

Brunei	0	0	0	0	0	0	0		
Cambodia	257	315	212	89	25	36	0	80	89.6
China	3 196	1 526	1 296	492	34	347	161		
China, Hong Kong									
Special Administrative Region	28	2	0	1	0	0	1	100	100
China, Macao Special									
Administrative Region	0	0	0	0	0	0	0		
Commonwealth of the Northern									
Mariana Islands	3	0	0	0	0	0	0		
Cook Islands	0	0	0	0	0	0	0		
Fiji	9	6	6	0	0	2	3		
Japan	10	11	9	1	0	0	0		
Kiribati	27	63	31	22	24	0	0		
Republic of Korea	363	12	10	5	0	6	3	100	100
Lao People's Democratic Republic	112	125	105	97	5	19	0		
Malaysia	681	190	134	59	10	2	0		
Marshall Islands	62	64	37	3	13	0	0		
Mongolia	0	0	0	0	0	0	0		
Micronesia (Federated States of)	87	141	65	29	38	0	0		
Nauru	3	3	3	0	1	0	1		
New Caledonia	4	2	2	1	0	0			
Palau	7	4	4	1	0	1	0		
Papua New Guinea	452	270	167	102	54	20	0		
Philippines	2 279	2 514	1 541	503	96	69	14	90	88
Singapore	29	12	5	0	0	0	0	100	100
Solomon Islands	12	15	12	10	3	0	0		
Tonga	0	0	0	0	0	0	0		
Tuvalu	1	1	1	1	0	0	0		
Vanuatu	4	3	2	1	0	0	0		
Viet Nam	521	588	409	178	25	102	8	100	100
Wallis and Futuna	0	0	0	0	0	0	0		
Total	8 152	5 867	4 051	1 595	328	604	192		

^a Prevalence per 10000 population, beginning of 2008.

^b Cure rate among 2006 cohort.

^c Cure rate among 2005 cohort.

^d Cure rate among 2004 cohort.

結 論

多くの国々では、年間発見される新規患者数は徐々に減少している。数は少ないかもしれないが、大多数のハンセン病流行国は未だ新規患者を発見している。このことは、全ての新規患者が適切に診断され、治療されることを保証するために、ハンセン病制圧活動を維持する必要の重要性を強調するものである。これらの努力を通して、ハンセン病問題は全ての流行国において引き続き減少し続けることが期待されている。国家プログラムは自己満足に浸る余裕はない。これらのプログラムには、特に流行性の低い場所で行動している場合には、この先により大きな挑戦が待っている。それは、とりわけ末端レベルにおけるハンセン病制圧活動の政治的関心の保持とサービスの維持の試みにおいてである。ハンセン病が比較的まれになった国々では特に、保健スタッフの中でハンセン病制圧の専門的知識を保つのは難しい。

ブラジル、ネパール、東ティモールは未だハン

セン病を克服していない。これらの国々がハンセン病制圧目標に近い未来に達成できるのを助けるための特段の努力が払われ続けるだろう。

WHO は、特に能力育成、モニター及び評価、そして全てのハンセン病新規患者が適切に診断され、最終的に多剤併用療法 (MDT) により完治するための主要活動を維持するための技術的支援を提供し続ける。多くの様々な協力者たちとの効果的な協同により、ハンセン病患者が耐えている偏見と社会的差別や、多くの地域におけるこの病気に関連する否定的な態度がなくなることが期待されている。

謝 辞

本論文は、平成 20 年度国際医療協力研究委託費「開発途上国で有効なハンセン病の診断、治療、障害予防に関する研究」の分担研究「開発途上国における偏見・差別の解消に向けた研究」の補助金を受けた。

追 加

本稿の編集中に、週間疫学記録 (WER No. 50, 2008, 83, 449-460) が発行され、新たなデータが 2 つの表として掲載されたので、Table S1, Table S2 としてここに追加する。

これにより、2007 の新規患者数および、2008 年の年初めの登録患者数が増加した。また、Table S2 では日本の新規患者数が訂正されているが、今回は日本人患者のみを掲載しており、在日外国人患者を除外したためである。

Table S1 Leprosy situation by WHO region (excluding European Region), beginning of 2008

WHO region ^a	Registered prevalence, ^b beginning 2008	New cases detected, ^c 2007
African	35 598 (0.51)	34 468 (4.95)
Americas	49 643 (0.61)	42 135 (5.15)
South-East Asia	120 973 (0.71)	171 576 (10.07)
Eastern Mediterranean	4 240 (0.09)	4 091 (0.85)
Western Pacific	8 151 (0.05)	5 863 (0.33)
Total	218 605	258 133

^a Population data from World population prospects: the 2004 revision, Vol. 1, Table A20. New York, United Nations Population Division.

^b Figures in parentheses are prevalence rates: number of cases per 10 000 population.

^c Figures in parentheses are case-detection rates: number of cases per 100 000 population.

Table S2 Global leprosy situation by WHO region, country or territory, beginning of 2008 (additional information)

Region and country or territory	Registered prevalence ^a	No. of new cases detected	No. of new cases of MB	No. of new female cases	No. of new cases among children	No. of new cases with grade 2 disabilities	No. of relapses 2007	Cure rate (%)	
								PB	MB
African									
Eritrea	142	10	6	2	0	1	6	-	-
United Republic of Tanzania	3 042	3 105	2 313	1 272	224	343	53	-	-
Zambia	2 359	316	237	141	28	26	52	-	-
Total	5 543	3 431	2 556	1 413	258	369	111	-	-
Americas									
Cuba*	255	244	176	109	2	8	6	-	-
United States of America		157	99	44	2	-	-	-	-
Total	255	401	275	153	4	8	6	-	-
South-East Asia									
Bangladesh*	4463	5 357	2 347	2 077	365	556	-	-	-
Bhutan		16							
Democratic People's Republic of Korea	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Maldives	6	8	2	5	0	0	-	-	-
Sri Lanka*	1 494	2 024	916	907	196	118	8	-	-
Total	5 963	7 405	3 265	2 989	561	674	8	-	-
Western Pacific									
Guam	8	6	4	2	2	0	0	-	-
Japan*	1	1	1		0	0	0	-	-
Total	9	7	5	2	2	0	0	-	-

^a Prevalence per 10 000 population, beginning of 2008.

MB = multibacillary leprosy.

PB = paucibacillary leprosy.

* Revised data.

Global leprosy situation, beginning of 2008

Koichi SUZUKI¹⁾ * , Yuzuru NAGAOKA²⁾, Shuuichi MORI³⁾, Norihisa ISHII¹⁾

1) Department of Bioregulation, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

2) Department of Dermatology, Tama-Zensho, Leprosy Hospital, Tokyo, Japan

3) Department of Microbiology, Fukushima Medical University, Fukushima, Japan

[Received / Accepted: 14 Oct. 2008]

Key words : elimination, multidrug therapy, new case, prevalence rate, WHO

The epidemiological situation of leprosy is reported by the health division of each country to WHO. The reported data is collected by WHO and is immediately run on the Weekly Epidemiological Record. On this latest edition, data from the beginning of 2008 was reported. In almost all of the highly endemic countries, control activities have been integrated within the general healthcare system. However, maintaining political interest and mobilizing the necessary funds to implement activities in the field are challenges for many national programmes as the burden of disease declines further.

