

201420018B

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24年度～平成26年度 総合研究報告書

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24年度～平成26年度 総合研究報告書

研究代表者 向井 徹

平成27(2015)年3月

目 次

I. 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 2 3

III. 研究成果の刊行物・別刷----- 2 9

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

総合研究報告書

平成24年度～平成26年度

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）
総合研究報告書

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、代謝機構は他の抗酸菌と異なる特性を有することを明らかにし、らい菌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、細胞免疫学的検査が有用な可能性を示し、免疫療法の開発では、感染樹状細胞のエキソソームは、抗原提示能を有することを示した。ハンセン病・結核共通ワクチンの免疫学的評価およびハンセン病ワクチンの開発では、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。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、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で、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

る。現状は、世界的に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）

A. 研究目的

ハンセン病の制圧は、世界共通の目的であ

B. 研究方法

1. らい菌の特性に関する研究

らい菌遺伝子の中で代謝関与が予想される遺伝子群（偽遺伝子を含む）の一部につき、*Mycobacterium smegmatis* の高い相同性を示す遺伝子群 (MSMEG_4536, MSMEG_1574, MSMEG_2035, MSMEG_4717, MSMEG_5119, MSMEG_1496, MSMEG_1898, MSMEG_5725) の破壊株作製、解析を行った。標的遺伝子の隣接領域を増幅し、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組み込んだ。さらに直鎖状とし recombinase 発現ベクター pJV53 を保持する *M. smegmatis* mc²155 株へ導入した。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置換した株を選抜した。さらに、ハイグロマイシン耐性遺伝子を切出し、染色体上からホモログ相同遺伝子が除去された遺伝子破壊株を取得した。代謝産物解析に使用する各 *M. smegmatis* 菌体は、7H9 + ADC 培地、37°C で振盪培養し調製した。基礎代謝成分解析に使用するらい菌は、*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。足蹠部を採取・破碎後、trypsin 処理により菌体を調製した。比較対照とし未接種の同部を使用した。また、7H9 + ADC 培地で培養した *M. bovis* BCG Tokyo 株を集菌後、それぞれ trypsin 処理を経て菌体を調製した。*M. smegmatis* 菌体、らい菌菌体、足蹠組織及び BCG 菌体調製液は 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りイオン性化合物として菌体内成分を抽出し、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タンパク質成分の除去を行い、分析用サンプルとした。解析は、低分子イオン性化合物の検出に適した CE-MS (capillary electrophoresis-mass spectrometry) 法を用い、全ての既知化合物を同定した。検出ピーク面積から算出された比率を基に半定量化を行った。

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

DNA ジャイレース A、B サブユニットをそれぞれコードする *gyrA*、*B* 遺伝子を、らい菌 Thai53 株由来 DNA を鋳型とし増幅させ、発現ベクター pET に連結、大腸菌へ導入し、ヒスチジンタグを有する組換え蛋白として発現させた。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した変異型 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、*gyrB* 遺伝子により組換え蛋白を発現させた。全ての蛋白はニッケル-アガロースカラムクロマトにより精製し実験に供した。

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）の定量により実施した。

3) キノロン剤のスーパーコイル化活性への阻害効果

新規キノロン、シタフロキサシン；SIT、シプロフロキサシン；CIP、ならびにレボフロキサシン；LVX を様々な濃度で上記アッセイ系に添加し、スーパーコイル化活性を 50% 阻害する薬剤の濃度 (IC₅₀) を求めた。

4) キノロン剤のスーパーコイル型プラスミド切断誘導能

スーパーコイル型プラスミド切断誘導能の評価は、種々のキノロン剤を様々な濃度で添加し、DNA ジャイレースにスーパーコイル型 DNA 25% の切断を誘導する薬剤の濃度 (CC₂₅) を求めた。

3. 再燃・再発に関する免疫学的診断法の開発

平成 24~26 年度に同意の得られた入所者のハンセン病の少菌型(PB)延べ 21 例、多菌型(MB)の延べ 16 例の計 37 例、正常対照群の延べ 19 例を対象とした。末梢血より単核球細胞を分離し、細胞に MMP-II、MLC を添加し培養した。平成 25 年からは、刺激効果の指標とし Phytohemagglutinin-P (PHA) 2.5 µg/ml を用いた。Golgi-Stop は、培養終了の約 15 時間前に加えた。培養上清中へ産生される IFN- γ 、IL-10 は ELISA で測定を行った。フローサイトメトリーでは、培養細胞中の CD4⁺および CD8⁺細胞における IFN- γ 、IL-10 の染色陽性細胞の割合(%)を算出した。また細胞内サイトカインの染色性を安定させるため Intracellular Cytokine Staining Starter Kit (BD)を用いた。さらに Golgi-Stop を加えない細胞につき CD45RO、CD4、CD8 陽性細胞の割合を算出し、各刺激物質に反応増殖する細胞種(CD4⁺または CD4⁺細胞、CD8⁺または CD8⁺細胞)、割合(%)につき病型ごとに検討した。さらに再発 2 例と再発疑いの 1 例では、ELISA と細胞内サイトカイン染色をそれぞれ比較検討した。

4. 免疫療法の開発

樹状細胞は正常健常者ヒト末梢血単球よりサイトカイン GM-CSF 及び IL-4 を用いて分化誘導したのち、抗原またはらい菌でパルスし、培地中に放出されるエキソソームを精製・解析を行った。精製は MHC Class-II ビーズまたは Invitrogen の Exosome isolation キットを、T 細胞は Dynabeads untouched human T cell または CD4 陽性 T 細胞は BD IMag CD4 T lymphocyte Enrichment Set を用いた。培地中の IFN- γ は BD 社の OptiEIA ELISA キットを用いた。抗らい菌膜タンパクに対するポリクロナル抗体はブレナン博士から分与された。らい菌は Oregon green で標識し、樹状細胞に感染させ、得られたエキソソームの蛍光強度を Infinite200

(Tecan)プレートリーダーを用いて測定した。miRNA 解析は SBI 社の SeraMir キットを用いて 380 種の miRNA を検出し、比較検討を行った。さらに、東レ社の高性能 DNA チップ基板 3D-Gene®を用いて 2000 種の遺伝子の比較検討を行った。

5. ハンセン病・結核共通ワクチンの免疫学的評価

BCG-DHTM 及び BCG-DHTMI の免疫学的活性を評価した。健常人末梢血より、抗 CD3 抗体付着ダイナビーズを用い T 細胞を除去した後、プラスチック付着性単球を得、リコンビナント (r) GM-CSF 50ng/ml および rIL-4 (10ng/ml)を添加し樹状細胞を産生した。樹状細胞に対し、rBCG あるいはコントロール BCG を感染させ成熟化樹状細胞を得た。BCG 感染樹状細胞の T 細胞活性化能は、感染樹状細胞をマイトマイシン C 処理し、自己 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞と混合培養し、産生する IFN- γ および IL-2 を ELISA 法で測定した。T 細胞は、抗 CD4 抗体あるいは抗 CD8 抗体付着ダイナビーズを用いて精製した。ナイーブ T 細胞は、これら T 細胞から CD45RO 陽性 T 細胞を除去し得た。IFN- γ および IL-2 は、ELISA 用キットを用いた。BCG 感染樹状細胞における T 細胞活性化の抗原特異性は、樹状細胞を抗 MHC 抗体および抗 CD86 抗体で処理した際の T 細胞の活性化の程度で評価した。樹状細胞表面抗原の発現程度は、FACSCalibur を用いた。rBCG 感染樹状細胞による T 細胞活性化機構を探索する目的で、樹状細胞を Chloroquine、Brefeldin A、Lactacystin で処理し、T 細胞の活性化抑制能を IFN- γ の産生量で評価した。さらに、rBCG のメモリー T 細胞産生能を測定するため、C57BL/6 マウスに rBCG を皮下接種し、4 週後に脾臓の T 細胞を *in vitro* で MMP-II 蛋白で刺激し、IFN- γ の産生量を測定した。さらに、rBCG 1×10^4 CFU を C57BL/6 マウスに皮下接種し、4 週

後にらい菌 5×10^3 をマウス足蹠に感染させ、31～32 週後に増殖したらい菌数を算出した。

6. ハンセン病ワクチンの開発

1) らい菌抗原発現 BCG の構築

抗酸菌ファージ由来 promoter L, M, H と BCG もしくはらい菌 Hsp70 とらい菌 MMP-II 融合蛋白遺伝子を pUC19 へ組み込んだ。その上下領域に BCG urease の上下領域配列を導入した。この plasmid を、recombinase 発現 BCG へ遺伝子導入を行い Hygromycin 耐性、ウレアーゼ陰性 clone を選択し、recombinase 遺伝子脱落クローンを選択した。resolvase を発現する pYUB870 を導入し、Hygromycin 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を行い発現の確認を行った。ま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) カニクイザルによるらい菌感染系の構築

平成 16 年度、医薬基盤研究所・霊長類医学研究センター P2 感染実験施設で 6～8 ヶ月齢の幼若カニクイザルを 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 週時に母ザルと共に、鼻腔内・鼻尖へ菌接種を行い観察を進めた。

3) *M. lepromatosis* の調査

薬剤耐性拠点監視事業において遺伝子解析を行う 9 か国、17 施設に、精度管理のための検体を配布し、結果報告を求めた。DNA 調整の効率と塩基配列解読の正確さ評価の

ため多剤耐性 *M. lepare* の 70% エタノール浮遊菌液をそれぞれの施設に配布した。

保有菌株の *M. lepromatosis* との異同の検討のために、ヌードマウス footpad において増殖した各株菌液を作製し、塩基配列を比較した。*M. lepromatosis* に存在し、*M. lepare* に存在しない *rpoT* 遺伝子の 21 塩基 3 コピー直列繰返しの有無および SNP の比較、16s rRNA 遺伝子の解析を行った。

メキシコ西部における *M. lepromatosis* の伝播調査のため、Jalisco 州の皮膚病研究所附属病院外来において症例より slit skin smear を採取し、*rpoT* および 16s rRNA 遺伝子の塩基配列を解析した。

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、それらを補う資料や情報を提供し、講習会などを開催した。また、ハンセン病の新規患者については、実際に診療方法、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

偽遺伝子を含むらい菌代謝関連遺伝子の *M. smegmatis* 相同遺伝子を破壊した。各変異株及び野生株の菌体内成分を CE-MS 法により解析した結果、野生株に比べ MSMEG_4536 変異株でアシル CoA 類が増加、MSMEG_2035 及び MSMEG_5119 変異株で、複数のアミノ酸類の産生量に変化していた。

らい菌菌体から抽出した基礎代謝成分の構成及び含有量を解析した結果、193 個の化合物がらい菌の代謝産物として検出された。一方、比較対照とした BCG からは 137 種が検出された。らい菌由来化合物と比較した結果、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%)。両菌から共通に検出された 84 種の化合物の量比を比較した結果、らい菌で顕著に検出されたグループに殆どのアミノ酸類が含まれていた。逆に、BCG で多く検出されたグループにはエネルギー代謝関連化合物が偏在していた。また、核酸代謝産物は、らい菌及び BCG のどちらからも GMP や UMP 等の 1 リン酸化物が一部を除いて検出されたが、らい菌では 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) 各種キノロン剤の野生型および変異型 DNA ジャイレース阻害活性

各種キノロン剤の DNA ジャイレース阻害活性の指標となるスーパーコイル化活性を 50% 阻害する薬剤の濃度 (IC50) ならびにスーパーコイル型 DNA の 25% を切断させる薬剤の濃度 (CC25) は、評価した全ての変異型に対する IC50 ならびに CC25 は野生型に対するものに比べて高かった。

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では、どの DNA ジャイレースも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。算出したスーパーコイル化プラスミド DNA の形成量を反応時間に対してプロットすると 600 分まで反応させた際の GyrA-Asp95Asn ならびに GyrA-Ala91Val は野生型の約 75% であった。また、GyrA-Asp95Gly ならびに GyrA-Gly89Cys をによるスーパーコイル化プラスミド DNA の形成量はそれぞれ野生型の約 30 ならびに 20% であった。一方、GyrA-Asp95Asn ならびに GyrA-Asp95Gly によるリラックス型プラスミド DNA の残存量は、GyrA-Ala91Val ならびに GyrA-Gly89Cys のそれに比べて多く、活性の質的な違いを示していた。

3) 新規キノロン剤のスーパーコイル化活性に対する阻害効果

1 位にフッ素化シクロプロピル基、8 位にメトキシ基を有する新規キノロンによるらい菌、結核菌、*S. enterica*、ならびに *C. jejuni* の DNA ジャイレースのスーパーコイル化活性に対する阻害効果評価では濃度依存的にスーパーコイル化プラスミドの減少が見られた。スーパーコイル化阻害効果評価試験で得られた結果から種々のキノロン剤の IC50 を算出した。新規キノロンのらい菌 DNA ジャイレースに対する活性は現在ハンセン病治療に用いられるオフロキサシンの中の活性型光学異性のみからなるレボフロキサシンに比べ約 6.5 倍高いと考えられた。

3. 再燃・再発に関する免疫学的診断法の開発

1) ELISA では、平成 24, 25 年度は、IFN- γ の産生量は少菌型で MMP-II、MLC の添加でより多かった。IL-10 の産生量は差を認めなかった。また少菌型において多菌型より

MLC の刺激効果がややあると考えられた。MMP-II 4 μ g/ml では、有意差は認められなかった。MLC 8 μ g/ml と MMP-II 4 μ g/ml を組み合わせた場合は少菌型で 1 例、多菌型で 2 例に上昇が明らかであった。IL-10 の産生は、正常対照群と少菌型で MLC、MMP-II、PHA の各刺激で統計学的に有意に増加していた。

2) フローサイトメトリーによる検討

平成 24 年度、平成 25 年度では少菌型、多菌型とも CD4⁺細胞において MMP-II PHA の刺激条件で IFN- γ 、IL-10 陽性細胞の割合が増加した。平成 26 年度は、IFN- γ および IL-10 陽性細胞は、少菌型、正常群においてやや有意に増加していた。IL-10 陽性細胞には、MMP-II 4 μ g/ml の条件で少菌型 CD4⁺細胞において有意差がみられ、刺激に反応して IL-10 が増加しているものと考えられた。

3) 平成 26 年度は、表面マーカー

特にメモリー細胞などにみられる CD45RO に加え CD 4、CD8 の各分子についてそれら陽性細胞の割合を上記の刺激条件ごとにフローサイトメトリーを用い算出した。MLC、MMP-II 刺激の条件では、症例により明らかに CD45RO 陽性細胞(CD4⁺あるいは CD8⁺)が増加するものがみられた。CD45RO 陽性細胞の内、CD4⁺あるいは CD8⁺細胞の検討では、少菌型で CD4⁺細胞で MMP-II および PHA の刺激で、CD8⁺細胞では PHA の刺激で割合(%)が有意に増加していた。

4) 再発 2 例、再発疑い 1 例について

少菌型の 1 例は、皮膚スミア検査は陰性で大腿部の皮疹とその病理所見により再発と考えられたが、特に ELISA において各刺激条件で明らかなサイトカインの増加が認められた。本症例では、平成 24 年度、25 年度の報告で再発時から治癒期にかけて ELISA での刺激に応じて産生される IFN- γ

の減少が観察されている。多菌型の再発疑い例は、治癒期と考えられる時期の血液ではあったが、MMP-II や MLC+ MMP-II の刺激条件で ELISA でのサイトカインの増加や、MMP-II 刺激での細胞内サイトカイン染色陽性細胞の増加が著明であった。皮膚スミア検査陽性で皮疹を認めた多菌型の再発例では、活動期と考えられたが、ELISA および細胞内染色では各刺激条件で他の多菌型の例と比べてかならずしも著明な増加は認めなかった。

4. 免疫療法の開発

LipoK の刺激により、MHC Class I, Class II および CD86 抗原は、らい菌感染樹状細胞から得られたエキソソームにより、多く含まれていた。らい菌体成分がエキソソーム中に含まれているか確かめため、蛍光ラベルしたらい菌を樹状細胞に感染し、得られたエキソソームの蛍光強度をプレートリーダーで測定した。LipoK で刺激するとらい菌のみで刺激した樹状細胞から得られたエキソソームの蛍光強度が増加した。この事は、LipoK により TLR2 を介して多くのらい菌成分が分解され、細胞外に提示されると考えられる。そこで、直接 T 細胞がエキソソームによって刺激されるか、T 細胞とエキソソームを混合培養し IFN- γ 分泌量を指標に調べた。その結果、らい菌感染樹状細胞から得られたエキソソームを用いた場合、CD4 陽性 T 細胞から 72pg/ml の IFN- γ が培養液中に産生されたが、その量は LipoK の刺激により得られたエキソソームを用いると 180pg/ml の IFN- γ が産生された。このことから、LipoK の刺激により、T 細胞がより強く活性化された事が明らかとなった。得られたエキソソームは MHC 抗原特異的に CD4 陽性 T 細胞を刺激し、IFN- γ の産生を誘導した。この結果を踏まえ、エキソソームが含む miRNA を SeraMir キットまたは DNA チップ基板 3D-Gene®で分析すると、らい菌

感染樹状細胞から得られたエキソソームは幾つかの miRNA をより多く含んでいた。しかし、多くの miRNA の機能は未だ不明なため、miRNA の役割も不明である。発現が高かった miR-373 は E-カドヘリンの発現を高める報告がある。カドヘリンは細胞接着を司り、NF- κ B やサイトカインの発現を抑制する因子である。もう一つの miR27 はプロヒビチンをターゲットとし、ミトコンドリアの機能または脂肪細胞の分化を抑制する。LipoK で刺激したららい菌感染樹状細胞から得られたエキソソームに多く含む miRNA は治療に関係すると考えられる。LipoK の刺激によって、miR34a, miR146a, miR3116 等が多く存在した。miR34a は細胞活性の調節に関わることが知られている。miR146a は TRAF6 及び IRAK1 遺伝子 3'UTR 領域に結合することから、自然免疫を制御すると考えられる。ハンセン病に関わる miRNA の同定には更なる詳細な分析が必要とする。

5. ハンセン病・結核共通ワクチンの免疫学的評価

BCG-DHTM は、非常に強くナイーブ CD4 陽性及び CD8 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った。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、その後に 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し、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 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、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。

BCG-DHTMI の免疫学的作用は、BCG-DHTM とほぼ同様であった。また、BCG-DHTMI をワクチン接種するとワクチン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) 改変 BCG の構築と安定性検討

抗酸菌ファージ由来 Promoter L, M, H と Hsp70-MMP II 各遺伝子を urase operon に組み込み、過程で使用した薬剤耐性遺伝子を除去した各種組換え BCG を構築した。らい菌由来 Hsp70 を用いたクローンでは、菌体内産

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 との発現比較では、M はやや低いが、H では十分量の抗原発現であった。発現安定性では、H のクローンで、55 日、passage 15 よりで抗原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 で安定的な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

H24 年度は、幼若群の #1, #6 より接種後 82 月に、新生仔群では、#13 の 34 月、#14 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。H25 年度は、新生仔群では、#13 の 53 月、#14 の 39 月、#15 の 36 月、#16 の 38 月のサンプルよりらい菌遺伝子が検出された。H26 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

検査機関の検査能力の評価では 2 機関において PCR の感度が低く十分な増幅ができなかった。また、1 機関において期待されるシーケンスと異なる結果が示され、精度の改善が必要であった。

本センターにて分離確立した 27 株の *M. lepre* は、3 株がタイ国、1 株がインドネシアもしくは韓国由来、その他 22 株が日本由来である。遺伝子検索の結果、全ての菌が *rpoT* および 16s rRNA 遺伝子ともに *M. lepre* の遺伝子と同一であった。

メキシコの検体は 52 検体を 4 回に分け解析した。最初の 2 回は 7 例のみが解析可能であった。そのうち 3 例が *M. lepromatosis* であった。3 回目には 5 例、4 回目には 8 例の検体が採取された。13 例中、11 例が PCR 陽性となりそのうち 3 例が *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

皮膚科医への講習会・検査実習を毎年実施した(参加者：平成 24 年 42 名、平成 25 年 25 名、平成 26 年 23 名)。講習は、ハンセン病診療するにあたり、新規患者の心情、外国人患者の不安、回復者の心情を理解し、ハンセン病について理解を深めることを目的とした。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も講義内容に組み入れた。実習は、皮膚スミア検査、末梢神経検査、病理組織検査を実施し、知識・技術の伝達を行った。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。さらにらい反応(ENL)に対するサリドマイド診療ガイドラインを作成し、2012 年に保険適用になったサリドマイドの使用法がスムーズに行われた。さらにハンセン病医療の進歩に合わせて「ハンセン病治療指針(第 3 版)」を作成した。

新規のハンセン病患者は、2012 年 3 名(うち日本人 0 名)、2013 年は 3 名(うち日本人 1 名)、2014 年は 5 名(うち日本人 1 名)いた。主治医に対して診療及び検査の指導を行い、ハンセン病を確実に診療できる体制を確立した。

D. 考察

1. らい菌の特性に関する研究

らい菌の特性を決定づける様々な細菌学的、生化学的特徴の中で、代謝に関する分子機構は依然不明である。本研究においては、第一に、代謝に関する遺伝子機能の側面からその特性にアプローチした。らい菌のゲノムには、代謝に関連がすいそく予想されるが機能が未だ確認されていない遺伝子、元々は代謝酵素等をコードしていたが偽遺伝子化したと考えられるものが存在している。これらがどのようにらい菌の代謝

に影響を及ぼしているかについては解明されていない。一方、らい菌は *in vitro* 培養できないため、これらの機能を解析するために、らい菌において直接遺伝子組換え株を作製することは不可能である。従って、同じ抗酸菌属に分類され且つ遺伝子操作が比較的容易な *M. smegmatis* において相同遺伝子の変異株を作製し、代謝成分解析を行うことにより、らい菌遺伝子の代謝や生理における機能を推測した。代謝成分に変化が認められた変異株の中で、MSMEG_4536 変異株は、 β -酸化（脂肪酸の代謝経路）での最終産物であるアシル CoA 類を野生株に比べ多く産生する傾向を示した。MSMEG_4536 は、らい菌遺伝子 ML0840 (putative cell surface protein) のホモログであり、そのモチーフから菌体表層に位置するタンパク質であることが予測されている。従って、一つの仮説として、MSMEG_4536 の遺伝子産物である表層タンパク質が、細胞内への栄養成分の取り込みに何らかの関与しており、変異株ではこのタンパク質が機能しなくなったことで脂肪酸等の取り込みが増大し、結果として β -酸化等の代謝が亢進した可能性が考えられる。この点を解明するためには、MSMEG_4536 変異株と野生株との間で、脂肪酸の取り込み能にどのような差があるかどうかを評価する必要がある。一方、ホモログがらい菌において偽遺伝子化している MSMEG_2035 と MSMEG_5119 の両変異株では、複数のアミノ酸含有量が野生株と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。両遺伝子の推定アミノ酸配列は、MSMEG_2035 遺伝子が amine oxidase、MSMEG_5119 遺伝子が 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase である。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、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。一方、らい菌においては、アミノ酸代謝遺伝子群と関連付けられ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。よって、単独の変異をそれぞれ保持する両変異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難い。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。らい菌の代謝機構を解明する上で、実際に菌体内に存在する基礎代謝成分の動態を把握することは重要である。本研究において、らい菌と BCG の基礎代謝成分を比較した結果、らい菌では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。これらの生合成に関与することが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って引き起こされていることが推測される。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と言える。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るものであった。このことはらい菌基礎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。本研究においては、遺伝子及び菌体成分の両面かららい菌代謝機構の解明を試みた。その結果、特異性が存在すると点にお

いては、それらの一端を明らかにすることが出来たが、全容は依然として不明である。らい菌の重要な特性の一つである代謝機構はハンセン病の発症や病態と深く結びついている可能性が強く、全容解明へ向けたさらなるアプローチが必要であると思われる。

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

種々のアミノ酸置換を有するらい菌 DNA ジャイレースを組換え蛋白質として発現させ、これらの活性ならびに各種キノロン剤の効果を評価し、キノロン剤耐性らい菌に実際に出現しうる DNA ジャイレース上のアミノ酸置換が GyrA-Ala91Val ならびに GyrA-Gly89Cys である事を明らかにした。また、組換えらい菌 DNA ジャイレースを、対象として新規キノロン剤の阻害効果を評価し、当該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。

3. 再燃・再発に関する免疫学的診断法の開発

ELISA 法では、IFN- γ 産生は MMP-II、MLC などの刺激条件により正常対照群と少菌型において多菌型よりやや多く、フローサイトメトリーによる細胞内サイトカイン (IFN- γ および IL-10) 染色陽性細胞の割合は、少菌型、多菌型とも MMP-II、PHA の刺激で CD4+細胞において増加する傾向がみられた。このようにらい菌の成分などの刺激物質を各病型の培養単核球細胞に加えることでみられるサイトカインの産生、それらの細胞内染色陽性細胞の割合を観察することで各病型に刺激条件ごとに反応に差が出ることが分かった。この傾向は、平成 24 年度、平成 25 年度と比べると培養細胞数を 2 倍に増やしたことで、特に ELISA においてより明瞭となった。また細胞内サイトカイン陽性細胞の検討で統計学的な有意差が出にくい場合に、CD45RO、CD4、CD8 等の表面分子

の割合を刺激条件ごとに検討することでサイトカイン産生に関わる細胞の反応をより明瞭に解析できる可能性が考えられた。

実際の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分かったが、病型ごとに経過を追って観察してゆくことが重要と考えられた。刺激により増加する細胞群は、今後さらにメモリー細胞と関連する CCR7、CD62L などの各種表面マーカーなどを加えて解析することでより詳細に解明できる可能性が考えられた。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

本研究で得られたエキソソームは MHC 抗原、CD86 抗原のみならず、らい菌由来抗原を保有し、CD4 陽性 T 細胞を直接活性化することから、エキソソームはハンセン病の免疫療法に活用できる可能性が示唆された。エキソソームのマイクロ RNA の解析を行うと、らい菌感染樹状細胞から放出されるエキソソームは特有の miRNA の発現が高いことから、これら miRNA はハンセン病状悪化に繋がる可能性は高く、これらの miRNA をターゲットとした、anti-miRs、及び miR-mimics の開発することで、新たな発想に基づく治療法が期待できる。LipoK で刺激し、得られたエキソソームの miRNA は T 細胞活性化に関わると考えられ、免疫療法の開発に有用な物質であると推測できる。

5. ハンセン病・結核共通ワクチンの免疫学的評価

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共通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。

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。BCG-DHTM を皮下接種すると、その後に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。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。BCG の DNA 内へ外来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 の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。通常プラスミド型遺伝子導入した場合は、外来遺伝子は多コピー導入可能なため、外来遺伝

子がコードする蛋白質はより大量に発現される。しかし、今回は抗酸菌ファージの高発現プロモーターを用いたため、1 コピーの導入であってもほぼ同程度の蛋白発現が得られ、そのためプラスミド型導入 BCG と同程度の T 細胞活性化能が得られたものと想定される。また、プラスミド型導入 BCG を用いる限り、遺伝子保有 BCG を選択するためのマーカー (通常薬剤耐性遺伝子) を除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。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。

6. ハンセン病ワクチンの開発

1) 改変 BCG の構築

安全かつ安定な組換え BCG を構築するため、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。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 より多いものであった。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 までは

安定して発現することが判明した。

2) カニクイザルらい菌感染系の樹立

3年間で、9頭のうち6頭に菌排泄が観察された。散発的な場合と連続な場合と様々な傾向であった。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。

3) *M. lepromatosis* の調査

M. leprae の薬剤感受性検査は薬剤が結合する蛋白をコードする遺伝子変異の検索により知ることが可能となった。GLP による薬剤監視事業はその方法の適用により行われている。検査の正確を期すため解析を担当する機関の能力評価を行った。2施設において十分な能力が見られなかったが、その他の機関ではPCRの感度、変異検出ともに満足する結果が示された。2施設に対しては再度検体を送付し、改善を求めた。

当センターにおいて保有する *M. lepre* は国内外のハンセン病研究者に実験材料として供給されるが、*M. lepromatosis* が *M. lepre* と高い遺伝子の相同性を有することが示されたことから、27の *M. lepre* 分離株に *M. lepromatosis* が含まれるか否かを明らかにした。22株の日本国内由来株、5株の国外由来株すべて *M. lepre* と判定された。日本国内由来株中16株が *M. lepromatosis* の特徴である *rpoT* 遺伝子中に4コピーの6塩基直列配列を有していたが、全て *M. lepre* と判定され、これまでDLLあるいはLucio現象の症例報告もないことから日本には *M. lepromatosis* は存在していないと推察された。

メキシコ西部からの検体は18検体中6例が *M. lepromatosis* と判定され、同地域では多くのDLLあるいはLucio現象の臨床例が多くみられており、それらの事実を裏付ける結果であった。Lucio現象は致死性的帰結をとることからDLLの段階での *M.*

lepromatosis の検出と適切な治療が求められる。未だ、*M. lepromatosis* の分離株が得られていないが、その細菌学的、病理メカニズムの解析のための資料として利用するために、その分離が必須である。

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医師（皮膚科医）が大多数を占めるようになっている。また、ハンセン病の歴史やハンセン病回復者の心情、社会的背景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。さらに他の皮膚科医の教育も必要と考え、「ハンセン病アトラス」を配布した。この活動を持続させるために、今後も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、気軽に相談できる皮膚科医を公表し、回復者や全国の皮膚科医などに衆知した。これらの皮膚科医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。さらにサリドマイドを2型らい反応に使用するためにガイドラインを有効に利用し、ハンセン病治療指針と共に診療に役立てていただきたい。

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
刺激に反応してサイトカインが増加してくる条件が認められ、表面マーカーの解析を加えることでどのような細胞が再燃・再発に関与するのか解明できる可能性が考えられた。

4. 免疫療法の開発

単球由来樹状細胞の分泌するエキソソームは抗原提示能を有することが示され、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る。

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 を構築した。

菌接種サルにおいて菌排泄を認めた。

本センターの保有する分離株に *M. lepromatosis* は含まれていなかった。

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

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で、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, 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, 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, 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, Makino M. Evaluation of major membrane protein-I as a serodiagnostic tool of pauci-bacillary leprosy. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 80:62-65, 2014

5) Duthie MS, Coler RN, Laurance JD, Sampaio LH, Oliveira RM, Sousa AL, Stefani AM, Maeda Y, Matsuoka M, Makino M, Reed SG. Protection against *Mycobacterium leprae* infection by the ID83/GLA-SE and ID93/GLA-SE vaccines developed for tuberculosis. *Infect Immun*, 82:3979-3985, 2014

6) Nakanaga K, Sekizuka T, Fukano H, Sakakibara Y, Takeuchi F, Wada S, Ishii N, M.

- Makino, Kuroda M, 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, 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, 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, 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
- 15) 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. A simple multiplex PCR for the identification of Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* with a lineage-specific mutation in Rv0679c. J Clin Microbiol, 51: 2025- 2032, 2013
- 16) Phetsuksiri B, Rudeeaneksin J, Srisungngam S, Bunchoo S, Roienthong D, Mukai T, Nakajima C, Hamada S, Suzuki Y. Applicability of in-house loop-mediated isothermal amplification for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex grown on solid media. Jpn J Infect Dis 66:249-251, 2013
- 17) Poudel A, Maharjan B, Nakajima C, Fukushima Y, Pandey BD, Beneke A, Suzuki Y. Characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Nepal. Tuberculosis 93:84-88, 2013
- 18) Wang H, Maeda Y, Fukutomi Y, Makino M. An *in vitro* model of *Mycobacterium leprae*

- induced granuloma formation. BMC Infectious Diseases, 13: 279, 2013
- 19) 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. Infect Genet Evol, 19: 200-204, 2013
- 20) Nakanaga, K, Hoshino Y, Yotsu RR, Makino M, Ishii N. Laboratory procedures for the detection and identification of cutaneous non-tuberculous mycobacterial infections. J Dermatol. 40: 151-159, 2013
- 21) Nakanaga K, Yotsu RR, Hoshino Y, Suzuki K, Makino M, Ishii N. Buruli ulcer and Mycolactone-producing mycobacteria. Jpn J Infect Dis, 66: 83-88, 2013
- 22) 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), メディカルレビュー社 (東京) p80-83, 2013 年.
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 常深祐一郎, 石井則久. 抗酸菌感染症. MB Derma 206: 27-37, 2013
- 26) 石井則久. ハンセン病. 内科学書改訂第8版 (小川 聡総編集), 中山書店 (東京), p74-75, 2013
- 27) 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
- 28) Rocha AS, Cunha MG, Diniz L, Salgado C, Aires MA, Nery JA, Gallo E, Miranda A, Magnanini M, Matsuoka M, Sarno E, Sufys P, Oliveira M. Drug and multiple-drug Resistance Among *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian relapsed leprosy patients. J Clin Microbiol. 50:1912-1917, 2012
- 29) Cambau E, Nevejans AC, Tejmar-Kolar L, Matsuoka M, 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
- 30) Khin SA, Yin TNO, Kyaw K, Aye AW, Matsuoka M. Genotyping of *Mycobacterium leprae* in Myanmar and supposed transmission mode. Jpn J Leprosy, 81:191-198, 2012
- 31) Yokoyama K, Kim H, Mukai T, Matsuoka M, Nakajima C, Suzuki Y. Impact of amino acid substitution in B subunit of DNA gyrase in *Mycobacterium leprae* on fluoroquinolone resistance. PLoS Negl Trop Di, 6: e1838, 2012
- 32) Suzuki Y, Nakajima C, Tamaru A, Kim H, Matsuba T, Saito H. Sensitivities of ciprofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates to fluoroquinolones: Role of mutant DNA gyrase subunits in drug resistance. Int J Antimicrob Agents, 39:435-439, 2012
- 33) Nakanaga K, Hoshino Y, Hattori Y,

- Yamamoto A, Wada S, Hatai K, Makino M, Ishii N. Mycobacterium pseudoshottsii isolated from 24 farmed fishes in western Japan. J Vet Med Sci, 74: 275-278. 2012
- 34) Nakata N, Kai M, Makino M. Mutation analysis of mycobacterial rpoB genes and rifampicin resistance using recombinant *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob Agents Chemother, 56: 2008-2013, 2012
- 35) 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
- 36) Nakanaga K, Hoshino Y, Wakabayashi M, Fujimoto N, Tortoli E, Makino M, Tanaka T, Ishii N. *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, 2012
- 37) Saiga H, Kitada S, Shimada Y, Kamiyama N, Okuyama M, Makino M, Yamamoto M, Takeda K. Critical role of AIM2 in *Mycobacterium tuberculosis* infection. Int Immunol, 24: 637-644, 2012
- 38) Mori S, Yotsu RR, 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
- 39) Nakanaga K, Hoshino Y, Yotsu R, Makino M, Ishii N. Laboratory procedures for the detection and identification of cutaneous nontuberculous mycobacterial (NTM) infections. J Dermatol, 40: 1-9, 2012
- 40) Degang Y, 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
- 41) 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. Jpn J Leprosy, 81:199-203, 2012
- 42) 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
- 43) Suzuki K, Akama T, Kawashima A, Yoshihara A, Yotsu RR, Ishii N. Current status of leprosy: Epidemiology, basic science and clinical perspectives. J Dermatol 39:121-129, 2012
- 44) Yotsu RR, 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
- 45) 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