

図1: 実験方法の概要図

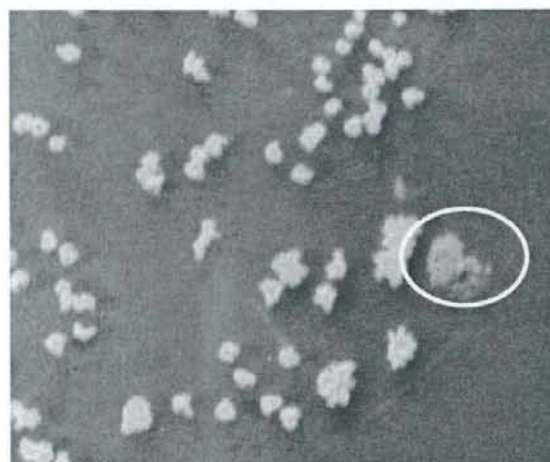


図2: 赤色呈するコロニー

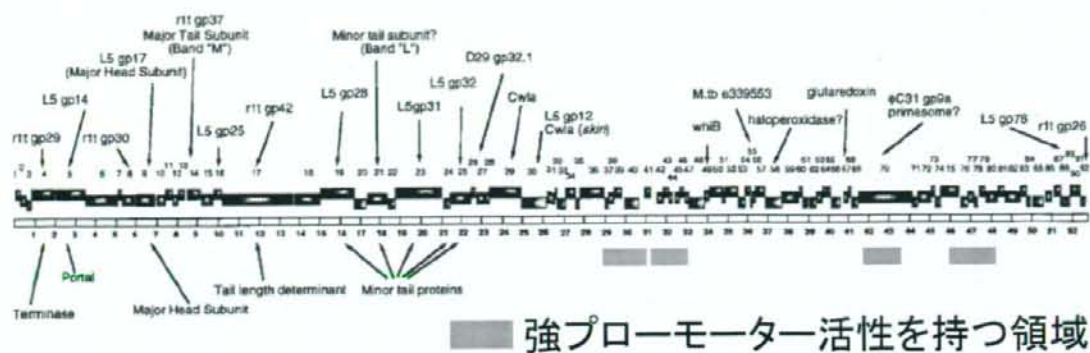


図3. TM4ゲノムマップと同定領域

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20年度 分担研究報告書

研究分担者 牧野 正彦

（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

難治性ハンセン病に対する免疫療法の開発

研究分担者 牧野 正彦（国立感染症研究所・病原微生物部・部長）
研究協力者 森 亨（国立感染症研究所・ハンセン病研究センター・
センター長）

研究要旨

薬剤耐性らい菌による難治性ハンセン病は今後増加することが予想されるが、耐性菌に有効に作用する新規薬剤の開発は進んでおらず、難治性ハンセン病に対する治療法としての免疫療法の開発が強く望まれている。らい菌に対する生体防御反応は、一般的には感染初期にはCD4陽性T細胞が、感染後期または再燃・再発時にはCD8陽性T細胞が重要な役割を果たす。したがって、難治性ハンセン病に対する免疫治療剤としても、これらT細胞を活性化させる治療剤の開発が必要となる。これまでにBCGに着目した治療的ワクチンの開発を行ってきたが、昨年までにウレアーゼ欠損BCG (BCG- Δ UT) はCD4陽性T細胞を現行のBCGに比し、強く活性化することを報告してきた。しかし、BCG- Δ UTはCD8陽性T細胞を強く活性化することはできず、新たなBCGの開発が求められた。そこで、BCG- Δ UTに新たにCD8陽性T細胞活性化因子を導入することで、両T細胞サブセットをより強く活性化させる方策の開発を試みた。CD8陽性T細胞活性化因子として、らい菌の主要抗原であるMajor Membrane Protein-II (MMP-II)に結核菌のAg85A由来分泌シグナルを連結したプラスミドを挿入する方法 (BCG-DSM) と、同じくMMP-IIにHSP70遺伝子を連結しHSP70の作用によりHSP70-MMP-II融合タンパクを分泌させる方法 (BCG-D70M) の2つを開発し、その評価を行った。ヒト末梢単球由来樹状細胞を抗原提示細胞として用い、自己のナイーブあるいはメモリータイプのCD4陽性あるいはCD8陽性T細胞をレスポンドーとして、BCG-DSMとBCG-D70MのT細胞活性化能を評価した。その結果、BCG-DSM・BCG-D70Mともに現行のBCG (ベクターコントロールBCG) より強く全てのT細胞を活性化し、BCG-DSMとBCG-D70Mを直接比較すると、BCG-D70Mの方が優れている可能性が示唆された。BCG-D70Mを中心とした詳細な免疫学的検討により、新しい免疫療法剤の開発に繋がると期待された。

A. 研究目的

ハンセン病のワクチンとして弱毒化牛型結核菌であるBCGが、長い間かつ幅広く使用されてきた。しかし、2006年、これまでの種々の臨床検討結果が総括的にまとめられ、BCGの有効性は26%であると報告された。このことは、現行のBCGではハンセン病の発症予防も、また免疫治療も遂行できないが、BCGに改良を加え、その有効性を改善すれば、発症予防も治療も可能となる

ことを意味している。これまでにBCGの改良を種々の方策を用いて行ってきた。最初の取り組みとして、BCGに改良を加える際に最も重要となるらい菌の主要抗原の同定を行った。少菌型ハンセン病患者では細胞性免疫応答能が比較的良好に保たれていることに着目し、らい菌の主要抗原としてMajor Membrane Protein-II (MMP-II)を同定した。次いで、MMP-IIを利用したリコンビナントBCGの作製を行った。BCGの最も

