

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り、家族内濃厚感染以外の感染例の存在を示した。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hashimoto K., Maeda Y., Kimura K., Suzuki K., Masuda A., Matsuoka M. and Makino M.: *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. Infect. Immun. Vol. 70 5167-5176 2002

2) Nomaguchi H., Mukai T., Takeshita F., Matsuoka M., Maeda Y., Aye T. M., Jahan N., Yogi Y., Endo M., Sato Y. and Makino M.: Effect of hsp65 DNA vaccination carrying immunostimulatory DNA sequences (CpG motifs) against *Mycobacterium leprae* multiplication in mice. Int. J. Lepr. Vol. 70 182-190 2002

3) 並里まさ子、東正明、松岡正典、柏原嘉子、小川秀興：ハンセン病の治療における薬剤耐性 —国内ハンセン病療養所における再発例での検討—。医療 56 巻6号 331-337 2002

4) 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。日本

ハンセン病学会雑誌 71 巻 3 号 197-199 2002

2. 学会発表

1) 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

2) Matsuoka M., Kashiwabara Y., Ozaki M. and Maeda S.: Drug resistant *Mycobacterium leprae* from relapsed or intractable leprosy case. 16th International leprosy congress. Salvador, Brazil, August 2002

3) Matsuoka M.: Genomic diversity of *Mycobacterium leprae rpoT* gene and geographical distribution. Workshop of molecular biology 16th International leprosy congress. Salvador, Brazil, August 2002

4) Namisato M., Matsubayashi M., Higashi M., Ozaki, M., Matsuoka M., Kashiwabara Y. and Ogawa H.: Drug resistance in the treatment of leprosy - Study in the relapsed cases found in sanatoria. 16th International leprosy congress. Salvador, Brazil, August 2002

5) Matsuoka M., Kashiwabara Y., Ozaki 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

6) 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

7) Nakata N., Hashimoto K. A., Kai M., Suzuki K., Matsuoka M., Maeda S., Kashiwabara Y. and Makino M.: Construction and analysis of a shuttle cosmid library of *Mycobacterium leprae* (Thai53). 37th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference. Kyoto, August, 2002

8) 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検査法の確立。第75回日本細菌学会総会、横浜市 2002年4月

9) 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

10) 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、横浜市 2002年4月

11) 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

12) 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感受性。第75回日本ハンセン病学会総会、三島、2002年5月

13) 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

14) 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、三島、2002年5月

15) 尾崎元昭、松岡正典、中田登、甲斐雅規、柏原嘉子、儀同政一、波里まさ子、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遺伝子変異検査結果。第75回日本ハンセン病学会総会、三島、2002年5月

16) 山崎利雄、松岡正典、儀同政一：生物発光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、三島、2002年5月

17) 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

18) 鈴木幸一、前田百美、中田登、松岡正典：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ル。第75回日本ハンセン病学会総会、三島、2002年5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 |

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

分担研究者 大山秀樹 埼玉医科大学医学部免疫学講座 講師

研究要旨：L型ハンセン病患者由来の活性化T細胞は、IL-12存在下においてIFN- γ 低産生性を示す。このことを免疫遺伝学的観点から解明することを目的として、本年度は各病型のハンセン病患者における *IFNG* および *IL-12RB2* の制御領域のアリル分布を調べ、これらアリルがIFN- γ 産生性およびハンセン病病型成立機序にどのような影響を及ぼすかを考察した。その結果、1) 患者集団において *IFNG* の制御領域の多型は存在しないこと、2) *IL-12RB2* に複数のSNPsを検出したものの、それらSNPs保有の有無によってIL-12存在下での活性化T細胞が産生するIFN- γ 量に差がないことが示された。しかし、-1036A/G および -659G(del)のアリル検出率は、L型患者の方がT型患者に比べ有意に高いことから、これらのSNPsがハンセン病の病型形成機序に何らかの影響を与えるものであることが示唆された。

A. 研究目的

IL-12は、活性化T細胞に対してIFN- γ 産生を誘導する。その産生量は様々であるが、L型ハンセン病患者由来のT細胞は、一様に低産生性を示す。このことを免疫遺伝学的観点から解明することを目的として、IL-12レセプター β 1および β 2遺伝子 (*IL-12RB1* および *IL-12RB2*) の翻訳領域における多型性がIFN- γ 量に与える影響について調べてきた。その結果、1) L型ハンセン病患者の *IL-12RB1* 遺伝子における翻訳領域には、複数の遺伝子多型が存在するものの、特定の一残基遺伝子多型 (SNPs) が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* 遺伝子のそれより頻度は少なく、IL-12に対するT細胞のIFN- γ 産生性に関与しない可能性が高いことをそれぞれ明らかにした。これらアプローチは、L型患者に見られるIFN- γ 低産生性の原因をIL-12レセプター分子の遺伝的な構造変化に求めたものであった。近年Kim Jらは、L型ハンセン病患者において、*M. leprae* 刺激に対する末梢血単核

球では *IL-12RB2* 遺伝子の発現が少なく、STAT4を介する細胞内刺激伝達がおこらないためIL-12刺激に対するIFN- γ が産生されないことを報告した(Kim J *et al.*, *J Immunol.* 2001)。これらのことから考えると、ハンセン病患者のT細胞のIL-12刺激に対するIFN- γ 産生性の違いには、*IL-12RB2* 遺伝子およびIFN- γ 遺伝子 (*IFNG*) の転写レベルでの個体間差が関与しているかもしれない。そこで本年度は、*IL-12RB2* および *IFNG* 遺伝子のプロモーター領域の多型性が、IFN- γ 産生性およびハンセン病の病型にどのような影響を与えるかについて調べる計画を立てた。

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および健常者それぞれ7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定した。なお、7名の健常者は、IL-12存在下の活性化末梢血T細胞からのIFN- γ 産生において、高

産生性被験者 4 名, 低産生性被験者 3 名に分類される。

2. IFNG および IL-12RB2 制御領域における多型解析: 各被験者から調整した末梢血単核球より, 全ゲノム DNA をフェノール・クロロフォルム法によって抽出した。抽出したゲノム DNA を試料として, 各被験者における *IL-12RB2* および *IFNG* 遺伝子の制御領域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。すなわち, 全ゲノム DNA を鋳型として PCR を行なうことにより *IL-12RB2* 遺伝子の -1254 番目から +99 番目までの領域および *IFNG* 遺伝子の -617 番目から +71 番目までの領域を増幅した後, Chain-termination 反応を行なった PCR 産物を ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer 社製) を用いて, 同塩基配列を解析した。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各遺伝子における SNPs を検出した。なお, すべての SNPs について, 遺伝子データベースに記載されているアリルをアリル 1, それ以外のものをアリル 2 とした。

