

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

薬剤耐性獲得機構解明とその迅速感受性試験法開発への応用

研究分担者 鈴木 定彦 北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター 教授  
研究協力者 松岡 正典 国立感染症研究所 ハンセン病研究センター 再任用職員  
研究協力者 中島 千絵 北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター 特任助教

研究要旨 薬剤耐性ハンセン病対策には、薬剤耐性ハンセン病の早期発見と、らい菌の薬剤感受性を踏まえた適切な治療の徹底が重要である。そのために精度ならびに特異性が高く、安価な薬剤感受性試験法の開発と実用化が鍵となる。本研究では、多剤耐性ハンセン病の治療に重要なキノロン耐性に係る遺伝子変異を明らかにするため、種々のらい菌 DNA ジャイレースを組換え蛋白質として発現させ、これらに対する各種キノロン剤の効果を評価した。その結果、近縁細菌である結核菌のキノロン耐性臨床分離株では見られるが、らい菌では報告のない DNA ジャイレース上のアミノ酸置換を引き起こす遺伝子変異により、らい菌はキノロン剤耐性を獲得する事を見出した。

A. 研究目的

現在のハンセン病の治療は世界保健機構(WHO)推奨の多剤併用療法により実施されているが、既に複数の国々で耐性ハンセン病患者が出現しており、問題となっている。我が国でもそれは例外でなく、薬剤耐性ハンセン病対策は、厚生労働行政の課題となっている。

薬剤耐性ハンセン病対策には、世界規模での薬剤耐性菌の伝播状況を把握し、それによって現行の多剤併用療法の効果を評価し、耐性菌の拡散の防止対策を立案し、以て、その有効性の維持を図る必要がある。そのためには、薬剤耐性ハンセン病の早期発見と、らい菌の薬剤感受性を踏まえた適切な治療の徹底が重要である。そのためには精度ならび

に特異性が高く、安価な薬剤感受性試験法の開発と実用化が鍵となる。薬剤感受性試験をより精度の高いものとするため、薬剤耐性に係る遺伝子変異の網羅的な解析が必要であるが、現状では十分とは言えない。特に多剤耐性ハンセン病の治療に重要なキノロン耐性に係る遺伝子変異の解析は不十分であったため、これを明らかにすることを目的として研究を進めた。

本年度は特に、近縁細菌である結核菌のキノロン耐性臨床分離株では見られるが、らい菌では報告のないDNA ジャイレース上のアミノ酸置換に着目して、そのらい菌におけるキノロン耐性への関与について解析した。

## B. 研究方法

### 1) 組換え DNA ジャイレース

DNA ジャイレース A、B 両サブユニットをコードする *gyrA*、*gyrB* 遺伝子を、らい菌 Thai53 株由来 DNA を鋳型として PCR 法により増幅させ、発現ベクター pET に連結、大腸菌へ導入してヒスチジンタグを有する組換え蛋白質として発現させた。更に、95 番目のアミノ酸にアスパラギンからグリシンへの置換を有する変異型 A サブユニット (GyrA-Asp95Gly)、GyrA-Asp95Asn および Ala91Val と変異型 B サブユニット GyrB-Asp500Asn、GyrB-Asn538Asp および GyrB-Glu540Val を用意した。発現させた全ての蛋白質はニッケル-アガロースカラムクロマトグラフィーにより精製した後、以下の実験に供した。

### 2) 組換え DNA ジャイレースの活性

精製した A、B サブユニットを等モルずつ混合し再構成した DNA ジャイレースを実験に用いた。ジャイレース活性の評価は、リラックス型のプラスミドを基質として、スーパーコイル型のプラスミドへと転換する活性 (スーパーコイル化活性) を定量する事により実施した。

### 3) キノロン剤のスーパーコイル化活性への阻害効果

種々のキノロン剤 (オフロキサシン; OFX、モキシフロキサシン; MXF、ガチフロキサシン; GAT、シタフロキサシン; SIT、シプロフロキサシン; SIT、レボフロキサシン; LVX) を様々な濃度で上記アッセイ系に添加し、DNA ジャイレース

のスーパーコイル化活性を 50% 阻害する薬剤の濃度 (IC50) を求めた。

### 4) キノロン剤のスーパーコイル型プラスミド切断誘導能

精製した A、B サブユニットを等モルずつ混合し再構成した DNA ジャイレースを実験に用いた。スーパーコイル型プラスミド切断誘導能の評価は、種々のキノロン剤を様々な濃度で添加し、DNA ジャイレースにスーパーコイル型 DNA 25% の切断を誘導する薬剤の濃度 (CC25) を求めた。

(倫理面への配慮)

該当せず

## C. 研究結果

### 1) 組換え DNA ジャイレース

図 1 に精製した種々の組換え DNA ジャイレースの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析結果を示す。全ての蛋白質において 200ml の大腸菌培養液から 1mg 以上の組換え蛋白質が精製でき、その純度は 95% 以上であった。

### 2) 組換え DNA ジャイレースの活性

図 2 に精製した種々の組換え DNA ジャイレースのスーパーコイル化活性の評価結果を示す。どの DNA ジャイレースも ATP 依存的にリラックス型のプラスミドをスーパーコイル型のプラスミドへと転換する活性を有していた。

### 3) キノロン剤のスーパーコイル化活性に対する阻害効果とスーパーコイル型プラスミド切断誘導能

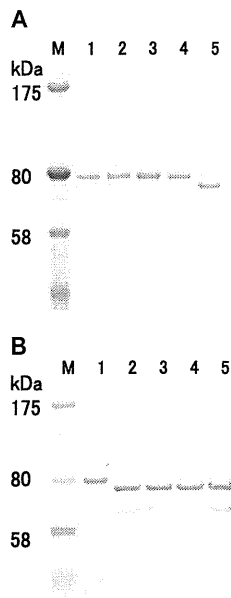


図1. 精製した種々の組換えDNAジャイレースのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析  
 パネルA: レーン1; 野生型GyrA、レーン2; GyrA-Ala91Val、レーン3; GyrA-Asp95Gly、レーン4; GyrA-Asp95Asn、レーン5; 野生型GyrB、パネルB: レーン1; 野生型GyrA、レーン2; 野生型GyrB、レーン3; GyrB-Asp500Asn、レーン4; GyrB-Asn538Asp、レーン5; GyrB-Glu540Val

