

200931040A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

ハンセン病の再発・再燃、難治症例に対する予防・診断・治療と
ハンセン病の啓発に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 向井 徹

平成22(2010)年3月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

ハンセン病の再発・再燃、難治症例に対する予防・診断・治療と
ハンセン病の啓発に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 向井 徹

平成22(2010)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

ハンセン病の再発・再燃、難治症例に対する予防・診断・治療と

ハンセン病の啓発に関する研究

向井 徹..... 1

II. 分担研究報告書

1. 薬剤耐性ハンセン病に関する研究及び調査

甲斐 雅規..... 9

2. 再燃・再発患者に対する血清診断法およびモニタリングシステムの開発

鮫島 朝之..... 15

3. らい菌のマクロファージ内寄生機構に関する研究

鈴木 幸一..... 19

4. 難治症例に対する免疫療法の開発

前田 百美..... 23

5. ハンセン病予防法に関する研究

向井 徹..... 29

6. ハンセン病に対する免疫療法の開発

牧野 正彦..... 37

7. ハンセン病の理解の促進に関する研究

野上 玲子..... 43

8. ハンセン病診療のネットワーク構築

石井 則久..... 51

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 5 5

IV. 研究成果の刊行物・別刷----- 5 9

厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

ハンセン病の再発・再燃、難治症例に対する予防・診断・治療と
ハンセン病の啓発に関する研究

平成21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)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

ハンセン病の再発・再燃、難治症例に対する予防・診断・治療と
ハンセン病の啓発に関する研究

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
感染制御部 室長

研究要旨 現在、世界のハンセン病は、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、再発・再燃を繰り返す難治性ハンセン病や多剤耐性らい菌の出現に対する対策等新たな問題が浮上している。これら諸問題の解決を目指し研究を推進した。薬剤耐性ハンセン病に関する研究では、らい菌薬剤耐性と遺伝子変異の相関の証明手法開発、多検体の耐性変異簡易検出法の確立を行い、また、WHO の薬剤耐性監視事業において世界 11 か所の reference labo. としての検出技術の統一を図った。再燃・再発患者に対する血清診断法およびモニタリングシステムの開発では、再燃例の血清ではらい菌蛋白 MMP II 抗体価は、皮膚病変が広範囲な症例において高値であることを示した。らい菌のマクロファージ内寄生機構に関する研究では、らい菌感染マクロファージでは脂質蓄積に関与する adipose differentiation-related protein や perilipin の発現誘導を示した。難治症例に対する免疫療法の開発では、らい菌リポ蛋白 LpK の N 末ペプチド LipoK はその刺激により、らい菌感染樹状細胞の放出するエキソソームの免疫賦活能を上昇させた。ハンセン病の予防法・免疫療法の開発では、結核ワクチンである BCG に菌由来 Hsp70 とらい菌 MMP-II の融合蛋白を発現させ、このリコンビナント BCG は、樹状細胞と T 細胞を強く活性化し、Hsp70 との融合が CD4、CD8 各陽性 T 細胞の活性化に有用であることを示した。また、安定・安全な組換え BCG に必須である強力な promoter の同定と解析を進めた。サルハンセン病モデル開発では、接種後 58、59 月目のサルの鼻腔内洗浄液より、らい菌遺伝子を検出した。ハンセン病の理解の促進では、理解の指標となる全国紙および地方紙の新聞記事を過去 22 年間検討し、地方紙が理解への役割が大きいことを示した。診療のネットワーク構築では、ハンセン病の講習会・実習を開催し、患者、回復者の診療体制構築を進めた。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

- 甲斐雅規 国立感染症研究所ハンセン病
研究センター感染制御部・室長
- 鮫島朝之 国立療養所星塚敬愛園・医長
- 鈴木幸一 国立感染症研究所ハンセン病
研究センター感染制御部・室長
- 前田百美 国立感染症研究所ハンセン病
研究センター感染制御部・主
任研究官
- 牧野正彦 国立感染症研究所ハンセン病
研究センター感染制御部・部長
- 野上玲子 国立療養所菊池恵楓園・副園長
- 石井則久 国立感染症研究所ハンセン
研究センター・センター長

A. 研究目的

現在、WHO により推進される MDT 療法によりハンセン病の登録患者数は、減少を示している。しかし、新規ハンセン病患者は、世界で年間二十数万人を数え、減少傾向は未だ示していない。さらに、再発・再燃を繰り返す難治性ハンセン病や多剤耐性らい菌の出現への対策が新たな問題として浮上している。また、わが国では症例が極めて少ないため、一般人、医療従事者等への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. 薬剤耐性ハンセン病に関する研究及び調査 (甲斐)
2. 再燃・再発患者に対する血清診断法およびモニタリングシステムの開発 (鮫島)
3. らい菌のマクロファージ内寄生機構に関する研究 (鈴木)
4. 難治症例に対する免疫療法の開発 (前田)

