

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 向井 徹

平成17(2005)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-----11

2. らい菌の型別とハンセン病の分子疫学

松岡 正典-----19

3. 薬剤耐性菌の伝播解明に関する研究

尾崎 元昭-----25

4. 新規抗らい菌薬と多剤併用療法の開発

儀同 政一-----27

5. らい菌菌膜抗原の細胞性免疫誘導能の検討

牧野 正彦-----35

6. らい菌特異的リポタンパクの機能解析

前田 百美-----41

7. ハンセン病易感受性宿主検出のための分子予防医学的研究

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	
岩佐 美智子	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16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 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。新規血清診断法に用いるらい菌 TMM, TDM の代替抗原として、他の抗酸菌由来抗原の検討を行った。分子疫学へ応用可能な菌型別に用いるゲノム中の 9 種の繰り返し配列を検討し、詳細な型別への利用可能であることが示され、同一家族内に異なる遺伝子型の感染例を示した。薬剤耐性発症状況把握と耐性菌伝播予防のために、らい菌の薬剤耐性遺伝子検査を行った。その結果の臨床応用により経過良好が示された。耐性例周囲に現在のところ二次感染は疑われなかった。新規抗らい菌薬の開発を行い、MFLX は SPFX に匹敵する抗らい菌活性を持ち、OFLX 耐性らい菌に対し、WQ-3402, STFX, MFLX が強い抗らい菌活性を持つことを示した。ワクチン候補蛋白として MMPⅡ, LipoK, FAP の検討を行い、MMPⅡ は、少菌型患者血清に認識され、細胞表面 TLR-2 と結合し樹状細胞、マクロファージを活性化し、抗らい菌生態防御反応に重要なサイトカインを産生することを示した。LipoK は、樹状細胞の活性化を引き起こし、自己の CD4 もしくは CD8 陽性 T 細胞を活性化することを示した。FAP は、菌の増殖形態に大きく寄与することを機能解析より明らかにし、宿主防御反応の標的となることが示された。また、投与方法の開発では、 σ 因子と菌蛋白との融合型の鼻内投与は、NALT の細胞性免疫応答を増強することが示された。IL12RB2 の遺伝子多型の検討の結果、T 細胞に低 IFN- γ 産生を誘導する 1 塩基多型を同定した。幼若カニクイサルへらい菌を接種したところ、約 1 年間菌を保持した固体が確認され、FAP, LPK で誘導される幼若化反応は、鼻腔内接種および鼻尖部接種群それぞれ 1 頭で一年間持続することを示した。発症状況の把握では、新患は約 10 名前後であり、在日外国人に多いことが示された。また、介護基準作成では、介護員が日々行っている一つひとつの介護行為を記録分析し、調査項目の科学的根拠を明らかにした。本研究により得られた知見は、ハンセン病対策へ有用な貢献が可能であると考えられた。

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
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
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
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

研究センター主任研究官

大山 秀樹 兵庫医科大学医学部講師
寺尾 恵治 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センター長
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
岩佐美智子 国立療養所長島愛生園看護部長

A. 研究目的

WHO により推進された MDT 療法によるハンセン病制圧政策は、登録患者数の減少に効を奏した。

しかし、世界的な新規患者数は、年間数十万人に達しその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、本研究班では、早期診断技術の開発、感染経路の解明・薬剤耐性菌対策、ワクチン開発、発症状況の把握、療養所における介護員配置基準作成などハンセン病の諸問題に対し包括的な検討を目的とし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)
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 (儀同)
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. ハンセン病易感受性宿主検出のための分子予防医学的研究(大山)
8. 効率的粘膜免疫誘導法の開発 (向井、宮本)
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(岩佐)

B. 研究方法

1. らい菌、結核菌及び他の抗酸菌の糖脂質を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、各抽出物の質量とピークパターン解析を行い、らい菌糖脂質と類似物質産生菌を検索した。抽出した糖脂質を用いて、血清反応性・免疫学的活性を検討した。
2. 型別に適応可能な VNTR の検索と応用のため、詳細な検討がなされていない 2 塩基から 27 塩基までの 44 繰返し配列 (Short tandem repeat: STR) につき、その多型性と安定性を比較した。世代間におけるその安定性を検討した。またそれらを用いて 27 の研究室維持株がどの程度細分可能であるか検討した。また、家族内複数感染例におけるらい菌の型別判定のため、インドネシア、北スラベシ州、マナド市周辺において家族内複数感染例のらい菌を得、型別に有用と考えられた 8 個の STR を用いて遺

伝子型を比較した。

3. 菌陽性多菌型患者の菌を採取し、遺伝子変異を検査して DDS・RFP・OFLX への耐性発現を調べる。耐性発現例では耐性発生の要因の検討と共に、検査結果の治療への活用を検証する。耐性検査結果により化学療法の指針作成を検討する。耐性患者の周辺に二次感染例の疫学的検討を行う。

4. Buddemeyer 法により FA の抗らい菌活性を DDS, SPFX, CAM, MINO, RFP と比較検討した。また OFLX 耐性らい菌に対する新規フルオロキノロン OFLX, LVFX, GFLX, SPFX, STFX, MFLX, WQ-3402 の抗らい菌活性を検討した。ヌードマウス足蹠法により MFLX と SPFX の及び FA と DDS の抗らい菌活性を比較検討した。

5. らい菌抗原性タンパク分子 MMP-II と抗原提示細胞との相互作用を解析した。リコンビナントらい菌 MMP-II を用い健康者末梢血由来樹状細胞およびマクロファージを刺激し、培養上清中の IL-12p70, TNF α 、および IL-10 を ELISA 法により測定した。MMP-II と抗原提示細胞上のレセプターとの関係は、TLR-2 発現 HEK293 細胞を MMP-II で刺激した際の NF- κ B 活性により測定した。MMP-II をパルスした樹上細胞あるいはマクロファージを stimulator として用いて T 細胞を刺激した際、T 細胞から産生される IL-2 および IFN- γ を ELISA 法により測定した。

