

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り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。

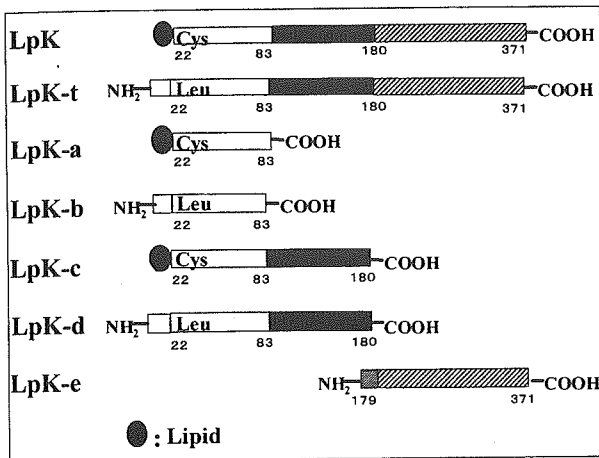


図1 リポ蛋白LpKおよびTruncated LpKの構造
LpK およびTruncated LpKはらい菌のゲノムDNAをもとにアミノ酸配列を決定し、遺伝子組み換えにより大腸菌で発現させた。数字はpro LpKのN末端からのアミノ酸番号を示している。

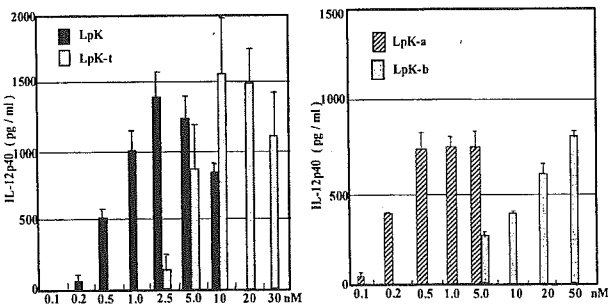


図2 リポ蛋白LpKおよびTruncated LpK刺激によるヒト単球からのIL-12誘導活性
ヒト末梢血単球 (1×10^5 cells) をLpK及びTruncated LpKで37°C、24時間刺激し、産生したIL-12p40をELISA法で測定した。

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。

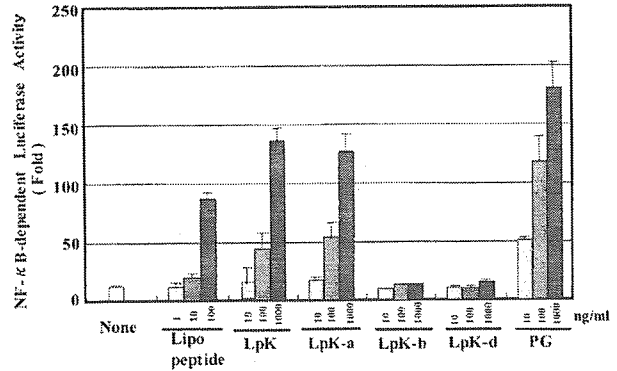


図3 リポ蛋白LpKおよびTruncated LpKのTLR2の関与
TLR2導入HEK293細胞を用いて、LpK及びTruncated LpKの刺激により活性化されたNF-κB-luciferase活性を測定した。
*PG: peptidoglycan
**Lipopeptide: 合成lipopeptide

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サン層、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。

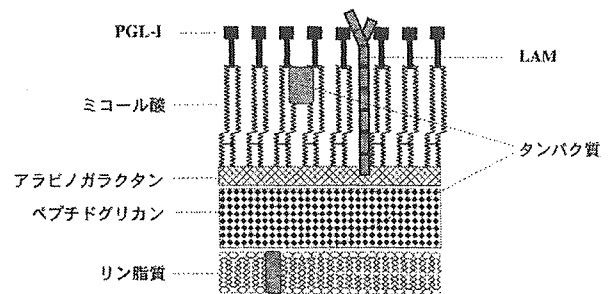


図4 らい菌細胞壁の構造

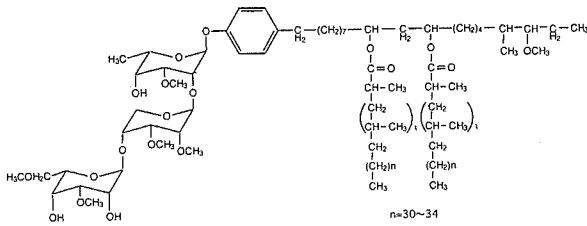


図5 PGL-Iの構造

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。

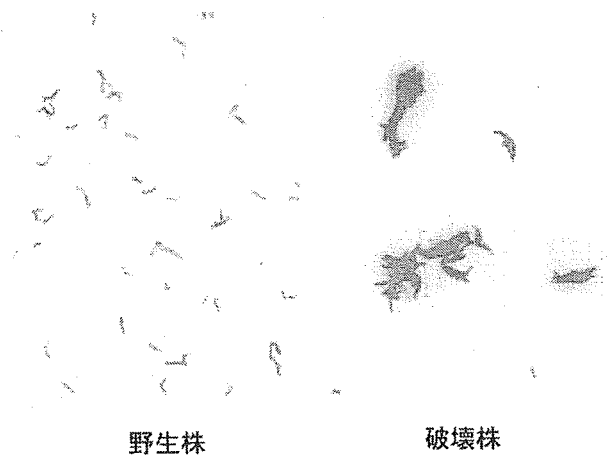
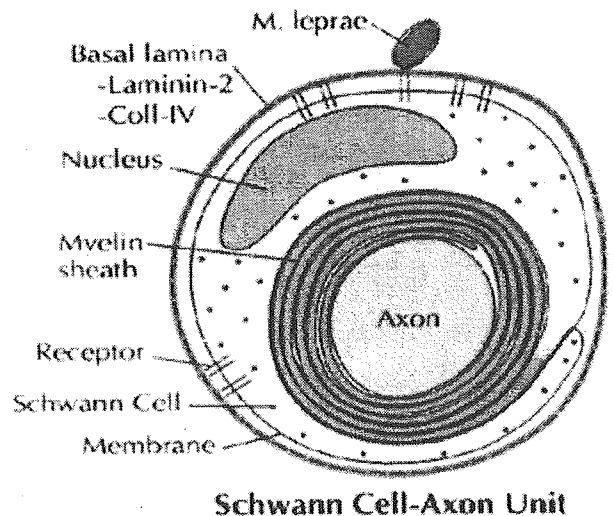


図6 *M. smegmatis* における FAP 遺伝子破壊株の形態

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くない。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

