

厚生科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

ハンセン病感染の実態把握及びその予防(後遺症の予防を含む)・診断・治療法に関する研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松岡 正典

平成 14 (2002) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書	
ハンセン病感染の実態把握及びその予防（後遺症の予防を含む。）・診断・治療法に関する研究 松岡正典	1
II. 分担研究報告	
1. 薬剤耐性菌による難治例ならびに再発に対する治療戦略に関する研究 尾崎元昭	15
2. 薬剤耐性らい菌の検出に関する研究 中田 登	17
3. 新規抗らい菌薬の開発研究 22儀同政一	23
4. 免疫環境是正法の開発 牧野正彦	27
5. 末梢神経機能障害の解明・予防・治療に関する研究 後藤正道	31
6. 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	35
7. 流行国における神経炎の実態調査 畑野研太郎	39
8. 末梢神経機能障害の解明・予防・治療に関する研究 岩田 誠	41
9. 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 松尾英一	45
10. ハンセン病の再発に関する調査・解析 長尾栄治	47

11、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 石井則久	49
12、らい菌の型別と地理的歴史的伝播および感染 経路解析への応用 松岡正典	57
13、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 大山秀樹	61
14、らい菌の機能解析 らい菌のホスファチジル セリン合成酵素の役割を中心に 前田伸司	65
15、ハンセン病政策の歴史的検証と将来に向けた 対策に関する研究 酒井シヅ （資料）1）基本合意文書 2）真相究明 3）歴史年表	69

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別冊

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

ハンセン病感染の実態把握及びその予防（後遺症の予防を含む。）・診断・治療法に関する
研究

主任研究者 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

研究要旨

国内ハンセン病の年間新規症例は20例以下で推移しているものの、後遺症、難治例あるいは再発がハンセン病対策上問題となっている。また新規症例の半数以上が在日外国人に見出されていること、世界ではWHOの努力にもかかわらず、年間約70万の新患発生があり、それらのうちでも有病率の高い国々からの在日外国人に新規の症例が見出されていることなどから、国外のハンセン病対策と連携した対策が必要となっている。

本研究においては治療戦略に関する研究、末梢神経機能障害に関する研究、分子疫学とハンセン病発生動向調査ならびにシステムの構築、ハンセン病の病態およびらい菌に関する研究を行うことにより国のハンセン病対策に貢献することを目的とする。また今年度にかぎりハンセン病違憲国家賠償訴訟判決の結果、実施することとなったハンセン病政策の歴史的検証と将来の対策に関する研究も加えられ、今後の国の行政の施策決定に参考となるよう実施された。

研究班はハンセン病研究センターを中心に、国内のハンセン病医療従事者、および大学の研究者を加えて構成され、ハンセン病に関し総合的に検討することとした。その結果、今年度は以下の成果が得られた。

薬剤耐性が疑われる難治性ハンセン病例ではハンセン病治療薬に対し単独で耐性を獲得した例のみならず、多剤耐性を示す例が多数見出された。治癒基準を設定し治癒後のフォローと後遺症・合併症のケアについての指針を確定した。*folP*遺伝子中のこれまで明らかになっている変異以外に新たに3部位の変異がDDS耐性に関与している可能性が示された。免疫療法およびワクチン開発に係る抗原性分子を探索する目的で、らい菌の菌壁・菌膜・細胞質の抗原性を検索した結果、らい菌膜には抗細菌細胞性免疫を誘導する分子が存在すると考えられた。Rifalazil (KRM-1648)、WQ-3345、WQ-3402、Ketolide(ケトライド)、HMR-3647の新規4種薬剤は、作用部位である第1標的がこれまでの薬剤と相違すると考えられることから、耐性菌に対する治療薬としての可能性が示唆された。

ハンセン病では加齢に伴ってPGP9.5陽性面積が減少する傾向が見いだされ、その減少はL型に著しく、かつ早期(60歳代)から始まることが明らかになった。ハンセン病では治癒状態においても、神経障害が進行することが明らかになった。ハンセン病性末梢神経炎発症機構を解明するために、アポトーシスを誘導した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た結果、らい菌感染シュワン細胞のこれら因子の発現動向とは、異なることを見いだした。ハンセン病の末梢神経障害が長期間においてどのような経過をとるかを検討した多くの例で、表在感覚障害部位の縮小を認めたが、筋力低下、筋萎縮には変化を認めないものがほとんどであった。Myanmarにおける1958年以後のカルテ調査を行った結果、地域におけるハンセン病流行状況を認識する上で、新患の障害率と診断年齢を組み合わせる事がよりの確に地域の流行状況を表す指標となると思われた。

剖検症例のデータベース(DB)化を伴う症例調査研究の基盤整備が必要であると考えその整備を図った。国立ハンセン病療養所において入所者のハンセン病再発状況を調査した。多菌型の約33%が再発を経験しており、DDS単独投与者からの再発者は45.7%であった。RFPやCLF投与者の再発も出現してきていることが判明した。一方、Myanmarとタイでの調査ではDDS単独投与者からの再発者しか発見できなかった。1993年以降の日本におけるハンセン病の新規患者は年間約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13年については、日本人5名(うち沖縄県出身者3名)、在日外国人7名(うちブラジル人3名)であった。ハンセン病の感染経路解析の手段となるらい菌の型別法の開発とその疫学解析への応用を目指した。メキシコからのらい菌は4型であり、過去のモンゴロイドの移動との関連性が推測された。TTC繰り返し配列の多型による型別は感染経路追求に有用であることが示され、インドネシアの流行地域の、同一家族以内から異なる型のらい菌が検出され、家族内接触感染以外の感染経路の存在が示唆された。

