

素遺伝子(Mb2224)の上下流領域をコスミドベクターへクローニングし、*in vitro* packagingにより得られた環状DNAを30°Cで迅速発育抗酸菌 *M. smegmatis* へ導入した。生じたプラークより組換え抗酸菌ファージを回収し、ハイグロマイシン耐性遺伝子を持つ組換え温度感受性抗酸菌ファージを構築した。本ファージをBCGに37°Cで感染させ、生育してきたハイグロマイシン耐性コロニーを遺伝子破壊株として単離した。遺伝子破壊株の確認はPCR等により行った。

各種分泌型プラスミドの構築は、HSP70、Ag85B 分泌シグナル、らい菌 MMP II 各遺伝子を基に pMV261 を用い構築し(図1)、BCG Tokyo株へ遺伝子導入後、Sauton培地にて培養後、上清を濃縮し、ウエスタンプロット法により菌体外分泌の確認を行った。

### C. 研究結果

UreaseC 破壊 BCG Tokyo 株は、PCR法およびウレアーゼ試験により、その活性を欠くことが証明された。しかし、グルタミン生合成酵素遺伝子(Mb2224)破壊では、遺伝子破壊用ベクターとして機能を保持していることが確認されたが、Mb2224 遺伝子が欠失している破壊株を得ることはできなかった。

各種発現プラスミドを遺伝子導入された BCG Tokyo 株は、菌体中および菌体外へも蛋白の発現・分泌が確認された。ウエスタンプロットの解析では、HSP70とMMP IIの融合型が、高い分泌効率を示した(図2、3)。

### D. 考察

菌体の食食後、ファゴソームとリソソームの融合後、結核などの urease を保有する抗酸菌は、その urease 活性により、周囲環境の pH を上げ、酸性蛋白分解酵素の機能を下げ菌体の生き延びが図られることが考えられている。そのため今回樹立された△UT株は、融合後の菌体分解を容易にし、抗原提示能の上昇等に結びつくことが考えられる。また、構築されたプラスミドを遺伝子導入したBCGを用いることにより、らい菌蛋白への免疫誘導能の増強効果が強く期待される。グルタミン生合成酵素の破壊株樹立では、生育に必須あるいは大きな影響を与える可能性もあることから、プラスミドベクター等で予め遺伝子を供給した後に、染色体上の破壊を行う等の工夫が必要であると思われた。

### E. 結論

免疫原性の向上した BCG 株の改良を目指し、urease C 破壊BCG株を樹立し、各種らい菌蛋白分泌プラスミドを構築した。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Miyamoto, Y., T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. Identification and characterization of the genes involved in glycosylation pathways of mycobacterial glycopeptidolipids biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 188:86-95, 2006.
- 2) Mukai, T., Y. Miyamoto, T. Yamazaki, and M. Makino. Identification of *Mycobacterium* species by comparative analysis of the *dnaA*

gene. FEMS Microbiol. Lettr., 254:232-239, 2006.

3) Makino, M., Y. Maeda, T. Mukai, and S. H. E. Kaufmann. Impaired maturation and function of dendritic cells by mycobacteria through IL-1 $\beta$ . Eur. J. Immunol., 36:1443-1452, 2006.

4) Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and T. Mukai. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. Microbes and Infection, in press, 2007.

5) 向井 徹. 迅速・簡易遺伝子診断法の開発. 日本ハンセン病学会雑誌. 75:265-269, 2006.

## 2. 学会発表

1) Mukai, T., M. Macdonald, C. Ranjit, B. R. Sapkota, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Development of rapid and simple diagnostic tool for leprosy. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 41<sup>st</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kagoshima, Japan, July 19-21, 2006.

2) Makino, M., Y. Maeda, K. Inagaki, and T. Mukai. Immunostimulatory activity of recombinant *M. bovis* BCG expressing the dominant antigen of *Mycobacterium leprae*. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 41<sup>st</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kagoshima, Japan, July 19-21, 2006.

3) 宮本友司, 向井 徹, 前田百美, 甲斐雅規,

中田 登, 中 崇, 矢野郁也, 牧野正彦. *Mycobacterium avium* 由来 2 型 Glycopeptidolipid の生合成解析. 第 79 回日本細菌学会総会 2006 年 3 月 金沢

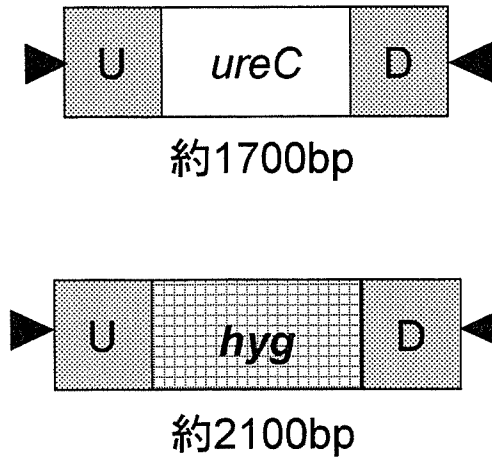
4) 牧野正彦, 前田百美, 福富康夫, 向井 徹. GM-CSF によるらい菌感染マクロファージの抗原提示能の増強. 第 79 回日本細菌学会総会 2006 年 3 月 金沢

5) 向井 徹. 迅速・簡易遺伝子診断法の開発. (シンポジウム;ハンセン病の診断と予防:最近の進歩)第 79 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2006 年 5 月 高松

## 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

A



B

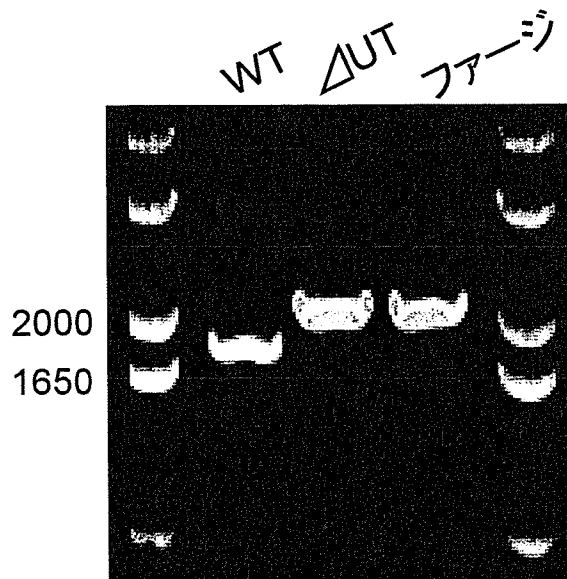


図1. urease C遺伝子の破壊確認。A.標的遺伝子模式図。親株遺伝子(上段)。破壊株(下段)。◀ 確認用プライマーの位置。B. PCRによる確認。WT:親株,  $\Delta$ UT:破壊株, フェージ:破壊に用いたフェージ。

