

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 融合蛋白遺伝子を、BCG urease 遺伝子位に組み込み、各種クローンを得た。安全性のため、薬剤耐性遺伝子を resolvase により除去を行った。各種選択したクローンはいずれも培養液中に融合蛋白の分泌が認められた。hsp70 がらい菌由来ものは、BCG 由来に比較し、分泌効率が悪いものであった。しかし、量と抗原性の強さはまだ不明のため、HSP が BCG 由来のものより菌由来のものでさらにマウス感染実験等の検討を進める。

カニクイザルらい菌感染系の構築

昨年度、鼻腔洗浄液に菌の排泄を認めた個体は、その後排泄を確認できなかった。母仔サルへの接種系では、2頭の母サルに、PCR 陽性の固体が認められた。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、2年目にも検出された例は認められていない。皮膚症状は未だ認められないが、今後のサンプル解析が期待された。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, and M. Makino. 2011. A lipopeptide facilitate induction of *Mycobacterium leprae* killing in host cells. PLoS Neglected Tropical Diseases, 5: e1401.

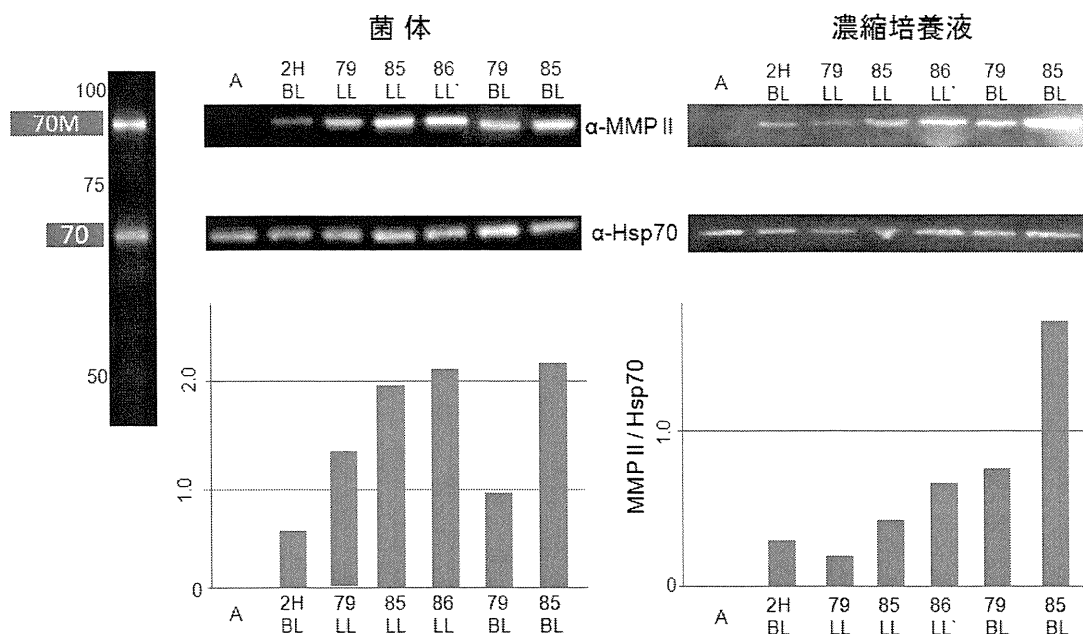
- 2) Yokoyama K, Kim H, Mukai T, Matsuoka M, Nakajima C, Suzuki Y. Amino acid substitutions at position 95 in GyrA can add fluoroquinolone resistance to *Mycobacterium leprae*. Antimicrob. Agents Chemother. 2012 in press

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) 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.
- 4) Maeda, Y., T. Tamura, M. Kai, T.

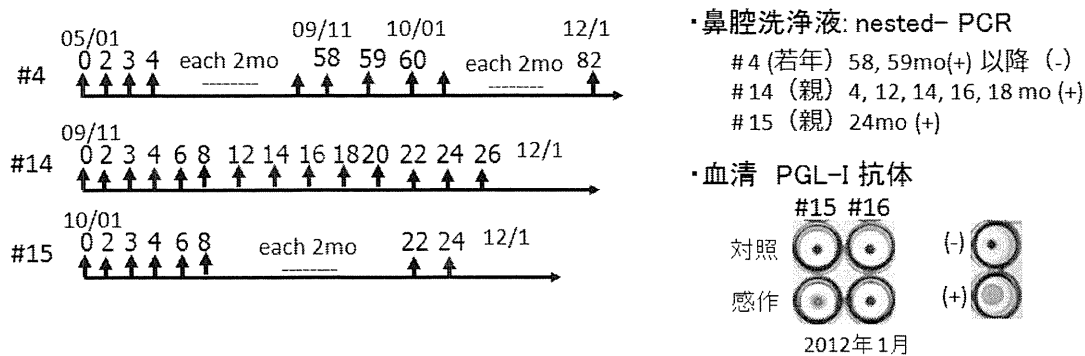
- Mukai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Increased expression of cytolytic effector proteins in human T cells co-cultured with dendritic cells by stimulation with *Mycobacterium leprae* lipopeptide. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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・学術大会 2011年5月岡山市
- 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. 構築されたrBCGの抗原分泌比較