5. ハンセン病予防法に関する研究 (向井)
6. ハンセン病に対する免疫療法の開発 (牧野)
7. ハンセン病の理解促進に関する研究 (野上)
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. 薬剤耐性責任遺伝子領域迅速検出用ヘアピンプライマーによるリアルタイム PCR 法の開発および *M. smegmatis* へらい菌薬剤耐性遺伝子を導入し、最少発育阻害試験を行った。薬剤耐性監視事業のため標準菌液および陰性対照を世界 11 施設へ配布した。
2. 療養所保存および再燃診断血清を用い、らい菌 MMP II を抗原とした ELISA を行った。
3. ヒトマクロファージにらい菌を感染させ、経時的に mRNA、RT-PCR、ウエスタンブロッティングを行った。
4. らい菌リポ蛋白 N 末合成 LipoK をヒト樹状細胞へ添加し、エキソームを精製後、各種免疫学的活性を検討した。
5. 各種 promoter を各種抗酸菌へ導入しその発現能を比較した。integrate 型で Hsp70-MMP II 融合蛋白を発現させる BCG を構築した。
6. Plasmid 型に Hsp70-MMP II 融合蛋白を発現する BCG を用い、ヒト樹状細胞による各種免疫学的活性を評価した。
7. 地方紙と全国 3 紙の 21 年間のハンセン病または菊池恵楓園の関連記事検索を

行った。また、療養所に蓄積された医学資料のアーカイブズ構築を図った。

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し、講習会を開催する。ハンセン病の新規患者については、診療方法、検査法を指導し、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 Consent)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. 開発された検出系の耐性菌による検討の結果、迅速・簡便であった。らい菌薬剤耐性遺伝子変異は、*M. smegmatis* により再現された。

2. ELISA の結果と病態の相関検討では皮疹の範囲が広い病型ほど抗体価が高い傾向を示した。

3. らい菌感染により脂質の蓄積・代謝に重要な宿主蛋白の発現が誘導・維持された。また、Toll 様受容体のシグナルを

抑制した。

4. LipoK 刺激により放出されるエキソームは、MHC Class I, Class II および CD86 抗原を多く含んでいた。

5. 検討した promoter 領域は、各種抗酸菌において発現傾向は同様であり、また、integrate 型 Hsp70-MMP II 融合蛋白は、抗原として充分量を BCG で発現させた。

6. Plasmid 型発現 Hsp70-MMP II 融合蛋白発現 BCG は、樹状細胞の免疫能を増強した。CD8 陽性 T 細胞の活性化は TAP および proteasome に依存した cytosolic pathway によるものであった。

7. 関連記事検索の結果、2001 年の違憲判決、2004 年の宿泊拒否問題以降減少の傾向にあった。また、報道の継続性は地方紙に特徴的であった。

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。回復者の一般医療機関受診機会を広げるため、各種パンフレットを関係機関に配布し、活用を依頼した。2009 年には 2 名の新規ハンセン病患者がいた。主治医に対して検査実技、治療の指導を行った。

D. 考察

1. 今回開発された遺伝子変異検出法は、労力と時間の短縮が可能であり、協力国における臨床応用が期待された。*M. smegmatis* によるらい菌薬剤耐性変異の同定法は、新規変異と耐性の関連性を迅速判定を可能にすると考えられた。各国の協力施設の検査技術統一は、汚染対策の指導が必要と考えられた。

2. 各病型のサンプルを経時的に収集を行い細胞性免疫との関連の検討が必要と考えられた。

3. 菌自身による生存に有利な細胞内環境構築の機構解明は、新たな治療戦略の開発につながると考えられた。

4. LipoK は、様々な免疫学的活性を上昇させるため、抗らい菌生体防御反応亢進に寄与する分子と考えられた。

5. 新規同定 promoter 領域は、安全かつ効果的な組換え BCG ワクチン構築に非常に有用と考えられた。

6. 親株 BCG にない、Hsp70-MMP II 融合蛋白分泌 BCG による T 細胞の抗原特異的活性化の証明は、ヒトの主要組織適合抗原の多様性を考慮すると重要なものであった。

7. マスメディアにおける報道解析は、今後、ハンセン病に関する効果的な情報発信に有益なものであった。

8. 皮膚科医等は、知識吸収の意欲はあり、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が必要である。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. らい菌薬剤耐性変異の迅速・簡易検出法開発、実験室における耐性能解析法開発、世界的検査技術の標準化を進めた。

2. 再燃・再発症例とらい菌抗原に対す

る血清抗体価の関連性の検討を行った。

3. らい菌は寄生細胞内で自身に有利な細胞内環境を構築すると考えられた。

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. 新規 promoter 領域は、安定かつ効果的なハンセン病ワクチン BCG 株構築を可能にすると考えられた。

6. BCG-D70M は、免疫療法剤として有用であると期待された。

7. ハンセン病報道に関し、理解が進んでいるかという視点からの検証が必要である。

8. 皮膚科医が主体的に診療を実施するためのネットワーク作りは、始まったばかりであるが、皮膚科医の教育、回復者の一般医療機関への受診の動きを継続して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) Makino, M., Maeda, Y., Kai, M., Tamura, T., Mukai, T. 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. 55:39-46, 2009.