*Corresponding author :
Department of Bioregulation, Leprosy Research Center, National
Institute of Infectious Diseases
4-2-1 Aoba-cho, Higashimurayama, Tokyo 189-0002, Japan
TEL : +81-42-391-8211 FAX : +81-42-391-9092
E-mail : koichis@nih.go.jp

タイリングアレイを用いたらい菌全ゲノムにおける 発現部位の検出

赤間 剛*、鈴木幸一、谷川和也、川島 晃、Huhehasi Wu、
中村和昭、林もゆる、石井則久

国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部

〔受付・掲載決定：2008年8月26日〕

キーワード：ゲノム、タイリングアレイ、偽遺伝子、非翻訳領域、らい菌

らい菌全ゲノム配列が解読された結果、タンパク質に翻訳される遺伝子数が少ない一方で、多くの偽遺伝子が存在し、その他の非翻訳領域がゲノム中に占める割合が多いことが明らかとなった。これら偽遺伝子と非翻訳領域は転写、翻訳を受けないジャンクな領域と考えられてきたが、これらの領域から転写されたRNAを我々はこれまでに特定していた。そこでらい菌全ゲノムに対する網羅的なRNA発現解析を行うために、タイリングアレイを設計し、らい菌 Thai-53 株から抽出した total RNA を解析した。その結果高発現領域として遺伝子の他に偽遺伝子や非翻訳領域から多数の領域を同定した。これら高発現領域の中にはMDTによって発現レベルが変化するものが存在したことから、RNA発現パターンの評価はハンセン病治療効果の有効な指標となりうる。

はじめに

2001年にらい菌の全ゲノム配列が解読され、らい菌特有の性質である宿主依存性や病原性の解明が期待された¹⁾。ゲノムの構造はmRNAが転写されタンパク質に翻訳される open reading frame (ORF) を有する遺伝子領域、元来遺伝子であった領域の中に終止コドンの挿入などが起こるなどして本来の機能を失った偽遺伝子領域、さらに全く既知の遺伝子構造との相同性が無い非翻訳領域 (non-coding region) から成り立っている。ら

い菌の近縁種である結核菌が約4.4Mbpのゲノムを有するのに対しらい菌のゲノムサイズは結核菌の3/4程度である約3.3Mbpであるが、遺伝子数では結核菌の3,959個を半数以上下回る1,604個が同定された (Table 1)。しかし結核菌には偽遺伝子がほとんど存在しないにもかかわらず、らい菌では1,116の偽遺伝子が存在することがあきらかとなった。これら偽遺伝子と何の機能も有さない非翻訳領域はらい菌ゲノム配列上で半数を占め (Fig. 1)、結核菌以外の様々な細菌ゲノムと比較しても特異なゲノム構造となっている²⁾。

らい菌偽遺伝子の構造を解析すると、終止コドンが多数挿入されてORFが細かく分断されているため、機能を有するタンパク質への翻訳が不可能となっている。従って偽遺伝子や非翻訳領域は何ら機能を有さない「ジャンク」な領域とみなされ、研究対象とされることが少なかった。しかし我々

* Corresponding author:
国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部
〒189-0002 東京都東村山市青葉町4-2-1
TEL: 042-391-8211 FAX: 042-394-9092
E-mail: akama@nih.go.jp

の研究グループでは、らい菌ゲノムコスミドライブラリをスポットしたメンブレンアレイを用いた解析により、マクロファージへの取り込み前後でその偽遺伝子領域から転写された RNA 発現量が変動することを報告した³⁾。従って偽遺伝子や非翻訳領域から何らかの役割を果たすために RNA が転写されていることが予想されたが、らい菌ゲノムから RNA が発現している領域を偽遺伝子や非翻訳領域を含めて明らかにした報告はこれまでになかった。また、従来のゲノムワイドな発現スクリーニング方法は ORF 領域の配列のみをプローブとした ORF アレイが中心であり、遺伝子領域以外の発現情報を明らかにすることができなかった。

近年、酵母などの微生物や高等生物の染色体に対してゲノム配列全てをカバーして解析することができるタイリングアレイを用いた発現解析が相次いでいる^{4,5)}。そこでらい菌全ゲノム配列をカバーするプローブを設計してタイリングアレイを構築し、らい菌偽遺伝子と非翻訳領域の RNA 発現を網羅的に解析した。発現が確認された領域に対してはハンセン病臨床検体から RT-PCR により発現の検出を試みた。

らい菌全ゲノムタイリングアレイ

らい菌ゲノム配列 (GENBANK Acc. No. NC_002677) を元にタイリングアレイに用いるプローブの設計を行った。60 mer のプローブをらい菌ゲノム配列上 18 mer ずつずらして隙間なく並べて設計した。相補鎖についても同様に設計し、合わせて 363,116 種類のプローブをアレイ上にランダムに配置した。

らい菌 Thai-53 株の増殖と精製は既報の通り行い⁶⁾、total RNA を miRVana miRNA isolation kit (Ambion) を用いて添付のプロトコルに従い抽出した。得られた total RNA は Nimblegen 社の標準的な方式に従い逆転写、蛍光標識とタイリングアレイへのハイブリダイゼーション、蛍光の検出を行った⁷⁾。得られたシグナルは Nimblegen 社のソフトウェア、SignalMap を用いて解析した。らい菌ゲノム配列において隣接したプローブは 60 mer のうち 42 mer ずつ重複するため (Fig. 2)、SignalMap 上でゲノム配列に応じて整列すると連続的な発現情報が得られた。そこでシグナル最大

Table 1

Feature	<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Genome size (bp)	3,268,203	4,411,532
G + C (%)	57.79	65.61
Protein coding genes (no.)	1,604	3,959
Pseudogenes (no.)	1,116	6

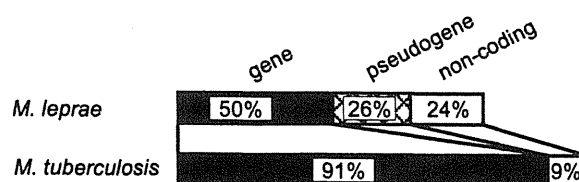


Fig. 1 らい菌のゲノム構造

全ゲノムが解読された結果、らい菌のゲノムは多数の偽遺伝子と非翻訳領域によって半数が占められていることが明らかとなった。近縁菌である結核菌では 90% 以上が遺伝子によって占められており、らい菌とは大きく異なっている。

値の60%以上のプローブを有する領域をRNAが高発現している陽性領域として抽出し、既知の遺伝子や偽遺伝子領域と比較した。

まず、遺伝子、偽遺伝子、あるいは非翻訳領域のそれぞれで高発現することが明らかとなった領域に対し、Thai-53株由来cDNAを鋳型としてRT-PCRを行って検証したところ、いずれもPCR産物が増幅された。しかしcDNAの材料として用いたRNAを加えてPCRを行った際には全てPCR産物を検出することができなかった(data not shown)。従ってタイリングアレイで示された高発現領域はゲノムDNAの混入による偽陽性でないと考えられる。

