

## 24. ハンセン病研究センター

### 感染制御部

#### 部長 牧野正彦

#### 概要

平成21年4月1日、ハンセン病研究センターにおいては歴史的な変革が行われた。従来の2研究部（病原微生物部と生体防御部）8室体制から、抗酸菌研究の横断的画一的研究の強化を図るとともに、結核の基礎研究の強化を目的として1部8室体制とし、部名を感染制御部（Department of Mycobacteriology）とした。8室の内、第1～3室はらい菌に軸足を置き、第4～6室は結核菌を中心とした研究を行うこととし、さらに第7室・8室は社会的側面の研究及び行政対応にも対処し得るハンセン病研究を行うこととした。また、病原性抗酸菌に対するワクチン開発並びに薬剤耐性菌に関する研究は、菌種の壁を越え、共通の重要研究課題との認識を持って、各研究員が情報交換を密にして部をあげての協力体制の下研究を推進させることとした。また、6月には昨年度完成した第二研究棟の稼働整備が整い、所長許可の下 *in vitro* の研究が先行して実験が開始された。さらに、11月にはカニクイザルが導入され、動物実験も開始された。

ほぼ全ての研究において、昨年度の研究が継続された。その中で、ハンセン病に対する免疫療法の開発研究とワクチンの開発研究において大きな進展があった。免疫療法の研究では、前田主任研究官を中心とした研究グループにより、らい菌のリポタンパク LpK の一部リポペプチド（LipoK）が、細胞内感染を果たしたらい菌の細胞内殺戮を誘導する上で極めて有用な役割を果たすことを明らかにした。LipoK は CD8 陽性キラーT細胞のみならず CD4 陽性キラーT細胞を分化誘導し、パーフォリン・グランザイム B に加え、グラニューライシンの産生を誘導し、これらが作用することによって、らい菌を殺戮することが可能であることを証明した。ワクチン開発の研究では、改良型 BCG の作製が予定通り行われ、BCG の持つ固有の欠点、すなわちファゴゾームとライソゾームの融合を阻止することを凌駕する方策開発に進展が見られた。これまでその方策として、BCG 感染ファゴゾームの酸性化を促進する方策と、ファゴゾーム内で抗原性分子を分泌

させることにより抗原提示細胞と T 細胞の両者を活性化させる方策を検討してきたが、両者を組み合わせると、それぞれが相乗的に作用して強い T 細胞活性化能を有する BCG を産生することが可能であることを見出した。さらに、改良型 BCG の作製においては、抗原性分子を BCG に組み込む手法の確立が必須であるが、従来用いられてきたプラスミド型での導入では、挿入した遺伝子が年月とともに脱落する可能性が強い。そこで、BCG の染色体に抗原性分子を導入する方策が向井室長を中心に検討され、十分量の抗原が発現するプロモーターの開発に成功した。抗酸菌ワクチンのみならず、種々の細胞内寄生性菌に対するワクチン開発への応用が可能であり、実用化が期待される。

結核の研究もワクチン開発のための基礎研究が中心に行われた。結核ワクチンの開発にあっては、抜本的対策が必要である。これまで積み上げてきたタイプ 1 T 細胞の活性化を誘導する分子機構を最大限に応用して、エピトープによる抗原刺激により、T 細胞レセプターに直結して活性化される転写因子の同定に田村室長のグループが成功した。本因子を活性化する能力を持つワクチンの開発が今後の課題となる。

また、ハンセン病に関する行政検査及び依頼検査としての希少抗酸菌の同定が従来通り行われた。

最後に人事であるが4月1日付で第7室長に森 修一、8月1日付で第5室研究員に塚本裕美子、9月1日付で第6室長に星野仁彦が採用された。また、平成21年3月31日に定年退官した松岡正典室長と儀同政一室長が4月1日付で再任用職員として採用された。

#### 業績

##### 調査・研究

##### I. 抗酸菌の病原性因子と病変発症機構に関する研究

1. 抗酸菌糖脂質 Glycopeptidolipid (GPL) に含まれる D-Rhamnose の生合成解析

Rhamnose は細菌構成成分に広く含まれる糖鎖である

が、その多くは L-rhamnose である。一方、20 型血清型 GPL には、稀有な存在である D-rhamnose が含まれる。そこで、未だ機能や生合成で不明な点が多い D-rhamnose 注目し、20 型 GPL から取得した生合成遺伝子の発現解析を行った。その結果、糖鎖に結合した状態の D-mannose に作用し D-rhamnose を産生する特徴を持つ変換酵素遺伝子の存在を同定した。

[宮本友司、向井 徹、前田百美、中 崇 (MBR 社)・矢野郁也 (日本 BCG 製造)、牧野正彦]

## 2. シュワン細胞を用いた神経障害機構の解明

らい菌のシュワン細胞への感染がヒト末梢神経障害の誘導に深く関与しているが、その障害機構は未だに不明である。これまでにカンクイサル由来シュワン細胞株を樹立し、サイトカイン産生能を検討してきた。らい菌感染後、シュワン細胞表面に MHC クラス I 抗原の発現が見られたことから、菌の局在を調べた結果、約半数の菌はリゾゾームに局在していることが明らかとなった。精製したらい菌は半分近く死菌が混在するためだと考えられる。

[前田百美、遠藤真澄、牧野正彦]