2) Kobiyama K., Takeshita F., Ishii KJ, Koyama S., Aoshi T., Akira S., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A., Yamanaka Y., Hirano H., Suzuki K., Okuda K. A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class of

- vaccine adjuvant. *J Immunol* 182: 1593-1601, 2009.
- 3) Akama T., Suzuki K., Tanigawa K., Kawashima A., Wu H., Nakata N., Osana Y., Sakakibara Y. and Ishii N. Whole genome tiling array analysis of *Mycobacterium leprae* RNA reveals high expression of pseudogenes and non-coding regions. *J Bacteriol* 191: 3321-3327, 2009.
 - 4) Bang PD, Suzuki K., Phuong LT, Chu TM, Ishii N. and Khang TH. Evaluation of PCR-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy. *J Dermatol* 36:269-276, 2009.
 - 5) Tanigawa K., Suzuki K., Kimura H., Takeshita F., Wu H., Akama T., Kawashima A., and Ishii N. Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signalling in *Mycobacterium leprae* infection. *Clin Exp Immunol*, 156:495-501, 2009.
 - 6) Nakamura K., Akama T., Pham DB, Sekimura S., Tanigawa K., Wu H., Kawashima A., Hayashi M., Suzuki K. and Ishii N. Detection of RNA expression from pseudogenes and noncoding genomic regions of *Mycobacterium leprae*. *Microb Pathog* 47:183-187, 2009.
 - 7) Hatta M., Makino M., Ratnawati, Mashudi, Yadi, Sabir M., Tandirogang N., Rusyati LMM, Kai M., Fukutomi Y., Miyamoto Y., Mukai T., and Maeda Y. Detection of serum antibodies to *M. leprae* Major Membrane Protein-II in leprosy patients from Indonesia. *Lep Rev*. 80: 402-409, 2009.
 - 8) Maeda Y., Tamura T., Matsuoka M., and Makino M. Inhibition of the multiplication of *Mycobacterium leprae* by vaccination with a recombinant *M. bovis* BCG strain that secretes major membrane protein II in mice. *Clin Vaccine Immunol*. 16:1399-1404, 2009.
 - 9) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. Induction of cross-priming of naïve CD8⁺ T lymphocytes by recombinant Bacillus Calmette-Guérin that secretes heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. *J. Immunol.*, 183: 6561-6568, 2009.
 - 10) 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.
 - 11) Mikita N., Kanazawa N., Ozaki M., Kosaka M., Ishii N., Nishimura H., Furukawa F.: No involvement of non-synonymous TLR2 polymorphisms in Japanese leprosy patients. *J Dermatol Sci* 54:48-49, 2009.
 - 12) Li H-J, Kanazawa N., Nakatani Y., Furukawa F., Ozaki M., Kosaka M., Ishii N. : No involvement of the NOD1 polymorphism Glu266Lys in Japanese leprosy patients. *J Dermatol Sci* 56: 72-73, 2009.
 - 13) 鈴木幸一、永岡 譲、森 修一、石井則久. 2008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誌* 78:25-34, 2009.
 - 14) 赤間 剛、鈴木幸一、谷川和也、川島 晃、Huhehasi Wu、石井則久. タイリングアレイを用いたらい菌全ゲノムにおける発現部位の検出. *日本ハンセン病学会誌* 78:49-54, 2009.
 - 15) 鈴木幸一、中村和昭、谷川和也、川島晃、Huhehasi Wu、赤間 剛、林もゆる、関村 慎、Pham Dang Bang、石井則久. らい菌ゲノム由来 RNA 発現の網羅的解析とその意味するもの. *日本ハンセン病学会誌* 78: 61-65, 2009.
 - 16) 石井則久、森 修一、永岡 譲、鈴木