ハンセン病の病型形成機構を解析した結果、1) IL-12RB1遺伝子上のSNPsは、ハンセン病の疾患感受性を規定するものではないこと、2) IL-12RB2遺伝子上のSNPsはIL-12RB1遺伝子のそれより、その頻度は少なく、IL-12に対するT細胞のIFN-gamma産生性に関与しないことが示唆された。膜を構成するリン脂質の合成酵素に着目し、抗酸菌での役割を検討した。ホスファチジルセリン合成酵素PSS遺伝子が菌の生存に重要な役割を持っていることを示唆された。ハンセン病政策の検証のために16項目について検討し、過去のハンセン病政策の問題点を明らかにすることとした。

薬剤に対する感受性を始めこれらの知見のいくつかは医療の現場に直ちに貢献できるものであり、ハンセン病対策に有用な成果と考えられる。

分担研究者名

尾崎元昭 兵庫県立尼崎病院
皮膚科部長

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

牧野正彦 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター
部長

儀同政一 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター
室長

後藤正道 鹿児島大学医学部
病理学第2講座
助教授

遠藤真澄 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター
主任研究員

畑野研太郎 国立療養所邑久光明園
副園長

岩田 誠 東京女子医科大学
脳神経センター
センター長

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

長尾栄治 国立療養所大島青松園
副園長

石井則久 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター
部長

大山秀樹 埼玉医科大学医学部
免疫学講座
講師

前田伸司 大阪市立大学大学院
医学研究科 感染防御学分野

助手

酒井シヅ 順天堂大学医学部 医史学
教授

A. 研究目的

国内のハンセン病は年間の新規症例は20例以下で推移しているものの、後遺症、難治例あるいは再発がハンセン病対策上問題となっている。また新規症例の半数以上が在日外国人に見出されていること、世界ではWHOの努力にもかかわらず、年間約70万の新患発生があり、それらのうちでも有病率の高い国々からの在日外国人に新規の症例が見出されていることなどから、国外のハンセン病対策と連携した対策が必要となっている。

本研究においては治療戦略に関する研究、末梢神経機能障害に関する研究、分子疫学とハンセン病発生動向調査ならびにシステムの構築、ハンセン病の病態およびらい菌に関する研究を行うことにより、国のハンセン病対策上解決が急がれるこれらの問題の解決を図り、国のハンセン病に対する施策に貢献することを目的とする。またハンセン病違憲国家賠償訴訟判決の結果、実施することとなったハンセン病対策の歴史的検証と将来の対策に関する研究も加えられ、今後の国の行政の施策決定に参考となるよう実施された。

具体的研究課題として、薬剤耐性菌の調査、治療方法の改善、末梢神経障害、機能障害の解明、ハンセン病対策構築に必要な基本データ収集、ハンセン病およびらい菌に関する基礎的研究、過去のハンセン病政策の歴史的検証などの検討を行った。

B. 研究方法

ハンセン病の難治例、再発に対する治療法の確立のために国内のハンセン病医

療を行っている施設より菌陽性活動性多菌型症例を登録し、これまでに其の変異が薬剤耐性を引き起こすことが明らかになっている *folP*、*rpoB*、*gyrA* 遺伝子中の変異の検出により治療薬(DDS、リファンピシン、ニューキノロン)に対する感受性を検査した。病歴と照合し薬剤耐性の発生要因の解明を試みた。治療判定基準案を策定し、日本ハンセン病学会に提示し基準案を完成させる作業を進めた。

*folP*遺伝子変異と薬剤耐性との因果関係を明確にするために *folP*遺伝子欠損大腸菌を用いて検討した。ヌードマウス足跡より得られたらい菌からDNAを得た。らい菌 *folP*遺伝子をPCR増幅により増幅した。大腸菌よりらい菌により近縁な *M. smegmatis*を用いた系での試験を可能にするために、*folP*欠損 *M. smegmatis*株の作製を試みた。PCR産物の塩基配列は BigDye Terminator Cycle Sequencingキット (Applied Biosystems製)を用いて決定し、DNASISコンピュータソフトウェア(日立ソフトウェアエンジニアリング製)を用いて解析した。ダブソン感受性試験には、*folP* 遺伝子欠損大腸菌 C600 \square *folP*: \square Km \square を用い、らい菌 *folP*プラスミドで形質転換することにより行った。大腸菌 C600 \square *folP*: \square Km \square 、およびその形質転換菌株の培養には2X YT培地を用い、ダブソン感受性試験には1mM IPTG、10 \square g/ml カナマイシン、および50 \square g/mlアンピシリンを含む Mueller Hinton (MH) 培地を用いた。

治療期間の短縮と薬剤耐性に対応するためリファマイシン系薬剤であるRifalazile (KRM-1648)、フルオロキノロン系薬剤であるWQ-3345、WQ-3402、ケトライド (Ketolid) HMR -3647の抗らい菌活性を *in*

*vitro*法であるBuddemeyer法で検討した。らい菌(Thai-53) : BALB/cヌードマウス足跡より集菌・精製し、Shepard法により菌数計算後所定の濃度に希釈し実験に用いた。抗菌薬 : Rifarazile (KRM-1648, 鐘淵化学)、WQ-3345 \cdot WQ-3402 (湧永製薬)、HMR-3647 (Aventis Pharm)、SPFX (大日本製薬)、GFLX (杏林製薬)、LVFX (第一製薬)、CAM (大正製薬)、RXM (Aventis Pharm)、AZM (ファイザー製薬) は、各製薬会社から原末の提供を受けた。RFP (和光純薬) は、市販品を用いた。

各薬剤の抗らい菌効果をBuddemeyer法により測定した。Rifarazileの抗らい菌活性はRFPと、WQ-3345、WQ-3402の抗らい菌活性はLVFX、SPFX、GFLX、RFP、HMR-3647の抗らい菌活性はCAM、RXM、AZM、RFP、SPFXとそれぞれ比較検討した。

