

より継続して偽陽性を認めるが、他の全検体では陰性であった。妊娠群においては、鼻腔洗浄液のPCRで、突発的に陽性を認めた。(図2)

#### D. 考察

##### 改変BCGの構築

安全かつ安定な組換えBCGを構築するため、これまで抗酸菌内で強力に働くpromoter領域を抗酸菌ファージに同定してきた。本領域を用いハンセン病ワクチン抗原候補であるHsp70-MMP II融合遺伝子を、BCG urease 遺伝子機能を破壊する位置に組み込み各種クローンを得た。安全性のため、薬剤耐性遺伝子を resolvase により除去を進めている。除去に至るまでには、各種蛋白発現 plasmid を導入、効果発現、脱落のステップを経る。BCGは、遺伝子導入後コロニー出現に約3週間、コロニーをピックアップ後培養に1週間かかる。そのため各ステップには、約2か月の期間を要する。今年度は、promoter、抗原の各種組み合わせ組換えBCG構築の過程において、85LL, 86LL, 86BBの構築まで終了した。現在も構築を進めている。

##### カニクイザルらい菌感染系の構築

昨年度、鼻尖接種幼若サルへの接種後58、59月目の鼻腔内洗浄液に、らい菌遺伝子をnested PCR法の2nd PCRにより検出した。しかし、その後、PCRでは菌排泄は認められず、皮膚症状等も観察されていない。母仔サルの接種系では、母サルの2、10カ月の鼻腔洗浄液にPCR陽性の個体が認められた。これまでも接種後半年間は散発的に菌検出が認められたが、今回10カ月とやや遅れた時期に観察されたため、今後のサンプル解析が期待された。

#### E. 結論

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。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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. Biochemical characteristics among *Mycobacterium bovis* BCG substrains. FEMS Microbiol. Lett., 306: 103-109. 2010.
- 2) Miyamoto, Y., T. Mukai, T. Naka, N. Fujiwara, Y. Maeda, M. Kai, S. Mizuno, I. Yano, and M. Makino. Novel rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. J. Bacteriol., 192: 5700-5708. 2010.
- 3) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. Enhanced activation of T lymphocytes by urease-deficient recombinant Bacillus Calmette-Guérin producing heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. J. Immunol., 185: 6234-6243. 2010.
- 4) 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., in press.

## 2. 学会発表

1) Makino, M., T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, Y. Tsukamoto, and M. Matsuoka. Induction of crosspriming of naïve CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by recombinant BCG that secretes HSP70-MMP-II fusion protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.

2) 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. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13- 16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.

3) 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 2010年3月 横浜

4) 向井 徹, 前田百美, 福富康夫, 宮本友司, 松岡正典, 牧野正彦. 抗酸菌フェージ 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 2010年3月 横浜

5) 向井 徹, 松岡正典, 前田百美, 宮本友司, 福富康夫, 牧野正彦. 抗酸菌フェ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・学術大会 2010年5月 鹿児島市

