

- 体症候群の1例. 東女医大誌, 70: 376-382, 2000.
- 8) 丸山健二ほか. 上肢主体の非対称性筋力低下を呈した慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー. 東女医大誌, 70: 417-422, 2000.
- 9) Sasaki S. et al. Excitatory amino acid transporter 1 and 2 immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*, 100: 138-144, 2000.
- 10) Sasaki S. et al. An unusual case of familial amyotrophic lateral sclerosis with extensive involvement and neuronal cytoplasmic inclusions. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 26: 398-402, 2000.
- 11) Sasaki S. et al. iNOS and nitrotyrosine immunoactivity in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*, 291: 44-48, 2000.
- 12) Sawada T. et al. Inhibition of L-leucine methyl ester mediated killing of THP-1, a human monocytic cell line, by a new anti-inflammatory drug, T614. *Immunopharmacology*, 49: 285-294, 2000.
2. 学会発表
- 1) 竹内 恵, 大澤美貴雄, 岩田 誠. 炎症性脱髄性ニューロパチーにおける馬尾伝導検査の有用性. 第41回日本神経学会総会 2000年5月 松本
- 2) 近藤裕美, 竹内 恵, 望月温子, 岩田 誠. 慢性進行性外眼筋麻痺における末梢神経障害の合併と頭部MRIについての検討. 第41回日本神経学会総会 2000年5月 松本
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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

ハンセン病発生動向調査システムの開発：

ハンセン病剖検例のデータベース，作製法と目的，抽出データ例

分担研究者 松尾英一 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
センター長

研究要旨

日本ハンセン病学会有志が行って来た本病患者登録を補完すべく、前者の扱う対象に含まれない本病患者で死亡例、特に化学療法施行後剖検された症例のデータベース（DB）化とその可能性を模索した。またその本格化にはDB作製に要する多大な労力に見合う知見獲得の可能性が最初から予想出来る事が必要である。そのため今年度は作製の方法論とDBから得られる情報の例示のために化学療法剤 B663 投与例に対しリファンピシン（RFP）と DDS 及び他のスルホン剤のみで B663 を使用しなかった対照症例での本病病変を比較検討した。

A. 研究目的

近年、内外のハンセン病患者に対する化学療法が精力的に行われてきたが、多剤療法（MDT）後も長期にわたり発症する神経痛や後遺症の発症メカニズム解析並びに対応は極めて不十分である。これらに対応するには現在の新患調査方法で得られる知見の解析だけでは不十分と考えられる。以上を補完すべく今回日本ハンセン病学会有志が行って来た本病患者登録に含まれない死亡例、特に化学療法施行後剖検された症例のデータベース（DB）化とそれにより齎される知見追加の可能性を模索した。DB作製を本格的に開始するには、要する多大な労力に見合う知見獲得の可能性が最初から予想出来る事が必要だからである。そのため今年度はDB作製の方法論とDBから得られる情報の例示のために化学療法剤

B663 投与例に対しリファンピシン（RFP）と DDS 及び他のスルホン剤のみで B663 を使用しなかった対照症例での本病病変を比較検討した。

B. 研究方法

全国的な本病剖検例 DB 作製には日本病理学会が編集した日本病理剖検輯報をオムロン社の OmCR ver.3 ソフトを用いて Microsoft 社の Excel に取り込む方法を検討した。化学療法施行後の剖検例としては 1970 から 80 年代まで、当研究所員が扱った全生園剖検例を検討した。その際、最長 4 年間 B663 の使用例 4 例と DDS 及び他のスルホン剤並びに RFP のみを用いた同数対照例を扱った。（倫理面の配慮）今年分の検討材料は亡くなって時間を経た剖検例で、故人を個人として同

定する事は不可能である。病理組織の染色切片を鎮魂の心をこめて扱っている。また、データベースの根幹は病理学会から既に刊行されている書籍を用いる。

C. 研究結果

DB 作製のみは既に刊行されている日本病理剖検剖検輯報を複写し、一例毎を横線で分割し、スキャナーでOmCRソフトに取り込み、ファイルを前記ソフトのExcelにドロップする事により可能となった。

化学療法施行後の剖検例の検索ではB663使用例では皮膚、末梢神経において伴に残存らい細胞群は大きく、かつ広範にみられた。細胞内には抗酸菌以上に無構造の抗酸菌染色陽性物質沈着領域がおおきく、ceroid色素形成を示唆した。末梢神経では大食細胞は神経上、周膜、内鞘にとともに残存したがそれらの硬化は極めて軽度で、神経線維は残存した。一方、対照例では皮膚並びに末梢神経のらい細胞は消失か著明な減少を示したが、末梢神経上、周膜の強い線維化と神経線維消失を示した。

D. 考察

以上から日本病理学会刊行の日本病理学会剖検輯報をExcelに取り込む事は可能であり、そのみである程度の基礎的DBが作製出来る事がわかった。

DB作製の効果の例証としての化学療法施行症例の所見を要約すると、B663使用例では抗酸菌と同じ染色性を示すceroidの沈着のため、対照例よりも本剤の抗菌作用が劣るように見えるにも関わらず末梢神経線維は極めて良く保存されていた。対照では神経周膜、内鞘とともに線維化が強く、神経線維の強度の脱落を認め、血管並びに病巣部でのArthus型

反応の既往を示唆した。以上はまたB663では本病病変部にらい菌由来の抗原物質をceroidで固め、不溶化することにより上記病変を抑制した可能性を示唆したと言えよう。らい腫型本病の局所病変は結核での第一期病変に相当し、非特異性炎に属する。結核症で、この時期に菌は石灰で固められ治癒する。本病病変でも菌がceroidで固められれば、病理学的には結核第1期で治癒した状態に相当する病変と見なされよう。またこれがB663の後遺症抑制に対応する像であろう。

E. 結論

ハンセン病の発生動向把握システムの開発に関する研究の範疇で、長年の隔離療法期間に行われた化学療法の経験を剖検例のDB化により活用出来る形にし、これを今後内外の本病対策に生かせる形にする事は関係者の責務と考え今回その可能性について例示を試みた。

F. 研究危険情報：なし

G. 研究発表

1. 松尾英一：ハンセン病とはいかなる病気か？病理学からみた現代の化学療法(その2) 化学療法が本病の主並びに随伴病変に及ぼす影響。駿河 2000 秋号：2-6,2000.