T細胞活性化を誘導する抗原性分子を探索する目的で菌を細胞壁・細胞膜・細胞質に分画し、その抗原性を解析した。正常健常者末梢単球を得て、リコンビナントGM-CSFおよびIL-4を用いて樹状細胞(DC)を分化誘導した。らい菌(Thai 53株)はビーズビーダーと超遠心機を用いて、細胞壁・細胞膜・細胞質分画に精製した。菌分画成分をパルスしたDCの抗原提示能は、自己T細胞の活性化誘導能で解析した。細胞表面抗原の解析にはFACScaliburを用い、DCにより刺激されたCD8陽性T細胞のper-forin産生能はT細胞膜をpermealizeして細胞内perforinをFACScaliburを用いて検索した。DCから産生されたIL-12 p70、T細胞から産生されるIFN- γ はELISA法をにてアッセイキットを用いて定量化した。

Silent Neuropathyの発症機序を解明する

ために、対照9例、治癒状態のハンセン病T型16例とL型33例の剖検例の下腹正中部の皮膚切片に、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。その後ヘマトキシリン染色をおこなった。さらに、PGP9.5免疫染色標本の真皮上層0.6x0.9mmの範囲のPGP9.5陽性部位の面積の計測を画像解析によって行うことで、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。

アポトーシスを誘導した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検討するために、アポトーシスを誘導したシュワン細胞株、並びにらい菌(Thai53), BCG, *M. avium*を感染させたシュワン細胞株より、経時的に定法に従い全RNAを分離し、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。アポトーシスは、TNF α 、アクチノマイシンド、グリオトキシンの添加、並びに無血清培養により誘導した。またアポトーシスは、細胞の形態学的変化(付着細胞の遊離)、並びにDNAの断片化により確認した。

コントロールの状況をより適正に評価するための指標を見出すべく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、1958年より98年にかけてのハンセン病治療終了者のカル

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。

ハンセン病の末梢神経障害が長期間においてどのような経過をとるかを検討した。対象患者は、1978年から1985年にかけて第1回目の詳細な神経内科的診察を受けたハンセン病患者58例中、追跡調査にて第1回目と同じ医師(本分担研究者)による第2回目の神経内科的診察を行い得た患者9例である。これらの9例につき、感覚脱失、特に痛覚脱失の範囲、筋力低下、深部感覚障害について、詳細な比較検討を行った。

データベース整備のためのプログラム開発: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に取り込む方法により、すでに昨年度作製済みのExcel fileを扱いやすくするためのプログラム作製について外部に委託した。剖検症例の試行的調査としては化学療法施行後の1970から80年代までの全生園剖検例のうち最長4年間B663の使用例4例とDDS及び他のスルフォン剤並びにRFPのみを用いた同数対照例を検討した。また、上記以外に無作為に末梢神経標本がスライドとして残存しているものについて検討し、その中から循環障害を示す症例の発見に努めた。

日本におけるハンセン病の発生動向を探るために、各種学会発表、論文発表、検査依頼診断結果などをもとに、ハンセン病の新規患者を診療した医師を特定した。診療医に調査用紙を郵送し、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、日本ハンセン病学会新患調査班の班員、全国ハンセン病療養所の園長・所長などにも問い合わせの文書を郵送した。それらを元に、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。

*rpoT*遺伝子多型により分類されるらい菌の地理的分布を明らかにするために、中米におけるらい菌の*rpoT*遺伝子型を検査した。*rpoT*遺伝子中の6塩基繰り返し配列を含む部位をPCRにより増幅し、4% Methaphore agaroseによる泳動の後の移動度によりその繰り返し配列数を比較した。分離株をより細分類可能なTTC繰り返し多型により小集団での分布を明らかにして、感染様式の解析を行うために、疫学解析のための有用性を保存株を用いて検討し、更にインドネシア北マルクの人口約500人、有病率4%の流行地域集落から得た住民の鼻粘膜材料に存在するらい菌のTTC-Rによる遺伝子型別を行い、集落内におけるそれぞれの遺伝子型の分布を調べた。

ハンセン病に対する疾患感受性を規定する免疫遺伝学的要因を明らかにするために、LL型ハンセン病患者であったドナーを10名、TT型ハンセン病患者であったドナーを8名、また健常者7名を被験者とした。LL型ハンセン病患者であったドナーを10名、TT型ハンセン病患者であったドナーを8名、また健常者7名を被験者とした。LL型ハンセン

病患者であったドナーを10名、TT型ハンセン病患者であったドナーを8名、また健常者7名を被験者とした。

全ゲノム DNA は、上述の各被験者から調整した末梢血単核球より、全ゲノム DNA を QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出・精製された。また全 mRNA は、末梢血単核球から T 細胞濃縮画分の刺激後 72 時間の細胞画分を TRIZOL LS を用いて処理することによって回収された。IL-12RB1 遺伝子上に存在する SNPs は、各被験者から調整した全ゲノム DNA を試料とした PCR-RFLP 法を用いることによって検出された。IL-12 存在下における活性化 T 細胞から得た cDNA を試料として、健常被験者 (IFN- γ 産生における高産生性被験者および低産生性被験者を含む) における IL-12RB2 の塩基配列をダイレクト・シーケンス法を用いることによって決定した。得られた塩基配列の解析結果を GenBank, EMBL, DDBJ, および PDB の遺伝子データベースに照合することによって、IL-12RB2 との相同性を調べた。

ホスファチジルセリン合成酵素 (PSS) の抗酸菌での機能や必要性について *Mycobacterium smegmatis* を実験モデルとして検討を行った。らい菌の PSS 遺伝子を用いて *M. smegmatis* データベースに対して相同性検索を行い PSS 遺伝子の DNA 配列に関する情報を得た。*M. smegmatis* mc² 155 ゲノム DNA を鋳型とした PCR 法で遺伝子をクローニングした。pMV261 の *Nde*I と *Pst*I サイトに遺伝子を挿入し、pMV261-PSS ベクターを構築した。PSS 遺伝子の約 2kbp の範囲の DNA を増幅し pGEM-T (プロメガ) に挿入した。次に *Bam*HI サイトにカナマイシン耐性遺伝子を導入し

pGEM-T-PSS/KMベクターを構築した。さらに pGEM-T-PSS/KMの *Sa*II サイトに pPR27の *Sac*B 遺伝子を含む断片を導入し pGEM-T-PSS/KM/*Sac*Bベクターを構築した。*M. smegmatis*をグリセロールで処理して作製したコンピテントセルにエレクトロポレーション法でベクターを導入しカナマイシンを含んだLB寒天培地で3日間37℃で培養した。液体培地での培養した菌体をクロロホルム/メタノール=(2:1)の溶媒に懸濁し、超音波で破砕し、少量の水を加えて有機層を洗い有機層可溶成分を抽出した。薄層クロマトグラフィ(TLC)の二次展開を行い含まれるリン脂質を分析した。