- 木幸一. WHO 第9回ハンセン病制圧のための技術勧告 (Technical Advisory Group: TAG) 会議報告. 日本ハンセン病学会誌 78:75-88, 2009.
- 17) 石井則久、鈴木幸一. 地球温暖化に伴う輸入感染症. 皮膚科の臨床 51:7-11, 2009.
- 18) 永岡 譲、石田 裕、鈴木幸一、石井則久. ミャンマーにおけるハンセン病制圧記念行事 (2009) の報告. 日本ハンセン病学会誌 78:251-253, 2009.
- 19) 石井則久、鈴木幸一. 抗酸菌感染症. 皮膚科の臨床 51:1599-1606, 2009.
- 20) 石井則久、永岡 譲: ハンセン病. 皮膚感染症のすべて (渡辺晋一編集), p174-178, 南江堂 東京 2009.
- 21) 石井則久: ハンセン病. 東京都感染症マニュアル 2009 (東京都新たな感染症対策委員会監修), pp370-371, 東京都福祉保健局 東京 2009.
- 22) 北見由季、北見 周、飯島正文、石井則久: ネパール人男性に生じたハンセン病(BL型)の1例. 皮膚科の臨床 51: 483-486, 2009.
- 23) 森山一隆、菊池一郎、石井則久: ハンセン病患者から生まれた子供たち - 奄美大島における妊娠・出産・保育・養育のシステムの軌跡 -. 日本ハンセン病学会雑誌 78: 231-250, 2009.
- 24) 金澤伸雄、三木田直哉、李 洪錦、中谷友美、尾崎元昭、小坂真紀、石井則久、西村泰行、古川福実: 日本人のハンセン病発症における細菌センサー分子の遺伝子多型の関与. 日本ハンセン病学会雑誌 78: 255-261, 2009.
- 25) 石井則久: Hansen 病の皮膚症状. 皮膚病診療 31: 1366-1370, 2009.
- 26) 石井則久: ハンセン病の現況. 日本皮膚科学会雑誌 119: 2573-2575, 2009.
2. 学会発表
- 1) T. Tamura, Y. Shimohakamada, M. Makino, and K. Takatsu. The role of T cell receptor-mediated signals in Th1 subset differentiation of naïve CD4+ T cells primed with Peptide-25 of Ag85B. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.
- 2) Mukai, T., Y. Maeda, Y. Miyamoto, and M. Makino. Identification of Strong Mycobacterial Promoters from Mycobacteriophage TM4. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.
- 3) Miyamoto, Y., and M. Makino. Biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.
- 4) Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. Apoptosis-inducing activity of clofazimine in macrophages and expression of ER stress proteins in the cells. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.
- 5) Maeda, Y., Y. Fukutomi, H. Wang, T. Tamura, and M. Makino. The fate of mycobacteria in human dendritic cells and macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.
- 6) 野上玲子. 新聞報道記事の検証による、ハンセン病の理解に関する一考察.

日本皮膚科学会第 200 回記念熊本地方会、2010 年 2 月

- 7) 向井 徹. 抗酸菌感染症ワクチンの開発～高発現組換え BCG の構築～. 第 5 回霊長類医科学セミナー、つくば、2009 年 12 月
- 8) 松本悠子、安岡英美、加茂真理子、大内健嗣、石河 晃、石井則久、天谷雅行. 顔面神経麻痺を伴った多菌型ハンセン病の 1 例. 日本皮膚科学会第 824 回東京地方会、東京、2009 年 6 月
- 9) 甲斐雅規、中田 登、松岡正典、椎名 隆、猪子英俊、牧野正彦. らい菌 Thai53 ゲノム由来新規 SNPs の探索. 第 82 回日本ハンセン病学会総会、出雲、2009 年 5 月
- 10) 前田百美、Mochammad Hatta、Ratnawati、Mashudi、Yadi、Muhammad Sabir、Nataniel Tandirogang、Luh Made Mas Rusyati、甲斐雅規、向井 徹、宮本友司、福富康夫、牧野正彦. Major Membrane Protein-II を用いた血清診断法. 第 82 回日本ハンセン病学会総会、出雲、2009 年 5 月
- 11) 赤間 剛、鈴木幸一、谷川和也、川島 晃、Huhehasi Wu、林もゆる、石藤雄子、石井則久、宮村達男. DNA マイクロアレイによるらい菌全遺伝子の発現解析. 第 82 回日本ハンセン病学会総会、出雲、2009 年 5 月
- 12) 谷川和也、鈴木幸一、川島 晃、Huhehasi Wu、赤間 剛、林もゆる、中村和昭、相沢清香、Pham Dang Bang、石藤雄子、木村博昭、生山祥一郎、武下文彦、石井則久. らい菌は宿主マクロファージの TLR シグナルを抑制し細胞内寄生環境を構築する. 第 82 回日本ハンセン病学会総会、出雲、2009 年 5 月
- 13) 細川 篤、山口さやか、宮里仁奈、上里 博、照屋 操、谷川和也、鈴木幸一、松岡正典、矢島幹久、石井則久. TT ～ BT 型が疑われたハンセン病の 1 例. 第 82 回日本ハンセン病学会総会、出雲、2009 年 5 月
- 14) 松尾英一、坂井哲夫、野間口博子、鈴木幸一、脇坂晟、藤岡保範、神谷茂. 血管病変と HI75 の神経侵入. 第 82 回日本ハンセン病学会総会、シンポジウム 1、ハンセン病神経障害総論と最近の知見、出雲、2009 年 5 月
- 15) 鈴木幸一. らい菌の細胞内寄生機構. 第 82 回日本ハンセン病学会総会、シンポジウム 2、らい菌の宿主体内での生き延び策をどう捉え、どう対処するのか. 出雲、2009 年 5 月
- 16) 向井 徹、宮本友司、前田百美、牧野正彦. らい菌蛋白調整に用いる発現用プロモーターの同定. 第 82 回日本ハンセン病学会総会、出雲、2009 年 5 月
- 17) 甲斐雅規、中田 登、松岡正典、椎名 隆、猪子英俊、牧野正彦. らい菌 Thai53 ゲノム由来新規 SNPs の探索. 第 82 回日本ハンセン病学会総会、出雲、2009 年 5 月
- 18) 田村敏生、福富康夫、牧野正彦. 結核・ハンセン病に対するワクチンの開発研究の最前線 (シンポジウム). 第 82 回日本ハンセン病学会総会、出雲、2009 年 5 月
- 19) 石井則久、熊野公子、杉田泰之、野上玲子、細川 篤、牧野正直. 2008 年のハンセン病新規患者発生状況. 第 82 回日本ハンセン病学会総会、出雲、2009 年 5 月
- 20) 熊野公子、村田洋三、土居敏明、庄野又仁、中森利枝、三木綾子、山本維人、石井則久. フィリピン女性の BL 症例新患の 1 例. 第 82 回日本ハンセン病学会総会、出雲、2009 年 5 月
- 21) 細川 篤、山口さやか、宮里仁奈、上里 博、照屋 操、谷川和也、鈴木幸一、松岡正典、石井則久、矢島幹久. TT ～ BT 型が疑われたハンセン病の 1 例. 第

