

201028025A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 向井 徹

平成23(2011)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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 向井 徹

平成23(2011)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..... 1 1

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..... 1 7

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..... 2 1

4. 難治症例に対する免疫療法の開発

前田 百美..... 2 5

5. ハンセン病予防法に関する研究

向井 徹..... 3 1

6. ハンセン病に対する免疫療法の開発

牧野 正彦..... 3 7

7. ハンセン病の理解の促進に関する研究

野上 玲子..... 4 3

8. ハンセン病診療のネットワーク構築

石井 則久..... 5 1

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22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 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など新たな問題が浮上している。これら諸問題に対応すべく研究を推進した。薬剤耐性ハンセン病に関する研究及び調査では、迅速な耐性変異検出法開発、迅速発育抗酸菌によるらい菌の遺伝子変異と耐性相関検出系開発および各国の耐性菌疫学を進めた。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、血清診断法のみならず細胞性免疫の検討の必要性を示した。らい菌のマクロファージ内寄生機構に関する研究では、細胞 HSL が治療効果把握への応用の可能性を示した。難治症例に対する免疫療法の開発では、LipoK が誘導する細胞因子が直接らい菌を殺戮することを示した。ハンセン病予防法に関する研究では、組込み型抗原発現 BCG は非常に安定であることを示した。ハンセン病に対する免疫療法の開発では、構築された BCG-D70M は、これまでの組換え BCG の中で、もっとも有望であることを示した。ハンセン病の理解促進に関する研究では、療養所に長期保存された各種資料のアーカイブ化とその有用性を示した。ハンセン病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、今後の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	ハンセン病研究センター
甲斐雅規 国立感染症研究所	感染制御部・部長
ハンセン病研究センター	野上玲子 国立療養所菊池恵楓園・副園長
感染制御部・室長	石井則久 国立感染症研究所
鮫島朝之 国立療養所星塚敬愛園・医長	ハンセン病研究センター
鈴木幸一 国立感染症研究所	センター長
ハンセン病研究センター	
感染制御部・室長	A. 研究目的
前田百美 国立感染症研究所	ハンセン病の登録患者数は、WHO
ハンセン病研究センター	により推進される MDT 療法により減
感染制御部・主任研究官	少を示している。しかし、新規ハン
牧野正彦 国立感染症研究所	セン病患者は、全世界で年間二十数
	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が新たな問題となる。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. 薬剤耐性変異を迅速・簡便に検出するヘアピンプライマーリアルタイム PCR 法 (HPRT-PCR) およびマルチプレックス PCR 法を開発した。耐性と変異の相関では、迅速発育性抗酸菌により、らい菌 *rpoB* のリファンピシン感受性試験を行った。薬剤耐性監視ではメキシコ、ベトナム、ミャンマー国の耐性症例検討を行った。

2. 療養所検診血清を用い、らい菌 MMP II を抗原とした ELISA を行った。末梢血単核球により細胞性免疫能を検討した。

3. ヒトマクロファージにらい菌を感染させ、各種遺伝子発現やタンパク発現を検討した。

4. グラニューライシンおよびグランザイムBをらい菌に添加しその殺菌作用を検討した。

5. らい菌蛋白発現BCGより薬剤耐性遺伝子の除去を進めた。らい菌感染サルを経過を観察した。

6. Hsp70-MMP II 融合蛋白発現 Plasmid を urease 破壊 BCG に導入し構築した BCG-D70M によるヒト樹状細胞の各種免疫学的活性を評価した。

7. 療養所の医療史の英訳、保存資料のアーカイブ化およびその解析を行った。

8. ハンセン病に関する講習会を開催した。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. 既知のダブソン、リファンピシン、キノロン耐性変異の検出が、臨床検体を用いてマルチプレックスと

PCR法 HPRT-PCR法により正確に検出された。らい菌 *rpoB* 変異導入迅速発育抗酸菌株により、リファンピシンおよびリファブチン耐性相関を明らかにした。治療患者より、右と左の耳朶では、耐性菌検出が異なる例を見出した。

2. 本年度の検診血清でも、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。末梢血単核球細胞の解析では、入所者群は刺激によるIL-10、INF- γ 陽性T細胞割合が少ない傾向がみられた。

