

200829009A

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 向井 徹

平成21(2009)年3月

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 向井 徹

平成21(2009)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

松岡 正典..... 9

#### 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..... 13

#### 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 康夫..... 19

#### 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..... 25

#### 5. 免疫機能亢進抗原の開発

向井 徹..... 31

#### 6. 難治性ハンセン病に対する免疫療法の開発

牧野 正彦..... 37

#### 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..... 43

#### 8. ハンセン病診療のネットワーク構築

石井 則久..... 49

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 5 3

IV. 研究成果の刊行物・別刷----- 5 7



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20年度 総括研究報告書

研究代表者 向井 徹

（国立感染症研究所 ハンセン病研究センター）

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

研究代表者 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、登録患者数の減少がみられている。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、メキシコにおけるらい菌の疫学調査より民族グループに付随したらい菌の特徴が見つかった。難治性ハンセン病治療薬の開発では、DC159a および RFB に、ヌードマウス足趾法により強い抗らい菌活性を示された。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、ヒトマクロファージでは、phox 発現の変動がらい菌殺傷と関連することを示した。ワクチン・免疫療法の開発では、らい菌リポペプチド LipO<sub>K</sub> が、NF- $\kappa$ B を介し樹状細胞を活性化することを示した。また、これまでに作製した uerase 破壊 BCG ( $\Delta$ U T11) に各種らい菌蛋白発現株を作製し、CD4 および CD8 両 T 細胞を強く活性化することを示した。また、抗酸菌に異種蛋白を産生させるために必須の強いプロモーターを同定した。サルス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 FAP が、免疫解析には有効であると考えられた。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。

研究分担者

- 松岡正典 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 生体防御部室長  
儀同政一 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 生体防御部室長  
福富康夫 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 病原微生物部室長  
前田百美 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 病原微生物部主任研究官  
牧野正彦 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 病原微生物部長  
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 生体防御部長

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。また、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、分子疫学的手法による感染経路の解明、難治性ハンセン病に対する新規治療薬の開発、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. メキシコの各地域のハンセン病検体を用い *rpoT* 遺伝子の VNTR および SNP を PCR 産物より塩基配列解析を行った。
2. 抗菌活性は、*in vivo* 法として、ヌードマウス足腫法を、*in vitro* 法として Buddemeyer 法を用いた。抗菌薬: DC-159a, rifabutin, sparfloxacin は、各製薬会社から原末の提供を受けた。
3. ヒトマクロファージにおけるらい菌動態検に適した温度の検討および各種抗菌活性因子の発現を菌の代謝活性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ティングで行った。
4. 合成 LipoK をヒト樹状細胞へパルスし、IL-12 産生測定により、T細胞活性化は、さらにパーフォリン、グランザイム B 産生能を用い定量した。
5. BCG において強力な活性を持つプロモーター検索のため、抗酸菌ファージゲノムより、蛍光蛋白を指標に screening を行った。
6. BCG- $\Delta$ UT を親株とし、各種らい菌蛋白発現リコンビナント (BCG-DSM, BCGD70M) のヒト樹状細胞活性化能、T細胞活性化能を ELISA 法により検討した。

7. らい菌接種経路の異なる幼若カニクイザルを、接種後4年にわたり 2 ヶ月月間隔でリンパ球を分離し主要リンパ球サブセットレベル、サイトカインの誘導を 4 種のらい菌由来ペプチドにつき測定した。

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. メキシコ東部、南部分離株は、分離株の VNTR は3型、西部分離株は、4型であった。SNP では、東部、南部分離株に type4 がみられた。
2. ヌードマウス足腫法により DC-159a および RFB の抗らい菌活性は、10mg/kg であった。
3. らい菌感染ヒトマクロファージは、35°C培養において菌活性が2週間維持された。phox タンパクの発現は、IFN $\gamma$  添加により p22-phox, p47-phox の発現が著明に増加した。
4. らい菌リポ蛋白 LpK 由来ポリペプチド LipoK は、



NF- $\kappa$ B を介し樹状細胞を活性化し多量の IL-12 を産生し、T細胞の混合により IFN- $\gamma$  産生が認められた。また、CD4 細胞、CD8 T 細胞ともに CTL 活性を認めた。

5. 赤色蛍光色素を指標に、抗酸菌ファージゲノムよりプロモーター活性領域を screening した結果、4か所の既存抗酸菌プロモーターよりはるかに強力な領域を同定した。

