

表1 ハンセン病患者血清の反応

		PGL-I	TDM-C	TDM-TB
MB	55	52 (95%)	37 (67%)	29 (53%)
PB	44	31 (70%)	15 (34%)	10 (23%)

MB: 多菌型ハンセン病、PB:少菌型ハンセン病

TDM-C: *M. bovis* BCG Connaught strain の TDM

TDM-TB: *M. tuberculosis* の TDM

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

らい菌の型別とハンセン病の分子疫学

平成17年度 分担研究報告書

分担研究者 松岡 正典

（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

らい菌の型別とハンセン病の分子疫学に関する研究

分担研究者 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

研究要旨：single nucleotide polymorphism (SNP)によるらい菌の遺伝子型別とその global な地理的分布を明らかにすることにより、地球規模でのハンセン病の伝播を検証するとともに、在日外国人のハンセン病の感染と発症について考察を加えた。九州および本州から得られたらい菌の SNP 型および *rpoT* 遺伝子型はミャンマー、韓国、沖縄に分布するらい菌と異なっていた上に均一な遺伝子型を示した。日本に分布するらい菌は限られたクローンに由来するものであることが推察された。日系ブラジル人の症例より得たらい菌の SNP 型は TTC あるいは CTC であり、特に TTC の遺伝子型はアジアでは見られないものであった。また CTC 型の SNP は日本にも多い型であったが、*rpoT* 遺伝子型は 3 型であり、日本の患者より分離されるものとは異なった遺伝子型であった。このことから、日系ブラジル人のハンセン病は従来の疫学解析の結果推測されてきたように、本国の高い感染率を反映して、ブラジルにおいて感染を受け、日本において発症したものであろうとする説を裏付ける結果を示していた。SNP 型および *rpoT* 遺伝子型の組み合わせによる型別は、グローバルならい菌の遺伝子解析に有用であった。

A. 研究目的

ハンセン病の感染源を含めた感染様式の解明を目的として、らい菌の型別法の確立とその疫学解析への応用を行ってきた。これまでに、らい菌ゲノム中の繰返し配列多型 (Variable number tandem repeat: VNTR) によりハンセン病流行地域の住民および患者から得られたらい菌について型別を行い、その分布状況からハンセン病の感染は、多菌型患者との家族内濃厚接触によって成立するとされる従来の説とは異なり、それ以外の感染源から起こっていることを示す結果が得られた。

本年度は最近、報告された single

nucleotide polymorphism (SNP)によるらい菌の型別と、その地理的分布について検討し、ハンセン病のグローバルな伝播について解析を行ない、さらに在日外国人の症例から得られたらい菌の SNP を比較し、その感染場所について解析を行なった。

B. 研究方法

I. 日本国内の本州および九州から、計 35 検体、沖縄から 11 検体、日系ブラジル人の症例から 9 検体のらい菌を得た。韓国およびミャンマーから得たそれぞれ 37 検体と 29 検体を供試した。らい菌のゲノム遺伝子中に多型性が報告された 146676, 1642875,

2935683 位のそれぞれの塩基についてダイレクトシーケンスを行ない比較した。

*rpoT* 遺伝子中の 6 塩基直列配列のコピー数について解析した。それぞれの地域における各 SNP 型と *rpoT* 遺伝子型の分布について比較検討した。

#### (倫理面への配慮)

本研究の実施は所属機関の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

SNP の比較のための塩基 146676 位は C ないし T、1642875 位は G ないし T、2935683 位は A ないし C の塩基が示され、それぞれの組み合わせにより Type I : CGA, Type II : CTA, Type III : CTC, type IV : TTC に分類された。理論的には 64 種の組み合わせが考えられたが、これら 4 種以外の組み合わせ例は見出されなかった。

それぞれの地域における各 SNP 型を表に示す。

表 各地域における SNP 型の分布

	Type I	Type II	Type III	Type IV
本州		2	33	
沖縄	4		7	
日系人			7	2
ミャンマー	26	1	2	
韓国	16	4	17	

本州、九州より得た株は圧倒的に Type III が多数を占め、沖縄における Type I の高い頻度とは異なった。日系ブラジル人の症例からはアジアでは見いだされない Type IV

が観察された。ミャンマーの分離株は Type I が特に高い頻度を示した。

*rpoT* 型は本州では 6 塩基繰り返しを 3 コピー有する株 (3 型) が 2 例、4 コピー有する株 (4 型) が 33 例、沖縄の分離株は全 11 株が 3 型、日系ブラジル人からの 9 株は全て 3 型であった。また、ミャンマーの株は 29 株全てが 3 型であり、韓国の分離株は 3 型が 5 株、4 型が 31 株であった。