3. らい菌感染により、細胞内のHSLの発現抑制が認められた。L型皮膚スメアでは発現が消失し、加療後発現が回復した。

4. グラニューライシン、グランザイムBは、直接らい菌を破壊した。

5. 各種 promoter と各種抗原発現 BCG は、安定に発現を維持し、各種 plasmid の導入・脱落過程を進めている。サル感染系では、昨年度菌の検出を認めた個体を含め、全頭に臨床症状は認められなかった。

6. BCG-D70M は、CD8 陽性 T 細胞のみならず CD4 陽性 T 細胞をも活性化した。

7. デジタル化した資料を用いた100年前の死亡者来訪歴解析は、社会科学的材料に、およびサリドマイド使用記録は、これからの使用に意義あるものであった。

8. ハンセン病に関する講習会では24名の参加者であった。ハンセン病療養所退所者等ハンドブックを回復者等に配付することとした。2010年には4名の新規ハンセン病患者がいた。

D. 考察

1. 薬剤耐性変異の迅速診断に向け、ヘアピンプライマーを用いたリアルタイムPCR法を確立した。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、通常法に比べ大幅な労力と時間の短縮が期待された。臨床分離株の変異には、リファンピシン耐性には関わらないものの存在が示唆された。患者の体内の一部に耐性菌が出現し、それらが感受性菌に置き換わるメカニズムが示された。

2. 再燃・再発の評価は抗体価が持続高値の場合は難しい可能性が考えられ、皮膚生検でらい菌陰性かつ抗体染色陽性例が1例の存在も考慮し、抗体価以外に細胞性免疫能の評価も必要と考えられた。

3. 皮膚スメア材料におけるHSL発現変動は、予後や治療効果を判定するマーカーとしての可能性を示唆した。

4. 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し、らい菌を殺戮するものと考えられた。

5. 新規 promoter による BCG ゲノム組み込み型発現系は、長期の継代でもその発現安定性を保ちワクチンとして有用と考えられた。

6. BCG の固有の欠点であるライゾームとの融合阻止を凌駕する二つの独立した方策は、相乗的に有用して強いT細胞の活性化を誘導したのと考えられた。

7. アーカイブ化された100年におよぶ療養所の医学資料は、社会科学的またはサリドマイド使用など医学的にも意義あるものであった。

8. 講習会を通じて皮膚科医等の学

習意欲を持続させるために、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、一步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. 耐性変異を検出する新しい方法を開発した。培養可能抗酸菌を用いた試験系で、リファンピシン耐性の中からリファブチン感受性を検出の可能性を示唆された。メキシコにリファンピシン、キノロン耐性の存在が示された。

2. 再燃・再発のモニタリングシステムの確立には、血清 MMP-II 抗体価の変動をチェックすること以外に MMP-II 刺激などによる細胞性免疫の評価も今後必要と考えられた。

3. らい菌の細胞内感染によって、宿主マクロファージの HSL 発現は強く抑制される。それによって、ファゴゾーム内の脂質が分解から免れることによってその量が維持され、らい菌に利用されるのではないかと考えられた。

4. LipoK によってより多く、グランザイム B およびグラニューライシンが分泌され、これら物質によって、らい菌が作用されることから、免疫療法分子として活用しようと考えられた。

5. BCG において抗酸菌ファージ由来 promoter 領域は、ワクチン効果に充分量の抗原を安定的に産生させた。らい菌接種サルにおいて接種後、6 年目の幼若群および 2 年目の母仔群

サルの観察を継続した。

6. BCG が T 細胞を活性化する際に必要なファゴゾームとライソゾームの融合を誘導する 2 方法を検討してきたが、両者を組み合わせることで、BCG は相乗的に非常に強く T 細胞を活性化し、細胞障害活性を持つことが可能であり、免疫療法剤として必須の因子を獲得することが可能であった。

7. アーカイブ化された資料は、極めて研究価値の高いものであった。

8. 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) Tsukamoto Y., H. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai and M. Makino. Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Vaccine Immunol. 18: 235-242, 2011.

2) Nakata N, Kai M, Makino M. Mutation Analysis of the *Mycobacterium leprae* *folPI* Gene and Dapsone Resistance. Antimicrob Agents Chemother. 55: 762-766, 2011.

3) Kai M., Nguyen P.N.H., Nguyen H.A., Pham T.H.B.D., Nguyen K.H., Miyamoto Y., maeda Y., Fukutomi Y., Nakata N., Matsuoka M., Makino M., & Nguyen T.T. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam.