菌体内発現は同様であるが、分泌能は異なる

図2. らい菌接種カニクイザルのサンプル解析



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23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
研究協力者 遠藤 真澄 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

研究要旨 ハンセン病に対する免疫療法の基本は、CD8 陽性 T 細胞を活性化してキラー T 細胞を誘導し、らい菌感染及びらい菌抗原保有抗原提示細胞を生体外に排除することにある。昨年度までに作製したリコンビナント BCG (BCG-D70M) は、ウレアーゼ欠損 BCG に HSP70-MMP-II 融合遺伝子を導入したものであり、ヒト末梢単球由来樹状細胞を介して CD8 陽性 T 細胞を活性化して IFN- γ の産生を誘導すると同時にメモリー T 細胞を分化誘導し、さらにはパーフォリン産生性キラー T 細胞を産生した。しかし、BCG の頻回投与は BCG の有する免疫活性化能をむしろ減弱させることが知られており、1 回投与によりらい菌抗原残存細胞を生体外に排除し得ない場合は、追加免疫用治療的ワクチンの投与が必要となる。そこで、らい菌の主要抗原 MMP-II 及び MMP-II と HSP70 の融合リコンビナント蛋白 (HSP70-MMP-II) の T 細胞活性化能を検討した。両蛋白は、ヒト末梢単球由来樹状細胞を介してメモリータイプ CD8 陽性 T 細胞及びナイーブ CD8 陽性 T 細胞を活性化して IFN- γ の産生を誘導すると同時に、パーフォリン産生性 CD8 陽性キラー T 細胞を産生した。さらに、これらリコンビナント蛋白をマウスに投与すると MMP-II あるいは HSP70 に反応し、IFN- γ を産生するメモリー T 細胞をマウス生体内で産生することが可能であった。したがって、MMP-II 及び HSP70-MMP-II 融合リコンビナント蛋白は、追加免疫用治療ワクチンとして有用であることが判明した。

A. 研究目的

1982 年に WHO が開発し導入し全世界に広げた多剤併用療法は有効に作用し、ハンセン病の登録患者を激減させた。この多剤併用療法によりハンセン病は治る病気となり、生らい菌の効率的生体内殺戮をもたらすことが可能となった。しかし、残念ながら多剤併用療法が完了し、生体内に生存するらい菌が確認できない状態にまでなった後も患者の末梢神経障害は徐々に進行し、四肢麻痺は少しずつ進行していく。これは、らい菌が化学療法によって死滅した後も、らい菌抗原が樹状細胞やマクロファージ等の抗原提示細胞内に残存し、T 細胞を活性化し続けることでシュワン細胞のアポトーシスが誘導され、末梢神経障害が進展することに起因すると考えられる。そこで、ハンセン病に対する免疫療法の開発にあたっては、

CD8 陽性キラー T 細胞を活性化し、らい菌抗原を保持する細胞を殺戮し、生体外へ排除することが重要となる。そこで、昨年までに作製したリコンビナント BCG (BCG-D70M) の最重要コンポーネントになっている MMP-II 及び MMP-II と HSP70 の融合蛋白 (HSP70-MMP-II) の免疫活性化能について検討を加えた。

B. 研究方法

非病原性抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* に MMP-II 遺伝子あるいは HSP70-MMP-II 融合遺伝子を導入し、リコンビナント蛋白を作製し、アフィニティカラムを用いて蛋白を精製した。得られたリコンビナント蛋白中の LPS は検出限界以下であった。正常健常人末梢血より、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蛋白をパルスし、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。樹状細胞の T 細胞活性化能は、抗原パルス樹状細胞を自己の 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- γ 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- γ 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。さらに、MMP-II 等の蛋白の生体内におけるメモリー T 細胞の産生能を検討するため、MMP-II あるいは HSP70-MMP-II 融合リコンビナント蛋白を経静脈的に投与し、6ないし12週後に脾 T 細胞を *in vitro* で MMP-II または HSP70 で刺激し、T 細胞から産生される IFN- γ を ELISA 法を用いて検討した。

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。また、動物実験においては、動物実験委員会の承認を得た後行った。

