

ハンセン病

(Hansen's disease, leprosy)

目次

- I. ハンセン病の概説
- II. ハンセン病の診断と検査
- III. 検査の実際
 - 1. 皮膚スミア検査
 - 2. 病理組織検査
 - 3. 血清 PGL-I 抗体検査
 - 4. 遺伝子増幅法(PCR 法)
- IV. 参考文献
- V. ハンセン病の行政検査に関する情報と様式および問い合わせ先
- VI. 執筆者一覧

I. ハンセン病の概説

ハンセン病(leprosy, Hansen's disease)は、主に皮膚と末梢神経が侵される慢性の細菌感染症である。病原体は抗酸菌の一種である、らい菌(*Mycobacterium leprae*)であり、1873年にノルウェーの医師 Armauer Hansen によって発見された。

WHO による分類では、大きく少菌型 (paucibacillary: PB)と多菌型 (multibacillary: MB)に分けられるが、これは菌による違いではなく宿主のらい菌に対する細胞性免疫応答が起こるか否かによるものである。らい菌は典型的な細胞内寄生菌であり、主に真皮の組織球と末梢神経のシュワン細胞に寄生する。皮膚症状としては、少菌型で見られる類上皮細胞性肉芽腫形成をともなう限局性の白斑、紅斑や環状斑から、多菌型で見られるらい菌を含む腫大化した組織球の出現をともなう多数の紅斑や結節まで多彩である。また、皮疹部の支配領域の末梢神経障害は、治癒後の後遺症の原因として重要である。WHO は多剤併用療法のパリスターパックを無償で提供しており、早期に発見して適切な治療を受ければ後遺症を残さずに完治することが可能である。

感染経路としては、乳幼児期に多菌型患者と濃密に接触することによる飛沫感染が主体であると考えられているが、自然界にアルマジロや霊長類なども保菌していることが知られており、上記以外の感染経路を完全に否定するものではない。菌に曝露された大多数の例では宿主の免疫機構によって菌は駆逐され、発症には至らない。また、発症する場合も感染から数年から数十年の潜伏期間を経ることが多いと考えられている。2010年現在、世界では年間20万人以上の新規患者が登録されているが、わが国では年間数例の発症をみるのみであり、そのほとんどは外国人である。

II. ハンセン病の診断と検査

日本におけるハンセン病疑い例の診断に当たっては、出身地、ハンセン病の家族歴、皮疹の知覚異常などが重要である。臨床的にハンセン病の鑑別が必要な場合には、皮膚スミア検査、病理組織検査、血清 PGL-I 抗体検査、および遺伝子増幅法(PCR法)などを参考にして確定診断に結びつける必要があるが、少菌型患者

の場合はこれらの検査による確定が困難な場合も多い。また、らい菌は、未だ人工培地による培養法が確立されていないために、患者検体からの菌の分離培養による同定を行うことは出来ない。現在、国立感染症研究所ハンセン病研究センターで行政検査としてこれらの検査を受け付けている。

III. 検査の実際

1. 皮膚スメア検査

真皮にメスの刃を刺し、浸出液をスライドグラスに塗布して抗酸菌染色を行うことで菌を証明する目的で行う。ハンセン病患者は末梢神経障害による痛覚の喪失があるために、局所麻酔無しで行うことが出来る。同様に採取された浸出液は後述の PCR 法によるらい菌 DNA の検出に用いることも可能である。

方法：

1. スライドグラスにチールの石炭酸フクシン液を濾過したものを載せ、アルコールランプで下から数秒間加温する。
2. そのまま 10 分間菌を染色する。
3. 流水中で水洗を 5 分間行う。
4. 1%塩酸 70%エタノール水溶液に浸し色を確認し、赤色から薄いピンク色になるまで分別を行う。
5. 流水中で水洗を 10 分間行い色出しを行う。
6. メチレンブルー液に 5 回浸し、1 分間の水洗の後、封入して検鏡する。らい菌は赤からピンク色の桿菌として染色され、背景の細胞は薄い青色に核染される。

2. 病理組織検査

皮膚生検組織から型通りのホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製して、病理組織学的診断を行うものである。通常のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色に加えて、チールニールセン (Ziehl-Neelsen)染色の変法である Fite 染色により

らい菌の染色を行う。また、炎症による末梢神経の障害の組織診断のために S-100 蛋白の免疫染色が有用である。ここでは、らい菌の検出にのみ行われる Fite 染色の方法について述べる。

方法：

1. オイルキシレン（オリーブ油：キシレンを 1：2）2 槽 10 分間ずつで脱パラフィンを行う。
2. ろ紙で軽くおさえ、余分のオイルキシレンを吸い取る。
3. 流水中で水洗を 5 分間行う。
4. チールのフクシン酸液にて室温で 10 分間染色する。
5. 流水中で水洗を 5 分間行う。
6. 1%塩酸 70%エタノール水溶液に浸し色を確認し、赤色から薄いピンク色になるまで分別を行う。
7. 流水中で水洗を 20 分間行い色出しを行う。
8. メチレンブルー液に 5 回浸し、1 分間の水洗の後封入後、検鏡する。らい菌は赤からピンク色の桿菌として染色され、背景の組織は薄い青色に核染される。

3. 血清 PGL-I 抗体検査

らい菌の phenolic glycolipid-I (PGL-I) に対する抗体を検出するものである。PGL-I 抗体は多菌型患者では検出率が高いが、少菌型では陰性例が多く、また健康者でも陽性例が存在するなど、感度、特異性が高いとは言い難いが、検査キットが市販されている唯一の血清診断法であり、抗体価の消長は予後とも相関するとの報告もある。セロディア・レプラ（富士レビオ）による血清 PGL-I 抗体の検出方法について述べる。

方法：

1. 96 穴丸底プレートの 1 列目を陽性血清、2 列目を陰性コントロールとして血清希釈液、3 列以降を被検血清の希釈系列に用いる。まず血清希釈用液を第 1 穴に 75 μ l、第 2 から第 7 穴までは 25 μ l ずつ滴下する。
2. 1 列目、2 列目、3 列目以降の第 1 穴に、それぞれ、陽性血清、血清希釈

液、被検血清を 25 μ l ずつ加え、第 7 穴まで順次希釈系列を作製する。

3. 全ての列の第 2 穴に対照粒子を、第 3 から第 7 穴には感作粒子を 25 μ l ずつ加える。最終的に、第 3 穴から 7 穴目までが、x32 から x512 希釈になる。
4. プレートミキサーで混合した後、室温で 30 分間水平に静置した後に凝集を判定する。第 2 穴が非凝集で、第 3 穴以降に凝集がみられた場合を陽性と判定する。

4. 遺伝子増幅法(PCR 法)

らい菌の遺伝子を PCR 法により同定するもので、検体として皮膚スミア、生検組織、パラフィン切片などを用いることが出来る。らい菌の死菌でも DNA が残存していれば陽性として検出される一方、菌がほとんど存在しない少菌型の検体では本法でも検出困難であるなどの問題も存在する。また、PCR は高感度であるが、皮膚スミアの検鏡で菌が認められないような検体からは、菌の DNA も検出できにくい点に留意すべきである。

DNA の抽出はそれぞれの材料に応じた方法で行うとともに、PCR 法は一般的に用いられている方法に準じて行えば良く、特にらい菌 DNA の検出に特別なものは無い。患者検体からの検出ではヒトの DNA が検出できることから、これを DNA 抽出の陽性コントロールとして用いることが出来る。具体的には、ヒト α -globin をコントロールとして、らい菌 *hsp70* または *groEL* 遺伝子を検出する。

方法：

1. らい菌 *hsp70* 遺伝子増幅用のプライマー配列としては、
forward: 5'-TACCGACATTTCCGCGATAAAGTCGGCA-3',
reverse: 5'-CGTCAACCACATCGTCAGTAGA-3'
を用いると 157 bp が増幅される。
2. 0.2 ml PCR 用チューブに検体 DNA、プライマー、dNTP、DNA ポリメラーゼ、バッファーを加え総量を 20 μ l にする。
3. 至適増幅条件は PCR 装置ごとに設定することが望ましいが、Takara PCR Thermal Cycle DICE の場合は、95°C, 3 min denature 後に、95°C 10 sec, 55°C 20 sec, 72°C 30 sec を 30 サイクルで十分な増幅を得ている。

4. 2%以上のアガロースゲル電気泳動によって特異的な増幅産物を確認する。
5. 必要に応じて nested PCR などで感度、特異性の検証を行う。

また、本法は薬剤耐性遺伝子検査にも応用可能であり、ダブソン (dapsone: DDS)、リファンピシン (rifampicin: RFP)、キノロンの耐性に関わるらい菌の dihydroptorate synthase 1 (*folP1*: ML0224), RNA polymerase β chain (*rpoB*: ML1891c), DNA gyrase subunit A (*gyrA*: ML0006) 遺伝子領域を増幅した後に direct sequence により塩基配列を決定する。現在までに変異が確認されている箇所は、以下の通りである。*folP1* : 53, 55 位、*rpoB*: 407, 510, 420, 425, 427 位、*gyrA* : 89, 91 位。

IV. 参考文献

1. Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. *J. Clin. Microbiol.*, 28(9), 1913-1917, 1990.
2. Sugita Y, Suga C, Ishii N, Nakajima H. A case of relapsed leprosy successfully treated with sparfloxacin. *Arch. Dermatol.*, 132(11), 1397-1398, 1996.
3. Donoghue HD, Holton J, Spigelman M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J. Med. Microbiol.*, 50(2), 177-182, 2001.
4. Bang PD, Suzuki K, Phuong le T, Chu TM, Ishii N, Khang TH. Evaluation of polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy. *J. Dermatol*, 36(5), 269-276, 2009..
5. Monot M, Honore N, Garnier T *et al.* Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat. Genet.*, 41(12), 1282-1289, 2009.
6. Kampirapap K. Assessment of subclinical leprosy infection through the measurement of PGL-1 antibody levels in residents of a former leprosy colony in Thailand. *Lepr. Rev.*, 79(3), 315-319, 2008.
7. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus.

Nature, 409(6823), 1007-1011, 2001.

8. Suzuki K, Takigawa W, Tanigawa K *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* DNA from archaeological skeletal remains in Japan using whole genome amplification and polymerase chain reaction. *PLoS One*, 5(8), e12422, 2010.
9. Suzuki K, Udono T, Fujisawa M, Tanigawa K, Idani G, Ishii N. Infection during infancy and long incubation period of leprosy suggested in a case of a chimpanzee used for medical research. *J. Clin. Microbiol.*, 48(9), 3432-3434, 2010.
10. 石井則久、尾崎元昭 編集：ハンセン病の外来診療、メジカルセンス、1997.
11. 小野友道、尾崎元昭、石井則久 編集：ハンセン病アトラス、金原出版、2006.
12. 中嶋 弘 監修：皮膚抗酸菌症、メジカルセンス、1998.

V. ハンセン病の行政検査に関する情報と様式および問い合わせ先

検査に関する情報や依頼用紙等は下記 URL から入手できます。

<http://www.nih.go.jp/niid/lrc/>

その他の問い合わせは以下にお願いします。

国立感染症研究所ハンセン病研究センター

センター長 石井則久

感染制御部第8室長 鈴木幸一

TEL: 042-391-8211

FAX: 042-394-9092

VI. 執筆者一覧

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

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

石井則久：国立感染症研究所ハンセン病研究センター