

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「アジアの感染症  
担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究」）  
（H23-新興-指定-020）  
分担研究報告書

ハンセン病の病原性と薬剤耐性に関する日台共同研究

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 第3室長  
研究協力者 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 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  
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

研究要旨 台湾 CDC との共同研究として、ハンセン病の血清診断法の開発と評価及びハンセン病の起原菌であるらい菌の薬剤耐性に関する遺伝子変異の検出を実施しているが、本年はらい菌の薬剤耐性に関する研究で、検出された薬剤耐性変異の詳細な解析を中心に共同研究を行った。耐性変異解析のために 13 例の検体から抽出した DNA を用い、9 例でらい菌由来 DNA を検出し、そのうち 2 例がダブソン耐性変異を示した。この検体は症例情報から耐性が疑われる難治例であることがわかった。その変異と耐性の相関を明らかにするために速発育性抗酸菌であるスメグマ菌 (*M. smegmatis*) にらい菌の耐性関連遺伝子を挿入し、その薬剤に対する影響をみることで証明することができた。

A. 研究目的

ハンセン病対策は世界保健機関 (WHO) が 1981 年より推奨してきた多剤併用療法が効果を奏して感染者の発症数は激減してきた。しかし、今なお世界の登録患者数及び新患発生数は約 20 万人を数え、最近では新患発生数の減少傾向も見られなくなっているのが現状である。また薬剤耐性菌の関与が疑われている再燃や再発などの難治例も無視できない状況である。多くの東南アジア諸国は登録患者の数値ではハンセン病流行国としての登録からは外れたものの、未だにインド、ミャンマー、インドネシア、フィリピン、ベトナムなどでは患者の多い地域が存在し、それぞれの国全体の感染症対策においてもまだ重要な対象感染症となっている。この現状を踏まえ、新患数を減少させ、さらには難治性ハンセン病を治療するためには、ハンセン病の早期診断、治療経過のモニタリング、薬剤耐性菌の調査、発生

源となりうる感染者の発見と感染予防、発症前予防などが必要と考えられる。台湾との協力研究では第 1 に、我々がこれまで確立してきたハンセン病の血清診断法を用い台湾のハンセン病患者由来血清の試験を実施してきた。また第 2 に、各国から報告が散見される薬剤耐性菌調査を台湾の患者由来 DNA で実施してきた。その中で、薬剤耐性の存在が疑われる患者由来のらい菌における遺伝子変異を数例検出してきた。それらの変異が実際に耐性をもたらすという直接的な証拠は、らい菌が人工培養できないことからこれまで得ることができなかったのが現状である。この点を明らかにする目的で我々が開発してきた速発育性抗酸菌であるスメグマ菌 (*M. smegmatis*) にらい菌の耐性関連遺伝子を入れ、その薬剤に対する影響をみることで証明するという方法を台湾で得られた耐性変異に応用する。

## B. 研究方法

MDT で用いられているダブソン、リファンピシシ及び2次薬剤として利用されているキノロン剤であるオフロキサシ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遺伝子、*folP1*, *rpoB* そして *gyrA* 遺伝子の耐性とかかわる領域である Drug Resistance Determining Region (DRDR)における変異を台湾で得た13検体を用いて検出する。ハンセン病患者由来の生検材料は台湾 CDC が収集し DNA 抽出を行い、その一部を分与された。DNA から各遺伝子を個別に PCR 増幅し、DRDR における変異の有無を直接シーケンスすることにより検出する。台湾 CDC と日本のハンセン病研究センターで独立に試験しその結果を照合した。変異と耐性の相関を明らかとする実験では、らい菌 *folP1* 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 *folP1* 遺伝子を破壊するための温度感受性ファージを作製し、らい菌 *folP1* 遺伝子導入 *M. smegmatis* にこれを作用させて、染色体上に存在する *M. smegmatis folP1* の破壊を試みた。また、らい菌 *folP1* 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ダブソン感受性を試験した。

(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

薬剤耐性変異については、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* 遺伝子のコドン 53 位と 55 位、リファンピシシ耐性の *rpoB* 遺伝子 4 カ所 (410 位、420 位、425 位、427 位) 及びキノロン耐性の *gyrA* 遺伝子 2 カ所 (89 位、91 位) の変異の有無を 13 検体について調べた。変異検出のための陰性コントロールとして標準株である Thai-53

