

CD86 に対する抗体で処理した際の T 細胞の活性化の減弱の程度で評価した。樹状細胞表面の抗原の発現程度は、FACSCalibur を用いて行った。抗体は市販の抗体を用いた。BCG-DHTM 感染 DC による T 細胞活性化機構を探索する目的で、DC を市販の Chloroquine、Brefeldin A、Lactacystin で処理し、T 細胞の活性化抑制能を T 細胞からの IFN- γ の産生量により評価した。さらに、BCG-DHTM のメモリー T 細胞産生能を測定する目的で、C57BL/6 マウスに BCG-DHTM および BCG-261H を皮下接種し、4 週間後に脾臓の T 細胞を *in vitro* で MMP-II タンパクで刺激し、IFN- γ の産生量を ELISA 法で測定した。さらに、BCG-261H 及び BCG-DHTM 1×10^4 CFU を C57BL/6 マウスに皮下接種し、4 週間後にらい菌 5,000 個をマウス足蹠に感染させ、8 ヶ月後に足蹠で増殖したらい菌数を算出した。

(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、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。

C. 研究結果

コントロール BCG としてベクターコントロール(BCG-261H)を用いて、BCG-DHTM のナイーブ T 細胞の活性化能を検討した。BCG-DHTM は、非常に強くナイーブ CD4 陽性 T 細胞を活性化した。BCG-DHTM はマクロ

ファージを介してもメモリータイプ CD4 陽性 T 細胞を活性化することが可能であった。これら樹状細胞及びマクロファージを介した BCG-DHTM による CD4 陽性 T 細胞の活性化は抗原特異的であり、BCG-DHTM を感染させた抗原提示細胞を HLA-DR あるいは CD86 抗原に対する抗体で処理すると、その活性化は 90 % 以上抑制された。次いで、BCG-DHTM のナイーブ CD8 陽性 T 細胞活性化を検討すると、BCG-DHTM は、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。この T 細胞の活性化は抗原特異的であって、BCG-DHTM 感染樹状細胞表面を抗 HLA-ABC 抗体あるいは抗 CD86 抗体で処理すると、その T 細胞活性化能は強く抑制された。BCG-DHTM の T 細胞活性化機構を解析するため、BCG-DHTM の抗原提示細胞活性化能を評価した。BCG-DHTM は強く樹状細胞を刺激し、大量の IL-12p70・IL-1 β ・TNF α の産生を誘導した。また、BCG-DHTM は樹状細胞表面上の HLA-DR・CD86・CD83 抗原の発現を増強させた。BCG-DHTM による T 細胞活性化機構をより詳細に検討する目的で、樹状細胞を予めクロロキニンで処理し、その後 BCG-DHTM を感染させると、BCG-DHTM の感染によって誘導される MMP-II の発現が著しく抑制され、同時に、BCG-DHTM によるナイーブ CD4 陽性 T 細胞及びナイーブ CD8 陽性 T 細胞の活性化が有意に抑制された。マクロファージによる CD4 陽性 T 細胞活性化もクロロキニン処理で抑制された。一方、樹状細胞を Brefeldin A あるいは Lactacystin で処理しても、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞の活性化は同様に抑制された。このことから、BCG-DHTM は HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌し、分泌された融合タンパクが CD4 陽性 T 細胞の活性化と CD8 陽性 T 細胞の活性化をもたらす、CD8 陽性 T 細胞の活性化はクロスプレゼンテーション機構によって生

じているものと考えられた。CD4 陽性 T 細胞存在下で CD8 陽性 T 細胞を BCG-DHTM で刺激すると、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞からパーフォリン産生性実効型 T 細胞が産生され、さらに、遊走能マーカーを有するメモリー T 細胞が産生された。また、C57BL/6 マウスに BCG-DHTM を皮下接種すると、効率良く MMP-II あるいは HSP70 に反応し、IFN- γ を産生するメモリー T 細胞が産生された。その効果は長期持続した。さらに、BCG-DHTM と BCG-261H のハンセン病に対するワクチン効果を検討したところ、BCG-DHTM は BCG-261H に比し、有意にらい菌の増殖を抑制し、従来の BCG に比しより強いワクチン効果を有することが判明した。

