

## ワクチン開発の新技術

山内 一也\*

ジェンナーの種痘に始まったワクチンの歴史は急性ウイルス感染症との人類の戦いであり、その最大の成果が痘瘡の根絶である。この200年間に微生物学は急速の進歩を遂げて来たが、ワクチンの製法はワクチンウイルスの増殖の場を動物から、孵化鶏卵、さらに培養細胞へと変えていったに過ぎず、基本的には同じ方式がとられてきた。しかも痘瘡根絶という偉業のもととなった種痘ワクチンは150年前に開発されたウシやヒツジを用いるもっとも古典的な製法によったものであった。ワクチン製造法の変遷を振り返り、現状を整理すると図1に示すようにおおまかに3つの世代に分けることができる。

1980年代から進展しはじめた遺伝子工学、細胞工学によりワクチン開発は第2世代ともいべき新しい局面にはいり、すでにいくつかの新型ワクチンが実用化にいたっている。また、第3世代に相当するユニークなワクチンの開発も進みはじめている。その現状を簡単に紹介

する。

### 1. サブユニットワクチン

病原ウイルスの構成蛋白のうち防御にかかわる蛋白遺伝子は大腸菌、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞などで発現させるものである。防御蛋白の多くはエンベロープまたはカプシド蛋白のようなウイルス粒子表面に存在する蛋白である。動物用では猫白血病ウイルスのエンベロープ蛋白を大腸菌で産生させたものが実用化されている。人体用では酵母で産生させたB型肝炎ウイルスの表面HBs蛋白のワクチンが実用化されている。

抗原性に深いかかわりのある糖鎖の付加は原核細胞である大腸菌では起こらないが、真核細胞である酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞では糖鎖が付加される。しかし、酵母や昆虫細胞で付加される糖鎖は哺乳動物細胞の場合とは異なる性状のものである。これらがワクチンの抗原性にどのように反映されるかは実際に接種して判断する以外には推測できない。

サブユニットワクチンの利点としては純度、安全性、品質管理、原材料の確保などの面がある。防御抗原蛋白のみという高い純度はもっとも大きな利点といえる。感染性はなく、また迷入微生物の危険性もない。製造の際に感染性ウイルスを取り扱う必要がないことは、たとえばB型肝炎や口蹄疫の場合に非常に大きな利点になる。使用時にも、古典的不活化ワクチンで時に問題となる不活化不十分なことによる汚染の危険性がまったくない。

一方、かつてのB型肝炎ワクチンのように原材料をキャリアーの血液に頼る必要がなくなり、原材料の心配はなくなった。

最大の問題点は免疫原性が天然型のものよりもはるかに低い点である。一般にサブユニットワクチンでは抗体産生に係わるTh2タイプのヘルパーT細胞が産生され、ウイルス感染細胞の破壊に重要な細胞傷害性T細胞の誘導に必要なTh1タイプのヘルパーT細胞の産生は起こらない。この点が低い免疫原性の原因とみなされる。通常

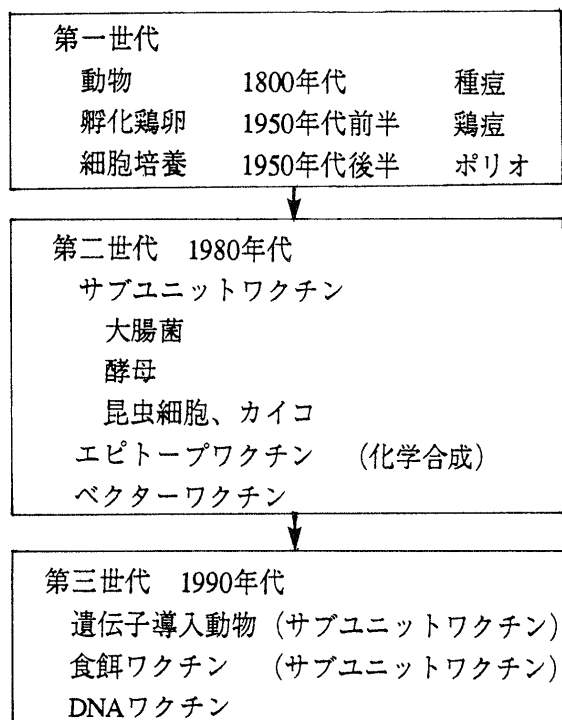


図1 ワクチン製造法の変遷

\*日本生物科学研究所

のアジュバントでは Th2 タイプの反応であるが、ISCOM (Immunostimulating complex) の場合には細胞傷害性 T 細胞の産生もみられることから、サブユニットワクチンへの利用が期待されている [4]。ISCOM は脂質のマトリックスの中にサブユニット蛋白を含んでおり、抗原提示細胞にとりこまれて適切な抗原処理が行われるために Th1 タイプの反応が誘導されるものと推測されている。このように有効性の面では、ISCOM は有用なアジュバントとみなされるが、コストの面で動物用ワクチンに用いるのは高価すぎる問題がある。

## 2. エピトープワクチン

抗体産生を誘導する B 細胞エピトープおよび細胞性免疫を誘導する T 細胞エピトープを化学合成したものがエピトープワクチンである。いずれも 8-10 数個のアミノ酸からなるペプチドがワクチンとして用いられるため、ペプチドワクチンとも呼ばれる。

B 細胞エピトープの決定には、ペプスキャン法が通常用いられる。ここでは抗原蛋白のアミノ酸配列に基づいて、1-数個ずつのアミノ酸配列をずらした 8-10 アミノ酸のペプチドを合成し、中和抗体と反応するペプチド部分を選ぶ。このほかに、中和活性を示すモノクローナル抗体で処理した結果、それと反応しなくなった、いわゆるエスケープミュータントを作り、そのアミノ酸配列の中で欠損した部分を中和エピトープとみなす方法、または抗原蛋白の DNA 配列を欠損させたのち、大腸菌で発現させて出てくるペプチドと中和活性のあるモノクローナル抗体の反応から、中和エピトープを決定する方法も用いられる。将来的には抗原-抗体結合物の結晶解析からエピトープの立体構造を決定することが望ましい。

T 細胞エピトープの決定方法は抗原蛋白遺伝子のいろいろな断片をワクチニアウイルスに組み込んで細胞に感染させて、あらかじめ分離しておいた細胞傷害性 T 細胞との反応性を調べる方法がもっとも普通に行われている。そのほか、B 細胞エピトープ決定の場合と同様にペプスキャン法で作成した合成ペプチドで細胞傷害性 T 細胞を刺激する方法、またはコンピューター解析で推定する方法も用いられている。

大規模な試験段階まで進んだエピトープワクチンはウイルスではまだない。マラリアのスポロゾイト表面抗原のエピトープワクチンでは大規模な野外試験が行われた [1]。しかし最近の成績では効果は確認されず、試験は中止された。

エピトープワクチンの最大の利点は化学合成によるためコストが低く高い安定性の製品が確保できることである。一方、問題点としては、免疫原性がサブユニットワクチンよりも低いために効果的なアジュバントの使用が不可欠であること、抗原変異の際の有効性に疑問がある、複数のペプチドを使用するため効果的なデザインを決定しなければならないことなどがある。

## 4. ベクターワクチン

弱毒ウイルスワクチンまたは弱毒細菌ワクチンをベクターとして、それらに抗原蛋白遺伝子を組み込んだものである。免疫効果はベクターの免疫誘導力を利用したものである。

ベクターワクチンの例は表 1 に示したとおりである。ウイルスベクターとしてはワクチニアウイルスがもっとも多く利用されており、すでに狂犬病ウイルスのエンベロープ蛋白遺伝子を組み込んだものは、暫定的承認の段階であるが、すでに表 2 に示すようにフランス、ベルギーなどで 850 万ドーズ以上がヘリコプターから散布されて野生の狐での狂犬病制圧に成果をあげてきている [2]。

ワクチニアウイルスと同じポックスウイルス科に属す

表 1 ベクターワクチン

ウイルスベクター	
ワクチニアウイルス	狂犬病, 牛疫, 水疱性口炎
カプリポックスウイルス	牛疫, ランベイスキン
鶏痘(カナリアポックス)ウイルス	ニューカッスル病, 伝染性ファブリシウス嚢病, トリインフルエンザ, マレック病
アデノウイルス	水疱性口炎, オーエスキー病, PRRS
牛エンテロウイルス	口蹄疫
細菌ベクター	
BCG	エイズ, 破傷風
サルモネラ	ロタ, 百日咳, コレラ, 破傷風

表 2 組換え狂犬病ワクチンの野外使用 (総計 850 万ドーズ)

ヨーロッパ		
ベルギー	1989 - 1995	150 万ドーズ
ルクセンブルグ	1992 - 1995	35 万ドーズ
フランス	1990 - 1995	(4 万平方キロ)
米国		
バージニア	1990	小規模実験
ペンシルバニア	1991	小規模実験
ニュージャージー	1992 - 1995	22 万ドーズ
ニューヨーク	1994 - 1995	30 万ドーズ
フロリダ	1995	10 万ドーズ
テキサス	1995	85 万ドーズ

る鶏痘ウイルスにニューカッスル病ウイルスのエンベロープ遺伝子を組み込んだワクチンは1994年に米国で承認されている。

実験室段階での試験が完了して、野外での安全試験を待つ段階になっているものとして、我々が開発した組換え牛痘ワクチンがある〔8〕。ワクチンの作成方法は図2に示したように、防御抗原である牛痘ウイルスエンベロープのH蛋白の遺伝子を、相同組換えで弱毒種痘ワクチン株であるLC16mOに組み込んだものである。牛痘の場合、流行地はインド、アフリカ、中近東で、現行の牛痘ワクチンは高い免疫原性はあるものの耐熱性が低いためにコールドチェーンの乏しい熱帯地域での使用に難点がある。我々の開発した組換えワクチンは凍結乾燥状態で45℃、1か月間は力価を保持しうる高い耐熱性のあることが確認されている。

このワクチンでは、接種後1年目に強毒牛痘ウイルスによる致死攻撃にも完全に耐過する高い有効性を示すこと、牛の皮膚を5代継代してもDNAの制限酵素切断パターンは変化せず、遺伝的に安定であることも確認されている。

ベクターワクチンの場合、ワクチン接種対象の標的動物だけでなく、人を含めた非標的動物での安全性がもっとも大きな問題である。この点については、OIEの組換え牛痘ワクチンに関する専門家会議は、組換えワクチンが排出されず、同居感染を起こさない場合には非標的動物に対する危険性は最小限度であろうと報告している〔5〕。我々の組換えワクチンはこの条件をすべて満たしている。

## 5. トランスジェニック動物および植物の利用

基本的にはサブユニットワクチンである。羊および山羊に種々の医薬品の遺伝子を導入して乳腺で発現させることにより、医薬品を乳の中で産生させる方式がいわゆ

る動物工場として進展してきており、すでに羊で産生した $\alpha$ lアンチトリプシン、山羊で産生したアンチトロンビンIIIは臨床試験の段階になっている。このシステムの大きな利点は極めて高い発現量である。乳1リットル中に10g位の蛋白の産生が得られており、年間に換算すると1頭から10kgもの医薬品蛋白がとれることになる。しかも生産コストは動物飼育が大部分であるため哺乳動物細胞などの発現系と比べるとはるかに安い。このシステムはそのままサブユニットワクチンに利用でき、おそらく多くのワクチンの年間需要は10頭前後の動物から確保できると予想される。現在のところワクチン市場が小さく、経済効果が期待できないためか、医薬品開発が優先されている。

トランスジェニック植物でのワクチン開発はこの2-3年活発になってきている。表3はその1例である。現在は主にタバコをモデルとした研究が行われているが

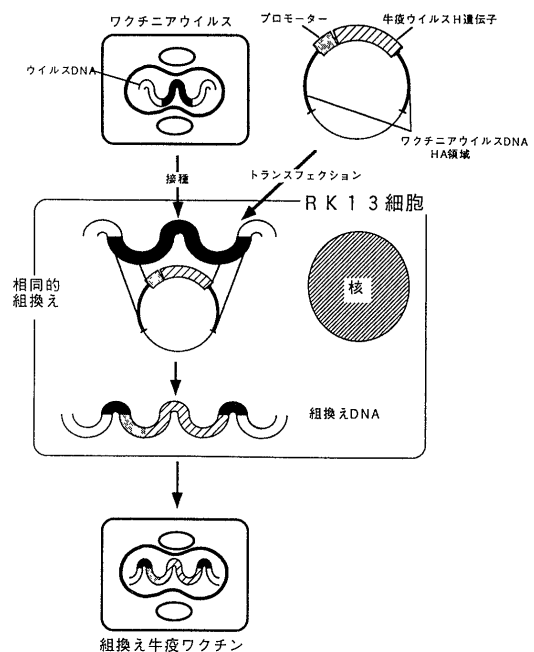


図2 ワクチニアベクターによる組換え牛痘ワクチンの作製法

表3 食べられるワクチン

植物種	プロモーター	遺伝子発現パターン	実験目的
タバコ	CaMV35S	構成的	葉での発現のために遺伝子発現および遺伝子産物の生化学解析の解析が即座に可能
キャノーラ じゃがいも バナナ トマト	2Salbumin patatin エチレン誘導 CaMV35S (狂犬病ウイルスG蛋白)	種子特異的 塊茎特異的 熟した果実に特異的 葉 (1-10ng/mg) と実	種子で発現—動物の餌に利用 食べられるワクチン候補 狂犬病ワクチン

表4 DNA ワクチン開発の現状

病原体	抗原	動物
ウシヘルペスウイルス	糖蛋白	牛, マウス
B型肝炎ウイルス	カプシド蛋白	マウス
	表面抗原	マウス, ウサギ, ラット, チンパンジー
C型肝炎ウイルス	コア, ヌクレオカプシド	マウス
狂犬病	糖蛋白	マウス
単純ヘルペスウイルス	糖蛋白 B, D	マウス
人免疫不全ウイルス	エンベロープ gp160	マウス, サル
サル免疫不全ウイルス	エンベロープ, gag 蛋白	サル
インフルエンザウイルス	血球凝集素	ニワトリ
	マトリックス蛋白	フェレット
	核蛋白	マウス, サル
パピローマウイルス	主要カプシド蛋白	ウサギ
LCMウイルス*	糖蛋白	マウス
結核菌	癩菌 hsp65	マウス
ライシュマニア	主要表面抗原	マウス
マイコプラズマ	M. pulmonis DNA	マウス
マラリア	Circumsporozoite 蛋白	マウス
日本住血吸虫	パラミオシン(Sj97)	マウス

\*LCM：リンパ球性脈絡髄膜炎

[3], ジャガイモ, バナナ, トマトなどへのワクチン遺伝子の導入も始まっている。人体用ではコレラや腸管毒素原性大腸菌への利用が検討されている。バナナではとくに発展途上国向けのコレラワクチンが期待されている。ひとりあたり10円以下という試算もある。また, 将来は家畜の飼料作物に発現させて餌による経口ワクチンとすることも考えられている。

## 6. DNA ワクチン

はだかのDNAプラスミドを直接, 筋肉に接種するワクチンである。米国のベンチャー企業Vicalの研究グループがこのアイデアを発表したときには, はだかのDNAが注射により細胞にとりこまれて発現するということは, まったく予想されていなかった[7]。この方式のpatentを獲得して開発に乗り出したのはMerckである。その後, DNAワクチンの研究は全世界で活発となり, エイズではすでに臨床試験が始まろうとしている。これまでのほかのワクチンとは異なりきわめて単純な方法で効果的なワクチンの可能性が出てきたことから, 第3のワクチン革命とまで呼ばれるようになった。動物モデルでのDNAワクチンの開発の状況は表4に示したとおりである。

DNAワクチンの利点は表5に示したとおりである。適当な発現プラスミド・ベクターにDNAを組み込むことでワクチンとしてすぐに利用できることから, 抗原変

表5 DNA ワクチンの利点

製造が容易
安定, 熱に強い (保存, 輸送が容易)
移行抗体の影響を受けない
投与方法が簡単 (筋肉内接種, パーティクルガンによる表皮内接種)
交差免疫が成立する
抗原蛋白の配列の変更ができる
エマージングウイルス発生時に利用可能
DNA クローンのワクチン
GMPによるプラスミドDNA製造可能
商業ベースにのらないワクチンへの応用表1

異を起こしやすいインフルエンザ, 突如として起きてくるエボラウイルス感染などのように緊急の対応が必要な場合に役立つことも期待できる[6]。

プラスミド・ベクターの条件としては, 反復使用の際にベクターに対する免疫反応が起こらないこと, 異種DNAの挿入に対して遺伝的に安定であること, 哺乳動物細胞の中で増殖しないこと, 宿主ゲノムに組み込まれないことなどがあげられる。

プラスミドDNAとして筋肉内に入れられたDNAは通常の過程で蛋白に発現する。細胞内で産生される蛋白は適切に処理されてクラスII MHCと会合して抗原提示が行われる。そのために抗体産生だけでなく, 細胞傷害性T細胞の産生も起こることが明らかになりつつある。

## おわりに

バイオテクノロジーを基盤としたワクチン開発の技術はめざましい進展をしてきている。その実用化にあたって、動物用ワクチンは実際にワクチン対象動物を用いて直接、安全性や有効性を試験することが可能という、人体用ワクチンでは不可能な、非常に大きな利点がある。種痘200年を記念して英国家畜衛生研究所に新たに設立されたジェンナーワクチン研究所は、動物用ワクチンで得られた成果を人体用ワクチンに還元することを念頭においたものである。動物用ワクチンは、これからのワクチン学の進展で重要な役割を果たすものと期待されているのである。

## 文 献

1. Alonson, P.L., Armstrong Scellenberg, J.R.M., Masanja, H. et al. 1994. Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet* 344: 1175–1181.
2. Brochier, B., Aubert, M.F.A., Pastoret, P.P., Masson, E., Schon, J., Lombard, M., Chappuis, G., Languet, B. and Desmettre, P. 1996. Field use of a vaccinia-rabies recombinant vaccine for the control of sylvatic rabies in Europe and North America. *Res. Sci. Tech. O.I.E.* (in press).
3. Haqu, T.A., Mason, H.S., Clements, J.D. and Arntzen, C.J. 1995. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268: 714–719.
4. Morein, B., Lovgren, K., Hoglund, S. and Sundquist, B. 1987. The ISCOM: an immunostimulating complex. *Immunology Today* 8: 333–338.
5. OIE. 1989. Report of the consultation on requirements for vaccinia-rinderpest recombinant (VRR) vaccines.
6. Whalen, R.G. 1996. DNA vaccines for emerging infectious diseases: What if? *Emerging Infect. Dis.* 2: 168–175.
7. Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., et al. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465–1468.
8. Yamanouchi, K. and Barrett, T. 1994. Progress in the development of a heat-stable recombinant rinderpest vaccine using an attenuated vaccinia virus vector. *Res. Sci. Tech. O.I.E.* 13: 721–735.