

Cytoplasmic domain

	320	330	340
Mafa-A*01	DRKGGSY	SQAASNSAQ	GSDVSLTACK V*
Mafa-A*02S.....*
Mafa-A*03S.....*
Mafa-A*04S.....*
Mafa-A*05S.....*
Mafa-A*06S.....*
Mafa-A*07S.....*
Mafa-A*08S.....*
Mafa-A*09S.....*
Mafa-A*10S.....*
Mafa-A*11S.....*
Mafa-A*12S.....*
Mafa-A*13S.....*
Mafa-A*14S.....*
Mamu-A*01S.....*
Mamu-A*02S.....*
Mamu-A*03S.....*
Mamu-A*04S.....*
Mamu-A*05S.....*
Mamu-A*06S.....*
Mamu-A*07S.....*
Mamu-A*08S.....*
Mamu-A*12S.....*
Mamu-B*02	GG.....S.....*
Mamu-B*03	GG.....S.....*
Mamu-B*04	GG.....S.....*
Mamu-B*05	GG.....WS.....*
Mamu-B*06	GG.....S.....*
Mamu-B*07	GG.....F.....E.....*
Mamu-B*08	GG.....S.....*
Mamu-B*09	GG.....SN.....*
Mafa-E*01	G.....SCS..T.....E.....	A*
Mafa-E*02	G.....LCS..T.....E.....	A*

Fig. 1 (continued)

14s, and IA-a. The concentrations of these primers were optimized after preliminary experiments (Table 1). The reactions were heated at 95 °C for 5 min, and then 25 cycles of amplification consisting of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing either at 72 °C (for primer set 1 and set 2) or 70 °C (for primer set 3) for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s. The amplicons were separated by 1.3% agarose gel electrophoresis and excised bands were purified using Freeze 'N Squeeze Spin Columns (Bio-Rad, Hercules, Calif.). The nucleotide sequences were determined by an ABI model 310 DNA sequencer (Applied Biosystem).

GenBank accession numbers

The *Mafa-A* sequences described in this manuscript have been deposited at GenBank and were assigned accession numbers AB154760–AB154773. The GenBank accession numbers for all sequences used in this studies are as follows: *Gogo-B*0401*, AF157407; *Gogo-B*0501*, AF157408; *Gogo-B*0502*, AF157409; *Gogo-C*0103*, AF157410; *Gogo-C*0204*, AF157411; *HLA-A*0201*, AY365426; *HLA-A*0301*, L77702; *HLA-A*2402*, L47206; *HLA-A*2602*, M98453; *HLA-A*2901*, U83415; *HLA-A*8001*, L18898; *HLA-B*0801*, D83956; *HLA-B*1301*, D50290; *HLA-B*1802*, D25275; *HLA-B*2702*, L38504; *HLA-B*4201*, L76225; *HLA-B*57*, M32318; *HLA-B*7301*, U04787; *Mamu-A*01*, MMU50836; *Mamu-A*02*, MMU50837; *Mamu-A*03*, MMU41379; *Mamu-A*04*, MMU41380; *Mamu-A*05*, MMU41831; *Mamu-A*06*, MMU41834; *Mamu-A*07*, MMU41832; *Mamu-A*08*, AF243179; *Mamu-A*12*, AF157398; *Mamu-B*02*, MMU41833; *Mamu-B*03*, MMU41825; *Mamu-B*04*, MMU41826; *Mamu-B*05*, MMU41827; *Mamu-B*06*, MMU41828; *Mamu-B*07*, MMU41829; *Mamu-B*08*, MMU41830; *Mamu-B*09*, MMU41835; *Patr-A*0301*, AF500288; *Patr-A*0501*, AF500289; *Patr-A*0601*, AF500290; *Patr-A*11*, L47291; *Patr-A*14*, L47292; *Patr-B*01*, L47293; *Patr-B*16*, L47296; *Patr-B*17*, L47348; *Patr-C*03*, L47294; *Patr-C*04*, L47347; *Patr-C*05*, L47298; *Patr-C*06*, L47299; *Popy-A*0302*, AY034115; *Popy-A*0401*, AY034116; *Popy-A*0402*, AY034117; *Popy-A*0501*, AY034114; *Popy-B*0701*, AF118895; *Popy-B*0601*, AF118894; *Popy-B*0801*, AF118896; *Popy-B*0302*, AF118891; *Popy-B*0401*, AF118892; *Popy-B*0501*, AF118893; *Popy-C*0201*, AF118898; *Popy-*

*C*0203*, AF470378; *Popy-C*0301*, AF470379; and *Popy-C*01*, 012 AF470376.

Results

Detection of 14 MHC class I *A* locus alleles in cynomolgus monkeys

As there was no report on genes coding for class I MHC molecules in cynomolgus monkeys, we attempted to determine the nucleotide sequences of the alleles of the *A* locus in cynomolgus monkeys (*Mafa-A*). The amplicons obtained using *A*-locus-specific primers were cloned into pCR4-Bhnt-TOPO plasmid and 8–48 independent clones were sequenced for each animal. When more than two clones from each animal showed the identical nucleotide sequences, the sequence was regarded as a consensus sequence representing a particular allele. Since PCR amplification and cloning procedures as well as sequencing are prone to misincorporation of nucleotides, amino acid sequences deduced from the nucleotide sequences were assessed by phylogenetic analysis using the neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987) (data not shown). When the nucleotide sequence variation of the clone was negligible ($d < 0.025$) compared with the consensus sequence, this particular clone was not considered to represent an independent allele. On the other hand, clones showing sequence variation of $d \geq 0.025$ were considered to represent independent alleles.

The deduced amino acid sequences of *Mafa-A* alleles are shown in Fig. 1, together with those published for *Mamu-A* and *-B*. All *Mafa-A* alleles encoded proteins of 365 amino acids. The putative glycosylation site was located at residue 86. In addition, conserved cysteine residues occurred at positions 101 and 164 in α_2 and at positions 203 and 259 in α_3 . Other areas of similarity with *Mamu* included a region of variability at residues 77–83 near the C terminus of the α_1 helix, analogous to the site of the Bw4/Bw6 motif in human.

To ascertain that these alleles were indeed derived from cynomolgus MHC class I *A* locus, they were compiled with other primate MHC class I loci (Fig. 2) and a phylogenetic tree was constructed using the amino acid sequences of α_1 and α_2 domains, since both domains were the most polymorphic regions of the molecule. The result showed that the sequences from cynomolgus monkeys aligned within the same cluster as those from other non-human primates, indicating that these cDNA clones were derived from distinct alleles of the MHC class I *A* locus of cynomolgus monkeys, *Mafa-A*.

A family consisting of eight animals was subjected to genetic analysis for better understanding of inheritance of *Mafa-A* alleles (Fig. 3, Table 2). By nucleotide sequence analysis, four *Mafa-A* alleles (*Mafa-A*03*, *-A*07*, *-A*11*, and *-A*14*) were found in this family. *Mafa-A*03* was detected in monkeys 2010 and 3005, whereas *Mafa-A*07* was detected in monkeys 8225 and 2010. *Mafa-A*11* was carried by monkeys 9234, 5117, 4045, 5076, and 1102,

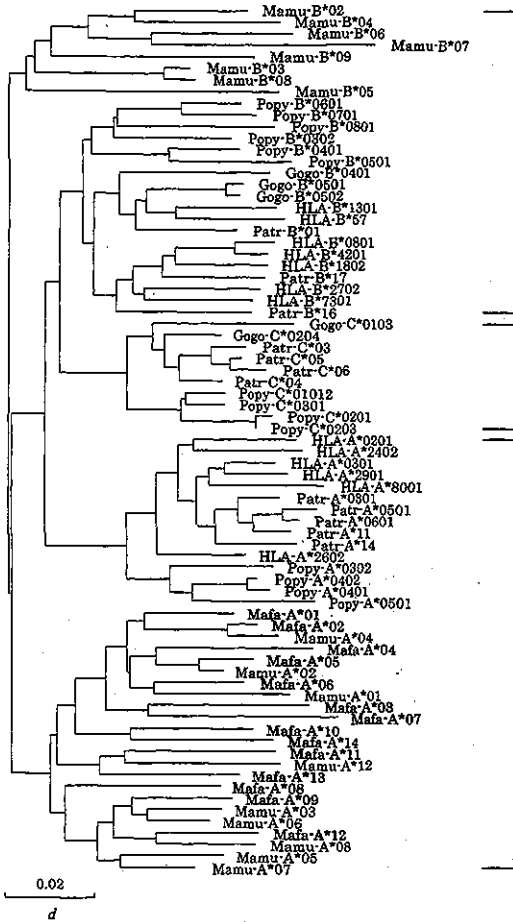


Fig. 2 Phylogenetic analysis of primate class I MHC molecules. The phylogenetic tree of α_1 - α_2 was constructed using nucleotide sequences with the neighbor-joining method by DNASIS pro (Hitachi software, Yokohama, Japan)

while *Mafa-A*14* was shared by monkeys 8225, 5117, 4045, 5076, and 3005. By nucleotide sequence analysis, only one allele (*Mafa-A*11*) was detected in 1102.

Fig. 4 Multiplex PCR-SSP analyses of *Mafa-A* alleles. Identification of *Mafa-A*01* through *A*14* was conducted using cloned genes inserted into pcDNA3.1(-) vector (left panel). Copy DNAs obtained from seven cynomolgus monkeys were similarly subjected to multiplex PCR-SSP (right panel)

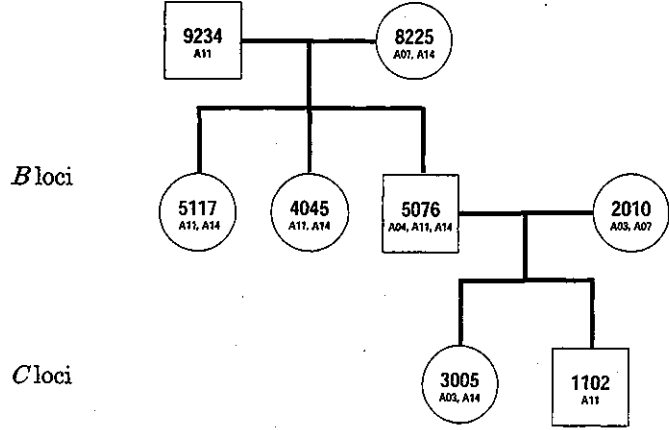
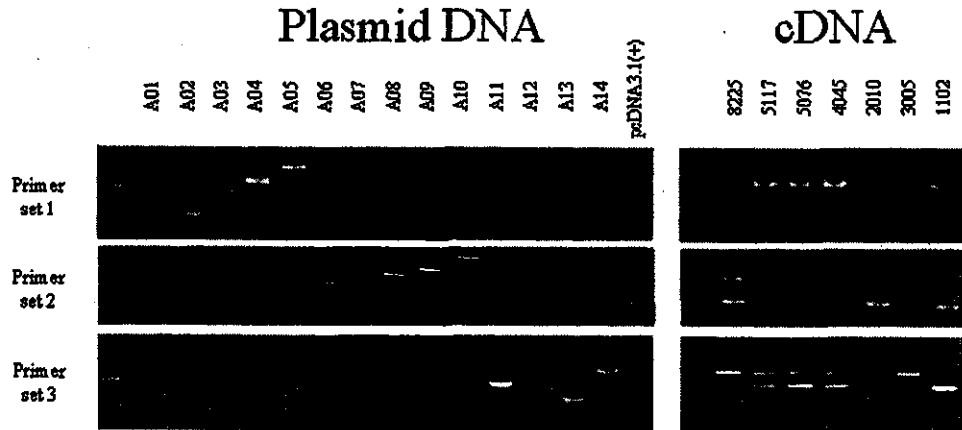


Fig. 3 The family pedigree demonstrating the inheritance of alleles of the MHC class IA locus in cynomolgus monkeys. Male or female is denoted by a square or circle, respectively. The animal number and allele assigned to the animal are shown