D. 考察

結核は結核菌の感染によって発症する 20 世紀最大の恐怖を与えた慢性感染症であり、ハンセン病は同じ抗酸菌に分類されるらい菌の感染によって発症する感染症である。ハンセン病の濃厚流行国あるいは地域は、同時に結核が多発している地域でもある。両者の発症を抑制するワクチンとして、*M. bovis* BCG が使われてきているが、BCG は成人の肺結核を予防することはできなく、また、ハンセン病の発症を阻止する上での有効性は 26%と結論されており、今後も BCG をワクチンとして使用するならば BCG の改良が不可欠となっている。ハンセン病の新規発症患者数は年間全世界で 30 万人を下回っており、ハンセン病単独に対するワクチンの開発及びワクチン接種を経済的理由から疑問視する声も少なくない。そこで、本研究では結核とハンセン病両者の発症を抑制し得る単一のワクチンを開発することを目的とした。ハンセン病に対するワクチンとして、これまでにウレアーゼ欠損 BCG に HSP70-MMP-II 融合遺伝子を組み込んだリコンビナント BCG (BCG-D70M) が極めて有効で

あることを報告してきた。ウレアーゼを欠損させる目的は、リコンビナント BCG 菌体をライゾームへ早期に移行させることにあり、HSP70 はシャペロン効果を有し、Cytotoxic T lymphocyte の活性化を有することからアジュバントとして用い、MMP-II はらい菌の主要抗原の一つであるため、ワクチンとして最も重要なコンポーネントとして用いた。

一方、結核菌においても MMP-II 遺伝子は存在し、BCG-D70M と同様にしてウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に BCG 由来の HSP70 遺伝子と結核菌由来の MMP-II 遺伝子を直接的に結合し導入して作製したリコンビナント BCG (BCG-DHTM) は、非常に強く未感作 CD4 陽性 T 細胞及び未感作 CD8 陽性 T 細胞を活性化し、大量の IFN- γ の産生を誘導した。さらに、BCG-DHTM は *in vitro* 及び *in vivo* において、効率的にメモリータイプの CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の産生を誘導した。BCG-DHTM を皮下接種すると、その後経気道的に噴霧感染させた結核菌の肺内での増殖をベクターコントロール BCG に比し有意に強く抑制した。らい菌由来の MMP-II と結核菌の MMP-II はアミノ酸レベルで 90%の相同性を有していたため、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。そこで、C57BL/6 マウスを用いて BCG-DHTM の抗ハンセン病ワクチン効果を検索したところ、BCG-D70M より弱いものの、らい菌の増殖を有意に抑制することが可能であった。

結核菌に対するワクチンの開発は更なる改良が必要であるが、ハンセン病・結核共通ワクチンの開発が可能であることが本研究から示唆された。

E. 結論

ウレアーゼ欠損 BCG に BCG 由来 HSP70 遺伝子と結核菌由来 MMP-II 遺伝子を連結し

た遺伝子を導入した新規リコンビナント BCG (BCG-DHTM) は、結核菌のみならずらい菌の増殖をもマウス生体内で抑制することが可能であり、ハンセン病・結核共通ワクチンとなり得ると想定された。

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. 2012. *Mycobacterium pseudoshottsii* isolated from 24 farmed fishes in western Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 74: 275-278.
- 2) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. 2012. Mutation analysis of mycobacterial *rpoB* genes and rifampicin resistance using recombinant *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56: 2008-2013.
- 3) Tanigawa, K., D. Yan, A. Kawashima, T. Akama, A. Yoshihara, Y. Ishido, M. Makino, N. Ishii, and K. Suzuki. 2012. Essential role of hormone-sensitive lipase (HSL) in the maintenance of lipid storage in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. *Microb. Pathog.*, 52: 285-291.
- 4) Nakanaga, K., Y. Hoshino, M. Wakabayashi, N. Fujimoto, E. Tortoli, M. Makino, T. Tanaka, and N. Ishii. 2012. *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.
- 5) Saiga, H., S. Kitada, Y. Shimada, N.