タイリングアレイから得られた結果の中でも、total RNAの8割以上がrRNAであることとよく一致して16S、26S、5Sの3種のrRNAをコードする領域が全域にわたり最も強いシグナルを示した(Fig. 3A)。また偽遺伝子領域に高発現領域が重なっている結果も得られたが、この偽遺伝子を解析するとORF全域にわたり終止コドンが挿入されていた(Fig. 3B)。さらに、遺伝子や偽遺伝子のいずれにも該当しない領域にだけ高発現領域が存在する結果も得られた(Fig. 3C)。このようらい菌ゲノムからは多数の偽遺伝子や非翻訳領域から

RNAが高発現していることが明らかとなった。

偽遺伝子から機能的なタンパク質が翻訳される可能性は非常に低いため、そもそもORFを有さない非翻訳領域とともに、転写されたRNAが重要であることを示唆している。いずれの領域からもmicroRNAなどの低分子RNAが生成され、他の遺伝子に働きかけて遺伝子からのタンパク質翻訳を制御する機能を有することが他の生物種での解析により知られている⁸⁾。従ってらい菌でも偽遺伝子や非翻訳領域から発現するRNAはそのような遺伝子発現調節を担っている可能性が考えられる。他の微生物と比較した中でもらい菌は多数の偽遺伝子と非翻訳領域を有するため²⁾、RNAによる遺伝子発現制御機構を体系的に解析するために有用と考えられる。

今後の展望

タイリングアレイによりRNAの発現する領域がゲノム全体で網羅的に明らかにされた。RNAはゲノムDNAと比較して安定性が低く発現量が制御されているので、らい菌のゲノムDNAをPCRにより増幅すると生菌と死菌の総数に比例して検出されると考えられるが、らい菌RNAは病態や治療

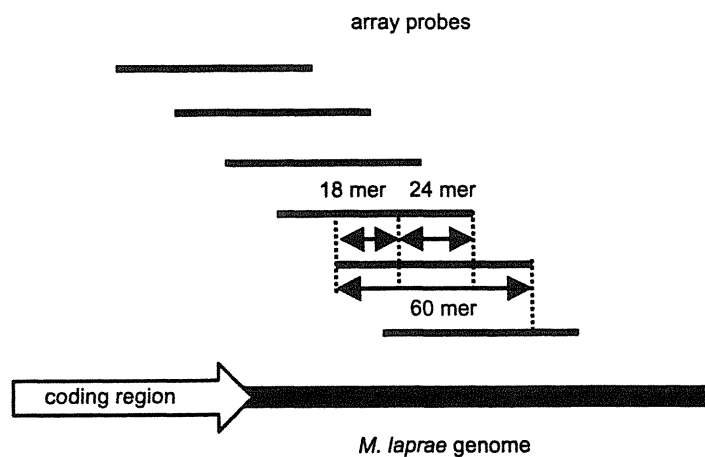


Fig. 2 タイリングアレイの設計
長さ60merのプローブをらい菌ゲノム配列に対して18merずつずらして設計し、隣り合ったプローブが42merずつ重なるように設計する。約36万種類のプローブを設計して全ゲノムをカバーし、アレイ上にランダムに配置する。

過程により変動することが期待された。実際 MDT 治療前後の同一患者から採取したスミア検体から DNA と RNA を検出し PCR を行うと、DNA を鋳型とすると治療前後のいずれの検体からも PCR 産物が検出されたが、RNA を材料に RT-PCR を行うと

治療前に検出された PCR 産物が治療後には検出されなくなった (data not shown)。

そこで本研究の結果得られた発現情報をもとにプライマーを設計して RT-PCR を行い、様々な領域から転写される RNA の発現パターンを解析する

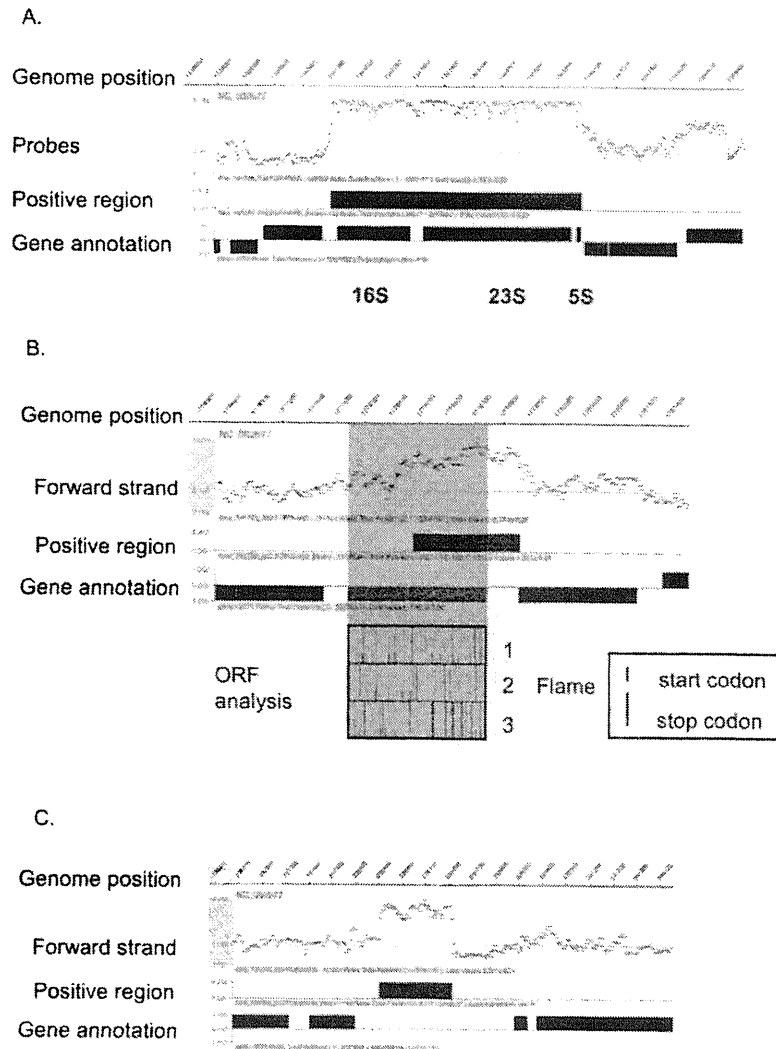


Fig. 3 タイリングアレイの解析によって同定された高発現領域

横軸のらい菌ゲノム上の位置に対して対応するプローブが配置されている。各プローブ位置の高さはシグナル強度を表す。その下には高発現領域として同定された部分と、遺伝子あるいは偽遺伝子の領域が示されている。A. 16S、23S、5S の各 rRNA をコードする領域ではほとんどのプローブが非常に強いシグナルを示した。B. 偽遺伝子の領域に重複して高発現領域が検出された。この偽遺伝子 ML1476 の構造を解析すると、多数の終止コドンが挿入されて ORF が分断されていた。C. 遺伝子、偽遺伝子のいずれの領域からも外れた非翻訳領域でのみ高発現が検出された。らい菌ゲノム上で 238,514-239,455 bp に同定されたこの領域に対し BLASTN による同源性検索を行ったが、同源性有する配列は検出できなかった。

