

総括研究報告書

ハンセン病発症におけるらい菌の特性

主任研究者 柏原嘉子 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 病原微生物部長

研究要旨

ハンセン病の主要な治療薬であるリファンピシン、ニューキノロン、マクロライド耐性の迅速検出法を確立し、臨床分離株でその有用性を検証、臨床の場へ迅速な情報を提供すると共に、我が国にも主要ハンセン病治療薬2剤以上に耐性を獲得しているらい菌がかなり出現していることを明らかにした。また流行国からの分離株にも2剤に耐性を獲得している菌を検出し耐性菌対策の必要性を示した。また、未だ有効な検出方法がないダブソン耐性迅速検出法の確立に手がかりを得た。さらに、らい菌における宿主が産生する殺菌性酸素代謝物処理機構の解析が進み、新治療薬開発の標的となる来菌の細胞内生存・増殖機構の解明に手がかりを与えた。らい菌の遺伝子型別法を作成し、地域・由来を異にする72株の分離株で検証し、その有用性を確認すると共に、わが国に2種類の型のらい菌が存在する事を初めて明らかにした。

分担研究者

松岡正典 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター
室長

甲斐雅規 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター
室長

中田 登 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター
研究員

青山由利 創価大学 工学部
助教授

耐性を獲得した菌の出現も報告されている。しかし有効なワクチンもまだ開発されておらず、薬剤に対する耐性獲得機構、病原性に関与する因子等も解明されていない。

ハンセン病はらい菌によって引き起こされ、皮膚と末梢神経を主病変とする慢性細菌感染症である。その発症には病原体であるらい菌と宿主の因子が複雑に関与する宿主・寄生体関係を介して成立し、らい菌と宿主の生存競争を反映している。その発症機構の解明はハンセン病の予防・治療に貢献することが期待される。

A. 研究目的

ハンセン病は多剤併用化学療法の世界普及によりその登録患者数は減ってきたが、毎年50万人を超す新規患者発生(97年度69万人)は減少傾向を示さず、最近は増加傾向すら示している。また治療薬に対し

本研究はハンセン病発症に関与する菌側の要因、特に、現在のハンセン病対策で緊急に解決を求められている課題、薬剤耐性獲得機構などを解明、感染源や感染経路を解明に資する分子疫学的手法の開発とそれを用いた疫学的研究、らい菌の宿主細胞内

での生存・増殖機構、宿主への攻撃機作などの解明を目的とする。

B. 研究方法

薬剤耐性に関する研究：薬剤耐性が疑われる臨床分離株について、現在用いられている治療薬に対する感受性試験、a)マウスを用いた *in vivo* 試験、b)代謝活性に基づく *in vitro* 試験を実施すると共に、各薬剤耐性菌の遺伝子内変異の検出による簡易検出法を検討した。また、ハンセン病の治療に広く利用されてかつ使用の歴史が長いダブソンに対する耐性に関しては、現在標的遺伝子が解明されていないため、培養可能抗酸菌を用い、人工的にダブソン耐性株を作製、感受性株と耐性株で発現に相違がある遺伝子を探索することにより、ダブソン耐性獲得機構の解明を行った。

らい菌の型別法の開発：マウスにおける増殖速度の著しく異なるらい菌分離株間に認められたらい菌遺伝子の差異を利用したらい菌の遺伝子型別法を作成、地理的、及び由来を異にするらい菌分離株72株について検証した。

らい菌の宿主細胞内生存・増殖機構の解明：らい菌が増殖するマクロファージで多量に産生される殺菌性酸素代謝物を処理する機構に関する解析を遺伝子レベルで検討した。また、一原子酸素添加酵素の存在について遺伝子レベルで検討した。

C. 研究結果

薬剤耐性機構並びに薬剤耐性菌の調査：現在世界のハンセン病対策では多剤併用化学療法が用いられているが、有効な治療薬に耐性を獲得した菌の出現が報告されはじ

めている。らい菌は人工培養ができず、迅速な薬剤感受性試験法が存在しない。迅速な薬剤感受性試験法の確立が臨床現場から急ぎ求められている。リファンピシン、ニューキノロン、マクロライドについてはらい菌の *rpoB* 遺伝子、*gyrA* 遺伝子、23SrRNA 遺伝子の標的部位を増幅し、その塩基配列を調べることによりこれら薬剤に対する耐性獲得の有無を検索した。その結果わが国において分離された多くのらい菌がハンセン病の主要な治療薬2剤以上に耐性を獲得していること、我が国の菌陽性患者の10%以上がこれら耐性菌のため治療に抵抗性を示していることが判明し治療現場へその結果を還元する事ができた。また例数は少ないがハンセン病流行地からのらい菌分離株にも2剤耐性の菌が検出され、化学療法後の耐性菌調査、並びにその対策の重要性が示唆された。また代表的ハンセン病治療薬ダブソン(DDS)に対する耐性機構は現在全く不明である。耐性の簡易検出系作成を目的とし、培養可能抗酸菌を用い、耐性菌を作成し、耐性関連遺伝子の解明を試みた。その結果、耐性菌ではその発現が抑制されている遺伝子断片が得られた。現在その遺伝子の単離、同定を進めている。この結果は DDS 耐性検出系作成への道を開くものである。

らい菌の型別法の開発：マウスでの増殖速度が著しく異なるらい菌分離株間で、遺伝子発現調節因子の1種であるシグマ因子をコードする *rpoT* 遺伝子内に6塩基からなる繰り返し構造の差を認めた。この差異はらい菌分離株間で良く保存されており、菌の識別に利用可能であることが明らかになり、地域あるいは由来を異にする分離株7

2株について解析した結果、分離株は2群に分かれた。さらに2つの遺伝子型の分布から興味ある知見が得られた。即ち、わが国本土と韓国由来のらい菌は同一の型（繰り返し構造4個）を示し、沖縄、アジア、ラテンアメリカ、及び自然感染アルマジロやマンガベイサル由来のらい菌の型と（繰り返し構造3個）異なった。この遺伝子型分布の偏りを説明するためには今後更に世界各地からの分離株で検証する必要がある。しかし、今回開発した方法は疫学に適用可能で有ることが示された。

らい菌の宿主細胞内生存・増殖機構：らい菌が宿主の産生する活性酸素など攻撃から逃れて増殖するにもかかわらず、そのために重要な働きをするカタラーゼの遺伝子に欠陥があり、遺伝子産物としての蛋白質を作る能力のないことを明らかにしてきた。従って、らい菌は何らかの代償作用を持ってこれら活性酸素を処理すると考えられるが、その機構は全く不明である。らい菌が人工培地で培養不可能なため、モデルとして培養可能抗酸菌を用いて種々の変異株を作製、過酸化水素に対する耐性を検討した結果、カタラーゼ以外の因子の関与を示唆する結果を得た。また、高等哺乳動物における薬物代謝あるいは酵母のステロール代謝に関与する1原子酸素添加酵素と類似のタンパクをコードする遺伝子が結核菌からクローニングされ、大腸菌で発現させることができた。発現タンパクは哺乳動物や酵母と同様の特徴を保持していた。このタンパクの抗酸菌中での機能については現在検討中である。このタイプのタンパク質の抗酸菌での存在に関する報告は無く、今回らい菌ゲノムDNAを用いたPCR法で