## 3. ミコール酸合成系に関する研究

らい菌の糖脂質である TMM 及び TDM が持つミコール酸サブクラスが、他の抗酸菌と比べ特徴的であることからその解析を行う目的で、人工培養できないらい菌に代わり、BCG 菌を用いてミコール酸合成系の解析を行っている。これまでにミコール酸合成系のうち mma4A 及び mma2A 遺伝子の破壊株を BCG 菌コンノート株で作成し構成されるミコール酸を調べたところ mma4A 破壊株がらい菌のミコール酸と類似していることがわかった。これら変異株よりミコール酸を主要構成成分とする TMM 及び TDM を抽出し質量分析したところらい菌のそれと類似していることがわかった。そこで、それらを利用しハンセン病の血清診断抗原としての可能性を探った結果、ハンセ病患者血清は反応するが、特異性ではまだ不十分であり、今後さらに検討が必要であることがわかった。

[甲斐雅規、宮本友司、向井 徹、牧野正彦]

## 4. クロファジミンにより誘導されるマクロファージの細胞死と小胞体ストレスタンパクの動態

ハンセン病の化学療法に用いられるクロファジミンにはらい菌に対する抗菌作用に加え、らい反応などを抑制するなど抗炎症作用が報告されている。この機序については不明な点が多い。ヒトやマウスマクロファージをク

ロファジミン存在下にて培養すると、小胞体ストレス関連タンパクの発現や caspase 活性化を伴った細胞死が誘導されることを見出した。共焦点レーザー顕微鏡による観察では、小胞体タンパクへのクロファジミンの沈着や、核内に切断されて不活性化した DNA 修復酵素 PARP もみられた。核内にはクロファジミンの沈着はみられなかった [福富康夫、前田百美、牧野正彦]

## 5. らい菌感染マクロファージの脂質蓄積機構に関する研究

らい菌が感染したマクロファージのファゴゾーム内で、菌は大量の脂質とともに存在することから、この脂質が菌の増殖に重要であると考えられる。近年、細胞内脂質蓄積の分子機構として ADRP が重要な役割を果たすことが明らかになるとともに、脂質の分解に重要な酵素 HSL の存在も明らかになってきた。そこで、らい菌感染マクロファージにおける ADRP, HSL の役割について検討を行い、感染後前者の発現が亢進、後者が抑制される事を示した。

[鈴木幸一、石井則久]

## II. 生体防御機構とワクチン開発に関する研究

### 1. らい菌感染モデルサルの樹立

ハンセン病の発症機構の解明およびワクチン開発における効果判定・安全性確認のため、サルのモデル系が必要になる。幼若および新生仔カンクイザルにらい菌を接種し、その経過解析を進めている。その結果、接種後 58, 59 カ月に 1 頭の鼻腔洗浄液よりらい菌 PCR 陽性が認められた。接種から、菌の排泄まで 5 年と長い経過を経て、感染成立を示す結果であった。

[向井 徹、松岡正典、片貝裕子 (予防衛生協会)、牧野正彦]

### 2. 効率的な抗原提示を行う BCG の開発

*M. bovis* BCG を宿主としたハンセン病ワクチン開発のため、Urease C 遺伝子破壊 BCG 株を作製してきた。さらに、らい菌蛋白を BCG で高度に発現させるため、抗酸菌ファージゲノムより promoter のスクリーニングを行った。その結果、*M. smegmatis* および BCG を宿主とし、既存の hsp60 プロモーターより強い活性をもつ領域を同定した。本領域は、これまで plasmid 型による蛋白発現量を integrate 型でも十分量補え、ワクチン開発に有用と考えられた。

[向井 徹、福富康夫、宮本友司、前田百美、牧野正彦]

### 3. らい菌由来リポ蛋白 LpK の免疫学的な解析

らい菌由来 LpK の合成リポペプチド LipoK は、樹状細胞を成熟化し、らい菌抗原を T 細胞に提示することによって免疫応答を引き起こすことを明らかにしてきた。感染した細胞を破壊するため、CTL 細胞の果たす役割が大きい事が知られている。LipoK 存在下でらい菌感染樹状細胞は CD8 及び CD4 陽性 T 細胞を刺激しパーフォリン、グランザイム B を産生した。さらに、らい菌または LipoK で刺激した樹状細胞を用いて、T 細胞からの granulysin 産生能を調べた結果、らい菌のみでは granulysin 産生 CD8 陽性細胞はほとんど (1.67%) 見られないが、らい菌存在下で LipoK をパルスした樹状細胞は CD8 陽性 T 細胞を刺激し、有意に granulysin を産生した (18.9%)。Granulysin は直接菌を殺す事が知られている、従って、LipoK はハンセン病予防に重要な分子である可能性が示唆された。

[前田百美、田村敏生、福富康夫、牧野正彦]

### 4. 結核菌ワクチン開発の基礎研究のための組換え BCG 作製

これまでの研究から、抗原性が高い major membran protein II (MMP II) と HSP70 との融合蛋白質を発現させた BCG 株を作製し、従来の BCG よりも強い免疫応答を誘導できることを見出してきた。そこで、結核菌に存在するが BCG に存在しない抗原として知られる ESAT6 分子を HSP70、MMP II と融合させて発現させた BCG 株を新たに樹立した。この BCG 株を感染させた場合の宿主の免疫応答についての解析を開始した。

[塚本裕美子、牧野正彦]

### 5. ヒトマクロファージ、樹状細胞を用いた組換え BCG の細胞内局在の解析

これまでの研究から、尿素分解酵素を欠損させた BCG (BCG- $\Delta$ UT 株) は従来の BCG と比較して強い免疫応答を誘導できることを見出してきた。従来の BCG 株は感染マクロファージ内ではライソソーム中に取り込まれないことが知られているが、BCG- $\Delta$ UT 株はライソソーム中に取り込まれることが予想される。そこでヒト由来マクロファージを用いて BCG- $\Delta$ UT 株の細胞内局在について解析し、ライソソーム中に取り込まれていることを確認した。ヒト由来樹状細胞では従来の BCG 株でもライソソーム中に取り込まれるものが多く、BCG- $\Delta$ UT 株との差は見られなかった。

[塚本裕美子、牧野正彦]

### 6. 結核菌分泌蛋白による Th1 分化誘導機序の解析

結核菌分泌蛋白由来のペプチド (Peptide-25) は、Th1 分化の主要調節因子である T-bet に加え、TATA box binding protein associated factor の一種の発現を誘導することで ifn- $\gamma$  遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導し、IL-12 などの Th1 分化誘導サイトカインや副刺激因子相互作用非依存的に Th1 分化を誘導していることを明らかにした。

[田村敏生、下袴田陽子、高津聖志 (富山県薬事研究所)、牧野正彦]

### 7. Th1 細胞依存的機能的細胞傷害性 T 細胞の分化誘導機序の解析

ナイーブ CD8+ T 細胞からグランザイム B の発現を伴う機能的な細胞傷害性 T 細胞への分化には Th1 細胞への分化を誘導するような環境下で CD4+ T 細胞と相互作用した樹状細胞の活性化が重要であること、この活性化には IFN- $\gamma$ 、IL-12、CD40-CD40 リガンド相互作用といった Th1 分化を誘導・制御する因子以外の CD4+ T 細胞が分泌する新たな液性因子によって制御されていることを明らかにした。

[田村敏生、下袴田陽子、高津聖志 (富山県薬事研究所)、牧野正彦]

## III. 病原性抗酸菌症の診断および治療に関する研究

### 1. ハンセン病の新しい血清診断の開発

これまでに血清診断用の抗原として、Major Membrane Protein-II (MMP-II) の有用性を検討してきた。ハンセン病流行地である、インドネシア (南スラウェシ島) の患者血清中の抗 MMP-II 抗体値を測定した結果、抗 MMP-II 抗体の陽性率は高く、血清診断に有用であることが示唆された。つぎに、日本の療養所入所者の血液を調べた。多菌型では 75.8%、少菌型では 47% の陽性率であり、抗 PGL-I 抗体の陽性率より高かった。多菌型ハンセン病患者では皮膚病変が広範囲であった症例で、抗 MMP-II 抗体価がより高値を示した。

[前田百美、鮫島朝之 (国立療養所星塚敬愛園)、甲斐雅規、Mohammed Hatta (Hasanuddin University)、牧野正彦]

### 2. クロファジミンの細胞親和性に関わる分子

クロファジミンには細胞親和性があり、継続服用により組織沈着が起こる。aurintricarboxylic acid (ATA) によりクロファジミン誘導アポトーシスが抑制されたが、FACS による解析からクロファジミンの細胞への沈着が

ATAにより阻害されていることが判明した。分光光度計による吸収スペクトルの解析結果からATAとクロファジミンは会合している可能性が示唆され、クロファジミンのフェナジン構造の窒素原子との間で水素結合が起こった結果、細胞への沈着が阻害された可能性が考えられた。すなわち、クロファジミンの分子中、フェナジン構造の窒素原子部分が細胞親和性に大きく関わっている可能性が示唆された。

[福富康夫、前田百美、牧野正彦]

### 3. ヒトとマウスマクロファージ内におけるらい菌に対する殺菌機構の違い

ハンセン病において、LL型ではらい菌がマクロファージ内で増殖しているが、TT型ではらい菌が病変部分に検出されることは稀である。TT型ではマクロファージが活性化して殺菌作用が増強しているといわれているが、ヒトマクロファージの殺菌機構について詳細は不明である。マウスマクロファージやM-CSF誘導ヒト単球由来マクロファージ(M-マクロファージ)をIFN $\gamma$ 存在下で培養すると抗らい菌活性(らい菌の代謝活性減少)が誘導されたが、IFN $\gamma$ 刺激マウスマクロファージにみられるような、誘導型酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現はなく、殺菌に酸化窒素の関わりは少ないと考えられる。

[福富康夫、前田百美、松岡正典、牧野正彦]

### 4. ヒトマクロファージにおける抗らい菌作用発現の仕組み

IFN $\gamma$ 刺激マクロファージではウエスタンブロット法によりNADPHオキシダーゼを構成するphoxタンパクの発現が著明に増強していることが判明した。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察により、IFN $\gamma$ 刺激したマクロファージ細胞質におけるphoxタンパクの蓄積や、貪食されたらい菌周囲へのphoxタンパクの集積が観察された。よって、スーパーオキシド産生酵素であるNADPHオキシダーゼの発現がらい菌に対する殺菌作用を増強している可能性が示唆された。

[福富康夫、前田百美、松岡正典、牧野正彦]

### 5. 病原性抗酸菌の分離・同定に関する研究

培養や同定が困難な病原性抗酸菌について、1. 培養条件の検討、2. 菌の生化学的性状、3. 各種遺伝子の配列解析、による分離・同定を試みた。これまでに、報告例のない皮膚疾患由来および肺疾患由来の新種抗酸菌の分離・同定に成功した。また、DDH法による同定でM. xenopi症とされる中にM. heckeshornense症例が高い確率であ

ること、あるいはM. abscessusとされている症例の1/3はM. massiliense症であることを明らかにした。

[中永和枝、星野仁彦、牧野正彦、石井則久、岩本朋忠(神戸市環境保健研究所)、吉田志緒美(NHO近畿中央胸部疾患センター) 齋藤肇(広島県環境保健協会)]

## IV. 薬剤耐性らい菌に関する研究

### 1. 抗酸菌のフルオロキノロンの耐性変異に関する研究

オフロキサシンなどのフルオロキノロン系薬剤に対する抗酸菌の耐性はgyrA遺伝子の変異によって起こるが、様々な変異の影響を検証するため、迅速発育抗酸菌Mycobacterium smegmatisのgyrA遺伝子を、らい菌、または結核菌gyrA遺伝子で置き換えたモデル抗酸菌株の作製を試みた。らい菌gyrA遺伝子ではインテイン部を除去しても置き換えに成功しなかったが、結核菌gyrA遺伝子ではモデル菌を得られたため、これに点変異を加えてgyrA変異とフルオロキノロン耐性の関係について詳細に検討している。

[中田登、甲斐雅規、牧野正彦]

### 2. 抗酸菌のリファンピシン耐性変異に関する研究

化学療法剤リファンピシンに対するらい菌、結核菌の耐性はrpoB遺伝子の変異によって起こり、様々な変異が報告されている。そこで、rpoB遺伝子の様々な変異がリファンピシン感受性に与える影響を詳細に検証するため、迅速発育抗酸菌Mycobacterium smegmatisのrpoB遺伝子をらい菌rpoB、または結核菌rpoB遺伝子で置き換えたモデル抗酸菌株を作製した。これを用いて、16ヶ所のコドン・30種の変異について試験した結果、8ヶ所のコドン・17種の変異で耐性化した。他の変異では耐性化しないことが示された。

[中田登、甲斐雅規、牧野正彦]

### 3. らい菌量と抗菌薬の濃度による抗らい菌活性の相関に関する研究

ハンセン病の治療に用いられている抗菌薬DDS, B663, RFP, SPFX, CAM, MINOの投与量が適正かどうか、らい菌量と抗らい菌薬の濃度との相関をBuddemeyer法を用いて調べた結果、RFP, SPFX, MINOは、少菌型・多菌型とも標準的治療法で、DDS, B663, CAMは、少菌型では標準的治療法で、多菌型では標準的治療法より投与量を増やすことで有効血中濃度を維持し、抗らい菌活性を強め、耐性菌対策になると考えられた。

[儀同政一、牧野正彦]

#### 4. らい菌 の薬剤耐性菌と感受性菌の混合感染に関する研究

ハンセン病治療薬、ダブソンの耐性がらい菌の薬酸合成酵素遺伝子の変異と関連することが知られており、耐性菌検出の指標となっている。しかし臨床分離株でしばしば塩基配列決定が困難な例や陰性だが、臨床上耐性が疑われる例があり、他の耐性機構の存在あるいは耐性菌と感受性菌の混在が疑われた。これまで、保存臨床検体 DNA から変異領域を PCR 増幅しダイレクトシーケンス及びクローニングしてシーケンスしたところ、耐性菌と感受性菌が混在していると考えられる検体を発見してきた。現在さらに治療経過と耐性菌出現との関連性等に着目して臨床材料の調査を行っている。

[甲斐雅規、松原久美子、牧野正彦]

#### V. らい菌の遺伝情報に関する研究

##### 1. らい菌ゲノムの次世代シーケンス解析

当センターで維持、管理、使用されているらい菌株 3 株の次世代ゲノムシーケンスを行い、全ゲノムシーケンスが解明されているらい菌 TN 株、Br4923 株を含めた相互比較を行なった。特に増殖能の異なるらい菌株から、これまで知られていないらい菌の増殖に関与する遺伝子もしくは遺伝子群の検索を行っている。SNPs 解析から増殖能の低いらい菌に特有のアミノ酸変異を持つ遺伝子約 30 を同定したので、各遺伝子のアミノ酸変異による増殖能に与える影響を調査している。また、これまで同定してきた SNPs 情報および今回得られたものより、らい菌の疫学調査に有用な SNPs パターンの検討を行っている。

[甲斐雅規、宮本友司、中田 登、松岡正典、牧野正彦]

##### 2. DNA マイクロアレイによるらい菌遺伝子発現の網羅的解析

らい菌の全遺伝子を対象とした DNA マイクロアレイを行い、遺伝子発現レベルを明らかにした。それらの遺伝子発現を機能ごとに分類を行いらい菌遺伝子の特徴を初めて明らかにするとともに、連続して発現する遺伝子から新規オペロンと考えられる領域を複数同定した。

[鈴木幸一、赤間剛、石井則久]

#### VI. ブルーリ潰瘍および近似疾患に関する研究

##### 1. *Mycobacterium ulcerans* 感染症に関する研究

*Mycobacterium ulcerans* によるブルーリ潰瘍は難治性の皮膚疾患である。これまでに、ブルーリ潰瘍に有効な治療薬・ワクチン等の開発を目的として、マウス実験

感染モデル系を確立し Rifalazil の有効性を明らかにするとともに末梢神経傷害と毒性脂質マイコラクトンの関係を明らかにした。また日本におけるブルーリ潰瘍 (“*M. ulcerans* subsp. *shinshuense*” 感染症) 14 症例を収集し、*M. ulcerans* との違いを検討中である。

[中永和枝、星野仁彦、牧野正彦、石井則久、後藤正道 (鹿児島大)、岩本朋忠 (神戸市環境保健研究所)、齋藤肇 (広島県環境保健協会)]

#### VII. ハンセン病回復者と家族への偏見・差別の是正に関する社会研究

##### 1. ハンセン病回復者と家族の社会課題と共生政策に関する国際研究

ミャンマーの Mandalay 管区、東 Shan 州、西 Shan 州、Mon 州、Magwe 管区、Siggaing 管区のハンセン病患者村 (コロニー) と一般社会 (コミュニティ) のハンセン病患者・回復者 (PAL: Person Affected by Leprosy) と家族の直面する社会課題を調査し、その対策としての有効事例を研究するなどして、PAL と家族への偏見・差別とスティグマの成立要因を分析し、それらを是正するプログラムなど研究した。その結果、回復者・患者への偏見・差別の是正には、彼らの経済的自立、教育水準の向上、アイデンティティの確立が必要と考えられ、早期発見・早期治療、障害予防のための医療制度の改革、経済的自立のための microcredit loan や効果的な職業訓練の導入、教育水準を高めるためのファンドの設立と PAL やその子弟から教師を育成するなど効果的であることが明らかとなった。

[森 修一、石井則久]

#### VIII. ハンセン病の疫学に関する研究

##### 1. 日本のハンセン病の疫学の歴史的研究

日本における日本人のハンセン病患者数は、過去 1 世紀以上にわたって減少を続けており、近年は年間数人程度にとどまっている。また、沖縄を中心として、南日本に新患者発生が集中している、新患者が高齢化傾向にある。このようなハンセン病の終焉期疫学的傾向が日本固有のものなのか、それとも類字の疫学的状況にある他国にも共通の要素があるのかを明らかにするために、過去の文献や全国のサーベイランスの結果をもとに、1964 年から 2008 年の 45 年間にわたる日本の患者の地理的分布、診断時年齢、性別、病型、家族歴などについて動向を分析した。その結果、日本人ハンセン病新規患者においても、近年、罹患時年齢の上昇、男女比の増加傾向がみられた。また、ハンセン病の流行の制圧は、北部ほどより

早期に開始し、成功も早かった。これらは、ヨーロッパ等世界の他地域においても、ハンセン病の流行の終焉期に共通して見られる減少であった。

[木庭 愛 (厚生労働省大臣官房統計情報部人口動態・保健統計課)、森 修一、石井則久]

## 国際協力関係業務

### I. ハンセン病の早期診断法と薬剤耐性らい菌に関する研究及び WHO の薬剤耐性監視事業への協力

これまで主にベトナム国とミャンマー国においてハンセン病の早期診断法に関する共同研究を実施し、PGL-I 及び MMP-II などのらい菌抗原を利用した血清診断法の確立とその有効性を証明してきた。今年度はさらに免疫学的な診断法のハンセン病診断への応用を可能にするための実験室準備と現地担当者の教育を行った。さらに WHO より依頼を受けた薬剤耐性サーベイへの協力 (ベトナム国、ミャンマー国で得られた試料を用い、薬剤耐性遺伝子変異の確認) を行い、結果をフランス国パリで行われた WHO によるワークショップに参加し報告した。

[甲斐雅規、福富康夫、向井 徹、前田百美、宮本友司、松岡正典、Nguyen Phuc Nhu Ha (Quyhoa hospital, Vietnam), Nguyen Thanh Tan (Quyhoa hospital, Vietnam), 牧野正彦]

### II. WHO による薬剤監視事業への協力

WHO による薬剤監視事業において耐性獲得に関与する変異検出遺伝子検索を担当する国内外の計 11ヶ所の reference center における技術の統一を図った。4 菌株についてそれぞれ 2 濃度のサンプルと、Negative control を配布した。2 施設を除いて PCR による遺伝子増幅の効率が低く、その改善が急務であった。また、1 施設においては Negative control に非特異的 PCR 陽性が示され、技術の改善が望まれた。FTA® elute card はらい菌遺伝子の保存とその後の遺伝子解析に有用であった。

[松岡正典]

### らい菌の供給

平成 21 年 4 月より同 22 年 3 月までの間において、のべ 36 回、122 匹、5 施設 (国内 3、国外 2)、8 名 (国内 6、国外 2) の研究者に対し、らい菌感染ヌードマウス足蹠の供給を行った。

[甲斐雅規・天内肇・前田百美・谷川和也・牧野正彦]

### らい菌感染ヌードマウス足蹠の分与 (平成 21 年 4 月より平成 22 年 3 月)

No.	年月日	分与先		マウス匹数
1)	4.1	前田	ハンセン研	1
2)	4.1	甲斐	ハンセン研	1
3)	4.28	前田	ハンセン研	1
4)	5.22	前田	ハンセン研	1
5)	5.27	甲斐	ハンセン研	5
6)	6.2	松岡	ハンセン研	12
7)	6.3	前田	ハンセン研	1
8)	6.1	松岡	ハンセン研	4
9)	6.1	甲斐	ハンセン研	6
10)	6.18	前田	ハンセン研	1
11)	6.23	天児	九州大	1
12)	7.15	儀同	ハンセン研	4
13)	7.17	前田	ハンセン研	1
13)	8.5	前田	ハンセン研	1
14)	8.18	松岡	ハンセン研	1
15)	8.26	甲斐	ハンセン研	13
16)	8.27	甲斐	ハンセン研	18
17)	9.3	前田	ハンセン研	1
18)	9.1	甲斐	ハンセン研	4
19)	9.16	(松岡)	WHO	2
20)	10.9	前田	ハンセン研	1
21)	11.9	向井	ハンセン研	5
22)	12.3	向井	ハンセン研	3
23)	12.4	前田	ハンセン研	1
24)	12.15	増澤	北里大	2
25)	2010.1.6	Dr Cambau (松岡)	フランス国立抗酸菌リファレンスセンター	8
26)	1.7	前田	ハンセン研	1
27)	1.26	前田	ハンセン研	1
28)	1.28	甲斐	ハンセン研	1
29)	2.1	向井	ハンセン研	5
30)	2.1	前田	ハンセン研	1
31)	2.17	天児	九州大	1
32)	2.19	前田	ハンセン研	1
33)	2.22	向井	ハンセン研	5
34)	3.5	前田	ハンセン研	1
35)	3.1	前田	ハンセン研	1
36)	3.23	向井	ハンセン研	5

## 発表業績一覧

### I. 誌上発表

#### 1. 欧文発表

- 1) Makino, M., Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, and T. Mukai. 2009. GM-CSF-mediated T-cell activation by macrophages infected with recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *Mycobacterium leprae*. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 55: 39-46.
- 2) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. 2009. Temperature dependency for survival of *Mycobacterium leprae* in macrophages. Jpn. J. leprosy, 78: 7-16.
- 3) Maeda, Y., T. Tamura, M. Matsuoka, and M. Makino.

2009. Inhibition of the multiplication of *Mycobacterium leprae* by vaccination with a recombinant *M. bovis* BCG strain that secretes major membrane protein-II in mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 16: 1399-1404.
- 4) Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, Matsuoka M, Taylor GM, Donoghue HD, Bouwman A, Mays S, Watson C, Lockwood D, Khamesipour A, Dowlati Y, Jianping S, Rea TH, Vera-Cabrera L, Stefani MM, Banu S, Macdonald M, Sapkota BR, Spencer JS, Thomas J, Harshman K, Singh P, Busso P, Gattiker A, Rougemont J, Brennan PJ, Cole ST. 2009. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet.* 41:1282-1289.
  - 5) Matsuoka M, Gonzalez AV, Estrada I, Carreño-Martinez C, Fafutis-Morris M. 2009. Various genotypes of *Mycobacterium leprae* from Mexico reveal distinct geographic distribution. *Lepr Rev.* 80:322-326.
  - 6) Gillis T, Vissa V, Matsuoka M, Young S, Richardus JH, Truman R, Hall B, Brennan P; Ideal Consortium Partners. 2009. Characterisation of short tandem repeats for genotyping *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev.* 80:250-60.
  - 7) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. 2009. Induction of cross-priming of naïve CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by recombinant Bacillus Calmette-Guérin that secretes heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. *J. Immunol.*, 183:6561-6568.
  - 8) Hatta, M., M. Makino, Ratnawati, Mashudi, Yadi, M. Sabir, N. Tandirogang, L. M. Rusyati, M. Kai, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, T. Mukai, and Y. Maeda. 2009. Detection of serum antibodies to *M. leprae* Major Membrane Protein-II in leprosy patients from Indonesia. *Lepr. Rev.* 80: 402-409.
  - 9) Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ, Koyama S, Aoshi T, Akira S, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Yamanaka Y, Hirano H, Suzuki K, Okuda K. 2009. A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class of vaccine adjuvant. *J. Immunol* 182:1593-601.
  - 10) Akama T, Suzuki K, Tanigawa K, Kawashima A, Wu H, Nakata N, Osana Y, Sakakibara Y and Ishii N. 2009. Whole genome tiling array analysis of *Mycobacterium leprae* RNA reveals high expression of pseudogenes and non-coding regions. *J. Bacteriol* 191:3321-3327.
  - 11) Bang PD, Suzuki K, Phuong LT, Chu TM, Ishii N and Khang TH. 2009. Evaluation of PCR-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy. *J Dermatol* 36:269-276.
  - 12) Tanigawa K, Suzuki K, Kimura H, Takeshita F, Wu H, Akama T, Kawashima A, and Ishii N. 2009. Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signalling in *Mycobacterium leprae* infection. *Clin Exp Immunol* 156:495-501.
  - 13) Nakamura K, Akama T, Pham DB, Sekimura S, Tanigawa K, Wu H, Kawashima A, Hayashi M, Suzuki K and Ishii N. 2009. Detection of RNA expression from pseudogenes and noncoding genomic regions of *Mycobacterium leprae*. *Microb Pathog* 47:183-187.
  - 14) Koba, A. N. Ishii, S. Mori, PE. Fine. 2009. The decline of leprosy in Japan: patterns and trends 1964-2008. *Lepr Rev.* 80:432-40.
  - 15) Matsuoka M. 2010. Drug resistance in leprosy. *Jpn J Infect Dis.* 63:1-7.
2. 和文発表
- 1) 田村敏生、福富康夫、牧野正彦. 2009. 結核・ハンセン病に対するワクチンの開発研究の最前線. (The forefront of vaccine development: tuberculosis and leprosy.) *日本ハンセン病学会誌* 78 : 271-276.
  - 2) 鈴木幸一、永岡譲、森修一、石井則久. 2009. 2008年における世界のハンセン病の現況について. *日本ハンセン病学会誌* 78:25-34.
  - 3) 赤間剛、鈴木幸一、谷川和也、川島晃、Huhehasi Wu、石井則久. 2009. タイリングアレイを用いたらい菌全ゲノムにおける発現部位の検出. *日本ハンセン病学会誌* 78:49-54.
  - 4) 鈴木幸一、中村和昭、谷川和也、川島晃、Huhehasi Wu、赤間 剛、林もゆる、関村 慎、Pham Dang Bang、石井則久. 2009. らい菌ゲノム由来 RNA 発現の網羅的解析とその意味するもの. *日本ハンセン病学会誌* 78: 61-65.
  - 5) 石井則久、森修一、永岡譲、鈴木幸一. 2009. WHO 第9回ハンセン病制圧のための技術勧告 (Technical Advisory Group: TAG) 会議報告. *日本ハンセン病学会誌* 78:75-88.
  - 6) 石井則久、鈴木幸一. 2009. 地球温暖化に伴う輸入感染症. *皮膚科の臨床* 51:7-11.
  - 7) 永岡譲、石田裕、鈴木幸一、石井則久. 2009. ミャンマーにおけるハンセン病制圧記念行事 (2009) の

報告. 日本ハンセン病学会誌 78:251-253.

- 8) 石井則久、鈴木幸一. 2009. 抗酸菌感染症. 皮膚科の臨床 51(11):1599-1606.
- 9) 森 修一、鈴木幸一、スマナ バルア、永岡 譲、石井則久. 2010. ハンセン病による負荷のさらなる軽減のための強化された世界戦略. 日本ハンセン病学会誌 79:53-73.

## II. 学 会 発 表

### 1. 国際学会

- 1) Tamura, T., Y. Shimohakamada, M. Makino, and K. Takatsu. The role of T cell receptor-mediated signals in Th1 subset differentiation of naïve CD4+ T cells primed with Peptide-25 of Ag85B. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.
- 2) Mukai, T., Y. Maeda, Y. Miyamoto, and M. Makino. Identification of Strong Mycobacterial Promoters from Mycobacteriophage TM4. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.
- 3) Miyamoto, Y., and M. Makino. Biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.
- 4) Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. Apoptosis-inducing activity of clofazimine in macrophages and expression of ER stress proteins in the cells. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.
- 5) Maeda, Y., Y. Fukutomi, H. Wang, T. Tamura, and M. Makino. The fate of mycobacteria in human dendritic cells and macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.
- 6) Izumi, S., Iswahydi, I. Agusni, C. Rosita, R. Wahyuni, D. Adriaty, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. *M. leprae*-derived Major membrane Protein II (MMP-II) as A New Antigen for Serodiagnosis of Leprosy

Infection. 10th Annual Meeting of Indonesian Society of Dermatology and Venereology, Bantem, Indonesia, October 29-30, 2009

- 7) Nakanaga K, Hoshino Y, Ishii N: Buruli ulcer in Japan: 14 cases of “Mycobacterium ulcerans subsp. shinshuense” infection in 1980-2009. Annual Meeting of the WHO Global Buruli Ulcer Initiative, Geneva, Switzerland, March 22-24 ,2010
- 8) Goto M, Junichiro En, Nakanaga K, Ishii N, Saito H, Sarfo S, Phillips RO, Wansbrough-Jones M: Comparison of murine and human histopathology after chemotherapy. Annual Meeting of the WHO Global Buruli Ulcer Initiative, Geneva, Switzerland, March 22-24, 2010

### 2. 国内学会

- 1) 赤間剛, 鈴木幸一, 谷川和也, 川島晃, Huhehasi Wu, 林もゆる, 石藤雄子, 石井則久. タイリングアレイによるらい菌ゲノム全域の網羅的発現解析. 第 3 回日本ゲノム微生物学会年会 2009 年 3 月. 東京
- 2) 川島晃, 谷川和也, Huhehasi Wu, 赤間剛, 石井則久, 武下文彦, 鈴木幸一. 甲状腺細胞傷害によって漏出する二本鎖 DNA が誘導する自然免疫機構の解明. 第 82 回日本内分泌学会 2009 年 4 月. 前橋
- 3) 中永和枝, 斎藤肇, 石井則久. 紅皮症患者より分離された遅発育性暗発色抗酸菌: 主としてその細菌学的性状について. 第 83 回日本感染症学会総会 2009 年 4 月 東京
- 4) 大野貴司, 井形華絵, 梶田 藍, 大塚正樹, 濱田利久, 岩月啓氏, 野村知代, 片山治子, 石井則久, 中永和枝. 非結核性抗酸菌による難治性潰瘍の 3 例. 第 247 回日本皮膚科学会岡山地方会 2009 年 5 月 岡山
- 5) 甲斐雅規, 中田 登, 松岡正典, 椎名 隆, 猪子英俊, 牧野正彦. らい菌 Thai53 ゲノム由来新規 SNPs の探索. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲
- 6) 松岡正典, Mary Fafutis Morrriis, Iris Estrada. メキシコにおいて分離されるらい菌の遺伝子型とその地理的分布. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲
- 7) 天児和暢, 飯田健一郎, 松岡正典, 吉田真一. らい菌の試験内培養. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲
- 8) 向井 徹, 宮本友司, 前田百美, 牧野正彦. らい菌



- 蛋白調整に用いる発現用プロモーターの同定. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲
- 9) 前田百美, Mochammad Hatta, Ratnawati, Mashudi, Yadi, Muhammad Sabir, Nataniel Tandirogang, Luh Made Mas Rusyati, 甲斐雅規, 向井 徹, 宮本友司, 福富康夫, 牧野正彦. Major membrane Protein-II を用いた血清診断法. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲
- 10) 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. 結核・ハンセン病に対するワクチンの開発研究の最前線. (シンポジウム) 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲
- 11) 儀同政一. ハンセン病の化学療法薬 (教育講演). 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲
- 12) 赤間剛, 鈴木幸一, 谷川和也, 川島晃, Huhehasi Wu, 林もゆる, 石藤雄子, 石井則久, 宮村達男. DNA マイクロアレイによるらい菌全遺伝子の発現解析. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲
- 13) 谷川和也, 鈴木幸一, 川島晃, Huhehasi Wu, 赤間剛, 林もゆる, 中村和昭, 相沢清香, Pham Dang Bang, 石藤雄子, 木村博昭, 生山祥一郎, 武下文, 石井則久. らい菌は宿主マクロファージの TLR シグナルを抑制し細胞内寄生環境を構築する. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲
- 14) 細川篤, 山口さやか, 宮里仁奈, 上里博, 照屋操, 谷川和也, 鈴木幸一, 松岡正典, 矢島幹久, 石井則久. TT ~ BT 型が疑われたハンセン病の 1 例. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲
- 15) 松尾英一, 坂井哲夫, 野間口博子, 鈴木幸一, 脇坂晟, 藤岡保範, 神谷茂. 血管病変と HI75 の神経侵入. 第 82 回日本ハンセン病学会, シンポジウム 1、ハンセン病神経障害総論と最近の知見. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲
- 16) 鈴木幸一. らい菌の細胞内寄生機構. 第 82 回日本ハンセン病学会 シンポジウム 2, らい菌の宿主体内での生き延び策をどう捉え、どう対処するのか. 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲
- 17) 中永和枝, 吉田志緒美, 岩本朋忠, 山本淳, 服部陽子, 畑井喜司雄, 石井則久, 牧野正彦, 斎藤肇. Mycobacterium marinum に関する研究: ヒト皮膚並びに肺疾患由来菌と魚病由来菌の比較検討. 第 79 回実験結核研究会 2009 年 7 月 札幌
- 18) 吉田志緒美, 鈴木克洋, 中永和枝, 岩本朋忠, 富田元久, 矢木泰弘, 坂谷光則, 斎藤肇. わが国における Mycobacterium marinum による肺感染症の第 2 例. 第 84 回日本結核病学会総会 2009 年 7 月 札幌
- 19) 中永和枝, 斎藤肇, 石井則久. 紅皮症患者の生検皮膚組織より分離された遅発育暗発色性の 1 抗酸菌株. 第 84 回日本結核病学会総会 2009 年 7 月 札幌
- 20) 中永和枝, 斎藤肇, 石井則久, 牧野正彦, 江良悠子, 松本賢太郎, 丸茂健治, 松本英伸, 洲鎌芳美, 重藤えり子, 児玉朱実, 小橋吉博, 富田元久, 倉岡敏彦. Mycobacterium abscessus と鑑別を要する抗酸菌、なかんずく Mycobacterium massiliense について. 第 41 回非結核性抗酸菌症研究協議会 2009 年 7 月 札幌
- 21) 斎藤肇, 中永和枝, 石井則久. 一温泉施設の垢擦りマッサージ師にみられた Mycobacterium massiliense 皮膚感染症の 2 例. 第 79 回日本感染症学会西日本地方会総会 2009 年 11 月 福岡
- 22) 斎藤肇, 中永和枝, 秋山也寸史, 松本英伸, 洲鎌芳美, 重藤えり子, 児玉朱実, 小橋吉博. Mycobacterium abscessus とその近縁菌 Mycobacterium massiliense との鑑別同定. 第 79 回日本感染症学会西日本地方会総会 2009 年 11 月 福岡
- 23) 斎藤肇, 中永和枝, 松本英伸, 小橋吉博, 児玉朱実, 丸茂健治, 江良悠子, 洲鎌芳美. 近縁な抗酸菌による誤診し易い感染症. 第 26 回広島感染症研究会 2009 年 11 月 広島
- 24) 斎藤肇, 中永和枝, 石井則久. Mycobacterium abscessus 類似抗酸菌 Mycobacterium massiliense による皮膚感染症の 2 例. 第 40 回結核・非定型抗酸菌症治療研究会 2009 年 12 月 東京
- 25) 斎藤肇, 中永和枝, 石井則久, 丸茂健治, 秋山也寸史, 松本英伸, 洲鎌芳美, 小橋吉博, 重藤えり子, 児玉朱実, 富田元久, 永井英明, 矢野修一, 加治木章, 伏脇猛司, 倉岡敏彦, 岡崎充宏. Mycobacterium abscessus とその近縁菌、Mycobacterium massiliense および Mycobacterium bolletii、との鑑別・同定法. 第 40 回結核・非定型

抗酸菌症治療研究会 2009年 12月 東京

- 26) 斎藤肇, 中永和枝, 石井則久, 丸茂健治, 松本英伸, 洲鎌芳美, 重藤えり子, 児玉朱実, 小橋吉博. *Mycobacterium abscessus* と, その類似抗酸菌, *Mycobacterium massiliense* との鑑別・同定. 第60回日本結核病学会中国四国支部学会 2010年 2月 山口
- 27) 斎藤肇, 中永和枝, 石井則久, 江良悠子, 松本賢太郎, 金澤裕司. *Mycobacterium abscessus* 類似抗酸菌 *Mycobacterium massiliense* による皮膚感染症の2例. 第60回日本結核病学会中国四国支部学会 2010年 2月 山口
- 28) 宮本友司, 向井 徹, 甲斐雅規, 前田百美, 中 崇, 藤原永年, 水野浄子, 矢野郁也, 牧野正彦. *Mycobacterium avium complex* 血清型4型株における glycopeptidolipid の生合成解析. 第83回日本細菌学会総会 2010年3月 横浜
- 29) 向井 徹, 前田百美, 福富康夫, 宮本友司, 松岡正典, 牧野正彦. 抗酸菌ファージ TM4 に由来する強力な抗酸菌プロモーターの同定. 第83回日本細菌学会総会 2010年3月 横浜
- 30) 中田 登, 甲斐雅規, 牧野正彦. 抗酸菌 *rpoB* 遺伝子変異とリファンピシン感受性に関する解析. 第83回日本細菌学会総会 2010年3月 横浜
- 31) 前田百美, 田村敏生, 甲斐雅規, 福富康夫, 牧野正彦. らい菌リボ蛋白由来リポペプチドによる宿主細胞内らい菌の殺戮. 第83回日本細菌学会総会 2010年3月 横浜
- 32) 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. ヒトマクロファージの抗らい菌活性発現と phox タンパクの動態. 第83回日本細菌学会総会 2010年3月 横浜