ことでハンセン病の病態や治療効果の判定への応用が期待される。従来のゲノム DNA 検出法と比較してより正確な治療効果の判定が期待できる。

文 献

- 1) Cole ST, Eglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG: Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409: 1007-1011, 2001.
- 2) Liu Y, Harrison PM, Kunin V, Gerstein M: Comprehensive analysis of pseudogenes in prokaryotes: widespread gene decay and failure of putative horizontally transferred genes. *Genome Biol* 5: R64, 2004.
- 3) Suzuki K, Nakata N, Bang PD, Ishii N, Makino M: High-level expression of pseudogenes in *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol Lett* 259: 208-214, 2006.
- 4) Kampa D, Cheng J, Kapranov P, Yamanaka M, Brubaker S, Cawley S, Drenkow J, Piccolboni A, Bekiranov S, Helt G, Tammana H, Gingeras TR: Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. *Genome Res* 14: 331-342, 2004.
- 5) Weile C, Gardner PP, Hedegaard MM, Vinther J: Use of tiling array data and RNA secondary structure predictions to identify noncoding RNA genes. *BMC Genomics* 8: 244, 2007.
- 6) Yogi Y, Endoh M, Banba T, Kobayashi M, Kato H, Suzuki K, Nomaguchi H: [Susceptibility to *Mycobacterium leprae* of congenic hypertensive nude rat (SHR/NCrj-rnu) and production of cytokine from the resident peritoneal macrophages]. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi* 71: 39-45, 2002.
- 7) O'Geen H, Squazzo SL, Iyengar S, Blahnik K, Rinn JL, Chang HY, Green R, Farnham PJ: Genome-wide analysis of KAP1 binding suggests autoregulation of KRAB-ZNFs. *PLoS Genet* 3: e89, 2007.
- 8) Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, Hodges E, Anger M, Sachidanandam R, Schultz RM, Hannon GJ: Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 453: 534-538, 2008.

Detection of RNA expression on whole genome analysis of *Mycobacterium leprae* by tiling array

Takeshi AKAMA * , Koichi SUZUKI, Kazunari TANIGAWA, Akira KAWASHIMA,
Huhehasi WU, Kazuaki NAKAMURA, Moyuru HAYASHI, Norihisa ISHII
Department of Bioregulation, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

[Received / Accepted: 26 Aug. 2008]

Key words : genome, *Mycobacterium leprae*, non-coding region, pseudogene, tiling array

Completion of *Mycobacterium leprae* genome sequence revealed that there are many pseudogenes and non-coding regions, but rather small numbers of protein-coding genes. Although it was thought that pseudogenes and non-coding regions were silent and junk, our previous studies indicated that RNA expression was detected from these regions. To elucidate comprehensive RNA expression pattern on *M. leprae* whole genome, tiling array was designed and total RNA of *M. leprae* Thai-53 strain was analyzed. As a result, highly expressed regions were detected among not only the gene regions but also pseudogenes and non-coding regions. Since some of the RNA expression levels were modulated by MDT, evaluation of RNA expression pattern might be a good indicator for the treatment of leprosy.

*Corresponding author :
Department of Bioregulation, Leprosy Research Center, National
Institute of Infectious Diseases
4-2-1 Aoba-cho, Higashimurayama, Tokyo 189-0002, Japan.
TEL : +81-42-391-8211 FAX : +81-42-394-9092
E-mail : akama@nih.go.jp

らい菌ゲノム由来 RNA 発現の網羅的解析と その意味するもの

鈴木幸一*、中村和昭、谷川和也、川島 晃、Huhehasi Wu、赤間 剛、
林 もゆる、関村 慎、Pham Dang Bang、石井則久

国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部

〔受付・掲載決定：2008年9月16日〕

キーワード：ゲノム、偽遺伝子、非翻訳領域銀、マイクロアレイ、らい菌

らい菌ゲノム全塩基配列の決定は、らい菌において蛋白質をコードする遺伝子数は少なく、一方で偽遺伝子の数は多い、極めて特異な菌であることを示した。我々は、らい菌の偽遺伝子を含むゲノム領域において、RNAとして高レベルで発現する領域を同定し、菌の生物学的特性を見い出そうと試みた。その中で、高レベルで発現し、かつ感染によって発現量が大きく変化する遺伝子領域を同定し、上位12個中6個が偽遺伝子由来であることを明らかにした。さらに、多数の非翻訳領域からも高レベルでRNAが発現していることを示した。これら偽遺伝子および非翻訳領域由来RNAの発現レベルはハンセン病の症例によって異なり、一部のRNAは治療後早期に消失していた。このことから、らい菌においては偽遺伝子や非翻訳領域が感染などに関連した機能を持ち、これらRNAの発現変動を解析することにより、病型や予後の予測、治療効果の判定が可能になると考えられた。

ハンセン病患者数は減少傾向にあるとはいえ、2007年における世界での新患発症数は20万人を超える重要な感染症である。起因菌であるらい菌は、結核菌に先立って発見され、その後の長い研究の歴史があるにもかかわらず、未だ試験管内培養法が確立されていない為に、菌の病原性や発症機構などの基礎研究が進んでいない。らい菌ゲノム全塩基配列が2001年に決定された結果、機能遺伝子が少なく、全ゲノムの40%近くが偽遺伝子として淘汰されることなく残存しており、この点

において、あらゆる生物種の中でも最も特異な存在であることが明らかになった¹⁾(Fig. 1)。

生物の多様性や複雑さは、ゲノム上にコードされる遺伝子の数やそれらの機能によって厳密に規定されると長い間考えられてきたが、様々な生物のゲノム塩基配列が明らかとなった結果、むしろ遺伝子をコードしない非翻訳領域の長さとの相関性が高いことが示された。また、偽遺伝子を含む非翻訳領域由来RNA(non-coding RNA)が様々な作用を持っている例が明らかになり²⁻⁴⁾、これらの発現状態とその機能解析が、感染症を引き起こす病原微生物研究においてもポストゲノム時代の大きな課題として浮上してきた。

らい菌は試験管内培養が出来ず、菌の機能研究を行うことが困難であることから、我々は感染に

* Corresponding author:
国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部
〒189-0002 東京都東村山市青葉町4-2-1
TEL: 042-391-8211 FAX: 042-394-9092
E-mail: koichis@nih.go.jp