Kamiyama, M. Okuyama, M. Makino, M. Yamamoto, and K. Takeda. 2012. Critical role of AIM2 in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int. Immunol.*, 24: 637-644.

- 6) Mori, S., R. R. Yotsu, K. Suzuki, M. Makino, and N. Ishii. 2012. 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.
 - 7) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. Yotsu, M. Makino, and N. Ishii. 2012. Laboratory procedures for the detection and identification of cutaneous nontuberculous mycobacterial (NTM) infections. *J. dermatol.*, 40: 1-9.
 - 8) Degang, Y., T. Akama, T. Hara, K. Tanigawa, Y. Ishido, M. Gidoh, M. Makino, N. Ishii, and K. Suzuki. 2012. Clofazimine modulates the expression of lipid metabolism proteins in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 6: e1936.
- ### 2. 学会発表
- 1) 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 ulucerans* 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
 - 2) 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

- 3) 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・学術大会 2012 年 6 月 札幌市
- 4) 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
- 5) 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ソームの解析. 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
- 6) 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

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)

ハンセン病ワクチンの開発

平成24年度 分担研究報告書

研究分担者 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）
分担研究報告書

ハンセン病ワクチンの開発

研究分担者 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 ハンセン病のワクチンとしての BCG の使用は、その効果の評価は様々である。しかし、BCG は結核のワクチンとして長期使用され、安全性は非常に高いと考えられる。らい菌と同じ抗酸菌である BCG を組換え DNA 技術により改変し、らい菌抗原を発現させ、ワクチンとしての能力向上を図った。これまでの抗原解析では、BCG 由来 Hsp70 とらい菌 MMPII の融合蛋白を BCG に plasmid 発現させ、マウスにおいてらい菌増殖を抑制することを見出してきた。さらに、本抗原を、BCG ゲノムに組込まれた 1 コピー遺伝子から安定かつ充分量発現する promoter 候補領域を抗酸菌ファージに同定してきた。HSP70-MMP II 融合蛋白をファージ由来 3 種の promoter により発現する組換え BCG の構築を進めた。各種検討により一番強い promoter 活性を持つ P86 により発現する組換え BCG の構築がなされた。安全性を得るため、薬剤耐性遺伝子の除去を行い、長期培養でも十分量の抗原を分泌するクローンの選択を進める。各種クローンの比較により安定・安全なハンセン病ワクチンとして使用が可能であると考えられた。また、ワクチンの効果・安全性評価のため、カニクイザルを用いたらハンセン病モデルサルの開発を進めている。本年度は、若年ザル接種群 2 頭、母仔接種群の 2 頭の鼻腔洗浄液にらい菌遺伝子が検出され、免疫抑制状態に菌接種を行うことにより、排菌の時期が早まることが示唆された。

A. 研究目的

BCG は樹立以来、長期の使用により安全性の非常に高いことが知られている。BCG は、ハンセン病と同じ抗酸菌感染症である結核のワクチンのため、ハンセン病ワクチンとして使用が試みられてきた。しかし、その有効性は低いものとされ、新規のハンセン病ワクチンの開発が必要と

考えられる。そのため、組換え DNA 技術により BCG を改変し、ハンセン病ワクチン開発を進めた。

これまでに、plasmid 発現による BCG Hsp70 とらい菌 MMPII 融合蛋白は、マウスにおいてらい菌の増殖抑制に効果的であることを示してきた。しかし、現実のワクチンとしての使用では、plasmid の脱落、その防止