は用いた条件下では増幅されてくる遺伝子は検出できなかったが、らい菌でのこのような1原子酸素添加酵素の存在について更に確認する必要がある。

D. 考察

化学療法の普及に伴い、感染症の病原体に薬剤耐性を獲得したものが出現し、耐性菌対策は今日の感染症の重要な課題の1つとなっている。

ハンセン病においては原因菌であるらい菌が人工培養不能のため、耐性菌の検出は困難かつ長時間を要する。そのため、耐性菌に関する報告例は多くないが、臨床症状からは耐性が疑われる例が出ている。らい菌の薬剤感受性試験はマウスを用いた *in vivo* 実験あるいは大量の菌を用いる *in vitro* 実験によるが、大量の菌を得るために通常マウスで増殖させて実験を行う。加えてマウスでの継代中に菌の選択が起きると必ずしも臨床分離株の状況を反映しない場合があると想定される。いずれの場合も結果を得るのに1年以上の長時間を要する。臨床分離株の薬剤耐性を迅速に推定する方法の確立が強く求められている。リファンピシン、ニューキノロン、マクロライドに対する耐性獲得を迅速に検出する遺伝子診断法を確立し、臨床分離株で検証したことはこの要請に応えるものである。さらに、今回調べただけでも、わが国に主要治療薬2剤以上に耐性を獲得している菌が菌陽性者(1998年12月62名)の10数%を占めたことはわが国の難治性ハンセン病の要因として耐性菌の関与が少なくないことを推測させる。また、流行国らの分離株からも2剤耐性菌が検出され、多剤併用化

学療法後の耐性菌調査およびその対策の重要性を示唆した。

薬剤耐性らい菌の出現は新治療薬開発の必要性を示唆する。その際にはらい菌の特性、特にその生存・増殖機構に関する知見に基づいた薬剤の標的が求められる。今回らい菌が宿主の産生する殺菌生活性酸素を処理するために、従来一般細菌で想定されているのと異なる機構によることを推定させる知見を得たことはらい菌の宿主内生存・増殖機構の解明に糸口を与える。

らい菌の感染源・感染経路の解析や再燃と再発の区別に不可欠ならい菌分離株の識別に関する実用的手段は現在間で報告がない。らい菌の多様性に関しては Fsihi らが *polA* 遺伝子座について報告しているが、5株の分離株について比較を行ったのみである。世界各地及び自然感染アルマジロやマンガベイサルなど由来を異にする多数の分離株で有効性を検証した型別法は世界で初めてのケースである。加えて、今回の調査からわが国に2つの型のらい菌が存在することおよび2つの遺伝子型の分布がきわめて偏っていること、わが国本土と韓国に分布するらい菌は同一の型で、沖縄に分布する型とは異なることが明らかになった。この理由を説明するには中国の北部や南部を含む多数の地域からの分離株について調べる必要があるが、わが国へのらい菌の由来を推測する道を開くものとなる。

E. 結論

①薬剤耐性に関しては、らい菌の遺伝子を利用した耐性を推定する方法を確立し臨床株に適用して調べた結果、わが国にリファンピシン、ニューキノロンなどハンセン

病治療薬2剤以上に耐性になっている菌がかなり出現していることが明らかになり、結果を臨床へ還元しその要請に応えると共に、耐性菌対策の重要性を示した。さらに、ハンセン病流行地からの分離株にもハンセン病主要治療薬2剤に耐性を獲得したらい菌が検出され、世界的に普及している化学療法後の耐性菌の出現調査やその対策の必要性を示した。また耐性機構が不明なダブソン (DDS) 耐性機構の解明に着手した。

②らい菌の型別法の確立と疫学への応用に関しては、らい菌の *rpoT* 遺伝子内構造の差による型別法を開発し、地域及び由来を異にする分離株72株について検証した。本法によりらい菌が2群に分類され、わが国には2つの型のらい菌が存在すること、及び2つの遺伝子型が極めて特徴的な分布をしていることを明らかにした。これまで多くの分離株を用いたらい菌の型別調査は世界でもなく、この結果は初めての例であり、本法が型別に利用可能であることを示した。

③らい菌の宿主内増殖機構の解析に関しては、らい菌が宿主の防御機構の1つである活性酸素処理機構に関し、カタラーゼ以外の機構によることを示唆する結果を得た。また哺乳動物の薬物代謝や酵母のステロール代謝に関与する酵素野遺伝子が結核菌で検出され、組み換え体タンパクとして得られた結核菌のタンパクは哺乳動物や酵母の酵素と類似の特徴を有した。本タンパクの生理的役割の解析、並びにらい菌における存在を検討中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- M. Kai, H. Saito, K. Kobayashi, Y. Kashiwabara: *Mycobacterium avium* complex with different reactivity to DNA probes. In Clinical Mycobacteriology, M. Casal ed., Prous Science/ Spain 159-164, 1998
- H. Saito, Y. Kashiwabara, K. Kobayashi: Present and future in leprosy research. In Clinical Mycobacteriology. M. Casal, ed., Prous Science/ Spain 51-62, 1998
- Saito, H., Gidoh, M., Kai, M., Kobayashi, K.: Chemoprophylaxis against *Mycobacterium avium* complex induced in mice. In Clinical Mycobacteriology, M. Casal, ed., Prous Science/ Spain 409-412, 1998
- Kobayashi, K., Gidoh, M., Kai, M., Saito, H.: Possible involvement of type 1 helper T cell/interferon- γ -inducing cytokines in protection against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. In Clinical Mycobacteriology, M. Casal, ed., Prous Science/ Spain 109-114, 1998
- Aoyama, Y., Horiuchi, T., Gotoh, O., Noshiro, M., Yoshida, Y.: CYP51-like gene of *Mycobacterium tuberculosis* actually encodes a P450 similar to eukaryotic CYP51. J. Biochem. 124: 694-696, 1998.
- Kobayashi, K., Kai, M., Gidoh, M., Nakata, N., Endoh, M., Singh, R.P., Kasama, T., Saito, H.: The possible role of interleukin (IL) 12 and interferon- γ -inducing factor/IL 18 in protection against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. Clinical Immunology and Immunopathology, 88: 226-231, 1998.
- Nakata, N.: The absence of a catalase function in *Mycobacterium leprae*. Indian J. Leprosy (in press) 1999
- Matsuoka, M., Izumi, S., Budiawan, T., Nakata, N., Saeki, K.: *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. Indian J. Leprosy (in press) 1999
- 齋藤肇, Dawson D., 甲斐雅規, 小林和夫: *Mycobacterium avium* complex の自然環境における地理的分布並びに AIDS ・非 AIDS 患者の血清型 結核, 73, 379-383, 1998
- 中村昌弘, 松岡正典: 無細胞液体培養系で培養したシリコンスライド上でのらい菌の増殖像と思われる所見. Jpn. J. Leprosy 67, 287-291, 1998
- 和泉真蔵, Budiawan, T., 松岡正典, 佐伯圭介, 川津邦雄: 熱帯アジアの濃厚流行地におけるハンセン病の現状 血清学的手法を用いた一般住民の感染状況の疫学調査 Jpn. J. Leprosy 67, 401-408, 1998
2. 学会発表
- Yamazaki, T., Sato, N., Haga, S., Fujii, H., Kobayashi, K., Kashiwabara, Y., Hayashi, T., Tamura, T., Yamashita, K., Toyoda, K., Okazawa, Y., Tanno, K.: Antimicrobial susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* by measuring mycobacterial ATP. 98th General Meeting of American Society of Microbiology May, 1998, Atlanta
- Fukutomi, Y., McCormic, G., Pasqua, J. P., Krahenbuhl, J. L., Toratani, S., Matsuoka, M.: Elongation of *Mycobacterium leprae* in macrophages cultured in the presence of interleukin-10. 15th International Leprosy Congress. Beijing, September 1998
- Izumi, S., Matsuoka, M., Budiawan, T., Nakata, N., Saeki, K.: An epidemiological

study of *M. leprae* infection and distribution of leprosy bacillus in the environment of endemic villages in North Maluku, Indonesia. 15th International Leprosy Congress. Beijing, September 1998