6. LpK の N 末端 13 アミノ酸配列を含む合成リポペプチド (lipoK) によりヒト末梢血単球を刺激した後、培養上清中の IL-12 p40 を測定した。ヒト樹状細胞へ精製抗原をパルスし、その抗原提示能を、自己 T 細胞の活性化 (IFN- γ 産生) を指標にした。IL-12 及び IFN- γ の測定は ELISA 法で半定量化した。

7. L 型, T 型および健康者を被験者とし *IL12RB2* 制御領域の塩基配列を決定した。同配列より転写制御領域の各ハプロタイプについて、転写活性の比較および SNPs の有無により分類した。さらに *IL12RB2* の遺伝子発現量と SNPs の有無の相関を評価した。*IL12RB2* 制御領域の多型が DNA への結合性に影響を与える結合タンパクの同定を試みた。

8. 粘膜に親和性を持つ因子とらい菌由来 FAP もしくは、MMP II 蛋白の融合蛋白と MBP を用い大腸菌発現・調整を行った。得られた蛋白を経鼻投与し、NALT 及び脾臓細胞の細胞増殖性、IFN- γ の産生により細胞性免疫応答の解析を行った。FAP の機能解析は、*M. smegmatis* 変異株作製のため変異株作製用ベクターを構築した。本ベクターを野生株に導入し、変異株の単離を行った。変異株及び野生株の形態は、液体培養菌体を抗酸菌染色した後、光学顕微鏡下で観察した。さらに菌体の生化学的性状を評価するため疎水性分子であるヘキサデカンとの親和性を測定した。

9. 6-8ヶ月齢の幼若カニクイザル6頭を3群に分け、静脈内、鼻腔内、鼻先端部に各2頭へ接種した。菌はヌードマウスより調整し、血中 PGL-1 抗体価、鼻腔内洗浄液をらい菌特異 PCR 法により感染を検討した。リンパ球のサブセット推移、幼若化反応の検討は、リンパ球を 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を3種のらい菌由来ペプチドと混合して細胞内に取り込まれた TdR 量を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

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。それらを元に、1993年から2004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. 介護員が日々行っている一つの介護行為を記録分析し調査項目の科学的根拠を明らかにした。記述分析法により介護員の介護内容を観察法にて看護師長がデータを収集した。調査対象として、国立ハンセン病療養所4施設の介護員70名に行った。

倫理面への配慮 検体採取・利用等は、研究者の所属機関の倫理委員会で承認され、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、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。また、動物実験についても、各施設の動物実験委員会の承認を受けてから行った。研究の実施にあたっては、各施設の諸内規や作業方式に従い、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた。

C. 研究結果及びD. 考察

1. ハンセン病及び結核患者由来血清の反応性を調べた結果、結核菌の TDM, TMM 同様患者血清が反応することが確認された。人工培養できないらい菌では抗原量が十分に確保できないため合成を試みているが、ミコール酸が非常に長鎖であり困難となっている。高収量を得るため代替候補として他種の抗酸菌を検討した。BCG 菌のパスツール株及びコンノート株の TMM, TDM の免疫活性を持つことが確認された。BCG 菌パスツール株は、利用するミコール酸種も同じことなどから、免疫学的活性および患者血清反応性の検討より、補助的診断法となりうるかと判断された。

2. 多型性を検討した全44個のSTR中から9種のVNCを詳しい遺伝子型別に用いるSTRとして選択した。4株の維持継代菌では全てのVNTRは変化を認めず特異的なVNTRが継代で維持されることが示された。9個のVNTRの組み合わせによる型別が疫学解析に有用であることが示され、この組み合わせによる型別法は臨床材料にも応用しうる有用な型別法と考えられた。3家族の複数感染例は、更に細分され同一家族内の感染例でも従来の概念で感染源と目される症例とは異なるらい菌による感染であることが示され、患者以外の感染源を想定した更なる検討が必要と考える。

3. 49例の遺伝子変異検査が実施された。DDSの耐性は35例中19例、RFPは33例中12例、OFLXは28例中7例に変異が認められた。3剤への耐性出現例がすでに5例あった。検査結果の臨床活用の中間集計では、化学療法剤の選択に利用され、経過良好が多数であった。新キノロン剤の使用に関する指針を作成したが、今回の臨床資料より指針の順守に不安がある。遺伝

子変異検査が化学療法に有用であることが明らかになった。現在、耐性例周辺に新患が出て耐性菌の二次感染を疑わせるような例は報告されていない。今後慎重に観察を続ける必要がある。

4. MFLX は Buddeneyer 法とヌードマウス足蹠法の結果からは、SPFX より強い抗らい菌活性を認めた。強い抗らい菌活性を保持しながら光毒性などの副作用の少ないフルオロキノロンとして臨床導入が期待される。FA の *in vitro* 活性は、SPFX や MINO に匹敵する抗らい菌活性を示すが、*in vivo* 活性は不完全抑制を示した。今後、投与量を増やすかマウス足蹠法を検討している。OFLX 耐性らい菌に対し WQ-3402, STFX, MFLX に強い抗らい菌活性を認め臨床使用が示唆された。

5. マクロファージは、MMP-II 刺激により IL-10 および TNF α を産生したが、自己 CD4 陽性 T 細胞を活性化するには至らなかった。樹状細胞を MMP-II 刺激により、IL-12p70 と TNF α が大量産生された。40~80% の樹状細胞が細胞表面に MMP-II を強く発現し、自己 ナイーブ T 細胞を刺激し、IL-2 および IFN- γ を産生し、自己のメモリー T 細胞をも刺激した。以上より MMP-II が抗原提示細胞を必要かつ十分に活性化したことを示した。さらに、メモリー T 細胞に加え ナイーブ T 細胞も活性化したことより、MMP-II はワクチン候補分子である可能性が極めて高いと予想される。また、少菌型患者では、これら T 細胞は *in vivo* でらい菌中の MMP-II を認識し、感作されているものと考えられた。MMP-II は抗原提示細胞および T 細胞を活性化する免疫原性に富んだらい菌抗原であることが判明した。

6. lipoK でヒト末梢血単球由来樹状細胞を刺激すると、HLA-ABC, HLA-DR, CD83, CD86 の発現が増強し、活性型 IL-12 の産生は、lipoK 濃度依存的に増加した。lipoK は IL-12 誘導に重要な役割を果たしていることを示している。樹状細胞にパルスし、自己の CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞の活性化を IFN- γ 産性能で調べた。T 細胞は、有意に IFN- γ を産生したこのことから、脂質部分及び N 末端 13 アミノ酸を含む領域が T 細胞活性化に関わっていることが明らかと

なった。つぎに、樹状細胞の表面発現している TLR2 をブロックすると、lipoK による T 細胞の活性は抑制されたことから、lipoK の認識に TLR2 が重要な役割を果たすことが明らかになった。13 アミノ酸を含むリポペプチド (LipoK) は、らい菌に対する自然免疫および獲得免疫反応の両者を賦活し得ることを示すもので、抗酸菌に対するワクチンを構築する上で有用な知見を与えるものと期待する。

7. *IL-12RB2* 制御領域の多型解析より 4 種類の SNPs の保有頻度を調べた。その結果、それらすべての SNPs 保有頻度は、1) ハンセン病患者群と健常者群の間には有意な差が存在しないこと、2) T 型患者に比べて L 型患者において有意に高いことが分かった。また、同領域は、各ポジションがすべてアレル 1 であるハプロタイプ 1 (1-5 に分けられる) の保有頻度を算出比較した結果、L 型患者の保有頻度は有意に低いことが分かった。ハプロタイプの転写活性は、タイプ 1 が他のタイプに比べ有意に高かった。多型が存在することにより、転写活性が低下することが分かった。*IL-12RB2* 制御領域における多型が mRNA 発現に及ぼす影響は、ハプロタイプ 1 と他のハプロタイプとのヘテロ接合体は IL-12R β 2 mRNA 発現量は低い傾向を示した。ゲルシフト・アッセイより、-650delG の配列には結合するが、-650G の配列には結合しないタンパクが存在することが分かった。IL-12R β 2 分子の低発現性を示す L 型患者に同 SNP が高頻度に検出されるという本研究の結果から考えると、同 SNP は、IL-12R β 2 分子の発現を低下させる要因であると考えられた。

8. 経鼻免疫による液性免疫応答の解析の結果、脾臓細胞の細胞増殖性応答では、FAP、MMP II 共に σ 因子の存在による差異は認められなかった。しかし、NALT 単核球では、 σ 因子融合型免疫マウスにおいて増殖性は、非融合型に比較し上昇していた。IFN- γ 産能では、NALT において、 σ 因子融合型免疫群は、非融合型免疫群に比較し、上昇していた。つまり σ 因子の付加による経鼻免疫は、細胞性の粘膜免疫誘導の増強を示すと考えられる。FAP の機能解析の

結果、形態について野生株との比較を行ったところ、変異株は著しく凝集する増殖形態を示した。さらに、変異株は野生株に比べより強いヘキサデカンとの親和性を示したことから、菌体表層の疎水性が増大していることが判明した。FAP が抗酸菌において菌体の保護という重要な生理的役割を担っていることを示唆している。従って、FAP の阻害により菌体の異常な増殖形態を引き起こすことから、有効なワクチンの候補分子と成りうる可能性が示された。

9. 抗体価、PCR による感染検討：PGL-1 抗体価は、2 固体に、8 ヶ月間陽性を認めた。PCR による鼻腔内洗浄液の検討では、2 固体に、陽性を認めた。腫脹部位のバイオプシーサンプルに PCR、抗酸菌染色が、最終月まで陽性を示す固体を認めた。

主要リンパ球サブセットレベルの変化：一過性に、らい菌接種に伴い CD3⁺/T 細胞の増加、CD20⁺/B 細胞の減少、CD4⁺/T 細胞の増加が認められた。また、接種直後に CD16⁺/NK 細胞レベルの低下および CD69⁺/CD4⁺/T 細胞の増加、初期活性化マーカーである CD69⁺CD4⁺/T 細胞レベルの増加が一部のサルで認められた。

らい菌由来ペプチドで誘導されるリンパ球幼若化反応：FAP および LpK で誘導される低レベルの幼若化反応が 1 年間持続した。鼻尖部接種群の 1 頭は FAP に対する反応が徐々に増加する傾向があった。

今回供試した 6 頭のカニクイザルにおける接種部位におけるらい菌の検出と、抗酸菌構成ペプチドで誘導される末梢リンパ球の幼若化反応との間になんらかの相関が認められれば、ペプチドを用いた幼若化反応はらい菌の持続感染をモニター、ワクチンの有効性評価の有効な指標となり得ると判断した。

10. 平成 16 年 (2004 年) の新規ハンセン病患者調査を行い 11 名の患者を登録した。日本人は 3 名で、外国人患者は 8 名であった。

1993 年からの新規ハンセン病患者のデータベースを作成し、解析を行った。この調査は日本におけるハンセン病の将来、施策を決定する上での基本になるものである。

11. 新しい介護度調査は、行動レベルで調査

し、準備、実施、片付け、予期せぬ要望の 4 つのサブカテゴリーで介護行為を分析する必要がある。介護行為を 12 のカテゴリーに分けることができる。準備から片付けの一連の介護行為の中に「説明と同意」「安全確認」の介護の質を表すと考えられる要素が含まれていた。

E. 結論

1. らい菌 TMM、TDM は十分な抗原量を確保できないため他の抗酸菌由来抗原の中から代替抗原を選出し、検討を進めた。

2. らい菌ゲノム中に存在する 9 種の繰返し配列の比較により詳細な型別が可能であることが示された。同一家族内に異なる遺伝子型のらい菌による感染例が存在した。

3. らい菌の遺伝子変異検査による耐性の検査は、化学療法の遂行と改良に必須となることが明らかである。臨床医、とくに新患を診察する機会の多い一般皮膚科医に、この検査法についての認識を高める必要がある。

4. MFLX は SPFX に匹敵する強い抗らい菌活性を示した。FA は、Buddemeyer 法では、SPFX、MINO に匹敵する強い抗らい菌活性を示したが、ヌードマウス足蹠法では、不完全抑制であった。OFLX 耐性らい菌に対し WQ-3402、STFX、MFLX は、強い抗らい菌活性を示した。

5. 少菌型ハンセン病患者血清によって認識されるらい菌膜中の蛋白抗原 MMP-II は、細胞表面抗原 TLR-2 と結合し、樹状細胞およびマクロファージを活性化し、抗らい菌生体防御反応を構築する上で重要な役割を果たすサイトカインを産生した。

6. らい菌由来の lipK は、生体防御、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. *IL12RB2* 転写制御領域の遺伝子多型を L 型患者および T 型患者を対象として解析を行った。その結果、L 型患者において高頻度に検出される 4 種類の 1 塩基多型 (SNPs) を同定した。これら多型は、同遺伝子の転写活性を低下させ、T 細胞の低 IFN- γ 産生を誘導することから、ハンセン病病型の成立機序の要因のひとつとして考えることができる。

8. 粘膜親和蛋白 σ 因子により、NALT 単核球の細胞性免疫誘導が増強された。FAP の機能について変異株を用いた解析より、FAP は菌体の保護に重要な分子の一つであることが明らかとなった。

9. 幼若カニクイザルにらい菌を接種し、一年間にわたり末梢リンパ球サブセットレベルおよび抗酸菌由来ペプチドで誘導されるリンパ球幼若化反応の継時的変化を調査した。サブセットレベルは接種直後に一過性に変化するものの、30 週目にはほぼ接種前のレベルに復帰した。幼若化反応では、FAP、LpK に対する反応が1年間継続して認められ、抗酸菌由来のペプチドを用いてカニクイザルにおけるらい菌の持続感染における末梢免疫記憶細胞検出の可能性を示唆している。

10. ハンセン病の新患は年間約10名前後で、日本人は数名で、ほとんどは60歳以上であり、患者の多い沖縄県出身患者でも新規患者の高齢化が進んでいる。在日外国人は8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. タイムスタディをとるにあたり検討しなければならないことは、①対象 ②対象数 ③期間 ④記録方法であり、新介護度調査の中で、評価することができない介護の質に関しては、将来検討する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

特に無し

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*. 72(1): 50-53, 2004.
- 2) Kai M. Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. *Jpn J Leprosy*. 73(3): 221-226, 2004.
- 3) Miyamoto Y, Mukai T., Takeshita F, Nakata N, Maeda Y., Kai M., Makino M. Aggregation of mycobacteria caused by disruption of fibronectin-attachment protein encoding gene. *FEMS Microbiol Lett*. 236:227-234, 2004.
- 4) 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.* 42:741-745, 2004
- 5) Fukutomi Y., Matsuoka M., Minagawa F., Toratani S., McCormic G and Krahenbuhl J. IL-10 treatment of macrophages bolsters intracellular survival of *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 72:16-25, 2004
- 6) Kimura H., Maeda Y., Takeshita F., Takaoka L. E., Matsuoka M., and Makino M. Upregulation of T-Cell-stimulating activity of Mycobacteria-infected macrophages. *Scand. J. Immunol.* 60:278-286, 2004
- 7) Zhang L., Namisato M. and Matsuoka M. A mutation at codon 516 in the rpoB gene of *Mycobacterium leprae* confers resistance to rifampin. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 72 (in press) 2004
- 8) Ozarmagan G., Sutlas M., Zhang L. and Matsuoka M. Detection of dapson resistant *Mycobacterium leprae* by DNA sequence analysis from a Turkish relapsed leprosy patient. *Med. Bull. Istanbul Med. Faculty* 67:153-156, 2004
- 9) Matsuoka M., Zhang L., Fafutis M., Legua P. and Wiens C. Polymorphism in the rpoT gene in *Mycobacterium leprae* isolates obtained from Latin American countries and its possible correlation with the spread of leprosy. *FEMS Microbio. Lett.* 242 (in press) 2005
- 10) Yamashita, Y., Y. Maeda, F. Takeshita, P. J. Brennan, and M. Makino. Role of the polypeptide region of 33 kDa mycobacterial lipoprotein for efficient IL-12 production. *Cell. Immunol.*, 229:13-20, 2004.

- 11) Maeda Y., T. Mukai, J. Spencer, and M. Makino. Identification of Immunomodulating Agent from *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun*, in press.
- 12) Ohyama H., Ogata, K., Takeuchi, K., Namisato, M., Fukutomi, Y., Nishimura, F., Naruishi, H., Ohira, T., Hashimoto, K., Liu, T., Suzuki, M., Uemura, Y., Matsushita, S. Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor β 2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. *J Clin Pathol*, in press.
- 13) Kato, N., Ohyama H., Nishimura, F., Matsushita, S., Takashiba, S., Murayama, Y. Role of helper T cells in the humoral immune responses against 53-kDa outer membrane protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.*, in press.
- 14) 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.*, 6: 1-20, 2004.
- 15) Ohyama H., Kato, N., Takeuchi, K., Uemura, Y., Nishimura, F., Matsushita, S. Monocytes of distinct clinical types of leprosy are differentially activated by crosslinking class II HLA molecules to secrete IL-12. *APMIS* 112: 271-274, 2004.
- 16) Maeda Y., P. J. Brennan, and M. Makino. Studies of lipoproteins of *Mycobacterium leprae*. *Jpn. J. Leprosy*, 73 : 15-21, 2004.
- 17) Uda A, Tanabayashi K, Mukai R, Terao K, Yamada A. Detection of CD3epsilon polymorphism in cynomolgus monkeys by a method based on RFLP. *J Med Primatol*. 2004, 33:34-37.
- 18) Uda A, Tanabayashi K, Yamada YK, Akari H, Lee YJ, Mukai R, Terao K, Yamada A. Detection of 14 alleles derived from the MHC class I A locus in cynomolgus monkeys. *Immunogenetics*. 2004, 56:155-163.
- 19) 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 7-14, 2004
- 20) 松岡正典：「感染症の話」ハンセン病 感染症週報 46 週号 国立感染症研究所 感染症情報センター 2004
- 21) 松岡正典 感染症の事典 「ハンセン病」分担執筆 国立感染症研究所学友会 編集朝倉書店 東京 p201-203. 2004
- 22) 儀同政一、並里まさ子、熊野公子、後藤正道、野上玲子、尾崎元昭：ニューキノロン使用指針、日本ハンセン病学会雑誌, 73:65-67 (2004).
- 23) 儀同政一：新規フルオロキノロン WQ-3345, WQ-3402 の抗らい菌活性、日本ハンセン病学会雑誌、74:43-48(2005).
- 24) 牧野正彦、鈴木幸一、福富康夫、山下康子、前田百美、宮本友司、向井 徹、中田 登、甲斐雅規、山崎利雄、儀同政一、松岡正典：ハンセン病基礎研究のトピックス、日本ハンセン病学会雑誌、74:3-22(2005).
- 25) 牧野正彦。結核・ハンセン病。倉田毅編、ネオエスカ 感染症・アレルギーと生体防御、同文書院出版、2004.
- 26) 石井則久：Hansen 病。皮膚診断の技法 (岩月啓氏、宮地良樹編集)、p148-149、診断と治療社 (東京)、2004.
- 27) 石井則久：一般医療の中のハンセン病。多磨 85 (4) : 2-7, 2004.
- 28) 石井則久：皮膚の痛み、知覚異常。今日の治療と看護、水島 裕、黒川 清総編集、27-28、南江堂 (東京)、2004.
- 29) 石井則久：抗酸菌感染症。NEW 皮膚科学、飯塚 一、大塚藤男、宮地良樹編集、p365-370、南江堂 (東京)、2004.
- 30) 石井則久：ハンセン病。家庭医学大全科 (高久史麿、猿田享男、北村惣一郎、福井次矢監修)、p2689-2690、法研 (東京)、2004.
- 31) 石井則久、森 修一、中嶋 弘：横浜市医師会員並びに大学医学部付属病院診療科におけるハンセン病患者の診療に関するアンケート結果。日本ハンセン病学会雑誌 73: 207-215, 2004.

- 32) 石井則久 : ハンセン病. 化学療法の領域
20: 870-876, 2004.
2. 学会発表
- 1) Matsuoka M.: Genotyping of *Mycobacterium leprae* and its application for analysis of leprosy transmission. Symposium of leprosy. Guadarajara, January, 2004
 - 2) Matsushita, S., Uemura, Y., Ohyama, H. Signal transduction through HLA-DQ molecules alter dendritic-cell function to enhance Th2 differentiation. XXIII EAACI Congress. (Amsterdam, Netherlands) XXIII EAACI Congress Programme, 92. June, 2004
 - 3) Ohyama, H., Takeuchi, K., Ogata, K., Namisato, M., Fukutomi, Y., Suzuki, M., Uemura, Y., Matsushita, S. The polymorphism on the 5' flanking region of IL-12 receptor $\beta 2$ gene confers the susceptibility to mycobacterial infection. 12th International Congress of Immunology & 4th Annual Conference of FOCIS. (Montreal, Canada) July. 2004
 - 4) Maeda, Y., M. Endoh, K., Terao, and M. Makino. Study of the interaction of *M. leprae* with Schwann cells. 4th The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 30 August-2 September, 2004, Hyogo, Japan.
 - 5) Miyamoto, Y., T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. The genes involved in glycosylation steps of mycobacterial glycopeptidolipids. 4th The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 30 August-2 September, 2004, Hyogo, Japan.
 - 6) Makino, M., Y. Maeda, T. Mukai, and N. Ishii. Development of a new vaccine candidate against mycobacteria. 4th The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 30 August-2 September, 2004, Hyogo, Japan.
 - 7) Matsuoka M.: Chemotherapy and Drug Resistance in Leprosy. Symposium on drug resistance. 40th anniversary meeting of US-Japan cooperative medical science program. Kyoto, December, 2004
 - 8) Khin Saw Aye, Yin Thet Nu Oo, Kyaw Kyaw, Matsuoka M., Kai M.: Molecular Detection of Primary Dapsone Resistant *Mycobacterium leprae* in Myanmar. 40th anniversary meeting of US-Japan cooperative medical science program. Kyoto, December, 2004
 - 9) Mukai T., Miyamoto Y., Matsuoka M., Yamazaki T. and Makino M.: Loop-Mediated Isothermal Amplification of the *dnaA* Sequence for Rapid Detection of *Mycobacterium leprae*. 40th anniversary meeting of US-Japan cooperative medical science program. Kyoto, December, 2004
 - 10) Fukutomi Y., Takeshita F., Matsuoka M. and Makino M.: Regulation by Clofazimine of Cytokine Production in *M. leprae*-infected Macrophages. 40th anniversary meeting of US-Japan cooperative medical science program. Kyoto, December, 2004
 - 11) Makino, M., Y. Maeda, and T. Mukai. Identification of anti-mycobacterial host defense-associated antigen and assessment of its immunological significance. 40th anniversary meeting of US-Japan cooperative medical science program. Kyoto, December, 2004
 - 12) Ohyama, H., Ogata, K., Takeuchi, K., Namisato, M., Fukutomi, Y., Suzuki, M., Uemura, Y., Tsujimura, T., Terada, N., Matsushita, S. Polymorphism on the 5' flanking region of IL12R2 affects establishment of clinical type of leprosy. 40th anniversary meeting of US-Japan cooperative medical science program. Kyoto, December, 2004
 - 13) 甲斐雅規, 山崎利雄, 藤田由希子, 矢野郁也, 牧野正彦. らい菌由来糖脂質抗原の分離とその免疫原性の解析. 第77回日本細菌学会総会, 2004年4月 大阪
 - 14) 中田 登, 松岡正典, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 牧野正彦. らい菌ゲノム DNA の株間における多様性の検討. 第77回日本細菌学会総会, 2004年4月 大阪

- 15) 福富康夫、甲斐雅規、中田 登、牧野正彦.
M. smegmatis の katG 変異株の解析. 第 77
回日本細菌学会総会、2004 年 4 月 大阪
- 16) 向井 徹、宮本友司、前田百美、牧野正彦.
DC-SIGN を介した抗酸菌感染の解析. 第 77
回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 17) 稲垣勝也、前田百美、牧野正彦. らい菌由
来抗原 MMP-II の分泌型および脂質付加型
発現抗酸菌株の作製. 第 77 回日本細菌学
会総会 2004 年 4 月 大阪
- 18) 前田百美、牧野正彦、遠藤真澄、寺尾恵治.
サルシュワン細胞のらい菌感受性の検討.
第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月、大阪
- 19) 宮本友司、向井 徹、武下文彦、中田 登、
甲斐雅規、牧野正彦. 抗酸菌糖脂質
Glycopeptidolipids (GPLs) 糖酵素遺伝子
の破壊株作製とその機能解析. 第 77 回日
本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 20) 牧野正彦、前田百美、向井 徹、武下文彦、
山下康子、稲垣勝也、石井則久. らい菌由
来 Major Membrane Protein-II による自然
免疫および獲得免疫の活性化. 第 77 回日
本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 21) 山下康子、前田百美、武下文彦、牧野正彦.
らい菌由来リポ蛋白 LpK の IL-12 産生活性
中心の解析. 第 77 回日本細菌学会総会
2004 年 4 月 大阪
- 22) 尾崎元昭: 教育講演 ハンセン病の新患が
来たら、第 103 回日本皮膚科学会総会、京
都、2004 年 4 月
- 23) 長谷川淳一、井上 香、生垣英之、林 宏
一、松本和彦、齋田俊明、石井則久: らい
反応を生じ、治療に難渋した LL 型ハンセン
病の 1 例. 第 103 回日本皮膚科学会総会、
2004 年 4 月 京都
- 24) 石井則久: 改選の集団発生に対する実践的
治療と問題点. 第 103 回日本皮膚科学会総
会(教育講演)、2004 年 4 月 (京都)
- 25) 向井 徹、宮本友司、武下文彦、牧野正彦.
LAMP 法によるらい菌遺伝子の検出. 第 77 回
日本ハンセン病学会総会・学術大会 2004
年 5 月 大宮
- 26) 甲斐雅規: らい菌のダブソンの耐性変異
(学会賞受賞講演). 第 77 回日本ハンセン
病学会総会、2004 年 5 月 埼玉
- 27) 中田 登、松岡正典、甲斐雅規、鈴木幸一、
牧野正彦. らい菌ゲノム DNA の多様性につ
いての検討. 第 77 回日本ハンセン病学会総
会、2004 年 5 月 埼玉
- 28) 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に基
づく感染様式の解析. 第 77 回日本ハンセン病
学会総会、さいたま市、2004 年 5 月
- 29) Zhang Liangfen, Masanori Matsuoka Teky
Budiawan Eduardo C. Dela Cruz Indropo
Agusni, Ratna Wahyuni: Prevalence of
drug resistant leprosy case in Southeast
Asian countries. 第 77 回日本ハンセン病
学会総会、さいたま市、2004 年 5 月
- 30) 儀同政一: MFLX と TFLX の抗らい菌活性. 第
77 回日本ハンセン病学会総会. さいたま
市、2004 年 5 月
- 31) 儀同政一、松岡正典: OFLX 耐性らい菌に対
する SPFX の抗らい菌活性. 第 77 回日本ハン
セン病学会総会、さいたま市、2004 年 5 月
- 32) 山崎利雄、松岡正典、儀同政一: 生物発光
法を用いたらい菌の薬剤感受性試験法. 第
77 回日本ハンセン病学会総会、さいたま市、
2004 年 5 月
- 33) 藤村響男、佐藤直哉、与儀ヤス子、狩野真
帆、宮田聡子、増澤真実子、松岡正典、増
澤幹男、勝岡憲生: mce1 蛋白によるらい菌
の上皮細胞への侵入. 第 77 回日本ハンセン
病学会総会、さいたま市、2004 年 5 月
- 34) 佐藤則子、佐藤かすみ、小関正倫、青崎 登、
石井則久: ハンセン病の再発疹が疑われた
脛骨前粘液水腫の 1 例. 日本ハンセン病学
会総会、2004 年 5 月 (さいたま).
- 35) 佐藤則子、佐藤かすみ、小関正倫、青崎 登、
石井則久、岩田 誠: ハンセン病ニューロ
パチーの 1 例. 日本ハンセン病学会総会、
2004 年 5 月 (さいたま).
- 36) 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: 2003 年のハンセン病新期患者発生
状況. 日本ハンセン病学会総会、2004 年 5

- 月 (さいたま) .
- 37) 谷合啓明、天児和暢、松岡正典、吉田眞一：
Acanthamoeba culbertsoni は、
Mycobacterium leprae の生存をサポートする。
第 57 回日本細菌学会九州支部総会、福岡市、2004 年 9 月
- 38) 並里まさ子、柏原嘉子、松岡正典、藤原剛、小川秀興、Khin Nwe Oo, Kyaw Kyaw：ミャンマーの農村におけるハンセン病の疫学調査。
第 45 回日本熱帯医学会総会、東京、2004 年 10 月
- 39) 鈴木幸一、武下文彦、中田登、松岡正典、牧野正彦：抗酸菌感染マクロファージにおける菌の細胞内寄生と排除に関わる分子機構。
第 45 回日本組織細胞化学会、鹿児島、2004 年 10 月
- 40) 尾崎元昭：ハンセン病の現在一菌とヒトとの興味深い関係、第 39 回神戸皮膚科臨床研究会、2004 年 10 月
- 41) 儀同政一：新しい抗菌薬の抗らい菌活性。
日本化学療法学会総会
- 42) 稲垣勝也、前田百美、牧野正彦。らい菌由来抗原 MMP-II 分泌型 BCG 株の作製とその免疫学的性状解析。日本農芸化学会 2004 年度 (平成 16 年度) 2004 年 3 月 広島
- 43) 植村靖史、鈴木元晴、劉天懿、大山秀樹、松下祥：ヒトインバリアント NKT 細胞サブセットの樹状細胞を介した免疫抑制機構。
第 54 回日本アレルギー学会総会 (横浜)、2004 年 11 月
- 44) 鈴木元晴、植村靖史、劉天懿、大山秀樹、松下祥 (2004) 子宮 Th2 環境の維持における脱落膜 NKT 細胞の役割。第 54 回日本アレルギー学会総会 (横浜) 2004 年 11 月
- 45) 劉天懿、植村靖史、鈴木元晴、大山秀樹、松下祥 (2004) 環境物質が有するヒトアレルギー誘導活性を試験管内で評価する実験系の確立。第 54 回日本アレルギー学会総会 (横浜)、2004 年 11 月
- 46) 植村靖史、劉天懿、鈴木元晴、黄成日、成田弥生、大山秀樹、松下祥：ヒト V α 24 インバリアント NKT 細胞サブセットの樹状細胞を介した免疫抑制機構。第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、2004 年 12 月、札幌
- 47) 劉天懿、植村靖史、成田弥生、黄成日、鈴木元晴、大山秀樹、松下祥：環境物質が有するヒトアレルギー誘導活性を迅速に評価する実験系の確立。第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、2004 年 12 月、札幌
- 48) 鈴木元晴、植村靖史、劉天懿、黄成日、成田弥生、大山秀樹、松下祥：妊娠子宮 Th2 環境の維持における脱落膜 non-invariant NKT 細胞の役割。第 34 回日本免疫学会総会・学術集会、2004 年 12 月、札幌
- 49) 劉天懿 植村靖史、鈴木元晴、大山秀樹、松下祥：環境化学物質が有するヒトアレルギー誘導活性を試験管内で評価する実験系の確立。第 4 回分子予防環境医学研究会、2004 年 12 月、東京
- 50) 牧野正彦、前田百美、向井 徹、山下康子、石井則久。自然免疫および獲得免疫の活性化能を有する新たな抗酸菌抗原の同定。第 34 回日本免疫学会総会 2004 年 12 月、札幌
- 51) 福富康夫、牧野正彦。ヒトマクロファージのらい菌食食とサイトカイン産生。第 34 回日本免疫学会総会 2004 年 12 月 札幌
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 (申請中)
- 名称；「インターフェロンガンマ (IFN- γ) 低産生に関わる IL12R プロモーター領域の多型とその検出方法」
発明考案者；緒方是嗣、大山秀樹、松下祥、山本卓志
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

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16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、らい菌感染アルマジロおよびヌードマウスかららい菌菌体成分の抽出を試み、これまでに糖脂質 TMM (Trehalose monomycolate) を検出するとともに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) を検出した。これらの物質は患者血清と反応するものの大量培養できないらい菌からの収量が低く血清診断に直接利用するには不十分であった。そこで構造的にらい菌糖脂質と類似糖脂質を他の抗酸菌から検索し、その免疫活性等を調べた。

A. 研究目的

ハンセン病の診断には従来から行われている抗酸菌染色に加え早期診断法として血清診断法および PCR 法等を利用した DNA 診断法がある。しかし、信頼性のある抗酸菌染色や DNA 診断には種々の機器と熟練した技術が必要とされる。血清診断法は他の多くの感染症診断にも利用されている比較的簡便な技術であり、その多くがキット化され取り扱いが容易である。ハンセン病診断には日本で唯一開発、キット化された血清診断法として、らい菌の PGL-I 抗原を利用したものがある。しかし、この方法には少菌型ハンセン病を診断できないことや非特異的な反応が一定の割合で見られること等これまで特異性、感度の点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を確立できれば、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ことができるとともに、未だに多くのハンセン病流行地を持つ発展途上国などのフィールドでの簡便な診断法ともなり得る。唯一のハンセン病血清診断に用いられている PGL-I 抗原はらい菌に特徴的な糖脂質であることが知られているが、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。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、血清診断のための候補としても注目されている。そこで、らい菌菌体成分より糖脂質の抽出を試み、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由来のバ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。らい菌以外の種々の抗酸菌について液体培地および固形培地で増殖させ、らい菌同様、溶媒分画法にて糖脂質を抽出し、各抗酸菌由来糖脂質を質量分析しらい菌糖脂質と類似物質産生菌を検索する。抽出した糖脂質を用いて、血清反応性を検討するとともに免疫学的活性を調べる。

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

昨年までの結果としてらい菌感染アルマジロおよびマウス足蹠から糖脂質画分を得、薄層クロマトグラムを結核菌のそれと比較したところ、結核菌の TDM、TMM と同等の位置にらい菌由来のバンドがそれぞれ得られた。これらのバンドを粗精製した後、質量分析装置にて解析したところ、脂肪酸の炭化水素数は異なるもの

の、らい菌の TMM および TDM であることを確認できた。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（図 1）。このことから得られた糖脂質がらい菌由来の TMM、TDM であることが確認された。しかし、感染動物から得られる抽出量が極端に少なく血清反応性を十分に検討することが困難であった。今回、僅かに得られたそれら糖脂質を用いてハンセン病及び結核患者由来血清の反応性を調べた結果、結核菌の TDM、TMM 同様患者血清が反応することが確認できた。そこで、高収量を得るため、らい菌糖脂質の代替えとなりうる候補糖脂質を他の抗酸菌糖脂質から検索し、代替え候補として数種の抗酸菌を選んだ。

そのうち、BCG 菌のパスツール株及び BCG 菌のコンノート株の TMM、TDM の免疫活性を調べ、結核菌同様抗酸菌糖脂質としての活性を持つことが確認された（図 2、3）。また、予備実験での結果ではあるが、らい菌由来糖脂質画分の物質（未同定）も弱いながら活性を示した。

D. 考察

らい菌糖脂質解析により、以前に既に報告されていたもののその後ほとんど研究の進んでいない TMM の存在が確認された。さらにこれまで未報告であつたららい菌の TDM が検出された。その TMM、

TDM の構成成分であるミコール酸もらい菌に特徴的なアルファミコール酸とケトミコール酸のみが使用されていることが確認された。少量のらい菌由来 TDM、TMM を用いて患者血清の反応性を確認し、らい菌抗原として診断への応用の可能性を明らかにしたが、人工培養できないらい菌では抗原量が十分に確保できないことから合成を試みているがこれについては取り扱うミコール酸が非常に長鎖であり困難となっているのが現状である。そこで、人工培養可能な抗酸菌かららい菌の代替え候補を検討し数種の候補菌を選んだ。中でも BCG 菌パスツール株は利用するミコール酸種も同じことなどから、免疫学的活性および患者血清反応性を検討した結果、少なくともハンセン病診断のための補助的な方法にはなりうるかと判断された。今後は多くの患者血清を用いて従来法との比較、使用方法等の検討を行いたい。

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。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。しかし、大量培養できないらい菌から抗原量を確保できないことから他の抗酸菌由来抗原の中から代替え抗原となりうるものを選出し、検討を進めている。

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*. 72(1): 50-53, 2004.
- 2) Kai M. Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. *Jpn J Leprosy*. 73(3): 221-226, 2004.
- 3) Miyamoto Y, Mukai T, Takeshita F, Nakata N, Maeda Y, Kai M., Makino M. Aggregation of mycobacteria caused by disruption of fibronectin-attachment protein-encoding gene. *FEMS Microbiol Lett*. 236(2): 227-234, 2004.
- 4) Makino M, Suzuki K, Fukutomi Y, Yamashita Y, Maeda Y, Miyamoto Y, Mukai T, Nakata N, Kai M., Yamazaki T, Gidoh M, Matsuoka M. Current advances in the leprosy research activities. *Jpn J Leprosy* 74: 3-22, 2004.

2. 学会発表

- 1) 甲斐雅規、山崎利雄、藤田由希子、矢野郁也、牧野正彦. らい菌由来糖脂質抗原の分離とその免疫原性の解析. 第 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月 大阪
- 2) 中田 登、松岡正典、甲斐雅規、鈴木幸一、牧野正彦. らい菌ゲノム DNA の株間における多様性の検討. 第 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月 大

阪

- 3) 福富康夫、甲斐雅規、中田 登、牧野正彦. *M. smegmatis* の *katG* 変異株の解析. 第 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月 大阪
- 4) 甲斐雅規: らい菌のダプソンの耐性変異 (学会賞受賞講演)。第 77 回日本ハンセン病学会総会、2004 年 5 月 埼玉
- 5) 中田 登、松岡正典、甲斐雅規、鈴木幸一、牧野正彦. らい菌ゲノム DNA の多様性についての検討。第 77 回日本ハンセン病学会総会、2004 年 5 月 埼玉
- 6) Khin Saw Aye, Yin Thet Nu Oo, Kyaw Kyaw, Masanori Matsuoka, Masanori Kai. Molecular detection of primary dapsone resistant *Mycobacterium leprae* in Myanmar. 日米医学協力計画会議、2004 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

図1. らい菌ミコール酸の薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析