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

図1. 安全・安定・効果的な抗原発現 rBCGの構築

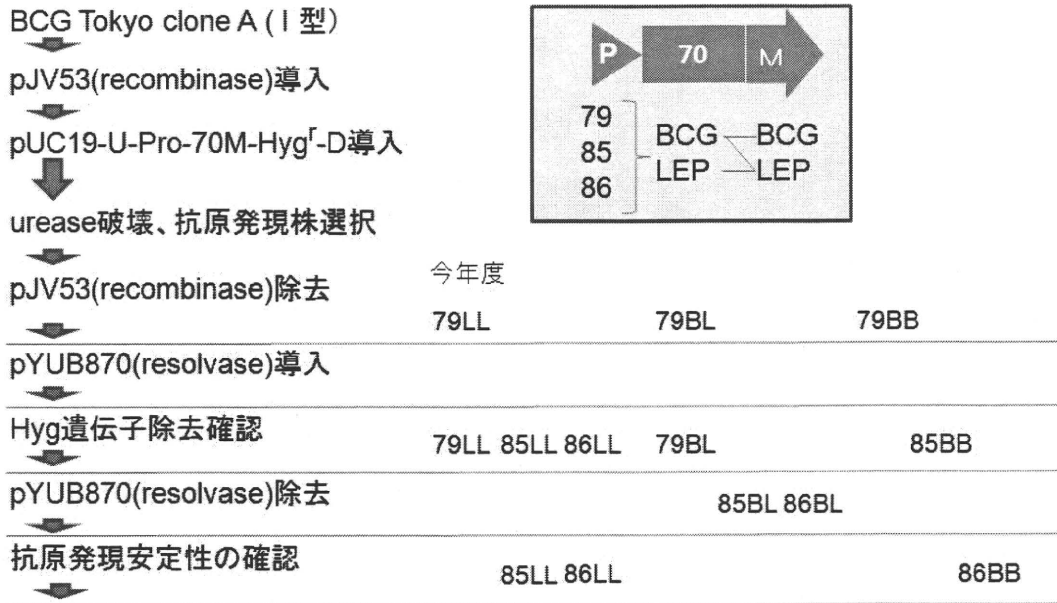
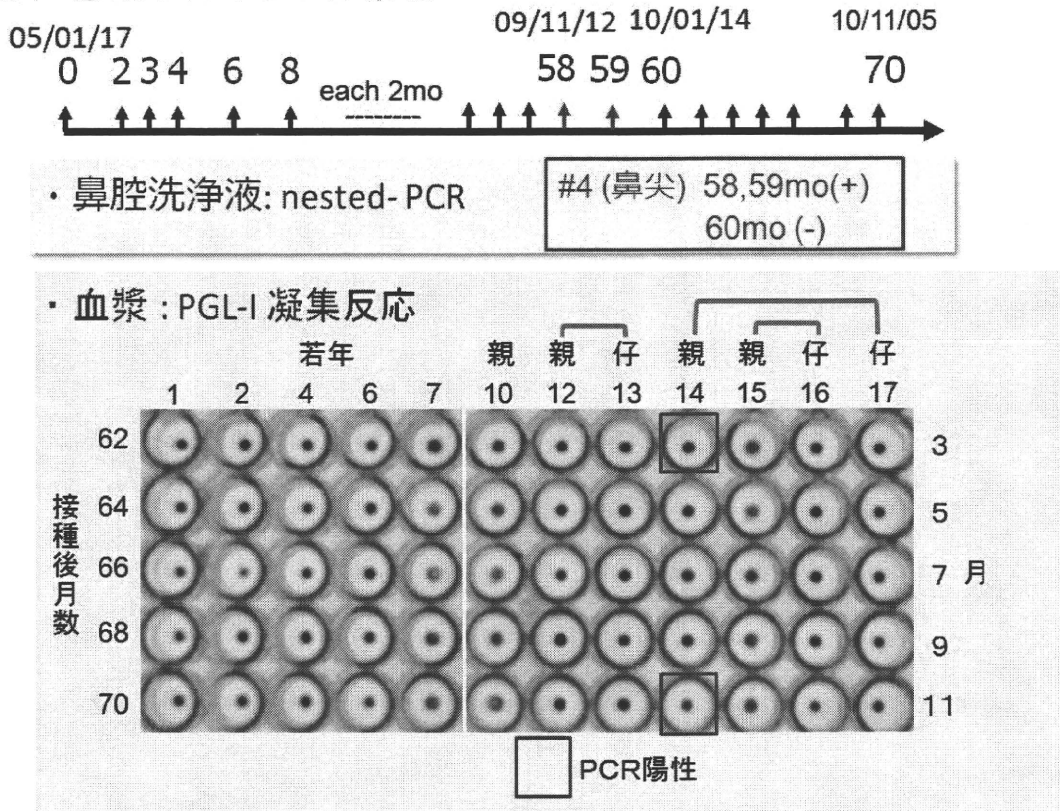


図2. 感染サルサンプル解析



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)

## ハンセン病に対する免疫療法の開発

平成22年度 分担研究報告書

研究分担者 牧野 正彦

(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

ハンセン病に対する免疫療法の開発

研究分担者 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

研究要旨. 弱毒化牛型結核菌 *Mycobacterium bovis* BCG は、タイプ 1 CD4 陽性 T 細胞を活性化し得る免疫賦活剤としての作用を有することが知られている。しかし、CD8 陽性 T 細胞の活性化能は弱く、免疫療法剤として用いるためには、新規リコンビナント BCG の開発が必要である。これまでに CD4 陽性 T 細胞の活性化には、BCG の持つウレアーゼ活性を除去すること、CD8 陽性 T 細胞の活性化には、HSP70-MMP-II 融合遺伝子を BCG に導入することが有効であることを報告してきた。本年度は両者を組み合わせ、ウレアーゼ欠損 BCG に HSP70-MMP-II 融合遺伝子を導入した新しいリコンビナント BCG (BCG-D70M) を作製し、その免疫学的効果を中心に解析した。BCG-D70M は、これまで作製した全てのリコンビナント BCG の中で、最も強く樹状細胞・マクロファージ・CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化した。また、これまでのリコンビナント BCG では不可能であった、マクロファージを介しての CD4 陽性 T 細胞の活性化を可能とした。CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の活性化は抗原特異的であり、BCG-D70M を用いると、ナイーブ及びメモリー CD8 陽性 T 細胞から effector 機能を有するパーフォリン産生性 CD8 陽性 T 細胞の分化誘導が可能であった。また、C57BL/6 マウスを用いて、BCG-D70M の *in vivo*での免疫学的効果を検討すると、MMP-II に反応するメモリータイプの CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞が効率的に産生されることが判明した。したがって、BCG-D70M は、ハンセン病の免疫療法剤として必須の CD8 陽性 T 細胞を非常に強く活性化することが明らかとなった。

A. 研究目的

ハンセン病に対する免疫療法の開発は、らい菌由来抗原を細胞内に保持する抗原提示細胞を殺戮する方策の開発に主眼が置かれている。一方、BCG は病原性抗酸菌症に対するワクチンとして、全世界的に幅広く用いられてきた。結核及びハンセン病に対して一定の予防効果があると考えられてきたが、近年では、ハンセン病に対する

BCG の予防効果は 26% にすぎないと結論付けられ、その最大の欠点は CD8 陽性 T 細胞を活性化し得ないことにあると考えられている。BCG は、CD4 陽性 T 細胞を活性化し、IFN- $\gamma$  などのタイプ 1 サイトカインの産生を誘導する点、各種病原性抗酸菌と共通の分子を有する点は大きなメリットであり、その点が高く評価されている。したがって、BCG に改良を加えることが免疫療法の

