

薬剤耐性らい菌の簡易検出法の開発と伝播状況
分担研究者 松岡 正典 国立感染症研究所室長

研究要旨

日本およびアジアにおける薬剤耐性らい菌の伝播状況について明らかにし、現行の多剤併用療法によるハンセン病対策の効果について明らかにすることを目的とした。そのために、dapson、rifampin、quinolon について遺伝子変異の検出により各地域における耐性菌の伝播を調査した。また、途上国においてもそれらの変異の検出を可能とするために、簡易検出法の開発を図った。国内の再燃例では約半数が何らかの薬剤に対して耐性を示し、3 剤に対して耐性を示す例も検出された。アジアの各地域では 1 次耐性の例は高くなかったものの再燃・難治例では 20%以上の耐性を示す地域もあった。薬剤耐性菌の伝播状況から多剤併用療法の有効性が認められたが、個々の感染例における治療効果を高めるために、感染菌の感受性検査を行なうことが必要と考えられた。

A. 研究目的

目下のハンセン病対策は早期発見と多剤併用量(MDT)による早期治療を主たる手段としている。その一方で、薬剤耐性例の報告もいくつかなされている。これまでらい菌の薬剤感受性はマウス足蹠法によって行なわれてきたために、その煩雑さから、薬剤耐性らい菌の伝播状況については流行地域を初めとして網羅的な把握ができていない。

近年、dapson、rifampin、quinolon については薬剤耐性を惹起する遺伝子変異が明らかとなってきた。遺伝子変異の検出により国内外における薬剤耐性らい菌の伝播状況を明らかにし、現行の化学療法を主たる手段とするハンセン病対策の有効性を検証することを目的とした。また途上国においてもそれらの変異の検出を可能とするために、マウス足蹠法により耐性が確認さ

れた菌に見出されるそれぞれの変異の簡易検出法の開発を図り、そのための基礎資料となる変異の種類を検索と、それらの変異を検出するための Dot blot 法の各種条件を検討した。

B. 研究方法

マウス足蹠法による感受性検査。国内の再燃、難治例より得た 22 例のバイオプシー検体をヌードマウス足蹠に接種し、らい菌を分離した。得られた菌より浮遊液を作成し、 1.0×10^4 個の菌を 1 群 6 匹の BALB/c マウスの後足足蹠に接種した。1 週間後より、Rifampin (0.01%) Dapson (0.01%, 0.001%, 0.0001%)、Ofloxacin (0.15%)、Sparfloxacin (0.02%) 混入飼料を与えた。25 ないし 30 週にそれぞれのマウスにおける菌の増殖を Shepard 法に準じて検査した。フィリピン Leonard Wood Memorial 研究所においても 63

例のバイオプシー検体を conventional マウスに直接接種して感受性検査を行なった。薬剤耐性を惹起する *folP*, *rpoB*, *gyrA* 遺伝子中の変異の種類を明らかにし、簡易検出法開発の基礎資料とするために、それぞれの分離株についてダイレクトシーケンスにより、各遺伝子中の変異を観察した。

変異検出による耐性菌の伝播調査。上記実験の結果と他の報告において明らかにされた耐性を惹起する変異を含めて *folP*, *rpoB*, *gyrA* 遺伝子のシーケンシングにより変異を検索し、日本(47 検体)、インドネシア(260 検体)、ミャンマー(157 検体)における耐性菌の伝播を調べた。検体は病変部位より、菌指数検査と同様の方法により、採取し、DNA 調整まで、70%エタノールに保存した。

簡易変異検出法の開発。これまでに報告されている各変異に対応する 15mer 前後の各種 DNA チップを (*folP* : 8 種、*rpoB* : 9 種、*gyrA* : 2 種) スライドガラス上にスポットし、hybridization 42°C、洗浄 47°C の条件下で、ビオチンラベル PCR 産物とのハイブリダイゼーションとドットの発色により遺伝子中の変異を検出する簡易な方法を考案した。

検体の採取に当たっては、所属機関の倫理審査委員会の承認の下に、対象者に対し研究の目的を説明し、同意が得られた場合にのみ、検体の採取を行なった。マウスを使用する実験は所属機関の動物実験規定を遵守して行なった。

C. 研究結果

マウス足蹠法によって dapsone, rifampin, quinolone に対してそれぞれ耐性が確認された分離株において、*folP* 遺伝子には 5 種類、*rpoB* 遺伝子には 3 種類、*gyrA* 遺伝子には 1 種類の変異が検出された。*folP* 53 位:ACC_ATC 3 例、ACC_GTC 1 例、ACC_ATC 1 例 55 位:CCC_CTC 5 例、55 位:CCC_TCC 1 例。*rpoB*:516 位 GAT_GTC 1 例、526 位 CAC_TAC 1 例、531 位 TCG_TTG 5 例。*gyrA*: 91 位:GCA_GTA 4 例。

それぞれの遺伝子における変異の検出により行なった耐性菌の頻度について Table 1 および 2 に示す。国内の再燃、難治例における症例の半数がいずれかの薬剤に対して耐性を示し、特に 5 例の 3 剤に対する耐性も検出された。表 2 にはアジア各国における耐性菌の出現頻度を示した。実験 1 において得られたフィリピンの結果も合わせて記載した。ミャンマー、インドネシアからの検体は低い PCR 陽性率を示し、限られた検体についてのみ検査可能であった。これは病巣部の Slit Skin Smear を用いたことと、低い菌指数を示す少菌型の症例が含まれていたためと考えられる。北マルクにおける rifampin 耐性菌の高い割合が示された。Dot blot hybridization 法により、それぞれの変異はそれに対応した DNA チップを吸着した部位における発色により検出可能とであった。これまでに明らかになっている全ての変異を個々に検出することが可能となった (Fig. 1)。

Table 1. Prevalence of drug resistance in Japanese patients.

Resistant to			Susceptible to all drugs			Total
DDS	RIF	Quinolone	DDS RIF	DDS RIF Quinolone		
8	2	2	7	5	24 (51%)	
					23 (49%)	
47						

Table 2. Prevalence of drug resistant *M. leprae* in Asian countries.