82 回日本ハンセン病学会総会、出雲、
2009 年 5 月

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

22) 欠田成人、山中恵一、磯田憲一、黒川一郎、中村明子、和田英夫、石井則久、水谷 仁. BL 型ハンセン病の 1 例. 第 108 回日本皮膚科学会総会、福岡、2009 年 4 月

23) 前田百美、田村敏生、福富康夫、牧野正彦. Evaluation of exosomes derived from *Mycobacterium leprae* infected dendritic cells. 第 82 回日本細菌学会総会、名古屋、2009 年 3 月

24) 福富康夫、前田百美、牧野正彦. クロファジミンにより誘導されるマクロファージの細胞死と小胞体ストレス蛋白の動態. 第 82 回日本細菌学会総会、名古屋、2009 年 3 月

25) 宮本友司、向井 徹、中 崇、甲斐雅規、前田百美、矢野郁也、牧野正彦. *Mycobacterium avium* complex における glycopeptidolipid 生合成遺伝子群の転写制御解析. 第 82 回日本細菌学会総会、名古屋、2009 年 3 月。

26) 甲斐雅規、藤原永年、宮本友司、向井 徹、矢野郁也、牧野正彦. BCG 菌ミコール酸のサブクラス合成遺伝子の解析. 第 82 回日本細菌学会総会、名古屋、2009 年 3 月

27) 藤原永年、中田 登、中 崇、水野淨子、合田麗奈、牧野正彦、吉村満美子、松本壮吉、前田伸司. *Mycobacterium intracellulare* 由来血清型 7, 12, 13 型糖ペプチド脂質の構造類似性とオリゴ糖解析. 第 82 回日本細菌学会総会、名古屋、2009 年 3 月

28) 下袴田陽子、田村敏生、牧野正彦、高津聖志. 抗酸菌分泌タンパク Ag85B 由来 Peptide-25 による Th1 型免疫応答誘導機序の解析. 第 82 回日本細菌学会総会、名古屋、2009 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

薬剤耐性ハンセン病に関する研究及び調査

平成21年度 分担研究報告書

研究分担者 甲斐 雅規

(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（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

薬剤耐性ハンセン病に関する研究及び調査

研究分担者 甲斐 雅規 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
感染制御部・室長

研究協力者 中田 登 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
感染制御部・主任研究官

研究協力者 松岡 正典 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
感染制御部・研究員

研究要旨 ハンセン病治療に対するらい菌の薬剤耐性と遺伝子変異の相関を直接証明する方法はこれまでなかった。そこで人工的に変異を加えたらい菌遺伝子を持つ組換え抗酸菌を作製し、その薬剤感受性を調べる系を開発し、その有効性を確認した。また、一般に相関が認められている箇所については、早期診断及び適切な治療を目指し、変異の存在を迅速に知るための新しい方法の開発を試み、特殊なプライマーを用いたリアルタイム PCR 法により、同時に多数の耐性変異をテストできる系を確立した。そのような遺伝子変異の有無による耐性検査に関する WHO の薬剤耐性監視事業において耐性獲得に関与する変異検出遺伝子検索を担当する国内外の計 11 ヶ所の reference center における技術の統一を図った。2 施設を除いて PCR による遺伝子増幅の効率が低く、その改善が急務であった。また、FTA[®] elute card はらい菌遺伝子の保存とその後の遺伝子解析に有用であった。