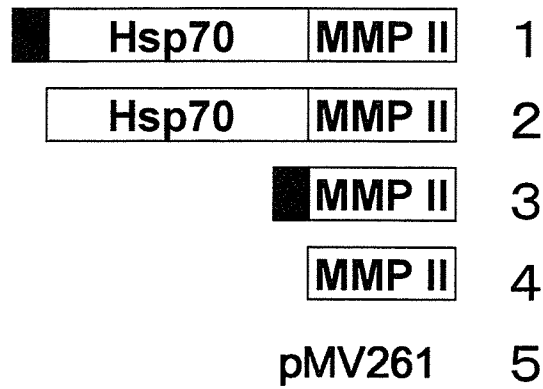


図2.各種融合蛋白発現プラスミド概略図。■:Ag85B分泌シグナル

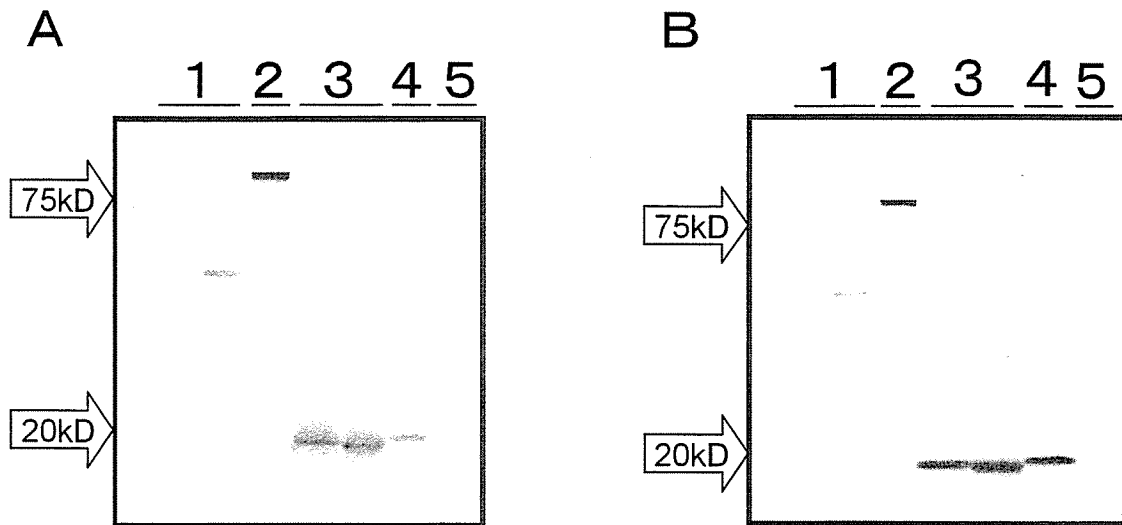


図3. 抗MMP II抗体によるウエスタンブロット。A:菌体、B:濃縮培養上清。Lane:1-5の数字は、図2に対応。1、3は、異なる2クローンを泳動。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

## 難治性ハンセン病に対する免疫療法の開発

平成18年度 分担研究報告書

分担研究者 牧野 正彦

（国立感染症研究所 ハンセン病研究センター）

難治性ハンセン病に対する免疫療法の開発

分担研究者 牧野 正彦 国立感染症研究所・病原微生物部・部長

研究要旨：ハンセン病は、らい菌の細胞内持続性感染によって発症する慢性感染症である。らい菌は1回の分裂に10～12日を要するなど、その基礎代謝能は極めて低いと考えられる。そのため、インターフェロンガンマー（IFN- $\gamma$ ）を介した免疫療法を開発する際にも、比較的大量のIFN- $\gamma$ 産生を誘導するシステムの開発が求められる。BCGがハンセン病のワクチンとして用いられたこともあるが、その効果は弱く信頼されるワクチンには至っていない。本研究班では、BCGに改良を加え、より大量のIFN- $\gamma$ 産生を誘導することを目的とした。BCGが感染した際ファゴゾームの酸性化を誘導し、Lysosomeとの融合を容易にさせるためBCGの有する酵素Ureaseを除去した。Urease欠損BCG株（BCG- $\Delta$ UT）を作製した。BCG- $\Delta$ UTは末梢単球由来樹状細胞に感染すると、親BCG-Tokyo株に比し強くCD4陽性T細胞を活性化し、より大量のIFN- $\gamma$ を産生させた。同時に、BCG- $\Delta$ UTは樹状細胞を刺激し、IL-12p70の産生を誘導した。さらに、BCG- $\Delta$ UTがマクロファージに感染しても、親BCGに比し有意に強くCD4陽性T細胞を活性化した。また、BCG- $\Delta$ UTはマクロファージを刺激しGM-CSFを産生した。GM-CSFは、抗原提示細胞に対し抗原提示能を増強するサイトカインとして知られているため、マクロファージによるCD4陽性T細胞の活性化に重要な役割を果たしているものと想定された。従って、抗らい菌活性を誘導する際に必要なIFN- $\gamma$ を効率良く産生する新しいBCGが作製された。

A. 研究目的

らい菌に対する生体防御反応を司る細胞としてCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞が考えられている。CD4陽性T細胞は活性化するとIFN- $\gamma$ を産生し、産生されたIFN- $\gamma$ はマクロファージを活性化することで細胞内に宿るらい菌を殺戮する。一方、CD8陽性T細胞は、頻回に抗原刺激を受けると抗原特異的キラーT細胞へと分化し、らい菌感染マクロファージをアポトーシス機構によって殺戮する。一般的にハンセン病においては、CD4陽性T細胞から産生されるIFN- $\gamma$ がより重要な役割を果たしている。また、ハンセン病に対するワクチンとしてBCGが利用された地域もあるが、

BCGが効率的にハンセン病の発症を抑制したとする報告は少ない。BCGが十分に奏効しない背景には二つの要素があると考えられる。一つは、らい菌そのものの抗原性が極めて弱く、たとえ最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞に感染したとしても、CD4陽性T細胞を十分に活性化するためには大量のらい菌が必要となる。そのため、らい菌特異的メモリーT細胞が存在しても有効に利用できないことにある。二つ目は、BCGのナイーブT細胞活性化能が弱く、そのためにらい菌に反応し得るメモリーT細胞が十分に産生されていないことによるものである。いずれの場合においても、らい菌が感染した際あるいは細胞内感染を果た