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

らい菌の遺伝子型別

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研究室長

感染経路解明を初めとするハンセン病の疫学解析の指標とするらい菌の型別法の開発と、異なる遺伝子型のらい菌の分布について検討した。これまでに明らかにした *rpoT* 遺伝子のそれぞれのタイプの分布と人類移動との関連を明らかにする目的で南米大陸からのらい菌について検査したが、全て3型であり、韓国およびわが国に特異的に多い4型の由来を明らかにすることはできなかった。arbitrarily primed PCR (AP-PCR) に基づく多型性について検討したが、1分離株のみに78bpの挿入配列があるのみで型別の手段としては不適であった。

A. 研究目的

新たならい菌感染を阻止し、ハンセン病の発生を防ぐ為にはその感染経路の解明が必須である。そのためには個々の感染例におけるらい菌を分別することがその手段となる。これまでに *rpoT* 遺伝子の多型を明らかにしたが、その分布について人類移動との関りを検討する為にモンゴロイドの分布する南米からのらい菌についてその遺伝子型をしらべた。より細分類を可能とする型別方法の開発に向けて arbitrarily primed PCR (AP-PCR) において見出された多型性の由来とその有用性について検討した。

B. 研究方法

バラグアイのハンセン病患者から20検体、ペルーの症例から31検体の skin scraped 材料を採取し、南米大陸から分離されるらい菌の *rpoT* 遺伝子型を検査した。検体は皮膚結節

部位あるいは耳朶より採取し、メス刃先を70%エタノールに保存して送付された。*rpoT* 遺伝子中の多型性を示す部位をPCRにより増幅し、6塩基配列のコピー数を比較した。

いくつかの10塩基前後よりなる arbitrary primer を作成し AP-PCR を行った。R4 primer (ATCGACGATC)により菌株間で異なる産物が増幅され、その塩基配列を比較した。その差異の原因となる挿入配列が見出された領域を含む産物が得られる primer により PCR を行い、分離株間の PCR 産物により、その配列の有無とその型別法としての有用性を検討した。

検体採取に際しては本研究の目的及び得られる学問的成果について説明を行い、同意が得られた場合に材料の提供を受けた。また個人が特定できる記録は行わなかった。

C. 研究結果

バラグアイより得たらい菌は全て *rpoT* 遺

伝子中に6塩基を3コピー直列する型(3型)であった。ペルーより得た検体中25検体が目的部位の増幅を示し、解析可能であったが、これらも全て3型であった。

種々の arbitrary primer の中で ATCGACGATC よりなる primer による AP-PCR において、数種の分離株中、常に1株が他よりやや大きなサイズのバンドを示した。その原因について他の分離株より得られた近傍のサイズの産物との比較により検討した結果、その株は transposonese の上流約 490 塩基の部位に他の株より78塩基が1コピー多く2コピー直列して存在することが明らかとなった。この塩基配列はデータベースとのホモロジー検索の結果では何らかのたんぱく質をコードするものではなかった。さらに多くの株についてこの78塩基のコピー数について比較したが、この株の他には2コピーを直列するものは無かった。

D. 考察

人類移動に伴い、HTLV-1 を初めとして世界各地に特異的遺伝子型を持つ微生物の分布が形成されたことが知られている。これまで、わが国も含めて世界各国から得たらい菌の *rpoT* 遺伝子の多型を調べた結果、わが国及び韓国に分布するらい菌は3型が圧倒的に多数を占めた。そのような特徴的分布は過去における日本人の形成過程と密接に関連したものであろうと推察された。さらに世界におけるらい菌 *rpoT* 遺伝子の分布を調査にすることにより、過去のハンセン病の世界的な拡散を知ることが可能と考えられた。過去にモンゴロイドがペーリジヤを経て南米大陸にまで達したことが知られており、その移動とともにハンセン病がそれらの地域に達したか否かを知ることはハンセン病の感染様式を知る一助

となるものと考えられた。

今回調べた検体の *rpoT* 遺伝子の型は全て3型であり、多くの日本及び韓国から分離されるらい菌が4型である点と結果を異にした。その理由として、南米に分布するハンセン病はモンゴロイド以外によってもたらされたかあるいは韓国、日本に分布する4型はモンゴロイドが北方アジアを去った後にそこに残存した3型から4型が派生し、朝鮮半島へ南下した民族とともに極東地域に分布した2通りの可能性が考えられた。これらについて考察するためにはさらに細分可能な指標が必要と思われる。

AP-PCR に基づいて見出された78bpの2コピー直列遺伝子型は調べた中で1株に限定されたものであり、遺伝子型別の指標としての有用性は低いと考えられた。型別の指標とするには多型性が多くの株間で示される新たな領域の検索が必要である。

E. 結論

南米地域に分布するらい菌は圧倒的に *rpoB* 遺伝子中に6塩基を3コピー直列する型が多いことが示された。78塩基の塩基配列を1コピー有するか2コピー有するかは型別の指標としては不適であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Naito M., Matsuoka M., Ohara N., Nomaguchi H. and Yamada T. The antigen 85 complex vaccine against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. Vaccine Vol.18 795-798 2000