重大な欠点である Phagosome と Lysosome の融合阻止能を凌駕するため、MMP-II に分泌シグナルを付加し、BCG が抗原提示細胞内でファゴゾームを作製した際に、ファゴゾーム内で MMP-II を分泌する BCG (BCG-SM) を作製した。BCG-SM は現行の BCG に比し、遥かに強く CD4 陽性 T 細胞を活性化し IFN- γ を産生誘導した。また、現行の BCG には欠如しているナイーブ CD8 陽性 T 細胞活性化能をも獲得していた。BCG-SM をワクチンとして用い、生体内でらい菌の増殖を抑制し得るか検索したところ、BCG-SM は現行の BCG に比し良好な結果をもたらしたが、らい菌の増殖を完全に抑制することはできず、新たな改良を必要とした。そこで第三の取り組みを行った。BCG の持つ Urease 酵素活性を除去し、アンモニアの産生を抑制することで、BCG 感染ファゴゾームがライソゾームと融合しやすい環境 (BCG- Δ UT の作製) 作りを行った。その結果、BCG- Δ UT は非常に強く CD4 陽性 T 細胞を活性化したものの CD8 陽性 T 細胞活性化能は欠如したままであり、更なる方策の検討を余儀なくされた。そこで本年度は、BCG- Δ UT をベースとして、CD8 陽性 T 細胞を活性化するための因子を付加することで、CD4 陽性 T 細胞も CD8 陽性 T 細胞も強く活性化する BCG を作製することを目的とした。

B. 研究方法

リコンビナント (BCG- Δ UT) を親株として、BCG-DSM と BCG-D70M を作製した。BCG- Δ UT に、MMP-II に secretion シグナルを連結した遺伝子を導入し BCG-DSM を作製した。同様に、HSP70 と MMP-II を連結した遺伝子を導入して BCG-D70M を作製した。ベクターコントロール BCG を BCG-261H と称した。正常健康人末梢血より、CD3 モノクローナル抗体付着ダイナビーズを用い T 細胞を除去した後、プラスティック付着性単球を得て樹状細胞のプレカーサーとして用いた。単球に対して、リコンビナント (r) GM-CSF 50ng/ml および rIL-4 (10ng/ml) を添加して 4 日間培養することで、未熟樹状細胞を分化誘導した。この未熟樹状細胞に対して、

リコンビナント BCG またはベクターコントロール BCG を感染させ、GM-CSF および IL-4 存在下で、さらに 2 日間培養することで成熟樹状細胞を得た。BCG 感染樹状細胞の T 細胞活性化能は、BCG 感染樹状細胞をマイトマイシン C 処理した後、自己の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞と 4 日間混合培養し、T 細胞が産生する IFN- γ および IL-2 を ELISA 法で測定して評価した。T 細胞は、CD4 モノクローナル抗体あるいは CD8 モノクローナル抗体付着ダイナビーズを用いて精製し、ナイーブ T 細胞分画は、これら T 細胞から CD45RO 陽性 T 細胞を除去して得た。CD45RO 抗体は市販の抗体を用い、さらに抗マウス IgG 抗体ダイナビーズ抗体 (市販) を用いて精製した。IFN- γ および IL-2 の ELISA は、市販のキットを用いて測定した。樹状細胞から産生される各種サイトカインも市販のキットを用いて ELISA 法で測定した。樹状細胞表面の抗原の発現程度は、FACSCalibur を用いて行った。抗体は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うる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 をベースとし、これに CD8 陽性 T 細胞活性化因子を付加することで、両 T 細胞を非常に強く活性化し得る BCG の作製を試みた。因子として、①MMP-II に BCG-SM に用いた分泌シグナルを直接的に連結した融合遺伝子を用いる (BCG-DSM) の作製、②MMP-II に HSP70 遺伝子を直接的に連結した融合遺伝子を用い (BCG-D70M の作製)、HSP70-MMP-II 融合タンパクを HSP70 の作用

により分泌させる、の二つを検討した。

最初に、BCG-DSM とベクターコントロール BCG (BCG-261H) の T 細胞活性化能を T 細胞から産生される IFN- γ を指標に検討した。ナイーブタイプおよびメモリータイプの CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞 (全 4 種類の T 細胞) は全て BCG-DSM により、より強く活性化された。次いで、BCG-D70M と BCG-261H の T 細胞の活性化能を比較すると、予想通り BCG-D70M が強い T 細胞活性化誘導能を示した。三番目に、BCG- Δ UT 対 BCG-DSM および BCG- Δ UT 対 BCG-D70M の CD8 陽性 T 細胞活性化能を比較検討した。その結果、BCG-DSM あるいは BCG-D70M が BCG- Δ UT に比し、強く CD8 陽性 T 細胞を活性化した。したがって、今回用いた二つの CD8 陽性 T 細胞活性化因子は、ともに有効に作用することが示された。そこで、BCG-DSM と BCG-D70M の上記 4 種類の T 細胞活性化能を直接比較した。両 BCG はともにナイーブ CD4 陽性 T 細胞およびナイーブ CD8 陽性 T 細胞を活性化したが、BCG-D70M が有意に強く両ナイーブ T 細胞を活性化し、より大量の IFN- γ の産生を誘導した。したがって、HSP70 を添加することで非常に強い T 細胞の活性化が得られることが明らかとなった。BCG-D70M の T 細胞活性化機構を探索する目的で、BCG-D70M と樹状細胞の関係を探索した。BCG-D70M は樹状細胞を刺激し、MHC class I・class II および CD86 抗原の発現を増強させ、さらに IL-12p70 の産生を誘導することが明らかとなり、BCG-D70M は樹状細胞を活性化し、その結果として T 細胞を活性化していることが判明した。

