

velopments in Immunology 4: 361-379, 2002.

31) 前田伸司、小林和夫: 医学細菌の分類・命名の情報、12. 病原性抗酸菌の新種。感染症学雑誌, 76: 413-415, 2002.

1. 学会発表

1) 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、野本三治、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

2) 野上玲子、若杉正司: ハンセン病のrelapse 17例の検討。第101回日本皮膚科学会総会。2002年6月

3) Namisato M., Matsubayashi M., Higashi M., Ozaki M., Matsuoka M., Kashiwabara Y., Oawa H.: Drug resistance in the treatment of leprosy-study in the relapsed cases found in Japan. The 16th International Leprosy Congress. Brazil, August, 2002

4) Matsuoka M., Kashiwabara Y., Ozaki M., Maeda S.: Drug resistant Mycobacterium leprae from relapse or intractable leprosy case. The 16th International Leprosy Congress. Brazil, August, 2002

5) 前田伸司、松岡正典、中田登、甲斐雅規、前田百美、橋本研、小林和夫、柏原嘉子: ハンセン病における薬剤耐性検査法の確立。第75回日本細菌学会総会、2002年

6) 鈴木幸一、武下文彦、中田登、川津邦雄、松岡正典、石井則久、牧野正彦: ファゴゾーム・ライソゾーム融合阻止に関わる因子TACOの宿主細胞内らい菌潜伏における役割。第75回日本ハンセン病学

会総会、2002年5月

7) 松岡正典、前田伸司、中田登、甲斐雅規、柏原嘉子: インドネシアおよびフィリピンのらい菌の薬剤耐性。第75回日本ハンセン病学会総会、2002年5月

8) 鈴木幸一、前田百美、中田登、松岡正典、牧野正彦: DNAマイクロアレイを用いたらい菌感染細胞の遺伝子発現プロファイリング。第75回日本ハンセン病学会総会、2002年5月

9) 中田登、Khairul A. Hahim、甲斐雅規、鈴木幸一、柏原嘉子、前田伸司、牧野正彦: 大腸菌-抗酸菌シャトルコスミドを用いたらい菌ゲノムDNAバンクの作製と遺伝子解析。第75回日本ハンセン病学会総会、2002年5月

10) 甲斐雅規、中田登、Patrick J. Brennan、牧野正彦: らい菌ゲノム上に存在する2成分制御系(ML2439-ML2440)の発現と機能解析。第75回日本ハンセン病学会総会、2002年5月

11) Nakata N., Hashim K. A., Kai M., Suzuki K., Matsuoka M., Maeda S., Kashiwabara Y. and Makino M.: Construction and analyses of a shuttle cosmid library of *Mycobacterium leprae* (Thai 53). 37th US-Japan Tuberculosis -Leprosy research conference. Aug. 2002

12) 儀同政一: WQ-3345, WQ-3402の抗らい菌活性。第75回日本ハンセン病学会総会。Jpn.J. Lep. 71:162(2002).

13) 牧野正彦、前田百美、儀同政一: 第75回日本ハンセン病学会。らい菌菌膜の細胞性免疫誘導能の検討、Jpn, J, Lep, 71:156 (2002).

14) 山崎利雄、松岡正典、儀同政一:

- osy sanatoria. 37th US-Japan Tuberculosis and leprosy research conference. Kyoto, 2002
- 29) M. Goto, S. Kitajima, M. Nomoto, S. Yonezawa, Eiichi Sato: Pathogenesis of silent neuropathy: analysis of PGP9.5 positive dermal nerve in the skin of cured leprosy patients. 26th International Congress of the International Academy of Pathology, Amsterdam, 2002 (*Histopathology* 41(suppl. 1):124, 2002)
- 30) 遠藤真澄: シュワン細胞における抗酸菌感染による神経栄養因子・サイトカインの発現、第25回日本神経科学大会、東京
- 31) M. Endoh: Studies of the peripheral nerve regeneration in leprosy patients. 3rd Asian Pacific Symposium on Neural Australia, 3rd.5th December 2002
- 32) 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43回日本神経学会総2002年5月札幌
- 33) 佐々木彰一, 割田 仁, 阿部康二, 岩田誠. 変異 SOD1(G93A)トランスジェニックマウスの脊髄における iNOS と nitrotyrosine の免疫活性. 第43回日本神経学会 総会 2002年5月 札幌
- 34) 徳永千春、新井春枝、小林米幸、石井則久: 背部に大きな局面を形成したハンセン病の1例. 日本皮膚科学会第772回東京地方会, 伊勢原, 2002年4月.
- 35) 石井則久、小原安喜子、熊野公子、杉田泰之、並里まさ子、野上玲子、細川篤、牧野正直: 2001年のハンセン病新患発生状況. 第75回日本ハンセン病学会総会, 三島, 2002年5月.
- 36) 鈴木陽子、戸倉新樹、瀧川雅浩、石井則久: 多菌型ハンセン病の1例. 第75回日本ハンセン病学会総会, 三島, 2002年5月.
- 37) 松尾英一、石井則久、川津邦雄、儀同政一、與儀ヤス子: ハンセン病剖検例の data base 化について. 第75回日本ハンセン病学会総会, 三島, 2002年5月.
- 38) 石井則久: 細菌感染症と環境因子. シンポジウム「環境と皮膚疾患」. 第66回日本皮膚科学会東部支部総会, つくば, 2002年10月.
- 39) 石井則久: 世界のハンセン病の現状. シンポジウム「世界のハンセン病の現状」. 第43回日本熱帯医学会総会, 高知, 2002年11月.
- 40) 牧野正彦、前田百美、儀同政一、石井則久: 抗ハンセン病ワクチン候補分子検索のためのらい菌分画の細胞性免疫応答誘導能の検討. 第32回日本免疫学会総会, 東京, 2002年12月.
- 41) Matsuoka M., Kashiwabara Y., Legua P., Wiens C. and Fafutis M.: Genomic diversity in *rpoT* gene of *Mycobacterium leprae* and geographic distribution in Latin America. 16th International leprosy congress. Salvador, Brazil, August 2002
- 42) Matsuoka M.: Genomic diversity of *Mycobacterium leprae rpoT* gene and geographical distribution. Workshop of molecular biology 16th International leprosy congress. Salvador, Brazil, August 2002
- 43) Matsuoka M., Kashiwabara Y., Ozaki