C. 研究結果

MMP-II 及び HSP70-MMP-II 融合蛋白は、ヒト末梢単球由来樹状細胞を活性化して、IL-12p40 の産生を誘導し樹状細胞を活性化した。また、これら蛋白を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 IFN- γ の産生を誘導した。また、これら蛋白をパルスした樹状細胞を用いて未感作 CD8 陽性 T 細胞を刺激すると、少量ながら IFN- γ の産生が誘導された。さらに、抗原パルスした樹状細胞を CD40 リガンドで副刺激して抗原提示細胞として用いると、未感作 CD8 陽性 T 細胞から産生される IFN- γ の量は増加した。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。そこで、MMP-II あるいは HSP70-MMP-II 融合蛋白を C57BL/6 マウスに経静脈的に投与し、6週及び12週後にメモリー T 細胞の産生の有無を調べる目的で、脾臓の T 細胞を分離し、*in vitro* で MMP-II あるいは HSP70、さらにはらい菌由来の細胞質蛋白で刺激すると、T 細胞は大量の IFN- γ を産生した。この場合においても、MMP-II と融合蛋白を比較すると、融合蛋白の方がメモリー T 細胞産生能は強かった。さらに、IFN- γ を産生する T 細胞分画を細胞内染色で調べると CD4 陽性 T 細胞・CD8 陽性 T 細胞何れも IFN- γ を産生していた。

D. 考察

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。らい菌に対して親和性を有する抗原提示細胞は樹状細胞とマクロファージであるが、何れにおいても生きたらい菌が感染しても、大量に感染しない限り T 細胞を活性化することは稀である。これは、抗原提示細胞内ではらい菌はファゴゾームを作製し、ライゾームとの融合を阻止している結果である。しかし、らい菌感染抗原提示細胞が化学療法等によって細胞内のらい菌が大量に殺戮されると、死菌となつたらい菌はファゴゾーム外へ放出され、かつ容易にライゾームに取り込まれることによって、主要組織適合抗原依存性に CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞を強く活性化し、同時に抗原提示細胞そのものを活性化することで、実にバラエティーに富んだサイトカインを産生することでアレルギー様反応を惹起して、

組織障害をもたらす。こうした一連の現象は「らい反応」として日常臨床的に観察されるが、らい菌抗原が抗原提示細胞内に保持される限り、組織障害あるいはシュワン細胞の細胞死に起因した末梢神経障害が誘導される。

HSP70-MMP-II 融合蛋白を分泌するリコンビナント BCG は、ヒト未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を強く活性化して、大量の IFN- γ を産生するばかりかパーフォリン産生性キラー CD8 陽性 T 細胞を産生すると同時にメモリー T 細胞を産生する。さらに、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。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakanaga, K., Y. Hoshino, Y. Hattori, A. Yamamoto, S. Wada, K. Hatai, M. Makino, and N. Ishii. 2011. *Mycobacterium pseudoshottsii* isolated from 24 farmed fishes in western Japan. J. Veterinary Medical Science, in press.
- 2) Nakanaga, K., Y. Hoshino, M. Wakabayashi, N. Fujimoto, E. Tortoli, M. Makino, T. Tanaka, and N. Ishii. 2011. *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.
- 3) Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, and M. Makino. 2011. A lipopeptide facilitate induction of *Mycobacterium leprae* killing in host cells. PLoS Neglected Tropical Diseases, 5: e1401.
- 4) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. R. Yotsu, M. Makino, and N. Ishii. 2011. Nineteen cases of Buruli ulcer diagnosed in Japan from 1980 to 2010. J. Clin. Microbiol., 49: 3829-3836.
- 5) Naka, T., N. Nakata, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Doe, S. Mizuno, M. Niki, K. Kobayashi, H. Ogura, M. Makino, and N. Fujiwara. 2011. Structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. J. Bacteriol., 193: 5766-5774.
- 6) Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. 2011. Apoptosis-inducing activity of clofazimine in macrophages. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55: 4000-4005.
- 7) Kai, M., N. H. Ngvyen Phvc, H. A. Ngvyen, T. H. Pham, K. H. Ngvyen, Y. Miyamoto, Y. Maeda, Y. Fukutomi, N. Nakata, M. Matsuoka, M. Makino, and T. T. Ngvyen. 2011. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam. Clin. Infect. Dis., 52: e127-e132.
- 8) Tsukamoto, Y., M. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. 2011. Immunostimulatory activity of major membrane protein II from *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Vaccine Immunol., 18: 235-242.
- 9) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. 2011. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae* *folP1* gene and Dapsone resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55: 762-766.
- 10) Nakanaga, K., Y. Hoshino, Y. Era, K. Matsumoto, Y. Kanazawa, A. Tomita, M. Furuta, M. Washizu, M. Makino, and N. Ishii. 2011. Multiple cases of cutaneous *Mycobacterium massiliense* infection in a "hot spa" in Japan. J. Clin. Microbiol., 49: 613-617.

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 Agents and 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.