Ohara N., Matsuoka M., Nomaguchi H., Naito M. and Yamada T.: Inhibition of multiplication of *Mycobacterium leprae* in mouse foot pads by

recombinant bacillus CarumetteGuerin (BCG).
Vaccine Vo.18

Matsuoka M., Maeda S., Kai M., Nakata N., Chae G., 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 Vol.65 No.2 121-128 2000 1294-1297 2000

佐伯圭介、Teky Budiawan、松岡正典、和泉眞蔵：生活環境中に存在するらい菌の疫学的意義 —Polymerase Chain Reaction を用いたハンセン病濃厚流行地住民の鼻腔表面付着らい菌の検出—。日本皮膚科学会雑誌 110 巻 2 号 153-156 2000

杉浦典子、松本佳子、伊藤千佳、小塚雄民、河原邦光、倉田明彦、倉知貴四郎、伊藤利根太郎、和泉眞蔵、松岡正典、小林和夫：サリドマイドにより治療したらい性結節性紅斑の1例。皮膚 42 巻 4 号 430-436 2000

2. 学会発表

Matsuoka M.: Leprosy, a possible reemerging disease. 5th international conference on emerging infectious diseases in the Pacific Rim. Chennai, India, January, 2000

Matsuoka M., Kashiwabara Y., Maeda S., Kai. M., Nakata N., Chae G. T., Yin Y-P., Wu Q. and Agdamag A.: Distribution of *Mycobacterium leprae* with different genotype in China and Korea.. 35th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference. Yokohama, July, 2000

Kashiwabara Y., Maeda S., Kai. M., Nakata N., Maeda Y., Hashimoto K., Agdamag A. and Matsuoka M.: Mutations in the genes involved in the drug resistance in *Mycobacterium leprae*. 35th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference. Yokohama, July, 2000

Ohara N., Matsuoka M., Nomaguchi H., Nito M. and Yamada T.: Inhibition of multiplication of *Mycobacterium leprae* in mouse foot pads by recombinant BCG vaccination. 35th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference. Yokohama, July, 2000

Kai. M., Hashimoto K., Nakata N., Kashiwabara Y., Matsuoka M.: DDS resistance and the mutation of *folp* gene in *M. leprae* isolates. 35th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference. Yokohama, July, 2000

Kai. M., Hashimoto K., Nakata N., Kashiwabara Y., Matsuoka M.: DDS resistance and the mutation of *folp* gene in *M. leprae* isolates. 35th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference. Yokohama, July, 2000

Williams D., Pittman T., Matsuoka M., Kashiwabara Y. and Gillis T.: the simultaneous detection of *Mycobacterium leprae* and its resistance to dapson directly from clinical specimens. 35th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference. Yokohama, July, 2000

Goto M., Nomoto M., and Matsuoka M.: Preservation of *Mycobacterium leprae* DNA in the nervous tissue of cured leprosy. 35th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference.

Yokohama, July, 2000

Fukutomi Y., Kimura K., Toratani S., Matsuoka M., and Kobayashi K.: Regulation of cytokine production by prostaglandin E2 in *M. leprae*-stimulated macrophages. 35th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference. Yokohama, July, 2000

Gtoto M., Matsuoka M., Kitajima S. and Sato E.: Animal model of leprous neuritis- Lymphocyte transfer into *Mycobacterium leprae* inoculated nude mice -. 14th International Meeting of Neuropathology Birmingham, England, September, 2000

松岡正典、前田伸司、甲斐雅規、中田登、川津邦雄、柏原嘉子、Chae G.、Yin Y.、Wu Q.、Agdamag A.T. : らい菌 *rpoB* 遺伝子の多型性とその地理的分布。II 韓国、中国におけるそれぞれの型の分布。第 73 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島、2000 年 3 月

中永和枝、義同政一、松岡正典、柏原嘉子 : NASBA 法によるらい菌メッセジャーRNA 検出の試み。第 73 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島、2000 年 3 月

松岡正典、前田伸司、甲斐雅規、中田登、川津邦雄、柏原嘉子、Chae G.、Yin Y.、Wu Q.、Agdamag A.T. : らい菌 *rpoB* 遺伝子の多型性とその地理的分布。II 韓国、中国におけるそれぞれの型の分布。第 73 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島、2000 年 3 月

中村昌弘、松岡正典 : 無細胞系でのらい菌 ATP generation に影響する因子。第 73 回日本

ハンセン病学会総会、鹿児島、2000 年 3 月

福富康夫、木村博昭、虎谷聡、松岡正典、 : らい菌刺激マクロファージのサイトカイン産生に対する PGE2 の影響。第 73 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島、2000 年 3 月

柏原嘉子、松岡正典、甲斐雅規、前田伸司、中田登、前田百美、長尾栄治、後藤正道、北島真一、並里まさ、尾崎元昭、柳橋次雄、小原安喜子、L.E. Teraoka、M. A. Abbasi、Agdamag A.T. : 薬剤耐性に関するらい菌の遺伝子変異。第 73 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島、2000 年 3 月

野間口博子、与儀ヤス子、遠藤真澄、松岡正典、岡村春樹、宮田昌之、佐藤由起夫 : ハンセン病に対する DNA ワクチンの開発 : らい菌熱ショック蛋白質の効果。第 73 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島、2000 年 3 月

Shi. L., Yajima M., Kawatsu K., Matsuoka M., Kashiwabara Y. and 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 年 3 月

松岡正典、和泉真蔵、中田登 : ハンセン病流行地域における生活用水からのらい菌遺伝子の検出と感染源としての意義。第 73 回日本細菌学会総会 ワークショップ「抗酸菌感染の疫学と対策」札幌、2000 年 5 月