Indonesia (North Maluku)					
New case		Quinolone	Relapse case		
DDS	RIF		DDS	RIF	Quinolone
1/8 (1.2%)	4/10 (3.8%)	N.D.	1/7 (14.2%)	2/9 (22.2%)	N.D.
Myanmar (Yangon)					
New case		Quinolone	Relapse case		
DDS	RIF		DDS	RIF	Quinolone
1/1 (6.2%)	1/1 (6.6%)	0/13	2/2 (7.1%)	0/36	0/21
Philippines (Cebu)					
New case		Quinolone	Relapse case		
DDS	RIF		DDS	RIF	Quinolone
0/47	0/47	0/47	3/1 (20%)	0/15	0/15

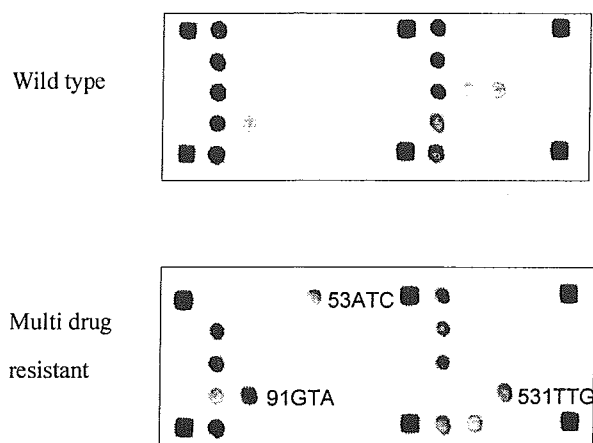


Fig.1 Dot blot hybridization for the strains with no mutation and mutations in *folP*, *rpoB* and *gyrA* gene

考察

dapson、rifampin、quinolon に対する耐性は *folP*、*rpoB*、*gyrA* 遺伝子中の特定部位の変異によって惹起されることが示されたが、らい菌についてはマウス足蹠法による感受性検査以外に信頼される方法が無いために、変異と耐性についての相関が明らかにされている例は他の培養可能な細菌に比べ圧倒的に少なく、耐性に関与するアミノ酸置換、あるいは塩基置換の種類についてより多くの資料の蓄積が必要である。本実験で検出された *rpoB* 遺伝子中の 516 位における GAT_GTC の変異はらい菌と結核菌との類似性から rifampin 耐性を惹起するものと推測されていたが、証明された例は無かった。本実験によって得られた結果により始めてそれが証明された。これまで報告されている国外の rifampin 耐性例では *rpoB* 遺伝子の 531 位 TCG_TTG の変異がほぼ 80% を占めていたが、国内で得られた rifampin 耐性株も 5/7 がこの変異を示し、その多さが際立っていた。

変異の検出により、臨床例について耐性菌の分布を調べた結果、国内の再燃例では他の地域に比べ多くの薬剤耐性例があることが示された。これは長年の単剤治療あるいは不規則治療に起因するものと推

察された。再燃例中 23 例の例はいずれの治療薬に対しても感受性であると判定されたが、これらは以前から知られている *persistor* の例であり、今後らい菌が感受性菌であるにもかかわらず、なぜ再燃が生ずるのか、その解明が望まれる。

インドネシアの北マルク地方においては rifampin 耐性菌の高い割合が示された。ミャンマーにおける rifampin の 1 次耐性の高さも含めて、その背景についての調査が必要と考える。インドネシア、ミャンマーにおいては薬剤耐性菌の分布については全く情報が無かった。これらの地域における耐性菌の伝播状況の一端を明らかに出来たことはハンセン病対策の有効性を知る上で、有益な知見となった。東南アジアの各地域には若干の耐性例は見出されるものの、WHO が進める MDT に用いられる治療薬中 clofazimin にはこれまで殆んど耐性の報告例が無いことから、現行の多剤併用療法はハンセン病対策に有効であると考えられる。

変異検出による感受性検査はマウス足蹠法に比し、時間、労力、経費ともに格段に節約できるものの、シークエンサーによるその解析は目下のところ、どこにおいても実施可能な手法ではない。療養所の検査室あるいは発展途上国においても実施可能な簡便な変異検出法の開発を行なった。スライドガラス上の塗布したそれぞれの変異に対応したオリゴマーにより、これまで報告されている dapson、rifampin、quinolon に対する耐性を惹起する遺伝子変異は全て特異的に検出可能となった。既にこの方法のミャンマー、フィリピンへの技術移転がなされた。今後それらの現地においても耐性検査が実施されることが期待される。

E. 結論

国内外のハンセン病治療薬に対する耐性菌伝播を遺伝子変異の検出により調査した結果、国内の再燃患者では耐性菌の割合が高いことが示

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

抗酸菌に対する宿主免疫応答

分担研究者 牧野 正彦（国立感染症研究所・病原微生物部・部長）

研究要旨.

病原性抗酸菌に対する新しいワクチンの開発を目的として、宿主細胞免疫を有効に賦活するリコンビナント BCG を作製し、本 BCG に対する宿主免疫応答能を検討した。らい菌の細胞膜より同定したタンパク Major Membrane Protein-II (MMP-II) は、らい菌に対する生体防御反応すなわちタイプ 1 細胞性免疫を誘導し、病変の限局化をもたらす。そこで、MMP-II 遺伝子上流に Antigen 85B 由来のタンパク分泌シグナルを付加した後 BCG に組み込んだ (BCG-SM の作製)。BCG-SM は、ベクターコントロール BCG (BCG-pMV) に比し、強く T 細胞を活性化した。T 細胞の活性化は、メモリータイプ T 細胞のみならず、ナイーブ T 細胞でも観察された。その主たる作用機序は、BCG-SM を樹状細胞に感染させた際、樹状細胞の表面に MMP-II が強く発現し、かつ MHC 分子、Co-stimulation 分子の樹状細胞表面への発現が増強されたことによると考えられた。BCG-SM は従来の BCG に比べ、より有効なワクチン効果をもたらすものと期待される。

A. 研究目的

BCG の病原性抗酸菌に対するワクチンとしての有効性は極めて限られている。ハンセン病においても、BCG が有効であったとする報告が一部で認められるが、全く無効であるとする報告もあり、BCG がハンセン病に対する有効なワクチンと信ずることはできない状況にある。ここでは、結核およびハンセン病を効率良く抑制する新しいワクチン開発を目的とした。これまでに、抗酸菌に対する生体防御反応を誘導するワクチン候補分子として、抗酸菌細胞膜に存在する Major Membrane Protein-II (MMP-II) を同定した。MMP-II は、樹状細胞を TLR-2 抗原を介して活性化し IL-12p70 を産生させ、かつ MMP-II をパルスした樹状細胞は CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞を活性化した。さらに、らい菌感染によって発症する少菌型ハンセン病患者の末梢 T 細胞は、MMP-II に感作されていることを見出した。これらの現象は、MMP-II はタイプ 1 細胞性免疫応答を効率良く誘導するタンパクであることを示唆している。そこで、MMP-II