した際に、CD4 陽性 T 細胞が容易に再活性化される環境を作ることが、ハンセン病の発症予防および免疫療法の開発には必要となる。そこで本研究班においては、より効率良くまたは強く CD4 陽性 T 細胞を活性化することが可能な BCG、すなわち新しいリコンビナント BCG を作製することを目的とした。BCG は、抗原提示細胞に感染するとファゴゾームを形成し、ファゴゾーム内の PH をコントロールすることによってファゴゾームの成熟化を阻止する欠点を有している。そこで、BCG の Urease 活性に関する酵素を欠損させた BCG (BCG- $\Delta$ UT) を作製し、その免疫学的効果を検討した。

## B. 研究方法

ウレアーゼ欠損 BCG (BCG- $\Delta$ UT) は、BCG-Tokyo 株より Urease を除去して作製した。正常健康者末梢血よりプラスチック附着性細胞を分離し単球として用いた。樹状細胞は、末梢単球に市販のリコンビナント GM-CSF および IL-4 を添加して作製した。マクロファージは、GM-CSF あるいは M-CSF を用いて分化誘導したが、GM-CSF を用いて誘導したマクロファージを GM-M $\emptyset$ 、M-CSF を用いて作製したマクロファージを M-M $\emptyset$  と称した。GM-M $\emptyset$  および M-M $\emptyset$  を BCG- $\Delta$ UT あるいは親 BCG を用いて刺激した際に培養上清中に産生される GM-CSF 等のサイトカインは市販 ELISA キットを用いて測定した。リコンビナント BCG 感染マクロファージの抗原提示能は CD4 陽性 T 細胞の活性化で半定量的に測定した。GM-M $\emptyset$  あるいは M-M $\emptyset$  に一定量のリコンビナント BCG を感染させ、さらに 2 日間培養し、マイトマイシン処理した後、自己の CD4 陽性 T 細胞と 4 日間混合培養した。CD4 陽性 T 細胞が産生する IFN- $\gamma$  は市販の ELISA キットを用いて測定した。マクロファージ表面抗原の発現程度の解析は、FACS Calibur を用いて行った。MHC 抗原・CD86 抗原など抗原提示に関わる分子の発現は、それぞれ市販のモノクローナル抗体を用いた。

**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細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。

## C. 研究結果

BCG- $\Delta$ UT または親 BCG (Tokyo 株) を末梢単球由来樹状細胞に感染させ、成熟化因子非存在下で 2 日間培養し、自己の CD4 陽性 T 細胞と混合培養した。レスポンドである CD4 陽性 T 細胞からメモリーマーカーである CD45RO を発現する細胞をビーズを用いて除き、ナイーブ T 細胞として用いた。BCG- $\Delta$ UT・親 BCG-Tokyo 株いずれも BCG の量依存性に強く CD4 陽性 T 細胞を活性化し、有意な IFN- $\gamma$  産生を誘導した。しかし、BCG- $\Delta$ UT を用いた場合明らかに強い T 細胞の活性化が誘導された。同様にメモリータイプ CD4 陽性 T 細胞も両 BCG にその量依存性に反応し IFN- $\gamma$  を産生し、BCG- $\Delta$ UT が有意に強く T 細胞を活性化した。さらに、ナイーブタイプの CD8 陽性 T 細胞の BCG- $\Delta$ UT に対する反応性を検討したが、その程度は親 BCG 株とほぼ同じであった。BCG- $\Delta$ UT の強い CD4 陽性 T 細胞活性化機構を解析するため、BCG を樹状細胞に感染させた後、その表面に発現する抗原提示に関わる分子の発現程度を比較検討したが、両 BCG 間に有意な差は認められなかった。そこで、樹状細胞からの IL-12p70 の産生誘導能を比較した。大量の BCG を用いて樹状細胞を刺激すると、BCG の IL-12p70 産生誘導能に有意な差はなかったが、比較的少量の BCG を用いた場合には、BCG- $\Delta$ UT は明らかに大量の IL-12p70 を産生することが可能であった。BCG は生体内ではマクロファージに対しより強い親和性を有するため、BCG 感染マクロファージの抗原提示能を CD4 陽性 T 細胞の活性化を指標に検討した。マクロファージは、GM-CSF (GM-M $\emptyset$ ) および M-CSF (M-M $\emptyset$ ) を用いて作製した。いずれのマクロファージを用いた場合にも、BCG-

△UTはBCG-Tokyo株に比し強いCD4陽性T細胞の活性化を誘導した。しかし、ナイーブCD4陽性T細胞の活性化を誘導することはできなかった。そこで、マクロファージの強い抗原提示に関わる因子について検討した。しかし、マクロファージ表面の抗原提示に関わる抗原の発現程度およびIL-12p40の産生は、両BCG間で有意の差は認められなかった。一般的にGM-MφとM-Mφの抗原提示能は明らかに差があり、GM-Mφを用いた場合より強いT細胞の活性化が期待できる。すなわちGM-CSFが単球あるいは分化途上にあるマクロファージに作用した場合、マクロファージのT細胞活性化能は増強される。そこで、BCG-△UTとBCG-Tokyo株のマクロファージからのGM-CSFの産生能を検討した。その結果、BCG-△UTは明らかに強いGM-CSF産生誘導能を有していた。

#### D. 考察

ハンセン病のワクチン開発あるいは免疫療法の開発においては、Keyとなるエフェクター因子が存在する。ワクチンにおいては、抗原提示細胞を介したT細胞の活性化とその後に産生されるメモリーT細胞であり、免疫療法においては、らい菌感染したマクロファージを活性化するために必要な十分量のIFN- $\gamma$ である。本研究班において作製したウレアーゼ活性を欠損するBCG株(BCG-△UT)は、ワクチンおよび免疫療法の開発の両者において有効に作用すると期待させる。ナイーブなCD4陽性T細胞の活性化はメモリーT細胞の産生に直接的に関わる細胞集団であり、ナイーブT細胞を強くかつ大量に活性化することが有効なメモリーT細胞の産生に繋がる。この点において、BCG-△UTは親BCGに比しより効率的にT細胞を活性化することが可能であり、従来BCGを凌駕するワクチンとなり得るものと期待される。

一方、免疫療法の開発においては、細胞内に感染しているらい菌を殺戮することが最も重要となる。マクロファージ内に感染したらい菌を殺すメディエーターとして現在最も有効とされているエフェクター因子はIFN- $\gamma$ であり、IFN- $\gamma$ はメモリーCD4陽性T細胞が抗原提示細胞を介して抗原