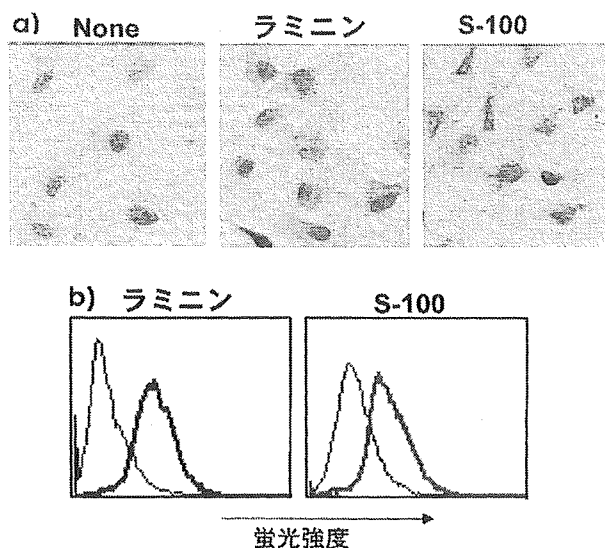


図8 a) サルのシュワン細胞をS-100、ラミニン抗原に対する抗体で組織免疫染色したところ、陽性であった。b) FACS解析：抗S-100及びラミニン抗体で染色し、さらに二次抗体、抗マウス-FITCで染めることによりシュワン細胞であること確認した。

(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。

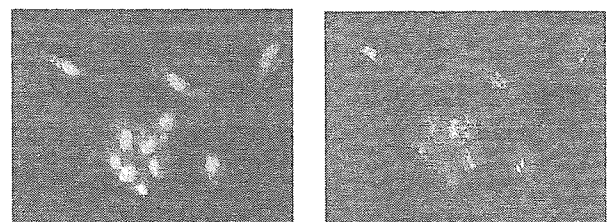


図9 FITCラベルしたらい菌をシュワン細胞と混合培養し、3時間後ヘキストで核を染色し、蛍光顕微鏡で観察すると、らい菌がシュワン細胞に取り込まれていることを確認した。

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)。

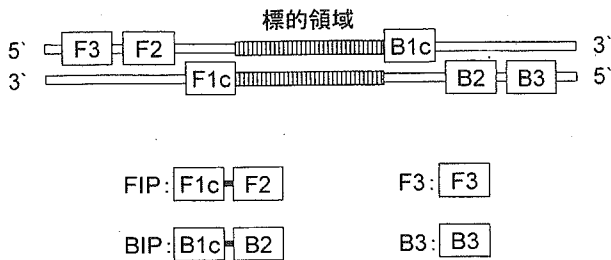


図10 LAMP法に用いるプライマーの構成

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。

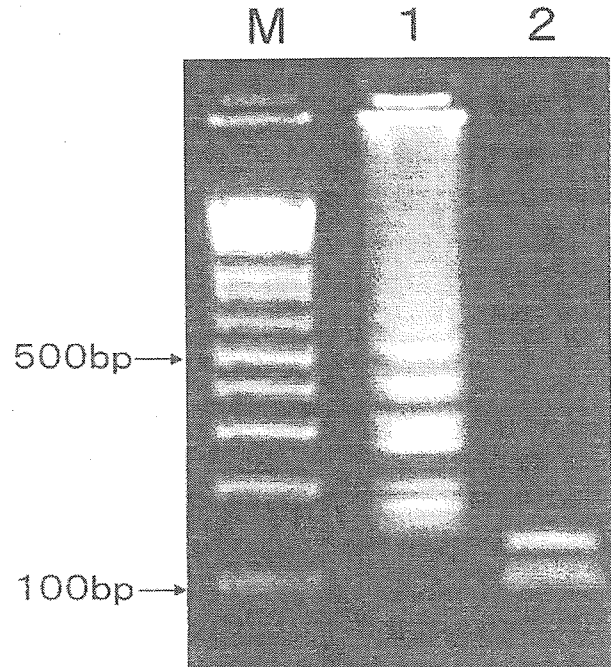


図11 LAMP法による *M. leprae* の増幅。M: 分子量マーカー、1: *M. leprae* DNAの増幅産物、2: *Bcn* I 酵素処理による産物

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。増幅産物産生量は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

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れると、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。

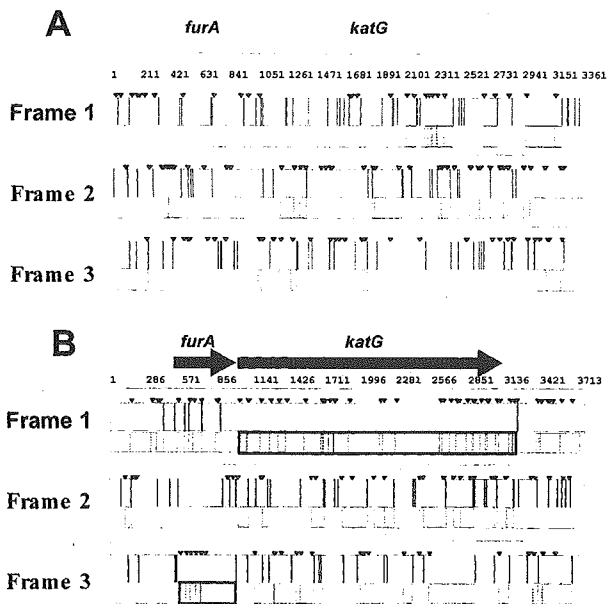


図12 らい菌と結核菌の*katG*領域のオープンリーディングフレーム分析
らい菌(A)、結核菌(B)の*katG*配列それぞれについて、3つのタンパク質翻訳フレームにおける開始コドン(▽)、終止コドン(|)の位置とフィケット法によって導き出されたオープンリーディングフレーム(斜線部)を示した。結核菌ではフレーム1に2,223塩基対の*katG*遺伝子、フレーム3に453塩基対の*furA*遺伝子のオープンリーディングフレームが見られる(太線部分)。一方、らい菌の*katG*領域には*furA*、*katG*ともに高い相同性を示す配列が存在するものの、それら遺伝子に相当するオープンリーディング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

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。そのため、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 (G.I.)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、ダプソンは*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)。

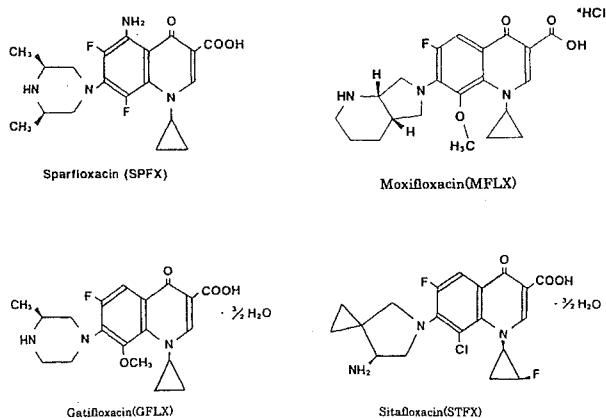


図13 Chemical structures of fluoroquinolone derivatives

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)。

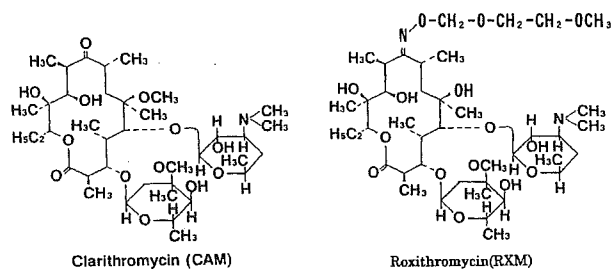
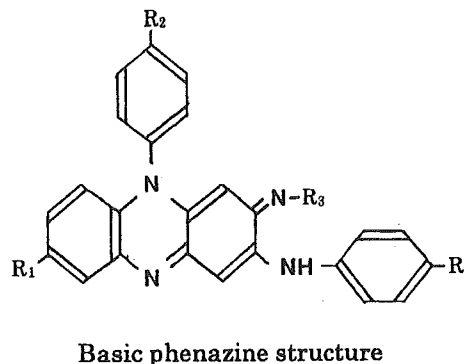