3. 各アリルの分布と IFN- γ 産生性およびハンセン病型との相関性の解析: *IL-12RB2* および *IFNG* 遺伝子制御領域における各 SNPs の有無によって各被験者を分類し, それら群間における IFN- γ 産生能の違いを調べた。なお, ここで示す IFN- γ 産生能とは, 昨年度および一昨年度前に調べた *IL-12* 存在下における活性化 T 細胞が産生する IFN- γ 量とした。さらに, 病型間における *IL-12RB2* および *IFNG* 遺伝子制御領域での SNPs 出現頻度を比較した。なお, IFN- γ 産生能との相関については Mann-Whitney の U 検定を, また病型との相関について

は Fisher の直説法を用いて検定を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究課題は, 岡山大学歯学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会 (受付番号: 4, 課題名: ハンセン病に対する疾患感受性および病型成立機序における免疫遺伝学的研究) および埼玉医科大学倫理委員会 (申請番号: 172, 課題名: 同上) において, 倫理的側面から実施内容の検討がなされ, 実施についての承認を得ている (岡山大学; 平成 13 年 9 月 28 日承認, 埼玉医科大学; 平成 14 年 11 月 20 日承認)。さらに, 研究の実施にあたっては, 本研究課題の目的を提示した上で, 各ドナーに対して遺伝子および細胞を採取することによって考えら得る全ての利益, 不利益を十分に説明した。それら説明によって十分にインフォームド・コンセントが得られたドナーからのみ, 試料の提供を受けた。

C. 研究結果

1. IFNG 制御領域における多型解析: 各被験者において *IFNG* の制御領域を含む -617 番目から +71 番目までの領域の多型性を調べることによって SNPs の検出を試みた。しかし, 対象とした被験者について調べた限りにおいて, 同領域における多型を検出するに至らなかった。

2. IL-12RB2 制御領域における多型解析: *IFNG* 同様に, 各被験者における *IL-12RB2* 制御領域を含む -1254 番目から +99 番目までの領域の多型性を調べた。その結果, -1048T(del), -1036A/G, -1034T/C, -1024A/G, -659G(del), -569A/C, -558T/C, -551T/C, -465A/G, -203T/C, -189A/C, -132(Ins) の計 12 の SNPs を検出した。これら SNPs を含む

対立遺伝子それぞれをアリル 2 とした。

3. *IL-12RB2* 制御領域の各アリル間における IFN- γ 産生性の違い:本研究において検出した *IL-12RB2* 遺伝子上の SNPs の有無によってグループ分けを行い、各群における IL-12 存在下での活性化 T 細胞が産生する IFN- γ 量を比較した。しかし、各 SNPs においてアリル 2 キャリア由来 T 細胞の IFN- γ 産生量はノンキャリア由来 T 細胞に比べて低い値を示す傾向にはあるものの、それらは有意ではなかった。

3. *IL-12RB2* 制御領域の各アリルの分布とハンセン病型との相関:本研究において検出した *IL-12RB2* 遺伝子上の SNPs それぞれについて、各病型のハンセン病患者におけるアリル 2 の保有頻度を比較した。その結果、1)すべての SNPs における検出頻度は、患者と健常者との間において差はなかった、2)患者を病型によって分類した場合、-1036A/G および-659G(del)のアリル検出率は、L型患者の方がT型患者に比べて有意に高いことがそれぞれ分かった。

D. 考察

本研究は、L型ハンセン病患者が示す IL-12 刺激に対する低 IFN- γ 産生性の原因を *IFNG* および *IL-12RB2* の各遺伝子の制御領域の多型に求めた作業仮説に基づき、それぞれの領域のアリル分布を調べたものである。

今までに、*IFNG* の制御領域および翻訳領域において数種の多型が存在すること、またそれらのアリルを有する個体は Th1-Th2 バランスが崩れ喘息などに対する感受性が高いことが報告されている。しかし、本研究で対象とした全被験者において *IFNG* の制御領域の多型を検出できなかった。このことから、L型ハンセン病患者が示す IL-12

刺激に対する低 IFN- γ 産生性、さらにはハンセン病に対する感受性の個体差および病型成立機序において、*IFNG* の制御領域の多型という直接的な原因によるものではないことが示された。

一方、*IL-12RB2* は、その遺伝子発現量の違いによってハンセン病患者の病型成立機序に関与することが報告されている。すなわち、L型ハンセン病患者由来の末梢血単核球は、*M. leprae* 刺激に対して *IL-12RB2* 遺伝子の発現が少ないこと、さらにそれによって STAT4 を介して細胞内に刺激伝達されないために IL-12 刺激に対して低い IFN- γ 産生性を示すことが明らかとなった(Kim *et al.*, *J Immunol.* 2001)。本研究において我々は、1) *IL-12RB2* 制御領域を含む領域に複数の多型が存在すること、2) さらに特定の SNPs は、L型患者においてその保有頻度がT型患者に比べて有意に高いことを示した。このことは、Kim らの報告を免疫遺伝学的な観点から裏付けるものとなるかもしれない。

近年、*IL-12RB2* の転写制御領域の解析から、SP-1 結合部位を含む-61 番目から-151 番目の領域およびさらに上流の-404 番目から-591 番目の領域が *IL-12RB2* 遺伝子の発現に大きく影響することが明らかとなった (van Rietschoten *JGI et al.*, *J Bio Chem.* 2001)。本研究で検出することに成功した SNPs において van Rietschoten らが報告した領域に存在するものは、-569A/C、-558T/C、-551T/C、-465A/G、および-132(Ins)であった。なかでも-465A/G SNPs のアリルは、L型患者に多く検出される傾向にあったことから、-465A/G SNPs は *IL-12RB2* の発現を左右し、ハンセン病の病型成立機序に対して何らかの影響を与えるものであるかもしれない。また、本研究においてL型患者に有意に多く検出した-1036A/G、-1024A/G および-659G(del) SNPs は-591

番目からさらに上流に存在する。これらの部位が転写活性にどのような影響を与えるかについては、過去においても報告がない。今後、これら SNPs が *IL-12RB2* 発現にどのような影響を与えるかについて解析を行なう予定である。

E. 結論

L型ハンセン病患者が示す IL-12 刺激に対する低 IFN- γ 産生性は *IFNG* および *IL-12RB2* の各遺伝子の制御領域の多型によるものであるという作業仮説に基づき、それぞれの領域のアリル分布を調べた。その結果、1) 患者集団において *IFNG* の制御領域の多型は存在しないこと、2) *IL-12RB2* に複数の SNPs を検出したものの、それら SNPs 保有の有無によって IL-12 存在下での活性化 T 細胞が産生する IFN- γ 量に差がないことが示された。しかし、-1036A/G および -659G(del) のアリル検出率は、L 型患者の方が T 型患者に比べ有意に高いことから、これらの SNPs がハンセン病の病型形成機序に何らかの影響を与えるものであることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y. Tumor necrosis factor-alpha gene (*TNF- α*) -1031/-863, -857 single nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *J. Clin. Periodontol.* in press (2003).

