

2008-29009B

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 18 年度～平成 20 年度 総合研究報告書

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 18 年度～平成 20 年度 総合研究報告書

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）

目 次

I. 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 21

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 29

I. 総合研究報告書

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

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本研究を行った。その結果、ハンセン病の分子疫学では、高有病率地域の生活水に生活性を持つらい菌を検出し、感染源になる可能性を示した。また、メキシコにおける疫学調査より民族グループに付随したらい菌型の特徴がみつかった。難治性ハンセン病治療薬の開発では、新規ニューキノロン系抗菌薬3剤、新規リファマイシン系抗菌薬 RFB の抗らい菌活性を既存薬と比較検討し、DC-159a および RFB が多剤耐性対策、治療期間短縮に有用であることを示した。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、35℃培養条件下でらい菌はヒトマクロファージ内に2週間持続すること、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 LipoK が、NF- κ B を介し樹状細胞を活性化すること、CTL 活性に重要なパーフォリン・グランザイム B の産生を増強することを示した。また、uerase 破壊 BCG (Δ UT11)を用い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。さらに抗酸菌に異種蛋白産生に必須の強いプロモーターを同定した。サル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、6頭の幼若カンクイザルへらい菌の接種を行い、4年間の経過観察から1頭のサルに、リンパ球幼若化反応および PGL-1 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、3年間にわたり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. インドネシア、北スラベシ州に位置する島をフィールドとして住民の生活用水について Real Time-PCR 及び Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)により、らい菌の定量と viability の検査を行った。多くの菌が存在した井戸水を濾過した液あるいは PBS に浮遊した菌を 30℃または 37℃に放置し、Buddemeyer 法により活性の変化の測定を行なった。

メキシコの東部大西洋岸地域及び南部のユカタン半島から計 32 検体のハンセン病感染例よりらい菌検体を得た。rpoT 遺伝子の VNTR および SNP それぞれの遺伝子型を調べた。

2. 1)らい菌(Thai-53 株), (Zensho-4 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)Buddemeyer 法

①Thai-53 株に対する抗らい菌活性

a. DC-159a, MFLX, GRNX の抗らい菌活性を SPFX, STFX, GFLX, LVFX, RFP と比較検討した。

b. DOXY の抗らい菌活性を MINO,CAM, MFLX, RFP と比較検討した。

②多剤耐性らい菌(Zensho-4)に対する DC-169a, MFLX, RFB の抗らい菌活性を RFP, WQ-3402, SPFX, STFX, GFLX, LVFX, OFLX と比較検討した。

3)ヌードマウス足趾法

①Thai-53 株に対する抗らい菌活性

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

c. 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。

②Zensho-4 株に対する抗らい菌活性 MFLX (10, 20, 30,40mg/kg) の抗らい菌活性を OFLX (150mg/kg) と比較検討した。

4)ニューキノロン系薬の化学構造式と抗らい菌活性の相関を Buddemeyer 法とヌードマウス足趾法の結果から検討した。

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。

3. マウスマクロファージの培養:マウス腹腔常在細胞からカバースリップ付着製のマクロファージを得て培養した。

ヒトマクロファージの培養:健康人末梢血よりフィコールを用いた比重勾配遠心法により単核球を分離して非付着細胞を除いて単球を精製し M-CSF もしくは GM-CSF を加えた培地にて 1 週間以上培養し単球からマクロファージに分化させてかららい菌を感染

させた。

マクロファージへのらい菌感染:ヌードマウスフットパッドに接種して増殖したらい菌を回収してマクロファージに感染させた。さらに培養を継続後マクロファージを可溶化して菌を得て radiorespirometry (基質として $1\text{-}^{14}\text{C}$ -パルミチン酸を用い、らい菌の脂肪酸・酸化反応により放出される $^{14}\text{CO}_2$ をシンチレーションカウンターにてアイトープ量を測定)にて生存率を判定した。

ウエスタンブロッティング:細胞を可溶化して lysate を得た。SDS 電気泳動を行って分離したタンパクをさらに PVDF 膜に転写、各種抗体で反応させ、次に HRP 標識二次抗体を反応させ化学発光による X 線フィルムへの露出で各種タンパクを検出した。

