

ニューキノロン系薬は、ハンセン病の治療薬として重要な抗菌薬である。

2) これまでニューキノロン系薬の中で最も血中半減期が 16.3 時間 (200 mg 空腹時単回経口投与) と長く最も強い *in vivo* 抗らい菌活性を示す SPFX は光線過敏症に課題がある。光線過敏症を軽減するため開発された 8-methoxy-quinolone である GFLX は、血中半減期が 7.1 時間 (200 mg 空腹時単回経口投与用) で、糖尿病患者の高血糖・低血糖の発現に課題がある。

3) MFLX に Buddeneyer 法とヌードマウス足蹠法で、既存ニューキノロン系薬の中で最も強い SPFX と同等またはそれ以上の強い抗らい菌活性を認めた。MFLX は優れた組織移行性、高い血中濃度と長い血中半減期を併せ持つ新規 8-methoxyquinolone で、血中半減期が 13.9 時間 (400 mg 空腹時単回経口投与) と長いことから、400mg 1 日 1 回投与が可能である。また MFLX は、強い抗らい菌活性を示し、光線過敏症や中枢神経系の副作用を軽減、非ステロイド性抗炎症薬やテオフィリンとの相互作用が低く、耐性発現を抑制するなど優れた薬理学的特長を持つ新規ニューキノロン系薬としてハンセン病の治療に貢献すると考える。

4) キノロン骨格の抗菌活性に必須とされていた 6 位にフッ素基が無く、既存ニューキノロンと異なった構造式を持つ GRNX は、Buddemeyer 法とヌードマウス足蹠法で LVFX と同等の抗らい菌活性を示した。GRNX は、血中半減期が 12.6 時間 (400 mg 空腹時単回経口投与) と長く、400mg 1 日 1 回投与が可能である。GRNX が MFLX と SPFX に比べ、抗らい菌活性が弱かった原因として、蛋白結合率が約 87% と他のニューキノロンより高いこと、皮膚までの組織移行性が劣ることなどが考えられる。しか

し GRNX は、光線過敏症や中枢神経系の副作用を軽減、非ステロイド性抗炎症薬やテオフィリンとの相互作用などの副作用が極めて低く、特に関節毒性は現在本邦で唯一小児適用が認められている norfloxacin (NFLX) より弱いことから、GRNX は小児から高齢者までのハンセン病患者に使用できる新規ニューキノロン系薬としてハンセン病の治療に貢献すると考える。

5) OFLX 耐性らい菌 (Zensho-4 株 : OFLX 150 mg/kg で不完全抑制) に対し WQ-3402, STFX, MFLX に強い *in vitro* 抗らい菌活性を認めた。OFLX の *in vitro*, *in vivo* 抗らい菌活性は弱く、低度キノロン耐性と考えられ、抗らい菌活性の強い WQ-3402, STFX, MFLX の臨床使用が示唆された。ヌードマウス足蹠法で、OFLX 耐性らい菌 (Zensho-4) に対する MFLX は、40mg/kg で完全抑制し、部分交差耐性であることを認めた。

6) 第 1 版を 2000 年に作成後、並里らが中心となって「ハンセン病治癒判定基準」を、儀同らが中心となって「ニューキノロン使用指針」を作成した。これらの作業や国際協力の経験などに基づき、追加・改訂作業を行った。今回の改訂では、薬剤耐性検査、ニューキノロン薬の使用法、治癒判定基準、外科的治療、眼科的ケア、外国人患者の対応、サリドマイド入手法、皮膚科医用簡易マニュアルを新たに加えた。本治療指針は現時点におけるわが国のハンセン病の基本的、標準的治療の目安を示すものである。

#### E. 結論

1) GRNX は、Buddemeyer 法とヌードマウス足蹠で LVFX と同程度の抗らい菌活性を示した。小児から老人まで使用できる唯一のニューキノロンとして、臨床導入が期待

される。

2) OFLX 耐性らい菌(Zensho-4 株)に対し WQ-3402, STFX, MFLX は、強い抗らい菌活性を示したことから OFLX 耐性らい菌への治療が示唆された。

3) 少菌型(PB)は、WHO の多剤併用療法(MDT)通りに6ヵ月間の WHO/MDT/PB を採用し、多菌型(MB)は、(a)MB で治療前に菌指数 BI(+3)以上の場合、原則として WHO/MDT/MB を2年間継続する。(b) MB で治療前に BI(+3)未満あるいは発症後極めて早期(6ヵ月以内)で、BI(+3)以上の場合には、原則として WHO/MDT/MB を1年間行う。

## G. 研究発表

### 1.論文発表

1) 後藤正道、野上玲子、畑野研太郎、岡野美子、石井則久、儀同政一、石田 裕、尾崎元昭：ハンセン病治療指針(第二版)、日本ハンセン病学会雑誌、75:191-226, 2006.

2) 山崎利雄、儀同政一、松岡正典：生物発光法による抗らい菌活性測定法の開発：日本ハンセン病学会雑誌、75:227-237, 2006.

3) 儀同政一：Moxifloxacin と garenoxacin の抗らい菌活性：日本ハンセン病学会雑誌、76:11-17, 2007.

### 2.学会発表

1) 儀同政一：Moxifloxacin, garenoxacin の抗らい菌活性、第76回日本ハンセン病学会総会、高松市、2006年5月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得       なし
2. 実用新案登録   なし
3. その他         なし