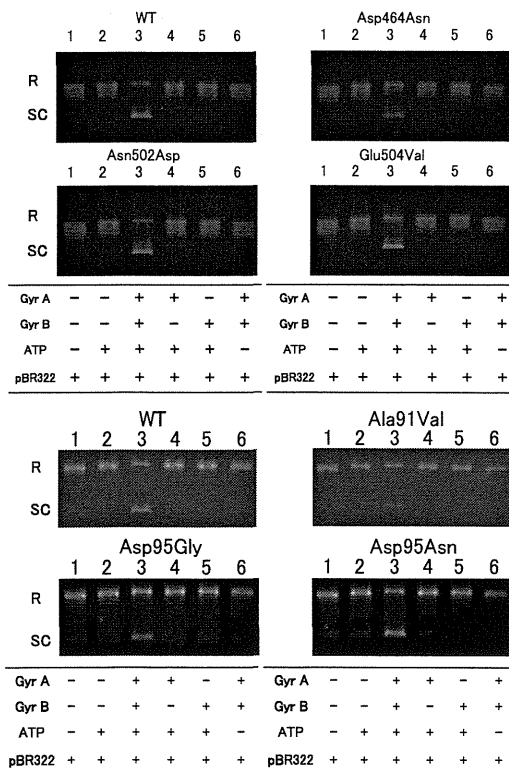


図2. 種々の組換えDNAジャイレースのスーパーコイル化活性

図3A にキノロン剤による DNA ジャイレースのスーパーコイル化活性に対する阻害効果評価試験結果の一例を、B にスーパーコイル型プラスミッド切断誘導能評価試験結果の一例を示す。スーパーコイル化阻害効果評価試験ではキノロン剤の濃度依存的にスーパーコイル化プラスミッドの現象が見られ、プラスミッド切断誘導能評価試験では、キノロン剤の濃度依存的に切断された DNA 量の増加が見られる。スーパーコイル化阻害効果評価試験で得られた結果から種々のキノロン剤の IC50 を算出し、表1 にまとめた。一方、プラスミッド切断誘導能評価試験で得られた結果から種々のキノロン剤の CC25 を算出し、表 2 にまとめた。比較対象としたキノロン耐性らい菌で見られる A サブユニットに Ala91Val 置換を有する DNA ジャイレースと同様に、GyrA-Asp95Gly、GyrA-Asp95Asn、GyrB-Asp500Asn、GyrB-Asn538Asp、GyrB-Glu540Val を保有する DNA ジャイレースに対する各種キノロンの IC50 ならびに CC25 は何れも野生型 DNA ジャイレースに対するそれに比べて高い値を示していた。また、本研究で評価に供したキノロン剤のうちでも特にシタフロキサシンは、GyrA-Asp95Gly、GyrA-Asp95Asn、GyrB-Asp500Asn、GyrB-Asn538Asp、GyrB-Glu540Val を保有する変異型 DNA ジャイレースに対する IC50 はそれぞれ 1.0、2.2、3.9、1.8、1.6、1.7  $\mu\text{g/ml}$ 、CC25 はそれぞれ 0.9、2.2、2.3、0.9、1.0、0.7  $\mu\text{g/ml}$  と特に低い値を示した。

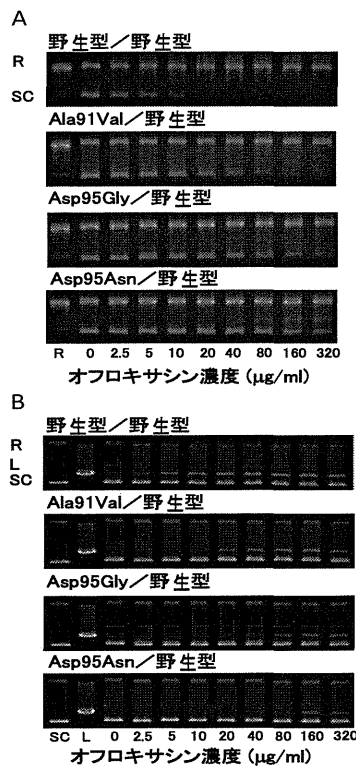


図1. キノロン剤のDNAジャイレースへの効果  
 パネルA: スーパーコイル化活性に対する阻害効果評価試験結果、  
 パネルB: スーパーコイル型プラスミッド切断誘導能評価試験結果。  
 右肩にDNAジャイレースの型を表記。R: リラクセス型プラスミッドDNA、  
 SC: スーパーコイル型プラスミッドDNA、L: リニア型プラスミッドDNA。

#### D. 考察

上記結果から、類縁菌である結核菌は有するが、らい菌においては未だに報告のないアミノ酸置換である GyrA-Asp95Gly、GyrA-Asp95Asn、GyrB-Asp500Asn、GyrB-Asn538Asp または GyrB-Glu540Val を保有する DNA ジャイレースは各種キノロンに対して耐性を示す事が明らかとなった。これは、上記のアミノ酸置換をとまなう遺伝子変異を持ったキノロン耐性らい菌の出現を予想するものであった。一方、シタフロキサシンの上記変異型 DNA ジャイレースに対する IC50 ならびに CC25 の低値は、これらの変異型 DNA ジャイレースを持ったらい菌が出現した場合でも、シタフロキサシンによる治療が可能である事を示すものであった。

