

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

ハンセン病の早期診断・薬剤耐性・ワクチンに係る新技術の
戦略的開発及び発症状況把握に関する研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 向井 徹

平成 16 (2004) 年 3 月

目 次

I 総括研究報告書

ハンセン病の早期診断・薬剤耐性・ワクチンに係る新技術の戦略的開発及び発
症状況把握に関する研究

向井 徹..... 1

II 分担研究報告書

1 新規らい菌抗原を用いたハンセン病診断法の開発

甲斐 雅規..... 13

2 らい菌の型別とハンセン病の分子疫学

松岡 正典..... 21

3 薬剤耐性菌の伝播解明に関する研究

尾崎 元昭..... 27

4 新規抗らい菌薬と多剤併用療法の開発

儀同 政一..... 29

5 らい菌菌膜抗原の細胞性免疫誘導能の検討

牧野 正彦..... 37

6 らい菌特異的リポタンパクの機能解析

前田 百美..... 41

7 高効率に NKT 細胞を誘導するペプチド型ワクチンのデザインに関する研究

大山 秀樹..... 47

8 効率的粘膜免疫誘導法の開発

向井 徹..... 53

9	サルのハンセン病モデル開発と新規ワクチンの有効性評価	
	寺尾 恵治.....	61
10	ハンセン病発症状況の把握	
	石井 則久.....	67
11	ハンセン病療養所における新たな介護職員配置基準の作成	
	占部 正子.....	71
III	研究成果の刊行に関する一覧表.....	77
IV	研究成果の刊行物・別刷.....	81

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

ハンセン病の早期診断・薬剤耐性・ワクチンに係る新技術
の戦略的開発及び発症状況把握に関する研究

平成 15 年度 総括研究報告書

主任研究者 向井 徹

（国立感染症研究所 ハンセン病研究センター）

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

総括研究報告書

ハンセン病の早期診断 薬剤耐性・ワクチンに係る新技術の戦略的開発及び
発症状況把握に関する研究

主任研究者 向井 徹 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 第一室長

研究要旨 早期診断技術の開発、感染経路の解明、薬剤耐性対策、ワクチン開発により、ハンセン病制圧に貢献すると共に、ハンセン病の発症状況の把握、療養所における新たな介護員配置基準作成により、諸問題を包括的に検討することを目的とした。今年度は、以下の成果が得られた。新規血清診断法の抗原として、らい菌糖脂質の解析を行い TMM およびらい菌では初めて TDM を同定し、その新たな診断抗原となる可能性を示した。感染経路特定のため、流行地域住民の遺伝子型分布を調べ、家族内多菌型患者以外の感染源の存在が示唆された。新規型別遺伝子領域探索のため、らい菌 Thai-53 株と TN 株の塩基配列を行い、より詳細な型別を可能にする新領域を同定した。耐性患者の発生状況把握し、耐性菌の伝播、耐性発生の予防 治療のために、耐性遺伝子変異の解析、耐性患者の追跡調査を行った。新規 7 例中 1 例に *gyrA* に、再検査 6 例中 4 例では *foP* に変異が検出された。耐性症例は、クロファジミン (CLF)、ミノサイクリン (MINO)、クラリスロマイシン (CAM) がおもに 2 剤、3 剤の使用で改善をみ、治療指針 (2000) 更新の必要性を認めた。治療期間短縮と耐性菌に対応するため、新ニューキノロン系抗菌薬の抗らい菌活性を検討した結果、MFLX は、SPFX より強い活性を認め、光毒性などの副作用の少ないフルオロキノロンとして期待された。また、SPFX は、OFLX 耐性らい菌の増殖を完全抑制し、OFLX 耐性患者の併用療法薬となる可能性を示唆した。次のような菌体成分が、ワクチン候補として有用であることが示唆された。らい菌由来 Major Membrane Protein-II (MMP-II) は、らい菌に対する生体防御反応を誘導する重要な抗原の一つである可能性を示唆した。生体防御反応を引き起こすらい菌リポ蛋白 (LpK) の活性中心部位は、脂質付加 N 末側 60 アミノ酸が重要な役割を担っていた。Fibronectin Attachment Protein (FAP)-DNA ワクチンは、抗らい菌免疫反応を惹起することが期待された。自然免疫活性化宿主因子を安全かつ効果的な遺伝子アジュバントとして利用した際、免疫原性増強効果が期待された。CD1d 分子結合性ペプチドの同定、およびそのアナログによる iNKT 細胞応答性の人為的制御は、困難であると考えられた。鼻腔粘膜抗原運搬細胞を標的としたワクチン投与法は、粘膜免疫を誘導し、簡易な噴霧ワクチン開発が可能であると考えられた。系統的なハンセン病モデル開発のため、経鼻、皮内、静脈の 3 経路より幼弱カニクイサルへらい菌を接種し、3 ヶ月現在、3 個体にらい菌蛋白に対し細胞性免疫である幼若化反応を認めた。らい菌感染サルの免疫学的指標の確立は、系統だった感染モデル系の開発に重要と考えられた。公表資料をもとに、ハンセン病の新規患者を検索した結果、平成 16 年 1 月 5 日現在、日本人は 1 名、外国人は 7 名であった。新規患者の継続的経過を知ることは、治療効果や副作用、再燃、再発などの貴重な情報を得るために重要と考えられた。ハンセン病療養所の入所者に 1995 年作成

の介護度調査票により、聞き取り・観察調査を行い、調査票項目の問題点が明らかになった。調査票の見直し、介護量を正しく把握し適正な人員配置基準の作成が必要と考えられた。本研究により得られた知見は、ハンセン病対策に有用な貢献が可能と考えられた。