The establishment of the multiplex PCR-SSP method

A loci

We tried to develop a convenient method for MHC typing among relatively large numbers of animals. We have modified an existing PCR-SSP for detection of multiple allele simultaneously. The concentrations of primers and the annealing temperatures, which appeared critical, were described in Materials and methods in detail. To know whether this method was actually able to detect the *Mafa-A* alleles, plasmids harboring cDNA inserts for respective *Mafa-A* alleles were subjected to multiplex PCR-SSP. As shown in Fig. 4, distinct bands were amplified using appropriate primer sets, although the presence of non-specific bands was also noticed. The cDNAs obtained from members of the family mentioned above were analyzed by multiplex PCR-SSP. *Mafa-A*03* was found in monkeys 2010 and 3005. *Mafa-A*04* was detected in monkeys 5117, 4045, 5076, and 1102, while *Mafa-A*07* was detected in three monkeys: 8225, 2010 and 1102. *Mafa-A*08* was detected only in monkey 8225, while *Mafa-A*11* was shared by monkeys 5117, 4045, 5076, and 1102. *Mafa-A*14* was carried by monkeys 8225, 5117, 4045, 5076, and 3005. The results are summarized in

Table 2 Summary of MHC class I cDNAs isolated from cynomolgus monkeys with RT-PCR and sequencing

Animal	Allele	Number of copies	Primer pair/s
9234	<i>A11</i>	8	<i>Mafa-A-s/Mafa-A-a</i>
8225	<i>A07</i>	5	<i>Mafa-A-s/Mafa-A-a</i>
	<i>A14</i>	31	<i>Mafa-A-s/Mafa-A-a</i>
5117	<i>A11</i>	20	<i>Mafa-A-s/Mafa-A-a</i>
	<i>A14</i>	11	<i>Mafa-A-s/Mafa-A-a</i>
4045	<i>A11</i>	35	<i>Mafa-A-s/Mafa-A-a</i>
	<i>A14</i>	7	<i>Mafa-A-s/Mafa-A-a</i>
5076	<i>A04</i>	6	<i>Mafa-A13-s/Mafa-A1013-a</i>
	<i>A11</i>	30	<i>Mafa-A-s/Mafa-A-a, Mafa-A13-s/Mafa-A1013-a</i>
	<i>A14</i>	10	<i>Mafa-A-s/Mafa-A-a, Mafa-A13-s/Mafa-A1013-a</i>
2010	<i>A03</i>	37	<i>Mafa-A-s/Mafa-A-a, Mafa-A13-s/Mafa-A1013-a</i>
	<i>A07</i>	9	<i>Mafa-A13-s/Mafa-A1013-a</i>
3005	<i>A03</i>	39	<i>Mafa-A-s/Mafa-A-a, Mafa-A13-s/Mafa-A1013-a</i>
	<i>A14</i>	15	<i>Mafa-A-s/Mafa-A-a, Mafa-A13-s/Mafa-A1013-a</i>
1102	<i>A11</i>	33	<i>Mafa-A-s/Mafa-A-a</i>

Table 3 Summary of typing alleles with sequencing and multiplex PCR-SSP analysis on cynomolgus monkeys (ND not done)

Animal	Sequencing	Multiplex PCR-SSP
9234	<i>A11</i>	ND
8225	<i>A07, A14</i>	<i>A07, A08, A14</i>
5117	<i>A11, A14</i>	<i>A04, A11, A14</i>
4045	<i>A11, A14</i>	<i>A04, A11, A14</i>
5076	<i>A04, A11, A14</i>	<i>A04, A11, A14</i>
2010	<i>A03, A07</i>	<i>A03, A07</i>
3005	<i>A03, A14</i>	<i>A03, A14</i>
1102	<i>A11</i>	<i>A04, A07, A11</i>

Table 3. Since the presence of the *Mafa-A*08* allele was only demonstrated by the multiplex PCR-SSP, the PCR amplicon was subjected to partial nucleotide sequence analysis. The result revealed that the DNA fragment identified as *Mafa-A*08* allele by multiplex PCR-SSP contained, in addition to that of an *Mafa-A* allele per se, the sequence derived from an allele that had not been found before. The results of similar analyses with large numbers of animals were consistent with the view that one to four *Mafa-A* alleles were present in an animal (data not shown). These results strongly suggested that the *A* locus in cynomolgus monkeys had been duplicated.

Discussion

The polymorphic nature of MHC genes is particularly important in antigen recognition because it provides a way of presenting huge numbers of antigens by comparably limited numbers of MHC molecules. Numerous reports on the association of MHC alleles with susceptibility to HIV-1 infection in humans have been published; the prevalence of *HLA-B*14*, *-B*27*, and *-B*57* was shown to be significantly high among slow progressors, while a possible association of *HLA-B*35* and *-B*44* with shorter

survival time was also demonstrated in HIV-1 infected patients (Gierowska et al. 1999; Hendel et al. 1999; Migueles et al. 2000; Nelson et al. 1997). In SIV-infected rhesus monkeys, *Mamu-A*01* and *-A*1303* have been shown to be associated with not only longer survival time but also lower set-point viral load (Muhl et al. 2002). However, as far as we know, there is no literature describing the associations of MHC polymorphism with progression of the disease in SIV-infected cynomolgus monkeys. Moreover, even the nucleotide sequence analyses have not been performed with regard to the class I MHC genes in cynomolgus monkeys. We therefore attempted to determine the nucleotide sequences of the MHC *A* locus genes. *Mafa-A* was amplified using *A*-locus-specific primer pairs. The results showed that at least 14 independent alleles of the class I *A* locus were found in cynomolgus monkeys.

We also have succeeded in developing a multiplex PCR-SSP method which enables us to readily detect several *Mafa-A* alleles simultaneously. When cDNA derived from cynomolgus monkey 8225 was analyzed by this method, however, the presence of a *Mafa-A* allele not detected by the usual RT-PCR was demonstrated. It seemed likely, therefore, that the primer pair designed to amplify *Mafa-A*08* was not specific enough to discriminate the *Mafa-A*08* allele from one with a very similar nucleotide sequence. Similarly, the primer pair designed to detect *Mafa-A*04* amplified a DNA fragment from not only the authentic *Mafa-A*04* allele but also an allele quite similar to *Mafa-A*04*. It seemed, therefore, premature to use only PCR-SSP for detection of either *Mafa-A*04* or *Mafa-A*08*; however, the method could be applied for detection of other alleles. Since we could not rule out completely the possibility that the primers designed to detect other alleles would cross-react with alleles yet to be found, further accumulation of the nucleotide sequences of *Mafa-A* alleles is required.

It was reported that rhesus MHC class I haplotype consisted of at least one *Mamu-A* and at least two *Mamu-B*

(Boyson et al. 1996b). No evidence for the presence of a *HLA-C* homologue was observed, suggesting that the evolution of the *C* locus in gorillas, chimpanzees, and humans is a fairly recent occurrence (Adams et al. 1999, 2000; Boyson et al. 1996b; Cooper et al. 1998; de Groot et al. 2000, Lawlor et al. 1990, 1991). This study showed that an individual cynomolgus monkey had two or three *Mafa-A* alleles, suggesting that the *A* locus of cynomolgus monkeys might be duplicated.

The amino acids that composed the *Mafa-A* pocket were compared with those for the *Mamu-A* pocket. From a crystallographic analysis, a peptide of 8–11 amino acids was demonstrated to bind into the groove of the MHC molecule, which was made up of α_1 and α_2 domains. In the case of the most HLA molecules, the second amino acid of the peptide is thought to play a crucial role in binding to the HLA molecule in conjunction with the C-terminal amino acid of the peptide. In the case of *Mamu-A*01*, however, the most important anchor residue was

Fig. 5 Amino acid residues of pockets B, C, D, and F probably determining the peptide-binding specificity of cynomolgus monkey MHC class I molecule. Amino acids identical with *Mamu-A*01* are indicated by dashes

MHC allele	B pocket residue No.										
	7	9	24	25	34	45	63	66	67	70	99
<i>Mamu-A*01</i>	Y	Y	A	V	V	M	E	N	M	E	V
<i>Mamu-A*1303,NA4</i>	A	.
<i>Mafa-A*01</i>	N	I	.	.	Y
<i>Mafa-A*02</i>	N	I	.	.	Y
<i>Mafa-A*03</i>	S	I	.	.	Y
<i>Mafa-A*04</i>	N	Y	.	.	L
<i>Mafa-A*05</i>	Y
<i>Mafa-A*06</i>	A	.
<i>Mafa-A*07</i>	.	H	K	.	.	Y
<i>Mafa-A*08</i>	.	H	T	.	.	K	N	I	S	N	Y
<i>Mafa-A*09</i>	E	.	I	Y	.	Y
<i>Mafa-A*10</i>	.	.	S	K	.	.	Y
<i>Mafa-A*11</i>	.	H	T	.	.	K	N	I	S	N	F
<i>Mafa-A*12</i>	E	.	I	Y	A	Y
<i>Mafa-A*13</i>	I	S	N	Y
<i>Mafa-A*14</i>	A	Y

MHC allele	C pocket residue No.								
	9	22	70	73	74	97	99	114	116
<i>Mamu-A*01</i>	Y	F	E	N	A	R	V	E	Y
<i>Mamu-A*1303,NA4</i>	.	.	A
<i>Mafa-A*01</i>	.	.	.	M	.	T	Y	.	F
<i>Mafa-A*02</i>	M	Y	D	F
<i>Mafa-A*03</i>	I	Y	S	F
<i>Mafa-A*04</i>	L	D	H
<i>Mafa-A*05</i>	K	Y	H	S
<i>Mafa-A*06</i>	.	.	A
<i>Mafa-A*07</i>	H	.	.	M	.	V	Y	S	.
<i>Mafa-A*08</i>	H	.	N	.	Y	K	Y	.	F
<i>Mafa-A*09</i>	Y	K	Y	.	S
<i>Mafa-A*10</i>	.	.	.	T	Y	T	Y	.	.
<i>Mafa-A*11</i>	H	.	N	T	Y	.	F	S	.
<i>Mafa-A*12</i>	.	.	A	T	Y	.	Y	S	.
<i>Mafa-A*13</i>	.	.	N	T	Y	.	Y	S	H
<i>Mafa-A*14</i>	.	.	A	T	Y	T	Y	D	S

MHC allele	D pocket residue No.					
	99	114	155	156	159	160
<i>Mamu-A*01</i>	V	E	S	M	Y	L
<i>Mamu-A*1303,NA4</i>	.	.	R	.	.	.
<i>Mafa-A*01</i>	Y	.	Q	.	.	.
<i>Mafa-A*02</i>	Y	D	Q	H	.	.
<i>Mafa-A*03</i>	Y	S	Q	W	.	.
<i>Mafa-A*04</i>	L	D
<i>Mafa-A*05</i>	Y	H	.	F	.	.
<i>Mafa-A*06</i>	.	.	Q	I	.	.
<i>Mafa-A*07</i>	Y	S	Q	H	.	.
<i>Mafa-A*08</i>	Y	.	Q	H	.	.
<i>Mafa-A*09</i>	Y	.	Q	.	.	.
<i>Mafa-A*10</i>	Y	.	Q	W	.	.
<i>Mafa-A*11</i>	F	S	.	F	.	V
<i>Mafa-A*12</i>	Y	S	.	F	.	V
<i>Mafa-A*13</i>	Y	S	Q	I	.	.
<i>Mafa-A*14</i>	Y	D	Q	Q	.	.

MHC allele	F pocket residue No.			
	77	80	81	116
<i>Mamu-A*01</i>	N	T	L	Y
<i>Mamu-A*1303,NA4</i>	A	N	.	.
<i>Mafa-A*01</i>	D	N	.	F
<i>Mafa-A*02</i>	.	N	.	F
<i>Mafa-A*03</i>	G	N	.	F
<i>Mafa-A*04</i>	.	N	.	H
<i>Mafa-A*05</i>	.	N	.	S
<i>Mafa-A*06</i>	.	N	.	.
<i>Mafa-A*07</i>	A	N	.	.
<i>Mafa-A*08</i>	.	N	.	F
<i>Mafa-A*09</i>	S	N	.	S
<i>Mafa-A*10</i>
<i>Mafa-A*11</i>	.	.	A	.
<i>Mafa-A*12</i>	S	N	.	H

identified at the third position of the antigen peptide (Allen et al. 1998; Dzuris et al. 2000; Sidney et al. 2000). On the other hand, anchor motif analysis of *Mamu-B*03* showed that the second as well as the C-terminal amino acids of the peptide was indispensable for binding to the MHC molecule (Dzuris et al. 2000). The second amino acid of the antigenic peptide interacts with the B pocket composed of the amino acids shown in Fig. 5. A close look at the amino acid sequences suggested that a peptide presented by *Mafa-A*06* might have a similar motif to the peptide presented by *Mamu-A*1303*, as amino acids involved in the formation of the B pocket were identical in both MHC molecules. Since it was shown that *Mamu-A*01* and *-A*1303* were associated with longer survival and lower set-point viral load (Nelson et al. 1997) in SIV-infected rhesus monkeys, it would be of interest to look at whether the presence of the *Mafa-A*06* allele in a cynomolgus monkey would affect the regulation of viral replication of SIV.

