

	110	120	130	140	150	160	170	180	Alpha 3 domain	190	200
HLA-B*2702	CDVGPDGRLL	RGYHQDAYDG	KDYIALNEDL	SSWTAADTAA	QITQRKWEAA	RVAEQLRAYL	EGECVEWLR	YLENGKETLQ	RA	DPPKTHVT	HHFISDHEAT
HLA-B*5701		HD. S.									
Mamu-B*02	L	F	R	M	N	GE	M	T	H		V
Mamu-B*03	L	Y	F	R	V	E	V	T			
Mamu-B*04		D. F.	Q	R	V	N	GE	Q	T		
Mafa-B*01	L	Y	R	R	E	N	G	W	K	C	M
Mafa-B*02	L	Y	R	R	E	N	E	M	L	H	VP
Mafa-B*03	L	D. S.		R	MD	N	GE	M	T	H	V
Mafa-B*04	L	S		R	VM	N	GD	Y	RF	R	H
Mafa-B*05	L	R		R	V	N	GD	Y	RF	T	V
Mafa-B*06	L	R		R	I	N	T	Y	RF	T	V
Mafa-B*07	N	H	F	R	G	M	N	V	GE	RF	R
Mafa-B*08	L	H	E. T.	R	M	N	D	Y	RF	T	L
Mafa-B*09	L	R		R	V	N	K	G	R	T	V
Mafa-B*10	LE	R		R	M	N	G	M			V
Mafa-B*11	L	E. F.	R	R	L	N	GE	W			V
Mafa-B*12	L	D. Y.	V	R	M	N	A	RQ	L	M	V
Mafa-B*13	L	H	D. Y.	V	R	M	N	A	RQ	L	R
Mafa-B*14	Y. E.	Y		R	M	N	G	RV	P	M	V
Mafa-B*15	L	X	Q	R	M	N	K	GD	Y	RF	L
Mafa-B*16	L	Y. H.		R	M	N	E	W	G	L	Y
Mafa-B*17	L	S		R	M	N	RF	E	M	L	H
Mafa-B*18	L	F		R	M	N	RF	E	Q	L	H
Mafa-B*19	L	F		R	M	N	RF	E	Q	L	H
Mafa-B*20	L	E	D. H.	R	M	N	E	E	M	R	L
Mafa-B*21	L	Y	Q	R	M	N	GE	R	R		E
Mafa-B*22	L	Y	Q	R	M	N	GE	R	R		E
Mafa-B*23	L	S		R	R	HN	A	LQ	R	L	V
Mafa-B*24	L	Y. R.		H	L	N	G	R	R	L	V
Mafa-B*25	L	Y. R.		H	L	N	G	R	R	L	V
Mafa-B*26	L	Y. S.	R	R	GK	N	G	R	L	S	A
Mamu-I*04	L	Y. S.	R	R	GE	N	GE	R	R	K	V
Mamu-I*07	L	Y. S.	R	R	GE	N	GE	R	R	K	V
Mamu-I*08	L	Y. S.	R	R	GE	N	GE	R	R	K	V
Mafa-I*01013	L	Y. S.	R	R	GE	N	GE	R	R	K	V
Mafa-I*02	L	Y	R	R	E	N	GE	R	R	K	V
Mafa-I*03	L	R	Y. S.	R	GE	HN	GE	R	R	K	V
Mafa-I*04	L	Y. S.	R	R	GE	N	GE	R	R	K	V
Mafa-I*05	L	Y. S.	R	R	GV	N	GE	R	R	K	V
Mafa-I*06	L	Y. S.	R	R	GE	N	GE	R	R	K	V
Mafa-I*07	L	Y. S.	R	R	GE	N	GE	W	R	K	V
Mafa-I*08	L	Y. S.	R	R	GE	N	GE	R	R	K	V
Mafa-I*09	L	Y. S.	R	R	GE	N	GE	R	R	K	V
HLA-A*0201	S. W. F.	Y	K	R	M	T. KH	H	T		T	A
Mamu-A*01	L	E. Y.		R	V	N	D	SM	Q	P	K
Mamu-A*02	L	S		R	M	N	GE	H	T	L	V
Mafa-A*01	L	E. F.	R	R	M	N	G	M	V	R	L
Mafa-A*02	L	D. F.	D	R	L	N	G	XII	T	L	V
Mafa-A*06	L	E. Y.	F	R	L	N	G	I	L	S	V

Fig. 1 (continued)

**Results**

Detection of 26 MHC class I *B* locus alleles and nine *I* locus alleles in cynomolgus monkeys

To amplify cynomolgus MHC class I *B* locus genes, PCR was carried out using primers that were successfully used for amplification of rhesus MHC class I *B* locus genes along with newly designed ones (Table 1; Boyson et al. 1996b). We obtained 48 clones from each animal. The nucleotide sequences that were found in just one clone

were excluded from the subsequent analyses to avoid incorporation of artificial sequences generated by PCR error or during the cloning procedure into public databases. Ambiguous sequences were also excluded. When the nucleotide sequence was shared by more than two clones, regardless of whether they were derived from one animal or multiple animals, the sequences were regarded as a consensus sequences representing a particular alleles of each animal. Eventually, 43 candidate alleles were obtained, and 34 of 43 were found to have substantial homology with *Mamu-B* alleles. Amino acid sequences deduced from the nucleo-

	210	220	230	240	250	260	270	Transmembrane domain			
								280	290	300	
HLA-B*2702	LRCWALGFYP	AEITLTWQRD	GEDQTQUTEL	VETRPAGDRT	FQKWAAVVVP	SGEEQRYTCH	VQHEGLPKPL	TLRW	EPSSQS	TVPIVGIVAG	LAVLAVVVIG
HLA-B*5701											
Mamu-B*02	V			G	G			E		I	T
Mamu-B*03		E		G	G	H		E		I	T
Mamu-B*04				G	G		Q	E		I	T
Mafa-B*01	S	RQ	E	G	G			LE		SI	T
Mafa-B*02				G	G			E		I	M
Mafa-B*03	V			G	G			E		I	T
Mafa-B*04		V		G	G			E		I	M
Mafa-B*05			I	F	G	G		E		I	V
Mafa-B*06			I	F	G	G		E		I	A
Mafa-B*07					G	G		Q		I	T
Mafa-B*08	R			G	G			RE		I	T
Mafa-B*09	V			G	G			E		I	T
Mafa-B*10			E	G	G			E		I	S
Mafa-B*11				G	G		H	E		I	T
Mafa-B*12			E	G	G			E	V	I	T
Mafa-B*13				G	G			LE		S	T
Mafa-B*14			I	F	G	G		LE		I	V
Mafa-B*15			E		G	NG		E		I	T
Mafa-B*16			E		G	G		RE		I	G
Mafa-B*17				G	G			E		I	M
Mafa-B*18				G	G			E		I	T
Mafa-B*19				G	G			E		IA	T
Mafa-B*20				G	G			E		E	T
Mafa-B*21			E		G		H	E		I	V
Mafa-B*22			E		G		H	E		I	V
Mafa-B*23			E		G	G		E		I	M
Mafa-B*24	D			G	G			E		I	T
Mafa-B*25	D			G	G			E		I	P
Mafa-B*26			E	F	G	G		E		IA	V
Mamu-I*04			E		G	GN		E		I	M
Mamu-I*07					G	GN		E		I	M
Mamu-I*08					G	GN		E		I	M
Mafa-I*01013					G	GN		E		I	M
Mafa-I*02					G	GN		E		I	M
Mafa-I*03			E		G	GN		E		I	M
Mafa-I*04			E		G	GN		E		I	M
Mafa-I*05			E		G	GN		E		I	M
Mafa-I*06			E		G	GN		E		I	M
Mafa-I*07			E		G			E		I	M
Mafa-I*08			E		G	GN		E		I	M
Mafa-I*09			E		G	GN		E		I	M
HLA-A*0201	S			G			Q		P	I	VLFGA
Mamu-A*01				G				H	F	I	VLGA
Mamu-A*02				G			K	RE	IL	I	VLGI
Mafa-A*01	G		E		G			E	I	I	VLGA
Mafa-A*02				G			K	IL	I	I	VLGA
Mafa-A*06	V			G			K		I	I	VLGA

Fig. 1 (continued)

tide sequences of these 34 candidate *B* alleles were further subjected to phylogenetic analysis using the neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987; data not shown). When the predicted amino acid sequence variation between two candidates was negligible ( $d < 0.025$ ), the amino acid sequence shared by a majority of the clones was regarded as representing a particular allele. The other sequence shared by a minority of clones was excluded from the subsequent analyses. As the result of the analysis, 26 *Mafa-B* alleles were identified. It was found that the remaining nine candidate alleles were closely related to those of *Mamu-I* locus

reported by Urvater et al. (2000b). Since Urvater et al. also identified two *Mafa-I* alleles (*Mafa-I\*01011* and *Mafa-I\*01012*), we named tentatively alleles identified here *Mafa-I\*01013* through *Mafa-I\*09*. The *Mafa-I\*01013* allele was identical in amino acid sequence with *Mafa-I\*01011* and *Mafa-I\*01012*, but there were several synonymous nucleotide changes scattered around the sequence. We therefore considered that this allele was a variant of *Mafa-I\*01*, although reported sequences of *Mafa-I\*01011* and *Mafa-I\*01012* were incomplete. The deduced amino acid sequences of *Mafa-B* and *Mafa-I* alleles were shown in Fig. 1

