

201123007A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 向井 徹

平成24(2012)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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 向井 徹

平成24(2012)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 3

4. 難治症例に対する免疫療法の開発

前田 百美..... 2 9

5. ハンセン病予防法に関する研究

向井 徹..... 3 3

6. ハンセン病に対する免疫療法の開発

牧野 正彦..... 3 9

7. ハンセン病の理解の促進に関する研究

野上 玲子..... 4 5

8. ハンセン病診療のネットワーク構築

石井 則久..... 5 5

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23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検査機関の技術指導を行った。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、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、今後の再燃に対する基礎データの蓄積を行った。らい菌のマクロファージ内寄生機構に関する研究では、宿主細胞 HSL が治療効果把握への応用を試みた。難治症例に対する免疫療法の開発では、LipoK により刺激された樹状細胞放出エキソソームに特定のらい菌膜成分が多く含まれることを示した。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 は非常に安定かつ安全性を高めた。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、追加免疫在の検討を行った。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より 2 型らい反応治療へのサリドマイド使用指針作製に活用した。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

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

ハンセン病研究センター
センター長

A. 研究目的

抗酸菌に属するらい菌の慢性感染症であるハンセン病の登録患者数は、WHO により推進される MDT 療法により減少を示している。しかし、新規ハンセン病患者は、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. 薬剤耐性を惹起する変異を検出するため、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、臨床材料で様々な薬剤耐性変異株の検討すすめ、マルチプレックスPCR、試薬の固相化により迅速性を検討した。

変異と耐性の相関を解明では、迅速発育抗酸菌 *M. smegmatis* を用い、らい菌 *gyrA* 遺伝子を標的にオフロキサシン感受性を試験法の確立を試みた。

WHO指定の感受性試験施行施設の検査法精度検証のため、標準菌浮遊液を配布し、その結果を受けた。

2. 国立療養所の検診時の血清 200 名を用い抗体価を測定した。細胞性免疫能は、培養末梢血単核球細胞にらい菌細胞質を添加し、T 細胞等より産生された INF- γ 、IL-10 などのサイトカインを測定した。

3. らい菌の特殊性を解明するために細胞内寄生の分子機構に関する研究を行うためヒト前単核球細胞株に菌を感染させ、経時的に mRNA とタンパクを調製し、各種遺伝子発現やタンパク発現を RT-PCR、realtime-PCR および Western blotting により

確認した。

4. LipoK またはらい菌を添加した樹状細胞の抗原提示能を自己T細胞の活性化を指標に解析した。4-6 日目に細胞をコンフォーカル顕微鏡およびオーラミンO抗酸菌染色を行った。T 細胞と混合培養した樹状細胞の活性化は、表面抗原の発現を指標とし FACS にて測定した。培地中に放出されるエクソソームの精製はヒト MHC Class II ビーズを用いた。

5. らい菌蛋白発現組換えBCGより薬剤耐性遺伝子の除去を進め、培養上澄に分泌される抗原をウエスタンブロット法にて検討した。らい菌感染サル経過を鼻腔洗浄液のPCR、血清の抗体凝集反応および視診により経過観察した。

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。*M. smegmatis*を宿主とし、調整されたらい菌組換え蛋白の免疫誘導を検討した。

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。ハンセン病に関する新聞報道記事の検討を行った。

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、講習会などを開催を行った。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）

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. 薬剤耐性をもたらす9カ所の変異の有無を判別する HPRT-PCR を開発した。様々な変異を持つ臨床分離株に応用した結果、ほぼ 100% の一致率を示した。マルチプレックス PCR 法により各遺伝子に分けることなく HPRT-PCR で変異の有無判定に成功した。試薬をプレートに固相化し、数ヶ月保存後の使用にも同じ結果を得た。

らい菌 *gyrA* 遺伝子を導入した *M. smegmatis* に対し、同菌が元々染色体上に持つ *gyrA* の破壊を試みたが破壊菌は得られず、機能の置き換えに成功しなかった。

薬剤耐性菌監視事業における検査技術の検証では、配布 17 施設中、13 施設から結果の報告がされ、4 施設に PCR 感度が低く、本来 PCR 陽性であるべき何例かの検体が陰性と報告された。

2. 今年度の検診血清 MMP-II 抗体価は、各病型群間において Unpaired Student's t-test で吸光度の値に有意差が認められた。L2、L3 など過去の皮膚病変の広範囲な多菌型の症例ほど抗体価(吸光度)は高値を示した。細胞性免疫解析では MMP-II 刺激の INF- γ 、IL-10 は、多菌型で少菌型よりやや少ない傾向がみられた。

3. 脂質の異化作用に関わる宿主酵素 HSL 総量はらい菌感染減少を示したのに対し、タンパク機能発現に重要である Ser563 位および Ser565 位のリン酸化は感染後1時間でほぼ消失することが特異抗体を用いた Western blotting の結果明らかと

なった。したがって、らい菌感染によって HSL の RNA およびタンパク発現レベルが抑制される以前に、HSL の脱リン酸化が起こり脂質異化作用が抑制されることが判明した。

4. らい菌感染樹状細胞を LipoK 刺激により、より多くの感染細胞を破壊するパーフォリン、グランザイム、グラニューライシンが T 細胞から産生された。コンフォーカル顕微鏡観察で菌の膜抗原が樹状細胞の膜表面側に観察された。さらに細胞表面の抗原を FACS で分析すると、MHC class I, II, CD86 の発現が増加した。また、放出されるエクソソームを解析に、約 35kD のバンドが抗らい菌膜抗体で検出された。

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、各種クローンを調整した。分泌は、BCG 由来 Hsp70 はらい菌由来 Hsp70 より効率的に分泌された。サル感染系では、2頭の接種親ザルに菌排泄を認めた。

6. MMP-II 及び HSP70-MMP-II 融合蛋白は、ヒト由来樹状細胞にパルスした後抗原提示細胞として用いると、メモリータイプ CD4 陽性 T 細胞及び未感作 CD4 陽性 T 細胞を活性化して INF- γ の産生を誘導した。いずれの場合においても、MMP-II と HSP70-MMP-II を比較すると、融合蛋白の方が T 細胞活性化能は強かった。

7. 療養所の医療史英訳「The View from Archives - History of Hansen's Disease in Kumamoto, Japan - Information dispatch from Kikuchi Keifuen」として作成した。療養所保管紙資料について、簿冊目録を作成した。新聞報道記事の検討では、全紙ともに、らい予防法廃止(1996年)を機に増加傾向がみられ2001年のハンセン病国倍訴訟違憲判決関連で急峻なピークを形成したのち、その後は徐々に下降線を辿っている。

8. ハンセン病に関する講習会では30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。2011年には5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開発は、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。さらに臨床サンプルを用いた場合、一連のステップを3-4時間で完了可能であった。

M. smegmatis の *gyrA* 機能をらい菌の *gyrA* で置き換えることに成功しなかった。らい菌 *gyrA* のコドン出現頻度が *M. smegmatis* の *gyrA* と異なることが原因である可能性があった。

WHO による拠点監視事業においては16か国の27拠点のうち2ヶ所の施設では、PCRの条件の検討が必要であった。sequencingは適性に行われていると考えられた。

2. 皮膚病変の広範であった多菌型ほどMMP-II血清抗体価は今年度も高かったが、細胞性免疫能の病型による差異については、今後さらに症例数を増やしての検討が必要と考えられた。

3. 皮膚スミア材料における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. HSLは、マクロファージでは主に細胞質中に局在し、脂質を分解する際に脂肪的表面に移動することで、蓄積されたTAGを遊離脂肪酸とグリセロールに分解して、再びエネルギーとして細胞外へ放出させる役割を担っている。THP-1細胞にらい菌を感染させると短時間でHSL発現が減少するが、さらに短時間のうちのHSLタンパクの脱リン酸化を行うことでその機能を阻害することが明らかになった。

5. 長期継代でも安定にかつ薬剤耐性遺

伝子を持たないため安全な組換えBCGの構築法の構築は、様々な応用が考えられた。妊娠中に菌接種された親ザル2頭に菌排泄が認められたことは、宿主の自然な免疫低下時に易感染状態であることが考えられた。

6. ハンセン病に対する免疫療法の開発は、T細胞を活性化する抗原提示能を有するらい菌保有細胞を殺戮し、生体外へ排除することを目的としている。HSP70-MMP-II融合蛋白を分泌するリコンビナントBCG、MMP-II蛋白あるいはHSP70-MMP-II融合蛋白は*in vitro*及び*in vivo*において両サブセットのT細胞を活性化することが可能であり、リコンビナントBCGと蛋白抗原を組み合わせることで良好な免疫療法剤が開発可能と考えられた。

7. 療養所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海外に向けた情報発信を図るために英語版として出版した。国内外の医学史研究家に貴重な研究資料を提供したと考えている。

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た。詳細に長期に亘る臨床経過を記録した診療録は、ハンセン病の病態を明らかにする上で、貴重なデータを提供することになり、保存と利活用の意義が大きいことを物語っている。

8. ハンセン病患者が減少し、一度も診療機会がない皮膚科医が大多数を占める。講習会を通じて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、ハンセン病回復者などから生の声を聞いて、患者と医師とのあるべき関係を構築することも大事である。2011年は5名の新規患者が登録され在日外国人3名、日本人が2名であった。

E. 結論

1. 耐性変異を検出する新しい方法を開発し 3-4 時間で臨床サンプルを迅速に検査可能であった。

培養可能抗酸菌 *M. smegmatis* を用いて、らい菌 *gyrA* 遺伝子変異とキノロン剤感受性の関係を試験する系の開発を試みたができなかった。

WHO による薬剤耐性拠点監視事業の技術評価では、ほとんどの施設では適正であったが、一部の施設では技術向上が求められた。

2. ハンセン病における再燃・再発のモニタリングシステムの確立には、血清 MMP-II 血清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能の評価も今後必要と考えられた。

3. らい菌は宿主マクロファージに感染後、ファゴゾーム内に脂質を蓄積するために宿主遺伝子発現を誘導し、自身の生存に有利な細胞内環境を構築すると考えられた。

4. LipoK は、らい菌感染細胞を活性化し、T 細胞の存在下でより高い効率で細胞内菌が抗原提示され、T 細胞が活性化されることから、LipoK は免疫療法に活用しうる分子であると考えられた。

5. ワクチン抗原候補を安定・安全に分泌する組換え BCG を構築した。らい菌接種サルにおいて接種後、母仔群サルの母ザル 2 頭に菌排泄を認めた。

6. MMP-II 及び HSP70-MMP-II 融合蛋白はハンセン病に対する免疫療法剤として有効と考えられた。

7. ハンセン病の理解の促進のためには、正確な偏らない情報を、発信し続けなければならない。

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 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yokoyama K., Kim H., Mukai T., Matsuoka M., Nakajima C., Suzuki Y., Amino acid substitutions at position 95 in GyrA can add fluoroquinolone resistance to *Mycobacterium leprae*. Antimicrobial Agent Chemother. 56:697-702, 2012.
- 2) Nakata N., Kai M., Makino M. Mutation Analysis of Mycobacterial *rpoB* Genes and Rifampicin Resistance Using Recombinant *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrobial Agent Chemother. doi:10.1128/ AAC. 05831-11, 2012.
- 3) Khin S. A., Matsuoka M., Kai M., Kyaw K., Win A. A., Shwe M. M., Thein M., Htoo M. M., & Htoon M. T. FTA Card Utility for PCR Detection of *Mycobacterium leprae*. Jpn J Infect Dis. 64 246-248, 2011.
- 4) Li W., Matsuoka M., Kai M., Thapa P., Khadge S., Hagge D. A., Brennan P. J., Vissa V. Real-time PCR and high resolution melt analysis for rapid detection of *Mycobacterium leprae* drug resistance mutations and strain types. J Clin Microbiol doi:10/ 1128 / JCM.05183, 2011.
- 5) Y. Maeda, T. Tamura, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, and M. Makino. A lipopeptide facilitate induction of *Mycobacterium leprae* killing in host

- cells. PLoS Neglected Tropical Diseases, 5: e1401, 2011.
- 6) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. R. Yotsu, M. Makino, and N. Ishii. Nineteen cases of Buruli ulcer diagnosed in Japan from 1980 to 2010. J. Clin. Microbiol., 49: 3829–3836, 2011.
 - 7) Naka, T., N. Nakata, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Doe, S. Mizuno, M. Niki, K. Kobayashi, H. Ogura, M. Makino, and N. Fujiwara. Structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. J. Bacteriol., 193: 5766–5774, 2011.
 - 8) Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. Apoptosis-inducing activity of clofazimine in macrophages. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55: 4000–4005, 2011.
 - 9) Nakanaga, K., Y. Hoshino, Y. Era, K. Matsumoto, Y. Kanazawa, A. Tomita, M. Furuta, M. Washizu, M. Makino, and N. Ishii. Multiple cases of cutaneous *Mycobacterium massiliense* infection in a “hot spa” in Japan. J. Clin. Microbiol., 49: 613–617, 2011.
 - 10) Suzuki K., Akama T., Kawashima A., Yoshihara A., Yotsu RR and Ishii N. Current status of leprosy: epidemiology, basic science and clinical perspectives. *J Dermatol* 38:1–9, 2011.
 - 11) Suzuki K., Tanigawa K., Kawashima A., Miyamura T. and Ishii N. Chimpanzees used for medical research shed light on the pathoetiology of leprosy. *Future Microbiol* 6:1151–1157, 2011.
 - 12) Ishii N., Nagaoka Y., Mori S., Suzuki K.: Hansen’s disease in Asia. Asian skin and skin diseases (Eun HC, Kim S-C, Lee W-S ed), pp 335–342, MEDrang Inc. (Seoul, Korea), 2011.
 - 13) Nakanaga, K., Y. Hoshino, Y. Hattori, A. Yamamoto, S. Wada, K. Hatai, M. Makino, and N. Ishii. Mycobacterium pseudoshottsii isolated from 24 farmed fishes in western Japan. J. Veterinary Medical Science, in press.
 - 14) Nakanaga, K., Y. Hoshino, M. Wakabayashi, N. Fujimoto, E. Tortoli, M. Makino, T. Tanaka, and N. Ishii. *Mycobacterium shigaense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic mycobacterium that produced nodules in an erythroderma patient with severe cellular immunodeficiency and a history of Hodgkin’s disease. J. Dermatol., in press.
 - 15) 松岡正典: WHO Global leprosy Programme による薬剤耐性拠点監視事業における我々の役割。日本ハンセン病学会雑誌 80:287–291, 2011
 - 16) 木庭 愛、森 修一、石井則久: わが国のハンセン病患者の動向。日本ハンセン病学会誌 80: 11–16, 2011.
 - 17) 石井則久、鵜殿俊史、藤澤道子、伊谷原一、谷川和也、宮村達男、鈴木幸一: チンパンジーとハンセン病。日本ハンセン病学会誌 80: 29–36, 2011.
 - 18) 石井則久、森 修一: ハンセン病医学夏期大学講座の歴史。日本ハンセン病学会誌 80: 47–52, 2011.
 - 19) 四津里英、鈴木幸一、森 修一、石井

- 則久: ハンセン病の診断. 日本ハンセン病学会誌 80: 57-70, 2011.
- 20) 森 修一、鈴木幸一、スマナ バルア、石井則久: 2010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 80:37-46, 2011.
 - 21) 石井則久、四津里英: ハンセン病の診断と治療. 診断と治療 99 (増刊) 336-344, 2011.
 - 22) 服部玲子、伊東由紀子、日下秀人、中西朝子、中林 洋、石井則久: 高度な鼻閉を訴えたら反応患者の1例. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 83, 75-78, 2011.
 - 23) 石井則久、四津里英、森 修一: 愛知県のハンセン病外来診療について. 日本ハンセン病学会誌 80: 261-268, 2011.
 - 24) 石井則久、石田 裕、岡野美子、尾崎元昭、儀同政一、熊野公子、後藤正道、野上玲子、畑野研太郎、山田 暁、四津里英: らい性結節性紅斑(ENL)に対するサリドマイド診療ガイドライン. 日本ハンセン病学会誌 80: 275-285, 2011.
 - 25) Matsuoka M. Edited by Makino M., Matsuoka M., Gotoh M, and Hatano K. Leprosy chapter 3 Microbiology and Experimental Leprosy. Tokai University Press, Kanagawa, Japan Total page 274 (partial page 36-47) 2011
 - 26) Kai M. Edited by Makino M., Matsuoka M., Gotoh M, and Hatano K. Leprosy chapter 9 Serology. Tokai University Press, Kanagawa, Japan Total page 274 (partial page 108-115) 2011
2. 学会発表
 - 1) Makino, M., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and T. Mukai. Naïve T cell activation by urease-deficient recombinant BCG that produces HSP70-MMP-II fusion protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 2) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Metabolome analysis of mycobacteria. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 3) Tamura, T., and M. Makino. The role of *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein in the induction of Th1 immune response. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 4) Mukai, T., Y. Maeda, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Development of a stable and high recombinant protein expression system in mycobacterium. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 5) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. Anti-*M.*

- leprae* activity and phox localization in human macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
- 6) Maeda, Y., T. Tamura, M. Kai, T. Mukai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Increased expression of cytolytic effector proteins in human T cells co-cultured with dendritic cells by stimulation with *Mycobacterium leprae* lipopeptide. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 7) Kai, M., H. Yamada, N. Fujiwara, S. maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, I. Yano, and M. Makino. Functional analysis of *mmaA2* and *mmaA4* in *Mycobacterium bovis* BCG Connaught. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 8) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. Yotsu, N. Ishii, and M. Makino. Nineteen cases of Buruli ulcer diagnosed in Japan, 1980-2010. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 9) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae rpoB* gene and rifampicin resistance using recombinant *Mycobacterium smegmatis*. 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agent Chemotherapy. 17-20 September, 2011, Chicago, USA.
 - 10) Tamura, T., and M. Makino. Peptide-25 of Ag85B induces Th1 differentiation in a T-bet-independent manner. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 11) Maeda, Y., T. Tamura, M. kai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Induction of intracellular killing of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells by a lipopeptide-mediated activation of T cells. XIII International Congress of Bacteriol Applied Microbiol. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 12) Nakata, N., M. Matsuoka, M. Makino, and M. Kai. Whole-genome comparison of *Mycobacterium leprae* strains differing in growth rate. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 13) Mukai, T., M. Matsuoka, Y. Maeda, Y. Miyamoto, Y. Fukutomi, and M. Makino. Identification of novel promoter of Mycobacteriophage TM4 to obtain fluorescent-*Mycobacterium leprae*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.

- 14) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. kai, Y. Maeda, and M. Makino. Characterization of intracellular metabolites from *Mycobacterium leprae*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 15) Kai, M., H. Yamada, N. Fujiwara, S. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, I. Yano, and M. Makino. Establishment and characterization of knockout mutants of *Mycobacterium bovis* BCG gene involved in mycolic acid synthesis pathway. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 16) Tsukamoto, Y., M. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. Activation of human naïve T cells of both CD4 and CD8 subsets by *Mycobacterium tuberculosis* major membrane protein II. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 17) K. Suzuki, T. Udono, M. Fujisawa, K. Tanigawa, G. Idani, T. Miyamura and N. Ishii. Infection during Infancy and Long Incubation Period of Leprosy: A West African Chimpanzee Shows Signs of Leprosy after 30 Years in Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology). September 6-10, 2011, Sapporo. Japan.
- 18) Matsuoka M. WHO drug resistance screening and surveillance program in leprosy. International Symposium on Mycobacteria and Drug resistance. Uberandia., July 2011, Brazil.
- 19) N. Ishii, K. Suzuki. Overview of Mycobacterioses. 22nd World Congress of Dermatology, Mycobacterial Skin Disease Symposia, May 24-29, Seoul.
- 20) 田村敏生、下袴田陽子、牧野正彦. 結核菌分泌蛋白由来 Peptide-25 による T-bet 非依存的 Th1 分化誘導機構の解析. 第 40 回日本免疫学会総会 2011 年 11 月 千葉
- 21) 塚本裕美子、田村敏生、牧野正彦. Immunostimulatory activity of major membrane protein II from *Mycobacterium tuberculosis*. 第 40 回日本免疫学会総会 2011 年 11 月 千葉
- 22) 鈴木幸一. 古病理学における感染症証明への分子病理学の応用. 第 65 回日本人類学会大会、シンポジウム 5「古病理学の新たな展開」2011 年 11 月 4-6 日 那覇
- 23) 甲斐雅規, 松岡正典, 宮本友司, 中田登, 牧野正彦. 増殖能の異なるらい菌株間のゲノム比較解析. 第 84 回日本ハンセン病学会総会 2011 年 5 月 岡山
- 24) 福富康夫, 前田百美, 松岡正典, 牧野正彦. ハンセン病におけるマクロファージのらい菌に対する殺菌機構の解明. 第 84 回日本ハンセン病学会

- 総会 2011年5月 岡山
- 25) 向井 徹, 松岡正典, 前田百美, 宮本友司, 福富康夫, 牧野正彦. 蛍光蛋白発現らい菌構築のための検討. 第84回日本ハンセン病学会総会 2011年5月 岡山
- 26) 中田 登, 甲斐雅規, 牧野正彦. 培養可能抗酸菌を利用したらい菌リファンピシニン耐性変異の解析. 第84回日本ハンセン病学会総会 2011年5月 岡山
- 27) 中永和枝, 星野仁彦, 四津里英, 牧野正彦, 石井則久. 日本のブルーリ潰瘍: 確定診断のための検査に関する検討. 第84回日本ハンセン病学会総会 2011年5月 岡山
- 28) 天児和暢, 飯田健一郎, 松岡正典, 吉田真一. らい菌の微好気性環境での培養. 第84回日本ハンセン病学会総会 2011年5月 岡山
- 29) 松岡正典. WHO Global Leprosy Programme による薬剤耐性拠点監視事業における我々の役割. 第84回日本ハンセン病学会総会、シンポジウム、2011年5月 岡山
- 30) 松尾英一, 坂井哲雄, 野間口博子, 鈴木幸一, 脇坂晟, 藤岡保範, 神谷茂. らい菌人工培養の完成報告、並びに派生する周辺医学知識拡大の展望. 第84回日本ハンセン病学会総会 2011年5月 岡山
- 31) 野上玲子, 原田寿真. 菊池恵楓園における明治42年～45年死亡者来歴の検討. 第84回日本ハンセン病学会総会 2011年5月 岡山
- 32) 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. 2010年のハンセン病新規患者発生状況. 第84回日本ハンセン病学会総会 2011年5月 岡山
- 33) 石井則久. 日本でのサリドマイドの使用状況. 第84回日本ハンセン病学会総会 2011年5月 岡山
- 34) 森 修一, 石井則久. 世界のハンセン病政策に関する研究－ハワイのハンセン病政策の変遷－. 第84回日本ハンセン病学会総会 2011年5月 岡山
- 35) 桜井準也, 佐宗亜衣子, 星野敬吾, 谷川和也, 森修一, 石井則久, 鈴木幸一, 平田和明. 鍋被り葬と分子古病理学－らい菌DNAの検出－. 日本考古学協会第77回(2011年度)総会 2011年5月 東京
- 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23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 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。WHO による拠点監視事業は 16 か国の 27 拠点において採取された検体を 17 か所の reference center において遺伝子変異の解析が行われることから、それら検査機関に同一サンプルを配布し、それぞれ適正に検査が行われているかを検証し、一部のセンターで PCR が陰性であった例があったが、sequence の結果には読み違いが無く、適性に行われていると考えられた。

A. 研究目的

感染症対策に化学療法剤が使用されるが、完璧な化学療法剤というものはなく、常に耐性菌出現と新しい薬剤開発との繰返しである。現在ハンセン病の治療はダブソン、リファンピシン、クロファジミンを用いた多剤併用療法が主に行なわれ、耐性菌出現の抑制も図られている。さらに臨床判断により、オフロキサシン(キノロン剤)も使用されている。しかし、ハン

セン病治療薬においても薬剤耐性菌の出現が数多く報告されている。そのため新薬の開発はなお重要な課題であり、同時に耐性菌の同定・耐性メカニズム解明もハンセン病対策に欠かせない課題である。

人工培養できないらい菌は、培養に動物を使用する必要があり、またその増殖速度は極端に遅く、大腸菌で1日に増える菌数をらい菌では半年以上待たな

ければ得られない。よって従来の薬剤感受性試験は、現実には臨床上早期治療の役には立たない。薬剤耐性菌は治療を困難にするため、薬剤感受性試験の迅速性が重要で、迅速に結果を得ることが可能な DNA 診断が必要になる。そのためより迅速・簡便な新しい早期診断法の開発を行なってきた。

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、DNA 変異と薬剤感受性の関係を明らかにする必要がある。これまでにらい菌 *folP1* 遺伝子変異とダブソン感受性、*rpoB* 遺伝子変異とリファンピシン感受性の関係について培養可能抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* を用いて直接試験する系を開発し、これを明らかにした。本年度は *gyrA* 遺伝子とキノロン剤感受性について同様に検討した。

薬剤耐性菌の存在は世界各地より散発的な報告があるものの、その伝播状況を正確に把握し、その実態に基づいて現行の多剤併用療法の有効性を検証する基礎データが不足していた。WHO は 2007 年より世界各地に耐性菌の監視拠点を設定し、その実態把握の事業を開始した。各拠点で採取された検体は 9 カ国 17 カ所の検査機関において Drug Resistance Determining Region (DRDR) における遺伝子変異の検索が行われ、ダブソン、リファンピシン、キノロンに対する耐性の有無の判定がなされる。本研究においてはそれぞれの施設において適正に検査がなされているかを検証し、必要な対策を講ずるため、各施設に同一サンプルを配布し解析結果の報告を求めた。

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 DRDR における変異を迅速・簡便に検出するため、これまで、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。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、本法の有効性を試験してきた。次に、臨床材料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、マルチプレックス PCR 法の検討も行なった。さらに、本法をより迅速・簡便にするためリアルタイム PCR 試薬を予め 96 穴プレートに固相化し検討した。

変異と耐性の相関を明らかとする研究では、らい菌 *gyrA* 遺伝子を発現ベクターにクローニングし、*M. smegmatis* に導入した。次に *M. smegmatis* の *gyrA* 遺伝子を破壊するため温度感受性ファージを作製し、らい菌 *gyrA* 遺伝子導入 *M. smegmatis* に作用させ、染色体上に存在する *M. smegmatis gyrA* の破壊を試みた。また、らい菌 *gyrA* の代わりに結核菌の *gyrA* を用い、これに変異を加えたものと加えないものを使用して同様の実験を行い、得られた菌株を用いてオフロキサシン感受性を試験した。

ダブソン、リファンピシン、キノロンに対する感受性検査が適正に行われているかを検証するために、対象 17 施設に対し、ヌードマウスフットパッドにおいて増殖した 3 剤感受性または 3 剤耐性らい菌の計 6 菌液を作成した。感受性菌は、 $6.0 \times 10^4/\text{ul}$, $6.0 \times 10^3/\text{ul}$, $6.0 \times 10^2/\text{ul}$ の菌液を、また耐性菌は $3.0 \times 10^4/\text{ul}$, 3.0

×10³/ul, 3.0×10²/ul のそれぞれ各3種の 70 %エタノール浮遊液として配布した。各施設では、ガイドラインに沿って DNA の調整さらに PCRダイレクトシーケンスを行い、その結果を報告した。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験を含まない。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。

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 *folP1* 遺伝子の3か所(コドン 53 位の A と C, 55 位の C)、リファンピシン耐性の *rpoB* 遺伝子4か所(410 位の、420 位の、425 位の、427 位の)及びキノロン耐性の *gyrA* 遺伝子2か所(89 位の、91 位の)合計9か所の変異の有無を調べることでできる HPRT-PCR を開発した。そして、様々な変異を持つ臨床分離株の DNA に応用した結果、実際の配列とほぼ 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。さらに HPRT-PCR の試薬をプレートに固相化し、数ヶ月保存後の使用にも同じ結果を得ることが可能であった。

耐性と遺伝子変異の解析で、らい菌 *gyrA* 遺伝子を導入した *M. smegmatis* に

対し、同菌が元々染色体上に持つ *gyrA* の破壊を試みたが破壊菌は得られず、機能の置き換えに成功しなかった。結核菌 *gyrA* 遺伝子を導入した *M. smegmatis* では *M. smegmatis* の *gyrA* が破壊された株が得られ、結核菌の *gyrA* で増殖する *M. smegmatis* が分離された。この実験系を用いて結核菌の臨床分離株に報告されている *gyrA* 遺伝子変異についてオフロキサシン感受性を調べた結果、A90V、S91P、D94N、D94W、D94H、D94G、D94A、D94V、D94L、の変異はオフロキサシン耐性を引き起こしたが、I92M の変異は耐性を引き起こさなかった。

薬剤耐性菌監視事業における検査技術の検証では、検体を配布した 17 施設中、13 施設から結果の報告がされた。4 施設における PCR 感度が低く、本来 PCR 陽性であるべき何例かの検体が陰性と報告された。特に 2 施設では耐性菌のサンプルが全く増幅されなかった。報告されたシーケンスの結果は、いずれの施設においても読み違いはなく、感受性菌は DRDR 中に変異が無く、耐性菌は以下の変異が報告された。*folP1* 55 位 CCC-CTC(Pro-Leu)、*rpoB* 425 位 TCG-TTG(Ser-Ler)、*gyrA* 91 位 GCA-GTA (Ala-Val)。

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 法が確立された。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 の併用、試薬のプレートへの固相化が検討さ

れ、いずれも有効であることが示された。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 3-4 時間で完了可能であった。今後は臨床応用の検討を行う予定である。

M. smegmatis の *gyrA* 機能をらい菌の *gyrA* で置き換えることに成功しなかったが、らい菌 *gyrA* のコドン出現頻度が *M. smegmatis* の *gyrA* と異なるなどの理由により、*M. smegmatis* においてらい菌 *gyrA* の十分な発現が得られなかったことが原因である可能性があるため、現在改良を加えた実験系の検討をしている。結核菌 *gyrA* とらい菌 *gyrA* ではアミノ酸配列で約 91% と高い相同性が見られ、キノロン耐性に関与することが強く疑われているらい菌 *gyrA* コドン 89-95 の領域は、結核菌 *gyrA* コドン 88-94 と同一のアミノ酸配列をコードする。このことから、結核菌 *gyrA* を用いた実験系によりらい菌 *gyrA* 変異とキノロン剤感受性の関係を推測することが可能であると考えられる。

WHO による拠点監視事業においては 16 か国の 27 拠点において採取された検体は 17 か所の reference center において遺伝子変異の解析が行われる。それら検査機関に同一サンプルを配布し、それぞれ適正に検査が行われているかを検証した。2 ヶ所の施設では耐性菌の PCR が全て陰性であり、PCR の条件の検討が必要であった。sequence の結果には読み違いが無く、sequencing は適性に行われていると考えられた。

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 法と試薬のプレートへの固相化を組み合わせた場合、3-4 時間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 *M. smegmatis* を用いて、らい菌及び結核菌 *gyrA* 遺伝子変異とキノロン剤感受性の関係を試験する系の開発を試みた。らい菌 *gyrA* 遺伝子では *M. smegmatis* の *gyrA* 機能を置き換えることができなかったが、結核菌 *gyrA* 遺伝子で置き換えることができ、これを用いて 10 種の変異についてオフロキサシン耐性との関係を明らかにした。

WHO による薬剤耐性拠点監視事業において正確な解析を行うための技術評価を行った。ほとんどの施設では適正な解析が行われたが、一部の施設では感度の向上が求められた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Khin S. A., Matsuoka M., Kai M., Kyaw K., Win A. A., Shwe M. M., Thein M., Htoo M. M., & Htoon M. T. FTA Card Utility for PCR Detection of *Mycobacterium leprae*. Jpn J Infect Dis. 64 246-248, 2011.
- 2) Yokoyama K., Kim H., Mukai T., Matsuoka M., Nakajima C., Suzuki Y., Amino acid substitutions at position 95 in GyrA can add fluoroquinolone resistance to *Mycobacterium leprae*. Antimicrobial Agent Chemother. 56:697-702, 2012
- 3) Nakata N., Kai M., Makino M. Mutation Analysis of Mycobacterial *rpoB* Genes and Rifampicin Resistance Using Recombinant *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrobial Agent Chemother. doi:10.1128/AAC.05831-11, 2012.
- 4) Li W., Matsuoka M., Kai M., Thapa

- P., Khadge S., Hagge D. A., Brennan P. J., Vissa V. Real-time PCR and high resolution melt analysis for rapid detection of *Mycobacterium leprae* drug resistance mutations and strain types. J Clin Microbiol doi:10/ 1128 / JCM.05183, 2011
- 5) 松岡正典: WHO Global leprosy Programme による薬剤耐性拠点監視事業における我々の役割。日本ハンセン病学会雑誌 80:287-291, 2011
- 著書
- 1) 著者名Matsuoka M. 編集・分担執筆 Edited by Makino M., Matsuoka M., Gotoh M, and Hatano K. Leprosy chapter 3 Microbiology and Experimental Leprosy. Tokai University Press, Kanagawa, Japan Total page 274 (partial page 36-47) 2011
- 2) Kai M. 編集・分担執筆 Edited by Makino M., Matsuoka M., Gotoh M, and Hatano K. Leprosy chapter 9 Serology. Tokai University Press, Kanagawa, Japan Total page 274 (partial page 108-115) 2011
- 3) 甲斐雅規、松岡正典、宮本友司、中田登、牧野正彦: 増殖能の異なるらい菌株間のゲノム比較解析。第 84 回日本ハンセン病学会総会、岡山市、2011 年 5 月
- 4) 福富康夫、前田百美、松岡正典、牧野正彦: ハンセン病におけるマクロファージのらい菌に対する殺菌機構の解明。第 84 回日本ハンセン病学会総会、岡山市、2011 年 5 月
- 5) 向井徹、松岡正典、前田百美、宮本友司、福富康夫、牧野正彦: 蛍光蛋白発現らい菌構築のための検討。第 84 回日本ハンセン病学会総会、岡山市、2011 年 5 月
- 6) 松岡正典: WHO Global Leprosy Programme による薬剤耐性拠点監視事業における我々の役割。第 84 回日本ハンセン病学会総会、シンポジウム 岡山市、2011 年 5 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

2. 学会発表

- 1) Matsuoka M. WHO drug resistance screening and surveillance program in leprosy. International Symposium on Mycobacteria and Drug resistance. Uberandia., Brazil, July 2011.
- 2) 天児和暢、飯田健一郎、松岡正典、吉田真一: らい菌の微好気性環境での培養。第 84 回日本ハンセン病学会総会、岡山市、2011 年 5 月