A. 研究目的

目下のハンセン病対策は感染者の早期発見と多剤併用療法を基本に行われている一方、薬剤耐性に関する報告が散発的になされている。耐性菌の拡散を防止し、現行の多剤併用療法の有効性を維持するためには、早期に耐性菌を同定し適切な治療薬を選択することが重要であり、そのための新しい早期診断法の開発を試みる。一方、本来らい菌の薬剤耐性と遺伝子変異の関係について直接的に証明した例

はらい菌が人工培養できないためほとんどない。そこで、人工的に変異を加えたらい菌の標的遺伝子を、人工培地でよく増殖する抗酸菌に入れ薬剤感受性をテストできる系の開発を行う。さらに、薬剤耐性菌の伝搬状況についての包括的把握もハンセン病対策に必須の条件である。WHO により開始された世界規模での耐性菌の拠点監視事業に参加し、検体採取並びに検査施設の検出技術の正確性の統一を図ること、担当国からの検体の検査も

本分担研究の目的の1つである。

B. 研究方法

DDS, rifampicin, quinolone に対する薬剤耐性を惹起することが明らかとなっている Drug resistance determining region (DRDR) における変異を迅速・簡便に検出するためにヘアピンプライマーによるリアルタイム PCR 法 (HPRT-PCR) を開発した。ヘアピンプライマーはプライマー分子がヘアピンループを形成する特殊なプライマーで、増幅スピードに影響することで1塩基の違いを際立たせることになる。このプライマーは各変異箇所毎に末端がそれぞれ A、T、G、C から成る異なる4種のヘアピンフォワードプライマーと同一の通常リバースプライマーを用いた、4種の PCR における増幅効率の違いで末端塩基を同定できることから変異の有無を判定した。

耐性と変異の相関では、*rpoB* 遺伝子断片をらい菌 Thai53 株のゲノム DNA より PCR を用いて調整し、抗酸菌発現プラスミドベクター pMV261 にクローニングした。変異導入 DNA プライマーを用いた PCR によって、プラスミド上の *rpoB* 遺伝子へ様々な点変異を導入した。らい菌 *rpoB* 遺伝子をクローニングしたプラスミドは電気穿孔法により *M. smegmatis* mc²155 株に導入した。*M. smegmatis* の *rpoB* 遺伝子の上流域、及び下流域それぞれ約 1kb を PCR により増幅し、これを元に *rpoB* 遺伝子破壊用組換えファージを得て、これをプラスミド導入 *M. smegmatis* に感染させ、相同組換えにより *M. smegmatis* が染色体上に持つ *rpoB* 遺伝

子の破壊を行った。組換え *M. smegmatis* よりゲノム DNA を回収し、PCR によって *M. smegmatis* 自身の *rpoB* 遺伝子の破壊を確認した。組換え *M. smegmatis* のリファンピシン感受性試験は、様々な濃度のリファンピシンを含む 7H10 寒天培地上での菌の増殖を比較することにより行い、最小発育阻害濃度 (MIC) を決定した。

WHO の薬剤耐性監視事業に関して、DRDR における変異を PCR direct sequence により検査する技術の統一を図るために、各薬剤に対する薬剤耐性遺伝子変異を有する株2株、いずれの薬剤に対しても感受性である株2株、についてそれぞれ $2.0 \times 10^7/\text{ml}$ および $2.0 \times 10^5/\text{ml}$ の異なる菌数を含む 100 μl の 70%エタノール浮遊液2種類、ならびに PCR negative control の1試料を計11施設に配布した。初回は8施設(A-H)、2回目は初回配布施設も含めた11施設(A-K)に配布し、研究分担者らが従来より行ってきた方法に基づいて作成されたWHOのガイドラインに則ったDRDRのPCRによる増幅結果、その変異の有無、それによるアミノ酸置換について報告を求めた。各施設における技術の評価と問題点の改善のための助言を行った。

さらに、現行のらい菌遺伝子解析のための検体保存方法に換え、他の微生物検体の検査にその有用性が報告されているFTA[®] elute cardを用いることが可能か否を検討するため、ミャンマーの2か所の skin clinic において異なる Bacterial Index (BI) の検体を採取し、現行のエタノール保存検体から作成したDNAサンプルと、本法により得たDNAサンプルについてPCRの増幅

効率を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験を含まない。FTAカードの有用性に関する研究においては分担研究、共同研究者の所属する両施設の倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

