

BCG-CWS (SMP-105): 現状と今後の展開

株式会社 MBR 柳 義 和

1. はじめに

BCG-CWS は、結核予防ワクチンや表在性膀胱がん治療剤として使われている *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) の細胞壁骨格成分 (cell wall skeleton) である。

BCG や結核菌などのミコバクテリアが強い免疫強化作用を持つことは古くから知られており、その死菌をミネラルオイルに懸濁した完全フロイントアジュバントは強力な免疫アジュバントとして実験動物で抗体作製や自己免疫疾患モデルの作製に広く使われて来た。しかし、強い副作用のためにヒトでは使えないとされている。

一方、BCG の免疫強化作用が細胞壁部分にあることが示され¹⁾、細胞壁骨格成分である BCG-CWS を少量のミネラルオイルに懸濁して水中油型エマルジョン (oil-attached BCG-CWS) にすると、実験動物 (マウス、モルモット、ウサギ) で強い抗腫瘍効果を示すことが報告されている^{2,3,4)}。BCG-CWS のがん免疫療法剤としての臨床研究は 1970 年代に大阪大学を中心に開始され、現在までに 3,000 名以上の患者さんに使われ、その臨床的なプロファイルが明らかになっている⁵⁻¹⁸⁾。

BCG-CWS はこれまで非特異的免疫剤に分類され、その作用機序が明確でないとされて来たが、最近、免疫応答における自然免疫の重要性が明らかにされ、BCG-CWS の作用も自然免疫の活性化を介して抗原の存在下で強力な抗原特異的免疫反応を誘導するという明確な作用機序によっていることが明らかになった。BCG-CWS は、最新の免疫科学の成果に裏付けされた確かな作用を持ち、また、ヒトでの豊富な使用実績があり、その有効性と安全性が分かっているという点では、現在、実用化に最も近い強力なアジュバント作用を持つがん免疫療法剤とすることができる。

しかし、BCG-CWS は、水にも有機溶媒にも不溶の複雑な構造を有する高分子物質で、物性的に極めて取り扱い難い性質を有している。そのため、一定品質の原薬や安定な製剤を提供することが困難であり、今まで医薬品としての開発は十分には行われて来なかった。

この問題を解決するために、より高純度、一定品質のミコール酸アラビノガラクトサン-ペプチドグリカンの基本構造を持つ BCG-CWS の製造方法が検討され、医薬品化を視野に入れた BCG-CWS である SMP-105 の提供が可能になった¹⁹⁾。以下、SMP-105 (BCG-CWS) の基本的な性質とその今後の開発の方向性について述べる。

2. SMP-105 (BCG-CWS) の製造

SMP-105 の製造は、基本的には東らの方法²⁾を改良、最適化することによって行われた¹⁹⁾。概略を述べると、BCG Tokyo 172 株の死菌を注射用水に懸濁して高圧破碎し、不溶性画分を得る。

この分画より核酸分解酵素処理によって核酸を除去し、不溶性画分を界面活性剤で洗浄した後、さらに蛋白分解酵素処理と界面活性剤洗浄とを行い蛋白質を除く。不溶性画分はさらに有機溶媒洗浄によって脂質を除去し、SMP-105を得る。湿重量 600 g の BCG 死菌から約 10 g (乾燥重量) の SMP-105 が得られる。SMP-105 に含まれるミコール酸-アラビノガラクトタン-ペプチドグリカン以外の糖およびアミノ酸の量は 3% (w/w) 以下、DNA および trehalose dimycolate (TDM) の量は 0.05% (w/w) 以下、エンドトキシンの量は 0.0015 endotoxin units/mg 以下であった。

3. SMP-105 (BCG-CWS) の製剤

3.1. In vitro 試験用製剤 (水性懸濁製剤)

SMP-105 はミコール酸という長鎖脂肪酸を約 40% 含み、水には極めて溶け難い性質を有している。そのため、in vitro 試験は、SMP-105 を 0.01% polysorbate 80 に懸濁し、超音波やホモジナイザーで物理的に分散させたものを用いて行われた。

3.2. In vivo 試験用製剤 (水中油型エマルジョン製剤)

動物実験やヒトでの臨床研究には、BCG-CWS を少量のミネラルオイルに懸濁して作製した水中油型エマルジョン (oil-attached BCG-CWS) が用いられて来た。In vitro 試験用の水性懸濁製剤は in vivo では効果を示さないとされている。そのため、SMP-105 の in vivo 試験も水中油型エマルジョン製剤で実施された。油成分としてはミネラルオイルの代わりに体内で代謝可能な squalane が用いられ、注射用蒸留水を加えるだけで容易に水中油型エマルジョンを調製できる凍結乾燥製剤 (以下、「SMP-105 注」と称する) が作製された。その成分比は、SMP-105 0.6 mg/mL、squalane 16 mg/mL、1% polysorbate 80、5% mannitol であった。

4. SMP-105 (BCG-CWS) の薬理学的特性・作用機序

4.1. SMP-105 の免疫アジュバント活性²⁰⁾

マイトマイシン C 処理により増殖できなくした Lewis lung carcinoma 細胞 (3LL 細胞) と SMP-105 注 (12.5 µg/マウス) を混合して day 0、7 にマウスの腹側部皮内に接種し (感作)、day 14 に後肢足蹠へ 3LL 細胞を接種 (惹起) して 24 時間後に足蹠の厚みを測定した。その結果、SMP-105 注投与群では、対照群 (ピークル投与群) に比較して明確な浮腫 (遅延型過敏反応) が認められた。浮腫の程度は、SMP-105 注の用量に相関することも明らかになっている。一方、SMP-105 の代わりに、代表的な TLR2 アゴニストである Pam3CSK4 (12.5 µg/マウス) をマイトマイシン C 処理 3LL 細胞と混合して感作に用いても、浮腫は全く惹起されなかった。

4.2. SMP-105 のマウスにおける抗腫瘍効果²¹⁾

マイトマイシン C 処理した 3LL 細胞と SMP-105 注 (12.5 µg/マウス) を混合して 7 日毎に 4 回マウスの腹側部皮内に接種し (感作)、最終感作 7 日後に腹側部皮内に 3LL 細胞の生細胞を移植して、腫瘍容積を経時的に測定した。

SMP-105 注は、正常マウスと TLR4 KO マウスでは明確な抗腫瘍効果を示した。一方、その抗腫瘍効果は MyD88 KO マウスでは完全に損なわれたが、TLR2 KO マウスでは部分的に損なわれただけであった。マウスにおける SMP-105 の抗腫瘍効果に MyD88 以降のシグナル伝達が極めて重要な役割を果たしていることは明らかであるが、TLR2 を介したシグナル伝達の関与は部分的、TLR4 は全く関与していないことが示された。

4.3. SMP-105 のモルモットにおける抗腫瘍効果^{22,23)}

モルモットの化学発がん細胞株 line 10 へパトーマ細胞を同系モルモットである strain 2 に皮内移植し、移植部位と同じ体側の少し離れた場所に SMP-105 注 3.75、15 あるいは 60 µg/モルモットを day 0、day 7、day 14 に皮内投与した。その結果、SMP-105 注投与により用量依存性にリンパ節転移が阻止され、原発巣の退縮が認められた。また、原発巣が退縮した個体に line 10 へパトーマ細胞を再移植すると生着が拒絶されることが認められている。

一方、SMP-105 注を細胞移植部位とは逆の体側に投与すると、SMP-105 注の投与量を 180 µg/モルモットに増量しても抗腫瘍効果は全く認められなかった。

マイトマイシン C 処理した line 10 へパトーマ細胞と SMP-105 注 (60 µg/モルモット) あるいは SMP-105 注のビークルを同じ体側の少し離れた場所に投与し、2 週間後に逆の体側に line 10 へパトーマの生細胞を移植した。ビークル投与群 (対照群) では腫瘍の生着、増殖が認められたが、SMP-105 注投与群では、移植部位で遅延型過敏反応 (強い発赤と浮腫) が認められ、8 匹中 4 匹で腫瘍の生着が拒絶された。

以上の結果は、SMP-105 注による抗腫瘍免疫の誘導には、投与部位近傍のリンパ節に抗原 (腫瘍細胞) が存在することが必須であること、また、一旦誘導された抗腫瘍免疫は全身性に効果を発揮することを明確に示している。SMP-105 注を単独で投与する場合には、リンパ節転移の部位を考慮して投与場所を選ぶ必要があり、また、より効果的に抗腫瘍免疫を誘導するためには SMP-105 注を抗原 (増殖できなくしたがん細胞やがん抗原ペプチドなど) と一緒に投与することが必要なことが明らかになった。

5. SMP-105 (BCG-CWS) に関する研究の課題と今後の展開

5.1. In vitro 試験用製剤（水性懸濁製剤）の改良

これまで、SMP-105 の in vitro 試験は、SMP-105 を 0.01% polysorbate 80 に懸濁して、物理的に強制的に分散させたものを用いて行われてきた。そのため、この懸濁液は、SMP-105 の粒度分布の均一性や再現性に問題があり、in vitro データの定量的な取り扱いはできなかった。

この問題を解決するために、株式会社 MBR では、SMP-105 の水性懸濁製剤の調製方法の検討を行い、0.2% polysorbate 80 (SMP-105 PS) あるいは 0.1% phosphatidyl choline と 0.03% polysorbate 80 (SMP-105 PC) を用いることにより 2 種類の SMP-105 の単粒子分散水性懸濁製剤の調製方法を確立した。特に、SMP-105 PS は 113 nm ± 34 nm の粒度分布を有し、0.22 μm ミリポアフィルターによる無菌ろ過が可能であった。

SMP-105 は、上述の方法により均一な水性懸濁製剤を調製することが可能になったため、抗 SMP-105 抗体を用いる ELISA や HEK-Blue™-2 細胞 (InvivoGen 社)を用いるバイオアッセイ (TLR 2 アゴニスト活性) などにより定量が可能になった。

また、SMP-105 水性懸濁製剤 (SMP-105 PS) は、不完全フロイントアジュバントである Montanide ISA 51 と組み合わせて水中油型エマルションを作製すると完全フロイントアジュバント (CFA) と同等の活性を示すので、CFA の代わりに抗体産生や自己免疫疾患モデルの作製に用いることができる。また、その作用の強度は SMP-105 と Montanide ISA 51 の量で調節可能であった²⁴⁾。

5.2. SMP-105 (BCG-CWS) の作用機序研究

BCG-CWS は TLR2 および TLR4 アゴニスト活性を示すことが報告されている²⁵⁾。一方、SMP-105 は TLR2 アゴニスト活性のみを有し、TLR4 アゴニスト活性を示さなかった²¹⁾。しかし、「4.2 の項」で述べたように、マウスにおける SMP-105 の抗腫瘍効果に MyD88 以降のシグナル伝達が極めて重要な役割を果たしていることは明らかであるが、TLR2 を介したシグナル伝達の関与は部分的であることが示唆されている²¹⁾。

また、マウス未成熟樹状細胞由来細胞株 BC-1 を用いた研究²⁶⁾でも、SMP-105 による BC-1 の IL-12/IL-23 p40 産生作用が抗 TLR2 抗体によって全く影響されなかったのに対し、代表的な TLR2 アゴニストである Pam3CSK4 の作用はこの抗体によって明確に阻害された。SMP-105 の BC-1 に対する作用は Pam3CSK4 とは明らかに異なり、TLR2 を介していない可能性もある。

SMP-105 は TLR2 アゴニスト活性を有するが、その免疫アジュバント作用には TLR2 を介したものとそうでないものがあると考えられる。TLR2 を介さない作用がより重要な役割を果たしている可能性もあり、その解明が今後の課題である。

5.3. In vivo 試験用製剤（水中油型エマルジョン製剤）の改良

BCG-CWS の in vivo 試験には水中油型エマルジョン製剤 (oil-attached BCG-CWS) が用いられて来た。ミネラルオイルは、ほとんどの場合、Drakeol 6VR (Pennsylvania Refining Co., Ltd., Butler, Pa.) が使われたが、代わりに体内で代謝可能な squalene あるいは squalane が使われたこともある。BCG-CWS、ミネラルオイルと Tween 80 の量は文献によって必ずしも一定ではないが、代表的な例⁴⁾を述べると、BCG-CWS 4 mg、Drakeol 6VR 10 mg に 0.2% Tween 80 を含む生理食塩液 1 mL が加えられて水中油型エマルジョンが作製されている。

SMP-105 注の場合、凍結乾燥製剤の再懸濁性を良好に保つために squalane の濃度 (16 mg/mL) を高くせざるを得ず、そのため、注射部位の皮膚刺激作用が強くなるおそれがあった。

株式会社 MBR では、ミネラルオイルとして Drakeol 6VR や squalane の代わりに Montanide ISA51 (Seppic Inc., Paris, France) を選択し、Montanide ISA51 に SMP-105 を懸濁した製剤 (以下、「SMP-105/IFA」称する) を in vivo 試験用に提供する。Montanide ISA51 は Drakeol 6VR と mannide monooleate からなる不完全フロイントアジュバント (IFA) で、がん抗原ペプチドワクチン療法の臨床研究において広く用いられている。SMP-105/IFA は、使用前に 0.2% polysorbate 80 を加え、ボルテックスミキサーと GP シリンジコネクタ (株式会社グリーンペパタイト) を用いて水中油型エマルジョンを用時調製する。その成分比は、SMP-105 1 mg/mL、Montanide ISA51 4~16 mg/mL、polysorbate 80 0.2% である。Montanide ISA51 の量は、臨床研究用には 4 mg/mL、動物実験用には 16 mg/mL を予定している。

6. おわりに

BCG-CWS は、1970 年代からがん免疫療法剤としての臨床研究が開始され、現在までに 3,000 名以上の患者さんに使われ、多くの報告がある⁵⁻¹⁸⁾。その結果をまとめると、以下のようになる。

- 1) BCG-CWS は、多くの場合、単独で用いられて来た。
- 2) BCG-CWS の主な副作用 (副反応) は、投与部位の強い炎症反応と発熱であった。但し、過量投与により間質性肺炎や肝酵素上昇を示すことがあるので注意を要する。
- 3) BCG-CWS が効果を発揮するためには以下の条件が必要である。
 - ・患者が前治療などにより免疫不全状態にないこと。
 - ・免疫を抑制する化学療法や放射線療法と同時に併用しないこと。
 - ・自己のがん細胞が抗原として存在すること。
 - ・抗腫瘍免疫が誘導される場としてリンパ節が重要であること。

即ち、これまでの臨床研究から、BCG-CWS は単独で用いても自己のがん細胞を抗原とするア

ジュバントとして働き、リンパ節を場として抗腫瘍免疫を誘導することが示されている。このことは、「4.3.の項」で述べたように、モルモットの化学発がん細胞株 line 10 へパトーマ細胞を用いた柏崎ら^{22,23)}の研究で、SMP-105 についても明確に裏付けられている。

したがって、これから実施する SMP-105 の臨床研究においても「抗原（腫瘍細胞）」と「リンパ節」がキーワードになる。

SMP-105 を単独で用いる場合には、SMP-105 の投与部位近辺の所属リンパ節に抗原として転移腫瘍細胞やその断片があることが必要である。事実、非小細胞肺がんの治癒切除例で鎖骨上窩に再発した症例を対象に行われた BCG-CWS の臨床研究¹⁵⁾で良好な成績が報告されており、また、次のような記述がこのことを裏付けている。「BCG-CWS を肩に皮内投与すると腋窩リンパ節が反応性に腫脹する例がみられる。またこれが皮膚に自壊してくる頻度も高い。……このような反応を示す症例は経験的に非常に予後がよい。」

また、SMP-105 は抗原と一緒に投与すればより強い効果が期待できるので、がん抗原ペプチドや自家がん抗原と組み合わせてがんワクチン療法のアジュバントとして使うことも検討したい。

引用文献

- 1) Azuma I, Kishimoto S, Yamamura Y, and Petit JF: Adjuvanticity of mycobacterial cell walls. *Jap J Microbiol* 15, 193-197, 1971.
- 2) Azuma I, Ribic E, Meyer TJ, and Zbar B: Biologically active components from mycobacterial cell walls. I. Isolation and Composition of cell wall skeleton and component P₃. *J Natl Cancer Inst* 52: 95-101, 1974.
- 3) Meyer TJ, Ribic E, Azuma I, and Zbar B: Biologically active components from mycobacterial cell walls. II. Suppression and regression of strain-2 guinea pig hepatoma. *J Natl Cancer Inst* 52: 103-111, 1974.
- 4) Azuma I, Yamamura Y. Immunotherapy of cancer with BCG cell-wall skeleton and related materials. *GANN Monogr Cancer Res* 24, 121-141, 1979.
- 5) Yamamura Y, Ogura T, Yoshimoto T, Nishikawa H, Sakatani M, Itoh M, Masuno T, Namba M, Yazaki H, Hirano F, and Azuma I: Successful treatment of the patients with malignant pleural effusion with BCG cell-wall skeleton. *Gunn* 67, 669-677, 1976.
- 6) Yasumoto K, Manabe H, Ueno M, Ohta M, Ueda H, Iida A, Nomoto K, Azuma I, and Yamamura Y: Immunotherapy of human lung cancer with BCG cell-wall skeleton. *Gunn* 67, 787-795, 1976.
- 7) Ohno R, Ueda R, Imai K, Kato Y, Watanabe E, Morishima Y, Yokomaku S, Kobayashi M,