開発においても有用であると考えられる。BCGの最大の欠点は、マクロファージなどの抗原提示細胞に貪食された際、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ことにある。したがって、BCG固有の欠点を凌駕するためには、ファゴゾームとライソゾームの融合を促進させることが最も大切となる。BCGの有する *UreC* 遺伝子を除去すると、ウレアーゼの産生が欠如し、ファゴゾーム内のアンモニアの産生を抑制し、ファゴゾームの酸性化を促進してライソゾームと融合し易い環境が産生される。また、BCGから積極的に病原性抗酸菌の主要抗原を分泌させると、分泌された抗原がライソゾームへ取り込まれることも判明した。主要抗原として Major Membrane Protein-II (MMP-II) を用い、さらに、シャペロン効果を有しアジュバント活性を持つ heat shock protein (HSP) 70 を併用する方策も有用と考えられる。すなわち、*UreC* 遺伝子を取り除いたリコンビナント BCG (BCG- $\Delta$ UT) を用い CD4 陽性 T 細胞を活性化し、HSP70-MMP-II 融合遺伝子を導入したリコンビナント BCG (BCG-70M) を用い、CD8 陽性 T 細胞の活性化に成功した。そこで、CD4 陽性 T 細胞の強いヘルプのもとで、CD8 陽性 T 細胞をより強く活性化するため、両方法を組み合わせ、BCG- $\Delta$ UT に HSP70-MMP-II 遺伝子を導入した新規リコンビナント BCG (BCG-D70M) を作製し、その免疫学的効果を検討した。

## B. 研究方法

*UreC* 遺伝子欠損リコンビナント BCG (BCG- $\Delta$ UT-11-3) に、らい菌由来 MMP-II 遺伝子に BCG 由来の HSP-70 遺伝子を結合させ、遺伝子導入しリコンビナント BCG (BCG-D70M) を作製した。正常健康人末梢血より、CD3 モノクロー

ナル抗体付着ダイナビーズを用い T 細胞を除去した後、プラスチック付着性単球を得て樹状細胞のプレカーサーとして用いた。単球に対して、リコンビナント (r) GM-CSF 50ng/ml および rIL-4 (10ng/ml) を添加して 4 日間培養することで、未熟樹状細胞を分化誘導した。この未熟樹状細胞に対して、リコンビナント BCG あるいはベクターコントロール BCG (BCG-261H) を感染させ、GM-CSF および IL-4 存在下で、さらに 2 日間培養することで成熟樹状細胞を得た。BCG 感染樹状細胞の T 細胞活性化能は、BCG 感染樹状細胞をと自己の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞と 4 日間混合培養し、T 細胞が産生する IFN- $\gamma$  を ELISA 法で測定して評価した。T 細胞は、CD4 モノクローナル抗体あるいは CD8 モノクローナル抗体付着ダイナビーズを用いて精製した。IFN- $\gamma$  は、市販の ELISA 用キットを用いて測定した。樹状細胞から産生される各種サイトカインも市販のキットを用いて ELISA 法で測定した。BCG 感染樹状細胞における T 細胞活性化の抗原特異性は、樹状細胞を抗 MHC 抗原抗体および抗 CD86 抗体で処理することで T 細胞の活性化の減弱の有無で評価した。樹状細胞表面の抗原の発現程度は、FACSCalibur を用いて行った。抗体は市販の抗体を用いた。BCG-70M 感染 DC による T 細胞活性化機構を探索する目的で、DC を市販の Chloroquine、Brefeldin A、Lactacystin で処理し、T 細胞の活性化抑制能を T 細胞からの IFN- $\gamma$  の産生量により評価した。

倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを守るため、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、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出

しないよう細心の注意を払った。また、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。

### C. 研究結果

BCG-D70MのCD4陽性T細胞の活性化能を、活性化したT細胞から産生されるIFN- $\gamma$ の量を指標に検討した。コントロールBCGとしてベクターコントロール(BCG-261H)とこれまでに作出したリコンビナントBCGであるBCG- $\Delta$ UT-11-3とBCG-70Mを用いた。その結果、BCG-D70Mが最も強く、かつその濃度依存性に、CD4陽性T細胞を活性化した。また、BCG-D70Mはマクロファージを介してもCD4陽性T細胞を活性化することが可能で、大量のIFN- $\gamma$ がCD4陽性T細胞から産生された。これら樹状細胞及びマクロファージを介したBCG-D70MによるCD4陽性T細胞の活性化は抗原特異的反応であり、BCG-D70Mを感染させた抗原提示細胞をHLA-DRあるいはCD86抗原に対する抗体で処理すると、その活性化は90%以上抑制された。次いで、BCG-D70MのCD8陽性T細胞活性化を検討すると、BCG-D70Mは、BCG-261H、BCG- $\Delta$ UT-11-3あるいはBCG-70Mより強くナイーブCD8陽性T細胞を活性化しIFN- $\gamma$ の産生を誘導した。このT細胞の活性化は抗原特異的であって、BCG-D70M感染樹状細胞表面を抗HLA-ABC抗体あるいは抗CD86抗体で処理すると、そのT細胞活性化能は強く抑制された。BCG-D70MがT細胞を強く活性化するためには、BCG-D70Mは抗原提示細胞をも強く活性化する必要がある。そこで、BCG-D70MのIL-12p70産生誘導能を檢