刺激を受けた際に大量に産生される。この点において、BCG-△UTは抗原提示細胞が樹状細胞であってもマクロファージであっても効率良くIFN- $\gamma$ の産生を誘導した。従って、BCG-△UTは難治性ハンセン病に対する免疫療法を司る上でも重要な役割を果たすものと期待される。また、マクロファージの抗原提示能を増強する因子としてGM-CSFが考えられるが、BCG-△UTはマクロファージからGM-CSFの産生を誘導した点も興味深い。

#### E. 結論

ウレアーゼを欠損するBCG-Tokyo株(BCG-△UT)を作製した。BCG-△UTは樹状細胞およびマクロファージを介して、ナイーブおよびメモリータイプCD4陽性T細胞を親BCGに比し強く活性化した。ハンセン病のワクチンおよび免疫療法の開発に寄与するものと期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Miyamoto, Y., T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. Identification and characterization of the genes involved in glycosylation pathways of mycobacterial glycopeptidolipids biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 188:86-95, 2006.
- 2) Mukai, T., Y. Miyamoto, T. Yamazaki, and M. Makino. Identification of *Mycobacterium* species by comparative analysis of the *dnaA* gene. *FEMS Microbiol. Lettr.*, 254:232-239, 2006.
- 3) Makino, M., Y. Maeda, T. Mukai, and S. H. E. Kaufmann. Impaired maturation and function of dendritic cells by mycobacteria through IL-1 $\beta$ . *Eur. J. Immunol.*, 36:1443-1452, 2006.
- 4) Suzuki, K., N. Nakata, P. D. Bang, N. Ishii, and M. Makino. High-level expression of pseudogenes in *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol. Lettr.*, 259:208-214, 2006.



- 5) Makino, M., Y. Maeda, and K. Inagaki. Immunostimulatory activity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG that secretes Major Membrane Protein II of *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immunity*, 74:6264-6271, 2006.
- 6) Suzuki, K., F. Takeshita, N. Nakata, N. Ishii, and M. Makino. Localization of COR01A in the macrophages containing *Mycobacterium leprae*. *Acta Histochemica et Cytochemica*, in press, 2007.
- 7) Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and T. Mukai. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. *Microbes and Infection*, in press, 2007.
- 8) 牧野正彦. 生体防御機構. 牧野正直・長尾栄治・畑野研太郎編, 総説現代ハンセン病医学, 東海大学出版会, in press, 2007.
2. 学会発表
- 1) LipoK activates *Mycobacterium leprae* infected macrophages and dendritic cells. Maeda, Y., M. Kai, and M. Makino. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, 18-23 June, 2006, Kyoto, Japan.
- 2) Development of rapid and simple diagnostic tool for leprosy. Mukai, T., M. Macdonald, C. Ranjit, B. R. Sapkota, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 41<sup>st</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kagoshima, Japan, July 19-21, 2006.
- 3) Immunostimulatory activity of recombinant *M. bovis* BCG expressing the dominant antigen of *Mycobacterium leprae*. Makino, M., Y. Maeda, K. Inagaki, and T. Mukai. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 41<sup>st</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kagoshima, Japan, July 19-21, 2006.
- 4) Clofazimine-induced cell death in macrophages. Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 41<sup>st</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kagoshima, Japan, July 19-21, 2006.
- 5) クロファジミンによるマクロファージの形態変化と細胞死. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第79回日本細菌学会総会 2006年3月 金沢
- 6) *Mycobacterium avium* 由来 2 型 Glycopeptidolipid の生合成解析. 宮本友司, 向井 徹, 前田百美, 甲斐雅規, 中田 登, 中 崇, 矢野郁也, 牧野正彦. 第79回日本細菌学会総会 2006年3月 金沢
- 7) 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. 前田百美, 稲垣勝也, 牧野正彦. 第79回日本細菌学会総会 2006年3月 金沢
- 8) 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. 牧野正彦, 前田百美, 福富康夫, 向井 徹. 第79回日本細菌学会総会 2006年3月 金沢
- 9) *Mycobacterium smegmatis* を用いたらい菌遺伝子変異と薬剤感受性に関する解析. 中田 登, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 牧野正彦. 第79回日本細菌学会総会 2006年3月 金沢
- 10) 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. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第79回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2006年5月 高松
- 11) リアルタイム PCR 法を利用した耐性変異の多剤同時検出. 甲斐雅規, Nguyen Phuc Nhu Ha, 松岡正典, 牧野正彦. 第79回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2006年5月 高松
- 12) *Mycobacterium smegmatis* を用いたらい菌

*foIP* 遺伝子変異とダブソン感受性に関する  
解析. 中田 登, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 牧  
野正彦. 第 79 回日本ハンセン病学会総会・  
学術大会 2006 年 5 月 高松

- 13) 高免疫原性分子の同定と予防法への応用.  
牧野正彦. (シンポジウム; ハンセン病の診  
断と予防: 最近の進歩) 第 79 回日本ハン

セン病学会総会・学術大会 2006 年 5 月  
高松

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 |

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

カニクイザルを用いたハンセン病モデル開発と  
新規ワクチンの有効性評価

平成18年度 分担研究報告書

分担研究者 寺尾 恵治

（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター）

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

カニクイザルを用いたハンセン病モデルの開発と新規ワクチンの有効性評価

分担研究者 寺尾恵治 医薬基盤研・霊長類医科学研究センター・センター長

研究要旨： カニクイザルを用いたハンセン病感染・発症モデルを開発し、新規ワクチンの有効性評価に用いる免疫学的指標を確立することを目的とする。異なる感染経路でらい菌を接種した幼若カニクイザル6頭について、らい菌接種後の主要リンパ球サブセットレベルと3種のらい菌由来ペプチド（MMP-II、LpK、FAP）で誘導されるリンパ球幼若化反応を二年間にわたり調査した。供試した6頭のカニクイザルのうち手根部に接種した一頭（#007）では、らい菌接種後3種のペプチド全てに対するリンパ球幼若化反応が2年間にわたり持続したが、ペプチドにより反応性が異なっていた。FAPおよびMMP-IIに対する幼若化反応は接種後5ヶ月前後から出現したが、FAPに対する反応性が二年間持続したのに対し、MMP-IIに対する反応性は一年後に低下した。MMP-IIに対する反応性が低下すると同時にLpKに対する幼若化反応が急激に増加した。#007では感染直後から休止期記憶CD4陽性T細胞と考えられるCD29<sup>high</sup>細胞レベルが増加し、二年間高レベルを維持したことから、ペプチドで誘導される幼若化反応を担う細胞集団である可能性が示唆された。さらに、調査した6頭のうち、#007のみで低レベルではあるがらい菌に対する抗体が接種後二年にわたり検出されることから、#007ではらい菌が持続感染している可能性が高い。