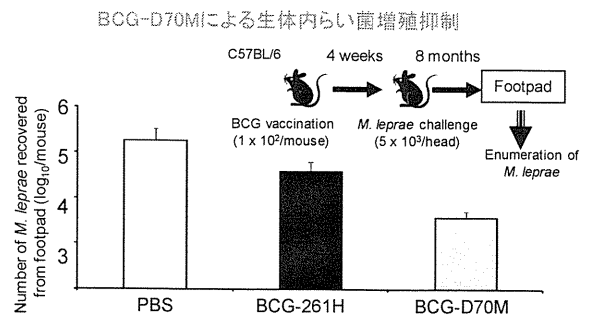
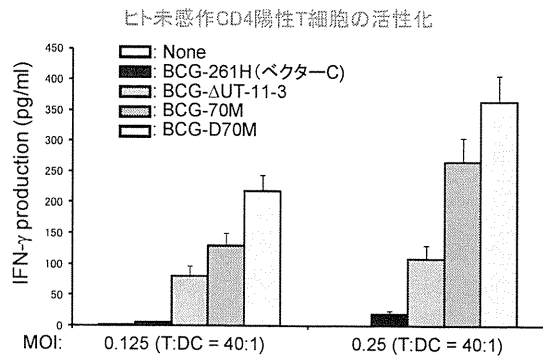
- XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 12) Nakata, N., M. Matsuoka, M. Makino, and M. Kai. Whole-genome comparison of *Mycobacterium leprae* strains differing in growth rate. XIII International Congress of Bacteriology and Applied 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) 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・学術大会 2011年5月岡山市
- 18) 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・学術大会 2011年5月岡山市
- 19) 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・学術大会 2011年5月岡山市
- 20) 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ン耐性変異の解析. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月岡山
- 21) 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・学術大会 2011年5月岡山市
- 22) 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
- 23) 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
- 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

らい菌の生体内増殖を抑制するリコンビナントBCGの作出と追加免疫剤の開発

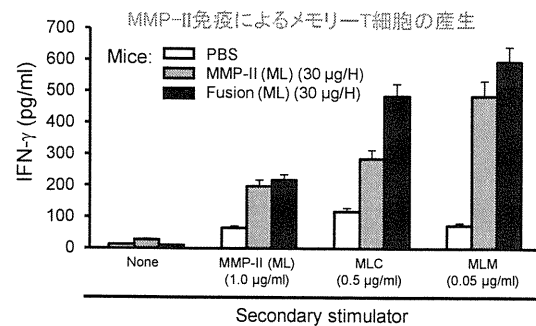
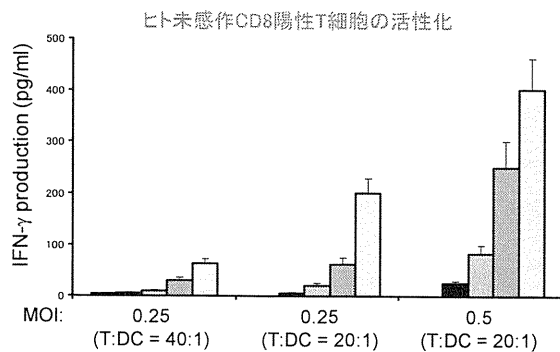
ヒトCD4陽性T細胞の活性化: ウレアーゼ欠損rBCG (BCG- Δ UT-11-3)が有効

ヒトCD8陽性T細胞の活性化: HSP70-MMP-II融合遺伝子導入rBCG (BCG-70M)が有効

→ 両者の組み合わせ = BCG- Δ UT-11-3にHSP70-MMP-II融合遺伝子を導入(BCG-D70Mの作製)



追加免疫剤の開発



MMP-II及びHSP70-MMP-II蛋白共に効率的にメモリーT細胞を産生

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23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 ハンセン病の理解の促進のため正確な偏らない情報を、過去に関することから現在、将来に亘るまで、発信し続けることが重要である。そのため菊池恵楓園の百年の歴史をまとめ、英語版として出版した。医学的資料のアーカイブズ構想の一環で、その利活用のパイロットとして再発症例に関し検討したところ、ハンセン病の興味深い再発の特徴が明らかになり、アーカイブズ構想がハンセン病の病態解明に貢献することを示した。啓発におけるメディアの関わりに関する検討では、県下での閲読率の高い地元紙によりハンセン病関連記事が多数掲載されている事実から、啓発活動は積極的に行われており、菊池恵楓園からの絶え間ない情報発信の働きかけがますます重要と考えられた。

A. 研究目的

らい予防法下における情報の偏在は、ハンセン病に対する偏見を助長した一因として否定できないと考える。そこで、正確で偏らない知識の共有を図る目的で、菊池恵楓園から情報発信し、将来に向けてニュートラルな視点での医学並びに医学史の研究に供することができるよう、菊池恵楓園に残されている資料のアーカイブズ構築の方法を探り、さらに、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について分析する。

B. 研究方法

1. 菊池恵楓園からの情報発信

熊本におけるハンセン病の歴史の中で菊池恵楓園がどのような位置づけであったかに焦点をあてながら、創立百年を迎えた菊池恵楓園の歴史を検証し、本研究の初年度、「百年の星霜」としてまとめた。これをさらに海外からの理解が容易となるよう編集し英語版として出版し、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(医学的)資料のアーカイブズ構築と利活用の試み

