

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(3年間のまとめ)

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研究を実施した。台湾のハンセン病患者血清を用い、らい菌由来抗原 MMP-I 及び MMP-II の血清診断を行った結果、従来法で用いている PGL-I 抗原での結果よりもいい成績を得た。らい菌の薬剤耐性に関する研究では 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。検出した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。さらに、らい菌の薬剤耐性の検出に新しい簡易遺伝子変異検出法 (Hp-rPCR 法) を検討した。

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症数は約 20 万人を数え、最近では新患発生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国も多いが、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。そこで第3にその変異が実際に耐性をもたらすということを確認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入れ、その薬剤に対する影響をみた。第4に耐性変異の迅速検出法を開発し検討を加えた。以上の協力研究を通じ、日台での技術共有を目指した。

B. 研究方法

精製したら い菌膜タンパク抗原 Major membrane protein-I (MMP-I)と MMP-II のハンセン病患者血清との反応性を ELISA 法で確認後、精製を行った。その精製抗原を用い、台湾のハンセン病患者血清 98 検体について ELISA 試験を行った。本血清は台湾市郊外にある元ハンセン病療養所を持つ病院、楽生療養院が保存している患者血清である。特異性や感度あるいは病型、臨床症状との相関性について解析した。

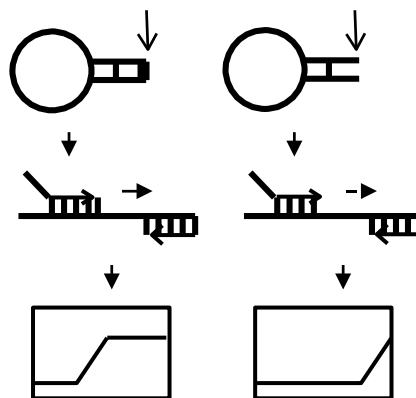
抗らい菌薬のダブソン、リファンピシン及びオフロキサシンに対する薬剤耐性を惹起する遺伝子変異は、*folP1*、*rpoB* そして *gyrA* 遺伝子で、その耐性とかかわる遺伝子変異が集中する領域を Drug Resistance Determining Region (DRDR)と呼ぶ。台湾で得た 13 検体を用いて DRDR における変異を検出を試みた。ハンセン病患者由来の生検材料は台湾 CDC が収集し DNA 抽出を行い、その一部を分与された。DNA から各遺伝子を個別に PCR 増幅し、DRDR における変異の有無を直接シーケンスすることにより検出した。

変異と耐性の相関を明らかとする実験では、台湾サンプルで検出された *folP1* 遺伝子の変異を試験した。まず、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 7H10 培地を用いて試験した。

耐性変異の迅速検出のために今回用いた方法は結核菌の薬剤耐性変異検出のために以前報告された方法で、リアルタイム PCR 法を一部改変した方法を用いている。PCR 産物である 2 本鎖 DNA がサイバークリーンで蛍光標識される反応系を用い、ABI の Step One Plus を用いて測定を行った。Forward Primer はそれ自身が構造的にヘアピンを形成するような配列にするのが特徴である。Reverse Primer は通常の PCR に使用するような配列にする。Forward Primer の 3' 末端の塩基が変異の有無

を調べる標的部位にくるように設計する。その標的部位の塩基が 4 種の塩基 G, A, T, C のいずれかを知るために、その 3' 末端が異なる 4 つの塩基となる 4 つの Forward Primer を作成する。ここでは本法を Hp-rPCR (Hairpin primer real time PCR)法と呼ぶ(図 1)。それぞれを Reverse Primer と PCR を行い、いずれの PCR がもっとも効率良く PCR 産物を産生するかを見ることでサンプルの持つその標的部位の塩基を決定し変異の有無を判定するものである。

図 1 Hp-rPCR(Hairpin-primer realtime PCR)法



(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 台湾のハンセン病患者由来血清サンプル 98

検体の ELISA を 3 種の抗原を用いて行った。カットオフ値は我々が保存している陽性血清コントロールの値の 10%とし、それ以上の値を示すものを陽性とした。その結果、表 1 のように従来法で用いられる抗原 PGL-1 で 62% 陽性であるのに対し、MMP-II で 87%と高

い陽性率を示した。また、新しく調整した抗原 MMP-I では 91%と最も高い陽性率を示した。

表 1

Antigen	No. of positive	No of sera	Positive rate
PGL-I	61	98	62%
MMP-II	85	98	87%
MMP-I	89	98	91%

台湾で採取及び DNA 抽出された 13 検体について薬剤耐性変異を調べた。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、リファンピシン耐性の *rpoB* 遺伝子 4 カ所(441 位、451 位、456 位、458 位)及びキノロン耐性の *gyrA* 遺伝子 2 カ所(89 位、91 位)の変異の有無を検出した。

表 2

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

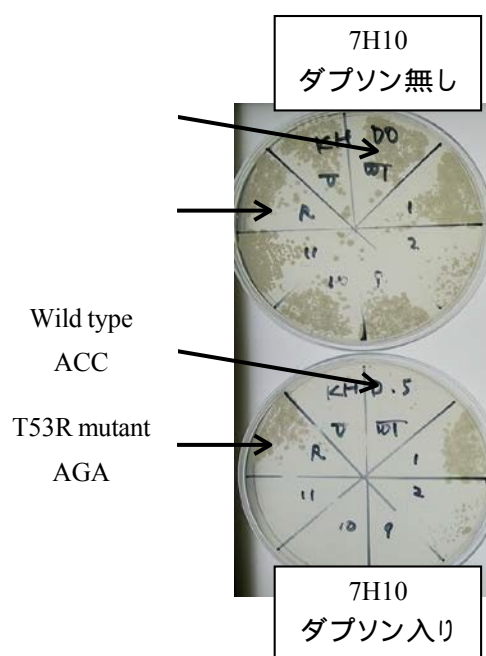
NA: not amplify, NR: could not read

13 検体を用い、9 検体の結果を得た(表 2)、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。NTU012 の変異は再現性がなく、次の実験では対象外とした。

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 *folP* 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 2 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すことが示された。

図 2. 組換え *M. smegmatis* を用いた薬剤感受性試験

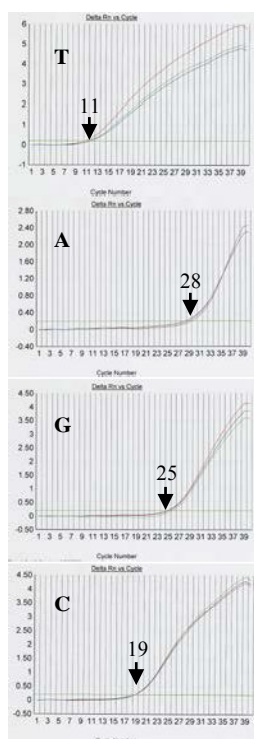


薬剤耐性変異の多数迅速同時検出において図 3 は Zensho-2 の *folP1* 遺伝子 55 位コドンの 2 番目の塩基を標的とした Hp-rPCR 法を示した。Forward プライマーの 3' 末端が T のプライマーの Ct 値が最も小さいことから Zensho-2 の *folP1* 遺伝子 55 位のコドンは CTC であり、ダブソン耐性変異であることが確認できた。同様に Thai-53 を用いて行った *folP1* 遺伝子 3 カ所の結果は 53 位の 1 番目の塩基は A、2 番目は C、そして 55 位の 2 番目が C であり、確かに感受性菌での配列であることが確認できた。*rpoB* 及び *gyrA* の結果は示していないが、いずれも本法により標的部位の塩基の判定ができた。

次に前述の表 2 にあるように耐性変異を示した NTU004 を用い、本法を試みた。最初は

臨床検体から得た DNA であることから非常に DNA が少なくクリアな結果が得られなかったため、マルチプレックス PCR 法を行い、その後 Hp-rPCR 法を行うこととした。その結果、クリアな結果を得ることができた。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 塩基に変異が生じていたことはこれまでに確認されている。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。

図3. *folP1* 遺伝子 55 位のコドン 2 番目の塩基 c の変異を持つらい菌 Zensho-2



数字は Ct 値

D. 考察

血清診断試験では、従来法に使用する PGL-I での値に比べ MMP-II はより高い陽性率であり、他の東南アジア諸国で得られた結果とほぼ同様であった。血清の少菌型、多菌型の区別がわからないので従来法より少菌型が高い値を示したかどうかはまだ判定できないが、いい結果が期待できるだろう。MMP-II よりいい結果を MMP-I が示したことは大変興味深く、また期待もできそうであるが、結核患者や健康人のデータを揃え特異度を検討し、今

後正確な評価をする必要がある。

13 検体中、明らかなダブソン耐性変異が NTU004 で検出された。こ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。

Hp-rPCR 法が標的である 9 カ所の変異の有無を確実に判定できることを、コントロールの菌においても臨床由来の菌においても可能であることが明らかとなった。DNA 回収が非常に悪いことが多い臨床検体においてもマルチプレックス PCR 法との併用により非常に高感度に判定することができた。マルチプレックス PCR 法と Hp-rPCR 法を併用した場合に要した時間は DNA 抽出から判定までで、約 5 時間であり、迅速性についても良好な結果だったと考えられる。NTU004 の持つ ACC から AGA の変異はトレオニンからアルギニンの変異であるが、Hp-rPCR 法で判定されるのは 2 番目の C が G であっただけであることになり、その場合アミノ酸の変異はトレオニンからセリンへの変異になる。この場合の変異と耐性の関係は証明されていないので、厳密には判定に間違いを冒す可能性があることになる。これは今後の課題である。

E. 結論 台湾ハンセン病患者血清を用い、血清診断

法の評価を行った結果、従来法で用いている PGL-I 抗原での結果よりも MMP-II 及び MMP-I でより好成績を得た。今後、健康人及びらい菌と同じ抗酸菌である結核菌による感染で生じる結核患者の血清を用いて、本法のハンセン病血清診断法としての特異度・感度を測定する予定である。

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。

Hp-rPCR 法をらい菌の耐性変異検出のために利用することが可能であることが証明出来た。マルチプレックス PCR 法との併用で迅速・簡便に多数標的箇所の同時判定ができた。

上記、結果を台湾のパートナーと共有し、使用した様々な技術に関しても共有することができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Khin S. A., Matsuoka M, Kai M., Kyaw K., Win A. A., Shwe M. M., Thein M., Htoo M. M., & Htoon M. T. FTA Card Utility for PCR Detection of *Mycobacterium leprae*. Jpn J Infect Dis. Vol. 64: 246-248, 2011.
 - 2) Nakata N., Kai M., Makino M. Amino acid substitutions at position 95 in GyrA can add fluoroquinolone resistance to *Mycobacterium leprae*. Antimicrobial Agent Chemother. Doi:10.1128/AAC.05831-11, 2012
 - 3) Li W., Matsuoka M., Kai M., Thapa P., Khadge S., Hagge D. A., Brennan P. J., Vissa V. Real-time PCR and high resolution melt analysis for rapid detection of *Mycobacterium leprae* drug resistance mutations and strain types. J Clin Microbiol. Vol. 50: 742-753, 2011
 - 4) Kai M., Nakata N, Matsuoka M, Sekizuka T, Kuroda M, Makino M. Characteristic mutations found in the ML0411 gene of *Mycobacterium leprae* isolated in Northeast Asian countries. Infection, Genetics and Evolution Vol. 19, 200-204, 2013.
 - 5) 甲斐雅規. Hp-rPCR 法を用いたらい菌薬剤耐性変異の検出. 日本ハンセン病学会雑誌. 2014 年 (in press)
- ### 2. 学会発表
- 1) 甲斐雅規, 松岡正典, 宮本友司, 中田登, 牧野正彦: 増殖能の異なるらい菌株間のゲノム比較解析. 第 83 回日本ハンセン病学会総会, 岡山市, 2011 年 5 月
 - 2) Amako, K., K. Iida, M. Kai, M. Matsuoka, and S. Yoshida. *In vitro* cultivation of *Mycobacterium leprae* in microaerophilic or anaerobic conditions. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 3) Kai, M., H. Yamada, N. Fujiwara, S. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, and M. Makino. Establishment and characterization of knockout mutants of *Mycobacterium bovis* BCG gene involved in mycolic acid synthesis pathway. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 4) Nakata, N., M. Matsuoka, M. Makino, and M. Kai. Whole genome comparison of *Mycobacterium leprae* strains differing in growth rate. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 5) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Characterization of intracellular metabolites from *Mycobacterium leprae*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 6) Maeda, Y., T. Tamura, M. Kai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Induction of intracellular killing of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells by a lipopeptide-mediated activation of T cells. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 7) Tsukamoto, Y., E. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. Activation of human naïve T cells of both CD4 and CD8 subsets by *Mycobacterium tuberculosis* major membrane protein II. XIII International Congress of Bacteriology

- and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 8) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae* *rpoB* gene and rifampicin resistance. 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 17-20 September, 2011, Chicago, USA.
 - 9) 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. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 10) 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. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 11) 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
 - 12) M. Kai, Y. Maeda, M. Makino. Molecular Studies on *M. leprae* and Ser-diagnosis of Leprosy. The 9th 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.
 - 13) P. S. Rosa, S. M. Diório, A. F. F. Belone, I. M.F.D. Baptista, P. N. Suffys, L. R V Fachin, L. M. Trino, B. G. C. Sartori, L. R. De Lamano, M. I. de Araujo, W. F. B. Delanina, F. B. Marques, S. Ura, C. T. Soares, M. B. Xavier, M. T. Mira, M. O. Moraes, M. Matsuoka, M. Kai, M. C. L. Virmond. Evidence of active transmission of drug resistant *Mycobacterium leprae* strain in Brazil. 18th International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
 - 14) Y. Miyamoto, M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Metabolome analysis of *Mycobacterium leprae*. 18th International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
 - 15) N. Nakata, M. Kai, and M. Makino. Mutation analysis of *Mycobacterium leprae* genes and drug resistance using cultivable mycobacteria. 18th International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
 - 16) Kai M, N. Nakata^a, G. T. Chae^b, P. Saunderson^c, A. A. Maghanoy^c, M. F. Balagon^c, M. Matsuoka^a, T. Sekizuka^d, M. Kuroda^d, and M. Makino. Characteristic SNPs in *Mycobacterium leprae* isolated in Japan. 18th International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
 - 17) 天児和暢, 飯田健一郎, 斉藤光正, 甲斐雅規, 松岡正典, 吉田真一:ライ菌の培養、マウス組織抽出物・ヒト血漿の効果。第 86 回日本ハンセン病学会総会、大宮市、2013 年 5 月
 - 18) 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、大宮市、2013 年 5 月
 - 19) 中田登, 甲斐雅規: 培養可能抗酸菌を用いたらい菌薬剤耐性変異解析法のフルオロキノロン耐性変異解析への応用。第 86 回日本ハンセン病学会総会、大宮市、2013 年 5 月
 - 20) 甲斐雅規、中田登、松岡正典、関塚剛史、黒田 誠、牧野正彦: SNPs の解析により

示された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、大宮市、2013
年5月

- 21) M. Kai, Y. Maeda, M. Makino. Molecular
detection of drug resistant *M. leprae* and
genotyping of *M. leprae*. The 10th Japan-
Taiwan Symposium on Vaccine Preventable
Diseases and Vector-Borne Diseases &
Cooperative Project Reports. Tokyo, Sep. 12-
13. 2013

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

- 1) 著者名 Kai M. 編集・分担執筆
Edited by Makino, M., M. Matsuoka,
M. Gotoh, and K. Hatano.
書名 Leprosy chapter 9 Serology.
Tokai University Press, Kanagawa,
Japan Total page 274 (partial page
108-115) 2011