

201225059A

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

ハンセン病の予防法及び診断・治療法の開発・普及に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 向井 徹

平成25(2013)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

ハンセン病の予防法及び診断・治療法の開発・普及に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 向井 徹

平成25(2013)年3月

目 次

I. 総括研究報告書

ハンセン病の予防法及び診断・治療法の開発・普及に関する研究

向井 徹----- 1

II. 分担研究報告書

1. らい菌の特性に関する研究

宮本 友司----- 9

2. 薬剤耐性獲得機構解明とその迅速感受性試験法開発への応用

鈴木 定彦----- 15

3. 再燃・再発に関する免疫学的診断法の開発

鮫島 朝之----- 21

4. 免疫療法の開発

前田 百美----- 27

5. ハンセン病・結核共通ワクチンの免疫学的評価

牧野 正彦----- 31

6. ハンセン病ワクチンの開発

向井 徹----- 37

7. ハンセン病の診療ネットワークと啓発に関する研究

石井 則久----- 43

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 47

IV. 研究成果の刊行物・別刷----- 51

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)

ハンセン病の予防法及び診断・治療法の開発・普及に関する研究

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 向井 徹

(国立感染症研究所 ハンセン病研究センター)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

ハンセン病の予防法及び診断・治療法の開発・普及に関する研究

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 ハンセン病の制圧は、世界共通の目的である。現状では、新規登録患者数は横ばいであり、加えて薬剤耐性菌感染による発症、再発・再燃も年々数を増しているなど新たな問題も浮上している。これら諸問題に対応すべく研究を推進した。らい菌の特性に関する研究では、らい菌遺伝子 ML0840 はアシル CoA 類代謝に関与することを示唆した。薬剤耐性獲得機構解明とその迅速感受性試験法開発への応用では、らい菌キノロン耐性獲得に係る遺伝子変異を明らかにし、オフロキサシン耐性には、シタフロキサシンが有効な変異があることを示した。再燃・再発に関する免疫学的診断法の開発では、免疫学的手法が有意義であることを示した。免疫療法の開発では、LipoK により活性化し放出されたエキソソームには、T 細胞を活性化させる一群の免疫賦活性分子を持つ蛋白を含むことを示唆した。ハンセン病・結核共通ワクチンの免疫学的評価では、ウレアーゼ破壊 BCG に BCG 由来 HSP70 遺伝子と結核菌由来 MMP-II 遺伝子の融合遺伝子導入 BCG は、ハンセン病・結核共通ワクチンとなり得ると想定された。ハンセン病ワクチンの開発では、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。また、らい菌接種サルにおいて、母仔群サルに早期の菌排泄を認めた。ハンセン病の診療ネットワークと啓発に関する研究では、ハンセン病診療ネットワーク作りは、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継続して行うことが重要であることを示した。本研究より得られた知見は、今後のハンセン病対策に有用な貢献が可能と考えられた。

研究分担者

宮本友司 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
鈴木定彦 北海道大学
人獣共通感染症リサーチセンター
国際疫学部門・教授
鮫島朝之 国立療養所星塚敬愛園・医長
前田百美 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター
感染制御部・主任研究官
牧野正彦 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター
感染制御部・部長
石井則久 国立感染症研究所
ハンセン病研究センター
センター長

A. 研究目的

ハンセン病の制圧は、世界共通の目的である。現状では、新規登録患者数は横ばいであり、加えて薬剤耐性菌感染による発症、再発・再燃も年々数を増しているなど新たな問題も浮上している。また、わが国では症例が極めて少ないため、一般人、医療従事者等へのハンセン病に関する知識の啓発・教育の必要性が存在する。これら諸問題の解決を目指し以下の研究を行った。

1. らい菌の特性に関する研究（宮本）
2. 薬剤耐性獲得機構解明とその迅速感受性試験法開発への応用（鈴木）
3. 再燃・再発に関する免疫学的診断法の開発（鮫島）
4. 免疫療法の開発（前田）

5. ハンセン病・結核共通ワクチンの免疫学的評価 (牧野)
6. ハンセン病ワクチンの開発 (向井)
7. ハンセン病の診療ネットワークと啓発に関する研究 (石井)

B. 研究方法

1. らい菌の機能未同定遺伝子の中から、代謝や生理に関与が予想される遺伝子を選別し、対応した *Mycobacterium smegmatis* の相同遺伝子破壊株作製し、メタボローム解析を行った。

2. らい菌各種組換え DNA ジャイレースを大腸菌発現・精製し、組換え DNA ジャイレースの活性、キノロン剤のスーパーコイル化活性への阻害効果、スーパーコイル型プラスミッド切断誘導能を検討した。

3. 療養所入所者の少菌型、多菌型、および対照群の末梢血単核球の MMP-II、あるいは MLC に対する反応性を、ELISA およびフローサイトメトリーにて IFN- γ ・IL-10 などのサイトカインの測定を行った。