4. LipoK の N 末端 13 アミノ酸を含む合成リポペプチド (LipoK) は 25mg/ml の濃度で保存した。樹状細胞は、正常健常者ヒト末梢血単球よりサイトカインを用いて分化誘導したのち、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 ($\text{IFN-}\gamma$ ・IL-2 産生) を指標に分析した。Naive T 細胞の精製には CD45RO 抗体および Dynal T cell negative selection kit (Invitrogen) を用いて行った。T 細胞の増殖は Molecular Probes 社のカルボキシフルオレセイン・ジアセテート (CFSE) を用いて、フローサイトメトリで測定した。CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞は Human T Lymphocyte Enrichment Set (BD) を用いて精製した。パーフォリン、グランザイム B 産生 T 細胞は FACS Calibur を用いて以下の方法で定量した。樹状細胞-T 細胞培養後、5 日目に Golgi stop (BD) を添加し、18 時間後に細胞を回収し intracellular 染色を行い、解析した。IL-12、IL-2 及び $\text{IFN-}\gamma$ の測定は BD Pharmingen の OptEIA キットを用いて ELISA 法で半定量化した。

5. 抗酸菌は、細胞内寄生性が大きな特徴である。その寄生性を担う因子の一つとして、抗酸菌 urease が考えられている。細胞内に侵入した BCG は、urease を産生することにより、周囲の環境をアルカリ

性へ傾かせ、宿主の酸性酵素の働きを抑え、宿主からの攻撃を防いでいる。そこで、ファージを用いた系により urease 遺伝子の破壊 BCG 株 ($\Delta\text{UT11-3}$) の作製を行った。さらに、らい菌蛋白 MMP II と hsp70 蛋白の融合型および Ag85B 分泌シグナルと融合型 MMP II を分泌する $\Delta\text{UT11-3}$ (BCG-D70M, BCG-DSM) の構築を行った。また、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、蛍光蛋白を指標にライブラリーを作製し、その screening を行った。

6. ベクターコントロール BCG を BCG-261H と称した。正常健常者末梢血より T 細胞をマグネットビーズ付着抗 CD3 抗体を用いて除去した末梢単核球分画よりプラスチック付着性細胞を分離して単球として用いた。樹状細胞は、末梢単球に市販のリコンビナント GM-CSF および IL-4 を添加して作製した。単球に対しリコンビナント M-CSF (10 ng/ml) を添加してマクロファージを分化誘導した。本マクロファージをここでは M-M0 と称した。BCG- ΔUT の CD4 陽性 T 細胞活性化能は、BCG- ΔUT あるいは BCG-Tokyo を樹状細胞あるいは M-M0 に感染させ、感染後 2 日後に自己の CD4 陽性 T 細胞あるいは CD8 陽性 T 細胞と 4 日間混合培養し、培養上清中に産生分泌された $\text{IFN-}\gamma$ は ELISA 法を用いて測定することで検討した。ELISA 法は市販のアッセイキットを用いた。レスポンド細胞として用いた T 細胞は、末梢血単核球より市販の negative isolation kit を用いて精製した。その純度は 95% 以上であった。ナイーブ T 細胞分画は、これら T 細胞から CD45RO 陽性 T 細胞を除去して得た。CD45RO 抗体は市販の抗体を用い、さらに抗マウス IgG 抗体ダイナビーズ抗体 (市販) を用いて精製した。M-M0 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・CD40 リガンド (L)・リコンビナント $\text{IFN-}\gamma$ を検討したが、これらは全て市販のリコンビナントタンパクを用いた。また、 $\text{IFN-}\gamma$ レセプター α 鎖 (CD119) に対する抗体を用いて、 $\text{IFN-}\gamma$ の補助因子としての役割を検討したが、本抗体も市販の抗体を用いた。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。全て市販の抗体を用いた。

7. 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターにおいて繁殖育成された8-12カ月の幼若カンクイザルにらい菌を皮下、鼻腔内投与の異なる経路により接種し、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能を4種のらい菌由来ペプチドにより測定した。

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パンフレットを作成などして提供し、講習会などを開催する。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する。

(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. Real-Time PCRでは43検体がらい菌の存在することを示し、それらは1菌体/20mlから3,620菌体/20mlのらい菌が生活用水に存在する結果を示した。RT-PCRにより検査した水の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。

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。

2. 1) Buddemeyer 法

① Thai-53 株に対する抗らい菌活性

- DC-159a は、MFLX より強い菌活性を示した。
- GRNX は、LVFX と同程度の活性を示した。
- DOXY は、MINO より活性は弱かった。
- RFB は RFP より16~64倍強い活性を認めた。

② OFLX 耐性らい菌(Zensho-4 株)