Singh R. P., Kai, M., Gidoh, M., Nakata, N., Endoh, M., Kobayashi, K., Saito, H. The possible role of interleukin (IL) 12 and interferon- γ -inducing factor/ IL-18 in protection against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. 15th International Leprosy Congress. Beijing, September 1998

Matsuoka, M., Kashiwabara, Y., Gidoh, M., Kai, M., Maeda, S., Nakata, N., Nagao, E., Kinjoh, K.: Rifampicin resistant *Mycobacterium leprae* isolated from Japanese patients and mutation in *rpoB* gene. 15th International Leprosy Congress. Beijing, September 1998

中田登、甲斐雅規、笹川千尋：らい菌カタラーゼ遺伝子に関する解析 第71回日本細菌学会総会、1998年4月

山崎利雄、佐藤直樹、芳賀伸治、小林和夫、柏原嘉子、林公子、田村俊秀、山下研也、豊田耕一、岡沢豊、丹羽和信：結核菌のATP測定による薬剤感受性試験法の検討 第68回実験結核研究会 1998年4月、新潟

佐藤直樹、山崎利雄、芳賀伸治、小林和夫、柏原嘉子、林公子、田村俊秀、山下研也、豊田耕一、岡沢豊、丹羽和信：生物発光を用いた結核菌の薬剤感受性試験法(1) アデノシン三リン酸(ATP)測定法の結核菌標準株による基礎的検討 第73回日本結核病学会総会 1998年4月 新潟

山崎利雄、佐藤直樹、芳賀伸治、小林和夫、柏

原嘉子、林公子、田村俊秀、山下研也、豊田耕一、岡沢豊、丹羽和信：生物発光を用いた結核菌の薬剤感受性試験法(2) ATP測定法の薬剤感受性試験への応用 第73回日本結核病学会総会 1998年4月 新潟

松岡正典、柏原嘉子、儀同政一、甲斐雅規、前田伸司、長尾榮治、金城邦浩：低度 rifampicin 耐性らい菌の分離と *rpoB* 遺伝子の変異：第71回日本ハンセン病学会 1998年6月 平良市

中村昌弘、松岡正典：無細胞液体培地におけるらい菌の限られた増殖 らい菌が無細胞系で増殖しない理由 第71回日本ハンセン病学会 1998年6月 平良市

福富康夫、虎谷聡、松木玄二、松岡正典：らい菌のマクロファージ内長期培養の試み(続報) 第71回日本ハンセン病学会 1998年6月 平良市

松木玄二、虎谷聡、松岡正典、福富康夫：マクロファージのらい菌食機構—糖レセプターの関与— 第71回日本ハンセン病学会 1998年6月 平良市

山田毅、内藤真理子、大原直也、松本壮吉、松岡正典、野間口博子：ハンセン病ワクチンの開発 第71回日本ハンセン病学会 1998年6月 平良市

鈴木定彦、勝川千尋、田丸亜貴、牧野正直、松岡正典：大腸菌中で発現させたリコンビナント85A複合体の免疫活性 第71回日本ハンセン病学会 1998年6月 平良市

和泉真蔵、Budiawan, T., 松岡正典、佐伯圭介、世界的濃厚流行地インドネシア北マルク県におけるハンセン病の現状 第71回日本ハンセン病学会 1998年6月 平良市

和泉真蔵、松岡正典、Budiawan, T., 佐伯圭介 熱帯アジアにおけるハンセン病流行の現状、イ

インドネシア北マルク県における疫学調査 国際
医療学会 1998年10月、大阪

中田登、松岡正典、甲斐雅規、柏原嘉子：らい
菌のカタラーゼに関する研究 第71回日本ハ
ンセン病学会 1998年6月 平良市

松岡正典、中田登、和泉真蔵、佐伯圭介、Teky
Budiawan: ハンセン病流行地における生活用
水からのらい菌遺伝子の検出 第71回日本ハ
ンセン病学会 1998年6月 平良市

花輪智子、甲斐雅規、神谷茂、山本友子：*Listeria
monocytogenes* の hexacistronic operon の構造
と転写解析 第21回日本分子生物学会年会
1998年12月、横浜

甲斐雅規、中田登、儀同政一、松岡正典、柏原
嘉子：DDS耐性にかかわる遺伝子のクローニン
グ：第72回日本細菌学会総会 1998年3月
東京

分担研究報告書

キノロン耐性を疑われた症例のらい菌 *gyrA* 遺伝子の変異

主任研究者 柏原 嘉子 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
病原微生物部長

研究要旨

キノロンに対する耐性獲得は結核菌を含む多くの細菌で報告されているが、らい菌に関してはマリの患者からの1例が報告されているに過ぎない。人工培養できないらい菌においては通常の薬剤感受性試験が行えないため、遺伝子診断によるキノロン耐性検出法を作成し、キノロン耐性が疑われた症例からのらい菌について検索したところ、我が国にもキノロン耐性菌が出現していることまた2剤以上のハンセン病治療薬に耐性を獲得した菌が我が国にもかなり出現していることが判明した。

A. 研究の目的

多剤併用化学療法 (MDT) の普及により世界のハンセン病登録患者数は著しく減少したが、毎年 50 万人を越す新患発生は減少傾向を示さず、ここ 2, 3 年は増加傾向にさえある。既にダブソン (DDS) やリファンピシンに耐性を獲得したらい菌の出現も報告されている。病原体であるらい菌は人工培養ができないため、通常の薬剤感受性試験ができず、マウスを用いる *in vivo* 試験、あるいは代謝活性を利用した *in vitro* 試験においても結果を得るのに 1 年以上の長時間を要する。

薬剤耐性を迅速に推定する遺伝子診断法の確立を目的とし、キノロン耐性を疑われた症例からのらい菌についてその方法を検証する。

B. 研究方法

らい菌の分離と DNA の調製：

生検材料を生理食塩水でホモゲナイズし、分別遠心によりらい菌の部分精製を行った。DNA の調製は既報に従った。

PCR 反応及び塩基配列の決定：

PCR は Takara Ex Taq DNA polymerase キット (宝酒造製) を用い、5 μ l の DNA 溶液、1 μ M のプライマーを含む 50 μ l の反応液で行った。プライマーはデータベースのらい菌 *gyrA* 遺伝子の塩基配列 (GenBank accession No. Z68206) に基づいて作製した以下のものを用いた。
S1: ATGACTGATATCACGCTGCCA,
A1: ATAACGCATCGCTGCCGGTGG