4. 合成リポペプチド LipoK をヒト樹状細胞に抗原またはらい菌とともに添加し、その抗原提示能を自己 T 細胞の活性化を指標に測定した。標識らい菌を、樹状細胞に感染し、得られたエキソソームの蛍光強度を測定した。エキソソーム内に同定したらい菌蛋白を発現精製した。

5. 結核菌由来 MMP-II 遺伝子に BCG 由来 HSP-70 遺伝子を融合させ、*Ure C* 遺伝子破壊 BCG に遺伝子導入し、BCG-DHTM を得、ヒト樹状細胞・T 細胞、マウス T 細胞を用い、各種免疫学的活性を評価した。さらに、マウスによるらい菌増殖抑制能を検討した。

6. らい菌抗原発現 BCG の構築
抗酸菌ファージ由来 promoter P79, P85, P86 を用い BCG もしくはらい菌 Hsp70 と

らい菌 MMP II 融合蛋白遺伝子および BCG urease の上下領域配列を pUC18 に組込んだ。recombinase を発現する BCG clone A-53 へ遺伝子導入を行い、ウエスタンブロット法を用い発現の確認を行った。P86 により発現するクローンは取得困難であったため、相同組換え領域を延長し、遺伝子導入量を増加させた。

カニクイザルによるらい菌感染系の構築
幼若カニクイザルに、3 経路で接種した。3 組の妊娠その出生仔へ鼻腔内、鼻尖へ菌接種を行った。2 ヶ月間隔で血漿・鼻腔内洗浄液を採取し PGL-1 抗体及びらい菌特異 PCR 法により感染のモニターを行った。

7. ハンセン病診療に欠けている要素を抽出し、それらを補う資料や情報を提供し、講習会などを開催する。また、新規患者については、実際に診療法、鑑別法、検査法を指導し、主治医がハンセン病を理解し、自ら診療可能になるようにした。また、近年増加しているブルーリ潰瘍とハンセン病の鑑別を明確にした

(倫理面への配慮)

検体採取・利用等は、研究者の所属機関の倫理委員会で承認され、プライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った動物実験については、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. らい菌遺伝子 ML0840 のホモログ MSMEG_4536 の遺伝子破壊株 (Δ 4536 株)

を作出した。菌体内成分の CE-MS 解析より、 $\Delta 4536$ 株において、解糖系や TCA サイクルと関連するアシル CoA 類が親株より多く産生されていた。

2. 精製した種々の組換え DNA ジャイレースは、スーパーコイル化活性を有していた。キノロン剤のスーパーコイル化阻害効果評価試験では、濃度依存的にスーパーコイル化プラスミドの現象が見られ、プラスミド切断誘導能評価試験では、キノロン剤の濃度依存的に切断された DNA 量の増加が見られた。

3. IFN- γ の産生量は正常対照群と比較し少菌型が多かった。IL-10 の産生量は、各群間で差を認めなかった。細胞内サイトカイン染色では、少菌型、多菌型とも IFN- γ では CD4 および CD8 陽性細胞において、IL-10 では CD4 陽性細胞において増加する傾向がみられた。再発例では、IFN- γ 産生量は、皮疹の出現時に最も高く、その後低下した。

4. らい菌感染樹状細胞を LipoK 添加後、放出されるエキソソームにより T 細胞刺激すると IFN γ が検出された。エキソソームにらい菌膜抗体で検出されたが、十分量の蛋白発現精製はできなかった。しかし、患者の血液と反応することから免疫原性を有する蛋白であると考えられた。

5. BCG-DHTM は、非常に強くナイーブ CD4 陽性 T 細胞を活性化し、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。抗原提示細胞活性化能を評価では、強く樹状細胞を刺激した。また、マウスに IFN- γ を産生するメモリー T 細胞が産生された。さらに、BCG-DHTM は有意にらい菌の増殖を抑制した。

6. 改変 BCG の構築

これまで、発現能力の一番高い P86 を用いたクローンは構築できなかったが、

相同領域の拡大、遺伝子導入量の増加により、P86 により発現するクローンの構築がなされた。さらに安全・安定な BCG 構築のため、耐性遺伝子を維持しない発現クローンの選択を進めている。

カニクイザルらい菌感染系の構築

今年度は、複数のサルにおいて、鼻腔洗浄液から PCR 陽性個体が同定された。幼若群の 2 頭、母仔群 2 頭にらい菌遺伝子が検出された。

7. 診療機会が殆どない皮膚科医を対象にハンセン病講習会を実施した。回復者は、一般医療機関を受診する勇気がないため、「ハンセン病の再発と皮膚病に気軽に対応する皮膚科医」の一覧を日本ハンセン病学会のホームページに掲載した。2012 年は 2 名の新規ハンセン病患者がいた。実際の検査の実技指導、治療の指導を行い、確実に診療できる体制を確立した。末梢神経症状を呈するブルーリ潰瘍について細菌学的な検討を行ない、臨床現場で鑑別がスムーズにできるように症例検討を行った。