D. 考察

BCG をらい菌由来主要抗原の細胞内導入のためのキャリアーとして用いる場合、抗酸菌特有の特徴であるファゴゾームの形成は避けられない現象である。一方で、T 細胞を活性化するためには主要抗原を細胞質内に分泌させなければならない。細胞内に感染したリコンビナント BCG からライソゾームを経由して抗原を細胞内へ分泌する方策として、二つの方法が考えられる。第 1

は、BCG 感染ファゴゾームの PH 環境を酸性側へ傾けライソゾームと融合し易くすることであり、第 2 は BCG から主要抗原を分泌させファゴゾームの膜を通過させることである。BCG-DSM および BCG-D70M は、ともに両方の活性を有しており、CD4 陽性 T 細胞も CD8 陽性 T 細胞も活性化されたことは、理論上期待した通りの結果であった。ただし、BCG-DSM は MMP-II を分泌し、BCG-D70M は HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌している可能性が高い。HSP70 は、heat shock protein (hsp) の一種であり、hsp はシャペロン効果を有し TLR2 結合能を持つ。そのために、より強く樹状細胞を活性化することが期待できる。さらに、細菌が CD8 陽性 T 細胞を活性化するためには、樹状細胞内で cross-presentation 機構が活性化されなければならないが、hsp は樹状細胞による cross-presentation に必要不可欠な分子と考えられている。したがって、分泌された融合タンパクの中に HSP70 が含まれたことによって、CD8 陽性 T 細胞が強く活性化されたものと考えられる。BCG-D70M の作用機序は、今後の詳細な検討が必要であるが、BCG-D70M はハンセン病の予防的ワクチンとして、また難治性ハンセン病の免疫治療剤として極めて有効であると期待される。

E. 結論

昨年までに有効性が確認された、強い CD4 陽性 T 細胞活性化能を有するウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に、HSP70-MMP-II 融合タンパクをコードする遺伝子を挿入した新しいリコンビナント BCG は、HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌し、CD4 陽性 T 細胞のみならず CD8 陽性 T 細胞をも強く活性化した。難治性ハンセン病の新しい免疫療法剤として期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, Y. Miyamoto, and M. Makino. CD4⁺ T cell activation by antigen-presenting cells infected with

- urease-deficient recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 53:96-106, 2008.
- 2) Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P. J. Brennan, K. Kobayashi, M. Makino, S. Matsumoto, H. Ogura, and S. Maeda. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. J. Bacteriol., 190:3613-3621, 2008.
 - 3) Kai, M., N. P. N. Ha, H. T. T. Huong, N. H. An, Y. Fukutomi, Y. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, T. Fujiwara, N. T. Tan, and M. Makino. Serological diagnosis of leprosy in patients in Vietnamese by enzyme-linked immunosorbent assay with *Mycobacterium leprae*-derived major membrane protein-II. Clin. Vaccine Immunol., 15:1755-1759, 2008.
 - 4) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. *Mycobacterium avium* complex *gtfTB* gene encodes glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8-specific glycopeptidolipid. J. Bacteriol., in press, 2009.
 - 5) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. Temperature dependency for survival of *Mycobacterium leprae* in macrophages. Jpn. J. leprosy, in press, 2009.
 - 6) Makino, M., Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, and T. Mukai. GM-CSF mediated T cell activation by macrophages infected with recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *Mycobacterium leprae*. FEMS Immunol. Med. Microbiol., in press, 2009.
2. 学会発表
- 1) CD4⁺ T cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant BCG. Makino, M., T. Mukai, Y. Maeda, Y. Miyamoto, and T. Tamura. 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
 - 2) Construction of *ureC*-disrupted BCG which expressing *M. leprae* MMP II antigen. Mukai, T., Y. Miyamoto, and M. Makino. 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
 - 3) *Mycobacterium avium* complex serovar 8. Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, and M. Makino. 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
 - 4) Genetic analysis of the glycosylation pathway of glycopeptidolipids in *Mycobacterium intracellulare* serotype 16 and serotype 17. Maeda, S., N. Nakata, I. Yano, M. Makino, and N. Fujiwara. ASM Meeting, June, 2008, Boston, USA.
 - 5) The three different methyltransferase genes determine the divergence between *Mycobacterium intracellulare* serotype 7 and 12. Nakata, N., N. Fujiwara, S. Maeda, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. ASM Meeting, June, 2008, Boston, USA.
 - 6) Structure and biosynthesis gene cluster of an antigenic serotype 16 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, K. Kobayashi, M. Makino, and S. Maeda. ASM Meeting, June, 2008,