増幅産物はアガロースゲルから Esay Trap DNA Purification kit (宝酒造製) を用いて回収後、pGEM-T ベクター (Promega 製) に連結、大腸菌 HB101 を形質転換し得られたプラスミドの塩基配列を BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction キット (Perkin Elmer

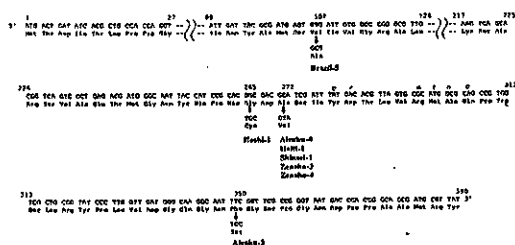
Applied Biosystem 製)で ABI Prism™ (Perkin Elmer Applied Biosystem 製)自動シーケンサーを用いて決定した。最低2個以上の独立したクローンからのプラスミドについて塩基配列を決定した。

DNA の解析には DNASIS プログラム (日立製) を用いた。

結果と考察

8例の臨床試料 (内6例は本邦分離株) から得られたらい菌の PCR でいずれも 390bp の DNA 断片が増幅された。これらの塩基配列を決定し、感受性菌のそれと比較した結果を図1に示す。

Nucleotide sequence of the QRDR and flanking region of *gyrA* gene of *Mycobacterium leprae*



8例中5例は90番アミノ酸アラニンのバリンへの変異が検出された。この変異はキノロン耐性と報告されているマリからの分離株で認められたものと一致し、この部位の変異が高い比率で生じていることを示唆した。残りの3例は35位 (バリン→アラニン)、88位 (グリシン→システイン)、及び116位 (フェニルアラニン→セリン) の変異であった。この内、88位のグリシン→システインの変異は結核菌でキノロン耐性に関与することが報告されている。また116位の変異はマウスでの耐

性試験から耐性であることが確認されている。これらの結果はらい菌においても、キノロン耐性らい菌がかなり出現していることを予測させ、またわが国においてもキノロン耐性らい菌が出現していることを示唆するものである。

GyrA 遺伝子の QRDR は異なる属の細菌間でもその塩基配列が良く保存されており、2本鎖 DNA の開裂とそれに続く A サブユニット 130 位のチロシン残基と 1 本鎖 DNA との結合を行う gyrase の活性中心を含み、かつキノロンとの相互作用をする部位と想定されている。この領域における変異は酵素蛋白の立体構造に変化をもたらし、本剤耐性を起こすものと考えられている。

表1に検索した薬剤耐性らい菌分離株を示す。分離株中にはキノロン耐性のみならず他の薬剤に対しても耐性を獲得し多剤耐性菌と推定されるものがかんり存在した。

Table I Clinical isolates of *M. leprae* and mutations in *gyrA*, *rpoB* and 23S rRNA genes

Resistance	Mutations in <i>gyrA</i> New Quinolone Resistance	Mutations in <i>rpoB</i> Rifampicin Resistance	Mutations in 23S rRNA gene Macrolide Resistance	OGS Resistance
Shinsei-1	Ala ⁹⁰ (GCA)→Val ⁹⁰ (GTA)	Leu ⁵³¹ (CTC)→Phe ⁵³¹ (CCT) Asp ⁵³² (GAT)→Asn ⁵³² (AAT)	AAAA→G ²⁴⁸³ AAA	R ⁰
Aiba-2	None	Ser ⁵³¹ (TCC)→Leu ⁵³¹ (TTG)	—	R ⁺
Aiba-3	Phe ⁹⁰ (TTC)→Ser ⁹⁰ (TCC)	None, R ⁺	—	R ⁺
Aiba-4	Ala ⁹⁰ (GCA)→Val ⁹⁰ (GTA)	His ⁵³¹ (ATC)→Val ⁵³¹ (GTG)	—	—
Hoshizu-1	Ch ⁹⁰ (GCC)→Cys ⁹⁰ (TCC)	—	—	—
Hoshizu-3	—	Ser ⁵³¹ (TCC)→Leu ⁵³¹ (TTG)	—	—
Zensho-2	None	—	—	R ⁺
Zensho-3	Ala ⁹⁰ (GCA)→Val ⁹⁰ (GTA)	None	—	—
Zensho-4	Ala ⁹⁰ (GCA)→Val ⁹⁰ (GTA)	Ch ⁵³¹ (GCC)→Ch ⁵³¹ (GAG)	—	—
Zensho-6	None	Ser ⁵³¹ (TCC)→Leu ⁵³¹ (TTG)	—	—
Braz-8	Val ⁹⁰ (TTC)→Ala ⁹⁰ (GCC)	Ch ⁵³¹ (GCT)→Val ⁵³¹ (TTG)	None	—
Hait-1	Ala ⁹⁰ (GCA)→Val ⁹⁰ (GTA)	Ser ⁵³¹ (TCC)→Leu ⁵³¹ (TTG)	—	—
Pakistan-4	None	His ⁵³¹ (ATC)→Val ⁵³¹ (GTG)	—	—

特筆すべきは分離株 Shinsei-1 でリファンピシン、キノロンに加えマクロライドに対しても既に耐性を獲得していた。また臨床症状からダブソン耐性も疑われている。このような薬剤耐性がどのような経過を

このような薬剤耐性がどのような経過を経て獲得されたかについては現在不明であるが、化学療法が普及しているハンセン病の治療の中で、わが国の難治性ハンセン病に耐性菌の関与が少なくないと推定され、耐性菌の現状を把握し、それに対応することの重要性を示唆するものである。

らい菌は未だ人工培地での培養が成功しておらず、薬剤感受性試験はマウスを用いる *in vivo* 実験あるいは大量の菌を必要とする（通常は臨床分離株を一旦マウスで継代して用いる）放射性標識パルミチン酸の代謝阻害で測定する *in vitro* 試験で行われる。しかし、いずれの場合も結果を得るのに1年以上の長期を必要とする。遺伝子による診断が100%確定的ではないにしても、長時間を要するマウスでの *in vivo* 実験に先立って、遺伝子解析は治療に有用かつ迅速な情報を提供する可能性がある。

現在、今回用いた分離株のマウスでの薬剤感受性試験を継続中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

M. Kai, H. Saito, K. Kobayashi, Y. Kashiwabara: *Mycobacterium avium* complex with different reactivity to DNA probes. In *Clinical Mycobacteriology*, M. Casal ed. Barcelona: Prous Science/ Spain 159-164, 1998

H. Saito, Y. Kashiwabara, K. Kobayashi: Present and future in leprosy research. In *Clinical Mycobacteriology*, M. Casal, ed. Barcelona: Prous Science/ Spain 51-62, 1998