表1. 各種キノロン剤の種々の変異型DNAジャイレースに対するIC50

| Drug | サブユニット |           | IC <sub>50</sub> |              |               |            |              |            |
|------|--------|-----------|------------------|--------------|---------------|------------|--------------|------------|
|      | A      | 野生型       | Ala91Val         | Asp95Gly     | Asp95Asn      | 野生型        | 野生型          | 野生型        |
|      | B      | 野生型       | 野生型              | 野生型          | 野生型           | Asp464Asn  | Asn502Asp    | Glu504Val  |
| OFX  |        | 6.8 ± 0.8 | 39.4 ± 15.5      | 161.2 ± 44.2 | 262.3 ± 105.8 | 53.9 ± 9.0 | 106.6 ± 25.1 | 34.6 ± 4.3 |
| MXF  |        | 1.5 ± 0.3 | 5.2 ± 1.0        | 21.5 ± 4.7   | 34.7 ± 3.1    | 4.1 ± 0.4  | 17.8 ± 2.6   | 13.9 ± 0.6 |
| GAT  |        | 1.0 ± 0.1 | 3.1 ± 0.7        | 7.5 ± 1.6    | 13.8 ± 1.6    | ND         | ND           | ND         |
| SIT  |        | 0.4 ± 0.0 | 1.0 ± 0.2        | 2.2 ± 0.5    | 3.9 ± 0.6     | 1.8 ± 0.3  | 1.6 ± 0.6    | 1.7 ± 0.2  |
| CIP  |        | ND        | ND               | ND           | ND            | 11.3 ± 2.7 | 257.9 ± 46.1 | 49.3 ± 9.4 |
| LVX  |        | ND        | ND               | ND           | ND            | 32.9 ± 3.2 | 46.8 ± 1.1   | 19.9 ± 2.9 |

表2. 各種キノロン剤の種々の変異型DNAジャイレースに対するCC25

| Drug | サブユニット |           | IC <sub>50</sub> |              |              |            |             |            |
|------|--------|-----------|------------------|--------------|--------------|------------|-------------|------------|
|      | A      | 野生型       | Ala91Val         | Asp95Gly     | Asp95Asn     | 野生型        | 野生型         | 野生型        |
|      | B      | 野生型       | 野生型              | 野生型          | 野生型          | Asp464Asn  | Asn502Asp   | Glu504Val  |
| OFX  |        | 7.3 ± 0.5 | 75.5 ± 16.8      | 240.5 ± 30.7 | 269.5 ± 76.5 | 32.7 ± 6.3 | 78.2 ± 12.6 | 30.0 ± 7.9 |
| MXF  |        | 1.0 ± 0.1 | 4.5 ± 1.0        | 25.5 ± 3.7   | 20.8 ± 5.0   | 3.3 ± 0.9  | 15.3 ± 2.6  | 9.6 ± 1.7  |
| GAT  |        | 1.1 ± 0.2 | 4.3 ± 0.2        | 15.6 ± 3.6   | 13.5 ± 3.1   | ND         | ND          | ND         |
| SIT  |        | 0.3 ± 0.0 | 0.9 ± 0.0        | 2.2 ± 0.6    | 2.3 ± 0.4    | 0.9 ± 0.0  | 1.0 ± 0.2   | 0.7 ± 0.1  |
| CIP  |        | ND        | ND               | ND           | ND           | 6.5 ± 0.6  | 42.5 ± 13.6 | 24.7 ± 0.5 |
| LVX  |        | ND        | ND               | ND           | ND           | 18.6 ± 4.9 | 51.7 ± 10.6 | 9.3 ± 0.7  |

## E. 結論

アミノ酸置換を導入した組換えDNA ジャイレースを用いた試験により、らい菌のキノロン耐性獲得に係る可能性のある遺伝子変異を明らかとした。また、同試験により、ハンセン病の治療に用いられているキノロンの一種のオフロキサシンに耐性であっても、シタフロキサシンはこれに有効であるものと考えられ、キノロン剤耐性ハンセン病治療に新たな道を示すものであった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Rocha A.S., Cunha M. G., Diniz L., Salgado C., Aires M. A., Nery J. A., Gallo E., Miranda A., Magnanini M., Matsuoka M., Sarno E., Sufys P., Oliveira M. Drug and multiple-drug Resistance Among *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian relapsed leprosy patients. *Journal Clinical Microbiology*. Vol. 50 1912-1917, 2012
- 2) Cambau E., Nevejans A.C., Tejmar-Kolar L., Matsuoka M., Jarier V. Detection of antibiotic resistance in leprosy using GenoType®Leprae DR, a novel ready-to-use molecular test. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Vol. 6: e1739. doi:10.1371, 2012
- 3) Khin S.A., Yin T.N.O., Kyaw K., Aye .A. W., Matsuoka M. Genotyping of *Mycobacterium leprae* in Myanmar and supposed transmission mode. *Japanese Journal of Leprosy*.

