

762-766, 2011.

4) 松岡正典、甲斐雅規：WHO・薬剤耐性らい菌拠点監視事業に関する会議報告，日本ハンセン病学会雑誌80：71-77，2011.

5) Kai M, Nguyen PNH, Nguyen Miyamoto Y, maeda Y, Fukutomi Y, Nakata N, Matsuoka M, Makino M & Nguyen TT. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam. Clin Infect Dis. 52: e127-132. 2011.

## 2. 学会発表

1) 宮本友司、向井 徹、甲斐雅規、前田百美、中 崇、藤原永年、水野 淨子、矢野 郁也、牧野正彦。*Mycobacterium avium* complex 血清型4型株における glycopeptidolipid の生合成解析。第83回日本細菌学会総会、横浜市、2010年3月

2) 天児和暢、飯田健一郎、松岡正典、甲斐雅規、吉田真一。らい菌が培養できない理由。第83回日本細菌学会総会、横浜市、2010年3月

3) 中田 登、甲斐雅規、牧野正彦。抗酸菌 rpoB 遺伝子変異とリファンピシン感受性に関する解析。第83回日本細菌学会総会、横浜市、2010年3月

4) 前田百美、田村敏生、甲斐雅規、福富康夫、牧野正彦。らい菌リポ蛋白由来リポペプチドによる宿主細胞内らい菌の殺戮。第83回日本細菌学会総会、横浜市、2010年3月

5) 天児和暢、飯田健一郎、松岡正典、甲斐雅規、吉田真一。らい菌が培養

できない理由。第83回日本ハンセン病学会総会、鹿児島市、2010年5月

6) 甲斐雅規、松岡正典、宮本友司、牧野正彦。次世代シーケンス解析によるらい菌株のゲノム配列比較。第83回日本ハンセン病学会総会、鹿児島市、2010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

厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

再燃・再発患者に対する血清診断法および  
モニタリングシステムの開発

平成22年度 分担研究報告書

研究分担者 鮫島 朝之

(国立療養所 星塚敬愛園)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

ハンセン病の再燃・再発患者に対する血清診断法および  
モニタリングシステムの開発

研究分担者 鮫島 朝之 国立療養所星塚敬愛園 内科医長  
研究協力者 後藤 正道 国立療養所星塚敬愛園 園長

研究要旨 らい菌の細胞膜蛋白 Major Membrane Protein (MMP)-II に対する血清抗体価を入所者群と対照群について ELISA 法で測定した。昨年度同様、MMP-II 血清抗体価は本年度も皮膚病変の広がった症例ほど高値であった。抗体価が持続高値であれば、再燃・再発の評価は困難な可能性も考えられた。MMP-II 血清抗体価に関する皮膚生検の検討で、らい菌陰性かつ MMP-II 抗体染色陽性例がみられた。これらを考慮すると細胞性免疫能の評価も必要と考えられ、らい菌由来の細胞質蛋白 MLC (*Mycobacterium leprae* cytosolic protein) や、MMP-II の刺激に対して培養末梢血単核球細胞より産生される INF- $\gamma$ 、IL-10 など細胞内サイトカインをフローサイトメトリーで測定した。MLC 刺激で INF- $\gamma$ 、IL-10 陽性 T 細胞は、入所者群でやや少ない傾向であった。MMP-II 刺激は少数例の検討で有効であった。ハンセン病の再燃・再発のモニタリングシステムの確立には、血清 MMP-II 抗体価の変動をチェックすること以外に MMP-II 刺激などによる細胞性免疫能の評価も今後さらに必要と考えられた。

A. 研究目的

らい菌の細胞膜蛋白 Major Membrane Protein (MMP)-II は、その血清抗体が日本人ハンセン病患者の多菌、少菌型の両方で陽性を示し、従来の PGL-1 より診断用抗原として有用である。国内外で発症しうる再燃・再発患者に関して増悪時の血清 MMP-II 抗体価と細胞性免疫能との関連性を解明することで再燃・再発を起こす可能性の高い患者の拾い上げや再燃・再発の早期診断のためのモニタリングシステムの開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

本年度も、昨年度に引き続き国立療養所星塚敬愛園の入所者検診の血清の MMP-II 抗体価(吸光度)を ELISA 法

で測定した。(平成 21 年度：231 名分、平均年齢 81.2 歳、平成 22 年度：215 名分、平均年齢 81.6 歳) 正常対照群としては、当園職員 71 名分(平均年齢 50.0 歳)の血清を用い MMP-II 抗体価を測定した。これらの結果について ROC (受信者動作特性) 曲線による解析を行い Cut-off 値を決定した。測定値を昨年度、本年度入所者血清について病型ごとに比較した。

また、平成 10 年以降に皮膚生検が施行された 6 例(内 3 例が再発例)について Fite 染色に加え PGL-1 抗体、MMP-II 抗体による免疫染色を行い、再燃・再発に関して血清 MMP-II 抗体価との関連性について検討した。