山田毅、大原直也、松岡正典、野間口博子、内藤真理子 : 組換え B C G ワクチンによる

Mycobacterium leprae の増殖抑制。第 73 回日本細菌学会総会 ワークショップ「抗酸菌感染の疫学と対策」札幌、2000 年 5 月

橋本研、前田百美、甲斐雅規、前田伸司、中田登、松岡正典：ダプ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、札幌、2000 年 5 月

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

再発に関する調査・解析

分担研究者 長尾 榮治 国立療養所大島青松園 副園長

研究要旨

ほとんどが DDS 単独投与により治療を終了した日本のハンセン病療養所入所者の再発状況を分析し、防止対策を探った。一方、MDT により治療を終えているタイとミャンマーでの状況を調査した。

A. 研究目的

日本国内におけるハンセン病の再発状況を調査・解析し、再発の予防対策を考える。

B. 研究方法

全国の国立ハンセン病療養所入所者の中から、1996 年から 2000 年までの 5 年間の期間における再発経験者の病歴経過表を作成し、その内容から再発に関する要因を分析した。他方、参考として MDT を行ったタイ、ミャンマーの実態を調査した。『再発者』は『皮膚スキンスメア・テストにおいて菌陰性化してから再び菌陽性となった者、又は再び皮疹が出現した者』と定義した。倫理面への配慮として、入所者自治会に調査に関する了承を得て、経過表には氏名を特定できる内容は記載せずに、作成・収集した。

C. 研究結果

平成 12 年 12 月 31 日における、全国国立ハンセン病療養所 13 施設の入所者総数は 4,436 名であった。入所者中、1996 年から 2000 年ま

での 5 年間における再発経験者は 59 名であった。が、その内 1 名は 1997 年に再入所者であったため、1996 年当時から入所していた者 58 名を分析対象者とした。年次毎の発見数は 1996 年・13 名、1997 年・9 名、1998 年・15 名、1999 年・9 名、2000 年・12 名であり、年間の平均発見数は 11.6 名であった。増加及び減少傾向を認めなかった。年間平均再発率は 0.26% であった。施設別の再発率を比較すると、2 施設は他の施設と比較して、有意に再発率が高かった。13 施設の中には、5 年間の調査期間に再発経験者が無かった施設が 2 施設、1997 年以後は無かった施設が 2 施設、1998 年以後は無かった施設が 4 施設あった。治療歴を見ると、DDS 単独治療者が最も多く 28 名(48%)、次いで(DDS+RFP)併用者が 16 名(28%)、(DDS・RFP・B663)服用者が 8 名(14%)、RFP 単独治療者が 3 名(5%)あり、(DDS+B663)、(DDS・RFP・OFL)服用者、及び MDT がそれぞれ 1 名ずつであった。皮膚塗抹検査において菌陰性化した後から再発に至るまでの期間を 5 年間

毎に区切ると、2名(0-4年)、15名(5-9年)、9名(10-14年)、3名(15-19年)、4名(20-24年)、7名(25-29年)、8名(30-34年)、5名(35-39年)、2名(40年以上)、3名(陰性期間不明)であり、5-14年後と25-34年後とに多くの発生数が見られた。治療内容との関係で見ると、DDS単独治療者は、1名(0-4年)、4名(5-9年)、2名(10-14年)、0名(15-19年)、2名(20-24年)、6名(25-29年)、5名(30-34年)、5名(35-39年)、2名(40年以上)、1名(陰性期間不明)であり、経年による減少傾向は認められなかった。(DDS+RFP)併用者や(DDS・RFP・B663)服用者は5-14年後の期間に63%・76%が再発をしており、経年による減少傾向がみられた。RFP単独治療者、(DDS+B663)や(DDS・RFP・OFL)及びMDTの服用者については少数のために傾向性の判断は不可能であった。病型別では、L・LLが40名あり、皮膚塗抹検査で菌陰性化後から再発までの期間を見ると、二峯性のピークが5-14年と25-34年に認められた。BLは14名あり、5-9年間に再発した者(43%)が最も多かったが、その後も再発はなくなっていなかった。B(1名)、BT(2名)、I(1名)にも再発例が認められたが、傾向性は不明であった。複数の再発経験をもつ者が53%、難治性であった者が25%、再発前にレプロミン反応が陰転化した者(33%)、抗PGL-1抗体価が上昇した者(20%)、末梢神経症状を認めた者(15%)があった。他方、MDTの歴史が長いタイ国における再発率は、国立Phrapradaengハンセン病病院の公式報告では0%であり、東北地方の国立感染症病院でも同様であった。同様の状況であるミャンマー連邦国の国立イェナダ・ハンセン病病院では、現在10例の再発患者を治療していることが分かった。しかし、全員がDDS単独治療者からの再発であった。

D. 考察

平成12年12月31日現在の調査では、皮膚塗抹検査による菌陽性者は全国で59名が報告されている。その内国立療養所の入所者は52名である。1996年から2000年の5年間に於ける再発経験者数59名との関連を見ると、菌陽性者数が5年間の再発経験者数を上回っている施設がある。その施設は、再発経験者の発生率が他の施設に比較して有意に多い施設でもある。このことにより、再発経験者の発生率が高い施設は、また難治性の患者がまだ存在していることが推定される。日本において、入所者の多くが1949年頃から1970年頃までDDS単独治療のみを受け、この時代に治療を終了した。1970年にRFPが使用されるようになり、DDS単独治療時代に急性反応や耐性菌の出現により難治性となった者は、RFP・CLF等の併用療法を受けた。その後、ハンセン病の基本治療は、スルホン剤・サルファ剤・抗結核薬及び抗生剤(CLF・OFL・MINO)等が各施設で種々の工夫をされながら患者に投与された。したがって、全国の再発例の状況を同じ母集団の中に入れて論じることはできない。各施設における対策や状況の内容から個々の再発要因を探る必要がある。過去の種々の調査から、『再発数は減少傾向にある』と考えられていたので、今回の結果は意外であった。しかし、5年間・毎年再発患者を発見している施設が3施設あり、それらで患者数が全国の2/3(66%)を占めている状況である。その他の施設は『減少傾向にある』と考えられる。例を挙げると、ある施設では1989年から1995年までの年間再発率は0.5%と報告されていたが、今回の調査では0.06%に減少している。また、別の施設では1972年から1991年の期間に年間平均4.25例の再発者が発見されていたが、今回の調査では年間平均0.8例に減少してい