本州における SNP 型が Type III、*rpoT* 型が 4 型を示すらい菌の高い頻度が特徴的であった。これまでの観察結果と同様に韓国、日本のらい菌の *rpoT* 遺伝子型の 4 型の圧倒的な高い頻度と、その他の地域における 3 型の高い頻度が示された。

### D. 考察

らい菌の SNP 遺伝子型は世界的に特徴ある地理的分布を示すことが Monot らによって示された。一方、報告者らはらい菌ゲノムの *rpoT* 遺伝子内の 6 塩基直列配列のコピー数の違いによって 3 型と 4 型の 2 型に分類され、それぞれの型は SNP 型と同様に世界的に特徴的な地理的分布を示すことを報告してきた。本研究では日本におけるらい菌のこれらの遺伝子型を他の地域の分離株と比較することにより、ハンセン病の伝播あるいは在日外国人の感染について考察を加えた。

本州および九州のらい菌は SNP 型が Type III、*rpoT* 型が 4 型のものが 31 株であり他の地域に比して極めて単一な遺伝子型のらい菌が分布していることが明らかとなった。これは沖縄の分離株には Type I が高い頻度で見られたこととは異なり、本州・九州に分布するらい菌は、少数のクローンに由来することによるものではないかと推察された。また沖縄への伝播とは由来を異にする

ことも示唆された。

近年の日本におけるハンセン病の新患の半数は在日外国人であり、さらにそのうちの半数が日系ブラジル人に見出されていることが報告されている。遺伝子型を調べた9例の日系ブラジル人の感染例の検体中、2例は本研究でもまた Monot らの報告でもアジア地域には存在していない Type IVを示した。このことは従来言われてきたように、日系ブラジル人の症例の場合はブラジルでのハンセン病の高い感染率と関連して、本国において感染し、来日後に発症したとする考えを遺伝子解析の結果により裏付けることとなった。また、他の7例のSNP型は本州に多数に見出だされた Type IIIであったが、*rpoT*型は全て3型であり、本州・九州では、この型の頻度が2/33であることから、国内の感染率とも合わせてこのSNP型の例もブラジルにおいて感染を受けたものと推察された。

古来多くの文献に、ハンセン病の起源はインド亜大陸であり、そこより世界各地に伝播したと記載されている。Monot らはハンセン病の起源について、各SNP型の分布と人類の発生からして、インドあるいはアフリカのどちらかであると提唱した。SNPの各型の出現は、その塩基配列から Type I から Type II、Type III、Type IVの順であると考えられる。Type I がミャンマーに多く分布し、そこから遠くなる日本、韓国では Type III が多数分布したことは、人類の移動とともに、後から出現した型が安定的に伝播したことを示していると同時にインドに近いミャンマーで多数の Type I が分布していたことは、ハンセン病がインド亜大陸より世界に伝播したとする説を支持するものであった。

広い多型を示すVNTRは、これまで報告し

たように、限定した地域のらい菌の比較とそれを用いた感染様式の解析に有用である一方、*rpoT*遺伝子多型のように多型の幅が小さなVNTRは世界的規模でのらい菌の遺伝子型を比較することに適していた。SNP型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ことが考えられた。

## E. 結論

らい菌ゲノム中のSNP型は世界的に異なる分布頻度を示すことが明らかとなり、日本の本州および九州には極めて高い頻度で1種類の型が分布していた。

SNP型および*rpoT*遺伝子型の比較により日系ブラジル人のハンセン病は本国において感染を受けたものであることが示された。

## 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) 牧野正彦、鈴木幸一、福富康夫、山下康

子、前田百美、宮元友司、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.

## 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. 5<sup>th</sup> 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. 41<sup>th</sup> 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. 41<sup>th</sup> anniversary meeting of US-Japan cooperative medical science program. Seattle, July, 2005.
  - 4) Phetsuksiri B., Wattanapokayakit S., Ruedeeaeaksin 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. 41<sup>th</sup> anniversary meeting of US-Japan cooperative medical science program. Seattle, July, 2005.
  - 5) 並里まさ子、柏原嘉子、松岡正典、小川秀興、チョウチョウ、キンニュエウ：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プログラム 横浜市、2005年4月
  - 6) 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、青森市、2005年5月
  - 7) 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、青森市、2005年5月
  - 8) 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、青森市、2005年5月
  - 9) 甲斐雅規、Nguyen Phuc Nhu Ha、松岡正典、牧野正彦：リアルタイムPCR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、青森市、2005年5月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
  2. 実用新案登録 なし
  3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

薬剤耐性菌の伝播解明に関する研究

平成 17 年度 分担研究報告書

分担研究者 尾崎 元昭

（国立療養所長島愛生園皮膚科医長）

分担研究報告書

薬剤耐性菌の伝播解明に関する研究

分担研究者 尾崎元昭 国立療養所長島愛生園 皮膚科医長

研究要旨 国内の活動性ハンセン病患者についてらい菌の遺伝子変異検査による耐性菌の発生状況を調査した結果をもとに、2000年発表のハンセン病治療指針の改訂を行った。耐性検査を実施した患者のその後の経過を追跡調査し、検査結果がその後の治療にどう活用されたかを検証した。大部分の例は検査結果により化学療法が調整されて良好な臨床経過を取っていた。遺伝子変異検査の臨床的有益性が確認された。

A. 研究目的

これまでに、まだ治癒していない多菌型患者および新患について、らい菌の遺伝子変異検査を実施し、国内の耐性発生状況を明らかにしてきた。今年度は、この調査結果を治療指針に反映させるため、ハンセン病治療指針の改訂を行う。検査実施後の治療と臨床経過を調査し、この検査が活用されたかどうか、および臨床的有益性について検証する。

B. 研究方法

遺伝子変異検査が実施された46例について、各施設に検査後の治療と臨床経過の調査を依頼し、検査結果が有益であったかどうか、治療担当医の意見を聴取する。

すでにOFLXへの耐性出現が確認され、平成16年度にニューキノロン薬の使用指針を刊行したが、これをふまえて「ハンセン病治療指針（2000）」の改訂作業を行い、ハンセン病学会の承認を経て「治療指針（2006）」を発表する。

（倫理面への配慮）

この研究の調査と結果の検討に関しては、調査対象の人権保護と情報管理に留意し、患者の個人情報から個人が特定されたり、個人情報から個人が特定されたり、個人情報が流出したりしないよう十分に配慮した。

C. 研究結果

再発25例、治癒遷延10例、新患11例についての予後調査では、

- 1群 検査結果から治療内容を決定：19例
- 2群 検査結果を参考に治療を継続：15例
- 3群 検査結果が出ず参考にならず：8例
- 4群 検査結果が活用されず：4例

であった。1群のなかで菌陰性化に至ったのは15/19例、2群では4/15例であった。3群はPCR法が陰性で、遺伝子変異の有無が判定できなかったため、臨床的な推測で耐性が検討されて治療が進められた。5/8例が菌陰性化し、担当医の判断が適切であったことを示している。4群は患者が恣意的に治療薬を選択あるいは拒否、または担当医が検査結果を参考にせず、耐性とされた薬剤の使用が続けられたか、治療がほとんど行われなかった例である。結果はすべて改善をみていない。これらの結果は、この検査の有用性を示すものである。

これまでの検査ですでにオフロキサシン耐性例が出ており、2剤ないし3剤への耐性も生じているところから、治療指針（2000）を改訂し、耐性発生予防と耐性例の治療を強調することとし、ハンセン病学会と協力して改訂作業を進めた。改定案は79回ハンセン病学会総会（2006）で提示され、承認を得て学会誌に公示される予定である。

これまで耐性を示した患者の周辺から新しい患者が出たことはなく、今のところ耐性菌の伝播は認められていない。



#### D. 考 察

薬剤耐性検査が実施された症例の追跡調査は興味深い結果となった。耐性が認められた例では、その薬剤を除いた化学療法プランが実施されていた。耐性なしとの結果だった例は、標準的な多剤併用療法が行われていた。いずれも良い臨床効果が得られ、高い菌陰性化率、治癒率を示した。一方、検査終了後も患者が新たな治療法を拒んだり、耐性とされた薬剤を続けたりしていた4例はすべて改善していない。この遺伝子変異検査の有用性、および結果を活用することの重要性を示すものである。

新患の11例中2例が耐性を示した。1例はすでにMHO/MDTを終えていた例で、リファンピシンへの耐性が生じていた。他の1例は比較的短期間の多剤併用療法後に3剤への耐性が明らかになった。治療期間固定の多剤併用療法に警鐘をならす結果とみられる。

耐性例、とくに2剤、3剤に耐性を示した例では、ミノサイクリン、クラシスロマイシン、新キノロン剤がクロファジミンと併用されていた。しかし新キノロン剤は耐性が出やすいとされており、新たに抗らい菌活性が認められてきた新キノロン剤の使用には注意を要する。2004年に公示した使用指針が守られることを期待するしかない。

これらの検査結果をふまえて、2000年に

作成したハンセン病治療指針の改訂を行った。おもな改訂ないし強調点は、耐性発生予防と耐性例の治療、治療期間固定の多剤併用療法終了後の維持療法、治癒判定とその後のケアなどである。2006年5月の日本ハンセン病学会で承認されてから学会誌を通じて公示し、ハンセン病医療関連施設に配布の予定である。

#### E. 結 論

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、合理性なものとし、優れた治療改良の手段となった。今後はこの検査がルーチンの検査となり、新患や再発例の治療の指標として用いられることが望ましい。

WHO/MDT実施後に耐性例が出ていることから、まだ患者の多い地域でMDT終了後の患者に耐性発生の追跡調査を行うことが適切と考えられる。

#### G. 研究発表 なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

新規抗らい菌薬と多薬併用療法の開発

平成17年度 分担研究報告書

分担研究者 儀同 政一

（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

新規抗らい菌薬と多剤併用療法の開発

分担研究者 儀同 政一 国立感染症研究所ハンセン病研究センター  
生体防御部第4室長

研究要旨 治療期間の短縮と薬剤耐性に対応するため新規抗らい菌薬の開発を行った。新規ニューキノロン系抗菌薬 moxifloxacin (MFLX, バイエル薬品)と garenoxacin (GRNX, 富山化学工業)を、Buddemeyer 法とヌードマウス足蹠法で検討した。MFLX は Buddemeyer 法で sparfloxacin (SPFX) を凌ぐ強い抗らい菌活性を示し、ヌードマウス足蹠法では 10 mg/kg でヌードマウス足蹠内のらい菌の増殖を完全抑制し、SPFX を凌ぐ強い抗らい菌活性を認めた。GRNX は、Buddemeyer 法で LVFX に匹敵する抗らい菌活性を認めた。

A. 研究目的

ハンセン病は、多剤併用療法の普及により有病率は低下したが、世界では今なお約 60 万人の新患発生があるばかりか、耐性菌の増加により治療困難に直面している。治療期間の短縮と薬剤耐性に対応するため、新規ニューキノロン系抗菌薬でキノロン骨格の 7 位にピロロピリジン基、8 位にメトキシ基を導入することで光毒性や中枢神経系などの副作用を軽減し、強い抗菌活性を保持する moxifloxacin (MFLX) とキノロン骨格 6 位のフッ素を水素に置換し、7 位にベンゾピロール基、8 位にジフルオロメトキシ基を導入することで光毒性、中枢神経、非ステロイド性抗炎症剤との副作用を軽減し、強い抗菌活性を保持する garenoxacin (GRNX) の抗らい菌活性を Buddemeyer 法とヌードマウス足蹠法で検討した。

B. 研究方法

1) らい菌 (Thai-53 株) : ヌードマウス (BALB/c) 足蹠より集菌・精製し、Shepard 法により菌数計算後所定の濃度に希釈し実験に用いた。

2) 抗菌薬 : MFLX (バイエル薬品)、GRNX (富山化学工業)、sparfloxacin (SPFX, 大日本住友製薬)、gatifloxacin (GFLX, 杏林製薬)、levofloxacin (LVFX, 第一三共製薬)、sitafloxacin (STFX, 第一三共製薬) は、各製薬会社から原末の提供を受けた。rifampicin (RFP, 和光純薬) は、市販品を用いた。

3) Buddemeyer 法 : 4ml のガラスバイアル中に 7H12 培地、らい菌 ( $2 \times 10^7$ )、抗菌薬 (最終濃度 : 8, 2.0, 0.5, 0.125  $\mu$ g/ml) を加えよく混合する。このガラスバイアルのキャップを緩く締め、32°C の炭酸ガス培養器で 4 日間培養後、 $^{14}$ C・パルミチン

酸(1  $\mu$  Ci)を加え混合後、再びキャップを緩く締めたガラスバイアルを、NaOH・シンチレータで処理したろ紙片を入れた18ml・ポリエチレンバイアルに入れキャップを強く締める。さらに32°Cの培養器で7日間培養を継続し、発生した<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>量を液体シンチレーションカウンターで測定し、MFLXとGRNXの抗らい菌活性をSPFX, GFLX, LVFX, STFX, RFPと比較検討した。

4)ヌードマウス足蹠法：ヌードマウス(BALB/c, 5週令・雌)の両後肢足蹠に10<sup>7</sup>のらい菌を接種した。接種後60-150日の90日間、ステンレスカテーテルで各薬剤を週5日毎日経口投与した。菌接種後8ヶ月から11ヶ月まで毎月1回もしくは4回ヌードマウス足蹠内のらい菌数を計測し各薬剤の抗らい菌活性を求めた。

a) MFLX (1.0, 2.0, 5.0, 10mg/kg)の抗らい菌活性をSPFX(10mg/kg)と比較検討した。

b) GRNX (40, 50, 60, 70 mg/kg)の抗らい菌活性を、SPFX(10 mg/kg)と比較検討中。

(倫理面での配慮)

使用マウスは、頸骨脱臼により安楽致死させてから所定の実験に用いた。

## C. 研究成果

### 1) MFLXの抗らい菌活性

Buddemeyer法でMFLXは、SPFXを凌ぐ強い抗らい菌活性を示した。ヌードマウス足蹠法では10 mg/kgでヌードマウス足蹠内のらい菌の増殖を完全抑制し、SPFXを凌ぐ強い抗らい菌活性を示した。結果を図1、2に示す。

### 2) GRNXの抗らい菌活性

Buddemeyer法でGRNXは、LVFXに

匹敵する抗らい菌活性を示した。結果を図1に示す。

## D. 考察

1) ハンセン病は、多剤併用療法の普及により有病率は低下したが、6ヶ月から1年に及ぶ長い治療期間のため不規則治療、治療中断また低用量長期投与によりDDS, B663, RFPのみならず近年開発されたニューキノロンOFLXやニューマクロライドCAMにも耐性菌が増加し治療を困難にしている。これら薬剤耐性に対応するため臨床から新規抗らい菌薬の開発が求められている。

2) 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。SPFXはニューキノロン中最も強い抗らい菌活性を保持するが、光毒性など副作用が強い。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ルンとの相互作用を軽減し、耐性発現を抑制する新規ニューキノロンとして臨床導入が期待される。

3) MRSA, VRE, キノロン耐性菌にも抗菌活性を示すニューキノロンとして開発されたGRNXは、Buddemeyer法でLVFXに匹敵する抗らい菌活性を認めた。ヌードマウス足蹠法は現在検討中である。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ルンとの相互作用を軽減するなどニューキノロン中最も副作用の少ない抗らい菌薬で、小児のハンセン病患者に使用できる唯一のニューキノロンとして、臨床導入が期待される。

## E. 結論

新規ニューキノロン Moxifloxacin (MFLX) は Buddemeyer 法で SPFX を凌ぐ強い抗らい菌活性を示した。ヌードマウス足蹠法では 10 mg/kg で完全抑制を示し、SPFX を凌ぐ強い抗らい菌活性を示した。Garenoxacin (GRNX) は Buddemeyer 法で LVFX に匹敵する抗らい菌活性を示した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表等

1) 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)。

### 2. 学会発表

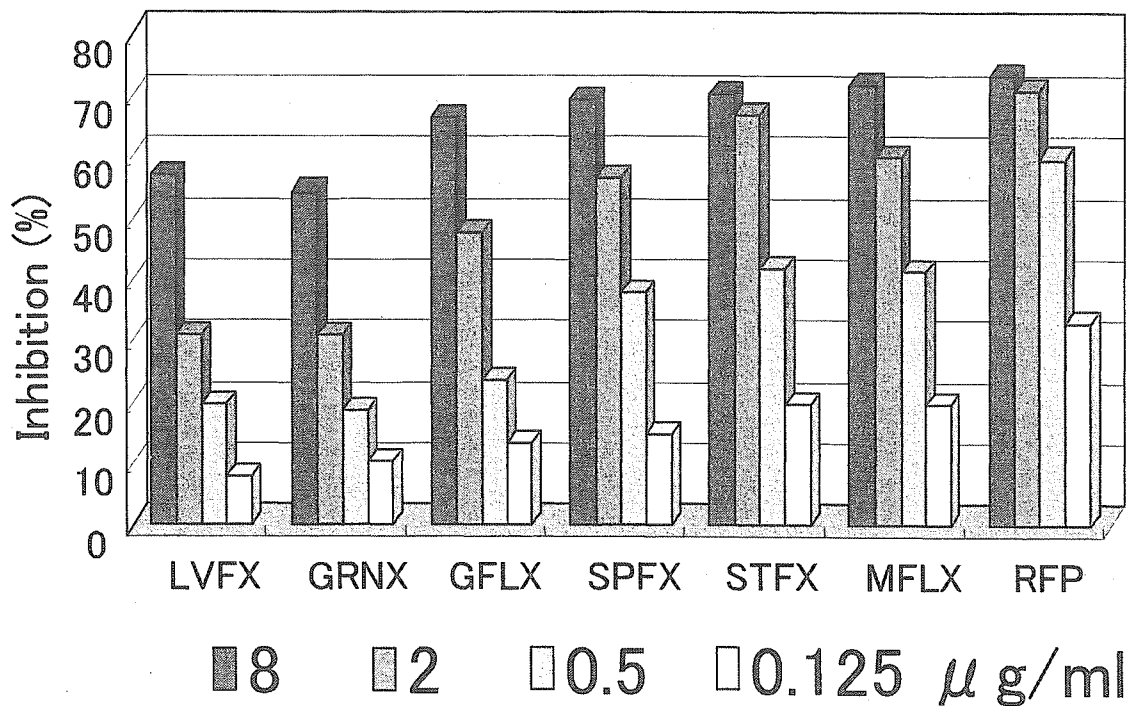
1) 儀同政一， 松岡正典：OFLX 耐性らい菌に対するフルオロキノロンの抗らい菌活性. 第 78 回日本ハンセン病学会総会. 日本ハンセン病学会雑誌. 74 :119 (2005).

2) 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、日本ハンセン病学会雑誌, 74:120 (2005).

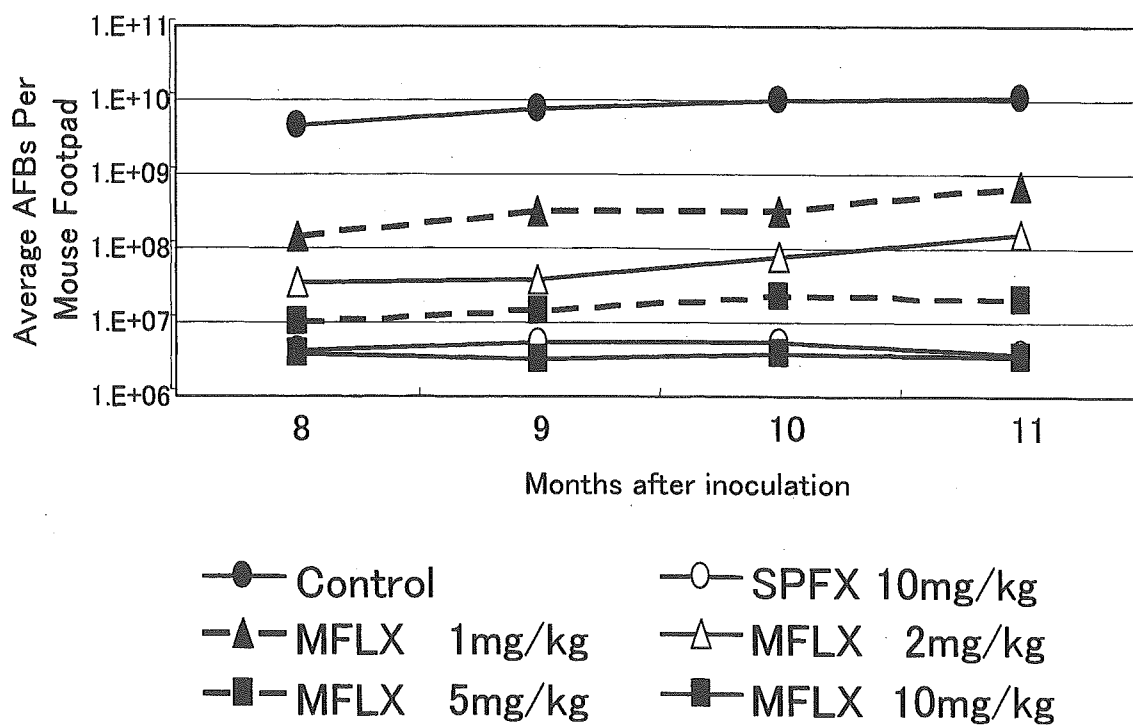
## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得       なし
2. 実用新案登録   なし
3. その他         なし

☒ 1. *In Vitro* Activities of New Quinolones against *M. leprae*



☒ 2. Activities of MFLX against *M. leprae* in Nude Mice



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

らい菌菌膜抗原の細胞性免疫誘導能の検討

平成 17 年度 分担研究報告書

分担研究者 牧野 正彦

（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

らい菌菌膜抗原の細胞性免疫誘導能の検討

分担研究者 牧野 正彦 国立感染症研究所 病原微生物部長

研究要旨 ハンセン病を誘導するらい菌は、主にマクロファージに感染し、宿主の生体防御反応を抑制し、ゆっくりと増殖し寄生性感染を果たす。らい菌はマクロファージ内ではファゴゾームを形成し、ライソゾームとの融合を阻止してT細胞の活性化を抑制し、同時にマクロファージから大量のIL-10産生を誘導してT細胞の活性化をさらに抑制する。らい菌に対する生体防御反応を惹起し、病変の限局化あるいは病変発症を阻止するためには、らい菌感染マクロファージに対し抗原提示機能を付与することが重要である。マクロファージを *in vitro* で分化させるためには種々のサイトカインが必要であり、サイトカインの種類によって多様な機能が誘導される。ここでは代表的なサイトカインであるGM-CSFとM-CSFに焦点を当て、マクロファージの抗原提示能について検索した。その結果、GM-CSFを用いて作製したマクロファージはIL-10産生能が欠如し、細胞内に貪食したらい菌をプロセッシングした後、らい菌の主要な抗原性分子であるMajor Membrane Protein-II (MMP-II)をその細胞表面に発現した。さらに、CD4陽性T細胞を活性化し、タイプ1サイトカインであるインターフェロンガンマー(IFN- $\gamma$ )を産生したが、マクロファージが十分にT細胞を活性化するためにはGM-CSFに加え、IFN- $\gamma$ およびCD40リガンドの副因子が必要であった。従って、らい菌に対する有効な生体防御反応を誘導するためには、GM-CSFの関与が不可欠と考えられた。

A. 研究目的

ハンセン病はらい菌の感染によって発症する慢性感染症であり、病変発症には生体内において大量のらい菌の増殖が必要である。らい菌はマクロファージに感染すると、T細胞の活性化を阻止することで宿主の生体防御反応を抑制し寄生性感染を果たす。従って、らい菌抗原特異的細胞性免疫を賦活し、らい菌の増殖阻止あるいは体外排除を誘導することがハンセン病の限局化または発症阻止に直接的に繋がる。これまでに我々は、らい菌が代表的な抗原提示細胞である末梢単球由来樹状細胞に感染すると宿主のCD4陽性およびCD8陽性T細胞を活性化し、IFN- $\gamma$ の産生をもたらすことを明らかにしてきた。一方、マクロファージは機

能的および形態的に多様性を示し、また病原体感染部位に存在するマクロファージも多彩な様相を呈する。一般にマクロファージを *in vitro* で誘導し、その機能を評価する際、種々のサイトカインを用いて末梢単球より分化誘導する。代表的なサイトカインは、GM-CSFとM-CSFである。そこで、これらサイトカインを用いて単球より誘導したマクロファージのらい菌親和性を検討し、らい菌感染を受けた際、どのような抗原提示能を示すか検討し、マクロファージを介した抗らい菌生体防御反応誘導法について検討した。

B. 研究方法

正常健常者末梢血をインフォームドコン



セントのもと供与を受け、Ficoll-Paque Plus を用いてリンパ球を分離した。末梢リンパ球よりプラスチック付着性単球を作製し、マクロファージのプレカーサーとして用いた。マクロファージは、単球を GM-CSF あるいは M-CSF 存在下で 3 日間培養し得た。これらのサイトカインは市販のものを用いた。マクロファージをらい菌で刺激した際に培養上清中に産生されるサイトカイン、IL-10、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-12p40 は、市販のキットを用いて ELISA 法で測定した。マクロファージ表面への MMP-II の発現は、昨年度作製した MMP-II に対するモノクローナル抗体 (M270-13) を用い FACSscalibur で検索した。さらに、GM-CSF あるいは M-CSF を用いて作製したマクロファージにらい菌を感染させた際にマクロファージ表面に発現している抗原の発現程度は市販の抗体を用いて FACSscalibur で測定した。さらに、らい菌感染マクロファージの抗原提示能は T 細胞の活性化を指標として測定した。すなわち、らい菌感染マクロファージをマイトマイシン C 処理した後 stimulator として用い、自己の CD4 陽性 T 細胞をレスポンドーとしてマクロファージ-T 細胞混合培養を 4 日間行い、培養上清中に T 細胞から分泌される IFN- $\gamma$  を ELISA 法で測定した。IFN- $\gamma$  の測定は市販のキットを用い、CD4 陽性 T 細胞は末梢血リンパ球より主要組織適合抗原 (MHC) クラス II 陽性および CD8 陽性 T 細胞をそれぞれに対する抗体を結合したダイナビーズを用いてネガティブセレクションして得た。

(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

GM-CSF を用いて作製したマクロファージ (GM-M $\emptyset$ ) と M-CSF を用いて作製したマクロファージ (M-M $\emptyset$ ) の性状を把握するため、これらマクロファージの表面抗原の発現程度を解析した。MHC クラス I、クラス II 抗原は両者でほぼ同程度に発現しており、TLR-2、CD209、CD40 抗原の発現にも差は認めなかった。しかし、CD14 の発現は GM-M $\emptyset$  で有意に低く、逆に CD86 抗原は有意に GM-M $\emptyset$  で高かった。そこで、抗酸菌に対する両マクロファージの親和性を検討した。らい菌は *in vitro* で培養ができず、そのために GFP を発現させることができないため、同じ抗酸菌属に属す BCG に GFP を発現させ用いた。しかし、GFP 発現 BCG の取り込み量は両者において差は認められなかった。次いで、両マクロファージにらい菌を感染させた際の抗原提示能を検索した。GM-M $\emptyset$  にらい菌を感染させ、さらに IFN- $\gamma$  (100 U/ml) および CD40 リガンド (1  $\mu$ g/ml) で処理すると、らい菌量に比例して T 細胞は活性化され IFN- $\gamma$  が産生された。しかし、M-M $\emptyset$  では同様の処理を施しても T 細胞を活性化することはできなかった。そこで、GM-M $\emptyset$  にらい菌特異的に T 細胞活性化能を付与する必要因子を検討したところ、IFN- $\gamma$  と CD40 リガンドの両者で GM-M $\emptyset$  を処理した時のみ有意な T 細胞活性化が得られた。次いで、らい菌感染したマクロファージ (GM-M $\emptyset$  および M-M $\emptyset$ ) の表面抗原の発現程度を比較検討した。その結果、MHC クラス I 抗原の発現は両者で差はなかったが、MHC クラス II 抗原、CD86 抗原の発現は GM-M $\emptyset$  で有意に高く、T 細胞の活性化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。さらに両マクロファージのサイトカイン産生能を比較した。IL-10 は、免疫抑制作用を有し、らい菌のマクロファージ内寄生性感染をもたらす因子の一つであるが、らい菌を感染させると M-M $\emptyset$  は大量の IL-10 を産生したのに対し、GM-M $\emptyset$  では IL-10 産生能は欠

如していた。また、肉芽腫形成に重要な因子TNF  $\alpha$  はGM-M $\emptyset$ からより強く産生され、IL-12の産生能は両者で差がなかった。最後にGM-M $\emptyset$ とM-M $\emptyset$ のらい菌抗原の表面発現能を比較した。MMP-IIはらい菌に対する生体防御反応を司る上で重要な抗原であるが、GM-M $\emptyset$ のみがMMP-IIを発現し、その発現にはGM-CSFのみならずIFN- $\gamma$ とCD40リガンドの両者による副刺激が必要であった。

#### D. 考察

らい菌に対する生体防御反応として、IFN- $\gamma$ を産生するT細胞すなわちタイプ1 T細胞の活性化が重要である。事実、限局性病変を発症する少菌型ハンセン病では、らい菌感染部位に樹状細胞が動員されT細胞の活性化が誘導されている。らい菌は宿主に感染するとマクロファージに対し強い親和性を示し、感染後宿主の免疫サーベイランス機構から巧みに身を隠し、ゆっくりと増殖しやがてハンセン病を発症させる。従って、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最も有効と想定される。マクロファージは機能上多様性を示し、末梢単球から分化誘導する際には、用いられたサイトカインにより大きくその機能が左右される。そこでマクロファージを分化させる代表的なサイトカインであるGM-CSFとM-CSFについて検討を加えた。その結果、GM-CSFを用いて作製したマクロファージ(GM-M $\emptyset$ )は、らい菌感染を受けるとらい菌を細胞内でプロセッシングして抗原性タンパクMMP-IIをその表面に発現し、さらにHLA-DRおよびCD86抗原といったT細胞の活性化に必須な分子の発現を増強させ、その結果としてCD4陽性T細胞を効率良く刺激しIFN- $\gamma$ の産生を誘導した。しかし、GM-CSFのみを用いて得たマクロファージでは、十分なMMP-IIの発現もT細胞の活性化も得られず、GM-CSFに加えIFN- $\gamma$ とCD40リガンドによる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ものと想定された。また、IL-10は免疫抑制作用を有し、T細胞が樹状細胞により活性化される際にもその活性化程度を減弱させることが知られる。従って、マクロファージからのIL-10産生量をより低くすることが、らい菌に対する生体防御反応を誘導する上で重要なファクターの一つとなる。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たこと、さらにGM-CSFとM-CSFの両者を用いてマクロファージを作製してもGM-CSFの作用が優位であったことは、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。

#### E. 結論

末梢単球にGM-CSFを作用させると、マクロファージにT細胞活性化能を付与した。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る。

#### 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(1):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 CORO1A that affects intracellular survival of mycobacteria. Suzuki, K., F. Takeshita, N. Nakata, N. Ishii, and M. Makino. The 14<sup>th</sup> 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. 40<sup>th</sup> 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. 40<sup>th</sup> 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. 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 $\beta$ . 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