細胞性免疫能の評価では、末梢血単核球細胞を MLC (*Mycobacterium leprae*

cytosolic protein)あるいは、MMP-IIで刺激後4日間培養し、CD4、CD8T細胞より産生される細胞内のINF- $\gamma$ 、IL-10などのサイトカインをフローサイトメトリーで測定した。細胞内サイトカイン陽性細胞の割合は、病型別に正常対照群と比較した。このフローサイトメトリーによる検討では、入所者群は11名(平均年齢:84.9歳)で多菌型(MB)6名、少菌型(PB)5名であった。正常対照群は7名(平均年齢:59.1歳)であった。正常対照群の6名は当園職員で、1名は近隣の医療施設、鹿屋医療センターを受診した健常者であった。MLC(15 $\mu$ g/ml)刺激はこれら全例に対して行ったが、MMP-II(15 $\mu$ g/ml)刺激は現在までのところMBの1例、正常対照群の1例のみにしか行っていない。

#### (倫理面への配慮)

過去の生検組織、血液(保存血清)の使用や定期検診時または随時に同意を得て採取した血液の使用については、個人ごとに研究内容、使用目的等を説明し、個人情報漏洩しない方法でデータの管理を行う旨を伝えた。また、採血時に気分不良となった場合は適切な処置を行い対応すること、本研究に参加しなくても不利益とならないこと、研究の途中で参加を中止できることなども説明した。内容の理解が困難な個人については、なるべく家族あるいは後見人に付き添ってもらい、出来るだけ研究内容等の理解がすすむように丁寧に説明を行った。同意書の得られた例の血液、生検組織のみを研究で使用した。尚、本研究は、平成21年12月に開催された第1回国立療養所星塚敬愛園倫理委員会で承認されたものである。また鹿屋医療センターにおいては、平成22年7月に行われた同センター生命倫理委員会の承

認を受けている。

#### C. 研究結果

昨年度同様、MedCalc softwareにてROC曲線による解析を行いCut-off値(吸光度)を0.2598とした(Sensitivity 67.5%、Specificity 84.5%)。病型のL型を皮疹の範囲が広い順にL3、L2、Lの3つに分類し病型を以下の6つに分けた上で、吸光度の平均値を本年度の値を主に示した。(括弧内は昨年度の値)

L3:0.4628 (0.4486)  
L2:0.4582 (0.4262)  
L: 0.3876 (0.3508)  
B-BL: 0.3310 (0.3187)  
BT: 0.3364 (0.2897)  
T: 0.2941 (0.2840)

昨年度、本年度のいずれもL3とL間、L3とB-BL間、L3とBT間、L3とT間、L2とBT間、L2とT間などの各群間においてUnpaired Student's t-testで吸光度の値に有意差( $p < 0.05$ あるいは $P < 0.01$ )が認められた。以上のように昨年度同様、本年度も皮疹の範囲が広い病型ほどMMP-II血清抗体価(吸光度)が高い傾向を示した。

皮膚生検でらい菌陰性(Fite染色)であり、かつMMP-II抗体染色陽性例が1例(Reversal reaction)みられた。

末梢血単核球細胞のMLC刺激によるIL-10、INF- $\gamma$ 陽性T細胞については、入所者群は正常対照群より刺激により増加する陽性細胞の割合が少ない傾向がみられた(Table 1)。MMP-II刺激では、MB例と正常例いずれもMLC刺激よりもIL-10、INF- $\gamma$ 陽性T細胞が多くみられた(Table 2)。

#### D. 考察

本年度も皮膚病変の広範であった症例ほど血清MMP-II抗体価が高かつ

たが、再燃・再発の評価は抗体価が持続高値の場合は難しい可能性も考えられた。皮膚生検でらい菌陰性かつ MMP-II 抗体染色陽性例が 1 例あったことも考慮すると、血清 MMP-II 抗体価以外に MMP-II 刺激などによる細胞性免疫能の評価も今後症例数を増やし検討してゆく必要があると思われた。

#### E. 結論

再燃・再発のモニタリングシステムの確立には、血清 MMP-II 抗体価の変動をチェックすること以外に MMP-II 刺激などによる細胞性免疫能の評価も今後必要と考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 鮫島朝之、前田百美、後藤正道、牧野正彦. Major Membrane Protein (MMP)-II 血清抗体価とハンセン病の病型について. 第 83 回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2010 年 5 月 鹿児島市

#### 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

**MLC刺激後の陽性CD4、CD8細胞 刺激無しでの陽性CD4、CD8細胞**

平均年齢	病型	IL-10 (%)		INF- $\gamma$ (%)		IL-10 (%)		INF- $\gamma$ (%)	
		CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
86.3	MB6例	0.31	1.56	0.31	1.82	0.22	1.75	0.38	1.65
	標準誤差	0.1	0.43	0.11	0.5	0.06	0.45	0.12	0.36
83.2	PB5例	0.29	1.82	0.3	1.52	0.24	1.37	0.21	1.77
	標準誤差	0.12	0.32	0.04	0.35	0.08	0.26	0.06	0.34
59.1	正常7例	0.38	2.47	0.62	1.12	0.25	0.76	0.3	0.97
	標準誤差	0.1	1.42	0.1	0.19	0.05	0.28	0.06	0.23

