

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

薬剤耐性らい菌の検出に関する研究

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 室長

研究要旨

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、ハンセン病治療薬に耐性を獲得した菌の出現が報告されている。そこで、日本国内におけるハンセン病患者の症例から得られた、ハンセン病治療薬に耐性が疑われるらい菌臨床分離株 21 株について、DDS、リファンピシン、キノロン耐性に関与する遺伝子変異の有無を調べた。その結果、ほぼ全ての株でこれらの遺伝子内に耐性への関与が知られている何らかの変異が見られた。また、9 例で多剤耐性を強く示唆する結果が得られ、そのうち 2 例では 3 種全ての薬剤に対して耐性を獲得していることが示唆された。

A.研究目的

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、50 万人を超す新患発生数は MDT 導入後も減少せず、最近では増加傾向を示している。また、最近 WHO は感染症における薬剤耐性菌の増加に警告を発しており、ハンセン病治療薬に耐性を獲得したらい菌の出現も報告されてきている。このような状況の中、今後ハンセン病の制圧、治療において耐性菌対策が極めて重要と考えられる。従来らい菌の薬剤感受性試験はマウス足蹠法あるいは BACTEC 法/Buddemyer 法により行われてきたが、これらの方法は結果を得るまでに極めて長時間と労力を要する。らい菌が人工培養不能かつ極めて遅い増殖速度を有するため、臨床応用可能な簡易・迅速薬剤感受性試験法が未だ開発されておらず、組織的な薬剤耐性菌の調査を困難にしている。

近年、ハンセン病治療薬であるリファンピシン、キノロン、DDS に関して耐性に関与する遺伝子変異が報告されてきており、遺伝子変異の検出による迅速な薬剤感受性判定試験が可能となりつつある。そこで、日本国内から分離されたらい菌臨床分離株 21 株の薬剤耐性に関与する遺伝子変異について調査を行った。

B.研究方法

凍結あるいはアルコール固定皮膚生検試料を生理食塩水中でホモジナイズし、遠心してらい菌を部分精製後、凍結融解でらい菌を破碎しゲノム DNA を調製し、PCR におけるテンプレートとして用いた。*folP1*、*rpoB*、*gyrA* それぞれの遺伝子断片の PCR 増幅に用いたオリゴ DNA プライマーの塩基配列は次の通りである。

folP1: (5'-GCTTCTCGTGCCGAAGCGCTC-3'),
(5'-GCCATCGCGGGATCTGCTCGCCCA-3')

rpoB: (5'-CAGACGCTGATCAATATCCGT-3'),
(5'-TACGGTGTTCGATGAACCCG-3')

gyrA: (5'-ATGACTGATATCACGCTGCCA-3'),
(5'-ATAACGCATCGCTGCCGGTGG-3')

PCR は Takara ExTaq DNA polymerase キット（宝酒造製）を使用し、得られた増幅産物はアガロースゲル電気泳動により分離した後、回収して直接シーケンシングに供した。一部の断片については回収後、pGEM-T ベクター（Promega 製）に連結、大腸菌に形質転換してクローニングを行い、得られたプラスミドクローンをういてシーケンシングを行った。シーケンシングは BigDye Terminator Cycle Sequencing キット（Applied Biosystems 製）、及び ABI PRISM 310 Genetic Analyzer（Applied Biosystems 製）を用いて行い、塩基配列を決定した。塩基配列のコンピュータによる解析には DNASIS ソフトウェア（Hitachi Software Engineering 製）を用いた。DNA 断片のクローニングを行ったものに関しては、最低 2 個以上の独立したクローンについてシーケンシング

を行った。また一部の菌株についてはマウスでの薬剤感受性試験を行った。

(倫理面への配慮)

サンプルの採取にあたっては、提供者に対して利用目的を十分説明し、同意を得た上で行った。

C. 研究結果

DDS、リファンピシン、キノロン耐性を示唆する 21 株のらい菌臨床分離株について、それぞれの薬剤の標的分子をコードすると考えられている *folP1* 遺伝子、*rpoB* 遺伝子、*gyrA* 遺伝子の標的部位を含む DNA 断片を PCR 法で増幅し、それぞれについて塩基配列を決定して感受性菌の塩基配列と比較した。表 1 に検出された変異を示す。調べた 21 株のほぼ全てで薬剤耐性への関与が示されている何らかの変異が認められた。特に、9 株で複数の薬剤に対して耐性を獲得していることを示す変異が認められ、さらに 2 株では治療薬 3 剤に耐性を獲得していることが示唆された。3 剤耐性を示したもののうち、1 株 (Zensho-4) に関してはマウスフットパッド法でも耐性を確認した。

表1 日本国内のらい菌臨床分離株に見られた *folP1*、*rpoB*、及び *gyrA* 遺伝子の変異

isolate	Mutation in <i>folP1</i> DDS Resistance	Mutation in <i>rpoB</i> Rifampicin Resistance	Mutation in <i>gyrA</i> New Quinolone Resistance
Airaku-2	55: P (CCC) → L (CTC) R(L)	532: S (TCG) → L (TTG)	None
Airaku-3	53: T (ACC) → I (ATC) R(B)	None R	147: F (TTC) → S (TCC) S
Airaku-4	21: D (GAT) → G (GGT) 6: E (CAG) → R (CGC)	503: I (ATC) → V (GTC)	91: A (GCA) → V (GTA)
Boahizuka-1	None	—	89: G (GGC) → C (TGC)
Boahizuka-3	53: T (ACC) → A (GCC)	532: S (TCG) → L (TTG)	—
Boahizuka-4	—	532: S (TCG) → L (TTG)	—
Kuatsuu-1	55: P (CCC) → L (CTC)	532: S (TCG) → W (TGG)	None
Kuatsuu-2	55: P (CCC) → L (CTC)	532: S (TCG) → L (TTG)	None
Kuatsuu-3	55: P (CCC) → L (CTC)	None	—
Kuatsuu-4	53: T (ACC) → A (GCC)	532: S (TCG) → L (TTG)	—
Kuatsuu-5	53: T (ACC) → A (GCC)	None	—
Kuatsuu-6	—	510: S (AGC) → G (GGC)	—
Kuatsuu-7	—	None	—
Shinee1-1	53: T (ACC) → A (GCC)	534: L (CTG) → P (CCG) 517: D (GAT) → W (AAT)	91: A (GCA) → V (GTA)
Zensho-2	55: P (CCC) → L (CTC) R(B)	None	None
Zensho-3	53: T (ACC) → A (GCC) 55: P (CCC) → L (CTC)	None	91: A (GCA) → V (GTA)
Zensho-4	53: T (ACC) → I (ATC) R(B)	532: S (TCG) → L (TTG)	91: A (GCA) → V (GTA) R
Zensho-5	55: P (CCC) → L (CTC)	532: S (TCG) → L (TTG)	None
Zensho-6	None	532: S (TCG) → L (TTG)	None
Zensho-8	—	532: S (TCG) → L (TTG)	—
Zensho-9	48: V (GTC) → A (GCC)	527: E (CAC) → Y (TAC)	—

R: マウスを用いた薬剤感受性試験において耐性を示したもの
S: マウスを用いた薬剤感受性試験において感受性を示したもの
()内のB, Lはそれぞれ高度耐性、低度耐性を表す
斜体はこれまでに耐性への関与が示されている部位

folP1 遺伝子に関して:

folP1 遺伝子産物 DHPS において、これまでに DDS 耐性への関与が知られている 53 あるいは 55 位の変異は 13 株で認められた。また、標的

部位内に見られる Val48 などの変異については、DDS 耐性との因果関係が明らかでないため、現在検討を行っている。

rpoB 遺伝子に関して:

調べた 20 株のうち、12 株に耐性への関与が示されている部位に変異が見られた。また、結核菌では知られていたが、らい菌ではこれまで報告の無かった 527 位の His に変異が検出された。503 位の Ile などの変異については耐性への関与が明らかでないため、マウスを用いた感受性試験を行う必要がある。

gyrA 遺伝子に関して:

これまでにらい菌で報告されている 91 位の Ala→Val の変異の他、結核菌で報告のある 89 位の Gly→Cys の変異が 1 例見られた。

D. 考察

らい菌は未だ人工培養が成功していないため、通常の薬剤感受性試験法が適用できない。マウスによる薬剤感受性試験では 1 年以上の長期間を必要とし、臨床応用は困難である。また、パルミチン酸の代謝活性で調べる *in vitro* の薬剤感受性試験も大量の菌を必要とするため、臨床材料での試験には適さない。遺伝子による診断は、長時間を必要とするマウスでの *in vivo* 試験に先立って、ハンセン病治療に対する有用かつ迅速な情報を提供するものと考えられる。

スルホンアミド誘導体の 1 種である DDS はハンセン病の最初の化学療法剤として 1940 年代から利用され、1970 年リファンピシンがハンセン病の治療薬として利用されるまで長期にわたって単剤で利用されてきた。1950 年代には DDS 耐性のらい菌が報告され始め、その後も繰り返し耐性菌について報告されてきている。スルホンアミド剤の作用機序は 7,8-dihydropteroate の合成における基質との拮抗阻害であることが他の細菌で報告されており、らい菌についても、*folP1* 遺伝子の 53 あるいは 55 位のアミノ酸をコードする部分の変異が DDS 耐性を引き起こすことが最近示された。大腸菌 DHPS の X 線解析の結果からこの領域は基質やスルホンアミド結合領域の近傍に当たることが明らかになっている。これらのアミノ酸の変異が DHPS の活性中心の立体構造に変化をもたらす、DDS との結合を低下させた結果、耐性を引き起こすと考えられる。

リファンピシン耐性に関しては、らい菌及び他の細菌で耐性に関与することが既に報告されている変異が調べた 20 株中 12 株で認められた。

また、*rpoB* 遺伝子全長に変異が存在しないにもかかわらず、マウスでの感受性試験でリファンピシン耐性を示す株が1例認められ (Airaku-3)、本遺伝子の変異以外の機構による耐性獲得が示唆された。

ハンセン病の治療薬では比較的新しく導入されたニューキノロン剤にも耐性を獲得している菌が出現している。キノロン耐性に関して、らい菌や結核菌で耐性に関与することが知られている変異が調べた12株中5株で認められた。また、マウスでの感受性試験での結果から (Airaku-3)、*gyrA* 遺伝子産物である DNA gyrase A-サブユニットの147位のアミノ酸変異はキノロン耐性に関与しないと考えられる。結核菌では低濃度のキノロン耐性に *gyrB* 遺伝子の変異が関与することが報告されているが、調べた限りにおいては、らい菌では *gyrB* 遺伝子の変異は認められなかった。

今回調べたらい菌分離株は臨床所見から耐性が疑われたものではあるが、調べた21株のうち9株が2剤以上のハンセン病治療薬に対し耐性を獲得した多剤耐性菌であったことから、さらなる簡易な耐性菌検出法の確立、耐性菌出現状況の把握、及び薬剤耐性菌による難治性ハンセン病に対する治療法の確立が急がれる。

E. 結論

臨床所見から耐性が疑われたらい菌の臨床分離株について、DDS、リファンピシン、ニューキノロン剤に関して、その耐性に関与することが知られている遺伝子の変異をしらべた。その結果、ほぼ全ての株で薬剤耐性に関与する何らかの変異が見られることがわかった。このことから、遺伝子変異の検出が薬剤耐性の判定において非常に有効であることが示された。また、調べた21分離株のうち9株が2剤以上のハンセン病治療薬に対し耐性を獲得した多剤耐性菌であることがわかり、日本におけるハンセン病の多剤耐性化が進んでいることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Jamal, M. A., Maeda, S., Nakata, N., Kai, M., Fukuchi, K. and Kashiwabara, Y. Molecular basis of clarithromycin resistance in *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *Tubercle and Lung Disease* 80:1-4, 2000

(2) Matsuoka, M., Maeda, S., Kai, M., Nakata, N., Chae, G. -T., Gillis, T. P., Kobayashi, K., Izumi,

S., and Kashiwabara, Y. *Mycobacterium leprae* typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*, 68:121-128, 2000.

(3) Hanawa, T., Kai, M., Kamiya, S., and Yamamoto, T. Cloning, sequencing, and transcriptional analysis of the *dnaK* heat shock operon of *Listeria monocytogenes*. *Cell Stress & Chaperons*, 5:21-29, 2000.

(4) Yamaguchi H, Osaki, T., Kai, M., Taguchi, H., and Kamiya, S. Immune response against a cross-reactive epitope on the heat shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, 68:3448-3454, 2000

2. 学会発表

(1) 橋本 研, 前田百美, 甲斐雅規, 前田伸司, 中田 登, 松岡正典.
ダブソン耐性らい菌における葉酸合成酵素 DHPS の変異.
第73回日本細菌学会総会. 2000年5月

(2) 前田伸司, 中田 登, 甲斐雅規, 橋本 研, 前田百美, 柏原嘉子.
らい菌のフォスファチジルイノシトール合成酵素(PIS)の発現と性質.
第73回日本細菌学会総会. 2000年5月

(3) Jamal, M. A., Maeda, S., Nakata, N., Kai, M., Kashiwabara, Y., and Gopalakrishnakone, P. Characterization of macrolides drug resistant mutants of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium fortuitum*. 7th Western Pacific Congress of Chemotherapy & Infectious Diseases, 2000

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

難治性抗酸菌感染症に対する免疫介入療法の開発

分担研究者 小林 和夫 大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学 教授

研究要旨

抗酸菌感染に対する細胞性免疫応答が宿主防御に貢献している。しかし、抗酸菌病原因子—宿主関係、すなわち、病原因子による宿主応答機序は不明である。本研究では、抗酸菌成分、特に、細胞壁由来糖脂質に注目し、炎症および免疫惹起性を解析した。結核菌やその他の抗酸菌細胞壁由来糖脂質、trehalose dimycolate が血管新生、肉芽腫炎症および細胞性免疫を惹起することが判明した。抗酸菌感染において、血管新生、肉芽腫炎症および細胞性免疫の発現は宿主防御に必須の構成要素である。従って、抗酸菌由来糖脂質は防御抗原であり、難治性抗酸菌感染症に対する免疫介入療法（ワクチンを含む）の開発に有望な戦略になる可能を示している。

A. 研究目的

抗酸菌感染は宿主防御および病変形成：肉芽腫炎症に帰結する。この過程は宿主-病原体関係を介して成立し、抗酸菌と宿主の壮絶な生存戦争を反映している。さらに、近年、結核などの抗酸菌感染症は増加している。薬剤耐性抗酸菌の出現が増加に関与している。しかし、薬剤耐性抗酸菌感染症には抗菌薬やワクチンなどの有効な戦略が現存しない。一方、抗酸菌感染における発病は10%以下であり、宿主防御機構を理解することは疾病制圧に寄与する。本研究では抗酸菌病原因子、防御抗原や宿主-病原因子関係を解明し、難治性抗酸菌感染症における免疫介入療法の基盤を提供することを目的とする。