D. 考察

1. $\Delta 4536$ 株のアシル CoA 類の増加は、MSMEG_4536 遺伝子の破壊により β -酸化若しくはアミノ酸の代謝が亢進したと推察される。MSMEG_4536 の遺伝子産物である表層タンパク質が機能なくなり脂肪酸等の取り込みが増大し、 β -酸化等の代謝が亢進したと考えられる。

2. 結核菌に存在するが、らい菌では報告のないアミノ酸置換を保有するらい菌 DNA ジャイレースは、各種キノロンに対し耐性を示し、このようなキノロン耐性らい菌の出現を予想するものであった。一方、シタフロキサシンは、これらの変異型 DNA ジャイレースを持ったらい菌治療が可能である事を示唆した。

3. IFN- γ の産生量は症例間にばらつきがあるため、さらに症例数を増やす必要

があると思われた。また、IFN- γ やIL-10を産生する細胞種にもCD4あるいはCD8陽性細胞以外の検討が必要と思われた。再発の少菌型の1例は、細胞性免疫能の変化を含めさらに経過観察してゆく。

4. LipoK はTLR2を認識し、エキソソームを放出させ、エキソソームに機能未知な菌蛋白が検出され、T細胞の活性化に関与する可能性が示唆された。

5. ハンセン病の濃厚流行地域は、同時に結核が多発している。結核菌でもMMP-II遺伝子は存在し、ウレアーゼ破壊BCGにBCG由来のHSP70遺伝子と結核菌由来のMMP-II遺伝子を融合させ導入したBCG-DHTMは、非常に強くヒト細胞に細胞性免疫を誘導し、効率的にメモリータイプのT細胞の産生を誘導した。BCG-DHTMがハンセン病に対するワクチンとしても有効に作用する可能性が考えられた。

6. 改変BCGの構築

構築過程の改変により、最強のpromoterであるP86によるHsp70-MMP II融合蛋白を発現するBCGクローンが取得できた。今後、同クローンを含め、構築済みのP79、P85により発現するクローンとワクチン効果の検討を進めていく。

カニクイザルらい菌感染系の構築

母仔サル接種系では、母仔サル各一頭に、PCR陽性の個体が認められた。3年目に検出されたこととなる。若年サル接種群より明らかに早い菌検出であり、接種時の免疫状態が、その後の体内菌増殖に大きく影響することが示唆された。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。

7. 講習会を実りあるものにするため回復者の方にも参加いただき、彼らの現状などについて講演いただいた。継続した教育機会を設けることが必要である。回

復者を一般医療機関に受診させる事(インテグレーション)は難しいが、一歩でもそれに近づける努力は必要である。ホームページに医療機関名・医師名を掲載し気軽に受診できることを期待したい。日本人患者は、ハンセン病とブルーリ潰瘍や他の皮膚病との鑑別は難しく、診断が遅れる場合がある。必ず鑑別に「ハンセン病」を入れることが必要である。

E. 結論

1. らい菌遺伝子ML0840はアシルCoA類代謝に関与すると考えられた。

2. らい菌キノロン耐性獲得に係る遺伝子変異を明らかにし、オフロキサシン耐性には、シタフロキサシンが有効な変異があると考えられた。

3. ハンセン病の再燃・再発の早期診断法は、免疫学的手法が有意義と考えられた。

4. LipoKにより活性化し放出されたエキソソームは、T細胞を活性化させる一群の免疫賦活性分子を持つ抗原性のある蛋白と考えられた。

5. ウレアーゼ破壊BCGにBCG由来HSP70遺伝子と結核菌由来MMP-II遺伝子の融合遺伝子導入BCGは、ハンセン病・結核共通ワクチンとなり得ると想定された。