- DC-159a と MFLX は、Zensho-4 株に対し SPFX より強い抗らい菌活性を示した。DC-159a は、交差耐性を示さなかった。
- RFB の RFP 耐性らい菌(Zensho-4)に対する活性は、部分交差耐性であることを認めた。

2) ノードマウス足趾法

① Thai-53 株に対する抗らい菌活性

- DC-159a は、SPFX と同様に10mg/kgで完全抑制をした。
- MFLX は、10mg/kgで完全抑制をした。
- GRNX は、60mg/kgで完全抑制しLVFXと同程度の抗らい菌活性を示した。小児から老人まで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。
- RFB は、2mg/kgで完全抑制をした。

② OFLX 耐性菌(Zensho-4 株)に対する抗菌活性

- MFLX は、SPFX と同様に40mg/kgで完全抑制した。

3) 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。このハンセン病治療指針(第2版)を、ハンセン病医学夏季講座などで配布し講義をするなど啓発普及を行う

ことは、ハンセン病の診断・治療・後遺症対策に貢献する。

3. マウスマクロファージ内のらい菌の生存率は 35 度で著明に上昇した。同様に、ヒトマクロファージ中でもらい菌は 2 週間以上代謝活性を維持していた。35 度で培養したらい菌感染ヒト M-マクロファージにおいて IFN γ 刺激により抗らい菌活性発現がみられ phox(phagosome oxidase)タンパクのうち p22-phox と p47-phox の発現が著明に増加した。マウスマクロファージでは IFN γ による抗らい菌活性発現で誘導型酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現が著明に増強し酸化窒素が蓄積したが、ヒトマクロファージでは酸化窒素の放出がみられず、iNOS の発現増強もみられなかった。NO 合成阻害剤もヒトマクロファージの抗らい菌活性に影響を与えなかった。

4. 末梢血単球から分化したらい菌感染樹状細胞を LipoK で刺激すると、IL-12 を LipoK 濃度依存的に産生した。NF- κ B のインヒビターである parthenolide 存在下で刺激すると、IL-12 の産生が抑制された。LipoK を樹状細胞にパルスし、抗原提示細胞として用いて、naïve の T 細胞の活性化を IFN- γ 産性能で調べた。らい菌のみでは IFN- γ はほとんど産生されないが、らい菌存在下で lipoK をパルスした樹状細胞は naïve T 細胞を刺激し、有意に IFN- γ 及び IL-2 を産生した。IFN- γ 産性能は CD40L 存在下で樹状細胞をらい菌で刺激しても、あまり産生されなかったことから、LipoK の方がより高い T 細胞活性化能を有すると考えられた。さらに、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 CD4 または 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 産生細胞も増えた (CD8 陽性 T 細胞内の 19.8%、CD4 陽性 T 細胞内の 17.3%)。らい菌のみではパーフォリンまたはグランザイム産生が低いことから、脂質部分を持つ LipoK が TLR2 を介して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 陽性細胞の共存が必須であることを確認した。パーフォリン産生している状態で、らい菌生存率を Buddemeyer 法で測定すると、コントロールに比べて約 50%のみ生存している事から、LipoK はらい菌の殺菌に参与していると考えられた。

5. urease 遺伝子の破壊 BCG 株(Δ UT11-3)は、ウレアーゼ試験では陰性を示した。さらに、その破壊株へ、urease 発現遺伝子を導入するとその機能が回復され urease 遺伝子が確実に破壊されていることが確認された。同破壊株へ、hsp70 と MMP II 融合発現用プラスミド、および Ag85B 分泌シグナル融合らい菌 MMP II 蛋白発現用プラスミドを導入した。各プラスミドを導入された Δ UT11-3 株の濃縮培養上清は、ウエスタンブロット法により、各目的蛋白が分泌産生されていることが確認された。プロモーター検索では蛍光色素を指標に、抗酸菌ファージゲノムより、4か所の既存抗酸菌用プロモーターよりはるかに強力なプロモーター領域を同定した。