B. 研究方法

抗酸菌病原因子として、結核菌細胞壁由来糖脂質（trehalose dimycolate : TDM や sulfolipid : SL）を分離、精製した。糖脂質を実験動物（マウス、ラットや家兎）に投与し、宿主応答（遅延型足蹠腫脹反応、肉芽腫炎症、血管新生や機能分子：サイトカイン/ケモカイン）を解析した。

C. 研究結果

TDMはBALB/cマウスに遅延型足蹠腫脹反応を惹起し、かつ、免疫群において非免疫群に比し、有意に増強していた。無胸腺ヌードマウスにおける足蹠腫脹反応は免疫群と非免疫群間で有意差を認めなかった。BALB/cマウスにおいてTDM静脈内投与は肉芽腫炎症を誘導したが、免疫群は非免疫群に比し、顕著であった。他方、ヌードマウスでは免疫による肉芽腫炎症の増強は認め

なかった。病変構成細胞として、免疫群で CD4 陽性細胞が有意に増加していた。病変部サイトカイン解析では早期に単球走化性ケモカイン（マクロファージ炎症性蛋白-1a や単球走化性蛋白-1）および炎症惹起性サイトカイン（インターロイキン 1：IL-1 や腫瘍壊死因子-a：TNF-a）、その後、1 型ヘルパー-T (Th1) /細胞性免疫誘導性サイトカイン（IL-12 やインターフェロン-g：IFN-g）蛋白発現を認めたが、何れのサイトカインも免疫群は非免疫群に比し、高値を示したが、Th2 サイトカイン（IL-4）は全く認めなかった。肉芽腫炎症周囲には新生血管を伴うが、TDM による血管新生を検索した。TDM は血管新生因子（IL-8 や血管内皮増殖因子）を誘導し、その結果、肉芽腫炎症周囲血管新生を誘導することが判明した。さらに、血管新生因子に対する抗体は血管新生や肉芽腫炎症を抑制した。また、家兎 TDM 肉芽腫は類上皮細胞や多核巨細胞を多数含み、ヒトにおける結核病変に類似していた。TDM が免疫担当細胞（胸腺や脾）にアポトシスを誘導した。なお、SL は肉芽腫や血管新生をほとんど誘導せず、TDM に比し、炎症惹起性は軽度であった。

D. 考察

結核菌由来 TDM は非特異的炎症応答、加えて、特異性および記憶を特徴とする Th1 細胞性免疫応答も惹起すること、さらに、T 細胞依存性抗原であることが判明した。すなわち、結核性肉芽腫炎症は異物性および過敏性機序の関与した混合性病変である。TDM は、肉芽腫炎症に加えて、血管新生やアポトシスも誘導し、結核菌—宿主関係における多機能分子である。TDM が抗結核免疫の効果機能分子である Th1 関連サイトカ

イン：IL-12 や IFN-g を誘導したことは、TDM は防御抗原であり、従って、ワクチンなど免疫介入療法の有望な候補になる可能性を示している。

E. 結論

抗酸菌細胞壁由来糖脂質：TDM は強力な Th1 細胞性免疫惹起物質であり、Th1 細胞性免疫は抗結核免疫に中枢的役割を演じていることから、TDM は宿主における抗結核防御抗原と考えられる。従って、本研究の成果は難治性抗酸菌感染症に対する免疫介入療法（ワクチンを含む）の開発に有望な基盤を提供している。

F. 研究発表

1. 論文発表

Naka, T., N. Fujiwara, E. Yabuuchi, M. Doe, K. Kobayashi, K. Kato, and I. Yano. 2000. A novel sphingolipid containing galacturonic acid and 2-hydroxy fatty acid in cellular lipids of *Sphingomonas yanoikuyae*. *J. Bacteriol.* 182: 2660-2663.

Hamasaki, N., K. Isowa, K. Kamada, Y. Terano, T. Matsumoto, T. Arakawa, K. Kobayashi, and I. Yano. 2000. In vivo administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits. *Infect. Immun.* 68: 3704-3709.

Saita, N., N. Fujiwara, I. Yano, K. Soejima, and K. Kobayashi. 2000. Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats. *Infect. Immun.* 68:

5991-5997.

Lu, J., T. Kasama, K. Kobayashi, Y. Yoda, F. Shiozawa, M. Hanyuda, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 2000. Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* 164: 5922-5927.

Yamagami, H., T. Matsumoto, N. Fujiwara, T. Arakawa, K. Kaneda, I. Yano, and K. Kobayashi. 2001. Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body- and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infect. Immun.* 69: 810-815.

2. 学会発表

原田登之、樋口一恵、小林和夫、関谷幸江、森下加奈. 2000. 結核菌死菌のマウスに対する免疫効果. *結核*, 75: 306, 2000. 第75回日本結核病学会総会(大阪、4月).

中 崇、藤原永年、小林和夫、藪内英子、加藤敬香、矢野郁也. 2000. *Sphingomonas yanoikuyae* から分離された新規スフィンゴ糖脂質. *日本細菌学会雑誌*, 55: 342, 2000. 第73回日本細菌学会総会(札幌、5月).

小林和夫、有田 斉. 2000. 炎症疾患と肉芽腫(ワークショップ). *炎症*, 20: 400, 2000. 第21回日本炎症学会総会(東京、7月).

藤原永年、山上博一、濱崎尚子、斎田典夫、矢野郁也、小林和夫. 2000. 抗酸菌性肉芽腫炎症の分子制御機構. *炎症疾患と肉芽腫(ワークショップ)*. *炎症*, 20: 401, 2000.

第21回日本炎症学会総会(東京、7月).

山上博一、藤原永年、矢野郁也、小林和夫. 2000. 結核菌由来 cord factor/trehalose 6,6'-dimycolate による肉芽腫炎症と分子機構. *炎症*, 20: 494, 2000. 第21回日本炎症学会総会(東京、7月).

木村博昭、虎谷 聡、松岡正典、小林和夫、福富康夫. 2000. マクロファージにおける抗らい菌活性発現に関わる分子の解析. *日本免疫学会・学術集会記録*, 30: 288, 2000. 第30回日本免疫学会総会・学術総会(仙台、11月).

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告

免疫環境是正法の開発

分担研究者 牧野 正彦 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 部長

研究要旨

ハンセン病は、抗酸菌であるらい菌の感染によって発症する慢性炎症性疾患である。ハンセン病の発症には、らい菌抗原に対して特異的免疫応答能の低下が密接に関与し、抗ハンセン病免疫療法の開発には抗らい菌細胞性免疫反応を賦活することが極めて重要である。しかし、生体内で最も有能な抗原提示細胞である樹状細胞(DC)とらい菌の相互作用については充分解明されていない。そこで、正常健常者末梢単球より分化誘導したDCのらい菌に対する感受性を検索し、さらに抗原提示能に及ぼす影響を検索した。DCはin vitroでらい菌に対し感受性を示し、感染DC細胞内にPGL-1抗原が検出された。同時に、DC表面にPGL-1抗原および患者プール血清に反応する抗原が検出された。そこで、らい菌感染DCの抗原提示能を検索したところ、対象として用いた*M. bovis* BCGおよび*M. avium*が、それぞれMOI 0.2および5.0で強いCD4およびCD8陽性T細胞の増殖応答をDCの活性化因子非存在下で誘導したのに対し、*M. leprae*はMOI 80で初めて有意のT細胞増殖をもたらした。感染DCにより刺激されたT細胞が産生するIFN- γ を測定したが、増殖応答と同様に対象群で強く、らい菌ではMOI 320を用いた場合に明らかな産生を認めた。感染DC表面の抗原提示に関与する抗原を検索したところ、らい菌感染DCでは菌数に比例してCD40、CD86、MHC抗原の発現が増強し、MOI 320でCD83抗原が陽性となった。そこで、らい菌感染DCをCD40 mAb、LPS、IL-12、IFN- γ などを単独で用いDCの活性化を試みた。CD40 mAbで処理したDCはCD83抗原の発現を増強したが、T細胞を刺激する能力は増強されなかった。従って、らい菌は生体内で最も有能なDCに対し感受性を示したが、他の抗酸菌(*M. bovis* BCGおよび*M. avium*)と異なり、自己のT細胞を容易には抗原特異的に刺激し得なかった。さらに、CD40リガンドなどのDC活性化因子にも抵抗性を示した。

