

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

啓発普及および難治性ハンセン病治療薬の開発

分担研究者 儀同政一 国立感染症研究所・ハンセン病研究センター生体防御部第4室長

研究要旨：難治性ハンセン病治療に対処するため新規抗らい菌薬の開発を行った。新規ニューキノロン系抗菌薬 DC-159a(第一三共)、新規リファマイシン系抗菌薬 rifabutin(RFB, Pfizer)と、テトラサイクリン系抗菌薬 doxycycline(DOXY)の *in vitro* 抗らい菌活性を、Buddemeyer 法を用い検討した。Thai-53 株に対する DC-159a と RFB の抗らい菌活性は、RFB ≧ RFP > DC-159a > MFLX > SPFX > GFLX > LVFX の順であった。RFB は RFP より 16~64 倍強い抗らい菌活性を示した。DC-159a は MFLX より強い抗らい菌活性を示した。また DOXY の抗らい菌活性は MINO より弱かった。多剤耐性らい菌 Zensho-4 株に対する抗らい菌活性は RFB > RFP > DC-159a > MFLX > SPFX の順であった。RFB は RFP と交差耐性を認めた。また Zensho-4 株に対する DC-159a の抗らい菌活性は、交差耐性を示さず Thai-53 株に対する MFLX とほぼ同等の強い抗らい菌活性を示した。RFB に RFP を凌ぐ強い抗らい菌活性を認めことから、治療期間の短縮または間欠併用療法への導入が期待される。DC-159a は、多剤耐性らい菌の治療に効果が期待される。

ハンセン病の啓発・普及のため 2000 年に作成したハンセン病治療指針に薬剤耐性検査、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、皮膚科医用簡易マニュアルを新たに加えるなど全面改訂を行ったハンセン病治療指針(第2版)を、医師・医療関係者を対象としたハンセン病医学夏期大学講座で講義するとともに啓発・普及を行った。

A. 研究目的

1) 難治性ハンセン病治療薬の開発

ハンセン病は、多剤併用療法の普及により有病率は低下したが、世界では今なお約 20 万人の新患発生があるばかりか、多剤耐性らい菌増加の問題も生じている。さらに PB で 6 ヶ月、MB で 1 年以上の長い治療期

間を要する。治療期間の短縮と薬剤耐性に対応するため、rifampicin (RFP)を除くと唯一らい菌に対し殺菌作用を持つニューキノロン系抗菌薬はハンセン病の治療薬として重要である。既存ニューキノロン系抗菌薬の中で強い抗らい菌活性を持つ sparfloxacin (SPFX)は、光線過敏症などの

副作用がある。8-methoxyquinolone である moxifloxacin (MFLX) と gatifloxacin (GFLX)は、抗らい菌活性が強く、光線過敏症などの副作用が少ないが、オフロキサシン(OFLX)耐性らい菌に対し交差耐性を示す。OFLX 耐性らい菌に対し強い抗らい菌活性を持ち、光線過敏症などの副作用が少ない新規ニューキノロン系抗菌薬の開発が求められている。

DC-159a は、キノロン骨格の7位にスピロ型二環性アミノピロピリジン基、8位にメトキシ基を導入することで、強い抗菌力と光毒性などの安全性を重視し、またキノロン耐性、RFP 耐性菌対策を目的に第一三共で開発された新規 8-methoxyquinolone である。

ハンセン病の多剤併用療法(MDT)で最も重要で強い抗らい菌活性を示す抗菌薬は RFP である。しかし近年 RFP 耐性らい菌の発現によりハンセン病の治療が困難になっていることから、RFP より強い新規リファマイシン系抗菌薬の開発が求められている。rifabutin (RFB)は、リファマイシン S からナフタレン環の3位と4位にスピロペリジル基を導入することで強い抗抗酸菌活性を持つことから抗酸菌症対策を目的に Pfizer 社で開発された半合成アンサマイシン系抗菌薬である。

テトラサイクリン系抗菌薬の中で強い抗らい菌活性を示す薬剤は minocycline (MINO)のみであることから、MINO より強い新規テトラサイクリン系抗菌薬の開発が求められている。doxycycline (DOXY)は、1日1回の投与で血中半減期が12時間と長く、長時間高い血中濃度が得られ、組織移行性に優れ、連続投与しても過剰蓄積をきたしにくいテトラサイクリン系抗菌薬である。

2) 啓発普及

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・改定作業を行った。この改訂では、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。1996年にらい予防法が廃止され、これに伴いハンセン病の新規患者は一般医療機関で保険診療が行われることになった。ハンセン病の新患を初めて経験する臨床医や医療関係者への啓発・普及が求められている。

B. 研究方法

難治性ハンセン病治療薬の開発

1) らい菌(Thai-53株、Zensho-4株)：ヌードマウス(BALB/c)足蹠より集菌・精製し、Shepard法により菌数計算後所定の濃度に希釈し実験に用いた。

2) 抗菌薬：DC-159a(第一三共)、rifabutin (RFB, Pfizer), moxifloxacin (MFLX, バイエル薬品)、sparfloxacin (SPFX, 大日本住友製薬)、gatifloxacin (GFLX, 杏林製薬)、levofloxacin (LVFX, 第一三共)は、各製薬会社から原末の提供を受けた。minocycline (MINO)、rifampicin (RFP, 和光純薬)は、市販品を用いた。DC-159a, RFB, DOXYの構造式を図1に示す。

3) Buddemeyer法：4mlのガラスバイアル中に7H12培地中にらい菌(Thai-53株またはZensho-4株)とRFB, RFP, DC-169a, MFLX, SPFX, GFLX, LVFXの抗菌薬

(Thai-53 株・・QLs: 32, 8, 2, 0.5, 0.125 μ g/ml, RMs: 32, 8, 2, 0.5, 0.125, 0.031, 0.0078 μ g/ml)、(Zensho-4 株・・QLs: 32, 8, 2, 0.5, 0.125 μ g/ml, RMs: 32, 8, 2, 0.5, 0.125, 0.031 μ g/ml)を加えよく混合する。このガラスバイアルのキャップを緩く締め、32°Cの炭酸ガス培養器で4日間培養後、¹⁴C-パルミチン酸(1 μ Ci)を加え混合後、再びキャップを緩く締めたガラスバイアルを、NaOH-シンチレータで処理済みろ紙片を入れたプラスチックバイアルに入れキャップを強く締める。さらに32°Cの培養器で7日間培養を継続し、発生した¹⁴CO₂量を液体シンチレーションカウンターで測定し、各抗菌薬の抗らい菌活性を求めた。

DC-159a, RFBの抗らい菌活性をRFP, MFLX, SPFX, GFLX, LVFXと比較検討した。DOXYの抗らい菌活性をMINO, CAM, MFLX, RFPと比較検討した。

多剤耐性らい菌(Zensho-4)に対するDC-169aとRFBの抗らい菌活性をRFP, MFLX, SPFXと比較検討した。

(倫理面での配慮)

使用マウスは、頸骨脱臼により安楽致死させてから所定の実験に用いた。

啓発普及

ハンセン病治療指針(第2版)を用いて臨床医や医療関係者を対象とした2007年ハンセン病医学夏期大学講座などで講義するとともに啓発・普及を行った。

C. 研究成果

難治性ハンセン病治療薬の開発

1) らい菌 Thai-53 株に対する DC-159a, RFB および DOXY の抗らい菌活性

DC-159a の抗らい菌活性は、DC-159a > MFLX > SPFX > GFLX > LVFX (図2) の

順で、RFB の抗らい菌活性は RFB >> RFP > MFLX (図3) の順で、DOXY の抗らい菌活性は、MFLX > CAM > MINO > DOXY (図4) の順であった。DC-159a は MFLX より強い抗らい菌活性を示した。RFB は RFP より 16~64 倍強い抗らい菌活性を示した。また DOXY の抗らい菌活性は MINO より弱かった

2) 多剤耐性らい菌(Zensho-4)に対する抗らい菌活性

多剤耐性らい菌(Zensho-4 株)に対する抗らい菌活性は DC-159a > MFLX > SPFX (図5)、RFB > RFP (図6)の順であった。Zensho-4 株に対する DC-159a の抗らい菌活性は、Thai-53 株に対する MFLX とほぼ同等の強い抗らい菌活性を示した。また RFB は RFP と交差耐性を認めた。

啓発普及

ハンセン病治療指針(第2版)を用いて臨床医や医療関係者を対照とした2007年ハンセン病医学夏期大学講座の受講生に講義するとともに啓発・普及を行った。

D. 考察

難治性ハンセン病治療薬の開発

1) ハンセン病は、PBで6ヶ月、MBで1年に及ぶ長い治療期間のためDDSとRFP耐性が増加しつつある。また抗らい菌活性の弱い ofloxacin の単剤または低用量長期投与によるキノロン耐性も増加しつつある。抗らい菌活性を示す抗菌薬は、DDS, B663, RFP とニューキノロン系では MFLX, SPFX, GFLX, LVFX, OFLX、マクロライド系では clarithromycin、テトラサイクリン系では minocycline に限られている。治療期間の短縮と薬剤耐性に対応するため臨床から新規抗らい菌薬の開発が求められてい

る。特にらい菌に対し殺菌作用を示す新規ニューキノロン系とリファマイシン系抗菌薬の開発は重要である。

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。光線過敏症の軽減を目的に 8-methoxyquinolone は開発された。MFLX は、SPFX より強い抗らい菌活性を持つが、キノロン耐性らい菌に交差耐性を示す。

3) 新規ニューキノロン系抗菌薬

DC-159a に Buddeneyer 法で、既存ニューキノロン中で最も強い MFLX より強い抗らい菌活性を認めた。DC-159a は優れた組織移行性、高い血中濃度と長い血中半減期を合わせ持つ新規 8-methoxyquinolone で、血中半減期が 11 時間 (5mg/kg 空腹時単回経口投与, monkeys) と長いことから、1 日 1 回投与が可能である。また DC-159a 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が低く、MFLX より長い後抗生物質効果を持つなど優れた薬理学的特徴を持つ新規ニューキノロン系抗菌薬としてハンセン病の治療に貢献すると考える。

4) rifabutin (RFB) は、リファマイシン S からナフタレン環の 3 位と 4 位にスピロペリジル基を導入することで 45 時間と長い血中半減期を持ち、また脂肪親和性が高く、全身に分布し、細胞内に多く取り込まれ、その主代謝物 25-O-desacetyl 体も RFB と同等の抗菌活性が半合成アンサマイシン系抗菌薬である。RFB は、リファマイシン系抗菌薬の中で抗らい菌活性が最も強い薬剤で、血中半減期が 45 時間 (300 mg 空腹時単回経口投与) と長いことから、患者負担を軽減するなど治療期間の短縮、間欠併用

療法への導入が期待される。

5) 多剤耐性らい菌 (Zensho-4 株) に対し DC-159a はキノロン耐性菌に対し交差耐性を示さず、強い *in vitro* 抗らい菌活性を認めたことから、DC-159a の多剤耐性患者に対する臨床使用が示唆された。RFB の RFP 高度耐性らい菌 (Zensho-4) に対する抗らい菌活性は、交差耐性であることを認めた。

啓発普及

1996 年にらい予防法が廃止され、これに伴いハンセン病の新規患者は一般医療機関で保険診療が行われることになった。ハンセン病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。ハンセン病の新患を初めて経験する臨床医や医療関係者に役に立つ指針になることを目的として作成したこのハンセン病治療指針 (第 2 版) を更なる啓発・普及が求められている。

E. 結論

1) DC-159a は、ニューキノロン中で最も強い抗らい菌活性を示した。また DC-159a は、OFLX 耐性らい菌 (Zensho-4 株) に対し交差耐性を示さず強い抗らい菌活性を認めたことからキノロン耐性患者への応用が示唆された。

2) RFB は、RFP より 16~64 倍強い抗らい菌活性を示したことから、患者負担軽減のため治療期間の短縮、間欠併用療法への導入が示唆された。多剤耐性らい菌に対し交差耐性を認めた。

3) 2007 年ハンセン病医学夏期大学講座で、臨床医と医療関係者にハンセン病治療指針を講義するとともに啓発・普及を行った。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 儀同政一：Moxifloxacin, garenoxacin の抗らい菌活性、第 80 回日本ハンセン病学会総会(横浜, 2007)、日本ハンセン病学会雑誌、76:139,2007.

2) 儀同政一：新規ニューキノロン系抗菌薬の構造式と抗らい菌活性の相関、第 55 回日本化学療法学会総会(仙台, 2007)、日本化学療法学会雑誌、55 S・A:157,2007.

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. Chemical structures of DC-159a, RFB and DOXY

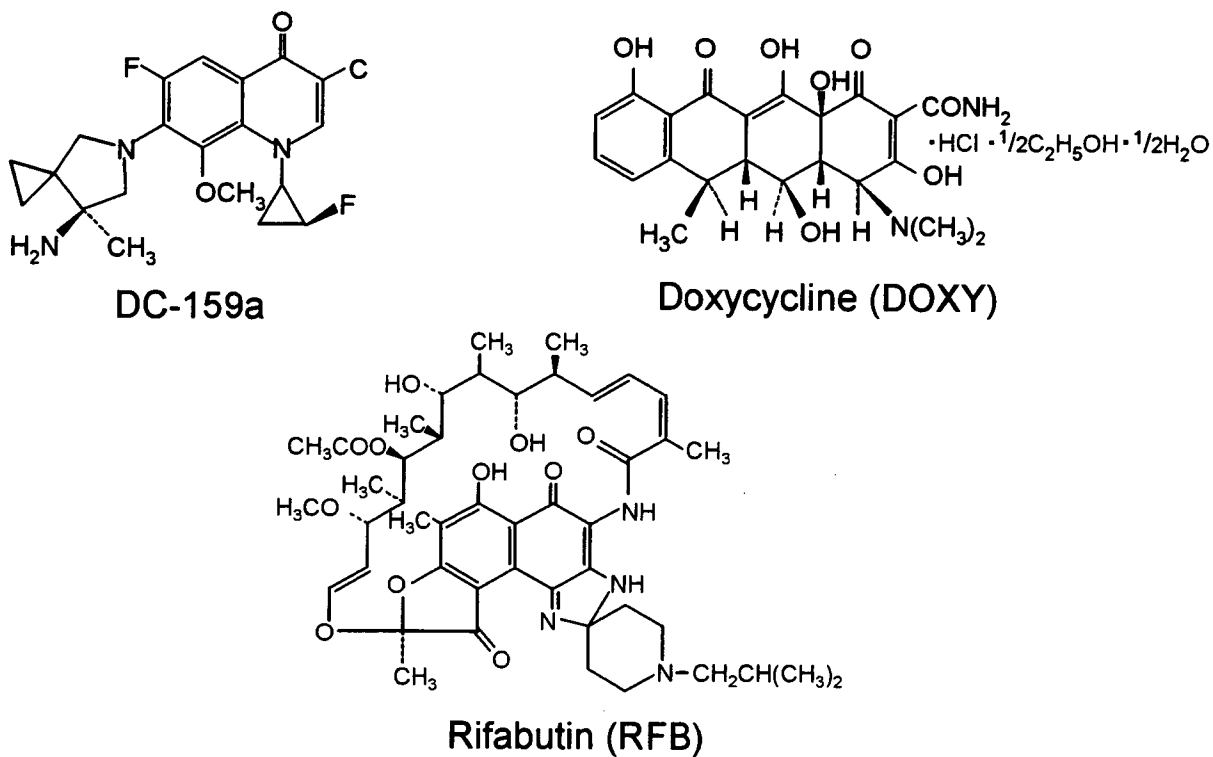


Fig. 2. *in vitro* activities of DC-159a against *M. leprae*

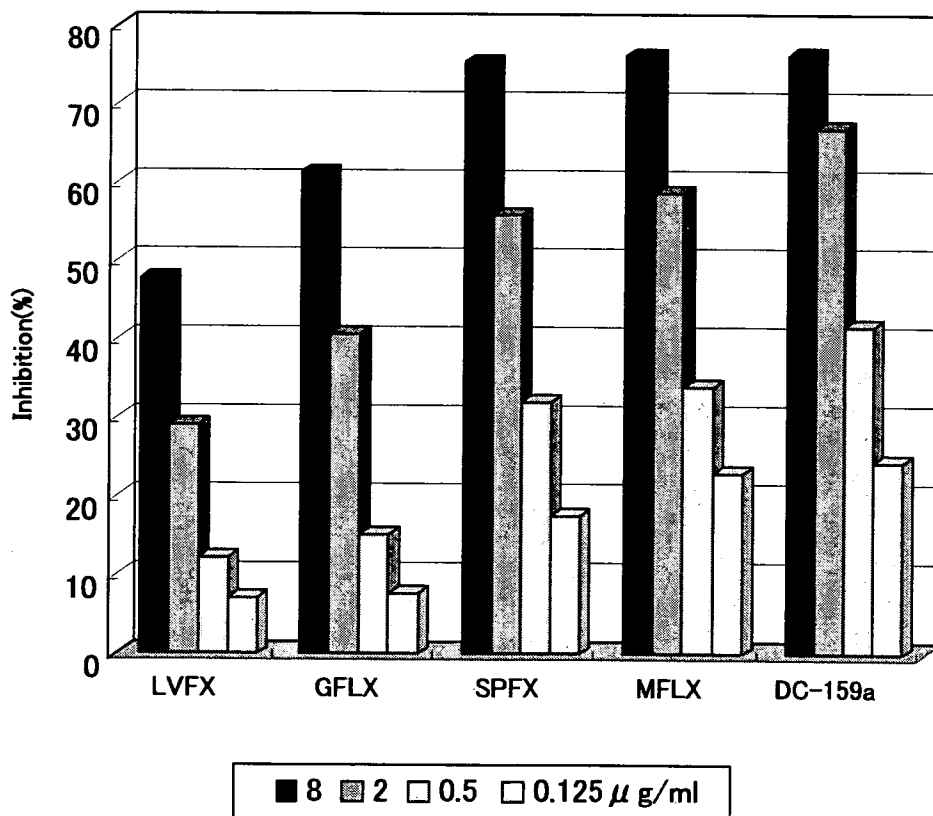


Fig. 3 *In vitro* activities of rifabutin against *M. leprae*

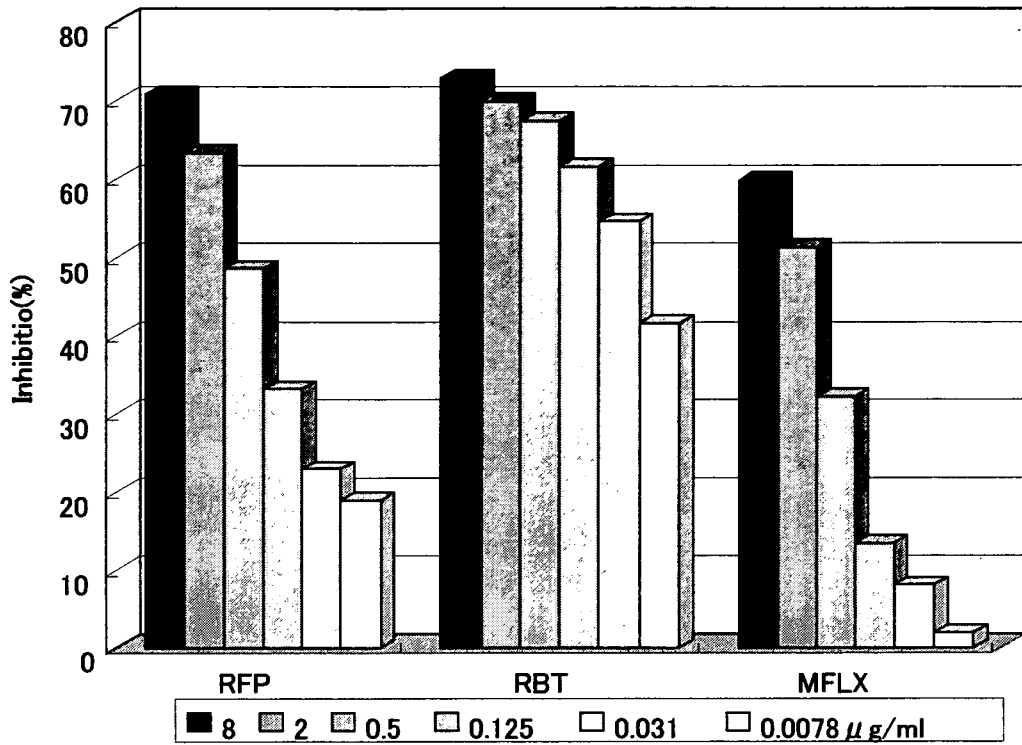


Fig. 4 *in vitro* activities of Doxycycline against *M. leprae*

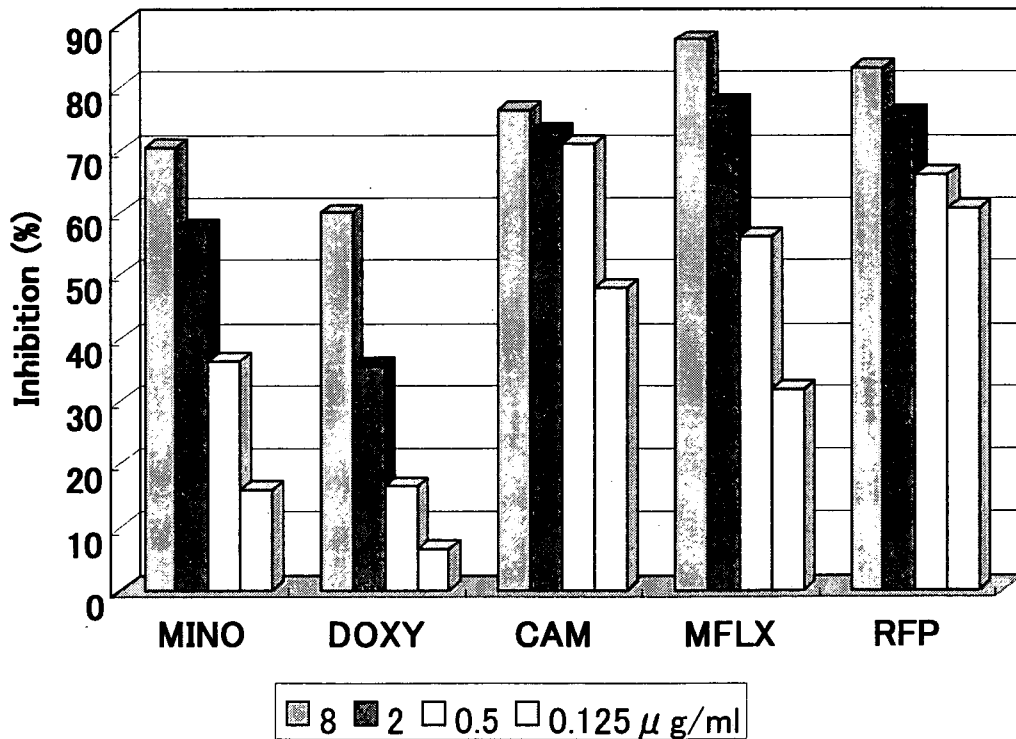


Fig.5. *in vitro* activities of new quinolones against *M. leprae*

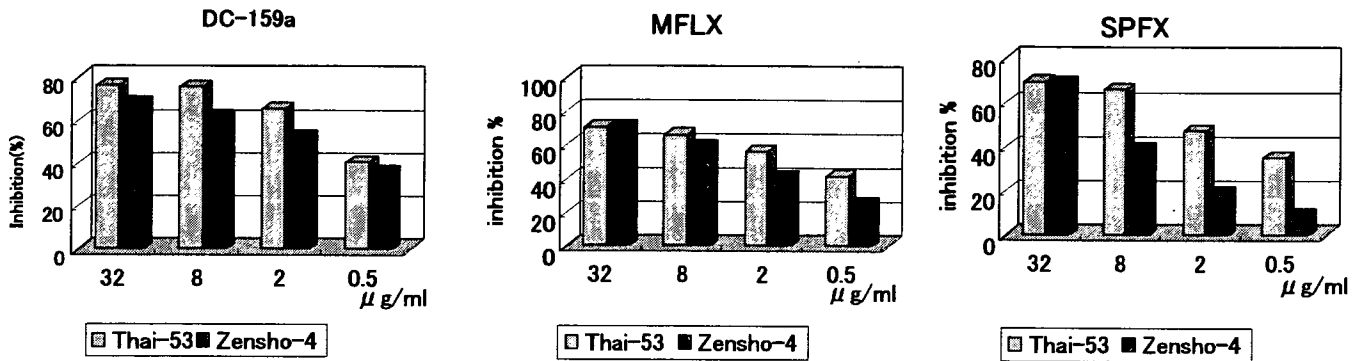
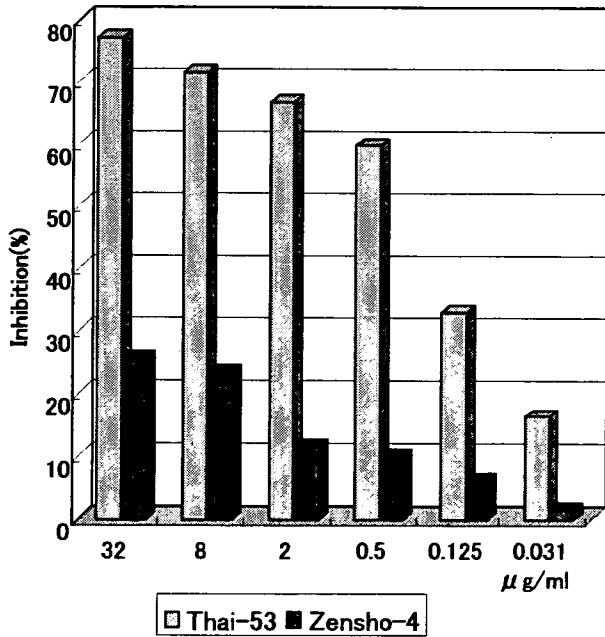
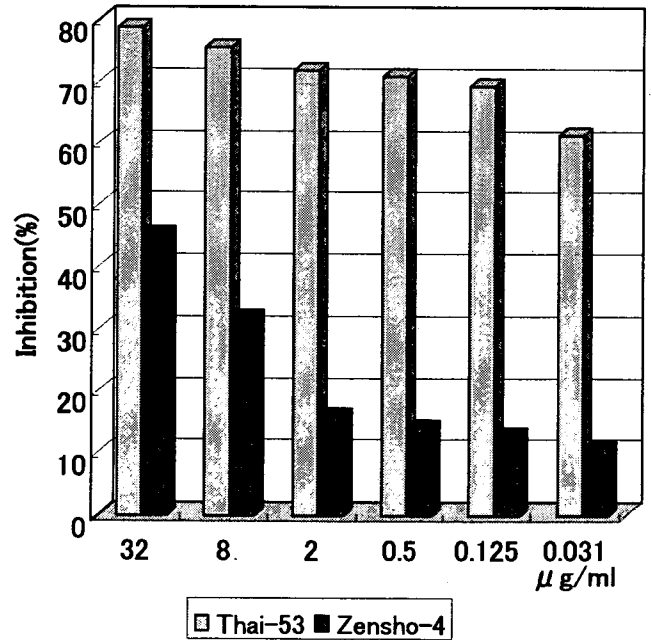


Fig. 6

in vitro activities of rifampicin against *M. leprae*



in vivo activities of rifampicin against *M. leprae*



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 19 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)

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て、らい菌が寄生して増殖するヒト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、35 度で培養するとらい菌の代謝活性が 2 週間以上持続することを見出し、さらに IFN γ 存在下で培養した M-CSF 誘導マクロファージに抗らい菌活性(らい菌の代謝活性減少)が誘導され、この時スーパーオキシドを産生する NADPH オキシダーゼの発現が増強していることが判明した。一方、マウスマクロファージにおいては同細胞が産生する酸化窒素が殺菌分子として重要であるが、ヒトマクロファージにおいては酸化窒素の関与は少ないことが判明した。

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で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 μ g/ml 含有 10%ウシ胎児血清(FBS)-RPMI1640 または DMEM 培地に浮遊させ、 1×10^6 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からの承認を得ており、倫理面への配慮を行った。

ヒトマクロファージの培養:健常人末梢血より 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 (2×10^4 /well)、またはカバースリップの入った 24 穴プレートウェル中 (2×10^5 /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 M-CSF もしくは GM-CSF を加えた 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、 3.3×10^7 個/ml に調整し 300 μ l づつ (らい菌 1×10^7 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β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1μCi/mlの1-¹⁴C-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。

ウエスタンブロッティング: らい菌感染ヒトマクロファージにIFN γ を添加し、5%CO₂存在下で35度にて一定期間培養した後Sigma社製cellytic M溶液にて細胞を可溶化してlysateを得た。SDS電気泳動を行ってlysateから分離したタンパクをさらにPVDF膜に転写、各種抗体(抗phox抗体(Cell Signal Technology社)、抗iNOS抗体、抗SOD抗体、抗カタラーゼ抗体(Santa Cruz社))を4度にて一晚反応させ、次

にHRP標識二次抗体を反応させ化学発光によるX線フィルムへの露出で各種タンパクを検出した。検出後はPVDF膜をstripping buffer(Pierce社)に浸して振とうさせて抗体を除去し再度抗体を反応させて別のタンパク検出を行った。

C. 研究結果

われわれは、脱カルボキシル化代謝反応(β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きた。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。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(昨年度報告)。同様に、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、一晚らい菌存在下で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 γ 存在下の培養で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 γ 未添加群との間で有意な差はみられないが、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(昨年度報告)。

次に、35度で培養したらい菌感染ヒト M-マクロファージにおいて phox(phagosome oxidase)タンパクの発現を Western blot 法により調べたところ、IFN γ 添加により p22-phox の発現が著明に増加した(Fig.1)。一方、p67-phox の発現には変化がなかった。さらに、M-マクロファージと GM-マクロファージを比較したところ、M-マクロファージでは IFN γ 刺激で p22-phox 発現が増強したが、GM-マクロファージでは変化がなかった。一方、スーパーオキシドをスカベンジするスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)の発現には両マクロファージ共に変化がないか減少傾向が認められた(Fig.2)。興味あることにらい菌感染マクロファージには 27kDa あたりを中心として、らい菌由来と思われる SOD のバンドがブロードにみられた(Fig.2)。次に、M-マクロファージをらい菌ならびに IFN γ で刺激した。その結果、p22-phox の発現はある程度増強したが p47-phox は IFN γ 刺激により著明に増強し、また、らい菌刺激によりさらに発現が増強した(Fig.3)。SOD 発現は変化せずカタラーゼは検出できなかった(Fig.3)。マウスマクロファージでは IFN γ による活性化で誘導型酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現が著明に増強するが、ヒトマクロファージでは上清中の酸化窒素 NO が増えもしないし、iNOS の発現増強もみられなかった(Fig.4)。

サイトカイン産生については、らい菌と IFN γ 刺激により M-マクロファージからは TNF 産生が強く起こり IL-10 産生が抑制された(Fig.5)。そして、TNF と IFN γ の同時

刺激で p22-phox の著明な誘導がみられた(Fig.6)。

D. 考察

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度といわれている。in vitroでの radiorespirometryを用いた実験でも30～33度が適温であることを報告した。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。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。

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量を測定したり、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 γ 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 γ 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小菌型である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 γ 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 γ によって酸化窒素合成酵素が強発現誘導され、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おらず、われわれの結果でもIFN γ でiNOSが誘導できなかった。以前よりマクロファージの産生するH₂O₂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。スーパーオキシド産生はNADPHオキシダーゼによって酸素分子に電子が付加される反応で起こる。NADPHオキシダーゼは主にファゴゾーム膜に局在するgp91-phoxタンパクとp22-phoxタンパク、そして細胞質に存在するp47-phoxタンパクとp67-phoxタンパクそれぞれのサブユニットからなり、活性化に伴い細胞質の2つのタンパクは細胞質からファゴゾーム膜に移動しファゴゾーム膜上の2つのタンパクと複合体を形成すると報告されている。われわれの観察結果ではヒトM-マクロファージのIFN γ 刺激でいくつかのphoxタンパクが著明に増強することが判明した。SODはスーパーオキシドをスカベンジする酵素であるがSODの発現は変化しなかったことから、IFN γ 添加によりphox発現が著明に増加することがTT型ハンセン病にみられるような殺菌作用の増強

につながることを示唆された。また、ヒトマクロファージの殺菌においてNOの関与は少ないと思われた。

E. 結論

IFN γ 存在下で培養したM-CSF誘導マクロファージに抗らい菌活性が誘導され、この時スーパーオキシドを産生するNADPHオキシダーゼの発現が増強していることが判明した。一方、マウスマクロファージにおいては酸化窒素が殺菌分子として重要であるが、ヒトマクロファージにおいては酸化窒素の関与は少ないことが判明した。

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*. *Microbes and infection* 9:70-77, 2007.

Yumi Maeda, Tetsu Mukai, Masanori Kai, Yasuo Fukutomi, Hiroko Nomaguchi, Chiyoji Abe, Kazuo Kobayashi, Seigo Kitada, Ryoji Maekura, Ikuya Yano, Norihisa Ishii, Toru Mori and Masahiko Makino: Evaluation of Major Membrane Protein-II as a Tool for Serodiagnosis of Leprosy. *FEMS Microbiol Lett.* 1272:202-5, 2007.

2. 学会発表

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

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 2007年3月、大阪

福富康夫・前田百美・牧野正彦クロファジンによるマクロファージの細胞死とcaspase活性化、第80回日本ハンセン病学会総会、横浜、2007年5月

Yasuo Fukutomi, Yumi Maeda and Masahiko Makino: Clofazimine-induced cell death in human and mouse macrophages. 42th Tuberculosis and Leprosy Research Conference organized by US-Japan Cooperative Medical Science Program. Zhengzhou, China, Sept. 2007.

Yasuo Fukutomi and Masahiko Makino: Induction of anti-*M.leprae* response in human macrophages. 第37回日本免疫学会総会・学術大会、2007年11月.

Yasuo Fukutomi, Yumi Maeda and Masahiko Makino: Clofazimine-induced cell death in macrophages. 17th

International Leprosy Congress, Hyderabad, India, Jan 30- Feb 4, 2008.

Masanori Kai, Yumi Maeda, Yasuo Fukutomi and Masahiko Makino: Search for *Mycobacterium leprae* antigens for sero-diagnosis. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, Jan 30- Feb 4, 2008.

Masanori Kai, Nguyen Phuc Nhu Ha, Yasuo Fukutomi, Yuji Miyamoto, Yumi Maeda, Tetsu Mukai, Nguyen Thanh Tan and Masahiko Makino: Application of new serological test for leprosy in Vietnam. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, Jan 30- Feb 4, 2008.

Maeda Y, Tamura T, Fukutomi Y, Kai M, Makino M, Lipopeptide (LipoK) of *Mycobacterium leprae* activates antigen presenting cells and type I T cells. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, Jan 30- Feb 4, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Fig.1. Western blot analysis of human M-macrophages

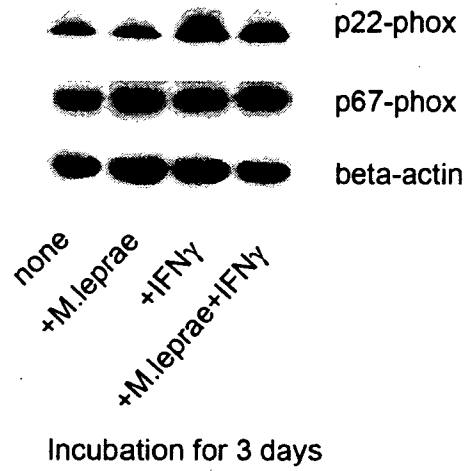


Fig.2. Western blot analysis of SOD and phox expression in human M- and GM-macrophages

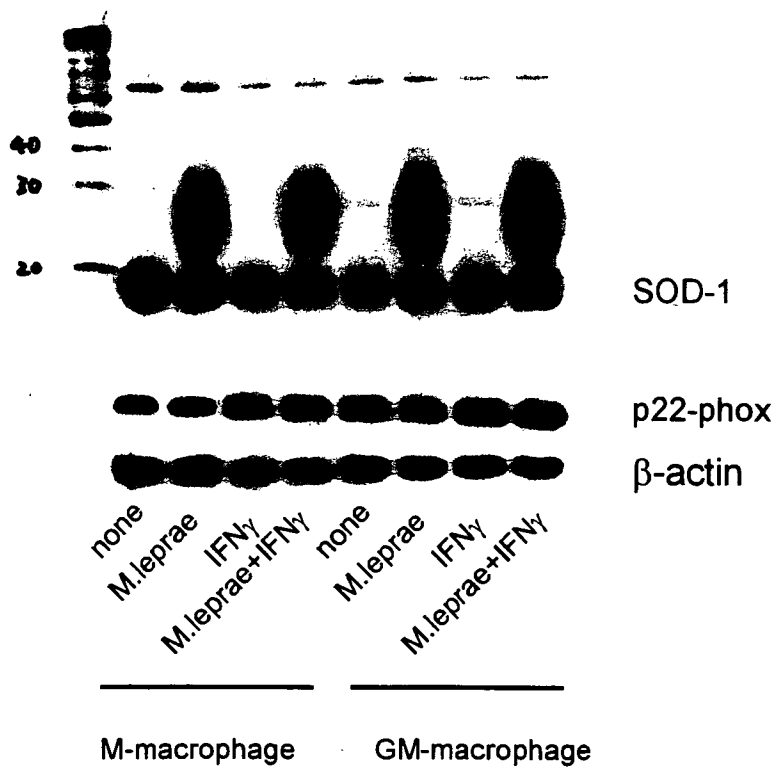


Fig.3. NADPH oxidase expression in human M-macrophages by stimulation with *M.leprae* and IFN- γ

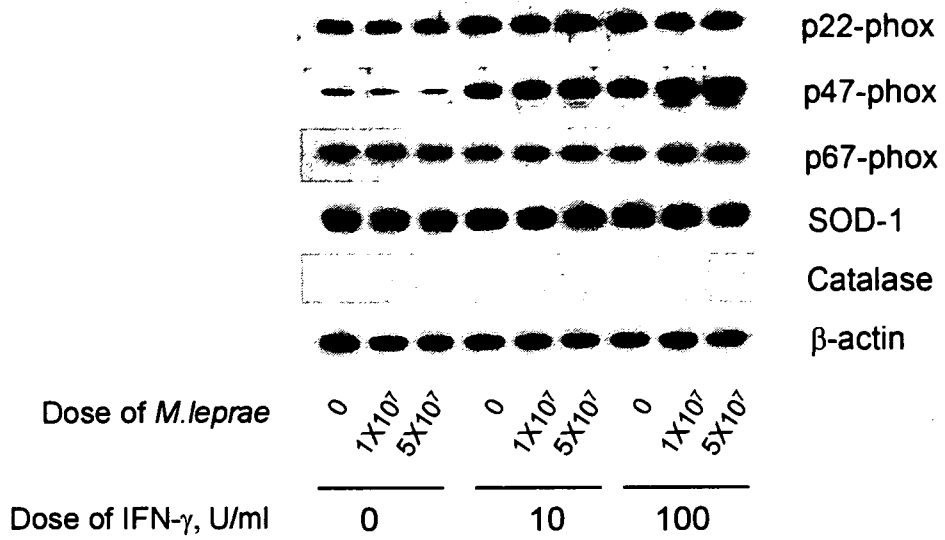


Fig.4. Western blot analysis of iNOS expression in human macrophages at 72 hr incubation