- Clinical Infectious Diseases. 52: e127-132, 2011.
- clinical application. *Jpn J Infect Dis*. 63: 387-392, 2010.
- 4) Miyamoto Y, Mukai T, Naka T, Fujiwara N, Maeda Y, Kai M, Mizuno S, Yano I, Makino M. Novel rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. *J Bacteriol*. 192: 5700-5708, 2010.
 - 5) Akama T, Tanigawa K, Kawashima A, Wu H, Ishii N and Suzuki K. Analysis of *Mycobacterium leprae* gene expression using DNA microarray. *Microb Pathog* 49: 181-185, 2010.
 - 6) Suzuki K, Takigawa W, Tanigawa K, Nakamura K, Ishido Y, Kawashima A, Wu H, Akama T, Sue M, Yoshihara A, Mori S and Ishii N. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA from archaeological skeletal remains in Japan using whole genome amplification and polymerase chain reaction. *PLoS ONE* 5: e12422, 2010.
 - 7) Suzuki K, Udono T, Fujisawa M, Tanigawa K, Idani G and Ishii N. Infection during infancy and long incubation period of leprosy suggested in the case of a chimpanzee used for medical research. *J Clin Microbiol* 48: 3432-3434, 2010.
 - 8) Akama T, Suzuki K, Tanigawa K, Nakamura K, Kawashima A, Wu H, Sue M, Yoshihara A, Ishido Y and Ishii N. Whole-genome expression analysis of *Mycobacterium leprae* and its clinical application. *Jpn J Infect Dis*. 63: 387-392, 2010.
 - 9) Mukai T, Maeda Y, Tamura T, Matsuoka M, Tsukamoto Y, Makino M. Enhanced activation of T lymphocytes by urease-deficient recombinant bacillus Calmette-Guerin producing heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. *J Immunol*. 185: 6234-6243, 2010.
 - 10) Hayashi, D., T. Takii, T. Mukai, M. Makino, E. Yasuda, Y. Horita, R. Yamamoto, A. Fujiwara, K. Kanai, M. Kondo, A. Kawarazaki, I. Yano, S. Yamamoto, and K. Onozaki. 2010. Biochemical characteristics among *Mycobacterium bovis* BCG substrains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 306: 103-109, 2010.
 - 11) 松岡正典、甲斐雅規. WHO・薬剤耐性らい菌拠点監視事業に関する会議報告, 日本ハンセン病学会誌 80: 71-77, 2011.
 - 12) 石井則久、スマナ・バルア、森修一、永岡譲、鈴木幸一. WHO第10回ハンセン病制圧のための技術勧告 (Technical Advisory Group: TAG) 会議報告書. 日本ハンセン病学会誌 79: 37-42, 2010.
 - 13) 鈴木幸一、森修一、永岡譲、石井則久. 2009年における世界のハンセン病の現状について. 日本ハンセン病学会誌 79: 43-51, 2010.
 - 14) 森修一、鈴木幸一、スマナ・バルア、永岡譲、石井則久. ハンセン病による負荷のさらなる軽減のための強化された世界戦略 日本ハンセン病学会誌 79: 53-73,

