

反応は、30°Cで実施し、0、10、20、40、60、90、120、240、360、600分の時点で反応を止め、アガロースゲル電気泳動にて分析して、スーパーコイル化プラスミドDNAの形成ならびにリラックス型プラスミドDNAの残存の様子を観察した。

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が、時間経過に伴うスーパーコイル化プラスミドDNAの形成量ならびにリラックス型プラスミドDNAの残存量は変異型DNAジャイレースごとに異なっていた。図2に得られたアガロースゲル電気泳動の画像から算出したスーパーコイル化プラスミドDNAの形成量を反応時間に対してプロットしたグラフを示す。

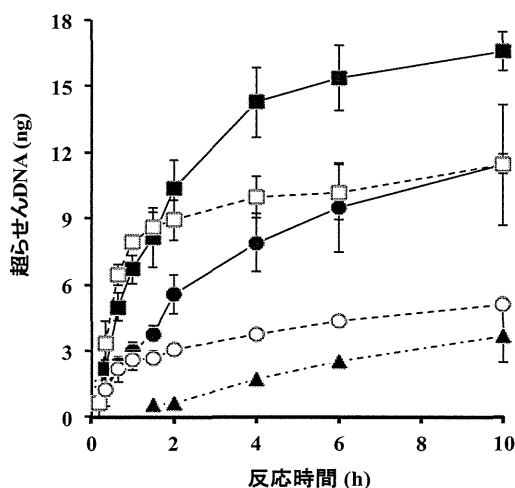


図2. 各種DNAジャイレースの時間経過によるスーパーコイル化プラスミドDNAの形成
 ■ : 野生型GyrA、○ : GyrA-Asp95Gly、□ : GyrA-Asp95Asn、● : GyrA-Ala91Valならびに▲ : GyrA-Gly89Cys を有するDNAジャイレースの時間経過によるスーパーコイル化プラスミドDNAの形成。

600分まで反応させた際のGyrA-Asp95AsnならびにGyrA-Ala91Valを含むDNA

ジャイレースによるスーパーコイル化プラスミドDNAの形成量は野生型GyrAを含むDNAジャイレースの約75%であった。また、GyrA-Asp95GlyならびにGyrA-Gly89Cysを含むDNAジャイレースによるスーパーコイル化プラスミドDNAの形成量はそれぞれ野生型GyrAを含むDNAジャイレースの約30ならびに20%であった。一方、GyrA-Asp95AsnならびにGyrA-Asp95Glyを含むDNAジャイレースによるリラックス型プラスミドDNAの残存量は、GyrA-Ala91ValならびにGyrA-Gly89Cysを含むDNAジャイレースのそれに比べて多く、DNAジャイレース活性の質的な違いを示していた。

D. 考察

らい菌にキノロン耐性を付与するとして報告のあるアミノ酸置換はGyrA-Gly89CysとGyrA-Ala91Valの僅か2種類にすぎず、これらのうちGyrA-Ala91Valが大半を占めている。一方、結核菌においては、非常に多くの臨床分離株から得られたデータにより、多種、多様なキノロン耐性関連遺伝子変異が明らかにされている(図3)。

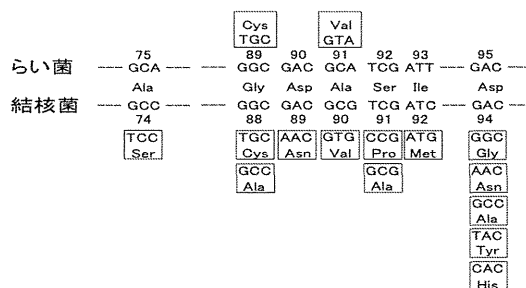


図3. らい菌ならびに結核菌におけるキノロン耐性に関連するものとして報告されているGyrA上の遺伝子変異とそれに伴うアミノ酸置換

中でも多いのは、らい菌の 95 番目に当たる 94 番目のアスパラギン酸がグリシンに置換 (GyrA-Asp94Gly) される遺伝子変異である。興味深いのは、この変異がらい菌では報告がない事である。もちろん、らい菌において報告されているキノロン耐性株の総数は結核菌のそれに比べて大幅に少ないが、それだけではこの現象は説明できない。野性型に加えて、GyrA-Gly89Cys、Ala91Val、Asp95Asn ならびに Asp95Gly の変異型 DNA ジャイレース A サブユニットを組換え蛋白質として発現・精製し、これらを同様に発現・精製した B サブユニットと混合する事により活性型 DNA ジャイレースを構築し、それぞれの DNA ジャイレースの活性を各種キノロン存在下に評価した。その結果、全ての変異型 A サブユニットを有する DNA ジャイレースでは野性型と比べてキノロンに対して耐性である事を証明した。しかしながら、この結果からは、結核菌では頻繁に見出される Asp95Asn ならびに Asp95Gly の変異型 DNA ジャイレース A サブユニットを持ったキノロン耐性らい菌がなぜ患者から見出されないかという疑問に対する解答は得られなかった。そこで我々は、DNA ジャイレース活性の変化に着目して、野性型ならびに各種変異型 DNA ジャイレースによってリラックス型プラスミド DNA が超らせん型 DNA に転換される様子を、時間を追って観察した。その結果、野性型ならびに各種変異型 DNA ジャイレースの活性に量的のみなら

ず質的な変化も見出した。GyrA-Gly89Cys の変異型 DNA ジャイレースでは活性の量的低下が顕著であった。これに対して、GyrA-Asp95Asn ならびに Asp95Gly の変異型 DNA ジャイレースは一定の割合までリラックス型プラスミド DNA を超らせん型 DNA に転換した後にそれ以上反応が進まないという質的变化を示した。GyrA-Asp95Asn ならびに Asp95Gly の変異型 DNA ジャイレースを持つらい菌が臨床検体から見出されない事は、この質的变化がらい菌の増殖に何らかの負の影響を及ぼしている可能性を示唆している。一方、GyrA-Gly89Cys の変異型 DNA ジャイレースでは顕著な活性の低下が見られるものの、臨床検体からはこの変異を持つらい菌が検出されている事から、本変異を持ったらい菌の増殖に正の影響を及ぼしている補完的変異または他のメカニズムが存在することが予想された。

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) Iwamoto T, Arikawa K, Nakajima C, Nakanishi N, Nishiuchi Y, Yoshida S, Tamaru A, Tamaru Y, Hoshino Y, Yoo H, Park YK, Saito H, Suzuki Y. Intra-subspecies sequence variability of the MACPPE12 gene in *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *Infect Genet Evolu*, 21:479-832, 2014

2) Paudel S, Mikota SK, Nakajima C, Gairhe KP, Maharjan B, Thapa J, Poudel A, Shimozuru M, Suzuki Y, Tsubota T. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from elephants of Nepal. *Tuberculosis*, 94: 287-292, 2014

3) Nishiuchi Y, Tamaru A, Suzuki Y, Kitada S, Maekura R, Tateishi Y, Niki M, Ogura H, Matsumoto S. Direct detection of *Mycobacterium avium* in environmental water and scale samples by loop-mediated isothermal amplification. *J Water Health*, 12:211-219, 2014

2. 学会発表

1) Yamaguchi T, Nakajima C, Suzuki Y. Changes in supercoiling activity of *Mycobacterium leprae* DNA gyrase by amino acid substitutions conferring quinolone resistance. 第 81 回日本細菌学会北海道支部総会、網走、2014 年 8 月

2) Yamaguchi T, Nakajima C, Suzuki Y. Diminution in *Mycobacterium leprae* DNA gyrase activity caused by amino acid substitutions conferring quinolone resistance. The 2nd Sapporo Summer Seminar for One Health, Sapporo, Japan September 25, 2014

3) 山口智之、中島千絵、鈴木定彦. らい菌にキノロン系抗菌薬体制を与える酵素内アミノ酸置換がもたらす DNA ジャイレース活性低下の解析. 第 87 回日本ハンセン病学会学術大会、所沢市、2014 年 9 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許 該当なし
2. 実用新案登録 該当無し
3. その他 該当無し

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

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

再燃・再発に関する免疫学的診断法の開発

平成26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）

（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）

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 繰り返した場合、後遺症の治療が困難となるハンセン病の再燃・再発のし易さを判定法の開発を目的とし、昨年度に引き続き実験法の検討を行った。ハンセン病の少菌型 10 名、多菌型 6 名および正常対照群 8 名を対象とした。末梢血単核球細胞を 1.0×10^5 個/well へ増やし、MMP-II 4 μ g/ml、MLC 8 μ g/ml さらに PHA 2.5 μ g/ml を添加し 96 時間培養した。培養後のサイトカイン陽性細胞をフローサイトメトリーで解析する細胞内染色の系では Golgi-Stop を添加した。ELISA 法での IFN- γ 産生は、MLC の刺激で多菌型より少菌型においてやや多かった。IL-10 の産生は、正常対照群と少菌型で MLC、MMP-II、PHA の各刺激で統計学的に有意に増加した。細胞内サイトカイン染色陽性細胞の割合は、IFN- γ および IL-10 陽性細胞に関し、PHA 刺激において少菌型、正常群で増加した。IL-10 陽性細胞は、MMP-II の刺激で少菌型の CD4⁺細胞で増加した。CD45RO⁺細胞は、少菌型で CD4⁺細胞で MMP-II および PHA の刺激で、CD8⁺細胞では PHA 刺激で割合が有意に増加した。再発 2 例(少菌型および多菌型)、再発疑い 1 例 (多菌型)では ELISA で比較的、刺激に対する反応が明らかであった。刺激により産生されるサイトカインに加え、増加する CD45RO⁺細胞などの表面マーカーの解析も加え、どのような細胞が再燃・再発に関与するのか解明してゆく、ハンセン病の再燃・再発の免疫学的な早期診断法の開発は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。このような症例が早期に診断できれば、臨床上

かなり有益と思われる。

らい菌の細胞膜蛋白 Major Membrane Protein (MMP)-II に対する血清抗体による診断法は、従来の抗 PGL-1 抗体による診断法と比べ多菌型に加え少菌型でも陽

性を示すことが多く再燃・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「ハンセン病の再燃・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た。したがって、再燃・再発に関する経時的観察の際に新たな診断法の開発が必要と考えられた。

MMP-II は T 細胞からのインターフェロン(IFN)- γ 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 *Mycobacterium leprae* cytosolic protein (MLC) 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、同時にこれらの刺激物質に反応して増殖する細胞も合わせてフローサイトメトリーで解析を行った。これらの結果と MMP-II 血清抗体価、各病型の臨床経過や再燃・再発時の症状との関連性につき検討し、ハンセン病の再燃・再発のおこし易い病態を判定する免疫学的診断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 10 名、多菌型(MB)の 6 名、計 16 名(男 9 名、女 7 名 平均年齢 83.6 歳、男女比 1.3:1、下記の多菌型の再燃 1 例以外は治癒期と考えられた。)および正常対照群として国立療養所星塚敬愛園職員 2 名および県民健康

プラザ鹿屋医療センター受診者 6 名の計 8 名(男 5 名、女 3 名、平均年齢 70.4 歳、男女比 1.7:1)を対象とした。少菌型の 1 名は再燃例であったが、約 1 年の内服治療後の治癒期の血液を使用した。多菌型の 1 例は、皮疹などの再燃症状は認めなかったが、皮膚スミア検査で陽性となり再燃を疑われた症例である。内服治療を 6 ヶ月行いその約 2 年後の治癒期と考えられる時期の血液を使用した。さらに多菌型の 1 例は、皮膚スミア検査で陽性、かつ皮疹を認め再燃と考えられたが、治療開始直後の血液を使用した。これら対象者の末梢血約 10ml を採取し、昨年度と同様の手技にて単核球細胞を分離し、一時凍結保存し解凍した後、これらの細胞を昨年度までの 0.5×10^5 個/well から 1.0×10^5 個/well へ増やし、刺激物質の量を本年度はそれぞれ 1 種ずつで MMP-II を $4 \mu\text{g/ml}$ 、MLC を $8 \mu\text{g/ml}$ 、さらに Phytohemagglutinin-P (PHA) を $2.5 \mu\text{g/ml}$ とし、別々に添加し 96 時間培養した。

これまでは、培養上清に産生される IFN- γ 、IL-10 などの ELISA による測定は Golgi-Stop を培養終了の約 15 時間前に加えた細胞内サイトカイン染色の系の培養上清について行ってきたが、値が低くなる可能性を考え、今年度は Golgi-Stop を加えない条件で別に約 96 時間細胞培養を行い、その上清を用いて ELISA の測定を行った。フローサイトメトリーでは、Golgi-Stop を 96 時間培養終了の約 15 時間前に加えた細胞内サイトカイン染色の系

において、培養終了時の CD4⁺および CD8⁺細胞におけるそれぞれ IFN- γ 、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。)また細胞内サイトカインの抗体による染色性をより安定させるために Intracellular Cytokine Staining Starter Kit (BD)の試薬を用いた。本年度は、さらに Golgi-Stop を加えない ELISA の系で培養上清を採取した後の細胞につき CD45RO、CD4、CD8 などの表面マーカーの染色を行い、それら陽性細胞の割合をフローサイトメーターで算出し、各刺激物質に反応して増殖する細胞の種類 (CD4⁺または CD4⁻細胞、CD8⁺または CD8⁻細胞)、割合(%)につき病型ごとに検討した。表面マーカーのコントロールとしては、IgG2a,IgG1 などの抗体を用いた。

前述の再発の 2 例と再発疑いの 1 例については、ELISA と細胞内サイトカイン染色の結果等をそれぞれ比較検討した。

(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、個々人ごとに研究内容、使用目的等を説明し、個人情報情報が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。平成 24 年 10 月、国立療養所星塚敬愛園倫理委員会で承認され、また平成 25 年 2 月鹿屋医療センターの生命倫理委員会の承認を受けて行った。

C. 研究結果

(1) ELISA では (Table 1.)、正常対照群 5 例、少菌型 8 例、多菌型 6 例について検討を行い、IFN- γ の産生量は、正常対照群では、刺激なしの条件で 173.2 ± 195.2 pg/ml と少菌型、多菌型よりやや高値であった。MLC 8 μ g/ml の刺激では、刺激なしの場合より統計学的に有意差があり IFN- γ が増加していると考えられたのは、少菌型のみで片側検定、有意水準 5%の場合であった。また少菌型と多菌型の比較でも片側検定、有意水準 5%において有意差がみられ、少菌型において多菌型より MLC の刺激効果がややあるものと考えられた。MMP-II 4 μ g/ml の刺激では、MLC より IFN- γ は多く産生される例もあったが刺激なしの条件と比べ有意差は認められなかった。ただ MLC 8 μ g/ml と MMP-II 4 μ g/ml を組み合わせた場合は少菌型で 1 例、多菌型で 2 例のみであったが、刺激効果は刺激なしの条件より比較的明らかであった。PHA 2.5 μ g/ml の刺激では、両側検定、有意水準 1%において刺激なしの

条件に比べいずれの群でも有意差があり、IFN- γ の増加を認めた。IL-10 の産生は、正常対照群と少菌型で刺激なしの場合より MLC、MMP-II、PHA の各刺激で統計学的に有意に増加がみられる条件が多かった。平成 24、25 年度の培養細胞数 0.5×10^5 個/well と比較すると本年度は 1.0×10^5 個/well と 2 倍となったが、上清中に産生されるサイトカイン量は全般に増加傾向がより明瞭であった。

(2) フローサイトメトリーによる細胞内サイトカイン陽性細胞の割合(%)については(Table 2.)、IFN- γ および IL-10 陽性細胞に関し、刺激なしの条件と比べると PHA 2.5 μ g/ml の刺激において産生の増加する傾向がみられた(片側検定、有意水準 5%で少菌型 CD4⁺細胞、少菌型 CD8⁺細胞において有意差あり、また両側検定、有意水準 5%あるいは 1%で正常対照群 CD8⁺細胞で有意差ありなど)。IL-10 陽性細胞については、MMP-II 4 μ g/ml の条件で少菌型 CD4⁺細胞で刺激なしの条件と比べ片側検定、有意水準 5%において有意差がみられ、刺激に反応して IL-10 が増加しているものと考えられた。

(3) 表面マーカー、特にメモリー細胞などにみられる CD45RO に加え CD 4、CD8 の各分子についてそれら陽性細胞の割合を上記の刺激条件ごとにフローサイトメトリーを用いて算出した。少菌型と多菌型の CD45RO 陽性細胞において CD8⁺細胞では、刺激なしと比べ PHA 2.5 μ g/ml の刺激で統計学的な有意差(少菌型：片側検

定、有意水準 5%、多菌型：両側検定、有意水準 1%)をもって増加がみられた(Table 3.)。MLC、MMP-II 刺激の条件では、症例により明らかに CD45RO 陽性細胞(CD4⁺あるいは CD8⁺)が増加しているものもみられた。CD45RO 陽性細胞の内、CD4⁺あるいは CD8⁺細胞についても検討を行った(Table 4.)が、少菌型では刺激なしの条件と比べ、CD4⁺細胞で MMP-II および PHA の刺激で(いずれも両側検定、有意水準 5%において)、CD8⁺細胞では PHA の刺激で(両側検定、有意水準 1%において)細胞の割合(%)が有意に増加していた。

(4)再発 2 例、再発疑い 1 例については、少菌型の 1 例、皮膚スミア検査は陰性で大腿部の皮疹とその病理所見により再発と考えられたが、血清 MMP-II 抗体価の変動は再発の前後でほとんど認めなかった。今回は約 1 年間の治療後の血液を使用した。特に ELISA において各刺激条件で著明ではないが、明らかなサイトカインの増加が認められた。本症例では、平成 24 年度、25 年度の報告で再発時から治癒期にかけて ELISA での刺激に応じて産生される IFN- γ の減少が観察されている。多菌型の再発疑い例は、治癒期と考えられる時期の血液ではあったが、MMP-II や MLC+MMP-II の刺激条件で ELISA でのサイトカインの増加や、MMP-II 刺激での細胞内サイトカイン染色陽性細胞の増加が前述の少菌型の例より著明であった。皮膚スミア検査陽性で皮疹を認めた多菌型の再発例では、活動期と考えられたが、

ELISA および細胞内染色では各刺激条件で他の多菌型の例と比べて特に著明な増加は認めなかった。

D. 考察

らい菌の成分などの刺激物質を各病型の培養単核球細胞に加えることでみられるサイトカインの産生能、それらの細胞内染色陽性細胞の割合を観察することで各病型に刺激条件ごとに反応に差が出るのが分かった。この傾向は、平成24年～25年度と比べると培養細胞数を2倍に増やしたことで特にELISAにおいてより明瞭となった。また、細胞内サイトカイン陽性細胞の検討で統計学的な有意差が出にくい場合に、CD45RO、CD4、CD8等の表面分子の割合を刺激条件ごとに検討することでサイトカイン産生に関わる細胞の反応をより明瞭に解析できる可能性が考えられた。実際の再発例などの解析では、活動期においてかならずしもサイトカイン産生が治癒期の症例より著明とは限らないことが分かったが、病型ごとに経過を追って観察してゆくことが重要と考えられた。刺激により増加する細胞群は、今後さらにメモリー細胞と関連するCCR7、CD62Lなどの各種表面マーカーなどを加えて解析することでより詳細に解明できる可能性が考えられた。再燃、再発を考える際にサイトカインの増加に限らず、らい菌の成分に反応して変動する細胞群も重要な因子と考えられた。

E. 結論

ハンセン病の再燃・再発の病態を解明し診断をより早期に的確に行うために少菌型、多菌型の培養単核球細胞にらい菌成分などを添加してその反応を観察してきたが、刺激に反応してサイトカインが増加してくる一定の条件がいくつか認められた。さらに表面マーカーの解析を加えることでどのような細胞が再燃・再発に関与するのか解明できる可能性も考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
 - 1) 北島信一, 後藤正道, 鮫島朝之, 甲斐雅規. 虫刺され様皮疹が先行し診断までに期間を要したハンセン病再発例. 第87回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2014年9月 所沢市
 - 2) 鮫島朝之, 前田百美, 後藤正道, 牧野正彦. 皮疹の出現前後にMMP-II血清抗体価の変化が観察できたハンセン病少菌型の1例. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013年5月 大宮市

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Table 1. MLC、MMP-II、PHA刺激による末梢血単核球培養(96時間後)上清中のIFN- γ 、IL-10の産生量(pg/ml)
(培地: 10%AB serum+RPMI+Penicillin)

PBMC: 1.0x10 ⁵ /well	Controls (5 Cases)		PB (8 Cases)		MB (6 Cases)	
	IFN- γ	IL-10	IFN- γ	IL-10	IFN- γ	IL-10
MLC-, MMP-, PHA-	173.2 \pm 195.2 ^a	25.3 \pm 41.9 ^{b,c}	25.2 \pm 34.5 ^{d,e}	9.1 \pm 3.8 ^{e,h,i}	17.7 \pm 24.3 ^j	6.7 \pm 3.3
MLC 8 μ g/ml	194.8 \pm 225.0	13.1 \pm 12.3	330.8 \pm 414.2 ^{e,f}	14.3 \pm 4.6 ^k	24.6 \pm 24.9 ^f	18.1 \pm 18.5
MMP-II 4 μ g/ml	391.7 \pm 636.9	356.7 \pm 167.8 ^c	257.8 \pm 474.9	388.0 \pm 197.3 ^h	128.8 \pm 149.7	346.8 \pm 416.1
MLC 8 μ g/ml+MMP-II 4 μ g/ml	107.9	490.9	462.6	970.6	747.6 \pm 484.2 [*]	784.8 \pm 547.3 [*]
PHA 2.5 μ g/ml	1341.7 \pm 175.1 ^a	255.1 \pm 107.6 ^b	2160.3 \pm 1036.0 ^d	385.3 \pm 222.5 ⁱ	1724.5 \pm 865.2 ^j	309.4 \pm 432.3

Means \pm SD(Standard deviation) Student's t test, a,b,d,h,i,j : p <0.01, c,g : p <0.05 (two-sided test), e , f, p <0.05(one-sided test)

*: two cases

Table 2. MLC、MMP-II、PHA刺激によるINF- γ 、IL-10陽性CD4、CD8細胞の割合(%)

	PB 6 Cases					
	IFN- γ Ab		IL-10 Ab		IgG	
	CD4(%)	CD8(%)	CD4(%)	CD8(%)	CD4(%)	CD8(%)
MLC- MMP-	0.26 \pm 0.10 ^a	0.21 \pm 0.13	0.36 \pm 0.12 ^{b,c}	0.19 \pm 0.11 ^d	0.18 \pm 0.25	0.10 \pm 0.09
MLC 8 μ g/ml	0.32 \pm 0.22	0.27 \pm 0.12	0.77 \pm 0.68	0.19 \pm 0.08	0.12 \pm 0.11	0.14 \pm 0.15
MMP-II 4 μ g/ml	0.35 \pm 0.16	0.34 \pm 0.17	0.75 \pm 0.45 ^b	0.26 \pm 0.18	0.36 \pm 0.26	0.29 \pm 0.27
MLC 8 μ g/ml+MMP-II 4 μ g/ml	0.40	0.27	0.46	0.27	0.20	0.03
PHA 2.5 μ g/ml	0.40 \pm 0.15 ^a	0.71 \pm 0.55	0.95 \pm 0.62 ^c	0.44 \pm 0.26 ^d	0.36 \pm 0.34	0.36 \pm 0.46

Means \pm SD(Standard deviation) Student's t test, a,b,c,d: p<0.05(one-sided test)

	MB 6 Cases					
	IFN- γ Ab		IL-10 Ab		IgG	
	CD4(%)	CD8(%)	CD4(%)	CD8(%)	CD4(%)	CD8(%)
MLC- MMP-	0.28 \pm 0.10	0.17 \pm 0.09	0.49 \pm 0.15	0.30 \pm 0.15	0.17 \pm 0.03	0.14 \pm 0.07
MLC 8 μ g/ml	0.22 \pm 0.12	0.20 \pm 0.15	0.59 \pm 0.32	0.32 \pm 0.24	0.15 \pm 0.07	0.10 \pm 0.11
MMP-II 4 μ g/ml	0.28 \pm 0.29	0.34 \pm 0.27	0.57 \pm 0.17	0.25 \pm 0.17	0.24 \pm 0.06	0.16 \pm 0.17
MLC 8 μ g/ml+MMP-II 4 μ g/ml	0.15	0.07	0.43	0.37		
PHA 2.5 μ g/ml	0.41 \pm 0.26	0.56 \pm 0.49	0.62 \pm 0.37	0.33 \pm 0.10	0.23 \pm 0.29	0.29 \pm 0.32

	Controls 5 Cases					
	IFN- γ Ab		IL-10 Ab		IgG	
	CD4(%)	CD8(%)	CD4(%)	CD8(%)	CD4(%)	CD8(%)
MLC- MMP-	0.19 \pm 0.11	0.27 \pm 0.21 ^e	0.35 \pm 0.12	0.21 \pm 0.09 ^f	0.14 \pm 0.13	0.22 \pm 0.15
MLC 8 μ g/ml	0.26 \pm 0.24	0.29 \pm 0.13	0.61 \pm 0.52	0.26 \pm 0.21	0.27 \pm 0.19	0.17 \pm 0.11
MMP-II 4 μ g/ml	0.39 \pm 0.47	0.28 \pm 0.17	0.57 \pm 0.30	0.23 \pm 0.13	0.28 \pm 0.23	0.33 \pm 0.26
PHA 2.5 μ g/ml	0.34 \pm 0.14	0.82 \pm 0.31 ^e	0.48 \pm 0.09	0.84 \pm 0.22 ^f	0.38 \pm 0.51	0.35 \pm 0.22

Means \pm SD(Standard deviation) Student's t test, e, p<0.05, f, p<0.01(two-sided test)

Table 3. CD45RO陽性のCD4+CD8+細胞の割合(%)

	PB					MB				
	CD45RO+(8 Cases)		IgG2a(4 Cases)			CD45RO+(5 Cases)		IgG2a(3 Cases)		
	CD4+(%)	CD8+(%)	CD4+(%)	CD8+(%)		CD4+(%)	CD8+(%)	CD4+(%)	CD8+(%)	
MLC- MMP-	17.5 ± 5.9	4.8 ± 3.2 ^a	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1		13.3 ± 6.0	2.6 ± 1.5 ^b	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	
MLC 8 μg/ml	19.0 ± 6.5	5.7 ± 3.9	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3		14.5 ± 5.8	3.0 ± 1.7	0.3 ± 0.4	0.1 ± 0.1	
MMP-II 4 μg/ml	19.3 ± 5.7	5.8 ± 3.3	0.4 ± 0.3	0.4 ± 0.4		14.8 ± 4.5	3.3 ± 1.7	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	
PHA 2.5 μg/ml	22.3 ± 7.8	11.5 ± 7.8 ^a	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.3		17.2 ± 8.0	6.9 ± 1.4 ^b	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	

Means ± SD (Standard deviation) Student's t test, a: p < 0.05 (one-sided test) Student's t test, b: p < 0.01 (two-sided test)

	Controls			
	CD45RO+(5 Cases)		IgG2a(5 Cases)	
	CD4+(%)	CD8+(%)	CD4+(%)	CD8+(%)
MLC- MMP-	20.1 ± 8.0	5.3 ± 3.6	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1
MLC 8 μg/ml	21.4 ± 7.7	6.0 ± 4.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
MMP-II 4 μg/ml	21.3 ± 8.0	6.2 ± 4.6	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.1
PHA 2.5 μg/ml	22.3 ± 7.2	11.9 ± 9.4	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1

Table 4. CD45RO陽性のCD4-CD8-細胞の割合(%)

	PB				MB			
	CD45RO+(8 Cases)		IgG2a(4 Cases)		CD45RO+(5 Cases)		IgG2a(3 Cases)	
	CD4-(%)	CD8-(%)	CD4-(%)	CD8-(%)	CD4-(%)	CD8-(%)	CD4-(%)	CD8-(%)
MLC- MMP-	8.9 ± 2.9 ^{ab}	24.0 ± 5.3 ^c	4.6 ± 3.4	3.5 ± 3.8	8.5 ± 6.1	16.3 ± 4.5	3.1 ± 3.1	2.2 ± 3.2
MLC 8 μg/ml	10.5 ± 3.4	27.1 ± 5.6	7.7 ± 8.5	6.7 ± 6.8	6.4 ± 2.7	15.1 ± 5.9	2.4 ± 2.4	1.8 ± 2.6
MMP-II 4 μg/ml	12.9 ± 3.8 ^a	28.6 ± 6.0	5.9 ± 5.4	4.5 ± 4.8	10.1 ± 6.6	18.5 ± 4.5	4.0 ± 4.6	3.0 ± 4.8
PHA 2.5 μg/ml	24.0 ± 9.2 ^b	38.7 ± 6.0 ^c	11.9 ± 10.9	8.7 ± 7.6	20.6 ± 10.3	28.1 ± 9.4	12.4 ± 12.3	6.1 ± 9.3

Means ± SD (Standard deviation) Student's t test, a, b: p < 0.05, c: p < 0.01 (two-sided test)

	Controls			
	CD45RO+(5 Cases)		IgG2a(5 Cases)	
	CD4-(%)	CD8-(%)	CD4-(%)	CD8-(%)
MLC- MMP-	10.8 ± 6.6 ^d	25.6 ± 10.1	6.9 ± 6.4	6.4 ± 6.8
MLC 8 μg/ml	10.5 ± 4.0	25.9 ± 8.6	5.6 ± 2.4	4.8 ± 2.6
MMP-II 4 μg/ml	14.3 ± 6.9	29.3 ± 11.2	8.7 ± 8.2	7.7 ± 9.0
PHA 2.5 μg/ml	24.7 ± 12.8 ^d	34.5 ± 14.4	13.2 ± 9.3	10.6 ± 10.6

Means ± SD (Standard deviation) Student's t test: d p < 0.05 (one-sided test)

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

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

免疫療法の開発

平成26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）

（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）

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 らい菌由来リポペプチド LipoK により活性化したらい菌感染樹状細胞より放出されるエキソソームの解析を行なった。らい菌感染樹状細胞から得られるエキソソームに含まれる MHC クラス I、II、CD86 抗原は若干上昇するが、LipoK で刺激したらい菌感染樹状細胞から放出されるエキソソームはこれら抗原を多く保有する。CD86 抗原はウエスタンブロットにより確認ができた。らい菌膜抗原も含むことから、T 細胞を活性化しうる物質であることで、エキソソームと CD4 陽性 T 細胞を混合培養すると直接活性化し、培養上清中に IFN- γ が産生された。そこで、得られたエキソソームの miRNA 発現プロファイリングを高性能 DNA チップ基板 3D-Gene[®]を用いて行い、幾つかの miRNA の発現がらい菌感染樹状細胞から得られたエキソソームで上昇していた。LipoK で刺激したらい菌感染樹状細胞から得られたエキソソームに多く miR34a、miR146a、miR3116 等が含まれ、これらは生体防御機構に関与すると推測された。樹状細胞から得られるエキソソームはハンセン病の免疫療法を構築する上で重要であり、その解析は治療薬の開発に有用であると考えられた。

A. 研究目的

抗らい菌免疫応答を賦活する有効な免疫学的治療法を探索するため、らい菌由来リポペプチド LipoK を用い、抗原提示細胞が放出するエキソソームに注目し解析を行った。LipoK は Toll 受容体 2 (TLR2) を介して樹状細胞を活性化することを報告した。エキソソームは様々な細胞から放出され、mRNA、マイクロ RNA(miRNA) や蛋白抗原を含むことから、体内の離れ

た場所にある細胞や組織に情報を伝達する事が明らかにされつつあり、医療やバイオへの応用研究が注目されている。そこでらい菌感染樹状細胞から得られるエキソソームを精製し、miRNA の解析を感度の高い 3D-Gene チップを用いて行った。エキソソームは MHC 抗原、miRNA などを含むことから、獲得免疫をスマートに活性化する分子で有り得るか検討した。

B. 研究方法

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、リポペプチドまたはらい菌でパルスし、その3日または4日後に培地中に放出されるエクソソームを精製した。エクソソームの精製はMHC Class-II ビーズまたはInvitrogenのExosome isolationキットを用いて行った。エクソソームのT細胞活性化を解析するため、CD4陽性T細胞はBD IMag CD4 T lymphocyte Enrichment Setを用いて精製した。培地中に分泌されるIFN- γ はBD社のOptiEIA ELISAキットを用いて測定した。エクソソームに含まれる蛋白の発現はウエスタンブロット法で確認した。miRNA解析は東レ社の高性能DNAチップ基板3D-Gene®を用いて2000種のmiRNAを検出し、比較検討を行った。

(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でパルスし、放出されるエクソソームを精製し、フローサイトメトリーで分析した結果、LipoKの刺激により、MHCクラスI及びクラスII、CD86抗原が、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 (Fig.1)。図はDynal beadsに結合したエクソソームにゲートをかけ、解析したものである。エクソソームはMHC抗原、CD86抗原などを含むことから、直接T細胞を刺激するかどうか、IFN- γ 産生量を指標に調べた。Fig.2に示すように、らい菌感染樹状細胞から得られたエクソソームの刺激により、CD4陽性T細胞から75 pg/mlのIFN- γ が培養液中に産生されたが、その量はLipoKの刺激により、得られたエクソソームを用いると約180 pg/mlのIFN- γ が産生された。このことから、LipoKの刺激により、T細胞がより強く活性化された事が明らかとなった。今後細胞傷害性T細胞になり得るか更なる検討が望まれる。

つぎにエクソソームに含まれる蛋白をウエスタンブロットで検討した。エクソソームマーカーである4回膜貫通型蛋白TSG101は安定的に一定量を発現しているが、同じくタイプ3テトラスパニンファミリーのタイプIIIメンバーであるヒトCD63の発現は刺激によって異なることが分かった。CD86抗原、MHCクラスII抗原はらい菌感染によってより多く発現が見られた。

エクソソームに含まれるmiRNAを網羅的に解析するため、東レが独自に開発した高性能DNAチップ基盤3D-Geneで解析を行った (Fig.3)。らい菌感染樹状細胞から得られたエクソソームは幾つかのmiRNAをより多く含んでいた。その中で

miR27はプロヒビチンをターゲットとし、ミトコンドリアの機能または脂肪細胞の分化を抑制する事が興味深い現象である。しかしながら、他の miRNA の機能についてはほとんど分かっていない。LipoK で刺激したららい菌感染樹状細胞から得られたエキソソームに多く含む miRNA は治療に関係すると考えられる。LipoK の刺激によって、miR34a、miR146a、miR3116 等が多く存在した。miR34a は細胞活性の調節に関わることが知られており、肝がん治療薬としても開発が進んでいる。miR146a は TRAF6 及び IRAK1 遺伝子 3'UTR 領域に結合することから、自然免疫を制御すると考えられる。

D. 考察

エキソソームは自己 T 細胞を活性化することから、免疫療法に役立つと考えられる。さらに、らい菌感染細胞から放出されるエキソソームの解析結果から得られる miRNA をターゲットとした、anti-miRs、及び miR-mimics の開発することで、新たな発想に基づく治療法が期待できる。

E. 結論

LipoK 刺激後、らい菌感染樹状細胞から得られたエキソソームは多く MHC 抗原を含み T 細胞を活性化しうることから、治療困難なハンセン病患者の新しい免疫療法のツールになりうる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsukamoto Y, Maeda Y, and Makino M. Evaluation of major membrane protein-I as a serodiagnostic tool of pauci-bacillary leprosy. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* (2014) 80:62.

2) Duthie M.S, Coler RN, Laurance JD, Sampaio LH, Oliveira RM, Sousa AL, Stefani AM, Maeda Y, Matsuoka M, Makino M, and Reed SG. Protection against *Mycobacterium leprae* infection by the ID83/GLA-SE and ID93/GLA-SE vaccines developed for tuberculosis. *Infect. Immun.* (2014) 82:3979.

2. 学会発表

1) 前田百美、田村敏生、向井徹、福富康夫、牧野正彦、らい菌感染樹状細胞から放出するエキソソームの miRNA 解析、第 87 回日本ハンセン病学会総会、2014 年 9 月

2) 向井徹、松岡正典、宮本友司、前田百美、牧野正彦、ハンセン病ワクチンのための組換え BCG 株の構築、第 87 回日本ハンセン病学会総会、2014 年 9 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当無し

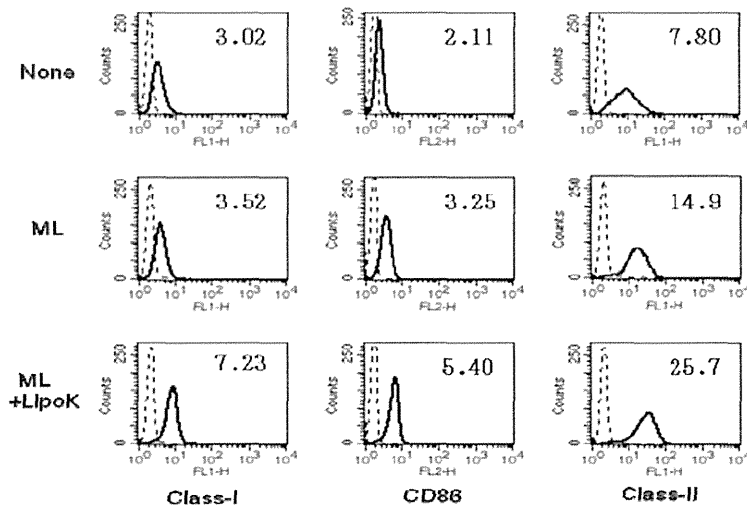


Fig. 1 樹状細胞から得られたエキソソームの蛍光強度。Dynal MHC ClassII beads を用いてエキソソームを精製したのち、flow cytometry で解析を行った。None: 未刺激、ML: らい菌、LipoK: らい菌由来合成リポペプチド。数値は mean fluorescence

intensity を表す。

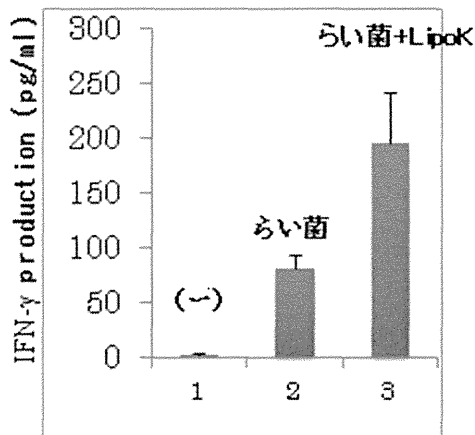


Fig. 2 CD4 陽性 T 細胞活性: らい菌感染樹状細胞または LipoK で刺激したらい菌感染樹状細胞から得られたエキソソームを T 細胞と混合培養し、細胞培養液中に分泌される IFN- γ を ELISA 法で測定した。

ID	Name	Global Normalization				Exo-Hone2 vs Exo-MK2				Exo-Hone2 vs Exo-MK2			
		Exp-Nu	Exp-MC	Ratio	Log2FC	Exp-Nu	Exp-MC	Ratio	Log2FC	Exp-Nu	Exp-MC	Ratio	Log2FC
3	hsa-miR-7a-3p	402.2	953.9	372.1	402.2	949.3	1.12	0.17		402.2	372.0	0.77	-0.29
4	hsa-miR-7b-3p	264.9	411.2	266.4	264.9	411.2	1.67	0.74		264.9	266.4	1.05	0.12
5	hsa-miR-7c	346.9	858.8	361.1	346.9	866.2	1.42	0.35		346.9	361.1	1.00	0.05
6	hsa-miR-7d-3p	459.9	411.9	337.6	459.9	411.9	1.15	0.00		459.9	337.6	0.62	-0.25
7	hsa-miR-7f-3p	47.9	45.4	15.5	47.9	45.4	0.74	-0.44		47.9	15.5	0.11	-0.50
8	hsa-miR-7f-5p	325.4	323.8	229.9	325.4	229.9	0.69	-0.54		325.4	229.9	0.70	-0.51
9	hsa-miR-15a-3p	347.3	349.3	479.9	347.3	484.5	1.44	0.52		347.3	479.9	1.67	0.70
10	hsa-miR-15b-3p	1378.1	2246.4	1282.1	1378.1	2246.9	1.63	0.10		1378.1	1282.1	0.97	-0.04
11	hsa-miR-17-3p	322.9	367.3	252.9	322.9	367.3	1.14	0.15		322.9	252.9	0.78	-0.25
12	hsa-miR-17-5p	32.0	24.2	22.3	32.0	24.2	1.21	0.27		32.0	22.3	1.11	0.16
13	hsa-miR-18a-3p	29.1	42.1	34.6	29.1	42.1	1.37	0.45		29.1	34.6	1.18	0.20
14	hsa-miR-18a-5p	42.3	32.4	36.5	42.3	32.4	1.03	0.41		42.3	36.5	0.91	-0.14
15	hsa-miR-19b-3p	292.3	415.1	305.7	292.3	415.1	1.42	0.51		292.3	305.7	1.15	0.20
16	hsa-miR-20a-3p	259.2	361.9	212.9	259.2	361.9	1.69	0.72		259.2	212.9	0.82	-0.29
17	hsa-miR-21-3p	4142.9	6696.9	4496.9	4142.9	6696.9	1.41	0.35		4142.9	4496.9	1.04	-0.09
18	hsa-miR-22-3p	799.9	1254.2	872.7	799.9	1254.2	1.63	0.71		799.9	872.7	1.15	0.21
19	hsa-miR-23a-3p	1791.9	2292.2	1742.9	1791.9	2292.2	1.34	0.42		1791.9	1742.9	1.00	0.00
20	hsa-miR-24-1-3p		2.3			7.1							
21	hsa-miR-24-2-3p	1899.2	2292.1	1996.7	1899.2	2292.1	1.42	0.51		1899.2	1996.7	0.96	-0.22
22	hsa-miR-25-1-3p	107.8	116.8	89.3	107.8	116.8	1.15	0.20		107.8	89.3	0.88	-0.19
23	hsa-miR-25-2-3p	240.4	372.1	304.4	240.4	372.1	1.69	0.72		240.4	304.4	0.99	-0.18
24	hsa-miR-25b-3p	212.2	254.2	165.9	212.2	254.2	1.19	0.28		212.2	165.9	0.76	-0.40
25	hsa-miR-27a-3p	699.9	1143.7	697.9	699.9	1143.7	1.31	0.32		699.9	697.9	1.00	0.00
26	hsa-miR-28-3p	71.6	79.0	52.7	71.6	79.0	1.10	0.14		71.6	52.7	0.75	-0.41
27	hsa-miR-29a-3p	368.8	1212.7	971.3	368.8	1212.7	1.46	0.55		368.8	971.3	1.26	0.24
28	hsa-miR-29b-3p	84.4	104.9	80.4	84.4	104.9	1.20	0.28		84.4	80.4	0.95	-0.09
29	hsa-miR-30a-3p	12.7	8.4	2.2	12.7	8.4	0.65	-0.29		12.7	2.2	0.32	-0.78
30	hsa-miR-31-3p	5.1	5.1	4.1	5.1	4.1	1.44	0.55		5.1	4.1	0.76	-0.41
31	hsa-miR-32-3p	249.3	1.4	124.9	249.3	1.4	0.21	-2.23		249.3	124.9	0.31	-1.70
32	hsa-miR-33a-3p	1.9	12.3	12.1	1.9	12.3	2.00	1.20		1.9	12.1	2.67	1.68
33	hsa-miR-33b-3p	127.2	199.2	154.3	127.2	199.2	0.94	-0.09		127.2	154.3	0.82	-0.28

Fig. 3 東レの高性能 DNA チップ基板 3D-Gene®を用いてエキソソーム中に含まれる miRNA を解析の一部

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

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

ハンセン病・結核共通ワクチンの免疫学的評価

平成26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）
（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
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 WHO が推進するハンセン病の制圧には、有効かつ信頼できるワクチンは必要不可欠である。弱毒化牛型結核菌 (*Mycobacterium bovis* BCG (BCG)) がハンセン病のワクチンとして使われた地域と時代がある。しかし、BCG のハンセン病に対するワクチンとしての有効性は 26% にとどまると報告され、現在では信頼し得るハンセン病ワクチンとしては使用されていない。また、世界的にもハンセン病ワクチンの開発を行っている研究機関は極めて少なく、ハンセン病制圧への道のりは極めて厳しいと言わざるを得ない。しかし、ハンセン病の発症を的確に予防するためには、従来 of BCG に改良を加えた改良型リコンビナント BCG の開発・実用化が最も容易であると想定される。これまでに、BCG から *ureC* 遺伝子を取り除き、ウレアーゼ活性を消失させたリコンビナント BCG に HSP70-MMP-II 連結遺伝子を導入したリコンビナント BCG (BCG-DHTM) を作出し、BCG-DHTM は現行の BCG-Tokyo 株に比し、有意に強く結核菌の肺内増殖及びらい菌のマウス足蹠での増殖を抑制することを見出してきた。すなわち、BCG-DHTM はハンセン病・結核共通ワクチンとなり得ると想定された。しかし、BCG-DHTM のように外来遺伝子をプラスミドフォームで BCG の細胞質内へ導入した場合、導入した遺伝子は非常に高い確率で脱落する可能性があり、ワクチンとして広く安定供給する際に大きな妨げとなる。そこで、*ureC* 遺伝子ノックアウト BCG の DNA へ HSP70-MMP-II 遺伝子を導入し、かつ外来遺伝子導入 BCG を選択する際に必要となる薬剤耐性遺伝子を除去したリコンビナント BCG (BCG-DHTMI) を作製し、その T 細胞活性化能を評価することを目的とした。その結果、BCG-DHTMI は BCG-DHTM とほぼ同程度の T 細胞活性化能を有しており、かつ、マウス生体内でらい菌の増殖を抑制したことから、ハンセン病・結核共通ワクチンとして有望な候補となり得ると考えられた。

A. 研究目的

ハンセン病や結核などの抗酸菌に対するワクチンの目的は、未感作 CD4 陽性 T 細胞及び未感作 CD8 陽性 T 細胞を強く活性化して、メモリー機能を有するこれらサブセットの T 細胞を作出することにある。しかし、現在日本国及び世界各国で使用されている BCG 株は、未感作 T 細胞の活性化能は弱く充分量の IFN- γ を産生することができず、そのためワクチンとして十分な効果を与えることができない。しかし、BCG は生後 5 ヶ月以内に接種されても強い副反応を惹起することは稀であり安全性はほぼ確立されており、かつコストも安く途上国などのハンセン病濃厚流行国におけるワクチンとしては非常に大きな利点を有している。そこで、BCG 株の T 細胞活性化能を強化した新しいリコンビナント BCG の開発と実用化が強く求められている。これまでに *ureC* 遺伝子をノックアウトし、ファゴゾームの酸性化を抑制するウレアーゼを取り除いたリコンビナント (r) BCG に HSP70-MMP-II (結核菌由来) 連結遺伝子をプラスミド型導入し、ファゴゾームあるいはファゴライソゾーム内で HSP70-MMP-II 融合蛋白を分泌する rBCG (BCG-DHTM) を作出したところ、BCG-DHTM は肺内での結核菌の増殖を BCG-Tokyo 株に比し有意に強く抑制し、同時に 1 回の皮下接種により、マウス足蹠にチャレンジしたら菌の増殖を強く抑制した。したがって、BCG-DHTM はハンセン病・結核共通ワクチンとして極めて有望と考えられた。しかし、外来性遺伝子を BCG の細胞質にエレクトロポレーション法等によりプラスミド型で導入すると、導入した遺伝子は著しく高確率で脱落することも判明した。こうした現象は、ワクチンを全世界的に広く供給する際に大きな障害となる。そこで、今回は *ureC* 遺伝子ノックアウト BCG の DNA の中に HSP70-MMP-II 外来遺伝子を導入するインテグレーション型導入リコンビナント BCG を作製し、その T 細胞活性化

能を評価することを目的とした。しかし、BCG の DNA 内へ外来遺伝子を導入する場合、通常 1 コピーしか導入できない。そこで、抗酸菌ファージを解析し、強いプロモーター活性を有する遺伝子を同定し利用した。

B. 研究方法

ureC 遺伝子欠損 rBCG の DNA に、結核菌由来 MMP-II 遺伝子と BCG 由来の HSP70 遺伝子を結合し、遺伝子導入し rBCG (BCG-DHTMI) を作製した。コントロールとして BCG-Tokyo 株 BCG-clone A を用い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、プラスティック付着性単球を得て rGM-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、rBCG あるいはクローニングした BCG-Tokyo 株 (BCG-clone A) 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- γ 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- γ 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 菌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 CD86 に対する抗体で処理した際の T 細胞の活性化の減弱の程度で評価した。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。BCG-DHTMI 感染樹状細胞による T 細胞活性化機構を探索する目的で、樹状細胞を市販の Chloroquine、

Brefeldin A、Lactacystin で処理し、T 細胞の活性化抑制能を T 細胞からの IFN- γ の産生量により評価した。さらに、BCG-DHTMI のメモリー T 細胞産生能を測定する目的で、C57BL/6 マウスに BCG-DHTMI および BCG-clone A を皮下接種し、4~12 週間後に脾臓を摘出し、脾中 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を *in vitro* で MMP-II あるいは HSP70 リコンビナント蛋白で刺激した際に、細胞内に IFN- γ を産生している細胞を FACSCalibur を用いて測定し算出した。また、BCG-DHTMI (1×10^4 CFU/マウス) を C57BL/6 マウスに皮下接種し、その後らい菌 (Thai-53 株) 5×10^3 菌体をマウス足蹠にチャレンジ、31~32 週間後にマウス足蹠に存在するらい菌数をバドマイヤー法により算出した。

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-DHTMI は菌体外へ HSP70-MMP-II 融合蛋白を分泌し、樹状細胞に感染させると IL-12p70・INF α ・IL-1 β などのサイトカインを BCG-clone A に比し効率的に産生誘導した。また、樹状細胞の細胞表面の抗原を解析すると、MHC クラス I 及び II・CD86 さらに CD83 抗原を強く発現させ、さらに rM-CSF を用いて分化誘導したマクロファージからも大量の IL-12p40・IL-1 β ・TNF α 及び GM-CSF を産生させた。さらに、BCG-DHTMI を樹状細胞及びマ

クロファージに感染させると細胞表面に MMP-II を発現し、これら抗原提示細胞を酸化抑制剤であるクロロキニンで前処理すると MMP-II の発現は抑制された。また、BCG-DHTMI 菌を樹状細胞に感染させた後、ヒト未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を刺激すると大量の IFN- γ を産生し、T 細胞からの IFN- γ の産生は、BCG-DHTMI 感染樹状細胞を抗 MHC 抗体あるいは抗 CD86 抗体で処理すると抑制され、さらにクロロキニンで樹状細胞を処理しても抑制された。また、BCG-DHTMI 感染樹状細胞を用いて未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を刺激すると CCR7 low あるいは CD27 low のメモリータイプ CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞が効率的に産生された。さらに、C57BL/6 マウスに BCG-DHTMI を皮下接種し、4 週あるいは 12 週後に脾 T 細胞を分離し、*in vitro* で MMP-II あるいは HSP70 で再刺激すると、大量の IFN- γ を産生した。さらに、BCG-DHTMI をワクチン接種するとワクチン非投与群に比し有意に強くらい菌のマウス足蹠での増殖を抑制した。

D. 考察

BCG の DNA 内へ外来遺伝子を導入したインテグレーション型 rBCG (BCG-DHTMI) は、同一遺伝子を BCG の細胞質へ導入したプラスミド型 rBCG (BCG-DHTM) とほぼ同程度の未感作 T 細胞活性化能を有していた。通常プラスミド型遺伝子導入した場合は、外来遺伝子は多コピー導入可能なため、外来遺伝子がコードする蛋白質はより大量に発現される。しかし、今回は抗酸菌ファージの高発現プロモーターを用いたため、1 コピーの導入であってもほぼ同程度の蛋白発現が得られ、そのためプラスミド型導入 BCG と同程度の T 細胞活性化能が得られたものと想定される。また、プラスミド型導入 BCG を用いる限り、遺伝子保有 BCG を選択するためのマーカー (通常薬剤耐性遺伝子) を除