2) Matsushita S, Tanaka Y, Tabata H, Matsuoka T, Ohyama H, Nakashima T.

Combinatorial peptide library for the analysis of antigen recognition by T cells. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* 5: 551-563, 2002.

3) Ohyama H, Nishimura F, Meguro M, Takashiba S, Murayama Y, Matsushita S. Counter-antigen presentation: fibroblasts produce cytokines by signaling through HLA class II molecules without inducing T-cell proliferation. *Cytokine* 17, 175-181, 2002.

4) Matsushita S, Tanaka Y, Ohyama H, Matsuoka T, Nakashima T. Application of combinatorial chemistry for the identification of peptide ligands recognized by T cells. *Recent Research Developments in Immunology* 4: 361-379, 2002.

5) 大山秀樹: 歯周病医療から健康科学への貢献とその展望: 生物学の立場から: ザ・クインテッセンス, 印刷中, 2003.

6) 松下 祥, 松岡多香子, 大山秀樹: 抗原提示細胞、狩野庄吾、中川武正編: 「アレルギー・リウマチ・膠原病の最新医療」, 先端医療技術研究所(東京)印刷中, 2003.

2. 学会発表

1) 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 Conference on Tuberculosis/Leprosy, 36-40, 2002

2) 竹内加珠, 大山秀樹, 目黒道生ら *P. gingivalis* 外膜蛋白を認識する T 細胞クローンのアミノ酸置換ペプチドに対する応答性. 第 45 回日本歯周病学会春季学術大会, 日本歯周病学会会誌 44 春季特別号 93, 2002.

3) 目黒道生, 大山秀樹, 西村英紀ら
ヒト歯肉線維芽細胞のケモカイン産生系
における HLA-DR 分子を介したシグナル
伝達の研究. 第 116 回日本歯科保
存学会春季学会, 日本歯科保存学雑
誌 45 春季特別号 29, 2002.

4) 工藤値英子, 大山秀樹, 河野隆幸ら
歯周治療は慢性関節リウマチの検査値
を変化させる一症例報告一. 第 116
回日本歯科保存学会春季学会, 日本
歯科保存学雑誌 45 春季特別号 72,
2002.

5) 大山秀樹 歯周病医療から健康科
学への貢献とその展望「生物学の立場
から -その2-」. 日本学術会議 研連
シンポジウム「健康寿命を延ばす歯周病
医療」, 2002.

6) 大山 秀樹, 松岡 多香子, 松下 祥
抗酸菌感染症に対する分子予防医学的
アプローチ. 第2回分子予防環境医学
研究会, 抄録集, 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

らい菌の機能解析
らい菌のリン脂質合成酵素の役割について

分担研究者 前田伸司 大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学 助手

研究要旨

リン脂質の新規合成が、菌の分裂・増殖に必須である。その合成酵素の1種であるホスファチジルセリン合成酵素(PSS)に着目し、抗酸菌での役割について検討を行った。リン脂質合成酵素の欠損株を *Mycobacterium smegmatis* を実験モデルとして作製して、PSS 欠損株の性質を調べた。菌の増殖速度は、欠損株と標準株 (mc²155) ほとんど変わらなかった。しかし、それぞれの株でリン脂質の組成は大きく異なり、欠損株ではホスファチジルエタノールアミン (PE) が検出されなかった。また、抗微生物薬に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を比較したところ PSS 欠損株は標準株と比べて MIC 値の低下が観察され、薬剤感受性が上昇することが明らかになった。このことは、PSS の阻害薬を抗微生物薬と併用することによって、薬剤の MIC を低下させ耐性菌の薬剤感受性を変化させることが可能で、治療に役立つことを示唆している。

A. 研究目的

細菌が分裂・増殖する際には、その形態を維持するために、新たなリン脂質の合成が必須である。らい菌を含めた抗酸菌では、細胞壁や細胞外の LAM など構造物をリン脂質に固定するアンカーの役割を持っているホスファチジルイノシトール (PI) が最も多く、次いでホスファチジルエタノールアミン (PE) が多いことが知られている。注目したホスファチジルセリン (PS) は、らい菌においてもリン脂質中の含量が非常に低く検出することは難しいが、この合成酵素であるホスファチジルセリン合成酵素 (PSS) 活性は

検出することが可能である。これは、PSS によって合成された PS が、直ちに他の物質に転換される可能性、つまり、PE の合成材料となっている可能性が高いことを示唆している。

PS がなければ PE が合成されない可能性が高いこと、PS の合成経路は細菌とほ乳類では異なることから、PSS に対する阻害薬が新しい抗微生物薬として利用できるかどうか検討した。

B. 研究方法

PSS 遺伝子破壊ベクターの構築：PSS 遺伝

子の中央付近にある *Bam*HI サイトから前後 1kbp からなる約 2kbp の範囲の DNA を TIGR ゲノム研究所のデータベースを利用して PCR で増幅し 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 (KMR) を導入し pGEM-T-PSS/KMR ベクターを構築した。その後、*Sac*B 遺伝子を持つ pJQ200 の *sm*aI サイトに pGEM-T-PSS/KMR のインサート DNA を導入し、PSS 破壊用ベクターを構築した。

M. smegmatis* の形質転換：M. smegmatis* mc²155 株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 (2500V, 25 μ F, 800 μ s) でベクターを導入しカナマイシン (25 μ g/ml) を含んだ LB 寒天培地で 3 日間 37 $^{\circ}$ C で培養した。

***Sac*B 遺伝子を利用した形質転換体の選別：**10%スクロースを含む培地で 1 回組換え体を培養し、ネガティブセレクションを行い 2 回組換え体を分離した。

***M. smegmatis* の液体培地での培養：**菌の培養は、37 $^{\circ}$ C でカナマイシン (25 μ g/ml) が入った Sauton 培地で 600nm の吸光度が 0.5-1.0 になるまで振とう培養した。

リン脂質の組成分析：クロロホルム/メタノール=(2:1)の溶媒に菌体を懸濁し、超音波で破碎し、少量の水を加えて有機層を洗い有機層可溶性成分を抽出した。この抽出液は、シリカゲルを担体とした薄層クロマトグラフィー (TLC) の二次元展開を行い、リン脂質を分析した。