を BCG に組み込み、さらに BCG の持つ欠点を補うために、細胞内感染後細胞内に MMP-II が分泌されるようにタンパク分泌シグナルを同時に組み込ませ、新しいリコンビナント BCG (BCG-SM) を作製し、次いで、作製した BCG-SM の T 細胞活性化能について検討した。

B. 研究方法

BCG パスツール株を用いてリコンビナント BCG を作製した。MMP-II 遺伝子上流に Antigen 85B 由来タンパク分泌シグナルをコードする遺伝子を組み込み、カナマイシン耐性遺伝子とともに BCG に組み込んだ。組み込み BCG をカナマイシン存在下 7H10 培地で培養し、リコンビナント BCG (BCG-SM) を得た。正常健常者末梢血よりプラスチック附着性細胞を分離し単球として用いた。末梢単球由来樹状細胞は、単球を rGM-CSF および rIL-4 存在下で 3 日間培養して得た。樹状細胞を BCG-SM あるいはベクターコントロール BCG (BCG-pMV) で刺激した際に、培養上清中に産生されるサイトカインは市販

の ELISA キットを用いて定量化した。BCG-SM および BCG-pMV の T 細胞活性化能は、これら BCG を感染させた樹状細胞をマイトマイシン処理した後抗原提示細胞として用い、自己の CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞をレスポンドーとして、T 細胞が産生するインターフェロンガンマー (IFN- γ) を指標に測定した。樹状細胞表面抗原の解析は、市販の抗体を用いて FACScalibur にて行った。また、昨年作製した MMP-II に対するモノクローナル抗体 (M270-13) を用いて、BCG-SM 感染樹状細胞表面への MMP-II の発現程度を測定した。BCG-SM のメモリー T 細胞の産生能は C57BL/6 マウスを用いて行った。本マウスに BCG-SM あるいは BCG-pMV を皮下接種し、7 および 13 週後に脾臓 T 細胞のリコンビナント MMP-II に対する反応性を検索した。T 細胞の活性化は IFN- γ の産生量を指標とし、IFN- γ は ELISA 法で測定した。

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

BCG-SM を 7H10 培地を用い *in vitro* で培養すると、その培養上清中に MMP-II が分泌されていることをウエスタンブロット法で確認し、さらに培養上清を濃縮し正常健常者樹状細胞を刺激すると、IL-12p40 の産生を誘導した。BCG-SM あるいは BCG-pMV を樹状細胞に感染させた後抗原提示細胞として用いて T 細胞の活性化誘導能を測定した。BCG-SM と BCG-pMV の間には大きな差が認められ、ナイーブ T 細胞 (CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞) およびメモリー T 細胞 (CD4 陽

性および CD8 陽性 T 細胞) は、BCG-SM を用いた時有意に強く活性化された。さらに、CD8 陽性 T 細胞を用い Cytotoxic T lymphocyte のマーカーである Perforin の細胞内産生能を BCG-SM と BCG-pMV で比較検討した。その結果、BCG-SM を用いるとより大量の Perforin が CD8 陽性 T 細胞内に産生された。そこで、BCG-SM の樹状細胞に及ぼす影響を検討した。BCG-SM を樹状細胞に感染させると、BCG-pMV に比し有意に強く MMP-II が樹状細胞表面に発現した。しかし、樹状細胞を予めクロロキニンで処理するか、BCG-SM を熱処理すると樹状細胞表面の MMP-II の発現は消失した。さらに、BCG-SM を樹状細胞に感染させると BCG-pMV に比し有意に高い HLA-ABC・HLA-DR・CD80 および CD86 抗原の発現が誘導された。BCG-SM あるいは BCG-pMV を C57BL/6 マウスに皮下接種し、その 7 あるいは 13 週後にマウス脾臓 T 細胞の MMP-II あるいは BCG に対する反応性を検討した。その結果、BCG に対する反応性は両者において有意の差はなかったが、MMP-II に対する反応性すなわち IFN- γ 産性能は BCG-SM 投与群において有意に高く、BCG-SM の方がより有効にメモリー T 細胞を産生することが明らかになった。

D. 考察

抗酸菌に対するワクチンとして全世界的に用いられてきた BCG の有効性は極めて限られている。BCG の持つ欠点は多い。その中で最も根本的かつ重大な欠点は、BCG が抗原提示細胞に貪食されると phagosome を形成し lysosome との融合を阻み十分にプロセッシングされないことである。BCG が抗原提示細胞に感染した後、その細胞内で生体防御反応を引き起こすタンパク抗原を分泌するリコンビナント BCG を作製した。さらに、タンパク抗原として多種類の抗酸菌に共通して存在し、かつ生体防御反応を司る上で重要な役割を果たす MMP-II を用いた。作製したリコンビナント BCG (BCG-SM) は、細胞内で MMP-II を分泌し、lysosome 内の酵素によりプロセッシングされ、主要組織適合抗原とともに樹状細胞

の表面に発現した。さらに、BCG-SMはコントロール BCG に比し、より強く樹状細胞を活性化した。その機序は一部不明であるが、MMP-II は TLR-2 と結合し、樹状細胞の NF- κ B を活性化する働きを有していることから、phagosome 内で分泌された MMP-II が phagosome 膜に存在する TLR-2 に結合して、樹状細胞をより強く活性化したものと想定された。このようにして、BCG-SM は従来の BCG に比し、より強く T 細胞を活性化し、その結果として大量のメモリー T 細胞を *in vivo* で産生したものと考えられた。

E. 結論

抗酸菌共通抗原である MMP-II を細胞内で分泌する新しいリコンビナント BCG は、樹状細胞を介してより強く T 細胞を活性化しメモリー T 細胞を産生した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeda, Y., T. Mukai, J. Spencer, and M. Makino. Identification of immunomodulating agent from *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immunity*, 73:2744-2750, 2005.
- 2) Makino, M., Y. Maeda, and N. Ishii. Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium leprae*. *Cell. Immunol.*, 233:53-60, 2005.
- 3) Miyamoto, Y., T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. Identification and characterization of the genes involved in glycosylation pathways of mycobacterial glycopeptidolipids biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 188:86-95, 2006.
- 4) Mukai, T., Y. Miyamoto, T. Yamazaki, and M. Makino. Identification of *Mycobacterium* species by comparative analysis of the *dnaA* gene. *FEMS Microbiol. Lettr.*, 254:232-239, 2006.