Table 1. MLC(15  $\mu$  g/ml)刺激後の細胞内サイトカイン陽性CD4及びCD8T細胞の割合(%)

**MMP-II 刺激後の陽性CD4、CD8細胞 刺激無しでの陽性CD4、CD8細胞**

年齢	症例	IL-10 (%)		INF- $\gamma$ (%)		IL-10 (%)		INF- $\gamma$ (%)	
		CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
87	MB, L3	0.91	0.64	1.48	1.48	0.4	0.28	0.46	0.69
76	正常例	0.46	0.91	1.5	0.94	0.31	0.82	0.49	0.31

Table 2. MMP-II (15  $\mu$  g/ml)刺激後の細胞内サイトカイン陽性CD4及びCD8T細胞の割合(%)



厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

らい菌のマクロファージ内寄生機構に関する研究

平成22年度 分担研究報告書

研究分担者 鈴木 幸一

(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（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

らい菌のマクロファージ内寄生機構に関する研究

研究分担者 鈴木 幸一 国立感染症研究所ハンセン病研究センター  
感染制御部 室長

研究要旨 らい菌が宿主マクロファージのファゴゾーム内に持続感染する際にファゴゾーム内の脂質を利用していると考えられるが、細胞内脂質は常に分解再利用されている。本年度の研究により、らい菌感染によって細胞内脂質の分解に関わる代表的な酵素である hormone sensitive lipase (HSL) の発現が強く抑制されることが明らかとなった。また病変部における HSL の発現が病態や治療効果と関連する可能性が示された。

A. 研究目的

ハンセン病の起因菌であるらい菌は、マクロファージのファゴゾーム内で長期間生存し増殖するという、あらゆる細菌の中でも最も顕著な細胞内寄生性を示すが、そのメカニズムについてはほとんど明らかになっていない。この点を解明することは、ハンセン病の診断、治療など全てに通じる重要な課題である。

LL 型ハンセン病において、らい菌は宿主マクロファージのファゴゾーム内で増殖するという顕著な細胞内寄生性を示す。そのようなファゴゾームは、脂質を蓄えており、らい菌は其中で生存している。このことは、らい菌が典型的な細胞内寄生を可能とした生物種であることを示すとともに、らい菌の生存にはそのようなファゴゾーム内環境が必要であることを示唆している。また、マクロファージのファゴゾームは、本来貪食した外来性細菌などの異物を消化し自然免疫および獲得免疫系を活性化する役割を担っているが、らい菌や結核菌はその

ような場所で生存を可能とする極限環境微生物であると位置付けることも出来る。したがって、らい菌の生物学的特性やハンセン病の病態を理解し治療戦略を立てる上で、このようなマクロファージ内寄生の分子機構を明らかにすることは極めて重要である。

B. 研究方法

従来、抗酸菌のマクロファージ内寄生に関する研究は、結核菌や *M. bovis* B. C. G. を用いたものが多かったが、上記のような観点から、らい菌の特殊性を解明するために細胞内寄生の分子機構に関する研究を行う必要がある。そのために培養ヒトマクロファージにらい菌を感染させ、経時的に mRNA とタンパクを調製し、各種遺伝子発現やタンパク発現を RT-PCR, Realtime-PCR および Western blotting により確認した。

(倫理面への配慮)

ハンセン病組織皮膚スミア材料は、「国立感染症研究所ヒトを対象とす



る医学研究倫理審査」で承認された内容に則って行った。

#### C. 研究結果

らい菌感染によって、細胞内の脂質の分解に重要な役割を果たす酵素である、hormone sensitive lipase (HSL) の発現が強く抑制されることが明らかとなった。らい菌の細胞壁成分であり toll-like receptor 2 のリガンドである peptidoglycan (PGN) を加えると HSL 発現は一過性に強く誘導された。しかし、PGN と同時にらい菌を加えると、HSL 発現は逆に減少した。すなわち、らい菌は細胞壁の PGN とは別の成分によって HSL 発現を抑制すると考えられた。

また、L 型ハンセン病皮膚スミアでは HSL 発現がほぼ消失しており、らい反応前あるいは多剤併用療法後に回復することが明らかとなった。

#### D. 考察

HSL はホルモンが誘導する脂肪の異化作用を誘導する酵素として脂肪細胞で初めて発見された。脂肪細胞以外にマクロファージを初めとする多くの細胞で発現することが知られているが、マクロファージでは主に細胞質中に局在し、脂質を分解する際に脂肪的表面に移動することで、蓄積された TAG を遊離脂肪酸とグリセロールに分解して再びエネルギーとして細胞外へ放出させる役割を担っている。

好気性菌であるらい菌は酸素分圧勾配が比較的低い肉芽腫環境において、炭素源として脂質や脂肪酸を利用することで生存を維持していると考えられることから、そのような脂質の蓄積や代謝に関与する宿主タンパク発現を制御している可能性が考えられた。