ハンセン病問題の真相を歴史的に、客観的に、科学的に究明し、将来の対策の検討を行うためにらい予防法の制定と後に廃止に至るまでの経過や、強制隔離等に関する歴史的事実の究明に加え、それをとりまく歴史的環境、関連事項、同種の差別問題の日本的対応などの事実関係を同時に明らかにすることとした。そのため、研究者と患者等が集まり、医学、疫学、歴史学、民俗学、法学の各方面から提起すべき課題について検討を行い、それらの課題の中から可能なところ調査を着手した。

(倫理面への配慮)

研究遂行に当たっては倫理面へ充分配慮した上で実施された。検体採取の提供はその目的、意義を説明のうえ、同意が得られた場合にのみなされた。また個人が特定できるデータは必要最低限とし、関係者のみが理解できるものとした。必要に応じ各分担研究者の所属する機関の倫理審査会の許可を得た。動物実験は実験動物の福祉

に注意を払い、法の定めるところおよび所属機関の規定を遵守して行われた。

C. 研究結果

全国の9施設(国立療養所7、大学1、公立病院1)から、41例の薬剤耐性疑いの多菌型活動性患者の登録があり、31例で菌の遺伝子変異検査が実施された。DDS耐性疑いの21例中13例で *foIP* 変異があり、RFPでは16例の疑い例で *rpoB* 変異が11例、OFLXでは3例の疑い例すべてに *gyrA* 変異がみられた。RFP、OFLXの耐性疑いなし各々1、4例はすべて変異を示さなかった。2剤に変異があったのが6例、3剤に変異があったのが2例あり、多剤耐性の発生が裏付けられた。治療指針(2000)による治療終了後の治癒判定、その後のフォローと後遺症の予防や治療についての基準案を日本ハンセン病学会に提示し、討議を経て基準を確定した。

らい菌 *foIP* 遺伝子変異のダブソン耐性に与える影響を調べた結果、*foIP* 遺伝子産物の T53I、または P55L の変異を持つものの最小発育阻害濃度は、野生型の約2倍を示し、また同様に L36M の変異、および D33R または D79R の変異によっても同様にダブソン最小発育阻害濃度は約2倍を示した。また、大腸菌と比較してよりらい菌に近縁な *Mycobacterium smegmatis* を用いた系での試験を可能にするため、*foIP* 欠損 *M. smegmatis* 株の作製を試み、*foIP* 遺伝子欠損株を得るための中間組換体が得られた。

Rifalazil(KRM-1648)は、RFPを凌ぐ強い活性を、WQ-3402は、SPFXを凌ぐ強い活性を、WQ-3345にLVFXより強い活性を

認めた。HMR-3647 は、CAM に及ばないものの AZM より強い活性を認めた。

生らい菌・菌膜・細胞質を同量樹状細胞 DC にパルスすると、菌膜を抗原として用いた場合、より強い CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞の増殖応答が観察された。らい菌細胞膜分画は抗原提示細胞である樹状細胞 (DC) に取り込まれプロセッシングされた後、細胞表面にらい菌由来の抗原を発現した。菌膜をパルスした DC は IL-12 p70 を産生し、この DC によって刺激された CD4 陽性 T 細胞は IFN- γ を、CD8 陽性 T 細胞は IFN- γ およびパーフォリンを産生した。

真皮上層における PGP9.5 陽性面積 (%) は、対照 : 0.20 ± 0.05 、T 型 : 0.11 ± 0.09 、L 型 : 0.08 ± 0.08 であった。ハンセン病では加齢に伴って PGP9.5 陽性面積が減少する傾向が見い出されたが、その減少は L 型に著しく、かつ早期 (60 歳代) から始まることが明らかになった。また、この面積減少は、個々の神経線維の大きさの減少によることが判明した。

ミャンマーではこの半世紀の診断、治療の発展により、診断時のハンセン病による障害度は確実に低下してきている傾向を示した。また、診断時平均年齢が、コントロールの進展に歩調を合わせて上昇してきている傾向が明瞭となった。

Excel file に既に取り込んである日本病理剖検報の記載項目から剖検番号、施設名、都道府県名、等のほか臨床診断、病型、主病診断、副病変等を選択し、加えて臨床記録、投薬記録、保存臓器などの保存場所、保存方法などの項目を加えた。また、それらを Access file で扱うためのプログラムの作製を

外部委託中である。化学療法と後遺症の関係については B663 使用例では過酸化によるらい菌の磷脂質の不溶化のため神経線維障害の程度が軽いことがあきらとなった。循環障害については、上記薬剤不使用例の中に末梢神経の梗塞を示す症例があることを見出した。

MB の約 33% が再発を経験しており、DDS 単独投与者からの再発者は 45.7% であった。近年は RFP や CLF 投与者の再発が出現してきていることが判明した。MDT 施行者 (27 例) からの再発は無かった。

一方、Myanmar とタイでの調査では DDS 単独投与者からの再発者しか発見できなかった。

ハンセン病の新規患者は年間約 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 13 年 (2001 年) については、日本人 5 名 (うち沖縄県出身者 3 名)、在日外国人 7 名 (うちブラジル人 3 名) であった。在日ブラジル人ハンセン病新規患者は 1989 年に 1 名登録され、その後 1996 年の 10 名を最高に、毎年 2~9 名で推移している。1981 年から 2000 年までの新規登録患者は 49 名 (男 41 名、女 8 名) であった。正確な統計が取られた 1993 年から 2000 年まで (男 29 名、女 4 名、計 33 名) では新規外国人患者 (75 名) の 44%、また日本人を含めた新規患者 (131 名) の 25.2% に達している。