6. 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、母仔群サルに早期の菌排泄を認めた。

7. ハンセン病診療ネットワーク作りは、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、継続して行うことが重要である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Rocha A.S., Cunha M. G., Diniz L., Salgado C., Aires M. A., Nery J. A., Gallo E., Miranda A., Magnanini M., Matsuoka M., Sarno E., Sufys P., Oliveira M. Drug and multiple-drug Resistance Among *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian relapsed leprosy patients. Journal Clinical Microbiology. Vol. 50 1912-1917, 2012
- 2) Cambau E., Nevejans A.C., Tejmar-Kolar L., Matsuoka M., Jarier V. Detection of antibiotic resistance in leprosy using GenoType®Leprae DR, a novel ready-to-use molecular test. PLoS Neglected Tropical Diseases. Vol. 6: e1739. doi:10.1371, 2012
- 3) Khin S.A., Yin T.N.O., Kyaw K., Aye .A. W., Matsuoka M. Genotyping of *Mycobacterium leprae* in Myanmar and supposed transmission mode. Japanese Journal of Leprosy. Vol.81:191-198, 2012
- 4) Yokoyama K., Kim H., Mukai T., Matsuoka M., Nakajima C., Suzuki Y. Impact of amino acid substitution in B subunit of DNA gyrase in *Mycobacterium leprae* on fluoroquinolone resistance. PLoS Neglected Tropical Diseases. Vol. 6: e1838, 2012
- 5) Suzuki Y., Nakajima C, Tamaru A, Kim H, Matsuba T, Saito H. Sensitivities of ciprofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates to fluoroquinolones: Role of mutant DNA gyrase subunits in drug resistance. Int. J. Antimicrob. Agents 39(5):435-439. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.01.007
- 6) Nakanaga, K., Y. Hoshino, Y. Hattori, A. Yamamoto, S. Wada, K. Hatai, M. Makino, and N. Ishii. Mycobacterium pseudoshottsii isolated from 24 farmed fishes in western Japan. J. Vet. Med. Sci., 74: 275-278. 2012
- 7) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. Mutation analysis of mycobacterial *rpoB* genes and rifampicin resistance using recombinant *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56: 2008-2013. 2012
- 8) Tanigawa, K., D. Yan, A. Kawashima, T. Akama, A. Yoshihara, Y. Ishido, M. Makino, N. Ishii, and K. Suzuki. Essential role of hormone-sensitive lipase (HSL) in the maintenance of lipid storage in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. Microb. Pathog., 52: 285-291. 2012
- 9) Nakanaga, K., Y. Hoshino, M. Wakabayashi, N. Fujimoto, E. Tortoli, M. Makino, T. Tanaka, and N. Ishii. *Mycobacterium shigaense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic mycobacterium that produced nodules in an erythroderma patient with severe cellular immunodeficiency and a history

- of Hodgkin's disease. *J. Dermatol.*, 39: 389-396. 2012
- 10) Saiga, H., S. Kitada, Y. Shimada, N. Kamiyama, M. Okuyama, M. Makino, M. Yamamoto, and K. Takeda. Critical role of AIM2 in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int. Immunol.*, 24: 637-644. 2012
- 11) Mori, S., R. R. Yotsu, K. Suzuki, M. Makino, and N. Ishii. Present situation of leprosy in Japan, 2006-2010: Analysis of drug resistance in new registered and relapsed cases by molecular biological methods. *J. Dermatol. Sci.*, 67: 192-194. 2012
- 12) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. Yotsu, M. Makino, and N. Ishii. Laboratory procedures for the detection and identification of cutaneous nontuberculous mycobacterial (NTM) infections. *J. dermatol.*, 40: 1-9. 2012
- 13) Degang, Y., T. Akam0a, T. Hara, K. Tanigawa, Y. Ishido, M. Gidoh, M. Makino, N. Ishii, and K. Suzuki. Clofazimine modulates the expression of lipid metabolism proteins in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 6: e1936. 2012
- 14) Makino M, Mukai T. Enhanced activation of T lymphocytes by urease-deficient recombinant bacillus Calmette-Guérin producing heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi*. 81:199-203. 2012
- 15) 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*. 56:697-702. 2012
- 16) Suzuki K., Akama T., Kawashima A., Yoshihara A., Yotsu R.R., Ishii N. Current status of leprosy: Epidemiology, basic science and clinical perspectives. *J Dermatol* 39: 121-129, 2012
- 17) Yotsu R.R., Nakanaga K., Hoshino Y., Suzuki K., Ishii N. Buruli ulcer and current situation in Japan: A new emerging cutaneous *Mycobacterium* infection. *J Dermatol* 39: 587-593 2012
- 18) 松岡正典、ハンセン病の基礎医学分野における日韓協力について。日本ハンセン病学会雑誌 81 巻 3 号 205-207、2012
- 19) 森 修一、スマナ バルア、鈴木幸一、石井則久、四津里英。2011 年における世界のハンセン病の現況について。日本ハンセン病学会雑誌 81: 145-154, 2012
- 20) 富井直子、石田 裕、石井則久。日系ブラジル人に発症した BT 型ハンセン病の 1 例。皮膚臨床 54: 1212-1213, 2012