図14 Chemical structures of macrolide derivatives

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

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

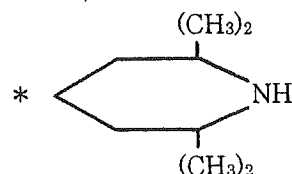


図15 Chemical structures of phenazine derivatives

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)。

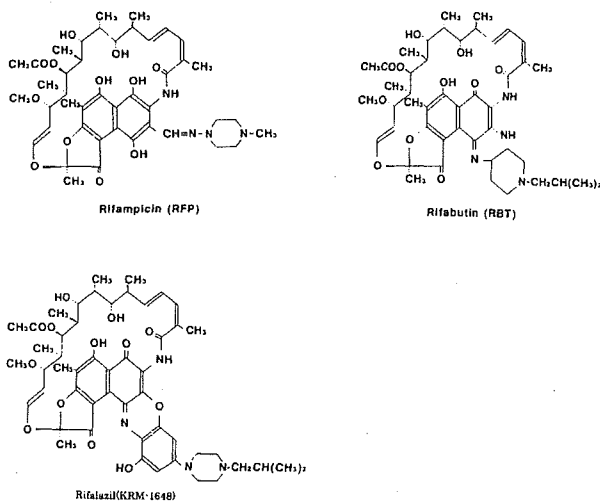
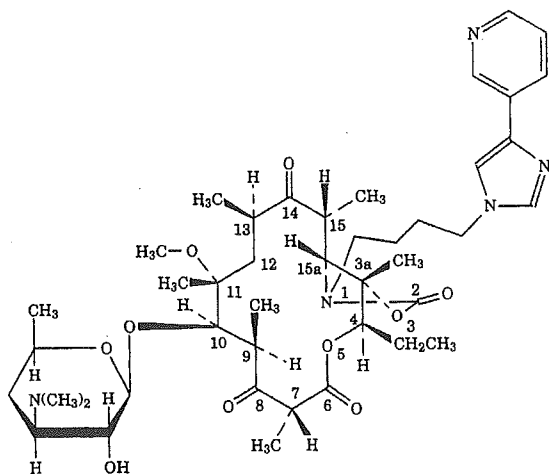


図16 Chemical structures of rifamycin derivatives

6. ケトライド系：マクロラクトン環を基本骨格とし、1位をアミノプチリダゾール基、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)。

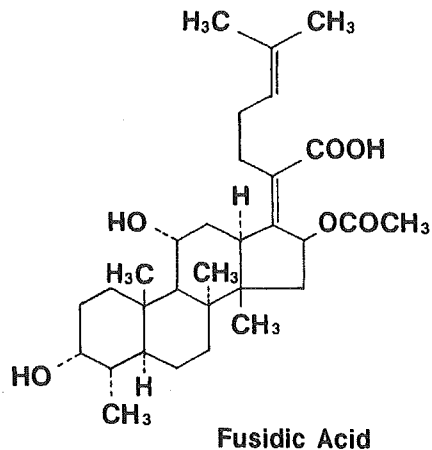


図18 Chemical structures of fusidic acid

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、

その中にGACACTの6塩基からなる繰返しが3個(3型)のものと4個(4型)の2群に分類可能であることを明らかにした⁵⁰⁾。更にその地理的分布を見ると、日本の本州、韓国、中国東部では4型が圧倒的多数を占め、沖縄、東南アジア、アメリカ大陸の一部からの分離株は全てが3型であることが示された。特異的な遺伝子型の微生物の地理的分布は多くの感染症について知られており、それらは過去の人類移動に伴って形成されたと考えられている^{52)・53)・54)}。らい菌についても現代の日本人の成立した過程⁵⁵⁾と相関して2通りの方法により大陸よりもたらされたと推察された。沖縄に分布する3型らい菌は台湾を経て進入し、一方本土に分布する4型らい菌は弥生人となった渡来人とともに朝鮮半島を経て拡散したと考えられ、これにより4型が韓国においても多数を占めたことも説明可能であった。

モンゴロイドがアメリカ大陸に渡り、それともいくつかの感染症も移動したことが示されており、アメリカ大陸に分布するらい菌がどのような*rpoT*遺伝子型を示すのか興味を持たれた。パラグアイとペルーから得たらい菌はすべて3型であったが、メキシコからの27株中25株は4型を示し、同じラテンアメリカの国でありながら、全く異なる分布を示した(印刷中)。アメリカ大陸には大きく分けて三つのモンゴロイドのグループが移動したことが知られており⁵⁶⁾、らい菌の異なる型の分布は異なるグループによって形成されることが推察される。らい菌の遺伝子型別はハンセン病についての研究にとどまらず、人類学とも関連した学際的広がりを持つ興味ある分野になりつつある。

2. TTC繰返し配列多型による疫学解析

Matsuokaらはインドネシアのハンセン病流行地域において同一住居に同居する住民間あるいは患者の鼻粘膜上のらい菌は異なるTTC遺伝子型を示す例が多数あること、また同一家族内の患者の病変部位からのらい菌についても患者間で異なる遺伝子型のらい菌が分布する結果を得た⁵⁷⁾(表3)。なおこの表において同一の遺伝子型であってもTTC遺伝子型の分別能の限界から完全に同一の株とは断定でない。これらの所見は従来言われ

表3 家族内発症例のTTC遺伝子型

	従来の概念による感染源 と思われる患者からのらい菌	家族内患者からのらい菌
ケース1	父親:10	息子:10
ケース2	父親:18	息子:10
ケース3	男子:13	父親:13, 姉:13, 兄:13, 弟:13
ケース4	男子:8	弟:8
ケース5	男子:12	弟:12, 弟:14

ているようなハンセン病の感染は同居する多菌型患者からによるものではなく、他の感染源が存在することを強く示唆する。流行地域における住民からのらい菌遺伝子の検出結果⁵⁸⁾あるいは血清疫学の結果⁵⁹⁾から推察された患者以外の感染源の存在の可能性とよく一致した。