6. BCG- Δ UT または親 BCG(Tokyo 株)を末梢血単球由来樹状細胞に感染させ、成熟化因子非存在下で 2 日間培養し、自己のメモリーおよびナイーブ CD4 陽性 T 細胞と混合培養した。BCG- Δ UT・BCG-Tokyo いずれも BCG の量依存性に強く CD4 陽性 T 細胞を活性化し、有意な IFN- γ 産生を誘導した。しかし、BCG- Δ UT を用いた場合明らかに強い T 細胞の活性化が誘導された。ナイーブ CD8 陽性 T 細胞の BCG- Δ UT に対する反応性を検討したが、その程度は親 BCG 株とほぼ同じであった。BCG- Δ UT 感染マクロファージにおけるファゴソームとライソソームの融合効率を検索した。BCG- Δ UT は BCG-Tokyo に比し、効率良く Phagosome-Lysosome fusion を誘導した。BCG- Δ UT を M-M ϕ 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- Δ UT は BCG-Tokyo に比し有意に強く CD4 陽性 T 細胞を活性化させたが、産生された 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- Δ UT によるマクロファージの活性化の有無を評価するため、BCG- Δ UT 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。BCG- Δ UT は IL-10 および GM-CSF \cdot TNF α \cdot IL-1 β の産生をより強く誘導した。IL-10 は T 細胞の活性化を抑制することが知られているため、BCG- Δ UT 感染 M-M \emptyset の T 細胞活性化に及ぼす IL-10 の影響を調べた。M-M \emptyset に BCG を感染させる際、IL-10 に対する中和抗体を添加したところ、マクロファージによる T 細胞活性化能は有意に増強した。GM-CSF はマクロファージからの IL-10 の産生を抑制する作用を有しているため、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- Δ UT を用いた場合のみ T 細胞は著しく強く活性化された。さらに、BCG- Δ UT は BCG-Tokyo に比し有意に強く CD40 抗原の発現を増強させた。そこで、BCG- Δ UT 感染マクロファージを CD40L で処理したところ、BCG-Tokyo 感染 M-M \emptyset に比し強く T 細胞活性化能が増強した。BCG- Δ UT 感染 M-M \emptyset を外因性 IFN- γ で処理しても、M-M \emptyset 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- Δ UT を用いた時のみ観察された。BCG- Δ UT 感染 M-M \emptyset を IFN- γ で刺激すると HLA-DR や CD86 分子の発現が増強し、BCG- Δ UT 感染 IFN- γ 刺激 M-M \emptyset を HLA-DR あるいは CD86 に対する抗体で処理すると、T 細胞活性化能は強く抑制された。したがって、M-M \emptyset は抗原特異的に T 細胞を活性化していた。次いで、BCG- Δ UT をベースとし、これに CD8 陽性 T 細胞活性化因子を付加することで、両 T 細胞を非常に強く活性化し得る BCG の作製を試みた。因子として、①MMP-II に BCG-SM に用いた分泌シグナルを直接的に連結した融合遺伝子を用いる (BCG-DSM) の作製、②MMP-II に HSP70 遺伝子を直接的に連結した融合遺伝子を用い (BCG-D70M の作製)、HSP70-MMP-II 融合タンパクを HSP70 の作用により分泌させる、の二つを検討した。最初に、BCG-DSM とベクターコントロール BCG (BCG-261H) の T 細胞活性化能を検討した。ナイー

ブタイプおよびメモリータイプの CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞 (全 4 種類の T 細胞) は全て BCG-DSM により、より強く活性化された。BCG-D70M と BCG-261H の T 細胞の活性化能を比較すると、BCG-D70M が強い T 細胞活性化誘導能を示した。三番目に、BCG- Δ UT 対 BCG-DSM および BCG- Δ UT 対 BCG-D70M の CD8 陽性 T 細胞活性化能を比較検討した。その結果、BCG-DSM あるいは BCG-D70M が BCG- Δ UT に比し、強く CD8 陽性 T 細胞を活性化した。したがって、二つの CD8 陽性 T 細胞活性化因子は、ともに有効に作用することが示された。そこで、BCG-DSM と BCG-D70M の上記 4 種類の T 細胞活性化能を直接比較した。両 BCG はともにナイーブ CD4 陽性 T 細胞およびナイーブ CD8 陽性 T 細胞を活性化したが、BCG-D70M が有意に強く両ナイーブ T 細胞を活性化し、より大量の IFN- γ の産生を誘導した。したがって、HSP70 を添加することで非常に強い T 細胞の活性化が得られることが明らかとなった。

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 γ 産生誘導が持続して観察された。

8. 皮膚科医の教育のため「ハンセン病アトラス」を作成・配布した。ハンセン病診療のインテグレーションのためのパンフレット作成・配布した。皮膚科医への講習・検査実習を行った。講習は、ハンセン病診療するにあたり、新規患者の心情、外国人患者の不安、回復者の心情を理解し、ハンセン病について理解を深めることを目標とした。ハンセン病回復者から、医療面や生活面などの体験や要望も講義内容に組み入れた。実習は、皮膚スミア検査、神経肥厚の触診、病理組織検査を実施し、知識・技術の伝達を行った。ハンセン病診療の座右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、当事者の他、医局員や若い皮膚科医の教育に活用するようにした。

ハンセン病回復者が一般医療機関受診のチャンスを

広げられるように、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大学皮膚科、学会(日本皮膚科学会総会、日本ハンセン病学会など)、ハンセン病療養所、関係機関などに配布し活用を依頼した。また、国立ハンセン病資料館にもパンフレットとしておいた。

新規のハンセン病患者は2006年は7名、2007年は11名、2008年は7名いた。主治医に対して診療及び検査の指導を行い、ハンセン病を確実に診療できる体制を確立した。

D. 考察

1. 世界のハンセン病はいまだに年間約30万人の新患登録が見られる。これまでの感染に関する概念から多剤併用療法により感染源となる多菌型患者の治療により、新たな感染が防げると考えられてきたが、多くの研究結果は多菌型患者との濃厚接触以外による感染を強く示唆された。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て、そこにおけるらい菌遺伝子の検索を行った。流行地域の井戸水からはPCRによってらい菌遺伝子が存在することを明らかにし、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。そのような生活用水中にどの程度のらい菌が存在するかについて検討した。43検体において1/20mlから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。水の中の菌の生死についてRT-PCRをおこなった結果、33検体中14検体に生きたらい菌が存在することを示す、16S rRNA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。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。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って、その感染を検証する必要がある。

メキシコの西海岸地方に分布する27例のらい菌のrpoT遺伝子型は25例が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rpoT遺伝子型並びにSNPによる遺伝子型別を行った。SNP type IVはアフリカ由来であることが推察されている。ユカタン半島および東海岸地方から得たらい菌は全てrpoT遺伝子型3型であり、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。rpoT遺伝子型およびSNP typeにより、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。

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。

キノロン母核 1 位にシクロプロピル基、3 位にカルボキシル基、4 位にオキシ基、5 位にアミノ基または水素基、6 位にフッ素基、7 位に 5 員環または 6 員環の塩基性環状アミン、8 位にフッ素基、塩素基またはメトキシ基を持つニューキノロン系抗菌薬が強い抗らい菌活性を示すことを認めた。

3. らい菌は低体温部で増殖する。本研究の *in vitro* での結果はこの *in vivo* の観察を裏付ける重要な情報も提供した。本研究では IFN γ がヒトマクロファージを活性化して抗らい菌作用を発揮することを示した。ヒトマクロファージにおいては IFN γ で iNOS が誘導できず酸化窒素の関与は少ないと思われた。しかし、殺菌分子であるスーパーオキシドを産生する NADPH オキシダーゼ構成タンパクである phox の発現は増強した。SOD の発現は変化しなかったことから、IFN γ 添加により phox 発現が特異的に増加することがスーパーオキシドの蓄積につながり、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っている可能性が示唆された。反対に、多菌型ハンセン病 (LL 型) と phox 発現低下の関与も考えられた。

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。LipoK は TLR2 を認識し、NF- κ B を介して、らい菌感染樹状細胞を活性化し、自己 CD4 及び CD8 陽性 T 細胞の増殖を促した。さらに、LipoK は自己 CD8 陽性 T 細胞のみならず、CD4 陽性 T 細胞から大量のパーフォリン及びグランザイム B を分泌しうる物質であることが判明した。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 は、その歴史的経過が示すように、安全性

は確立されている。しかし、同じ抗酸菌感染症であるハンセン病のワクチンに使用することは、その効果が疑問視されている。そのため、BCG をより生体側に認識され易いように、さらにらい菌特異蛋白を産生させる必要がある。本研究において、BCG が宿主内で生き延びるために用いる機構の一つ urease 遺伝子を破壊した。これは、宿主内において BCG 分解促進を期待するものである。さらに、同株を用い、宿主の免疫機能に易認識を促す hsp70 とらい菌蛋白を融合させて分泌発現する BCG の構築は、ハンセン病ワクチンとして有益なものと考えられる。しかし、これらの結果は、プラスミドを用いたものより得られたため、その安定性に疑問が生じる。その解決法として、抗酸菌ファージより、新規のプロモーター領域を同定したことは、この疑問を解決する策となると考えられた。

6. ハンセン病のワクチン開発あるいは免疫療法の開発においては、鍵となるエフェクター因子が存在する。ワクチンにおいては、抗原提示細胞を介した T 細胞の活性化とその後に産生されるメモリー T 細胞であり、免疫療法においては、らい菌感染したマクロファージを活性化するために必要な十分量の IFN- γ である。したがって、IFN- γ 産生性 T 細胞の活性化が不可欠である。そのため、らい菌由来主要抗原を有効活用することが重要である。BCG がマクロファージに対して強い親和性を有し、マクロファージに感染するとファゴゾームを形成し、ライソゾームとの融合を阻止する。BCG をらい菌由来主要抗原の細胞内導入のためのキャリアーとして用いる場合、抗酸菌特有の特徴であるファゴゾームの形成は避けられない現象である。一方で、T 細胞を活性化するためには主要抗原を細胞質内に分泌させなければならない。細胞内に感染したリコンビナント BCG からライソゾームを経由して抗原を細胞内へ分泌する方策として、二つの方法が考えられる。第 1 は、BCG 感染ファゴゾームの PH 環境を酸性側へ傾けライソゾームと融合し易くすることであり、第 2 は BCG から主要抗原を分泌させファゴゾームの膜を通過させることであ

る。そこで、BCGのT細胞活性化能の増強を図るため、BCGが有するウレアーゼ遺伝子を除去し、ウレアーゼ欠損リコンビナントBCG(BCG- Δ UT)を作製した。ウレアーゼ酵素は、アンモニアを産生しファゴゾームの酸性化を抑制することでライソゾームとの融合阻止に寄与している。BCG- Δ UTは、樹状細胞に感染するとライソゾームとの融合を促進し、親BCG(BCG-Tokyo)より有意に強くCD4陽性T細胞を活性化した。しかし、残念ながらマクロファージに感染した際は、強いT細胞の活性化は観察されず、マクロファージのIL-10産生能を抑制する、または、外因性IFN- γ あるいはCD40リガンドを用いて副刺激を与えることで初めてT細胞を強く活性化した。マクロファージが必要とする補助因子は、BCG- Δ UTが樹状細胞に感染すると容易に供給可能であった。CD40リガンド・IFN- γ 何れを用いた場合においても、BCG-Tokyoに比しBCG- Δ UTにおいて、その増強効果は明らかに強かった。IFN- γ は、全ての抗酸菌感染マクロファージを活性化すると想定されてきた。しかし、らい菌感染マクロファージにおいてはIFN- γ の増強効果はきわめて弱く、今回明らかになったようにBCG- Δ UTとBCG-Tokyoの間においてもIFN- γ に対する感受性は大きく異なっていた。このことは、抗酸菌の種類または表現型によってIFN- γ 感受性はそれぞれ異なり、BCG- Δ 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と考えられた。次いで、CD8陽性T細胞を活性化する方策を検討した。二つの方策を用いたが、BCG-DSMおよびBCG-D70Mは、ともにCD4陽性T細胞もCD8陽性T細胞も活性化した。BCG-DSMはMMP-IIを分泌し、BCG-D70MはHSP70-MMP-II融合タンパクを分泌している可能性が高い。HSP70は、heat shock protein (hsp)の一種であり、hspはシャペロン効果を有しTLR2結合能を持つ。そのために、より強く樹状細胞を活性化することが期待できる。さらに、細菌がCD8陽性T細胞を活性化するためには、樹状細胞内でcross-presentation機構が活性化

されなければならないが、hspは樹状細胞によるcross-presentationに必要な不可欠な分子と考えられている。したがって、分泌された融合タンパクの中にHSP70が含まれたことによって、CD8陽性T細胞が強く活性化されたものと考えられる。BCG-D70Mの作用機序は、今後の詳細な検討が必要であるが、BCG-D70Mはハンセン病の予防的ワクチンとして、また難治性ハンセン病の免疫治療剤として極めて有効であると期待される。

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. ハンセン病患者が減少し、診療する機会が減少し、教育を受けていない、一度も診療機会がない皮膚科医が大多数を占めるようになってきている。また、ハンセン病の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。それらを解決するために、講習会を開催し、意識向上に努めた。さらに他の皮膚科医の教育も必要と考え、「ハンセン病アトラス」を配布した。この意欲を持続させるために、今後も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、一歩でもそれに近づける努力は必要である。そのため、気軽に相談できる皮膚科医を回復者向けパンフレットに記載し、回復者や全国の皮膚科医などに配布した。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. 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。