よるらい菌遺伝子発現変化を網羅的に評価する試みを行った。すなわち、らい菌 Thai53 株ゲノム断片を大腸菌・抗酸菌シャトルコスミドベクターに組み込むことで DNA ライブラリーを構築し、その中から、全ゲノムの 98% 以上をカバーする 137 クローンを選び、PVDF 膜にスポットしてアレイを作製した。宿主であるマクロファージに感染前後のらい菌から mRNA を抽出し、逆転写して cDNA とした後に subtraction 法により感染前後に特異的に発現量が変化するものを enrich した。これを ³³P-dCTP で標識して cDNA プローブとしてハイブリダイズさせた (Fig. 2A, 2B)。発現量変化の大きいクローンを選び出し (Fig. 2C)、8 種類の制限酵素処理後、サザン法にてハイブリダイズした DNA 断片を得て、最終的に、らい菌において高レベルで発現し、かつ感染によって発現量が大きく変化した遺伝子を同定した (Fig. 2D)。その結果、発現量の高い上位 12 個中 6 個が偽遺伝子由来の RNA

であることが判明した⁵⁾。

この結果は、これら偽遺伝子が感染や細胞内寄生に関連した未知の作用を持つ可能性を示唆するとともに、培養できないために研究対象となりにくかったらい菌が、偽遺伝子研究の格好のモデルとなりうる可能性をもたらした。

しかしながら、1つのクローンで約 30kb のゲノム領域を含むライブラリーを用いる限り、分解能の良い検討を行うことは出来ない。より分解能が高い方法として、らい菌ゲノム全域にわたるタイリングアレイを作製し、らい菌に発現する全 RNA を網羅的に解析してゲノム上にマッピングし、機能解析を行うことを計画した。現在までにらい菌ゲノム全域をカバーするタイリングアレイをプローブ長 29 nt および 60 nt の 2 種類で作製し、複数回の発現解析を行っている。アレイの結果は既知の ORF アレイと良く一致したことから精度的には充分信頼に足るものと判断された。

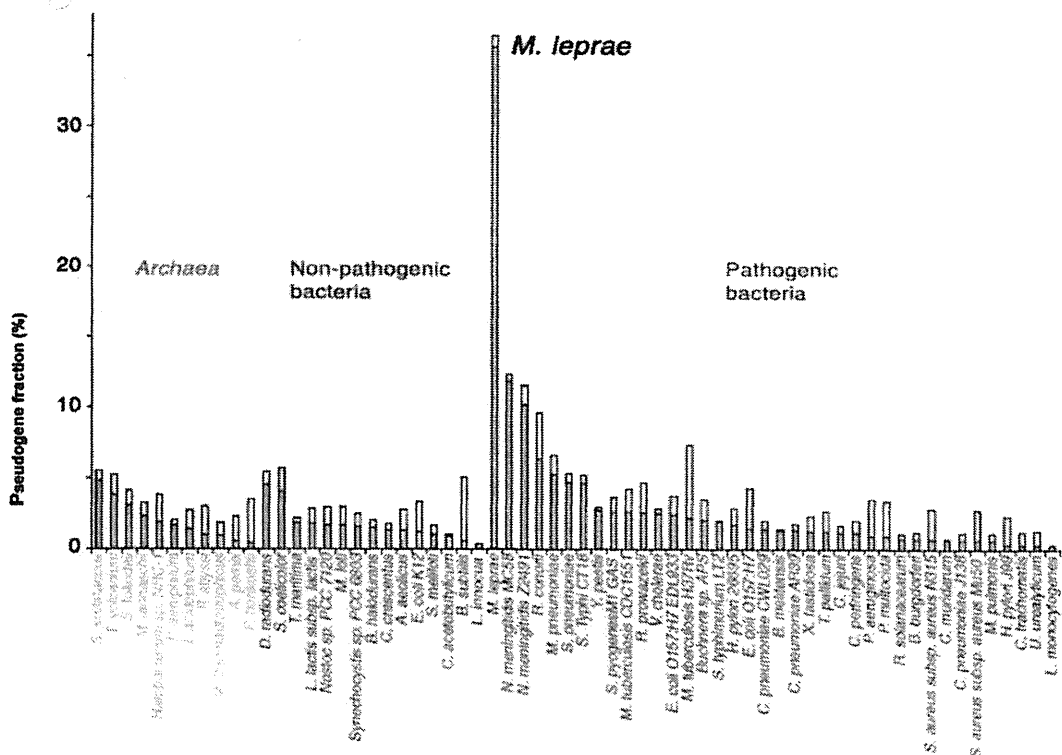


Fig. 1 らい菌ゲノムにおける偽遺伝子の割合
 全ゲノムが解読された結果、らい菌のゲノム中には多数の偽遺伝子が存在し、全体の約 40% が偽遺伝子であることが明らかとなった。この偽遺伝子の割合は他の細菌と比較して著しく高い。

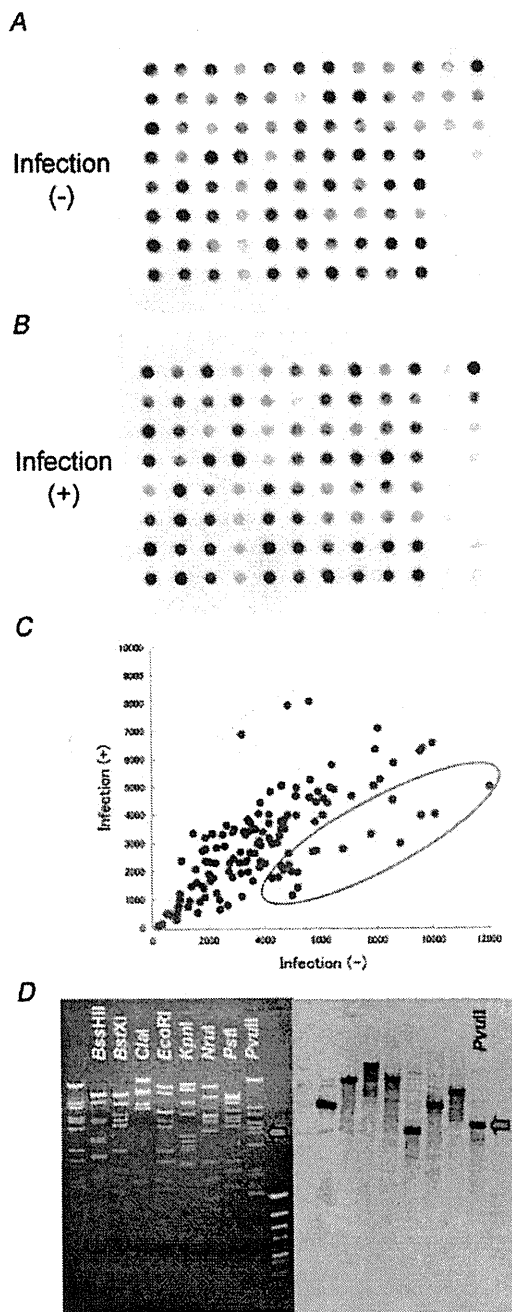


Fig. 2 らい菌ゲノムアレイによる高発現領域の同定

(A, B) らい菌 Thai53 株ゲノム断片をコスミドベクターに組み込み PVDF 膜上にアレイを作成し、マクロファージ感染前後のらい菌 mRNA を用いて作成した ³³P-dCTP ラベル cDNA プロープによりハイブリダイゼーションを行った。(A) 感染前のらい菌より得た mRNA によりプロープを合成しハイブリダイゼーションを行った。(B) 感染後のらい菌より得た mRNA によりプロープを合成しハイブリダイゼーションを行った。(C) 両者のシグナルを比較し、感染前後で発現量が変化するゲノム断片を含むコスミドベクターを同定した。横軸は A から得られた感染前の結果を示し、縦軸は B から得られた感染後の結果を示す。(D) 得られたコスミドベクターを 8 種類の制限酵素で処理し、サザン法にてプロープとハイブリダイズする DNA 断片を同定した。