Vol.81:191-198, 2012

- 4) Yokoyama K., Kim H., Mukai T., Matsuoka M., Nakajima C., Suzuki Y. Impact of amino acid substitution in B subunit of DNA gyrase in *Mycobacterium leprae* on fluoroquinolone resistance. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Vol. 6: e1838, 2012
  - 5) Suzuki Y., Nakajima C, Tamaru A, Kim H, Matsuba T, Saito H. Sensitivities of ciprofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates to fluoroquinolones: Role of mutant DNA gyrase subunits in drug resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39(5):435-439. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.01.007
  - 6) 松岡正典、ハンセン病の基礎医学分野における日韓協力について。日本ハンセン病学会雑誌 81 巻 3 号 205-207、2012
- ### 2. 学会発表
- 1) 金玄、横山和正、中島千絵、松岡正典、向井徹、福富康夫、鈴木定彦。らい菌の DNA ジャイレースの性状解析。第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会。2012 年 6 月。札幌市
  - 2) 横山和正、金玄、中島千絵、松岡正典、向井徹、鈴木定彦。らい菌の DNA ジャイレース A サブユニット上のアミノ酸置換とニューキノロン耐性。第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会。2012 年 6 月。札幌市
  - 3) 横山和正、金玄、中島千絵、松岡正典、向井徹、鈴木定彦。らい菌の

DNA ジャイレース B サブユニット上の  
アミノ酸置換とニューキノロン耐性. 第  
85 回日本ハンセン病学会総会・学術  
大会. 2012 年 6 月. 札幌市

- 4) Masanori Matsuoka. Collaboration  
between Korea and Japan for basic  
research on leprosy. 第85回日本ハン  
セン病学会総会・学術大会、シンポジ  
ューム. 2012 年 6 月. 札幌市
- 5) 甲斐雅規、中田 登、松岡正典、関  
塚剛史、黒田誠、牧野正彦. らい菌  
Kyoto-2 株の全ベノムシーケンスに  
より同定された SNPs の解析. 第 85 回  
日本ハンセン病学会総会・学術大会  
2012 年 6 月. 札幌市

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許

- 1) 鈴木定彦、中島千絵、鈴木晴香、奥  
村英正、川瀬三雄、廣田寿一、丹羽  
孝介. 標的ポリヌクレオチドの検出方  
法及びアレイ. 平成24年6月25日、  
PCT/JP2012/066167、出願人；国立  
大学法人北海道大学、日本碍子株式  
会社

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・再発に関する免疫学的診断法の開発

平成24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

再燃・再発に関する免疫学的診断法の開発

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 ハンセン病の再燃・再発は、少ないが繰り返すと後遺症の治療は困難となる。末梢血単核球細胞を培養し MMP- II および MLC を添加後に産生されるサイトカインを ELISA、フローサイトメトリーで解析した。病型、臨床症状や経過との関連性よりハンセン病の再燃・再発のし易さを判定する方法を開発することを目的とした。ハンセン病の少菌型 6 名、多菌型 5 名および正常対照群 6 名について末梢血単核球細胞を分離し、MMP- II (2 もしくは 4  $\mu$  g/ml) あるいは MLC (4 もしくは 8  $\mu$  g/ml) を添加し 96 時間培養した。培養上清中の IFN- $\gamma$  の産生は、ELISA では正常対照群と比較して少菌型で MMP- II、MLC の刺激でより多かった。フローサイトメトリーによる細胞内サイトカイン染色陽性細胞の割合は、少菌型、多菌型とも刺激の条件で IFN- $\gamma$  については CD4 および CD8 陽性細胞において、IL-10 では CD4 陽性細胞において増加する傾向がみられた。少菌型で 1 例再発を認めたが、再発時の培養上清で IFN- $\gamma$  産生が最も高値を示した。ハンセン病の再燃・再発について免疫学的手法で早期診断が出来れば有意義と考えられた。

A. 研究目的

ハンセン病の再燃・再発は比較的少ないが、繰り返す場合は後遺症の治療に難渋することがよく知られている。このような症例の早期診断は重要な課題と考えられる。

らい菌の細胞膜蛋白 MMP (Major membrane protein)- II に対する血清抗体による診断法は、従来の PGL-I 抗体測定法と比較して陽性率が高く、再燃・再発の予測に有用と考えられたが、抗体

価持続高値の症例があることが、平成 21 年から 23 年度の「ハンセン病の再発・再燃症例に対する予防・診断・治療とハンセン病の啓発に関する研究」班の分担研究の結果で明らかとなっている。したがって再燃・再発に関する新たな診断法の開発が必要と考えられる。

MMP- II は T 細胞からの IFN- $\gamma$  などのサイトカイン産生を惹起することが知られているが、末梢血単核球細胞の培養系に MMP- II および MLC (*Mycobacterium*



*leprae* cytosolic protein)を添加して産生されるサイトカインをELISAおよびフローサイトメトリーで詳細に解析し、病型や臨床症状とその経過等との関連性も同時に検討してゆくことでハンセン病の再燃・再発のおこし易さを判定する方法を開発することを目的とした。

## B. 研究方法

同意の得られた国立療養所星塚敬愛園入所者のハンセン病の少菌型(PB)の6名(男1名、女5名)、多菌型(MB)の5名(男3名、女2名)、および国立療養所星塚敬愛園および鹿屋医療センターの外来受診者である対照群の6名(男4名、女2名)について末梢血約10mlを採取した。この血液より単核球細胞を分離し、一時凍結保存し、解凍後これらの細胞(細胞数  $0.5 \times 10^5$  個/well)に MMP-II を 2 もしくは  $4 \mu\text{g/ml}$ 、あるいは MLC を 4 もしくは  $8 \mu\text{g/ml}$  を添加し 96 時間培養した。

少菌型の1例は平成24年4月に再発したが、血清 MMP-II 抗体価については再発前後の6回分の血清、ELISA およびフローサイトメトリーについては、再発時、内服治療中の同年9月、11月の血液検体を用いた。他の例では治癒期の血液検体を用いた。

平成21年から23年度の上記研究班の分担研究では、培地(RPMI-1640)の10%にFCS(Fetal calf serum)を加えたが、培養上清中のIFN- $\gamma$ 値がMMP-II、MLCなどの刺激物質のない状態でもやや高値の例があったため、今回はより影響の少ないと考えられるヒトAB型血清を代わりに培地に10%加えた。培養上清中

へ産生されるIFN- $\gamma$ 、IL-10などのサイトカインについてELISAで測定を行った。フローサイトメトリーでは、培養細胞中のCD4およびCD8陽性細胞におけるそれぞれIFN- $\gamma$ 、IL-10に対する抗体での染色陽性細胞の割合(%)を算出した。(コントロールとしてIgG1抗体を用いた。)