- 2010.
- 15) 石井則久. Hansen 病の検査と末梢神経検査. 皮膚病診療 32(増): 92-94, 2010.
 - 16) 石井則久, 森 修一, 朝比奈昭彦. らい菌. 日本臨床 68(増): 165-167, 2010.
 - 17) 石井則久, 小野友道: ハンセン病の医療充実に向けた取り組み. 日本皮膚科学会誌 120: 1673-1674, 2010.
 - 18) 石井則久. サリドマイドのらい性結節性紅斑に対する保険適用に向けて. 日本ハンセン病学会誌 79: 275-279, 2010.
 - 19) 石井則久, 森 修一. 第 1 回日本癩学会の開催日について. 日本ハンセン病学会誌 79: 281-282, 2010.
 - 20) 前田吉民, 石井則久. ハンセン病—発熱と浸潤性紅斑を呈した 1 例. Visual Dermatology 9: 1148-1149, 2010.
 - 21) 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 Hansen 病の 1 例. 臨床皮膚科 64: 337-341, 2010.
 - 22) 四津里英, 石井則久. ハンセン病. 治療 92: 2641-2645, 2010.
2. 学会発表
- 1) K. Tanigawa, A. Kawashima, H. Wu, T. Akama, M. Sue, A. Yoshihara, Y. Ishido, N. Ishii, K. Suzuki. A Role of Adipose Differentiation-Related Protein (ADRP) And Hormone-Sensitive Lipase (HSL) in The *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) Infection Macrophage. The 48th Annual Meeting of The Infectious Diseases Society of America. Vancouver, October 21-24, 2010.
 - 2) M. Sue, T. Akama, K. Nakamura, K. Tanigawa, A. H. Wu, Kawashima, A. Yoshihara, Y. Ishido, N. Ishii, K. Suzuki. Detection of RNA expression from pseudogenes and noncoding regions of *Mycobacterium leprae* genome by tiling array analysis. The 48th Annual Meeting of The Infectious Diseases Society of America. Vancouver, October 21-24, 2010.
 - 3) Maeda Y, Tamura T, Fukutomi Y, Makino M, The fate of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells. 11th International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology, Lugano, Switzerland, Sept 26-30, 2010.
 - 4) Makino, M., T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, Y. Tsukamoto, and M. Matsuoka. Induction of crosspriming of naïve CD8⁺ T lymphocytes by recombinant BCG that secretes HSP70-MMP-II fusion protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Cambridge, Massachusetts, USA. July 13-16, 2010.
 - 5) Mukai, T., Y. Fukutomi, Y. Maeda, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Expression of the fluorescent protein in *Mycobacterium leprae*. US-Japan Cooperative

- Medical Science Program. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Cambridge, Massachusetts, USA. July 13-16, 2010.
- 6) Tamura, T., Y. Shimohakamada, M. Makino, and K. Takatsu. Peptide-25 of Ag85B induces Th1 differentiation in a T-bet-independent manner. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Cambridge, Massachusetts, USA. July 13-16, 2010.
- 7) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. Anti-*M. leprae* activity and Phox expression in human macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Cambridge, Massachusetts, USA. July 13-16, 2010.
- 8) Miyamoto, Y., and M. Makino. Characterization of the glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium avium* complex serovar 20. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Cambridge, Massachusetts, USA. July 13-16, 2010.
- 9) 宮本友司、向井 徹、甲斐雅規、前田百美、中 崇、藤原永年、水野淨子、矢野郁也、牧野正彦. *Mycobacterium avium* complex 血清型 4 型株における glycopeptidolipid の生合成解析. 第 83 回日本細菌学会総会、横浜市、2010 年 3 月
- 10) 天児和暢、飯田健一郎、松岡正典、甲斐雅規、吉田真一. らい菌が培養できない理由. 第 83 回日本細菌学会総会、横浜市、2010 年 3 月
- 11) 中田 登、甲斐雅規、牧野正彦. 抗酸菌 rpoB 遺伝子変異とリファンピシン感受性に関する解析. 第 83 回日本細菌学会総会、横浜市、2010 年 3 月
- 12) 前田百美、田村敏生、甲斐雅規、福富康夫、牧野正彦. らい菌リポ蛋白由来リポペプチドによる宿主細胞内らい菌の殺戮. 第 83 回日本細菌学会総会、横浜市、2010 年 3 月
- 13) 天児和暢、飯田健一郎、松岡正典、甲斐雅規、吉田真一. らい菌が培養できない理由. 第 83 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島市、2010 年 5 月
- 14) 甲斐雅規、松岡正典、宮本友司、牧野正彦. 次世代シーケンス解析によるらい菌株のゲノム配列比較. 第 83 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島市、2010 年 5 月
- 15) 鮫島朝之、前田百美、後藤正道、牧野正彦. Major Membrane Protein (MMP)-II 血清抗体価とハンセン病の病型について. 第 83 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島市、2010 年 5 月
- 16) 森 修一、San Shwe, Le Le Win, Kyaw Myint、鈴木幸一、石田 裕、石井則久. ハンセン病回復者と家族の社会課題と共生政策に関する国際研究—ミャンマーのハンセン病コロニーとコミュニティーの調査から—. 第 83 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島市、2010 年 5 月