		Cytoplasmic domain			
		310	320	330	340
HLA-B*2702	AVVAAVMC	RR	KSSGGRGGSY	SQAACSDSAQ	GSDVSLTA*-
HLA-B*5701	.....	.....	.....	.....	.....
Mamu-B*02	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mamu-B*03	..... W	.....	..... SX	.....	.....
Mamu-B*04	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mafa-B*01	..... R	.....	..... S	.....	.....
Mafa-B*02	..... M	..... K	..... T	..... F	..... SK
Mafa-B*03	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mafa-B*04	..... W	.....	..... S	..... N	.....
Mafa-B*05	..... W	.....	..... SX	.....	.....
Mafa-B*06	..... W	.....	..... SX	.....	.....
Mafa-B*07	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mafa-B*08	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mafa-B*09	..... W	.....	..... SX	.....	.....
Mafa-B*10	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mafa-B*11	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mafa-B*12	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mafa-B*13	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mafa-B*14	..... W	.....	..... SX	.....	.....
Mafa-B*15	..... W	.....	..... SX	.....	.....
Mafa-B*16	..... W	..... K	..... S	..... R	..... S
Mafa-B*17	..... M	..... T	..... R	..... F	..... SK
Mafa-B*18	..... M	..... R	..... T	..... R	..... F
Mafa-B*19	..... W	.....	..... F	..... SK	..... P
Mafa-B*20	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mafa-B*21	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mafa-B*22	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mafa-B*23	..... W	..... K	..... RT	..... R	..... F
Mafa-B*24	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mafa-B*25	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mafa-B*26	..... W	.....	..... SX	.....	.....
Mamu-I*04	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mamu-I*07	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mamu-I*08	..... W	.....	..... S	..... N	.....
Mafa-I*01013	..... P	.....	..... S	..... N	.....
Mafa-I*02	..... P	.....	..... S	..... N	.....
Mafa-I*03	..... W	.....	..... S	..... N	.....
Mafa-I*04	..... W	.....	..... S	..... N	.....
Mafa-I*05	..... W	.....	..... S	..... N	.....
Mafa-I*06	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mafa-I*07	..... W	.....	..... S	..... N	.....
Mafa-I*08	..... W	.....	..... S	.....	.....
Mafa-I*09	..... W	.....	..... S	..... N	.....
HLA-A*0201	..... W	..... DR	.....	..... S	..... CK V*
Mamu-A*01	..... W	..... DR	.....	..... S	..... CK V*
Mamu-A*02	..... J	..... TW	..... DR	..... S	..... CK V*
Mafa-A*01	..... W	..... DR	.....	..... SX	..... CK V*
Mafa-A*02	..... V	..... W	..... DR	..... S	..... CK V*
Mafa-A*06	..... T	..... W	..... DR	..... S	..... CK V*

Fig. 1 (continued)

along with those of alleles reported for other primates. The total numbers of clones obtained and the numbers of animals having the allele were shown in the figure. The putative glycosylation site was located at residue 86, and the conserved cysteine residues occurred at positions 101 and 164 in  $\alpha 2$  and at positions 203 and 259 in  $\alpha 3$ . To evaluate whether the nucleotide sequences of *Mafa-B* and *Mafa-I* alleles established in this study were gene products of class I *B* and *I* loci, respectively, *Mafa-B* and *Mafa-I* alleles were phylogenetically analyzed (Fig. 2a). The full-length nucleotide sequences of *Mafa-B*, *Mafa-I*, *Mafa-A*, *Mamu-A*, *Mamu-B*, *Mamu-I*, *HLA-A*, and *HLA-B* were aligned by Clustal W. A

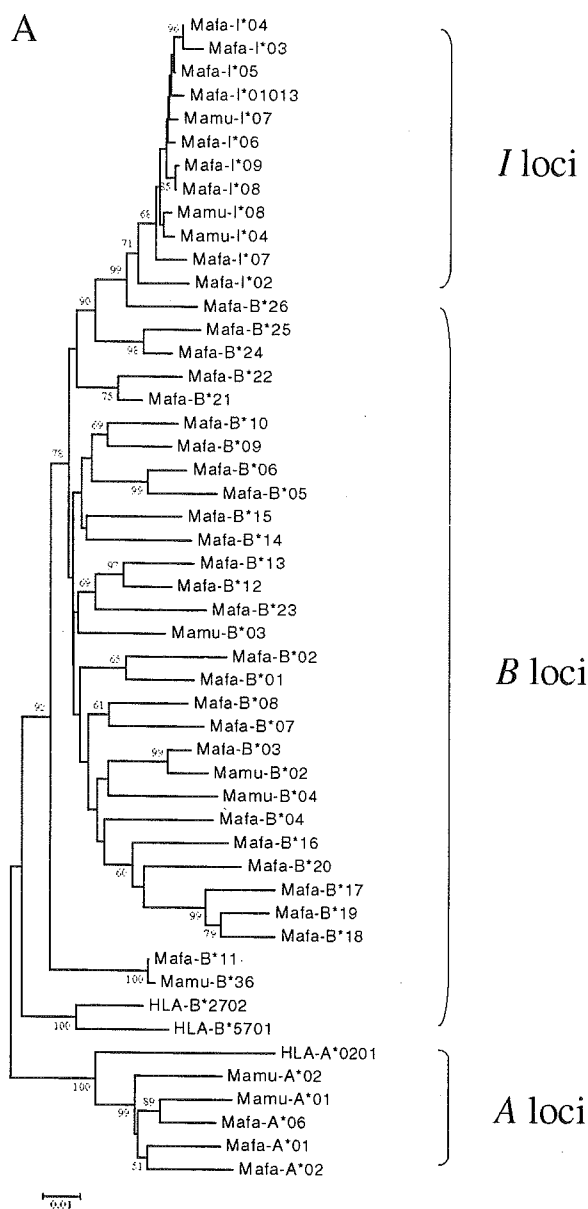


Fig. 2 Phylogenetic analysis of primate class I MHC molecules. The phylogenetic tree was constructed using a full-length and b exon five to eight nucleotide sequences by neighbor-joining method with MEGA2.1. The bootstrap values of more than 50% were shown

phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method of MEGA2.1 software. The reliability of the tree topology was tested by the bootstrap method, and the bootstrap values are shown in Fig. 2a. Since the bootstrap values of less than 50% were unreliable, the bootstrap values of greater than 50% are shown in Fig. 2a. Several *Mafa-B* alleles (*Mafa-B*\*21, 22, 24, 25, and 26) appeared to cluster with *Mamu-I* or *Mafa-I* allele rather than *B* locus alleles. Since amino acid difference between alleles of *I* and *B* loci were more apparent at the carboxy half of the protein, we recon-

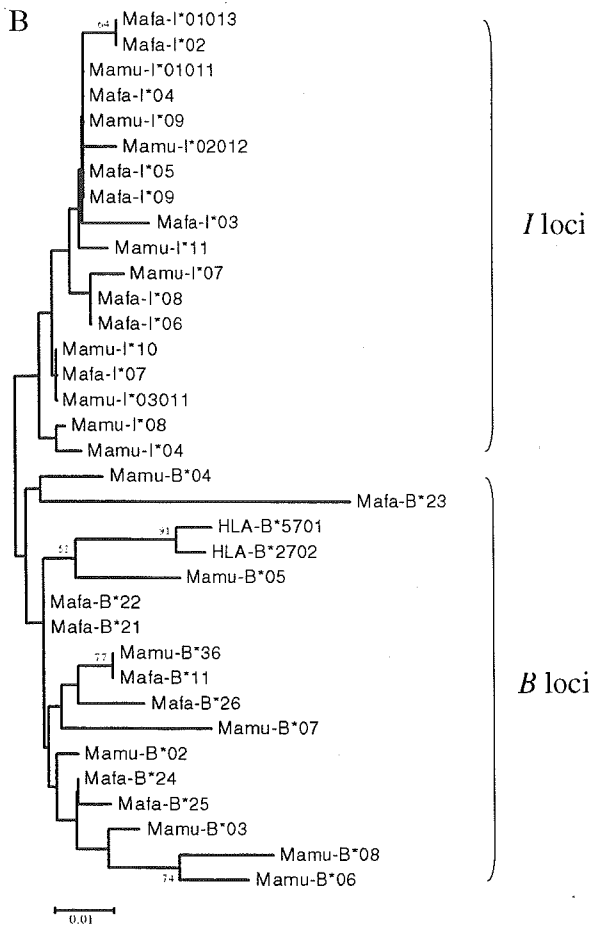


Fig. 2 (continued)

Table 2 Segregation of alleles with haplotypes

Haplotypes	Alleles	Animal no.						
		3032	3028	1159	1113	0079	7071	0068
A	<i>Mafa-B*03</i>	○			○			○
	<i>Mafa-I*09</i>	○			○			○
B	<i>Mafa-B*24</i>	○				○	○	
	<i>Mafa-B*25</i>	○				○	○	
C	<i>Mafa-B*17</i>			○			○	
	<i>Mafa-B*20</i>			○			○	
	<i>Mafa-I*06</i>			○			○	
D	<i>Mafa-B*01</i>			○			○	
	<i>Mafa-B*04</i>			○				○
E	<i>Mafa-B*16</i>	○			○	○		
	<i>Mafa-I*03</i>	○			○	○		
F	<i>Mafa-B*06</i>	○						
	<i>Mafa-B*23</i>	○						
	<i>Mafa-I*02</i>	○						

○ :Alleles were detected in each individual

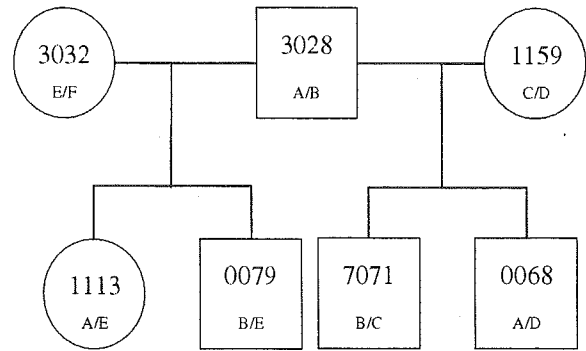


Fig. 3 The family pedigree demonstrating the inheritance of alleles of the MHC class I *B* and *I* loci of cynomolgus monkeys. Male and female are denoted by squares and circles, respectively. The animal number assigned to the animal is shown. The haplotypes of each animal are given by capital letters

structured the phylogenetic tree using the amino acid sequences of the exons 5 to 8. The result clearly showed that these nine alleles clustered with *Mamu-I* alleles (Fig. 2b). These results strongly suggested that these cDNA clones were derived from distinct alleles on MHC class I *B* and *I* loci of cynomolgus monkeys.

