

201123007B

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

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

平成21年度～平成23年度 総合研究報告書

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 21 年度～平成 23 年度 総合研究報告書

研究代表者 向井 徹

平成 24 (2012) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 2 7

III. 研究成果の刊行物・別刷----- 3 7

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

総合研究報告書

平成21年度 ～ 平成23年度

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)

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 世界における新規ハンセン病患者は、年間二十数万人を数え、減少傾向を示さない。必要とされる取り組みは、耐性菌によるハンセン病および再発・再燃であるが、有効な予防・診断・治療法は現存しない。また、我が国における新規患者数は極めて少ないため、医療従事者のみならず一般人への知識の啓発・教育の必要性がある。これらの諸問題に対し、各研究項目の遂行により、難治ハンセン病に対する対処法を明らかにすることを目的とした。その結果、ハンセン病における薬剤耐性に関する研究では、耐性ととの相関が認められているらい菌遺伝子変異を迅速に検出する 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。メキシコ、ベトナム、ミャンマーにおいて調査を行ない、いずれにおいても耐性菌の存在が確認された。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、臨床応用への可能性を示した。さらに、WHO による拠点監視事業の検査機関の評価を行った。ハンセン病の再燃・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、菌の細胞膜蛋白に対する血清抗体価を 3 年間測定し、再燃・再発との関連性を検討した。さらに、らい菌成分に対する細胞性免疫能を測定した。MMP-II 血清抗体価は皮膚病変の広範であった多菌型ほど抗体価高値が持続した。INF- γ 、IL-10 の産生量は、多菌型で少菌型よりやや少なかった。再燃・再発の早期診断には、血清抗体価の変動以外に、細胞性免疫能の評価や臨床症状の観察も含めた総合的な検討が必要と考えられた。らい菌のマクロファージ内寄生機構に関する研究では、らい菌宿主マクロファージ内ファゴゾームの脂質蓄積機構に関して検討を行った。らい菌感染細胞においては、脂質蓄積に関与する宿主酵素の発現が誘導され、逆に脂質の分解に関わる代表的な酵素の発現が強く抑制されることを明らかにした。この成果は、多菌型ハンセン病患者材料を用い、上記遺伝子発現の評価により病態変化や多剤併用療法の効果判定に重要である可能性が示唆された。難治症例に対する免疫療法の開発では、らい菌リポ蛋白 LpK の N 末端からなる LipoK は T 細胞から INF- γ 産生が誘導し、細胞障害性分子の産生能が増強され、らい菌に対して殺菌作用を示すことを明らかにした。さらに、LipoK 刺激後のらい菌感染樹状細胞が放出するエクソソームにらい菌膜蛋白由来分子が検出され、T 細胞の活性化に関わっていることが示唆された。ハンセン病予防法に関する研究では、安全かつ安定した抗原を分泌する BCG の開発を行った。ゲノムに組み込まれた 1 コピーの遺伝子から、抗原として充分量発現する promoter を同定し、BCG ゲノムに hsp70-MMP II 融合遺伝子として組み込んだ。クローニングの過程で使用した薬剤耐性遺伝子を除去し安全なものとした。長期に渡る過程においても構築された組換え BCG の抗原分泌能は欠けることなく維持され、安定発現であった。BCG を基本とした様々なワクチンが作製可能と考えられた。ハンセン病に対する免疫療法の開発では、BCG に改良を加え、新規リコンビナント BCG を作製することを目的とした。ウレアーゼ欠損 BCG に HSP70-MMP-II 融合遺伝子を導入した BCG-D70M を作製し、その免疫学的効果を解析した。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。BCG の頻回投与は免疫活性化能をむしろ減弱させるため、追加免疫用治療的ワクチンの開発を目的として、MMP-II 及び HSP70-MMP-II 融合組換え蛋白の 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および未感作 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。したがって、BCG-D70M は初回治療用ワクチンとして、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。理解の促進に関する研究では、療養所からの情報発信と将来に亘るニュートラルな視点でのアーカイブズ構築の構想を機軸に、図書、行政文書等の紙資料に関する簿冊目録を作成し、今後アーカイブズを構築するための基礎データとした。また、医学資料の利活用のパイロットスタディとして①開所当初である明治 42 年から 45 年の死亡者来歴と病床日誌の検討 ②1970 年から 80 年代前半にかけての ENL (2型らい反応) に対するサリドマイドの使用状況の検討 ③1996 年から 2005 年における再発例の検討を行い、医学資料をも含めたアーカイブズの構築が医学史研究やハンセン病の病態解明に貢献しうることを示した。啓発におけるマスメディアの影響は大きい。ハンセン病に関する新聞報道記事(1988～2011)を検証し、菊池恵楓園からの情報発信が地元紙の報道の継続性に影響を与えていると考察した。ハンセン病ネットワーク構築では、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。毎年1回、皮膚科医・医師にハンセン病の講習会・実習(皮膚スミア検査、末梢神経検査、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整えた。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、ハンセン病診療がスムーズに行われるようにした。本研究より得られた知見は、ハンセン病対策に有用な貢献が可能と考えられた。

研究分担者

甲斐雅規 国立感染症研究所ハンセン病研究センター感染制御部 室長
 鮫島朝之 国立療養所星図化敬愛園 内科医長
 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長

万人を数え、減少傾向を未だ示していない。また、多剤耐性らい菌の出現や、免疫不全を伴い再発・再燃を繰り返す難治性ハンセン病の対策が新たな問題として浮上している。そのため、分子疫学的手法による薬剤耐性菌疫学、難治性ハンセン病に対する早期診断法開発、免疫療法・ワクチン開発が必要と考えられる。また、わが国におけるハンセン病症例は極めて少ないため、医師、医学生や医療従事者等に対するハンセン病に関する知識や医学史の啓発・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。