- 生物発光法による薬剤感受性試験法のらい菌への適用. 第75回日本ハンセン病学会総会. Jpn, J, lep, 71:161(2002).
- 15) Maeda Y., Gidoh M. and Makino M., Dendritic cell-mediated production of IL-12 and IFN- γ by *Mycobacterium leprae* derived cell membrane. International 16th Leprosy Congress, Brazil, 2002
- 16) 前田百美, 柏原嘉子, 牧野正彦. らい菌のリボ蛋白をコードする遺伝子の発現とその機能的役割. 第75回日本細菌学会総会2002年4月 横浜
- 17) 牧野正彦, 前田百美, 松岡正典. らい菌と正常健康者末梢単球由来樹状細胞の相互作用. 第75回日本細菌学会総会 2002年4月横浜
- 18) 前田百美, 鈴木幸一, 川津邦雄, 牧野正彦. らい菌のリボ蛋白の発現とその生理的役割. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 19) 武下文彦, 向井 徹, 牧野正彦. らい菌Fibronectin Attachment Proteinの免疫原性およびその宿主細胞侵入抑制効果. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 20) 向井 徹, 武下文彦, 牧野正彦. 経鼻腔粘膜ワクチンの開発. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 21) Makino, M., and Y. Maeda. Dendritic cell-mediated production of IL-12 and IFN- α by *Mycobacterium leprae*-derived cell membrane. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 37th Tuberculoid and Leprosy Research Conference, Kyoto, August 21-23, 2002.
- 22) Maeda, Y., Y. Kashiwabara, K. Suzuki, D. C. Crick, P. J. Brennan, and M. Makino. Characterization of *Mycobacterium leprae* 33 kD lipoprotein and its immunological significance. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 37th Tuberculoid and Leprosy Research Conference, Kyoto, August 21-23, 2002.
- 23) Makino M. Monocyte-derived dendritic cell-mediated antigenicity of *M. leprae* subcellular fractions. Pre workshop, 16th International Leprosy Congress, 4-9 August, 2002, Salvador, Bahia, Brasil.
- 24) Maeda M., M. Gidoh, N. Ishii, and M. Makino. Dendritic cell-mediated production of IL-12 and IFN- α by *Mycobacterium leprae*-derived cell membrane. 16th International Leprosy Congress, 4-9 August, 2002, Salvador, Bahia, Brasil.
- 25) Maeda Y., M. Makino, D. C. Crick, Y. Kashiwabara, and P. J. Brennan. A novel 33 KD Lipoprotein Antigen from *Mycobacterium leprae*. 16th International Leprosy Congress, 4-9 August, 2002, Salvador, Bahia, Brasil.
- 26) 後藤正道: 太平洋の島々におけるハンセン病. 第26回日本熱帯医学会九州支部大会. シンポジウム「南太平洋島嶼の諸問題」、鹿児島, 2002
- 27) 後藤正道: ハンセン病における末梢・中枢神経病変. 第7回神経感染症研究会 国際シンポジウム「神経系新興・再興感染症」、東京, 2002
- 28) S. Kitajima, M. Goto, M. Nomoto, C. Taki: Cured tuberculoid leprosy patients live longer than lepromatous patients in Japanese lepr

M, and Maeda S.: Distribution of the drug resistant *Mycobacterium leprae* in Japan and Southeast Asian countries.

37th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference. Kyoto, August, 2002

44) Fukutomi Y., Toratani S., Kimura H. and Matsuoka M.: Requirement of cyclooxygenases in the induction of IL-10 production in *Mycobacterium leprae*-stimulated macrophages. 37th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference. Kyoto, August, 2002

45) 福富康夫、松岡正典:らい菌貧食マクロファージのIL-10産生調節機構の解析。第75回日本細菌学会総会、横浜市 2002年4月

46) 天児和暢、高出明美、梅田昭子、松岡正典、吉田真一、中村昌弘:らい菌は増殖時に頻繁に自然細胞死を起こしている。第75回日本細菌学会総会、横浜市 2002年4月

47) 松岡正典:ハンセン病の国際協力における基礎研究の役割とそのあり方。第75回日本ハンセン病学会総会 シンポジウム、三島、2002年5月

48) 福富康夫、虎谷聡、松岡正典:らい菌マクロファージにおけるIL-10産生機構。第75回日本ハンセン病学会総会、三島、2002年5月

49) Ohyama H., Yamada H, Takeuchi K et al. A study on the polymorphism of IL-12R gene in patients with leprosy. 37th US-Japan Cooperative Medical Science Program Tuberculosis-Leprosy Research Conference, 36th US-Japan Confer

ence on Tuberculosis/Leprosy, 36-40, 2002

50) 中 崇、藤原永年、前田伸司、矢野郁也、南野実紀、池田紀和、加藤敬香、小林和夫: *Sphingobacterium spiritivorum*から分離された新規スフィンゴリン脂質。第75回日本細菌学会総会、横浜、2002年4月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（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 治療指針（2000）に基づく化学療法を終了した例の治療基準を日本ハンセン病学会誌に公示し、治療終了後のフォローについて注意を促した。国内の薬剤耐性症例の解析結果を学会で報告した。オフロキサシンへの耐性例がすでに出ているので、ニューキノロン剤の使用指針を審議した。近く治療指針、治療基準に準じて報告の予定である。

A. 研究目的

化学療法を終了した患者の取り扱いについて、化学療法終了イコール治癒とする WHO の指針には疑問があるため、コンセンサスの得られる治療判定基準を定めることを目的とする。さらに薬剤耐性例の増加、とくにオフロキサシン（OFLX）耐性例の出現が明らかになったため、ニューキノロン剤の使用指針を設けて今後の耐性例発生の予防と再発例の治療のガイドラインとすることを検討する。

B. 研究方法

従来の臨床的治療判定基準、WHO/MDT の治療判定基準を検討し、現在の治療指針（2000）終了後のどの時点で治癒と判断するのが妥当かを小委員会で討議する。その結果を治療判定基準案としてまとめ、日本ハンセン病学会の会員に提示して賛意を得られたら、わが国

の治療判定基準として学会誌に公示する。

ニューキノロン剤のらい菌への作用機序を最近の研究成果から見直し、耐性発生の予防と再発例治療のための使用指針を作成する目的で、作業グループを編成した。その討議により、ニューキノロン剤の使用状況の問題点を明らかにし、今後の化学療法における使用指針を提示する。

C. 研究結果

2000年にこの研究班でまとめた治療指針の化学療法が終了した時点で、治療と判定するのが適切との結論に達した。治療判定の基準と患者への告知、告知の際に注意すべき事項、その後のフォローの必要性などを治療判定基準としてまとめた。この基準を日本ハンセン病学会に提示し、会員の賛意を得て学会誌に公示した。

