

2013/8031A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 向井 徹

平成26(2014)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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 向井 徹

平成26(2014)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..... 19

4. 免疫療法の開発

前田 百美..... 25

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..... 29

6. ハンセン病ワクチンの開発

向井 徹..... 35

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..... 41

III. 研究成果の刊行に関する一覧表..... 45

IV. 研究成果の刊行物・別刷..... 47

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25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、全世界で毎年 20 数万人のまま横ばいであり、加えて薬剤耐性菌による発症、再発・再燃も年々数を増している。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、らい菌の偽遺伝子化がアミノ酸代謝形成と関連していることを示唆した。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、新規キノロン剤が低濃度でらい菌 DNA ジャイレースを阻害できることを見出した。再燃・再発に関する免疫学的診断法の開発では、細胞性免疫能の測定が有意義であることを示した。免疫療法の開発では、感染樹状細胞のエキソソーム解析はハンセン病の病態を知る上で重要であることを示した。ハンセン病・結核共通ワクチンの免疫学的評価では、らい菌由来 MMP-II を用いた融合組換え蛋白は、ナイーブマウス生体内にメモリーT 細胞を作製することは可能であったが、BCG-DHTM のらい菌増殖抑制能を増強することはできなかった。ハンセン病ワクチンの開発では、構築された候補ワクチン組換え BCG に抗原分泌長期安定でないものがあることを示した。らい菌接種サルにおいて、母仔群サル 4 頭に菌排泄を認めた。国内で維持されているらい菌株に *M. lepromatosis* は、存在しないことを示した。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、皮膚科医の教育、回復者の一般医療機関への受診への働きかけ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. らい菌の代謝関与予想遺伝子 7 種に対応した *Mycobacterium smegmatis* の相同遺伝子破壊株作製し、CE-MS 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、各種キノロン剤の活性能を検討した。
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、フローサイトメトリーにより IFN- γ 、IL-10 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、得られるエキソソームの解析を行った。
5. 組換え蛋白を作製し、そのワクチン能を各種免疫学的活性により評価した。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
各種抗酸菌ファージ由来 promoter により発現する組込み型 BCG を構築し、そ

の性状を検討した。

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 経路で菌接種した。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。

分離継代株の検証

当センターで継代保存されているらい菌の遺伝子配列の精査を行った。

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。

(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、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. らい菌の偽遺伝子化 7 遺伝子の相同遺伝子を *M. smegmatis* につき、破壊変異株

を作製した。2株でアミノ酸含有量が変化した。残りの5変異株では著しい差は認められなかった。

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 plasmid の現象が見られ、plasmid 切断誘導能評価試験では、新規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. 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 は CD8⁺ 細胞において最も増加し、6ヶ月後では CD4⁺ 細胞において最も増加した。

4. らい菌感染樹状細胞のエキソソームは、T細胞刺激し IFN γ が検出された。また、らい菌抗原が検出され、含有 miRNA は、miR-373 の発現が高かった。

5. 組換え蛋白のブースターワクチンとしてのらい菌増殖抑制能を評価した。BCG-DHTM の単独投与のみで、らい菌増殖は抑制されたが、組換え蛋白投与によるらい菌増殖抑制能の増強は観察されなかった。

6. 改変 BCG の構築

3種の promoter により組込み型 BCG を作製した。抗原発現量は plasmid 発現に劣らないものであったが、90日の培養により、発現量の低下が認められた。

カニクイザルらい菌感染系の構築

母仔群4頭にらい菌遺伝子が、鼻腔洗

浄液に検出された。

分離継代株の検証

分離・継代 27株の *rpoT* 遺伝子、16s rRNA 遺伝子共に *M. leprae* 特異的塩基配列を示し、*M. lepromatosis* ではないことが示された。