A. 研究目的

ハンセン病は、WHOにより推進されたMDT療法により登録患者数は、減少を示してきた。しかし、新規ハンセン病患者は、今なお世界では年間二十数

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. ハンセン病の理解の促進に関する研究(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. 薬剤耐性ハンセン病に関する研究及び調査

ダプソン、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に、ヘアピンプライマーによるリアルタイム PCR 法(HPRT-PCR)を開発した。本法は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。さらに、本法をより迅速・簡便にするためにリアルタイム 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 *rpoB* 遺伝子及び *gyrA* 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* 及び *gyrA* 遺伝子の破壊を試みた。その結果得られた破壊株を用いて薬剤感受性を変異の有無で比較した。さらに、*rpoB* 破壊株では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 *gyrA* 遺伝子の破壊株を用いて、オフロキサシン感受性を試験した。

メキシコの西部および南部地域の 38 例の新患者、治療中のハンセン症例より、検体を採取した。またベトナム国中部 11 州の新患者、再発患者、治療中のハンセン症例より、左右の耳朵、及び皮膚病変部の Slit skin 法によるサンプルを採取し、検査時まで

70%エタノールに保存した。*folP1*, *rpoB*, *gyrA* のダプソン、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。

ダプソン、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、3種類の 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 の調整とそれに続く PCRダイレクトシーケンスを行った。

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

国立療養所星塚敬愛園の入所者約 200 名の平成 21-23 年度の検診時血清を用い、MMP-II 抗体価を ELISA 法で測定した。正常対照群は 78 名とした。細胞性免疫能に関しては、培養末梢血単核球細胞にらい菌細胞質蛋白 *Mycobacterium leprae* cytosolic protein(MLC)の 4, 8, 15 μ g/ml、あるいは MMP-II の 2, 4, 15 μ g/ml を添加し、96 時間後に樹状細胞により活性化された T 細胞などより培養上清中へ産生される INF- γ 、IL-10 などのサイトカインを ELISA 法で定量した。同時に T 細胞内のこれらサイトカインをフローサイトメトリーで測定し、それぞれのサイトカイン陽性細胞の割合(%)を CD4+細胞および CD8+細胞ごとに算出した。細胞性免疫能の評価は、入所者群 20 名(少菌型 9 名、多菌型 11 名、平均年齢 84.6 歳)、正常対照群 16 名(当園職員 6 名、当園外来 5 名、鹿屋医療センター 5 名、平均年齢 71 歳)について行った。また、平成 9 年以降に皮膚生検が施行された 8 例(内 3 例が再発例)について MMP-II 抗体による免疫染色を行い、再燃・再発との関連性について検討した。皮膚スミア検査で陽性所見(BI=4)を認め、皮疹を認めないが再発の可能性を否定できないため、内服治療を開始した症例について MMP-II 抗体価の経時的な変化について評価した。

3. らい菌のマクロファージ内寄生機構に関する研究

従来、抗酸菌のマクロファージ内寄生に関する研究は、結核菌や *M. bovis* B.C.G. を用いたものが多かったが、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必要がある。そのために培養ヒト前単球由来 THP-1 細胞にらい菌を感染させ、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。また、コントロールとして、らい菌加熱死菌およびラテックスビーズを用い同様の検討を行った。

THP-1 細胞は 10% ウシ胎児血清、2% 非必須アミノ酸を添加した RPMI1640 培地で培養し、 3×10^6 の THP-1 細胞に 3×10^7 の菌を用いた (MOI 10)。RNA の抽出は RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用い、cDNA は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いた。PCR 反応は以下のプライマーを用いた。HSL: 5'-CTC CTC ATG GCT CAA CTC CTT CC-3' (forward), 5'-AGG GGT TCT TGA CTA TGG GTG-3' (reverse); ADRP: 5'-TGT GGA GAA GAC CAA GTC TGT G-3' (forward), 5'-GCT TCT GAA CCA GAT CAA ATC C-3' (reverse); actin: 5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC-3' (forward); 5'-TGT GGT GGT GAA GCT GTA GC-3' (reverse)。増幅には PCR thermal cycler DICE (TaKaRa Bio) を用い、既報の如く touchdown PCR を行った。

細胞からのタンパクは、50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% NP40, 20% glycerol とタンパク分解酵素阻害剤を含む液で可溶化した後に遠心分離した上清を用いた。タンパクは SDS PAGE で分離後 PVDF 膜に転写後 PBST で洗浄し 5% nonfat milk 含 PBST でブロッキングした後に 1 次抗体と反応させた。洗浄後ビオチン標識 2 次抗体およびストレプトアビジン-HRP と反応させ、ECL Plus reagent (GE Healthcare) にて検出した。一部の実験では、THP-1 細胞を 24 穴プレートに入れた円形カバーガラス上で培養した後に脂肪染色や免疫染色を行った。また、らい菌感染 THP-1 細胞を種々の濃度のリファンピシン、ダブソンおよびクロファジミンとともに培養し HSL

