

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

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

平成15年度～平成17年度 総合研究報告書

主任研究者 向井 徹

平成18(2006)年3月

目 次

I. 総合研究報告書

ハンセン病の早期診断・薬剤耐性・ワクチン ----- 1

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

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 37

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 43

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総合研究報告書

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 WHOのMDT療法推進により、ハンセン病登録患者数の減少に効を奏している。しかし、未だ世界的に数十万人の新規患者が発生し、その対策が望まれている。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、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。早期診断技術の開発では、らい菌にTDM, TMMの存在を明らかにし、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、各種型別法の安定性の検討により、有用な型別法を開発し、その応用により、国内のみならず世界的ならい菌分布の解析を進めた。薬剤耐性対策では、らい菌薬剤耐性遺伝子検査の臨床現場における応用の有用性が示され、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、およびOFLX耐性らい菌対策に有用な抗菌剤を示した。ワクチン開発では、ワクチン候補抗原として、各種らい菌由来抗生物質が同定され、その様々な免疫活性性状が明らかになった。また、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lipoSがマクロファージを活性化し、その活性中心が明らかにされた。抗酸菌FAP蛋白の性状が解析され、BCGの相同遺伝子を破壊しらい菌由来FAP蛋白をその菌株に発現させ解析を可能にした。また、予防医学的見地では、*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り、L型患者では、その多型に特徴があることを明らかにした。ワクチン投与方法開発では、粘膜親和性蛋白σ因子を利用することにより、鼻腔内に抗らい菌免疫応答誘導がなされ、サル感染症モデル系開発では、皮内接種により1年間菌体が接種部位に保持され、また、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、新規患者数は年間約10名前後で、日本人は数名であり、在日外国人の若者が多くを占め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、これまでの介護度調査票の問題点を抽出し、新たな介護度調査票の作成・調査より、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		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
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	大山 秀樹	兵庫医科大学医学部 講師
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	寺尾 恵治	医薬基盤研霊長類医学科学研究センター センター長
尾崎 元昭	国立療養所長島愛生園皮膚科医長	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
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	地蔵テイ子	国立療養所多磨全生園看護部長
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	占部 正子	国立療養所菊池恵楓園看護部長
		岩佐美智子	国立療養所長島愛生園看護部長

A. 研究目的

世界的ハンセン病制圧は、WHOの推進するMDT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、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. 効率的粘膜炎誘導法の開発（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（岩佐、占部、地藏）

B. 研究方法

1. らい菌感染アルマジロの足からの結節状組織及びらい菌感染ヌードマウスの足蹠（フットパット）を採取し、オートクレーブ処理後、クロロフォルム・メタノール溶液、アセトン等により順次脂質成分を抽出する溶媒分画を行い、薄層クロマトグラフィーにて糖脂質を検出する。得られたクロマトグラムをすでに同定されている結核菌青山B株由来の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、患者血清反応性はELISA法で検討する。また、免疫学的活性をマクロファージ及び樹状細胞（DC細胞）を糖脂質で刺激した後それら細胞から放出される各種サイトカインの産生量で検討する。

2. 1) TTC 遺伝子多型による型別の有用性.

らい菌遺伝子中のTTC塩基配列繰り返し数の多型性（TTC-RV）によるらい菌の型別法の疫学解析への有用性を検討するために11研究室維持株についてその多型性と継代中におけるその安定性を調べた。ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、繰り返し数を比較した。インドネシア共和国の北 Maluku のハンセン病流行地域の2集落から得た住民の鼻粘膜材料に存在するらい菌のTTC-RVによる遺伝子型別を行い、個々の住居に同居する住民のそれぞれの遺伝子型の分布を調べた。それぞれの人口、世帯数、検体数、有病率および住民の鼻粘膜におけるらい菌の保有率は以下のとおりであった。集落L：434名、77世帯、277検体、3.3%、25.2%。集落G：509名、105世帯、353検体、4.0%、28.2%。同一家族内に複数の感染例が存在する5家族のハンセン病症例について患者の病変部よりバイオプシーにより感染らい菌を得、その遺伝子型を比較し、家族内感染例に分布するらい菌のTTC-RV遺伝子型の異同を検討した。

2) 型別に適応可能なVNTRの検索.

他の研究グループによって遺伝子型別に有用と考えられたもののその多型性と型別への適用性について詳細な検討がなされていなかった2塩基から27塩基までの44STRについて、27株の研究室継代株を用いてその多型性と安定性を比較した。9個のSTRが型別に有用と考えられたことから、4株の異なる世代数のらい菌を用いて各世代間におけるそれぞれのSTRのコピー数を検査してその安定性を検討した。またそのSTR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。TTC-RVにより分別不可能であった3家族、計10症例について実験Ⅱに

において型別に有用と考えられた 8 個の STR を用いてその遺伝子型を比較した。

3) SNP によるらい菌の型別と疫学解析.

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 36 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って SNP 型を比較した。rpoT 遺伝子中の 6 塩基直列配列のコピー数についても観察し、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。

3. 菌陽性の多菌型患者の菌を採取し、菌の遺伝子変異検査を行って DDS・RFP・OFLX への耐性発現を調べる。耐性発現例について耐性発生要因を探るとともに、その後の治療に検査結果が活用されたかどうかを検証する。耐性患者の周辺に耐性菌の二次感染例が出ていないかどうか、疫学的検討を行う。これらの調査結果を基に新キノロン剤の使用法、多剤併用療法の実施について検討し、治療指針の改訂を行う。

4. 1) らい菌(Thai-53 株), (Zensho-4 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: WQ-3402・WQ-3345(湧永製薬), moxifloxacin (MFLX, バイエル薬品), garenoxacin (GRNX, 富山化学工業), sitafloxacin (STFX, 第一三共製薬), sparfloxacin (SPFX, 大日本住友製薬), gatifloxacin (GFLX, 杏林製薬), levofloxacin (LVFX, 第一三共製薬), ofloxacin (OFLX, 第一三共製薬) clarithrimycin (CAM, 大正富山製薬), minocycline (MINO, ワイスレダリー武田薬品)は、各製薬会社から原末の提供を受けた。rifampicin (RFP, 和光純薬), fusidic acid (FA, SIGMA), 4,4'-diaminodiphenyl-sulfone (DDS, 和光純薬)は、市販品を用いた。

3) Buddemeyer 法: 4-ml のガラスバイアル中に

7H12 培地、らい菌(2×10^7)、抗菌薬(最終濃度: 32, 8, 2.0, 0.5, 0.125 $\mu\text{g/ml}$)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 μCi)を加え混合する。その後、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済みろ紙片を入れた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 ^{14}C 量を液体シンチレーションカウンターで測定し、各抗菌薬の抗らい菌活性を求めた。

- WQ-3345, WQ-3402 の抗らい菌活性を LVFX, SPFX, GFLX, RFP と比較検討した。
- MFLX, TFLX の抗らい菌活性を SPFX, GFLX, LVFX, CAM, MINO, RFP と比較検討した。
- GRNX の抗らい菌活性を LVFX, GFLX, SPFX, MFLX, RFP と比較検討した。
- FA の抗らい菌活性を DDS, SPFX, CAM, MINO, RFP と比較検討した。
- OFLX 耐性らい菌に対する新規ニューキノロン OFLX, LVFX, GFLX, SPFX, STFX, MFLX, WQ-3402 の抗らい菌活性を検討した。