C. 研究結果

PSS 遺伝子破壊用のベクター (pJQ200-PSS/KMR) を構築し、このベクターで *M. smegmatis* を形質転換してカナマイシン耐性株をスクリーニングした。ベクター自体は、抗酸菌の複製開始点を持たないためスクリーニングで得た株は遺伝子破壊用のベクターがゲノム DNA 中に挿入された株である

(1 回組換え体)。この 1 回組換え体は、菌が持つ PSS 遺伝子と読み取り枠を破壊した PSS の両方を持っている。得られた 10 株の 1 回組換え体について、ベクター上の *Sac*B 遺伝子を利用してネガティブセレクションを行い 2 回組換え体を得た。得られた株からゲノム DNA を精製し、*Sac*I で消化後 PSS 遺伝子 DNA をプローブとして、サザンハイブリダイゼーション分析を行った。図 1 に表したように 2 回組換え体では mc²155 とは異なる位

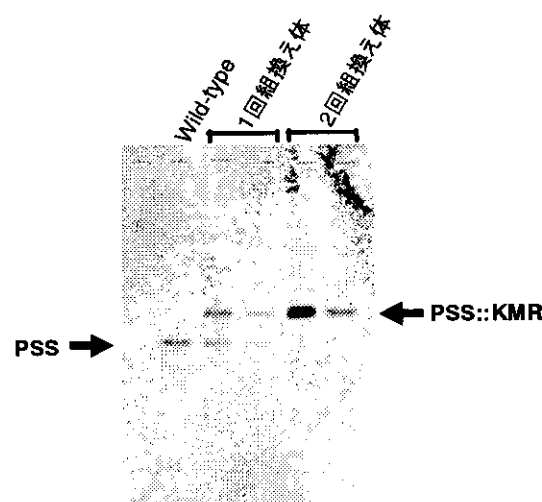


図1 サザンハイブリダイゼーション分析

置の DNA が反応し、1 回組換え体の破壊した PSS 遺伝子の位置と一致し、標準株の PSS 遺伝子 DNA の位置には反応していないことから、この変異株は、PSS 遺伝子が破壊された株であることが確認できた。そこで、得られた PSS 破壊株と mc²155 及び PSS 破壊株に PSS 遺伝子をプラスミドで導入して機能を補った株 (PSS 補完株) の 3 種類について表現型の違いを比較検討した。

3 株の増殖速度を比較すると、37 $^{\circ}$ C では若干破壊株の増殖速度が遅いが、mc²155 とほとんど変わらなかった。30 $^{\circ}$ C では、全く増殖速度に変化はみられなかった。

膜を構成するリン脂質の組成を 2 次元 TLC

で分析すると PSS 破壊株では PE が全く観察されなかった。また、破壊株では、PE 存在しないためリン脂質の構成が変化し、相対的に PI の含量が増加していた。一方、PSS 補完株ではリン脂質の組成は、mc²155 とほとんど変わらなかった。膜は、細菌にとって物理的なバリアの 1 種としての機能を持っている。そのため、組成の変化は外的な温度や抗微生物薬の膜の透過性、あるいは efflux ポンプなどの機能に影響を及ぼす可能性がある。そこで、

表1 変異株のMIC

<i>M. smegmatis</i> transformants	CAM	RIF	OFLX
	μg ml ⁻¹		
KO	0.5	10	0.5
mc ² 155	10	50	0.5
KM耐性プラスミド	10	50	0.5
KO + PSSプラスミド	5	50	0.5

破壊株、補完株及び mc²155 について Disk 法で菌の抗微生物薬に対する感受性を調べた。オフロキサシン (OFLX) に対しては 3 株とも阻止円の大きさは変わらなかったが、クラリスロマイシン (CAM) では、欠損株では阻止円が大きくなり菌の感受性が增大していることが示唆された。補完株では、mc² 155 の阻止円と大きさがほぼ等しくなったことから、一部の抗微生物薬で PSS の欠損は菌の感受性を増大させることが明らかになった。次に、それぞれの抗微生物薬に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を測定したところ OFLX では各株とも MIC は変化なかったが、CAM と RIF では、PSS 欠損株で MIC の低下が認められ、PSS 遺伝子を補完株では親株の mc²155 とほぼ同じ MIC であった (表 1)。

D. 考察

PSS 遺伝子は菌が増殖するのに必要な酵素であると考えていたが、実際に 2 回組換え体が得られたという事実から PSS 自体は菌の生存に必要なものでないという結論が得られ

た。増殖にはリン脂質の新たな合成が必要となるが、調べた限り PSS 欠損によって増殖能が低下するなどの影響はほとんど観察されなかった。しかし、欠損株のリン脂質の構成は、用いた mc²155 のものと大きく異なり、PE が全く検出されなかった。このことは、抗酸菌において PE の合成は、脱炭酸酵素によって PS から合成されるという経路を介していること、PE の不足分は PI やホスファチジルイノシトールマンノシドの含量が増大し、補うことによって菌の増殖能が維持されることが明らかになった。

一方、抗微生物薬に対する MIC 値を比較すると薬剤によって反応が異なるが CAM と RIF で PSS 欠損株の MIC が低下した。このことは、これらの薬物に対する耐性菌に PSS の酵素活性阻害薬を同時に投与すれば、菌の薬剤感受性が上昇し、薬剤の殺菌あるいは静菌効果を期待できるということを示唆している。このような効果は、PSS 欠損により、リン脂質の組成が変化して物質 (薬剤) の透過性が変化することによって生じていると考えられる。しかし、OFLX ではこのような効果が観察されなかった。そのため、PSS の阻害薬がすべての抗微生物薬の耐性菌に対して効果ないことがわかったので、今後、PSS 欠損による菌の薬剤感受性の上昇効果のメカニズムを詳細に検討する必要がある。

E. 結論

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。PSS 遺伝子を欠損させても菌は標準株と同様に増殖することがわかった。しかし、欠損株では、CAM や RIF に対する MIC が低下していることから PSS の阻害薬とこれら薬剤を併用することによって、耐性菌に関しても殺菌、静菌することが可能であることが明らかになった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

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、横浜、2002年4月

2) 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

3) Matsuoka M., Kashiwabara Y., Ozaki M. and Maeda S. :Distribution of the drug resistance *Mycobacterium leprae* in Japan and Southeast Asian countries. 37th US-Japan Tuberculosis-Leprosy Research Conference. Kyoto, August, 2002

4) Nakata N., Hashim KH, Kai M., Suzuki K., Matsuoka M., Maeda S., Kashiwabara Y. and Makino M. :Construction and analyses of a shuttle cosmid library of *Mycobacterium leprae* (Thai53). 37th US-Japan Tuberculosis-Leprosy Research Conference. Kyoto, August, 2002

H. 知的財産権の出願・登録情報

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

ハンセン病の視覚障害に関する研究

分担研究者 谷原秀信 熊本大学医学部眼科学教室 教授

研究要旨

国立療養所菊池恵楓園での眼科検診（2002 年度）と最近の手術成績を検討した。検診では視力 0.1 未満の者は入所者のうちの約 15%を占め、ハンセン病での視覚障害者の多さが窺われた。また、兔眼が 30%以上にも達し、それに伴い角膜障害を有する割合が非常に高くなっていった。手術治療については、ハンセン病特有の様々な術前問題点はあるものの、白内障や硝子体手術は十分な視力回復を得ることのできる有効な治療法であった。また緑内障手術や角膜移植術についても視機能維持に有用であった。さらにハンセン病の眼疾患患者に手術治療を行う場合、様々な角膜病変により瘢痕性角膜膜障害をきたしているため、同時に眼表面再建術を必要とするケースが多いので、羊膜を使用した緑内障手術を動物実験で検討した。

A. 研究目的

ハンセン病において眼はしばしばおかさされる器官であり、失明につながる事も少なくない。その眼疾患について近年の統計学的検討は少なく、眼科医療レベルの向上に伴い、薬物や手術の治療成績は大きく変化していると思われる。ハンセン病において眼はハンセン病視覚障害に対しては、3つの障壁のため十分に質の高い治療を提供できていない現状がある。その3つの障壁とは、(1) あきらめ、ためらいなどの心理的障壁、(2) ハンセン病の複雑な歴史的経緯のため先端医療の応用が慎重になっている医学的障壁、(3) 眼科常勤医不在のため意識しない最新情報の停滞・遮断による社会的障壁である。本研究においては、医学的障壁を解消することを志しており、先進医療をハンセン病視覚障害に適応するために、どのような眼科的問題点を抱えているのか

を解明しておき、確認できた問題点に対応する診療体制を構築することにある。

B. 研究方法

1. 臨床研究（1）：恵楓園での眼科検診

2002 年度の国立療養所菊池恵楓園における眼科検診は、上記の目的に添って、熊本大学医学部眼科学教室と恵楓園常勤医二名の協力のもとで、診察、検査を行った 386 名（男性 203 名、女性 183 名）を対象とした。年齢は 48～100 歳（平均 74.3 歳）で、視力、眼瞼疾患の有無、角膜病変、角膜内皮細胞、角膜知覚、眼圧、視神経乳頭陥凹比、点眼の使用頻度、眼科手術の既往について検討した。

2. 臨床研究（2）：ハンセン病視覚障害に対する手術成績

手術成績は、ハンセン病視覚障害に対し

て最近行った白内障手術、緑内障手術、角膜移植術、硝子体手術に限定して調べた。白内障手術は、2000年10月～2002年9月までの期間に白内障手術を行った41例50眼（男性22例26眼、女性19例24眼）を対象とし、年齢は64～95歳（平均75.0歳）で、術前の問題点、術式の内訳、術前後の視力変化、術中・術後の合併症について検討した。緑内障手術は、1998年9月～2002年9月までの期間に緑内障手術を行った7例8眼（男性5例5眼、女性2例3眼）を対象とし、1眼は3回手術を施行した。症例は、手術日が早い順に症例1～8と番号をつけた。年齢は64～90歳（平均73.1歳）で、疾患・術式の内訳、術前後の眼圧変化、術後の合併症、術後の眼圧コントロール・視野変化について検討した。角膜移植術は1996年11月～2002年5月までの期間に角膜移植術を行った5例6眼（男性4例5眼、女性1例1眼）を対象とし、1眼では3回手術が行われた。年齢は71～84歳（平均79.6歳）で、術前の問題点、疾患・術式の内訳、術前後の視力変化、術後の合併症について検討した。硝子体手術は2001年5月～2002年2月までに硝子体手術を行った3例3眼（男性1例1眼、女性2例2眼）を対象とした。年齢は62～68歳（平均64.7歳）で、疾患・術式の内訳、術前後の視力変化について検討した。

今回の検診と手術成績の検討では、ハンセン病患者のプライバシー保護を十分考慮し、この結果を今後の検査や治療に役立てることを説明した。

3. 基礎研究：眼表面再建手術・緑内障手術の組み合わせについての動物実験

上記の臨床研究から、ハンセン病視覚障害にとっては、麻痺性兔眼症により生じる重篤な眼表面が術中・術後の難易度に大きくかかわっており、その手術操作のやりやすさや手術成績に影響する。従って難治な眼表面障害を有するハンセン病視覚障害眼においては、眼表面再建手術の導入は必須である。そこで、羊膜を移植することで眼表面再建して、二期的に眼科手術を加える方法を考案した。そこで、熊本大学医学部倫理委員会の審議を経た上で、羊膜移植を用いた動物実験を行った。

緑内障手術の方法は、羊膜移植後に二期的に緑内障濾過手術を行う新しい術式で、治療効果を家兎眼を用いて検討した。10羽の白色家兎の右眼に対し、輪部基底の結膜切開を行い、5x5mmの兎羊膜を強膜上に9-0ナイロン糸で縫着した。さらに羊膜を覆うように結膜を9-0ナイロン糸で縫合した。左眼は同様に輪部基底で結膜切開後そのまま9-0ナイロン糸で縫合した。1週間後に結膜縫合糸を抜糸し、羊膜と強膜間を強膜刀にて輪部まで剥離し、ケリーのパンチでsclerectomy（強膜切除術）を行った後、結膜を9-0ナイロン糸にて再縫合した。コントロール群も同様にsclerectomyを行い、結膜縫合した。術後は毎日眼圧を測定し、濾過胞の状態を観察した。1週間後に眼摘し、組織学的検討を加えた。

C. 研究結果

1. 臨床研究（1）：恵楓園での眼科検診

視力の結果は図1のように、視力0.1未満の患者割合が、右眼17.7%（77/379眼）、左眼14.1%（54/384眼）と高い傾向にある。眼瞼疾患では麻痺性兔眼症が右眼32.1%

(97/302 眼)、左眼 36.0% (109/303 眼) と非常に高い割合で存在し、閉瞼時の平均瞼裂幅は右眼が 4.4mm、左眼が 4.2mm であった。睫毛内反は右眼 9.9% (34/342 眼)、左眼 7.5% (25/335 眼) であった。角膜病変は、角膜びらんが右眼 25.8% (86/334 眼)、左眼 25.8% (85/329 眼)、角膜混濁が右眼 32.3% (116/359 眼)、左眼 34.8% (126/362 眼)、角膜菲薄化が右眼 13.6% (46/338 眼)、左眼 15.5% (52/335 眼)、角膜血管進入が右眼 18.7% (64/342 眼)、左眼 23.1% (80/347 眼) で、いずれも多く見られた。角膜内皮細胞は、細胞密度 (cells/mm²) が右眼 2598.6、左眼 2506.1、細胞面積の変動係数が右眼 0.347、左眼 0.342、六角形細胞率 (%) 右眼 56.6、左眼 57.1 で、ほぼ正常近い値であった。角膜知覚は、角膜を中央部、耳側、鼻側、上方、下方の 5ヶ所に分けて Cochet-Bonnet 型の角膜知覚計 (単位: mm) で計測し、平均を調べたところ、右眼は中央部 48.4、耳側 50、鼻側 47.9、上方 47.4、下方 47.3 で、左眼は中央部 47.7、耳側 48.7、鼻側 49.5、上方 46.1、下方 47.7 と全体的にやや低めだがほぼ正常範囲内で、部位による明らかな差もなかった。眼圧は、平均眼圧が右眼 12.0mmHg、左眼 12.2mmHg で、21mmHg 以上の割合は右眼 0.68% (2/295 眼)、左眼 1.43% (4/280 眼) と低い値であった。視神経乳頭の陥凹と直径の比率 (C/D) は、平均で右眼は 0.45、左眼は 0.44 と正常で、0.8 以上の割合は右眼が 10.3% (27/261 眼)、左眼が 9.84% (24/244 眼) であった。点眼の使用頻度は高く、各点眼剤の使用頻度は角膜保護剤が 57.7% (195/338 眼)、人工涙液が 29.3% (99/338 眼)、緑内障点眼薬が

7.4% (25/339 眼)、抗菌薬が 31.1% (105/338 眼)、副腎皮質ステロイド剤が 18.1% (61/338 眼) であった。眼科手術既往の割合は、58.0% (127/219 眼) と高い値を示した。

2. 臨床研究 (2): ハンセン病視覚障害に対する手術成績

白内障手術

術前の問題点として、兎眼 55.1% (27/49 眼)、最大散瞳径が 4.5mm 以下の小瞳孔 51.1% (24/47 眼)、角膜混濁 36.2% (17/47 眼)、水晶体核硬度 grade 3.5 以上 33.3% (14/42 眼)、虹彩炎 22.0% (11/50 眼) があり、難症例が多くみられた。術式の内訳は超音波乳化吸引術+眼内レンズ挿入術が 38 眼、超音波乳化吸引術が 2 眼、水晶体囊外摘出術+眼内レンズ挿入術が 9 眼、眼内レンズ二次挿入術が 2 眼であった。術前後の視力変化は図 2 に示す通りで、視力低下をきたす症例はなく、多くの症例で視力改善を得た。術中合併症として、水晶体後囊破損 4% (2/50 眼)、水晶体皮質残存が 4% (2/50 眼)、虹彩根部離断 2% (1/50 眼)、チン小帯断裂 2% (1/50 眼) があった。術後合併症は、点状表層角膜症 24% (12/50 眼)、眼圧上昇が 14% (7/50 眼)、炎症遷延・再燃 8% (4/50 眼)、瞳孔異常 6% (3/50 眼)、角膜びらん 6% (3/50 眼)、角膜潰瘍 6% (3/50 眼)、前囊収縮 4% (2/50 眼)、後発白内障 4% (2/50 眼) であった。

緑内障手術

疾患の内訳は慢性閉塞隅角緑内障が 5 眼、原発開放隅角緑内障が 2 眼、落屑緑内障 1 眼で、術式は、マイトマイシン C 併用線維

柱帯切除術を4眼、線維柱帯切除術+白内障手術を3眼、非穿孔性線維柱帯切除術を1眼に選択した。術前後の眼圧変化（入院時と退院時）を図3に示す。1例を除き眼圧の低下が得られた。術後合併症は8症例中6症例にあり、症例2は点状表層角膜症、症例3は遷延性角膜上皮欠損、濾過胞消失、症例4は濾過胞形成不全、眼圧上昇、症例5は脈絡膜剥離、症例7は浅前房、縫合不全、症例8は濾過胞形成不全であった。術後経過において、眼圧コントロールの良好な症例が6眼、コントロール不良な症例が2眼で、視野変化は進行のないものが7眼、あるものが1眼あった。

角膜移植術

術前の問題点として、兎眼100%(6/6眼)、虹彩炎50%(3/6眼)があり、いずれも難症例であった。原疾患は細菌性角膜潰瘍、角膜真菌症、角膜ヘルペス、周辺部角膜潰瘍、角膜混濁、角膜穿孔がそれぞれ1眼ずつであった。術式は全層角膜移植術を3眼、深層角膜移植術を2眼、自己角膜回転移植術を1眼に選択した。術前後の視力変化は図4に示す通りで、1眼を除き視力低下はなかった。術後合併症としては角膜移植片不全2眼、角膜混濁が1眼にあった。

硝子体手術

原疾患の内訳は、眼内炎、黄斑上膜、黄斑円孔・網膜剥離がそれぞれ1眼ずつで、術式は白内障手術+硝子体切除術が2眼、硝子体切除術のみが1眼であった。術前後の視力比較では、すべて症例で改善している。

3. 基礎研究：眼表面再建手術・緑内障手術の組み合わせについての動物実験

術中所見として、羊膜移植眼では、結膜を剥がしやすく羊膜と強膜との癒着も少なく、簡単に輪部まで剥離できた。一方、コントロール眼では結膜と強膜間の癒着がみられ、輪部まで剥離するのが比較的困難であった。術後眼圧は、術直後では羊膜移植眼で低い傾向があったが、両群間で有意の差を認めなかった。濾過胞の形成は羊膜移植眼の方が良好であった。組織学的にも結膜下のfibrosisや炎症細胞の浸潤は羊膜移植眼の方が少なかった。

D. 考察

今回、国立療養所菊池恵楓園で行った眼科検診(2002年度)と手術成績について検討した。視力0.1未満の者は入所者のうちの約15%を占め、ハンセン病での視覚障害者の多さが窺われた。また、兎眼が30%以上にも達し、それに伴い角膜障害を有する割合が非常に高くなっていた。異常が予想された角膜内皮細胞や角膜知覚は正常であった。緑内障に関しては、すでに今までの検診で異常者は発見され治療されていたのか、高眼圧者は少数であった。しかし、視神経乳頭陥凹比が0.8以上の人が10%程度存在するので、今後は視野検査による精査を行う必要である。点眼の使用頻度は非常に高く、兎眼による角膜障害に対しては角膜保護剤や人工涙液が使用され、虹彩炎既往のため長期にステロイド点眼や感染予防の抗菌薬点眼も投与されていた。

手術治療については様々な術前問題点はあるものの、白内障や硝子体手術は十分な視力回復を得ることのできる有効な治療法

であった。手術後の虹彩炎の再燃が心配されたが、白内障術後の4症例に炎症再燃や遷延化が起きたものの、いずれも後遺症はなく治癒し問題となるような炎症はなかった。虹彩炎など眼内の炎症が落ち着いている状態であれば、手術による悪影響は少ないと考えられた。また緑内障手術や角膜移植術についても視機能維持に有用であった。しかし、ハンセン病による眼疾患では、兔眼による角膜障害が最も大きな問題として残っており、兔眼を解決できないときは、手術の長期予後が不良になる。

眼科医療レベルの向上に伴い、ハンセン病の眼疾患に対する薬物や手術の治療成績は、大きく改善していた。しかし、様々な身体障害を持つハンセン病患者に適した手術治療や検査法はまだ十分に行われていない。緑内障評価においては視野計測が不可欠であるが、ハンセン病患者は垂手や鷲爪手など手指が不自由で、検査用のスイッチが押せずに視野測定が正確にできないので、診断や治療に支障をきたしている。そこで視野計をスイッチに代わり音声に反応するように改良し、臨床応用する予定である。角膜移植については、今までは角膜感染症や角膜穿孔など急性期の角膜疾患に対する治療が中心であったが、今後は眼表面疾患や角膜混濁など視機能回復を目指した治療が必要である。国内提供角膜の深刻な不足のため、移植角膜の確保という大きな問題がある。また、眼表面疾患患者には羊膜を使用した眼表面再建術を試みる予定である。

動物実験では、羊膜移植後に、二期的に緑内障濾過手術を行うことは結膜癒着や眼表面疾患を伴う緑内障眼において、良好な濾過胞を形成する優れた方法だと思われた。

E. 結論

ハンセン病での視覚障害者は多く、兔眼が30%以上にも達し、それに伴い角膜障害を有する割合が非常に高くなっていた。ハンセン病の眼疾患は、眼科医療レベルの向上に伴い、薬物や手術の治療成績は大きく改善していた。しかし、様々な身体障害を持つハンセン病患者に適した手術治療や検査法はまだ十分に行われておらず、今後は新しい検査機器の開発や手術治療が必要である。羊膜を使用した緑内障手術は有用である可能性が示された。