のための plasmid 上にある耐性薬剤遺伝子に応じた薬剤添加など、らい菌抗原発現 BCG の安全性・安定性に疑問が残る。そのため、抗原発現遺伝子の維持を plasmid によらず、BCG ゲノムへの組み込み型による組換え BCG が適していると考えられる。しかし、既存の promoter では組み込み型遺伝子発現量は不十分なため、抗酸菌ファージより強力な promoter 領域を同定してきた。同定された領域から強い 3 プロモーター領域を用い BCG もしくはらい菌由来 Hsp70 とらい菌 MMP II 融合蛋白の組み込み型発現 BCG を構築し、プラスミド発現と同等の抗原産生量であることを示してきた。今回、構築された BCG より、薬剤耐性遺伝子除去を行った。

一方、ワクチン開発において、その効果と安全性の評価のため感染動物実験が必要になる。しかし、らい菌感染による神経症状等の臨床症状を示す動物は、ヒトとサルのみである。マウスとアルマジロは、菌の増殖は可能であるが発症はしない。そのため、幼若カニクイザル及び妊娠ザルとその新生仔へらい菌の接種を行い、らい菌感染モデル系の開発を進めた。

B. 研究方法

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 BCG urease の上下領域配列を導入した。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 Hsp70 単抗体、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。P86 により発現するクローンは取得困難であったため、urease 遺伝子と相同組換えに用いる領域を 200bp から 1,000bp に延長し、遺伝子導入量を $10\mu\text{g}$ から $50\mu\text{g}$ へ増加させた。

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 ヶ月齢の幼若カニクイザル 3 群に分け、らい菌を鼻腔内、鼻先端部、左手根部へ接種した。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 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 法によりモニターを行った。また、平成 20 年度に 1 組、平成 22 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。

(倫理面への配慮)

動物実験は、各施設の動物実験委員会の承認を受け行った。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

改変 BCG の構築

Promoter として P79, P85, P86 を、Hsp70 として BCG もしくはらい菌由来を、MMP II としてらい菌由来を持つ plasmid を urease 配列内に組み込み urease 破壊各種抗原発現 BCG 株を構築した。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 (図 1)。さらに安全・安定な BCG 構築のため、カナマイシン耐性遺伝子を持つ pJV53 脱落クローンを選択し、次に Hygromycin 遺伝子両端にある res 配列と反応し、耐性遺伝子を切り出す resolvase をコードする pYUB870 を遺伝子導入後、Hygromycin 感受性菌を選択し、さらにカナマイシン遺伝子を持つ pYUB870 を脱落させ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 #1, #6 より接種後 82 月のサンプルに、らい菌遺伝子が検出された。新生仔群では、#13, (仔) の 34 月、#14, (親) の 36, 38 月の

連続したサンプルよりらい菌遺伝子が検出された。しかし、これまで検出された #4, #15 は年間を通して PCR 陰性であった。

D. 考察

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。しかし、これまで、最強の promoter である P86 によるクローンの構築はできていなかった。しかし、今回、構築過程に改変により、Hsp70-MMP II 融合蛋白を発現するクローンを取得できた。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の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樹立

昨年度、鼻腔洗浄液に菌の排泄を認めた個体 #15 は、その後排泄を確認できなかった。母仔サルの接種系では、母サル、仔ザル各一頭に、PCR 陽性の個体が認められた。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、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。

学術大会 2012年6月. 札幌市

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早期に母仔群サルの母ザル・仔ザル各1頭に菌排泄を認めた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yokoyama K, Kim H, Mukai T, Matsuoka M, Nakajima C, Suzuki Y. Impact of amino acid substitutions in B subunit of DNA gyrase in *Mycobacterium leprae* on fluoroquinolone resistance. PLoS Negl Trop Dis. 6:e1838. 2012.

2) 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.

3) 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.

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・

2) 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

3) 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

4) Maeda Y., Tamura T., Mukai T., Fukutomi Y. and 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.