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 10^7 のらい菌を接種した。菌接種後60-150日の91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、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。

- WQ-3402 (30, 40, 50mg/kg)の抗らい菌活性を SPFX (10mg/kg)と比較検討した。
- MFLX(1, 2, 5, 10mg/kg), (10, 20, 30, 40mg/kg)の抗らい菌活性を SPFX(10mg/kg)と比較検討した。
- FA(15, 30, 50, 70mg/kg)の抗らい菌活性を DDS (15mg/kg)と比較検討した。
- OFLX 耐性らい菌 (Zensho-4)に対する SPFX の抗らい菌活性を検討した。

5. 正常健常者の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

用いてリンパ球を得た。単球由来樹状細胞(DC)は rGM-CSF および rIL-4 を用いて誘導した。DC を MMP-II を用いて刺激した際、DC より産生されるサイトカインは ELISA 法にて測定した。ELISA は、市販のキットを用いて行った。MMP-II パルス DC の抗原提示能は、自己 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞をレスポンド細胞として用いた際に T 細胞から産生される IFN- γ を指標とした。らい菌が保有し、T 細胞を中心とした細胞性免疫反応を誘導し得る抗原の探索は以下の通り行った。らい菌を分画し、らい菌菌膜を得た後、可溶化し、さらに、ゲル濾過法にて分画した。それぞれの菌膜分画の抗原性は、各分画を DC にパルスし DC の抗原提示能により測定した。また、らい菌に対する細胞性免疫反応を示す少菌型患者より得た血清を用い、細胞膜をウェスタンブロット法で検索し、抗原性の強い細胞膜分画に共通して存在するバンドを得た。このバンドを抽出し、得られたタンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定し、目的としたタンパク質を同定した。得られたタンパク質をコードする遺伝子を PCR 法にて増幅した後、大腸菌に挿入し精製タンパクを得た。得られた抗原性タンパク MMP-II と抗原提示細胞上のレセプターとの関係は、予想されるレセプター TLR-2 を HEK293 細胞に発現させ、MMP-II で TLR-2 発現 HEK293 細胞を刺激した際の NF- κ B 依存性リンフェラーゼ活性を Reporter Gene Assay で測定した。MMP-II パルス樹状細胞の表面抗原の発現程度は、FACScaliber を用いて測定した。解析には、市販の抗体を用いた。次いで、末梢リンパ球よりプラスティック付着性単球を作製して、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 日間培養して得た。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、MMP-II に対するモノクローナル抗体 (M270-13) を作製して用い FACScalibur 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の

表面抗原は市販の抗体を用いて FACScalibur で解析した。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。

6. Truncated LpK の作製にあたり、プライマーを合成し、幾つかの蛋白をコードする遺伝子断片を PCR で得て大腸菌発現ベクターに導入し、DH5 α で発現した。蛋白の精製は HisBind カラム (Novagen) またはゲル濾過カラム HiLoad 26/60 Superdex 75 (Amersham Pharmacia) で行った。正常健常者ヒト末梢血単球 (10^5 細胞/ ウェル) を、精製した蛋白で 24 時間刺激したのち、培地上清中の IL-12 p40 を測定した。LpK の N 末端 13 アミノ酸配列を含む合成リポペプチドの配列は Palmitoyl-Cys (2,3-di (palmitoyloxy)-propyl)-Leu-Pro-Asp-Trp-Leu-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr-Gly-Gly-OH である。作成した合成リポペプチドを以下 lipoK と称した。lipoK は 20% 酢酸に溶解し、-80 $^{\circ}$ C に保存した。正常健常者ヒト末梢血単球 (10^5 細胞/ ウェル) を、lipoK で 24 時間刺激したのち、培養上清中の IL-12 p40 を測定した。樹状細胞はヒト末梢血単球より分化誘導したのち、精製した抗原でパルスし、その抗原提示能を自己 T 細胞の活性化を、IFN- γ を指標に分析した。IL-12 及び IFN- γ の測定は市販の OptEIA キットを用いて ELISA 法で半定量化した。マクロファージはヒト末梢血単球よりサイトカイン GM-CSF を用い分化誘導したのち、lipoK でパルスし、その抗原提示能を自己 T 細胞の活性化 (IFN- γ 産生) を指標に解析した。TLR2 の antagonistic 抗体は Genentech から分与を受けた。マンノース受容体の抗体は市販の抗体を用いた。

7. 1) 被験者: 国立療養所に入所するハンセン病患者であったドナー 176 名 (L 型患者; 130 名, T 型患者; 46 名) および健常者 68 名を被験者とした。なお、ドナーの臨床的分類は, Ridley & Jopling の分類に合わせ, らい反応および全身の後遺症の程度から判定した。
2) *IL12RB2* 制御領域の多型解析: 各被験者から調整した末梢血単核球より, QIAamp DNA mini kit を用いることによって抽出した。抽出した

ゲノム DNA を試料として、ダイレクト・シーケンシング法を用いることによって各被験者における *IL12RB2* 制御領域の塩基配列を決定した。すなわち、全ゲノム DNA を鋳型として PCR を行なうことにより *IL12RB2* の -1253 番目から +99 番目までの領域を増幅した後、Chain-termination 反応を行なった PCR 産物を ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer 社製) を用いて、同塩基配列を解析した。

ハプロタイプの決定は、pGEM-T Easy plasmid (Promega,) をベクターとして用いて *IL12RB2* の -1247 番目から +55 番目までの領域をサブクローニングした後、同領域をシーケンシングすることにより行なった。

3) *IL12RB2* 制御領域における多型が転写活性に及ぼす影響についての評価：*IL12RB2* の転写制御領域において検出することができた各ハプロタイプについて、-1247 番目から +55 番目までの領域をルシフェラーゼ・レポーター・ベクター (pGL3) に組み込んだコンストラクトと同時に遺伝子導入効率のコントロールとなる Renilla ルシフェラーゼ・レポーター・プラスミド (pRL-TK) を Jurkat 細胞にトランスフェクトして一定期間培養を行なった。その後、Dual Luciferase reporter gene assay system (Promega) を用いて、発光強度を計測することによって、*IL12RB2* 転写制御領域におけるそれぞれのハプロタイプが有する転写活性を比較した。

4) *IL12RB2* 制御領域における多型が T 細胞および NK 細胞の IFN- γ 産生に及ぼす影響についての評価：各被験者を *IL12RB2* 制御領域の多型の有無によって分類し、それぞれの被験者における T 細胞および NK 細胞の IFN- γ 産生量を測定した。T 細胞および NK 細胞濃縮画分 (1.2×10^5 cells/well: 96 well plate) の分離調整は、それぞれ末梢血単核球から磁気ビーズを用いた negative selection 法によって行った。また、T 細胞は rhIL-12 (1.0 ng/ml) 存在下で PHA を加えることによって、また NK 細胞は rhIL-12 (1.0 ng/ml) 存在下で rhIL-2 (50U/ml) を加えることによって刺激を与え、それぞれ一定期間培養を行った後に上清を回収した。上清に含

まれる IFN- γ 量は human IFN- γ ELISA kit (Endogen 社製) を用いることによって測定した。なお、IFN- γ 産生能との相関については Mann-Whitney の U 検定を用いて検定を行なった。

