

存在下で、CTL 活性を誘導しパーフォリン産生を促し、グランザイム B の分泌を促した。これら物質は感染細胞を破壊するために、重要であると考えられる。したがって、LipoK は免疫療法分子として活用し、さらに、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) Maeda Y, Mukai T, Kai M, Fukutomi Y, Nomaguchi H, Abe C, Kobayashi K, Kitada S, Maekura R, Yano I, Ishii N, Mori T, and Makino M. Evaluation of major membrane protein-II as a tool for serodiagnosis of leprosy. *FEMS Microbiol Lett* 2007, 272: 202-205
- 2) Kai M, Fujita Y, Maeda Y, Nakata N, Izumi S, Yano I, and Makino M. Identification of trehalose dimycolate (cord factor) in *Mycobacterium leprae*. *FEBS Lett* 2007, 581: 3345-3350.

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) Fukutomi Y, Maeda Y and Makino M, Clofazimine-induced cell death in macrophages. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, Jan 30- Feb 4, 2008.
- 3) Fukutomi Y, Maeda Y, Makino M, Clofazimine-induced cell death in human

and mouse macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 42nd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zhengzhou, China, Sept 11-14, 2007.

- 4) 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
- 5) 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦, ハンソン病におけるマクロファージのサイトカイン産生調整機構, 第 80 回日本細菌学会総会 2007 年 3 月, 大阪
- 6) 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, 抗酸菌糖脂質生合成における fucose 転移酵素遺伝子の解析 第 80 回日本細菌学会総会 2007 年 3 月, 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

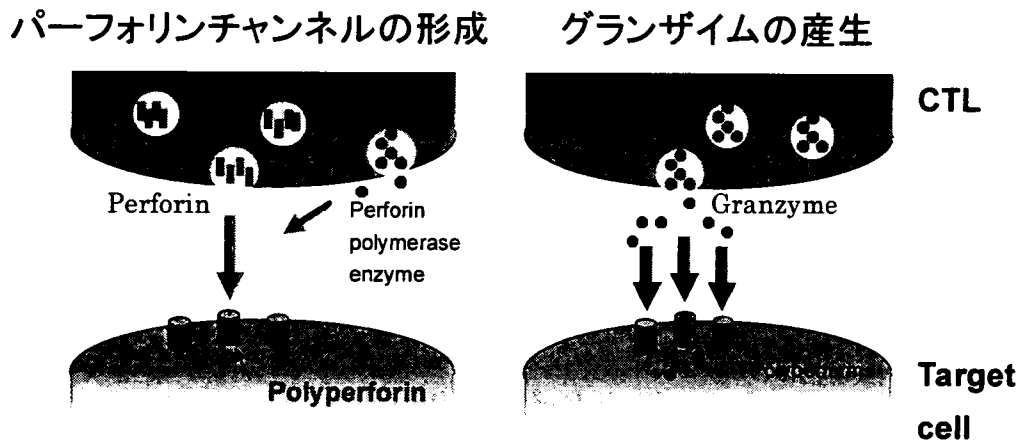


Fig. 1 Schematic representation of CTL activity: Perforin production and granzyme secretion