A. 研究目的

らい菌は、抗原提示細胞の一種であるマクロファージに親和性を示し細胞内寄生感染を果たす。らい菌感染マクロファージは容易には活性化されず、自己のT細胞を活発に活性化することもない。その結果、らい菌は生体内でいわゆる免疫学的不応答性を獲得し、重篤かつ広範な病変を誘導する。そのため、細胞内寄生感染を果たしたらい菌を細胞性免疫反応を誘導することで体外へ排除することが、新たな治療法として重要となる。しかし、これまでらい菌と生体内で最も有能な抗原提示細胞である樹状細胞(Dendritic cell, DC)とのかかわり合い

については充分解明されていない。そこで、抗らい菌免疫応答の誘導を目的としてらい菌のDCに対する感受性を検索し、さらにDCの抗原提示能に及ぼす影響を検索した。

B. 研究方法

細胞および抗酸菌 正常健常者より、十分なインフォームドコンセントを行った後、末梢血リンパ球(PBMC)の供与を受けた。プラスチック附着性単球は、PBMCを60分間培養した後非附着性細胞を除去して得た。DCの分化誘導には、recombinant (r)GM-CSF 50 ng/ml と rIL-4 10 ng/ml を用いた。マ

クロファージは、プラスチック附着性単球を20% FCS非存在下で培養して得た。

細胞表面抗原の解析 DCの細胞表面抗原の解析は、市販の抗体(CD1a, CD54, CD86, CD83, HLA-ABC, HLA-DR)を用いFACScaliburにて行った。

抗酸菌および抗酸菌感染 らい菌はヌードマウスを用い増殖させたThai 53株を用いた。対照として *M. bovis* BCG および *M. avium* を用いた。らい菌のDCへの感染は、抗 PGL-1 モノクローナル抗体(DZ2C11, ハンセン病研究センター皆川文重博士より供与)を用い、細胞内抗原染色を施した後FACScaliburにて検索した。らい菌由来の抗原の細胞表面への発現は、抗 PGL-1 抗体およびハンセン病患者血清(皆川博士より分与)を用い検索した。

樹状細胞の抗原提示能の検索 非感染および抗酸菌感染 DCの抗原提示能は、自己のCD4 および CD8 T細胞の増殖応答能にて検索した。CD4 陽性および CD8 陽性 T細胞の精製は、ダイナビーズ結合抗体を用いて negative selection で行った。

倫理面への配慮 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充分に説明し理解(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

らい菌のDCへの感染は、らい菌特異的抗原である PGL-1 抗原を指標として細胞内抗原染色を行った。in vitro で加えたらい菌の量依存性に PGL-1 抗原の量が増大し、その程度はマクロファージとほぼ同程度であり、らい菌は in vitro で容易にDCに感染した。らい菌は、マクロファージ内では菌体のプロセッシングを妨げるため、らい菌由来抗原はマクロファージ細胞表面には発現されない。これに対して、DC内においてはらい菌はプロセッシングを受け DC 表面に PGL-1 抗原を発現した。さらに、らい

菌感染 DC 表面にはハンセン病患者プール血清と反応する抗原が検出された。ついで、抗原提示に関わる分子のらい菌感染 DC への発現を検索すると MHC class I, class II および CD40 抗原陽性であり、らい菌の量依存性に CD86 抗原の発現が増強した。しかし、DCの活性化マーカーである CD83 は陰性で超大量のらい菌(MOI 320)を感染させて初めて陽性となった。そこで、*M. bovis* BCG および *M. avium* を対象としてらい菌感染 DCの抗原提示能を自己(同一人)のCD4 陽性および CD8 陽性 T細胞を responder として検索したところ、対象抗酸菌を感染させた DC は、DCの活性化因子非存在下において *M. bovis* BCG (MOI 0.6~2.5) および *M. avium* (MOI 0.3~1.3) で非常に強い T細胞の増殖応答を誘導したが、らい菌感染 DCの抗原提示能は弱く、MOI 80~320 において T細胞の弱い増殖応答を誘導した。さらに、感染 DC によって刺激された CD4 陽性および CD8 陽性 T細胞が産生する IFN- γ を測定したが、対象抗酸菌を感染させた DC は強い IFN- γ 産生を誘導するのに対し、らい菌感染 DC では MOI 320 において有意の IFN- γ 産生をもたらした。しかし、その産生能は対照抗酸菌に比し明らかに低下していた。これらの結果は、らい菌感染 DC は BCG 株あるいは *M. avium* とは異なり菌の感染だけでは T細胞を十分に刺激し得るまでには活性化されていない可能性を考えさせる。この点を明らかにするためらい菌感染 DC を種々の因子を用い活性化を試みた。DC 上に発現する CD40 抗原を通じてシグナルを施すと DC は有意に活性化することが知られる。そこで、CD40 mAb を用いらい菌感染 DC にシグナルを与えたところ、CD86 抗原の発現が増強し CD83 抗原が陽性(MOI 80)となり、DCの成熟化および活性化が進行した。しかし、らい菌感染 DC の自己 T細胞刺激能は有意には増強されなかった。CD40 抗原を介したシグナルの他に、LPS, IFN- γ , IL12 の DC 活性化因子としての作用を同様に検索したが、らい菌感染 DC の抗原提示能は増強されなかった。一方、PGL-1 抗原は免疫抑制性に働く可能性が示唆されている。かつ、らい菌感染 DC 表面には PGL-1 抗原が発現しているため、DC 表面の PGL-1 抗原をモノクロー

一ナル抗体を用いマスクした後、感染 DC の抗原提示能を検索した。その結果、感染 DC の CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞刺激能は有意に増強した。

D. 考察

慢性感染症とりわけ細胞内持続感染症に対し有効な免疫療法を施すには、抗原提示細胞を用いた抗原特異的細胞性免疫応答を誘導することが不可欠である。抗原提示細胞として種々の細胞が知られているが、この中で非感作 T 細胞および感作 T 細胞の両者を強く活性化し得る細胞は樹状細胞 (DC) のみである。マクロファージは非感作リンパ球を刺激することはできなく、さらにらい菌感染マクロファージは、非感染マクロファージと比較すると細胞表面上の MHC class I および class II 抗原の発現は低下し、IFN- γ 等の MHC 抗原増強剤を用いても自己の T 細胞を活性化・増殖させることはできない。従って、抗らい菌特異的 T 細胞増殖応答を誘導するには DC を用いることが最も有効と想定された。しかし、これまでらい菌と DC の相互作用については十分に検討されていないため、本年度はらい菌感染 DC の抗原提示能について検索した。その結果、同じ抗酸菌である *Mycobacterium bovis* BCG および非定型抗酸菌である *M. avium* と異なり、らい菌は DC に感染しても自己の T 細胞を十分に活性化することはできなかった。その原因として、①らい菌は抗原性の極めて弱い菌であること、②PGL-1 抗原および患者血清と反応する抗原が細胞表面に発現しているにも関わらず、T 細胞を刺激するためにエッセンシャルなエピトープが発現していない、③らい菌が樹状細胞内でプロセッシングされるためには長時間を要し、通常の *in vitro* のアッセイシステムでは DC の抗原提示能が正確に評価されていない、④今回は T 細胞と DC の相互作用に重要な CD40 を介したシグナル、LPS, IL-12, IFN- γ などを用い DC の活性化を試みたが十分な結果は得られず、今回未検索の因子あるいは未知の因子がらい菌感染 DC の抗原提示に重要な役割を果たしている、⑤らい菌菌体中に免疫抑制性に働く成分が存在し DC の機能

を抑制している、などの可能性が考えられる。この中で、今回検索した中では⑤の可能性が強く考えられた。すなわち、DC 表面上に発現する PGL-1 抗原を抑制したところ DC による CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞の増殖応答が有意に増強した。PGL-1 抗原はらい菌特異的であり、BCG 株にも *M. avium* にも発現していない。従って、PGL-1 抗原が DC の抗原提示能を抑制している可能性は強い。抗らい菌免疫療法は極めて重要であるが、DC を用いた免疫療法の開発に今回の結果は有用な情報を提供していると考えられる。

E. 結論

らい菌は生体内で最も有能な DC に対し感受性を示したが、他の抗酸菌 (*M. bovis* BCG および *M. avium*) と異なり、自己の T 細胞を容易には抗原特異的に刺激し得なかった。さらに、CD40 リガンドなどの DC 活性化因子にも抵抗性を示した。しかし、感染 DC 表面の PGL-1 抗原の発現を抑制すると DC の抗原提示能は増強した。このことは、抗らい菌免疫療法の開発に有用な情報と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 牧野正彦. HTLV-I 感染症 (ATL/HAM). 茂田士郎, 満屋裕明編, ウイルス感染症との戦い, 285-295, 2000.
- 2) 牧野正彦. HTLV-I 関連脊髄症 (HTLV-I-associated myelopathy; HAM) 熱帯性痙性脊髄対麻痺 (tropical spastic paraparesis; TSP). 免疫症候群. 矢田純一編, 日本臨床, 9-12, 2000.
- 3) Makino, M., S. Wakamatsu, S. Shimokubo, N. Arima, and M. Baba. Production of Functionally Deficient Dendritic Cells from HTLV-I-Infected Monocytes: Implication for the Dendritic Cell Defect in Adult T Cell Leukemia., *Virology*, 274:140-148, 2000.

2. 学会発表

- 1) 牧野正彦, 宇都宮 與, 下窪 敏, 出雲周二, 馬場昌範. 成人 T 細胞白血病における免疫不全症発症に及ぼす HTLV-I 感染 CD4 陽性 T 細胞上の CD40 リガンドの発現異常の影響. 第 48 回日本ウイルス学会学術集会総会 2000 年 10 月 津
- 2) Maeda Y., B. V. Hoang, S. Shrisunggam, S. Maeda, P. J. Brennan, Y. Kashiwabara, and M. Makino. Molecular and

immunological analysis of a protein against leprosy. International Symposium on Mycobacterial Diseases: Pathogenesis, Protection and Control, Jan., 2001, Bose Institute, Calcutta, India.

G. 知的所有権の取得状況
なし

ハンセン病による末梢神経炎発症および制御機構の解析

遠藤 真澄 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
主任研究官

ハンセン病性末梢神経炎発症機構を解明する上で、らい菌とシュワン細胞の相互作用を解析することは極めて重要である。我々はシュワン細胞株を樹立し、シュワン細胞株由来生理活性物質遺伝子発現の解析を行ってきた。今回、各種抗酸菌感染に伴うシュワン細胞由来神経栄養因子、炎症惹起性サイトカイン等生理活性物質の動向を追跡した。本研究で神経再生・修復に重要な役割を果たしている生理活性物質の発現調節機構を解明することにより、それらの物質による後遺症を含めたハンセン病性末梢神経炎の新しい治療や予防戦略を構築することが期待できる。

A. 研究目的

ハンセン病による末梢神経炎発症機構は、現在でもほとんど不明であり、適切な治療方法や予防方法も確立されていない。臨床的には、化学療法によりハンセン病の原因菌であるらい菌を完全に排除してもなお末梢神経炎は完治せず、後遺症として残存する。末梢神経炎の発症は、神経組織構成細胞であるシュワン細胞にらい菌が特異的に感染し、局所的な炎症性細胞浸潤を惹起することに起因していると考えられる。シュワン細胞は神経栄養因子やサイトカインなどの生理活性物質を産生し、末梢神経や組織の恒常性維持に関与している。そして末梢神経炎の際、これらの生理活性物質の発現レベルが変動することから、末梢神経炎あるいは炎症後の神経組織の再生・修復にシュワン細胞は重要な役割を果たしている。しかしながら、ハンセン病性末梢

神経炎におけるシュワン細胞やシュワン細胞由来生理活性物質の役割はほとんど不明である。したがって、ハンセン病性末梢神経炎発症機構を解明する上で、らい菌感染シュワン細胞と末梢神経との相互作用を解析することは極めて重要である。本研究は、株化した培養シュワン細胞にらい菌を感染させ、シュワン細胞由来生理活性物質の発現調節機構の動態を解析し、後遺症を含めたハンセン病性末梢神経炎の新しい治療や予防戦略を構築することを目的とする。これまでに我々は、ラット坐骨神経由来シュワン細胞の株化・クローニングを行い、それらが産生する神経栄養因子、サイトカイン等、生理活性物質遺伝子発現の解析を行ってきた。そこで今年度は、各種抗酸菌のシュワン細胞への侵入を確認する共に、各種抗酸菌の感染に伴う生理活性物質遺伝子発現の変動を解析した。

B. 研究方法

シュワン細胞株にらい菌(Thai53), BCG, *M.smegmatis*, *M.avium* を感染させた後、経時的に定法に従い細胞より全 RNA を分離し、RT-PCR 法にて神経栄養因子、それらのレセプター、サイトカイン、ケモカイン mRNA 発現を解析した。抗酸菌の感染は、カバースリップ上で培養した感染シュワン細胞株を、チール・ネールセン法による抗酸菌染色を施すことにより確認した。

C. 研究結果

らい菌は感染 24 時間後にはすでにシュワン細胞中に存在が認められ、72 時間後には殆ど全ての細胞中に多数のらい菌の存在が確認された。BCG も、らい菌と同程度の頻度で株化シュワン細胞内への侵入が確認された。*M.avium* も僅かながらシュワン細胞内への侵入が見られた。*M.smegmatis* も、更に低い頻度ながらシュワン細胞への付着。侵入が見られた。らい菌感染に伴いシュワン細胞由来 glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), neurotrophin 3 (NT-3), regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES) mRNA 発現の upregulate が観られる一方で、BCG 感染においてはこれらの因子の発現変動は認められなかった。シュワン細胞は、C-C ケモカインレセプター CCR1, CCR5 を発現しており、らい菌感染によりこれらの発現も upregulate されることが認められた。ケモカイン類のうち唯一の膜結合型タンパクである fractalkine がシュワン細胞株において構成的に発現していることが明らかとなった。

D. 考察

シュワン細胞へのらい菌の感染に伴い、特定のシュワン細胞由来神経栄養因子発現の upregulate が認められた。これは *M.leprae* 感染に伴う神経炎の組織再生・修復にシュワン細胞由来因子が機能している可能性を示唆する。一方、ケモカインは特定の白血球の組織への浸潤を誘導することにより、感染症の病態に深く関与していると考えられており、特に HIV, *H. pylori*, マラリア感染におけるケモカインの関与は詳細な検討が成されている。また種々の神経変性疾患の病態形成においてもケモカイン類が重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。一方近年、fractalkine が中枢神経系において神経保護作用を持つことが報告されている。今回の結果より fractalkine がシュワン細胞に構成的に発現していることより、末梢神経系では神経修復に関与している可能性も考えられる。そこで今後は、らい菌感染時におけるケモカイン類発現の神経系に係わる意義を、*M. avium*, *M. smegmatis* 等他の抗酸菌感染に伴う結果と対比させながらの検討等が必要である。そして最終的には、らい菌感染シュワン細胞が産生する因子の発現制御による、ハンセン病性末梢神経炎の新しい治療や予防戦略の構築を試みる。

E. 結論

- 1、ラット坐骨神経由来シュワン細胞株に、らい菌(Thai53), BCG, *M.smegmatis*, *M.avium* の侵入を認めた。
- 2、シュワン細胞が発現する GDNF, NT-3, RANTES は、らい菌感染により特異的に upregulate されることが明らかとなった。
- 3、ケモカイン類のうち唯一の膜結合型タンパクである fractalkine のシュワン細胞における構成的発現が明らかとなった。

F、研究発表

1、論文発表

Shi L, Yajima M, Kawatsu K, Matsuoka M, Kashiwabara Y, Endoh M: Comparison of polymerase chain reaction, immunohistochemistry and conventional histopathology in the diagnosis of early leprosy in Sichuan Province of China. Jap. J. Lepr. 69 : 147-156, 2000.

2、学会発表

Shi L, Yajima M, Kawatsu K, Matsuoka M, Kashiwabara Y, Endoh M ; Investigation of Polymerase Chain Reaction and Immunohistochemical Staining with Histopathology in the Diagnosis of Early Leprosy in Sichuan Province of China. 第73回日本ハンセン病学会総会、鹿児島、2000.

遠藤真澄： *Mycobacterium leprae* 感染ヒト神経細胞におけるアルツハイマー病関連遺伝子の発現
第43回日本神経化学会、金沢、2000.

Endoh M: Alzheimer's disease-related gene expression in human neural cell following infection with *Mycobacterium leprae*. Joint meeting of the Australian Neuroscience Society and Asian Pacific Society of Neurochemistry. Brisbane, Australia, 29 January, 2001.

末梢神経機能障害の解明・予防・治療に関する研究 ． PGP9.5 陽性皮内神経の定量的解析

分担研究者 後藤 正道 鹿児島大学医学部第二病理助教授

研究要旨

化学療法によってハンセン病の皮膚症状が治癒した後も末梢神経障害が徐々に進行する症例が少なからずあるが(Silent Neuropathy)、その病態はまだ未解明である。今回は、剖検例を用いてその基礎的な研究を行った。対照9例、治癒状態のハンセン病T型8例とL型12例の下腹正中部の皮膚切片に、神経 marker である抗 Protein Gene Product 9.5 (PGP9.5)抗体による免疫組織化学染色と、NIH image を用いたその陽性面積の計測をおこなった。真皮上層における PGP9.5 陽性面積(%)は、対照： 0.20 ± 0.05 、T型： 0.15 ± 0.09 、L型： 0.10 ± 0.08 であった。年齢と PGP9.5 陽性面積(log 変換)の相関を見ると、L型の5/12例では、PGP9.5 陽性面積が60歳頃を出発点に直線的に減少する結果が得られた。これまで、ハンセン病の麻痺は手袋・靴下状かつ低温皮膚優位に起こり、高温部である下腹部の知覚は末期まで保たれるとみなされていた。しかし、実際にはL型治癒例の約半数において下腹部皮膚の神経線維が加齢に伴って脱落することが明らかになった。

【研究協力者】

野元 三治¹・北島 信一¹・米澤 傑²

¹国立療養所星塚敬愛園研究検査科

²鹿児島大学医学部第二病理

A. 研究目的

ハンセン病は皮膚と末梢神経をおかす慢性感染症であり、化学療法によって皮膚症状が治癒すると末梢神経障害の進行も停止することが多い。しかしながら、治癒後も末梢神経障害が徐々に進行する症例が少なからずあり、Silent Neuropathy あるいは Quiet Nerve Paralysis (QNP)と称されている。

わが国においても、新規患者あるいは療養所で生活中の入園者のうち、かなりの症例において神経障害の進行・日常生活能力(ADL)の低下が続いている。そこで、らい性神経炎および続発する神経麻痺の発症機序を解明し、それらの予防策を明らかにすることは重要な課題である。

一方、ハンセン病の皮膚における微細な神経線維を染色する方法として、神経特異的なマーカーの Protein Gene Product 9.5 (PGP9.5)免疫組織化学の有用性が報告されている。そこで、剖検例の腹部皮膚を用いて PGP9.5 の組織定量的研究を行ったところ、これまでに報告されていない興味深い結果が得られた。

B. 方法

対照の剖検9例(鹿児島大学医学部、51-82歳)、治癒状態のハンセン病T型8例(星塚敬愛園、66-95歳)、治癒状態のハンセン病L型12例(星塚敬愛園、64-90歳)の下腹正中部皮膚のホルマリン固定・パラフィン切片に、Fite 染色、抗酸菌マーカーの抗 BCG 抗体(DAKO)と、神経マーカーの抗 PGP9.5

抗体(Ultraclone, rabbit poly-clonal)による免疫組織化学染色(ABC法)を行なった。また、知覚神経のマーカーである Substance P (Chemicon, rabbit polyclonal)ならびに自律神経のマーカーである Vasoactive Intestinal Peptide (VIP, Chemicon, rabbit polyclonal)の免疫染色も試みた。これらの免疫染色は ABC 法(Amersham 社)で行い、DAB 発色後にヘマトキシリンで核染色をおこなった。

さらに、PGP9.5 免疫染色標本の真皮上層 0.6x0.9mm の範囲を顕微鏡からデジタルカメラ Fuji Finepix S1 Pro に取り込み、マッキントッシュコンピュータの Photoshop(Adobe 社)で青画像を抽出後に、画像処理プログラム NIH image を用いて、PGP9.5 陽性部位の面積の計測を行うことで、皮内神経の分布密度を求めた。これらの解析結果と年齢・病型などとの関連について解析を行った。

C. 結果

(1) L型1例の神経周囲にらい性神経炎を示すリンパ球の浸潤が見られた(Fig. 1a)。他のハンセン病19例に神経炎は見られず、Fite 染色と抗 BCG 免疫染色は全例において陰性であった。

(2) 多くの症例では皮内神経は良く保たれていたが(Fig. 1b)、リンパ球浸潤を示す1例を含むL型の5例では、皮内神経はかなり脱落していた(Fig. 1c)。

(3) 免疫染色の画像解析の結果、真皮上層における PGP9.5 陽性面積すなわち皮内神経の単位面積当りの分布密度は、対照： $0.20 \pm 0.05\%$ 、T型： $0.15 \pm 0.09\%$ 、L型： $0.10 \pm 0.08\%$ であり、L型になるほど減少する傾向が得られた。