- 17) 谷川和也、赤間 剛、川島 晃、Huhehasi Wu、須江麻里子、石藤雄子、石井則久、鈴木幸一。らい菌感染マクロファージ内の脂質維持に対する hormone-sensitive lipase (HSL)の関与。第 83 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島市、2010 年 5 月
- 18) 鈴木幸一、鶴殿俊史、藤澤道子、谷川和也、矢島幹久、宮村達男、伊谷原一、石井則久。乳幼児期感染と約 30 年の潜伏期間を証明し得た LL 型ハンセン病チンパンジーの 1 例。第 83 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島市、2010 年 5 月
- 19) 鈴木幸一、谷川和也、瀧川 渉、石藤雄子、赤間 剛、川島 晃、Huhehasi Wu、須江麻里子、森 修一、石井則久。遺跡で発掘されたハンセン病疑い人骨からのらい菌 DNA の証明。第 83 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島市、2010 年 5 月
- 20) 鶴殿俊史、谷川和也、鈴木幸一、石井久則、藤澤道子、伊谷原一。早期診断と治療に成功したチンパンジーにおけるハンセン病の 1 例。第 16 回日本野生動物医学会大会、福岡市、2010 年 9 月
- 21) 佐宗亜衣子、星野敬吾、櫻井準也、谷川和也、森修一、石井則久、鈴木幸一、平田和明。近世鍋被り葬人骨の分子古病理学的検討。第 64 回日本人類学会大会、伊達市、2010 年 10 月
- 22) 鶴殿俊史、谷川和也、鈴木幸一、石井則久、藤澤道子、伊谷原一。チンパンジーに見られたハンセン病の 1 例。SAGA シンポジウム (SAGA13)、東京、2010 年 11 月
- 23) 福富康夫、前田百美、牧野正彦。ヒトマクロファージの抗らい菌活性発現と phox タンパクの動態。第 83 回日本細菌学会総会、横浜市、2010 年 3 月
- 24) 前田百美、田村敏生、福富康夫、牧野正彦、らい菌のリポペプチドによる抗らい菌生体防御反応に及ぼす影響、第 83 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島市、2010 年 5 月
- 25) 向井 徹、前田百美、福富康夫、宮本友司、松岡正典、牧野正彦。抗酸菌ファージ TM4 に由来する強力な抗酸菌プロモーターの同定。第 83 回日本細菌学会総会、横浜市、2010 年 3 月
- 26) 向井 徹、松岡正典、前田百美、宮本友司、福富康夫、牧野正彦。抗酸菌ファージプロモーターによるらい菌の蛍光蛋白発現。第 83 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島市、2010 年 5 月
- 27) 福富康夫、前田百美、松岡正典、牧野正彦。クロファジミンによる細胞死誘導の機序。第 83 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島市、2010 年 5 月
- 28) 石井則久。皮膚の抗酸菌感染症・ハンセン病。教育講演「重要な皮膚感染症・性感染症」第 109 回日本皮膚科学会総会、大阪市、2010 年 4 月。
- 29) 石井則久、熊野公子、杉田泰之、永岡 譲、野上玲子、畑野研太郎、細川 篤。2009 年のハンセン病新規患者発生状況。第 83 回日本ハンセン病学会総会、鹿児島市、2010 年 5 月。

- 30) 木庭 愛、Paul E. M. Fine、森修一、石井則久. わが国のハンセン病患者の動向の概観—1964年より2008年までのデータをもとに—. 第83回日本ハンセン病学会総会、鹿児島市、2010年5月
- 31) 石井則久、鈴木幸一、永岡 譲. ハンセン病の医療充実に向けた取り組み. 第83回日本ハンセン病学会総会、鹿児島市、2010年5月
- 32) 森 修一、San Shwe, Le Le Win, Kyaw Myint、鈴木幸一、石田 裕、石井則久. ハンセン病回復者と家族の社会課題と共生政策に関する国際研究. 第83回日本ハンセン病学会総会、鹿児島市、2010年5月
- 33) 永岡 譲、田辺清勝、石井則久、矢島幹久、松崎秀男、堀江大介、宇野公男、中井淳仁、松谷有希雄. 経過中に1型らい反応を生じた高齢者のハンセン病再発例. 第83回日本ハンセン病学会総会、鹿児島市、2010年5月.
- 35) 石井則久. 抗酸菌感染症の最近の進歩. 日本皮膚科学会第120回山陰・第16回島根合同開催地方会、鳥取市、2010年7月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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22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