2. 学会発表
- 1) Maeda Y., Tamura T., Mukai T., Fukutomi Y., Makino M. Characterization of exosomes derived from *Mycobacterium leprae* infected human dendritic cells. Keystone Symposia, Tuberculosis: Understanding the enemy. Whistler, BC, Canada, Mar 13-18, 2013
 - 2) 宮本友司、向井 徹、牧野正彦. 抗酸菌菌体内成分のメタボローム解析. 第86回日本細菌学会総会 2013年3月 千葉市
 - 3) Shimohakamada, Y., T. Tamura, and M. Makino. Enhancing effect of Peptide-25 on the induction of functional activation of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. 第41回日本免疫学会総会・学術集会 2012年12月 神戸市
 - 4) 向井 徹、宮本友司、福富康夫、前田百美、牧野正彦. Bioluminescence 系の抗酸菌応用への基礎的検討. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012年6月 札幌市
 - 5) 金玄、横山和正、中島千絵、松岡正典、向井 徹、福富康夫、鈴木定彦. らい菌の DNA ジャイレースの性状解析. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2012年6月. 札幌市
 - 6) 横山和正、金玄、中島千絵、松岡正典、向井 徹、鈴木定彦. らい菌の DNA ジャイレース A サブユニット上のアミノ酸置換とニューキノロン耐性. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2012年6月. 札幌市
 - 7) 横山和正、金玄、中島千絵、松岡正典、向井 徹、鈴木定彦. らい菌の DNA ジャイレース B サブユニット上のアミノ酸置換とニューキノロン耐性. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2012年6月. 札幌市
 - 8) Masanori Matsuoka. Collaboration between Korea and Japan for basic research on leprosy. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会、シンポジウム. 2012年6月. 札幌市
 - 9) 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 株の全ベノムシークエ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・学術大会 2012年6月. 札幌市
 - 10) 前田百美、田村敏生、福富康夫、牧野正彦. らい菌感染した樹状細胞から分泌されるエキソゾームの解析. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2012年6月 札幌市
 - 11) 鈴木幸一、Yang Degang、石藤雄子、大塚幹夫、塘 忠顕、斎藤一二三、小林睦生、赤間 剛、原 武史、中永和枝、星野仁彦、四津里英、牧野正彦、石井則久. Buruli 潰瘍家族発生例の住居敷地内からの *Mycobacterium ulcerans* DNA 検出. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012年6月札幌市
 - 12) Degang Yang, Takeshi Akama, Takeshi

- Hara, Yuko Ishido, Masahiko Makino, Norihisa Ishii, and Koich Suzuki. Clofazimine modulates the expression of lipid metabolism in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012 年 6 月 札幌市
- 13) 石井則久、熊野公子、杉田泰之、野上玲子、畑野研太郎、細川 篤. 2011 年のハンセン病新規患者発生状況. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012 年 6 月 札幌市
- 14) 森 修一、石井則久. 国内ハンセン病療養所における入退所者数統計報告. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012 年 6 月 札幌市
- 15) 鈴木幸一、谷川和也、石藤雄子、森修一、佐宗亜衣子、星野敬吾、櫻井準也、平田和明、石井則久. 鍋被り葬人骨からのらい菌 DNA の証明. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012 年 6 月 札幌市
- 16) 吉田 紫、佐藤彰洋、榊原章浩、石井則久. ハンセン病治療歴のあるブラジル人男性に生じた斑状皮膚萎縮症の 1 例. 第 260 回日本皮膚科学会東海地方会例会 2012 年 6 月 名古屋市
- 17) 中永和枝、星野仁彦、石井則久. 本邦の “*M. ulcerans* subsp. *shinshuense*” を起因菌とするブルーリ潰瘍症例の増加. 第 87 回日本結核病学会総会 2012 年 5 月 広島市
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
 - 1) 鈴木定彦、中島千絵、鈴木晴香、奥村英正、川瀬三雄、廣田寿一、丹羽孝介. 標的ポリヌクレオチドの検出方法及びアレイ. 平成 24 年 6 月 25 日、PCT/JP2012/066167、出願人; 国立大学法人北海道大学、日本碍子株式会社
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

らい菌の特性に関する研究

平成24年度 分担研究報告書

研究分担者 宮本 友司
(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

らい菌の特性に関する研究

研究分担者 宮本 友司 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 ハンセン病の起因菌であるらい菌は、他の細菌や抗酸菌属とは異なる微生物学的特性を持つ。これらの特性がハンセン病の発症機構に深く関与していることが推察されるが、その詳細は不明である。本研究では、未だに機能が解明されていないらい菌遺伝子に注目し、他の抗酸菌におけるホモログ遺伝子の破壊株を作製した。本株の代謝産物をメタボロームにより解析した結果、一部に量的な変化が生じていることが判明した。これらの結果は、らい菌の特性と関連する代謝メカニズムの解明へ向けた新たな一助となり得ると考えられた。

A. 研究目的

ハンセン病は、現在もアジア等の発展途上国を中心に、全世界で年間二十万人余りの新患が発生している感染症である。ハンセン病の発症機構には未だに不明な点も多く、その仕組みを解明することによって、制圧に向けた新たな予防、診断、治療法を開発することが求められている。ハンセン病の起因菌であるらい菌(*Mycobacterium leprae*)は、抗酸菌属に分類される細菌であり、宿主内で長期間にわたって慢性的に生存・増殖を続ける。その結果、他の抗酸菌感染症では見られない末梢神経障害や組織障害等の深刻な病原性を生体に及ぼす。一方、らい菌は、*in vitro* で培養不能であるなど他の抗酸菌属とは異なる特徴的な生理的側面を多く持つ。従って、これらの特性が、ハンセン病特有の病態等に影響