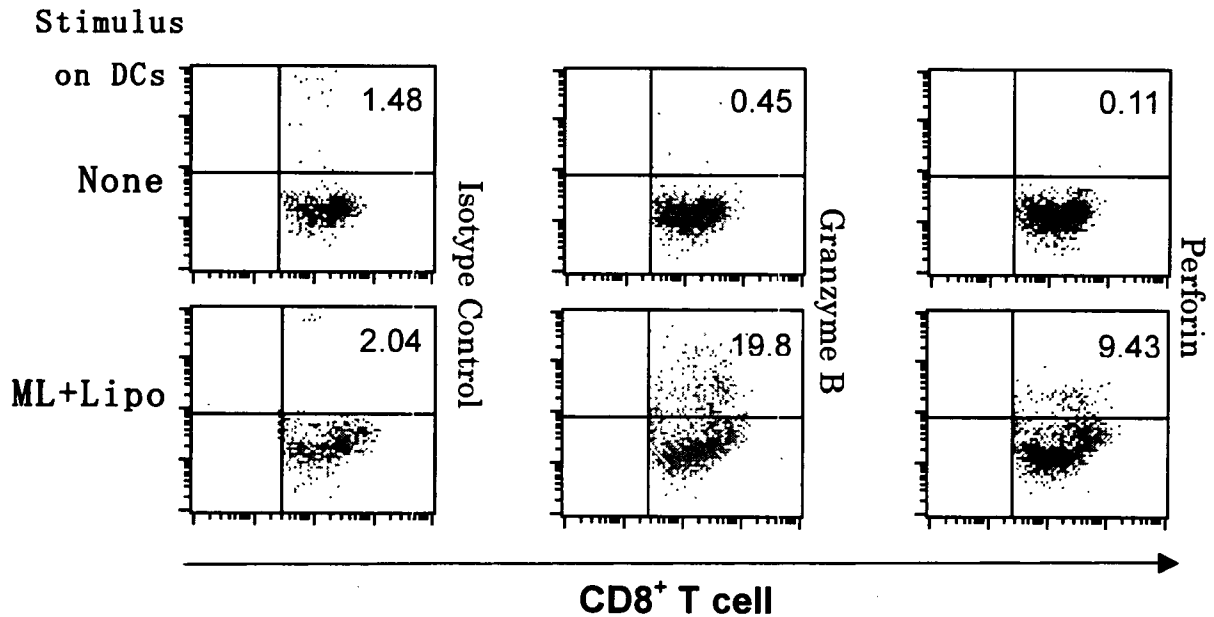


Fig. 2 Cytotoxic T cell activity measurement by intracellular production of granzyme B and perforin as measured by flow cytometry

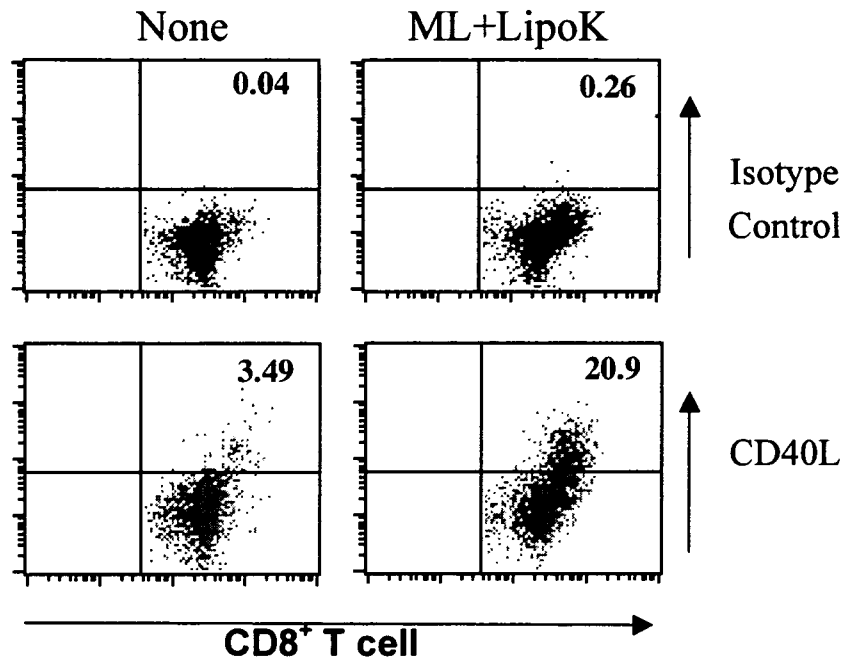


Fig. 3 Expression of CD40L on CD8⁺ T cells stimulated with activated DCs

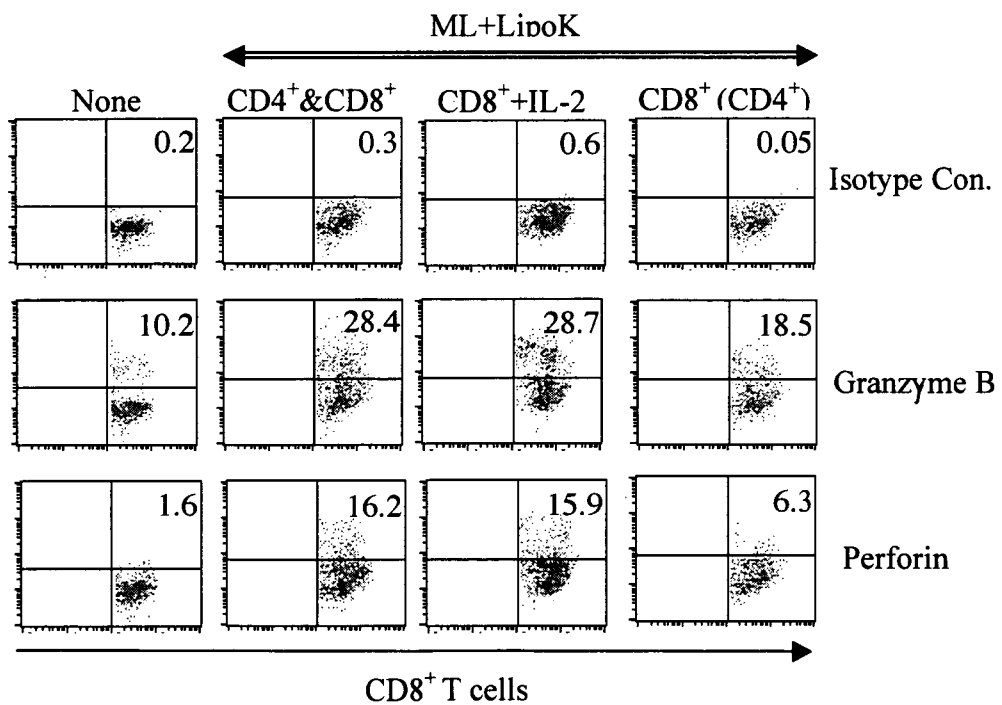


Fig. 4 Involvement of CD4⁺ T cells and IL-2 on perforin and granzyme production from activated CD8⁺ T cells