- 5) 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, 105-110, 2005.
- 6) 牧野正彦. 生体防御機構. 牧野正直・長尾栄治・畑野研太郎編, 総説現代ハンセン病医学, 東海大学出版会, in press, 2006.
- 7) 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. ハンセン病基礎医学研究のトピックス. *Jpn. J. Leprosy*, 74:3-22, 2005.

2. 学会発表

- 1) Functional counteraction between toll-like receptor 2 and COR01A that affects intracellular survival of mycobacteria. Suzuki, K., F. Takeshita, N. Nakata, N. Ishii, and M. Makino. The 14th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage 2005, 3-4 June, 2005, Saitama, Japan.
- 2) IL-1 at the early stage of monocyte differentiation to dendritic cells impairs functional activities of dendritic cells. Makino, M., Y. Maeda, and T. Mukai. Fortieth Annual U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Seattle, USA, July 28-30, 2005.
- 3) Rapid detection of *Mycobacterium leprae* by a loop-mediated isothermal amplification method. Mukai, T., Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Fortieth Annual U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Seattle, USA, July 28-30, 2005.

- 4) 細胞内寄生に影響を与える抗酸菌糖脂質 Glycopeptidolipids の構造. 宮本友司, 向井 徹, 中田 登, 甲斐雅規, 前田百美, 中 崇, 矢野郁也, 牧野正彦. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
- 5) クロファジミンによるマクロファージの細胞死誘導. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
- 6) らい菌感染末梢血単球由来サイトカインの樹状細胞による生体防御反応に及ぼす影響 (ワークショップ). 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
- 7) *Mycobacterium smegmatis* の持つ第 2 の *katG* 遺伝子の機能. 中田 登, 甲斐雅規, 宮本友司, 鈴木幸一, 牧野正彦. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
- 8) MMP-II を用いたハンセン病血清診断法の開発. 前田百美, 石井則久, 向井 徹, 甲斐雅規, 福富康夫, 北田清悟, 小林和夫, 矢野郁也, 牧野正彦. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
- 9) リアルタイム PCR 法を利用した薬剤耐性変異検出の試み. 甲斐雅規, Nguyen Phuc Nhu Ha, 松岡正典, 牧野正彦. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2005 年 5 月 青森
- 10) クロファジミンによる細胞死誘導. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2005 年 5 月 青森
- 11) らい菌偽遺伝子の一部は高レベルで発現しており感染後に発現量が変化する. 鈴木幸一, 中田 登, Pham Dag Bang, 牧野正彦. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2005 年 5 月 青森
- 12) らい菌膜免疫調整性蛋白の同定. 前田百美, 向井 徹, 山下康子, 牧野正彦. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2005 年 5 月 青森
- 13) LAMP 法によるらい菌遺伝子診断法の確立. 向井 徹, 宮本友司, 松岡正典, 牧野正彦. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2005 年 5 月 青森
- 14) Analysis of mechanisms of multibacillary leprosy development: the role of IL-1 β (ワークショップ). 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹. 第 35 回日本免疫学会総会 2005 年 12 月 横浜
- 15) マクロファージの in vitro における抗らい菌活性発現. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第 35 回日本免疫学会総会 2005 年 12 月 横浜
- 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（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

らい菌に対するマクロファージ応答の機構に関する研究

分担研究者 福富康夫

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二室長

研究要旨

ハンセン病における抗らい菌薬であるクロファジミン（B663）にはマクロファージに対する細胞死誘導活性が存在した。健常人末梢血単球由来マクロファージやマウス腹腔マクロファージを B663 存在下にて培養したところ、B663 の濃度 10 μ g/ml で約 80%の細胞死が認められた。その過程で細胞質の縮小化や核の縮小化・断片化が観察された。また、ミトコンドリア代謝酵素活性測定による生細胞定量法においても細胞死が確認された。THP-1 細胞でも著明な細胞死が観察され annexinV 染色陽性細胞が現れた。さらに DNA を抽出しアガロース電気泳動を行なったところ、ヌクレオソーム単位の大きさでの DNA 断片化が観察された。細胞死はエンドヌクレアーゼの阻害剤で抑制され、これらの結果から B663 による細胞死はアポトーシスであることが判明した。

A. 研究目的

ハンセン病はらい菌に対する様々な免疫反応を呈する慢性感染症であり、宿主の免疫状態により、マクロファージやシュワン細胞内でらい菌が増殖する症例と、反対に殺菌される症例がみられる（それぞれ LL 型と TT 型）。また、マクロファージやリンパ球が菌体成分や抗原に対し過剰な免疫反応（らい反応）を起こすと神経障害をきたしてハンセン病に特徴的な身体障害を生んでしまう。ハンセン病治療に用いられる幾つかの化学療法剤のうち、クロファジミン（B663）にはらい菌に対する抗菌作用に加え患者のらい反応などを抑制するといった抗炎症作用も報告されている。マクロファージは proinflammatory cytokine 産生細胞としてらい反応に大きく関わっていると思われ

るが、B663 の抗炎症作用との関係については不明な点が多くそれを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

試薬：クロファジミン（B663）は Sigma 社製を用いた。各薬剤は DMSO にて溶かし使用直前まで -20 度に保存した。

マウスマクロファージの培養：リタイアメス ICR マウス腹腔常在細胞を、アンピシリン 50 μ g/ml 含有 10%ウシ胎児血清(FBS)-RPMI1640 または DMEM 培地に浮遊させ、 1×10^6 個の細胞をカバースリップの入った 24 穴プレートウエル中にて 2 時間ないし一晩培養した。Hanks 液にてカバースリップを十分に洗い非附着細胞を除いた後、マクロファージの張り付いた同カバースリップ