これらのタイリングアレイで得られた RNA 発現情報の統計的解析の結果、60 nt のプロープで検出される短鎖 RNA の発現頻度や強度は遺伝子と偽遺伝子および非翻訳領域由来 RNA の多くが高レベルで発現していることが明らかとなった (投稿中)。すなわち、らい菌においては、ゲノム全体から多数の短鎖 RNA が比較的高いレベルで発現することが明らかとなった。

これまでの解析の結果、らい菌ゲノム中に約 170 箇所の RNA 高発現領域を同定しており、これらに RT-PCR 用のプライマーを設計した。検討の対象として、らい菌を試験管内で種々の薬剤の単剤あるいは併用により処理し、1 日から数ヶ月の間経時的に RNA を抽出してその発現変化をこれらのプライマーを用いた RT-PCR により明らかにし、これによって、治療開始後任意の時点で採取した検体で効果判定を行うための基準を確立するための検討を行った。

同時に、臨床検体を用いた検討を、国内では新規症例が少ないために海外のハンセン病流行国との共同研究で進めている。MDT 治療前後の患者から皮膚スミア検体を採取し RNA を抽出し、上記プライマーを用いた RT-PCR によってらい菌由来 RNA の発現レベルを評価する方法に関する検討を行うとともに、治療後任意の時間経過後の検体に関しても同様に発現解析を行っている。得られたデータを基にして、最小のプライマーの組合せで効率的に治療効果や薬剤耐性の有無などを評価可能な RT-PCR プロトコルを作製することを最終的な目標としている。

これにより、らい菌遺伝子の初めての網羅的発現解析を可能としたとともに、他の生物種における non-coding RNA の発現と機能を探索するための重要なデータとなるものと期待された。また、一連の研究成果は、偽遺伝子や非翻訳領域由来 RNA

が、感染や細胞内寄生に関連した未知の作用を持つ可能性を示唆するとともに、らい菌という研究対象となりにくかった特殊な菌が、短鎖 RNA 研究の格好のモデルとなり得る可能性を示すと考えられた。

以上の知見に基づいて、現在さらに多くのハンセン病症例において偽遺伝子や非翻訳領域由来遺伝子の発現パターンを調べることで、病型や予後との関連を明らかにし、少ない数のプライマーの組合せを用いた RT-PCR 法で病型や予後の予測が可能になるようなパネル化した方法を作製すべく検討を進めている。最終的には、流行国でも簡便に行うことができる検査方法として確立することを目指している。また、薬剤耐性の早期診断などの治療効果の判定や再燃の予測に有用な RNA 検出用プライマーに関しても、同様に多くの臨床検体を調べることによって、その方法を確立したいと考えている。

文 献

- 1) Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG: Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409:1007-1011, 2001.
- 2) Eddy SR: Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet* 2:919-29, 2001.
- 3) Erdmann VA, Barciszewska MZ, Hochberg A, de Groot N, Barciszewski J: Regulatory RNAs. *Cell Mol Life Sci* 58:960-977, 2001.
- 4) Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, Hodges E, Anger M, Sachidanandam R, Schultz RM, Hannon GJ: Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 453:534-538, 2008.
- 5) Suzuki K, Nakata N, Bang PD, Ishii N, Makino M: High-level expression of pseudogenes in *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol Lett* 259: 208-214, 2006.

Comprehensive analysis of RNA expression of *Mycobacterium leprae* and clinical and biological significance

Koichi SUZUKI^{*}, Kazuaki NAKAMURA, Kazunari TANIGAWA,
Akira KAWASHIMA, Huhehasi WU, Takeshi AKAMA, Moyuru HAYASHI,
Shin SEKIMURA, Pham Dang BANG, Norihisa ISHII

Department of Bioregulation, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

[Received / Accepted: 16 Sept. 2008]

Key words : genome, microarray, *Mycobacterium leprae*, non-coding region, pseudogene

Completion of *Mycobacterium leprae* genome sequence revealed that there are many pseudogenes and non-coding regions, but rather small numbers of protein-coding genes. This result indicates that *M. leprae* is a very unique organism, and this future is important to understand the biological nature and/or pathogenicity of *M. leprae*, which remain unclear. We attempted to find the biological nature of *M. leprae* by detecting the gene and pseudogene regions transcribed at high level. We detected the genomic regions including pseudogenes and demonstrated that six out of twelve high expression regions were pseudogenes. In addition, its transcription level was changed when *M. leprae* infects macrophage. RNA was detected from genes, pseudogenes and non-coding regions. The expression levels of these regions were different among patients and a part of them is disappeared just after treatment. These results suggested that RNA derived from pseudogene and non-coding region have some function concerning the infection and/or intracellular parasitism and that the analysis of pseudogene and non-coding region expression pattern of *M. leprae* is available as a criterion for therapeutic effect and disease type of leprosy, and a prognostic marker.

*Corresponding author :
Department of Bioregulation, Leprosy Research Center, National
Institute of Infectious Diseases
4-2-1 Aoba-cho, Higashimurayama, Tokyo 189-0002, Japan.
TEL : +81-42-391-8211 FAX : +81-42-394-9092
E-mail : koichis@nih.go.jp

WHO 第9回ハンセン病制圧のための技術勧告 (Technical Advisory Group: TAG) 会議報告

石井則久*¹⁾、森 修一²⁾、永岡 譲³⁾、鈴木幸一¹⁾

- 1) 国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部
- 2) 福島県立医科大学医学部微生物学講座
- 3) 国立療養所多磨全生園皮膚科

[受付・掲載決定：2008年11月17日]

キーワード：制圧、世界保健機関、多剤併用療法、ハンセン病

世界保健機関 (WHO) は 2008 年 3 月 6～7 日にエジプトのカイロで、第 9 回ハンセン病制圧のための技術勧告会議 (Ninth Meeting of the WHO Technical Advisory Group on Leprosy Control) を開催し、その内容が報告書としてまとめられ、WHO 南東アジア局から出版された。会議では、世界のハンセン病の状況が報告されるとともに、今後のハンセン病制圧活動の課題が討議されている。

今回、世界保健機関 (WHO) が、2008 年 3 月 6～7 日にエジプトのカイロで開催した第 9 回ハンセン病制圧のための技術勧告会議 (Ninth Meeting of the WHO Technical Advisory Group on Leprosy Control) の報告を許可を受け、日本語訳を行った (原著の著作権は WHO にある)。表については原文のまま記載した。世界のハンセン病の現状と WHO の制圧戦略を理解して頂き、大いに活用して頂きたい。