3. 遺伝子型別に有用と考えられる新たなVNTRs
解読されたらい菌遺伝子²⁷⁾の検索の結果、上記2例の他にらい菌遺伝子中には様々な直列繰返し配列が存在することが示された^{60)・61)}。6塩基以下のものはmicrosatellite、6から100塩基のVNTRsはminisatelliteといわれ、それぞれ型別に利用可能と思われる配列が少なくとも33及び11個存在することが示された⁶⁰⁾。今後、菌株間でのそれらの多様性が検討され、TTC遺伝子多型のみによる型別法より更に詳細な疫学解析手法が開発されることと想定される。これにより、より正確な感染源・感染経路・感染様式の解析、再発と再感染の区別などの検討が図られるものと期待される。

おわりに

現在に残されているハンセン病世界の課題を数え上げるときりが無い。しかし、これらの中で、ワクチン開発・薬剤耐性菌に対する問題・感染経路の解明・末梢神経障害発症機構の解析とその制御の4つがとりわけ重要と考えられる。科学技術は日進月歩、急速に発展している。分子生物学の分野を中心に、これら重要な課題が次々と征服されていくものと期待する。

文 献

- 1) Janeway CA, Jr Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216,

- 2002.
- 2) Krutzik SR, Modlin RL. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Semin Immunol* 16: 35-41, 2004.
 - 3) 福富康夫. らい菌によるマクロファージの機能変化. *Jpn J Leprosy* 73: 253-261, 2004.
 - 4) Krahenbuhl JL. Role of the macrophage in resistance to leprosy. In: *Leprosy*, 2nd ed, Hastings RC, Opromolla DVA (ed) , Churchill Livingstone, Edinburgh, p137-155, 1994.
 - 5) Gatfield J, Pieters J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* 288: 1647-50, 2000.
 - 6) Vergne I, Chua J, Singh SB, Deretic V. Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 367-394, 2004.
 - 7) Arruda S, Bomfim G, Knights R, Huima-Byron T, Riley LW. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science* 261: 1454-7, 1993.
 - 8) Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97: 435-47, 1999.
 - 9) Oftung F, Wiker HG, Deggerdal A, Mustafa AS. A novel mycobacterial antigen relevant to cellular immunity belongs to a family of secreted lipoproteins. *Scand J Immunol* 46: 445-451, 1997.
 - 10) Maeda Y, Brennan PJ, Crick DC, Mahapatra S, Srisungram S, Takii T, Kashiwabara Y, Brennan PJ. Novel 33-kilodalton lipoprotein from *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* 70: 4106-4111, 2002.
 - 11) Yamashita Y, Maeda Y, Takeshita F, Brennan PJ. Role of polypeptide region of a 33kDa mycobacterial lipoprotein for efficient IL-12 production. *Cellular Immunol* 229: 13-20, 2004.
 - 12) Takeda K, Takeuchi O, Akira S. Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 8: 459-463, 2003.
 - 13) Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, Makino M. *Mycobacterium leprae* Infection in Monocyte-Derived Dendritic Cells and Its Influence on Antigen-Presenting Function. *Infect Immun* 70: 5167-5176, 2002.
 - 14) Kimura H, Maeda Y, Takeshita F, Takaoka LE, Matsuoka M, Makino M. Up-Regulation of T cell stimulating activity of mycobacteria infected macrophages. *Scand J Immunol* 60: 278-286, 2004.
 - 15) Maeda Y, Gidoh M, Ishii N, Mukai C, Makino M. Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens. *Cell Immunol* 222: 69-77, 2003.
 - 16) Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell* 103: 511-524, 2000.
 - 17) Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, Kaplan G, Barry CE 3rd. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 431: 84-87, 2004.
 - 18) Schorey JS, Li Q, McCourt DW, Bong-Mastek M, Clark-Curtiss JE, Ratliff TL, Brown EJ. A *Mycobacterium leprae* gene encoding a fibronectin binding protein is used for efficient invasion of epithelial cells and Schwann cells. *Infect Immun* 63: 2652-2657, 1995.
 - 19) Miyamoto Y, Mukai T, Takeshita F, Nakata N, Maeda Y, Kai M, Makino M. Aggregation of mycobacteria caused by disruption of fibronectin-attachment protein-encoding gene. *FEMS Microbiol Lett* 236: 227-234, 2004.
 - 20) Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, Campbell KP, Fischetti VA. Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science* 282: 2076-2079, 1998.
 - 21) Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA,

- Rambukkana A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. Proc Natl Acad Sci USA 96: 9857-9862, 1999.
- 22) Hagge DA, Oby Robinson S, Scollard D, McCormick G, Williams DL. A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann cell and neuron interactions. J Infect Dis 186: 1283-1296, 2002.
- 23) 神田秀俊、納富継宣. LAMP法による遺伝子の簡易・迅速増幅. 医学の歩み 206: 470-474, 2003.
- 24) <http://loopamp.eiken.co.jp>
- 25) Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. J Clin Microbiol 41: 2616-2622, 2003.
- 26) Enosawa M, Kageyama S, Sawai K, Watanabe K, Notomi T, Onoe S, Mori Y, Yokomizo Y. Use of loop-mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J Clin Microbiol 41: 4359-4365, 2003.
- 27) Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honor'H N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature 409: 1007-1011, 2001.
- 28) Nakata N, Matsuoka M, Kashiwabara Y, Okada N, Sasakawa C. Nucleotide sequence of the *Mycobacterium leprae* katG region. J Bacteriol 179: 3053-3057, 1997.
- 29) Harrison PM, Gerstein M. Studying genomes through the aeons: protein families, pseudogenes and proteome evolution. J Mol Biol 318: 1155-1174, 2002.
- 30) Korneev SA, Park JH, O'Shea M. Neuronal expression of neural nitric oxide synthase (nNOS) protein is suppressed by an antisense RNA transcribed from an NOS pseudogene. J Neurosci 19: 7711-7720, 1999.
- 31) Hirotsune S, Yoshida N, Chen A, Garrett L, Sugiyama F, Takahashi S, Yagami K, Wynshaw-Boris A, Yoshiki A. An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. Nature 423: 91-96, 2003.
- 32) Kai M, Matsuoka M, Nakata N, Maeda S, Gidoh M, Maeda Y, Hashimoto K, Kobayashi K, Kashiwabara Y. Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. FEMS Microbiol Lett 177: 231-235, 1999.
- 33) Honore N, Cole ST. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. Antimicrob Agents Chemother 37: 414-418, 1993.
- 34) Morrison NE, Marley GM. The mode of action of clofazimine. Intl J Lepr 44: 133-134, 1976.
- 35) Shetty VP, Uplekar MW, Antia NH. Primary resistance to single and multiple drugs in leprosy-a mouse footpad study. Lepr Rev 67: 280-286, 1996.
- 36) Maeda S, Matsuoka M, Nakata N, Kai M, Maeda Y, Hashimoto K, Kimura H, Kobayashi K, Kashiwabara Y. Mutidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. Antimicrob Agents Chemother 45: 3635-3639, 2001.
- 37) Williams DL, Gillis TP. Molecular detection of drug resistance in *Mycobacterium leprae*. Lepr Rev 75: 118-130, 2004.