Inheritance of *Mafa-B* and *Mafa-I* in a family of cynomolgus monkeys

A family consisting of three parents (one sire and two dams) and four offspring was subjected to genetic analysis to study inheritance of *Mafa-B* and *Mafa-I* alleles. By nucleotide sequence analysis, ten *Mafa-B* alleles and four *Mafa-I* alleles were detected in this family as shown in Table 2. Since certain alleles appeared to be inherited in this family as a complex, we considered those gene complexes as haplotypes and assigned letters A through F to those combinations of alleles (Table 2). Haplotype A (*Mafa-B\*03* and *Mafa-I\*09*)

Table 3 The presence of multiple *Mafa-B* alleles in cynomolgus monkeys

Animal no.	Alleles	Number of copies	Primers
2010	<i>Mafa-B*09</i>	5	5'MBS/3'MBS, 5'Beta 3 XHO/Mafa-Bla
	<i>Mafa-B*11</i>	16	5'MBS/3'MBS, 5'Beta 3 XHO/Mafa-Bla
	<i>Mafa-B*12</i>	7	5'MBS/3'MBS, 5'Beta 3 XHO/Mafa-Bla
	<i>Mafa-B*19</i>	2	5'MBS/3'MBS, 5'Beta 3 XHO/Mafa-Bla
5076	<i>Mafa-B*10</i>	4	5'MBS/3'MBS
	<i>Mafa-B*14</i>	17	5'MBS/3'MBS, 5'Beta 3 XHO/Mafa-Bla
	<i>Mafa-B*15</i>	10	5'MBS/3'MBS
	<i>Mafa-I*010103</i>	13	5'MBS/3'MBS, 5'Beta 3 XHO/Mafa-Bla

was detected in 3028, 1113, and 0068, whereas haplotype B (*Mafa-B\*24* and *Mafa-B\*25*) was carried by 3028, 0079, and 7071 (Fig. 3). Haplotype C (*Mafa-B\*17*, *Mafa-B\*20*, and *Mafa-I\*06*) was found in 1159 and 7071, haplotype D (*Mafa-B\*01* and *Mafa-B\*04*) in 1159 and 0068, haplotype E (*Mafa-B\*16*, *Mafa-I\*03*) in 3032, 0079, and 1113, and haplotype F (*Mafa-B\*06*, *Mafa-B\*23*, and *Mafa-I\*02*) in 3032 (Fig. 3). We could not detect *Mafa-I* alleles in monkeys bearing haplotypes B and D. It was evident that *Mafa-B* alleles were inherited in a Mendelian fashion. Moreover, cynomolgus monkeys in this family were shown to have two to four *Mafa-B* alleles. The presence of multiple *Mafa-B* alleles was confirmed by nucleotide sequences analysis of two additional cynomolgus monkeys unrelated to this family. Table 3 showed that 2010 had four *Mafa-B* alleles and 5076 had three *Mafa-B* alleles. These results indicated that MHC class I *B* locus of cynomolgus monkeys was duplicated as in the case of rhesus monkeys (Boyson et al. 1996b).

## Discussion

Although cynomolgus monkeys are widely used as animal models in a variety of biomedical researches, there are no nucleotide sequence data on cynomolgus MHC class I *B* locus. In this study, we tried to identify the alleles of cynomolgus MHC class I *B* locus, using PBMC cDNA from 16 cynomolgus monkeys.

Nucleotide sequence analyses and following phylogenetic analysis identified 26 *Mafa-B* alleles (Figs. 1, 2a). We also found nine clones with the nucleotide sequences showing high homology with those of *Mamu-I* alleles. Phylogenetic analysis showed that these clones were derived from nine *Mafa-I* alleles. It was reported that novel MHC class I *I* locus in rhesus monkeys, *Mamu-I*, could be amplified with *B* locus-specific primers, and that the *I* locus was recently evolved from a classical MHC class I *B* locus by duplication (Urvater et al. 2000b).

The haplotypes of rhesus MHC class I composed of at least one *A* locus and at least two *B* loci (Boyson et al. 1996b). In cynomolgus monkeys, we previously reported that the *A* locus had been duplicated, because one to four *Mafa-A* alleles were found in an animal (Uda et al. 2004). The presence of up to six *Mamu-B* alleles in a rhesus monkey (Urvater et al. 2000a) indicates that rhesus monkeys have three class I *B* loci. In this study, we also showed that two to four *Mafa-B* alleles were present in each individual, strongly suggesting that cynomolgus monkeys have multiple MHC class I *B* loci. Regarding the *I* locus, it seemed possible that at least one locus was present in each animal, although some individual appeared not to have the locus. The apparent lack of the *I* locus in some individual was probably due to low efficiency of amplification of the *I* locus because of the presence of the multiple *B* loci.

Information on MHC class I molecule is particularly important in better understanding of pathogenesis of various infectious diseases including HIV infection. So far the nucleotide sequence data are available for the alleles of

*Mafa-A* (Uda et al. 2004), *Mafa-E* (Alvarez et al. 1997; Boyson et al. 1995), *Mafa-G* (Arnaiz-Villena et al. 1997; Castro et al. 1996), *Mafa-I* (Urvater et al. 2000b), *Mafa-DRB* (Gaur et al. 1997; Kriener et al. 2000; Leuchte et al. 2004), *Mafa-DQA* (Kenter et al. 1992), and *Mafa-DQB* (Otting et al. 2002) in cynomolgus monkeys. The identification of *Mafa-B* alleles would, therefore, greatly help understand the pathogenesis of various pathogens that naturally or experimentally infect cynomolgus monkeys.

**Acknowledgements** We thank K. Ono, A. Hiyaoka, M. Maeshima, and other staff in The Corporation of Production and Breeding of Primate for animal care and blood collection. 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.

## References

- 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
- Arnaiz-Villena A, Martinez-Laso J, Alvarez M, Castro MJ, Varela P, Gomez-Casado E, Suarez B, Recio MJ, Vargas-Alarcon G, Morales P (1997) Primate *Mhc-E* and *-G* alleles. *Immunogenetics* 46:251-266
- 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
- Castro MJ, Morales P, Fernandez-Soria V, Suarez B, Recio MJ, Alvarez M, Martin-Villa M, Arnaiz-Villena A (1996) Allelic diversity at the primate *Mhc-G* locus: exon 3 bears stop codons in all Cercopitheciinae sequences. *Immunogenetics* 43:327-336
- Evans DT, Jing P, Allen TM, O'Connor DH, Horton H, Venham JE, Piekarczyk M, Dzuris J, Dykhuizen M, Mitchen J, Rudersdorf RA, Pauza CD, Sette A, Bontrop RE, DeMars R, Watkins DI (2000) Definition of five new simian immunodeficiency virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes and their restricting major histocompatibility complex class I molecules: evidence for an influence on disease progression. *J Virol* 74:7400-7410
- Gaur LK, Nepom GT, Snyder KE, Anderson J, Pandarpurkar M, Yadock W, Heise ER (1997) *MHC-DRB* allelic sequences incorporate distinct intragenic trans-specific segments. *Tissue Antigens* 49:342-355
- Kenter M, Otting N, Anholts J, Leunissen J, Jonker M, Bontrop RE (1992) Evolutionary relationships among the primate *Mhc-DQA1* and *DQA2* alleles. *Immunogenetics* 36:71-78
- Kriener K, O'Uigin C, Tichy H, Klein J (2000) Convergent evolution of major histocompatibility complex molecules in humans and New World monkeys. *Immunogenetics* 51:169-178
- Lafont BA, Buckler-White A, Plishka R, Buckler C, Martin MA (2004) Pig-tailed macaques (*Macaca nemestrina*) possess six MHC-E families that are conserved among macaque species: implication for their binding to natural killer receptor variants. *Immunogenetics* 56:142-154

- Leuchte N, Berry N, Kohler B, Almond N, LeGrand R, Thorstensson R, Titti F, Sauermann U (2004) *MhcDRB*-sequences from cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) of different origin. *Tissue Antigens* 63:529–537
- Otting N, Bontrop RE (1993) Characterization of the rhesus macaque (*Macaca mulatta*) equivalent of *HLA-F*. *Immunogenetics* 38:141–145
- Otting N, de Groot NG, Doxiadis GG, Bontrop RE (2002) Extensive *Mhc-DQB* variation in humans and non-human primate species. *Immunogenetics* 54: 230–239
- Prilliman K, Lawlor D, Ellexson M, McElwee N, Confer D, Cooper DK, Kennedy RC, Hildebrand W (1996) Characterization of baboon class I major histocompatibility molecules. Implications for baboon-to-human xenotransplantation. *Transplantation* 61:989–996
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Sidebottom DA, Kennedy R, Hildebrand WH (2001) Class I MHC expression in the yellow baboon. *J Immunol* 166:3983–3993
- Uda A, Tanabayashi K, Yamada YK, Akari H, Lee YJ, Mukai R, Terao K, Yamada A (2004) Detection of 14 alleles derived from the MHC class I *A* locus in cynomolgus monkeys. *Immunogenetics* 56:155–163
- 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-B\*27*. *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



## 解説

# インバリアントNKT細胞による Th1/2バランスの調節\*

植村 靖史\*\* 劉 天懿\*\* 鈴木 元晴\*\*  
成田 弥生\*\* 大山 秀樹\*\*\* 松下 祥\*\*

Key Words : invariant NKT cells,  $\alpha$ -GalCer, CD1d, Th1/2, dendritic cells

### はじめに

インバリアントNKT(iNKT)細胞は, CD1d分子によって提示された糖脂質抗原を認識し, TCR $\alpha$ 鎖に可変性のないインバリアントT細胞抗原受容体(iTCR: マウスではV $\alpha$ 14J $\alpha$ 281, ヒトではV $\alpha$ 24J $\alpha$ Q)を発現する. iNKT細胞はTCRを介した抗原刺激により活性化されると短時間で大量のIFN- $\gamma$ とIL-4を産生し, 自然免疫, および獲得免疫応答を担当する種々の細胞の多様な生物活性を誘導するとともに, 自己免疫疾患や感染症, 腫瘍免疫, 移植免疫などの免疫制御において重要な役割を示すことで注目視されている. 最近, iTCRのリガンドであるCD1d/ $\alpha$ -ガラクトシルセラミド( $\alpha$ -GalCer)複合体の立体構造が明らかにされるとともに, ヒトとマウスのiNKT細胞が共通して認識する自己および微生物由来の糖脂質抗原が同定され, iNKT細胞が有する多様な生物活性との因果関係が明らかにされつつある. 本稿ではiNKT細胞によるヘルパーT(Th)応答制御における役割について最近の知見を踏まえて解説する.