A. 研究目的

カニクイザルを用いてハンセン病モデルを作製し、分担研究者により開発される新規ワクチンの有効性を評価することを最終目標とする。本研究では、幼若カニクイザルに異なる接種経路により、らい菌を感染させ、カニクイザルでの感染条件を検討するとともに、ワクチンの有効評価に用いる免疫学的指標の確立を目的とする。今年度は、異なる感染経路でらい菌を接種した6頭のカニクイザルについて、二年間にわたり末梢リンパ球サブセットレベルおよびらい菌由来ペプチドに対する反応性を継時的に調査した。

B. 研究方法

独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科

学研究センターで繁殖育成された6—8ヶ月齢の幼若カニクイザル6頭を3群に分け、らい菌を鼻腔内、鼻先端部、左手根部にそれぞれ2頭ずつ接種した。らい菌接種前、接種後二年間にわたり3—5ヶ月間隔で採血し、定法に従ってリンパ球を分離した。

2x10<sup>5</sup>のリンパ球を蛍光色素標識マウスモノクローナル抗体で染色し、FACSにより主要リンパ球サブセットレベルを測定した。用いた抗体の組み合わせは、PE-CD20/FITC-CD3、PE-CD8/FITC-CD16、Cy5-CD8/PE-CD4/FITC-CD29、Cy5-CD8/PE-CD4/FITC-CD69の4種類である。

幼若化反応は2x10<sup>5</sup>のリンパ球を10%FCS-RPMI-1640培地に浮遊させ、3種のら

い菌由来ペプチド (MMP-II; 0.1  $\mu$ g/ml, LpK; 0.1  $\mu$ g/ml, FAP; 1  $\mu$ g/ml) と混合して3日間培養した。培養3日目に1  $\mu$ Ci/well の TdR を添加しさらに16時間培養した。培養後細胞をガラスフィルター上に回収し、細胞内に取り込まれた TdR 量を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

採血時に、血漿および鼻腔内洗浄液を採取した。血漿は、セロディアレープラ (富士レビオ社) によりらい菌特異抗 PGL 抗体凝集反応試験を行い、また、鼻腔内洗浄液は、遠心沈査を RLEP を標的としたらい菌特異的 nested-PCR 法により、鼻腔内排泄を検討した。

(倫理面への配慮)

らい菌接種および感染動物の維持は、医薬基盤研究所・動物実験委員会の承認を得た後、P2感染実験施設内で行なった。

## C. 研究結果および考察

### 1. 抗体およびPCRによる検討

#007 は、菌接種後2ヶ月に土、その後3-6ヶ月は陽性8-12ヶ月では陰性であったが、14ヶ月より24ヶ月は、土を示す状態が続いている。他のサルでは、14-24ヶ月の間は、陰性を示した。PCRによる検討では、全頭において全期間らい菌は、検出されなかった。

### 2. 主要リンパ球サブセットレベルの変化:

図1から図6に、らい菌を鼻腔内 (#001, #002)、鼻尖端部 (#004, #009)、左手根部 (#006, #007) に接種したカニクイザルについて、二年間にわたり末梢血中の CD3+/T 細胞 (図1)、CD20+/B 細胞 (図2)、CD4+/T 細胞 (図3)、CD8+/T 細胞 (図4)、CD16+/NK 細胞 (図5) および休止期記憶 CD4 陽性 T 細胞 (CD29high/CD4: 図6) レベルの変化を示す。らい菌接種直後に CD3+/T 細胞の増加、CD20+/B 細胞の減少、CD4+/T 細胞の増加が認

められるが一年後には接種前のレベルに低下した。最も顕著に変化したサブセットは、休止期記憶細胞と考えられる CD29high/CD4 細胞で、図6に示すように左手根部に接種した二頭において、CD29high/CD4 細胞レベルがらい菌接種後に増加し、二年間にわたり高レベルを維持した。

### 3. らい菌由来ペプチドで誘導されるリンパ球幼若化反応:

らい菌由来の3種類のペプチドで誘導されるリンパ球幼若化反応の変化を図7、8、9に示す。Stimulation Index (SI 値) が2以上を陽性反応と判断すると、らい菌を接種した6頭全てで3種のペプチドに対する一過性もしくは持続性の幼若化反応が観察された。供試した6頭のカニクイザルの内、3頭 (#001, #002, #009) ではらい菌感染前のリンパ球で陽性反応が認められている。これはコロニー内に常在している非定型抗酸菌の感染による交叉反応の結果と考えられ、らい菌感染に伴う免疫応答を評価するのが困難である。今回は、非結核性抗酸菌感染の影響が除外できる3頭、特に左手根部に接種した2頭 (#006, #007) について考察する。二頭とも FAP および LpK に対する反応性はほぼ同様なパターンを示し、感染直後に FAP に対する反応性が発現し、感染後1年を経過して LpK に対する幼若化反応が出現した。#007 では MMP-II に対する持続的な幼若化反応が観察されたが、#006 では顕著な反応は認められなかった。左手根部に接種した二頭では休止期記憶 CD4 細胞レベルが増加し、高レベルを維持することから、らい菌の持続感染が生じる可能性が高い。特に図10に示す#007 では、休止期記憶 CD4 細胞レベルの増加に伴いらい菌ペプチドに対する幼若化反応が出現すること、二年間にわたり低レベルではあるがらい菌特異抗体が検出されることから、持続感染の可能性が高い。今後はらい菌ペプ

チドで誘導されるリンパ球および抗原提示細胞の反応性を詳細に検討する予定である。また、免疫抑制処置などの方法によりハンセン病発症モデルの開発を試みる予定である。今回の結果から、らい菌の持続感染を成立させる接種条件として、手根部接種法の有用性が明らかになったと考える。

#### E. 結論

幼若カニクイザルにらい菌を鼻腔内、鼻尖端、左手根部の異なった経路で接種し、らい菌の持続感染モデル成立の有無をらい菌由来ペプチドで誘導されるリンパ球幼若化反応を指標として調査した。その結果、手根部に接種した2頭のカニクイザルではFAP、LpK、MMP-IIのいずれのペプチドに対する反応性が比較的長期間維持することが判明した。さらに、休止期記憶CD4細胞と考えられるCD29<sup>high</sup>/CD4細胞レベルの増加とペプチドで誘導される幼若化反応とが相関することから、持続感染モデル作成のための接種部位としては手根部接種法が有望であることが明らかとなった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kikuchi T, Hara M and Terao K, Development of microsatellite marker set applicable to genome-wide screening in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), Primates, 2006 Nov 22; [Epub ahead of print]