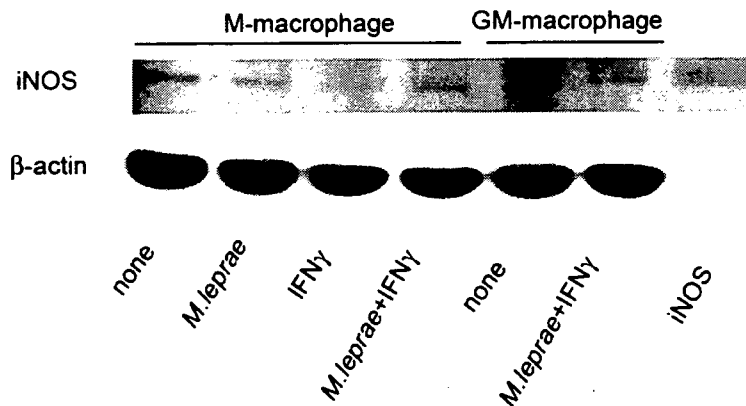


Fig.5. Cytokine production in human macrophages infected with *M.leprae*

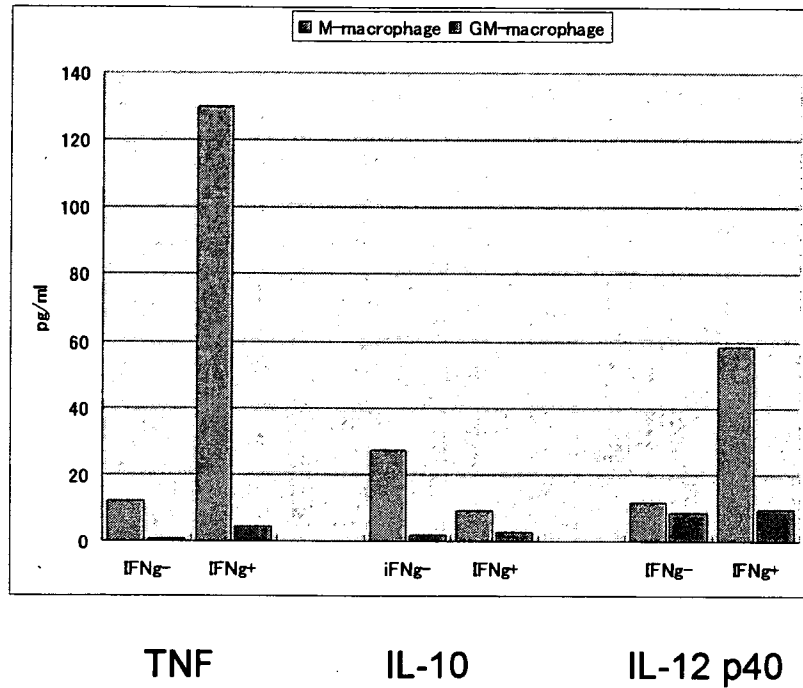
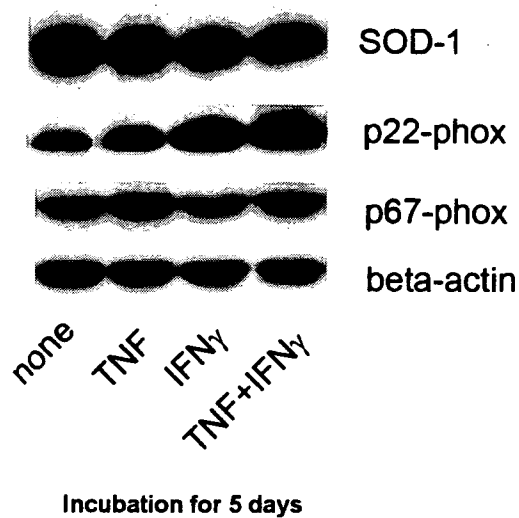


Fig.6. Western blot analysis of SOD and phox expression in human M-macrophages



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 19 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、その役割を検討した。LipoK は TLR2 を認識して樹状細胞を活性化し、T 細胞から有意に IFN- γ を産生することを報告した。本年度は、パーフォリン産生能に着目し、樹状細胞、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の役割に焦点をあて検討を加えた。樹状細胞を LipoK 及びらい菌で刺激し、T 細胞と混合培養すると、CD8 陽性 T 細胞からパーフォリン及びグランザイム B 産生が有意に増強した。培養インサートを用いて検討した結果、CD4 陽性細胞との間接的共存培養が必要であると考えられた。パーフォリン及びグランザイム B は、らい菌感染細胞を破壊するために重要であると考えられる。従って、LipoK は免疫療法分子として活用でき、標的感染細胞を死滅させることより自己防御に働く可能性が示唆された。

A. 研究目的

らい菌のリポ蛋白 LpK の N 末端部分が重要であるが、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。LipoK により成熟した樹状細胞が抗原を T 細胞に提示し、活性化することを明らかにした。

生体防御において感染した細胞を破壊するため、CTL 細胞の果たす役割が大きい事が知られている。CTL は、標的細胞に接触すると、パーフォリン(perforin)を分泌し、細胞膜に孔をあける。また、グランザイム(granzyme)は細胞障害性 T 細胞

の顆粒内に存在し、標的細胞の破壊に関与する蛋白分解酵素である。つまり、CTL はパーフォリンによって標的細胞表面に孔を開け、そこからグランザイムを注入し標的細胞を破壊する(図 1)。今回 LipoK における、CD8 陽性 T 細胞からのパーフォリン及びグランザイム B の産生能及び CD4 陽性 T 細胞の役割を検討した。

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)は 25mg/ml の濃度で -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- γ , IL-2 産生) を指標に分析した。CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞は Human T Lymphocyte Enrichment Set (BD) を用いて精製した。IL-12、IL-2 及び IFN- γ の測定は BD Pharmingen の OptEIA キットを用いて ELISA 法により半定量化した。パーフォリン、グランザイム B 産生 T 細胞は、FACS Calibur を用い以下の方法で定量した。樹状細胞-T 細胞培養後、5 日目に Golgi stop (BD) を添加し、18 時間後に細胞を回収し intracellular 染色を標識抗体により解析した。

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

末梢血単球から分化した樹状細胞を LipoK で刺激すると、IL-12 を産生し、自己 T 細胞を活性化することを報告してきた。今回、CTL 活性に重要なパーフォリンまたはグランザイム産生機構を解明する事を試みた。LipoK をらい菌感染樹状細胞にパルスすると、自己の CD8 陽性 T 細胞内パーフォリン産生能が増加した (図 2)。LipoK 存在下では、蛋白分解酵素であるグランザイム B 産生細胞数も増加した (CD8 陽性 T 細胞内の 19.8%)。らい菌のみでは

パーフォリンまたはグランザイムが産生されないことから、脂質部分を持つ LipoK が TLR2 を介し、これら物質の産生に重要な役割を果たしていると考えられた。つぎに CTL 活性に CD40-CD40L の相互作用の関与を調べるため、CD40L の発現を検索した。CD8 陽性 T 細胞は有意に CD40L を発現していたが (図 3)、CD40 の中和抗体を用いても、パーフォリン産生には変化が見られなかった。

CTL 活性に、CD4 陽性細胞の共存は必須であるかを確認するため、培養インサートを用いて実験を行った (図 4)。その結果、パーフォリン及びグランザイム B 産生が低下していたことから、CD4 陽性細胞との間接的共存培養が必要であると考えられた。リコンビナント IL-2 を大量 (100U/ml) に樹状細胞-CD8 陽性 T 細胞培養中に添加すると CD4 の不足が補えることが明らかとなった。

D. 考察

LipoK は、樹状細胞を成熟し、らい菌抗原を 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。さらに LipoK は TLR2 を認識し、パーフォリン及びグランザイム B を分泌する CD8 陽性 T 細胞数増加を促進した。そのために、CD4 陽性 T 細胞の存在は重要であった。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、CD4 陽性 T 細胞