- Boston, USA.
- 7) Vaccines for mycobacterial diseases. Makino, M. The fifth Taiwan-Japan symposium on International Collaboration and TB. September 11-13, 2008, Taipei, Taiwan.
- 8) *Mycobacterium intracellulare* 由来血清型 7、12 型 glycopeptidolipid 糖鎖合成遺伝子の機能解析. 藤原永年, 中田 登, 前田伸司, 中 崇, 水野淨子, 牧野正彦, 松本壮吉, 矢野郁也. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都
- 9) *Mycobacterium intracellulare* 血清型 12 の glycopeptidolipid 生合成遺伝子領域の解析. 中田 登, 藤原永年, 前田伸司, 中 崇, 矢野郁也, 小林和夫, 牧野正彦. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都
- 10) *Mycobacterium avium* complex 血清型 8 型株における糖脂質抗原の生合成経路の解析. 宮本友司, 向井 徹, 甲斐雅規, 前田百美, 中 崇, 矢野郁也, 牧野正彦. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都
- 11) クロファジミンにより誘導されるマクロファージの細胞死と caspase 等細胞内情報伝達分子の動態. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都
- 12) 遺伝子破壊による BCG 菌ミコール酸のサブクラス変換. 甲斐雅規, 宮本友司, 向井 徹, 矢野郁也, 牧野正彦. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都
- 13) LipoK の細胞障害性 T 細胞の活性化及びエキソソーム産生に及ぼす影響. 前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都
- 14) らい菌由来免疫原タンパク、MMP-II を用いた血清診断. 甲斐雅規, 前田百美, 福富康夫, 宮本友司, 向井 徹, 牧野正彦. 第 81 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2008 年 5 月 熊本
- 15) 常温輸送臨床検体の LAMP 法によるらい菌遺伝子検出. 向井 徹, 和泉眞蔵, Teky Budiawan, 宮本友司, Cita Rosita, Indropo Agusni, 松岡正典, 牧野正彦. 第 81 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2008 年 5 月 熊本
- 16) ヒトマクロファージ内におけるらい菌の生存機構. 福富康夫, 前田百美, 松岡正典, 牧野正彦. 第 81 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2008 年 5 月 熊本
- 17) *Mycobacterium intracellulare* serotype13 由来新規特異糖ペプチド脂質の糖鎖構造と生合成. 水野淨子, 中 崇, 中田 登, 前田伸司, 合田麗奈, 小林貴美子, 牧野正彦, 藤原永年. 日本生化学・日本分子生物学会合同年会 2008 年
- 18) らい菌感染ヒトマクロファージの IFN- γ 刺激による phox 発現. 福富康夫, 牧野正彦. 第 38 回日本免疫学会総会 2008 年 12 月 京都
- 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）

サルの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20年度 分担研究報告書

研究分担者 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

研究分担者 寺尾恵治 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター

研究要旨 ハンセン病の感染・発症モデルをカニクイザルで開発し、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。離乳直後のカニクイザル6頭に異なる感染経路でらい菌を接種し、接種後4年間にわたり末梢血中の主要リンパ球サブセットレベルと4種のらい菌由来ペプチド(MMP-II、LpK、LipoK、FAP)による刺激で誘導されるリンパ球のL-12およびIFN γ 産生能を継続調査した。その結果、手根部に 10^9 個のらい菌を一週間隔で5回接種した#007では接種後4年間にわたって、1)低レベルのらい菌特異的抗体が検出されること、2)LPKおよびFAP刺激でIFN γ が誘導されることから、らい菌が持続感染している可能性が高いと判断した。さらに、らい菌由来ペプチドに対する#007のリンパ球の反応性から、らい菌の持続感染で誘導される免疫ではFAPが最も特異性の高いペプチドであることが推測された。

A. 研究目的

カニクイザルを用いてハンセン病の感染・発症モデルを作成し、研究班が開発する新規ワクチン候補の安全性および有効性を評価することを最終目標とする。これまでに、離乳直後に異なる接種経路でらい菌を感染させた6頭のカニクイザルについて、末梢血中の主要リンパ球サブセットレベルの変化およびらい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またはサイトカイン産生能を三年間継続調査してきた。その結果、手根部に 10^9 個のらい菌を接種した一頭(#007)でらい菌の持続感染が成立している可能性を示唆する結果が得られた。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、持続感染成立個体(#007)において、特異的かつ高レベルで誘導される免疫の標的エピトープを含むペプチドを明らかにするために、末梢リンパ球について、4種のらい菌由来ペプチド(MMP-II、LpK、LipoK、FAP)で誘導されるサイトカインを他の個体と

比較した。

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頭づつ接種した。らい菌接種および感染動物の維持は、P2感染実験施設内でおこなった。らい菌接種前、接種後四年間にわたり2~5ヶ月間隔で採血し、定法に従ってリンパ球を分離した。

2×10^5 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下記の4種である。

PE-CD20/FITC-CD3,
PE-CD8/FITC-CD16,
Cy5-CD8/PE-CD4/FITC-CD29,
Cy5-CD8/PE-CD4/FITC-CD69

サイトカインの誘導は、リンパ球を 2×10^6 /mlの濃度で10%FCS-RPMI-1640培地

に浮遊させ、4種のらい菌由来ペプチド (MMP-II(最終濃度: 0.1ug/ml)、LpK(0.1ug/ml)、LipoK(0.1ug/ml)、FAP(1ug/ml)存在下で培養した。培養4日目に培養液を回収し、遠心上清を-80Cで凍結保存した。昨年までらい菌感染ザルのリンパ球をペプチドで刺激した場合、IL-12およびIFN γ の産生は認められるが、IL-2、IL-4、IL-6、TNF α は産生されないことを明らかにしていることから、今年度は培養上清中のIL-12とIFN γ を市販のMonkey Cytokine Assay ELISA Kitで測定した。

(倫理面への配慮)

医薬基盤研究所・霊長類医学研究センター実験動物委員会の承認を得、実験動物指針に則り実験を行った。実験期間中の動物の飼育管理および実験補助は熟練した技術員が担当し、心理的、生理的苦痛の軽減を目的とした処置を施した。