2) Hara M, Kikuchi T, Sata T, Nakajima N, Ami Y, Sato Y, Tanaka K, Narita T, Ono F, Akari H, Terao K, Mukai R. Detection of SRV/D shedding in body fluids of cynomolgus macaques and comparison of partial gp70 sequences in SRV/D-T isolates. Virus Genes. 2007 Jan 26; [Epub ahead of print]

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

図1：らい菌接種後の末梢CD3陽性T細胞レベルの変化

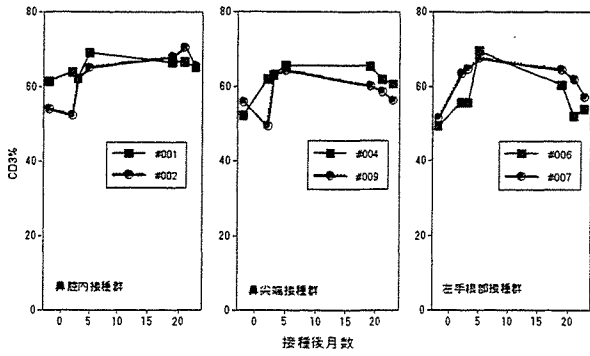


図2：らい菌接種後の末梢CD20+B細胞レベルの変化

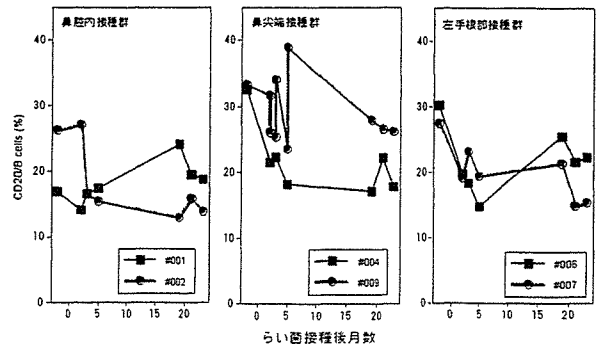


図3：らい菌接種後の末梢CD4+T細胞レベルの変化

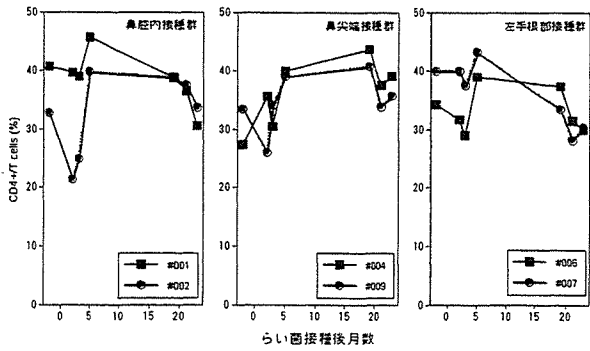


図4：らい菌接種後の末梢CD8+ T細胞レベルの変化

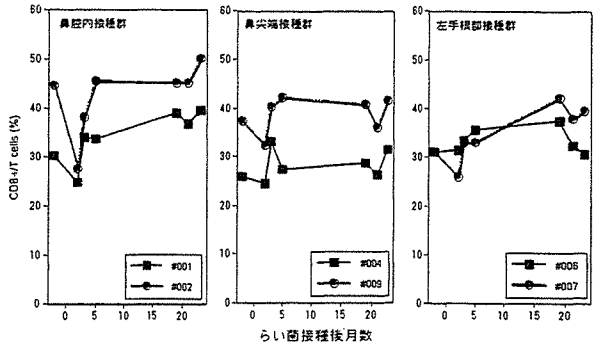


図5：らい菌接種後の末梢CD16+ NK細胞レベルの変化

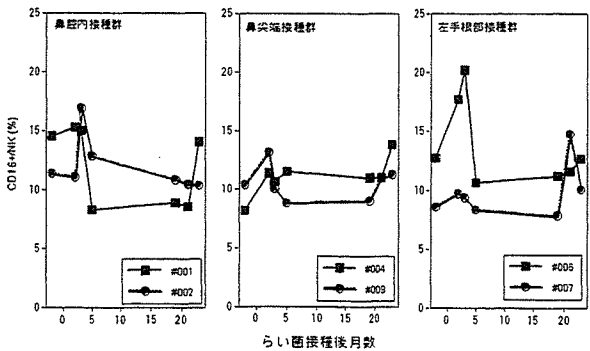


図6：らい菌接種後の末梢CD29+CD4 T細胞レベルの変化

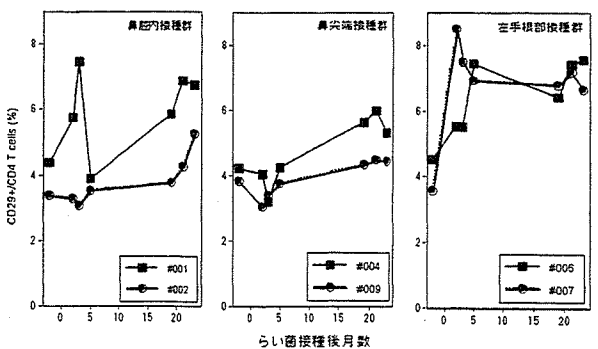