分担研究者名

甲斐 雅規 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター
室長

松岡 正典 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター
室長

尾崎 元昭 国立療養所長島愛生園
皮膚科
医長

磯同 政一 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター
室長

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

前田 百美 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター
研究員

大山 秀樹 埼玉医科大学
医学部
講師

寺尾 恵治 国立感染症研究所
筑波霊長類センター
センター長

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

占部 正子 国立療養所菊池恵楓園
看護部長

を数え、減少傾向を示さない。WHO により推進された MDT 療法により、ハンセン病制圧政策は、登録患者数の減少に効を奏したが、新規患者の発症に歯止めをかけることは出来ずその対策が望まれている。このため、早期診断技術の開発、感染経路の解明、薬剤耐性対策、ワクチン開発、ハンセン病の発症状況の把握、療養所における新たな介護員配置基準作成など、これらハンセン病の諸問題に対し包括的な検討を目的に以下の研究を行った。

- 1 新規らい菌抗原を用いたハンセン病診断法の開発(甲斐)
- 2 らい菌の型別とハンセン病の分子疫学(松岡、中田)
- 3 薬剤耐性菌の伝播解明(尾崎)
- 4 新規抗らい菌薬と多剤併用療法の開発(磯同)
- 5 らい菌菌膜抗原の細胞性免疫誘導能の検討(牧野)
- 6 らい菌特異的リポ蛋白の機能解析(前田)
- 7 効率粘膜炎免疫誘導法の開発(向井、武下)
- 8 NKT 細胞誘導ペプチド型ワクチンのデザイン(大山)
- 9 サルのハンセン病モデル開発と新規ワクチンの有効性評価(寺尾)
- 10 ハンセン病発症状況の把握(石井)
- 11 ハンセン病療養所における新たな介護職員配置基準の作成(占部)

B 研究方法

- 1 新規診断抗原探索のため、らい菌より糖脂質を抽出し、クロマトグラムにて、結核菌由来のバンドと比較検討した。さらに、

A. 研究目的

新患ハンセン病患者は、今なお年間数十万人

MALDI-TOFMS (マトリックス支援レーザー解離イオン化-飛行時間型質量分析装置) により質量とピークパターン解析を行った。

2 らい菌遺伝子中の TTC 塩基配列繰り返し数の多型性 (TTC-RV) による型別法の疫学解析への有用性検討のため、11 研究室維持株について多型性と継代による安定性を調べた。インドネシア共和国の北 Maluku のハンセン病流行地域から得た住民の鼻粘膜材料のらい菌 TTC-RV により、個々の住居に同居する住民のそれぞれの遺伝子型分布を調べた。新規型別用遺伝子領域探索のため、ゲノム DNA 配列を検索し、Thai-53 株と既報のらい菌 TN 株を比較した。

3 ハンセン病の再発例、治癒遅延例および新患について、らい菌遺伝子変異の検索を行った。DDS・リファンピシン (RFP) オフロキサシン (OFLX) の耐性発生状況を調査した。耐性患者について、現在の治療状況を検討し、新キノロン剤の使用指針を作成した。

4 治療期間短縮と耐性菌に対応するため、Buddemeyer 法により WQ-3402, MFLX, TFLX の抗らい菌活性を SPFX, GFLX, LVFX, CAM, MINO, RFP と比較検討した。ヌードマウス足蹠法により WQ-3402 と SPFX, MFLX と SPFX, OFLX 耐性らい菌に対する SPFX の抗らい菌活性を比較検討をした。

5 細胞性免疫反応を誘導し得るらい菌抗原探索のため、菌膜各分画を樹状細胞 (DC) にパルスし、その抗原提示能を測定した。ウェスタンブロット法で、抗原性の強い菌膜分画にバンドを得、N 末端アミノ酸配列を決定し、大腸菌にて発現 精製した。DC を MMP-11 により刺激し、産生される IL-12 p70 は ELISA 法にて測定した。抗原提示能は、自己 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞から産生される IFN- γ を指標とした。

6 生体防御反応を引き起こすらい菌リポ蛋白 (LpK) の活性中心部位を同定するため、様々な Truncated LpK を大腸菌で発現・精製を行った。精製蛋白によりヒト末梢血単球を刺激後、上清中の IL-12 p40 を測定した。ヒト樹状細胞に精製抗原をパルスし、抗原提示能は IFN- γ を指標に自己 T 細胞の活性化解析した。

7 粘膜面抗原運搬細胞 M 細胞と特異的に結合するヒトレオウイルス 3 型 σ 因子のクローニングを行い、MBP 融合蛋白の形で、らい菌 FAP および MMP-11 発現蛋白を σ 因子の付加、非付加の形で精製した。 σ 因子依存性 HeLa 細胞結合性を検討し、*in vivo* での免疫誘導性検討は、精製蛋白群をマウスに投与し、抗 FAP、抗 MMP-11 抗体価を ELISA 法を行った。らい菌の細胞侵入における FAP の機能解析は、らい菌を非免疫血清または抗 FAP 血清で前処理後細胞へ感染させ、細胞内侵入菌数を解析した。ELISA 法により健常者、患者の血清中の抗 FAP 抗体価を定量した。FAP、FAP-MyD88、FAP-TRIF 各 DNA ワクチンを作製し、NF- κ B または IFN- β プロモーターの活性を定量した。また、ウエスタンブロット法により、細胞内 FAP タンパクの発現量を比較した。