(1) 診療録等個人情報に関わるものを除く、図書、行政文書等について、アーカイブ化の基礎となる簿冊目録を作成する。

菊池恵楓園の旧事務本館にあった旧図書室等から搬出した図書、行政文書等の紙資料は、アトランダムに段ボール箱に詰め、第二次箱番号として連番(1～842)をふって保管されている。簿冊目録は、表計算ソフトExcelを用い、資料ごとに<第二次箱番号><資料番号><資料名><フリガナ><作成者><作成時><サイズ(縦×横)><サイズ(厚さ)><第一次箱番号><備考>の各項目について入力した。<備考>欄には、当該資料の収納前の所在、体裁、その他特記すべき事項を入力する。

(2) 医学的資料の利活用の実例として、1996年から2005年の10年間に当園で経験した再発症例について、残されている医学資料(主として診療録)をもとに再発時の病型(LL, BL, BT)別に初診時の病型と治療歴、再発後の治療経過を分析する。

3. 新聞報道記事の検討

Nifty 新聞横断検索データベースを用い、(1) 全国紙4紙、ブロック紙の西日本新聞、地元紙である熊本日日新聞について、1988年1月から2011年12月までのハンセン病関連記事の総件数を調

査、比較する。(2) 2009年～2011年のハンセン病関連特集・連載記事について検討する。(3) 全国紙4紙、ブロック紙、地方紙について、全国13療養所に関連した記事の掲載状況を1988年から2011年について調べる。これらから、菊池恵楓園の所在地における地元紙の特徴、報道のあり方について検討する。

(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のいずれも公にされているもので、倫理上の問題はないと判断した。

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. 「The View from Archives - History of Hansen's Disease in Kumamoto, Japan - Information dispatch from Kikuchi Keifuen」として出版した。

2. (1) 簿冊目録の作成

第二次箱番号1～842に収められている紙資料(各箱に最大30件程度)について、簿冊目録を作成した。

(Table 1にそのサンプルを示す)

(2) 1996年から2005年の10年間に当

園で経験した再発症例について

当該期間中に再発により治療を行った症例は 25 例あり、そのうち 96 年初頭に治療の最終段階にあった 4 例を除く 21 例は、再発時の病型が LL の 11 例(男性 9, 女性 2)、BL の 4 例(男性 1, 女性 3)、BT の 6 例(男性 4, 女性 2)であった。初診時(入所時)の病型と治療歴、再発後の治療経過を検討した結果、下記の特徴が見られた。

(i) LL の 11 例: いずれも初診時の病型は L 型(MB/WHO)。治療歴はスルホン剤単独 7 名、スルホン剤+RFP 少量併用 3 名、スルホン剤+CLF 2 名、スルホン剤+NQ 1 名、スルホン剤+RFP 少量+CLF 1 名、

再発時の菌指数は BI3 が 2 名のほかは BI5~6 と高値、NQ, DDS, CLF, RFP, MINO, CAM の中から 2~3 剤を併用、多くの症例で菌指数 0 となるのに 5 年以上を要している。経過中境界反応を来した 2 名では速やかに菌指数が減少した。

(ii) BL の 4 例: 初診時の病型は L 型(MB/WHO)。治療歴はスルホン剤単独 3 名、スルホン剤+RFP 少量併用 1 名、

再発時の菌指数 3~5、菌指数の高い(BI4 以上)境界群では、神経炎を伴い、境界反応を起こしやすく、ステロイドの併

用を要した。

RFP+CLF+DDS,
NQ+CLF+DDS,
RFP+CAM+CLF,
RFP+NQ+DDS,
RFP+CFLF+MINO

の併用療法でいずれも菌指数 0 となっている。

(iii) BT の 6 例: 先行する病型は 1 例を除き MB/WHO で、MDT/MB/WHO を施行されていた症例もあった。その他スルホン剤単独 2 名、スルホン剤+RFP 少量 2 名、スルホン剤+RFP+NQ 1 名であった。PB と見なされていた 1 名も、昭和 30 年代の眼科診療録から L 型の眼科所見と診断名の記載が発見され、BT の症状で再発した 6 名全員、発病時は MB だったことが判明した。再発後は MDT/MB ないし PB に準じ治療を行った。

3. 新聞報道記事の検討

(1) 全国紙 4 紙、ブロック紙の西日本新聞、地元紙における 1988 年 1 月から 2011 年 12 月までのハンセン病関連記事の件数を年次ごとにみると (Fig. 1)、1995 年までは、地元紙で 93、95 年に年間数十件を数えるほかは他紙に目立ったピークは見られない。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、2000 年までは年間百~百数

十件を数える。2001年のハンセン病国
倍訴訟違憲判決関連で年間600～1200
件の急峻なピークを形成したのち、2003
年11月の黒川温泉宿泊拒否問題を受
けて翌2004年にかけて僅かに上昇、そ
の後は徐々に下降線を辿っている。地
元紙においては、2010年、11年と140
件台を保っている。