を及ぼしている可能性があるが、そのメカニズムも含め詳細はほとんどが明らかとなっていない。本研究では、らい菌の特性、特に菌自身の代謝や生理に焦点を絞り、これらと関わるらい菌の遺伝子機能を組換え株の作製及びメタボローム解析により明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

らい菌の機能未同定遺伝子の中から、代謝や生理に何らかの関与が予想される遺伝子に注目し、それぞれに対応した *M. smegmatis* におけるホモログ遺伝子の破壊株作製を試みた。標的遺伝子に隣接する上流及び下流領域を PCR により増幅し、ハイグロマイシン耐性遺伝子を挟む形で大腸菌ベクターへクローニングした。得られたベクターを制限酵素で切断後、直鎖状の DNA 断片として調製

した。これらの断片を recombinase 発現ベクター pJV53 を保持する *M. smegmatis* mc²155 株へ導入し、染色体上の標的遺伝子がハイグロマイシン耐性遺伝子と入れ替わった株を選抜した。さらに、ハイグロマイシン耐性遺伝子の脱落を促す pYUB870 ベクターをこれらに導入し、染色体上からホモログ遺伝子が除去された遺伝子破壊株を取得した。メタボローム解析に使用する菌体は、7H9+ADC 培地で 2 日間、37°C で振とう培養し 1.5×10^9 個の菌量として調製した。Milli-Q 水による洗浄後、内部標準物質を含むメタノールにより、イオン性化合物として基礎代謝産物が含まれる菌体内成分を抽出した。さらに、クロロホルムによる脂質成分、限外濾過フィルターによるタンパク質成分の除去をそれぞれ行い、分析用サンプルとした。解析には、低分子イオン性化合物の検出に適した CE-MS (capillary electrophoresis-mass spectrometry) 法を採用し、サンプル中に含まれる全ての既知化合物を同定した。内部標準物質及び各化合物の検出ピーク面積から算出された比率を基に半定量化を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、臨床サンプル、動物実験は行われていない。

C. 研究結果

本年度は、らい菌遺伝子 ML0840 のホモログ MSMEG_4536 の遺伝子破壊株 (Δ 4536 株) を作出した。図 1 に示すように、染色体上から MSMEG_4536 遺伝子領域が除かれていることを PCR により確

認した。本株及び mc²155 株から得られた菌体内成分を CE-MS 法により解析した結果、両株由来サンプルより、合計 184 個の化合物が検出された。この内、74 個がカチオン(陽イオン性化合物)で、110 個がアニオン(陰イオン性化合物)であった。内部標準物質に対する各化合物の含有比率を算出し、主な基礎代謝経路上(解糖系、TCA サイクル、アミノ酸及び核酸代謝経路)に位置する化合物を両株間で比較した結果、アミノ酸及び核酸に関連する化合物では著しい差は認められなかったが(図 2)、 Δ 4536 株において、解糖系や TCA サイクルと関連するアシル CoA 類 (acetyl-CoA、propionyl-CoA、succinyl-CoA) が mc²155 株に比べ多く産生されていることが明らかとなった(図 3)。

D. 考察

らい菌の特性を決定づける様々な細菌学的特徴のメカニズムが依然として不明である中、本研究においては、遺伝子機能の側面からその特性にアプローチすることを試みた。らい菌には代謝や生理と関連することが推測され且つそれらの機能が未だ実験的に確認されていない遺伝子が数多く存在する。しかしながら、これらの中のどの遺伝子がらい菌特有の性質に影響を及ぼしているかについては解明されていない。一方、らい菌は *in vitro* 培養できないため、これらの機能を解析するために、らい菌において直接遺伝子組換え株を作製することは不可能である。従って、本研究では、同じ抗酸菌属に分類され且つ遺伝子操作が

比較的容易な *M. smegmatis* をモデルとした組換え株を作製し、そのメタボローム解析を行うことにより、らい菌遺伝子の代謝や生理における機能を推測した。本年度作製した MSMEG_4536 遺伝子の破壊株 Δ 4536 株は、親株の mc²155 株に比べアシル CoA 類を多く産生する傾向を示した。MSMEG_4536 は、らい菌遺伝子 ML0840 (putative cell surface protein) のホモログであり、そのモチーフから菌体表層に位置するタンパク質であることが予測されている。しかし、らい菌における機能・役割については未だ明らかとなっていない。主なアシル CoA 類である acetyl-CoA や propionyl-CoA は、脂肪酸の代謝経路である β -酸化の最終産物として生じる。これらはさらに TCA サイクルへと組み込まれ、エネルギー代謝の主要な役割を担う。また、一部のアミノ酸類が代謝されることにより propionyl CoA が産生されることも知られている。従って、 Δ 4536 株においてアシル CoA 類の増加が認められたことは、MSMEG_4536 遺伝子の破壊により β -酸化若しくはアミノ酸の代謝が亢進した結果であると推察される。予想される仮説としては、MSMEG_4536 の遺伝子産物である表層タンパク質が、細胞内への栄養成分の取り込みに何らかの関与をし、このタンパク質が機能しなくなることで脂肪酸等の取り込みが増大し、結果として β -酸化等の代謝が亢進した可能性が考えられる。この点を解明するためには、放射性同位体で標識した脂肪酸やアミノ酸類の代謝活性を計測する Buddemeyer 法を行い、親株と Δ 4536 株との間で取り込み