WHO 第9回ハンセン病制圧のための技術 顧問会議 (Technical Advisory Group: TAG) 報告

目次

1. 序論
2. WHO 東地中海地域 (EMRO) 事務局長 (Regional Director) Dr. Hussein A. Gezairy のメッセージ
3. 第 8 回 TAG 会議の報告
4. 世界及び各地域のハンセン病状況
 - 4.1 現在の世界のハンセン病状況
 - 4.2 アフリカ地域 (AFRO) のハンセン病状況
 - 4.3 アメリカ地域 (AMRO) のハンセン病状況
 - 4.4 東地中海地域 (EMRO) のハンセン病状況
 - 4.5 南東アジア地域 (SEARO) のハンセン病状況
 - 4.6 西太平洋地域 (WPRO) のハンセン病状況
5. タイの新規患者状況
6. ハンセン病制圧プログラム担当の保健機関管理者のための講習会
7. 自分で出来る (I can do it myself) : 自己管理

* Corresponding author:

国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部
〒189-0002 東京都東村山市青葉町 4-2-1
TEL: 042-391-8211 FAX: 042-391-8776
E-mail: norishii@nih.go.jp

(self-care) 冊子

8. ハンセン病と HIV-1 の重複感染
9. 多施設での Uniform-Multidrug Therapy (U-MDT) 研究の進行状況の報告
10. ブラジルの 12 ヶ月 MB-MDT 研究の進行状況
11. より良いハンセン病制圧のための新しい多剤併用計画の必要性
12. ハンセン病薬剤耐性の世界的サーベイランスのガイドライン：レビューのためのドキュメント
13. スティグマ (stigma)、差別 (discrimination) そしてハンセン病対策 (leprosy control)
14. ハンセン病の根絶 (leprosy eradication) — 意味、実行可能性、および合意の議論
15. ハンセン病研究の優先順位と今日的意味
16. 結論と勧告

補遺 (翻訳省略)

1. 序論

ハンセン病制圧における WHO Technical Advisory Group (TAG) の第 9 回目の会議が 2008 年 3 月の 6 日と 7 日にエジプトのカイロで開催された。この会議は W. C. S. Smith 教授が議長を勤め、ブラジル、コンゴ民主共和国、カンボジア、エジプト、イラン、インド、ナイジェリア、およびタイからの国家ハンセン病プログラム管理者が出席した。さらに、International Federation of Anti-Leprosy Associations (ILEP) の Technical Commission から数人の専門家とメンバーが会議に出席した。(訳注：日本からは TAG メンバーとして畑野研太郎先生 (邑久光明園)、専門家として神美知宏氏 (全療協) と松岡正典先生 (感染研)、オブザーバーとして鈴木定彦先生 (北大) が参加した。)

2. WHO 東地中海地域 (EMRO) 事務局長 (Regional Director) Dr. Hussein A. Gezairy のメッセージ

Gezairy 博士は彼のメッセージ (WHO エジプト代表 Dr. Zuhair Hallaj により発表) の中で、この会議の実現のために、地域事務局と優れた連携を

行った世界ハンセン病プログラムのスタッフに謝意を表した。彼は、新規患者発見数の継続的な減少と、ハンセン病制圧サービスの高い人口カバー率を国家プログラム、国内外のパートナー、そして WHO 間の実り多い協力による結果だと述べた。彼は、いくつかの国、特に東地中海地域のインフラストラクチャーに厳しい損害を与える内戦と経済混乱を改善すべきであると述べた。彼はハンセン病制圧とプライマリーヘルスケアシステムとの共同努力が感染地域でのサービス再建につながるという明るい見通しを示すとともに、偏りなく分配され、手頃な費用で、容易に利用しやすい患者への良質なケアを供給することを強調し、ハンセン病問題をさらに減少させ、制圧活動を維持するために、WHO 世界戦略を実行する必要性を再確認した。

3. 第 8 回 TAG 会議の報告

2006 年 4 月 21 日にスコットランドのアバディーン (Aberdeen) で行われた第 8 回 TAG 会議の報告が承認された。議題を承認後、メンバーは会議のための報告担当者として、イエメンの Dr. Yasin Al-Qubati を共同議長、そしてウガンダの Dr. H. J. S. Kawuma を報告者 (rapporteur) に任命した。

4. 世界及び各地域のハンセン病状況

4.1 現在の世界のハンセン病状況

世界の概要は、世界ハンセン病プログラム (Global Leprosy Programme) の V. Pannikar 博士によって発表された。2007 年の始めに報告された世界のハンセン病登録患者数は 231,361 人だった。2006 年に発見された新規患者数は 265,661 人 (Table 1) だった。この数は 2005 年と比べると、33,375 人 (11.2%) 減少した。

16 ケ国 (アンゴラ、バングラデシュ、ブラジル、中国、コンゴ民主共和国、インド、インドネシア、マダガスカル、モザンビーク、ミャンマー、ネパール、ナイジェリア、フィリピン、スリランカ、タンザニア、およびエチオピア) は 1,000 人を超える新規患者が登録され、さらにこれら 16 ケ国で

2006年の世界新規患者数の94%を占めた。

新規患者の詳細に関して、新規患者中のMBの割合は、ケニアの90.5%からコンゴ民主共和国の56.1%の範囲であった。新規女性患者の割合は、ウガンダの60%からソマリアの16%の範囲であった。小児の割合は中央アフリカ共和国の19.2%からキューバの1%未満までであり、第2度障害者(grade 2)の新規患者の割合は中国の23.0%からミクロネシアの0.66%まで及んだ。これは、全ての国々と地域において、指標が幅広くばらついていることを示し、また、その傾向をつかむことが重要であるとともに、それぞれのプログラムの中において種々の指標を解釈することの重要性を示すものであった。

国家レベルでのハンセン病制圧活動の主な課題は以下の通りである。

- ▷質を維持すること。サービスの質を維持すること、障害を防ぎ、リハビリテーションを提供するために患者への良質なケアを行うこと。
- ▷ハンセン病問題を減少させること。ハンセン病問題の一層の減少を確実にするために、いくつかの地域でのハンセン病制圧活動サービスの範囲を維持、そして改善すること。ハンセン病問題は障害、小児患者、そしてハンセン病に関するスティグマと差別の観点から見べきである。
- ▷能力向上。特に発病者数が比較的低い国における保健職員の専門的技術の維持。
- ▷紹介システム。統合された紹介施設を設立し、

統合サービスをサポートするため、紹介ネットワークの強化。

▷薬剤耐性。WHOは、リファンピシン(RFP)とダブソン(DDS)耐性という脅威の出現に対して、世界規模での監視システムを確立し、その状況をモニターする取り組みを行う。これは様々な国家プログラム、研究所、およびパートナーとの共同で実行される。