### CD1d/糖脂質抗原複合体の構造と iTCR認識の多様性

近年, ヒトとマウスのiNKT細胞がCD1d拘束性

に,  $\alpha$ -GalCerを認識して活性化を受けることが明らかとなり, iNKT細胞の有する生物活性が種々の観点から解析されてきた. さらに最近, ヒトおよびマウスにおけるCD1d/ $\alpha$ -GalCer複合体の立体構造が解明され, iTCRの抗原認識における構造基盤が明らかとなった<sup>1)2)</sup>. これによると $\alpha$ -GalCerのアシル鎖がCD1d分子のA'ポケットに反時計回りに回転しながら収容され, A'ポケットを安定化する. 一方, スフィンゴシン鎖はF'ポケットに収容される. 親水性頭部のガラクトースは, これら2つの疎水性のポケットの中央に位置しながら溶媒に露出する(図1A). iTCRのTCRV $\alpha$ 領域はCD1d分子のA'ポケットの上方で $\alpha$ 2ヘリックス側に, TCRV $\beta$ 領域はCD1d分子のF'ポケット上方で $\alpha$ 1ヘリックス側に位置するようにCD1d分子と会合し, 主にTCR $\alpha$ 鎖のCDR3領域で $\alpha$ -アノマータイプのガラクトースを認識することが予想される. さらに, MHC class I分子がペプチドを結合する際に $\alpha$ 1と $\alpha$ 2のヘリックスの間隔が狭くなるのと同様に,  $\alpha$ -GalCerの結合によりCD1d分子の両ヘリックスの間隔が狭くなるなどの特徴からiTCRの抗原認識は, 基本的に $\alpha\beta$ TCRとMHC class I分子の相互作用に類似していることが予想される. しかし, CD1d分子に結合した $\alpha$ -GalCerのガラクトースの位置がヒトとマウスで異なっていることから(図1B), ヒトとマウス

\* Regulation of T helper type 1 and type 2 immune responses by invariant natural killer T cell.

\*\* Yasushi UEMURA, D.D.S., Ph.D., Tianyi LIU, M.D., Ph.D., Motoharu SUZUKI, M.D., Ph.D., Yayoi NARITA, M.D. & Sho MATSUSHITA, M.D., Ph.D.: 埼玉医科大学免疫学[〒350-0495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38]; Department of Allergy and Immunology, Saitama Medical School, Saitama-ken 350-0495, JAPAN

\*\*\* Hideki OHYAMA, D.D.S., Ph.D.: 兵庫医科大学病理学第1

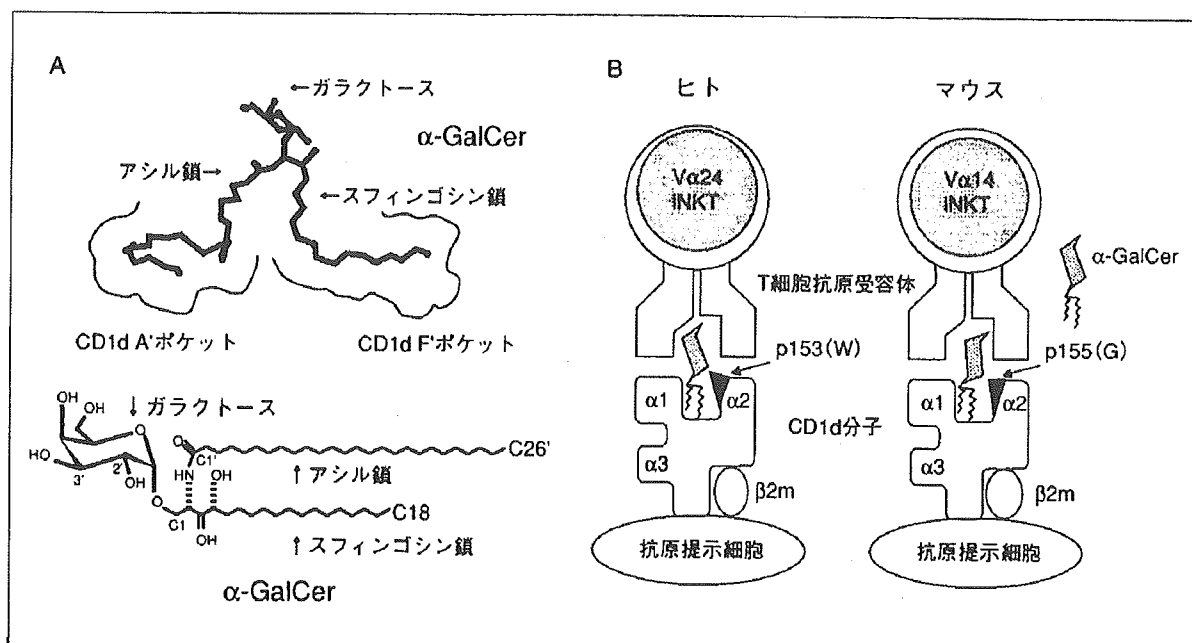


図1 iNKT細胞が認識する糖脂質抗原とCD1d分子

- A:  $\alpha$ -GalCerの構造とCD1d/ $\alpha$ -GalCer複合体の模式図.  $\alpha$ -GalCerのアシル鎖がCD1d分子のA'ポケットに、スフィンゴシン鎖がF'ポケットに収容される様子を示す. 親水性のガラクトース部分が溶媒に露出し、iTCRに認識されると考えられる.
- B: ヒトおよびマウスのiTCR認識における抗原認識の違い.  $\alpha$ -GalCerのガラクトース部分に近接するヒトCD1d p153のアミノ酸残基はトリプトファン(W)であり、これに相当するマウスCD1d p155はグリシン(G)となっている. ヒトCD1d p153 Wは側鎖構造が大きいため、 $\alpha$ -GalCerの頭部ガラクトースを押し出している. これによりガラクトースの位置がヒトとマウスで約3 Åずれている. したがってヒトとマウスのiTCRの認識様式が若干異なることが予想される.

のiTCRが認識可能な抗原プロフィールが異なることが予想される<sup>3)</sup>. また、 $\alpha$ -GalCerとは大きな構造の違いを有する自己糖脂質抗原、isoglobotrihexosylceramide (iGb3) (図2)をヒトとマウスの両方のiTCRが認識することなどを考慮すると、iTCRの認識はこれまで考えられていた以上に可塑性を有しており、多様な糖脂質抗原を認識することが予想される. 今後、iTCRが、CD1d/糖脂質抗原分子複合体とどのようにして会合するのか、また、多様なTCR $\beta$ 鎖の影響、およびiTCR認識における可塑性の程度が、iTCR/糖脂質抗原/CD1dの三分子複合体の構造解析により明らかにされるであろう.

### iNKT-TCRリガンドを用いたTh応答制御

MHC class I, あるいはclass II拘束性の $\alpha\beta$ TCR認識は多様であり、アミノ酸配列のまったく異なるペプチドをも認識することが明らかとなっている<sup>4)</sup>. さらにこれらのペプチドの中には、T

細胞のサイトカイン産生性を変化させるものが存在する<sup>5)</sup>. 前述のように、iTCRの認識も多様であることが予想されるが、すでに $\alpha$ -GalCerの変異アナログを用いることによってTh応答を制御しようとする試みが行われている(図2).  $\alpha$ -GalCerの $\alpha$ -C-グリコシドアナログを認識したマウスiNKT細胞は選択的にIFN- $\gamma$ 産生を誘導する<sup>6)</sup>. 一方、 $\alpha$ -GalCerのスフィンゴシン鎖の炭素9個、アシル鎖の炭素2個を短くしたOCH, あるいはアシル鎖の炭素18個を短くしたPBS-25では、IFN- $\gamma$ に対するIL-4の産生比が上昇する. OCHによって誘導されるサイトカインバランスの変化は、スフィンゴシン鎖が短縮することによりCD1d分子との結合が $\alpha$ -GalCerより不安定となることに起因すると考えられている<sup>7)</sup>. 一方、PBS-25は水性溶媒に対する溶解性が高く、アシル鎖が著しく短いにもかかわらずCD1d分子との結合安定性に優れている. CD1d-PBS-25複合体の構造解析では、PBS-25の短いアシル鎖を補償するとともにCD1d