ヒト培養マクロファージにらい菌

を感染させると短時間で HSL 発現が減少した。HSL 発現は *in vivo* においては、エネルギーレベルの変化によって修飾されることが知られている。肥満においては、前脂肪細胞や分化した脂肪細胞において HSL 発現が減少し、2 型糖尿病では脂肪組織における HSL mRNA が減少することが示され、インスリン抵抗性が HSL 発現を調節していると報告されている。*In vitro* の研究では、3T3-L1 脂肪細胞やインスリン欠損動物から単離した脂肪細胞における HSL mRNA 発現はインスリン処理によって down-regulate される。しかしながら、これまでに HSL 発現を修飾するような細菌の作用が証明された報告は無い。*M. tuberculosis* や *M. avium* なども宿主の脂質を利用するので、本研究の成果はこれらの細菌感染においても重要な働きをしている可能性が考えられる。

皮膚スミア材料における HSL 発現変動は、これが予後や治療効果を判定するためにマーカーとして有用である可能性を示唆するが、より多くの献体を用いて検討を進める必要がある。

#### E. 結論

らい菌の細胞内感染によって、宿主マクロファージの HSL 発現は強く抑制される。それによって、ファゴゾーム内の脂質が分解から免れることによってその量が維持され、らい菌に利用されるのではないかと考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Akama T, Tanigawa K, Kawashima A, Wu H, Ishii N and Suzuki K. Analysis of *Mycobacterium leprae* gene expression using DNA microarray. *Microb Pathog* 49: 181-185, 2010.

- 2) Suzuki K, Takigawa W, Tanigawa K, Nakamura K, Ishido Y, Kawashima A, Wu H, Akama T, Sue M, Yoshihara A, Mori S and Ishii N. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA from archaeological skeletal remains in Japan using whole genome amplification and polymerase chain reaction. *PLoS ONE* 5:e12422, 2010.
- 3) Suzuki K, Udono T, Fujisawa M, Tanigawa K, Idani G and Ishii N. Infection during infancy and long incubation period of leprosy suggested in the case of a chimpanzee used for medical research. *J Clin Microbiol* 48:3432-3434, 2010.
- 4) 石井則久、スマナ・バルア、森修一、永岡譲、鈴木幸一。WHO第10回ハンセン病制圧のための技術勧告 (Technical Advisory Group: TAG) 会議報告書。日本ハンセン病学会誌 79:37-42, 2010.
- 5) 鈴木幸一、森修一、永岡譲、石井則久。2009年における世界のハンセン病の現状について。日本ハンセン病学会誌79:43-51, 2010.
- 6) 森修一、鈴木幸一、スマナ・バルア、永岡譲、石井則久。ハンセン病による負荷のさらなる軽減のための強化された世界戦略。日本ハンセン病学会誌 79:53-73, 2010.
- 7) Akama T, Suzuki K, Tanigawa K, Nakamura K, Kawashima A, Wu H, Sue M, Yoshihara A, Ishido Y and Ishii N. Whole-genome expression analysis of *Mycobacterium leprae* and its clinical application. *Jpn J Infect Dis* 63(6):387-392, 2010.
2. 学会発表
- 1) 森 修一、San Shwe、Le Le Win、Kyaw Myint、鈴木幸一、石田 裕、石井則久。ハンセン病回復者と家族の社会課題と共生政策に関する国際研究—ミャンマーのハンセン病コロニーとコミュニティの調査から—。第 83 回日本ハンセン病学会。2010 年 5 月 27-29 日、鹿児島。
- 2) 谷川和也、赤間 剛、川島 晃、Huhehasi Wu、須江麻里子、石藤雄子、石井則久、鈴木幸一。らい菌感染マクロファージ内の脂質維持に対する hormone-sensitive lipase (HSL) の関与。第 83 回日本ハンセン病学会。2010 年 5 月 27-29 日、鹿児島。
- 3) 鈴木幸一、鵜殿俊史、藤澤道子、谷川和也、矢島幹久、宮村達男、伊谷原一、石井則久。乳幼児期感染と約 30 年の潜伏期間を証明し得た LL 型ハンセン病チンパンジーの 1 例。第 83 回日本ハンセン病学会。2010 年 5 月 27-29 日、鹿児島。
- 4) 鈴木幸一、谷川和也、瀧川 渉、石藤雄子、赤間 剛、川島 晃、Huhehasi Wu、須江麻里子、森 修一、石井則久。遺跡で発掘されたハンセン病疑い人骨からのらい菌 DNA の証明。第 83 回日本ハンセン病学会。2010 年 5 月 27-29 日、鹿児島。
- 5) 鵜殿俊史、谷川和也、鈴木幸一、石井久則、藤澤道子、伊谷原一。早期診断と治療に成功したチンパンジーにおけるハンセン病の 1 例。第 16 回日本野生動物医学会。2010 年 9 月 1-4 日、福岡。
- 6) 佐宗亜衣子、星野敬吾、櫻井準也、谷川和也、森修一、石井則久、鈴木幸一、平田和明。近世鍋被り葬人骨の分子古病理学的検討。第 64 回日本人類学会。2010 年 10 月 1-3 日、伊達市。

