

23. ハンセン病研究センター

感染制御部

部長 石井 則久

概要

感染制御部においては、らい菌・結核菌・非結核性抗酸菌の感染によって発症する疾病の病態生理・発症機構の解明ならびに診断・治療・予防に関する研究業務とハンセン病に関する行政検査及び希少非結核性抗酸菌の分離・同定試験（依頼検査）を行っている。

Mycobacterium leprae (*M. leprae*, らい菌)に関する研究においては、らい菌の宿主細胞内寄生機構に関する研究がなされた。らい菌は感染後宿主マクロファージに豊富な脂質とともに寄生する機構が知られているが、感染後宿主細胞から脂質を抽出して構造解析を行う一方で、細胞内の遺伝子発現をマイクロアレイ法で解析した。その結果、らい菌貪食後に細胞内遺伝子発現変化が起き、triglycerol の細胞内合成に起用する遺伝子を誘導することを発見した。また、らい菌は人工培地による培養が現在に至るまで実現しておらず、薬剤感受性試験を容易に施行することができなかったが、らい菌の薬剤標的遺伝子を迅速発育抗酸菌である *M. smegmatis* の ortholog と交換したところ、らい菌の薬剤感受性表現型を人工培地に発育する抗酸菌で評価することに成功した。

ハンセン病に関しては積極的に疫学研究が行われ、感染症対策としての日本のハンセン病政策が新規患者の減少に与えた影響を解析するため、日本と世界のハンセン病医学の医学史的研究、日本のハンセン病療養所の統計記録の解析、諸外国のハンセン病政策の研究、諸外国のハンセン病療養所の統計記録などを使用した考証が進展し、この過程で日本の100年の隔離政策下での入退所数がデータとして明らかとなっていった。また、ハンセン病対策の進展要因（隔離から解放へ）の検証に寄与することを目的として、ハンセン病近現代資料データベースの作成が開始され、医学的資料を中心に数万点の資料の収集・検証が進み、約3千点の資料のデータベース化が行われ、部分的公開が始まっている。

非結核性抗酸菌の一つである、*M. ulcerans* によって生じるブルーリ潰瘍は無痛の難治性潰瘍を特徴とする皮膚疾患である。*M. ulcerans* 感染症は世界では結核、ハンセ

ン病に次いで3番目に患者数が多い抗酸菌感染症である。ブルーリ潰瘍は重篤な身体後遺症を残す事が多くハンセン病同様社会的偏見差別を受けやすい。WHO はブルーリ潰瘍を neglected tropical diseases (貧困、偏見、差別のために顧みられない熱帯病) の一つに定め、その検査、診断、治療、予防、感染源検索、疫学などに精力的に活動を行っており、世界で毎年数千人規模の新規患者が登録されている。WHO の *M. ulcerans* 感染症対策には感染制御部が連携を行っており、石井が日本の責任者であり、中永が検査の責任者となり、活発に活動を展開している。我々は2015年3月23日から25日にスイス連邦ジュネーブ市で開催された WHO 主催の Global Buruli Ulcer Initiative events において、日本においても2015年3月末までに累計55例のブルーリ潰瘍が集積されている現状を報告すると共に、新たな治療法の提案を行い、日本におけるブルーリ潰瘍研究の進歩を参加者に印象づけた。また、*M. ulcerans* における日本の subspecies と考えられる *M. shinshuense* については全ゲノム解析が行われておらず、類縁種の *M. marinum* や *M. ulcerans* との類似や相違について不明であったが、*M. shinshuense* の type strain に関して全ゲノム解析を終了し、また *M. marinum* や *M. ulcerans* との比較ゲノム解析を行った。

また、ハンセン病の血清診断、ハンセン病や結核に対する組み換え BCG ワクチンの開発、らい菌以外のハンセン病のもう一つの病原体である *M. lepromatosis* に関する研究、らい菌日本株ゲノムの解析、病原性抗酸菌の分離・同定・薬剤感受性に関する研究などが行われた。

BSL3、ABSL3 施設が稼働している第二研究棟においては、結核菌に関する研究を行っている。結核菌の培養、保存、*in vitro* での結核菌の各種解析を行うとともにマウス、サルを使用した *in vivo* における感染実験を行っている。この感染実験により抗結核菌ワクチンの予防効果を個体レベルで解析することが可能となっており、研究が進んでいる。

最後に人事であるが、3月31日付で牧野正彦が定年退職した。鈴木幸一は4月1日付で帝京大学医療技術学部

教授として転出した。

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. 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。シュワン細胞はらい菌感染によりエキソソームを放出することが、今回初めて明らかになった。エキソソームを介した細胞間情報伝達機構が存在すると考えられ、神経障害機構にどのような影響をもたらすか、興味深いところである。