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 19 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・主任研究官

研究要旨 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であるBCGの使用は、非常に低いと報告されている。一方、BCGは、これまでワクチンとして長期の使用により、その安全性が示されている。そこで、BCGを改変することより、その免疫抗原としての能力を向上させることを試みた。これまでに、pH 環境調節に重要とされる、urease 遺伝子の破壊株の作製を行い、各種らい菌分泌プラスミドを構築を行った。本年度は、破壊株に存在する薬剤耐性遺伝子の除去およびその株への分泌蛋白発現の蛋白発現プラスミドの導入を行いその発現の確認した。

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、urease の破壊株△UT-11を取得してきた。また、菌体外へのらい菌由来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行い、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、その発現BCG株樹立・検討を行った。今年度は、△UT-11より薬剤耐性遺伝子の除去を行い、その株を用い各種分泌蛋白のプラスミドの導入および発現

の確認を行った。

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)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。得られた株(△UT-11)へ、pYUB870 を導入し、カナマイシン選択により生育してきたコロニーより、ハイグロ耐性遺伝子の除去さ

れたものを選択し、その後、カナマイシン無添加培地により数代継代を続け、pYUB870 プラスミド脱落株(△UT11-3)を選択した。

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、△UT11-3 株へ遺伝子導入後、Sauton 培地にて培養後、上清を濃縮し、ウエスタンブ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。pYUB870 を導入し、カナマイシンプレートに生育したコロニーより、ハイグロマイシン遺伝子の除去された株を選択し(図1)、カナマイシン無添加培地に数代継代することにより、pYUB870 脱落株、△UT11-3クローンを樹立した(図2)。本株へ、各種発現プラスミド(図3)を遺伝子導入し、菌体中および菌体外へも蛋白の発現・分泌が確認された。ウエスタブロットの解析では、HSP70とMMP IIの融合型が、高い分泌効率を示した(図4)。しかし、分泌シグナルの有無により、MMPIIの発現に差は認められなかった。

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△UT11-3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。しかし、遺伝子破壊は、薬剤耐性遺伝子と標的遺伝子の置換により行われるため、薬剤耐性遺伝子産物は、産生されたままとなる。将来のワクチンとしての使用を考慮した場合、抗原となる菌蛋白以外の外来遺伝子産物は、予期せぬ副反応を引き起こす可能性は否定しきれず、極力取り除くことが望ましい。また、各種プラスミドを用いて、抗原性の検討を行うには、薬剤耐性遺伝子の使用自由度を確保する観点からも、元となる株では、薬剤耐性を除去することが必要なことである。今回、構築された△UT11-3は、選択に用いたハイグロマイシン耐性遺伝子を取り除いたため、Hsp70融合蛋白発現プラスミドにハイグロマイシン耐性遺伝子の使用が可能であった。これまで、長鎖断片をもつプラスミドの場合、カナマイシン耐性遺伝子は、長期の培養により、菌体から脱落することが頻回認められている。今後の抗原検討に、ハイグロマイシンの使用を可能にし、安定した実験系が構築できるものと考えられた。

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、薬剤耐性遺伝子の除去を行い、各種らい菌蛋白分泌プラスミド発現株を構築した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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 Infect.*, 9:70-77, 2007.

2) Maeda, Y., T. Mukai, M. Kai, Y. Fukutomi, H. Nomaguchi, C. Abe, K. Kobayashi, S. Kitada, R. Maekura, I. Yano, N. Ishii, T. Mori, and M. Makino. Evaluation of major membrane protein-II as a tool for serodiagnosis of leprosy. *FEMS Microbiol. Lett.*, 272:202-205, 2007.

3) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, N. Nakata, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. Characterization of the fucosylation pathway in the biosynthesis of glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium* complex. *J. Bacteriol.*, 189:5515-5522, 2007.

2. 学会発表

1) 向井 徹、和泉眞蔵、宮元友司、Cita Rosita, Indropo Agusuni、松岡正典、牧野正彦: LAMP 法によるらい菌遺伝子検出の応用. 第 80 回日本ハンセン病学会総会、横浜市、2007 年 5 月

2) 和泉眞蔵、Indropo Agusuni、Cita Rosita、松岡正典、向井徹: ハンセン病濃厚流行地健康住民血中からのらい菌の検出. 第 80 回日本ハンセン病学会総会、横浜市、2007 年 5 月

3) Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, T. Mukai, and T. Mori. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating

activity of macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42nd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.