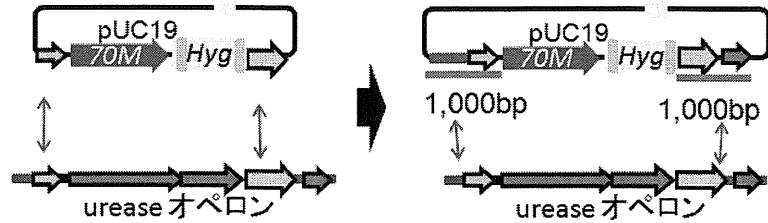
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

図1. P86 より発現する組換 BCG の構築

変更点

- ・導入DNA量の増加
10 μ g \Rightarrow 50 μ g
- ・上流域、下流域を長くする
200bp \Rightarrow 1,000bp



86BL ウェスタンブロッティング

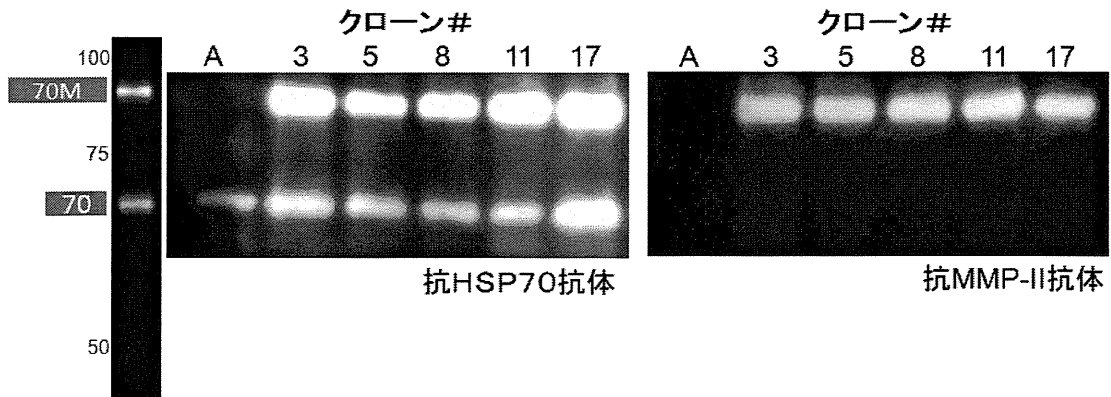
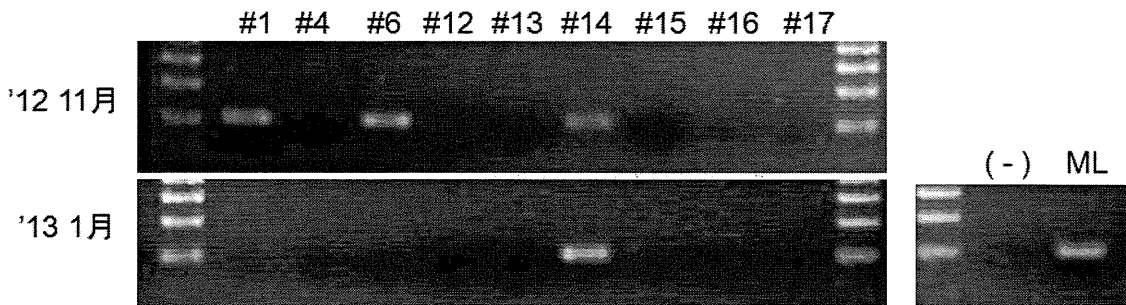


図2. H24年度の鼻腔洗浄液 PCR 陽性サルサンプル

・鼻腔洗浄液: nested-PCR

- # 1 (若年) 鼻腔内 82 mo
- # 6 (若年) 手首 82 mo
- # 13 (仔) 鼻腔内、鼻尖 34 mo
- # 14 (親) 鼻腔内、鼻尖 4, 12, 14, 16, 18, 36, 37 mo



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)

ハンセン病の診療ネットワークと啓発に関する研究

平成24年度 分担研究報告書

研究分担者 石井 則久

(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

ハンセン病の診療ネットワークと啓発に関する研究

研究分担者 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
研究協力者 森 修一 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
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
中永 和枝 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
四津 里英 国立国際医療研究センター 皮膚科フェロー