[前田百美、遠藤真澄、牧野正彦]

2. らい菌の宿主細胞内寄生機構に関する研究

らい菌は経気道感染の後に、宿主マクロファージのファゴゾーム内で豊富な脂質とともに寄生すると考えられているが、その分子機構は不明のままである。らい菌感染後の宿主細胞から Bligh-Dyer 法で全脂質を抽出し蓄積する脂質を TLC によって分析を行い、さらにその構造について LC/MS/MS 解析を行った。細胞より RNA を抽出し cDNA を合成し細胞内の遺伝子発現の変動について DNA マイクロアレイを行った。その結果をふまえ、蓄積される脂質について細胞内合成に寄与する遺伝子について RT-PCR, qPCR で評価した。その結果、らい菌がマクロファージに貪食されると、細胞内の遺伝子発現変化が起こり、triglycerol (TG)の細胞内合成に寄与する遺伝子を誘導することが判明した。

[鈴木幸一]

II. 生体防御機構とワクチン開発に関する研究

1. らい菌由来リポ蛋白 LpK の免疫学的な解析

らい菌由来リポペプチド LipoK は、TLR 2 を介して樹状細胞を成熟し、自己 T 細胞を活性化することを明らかにした。樹状細胞をらい菌感染し、LipoK 存在下または非存在下で放出されるエキソソームが保有するマイクロ RNA の解析を行った。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 を多く含んでいた。その中で 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因子であった。miR27 は LipoK 存在下では量比が変化しないことから、らい菌感染特異的に放出される miRNA であることが考えられた。

[前田百美、田村敏生、福富康夫、牧野正彦]

2. ハンセン病のワクチン開発に関する研究

結核由来蛋白からなるキメラ蛋白 ID83 及び ID93 を作製した。これら抗原は少菌型ハンセン病患者、結核患者の PBMC から、有意に IFN- γ 産生を誘導した。この事はらい菌と結核菌に共通抗原が存在することを示す。C57BL/6J マウスを用いてらい菌の増殖制御を検討した結果 ID83 及び ID93 はらい菌増殖制御に関わることが明らかとなった。

[前田百美、田村敏生、Malcolm Duthie (Infectious Disease Research Institute, Seattle)、松岡正典、牧野正彦]

3. らい菌感染モデルサルでの樹立

ハンセン病の神経障害症状は、ヒトとサル以外に知られていない。そのためワクチンの候補実用化における安全性・効果判定のためカニクイザルを用いたらい菌感染系構築を試みた。生後 1 年以内の幼若群 3 頭、妊娠期及びその出生仔にらい菌を接種し、その感染の解析を進めた。今年度は、幼若期接種群の 1 頭、妊娠期接種群 2 頭、新生仔群 2 頭の鼻腔洗浄液よりらい菌 DNA が認められ感染持続が確認された。

[向井 徹、松岡正典、片貝裕子 (予防衛生協会)、牧野正彦]

4. 安定した十分量抗原発現を行う組換え BCG の開発

BCG を宿主としたハンセン病を含む抗酸菌症ワクチン開発のため、ファージプロモーター 3 領域を用い、抗酸菌融合蛋白を分泌する遺伝子を BCG *Urease C* 遺伝子部位と置換し、薬剤耐性遺伝子の除去を行い、各種検討を行った。抗原発現安定性では、弱、中等度のプロモーターでは少なくとも 20 継代までは安定発現を示した。非常に強いプロモーターでは、15 継代までは安定した発現であったが、その後 *extra band* が出現し、完全長抗原の発現量は減少し、長期継代では発現が不安定化することを明らかにした。

[向井 徹、福富康夫、宮本友司、前田百美、牧野正彦]

5. 新規結核ワクチン開発のための基礎研究

(1)結核菌分泌蛋白による機能的細胞傷害性 T 細胞の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)を介した C D4 T 細胞との相互作用によって成熟化した樹状細胞のみがグランザイム B の発現を伴うエフェクターメモリー様細胞傷害性 T 細胞の分化を誘導すること、この樹状細胞の成熟化には Peptide-25 刺激によって誘導される Th1

細胞、Th17 細胞とは異なるレジデントメモリー様 CD4 T 細胞から産生される IL-17F が重要な役割を果たしていること、IL-17F による樹状細胞の成熟化には CD4 T 細胞が産生する共因子が必要であることを明らかにした。

[田村敏生、下袴田陽子、牧野正彦]