る。全国的には、再発率は減少して来ている、ことは間違いない。DDS 単独治療者からは、30%以上の再発率が報告されているが、RFP 服用者からの再発率は多くない、と思われている。今回の調査では、RFP 服用者の母集団が確定されていないために、再発率は不明であるが、現在の再発者の 50%以上は RFP 服用経験者であることは、注目すべきことである。RFP 耐性菌の出現が報告されていることは、これらの症例の根拠となる。RFP 服用者からの再発状況を分析すると、一回毎の服用量や服用期間の不足と思われる例が半数であると推測された。また、不規則治療者である、と推測された例が半数あった。また、難治性であった、と推測された例が 25%あった。このようなことから、再発の予防には、全入所者の服薬歴を再度調査する必要があると考えられる。また、再発前に光田反応が陰転したり、抗 PGL-1 抗体価が上昇傾向にあったり、末梢神経症状が出現している者があった。

これらの検査成績や症状は、全国的にルーチンに行われている内容ではなく、担当医師によって異なっている。また、これらのサインは全ての再発例に出現しているのではないので、参考でしかないが、注目すべきことである。タイやミャンマーにおける MDT 受療者の再発率は WHO のレベルを越えていないが、観察期間の不十分さが考えられる。

E. 結論

日本の国立療養所における、ハンセン病の再発者が毎年 11 名以上もあることがわかった。年間再発率は 0.26%であった。しかも、その 2/3 は 3 施設内に集中しており、減少傾向はまだ不明である。これらの施設は難治性の症例もまだ存在していることがわかった。再発の予防には、各施設に於いて、全入所者の治療歴

調査が必要であることがわかった。また、再発前に、光田反応・末梢神経症状・抗 PGL-1 抗体などのサインが出ていることがあることもわかった。海外での MDT 後の再発のデータに注目することが必要である。

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

ハンセン病患者（新患・既往者）データベース化の確立に関する研究

分担研究者 石井則久 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
生体防御部 部長

研究要旨

日本におけるハンセン病の新規患者数の把握と、統計学的解析を行った。新規患者を診察した医師に調査用紙を送付して調査し、さらにそれらを解析した。ハンセン病の新規患者は年間約15名で、日本人は5名前後で、ほとんどは60歳以上であった。在日外国人は10名前後で、南米、東南アジアなどの出身者が目立った。なお、平成12年（2000年）については、日本人6名（うち沖縄県出身者3名）、在日外国人6名（うちブラジル人2名）であった。

A. 研究目的

日本におけるハンセン病の発生動向を探るために、プライバシーに配慮し、データベース化し、日本におけるハンセン病の動向を明らかにする。

患者の氏名欄はイニシャルにした。回収した調査用紙は石井が管理し、イニシャル、正確な生年月日、年齢などは研究者を特定した上で公開した。

B. 研究方法

各種学会発表、論文発表、依頼 DNA 診断結果などをもとに、ハンセン病の新規患者を診察した医師を特定した。診療医に調査用紙を郵送し、返送を依頼した。回収した調査用紙をもとに年齢、性、国籍、経過などを検討した。

また、1993年から2000年までの新規患者をデータベース化して統計学的観察を行った。

（倫理面への配慮）調査依頼した医師には、プライバシーを厳守する旨を依頼文に明記した。

C. 研究結果

平成12年（2000年）の新規ハンセン病患者調査を行った。平成13年2月28日現在12名の患者を登録した。それらのうち3名については実際に患者の状態を観察し、検査等の指導をし、発生動向調査への協力を依頼した。また5名については診断のための検査指導を行った。調査の詳細は、日本人は6名（男2、女4）、うち沖縄県出身者は3名であった。日本人患者は平均67.0歳（2名のみ60歳未満）、病型は4名がMB（多菌型）であった。一方、外国人患者は6名（男3、女3）、ブラジル人2名、フィリ

ピン人3名、バングラデシュ人1名であった。平均年齢は27.8歳、病型は2名がMB（多菌型）であった。報告元は皮膚科から8名、国立ハンセン病療養所から3名、ハンセン病専門外来から1名であった。また1例については、既に皮膚科関係の学会に発表済みである。

1993年からの新規ハンセン病患者のデータベースを作成し、解析を行っている。またデータベース化に対応した調査表を作成し、2000年からの調査に使用した。

1993年から新規ハンセン病として登録された患者について、その後の経過観察を実施するために、調査表を作成し、実際に横浜市大及び琉球大学の皮膚科症例を調査し、データベースの準備している。順次症例を網羅する予定である。

D. 考察

らい予防法廃止後、厚生省による新患調査は廃止され、ハンセン病の動向調査の継続が切望されていた。この調査は日本におけるハンセン病の将来、施策を決定する上での基本になるものである。

今年度も引き続き新規ハンセン病患者調査を行った。登録済み新規患者の経過観察調査もを行い、らい反応、再発、再燃の有無を検討している。ハンセン病患者のデータベースを活用して日本における発生動向の将来予測を立てる予定である。特に在日日系ブラジル人においては、毎年新規患者として多数登録されているので、ブラジル国内の現況を調査して今後の外国人患者の動向を予測すべきである。さらに日系ブラジル人のハンセン病の動向を探るために、ブラ