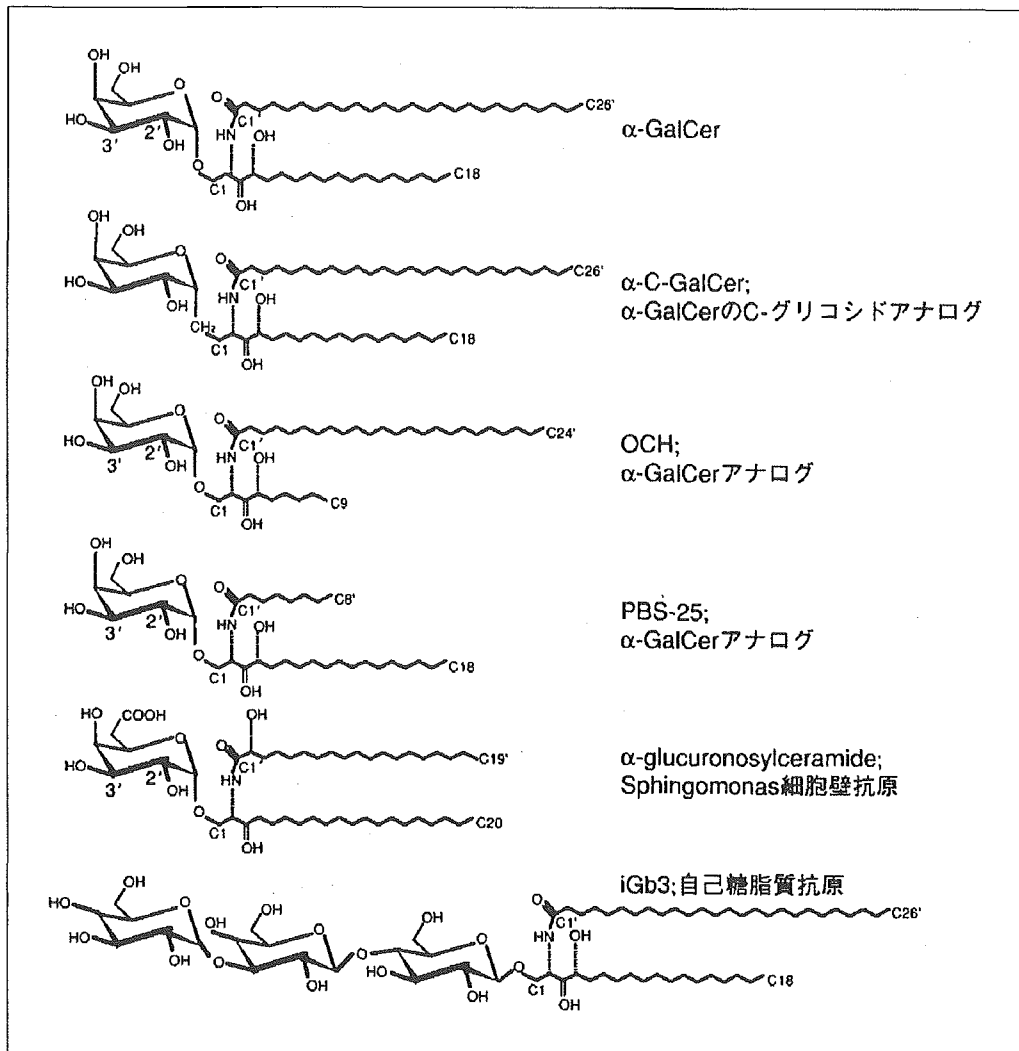


図2 iNKT細胞が認識する糖脂質抗原の構造

自己糖脂質抗原であるiGb3のガラクトースだけが、 $\beta$ フォームをとっているがこれもiNKTによって認識される。

分子の安定化を促進する内因性のスペーサーリピッドがA'ポケットに存在することが明らかとなっている<sup>2)</sup>。α-GalCerがCD1d分子と会合するには、このスペーサーリピッドをlipid-transfer proteinの作用によりA'ポケットから取り出す必要がある<sup>3)</sup>。CD1d分子は、MHC分子のように個人差がないため、これら糖脂質抗原のアナログはiNKT細胞のサイトカイン産生性を制御する格好のワクチンとなりうる。水性溶媒への溶解性、エンドソームにおけるlipid-transfer proteinの関与、受容体を介した抗原の取込み、CD1d分子との結合親和性、安定性などがiNKT応答を制御するワクチンデザインの重要な要素となる。

### Th応答性における iNKTサブセットの役割

iNKT細胞には、Th2免疫応答を促進して自己免疫応答を抑制する機能を有するという報告がある一方、樹状細胞(DC)などのIL-12産生を促進することにより誘導されるTh1免疫応答を促進し、腫瘍細胞の拒絶、あるいは感染防御に貢献するという報告もある<sup>4)</sup>。この矛盾する観察は、iNKT細胞には異なる機能を有するサブセットが存在し、これらのバランスの変化によって免疫応答性が制御されていることを示唆している。マウスiNKT細胞には、組織の違いによりそれぞれ異なるサイトカイン産生性や共刺激シグナル依存

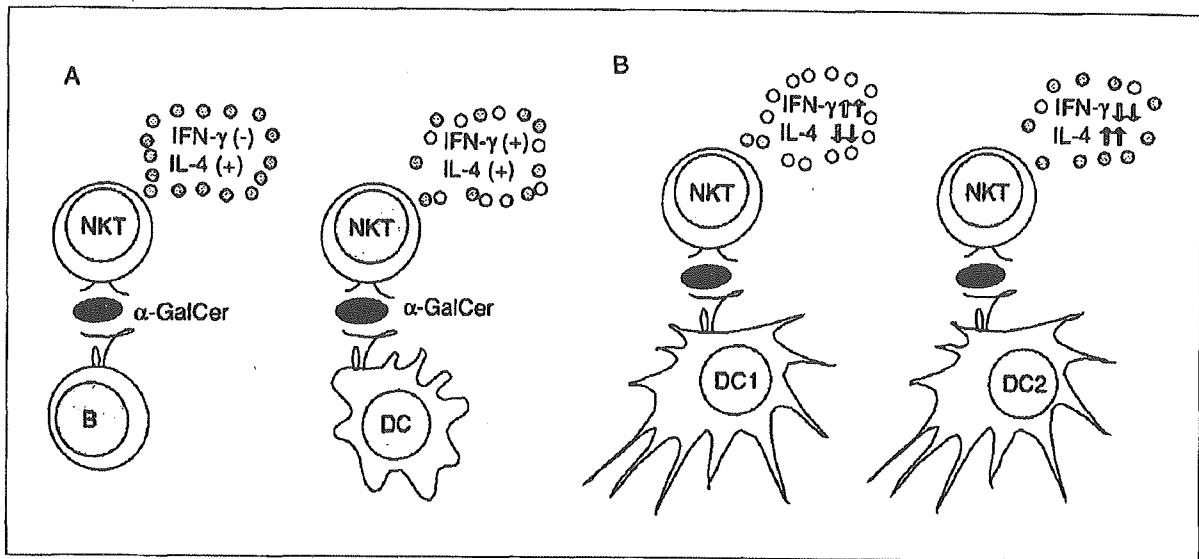


図3 抗原提示環境とiNKT細胞の応答性

- A : 抗原提示細胞とiNKT細胞応答. DCによって提示された $\alpha$ -GalCerを認識したマウスiNKT細胞はIFN- $\gamma$ とIL-4の両方を産生する. これに対してB細胞によって提示された $\alpha$ -GalCerを認識したiNKT細胞はIFN- $\gamma$ を産生せず低レベルのIL-4を産生する.
- B : DCサブセットとiNKT細胞応答. Th1誘導性のDC(DC1)によって提示された $\alpha$ -GalCerを認識したヒトiNKT細胞はTh1サイトカインを優位に産生するが, Th2誘導性のDC(DC2)によって提示された $\alpha$ -GalCerを認識したヒトiNKT細胞はTh2サイトカインを優位に産生する. このiNKTの応答性は可逆的である.

性を示すサブセットが存在するという報告がある<sup>10)</sup>.

ヒトiNKT細胞は, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, およびCD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (double negative ; DN) の3つのサブセットから構成されており, サイトカイン産生性やケモカイン受容体の発現などがそれぞれ異なっている<sup>11)</sup>. CD4 iNKTはTh2サイトカイン(IL-4, IL-13)の高産生性を示し, IL-2受容体 $\alpha$ 鎖(CD25)を発現する. DN iNKTは, Th1サイトカイン(IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ )を主に産生する. 2B4, CD94, NKG2A, CD161などのNK受容体, およびCCR5, CCR6, CXCR6などのケモカイン受容体は, DNサブセットに特異的に発現する<sup>12)13)</sup>. したがってCD4/DNバランスがTh1/Th2サイトカインバランスに直接的に影響を与える可能性がある. 近年, 全身性強皮症, 1型糖尿病, 全身性エリテマトーデス, 関節リウマチなどの自己免疫疾患の患者群において, DN iNKTサブセットの減少, あるいは機能不全が報告され, これらの疾患の病因, 病態に深く関与していることが示唆されているが, これらの現象が上記の疾患にどのように関与しているかについては明らかとされていない<sup>14)~16)</sup>.

### 抗原提示細胞環境の違いによるiNKT細胞のTh応答性

$\alpha$ -GalCerを提示する抗原提示細胞(APCs)がDCかBリンパ球(B細胞)であるかでマウスiNKT細胞の産生するサイトカインバランスが変化するという報告がある. B細胞上のCD1d分子により提示された $\alpha$ -GalCerを認識したiNKT細胞は低レベルではあるがIL-4だけを産生し(図3A), DCの機能不全が認められるNODマウスのTh1優位な免疫応答性をTh2傾向にすることで自己免疫性膵臓病を抑制する<sup>17)</sup>.