討した。その結果、BCG-D70Mはこれまで作出した全てのリコンビナントBCGの中で、最も強く樹状細胞を刺激し、大量のIL-12p70の産生を誘導した。さらに、BCG-D70Mは強くIL-1 $\beta$ ・TNF $\alpha$ の産生をも誘導し、同時に、樹状細胞表面上のHLA-DR・CD86・CD83抗原の発現を増強させた。BCG-D70MによるT細胞活性化機構を探る目的で、樹状細胞を予めクロロキニンで処理し、その後BCG-D70Mを感染させると、BCG-D70Mの感染によって誘導されるMMP-IIの発現が著しく抑制され、同時に、樹状細胞をクロロキニン処理することでBCG-D70MによるCD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞の活性化が有意に抑制された。マクロファージによるCD4陽性T細胞活性化もクロロキニン処理で抑制された。一方、樹状細胞をBrefeldin AあるいはLactacystinで処理しても、CD8陽性T細胞の活性化は同様に抑制された。このことから、BCG-D70MはHSP70-MMP-II融合タンパクを分泌し、分泌された融合タンパクがCD4陽性T細胞の活性化とCD8陽性T細胞の活性化をもたらし、CD8陽性T細胞の活性化はクロスプレゼンテーション機構によって生じているものと考えられた。また、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。CD4陽性T細胞存在下でCD8陽性T細胞をBCG-D70Mで刺激すると、ナイーブ及びメモリーCD8陽性T細胞からパーフォリン産生性T細胞が産生され、さらに、遊走能を有するメモリーT細胞が産生された。

### D. 考察

BCGをハンセン病に対する免疫療法剤として用いる場合、その最も期待される効果は、CD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞を強く活性化し、最終的に細胞障害活性を持つCD8陽性キラーT

細胞を産生することにある。現行の BCG では、どちらの T 細胞をも活性化する能力が弱く、そのため改善が求められている。BCG の持つ最大の欠点は、BCG が抗原提示細胞に取り込まれた場合、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ことで、機能的な Phago-lysosome を形成し得ないことにある。この欠点を凌駕するため種々の試みを行ってきたが、基本となる考え方は二つに大別される。一つは、BCG 感染ファゴゾームを酸性化することでライソゾームとの融合を促進させることであり、この目的のため *UreC* 遺伝子を欠損させた BCG- $\Delta$ UT-11-3 を作製した。その結果、BCG- $\Delta$ UT-11-3 は容易にライソゾームに取り込まれることが確認できた。第二の試みは、ファゴゾームの中でタンパクを分泌させることである。分泌されたタンパクにより、CD8 陽性 T 細胞がより強く活性化されることを期待し、抗酸菌主要抗原である MMP-II と HSP70 が融合したタンパクをファゴゾームの中で分泌し得るリコンビナント BCG (BCG-70M) を作製したところ、期待した通り融合タンパク特異的に CD8 陽性 T 細胞が活性化された。そこで、本年度は両方法を組み合わせた新しいリコンビナント BCG (BCG-D70M) を作製した。BCG-D70M は、*UreC* 遺伝子を欠く一方で、HSP70-MMP-II 融合タンパクをコードする遺伝子を持つ BCG である。結果として BCG-D70M は、CD4 陽性 T 細胞も CD8 陽性 T 細胞も非常に強く活性化し、その程度は BCG- $\Delta$ UT-11-3 及び BCG-70M より強力であった。さらに、BCG-D70M は他のリコンビナント BCG に比し、最も効率的にライソゾームに取り込まれることも確認でき、予想した通りの結果が得られた。また、T 細胞の活性化は抗原特異的であり、BCG-D70M は BCG-70M と同様に

HSP70-MMP-II 融合タンパクが両サブセット T 細胞の活性化に強く関与しているものと考えられた。その最大の理由は、BCG-D70M は *UreC* 遺伝子を欠くため、BCG-D70M はファゴゾーム内に留まらず、ライソゾームへ容易に取り込まれ、ライソゾーム内で融合タンパクを分泌したため、分泌タンパクがより効率良くプロセッシングを受けたためと想定された。

したがって、BCG の固有の欠点であるライソ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ものと考えられた。そのため、BCG-D70M はこれまでのリコンビナント BCG の中で、最も効率的に CD8 陽性キラー T 細胞を産生したものと考えられた。

## E. 結論

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。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Miyamoto, Y., T. Mukai, T. Naka, N. Fujiwara, Y. Maeda, M. Kai,



- S. Mizuno, I. Yano, and M. Makino. 2010. Novel rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. J. Bacteriol., 192: 5700-5708.
- 3) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. 2010. Enhanced activation of T lymphocytes by urease-deficient recombinant Bacillus Calmette-Guérin producing heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. J. Immunol., 185: 6234-6243.
  - 4) Kai, M., N. P. N. Ha, N. H. An, P. T. H. B. Diu, N. K. Hoa, Y. Miyamoto, Y. Maeda, Y. Fukutomi, N. Nakata, M. Matsuoka, M. Makino, and N. T. Tan. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam. Clin. Infect. Dis., in press.
  - 5) 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., in press.
2. 学会発表
- 1) Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, and M. Makino. The fate of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells. 11<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology. 26-30 September, 2010, Lugano, Switzerland.
  - 2) 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. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
  - 3) 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. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
  - 4) Makino, M., T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, Y. Tsukamoto, and M. Matsuoka. Induction of crosspriming of naïve CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by recombinant BCG that secretes HSP70-MMP-II fusion protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
  - 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. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
  - 6) Miyamoto, Y., and M. Makino. Characterization of the glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium avium* complex