4) Mukai, T., S. Izumi, C. Rosita, I. Agusni, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Detection of *M. leprae* DNA in nasal swab samples by LAMP method. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42nd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.

5) Kai, M., N. P. N. Ha, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, Y. Maeda, T. Mukai, N. T. Tan, and M. Makino. Application of new serological test for leprosy in Vietnam. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.

6) 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. 抗酸菌糖脂質生合成における fucose 転移酵素遺伝子の解析. 第 80 回日本細菌学会総会 2007 年 3 月 大阪

7) 向井 徹, 和泉眞蔵, 宮本友司, Cita Rosita, Indropo Agusni, 松岡正典, 牧野正彦. LAMP 法によるらい菌遺伝子検出の応用. 第 80 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2007 年 5 月 横浜

8) 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 complex における fucose
含有糖脂質抗原の生合成解析. 第 90 回日本
細菌学会関東支部総会 2007 年 10 月 東京

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

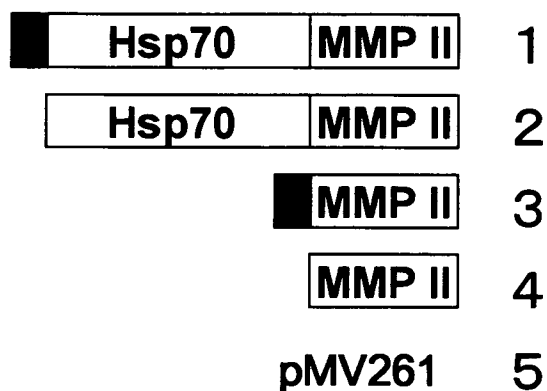


図3.各種融合蛋白発現プラスミド概略図。■:Ag85B分泌シグナル

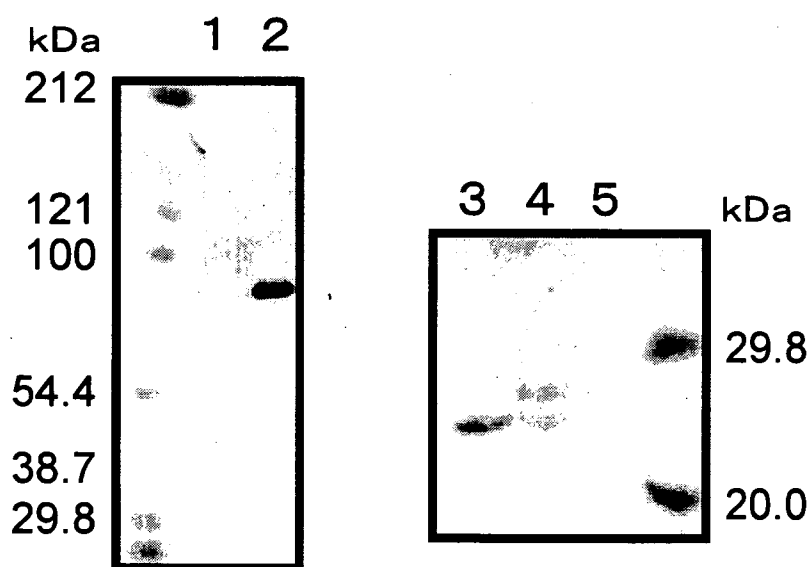


図4. 抗MMP II抗体による濃縮培養上清のウエスタンブロット。左図Hsp 70融合蛋白。右図MMP II発現株培養上清。Lane:1-5の数字は、図3に対応。

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 19 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. ハンセン病の起因菌であるらい菌は、免疫系細胞群においてはマクロファージに強い親和性を有し、細胞内に寄生性感染し長く生体内に宿る。マクロファージ内に感染したらい菌を殺戮するためには、インターフェロンガンマー (IFN- γ) が必須な役割を果たし、IFN- γ は主に CD4 陽性 T 細胞から産生される。したがって、らい菌が感染した直後にらい菌を生体外へ排除するためには、予防的ワクチンの投与により予め作製されたメモリー T 細胞が作用し、効率良く再活性化される必要性が高い。そこで、予防的ワクチンとして改良型リコンビナント BCG (BCG- Δ UT) を作製し、マクロファージを介した T 細胞活性化能を検討した。リコンビナント M-CSF を用いて作製したマクロファージ (M-M \emptyset) に BCG- Δ UT を感染させると CD4 陽性 T 細胞の活性化が誘導され、その程度は親 BCG である BCG Tokyo 株 (BCG-Tokyo) よりも強かった。しかし、BCG- Δ UT による CD4 陽性 T 細胞の活性化は、比較的弱く期待された程ではなかった。そこで、BCG- Δ UT 感染マクロファージにより T 細胞をより強く活性化するための補助因子の同定を試みた。GM-CSF はマクロファージからの IL-10 の産生を抑制することが知られるため、M-M \emptyset を予め GM-CSF で処理すると BCG- Δ UT 感染 M-M \emptyset の CD4 陽性 T 細胞活性化能は有意に増強された。さらに、BCG- Δ UT が M-M \emptyset に感染すると、M-M \emptyset 表面の CD40 抗原の発現が増強したため、BCG- Δ UT 感染 M-M \emptyset に CD40 リガンドを作用させたところ、M-M \emptyset の抗原提示能は有意に増強した。また、外因性 IFN- γ は M-M \emptyset を活性化することが知られているため、BCG- Δ UT 感染マクロファージを IFN- γ 処理すると、CD4 陽性 T 細胞はより強く活性化された。CD40 リガンドおよび外因性 IFN- γ のマクロファージ抗原提示能に及ぼす影響は、BCG- Δ UT を用いた場合より強く増強された。したがって、BCG- Δ UT は補助因子存在下でマクロファージを介して強く T 細胞を活性化することが可能であり、T 細胞活性化因子あるいはハンセン病に対する免疫療法剤として有効に作用する可能性があると思定された。