変異によりダブソン耐性をもたらすことが知られている *folP1* 遺伝子の3か所(157位のA, 158のC, 164のC)の塩基に対してそれぞれヘアピンループプライマーを作成し、ダブソン感受性であるらい菌 Thai-53 株からクローニングした DNA を鋳型にしてリアルタイム PCR を行った結果、それぞれのポジションがA,C,Cであることを Ct 値から確認した。Ct 値は PCR 増幅効率を示す指標で末端のみ異なる4種のヘアピンプライマーでの HPRT-PCR でもっとも数字が少ないものが増幅効率が高いことを示し、実際の配列であると推察できるものである。同様にダブソン耐性菌である Zensho-2 をテストした結果、それぞれ、A,C,T となり、164位のCがTに変異していることを確認でき、本法が変異検出のための迅速・簡便な方法であることが示された。

耐性と遺伝子変異の相関の証明では、まず、らい菌 *rpoB* 遺伝子をプラスミドにクローニングし、*M. smegmatis* に導入し、*M. smegmatis m* の *rpoB* 遺伝子破壊用組換えファージを用いて、染色体上の *rpoB* 遺伝子の破壊を行い、らい菌の *rpoB* 遺伝子に依存して増殖する *M. smegmatis* を作製した。

次にらい菌 *rpoB* 遺伝子のコドン 507、513、516、517、526、531、532、533、547 に変異を加えて 11 種類の変異プラスミドを作製し、それぞれを *M. smegmatis* に導入し、同様に染色体上の *rpoB* 遺伝子を破壊した(コドン番号は大腸菌 *rpoB* 遺伝子に由来する)。これらの菌株のダブソン MIC を測定した結果、コドン 513、516、526、531、533 に変異を持つものは、リファンピシン MIC が 8 倍以上上昇したがコドン 507、517、532、547 に変異を持つものは野生型 *rpoB* と比較して変化が見られなかった(表1)。

表1 変異とリファンピシン MIC

strain	mutation	MIC (µg/ml)
mc ² 155	none	4
M1	507 GGC (Gly) → GGG (Gly)	4
M2	507 GGC (Gly) → AGC (Ser)	4
M3	513 CAG (Gln) → GTG (Val)	64
M4	516 GAT (Asp) → AAT (Asn)	64
M5	517 CAG (Gln) → CAT (His)	4
M6	526 CAC (His) → TAC (Tyr)	32
M7	531 TCG (Ser) → TTG (Leu)	32
M8	531 TCG (Ser) → TGG (Trp)	32
M9	532 GCG (Ala) → TCG (Ser)	4
M10	533 CTG (Leu) → CCG (Pro)	64
M11	547 GTC (Val) → ATC (Ile)	4

薬剤耐性監視事業に関しては、1回目の標準検査試料の配布は 8 reference center、2回目の配布は 11 reference center に対して行われ、それぞれ 4 施設(A, B, C, D)及び 3 施設(A, E, F)より結果が報告された。

1回目配布のサンプルについては 2 施設(A, B)において目的とする 8 検体

3 遺伝子の合計 24 DRDR すべての PCR 産物が得られ、明らかにされている mutant、wild type との一致した結果が報告された。施設 C においては PCR の感度が低く、24 DRDR 中 6 例の解析ができたのみであった。また、施設 D においては同一検体の異なる濃度の 2 例について結果が得られたにすぎなかった。negative control における非特異的増幅はいずれにおいてもなかった。

2 回目配布検体については 1 回目同様、施設 A では目的とする DRDR 全てが解析され、期待される結果と一致した。E においては当初 14/24 について期待される結果が示されたが、negative control において *gyrA* 遺伝子に対し偽陽性が示された。同施設では同一検体に対して nested PCR が適用され、21/24 検体について期待される塩基配列と同一の結果が得られたが、negative control において再度、1 偽陽性が示された。

F においては通常の PCR により 22/24 について DRDR の結果が得られた。それらはいずれも期待される塩基配列であった。

FTA カードの有用性を検討するため BI-1;31 検体、BI-2;48 検体、BI-3;29 検体、BI-4;37 検体、BI-5 以上;47 検体を採取した。それらより RLEP 遺伝子を増幅する PCR を行った結果、FTA カードから作成した template DNA ではそれぞれ 35%、56%、57%、59%、82% の陽性率が示され、一方 70% エタノールにより保存した後、DNA を作成した材料では、45%、46%、57%、62%、77% の陽性率が示された。

実際にベトナム国及びミャンマー

国より検査依頼された再発患者由来サンプルは 2009 年にベトナム国から 4 例、ミャンマー国から 20 例であった。ベトナム国の 4 例のうち 2 例が *folP1* 遺伝子に耐性変異をミャンマー国 20 例のうち 1 例が *folP1* 遺伝子に 1 例が *rpoB* 遺伝子に耐性変異が認められた。