図7：らい菌接種後FAPで誘導される幼若化反応の変化

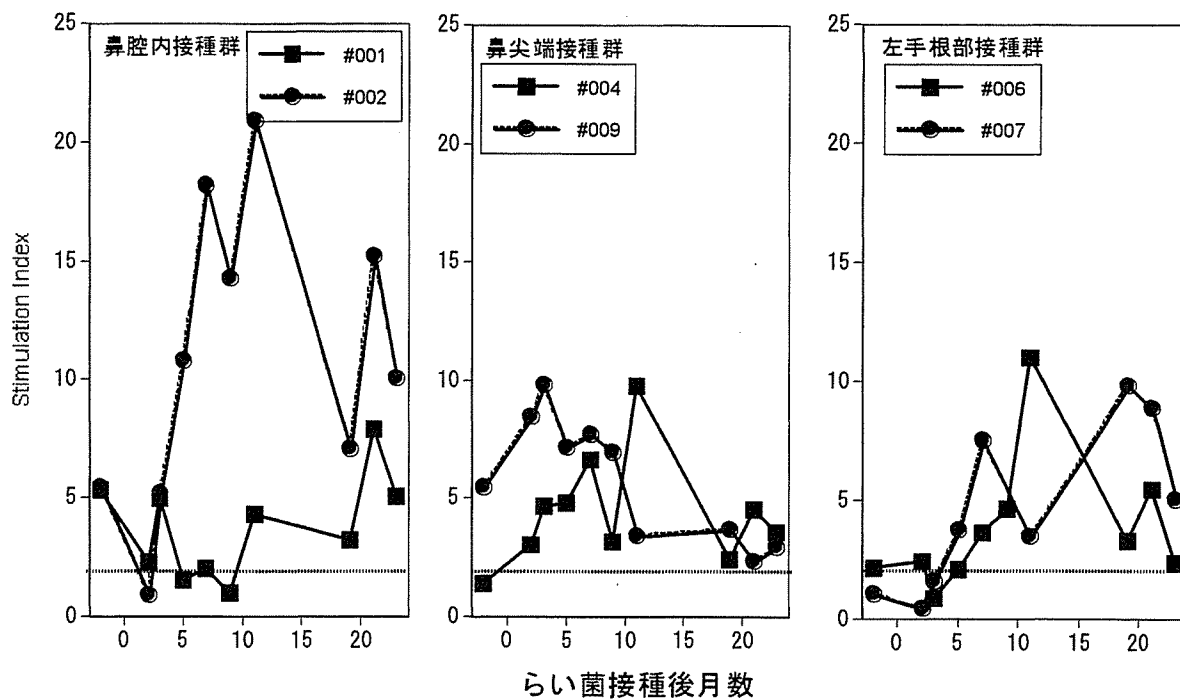




図8：らい菌接種後のLpKで誘導される幼若化反応の変化

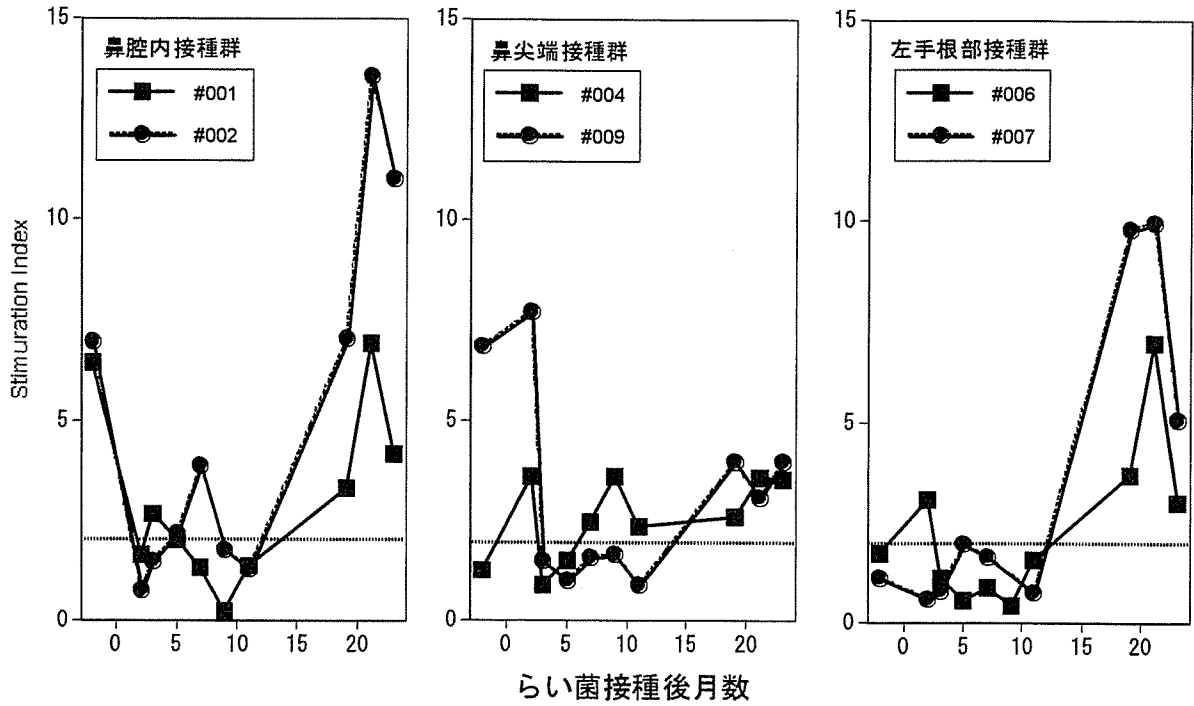


図9：らい菌接種後のMMPI-IIで誘導される幼若化反応の変化

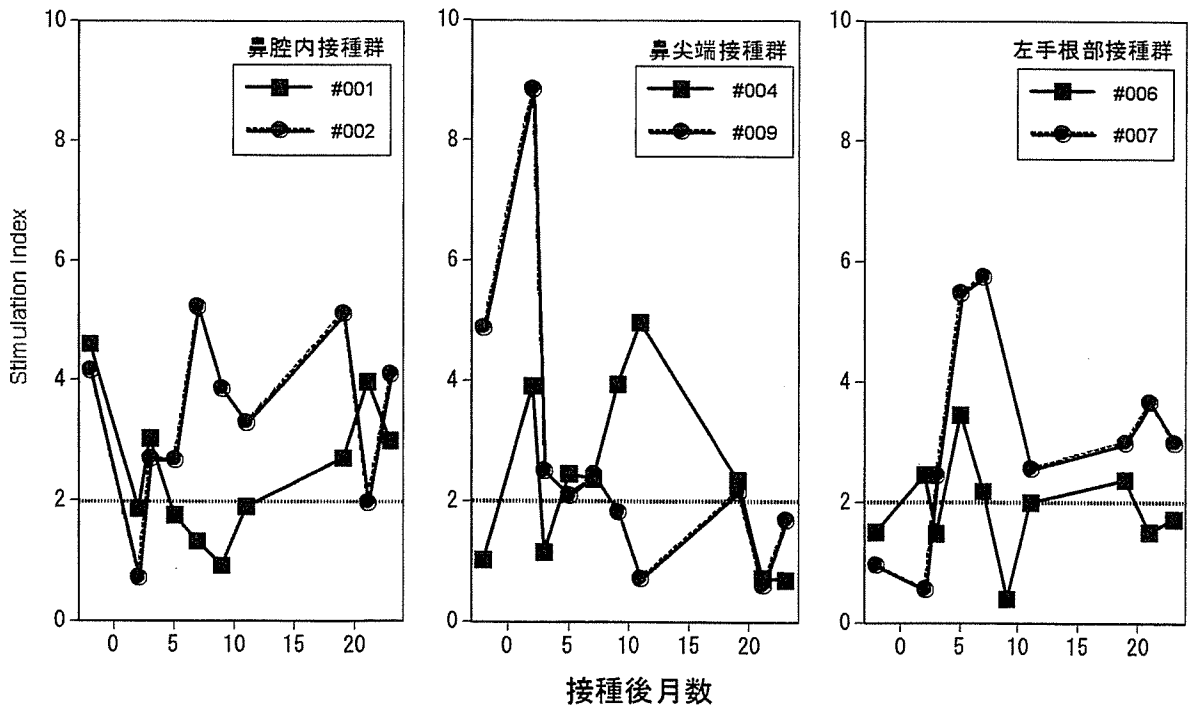
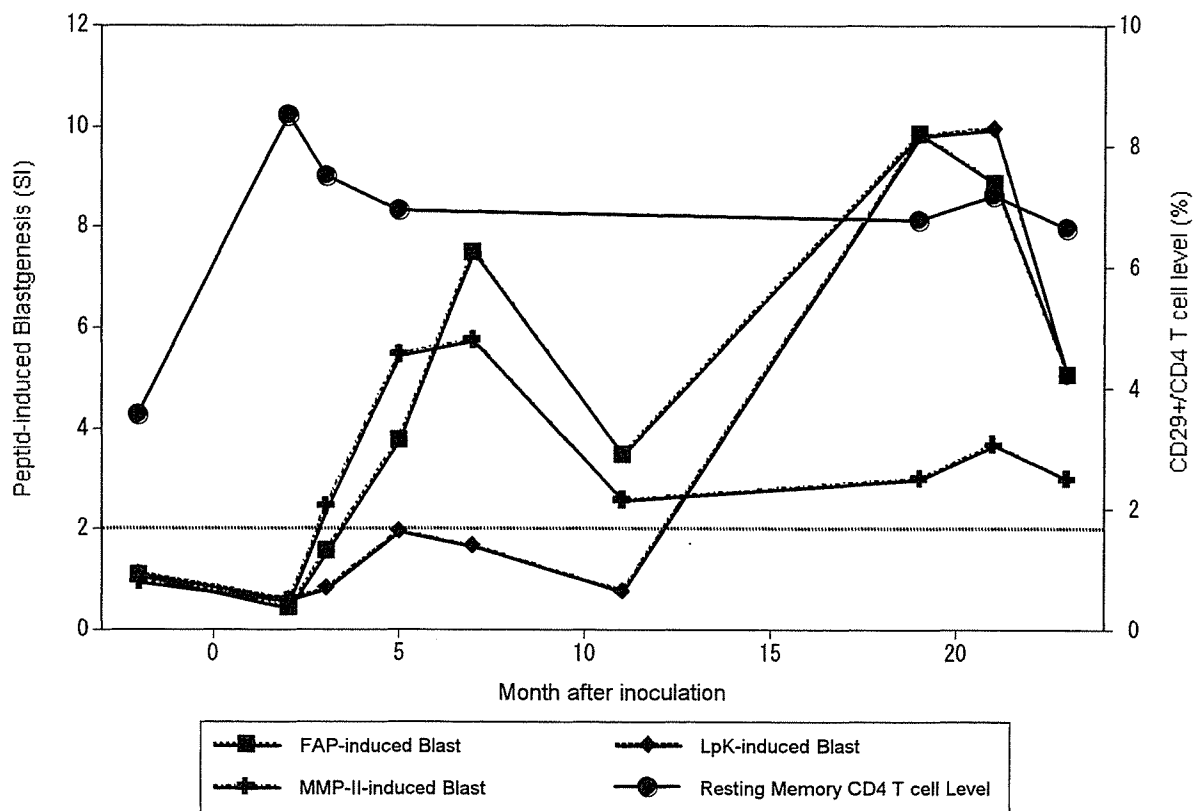


図10：#007での休止期記憶CD4陽性T細胞レベルとらい菌ペプチドで誘導される幼若化反応との関連



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

## ハンセン病診療のネットワーク構築に関する研究

平成18年度 分担研究報告書

分担研究者 石井 則久

（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

ハンセン病診療のネットワーク構築に関する研究

分担研究者 石井則久 国立感染症研究所ハンセン病研究センター  
生体防御部 部長

研究要旨：日本におけるハンセン病診療がスムーズに行われるようにネットワーク構築を目指した。ハンセン病診療の座右の書として作成した「ハンセン病アトラス 診断のための指針」を全国の大学皮膚科及び関係団体に配布し、診療の補助として活用するよう依頼した。また、60名の皮膚科医にハンセン病の講習会・実習を行い、ハンセン病患者・回復者の診療体制を依頼した。さらに、ハンセン病回復者が安心して一般病院を受診できるようにパンフレットを作成、一般医療機関の医師がハンセン病患者診療時に必要な知識のパンフレットを作成、両者のパンフレットを関係機関に配布し、ハンセン病診療がスムーズに行われるようにした。