(2) 抗酸菌感染防御における濾胞ヘルパー T 細胞の役割

濾胞ヘルパー T 細胞 (TFH) が産生する IL-21 は T 細胞、B 細胞及び NK 細胞の分化、活性化を制御する作用を有しているが、抗酸菌感染防御における TFH の動態に関しては明らかではない。IL-21 遺伝子の片方のアレルを EGFP 遺伝子に置き換えたノックインマウスを用い、抗酸菌感染後の TFH の動態を解析した結果、抗酸菌特異的獲得免疫が誘導されないと考えられている感染早期においてリンパ組織内で IL-21 を産生する TFH と IL-21 を産生しない TFH が共局在していることが示された。現在 IL-21 を産生しない TFH の機能に関して検討している。

[下袴田陽子、田村敏生、牧野正彦]

6. HSP70-MMP-II 融合蛋白質発現組み換え BCG の改良

(1) これまでの組み換え BCG の研究から、シャペロン分子 HSP70 およびらい菌由来膜蛋白質 MMP-II の融合抗原を発現させた組み換え BCG をワクチンとしてマウスに投与すると結核菌、らい菌の増殖を抑制することが明らかになっている。さらにその効果を高めるために、蛋白質分解のシグナルとなる配列を融合抗原に挿入した組換え BCG を作製しそのワクチン効果について解析を行った。

(2) (1) とは別個に、HSP70 と MMP-II、結核菌抗原 Ag85B の融合抗原を発現する組換え BCG を作製し、その抗原発現量について解析を行った。

[塚本裕美子、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. ハンセン病の血清診断

先行研究により、らい菌由来膜蛋白質 MMP-II を使用したハンセン病の血清診断は従来のものよりも高感度でらい菌への感染を検出できることが明らかにしてきた。らい菌由来膜蛋白質 MMP-I は MMP-II よりも多量にらい菌の膜面に存在し、より高感度に血清診断を行える可能性がある。そこで、MMP-I を使用したハンセン病の血清診断法を ELISA 法により検討し、MMP-I と MMP-II を使用したハンセン病の血清診断法について、抗原を混合した場合、分けた場合など様々なパターンを評価し論文に報告した。

[塚本裕美子、前田百美、牧野正彦]

2. ハンセン病の血清診断法の開発

らい菌由来膜タンパク MMP-II を使用したハンセン病の血清診断法は、従来のものより、少菌型ハンセン病患者を高感度に検出できることを明らかにした。今回、中国南西地方の患者血清を用いて、MMP-II と従来使用されていた、NDO-BSA 抗原を用いて検討を行った。これら、抗原を併用することで、患者の陽性率が上がり、3 年間家族内接触者をフォローアップした結果、抗体陽性者 21 人中 7 人が発病したことから、この血清診断法は早期診断に有効であることが判明した。

[前田百美、Wang Hongsheng (Chinese Academy of Medical Sciences)、田村敏生、牧野正彦]

3. 病原性抗酸菌 *M. chelonae* と *M. haemophilum* の分離・同定・薬剤感受性に関する研究

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・同定および薬剤感受性に関して検討し、特に皮膚疾患における新種抗酸菌の分離・同定に成功し、症例を収集中である。また、一般の抗酸菌培養方法では分離されにくい *M. chelonae* 症や *M. haemophilum* 感染症に関する研究を展開中である。

[中永和枝、石井則久]

4. らい菌 RNA の治療評価への応用

ハンセン病に対する治療法である多剤併用療法は、顕著な効果を示す一方で、副作用であるらい反応が問題となっている。本研究では、らい反応を予防・制御することを目的として、らい菌由来 RNA を指標とした多剤併用療法の評価を試みた。各治療段階における患者由来のらい菌から RNA を抽出し、それらを定量化した結果、多剤併用療法の進行に伴い RNA 量が減少し、らい菌の生存度が低下していることが明らかとなった。このことは、らい反応と密接な関わりを持つ多剤併用療法の効果を評価する上で、らい菌 RNA が重要な指標となり得ることが示唆された。

[宮本友司、甲斐雅規、向井 徹、牧野正彦]

5. ハンセン病のもう一つの病原体 *M. lepromatosis* の判別法開発

近年、ハンセン病検体より塩基配列ではらい菌と非常に似ているがらい菌とは異なる *M. lepromatosis* が報告された。しかし、未だ疫学調査等が未整備なため、産物の大きさによりらい菌と *M. lepromatosis* の判別可能な

PCR primer の設計を行った。*M. lepromatosis* 数株 DNA を用いて試行したところ、全株において想定された位置に産物バンドが増幅された。今後、この系により簡易に判別が可能と考えられた。