研究要旨 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。19名の皮膚科医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構築した。さらにハンセン病回復者が安心して受診できるように「ハンセン病診療の相談に応じる医師」と「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。

A. 研究目的

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の構築を目指す。

B. 研究方法

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、ハンセン病の新規患者については、実際に診療方法、鑑別方法、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した。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した

（倫理面への配慮）

患者情報については入手しないため、倫理上の問題はない。

C. 研究結果

ハンセン病患者の減少のため、皮膚科医が診療する機会が殆どない。そのため42名に対してハンセン病講習会を実施した（参加者：皮膚科医19名、精神科医1名、ハンセン病回復者支援センター1名、弁護士2名、回復者12名、資料での参加7名）。ハンセン病の知識、回復者の心情、皮膚スミア検査実習、末梢神経検査、病理組織検査などを実施し、知識・技術の伝達を行った。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をお聞きした。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。

ハンセン病回復者は、過去の偏見・差別の歴史から、なかなか一般医療機関に受診する勇気がない。一般医療機関受診のチャンスを広げるため、「ハンセン病診療の相談に応じる医師」と「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年には2名の新規ハンセン病患者がいた。2名の新規患者については主治医に対して、実際の検査の実技指導、治療の指導を行い、ハンセン病を確実に診療できる体制を確立した。

顧みられない熱帯病 (neglected tropical diseases)としてハンセン病と共に挙げられているブルーリ潰瘍についても検討・研究を行った。すなわち、両者は末梢神経症状を呈すること、潰瘍をおこすこと、熱帯地域に多いことなどから極めて類似した所見を示すので鑑別が困難である。日本においてもブルーリ潰瘍が現在まで36例報告されており、ハンセン病との鑑別に困難をきたし、両疾患の異同が問題になっている。両疾患の臨床的、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

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

とブルーリ潰瘍の鑑別ができない場合もおきている。また、ハンセン病の偏見・差別の歴史や、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。皮膚科医は知識吸収の意欲はあり、講習会には19名の皮膚科医が参集した。講習会を実りあるものにするためにハンセン病回復者の方、12名にも参加いただき、彼らの現状などについて講演いただいた。今後も講習会を通じて学習意欲を持続させるために、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、ホームページ上に医療機関名・医師名を掲載した。これらの医師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。また、ハンセン病回復者などから生の声を聞いて、患者と医師とのあるべき関係を構築することも大事である。

ハンセン病の新規患者は減少しているが、外国人患者については鑑別にハンセン病が入っているので、診断に迷うことは多くないようである。一方、日本人患者については、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。数年に1名程度は日本人新規患者も登録されることがあり、必ず鑑別に「ハンセン病」を入れることが必要である。2012年は2名の新規患者が登録されたが、インド人とフィリピン人が各1名であった。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Tanigawa K., Yan D., Kawashima A., Akama T., Yoshihara A., Ishido Y., Makino M., Ishii N., Suzuki K. Essential role of hormone-sensitive lipase (HSL) in the maintenance of lipid storage in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. Microb Pathog 52: 285-291, 2012.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Mori S., Yotsu R.R., Suzuki K.,

Makino M., Ishii N. 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.

- 6) 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.
 - 7) Yang D., Akama T., Hara T., Tanigawa K., Ishido Y., Gidoh M., Makino M., Ishii N., Suzuki K. Clofazimine modulates the expression of lipid metabolism proteins in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. PLoS Negl Trop Dis 6: e1936, 2012.
- ### 2. 学会発表
- 1) 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
 - 2) 鈴木幸一、Yang Degang、石藤雄子、大塚幹夫、塘 忠顕、斉藤一三、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
 - 3) 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

- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Rocha A.S., Cunha M. G., Diniz L., Salgado C., Aires M. A., Nery J. A., Gallo E., Miranda A., Magnanini M., <u>Matsuoka M.</u> , Sarno E., Sufys P., Oliveira M.	Drug and Multiple drug Resistance among <i>Mycobacterium leprae</i> Isolates from Brazilian Relapsed Leprosy Patients.	J Clin Microbiol	50	1912-1917	2012
Cambau E., Nevejans A.C., Tejmar-Kolar L., <u>Matsuoka M.</u> , Jarier V.	Detection of Antibiotic Resistance in leprosy Using GenoType®Leprae DR, a Novel Ready-To-Use Molecular Test.	PLoS Negl Trop Dis	6	e1739	2012
Khin S.A., Yin T.N.O., Kyaw K., Aye .A. W., <u>Matsuoka M.</u>	Genotyping of <i>Mycobacterium leprae</i> in Myanmar and supposed transmission mode.	Jpn J Lepr	81	191-198	2012
<u>Makino, M.</u> <u>Mukai T.</u>	Enhanced activation of T lymphocytes by urease-deficient recombinant bacillus Calmette-Guérin producing heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein.	Jpn J Lepr	81	199-203	2012
Yokoyama K., Kim H., <u>Mukai T.</u> , <u>Matsuoka M.</u> , Nakajima C., <u>Suzuki Y.</u>	Impact of Amino Acid Substitutions in B Subunit of DNA Gyrase in <i>Mycobacterium leprae</i> on Fluoroquinolone Resistance.	PLoS Negl Trop Dis	6	e1838	2012

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 <i>Mycobacterium leprae</i> .	Antimicrob Agents Chemother	56	697-702	2012
Suzuki Y., Nakajima C., Tamaru A., Kim H., Matsuba T., Saito H.	Sensitivities of ciprofloxacin-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> clinical isolates to fluoroquinolones: role of mutant DNA gyrase subunits in drug resistance.	Int J Antimicrob Agents	39	435-439	2012
Nakanaga K., Hoshino Y., Hattori Y., Yamamoto A., Wada S., Hatai K., Makino M., Ishii N.	<i>Mycobacterium pseudoshottsii</i> Isolated from 24 Farmed Fishes in Western Japan.	J Vet Med Sci	74	275-278	2012
Nakata N., Kai M., Makino M.	Mutation Analysis of Mycobacterial <i>rpoB</i> Genes and Rifampicin Resistance Using Recombinant <i>Mycobacterium smegmatis</i> .	Antimicrob Agents Chemother	56	2008-2013	2012
Nakanaga K., Hoshino Y., Wakabayashi M., Fujimoto N., Tortoli E., Makino M., Tanaka T., Ishii N.	<i>Mycobacterium shigaense</i> 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
Saiga H., Kitada S., Shimada Y., Kamiyama N., Okuyama M., Makino M., Yamamoto M., Takeda K.	Critical role of AIM2 in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection.	Int Immunol	24	637-644	2012
Nakanaga K., Hoshino Y., Yotsu R., Makino M., Ishii N.	Laboratory procedures for the detection and identification of cutaneous non-tuberculous mycobacterial (NTM) infections.	J Dermatol	40	1-9	2012

Yang D., Akama T., Hara T., Tanigawa K., Ishido Y., Gidoh M., Makino M., Ishii N., Suzuki K.	Clofazimine modulates the expression of lipid metabolism proteins in <i>Mycobacterium leprae</i> -infected macrophages.	PLoS Negl Trop Dis	6	e1936	2012
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
Tanigawa K., Yang D., Kawashima A., Akama T., Yoshihara A., Ishido Y., Makino M., Ishii N., Suzuki K.	Essential role of hormone-sensitive lipase (HSL) in the maintenance of lipid storage in <i>Mycobacterium leprae</i> -infected macrophages.	Microb Pathog	52	285-291	2012
Yotsu R.R., Nakanaga K., Hoshino Y., Suzuki K., Ishii N.	Buruli ulcer and current situation in Japan: A new emerging cutaneous <i>Mycobacterium</i> infection.	J Dermatol	39	587-593	2012
Mori S., Yotsu R.R., Suzuki K., Makino M., Ishii N.	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
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	205-207	2012
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
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

IV. 研究成果の刊行物・別刷