7. ハンセン病講習会を実施した。回復者のため、「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。2013年は3名の新規ハンセン病患者がいた。ブルーリ潰瘍について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. らい菌を含む抗酸菌では、他細菌類とは異なるアミノ酸代謝系が存在し、両遺伝子がこれらの主要部分を担っている可能性を示した。過酷な栄養環境が考えられる宿主細胞内で、主要な栄養源であるアミノ酸を代謝・利用する能力は、病原性と何らかの関連性が推測された。

2. 評価に供した新規キノロンは SIT に次ぐ強い活性を示した。一方、*S. enterica*、ならびに *C. jejuni* の DNA ジャイレースに対する新規キノロンの阻害効果は、SIT のそれよりも低く、LVX ならびに CIP と同等であったが、十分使用に堪えうるものと考えられた。

3. 再発例の免疫反応の変化は、今後同様の症例の蓄積により貴重な参考資料になりうると思われた。少菌型、多菌型、正常対照群いずれもさらに症例数を増やしての検討が必要と思われた。

4. らい菌感染樹状細胞から放出される

エキソソームには特有の miRNA の発現が高くハンセン病状悪化に繋がる可能性は高い。今後再現性の高い miRNA プロファイリングを行って行く。

5. 組換え蛋白投与による BCG-DHTM のらい菌増殖抑制能を増強することは残念ながらできなかった。今後リコンビナント蛋白の組成・投与時期・投与量など検討する予定である。

6. 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、各種クローンを得た。蛋白発現量はこれまで効果のあった plasmid 発現組換え BCG より多いものであったが、安定性に欠けることが判明した。今後、2 番手の強さを持つクローンによりワクチン能解析を進めていく。

カニクイザルらい菌感染系の構築

母仔サル接種系で4頭に PCR 陽性の個体が認められた。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。

分離継代株の検証

M. lepromatosis は *M. leprae* と高い遺伝子の相同性を有す。ハンセン病研究センターでは 27 株のらい菌株を確立し、各種実験に用いてきた。これらの *M. lepromatosis* との異同を明らかにするため 16s rRNA 遺伝子及び *rpoT* 遺伝子解析しその結果分離株は *M. leprae* と同定され、使用に問題ないことが示された。

7. ハンセン病患者の診療機会が一度もない皮膚科医が大多数を占めるため、講習会を開催し、意識向上に努めた。学習意欲を持続のため、年に一回程度継続し

た教育機会を設ける必要がある。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、それに近づけるため、ホームページ上に医療機関名・医師名をひき続き掲載した。2013 年は 3 名の新規患者が登録された。日本人とネパール人、ブラジル人が各 1 名であった。

E. 結論

1. らい菌の偽遺伝子にアミノ酸代謝の形成に関与している可能性のある遺伝子を同定した。

2. 新規キノロンは多剤耐性ハンセン病治療に有効であるものと考えられた。

3. ハンセン病の再燃・再発は、MMP-II 血清抗体価測定および細胞性免疫能の経時観察により早期診断可能と考えられた。

4. LipoK 添加らい菌感染樹状細胞のエキソソームは生体防御に重要な役割を果たすと考えられた。

5. 発症予防用ブースターワクチン開発のため、リコンビナント蛋白の T 細胞活性化能及びらい菌増殖抑制能を検討した。本リコンビナント BCG は、らい菌抑制上は十分な効果が観察されなかった。

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。菌接種サルにおいて接種後早期に母仔群サルに菌排泄を認めた。当センターにおいて *M. leprae* とした菌株は全て *M. leprae* であった。