[向井 徹、松岡正典、宮本友司、甲斐雅規]

6. 病原性抗酸菌 *M. abscessus* と *M. massiliense* の分離・同定・薬剤感受性に関する研究

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・同定および薬剤感受性に関して検討し、これまで報告のない皮膚疾患および肺疾患由来の新種抗酸菌の分離・同定に成功し、症例を収集中である。また、一般の方法では鑑別できない *M. abscessus* と *M. massiliense* 症を鑑別する簡便なマルチプレックス PCR 法を開発した。

[中永和枝、星野仁彦、石井則久]

7. 蛍光色素を利用したらい菌の生死鑑別法の確立並びに宿主細胞であるマクロファージの活性化に伴う細胞内生存率の低下

CTC は還元反応を受けると蛍光を発する分子 CTF に変化する。生きている真核細胞はミトコンドリアの呼吸反応により CTC を CTF へと変化させる。原核細胞である抗酸菌の生死もこの分子を利用して鑑別可能であることを見出した。抗菌薬で処理して死んだ抗酸菌は CTC 還元能を失い、また、らい菌を感染させた培養ヒトマクロファージを IFN γ で活性化させると細胞中のらい菌の CTC 還元能が対照培養マクロファージ中のそれと比べて著明に低下した。共焦点レーザー顕微鏡で観察すると生成した CTF の蛍光強度を定量化できるので、抗菌活性を発現している細胞を検出できる有用な試薬であることが分かった。

[福富康夫、前田百美、星野仁彦]

8. 肺結核症の新規診断法の開発

結核症はツベルクリン皮内反応などで診断されてきたが、BCG 菌との交差反応などの問題点があった。最近では結核菌特異的抗原を使用するクオンティフェロン(QFT)検査や T-SPOT.TB などのインターフェロンガンマ放出アッセイ(IGRA)が臨床の場に行われているが、現在の IGRA は新規感染と既感染を区別することはできない。そこで QFT 陽性者の末梢血単核球の中で結核菌特異的タンパクのみを認識するリンパ球を識別する解析法(テトラマーアッセイ)を開発し、新規感染と既感染を鑑別で

きるかどうか検討中である。

[星野仁彦、工藤翔二(複十字病院)、永井英明(国立病院機構東京病院)]

9. 潜在性肺結核症診断法の開発

結核菌は治療後も患者肺内に潜伏し細胞性免疫の減弱と共に再活性化し活動性結核を再燃することがある。潜在性結核症の活動性を評価する方法として、結核菌が潜伏期に発現するとされるタンパク質を使用し、患者末梢血単核球を用いたアッセイで潜在性結核の活動性を評価できないか検討中である。

[星野仁彦、永井英明(国立病院機構東京病院)、工藤翔二(複十字病院)、松本壮吉(新潟大学細菌学)]

10. 病原性抗酸菌の分離・同定・薬剤感受性に関する研究

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・同定および薬剤感受性に関して検討し、これまで報告のない皮膚疾患および肺疾患由来の新種抗酸菌の分離・同定に成功し、症例を収集中である。また、水棲動物の非結核性抗酸菌症について、人への感染性を検討中である。

[中永和枝、深野華子(日本獣医生命科学大学)、和田新平(日本獣医生命科学大学)、石井則久、星野仁彦]

11. C 型レクチン受容体と抗酸菌の相互作用に関する研究

C 型レクチン受容体(CLR)は Toll 様受容体、Nod タンパク質などと共に宿主の自然免疫を司る構造パターン認識受容体の一つである。特に *macrophage inducible c type lectin (mincle)* や *macrophage c type lectin(MCL)* のリガンドは結核菌の病原因子の一つとされる *trehalose di-mycolate (TDM)* であり、*dendritic cell-associated C-type lectin-2 (dectin-2)* のリガンドは抗酸菌の *mannose-capped lipoarabinomannan (Man-LAM)* であることが明らかとなった。TDM や Man-LAM は多くの抗酸菌が発現しているので他の抗酸菌免疫にも関連する可能性がある。CLR を欠出したマウスを利用して抗酸菌と宿主自然免疫の相互作用を検討中である。

[星野仁彦、片野晴隆(感染病理部)、鈴木真穂(東京病院)、西城忍(千葉大学医学部)、山崎晶(九州大学生体防御医学研究所)]