C. D. 研究結果および考察

図1に調査した7種の末梢リンパ球サブセットの内CD3陽性pan T細胞レベルの感染後4年間にわたる変化を示す。CD3+/T細胞レベルには感染後13ヶ月から48ヶ月の間では特に顕著な変化は認められなかった。CD3+/T細胞以外のCD20+/B細胞、CD4+/T細胞、CD8+/T細胞、CD16+/NK細胞およびCD29high/CD4 T(休止期記憶細胞)、CD69+/CD4(活性化CD4細胞)のいずれにも特に著しい変化が認められなかった(結果略)。

6頭全てで4種のペプチド刺激により培養上清中にIL-12が検出されたが、その産生量には感染経過と有意に関連する変動が認められなかった(結果略)。さらに、カンクイザルでは正常リンパ球の無刺激培養でもIL-12の産生が認められることから、IL-12の検出ではらい菌感染で誘導される特異性の高い免疫の標的となるペプチド絞り込むことが不可能である

と判断した。一方、LipoKが樹状細胞を刺激してIL-12の産生を誘導することが報告されていることから、今後は単離精製した細胞についてペプチドで誘導されるIL-12の産生能を詳細に調査する必要がある。

図2にらい菌を鼻腔内、鼻先端および手根部に接種した6頭のカンクイザルの末梢リンパ球をMMP-IIで刺激した培養上清中のIFN γ を測定した結果を示す。#007でのみ接種後27および29ヶ月目にIFN γ の産生が認められたが、31ヶ月以降では不検出となった。同様に#007でのみFAPで誘導されるIFN γ 産生が接種後27から48ヶ月まで4年間継続した(図3)。しかしながら、FAP刺激でのIFN γ 産生能は感染後3年を経過した時点から急激に低下する傾向が認められた。一方、リボタンパクLpKとそのN末端の13アミノ酸で構成されるリボペプチドLipoKで刺激した場合のIFN γ 産生は著しく異なっていた。すなわち、LpK刺激の場合には鼻先端接種した二頭を除いた4頭でIFN γ 産生が確認されたが(図4)、LipoK刺激では接種後27ヶ月目に二頭(#007、#009)で極めて低レベルの産生が認められただけであった(図5)。

図4に示す#002のLpK刺激によるIFN γ 産生に関しては、らい菌の持続感染の結果ととらえるよりも、非定型抗酸菌の感染により誘導された免疫で生じた結果である可能性が高い。すでに報告したように、今回実験に供試した6頭の内3頭(#001、#002、#009)では、らい菌接種前(Pre)のリンパ球を3種のペプチドで刺激した場合に、陽性のリンパ球幼若化反応が認められている。このことから、これら3頭ではらい菌接種前に飼育環境中に存在する非定型抗酸菌に感染していた可能性が考えられる。さらに、#002ではらい菌特異的血中抗体が陰性になった後にも、LpK刺激で高レベルのリンパ球幼若化反応が持続することから、#002で認

められた LpK 刺激で誘導される IFN γ 産生が、らい菌の持続感染ではなく非定型抗酸菌の持続感染に起因している可能性が強く示唆される。非定型抗酸菌の感染を考慮すれば、らい菌の持続感染を特異的に検出する方法として、FAP 刺激による IFN γ 産生が最も特異性の高い評価法と判断できる。

昨年度までに、#007 では、らい菌接種後 3 種のペプチド (LpK、MMP-II、FAP) すべてに対するリンパ球幼若化反応が二年間にわたり持続すると同時に、感染後 2 年の時点で 4 種のペプチド刺激により IFN γ 産生が確認された。#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^{high} 細胞レベルが増加し、二年間高レベルを維持したこと、CD29^{high}/CD4 細胞がペプチドで誘導される幼若化反応と IFN γ 産生を担う細胞集団である可能性が考えられる。さらに、#007 は、唯一四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、らい菌の持続感染が成立した可能性が極めて高いと判断している。

今回の一連の実験ではらい菌由来ペプチドに対するリンパ球の反応性を幼若化反応と IFN γ 産生という異なった方法で評価している。両者の反応性に一定の相関性があるか否かを検証するために、手根部に接種した 2 頭 (#006、#007) で 4 年間にわたる幼若化反応と IFN γ 産生との関連を調査した。図 6 上図に示すように、状況証拠から持続感染不成立と判断した #006 では三種のペプチドで誘導される幼若化反応と IFN γ 産生との間に関連性は認められないが、下図に示す持続感染成立個体 (#007) では 3 種すべてのペプチドで誘導される幼若化反応と IFN γ 産生との間に明確な相関が認められた。このことから、らい菌が持続感染しているカニクイザルでは感染後 2 年でリンパ球の反応性がピークに達し、以後低下してゆくことが示唆された。

今回の実験で幼弱カニクイザルの手根部に 10⁹ のらい菌を一週間隔で 5 回接種することにより持続感染モデルが作成できる可能性が示唆されたことから、今後はより幼弱な新生仔を用いて再現性の高い感染方法を検討してゆく必要がある。

E. 結論

幼弱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特異的ペプチドで誘導される末梢リンパ球のサイトカイン産生能を指標として調査した。その結果、IL-12 と IFN γ がペプチド刺激した培養上清中に検出されたが、らい菌の持続感染が成立した可能性の高い #007 の解析結果から、らい菌感染で誘導される免疫の標的エピトープとしては FAP が最も特異性の高いペプチドであることが判明した。今後は FAP で誘導される IFN γ 産生量を指標として持続感染の経過を追跡調査するとともに、#007 についてリンパ球及び抗原提示細胞の機能を解析し、ヒト患者の免疫応答との類似性を明らかにしてゆく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Terao K., Dynamic changes in early development of immune system in macaque monkeys -The significance from standpoint of the preclinical toxicity test using nonhuman primates- Journal of Toxicological Science, 2009, -in press-

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

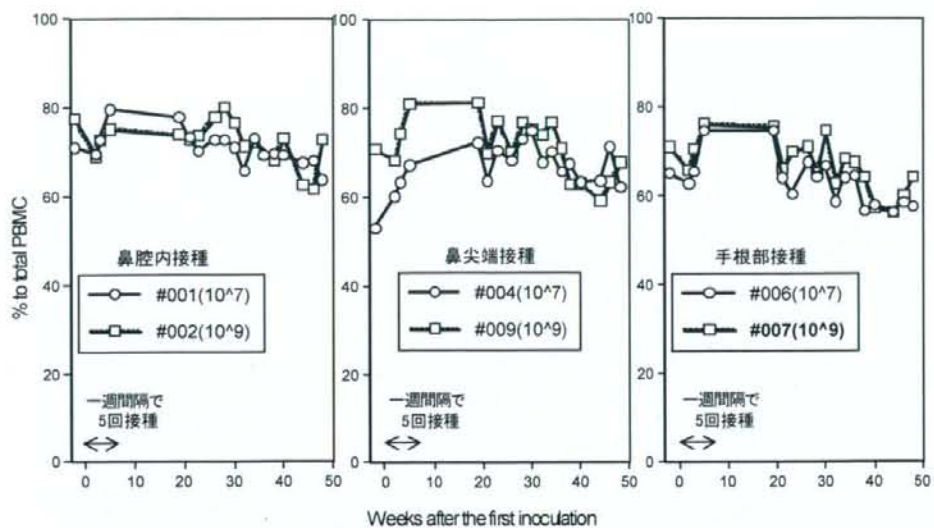


図1:らい菌感染後4年間にわたる末梢中のCD3+pan-T細胞サブセットレベルの変化

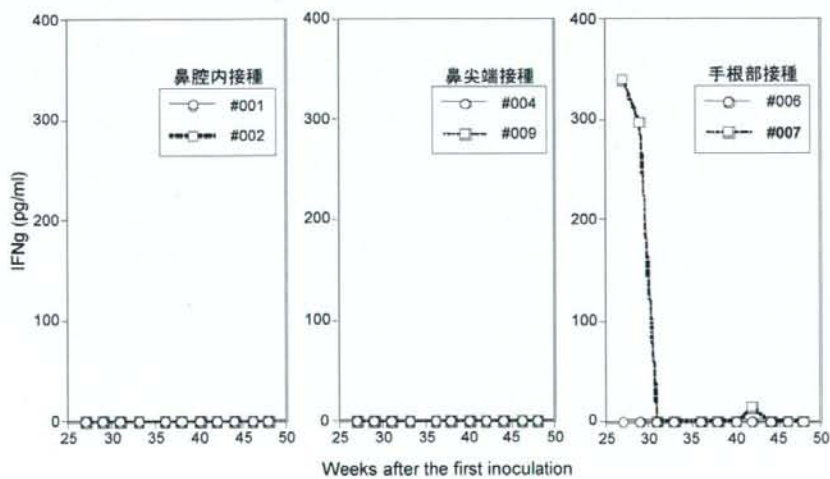


図2: MMP IIで誘導されるIFN γ 産生能の変化

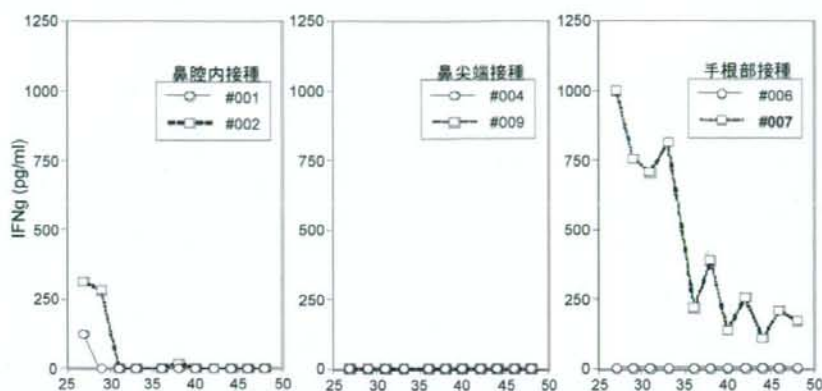


図3: FAPで誘導されるIFN γ 産生

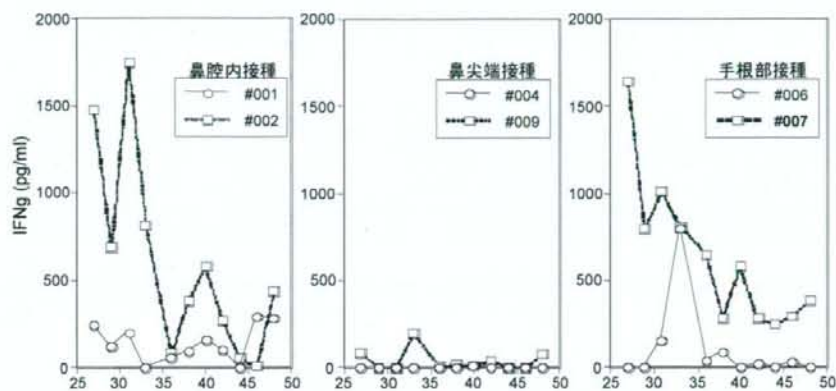


図4: LpKで誘導されるIFN γ 産生

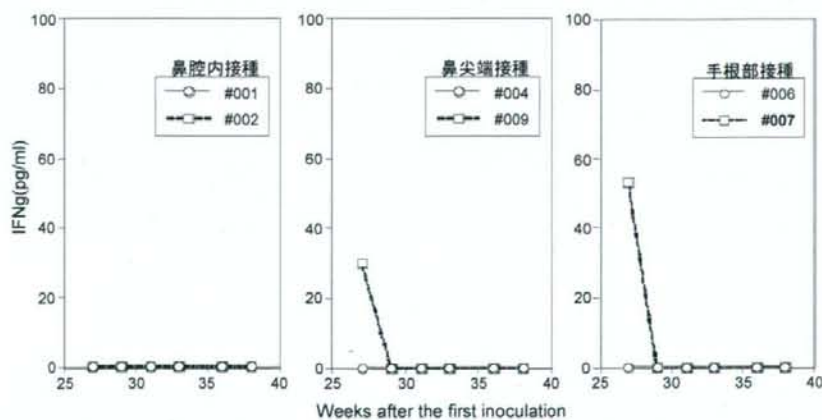


図5: LipoKで誘導されるIFN γ 産生

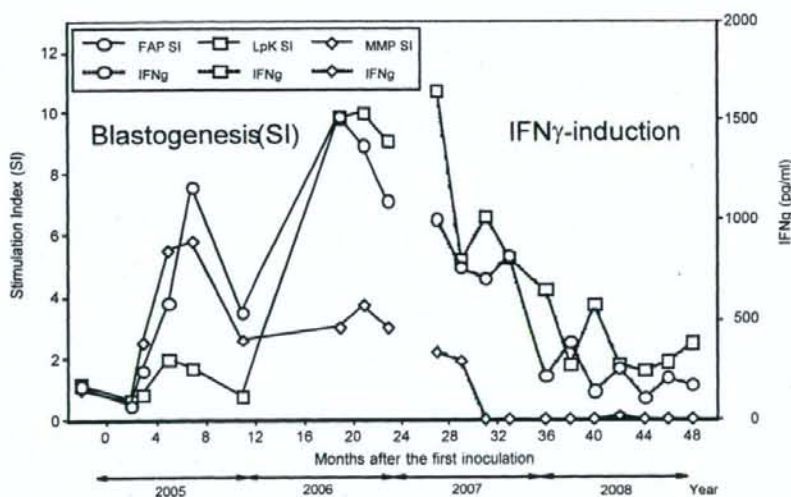
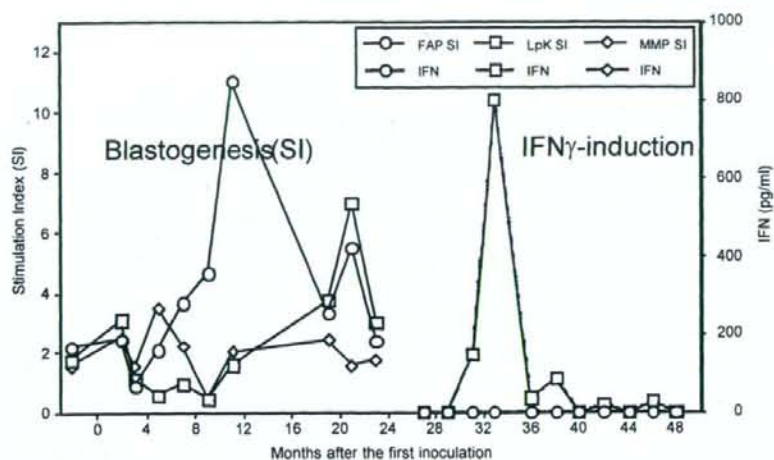


図6: 手根部接種後4年間にわたるらい菌特異的ペプチドに対するリンパ球反応 (0~24ヶ月: 幼若化反応、26~48ヶ月: IFN γ 産生)

上図: 持続感染不成立個体(#006)、下図: 持続感染成立個体(#007)

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

平成20年度 分担研究報告書

研究分担者 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

研究分担者 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長
研究協力者 鈴木幸一 国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部室長
永岡 譲 国立療養所多磨全生園皮膚科医長
森 修一 福島県立医科大学微生物学講座主任医療技師

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。10名の皮膚科医・医師にハンセン病の講習会・実習（皮膚スミア検査、神経肥厚触診、病理組織検査など）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作成したパンフレットを皮膚科医などに配布し、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。ハンセン病診療するにあたり、回復者の心情を理解し、皮膚スミアテスト検査実施は必須であるため、18名に対して講習会を実施した（参加者：皮膚科医10人、回復者7人、弁護士1人）。ハンセン病の知識、回復者の心情、皮膚スミア検査実習、神経肥厚の触診、病理組織検査を実施し、知識・技術の伝達を行った。多くのハンセン病回復者から、医療面や生活面などの体験や要望をお聞きし、また弁護士からは人権面での講演もお聞きした。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」も配布し、当事者の他、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に受診する勇気がない。一般医療機関受診のチャンスを広げるため、一昨年度作成したハンセン病患者（回復者）向けパンフレットと医療者向けパンフレットを大学皮膚科、学会（日本皮膚科学会総会、日本ハンセン病学会など）ハンセン病療養所、関係機関などに配布し活用を依頼した。また、国立ハンセン病資料館にもパンフレットとしておいた。