一方, アジュバントの作用により成熟分化したDCを用いてヒトiNKT細胞のサイトカイン産生性を変化させることができる(図3B). Th1誘導性のDC(DC1)とIL-15を組み合わせることにより, Th1サイトカイン(IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF)産生能が高く,  $\alpha$ -GalCer依存性に細胞傷害活性を示す1型(Th1型)iNKT細胞を誘導することができる. さらに, DC2によって誘導された2型(Th2型)iNKT細胞をDC1+IL-15を用いて刺激することにより, 1型の性質を示すiNKT細胞に変化させることができる. つまり, iNKT細胞はTh1/Th2 po-

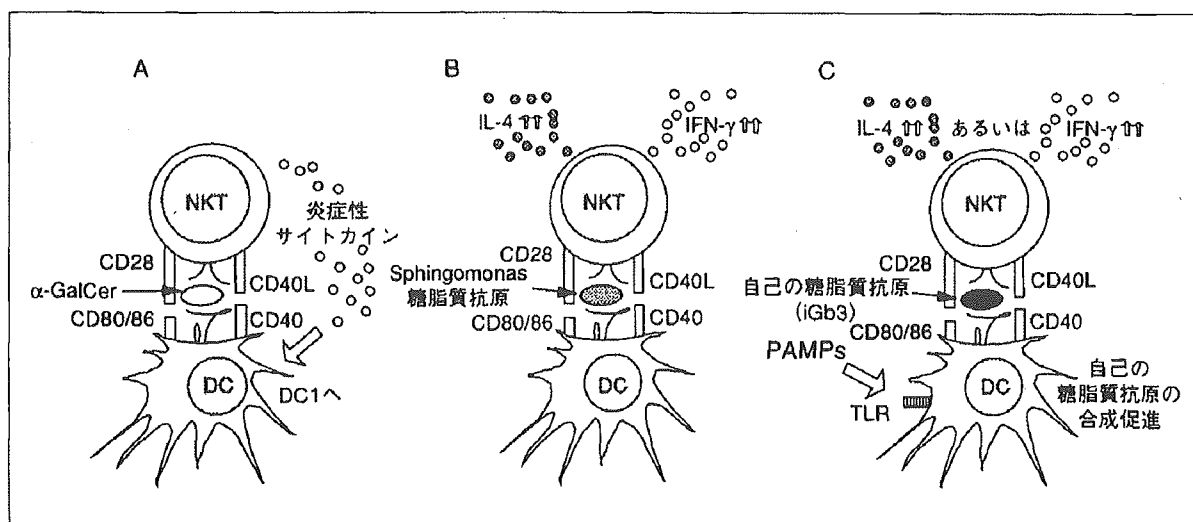


図4 iNKTのアジュバント活性と微生物感染感知機構

- A: iNKT細胞のアジュバント活性.  $\alpha$ -GalCerによって活性化されたiNKT細胞が産生する炎症性サイトカインとCD40Lの作用によりDCの成熟が誘導される.
- B: 微生物由来の糖脂質抗原を直接感知するシステム. *Sphingomonas*由来の糖脂質抗原をCD1d拘束性に直接認識してiNKT細胞が活性化される.
- C: DCの活性化を介した微生物感染感知機構. 微生物の特有の分子構造(PAMPs)をTLRを介して認識したDCは, 自己糖脂質抗原の合成を促進し, これをCD1d分子により提示する. さらにこれを認識したiNKT細胞は活性化される. PAMPsの構造の違いにより, DCの異なる機能的修飾が誘導され, 間接的にiNKT細胞の産生するThサイトカインバランスが変化するかもしれない.

larizationの可塑性を有しており, DC1/2-iNKT細胞の相互作用により免疫応答を変化させることができる<sup>18)</sup>.

### iNKT細胞が有するアジュバント活性と微生物感染感知機構

DCを炎症性サイトカインで刺激するだけで成熟が誘導されることは以前より知られていたが, この成熟は獲得免疫応答を誘導するには不十分であることが最近報告されている. しかし, iNKT細胞は, その活性化を通してDCの完全な成熟を誘導し, 獲得免疫応答を促進するアジュバントとしての活性を有している.  $\alpha$ -GalCerによって活性化されたiNKT細胞のCD40L(CD154)分子がDC上のCD40分子をligationすることでDCの成熟を誘導してTh1応答を促進する(図4A)<sup>19)</sup>. 最近, ヒトおよびマウスのiNKT細胞が, LPS陰性・グラム陰性の細菌である*Sphingomonas*の細胞壁に存在する糖脂質抗原をCD1d拘束性に認識することが明らかとなった(図4B)<sup>20)21)</sup>. *Sphingomonas*にはLPSが存在しないため, DCはTLR4を介してこれを感知することができないが, iNKT細胞が

*Sphingomonas*由来の糖脂質抗原を認識して産生するサイトカインとCD40Lの作用によってDCの成熟が誘導される. 一方, LPS刺激により成熟分化したDCは自己の糖脂質抗原iGb3の合成を促進して, これをCD1d分子により提示し, さらにiNKT細胞がこれを認識した際にはIFN- $\gamma$ を優位に産生するという間接的なシステムによって感染を感知している(図4C)<sup>22)</sup>.

### おわりに

これまで $\alpha$ -GalCerや変異 $\alpha$ -GalCerにより活性化されたiNKT細胞が直接産生するThサイトカインバランスと, これらが疾患に及ぼす影響について主に解析されてきた. iNKT細胞は免疫賦活, あるいは免疫抑制作用という相反する機能を示すことが報告されているが, 抗原として広く解析に用いられてきた $\alpha$ -GalCerがiNKTに対して強力なTCRアゴニスト(スーパーアゴニスト)活性を示し, IFN- $\gamma$ とIL-4を同時に産生させてしまうため, その生理的機能を反映した解析を困難にしてきたように思われる. 最近, 異なるTLRシグナルの活性化を通して機能的修飾を受けたDCが,

自己の糖脂質抗原の合成を促進し、これを提示することによりCD1拘束性T細胞の異なるThサイトカイン産生性を誘導することが明らかとなっている<sup>23)</sup>。iNKT細胞は免疫制御の中心的役割を果たすDCと緊密な相互作用を有しながらTh応答性を制御しているように思われる。最近同定されたiNKT細胞の自己糖脂質抗原、および非自己糖脂質抗原が、iNKT細胞の有する生理的免疫制御機構を解明する重要な手掛かりとなるであろう。

### 文 献

- 1) Koch M, Stronge VS, Shepherd D, et al. The crystal structure of human CD1d with and without  $\alpha$ -galactosylceramide. *Nat Immunol* 2005 ; 6 : 819.
- 2) Zajonc DM, Cantu III C, Mattner J, et al. Structure and function of a potent agonist for the semi-invariant natural killer T cell receptor. *Nat Immunol* 2005 ; 6 : 810.
- 3) Godfrey DI, McCluskey J, Rossjohn J. CD1d antigen presentation : treats for NKT cells. *Nat Immunol* 2005 ; 6 : 754.
- 4) Uemura Y, Senju S, Maenaka K, et al. Systematic analysis of the combinatorial nature of epitopes recognized by TCR leads to identification of mimicry epitopes for glutamic acid decarboxylase 65-specific TCRs. *J Immunol* 2003 ; 170 : 947.
- 5) Liu TY, Kohsaka H, Uemura Y, et al. Positional effect of amino acid replacement on peptide antigens for the increased IFN- $\gamma$  production from CD4T cells. *Allergol Int* 2005 ; 54 : 117.
- 6) Schmiege J, Yang G, Franck RW, et al. Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand  $\alpha$ -galactosylceramide. *J Exp Med* 2003 ; 198 : 1631.
- 7) Oki S, Chiba A, Yamamura T, et al. The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. *J Clin Invest* 2004 ; 113 : 1631.
- 8) Zhou D, Cantu III C, Sagiv Y, et al. Editing of CD1d-bound lipid antigens by endosomal lipid transfer proteins. *Science* 2004 ; 303 : 523.
- 9) Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways : immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 2004 ; 114 : 1379.
- 10) Yang Y, Ueno A, Wang Z, et al. Control of NKT cell differentiation by tissue-specific microenvironment. *J Immunol* 2003 ; 171 : 5913.
- 11) Takahashi T, Chiba S, Nieda M, et al. Analysis of Human  $V\alpha 24^+ CD8^+$  NKT cells activated by  $\alpha$ -galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2002 ; 168 : 3140.
- 12) Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, et al. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 2002 ; 195 : 625.
- 13) Lee PT, Benlagha K, Teyton L, et al. Distinct functional lineages of human  $V\alpha 24$  natural killer T cells. *J Exp Med* 2002 ; 195 : 637.
- 14) Wilson SB, Kent SC, Patton KT, et al. Extreme Th1 bias of invariant  $V\alpha 24 J\alpha Q$  T cells in type 1 diabetes. *Nature* 1998 ; 391 : 177.
- 15) Sumida T, Maeda T, Taniguchi M, et al. TCR AV24 gene expression in double negative T cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1998 ; 7 : 565.
- 16) Kojo S, Adachi Y, Keino H, et al. Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18<sup>+</sup>, BV11<sup>+</sup> double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 2001 ; 44 : 1127.
- 17) Bezradica JS, Stanic AK, Matsuki N, et al. Distinct role of dendritic cells and B cells in  $V\alpha 14J\alpha 18$  natural T cell activation *in vivo*. *J Immunol* 2005 ; 174 : 4696.
- 18) van der Vliet HJJ, Molling JW, Nishi N, et al. Polarization of  $V\alpha 24^+ V\beta 11^+$  natural killer T cells of healthy volunteers and cancer patients using  $\alpha$ -galactosylceramide-loaded and environmentally instructed dendritic cells. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 4101.
- 19) Fujii S, Liu K, Smith C, et al. The linkage of innate to adoptive immunity via maturing dendritic cells *in vivo* requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J Exp Med* 2004 ; 199 : 1607.
- 20) Mattner J, DeBord KL, Ismail N, et al. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT

cells during microbial infections. *Nature* 2005 ; 434 : 525.

21) Kinjo Y, Wu D, Kim G, et al. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells.

*Nature* 2005 ; 434 : 520.

22) Brigl M, Bry L, Kent SC, et al. Mechanism of CD1d-

restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* 2003 ; 4 : 1230.

23) De Libero G, Moran AP, Gober HJ, et al. Bacterial infections promote T cell recognition of self-gly-

colipids. *Immunity* 2005 ; 22 : 763.

\* \* \*

# ハンセン病

国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部

石井 則久

## I. 社会・医療の中のハンセン病

### 1 ハンセン病と皮膚科医

ハンセン病 (Hansen's disease, Leprosy) はらい菌 (*Mycobacterium leprae*) による抗酸菌感染症である。この病気は古くから知られており、家族内に患者が多い、顔面や手足に変形が起こることなどから、世界中で忌み嫌われ、宗教の救いも及ばなかった。らい菌がノルウェーのハンセン博士によって発見され (1873年)、感染症と認識され、医学が進歩しても、「らい (癩)」を病む人々は医学・医療の恩恵を十分には受けることができなかった。

日本皮膚科学会の生みの親である土肥慶蔵教授をはじめ多くの皮膚科医がハンセン病の病態解明、らい菌の培養、治療、疫学など多彩な分野で精力的な研究を行ってきた。しかし、臨床面では、1948年頃までは有効な治療薬が無かったため、皮膚科では患者を「らい」と診断すると、らい (ハンセン病) 療養所に送致することが多かった。ハンセン病療養所が整備されるにつれて、診療・研究の中心は療養所の医師や多摩研究所の研究員等になっていき、皮膚科医の関心は低下していった。また、日本癩 (現・ハンセン病) 学会が創設された1927

表1 ハンセン病関連年表

1873 (M 6)	ハンセンがらい菌を発見
1889 (M22)	テストウイード神父、日本初のハンセン病療養所開設
1907 (M40)	「癩豫防二関スル件」(法律第11号) 制定
1909 (M42)	全国5ヶ所に公立療養所開設
1917 (T 6)	患者懲戒・検束二関スル施行細則
1931 (S 6)	「癩予防法」制定
1947 (S 22)	日本でプロミン治療開始
1953 (S 28)	「らい予防法」制定
1996 (H 8)	「らい予防法廃止に関する法律」制定
2001 (H 13)	「らい予防法」違憲国家賠償請求事件 (熊本地裁) で原告勝訴
2001 (H 13)	内閣総理大臣談話発表、控訴せず

年頃からは、ハンセン病が皮膚科疾患の枠から多少ずれた位置におかれ、一部の皮膚科医が日本らい学会に参加していた。癩予防法の成立（1931年）によって、さらに皮膚科医からは遠い存在としてのハンセン病になったと考えられる。らい予防法の廃止（1996年）に伴い、ハンセン病は一般保険診療のもと感染症法に規定されない「普通の感染症」になり、新規ハンセン病患者は主に皮膚科医が診療することになった（表1）。

法律及び療養所の存在、また世間から忌み嫌われた病気故に、医学・科学の進歩を医療に還元せずに、皮膚科医は自らが診るべき患者を無視し、病者の苦しみに耳を傾けなかったのでは無いか、という自省の思いは私一人であろうか。

「らい」は皮膚に変形がおこる皮膚感染症なのに、なぜ偏見・差別が起こり、人権が無くなるのか？社会、個人、政府、法律、宗教、倫理、時代など多くの要因についての考察が必要である。なぜ「らい」、「癩」、「ライ」、「かったい」ではなく「ハンセン病」と呼ぶ必要があるのか？これらの問いが単に総論としての問いでなく、医療の中のハンセン病として各皮膚科医に向けられていることを認識して頂きたい。

## 2 日本のハンセン病史

日本では皇室・宗教などに絡んだ歴史と、法律による政策、さらに偏見・差別、療養所など多くの要素・視点をもって眺めることが必要である。また、不治の病、天刑病、業病、遺伝病と呼ばれたハンセン病は病者、そして病者の家族を苦しめた。

1947年、静注のDDS製剤であるプロミンによって初めてハンセン病患者の症状改善に革命がもたらされたが、「らい予防法」は1953年に施行された。ハンセン病を日本らい（ハンセン病）学会に委ねた日本皮膚科学会は診断までの作業が皮膚科医の守備範囲であった。「らい予防法の廃止に関する法律」（1996年施行）でハンセン病に関する差別・人権無視の法律は廃止され、その後の1999年施行の「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）」の前文には「我が国においては、過去にハンセン病、後天性免疫不全症候群等の感染症の患者等に対するいわれのない差別や偏見が存在したという事実を重く受け止め、これを教訓として今後に生かすことが必要である。」と明記された。

2001年の熊本地方裁判所ハンセン病国家賠償請求訴訟判決、その後の政府声明、内閣総理大臣談話などでハンセン病に対する国民の認識が高まった。しかし、ハンセン病、ハンセン病患者の過去及び現況については皮膚科医でさえ殆ど知らない。

## 3 ハンセン病療養所

現在、13国立療養所、2私立療養所に約3,500人（平均年齢77歳）が療養している（入所者）。ハンセン病は治癒しているが、後遺症や故郷が無い、さらに長期間に亘って生活の場が療養所であったため、終生療養所での生活を余儀無くされている。入所者にとっては高齢者対策、後遺症対策、日常生活・医療などへの対応も必要である。さらに、療養所退所者の対策も忘れてはならない。

## Ⅱ. ハンセン病の基礎及び研究

### 1 らい菌

らい菌は、現在も培養不可能な抗酸菌であり、ヌードマウス足蹠で増殖したらい菌が種々の実験に供給されている。世代時間（1回の分裂に要する時間）は約12日と遅く、菌の至適温度は30℃前後であり、皮膚はらい菌にとって増殖の場になる。らい菌のゲノムDNAの全配列が決定され、ゲノムDNAの27%を偽遺伝子（pseudogene）が占めており、機能を持つ遺伝子は49.5%であり、遺伝子密度の低さが顕著である。毒力はなく、感染しても直ちには発症には結びつかない。また、シュワン細胞のbasal laminaにあるラミニン2（laminin-2）とらい菌の最外層にあるフェノール糖脂質（PGL-I）の両者が結合することによってシュワン細胞の障害が進み末梢神経障害が惹起されることが解明されてきた。

### 2 ハンセン病の免疫と研究の動向

らい菌に感染しても殆どの方は発症しない。発症してもらい菌に対する各人の特異的免疫能（特に細胞性免疫）の差によってらい菌を排除する過程が異なり、病型に差がでてくる。病変部皮膚の免疫状態は免疫能が高い場合（TT型等）では、IL-2, IFN $\gamma$ , IL-12, TLR2, TLR1等が強く発現されており、一方LL型等ではIL-4, IL-5, IL-10等が強く発現されている。また最近、ハンセン病の感受性が第6染色体にあるPARK2とPACRGの2つの遺伝子に関与することが判明し、らい菌特異的免疫不全状態の解明、さらにハンセン病の発症の危険性を検討できる可能性が出てきた。

しかし、早期診断用検査法、ワクチン開発、新規薬剤開発、耐性菌検索、らい菌培養、モデル動物、後遺症の予防、末梢神経とらい菌との関係など問題は山積している。また患者、療養者についての臨床研究も必要である。

## Ⅲ. ハンセン病の疫学

### 1 新規のハンセン病患者

感染源は、らい菌が多く証明される未治療患者で、飛沫感染といわれている。発症に深い関わりのある感染時期は免疫系が十分に機能していない乳幼児期が最も多い。

らい菌に感染（菌が生体内に入る）しても発病（ハンセン病になる）することは極めて希である。また感染から発病まで長期間（数年～10数年～数10年）を要し、さらに生体の免疫能、菌の量、環境要因など種々の要因が関与する。そのため日本人新規患者は60歳以上がほ



表2 ハンセン病新規患者数 (2004/9/15)

日本人				外国人				外国人割合		
計	女	男	年	男	女	計	%			
8	1	7	1993	9	1	10	55.6			
9	7	2	1994	4	2	6	40			
8	3	5	1995	9	1	10	55.6			
93-'97	6	2	4	1996	14	4	18	75	93-'97	外人%
37 (7.4/y)	6	3	3	1997	6	2	8	57.1	52 (10.4/y)	58.4%
5	2	3	1998	2	3	5	50			
8	2	6	1999	7	4	11	57.9			
6	4	2	2000	5	3	8	57.1			
98-2002	5	2	3	2001	5	3	8	61.5	98-2002	
31 (6.2/y)	7	3	4	2002	6	3	9	56.3	41 (8.2/y)	56.9%
68 (6.8/y)	1	0	1	2003	6	1	7	87.5	93 (9.3/y)	57.8%
10年間	1	1	0	2004	6	1	7		10年間	

とんどである。病変は主に皮膚と末梢神経に生じ、内臓が侵されることは希である。

以前は「癩」,「らい」などと呼称されていたが、現在は「ハンセン病」が正式病名である。

毎年、日本人は約4名、在日外国人は約8名である(表2)。日本人では沖縄県出身者が多くを占めているものの、新規患者の減少が著しく、かつ高齢化している。一方、外国人患者についてはブラジル人など患者の多い国からの発病が目立ち、若者が多い。これは、若い  
在日外国人労働者が多いためである。約1/3の外国人患者は診断確定後、治療を受けずに帰国する。

## 2 新規患者に対する外来診療の現状

「らい予防法」廃止によってハンセン病が保険診療できるようになり、新規患者の殆どは大学病院や一般病院、クリニックなどの皮膚科を受診して保険診療が行われている。課題としては、①医師がハンセン病に対する知識がないために、初診から診断までに長期間を必要とする。②日本人患者の場合は、本人及び家族などに時として病気に対するいわゆる「偏見」があり、病名の告知やカルテへの病名記載等に十分な配慮が必要である。③在日外国人患者の場合は、言葉の問題(意志の疎通が不十分)、診療代金(高価で払えない)、雇用主との関係(解雇や帰国の可能性)などがある。現在は、各医療機関で患者の診療を継続し、検査や治療等の不明点などについてサポートすることで、一般医療へのハンセン病の定着に努力している。