ニューキノロン剤の使用指針の作業グ

ループは、らい菌の標的酵素はトポイソメラーゼよりジャイレースが主になることから、後者に選択性の強いニューキノロン剤をハンセン病治療に使用する必要があるとの結論に達した。これに基づいてニューキノロン剤の使用指針案を作成した。この案はさらに広く専門医の検討にかけた上で、2003年中に日本ハンセン病学会誌に掲載の予定である。

D. 考察

最近の新発生患者の多くは一般病院の皮膚科で診断され、治療されている。ふつうハンセン病専門医ないし専門施設に連絡があるので、「治療指針（2000）」によって診療を進めるよう助言し、診療に協力している。今回明らかにした「治癒判定基準」は治癒の概念を明確にし、化学療法を終了したあとの診療について、治療者にも患者にもはっきりした指針を与えるものとなっている。ハンセン病は治癒後も後遺症や合併症に注意をはらう必要があり、フォローにあたる一般の医師にこれを認識してもらうことも、この治癒判定基準作成のねらいの一つである。

まだ治癒していない、活動性患者の薬剤耐性検査から、スルホン剤やリファンピシンへの耐性が増加し、オフロキサシン（OFLX）への耐性も生じた多剤耐性患者がすでに現れていることが明らかになった。これは OFLX の使用法に問題があるだけでなく、OFLX 自体の抗菌作用にも関連している。らい菌の主な標的酵素であるジャイレースに対しては、広く用いられている OFLX より、ガチフロキサ

シン（GFLX）やスバルフロキサシン（SPFX）の方が選択性が強く、臨床効果も優ると考えられる。

OFLX の適正な使用を進めるとともに、GFLX と SPLFX の使用には耐性発生を考慮した規制を行なうことが必要となる。この研究班で作成したニューキノロン剤の使用指針を徹底させ、治療指針を改定していくことが今後の課題となる。

E. 結論

専門施設および一般医療施設でのハンセン病診療のために、治療指針（2000）による治療終了後の治癒判定とフォローを示す治癒判定基準を明らかにした。まだ活動性の患者に薬剤耐性が多いので、濫用されるニューキノロン剤の使用指針を提示した。

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、屋崎元昭：ハンセン病治癒判定基準。日本ハンセン病学会誌. 71:235-238、2002

2. 学会発表

1)屋崎元昭、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、野本三治、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

2) 野上玲子、若杉正司：ハンセン病の
relapse 17 例の検討. 第 101 回日本皮膚
科学会総会. 2002 年 6 月

3) Namisato M., Matsubayashi M., Higashi
M., Ozaki M., Matsuoka M., Kashiwabara Y.,
Oawa H.: Drug resistance in the treatment of
leprosy-study in the relapsed cases found in
Japan. The 16th International Leprosy

Congress. Brazil, August, 2002

4) Matsuoka M., Kashiwabara Y., Ozaki M.,
Maeda S.: Drug resistant Mycobacterium
leprae from relapse or intractable leprosy
case. The 16th International Leprosy
Congress. Brazil, August, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 実用新案登録 なし
2. 特許取得 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（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 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

研究要旨

ハンセン病治療薬ダブソンに対する耐性は、らい菌 *folP* 遺伝子の変異によって引き起こされると考えられているが、らい菌は人工培養ができないため、新たに見出された遺伝子変異と薬剤耐性との関係を調べることは大変困難である。そこで分類学上らい菌と近縁な *Mycobacterium smegmatis* を用いてダブソン耐性株を *in vitro* で分離し、*folP* 遺伝子の DNA 配列を調べたが、いずれも *folP* 遺伝子には変異は見られなかったことから、*folP* 遺伝子発現調節領域、または全く別の耐性機構の存在が示唆された。一方、らい菌 *folP* 遺伝子断片にランダムに変異を加え、*folP* 遺伝子欠損大腸菌に導入してダブソン耐性を示す菌を 9 株分離し調べた結果、130、134 番のアミノ酸残基等に変異が見られたことから、これらの残基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。

A. 研究目的

ダブソンは代表的なハンセン病治療薬であるが、近年、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大きな問題となっている。ダブソンはサルファ剤類似の化学構造を持ち、らい菌の Dihydropteroate synthase (DHPS) を不活化することにより抗菌活性を発揮すると考えられており、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報告されている。しかし、らい菌は人工培養できず、実験動物における増殖も非常に遅いため、新たに見出された *folP* 遺伝子変異とダブソン耐性の関係を調べることは大変困難である。ダブソンはハンセ

ン病以外の感染症治療には用いられないため、変異に関して他の細菌の臨床分離株からの情報が得られることはなく、また、一般細菌に対しては抗菌作用がないため、サルファ剤耐性一般細菌から得られた変異に関する情報をそのまま利用可能かどうか明らかでない。そこで、らい菌と近縁関係にあり、人工培養可能な抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* を用いて *in vitro* でのダブソン耐性株を分離し、*folP* 遺伝子における変異の有無を調べた。また、*folP* 遺伝子欠損大腸菌にランダム変異を導入したらい菌 *folP* 遺伝子断片を導入して変異とダブソン耐性に関して検討を行った。

B. 研究方法

M. smegmatis の *folP* 遺伝子の PCR 増幅には以下の DNA プライマーを使用した。(MSfolP1: 5' GCTCTAGAAGAACGGA GACTTCGATGAC 3'; MSfolP2: 5' GCGA ATTCACCGTCTCGATCAGGTTGCG 3') らい菌 *folP* 遺伝子の PCR 増幅によるランダム変異導入には Diversify™ PCR Random Mutagenesis Kit (Clontech) を用い、以下の DNA プライマーを使用した。(MLfolP3: 5' CCGGAATTCCGTGAGTTTGGC G 3'; MLfolP4: 5' GCGGGATCCGTCAG CCATCACATC 3') 変異を加えた DNA はプラスミド pUC18 に連結した後に大腸菌 DH5α を形質転換して導入して増幅し、さらにこれを用いて *folP* 遺伝子欠損大腸菌 C600Δ*folP*::Km^r を形質転換して 10μg/ml のダブソンを含む Mueller Hinton (MH) 寒天培地で選択した。大腸菌組換え株のダブソン最小発育阻害濃度(MIC)は、1mM IPTG、10μg/ml カナマイシン、および 50μg/ml アンピシリンを含む MH 寒天培地を用いて試験した。ダブソン耐性 *M. smegmatis* は、約 10⁸ の菌をダブソン 50μg/ml 含む 7H10 寒天培地上に塗布し、増殖コロニーを選択することにより得た。*M. smegmatis* のダブソン MIC は、0.5% グルコースを含む 7H10 寒天培地を用いて試験した。*folP* 遺伝子断片の DNA 塩基配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing キット (Applied Biosystems) 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) で解析した。