Acknowledgements We thank K. Ono, A. Hiyaoka, and other staff in The Corporation of Production and Breeding of Primate for animal care and blood collection. We also thank H. Okada and S. Miyamoto for helping various experiments. This study was supported by the Program of Fundamental Studies in Health Science of the Organization for Pharmaceutical Safety and Research of Japan, and by the Health Science Research Grants from the Ministry of Health and Welfare of Japan.

Reference

- Adams EJ, Parham P (2001) Species-specific evolution of MHC class I genes in the higher primates. *Immunol Rev* 183:41–64
- Adams EJ, Thomson G, Parham P (1999) Evidence for an *HLA-C*-like locus in the orangutan *Pongo pygmaeus*. *Immunogenetics* 49:865–871
- Adams EJ, Cooper S, Thomson G, Parham P (2000) Common chimpanzees have greater diversity than humans at two of the three highly polymorphic MHC class I genes. *Immunogenetics* 51:410–424
- Allen TM, Sidney J, del Guercio MF, Glickman RL, Lensmeyer GL, Wiebe DA, DeMars R, Pauza CD, Johnson RP, Sette A, Watkins DI (1998) Characterization of the peptide-binding motif of a rhesus MHC class I molecule (*Mamu-A*01*) that binds an immunodominant CTL epitope from simian immunodeficiency virus. *J Immunol* 160:6062–6071
- Allen TM, Mothe BR, Sidney J, Jing P, Dzuris JL, Liebl ME, Vogel TU, O'Connor DH, Wang X, Wussow MC, Thomson JA, Altman JD, Watkins DI, Sette A (2001) CD8(+) lymphocytes from simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques recognize 14 different epitopes bound by the major histocompatibility complex class I molecule *mamu-A*01*: implications for vaccine design and testing. *J Virol* 75:738–749
- Alvarez M, Martinez-Laso J, Varela P, Diaz-Campos N, Gomez-Casado E, Vargas-Alarcon G, Garcia-Torre C, Arnaiz-Villena A (1997) High polymorphism of *Mhc-E* locus in non-human primates: alleles with identical exon 2 and 3 are found in two different species. *Tissue Antigens* 49:160–167
- Boyson JE, McAdam SN, Gallimore A, Golos TG, Liu X, Gotch FM, Hughes AL, Watkins DI (1995) The MHC *E* locus in macaques is polymorphic and is conserved between macaques and humans. *Immunogenetics* 41:59–68
- Boyson JE, Iwanaga KK, Golos TG, Watkins DI (1996a) Identification of the rhesus monkey *HLA-G* ortholog. *Mamu-G* is a pseudogene. *J Immunol* 157:5428–5437
- Boyson JE, Shufflebotham C, Cadavid LF, Urvater JA, Knapp LA, Hughes AL, Watkins DI (1996b) The MHC class I genes of the rhesus monkey. Different evolutionary histories of MHC class I and II genes in primates. *J Immunol* 156:4656–4665
- Cooper S, Adams EJ, Wells RS, Walker CM, Parham P (1998) A major histocompatibility complex class I allele shared by two species of chimpanzee. *Immunogenetics* 47:212–217
- de Groot NG, Otting N, Arguello R, Watkins DI, Doxiadis GG, Madrigal JA, Bontrop RE (2000) Major histocompatibility complex class I diversity in a West African chimpanzee population: implications for HIV research. *Immunogenetics* 51:398–409
- Dzuris JL, Sidney J, Appella E, Chesnut RW, Watkins DI, Sette A (2000) Conserved MHC class I peptide binding motif between humans and rhesus macaques. *J Immunol* 164:283–291
- Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Koller B, Bloom BR (1992) Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:12013–12017
- Gaur LK, Nepom GT (1996) Ancestral major histocompatibility complex *DRB* genes beget conserved patterns of localized polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5380–5383
- Gierowska M, Theodorou I, Debre P, Sanson F, Autran B, Riviere Y, Charron D, Costagliola D (1999) Combined genotypes of *CCR5*, *CCR2*, *SDF1*, and *HLA* genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood* 93:936–941
- Hebert AM, Strohmaier J, Whitman MC, Chen T, Gubina E, Hill DM, Lewis MS, Kozlowski S (2001) Kinetics and thermodynamics of beta 2-microglobulin binding to the alpha 3 domain of major histocompatibility complex class I heavy chain. *Biochemistry* 40:5233–5242
- Hendel H, Caillat-Zucman S, Lebuane H, Carrington M, O'Brien S, Andrieu JM, Schachter F, Zagury D, Rappaport J, Winkler C, Nelson GW, Zagury JF (1999) New class I and II *HLA* alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. *J Immunol* 162:6942–6946
- Hennecke J, Wiley DC (2001) T-cell receptor-MHC interactions up close. *Cell* 104:1–4
- Horton H, Rehrauer W, Meek EC, Shultz MA, Piekarczyk MS, Jing P, Carter DK, Steffen SR, Calore B, Urvater JA, Vogel TU, Wilson NA, Watkins DI (2001) A common rhesus macaque MHC class I molecule which binds a cytotoxic T-lymphocyte epitope in Nef of simian immunodeficiency virus. *Immunogenetics* 53:423–426
- Hou S, Doherty PC, Zijlstra M, Jaenisch R, Katz JM (1992) Delayed clearance of Sendai virus in mice lacking class I MHC-restricted CD8⁺ T cells. *J Immunol* 149:1319–1325
- Kriener K, O'hUigin C, Tichy H, Klein J (2000) Convergent evolution of major histocompatibility complex molecules in humans and New World monkeys. *Immunogenetics* 51:169–178
- Lawlor DA, Warren E, Ward FE, Parham P (1990) Comparison of class I MHC alleles in humans and apes. *Immunol Rev* 113:147–185
- Lawlor DA, Warren E, Taylor P, Parham P (1991) Gorilla class I major histocompatibility complex alleles: comparison to human and chimpanzee class I. *J Exp Med* 174:1491–1509
- McClure HM, Anderson DC, Ansari AA, Fultz PN, Klumpp SA, Schinazi RF (1990) Nonhuman primate models for evaluation of AIDS therapy. *Ann N Y Acad Sci* 616:287–298
- Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, Hallahan CW, Seling SM, Schwartz D, Sullivan J, Connors M (2000) HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2709–2714
- Miller MD, Yamamoto H, Hughes AL, Watkins DI, Letvin NL (1991) Definition of an epitope and MHC class I molecule recognized by gag-specific cytotoxic T lymphocytes in SIVmac-infected rhesus monkeys. *J Immunol* 147:320–329

- Mothe BR, Sidney J, Dzuris JL, Liebl ME, Fuenger S, Watkins DI, Sette A (2002) Characterization of the peptide-binding specificity of Mamu-B*17 and identification of Mamu-B*17-restricted epitopes derived from simian immunodeficiency virus proteins. *J Immunol* 169:210-219
- Muhl T, Krawczak M, Ten Haaf P, Hunsmann G, Sauer mann U (2002) MHC class I alleles influence set-point viral load and survival time in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Immunol* 169:3438-3446
- Nelson GW, Kaslow R, Mann DL (1997) Frequency of HLA allele-specific peptide motifs in HIV-1 proteins correlates with the allele's association with relative rates of disease progression after HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9802-9807
- Otting N, Bontrop RE (1993) Characterization of the rhesus macaque (*Macaca mulatta*) equivalent of HLA-F. *Immunogenetics* 38:141-145
- Otting N, Kenter M, van Weeren P, Jonker M, Bontrop RE (1992) *Mhc-DQB* repertoire variation in hominoid and Old World primate species. *J Immunol* 149:461-470
- Putkonen P, Kaaya EE, Bottiger D, Li SL, Nilsson C, Biberfeld P, Biberfeld G (1992) Clinical features and predictive markers of disease progression in cynomolgus monkeys experimentally infected with simian immunodeficiency virus. *AIDS* 6:257-263
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425
- Salter RD, Benjamin RJ, Wesley PK, Buxton SE, Garrett TP, Clayberger C, Krensky AM, Norment AM, Littman DR, Parham P (1990) A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature* 345:41-46
- Sidney J, Dzuris JL, Newman MJ, Johnson RP, Kaur A, Armitinder K, Walker CM, Appella E, Mothe B, Watkins DI, Sette A (2000) Definition of the Mamu A*01 peptide binding specificity: application to the identification of wild-type and optimized ligands from simian immunodeficiency virus regulatory proteins. *J Immunol* 165:6387-6399
- Slukvin II, Watkins DI, Golos TG (1999) Tissue distribution of the mRNA for a rhesus monkey major histocompatibility class Ib molecule, Mamu-AG. *Tissue Antigens* 53:282-291
- Urvater JA, McAdam SN, Loehrke JH, Allen TM, Moran JL, Rowell TJ, Rojo S, Lopez de Castro JA, Taurog JD, Watkins DI (2000a) A high incidence of *Shigella*-induced arthritis in a primate species: major histocompatibility complex class I molecules associated with resistance and susceptibility, and their relationship to HLA-B27. *Immunogenetics* 51:314-325
- Urvater JA, Otting N, Loehrke JH, Rudersdorf R, Slukvin II, Piekarczyk MS, Golos TG, Hughes AL, Bontrop RE, Watkins DI (2000b) *Mamu-I*: a novel primate MHC class I B-related locus with unusually low variability. *J Immunol* 164:1386-1398
- Valiante NM, Lienert K, Shilling HG, Smits BJ, Parham P (1997) Killer cell receptors: keeping pace with MHC class I evolution. *Immunol Rev* 155:155-164
- Voss G, Letvin NL (1996) Definition of human immunodeficiency virus type 1 gp120 and gp41 cytotoxic T-lymphocyte epitopes and their restricting major histocompatibility complex class I alleles in simian-human immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Virol* 70:7335-7340
- Watanabe N, McAdam SN, Boyson JE, Piekarczyk MS, Yasutomi Y, Watkins DI, Letvin NL (1994) A simian immunodeficiency virus envelope V3 cytotoxic T-lymphocyte epitope in rhesus monkeys and its restricting major histocompatibility complex class I molecule Mamu-A*02. *J Virol* 68:6690-6696
- Yasutomi Y, McAdam SN, Boyson JE, Piekarczyk MS, Watkins DI, Letvin NL (1995) A MHC class I B locus allele-restricted simian immunodeficiency virus envelope CTL epitope in rhesus monkeys. *J Immunol* 154:2516-2522
- York IA, Rock KL (1996) Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 14:369-396

ハンセン病基礎医学研究のトピックス

牧野 正彦¹⁾*、鈴木 幸一¹⁾、福富 康夫¹⁾、山下 康子¹⁾、前田 百美¹⁾、
宮本 友司¹⁾、向井 徹¹⁾、中田 登¹⁾、甲斐 雅規¹⁾、山崎 利雄¹⁾、
儀同 政一²⁾、松岡 正典²⁾

1) 国立感染症研究所ハンセン病研究センター病原微生物部

2) 国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部

[受付・掲載決定：2004年11月12日]

キーワード：ハンセン病・らい菌・トピックス

ハンセン病はWHOの多剤併用療法の導入により、現在では「治る病気」として認識されるに至った。化学療法の普及と日本国内の新規患者の発症率から、ともすれば安易に考えられがちであるが、ハンセン病をサイエンスの観点から見た時、その重要性は極めて高い状態にある。ハンセン病及びらい菌を取り巻く基礎医学は、今尚未開発のまま取り残されている重要課題が山積みされている。ここでは、基礎医学上の最近のトピックスを紹介したい。

はじめに

ハンセン病は有史以来、差別と偏見の対象となってきた慢性感染症である。抗酸菌属に分類されるらい菌の感染により発症し、皮膚および末梢神経を主病巣とする。1982年WHOは、多剤併用療法を推奨・開始した。本治療法は、薬剤耐性らい菌を抑制することを目的として開始されたが、当初期待した以上に奏効し、ハンセン病の制圧も視野に入るまでに至った。世界のハンセン病登録者数は順調に減少しているものの、新規ハンセン病患者の抑制は期待された以上には減少していない。真の意味でのハンセン病の制圧には、信頼に足るワクチンの開発が強く望まれる。また、薬剤