ハンセン病における薬剤耐性に関する研究

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 再任用職員

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新しい方法を開発し、その有効性を評価するとともに本法により得られた結果の臨床応用への可能性を示した。また、耐性との相関が認められている遺伝子変異箇所については、早期診断及び適切な治療を目指し、迅速に検出するための新しい方法、HPRT-PCR 法の開発を行ない、同時に多数の耐性変異をテストできる系を確立した。さらにマルチプレックス PCR 法と併用することで迅速性の向上も行なった。遺伝子変異の有無による耐性検査に関する国外特に、メキシコ、ベトナム、ミャンマーでの調査を行ない、国毎に異なる傾向ではあるがいずれにおいても耐性菌の存在が確認された。その調査結果の一部は WHO の薬剤耐性サーベイランスにおけるリファレンスセンターとして会議にて報告した。

A. 研究目的

現行のハンセン病対策は、専ら多剤併用療法に依っているが、それらに対する薬剤耐性菌の存在が報告がされている。通常感染症においては、薬剤耐性菌は治療を困難にするため、迅速な薬剤感受性試験が必要となるが、らい菌は人工培養不可能であり、その確立された薬剤感受性試験は、動物を用い長い時間と労力を要するため、現実には臨床上早期治療の役には立たない。そのため迅速に結果を得ることが可能な DNA 診断がらい菌の薬剤感受性試験として重要である。早期に DNA 診断により耐性菌を同定し、適切な治療薬を選択することが、耐性菌の拡散を防止し、多剤併用療法の有効性の維持に

も繋がる。そのための新しい早期診断法の開発を行ってきた。一方、臨床分離株に見られる DNA の変異には薬剤耐性と直接関係しないものが存在するため、正確な DNA 診断を行うためには遺伝子変異と薬剤感受性の正確な関係を明らかにする必要がある。そこで、遺伝子変異の薬剤感受性に与える影響を人工培養可能な抗酸菌を用いて試験する系の開発を行い、らい菌臨床分離株に見られる *rpoB* 遺伝子変異のうち、リファンピシン耐性を引き起こすものと引き起こさないものを調べた。さらに、国外における耐性菌の調査は、我が国における耐性菌の今後の動向を知る上で有意義なことである。そのような観点から、これまでその状況がほ

とんど把握されていないメキシコ及びベトナム国における耐性菌の伝播状況について調査した。薬剤耐性菌の伝播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サーベイに協力し、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、さらに担当国からの検体の検査も本分担研究の目的の1つとなっている。

B. 研究方法

ダブソン、リファンピシン、キノロン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、これまでにヘアピンプライマーによるリアルタイム PCR 法 (HPRT-PCR) を開発してきた。本法はヘアピンを形成する特殊なプライマーをフォワードプライマーとして用い、プライマー末端に設定した標的変異箇所の塩基を同定する方法で、これまで標準株である Thai-53 株の DNA から各遺伝子を個別に増幅し、それを用いて、本法の有効性を試験してきた。次に臨床材料由来で様々な薬剤耐性変異株の DNA について検討するとともに、各遺伝子を個別に精製することなく同時に増幅利用するためにマルチプレックス PCR 法の検討も行なった。

耐性と変異の相関では、らい菌 *rpoB* 遺伝子を発現ベクターにクローニングし、それに臨床分離株に見られる変異を加えたものを数種作製した。それぞれを迅速発育性抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* に導入した後、*M. smegmatis* 自身が持つ *rpoB* 遺伝子を破壊し、らい菌 *rpoB* 遺伝子に依存して増殖する *M. smegmatis*

を作製した。これらの株を用いリファンピシン感受性を変異の有無で比較した。さらに、リファンピシン耐性の結核菌の一部に有効とされるリファブチンに対する感受性を試験して比較した。

メキシコの西部および南部地域の 38 例の新患者、治療中のハンセン病症例より、検体を採取した。またベトナム国中部 11 州の新規患者、再発患者、治療中のハンセン病症例より、左右の耳朶、及び皮膚病変部の Slit skin 法によりサンプルを採取し、検査時まで 70%エタノールに保存した。*folP1*, *rpoB*, *gyrA* のダブソン、リファンピシン、キノロンに対する DRDR におけるアミノ酸置換を PCR direct sequence により検索し、それぞれの薬剤に対する感受性を検査した。メキシコサンプルで *gyrA* 遺伝子に Wild type と変異が混在した例について、TOPO TA kit (Invitrogen) を用いて PCR 産物の Cloning を行い、その比率を調べた。