▷責務(Commitment)。ハンセン病を保健上の課題として残し、成功が自己満足にならないようにするために、パートナーからの継続的サポートが不可欠である。

TAGのメンバーは、特に新規患者数が大きく変動する国(急激に増加している状況のみならず、急激に減少する場合においても)の疾患の傾向を注意深く監視する必要性を強調した。国家プログラムは疾患の動向に焦点を合わせて、各々のデータを再検討するよう奨励されている。その疾患の動向を解釈する際に必要となる各国の状況を調査するため、すなわち実践的そして疫学的要素を理解するためのサポートが国家プログラムに提供されている。WHOは、プログラムレビューを行う際に、報告されたデータを確認すると共に、ハンセン病制圧サービスの質が維持されていることを確実にするため、これからも国家プログラムに技術的サポートを提供し続けるべきである。

ケアの質の指標となる「治癒率」の情報を集めるためにも国家プログラムの奨励の必要性が強調された。

Table 1 : Leprosy situation by WHO region at the beginning of 2007 (excluding Europe)

WHO Region	No. of countries/ areas reporting	Registered Prevalence at beginning of 2007	Cases detected during 2006
Africa	38/46	36 124	34 480
Americas	26/35	64 715	47 612
Eastern Mediterranean	17/21	3986	3261
South-East Asia	10/11	116 663	174 118
Western Pacific	33/37	9 873	6190
TOTAL	124/150	231 361	265 661

4.2 アフリカ地域 (AFRO) のハンセン病状況

Dr. L. Bide はアフリカ地域におけるハンセン病状況について以下のことを発表した。

- ▷ 新規患者数は当地域で減少している。国家プログラム管理者は、実際の減少と診断未確定の違いの判断の難しさと、診断を確定するシステムを開発する必要性を表明した。
- ▷ 2つの国、すなわち、コンゴ民主共和国とモザンビークは2008年の始めにハンセン病制圧目標に達していなかった。
- ▷ 7つの国が毎年、1,000人以上の新規患者を登録している。それらは、アンゴラ、コンゴ民主共和国、エチオピア、マダガスカル、モザンビーク、ナイジェリア、およびタンザニアである。
- ▷ 各国は地区レベルにおけるハンセン病問題の減少を図る年間計画を設定した。その必要性は "pockets" と呼ばれる、例えば中央アフリカのピグミーの人々のコントロールを集中的に行うことであると指摘された。
- ▷ 当地域の国々は、ハンセン病問題のさらなる減少と制圧活動維持のための戦略を実行する際に、まだ多くの課題に直面している。特に、政治的関心と資金を維持するために、ハンセン病関連の公的支援を再定義する必要性が大いにある。

地域の状況はTable 2にまとめられている。また、地域事務局は国の公式政府を通して集めた情報を発表しているが、場合によってこれらの地域に提出される報告は時期が異なり、一貫していないことも強調されていた。

4.3 アメリカ地域 (AMRO) のハンセン病状況

この地域の報告は提示されなかった。代わりに、国家プログラムマネージャーである Dr. M. Leide によって、現在のブラジルのハンセン病状況の簡単な紹介が行われた。それには以下の項目が含まれていた。

- ▷ ハンセン病は保健省の計画の中の重要な病気の一つである。
- ▷ ブラジルは世界で2番目に新規患者数の多い国と格付けされた。
- ▷ ブラジルは年間平均47,600人の新規患者がここ5年間、毎年発見されている。
- ▷ 新規患者の8%が子供である。
- ▷ 新規患者の約53%がMBであった。
- ▷ 新規患者のうち、6%が第2度障害者であった。

4.4 東地中海地域 (EMRO) のハンセン病状況

Dr. N. Neouimine は報告の中で、この地域の新規患者数は2000年の5,565人から2006年の3,261に減少し、これに対応して新規患者発見率もそれぞれ人口100,000人当たり1.21から0.6に減少したことを示した。5つの国（エジプト、パキスタン、ソマリア、スーダン、イエメン）は当地域で最も大きなハンセン病問題を抱える。他の17ヶ国はごく僅かであるか、全く新規患者がいないことを報告した。

2000年から2006年の間、報告された新規患者の大部分がMBであり、5%から8%が子供、そして約1/3が女性であった。また、新規患者の第2度障害者の数も2000年の新規患者の20.1%から2006年11.7%と減少傾向にあることが観察さ

Table 2: Summary of leprosy situation in the African Region at the end of 2007

	Number of cases	Rate/proportion
Prevalence	35 852	0.54 / 10 000
Detection	34 703	5.3 / 100 000
New MB	24 750	71%
New cases disabled grade 2	3185	10%
New cases in children	3061	9%

れた。多くの新規患者は南スーダンから報告されている。ハンセン病制圧活動は、この地域で活動する様々な NGO からのサポートを得て、徐々に南スーダンに拡大している。現在、定期的に報告を受け、これらのデータの質は向上している。Table 3 は当地域の主な国々の 2003 年から 2007 年の新規患者数をまとめている。

ハンセン病制圧活動の大部分は一般保健サービスに統合され、残されたハンセン病センターや診療所は主に紹介や監視機能を持つ。場合によっては、ハンセン病制圧活動は他の病気のプログラムに、たとえば皮膚科学（エジプト、モロッコ、およびパキスタンにおける）や TB コントロール（サウジアラビア）に統合されている。

国家プログラムとして成果を維持し、ハンセン病問題をさらに減少させられるかの大きな課題に直面している。

発表者はハンセン病制圧活動の主要部分を既存のプライマリーヘルスケアシステムへ統合し維持する必要性と、特にハンセン病が比較的にまれな病気となった国において、統合した紹介施設の開発の重要性、そしてこれらを行うにあたって生じる課題を強調した。

4.5 南東アジア地域（SEARO）のハンセン病状況
Dr. S. Barua の発表はハンセン病状況に関する最新情報、制圧後の戦略と今後の課題を含んでいた。

▷新規患者発見率は 1998 年の人口 100,000 人につき 47.8 から 2006 年には 10.51 と減少した。

▷当地域の 11 ケ国の中 2 ケ国（ネパールと東ティモール）は制圧目標を未だ達成していない。

▷6 つの国が毎年 1,000 人以上の新規患者数を報告した（バングラデシュ、インド、インドネシア、ミャンマー、ネパール、およびスリランカ）。ネパールはインドに隣接している地域において、比較的多くの患者がいた。

当地域での 2007 年初頭のハンセン病状況は Table 4 にまとめられている。

以下の残された課題が強調された。

▷ネパールと東ティモールでハンセン病制圧目標を達成すること。

▷政治の関与の維持と、確実に十分な財源。

▷ハンセン病の一般保健システムへの統合強化。

▷現在サービスの行き届いていない人々への、より広い範囲のハンセン病サービスの確立。

世界戦略とガイドラインを実行する国を支援するために、南東アジア地域事務局は他の地域事務

Table 3: Detection of new leprosy cases in Eastern Mediterranean Region selected countries in 2003–2007

Country	Year				
	2003	2004	2005	2006	2007
Afghanistan	15	20	31	21	26
Egypt	1412	1216	1134	945	887
Iran	51	73	79	64	25
Morocco	50	62	43	62	38
Pakistan	751	655	551	476	496
Somalia	300	183	62	390	414
Sudan	906	722	782	884	777
Southern Sudan	2139	1944	1498	1060	929
Yemen	413	415	395	358	434