## 3 ハンセン病回復者に対する外来診療の現状

ハンセン病療養所入所者のハンセン病及びその後遺症についての診療は療養所を中心に行わ

表3 世界のハンセン病患者数 (WHO)

国	登録患者数 Jan01,2004	有病率 (/10,000)	新患者数 (2003年)	新患発見率 (/100,000)
インド	265,781	2.6	367,143	35.7
ブラジル	79,908	4.6	49,206	28.6
中央アフリカ	952	2.6	542	14.7
コンゴ民主共和国	6,891	1.3	7,165	13.5
アングラ	3,776	2.8	2,933	22.1
モザンビーク	6,810	3.4	5,907	29.4
マダガスカル	5,514	3.4	5,104	31.1
ネパール	7,549	3.1	8,046	32.9
タンザニア	5,420	1.6	5,279	15.4
世界合計	457,792		513,798	

れている。

療養所退所者、当初から外来通院している元患者などのハンセン病回復者は、過去の「ハンセン病」歴が、他人に知られることを避ける場合がある。その理由として、①一般市民のハンセン病に対する偏見・差別、②医師・医療関係者のハンセン病あるいは後遺症、社会的背景等についての知識・経験の不十分さ、③回復者の過去の経験等から「ハンセン病」既往歴を秘匿すること、などが挙げられる。しかし回復者は高齢に近づき、再発や後遺症、さらに一般の病気に対して大きな不安を抱いている。回復者は病気の場合、以前治療の場であった療養所、ハンセン病専門診療所、特定の大学病院などに遠路であっても通院することもある。しかし、すでにハンセン病は「普通」の病気であり、一般社会で傷害を持ちながら普通の生活ができるノーマライゼーション (normalization) を目指し、診療は一般医療へ統合 (integration) し、安心して診療できる体制作りに取り組むべき時である。

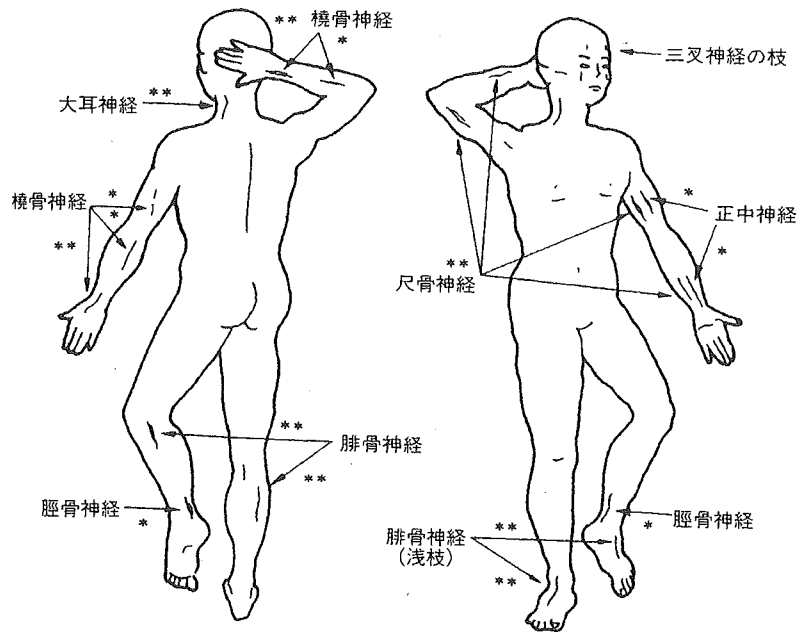
#### 4 世界のハンセン病患者

インドを中心とした南アジア・東南アジア、ブラジルを中心とした南アメリカ、アフリカが依然、ハンセン病患者の多い国・地域である (表3)。これらの国々はWHOの指導と、GOやNGOの協力・援助を受けながらハンセン病対策を推進している。日本人医師や医療関係者等がミャンマーやアフガニスタンなどでハンセン病制圧のため活動している。

## IV. ハンセン病の臨床

### 1 どんな症状が表れるのか

ハンセン病の初期の皮疹は痒みのない紅斑、丘疹、環状斑など様々であり、ハンセン病に



しばしば神経肥厚を触れる部位

\*注意しないと触れにくい

\*\*触れやすい

図1 ハンセン病で肥厚をきたしやすい末梢神経

特異な（こんな皮疹がでたら診断できる）皮疹はない。皮疹の見方として、①色調（赤い、褐色、白色等）、②大きさ（〇〇mm等）、③形状（斑、丘疹、結節、潰瘍、環状、局面、浸潤等）、④平坦か隆起しているか、⑤皮疹の個数、⑥皮疹の分布（左右対称、散在等）、⑦皮疹の境界（明瞭、不明瞭）、⑧衛星病巣の有無、⑨皮疹にほぼ一致した知覚（触覚、痛覚、温度覚）鈍麻や麻痺、⑩表面は乾燥しているか否か、⑪皮疹部に脱毛はあるか否か、等。また末梢神経の肥厚や運動障害も認められる（図1）。外国人の場合には、皮膚色、表現の違い、会話能力の問題などから症状が分かりにくいこともある。知覚異常を伴う皮疹、治りにくい皮疹、末梢神経障害などの主訴で皮膚科や、神経内科に受診し、主治医が日常見かけない皮疹、はっきりしない症状などで、疑診、診断名不明のもとに病院・大学の皮膚科へ紹介する事が多い。

また汗腺や毛包も侵されるので、発汗の減少、無毛などもみられる。

## 2 診療内容

大多数の医師（皮膚科医を含め）は患者減で一度も診療した経験がない。初発症状は皮疹が主である。患者は先ず皮膚科へ受診する。皮膚科では自覚症のない皮疹、知覚異常、神経肥厚などからハンセン病を鑑別にいれ、らい菌の検出（皮膚スメア検査、病理組織での染色、PCRなど）、皮膚病理組織検査などを行う（図2、表4）。当日（皮膚スメア検査）、遅くとも2週間以内（皮膚病理組織検査、PCR検査）に診断可能である。診断に迷う時はハンセン

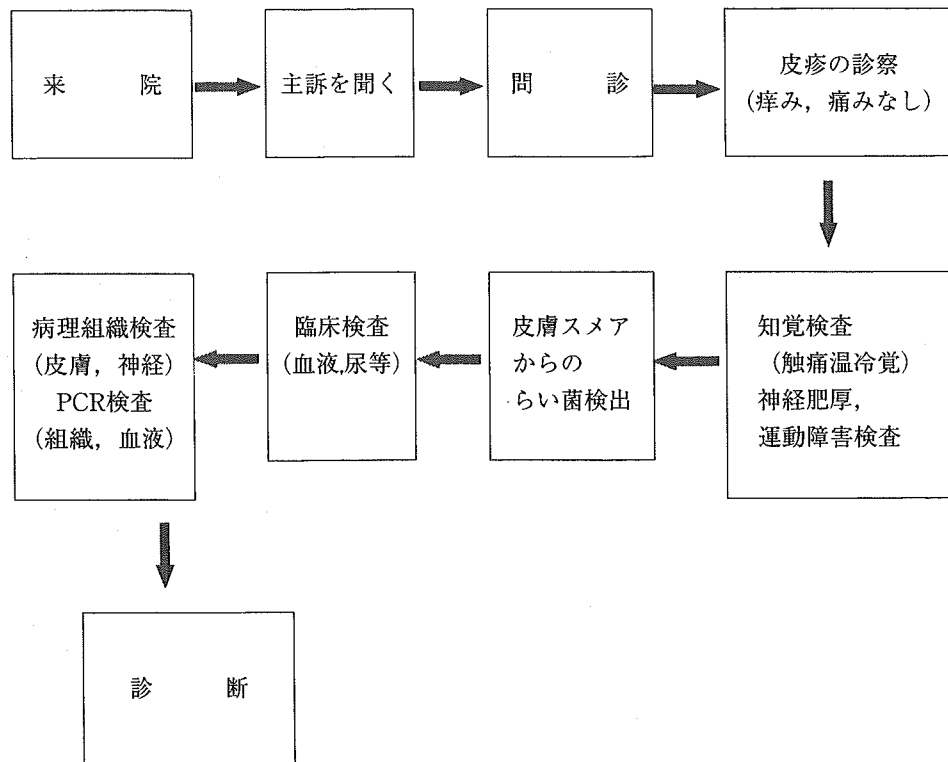


図2 ハンセン病診断への手順

表4 ハンセン病の検査

1. らい菌の検出
a) 皮膚スミア検査: 病変皮膚の組織液をメスでかき出し, 塗抹標本(抗酸菌染色)を作成して検鏡する.
b) 病理組織標本: 病変部皮膚を生検し, 抗酸菌染色して検鏡.
c) PCR法: 血液, 組織(凍結生標本, ホルマリン固定標本, パラフィン切片等)などからDNAを抽出して, らい菌特異的であるか否かを検索する.
2. 神経学的検査
a) 知覚検査: 触覚・痛覚・温度覚の検査
b) 神経肥厚の検査: 表在性の神経を触知して硬さ, 太さを検査する.
c) 運動障害の検査: 四肢を中心に運動障害の有無を検査する.
3. 病理組織検査
皮膚, 神経を生検し, HE染色の他, 抗酸菌染色, S100染色などをして検鏡

病ネットワークという組織があり, 問い合わせが可能である.

### 3 ハンセン病に必要な検査

ハンセン病の検査は検体数が少ないため, 一般検査機関では実施していない. ハンセン病研究センターでは, 病理組織検査(作成, 染色, 診断), PCR検査(組織, 血液等), 血清PGL-I抗体検査, 薬剤耐性遺伝子変異検査など無料で実施している.