(2)2009年～2011年のハンセン病関連
特集・連載記事は別表(Table2)
のとおり。

(3)全国紙4紙、ブロック紙8紙、地方紙
29紙について、1988年から2011年の全
国13療養所に関連した記事の掲載件
数を、療養所別に比較すると、合計件数
で最も多いのは菊池恵楓園(5115件)、
次いで長島(3128件)、星塚(2408件)、
大島(2383件)、沖縄(1915件)、邑久
(1723件)、多磨(1566件)、栗生(1138
件)、宮古(1090件)、奄美(834件)、松
丘(625件)、駿河(550件)、東北(359
件)の順であった。全国紙の合計が700
件を越えるのは、長島(1641件)、菊池
恵楓園(1539件)、大島(1158件)、星塚
(954件)、邑久(935件)、多磨(931件)、
栗生(716件)の順で、ブロック紙の合計
件数で多いのは菊池恵楓園(1063件、う
ち西日本新聞880件)、長島(509件、う
ち中国新聞302件)、星塚(427件、うち
西日本新聞341件)であった。地方紙合
計が1000件を越すのは、菊池恵楓園
(2513件)、沖縄(1576件)、大島(1044

件)、星塚(1027件)であった。菊池恵楓
園の件数が最多であった内訳としては、
全国紙では2位であるが、ブロック紙、地
方紙ではいずれも13園中最も掲載件数
が多かったことによる。

D. 考察

国内で最も古い官立ハンセン病療養
所の一つである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、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、
今回、再発症例に関する初発時の病型、
治療歴、治療経過等を過去の診療録に
遡って検討した。初診(入所)は最も古い
者で1940年、再発までの寛解期間は30
数年に及ぶ者も稀ではなかった。そして
極めて興味深い臨床経過として、当初、
L型(LLまたはBLと思われる。

MB/WHO)であって一定の寛解期間を経てBT(PB/WHO)の病型で再発した症例が21例中6例にみられた。5～10年の経過で周期的にBTでの再発を繰り返していた症例すらあった。スキンスメアで菌が検出されないBT(PB/WHO)での再発を診断するために、当園では全例に皮膚生検を行い、病理組織診断を行っていることと、入所時からの診療録が保管され、30年以上過去に遡って診療経過が分かるのも療養所ならではの特色で、これらによりBT(PB/WHO)のパターンでの再発例を正確に捉えることができたと言える。診療録保管義務が5年間と定められている一般の医療機関や皮膚生検のままならない途上国でのハンセン病診療ではこれらの長期の臨床経過を知ることはいかなる。

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。

全国13療養所についてそれぞれに関連する記事を多く掲載している新聞(Table3,4)は、全国紙を別にすれば、所在地のブロック紙または地方紙であることが多い。松丘に関しては北海道新聞、河北新聞(ブロック紙、以下ブと略)、東奥新聞(地方紙、以下地と略)、東北は河北(ブ)、多磨、栗生は全国紙のほかは信濃毎日(地)、駿河は静岡新聞(地)、

瀬戸内3園では全国紙による掲載が多いが、中国新聞(ブ)、山陽新聞(地)が続き、とくに大島では加えて徳島、愛媛、高知(地)の各新聞に掲載されている。星塚は南日本新聞、熊日新聞(地)、西日本新聞(ブ)、奄美は南日本(ブ)、沖縄、宮古は琉球新聞、沖縄タイムス(地)が多い。菊池恵楓園については、圧倒的に地元紙熊日(地)が多く、次いで全国紙、西日本(ブ)が1000件台、佐賀新聞、南日本(地)が2桁で続く。

ブロック紙の中では、河北新聞が東北と松丘、中国新聞が瀬戸内3園、西日本新聞が九州沖縄5園をカバーしている。中でも菊池恵楓園の880件はブロック紙として最多である。

菊池恵楓園の地元紙である熊日新聞は菊池恵楓園に関する記事で2134件と群を抜くが、九州沖縄、瀬戸内、栗生、多磨に関する記事の件数も比較的多くみられる。日本ABC協会「新聞発行社レポート半期2008年1月～6月都道府県部数表」によると熊日の熊本県下におけるシェア(占有率)は67.2%、ビデオリサーチ「全国新聞総合調査2007」によると、読者率は66.4%と全国の地方紙の中でも高いスコアであり、1ヵ月の間に熊日の発行する紙媒体のいずれかに接触した熊本県民の割合は全県民の87.4%に上るとされている。従って、地元紙によって菊池恵楓園またはハンセン病に関する記事が熊本県民に読まれる割

合も、高いといえる。

2009年から11年の3年間に熊日で話題にされた記事では、園の将来構想に関連して医療刑務所の保存に関すること、F事件、保育所開設、市民学会、人権啓発キャンペーン記事、などが目立つ。啓発・人権講座関連では、宿泊拒否契機に啓発活動が続けている地域の問題、退所者等による講演の広報などが見られ、また、読者のひろばでは入所者による投稿や交流をもった児童、生徒などの作文が紹介されている。若い世代が関心をもち、正しい知識を持つようになると、ハンセン病の理解は促進的に働くと考えられ、地元紙がある程度の役割を果たしているのではないかと考えられる。菊池恵楓園からの絶え間ない情報発信が地元メディアに働きかけている点も見逃せないのではないと思われる。