D. 考察

これまでに様々な遺伝子変異検出技術が報告されているが、ヘアピンプライマーを用いたリアルタイム PCR 法の確立は初めてである。本法を用いれば、96well の PCR プレートにより 1 回の反応で 12 か所の変異同定を行うことが可能であり、通常の PCR direct sequence に比べ大幅な労力と時間の短縮が期待される。実際の臨床サンプルについて検討することが必要であるが、すでに研究協力国と連携をしておき今後は臨床サンプルの検討を行う予定である。

リファンピシンは、らい菌の RNA ポリメラーゼ活性を阻害することにより抗菌活性を発揮するとされている。らい菌の臨床分離株の *rpoB* 遺伝子の塩基配列からは主にコドン 511、516、526、531 がコードするアミノ酸部分に塩基の置換が報告されており、この部分の変異がダブソン耐性を引き起こすことが疑われている。らい菌 *rpoB* 遺伝子のコドン 511、516、526、531 のアミノ酸の変異はリファンピシン耐性を引き起こすことが示されたが、コドン 507、517、532、547 の変異はリファンピシン耐性とは無関係であることが示唆され、らい菌臨床分離株で見られる変異にもリファンピ

シン耐性には関わらないものが存在することが示唆された。本研究により、らい菌臨床分離株に見られる *rpoB* 遺伝子の変異の全てがリファンピシン耐性を引き起こすものではないことが示された。本研究で用いた方法を使用すれば、新たに検出されたらい菌 *rpoB* 遺伝子変異がリファンピシン耐性に関わるかどうかを迅速に判定することが可能であると考えられる。

各施設よりなされた報告は PCR direct sequencing の基本となる DRDR の PCR の増幅効率に施設間に大きな差があることを示した。配布された菌液はガイドラインに沿って DNA が調整された場合、 $5.0 \times 10^5/5\mu\text{l}$ あるいは $5.0 \times 10^3/5\mu\text{l}$ のらい菌に相当する DNA を PCR 反応液中に含んでいる。 5.0×10^3 のらい菌に相当する DNA は、PCR により容易に目的遺伝子が増幅される量であるにも関わらず、施設 A と B においては全ての DRDR が解析可能であったが、施設 C, D, E においては PCR により増幅された DRDR が極めて少なく当該施設での PCR の改善が強く望まれた。臨床検体はより低い PCR 陽性率が示されると考えられることから、これら施設を含め、低い PCR 陽性率の改善ために、primer の変更、あるいは nested PCR の適用も考慮する必要があると思われる。また施設 E においては非特異的 PCR 増幅が示され、汚染防止の対策が強く望まれた。目下その原因を調査中である。

FTA カードは液体を全く用いずに DNA を保存するため、輸送に臨床現場から検査施設へ輸送する際に起こる制約から解放される。また検査室における template DNA の調整に際しても

特別な試薬を必要とせず、多くの利点を有する。FTA カードから得た DNA と従来の方法により調整された DNA の PCR 陽性率の間に有意な差はなく、FTA カードをらい菌 DNA の保存、輸送に適用することは今後、多くの利便をもたらすものと考えられた。高い PCR 陽性率が期待される RLEP を対象とした PCR においても BI-5 以上;47 検についても 82%あるいは 77%の陽性率であったことは PCR 陰性の原因の解明が必要である。

各国からのサンプルについてこれまで同様、DNA 抽出、PCR、シーケンスにより耐性菌の監視を行う。

E. 結論

耐性変異を検出する新しい方法を開発した。

らい菌 *rpoB* 遺伝子の変異がリファンピシン耐性を引き起こすかどうかを直接試験する系を開発した。これを用いて、リファンピシン耐性を引き起こす変異と耐性とは無関係の変異を明らかにした。

薬剤耐性遺伝子検査のための quality control を行った結果、基本となる PCR に施設間で大きな陽性率の差が明らかとなった。増幅効率の改善が必要であった。FTA カードはらい菌の遺伝子保存に有用であることが示された。

ベトナム国及びミャンマー国からハンセン病の再発患者検体計 24 例を調査し 2 例でダプソン耐性変異を 1 例でリファンピシン耐性変異を検出した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Makino, M., Maeda, Y., Kai, M., Tamura, T. Mukai, T. 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. Vol. 55:39-46, 2009.

2. 学会発表

1. 甲斐雅規、中田 登、松岡正典¹⁾、椎名 隆、猪子英俊、牧野正彦. らい菌 Thai53 ゲノム由来新規 SNPs の探索. 第 82 回日本ハンセン病学会総会、出雲市、2009 年 5 月

2. 前田百美、Mochammad Hatta、Ratnawati、Mashudi、Yadi、Muhammad Sabir、Nataniel Tandirogang、Luh Made Mas Rusyati、甲斐雅規、向井徹、宮本友司、福富康夫、牧野正彦. Major Membrane Protein-II を用いた血清診断法. 第 82 回日本ハンセン病学会総会、出雲市、2009 年 5 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし