

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

ハンセン病の啓発と難治症例に対する  
予防・診断・治療に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 向井 徹

平成20(2008)年3月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

ハンセン病の啓発と難治症例に対する予防・診断・治療に関する研究

向井 徹..... 1

### II. 分担研究報告書

1. ハンセン病の分子疫学・生活用水中のらい菌

松岡 正典..... 1 1

2. 啓発普及および難治性ハンセン病治療薬の開発

儀同 政一..... 1 5

3. 宿主内におけるらい菌の殺傷および菌増殖機構に関する研究

福富 康夫..... 2 3

4. 免疫原性機能低下を凌駕する細胞性免疫賦活法の開発

前田 百美..... 3 1

5. 免疫機能亢進抗原の開発

向井 徹..... 3 7

6. 難治性ハンセン病に対する免疫療法の開発

牧野 正彦..... 4 3

7. 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..... 5 1

8. ハンセン病診療のネットワーク構築に関する研究

石井 則久..... 5 7

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 6 1

IV. 研究成果の刊行物・別刷----- 6 3

厚生労働科学研究費補助金

(新興・再興感染症研究事業)

ハンセン病の啓発と難治症例に対する  
予防・診断・治療に関する研究

平成 19 年度 総括研究報告書

主任研究者 向井 徹

(国立感染症研究所 ハンセン病研究センター)

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

総括研究報告書

ハンセン病の啓発と難治症例に対する予防・診断・治療に関する研究

主任研究者 向井 徹 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 病原微生物部 室長

研究要旨 ハンセン病は、WHOのMDT療法により、登録患者の減少をみている。しかし、多剤耐性らい菌の出現や、免疫不全を伴い再発・再燃を繰り返す難治性ハンセン病の対策等が新たな問題として浮上している。これら諸問題の解決を目指し研究を行った。その結果、ハンセン病の分子疫学では、流行地生活用水中に生活性を持つらい菌を検出した。難治性ハンセン病治療薬の開発では、DC159a および MFLX の強い抗らい菌活性を示した。宿主内におけるらい菌の殺傷および菌増殖機構の解析では、M-CSF 型ヒトマクロファージでは、phox 発現がらい菌殺傷に関与することを示した。ワクチン・免疫療法の開発では、らい菌リポペプチド LpK が、パーフォリンおよびグランザイム B 産生を強く誘導することを示した。また、uerase 破壊 BCG(ΔUT 1 1) を作製し、これは、親株に比較し各種免疫誘導を強く引き起こすことを示し、ΔUT 1 1 より薬剤耐性遺伝子を除去し、らい菌由来蛋白を発現させた。サルでのハンセン病モデル開発と新規ワクチンの有効性評価では、1頭のサルに、リンパ球幼若化反応および PGL 抗体価が継続して観察され、らい菌由来蛋白に対する IFN $\gamma$  産生の持続より、菌の持続感染が示唆された。ハンセン病診療のネットワーク構築では、医療者向けおよび回復者向けパンフレットの作製・配布、皮膚科医等を対象としたハンセン病の講習会を開催した。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と考えられた。

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  
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  
福富康夫 国立感染症研究所  
ハンセン病研究センター 室長  
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  
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  
寺尾恵治 医薬基盤研究所  
霊長類医科学研究センター 特別研究員  
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

A. 研究目的

ハンセン病は、WHOにより推進されたMDT療法により、登録患者数は、減少を示してきた。しかし、新規ハンセン病患者は、今なお世界では年間二十数万人を数え、減少傾向を未だ示していない。さらに、多剤耐性らい菌の出現や、免疫不全を伴い再発・再燃を繰り返す難治性ハンセン病の対策が新たな問題として浮上している。そのため、感染経路の解明、新規治療薬の開発、免疫療法・ワクチン開発が必要と考えられる。また、わが国におけるハンセン病症例は極めて少ないため、医師、医学生や医療従事者等に対するハンセン病に関する知識の啓発・教育の必要性が存在する。これら諸問題の解決を目指し以下の研究を行った。

1. ハンセン病の分子疫学(松岡)
2. 啓発普及および難治性ハンセン病治療薬の開発(儀同)
3. 宿主内におけるらい菌の殺傷および菌増殖機構の解析(福富)
4. 免疫原性機能低下を凌駕する細胞性免疫賦活法の開発(前田)
5. 免疫機能亢進抗原の開発(向井)
6. 難治性ハンセン病に対する免疫療法の開発(牧野)
7. 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)
8. ハンセン病診療のネットワーク構築(石井)

## B. 研究方法

1. ハンセン病流行地域にて多くのらい菌の存在が示された井戸から検体を採取した。遠心操作により、20mlの検体を1mlに濃縮し、Ziehl-Neelsen染色を行った。さらに遠心を行い、その沈渣からReverse Transcription-PCR (RT-PCR)を行った。多くの菌を含んでいた井戸水を濾過あるいはPBSに浮遊した菌を30℃または37℃に放置し、Buddemeyer法を行なった。
2. らい菌は、標準株としてThai-53株、多剤耐性菌としてZensho-4株を用いた。in vivo法として、Shepard法を、in vitro法としてBuddemeyer法により抗菌活性を測定した。抗菌薬：DC-159a、rifabutin, moxifloxacin, sparfloxacin, gatifloxacin, levofloxacin,は、各製薬会社から原末の提供を受けた。minocycline, rifampicin は、市販品を用いた。
3. らい菌感染マクロファージの可溶化により菌を得、radiorespirometryにて菌の代謝活性を測定および抗酸菌染色、各種抗体によるウエスタンブロットングを行った。
4. 樹状細胞は正常健常者ヒト末梢血より分化誘導したのち、抗原またはらい菌でパルスし、その抗原提示能を自己T細胞の活性化(IFN $\gamma$  IL-2産生)を指標に分析した。パーフォリン、グランザイムB産生T細胞は、FACS Caliburを用い定量した。
5. 昨年度作製した ureC 遺伝子破壊株( $\Delta$ UT-11)へ、pYUB870を導入し、カナマイシン選択により生育してきたコロニーより、ハイグロ耐性遺伝子の除去されたものを選択し、その後、カナマイシン無添加培地により数代継代を続け、pYUB870プラスミド脱落株( $\Delta$ UT11-3)を選択した。各種分泌型プラスミドの構築は、HSP70、Ag85B 分泌シグナル、らい菌 MMP II 各遺伝子を基にpMV261を用い構築し、 $\Delta$ UT11-3株へ遺伝子導入後、Sauton 培地にて培養後、上清を濃縮し、ウエスタンブロット法により菌体外分泌の確認を行った。
6. 正常健常者末梢血よりM-CSFによりマクロファージ(M-M $\phi$ )を分化誘導した。BCG- $\Delta$ UTのCD4陽性T細胞活性化能は、感染後M-M $\phi$ と自己のCD4陽性T細胞を混合培養し、上清中IFN- $\gamma$ を測定した。レスポンダー細胞として用いたCD4陽性T細胞は、末梢血単核球より精製した。M-M $\phi$ の抗原提示能を増強させる補助因子として、リコンビナント GM-CSF $\cdot$ CD40 リガンド $\cdot$ リコンビナント IFN- $\gamma$ を検討した。また、IFN- $\gamma$ レセプター $\alpha$ 鎖に対する抗体を用いて、IFN- $\gamma$ の補助因子としての役割を検討した。マクロファージの表面抗原の発現程度の解析は、FACSCaliburを用いた。
7. 幼若カニクイザル6頭を3群に分け、らい菌を鼻腔内、鼻先端部、左手根部にそれぞれ2頭ずつ接種した。らい菌接種前、接種後三年間にわたり2ヶ月月間隔で採血し、定法に従ってリンパ球を分離した。FACSにより主要リンパ球サブセットレベルを測定した。サイトカインの誘導は、リンパ球

を4種のらい菌由来ペプチドと混合して培養上清中のサイトカインを測定した。

8. ハンセン病診療に欠けている要素を抽出し、それらを補う資料や情報を提供する。また、ハンセン病の新規患者については、実際に診療方法、検査方法を指導し、主治医がハンセン病を理解し、自ら診療可能になるようにした。

#### (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

1. 菌液を作成した直後の無処理らい菌は  $4.5 \times 10^2/25 \mu\text{l}$  PCR 反応まで PCR 陽性となった。  $2.0 \times 10^7$  個のらい菌の Buddemeyer 法による CPM 値は  $54,482 \pm 5616$  であったのに対し、 $37^\circ\text{C}$  で保存した検体の CPM 値は  $286 \pm 17.2$  であり、有意に低い値を示した。検査した水の 33 検体中 14 検体が RT-PCR 陽性となり、それらの水にはらい菌が生存していることが示された。RT-PCR 陽性を示した井戸水の水温は  $29.7 \pm 0.6^\circ\text{C}$  であった。

2. らい菌 Thai-53 株に対する DC-159a の抗らい菌活性は、DC-159a > MFLX > SPFX > GFLX > LVFX の順で、RFB の抗らい菌活性は RFB ≫ RFP > MFLX の順で、DOXY の抗らい菌活性は、

MFLX > CAM > MINO > DOXY の順であった。多剤耐性らい菌に対する抗らい菌活性は DC-159a > MFLX > SPFX、RFB > RFP の順であった。

Zensho-4 株に対する DC-159a の抗らい菌活性は、Thai-53 株に対する MFLX とほぼ同等の強い抗らい菌活性を示した。また RFB は RFP と交差耐性を認めた。

3.  $35^\circ\text{C}$  で培養したらい菌感染ヒト M-マクロファージにおいて phox タンパクの発現を Western blot 法により調べたところ、IFN  $\gamma$  添加により p22-phox の発現が著明に増加した。さらに、M-マクロファージと GM-マクロファージを比較したところ、M-マクロファージでは IFN  $\gamma$  刺激で p22-phox 発現が増強した。次に、M-マクロファージ菌ならびに IFN  $\gamma$  で刺激した結果、p22-phox の発現はある程度増強したが p47-phox は IFN  $\gamma$  刺激により著明に増強し、また、らい菌刺激によりさらに発現が増強した。

4. CTL 活性に重要なパーフォリンまたはグランザイム産生機構を解明する事を試みた。LipoK をらい菌感染樹状細胞にパルスすると、自己の CD8 陽性 T 細胞内パーフォリン産生能が増加した。LipoK 存在下では、蛋白分解酵素であるグランザイム B 産生細胞数も増加した。らい菌のみではパーフォリンまたはグランザイムが産生されないことから、脂質部分を持つ LipoK が TLR2 を介し、これら物質の産生に重要な役割を果たしていると考えられた。CTL 活性に、CD4 陽性細胞の共存は必須であるかを確認するため、培養インサートを用いて実験を行った。その結果、CD4 陽性細胞との間接的共存培養が必要であると考えられた。リコンビナント IL-2 を大量 (100U/ml) に樹状細胞-CD8 陽性 T 細胞培養中に添加すると CD4 の不足が補えることが明らかとなった。