中南米から得たらい菌の *rpoT* 遺伝子中の 6 塩基配列の繰り返し数を調べたところ、パラグアイ、ペルーからの株は全て 3 型であったが、メキシコからのらい菌は検査可能であった 2 株とも 4 型であ

った。TTC 配列のコピー数はそれぞれの株ではマウスでの継代を8年以上行っても安定していること示された。インドネシアの流行地域から得たらい菌の TTC 繰り返しの型別とその分布を検討したところ同一家族以内から異なる型のらい菌が検出された。

IL-12RB1 遺伝子上に存在する SNPs の出現頻度は被験者の多くは、A705G (Q214R) の SNP を heterozygous で有した。2 本研究課題において調べた 8 種類の SNPs に関して、各病型群間における出現頻度に有意な差はなかった。exon 10 の上流のイントロン部 (exon 10 の開始点から 121-125 bp 上流) に存在する変異は患者群でのみ検出され、健常者群では検出されなかった。IL-12RB2 遺伝子上に存在する SNPs の検索の結果、2 種類の silent SNPs と 3 種類の coding SNPs を検出した。2 種類の silent SNPs は被験者の IL-12 刺激に対する T 細胞の IFN-gamma 産生性に関わらず高頻度に検出することができた。また、3 種類の coding SNPs を 2 名の被験者から検出した {T1395G (Val252Gly), T1174G (Cys178Trp), G1380A (Arg247Lys)}。しかし、その coding SNPs を有する被験者において、IL-12 刺激に対する T 細胞の IFN-gamma 産生性の特徴を観察するに至らなかった。

ホスファチジルセリン合成酵素 (PSS) を *M. smegmatis* からクローニングして、遺伝子破壊用ベクターを構築し、*M. smegmatis* の PSS 遺伝子破壊株の分離を試みた。得られた 194 株について、PSS 遺伝子の状態を調べると、すべてが 1 回組換え体であった。*SacB* 遺伝子を遺伝子破壊

用ベクターに導入し、2 回組換え体の分離を試みているが、現在までこのような変異株は得られていない。

我が国のハンセン病の特殊性と歴史的問題と研究課題は以下の点であると考えられた。1) ハンセン病患者に対する偏見・差別の日本の特殊性についての研究—歴史的背景、外国との比較検討。2) 日本のハンセン病対策の特殊性とその影響—皇室および宗教とハンセン病対策。3) らい病予防法成立以前の近代ハンセン病対策。4) ハンセン病予防法成立から廃止に至るまでのハンセン病政策の展開と問題。5) 日本におけるハンセン病対策の特殊性を解明—他国との比較検討。6) 日本におけるハンセン病学の利点と問題点—歴史的検証。7) 日本占領下の植民地におけるハンセン病対策の史的調査ならびに現状の調査。8) 全国のハンセン病療養所の調査。9) 日本のハンセン病患者数の動向。10) 日本のハンセン病研究史。11) ハンセン病患者文学の意味するもの。12) ハンセン病政策、疾病観に影響を与えた、あるいは別の見識をもった医学者、作家等の伝記研究。13) ハンセン病知識の啓発運動史—国際比較。14) 諸外国におけるハンセン病対策と政策の比較研究。15) ハンセン病資料・文献蒐集、保存とその方法の検討。16) ハンセン病の正しい知識の普及。

これらの課題中、韓国が日本植民地時代に行ったハンセン病対策及び治療の実態について資料収集と現地調査を行った。また台湾のハンセン病政策に関し、同地のハンセン病対策の歴史と戦後のハンセン病対策の実状を調査した。

D. 考察

昨年に引き続き、薬剤耐性の発生が遺伝子変異検査でも確認された。再燃・難治例では半数以上DDSあるいはリファンピシンに対し、単独あるいは同時耐性を示し、これらの症例に対する治療は有効薬剤の選択に注意しなければならないことが示された。新キノロン系薬剤の使用指針を作成し、今後の耐性発生产防に努めるとともに、新しい治療薬の開発を促進する必要がある。

ダブソンに対する感受性に影響を与える *folP* 遺伝子の変異として、36番のLeu、および33番のGlnまたは79番のGlnの変異がダブソン感受性に影響を与えることが示唆された。らい菌の遺伝子の変異における薬剤感受性への影響を調べるには大腸菌よりらい菌に近縁である菌種を利用することが望ましいと考えられ、迅速発育性抗酸菌である *M. smegmatis* はこの目的に適している。*folP* 遺伝子欠損抗酸菌を利用してらい菌 *folP* 遺伝子変異によるダブソン感受性の変化を調べることは薬剤耐性らい菌の早期診断への応用が可能であり大変重要であると考えられる。またリファンピシンやキノロン剤など標的遺伝子の明らかとなっている他のハンセン病治療薬に関しても、同様の試験系を開発が重要であると考えられる。

ハンセン病の発症を阻止するワクチンはこれまでに確立されておらず、早急な対応が望まれている。らい菌の細胞膜にTh1タイプCD4陽性T細胞・Tc1タイプCD8陽性T細胞の活性化を誘導する分子が存在することが判明した。これらのT細胞サブセットの活性化は、らい菌膜がDCを刺激しIL-12 p70を産生することに関連しているものと考えられた。CD40L存在下で菌膜はDCを介しperforin産生

に至るまでCD8陽性T細胞を活性化したことは意義深い。約50%のドナーにおいて、*in vitro*で菌膜パルスDCによる刺激を受けてCD8陽性T細胞はCTLにまで分化したが、これはドナーのBCGに対する感受性あるいはBCG菌による感作程度を反映している可能性が考えられ、抗酸菌に対するワクチンを考える際に有用な知見と思われる。