2. 学会発表

山崎利雄、佐藤直樹、芳賀伸治、小林和夫、柏原嘉子、林公子、田村俊秀、山下研也、豊田 耕 一岡沢豊、丹羽和信：結核菌の ATP 測定による薬剤感受性試験法の検討 第68回実験結核研究会 1998年 4月、新潟
佐藤直樹、山崎利雄、芳賀伸治、小林和夫、柏原嘉子、林公子、田村俊秀、山下研也、豊田耕一、岡沢豊、丹羽和信：生物発光を用いた結核菌の薬剤感受性試験法（1）アデノシン三リン酸（ATP）測定法の結核菌標準株による基礎的検討 第73回日本結核病学会総会 1998年 4月 新潟
山崎利雄、佐藤直樹、芳賀伸治、小林和夫、柏原嘉子、林公子、田村俊秀、山下研也、豊田耕一、岡沢豊、丹羽和信：生物発光を用いた結核菌の薬剤感受性試験法（2）ATP測定法の薬剤感受性試験への応用 第73回日本結核病学会総会 1998年 4月 新潟
Yamazaki, T., Sato, N., Haga, S., Fujii, H., Kobayashi, K., Kashiwabara, Y., Hayashi, K., Tamura, T., Yamashita, K., Toyoda, K., Okazawa, Y., Tanno, K.: Antimicrobial susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* by measuring mycobacterial ATP. 98th General Meeting of American Society of Microbiology, May, 1998, Atlanta
松岡正典、柏原嘉子、儀同政一、甲斐雅規、前田伸司、長尾榮治、金城邦浩：低度 rifampicin 耐性らい菌の分離と *rpoB* 遺伝子の変異：第71回日本ハンセン病学会 1998年 6月 平良市
中田登、松岡正典、甲斐雅規、柏原嘉子：らい菌のカタラーゼに関する研究：第71回日本ハンセン病学会 1998年 6月 平良市

Matsuoka, M., Kashiwabara, Y., Gidoh, M.,
Kai, M., Maeda, S., Nakata, N., Nagao, E.,
Kinjoh, K.: Rifampicin resistant
Mycobacterium leprae isolated from
Japanese patients and mutation in *rpoB*
gene. 15th International Leprosy Congress.
Beijing, September 1998

甲斐雅規、中田登、儀同政一、松岡正典、
柏原嘉子：DDS 耐性にかかわる遺伝子のク
ローニング：第72回日本細菌学会総会
1998年3月 東京

らい菌の *rpoT* 遺伝子の多型とその地理的分布

(分担研究者) 松岡正典 国立感染症研究所ハンセン病研究センター

生体防御部 第1研究室

研究要旨：らい菌の型別法確立を意図し、ヌードマウス足蹠内増殖を異にする菌株の遺伝子について比較した結果、*rpoT* 遺伝子内に6塩基からなる直列配列があり、それが3コピーのものと4コピーのものに分けられることが明らかとなった。由来を異にする72株について検索した結果、特徴ある地理的分布が明らかとなった。本州由来株はほとんど4コピーであたのに対し、沖縄由来の株は全て3コピーであった。韓国由来株は全て4コピーであり、現代の日本人の形成過程に伴う分布が示された。国外のその他の株は3コピーのものがほとんどであった。韓国と本州の4コピーのらい菌の分布はこれらが弥生人により大陸よりもたらされたことを示唆した。

A. 研究目的

ハンセン病の抜本的感染防止策構築の為にはその感染経路の解明が必須であり、また再燃、再感染を区別し治療の有効性判定の為にはらい菌の異同を明らかにする必要がある。これらの目的を達成する為の技術的基盤として個々の症例における原因らい菌を分別することが求められるが、これまでその目的にかなう実用的手法はほとんど報告されていない。

らい菌の型別を目的として上記目的にかなう多型性を示す遺伝子部位の検索を行った結果、マウス足蹠内増殖を異にするらい菌株間において、16SrRNA 遺伝子に差異は認められなかったが、*rpoT* 遺伝子内に存在する6塩基からなる直列配列のコピー数に違いがあり6塩基配列を3回繰り返すものと4回繰り返す株に分けられることを観察した。国内外より収集した更に多くの菌株について比較し、その地理的分布について検討すると共に上記コピー数と異なる株が見られるかについても検索を行った。

B. 研究方法

国内、国外より得た72株について検討した。国内由来株は計23株、内5株は沖縄の患者より分離された。国外の49株はタイ4株、フィリピン2株、ネパール1株、パキスタン1株、インド1株、中国8株、韓国11株、バングラディッシュ3株、インドネシア8株、ブラジル6株、ハイチ2株、自然感染アルマジロ1株、マンガベイサル1株を用いた。

凍結ないしアルコール浸漬 Biopsy 材料、パラフィンブロック、結節部位 Skin scraped 材料、ヌードマウス足蹠増殖らい菌、アルマジロ組織より適宜 DNA を調製した。

標的部位を含む300bp長の *rpoT* 遺伝子の一部をPCRにより増幅し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction kit により塩基配列を決定した。また同領域の更に短い97または91bpの産物をPCRにより増幅し、4%Meta Phor agarose を用いてその差異の簡易検出を行った。

C. 研究成果

検査した材料は *rpoT* 遺伝子中の繰り返し配列の数の差異により2群に分類された。即ち6

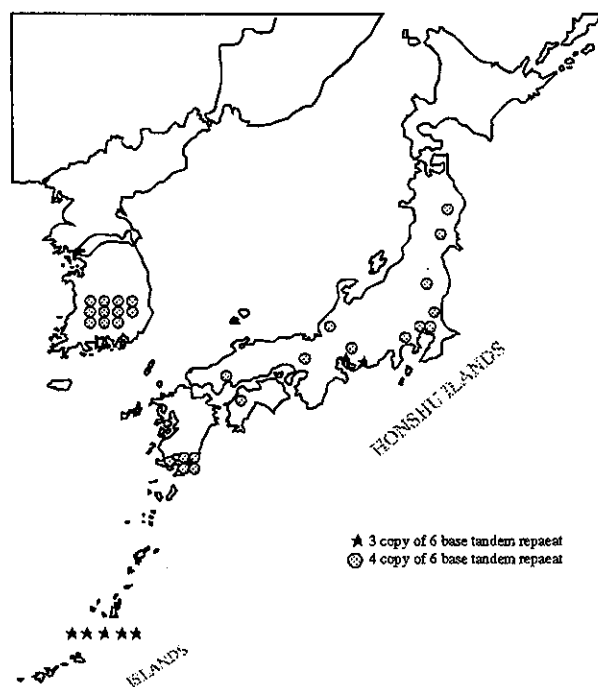
bp 配列が 3 回繰り返して直列するもの (3 型)、あるいは 6 bp 配列が 4 回繰り返して直列するもの (4 型) が認められた。

4 型の株からは 97bp の PCR 産物が得られ、3 型のらい菌からは 91bp の産物が得られた。



Electrophoresis of 97bp or 91bp PCR products amplified from *rpoT* gene of various isolates of *M. leprae*

国内の分離株のうち、本州および九州の患者由来 18 株中、16 例は 4 型を示し、岐阜県由来の 2 例は 3 型であった。一方、沖縄由来の 5 例はすべて 3 型であった。国外由来株のうち韓国の患者より得た 11 株は全て 4 型であり、本州



Distribution of different types of *M. leprae* in Japan and Korea

での分布に類似していた。国外の分離株中パキスタン、インドネシア、中国に由来するそれぞ

れ 1 株が 4 型であったが、その他は全て 3 型であった。自然感染マンガベイサル由来菌、アルマジロ由来菌は 3 型であった。

D. 考察

ハンセン病の個々の症例における原因らい菌を識別し、疫学的解析を行うことは感染経路解明のために必須の要件であるにもかかわらず、これまでらい菌については Williams らの報告に示された様に遺伝子の多様性が極めて少なく、結核菌で有益な疫学手段となっている RFLP による解析法は応用できず、その他の有効な手法も開発されていない。Shepard によって菌株間でのマウス footpad 内増殖の差異が報告されているが、上記目的のためには応用不可能である。株間の遺伝子の多型性について Fsihi らによって *polA* 遺伝子を 1 コピーもつ株と一部の株ではそこから約 300 kb 離れた位置に更に 1 コピー有する株があり、その差によって 2 群に分けられることが報告されている。分子疫学に应用可能なその他の部位の遺伝子の多様性を見出し、型別法の確立を行うことを試み、検出された異なる遺伝子型の地理的分布について観察した。

ヌードマウスによりらい菌を継代する際、菌株によって footpad 内での増殖に違いがあることを認め、高い footpad 内増殖を示す株ではその 6 塩基が 3 コピー直列し、低い増殖を示す株では 4 コピー直列することが見出された。例数をまして国内外より得られたらい菌について検討した。

日本国内におけるそれぞれのタイプの分布様式とりわけ、沖縄と本州における 4 型ないし 3 型のらい菌の偏った分布は現代日本人の成立過程とされる 2 重構造モデルと一致して形成されたと推察された。2 重構造モデルによると現代日本人は以下の過程を経て成立したと考えられている。約 90 万年前、現在のインドネシアを基点とする民族が中国南部に進出し、

その後更に北上した。その一部は台湾、沖縄を經由して一万年前より日本全土に分布し縄文人を形成した。その後 2,300 年から 1,700 年前にかけて極東地域北部において寒冷地適応した民族の一部が朝鮮半島を經由して日本に渡来し、弥生人となり縄文人を駆逐ないし混血し、現代の本州を中心として分布する日本人が成立した。現在の沖縄の人々およびアイヌの人々は縄文人の形質を受け継ぐヒトであるとされる。

本州ではほとんど株が 4 型であるのに対し、沖縄の分離株は全て 3 型であり、かつまた韓国由来の株は全て 4 型であったことは日本に分布するらい菌は 2 通りの方法により大陸よりもたらされたと推察される。沖縄に分布するらい菌は台湾を経て進入し、一方、本土に分布するらい菌は弥生人となった大陸人ともに朝鮮半島を経て渡来したと考えられた。この推察を実証する為には中国東北部さらにはシベリア由来のらい菌のタイプを検査する一方で、中国南部より分離されるらい菌についてもその型を調べる必要があると考える。

世界的な分布を見ると動物の自然感染例も含めて圧倒的に 3 型が多かったが、その理由に付いては更なる解析を必要とする。

これまでらい菌遺伝子の多型性については先に述べた Fsihi らの報告があるのみである。しかしながらその報告は僅かに 5 株について比較を行っただけであり、その後それを用いた疫学的解析の報告は見られていない。我々の見出した遺伝子部位の差異は有力な型別あるいは疫学解析の手段となることが示された。更にその他の多型性を示す部位の検索とそれらを組み合わせることによって、結核の分子疫学に適用されている RFLP に匹敵する解析能を持った分離株型別法の開発が望まれる。

E. 結論

らい菌は *rpoT* 遺伝子中の 6 塩基からなる直列配列が 3 コピーあるいは 4 コピーのものに分けられることが明らかとなった。日本ならびに韓国でのそれらの偏った分布から 4 コピーの株は弥生人と共に大陸から伝来したものであることが推察された。国外の株はほとんどが 3 コピーであった。

F. 研究発表

紙上発表

- 1) 中村昌弘、松岡正典：無細胞液体培養系で培養したシリコンスライド上でのらい菌の増殖像と思われる所見. Jpn. J. leprosy 67 287-291 (1998)
- 2) 和泉真蔵、Teky Budiawan、松岡正典、佐伯圭介、川津邦雄：熱帯アジアの濃厚流行地におけるハンセン病の現状 — 血清学的手法を用いた一般住民の感染状況の疫学調査— Jpn. J. Leprosy 67 401-408 (1998)
- 3) Matsuoka M., Izumi S., Budaiwan T. and Nakata N.: *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. Ind. J. Leprosy (in press)

学会発表

- 1) 松岡正典、柏原嘉子、儀同政一、甲斐雅弘、前田伸司、長尾栄治、金城邦浩：低度 rifampicin 耐性らい菌の分離と *rpoB* 遺伝子の変異。第 71 回日本ハンセン病学会 平成 10 年 6 月 平良市
- 2) 中村昌弘、松岡正典：無細胞液体培地におけるらい菌の限られた増殖：らい菌が無細胞系で増殖しない理由。第 71 回

- 日本ハンセン病学会 平成10年6月
平良市
- 3) 中田登、松岡正典、甲斐雅規、柏原嘉子：らい菌のカタラーゼ遺伝子に関する解析。第71回日本ハンセン病学会 平成10年6月 平良市
- 4) 福富康夫、虎谷聡、松木玄二、松岡正典：らい菌のマクロファージ内長期培養の試み（続報）第71回日本ハンセン病学会 平成10年6月 平良市
- 5) 松木玄二、虎谷聡、松岡正典、福富康雄：マクロファージのらい菌貪食機構—糖レセプターの関与— 第71回日本ハンセン病学会 平成10年6月 平良市
- 6) 山田毅、内藤真理子、大原直也、松本壮吉、松岡正典、野間口博子：ハンセン病ワクチンの開発。第71回日本ハンセン病学会 平成10年6月 平良市
- 7) 鈴木定彦、勝川千尋、田丸亜貴、牧野正直、松岡正典：大腸菌中で発現させたリコンビナト85A複合体の免疫活性。第71回日本ハンセン病学会 平成10年6月 平良市
- 8) 和泉眞蔵、Teky Budiawan、松岡正典、佐伯圭介：世界的濃厚流行地インドネシア北マルク県におけるハンセン病の現状。第71回日本ハンセン病学会 平成10年6月 平良市
- 9) 松岡正典、中田登、和泉眞蔵、佐伯圭介、Teky Budiawan：ハンセン病濃厚流行地における生活用水からのらい菌遺伝子の検出。第71回日本ハンセン病学会 平成10年6月 平良市
- 10) 和泉眞蔵、松岡正典、Teky Budiawan、佐伯圭介：熱帯アジアにおけるハンセン病流行の現状、インドネシア北マルク県における疫学調査。国際医療学会 平成10年8月 大阪市
- 11) Suzuki Y., Katsukawa C., Tamura A., Makino M. and Matsuoka M.: Immunological characteristics of five recombinant *Mycobacterium leprae* proteins produced in *Escherichia coli*. 33rd US-Japan cooperative medical science program. Tuberculosis-leprosy research conference. Osaka, August, (1998)
- 12) Izumi S., Matsuoka M., Budiawan T., Nakata N. and Saeki K.: An epidemiological study of *Mycobacterium leprae* infection and prevalence of leprosy in an endemic district of North Maluku, Indonesia. 33rd US-Japan cooperative medical science program. Tuberculosis-leprosy research conference. Osaka, August, (1998)
- 13) Goto M., Matsuoka M. and Kitajima S.: Animal model of leprous neuritis: Comparison of transfer of CD4+ and CD8+ lymphocytes into *M. leprae* inoculated nude mice. 33rd US-Japan cooperative medical science program. Tuberculosis-leprosy research conference. Osaka, August, (1998)
- 14) Fukutomi Y., Toratani S., Matsuki G. and Matsuoka M.: Mechanisms of nitric oxide production by macrophages that express anti-*M. leprae* response. 33rd US-Japan cooperative medical science program. Tuberculosis-leprosy research

conference. Osaka, August, (1998)