発現への影響を検討した。

4. 難治症例に対する免疫療法の開発

LpK の N 末端 13 アミノ酸を含む合成リポペプチド (LipoK) は 0.05mg/ml の濃度で小分けし保存した。樹状細胞は正常健康者ヒト末梢血単球よりサイトカインを用いて分化誘導して得たのち、抗原またはらい菌でパルスし、その抗原提示能を自己 T 細胞の活性化を指標に分析した。CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞は Human T Lymphocyte Enrichment Set (BD) を用いて精製した。グラニューライシン産生 T 細胞は FACS Calibur を用いて以下の方法で定量した。樹状細胞-T 細胞培養後、6 日目に Golgi stop (BD) を添加し、18 時間後に細胞を回収し intracellular 染色を行い、解析した。さらに、らい菌由来タンパクの細胞内分布をみるため、樹状細胞-T 細胞培養後、4 日目に細胞を抗らい菌膜タンパク抗体を用いて染色し、コンフォーカル顕微鏡で観察した。抗らい菌膜タンパクに対するポリクロナル抗体はブレナン先生から提供を受けた。T 細胞と混合培養した、樹状細胞の活性化は表面抗原 MHC class I, II, CD86 の発現を FACS Calibur にて測定した。培地中に放出されるエキソソームの精製はヒト MHC Class II ビーズを用いて行った。

5. ハンセン病予防法に関する研究

らい菌抗原発現 BCG の構築

抗酸菌ファージ由来 promoter と BCG もしくはらい菌 Hsp70 とらい菌 MMP II 融合蛋白遺伝子を pUC18 へ組み込んだ。その領域の上下流にウレアーゼ配列を導入した。この plasmid を、抗酸菌ファージ由来 recombinase を発現する pJV53 を維持する BCG clone A-53 へ、遺伝子導入を行い Hygromycin 耐性、ウレアーゼ試験陰性 clone を選択した。選択された clone より pJV53 を脱落したクローンを選択し、resolvase を発現する pYUB870 を導入した。さらに hygromycin 感受性の株を選択し、pYUB870 を脱落したクローンを選択した。各段階で菌体を可溶化し抗 MMP II 単抗体によるウエスタンブロット法を用い

発現の確認を行った。

カニクイザルによるらい菌感染系の構築

平成16年度に独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医学研究センターで繁殖育成された6-8ヶ月齢の幼若カニクイザル6頭を3群に分け、らい菌を鼻腔内、鼻先端部、左手根部に各2頭へ接種した。らい菌接種および感染動物の維持は、医薬基盤研究所 P2感染実験施設内で行った。らい菌接種前、接種後6年間にわたり2ヶ月間隔で血漿・鼻腔内洗浄液を採取しPGL-I抗体及びらい菌特異PCR法によりモニターを行った。また、平成20年度に1組、平成21年度に2組の妊娠4週ザルへ菌接種後、その出生仔へ1、4、8週時に母ザル共に、鼻腔内、鼻尖へ菌接種を行い経過観察を進めた。

6. ハンセン病に対する免疫療法の開発

らい菌由来MMP-II遺伝子とBCG由来のHSP70遺伝子を連結し、BCGに導入することで新規リコンビナントBCG(BCG-70M)を作製した。UreC遺伝子欠損リコンビナントBCG(BCG-ΔUT-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。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。正常健常人末梢血の提供を受け、抗CD3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、リコンビナント(r)GM-CSFおよびrIL-4を添加して4日間培養することで、樹状細胞を得た。樹状細胞に対して、リコンビナントBCGあるいは蛋白抗原をパルスし、そのT細胞活性化能をT細胞が産生するIFN-γおよびIL-2を指標に評価した。T細胞として自己のCD4陽性及びCD8陽性T細胞を用いた。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

およびIL-2のELISAは、市販の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。樹状細胞の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。樹状細胞によるT細胞活性化機構を探索する目的で、樹状細胞をChloroquine、Brefeldin A、Lactacystinで処理し、T細胞の活性化抑制能をIFN-γの産生量を指標に評価した。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

7. ハンセン病の理解の促進に関する研究

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、出版物を日本語(初年度)と英語(次年度に翻訳、最終年度に出版)で作成する。

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

- 1) 図書、行政文書等の薄冊目録作成
- 2) 医学資料(診療録等)の利活用のパイロットスタディとして、①開所当初である明治42年から45年の死亡者来歴と病床日誌の検討 ②1970年から80年代前半にかけてのENL(2型らい反応)に対するサリドマイドの使用状況の検討(以上は22年度)③1996年から2005年における再発例の治療歴等の検討(23年度)を行う。

3. ハンセン病に関する新聞報道記事の検証

Nifty新聞横断検索データベースを用い、全国紙、ブロック紙、地方紙について、1988年から2011年のハンセン病関連記事の総件数、全国13療養所に関

する記事の件数、ハンセン病関連特集・連載記事を調査、比較し、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。

8. ハンセン病診療のネットワーク構築

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パンフレットを作成などして提供し、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、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する。また、近年増加している抗酸菌感染症であるブルーリ潰瘍とハンセン病の鑑別を明確にする。

(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. 薬剤耐性ハンセン病に関する研究及び調査(甲斐)

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、数ヶ月保存後に使用しても同じ結果を得ることが可能であることがわかった。

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* に対して、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)。

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)

MMP-II 血清抗体価の陽性率は、多菌型で平成21年度:75.8%、平成22年度:77.0%、平成23年度:88.8%、少菌型で平成21年度:47.0%、平成22年度:43.5%、平成23年度:59.6%であり、定性PGL-1抗体の陽性率より高かった。(平成16~18年度の定性