(4) PGP9.5 陽性面積(log 変換)と年齢の相関を見ると(Fig. 2)、対照では加齢によってわずかに

減少し、T型の全例とL型の7/12例は加齢による減少の範囲であった。しかしL型の5/12例では、PGP9.5陽性面積が60歳頃を出発点に急激に直線的に減少する結果が得られた。

(5) PGP9.5陽性の神経線維の一本当たりの平均面積(太さ)と年齢との相関を見ると(Fig. 3)、Fig. 2で減少が見られた5例はやや細い傾向があるものの、それほど明確ではないことから、皮内神経の分布密度の低下は主として神経線維の数の減少によるものと推測された。

(6) Substance PとVIPの免疫染色は、現在のところ陽性像が得られていない。

D. 考察

ハンセン病の麻痺は手袋・靴下状かつ低温皮膚優位に起こり、高温部である下腹部の知覚は末期まで保たれるとみなされていた。しかし、実際にはL型の治癒例の約半数において下腹部皮膚の神経線維が加齢に伴って著明に脱落することが明らかになった。

これらのL型症例の神経脱落の原因については、長期間服用していたスルホン剤であるDDS(Dapsone)による末梢神経障害の可能性も含め、その要因について検索中であるが、まだ明確な結果は得られておらず、引き続き症例を増やして解析が必要である。

E. 結論

本研究は、Silent Neuropathyの発症機序の解明に新しい視点を加えるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

後藤正道、石田 裕、儀同政一、長尾榮治、並里まさ子、石井則久、尾崎元昭：ハンセン病治療指針、日本ハンセン病学会雑誌 69: 157-177 (2000)

2. 学会発表

14th International Congress of Neuropathology, Birmingham, U.K. (2000年9月)

第90回日本病理学会総会(平成13年4月 東京)

第42回日本神経病理学会総会(平成13年5月 東京)

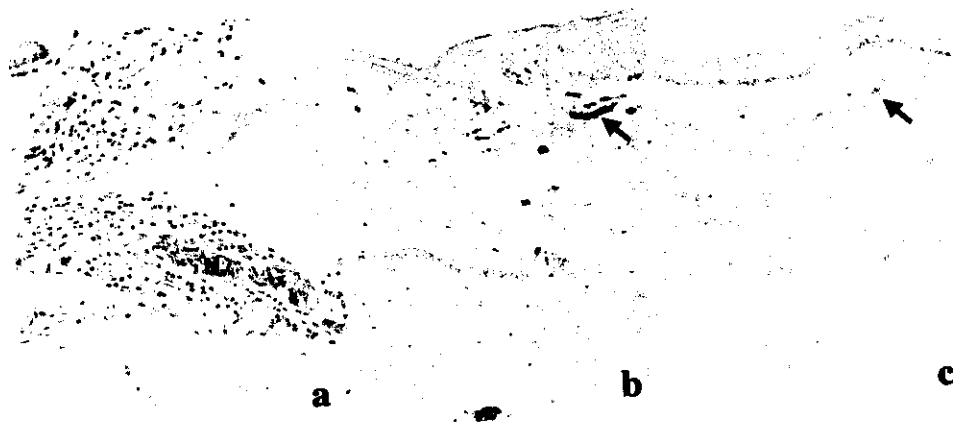


Fig. 1 (a) Perineural lymphocytic cuffing indicating leprous neuritis. N: nerve fiber. (HA9701, PGP9.5 immunostaining). (b) Well preserved nerve fibers in a LL case (HA9801, 79yrs, PGP9.5). (c) Marked loss of nerve fibers in a LL case (HA9704, 77yrs, PGP9.5)

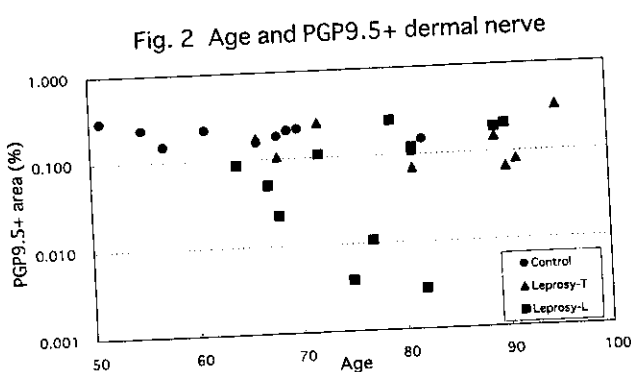


Fig. 2 Age and PGP9.5+ dermal nerve

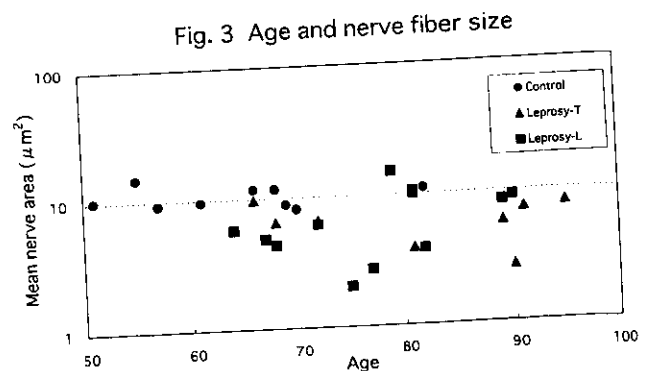


Fig. 3 Age and nerve fiber size

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

流行国における神経炎の実態調査

分担研究者 畑野研太郎 国立療養所邑久光明園 副園長

研究要旨 ミャンマー国ミンゲン地方における 1958 年以後のハンセン病患者の初診時障害率についてカルテ調査を行い、コントロールの進行に伴い平均初診時障害率の減少が、明らかに見られることを確認した。

A. 研究目的

ハンセン病は、早期診断早期適正治療により、障害を残すことなく治癒しうる疾病である。しかし、一般にコントロールワークが積極的に、かつ適正に行われている場合においても、約 10% の障害者が発生することは避けられないと考えられている。

本研究は、流行国におけるハンセン病患者の実態を調査し、初回診断時、治療中、および治療終了後における神経炎の発生状況を明確にすることを通じて、それぞれの時期における神経炎発症の既序を解明し、その対策を検討することをつうじて、ハンセン病による障害者発生を減少させることを目的としている。

B. 研究方法

本年は、ミャンマー国サガイン管区ミンゲン地方(日本でいう郡程度の行政単位)の、過去 58 年の最初のケースより 98 年におけるハンセン病治療回復者のカルテ調査を施行した。これらのカルテ調査によって、初診診断時の末梢神経障害の状況、末梢神経肥大状況およびハンセン病の一般情報を収集した。

症例は、154 症例中カルテが比較的無

事に残存しており、記載も判読可能な 128 症例に関しておこなった。内訳は、男性：69 例、女性：59 例であった。病型は MB: 58 例、PB: 70 例であった。年齢分布は、4 歳より 73 歳（平均 29.4 歳）であった。

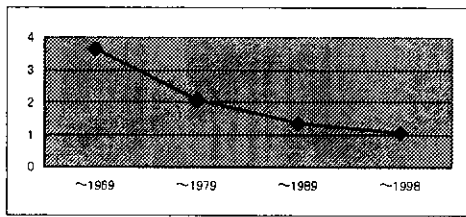
(倫理面への配慮)

基本的には、倫理面上の問題は存在しないと考えられる。カルテ調査は、カルテ番号に基づいて、記録されており患者名の記載は行われていない。また、たまたま患者の診察を行う場合にも、現地医師の通常の診察に同行するかたちで施行した。