7. ハンセン病診療ネットワーク作り、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への働きかけを引き続き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) Nakajima C, Tamaru A, Rahim Z, Poudel A, Maharjan B, Aye KS, Ling H, Hattori T, Iwamoto T, Fukushima Y, Suzuki H, Suzuki Y, Matsuba T. (2013) A simple multiplex PCR for the identification of Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* with a lineage-specific mutation in Rv0679c. J. Clin. Microbiol. 51(7): 2025-2032
- 2) Phetsuksiri B, Rudeeaneksin J, Srisungngam S, Bunchoo S, Roienthong D, Mukai T, Nakajima C, Hamada S, Suzuki Y. (2013) Applicability of in-house loop-mediated isothermal amplification for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex grown on solid media. Jpn. J. Infect. Dis. 66 (3):249-251.
- 3) Poudel A, Maharjan B, Nakajima C, Fukushima Y, Pandey BD, Beneke A, Suzuki Y. (2013) Characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Nepal. Tuberculosis 93(1):84-88
- 4) Mukai T, Y. Tsukamoto, Y. Maeda, T. Tamura, and M. Makino. 2013. Efficient Activation of Human T Cells of Both CD4 and CD8 Subsets by Urease Deficient -Recombinant BCG that Produced Heat Shock Protein 70- *Mycobacterium tuberculosis* -Derived Major Membrane Protein-II Fusion Protein. Clin. Vaccine

Immunol., *in press*.

- 5) Wang, H., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and M. Makino. 2013. An in vitro model of *Mycobacterium leprae* induced granuloma formation. BMC Infectious Diseases, 13: 279.
- 6) Kai, M., N. Nakata, M. Matsuoka, T. Sekizuka, M. Kuroda, and M. Makino. 2013. Characteristic mutations found in the ML0411 gene of *Mycobacterium leprae* isolated in Northeast Asian countries. Infection, Genetics and Evolution, 19: 200-204.
- 7) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. R. Yotsu, M. Makino, and N. Ishii. 2013. Laboratory procedures for the detection and identification of cutaneous non- tuberculous mycobacterial infections. J. dermatol., 40: 151-159.
- 8) Nakanaga, K., R. R. Yotsu, Y. Hoshino, K. Suzuki, M. Makino, and N. Ishii. 2013. Buruli ulcer and Mycolactone -producing mycobacteria. Jpn. J. Infect. Dis., 66: 83-88.
- 9) 石井則久、四津里英：ハンセン病。誤診されている皮膚疾患（宮地良樹編集），p80-83，メディカルレビュー社（東京），2013年。
- 10) Otsuka A, Ozaki M, Horiguchi Y, Murata Y, Kumano K, Nogami R, Goto M, Walls AF, Ishii N, Miyachi Y, Kabashima K: Basophils Infiltrate the Skin Lesions in Lepromatous Leprosy. Acta Derm Venereol 93: 88-89, 2013.
- 11) 四津里英、石井則久：肉芽腫症とし

- てのハンセン病の病態と臨床. MB Derma 204: 67-73, 2013.
- 12) 常深祐一郎、石井則久：抗酸菌感染症. MB Derma 206: 27-37, 2013.
- 13) 石井則久：ハンセン病. 内科学書改訂第8版(小川 聡総編集), p74-75, 中山書店(東京), 2013.
- 14) 後藤正道、野上玲子、岡野美子、儀同政一、四津里英、石田 裕、北島信一、甲斐雅規、石井則久、尾崎元昭、畑野研太郎:ハンセン病治療指針(第3版). 日本ハンセン病学会雑誌 82: 143-184, 2013.
2. 学会発表
- 1) Nakajima C, Tamaru A, Rahim Z, Poudel A, Maharjan B, Khin Saw Aye, Suzuki Y. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Asian Countries. Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. Aug 17 – 18, 2013, Sapporo, Japan
- 2) Khin Saw Aye, Aye Aye Win, Win Le May, Min Thein, Nakajima C, Suzuki Y. Application of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis of Extra-Pulmonary Tuberculosis. Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. Aug 17–18, 2013, Sapporo, Japan
- 3) Maharjan B, Shrestha B, Beneke A, Suzuki Y. Nakajima C, Paudel A. Evaluation of Genotype MTBDRsl for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides. Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. Aug 17–18, 2013, Sapporo, Japan
- 4) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Makino. Enhancing effect of Peptide- 25 on the induction of functional activation of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 5) Shimohakamada, Y., T. Tamura, M. Makino, and S. L. Nutt. The role of follicular helper T cell in mycobacterial infection. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 6) Tsukamoto, Y., Y. Maede, T. Tamura, T. Mukai, and M. Makino. Development of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG for the inhibition of *M. tuberculosis* multiplication in lung. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 7) Mukai, T., Y. Miyamoto, M. Matsuoka, Y. Maeda, and M. Makino. Construction of stable recombinant BCG which secretes HSP70-MMP-II fusion protein by chromosomal integration of the gene for leprosy vaccine. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 8) Maeda, Y., T. Tamura, T. Mukai, Y.

- Fukutomi, and M. Makino. Exosomes derived from *Mycobacterium leprae* infected dendritic cells stimulated with a lipopeptide participate in intercellular communication. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 9) Miyamoto, Y., T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Biosynthetic characterization of glucuronic acid-containing glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 10) Makino, M. Novel vaccine development against leprosy. 18th International Leprosy Congress, 16th-19th September, 2013, Brussels, Belgium.
- 11) Maeda Y., Mukai T., Fukutomi Y, Tmaura T and M. Makino. Exosomes released from *Mycobacterium leprae* infected human dendritic cells can activate T cells. 18th International Leprosy Congress, 16th-19th September, 2013, Brussels, Belgium.
- 12) Y. Miyamoto, M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda and M. Makino. Metabolome analysis of *Mycobacterium leprae*. 18th International Leprosy Congress, 16th-19th September, 2013. Brusseru Belgium.
- 13) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Makino. The role of *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein in the induction of Th1 immune response. 15th International Congress of Immunology. August, 2013. Milano, Italy.
- 14) Ishii N: History of Hansen's disease in Japan. 1st International Hansen Forum, Sorokdo, Korea, Sep 2013.
- 15) Suzuki Y., Yokoyama K, Kim H, Nakajima C. Genetic background of the DNA gyrase in quinolone resistance. The 1st Korea-Japan Leprosy Meeting. Nov 15 – 16, 2013, Seoul, Korea.
- 16) 甲斐雅規, 中田 登, 松岡正典, 関塚剛史, 黒田 誠, 牧野正彦. SNPs 解析により示されたらい菌日本株ゲノムの特徴. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 17) 向井 徹, 宮本友司, 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 組換えらい菌株構築への基礎的検討. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 18) 牧野正彦. 結核ワクチン作製の試み. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 19) 田村敏生, 下袴田陽子, 牧野正彦. 新たな結核・ハンセン病ワクチン開発に向けて—Th1 分化誘導型ペプチドによる細胞障害性記憶 T 細胞の分化誘導機構の解析—. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 20) 福富康夫, 前田百美, 松岡正典, 牧野正彦. 蛍光色素を利用したマクロフ

- ァージの抗らい菌活性発現機構の解明. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 21) 下袴田陽子, 田村敏生, Stephan Nutt, 牧野正彦. 抗酸菌感染における濾胞ヘルパーT 細胞の動態. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 22) 鮫島朝之, 前田百美, 後藤正道, 牧野正彦. 皮疹の出現前後に MMP-II 血清抗体価の変化が観察できたハンセン病少菌型の 1 例. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 23) 宮本友司, 松岡正典, 福富康夫, 向井 徹, 甲斐雅規, 前田百美, 牧野正彦. *Mycobacterium leprae* のメタボローム解析. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 24) 鈴木幸一, 谷川和也, Yang Degang, 赤間 剛, 川島 晃, 石藤雄子, 牧野正彦, 石井則久. らい菌感染マクロファージ内の脂質維持機構とクロファジンによる阻害. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 25) 前田百美, 向井 徹, 福富康夫, 田村敏生, 牧野正彦. らい菌感染樹状細胞が細胞外放出するエキソソームを構成するタンパクの分析. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 26) 石井則久, 熊野公子, 野上玲子, 畑野研太郎, 細川 篤, 四津里英: 2012 年のハンセン病新規患者発生状況. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会(さいたま), 2013 年 5 月.
- 27) 後藤正道, 野上玲子, 岡野美子, 儀同政一, 石田 裕, 四津里英, 北島信一, 甲斐雅規, 石井則久, 尾崎元昭, 畑野研太郎: ハンセン病治療指針の改定(第 3 版)について. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会(さいたま), 2013 年 5 月.
- 28) 太田貴洋, 伊藤博之, 高橋喜久子, 石井則久, 朝戸 裕: 全国ハンセン病療養所における慢性疼痛に対する薬剤の 2 年間の使用状況. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会(さいたま), 2013 年 5 月.
- 29) 抗酸菌におけるアミノ酸生合成・代謝解析. 宮本友司, 向井徹, 牧野正彦. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 東京
- 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)

らい菌の特性に関する研究

平成25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 ハンセン病を引き起こすらい菌は、他の細菌や抗酸菌属とは異なる様々な特性を持つ。中でも代表的な特性の一つである代謝系については、未解明な点が多い。本研究では、らい菌のアミノ酸代謝に注目し、そのメカニズム及び病原性との関わりを解明することを目的とした。らい菌において偽遺伝子化つまり変異しているアミノ酸代謝遺伝子群のホモログ遺伝子群の一部を他の抗酸菌で同様に変異させ、それらのアミノ酸を解析した。その結果、一部の変異株のアミノ酸含有量が野生株と比べ変化しており、偽遺伝子化がらい菌のアミノ酸代謝形成と関連していることが示唆された。

A. 研究目的

ハンセン病は、抗酸菌の一種であるらい菌 (*Mycobacterium leprae*) によって引き起こされる慢性感染症であり、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。ハンセン病の主な病態である末梢神経障害や組織障害等は、他の抗酸菌には見られないものであり、らい菌が長期間にわたり慢性的に生存・増殖することで引き起こされる。一方、らい菌は、生体内で分裂増殖するが、人工的な条件下では培養は不可能である。このような代謝と結び付くらい菌の特性は、慢性的な宿主内での生存・増殖を可能にする一因であると考えられる。さらに、これらの代謝を制御することは、新たなハンセン病治療薬の開発へと繋がる可能性がある。しかしながら、その機構については未解明な部分が多い。本研究では、らい菌の生存や分裂増殖と関わる基礎代謝系の中でアミノ酸代謝に焦点を当

て、その機構及び病態との関わりを解明することを目的とした。

B. 研究方法

らい菌は、ゲノム上に他の細菌に比べ極めて多くの偽遺伝子（変異）を持つ。主要な代謝系の一つであるアミノ酸代謝についても、関与が予測される一部の遺伝子群が偽遺伝子化した状態で存在している。一方、らい菌菌体内のアミノ酸含有量が他の抗酸菌に比べ高いことも明らかになっており、この現象は上記の変異が引き起こしている可能性もある。そこで、結核菌等を含む他の抗酸菌では機能しているが、らい菌では変異しているアミノ酸代謝関連遺伝子に注目し、これらのホモログ遺伝子を *M. smegmatis* で破壊し、各変異株のアミノ酸含有量を解析した。7つ標的遺伝子 (MSMEG_1574, MSMEG_2035, MSMEG_4717, MSMEG_5119, MSMEG_1496, MSMEG_1898, MSMEG_5725) について、それぞれに隣接する上流及

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* mc² 155 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代わった株を選抜した。メタボローム解析に使用する菌体は、7H9+ADC 培地で 28 時間、37°C で振とう培養し 3.5×10^9 の菌数を得た。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って、イオン性化合物としてアミノ酸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高分子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、内部標準物質に対する検出量の比率からサンプル中に含まれるアミノ酸量を算出した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