- serovar 20. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 13-16 July, 2010, Cambridge, Massachusetts, USA.
- 7) 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 2010 年 3 月 横浜
- 8) 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 2010 年 3 月 横浜
- 9) 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 2010 年 3 月 横浜
- 10) 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 2010 年 3 月 横浜
- 11) 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 2010 年 3 月 横浜
- 12) 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・学術大会 2010 年 5 月 鹿児島市
- 13) 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・学術大会 2010 年 5 月 鹿児島市
- 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・学術大会 2010 年 5 月 鹿児島市
- 15) 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・学術大会 2010 年 5 月 鹿児島市
- 16) 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・学術大会 2010 年 5 月 鹿児島市
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
  2. 実用新案登録 なし
  3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

ハンセン病の理解の促進に関する研究

平成22年度 分担研究報告書

研究分担者 野上 玲子

(国立療養所 菊池恵楓園)

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

ハンセン病の理解の促進に関する研究

研究分担者 野上 玲子 国立療養所菊池恵楓園 副園長

研究要旨 国内で最も古い官立ハンセン病療養所の一つであった当園の百年に及ぶ歴史は、熊本におけるハンセン病史そのものであり、日本のハンセン病史を読み解く上で重要な資料を提供すると思われる。菊池恵楓園の歴史から日本のハンセン病史が見えてくることを意図して「百年の星霜」を編集、さらに、海外に向けた情報発信を図るために英語訳を行った。将来に亘りハンセン病の正しい理解が促進されるために、当園に蓄積されている医学資料などの資料をアーカイブ化し、ニュートラルな立場で、医学、医学史、あるいは社会科学における貴重な資料として残すことを提言し、その方策を検討してきたが、その利活用の例として①明治42年～45年の死亡者来歴(44名)の検討②サリドマイド使用例(22名)の検討を行った。明治年間の来歴と病床日誌はわが国における公立のハンセン病療養所開設当初を物語るもので、きわめて研究価値が高く、他分野との共同研究にも供されるべきものであることがわかった。サリドマイドの歴史的利用状況については、ENLを克服しなければならない患者への示唆を与えることは間違いない。これらの研究は、元になる資料が残されていなければ不可能であって、われわれが取り組んでいるアーカイブ化の事業の重要性と、将来に多くの実りをもたらす得ることを示したものと考える。メディアに対しても絶え間ない情報発信することが公平な視点での報道を促し、正しい理解の促進のための啓発に影響を与えていくと考える。

A. 研究目的

医学的情報の偏在がハンセン病への偏見を助長したことが否めないと考えるので、菊池恵楓園に残る資料を材料としてそこから熊本のハンセン病史が見え、さらに近代日本のハンセン病史が見えてくる方策をたてる。

1. 菊池恵楓園からの情報発信

園の百年の歴史は近代日本のハンセン病医療の歴史そのものとかぶる部分が多い。日本のハンセン病史における熊本、菊池恵楓園の立ち位置を明らかにした「百年の星霜」の英語版に

取り組み、海外から見えにくいとされている本邦の療養所におけるハンセン病医療の情報を世界に向けて発信する。

2. 菊池恵楓園に蓄積されている（医学）資料のアーカイブ化とその活用  
利活用の例として次の2つの研究を行った。

1) 菊池恵楓園の前身である九州癩療養所が開所された明治42（1909）年、43年、44年、45年（7月29日まで）の死亡者来歴の検討：  
当園開所当時の状況を知る最も古い資料の部類と考えられ、あわせて近代

日本のハンセン病対策の初期の状態を類推することができる。

2) 当園におけるサリドマイドの使用の歴史について：

大風子の時代から、ENL には医師も患者も苦しんできたが、1965 年 Sheskin の報告後、サリドマイドは ENL の症状コントロールに欠かせない薬剤となった、という記録がありその実態を調査する。

### 3. マスメディアによる報道の検討

全国紙と地元紙を比較しつつ、マスメディアによるハンセン病報道への重点の置かれ方を調べる。

## B. 研究方法

### 1. 菊池恵楓園からの情報発信

「百年の星霜」をもとに、海外から理解がより容易となるよう詳細な部分を削除し、大極的な解説を追加し、英語に翻訳する。

2. 菊池恵楓園に蓄積されている（医学）資料のアーカイブ化の利活用

1) 明治 42 (1909) 年、43 年、44 年、45 年死亡者来歴の検討。

(1) 当該資料の保存環境を記録する。

(2) 当該資料をデジタルデータ化し、以後の作業に供す。

(3) 原本の状態を観察する。

(4) 来歴の記載事項、記載内容を調査する。

2) 当園におけるサリドマイドの使用の歴史について：

(1) 既に故人となっている者も含め L 型の患者のカルテを無作為に選び、その中からサリドマイド使用者を抽出する。

(2) カルテの記載内容から、サリドマイドの処方歴（処方日、用法、用量、処方日数）、その当時の菌指数、使用中の抗ハンセン病薬、処方医を調査す

る。

### 3. マスメディアによる報道の検討

昨年 に 倣 い、新聞横断検索データベースを用いて、朝日、読売、毎日各紙と地元熊本日日新聞紙上における 2010 年 1 月 1 日から 12 月 21 日までに掲載された「ハンセン病」または「菊池恵楓園」関連の記事を調べる。

(倫理面への配慮)

出版物「百年の星霜」、新聞横断検索データベースともに公にされているもので、倫理上の問題はないと判断した。来歴、診療録等の医学資料については、故人のものも生存している人のものと同等の個人情報保護の配慮を行い、情報の保有者が特定できないようにした。

## C. 研究結果

1. 別添にて目次欄を示す。

2. 1) 明治 42 (1909) 年、43 年、44 年、45 年死亡者来歴の検討

(1) 当該資料の所在 当園中央倉庫、カルテ棚の、医学資料と思われる未整理の紙資料の棚にあった。

(2) 保存環境 直射日光の影響はないが、温度・湿度環境は悪い。虫害対策もない。

(3) 保管状態 一部はヒモでまとめられ、横積みにしてある。いつこのような形にまとめられたか不明。また、中央倉庫に収められるまでの経緯も不明。

(4) 原本の状態

明治 42 年死亡者来歴：上部の紐綴じ。表紙のみ紐が通されておらず、糊ではりつけられていた。表紙には「明治四十二年死亡」と記載。この表紙は両面印刷の診療録の 3 号用紙を利用したもののようなので、カルテの大きか

りな整理が行われた時期の特定につながるであろう。明治43年、明治44年、明治45年死亡者来歴：患者毎に冊子にされた「病床日誌」数冊が紐で一括りにされている。紐には「明治四十三年（四十四年、四十五年）死亡」と記された革のタグが付されていた。

冊子は左を紐で綴じてある。綴じ方は袋綴じで、冊子によっては綴じた裏面にも記録がなされている。冊子の表紙には患者の「来歴」が糊で貼り付けられている。「来歴」のみで「病床日誌」を伴わないものもある。表紙は明治42年死亡者来歴と同じ形式である。

#### (5) 調査対象資料の数

来歴：片面印刷の計 45枚 (44人分)  
病床日誌：袋綴じ両面 22冊 (22人分)

	M 42	M 43	M 44	M45
死亡退所者数 (50年史による)	13	17	12	16
来歴数 (患者数)	11	14	13	7 (6)

但し、M45の死亡退所者数には大正元年の死亡者も含まれる。

#### (6) 44名の集計

- ・男30, 女5, 空欄9 (男8, 女1か?)
- ・本籍：福岡13, 熊本10, 鹿児島, 大分4, 沖縄3, 佐賀, 宮崎2, 長崎, 滋賀, 愛媛, 新潟1, 不明2
- ・現住所：熊本13 (花園：本妙寺界限9), 不定5, 福岡, 宮崎, 沖縄, 神奈川1, 空欄22
- ・送致県：熊本23, 福岡6, 鹿児島4, 長崎, 沖縄3, 大分, 宮崎2, 全生病院移送1
- ・病型：結節癩27 (31.07±8.42歳), 神経癩15 (39.13±11.59歳), 斑紋癩2
- ・死亡時満年齢：34.8±11 (15-67)歳
- ・発病年齢：17.42±14.14 (6-66)

不詳13名

- ・発病から入所までの経過年数：8.9±9.81 (1-41)
- ・発病から死亡までの経過年数：9.76±9.75 (2-41)
- ・死因病名：結核関連疾患14 (肺結核、肋膜炎、腸結核、腹膜炎、脳膜炎) 呼吸器疾患8 (肺炎、気管支炎、喘息) 衰弱、癩性衰弱、癩病 7 膿毒症 2 脱疽 2 腎臓炎 2 僧帽弁不全閉鎖症 2 動脈瘤 1 パラチフス 2 餓死 1 自殺 1
- ・入所から1ヶ月以内の死亡例 (4日-23日) 8例：(熊本県花園村3, 住所不定1) 癩(病)衰弱 4 (明治42年死亡者) 腸結核 2, 喘息、僧帽弁不全閉鎖症、各1

#### 2. 2) 当園におけるサリドマイドの使用の歴史について

- (1) サリドマイド使用例 22人  
男性 16名 (開始時17歳~57歳)  
女性 6名 (同42歳~76歳)
- (2) 使用開始時期と薬剤名について  
当園では、1970年より使用が開始され、当初Thalimin、1977年9~10月にCGにかわった。
- (3) 用法、用量など
  - ・初回投与量は、30mg 1x (眠前) ~ 120mg 2x1 (朝、眠前)
  - ・最大量 200mg 2x1
  - ・最小量 5mg
  - ・通常、50~60mg 発熱のあるとき100~150mgを7日分~14日分処方、症状軽快とともに減量、中止し、ENLの再燃とともに処方を繰り返しているケースが多い。
  - ・連続して処方されている場合も、10日やそれ以上の間隔で受診して7日分ずつ処方されているようなものもある。または、屯用として5包等処方されているものもある。
  - ・神経痛を伴うとき、しばしばステロ

イドと併用されている。一方、神経痛を主訴とする者に対し、長期間処方されているものもある。

3. マスメディアによる報道の検証  
各紙に掲載された記事の件数は下の表のとおりである。

	朝日	読売	毎日	熊日
ハンセン病 or 恵楓園	122	110	206	137
菊池恵楓園	13	10	19	92
ハンセン病 (not 恵楓園)	109	100	187	45

#### D. 考察

明治 42 年死亡者の資料は、九州療養所ができた年に入所した患者の資料であり、当園所蔵資料の中では最も古い部類に入る。明治 42 年の来歴には空欄が多く、翌年からは性別など基本的な項目についての記載漏れが減っているように見える。この年は来歴のみで診療録（病床日誌）がない。明治 42 年 12 月 23 日に死亡した患者についても、来歴のみである。診療録が失われたのか、存在しなかったのかは更なる資料の検討を待たねばならない。

明治 43 年死亡者の診療録（病床日誌）はおそらく菊池恵楓園所蔵のものでは最も古く診療録の体裁を知る上で重要である。ここには、明治 42 年 4 月 30 日に収容された患者の病床日誌が含まれているが、いつ記載されたものかは今のところ手がかりがない。

現住所を見ると本妙寺界限が 9 名、うち 7 名は明治 42 年の収容であり、当初本妙寺境内の浮浪患者を熊本県の送致により収容したとの記録に一致する。入所から 1 ヶ月以内（4 日～23 日）の死亡例 8 名は本妙寺界限の者 3 名、住所不定 1 名となっている。またこの 8 名中、4 名は明治 42 年死亡者

で死因は癩(病)衰弱となっている。この頃に収容された浮浪患者の中に、病が重篤でかなり衰弱した患者が含まれていたことがわかる。結核性疾患の合併も多かったことがわかる。

診療録については今回詳しい検討を行わないが、きわめて興味深いいくつかの研究課題が考えられる。例えば、いつ頃から当該形式の診療録を使用するようになったのか。当園の初代園長は他の 4 園と異なり医師であったが、患者来歴や診療録には他園との間に差があるか。また、他のハンセン病施設、あるいは他の疾患の診療録、また、当園所蔵の大正、昭和期の診療録との比較により、本疾患に対する医学的関心事項の移り変わりが時代背景とともに見えてくる可能性がある。

患者の職業、宗教等、社会科学的にも興味深い研究材料を提供するだろう。

ENL（らい性結節性紅斑、Erythema nodosum leprosum）または 2 型らい反応に対するサリドマイドの適正使用ガイドライン策定のため、過去 5 年間の使用経験を調査したが、菊池恵楓園では該当者は 1 例だけであった。筆者が知る限り 1996 年以降 ENL を生じた例は当該例を含む 4 例で、そのうちサリドマイドを使用したのは 2 例である。しかし、ハンセン病の治療法が確立するまで LL ないし BL の患者は長期にわたり病状が安定せず ENL に苦しめられたと言われており、1965 年 Sheskin の報告後、当園でもサリドマイドの使用が始まり、ENL の症状コントロールに欠かせない薬剤となった、という記録がある。

ハンセン病の多発国では ENL を発症する患者が多いことが推測され、WHO/MDT の普及により短期間の治療で完治が期待されるようになったとはいえ、ENL やその際の全身

症状、眼合併症への対応や神経障害予防については十分とはいえない現状ではないかと思われる。MDT下におけるENLのコントロールや、本邦でのGL策定に過去の使用経験がそのまま適用できるとは考えないが、使用の歴史について述べた文献もなく、使用状況を明らかにすることには意義があると考えた。

当園においてはサリドマイドは1970年から使用され80年前後まで汎用されているが、80年代後半から使用例が減少しているのがわかった。これはこの頃ENLの症例が減ってきたことを意味し、抗ハンセン病薬の効果によって菌量が減り治癒する症例が増えていったことを示していると言えるだろう。

使用期間は3ヶ月から17年に亘るものもあり、連続的または断続的、あるいは比較的長期の休薬期間を挟むもの、などがあつた。サリドマイドの使用期間が長期に亘るのは、ENLが長期に亘り消長を繰り返していたからであり、それはとりもなおさず、その当時スルホン剤を主体とした抗ハンセン病薬による本病のコントロールが困難を極めていたことを示している。

用法に関しては、眠前1回、分2(朝、眠前)、また分2でも眠前の量を多くするなどがあつた。次の投薬日までの期間より少ない日数の処方が行われる例が大多数であつたが、連続して服用したのち何日か休薬するのか、不規則に、あるいは1日おきなどに服用しているのか、入院の症例を除き、服用状況の詳細は不明である。

当時の処方医でもあつた医師によると、サリドマイドは発熱などの全身症状を伴うENLに連続投与し、効果は並べて短期間のうちに著効したという印象が持たれている。再びENL

が現れればその都度対症的に投与した。少量で効果があればそれで十分なので量を調節したが、ステロイドのような使い方とは元来全く異なるものである。10～5mgまで漸減したり隔日または週3回投与とする投与方法は22症例の500件に及ぶ処方例の中で2症例4件みられ、このうち1例は76歳と高齢者だった。投与方法の評価は困難である。

2010年のハンセン病に関する話題は基本法に基づく保育所の開設問題や、予防法廃止と国賠訴訟で貢献のあつた大谷藤郎氏の訃報などがあり、これらは地元紙と全国紙で等しく取り上げられていた。2011年は国賠訴訟から10年になり、いくつかの特集がくまれることが予想される。地元誌ではこれらに加えよりきめ細かで継続的な報道がなされているのが際立ち、菊池恵楓園からの絶え間ない情報発信が影響を与えていると考える。

## E. 結論

ハンセン病の理解を促進するため、当園に蓄積されている医学資料などの資料をアーカイブ化し、ニュートラルな立場で、医学、医学史、あるいは社会科学における貴重な資料として残す方策を検討中であるが、その利活用例として今回の研究を行った。明治年間の来歴と病床日誌はわが国における公立のハンセン病療養所開設当初を物語るもので、きわめて研究価値が高く、他分野との共同研究にも供されるべきものである。サリドマイドの歴史的利用状況については、ENLを克服しなければならぬ患者への示唆を与えることは間違いない。これらの研究は、元になる資料が残されていなければ不可能であつて、われわれが取り組んでいるアーカイブ化の事業の重要性と、将来に多くの実りをもた



らし得ることを示したものと考える。

メディアに対しても絶え間ない情報発信することが公平な視点での報道を促し、正しい理解の促進のための啓発に影響を与えていくと考える。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

なし

別添

The view from archives

-History of Hansen's disease-  
Information dispatch from Kikuchi Keifuen

< contents >

Prologue Kikuchi Keifuen Director : Dr. Masataka Harada

Section 1 Prior to the establishment of Kyushu Sanatorium

Chapter 1 History of Kumamoto Hansen's disease  
From Louise Almeida to Shonan Yokoi  
Kumamoto medical science in the Meiji era

Chapter 2 Related places or facilities in Kumamoto prefecture  
Honmyoji  
Kaishun Hospital  
Tairouin

Section 2 History from the establishment of the Kyushu Sanatorium to present

Chapter 1 Founding the sanatorium

Establishing the sanatorium's presence  
Topography

Chapter 2 The facility

The site · The structure

Chapter 3 Medical Treatment

Treatment and Research  
Consignment medical treatment

Chapter 4 Nursing

History of Nursing and Caring  
Education · Training  
Nurturing Nurses and the Nursing School

Chapter 5 Inpatients

Food · Clothing · Shelter  
Recreation · Amusement  
Inpatient operations (engagement in activity application)  
and community return  
Inpatients' education  
Patients' Jichikai Association  
Visiting one's old home project  
Relation with the Imperial House  
Regarding release from the sanatorium  
Enlightenment activities

Chapter 6 Affairs · Incidents

"F" Incident  
Tatsudaryo Incident  
Hotel reservation rejection Incident  
The abolition of the Leprosy Prevention Law; and the  
National Compensation case

Chapter 7 The successive Directors

The successive directors' profiles and achievements

Chapter 8 Open Sanatorium

Sanatorium prospectus  
Hansen's disease institute and the 100th anniversary celebration  
The 81st Japan Hansen's disease institute general meeting  
Research meeting  
The 20th Co-medical research assembly  
The 100th anniversary of the founding of Kikuchi Keifuen

Epilogue Kikuchi Keifuen vice director : Dr. Reiko Nogami

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)

## ハンセン病診療のネットワーク構築

平成22年度 分担研究報告書

研究分担者 石井 則久

(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

ハンセン病診療のネットワーク構築に関する研究

研究分担者	石井則久	国立感染症研究所ハンセン病研究センター センター長
研究協力者	森 修一	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
	永岡 譲	国立療養所多磨全生園 皮膚科医長
	四津里英	国立国際医療センター皮膚科 レジデント
	中永和枝	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
	小茂田昌代	東京理科大学薬学部医療安全学 教授

研究要旨 日本におけるハンセン病診療がスムーズに行われるようにネットワーク構築を目指した。20名の皮膚科医にハンセン病の講習会・実習（皮膚スメア検査、神経肥厚触診、病理組織検査など）を行い、ハンセン病患者・回復者の診療体制を構築した。さらに、ハンセン病回復者が安心して一般病院を受診できるように退所者ハンドブックを作成し、皮膚科医の一覧を掲載し、ハンセン病診療がスムーズに行われるようにした。

A. 研究目的

日本におけるハンセン病診療がスムーズに行われるようにネットワークの構築を目指す。

B. 研究方法

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、鑑別方法、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）

患者情報については入手しないため、倫理上の問題はない。

C. 研究結果

患者の減少のため、皮膚科医が診療する機会が殆どない。そのため24名

に対してハンセン病講習会を実施した（参加者：皮膚科医20名、回復者4名）。ハンセン病の知識、回復者の心情、皮膚スメア検査実習、神経肥厚の触診、病理組織検査などを実施し、知識・技術の伝達を行った。多くの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をお聞きした。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こととした。

ハンセン病回復者は、過去の偏見・差別の歴史から、なかなか一般医療機関を受診する勇気がない。一般医療機関受診のチャンスを広げるため、研究分担者が厚労省疾病対策課と共同で作成し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