- 7) K. Tanigawa, A. Kawashima, H. Wu, T. Akama, M. Sue, A. Yoshihara, Y. Ishido, N. Ishii, K. Suzuki. A Role of Adipose Differentiation-Related Protein (ADRP) And Hormone-Sensitive Lipase (HSL) in The *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) Infection Macrophage. The 48th Annual Meeting of The Infectious Diseases Society of America. October 21-24, 2010, Vancouver.
- 8) M. Sue, T. Akama, K. Nakamura, K. Tanigawa, A. H. Wu, Kawashima, A. Yoshihara, Y. Ishido, N. Ishii, K. Suzuki. Detection of RNA expression from pseudogenes and noncoding regions of *Mycobacterium leprae* genome by tiling array analysis. The 48th Annual Meeting of The Infectious Diseases Society of America. October 21-24, 2010, Vancouver.
- 9) 鶴殿俊史、谷川和也、鈴木幸一、石井則久、藤澤道子、伊谷原一。チンパンジーに見られたハンセン病の1例。SAGA シンポジウム (SAGA13)。2010年11月13-14日、東京。
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)  
なし

厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

## 難治症例に対する免疫療法の開発

平成22年度 分担研究報告書

研究分担者 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（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

難治症例に対する免疫療法の開発

研究分担者 前田百美 国立感染症研究所ハンセン病研究センター  
感染制御部 主任研究官

研究要旨 LipoK は、らい菌感染樹状細胞を活性化し、自己の T 細胞と混合培養すると IFN- $\gamma$  産生が誘導される。さらに、細胞障害性分子であるグラニューライシンおよびグランザイム B の産生能が増強されることを報告してきた。生体内における、これら傷害性分子の役割については不明な点が多い。今回、グラニューライシンおよびグランザイム B がらい菌に対して殺菌作用を示すことを初めて明らかにした。しかしながら、これら物質のみではらい菌は完全に殺菌されないことから、他の物質も関与することが考えられる。今後マイクロアレイなどで、これら物質を探索する系を構築することが望まれる。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、難治症例に対する免疫療法に活用し得る分子であると考えられる。

A. 研究目的

我々は、リポ蛋白 LpK がらい菌に対する生体防御反応を司る分子であることを見出し、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 は樹状細胞を活性化した。今回マイクロアレイを使用し、樹状細胞内の免疫関連遺伝子の発現を比較した。また、細胞障害性 T リンパ球 (CTL) は、顆粒依存的機序により細胞内病原体を殺すことが知られているが、顆粒に存在するグランザイム及びグラニューライシンの役割については不明な点が多い。そこで、今回らい菌を用いてこれらの分子の作用を検討した。

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て得たのち、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。樹状細胞-T 細胞培養後、7 日目に細胞を集めて、0.1N NaOH を用いて細胞を可溶化し、らい菌を回収した。1mCi/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 を添加した。バイアルのキャップをゆるめ、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 度で静置培養した。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 ( $\text{CO}_2$ ) を測定した。マイクロアレイは東レの 3D-Gene を使



用し、細胞は BD FACS Aria セルソーターを用いて、樹状細胞のソーティングを行い、RNeasy Mini Kit を用いて RNA を精製した。

(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

らい菌感染樹状細胞を LipoK で刺激すると、IL-12、IL-1、TNF- $\alpha$  等のサイトカイン産生量が増強されることが明らかである。マイクロアレイ 3 D-Gene Human Oligo chip 25 を用いて、らい菌感染樹状細胞を LipoK で刺激した細胞と CD40 リガンドで刺激後と比較すると、IL-12、IL-1B、IL-6、TNF-SF7、NF-kB12 等の発現は LipoK 刺激後の樹状細胞では 8 倍増加していた。同様にキモカイン CCL2、CCL7、CCL8、CCL20 等の発現も高く見られた。さらに、幾つかの未知遺伝子の発現上昇が見られたことから、今後、これらの遺伝子発現を再確認する必要がある。

感染細胞を破壊するため CTL 細胞が重要である。LipoK 刺激によって、より多くのパーフォリン、グランザイム、グラニューライシンが産生されるが、実際にらい菌は殺戮されるか、不明である。そこで、今回菌の生存率を検討した。らい菌は、試験管内で培養できないため、アイソトープを用いて代謝活性を見た。精製した CD4 陽性または CD8 陽性 T 細胞と感染した樹状細胞を 1 週間混合培養すると、らい菌の生存率は有意に下がることが分かった (Fig. 1)。値は cpm ( $^{14}\text{CO}_2$ ) カウント

で表している。LipoK の非存在下では、有意にらい菌の生存率の低下は見られなかった。さらに CTL 活性には、IFN- $\gamma$ 、IL-2 が重要であると考えられる。そこで、IFN- $\gamma$ 、IL-2 存在下でらい菌の生存率を調べると、低下している事から、これらサイトカインは何らかの関与あると考えられる (Fig. 2)。しかし、これらサイトカインの直接的な殺菌作用は見られなかった。

グラニューライシンは結核に殺菌作用があることが報告されている。そこで、グラニューライシンを培地中に添加し 3 日間らい菌と培養すると、らい菌の生存率が有意に落ちることが、明らかになった。グランザイム B の直接的な殺菌作用は報告されていないが、同様にらい菌はグランザイムにより殺戮されることが判明した。

### D. 考察

LipoK は、樹状細胞を活性化し、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。LipoK は自己 CD8 陽性 T 細胞のみならず、CD4 陽性 T 細胞から大量のグラニューライシン、グランザイム B を分泌しうる物質である。CTL 活性に重要なグラニューライシンまたはグランザイム B はらい菌を直接破壊することが今回初めて確認できた。IFN- $\gamma$ 、IL-2 はらい菌を破壊するために、重要なサイトカインではあるが、直接菌を破壊することはない。この事は、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し、らい菌を殺戮するものと考えられた。

### E. 結論

LipoK は、感染細胞を破壊するためには、CTL 細胞が重要な役割を担っている。LipoK によってより多く、グラ

ンザイムBおよびグラニューライシンが分泌され、これら物質によって、らい菌が作用されることから、LipoKは免疫療法分子として活用しうると考えられた。

Clinical Immunology, Lugano, Switzerland, Sept 26-30, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Mukai T, Maeda Y, Tamura T, Matsuoka M, Tsukamoto Y, Makino M. Enhanced activation of T lymphocytes by urease-deficient recombinant bacillus Calmette-Guerin producing heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. J Immunol. 185: 6234-6243, 2010.

### 2. 学会発表

1) 前田百美、田村敏生、甲斐雅規、福富康夫、牧野正彦. A lipopeptide facilitates induction of *Mycobacterium leprae* killing in host cells、第83回日本細菌学会総会 2010年3月

2) 福富康夫、前田百美、牧野正彦. Anti-*M. leprae* activity and phox expression in human macrophages、第83回日本細菌学会総会 2010年3月

3) 前田百美、田村敏生、福富康夫、牧野正彦、らい菌のリポペプチドによる抗らい菌生体防御反応に及ぼす影響、第83回日本ハンセン病学会総会、2010年5月

4) Maeda Y, Tamura T, Fukutomi Y, Makino M. The fate of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells. 11<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and

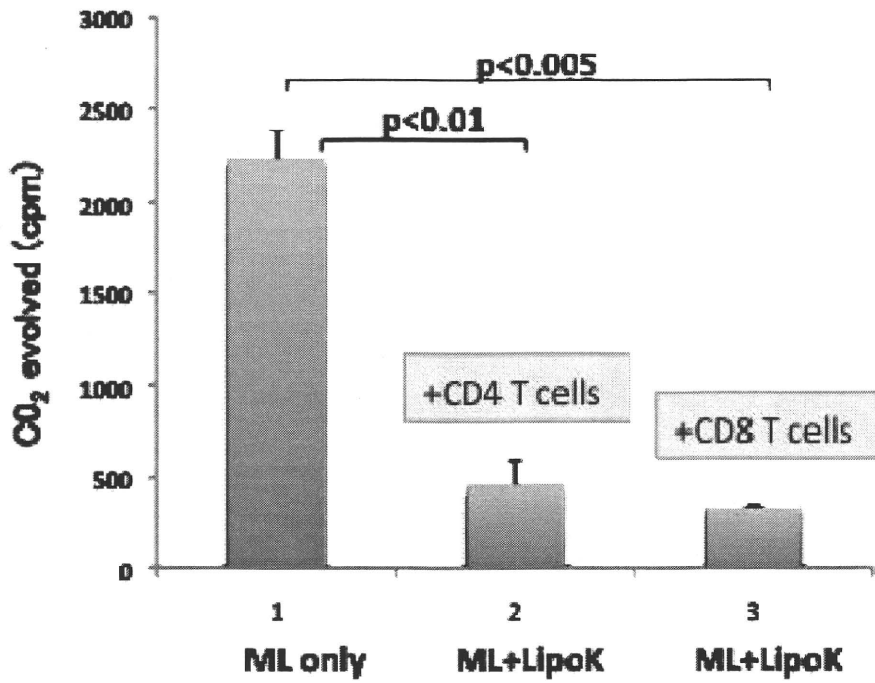


Fig.1 樹状細胞に感染したらい菌の生存率測定：樹状細胞を LipoK で刺激した後、CD4<sup>+</sup> 及び CD8<sup>+</sup> T細胞と混合培養し、1週間後にらい菌の生存率を測定

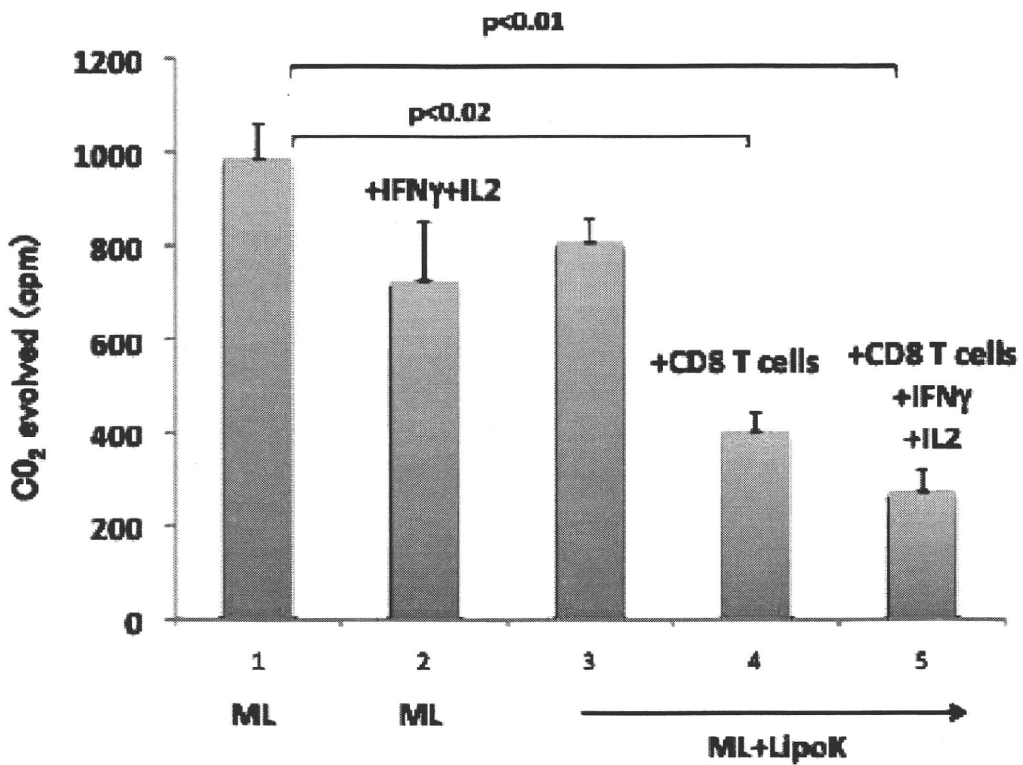


Fig.2 IFN- $\gamma$  及び IL-2 が樹状細胞内のらい菌生存率に与える影響

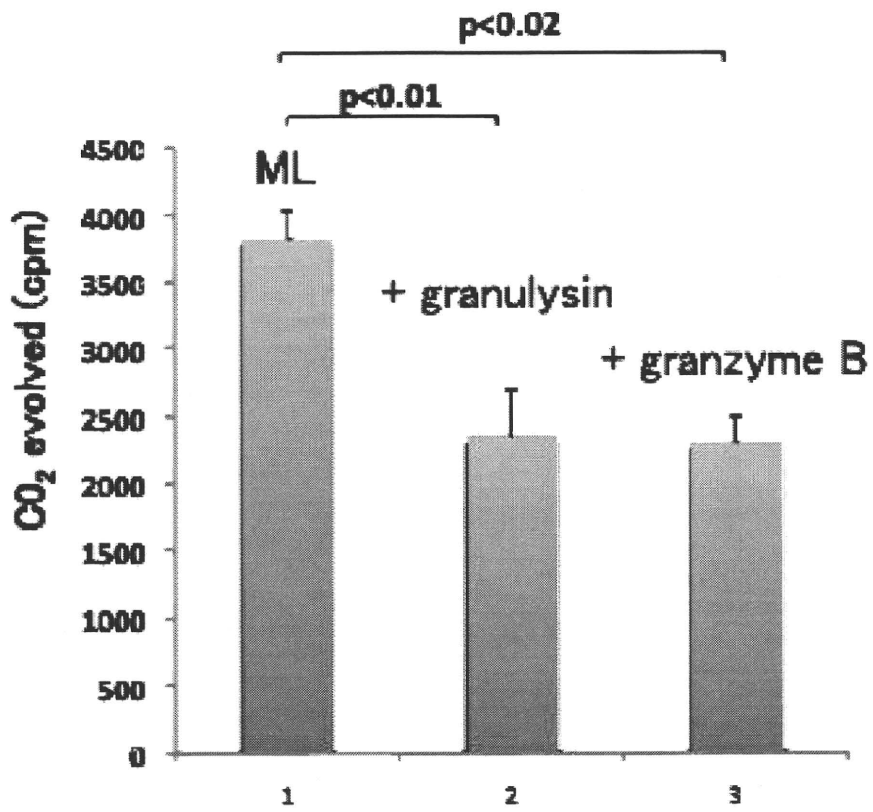


Fig.3 グラニューライシン及びグランザイムBはらい菌に対して殺菌作用を有する・in vitro 結果

厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

ハンセン病予防法に関する研究

平成22年度 分担研究報告書

研究分担者 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（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

ハンセン病予防法に関する研究

研究分担者 向井 徹 国立感染症研究所ハンセン病研究センター  
感染制御部 室長

研究要旨 BCG は、結核のワクチンとして長期間使用され、安全性は非常に高いと考えられる。しかし、ハンセン病予防ワクチンとしては、その効果は低いと報告されている。本研究では、らい菌と同じ抗酸菌である BCG の改変およびらい菌抗原を発現させることにより、ワクチンとしての能力向上の開発を行った。抗原解析では、抗酸菌由来 Hsp70 とらい菌 MMPII の融合蛋白を BCG に plasmid 発現させ、マウスにおいてらい菌増殖を抑制することを見出してきた。さらに本抗原を、BCG ゲノムに組み込まれた 1 コピー遺伝子から安定かつ充分量発現する promoter 候補領域を抗酸菌ファージに同定してきた。そこで抗原候補である融合蛋白の発現を同定 promoter により行った。その結果、組み込み型による Hsp70 とらい菌 MMPII 融合蛋白は、plasmid 型発現と同等の発現量を確認した。また安全性を得るために、BCG クローニングに用いた薬剤耐性遺伝子の除去を進めた。ワクチン開発において、その効果と安全性の評価のために感染動物実験が必要になる。そのため、幼若カニクイザル及び妊娠ザルとその新生仔へらい菌の接種を行い、らい菌感染モデル系の開発を進めている。これまでの成果は、安定・安全なハンセン病ワクチンとして組換え BCG の構築を可能にすると考えられた。