5. pYUB870 を導入し、カナマイシンプレートに生育したコロニーより、ハイグロマイシン遺伝子の除

去された株を選択し、カナマイシン無添加培地に数代継代することにより、pYUB870 脱落株、ΔUT11-3クローンを樹立した。本株へ、各種発現プラスミドを遺伝子導入し、菌体中および菌体外へも蛋白の発現・分泌が確認された。ウエスタブロットの解析では、HSP70とMMP IIの融合型が、高い分泌効率を示した。しかし、分泌シグナルの有無により、MMPIIの発現に差は認められなかった。

6. BCG-ΔUTを正常健常人由来のM-MØに感染させた際の自己CD4陽性T細胞活性化能を検討した。BCG-Tokyoを同様にM-MØに感染させ比較検討すると、BCG-ΔUTはBCG-Tokyoに比し有意に強くCD4陽性T細胞を活性化させ、IFN-γの産生を誘導した。IFN-γ量は50 pg/ml程度であって期待した程の成果は得られなかった。BCG-ΔUTとBCG-Tokyoのマクロファージからの各種サイトカイン産生誘導能を比較検討した。その結果、BCG-ΔUTはIL-10のみならずGM-CSF・TNFα・IL-1βの産生をより強く誘導した。マクロファージを予めGM-CSFで前処理した後BCGを感染させたところ、BCG-ΔUTを用いた場合のみT細胞は著しく強く活性化された。マクロファージ表面抗原の発現程度の変化は、BCG-ΔUTはBCG-Tokyoに比し有意に強くCD14およびCD40抗原の発現を増強させ、CD40Lで処理したところ、BCG-Tokyo感染M-MØに比し強くT細胞活性化能が増強した。M-MØを外因性IFN-γで処理しても、M-MØのT細胞活性化能は著しく増強されたが、IFN-γによる増強はBCG-ΔUTを用いた時のみ観察された。

7. らい菌接種後26ヶ月から34ヶ月の間では、主要リンパ球サブセットレベルには特に著しい変化が認められなかった。LpKとFAPで刺激した場合にのみIFNγの産生が誘導されること、#002と#007の2頭でのみ高レベルのIFNγ産生が認められることが明らかとなった。一方、FAPで誘導さ

れるIFNγは、#007でのみ28ヶ月目から34ヶ月目まで継続して高レベルのIFNγが検出された。らい菌接種前(Pre)のリンパ球をLpKおよびFAPで刺激した場合の幼若化反応とIFNγ産生量との相関を調べてみた。その結果#002と#007ではいずれもLpKで誘導されるIFNγ産生量が高いが、#002ではPreでの幼若化反応が高いレベルにある。一方、#007はPreでの幼若化反応が陰性(SI<2.0)で、かつLpK刺激およびFAP刺激で高レベルのIFNγを産生する唯一の個体であることが明らかとなった。

8. ハンセン病患者の減少のため、皮膚科医が診療する機会が殆ど無い。ハンセン病診療するにあたり、回復者の心情を理解し、皮膚スミアテスト検査実施は必須であるため、講習会を実施した。ハンセン病診療の書として作成した「ハンセン病アトラス診断のための指針」も配布した。

ハンセン病回復者は、過去の偏見・差別の歴史から、なかなか一般医療機関に受診する勇気がない。一般医療機関受診のチャンスを広げるため、ハンセン病患者(回復者)向けパンフレットと医療者向けパンフレットを関係機関に配布し活用を依頼した。

2007年には11名の新規ハンセン病患者がいた。全ての患者について、主治医に対して診療及び検査の指導を行った。

#### D. 考察

1. 流行地域の井戸水を、菌の生死を判定するRT-PCR法により調査し、感染源としての意義を検討した。その結果、33検体中14検体に生きたらい菌が存在することを示した。これらが感染源となっていることが強く示唆された。

井戸水の温度は約30℃で、至適増殖温度に近い値であり、それらの場所がらい菌の増殖に適していることが示された。

2. ハンセン病は、DDSとRFP耐性が増加しつつあ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。特に殺菌作用を示す新規ニューキノロン系とリファマイシン系抗菌薬の開発は重要である。DC-159a に Buddemeyer 法で、既存ニューキノロン中で最も強い MFLX より強い抗らい菌活性を認めた。DC-159a は、光線過敏症や中枢神経系の副作用を軽減、非ステロイド性抗炎症薬やテオフィリンとの相互作用が低く、ハンセン病の治療に貢献すると考える。RFB は、リファマイシン系抗菌薬の中で抗らい菌活性が最も強い薬剤で、血中半減期が長いことから、治療期間の短縮、間欠併用療法への導入が期待される。多剤耐性らい菌(Zensho-4 株)に対し DC-159a はキノロン耐性菌に対し交差耐性を示さず、多剤耐性患者に対する臨床使用が示唆された。RFB の RFP 高度耐性らい菌に対する抗らい菌活性は、交差耐性であることを認めた。

3. 二種類のCSFで誘導されたマクロファージの抗らい菌活性について、M-CSFで誘導されたM型マクロファージの方がGM-CSFで誘導されたGM型マクロファージより活性が高かったのは非常に興味のあるところである。以前よりマクロファージの産生するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>やスーパーオキシドが殺菌作用を有することが報告されている。ヒトM-マクロファージのIFN $\gamma$  刺激でいくつかのphoxタンパクが著明に増強することが判明した。SODはスーパーオキシドをスカベンジする酵素であるがSODの発現は変化しなかったことから、IFN $\gamma$  添加によりphox発現が著明に増加することがTT型ハンセン病にみられるような殺菌作用の増強につながることを示唆された。