8 末梢血単核細胞から V α 24 陽性 T 細胞を分離し、NKT 細胞株を樹立した。CD1d 分子に結合することが知られる 2 種のペプチドおよび CD1d 分子結合性モチーフを含むコンビナトリアルペプチドライブラリーおよび長さの異なるコンビナトリアルペプチドライブラリーを合成した。合成ペプチドが V α 24NKT 細胞株に誘導するアゴニスト活性およびアタゴニスト活性は、抗原存在下における細胞増殖能で評価した。

9 国立感染症研究所 筑波医学実験用霊長類センターで繁殖育成された 6-8 ヶ月齢の幼若カニクイザル 6 頭に、らい菌を静脈内、鼻腔

内、鼻先端部それぞれ2頭ずつ接種した。らい菌接種前、接種後4および6週目に採血し、定法に従ってリンパ球を分離し、FACSにより主要リンパ球サブセットレベルを測定した。幼若化反応はリンパ球に3種のらい菌由来ペプチド(MMP-II、LpK、FAP)を添加し測定した。

10 公表されている各種学会発表、論文発表等をもとに、ハンセン病の新規患者を検索した。検索内容は年齢、性、国籍、病型、治療内容、経過などである。それらを基に、1993年から2003年までの新規患者をデータベース化して統計学的解析を行った。

11 国立ハンセン病療養所13施設の入所者(長期不在者をのぞく)全員を調査対象者とした。2003年9月1日~20日に1995年作成の介護度調査票を用い、看護師長・看護師・介護員の3名1組で聞き取り・観察調査を行い、介護度調査票の問題点の抽出をした。

倫理面への配慮 検体採取等は、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。動物を用いる実験では、当該施設の動物実権指針に基づき計画・審査され施行し、動物愛護の観点に立ち、痛みの軽減 安楽死などの処置を行う。

C. 研究結果およびD 考察

1 らい菌と結核菌粗糖脂質画分画分の薄層クロマトグラフィー比較より、結核菌の血清

診断に用いられるTDM、TMMと同等の位置にバンドが得られた。質量分析装置の解析より、らい菌はメトキシミコール酸を含有しないこと、また、ミコール酸を構成する炭化水素鎖の長さが結核菌と異なることが明らかになり、このことから抗原性に違いがあると推察され、新規抗原に有用と考えられた。

2 ヌードマウスに維持された11株のTTC-RVを検討の結果、株間で異なるコピー数を示し、また、11代を経ても同じコピー数が安定保存され、疫学解析に有用であると考えられた。北Malukuの5軒において同居する家族間に明らかにTTC-RVを異にするらい菌が分布する家が複数あり、住居以外に存在する感染源から感染を受けたことが示された。特定の家族にハンセン病患者が集積する傾向が認められるが、これは個人の感受性差に起因するのではないかと考える。らい菌Thai-53株ゲノムライブラリーと既報のTN株のリピートについて比較の結果、19領域にコピー数の相違が見られた。そのうちの1つ、*ML1505*遺伝子内のGCACCTを5ヶ国の臨床分離株31株と比較した結果、株により様々なコピー数を示し、また、安定して保存されていた。これまでらい菌ゲノムDNAは株間における相違に乏しいと考えられてきたが、ゲノム中のリピートに様々なパターンが見られることが明らかとなり、従来の方法による分類では区別不能な分離株についても分類可能であることが示され、ハンセン病感染経路の特定に有用であると考えられる。

3 今年度を実施した耐性検査より、新規7例中1例に*gyrA*に、再検査6例中4例では*folP*に変異が検出された。DDS・RFP OFLXのうち2剤ないし3剤に耐性が生じていた症例は、クロファジミン(CLF)、ミノサイクリン(MINO)、クラリスロマイシン(CAM)がおもに2剤、と

きに3剤で使用され、臨床症状の改善をみた。WHO/MDT が実施されているミャンマーにおける MDT 実施後の耐性発生調査の可能性について予備調査を実施した。2000年に治療指針が出されているが、一部の施設でまだ少量投与が行われ、ハンセン病診療施設への強力な働きかけが必要とみられる。新キノロン剤は、一般感染症に広く使用され、耐性発生を予防するのは困難と推測される。

4 WQ-3402 は、Buddemeyer 法で、SPFX を変え RFP に匹敵する強い抗らい菌活性を示したが、ヌードマウス足趾法では、50mg/kg でも不完全抑制であった。MFLX は、足趾法で SPFX に匹敵する強い抗らい菌活性を示した。MFLX に、SPFX より強い抗らい菌活性を認め、光毒性などの副作用の少ないフルオロキノロンとして期待される。OFLX 耐性らい菌 (OFLX 150mg/kg で不完全抑制) に対し SPFX は、40mg/kg でらい菌の増殖を完全抑制した。OFLX 耐性患者に併用療法薬として使用できる可能性を示唆した。

5 PB 型患者と反応性の強い蛋白は、N 末端アミノ酸配列解析より、らい菌細胞膜の Membrane Protein-II (MMP-II) と同定された。大腸菌発現 MMP-II を精製し、抗原性について検索したところ量依存的に DC は IL-12 p70 を産生した。MMP-II パルス DC を用いて自己の CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞を刺激したところ、T 細胞が活性化され IFN- γ が産生された。細胞性免疫賦活能を有するらい菌抗原の同定は、ワクチンの開発に直接的に結びつく。また、PB 型患者 T 細胞は、MMP-II に感作されている可能性が示唆され、MMP-II はらい菌に対する細胞性免疫を誘導する際の重要な抗原であると想定された。

6 脂質付加、非付加の N 末側 60 アミノ酸および C 末側 179-371 からなる LpK 蛋白を大腸

菌により発現 精製した。ヒト末梢血単球へ添加後の IL-12 p40 産生を検討した結果、脂質付加 N 末側 60 アミノ酸は、親 LpK と同等の IL-12 が産生され、自己の CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞を活性化し有意に IFN- γ を産生した。また、LpK と TLR2 の関与が明らかとなった。抗酸菌に対するワクチンを構築する上で有用な情報を与えるものと期待する。

7 MBP 融合型らい菌 FAP および MMP-II 蛋白の HeLa 細胞結合能は、いずれも σ 因子依存的に結合した。マウスへの経鼻投与 6 週目で、糞便中、血漿中抗 FAP および MMP-II IgA 抗体価は、 σ 因子付加群が非付加群より上昇していた。 σ 因子依存的に粘膜免疫誘導効果の増強を示し、簡易な投与方法開発の可能性を示した。抗 FAP 血清処理らい菌投与群で有意に侵入菌数が少なかった。抗 FAP-IgG 抗体価は、ハンセン病患者で有意に高値を示し FAP の免疫原性が確認された。FAP-MyD88、FAP-TRIF 各 DNA ワクチンは FAP ワクチンと比べ、レポーター活性の上昇を認め、また、同等レベルの FAP タンパク発現を誘導した。自然免疫活性化に係わる宿主分子を安全で効果的な遺伝子アジュバントとして利用した際、免疫原性増強効果が期待された。

8 樹立した T 細胞株が抗原提示細胞存在下で抗原濃度依存的に増殖活性を示すこと、irrelevant である cerebroside に対してはまったく増殖活性を示さないことから iNKT 細胞株と確認された。合成したペプチドのヒト V β 24NKT 細胞に誘導するアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性は示さなかったため、iNKT 細胞応答性の人為的制御は、困難であると考えられた。

9 サルへのらい菌接種に伴い CD3+/T 細胞の増加、CD20+/B 細胞の減少、活性化 T 細胞のマーカー CD29 強陽性の CD4+/T 細胞の増加な

どの各種細胞表面マーカーの変動は、らい菌に対する免疫応答というよりも、らい菌接種により生じた炎症反応に由来する変化と考えられる。らい菌由来ペプチドで誘導される幼若化反応は、静脈内接種した2頭および鼻腔内に接種した1頭でFAPおよびLpKに対する幼若化反応が生じた。らい菌感染サルの免疫学的指標の確立は、系統だった感染モデル系の開発に重要なものと考えられる。

10 平成15年の新規ハンセン病患者調査の結果、平成16年1月5日現在8名の患者を登録した。日本人は男1名、沖縄県出身者、70歳代で、病型はMB(多菌型)であった。一方、外国人患者は7名(男6,女1)、ブラジル人3名、インドネシア人1名、ネパール人1名、ミャンマー人1名、フィリピン人1名(女)であった。平均年齢は36.6歳、病型は6名がMB(多菌型)であった。引き続き新規ハンセン病患者調査を行い、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。新規患者の継続的経過を知ることは、治療効果や副作用、再燃、再発などの貴重な情報を得るために重要である。在日外国人は新患の約2/3を占めているが、継続治療に困難をきたしているため、国際関係などからも支援すべきである。

11 1995年作成の介護度調査票を使用し調査を行った結果、

- ・入所者自身が一人で出来るにもかかわらず、介護員が行っている
- ・一つの項目の中に多くの要素を含むため評価しにくい
- ・進行状況1つの中に認知と行動のレベルがあり評価にとまどる
- ・心のケアを求めているが、介護度調査票では計ることができない
- ・介護度調査票には安全管理の項目、事故防

止やQOL向上のための観察の項目がない
・調査票の内容や点数配分の根拠がはっきりしていない

以上の点が明らかになった。

E 結論

1 らい菌糖脂質 TMM、TDM の検出をした。ミコール酸のサブタイプが異なり、かつ脂肪酸の鎖長にも違いがみられたことから、らい菌特有の血清診断用抗原の候補になりうることを示唆された。

2 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、家族内多菌型患者以外の感染源の存在が示唆された。ML1505 遺伝子内の GCACCT リピートは株により5種のコピー数を示し、ハンセン病感染経路の特定のために有用であると考えられる。

3 薬剤耐性検査としてのらい菌遺伝子変異検査は、新患にも実施されるようになった。全国のサーベイランス実施および耐性菌伝播の把握を進めていく必要がある。耐性が確認された症例の治療成績を追跡し、治療指針(2000)更新の必要性を認めた。ハンセン病流行地での MDT 後の耐性発生調査に着手した。

4 MFLX は Buddemeyer 法で SPFX を凌ぎ RFP に匹敵する強い抗らい菌活性を示した。OFLX 耐性らい菌に対し SPFX は 40mg/kg で完全抑制を示した。

5 らい菌由来 MMP-II は、らい菌に対する生体防御反応を誘導する重要な抗原の一つである可能性が示唆された。

6 らい菌由来のリポ蛋白 LpK は、脂質を含む N 末端部分が生体防御反応に重要な役割を担っていた。抗酸菌感染症のワクチン候補として有用であることが示唆された。

7 粘膜抗原運搬細胞を標的とした抗原投与

法は、非標的投与法に比べ強い粘膜免疫を誘導し、簡易な噴霧ワクチン開発が可能であると考えられた。自然免疫活性化分子 (MyD88, TRIF) を遺伝子アジュバントとして用いた FAP-DNA ワクチンは、抗らい菌免疫反応を惹起することが期待された。

8 CD1d 分子結合性ペプチドの同定、およびそのアナログによる iNKT 細胞応答性を人為的制御することは困難であった。

9 幼若カニクイザルにらい菌を異なった 3 経路で接種し、感染時におけるリンパ球サブセットレベル及びらい菌由来ペプチドで誘導されるリンパ球幼若化反応を調査した。CD3+/T 細胞と CD4+/T 細胞レベルの上昇がほとんどすべての感染ザルで認められた。これは接種部位の炎症反応に伴う応答と考えられる。幼若化反応は、3 頭で認められた。

10 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。

11 現行の調査票項目の問題点が明らかになり、介護度調査票の見直し、又はあらたな調査票を作成により入所者の介護量の正しい把握、適正な人員配置基準の作成が必要と考えられた。

以上の本研究により得られた知見は、ハンセン病対策に有用な貢献が可能と考えられた。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

1 Kai M, Y. Maeda, S Maeda, Y Fukutomi,

K Kobayashi, Y Kashiwabara, M. Makino, M A Abbasi, M Z Khan, P A Shah Active surveillance of leprosy contacts in country with low prevalence rate Intl J Leprosy 2004 (1) (in press)

2 Takeda A, Umeda A, Matsuoka M, Yoshida S, Nakamura M and Amako K Comparative studies of the cell structures of *Mycobacterium leprae* and *M tuberculosis* using the electron microscopy freeze-substitution technique Microbiol Immunol Vol 47 265-270 2003

3 Amako K, Takede A, UmedaA, Matsuoka M Yoshida S and Nakamura M Degradation process of *Mycobacterium leprae* cells in infected tissue examined by the freeze-substitution method in electron microscopy Microbiol Immunol Vol 47 387-394 2003

4 Matsuoka M, Kashiwabara Y, Zhang L, Gotoho M and Kitajima S A second case of multi-drug resistant *Mycobacterium leprae* isolated from a Japanese patient with relapsed lepromatous leprosy Int J Lepr Diseases Vol 71 240-243 2003

5 Matsuoka M, Zhang L, Budiawan T, Saeki K and Izumi S Analysis of leprosy transmission based on the genotyping of *Mycobacterium leprae* by TTC repeats polymorphism J Clin Microbiol Vol 42 (in press) 2004

6 Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno

- EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, and Modlin RL Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy *Nature Medicine* 9, 5 525-532, 2003
- 7 Maeda Y, M Gidoh, N Ishii, C Mukai, and M Makino Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens *Cell Immunol*, 222 69-77, 2003
- 8 Maeda Y, P J Brennan, and M Makino Studies of lipoproteins of *Mycobacterium leprae* *Jpn J Leprosy*, in press, 2004
- 9 Matsushita S, Ohyama H, Kudo H, Tabata H, Matsuoka T HLA-mediated signaling via HLA-peptide-TCR complex determines immune responses of antigen-presenting cells *Current Topics in Peptide & Protein Research*, in press 2004
- 10 Meguro M, Nishimura F, Ohyama H, Takashiba S, Murayama Y, Matsushita S Ligation of IFN- γ -induced HLA-DR Molecules on Fibroblasts Induces RANTES Expression via c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Pathway *Cytokine*, 22, 107-115, 2003
- 11 Lee WW, Nam KH, Terao K and Yoshikawa Y Age-related increase of peripheral CD4+/CD8+ double positive (DP) T lymphocytes in the cynomolgus monkey longitudinal study in relation to thymic involution *Immunol*, 2003 109(2) 217-225
- 12 Kirii Y, Inoue T, Yoshino K, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, Shibata H, Yoshikawa Y, Terao K Molecular cloning, functional characterization, and enzyme-linked immunosorbent assay of cynomolgus monkey Fas ligand *J Immunol Methods* 2003 278(1-2) 201-9
- 13 Shibata H, Hanazono Y, Ageyama N, Nagashima T, Ueda Y, Hasegawa M, Ozawa K, Yoshikawa Y, Terao K Collection and analysis of hematopoietic progenitor cells from cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) Assessment of cross-reacting monoclonal antibodies *Am J Primatol* 2003, 61(1) 3-12
- 14 松下祥, 植村靖史, 大山秀樹 分子擬態によるT細胞セルフトランスの破綻 *BIO Clinica*, 18, 678-682, 2003
- 15 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) 22-27, 2003
- 16 松下 祥, 植村靖史, 大山秀樹 第8章 明日の治療/予防医学 各論V MHC 結合性ペプチドの分子予防医学への応用, 「分子予防環境医学」 松島綱治監修, 本の泉社(東京), 715-726, 2003
- 17 松岡正典、張良芬 ハンセン病の分子疫学。日本ハンセン病学会雑誌 73 巻 1 号 (印刷中) 2004
- 18 儀同政一、並里まさ子、野上玲子、後藤正道、熊野公子、尾崎元昭 ニューキノロンの使用基準、日本ハンセン病学会誌、73 巻 (印刷中)
- 19 牧野正彦 らい菌と樹状細胞の相互作用 *臨床免疫* 39 (2) 109-115, 2003
- 20 石井則久 Hansen 病 皮膚疾患最新の治療 2003-2004 (新村真人、瀧川雅浩編集),

- p137, 南江堂 (東京), 2003
- 21 石井則久, 佐々木 津 皮膚知覚異常 最新皮膚科学大系第 18 卷 (王置邦彦総編集), p298-300, 中山書店 (東京), 2003
 - 22 石井則久 抗抗酸菌薬 最新皮膚科学大系 第 2 卷 (王置邦彦総編集), p100-102, 中山書店 (東京), 2003
 - 23 石井則久 抗酸菌感染症 p1-12, 日本皮膚科学会研修委員会 (東京), 2003
 - 24 石井則久 皮膚感染症の検査と診断 今日の治療 11 873-875, 2003
 - 25 前田 学, 山崎隆治, 荒木麻里, 遠渡 舞, 佐々木 津, 石井則久 環状紅斑を主訴としたハンセン病 (B 群) のブラジル人女性例 西日本皮膚科 65 351-354, 2003
 - 26 中山聡子, 上坂義和, 國本雅也, 三方崇嗣, 清水 潤, 石井則久 急性発症の疼痛をともなった上肢多発性単神経炎型ハンセン病ニューロパチーの 1 例 臨床神経学 43 265-269, 2003
 - 27 石井則久 抗酸菌感染症 (皮膚結核とハンセン病) の診断と治療 p1-10, 日本皮膚科学会研修委員会 (東京), 2003
 - 28 石井則久, 佐々木 津 熱帯医学の動向と輸入感染症 MB デルマ 78 17-23, 2003
 - 29 石井則久 ハンセン病 ヴィジュアルダーマトロジー 2 1060-1061, 2003
 - 30 市川栄子, 大塚藤男, 堀井のり子, 田中未知, 石井則久, 杉田泰之, 小関正倫 ハンセン病患者の 2 例 日本ハンセン病学会誌 72 271-273, 2003
 - 31 杉田泰之, 吉仲 真, 武川るみ, 大沼すみ, 石井則久, 中嶋 弘 多菌型ハンセン病の 1 例 日本ハンセン病学会誌 72 279-281, 2003
 - 32 鈴木陽子, 瀧川雅浩, 石井則久 多菌型ハンセン病として治療したが最終診断未定の症例 日本ハンセン病学会誌 72 287-290, 2003
- 2 学会発表
 - 1 Sato N, Fujimura T, Masuzawa M, Katsuoka K, Kanou M, Yogi Y and Matsuoka M Recombinant expression and functional analysis of the protein encoded by mce1A region of *Mycobacterium leprae* 64th Congress of International Investigative Dermatology Florida, May, 2003
 - 2 Matsuoka M, Zhang L and Budiawan T Analysis of leprosy transmission based on genotyping 38th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference Newark, July, 2003
 - 3 Arakaki H, Uezato H, Hosokawa A, Matsuoka M and Nonakai S Why the leprosy recurred after 34 years of DDS therapy 13th Japan-Korea conference of dermatology Dejeon, October, 2003
 - 4 Matsuoka M Genotyping of *Mycobacterium leprae* and its application for analysis of leprosy transmission Symposium of leprosy Guadarajara, January, 2004
 - 5 Makino M, Y Maeda, H Kimura, and F Takeshita Up-regulation of antigen presenting function of mycobacteria infected macrophage US-Japan Cooperative Medical Science Program 38th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Newark, USA, July 21-23, 2003
 - 6 Ohyama, H, Takeuchi, K, Yamada, H,

- Uemura, Y, Matsushita, S SNPs on IL-12 receptor gene associated with the susceptibility to leprosy 38th US-Japan Cooperative Medical Science Program Tuberculosis-Leprosy Research Conference (Newark, USA) 2003 July, US-Japan Cooperative Medical Science Program, 38, 105-110
- 7 甲斐雅規、藤田由希子、矢野郁也、牧野正彦 らい菌由来糖脂質の解析 第76回日本ハンセン病学会総会 2003年7月神戸
 - 8 宮本友司、武下文彦、中田 登、前田百美、甲斐雅規、牧野正彦、向井 徹 抗酸菌 Fibronectin Attachment Protein の機能解析 第76回日本ハンセン病学会総会 2003年7月 神戸
 - 9 甲斐雅規、中田 登、牧野正彦 速発育性抗酸菌 *M. smegmatis* のトランスポゾン変異株ライブラリーの作製と解析 第86回日本細菌学会関東支部総会 2003年10月 横浜
 - 10 宮本友司、武下文彦、中田 登、前田百美、甲斐雅規、牧野正彦、向井 徹 Fibronectin Attachment Protein 遺伝子破壊株を用いた抗酸菌表層疎水性の検討 第26回日本分子生物学会年会 2003年12月 神戸
 - 11 儀同政一 WQ-3345, WQ-3402, HMR-3647 の抗らい菌活性 第76回日本ハンセン病学会総会 日本ハンセン病学会雑誌 72 140 (2003)
 - 12 山崎利雄、松岡正典、儀同政一 第75回日本ハンセン病学会 らい菌のATP 測定による薬剤感受性試験法の検討、日本ハンセン病学会雑誌、72 137 (2003)
 - 13 前田百美 らい菌のリポ蛋白に関する研究、日本ハンセン病学会総会、2003年7月 神戸
 - 14 中田 登、甲斐雅規、鈴木幸一、前田伸司、松岡正典、牧野正彦 大腸菌-抗酸菌シャトル庫墨度を用いたらい菌 Thai-53 株整列クローンライブラリーの作成と解析。第76回日本細菌学会総会、熊本、2003年4月
 - 15 松岡正典、柏原嘉子、尾崎元昭 国内再燃、再発および国外新患における薬剤耐性らい菌の伝播。第102回日本皮膚科学会総会、千葉、2003年5月
 - 16 和泉眞蔵、佐伯圭介、松岡正典 ハンセン病濃厚流行地におけるらい菌感染源に関する疫学的考察。第102回日本皮膚科学会総会、千葉、2003年5月
 - 17 福富康夫、松岡正典 ハンセン病におけるマクロファージのサイトカイン産生機構。第102回日本皮膚科学会総会、千葉、2003年5月
 - 18 佐伯圭介、和泉眞蔵、長尾栄治、松岡正典、テキ ブディアワン 生活環境中に存在するらい菌の疫学的意義。第102回日本皮膚科学会総会、千葉、2003年5月
 - 19 天児和暢、高出明美、梅田昭子、松岡正典、吉田真一 急速凍結置換法により明らかになったらい菌の変性過程。第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月
 - 20 松岡正典、張良芬、佐伯圭介、和泉眞蔵、Teky Budiawan らい菌の遺伝子多型と感染経路解明への応用。第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月
 - 21 清水利明、富岡治明、佐野千晶、松岡正典 *Mycobacterium leprae* および *M. avium* complex 感染マクロファージにおけるサイトカイン mRNA 発現プロフィ

- ルの検討。第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月
- 22 松岡正典 らい菌の環境中での存在と感染源としての可能性。第6回 VNC 研究会 東京、2004年2月
- 23 牧野正彦、前田百美 タイプ1細胞性免疫を誘導するらい菌抗原の探索 第76回日本細菌学会総会 2003年4月 熊本
- 24 前田百美、遠藤真澄、寺尾恵治、牧野正彦 シュワン細胞とらい菌の相互作用の解明 第76回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2003年7月 神戸
- 25 武下文彦、向井 徹、宮本友司、牧野正彦 らい菌 Fibronectin Attachment Protein (FAP) を標的にしたDNAワクチンの検討 第76回日本ハンセン病学会総会 学術大会 2003年7月 神戸
- 26 牧野正彦、前田百美、木村博昭、武下文彦、稲垣勝也 らい菌感染マクロファージの抗原提示能の増強 第33回日本免疫学会総会 2003年12月 福岡
- 27 大山秀樹、竹内加珠、植村靖史、鈴木元晴、松下祥 ハンセン病をモデルとした抗酸菌感染症感受性に関する免疫遺伝学的研究 第33回日本免疫学会(福岡)、2003年12月、日本免疫学会総会・学術集会記録、33、2003
- 28 大山秀樹、植村靖史、鈴木元晴、高木理英、松下祥 *IL12RB2* 制御領域の多型が細菌感染症に対する感受性に与える影響 第3回分子予防環境医学研究会(東京)、2003年12月、第3回分子予防環境医学研究会、抄録集、2003
- 29 松本和彦、酒井咲子、飯島みわ子、齋田俊明、石井則久 日系ブラジル人に発症した lepromatous leprosy の1例 第102回日本皮膚科学会総会、浦安、2003年5月
- 30 堤 祐子、川上民裕、上西香子、山前恵美子、保坂恵理、芳賀恒夫、木村聡子、相馬良直、溝口昌子、石井則久 サリドマイドを併用したハンセン病の1例 第102回日本皮膚科学会総会、浦安、2003年5月
- 31 石井則久、小原安喜子、熊野公子、佐々木 津、杉田泰之、並里まさ子、野上玲子、細川 篤、牧野正直 2002年のハンセン病新患発生状況 第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月
- 32 加藤知子、柳田敦美、松本義也、杉田泰之、石井則久、富田 靖 日本で発症した在日外国人の多菌型ハンセン病の一例 第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月
- 33 市川栄子、大塚藤男、堀井のり子、田中未知、石井則久、杉田泰之、小関正倫 ハンセン病の2例 第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月
- 34 杉田泰之、吉仲 真、石井則久、中嶋弘 高齢発症の多菌型ハンセン病の1例 第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月
- 35 鈴木陽子、瀧川雅浩、石井則久 多菌型ハンセン病と診断したが誤診とされた症例 第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月
- 36 吉仲 真、小関正倫、矢島幹久、成田 稔、石井則久 手関節神経病性関節症を生じたLL型ハンセン病の1例 第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月
- 37 石井則久 抗酸菌感染症 日本皮膚科学会前実績研修講習会、東京、2003年8月
- 38 笹木慶子、下江敬生、石井則久 1型反応を生じたBL型ハンセン病の1例 第

55 回日本皮膚科学会西部支部学術大会 松山市, 2003 年 10 月	H. 知的財産権の出願・登録状況
39 <u>石井則久</u> 抗酸菌感染症（皮膚結核とハンセン病）の診断と治療 日本皮膚科学会前実績研修講習会, 大阪, 2003 年 11 月	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）

新規らい菌抗原を用いたハンセン病診断法の開発

平成 15 年度 分担研究報告書

分担研究者 甲斐 雅規

（国立感染症研究所 ハンセン病研究センター）

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

新規らい菌抗原を用いたハンセン病診断法の開発

分担研究者 甲斐 雅規 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 室長

研究要旨

らい菌細胞壁の PGL-I 抗原を用いた血清診断法は少菌型ハンセン病を診断出来ないなど特異性や感度の面で不十分と指摘されてきた。そこで、新たなるらい菌特異的抗原を検出するために、らい菌をアルマジロおよびヌードマウスに感染させ菌が増殖した臓器かららい菌菌体成分の抽出を試みた。未だらい菌を含む抗酸菌菌体膜構造には未知の部分が多いのが現状であるが、これまで結核菌では発見されているが、らい菌では報告のない糖脂質 TDM (Trehalose dimycolate) が抽出、検出された。

A 研究目的

ハンセン病の血清診断法として現在確立されている方法はらい菌の PGL-I 抗原を利用した抗体検出法である。しかし、この方法では少菌型ハンセン病を診断できないこと、非特異的な反応も見られること等これまで特異性、感度で不十分であることが指摘されてきた。そのためより感度・特異性の高い診断法の開発はもとより感染初期や除菌後の状態など感染状態や治療効果を知る診断法確立が望まれている。PGL-I 抗原はらい菌に特徴的な糖脂質であることか知られているか、らい菌ではその他の糖脂質に関する研究はほとんど知られていない(図 1)。僅かに Trehalose monomycolate (TMM) の発見、分離の報告があるにととまり、不明の部分が多い。結核菌など他の抗酸菌では Trehalose dimycolate (TDM) がある種の病原性因子であり、各種生物活性を示すこ

となどが報告されている。そこで、らい菌菌体成分より糖脂質 TMM 及び TDM の抽出を試み(図 2)、らい菌由来糖脂質の機能を解析することで、血清診断抗原としての利用の可能性を探る。

B 研究方法

らい菌感染アルマジロの足からの結節状組織及びらい菌感染ヌードマウスの足蹠(フットパット)を採取し、オートクレーブ処理後、クロロフォルム・メタノール溶液、アセトン等により順次脂質成分を抽出する溶媒分画を行い、薄層クロマトグラフィーにて糖脂質を検出する。得られたクロマトグラムをすでに同定されている結核菌青山 B 株由来のハンドと比較検討する。さらに、MALDI-TOFMS (マトリックス支援レーザー解離イオン化-飛行時間型質量分析装置)にて各抽出物の質量とピークパターン解析を行う。

倫理面への配慮

動物実験は「国立感染症研究所動物実験指針」に基づき計画、審査された。

C 研究結果

らい菌感染アルマジロの足結節約 9g およびマウス足蹠約 1g をホモジェネート後、クロロフォルム・メタノール溶液にて抽出し、さらにアセトン抽出を行って粗糖脂質画分約 500 μ g を得た。この画分の薄層クロマトグラフィーを結核菌のクロマトグラムと比較したところ、結核菌の TDM、TMM と同等の位置にそれぞれのバンドが得られた(図 3)。これらのバンドを薄層プレートから切り出し粗精製した後、質量分析装置にて解析したところ、結核菌の TDM および TMM と同様の物質の存在を確認できた(図 4)。しかし両者で脂肪酸の炭化水素数の違いに由来すると考えられるピークのずれが確認された。また TMM、TDM の構成成分であるミコール酸のサブクラスについては、結核菌でアルファミコール酸、メトキシミコール酸、ケトミコール酸の 3 種であるのに対してらい菌ではメトキシミコール酸を欠いていることが確認された。

D 考察

今回の糖脂質解析により、以前に報告されていたらい菌の TMM の存在が確認され、さらにこれまで未報告であった TDM が検出された。TMM、TDM の構成成分であるミコール酸は抗酸菌の特徴的な膜成分の主体をなすものであるが、大きく分けてアルファミコール酸、メトキシミコール酸、ケトミコール酸の 3 種のサブ

クラスが存在している。らい菌はこれらサブクラスのうちアルファミコール酸とケトミコール酸が使用され結核菌では 3 種すべてが使用されていること、ミコール酸を構成する炭化水素鎖の長さが異なることから両者では抗原性に違いがあるものと推察された。らい菌の TDM は今回初めて同定されたものであるため、今後 TDM および TMM の構造と性状を決定した上で、らい菌特異的抗原としての有用性、とりわけ診断への応用の可能性を探りたい。

E 結論

らい菌に感染した動物組織から 2 種類の糖脂質 TMM、TDM の検出をした。質量分析の結果からそれらは結核菌で知られている TMM、TDM と同じ物質であることがわかった。しかしミコール酸のサブタイプが異なり、かつ脂肪酸の鎖長にも違いがみられたことから、らい菌特有の血清診断用抗原の候補になりうることを示唆された。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Bii CC, H Yamaguchi, M Kai, K Nagai, Y Sugiura, H Taguchi, J M Chakaya, G G Mbugua, S Kamiya *Mycoplasma pneumoniae* in children with pneumonia at Mbagathi District Hospital, Nairobi East Afr Med J, 79, 317-22, 2002
- 2) Yamaguchi H, T Osaki, H Taguchi, N

Sato, A Toyoda, M Takahashi, M Kai, N Nakata, A Komatsu, Y Atomi, S Kamiya
Effect of bacterial flora on postimmunization gastritis following oral vaccination of mice with *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 Clin Diagn Lab Immunol 10(5) 808-12, 2003

3) Kai M, Y Maeda, S Maeda, Y Fukutomi, K Kobayashi, Y Kashiwabara, M Makino, M A Abbasi, M Z Khan, P A Shah
Active surveillance of leprosy contacts in country with low prevalence rate Intl J Leprosy 2004 (1) (in press)

2 学会発表

1) 甲斐雅規、藤田由希子、矢野郁也、牧野正彦 らい菌由来糖脂質の解析 第76回日本ハンセン病学会総会 2003年7月 神戸

2) 宮本友司、武下文彦、中田 登、前田百美、甲斐雅規、牧野正彦、向井 徹
抗酸菌 Fibronectin Attachment Protein の機能解析 第76回日本ハンセン病学会総会 2003年7月 神戸

3) 甲斐雅規、中田 登、牧野正彦 速発育性抗酸菌 *M smegmatis* のトランスポソン変異株ライブラリーの作製と解析 第86回日本細菌学会関東支部総会 2003年10月 横浜

4) 宮本友司、武下文彦、中田 登、前田百美、甲斐雅規、牧野正彦、向井 徹
Fibronectin Attachment Protein 遺伝子破壊株を用いた抗酸菌表層疎水性の検討 第26回日本分子生物学会年会 2003年12月 京都

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 |