ジルに現地調査に行く予定である。

調査用紙の内容は、動向調査に最低限必要な項目のみ盛り込んだ。さらに2000年からはデータベース化を念頭におき、改訂版の調査用紙を作製した。データベース化は1993年から入力した。ハンセン病に関する情報を多くの国民が共有できる様な情報公開を考慮している。初診時のみの調査を、継続的に行うべく年1回の経過観察を試行的に行った。それによって治療効果や副作用、再燃、再発などの貴重な情報を得ることが可能と考えられる。

ハンセン病の報告先は殆どが皮膚科医である。新患の全例報告を目標にするためには、皮膚科医を対象に啓発（ハンセン病について、疑診の時、検査方法、報告など）すると共に、ハンセン病を診療する機会のある整形外科医、神経内科医などへも働きかけも必要である。

外国人患者の問題にも言及したい。在日外国人は新患の約2/3を占めている。ほとんどは労働のため来日しており、金銭的に困窮し、通院の時間も確保しづらいなど、継続治療に困難をきたしている。彼らを継続治療することは、国際関係などからも支援すべきである。さらに、日本における将来の労働力の不足が予想され、外国人患者の増加のの予測をする必要がある。

E. 結論

ハンセン病の新患は年間約15名前後で、日本人は5名前後で、ほとんどは60歳以上である。在日外国人は10名前後で、20歳代から30歳代の若者が多くを占め、南米、東南アジアなどの出身者が目立った。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ishii N, Onoda M, Sugita Y, Tomoda M, Ozaki M: Survey of newly diagnosed leprosy patients in native and foreign residents of Japan. *Int J Lepr* 68: 172-176, 2000.

石井則久：ハンセン病. *日本皮膚科学雑誌* 110: 1983-1985, 2000.

石井則久、杉田泰之：抗酸菌症に関する検査. *Monthly Book Derma* 41: 140-146, 2000.

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. *日ハンセン病会誌*, 69: 157-177, 2000.

2. 学会発表

石井則久：ハンセン病. シンポジウム「20世紀皮膚科学の総括」. 第99回日本皮膚科学会総会 仙台、2000年5月.

堀井のり子、望月太郎、市川栄子、藤澤裕志、今門純久、大塚藤男、田中未知、石井則久、杉田泰之、小関正倫：B L型ハンセン病の1例. 第99回日本皮膚科学会総会 仙台、2000年5月.

Ishii N, Matsuo E, Ozaki M, Kusakabe Y: Survey of newly diagnosed leprosy patients in Japan. Asian Leprosy Congress, Agra, India, November, 2000.

Ishii N, Sugita Y, Kusakabe Y, Okuda K:

Immunological characterization of vaccine. Asian Leprosy Congress, Agra, India, November, 2000.

石井則久：ハンセン病. 第104回神奈川県皮膚科医会、横浜、2000年12月.

石井則久：感染症新法と皮膚感染症-抗酸菌とHIVを中心にして-. 教育講演. 第64回日本皮膚科学会東京支部総会、東京、2001年2月.

堀井のり子、市川栄子、今門純久、大塚藤男、杉田泰之、石井則久：少菌型ハンセン病の1例. 第64回日本皮膚科学会東京支部総会、東京、2001年2月.

2000年新規患者（2001年2月末現在）

	国籍（出身）	性	年齢（年代）	病型	参考
1	日本(沖縄県)	F	60	PB(?)	2000-2
2	日本(沖縄県)	M	50	MB(BB)	2000-6
3	日本(山口県)	F	80	MB(BL)	2000-7
4	日本(鹿児島県)	F	70	MB(BL)	2000-8
5	日本(静岡県)	F	60	MB(BL)	2000-9
6	日本(沖縄県)	M	30	PB(I)	2000-11
7	フィリピン	F	20	MB(LL)	2000-1
8	バングラデシュ	M	20	MB(B)	2000-3
9	フィリピン	F	30	PB(BT)	2000-4
10	ブラジル	M	20	PB(BT)	2000-5
11	フィリピン	F	30	PB(BT)	2000-10
12	ブラジル	M	20	PB(?)	2000-12

平成12年（2000年）新患のまとめ

日本人			在日外国人		
性	人数	平均年齢	性	人数	平均年齢
男	2	48.5 (37-60)	男	3	25.3 (22-28)
女	4	76.3 (67-85)	女	3	30.3 (26-34)
計	6	67.0 (37-85)	計	6	27.8 (22-34)
MB : 4 PB : 2			MB : 2 PB : 4		
沖縄県出身者 : 3人 54.7 (37-67)			ブラジル人 : 2		
			帰国者 : 2		

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

病型スペクトラム成立機規序の解析

分担研究者 福富康夫 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
病原微生物部第二研究室 室長

研究要旨

ハンセン病の病巣局所では、Th1 型サイトカイン（TT 型）と Th2 型サイトカイン（LL 型）がそれぞれ優位に発現しており各病型形成の一因であることが知られている。また、らい反応と呼ばれる特徴的なアレルギー反応も観察され、マクロファージが産生するサイトカインも大きく関わっている。マクロファージは種々の機能を担っている免疫担当細胞であり、異物貪食やサイトカイン産生等、重要な役割を果たしている。これらの機能を解析しマクロファージの病型スペクトラム成立への関わりを検討した。マクロファージの細胞膜上には様々なレセプターが存在し、病原細菌を認識あるいは貪食するのに関与するものがいくつか知られている。我々はマウスマクロファージが細胞膜上のマンノースレセプターを介してらい菌を認識し貪食する機構について解析し、マウスマクロファージがらい菌により刺激された時に、過剰のマンノースがサイトカインの一つである腫瘍壊死因子（TNF）の産生誘導を抑制することを報告してきた。さらに深く検討したところ、TNF と同様に IL-10 の産生も抑制されていた。また、らい菌刺激により MAPK (mitogen-activated protein kinase) の ERK や p38MAPK がリン酸化されたが、マンノース存在下でその活性は抑制された。マンノースレセプターを介してサイトカイン産生を誘導する zymosan 刺激でもサイトカイン産生の抑制が確認された。これらの結果から、らい菌刺激によるサイトカイン産生はマンノースレセプターを介して引き起こされ、過剰マンノースによりその反応が抑制される可能性が考えられた。