株の DNA についても検討した。

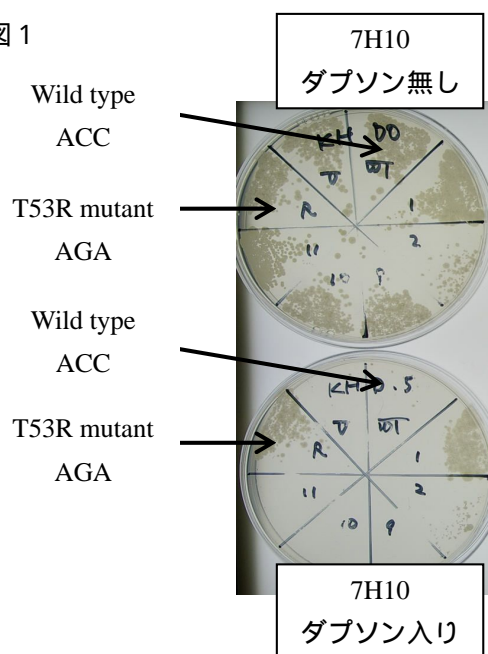
表 1

Sample	Type	<i>folP1</i>	<i>rpoB</i>	<i>gyrA</i>
NTU001	MB	wt	wt	wt
NTU002	MB	wt	wt	wt
NTU003	MB	wt	wt	wt
NTU004	MB	T53R★	wt	wt
NTU006	MB	NA	NA	NR
NTU007	MB	wt	NA	NA
NTU011	MB	wt	NA	NA
NTU012	PB	T53I	wt	NA
NTU013	PB	wt	wt	NR

★T53R: *folP1* 遺伝子の 53 位トレオニンがアルギニンに変異

13 検体を用い、台湾と日本で数度にわたる実験及び結果の照合から前回よりコンセンサスが増え、9 検体の結果を得た(表 1)。NTU004 は *folP1* 遺伝子の 53 位のアミノ酸トレオニンに変異がありアルギニンとなり、そのコドンは ACC から AGA に 2 塩基に変異が生じた。この変異によってダブソン耐性をもたらすことが推察された。他は変異が認められず、各薬剤に対して感受性であることがわかった。

図 1



そこで、*folP1* 遺伝子の 53 位が ACC の wild タイプと AGA の NTU004 タイプの遺伝子を作成し、*M. smegmatis* の染色体に挿入し、*M. smegmatis* が自然に持っている *folP1* 遺伝子を破壊した。得られた *M. smegmatis* で、53 位が

wild タイプのらい菌 *folP1* 遺伝子持つ菌 ( Wild type ACC ) と NTU004 タイプを持つ菌 ( T53R mutant AGA ) の増殖をダブソン入り培地及び薬剤無しの培地での増殖の違いを検討した結果、図 1 で見られるように、薬剤の入った 7H10 培地でも T53R mutant AGA は増殖できることを確認した。すなわち NTU004 で見られた変異が明らかにダブソン耐性をもたらしことが示された。

#### D. 考察

13 検体中、ダブソン耐性変異が 2 つ検出された。そのうちの NTU004 でのトレオニンからアルギニンへの変異はコドンの ACC が AGA に変わる変異であった。同じコドンにおいても耐性変異が 1 塩基変異で生じている例と今回のように 2 つの塩基が変化している例があることからそれらの違いが耐性の度合いに影響する可能性も示唆され、大変興味深い結果であった。また、患者データからも NTU004 は多菌型患者であり、臨床的にも薬剤耐性が疑われた例であることが台湾 CDC からの情報でわかり、この変異検出の有用性をお互いに再認識することができた。

#### E. 結論

今年度は新たなサンプルのテストができなかった、血清診断については、前回好成绩が得られていることから、今後パートナーである台湾でハンセン病患者血清を収集してもらい、さらに健常人コントロール及び結核患者血清等の多数の検体も用いて血清診断法の評価を必要があるだろう。

薬剤耐性変異の検出では 13 例中 9 例の結果を得ることができ、得られた変異が確かに耐性と相関していることが証明できたが、耐性菌の動態を把握するためには、やはりさらに多くの菌を調べる必要があるだろう。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 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. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.

- 2) 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. 46<sup>th</sup> 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. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
- 4) 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. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
- 5) 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. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
- 6) 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. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.

- 7) 甲斐雅規、中田登、松岡正典、関塚剛史、黒田 誠、牧野正彦：らい菌 Kyoto-2 株の全ゲノムシーケンスにより同定された SNPs の解析。第 85 回日本ハンセン病学会総会、札幌市、2012 年 6 月
- 8) M. Kai, Y. Maeda, M. Makino. Molecular Studies on *M. leprae* and Ser-diagnosis of Leprosy. The 9<sup>th</sup> Taiwan-Japan Symposium on Preparedness, Surveillance and Response to New Emerging, Re-emerging Infectious Diseases and Infectious Diseases Associated with Disaster. Taipei, Sep. 20-21. 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他 著書

なし