5) *IL12RB2* 制御領域における多型が T 細胞および NK 細胞の mRNA 発現に及ぼす影響についての評価：4) で示した方法に従い、それぞれの被験者の末梢血単核球から T 細胞および NK 細胞濃縮画分を得た。それぞれの細胞を一定時間刺激培養した後細胞画分を破碎し、TRIZOL を用いることによって全 mRNA を回収した。得られた試料の *IL12RB2* の遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR 法を行ない SNPs の有無と遺伝子発現を比較することによって、それらの相関の有無を評価した。

6) DNA 結合タンパクの同定：ゲルシフト・アッセイ法を用いることによって、*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。すなわち、抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体およびリコンビナント IL-12 存在・非存在下で一定時間刺激した健常者末梢血単核球由来の T 細胞から抽出した核タンパクと ^{32}P 標識した合成 2 本鎖オリゴ DNA とを一定時間結合させ、ゲル上に展開した後、SNPs の有無によってその移動度を比較することによって、DNA 結合タンパクの存在を評価した。また、質量分析計を用いて、*IL12RB2* 制御領域の多型の有無によって DNA 結合性が影響を受ける核タンパクの特定を T 細胞および NK 細胞それぞれについて試みた。すなわち、健常者末梢血 T 細胞画分および NK 細胞画分のそれぞれから抽出した核タンパクとビオチン標識した合成 2 本鎖オリゴ DNA とを一定時間結合させた後、アビジン・コートされたアガロースビーズと共培養することによって、DNA-タンパク複合体をビーズ上に結合させた後に回収し、高塩濃度バッファーを用いることによってタンパクのみを回収し、質量分析計にかけることによって特定することを試みた。

8. 粘膜面への付着能を持つレオウイルス σ 因子とらい菌由来蛋白 MMP II もしくは FAP を MBP 融合蛋白として大腸菌により発現・精製を行っ

た。HeLa 細胞により、 σ 因子依存的細胞接着能の検討を行った。また、得られた蛋白を、マウスへ $20 \mu\text{g}/\text{頭}$ で、7 日間隔 3 回経鼻接種し、その免疫誘導の検討を、抗体価測定、NALT および脾臓細胞の抗原刺激による増殖性および IFN- γ および IL-4 産生能測定により行った。MBP を持たないより naive な MMP II 可溶化抗原調整のため、MMP-II 融合 σ 蛋白の調整を様々なシヤペロン蛋白の同時発現系を用い行った。

迅速発育抗酸菌 *M. smegmatis* において変異株を作製するため FAP 遺伝子の周辺領域を持つ破壊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、薬剤マーカーを指標とした二段階の選抜によって変異株の単離を行った。破壊株及び野生株の形態は、液体培養時の菌体を抗酸菌染色した後、光学顕微鏡下 (1000 倍) で観察した。さらに菌体の生化学的性状を評価する手法として、疎水性分子であるヘキサデカンとの親和性を測定した。BCG において破壊株を作製するため FAP 遺伝子の周辺領域を持つ破壊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、染色体上のターゲット配列と相同組換えを起こした株について、薬剤マーカーを指標とした選抜により破壊株の単離を行った。さらに、らい菌 FAP の発現には染色体組込み抗酸菌ベクターを使用した。遺伝子破壊株の確認は PCR 及びウェスタンブロットティングにより行った。

9. 独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターで繁殖育成された 8-12 ヶ月齢の幼若カニクイザルを H15-16 年度は、6 頭を 3 群 (静脈、皮下、鼻腔内投与各 2 頭) に 5×10^9 菌量、H16-17 年度は、9 頭を 3 群に分け、らい菌を鼻腔内 (2 菌量)、鼻尖端部 (2 菌量)、左手根部 (2 菌量) にそれぞれ接種した。経時的に、鼻腔洗浄液、血漿、末梢血リンパ球を採取し、感染性、免疫応答性の解析を行った。接種後 1 年に解剖を行い、その感染性の検討を行った。また、細胞免疫応答の上昇した個体より T 細胞株の樹立を行った。

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 2005 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. 第 1 段階

従来の介護度調査票による介護度調査を実施し、調査内容の問題点の抽出

調査対象者：国立ハ病療 1 3 施設の入所者 (長期不在者を除く) 全員 (3, 605 名)

調査期間：平成 15 年 9 月 1 日 ~ 20 日

調査方法：従来の介護度調査票を使用し、看護師長、看護師、介護員の 3 名一組で聞き取り、観察する。看護度調査票の問題点を抽出する。

第 2 段階

記述分析法

調査対象：国立ハ病療 4 施設の介護員 70 名

調査期間：平成 16 年 6 月 ~ 8 月

調査方法 1) データ収集：介護員の介護内容を観察法にて収集する。介護員が日々行っている介護内容の一つひとつを観察者が分単位で記述し、合わせて、関わった対象者の障害の程度と自立の度合いも含めてデータ収集した。

2) 観察者：看護師長

第 3 段階

タイムスタディ調査による分析に基づく、介護度調査票 (案) の作成と介護員配置基準の作成

1) タイムスタディの方法

(1) 調査対象：国立ハ病療 1 3 施設の不自由者棟に入居している独身者 120 名

不自由度：

230 点以上 (特重) 24 名

190 ~ 229 点 (特重) 25 名

135 ~ 189 点 (重) 24 名

86 ~ 134 点 (中) 25 名

41 ~ 85 点 (軽) 22 名

(2) 調査期間：平成 17 年 4 月の日曜日 ~ 土曜日 1 週間

(3) 調査内容・方法

① 介護度調査対象者フェイスシート：看護師長が記載。

② 調査項目は 13 項目「食事」、「活動」、「清掃」、

「移動」、「排泄」、「洗濯・整理・補修」、「代理行為」、「入浴」、「清潔」、「更衣」、「寝具」、「観察」、「予期せぬ要望」とする。

③記録方法・集計

- ・調査対象者に介護員が直接介護した時間（分単位）で24時間、1週間分を自己記録する。
- ・記録用メモ用紙は、居室に貼っておく、またはスタッフステーションのわかりやすい場所におく。
- ・対象とする入所者に関わった介護員が、その都度、分単位でメモ用紙に記録し、看護師長が集計表にまとめ、看護部長・総看護師長に提出する。

2) 介護度調査票（案）の作成

3) 介護員配置基準の作成

（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

1. 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。しかし両者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も免疫学的な活性も測定できなかったため、らい菌糖脂質の代替と成りうる候補糖脂質を他の抗酸菌糖脂質から検索した結果、BCG菌の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。その後、BCG菌の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。必要十分な量を抽出、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- α 等の産生増強等の免疫学的活性を持つことがわかった。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。

2. 1) TTC 遺伝子多型による型別の有用性.

ヌードマウスにより維持された11株についてTTC-RVを検討した結果、株間では異なるTTCコピー数を示した。また、ヌードマウス継代株間について同一株ではそれぞれの株のコピー数に変化が無く長期間安定であることが示され、安定性と多型性の範囲の両条件からTTC-RVにより疫学解析が可能であることが示された。

2集落中、G集落の検体は31軒の49例が解析可能であった。L集落では12軒の住居で2名以上が陽性を示した。それぞれ5軒および11軒の住居の住民の鼻粘膜に異なるTTCコピー数のらい菌が存在することが示された。同一家族内に複数の感染例が存在する5家族の家族内複数感染症例中2家族の患者に明らかに異なるTTCコピー数を有するらい菌が存在した。

2) 型別に適応可能なVNTRの検索.

多型性を検討した全44個のSTR中29個が2

個以上の繰返し数のバリエーションを示した。コピー数の違いは最も少ないもので2種類で、最も広い違いを示したものは10種類であった。変異の広さ及び塩基配列の判読のしやすさから、8個のVNTRが異なる型別に有用であった。4株の維持継代菌について、調べた範囲の継代ではこの8個のVNTRは変化を認めなかった。異なる世代数でもそれぞれの株に特異的なVNTRが維持されることが示された。9種類のVNTRの組み合わせにより、27株は全て異なる遺伝型に分類され、クラスターの形成は示されず、8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た。TTC-RV遺伝子型で区別ができなかった3家族の家族内多発例では、1家族がこの組み合わせにより異なる遺伝子型であることが示され、従来の感染源とされる家族内多菌型患者を否定する結果であった。2家族では全てが同じ型であった。

3) SNPによるらい菌の型別と疫学解析。

SNPの比較のための塩基中、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。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。

*rpoT*型は本州では6塩基繰返しを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。

3. 検査に登録されたのは61例であったが、遺伝子変異検査が実施されたのは46例であった。そ

の内訳は男37例、女9例で、病型別ではLL34例、BL9例、BT2例、B1例であった。病勢は再発25例、治癒遷延10例、新患11例であった。folP遺伝子に変異がありDDS耐性と判定されたのは19例、変異なしが16例、PCR法陰性で判定できなかったのが11例であった。rpoB遺伝子(RFP)では変異あり15例、変異なし19例、PCR法陰性12例であった。gyrA遺伝子(OFLX)では変異あり6例、変異なし25例、PCR法陰性15例であった。1剤だけに耐性が認められたのは11例、2剤耐性が7例、3剤耐性が5例であった。これらの結果から、日本ではすでにRFPおよびOFLXへの耐性がかなり出現し、多剤耐性患者がいること、新患にも耐性を示す例があることが明らかになった。今のところ、日本人耐性患者からの二次感染による発病例は認められていない。検査後の治療、臨床経過の検証では、耐性判明により治療内容が変更されたのが19例、そのうち15例で菌陰性化・臨床的治癒が達成されていた。耐性なしだった15例では標準的な治療が継続され、4例に菌陰性化がみられた。PCR法陰性で検査が参考にならなかった8例では5例が菌陰性化していた。患者の恣意的治療、あるいは担当医が検査結果を活用しなかった4例では、全例臨床的改善が認められなかった。これらは遺伝子変異検査の有用性を示している。

ハンセン病がまだ流行している発展途上国で、MDT終了後の耐性発生や耐性菌感染による新患発生の状況を調査するためのトライアルとして、ミャンマーのハンセン病医療施設で菌を採取し、日本で遺伝子変異を検査するという予備調査を実施した。検査そのものは成功したが、検体の採取や運搬、検査技術の移転などに課題があることが判明した。耐性発生状況を考慮して、新キノロン剤の使用指針を作成して公示した。耐性発生予防と耐性患者の治療のためにハンセン病治療指針の改訂を行った。

4. 1) WQ-3402の抗らい菌活性

Buddemeyer法でWQ-3402は、SPFXを凌ぎニューキノロン中で最も強い抗らい菌活性を示したが、ヌードマウス足蹠法では、50mg/kgでも不完全抑制であった。

2) 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 MFLX は、10 mg/kg で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。

3) TFLX の抗らい菌活性

Buddemeyer 法で LVFX に近似した抗らい菌活性を認めた。

4) GRNX の抗らい菌活性

Buddemeyer 法で LVFX に匹敵する抗らい菌活性を認めた。

5) FA の抗らい菌活性

Buddemeyer 法での FA の抗らい菌活性は、SPFX に匹敵する強い抗菌活性を認めた。ヌードマウス足蹠法では、70mg/kg でも不完全抑制であった。

6) OFLX 耐性らい菌 (Zensho-4 株) に対する新規ニューキノロンの抗らい菌活性 Buddemeyer 法で OFLX 耐性らい菌 (Zensho-4 株) に対する新規ニューキノロンの抗らい菌活性は、WQ-3402 > STFX, MFLX > SPFX, GFLX > LVFX > OFLX の順で WQ-3402 が最も強く STFX, MFLX に OFLX, LVFX の 8 ~ 16 倍強い抗菌活性を認めた。ヌードマウス足蹠法で OFLX 耐性らい菌に対し、OFLX は 150mg/kg でも不完全抑制であったが SPFX は 40mg/kg で完全抑制を示した。

5. らい菌感染樹状細胞は、らい菌細胞膜に対するポリクローナル抗体で陽性に染まった。しかし、らい菌細胞壁あるいは細胞質に対する抗体は陰性であった。らい菌細胞膜を可溶化し、ゲル濾過法により分画した。ゲル濾過各分画には種々のタンパクが含まれていることを銀染色で確認した後、それぞれの細胞膜画分を DC にパルスし、その抗原性を検索した。二つの分画に CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を強く刺激し得る抗原が含まれている可能性が示唆された。そこで、少菌型患者血清を抗酸菌の細胞壁と細胞質で吸収した後、ウェスタンブロット法で上記 2 分画を検索し、両者に共通して存在するバンドを抽出し、その N 末端アミノ酸配列を解析した。その結果、細胞膜の主要タンパク成分である Membrane Protein-II (MMP-II) が同定され

た。そこで、T7 expression system を用い、大腸菌で MMP-II を産生・精製し、以下の実験に用いた。MMP-II を DC にパルスしたところ、DC 表面の HLA-ABC、HLA-DR、CD86 および CD83 抗原の発現量が増強した。DC を MMP-II で刺激すると IL-12 p70 が産生された。DC に MMP-II をパルスすると、40~80% の DC が細胞表面に MMP-II を強く発現した。MMP-II が抗原提示細胞を活性化する機序を解明するため、TLR-2 を導入した HEK293 細胞を MMP-II で刺激したところ、細胞内のレポーター遺伝子が活性化された。さらに、MMP-II パルス DC を用いて、自己の CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞を刺激すると、MMP-II 濃度依存性に T 細胞が活性化され IFN- γ が産生された。しかし、IL-4 は産生されなかった。正常健常者と少菌型ハンセン病患者の T 細胞の MMP-II 反応性を検討すると、ナイーブ T 細胞を Responder として用いると両者に明らかな差はなかったが、メモリー T 細胞の反応性を比較すると少菌型患者で非常に強い T 細胞活性化が観察された。少菌型 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。次いでマクロファージについて検討した。正常健常者末梢単球由来マクロファージを MMP-II で刺激すると、IL-10 および TNF α を産生したが、IL-12 は産生しなかった。マクロファージに MMP-II をパルスすると、その細胞表面に MMP-II を発現したが、自己 CD4 陽性 T 細胞を有効に活性化するには至らなかった。そこで、らい菌感染マクロファージについて検討を加えた。GM-CSF を用いて作製したマクロファージ (GM-M ϕ) と M-CSF を用いて作製したマクロファージ (M-M ϕ) を比較すると、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いた。しかし、CD14 の発現は GM-M ϕ で有意に低く、逆に CD86 抗原は有意に GM-M ϕ で高かった。抗酸菌に対する両マクロファージの親和性を検討した。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。そこで、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 ϕ にらい菌を感染させ、さらに IFN- γ (100 U/ml) および CD40 リガンド (1 μ g/ml) で処理すると、T 細胞は活性化され IFN- γ が産