らい菌で偽遺伝子化し、*M. smegmatis* で機能している 7 つのホモログ遺伝子について、それぞれを破壊した変異株を作製した。PCR によって標的遺伝子の上下流領域を含む形で増幅した結果、7 つ株全てで標的遺伝子がハイグロマイシン耐性遺伝子で入れ代わっており、変異株であることを確認した。各変異株及び野生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、全ての株から 18 種の主要アミノ酸が検出された。図に示したように、各変異株のアミノ酸含有量を野生株と比較した結果、MSMEG_2035 変異株でグルタミン、プロリン、イソロイシン、リジン、ロイシンが、MSMEG_5119 変異株でグルタミン及びプロリンが 2 倍以上有意に減少していた。一方、ロイシン及びヒスチジンが MSMEG_5119 変異株で 2 倍以上有意に増加していた。残りの 5 変異株の各アミノ酸含有量を野生株と比較した結果、著しい差は認められなかった。

D. 考察

らい菌のアミノ酸代謝に注目し、解析を進める中、本年度は、*M. smegmatis* で 7 つの遺伝子変異株を作製した。これらのメタボローム解析を行った結果、MSMEG_2035 と MSMEG_5119 遺伝子の両変異株において、複数のアミノ酸含有量が野生株と大きく異なっていることが判明した。このことは、両遺伝子がアミノ酸代謝に強い影響を及ぼしていることを示している。酵素学的には MSMEG_2035 遺伝子が、amine oxidase を、MSMEG_5119 が 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase をそれぞれコードしている。真核生物や他の細菌類では、両酵素は複数のアミノ酸代謝で主要経路ではなく補完的な経路を担うことが知られている。しかし、本研究で得られた結果は、らい菌を含む抗酸菌では、他細菌類とは異なるアミノ酸代謝系が存在し、両遺伝子がこれらの主要部分を担っている可能性を示すものである。最終的にこれらの機能や新たな経路の存在を証明するには、アミノ酸代謝の中間体を利用した酵素活性の測定や基質の特定等を行う必要がある。

らい菌では、多くのアミノ酸類で含有量が他の抗酸菌に比べ高くなる傾向が観察されるが、両遺伝子変異株では一部のアミノ酸のみで含有量が増加していた。アミノ酸代謝系に関わる偽遺伝子群はゲノム上に 20~30 種あり、らい菌ではこれらが全て変異した状態であることから、単独の変異をそれぞれ保持する両株はらい菌のアミノ酸代謝系を十分に反映しているとは言いがたい。これを完全な形に近いものにするには、全ての偽遺伝子を変異として多重的に保持する株を作製する必要がある。今回、偽遺伝子に相当するホモログ遺伝子を単独に変異させた場合でも、一部のアミノ酸類に変化が生じたことは、取得した二つの変異株において、らい菌アミノ酸代謝の一端が形成された可能性がある。このことは、偽遺伝子化というゲノム上の特性が代謝を含む様々ならい菌の表現型を生み出す要因になっていることを示す一例であるといえる。過酷な栄養環境が考えられる宿主細胞内で、主要な栄養源であるアミノ酸を代謝・利用する能力は、病原性と何らかの関連性が推測されるが、その詳細は不明である。今後は、アミノ酸に変化が生じた変異株の細胞内寄生性等を評価することで、その代謝が病原性に与える影響の解明を目指す。

E. 結論

らい菌で偽遺伝子化しているアミノ酸代謝遺伝子群のホモログ遺伝子群の一部を *M. smegmatis* で変異させた。その結果、一部の変異株のアミノ酸量が野生株と異なっていることが判明し、当該偽遺伝子がらい菌アミノ酸代謝の形成に関与している可能性が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
 - 1) *Mycobacterium leprae* のメタボローム解析. 宮本友司, 松岡正典, 福富康夫, 向井 徹, 甲斐雅規, 前田百美, 牧野正彦. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013年5月 大宮
 - 2) 組換えらい菌株構築への基礎的検討. 向井 徹, 宮本友司, 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013年5月 大宮
 - 3) Biosynthetic characterization of glucuronic acid-containing glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. Y. Miyamoto, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda and M. Makino. Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 2013. August, Spporo
 - 4) Construction of stable recombinant BCG which secretes HSP70-MMP II fusion protein by chromosomal integration of the gene for leprosy vaccine development. T. Mukai, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, Y. Maeda and M. Makino. Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 2013. August, Spporo
 - 5) Metabolome analysis of *Mycobacterium leprae*. Y. Miyamoto, M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda and M. Makino. 18th International Leprosy Congress, 2013. September,

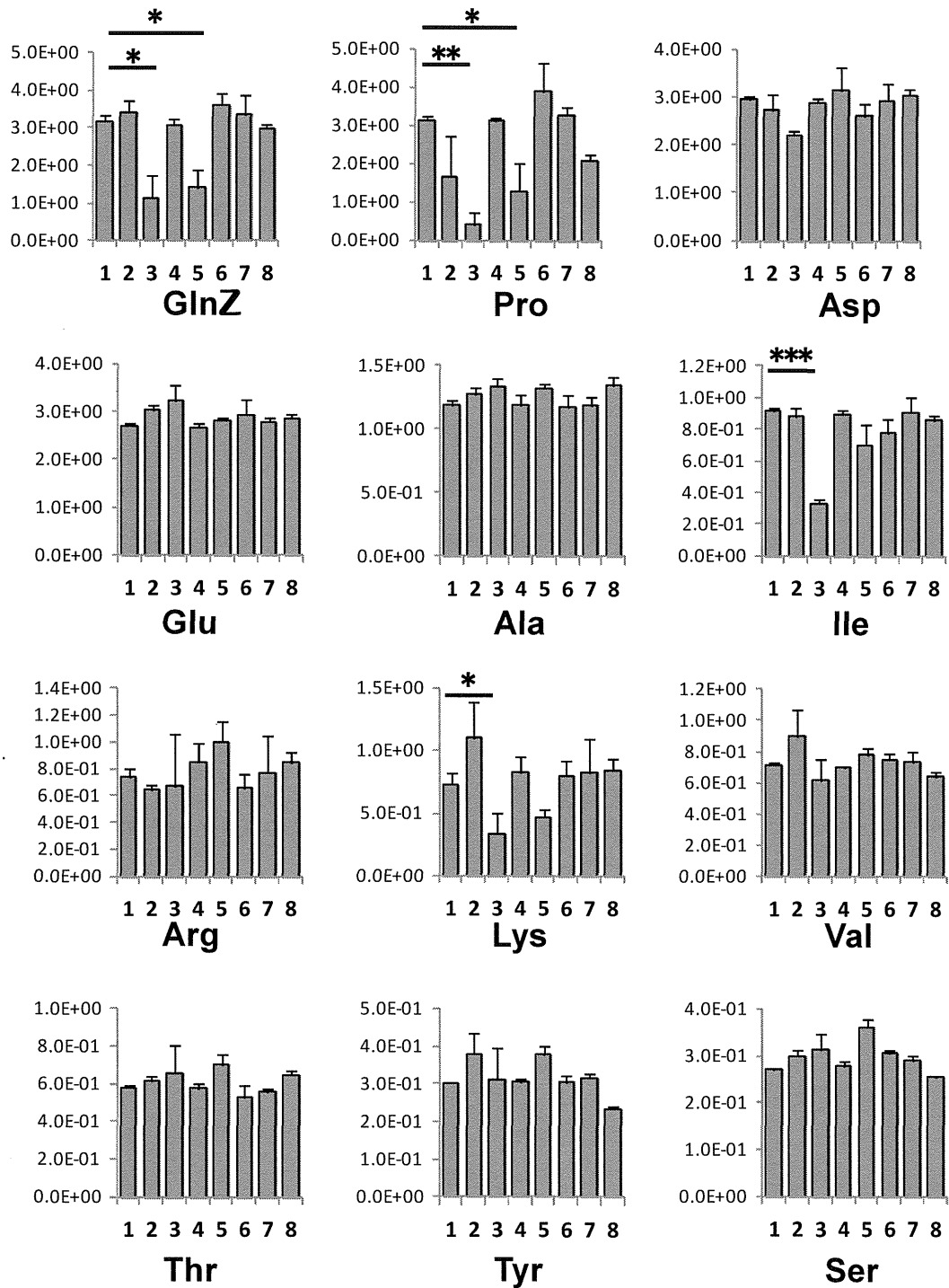
Brusseru

6) 抗酸菌におけるアミノ酸生合成・代謝解析. 宮本友司、向井徹、牧野正彦. 第87回日本細菌学会総会、2014年3月 東京

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：野生株及び変異株におけるアミノ酸含有量

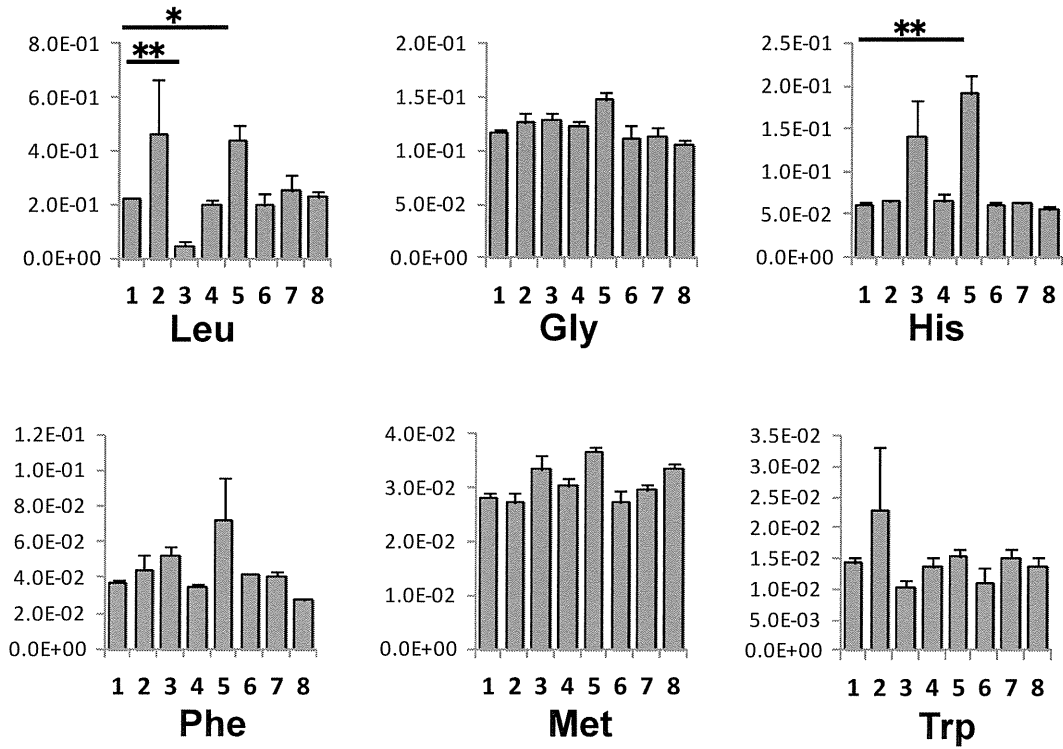


* P < 0.05
 ** P < 0.01
 *** P < 0.001

1: mc²155 (野生株)
 2: MSMEG_1574 変異株
 3: MSMEG_2035 変異株
 4: MSMEG_4717 変異株

5: MSMEG_5119 変異株
 6: MSMEG_1496 変異株
 7: MSMEG_1898 変異株
 8: MSMEG_5725 変異株

図：野生株及び変異株におけるアミノ酸含有量



* P < 0.05
 ** P < 0.01
 *** P < 0.001

1: mc²155 (野生株)
 2: MSMEG_1574 変異株
 3: MSMEG_2035 変異株
 4: MSMEG_4717 変異株

5: MSMEG_5119 変異株
 6: MSMEG_1496 変異株
 7: MSMEG_1898 変異株
 8: MSMEG_5725 変異株

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25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)