A. 研究目的

ハンセン病と同じ抗酸菌感染症である結核のワクチン BCG の使用がハンセン病予防ワクチンとして試みられてきた。しかし、その有効性は低いものとされ、新規のハンセン病ワクチンの開発が必要と考えられる。BCG は、樹立以来、長期間の使用より安全性の非常に高いことが知られている。そのため、BCG を改変することによるハンセン病ワクチン開発を進めた。

これまでに、plasmid 発現による BCG Hsp70 とらい菌 MMPII 融合蛋白は、マウスにおいてらい菌の増殖抑制に効果的であることを示してきた。

実際のワクチンとしての使用では、plasmid の脱落、その防止のための薬剤添加など、らい菌抗原発現 BCG の安全性・安定性には疑問が残る。そのため、抗原発現遺伝子の BCG ゲノムへの組み込み型による組換え BCG が必要となる。しかし、既存の promoter では組み込み型遺伝子発現量は不十分なため、これまでに抗酸菌ファージより強力な promoter 領域を同定してきた。同定された領域より強い 3 プロモーター領域を用い BCG もしくはらい菌 Hsp70 とらい菌 MMPII 融合蛋白の組み込み型発現 BCG を構築し、プラスミド発現と同等の抗原産生量であることを示して

きた。今回、構築された BCG より、薬剤耐性遺伝子除去を行った。

一方、ワクチン開発において、その効果と安全性の評価のために感染動物実験が必要になる。しかし、らい菌感染による神経症状等の臨床症状を示す動物は、ヒトとサルのみである。そのため、幼若カニクイザル及び妊娠ザルとその新生仔へらい菌の接種を行い、らい菌感染モデル系の開発を進めている。

## B. 研究方法

### らい菌抗原発現 BCG の構築

抗酸菌ファージ由来 promoter と BCG もしくはらい菌 Hsp70 とらい菌 MMP II 融合蛋白遺伝子を pUC18 へ組み込んだ。その領域の上下流にウレアーゼ配列を導入した。この plasmid を、抗酸菌ファージ由来 recombinase を発現する pJV53 を維持する BCG clone A-53 へ遺伝子導入を行い Hygromycin 耐性、ウレアーゼ試験陰性 clone を選択した。選択された clone より pJV53 を脱落させ、resolvase を発現する pYUB870 を導入した。さらに hygromycin 感受性の株を選択し、pYUB870 を脱落したクローンを選択した。各段階で菌体を可溶化し抗 MMP II 単抗体によるウエスタンプロット法を用い発現の確認を行った。

### カニクイザルによるらい菌感染系の構築

平成 16 年度に独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医学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、左手根部に各 2 頭へ接種した。らい菌接種および感染動物の維持は、医薬基盤研究所 P2 感染実験施設内で行

った。らい菌接種前、接種後 6 年間にわたり 2 ヶ月間隔で血漿・鼻腔内洗浄液を採取し PGL-1 抗体及びらい菌特異 PCR 法によりモニターを行った。また、平成 20 年度に 1 組、平成 21 年度に 2 組の妊娠 4 週ザルへ菌接種後、その出生仔へ 1、4、8 週時に母ザル共に、鼻腔内、鼻尖へ菌接種を行い経過観察を進めた。

(倫理面への配慮)

動物実験は、各施設の動物実験委員会の承認を受け行った。研究の実施にあたっては、各施設の諸内規や作業方式に従い、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた。

## C. 研究結果

### 改変 BCG の構築

Promoter として P79, P85, P86 を、Hsp70 として BCG もしくはらい菌由来を、MMP II としてらい菌由来を持つ plasmid を urease 配列内に組み込み urease 破壊各種抗原発現 BCG 株を構築した。安全・安定な BCG 構築のため、まず、カナマイシン耐性遺伝子を持つ pJV53 脱落クローンを選択した。次に Hygromycin 遺伝子両端にある res 配列と反応し、耐性遺伝子を切り出す resolvase をコードする pYUB870 を遺伝子導入後、hygromycin 感受性菌を選択した。さらにカナマイシン遺伝子を持つ pYUB870 を脱落させ (図 1)、ウエスタンプロットにより抗原発現を確認した。

### カニクイザルらい菌感染系の構築

幼若サル、鼻尖接種の 1 頭に接種後 5 8、5 9 月目に鼻腔洗浄液の nested PCR 法の 2nd において陽性が確認された。6 0 月目のサンプルでは、陽性は確認されなかった。PGL-1 抗体の検討では、1 頭に昨年