

去することはできず、このマーカーがヒト生体内においては毒性因子となる可能性が極めて高く、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できており、その点安全性が確保されている。さらに、BCG-DHTMI は数代にわたり継代培養しても、その T 細胞活性化能が強く損なわれることはなかった。また、BCG-DHTMI を用いても BCG-DHTM と同様にチャレンジしたらい菌のマウス生体内での増殖が可能であった。したがって、本研究で得られた方策は、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と考えられる。今後、BCG-DHTM に更なる改良を加え、より有効なワクチンを作成し、さらに本年度の成果で得られた安全供給のための方策を導入することで、日本初の信頼されるハンセン病・結核共通ワクチンに近い将来作製され、実用化されるものと期待される。

## E. 結論

BCG DNA へ外来遺伝子を組み込み、マーカー遺伝子を除去したインテグレーション型リコンビナント BCG の作出戦略が確立された。遺伝子導入リコンビナント BCG の安定供給が可能となった。

## G. 研究発表

### 論文発表

- 1) Nakanaga, K., T. Sekizuka, H. Fukano, Y. Sakakibara, F. Takeuchi, S. Wada, N. Ishii, M. Makino, M. Kuroda, and Y. Hoshino. 2014. Discrimination of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* from *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* in Clinical Isolates by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 52: 251-259.
- 2) Mukai, T., Y. Tsukamoto, Y. Maeda, T. Tamura,

and M. Makino. 2014. 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.

- 3) Tsukamoto, Y., Y. Maeda, T. Tamura, T. Mukai, and M. Makino. 2014. 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.

- 4) Tsukamoto, Y., Y. Maeda, and M. Makino. 2014. Evaluation of Major Membrane Protein-I as a Serodiagnostic Tool of Pauci-bacillary Leprosy. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 80: 62-65.

- 5) Duthie, M. S., R. N. Coler, J. D. Laurance, L. H. Sampaio, R. M. Oliveira, A. L. Sousa, M. M. Stefani, Y. Maeda, M. Matsuoka, M. Makino, and S. G. Reed. 2014. Protection against *M. leprae* infection by the ID83/GLA-SE and ID93/GLA-SE vaccines developed for tuberculosis. *Infect. Immun.*, 82: 3979-3985.

### 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 所沢市
- 2) 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

3) 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

4) 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が細胞外放出するエクソソームの 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

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 所沢市

6) 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

#### 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)

ハンセン病ワクチンの開発

平成26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）  
（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

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  
研究協力者 松岡正典 国立感染症研究所 ハンセン病研究センター 感染制御部 客員研究員

研究要旨 *Mycobacterium bovis* BCG は、ハンセン病のワクチンとして使用が試みられてきたが、効果の評価は様々である。しかし、BCG は長期使用され、安全性は非常に高いと考えられる。BCG の組換え DNA 技術による改変によりらい菌抗原を発現させ、ハンセン病ワクチンとしての能力向上を目的とした。抗原とした HSP70-MMP II 融合蛋白をファージ由来の promoter により発現するゲノム組込み型組換え BCG の構築を進めた。その結果、urease 活性陰性、抗原が発現・分泌し、薬剤耐性遺伝子の除去されたクローンを選択した。構築時は、plasmid 抗原発現と遜色ない発現量であったが、培養 48 日で、高い promoter 活性のクローンでは、その発現量が低下した。しかし、他のクローンでは、発現量は維持され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の開発では、本年度、幼若群の 1 頭の鼻腔洗浄液にらい菌遺伝子が検出された。さらにらい菌と非常に近縁である *M. lepromatosis* のメキシコ西部における疫学調査を行った。11 検体中 3 検体より *M. lepromatosis* が検出され、同地域においては同菌が広く分布していることが示された。

A. 研究目的

*Mycobacterium bovis* BCG は、結核のみならずハンセン病のワクチンとして使用が試みられてきたが、効果の評価は様々である。しかし、BCG は長期使用され、安全性は非常に高いと考えられ、BCG を組換え DNA 技術による改変によりらい

菌抗原を発現させ、ハンセン病ワクチンとしての能力向上を目的とした。

これまで、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。現実のワクチン使用では、plasmid の脱落、その防止のた

めの耐性薬剤遺伝子に応じた薬剤添加など、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 によらない、BCG ゲノムへの組込み型による組換え BCG が適していると考えられる。既存の promoter では組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 領域を同定した。同定された領域から強い 3 種のプロモーター領域を用い HSP70 とらい菌 MMPII 融合蛋白の組込み型発現 BCG の構築を進め、その安定性検討を行った。

一方、ワクチン開発において、その効果と安全性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。

また、ハンセン病の早期診断は後遺症の防止のために必須の条件である。従来ハンセン病の 1 病型と考えられてきた diffuse lepromatous leprosy (DLL) とそれに引き続き起こる Lucio 現象の原因菌として *M. lepromatosis* が近年報告された。Lucio 現象の多くは致死的结果に終わるためその早期診断が重要となる。*M. lepromatosis* の世界規模での調査の一環とし、これまで DLL および Lucio 現象が多く見出されるメキシコ西部における *M. lepromatosis* の感染状況の解析を行った。

## B. 研究方法

### 1) 改変 BCG の構築と安定性検討

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 pUC19 へ組み込んだ。その領域の上下流に BCG ウレアーゼ遺伝子領域の上下配列を導入した。この plasmid を、抗酸菌ファージ由来 recombinase を発現する pJV53 を BCG へ遺伝子導入行いハイグロマイシン耐性、ウレアーゼ陰性クローンを選択した。さらに、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。ハイグロマイシン感受性株を選択し、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。さらに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採取を行い、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

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。

### 3) *M. lepromatosis* の疫学調査

メキシコ合衆国、Guadalajara 市の Guadaratajara Instituto Dermatológico de Jalisco “José Barba Rubio”においてハンセン病と診断された患者より、通常の治療方針策定のために行う Slit skin smear と同様の方法により、皮膚組織を採取した。Lysis buffer により、temperate DNA を調整した後、*rpoT* 遺伝子、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を PCR direct sequencing により解読し、*M. lepromatosis* あるいは *M. leprae* であるかを同定した。

(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。

臨床検体採取使用の研究は、当該機関の倫理委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

### 1) 改変 BCG の構築と安定性検討

抗酸菌ファージ由来 Promoter 3 種 L、M、H、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(図 1)。抗原

発現量は L、M、H の順に多かった。また、らい菌由来 Hsp70 を用いたクローン検討では、菌体内抗原産生量は、BCG 由来 HSP70 を用いたクローンと同様であったが、菌体外分泌量では、BCG 由来 Hsp70 のクローン群が多かった。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 passage 12 までは、安定した発現であったが、55 日、passage 15 よりで抗原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 定量的に抗原発現が観察された(図 2)。

### 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

Lucio 症例 1 例、DLL 6 例、LL 5 例、BL 1 例の計 13 検体が得られた。11 例について *rpoT* および 16s rRNA 配列が PCR により増幅され、塩基配列の解析が可能であった。11 例中 3 検体が *M. lepromatosis* の感染と判定された。1 例は Lucio 現象を発症している症例からであった。1 例は DLL と診断された患者からであり、他の 1 例は LL と診断された症例からであった。

## D. 考察

### 1) 改変 BCG の構築と安定性検討

安全かつ安定な組換えBCGを構築するために、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 ウレアーゼ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 によるクローンはその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 までは安定して発現することが判明した。

## 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、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

DLL および Lucio 現象の原因菌として近年報告された *M. lepromatosis* の遺伝子の特徴として、*rpoT* 遺伝子中に *M. leprae* と同じ GACATC の6塩基からなる直列4コピーの variable number tandem repeat が存在することが報告された。一方、これまでに行った *M. leprae* の分子疫学解析の結果、メキシコ西部地域には同国内の他の地域と異なり、6塩基配列を4コピー繰返す遺伝子型の *M. leprae* が多数の分布が明らかとなっている。また、古くより同地域には 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ている。検査可能であった11検体中3例が *M. lepromatosis* の感染例であり、同地域には多数の *M. lepromatosis* の感染症例があることが示された。

これまでの症例報告では *M. lepromatosis* 感染診断例は Lucio 現象例からのものがほとんどであるが、今回の1例は Lucio 現象発症前の DLL 症例から検出され、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。

未だ分離確立株が無い。その細菌学的性状の解析、病理の解明、有効化学療法の確立のために、*M. leprae* の分離に用いられているマウス footpad 法による *M. lepromatosis* の分離が喫緊の課題である。

## E. 結論

ワクチン候補抗原を分泌する組換えBCGは、12 passage まで安定発現した。

らい菌接種サルにおいて幼若群1頭に排菌を認めた。

メキシコ西部にへ *M. lepromatosis* による感染は高い頻度で発生していることが示された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Mukai, T., Y. Tsukamoto, Y. Maeda, T. Tamura, and M. Makino. 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

2) Tsukamoto, Y., Y. Maeda, T. Tamura, T. Mukai, and M. Makino. 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.

3) 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

## 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

3) 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が細胞外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

4) 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 2014年9月 所沢市

5) 天児和暢、飯田健一郎、齋藤光正、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 2014年9月 所沢市

6) 甲斐雅規、中田登、松岡正典、牧野正彦。らい菌 Kyoto-2 株の増殖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 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



図1. 各種構築したBCGの遺伝子MAP

PCR analysis of integrated regions in BCG genome

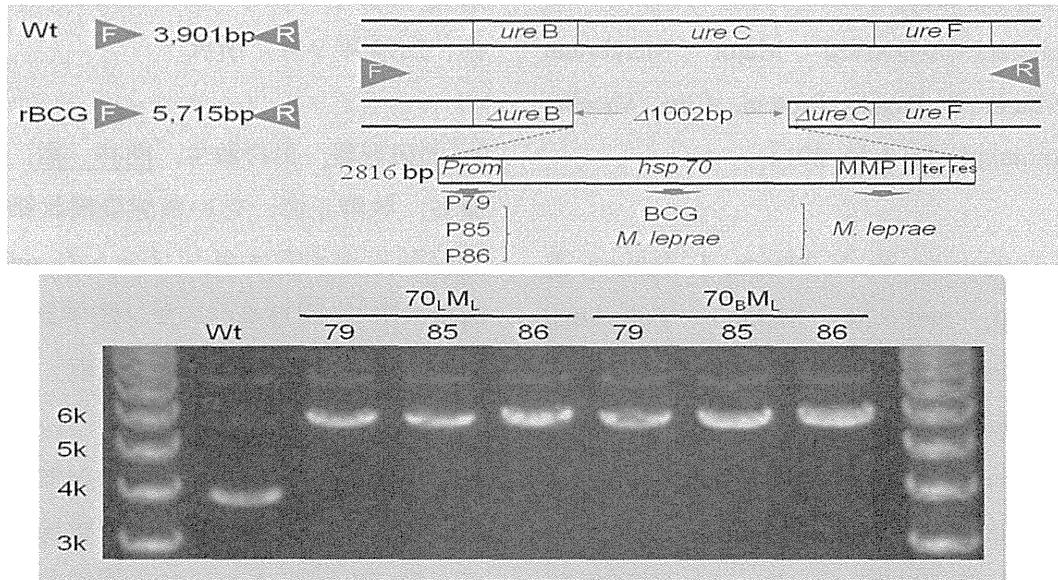


図2 抗原発現安定性検討

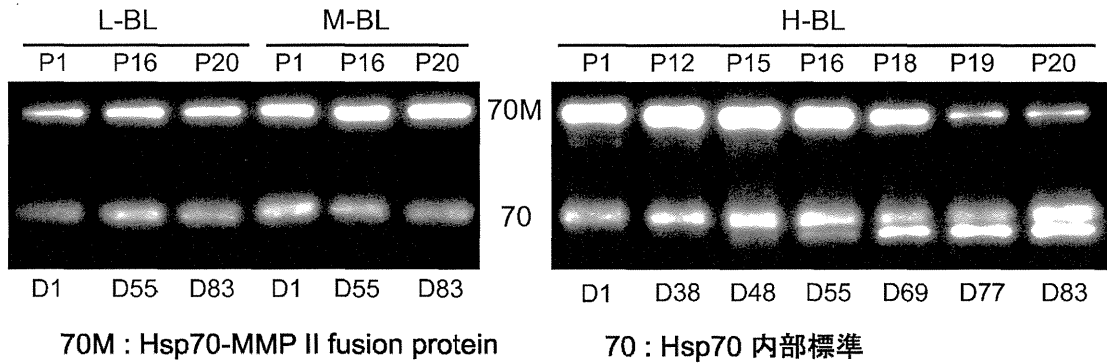
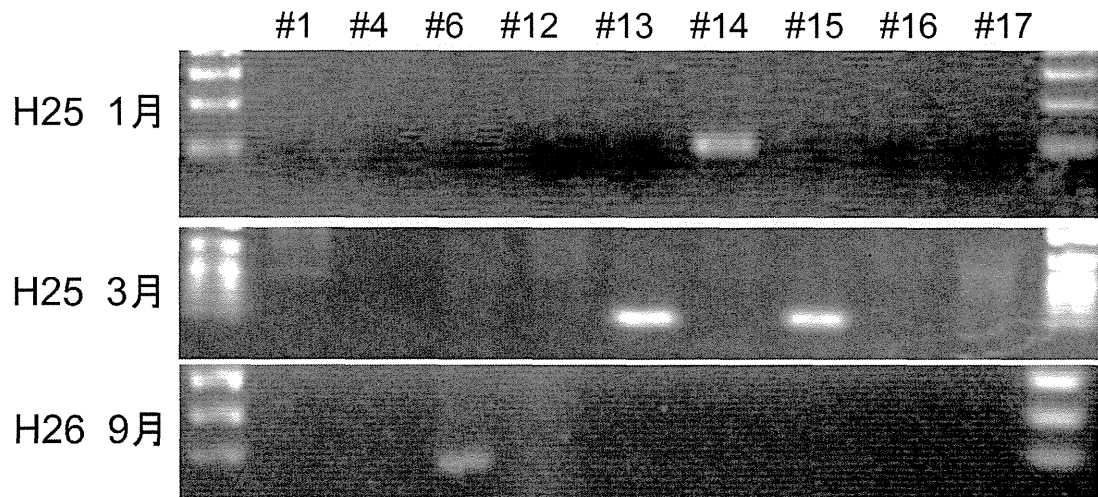


図3. 26年度の鼻腔洗浄液 PCR 陽性サルサンプル



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)

ハンセン病の診療ネットワークと啓発に関する研究

平成26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）  
（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

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 国立駿河療養所／国立国際医療センター皮膚科 フェロー

研究要旨 日本におけるハンセン病診療が偏見・差別なく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。17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、病理組織検鏡など）を行い、ハンセン病患者・回復者の診療体制を構築した。

A. 研究目的

日本におけるハンセン病診療が偏見・差別なく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。

（倫理面への配慮）

患者情報について入手しないため、倫理上の問題はない。

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。

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23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17名、回復者1名、社会福祉法人関係者1名、回復者支援ボランティア4名）。ハンセン病の知識、回復者の心情、偏見・差別の歴史、皮膚スミア検査実習、末梢神経検査、病理組織検鏡などを実施し、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、人権問題な

どをお聞きした。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」の一覧が日本ハンセン病学会のホームページに掲載されているので、その活用を促した。

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主治医に対し、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。1名は沖縄県出身の患者であった。

顧みられない熱帯病(neglected tropical diseases: NTD)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53例報告され、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17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、1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）ことは難しいが、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・医師名を引き続き掲載した。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。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切である。

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受診することがあり、必ず鑑別に「ハンセン病」を入れることが必要である。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

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) Yang D, Nakamura K, Akama T, Ishido Y, Luo Y, Ishii N, Suzuki K: Leprosy as a model of immunity. *Future Microbiol* 9: 43-54, 2014.

2) 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年.

3) 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.

4) 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.

5) 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 なし

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
石井則久	ハンセン病	福井次矢、 高木 誠、 小室一成	今日の治療指 針2014（総編 集）	医学書院	東京	2014	1122- 1123

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
Tsukamoto Y, <u>Maeda Y</u> , <u>Makino M</u>	Evaluation of major membrane protein-I as a serodiagnostic tool of pauci-bacillary leprosy	Diagn Microbiol Infect Dis	80	62	2014
Duthie MS, Coler RN, Laurance JD, Sampaio LH, Oliveira RM, Sousa AL, Stefani AM, <u>Maeda Y</u> , Matsuoka M, <u>Makino M</u> , Reed SG	Protection against <i>Mycobacterium leprae</i> infection by the ID83/GLA-SE and ID93/GLA-SE vaccines developed for tuberculosis	Infect Immun	82	3979 -3985	2014
Iwamoto T, Arikawa K, Nakajima C, Nakanishi N, Nishiuchi Y, Yoshida S, Tamaru A, Tamura Y, Hoshino Y, Yoo H, Park YK, Saito H, <u>Suzuki Y</u> .	Intra-subspecies sequence variability of the MACPPE12 gene in <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> .	Infect Genet Evolu	21	479-483	2014
Paudel S, Mikota SK, Nakajima C, Gairhe KP, Maharjan B, Thapa J, Poudel A, Shimosuru M, <u>Suzuki Y</u> , Tsubota T.	Molecular characterization of <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> isolates from elephants of Nepal.	Tuberculosis	94	287-292	2014
Nishiuchi Y, Tamaru A, <u>Suzuki Y</u> , Kitada S, Maekura R, Tateishi Y, Niki M, Ogura H, Matsumoto S	Direct detection of <i>Mycobacterium avium</i> in environmental water and scale samples by loop- mediated isothermal amplification	J Water Health	12	211-219	2014
Yang D, Nakamura K, Akama T, Ishido Y, Luo Y, <u>Ishii N</u> , Suzuki K	Leprosy as a model of immunity	Future Microbiol	9	43-54	2014



Nakanaga K, Sekizuka T, Fukano H, Sakakibara Y, Takeuchi F, Wada S, <u>Ishii N</u> , <u>Makino M</u> , Kuroda M, Hoshino Y	Discrimination of <i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> from <i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> in Clinical Isolates by Multiplex PCR	J Clin Microbiol	52	251-259	2014
<u>Mukai T</u> , Tsukamoto Y, <u>Maeda Y</u> , Tamura T, <u>Makino M</u>	Efficient Activation of Human T Cells of Both CD4 and CD8 Subsets by Urease-Deficient recombinant <i>Mycobacterium bovis</i> BCG That Produced a Heat Shock Protein 70- <i>M. tuberculosis</i> -Derived Major Membrane Protein II Fusion Protein	Clin Vaccine Immunol	21	1-11	2014
Tsukamoto Y, <u>Maeda Y</u> , Tamura T, <u>Mukai T</u> , <u>Makino M</u>	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
Singh P, Benjak A, Carat S, Kai M, Busso P, Avanzi C, Paniz-Mondolfi A, Peter C, Harshman K, Rougemont J, <u>Matsuoka M</u> , Cole ST	Genome-wide resequencing of multidrug-resistant <i>Mycobacterium leprae</i> Airaku-3	Clin Microbiol Infect	20	O619-622	2014
Suzuki K, Saso A, Hoshino K, Sakurai J, Tanigawa K, Luo Y, Ishido Y, Mori S, Hirata K, <u>Ishii N</u>	Paleopathological Evidence and Detection of <i>Mycobacterium leprae</i> DNA from Archaeological Skeletal Remains of Nabekaburi (Head-Covered with Iron Pots) Burials in Japan	PLoS ONE	9	e88356	2014
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
四津里英、 <u>石井則久</u> 、玉木 毅	抗酸菌の検査	MB Derma 216	(増)	103-112	2014

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

## 1 朝食後

### ④ *M. ulcerans*, *M. shinshuense* 感染症

【処方例】 RFP+SM または AMK, もしくは RFP+CAM の 8 週間の 2 剤併用と外科的切除を行う。

- 1) リファジンカプセル (RFP) (150 mg) 3 カプセル 分1 朝食前空腹時
- 2) 硫酸ストレプトマイシン注 (SM) 1 回 1 g 1 日 1 回 筋注
- 3) クラリス錠 (CAM) (200 mg) 3 錠 分1 朝食後 固

### ■患者説明のポイント

- ・治療は長期 (2 か月 - 1 年以上) になるが, 確実な治療のために欠かさず服用することの必要性を理解してもらう。
- ・長期服用による副作用に留意することや定期的な検査の必要性も説明する。
- ・外科的切除の必要性を考慮する。

### ■看護・介護のポイント

- ・皮膚症状の改善に時間がかかることへの理解と支援を行う。
- ・温熱療法の継続指導を行う。

## ハンセン病

Hansen's disease, leprosy

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 (東京)

### 病態と診断

#### A 病態

ハンセン病はらい菌感染による, 主に皮膚と末梢神経に病変を形成する慢性抗酸菌感染症である。

生体のらい菌に対する免疫応答の差から病型は大きく 2 型に分けられている。菌と皮疹が多く, 初期は神経症状が軽微な多菌型 (MB) と, 菌と皮疹が少なく, 皮疹部を中心とした神経症状が目立つ少菌型 (PB) である。

#### B 診断

診療では出生地 (国), 小児期生活歴, 家族歴などの問診を行い, 自覚症 (痒みや痛みなど) のない皮疹や, 知覚異常による外傷や熱傷, さらに神経肥厚などからハンセン病を鑑別に入れる。

らい菌検出法は, ①皮膚スメア検査, ②病理組織の抗酸菌染色, ③皮膚組織などからの PCR 検査である。

診断は, ①知覚障害を伴う皮疹, ②神経障害 (知覚低下, 運動麻痺, 神経肥厚), ③らい菌検出, ④

病理組織所見の 4 項目を総合して行う。

### 治療方針

不可逆的な後遺症となる神経症状を起こさず, らい菌を生体から排除する。WHO が推奨する多剤併用療法 (MDT) を基本にして治療する。

らい反応ではステロイド内服を中心として治療を行う。

#### A 多菌型 (MB)

菌が多いため治療期間は長い。

【処方例】 下記を併用する。

- 1) リファジンカプセル (150 mg) 4 カプセル 分1 朝食前空腹時 月1回
  - 2) レクチゾール錠 (25 mg) 4 錠 分2 朝・夕食後
  - 3) ランプレンカプセル (50 mg) 1 カプセル 分1 朝食直後
- (2-3 年間)

●治療の継続・終了の指標 2 年後, 臨床症状や皮膚スメア検査によって治療の見直しを行う。特に臨床症状の沈静化を治療終了の目標にする。

#### B 少菌型 (PB)

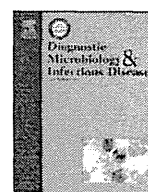
【処方例】 下記の 1) を併用する。可能な限り 2) を追加する。

- 1) リファジンカプセル (150 mg) 4 カプセル 分1 朝食前空腹時 月1回
  - 2) レクチゾール錠 (25 mg) 4 錠 分2 朝・夕食後
- (6 か月間)
- 2) ランプレンカプセル (50 mg) 1 カプセル 分1 朝食直後 6 か月間

#### C らい反応

【処方例】 ハンセン病の治療を継続しながら下記の 1) を併用する。2) はらい性結節性紅斑 (ENL) に保険適用になっているが, 使用にあたってはサリドマイド製剤安全管理手順 (TERMS) を遵守する。

- 1) ランプレンカプセル (50 mg) 2 カプセル 分1 朝食直後
- 2) プレドニン錠 (5 mg) 6-15 錠 分1-3 食後 (症状を改善させてから漸減, 健胃薬を併用)
- 2) サレドカプセル (50・100 mg) 症状によって 50 mg ないし 100 mg 就寝前 (症状が緩和するまで漸増し, 改善に伴い漸減)



## Mycobacteriology

## Evaluation of major membrane protein-I as a serodiagnostic tool of pauci-bacillary leprosy



Yumiko Tsukamoto\*, Yumi Maeda, Masahiko Makino

Department of Mycobacteriology, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-2-1 Aoba-cho, Higashimurayama, Tokyo, 189-0002, Japan

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 January 2014

Received in revised form 21 April 2014

Accepted 11 June 2014

Available online 19 June 2014

## Keywords:

Serodiagnosis

Leprosy

Major membrane protein-I

## ABSTRACT

We have previously shown that the serodiagnosis using major membrane protein-II (MMP-II) is quite efficient in diagnosing leprosy. However, the detection rate of pauci-bacillary (PB) leprosy patients is still low. In this study, we examined the usefulness of major membrane protein-I (MMP-I) from *Mycobacterium leprae*. The MMP-I-based serodiagnosis did not show significantly high detection rate. However, when the mixture of MMP-I and MMP-II antigens was used, we detected 94.4% of multi-bacillary leprosy and 39.7% of PB patients. There were little correlation between the titers of anti-MMP-I antibodies (Abs) and that of anti-MMP-II Abs in PB patients' sera. Ten out of 46 MMP-II-negative PB leprosy patients were MMP-I positive, so that the detection rate of PB leprosy patient increased from 39.7% to 53.8% by taking either test positive strategy. We concluded that MMP-I can complement the MMP-II-based serodiagnosis of leprosy.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Leprosy is chronic infectious disease caused by an infection with *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), and a significant number of new cases are still detected in 2011; for instance, 219,075 new cases were reported (WHO, 2012). Leprosy usually leads to peripheral nerve injury and systemic deformity (Job, 1989; Stoner, 1979), and the development of the deformity might be preventable, if the sufficient chemotherapy is initiated at an early stage of infection. Thus, early detection of leprosy is quite essential. As leprosy is mainly endemic in developing countries, easy and inexpensive diagnosis is strongly desired.

The diagnosis of leprosy is conducted based on microscopic detection of acid-fast bacilli in skin smears or biopsies, along with clinical and histopathological evaluation of suspected lesions. However, these methods have low sensitivity because *M. leprae* bacilli cannot be detected easily (Shepard and McRae, 1968). Although PCR-based molecular methods have been developed (Donoghue et al., 2001; Martinez et al., 2006; Phetsuksiri et al., 2006), it is not practical to perform PCR in resource-poor settings area. In this respect, serodiagnosis is a reasonable method to diagnose leprosy. Phenolic glycolipid-I (PGL-I), which is supposed to be *M. leprae* specific, was discovered in 1981 (Hunter and Brennan, 1981). The PGL-I is currently accepted as the standard target antigen (Ag) for serodiagnosis of leprosy (Meeker et al., 1986; Schuring et al., 2006; Sekar et al., 1993). However, the method using PGL-I may be useful for the detection of multi-bacillary (MB) leprosy but is not sensitive enough for the detection of pauci-bacillary (PB) leprosy at least in some countries (Kai et al., 2008; Soebono and Klatser, 1991). In the previous study, we have focused on major

membrane protein-II (MMP-II) from *M. leprae* (Maeda et al., 2007; Kai et al., 2008). MMP-II is one of the major proteins in the membrane fraction of *M. leprae*, and it induces immune response of host cells during infection (Maeda et al., 2005; Makino et al., 2005). We applied MMP-II as a serodiagnostic tool and found that the MMP-II-based serodiagnosis can increase the detection rate of PB leprosy patient. However, detection rate was still low at 39% (Maeda et al., 2007); thus, it is desirable to improve the sensitivity of the diagnostic tool.

In this study, we focused on major membrane protein-I (MMP-I) from *M. leprae*. MMP-I is 35-kDa major membrane protein expressed in *M. leprae*, which is identified as one of the most dominant Ags of *M. leprae* (Winter et al., 1995).

Although the function of MMP-I is still unknown, MMP-I may induce cell-mediated immune responses (unpublished observation) but has no homology with MMP-II. Therefore, MMP-I could be recognized by the different population of immune cells of leprosy patients and might be worth applying as a serodiagnostic Ag for the improvement of serodiagnosis. We purified recombinant MMP-I Ag using *Mycobacterium smegmatis* and evaluated its usefulness in the detection of both PB and MB leprosy patients.

## 2. Materials and methods

## 2.1. Study population

Sera were obtained with informed consent from healthy volunteers and leprosy patients in Japan. Frozen sera samples were used for the study. The samples studied comprised of MB ( $n = 72$ ) and PB ( $n = 78$ ) leprosy patients, either treated or untreated, from the National Sanatorium Oshimaseishoen. Classification of leprosy was performed by using the clinical criteria but was re-classified according to WHO

\* Corresponding author. Tel.: +81-42-391-8211; fax: +81-42-391-8807.  
E-mail address: ytsuka@nih.go.jp (Y. Tsukamoto).

recommendations (<http://www.who.int/lep/classification/en/index.html>) for study purposes. In Japan, children are obligated to get vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guerin (BCG); therefore, all healthy volunteers ( $n = 78$ ) are likely to be BCG-vaccinated. Sera from healthy volunteers were used as negative controls in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine the cut-off value for the positivity. This study is approved by the ethics committee of the National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.

## 2.2. Purification of MMP-I and MMP-II

The MMP-I gene (ML0841) was cloned from the genome DNA of *M. leprae*, using primers: 5'-GAGGATCCACGTCGGCTCAGAATGAGTC-3' and 5'-ATACTAGTTCACCTGTACTCATGGAAGT-3'. The amplified gene was expressed in *M. smegmatis* using pMV261 expression vector. The recombinant protein was His6-tagged and purified with  $\text{Cu}^{2+}$  resin (ABT Agarose Bead Technologies, Tampa, FL, USA). The protein obtained was electrophoresed on sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels, then the gel was stained with Instant Blue (Expedeon protein solution, San Diego, CA, USA), and a single band of MMP-I protein was observed. The MMP-II gene (ML2038c) was expressed and purified as previously described (Maeda et al., 2007).

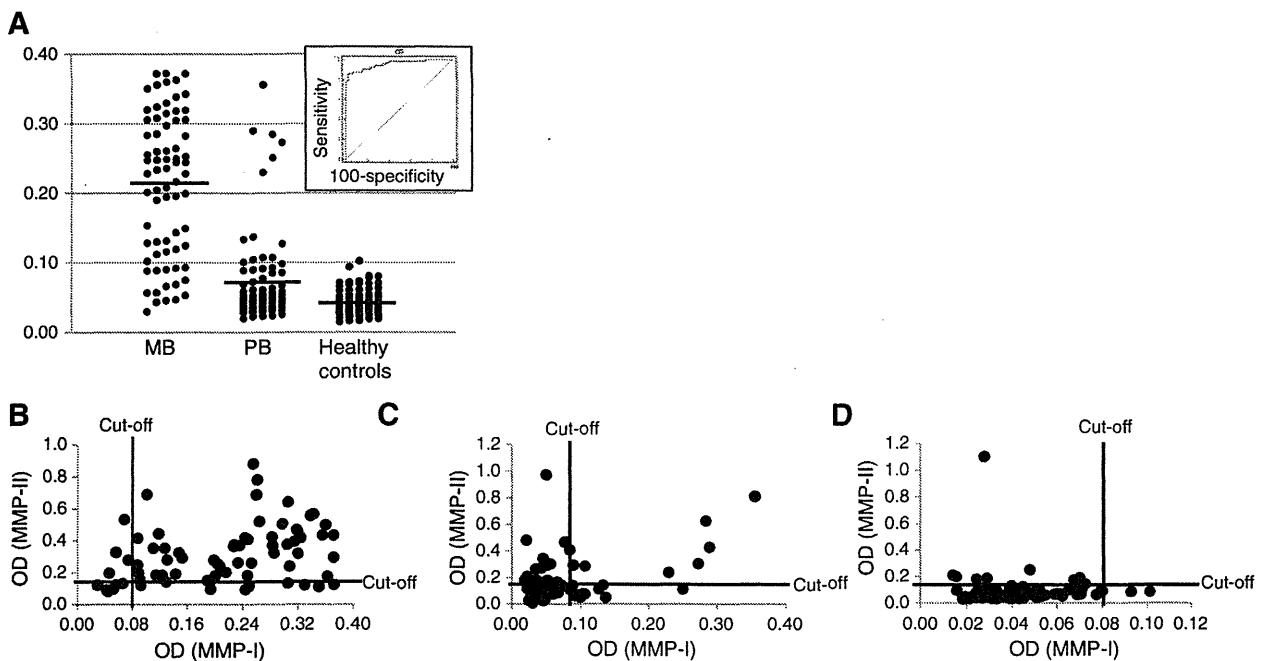
## 2.3. ELISA

The ELISA for the detection of anti-MMP-I antibodies (Abs) was performed as described previously with several modifications (Maeda et al., 2007). Briefly, 96-well plates (Nunc Maxisorp, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) were coated overnight with MMP-I Ag at a concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , MMP-II Ag at 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , or the mixture of MMP-I (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and MMP-II (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Ags. All Ags were diluted in 0.1 mol/L carbonate buffer (pH 9.5). After blocking

with 10% fetal bovine serum (FBS)-containing phosphate-buffered saline (PBS), the plates were washed 3 times with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T). The optimal concentration of both Ags was determined in advance. Human sera diluted 100-fold were added and incubated at room temperature for 2 hours. After washing with PBS-T, biotinylated anti-human IgG Ab (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was added at a concentration of 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and incubated for 1 hour. Then, the plates were incubated with reagents from a Vecstain ABC kit (Vector Laboratories) for 30 min. These reagents include avidin and biotinylated horse-radish peroxidase, and this enzyme binds to biotinylated anti-human IgG Ab via avidin. After further washing with PBS-T, a substrate solution consisting of 0.2 mg/mL of 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazolone-6-sulfonic acid) and 0.02%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 0.1 mol/L citrate buffer was added until a blue color developed, and the reaction was stopped by adding 2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Optical density (OD) was measured at 405 nm using a spectrophotometer. Plate-to-plate variations in OD readings were controlled using a common standard serum with an OD value of 0.360. The volume of all solutions used in the 96-well plate was 50  $\mu\text{L}/\text{well}$ .

## 2.4. Statistical analyses

The data were analyzed using MEDCALC software (MedCalc, Ostend, Belgium). A receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn to calculate the cut-off levels using the OD values of MB leprosy patients' sera and healthy controls. The McNemar test was applied to determine the  $P$  value. When the number of inconsistent pairs was less than or equal to 25, the calculation of 2-sided  $P$  value was done based on the cumulative binomial distribution. The  $P$  value of  $<0.05$  was considered to be statistically significant. The  $\kappa$  value was calculated to determine the agreement between the 2 tests.



**Fig. 1.** OD values of each sample were determined by MMP-I-based serodiagnosis and MMP-II-based serodiagnosis. (A) Sample sera from MB leprosy patients (left), PB leprosy patients (middle), and healthy controls (right) were subjected to MMP-I-based ELISA. OD value (wave length: 405 nm) of each sample was plotted. The thick horizontal lines show the average of OD in each group. (Inset) ROC curve analysis of MMP-I-based ELISA. The cut-off value was determined as 0.080, and the area under the ROC curve was 0.952. (B–D) The results of MMP-I-based ELISA and MMP-II-based ELISA were plotted. Sample sera from MB leprosy patients (B), PB leprosy patients (C), and healthy controls (D) were subjected to MMP-I-based or MMP-II-based ELISAs. The x-axis shows the OD value of MMP-I-based ELISA, and the y-axis shows that of MMP-II-based ELISA. Thick lines show the cut-off value of each analysis (MMP-I, 0.080; MMP-II, 0.13).