能に違いがあるかどうかを評価する必要がある。一方、アシル CoA 類に差が生じたもう一つの理由として、MSMEG_4536 の遺伝子産物が β -酸化等の代謝遺伝子群の発現制御に影響を与えている可能性も挙げられる。これについては、DNA アレイ等による網羅的な遺伝子発現の解析が解明への手掛かりになると考えられる。本研究では、最終的に、*M. smegmatis*での標的遺伝子の破壊、それに続くらい菌遺伝子の導入により、*M. smegmatis*においてらい菌特有の代謝や生理機構の再現を目指している。アシル CoA 類に留まらず多くの化合物について代謝機構は未だ不明な点も多く、本研究を進めることにより、らい菌の特性の一端が明らかにされることが期待される。

E. 結論

らい菌遺伝子 ML0840 のホモログを *M. smegmatis* において破壊し、メタボロームによる代謝成分解析を行った結果、アシル CoA 類の産生が高まる傾向が観察された。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

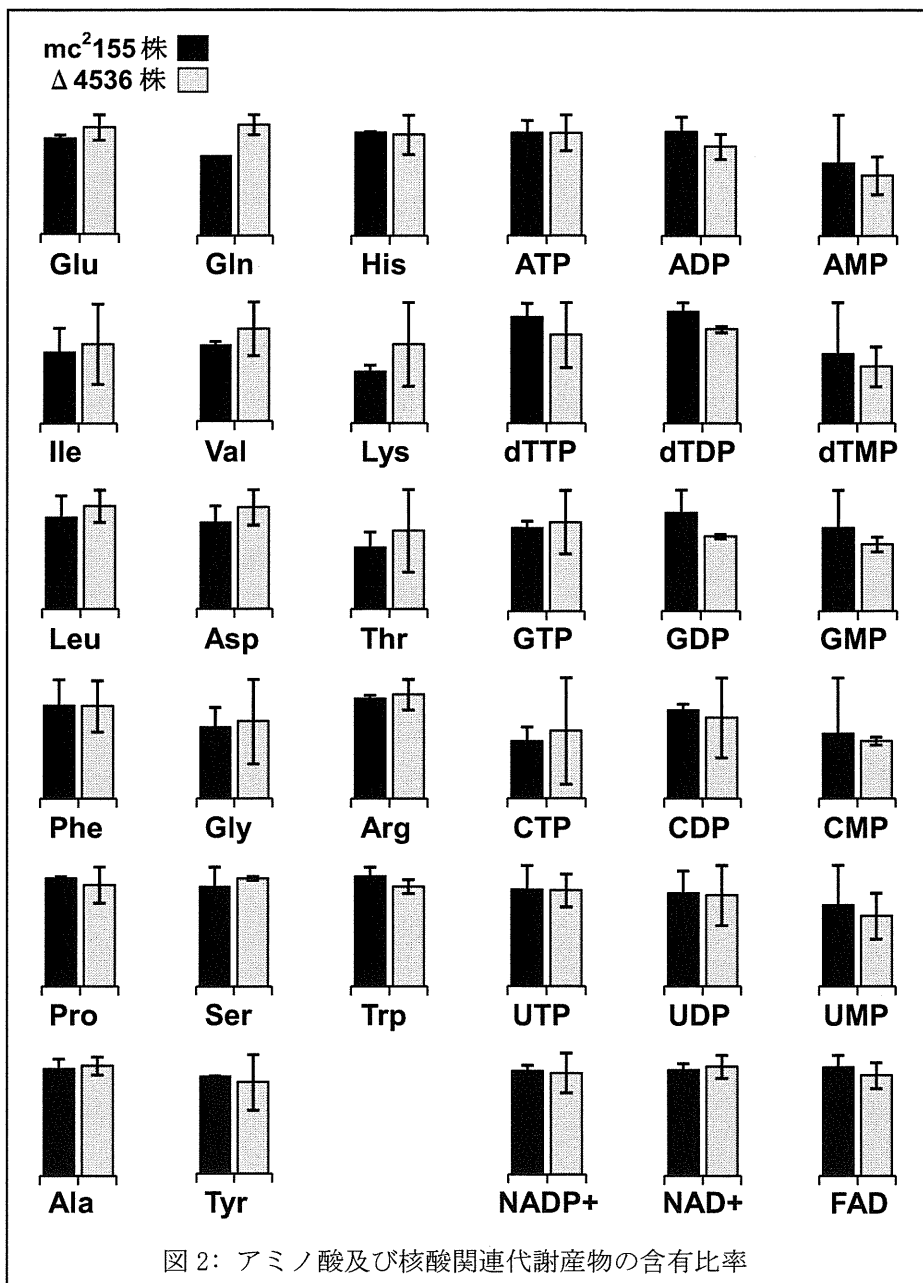
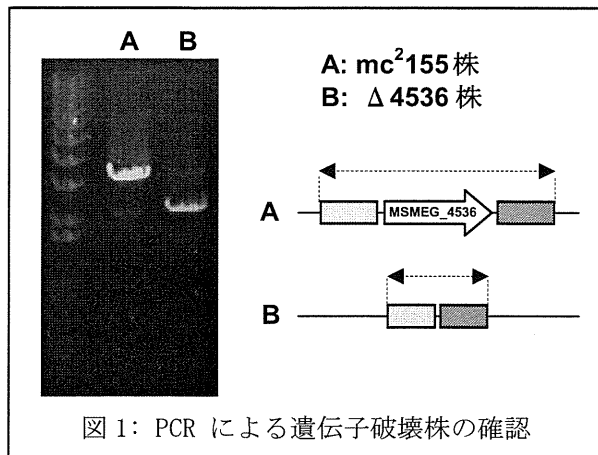
2. 学会発表