4. LipoK は、樹状細胞を成熟し、らい菌抗原をT細胞に提示することによって免疫応答を引き起こすことを明らかにしてきた。さらに LipoK は TLR2 を認識し、パーフォリン及びグランザイム B を分泌する CD8 陽性 T 細胞数増加を促進した。そのため、CD4 陽性 T 細胞の存在は重要であった。このことから、LipoK は、らい菌感染樹状細胞を活

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。

5. BCGの遺伝子破壊は、薬剤耐性遺伝子と標的遺伝子の置換により行われる。将来のワクチンとしての使用を考慮した場合、極力取り除くことが望ましい。また、各種プラスミドを用いて、抗原性の検討を行うには、薬剤耐性遺伝子の使用自由度を確保することになる。今回、構築された $\Delta$ UT 11-3は、選択に用いたハイグロマイシン耐性遺伝子を取り除いたため、Hsp70融合蛋白発現プラスミドにハイグロマイシン耐性遺伝子の使用が可能であった。今後の抗原検討に、ハイグロマイシンの使用を可能にし、安定した実験系が構築できるものと考えられた。

6. 今回明らかになったように BCG- $\Delta$ UT と BCG-Tokyo の間においても IFN- $\gamma$  に対する感受性は大きく異なっていた。このことは、抗酸菌の種類によって IFN- $\gamma$  感受性はそれぞれ異なっており、BCG- $\Delta$ UT が非常に強い感受性を示したことは、ウレアーゼの欠損によりライソゾームとファゴゾームの融合が促進されやすい環境になっていたことがその一因である可能性が考えられる。

7. IL-12がMMP II刺激により上昇しないことより、少なくとも MMP-II はらい菌の持続感染を評価する指標とは成り得ないこと、また、IL-12 の検出では、らい菌感染で誘導される特異性の高い免疫の標的となるペプチド絞り込むことが不可能であると判断した。#007 では、らい菌接種後3種のペプチド(LpK、MMP-II、FAP)すべてに対するリンパ球幼若化反応が二年間にわたり持続すると同時に、感染直後から休止期記憶CD4 陽性T細胞と考えられる CD29high 細胞レベルが増加し、二年間高レベルを維持したことから、持続感染の可能性が高い。今後はらい菌ペプチドで誘導されるリンパ球および抗原提示細胞の反応性を詳細に検討する予定である。

8. ハンセン病患者が減少し、診療する機会が減少し、診療機会がない皮膚科医が大多数を占め、歴史やハンセン病回復者の心情なども理解できていない。そのために、講習会を開催し、意識向上に努めた。皮膚科医は知識吸収の意欲はあり、年に一回程度の継続した教育機会を設けることが必要である。

ハンセン病回復者を一般医療機関に受診させる(インテグレーション)事は難しいが、一步でもそれに近づける努力は必要である。これらの皮膚科医を起点として他の診療科などに受診できることを期待したい。

ハンセン病の新規患者は減少しているが、日本人患者については、ハンセン病を鑑別に入れることは難しく、診断が遅れる場合がある。必ず鑑別に「ハンセン病」を入れることが必要である。

#### E. 結論

1. ハンセン病の流行地においては住民が使用する生活用水中に生きたらい菌が存在することが示され、そこからの感染が強く示唆された。

2. DC-159a は、ニューキノロン中最も強い抗らい菌活性を示し、OFLX 耐性らい菌に対し交差耐性を示さずキノロン耐性患者への応用が示唆された。RFB は、RFP より 16~64 倍強い抗らい菌活性を示したことから、患者負担軽減のため治療期間の短縮、間欠併用療法への導入が示唆された。多剤耐性らい菌に対し交差耐性を認めた。

3. IFN $\gamma$  存在下で培養した M-CSF 誘導マクロファージに抗らい菌活性が誘導され、この時スーパーオキシドを産生する NADPH オキシダーゼの発現が増強していることが判明した。一方、マウスマクロファージにおいては酸化窒素が殺菌分子として重要であるが、ヒトマクロファージにおいては酸化窒素の関与は少ないことが判明した。

4. リポペプチド LipoK は、CD4 陽性 T 細胞存在

下で、CTL 活性を誘導しパーフォリン産生を促し、グランザイム B の分泌を促した。これら物質は感染細胞を破壊するために、重要であると考えられる。したがって、LipoK は免疫療法分子として活用し、さらに、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。

5. 免疫原性の向上した BCG 株の改良を目指し、urease C 破壊 BCG 株を樹立し、薬剤耐性遺伝子の除去を行い、各種らい菌蛋白分泌プラスミド発現株を構築した。

6. ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG は、GM-CSF $\cdot$ CD40 リガンド $\cdot$ IFN $\gamma$  存在下で自己 CD4 陽性 T 細胞を強く活性化する免疫療法剤として有効である可能性が示唆された。

7. らい菌の持続感染モデル成立の有無を抗酸菌由来ペプチドで誘導される末梢リンパ球のサイトカイン産生能を指標として調査した結果、IL-12 と IFN $\gamma$  がペプチド刺激した培養上清中に検出されたが、らい菌感染で誘導される免疫の標的エピトープとしては FAP が最も特異性の高いペプチドであることが判明した。らい菌が持続感染している可能性の高いカニクイザルについてリンパ球及び抗原提示細胞の機能を解析し、ヒト患者の免疫応答との類似性を明らかにしてゆく必要がある。

8. ハンセン病診療を皮膚科医が主体的に実施するためのネットワーク作りは、まだ始まったばかりであるが、皮膚科医の教育、ハンセン病回復者の一般医療機関への受診の動きを、引き続き行うことが重要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuoka M., Budiawan T., Khin S A., Kyaw K., Tan EV., dela Cruz EC., Robert Gelber R., Paul Saunderson P., Balagon MV, and Pannikar V. The frequency of drug resistance mutations in *Mycobacterium leprae* isolates in untreated and relapsed leprosy patients from Myanmar, Indonesia and the Philippines. *Lepr. Rev.* 78, 343-352. 2008
- 2) Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and T. Mukai. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. *Microbes and Infect.*, 9:70-77, 2007.
- 3) Maeda, Y., T. Mukai, M. Kai, Y. Fukutomi, H. Nomaguchi, C. Abe, K. Kobayashi, S. Kitada, R. Maekura, I. Yano, N. Ishii, T. Mori, and M. Makino. Evaluation of major membrane protein-II as a tool for serodiagnosis of leprosy. *FEMS Microbiol. Lett.*, 272:202-205, 2007.
- 4) Kai, M., Y. Fujita, Y. Maeda, N. Nakata, S. Izumi, I. Yano, and M. Makino. Identification of trehalose dimycolate (cord factor) in *Mycobacterium leprae*. *FEBS Lett.*, 581:3345-3350, 2007.
- 5) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, N. Nakata, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. Characterization of the fucosylation pathway in the biosynthesis of glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium* complex. *J. Bacteriol.*, 189:5515-5522, 2007.
- 6) Duthie, M. S., W. Goto, G. C. Ireton, S. T. Reece, L. P. V. Cardoso, C. M. T. Martelli, M. M. A. Stefani, M. Nakatani, R. C. de Jesus, E. M. Netto, M. V. F. Balagon, E. Tan, R. H. Gelber, Y. Maeda, M. Makino, D. Hoft, and S. G. Reed. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin. Vaccine Immunol.*, 14:1400-1408, 2007.
- 7) Kawakami T, Tsutsumi Y, Mizoguchi M, Ishii N, Soma Y: Leprosy with hepatic involvement. *Int J Dermatol* 46: 348-349, 2007.
- 8) 石井則久、永岡 譲、森 修一、鈴木幸一：2006 年における世界のハンセン病の現況について。日本ハンセン病学会雑誌 76: 19-28, 2007.
- 9) 森 修一、石井則久：ハンセン病と医学 II. -絶対隔離政策の進展と確立-。日本ハンセン病学会雑誌 76: 29-65, 2007.
- 10) 石井則久、小坂真紀、永岡 譲：ハンセン病の診断・治療-最近のトピックス。MB デルマ 127: 59-654, 2007.
- 11) 石井則久、鈴木幸一、竹崎伸一郎、永岡 譲：皮膚スミア検査のアンケート調査結果。日本ハンセン病学会雑誌 76: 227-232, 2007.
- 12) 石井則久、永岡 譲：Hansen 病。診断と治療 95: 1591-1596, 2007.
- 13) 石井則久：ハンセン病。Visual Dermatology 6: 1188-1189, 2007.
- 14) 永岡 譲、石井則久：ハンセン病。Visual Dermatology 6: 1266-1271, 2007.
- 15) 石井則久：ハンセン病の現況。日本皮膚科学会雑誌 117: 2226-2227, 2007.
2. 学会発表
- 1) E. Tan, M.V., Balagon, E., de la Peña and Matsuoka M. A simple method of detecting drug

resistant mutant in *Mycobacterium leprae* by DNA hybridization. The Symposium on Remaining Challenges in Leprosy, Kathmando, Nepal. September, 2007

2) Matsuoka M., Lopez Roa R.I., Budiawan T., Kyaw K. and Chae G.T. Genotypic Analysis of *Mycobacterium leprae* isolates from Japan and other Asian countries reveals a global transmission pattern of leprosy. 42th US-Japan conference on Tuberculosis and Leprosy. Zhenzhou, China, September, 2007

3) Matsuoka M. Khin SA., Kyaw K., Tan EV., Balagon MV., Saunderson P., Makino M., Nakajima C. and Suzuki Y. A simple methods for detecting drug resistant *Mycobacterium leprae* based on DNA microarray. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress. Hyderabad, India, February 2007

4) Matsuoka M. Molecular biological techniques for detecting drug resistance. Symposium on Chemotherapy and drug resistance. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress. Hyderabad, India, February 2007

5) 松岡正典、鈴木定彦、Esterina Tan, Khin Saw Aye: 薬剤耐性らい菌の簡易検出法の開発地上国への移転とそれによる耐性菌の伝播調査. 第80回日本ハンセン病学会総会、横浜市、2007年5月

6) 儀同政一 松岡正典、: Moxifloxacin と Garenoxacin の抗らい菌活性. 第80回日本ハンセン病学会総会、横浜市、2007年5月

7) 向井徹、和泉眞蔵、宮本友司、Cita Rosita, Indropo Agusuni、松岡正典、牧野正彦: LAMP 法によるらい菌遺伝子検出の応用. 第80回日本ハン

セン病学会総会、横浜市、2007年5月

8) 和泉眞蔵、Indropo Agusuni、Cita Rosita、松岡正典、向井徹: ハンセン病濃厚流行地健康住民血中からのらい菌の検出. 第80回日本ハンセン病学会総会、横浜市、2007年5月

9) Sitti Nur Rahmah、佐藤直哉、藤村響男、与儀ヤス子、松岡正典、増澤幹男、藤岡憲生: 各種培養ヒト気道上皮細胞に対するらい菌 mce1A 領域と結核菌 mce1A 領域との侵入活性の異同. 第80回日本ハンセン病学会総会、横浜市、2007年5月

10) 松岡正典: ハンセン病の分子疫学第4回地域分子疫学研究会、清瀬市 2008年1月

11) 儀同政一: Moxifloxacin, garenoxacin の抗らい菌活性、第80回日本ハンセン病学会総会、2007. 横浜

12) 儀同政一: 新規ニューキノロン系抗菌薬の構造と抗らい菌活性の相関、第55回日本化学療法学会総会 2007, 仙台

13) 福富康夫・前田百美・牧野正彦: ハンセン病におけるマクロファージのサイトカイン産生調節機構、第80回日本細菌学会総会、大阪、2007年3月

14) 前田百美、田村敏生、福富康夫、牧野正彦、らい菌由来リポ蛋白の抗らい菌生体防御反応に及ぼす影響、第80回日本細菌学会総会 2007年3月、大阪

15) 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とcaspase活性化、第80回日本ハンセン病学会総会、横浜、2007年5月

16) Kai, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi and M. Makino: Search for *Mycobacterium leprae*

antigens for sero-diagnosis. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, Jan 30- Feb 4, 2008.

17) Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, T. Mukai, and T. Mori. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42<sup>nd</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.

18) Mukai, T., S. Izumi, C. Rosita, I. Agusni, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Detection of *M. leprae* DNA in nasal swab samples by LAMP method. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42<sup>nd</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.

19) Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. Clofazimine-induced cell death in macrophages. 17<sup>th</sup> International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.

20) Kai. M., N. P. N. Ha, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, Y. Maeda, T. Mukai, N. T. Tan, and M. Makino. Application of new serological test for leprosy in Vietnam. 17<sup>th</sup> International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.

21) Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, M. Kai, and M. Makino. Lipopeptide (LipoK) of *Mycobacterium leprae* activated antigen presenting cells and type 1 T cells. 17<sup>th</sup> International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.

22) Makino, M., Y. Maeda, M. Matsuoka, and T. Tamura. Inhibition of the multiplication of *Mycobacterium leprae* vaccination with a recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *M. leprae*. 17<sup>th</sup> International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.

23) Maeda, Y., M. Kai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Utility of MMP-II for diagnosis of leprosy. 17<sup>th</sup> International Leprosy Congress, Pre-workshop, New Diagnostics and Molecular Epidemiology, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.

24) Kai, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and M. Makino. Search for *Mycobacterium leprae* antigens for sero-diagnosis. 17<sup>th</sup> International Leprosy Congress, Pre-workshop, Future Research Needs, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.

25) 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. ハンセン病におけるマクロファージのサイトカイン産生調節機構. 第80回日本細菌学会総会 2007年3月 大阪

26) 前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. らい菌由来リポ蛋白の抗らい菌生体防御反応に及ぼす影響. 第80回日本細菌学会総会 2007年3月 大阪

27) 宮本友司, 向井 徹, 前田百美, 甲斐雅規, 中田 登, 中 崇, 矢野郁也, 牧野正彦. 抗酸菌糖脂質生合成における fucose 転移酵素遺伝子の解析. 第80回日本細菌学会総会 2007年3月 大阪

28) 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と caspase 活性化. 第80回日本ハンセン病学会総会・学術大会

2007年5月 横浜

29) 甲斐雅規, 倉繁昌浩, 松原久美子, 中田 登, 牧野正彦. 変異検出におけるダイレクトシーケンスとクローン化シーケンスの相違. 第80回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2007年5月 横浜

30) 向井 徹, 和泉眞蔵, 宮本友司, Cita Rosita, Indropo Agusni, 松岡正典, 牧野正彦. LAMP法によるらい菌遺伝子検出の応用. 第80回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2007年5月 横浜

31) 下袴田陽子, 田村敏生, 牧野正彦, 高津聖志. 結核菌分泌蛋白による Th1 分化誘導機構の解析: TCR による抗原認識の役割. 第90回日本細菌学会関東支部総会 2007年10月 東京

32) 宮本友司, 向井 徹, 前田百美, 甲斐雅規, 中田 登, 中 崇, 矢野郁也, 牧野正彦. *Mycobacterium avium* complex における fucose 含有糖脂質抗原の生合成解析. 第90回日本細菌学会関東支部総会 2007年10月 東京

33) 福富康夫, 牧野正彦 ヒトマクロファージにおける抗らい菌活性誘導. . 第37回日本免疫学会総会 2007年12月 東京

34) 寺尾 恵治, カニクイザルのらい菌持続感染モデル開発の試み, 第23回日本霊長類学会大会, 7月14日-16日, 2007年, 彦根市

35) 石井則久: ハンセン病の現況. 第106回日本皮膚科学会総会教育講演「ハンセン病: 基礎から臨床まで」, 横浜, 2007年4月.

36) 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: 2006年のハンセン病新規患者発生状況. 第80回日本ハンセン病学会総会, 横浜, 2007年5月.

37) 谷川和也, 川島 晃, Huhehasi Wu, 三島眞代, 武下文彦, 鈴木幸一, 石井則久: らい菌感染マクロファージ内における菌の寄生と排除に関わる分子機構の相互作用. 第80回日本ハンセン病学会総会, 横浜, 2007年5月.

38) 谷川和也, 赤間 剛, 川島 晃, Huhehasi Wu, 三島眞代, 石井則久, 高橋伸一郎, 生山祥一郎, 鈴木幸一: らい菌感染マクロファージにおける細胞内脂質蓄積分子機構に関する研究. 第48回日本組織細胞化学会総会, 第39回日本臨床分子形態学会総会合同学術集会, 甲府, 2007年9月.

39) 北村真人, 藤井紀和, 吉田未征, 藤本徳毅, 植西敏浩, 田中俊宏, 石井則久: DIC を合併し, らい反応の関与が疑われたハンセン病の一例. 第58回日本皮膚科学会中部支部学術大会, 京都, 2007年10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）

ハンセン病の分子疫学・生活用水中のらい菌

平成 19 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）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

ハンセン病の分子疫学・生活用水中のらい菌

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：抜本的な新規の感染防止策構築のために、らい菌の遺伝子型別を応用して検討を行なった結果、家族内多菌型患者以外の感染源が存在し、生活用水が感染源となっていることが強く示唆された。昨年度の生活用水中のらい菌の定量に続いて、そこに存在するらい菌が生きた菌であるか否かについて、Reverse Transcription PCR によって検討した結果、33 検体中 14 検体に生きたらい菌が存在することを示す、16SrRNA の存在が認められた。流行地における生活用水からの感染が強く示唆された。

A. 研究目的

抜本的ハンセン病感染防止策構築のために感染源を含めたハンセン病の感染様式の解明を行なってきた。らい菌の遺伝子型別の結果、また住民の血清抗体価に関する結果は、ハンセン病の感染は従来言われてきた説とは異なり、同居する多菌型患者以外の感染源の存在と、そこからの感染を示した。これまでに行った研究の結果、流行地の住民が生活用水として用いる水が感染であることが示された。Real Time-PCR の結果、そこには 1 菌体/20ml から 3,620 菌体/20ml のらい菌が生活用水に存在したことから、インドネシアの高ハンセン病有病率を示す集落から得た井戸水について、そこに存在するらい菌の生死について解析を行い感染源としての意義について検討を行った。

B. 研究方法

インドネシア、北スラベシ州に位置する島の 1 集落において、日ごろ住民が生

活に用いる井戸水のうち、昨年報告した Real Time-PCR により多くのらい菌の存在が示された井戸から 33 検体を採取した。対象とした集落は戸数 450 戸、人口 2,020 名、過去 2002 から 2004 の間には各年度 10 例、10 例、7 例の新たな感染者が登録されたハンセン病の高い有病率が記録された地域である。また一部、東ジャワ州から得た試料についても検討した。

Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) は以下の方法で行なった。遠心操作により、20ml の検体を 1ml に濃縮し、塗抹検体を作成した。Ziehl-Neelsen 染色の後に鏡検を行った。さらに遠心を行い、その沈渣から市販キット(RNeasy Minikit, QIAGEN, CA, USA) を用いて RNA を調整した。Random hexamers を用いて RT-PCR により cDNA (SuperScript First-Strand Synthesis System, Invitrogen, CA, USA) を作成し、らい菌特異的の 16s rRNA を標的とした PCR を行



い rRNA の有無を検討した。また、検体とした井戸水の温度を測定した。ヌードマウス footpad 内増殖らい菌より菌液を調整し、Rifampicin を  $8\mu\text{g/ml}$  加えた PBS に浮遊し、 $37^\circ\text{C}$  に 10 日間放置した後、Buddemeyer 法により活性を調べ、RT-PCR を行ない、不活化されたらい菌からは RT-PCR により、rRNA が検出されないことを確認した。多くの菌を含んでいた井戸水をポアサイズ  $0.22\mu\text{m}$  の Millipore filter で濾過した液(Filtrate)あるいは PBS に浮遊した菌を  $30^\circ\text{C}$  または  $37^\circ\text{C}$  に放置し、Buddemeyer 法を行なった。

検体の採取は、Dr. Teky Budiawan, TB-Leprosy program manager, North Sulawesi Province, Health Service および、Dr. Indropo Agsuni, Airlangga University の協力を得て行なわれた。

#### C. 研究結果

菌液を作成した直後の無処置らい菌は  $4.5 \times 10^2 / 25\mu\text{l}$  PCR 反応まで PCR 陽性となり、また  $30^\circ\text{C}$  に保存した菌も同様に PCR 陽性を示した。一方 Buddemeyer 法により、Rifampicin 処理した菌は完全に不活化され、 $4.5 \times 10^6 / 2.5\mu\text{l} / 25\mu\text{l}$  の検体まで PCR 陰性であった。生きた菌が RT-PCR により陽性を示すことが示され、一方不活化された菌は RNA の消失により陰性となることが示された。Filtrate に浮遊し  $30^\circ\text{C}$  で保存した  $2.0 \times 10^7$  個のらい菌の Buddemeyer 法による CPM 値は  $54,482 \pm 5,616$  であったのに対し、 $37^\circ\text{C}$  で保存した検体の CPM 値は  $286 \pm 17.2$  であり、有意に低い値を示した。

検査した水の 33 検体中 14 検体が RT-PCR 陽性となり、それらの水にはらい菌が生存していることが示された。RT-PCR 陽性を示

した井戸水の水温は  $29.7 \pm 0.6^\circ\text{C}$  であった。

#### D. 考察

ハンセン病は多剤併用療法により登録患者数は著しく減少し、新患登録数も年間約 30 万人に減少している。その一方、患者との接触歴が無いにもかかわらず発症する例、あるいは患者間で異なる遺伝子型のらい菌を保有するなどの事実から、ハンセン病の感染はこれまで言われてきたような多菌型患者を感染源とする濃厚接触のみによって起こるのではなく、住居以外からの感染が考えられ、その感染様式は充分解明されていない。多くの抗酸菌の水における存在と、そこからの感染による抗酸菌感染症の例から、ハンセン病の感染源として日頃住民が生活用水として用いる水を想定し、そこにおけるらい菌遺伝子の検索を行った結果、いくつかの井戸水がらい菌特異的 PCR 陽性となり、らい菌遺伝子が存在する水を水浴、洗濯に使用している住民の感染危険率はらい菌遺伝子陰性の水を使用する人に比し、3 倍の危険率を示したことを報告してきた。昨年度、生活用水中にどの程度の量のらい菌が存在するかについて Real Time-PCR により定量した結果、多いものでは 3,620 菌体/20ml のらい菌が存在したことから、これらが感染源となっている可能性が示された。

今年度は RNA の有無によりその生死を判定する RT-PCR 法によりそれらの菌生死について調査し、感染源としての意義を検討した。昨年度 Real Time-PCR により多数のらい菌が存在した井戸水を再度採取し、RT-PCR を行なった結果、33 検体中 14 検体に生きたらい菌が存在することを示し、また 16SrRNA の存在が認めら

れた。これらが感染源となっていることが強く示唆された。

らい菌の至適増殖温度はマウス footpad 法による増殖から、30℃前後であると言われている。また、人の場合に低体温部に病変が多く見られることから、発育には低温が適していると考えられている。今回 RT-PCR 陽性を示した井戸水の温度は約 30℃で、至適増殖温度に近い値であり、それらの場所がらい菌の増殖に適していることが示された。体外に排出されたらい菌が 2 ヶ月はマウス footpad での増殖力を保持していたことが報告されている。本実験でも 30℃に保存した菌が Buddemeyer 法により、37℃に保存したものより高い活性を示したことから、らい菌が井戸水中で生存していることが示唆された。

今後、生活用水中においてどのように増殖して感染を起こすに足る菌数が維持されるかについて検討する必要がある。また、感染源と目される生活用水中に存在するらい菌とそれを使用する住民および患者から分離されるらい菌の遺伝子型の比較を行ない、その感染を検証する必要がある。

#### E. 結論

ハンセン病の流行地においては住民が使用する生活用水中に生きたらい菌が存在することが示され、そこからの感染が強く示唆された。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Lopez-Roa R. I., Fafutis-Morris M., and

Matsuoka M. Dapsone resistant *Mycobacterium leprae* detected by DNA sequence analysis from a relapsed Mexican leprosy patient. *Revista Latinoamericana de Microbiología*.48, 256-259 2006

Matsuoka M., Budiawan T., Khin S A., Kyaw K., Tan EV., dela Cruz EC., Robert Gelber R., Paul Saunderson P., Balagon MV, and Pannikar V. The frequency of drug resistance mutations in *Mycobacterium leprae* isolates in untreated and relapsed leprosy patients from Myanmar, Indonesia and the Philippines. *Lepr. Rev.* 78, 343-352. 2008

##### 2. 学会発表

E. Tan, M.V., Balagon, E., de la Peña and Matsuoka M. A simple method of detecting drug resistant mutant in *Mycobacterium leprae* by DNA hybridization. The Symposium on Remaining Challenges in Leprosy, Kathmando, Nepal. September, 2007

Matsuoka M., Lopez Roa R.I., Budiawan T., Kyaw K. and Chae G.T. Genotypic Analysis of *Mycobacterium leprae* isolates from Japan and other Asian countries reveals a global transmission pattern of leprosy. 42th US-Japan conference on Tuberculosis and Leprosy. Zhenzhou, China, September, 2007

Mukai T., Izumi S., Rosita C., Agusni I., Miyamoto Y., Matsoka M., Makino M. Detection of *M.lepae* DNA in nasal swab

samples by LAMP methods. 42th US-Japan conference on Tuberculosis and Leprosy. Zhenzhou, China, September, 2007

Matsuoka M. Khin SA., Kyaw K., Tan EV., Balagon MV., Saunderson P., Makino M., Nakajima C. and Suzuki Y. A simple methods for detecting drug resistant *Mycobacterium leprae* based on DNA microarray. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress. Hyderabad, India, February 2007

Matsuoka M. Molecular biological techniques for detecting drug resistance. Symposium on Chemotherapy and drug resistance. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress. Hyderabad, India, February 2007

松岡正典、鈴木定彦、Esterina Tan, Khin Saw Aye : 薬剤耐性らい菌の簡易検出法の開発地上国への移転とそれによる耐性菌の伝播調査。第 80 回日本ハンセン病学会総会、横浜市、2007 年 5 月

儀同政一、松岡正典 : Moxifloxacin と Garenoxacin の抗らい菌活性。第 80 回日本ハンセン病学会総会、横浜市、2007 年 5 月

向井徹、和泉眞蔵、宮元友司、Cita Rosita, Indropo Agusuni、松岡正典、牧野正彦 : LAMP 法によるらい菌遺伝子検出の応用。第 80 回日本ハンセン病学会総会、横浜市、2007 年 5 月

和泉眞蔵、Indropo Agusuni、Cita Rosita、松岡正典、向井徹 : ハンセン病濃厚流行地健康住民血中からのらい菌の検出。第 80 回日本ハンセン病学会総会、横浜市、2007 年 5 月

Sitti Nur Rahmah、佐藤直哉、藤村響男、与儀ヤス子、松岡正典、増澤幹男、藤岡憲生 : 各種培養ヒト気道上皮細胞に対するらい菌 mce1A 領域と結核菌 mce1A 領域との侵入活性の異同。第 80 回日本ハンセン病学会総会、横浜市、2007 年 5 月

松岡正典 : ハンセン病の分子疫学第 4 回地域分子疫学研究会、清瀬市 2008 年 1 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（新興・再興感染症研究事業）

啓発普及および難治性ハンセン病治療薬の開発

平成 19 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）