Fig. 1. *In Vitro* Activities of New Quinolones against *M. leprae*

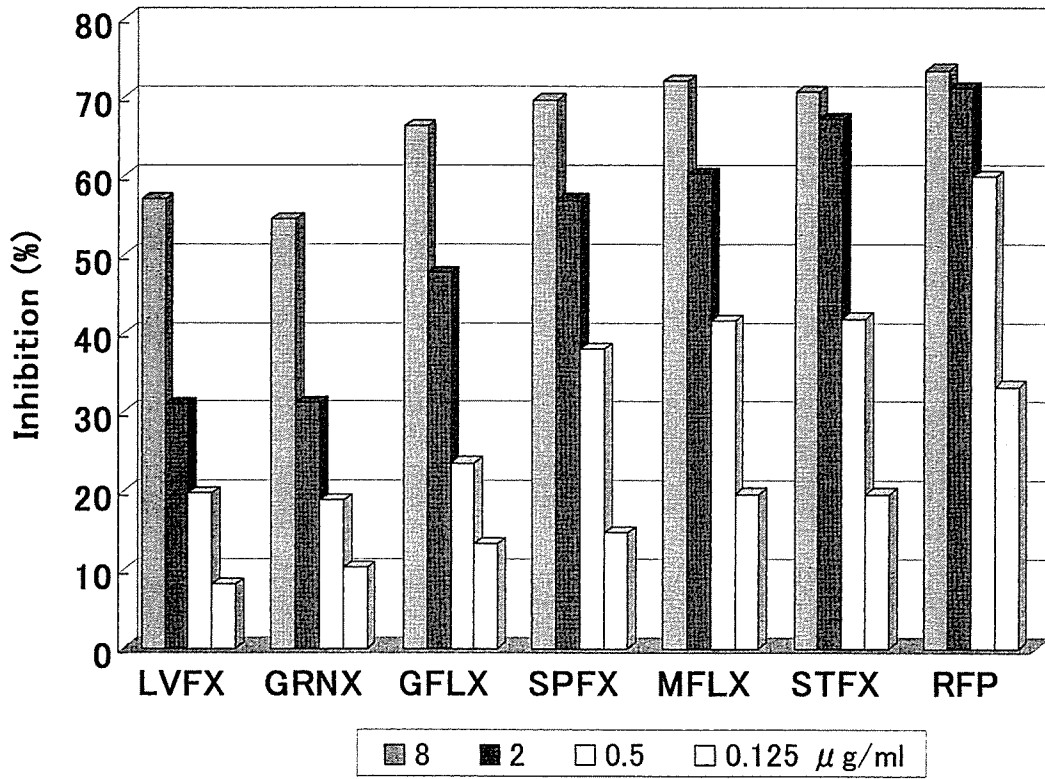


Fig. 2. Activities of GRNX against *M. leprae* in nude mice

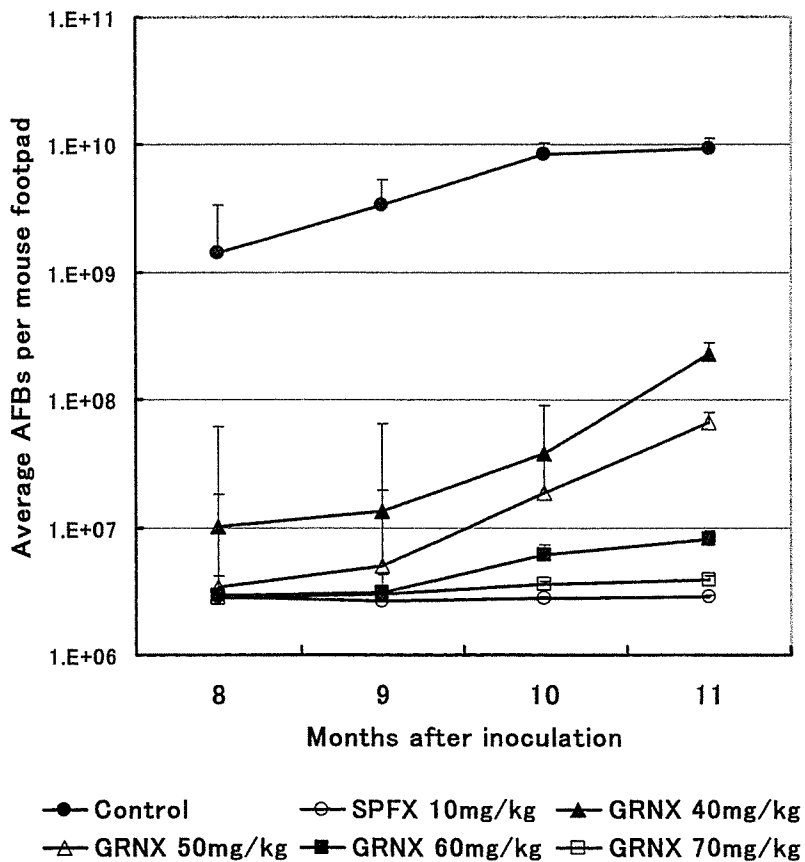


Fig. 3. *In vitro* activities of OFLX-resistant *M. leprae*

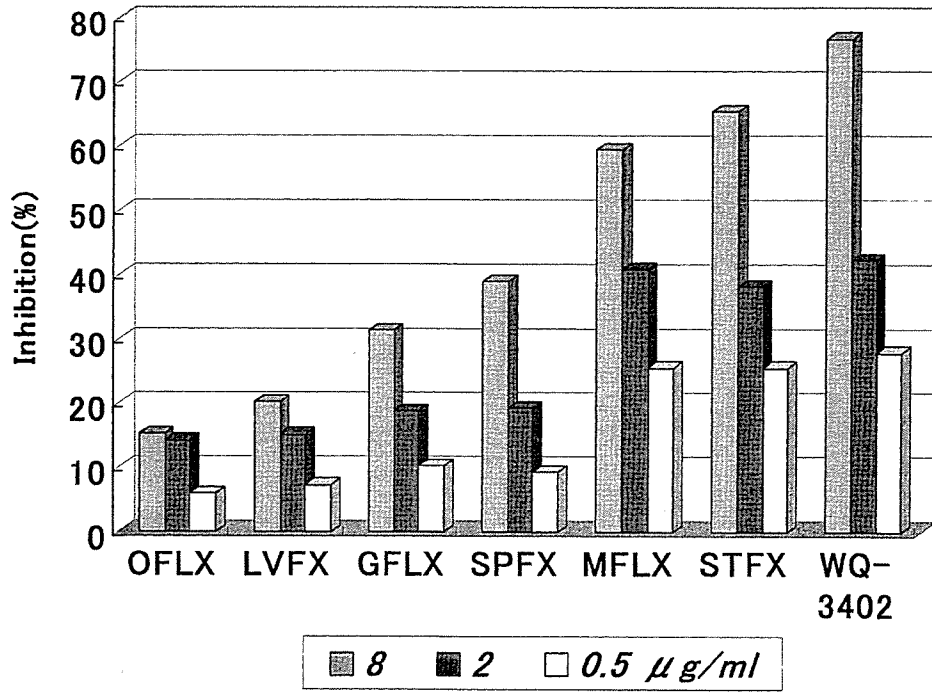


Fig. 4. Activity of MFLX against OFLX-Resistant *M. leprae* in Nude Mice

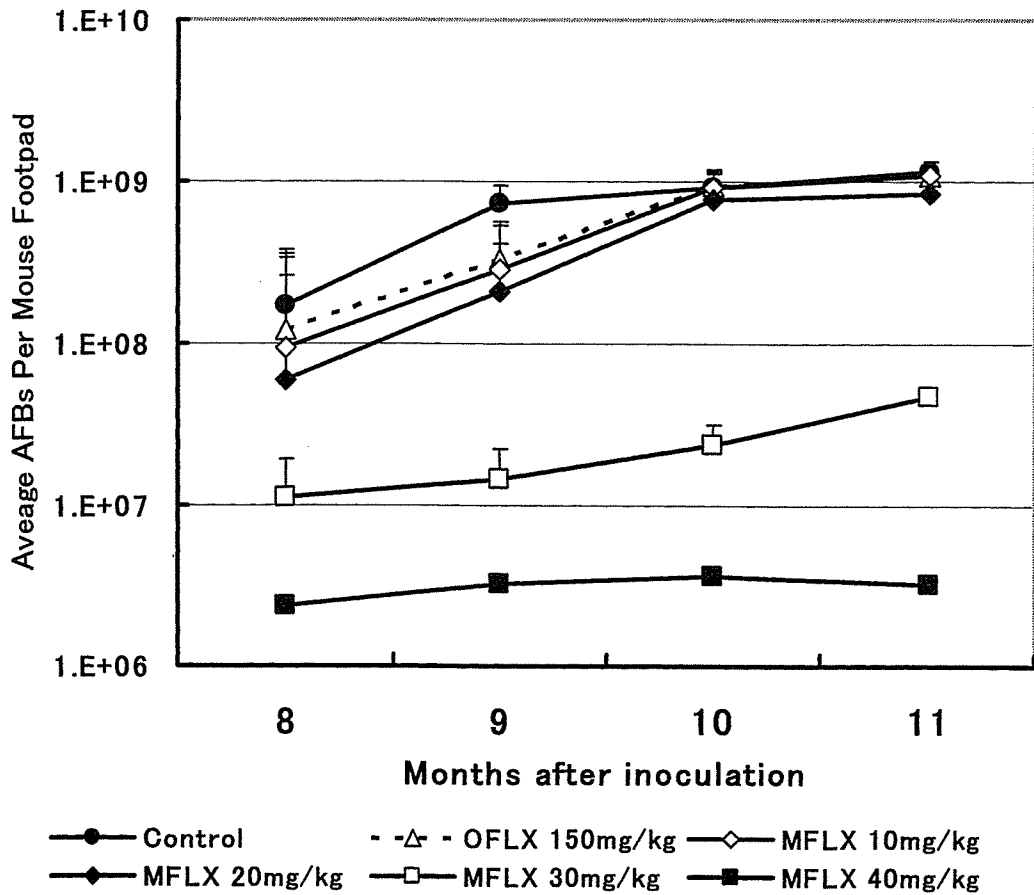
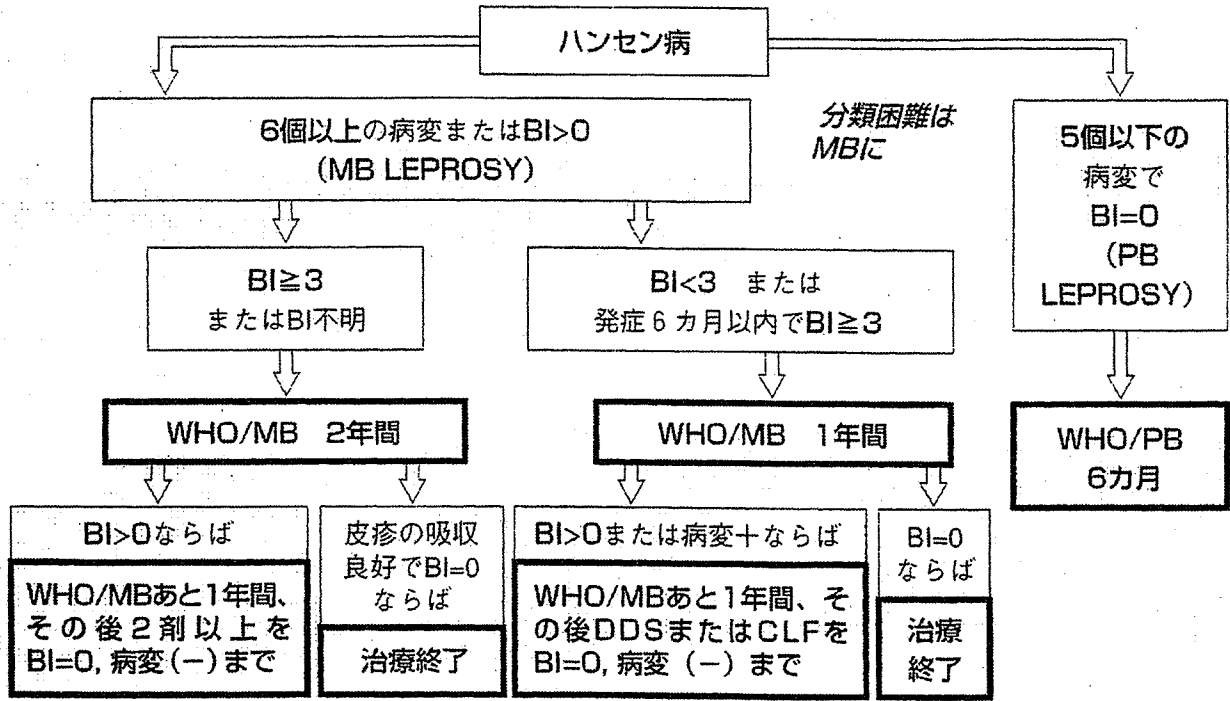


Fig.5. 日本におけるハンセン病の標準的薬学療法 (2006)



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

宿主内におけるらい菌の殺傷および  
菌増殖機構に関する研究

平成18年度 分担研究報告書

分担研究者 福富 康夫

（国立感染症研究所 ハンセン病研究センター）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

宿主内におけるらい菌の殺傷および菌増殖機構に関する研究

分担研究者 福富康夫 国立感染症研究所 ハンセン病研究センター 病原微生物部第二室長

研究要旨 らい菌が宿主内で増殖、または殺菌される機構を *in vitro* において解明することを目的とし、らい菌が寄生して増殖するマクロファージ内におけるらい菌の動態を探った。その結果、37 度で培養すると、マウスマクロファージ中のらい菌の代謝活性が 1 週間で著しく低下すること、35 度で培養すると同代謝活性が 2 週間以上持続することを見出し、さらに IFN $\gamma$  存在下で培養したヒト単球由来マクロファージに抗らい菌活性が誘導されることが判明した。

A. 研究目的

ハンセン病において、LL型ではらい菌が宿主細胞であるマクロファージ内で増殖するが、TT型では殺菌される。殺菌にはマクロファージの活性化が大きく関与しているが、その機構について詳細は不明である。よって、その機構を調べることにより、特徴的な病態形成の原因を解明し、新たな治療法を開発するための有益な情報を得る。