Rifalazil (KRM-1648)は、RFPを凌ぐ強い活性を、WQ-3402は、SPFXを凌ぐ強い活性を、WQ-3345にLVFXより強い活性を認めた。HMR-3647は、CAMに及ばないもののAZMより強い活性を認めた。新規4種薬剤は、作用部位である第1標的が相違すると考えられることから耐性患者に対する治療薬としての可能性を示唆した。

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)と呼称されている。この病態についてはいまだに十分に解明されていない。病理学的な手法を用いて、ハンセン病におけるSilent Neuropathyの発症機序を解明することを試みた結果、個々の神経線維の大きさの減少により神経線維の脱落が起こり、T型でも脱落する症例があること、しかしL型のほうが早期からかつ高度に脱落することが明確になった。

らい菌はマクロファージやシュワン細胞内に寄生し、ハンセン病の病態形成に大きく関わってくる。宿主側であるシュワン細胞のらい菌感染に伴う生死は、神経障害の重篤度に直結すると思われる。L型ハンセン病では、末梢神経の変化は節性脱髄が主であり、T型ハンセン病では、シュワン細胞と神経線維は完全に消失、らい菌は認められない。らい菌感染生細胞はL型、ア

ポトース細胞はT型を想定してその遺伝子発現の相違について検討したが、変動を認めたシュワン細胞由来因子の多くは、神経細胞の生存維持・軸索再生に係わる主要なものであり、またシュワン細胞自身も、これらの因子によるautocrine growth controlを受けていることから、これらの因子がハンセン病の神経障害の要因となりうることが示唆される。

ハンセン病の末梢神経障害の長期予後については、詳細な検討が少ない。今回調査では、少なくとも治癒に至ったハンセン病ニューロパチーにおいては、感覚障害の範囲が縮小する可能性のあることが明らかになった。このことは、障害を受けた感覚神経の再生能力が残存していたことを示唆する所見であると言える。ENLによる末梢神経障害は、末梢神経の再生能を高度に傷害するような組織障害を生じると考えられる。

WHOが現在用いている指標では、コントロール努力の結果が反映されていないために、より効率的なコントロールを施行する事を妨げている。Myanmar国ミンゲン地方におけるハンセン病患者のカルテ調査を行い、地域におけるハンセン病流行状況を認識する上で有用な新たな指標の検討をおこなった。新患の障害率と診断年齢を組み合わせる事で、簡単でありながらよりの確に地域の流行状況を表す指標を算出できる可能性があるものと思われる。

日本病理学会刊行の日本病理学会剖検輯報を電子化し、それを基に本疾患の未解決問題解決の手がかりを得るためのDB基盤整備に用いることは可能であることがわかった。DB作製の効果の例証としてB663使用例では末梢神経線維は極めて良く保存され、それ以

外の薬剤に比し組織の線維化と神経線維の強度の脱落を防ぎ、後遺症の原因を除去しやすいと考えられる症例と組織所見が分かった。

一般に、DDS単独服用者からの再発率は30%前後と言われていたが、今回の調査で、現入所者は45%に至っていたことは、予想以上の結果であった。

又、MDT/WHOの服用者が3%に至らないことは、日本において、ハンセン病の治療はWHO方針の恩恵を受けた者がいないことを示している。ミャンマー・タイにおいて、MDTを受けた者からの再発者報告には未だ接していない。むしろ当面の問題は高齢者におけるDDS単独治療者であろう。もう一つの課題は、DDS, Rif, CLFの耐性菌出現の問題である。今後、両面から調査する必要がある、と考える。

らい予防法廃止後、厚生省による新患調査は廃止されたが、ハンセン病の動向調査の継続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。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。在日日系ブラジル人において毎年新規患者として多数登録されていることからブラジル国内の現況を調査し、今後の外国人患者の動向を予測すべきである。ブラジル本国で進められているWHO方式の治療や予防の進捗状況は今後の動向に大きく影響するであろう。新患の全例報告を目標にするためには、皮膚科医、整形外科医、神経内科医などへも働きかけも必要である。在日外国人は新患の約2/3を占めている。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予測をする必要がある。

メキシコより得たらい菌の *rpo7*型は4型であり、南米におけるらい菌の分布とは異なった。これらの地域に分布するらい菌の由来の歴史が異なることが推察された。らい菌の TTC繰り返し多型は同一株では長期継代を経ても変化することが無く、またその多型性の範囲が大きいことから、疫学解析に有用と考えられた。同一住家屋に居住する住民のらい菌TTC型は同一ではなかったことからハンセン病の感染様式は家族内感染主たるものではなく異なる患者から感染を受けることの方が主要な感染であることの可能性が想定された。

IL-12RB1遺伝子上にその存在が報告されている8種類のSNPsを調べた結果、ハンセン病に対する疾患感受性およびIL-12刺激に対するT細胞のIFN- γ 産生性を規定するSNPsを特定できなかった。しかし、exon 10の上流のイントロン部に存在するSNPは患者群でのみ検出された。このSNPは、ハンセン病に対する疾患感受性マーカーとなり得るものかもしれない。IL-12RB2遺伝子の多型性を、IL-12刺激に対するT細胞のIFN- γ 産生性の個体間差との関連性に着目して調べた。その結果、2種類のsilent SNPsと3種類のcoding SNPsを検出したが、IL-12刺激に対するT細胞のIFN- γ 産生性に与える影響を観察するに至らなかった。

*M. smegmatis*の形質転換を行い相同組換えを起こし、スクロースとカナマイシン存在下で培養して得られる株は、PSS遺伝子が破壊された変異株が未だに得られないということはこのPSS遺伝子が抗酸菌の増殖に重要な働きをしていることが示唆している。このような抗酸菌で生存に関与する酵素遺伝子を検索することによって、今まで用いられ