- 38) Honore N, Roche PW, Grosset JH, Cole ST. A method for rapid detection of rifampicin-resistant isolates of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* 72: 441-448, 2001.
- 39) 儀同政一、齊藤肇. 治らい薬研究の現状. *Jpn J Leprosy* 64: 174-187, 1995.
- 40) Shepard CC. A kinetic method for the study of activity of drugs against *Mycobacterium leprae* in mice. *Int J Lepr* 35: 429-435, 1967.
- 41) Buddemeyer E, Hutchinson R, Cooper M. Automatic Quantitative Radiometric assay of bacterial metabolism. *Clin Chem* 22: 1459-1464, 1976.
- 42) Franzblau SG. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium leprae* in the BACTEC 460 system. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 2115-2117, 1989.
- 43) 山崎利雄. 生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性測定. *臨床検査* 47: 197-199, 2003.
- 44) Gidoh M, Tsutsumi S. Activity of sparfloxacin against *Mycobacterium leprae* inoculated into footpads of nude mice. *Lepr Rev* 63: 108-116, 1992.
- 45) Rosalind M, Van Landingham, Walker LL, O'Sullivan JF, Shinnick TM. Activity of phenazine analogs against *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr* 61: 406-414, 1993.
- 46) Gidoh M, Tsutsumi S, Yamane T, Yamashita K, Hosoe K, Hidaka T. Bactericidal action at low doses of a new rifamycin derivative, 3'-hydroxy-5'-(4-isobutyl-1-piperazinyl) benzoxazinorifamycin(KRM-1648) on *Mycobacterium leprae* inoculated into footpads of nude mice. *Lepr Rev* 63: 319-328, 1992.
- 47) Yoder LJ, Jacobson RR, Hastings RC. The activity of rifabutin against *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* 62: 280-287, 1991.
- 48) Bryskier A. Ketolides-telithromycin, an example of a new class of antibacterial agents. *Clin Infect* 6: 661-669, 2000.
- 49) Williams DL, Gillis TP, Portaels F. Geographically distinct isolates of *Mycobacterium leprae* exhibit no genotypic diversity by restriction fragment length polymorphism analysis. *Mol Microbiol* 4: 1653-1659, 1990.
- 50) Matsuoka M, Maeda S, Kai M, Nakata N, Chae GT, Gillis TP, Kobayashi K, Izumi S, Kashiwabara Y. *Mycobacterium leprae* typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. *Int J Lepr* 68: 121-128, 2000.
- 51) Shin YC, Lee H, Lee H, Walsh GP, Kim JD, Cho SN. Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. *J Clin Microbiol* 38: 4543-4538, 2000.
- 52) Sonoda S, Li HC, Cartier L, Nunez L, Tajima K. Ancient HTLV type I provirus DNA of Andean mummy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 1753-1756, 2000.
- 53) Sugimoto C, Kitamura T, Guo J, Al-Ahdal MN, Shchelkunov SN, Otova B, Ondrejka P, Chollet JY, El-Safi S, Ettayebi M, Gresenguet G, Kocagoz T, Chaiyarasamee S, Thant KZ, Thein S, Moe K, Kobayashi N, Taguchi F, Yogo Y. Typing of urinary JC virus DNA offers a novel means of tracing human migrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9191-9196, 1997.
- 54) Covacci A, Telford JL, Giudice GD, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284: 1328-1333, 1999.
- 55) Hanihara K. Dual structure model for the population history of the Japanese. *Japan Review* 2: 1-33, 1991.
- 56) Greenberg JH, Turner II CG, Zegura SL. The settlement of the Americas: A comparison of the linguistic, dental, and genetic evidence. *Curr Anthropol* 27: 477-497, 1986.
- 57) Matsuoka M, Zhang L, Budiawan T, Saeki K, Izumi S. Genotyping of *Mycobacterium leprae* on the basis of polymorphism of TTC repeats for analysis of leprosy transmission. *J Clin Microbiol* 42: 741-745, 2004.
- 58) van Beers SM, Izumi S, Madjid B, Maeda Y,

- Day R, Klatser PR. An epidemiological study of leprosy infection by serology and polymerase chain reaction. *Int J Lepr* 62: 1-9, 1994.
- 59) Abe M, Ozawa T, Minagawa F, Yoshino Y. Immunoepidemiological studies on studies on substantial infection in leprosy II. Geographical distribution of seropositive responders with special reference to their possible source of infection. *Int J Lepr* 59: 162-168, 1990.
- 60) Groathouse NA, Rivoire B, Kim H, Lee H, Cho SN, Brennan PJ, Vissa VD. Multiple polymorphic loci for molecular typing of strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol* 42: 1666-1672, 2004.
- 61) Truman RW, Fontes AB, de Miranda AB, Suffys P, Gillis TP. Genotypic variation and stability of four variable-number tandem repeats and their suitability for discriminating strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol* 42: 2558-2562, 2004.

Current advances in the leprosy research activities

Masahiko Makino^{1)*}, Koichi Suzuki¹⁾, Yasuo Fukutomi¹⁾, Yasuko Yamashita¹⁾,
Yumi Maeda¹⁾, Yuji Miyamoto¹⁾, Tetsu Mukai¹⁾, Noboru Nakata¹⁾, Masanori Kai¹⁾,
Toshio Ymazaki¹⁾, Msaichi Gidoh²⁾, Masanori Matsuoka²⁾

1)Department of Microbiology,

2)Department of Bioregulation, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo.

[Received: 12 Nov. 2004]

Key words : Leprosy, *Mycobacterium leprae*, Topics

Due to the advent of multi-drug therapy (MDT) recommended by the WHO, for the treatment of leprosy, presently, leprosy is regarded as a "curable disease". The number of new cases in Japan is relatively very low, due to which the disease is likely to be neglected, but on scientific grounds, there is a necessity to perform in depth studies. Leprosy caused by *M. leprae* is still unclear on various aspects including transmission, immunology, nerve damage etc. Here we introduce the recent advances in the field of basic leprosy research.

*Corresponding author :

Department of Microbiology, Leprosy Research Center,
National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, 189-0002,
Japan.

TEL: 042-391-8211 FAX: 042-391-8212

E-mail: mmaki@nih.go.jp

Identification of an Immunomodulating Agent from *Mycobacterium leprae*

Yumi Maeda,¹ Tetsu Mukai,¹ John Spencer,² and Masahiko Makino^{1*}

*Department of Microbiology, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-2-1 Aobacho, Higashimurayama, Tokyo 189-0002, Japan,¹ and
Department of Microbiology, Colorado State University,
Fort Collins, Colorado 80523-1677²*

Received 22 October 2004/Returned for modification 1 December 2004/Accepted 7 January 2005

A search for an immunomodulating agent from mycobacteria was carried out using *Mycobacterium leprae*. The antigenicity of each fraction of the bacterial membrane, which contains the most antigenic components of *M. leprae*, was assessed by using sera from paucibacillary leprosy. N-terminal sequencing of the serum-reactive protein and functional assessment of the membrane fractions using monocyte-derived dendritic cells (DCs) identified major membrane protein II (MMP-II) as one of the efficient T-cell-activating candidates. Purified MMP-II stimulated DCs from healthy individuals to produce interleukin-12 p70 and up-regulated the surface expression of major histocompatibility complex class I and II, CD86, and CD83 molecules. Also, there was an increase in the percentage of CD83⁺ cells in the DC population. Furthermore, MMP-II-pulsed DCs expressed their derivatives on their surfaces. Using Toll-like receptor 2 (TLR-2)-dependent receptor constructs, we found that TLR-2 signaling was involved in DC maturation induced by MMP-II. Taken together, MMP-II can be recognized as an immunomodulating protein in terms of activation of antigen-presenting cells and innate immunity.

Mycobacterial infection is a major public health risk worldwide, and around one-third of the world's population is estimated to be latently infected. *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of human tuberculosis, accounts for 8 to 10 million new active cases and 2 million deaths annually (12, 41). Nontuberculous mycobacterial infections of immunocompromised individuals, such as human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients (8, 28), evoke serious concern, and *Mycobacterium leprae* induces a chronic progressive peripheral nerve injury which leads to systemic deformity (16, 37). The sole immunomodulating agent currently available for human use against mycobacterial diseases is *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG). However, its protective effect against mycobacterial infection is unconvincing, especially to elderly people, and thus, its use is limited (3). Various efforts are currently being made to develop immunomodulating agents, but convincing protection against mycobacterium-induced diseases has not been achieved to date. The development of other useful molecules as immunomodulating agents is greatly desired. In this study, we attempted to find such antigenic molecules in *M. leprae* subfractions.

M. leprae is the causative agent of human leprosy, for which a broad disease spectrum is clinically observed (34). Most individuals infected with *M. leprae* do not manifest leprosy, but a few manifest the disease, depending on their immunological status. The representative spectra are the tuberculoid, or paucibacillary (PB), leprosy and the lepromatous, or multibacillary (MB), leprosy. In the former disease spectrum, localized skin and nerve lesions are observed, and T cells act chiefly to lo-

calize bacterial spread and, thus, disease lesions (20, 31, 36). In contrast, in the latter disease spectrum, such cell-mediated immune responses are not efficiently evoked; rather, T cells show *M. leprae* antigen (Ag)-specific anergic responses. In both types of leprosy, the protective effect of antibody (Ab) is not observed. These observations indicate that the bacterial component Ags capable of modulating immune responses should be identified. Previously it has been demonstrated that monocyte-derived dendritic cells (DCs), which are the most potent antigen-presenting cells (APCs), are capable of stimulating both memory and naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells (14, 15, 21). Also, we reported that DCs played a central role in stimulating T cells (10, 18, 22); however, macrophages stimulated T cells less efficiently. Furthermore, we showed that among subcellular components of *M. leprae*, the cell membrane fraction was quite antigenic and contained molecules which stimulated DCs to produce interleukin-12 (IL-12) p70 (22). However, the molecules associated with DC activation have not been elucidated. For identification of an APC-associated immunomodulator, the following issues should be addressed: (i) the ability of the immunogen to activate APCs, including both DCs and macrophages; (ii) the ability of the immunogen to be processed and presented on the surfaces of these APCs, because mycobacteria are intracellular parasitic pathogens. In this context, we fractionated the *M. leprae*-derived cell membrane fraction, screened the fractions for such a protein by using DCs as APCs, and subsequently evaluated the newly identified molecule, major membrane protein II (MMP-II), in terms of innate immunity.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of cells and bacteria. Peripheral blood was obtained with informed consent from healthy individuals who were positive for purified protein derivative (PPD) due to *M. bovis* BCG vaccination. We are aware that PPD-negative individuals would help to provide full information for these experi-

* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-2-1 Aobacho, Higashimurayama, Tokyo 189-0002, Japan. Phone: 81-42-391-8059. Fax: 81-42-391-8212. E-mail: mmaki@nih.go.jp.

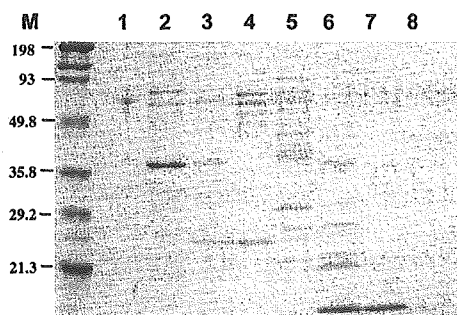


FIG. 1. *M. leprae* membrane fractions were separated into eight fractions by gel filtration as described in Materials and Methods. Then 3 μ g of each fraction was run on a 12% SDS-polyacrylamide gel, and silver staining of the gel was performed.

ments, however, in Japan, such individuals are not available for study, because *M. bovis* BCG vaccination is compulsory for children (0 to 4 years old). Moreover, PPD-negative individuals in the Japanese population are those who do not respond to BCG vaccination, and therefore, it is likely that they suffer from an unknown human disease or immune insufficiency. Therefore, these individuals cannot be used as controls for our experiments. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using Ficoll-Paque Plus (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and cryopreserved in liquid nitrogen until use, as previously described (23). Macrophages were differentiated by culturing plastic-adherent CD14⁺ monocytes with RPMI 1640 medium containing 20% of fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin G (Katayama Chemical, Osaka, Japan) in the presence of 5 ng/ml of macrophage colony-stimulating factor (R & D Systems, Abingdon, United Kingdom), as previously described (40). For preparation of the monocytes, CD3⁺ T cells were removed from either freshly isolated heparinized blood or cryopreserved PBMCs using immunomagnetic beads coated with an anti-CD3 monoclonal antibody (MAb) (Dynabeads 450; Dynal, Oslo, Norway). The CD3⁻ fraction of the PBMCs was plated on collagen-coated plates and cultured for 60 min at 37°C. The non-plastic-adherent cells were then removed by extensive washing, and the remaining adherent cells were used as monocytes and precursors of macrophages and DCs (23). Monocyte-derived DCs were differentiated from the plastic-adherent cells as described previously (23, 24). Briefly, the plastic-adherent cells were cultured in 3 ml of RPMI 1640 medium containing 10% FCS for 5 days in the presence of 50 ng of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rGM-CSF) (Pepro Tech EC Ltd., London, England) and 10 ng of rIL-4 (Pepro Tech) per ml. rGM-CSF and rIL-4 were supplied every 2 days, and 400 μ l of medium was replaced as described previously (24). In some cases, DCs unpulsed or pulsed with Ags were further treated with a soluble form of CD40 ligand (CD40L) (Pepro Tech) to obtain fully matured DCs capable of efficiently activating T cells. The purity of DCs obtained was 90.5% as judged by the expression of CD1a. Since *M. leprae* cannot be cultivated or grown in vitro, *M. leprae* (Thai-53) was obtained from an armadillo liver that

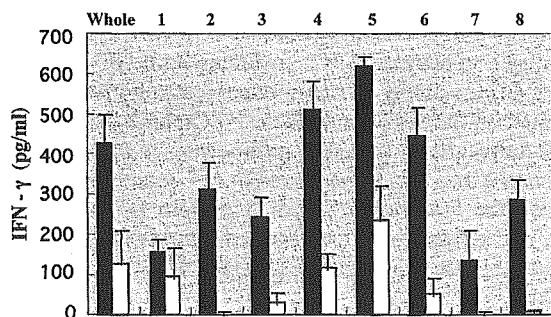


FIG. 2. IFN- γ production by T cells stimulated with membrane fraction-pulsed DCs. The responder CD4⁺ and CD8⁺ T cells (10^5 /well) were stimulated for 4 days with autologous DCs which had been previously stimulated with 10 μ g/ml of various membrane fractions of *M. leprae* obtained by gel filtration. Solid bars, IFN- γ production from CD4⁺ T cells; open bars, IFN- γ production from CD8⁺ T cells.

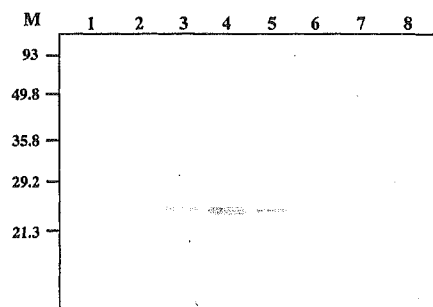


FIG. 3. Western blot of *M. leprae* membrane fractions. Five micrograms of various membrane fractions of *M. leprae* was run on a 12% SDS-polyacrylamide gel and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane, which was further probed with an anti-MMP-II MAb. An alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG Ab was used as the secondary Ab, and the protein was detected with NBT/BCIP reagent.

had been previously infected with *M. leprae*. The isolated bacteria were counted by Shepard's method (35) and were frozen at -80°C until use. The viability of *M. leprae* was assessed by using a fluorescent diacetate/ethidium bromide test (17).

Fractionation of *M. leprae* protein and N-terminal sequencing. The fractionation of the mycobacterial proteins into cell wall, membrane, and cytosolic fractions was carried out according to previous reports (13, 18, 22). Briefly, the mycobacterial suspension was mixed with zirconium beads in the presence of protease inhibitors at a ratio of approximately 1:1 (vol/vol) and homogenized using Beads Homogenizer, model BC-20 (Central Scientific Commerce, Tokyo, Japan), at 1,500 rpm for 90 s three to four times. The beads were separated, and the suspension was centrifuged at $10,000 \times g$ for 30 min. The supernatant was then further ultracentrifuged at $100,000 \times g$ for 1 h. The resulting pellet was suspended in phosphate-buffered saline, washed twice, and taken as the membrane fraction. For the identification of *M. leprae* antigenic molecules, the membrane fraction was further fractionated using a fast protein liquid chromatography system (Amersham Bioscience, New Jersey). Four hundred micrograms of protein was run on a Superose 12 column (Amersham Bioscience) in 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, and 0.5% 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) at a flow rate of 0.5 ml/min. Fractions were collected, concentrated, buffer exchanged to 50 mM Tris-HCl using Microcon centrifuge filter units YM-3 (Millipore, Bedford, MA), and run on a 12% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel. The gel was stained with "Daiichi" silver stain (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd., Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions. Western blotting was performed using PB patients' pooled sera, at a dilution of 1:25, which had been preadsorbed with the *M. leprae* cytosolic fraction. Alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human immunoglobulin G (IgG) (Biosource, Camarillo, CA) was used as the secondary Ab, and detection was performed by using the nitroblue tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) reagent (Calbiochem, San Diego, CA). N-terminal peptide sequencing of the protein which reacted to the sera was performed at the Center for Instrumental Analysis, Hokkaido University.

Analysis of cell surface Ags. The expression of cell surface Ags on DCs was analyzed using FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Dead cells were eliminated from the analysis by staining with propidium iodide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), and 10^4 live cells were analyzed. For analysis of cell surface Ags, fluorescein isothiocyanate-conjugated MAbs against HLA-ABC (G46-2.6; PharMingen, San Diego, CA), HLA-DR (L243; PharMingen), CD86 (FUN-1; PharMingen), and CD83 (HB15a; Immunotech, Marseille, France) were used. A murine MAb against MMP-II was raised by immunizing a mouse with purified MMP-II. The optimal concentrations of MAbs were determined in advance.

Identification and purification of MMP-II. The MMP-II gene was PCR amplified from *M. leprae* chromosomal DNA and cloned into an *Escherichia coli* expression vector. Briefly, the MMP-II gene was inserted into the expression plasmid pET28 (Novagen Inc., Madison, WI) and transformed into *E. coli* strain ER2566 (New England Biolabs Inc., Beverly, MA). The expressed protein was eluted using Whole Gel Eluter (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) and used for all experiments. The amount of lipopolysaccharide (LPS) in the purified MMP-II protein was determined by using a *Limulus* amoebocyte lysate assay (Whittaker Bioproducts, Walkersville, MD) and found to be less than 70 pg per mg of MMP-II, a level that did not affect the maturation of DCs.

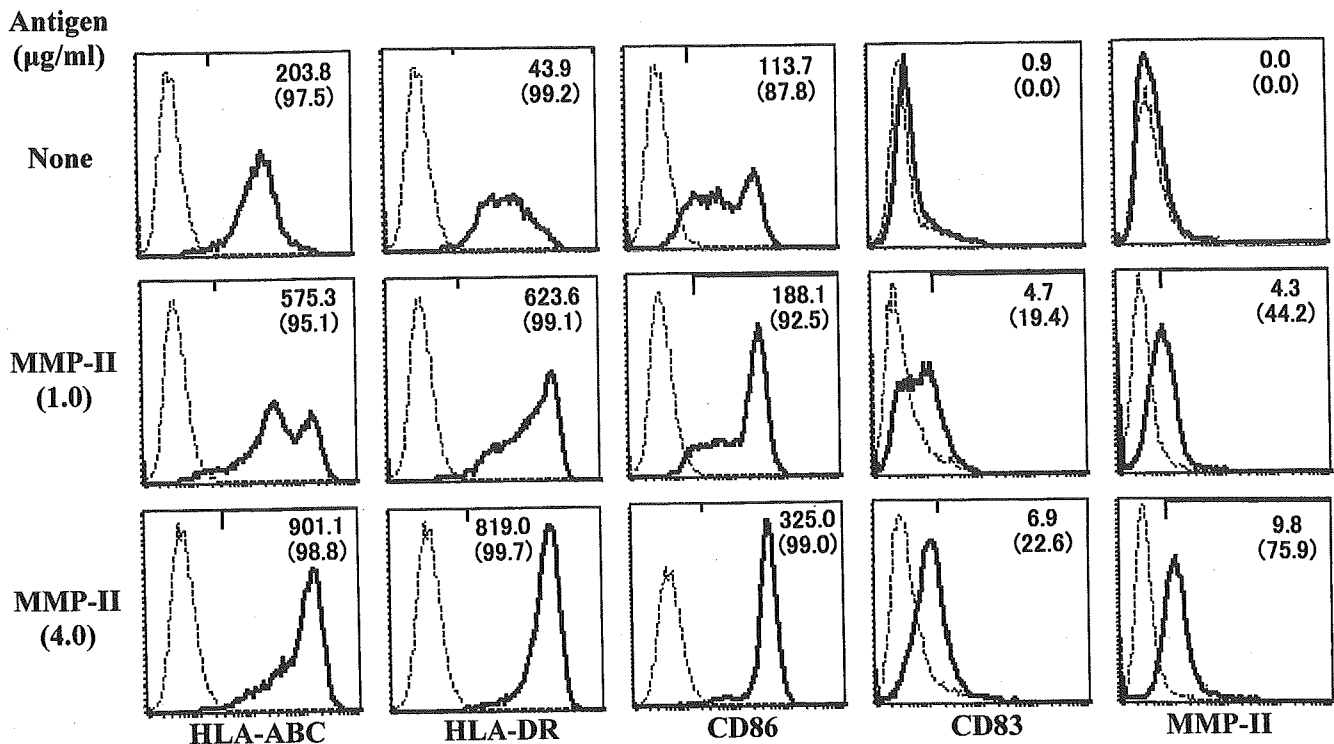


FIG. 4. Expression of various molecules on DCs pulsed with MMP-II. Monocyte-derived DCs from healthy individuals (PPD positive) were pulsed with the indicated dose of MMP-II. DCs were gated and analyzed. Solid curves, isotype-matched control IgG; broken curves, the indicated MAb. The number in the top right corner of each panel represents the difference in mean fluorescence intensity between the control IgG and the test MAb. The number in parentheses is the percentage of positive cells. Results of one experiment representative of three separate experiments are shown.

Assessment of APC function of DCs pulsed with cell membrane fractions. The ability of DCs pulsed with various fractions of the *M. leprae* cell membrane to stimulate autologous T cells was assessed using an autologous stimulator-T-cell mixed reaction as previously described (10, 24). The Ag-pulsed DCs were treated with 50 µg/ml of mitomycin C, washed extensively to remove extracellular Ags, and used as a stimulator. T cells were prepared as follows: freshly thawed PBMCs were depleted of major histocompatibility complex (MHC) class II⁺ cells by using magnetic beads coated with a MAb to MHC class II Ag (Dynabeads 450; Dynal) and were further treated with beads coated with either a CD4 or a CD8 MAb to select T cells negatively as previously reported (10). The purity of CD4⁺ T cells or CD8⁺ T cells was more than 98%. The supernatant of the stimulator-T-cell mixture was collected on day 4 of coculture, and the level of gamma interferon (IFN-γ) produced was measured by an Opt EIA Human ELISA Set (BD PharMingen International).

Assessment of cytokine production. Levels of the following cytokines were measured: tumor necrosis factor alpha (TNF-α), IL-10, and IL-12 p70 produced

from either macrophages or DCs by stimulation with MMP-II for 24 h in the presence or absence of a soluble form of CD40L (Pepro Tech). The murine MAb against TLR-2 (clone 2392; IgG1) with neutralizing activity was obtained from Genentech (San Francisco, CA). The optimal concentration of the anti-Toll-like receptor 2 (anti-TLR-2) Ab was determined in advance. The concentrations of IL-12 p70, IL-10, and TNF-α were quantified using the Opt EIA Human ELISA Set enzyme assay kits, available from BD PharMingen International.

Cell transfection and luciferase assay. Human embryonic kidney cells (HEK293) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% FCS, 50 mg/ml penicillin/streptomycin, and nonessential amino acids (Invitrogen, Carlsbad, CA) at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. The cDNA of human TLR-2 was PCR amplified using a human spleen cDNA library (BD Biosciences, San Jose, CA) and inserted into pCIneo (Promega, Madison, WI). HEK293 cells (2 × 10⁶) were transiently transfected with a mixture of plasmids—200 ng of pCIneo hTLR2, 25 ng of p5×NF-κB-luc

TABLE 1. Cytokine production from DCs stimulated with MMP-II^a

DC stimulation (dose)	Concn (pg/ml) of the following cytokine:					
	IL-12 p70		TNF-α		IL-10	
	CD40L (-)	CD40L (+)	CD40L (-)	CD40L (+)	CD40L (-)	CD40L (+)
None	2.6 ± 0.2*,†	17.7 ± 0.4‡,§	2.6 ± 0.4¶,	15.4 ± 3.8**,††	2.0 ± 0.1	3.4 ± 0.1
MMP-II (1 µg/ml)	51.2 ± 0.5*	782.0 ± 8.7‡	345.4 ± 9.9¶	345.7 ± 19.3**	2.5 ± 0.3	1.7 ± 0.1
MMP-II (4 µg/ml)	404.0 ± 9.8†	1624.0 ± 11.0§	773.8 ± 11.1	747.3 ± 18.7††	2.2 ± 0.1	2.8 ± 0.3
LPS (0.3 pg/ml)	2.8 ± 0.3	18.7 ± 0.6	5.0 ± 1.3	36.0 ± 9.2	2.0 ± 0.3	3.0 ± 0.2

^a Monocyte-derived DCs (10⁵/well) were stimulated for 24 h with the indicated dose of MMP-II in the absence [CD40L (-)] or presence [CD40L (+)] of a soluble form of CD40L (1.0 µg/ml). The DCs were also stimulated for 24 h with 0.3 pg/ml of LPS, which is estimated to be present in 4 µg/ml of MMP-II. Results representative of more than three separate experiments are shown. Assays were done in triplicate, and results are expressed as means ± standard deviations. Titers with the same symbols are statistically compared by Student's *t* test, as follows: *, *P* < 0.001; †, *P* < 0.001; ‡, *P* < 0.001; §, *P* < 0.001; ¶, *P* < 0.0005; ||, *P* < 0.0005; **, *P* < 0.001; ††, *P* < 0.001; †††, *P* < 0.0005.