PGL-1 抗体陽性率は、多菌型:7.3%、少菌型:1.5%であった。) Cut-off 値は、平成 21 年度:0.2598、平成 22 年度:0.2923、平成 23 年度:0.2559 であった。各年度とも 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は高値が持続した。細胞性免疫能に関しては、特に ELISA 法による MMP-II(2,4 μ g/ml)刺激の 96 時間後の培養細胞上清中 INF- γ 、IL-10 の産生量は、多菌型で少菌型よりやや低い傾向がみられた。MMP-II (2, 4 μ g/ml) による刺激の場合、MLC 刺激(4, 8 μ g/ml)の場合より IL-10 の産生が多い傾向がみられた。細胞内サイトカイン産生に関するフローサイトメトリーを用いた検討では、これまでのところ病型による有意な差異を認めなかった。

皮膚生検標本を用いた MMP-II 抗体による免疫染色では、8 例中 6 例に陽性所見を認めた。これら陽性例の内、再発例を含む活動期の 5 例は Fite 染色でらい菌を認めたが、他の 1 例は菌陰性であった。皮膚スミア検査で陽性所見を認めた症例の MMP-II 血清抗体価は 3 年連続で軽度高値を示した。

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)

らい菌感染によって、細胞内脂質の蓄積や代謝に重要な役割を果たす PAT タンパクである adipophilin/adipose differentiation-related protein (ADRP)や perilipin の発現が誘導され維持されることが明らかとなった。また、らい菌は、ライソゾーム融合を阻害する機能を持つアクチン結合タンパク CORO1A の発現も同時に誘導するとともに、自然免疫活性化に必要な Toll 様受容体や TNF- α のシグナルを抑制することが判明した。一方で、らい菌感染により細胞内の脂質の異化作用に重要な役割を果たす酵素である、hormone sensitive lipase (HSL) の発現が強く抑制されることが明らかとなった。らい菌の細胞壁成分であり toll-like receptor 2 のリガンドである peptidoglycan (PGN)を加えると HSL 発現は一過性に強く誘導された。しかし、PGN と同時にらい菌を加えると、HSL 発現は逆に減少した。すなわち、らい

菌は細胞壁の PGN とは別の成分によって HSL 発現を抑制すると考えられた。HSL タンパクの総量はらい菌感染 6 時間後より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を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。また、L 型ハンセン病皮膚スミアでは HSL 発現がほぼ消失しており、らい反応前あるいは多剤併用療法後に回復することが明らかとなった。多剤併用療法薬剤のうちクロファジミンは、らい菌感染によって発現量が低下した HSL 量を増加させ、らい菌感染により誘導される ADRP のレベルを下げるという、感染によって引き起こされる宿主遺伝子発現変化を打ち消す作用があることを証明した。リファンピシンおよびダブソンにはそのような作用は無かった。

4. 難治症例に対する免疫療法の開発(前田)

らい菌または LipoK で刺激した樹状細胞を用いて、T 細胞からのグラニューライシン産生能を調べた。らい菌のみではグラニューライシン産生 CD8 陽性細胞はほとんど(1.67%)見られないが、らい菌存在下で LipoK をパルスした樹状細胞は CD8 陽性 T 細胞を刺激し、有意にグラニューライシンを産生した(18.9%)。つぎに CD4 陽性 T 細胞が CTL の役割を果たしていることを検討した。LipoK の刺激により、グラニューライシン産生細胞が増強していることも明らかとなった(28.4% v/s 0.64%)。T 細胞内のパーフォリン及びグランザイム B 産生も同じ傾向で増加した。これら分子の産生において、脂質部分を持つ LipoK が重要な役割を担っていると考えられた。さらに、CTL 活性に、CD4 陽性細胞の共存が必須であることを確認した。

LipoK によって活性化した樹状細胞の変化をコンフォーカル顕微鏡で観察すると、らい菌の膜抗原が樹状細胞の膜表面側に観察されることから、らい菌のタンパクがプロセッシング受ける可能性が示唆さ

れた。このことから、LipoK は TLR2 を介してより強力に T 細胞に抗原提示を行うと考えられる。つぎに樹状細胞の細胞表面の抗原を FACS で分析すると、MHC class I, II, CD86 の発現も増加していた。樹状細胞を LipoK で刺激したのみでも、細胞表面抗原の発現が上がるのですが、T 細胞と混合培養すると、さらに樹状細胞が活性化された。

らい菌感染樹状細胞を LipoK でパルスし、放出されるエキソソームの分析を行った。これまでに、FITC(蛍光)ラベルしたらい菌を用いると LipoK 刺激によって、エキソソームの蛍光強度が増加することが確認された。Class I, II, CD86 抗原も検出でき、らい菌抗原も存在することを確認するため、ウェスタン法で分析を行った。その結果、約 35kD のバンドが抗らい菌膜抗体で検出された。LipoK の刺激によって、らい菌抗原がエキソソーム中にも存在し、何らかの T 細胞活性化に関わっていると考えられた。

さらに、詳細にマイクロアレイ 3D-Gene Human Oligo chip 25 を用いて検討すると、らい菌感染樹状細胞を LipoK で刺激した細胞と CD40 リガンドで刺激後の細胞から遺伝子発現を比較すると、IL-12, IL-1B, IL-6, TNF-SF7, NF- κ B12 等の発現は LipoK 刺激後の樹状細胞では 8 倍増加していた。同様にキモカイン CCL2, CCL7, CCL8, CCL20 等の発現も高く見られた。さらに、幾つかの未知遺伝子の発現上昇が見られたことから、今後、これらの遺伝子発現を再確認する必要がある。

5. ハンセン病予防法に関する研究(向井)