(倫理面への配慮)

過去の生検組織、血液検体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24年10月に開催された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。また凍結保存中であった鹿屋医療センターで得られた血液検体の細胞性免疫能等に関する使用については、前述の平成21年から23年度の「ハンセン病の再発・再燃症例に対する予防・診断・治療とハンセン病の啓発に関する研究」班の分担研究に対して平成22年7月に行われた同センター生命倫理委員会で承認を受けている。

### C. 研究結果

ELISA では、IFN- $\gamma$  の産生量は対照群と比較して少菌型で MMP-II、MLC の添加の条件でより多かった。(MMP-II 2  $\mu$ g/ml で正常対照群: 351.2  $\pm$  505.4 pg/ml、少菌型: 1139.4  $\pm$  1889.6 pg/ml、多菌型: 253.6  $\pm$  64.0 pg/ml、MLC 4  $\mu$ g/ml で正常対照群: 170.4  $\pm$  151.0 pg/ml、少菌型: 273.5  $\pm$  153.7 pg/ml、多菌型: 165.3  $\pm$  9.6 pg/ml) MMP-II、MLC のない条件で IFN- $\gamma$  の産生量がやや高値の例は比較的少なかった。ELISA での IL-10 の産生量は、各群間で著明な差を認めなかった。(Table 1.)

フローサイトメリーによる細胞内サイトカイン染色陽性細胞の割合については、同様の刺激条件で少菌型、多菌型とも IFN- $\gamma$  では CD4 および CD8 陽性細胞において、IL-10 では CD4 陽性細胞において刺激のない条件より増加する傾向がみられた。

上記の少菌型の1例は、平成 24 年 5 月に再発したが、その際右大腿外側に 2 カ所(4-7cm)の環状紅斑と、左大腿前面に 1 カ所(2-3cm)の紅斑を認めた。皮疹部の触覚は低下していた。環状紅斑より皮膚生検を施行したが、真皮表層から中層にかけて、末梢神経束の周囲を中心に、血管周囲にもリンパ球の浸潤を認めた。明らかな類上皮細胞肉芽腫は認めず、末梢神経は良く保たれており、抗酸菌染色は陰性であった。ハンセン病の再発初期(I-BT)と考えられた。また MMP-II モノクローナル抗体による免疫染色も行ったが、陰性であった。血清 MMP-II 抗体価は皮疹出現の前後で著

明な上昇は見られなかったが、RFP(600mg 1 回/月)、DDS(75mg 1 回/日)の内服治療開始の約 6 ヶ月後、軽度の上昇がみられた。ELISA において培養上清中の IFN- $\gamma$  産生量は、皮疹の出現時に最も高く、その後低下した。フローサイトメリーによる細胞内サイトカイン染色陽性細胞の割合については、刺激の条件で IFN- $\gamma$  では CD4 陽性細胞でより増加する傾向がみられた。

### D. 考察

ELISA では、IFN- $\gamma$  の産生量は対照群と比較して少菌型で MMP-II、MLC の添加の条件でより多かったが、症例間で値にばらつきがあったため、少菌型、多菌型、正常対照群いずれもさらに症例数を増やしての検討が必要と思われた。フローサイトメリーによる細胞内サイトカイン染色陽性細胞の割合については、刺激の条件で少菌型、多菌型とも IFN- $\gamma$  では CD4 および CD8 陽性細胞において、IL-10 では CD4 陽性細胞において刺激のない条件より増加する傾向がみられたが、刺激のない条件でもやや値が高い傾向もあったため実験条件をさらに再検討する必要があると思われた。また、IFN- $\gamma$  や IL-10 を産生する細胞の種類についても CD4 あるいは CD8 陽性細胞以外にどのようなものがあるかの検討も必要と思われた。

再発の少菌型の1例については、細胞性免疫能の変化を含めさらに経過観察してゆく方針である。

### E. 結論

ハンセン病の再燃・再発の可能性について免疫学的手法を用い早期診断が出来れば有意義と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

培地: 10%AB serum+RPMI+Penicillin

PBMC:  $0.5 \times 10^5$ /well

|                     | <b>Control 6例</b>   |                 | <b>PB 6例</b>        |                 | <b>MB 5例</b>        |                 |
|---------------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
|                     | INF- $\gamma$ pg/ml | IL-10 pg/ml     | INF- $\gamma$ pg/ml | IL-10 pg/ml     | INF- $\gamma$ pg/ml | IL-10 pg/ml     |
| MLC- MMP-           | 167.8 $\pm$ 130.6   | 51.0 $\pm$ 9.8  | 177.3 $\pm$ 46.8    | 64.1 $\pm$ 21.4 | 169.8 $\pm$ 10.3    | 48.1 $\pm$ 7.7  |
| MLC 4 $\mu$ g/ml    | 170.4 $\pm$ 151.0   | 49.7 $\pm$ 8.3  | 273.5 $\pm$ 153.7   | 53.7 $\pm$ 12.4 | 165.3 $\pm$ 9.6     | 48.3 $\pm$ 8.3  |
| MLC 8 $\mu$ g/ml    | 227.6 $\pm$ 268.2   | 56.0 $\pm$ 4.4  | 537.9 $\pm$ 761.8   | 60.9 $\pm$ 19.8 | 166.9 $\pm$ 10.4    | 44.9 $\pm$ 6.8  |
| MMP-II 2 $\mu$ g/ml | 351.2 $\pm$ 505.4   | 74.9 $\pm$ 10.4 | 1139.4 $\pm$ 1889.6 | 83.5 $\pm$ 11.9 | 253.6 $\pm$ 64.0    | 87.2 $\pm$ 26.7 |
| MMP-II 4 $\mu$ g/ml | 372.1 $\pm$ 587.2   | 80.6 $\pm$ 11.2 | 1073.6 $\pm$ 1278.1 | 93.5 $\pm$ 17.9 | 242.0 $\pm$ 71.2    | 71.8 $\pm$ 13.7 |

: Means $\pm$ SD(Standard deviation)

Table 1. MLC、MMP-II刺激による末梢血単核球培養(96時間後)上清中のINF- $\gamma$ 、IL-10の産生量(pg/ml)

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)

## 免疫療法の開発

平成24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

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 が宿主のらい菌感染防御機構に大きな役割を担っていることを報告してきた。LipoK でらい菌感染樹状細胞を刺激し、T細胞と混合培養すると、T細胞から大量の IFN- $\gamma$  産生が誘導され、細胞傷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た。しかしながら、T細胞の活性化に LipoK がどのように関わっているか、その機序は不明である。そこで、活性化した樹状細胞から放出されるエキソソームの解析を行なった。LipoK で刺激した樹状細胞から放出されるエキソソームはらい菌膜蛋白の抗体と反応し、N末端分析した結果、予想される分子量は約 29kD、271 アミノ酸からなるらい菌膜蛋白であった。大腸菌で融合蛋白として発現した蛋白は、らい菌膜抗体と反応することが確認された。今回得られたエキソソームは T細胞を直接活性化することが明らかになり、エキソソームは免疫療法に活用し得る分子であると考えられた。

A. 研究目的

これまでに、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から、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 TLR2 を認識し、樹状細胞を活性化した。

今回、抗原提示細胞から分泌されるエキソソームの役割に注目した。エキソソームは、細胞から放出される微小小胞である。エキソソームは、エンドソームに由来し、細胞膜と融合することによって内

部の小胞を細胞外環境に放出する。抗原提示細胞に由来するエキソソームは、T細胞を活性化させる一群の免疫賦活性分子を含むことから、生体防御に重要な役割を果たす事が推測される。そこで、樹状細胞から放出されるエキソソームの解析を行った。また、N末端ペプチド分析から得られた未知のらい菌膜蛋白の発現と精製を大腸菌で試みた。

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 0.3 $\mu$ g/ml の濃度

で使用した。樹状細胞は正常健康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して分析した。T細胞は Dynabeads untouched human T cell を用いて精製した。培地中に分泌される IFN- $\gamma$  は BD 社の OptiEIA ELISA キットを用いて測定した。抗らい菌膜タンパクに対するポリクロナル抗体はブレナン博士から分与された。培地中に放出されるエクソソームの精製は Invitrogen のキットを用いて行った。らい菌を Oregon green で標識し、樹状細胞に感染し、得られたエクソソームの蛍光強度を Infinite200 (Tecan) プレートリーダーを用いて測定した。蛋白発現には pMAL-c2X(NEB)発現ベクターを用いた。蛋白精製はアミロースカラムを使用し、マルトースで溶出した。

#### (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を漏出しないように注意を払った。

#### C. 研究結果

これまでに、らい菌感染樹状細胞を LipoK でパルスし、放出されるエクソソームを Class II ビーズで精製し、フローサイトメトリで分析した結果、LipoK の刺激により、MHC Class I, Class II および

CD86 抗原は、らい菌感染樹状細胞から得られたエクソソームより多く含まれていた。そこで、菌体成分が含まれているか確かめるため、Oregon green(蛍光)ラベルしたらい菌で樹状細胞を感染し、得られたエクソソームの蛍光強度をプレートリーダーで測定した。LipoK で刺激するとらい菌のみで刺激した樹状細胞からえられたエクソソームの蛍光強度が有意に増加した(Fig.1)。この事は、LipoK により TLR2 を介して多くのらい菌が分解され、抗原提示に繋がると考えられる。そこで、直接 T 細胞をエクソソームによって刺激されるか、IFN- $\gamma$  分泌量を指標に調べた。その結果、らい菌感染樹状細胞からえられたでは 400pg/ml に対して LipoK 刺激して得られたエクソソームからは約 1.5ng/ml の IFN- $\gamma$  が検出された。

らい菌抗原の存在を確認するため、ウエスタンブロット法で分析を行った。その結果、約 28-35kD あたりにブロードなバンドが抗らい菌膜抗体で検出された(Fig.2)。そこで、PVDF 膜から蛋白バンドを切り出し、N 末端解析を(ABI precise 491HT)で行った。“Exop-1”と命名した未知な蛋白が検出された。Exop-1 は 271 アミノ酸からなる約 29kD の蛋白であり、export 蛋白である可能性が高い。Exop-1 蛋白を大腸菌で発現するため、pMAL-c2X を用いた。Exop-1-MBP (MBP:マルトース結合蛋白)融合蛋白として約 66kD にバンドが検出された。精製するため、アミロースカラムを用いて、マルトースで溶出を試みたが、ほとんど検出できなかった。コントロールとして MMP-II は精製されました。さらなる、精

製手段が必要となる。しかしながら、未精製蛋白を電気泳動し、ハンセン病患者の血液とウエスタンブロットを行うとバンドが見えてきたことから、この蛋白は免疫原性を有する蛋白であると考えられた。

#### D. 考察

LipoK は TLR2 を認識し、エキソソームを放出した。エキソソームの分析をすると菌由来の蛋白が検出された。抗らい菌膜蛋白抗体を用いると約 28-35kD の蛋白が存在すると考えられた。プロテオミクス解析によると MMP-I, groEL, eftA, mtrA, prcA などが報告されているが、N 末端解析すると未知な蛋白が検出され (Exop-1)、T 細胞の活性化に関与する可能性が示唆された。

#### E. 結論

LipoK は TLR-2 を介して、感染細胞を活性化し、エキソソームを放出した。この微小小膜は T 細胞を活性化させる一群の免疫賦活性分子を持つことから、生体防御に重要な役割を果たす事が考えられる。得られた未知な蛋白は新たな有用な抗原性のある蛋白になり得ると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 前田百美、田村敏生、福富康夫、牧野正彦. らい菌感染した樹状細胞から分泌されるエキソゾームの解析. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術

大会. 2012 年 6 月 札幌市

- 2) 向井徹、宮本友司、福富康夫、前田百美、牧野正彦. Bioluminescence 系の抗酸菌応用への基礎的研究. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2012 年 6 月 札幌市

- 3) Maeda Y., Tamura T., Mukai T., Fukutomi Y., Makino M. Characterization of exosomes derived from *Mycobacterium leprae* infected human dendritic cells. Keystone Symposia, Tuberculosis: Understanding the enemy. Whistler, BC, Canada, Mar 13-18, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



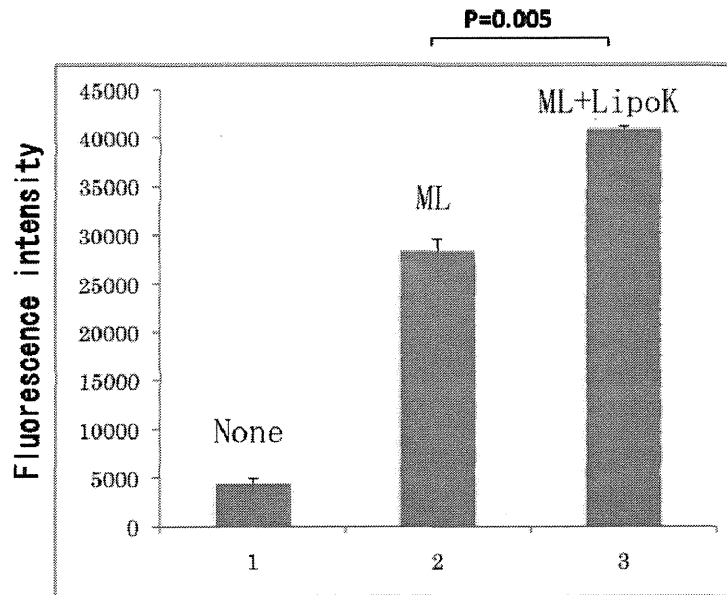


Fig. 1 樹状細胞から得られたエクソソームの蛍光強度。y 軸は蛍光強度、None: 未刺激、ML: らい菌

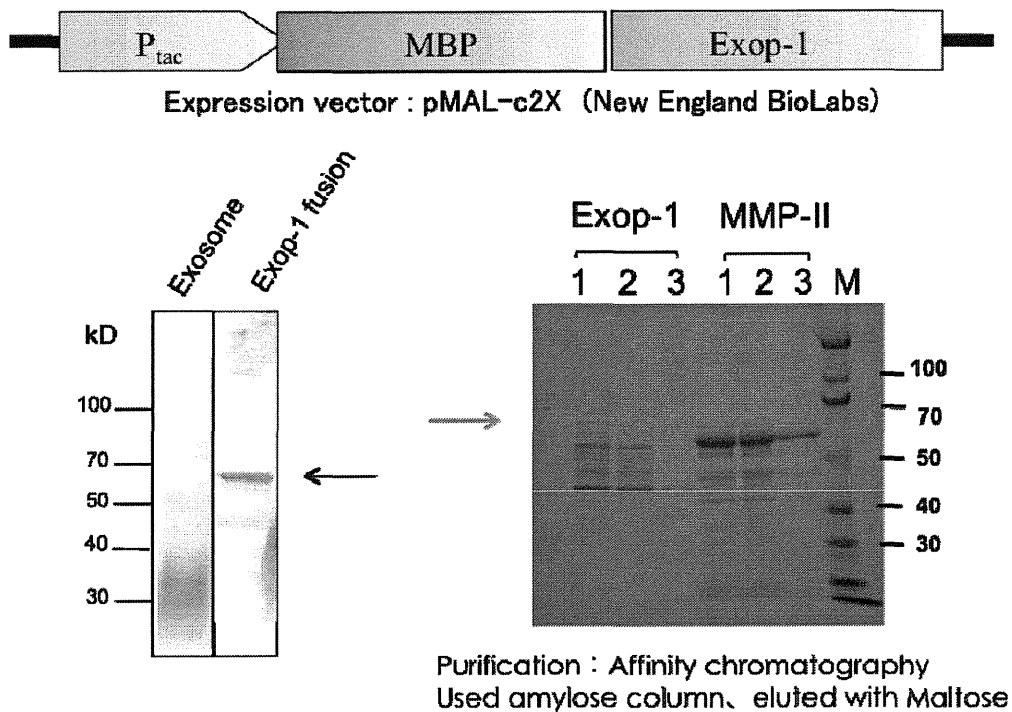


Fig. 2 大腸菌で Exop-1 を融合蛋白として発現し、ウエスタン法で検出した (左の図)。右の図は SimplyBlue SafeStain で染色した精製蛋白。

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・結核共通ワクチンの免疫学的評価

平成24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・結核共通ワクチンの免疫学的評価

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  
感染制御部 部長  
研究協力者 遠藤 真澄 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 ハンセン病と結核は共に抗酸菌の感染により発症する慢性細菌感染症であって両者の流行国はほぼ同一であり、かつ、共にワクチンとして弱毒化牛型結核菌 *Mycobacterium bovis* BCG が用いられてきた。しかし、BCGの有効性は共に限られており、また結核菌とらい菌に存在する免疫学的主要抗原は極めて良く似ている。両者に共通して存在する抗原を有効利用して、BCGに改良を加えることが可能であれば、ハンセン病・結核を同時に予防し得るワクチンが開発可能である。BCGが効かない最大の理由は、BCGが抗原提示細胞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、すなわち、その結果としてBCGが充分T細胞を活性化できないことにある。したがって、改良型BCGの作製にあたっては、新規BCGが容易にライソゾームに移行し得る方策をBCGに組み込ませる必要がある。これまでにこの点について検討を加え、BCGからウレアーゼをコードする遺伝子を除去すること、BCGが積極的に抗酸菌由来の主要抗原を細胞内で分泌する能力を付与することが有効であることを突き止めている。さらに、らい菌と結核菌に共通して存在する主要抗原としてMMP-II蛋白が有用であることが判明している。そこで、ウレアーゼ欠損BCGにHSP70-MMP-II融合遺伝子を導入した新しいリコンビナントBCG (BCG-DHTM) を作製し、そのT細胞活性化能を評価した。HSP70はMMP-II蛋白に対するシャペロン効果を期待して用いた。BCG-DHTMは、樹状細胞・マクロファージ・未感作CD4陽性T細胞及び未感作CD8陽性T細胞を活性化した。また、マクロファージを介してのCD4陽性T細胞の活性化を可能とした。さらに、BCG-DHTMは、未感作CD8陽性T細胞からパーフォリン産生性CD8陽性T細胞を産生した。また、C57BL/6マウスに皮下接種すると、MMP-IIに反応するメモリータイプのCD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞が効率的に産生されることが判明した。さらに、BCG-DHTMを皮下接種すると、その後マウス足蹠に感染させたらい菌の増殖を有意に抑制した。したがって、BCG-DHTMは、ハンセン病・結核共通ワクチンとなり得る可能性があると思定された。

A. 研究目的

抗酸菌ワクチンの作製においては、抗酸菌主要抗原を用いた抗原特異的メモリーT細胞の産生が重要である。BCGはハンセン病及び結核に対するワクチンとして、幅広く用いられ

一定の予防効果を挙げてきた。しかし、近年では、両者に対する有効性は極めて限られていることが明らかとなっている。BCGは、未感作CD4陽性T細胞を活性化し、抗酸菌を制御する上で不可欠なサイトカインであるインターフェ

ロンガンマ (IFN- $\gamma$ ) を産生することが可能であるが、未感作 CD8 陽性 T 細胞を活性化することはできず、改良の余地を残している。BCG に改良を加えるにあたっては、BCG の有する本質的弱点を凌駕する方策を周到しなければならない。BCG の最大の欠点は、抗原提示細胞に感染した際、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。したがって、BCG の改良にあたっては、BCG 菌体あるいは BCG 由来の抗原を効率的にライソゾームへ移行させる方策を樹立することが重要となる。これまでに我々は、種々の方法でこの問題に取り組んできた。まず、アンモニアの産生を誘導しファゴゾームの酸性化を抑制するウレアーゼを除去することで、ファゴゾームの酸性化を促進してライソゾームとの融合を容易にした。第2の方法は、BCG から積極的に病原性抗酸菌の主要抗原を分泌させ、分泌された抗原をライソゾームへ移行させることであった。これまでに主要抗原としてらい菌と結核菌に共通して存在する Major Membrane Protein-II (MMP-II) を見出し、さらに、シャペロン効果を有する heat shock protein (HSP)70 を併用することで、MMP-II の抗原性を高めることが可能であることを見出している。すなわち、HSP70 遺伝子と MMP-II 遺伝子を融合させ、これを BCG に遺伝子導入することが、T 細胞を活性化する上で有用であることを見出している。二つの方策は何れも有効であって、ウレアーゼをコードする *UreC* 遺伝子を取り除いたリコンビナント BCG (BCG- $\Delta$ UT) は CD4 陽性 T 細胞の活性化に有効であり、HSP70-MMP-II 融合遺伝子を導入したリコンビナント BCG は CD8 陽性 T 細胞の活性化に有効であった。さらに両方法を組み合わせ、BCG- $\Delta$ UT に HSP70-MMP-II 遺伝子を導入したリコンビナント BCG を作製すると、T 細胞活性化能とメモリー T 細胞の産生能ともに、さらに増強した。一方、結核菌由来の MMP-II 蛋白は強い T 細胞

活性化能を有していて、主要抗原の一つとして考えられる。そこで、*UreC* 遺伝子欠損 BCG に BCG 由来 HSP70 と結核菌由来 MMP-II の遺伝子を融合させ組み込ませた新しいリコンビナント BCG (BCG-DHTM) を作製したところ、BCG-DHTM は T 細胞を強く活性化し、結核菌の増殖をマウス生体内で抑制した。そこで、BCG-DHTM がハンセン病・結核共通ワクチンとなり得るか検索するため、抗らい菌活性について検討することを目的とした。

## B. 研究方法

*UreC* 遺伝子欠損リコンビナント BCG に、結核菌由来 MMP-II 遺伝子に BCG 由来の HSP-70 遺伝子を結合させ、遺伝子導入しリコンビナント BCG (BCG-DHTM) の免疫学的活性を評価した。正常健常人末梢血より、抗 CD3 抗体付着ダイナビーズを用い T 細胞を除去した後、プラスチック付着性単球を得てリコンビナント (r) GM-CSF 50ng/ml および rIL-4 (10ng/ml) を添加して樹状細胞を産生した。この樹状細胞に対して、リコンビナント BCG あるいはベクターコントロール BCG (BCG-261H) を感染させ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- $\gamma$  および IL-2 を ELISA 法で測定して評価した。T 細胞は、抗 CD4 抗体あるいは抗 CD8 抗体付着ダイナビーズを用いて精製した。ナイーブ T 細胞は、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た。IFN- $\gamma$  および IL-2 は、市販の ELISA 用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。BCG 感染樹状細胞における T 細胞活性化の抗原特異性は、樹状細胞を MHC 抗原に対する抗体および