A. 研究目的

マクロファージの病原細菌を認識する細胞膜上の分子については、最近 TLR (Toll-like receptor) がよく知られており、特に LPS のシグナル伝達を介する TLR4 に関してはそのアダプター分子である MyD88 から NF- κ B の活性化までのメカニズムが解明されつつある。抗酸菌に関しては TLR2 の関与が示唆されているが、まだ詳しくは解明され

ていない。抗酸菌はマクロファージに貪食される。その貪食機構については補体や抗体のオプソニン作用が大きな役割を果たしているが、それ以外にも菌表層に多く存在するマンノースに対するマクロファージ上のマンノースレセプターも関与することが示唆されている。そこで我々は、マクロファージがらい菌の糖を認識し、TNF 等のサイトカインの発現誘導やらい菌の貪食が起こる系が存在するか

否かを検討した。

B. 研究方法

(1) らい菌の回収：ヌードマウス foot pad にらい菌 (Thai-53 株) を接種し、一年後に増殖してきた菌を回収し、5% グリセロール含有 BSS 溶液に浮遊させ -80°C で保存し、実験に供与した。(2) マクロファージの培養：ICR マウス腹腔常在細胞をカバースリップのついた 24 well プレートにまいて、10% FBS-RPMI 培地中で一晩前培養した。ハンクス液で洗浄後、得られた付着細胞をマクロファージとして用いた。(3) らい菌のマクロファージへの感染：Shepard 法で菌数計算した一定量のらい菌を細胞培養液に加え、4 時間 37°C で培養した。(4) 培養上清中のサイトカイン測定：培養上清を回収し、遠心して細胞等を除去した後、ELISA (TNF: R&D, IL-10: Biosource) 法で培養上清中のサイトカイン量を定量した。(5) RT-PCR: total RNA 抽出後、reverse transcriptase (Perkin-Elmer) で逆転写したものを template として GeneAmp PCR kit (Perkin-Elmer) で増幅することにより、TNF 及びコントロールとして GAPDH の mRNA の発現量を調べた。プライマーには以下に示したものをを用いた。

TNF sense primer

(5'-TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGG-3'), TNF anti-sense primer

(5'-TGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG-3'),

IL-10 sense primer

(5'-ATG CAG GAC TTT AAG GGT TAC TTG GG-3'),

IL-10 anti-sense primer

(5'-ATT TCG GAG AGA GGT ACA AAC GAG G-3'),

GAPDH sense primer

(5'-TCGGTGTGAACGGATTTGGC-3'),

GAPDH anti-sense primer

(5'-CTCTTGCTCAGTGTCCTTGC-3').

(6) リン酸化 MAPK の同定：腹腔マクロファージをらい菌刺激して 20 分後の細胞抽出液を得、SDS-PAGE を行い、メンブリンに転写してから MAPK の各抗体 (リン酸化された MAPK 及びリン酸化されていない MAPK を認識する抗体) で処理し、2 次抗体で処理してから ECL キット (Amersham-Pharmacia) を利用して検出を行った。(7) メチオニンの取込：マクロファージを 24 well フラッシュプレートにまき、methionine-free medium で一晩培養してから ^{35}S でラベルされたメチオニンを添加した methionine-free medium で 48 時間培養し、トップカウンターでカウントを測定した。

C. 研究結果

マウスマクロファージをらい菌とともに培養し、2 時間後の total RNA を抽出して RT-PCR をおこなったところ、TNF, IL-10 の発現誘導が mRNA レベルで確認された。培養 4 時間後の培養上清を採取し、ELISA を行った結果、蛋白レベルでの TNF, IL-10 の発現誘導も確認された。この系にマンノース 2~5 mg/ml を共存させたところ、培養 2 時間後の TNF, IL-10 mRNA の発現、培養 4 時間後の TNF, IL-10 蛋白の発現が共に抑制された。これらのサイトカインの発現には MAPK のリン酸化カスケードが関与することが報告されている。そこでらい菌によって MAPK のリン酸化が起こっているかどうかを検討した。らい菌刺激して 20 分後の細胞

抽出液をとって MAPK (ERK, P38MAPK) のリン酸化が確認された。またこのリン酸化にマンノースが影響を及ぼすかどうかを検討した。マンノース存在下では MAPK のリン酸化は抑制されていた。また、ERK のすぐ上流にある MEK の阻害剤存在下でのサイトカインの発現をみると IL-10 の発現が抑制されていた。また、p38MAPK の阻害剤存在下では TNF, IL-10 両方の発現が抑制された。

酵母の成分である zymosan はマンノースレセプターを介してマクロファージを刺激することが報告されており、我々の系でもサイトカインの発現が確認された。この系にマンノースを加えたところサイトカインの発現が抑制された。

マンノースの濃度が 10 mg/ml で NO の発現を検討したときに細胞毒性のような現象がみられたので、念のために現在の 2 mg/ml の濃度でのマンノースがマクロファージの代謝に影響を及ぼすかどうかを ^{35}S でラベルしたメチオニンの取込を測定することで調べてみた。しかし、この濃度でのメチオニンの取込には影響がなかった。