A. 研究目的

日本におけるハンセン病診療がスムーズに行われるようにネットワークの構築を目指す。

B. 研究方法

ハンセン病診療に欠けている要素を抽出し、それらを補う資料や情報を提供する。また、ハンセン病の新規患者については、実際に診療方法、検査方法を指導し、主治医がハンセン病を理解し、自ら診療可能になるようにした。

C. 研究結果

ハンセン病患者の減少のため、皮膚科医が診療する機会が殆ど無いため、ハンセン病診療の座右の書として作成した「ハンセン病アトラス 診断のための指針」を全国の大学皮膚科及び関係団体に配布し、医局員や若い皮膚科医の教育に活用するようになった。

ハンセン病を診療するにあたり、回復者の心情と皮膚スメアテスト検査は必須であるが、皮膚科医は経験がないため、60名に対して講習会を実施した（参加者：皮膚科医57人、回復者2人、ソーシャルワーカー1人、資料のみの参加皮膚科医5人）。ハンセン病の知識、回復者の心情、皮膚スメア検査実習を実施し、知識・技術の伝達を行った。ハンセン病回復者は、過去の偏見・差別の歴史から、なかなか一般医療機関を受診する勇気がない。一般医療機関受診のチャンスを拡げるため、ハンセン病患者（回復者）向けパンフレットと医療者向けパンフレットを作成した。パンフレットには、気軽に相談可能な皮膚科医を29名記載した。全国の大学皮膚科、療養所（施設、自治会、ケースワーカー）、関係機関に配布し活用を依頼した。2006年には7名の新規ハンセン病患者がいた。全ての患者について、主治医に対して診療及び検査の指導を行った。6名の新規患