A. 研究目的

らい菌は他の抗酸菌に比し抗原性が弱く、初回感染時 CD4 陽性 T 細胞を十分に活性化することができない。しかし、らい菌を生体外へ

排除する抗らい菌生体防御反応において、中心的な役割を果たす因子は CD4 陽性 T 細胞から産生される IFN- γ であると思定されている。したがって、らい菌感染時メモリー T 細胞が有

効に作用し、より速くらい菌を殺戮できる環境を作ることが、ハンセン病の予防にも免疫学的治療にも有効と考えられる。メモリーT細胞は、らい菌抗原と反応する抗原性分子を予め投与することで作製され、メモリーT細胞の産生を目的としてBCGがワクチンとして特定の地域で用いられてきた。2006年Setia等は、これまでのBCGのワクチンとしての効果に関する論文を網羅的に集積し解析した結果、BCGのハンセン病に対するワクチンとしての有効性は、26%にとどまると報告した。このことは、BCGに改良を加えるとより有効に作用するワクチンを作製し得ることを意味している。そこで、我々は本研究班において、BCGの改良を目的としたリコンビナントBCGの作製をし、その有効性を測定することを目的とした。

BCGが十分その効果を発揮できない理由として種々考えられるが、最大の原因はBCGも抗酸菌であることから、マクロファージに対して非常に強い親和性を有し、マクロファージに感染すると細胞内でファゴゾームを形成しライソゾームとの融合を阻止することにある。ファゴゾーム-ライソゾーム融合が欠如すると、BCG由来の主要抗原がマクロファージ表面に十分に発現されず、そのためにCD4陽性T細胞を十分に活性化し得ない。そこで、BCGのこの最大の欠点を凌駕するため、BCGよりウレアーゼ遺伝子を除去することにした。ウレアーゼはファゴゾーム内のpH環境を中性に保つ作用を有する。BCG感染ファゴゾームが、より効率的にライソゾームと融合するためには、ファゴゾーム内のpHをより酸性側に傾ける必要がある。つまり、ウレアーゼ欠損BCGは、ウレアーゼのpH調整作用が欠如するため、ファゴゾームとライソゾームの融合を抑制し得ない可能性が考えられる。本年度は、ウレアーゼ欠損BCG (BCG- Δ UT)がマクロファージに感染した際、どの程度T細胞を活性化し得るか、また、CD4

陽性T細胞が十分量のIFN- γ を産生するためには、マクロファージに対してどのような補助因子が必要となるのか検討した。

B. 研究方法

ウレアーゼ欠損BCG (BCG- Δ UT)は、BCG (Tokyo株)よりファージシステムを用いUre C遺伝子を除去して作製した。正常健常者末梢血よりT細胞をマグネットビーズ付着抗CD3抗体を用いて除去した末梢単核球分画よりプラスチック付着性細胞を分離して単球として用いた。単球に対しリコンビナントM-CSF (10 ng/ml)を添加してマクロファージを分化誘導した。本マクロファージをここではM-M \emptyset と称した。BCG- Δ UTのCD4陽性T細胞活性化能は、BCG- Δ UTあるいはBCG-TokyoをM-M \emptyset に感染させ、感染後2日後のM-M \emptyset と自己のCD4陽性T細胞を4日間混合培養し、培養上清中に産生分泌されたIFN- γ をELISA法を用いて測定することで検討した。ELISA法は市販のアッセイキットを用いた。レスポンド細胞として用いたCD4陽性T細胞は、末梢血単核球より市販のCD4 negative isolation kitを用いて精製した。その純度は95%以上であった。M-M \emptyset の抗原提示能を増強させる補助因子として、リコンビナントGM-CSF・CD40リガンド(L)・リコンビナントIFN- γ を検討したが、これらは全て市販のリコンビナントタンパクを用いた。また、IFN- γ レセプター α 鎖(CD119)に対する抗体を用いて、IFN- γ の補助因子としての役割を検討したが、本抗体も市販の抗体を用いた。マクロファージの表面抗原の発現程度の解析は、FACSCaliburを用いた。全て市販の抗体を用いた。