D. 考察

自然免疫に関わる分子として TLR (Toll-like receptor) がクローズアップされ、TLR2, 4, 6, 9 などの解析が進んで、次々とその機能が明らかになってきている。例えば、大腸菌の細胞壁構成成分の LPS による刺激がマクロファージ内部へ伝達される場合に必要分子として TLR4 の解析が進んでいる。その TLR のファミリー分子の一つである TLR2 が抗酸菌の構成成分や抗酸菌自体によるマクロファージ系細胞への刺激に関係しているという報告もある。ただし、抗酸菌の細胞表面上には様々な分子が多く存在し、TLR2

のみが抗酸菌を認識しているとは考えにくい。マンノースレセプターは抗酸菌の食食に関わる分子であるが、同時に菌による刺激の伝達にも関わっているのではないかと我々は考え、今回の報告のような実験を行った。その結果、マンノースレセプターも TLR ファミリーのように細菌構成成分の刺激を伝達していることが示唆された。マクロファージがらい菌刺激時にマンノースレセプターを介して細胞内にシグナルを伝え、MAPK カスケードが活性化され、TNF や IL-10 の発現が誘導されていると予想された。ERK は IL-10 の発現に、p38MAPK は IL-10, TNF 両方の発現に関わっていた。zymosan の実験でもマンノースによりサイトカイン誘導が抑制されたことと以前に行ったマンノース dimmer やマンノース結合 BSA でもサイトカインの発現が抑えられたことから、らい菌によるマクロファージの活性化もマンノースレセプターが関与している可能性が考えられた。また、それらのサイトカイン発現抑制はマンノースの細胞毒性による代謝低下でないことも確認された。

E. 結論

マンノースレセプターはらい菌食食及びらい菌認識時のマクロファージの反応に重要な役割を果たしており、TNF や IL-10 の発現誘導や MAPK のリン酸化に関わりを持っていることがわかった。これらサイトカインはハンセン病病巣局所で産生されており、このレセプター刺激が病型成立に関与している可能性が示唆された。

研究発表

(学会発表)

木村博昭、虎谷聡、松岡正典、小林和夫、福富康夫：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、第30回日本免疫学会総会、仙台、11月14、15、16日 2000年

虎谷聡、木村博昭、松岡正典、福富康夫：らい菌感染マウス腹腔マクロファージにおけるiNOS蛋白質のTNF- α による活性化、第30回日本免疫学会総会、仙台、11月14、15、16日 2000年

福富康夫、木村博昭、虎谷聡、松岡正典：PGE2によるらい菌刺激マクロファージのサイトカイン産生調節：第30回日本免疫学会総会、仙台、11月14、15、16日 2000年

Yasuo Fukutomi, Hiroaki Kimura, Satoshi Toratani, Masanori Matsuoka, and Kazuo

Kobayashi: Regulation of cytokine production by prostaglandin E2 in *M. leprae*-stimulated macrophages: 35th Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Yokohama, July, 2000

H. Kimura, S. Toratani, M. Matsuoka, K. Kobayashi, and Y. Fukutomi: Analysis of *Mycobacterium leprae* infection in macrophages: 35th Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Yokohama, July, 2000

ハンセン病に対する疾患感受性の個体差における免疫遺伝学的研究

研究者 大山秀樹 岡山大学歯学部歯科保存学第二講座

研究要旨

本研究は、ハンセン病患者のIL-12に対する非特異的なT細胞応答における特徴を調べることを目的に、1) PHA刺激時におけるIL-12存在下でのIFN-g産生量、2) IL-12Rb1遺伝子の多型性がIFN-g産生にどのような影響を及ぼすかについて調べた。その結果、1) PHA刺激によって活性化した健常者由来T細胞のIFN-g産生量は、IL-12存在下において様々であるのに対して、すべてのLLおよびTT型患者由来T細胞のIFN-g産生量は皆無であるか極めて低いものであった。2) IL-12Rb1分子にVal(5)-Leuのアミノ酸変異を有する被験者由来の活性化T細胞は、IL-12存在下においてIFN-g低産生性を示した。3) Lys(259)-Asnのアミノ酸変異を有する被験者はLL型患者においてのみ検出された。以上の結果から、1) ハンセン病に対する疾患感受性の違いは、活性化T細胞のIL-12存在下におけるIFN-g産生性によって決定付けられること、さらにその産生性の違いはIL-12Rb1遺伝子のcoding SNPsによって説明付けられる可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

ハンセン病患者のMycobacterium leprae (M. leprae)に対する防御において、抗原提示細胞 (APC) が産生するIL-12は、ハンセン病患者のM. lepraeに対する細胞性免疫様態を説明づける鍵となる。前年度の本課題において我々は、T細胞膜表面にIL-12 b1レセプター (IL-12Rb1) を発現しているにも関わらず、PHA刺激時にIL-12存在下においてIFN-gを産生しないLL型患者が存在することを示した。このLL型患者由来T細胞におけるIL-12刺激に対するIFN-gの産生異常には、1) IL-12R遺伝子の多型性、2) IL-12Rを介する細胞内刺激伝達系の異常、3) T細胞が発現するIL-12Rb1およびb2 mRNA量などが関与していると考えられる。そこで我々は、このLL型患者が示すようなIL-12刺激に対するIFN-g低産生性がハンセン病患者のM.

leprae感染に対する感受性の高さを表しているという作業仮説のもとに、ハンセン病患者のIL-12に対する非特異的なT細胞応答の特徴、およびそれに関わる要因を調べることを目的とした。本年度は、1) PHA刺激時におけるIL-12存在下でのIFN-g産生量を多人数の患者および健常者で調べることに、および、2) IL-12Rb1遺伝子の多型性に着目し、低産生性を誘導するSNPsの存在の検出を行った。

B. 研究方法

1. 被験者：LL型ハンセン病患者であったドナーを8名、TT型ハンセン病患者であったドナーを6名、また健常者8名を被験者とした。なお、ドナーの臨床的分類は、Ridley & Joplingの分類に合わせ、らい反応および全身の後遺症の程度から判