B. 研究方法

マウスマクロファージの培養:リタイアメス ICR マウス腹腔常在細胞を、アンピシリン 50 $\mu$ g/ml 含有 10%ウシ胎児血清(FBS)-RPMI1640 またはDMEM 培地に浮遊させ、 $1 \times 10^6$  個の細胞をカバースリップの入った 24 穴プレートウェル中にて2時間ないし一晩培養した。Hanks 液にてカバースリップを十分に洗い非付着細胞を除いた後、マクロファージの張り付いた同カバースリップを再び 24 穴プレート中にて培養した。なお、マウスの使用については国立感染症研究所動物実験委員会による審査を経、承認さ

れ、動物愛護への配慮を行った。

ヒトマクロファージの培養:健康人末梢血より 2 段階の比重勾配遠心法により単球を分離して AIM 培地に浮遊させ 48 穴プレート ( $2 \times 10^4$ /well)、もしくはカバースリップの入った 24 穴プレートウェル中 ( $2 \times 10^5$ /well) にまき、37 度で 1 時間培養した。HBSS にてウェル内を洗浄し、非付着細胞を除いて 20%FBS 添加 RPMI1640 培地にて 1 週間以上培養し単球からマクロファージに分化させてから、らい菌を感染させた。

マクロファージへのらい菌感染:ヌードマウスフットパッドに接種して増殖したらい菌を回収して精製し、 $3.3 \times 10^7$  個/ml に調整し 300  $\mu$ l ずつ (らい菌  $1 \times 10^7$  個/ウェル) マクロファージが張り付いたカバースリップの入ったウェルに添加した。そして、マウスマクロファージの場合は4時間、ヒトマクロファージの場合は20時間培養し、カバースリップを取り出しHBSS液にて洗浄、さらに培養を継続した。そして、0.1N NaOH溶液中にカバースリップを入れマクロファージを可溶化して菌を得て radiorespirometry にて菌の

代謝活性を測定した。

Radiorespirometry: BuddemeyerやFranzblauらの方法を改変して、らい菌の脂肪酸 $\beta$ 酸化反応を測定した。Wheaton社製の4mlガラスバイアルにらい菌を含んだ $1\mu\text{Ci/ml}$ の $1\text{-}^{14}\text{C}$ -パルミチン酸(NEC075H)含有抗酸菌培養用7H12培地を1ml加え、雑菌の増殖を防ぐためにアンピシリンとアンフォテリシンB(Sigma社製)を添加した。よく混合後、バイアルのキャップをゆるめて、NaOH処理シンチレータを添加した20ml容量プラスチックバイアル中にこのバイアルを挿入した。プラスチックバイアルのキャップを強く閉め、32度にセットしたふ卵器中にて静置培養した。そして7日目にシンチレーションカウンターにて放出されたアイソトープ量を測定した。

抗酸菌染色: カバースリップ上のらい菌感染マクロファージを塩基性フクシン液で20分間室温にて染色し、1%塩酸アルコールによる脱色、メチレンブルーによる対比染色後に光学顕微鏡下で観察した。

### C. 研究結果

我々は、脱カルボキシル化代謝反応( $\beta$ 酸化)を定量するradiorespirometryにてらい菌の代謝率を測定し、マクロファージ内らい菌の生存率評価を行っている。7H12培地中で直接らい菌を培養する際、29度、32度、35度、37度の4種類の温度設定で代謝活性を調べたところ、32度での培養において2週間までを $^{14}\text{CO}_2$ の放出限界として一番良好に温存できた。次に、ヌードマウスより得られた新鮮ならい菌を*in vitro*にてマウスマクロファージに貪食させ、感染マクロファージを35度と37度で培養し、7日目と14日目にらい菌を回収し代謝活性を調べたところ、37度における培養では7日

目にはすでに代謝活性が著しく減少していた(Fig.1)。一方、35度での培養では代謝活性は残っており、同様な実験を再度行なったところ、14日目でも35度では培養開始時と同程度の活性が維持されていた(Fig.2)。ヒト健常人末梢血より単球を分離し、M-CSFもしくはGM-CSFを添加し、一週間以上培養してマクロファージを得た(各々M-マクロファージ、GM-マクロファージ)。そして、一晩らい菌存在下で35度にて培養し貪食させ(マクロファージへの取り込みは抗酸菌染色にて確認)、これら感染マクロファージを35度で培養を継続した。M-マクロファージ、GM-マクロファージ中のらい菌は2週間以上にわたって代謝活性を維持していた。IFN $\gamma$ 存在下ではマクロファージの形態が著しく変化し、M-マクロファージの場合は2週間後のらい菌の代謝活性は有意に低下した。一方、GM-マクロファージの場合は、2週間ではIFN $\gamma$ 未添加群との間で有意な差は見られないが、3週間目以降は低下した。興味あることに対照群をみるとGM-マクロファージ中の菌の代謝はM-マクロファージ中の菌と比べてより長期保たれていた。

### D. 考察

らい菌は培養できないためマクロファージのらい菌に対する殺菌作用の解析は困難であったが、現在ではらい菌はヌードマウスフットパッドやアルマジロに接種して*in vitro*増殖したものが得られ、また、菌のATPやPGL量を測定や、放射性同位元素標識パルミチン酸の代謝量を測定(radiorespirometry)することで、らい菌の生存率をより正確に定量することができる。そして、radiorespirometryを用いてマウスマクロファージの抗らい菌活性が調べられ、細胞性免疫の主役を担っているIFN $\gamma$ がTNFと共同して



マクロファージを活性化し抗らい菌活性を発現することが証明されている。しかし、これまでヒトマクロファージの抗らい菌活性を *in vitro* にて証明した報告はなく、本研究で初めてIFN $\gamma$ 刺激したマクロファージ中のらい菌の代謝低下、すなわち抗らい菌活性を認めた。ハンセン病において少菌型であるTT型では病巣でTh1型サイトカインが主に発現しており、その中でIFN $\gamma$ がマクロファージを活性化して抗らい菌作用を発揮すると長い間いわれてきたが、それを証明した報告はなく、本研究で示された結果は非常に価値のあるものである。また、二種類のCSFで誘導されたマクロファージの抗らい菌活性について、M-CSFで誘導されたM型マクロファージの方が、GM-CSFで誘導されたGM型マクロファージより活性が高かったのは非常に興味のあるところである。マウスマクロファージではIFN $\gamma$ によって酸化窒素合成酵素が強く発現誘導され、この酵素により酸化窒素が産生され抗酸菌に対し殺菌的に作用することが知られている。一方、ヒトにおいては酸化窒素の産生と抗菌作用との関連は明確にはなっていない。以前よりマクロファージの産生するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>やスーパーオキシドが殺菌作用を有することが報告されている。本研究で得られたM型とGM型マクロファージの抗らい菌活性の差と殺菌作用に関わるこれら分子の発現レベルを調べるのが今後の課題である。

ハンセン病はらい菌によって引き起こされる慢性感染症である。マウスフットパッド接種による動物実験で、らい菌の至適発育温度は25～30度と言われている。*in vitro*でのradiorespirometryを用いた実験でも30～33度が適温であることが報告されている。培養マクロファージ内のらい菌の代謝活性を指標とした生存率も37度では早期に低下し、35度に下げ

ると著明に生存率が上昇した(Fig.3と4)。らい菌は皮膚近くの末梢神経中のシュワン細胞やマクロファージ内で増殖し、低体温部を好む。本研究の結果は、この *in vivo* の現象を裏付ける重要な情報も提供している。

## E. 結論

細胞性免疫を賦活する Th1 型サイトカインの IFN $\gamma$ により刺激を受けたヒト単球由来マクロファージには抗らい菌活性が誘導されることが判明した。また、らい菌は 35 度の培養温度条件下でマクロファージ内において長期間生存することが分かった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Masahiko Makino, Yumi Maeda, Yasuo Fukutomi, Tetsu Mukai: Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. *Microbes and Infection* (in press).

### 2. 学会発表

1) 福富康夫・前田百美・牧野正彦:クロファジミンによるマクロファージの細胞死と核の形態変化、第79回日本ハンセン病学会総会、高松、2006年5月

2) Yasuo Fukutomi, Yumi Maeda and Masahiko Makino: Clofazimine-induced cell death in macrophages. Forty second Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program, Kagoshima, July 2006.

3) 福富康夫・牧野正彦:らい菌感染ヒトマクロファージの *in vitro* 培養. 第36回日本免疫学会総会、大阪、2006年12月

4) 福富康夫・前田百美・牧野正彦:ハンセン病におけるマクロファージのサイトカイン産生

調節機構、第 80 回日本細菌学会総会、大阪、  
2007 年 3 月

5) 前田百美・田村敏生・福富康夫・牧野正  
彦:らい菌由来リポ蛋白の抗らい菌生体防御

反応に及ぼす影響、第 80 回日本細菌学会総  
会、大阪、2007 年 3 月

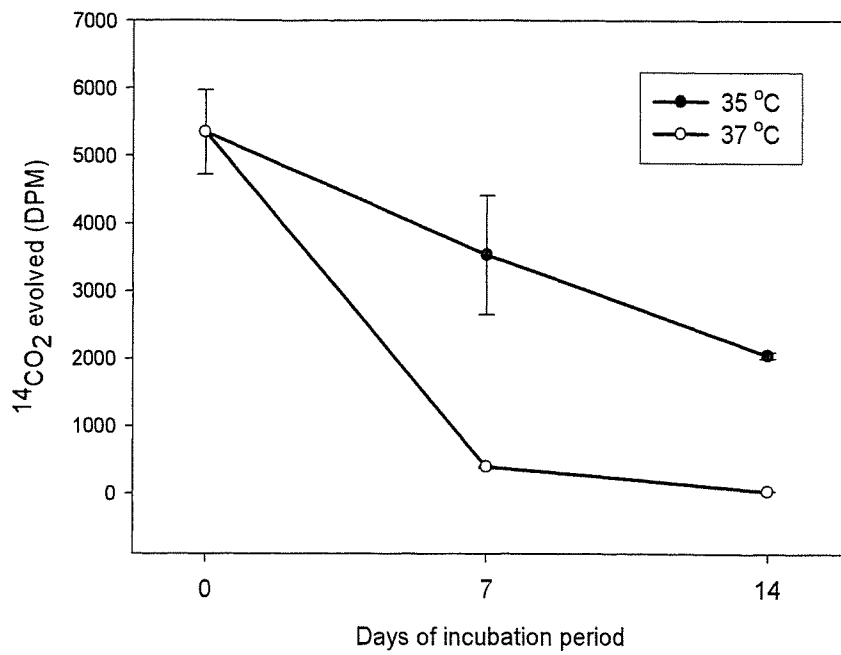


Fig. 1: Metabolic activity of *M. leprae* in mouse macrophages cultured in vitro at different temperatures.

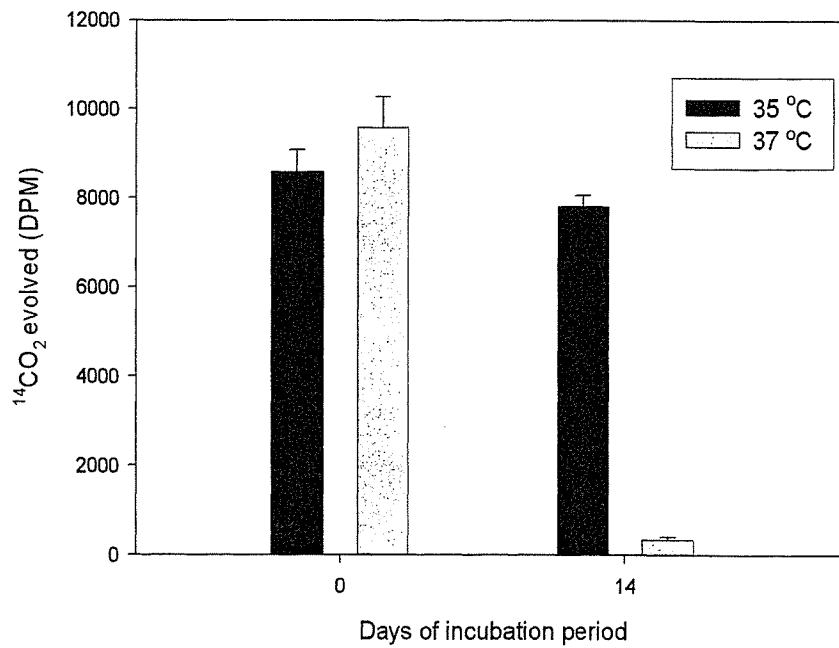


Fig. 2: Metabolic activity of *M. leprae* in mouse macrophages cultured in vitro at different temperatures.

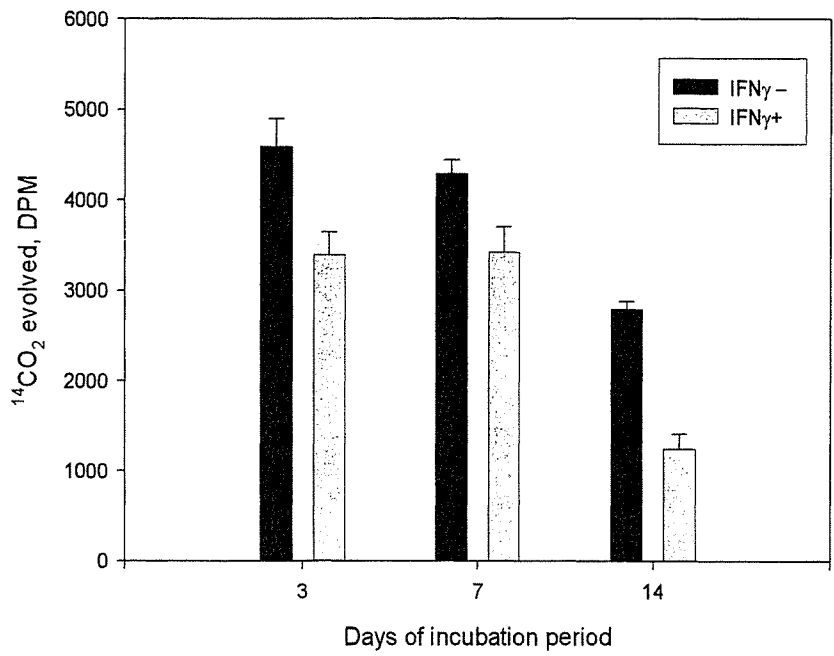


Fig. 3: Anti-*M. leprae* activity of human M-macrophages

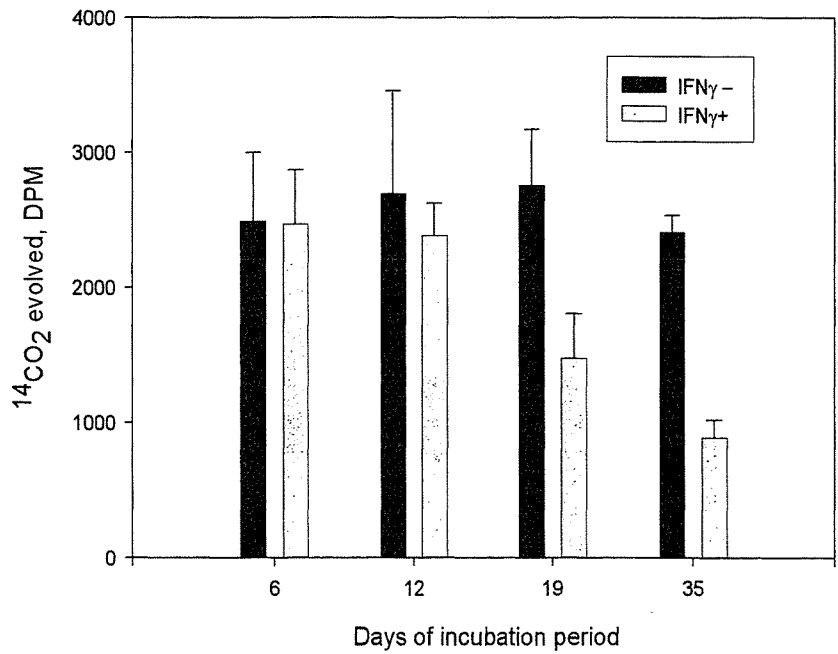


Fig. 4: Anti-*M. leprae* activity of human GM-macrophages

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

免疫原性機能低下を凌駕する  
細胞性免疫賦活法の開発

平成18年度 分担研究報告書

分担研究者 前田 百美

（国立感染症研究所 ハンセン病研究センター）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

免疫原性機能低下を凌駕する細胞性免疫賦活法の開発

分担研究者 前田百美 国立感染症研究所ハンセン病研究センター  
病原微生物部 主任研究官

研究要旨：らい菌に対する生体防御反応を司る分子として、リポ蛋白 LpK を同定し、その活性中心は、N末端部分に存在することを明らかにしてきた。そこで、LpK のN末端をコードするリポペプチド lipoK を作製し、樹状細胞を刺激したところ、lipoK は TLR2 を認識し、樹状細胞を活性化した。本年度は、樹状細胞、T細胞と lipoK の相互作用に焦点をあて検討を加えた。樹状細胞は、lipoK の刺激により活性型サイトカイン IL-12p70 及び TNF- $\alpha$ 、IL-6 の産生を誘導した。らい菌及び lipoK により成熟した樹状細胞は、自己の naïve CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を刺激し、有意に IFN- $\gamma$  を産生した。パーフォリン産生 CD8 陽性 T 細胞も lipoK 及びらい菌刺激により、有意に増強したことから、標的感染細胞を死滅させることより、自己防御に働くと考えられる。従って、lipoK は、らい菌感染防御機構に重要な役割を担っていることから、免疫療法に活用し得る重要な分子であることが示唆された。

A. 研究目的

らい菌のリポ蛋白 LpK のN末端は末梢単球を刺激し、生体防御反応に重要な役割を果たすサイトカイン IL-12 を誘導することから、LpK のN末端が活性中心であると考えられた。LpK のN末端は大量に精製できないため、13 アミノ酸配列を含むリポペプチド lipoK を合成し、免疫活性を検討した。これまでに lipoK は樹状細胞を活性化し IL-12 を産生することを報告してきた。今回 lipoK により成熟した樹状細胞が抗原を naïve T 細胞に提示し得るか検討した。さらに細胞障害性について、パーフォリン産生能により検討した。少菌型ハンセン病患者においては、らい菌感染部位に樹状細胞が集積し、細胞性免疫反応を誘導する。LipoK は、この

反応をさらに高める役割を担うか検討した。

B. 研究方法

LpK のN末端 13 アミノ酸を含む合成リポペプチド (lipoK) を 25mg/ml の濃度で酢酸に溶解後、-80°C に保存した。樹状細胞は、正常健常者ヒト末梢血単球よりサイトカインを用いて分化誘導したのち、抗原またはらい菌でパルスし、その抗原提示能を自己 T 細胞の活性化 (IFN- $\gamma$ 、IL-2 産生) を指標に分析した。Naïve T 細胞の精製には CD45RO 抗体および Dynal T cell negative selection kit (Invitrogen) を用いて行った。IL-12、IL-2 及び IFN- $\gamma$  の測定は BD Pharmingen の OptEIA キットを用いて ELISA 法で半定量化した。らい菌の trafficking を観察するため、リソソームのマーカーである

LyoTracker Red (Molecular Probes 社) を細胞培養中に添加し、3-5 時間後に細胞を固定し、蛍光顕微鏡で観察した。パーフォリン産生 T 細胞は FACS Calibur を用いて測定した。樹状細胞-T 細胞セット後 5 日目に Golgi stop を添加し、18 時間後に細胞を回収し解析した。

倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないように注意を払った。

### C. 研究結果

ヒト末梢血単球から分化した樹状細胞を lipoK で樹状細胞を刺激すると、HLA-ABC, HLA-DR, CD83, CD86 の発現が増強した。らい菌存在下では活性化マーカーの発現がさらに増強したことを報告した。今回その樹状細胞をリソソームマーカーである LysoTracker を細胞培養中に添加し、蛍光顕微鏡で観察した。lipoK の刺激のみではリソソームが観察されないが、らい菌存在下では LysoTracker が集積した。らい菌は FITC で標識しているので、らい菌はリソソームと共存するものとし、らい菌がいることが観察された (data not shown)。一方、lipoK を樹状細胞にパルスし、抗原提示細胞として用いて、naïve の T 細胞の活性化を IFN- $\gamma$  産性能で調べた。らい菌のみでは IFN- $\gamma$  はほとんど産生されないが、らい菌存在下で lipoK をパルスした樹状細胞は naïve T 細胞を刺激し有意に IFN- $\gamma$  を産生した (図 1)。IL-2 も IFN- $\gamma$  と同様にはらい菌存在下で lipoK をパルスすると有意に高い値

を示したが、IL-2 はらい菌のみでも弱いながら検出された。IL-2 は主に CD4 陽性細胞の培養上清中に検出され、CD8 陽性細胞からは分泌されなかった (図 1)。IFN- $\gamma$  産性能は CD40L 存在下で樹状細胞をらい菌で刺激しても、あまり産生されなかったことから、lipoK の方がより高い T 細胞活性化能を有すると考えられる。次に、lipoK またはらい菌を樹状細胞にパルスし、抗原提示細胞として用いて、自己の CD8 陽性 T 細胞内パーフォリン産生能を FACS Calibur にて検討した。lipoK のみで樹状細胞をパルスすると、T 細胞を刺激するにもかかわらず、パーフォリン産生細胞はみられなかった。しかしながら、らい菌で刺激するとパーフォリン産生細胞が増した。lipoK 存在下では、パーフォリン産生細胞がさらに増えた (図 2)。脂質部分を持つ lipoK が TLR2 を介してパーフォリン産生に重要な役割を果たしていると考えられた。

### D. 考察

LpK の N 末端 13 アミノ酸配列を含むリポペプチド lipoK は、樹状細胞を成熟し、MHC クラス I, II 分子を細胞表面に再配置し、抗原を naïve T 細胞に提示することによって免疫応答を引き起こすことを明らかにしてきた。LipoK は TLR2 を認識し、パーフォリン産生する CD8 陽性 T 細胞数を促進した。このことから、LipoK は、らい菌感染樹状細胞を活性化し、抗らい菌生体防御反応を増進させる作用を有するものと考えられた。

### E. 結論

リポペプチド lipoK は、naïve CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性細胞を活性化した。

免疫療法に活用する分子として、または、抗酸菌感染症のワクチン候補分子として有用であると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Makino M, Maeda Y, Inagaki K. Immunostimulatory activity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG that secretes major membrane protein II of *Mycobacterium leprae*. Infect. Immun. 74, 6264-6271, 2006.
- 2) Maeda Y. Diagnosis of leprosy-serological aspects. Jap J Leprosy 75, 285-289, 2006.
- 3) Makino M, Maeda Y, Mukai T, Kaufmann SH. Impaired maturation and function of dendritic cells by mycobacteria through IL-1beta. Eur J Immunol. 36, 1443-1452, 2006.

##### 2. 学会発表

- 1) Maeda Y, Kai M, and Makino M. LipoK activates *Mycobacterium leprae* infected macrophages and dendritic cells. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, June 18-23, 2006
- 2) Makino M, Maeda Y, Inagaki K, and Mukai T. Immunostimulatory activity of recombinant *M. bovis* BCG expressing the dominant antigen of *M. leprae*, US-Japan Cooperative Medical Science Program, 41<sup>st</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kagoshima, Japan, July 19-21, 2006.
- 3) 前田百美：高免疫原性タンパクを用いた新しい血清学的診断法、第 79 回日本ハンセン病学会総会、2006 年 5 月

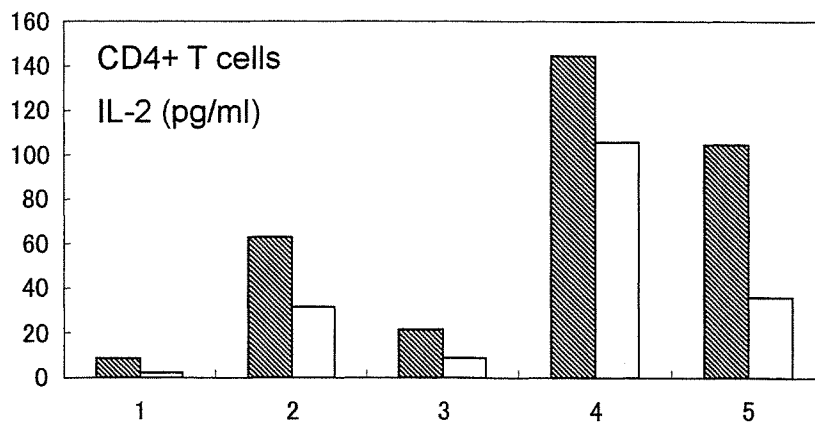
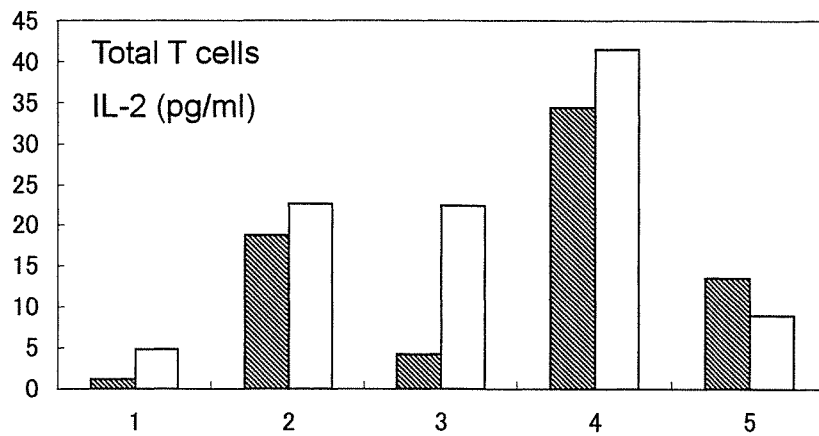
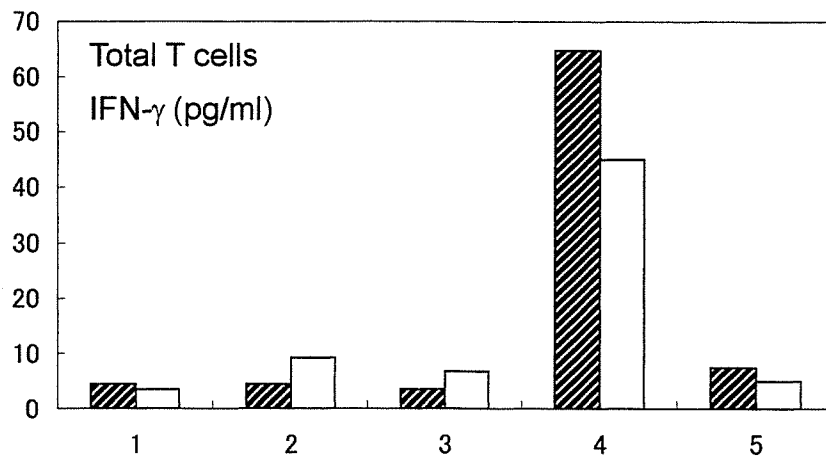
高松.

- 4) 福富康夫、前田百美、牧野正彦：クロファジミンによるマクロファージの細胞死と核の形態変化、第 79 回日本ハンセン病学会総会、2006 年 5 月 高松.
- 5) 牧野正彦、前田百美、福富康夫：GM-CSF によるらい菌感染マクロファージの抗原提示能の増強、第 79 回日本細菌学会総会、2006 年 3 月 金沢
- 6) 前田百美、稲垣 勝也、牧野正彦：らい菌由来 MMP-II 抗原を分泌する rBCG の作製とその T 細胞活性化能の解析、第 79 回日本細菌学会総会、2006 年 3 月 金沢

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし





⊗ 1 . IFN-  $\gamma$  and IL-2 production from naïve T cells. Open bars denotes the ratio of T cells to DC is 10 and closed bars show T cells to DC ratio of 5. 1. No stimulation, 2. *M. leprae*, 3. LipoK, 4. *M. leprae* + LipoK, 5. *M. leprae* + CD40L

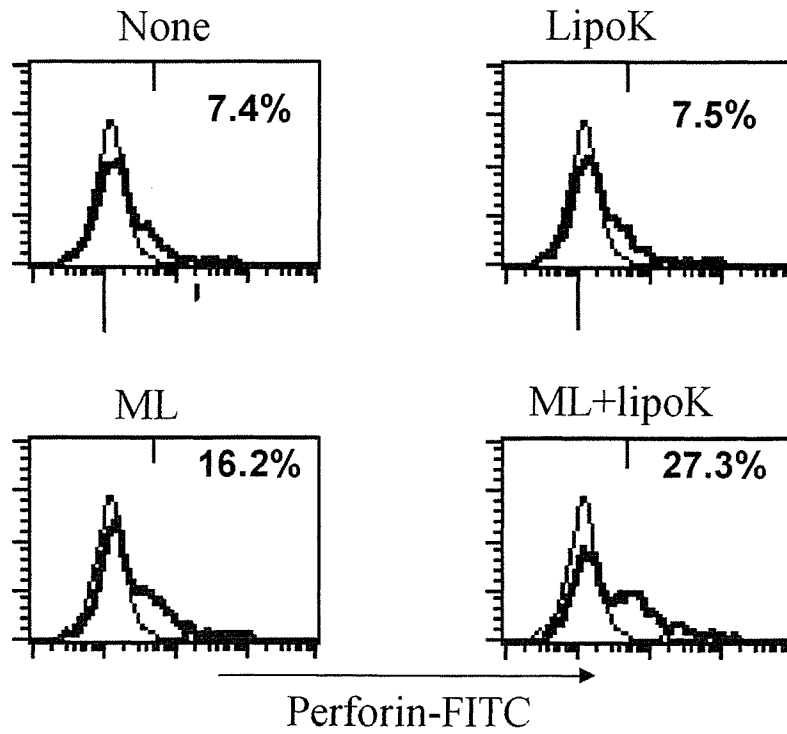


图 2. Intracellular stain of perforin production from CD8 positive T cells. Analysis by FACS Calibur. Number denotes the percentage of perforin positive T cells

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

## 免疫機能亢進抗原の開発

平成18年度 分担研究報告書

分担研究者 向井 徹

（国立感染症研究所 ハンセン病研究センター）

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

免疫機能亢進抗原の開発

分担研究者 向井 徹 国立感染症研究所・ハンセン病研究センター・病原微生物部・室長

研究協力者 宮本友司 国立感染症研究所・ハンセン病研究センター・病原微生物部・研究員

研究要旨 抗酸菌感染症であるハンセン病に対し、同じ抗酸菌感染症である結核のワクチン BCG の使用がこれまでに試みられている。しかし、その効果は、非常に低いものであった。一方、BCG は、安定した安全性がこれまでに示されている。そこで、BCG を改変することにより、免疫提示能等の亢進を目的とした BCG 株の作製を行った。本研究では、ファゴソームとリソソームの融合後、ペプチド消化に重要な pH 環境に影響する urease の破壊株、および分解、消化の増強が期待されるリゾチーム高感受性株の作製を目指した。また、菌体外へのらい菌由来発現蛋白の分泌効率を上昇させるプラスミドベクターの検討を行った。その結果、BCG Tokyo 株を用いて、urease 活性を欠くΔUT を樹立した。しかし、他菌種にリゾチーム感受性の亢進が認められたグルタミン生合成酵素の遺伝子破壊株は樹立できなかった。菌体外分泌ベクター系では、らい菌 MMP II 蛋白を、菌体外に分泌する目的のため、HSP70 融合型、Ag85B 分泌シグナル付加型等を作製し、検討した結果、菌体外分泌を BCG 株により確認した。これら、改変 BCG や分泌型ベクターは、従来の BCG より強い抗らい菌免疫誘導を行うことが期待される。

A. 研究目的

ハンセン病のワクチンとして、BCG の使用が過去に試みられてきた。しかし、その効果の評価には、ばらつきがあるものの、現在では非常に低いものであるとされている。BCG は、長期間にわたり使用され、卓越した安全性が示されている。そこで、BCG を改変することにより、らい菌蛋白の免疫提示等の亢進した BCG 株の作製を目的とした。BCG の改変では、ファゴソームとリソソームの融合後、ペプチド消化に重要な pH 環境に影響する urease の破壊株、および分解、消化の増強が期待されるリゾチ

ーム高感受性株の作製を目指した。また、菌体外へのらい菌由来発現蛋白の分泌効率を上昇させるプラスミドベクターの構築を目的にシャペロン蛋白である HSP70、Ag85B の菌体外分泌シグナルを付加したらい菌 MMP II を発現する各種プラスミドベクターの構築とその発現 BCG 株の樹立・検討を行った。

B. 研究方法

遺伝子破壊は、温度感受性抗酸菌ファージを利用する手法によって実施した。BCG に urease C (Mb1881) およびグルタミン生合成酵