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。

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. IFN γ 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 オキシダーゼ構成タンパクである phox の発現が増強していることが判明した。phox タンパク発現量の変動がハンセン病におけるらい菌に対する殺菌作用に影響を与えている可能性が示唆された。

4. リポペプチド LipoK は、naïve CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性細胞を活性化した。さらに、CD4 陽性 T 細胞存在下で、CTL 活性を誘導しパーフォリン及びグランザイム 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。らい菌の生存率が低下していたことから、LipoK はらい菌の殺菌に関与している。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. BCG 株の宿主内寄生性に関与する urease 遺伝子破壊株を作製し、Hsp70-らい菌 MMP II 融合蛋白分泌株を構築した。さらに、安定らい菌蛋白産生 BCG に必須である、強い抗酸菌プロモーターを同定した。これらの結果は、ハンセン病ワクチンとしての BCG を構築するために有用であると考えられた。

6. ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG (BCG- Δ UT) は、樹状細胞およびマクロファージを介して、ナイーブおよびメモリータイプ CD4 陽性 T 細胞を親 BCG に比し強く活性化した。さらに、BCG- Δ UT に HSP70-MMP-II 融合タンパクをコードする遺伝子を

挿入した新しいリコンビナント BCG は、HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌し、CD4 陽性 T 細胞のみならず CD8 陽性 T 細胞をも強く活性化した。難治性ハンセン病の新しい免疫療法剤として期待される。

7. 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⁺ 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.
- 18) 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
- 19) 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 Infect., 9:70-77, 2007.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) Kawakami T, Tsutsumi Y, Mizoguchi M, Ishii N, Soma Y: Leprosy with hepatic involvement. *Int J Dermatol* 46: 348-349, 2007.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 石井則久, 小坂眞紀, 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* 127:59-65, 2007.
- 28) 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.
- 29) 石井則久, 永岡 譲: Hansen 病. 診断と治療 95: 1591-1596, 2007.
- 30) 石井則久: ハンセン病. *Visual Dermatology* 6: 1188-1189, 2007.
- 31) 永岡 譲, 石井則久: ハンセン病. *Visual Dermatology* 6: 1266-1271, 2007.
- 32) 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.
- 33) 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 Infection*, 9 : 70-77, 2007.
- 34) Hara M, Kikuchi T, Sata T, Nakajima N, Ami Y, Sato Y, Tanaka K, Narita T, Ono F, Akari H, Terao K., Mukai R.: Detection of SRV/D shedding in body fluids of cynomolgus macaques and comparison of partial gp70 sequences in SRV/D-T isolates. *Virus Genes.*, Jan. 26, 2007.
- 35) Matsuoka M., Lopez R., Budiawan T., Kyaw K. and Chae G.-T.: Genotypic analysis of *Mycobacterium leprae* isolates from Japan and other Asian countries reveals global transmission pattern of leprosy. *FEMS Microbiol. Lett.* 261 150-154, 2006.
- 36) Miyamoto, Y., T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino: Identification and characterization of the genes involved in glycosylation pathways of mycobacterial glycopeptidolipids biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 188:86-95, 2006.
- 37) Makino, M., Y. Maeda, T. Mukai, and S. H. E. Kaufmann: Impaired maturation and function of dendritic cells by mycobacteria through IL-1 β . *Eur. J. Immunol.*, 36:1443-1452, 2006.
- 38) Maeda Y.: Diagnosis of leprosy- serological aspects. *Jap. J. Leprosy* 75, 285- 289, 2006.
- 39) 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.