生された。しかし、M-MØ では同様の処理を施しても T 細胞は活性化されなかった。GM-MØ にはらい菌特異的に 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- γ と CD40 リガンドの両方で GM-MØ を処理した時のみ有意な T 細胞活性化が得られた。らい菌感染した GM-MØ および M-MØ の表面抗原の発現程度を比較検討した。MHC クラス II 抗原、CD86 抗原の発現は GM-MØ 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。両マクロファージのサイトカイン産生能を比較すると、らい菌を感染させると M-MØ は大量の IL-10 を産生したのに対し、GM-MØ 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 α は GM-MØ からより強く産生され、IL-12 の産生能は両方で差がなかった。最後に GM-MØ と M-MØ のらい菌抗原の表面発現能を比較した。GM-MØ のみが MMP-II を発現し、その発現には GM-CSF のみならず IFN- γ と CD40 リガンドの両者による副刺激が必要であった。

6. LpK の幾つかの truncated forms を作製した。LpK の N 末端にシスチン残基を欠く LpK(n1) は脂質付加を受けない蛋白である。N-LpK(1) は N 末端に脂質付加をうける 60 アミノ酸残基からなるものであり、N-LpK(n1) は脂質付加を受けない 60 アミノ酸のみからなる蛋白である。C 末端の 179-371 アミノ酸部分からなる蛋白は C-LpK である。これらの蛋白を大腸菌で発現精製し、ヒト末梢血単球を刺激した際の IL-12 p40 の産生を検討した。0.5 nM のリポ蛋白 LpK で単球を刺激すると、700pg/ml の IL-12 を産生するが、同じアミノ酸配列を持つ脂質非付加蛋白 LpK(n1) 0.5 nM では IL-12 が産生されず、5 nM 以上の大量の蛋白で刺激すると初めて IL-12 が産生された。同様に 0.5 nM の N 末端 60 アミノ酸残基を持つ脂質付加蛋白 N-LpK(1) を用いると親 LpK と同等の IL-12 が産生されるが、N-LpK(n1) では産生されず、20nM 以上の蛋白を必要とした。C 末端の 192 アミノ酸を含む C-LpK では全く IL-12 が産生されなかった。このことは、脂質を含む N 末端 60 アミノ酸部分が 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。これら truncated LpK を樹状細胞にパルスし、抗原提示細胞として用いて、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。LpK または N-LpK(1) をパルスした樹状細胞は T 細胞を刺激し有意に IFN- γ を産生したが、C-LpK では全く IFN- γ は産生されなかった。LpK(n1) または N-LpK(n1) はわずかながら CD4 陽性 T 細胞を刺激した。このことは LpK の脂質部分及び N 末端 60 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を示す。Toll-like receptor 2 (TLR2) は細菌由来リポ蛋白並びにリポペプチドの認識に重要な役割を果たすことが明らかにされているため、truncated LpK と TLR2 の関係を調べた。脂質付加蛋白 LpK または N-LpK(1) は reporter gene assay で有意な活性を示し、宿主細胞の活性化に TLR2 の関与が明らかとなった。

次に、LpK の N 末端 13 アミノ酸を含む合成リポペプチド lipoK の免疫活性を検討した。ヒト末梢血単球から分化した樹状細胞を lipoK、またはらい菌で刺激した際の細胞表面マーカーを FACS calibur を用いて検討した。0.4 μ g/ml の lipoK で樹状細胞を刺激すると、HLA-ABC, HLA-DR, CD83, CD86 の発現が増強した。らい菌存在下では lipoK は活性化マーカーの発現をさらに増強した。つぎに樹状細胞を用いて活性型 IL-12 (IL-12 p70) の産生量を ELISA で測定した。CD40 リガンド存在下らい菌で樹状細胞を刺激しても IL-12 は全く産生されなかったが、lipoK で刺激すると lipoK の濃度依存的に IL-12 が産生された。またらい菌と共に lipoK で刺激すると IL-12 の産生量が増加した。このことは、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。lipoK を樹状細胞にパルスし、抗原提示細胞として用いて、自己の CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞の活性化を上記と同様に調べた。lipoK をパルスした樹状細胞は T 細胞を刺激し有意に 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、TLR2 に対する中和抗体を用いて、樹状細胞の表面に発現している 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 が重要であることが明らかになった。同様に、樹状細胞をらい菌で刺激すると、有意な IFN- γ 産生性 T 細胞の活性化が観察されるが、lipoK 存在下でらい菌刺激すると樹状細胞の抗原提示能はさらに増強された。

ヒト末梢血単球から分化したマクロファージを lipoK またはらい菌で刺激し、その細胞表面マーカーを FACS calibur を用いて検討した。0.3 μ g/ml の lipoK でマクロファージを刺激すると、HLA-ABC, HLA-DR, CD83, CD86 の発現に変化は見られなかった。らい菌存在下でも lipoK は活性化マーカーの発現を増強しなかった。しかしながら、培養上清中の IL-12p40 の産生量を ELISA 法で測定したところ、lipoK で刺激すると IL-12 が産生された。らい菌単独でマクロファージを刺激しても IL-12 は全く産生されなかったが、lipoK と共に刺激すると IL-12 の産生量は相乗的に増加した。IL-12 の産生量は、らい菌と lipoK の濃度に依存していた。このことは、lipoK は樹状細胞のみならず、マクロファージでも、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。次に、lipoK をマクロファージにパルスし、抗原提示細胞として用い、自己の CD4 陽性 T 細胞の活性化を検討した。lipoK をパルスしたマクロファージは T 細胞を刺激し有意に IFN- γ を産生した。lipoK 存在下では、らい菌感染マクロファージは T 細胞をさらに活性化した。脂質部分を持つペプチドが T 細胞活性化に重要な役割を果たしていると考えられた。そこで、マクロファージの受容体に対する中和抗体を用いて、表面に発現している受容体をブロックすると、サイトカイン産生能がどのように変化するか検討した。らい菌及び結核菌はマンノース受容体を介しマクロファージ内に貪食されることが知られている。しかしマンノース受容体に対する抗体で細胞表面をブロックしても、らい菌と lipoK による IL-12 あるいは TNF- α の産生量は変わらなかった。同様に、Toll like receptor2 (TLR2) の中和抗体を用いて、マクロファージからの IL-12 または TNF- α の産生量を検討すると、サイトカイン産生能は有意に低下した。従って、IL-12 及び TNF- α のマク

ロファージからの産生は TLR2 を介することが明らかになった。

- 1) IL-12RB2 制御領域の多型解析：-1035 A>G, -1023 A>G, -650 delG および -464 A>G の計 4 種類の SNPs の保有頻度を L 型患者, T 型患者および健常者を対象として調べた。その結果, それらすべての SNPs 保有頻度は, 1. L 型および T 型をあわせたハンセン病患者群と健常者群と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, 患者および健常者に関わらず, -1035, -1023, -650 および -464 各ポジションにおけるそれぞれの allele は, 連鎖不平衡の関係にあることが分かった。さらに, -1035 A>G, -1023 A>G, -650 delG および -464 A>G の計 4 種類の SNPs において, 各ポジションにおいてひとつでもヘテロ接合体であるドナーを無作為に抽出し, 同領域の DNA の subcloning を行なうことによって, haplotype 頻度を解析することを行なった。その結果, 各ポジションがすべてアレル 1 であるハプロタイプ 1 (-1035A --1023A --650G --464A ; 41.2%) が一番高頻度であり, 逆に各ポジションがすべてアレル 2 であるハプロタイプ 2 (-1035G --1023G --650delG --464G ; 32.4 %) が 2 番目に多かった。その他, ハプロタイプ 3 (-1035A --1023A --650delG --464A ; 11.8%), ハプロタイプ 4 (-1035G --1023G --650G --464A ; 8.3%) およびハプロタイプ 5 (-1035A --1023A --650delG --464G ; 5.9%) を検出した。さらに, Hardy-Weinberg 平衡に従い, 各群におけるハプロタイプ 1 の保有頻度を算出し, 各群間で比較した結果, L 型患者の保有頻度は T 型患者および健常者のそれに比べて, 有意に低いことが分かった。
- 2) *IL-12RB2* 制御領域における多型が転写活性に及ぼす影響についての評価：上記それぞれのハプロタイプの転写活性を比較するために, ハプロタイプ 1 から 5 のそれぞれについて, -1247 番目から +55 番目までの領域を pGL3 Basic vector に組み込み, それぞれ作製したコンストラクトを Jurkat 細胞に移入した Dual Luciferase reporter gene assay を行なうこと

によって評価した。その結果、遺伝子多型を有するハプロタイプ 2, 3, 4 および 5 のそれぞれの RLU (Relative Luciferase Unit) 値は、ハプロタイプ 1 のそれに比べて有意に低かった。このことから、それぞれのポジションに多型が存在することによって、転写活性が低下することが分かった。

3) *IL12RB2* 制御領域における多型が T 細胞および NK 細胞の IFN- γ 産生に及ぼす影響についての評価：各被験者を *IL12RB2* 制御領域の多型の有無によって分類し、それぞれの被験者における T 細胞および NK 細胞の IFN- γ 産生量を測定した結果、以下のことが明らかとなった。1. ハプロタイプ 1 ホモ接合体から採取した T 細胞は、ハプロタイプ 1 以外のハプロタイプのヘテロ接合体およびホモ接合体から採取したそれに比べて、有意に高く IFN- γ を産生した ($p=0.0251$)。一方、NK 細胞においては、全くその逆に、ハプロタイプ 1 ホモ接合体は有意に低い IFN- γ 産生を示した ($p=0.0082$)。2. *IL12RB2* 転写制御領域にハプロタイプ 1 以外のハプロタイプのホモ接合体の被験者から採取した NK 細胞は、ヘテロ接合体の被験者から採取した NK 細胞に比べて、高い IFN- γ 産生を有する傾向を示した。

4) *IL-12RB2* 制御領域における多型が mRNA 発現に及ぼす影響についての評価：健常被験者の末梢血単核球から T 細胞および NK 細胞濃縮画分を分離調整し、それぞれを刺激した時の細胞画分から全 mRNA を回収し、リアルタイム PCR を行なうことによって *IL-12RB2* の遺伝子発現量を各被験者間で比較した。その結果、48 時間後の T 細胞においては、ハプロタイプ 1 のホモ接合体に比べて、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。一方、NK 細胞においては、T 細胞よりも早期において (0 時間, 24 時間)、ハプロタイプ 1 のホモ接合体に比べて、ハプロタイプ 1 以外のハプロタイプのヘテロ接合体およびホモ接合体の *IL-12R β 2* mRNA 発現量は高い傾向を示した。この結果は、IFN- γ 産生と同じく、同領域の遺伝子多型は、NK 細胞と T 細胞の *IL-12R β 2* mRNA 発現に全く逆の影響を及ぼすことが示された。

5) DNA 結合タンパクの同定：ゲルシフト・アッセイ法を用いることによって、*IL12RB2* 制御領域の多型によって DNA への結合性が変化する核タンパクの同定を試みた。その結果、-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。この核タンパクは、活性化 T 細胞を IL-12 存在下で培養した時に比べて、非存在下で培養した時のほうが核内に多く含まれている可能性が示された。

さらに、-1035 および -1023 番目の塩基の違いによって、その結合性が異なる DNA 結合タンパクが未刺激の T 細胞から精製した核タンパクに含まれている可能性があること、また、活性化 T 細胞から精製した核タンパクには、変異型である -1035 G / -1023 G の塩基配列からなる 2 本鎖オリゴ DNA にのみ結合する DNA 結合タンパクが含まれることがそれぞれ分かった。なお、この活性化 T 細胞由来の核タンパクに含まれ、変異型 2 本鎖オリゴ DNA のみに結合する DNA 結合タンパクは、未刺激および活性化 T 細胞から精製した核タンパクに含まれ、野生型 -1035A / -1023A からなる 2 本鎖オリゴ DNA と結合するタンパクと同じか、ほぼ同じ分子量のタンパクであることが考えられた。

質量分析計を用いて、*IL12RB2* 制御領域の多型の有無によって DNA 結合性が影響を受ける核タンパクの特定を T 細胞および NK 細胞のそれぞれから精製した核タンパクを用いて行った。その結果、精製することができた核タンパク量が少なかったため特定するには至らなかったが、1. -650G DNA-T 細胞由来の核タンパク、2. -464A DNA-T 細胞由来の核タンパク、および 3. -464G DNA-NK 細胞由来の核タンパクのそれぞれの組み合わせにおいて、特異的に結合するタンパクの存在が示唆された。

8. ヒトレオウイルス 3 型より、 σ 蛋白遺伝子をクローニングし、らい菌 MMP II もしくは FAP 蛋白と MBP 融合蛋白の形状で大腸菌により発現精製した。HeLa 細胞を用いた細胞結合性能の検討では、 σ 因子融合型は、非結合型と比較し、有意に結合した。マウスへの鼻腔内投与実験では、

σ 因子融合型は、非融合型に比べ血中、鼻腔洗浄液内の抗体価の上昇、NALT 由来単核球の抗原刺激による細胞増殖性、IFN-γ 産生能は上昇していたが、IL-4 の産生能に差は認められなかった。MBP 非融合型の σ 因子と MMP II 融合型蛋白の大腸菌による調整は、困難であった。

M. smegmatis における FAP 破壊株の構築では、単離した株を PCR 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破壊株であることを確認した。形態について野生株との比較を行ったところ、液体培養時において変異株は著しく凝集する増殖形態を示した。さらに、破壊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。*M. bovis* BCG における FAP 破壊株の作製及びらい菌 FAP の発現では、単離した株を PCR 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。また、破壊株の菌体より調製した無細胞抽出液に対して抗 FAP 抗体によるウェスタンブロッティングを行ったところ、FAP の発現が消失していることが判明した。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。

9. らい菌接種前、接種後 2、3、5、7、および 11 ヶ月目に採血し、定法に従いリンパ球を分離した。2 年間の合計で静脈 (2 頭)、鼻腔内 (4 頭)、皮下 (9 頭) の異なった接種経路による投与を行い、経過観察を行った。PGL-1 抗体価の上昇は、静脈接種経路群に、1-8Mo に認められたが、その後、陰性となった。鼻腔内洗浄液のらい菌 PCR 法の結果では、鼻尖接種群に、おいて 8Mo まで散発的に陽性が観察されたが、12Mo では全頭陰性であった。鼻尖接種部位の検索では、12Mo 後まで腫脹が認められた。PCR は陽性、染色でも抗酸菌の存在が認められ、病的には、菌周囲に異物型巨細胞を含む肉芽腫形成が認められた。リンパ球幼若化反応の検討では、接種経路、接種菌量に相関なく陽性を認める個体が観察された。継続的に幼若化反応の認められた個

体より、CD4 陽性 T 細胞の細胞株樹立を試みるが、培養期間中に CD8 陽性 T 細胞が優位となった。

10. 1993 年から 2005 年までの 13 年間の新規ハンセン病患者調査を行った。13 年間の平均は日本人は年間 5.6 名、外国人は年間 8.8 名であった。しかし最近 5 年間 (2001-2005 年) では日本人は年間 3.4 名、外国人は年間 7.6 名と減少してきた。病型では多菌型 (multibacillary: MB) が増加してきた。更に外国人ではブラジル人が半数以上を占めていた。

11. 第 1 段階

従来の介護度調査票による調査の結果、調査項目・内容について以下の問題点が抽出された。

① 一つの項目に多くの要素が含まれているので評価しにくい。② 項目の優先順位の根拠が不明確。③ 生きがいに関連する心のケアの項目がない。

第 2 段階

介護員の介護行為を観察法にて収集し、さらに介護内容を整理した。介護項目をカテゴリ別に整理し、調査項目の根拠を明らかにし、12 のカテゴリと 88 項目のサブカテゴリに分類した。

第 3 段階

(1) 介護内容によるタイムスタディ調査

第 2 段階で介護行為を 12 のカテゴリに分類したが、カテゴリの中のサブカテゴリの項目に整理できない予期せぬ依頼などがあることがわかり、それらは入所者の生活習慣を熟知していて、コミュニケーションがよくとれている介護員へ依頼することが多く、介護の質の向上につながる部分と考えた。そこで、12 のカテゴリに「予期せぬ要望」を加え、13 のカテゴリについて、タイムスタディをとった結果、以下のことがわかった。① 不自由度が高い程、介護所要時間が長かった。② 要介護状態 (全介助・一部介助・見守り) の区別では、不自由度の程度にかかわらず、全介助で援助を受けている時間が多かった。③ カテゴリ別で見ると、食事に関わる時間が一日平均 89.2 分で一番長く、生きがい対策として新たに追加し

た「活動」の介護所要時間が25.5分で2番目に長かった。カテゴリーの介護所要時間を不自由度別でも、同様の傾向を示した。④時系列でみると、朝・昼・夕食時間帯に介護所要時間が長い。

(2) 介護度調査票（案）の作成

タイムスタディの結果から、介護度調査票（案）を作成した（表1）。今後、後遺症による障害の程度、高齢に伴う身体機能の低下等と介護内容を検討できるようにフェイスシートを見直した。障害の種類に加齢、認知障害に関連した「排泄障害（失禁・頻尿）」を加えて10項目とした。縦軸の援助項目は「食事」、「活動」、「清掃」、「移動」、「排泄」、「洗濯・整理・補修」、「代理行為」、「入浴」、「清潔」、「更衣」、「寝具」、「観察」、「予期せぬ要望」の13項目とした。「全介助」、「一部介助」、「見守り」の要介護状態を横軸にした。介護度調査票の縦軸、横軸を検討するにあたっては、現在、使用している不自由度調査票、介護度調査票をもとに、比較検討するため、従来同様に縦軸55点、横軸5点、最高点を275点に設定した。従来の縦軸の配点の合計55点にタイムスタディのカテゴリーの割合を乗じて、優先順位と配点を決定した。横軸は従来の介護度調査票では、調査項目の内容が不明確で判断しにくい等の問題点があったため、タイムスタディ調査の結果から「全介助・一部介助・見守り」の要介護状態区分に設定した。従来の横軸の配点の合計15点にカテゴリー毎の要介護状態区分の割合を乗じ、更に全介助を5とした場合の一部介助・見守りの配点を出した。タイムスタディ調査をした入所者118名（120名中2名死亡）を対象に調査した結果、従来の介護度調査票に比べ、不自由度が低い程、高めの点数になった。また、「判断しやすく、短時間で記入できた。」「要介護状態区分（全介助・一部介助・見守り）が明確でつけやすい。」等の意見があったが、一方「ルーチン化している業務は点数が高く出る。」「観察、巡視などの要介護状態区分の判断に迷うので、説明が必要。」などの意見もあった。

(3) 時系列タイムスタディの結果から、介護員が入所者に多く関わる時間帯である9～17時

の日勤帯の勤務時間8時間（480分）で一人の介護員が何名の入所者を受け持てるか計算してみた（表2）。その結果、日中に介護員一人あたりが受け持つ入所者数は、「特重」2人、「重」3人、「中」5人、「軽」6人となった。

D. 考察

1. 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が、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、ミコール酸を構成する炭化水素鎖の長さが異なることから両者では抗原性に違いがあるものと推察された。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。

2. これまでハンセン病の主たる感染様式は家族内の多菌型患者との濃厚接触によると説明され、現行のWHOによる多剤併用療法は感染者の治療と同時に多菌型患者の治療による感染源の除去とそれによる新たな感染の防止も併せて目的としている。その一方、世界の新規感染例の発見数は一向に減少を見ていない。感染源と推察される症例と感染を受けたとされる症例の間で菌の異同についての細菌学的な検証は無い。血清疫学あるいは患者以外の住民の鼻粘膜上の高いらい菌の保有率は家族内多菌型患者以外からの感染を強く示唆している。

感染源の究明のためにらい菌の型別の確立とそれを用いて感染者、健康保菌者のらい菌の遺伝子を比較した。TTC繰返し配列を含めた8個のSTRはヌードマウスによる継代を経ても安定であり、疫学解析に適用可能であると結論された。またこれら8個のSTRを組み合わせること

により十分な解析能を有する型別方法が確立された。

住民、患者から得たらい菌について選択された STR を用いて行ったらい菌遺伝子型別の結果は明らかに同一住居に居住する家族でも異なる遺伝子型のらい菌を保有することを示しており、これまで言われているような、ハンセン病は家族内の多菌型患者との濃厚接触によって感染が成立するものではないことを示した。今後その感染源となるらい菌の存在を証明する必要がある。いくつかの家族内多発例において全く同一の遺伝子型のらい菌が検出されたが、これはそれらの家族が住居外で感染した感染源に同一のらい菌が存在していたためと推測される。

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報告され、一報告者らによってらい菌ゲノムの *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が報告されている。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の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。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。近年の半数症例が報告されている日系ブラジル人からのらい菌の SNP の 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。このことはブラジルでのハンセン病の高い感染率と関連して、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。7 例の *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。

広い多型を示す VNTR は、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変異の幅

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と考えられた。

3. わが国の活動性ハンセン病患者にかなりの高率で薬剤耐性があり、すでに多剤耐性が出ていることが明らかになった。これらは過去のスルホン剤単独使用時代に DDS 耐性が出現しやすかったことに加えて、その後の多剤併用に問題があったことを示唆している。耐性例の過去の治療歴を検討したところ、耐性発生のおもな要因は低用量投与、単剤使用、不規則治療であった。新患の耐性例では、WHO/MDT 終了後の患者（日系ブラジル人）、短期間の多剤併用療法後の日本人患者に耐性が出現していた。多剤併用、MDT の過信を戒める結果と考えられる。

新キノロン剤への耐性菌が出ていることから、新キノロン剤の使用指針を作成して日本ハンセン病学会誌に掲載した。研究結果を日本のハンセン病診療に反映させるために、「ハンセン病治療指針(2000)」の改訂を行った。2006 年中に刊行の予定である。耐性患者の治療、耐性発生の予防については、これらの指針とかけ離れた治療が行われやすい場である療養所、新患の治療にあたる一般病院の医師に情報を伝え、関心を喚起していく必要がある。

遺伝子変異検査による耐性確認が臨床上高い有益性を示したが、今後、化学療法時のルーチン検査として実施できるよう、検査体制を整える必要がある。一般医にこの検査についての認識を高めることも重要である。

患者がまだ多く、WHO/MDT が実施されている地域で、治療後および新患について耐性検査を実施することは重要な意義があると考えられ、発展途上国への技術移転としても意義が大きい。適切なフィールドを設定し、遺伝子変異検査および日本の経験が国際協力に活用されることが望ましいと考える。

4. 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投与により

DDS, B663, RFP のみならず近年開発された OFLX, CAM にも耐性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。

1) WQ-3402 は、1 位に 5-amino-2, 4-ジフルオロフェニル基、7 位にメチルアミノ基を導入することで MRSA キノロン耐性に対応する WQ-3402 は Buddeneyer 法でニューキノロン中最も強い抗らい菌活性を示したが、ヌードマウス足蹠法での抗らい菌活性が弱かったのは、血中半減期が 2.7 時間と短いことと、血中蛋白結合率が約 90% と高いことが原因と考えられる。

2) 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。MFLX は 7 位にピロロピリジン基、7 位にメトキシ基を導入することで強い抗らい菌活性を保持しながら光毒性や痙攣誘発などの副作用の少ないニューキノロンとして臨床導入が期待される。

3) TFLX は、1 位にジフルオロフェニル基、7 位にアミノピロリジニル基を導入することで抗菌活性を保持しつつ、痙攣誘発などの副作用を軽減したニューキノロンであるが、血中半減期が 5.4 時間、AUC も $2.78 \mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{ml}$ と短いことが *in vitro* 活性が弱かった原因と考えられる。

4) GRNX は、7 位にベンゾピロール基、6 位のフッ素を水素に置換し既存ニューキノロンと異なる構造式を持ち、光毒性、痙攣誘発などの副作用の最も少なくニューキノロン中唯一小児にも使用でき、MRSA, VRE, キノロン耐性に対応するニューキノロンとして開発された薬剤であるが、LVFX と同程度抗らい菌活性であったことは、皮膚末端までの組織移行性、代謝安定性、高い蛋白結合率が原因と考えられる。

5) FA の *in vitro* 活性 SPFX や MINO に匹敵する抗らい菌活性を示したが、*in vivo* 活性は 70mg/kg でも不完全抑制であった。今後、投与量を増やすかマウス足蹠法を検討している。

6) OFLX 耐性らい菌 (Zensho-4 株 : OFLX 150 mg/kg で不完全抑制) に対し WQ-3402, STFX, MFLX に 8~16 倍強い *in vitro* 抗らい菌活性を認めた。OFLX の *in vitro*, *in vivo* 抗らい菌活性は弱く、低度キノロン耐性と考えられ、抗ら

い菌活性の強い WQ-3402, STFX, MFLX の臨床使用が示唆された。ヌードマウス足蹠法で、OFLX 耐性らい菌 (Zensho-4) に対する SPFX は、40mg/kg で完全抑制し、部分交差耐性であることを認めた。

7) ニューキノロンの化学構造と抗らい菌活性の相関キノロン骨格 1 位 : cyclopropyl > F2C6H5 > C2H5, 3 位 : COOH, 4 位 : O(oxo), 7 位 : 5 員環または 6 員環, 8 位 : F > Cl \geq OCH3 > CH₃, N であることが、強い抗らい菌活性を示した。

5. 細胞性免疫反応は、抗酸菌感染症に対する生体防御反応の中心的役割を果たす。細胞性免疫賦活能を有する抗原の同定は、ハンセン病に対するワクチンの開発に直接的に結びつく。本研究においては、らい菌に対して強い細胞性免疫反応を示す少菌型患者血清と、抗原性に富むらい菌細胞膜を用いてワクチン候補分子の同定を試みた。その結果として MMP-II が同定された。MMP-II は、1990 年に major native protein として同定され、1994 年 Bacterioferrin と同一分子であることが明らかにされたが、その抗原性、特に細胞性免疫賦活能については未検索のまま放置されてきた。本研究を通じ、MMP-II は DC を活性化・成熟化し、IL-12 を産生し、またマクロファージを刺激し IL-10 を産生させた。さらに、DC に MMP-II をパルスすると、自己の T 細胞を活性化・タイプ 1 CD4 陽性およびタイプ 1 CD8 陽性 T 細胞を活性化した。これらのことは、MMP-II は自然免疫 (innate immunity) および獲得免疫 (adaptive immunity) の両者を活性化することを示すものである。自然免疫の活性化には抗原提示細胞上の TLR2 が MMP-II ligand として作用している可能性が強く示唆された。T 細胞を MMP-II パルス樹状細胞で刺激する際、樹状細胞上の MHC 抗原あるいは CD86 抗原、または MMP-II 抗原に対するモノクローナル抗体を用いて被覆すると T 細胞の活性化は抑制されたことより、T 細胞の活性化は抗原特異的であることが判明した。さらに、MMP-II パルス樹状細胞はメモリー 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 は目的とした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。さらに、樹状細胞によるナイーブ T 細胞の活性化の程度を正常健康者と少菌型ハンセン病患者との間で比較検討すると、両者はほぼ同程度であった。一方、メモリー T 細胞について両者で比較すると、少菌型ハンセン病患者 T 細胞は、正常者 T 細胞に比し明らかに強い IFN- γ 産生を示した。これらのことから、患者 T 細胞はらい菌感染を受けたために、*in vivo* で MMP-II 抗原により感作されていると考えられた。以上より、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。一方、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、ゆっくりと増殖しハンセン病を発症させる。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 ϕ) 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 MMP-II をその表面に発現し、さらに HLA-DR および CD86 抗原の発現を増強させ、CD4 陽性 T 細胞を刺激し IFN- γ 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- γ 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。

6. LpK の N 末端の脂質付加領域を含む LpK の 60 アミノ酸が末梢単球及び樹状細胞活性化に関わっていることが明らかとなった。LpK の C 末端 192 アミノ酸を含む蛋白は全く抗原提示細胞も刺激せず、T 細胞活性にも関与していなかった。LpK または N-LpK (1) は TLR2 の関与によって、T 細胞を刺激することが明らかとなった。従って、LpK の活性中心は、N 末端の脂質付加領域を含む 60 アミノ酸に存在した。LpK の N 末端合成リポペプチド lipoK は樹状細胞を刺激し、IL-12 の産生を誘導するなど、樹状細胞を活性化した。lipoK は TLR2 を認識し、樹状細胞の抗原提示能を増強し、T 細胞を活性化した。このことは、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。さらに、lipoK は樹状細胞と同様にマクロファージも TLR2 を認識して活性化した。lipoK はマクロファージ表面に発現し、抗原提示に関わる抗原の発現程度には、大きな役割を及ぼさなかったが、Th 1 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、その結果として、lipoK でパルスしたマクロファージは T 細胞を強く活性化した。このことから、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うる可能性があると思定された。

7. L 型ハンセン病患者の病巣局所において、IL-12R β 2 mRNA 発現量が低いという現象は、ハンセン病の免疫病理から考えると大変納得できる。事実、Kim らは、L 型ハンセン病患者の病巣局所における IL-12R β 2 分子の遺伝子発現は