らい菌抗原発現 BCG の構築

抗酸菌ファージ由来 promoter と BCG もしくはらい菌 Hsp70 とらい菌 MMP II 融合蛋白遺伝子を pUC18 へ組み込んだ。その領域の上下流にウレアーゼ配列を導入した。この plasmid を、抗酸菌ファージ由来 recombinase を発現する pJV53 を維持する BCG clone A-53 へ、遺伝子導入を行い Hygromycin 耐性、ウレアーゼ試験陰性 clone を選択した。選択された clone より pJV53 を脱落したクローンを選択し、resolvase を発現する pYUB870 を導入した。さらに

hygromycin 感受性の株を選択し、pYUB870 を脱落したクローンを選択した。各段階で菌体を可溶化し抗 MMP II 単抗体によるウェスタンブロット法を用い発現の確認を行った。

カンクイザルによるらい菌感染系の構築

平成16年度に独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターで繁殖育成された 6-8 ヶ月齢の幼若カンクイザル 6 頭を 3 群に分け、らい菌を鼻腔内、鼻先端部、左手根部に各 2 頭へ接種した。らい菌接種および感染動物の維持は、医薬基盤研究所 P2 感染実験施設内で行った。らい菌接種前、接種後 6 年間にわたり 2 ヶ月間隔で血漿・鼻腔内洗浄液を採取し PGL-I 抗体及びらい菌特異 PCR 法によりモニターを行った。また、平成 20 年度に 1 組、平成 21 年度に 2 組の妊娠 4 週ザルへ菌接種後、その出生仔へ 1、4、8 週時に母ザル共に、鼻腔内、鼻尖へ菌接種を行い経過観察を進めた。

6. ハンセン病に対する免疫療法の開発(牧野)

BCG-70M は、期待した MMP-II-HSP70 融合タンパクを分泌するか検討した。BCG-70M の培養上清を濃縮した後、ウェスタンブロット法で検索すると、抗 MMP-II 抗体および抗 HSP70 抗体と反応する 90 kDa のタンパクが存在することが確認された。したがって、BCG-70M は HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌することが明らかになった。そこで、精製した HSP70-MMP-II 融合タンパクで樹状細胞を刺激すると、樹状細胞から IL-12p70 が産生され、樹状細胞を予め TLR2 に対する中和抗体で処理しておくと、樹状細胞からの IL-12p70 の産生は強く抑制された。BCG-70M で樹状細胞を刺激すると、強く HLA-ABC、HLA-DR、CD86 および CD83 抗原の発現程度を増強した。同時に BCG-70M は、樹状細胞から IL-12p70、TNF α 、IL-1 β などのサイトカイン産生を誘導した。そこで BCG-70M 感染樹状細胞を用い、自己のナイーブ及びメモリー CD4 陽性 T 細胞を刺激すると、T 細胞は強く活性化され IFN- γ を産生した。BCG-70M 感染樹状細胞表面の HLA-DR およ

び CD86 抗原の発現を抗体を用いてマスクすると T 細胞の活性化は抑制され、同時に樹状細胞を Chloroquine 処理しても T 細胞の活性化は抑制された。自己の CD8 陽性 T 細胞を同様に刺激した場合も全く同様の現象が観察された。そこで、樹状細胞を Brefeldin A あるいは Lactacystin で処理した後 BCG-70M を感染させると、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞の活性化は抑制された。BCG-70M を用いて CD8 陽性 T 細胞を CD4 陽性 T 細胞存在下で刺激したところ、CD8 陽性 T 細胞は CD62L 抗原の発現を抑制し、同時に細胞内にパーフォリンを産生した。

BCG-D70M の T 細胞活性化能も同様に測定した。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- Δ 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- γ が CD4 陽性 T 細胞から産生された。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- Δ 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- γ の産生を誘導した。さらに、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。同時に、樹状細胞表面上の HLA-DR \cdot CD86 \cdot CD83 抗原の発現を増強させた。

MMP-II 及び HSP70-MMP-II 融合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、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、抗原パルスした樹状細胞に対して CD40 リガンドで副刺激を施すと、未感作 CD8 陽性 T 細胞はより強く活性化された。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 周及び 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、融合蛋白がより強くメモリー T 細胞を産生した。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 \cdot CD8 陽性 T 細胞何れも IFN- γ を産生していた。

7. ハンセン病の理解の促進に関する研究(野上)

1. 初年度、菊池恵楓園百周年記念誌「百年の星霜」(要約版、約 220 頁)として出版、次年度、内容を海外向けに改変し英訳、最終年度、「The View from Archives-History of Hansen's Disease in Kumamoto, Japan-Information dispatch from Kikuchi Keifuen」(約 130 頁)として出版した。成果物は、見学者を受け入れている園の社会交流会館(歴史資料館)や、ボランティアガイド教育を通じて公開するほか、図書館、県下の教育機関等へ配布した。また英語版は国内外の大学、図書館、医学史研究者へ送付ならびに紹介した。

2.-1) 薄冊目録は、第二次箱番号 1~842 として連番のふられた段ボール箱に収められている図書、行政文書等の紙資料に対し、<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 \times 横)><サイズ(厚さ)><第一次箱番号><備考>として作成した。

2-2) ①明治 42 年から 45 年の死亡者(44 名)来歴と病床日誌(22 冊)は、きわめて保存状態が悪く、一次資料の手当てを行いデジタルデータ化したものを研究に用いた。この間の死亡者数は園の 50 年誌の統計資料に照らして正確なものであった。男性 38、女性 6(性別欄が空欄のものがあり、名前より推定)、死亡時満年齢は 15 歳から 67 歳、結節癩 27(31.07 \pm 8.42 歳)、神経癩 15(39.13 \pm 11.59 歳)、斑紋癩 2 と、すべて病型診断がなされており、死亡時年齢は