WHO の薬剤耐性サーベイに関して、2009 年はパリにおいて、2010 年は東京において、ベトナム国及びミャンマー国における再発患者での耐性菌状況の結果を報告した。

(倫理面への配慮)

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。検体の採取は通常の菌検査において実施される方法であり、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検体の採取を実施した。本研究は動物実験を含まない。

C. 研究結果

これまでに、ダブソン耐性をもたらすことが知られている *folPI* 遺伝子の3か所(157位のA, 158のC, 164のC)、リファンピシン耐性の *rpoB* 遺伝子4カ所(516位のG、526位のT、531位のC、533位のT)(コドン番号は大腸菌 *rpoB* 遺伝子に由来する)及びキノロン耐性の *gyrA* 遺伝子2カ所(89位のG、91位のC)合計9カ所の変異の有無を調べるためにそれぞれの変異箇所を末端とし、末端塩基のみ異なる4種のヘアピンプライマーを作成し、まず Thai-53 について HPRT-PCR を行なった。その結果、それぞれのポジションが感受性菌の持つ塩基であることを Ct 値(増幅が対数期となるサイクル数を示す)から確認できた。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を用いた HPRT-PCR で最少の数字が増幅効率の高さを示し、試験したサンプルの配列であると推察できるものである。同様に様々な変異を持つ臨床分離株の DNA を用いてテストした結果は、実際の配列と、100%の一致率を示した。また、マルチプレックス PCR 法により臨床分離株から3種の遺伝子を同時増幅し、それを各遺伝子に分けることなくすべての遺伝子変異検出のための DNA テンプレートとして HPRT-PCR で変異の有無を試験することにも成功した。

耐性と遺伝子変異の解析で、これまでにらい菌の *rpoB* 遺伝子に依存して増殖する *M. smegmatis* を作製し、次にらい菌 *rpoB* 遺伝子のコドン 507、513、516、517、526、531、532、533、547(コドン番号は大腸菌のもの)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。次にリファブチンに関して調べた結果、G507S、Q517H、A532S、V547I の変異ではリファンピシン、リファブチンともに感受性を示したことから、これらの変異はらい菌のリファンピシン耐性とは無関係と考えられた。Q513V、H526Y、S531L、S531W、L533P の変異ではリファンピシン、リファブチンともに耐性を示した。D516N の変異ではリファンピシンには耐性を示したが、リファブチンには感受性を示した

メキシコでの調査結果はこれまでにダブソン、リファンピシン、キノロン耐性を惹起することが、明らかとなっている *folPI* 遺伝子の 53、55 位、*rpoB* 遺伝子の 407(513)、410(516)、420(526)、425(531)、427(533)(括弧内は大腸菌での番号)、*gyrA* の 89、91 位の変異により耐性菌の検出を行った結果、38 例中ダブソンに対する耐性はみられなかったが、2 例のリファンピシン耐性例、1 例のキノロン耐性が検出された。2 例のリファンピシン耐性例はそれぞれ 12 ヶ月、22 ヶ月間治療を継続中の症例であった。12 ヶ月間治療した例では左の耳朶からの検体、22 ヶ月間治療した例では右の耳朶からの検体に *rpoB* 遺伝子の変異で最も頻度が高い 425 位の TCG(serine) が TTG(leucine)に置換した変異が見られた。4 か月間治療した症例の右耳朶からは *gyrA* 遺伝子の 91 位に GCA の Wild type と GTA(Valine)の変異

菌が混在している結果が示された。TA cloning の結果、その比率は 4:1 であった。

ベトナムで過去に調査したものと本研究期間に調査したものの合計でまとめると、新患 33 例のうち 2 例 (6.1%) で *foIPI* 遺伝子の 55 位コドンで変異があり、再発患者 14 例のうち 8 例 (57%) で *foIPI* 遺伝子の 53 位コドン (2 例) と 55 位コドン (6 例) に変異があり、治療中の患者 140 例中 9 例 (6.4%) で *foIPI* 遺伝子の 53 位コドン (4 例) と 55 位コドン (5 例) に変異があった。しかし、リファンピシン、キノロンに対する耐性変異は認められなかった。