耐性らい菌は日に日に増加しており、今後世界的レベルでの対処が必要となると想定される。一方、基礎医学分野では、Cole等によりらい菌の全遺伝子配列が決定され、生化学・免疫学等の分野の進展とともに、ハンセン病に関する基礎医学も急速に発展し、有史以来のらい菌の謎も少しずつ解き明かされていくものと期待される。

本稿では、ハンセン病およびらい菌に関する最新の知見を紹介することを目的とする。ハンセン病制圧への一助となれば幸いである。

I. 自然免疫

表皮や粘膜上皮などの被覆上皮は病原体の侵入を防ぐ物理的および生物学的障壁として働くが、病原体がそれらを超えて生体内に侵入した際に最初に発動するのが自然免疫系による生体防御反応である。すなわち、マクロファージなどの食細胞は、感染初期の段階において異物を認識し、貪

*Corresponding author :

国立感染症研究所ハンセン病研究センター病原微生物部
〒189-0002 東京都東村山市青葉町4-2-1

Tel : 042-391-8211 Fax : 042-391-8212

E-mail : mmaki@nih.go.jp

食・殺菌するとともに炎症性サイトカインやインターフェロンなどを産生する。そのような異物の認識に関わる手段として、細胞表面のスカベンジャー受容体やマンノース受容体を初めとするいくつかの機構が知られていたが、近年、Toll様受容体 (TLR) がクローニングされ、その自然免疫系における重要性が認識されてきた¹⁾。

TLRはI型の膜貫通型受容体であり、現在までに11種が知られている。その発現は、マクロファージなどの免疫担当細胞に限らず、上皮細胞を初めとする生体内の多くの細胞に見い出されることが報告され、病原体が持つ様々な分子パターン (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) を認識するパターン認識受容体 (pattern recognition receptors : PRRs) として機能することが明らかにされてきた。

TLRが認識するPAMPsは、大別するとリポ多糖 (LPS) やペプチドグリカン (PGN) などの細菌由来成分 (TLR1, 2, 5, 6, 11などが認識) と、二本鎖RNA (dsRNA) や非メチル化CpGモチーフを持つDNAなどの核酸成分 (TLR3, 7, 8, 9などが認識) とに分けることができる。しかしながら、TLRは機能やリガンドの情報からではなく、ホモロジー検索によって先に遺伝子群がクローニングされたものであり、それらが認識するリガンドの全容は未だ明らかではない。また、一つのTLRが認識できるリガンドは必ずしも種類に限定するものではなく、様々な分子パターンと幅広い親和性を持つと考えた方がより合目的でもある。

刺激前の状態においては、一部のTLRは細胞膜に発現し、その他は細胞内に存在するが、最終的には異物を含んだエンドゾーム膜などに局在化するものと考えられる。TLRの細胞内ドメインは、インターロイキン1受容体 (IL-1R) とホモロジーが高くToll-IL-1R (TIR) ドメインと呼ばれる。TLRが異物を認識すると、このTIRドメインに結合するアダプター分子群が活性化し、シグナルが伝達される。抗酸菌が持つリポアラビノマンナン (LAM) やペプチドグリカン (PGN) は、マクロファージ等が細胞膜に発現しているTLR2がTLR1およびTLR6などと共同することによって認識される。その結果として、TIRドメインに

結合するMyD88 (myeloid differentiation factor 88) を介したシグナル伝達経路を活性化しNF κ Bの誘導を経てIL-1やTNF- α などの炎症性サイトカイン遺伝子の転写を誘導することが示されている²⁾。

II. マクロファージとサイトカイン

1. ハンセン病におけるマクロファージの関与

らい菌は細胞内寄生菌としてマクロファージやシュワン細胞内で増殖する。マクロファージは下等動物から高等動物に至るまで広く存在し、体内に侵入した細菌などを貪食して排除する機能を有する。また、サイトカインなどの免疫調節分子を産生する他、抗原提示能を有し、さらには抗腫瘍作用も持ち合わせるなど多機能細胞である。

ハンセン病はきわめて特異な臨床スペクトラムを呈する疾患である。サイトカイン産生の観点からみると、TT型ではTh1型サイトカインであるIL-2とIFN- γ が主に発現しており、LL型ではTh2型サイトカインであるIL-4、IL-5、IL-10が強く発現している。マクロファージが主体となり産生するサイトカインはTT型ではIL-1 β 、TNF α 、GM-CSF、IL-6、LL型ではIL-10である。

2. マクロファージが産生するサイトカイン

マクロファージはグラム陰性菌のLPSなど細菌菌体成分等の刺激によりIL-1やTNF α など炎症性サイトカイン、さらに、IL-6、IL-8、IFN α/β 等も産生する。抗酸菌にはLAMのような糖脂質を含む細胞壁菌体成分が存在し、LPSと同様にマクロファージからのサイトカイン産生を誘導する。らい菌を貪食したマクロファージからはTNF α やIL-10が産生されるが、LAMで前処理するとマクロファージの活性化が抑制される。マクロファージはマンノースなどの糖に対する受容体やフィブロネクチン等を介してらい菌を認識し貪食する。オプソニン化されたらい菌を補体受容体やFc受容体を通じて貪食する機構もある。その過程でTNF α やIL-1を産生する。しかし、*M. bovis* BCGなど他の抗酸菌と比較するとTNF α の産生量は低く、その原因はPGL-Iなどの脂質成分によるサイトカイン産生抑制作用によると考えられる。

また、免疫反応抑制因子の一つであるIL-1レセプターアンタゴニストが、らい菌刺激により産生されるLL型における増菌の一因である。ハンセン病患者の皮内反応に用いられるダルメンドラ抗原は脱脂菌体であるためサイトカイン産生を強く誘導し、結果としてリンパ球を強く刺激する³⁾。

3. マクロファージの機能発現に関わるサイトカイン

1) 抗らい菌活性の発現と抑制に関わるサイトカイン

放射性同位元素標識基質の代謝を指標としてらい菌の生存率を定量する方法が開発されている。本方法を用いてマウスマクロファージの抗らい菌活性を検索すると、細胞性免疫の主役を担うIFN- γ はマクロファージを活性化し抗菌活性を発揮する。この時殺菌作用を有するNOが遊離される。マクロファージの活性化には、らい菌貪食時に産生されるTNF α が二次刺激として必須であることが判明している。一方、ヒトマクロファージにおいては、IFN- γ 刺激による抗らい菌活性の発現及びNOの産生は実験的には証明されていない。しかし、TT型病巣でIFN- γ の発現が高いことから、*in vivo*ではIFN- γ がヒトマクロファージの活性化に関与している可能性は高い。NO以外のO₂⁻などが殺菌に重要な役割を果たしている可能性もある⁴⁾。

IL-10はT細胞などにおけるサイトカイン産生を抑制する作用をもっている他、マクロファージの殺菌能を抑制することが知られている。LL型病巣部ではIL-10の発現が顕著にみられる。PGE₂はT細胞やマクロファージに対して免疫抑制的に作用するプロスタノイドとして知られており、ハンセン病においてもPGE₂を誘導するシクロオキシゲナーゼ-2がLL型病巣で多く発現している。従って、これら抑制因子がLL型病変部における殺菌能低下に関与していると考えられる。また、*in vitro*でらい菌感染マクロファージをIL-10存在下で培養すると、らい菌の代謝活性が長期維持され菌体の伸長現象も観察される。

2) マクロファージの抗原提示機能に関わるサイトカイン

マクロファージはMHC class II抗原を通じた抗原提示機能を有しており、IFN- γ 刺激によりその

発現は強まり提示能が増強される。*in vivo*や*in vitro*において、らい菌感染したマクロファージ表面のMHC class II抗原の発現低下が観察されている。らい菌が大量に存在するらい腫内マクロファージでは、その抗原提示機能の低下が考えられている。

Ⅲ. 細胞内プロセッシング (P-L fusionを中心として)

マクロファージを主たる宿主とする細胞内寄生菌である結核菌やらい菌が、どのようにして細胞内に侵入し、長期間潜伏・増殖を可能にするのかという点はきわめて重要な問題である。これらの菌を含むファゴゾームは、成熟が抑制され、菌は、ライソゾームからの消化酵素や酸性のpHから逃れることによって細胞内寄生が可能となる。これらの現象は古くから知られているが、その分子機構は未だ不明な点が多い。本稿では、主に結核菌において得られた知見を元に概説する。

マクロファージによる異物の貪食は、特定の細胞膜受容体を介した接着と認識によって引き起こされる。抗酸菌の認識に際しては、免疫グロブリンのFc受容体、マンノース受容体、スカベンジャー受容体、補体受容体などが関与することが示されている。特に、CR3補体受容体による認識は重要であるが、抗酸菌の取込みには補体によるオプソニン化は必要では無く、菌体表面のリガンドを直接認識すると考えられている。

菌の取り込みに際しては、細胞膜上のコレステロールに富む脂質領域であるラフト構造が重要な役割を果たす⁵⁾。注目すべき点は、用いられる受容体の種類によって細胞内で活性化するシグナル伝達機構が異なり、その後の菌の運命に影響を与えることである。すなわち、補体受容体やスカベンジャー受容体によって認識された場合は、ファゴゾームの成熟が抑制され菌は生存可能となるが、免疫グロブリンでオプソニン化されFc受容体を介して取り込まれた場合は、ファゴゾームとライソゾームの融合(P-L fusion)が起こり殺菌される。このことは、菌を含むファゴゾームは全て同じではなく、菌の認識に関わった受容体の種類や菌との親和性によってそれぞれ異なることを意味

する。これらファゴゾームの多様性は、ファゴゾーム膜に存在するEEA 1, Rab 5, Rab 7, LAMP, PI (3) P, calnexin, H⁺ATPaseなど数多くの機能蛋白群によって規定されている⁶⁾。

IFN- γ や活性型ビタミンD₃などはマクロファージ内の菌に対し殺菌的に作用するが、その重要な手段の一つにP-L fusionの阻害を解除することがある。P-L fusionに際しては従来ライソゾームが完全にファゴゾームと一体化すると考えられてきたが、一過性に融合しすぐに離れる“kiss-and-run”機構も有力視されてきている。また、一般に、抗酸菌はサルモネラなどと異なり積極的に細胞内に侵入する手段を持っていないと考えられているが、結核菌やらい菌が持つ遺伝子のmce1A領域遺伝子産物が積極的に細胞内侵入に関与するという報告もある⁷⁾。

未成熟のままのファゴゾームは、その中に潜伏する菌にとって、増殖するための栄養が供給される場であり、また、細胞内の殺菌機構から防御されるだけでなく、免疫監視機構からも逃れるシールドの役割を果たし、これが長期間の菌の潜伏と持続感染を可能としている。マウスのマクロファージと*M. bovis* BCGを用いた研究で、アクチン結合性を有する細胞膜の裏打ち蛋白として知られていたcoronin (別名tryptophane aspartate-containing coat protein: TACO) は、生きた菌を含むファゴゾーム膜に移行し、そのことがP-L fusionの阻害に重要であることが示された⁸⁾。しかしながら、マウス以外の食細胞を用いた実験ではcoroninにそのような働きが見られない例も報告されている。したがって、coroninがヒトのマクロファージや、結核菌やらい菌感染においても報告されたような働きを持ち、P-L fusion阻止に関わる唯一の蛋白であるか否かに関しては、さらなる検討が必要である。また、末梢血単球からサイトカインで誘導されたマクロファージと樹状細胞とでは、ファゴゾームの性質や菌の増殖能が全く異なることも報告されている。これらのことは、細胞内プロセッシング機構の解明には培養細胞に菌を感染させるという実験手法が不可欠であるが、用いる細胞や菌の種類によってその結果が異なり、解釈には注意が必要であることを示している。

IV. らい菌のリポ蛋白

細菌には多くのリポ蛋白が存在するが、その生理的役割は十分に明らかにされていない。結核菌では、19kDと38kDのリポ蛋白が報告され、その免疫学的性状も明らかにされつつあるが⁹⁾、らい菌に関しては、リポ蛋白の存在も明らかにされていなかった。2001年らい菌のゲノムDNAの全配列が公開され、我々は脂質附加を受けることが予想されるアミノ酸配列をもとにリポ蛋白をコードするらい菌遺伝子を探し、免疫学的活性を有する新しいリポ蛋白LpK (Accession No.ML0603)を発見した¹⁰⁾。

1. らい菌のリポ蛋白質の構造

細菌のリポ蛋白はN末端側に特徴的なアミノ酸配列 (MISALMVAVAC) を有するプロ蛋白質として合成され、Diacylglyceryl transferase及びSignal peptidase IIにより翻訳後修飾の脂質附加を受け、N-acyl-diglyceride-cystein構造を有する成熟リポ蛋白質となる。らい菌のゲノムDNAの情報をもとに遺伝子組み換えによりリポ蛋白LpKを大腸菌で発現し、その構造を検討した。LpKはらい菌の膜に存在し、分子量33kDでN末端のシステインに脂質が附加したリポ蛋白であることが明らかとなった。

2. リポ蛋白質の生理的役割

細菌の感染免疫反応に重要な役割を果たすリポ蛋白としては結核菌の分子量19kDのリポ蛋白が、IL-12を強く誘導し細胞性免疫反応に関与していることが報告されている⁹⁾。

遺伝子組み換えにより大腸菌で発現したLpKについてヒト単球からのIL-12誘導活性を検討した結果、強くIL-12誘導する活性を有していることが明らかとなった。したがってLpKは生体防御反応に密接に関与しているものと考えられる。さらにLpKの種々の組み換え蛋白を大腸菌で作製し (図1)、IL-12誘導の活性中心を検討した¹¹⁾ (図2)。脂質の附加したLpK, LpK-aでは非常に強い活性があり脂質を欠くLpK-t, LpK-bではその活性が弱く、C末端側LpK-eには活性がないことが明らかとなった (図2)。したがってLpKのIL-12誘

導活性には脂質とN末端領域の蛋白部分の両方が必要であることが示唆された。

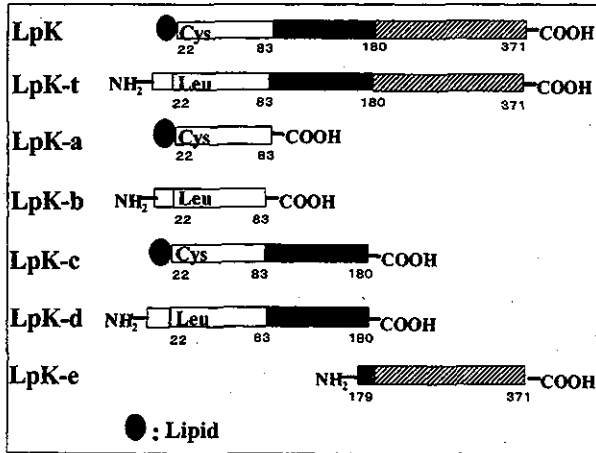


図1 リポ蛋白LpKおよびTruncated LpKの構造
LpK およびTruncated LpKはらい菌のゲノムDNAをもとにアミノ酸配列を決定し、遺伝子組み換えにより大腸菌で発現させた。数字はpro LpKのN末端からのアミノ酸番号を示している。

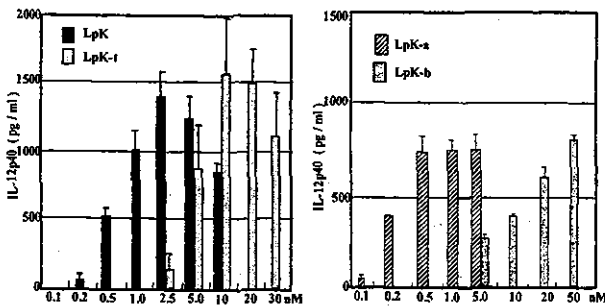


図2 リポ蛋白LpKおよびTruncated LpK刺激によるヒト単球からのIL-12誘導活性
ヒト末梢単球 (1×10^5 cells) をLpK及びTruncated LpKで37°C、24時間刺激し、産生したIL-12p40をELISA法で測定した。

3. リポ蛋白とTLR

近年、病原体の防御システムである自然免疫系においてTLRファミリーの関与が明らかとなってきた。種々の病原体の構成成分に対するTLRの活性化機構が報告されているが、リポペプチドによるサイトカインの誘導に関してもTLR2の関与の報告がある¹²⁾。らい菌のリポ蛋白LpKにおいてTLR2の関与を検討したところ、脂質を有するLpK、LpK-aでTLR2の関与が認められた(図3)。LpKはTLR2を介してIL-12を誘導しているものと考えられる。このことはLpKが自然免疫を賦活する物質のひとつであり、ワクチンの候補物質になりうる可能性を示唆している。

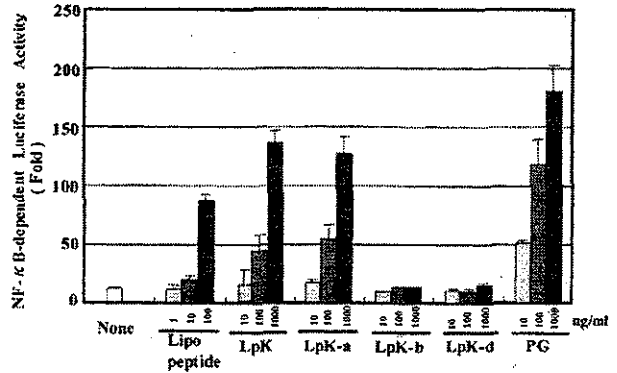


図3 リポ蛋白LpKおよびTruncated LpKのTLR2の関与
TLR2導入HEK293細胞を用いて、LpK及びTruncated LpKの刺激により活性化されたNF-κB-luciferase活性を測定した。
*PG: peptidoglycan
**Lipo peptide: 合成lipopeptide

V. 樹状細胞とワクチン

1. 樹状細胞

病原体が体外へ速やかに排除されるためには免疫系が十分に働かなければならない。その免疫系は、病原体感染初期に働く自然免疫系と、活性化には若干の時間を要する獲得免疫系に大別される。獲得免疫反応は、抗原特異的であり、多様な抗原に特異的に反応する多くのT細胞およびB細胞クローンから構築されている。獲得免疫が有効に活性化するためには、抗原提示細胞が抗原を取り込み活性化した後、抗原由来ペプチドを主要組織適合抗原とともに細胞表面に発現させ、T細胞を活性化する必要がある。抗原提示細胞には、マクロファージ・B細胞・樹状細胞が存在するが、この中でナイーブなT細胞を強く活性化できるのは樹状細胞だけである。樹状細胞は、抗酸菌に対する生体防御反応として最も重要なタイプ1細胞性免疫反応の活性化を推進するサイトカイン、IL-12を産生する。樹状細胞はあらゆる種類の抗原にも対応することが可能で、自然免疫反応と獲得免疫反応の橋渡し役をしている。従って、細胞性免疫反応の司令塔の役割を果たす細胞とも言える。樹状細胞は、樹状突起を持つ細胞として命名されたが、単一の細胞ではなく、細胞起源あるいは機能が異なる種々のサブセットからなる細胞集団である。本稿では、ヒト末梢単球からGM-CSFとIL-4を用いて分化誘導した樹状細胞を用いて得られ

た最近の知見を紹介する。

2. 樹状細胞とらい菌

少菌型ハンセン病患者皮膚病変を検索すると、類上皮性肉芽腫性病変を構成する細胞集団の中にCD1a陽性の樹状細胞が存在する。しかし、多菌型ハンセン病患者皮膚病変中には存在しない。このことは、抗らい菌細胞性免疫反応の活性化に樹状細胞が重要な役割を果たしていることを示している。*in vitro*でらい菌をパルスした樹状細胞を抗酸菌染色すると、細胞内に抗酸菌が染め出され、細胞内をFACSを用いて半定量的に解析すると、パルスしたらい菌の量依存性にPGL-I抗原の発現が増強する¹³⁾。その程度は、マクロファージと同程度であり、樹状細胞も*in vitro*ではらい菌に親和性を有するものと考えられる。一般に抗原提示細胞は、T細胞を活性化するにはその表面に病原体由来のペプチド抗原を発現しなければならない。マクロファージにらい菌が感染しても、ファゴゾームを形成しライソゾームとの融合を阻止して、らい菌由来抗原の細胞表面発現を抑制している。しかし、樹状細胞では、細胞表面にハンセン病患者血清と反応するらい菌抗原を発現させる。らい菌感染樹状細胞は、自己CD4陽性およびCD8陽性T細胞を刺激・活性化させて、IFN- γ の産生を誘導する。以上より、樹状細胞は、らい菌に対する生体防御反応を惹起する上で、重要な役割を果たしていると考えられる。

3. 樹状細胞を用いたハンセン病免疫療法

ハンセン病に対する免疫療法の目的は、細胞内寄生性感染をしたらい菌を体外に排除することにある。らい菌は生体内ではマクロファージに対し最も強い親和性を示す。そこで、らい菌感染したマクロファージを上述のサイトカインを用い樹状細胞様に形質転換し、その免疫学的性状を解析した¹⁴⁾。形質転換した細胞は、自己のCD4陽性およびCD8陽性T細胞を活性化する能力を獲得し、同時にIL-12を産生する能力を得た。親マクロファージには存在しなかった抗原提示能を獲得したことが明らかになった。また、形質転換した細胞の表面を検索すると、らい菌由来細胞膜抗原が発現していた。そこで、本細胞膜に特異的に働く

CD8陽性キラーT細胞(CTL)を活性化したところ、らい菌感染した上記形質転換細胞は容易に殺戮されたが、親らい菌感染マクロファージは抵抗性を示した。このことから、新しい免疫療法の可能性が開けたと考えられる。

4. ハンセン病に対するワクチン開発

樹状細胞を用いると自己のT細胞を活性化することが可能である。らい菌に対するワクチンは、らい菌由来抗原を用いて、らい菌に対して迅速に反応するメモリーT細胞を産生することにある。そのためには、T細胞を強く活性化するらい菌抗原を同定しなければならない。我々は、らい菌を細胞壁・細胞膜・細胞質の3つに分画し、ワクチン候補分子となり得る抗原がどの分画に存在するか検索した¹⁵⁾。その結果、細胞膜は樹状細胞を強く成熟化および活性化させ、同時にCD4陽性およびCD8陽性T細胞を強く活性化しIFN- γ を産生させた。今後、細胞膜中に存在するワクチン候補分子を同定する予定である。

VI. 細胞壁の構造と成分

らい菌等の抗酸菌の主な特徴として、菌体を構成する細胞壁の構造が他の細菌に比べ非常に複雑であり、抗原性や病原性に深く関わっている点が挙げられる。細胞壁には抗酸菌に共通するアラビノガラクトタン層、ミコール酸などが存在し、さらに最外層にらい菌に特異的な糖脂質成分としてPhenolic glycolipid-I (PGL-I)を有する(図4, 5)。また細胞壁には糖脂質成分と並んでタンパク質成分も含まれており、これらが複合的あるいは単独で宿主に様々な影響を与えることにより、病原性因子として作用する。

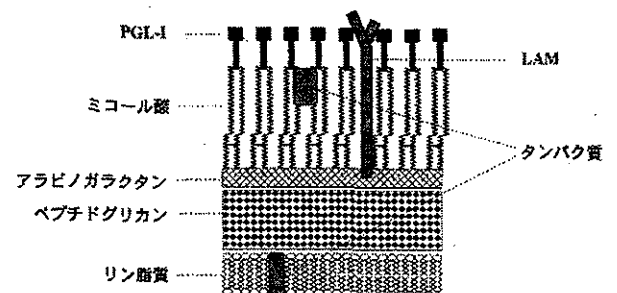


図4 らい菌細胞壁の構造

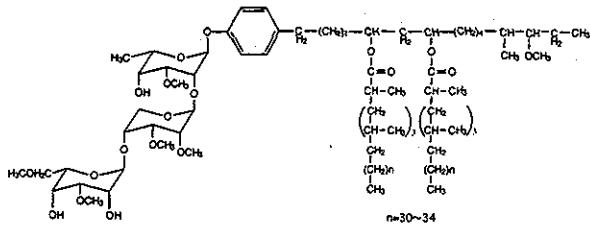


図5 PGL-Iの構造

1. 糖脂質

らい菌において主要な糖脂質成分の一つがPGL-Iである。PGL-Iは糖鎖部分が他のPGL類と異なりらい菌に特有な構造であることから、その抗原性を生かし血清診断法として利用されている。一方、病原性とPGL-Iとの関連性については従来不明な点が多かったが、近年いくつかの知見が発表され次第に明らかになりつつある。ハンセン病の主要な症状の一つに末梢神経傷害がある。本症誘導に際し、らい菌のシュワン細胞への侵入にPGL-Iが深く関与しており、特に糖鎖部分が重要な役割を果たしていることが判明した¹⁶⁾。また、PGL-Iと糖鎖を除き構造がほぼ同一である結核菌のPGL類についても、これまで病原性との関わりは不明であったが、結核菌においてPGL類は高病原性株に偏在し、生体防御に重要である炎症性サイトカインを抑制する働きを持つことが明らかとなった¹⁷⁾。

2. タンパク質

細胞壁には糖脂質成分と並んで、病原性に関与するタンパク質成分も数多く存在する。それらの一つとして、らい菌感染の第一段階である宿主細胞への接着へ関与するタンパク質FAP (Fibronectin-Attachment Protein) が知られている¹⁸⁾。FAPは、粘膜などに存在するfibronectinと結合する性質を持っており、この過程を経て宿主細胞へ侵入する。また、らい菌FAPのアミノ酸配列と高い相同性を示す分子が他の抗酸菌にも存在している。筆者らはらい菌FAPの詳細な機能を明らかにする目的で、同じ抗酸菌である*Mycobacterium smegmatis*において遺伝子破壊株を作製・解析し、FAPが菌体の凝集性や疎水性に大きな影響を与える因子であることを新たに明らかにした(図6)¹⁹⁾。らい菌においてもFAPは同様の機能を担っていることが予想される。

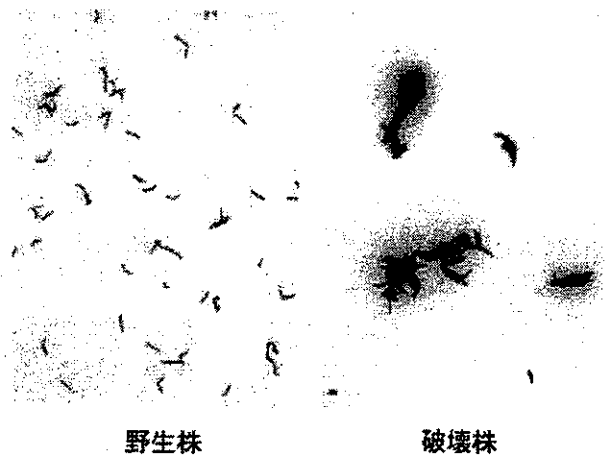
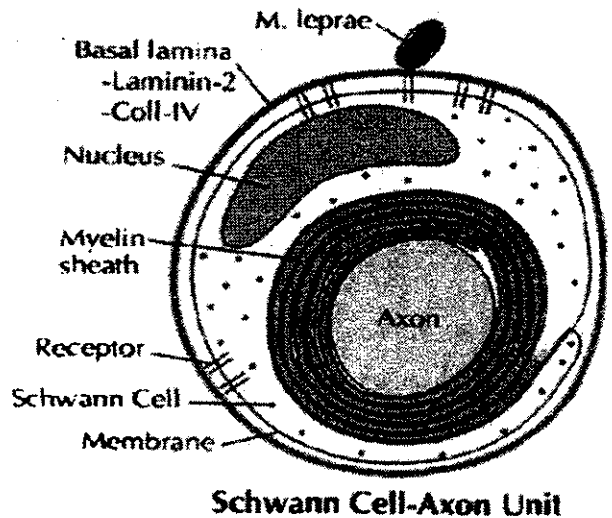


図6 *M. smegmatis* における FAP 遺伝子破壊株の形態

VII. シュワン細胞とらい菌

ハンセン病はらい菌の感染により、末梢神経障害が誘導される疾患である。末梢神経障害に起因した運動機能障害が引き起こされる患者は少ない。従って、らい菌による神経障害機構の解明はハンセン病の発病、病態を理解する上で不可欠である。神経細胞とらい菌の関係が少しずつ明らかになっている。シュワン細胞のbasal laminaに存在するラミニン2およびその受容体 dystroglycanがらい菌との作用にかかわっていることが報告されている²⁰⁾。近年、Rambukkanaらにより、らい菌の細胞壁に存在する糖脂質PGL-Iがラミニン2に結合することが明らかになった



A schematic drawing showing in vivo interaction of the leprosy bacterium *M. leprae* with the basal lamina of a myelinated Schwann cell-axon unit.

図7 らい菌とシュワン細胞の関係 (Vincent Ng et al. ¹⁶⁾) らい菌はシュワン細胞のラミニン2に結合し感染する。

(図7)¹⁶⁾。PGL-Iはらい菌特異的な糖脂質であることから、らい菌の神経親和性にPGL-Iが関与している可能性が高い。ラミニン2に結合する菌因子として分子量21kDの蛋白 (ML-LBP21) の報告もある²¹⁾。しかしながら、その多くの研究はハンセン病を発症しないラットのシュワン細胞が用いられて行われたことを重要視し^{16), 22)}、我々はらい菌感染により末梢神経障害を示すことが報告されているサルに着目し、サル由来シュワン細胞を樹立した。

1. サル由来シュワン細胞の分離

カニクイザルの新生児および成体サルより、後根神経節および坐骨神経をコラゲナーゼとトリプシンで処理し、細胞を分散させ、初代培養を行った。その後DNA合成阻害剤であるAra-C (cytosine-b-D-arabinofuranoside) を作用させて、シュワン細胞の増殖を妨げる繊維芽細胞を除去した。さらに、増殖因子heregulin存在化で2~3週間培養し、シュワン細胞の分離を行った。

2. シュワン細胞表面マーカーの解析

サルの後根神経節、坐骨神経由来初代培養細胞、および株化細胞は、S-100およびラミニン抗原に対する抗体を用いたFACS解析、さらに、組織免疫染色によりシュワン細胞であること確認した

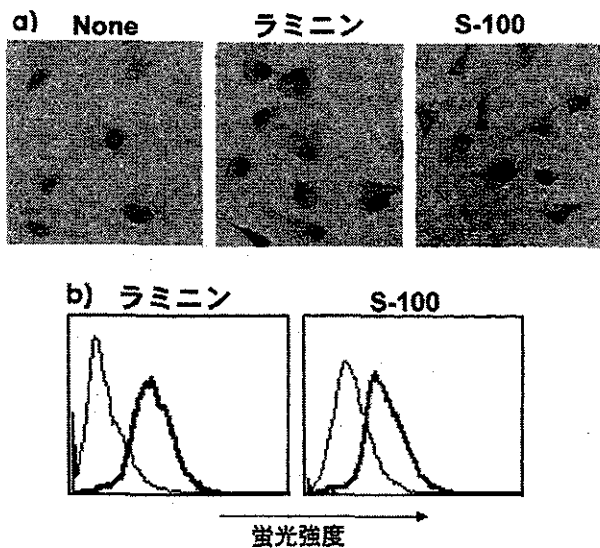


図8 a) サルのシュワン細胞をS-100、ラミニン抗原に対する抗体で組織免疫染色したところ、陽性であった。b) FACS解析：抗S-100及びラミニン抗体で染色し、さらに二次抗体、抗マウス-FITCで染めることによりシュワン細胞であること確認した。

(図8)。細胞表面マーカーを調べるとMHCクラスI抗原は発現していたが、クラスII抗原は陰性であった。

3. シュワン細胞のらい菌感受性

らい菌に対するシュワン細胞の感受性を検索した。FITC標識したらい菌をシュワン細胞と混合培養すると、2~3時間以内にらい菌はシュワン細胞により容易に取り込まれ高親和性を示した(図9)。さらに、らい菌の膜蛋白に対するポリクローナル抗体で、らい菌感染シュワン細胞表面を染色すると陽性であった。このことから、シュワン細胞は、らい菌感染をうけるとらい菌由来抗原をその表面に発現する可能性が示唆された。

サル由来のシュワン細胞はらい菌感受性を有し、らい菌抗原をその表面に発現することから、ハンセン病における末梢神経障害機構の解析に有用であることが示唆された。

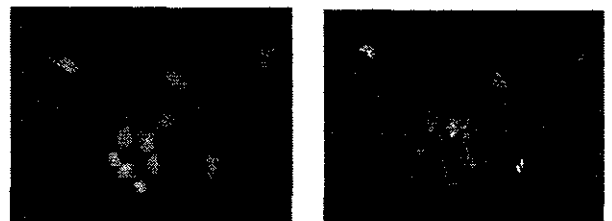


図9 FITCラベルしたらい菌をシュワン細胞と混合培養し、3時間後ヘキストで核を染色し、蛍光顕微鏡で観察すると、らい菌がシュワン細胞に取り込まれていることを確認した。

VIII. らい菌の新しい遺伝子診断法

1. LAMP法とは

らい菌の遺伝子検査は、高感度で検出が容易なことからPCR法が広く利用されている。しかし、操作の煩雑性、器具が高価であることが問題となっている。最近、PCRと異なった原理に基づき、等温で標的遺伝子を増幅するシステム、loop-mediated isothermal amplification (LAMP法) が開発された²³⁾。LAMP法は、温度制御装置を必要とせず、簡便かつ迅速に遺伝子を検出できるため、様々な分野において利用されつつある。

2. LAMP法の特徴

1) 反応組成

反応液は、緩衝液、鎖置換型DNAポリメラーゼ (*Bst* polymerase)、基質 (dNTP) およびプライマーから構成される。プライマーは、標的遺伝子配列の6領域を用いた4種類のプライマー (Forward Inner Primer [FIP], Backward Inner Primer [BIP], F3, B3) を用いる (図10)。

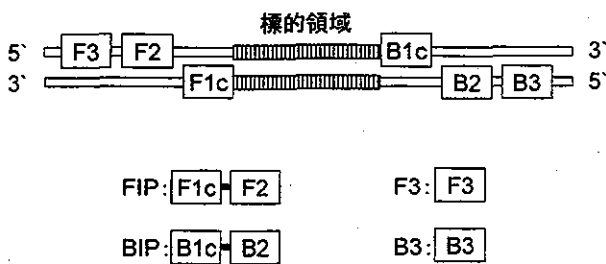


図10 LAMP法に用いるプライマーの構成

2) 一定温度による反応

反応液にサンプルを加え、60℃から65℃の間の一定温度に30分～1時間反応させることにより遺伝子を増幅する。つまり精密な温度制御装置を必要とせず、一定温度を保てる装置があれば反応が可能である。等温の遺伝子増幅過程においてDNAが、Loopを形成することより、loop-mediated isothermal amplificationと呼ばれる。詳細な増幅原理等は、参考文献に記載したホームページを参照されたい²⁴⁾。

3) 高い特異性と増幅性

反応に6領域からなる4種のプライマーを用いるため、増幅の特異性は極めて高い。LAMP法の遺伝子増幅産物は、標的遺伝子の相補的な配列の繰り返し構造により様々なサイズで産生されるため、特徴的な電気泳動像になる。また、増幅領域内に単一で存在する制限酵素サイトの処理により産物は集約し、特異的増幅が確認できる (図11)。増幅効率も高く、ほとんどの標的遺伝子において10コピー以下の遺伝子から増幅が可能である。PCR法において阻害物質として知られるヘパリン添加血液も熱処理を施すことによりLAMP法に適用し得る。

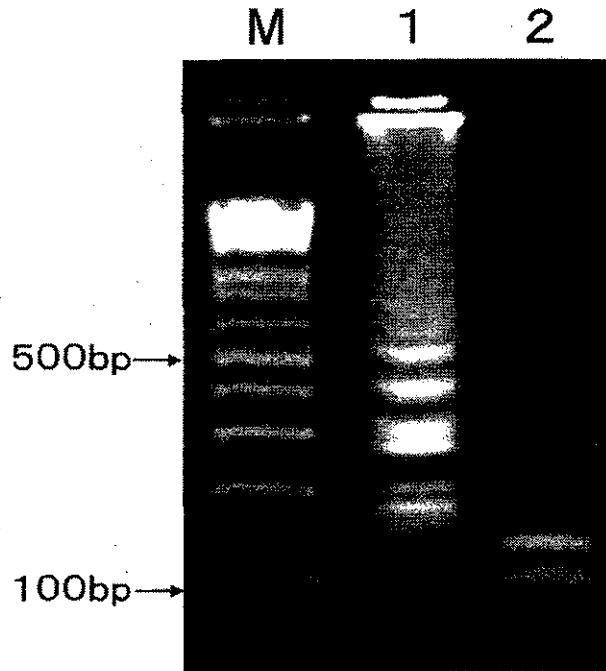


図11 LAMP法による *M. leprae* の増幅。M: 分子量マーカー、1: *M. leprae* DNAの増幅産物、2: *Bcn* I 酵素処理による産物

4) 簡易検出法

PCR法の結果判定は、増幅産物のサイズや相同性を用いた特異性の確認が必要である。LAMP法では特異性が非常に高いことから、増幅産物の有無により検出判定が可能である。増幅産物産量はPCR法に比べ非常に多量であるため、3%アガロース電気泳動法以外に、エチジウムブロマイドや、SYBR Green I等の2本鎖DNAにインターカレートする試薬を添加し、産物の可視化による判定が可能である。また、増幅反応の副産物であるピロリン酸と反応液中のマグネシウムイオンの結合から生じるピロリン酸マグネシウムの白濁を指標にした肉眼による検出も可能である。現在、濁度測定を応用したリアルタイム検出器が市販されている。

3. LAMP法の応用

細菌、ウイルス、寄生虫など様々な病原体の検出に応用が試みられている。抗酸菌感染症では、結核菌、MAC²⁵⁾、*M. paratuberculosis*²⁶⁾ への応用が報告され、らい菌検出のシステムも確立しつつある。LAMP法は、安価な設備・器具を用いるため、開発途上国における感染症診断をより容易にすると期待される。

IX. らい菌の偽遺伝子

らい菌TN株のゲノムサイズは約3.3Mbで、結核菌H37Rv株の4.4Mbと比較して小さく、染色体上に多数の偽遺伝子が存在する²⁷⁾。偽遺伝子とは、機能を持つ遺伝子の塩基配列と相同性の高い塩基配列を持つが、塩基の置換、欠失などにより遺伝子としての機能を失ったDNA配列のことである。当初、らい菌TN株のゲノムには、1,604の遺伝子と1,116の偽遺伝子があるとされたが、2004年7月にコンピュータプログラムの変更により10の遺伝子と17の偽遺伝子が新たに追加された。

1. らい菌 *katG* 領域

筆者らは*katG*のDNA塩基配列をらい菌の偽遺伝子として初めて報告した²⁸⁾。*katG*遺伝子はグラム陰性菌、陽性菌に広く分布する遺伝子で、カタ

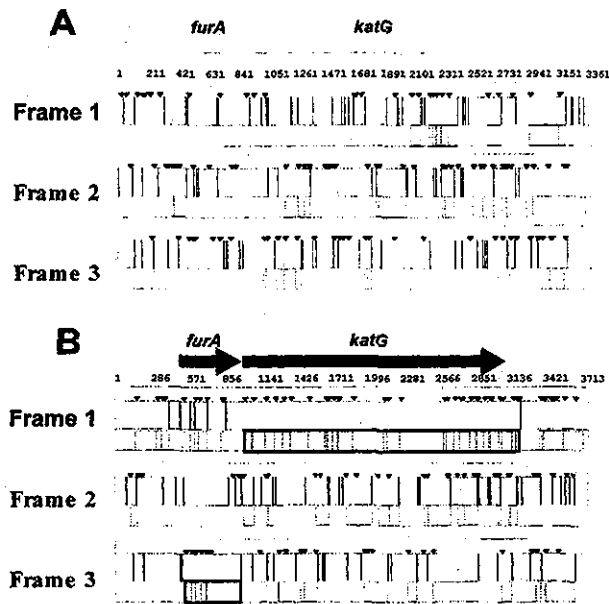


図12 らい菌と結核菌の*katG*領域のオープンリーディングフレーム分析
らい菌 (A)、結核菌 (B) の*katG*配列それぞれについて、3つのタンパク質翻訳フレームにおける開始コドン (▽)、終止コドン (|) の位置とフィケット法によって導き出されたオープンリーディングフレーム (斜線部) を示した。結核菌ではフレーム1に2,223塩基対の*katG*遺伝子、フレーム3に453塩基対の*furA*遺伝子のオープンリーディングフレームが見られる (太線部分)。一方、らい菌の*katG*領域には*furA*、*katG*ともに高い相同性を示す配列が存在するものの、それら遺伝子に相当するオープンリーディングフレームは見られない。らい菌*katG*配列内には、フレーム1、2、3にそれぞれ27、15、24個の終止コドンが存在する。

ラーゼとパーオキシダーゼ両方の活性を持つ酵素タンパク質をコードしており、結核菌など細胞内寄生菌のビルレンス因子の一つと考えられている。らい菌の*katG*配列は結核菌などと同じく、その発現調節因子である*furA*配列の下流に存在し、周辺領域の遺伝子配置もほぼ同じであるが、5'末端側の領域に100塩基対程度の欠失が二ヶ所見られる。この配列が偽遺伝子であることを示す最大の特徴はその配列中に全てのフレームにおいて終止コドンが多数見られることである (図12)。一般に、生物の生存に重要な遺伝子領域に変異が生じて機能の喪失が起こると、その個体は淘汰されるため変異は蓄積されないが、生存に必須でない領域には時間とともに変異が蓄積する。らい菌の偽遺伝子にはこのように多重のナンセンス変異を持つものが多く、らい菌の遺伝子崩壊が起こり始めてから既に長い時間が経過していることを示唆している。

2. その他の偽遺伝子と偽遺伝子配列の機能

らい菌の特筆すべき特徴として遅増殖と人工培地での培養が困難であることがあげられるが、これらの性質と偽遺伝子の数の多さは決して無関係ではないと考えられる。結核菌とらい菌の遺伝子セットを比較すると、生合成や代謝に関わる様々な経路についてらい菌では多くの偽遺伝子が存在するが、機能別分類による偽遺伝子の偏りはあまり見られず²⁷⁾、これらの原因となる決定的な遺伝子欠損は明らかになっていない。

細菌では一般にゲノムサイズを小さくしようとする力が働くため、機能を失ったDNA領域は染色体から脱落する傾向にあるが、らい菌染色体では30%近くの領域が偽遺伝子の配列で占められている。ゲノムに偽遺伝子を比較的多く持つ病原細菌と出芽酵母における遺伝子数、偽遺伝子数を表1に示したが²⁹⁾、その中でもらい菌はとりわけ偽遺

表1 遺伝子数と偽遺伝子数

種	遺伝子数	偽遺伝子数
<i>Mycobacterium leprae</i> (らい菌)	1604	1116
<i>Rickettsia prowazekii</i> (発疹チフスリケッチア)	834	241
<i>Yersinia pestis</i> (ペスト菌)	4061	160
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母)	6340	241

伝子の数が多い。このことは、特殊な生存環境に対するらい菌の適応の結果であると考えられる。偽遺伝子は意味の無い配列のように考えられてきたが、近年になりカタツムリやマウスの偽遺伝子がmRNAの発現を制御している例が示された³⁰⁾、³¹⁾。筆者らは、らい菌に高頻度で発現するmRNAをスクリーニングしたところ、その中に偽遺伝子領域に由来する物が多いことを見出した(未発表)。これらが単に近傍の遺伝子のmRNA転写に伴って生じている可能性も否定できないが、その発現量の高さから何らかの生理的役割を果たしている可能性も充分考えられる。らい菌の遺伝子・偽遺伝子数はコンピュータプログラムにより算出されたものであり、必ずしも実際の機能の有無を反映しているとは限らない。らい菌mRNA発現に関するより詳細な解析により、らい菌偽遺伝子配列の新たな機能が解明されるかもしれない。

X. 薬剤耐性機構

ハンセン病の抗菌薬として使用されている薬剤に対する耐性機構解明の現状と今後の展望について概観したい。

1. ダブソン

ダブソンは細菌だけに存在する代謝系の葉酸合成系に作用する。合成系中、酵素dihydropteroate synthase (DHPS) が作用する時、必要となる補酵素、パラアミノ安息香酸 (PABA) の構造類似体としてダブソンは競合的にDHPSに結合し反応を阻害する。多くの耐性菌でこのDHPSの遺伝子 *folP* の変異による特定のアミノ酸置換 (53位のトレオニンがアラニンやイソロイシン、55位のプロリンがロイシン等) があることが示された³²⁾。変異によりPABAは結合できるが、ダブソンはできないことがその主要な耐性機構と考えられている。

2. リファンピシン

リファンピシンはらい菌のみならず結核菌にも強い殺菌作用を示す効果的な薬剤であるが、耐性菌の報告も多い。薬剤の標的は菌の持つRNAポリメラーゼの β サブユニットで、耐性菌ではこの β

サブユニットをコードする遺伝子 *rpoB* の変異が強く関与している。中でも425位と420位のアミノ酸セリンとヒスチジンの変異が多く報告されている³³⁾。

3. クロファジミン

抗菌剤としての利用とともにらい性結節性紅斑 (ENL) の治療薬としても重要な薬剤であるが、その作用機序はほとんど知られていない。明らかにされている作用は、DNAのGCリッチな領域への結合性である³⁴⁾。耐性菌の報告は少ないが³⁵⁾、多剤耐性菌の出現も報告されていることから、早期の作用機序解明及び耐性機構の解明が望まれる。

4. オフロキサシン

ニューキノロン剤で、標的はDNA gyraseである。DNA gyraseは *gyrA* 遺伝子にコードされるAサブユニットと *gyrB* 遺伝子にコードされるBサブユニットがそれぞれ2つずつ集まった4量体であるが、耐性菌ではこれらの遺伝子に変異が生じる。特に *gyrA* の特定の領域 (quinolone resistance determining region: QRDR) がらい菌での耐性に強く関与している。らい菌では *gyrA* のコードするアミノ酸89位のグリシン、91位のアラニンでの変異が報告されている³⁶⁾。

WHOの多剤併用療法 (MDT) が奏効し、登録患者数は顕著に減少したにもかかわらず、ダブソンのみならず他の薬剤に対する耐性菌も次々と出現している。ハンセン病患者から分離された菌の10~20%が何らかの薬剤耐性を示している³⁷⁾。さらに、数種の薬剤に同時に耐性を示す多剤耐性菌も出現している³⁵⁾、³⁶⁾。今後の対策が重要である。変異と耐性の相関を利用し様々な耐性菌検出法が考案されているが³⁸⁾、臨床の現場で容易に利用し得る迅速、簡便かつ低コストの方法の開発もまた望まれるところである。薬剤耐性と特定の遺伝子変異は相関関係にあると考えられるが、すべての耐性菌が遺伝子変異により誘導されるとは限らない。従って、他の耐性機構の解明も重要な研究課題となる。クロファジミン耐性機構は不明であり、早期の機構解明が期待される。

XI. 抗菌剤の抗らい菌活性判定法

ハンセン病は、多剤併用療法 (Multidrug therapy, MDT) の導入によって確実な治療と耐性予防が行われている。効果的な菌陰性化をめざす治療を施すために、らい菌の治療薬剤に対する抗らい菌活性を知ることは重要である³⁹⁾。らい菌は、試験管内にて培養増殖できないため、ヌードマウスの足蹠内にて増菌後、薬剤感受性検査を行う。そのため効果判定には、約1年の長時間を必要とする。治療薬剤の抗らい菌活性を調べる方法として、マウス足蹠内接種法⁴⁰⁾、Buddemeyer法⁴¹⁾、BACTEC 460 TB system法⁴²⁾、adenosin triphosphate (ATP) 法⁴³⁾がある。また、薬剤耐性に関与する遺伝子の変異を調べる遺伝子変異検出法³⁶⁾もある。(表2)

表2 抗菌剤の抗らい菌活性判定法の優位点と欠点

	マウス足蹠内接種法	Buddemeyer法	BACTEC 460 TB system法	ATP法	遺伝子変異検出法
優位点	生体内における薬剤の抗菌活性を知ることが出来る。 他法に比べ比較的少数の菌にて試験ができる。	菌接種後2週間以内で抗菌活性を判定できる。 ATP法より約10倍感度が高い。 菌接種後7日以降毎日測定できる。	菌接種後2週間以内で抗菌活性を判定できる。 ATP法より約10倍感度が高い。 菌接種後毎日自動測定できる。	菌接種後10日で抗菌活性を判定できる。 生物発光法のため、特殊な施設は不要で、廃液、廃材処理が容易。	臨床検体からも検査が可能。 1から2日で耐性遺伝子を検出できる
欠点	臨床検体中のらい菌が少量の場合、増菌操作が必要。 判定までに、らい菌接種後6から10ヶ月という長期間を必要とする。	増菌操作が必要。 放射能使用の為の特殊な施設が必要。 廃液・廃材の処理が必要。	増菌操作が必要。 放射能使用の為の特殊な施設が必要。 廃液・廃材の処理が必要。	増菌操作が必要。 放射能測定法より感度が悪い。	臨床検体中のらい菌が少量の場合、増菌操作が必要。 耐性遺伝子が不明の場合は検出できない。 耐性の程度が不明

1. マウス足蹠内接種法

正常マウス足蹠内に $10^3 \sim 10^5$ 個のらい菌を接種すると、6~10ヶ月後に菌は、 $10^5 \sim 10^6$ に達する。菌接種と同時に薬剤を混入した飼料を与え、その増殖抑制効果から薬剤の抗らい菌活性を半定量的に判定する。ヌードマウス足蹠内に $10^6 \sim 10^7$ のらい菌を接種した場合は、6~10ヶ月後に $10^9 \sim 10^{10}$ に達する。本方法を用いると増殖巾が大きいため、より正確に抗らい菌活性が判定し得る。

2. Buddemeyer法

Middlebrook 7 H12培地 4 mlに薬剤とらい菌液 (2×10^8 /ml) の0.1 mlを接種し、4日後に ^{14}C -パルミチン酸 ($1 \mu\text{Ci}$) を添加する。11日間培養し経時的にらい菌の代謝により発生した $^{14}\text{CO}_2$ 量を測定する。 CO_2 発生抑制率を計算し、薬剤の抗らい菌活性を判定する方法である。

3. BACTEC 460 TB system

結核菌の薬剤感受性試験に用いられているBACTEC法をらい菌に適用した方法である。BACTEC 12B培地にらい菌を接種し、らい菌が発生した $^{14}\text{CO}_2$ 量をBACTEC 460 TB自動測定装置を用いて測定する。菌接種11~18日後のGrowth index (GI) を計算し、GI (対照) > GI (薬剤) の場合に薬剤感性と判定する。

4. ATP法

Middlebrook 7 H 9 培地に薬剤とらい菌液を接種し、10日後に培養液中のATP量をルミノメーターで測定 (生物発光分析法) する。ATP抑制率より薬剤の抗らい菌活性を判定する方法である。

5. 遺伝子変異検出法

らい菌の薬剤耐性に関与している遺伝子の突然変異の有無を調べる方法で、ダブソンは*folP*遺伝子、リファンピシンは*rpoB*遺伝子、キノロン剤は*gyrA*遺伝子が知られている。

XII. 新薬開発

強力な抗らい菌活性を有する抗菌薬の開発と導入は、治療期間の短縮、薬剤耐性化防止、多剤耐性菌の治療、治療完了率の向上などを図る上から極めて重要かつ早期に解決すべき課題である。ハンセン病は皮膚または末梢神経を主病巣とする慢性感染症である。従って、血中半減期が長く、優れた組織移行性・代謝安定性を有する脂溶性薬剤で、慢性毒性の少ない抗菌薬であることが望ましい。

新規抗らい菌薬開発の現状

1. フルオロキノロン系：抗らい菌活性は

ofloxacin (OFLX) <levofloxacin (LVFX) < gatifloxacin (GFLX), sitafloxacin (STFX) < sparfloxacin (SPFX) < moxifloxacin (MFLX) の順でSPFX⁴⁴⁾, MFLXが最も強い。STFXとMFLXは、臨床治験中であるが副作用が少なく、強い抗らい菌活性を持つ抗菌薬として期待されている。抗らい菌活性を有するフルオロキノロンの化学構造式は、1位にシクロプロピル基、4位にカルボキシル基、7位にフッ素基、8位に5または6員環、9位にハロゲン基またはメトキシ基を有する抗菌薬である (図13)。

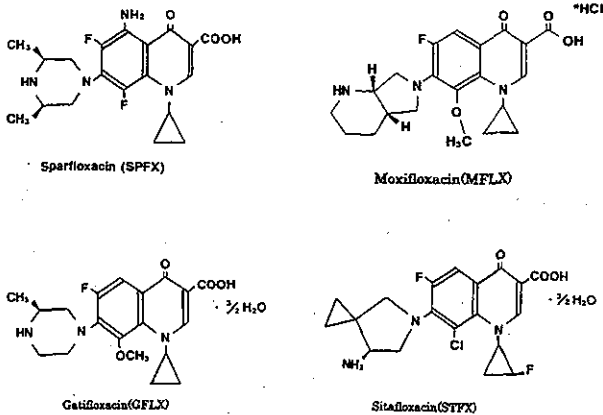


図13 Chemical structures of fluoroquinolone derivatives

2. マクロライド系：抗らい菌活性は azithromycin (AZM) <roxithromycin (RXM) < clarithromycin (CAM) の順でCAMが最も強い。抗炎症作用はAZM<CAM<RXMの順でRXMが最も強い (図14)。

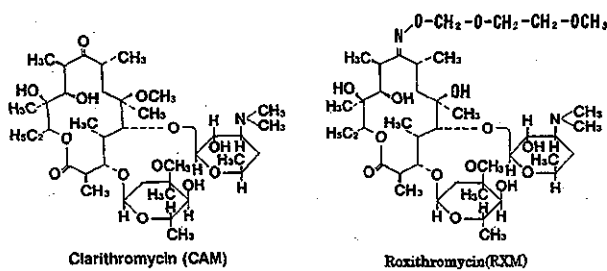
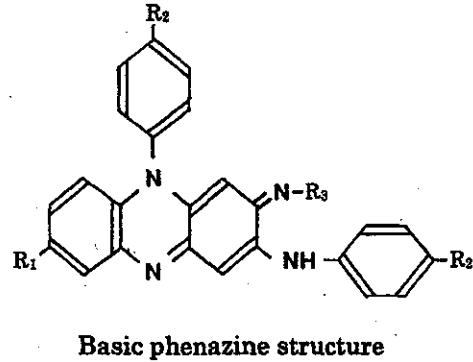


図14 Chemical structures of macrolide derivatives

3. テトラサイクリン系：現在まで抗らい菌活性を示す抗菌薬はminocycline (MINO) のみである。強い抗炎症作用を持ち、らい性結節性紅斑 (ENL) を抑制する。

4. イミノフェナジン系：イミノフェナジン系の染料で、B663は優れた抗らい菌活性と抗炎症作用を有するが皮膚の着色や臓器に蓄積などの課題がある。現在、B746, B4090, B4100, B4101など色素沈着を軽減した新たなイミノフェナジン誘導体⁴⁵⁾の抗らい菌活性が検討されている (図15)。



Phenazine

compounds	R ₁	R ₂	R ₃
B663	H	Cl	CH(CH ₃) ₂
B746	H	Cl	C ₂ H ₅
B4090	Cl	Cl	*
B4100	H	3,4Cl	*
B4101	H	3,4Cl	C ₂ H ₅

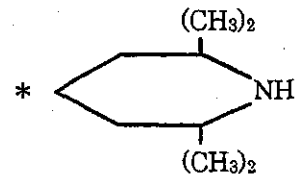


図15 Chemical structures of phenazine derivatives

5. リファマイシン系：rifalazil (KRM-1648)⁴⁶⁾にRFPを凌ぎ、リファマイシン誘導体中最も強い抗らい菌活性を認めたが、連日投与すると白血球減少症などの副作用が出現するため開発が中止された。スピロピペリジル基を導入したrifabutin (RFB)⁴⁷⁾にRFPの数倍の抗らい菌活性が報告されているが、国内では未承認である。RFPのピペラジン環のメチル基にサイクロペンチル基を導入したrifapentine (RPT)は、1998年に米国FDAにより抗結核薬として承認されたが、国内では認可されていない。抗らい菌活性は、RFP<RPT<RFBの順でRFBが最も強い (図16)。

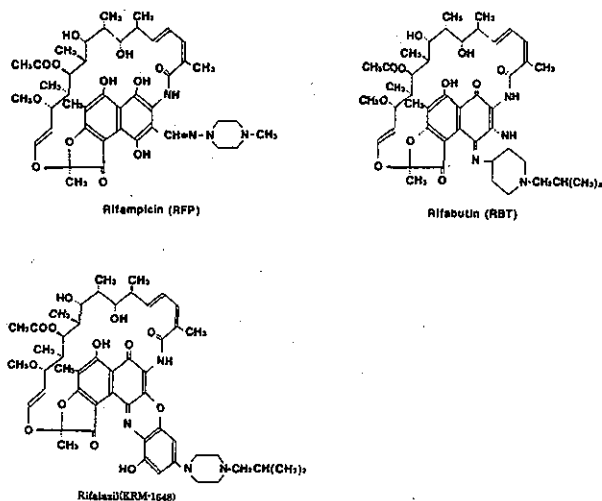
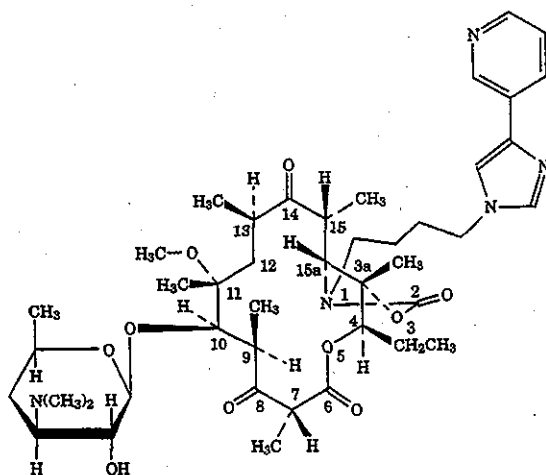


図16 Chemical structures of rifamycin derivatives

6. ケトライド系：マクロラクトン環を基本骨格とし、1位をアミノブチリダゾール基、8位をケトン基、11位をメトキシ基に置換した telithromycin (TEL)⁴⁸⁾ はKetolide (ケトライド) と称される新しい作用機序を有する抗菌剤である。マクロライド系と比較すると、AZM<TEL<RXM<CAMの順でTELの抗らい菌活性はRXMより弱い(図17)。



Telithromycin(TEL, HMR-3647)

図17 Chemical structures of telithromycin

7. ステロイド系：fusidic acid (FA) は、多菌型患者に対し弱い殺菌的作用と静菌作用を示す。経口及び経皮投与薬として用いられる。経口投与薬は、国内では未承認である(図18)。

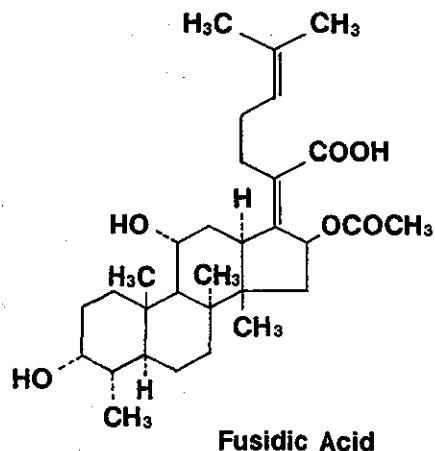


図18 Chemical structures of fusidic acid

今後のハンセン病抗菌化学療法を構築する上で、新しい構造と作用機序を有する強力な新規抗らい菌薬の開発が不可欠である。これらを用いた新たな多剤併用療法の開発が求められている。

XIII. らい菌の遺伝子多型と分子疫学

感染症に対してその抜本的対策を講ずるためには、その感染源、感染様式の解明が必須である。本目的のため、近年多くの微生物について遺伝子多型に基づく型別の開発とその疫学解析への応用がなされ、分子疫学といわれる学問が確立されるに至った。らい菌についても繰返し配列をプローブとしたRestriction fragment polymorphism (RFLP) による型別が試みられたが、らい菌株間に多型性は見い出せず、この方法による型別は不可能であった⁴⁹⁾。その後、多くの試みがなされたが疫学解析に用いるような遺伝子多型の報告には至らなかった。しかし2000年に、らい菌遺伝子中には数塩基からなる繰返し配列が直列し、その繰返し数が菌株により異なること (Variable number tandem repeats: VNTRs) が報告された^{50), 51)}。さらにごく最近、多くの同様のVNTRsの存在が明らかになり、ハンセン病についてもPCRにより増幅したこれらの遺伝子産物についてVNTRsを比較し、疫学解析を行う試みが始まっている。それらについて概説する。

1. *rpoT*遺伝子内の6塩基VNTRs

Matsuokaらはらい菌の*rpoT*遺伝子を比較し、