- Takeyama H, Ezaki K, Kawashima K, Hirano M, Ohara K, Kosaki T, Yoshikawa S, and Yamada K: A clinical trial of cell-wall skeleton of BCG in chemoimmunotherapy of acute leukemia. *Gann* 69, 179-186, 1978.
- 8) Yamamura Y, Sakatani M, Ogura T, and Azuma I: Adjuvant immunotherapy of lung cancer with BCG cell wall skeleton (BCG-CWS). *Cancer* 43, 1314-1319, 1979.
 - 9) Ochiai T, Sato H, Hayashi R, Asano T, Sato H, and Yamamura Y: Postoperative adjuvant immunotherapy of gastric cancer with BCG-cell wall skeleton. 3- to 6-year follow up of a randomized clinical trial. *Cancer Immunol Immunother* 14, 167-171, 1983.
 - 10) Ikegami H, Horai T, and Hattori S: Combined modality studies on small cell carcinoma of the lung - current status in Japan. *Recent Results Cancer Res* 76, 257-266, 1981.
 - 11) Hayashi A: Interferon- γ as a marker for the effective cancer immunotherapy with BCG-cell wall skeleton. *Proc Japan Acad* 70, 205-209, 1994.
 - 12) Hayashi A, and Noda A: Does the cell wall skeleton from Baccille Calmette-Guerin directly induce interferon- γ , independent of interleukin-12? *Jpn J Clin Oncol* 26, 124-127, 1996.
 - 13) Hayashi A, Doi O, Azuma I, and Toyoshima K: Immuno-friendly use of BCG-cell wall skeleton remarkably improves the survival rate of various cancer patients. *Proc Japan Acad* 74, 50-55, 1998.
 - 14) 林 昭: よみがえった BCG-CWS. *医学のあゆみ 別冊* 415-421, 2002.
 - 15) 児玉 憲, 瀬谷 司: Toll-like receptor とがん免疫療法. *Biotherapy* 17, 490-493, 2003.
 - 16) Kodama K, Higashiyama M, Takami K, Oda K, Okami J, Maeda J, Akazawa T, Matsumoto M, Seya T, Wada M, and Toyoshima K: Innate immune therapy with a Bacillus Calmette-Guerin cell wall skeleton after radical surgery for non-small cell lung cancer: a case-control study. *Surg Today* 39, 194-200, 2009.
 - 17) Hayashi A, Nishida Y, Yoshii S, Seo Y Kim, Uda H, and Hamasaki T: Immunotherapy of ovarian cancer with cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin: Effect of lymphadenectomy. *Cancer Sci* 100, 1991-1995, 2009.
 - 18) Sasagawa T, Hayashi A, and Makinoda S: Effectiveness of immune therapy with BCG-CWS to cervical cancer. 69th Annual Meeting of Japanese Cancer Association Abstract Number P-1040, 2010.
 - 19) Uenishi Y, Okada T, Okabe S, and Sunagawa M: Study on the cell wall skeleton derived from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo (SMP-105):

Establishment of preparation and analytical methods. *Chem Pharm Bull* 55, 843-852, 2007.

- 20) Miyauchi M, Murata M, Shibuya K, Koga-Yamakawa E, Yanagawa Y, Azuma I, and Kashiwazaki Y: Phagocytosis plays a dual role in activating dendritic cells; digestive production of active Toll-like receptor ligands and cooperation with Toll-like receptor signaling. *Drug Discoveries & Therapeutics* 4, 135-143, 2010.
- 21) Murata M: Activation of Toll-like receptor 2 by a novel preparation of cell wall skeleton from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo (SMP-105) sufficiently enhances immune responses against tumors. *Cancer Sci* 99, 1435-1440, 2008.
- 22) Kashiwazaki Y, Murata M, Sato T, Miyauchi M, Nakagawa M, Fukushima A, Chiba N, Azuma I, and Yamaoka Y: Injection of cell-wall skeleton of *Mycobacterium bovis* BCG draining to a sentinel lymph node eliminates both lymph node metastases and the primary transplanted tumor. *Drug Discov Ther* 2, 168-177, 2008.
- 23) Kashiwazaki Y, Murata M, Fujii T, Nakagawa M, Fukushima A, Chiba N, Azuma I, and Yamaoka T: Immune response against cell-wall skeleton of *Mycobacterium bovis* BCG at the inoculation site and peripheral lymphoid organs. *Drug Discov Ther* 2, 178-187, 2008.
- 24) Kishimoto S, Hatano Y, Itoh Y, Yanagi Y, and Fukushima S: Adjuvant effect of SMP-105 (BCG-CWS) aqueous formulation. 14th Annual Meeting of Japanese Association of Cancer Immunology Abstract Number 47, 2010.
- 25) Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, Toyoshima K, and Seya T: Maturation of Human Dendritic Cells by Cell Wall Skeleton of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin: Involvement of Toll-Like Receptors. *Infect Immun* 68, 6883-6890, 2000.
- 26) Yanagi Y, Kishimoto S, and Fukushima S: TLR2-independent activity of SMP-105 (BCG-CWS) on BC-1, a mouse immature dendritic cell line. 69th Annual Meeting of Japanese Cancer Association Abstract Number P-0851, 2010.