結節癩で優位に若年であった。死因の 1 位は結核関連疾患、呼吸器疾患、次いで衰弱、癩性衰弱、癩病の診断で、入所から 1 ヶ月以内の死亡例が 8 例あり、住所不定または熊本県花園村(らい部落が存在した)から送致され癩(病)衰弱で死亡した 4 例(明治 42 年)が含まれる。

②既に故人となっている者も含め L 型の患者の診療録を無作為に選び、1970 年から 80 年代前半にかけての ENL(2 型らい反応)に対するサリドマイド使用者 22 名:男性 16 名(開始時 17 歳~57 歳)、女性 6 名(42 歳~76 歳)を抽出し、当該薬剤の処方例 500 件について検討した。当園では、1970 年より使用が開始され、当初 Thalimin、1977 年 9~10 月以降、CG の名称で記載されている。用法、用量は、初回投与量は、30mg 1x(眠前)~120mg 2x1(朝、眠前)、1 日最大投与量 200mg 2x1、最小量 5mg であった。通常 50~60mg、発熱を伴うとき 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ことが多い。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、などがあった。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、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。

③1996 年から 2005 年における再発例 21 例についての検討では、寛解期間が 30 数年に及ぶものもあり、最も古いもので 1940 年の初診(入所)時に遡って詳細に経過を明らかにした。初診時は多くは L 型、一部は B 型(全例 MB/WHO)で、再発時の病型(LL、BL、BT)により臨床経過に特徴がみられ、特に MDT/MB/WHO に準じ十分に治療された症例を含め BT の病型で再発する症例が 21 例中 6 例にみられたことは特筆すべきである。

3. 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 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 年にはハンセン病国賠訴訟違憲判決関連で 600~1200 件の急峻なピークを形成したのち、減少、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のに対し、地元紙においては、類似の傾向ながら 2010 年、11 年と 140 件台を保っている。1988 年から 2009 年のハンセン病関連記事総件数に占める菊池恵楓園に関する記事の割合は、全国紙(朝日、読売、毎日の 3 紙)では平均 11.24%、熊日では 53.22%を占めていた。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、菊池恵楓園(5115 件)が最多であった。全国紙による掲載が 1、2 位を争う頻度であったほか、ブロック紙(1063 件、うち西日本新聞 880 件)、地方紙(2513 件、うち熊日新聞 2134 件)の掲載がいずれもトップであったことによる。

8. ハンセン病診療のネットワーク構築(石井)

皮膚科医への講習会・検査実習を毎年実施した(参加者:平成 21 年 35 名、平成 22 年 24 名、平成 23 年 30 名)。講習は、ハンセン病診療するにあたり、新規患者の心情、外国人患者の不安、回復者の心情を理解し、ハンセン病について理解を深めることを目的とした。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も講義内容に組み入れた。実習は、皮膚スミア検査、末梢神経検査、病理組織検査を実施し、知識・技術の伝達を行った。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ようにした。

ハンセン病回復者が一般医療機関受診のチャンスを広げられるように、「ハンセン病療養所退所者等ハンドブック」を作成した。さらにらい反応(ENL)に対するサリドマイド診療ガイドラインを作成し、2012 年に保険適用になる予定のサリドマイドの使用法を明

示した。

新規のハンセン病患者は2009年は2名(うち日本人0名)、2010年は4名(うち日本人0名)、2011年は5名(うち日本人2名)いた。主治医に対して診療及び検査の指導を行い、ハンセン病を確実に診療できる体制を確立した。

D. 考察

1. 薬剤耐性ハンセン病に関する研究及び調査(甲斐)

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の併用及び試薬をプレートに固相化したHPRT-PCRを用いることが検討され、それぞ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3-4時間で完了可能であった。

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。*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考えられた。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 *folP1* 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。

耐性菌の伝播について、遺伝子変異の検索により把握するためには、その正確な検査が基本となる。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。

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)

多菌型では、MMP-II 血清抗体価の持続高値の例があることより、再燃・再発に関して細胞性免疫能の評価も今後さらに必要と考えられた。

他に生検病理標本のさらなる検討や個別の症例ごとに臨床症状に関して慎重な経過観察を行ってゆくことなども再燃・再発を予測する上で重要と思われる。

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)

らい菌は試験管内培養ができず、はなはだ困難な研究対象ではあるが、高率な偽遺伝子発現や厳格なファゴゾーム内寄生という、他の生物には無い大きな特徴を有している。らい菌は、感染後に宿主マクロファージの遺伝子発現を制御することで、自らの生存に適した環境を構築していることが明らかになってきた。このような作用は、らい菌の死菌やラテックススピーズでは起こらないことから、らい菌生菌由来の未知の物質に関わる可能性が考えられた。

HSL はホルモンによる脂肪の異化作用を誘導する物質として脂肪細胞で初めて発見された酵素である。種々の細胞で発現しているが、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。

好気性菌であるらい菌は酸素分圧勾配が比較的低い肉芽腫環境において、炭素源として脂質や脂肪酸を利用することで生存を維持していると考えられることから、そのような脂質の蓄積や代謝に関与する宿主タンパク発現を制御している可能性が考えられた。