C. 研究結果

初診時における障害度を WHO 障害度指数の合計点数で計算した。ただし、WHO の障害指数は、フィールドに適応しやすくするため途中で簡略化されたので、現在使用されている指数に変換して計算した。

これらの計算結果は添付資料として提出する。しかし、この結果から得られた数値は、単年当たりの患者数にばらつきが大きく、個々の患者の状態に大きく左右されるために、十年ごとを単位として計測してみると、以下のようなになった。



D. 考察

今回、10年ごとの単位でハンセン病コントロールを検討すると、明らかに初診時障害率の低下が認められることが判明した。これは予想された結果ではあったが、当地におけるハンセン病コントロールが、治療薬の普及とあいまって効果をあげている結果である。

しかし、個々の初診時障害の程度は軽減しているものの、ミンゲン地方においては障害を持つ者の率自体はまだまだ高水準である。単なるWHO障害度指数のみでは、これからの障害度の軽度化を適切に表しえないことも判明した。

今回は、初診時障害のレトロスペクティブな調査であり、治療中・治療後の障害の進行と神経炎に関しては、今後の課題として残されている。

E. 結論

ハンセン病コントロールの世界的な進行により、新患中の障害者率は減少し障害度も軽度化している。しかし、回復者の中には障害を持つ者が多く、かつ障害進行防止の手当てもなく事実上放置されているのが現状である。後遺症による障害の進行を防ぐための方策を早急に確立する必要がある。

ミャンマー国における障害度年次推移

年	ケース	障害度合計	障害度平均
58	1	10	10
61	5	30	6
62	10	39	3.9
63	6	12	2
64	12	42	3.5
65	4	17	4.25
66	2	6	3
67	5	30	6
68	6	8	1.33
69	3	3	1
70	6	16	2.66
71	3	0	0
72	1	0	0
73	0	0	0
74	0	0	0
75	0	0	0
76	1	3	3
77	2	0	0
78	5	9	1.8
79	4	17	4.25
80	1	0	0
81	7	10	1.43
82	4	2	0.5
83	1	0	0
84	0	0	0
85	1	6	6
86	4	12	3
87	3	2	0.67
88	1	0	0
89	4	3	0.75
90	0	0	0
91	0	0	0
92	2	0	0
93	6	5	0.83
94	2	11	5.5
95	0	0	0
96	2	2	1
97	2	3	1.5
98	12	7	0.58

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

末梢神経機能障害の解明・予防・治療に関する研究

分担研究者 岩田 誠 東京女子医科大学脳神経センター
センター長

研究要旨

ハンセン病における末梢神経障害の臨床像の 15～20 年にわたる変化を、特に感覚障害の範囲の面において解析した。少数例の治癒とされた症例における予備的な調査においては、感覚障害の範囲は縮小傾向にあり、神経症状の悪化は見られていない。今後症例数を増やして検討していく予定である。

A. 研究目的

ハンセン病の末梢神経障害は病型によって様々であるが、皮膚感覚障害、特に痛覚脱失の空間的分布は疾患特異的な様相を示す。われわれは過去 20 年以上にわたり痛覚脱失域の経過を追跡し得た患者においてその変化の有無を調査し、ハンセン病の末梢神経障害がどのような経過をとるものであるかにつき、特にハンセン病治癒症例と難治性ハンセン病症例とに注目して検討した。

B. 研究方法

1978 年から 1985 年にかけて第 1 回目の神経内科的診察を受け、詳細な感覚障害の調査がなされた多磨全生園に入園中のハンセン病患者 58 例につき、追跡調査を行った。第 2 回目の感覚障害の調査は、第 1 回目と同じ医師（本分担研究者）が行い、感覚脱失、特に痛覚脱失の範囲につき、第 1 回調査の結果と比較した。また、筋力低下、深部感覚障害についても、詳細な比較検討を行った。

（倫理面への配慮）

本調査は日常的な診療の範囲で行われたものであり、患者には調査の目的を説明し承諾を得ているので倫理的な問題はないと判断される。

C. 研究結果

第 1 回調査の対象となった患者は 58 例であり、病型の内訳は、LL24 例、BL18 例、BB4 例、BT12 例であった。これら 58 例のうち、現在追跡調査の可能な者は約 10 例ほどである。今年度はこのうちの 6 例につき第 2 回調査を行った。これら 6 例は、LL4 例と BL2 例であり、LL の 2 例を除いた残り 4 例においては、現在は無治療であるが、LL の 1 例は難治性ハンセン病であり、現在もなお多剤併用を行っている。残りの 1 例も DDS のみを継続しているが、ハンセン病は非活動性であると思われる。第 1 回調査と第 2 回調査の間隔は、15～22 年である。これら 6 例中 5 例では、2 回の調査におい

て、皮膚の痛覚脱失または全感覚脱失域の拡がりに、大きな差はなかった。このうち1例では感覚障害域の部分的縮小が認められ、1例では新しい軽度の感覚障害域が認められるようになっていた。残りの3例では、一部の感覚障害域には縮小が、他の部分には拡大が認められていた。これら5例の全例において、運動麻痺の範囲の拡大は全く見られなかった。難治性ハンセン病の1例では、感覚障害域の著明な拡大を認め、また顔面筋、両手の手内筋に運動麻痺の出現を認めた。

D. 考察

今回の調査では未だ追跡し得た症例数も少なく、結論的なことは言えないが、少なくともハンセン病の治癒患者においては、15～22年を経てもそれほど著明な神経症状の変化は見られず、部分的には感覚障害域の縮小が認められることさえあるということがわかった。これに対し、らい菌の消失が得られない難治性ハンセン病においては、神経症状の悪化が、感覚障害においても運動麻痺においても認められる。

今回の調査は、15～22年という長期間にわたる神経症状の経過を、同一の神経内科の専門医が詳細に観察したデータは、わが国ではこれまでほとんど知られていない。特に、感覚障害の分布域や、運動麻痺に陥った筋肉の分布域に関しては、神経内科の専門家による所見が極めて重要である。そのような点で、本追跡調査は大きな意義を有するものである。今後可能な限り同様の追跡調査を行い、ハンセン病における神経障害の長期予後につき見当する予定である。

E. 結論

ハンセン病の治癒患者では、15～22年にわたる長期にわたっても神経症状の変化はそれほど大きなものではない。これに対し、難治性ハンセン病患者においては、感覚障害、運動麻痺の両者において、明らかな進行が認められる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 岩田 誠. 辺縁系の症候学. 板倉 徹、前田敏博・編, 大脳辺縁系. 神経科学の基礎と臨床 VIII, プレーン出版, 東京, 2000, pp63-70.
- 2) 植田美加ほか. 慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーに対するインターフェロン- α 2a 治療. 臨床神経, 40: 155-159, 2000.
- 3) 清水優子ほか. 高活性抗レトロウイルス療法が有効であった後天性免疫不全症候群にともなう進行性多巣性白質脳症の1例. 臨床神経, 40: 821-826, 2000.
- 4) 竹内 恵ほか. 血管炎性ニューロパチーの臨床病理学的検討. 東女医大誌, 70: 330-339, 2000.
- 5) 近藤裕美ほか. 慢性炎症性脱髄性根神経炎における血液浄化療法の有用性について. 東女医大誌, 70:354-362, 2000.
- 6) 望月温子ほか. 多発脳神経麻痺を呈した症例の病因および臨床的特徴について. 東女医大誌, 70: 363-366, 2000.
- 7) 海野聡子ほか. 血管炎性ニューロパチーを伴った原発性抗リン脂質抗