プを再び 24 穴プレート中にて培養した。なお、マウスの使用については国立感染症研究所動物実験委員会による審査をパスしており、倫理面への配慮がなされている。

ヒトマクロファージの培養：健常人末梢血より比重勾配遠心法により単核球を得て U 型 96 穴プレート (1×10^5 /well)、もしくはカバースリップの入った 24 穴プレートウェル中 (1×10^6 /well) にまき培養した。HBSS にてウェル内を洗浄し非付着細胞を除いて 10%FBS 添加 RPMI1640 にて 1 週間以上培養しモノサイトからマクロファージに分化させてから用いた。また、ヌンク製の 8 ウェルタイプ細胞培養ガラスチェンバーに単核球をまき、同様な方法でマクロファージを得た。さらに、ヒト THP-1 細胞株も用いた。

細胞死の検出：代謝酵素活性測定法

(Promega 社製 Cell titier 96 Aqueous Non-radioactive Cell Proliferation Assay) を用いた。96 穴、もしくは 24 穴プレート内カバースリップ上で培養しているマクロファージ、もしくは THP-1 細胞を B663 存在下でフェノールレッド不含 10%FBS 含有 RPMI1640 培地で一晚培養した後、基質液を添加し、数時間後の発色をプレートリーダーにて測定した。また、死細胞からの培地への LDH 放出測定(Promega 社製)によっても細胞死を評価した。

形態観察：B663 を添加して培養したマクロファージをメタノール固定後ギムザ染色を施し顕微鏡にて形態を観察した。また、グルタルアルデヒド固定した細胞を Hoechst33342 にて核染色し、蛍光顕微鏡にて核の形態を観察した。

DNA 断片化の検出：B663 存在下で培養し

た THP-1 細胞やマクロファージから細胞抽出液を得、さらに DNA 抽出キットを用いスピナラムにて DNA を精製した。そしてアガロースゲル電気泳動を行い断片化 DNA を検出した。

C. 研究結果

健常人末梢血単核球からプラスチック付着性の単球を精製して培養しマクロファージに分化させた後、B66310_g/ml 存在下にて培養して倒立顕微鏡下で観察したところ、培養開始後数時間内に細胞が収縮し始め、5 時間目以降ではアポトーシスに特徴的なアポトーシス小体が出現し、24 時間後には約 80%で細胞が縮小化を伴った顕著な形態異常を示した。生細胞判定のためのミトコンドリア活性を指標とした代謝試験(ホルマザン発色)によってこれらの細胞は死滅していることが確認された。培養上清中の LDH 量も著明に増加することから細部死が起こっていることが再確認された。マウス腹腔マクロファージについても B663 の作用を調べたが、ヒトマクロファージと同様な結果が得られた。また、B663 存在下で培養したヒトマクロファージを、メタノール固定後ギムザ染色を施して顕微鏡下で観察したところ、4-5 時間目から核は顆粒状に染まる傾向にあり、6 時間目以降は著明な核の凝縮と細胞質の縮小がみられ典型的なアポトーシスの形態を示した。同様に Hoechst33342 で核染色を施して蛍光顕微鏡で観察したが核の縮小化・断片化はより明瞭に観察された。

ヒトマクロファージ細胞株の THP-1 細胞でも B663 により著明な細胞死が観察され、FACS による解析からは B663 処理後数時

間内に annexinV 染色陽性細胞が現れた。さらに 4-5 時間目に回収した細胞から DNA を抽出しアガロース電気泳動を行なったところ、ヌクレオソーム単位の大きさでの DNA 断片化が観察された。ヒトマクロファージにおいても同様な断片化がみられた。また、エンドヌクレアーゼの阻害剤である aurintricarboxylic acid により細胞死が抑制され DNA 断片化もみられなくなった。

D. 考察

クロファジミン(B663)には抗菌活性の他、マクロファージのリゾチーム活性の増強や好中球の O₂-産生を増強するなど免疫細胞に対する薬理作用があると報告されている。しかし、らい反応を抑制する機構については明らかになっていない。我々は一昨年本報告にて、らい菌刺激マウスマクロファージにおいて 10 μ g/ml の B663 存在下にて TNF α 産生が一過性(培養開始 4 時間目まで)に増強することを報告し、その原因が炎症因子である PGE₂ の産生抑制にあることを見出した。しかし、さらにマクロファージの培養を続けると、24 時間後には顕微鏡下による観察で細胞死が起こっていることが判明し、ミトコンドリア代謝活性測定による生細胞定量法でも細胞死が確認された。また、ヒト単球由来マクロファージやヒトマクロファージ細胞株 THP-1 においても同様の結果が得られた。FACS による解析からは annexinV 染色陽性細胞が現れた。さらに細胞の縮小化や核の縮小化が観察され DNA 断片化もみられることから、B663 により誘導されるマクロファージや THP-1 の細胞死はアポトーシスであることが判明した。種々のアポトーシス阻害剤も

この細胞死を抑制した。

B663 の抗炎症作用についてはラットやモルモットを用いた動物実験においてツベルクリン反応を抑制するといった報告がある。また、ヒトにおいてもハンセン病のみならず一部の皮膚疾患では抗炎症剤として用いられている。これまで B663 が宿主側の細胞に対して、高濃度ではいわゆる細胞毒性を有すると理解はされていてもアポトーシスを誘導するとは理解されておらず、本報告の内容は新知見である。マクロファージは TNF など炎症性サイトカインやプロスタノイドなど炎症因子を産生する細胞であり、らい反応においても大きく関わっている細胞である。B663 によりこの細胞が除去されることは B663 の抗炎症作用を考え合わせると興味深い現象であった。

E. 結論

クロファジミンにより誘導されるマクロファージの細胞死はアポトーシスであることが判明した。これまでクロファジミンが宿主側の細胞に対してアポトーシスを誘導するといった報告例はない。マクロファージのアポトーシスは炎症性サイトカインを産生する細胞が除去されることも意味しており、クロファジミンによるマクロファージのアポトーシスはその抗炎症作用と深い関係があると思われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

福富康夫:「らい菌による免疫抑制の機序」、臨床免疫 43 (4) :392-399, 2005.

牧野正彦・鈴木幸一・福富康夫他(共著):ハンセン病基礎医学研究のトピックス

Jpn.J.Leprosy 74:3-22, 2005.

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 beta 2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. J Clin Pathol 58(7):740-743, 2005.