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 なし

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

図1 菊池恵楓園入所者の矯正視力

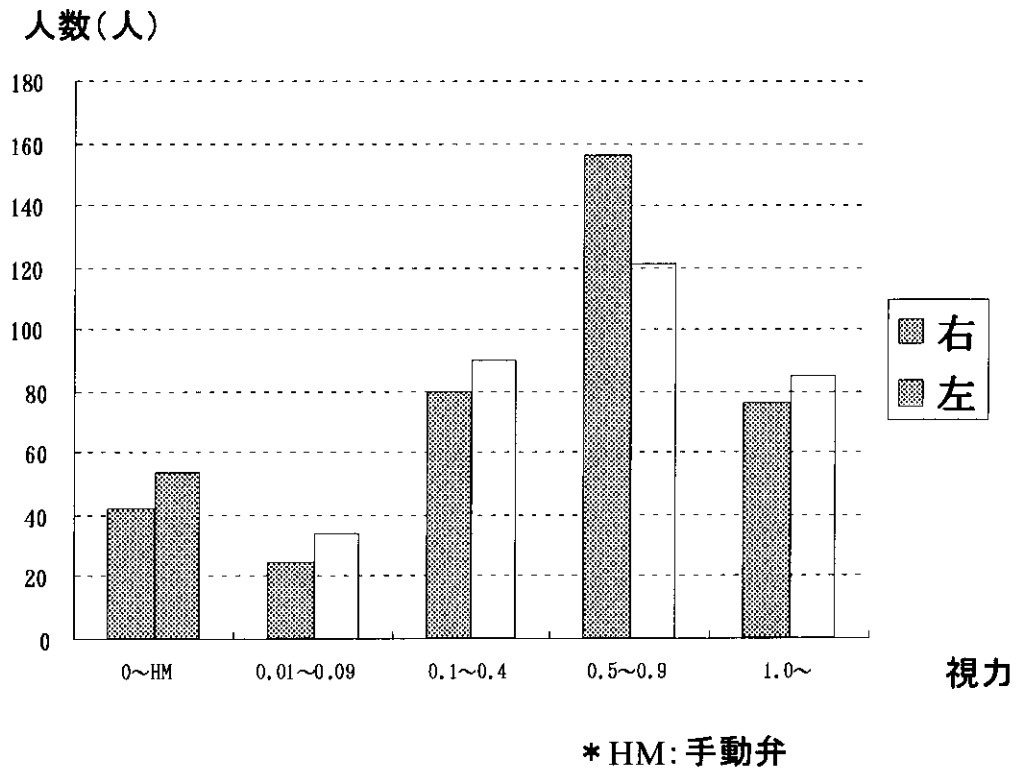


図2 白内障手術前後の視力変化

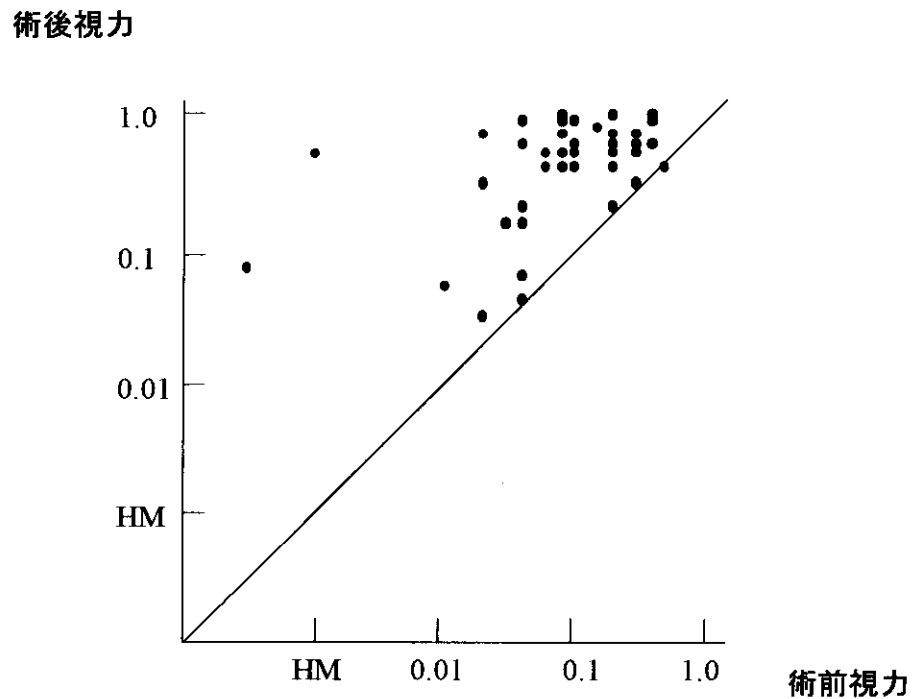


図3 緑内障手術前後の眼圧変化

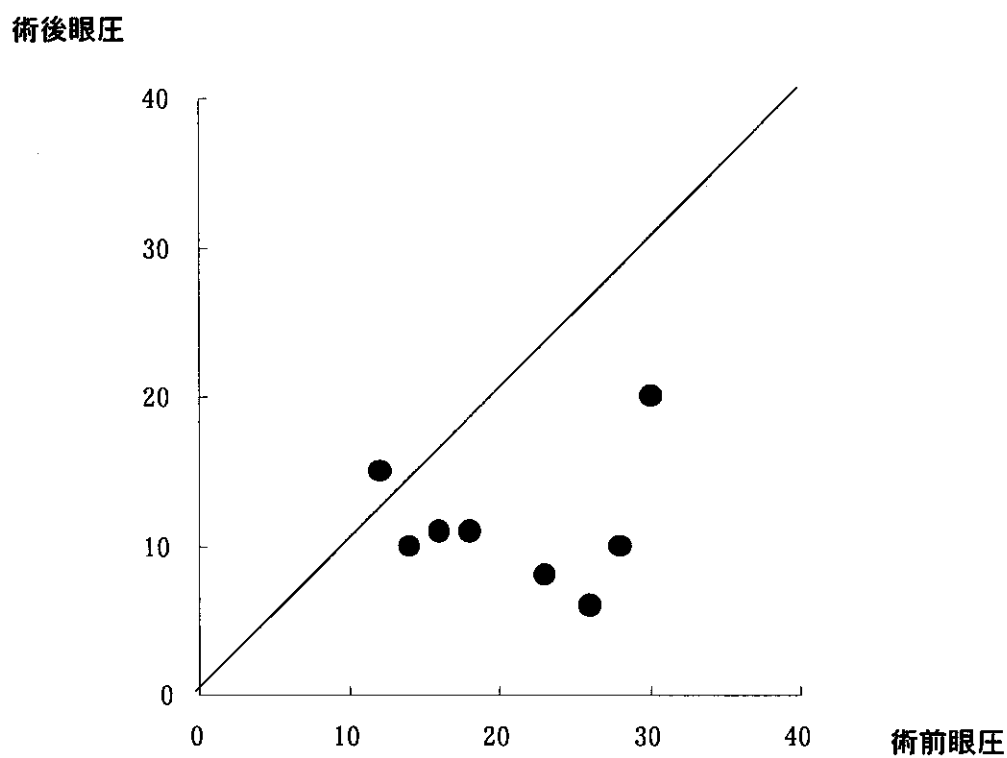
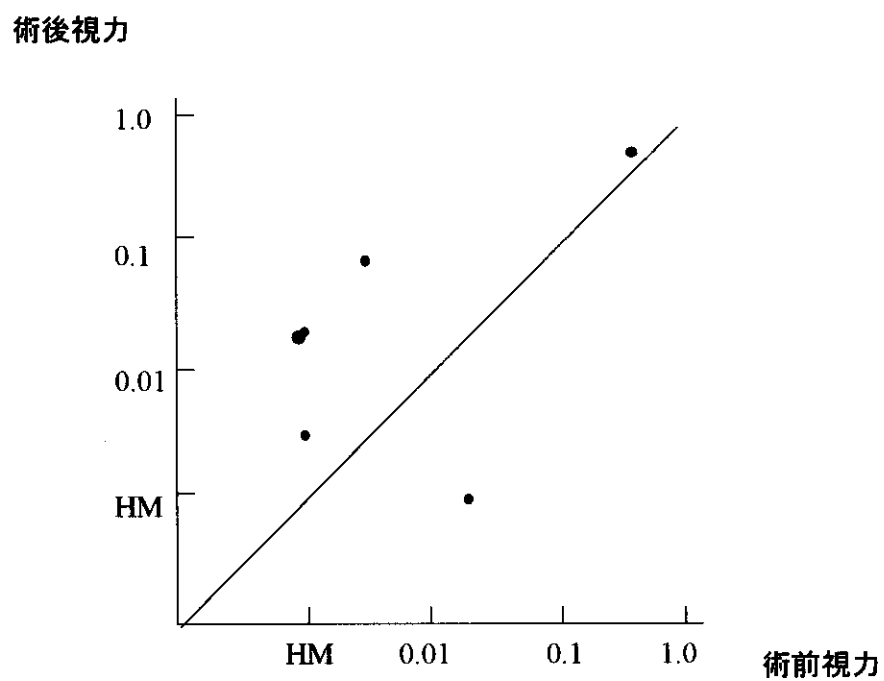


図4 角膜移植術前後の視力変化



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
牧野正彦	ハンセン病— Hansen's Disease, Leprosy.	小早川隆敏	新版・感染症 マニュアル			2002	176- 179
岩田 誠	ミトコンドリア脳筋 症	多賀須幸男 尾形悦郎	今日の治療指 針2002	医学書院	東京	2002	585- 586
内山真一郎 中村智美、 山崎昌子、 岩田 誠	抗血小板療法—単独 療法と併用療法—	柳沢信夫、篠 原幸人、岩田 誠、清水輝夫 寺本明	Annual Revi ew 神経2002	中外医学 社	東京	2002	146- 157
岩田 誠	知覚と認知	小川紀雄、 仙波純一	脳の健康科学	放送大学 教育振興 会	東京	2002	78-90
岩田 誠	摩擦 ほか	内菌耕二、小 坂樹徳	看護学大辞典 第5版	メジカル フレンド 社	東京	2002	
岩田 誠	田沼さんの進行性核 上性摩擦	田沼祥子	フォトドキュ メントいのち 抱きしめて	日本評論 社	東京	2002	I-VI
岩田 誠、 大東祥孝、 加藤元一郎 田邊敬貴、 山鳥重	脳とこころ—神経心 理学的視点から	田邊敬貴	脳とこころ	共立出版	東京	2002	1-73
岩田 誠	神経心理学の展開	田邊敬貴	脳とこころ	共立出版	東京	2002	122- 131
石井則久	ハンセン病	多賀須幸雄 尾形悦郎	2002 今日の 治療指針	医学書院	東京	2002	770- 771
石井則久	知覚異常を愁訴とす る皮膚疾患	宮地良樹、 古川福実	皮膚疾患診療 実践ガイド	文光堂	東京	2002	40