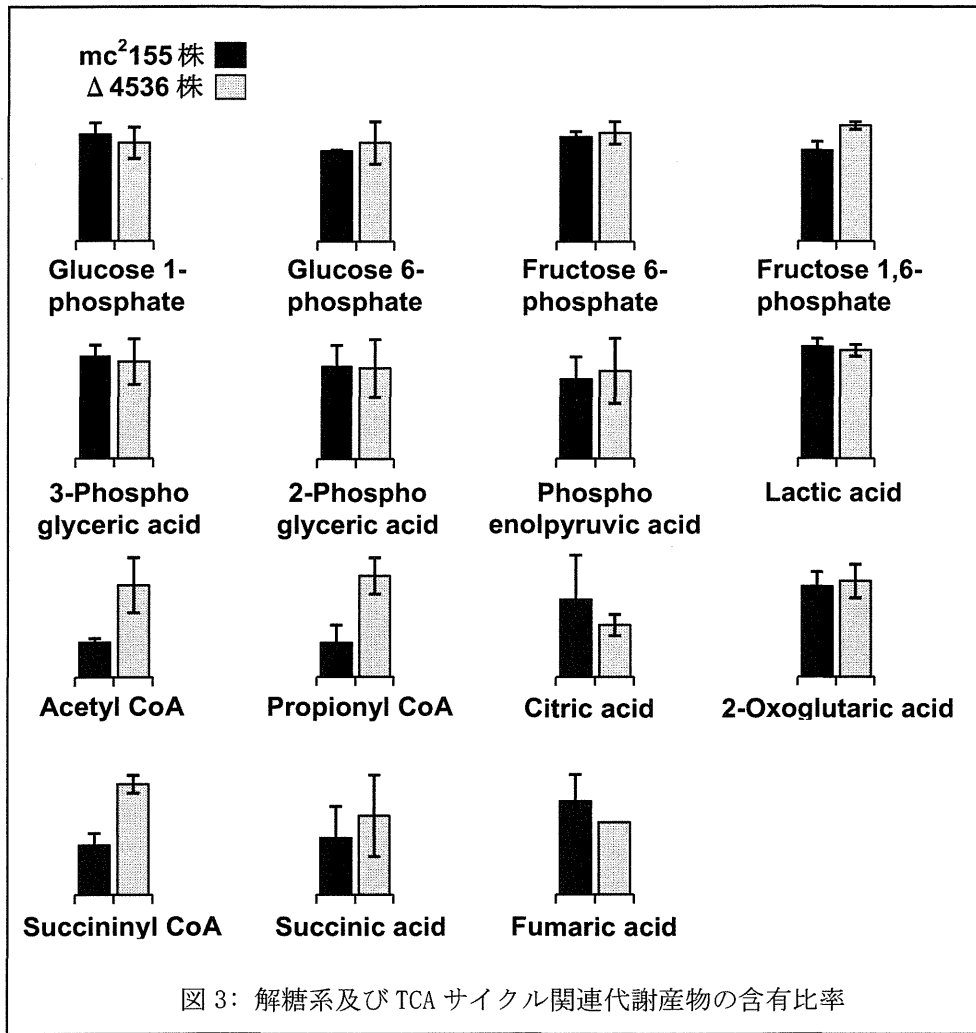
- 1) 向井 徹、宮本友司、福富康夫、前田百美、牧野正彦. Bioluminescence 系の抗酸菌応用への基礎的検討. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012 年 6 月 札幌市
- 2) 宮本友司、向井 徹、牧野正彦. 抗酸菌菌体内成分のメタボローム解析. 第 86 回日本細菌学会総会

2013年3月 千葉市

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





厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

薬剤耐性獲得機構解明とその迅速感受性試験法開発への応用

平成24年度 分担研究報告書

研究分担者 鈴木 定彦
(北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター)