特集：特異抗原をターゲットとした **Immunotherapy**
総　説

新しい結核ワクチンの開発

岡 田 全 司

The development of novel vaccines against Tuberculosis

Masaji OKADA

Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center

(Received August 4, 2008)

summary

We have developed a novel tuberculosis (TB) vaccine ; a combination of the DNA vaccines expressing mycobacterial heat shock protein 65 (HSP65) and interleukin 12 (IL-12) delivered by the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome or-envelope (HSP65 + IL-12/HVJ). This vaccine provided remarkable protective efficacy in mouse and guinea pig models compared to the BCG vaccine, on the basis of an induction of the CD8 positive CTL activity against TB antigens and improvement of the histopathological tuberculosis lesions, respectively. The Elispot assay showed that HSP65 + IL-12 DNA/ HVJ vaccine induced a greater number of IFN-γ producing T cells than BCG in the mouse model. Furthermore, we extended our studies to a cynomolgus monkey model, which is currently the best animal model of human tuberculosis. This novel vaccine provided a higher level of the protective efficacy than BCG based upon the assessment of mortality, the ESR, body weight, chest X-ray findings and immune responses (IFN-γ, IL-2, IL-6 production , and lymphocyte proliferation of cynomolgus monkey). The combination of HSP65 + IL-12/HVJ and BCG by the priming-booster method showed a synergistic effect in the TB-infected cynomolgus monkey (100% survival). In contrast, 33% of monkeys from BCG Tokyo alone group were alive (33% survival). These data indicate that our novel DNA vaccine might be useful against Mycobacterium tuberculosis for human clinical trials.

Key words——Mycobacterium Tuberculosis; HSP65 DNA + IL-12 DNA; Cytotoxic T-cell; Cynomologus monkey; DNA vaccine and recombinant BCG

抄　録

1998 年，米国 CDC 及び ACET は新世代の結核ワクチン開発の必要性を発表した．しかしながら，BCG ワクチン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．我々は BCG を凌駕する強力な結核予防ワクチン（HVJ-エンベロープ（又はリポソーム）/HSP65 + IL-12 DNA ワクチン）を開発した．結核免疫を強く誘導するヒト結核菌由来の HSP65 蛋白をコードする DNA を用いた．プライム・ブースター法を用い，HSP65 DNA + IL-12 DNA（HVJ-エンベロープベクター）のワクチンは BCG よりも 1 万倍強力な結核予防ワクチンであり，CD8 陽性キラー T 細胞の分化，IFN-γ 産生 T 細胞の分化を増強した．肺の結核病理像を改善した．このワクチンは多剤耐性結核菌に対しても治療ワクチン効果を示した．さらに，ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザル（Nature Med. 1996）を用い，このワクチンの強力な有効性を得た．カニクイザルにワクチン接種後ヒト結核菌を経気道投与し，1 年以上経過観察した．免疫反応増強及び胸部 X 線所見・血沈，体重の改善効果が認められた．また，生存率改善・延命効果も認められた．

BCG ワクチン・プライム-DNA ワクチン・ブースター法を用いた群は 100%の生存率を示した．一方，BCG ワクチン単独群は 33%の生存率であった．このワクチンが強力な成人ワクチンとなることが示唆された．

I. 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，最大の感染症の一つである（WHO レポート 2007 年（図 1））[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

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

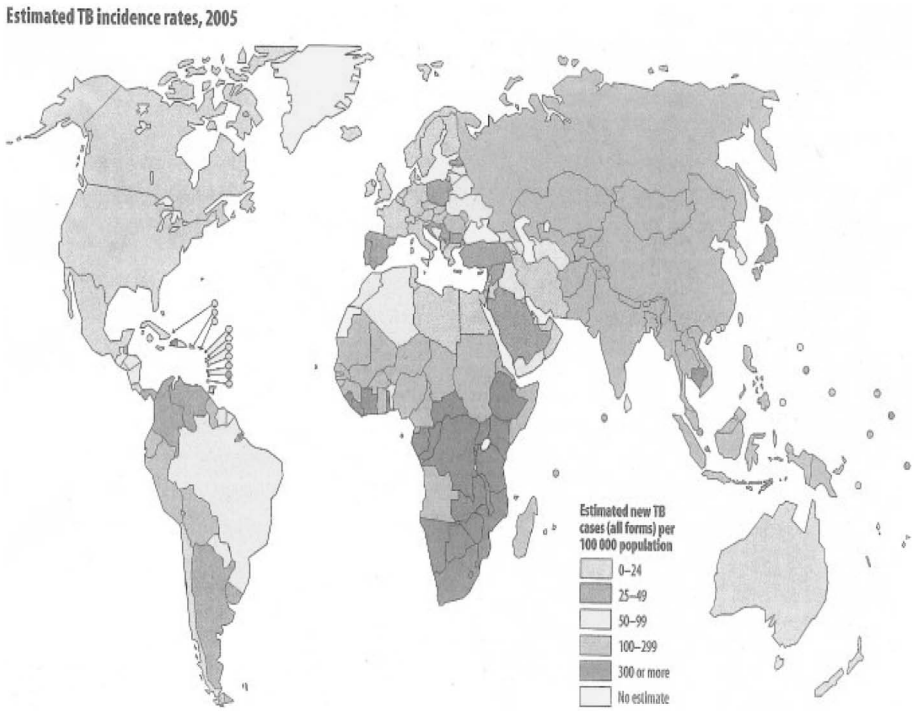


図 1

抵抗性は T 細胞性免疫といって過言ではない．特に獲得免疫（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．又，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．我々は 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 2）[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 の機能解明についても述べる[9,10]．

II. 結核と免疫

1. 自然免疫と結核

1） マクロファージ（Mφ）

結核菌の増殖場所は Mφ 内である．一方，Mφ は異物貪食能と細胞内殺菌能及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．（詳細は岡田結核文献[1,2]参照）

2） Toll-like Receptor 及び Pathogen Recognition Receptor とマクロファージ・樹状細胞活性化

最近発見された Toll-like receptor（TLR）ファミリーが innate immunity の重要な役割を果たしている[11]．

TLR（TLR1～TLR10）はそのリガンドによって大きく 3 つに分類される．

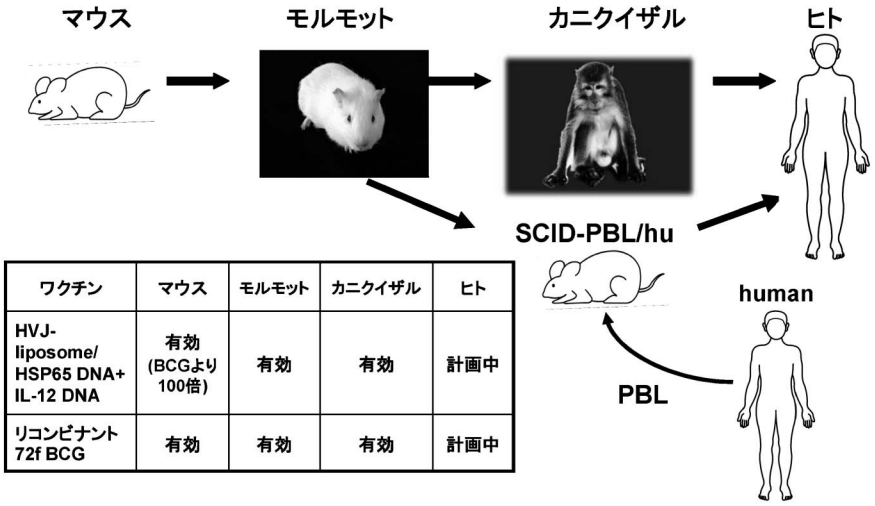
このうち菌体膜由来の糖脂質を認識する TLR としては，TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR9 である．

結核菌の cell wall（LAM, mAGP, total lipid）による応答は TLR2 を介する．一方，結核生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 Mφ 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 Mφ 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－/TLR2 を介して Mφ を活性化する．また，抗酸菌 DNA から見いだされた 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

表1　新しい結核ワクチンの開発

（1）DNA ワクチン	BCG より有効
HV J–liposome/HSP65 DNA＋IL–12 DNA	（マウス，モルモット，カニクイザル）
（2）DNA ワクチン	BCG よりはるかに有効（マウス）
HVJ–エンベロープ/HSP65 DNA＋IL–12 DNA	
（3）リコンビナント BCG ワクチン	BCG より有効
①リコンビナント 72f BCG	（マウス，モルモット，カニクイザル）
②リコンビナント（Ag85A＋85B＋MPB51）BCG	BCG より有効（マウス）
（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（1000 倍発現効率↑），Adenovirus ベクター	
→WHO STOP TB Partnership 及び WHO STOP TB Vaccines Working Group に選出	



ワクチン	マウス	モルモット	カニクイザル	ヒト
HVJ-liposome/ HSP65 DNA+ IL-12 DNA	有効 (BCGより 100倍)	有効	有効	計画中
リコンビナント 72f BCG	有効	有効	有効	計画中

図2　新しい結核ワクチンの開発

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．主に前者は全ての 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 を介したインターフェロン（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（pathogen recognition receptor）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，古くより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．

III. キラー T 細胞と結核免疫

1. キラー T 細胞（CD8⁺T 細胞）

CD8 あるいは β_2 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 3）[3,12～17]．

キラー T の一つの役割として 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 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）等の結核菌 lipid と lipoglycan を認識する．このキラー T の顆粒内の蛋白である granulysin は直接細胞外の結核菌を殺す．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．我々は結核患者，特に多剤耐性結核患者ではキラー T リンパ球の mRNA の発現及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，我々はキラー T 細胞の granulysin（分子量 9000）産生低下が多剤耐性結核発症と大きな関連があるのではないかと考えている．一方，キラー T 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 3）．

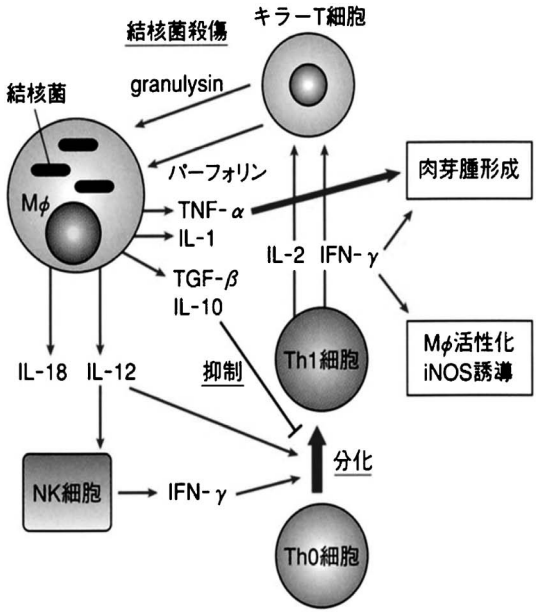


図 3　抗結核免疫とマクロファージ，ヘルパー T，キラー T 細胞活性化

一方，MHC クラス I 拘束性の結核菌の 38 kDa 蛋白，HSP65 蛋白を認識するマウス CD8⁺ キラー T や 19 kDa 蛋白，Ag85, CFP10（Mtb11）を認識するヒト CD8⁺ キラー T が報告されている．ESAT-6 抗原に対するキラー T で HLA-A2 とは 82～90 位の 9 個のアミノ酸 AMASTEGNV，が結合してキラー T 細胞がこれらを認識する．我々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 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（Tc）の誘導にはヘルパー T 細胞（Th 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 Th 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 Th 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 4）．

さらに，IL-2 とは異なるサイトカインも T 細胞分化誘導に必要であることをキラー T 細胞分化因子を産生するヒト T 細胞ハイブリドーマ，および IL-2 依存性ヒト Th クロ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 分化を誘導することを明らかにした[16,17]．筆者らは IL-6 が Tc 誘導の後期の分化段階に作用することを解明した[17]（図 4）．多剤耐性結核患者 PBL におい

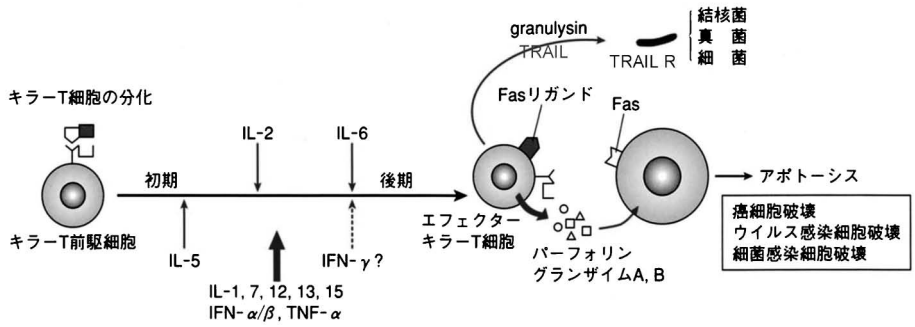


図 4　キラー T 細胞活性化と細胞傷害機構

表 2　新しい結核ワクチン

1. サブユニットワクチン
   Mtb 72f fusion 蛋白
   8.5B–ESAT6 fusion 蛋白
   α抗原（Antigen 85B), Ag 85A, MPB51, ESAT−6, Hsp65
   19Kd lipoprotein
   リコンビナントサイトカイン（吸入・注射）（γ–IFN，など）
   新しい結核蛋白抗原等 Mtb8.8, Mtb9.9, Mtb32, Mtb39, Mtb11
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，γ–IFN 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 誘導蛋白遺伝子，CD40L，遺伝子，MPT64 DNA, MPT63 DNA, Kat G DNA, 上記の新しい結核蛋白抗原遺伝子
3. リコンビナント BCG ワクチン
   ① Mtb 72f 遺伝子
   ② Antigen 85A−, 85B−, 85C−, MPB51−遺伝子，MDP−1 遺伝子，ESAT−6 遺伝子，HSP65 遺伝子
   ③ IL−6 遺伝子，γ–IFN 遺伝子，IL−2 遺伝子，IL−12 遺伝子，IL−18 遺伝子
   ④ キラー T 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

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 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，TNFα，IL−6，IL−12 が重要であることは解析されている(岡田結核文献[9]参照)．

IV. 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，13 年間 230 代継代培養し，1921 年，動物に病原性のない菌株 BCG （Bacille de Calmette et Guerin : BCG）: Mycobacterium bovis strain BCG を得た．現在世界で年間約 1 億人に BCG が接種されている[2]．

2） わが国における BCG の導入と経過

志賀潔は，大正 14 年（1925），パスツール研究所から BCG 株を持ち帰った．その後，特に今村ら（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，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 IS*6110* と *mpt64* をマーカーにして検べた結果，日本株やロシア株は 2 コピーの IS*6110* 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 IS*6110*，*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．

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及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 U. Fruth，近畿中央胸部疾患センター 岡田全司，Staten 研究所 P. Andersen，米国 FDA M. Brennan，米国 CDC M. F. Iademarco ら）．

4） 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，他に何ら予防法も治療法も確立されていなかった 70 年以上も前から広範に用いられ，多くの先進国ではその導入と結核の減少に平行関係がみられたこと，安全なワクチンであることより，感染予防効果に厳密な疫学的証拠があるか否かが明確でないままに，長年用いられてきたことがその理由である．

1940 年代後半から BCG の結核予防効果に関する野外調査の報告がみられる（表 3）[10]．特に 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，全く有効性が否定される結果となった．この結果を元に WHO は BCG ワクチンは成人の結核に無効であると世界中に勧告した．日本も WHO の勧告に従った．高緯度地域に比べ低緯度地域では一般的に BCG の効果が低い傾向が 1950 年代から指摘されており，高温帯に多い非結核性抗酸菌による自然感作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）に対して極めて高い菌数増殖抑制効果が得られる．

V. 新しい結核ワクチン開発

1. BCG ワクチンより 1 万倍強力な結核予防ワクチン

BCG ワクチンより 1 万倍強力な結核予防ワクチンを開発：我々国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センターが，画期的な結核の新しいワクチンを開発した．マウスの実験で現行の BCG ワクチンを超える極めて強力な有効性（1 万倍の効果）を確認した．マウスの結核感染系では BCG ワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチンは極めて少ない．我々は 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

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
米国	1977	12,867	13,958	93	56	77
インド（Chingleput）	1980	79,398	272,455	93	192	0

（文献 10）より引用）

を世界に先駆けて明らかにした．このワクチンでマウスを免疫して結核菌を投与すると，マウス肺の結核菌数がBCGワクチン投与の1万分の1以下となった．これを1万倍強力という．これらの研究が国内外より極めて高く評価され当臨床研究センターはWHO（世界保健機関）よりWHO STOP TB Partnershipに選ばれた（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．

2. 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極めて少ない．われわれはHSP65 DNA＋IL−12 DNA予防ワクチンにてBCGワクチンの100倍強力なワクチンの開発に成功した（表1，図2）[6,7,9,18]．

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よりも極めて強力な（約100倍）結核予防ワクチンであることを明らかにした（自治医科大学吉田博士との共同研究）．IL−12の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）[18]．

HVJリポソームをベクターに用いた場合，HSP65 DNA単独（HVJリポソーム/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）（図2，図5）．

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（図5）．さらに，このHSP65 DNA＋IL−12 DNAワクチンはHSP65タンパク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[18]．

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タンパクであるHSP65タンパク抗原に対する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タンパクに対するキラーT細胞誘導活性はほとんど認められなかった（図5）[18]．

このように，HVJ−リポソーム/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（図6）．

新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され，WHO STOP TB VACCIENE GROUP MEETINGに選出された．

一方，Huygenらは，Ag85AのDNAワクチンを用い，マウスで抗原特異的キラーT細胞（CTL）が誘導されることや，BCG免疫と同等の防御効果が得られることを明らかにした．

2） リコンビナントBCGワクチン

結核菌は300種以上のタンパク質を分泌するが，α抗原Ag 85Bとそのファミリー（85A, Ag85C）DNAをリコンビナントBCGに使用した[2,5]．

これらの遺伝子をPNN2シャトルベクター（大腸菌⇔好酸菌）に組み込みBCG東京菌に，遺伝子を導入した．われわれは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及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融合タンパク質の[19] DNAを導入した72fリコンビナントBCGの作製に成功した．この72f rBCGはBA51 rBCGと同程度の極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

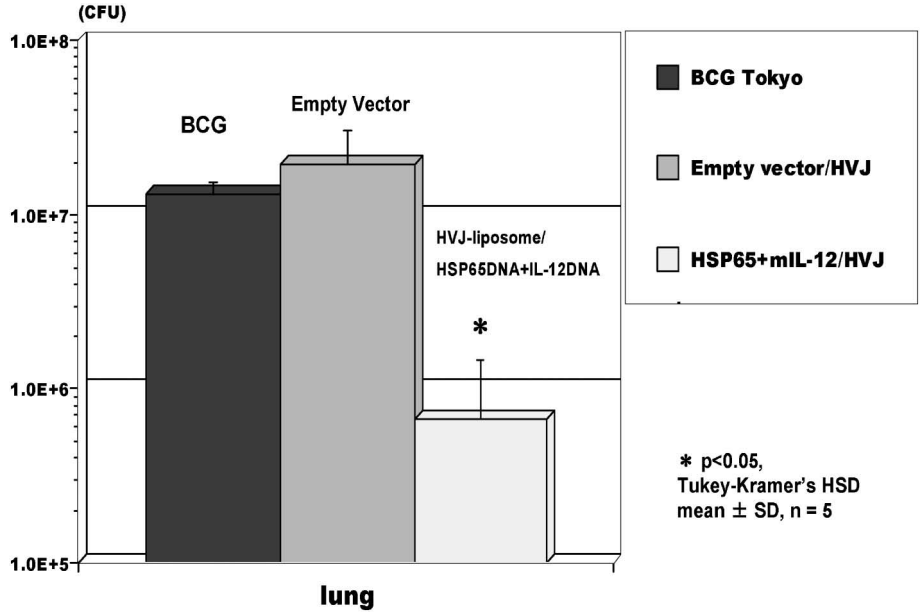


図5 Prophylactic efficacy of HVJ-liposome/HSP65 DNA＋IL−12 DNA vaccine in TB-infected mice（5weeks after TB infection）
Number of M. tuberculosis

た．

3） 遺伝子ノックアウト attenuated（弱毒化）菌体を用いた結核ワクチン

ある結核菌遺伝子を欠失させて弱毒化した結核菌をワクチンにする方法がある．我々は（浜松医大小出教授と）さらに，akt 遺伝子を欠失させた無毒化リステリア菌に Ag85A−, 85BB−, MPB51−DNA を導入し新しい結核ワクチンを開発した．このワクチンは経口ワクチンとして応用できる利点がある[9]．

4） 我々が開発した，新しい結核ワクチン

新ワクチンは，前述の如く，結核菌の HSP65 というたんぱく質と免疫力を高める働きのあるインターロイキン−12 を作る遺伝子（DNA）を注射する DNA ワクチンと呼ばれるものである．HVJ ウイルスの殻を利用して DNA を体内の細胞内に送り込んでこれらのたんぱく質を作らせ，強い免疫反応の誘導を狙った．この新しいワクチンは結核免疫に最も重要と考えられている（結核菌に対する）CD8 陽性キラー T 細胞の分化を増強した．さらに IFN−γ 産生 T 細胞の分化を増強した．

マウスの実験系：マウスに新ワクチンを接種した後，結核菌を感染させ，5 週間後の結核菌の数を調べた．すると，新ワクチンを接種したマウスの菌数は BCG 接種のマウスの約 1 千分の 1 で発症を抑えられる程度だった．さらに，あらかじめ BCG を接種してから新ワクチンを打つと，菌数は約 1 万分の 1 まで抑えられていた．

3. 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，結核菌タンパク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]．

VI. 結核ワクチンの展望

1. 新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル（cynomolgus monkey，最もヒトの肺結核に近いモデル，Nature Medicine 2, 430, 1996 参照）を用い BCG よりもはるかに強力な予防ワクチン効果（生存率，血沈，体重，肺の組織）を示すワクチン二種を開発した[8]．すなわち，現在最も有力なものとして HVJ リポソーム/HSP65 DNA＋IL−12 DNA ワクチン及び，r72f BCG ワクチンがあげられる（図 2）．すなわち，カニクイザルに 3 回ワクチン投与を 3 週間隔で行った．最終免疫より，4 週間後にヒト結核菌エルドマン株 5×10^2 CFU を気道内注入した．事実，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）．HSP65 DNA＋IL−12 DNA ワクチン投与群は，4 匹中 2 匹生存（50％生存），r72f BCG ワクチンで 4 匹中 3 匹生存（75％生存），生存を認め，これらのワクチン効果をサルのレベル

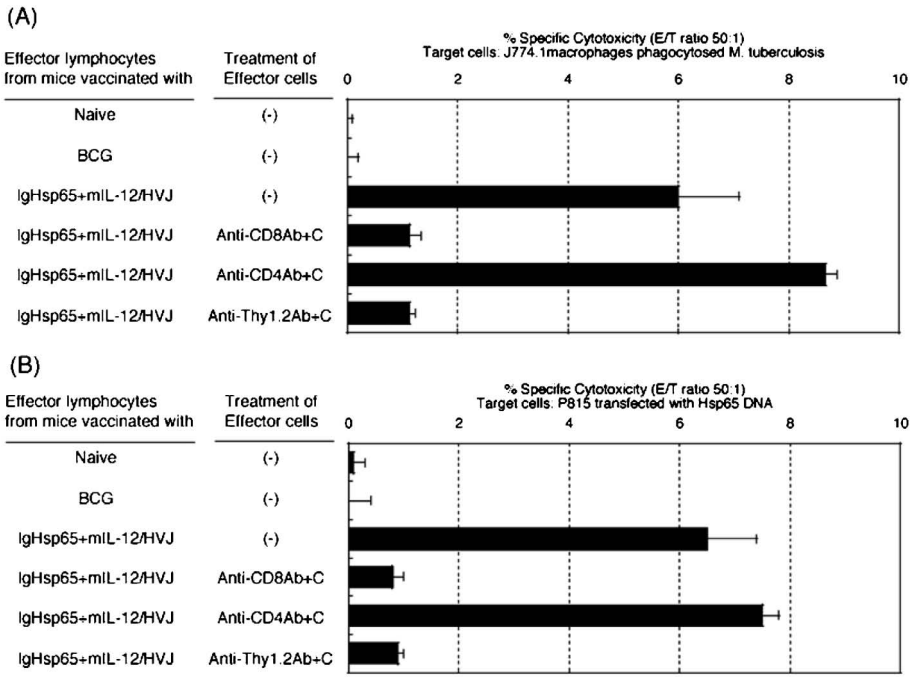


図6 Induction of $CD8^+$ CTL against M. tuberculosis in the spleen cells from HVJ-liposome/HSP65 DNA＋IL-12 DNA vaccine

表4 HVJ-リポソーム/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/HSP65 DNA＋IL-12DNA	4	2	2	50%
BCG	4	2	2	50%
生食	4	0	4	0%

表5 HVJ-リポソーム/HSP65 DNA＋IL-12 DNA 予防ワクチンによる結核感染カニクイザルの血沈改善効果

ワクチン	血沈（mm/hr）	平均±S.D	生食投与群に対する有意差検定（Student t test）
HVJ-liposome /HSP65 DNA ＋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	

で認めた[8]（表4）．すなわち，HVJ リポソーム/HSP65DNA＋IL-12DNA 予防ワクチン投与による結核感染カニクイザル生存率改善効果を得た（表4）．また，HSP65DNA＋IL-12DNA ワクチンは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（図7，8）．Ag85B-ESAT-6 融合タンパク質（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 融合タンパク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[21]．A. Hill Dr. らのワクシニアウイルスー 85A DNA ワクチンは，アフリカでの第一相 clinical trial では，85A DNA 蛋白に対する免疫応答増殖が認められた．最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．リコンビナント 72fBCG も有効である．さらに，われわれは HSP65 DNA＋IL-12 DNA ワクチンやリコンビナント 72f BCG ワクチンを組み合わせ，極めて強力なワクチン開発を目指している[5~7]．

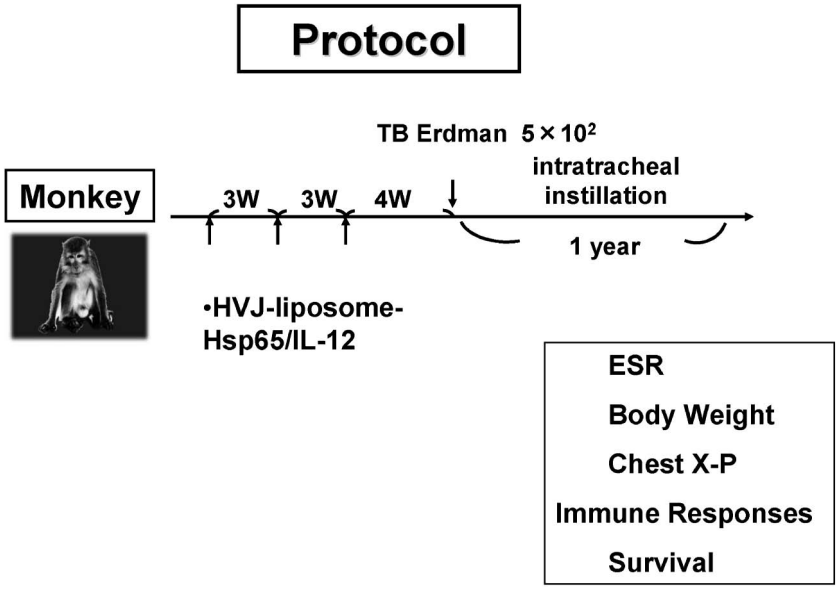


図 7

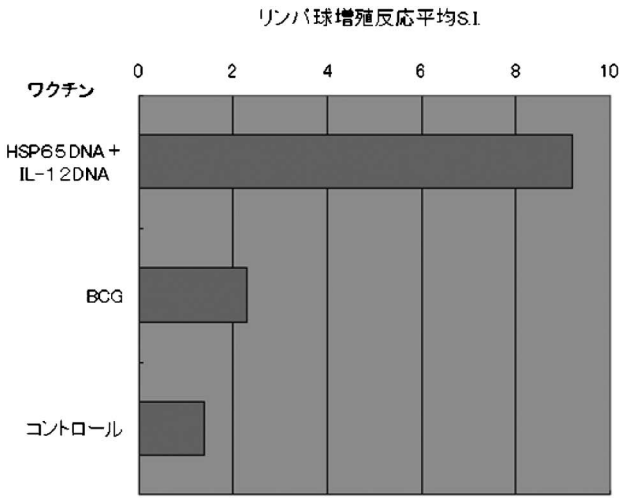


図 8　ワクチン投与カニクイザルの末梢リンパ球増殖反応

2. プライミングーブースター法（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．このプライミングーブースター法で 100％の生存を示した[22]（図 9）．一方，BCG ワクチン単独投与群は 33％の生存率であった[22]．このように，ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いた実験系で，強力な新しい結核ワクチンを我々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我々が開発したこの 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 10）．

VII. Stop TB Partnership

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．

我々の 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（表 5, 6, 7）．

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．

2050 年までに結核撲滅．が WHO の目標である．

これらのワクチンについて概略する．

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

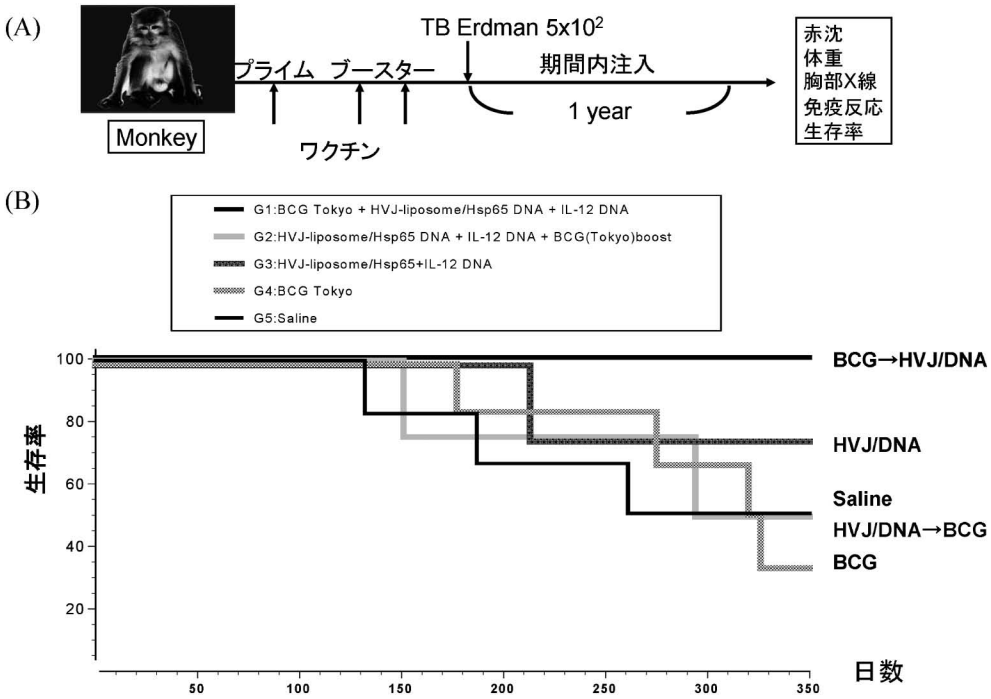


図 9　ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いたの末 Hsp65 蛋白をコードする DNA を用いた．HVJ−リポソーム/HSP−65 DNA＋IL−12 DNA ワクチンの結核予防効果

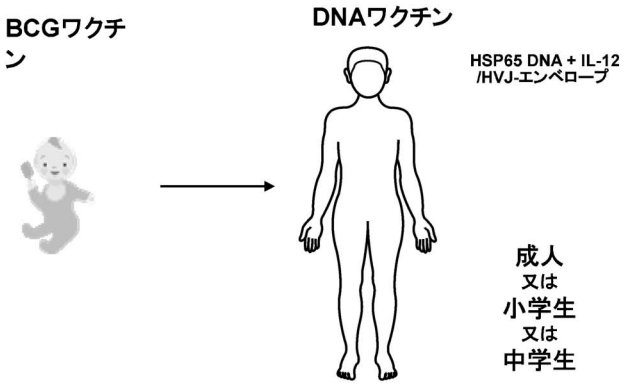


図 10　新しい結核予防ワクチン（案）（DNA ワクチン）

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

VIII. 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により，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だろう．

これらの研究は，厚生労働省，厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業，文部科学研究費，大阪結核予防会等により支援を受けた．

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，pp. 150−161, 2003.
2） 岡田全司，田中高生，喜多洋子：結核感染・新しい結核ワクチンの開発「感染症発症の分子機構―宿主と病原体の分子の攻防」．*Molecular Medicine* **39** : 144−154, 2002.
3） Flynn, J. L., Chan, J. : Immunologyof Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* **19** : 93−129, 2001.
4） Schluger, N. W., Rom, W. N. : 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］”，pp. 1−140, 2004.
7） Okada M, Tanaka T, Inoue Y, et al. : Novel

表 6

A. Priming, Pre-Exposure	
1. Phase I：現在-2008 年	特徴
a. rBCG30	リコンビナント 85B BCG
b. rBCG30⊿ ureC：Hly（VPM1002）	リコンビナント listeriolysin BCG
c. AERAS-407	リコンビナント perfringiolysin
d. rBCG30ARMF, rBCG Mtb B30, rBCG h IFNy	リコンビナント 85B BCG
e. Nas L3/Htk BCG	鼻粘膜ワクチン/heat killed whole BCG コペンハーゲン株
f. mc^26220, mc^26221, mc^26222, mc^26231	nor-replicating, M. Tuberculosis strain（⊿lys A ⊿ pan CD）
g. mc^25059	replicating pro-apoptotic M. bovis BCG 株（⊿nuo G）
2. Phase I 2009 or Later	
a. HBHA（heparin-binding haemagglutinin）	メチル化 21-K Da 蛋白
c. Attenuated Live Vaccine based on Phop	弱毒化ヒト結核菌（virulence gene の pho P の不活性）
b. paBCG（pro-apoptotic BCG）	anti-apoptotic 酵素活性を減弱

表 7

B. BOOSTING, PRE-Exposure	
1. Phase I：現在-2008 年	特徴
a. MVA85A	リコンビナント MVA（Ag85A を発現した）
b. M72	Mtb32＋Mtb29 の fusion 蛋白
c. AERAS-402	Replication-incompetent adenovirus 35 vector expressing M. Tuberculosis antigens Ag85A, Ag85B, and TB 10.4.
d. SSI Hybrid-1	fusion 蛋白（Ag85B-ESAT-6）
e. SSI HyVac4/AERAS-404	fusion 蛋白（Ag85B-TB10.4）
f. AERAS-405	Shigella-delivered recombinant double-stranded RNA nucleocapsid（Ag85A, 85B, Rv3407, latency antigen）
g. r30	リコンビナント Ag85B 蛋白
h. Nas L3/Htk BCG	
2. Phase I：2009 or Later	
a. Hsp C™ TB Vaccine	Heat shock protein antigen complexes（Hsp Cs）
b. HBHA（heparin-binding haemagglutinin）	
c. $NasL_3$/AM85B conjugate	Nasal vaccine/Man capped Arabinomonnan oligosaccharide
d. PP1, PP2, PP3	BCG boosting
f. AC_2SGL Diacylated Sulfoglycolipids	AC_2 SGL Mycobacterial lipids
g. HVJ-liposome/Hsp65 DNA＋IL-12 DNA	M. Okada, 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター

（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）. pp. 209-213, 2004.

10） 岡田全司：結核ワクチン．結核　第 4 版（医学書院）（編集　泉孝英，網谷良一）2004（in press）.

11） Akira, S.：Toll-like receptor and innate immunity, *Adv. in Immunol.* **78**：1-56, 2001.

12） Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., et al.：Deciphering the biology of Mycobacterium Tuberculosis from the complete genome se；quence. *Nature* **93**：537-544, 1998.

13） Stenger, S., Hanson, D. A., Teitelbaum, R., et al.：An Antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* **282**：121-125, 1998.

14） Tanaka, F., Abe, M., Akiyoshi, T., et al.：The anti-human tumor effect and generation of

表 8

C. POST EXPOSURE−Immunotherapy	
1. Phase I：現在−2008 年	特徴
a. Mycobacterium vaccae Heat−Killed	
b. MVA85A	
c. RUTI	Fragmented M. Tuberculosis cells
d. Nas L3/Htk BCG	
2. Phase I：2009 or Later	
a. $NasL_3$/AM85B conjugate	
b. hspDNA vaccine	naked hsp 65 DNA vaccine
c. HG856A	Chimeric ESAT6/Ag 85A DNA ワクチン
d. HBHA（heparin−binding haemagglutinin）	
e. HG856−BCG	Recombinant BCG overexpressing chimeric ESAT6/Ag85A fusion protein
f. HG856−SeV	Recombinant Sendai virus overexpressing chimeric ESAT6/Ag85A fusion protein
g. TB Vax	Epitope−based DNA−prime/peptide−boost vaccine.（liposome と CpG アジュバント）
h. F36, F727	
i. Mycobacterium vaccae Heat−Killed	
j. Ac_2SGL Diacylated Sulfoglycolipid	

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.

15） 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.

16） 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.

17） 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.

18） Yoshida, S., 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.

19） Skeiky, Y. A., Alderson, M. R., Ovendale, P. J., 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.* **172**（12）：7618−7628, 2004.

20） 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. *Infection and Immunity* **72**（4）：2014−2021, 2004.

21） McShane, H., Pathan, A. A., Sander, C. R., Keating, S. M., Gilbert, S. C., Huygen, K., Fletcher, H. A., Hill, A. V.：Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med.* **10**（11）：1240−1244, 2004.

22） 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* **25**：2990−2993, 2007.）