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- Δ UT 感染マクロファージにおけるファゴソームとライソソームの融合効率をコンフォーカルマイクロスコープで検索した。ライソソームのマーカースとしてLAMP-1抗体を用い、マクロファージとして活性化THP-1細胞を用いると、BCG- Δ UTは親BCG(BCG-Tokyo)株に比し、効率良くPhagosome-Lysosome fusionを誘導し、Lysosome内に存在するBCG- Δ UTが多数観察された。そこで、BCG- Δ UTを正常健康人由来のM-M \emptyset に感染させた際の自己CD4陽性T細胞活性化能を検討した。BCG-Tokyoを同様にM-M \emptyset に感染させ比較検討すると、BCG- Δ UTはBCG-Tokyoに比し有意に強くCD4陽性T細胞を活性化させ、IFN- γ の産生を誘導した。しかし、BCG- Δ UTをMOI 0.25で感染させ、T細胞対マクロファージ比5と比較的生理的に近い状態でT細胞を刺激しても産生されたIFN- γ 量は50 pg/ml程度であって期待した程の成果は得られなかった。一方、BCGがM-M \emptyset に感染すると大量のIL-10を産生し、IL-10はT細胞の活性化を抑制することが知られている。そこで、BCG- Δ UTとBCG-Tokyoのマクロファージからの各種サイトカイン産生誘導能を比較検討した。その結果、BCG- Δ UTはIL-10のみならずGM-CSF・TNF α ・IL-1 β の産生をより強く誘導した。そこで、BCG- Δ UT感染M-M \emptyset のT細胞活性化に及ぼすIL-10の影響を調べた。

M-M \emptyset にBCG- Δ UTあるいはBCG-Tokyoを感染させる際、IL-10に対する中和抗体を添加したところ、マクロファージによるT細胞活性化能は有意に増強した。このことは、BCG- Δ UTを用いた場合もBCG-Tokyoを用いた場合にも観察された。また、GM-CSFはマクロファージからのIL-10の産生を抑制する作用を有していることをこれまでに報告してきた。そこで、M-M \emptyset にBCG感染させる際、マクロファージを予めGM-CSFで前処理した後BCGを感染させたところ、BCG- Δ UTを用いた場合のみT細胞は著しく強く活性化された。ついで、M-M \emptyset にBCGを感染させた際のマクロファージ表面抗原の発現程度の変化をFACSCaliburを用いて検索した。BCG- Δ UTはBCG-Tokyoに比し有意に強くCD14およびCD40抗原の発現を増強させた。そこで、BCG- Δ UT感染マクロファージをCD40Lで処理したところ、BCG-Tokyo感染M-M \emptyset に比し強くT細胞活性化能が増強した。BCG- Δ UTとBCG-TokyoのCD40Lに対する感受性の違いは、CD40の発現程度の違いによると考えられた。さらに、BCG- Δ UT感染M-M \emptyset を外因性IFN- γ で処理しても、M-M \emptyset のT細胞活性化能は著しく増強されたが、IFN- γ による増強はBCG- Δ UTを用いた時のみ観察された。IFN- γ 処理する際にIFN- γ レセプターに対する抗体を添加しておくと、IFN- γ の増強作用はキャンセルされた。IFN- γ はマクロファージを活性化する作用を有することが知られている。BCG- Δ UT感染M-M \emptyset をIFN- γ で刺激するとT細胞を刺激する際に重要な役割を果たすHLA-DRやCD86分子の発現が増強し、BCG- Δ UT感染IFN- γ 刺激M-M \emptyset をHLA-DRあるいはCD86に対する抗体で処理すると、本マクロファージのT細胞活性化能は強く抑制された。このことは、本マクロファージは抗原特異的にT細胞を活性化していること

も示唆していると考えられる。

D. 考察

ハンセン病において CD4 陽性 T 細胞を活性化し、ひいては病変の発症を予防する方策として BCG がしばしば用いられてきた。BCG に対する評価は様々であって地域によって大きく異なる。昨年、Setia 等はこれまで報告されてきた BCG の予防効果を網羅的に解析し、その有効性は 26% であると報告した。BCG が期待された程有効ではなかった理由は種々考えられるが、その最大の欠点は BCG も抗酸菌に属する生ワクチンであることに起因すると考えられる。すなわち、BCG はマクロファージに対して強い親和性を有し、マクロファージに感染するとファゴゾームを形成し、ライソゾームとの融合を阻止する能力を身につけていることにある。ライソゾームとの融合が十分に生じないと、BCG 由来の抗原性分子が MHC クラス II 経路を介して運搬されず、その結果として十分に CD4 陽性 T 細胞を活性化し得ないことに繋がる。そこで、BCG の T 細胞活性化能を増強する方策として、BCG が有するウレアーゼ遺伝子を人為的に除去し、新たなリコンビナント BCG を作製することを試みた。ウレアーゼ酵素は、ファゴゾーム内の pH 環境を中性に保つこと、すなわちファゴゾームの酸性化を抑制することでライソゾームとの融合阻止に寄与していると考えられる。今回作製したウレアーゼ除去リコンビナント BCG (BCG- Δ UT) は、予想した通りライソゾームとの融合を促進した。さらに、親 BCG である BCG-Tokyo 株より有意に強く CD4 陽性 T 細胞を活性化した。しかし、残念ながらその程度は期待した程ではなく、生理的条件下では 50 pg/ml の IFN- γ が産生されたにとどまった。

そこで、BCG- Δ UT による T 細胞の活性化を促進する方策について検討を加えた。

BCG- Δ UT がマクロファージに感染すると大量の IL-10 が産生される。そこで、本免疫抑制性サイトカインの影響をまず検索した。BCG- Δ UT 感染時に IL-10 に対する中和抗体を添加しても、またマクロファージを予め GM-CSF で処理することで IL-10 の産生を抑制しても、BCG- Δ UT のマクロファージを介した T 細胞活性化能は著しく増強した。その増強程度は、BCG-Tokyo に比し有意に強いものであった。さらに、積極的に BCG- Δ UT の T 細胞活性化能増強を図るために、マクロファージに対する補助因子 (Co-stimulator) について検討を加えた。BCG- Δ UT が感染するとマクロファージ上の CD40 抗原の発現が増強するため、BCG- Δ UT 感染マクロファージを CD40 リガンドで刺激すると T 細胞活性化能は増強し、またマクロファージの活性化を誘導する因子として知られる IFN- γ で感染マクロファージを刺激しても、BCG- Δ UT 感染マクロファージの T 細胞活性化能は著しく増強された。CD40 リガンド・IFN- γ 何れの場合においても、BCG-Tokyo に比し BCG- Δ UT において、その増強効果は明らかに強く、かつ IFN- γ は、全ての抗酸菌感染マクロファージを活性化すると想定されてきた。しかし、らい菌感染マクロファージにおいては IFN- γ の増強効果はきわめて弱く、今回明らかになったように BCG- Δ UT と BCG-Tokyo の間においても IFN- γ に対する感受性は大きく異なっていた。このことは、抗酸菌の種類によって IFN- γ 感受性はそれぞれ異なっており、BCG- Δ UT が非常に強い感受性を示したことは、ウレアーゼの欠損によりライソゾームとファゴゾームの融合が促進されやすい環境になっていたことがその一因である可能性が考えられる。

一方で、BCG- Δ UT の増強速度は BCG-Tokyo に比し遅い。このことは、ウレアーゼ遺伝子は IFN- γ の感受性に関与し、かつ

菌の増強速度を調整する二つの作用を有する。すなわち、ウレアーゼ遺伝子は病原性抗酸菌感染症において、化学-免疫コンビネーション療法の良きターゲット遺伝子になるものと想定された。

E. 結論

ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG は、GM-CSF・CD40 リガンド・IFN- γ 存在下で自己 CD4 陽性 T 細胞を強く活性化する免疫療法剤として有効である可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 Infect.*, 9:70-77, 2007.
- 2) Maeda, Y., T. Mukai, M. Kai, Y. Fukutomi, H. Nomaguchi, C. Abe, K. Kobayashi, S. Kitada, R. Maekura, I. Yano, N. Ishii, T. Mori, and M. Makino. Evaluation of major membrane protein-II as a tool for serodiagnosis of leprosy. *FEMS Microbiol. Lett.*, 272:202-205, 2007.
- 3) Kai, M., Y. Fujita, Y. Maeda, N. Nakata, S. Izumi, I. Yano, and M. Makino. Identification of trehalose dimycolate (cord factor) in *Mycobacterium leprae*. *FEBS Lett.*, 581:3345-3350, 2007.
- 4) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, N. Nakata, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. Characterization of the fucosylation pathway in the biosynthesis of glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium* complex. *J.*

Bacteriol., 189:5515-5522, 2007.

- 5) Duthie, M. S., W. Goto, G. C. Ireton, S. T. Reece, L. P. V. Cardoso, C. M. T. Martelli, M. M. A. Stefani, M. Nakatani, R. C. de Jesus, E. M. Netto, M. V. F. Balagon, E. Tan, R. H. Gelber, Y. Maeda, M. Makino, D. Hoft, and S. G. Reed. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin. Vaccine Immunol.*, 14:1400-1408, 2007.

2. 学会発表

- 1) Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, T. Mukai, and T. Mori. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42nd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.
- 2) Detection of *M. leprae* DNA in nasal swab samples by LAMP method. Mukai, T., S. Izumi, C. Rosita, I. Agusni, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42nd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.
- 3) Clofazimine-induced cell death in human and mouse macrophages. Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42nd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.