ている抗微生物薬とは異なる作用機序の薬物開発につながる可能性がある。

本邦における近代的なハンセン病対策が始まった時期は、我が国の政治体制が中央集権化して、同時に急激に西洋化、近代化が進められた時に一致した。その結果、ハンセン病患者の社会的地位も激変した。なぜ、日本のハンセン病対策が他国に比べて特殊性を帯びて始まったかについて明らかにするための問題提起を行った。これらを科学的に研究することで、ハンセン病の法制定過程、実施においての過ち等の諸問題について真相究明に近づくことを目指す。

今後、得られた知見を共有し、統合を図り、ハンセン病対策に生かすことが必要と考えられる。

E. 結論

治療戦略に関する研究：1. 薬剤耐性について臨床的診断基準の検討、遺伝子変異検査の検査体制整備、化学療法の改良を進める必要がある。2. らい菌DHP5のT53I、およびP55Lの変異以外にも、L36M、およびD33RまたはD79Rの変異により、ダブソン感受性が影響を受けることわかった。また、らい菌遺伝子変異の薬剤感受性への影響を試験するために *M. smegmatis*の *folP*遺伝子欠損株の作製を試み、中間組換体を得た。3. 抗酸菌菌膜には、樹状細胞よりIL-12 p70を産生しTh1タイプCD4陽性T細胞およびTc1タイプCD8陽性T細胞を活性化する抗原性分子が複数含まれていた。4. Rifalazil (KRM-1648)は、RFPを凌ぐ強い活性を、WQ-3402は、SPFXを凌ぐ強い活性を、WQ-3345にLVFXより強い活性を認めた。HMR-3647は、CAMに及ばないもののAZMより強い活性を認めた。

末梢神経機能障害に関する研究：1. L型治癒例に多く見られる Silent Neuropathy の発症には、皮膚神経線維の径の減少を伴う脱落が関与していることが、病理組織学的に明らかになった。2. アポトーシスを誘導した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検討した結果、らい菌感染シュワン細胞(生細胞)のこれら因子の発現動向とは、異なることを見いだした。3. ハンセン病の治癒患者では、感覚障害の範囲は縮小する可能性があるが、筋萎縮、筋力低下の回復はほとんど見られない。ENL を繰り返す場合には、ENL 生じた領域における感覚障害の範囲は、次第に拡大する傾向がある。4. 診断時障害度数平均と年齢平均から、地域のハンセン病流行度をあらわす簡便な指標をつくる可能性が存在する。ハンセン病有病率の高さに悩む途上国の現状からかんがみても、今後、この点について検討を深める必要がある。

分子疫学とハンセン病発生病動向調査ならびにシステムの構築：1. 長期間に蓄えられた剖検例を無意味にすることなくそのDB化により現在も解決されていない後遺症のメカニズムを明らかに出来る形にし、これを今後内外の本疾患対策に生かせる形にする事は関係者の責務と考えられる。2. DDS単独治療者は菌陰性化後も長期間にわたって、再発の安全圏に到達できないことが判明した。一方、RFPやCLFの投与を受けた者の再発率は2-4%までであり、菌陰性化後15年を過ぎると安全圏に入ることが推測できた。WHOレジメンによるMDT投与を行って再発を予防することは日本において困難である。3. 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歳以上であり、例外的に沖縄県出身患者では若年発症することがある。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。5. メキシコ合衆国に分布するらい菌は日本、韓国と同様に4型が多いことが明かとなった。ハンセン病流行地域の住民の鼻粘膜上に存在するらい菌のTTC繰り返し配列は広い多型性を示した。同一家族でも異なる遺伝子型のらい菌を有することが明かとなった。

ハンセン病の病態およびらい菌に関する研究：1. IL-12RB1およびIL-12RB2遺伝子の多型性がハンセン病の病型およびIL-12刺激に対するT細胞のIFN-gamma産生性の違いに与える影響を調べた。その結果、1) 現在までに報告のあるIL-12RB1遺伝子上のSNPsは、ハンセン病の疾患感受性を規定するものではないこと、2) IL-12RB2遺伝子上のSNPsはIL-12RB1遺伝子のそれより、その頻度は少なく、IL-12に対するT細胞のIFN-gamma産生性に関与しないことが示唆された。2. らい菌でのPSSの機能を明らかにするために*M. smegmatis*をモデルとして遺伝子破壊株の作製を行った。遺伝子破壊用ベクターで相同組換え体を分離したところ1回組換え体しか得られなかった。ネガティブスクリーニング法で2回組換え体の分離を試みたが、現在までこのような株は得られていない。このことは、PSSは抗酸菌の増殖に必要な酵素であることを示唆している。

ハンセン病政策の歴史的検証：真相究明のために、いかなる課題があるか、医学、法学、歴史、民俗学、公衆衛生学、患者の各方面からの研究者が集まり、検討を行い

16課題を指摘した。本年度着手した課題は日本の統治下にあった朝鮮、台湾におけるハンセン病対策についての歴史的調査、現状調査であった。台湾では1930年に総督府が本格的なハンセン病対策を始めたが、現在、台湾で唯一のらい療養所である省立楽生療養院はそれを継承したものである。台湾ではハンセン病患者の数は少なく、政府ならびに一般人のハンセン病に対する関心はきわめて低い。楽生院の予算は国立療養所の中では最低であり、ハンセン病者は最低水準に近い生活に甘んじている。

本年度はまた、ハンセン病関係年表の作成、厚生労働省保管の資料調査・収集に着手した。

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

薬剤耐性菌による難治例ならびに再発に対する治療戦略に関する研究

分担研究者 尾崎元昭 兵庫県立尼崎病院皮膚科 部長

研究要旨 国内の薬剤耐性が疑われる多菌型ハンセン病症例のらい菌遺伝子変異検査を進め、その結果を解析した。多剤耐性の症例がこの検査法で確認された。治癒基準案の日本ハンセン病学会での検討が終了し、承認されたので治療指針（2000）に順じて近く報告する。今後のハンセン病医療を担う医療従事者のための育成セミナーを開催した。