2. 学会発表

福富康夫・前田百美・牧野正彦：クロファジミンによるマクロファージの細胞死誘導、第 78 回日本細菌学会総会、東京 2005 年 4 月

福富康夫・前田百美・牧野正彦：クロファジミンによる細胞死誘導、第 78 回日本ハンセン病学会総会、青森、2005 年 5 月

福富康夫・前田百美・牧野正彦：マクロファージの *in vitro* における抗らい菌活性発現、第 35 回日本免疫学会総会、横浜、2005 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金(国際医学協力研究事業)
分担研究報告書

ハンセン病の新規診断検査法の開発

分担研究者 向井 徹 国立感染症研究所 ハンセン病研究センター 室長
協力研究者 宮本友司 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 ハンセン病の遺伝子診断法開発のため、LAMP 法によるらい菌の同定法を確立してきた。LAMP 法に供する検体の簡易保存・移送法の検討を行うため、FTA カードに塗布された 54 検体を用い、LAMP 法と PCR 法による検出率を比較検討した。その結果、両法の一致率は 76%であった。また、プリザベーションプレートを用いた保存法の検討では、らい菌 50 菌体の検出感度は 90%であった。これら検出法、保存法は、経済的かつ簡易な遺伝子検査法の開発を可能にすると考えられた。

A. 研究目的

らい菌の遺伝子同定検査を行うためには、臨床検体を採取後、それを検査可能な施設へ移送する必要がある。一般に、検体の移動は低温下で行われるが、検査を行う施設まで長時間を要するため冷蔵庫などの設備や器具を必要とする。そのため、臨床検体を簡易にかつ安定した状態で保管・移送する方法が必要とされる。本研究では、これまでに、確立してきた等温遺伝子増幅法である loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法に応用可能な検体保存法の検討を目的とした。

B. 研究方法

特殊化学表面処理を施した FTA カード (Watman 社) に塗布された 54 サンプルを検体として用いた。塗布領域より径 2 mm のディスクをパンチアウトし、洗浄液にて 2 回、トリス緩衝液にて 2 回洗浄後、ディ

スクを直接らい菌特異 LAMP 法および PCR 法に用いた。増幅産物は、Fluorescent Detection 試薬(栄研化学)により検出した。また、検体保存法の検討として、プリザベーションプレート(東京ケミカルリサーチ)の各ウエル内のろ紙へ、段階希釈らい菌液を添加・乾燥後、密封し、5 日間室温保存後、ろ紙を直接 LAMP 法に用い、検出感度を FTA カードと比較検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施は倫理委員会の承認を得て行われた。検体採取においては、研究の目的・意義について説明し、同意が得られた場合にのみ材料の提供を受けた。

C. 研究結果

FTA カード塗布検体を用いた LAMP 法と PCR 法の結果の一致率は、76%であった。また、LAMP 法は B.I.0.25 の検体まで検出可能であった。検出の不一致検体は、LAMP

法のみ陽性は9サンプル、PCR法のみ陽性は、4サンプルであった。

プリザベーションプレートの検討の結果、菌体を添加後、室温5日保存では、50菌体の検出率は、90.0%、20菌体では、20%であった。

D. 考察

FTAカードは、その表面を化学処理が施され、菌体の蛋白、脂質を壊し、核酸を紙面へ結合させる。ろ紙のみのプリザベーションプレートは、FTAカードと比較し、その検出感度は低いと予想された。しかし、プリザベーションプレートを用いた結果、ウエルあたり50前後の菌体をLAMP法により検出可能であり、この検出感度は、FTAカードを用いた検出感度と同等であった。これは、FTAカードでは、表面化学処理を洗浄により除去する必要があるため、その過程が、紙面に結合した核酸の減少の原因となるため、洗浄過程の必要のないプリザベーションプレートと同等の感度となったと考えられた。

LAMP法とPCR法の不一致率の高さは、サンプルの塗布領域からパンチアウトする領域に左右されたと考えられる。今回用いたカードでは、紙面の面積が広く、検体塗布後拡散により菌体の分布が不均一になり、結果にばらつきが生じたと考えられた。プリザベーションプレートは、添加領域に制限があり、サンプルが拡散することはなく、添加したサンプルは全て反応に供することが可能である。今後、本プレートを応用することにより、結果の一致率の向上が図られると考えられた。

E. 結論

らい菌特異検出LAMP法は、FD試薬による迅速検出とプリザベーションプレートによる検体の室温保存・運搬法を組み合わせることにより、経済的かつ簡易なハンセン病の遺伝子診断システムに成り得ることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1)Maeda, Y., T. Mukai, J. Spencer, and M. Makino. Identification of immunomodulating agent from *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immu*, 73: 2744-2750, 2005.

2)Miyamoto, Y., T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. Identification and characterization of the genes involved in glycosylation pathways of mycobacterial glycopeptidolipids biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 188:86-95, 2006.

3)Mukai, T., Y. Miyamoto, T. Yamazaki, and M. Makino. Identification of *Mycobacterium* species by comparative analysis of the *dnaA* gene. *FEMS Microbiol. Lettr.*, 254:232-239, 2006.

4)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. ハンセン病基礎医学研究のトピックス. *Jpn. J. Leprosy*, 74:3-22, 2005.

2. 学会発表

1)Makino, M., Y. Maeda, and T. Mukai. IL-1 at the early stage of monocyte differentiation to dendritic cells impairs functional activities of dendritic cells. Fortieth Annual U.S.-Japan

Cooperative Medical Science Program. 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Seattle, USA, July 28-30, 2005.

2) Mukai, T., Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Rapid detection of *Mycobacterium leprae* by a loop-mediated isothermal amplification method. Fortieth Annual U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Seattle, USA, July 28-30, 2005.

3) 宮本友司, 向井 徹, 中田 登, 甲斐雅規, 前田百美, 中 崇, 矢野郁也, 牧野正彦. 細胞内寄生に影響を与える抗酸菌糖脂質 Glycopeptidolipids の構造. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京

4) 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹. らい菌感染末梢血単球由来サイトカインの樹状細胞による生体防御反応に及ぼす影響. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京

5) 前田百美, 石井則久, 向井 徹, 甲斐雅規, 福富康夫, 北田清悟, 小林和夫, 矢野郁也, 牧野正彦. MMP-II を用いたハンセン病血清診断法の開発. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京

6) 前田百美, 向井 徹, 山下康子, 牧野正彦. らい菌膜免疫調整性蛋白の同定. 第 78 回日本ハンセン病学会総会 2005 年 5 月 青森

7) 向井 徹, 宮本友司, 松岡正典, 牧野正彦. LAMP 法によるらい菌遺伝子診断法の確立. 第 78 回日本ハンセン病学会総会 2005 年 5 月 青森

8) 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹. Analysis of mechanisms of multibacillary leprosy development: the role of IL-1. 第 35 回日本免疫学会総会 2005 年 12 月 横浜

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

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
松本 壮吉	分子生物学から見た結核研究の現在	四元秀毅、倉島篤行編	結核Up to D 第2版	南光堂	東京	2005	184-188
後藤正道、ティダアウン、北島信一	ハンセン病の免疫病態	柳澤信夫、篠原幸人、岩田誠、清水輝夫、寺本明	Annual Review 神経 2005	中外医学社	東京	2005	103-112
大山秀樹	ハンセン病の免疫遺伝学	大谷藤郎	総説現代ハンセン病医学	東海大学出版会	神奈川	2006	in press
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		2005	105-110
牧野正彦	生体防御機構	牧野正直・長尾栄治・畑野研太郎編	総説現代ハンセン病医学	東海大学出版会		2006	in press

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fukasawa, Y., Kawamura, I., Uchiyama, R., Yamamoto, K., Kaku, T., Tominaga, T., Nomura, T., Ichiyama, S., Ezaki, T., Mitsuyama, M	Streptomycin-dependent exhibition of cytokine-inducing activity in streptomycin-dependent <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strain 18b	Infect. Immun.	73	7051-7055	2005
谷口初美	結核菌の病原性に関する分子遺伝学的研究	日本結核病学会誌	80(9)	621-623	2005
Matsumoto S, Matsumoto M, Umemori K, Ozeki Y, Furuhashi M, Tatsuo T, Hirayama Y, Yamamoto S, Yamada T, Kobayashi K.	DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection in Mice	J. Immunol.	175	441-449	2005

Kanekiyo M, Matsu o K, Hamatake M, Hamano T, Ohsu T, Matsumoto S, Y amada T, Yamazaki S, Hasegawa A, Yamamoto N, Hon da M.	Mycobacterial codon opti mization enhances antigen expression and virus-spec ific immune responses in recombinant <i>Mycobacteriu m bovis</i> bacille Calmette- Guerin expressing human immunodeficiency virus T ype 1 Gag	J. Virol.	79	8716-8723	2005
Ami Y, Izumi Y, Matsuo K, Someya K, Kanekiyo M, Horibata S, Yoshin o N, Sakai K, Shin ohara K, Matsumot o S, Yamada T, Y amazaki S, Yamam oto N, Honda M.	Priming-Boosting Vaccinat ion with recombinant <i>Myc obacterium bovis</i> Bacillus Calmette-Guerin and a n onreplicating vaccinia viru s recombinant leads to lo ng-lasting and effective i mmunity	J. Virol.	79	12871-12879	2005
Oiso R, Fujiwara N, Yamagami H, Maeda S, Matsumot o S, Nakamura S, Oshitani N, Matsu moto T, Arakawa T, Kobayashi K	Mycobacterial trehalose 6, 6'-dimycolate preferentially induces type 1 helper T cell responses through sig nal transducer and activat or of transcription 4 prote in	Microb. Pathog.	39	35-43	2005
松本壮吉	結核菌の潜伏感染と内因 性再燃の分子機構	化学療法の 領域	21	79-85	2005
大原直也	B C Gを用いた抗酸菌の 抗原性および病原性に関 する研究	日本細菌学 雑誌	60巻2号	349-356	2006
Takahashi H, Sasaki K, Takahashi M, Shigenori N, Honda S, Arimitsu H, OchiS, Ohara N, Tsuji T	Mutant <i>Escherichia coli</i> enterotoxin as a muc osal adjuvant causes specific CD4+ and CD8+ T cells to produce IFNg and TNFa inresponse to nasal killed-bacillus Catmette-Guerin vaccine in mice.	Vaccine	24巻	in press	2006
Yajima, T., H. Nish imura, S. Sad, H. S hen, H. Kuwano, an d Y. Yoshikai	A novel role of IL-15 in early activation of memor y CD8+ CTL after re-infe ction.	J.Immunol.	174:	3590-3597	2005
Yajima T., Yoshiha ra K., Nakazato K., Kumabe S., Koyas u S., Sad, S., Shen H , Kuwano H., and Yoshikai Y.	IL-15 regulates CD8+ T c ell contraction during pri mary infection	J.Immunol.	176:	507-515	2006
Saito, K, Yajima T, Kumabe S, Doi T, Nishimura H, Sad S, Shen H and Yos hikai Y.	Impaired protection agains t <i>Mycobacterium bovis</i> Ba cillus Calmette-Guérin inf ection in IL-15 deficient mice.	J.Immunol.	176:	2496-2504	2006

Kikuchi, T. Uehara, S.Ariga, H. Tokunaga, T.Kariyone, A. Tamura, T. Takatsu. K.	Augmented induction of CD8 ⁺ cytotoxic T-cell response and antitumour resistance by T helper type 1-inducing peptide.	Immunology	117:1	47-58	2005
Komuro, I., Yasuda, T., Iwamoto, A. and Akagawa, K.S.	Catalase plays a critical role in the CSF-independent survival of human macrophages via regulation of the expression of Bcl-2 family	J. Biol. Chem.	280	41137-41145	2005
Akagawa K.S., Komuro, I., Kanazawa H., Yamazaki,T., Mochida K. and Kishi, F.	Functional Heterogeneity of Colony-Stimulating Factor-Induced Human Monocyte-Derived Macrophages.	Respirology	11	S32-S36	2006
Nam MH, Hijikata M, Tuan LA, Lien LT, Shojima J, Horie T, Nakata K, Matsushita I, Ohashi J,Tokunaga K, Keicho N.	Variations of the CFTR gene in the Hanoi-Vietnamese.	Am J Med Genet A.	136 (3)	249-53	2005
Kutok JL, Yang X, Folkerth RD, Imitola J, Raddassi K, Yano Y, Salahuddin S, Lawitts J, Imboden H, Chinami M, Shirakawa T, Turner H, Khoury S, Sayegh MH, Scadden D, Adra C:	The cell cycle association protein, HTm4, is expressed in differentiating cells of the hematopoietic central nervous system in mice.	J Mol Histol.	36(1-2)	77-87	2005
Akahashi M, Obara K, Hirota T, Matsuda A, Hasegawa K, Takahashi N, Shimizu M, Nakashima K, Cheng L, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Higashi N, Taniguchi M, Enomoto T, Mao XQ, Nakashima H, Adra CN, Nakamura Y, Tamari M, Shirakawa T	Functional promoter polymorphism in the TBX21 gene associated with aspirin-induced asthma.	Hum Genet	117	16-26	2005

Akahoshi M, Nakahima H, <u>Shirakawa T</u>	Th1 immunity and autoimmune disorders.	Seminar Immunol	In press		2006
Takemasa Takii, Sonomi Hamasaki, Kazue Hirano, Chiyoji Abe, and Kikuo Onozaki	Simple fibroblast-based assay to test the pyrazinamide susceptibility of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Antimicrob Agents Chemother.	49	804-807	2005
Nobumiti Ohoka, Satoru Yoshii, Ttakyuki Hattori, Kkiko Onozaki, and Hidetoshi Hayashi	TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death.	EMBO J.	24(6)	1243-1255	2005
林 秀敏、小野寄菊夫	Interleukin-1 (IL-1) alpha, beta, IL-1 receptor, IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)	日本臨床	63 Suppl 8	60-64	2005
Daichi Katagiri, Hidetoshi Hayashi, A. F. Victoriano, Takashi Okamoto T, and Kikuo Onozaki	Estrogen stimulates transcription of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)	Int Immunopharmacol.	6(2)	170-181	2006
Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Kanamaru N, Muraki Y, Hashimoto S, Inoue Y, Sakatani M, Kobayashi E, Kaneda Y, <u>Okada M</u>	DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against <i>Mycobacterium tuberculosis</i> by T cell activation.	Vaccine	24	1191-204	2006
Kita Y, <u>Okada M.</u> et al	Novel recombinant BCG- and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model.	Vaccine	23	2132-5	2005
<u>Okada M.</u> et al	The Development of vaccines against SARS Coronavirus in Mice and SCID-PBL/hu Mice.	Vaccine	23	2269-72	2005
<u>Okada M</u> and Shirakawa T	Frontier of <i>Mycobacterium</i> Research – Host Vs <i>Mycobacterium</i> . “the 80 th Annual Meeting Symposium	Kekkaku	80	613-629	2005
<u>Okada M.</u> et al	Novel vaccination (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA and recombinant 72f BCG) against tuberculosis using cynomolgus monkey.	40 th Tuberculosis and Leprosy Research Conference US-JAPAN Cooperative Medical Science Program.		46-50	2005

岡田全司	結核：自然・獲得免疫と疾患「免疫と疾患」.	最新医学	60	678-696	2005
岡田全司. et al	結核ワクチン	呼吸器科	7	63-70	2005
Aoshi T, Suzuki M, Uchijima M, Nagata T, Koide Y	Expression mapping by retroviral vector for CD8 ⁺ T cell epitopes: definition of a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> peptide presented by H2-D ^d .	J Immunol Methods	298(1-2)	21-34	2005
Nagata T, Uchijima M, Uchiyama H, Yamada T, Aoshi T, Koide Y	Immunization with gene encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inserted with a single helper T-cell epitope of an intracellular bacterium induces a specific T-cell subset and protective immunity.	Vaccine	In press		
Nakano H, Nagata T, Suda T, Tanaka T, Aoshi T, Uchijima M, Chida K, Nkamura H, Okada M, Koide, Y	Immunization with dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to a dominant epitope on Antigen 85A.	Vaccine	In press		
Tomoshige Matsumoto, Hiromi Ano, Takayuki Nagai, Katsura Danno, Tetsuya Takashima, Izuo Tsuyuguchi	IS6110 DNA fingerprinting analysis of individually separated colony	Tuberculosis	85	207-212	2005
後藤正道、Thida Aung、北島信一	途上国におけるハンセン病の病理診断	日本ハンセン病学会雑誌	74 (3)	191-198	2005
Masamichi Goto, Kazue Nakanaga, Thida Aung, Tomofumi Hamada, Norishige Yamada, Mitsuharu Nomoto, Shinichi Kitajima, Norihisa Ishii, Suguru Yonezawa, Hajime Saito	Nerve damage in <i>Mycobacterium ulcerans</i> infected mice: probable cause of painlessness in Buruli ulcer	American Journal of Pathology	168 (3)	805-811	2006

<u>Ohyama, H.</u> , 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 $\beta 2$ gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity.	J. Clin. Pathol.	58	740-743	2005
Liu, T., Kohsaka, H., Suzuki, M., Takagi, R., Hashimoto, K., Uemura, Y., <u>Ohyama, H.</u> , Matsushita, S.	Positional Effect of Amino Acid Replacement on Peptide Antigens for the Increased IFN- γ Production from CD4T cells. Allergol. International.	Allergol. International.	54	117-122	2005
Zhang L., Namisato M. and <u>Matsuoka M.</u>	A mutation at codon 516 in the <i>rpoB</i> gene of <i>Mycobacterium leprae</i> confers resistance to rifampin.	Int. J. Lepr.	72	468-472	2004
<u>Matsuoka M.</u> , Zhang L., Fafutis M., Legua P. and Wiens C.	Polymorphism in the <i>rpoT</i> gene in <i>Mycobacterium leprae</i> isolates obtained from Latin American countries and its possible correlation with the spread of leprosy.	FEMS Microbio. Lett.	242	311-315	2005
Zhang L., Budiawan T., and <u>Matsuoka M.</u>	Diversity of potential short tandem repeats in <i>Mycobacterium leprae</i> and application for Molecular typing.	J. Clin. Microbiol.	43	521-529	2005
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.	ハンセン病基礎医学研究のトピックス.	Jpn. J. Leprosy	74	3-22	2005
Y. Maeda, T. Mukai, J. Spencer, <u>M. Makino.</u>	Identification of Immunomodulating Agent from <i>Mycobacterium leprae</i> .	Infect. Immunity	73	2744-2750	2005
<u>M. Makino.</u> , Y. Maeda, N. Ishii.	Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from <i>Mycobacterium leprae</i> .	Cell. Immunol.	233	53-60	2005