(倫理面への配慮)

本研究に使用したらい菌遺伝子断片は

実験動物より得られたらい菌株から PCR 増幅により得た。動物実験は「国立感染症研究所において行われる動物実験に関する基本方針」に則って行い、倫理面に配慮した。

C. 研究結果

ダブソン耐性 *M. smegmatis* を 8 株分離した。これらの分離株について、ダブソン MIC を調べたところ、親株の 4~32 倍を示した。そこで、これらのコロニーから PCR により *folP* 遺伝子断片を増幅し、塩基配列を決定した。その結果、*folP* 構造遺伝子内の変異は全ての株で見られなかった。

一方、らい菌 *folP* 遺伝子断片に 1000 塩基あたり 5 塩基の変異率でランダムに変異を加えた DNA 断片で形質転換した *folP* 遺伝子欠損大腸菌のうち、ダブソン耐性を示したのものについてプラスミドを回収し、その *folP* 遺伝子部分の塩基配列を決定した。結果を表 1 に示した。

分離株	<i>folP</i> 遺伝子内に見られた変異によるアミノ酸置換
M1	134 Leu → Pro (88)
M2	107 Val → Ala (88)
M3	1 Val → Ala, 130 Met → Thr (181, 227)
M4	130 Met → Thr (87, 91, 160, 221)
M5	134 Leu → Pro, 146 Asp → His
M6	130 Met → Thr, 235 Thr → Ala (28, 70)
M7	75 Glu → Gly, 134 Leu → Pro, 135 Met → Val
M8	130 Met → Thr, 134 Leu → Pro, 280 Val → Ala (121, 166, 280)
M9	134 Leu → Pro (80, 112, 167, 168, 281)

表 1 大腸菌株のらい菌 *folP* 遺伝子に見られた変異

() 内はアミノ酸の置換を伴わない変異を表す。

D. 考察

らい菌 *folP* 遺伝子と *M. smegmatis folP*

遺伝子の塩基配列は約 70%の相同性を持ち、アミノ酸配列上でも約 73%と高い相同性を有している (図 1)。また、らい菌 DHPS の 53 番目の Thr と 55 番の Pro の両残基に関しては保存されており、この二つの残基に関する変異に関してはらい菌と *M. smegmatis* で同様の傾向を示す可能性が高いと考えられる。

	10	20	30	40	50
<i>M. leprae</i> DHPS	1 VVLA-----PVPVDTL NVTDMFSDG GYLIDDDAV QGLLNTARG	50			
<i>M. smeg.</i> DHPS	1 .KPKLKAQD GT....M..V...GD.....KFT.T.R..R....L..A.	50			
	60	70	80	90	100
<i>M. leprae</i> DHPS	51 AALVYVGGH EYDCAKTON EVELKLVFF VEKLAQDIZ VADDTLMDV	100			
<i>M. smeg.</i> DHPS	51 .Q.S.....T.I..G..NA.VT..ZL.....I...NE...	100			
	110	120	130	140	150
<i>M. leprae</i> DHPS	101 KRALGQGR TWDFDGRS DPADQVVAE KGVNVLAWV KEMAKRQYE	150			
<i>M. smeg.</i> DHPS	101KA..M.....G..GVL...K.P.T.L...FVQ.DL.RR	150			
	160	170	180	190	200
<i>M. leprae</i> DHPS	151 NPTVDFVE VRAILKQVD QAVANQVDS KLVFDGLGF NKTQKMDL	200			
<i>M. smeg.</i> DHPS	151 V.G.....TE...R...H..T...E.H.R.....RE.....	200			
	210	220	230	240	250
<i>M. leprae</i> DHPS	201 LMLKELFKI QVDEKGRR KPLKELIAC KGVYVSDG NTKAVTIA	250			
<i>M. smeg.</i> DHPS	201 .H...D.....V.V.....T...A...TE.....V	250			
	260	270	280	290	300
<i>M. leprae</i> DHPS	251 LALMDSNV EWDVWASVD ALKVVGKLE NQVLEKVC DG*	300			
<i>M. smeg.</i> DHPS	251 ...M.....Q.....L...T.S.G.....*	300			

図 1 らい菌と *M. smegmatis* の DHPS のアミノ酸配列の比較

今回分離したダブソン耐性を示す *M. smegmatis* 株の *folP* 構造遺伝子の中には変異は見られなかった。この理由として *folP* 遺伝子の発現調節領域における変異により *folP* 遺伝子産物である DHPS の発現量が上昇している可能性が考えられる。また、*M. smegmatis* はらい菌と比較してゲノムサイズが約 2 倍と大きく、より多くの代謝系遺伝子を持つため、その他のメカニズムによりダブソン耐性が生じたのかもしれない。一方、*folP* 欠損大腸菌を用いて調べた結果、53 番、55 番以外のアミノ酸に関しても変異が見られたことから、これらの変異の見られた残基に関してもダブソン耐性に影響を与えることが示された。大腸菌の系はマルチコピープラスミドベクターを用いており、また分類学上らい菌とあまり近縁ではないため、

より正確な検討を行うためには、*folP* 欠損 *M. smegmatis* 組換え株の作製が必要と考えられる。

らい菌は人工培地による培養が不可能であり、実験動物中での増殖も大変遅いため、一般に行われる薬剤感受性試験が適用できない。迅速発育性抗酸菌の遺伝子組換えにより、ハンセン病治療薬の標的となる因子についてらい菌とまったく同じものを有するモデル菌を作製し、遺伝子変異と薬剤耐性との関係を調べることは、薬剤耐性らい菌の早期診断に関して大変有用であると考えられる。

E. 結論

in vitro で分離したダブソン耐性 *M. smegmatis* の *folP* 構造遺伝子には変異が見られなかったことから、その発現調節領域の変異か、または全く他の機構によるダブソン耐性機構が示唆された。また大腸菌を用いた解析から、既に知られている 53、55 番以外のアミノ酸残基の変異によってもダブソン感受性が影響を受けることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 前田伸司、松岡正典、中田登、甲斐雅規、前田百美、橋本研、小林和夫、柏原嘉子：ハンセン病における薬剤耐

性検査法の確立. 第 75 回日本細菌学会総会、2002 年

2) 鈴木幸一、武下文彦、中田登、川津邦雄、松岡正典、石井則久、牧野正彦：

ファゴゾーム・ライソゾーム融合阻止に関わる因子 TACO の宿主細胞内らい菌潜伏における役割. 第 75 回日本ハンセン病学会総会、2002 年 5 月

3) 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総会、2002 年 5 月

4) 松岡正典、前田伸司、中田登、甲斐雅規、柏原嘉子：インドネシアおよびフィリピンのらい菌の薬剤耐性. 第 75 回日本ハンセン病学会総会、2002 年 5 月

5) 鈴木幸一、前田百美、中田登、松岡正典、牧野正彦：DNA マイクロアレイを用いたらい菌感染細胞の遺伝子発現プロファイリング. 第 75 回日本ハンセン病学会総会、2002 年 5 月

6) 中田登、Khairul A. Hahim、甲斐雅規、鈴木幸一、柏原嘉子、前田伸司、牧野正彦：大腸菌-抗酸菌シャトルコスミドを用いたらい菌ゲノム DNA バンクの作製と遺伝子解析. 第 75 回日

本ハンセン病学会総会、2002 年 5 月

7) 甲斐雅規、中田登、Patrick J. Brennan、牧野正彦：らい菌ゲノム上に存在する 2 成分制御系 (ML2439-ML2440) の発現と機能解析. 第 75 回日本ハンセン病学会総会、2002 年 5 月

8) Nakata N., Hashim K. A., Kai M., Suzuki K., Matsuoka M., Maeda S., Kashiwabara Y. and Makino M.: Construction and analyses of a shuttle cosmid library of *Mycobacterium leprae* (Thai 53). 37th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference. Aug. 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

新規抗らい菌薬の開発研究

分担研究者 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

研究要旨：

治療期間の短縮と薬剤耐性に対応するため新規抗らい菌薬の開発を行った。リファマイシン系薬剤である RFP 耐性に対応する薬剤として Rifalazil(KRM-1648)を、キノロン系薬剤である OFLX 耐性に対応する薬剤として WQ-3345,WQ-3402 を、マクロライド系薬剤である CAM 耐性に対応する薬剤として Ketolide(ケトライド)HMR-3647 をヌードマウス足蹠法で検討した。Rifalazil は、RFP を凌ぐ強い活性を示したが、WQ-3345,WQ-3402 は、20mg/kg では不完全抑制であった。HMR-3647 は、60mg/kg で不完全抑制ではあるが RXM (roxi-thromycin)に匹敵する強い活性を認めた。上記薬剤は、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薬剤耐性患者に対する治療薬としての可能性を示唆した。

A. 研究目的

ハンセン病は、多剤併用療法の普及により有病率は低下したが、いまなお約 70 万人の新患発生があるばかりか、耐性菌の増加により治療を困難にしている。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 Rifalazil、フルオロキノロン系薬剤である WQ-3345, WQ-3402、エリスロマイシンを種変換して新しいクラスの抗生物質でケトライド (Ketolido) と称される HMR-3647 の抗らい菌活性をヌードマウス足蹠法で検討する。

B. 研究方法

1) 抗らい菌(Thai-53 株)：ヌードマウス (BALB-c)足蹠より集菌・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。

2) 抗菌薬：Rifalazil(鐘淵化学)、WQ3345・WQ-3402(湧永製薬)、HMR-3647(Aventis Pharm)、SPFX(大日本製薬)、CAM(大正製薬)は、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。

各抗菌薬は、所定の濃度に希釈しステンレスカテーテルで経口投与した。

3)ヌードマウス足蹠法

ヌードマウス (BALB/c, 5 週令・雌)の両後肢足蹠に 10^7 のらい菌を接種した。菌接種後 60-150 日の 90 日間、ステンレスカテーテルで各薬剤を毎日経口投与した。菌接種後 8 ヶ月から 11 ヶ月までの

4 回ヌードマウス足蹠内のらい菌数を計測し各薬剤の抗らい菌活性を求めた。

- a. Rifalazil(0.6mg/kg)の抗らい菌活性を RFP(0.6mg/kg)と比較検討する。
- b. WQ-3345(10,20mg/kg), WQ-3402(10,20mg/kg)の抗らい菌活性を SPFX と比較検討する。
- c. HMR-3647(20,40,60mg/kg)の抗らい菌活性を CAM(40mg/kg)と比較検討する。

(倫理面での配慮)

使用マウスは、頸骨脱臼により安楽致死させてから所定の実験に用いている。

C. 研究成果

1) Rifalazil の抗らい菌活性

Rifalazil は、0.6mg/kg でヌードマウス足蹠内のらい菌の増殖を完全抑制をした。Rifalazil に RFP を凌ぐ強い抗らい菌活性を認めた。結果を図 1 に示す。

2) WQ-3345, WQ-3402 の抗らい菌活性
対照薬 SPFX は、10mg/kg でらい菌の増殖を完全抑制した。WQ-3345 と WQ-3402 は 20mg/kg でも不完全抑制であった。WQ-3345 の抗らい菌活性は WQ-3402 より弱かった。結果を図 2 に示す。

3) HMR-3647 の抗らい菌活性
対照薬 CAM は、40mg/kg でらい菌の増殖を完全抑制した。HMR-3647 は 60mg/kg でも不完全抑制ではあるが、 10^8 以下で強い抗らい菌活性を認めた。結果を図 3 に示す。

D. 考察

多剤併用療法の普及により有病率は

低下したが、6 ヶ月から 1 年に及ぶ長い治療期間のため不規則治療、治療中断また低用量長期投与により DDS, B663, RFP のみならず近年開発された OFLX, CAM にも耐性が増加し治療を困難にしている。これら薬剤耐性に対応するため臨床から新規薬剤の開発が求められている。

今回ヌードマウス足蹠法で検討の結果から Rifalazil は、RFP より強い抗らい菌活性を認めた。またシプロフロキサシン耐性菌に抗菌活性を示す WQ-3345 と WQ-3402 は OFLX と第一次標的酵素が相違すると考えられること、またエリスロマイシン耐性菌に抗菌活性を示すケトライド HMR3647 に強い抗らい菌活性を認めた。以上のことから Rifalazil, WQ-3402, HMR-3647 は、薬剤耐性患者に対する治療薬としての可能性を示唆した。強い抗らい菌活性を保持する WQ-3402 については、ヌードマウス足蹠法で投与を増やして最少抑制濃度を検討している。

E. 結論

ヌードマウスの足蹠内に接種したらい菌の増殖を Rifalazil は 0.6mg/kg で完全抑制した。WQ-3345, WQ-3402 は 20mg/kg では不完全抑制であった。HMR-3647 は 60mg/kg で強い抗らい菌活性を示した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 並里まさ子, 後藤正道, 儀同政二, 細

川篤, 杉田泰之, 石井則久, 長尾榮一, 尾崎元昭: ハンセン病治癒判定基準、Jpn,J,Lep,71:235-238(2002).

2) Maeda Y.,Gidoh M. and Makino M.: Induction of Type 1 Cellular Immunity by Mycobacterium leprae Derived Antigens. Infection and Immunity (in press,2002).

2.学会発表

1) 儀同政一: WQ-3345,WQ-3402 の抗らい菌活性. 第 75 回日本ハンセン病学会総会. Jpn.J.Lep. 71:162(2002).

2) 牧野正彦, 前田百美, 儀同政一: 第 75 回日本ハンセン病学会. らい菌菌膜の細胞性免疫誘導能の検討、Jpn,J,Lep, 71:156 (2002).

3) 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総会, Jpn,J,Lep, 71:159(2002).

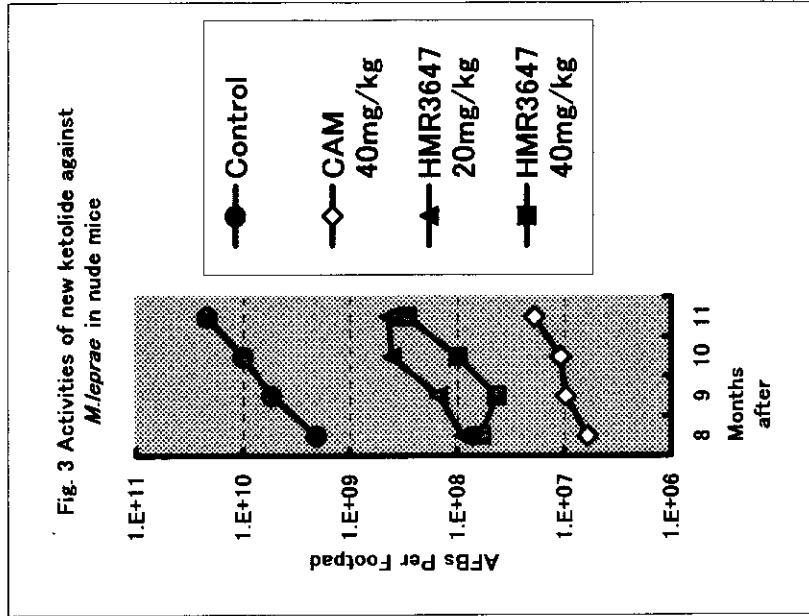
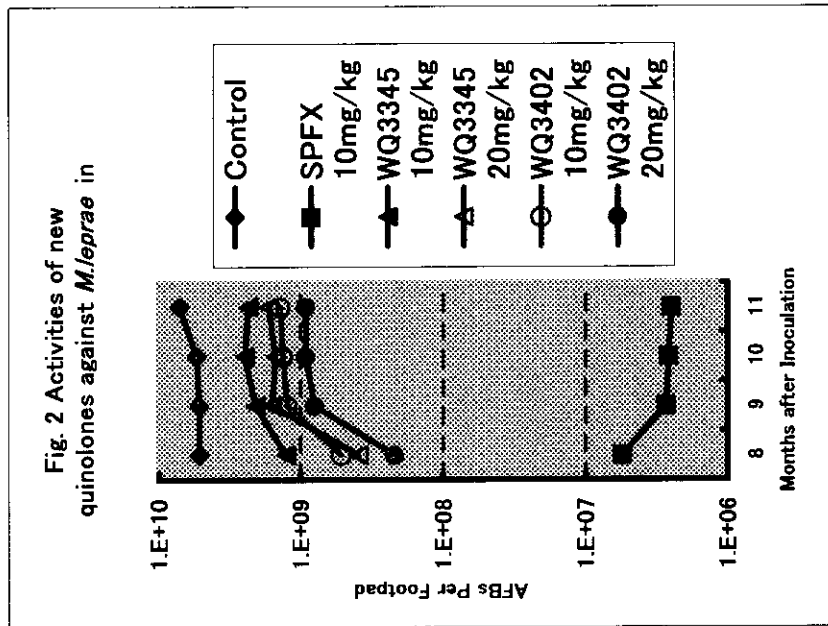
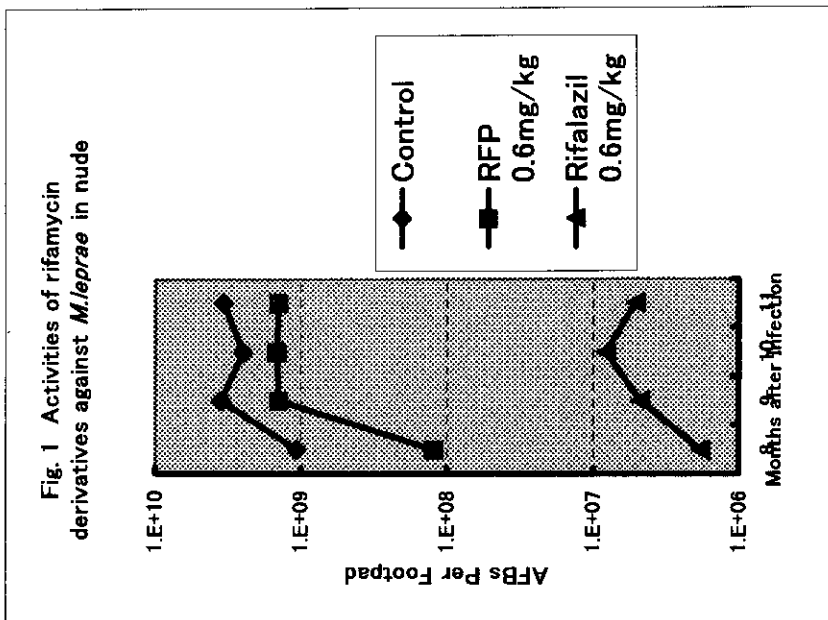
4) 山崎利雄, 松岡正典, 儀同政一: 生物発光法による薬剤感受性試験法のらい菌への適用. 第 75 回日本ハンセン病学会総会. Jpn, J, lep, 71:161(2002).

5) Maeda Y.,Gidoh M. and Makino M., Dendritic cell-mediated production of IL-12 and IFN- γ by Mycobacterium leprae derived cell membrane. International 16th Leprosy Congress,

Brazil,2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

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 部長

研究要旨. らい菌はマクロファージ・シュワン細胞に親和性を示し、これらの細胞に寄生性感染を果たす。しかし、らい菌感染したマクロファージは、らい菌に対する生体防御反応を司る上で最も重要なタイプ1細胞性免疫を惹起することができず、らい菌の生体外排除を誘導する上で大きな障害となっている。そこで、らい菌感染マクロファージを *in vitro* で GM-CSF 及び IL-4 などにより処理し、樹状細胞様細胞に形質転換したところ、細胞表面にらい菌菌膜由来抗原を発現し自己の CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞を刺激し活性化させ、IFN- γ の産生を誘導した。さらに、らい菌菌膜特異的 CD8 陽性キラーT 細胞の細胞障害活性に強い感受性を示すようになった。従って、らい菌感染マクロファージを樹状細胞様に形質転換することは、らい菌に対する生体防御反応を高め、さらにハンセン病に対する免疫療法の開発を考える上で重要であると考えられた。

A. 研究目的

らい菌に対する生体防御反応は、IFN- γ 産生性 CD4 陽性 T 細胞が中心となっていると考えられている。このタイプ 1 CD4 陽性 T 細胞の抗原特異的活性化には、らい菌に感受性を示す抗原提示細胞が必要である。マクロファージは、らい菌に対し最も強い感受性を示す抗原提示細胞であるが、マクロファージに取り込まれたらい菌は、ファゴゾームを形成するものの vacuolar H と ATPase が少ないために Lysosome との結合を妨げ、らい菌のプロセッシングを阻害することが報告されている。プロセッシングが阻害される結果、らい菌由来抗原の細胞表面への発現は抑制され、そのため T 細胞の活性化が阻止され、最終的にはらい菌の寄生性感染を許すことになる。一方、ハンセン病に対する免疫療法の開発及びらい菌に対する生体防御反応の高揚のためには、らい菌感染マクロファージはキラーT 細胞により効率よく殺戮される必要がある。らい菌感染マクロファージがこれらキラーT 細胞に認識されるためにも、マクロフ

ージは、らい菌抗原を細胞表面に発現しなければならない。本研究においては、らい菌感染マクロファージを樹状細胞様細胞(MACDC)に形質転換し、その抗原提示能及びキラーT 細胞に対する感受性を検討した。

B. 研究方法

正常健常者末梢単球を得て、20% FCS medium 存在下で *in vitro* でマクロファージの分化を誘導した。らい菌(Thai53 株)は、ヌードマウスを用いて増殖させ、定法により分離精製した。らい菌感染及び非感染マクロファージの樹状細胞様細胞(MACDC)への形質転換は、マクロファージを IFN- γ (300 U/ml)で活性化した後、リコンビナント(r)GM-CSF と rIL-4 を用い行なった。また MACDC の活性化には LPS (30 ng/ml)あるいは soluble form CD40 ligand (1 μ g/ml)を用いた。マクロファージ及び MACDC 表面抗原の解析には FACScalibur を用い、抗原提示機能に關与する抗原に対する抗体は市販の抗体を用い、らい菌分画に対する抗体はコロラド

州立大学Brennan教授より供与を受けた。MACDC の抗原提示能は刺激された細胞の増殖応答及び IFN- γ 産生能で測定した。CD8 陽性特異的キラーT細胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL) は、CD8 陽性をらい菌菌膜パルス樹状細胞で IL-2 存在下で 10 日間刺激して得た。らい菌感染マクロファージ及び MACDC のキラーT細胞感受性は、LDH release assay (5時間)で測定した。

倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。

C. 研究結果

らい菌感染マクロファージと感染 MACDC の抗原提示能を検索するため、自己 T 細胞が刺激され活性化されて培養上清中に産生する IFN- γ を測定した。マクロファージは IFN- γ の産生を全く誘導しなかったのに対し、らい菌感染 MACDC はらい菌量依存性に CD 4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞を刺激し IFN- γ の産生を誘導した。その際、らい菌量と T 細胞活性化の間には“ベル現象”が観察され、MOI 20 以下の比較的少量のらい菌がマクロファージに感染した時のみ有意な T 細胞の活性化が観察された。また MACDC は、マクロファージと異なり、CD40 リガンド刺激により活性化 IL-12p70 を産生した。そこで MACDC の細胞表面抗原の発現を検索すると、MACDC ではマクロファージマーカーである CD14 抗原の発現が消失し、代わりに

CD86 抗原の発現が増強され、CD1a 及び CD83 抗原の発現が誘導されていた。これらの結果は、MACDC は単球由来樹状細胞(DC)に極めてよく似た性状を有していることを示している。さらに MACDC は、らい菌の感染により CD1a 及び CD83 抗原の発現を増強させた。また、らい菌感染 MACDC とらい菌抗原の関係を検索すると MACDC は、細胞表面にハンセン病患者血清と反応する抗原及びらい菌菌膜に対するポリクローナル抗体により認識される抗原を発現していた。MACDC の誘導に際し、IFN- γ 、GM-CSF、IL-4 を用いたが、この中で IFN- γ は、マクロファージ表面への CD1a の発現を誘導しかつ CD86 抗原の発現を増強させた。GM-CSF と IL-4 は、DC の誘導に不可欠な要素であり、MACDC への分化誘導にも重要な役割を果たしていた。さらに、DC の活性化に用いる LPS や CD40L を MACDC に作用させると MACDC の抗原提示能は増強した。最後に、らい菌感染 MACDC のらい菌特異的キラーT細胞に対する感受性を検索すると、らい菌感染マクロファージに比し、より強い細胞障害をうけた。

D. 考察

マクロファージ及び DC は抗酸菌感染症に対する生体防御反応を誘導する際、抗原提示細胞として重要な働きをしている。しかし、マクロファージは主に IL-10 を産生し、結核性の granuloma 形成に重要な役割を果たすものの、T 細胞の活性化には大きな役割を果たすことができない。一方 DC は、抗酸菌感染をうけると IL-12 を産生しタイプ 1 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化することが明らかにされている。これらの T 細胞から産生される IFN- γ は、マクロファージを活性化し、抗菌作用を誘導することが知られていて、マクロファージと DC は生体内にあって異なる作用を示し、両者がお互いの弱点を補いながら生体防御にあたっている。

しかしながら、らい菌感染症においては、我々はこれまでに、DCはT細胞の活性化を誘導するためには大量の菌が感染する必要があることを報告し、マクロファージではT細胞を効率よく活性化し得ないことを報告してきた。このことは少量の菌が感染しても（すなわち感染初期）、有効にT細胞を活性化する抗原提示細胞を生体内で産生しなければならないことを示している。今回、我々は、らい菌感染マクロファージをIFN- γ 、GM-CSF、IL-4、LPSあるいはCD40Lを用いてDC様細胞に分化させると、少量の菌が感染した場合においても効率よくT細胞を活性化することを示した。また、この形質転換したマクロファージではキラーT細胞により容易に殺戮されたことから極めて重要な生体防御反応を惹起し得る可能性を有しているものと考えられた。

E. 結論

らい菌感染マクロファージを樹状細胞様に形質転換することは、らい菌に対する生体防御反応を高め、かつ免疫療法の開発に有効な手段になるものと想定された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawamura, M., T. Naito, M. Ueno, T. Akagi, K. Hiraishi, I. Takai, M. Makino, T. Serizawa, K. Sugimura, M. Akashi, and M. Baba. Induction of mucosal immunity following intravaginal administration of inactivated HIV-1-capturing nanospheres in mice. *J. Med. Microbiology*, 66:291-298, 2002.
- 2) Maeda, Y., M. Makino, D. C. Crick, S. Mahapatra, S. Srisungnam, T. Takii, Y. Kashiwabara, and P. J. Brennan. Novel 33-Kilodalton Lipoprotein from

Mycobacterium leprae. *Infect. Immunity*, 70(8):4106-4111, 2002.

- 3) Shimokubo, S., S. Wakamatsu, Y. Maeda, M. Baba, and M. Makino. Fusion of Mature Dendritic Cells and Human T-Lymphotropic Virus Type-I-Infected T cells: its Efficiency as an Antigen-Presenting Cell. *Virology*, 301:13-20, 2002.
 - 4) Hashimoto, K., Y. Maeda, H. Kimura, K. Suzuki, A. Masuda, M. Matsuoka, and M. Makino. *Mycobacterium leprae* Infection in Monocyte-Derived Dendritic Cells and Its Influence on Antigen-Presenting Function. *Infect. Immunity*, 70(9):5167-5176, 2002.
 - 5) Umemura, M., H. Nishimura, T. Yajima, W. Wajjwalk, T. Matsuguchi, M. Takahashi, Y. Nishiyama, M. Makino, Y. Nagai, and Y. Yoshikai. Overexpression of interleukin-15 prevents the development of murine retrovirus-induced acquired immunodeficiency syndrome. *FASEB*, 16:1755-1763, 2002.
 - 6) Nomaguchi, H., T. Mukai, F. Takeshita, M. Matsuoka, Y. Maeda, T. M. Aye, N. Jahan, Y. Yogi, M. Endo, Y. Sato, and M. Makino. Effect of hsp65 DNA vaccination carrying immunostimulatory DNA sequences (CpG motifs) against *Mycobacterium leprae* multiplication in mice. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, in press, 2002.
 - 7) 牧野正彦. ハンセン病—Hansen's Disease, Leprosy. 小早川隆敏編, 新版・感染症マニュアル, 176-179, 2002.
 - 8) 牧野正彦. らい菌と樹状細胞の相互作用. *臨床免疫* 38(5), in press, 2002.
- ##### 2. 学会発表
- 1) 前田百美, 柏原嘉子, 牧野正彦. らい菌のリポ蛋白をコードする遺伝子の発現とその機能的役割. 第75回日本細菌学会総会 2002年4月 横浜

- 2) 牧野正彦, 前田百美, 松岡正典. らい菌と正常健常者末梢単球由来樹状細胞の相互作用. 第75回日本細菌学会総会 2002年4月 横浜
- 3) 前田百美, 鈴木幸一, 川津邦雄, 牧野正彦. らい菌のリポ蛋白の発現とその生理的役割. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 4) 鈴木幸一, 武下文彦, 中田 登, 川津邦雄, 松岡正典, 石井則久, 牧野正彦. ファゴゾーム・ライソゾーム融合阻止に関わる因子 TACO の宿主細胞内らい菌潜伏における役割. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 5) 牧野正彦, 前田百美, 儀同政一. らい菌菌膜の細胞性免疫誘導能の検討. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 6) 武下文彦, 向井 徹, 牧野正彦. らい菌 Fibronectin Attachment Protein の免疫原性およびその宿主細胞侵入抑制効果. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 7) 向井 徹, 武下文彦, 牧野正彦. 経鼻腔粘膜ワクチンの開発. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 8) 鈴木幸一, 前田百美, 中田 登, 松岡正典, 牧野正彦. DNA マイクロアレイを用いたらい菌感染細胞の遺伝子発見プロファイリング. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 9) 中田 登, Khairul A. Hashim, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 柏原嘉子, 前田伸司, 牧野正彦. 大腸菌-抗酸菌シャトルコスミドを用いたらい菌ゲノムDNA バンクの作製と遺伝子解析. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 10) 甲斐雅規, 中田 登, Patrick J. Brennan, 牧野正彦. らい菌ゲノム上に存在する2成分制御系 (ML2439-ML2440) の発現と機能解析. 第75回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2002年5月 三島
- 11) Makino, M., and Y. Maeda. Dendritic cell-mediated production of IL-12 and IFN- γ by *Mycobacterium leprae*-derived cell membrane. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 37th Tuberculoid and Leprosy Research Conference, Kyoto, August 21-23, 2002.
- 12) Maeda, Y., Y. Kashiwabara, K. Suzuki, D. C. Crick, P. J. Brennan, and M. Makino. Characterization of *Mycobacterium leprae* 33 kD lipoprotein and its immunological significance. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 37th Tuberculoid and Leprosy Research Conference, Kyoto, August 21-23, 2002.
- 13) Nakata, N., K. A. Hashim, M. Kai, K. Suzuki, M. Matsuoka, S. Maeda, Y. Kashiwabara, and M. Makino. Construction and analyses of a shuttle cosmid library of *Mycobacterium leprae* (Thai 53). US-Japan Cooperative Medical Science Program. 37th Tuberculoid and Leprosy Research Conference, Kyoto, August 21-23, 2002.
- 14) Makino M. Monocyte-derived dendritic cell-mediated antigenicity of *M. leprae* subcellular fractions. Pre workshop, 16th International Leprosy Congress, 4-9 August, 2002, Salvador, Bahia, Brasil.
- 15) Maeda M., M. Gidoh, N. Ishii, and M. Makino. Dendritic cell-mediated production of IL-12 and IFN- γ by *Mycobacterium leprae*-derived cell membrane. 16th International Leprosy Congress, 4-9 August, 2002, Salvador, Bahia, Brasil.
- 16) Maeda Y., M. Makino, D. C. Crick, Y. Kashiwabara, and P. J. Brennan. A novel 33 KD Lipoprotein Antigen from *Mycobacterium leprae*. 16th

International Leprosy Congress, 4-9
August, 2002, Salvador, Bahia, Brasil.

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

H. 知的財産権の出願・登録状況