- 15) Matsuoka M., Kashiwabara K., Gidoh M., Kai M., Maeda S., Nakata N., Nagao E. and Kinjoh K.: Rifampicin resistant *Mycobacterium leprae* isolated from Japanese patients and mutation in *rpoB* gene. 15th International Leprosy congress. Beijing, September (1998)
- 16) Izumi S., Matsuoka M., Budiawan T., Nakata N. and Saeki K.: An epidemiological study *M. leprae* infection and distribution of leprosy bacillus in the environment of endemic villages in North Maluku, Indonesia. 15th International Leprosy congress. Beijing, September (1998)
- 17) Fukutomi Y., McCormic G., Pasqua J.P., Krahenbuhl J. L., Toaratani S. and Matsuoka M. Elongation of *Mycobacterium leprae* in macrophages cultured in the presence of interleukin-10. 15th International Leprosy congress. Beijing, September (1998)

分担研究報告書

薬剤耐性遺伝子の単離と薬剤耐性機構の解明

分担研究者 甲斐雅規 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
病原微生物部第三研究室長

研究要旨：

らい菌のダブソン (DDS) 耐性は以前より報告されてきているが、その耐性機構についてはまったく不明のままである。そこで、速発育性抗酸菌である *M. smegmatis* をから DDS 耐性変異株を4株得、その変異株の中の1株 (K1 株) と DDS 感受性の親株について RNA arbitrary primer (RAP)-PCR 法により耐性関連遺伝子の単離を試みた。その結果、感受性菌では増幅するが耐性菌では増幅されない DNA 断片を得た。この断片をクローニングし塩基配列を決定した。またこの領域の遺伝子発現を調べたところ、すべての耐性菌変異株で発現が抑制されていることがわかった。

A. 研究目的

ダブソン(DDS)はリファンピシン、クロファジミンとともに多剤併用療法に用いられる代表的なハンセン病治療薬である。ハンセン病の起原菌である *M. leprae* の中にこれら薬剤に対する耐性菌が存在することが以前より報告されてきている。DDS はサルファー剤の一種と考えられ、サルファー剤であるスルホンアミド耐性について他の菌では薬酸合成酵素(DHPS)の遺伝子の変異などの報告がある。しかし、らい菌の DDS 耐性についてはこれまで DHPS の変異の報告はない。すなわち、らい菌のダブソン耐性機構については現在のところまったく不明のままである。そこで、らい菌の DDS 耐性にかかわる遺伝子の単離および耐性機構の解明を目指し、第一段階として、培養が容易で増殖が速い抗酸菌である *M. smegmatis* を利用し、その DDS 耐性変異株を実験的に作成し、その変異株から DDS 耐性に関わる遺伝子のクローニングを試みた。

B. 研究方法

使用した菌は *M. smegmatis* mc²155 および *M. smegmatis* ATCC23011 で、DDS 含有の抗酸菌用培地 7H10 上で培養し耐性変異株を単離した。この耐性菌と感受性の親株両者間で発現の異

なる遺伝子を検出するため RNA Arbitrary primer (RAP)-PCR 法と呼ばれる遺伝子検出法を利用した。本法は遺伝子の発現が異なることが予想される2者間より当該遺伝子を検索、単離する方法である。具体的には、耐性株およびその親株である感受性株それぞれより RNA を抽出し cDNA を合成し、これを鋳型として 10 塩基程の短いオリゴヌクレオチドプライマー (Arbitrary primer) (表1) による PCR を低いアニリング温度(40℃)で行い、両者で得られた増幅断片を電気泳動上で比較した。

表 1

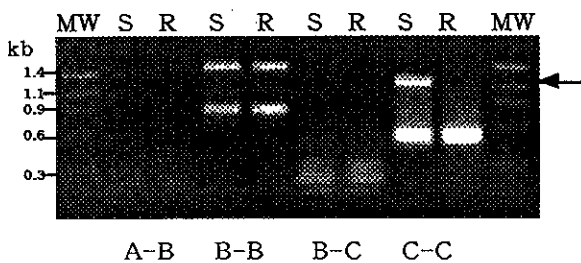
Arbitrary primers	
A:	5'-CAAGCGAGGT-3'
B:	5'-AACGCGCAAC-3'
C:	5'-CAGTGAGCGT-3'

そして両者で違いを示した DNA 断片を単離しその塩基配列を調べ、データベースの検索を行った。また、この断片をゲノム DNA よりクローニングしてオープンリーディングフレーム (ORF) の検索を行った。さらに、この増幅領域内にプライマーを設定し変異株と親株で RT-PCR による発現の違いを検討した。

C. 研究結果

M. smegmatis の耐性変異株を 4 株獲得した。それらの最小発育阻止濃度 (MIC) は 100~250 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示した。DDS 感受性の親株と 4 株の変異株うち K1 と名付けた MIC 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示す変異株を耐性株の代表として用い RAP-PCR を行った結果、Arbitrary プライマー C のみの PCR により両者で異なる増幅バンドが得られた。それは感受性菌では見られるが、耐性菌では見られない約 1.1kb のバンドであった (図 1)。

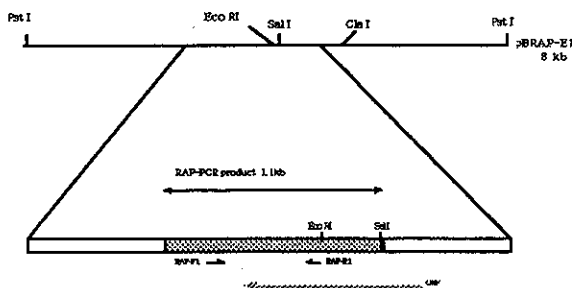
図 1



S: 感受性菌 A: 5'-CAAGCGAGGT-3'
R: 耐性菌 B: 5'-AACGCGCAAC-3'
 C: 5'-CAGTGAGCGT-3'

塩基配列を調べ、データベースのホモロジーサーチを試みた結果結核菌およびらい菌の遺伝子ライブラリー中にある程度の相同性を示すものがあったが、それは機能の知られていないオープンリーディングフレーム(ORF)であり、遺伝子は特定されなかった。そこで、このバンドをプローブにサザンハイブリダイゼーションを行い、感受性菌の染色体 DNA から約 8kb の *Pst*I 断片をクローニングした (図 2)。

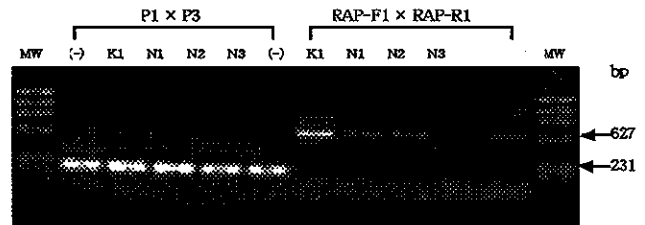
図 2



そのうちプローブ断片を含む約 3kb の領域の塩基配列を決定し、ORF を検索した結果 1kb 弱のものが 1 つ検出された。

次にその領域内にプライマー RAP-F1, RAP-R1 を設定し耐性菌と感受性菌における本遺伝子の発現を RT-PCR で確認したところ、独立に分離した 4 つの耐性株すべてでこの部分の遺伝子の発現が抑制されていることがわかった (図 3)。

図 3



D. 考察

M. smegmatis の DDS 耐性変異株 K1 (MIC 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上) と DDS 感受性の親株とを用い RAP-PCR を行った結果、感受性菌では見られるが、耐性菌では見られない約 1.1kb の明瞭な増幅バンドが得られた。ここで用いた Arbitrary プライマー C は我々の別の実験結果あるいは他の研究者の報告でも DNA の非特異的増幅により結果をもたらすことから、RAP-PCR 実験に非常に有効な配列であることがわかった。感受性菌のみで増幅されたバンドの解析の結果、遺伝子は特定されなかった。そのことより、この領域に含まれ今回の DDS 耐性に関与することが予想される遺伝子が新規遺伝子である可能性を示すものと考えられる。染色体 DNA からクローニングした断片の部分的塩基配列を決定し、ORF を検索した結果 1kb 弱のものが 1 つ検出された。しかし、この ORF には明確なプロモーター領域は見いだされず、現時点では、今回の耐性菌で見られた発現抑制を受ける遺伝子そのものであるかどうかは不明である。今後この領域のさらに詳細な解析を進めて遺伝子の特定を行うとともに遺伝子のノックアウト実験により耐性化の導入が生じるかどうかを調べ、遺伝子とその機能の解析が必要であろう。次

にその領域内にプライマーを設定し耐性菌と感受性菌における本遺伝子の発現を RT-PCR で確認したところ、独立に分離した4つの耐性株すべてでこの部分の遺伝子の発現が抑制されていることがわかった。

E. 結論

新しい分子生物学的手法である RAP-PCR 法を用いて、実験的に作成した *M. smegmatis* の DDS 耐性変異株と DDS 感受性親株の比較よりその耐性にかかわる遺伝子を含むと考えられる領域のクローニングに成功した。また今回作成したすべての耐性変異株でこの領域の発現が抑制されていることを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kobayashi K., Kai M., Gidoh M., Nakata N., Endoh M., RP. Singh, Kasama T., Saito H.

The possible role of interleukin (IL) 12 and interferon- γ -inducing factor/IL-18 in protection against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice.
Clinical Immunology and Immunopathology Vol.88(3), 226-231, 1998

(2) Kai M., Saito H., Kobayashi K., Kashiwabara Y.
Mycobacterium avium complex with different reactivity to DNA probes.
Clinical Mycobacteriology 159-164, 1998

(3) Saito H., Gidoh M., Kai M., Kobayashi K.
Chemoprophylaxis against *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice.
Clinical Mycobacteriology 409-414, 1998

(4) Kobayashi K., Gidoh M., Kai M., Saito H.
Possible involvement of type 1 helper T cell / interferon- γ -inducing cytokines in protection against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice.
Clinical Mycobacteriology 109-116, 1998

(5) 齋藤 肇、David Dawson、甲斐雅規、小林和夫

Mycobacterium avium complex の自然環境における地理的分布並びに AIDS・非 AIDS 患者株の血清型
結核 日本結核病学会 73(5) 379-383, 1998

2. 学会発表

(1)花輪智子、甲斐雅規、神谷 茂、山本友子

Listeria monocytogenes の *dnaK* hexacistronic operon の構造と転写解析
日本分子生物学会 第21回日本分子生物学会年会 1998.12

(2)甲斐雅規、中田 登、儀同政一、松岡正典、柏原嘉子

抗酸菌の DDS 耐性にかかわる遺伝子のクローニング

日本細菌学会雑誌 日本細菌学会 54(1) 174, 1999.3

分担研究報告書

らい菌の酸素代謝に関する研究

分担研究者 中田 登 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
病原微生物部第三研究室研究員

研究要旨

らい菌の酸素代謝に関する研究の一環として、マイコバクテリアにおけるカタラーゼの意義を明らかにするため、迅速発育性マイコバクテリア *Mycobacterium smegmatis* のカタラーゼ遺伝子 *katE*、*katG* をそれぞれクローニングし、その塩基配列を決定した。これらの遺伝子は大腸菌の *katE*、*katG* 遺伝子とそれぞれ約 65%、60% の相同性が見られた。これらの DNA 断片を使用して相同組み換えによる *M. smegmatis* のカタラーゼ遺伝子の不活化を試みたが、導入した DNA 断片は染色体上のランダムな部分に組み込まれ、相同組み換えを起こしたものは得られなかった。そこで *M. smegmatis* のトランスポゾン Tn611 挿入変異株 500 株を分離し、 H_2O_2 耐性について調べ、 H_2O_2 感受性の変異株を 1 株分離した。この変異株は正常なカタラーゼ活性が見られたことから、 H_2O_2 耐性についてカタラーゼ以外の因子の関与が示唆された。

A. 研究目的

らい菌を含む病原性マイコバクテリアは細胞内寄生菌であり、宿主動物のマクロファージ細胞の内部で増殖する。そのため、宿主細胞の産生する活性酸素などの攻撃から逃れて菌が増殖するために、菌体の産生するカタラーゼが重要な役割を果たしていると考えられており、実際カタラーゼを欠失した結核菌は病原性が低下することが知られている。我々は、らい菌のカタラーゼ遺伝子 *katG* にはその塩基配列上に遺伝子としての欠陥が多数見られ、またらい菌 *katG* 領域からはタンパク質産物の産生が見られないことを明らかにしてきた。また、らい菌ゲノム中に *katE* 遺伝子の存在も見られないことから、らい菌はこれら 2 種の遺伝子に由来するカタラーゼ活性を欠失していると考えられる。そのため、らい菌は何らかの代償作用をもってこれらの活性酸素を処理していると考えられるが、らい菌は人工培地による培養が不可能なため、そのメカニズムの解析を行うことは容易ではない。そこでらい菌における酸素代謝を解明する手がかりとして、人工培地

による培養が可能な迅速発育性マイコバクテリア *Mycobacterium smegmatis* を使用し、 H_2O_2 処理に対するカタラーゼの役割、及びカタラーゼ以外の因子についての関与を検討した。まず、*Mycobacterium smegmatis* の *katG*、*katE* 遺伝子のクローニングを行い、さらにカタラーゼ欠失 *M. smegmatis* の分離を試みた。また、*M. smegmatis* の独立したトランスポゾン挿入変異株 500 株を分離して H_2O_2 耐性を調べた。

B. 研究方法

M. smegmatis は ATCC23011 株、及び MC²155 株を用いた。*M. smegmatis* のイソニアジド (INH) 耐性変異株は、菌を 100 μ g/ml の INH を含む Luria-Bertani 培地に塗布して、増殖するコロニーを選別することにより得た。カタラーゼ活性の検出は、超音波処理により菌体を破碎した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ゲルを Horseradish peroxidase、 H_2O_2 、Diaminobenzidine で処理してカタラーゼ活性を持つバンドを陰性染色することにより行った。*M.*