

201420018A

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 向井 徹

平成27(2015)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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 向井 徹

平成27(2015)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----- 13

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----- 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----- 49

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

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

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26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）
（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
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。しかし、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、他の抗酸菌と異なる代謝機構特性を保持することが判明し、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、キノロン耐性ハンセン病の迅速感受性試験法開発には GyrA-Asp95Gly ならびに GyrA-Gly89Cys を付与する遺伝子変異の検出が必要十分条件であることを示した。再燃・再発に関する研究では、細胞性免疫細胞の解析が再燃・再発を予想できる可能性を示し、免疫療法の開発では、感染細胞エキソソームは抗原提示能を有し、新たな発想による新規免疫療法の開発につながる事が期待された。ハンセン病・結核共通ワクチンの免疫学的評価およびハンセン病ワクチンの開発では、共通ワクチン作製の基本戦略が樹立され、ワクチン候補抗原を安定・安全に分泌する組換え BCG の構築、サル感染症系樹立の可能性を示した。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、ハンセン病回復者の一般医療機関への受診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。

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
バイオリソース部門・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。現状では世界的に毎年の新規登録患者数は横ばいであり、加えて薬剤耐性菌による発症、再発・再燃も年々数を増すなど新たな問題も浮上している。また、わが国では症例数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的と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. らい菌の特性に関する研究

らい菌は、Thai-53 株をヌードマウス足蹠で増殖させ、破砕後、trypsin 処理により菌体を調製した。同様に、比較対照とし菌未接種の足蹠より、組織懸濁液を調製した。*M. bovis* BCG Tokyo 株を trypsin 処理し菌体を調製した。各種サンプルは、菌体内成分を抽出し、脂質成分、蛋白成分の除去を行い、分析用サンプルとした。解析は、capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS)により全ての既知化合物を同定し、検出ピーク面積から半定量化を行った。

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

1) 組換え DNA ジャイレース

らい菌 *gyrA*, *B* 遺伝子を、各々発現ベクター pET により各種変異導入組換え蛋白を発現させ精製した。

2) 組換え DNA ジャイレースの活性

精製 A、B サブユニットにより再構成した DNA ジャイレースを用い、活性評価は、リラックス型プラスミドを基質とし、スーパーコイル型プラスミドへと転換する活性 (スーパーコイル化活性) の定量により行った。

3. 再燃・再発に関する免疫学的診断法の開発

同意の得られた入所者、対照群を対象とした。末梢血単核球細胞を分離し、菌体成分等を添加し、96 時間培養した。上清に産生される各種サイトカインを

ELISA で、細胞内サイトカイン、表面マーカーは、フローサイトメトリーで病型ごとに検討した。

4. 免疫療法の開発

ヒト樹状細胞に、リポペプチドまたはらい菌を添加し、放出されるエキソソームを精製した。T 細胞活性化能の解析を ELISA で、含有蛋白はウエスタンブロット法で、miRNA 解析は 3D-Gene®を用い比較検討を行った。

5. ハンセン病・結核共通ワクチンの免疫学的評価

結核菌由来 MMP-II 遺伝子と BCG 由来の HSP70 遺伝子を結合し、urease operon に遺伝子導入しリコンビナント BCG (BCG-DHTMI)、およびコントロールをヒト樹状細胞に感染させ、様々な T 細胞活性化能を評価した。さらに、マウスによりらい菌増殖抑制能を算出した。

6. ハンセン病ワクチンの開発

1) らい菌抗原発現 BCG 構築と安定性検討

抗酸菌ファージ由来 promoter と BCG HSP70 とらい菌 MMP II 融合蛋白遺伝子を用い、薬剤感受性、ウレアーゼ陰性クローンを選択した。発現安定性検討のため、長期培養を行い経時的にサンプルのウエスタンブロットを行った。

2) カニクイザルのらい菌感染系構築

医薬基盤研究所・霊長類医学研究センターで幼若カニクイザルを 3 群に分け、3 部位へ接種した。また、3 頭の妊娠ザルへ接種後、その出生仔へ鼻腔内・鼻尖へ接種を行った。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。

3) *M. lepromatosis* の疫学調査

メキシコ合衆国西部の病院にて Slit

skin smear を採取し、*rpoT* 遺伝子、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解読し、*M. lepromatosis* あるいは *M. leprae* であるかを同定した。

7. ハンセン病の診療ネットワークと啓発に関する研究

ハンセン病診療に欠けている要素を抽出し、それ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)

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. らい菌の特性に関する研究

らい菌と BCG サンプルを比較した結果、らい菌のみから 109 種、BCG のみから 53 種、さらに、共通として 84 種の化合物が認められた。また、らい菌のみから検出された化合物の 70% は、アミノ酸関連成分であった。量比を比較した

結果、らい菌で顕著に多く検出されたグループはアミノ酸類が顕著に含まれ、BCG で多く検出されたグループはエネルギー代謝関連代謝産物に偏在していた。また、核酸代謝産物群では、らい菌からは 2 及び 3 リン酸化物のほとんどが検出されなかった。

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

1) 組換え DNA ジャイレース

精製した種々の組換え DNA ジャイレースは、その純度が 95% 以上であった。

2) 組換え DNA ジャイレースの活性

種々の組換え DNA ジャイレースのスーパーコイル化活性の評価の結果、どの DNA ジャイレースもリラックス型のプラスミドをスーパーコイル型のプラスミドへと転換する活性を有していたが、時間経過に伴うスーパーコイル化プラスミド DNA の形成量ならびにリラックス型プラスミド DNA の残存量は変異型 DNA ジャイレースごとに異なっていた。

3. 再燃・再発に関する免疫学的診断法の開発

1) IFN- γ の産生量では、少菌型において多菌型より MLC の刺激効果がややあるものと考えられた。PHA の刺激では、いずれの群でも有意差があった。IL-10 の産生は、対照群と少菌型で全刺激に有意な増加がみられた。

2) フローサイトメトリーによる細胞内サイトカイン陽性細胞の割合は、IL-10 陽性細胞について、MMP-II 刺激で少菌型 CD4⁺細胞で有意差がみられた。

3) メモリー細胞などにみられる CD45RO に加え CD4、CD8 の各分子には、少菌型と多菌型の CD45RO 陽性細胞において CD8⁺細胞では、MLC、MMP-II で、明らかに増加するものがあつた。

4) 再発2例、再発疑い1例については、少菌型の1例は、明らかなサイトカインの増加が認められた。多菌型の再発例では、特に著明な増加は認めなかった。

4. 免疫療法の開発

フローサイトメトリーの結果、LipoK 刺激によるらい菌感染樹状細胞由来エキソソームに各種抗原がより多く含まれ、また、LipoK 刺激により、T細胞がより強く活性化された。エキソソームに含まれる蛋白でヒトCD63の発現は刺激によって異なった。

エキソソームに含まれる miRNA を解析し、幾つかの miRNA が未感染より多く含んでいた。LipoK の刺激によって、miR34a、miR146a、miR3116 等が多く存在した。

5. ハンセン病・結核共通ワクチンの免疫学的評価

BCG-DHTMI を樹状細胞、マクロファージに感染させると各種サイトカインを効率的に産生誘導し、各種表面抗原を強く発現させた。また、感染樹状細胞は T 細胞を刺激した。未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を刺激するとメモリータイプ T 細胞が効率的に産生された。接種 C57BL/6 マウス脾 T 細胞は、MMP-II あるいは HSP70 で再刺激すると、大量の IFN- γ を産生した。BCG-DHTMI をワクチン接種すると非投与群に比し有意に強くらい菌のマウス足蹠での増殖を抑制した。

6. ハンセン病ワクチンの開発

1) らい菌抗原発現BCG構築と安定性検討
抗酸菌ファージ由来 Promoter 3種、HSP70、MMP II 各遺伝子を urase operon に組み込み、薬剤耐性遺伝子を除去された各種組換え BCG を構築した。抗原発現

量は L、M、H の順に多かった。また、菌体内抗原産生量は、らい菌由来 Hsp70 と BCG 由来と同等であったが、菌体外分泌量では、BCG 由来が多かった。Plasmid 発現との比較では、M はやや低いが、H では十分量の抗原発現であった。抗原発現安定性では、H のクローンでは、培養 48 日、passage12 までは、安定した発現であったが、55 日、passage 15 よりで抗原量の発現低下が認められた。しかし、L、M のクローンでは、83 日、passage 20 まで定量的に抗原発現が観察された。

2) カニクイザルのらい菌感染系構築

今年度は、幼若群1頭、#6、116月のサンプルより鼻腔洗浄液から PCR 陽性が同定された。

3) *M. lepromatosis* の疫学調査

11例につき *rpoT* および 16s rRNA 配列の解析が可能であり、3検体が *M. lepromatosis* と判定された。

7. ハンセン病の診療ネットワークと啓発に関する研究

ハンセン病講習会を実施し、23名が参加した。「ハンセン病アトラス 診断のための指針」を配布し、教育に活用するようにした。

回復者の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」の一覧の活用を促した。

2014年には5名の新規ハンセン病患者がいた。4名の新規患者については、確実に診療できる体制を確立した。

顧みられない熱帯病としてハンセン病と共に挙げらるブルーリ潰瘍は末梢神経症状、潰瘍形成、熱帯地域に多いなど鑑別が困難である。臨床的、菌学的な検討を行い、鑑別がスムーズにできるよう症例検討を行った。

D. 考察

1. らい菌の特性に関する研究

らい菌代謝産物動態の特徴に關与するゲノム領域に偽遺伝子の存在は確認できるが、原因遺伝子を特定することは困難である。アミノ酸關連化合物の蓄積は、取り込みや排出に關連する機構が關与している可能性がある。他の抗酸菌とは異なる基礎代謝産物の動態は、らい菌の特性の重要な一面であり、ハンセン病の病態解明に向けて一つの鍵となり得ると考えられる。

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

らい菌にキノロン耐性を付与する報告は、GyrA-Gly89Cys と GyrA-Ala91Val の僅か2種類にすぎない。一方、結核菌においては、多種、多様なキノロン耐性關連遺伝子変異が明らかにされている。そこで各種らい菌 DNA ジャイレース A の活性を評価した。その結果、全ての変異型はキノロン耐性であった。さらに経時的酵素活性を觀察し、質的な変化を見出した。GyrA-Gly89Cys の変異型は顕著な活性低下が見られるが、臨床検体からこの変異を持つらい菌が検出され、本変異を持つらい菌の増殖に正の影響を及ぼす補完的変異または他のメカニズムが存在することが予想された。

3. 再燃・再発に関する免疫学的診断法の開発

らい菌成分などの刺激物質を各病型の培養単核球細胞への添加によるサイトカインの産生能、細胞内染色陽性細胞の割合を檢討することで各病型に刺激ごとに差が出ることが判明した。また、有意差が出にくい場合に、表面分子の割合を檢討することで明瞭に解析できる可能性が考えられた。再発例などの解析

では、活動期においてかならずしもサイトカイン産生が治癒期の症例より著明とは限らないことが判明した。再燃、再発を考える際にサイトカインの増加に限らず、らい菌の成分に反応して変動する細胞群も重要な因子と考えられた。

4. 免疫療法の開発

エキソソームは自己 T 細胞を活性化することから、免疫療法に役立つと考えられる。さらに、らい菌感染細胞から放出されるエキソソームの解析結果から得られる miRNA をターゲットとした、anti-miRs, 及び miR-mimics の開発等新たな発想に基づく治療法が期待できる。

5. ハンセン病・結核共通ワクチンの免疫学的評価

BCG の DNA 内へ遺伝子を導入したインテグレーション型リコンビナント BCG (BCG-DHTMI) は、同一遺伝子を BCG 細胞質へ導入したプラスミド型リコンビナント BCG (BCG-DHTM) とほぼ同程度の未感作 T 細胞活性化能を有していた。また、プラスミドを用いる限りマーカー (通常薬剤耐性遺伝子) を除去することはできず、安全なワクチンを供給する際に大きな妨げとなる。今回作製した BCG-DHTMI では、薬剤耐性遺伝子は除去され、安全性が確保されている。また、BCG-DHTMI を用いても、らい菌のマウス生体内での増殖抑制が可能であった。したがって、本研究結果で得られた方策は、遺伝子導入リコンビナント BCG をワクチンとして全世界へ供給する際、大きな役割を担うことが可能であると考えられる。

6. ハンセン病ワクチン開発

1) らい菌抗原発現 BCG 構築と安定性検討
安全かつ安定な組換え BCG を構築す

るために抗酸菌ファージを用い抗原候補である 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。その *in vitro* での発現量はこれまで効果のあった plasmid 発現組換え BCG より多いものがあった。しかし、強い promoter によるクローンは強すぎる能力のためか、安定性に欠けるが、少なくとも 12 passage まで安定して発現することが判明し、今後の改良により大きく飛躍するものと考えられた。

2) カニクイザルのらい菌感染系構築

幼若群 1 頭、#6、116 月のサンプルより鼻腔洗浄液から PCR 陽性が同定され、感染が持続していることが確認された。

3) *M. lepromatosis* の疫学調査

メキシコ西部には DLL あるいは Lucio 現象の症例が高い頻度で見出されることが知られ、11 検体中 3 例が *M. lepromatosis* の感染例であり、同地域には多数の感染症例があることが示された。そのうち 1 例は Lucio 現象発症前の DLL 症例から検出されており、重篤な症状を示す Lucio 現象発症前に診断可能であったことは、適切な治療を行う上で重要な手段であった。

7. ハンセン病の診療ネットワークと啓発に関する研究

講習会に 17 名の皮膚科医が参集した。回復者 1 名にも参加いただき、講演いただいた。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。

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。そのため、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。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。

ハンセン病の新規患者は減少しているが、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。2014 年は 5 名の新規患者が登録されたが、日本人とネパール人、ブラジル人が各 1 名、フィリピン人 2 名であった。

E. 結論

1. らい菌の特性に関する研究

らい菌の代謝機構は他の抗酸菌とは異なる特性を保持することが判明した。

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

キノロン耐性ハンセン病の迅速感受性試験法開発には GyrA-Asp95Gly ならびに GyrA-Gly89Cys を付与する遺伝子変異の検出が必要十分条件であった。

3. 再燃・再発に関する免疫学的診断法の開発

細胞性免疫細胞の解析が再燃・再発を予想する可能性が考えられた。

4. 免疫療法の開発

感染細胞エキソソームは抗原提示能を有し、新規免疫療法の開発につながる事が期待された。

5. ハンセン病・結核共通ワクチンの免疫学的評価

ハンセン病・結核共通ワクチン作製の基本戦略が樹立された。

6. ハンセン病ワクチンに関する研究

ワクチン候補抗原を安定・安全に分泌する組換え BCG を構築、サル感染系樹立の可能性を示した。

メキシコ西部には多数の *M. lepromatosis* が分布していた。

7. ハンセン病の診療ネットワークと啓発に関する研究

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。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwamoto T, Arikawa K, Nakajima C, Nakanishi N, Nishiuchi Y, Yoshida S, Tamaru A, Tamura Y, Hoshino Y, Yoo H, Park YK, Saito H, and Suzuki Y. Intra-subspecies sequence variability of the MACPPE12 gene in *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *Infect Genet Evolu*, 21:479-832, 2014
- 2) Paudel S, Mikota SK, Nakajima C, Gairhe KP, Maharjan B, Thapa J, Poudel A, Shimozuru M, Suzuki Y, and Tsubota T. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from elephants of Nepal. *Tuberculosis*, 94:287-292, 2014
- 3) Nishiuchi Y, Tamaru A, Suzuki Y, Kitada S, Maekura R, Tateishi Y, Niki M, Ogura H, and Matsumoto S. Direct detection of *Mycobacterium avium* in environmental water and scale samples by loop-mediated isothermal amplification. *J Water Health*, 12:211-219, 2014
- 4) Tsukamoto Y, Maeda Y, and Makino M. Evaluation of major membrane protein-I as a serodiagnostic tool of pauci-bacillary leprosy. *Diagn. Microbiol Infect Dis*, 80:62, 2014
- 5) Duthie MS, Coler RN, Laurance JD, Sampaio LH, Oliveira RM, Sousa AL, Stefani AM, Maeda Y, Matsuoka M, Makino M, and Reed SG. Protection against *Mycobacterium leprae* infection by the ID83/GLA-SE and ID93/GLA-SE vaccines developed for tuberculosis. *Infect Immun*, 82:3979, 2014
- 6) Nakanaga K, Sekizuka T, Fukano H, Sakakibara Y, Takeuchi F, Wada S, Ishii N, M. Makino, Kuroda M and Hoshino Y. Discrimination of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* from *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* in Clinical Isolates by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 52:251-259, 2014
- 7) Mukai T, Tsukamoto Y, Maeda Y, Tamura T and Makino M. Efficient Activation of Human T Cells of Both CD4 and CD8 Subsets by Urease-Deficient Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG That Produced a Heat Shock Protein 70-*M. tuberculosis*-Derived Major Membrane Protein II Fusion Protein *Clin Vaccine Immunol*, 21:1-11, 2014
- 8) Tsukamoto Y, Maeda Y, Tamura T, Mukai T and Makino M. Polyclonal activation of naïve T cells by urease deficient-recombinant BCG that produced protein complex composed of heat shock protein 70, CysO and major membrane protein-II. *BMC Infect Dis*, 14:179, 2014
- 9) Singh P, Benjak A, Carat S, Kai M, Busso P, Avanzi C, Paniz-Mondolfi A, Peter C, Harshman K, Rougemont J, Matsuoka M, and Cole ST. Genome-wide re-sequencing of multidrug-resistant *Mycobacterium leprae* Airaku-3. *Clin Microbiol Infect*. 20:O619-622, 2014
- 10) Yang D, Nakamura K, Akama T, Ishido Y, Luo Y, Ishii N, and Suzuki K. Leprosy as a model of immunity. *Future Microbiol* 9:43-54, 2014
- 11) Suzuki K, Saso A, Hoshino K, Sakurai J, Tanigawa K, Luo Y, Ishido Y, Mori S, Hirata K, Ishii N: Paleopathological Evidence and Detection of *Mycobacterium leprae* DNA from Archaeological Skeletal Remains of Nabe-kaburi (Head-Covered with Iron Pots) Burials in Japan. *PLoS ONE*, 9: e88356, 2014

- 12) 石井則久. ハンセン病. 今日の治療指針 2014 (福井次矢、高木 誠、小室一成総編集), p1122-1123, 医学書院(東京), 2014
- 13) 石井則久、四津里英、菅原万理子. 稀だけど見逃してはいけない抗酸菌症. 感染症内科 2:84-90, 2014
- 14) 四津里英、石井則久、玉木 毅. 抗酸菌の検査. MB Derma 216(増):103-112, 2014

2. 学会発表

- 1) Yamaguchi T, Nakajima C, Suzuki Y. Changes in supercoiling activity of *Mycobacterium leprae* DNA gyrase by amino acid substitutions conferring quinolone resistance. 第 81 回日本細菌学会北海道支部総会、2014 年 8 月 網走
- 2) Yamaguchi T, Nakajima C, Suzuki Y. Diminution in *Mycobacterium leprae* DNA gyrase activity caused by amino acid substitutions conferring quinolone resistance. The 2nd Sapporo Summer Seminar for One Health, September 25, 2014, Sapporo
- 3) 山口智之、中島千絵、鈴木定彦. らい菌にキノロン系抗菌薬体制を与える酵素内アミノ酸置換がもたらす DNA ジャイレース活性低下の解析. 第 87 回日本ハンセン病学会学術大会、2014 年 9 月 所沢市
- 4) 向井 徹、松岡正典、宮本友司、前田百美、牧野正彦. ハンセン病ワクチンのための組換え BCG 株の構築. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会、2014 年 9 月 所沢
- 5) 宮本友司、向井 徹、牧野正彦. *Mycobacterium leprae* のアミノ酸代謝解析. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会、2014 年 9 月 所沢
- 6) 北島信一、後藤正道、鮫島朝之、甲斐雅規. 虫刺され様皮疹が先行し診断までに期間を要したハンセン病再発例. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会、2014 年 9 月 所沢市
- 7) 前田百美、田村敏生、向井 徹、福富康夫、牧野正彦. らい菌感染樹状細胞から放出するエキソソームの miRNA 解析. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会、2014 年 9 月 所沢市
- 8) 田村敏生、下袴田陽子、前田百美、牧野正彦. 追加免疫法の開発に向けた樹状細胞による細胞障害性メモリー T 細胞の分化調節機構の解析. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会、2014 年 9 月 所沢市
- 9) 福富康夫、前田百美、牧野正彦. 蛍光色素を利用した抗らい菌活性の新しい評価方法 - 薬剤の抗らい菌活性や宿主細胞の抗らい菌活性評価への応用. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会、2014 年 9 月 所沢市
- 10) 甲斐雅規、中田 登、松岡正典、牧野正彦. らい菌 Kyoto-2 株の増殖能への関与が疑われる遺伝子の解析. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会、2014 年 9 月 所沢市
- 11) 松岡正典. WHO によるハンセン病薬剤耐性性拠点監視事業の進捗状況について. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会、2014 年 9 月 所沢市
- 12) 天児和暢、飯田健一郎、斎藤光正、甲斐雅規、松岡正典、吉田真一. らい菌培養その後. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会、2014 年 9 月 所沢市

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

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

らい菌の特性に関する研究

平成26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）

（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）

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らい菌は、その生存や増殖と関わる特性が他の細菌や抗酸菌と著しく異なることが知られている。この特性は、らい菌に特異的な代謝機構が影響を及ぼしていると考えられるがその詳細は不明である。本研究では、らい菌の代謝機構を解明することを目的とし、らい菌基礎代謝成分の動態を他の抗酸菌と比較した結果、構成及び量比に著しい差が存在することが判明した。この結果は、らい菌の代謝機構が他の抗酸菌とは異なること、さらには代謝機構が関与するハンセン病の病態解明へ繋がる可能性を示唆するものであった。

A. 研究目的

ハンセン病の起因菌であるらい菌 (*Mycobacterium leprae*) は、生体内で長期にわたり生存・増殖する特性を有する。この特性は、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を引き起こす一因と考えられている。その一方で、らい菌は、人工的な条件下では生存・増殖が不可能であり、他の細菌と異なる特異的な性質を有する。このような病態に影響を及ぼすらい菌の特性は、代謝機構と深く結びついていることが予想されるが、その実体は殆ど解明されていない。本研究では、らい菌の代謝機構を解明することを目指し、生存や分裂増殖等、重要な生命活動に関わる菌体内基礎代謝成分に

焦点を絞り、その動態を明らかとすることを目的とした。

B. 研究方法

らい菌は、*M. leprae* Thai-53 株を BALB/c ノードマウスの足蹠部に接種し、12 ヶ月間増殖させた。足蹠部を細かく破碎後、trypsin 処理により 2.5×10^{10} の菌体を調製した。同様に、比較対照とし菌未接種の BALB/c ノードマウスの足蹠部を採取し、組織懸濁液を調製した。らい菌接種及び未接種ノードマウスはそれぞれ 3 個体使用した。また、3 つの独立した 7H9 + ADC 培地で培養した *M. bovis* BCG Tokyo 株を集菌後、trypsin 処理を経て 2.5×10^{10} の菌体を調製した。らい菌菌体、

足蹠組織及び BCG 菌体調製液を Milli-Q 水で洗浄後、内部標準物質を含むメタノールにより基礎代謝産物が含まれる菌体内成分を抽出した。クロロホルムによる脂質成分、さらに限外濾過フィルターによる蛋白質成分の除去を行い、分析用サンプルとした。解析は、イオン性化合物の検出に適した capillary electrophoresis - mass spectrometry (CE-MS) 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る比率により半定量化を行った。

(倫理面への配慮)

らい菌をマウスで増殖する実験は、国立感染症研究所動物実験委員会の審査・承認を経て実施した。

C. 研究結果

らい菌及び未接種足蹠部サンプルより、合計 207 種の化合物が検出された。この内、らい菌のみから 158 種、未接種足蹠部のみから 1 種であった。共通に検出された化合物は 48 種で、そのほとんどで未感染足蹠部由来の含有量がらい菌に対して 10% 以下であった。これらの 48 種についてはバックグラウンドに相当する未接種足蹠部位の平均値をらい菌の値から差し引き、これらの値と合わせ合計 193 種をらい菌由来の代謝産物とした。一方、BCG サンプルからは 137 種が検出された。それらにつき、らい菌由来の化合物と比

較した結果、らい菌のみから 109 種、BCG のみから 53 種、さらに、84 種の化合物が共通に認められた。また、らい菌のみから検出された 109 種の化合物の 70% は、アミノ酸及びアミノ酸代謝関連成分であった (BCG のみからでは 6%)。さらに、らい菌及び BCG から共通に検出された 84 種の化合物について、量比を比較した結果、らい菌で顕著に多く検出されたグループはアミノ酸類の殆どが含まれていた (図 1)。逆に、BCG で顕著に多く検出されたグループは、エネルギー代謝関連代謝産物が偏在していた (図 2)。また、核酸代謝産物群に注目すると、らい菌及び BCG のどちらからも GMP や UMP といった 1 リン酸化合物が一部を除いて検出されたが、らい菌からは 2 及び 3 リン酸化合物のほとんどが検出されなかった (図 3)。

D. 考察

菌体内成分の解析を実施したらい菌は、人工培養が不可能であるため、ヌードマウスの足蹠部で増殖させる必要がある。そのため、らい菌の菌体内成分として取得した抽出液には、ヌードマウス由来成分の混入が懸念されたが、未接種ヌードマウスの足蹠部の解析から、その頻度は極めて低いことが判明した。これは、らい菌菌体洗浄時に緩衝液ではなく、MilliQ 水を使用することでヌードマウス由来の細胞が除去されたと考えられる。また、従来、らい菌の単離ではヌードマウス由来成分を除くため、trypsin 及び NaOH に

よる処理が不可欠であったが、本研究においては NaOH による菌体内代謝成分の破壊を避けるため、この処理を省き、trypsin 処理のみを実施した。さらに、trypsin 処理によるらい菌代謝産物への影響も考慮し、BCG も同様に trypsin 処理を実施し、影響の差を小さいものとなるようにした。らい菌と BCG から多くの代謝産物が検出されたこと、さらに後述するように、両者の間で代謝産物の動態に著しい違いが観察されたことから、これらの単離法の改変はらい菌代謝産物の解析において適切であったと思われる。

らい菌の菌体内における代謝産物動態の特徴は、BCG と比べた場合、アミノ酸及びアミノ酸関連化合物が多く蓄積し、エネルギー産生関連化合物が低下、さらに、核酸代謝産物の 2 リン酸化及び 3 リン酸化物が欠落していることが判明した。これら生合成に関与すると予測されるゲノム領域を観察すると、大規模な欠落は見られないが、らい菌の特徴である偽遺伝子の存在はある程度の数確認できる。従って、本研究で明らかとなったらい菌代謝産物の動態は、このような特異的なゲノム構造により引き起こされていると推測される。しかし、一般に、アミノ酸やエネルギー、核酸代謝産物の生合成は互いに経路が複雑に絡み合うため、原因となる偽遺伝子を特定することは困難である。一方、らい菌菌体内におけるアミノ酸及びアミノ酸関連化合物の蓄積は、それらの種類に偏りなく全般的に認めら

れた。これはらい菌代謝産物の動態の特徴が、単に生合成のステップに起因するのではなく、菌体内への取り込みや排出に関連する機構が関与している可能性がある。本研究で明らかとなった他の抗酸菌 (BCG) とは異なる基礎代謝産物の動態は、らい菌の特性の重要な一面であり、さらに、長期に亘る生存・増殖が影響を及ぼす慢性的なハンセン病の病態解明に向けて一つの鍵となり得るものであると考えられる。

E. 結論

らい菌菌体内代謝成分の動態は他の抗酸菌と異なる特徴を示すことが判明した。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
 - 1) 向井 徹、松岡正典、宮本友司、前田百美、牧野正彦. ハンセン病ワクチンのための組換え BCG 株の構築. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2014 年 9 月 所沢
 - 2) 宮本友司、向井 徹、牧野正彦. *Mycobacterium leprae* のアミノ酸代謝解析. 第 87 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2014 年 9 月 所沢

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

■ らい菌
■ BCG

図 1. らい菌で多く検出された代謝産物群

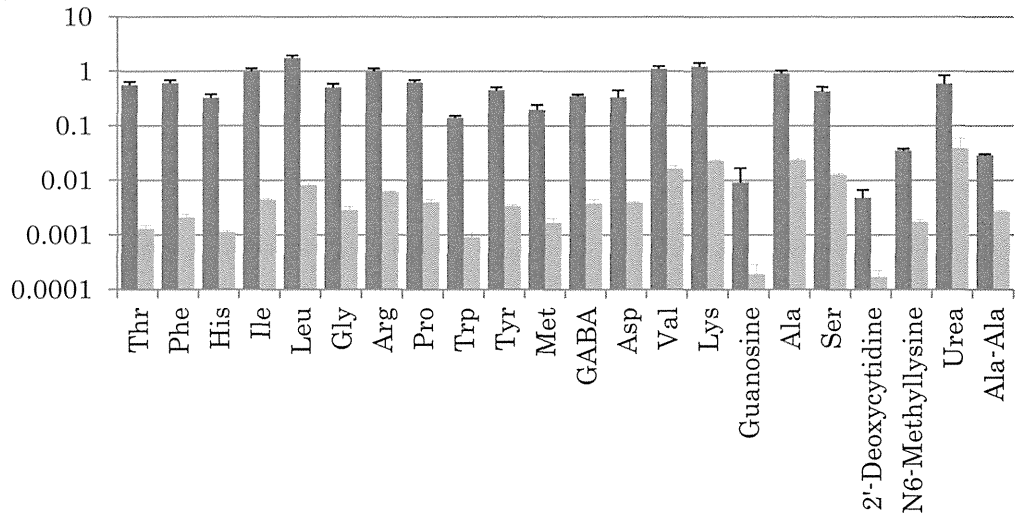


図 2. BCG で多く検出された代謝産物群

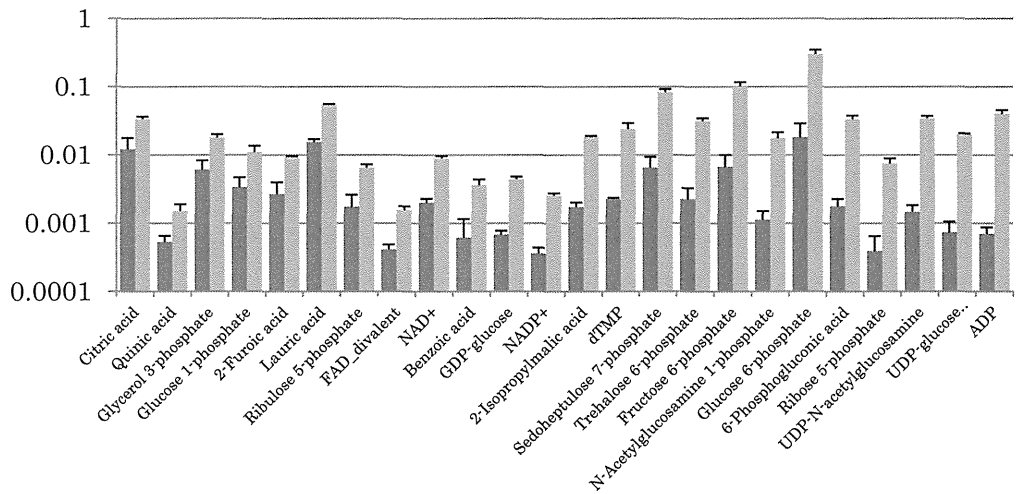
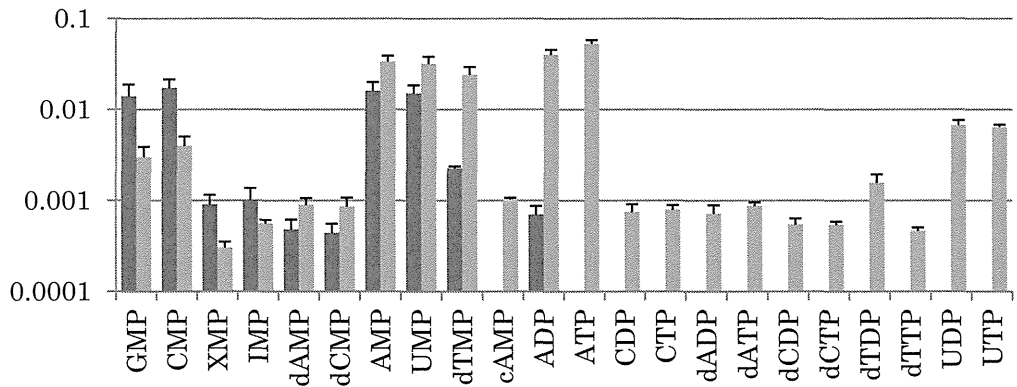


図 3. 核酸代謝産物群



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

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

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26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)

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）
（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
分担研究報告書

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

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 教授
研究協力者 中島 千絵 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 准教授

研究要旨 薬剤耐性ハンセン病対策には、薬剤耐性ハンセン病の早期発見とらい菌の薬剤感受性を踏まえた適切な治療の徹底が重要である。そのためには精度ならびに特異性が高く、安価な薬剤感受性試験法の開発と実用化が鍵となる。本研究では、多剤耐性ハンセン病の治療に重要なキノロン耐性に係る遺伝子変異を明らかにするため、種々のらい菌 DNA ジャイレースを組換え蛋白質として発現させ、これらの有する DNA ジャイレース活性を評価した。その結果、結核菌では頻繁に見られるが、らい菌では報告のない DNA ジャイレース A サブユニットの 95 番目のアミノ酸置換により DNA ジャイレースの質的な変化が起こる事が判明した。この結果は、95 番目のアミノ酸置換を持ったらい菌が患者から報告されない事の理由になるものと考えられた。

A. 研究目的

現在のハンセン病の治療は世界保健機構（WHO）推奨の多剤併用療法により実施されているが、既に複数の国々で耐性ハンセン病患者が出現しており、問題となっている。我が国でもそれは例外でなく、薬剤耐性ハンセン病対策は、厚生労働行政の課題となっている。

薬剤耐性ハンセン病対策には、世界規模での薬剤耐性菌の伝播状況を把握し、それによって現行の多剤併用療法の効果を評価し、耐性菌の拡散の防止対策を立

案し、以て、その有効性の維持を図る必要がある。そのためには、薬剤耐性ハンセン病の早期発見と、らい菌の薬剤感受性を踏まえた適切な治療の徹底が重要である。そのためには精度ならびに特異性が高く、安価な薬剤感受性試験法の開発と実用化が鍵となる。薬剤感受性試験をより精度の高いものとするためには、薬剤耐性に係る遺伝子変異の網羅的な解析が必要であるが、現状では十分とは言えない。特に多剤耐性ハンセン病の治療に重要なキノロン耐性に係る遺伝子変異の

解析は不十分であったため、これを明らかにすることを目的として研究を進めた。

本年度は特に、近縁細菌である結核菌のキノロン耐性臨床分離株では見られるが、らい菌では報告のない DNA ジャイレース上のアミノ酸置換に着目し、当該アミノ酸置換を持ったらい菌が患者から検出されない理由を明らかにする事を意図し研究を遂行した。

B. 研究方法

1) 組換え DNA ジャイレース

DNA ジャイレース A サブユニットをコードする *gyrA* 遺伝子を、らい菌 Thai53 株由来 DNA を鋳型として PCR 法により増幅させ、発現ベクター pET に連結、大腸菌へ導入してヒスチジンタグを有する組換え蛋白質として発現させた。更に、95 番目のアミノ酸にアスパラギンからグリシンへの置換を有する変異型 A サブユニット (GyrA-Asp95Gly)、GyrA-Asp95Asn、GyrA-Ala91Val ならびに GyrA-Gly89Cys を発現させた。また、らい菌 Thai53 株由来 DNA を鋳型として PCR 法により DNA ジャイレース B サブユニットをコードする *gyrB* 遺伝子増幅させ、発現ベクター pET に連結、大腸菌へ導入してヒスチジンタグを有する組換え蛋白質として発現させた。発現させた全ての蛋白質はニッケル-アガロースカラムクロマトグラフィーにより精製し、以下の実験に供した。

2) 組換え DNA ジャイレースの活性

精製した A、B サブユニットを等モル

ずつ混合し再構成した DNA ジャイレースを実験に用いた。ジャイレース活性の評価は、リラックス型のプラスミドを基質とし、スーパーコイル型のプラスミドへと転換する活性 (スーパーコイル化活性) を定量する事により実施した。

(倫理面への配慮) 該当せず

C. 研究結果

1) 組換え DNA ジャイレース

精製した種々の組換え DNA ジャイレースにおいて 200ml の大腸菌培養液から 1 mg 以上の組換え蛋白質が精製できた。その純度を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分析した所、その純度が 95%以上であることが判明した。

2) 組換え DNA ジャイレースの活性

図 1 に種々の組換え DNA ジャイレースのスーパーコイル化活性の結果を示す。

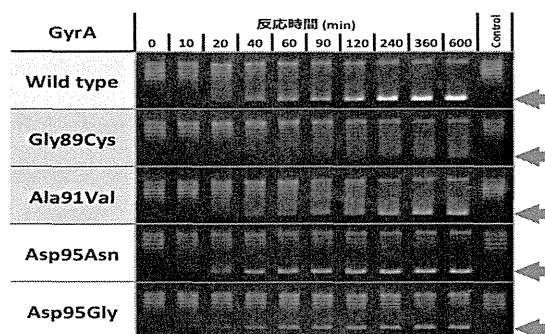


図1. 各種DNAジャイレース活性評価
野生型GyrA、GyrA-Asp95Gly、GyrA-Asp95Asn、GyrA-Ala91ValならびにGyrA-Gly89Cysを有するDNAジャイレースの時間経過によるスーパーコイル化プラスミドDNAの形成ならびにリラックス型プラスミドDNAの残存の様子を観察した。矢印はスーパーコイル化DNA