ヒト培養マクロファージ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。

HSL 発現は *in vivo* においては、エネルギーレベルの変化によって修飾されることが知られている。肥満においては、前脂肪細胞や分化した脂肪細胞において HSL 発現が減少し、2 型糖尿病では脂肪組織における HSL mRNA が減少することが示され、インスリン抵抗性が HSL 発現を調節していると報告されている。*In vitro* の研究では、3T3-L1 脂肪細胞やインスリン欠損動物から単離した脂肪細胞における HSL mRNA 発現はインスリン処理によって抑制される。しかしながら、これまでに HSL 発現を修飾するような細菌の作用が証明された報告は無い。*M. tuberculosis* や *M. avium* なども宿主の脂質を利用するので、本研究の成果はこれらの細菌感染においても重要な働きをしている可能性が考えられる。

MDT 治療後の多菌型ハンセン病患者皮膚スミア材料における HSL 発現回復のメカニズムとしたクロファジミンの直接作用である可能性が示唆された。

今後らい菌に関する基礎研究から得られた成果が、広く生物学全体に還元されることが期待される。

4. 難治症例に対する免疫療法の開発(前田)

LipoK は、樹状細胞を活性化し、らい菌抗原を T 細胞に提示することによって免疫応答を引き起こすことを明らかにしてきた。LipoK は自己 CD8 陽性 T 細胞のみならず、CD4 陽性 T 細胞から大量のグラニューライシン、グランザイム B を分泌しうる物質である。CTL 活性に重要なグラニューライシンまたはグランザイム B はらい菌を直接破壊することが今回初めて確認できた。LipoK は TLR2 を認識し、らい菌感染樹状細胞からエクソソームを放出した。エクソソーム中に抗原提示関連分子及びらい菌膜蛋白由来分子の含量を増強していることが分かり、その結果、T 細胞の活性化を増強することが示唆された。さらに、エクソソームをウエスタンで分析すると、約 35kD のらい菌膜蛋白が検出され、N 末端解析で同定できれば、新

たな有用な抗原性のある蛋白になり得ると考えられる。

5. ハンセン病予防法に関する研究(向井)

改変 BCG の構築

安全かつ安定な組換え BCG を構築するために、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 融合たん遺伝子を、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、両抗原性の強さはまだ不明のため、HSP が BCG 由来ものどらい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。

6. ハンセン病に対する免疫療法の開発(牧野)

らい菌に対する生体防御反応は、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を中心に営まれている。ハンセン病に対する免疫治療に際しても、両 T 細胞を強く活性化し、実効性分子または因子を産生する必要がある。従来の BCG は、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を活性化する能力は有するものの、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞を活性化する能力は有していない。このことは、BCG は抗原提示細胞内で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ため、BCG 由来の抗原が細胞表面に発現されず、また BCG の菌体成分が細胞質に放出されないために、CD8 陽

性 T 細胞の活性化に必須のクロスプレゼンテーション機構が活性化されないことに起因している。これらの欠点を凌駕するため、らい菌の主要抗原の一つと考えられる MMP-II を菌体外へ分泌することにより両 T 細胞サブセットがより強く活性化されることを期待し、さらに両 T 細胞をアジュバント的に強く活性化する作用を有する HSP70 に着目し、菌体外に HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌するリコンビナント BCG (BCG-70M 及び BCG-D70M) を作製した。これらの BCG は期待した通り非常に強くナイーブ及びメモリー T 細胞を活性化し、大量の IFN- γ を産生した。さらに、CD8 陽性 T 細胞を CD4 陽性 T 細胞存在下で刺激すると、パーフォリン産生性のキラー CD8 陽性 T 細胞が効率的に産生された。これら T 細胞の活性化は抗原特異的であり、抗原として MMP-II と HSP70 の両者が深く関与しているものと推定された。このことは、ヒトの主要組織適合抗原の多様性を考慮すると極めて重要な位置を占めていると考えられる。T 細胞の強い活性化誘導には、BCG-70M 及び BCG-D70M の有する強い抗原提示細胞活性化能が関与しており、その際に HSP70 がファゴゾームの中で分泌されたことが、強い活性化に繋がったと考えられた。

さらに、追加治療用ワクチンとして用いる 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. ハンセン病の理解の促進に関する研究(野上)

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。ハンセン病は医学史的に重要な側面を持つが、その観点からの検討は着手が遅れている。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ことは、これからの医学史、社会科学的研究のために貴重な資料を準備したといっても過言ではない。

国の隔離政策の被害実態を明らかにするために近代史家、社会学者の手によって療養所入所者に対する聞き取り調査が積極的に行われていて、それらの調査結果はまさに人権侵害の悲劇に思いを致させ、共感させることで、人権教育に大きく役立っていると思われる。しかしながら、彼らの証言はあくまで主観的なものであるから、社会科学的に考察するにあたっては客観的な歴史的事実との照会が不可欠で、医学的に考察するならばなおさら、専門的なニュートラルな視点と、医学史的な考察方法が重要になろう。ハンセン病の病態、後遺症を理解しつつ、近世日本における障害者の置かれてきた環境や、痘瘡などの重篤な感染症、急性疾患等との比較検討、日本に留まらず中国、東アジアほか海外の状況にまで視野を広げながら、歴史の重層の中でハンセン病の背負ってきた歴史を考察することで、この複雑な疾患の真の理解に一步ずつ近づけるのではないだろうか。

今後、この領域へのアーキビストの関与、ニュートラルな視点での医学史研究者との情報交換の嚆矢とするべく、今回の成果物を活用することができると考える。一疾患に特化した大量の医学資料が保管されている菊池恵楓園の特性を生かしアーカイブズとすることは医学史研究上まだほかにあまり例がなく、他疾患に先駆けての医学資料アーカイブズ構築のモデルとなり得る可能性も含んでいる。

医学資料を用いてパイロットスタディ的に行った3つの研究、すなわち①開所当初である明治42年から45年の死亡者来歴と病床日誌の検討 ②1970年から80年代前半にかけてのENL(2型らい反応)に対するサリドマイドの使用状況の検討 ③1996年から2005年における再発例の治療歴等の検討からは、それぞれ興味深い結果が得られた。明治期における医事制度や病気の近代史的な一般論と照合しつつ、公立療養所が当地に設立された背景や、病という極めて個人的な問題に国家が介入してくることの時

代的考察、公衆衛生的概念の成熟過程など、さらに文献的考察を深めて論文としたい。またサリドマイドの使用経験、MB/WHOの病型における治療後の長期観察結果に関しては本邦ならではの検証可能な資料が残されており、ハンセン病病態研究に貢献が可能である。

当園における医学資料を含むアーカイブズ構築が、このような重要な意味を持ちうることを示すことができた点で、これらのパイロットスタディを評価することができると思う。無論、アーカイブズの公開、利用に関しては、多くの個人情報が含まれている可能性を重視し、慎重にその基準を設定する準備をしなければならない。今後の重要な課題である。

一般市民に対しハンセン病の理解を促進させる上でマスメディアの関与は大である。新聞横断検索データベースを用い、ハンセン病関連記事、菊池恵楓園はじめ全国13療養所に関する記事の掲載件数を調べた。1988年から1994年まで地元紙(熊日新聞)を除き、他紙ではほとんどそれらが見当たらない。96年の予防法廃止に向けて地元紙、毎日新聞紙上で積極的に啓発記事の掲載があり、97~98年、熊日、毎日、読売、西日本の各紙で特集が組まれた。その後、話題に上るのは2000年から2001年にかけて国賠訴訟違憲判決関連記事、2003年の温泉宿泊拒否問題などで、その後も全国紙において毎年何らかのハンセン病関連特集記事が組まれている。地元紙においては一般に入所者に好意的な論調であり、具体的で親近感の持てる報道内容が多く見られ、話題性のある[事件]がなくとも、報道に継続性がみられる点は評価できる。全国13園の中で、菊池恵楓園に関する報道記事が最も多いことがわかり、ブロック紙、地元地方紙の関与が大きかった。菊池恵楓園からの絶え間ない情報発信による地元メディアへの働きかけが、今後、正しい情報の伝達と啓発に繋がると思われる。

8. ハンセン病診療のネットワーク構築(石井)

ハンセン病患者が減少し、診療する機会が減少し、教育を受けていない、一度も診療機会がない医師、

特に皮膚科医が大多数を占めるようになっている。また、ハンセン病の歴史やハンセン病回復者の心情なども理解できていない。それらを解決するために、講習会を開催し、意識向上に努めた。さらに他の皮膚科医の教育も必要と考え、「ハンセン病アトラス」を配布した。この意欲を持続させるために、今後も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。

ハンセン病回復者を一般医療機関に受診させる(インテグレーション)事は難しいが、一歩でもそれに近づける努力は必要である。そのため、気軽に相談できる皮膚科医を「ハンセン病療養所退所者ハンドブック」に記載し、回復者や全国の皮膚科医などに配布した。これらの皮膚科医を起点として他の診療科などに受診できることを期待したい。さらにサリドマイドを2型らい反応に使用するためにガイドラインを有効に利用していただきたい。

E. 結論

1. 薬剤耐性ハンセン病に関する研究及び調査(甲斐)

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。同様にらい菌、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。

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。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。

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)

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、MMP-II 血清抗体価の変動をチェックすること以外に、MMP-II の刺激などによる細胞性免疫能の評価や臨床症状の観察も含めた総合的な検討が必要と考えられた。

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)

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。ハンセン病患者皮膚スミア材料におけるこれら遺伝子発現によって、病態の変化や治療効果判定を評価しうる可能性が示された。

4. 難治症例に対する免疫療法の開発(前田)

LipoK は TLR-2 を介して、より多くグランザイム B 及びグラニューライシンが T 細胞から産生され、これら物質によってらい菌が殺菌されることが明らかになった。したがって、LipoK は免疫療法に活用しうる分子であると事が示唆された。

5. ハンセン病予防法に関する研究(向井)

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. ハンセン病に対する免疫療法の開発(牧野)

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に関する研究(野上)

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、発信し続けることが重要である。ニュートラルな視点での日本のハンセン病史の理解促進のため、

菊池恵楓園の創立以来百年の歴史を日本語と英語で編集、出版した。菊池恵楓園に蓄積されている資料のアーカイブズ構想のもと、図書、行政文書等の紙資料に関する薄冊目録を作成し、今後アーカイブズを構築するための基礎データとした。また、医学資料の利活用のパイロットスタディとして①開所当初である明治42年から45年の死亡者来歴と病床日誌の検討 ②1970年から80年代前半にかけてのENL(2型らい反応)に対するサリドマイドの使用状況の検討 ③1996年から2005年における再発例の治療歴等の検討を行い、医学資料をも含めたアーカイブズの構築が医学史研究のみならず医学的にもハンセン病の病態解明に貢献しうることを示した。

啓発におけるマスメディアの影響は大きいと考えるので、ハンセン病に関する新聞報道記事(1988～2011)を検証し、菊池恵楓園からの情報発信が地元紙の報道の継続性に影響を与えていると考察した。

8. ハンセン病診療のネットワーク構築(石井)

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

特になし

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 Agent Chemother, 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.