- 40) Suzuki, K., N. Nakata, P. D. Bang, N. Ishii, and M. Makino: High-level expression of pseudogenes in *Mycobacterium leprae*. FEMS Microbiol. Lettr., 259:208-214, 2006.
- 41) Makino, M., Y. Maeda, and K. Inagaki: Immunostimulatory activity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG that secretes Major Membrane Protein II of *Mycobacterium leprae*. Infect. Immunity, 74:6264-6271, 2006.
- 42) Kikuchi T, Hara M and Terao K.: Development of microsatellite marker set applicable to genome-wide screening in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), Primates, Nov. 22, 2006.
- 43) 儀同政一: Moxifloxacin と garenoxacin の抗らい菌活性: 日本ハンセン病学会雑誌, 76:11-17, 2007.
- 44) 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, 2007.
- 45) 向井 徹: 迅速・簡易遺伝子診断法の開発. 日本ハンセン病学会雑誌. 75:265-269, 2006.
- 46) 石井則久: ハンセン病. 今日の治療指針 2006 (山口 徹, 北原光夫, 福井次矢総集) 医学書院(東京), p868-869, 2006.
- 47) 森 修一, 石井則久: ハンセン病と医学 1. - 隔離政策の提唱とその背景-. 日本ハンセン病学会誌 75: 3-22, 2006.
- 48) 鈴木幸一, 森 修一, 石井則久: 世界のハンセン病の将来戦略. 日本ハンセン病学会誌 75: 23-39, 2006.
- 49) 石井則久, 森 修一, 鈴木幸一: 世界のハンセン病の現況. 日本ハンセン病学会誌 75: 41-49, 2006.
- 50) 福沢正男, 石井則久: Hansen 病-紅斑を伴う症例-. 皮膚病診療 28: 163-166, 2006.
- 51) 石井則久: ハンセン病. 皮膚科学(片山一朗, 土田哲也, 橋本 隆, 古江増隆, 渡辺晋一編), 文光堂(東京), p708-713, 2006.
- 52) 小野友道, 尾崎元昭, 石井則久責任編集: ハンセン病アトラス p1-70, 金原出版(東京), 2006.
- 53) 石井則久: ハンセン病と皮膚科医. 皮膚科の臨床 48: 727-728, 2006.
- 54) 石井則久: ハンセン病の現状. MB Derma 114: 39-45, 2006.
- 55) 佐藤かずみ, 佐藤則子, 小関正倫, 石井則久: ハンセン病回復者の爪変形について. 横浜医学 57: 95-100, 2006.
- 56) 後藤正道, 野上玲子, 畑野研太郎, 岡野美子, 石井則久, 儀同政一, 石田 裕, 尾崎元昭: ハンセン病治療指針(第2版). 日本ハンセン病学会誌 75: 191-226, 2006.
- 57) 石井則久, 永岡 譲, 森 修一, 鈴木幸一: ハンセン病制圧後のハンセン病対策戦略. 日本ハンセン病学会誌 75: 239-248, 2006.
- 58) 石井則久, 中永和枝, 松岡正典, 鈴木幸一: 抗らい菌の遺伝子診断の現状. 日本ハンセン病学会誌 75: 261-264, 2006.
- 59) 鈴木幸一, 石井則久: 抗酸菌検査. 皮膚科の臨床 48: 1371-1375, 2006.
- 60) 石井則久: ハンセン病-患者を診たときの対応-. 日本皮膚科学会雑誌 116: 1970-1972, 2006.
- 61) 山崎利雄, 儀同政一, 松岡正典: 生物発光による抗らい菌活性測定法の開発. 日本ハンセン病学会雑誌 75 巻 3 号 227-237 2006.
- 62) 鈴木定彦, 松岡正典: DNA マイクロアレイを用いた *Mycobacterium leprae* の迅速薬剤感受性試験法. 日本ハンセン病学会雑誌 75 巻 3 号 271-277 2006.

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⁺ T cell activation by

- antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant BCG. 43rd 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. 43rd 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. 43rd 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. 17th 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. 17th 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- γ 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
- 33) Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino : Clofazimine-induced cell death in macrophages. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 34) 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. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 35) 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. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 36) 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*. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 37) Maeda Y., M. Kai, Y. Fukutomi, and M. Makino: Utility of MMP-II for diagnosis of leprosy. 17th International Leprosy Congress, Pre-workshop, New Diagnostics and Molecular Epidemiology, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 38) Kai, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and M. Makino: Search for *Mycobacterium leprae* antigens for sero-diagnosis. 17th International Leprosy Congress, Pre-workshop, Future Research Needs, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 39) 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.
- 40) 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
- 41) 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
- 42) 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. 18th International Leprosy Congress. Hyderabad, India, February 2007
- 43) Matsuoka M.: Molecular biological techniques for detecting drug resistance. Symposium on Chemotherapy and drug resistance. 18th International Leprosy Congress. Hyderabad, India, February 2007
- 44) 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. 42nd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.
- 45) 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. 42nd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.
- 46) 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
- 47) 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
- 48) 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
- 49) 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
- 50) 和泉眞蔵, Indropo Agusuni, Cita Rosita, 松