薬剤耐性監視事業に関しては、再発患者由来サンプルはベトナム国から 2009 年に 4 例、2010 年に 6 例、ミャンマー国から 2009 年に 20 例、2010 年に 21 例であった。まとめるとベトナム国で 10 例のうち 4 例 (40%) が *foIPI* 遺伝子に耐性変異を持ち、ミャンマー国 41 例のうち 6 例 (15%) が *foIPI* 遺伝子に変異が見られた。ミャンマーで 1 例 (2%) が *rpoB* 遺伝子に耐性変異が認められた。

D. 考察

薬剤耐性変異の迅速診断に向け、ヘアピンプライマーを用いたリアルタイム PCR 法を確立した。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た。さらにマルチプレックス PCR を併用することが検討され、有効であることが示されたことから、実際の臨床サンプルを用いた場合、サンプル採取、DNA 抽出、マルチプレックス PCR、

HPRT-PCR、結果判定という一連のステップを 5~6 時間で完了可能であった。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 513、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 513、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。D516N の変異ではリファンピシンには耐性を示したが、リファブチンには感受性を示したことから、この変異を持つらい菌にはリファンピシンは無効だが、リファブチンは有効であることが示唆された。

メキシコの人口は約 109,610,000 人であり、いまだに年間 100 名を超す新患例が報告されている。同国のハンセン病対策は他の国々と同様に多剤併用療法を専らとしているものの、薬剤感受性に関する調査はほとんど行われておらず、わずかに報告者らが行った 1 例のダブソン耐性に関する症例報告があるのみである。本研究ではより多くの検体について検査し、その伝播について明らかにすることを試みた。

38 例中ダブソン耐性例はゼロであった。この値は報告者らが行ったインドネシア (1/121, 0.8%)、ミャン

マー(4/54, 7.2%)、フィリピン(2/77, 2.6%)、インド(7/265, 2.6%)に比して低い傾向が示されたが、母数が少なく、結論を述べるには不十分であった。一方、38例中2例(5.3%)リファンピシン耐性例が見いだされたが、この値は上記国々のそれぞれ3.3%、3.3%、1.8%、1.5%の割合に比し高い値であった。またキノロンに対しては以前の研究では、ミャンマーとフィリピンについて検討されたが、いずれも耐性例は検出されていなかった。これに対し1例の耐性菌が検出されたことは、同国におけるキノロンに対する高い耐性菌の割合が示唆された。

2例のリファンピシン耐性変異はそれぞれの患者の一方の耳朶から検出され、他方の耳朶からは変異株は見出されなかった。また1例のキノロン耐性も一方の耳朶のみから検出され、しかもそれは感受性菌と耐性菌が混在したものだ。このように患者の一部に耐性菌が出現し、それらが感受性菌に置き換わることにより、耐性菌が体内で増加するメカニズムが示された。

ベトナムでの結果から示された特徴は再発患者においてダブソン耐性変異が顕著に高いということであった。その理由として考えられることは、過去にダブソン単剤治療を受けた治療歴がある患者が多いということで、単剤投与で生じた耐性菌が潜伏していたということである。また、多剤併用療法後にも現れる変異菌については耐性菌による1次耐性であることが考えられた。

E. 結論

耐性変異を検出する新しい方法を開発した。マルチプレックスPCR法との組み合わせで臨床サンプルを迅

速に試験可能であることが示された。

培養可能抗酸菌を用いた試験系で、リファンピシン耐性を示すらい菌 *rpoB* 遺伝子変異の中から D516N がリファブチン感受性を示すことが示された。本試験系により、リファンピシン耐性を示す変異の中からリファブチン感受性であるものを検出可能であることが示唆された。

メキシコにおける薬剤耐性菌の伝搬について検査した結果、リファンピシン耐性菌、キノロン耐性菌の存在が示された。

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の2年間の調査ではダブソン耐性変異を示す割合が最も高く、1例のみリファンピシン耐性変異を検出したが、キノロン耐性変異は認められなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Miyamoto Y, Mukai T, Naka T, Fujiwara N, Maeda Y, Kai M, Mizuno S, Yano I, Makino M. Novel rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. J Bacteriol. 192, 5700-5708, 2010.

2) Tsukamoto Y, Endoh M, Mukai T, Maeda Y, Tamura T, Kai M, Makino M. Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Vaccine Immunol. 18, 234-242, 2010.

3) Nakata N, Kai M, Makino M. Mutation Analysis of the *Mycobacterium leprae* *folPI* Gene and Dapsone resistance. Antimicrob Agents Chemother. 55,