6. ヒト樹状細胞を抗原提示細胞とし、自己の CD4 T 細胞あるいは、CD8 T 細胞をレスポンドーとしたとき、BCG-DSM、BCGD70M はともに現行の BCG より強くT細胞を活性化した。

7. らい菌接種幼若カニクイザルを4年間にわたり調査した結果、1頭に低レベルの抗らい菌抗体が検出され、LpK, FAP 刺激により IFN  $\gamma$  産生誘導が持続して観察された。

8. ハンセン病知識、回復者の心情、弁護士による人権面に関する講義、皮膚スミアテスト検査実習を含めた講習会を実施した。

ハンセン病回復者の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。

2008 年には7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. メキシコにおけるらい菌型分布は、モンゴロイドの移動によるハンセン病の伝播を示唆した。これら世界的規模のらい菌型別の調査は、在日外国人の発症例において感染地確定に有効であると考えられる。

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。DC-159a および RFB は、既存薬より

強い抗らい菌活性を認め、治療期間の短縮、間欠併用療法への導入が期待された。

3. ハンセン病少菌型では、病巣のTh1型サイトカインIFN  $\gamma$  が抗らい菌活性を持つことを証明したことになる。また、GM-CSFマクロファージがより抗らい菌活性が高いことは今後の課題であろう。

4. これまでの結果より、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と考えられた。

5. 今回同定した領域を用いることにより、ハンセン病のワクチンとして、長期安定にらい菌蛋白を充分量産生する BCG の作製を可能にすると考えられた。

6. BCG-DSM, BCGD70M の樹状細胞およびT細胞の活性化のより詳細な免疫学的検討により、新しい免疫療法剤の開発に繋がると考えられた。

7. 幼若カニクイザルの皮下にらい菌を一週おきに5回接種することにより持続感染モデルが作製できることが示唆された。今後新生仔を用い再現性の高い方法を検討する必要がある。

8. ハンセン病に関する講習会を開催し、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。

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、一歩でもそれに近づける努力は必要である。

ハンセン病の新規患者は減少しているが、日本人患者は、診断の遅れを防ぐためにも必ず鑑別に「ハンセン病」を入れることが必要である。

#### E. 結論

1. メキシコにおけるらい菌型別より民族グループの移動によるハンセン病の伝播が示された。

2. DC-159a および RFP が、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。

3. Phox 蛋白発現量がらい菌に対する殺菌作用に影響を与える可能性が示唆された。

4. LipoK は、免疫療法分子、ワクチン候補分子として有用であると考えられた。

5. 安定したハンセン病ワクチン BCG 株作製に欠かせない遺伝子領域を同定した。

6. BCG-D70M は、難治性ハンセン病の新しい免疫療法剤として期待された。

7. らい菌が持続感染している可能性の高いカンクイザルについてリンパ球及び抗原提示機能を解析し、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 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino: Temperature dependency for survival of *Mycobacterium leprae* in macrophages. *Jpn. J. Leprosy*, 78: 7-16, 2009.
- 2) Matsuoka M.: Recent advances in the molecular epidemiology of leprosy. *Japanese Journal of Leprosy*, 78:67-73, 2009
- 3) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino: *Mycobacterium avium* complex *gtfTB* gene encodes glucosyltransferase required for the biosynthesis

of serovar 8-specific glycopeptidolipid. *J. Bacteriol.*, in press, 2009.

- 4) Makino, M., Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, and T. Mukai: GM-CSF mediated T cell activation by macrophages infected with recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, in press, 2009.
- 5) Terao K.: Dynamic changes in early development of immune system in macaque monkeys -The significance from standpoint of the preclinical toxicity test using nonhuman primates- *Journal of Toxicological Science*, 2009, -in press-
- 6) Matsuoka M., Khin S. A., Kyaw K., Tan E. V., Balagon M. V., Saunderson P., Gelber R., Makino M., Nakajima C. and Suzuki Y.: A novel method for simple detection of mutations conferring drug resistance in *Mycobacterium leprae*, based on a DNA microarray, and its applicability in developing countries *Journal of Medical Microbiology* Vol. 57 1213-1219, 2008
- 7) Kai, M., N. P. N. Ha, H. T. T. Huong, N. H. An, Y. Fukutomi, Y. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, T. Fujiwara, N. T. Tan, and M. Makino: Serological diagnosis of leprosy in patients in Vietnamese by enzyme-linked immunosorbent assay with *Mycobacterium leprae*-derived major membrane protein-II. *Clin. Vaccine Immunol.*, 15:1755-1759, 2008.
- 8) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, Y. Miyamoto, and M. Makino: CD4<sup>+</sup> T cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 53:96-106, 2008.
- 9) Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P. J. Brennan, K. Kobayashi, M. Makino, S. Matsumoto, H. Ogura, and S. Maeda: Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.*, 190:3613-3621,

- 2008.
- 10) Bang PD, Suzuki K, Ishii N., Khang TH: Leprosy situation in Vietnam - reduced burden of stigma. *Jpn J Leprosy* 77: 29-36, 2008.
  - 11) Tanigawa K, Suzuki K, Nakamura K, Akama T, Kawashima A, Wu H, Hayashi M, Takahashi S, Ikuyama S, Ito T, Ishii N.: Expression of adipose differentiation-related protein(ADRP) and perilipin in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol Lett* 289: 72-79, 2008.
  - 12) 儀同政一: ニューキノロン系抗菌薬の構造式と抗らい菌活性の相関、日本ハンセン病学会雑誌、78: 17-23, 2009.
  - 13) 鈴木幸一、永岡 譲、森 修一、石井則久: 2007 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 77: 15-23, 2008.
  - 14) 谷川和也、鈴木幸一、川島 晃、三島眞代、Huhehasi Wu、赤間 剛、武下文彦、石井則久: らい菌感染マクロファージにおける細胞内寄生と排除に関わる分子機構。日本ハンセン病学会雑誌 77: 57-61, 2008.
  - 15) 石井則久、関根万里、渡辺朋美、朝比奈昭彦: 輸入皮膚感染症。臨床皮膚科 62(増刊号): 22-26, 2008.
  - 16) 石井則久、鈴木幸一: ハンセン病。よくわかる病態生理9皮膚疾患(川田 暁編集), p187-190, 日本医事新報社(東京), 2008.
  - 17) 石井則久: ハンセン病の最近の話題。皮膚の科学 7: 416-420, 2008.
2. 学会発表
- 1) Matsuoka M.: Genotyping of *Mycobacterium leprae* and its application to analysis of leprosy transmission. Second International Symposium on leprosy. Valencia, Spain, January 2009
  - 2) Makino, M., T. Mukai, Y. Maeda, Y. Miyamoto, and T. Tamura: CD4<sup>+</sup> T cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant BCG. 43<sup>rd</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
  - 3) Mukai, T., Y. Miyamoto, and M. Makino: Construction of *ureC*-disrupted BCG which expressing *M. leprae* MMP II antigen. 43<sup>rd</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
  - 4) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, and M. Makino: *Mycobacterium avium* complex serovar 8. 43<sup>rd</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
  - 5) Matsuoka M., Budiawan T., Mukai T., Gidoh M. and Izumi S.: Quantitation and evaluation of *Mycobacterium leprae* viability found in water in a leprosy endemic area. 43th US-Japan conference on Tuberculosis and Leprosy. Baltimore, USA, July 2008
  - 6) Matsuoka M.: Application of molecular biological methods to monitor the level of drug resistance in leprosy. 17<sup>th</sup> International Congress of Tropical Diseases and Malaria. Judu, Korea, October 2008
  - 7) Maeda, S., N. Nakata, I. Yano, M. Makino, and N. Fujiwara: Genetic analysis of the glycosylation pathway of glycopeptidolipids in *Mycobacterium intracellulare* serotype 16 and serotype 17. ASM Meeting, June, 2008, Boston, USA.
  - 8) Nakata, N., N. Fujiwara, S. Maeda, T. Naka, I. Yano, and M. Makino: The three different methyltransferase genes determine the divergence between *Mycobacterium intracellulare* serotype 7 and 12. ASM Meeting, June, 2008, Boston, USA.
  - 9) Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, K. Kobayashi, M. Makino, and S. Maeda: Structure and biosynthesis gene cluster of an antigenic serotype 16 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. ASM Meeting, June, 2008, Boston, USA.



- 10) Makino M.: Vaccines for mycobacterial diseases. The fifth Taiwan-Japan symposium on International Collaboration and TB. September 11-13, 2008, Taipei, Taiwan.
- 11) Maeda Y., Tamura T., Fukutomi Y., Kai M., Makino M.: Lipopeptide (LipoK) of *Mycobacterium leprae* activates antigen presenting cells and type I T cells. 17<sup>th</sup> International Leprosy Congress, Hyderabad, India, Jan 30- Feb 4, 2008.
- 12) Kanazawa N., Mikita N., Nakatani Y., Kosaka M., Ozaki M., Ishii N., Nishimura H., Furukawa F.: Genetic involvement of bacterial sensor molecules TLR2, DC-SIGN and NOD2 in Hansen's disease. The 5th Joint Meeting of International Investigative Dermatology 2008, Kyoto, May 2008.
- 13) 福富康夫, 牧野正彦: らい菌感染ヒトマクロファージの IFN- $\gamma$  刺激による phox 発現. 第 38 回日本免疫学会総会 2008 年 12 月 京都
- 14) 松岡正典: らい菌の遺伝子型別とハンセン病の感染様式解析への応用. 第75回日本細菌学会北海道支部総会 特別講演 札幌市 2008 年 9 月
- 15) 儀同政一, 松岡正典: rifabutin と doxycycline の抗らい菌活性. 第 81 回日本ハンセン病学会総会(熊本, 2008)、日本ハンセン病学会雑誌、77:132,2008.
- 16) 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦: ヒトマクロファージ内におけるらい菌の生存機構. 第81回日本ハンセン病学会総会、熊本、2008年5月
- 17) 甲斐雅規, 前田百美, 福富康夫, 宮本友司, 向井 徹, 牧野正彦: らい菌由来免疫原生タンパク、MMP-II を用いた血清診断. 第 81 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2008 年 5 月 熊本
- 18) 向井 徹, 和泉眞藏, Teky Budiawan, 宮本友司, Cita Rosita, Indropo Agusni, 松岡正典, 牧野正彦: 常温輸送臨床検体の LAMP 法によるらい菌遺伝子検出. 第 81 回日本ハンセン病学会総会、熊本市、2008 年 5 月
- 19) 松岡正典, Thomas Gillis, Teky Budiawan, Indropo Agusni, 向井 徹, 儀同政一, 和泉眞藏: 生活用水中のらい菌の感染源としての意義. 第 81 回日本ハンセン病学会総会、熊本市、2008 年 5 月
- 20) 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: 2007年のハンセン病新規患者発生状況. 第81回日本ハンセン病学会総会、熊本、2008年5月.
- 21) 森 修一, San Shwe, 石田 裕, 石井則久: ハンセン病回復者への偏見・差別の是正と社会復帰に関する研究. 第81回日本ハンセン病学会総会、熊本、2008年5月.
- 22) 金澤伸雄, 三木田直哉, 中谷友美, 尾崎元昭, 小坂眞紀, 石井則久, 西村泰行, 古川福実: 細菌センサー分子TLR2・DC-SIGN・NOD2の遺伝子多型のハンセン病発症への関与. 第81回日本ハンセン病学会総会、熊本、2008年5月.
- 23) 谷川和也, 鈴木幸一, 赤間 剛, 川島 晃, Huhehasi Wu, 高橋伸一郎, 生山祥一郎, 石井則久: ハンセン病における細胞内脂質蓄積機構について～らい菌感染マクロファージにおけるADRP, perilipinの発現誘導～. 第81回日本ハンセン病学会総会、熊本、2008年5月.
- 24) 石井則久: ハンセン病の将来. 教育講演 ハンセン病-neglected diseasesのコントロールに向けて、第107回日本皮膚科学会総会(京都)、2008年4月.
- 25) 鈴木幸一, 赤間 剛, 石井則久: ハンセン病研究の基礎と臨床の架け橋-らい菌ゲノム発現情報の臨床応用-. 教育講演 ハンセン病-neglected diseasesのコントロールに向けて、第107回日本皮膚科学会総会(京都)、2008年4月.
- 26) 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦: クロファジンミンにより誘導されるマクロファージの細胞死と caspase 等細胞内情報伝達分子の動態. 第 81 回日本細菌学会総会、京都、2008 年 3 月
- 27) 前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦: LipoKの細胞障害性T細胞活性化及びエキソソ



ーム産生に及ぼす影響、第81回日本細菌学会  
総会、大阪、2008年3月

- 28) 宮本友司、向井 徹、甲斐雅規、前田百美、  
中 崇、矢野郁也、牧野正彦: *Mycobacterium*  
*avium* complex 血清型 8 型株における糖脂質抗  
原の生合成経路の解析. 第 81 回日本細菌学  
会総会 2008 年 3 月 京都
- 29) 甲斐雅規、宮本友司、向井 徹、矢野郁也、  
牧野正彦: 遺伝子破壊による BCG 菌ミコール  
酸のサブクラス変換. 第 81 回日本細菌学会総  
会 2008 年 3 月 京都
- 30) 藤原永年、中田 登、前田伸司、中 崇、水  
野浄子、牧野正彦、松本壮吉、矢野郁也:  
*Mycobacterium intracellulare* 由来血清型 7、12  
型 glycopeptidolipid 糖鎖合成遺伝子の機能解  
析. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月  
京都
- 31) 中田 登、藤原永年、前田伸司、中 崇、矢  
野郁也、小林和夫、牧野正彦: *Mycobacterium*  
*intracellulare* 血清型 12 の glycopeptidolipid 生  
合成遺伝子領域の解析. 第 81 回日本細菌学  
会総会 2008 年 3 月 京都
- 32) 水野浄子、中 崇、中田 登、前田伸司、合  
田麗奈、小林貴美子、牧野正彦、藤原永年:  
*Mycobacterium intracellulare* serotype13 由来  
新規特異糖ペプチド脂質の糖鎖構造と生合成.  
日本生化学・日本分子生物学会合同年会  
2008 年

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当なし
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）

## ハンセン病の分子疫学

平成20年度 分担研究報告書

研究分担者 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

メキシコのらい菌の遺伝子型と地理的分布の特徴

研究分担者 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 メキシコの西部地域より得たらい菌は、他の中南米の国々から得たらい菌とは異なる遺伝子型の特徴を示したことから、東部及び南部半島域より得たらい菌の遺伝子型の解析を行った。西部地域由来の菌は rpoT 遺伝子 4 型が圧倒的多数を占めたが、東部および半島からの菌は全て rpoT 遺伝子 3 型であった。SNP は西部地域では見られなかったアフリカが起源と考えられている type 4 が 2 例見られた。それぞれの地域に定住した異なる民族的由来に伴ってそれぞれの地域でのハンセン病の伝搬経路が推察された。

A. 研究目的

ハンセン病の感染様式を解明し、その抜本的感染防止策を構築することが求められる。合わせて近年の在日外国人におけるハンセン病の症例についてはその感染場所を含めた対策が求められる。それらの症例における感染の場はどこであるのかを追求するためにはそれぞれの国におけるらい菌の特徴を知ることがその基盤となる。各国に分布するらい菌の遺伝子型のデータの集積を目的としてこれまでに行ったメキシコの西部地域に加え、東部および南部半島域に分布するらい菌の遺伝子型別を Variable Number Tandem Repeat (VNTR) および Single Nucleotide Polymorphism (SNP) により行った。このような global な各遺伝子型の地理的分布のデータは過去の人類の移動とも密接に関連することが知られており、学際的研究分野としても有意義かつ興味ある課題である。

B. 研究方法

メキシコの東部大西洋岸地域及から 20 検体、南部のユカタン半島から 12 検体のハンセン病感染例より検体を得た。病変部より Slit Skin 法により菌を含む組織

を得、DNA 調整の後、rpoT 遺伝子の VNTR および SNP を PCR direct Sequencing により調べた。

（倫理面への配慮）

検体は通常の臨床検査のための材料採取時に得た。その方法は特段の侵襲性を有するものではなく、菌の解析は患者のプライバシーには全く抵触しない。患者に対しては目的を説明し、同意が得られた場合にのみ供試した。

C. 研究結果

東部大西洋岸地域及からの 20 検体及びユカタン半島からの 12 検体、計 32 例の rpoT 遺伝子の VNTR 遺伝子型は全て 6 塩基を 3 個直列する 3 型であった。SNP 解析が可能であった 18 および 9 検体中それぞれ 1 例が SNP type IV であり、その他の 17 例及び 8 例は SNP type III であった。

D. 考察

これまでにメキシコの西海岸地方に分布する 27 例のらい菌の rpoT 遺伝子型を調べたが、それらは他の中南米地域に分布するらい菌と異なり、ほとんどが 6 塩基を 4 個直列するもの（4 型）であった。日本、韓国及び中国東部海岸域では圧倒



的多数を占めるが、世界的に、他の地域では3型が多数であり、4型は世界の限られた地域に分布する。

同国に分布するらい菌はモンゴロイドの移動によるハンセン病の拡散を示唆した。一方、同国における民族構成は由来を異にする民族グループから成っていることが知られていることから、ユカタン半島および東海岸地方に分布するらい菌について global な伝播の追跡に有用とされる rpoT 遺伝子型並びに SNP による遺伝子型別を行った。

全 32 検体の rpoT 遺伝子型は 3 型であった。SNP 解析が可能であった 28 研体中 26 検体が SNP type III、2 検体が SNP type IV であった。一方、これまでに調べた西海岸地方からのらい菌は 82% が SNP type III、18% が SNP type II であった。SNP type IV はアフリカ由来であることが既報において推察されている。ユカタン半島および東海岸地方から得たらい菌に SNP type IV が見いだされたことは同地域に分布するらい菌の由来は西海岸地方に分布するらい菌とは由来を異にすることが示された。

世界規模でのらい菌遺伝型の地理的分布を明らかにすることは、人々の移動に伴う過去のハンセン病の伝播を知る上で有用であると同時に、今日の母国以外に居住する人々において見出されるハンセン病感染例の感染場所を特定する上で有用な手段となる。既報のごとく、日本における外国人のハンセン病の症例について SNP および rpoT 遺伝子型の解析を行った結果そこから得られるらい菌は日本人の感染例からは分離される可能性の極めて低い SNP type IV、rpoT 3 型及び SNP type III、rpoT 3 型であったことから在日ブラジル人のハンセン病は同国において感染し、来日後発症したものであることを細菌学的証拠により証明した。それぞれの地域に分布するらい菌の遺伝子型のデータの集積はハンセン病の感染におけ

る global な解析に有用となることが期待される。

#### E. 結論

メキシコにおけるらい菌遺伝子型の解析を行った。由来を異にする民族グループの分布に付随したハンセン病の伝搬が示された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Matsuoka M., Khin S. A., Kyaw K., Tan E. V., Balagon M. V., Saunderson P., Gelber R., Makino M., Nakajima C. and Suzuki Y. A novel method for simple detection of mutations conferring drug resistance in *Mycobacterium leprae*, based on a DNA microarray, and its applicability in developing countries *Journal of Medical Microbiology*, 57 1213-1219, 2008

2. Matsuoka M. Recent advances in the molecular epidemiology of leprosy. *Japanese Journal of Leprosy*, in press, 2009.

##### 2. 学会発表

1. Matsuoka M., Budiawan T., Mukail T., Gidoh M. and Izumi S. Quantitation and evaluation of *Mycobacterium leprae* viability found in water in a leprosy endemic area. 43th US-Japan conference on Tuberculosis and Leprosy. Baltimore, USA, July 2008

2. Matsuoka M. Application of molecular biological methods to monitor the level of drug resistance in leprosy. 17<sup>th</sup> International Congress of Tropical Diseases and Malaria. Judu, Korea, October 2008

3. Matsuoka M. Genotyping of *Mycobacterium leprae* and its application to analysis of leprosy transmission. Second International Symposium on leprosy.

Valencia, Spain, January 2009

4. 松岡正典、Thomas Gillis、Teky Budiawan、Indropo Agusni、向井 徹、儀同政一、和泉眞藏：生活用水中のらい菌の感染源としての意義。第 81 回日本ハンセン病学会総会、熊本市、2008 年 5 月

5. 向井 徹、和泉眞藏、Teky Budiawan、宮本友司、Cita Rosita、Indropo Agusni、松岡正典：牧野正彦常温輸送臨床検体の LAMP 法によるらい菌遺伝子検出。第 81 回日本ハンセン病学会総会、熊本市、2008 年 5 月

6. 松岡正典：らい菌の遺伝子型別とハンセン病の感染様式解析への応用。第 75 回日本細菌学会北海道支部総会 特別講演 札幌市 2008 年 9 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20年度 分担研究報告書

研究分担者 儀同 政一

（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

啓発普及および難治性ハンセン病治療薬の開発

研究分担者 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：難治性ハンセン病治療に対処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 DC-159a(第一三共)と新規リファマイシン系抗菌薬 rifabutin(RFB, Pfizer)の *in vivo*-抗らい菌活性を、ヌードマウス足趾法を用い検討した。DC-159a は 10mg/kg で完全抑制を示し、MFLX、SPFX と同等以上の抗らい菌活性を示した。DC-159a は、治療期間の短縮と多剤耐性菌の治療に効果が期待される。RFB は 2mg/kg で完全抑制を示し、RFP より 2.5 倍強い抗らい菌活性を示した。RFB に RFP を凌ぐ強い抗らい菌活性を認めたことから、治療期間の短縮、多剤耐性菌対策、間欠併用療法への導入が期待される。ハンセン病の啓発普及のため 2000 年に作成したハンセン病治療指針に薬剤耐性検査、ニューキノロン薬の使用法、治癒判定基準、外科的治療、眼科的ケア、外国人患者の対応、皮膚科医用簡易マニュアルを新たに加えるなど全面改訂を行ったハンセン病治療指針(第2版)を、ハンセン病医学夏期講座などで配布し啓発普及を行った。

A. 研究目的

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、世界では今なお約 20 万人の新患発生があるばかりか、耐性菌増加の問題も生じている。さらに PB で 6 ヶ月、MB で 1 年以上の長い治療期間を要する。治療期間の短縮と薬剤耐性に対応するため、rifampicin (RFP)を除くと唯一抗らい菌に対する殺菌作用を持つ抗菌薬としてニューキノロン系薬はハンセン病の治療薬として重要である。既存ニューキノロン系薬の中で抗らい菌活性の最も強い sparfloxacin (SPFX)は、副作用として光線過敏症がある。8-methoxyquinolone で副作用が少なく SPFX と同等以上の強い抗らい菌活性を

持つ moxifloxacin(MFLX)は、OFLX 耐性抗らい菌に対し部分交差耐性を示す。

DC-159a は、キノロン骨格の 7 位にスピロ型二環性アミノピロピリジン基、8 位にメトキシ基を導入することで、約 11 時間と長い血中半減期を持ち、優れた組織移行性、強い抗菌力、薬物相互作用と光線過敏症など安全性を重視して、キノロン耐性、RFP 耐性菌対策を目的に Pfizer 社により開発中の新規 8-methoxy quinolone で、OFLX 耐性抗らい菌(Zensho-4 株)に対し強い *in vitro* 抗らい菌活性を示した。

rifabutin(RFB)は、リファマイシン S からナフタレン環の 3 位と 4 位にスピロピペリジル基を導入することで 45 時間と

長い血中半減期を持ち、また脂肪親和性が高く、全身に分布し、細胞内に多く取り込まれ、その主代謝物 25-O-desacetyl 体も RFB と同等の抗菌活性が半合成アンサマイシン系抗菌薬で RFP 耐性らい菌 (Zensho-4 株) に対し部分交差耐性を示した。今回ヌードマウス足趾法を用いて DC-159a の抗らい菌活性を SPFX と、RFB の抗らい菌活性を RFP と比較検討した。

2) 1996 年にらい予防法が廃止され、これに伴いハンセン病の新規患者は一般医療機関で保険診療が行われることになった。ハンセン病の新患を初めて経験する臨床医にとって、役に立つ指針になることを目的としてハンセン病治療指針を全面改定した。

## B. 研究方法

1) らい菌 (Thai-53 株) : ヌードマウス (BALB-c) 足趾より集菌・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: DC-159a (第一三共)、rifabutin (RFB, Pfizer), sparfloxacin (SPFX, 大日本住友製薬)、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) ヌードマウス足趾法

ヌードマウス (BALB/c, 5 週令・雌) の両後肢足趾に  $10^7$  のらい菌 (Thai-53 株) 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 2 匹 4 足趾内のらい菌数を計測し各薬剤の最小抑制濃度を求めた。

a. DC-159a (5, 10, 20, 40 mg/kg) の抗らい菌活性を SPFX (10mg/kg) と比較検討し

た。

b. RFB (0.5, 1, 2, 5 mg/kg) の抗らい菌活性

を RFP (5 mg/kg) と比較検討した。

(倫理面での配慮)

国立感染症研究所実験動物委員会の承認を得、実験動物指針に則り実験を行った。実験期間中の動物は、心理的、生理的苦痛の軽減を目的とした処置を施した。

5) ハンセン病治療指針は、日本ハンセン病学会の委員により構成され作成した。薬剤耐性検査、ニューキノロン薬の使用法、治癒判定基準、外科的治療、眼科的ケア、外国人患者の対応、皮膚科医用簡易マニュアルを新たに加えるなど全面改訂を行ったハンセン病治療指針 (第 2 版) を用いた。

## C. 研究成果

### 1) DC-159a の抗らい菌活性

DC-159a は、10 mg/kg の経口投与でヌードマウス足趾内のらい菌の増殖を完全抑制した。結果を図 1 に示す。

### 2) RFB の抗らい菌活性

RFB は、2 mg/kg の経口投与でヌードマウス足趾内のらい菌の増殖を完全抑制した。結果を図 2 に示す。

3) ハンセン病治療指針 (第 2 版) を、ハンセン病医学夏期大学講座などで配布し講義をするなど啓発普及を行った。

## D. 考察

1) ハンセン病は、PB で 6 ヶ月、MB で 1 年に及ぶ長い治療期間のため DDS と RFP 耐性が増加しつつある。また抗らい菌活性の弱い ofloxacin の単剤または低用量長期投与によるキノロン耐性、また RFP 耐



性も増加しつつある。治療期間の短縮と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。しかし抗らい菌活性を示す抗菌薬は、DDS, B663, RFP とニューキノロン系では SPFX, GFLX, LVFX, OFLX など、マクロライド系では clarithromycin、テトラサイクリン系では minocycline に限られている。特に抗らい菌に対し殺菌作用を示し、RFP に匹敵する強い抗らい菌活性を持つニューキノロン系薬は、ハンセン病の治療薬として重要な抗菌薬である。これまでニューキノロン系薬の中で MFLX とともに最も強い *in vivo* 抗らい菌活性を示す SPFX は光線過敏症に課題がある。

2) 今回実験を行った DC-159a は Buddeneyer 法とヌードマウス足趾法で、既存ニューキノロン系薬の中で最も強い MFLX、SPFX と同等以上の強い抗らい菌活性を認めた。またキノロン耐性菌に対しても強い抗たい菌活性を認めた。DC-159a は優れた組織移行性、高い血中濃度と長い血中半減期を合わせ持つ新規 8-methoxyquinolone で、血中半減期が約 11 時間 (5mg/kg 空腹時単回経口投与, monkeys) と長いことから、1日1回投与が可能である。また DC-159a は、光線過敏症や中枢神経系の副作用を軽減、非ステロイド性炎症薬やテオフィリンとの相互作用が低く、MFLX より長い後抗生物質効果を持つなど優れた薬理学的特徴を持つ新規ニューキノロン系薬として治療期間の短縮、また多剤耐性菌対策など難治性ハンセン病の治療に貢献すると考える。

3) rifabutin (RFB) は、リファマイシン S からナフタレン環の 3 位と 4 位にスピロピペリジル基を導入することで 45 時間と

長い血中半減期を持ち、また脂肪親和性が高く、全身に分布し、細胞内に多く取り込まれ、その主代謝物 25-O-desacetyl 体も RFB と同等の抗菌活性が半合成アンサマイシン系抗菌薬である。RFB は、抗らい菌活性が最も強い薬剤で、血中半減期が 45 時間 (300 mg 空腹時単回経口投与) と長いことから、患者負担を軽減するため治療期間の短縮、また多剤耐性菌対策など難治性ハンセン病の治療に貢献すると考える。

4) ハンセン病の啓発普及のため 2000 年に作成したハンセン病治療指針に薬剤耐性検査、ニューキノロン薬の使用法、治療判定基準、外科的治療、眼科的ケア、外国人患者の対応、サリドマイド入手法、皮膚科医用簡易マニュアルを新たに加えた。本治療指針は現時点におけるわが国のハンセン病の基本的、標準的治療の目安を示すもので、ハンセン病関係者に対しこのハンセン病治療指針(第 2 版)を用いて啓発普及することは、診断・治療・後遺症対策などハンセン病医学に貢献すると考える。

## E. 結論

1) DC-159a は 10 mg/kg でヌードマウス足趾内の抗らい菌の増殖を完全抑制しニューキノロン中最も強い抗らい菌活性を示したことから、治療期間の短縮と多剤耐性菌の治療など難治性ハンセン病のが期待される。

2) RFB は 2mg/kg でヌードマウス足趾内の抗らい菌の増殖を完全抑制した。RFP より 2.5 倍強い抗らい菌活性を示したことから、治療期間の短縮、多剤耐性菌対策、間欠併用療法への導入が期待される。

3) ハンセン病の啓発普及のため 2000 年