, et al: Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvant activity. *Nat Med* **17**: 479-487, 2011.
- 9) Shi Y, et al: Monosodium urate crystals in inflammation and immunity. *Immunol Rev* **233**: 203-217, 2010.
- 10) Guy B: The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol* **5**: 505-517, 2007.
- 11) Perrie Y, et al: Vaccine adjuvant systems: Enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *Int J Pharm* **364**: 272-280, 2008.
- 12) Pulendran B, et al: Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* **20**: 61-67, 2008.
- 13) Coquerelle C, Moser M: DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol Rev* **234**: 317-334, 2010.
- 14) Dudziak D, et al: Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* **315**: 107-111, 2007.

- 15) Crozat K, et al: Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. *Immunol Rev* 234: 177-198, 2010.
- 16) Koyama S, et al: Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci Transl Med* 2: 25ra24, 2010.
- 17) Ellebedy AH, et al: Inflammasome-independent role of the apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) in the adjuvant effect of MF59. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 2927-2932, 2011.
- 18) Moreira LO, et al: Modulation of adaptive immunity by different adjuvant-antigen combinations in mice lacking Nod2. *Vaccine* 26: 5808-5813, 2008.
- 19) Schoenen H, et al: Cutting edge: Mincle is essential for recognition and adjuvanticity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. *J Immunol* 184: 2756-2760, 2010.
- 20) Iwakura Y, Ishigame H: The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 116: 1218-1222, 2006.

アジュバントー開発研究の現状と課題

Adjuvant

特集

鉄谷 耕平 石井 健*
TETSUTANI Kohhei ISHII Ken J

VPDを制御するためのわが国の課題 Key words ワクチン アジュバント 薬物輸送系

ワクチンにとってのアジュバント

ラテン語 *Adjuvare* (to help) から *Adjuvant* と名付けられたように、アジュバントはワクチンの免疫原性を増強する物質を指す一般名詞で、表1にみるようにさまざまな物質がある。表2のように、弱毒化生ワクチンのようにアジュバントを含まないワクチンもあり、現在日本で用いられているワクチン商品24種のうちアジュバントを含むものは9種。そのうち古典的なアルミニウム塩がほとんどを占め、その他新規にMF59などの乳化剤アジュバントがある。

ワクチンは、目標とする疾患の原因微生物の全体ないし一部をワクチン抗原として製造される。当該病原体に暴露されたとき速やかに排除して感

染を予防できるように、病原性を持たないように不活化ないし弱毒化した抗原をあらかじめ接種して、体内に抗原特異的な免疫を付与する医薬品である。弱毒化生ワクチンと不活化ワクチンとに大別され、後者はさらに不活化全粒子ワクチン、不活化スプリットワクチン、不活化サブユニットワクチン、遺伝子組み換えタンパクワクチン、DNAワクチンなど、抗原によって区別される。

歴史的にみてワクチンは常に安全というわけでは必ずしもなく、夾雑物の混入や抗原の不十分な不活化などもあって、予防接種禍と呼ばれる医療事故が繰り返して発生した。そのため、より高い安全性を求めて、製造技術の向上とともに、全粒子ワクチンから遺伝子組み換えタンパクを用いたワクチンへと抗原の精製・単純化が進められてきた。

表1 アジュバントの分類

機能	分類	例
抗原輸送	アルミニウム塩	水酸化アルミニウムゲルなど
	乳化アジュバント	CFA, IFA, スクワレン, MF59など
	微粒子アジュバント	リポソーム, PLGAなどのバイオポリマー, ウイルス様粒子, ISCOMなど
	微生物由来物質	鞭毛成分, コレラトキシン・大腸菌易熱性毒素などの毒素, 細胞壁成分など
免疫増強	サイトカイン	IL-2, IL-15, GM-CSFなど
	Costimulatory molecule	CD134など
	核酸	dsDNA, CpG-ODNなど
	他	尿酸, 合成ヘモゾインなど

独立行政法人医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト
プロジェクト研究員 *プロジェクトリーダー

表2 日本医薬品集 2011 (文献16)に収録されているワクチン・トキソイド類における、アジュバント使用

日本標準商品分類	統一名	商品名例(メーカー)	アジュバント
631 ワクチン類	インフルエンザ HA ワクチン	各社20商品	なし
	乳濁 A 型インフルエンザ HA ワクチン	アレバンリックス(GSK)	スクワレン・トコフェロール(AS03)
	乳濁細胞培養 A 型インフルエンザ HA ワクチン	インフルエンザ HA ワクチン(ノバルティス)	スクワレン・スパン85・トウイーン80(MF59)
	破傷風トキソイド結合インフルエンザ菌 b 型多糖	アクトヒブ(サノフィバシ第一三共)	なし
	黄熱ワクチン	黄熱ワクチン(サノフィバシ第一三共)	なし
	乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン	各社3商品	なし
	乾燥組織培養不活化 A 型肝炎ワクチン	エイムゲン(化血研)	なし
	組み換え沈降 B 型肝炎ワクチン	各社4商品	アルミニウム塩
	乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン	組織培養不活化狂犬病ワクチン(化血研)	なし
	コレラワクチン	各社3商品	
	乾燥弱毒生水痘ワクチン	乾燥弱毒生水痘ワクチン(阪大微研)	なし
	日本脳炎ワクチン	各社8商品	なし
	乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン	ジェービック(阪大微研)	なし
	肺炎球菌ワクチン	ニューモバックス NP (万有)	なし
	沈降7価肺炎球菌結合型ワクチン	プレベナー(ファイザー)	リン酸アルミニウム
	乾燥 BCG ワクチン	BCG ワクチン(日本 BCG)	なし
	組み換え沈降2価ヒトパピローマウイルス様粒子ワクチン	サーバリックス(GSK)	MPL, 水酸化アルミニウム(AS04)
	乾燥弱毒生風しんワクチン	各社4商品	なし
	産口生ポリオワクチン	ポリオワクチン(日本ポリオ)	なし
	乾燥弱毒生麻しんワクチン	各社4商品	なし
ワイル病状やみ混合ワクチン	ワイル病状やみ混合ワクチン(デンカ生研)		
632 毒素およびトキソイド類	成人用沈降ジフテリアトキソイド	ジフトキ(阪大微研)	リン酸アルミニウム
	沈降破傷風トキソイド	各社5商品	アルミニウム塩
636 混合生物学的製剤	沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド	各社5商品	アルミニウム塩
	沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン	各社8商品	アルミニウム塩
	乾燥弱毒生麻しん風しん混合ワクチン	各社2商品	なし

しかし、古くは20世紀初頭に開発されたトキソイド、また1980年代の組み換えタンパクを抗原とするワクチンは、接種しても低い抗体価しか示せず、感染防御に十分な免疫を付与することができなかった。それを補うために抗原を沈降・濃縮したり、さまざまな物質を添加するなどが検討され、アジュバントが開発・改良されるきっかけになったとされる。たとえばアルミニウム塩は、ジフテリアトキソイドを沈降させるために添加したミョウバンが原型である。とはいえ、このようにアジュバントは当初経験則によって発見・使用されており、1989年 C. A. Janeway Jr. が“immunologists' dirty little secret”などと呼んだように、アジュバントがどのように効くか詳細に解明されないまま使用されてきた。

機能解析が進んだ現在では、精製されたワクチンが低い免疫原性を示すことについて、病原体由来のさまざまな因子が免疫増強の役割を果たしている、抗原の精製とともにこれらも除去されたためと考えられていて、粗精製だが強力だったワクチンを、“精製抗原+免疫増強アジュバント”として安全に、再構築するワクチンが盛んに設計されている。さらに、それらを効率よく免疫系に提示するワクチン輸送系アジュバントと併用するなど、今後のワクチンにおいてアジュバントはますます重要性を増すと思われる。

アジュバントの機能

薬物輸送(Drug Delivery System)は、とくに

癌治療薬剤において追究されている考え方で、目標臓器あるいは標的病原体に、薬物を効果的かつ集中的に送り込む技術をさし、具体的には、①薬剤を運搬媒体に安定的に封入し、②目標臓器に到達するまでの間生体内での代謝から保護し、③目標部位まで運搬し、④目標部位において薬剤を放出し、⑤薬剤活性を發揮させる技術からなる。

これは、抗癌剤の重大な副作用は癌組織以外の正常な組織にまで薬剤が作用するために起こるので、癌組織のみに薬剤を到達させることができれば、より安全により強力な薬剤を用いることができるという仮説に基づいている。この考え方をワクチンアジュバントに敷衍すると、

①アジュバントと、抗原を組み合わせる製剤化の技術。

②抗原を生体内代謝から保護して長くそのままの形でとどめ、長時間の抗原提示を可能にする depot 効果。

③抗原提示細胞に働きかけ、抗原タンパクの取り込みの効率を上げる。

④抗原提示細胞に働きかけ、エフェクター免疫細胞への抗原提示の効率を上げる。

⑤抗原特異的記憶免疫細胞に働きかけ、これらをより長期間、より高いレベルで保持する。

の段階に分けられよう。そのうち、抗原タンパクとともに生体内でふるまい、上記のうちの②あるいは②～③の機能を示すものを抗原輸送系 antigen delivery system とする。一方、抗原タンパクとは必ずしも同一にふるまわず、たとえばサイトカインのように、免疫細胞を独自に活性化して③～⑤の機能を果たすものを免疫増強物質 immunopotentiator とする。現存するワクチンアジュバントは以下各項で触れるように、抗原輸送あるいは免疫増強のいずれかを主に示すものが知られている(表1)。ただし以下各項でみるように、抗原輸送アジュバントとされているものでも免疫増強効果を持つことが近年明らかにされてきている。

アジュバントの使い方

アジュバントの機能解析が進むにつれ、ワクチンに適したアジュバント機能を選択する研究が盛んになってきている。特徴的なのは、どの免疫賦活アジュバントを用いるかによって、ワクチンが誘導する免疫応答の型が大きく影響を受けることで、微生物由来の自然免疫受容体リガンド Monophospholipid A (MPL) や CpG-oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) などは Th1 型免疫応答を¹⁾、アルミニウム塩は Th2 型免疫応答を誘導すること²⁾が知られている。たとえば、Pollinex[®] Quattro Ragweed という花粉症ワクチンの開発ではこの点に着目して、MPL を花粉抗原とともに投与し、アレルギーを引き起こす病的な Th2 型ではなく、Th1 型免疫応答を生体内で誘導することによって花粉症を予防ないし治療するデザインをとっている。

このように、目的とする免疫応答の型によってアジュバントの選択が本来なのだろうが、実際にアジュバントを単独で用いる場合には、歴史的に最も長く利用され、また安全性が最も強固に担保されているとしてアルミニウム塩が主に選択される。表2にみるようにトキシソイドのすべてと、遺伝子組み換えタンパクを抗原とするワクチンの多くに用いられており、きわめて高い安全性が求められる臨床応用を視野に入れるワクチンでは、アルミニウム塩がまず検討される候補といえよう。ただし、アルミニウム塩は Th2 型免疫応答を主に誘導するため、細胞障害性免疫応答が病原体排除に必要なウイルス性疾患の予防を目的とする場合、高い免疫原性を誘導するために最適なアジュバントとは必ずしも言えない。

そこで、アルミニウム塩を抗原輸送系として用い、免疫増強アジュバントを混合して用いることが行われる。混合アジュバントでは、アルミニウム塩や微粒子アジュバントを抗原輸送系として用い、そこに抗原とさまざまな免疫増強剤を吸着な

いし結合させて付加する。たとえばアルミニウム塩とMPLの混合アジュバントは、ヒトパピローマウイルスワクチンに添加されて臨床使用されている³⁾。

以下、各アジュバントの機能を概観する。

抗原輸送を担うアジュバント

1. アルミニウム塩

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、トキソイド接種量を10分の1に減らしても、沈降前と同程度以上の免疫原性が得られ、著明な免疫賦活効果を示した。アルミニウム塩は1934年ジフテリアトキソイドに添加されて、ヒトに初めて用いられたアジュバントワクチンとなった。

Glennyらは初出論文ですでに、「免疫原性が上昇したのは、沈殿物として接種されたために体内へ取り込まれるスピードが遅くなったためではないか」と、アルミニウム塩によるDepot効果を推測したが、Harrisonが1935年に、アルミニウム添加ジフテリアトキソイド接種7週後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したところ、トキソイド特異的抗体を誘導したとして、アルミニウム塩とともに接種された抗原が接種局所に数週間以上とどまることを示し、depot効果が確認された。

アルミニウム塩アジュバントとして水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムの2種が主に用いられる。水酸化アルミニウムは $\text{AlO}(\text{OH})$ の結晶構造を作り、大きさがnm大の微粒子が合わさって2~20 μm 大の結晶のゲル状となる。一方、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。また、通称アラムはリン酸カリウムアルミニウム $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ である。

いずれも抗原タンパクを強く吸着することができるが、それは静電力、疎水結合と、すべてのアルミニウム塩が共通して表面に持つ水酸基をめぐ

ぐつてのligand exchangeによるものとされ、なかでも静電力による結合がおそらく最も強い。水酸化アルミニウムの等電点は11.4であるが、等電点が7未満である抗原(4.8であるアルブミンなど)は水酸化アルミニウムに吸着されるが、等電点が7未満となる条件下でリン酸アルミニウムには吸着されないなど、抗原や他のアジュバントの条件設定には注意が必要である⁴⁾。

Depot効果がアルミニウム塩のアジュバント機構と考えられていたが近年、免疫増強作用も持つことが明らかになってきた。たとえば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、さらには、自然免疫受容体の1つであるNLRP3と関連して炎症性サイトカイン分泌を促進する⁵⁾ことなどが示されたほか、アルミニウム塩アジュバントはTh2型免疫応答を誘導することが知られている。そのため、有効性についてはジフテリア・破傷風トキソイドの成人に対するブースター接種、インフルエンザHAワクチン、口蹄疫ワクチンにおいて疑問が呈された。

しかしアルミニウム塩の最大の特徴は、前述のとおり臨床使用に際して他のアジュバントよりも安全であることである。高IgE血症を引き起こす、アルミニウム塩を含むワクチンは共通して接種局所の硬結・疼痛・腫脹などを高頻度で引き起こすし、接種部位に肉芽腫形成がしばしば見られるなど、安全面の問題はないわけではないが、それらは必ずしも重症とはならず、現時点では、アルミニウム塩自体に発癌性・催奇形性・発熱性があるという証拠はないことから、「非常に豊富な経験から、ワクチンアジュバントとしてのこのクラスのアジュバントは安全だと結論付けられ⁶⁾」ている。

2. 乳化剤アジュバント

1916年、Le MoignicとPinoyが「油脂ワクチン」として、ワセリンとラノリンを混ぜ合わせた植物