- 4) Clofazimine-induced cell death in macrophages. Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 5) Application of new serological test for leprosy in Vietnam. Kai, M., N. P. N. Ha, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, Y. Maeda, T. Mukai, N. T. Tan, and M. Makino. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 6) Lipopeptide (LipoK) of *Mycobacterium leprae* activated antigen presenting cells and type 1 T cells. Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, M. Kai, and M. Makino. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 7) Inhibition of the multiplication of *Mycobacterium leprae* vaccination with a recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *M. leprae*. Makino, M., Y. Maeda, M. Matsuoka, and T. Tamura. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 8) Utility of MMP-II for diagnosis of leprosy. Maeda, Y., M. Kai, Y. Fukutomi, and M. Makino. 17th International Leprosy Congress, Pre-workshop, New Diagnostics and Molecular Epidemiology, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 9) Search for *Mycobacterium leprae* antigens for sero-diagnosis. Kai, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and M. Makino. 17th International Leprosy Congress, Pre-workshop, Future Research Needs, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 10) 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. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第 80 回日本細菌学会総会 2007 年 3 月 大阪
- 11) 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. 前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. 第 80 回日本細菌学会総会 2007 年 3 月 大阪
- 12) 抗酸菌糖脂質生合成における fucose 転移酵素遺伝子の解析. 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 80 回日本細菌学会総会 2007 年 3 月 大阪
- 13) クロファジミンによるマクロファージの細胞死と caspase 活性化. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第 80 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2007 年 5 月 横浜
- 14) 変異検出におけるダイレクトシーケンスとクローン化シーケンスの相違. 甲斐雅規, 倉繁昌浩, 松原久美子, 中田登, 牧野正彦. 第 80 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2007 年 5 月 横浜
- 15) LAMP 法によるらい菌遺伝子検出の応用. 向井 徹, 和泉眞蔵, 宮本友司, Cita Rosita, Indropo Agusni, 松岡正典, 牧野正彦. 第 80 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2007 年 5 月 横浜
- 16) 結核菌分泌蛋白による Th1 分化誘導機構の解析: TCR による抗原認識の役割. 下袴田陽子, 田村敏生, 牧野正彦, 高津聖志. 第 90 回日本細菌学会関東支部総会 2007 年 10 月 東京
- 17) *Mycobacterium avium* complex におけ

る fucose 含有糖脂質抗原の生合成解析. 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 90 回日本細菌学会関東支部総会 2007 年 10 月 東京

- 18) ヒトマクロファージにおける抗らい菌活性誘導. 福富康夫, 牧野正彦. 第 37 回

日本免疫学会総会 2007 年 12 月 東京

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 19 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

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。昨年までの二年間は、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調査してきた。今年度は、らい菌感染により誘導される免疫応答の標的となるワクチン候補ペプチドを明らかにする目的で、らい菌を接種した6頭のカニクイザルについて、抗酸菌由来ペプチド(MMP-II、LpK、LipoK、FAP)で刺激した末梢リンパ球のサイトカイン産生能を調査した。らい菌接種後二年を経過したカニクイザルでは、ペプチドで刺激したリンパ球の培養上清中に、IL-12 と IFN γ が検出された。一方、IL-2、IL-4、IL-6、TNF α は検出されなかった。IL-12 は供試した 6 頭すべてのリンパ球を 4 種のペプチドのいずれで刺激した場合にも検出された。IFN γ は Lpk で刺激した#002、#006、#004 の 3 頭のリンパ球培養上清で検出された。さらに、FAP 刺激では#007 のみで、らい菌接種後 28、30、32、34 ヶ月目のいずれの時期でも検出されたことから、FAP がらい菌で誘導される免疫応答の中で最も特異性の高い標的エピトープであることが推測された。#007 は唯一低レベルではあるがらい菌に対する抗体が接種後三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。

キーワード:カニクイザル、ハンセン病、リンパ球サブセット、サイトカイン

A. 研究目的

カニクイザルを用いてハンセン病感染モデルを作成し、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。今期では、幼若カニクイザルに異なる接種経路でらい菌を感染させ、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した。昨年まではらい菌を接種した 6 頭のカニクイザルについて、2 年間にわたり抗酸菌由来ペプチドで誘導される末梢リンパ球の幼若化反応を調査してきたが、特異性の点で問題があった。今年度は、リンパ球サブセットレベルの継時的変化の解析と平行して、らい菌感染で誘導される免疫のうち最も特異性の高い標的エピトープを明らかにすることを目的として、らい菌接種後 28、

チンの有効評価に用いる免疫学的指標の確立を目的とした。昨年まではらい菌を接種した 6 頭のカニクイザルについて、2 年間にわたり抗酸菌由来ペプチドで誘導される末梢リンパ球の幼若化反応を調査してきたが、特異性の点で問題があった。今年度は、リンパ球サブセットレベルの継時的変化の解析と平行して、らい菌感染で誘導される免疫のうち最も特異性の高い標的エピトープを明らかにすることを目的として、らい菌接種後 28、