E. 結論

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、過去に関することから現在、将来に亘るまで、発信し続

けなければならない。(医学的)資料のアーカイブズの構想もその一端である。今回、その利活用のパイロットとして検討を試みた再発症例に関する検討では、ハンセン病の興味深い再発の特徴が明らかになり、医学的にもアーカイブズ構想がハンセン病の病態解明に貢献することを示した。菊池恵楓園の地元では地元紙により多くのハンセン病関連記事が掲載されている事実と、多くの県民に閲読されていることにより、啓発活動は積極的に行われていると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

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，2011年5月、岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 薄冊目録のサンプル

第二次箱番号	資料番号	資料名	フリガナ	作成者	作成時	サイズ(縦×横)	サイズ(厚さ)	第一次箱番号	備考
773	15	熊本市當局ノ意見并対策	クマモトシトウキョクノイケンナラビニタイサク	九州療養所	昭和7年10月	B5			自治体より寄贈(自治会相談室⑧)。半分に折った原稿用紙2枚綴りをホチキスで留めたもの

Table 2

全国紙、ブロック紙(西日本)、地方紙(熊本日)における特集記事(2009年～2011年)

	2009	2010	2011
朝日			ニッポン人・脈・記 隔離の記憶(13)
読売	人権週間 ハンセン病解決途上(特集) 全生園は今(3)	ハンセン病・川柳に託した半世紀(2)	扉は開かれて・ハンセン病訴訟から10年(3)
西日本	国立ハンセン病療養所・菊池恵楓園100年 蝕まれる人権 感染症の教訓から(6)	国立ハンセン病療養所・菊池恵楓園100年 絆ふたたび(5)	
熊日	療養所にて平和を考える(5) 幸多かれと 入所者の日々(7) 雑草のように生きて 畑野むめ一世紀の軌跡(6)	「恵楓園100年」第4部:共生への一歩(10) 菊池恵楓園100年=将来構想	「故郷」忘じがたく候・在日と祖国とハンセン病と(6)

()は連載回数

Fig.1 各種新聞におけるハンセン病関連記事の年次掲載件数(1988年～2011年)

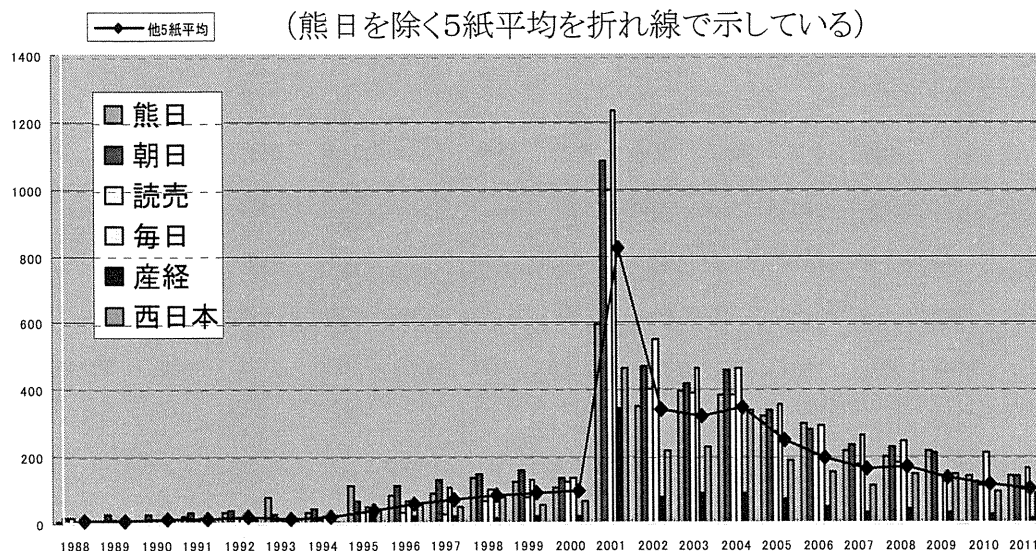
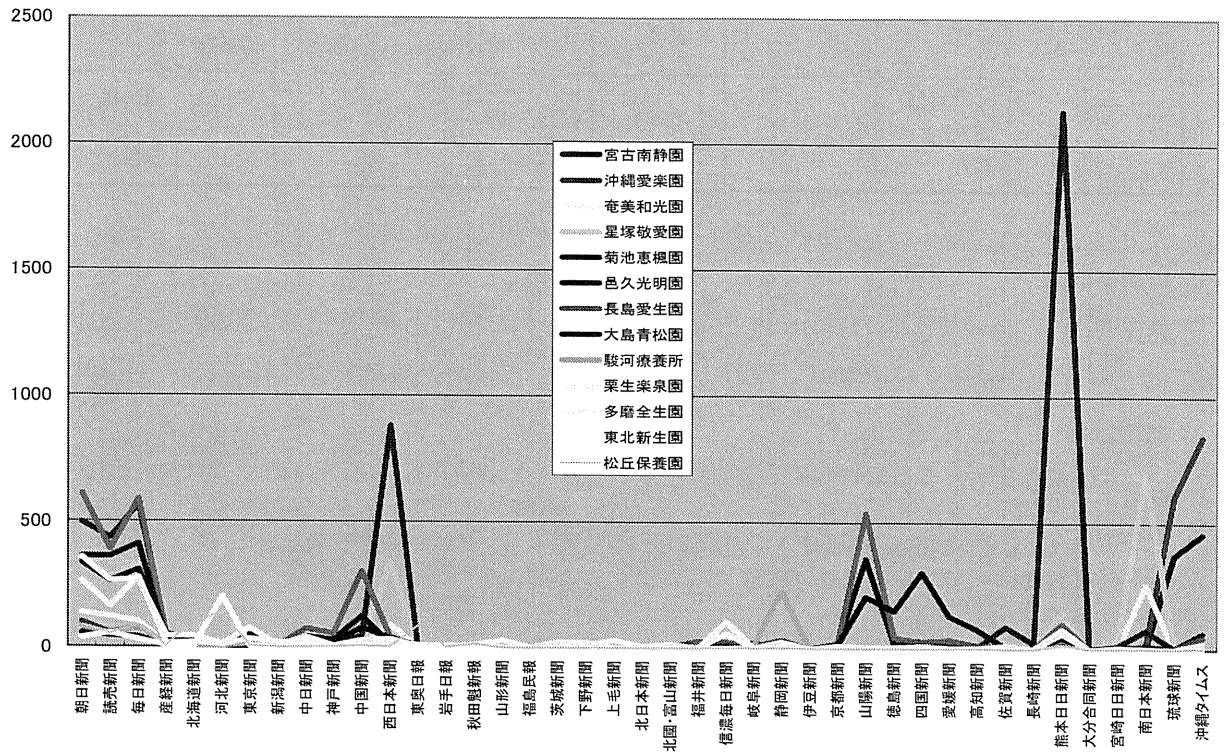


Table 3 全国 13 療養所に関する新聞掲載記事数 (1988 年～2011 年)



	宮古	沖縄	奄美	星塚	菊池	邑久	長島	大島	駿河	栗生	多磨	東北	松丘
全国紙合計	149	250	366	954	1539	935	1641	1158	217	716	931	126	229
ブロック紙合計	49	89	126	427	1063	219	509	181	66	132	245	215	255
地方紙合計	892	1576	333	1027	2513	569	978	1044	267	320	392	18	141
合計	1090	1915	834	2408	5115	1723	3128	2383	550	1138	1566	359	625

Table 4 全国13療養所に関する地方紙の掲載記事数（1988年～2011年）

	宮古	沖縄	奄美	星塚	菊池	邑久	長島	大島	駿河	栗生	多磨	東北	松丘
東奥日報	1	4	1	1	8	2	6	6	1	10	6	2	86
岩手日報	0	2	0	1	6	2	3	1	0	3	7	1	3
秋田魁新報	1	2	0	1	5	2	3	1	1	12	8	1	14
山形新聞	0	0	0	0	1	0	0	0	0	30	1	2	0
茨城新聞	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	21	0	0
下野新聞	0	1	1	1	1	0	1	5	0	12	22	0	0
上毛新聞	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	2	0	0
北日本新聞	0	0	0	5	0	1	0	1	0	7	2	0	0
北國・富山新聞	0	1	0	1	2	4	4	0	2	13	12	0	0
福井新聞	0	0	0	0	2	27	28	1	1	1	2	0	0
信濃毎日新聞	4	11	5	4	22	2	23	9	2	57	105	0	2
岐阜新聞	0	0	1	0	0	22	7	1	7	1	1	0	0
静岡新聞	2	3	2	14	21	5	33	8	226	16	26	1	2
京都新聞	0	3	3	2	1	18	22	13	2	3	11	0	1
山陽新聞	0	0	0	1	2	356	538	206	0	6	6	0	1
徳島新聞	2	8	0	1	3	18	43	150	2	1	6	3	0
四国新聞	6	7	4	15	24	21	27	303	0	9	10	0	1
愛媛新聞	0	0	0	2	1	11	35	130	0	3	4	0	0
高知新聞	0	1	0	1	6	2	14	78	1	3	3	0	2
佐賀新聞	3	17	6	21	90	6	14	8	0	6	16	1	1
長崎新聞	0	1	0	7	21	1	3	1	0	1	2	0	0
熊本日日新聞	38	58	42	145	2134	46	102	81	14	64	79	4	16
宮崎日日新聞	0	2	0	36	14	4	6	5	1	6	8	0	2
南日本新聞	4	9	256	692	75	2	13	13	2	1	4	0	3
琉球新聞	372	603	1	14	6	1	6	3	2	2	2	0	2
沖縄タイムス	459	843	11	62	66	16	47	19	3	18	26	3	5
地方紙合計	892	1576	333	1027	2513	569	978	1044	267	320	392	18	141