

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 向井 徹

平成18(2006)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..... 9

#### 2. らい菌の型別とハンセン病の分子疫学

松岡 正典..... 17

#### 3. 薬剤耐性菌の伝播解明

尾崎 元昭..... 21

#### 4. 新規抗らい菌薬と多剤併用療法の開発

儀同 政一..... 23

#### 5. らい菌菌膜抗原の細胞性免疫誘導能の検討

牧野 正彦..... 27

#### 6. らい菌特異的リポタンパクの機能解析

前田 百美..... 33

#### 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..... 39

#### 8. 効率的粘膜免疫誘導法の開発

向井 徹..... 45

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	51
10. ハンセン病発症状況の把握	
石井 則久	59
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	
地蔵 テイ子	63
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	79
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17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）

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1室長

研究要旨 ハンセン病の諸問題に対し、包括的な検討を行うことを目的に、ハンセン病の早期診断・薬剤耐性・ワクチン開発・発症状況把握および療養所における介護員配置基準作成の課題にとり組んだ。本年度は、早期診断技術の開発では、各種抗酸菌の解析より BCG コンノート株の TDM, TMM が新規血清抗原になり得る可能性を示した。感染経路の解明では、2種類の型別法の応用により、世界的ならい菌分布の解析を進めた。薬剤耐性対策では、らい菌の薬剤耐性遺伝子検査の有用性が示され、また、新規ニューキノロン系薬剤 MFLX および GRNX の強い抗らい菌活性が明らかになった。ワクチン開発では、GM-CSF 誘導マクロファージがらい菌排除に重要であること、らい菌由来リポペプチド lipoK がマクロファージを活性化すること、らい菌 FAP 蛋白を BCG に発現させたこと、*IL12RB2* 転写制御領域の多型性により NK 細胞と T 細胞の核結合蛋白に差があること、 $\sigma$  因子により鼻腔内に抗らい菌免疫応答が誘導されたこと、サル感染症モデル系開発では FAP, MMP II への免疫応答には主要組織抗原が密接に関与することが示された。日本における発症状況把握では、2005 年は、日本人新規患者は 0 名、在日外国人が 8 名前後であることが明らかになった。また、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では、介護業務 13 項目によるタイムスタディーを行い、直接介護に必要な介護員数の算出を行った。本研究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 医薬基盤研霊長類医科学研究センター 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  
地蔵テイ子 国立療養所多磨全生園看護部長

A. 研究目的

世界的ハンセン病制圧は、WHO の推進する MD T 療法により進められ、登録患者数の減少に効を奏してきた。しかし、新規患者数は、未だ世界では毎年数十万人に達して、その対策が望まれている。本研究班では、早期診断技術の開発、感染経路の解明、薬剤耐性対策、ワクチン開発、発症状況把握、療養所における介護員配置基準作成などハンセン病における諸問題に対し包括的に検討を行うことを目的として、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に関する研究（松岡）
3. 薬剤耐性菌の伝播解明に関する研究（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. ハンセン病易感染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)
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 (地蔵)

## B. 研究方法

1. らい菌および他の抗酸菌種より糖脂質を精製し、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解析し、らい菌糖脂質と類似物質産生菌を検索した。抽出糖脂質を用い、患者血清反応性および各種サイトカインの産生能を解析した。
2. 日本国内症例、日系ブラジル人症例、韓国ミャンマーの検体を用い、それぞれの地域における、らい菌遺伝子中の 146676, 1642875, 2935683 位の塩基および *rpoT* 遺伝子中の直列配列コピー数につき解析し、各遺伝子型の分布について比較検討した。
3. 遺伝子変異検査が実施された 4 6 例につき、検査後の治療と臨床経過の調査を依頼し、検査結果の有益性を治療担当医に聴取した。
4. Buddemeyer 法およびヌードマウス足蹠法により、抗菌薬 MFLX, GRNX, SPFX, gatifloxacin, levofloxacin, STFX, RFP の抗らい菌活性を比較検討した。
5. ヒト末梢血より、マクロファージを、GM-CSF あるいは M-CSF 存在下培養で得、らい菌で刺激時産生される各種サイトカインを測定した。また、両マクロファージ表面抗原および MMP-II の発現を検索し、さらに、らい菌感染マクロファージの抗原提示能を測定した。
6. らい菌 LpK の N 末側合成リポペプチド (lipoK) 刺激によるヒト末梢血単球の IL-12 p40 の産生能を測定した。GM-CSF 分化誘導型ヒトマクロファージに、lipoK を添加による抗原提示能を解析した。
7. *IL12RB2* 制御領域の各種多型性をもつ NK 細胞の IFN- $\gamma$  産生能の評価を行った。本多型

に起因する、NK 細胞の IL-12 レセプター  $\beta 2$  分子 mRNA 発現量、DNA 結合性の核タンパク同定を試みた。

8. 粘膜上の M 細胞と特異的結合する  $\sigma$  因子とらい菌蛋白 FAP もしくは MMP II を融合蛋白としマウスへ鼻腔内投与し、免疫応答解析に用いた。各種シャペロン共役発現系及び各種発現用大腸菌を用い、His-MMP II- $\sigma$  の可溶性調整を試みた。FAP 破壊株作製用ベクターを構築し、BCG FAP 破壊株の単離を行った。さらに、同株へらい菌 FAP の発現ベクターを導入した。

9. らい菌接種した幼若カニクイザルより定期的にリンパ球を分離し、3 種のらい菌由来ペプチドの細胞増殖性を検討した。特異的な幼弱若化反応を示す 1 頭よりペプチド特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞株の樹立およびその表現型を検討した。

10. 公表されている各種学会発表、論文発表等より、ハンセン病の新規患者を検索した。これより 1993 年から 2005 年までの新規患者をデータベース化し、統計学的解析を行った。

11. 国立ハンセン病療養所 13 施設の不自由者棟の入居者を対象に、調査項目 13 のタイムスタディーを行い、介護度調査票 (案) の作成と介護員配置基準の作成の資料とした。

### (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. 研究結果および D. 考察

1. らい菌に、これまで未報告であった TDM が検出された。らい菌ではミコール酸サブクラスは、メトキシミコール酸を欠くことが示された。得られた糖脂質を用い患者血清の反応性を

調べた結果、TDM, TMM とともに血清が反応した。決定したらい菌 TDM および TMM の構造より生合成を試みているが、現在のところ成功していない。らい菌より抽出可能糖脂質量は極端に少ないため代替候補糖脂質を他の抗酸菌糖脂質から検索した結果、BCG 菌コンノート株がらい菌と酷似し、TMM, TDM の免疫活性検討では、マクロファージの種々のサイトカイン産生を増強する等の免疫学的活性を示した。BCG 菌コンノート株の類似糖脂質をらい菌抗原の代用として診断への応用の可能性は十分にあるものと考えられた。

2. SNP 比較対象の塩基は、組合せにより Type I - IV に分類された。本州、九州の株は Type III が、沖縄の株は Type I が高頻度であった。日系ブラジル人症例はアジアで見られない Type IV であった。ミャンマーの株は Type I が高い頻度を示した。*rpoT* 型別は本州、韓国は 4 型が多く、沖縄、日系ブラジル人、ミャンマーの株は、3 型であった。本州および九州のらい菌は少数のクローンに由来するらい菌が分布し、また沖縄への伝播は由来を異にすると示唆された。日系ブラジル人分離株は、アジア地域には存在していない型を示し、本国で感染し、来日後の発症を裏付けた。*rpoT* 遺伝子のように多型の幅が小さな VNTR は世界的規模での遺伝子型比較に適し、また、SNP 型別を加えることにより、グローバルなハンセン病の伝播の解析がより正確になされると考えられた。

3. 再発、治癒遷延、新患の予後調査では、検査結果から治療内容を決定した群では大半が菌陰性化に至るが、検査結果を参考に治療を継続群では菌陰性化は、4/15 例であった。耐性判定例では、その薬剤を除いた化学療法プランが実施され、高い菌陰性化率、治癒率を示した。検査結果が生かされない群では、すべて改善されなかった。遺伝子変異検査の有用性、および結果の活用の重要性を示している。これらの結果を踏まえ、耐性発生予防と耐性例の治療などを主眼に、ハンセン病治療指針の改訂を行った。また、これまで耐性を示す患者周囲に新しい患者は認められず、耐性菌の伝播は認められていない。

4. MFLX は Buddeneyer 法とヌードマウス足蹠法で、SPFX を凌ぐ強い抗らい菌活性を認めた。

GRNX は、Buddeneyer 法で LVFX に匹敵する抗らい菌活性を認め、ヌードマウス足蹠法は現在検討中である。これら薬剤は、強い抗らい菌活性を保持し、かつ光毒性や中枢神経系の副作用を軽減、また非ステロイド性抗炎症剤やテオフィリンとの相互作用を軽減するなど臨床導入が期待される。

5. らい菌に対する生体防御反応を誘導し、らい菌を完全に生体外に排除するためには、マクロファージに対し抗原提示活性を与えることが有効と想定される。マクロファージは分化誘導に用いられたサイトカインにより機能上多様性を示す。分化させる GM-CSF と M-CSF につき検討を加えた。GM-CSF 誘導マクロファージは、らい菌感染により抗原性タンパク MMP-II を表面に発現し、さらに T 細胞活性化必須分子の発現を増強させ、その結果 CD4 陽性 T 細胞の IFN- $\gamma$  産生を誘導した。充分な MMP-II の発現と T 細胞の活性化は、IFN- $\gamma$  と CD40 リガンドの副刺激が必要であった。このことは、らい菌は他の抗酸菌に比較し、抗原性が著しく弱いことに起因すると想定された。また、IL-10 はその免疫抑制作用のため産生量を低くすることが、らい菌に対する生体防御反応を誘導の重要なファクターである。この点において、GM-CSF を単球に作用させると IL-10 の産生がほぼ消失し、GM-CSF はらい菌の体外排除を図る際に極めて重要な役割を果たし得ることを示唆しているものと考えられる。

6. TLR2 の中和抗体を用いたマクロファージの IL-12、TNF- $\alpha$  の産生能は有意に低下した。つまり IL-12 及び TNF- $\alpha$  の産生は TLR2 を介することが明らかになった。また、lipoK はマクロファージで TLR2 により認識され活性化した。lipoK はマクロファージ表面に発現し、Th1 タイプの T 細胞の活性化を促進するサイトカインの発現を有意に高め、T 細胞を強く活性化した。これは、LipoK は、らい菌感染マクロファージを活性化し、抗らい菌生体防御反応を増進させる作用を有するものと考えられた。LpK 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、少菌型ハンセン病のみならず、多菌型ハンセン病患者の免疫療法剤として使用し得る可能性があるとして想定された。

7. *IL12RB2* の転写制御領域に検出した SNPs

が、T細胞においては IL-12R $\beta$ 2 鎖遺伝子の低発現、またそれに伴う低 IFN- $\gamma$  産生を誘導するのに対して、NK 細胞においては、IL-12R $\beta$ 2 鎖遺伝子の高発現、および IFN- $\gamma$  の高産生性と相関する可能性が示唆された。これら SNPs が NK 細胞における遺伝子発現に及ぼす直接的な影響は、今後 NK 細胞株を宿主細胞とした reporter gene assay 等を行うことによって明らかとなるであろう。T細胞と NK 細胞との間で、IL-12R $\beta$ 2 鎖遺伝子の発現に関与する核タンパクが全く異なることが明らかになり、これが IFN- $\gamma$  産生能の全く逆相関となっている可能性がある。ハンセン病 L 型患者の多くは、*IL12RB2* 転写制御領域に多型性を有する。抗酸菌感染症において NK 細胞は、菌由来の糖タンパクおよび脂質を直接認識することによって、IFN- $\gamma$  産生が誘導されることが示唆されている。今後更なる解析によって、その全様がつかめるであろう。

8. 経鼻免疫による細胞性免疫の解析では、鼻腔内免疫マウスの NALT 細胞及び脾細胞の抗原添加による IL-4 産生能の検討を行った。その結果、NALT 組織では、 $\sigma$  因子融合群は、非融合群と比較し、IL-4 産生の有意な上昇は認められなかった。His-MMP II- $\sigma$  蛋白の可溶化発現検討では、5 組のシャペロン共発現系、3 種の発現用大腸菌株の検討を行った。その結果、対照として、用いた His-MMP II は、inclusion body も産生されたが、可溶化画分にも発現された。今後、抗酸菌による発現系の構築が必要と考えられた。FAP 蛋白の解析では、単離した BCG 株を PCR、ウェスタンブロットティングによって解析した結果、染色体上の FAP 遺伝子が完全に欠失している遺伝子破壊株であることを確認した。さらに、らい菌 FAP 発現ベクターを導入した破壊株のウェスタンブロットティングを同様に行った結果、らい菌 FAP のみが発現していることが明らかとなった。この株は、らい菌に特異的な FAP の抗原性や機能を検討する上で有用であり、且つ BCG を利用したハンセン病に対する生菌ワクチンの候補と成り得ると考えられる。

9. 接種経路および接種菌量を異にする 9 頭のカニクイザルで、三種のらい菌ペプチド (FAP、LpK、MMP-II) に対する末梢リンパ球別の幼弱

若化反応では、FAP および MMP-II に対する反応が増加した個体、FAP に対する反応のみが増加した個体に大別された。反応の強さと接種部位および接種菌量との間に、有意な相関は認められなかった。らい菌感染後にペプチドに対する特異的反応が認められたサル末梢リンパ球について、FAP および MMP-II に特異的な CD4+/T 細胞株の樹立を試みたが、大半の細胞は、CD8 を発現していた。CD8+細胞がドミナントになった理由は、過度の抗原刺激により CD4+/T 細胞がアポトーシスに陥る可能性は否定できない。このことは、らい菌を感染させたカニクイザルでは、感染後 8 ヶ月以上にわたりらい菌ペプチドに対する特異的な CD4+/T 細胞が誘導されることを示唆している。今回の結果から以下が推測できる。1) カニクイザルでは、らい菌感染に伴い FAP および MMP-II に対するペプチド特異的な T 細胞は誘導される。2) 感染経路および感染菌量の条件が同一でも、個体によりペプチドに対する反応性が異なることから、FAP および MMP-II に対する免疫応答では、ペプチドの認識に主要組織適合性抗原系 (MHC) が密接に関与している可能性が高い。

10. 平成 17 年 (2005 年) の新規ハンセン病患者調査を行い、6 名の患者を登録した。日本人の登録は無かった。一方、外国人患者は 6 名、ブラジル人 4 名、フィリピン人 2 名であった。平均年齢は 33.3 歳、病型は 5 名が MB (多菌型) であった。ハンセン病の報告先は殆どが皮膚科医であるため、皮膚科医を対象に啓発すると共に、ハンセン病を診療する機会のある整形外科医、神経内科医などへも働きかけも必要である。在日外国人は新患の約 2/3 以上を占めている。ほとんどは労働のため来日しており、金銭的に困窮し、通院の時間も確保しづらい、勤務先から帰国を勧告されるなど、継続治療に困難をきたしている。約 1/3 の患者は診断確定後帰国している。彼らを継続治療することは、国際関係などからも支援すべきである。さらに、日本における将来の労働力の不足が予想され、外国人患者の増加の予測をする必要がある。らい予防法廃止後、厚生省による新規患者調査は廃止され、ハンセン病の動向調査の継続が切望されていた。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。

1 1. タイムスタディの結果から、食事に関わる介護所要時間が一番長かった。次いで「活動」の介護所要時間が長かった。不自由度が高い程、介護所要時間が長かったが、要介護状態区分別でみると、不自由度にかかわらず、全介助で援助を受けている時間が多かった。介護度調査票（案）を作成し、調査した結果、従来の介護度調査票に比較し、高めの点数であった。今後業務の見直しも含め、入所者のQOLを高める援助が必要である。時系列タイムスタディの結果から、9～17時の日勤帯の介護員必要数を算出した。今後、業務の中央化、委託等の業務改善の方向で考えることとした。入所者個人への直接介護所要時間のみで介護員必要数を算出した。介護時間を多く要する時間に応じて早出、遅出勤務に割り振ることにより、対応できると考える。入所者の状況に応じた配置を行うことにより個別的な質の高い介護の提供が必要と考える。

## E. 結論

BCG 菌コンノート株のTMMとTDMは、新規診断抗原となりうることが示唆された。らい菌ゲノムのSNP型は世界的に異なる分布を示すことが明らかとなった。遺伝子型の比較より日系ブラジル人は本国において感染を受けたことが示された。らい菌の遺伝子変異検査による耐性の検査は活動性患者の治療をより科学的、合理的なものとし、優れた治療改良の手段となった。新規ニューキノロンMoxifloxacin (MFLX)はSPFXを凌ぐ強い抗らい菌活性を示し、Garenoxacin (GRNX)は、LVFXに匹敵する抗らい菌活性を示した。GM-CSF誘導分化マクロファージはT細胞活性化能を付与し、らい菌の体外排除に重要な役割を果たすものと期待された。リポペプチドlipoKは、マクロファージを活性化することを明らかにし、免疫療法に活用する分子、または、抗酸菌感染症のワクチン候補分子として有用であると考えられた。*IL12RB2* 転写制御領域の遺伝子多型によるNK細胞とT細胞の免疫応答等の逆相関、核結合蛋白の異がいが示され、ハンセン病に対するゲノム創薬開発の糸口となる可能性を示唆した。 $\sigma$ 因子融合蛋白による、鼻腔内免疫は有効である

ことが示され、らい菌抗原発現BCG組換え株は、ハンセン病生菌ワクチンの候補と成り得ると考えられた。らい菌接種幼若カニクイザルは、らい菌由来ペプチドFAP及びMMP IIに対し、幼弱若化反応が増加し、ペプチドの認識に主要組織適合性抗原系(MHC)が密接に関与している可能性が示された。2005年には日本人新規患者はいなかった。在日外国人は8名前後で、南米、東南アジアなどの出身者が目立った。タイムスタディを実施した対象者に介護度調査票(案)で調査した結果、従来の介護度調査票と比較し、高めの点数になり、直接介護に必要な日中の介護員数を算出した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

1. 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 Microbiol. Lett.* 242:311-315, 2005.
2. Zhang L., Budiawan T., and Matsuoka M. Diversity of potential short tandem repeats in *Mycobacterium leprae* and application for Molecular typing. *J. Clin. Microbiol.* 43: 521-529, 2005.
3. 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.* 72:468-472, 2004.
4. Maeda, Y., T. Mukai, J. Spencer, and M. Makino. Identification of immunomodulating agent from *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immunity*, 73:2744-2750, 2005.
5. Makino, M., Y. Maeda, and N. Ishii. Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium leprae*. *Cell. Immunol.*, 233:53-60, 2005.
6. 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.
7. 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.
  8. 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.*, 58:740-743, 2005.
  9. Liu, T., Kohsaka, H., Suzuki, M., Takagi, R., Hashimoto, K., Uemura, Y., Ohyama, H., Matsushita, S. Positional Effect of Amino Acid Replacement on Peptide Antigens for the Increased IFN- $\gamma$  Production from CD4T cells. *Allergol. International*. 54:117-122, 2005.
  10. Hara M, Kikuchi T, Ono F, Takano J, Ageyama N, Fujimoto K, Terao K, Baba T, Mukai R. Survy of captive Cynomolgus macaque colonies for SRV/D infection using polymerase chain reaction assays. *Comp. Med.* 55: 145-149. 2005.
  11. Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, Hotta A, Terao K, Yamada A. Identification of the MHC class I B locus in cynomolgus monkeys. *Immunogenetics*. 57 :189-197. 2005.
  12. Takano JI, Narita T, Tachibana H, Shimizu T, Komatsubara H, Terao K, Fujimoto K. Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar infections in cynomolgus monkeys imported into Japan for research. *Parasitol Res.* 97: 255-257. 2005.
  13. 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。日本ハンセン病学会雑誌 74 巻 3-21, 2005.
  14. 儀同政一：総説現代ハンセン病医学、第 7 節ハンセン病の治療薬、東海大学出版会（印刷中）
  15. 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.
  16. 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.
  17. 植村靖史, 劉天懿, 鈴木元晴, 成田弥生, 大山秀樹, 松下祥: インバリアント NKT 細胞による Th1/Th2 バランスの調整. 臨床免疫, 44:682-688, 2005.
  18. 石井則久: ハンセン病. p1-20, 日本皮膚科学会研修委員会 (東京), 2005.
  19. 中居賢司、大西誉光、渡辺晋一、石井則久: 在日外国人にみられたハンセン病の 1 例. 皮膚科の臨床 47: 123-127, 2005.
  20. 石井則久: 抗酸菌感染症. 日本皮膚科学会雑誌 115: 995-999, 2005.
  21. 石井則久: らい菌. 日本臨床 (増刊 7) 63: 156-158, 2005.
  22. 和田秀文、石井則久: ハンセン病. *Visual Dermatology* 4: 158-159, 2005.
  23. 石井則久、森 修一: ミャンマーにおけるハンセン病対策-多剤併用療法以前と以後-. 日本ハンセン病学会雑誌 74: 177-180, 2005.
  24. 石井則久: 知っておきたいハンセン病の知識. 皮膚と美容 37: 129-134, 2005.
  25. 小串葉月、田上俊英、木下美佳、大石 空、野上玲子、石井則久、小野友道: 境界反応を呈したハンセン病の 1 例. 西日本皮膚科 67: 367-372, 2005.
  26. 石井則久: Hansen 病. 日本医師会雑誌 134(suppl 2): 319-320, 2005.
  27. 石井則久: 在日外国人ハンセン病患者について. *Visual Dermatol* 4:1208-1210, 2005.
2. 学会発表
    1. Matsuoka M., Zhang L. and Suzuki Y.: Mutations Conferring Drug Resistance in *Mycobacterium leprae* and Developing Simple Method for Detection. 5th International Symposium on Antimicrobial Agents and Resistance. Seoul, April, 2005.
    2. Matsuoka M., Zhang L. and Budiawan T.: Genotyping of *Mycobacterium leprae* by variable number tandem repeats and its

- application for molecular epidemiology. 41th anniversary meeting of US-Japan cooperative medical science program. Seattle, July, 2005.
3. Muaki T., Miyamoto Y., Matsuoka M. and Makino M.: Rapid detection of *Mycobacterium leprae* by a Loop-mediated isothermal amplification method. 41th anniversary meeting of US-Japan cooperative medical science program. Seattle, July, 2005.
  4. Phetsuksiri B., Wattanapokayakit S., Ruedeeaksin J., Sriungunam S., Reinthong D., Cho S.-N., Matsuoka M. and Brennan P.: Genotypic detection of rifampin resistance by mini PCR-Single strand conformational polymorphism. 41th anniversary meeting of US-Japan cooperative medical science program. Seattle, July, 2005.
  5. Suzuki, K., F. Takeshita, N. Nakata, N. Ishii, and M. Makino. Functional counteraction between toll-like receptor 2 and CORO1A that affects intracellular survival of mycobacteria. The 14th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage 2005, 3-4 June, 2005, Saitama, Japan.
  6. 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.
  7. Ohyama, H., Ogata, K., Takeuchi, K., Uemura, Y., Oyama, M., Ohara, N., Namisato, M., Kogoe, N., Yamada, N., Terada, N., Matsushita, S. Polymorphism on the 5' flanking region of the IL-12 receptor b2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. US-Japan Cooperative Medical Science Program. Fortieth Tuberculosis and Leprosy Research Conference. Seattle, USA, 2005 July.
  8. 甲斐雅規, Nguyen Phuc Phu Ha, 松岡正典, 牧野正彦. リアルタイムPCR法を利用した薬剤耐性変異検出の試み. 第78回日本ハンセン病学会総会. 2005年5月. 青森
  9. 中田 登, 甲斐雅規, 宮本友司, 鈴木幸一, 牧野正彦. *Mycobacterium smegmatis* の持つ第2の *katG* 遺伝子の機能. 第78回日本細菌学会総会, 2005年4月. 横浜
  10. 並里まさ子, 柏原嘉子, 松岡正典, 小川秀興, チョウチョウ, キンニユエウ: 流行地における新たなハンセン病対策とNGOの支援. 第104回日本皮膚病学会総会, 2005年4月 横浜
  11. 松岡正典, 張 良芬, 鈴木定彦: 薬剤耐性らい菌の遺伝子変異およびその易検出法の開発. 第78回日本ハンセン病学会総会, 2005年5月. 青森
  12. Zhang Liangfen, Teky Budiawan and Matsuoka M.: Short Tandem Repeats: variation and application for molecular typing of *Mycobacterium leprae*. 第78回日本ハンセン病学会総会, 2005年5月. 青森
  13. 儀同政一, 松岡正典: OFLX 体制らい菌に対する各種フルオロキノロン抗らい菌活性. 第78回日本ハンセン病学会総会, 2005年5月. 青森
  14. 山崎利雄, 松岡正典, 儀同政一: 生物発光法による薬剤感受性試験法, 第78回日本ハンセン病学会総会, 2005年5月. 青森
  15. 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
  16. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. クロファジ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 2005年4月 東京
  17. 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
  18. 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
  19. 鈴木幸一, 中田 登, Pham Dag Bang, 牧野

- 正彦. 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. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2005 年 5 月 青森
20. 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・学術大会 2005 年 5 月 青森
21. 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・学術大会 2005 年 5 月 青森
22. 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹. Analysis of mechanisms of multibacillary leprosy development: the role of IL-1 $\beta$ . 第 35 回日本免疫学会総会. 2005 年 12 月 横浜
23. 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. 2005 年 12 月. 横浜
24. 大山秀樹, 緒方是嗣, 畑中加珠, 並里まさ子, 中村佳照, 山田直子, 辻村亨, 寺田信行, 松下祥: IL12RB2 転写制御領域の遺伝子多型がハンセン病患者の病型成立機序に及ぼす影響. 第 94 回日本病理学会総会. 2005 年 4 月 横浜
25. 劉天懿, 植村靖史, 鈴木元晴, 成田弥生, 中野和久, 涌井昌俊, 大山秀樹, 松下祥: エストロゲンが DC を介して Th 応答性に及ぼす影響の評価. 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2005 年 10 月 盛岡
26. 植村靖史, 劉天懿, 鈴木元晴, 成田弥生, 大山秀樹, 中野和久, 涌井昌俊, 松下祥: V $\cdot$ 24 インバリアント NKT 細胞サブセットによる DC を介した免疫制御機構の解析. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会, 2005 年 12 月, 横浜
27. 成田弥生, 植村靖史, 劉天懿, 鈴木元晴, 大山秀樹, 中野和久, 涌井昌俊, 菊地博達, 松下祥: ヒト樹状細胞におけるリアノジン受容体サブタイプの発現と免疫応答性への関与の可能性. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会, 2005 年 12 月, 横浜
28. 鈴木元晴, 植村靖史, 劉天懿, 成田弥生, 大山秀樹, 松下祥: 脱落膜 non-invariant NKT 細胞の妊娠子宮 Th2 環境維持における役割. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会, 2005 年 12 月, 横浜
29. 伊藤香子, 石垣 光, 赤坂季代美, 岸本恵美, 堀田健人, 利根川 守, 守屋修二, 江藤隆史, 田嶋 徹, 石井則久: 多菌型ハンセン病の 1 例. 第 68 回日本皮膚科学会東京支部学術大会総会, 2005 年 2 月, 東京
30. 石井則久: ハンセン病. 第 104 回日本皮膚科学会総会研修講習会, 2005 年 4 月, 横浜
31. 宮田奈穂, 田中京子, 樹神元博, 杉浦 丹, 堀口大輔, 石井則久: 多菌型 (MB) ハンセン病の 1 例. 第 104 回日本皮膚科学会総会, 2005 年 4 月, 横浜
32. 石井則久, 熊野公子, 杉田泰之, 並里まさ子, 野上玲子, 細川 篤, 牧野正直: 2004 年のハンセン病新規患者発生状況. 第 78 回日本ハンセン病学会総会, 2005 年 5 月, 青森
33. 佐藤則子, 佐藤かすみ, 青崎 登, 石井則久, 尾崎元昭, 畑野研太郎, 長尾榮治: ハンセン病の臨床とその鑑別診断. 第 78 回日本ハンセン病学会総会, 2005 年 5 月, 青森
34. 石井則久: ハンセン病の現況-在日外国人患者について. 第 21 回日本臨床皮膚科医会総会, 2005 年 6 月, 高崎
35. 岩佐美智子, 全国ハンセン病療養所看護共同研究班. 介護員の配置基準作成について-介護内容のカテゴリー化について-. 第 78 回日本ハンセン病学会コメディカル学術集会 2005 年 5 月, 青森

#### 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- $\gamma$ ) 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 17 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）

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 ハンセン病血清診断に利用可能な新規抗原候補として、らい菌由来の糖脂質 Trehalose monomycolate (TMM)及び Trehalose dimycolate (TDM)を抽出・同定した。これら物質は患者血清と反応するものの、らい菌が人工培養できないことから感染動物組織から抽出する必要があり、そのため収量が非常に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た。この抗酸菌由来糖脂質から TMM, TDM を抽出して、その免疫活性能、患者血清反応性等を検討した。

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、非特異的な反応も多く見られること等より、これまで特異性・感度みにおいて不十分であることが指摘されてきた。PCR(Polymerase chain reaction)法などの DNA 診断法も近年開発されてきたが、診断には種々の機器と熟練した技術が必要となる。そのため従来の方法より感度・特異性の高い血清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容易にできるとともに、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。そこで、らい菌菌体成分より糖脂質 Trehalose monomycolate(TMM) 及び Trehalose

dimycolate TDM 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。また、収量の少ないらい菌糖脂質を補うため、類似糖脂質を持つ抗酸菌を検索しこの糖脂質についても同様に解析を行った。

B. 研究方法

らい菌感染アルマジロ及びらい菌感染ヌードマウスの足蹠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した。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 株由来のバンドと比較検討する。さらに、MALDI-TOF MS（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、患者血清反応性を検討するとともに免疫学的活性を各種サイトカインの産生能で解析する。

(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

らい菌感染動物組織より溶媒分画にて糖脂質を得た。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。これらのバンドを薄層プレートから切り出し、粗精製後、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。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。しかし両方で脂肪酸の炭化水素数の違い及びミコール酸のサブクラスの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。得られた糖脂質を用いて患者血清の反応性を調べた結果、TDM、TMM とともに血清が反応することが確認できた。しかし、らい菌試料から抽出可能な糖脂質の量は極端に少なく十分な血清反応性尾及

び免疫学的な活性も測定できないため、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た。その結果、BCG 菌コンノート株がらい菌同様のミコール酸のサブクラスを持ちかつ質量分析したピークパターンが酷似していた(図1, 2)。その後、BCG 菌コンノート株の糖脂質の解析データとらい菌糖脂質のそれとの詳細な比較検討の結果、らい菌の糖脂質、TMM 及び TDM の主要な構造が明らかとなった。十分量抽出・回収できる、BCG 菌コンノート株の TMM、TDM の免疫活性および血清反応性を調べた結果、マクロファージの種々のサイトカイン IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ 等の産生を増強する等の免疫学的活性を示した(図3)。さらに患者血清とも特異的な反応性があることが確認された(表1)。

### 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、多くの抗酸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種のサブクラスが存在している。らい菌はアルファミコール酸とケトミコール酸のみが使用され、また、ミコール酸を構成する炭化水素鎖の長さが、他の抗酸菌とは異なることかららい菌は抗原性に違いがあると推察された。今回、初めてらい菌の TDM および TMM の構造がほぼ決定できたので、それを合成する検討を試みているが、これまでのところ成功していない。そこ

で、BCG 菌コンノート株の類似糖脂質をらい菌特異的抗原の代用としてできるかどうか、とりわけ診断への応用を検討しているが、これまでのところその可能性は十分にあるものと考えられた。

#### E. 結論

らい菌感染動物組織から2種類の糖脂質 TMM、TDM を検出し、質量分析等による同定を、結核菌およびBCG菌のものとの比較とともに行った。らい菌特有の血清診断用抗原の候補になりうることが示唆されたが、人工培養できないらい菌から十分な抗原量を確保できないことから他の抗酸菌の中から代替糖脂質となりうるものを選出し解析した結果、新しい診断抗原となりうることが示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Miyamoto Y, Mukai T, Nakata N, Maeda Y, Kai M, Naka T, Yano I, Makino M.

Identification and characterization of the genes involved in glycosylation pathways of mycobacterial glycopeptidolipid biosynthesis. *J. Bacteriol.* 188:86-95, 2006.

##### 2. 学会発表

- 1) 甲斐雅規、Nguyen Phuc Phu Ha、松岡正典、牧野正彦. リアルタイムPCR法を利用した薬剤耐性変異検出の試み. 第78回日本ハンセン病学会総会 2005年5月 青森
- 2) 中田 登、甲斐雅規、宮本友司、鈴木幸一、牧野正彦. *Mycobacterium smegmatis* の持つ第2の *katG* 遺伝子の機能. 第78回日本細菌学会総会、2005年4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



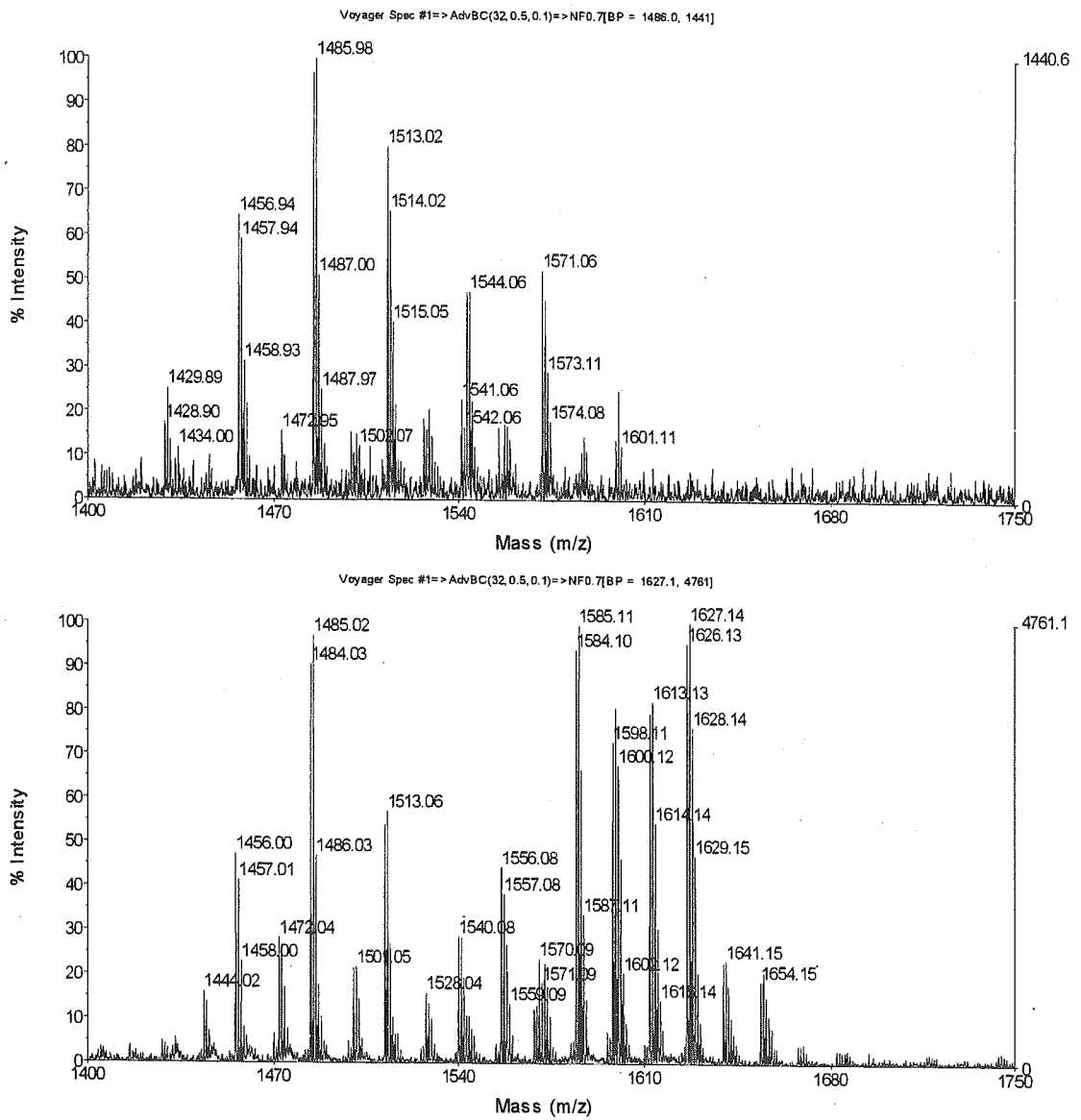


図1 らい菌より抽出した TMM (上段) と BCG 菌コン  
ノート株 TMM (下段) の質量分析パターンの比較

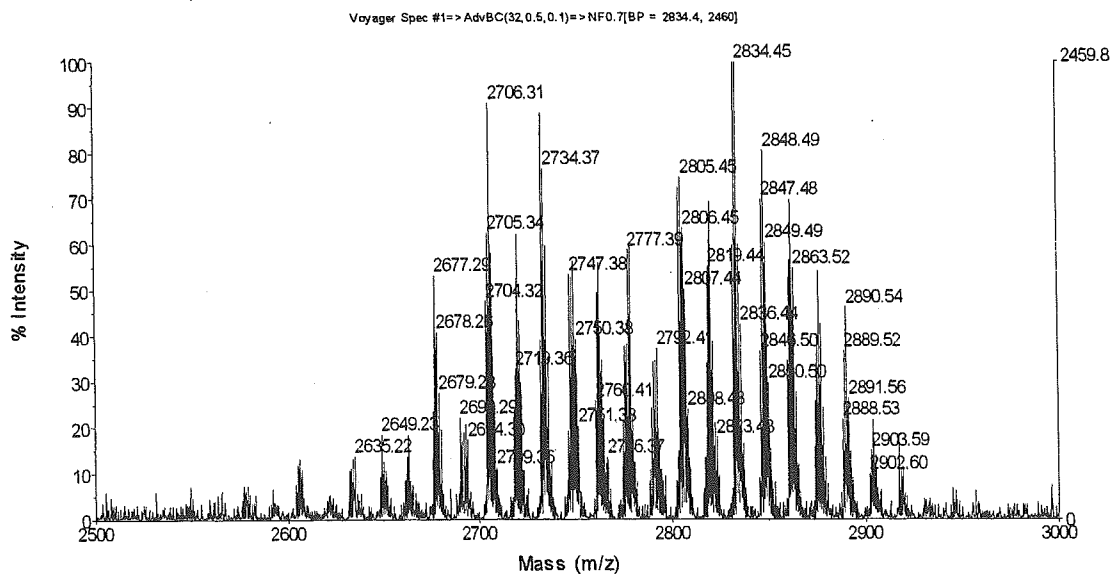
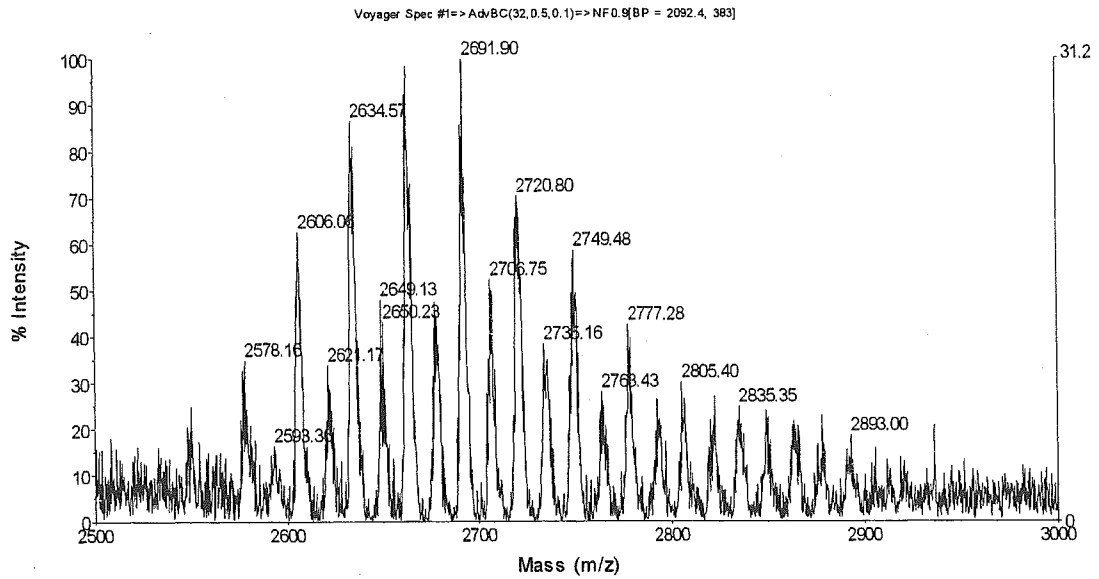


図2 らい菌より抽出した TDM (上段) と BCG 菌コントロール株 TDM (下段) の質量分析パターンの比較

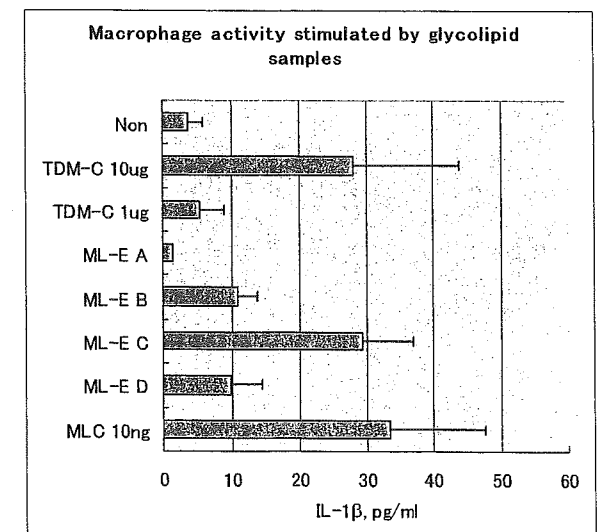
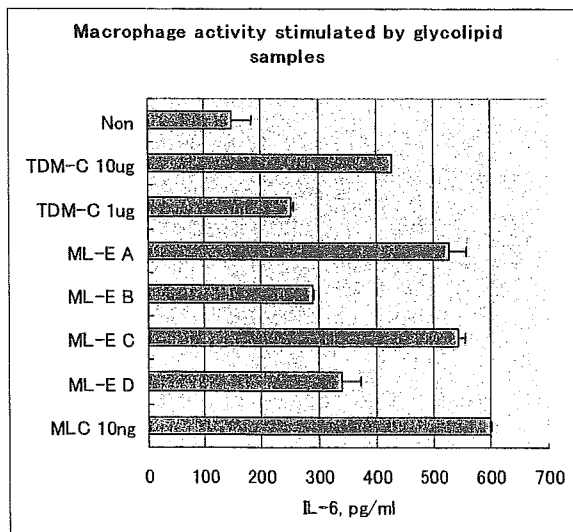
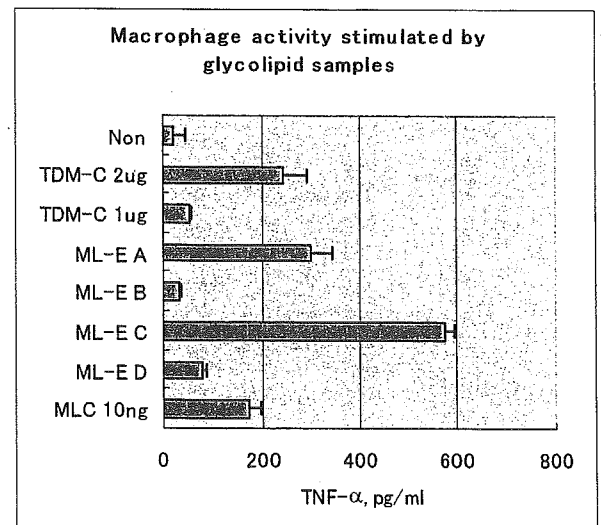
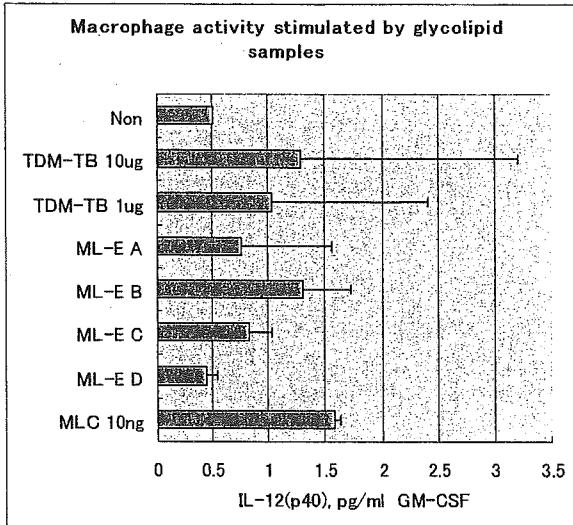
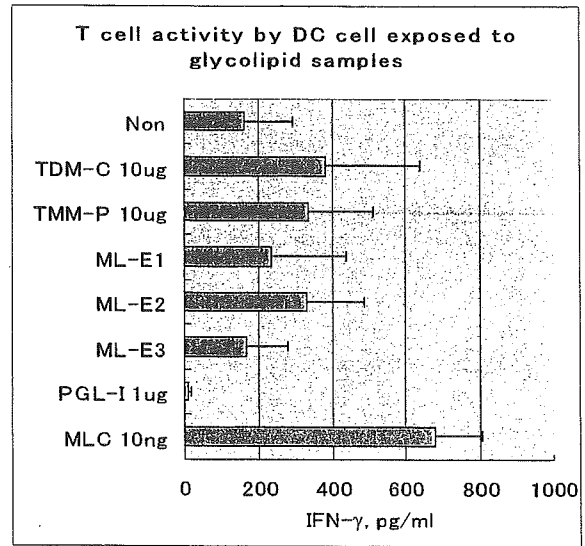
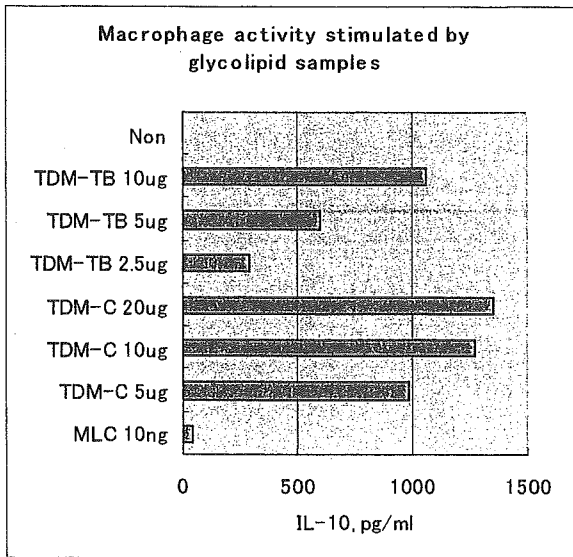


図3 マクロファージ及び樹状細胞 (DC) を用いた血清診断候補糖脂質の免疫活性化能 (糖脂質に暴露されたマクロファージの IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 及び DC で活性化したT細胞からの IFN- $\gamma$  産生)

TDM-C: *Mycobacterium bovis* BCG connacht TDM

TMM-P: *Mycobacterium bovis* BCG pastuer TMM

E1, E2, E3: らい菌由来糖脂質画分でTLC上の異なるバンド

PGL-I: Phenolic glycolipid I

ML-EA: らい菌由来糖脂質画分 E (抽出日1) 10 $\mu$ l

ML-EB: らい菌由来糖脂質画分 E (抽出日1) 1 $\mu$ l

ML-EC: らい菌由来糖脂質画分 E (抽出日2) 10 $\mu$ l

ML-ED: らい菌由来糖脂質画分 E (抽出日2) 1 $\mu$ l

MLC: *Mycobacterium leprae* soluble fraction C (Positive control)