2008年には7名の新規ハンセン病患者がいた。主治医に対して診療及び検査の指導を行った。5名の新規患者については主治医に対して、実際の検査の実技指導、治療の指導を行い、ハンセン病を確実に診療できる体制を確立した。

D. 考察

ハンセン病患者が減少し、診療する機会が減少し、教育を受けていない、一度も診療機会がない皮膚科医が大多数を占めるようになっている。また、ハンセン病の歴史やハンセン病回復者の心情なども理解できていない。それらを解決する

ために、講習会を開催し、意識向上に努めた。皮膚科医は知識吸収の意欲はあり、講習会には10名の皮膚科医が参集した。さらに他の皮膚科医の教育も必要と考え、「ハンセン病アトラス」を配布した。この意欲を持続させるために、年に一回程度の継続した教育機会を設けることが必要である。

ハンセン病回復者を一般医療機関に受診させる（インテグレーション）事は難しいが、一步でもそれに近づける努力は必要である。そのため、気軽に相談できる皮膚科医を回復者向けパンフレットに記載し、全国の皮膚科医などに配布した。これらの皮膚科医を起点として他の診療科などに受診できることを期待したい。また、ハンセン病回復者などから生の声を聞いて、患者と医師とのあるべき関係を構築することも大事である。

ハンセン病の新規患者は減少しているが、外国人患者については鑑別にハンセン病が入っているのが、診断に迷うことは多くないようである。一方、日本人患者については、ハンセン病を鑑別に入れることは難しく、診断が遅れる場合がある。数年に1名程度は日本人新規患者も登録されることがあり、必ず鑑別に「ハンセン病」を入れることが必要である。2008年は2名の沖縄県からの新規患者が登録されたが、60歳代、70歳代と高齢で、今後も沖縄県出身の新規患者は高齢化していくものと考えられる。

E. 結論

ハンセン病診療を皮膚科医が主体的に実施するためのネットワーク作りは、まだ始まったばかりであるが、皮膚科医の教育、ハンセン病回復者の一般医療機関への受診の動きを、引き続き行うことが重要である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 鈴木幸一、永岡 譲、森 修一、石井則久：2007年に於ける世界のハンセン病の現況について。日本ハンセン病学会雑誌 77: 15-23, 2008.
2. 谷川和也、鈴木幸一、川島 晃、三島眞代、Huhehasi Wu、赤間 剛、武下文彦、石井則久：らい菌感染マクロファージにおける細胞内寄生と排除に関わる分子機構。日本ハンセン病学会雑誌 77: 57-61, 2008.
3. 石井則久、関根万里、渡辺朋美、朝比奈昭彦：輸入皮膚感染症。臨床皮膚科 62(増刊号): 22-26, 2008.
4. 石井則久、鈴木幸一：ハンセン病。よくわかる病態生理9皮膚疾患(川田暁編集), p187-190, 日本医事新報社(東京), 2008.
5. 石井則久：ハンセン病の最近の話題。皮膚の科学 7: 416-420, 2008.
6. Bang PD, Suzuki K, Ishii N, Khang TH: Leprosy situation in Vietnam - reduced burden of stigma. Jpn J Leprosy 77: 29-36, 2008.
7. Tanigawa K, Suzuki K, Nakamura K, Akama T, Kawashima A, Wu H, Hayashi M, Takahashi S, Ikuyama S, Ito T, Ishii N: Expression of adipose differentiation-related protein(ADRP) and perilipin in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. FEMS Microbiol Lett 289: 72-79, 2008.

2. 学会発表

1. 石井則久：ハンセン病の将来。教育講演 ハンセン病-neglected diseases のコントロールに向けて、第107回日本皮膚科学会総会(京都), 2008年4月。
2. 鈴木幸一、赤間 剛、石井則久：ハンセン病研究の基礎と臨床の架け橋-らい菌ゲノム発現情報の臨床応用-。教育講演 ハンセン病-neglected diseases のコントロールに向けて、

第 107 回日本皮膚科学会総会(京都),
2008 年 4 月.

3. Kanazawa N, Mikita N, Nakatani Y, Kosaka M, Ozaki M, Ishii N, Nishimura H, Furukawa F: Genetic involvement of bacterial sensor molecules TLR2, DC-SIGN and NOD2 in Hansen's disease. The 5th Joint Meeting of International Investigative Dermatology 2008, Kyoto, May 2008.
4. 石井則久、熊野公子、杉田泰之、並里まさ子、野上玲子、細川 篤、牧野正直: 2007 年のハンセン病新規患者発生状況. 第 81 回日本ハンセン病学会総会, 熊本, 2008 年 5 月.
5. 森 修一、San Shwe、石田 裕、石井則久: ハンセン病回復者への偏見・差別の是正と社会復帰に関する研究. 第 81 回日本ハンセン病学会総会, 熊本, 2008 年 5 月.
6. 金澤伸雄、三木田直哉、中谷友美、尾崎元昭、小坂真紀、石井則久、西村泰行、古川福実: 細菌センサー分子 TLR2・DC-SIGN・NOD2 の遺伝子多型のハンセン病発症への関与. 第 81 回日本ハンセン病学会総会, 熊本, 2008 年 5 月.
7. 谷川和也、鈴木幸一、赤間 剛、川島 晃、Huhehasi Wu、高橋伸一郎、生山祥一郎、石井則久: ハンセン病における細胞内脂質蓄積機構について〜らい菌感染マクロファージにおける ADRP、perilipin の発現誘導〜. 第 81 回日本ハンセン病学会総会, 熊本, 2008 年 5 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表