A. 研究目的

薬剤耐性疑い例で菌の遺伝子変異を調査し、耐性発生状況を明らかにして今後の化学療法の指針とし、多剤併用療法改良の基礎資料とする。一般医療施設でのハンセン病診療のために、治療指針（2000）に基づいて治療した例の治癒基準を新たに設定し、治癒後のフォローと後遺症・合併症のケアについての指針を明らかにする。

B. 研究方法

まだ菌陽性で活動性の多菌型ハンセン病の症例を登録し、皮膚組織液ないし生検組織からの菌の遺伝子変異検査を実施した。その結果を治療歴、臨床経過と照合し、薬剤耐性の発生要因を検討した。調査に際しては、患者のプライバシーを尊重し、調査結果から個人が特定されないよう、また個人情報流出しないよう注意した。治癒判定基準案を作成し、日本ハンセン病学会に提示して基準を完成

する作業を進めた。

C. 研究結果

全国の9施設（国立療養所7、大学1、公立病院1）から、41例の薬剤耐性疑いの多菌型活動性患者の登録があり、31例で菌の遺伝子変異検査が実施された。DDS耐性疑いの21例中13例でfolP変異があり、RFPでは16例の疑い例でrpoB変異が11例、OFLXでは3例の疑い例すべてにgyrA変異がみられた。RFP、OFLXの耐性疑いなし各々1、4例はすべて変異を示さなかった。2剤に変異があったのが6例、3剤に変異があったのが2例あり、多剤耐性の発生が裏付けられた。

治療指針（2000）による治療終了後の治癒判定、その後のフォローと後遺症の予防や治療についての基準案を日本ハンセン病学会に提示し、討議を経て基準を確定した。治療指針に準じて学会誌に発表の予定である。

治癒判定基準案を検討する班会議に合

わせて、ハンセン病医療に携わる医師、看護婦のためのセミナーを開催し、再発例の治療その他の課題について研究発表や討議を行なった。

D. 考察

薬剤耐性の検査を実施した 31 例中 9 例が判定不能で、検査に必要な菌量、PCR 増幅、シーケンシングなどにまだ検討の余地があると考えられる。今後の再発例、新患に菌の遺伝子変異検査を積極的に行い、化学療法の指標としていくためにはさらに検査法の改善と検査体制の充実をはかることが望まれる。

多剤耐性の発生が遺伝子変異検査でも確認された。新キノロン系薬剤の使用指針を作成し、今後の耐性発生予防に努めるとともに、新しい治療薬の開発を促進する必要がある。

E. 結論

薬剤耐性について臨床的診断基準の検討、遺伝子変異検査の検査体制整備、化学療法の改良を進める必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1)並里まさ子、後藤正道、儀同政一、細川篤、杉田泰之、石井則久、長尾榮治、尾崎元昭：ハンセン病治癒判定基準。日本ハンセン病学会誌（投稿準備中）。

2. 学会発表

(1)並里まさ子、松岡正典、柏原嘉子、小松彦太郎、小川秀興：ハンセン病における薬剤耐性。第 100 回日本皮膚科学会。2001 年 4 月。

(2)尾崎元昭、松岡正典、中田登、甲斐雅規、柏原嘉子、儀同政一、並里まさ子、野上玲子、江川勝士、柳橋次雄、青木美憲、熊野公子、野元三治、細川篤：臨床的薬剤耐性疑い例のらい菌遺伝子変異検査。第 75 回日本ハンセン病学会。2002 年 5 月。（発表予定）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

薬剤耐性らい菌の検出に関する研究

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 *folP* 遺伝子の変異によってハンセン病治療薬ダブソンに対する耐性が引き起こされると考えられているが、らい菌臨床分離株の *folP* 遺伝子には耐性への関与が明らかでない変異が多数検出されている。そこで変異と薬剤耐性との関係を明確にするため、*folP* 遺伝子欠損大腸菌を用いて、らい菌 *folP* 遺伝子変異のダブソン耐性に与える影響を調べた結果、*folP* 遺伝子産物の T53I、または P55L の変異を持つものの最小発育阻害濃度は、野生型の約 2 倍を示し、また同様に L36M の変異、および D33R または D79R の変異によっても同様にダブソン最小発育阻害濃度は約 2 倍をしめした。また、大腸菌と比較してよりらい菌に近縁な *Mycobacterium smegmatis* を用いた系での試験を可能にするため、*folP* 欠損 *M. smegmatis* 株の作製を試み、*folP* 遺伝子欠損株を得るための中間組換体を得た。

A. 研究目的

多剤併用化学療法による治療以前は、多くのハンセン病患者に対しダブソン単剤による治療が行われてきた。そのため、近年ダブソン耐性らい菌が報告されるようになりハンセン病制圧にとって問題となっている。らい菌は人工培地での培養が成功していないことから、薬剤感受性試験はマウスを用いる試験あるいは放射性標識バルミチン酸の代謝阻害の測定により行われるが、これらの試験は結果を得るまでに長い時間を要するため、より迅速で簡便な試験法の開発が望まれている。一方、遺伝子変異の検出による診断は迅速に行うことができるが、変異と薬剤耐性との因果関係を明確にすることが重要である。ダブソン耐性らい菌の *folP* 遺伝子に変異が認められることが

最近報告されたが、これらの変異とダブソン耐性との関係を *folP* 遺伝子欠損大腸菌を用いて検討し、さらに適した試験系の開発のため、*M. smegmatis* の *folP* 遺伝子破壊株の作製を試みた。

B. 研究方法

ヌードマウス足蹠より得られたらい菌を部分精製し、凍結と沸騰を繰り返すことにより DNA を得た。らい菌 *folP* 遺伝子の PCR 増幅には以下の DNA プライマーを使用した。(ML*folP*1: 5' GCTCTAGACACCTGTGCATGGCAATGCG 3', ML*folP*2: 5' GCGAATTTCGTAGACACCGTGTCTCGTCC A 3', ML*folP*3: 5' CCGGAATTCCTGA GTTTGGCG 3', ML*folP*4: 5' GCGGGATCCGTCAGCCATCACATC 3') *M.*