12. 生体内でのらい菌の殺菌に関する研究

RI 標識脂肪酸を基質とした代謝系に着目し、マウスやヒトマクロファージの活性化状態と同細胞中のらい菌の生存率との関係を検討した。IFN γ 刺激を受けたマウスマクロファージはTNFによる二次刺激で活性化して、刺激後 24 時間以内に抗らい菌活性を発現(らい菌の代謝活性の著しい減少)した。しかし、ヒト末梢血単球由来マクロファージでは IFN γ 刺激による抗らい菌活性発現には 1 週間程度かかった。また、マウスマクロファージでは酸化窒素の殺菌への関与は大きい、ヒトマクロファージでは酸化窒素の殺菌への関与は少なく、酸素ラジカル生成に関わる NADPH オキシダーゼの発現増強と菌周囲への集積はみられることから、酸素ラジカルの殺菌への関与は示唆された。

[福富康夫、前田百美、牧野正彦]

IV. らい菌の生理機能及び遺伝情報に関する研究

1. らい菌日本株ゲノムの解析

日本の分離株である Kyoto-2 株は日本で標準株として一般に利用されているタイ国由来の Thai-53 株や他の多くの分離株と比べ増殖が遅い傾向にある。Kyoto-2 株全ゲノムシーケンスが決定されたので、この増殖に関与する因子の探索を行った。ゲノム情報がデータベース化され利用可能な TN 株との比較解析から約 200 の SNPs を検出したので、そのうち機能している遺伝子のアミノ酸配列に変異をもたらす SNPs を選出し、その中から増殖への関与が疑われた遺伝子として *rplS* 遺伝子に着目し解析を行った。Kyoto-2 株では 74 位のアミノ酸がプロリンからロイシンに変化していることから、遺伝子操作のできないらい菌に代わり *Mycobacterium smegmatis* を用いて *rplS* のオーソログ遺伝子が高い相同性を持つので、Kyoto-2 株と同じ変異を持つ株を作成し変異の有無で増殖違いを示すのかを調べた。その結果若干ではあるもののこの変異により *M. smegmatis* も増殖が遅くなることを明らかとした。

[甲斐雅規、中田 登、松岡正典、松原久美子、牧野正彦]

V. らい菌の病原性と薬剤耐性に関する研究

1. 抗酸菌の *gyrBA* 遺伝子とフルオロキノロン耐性、及び温度感受性に関する研究

らい菌 *gyrBA* 遺伝子変異とフルオロキノロン耐性を解析するために、*M. smegmatis* の *gyrBA* をらい菌の *gyrBA* と交換した菌を作製したところ、得られた菌は温度感受性を示し、37°C で増殖しないことがわかった。この実験系で *gyrBA* 遺伝子に変異を導入しフルオロキノロン感受

性を調べる予定である。

[中田登、甲斐雅規、星野仁彦]

2. 抗酸菌のリボゾームRNA遺伝子変異と薬剤耐性の研究

リボゾームRNAオペロン (*rrn*) は、*rrs*、*rrl*、*rrf*より成り、*rrs*変異はアミノグリコシド耐性、*rrl*変異はマクロライド耐性に関与している。*M. smegmatis*の*rrn* 2 コピーを、*M. avium*の*rrn*で置換して変異の影響を調べたところ、*rrl*のA2058CとA2059Cの変異ではクラリスロマイシンの最小発育阻害濃度がそれぞれ野生型の8倍、4倍を示し、薬剤耐性を引き起こすことがわかった。

[中田登、甲斐雅規]

3. 抗酸菌のクロファジミン耐性に関する研究

ハンセン病主要治療薬の一つであるクロファジミンの作用機序は不明であり、耐性変異についても知見が無く、DNA診断も不可能である。これらを調べるため、*M. avium*を用いてクロファジミン耐性を示す変異株を2株分離した。これらはそれぞれ親株に対して4倍、16倍の最小発育阻害濃度を示した。これら菌株のゲノム塩基配列比較解析を行う予定である。

[中田登、星野仁彦]

VI. ブルーリ潰瘍および近似疾患に関する研究

1. ブルーリ潰瘍に関する疫学研究

M. 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、日本のブルーリ潰瘍 ("*M. ulcerans* subsp. *shinshuense*" 感染症) 55 症例 (2015 年 3 月末まで) を収集し、世界のブルーリ潰瘍との比較研究を展開中である。

[中永和枝、四津里英 (国立駿河療養所・国立国際医療研究センター)、石井則久]

2. *M. ulcerans* の細菌学的検討

M. 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、マウス実験感染モデル系を用い rifalazil の有効性や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。また日本のブルーリ潰瘍 ("*M. ulcerans* subsp. *shinshuense*" 感染症) 55 症例 (2015 年 3 月末まで) を収集し、世界のブルーリ潰瘍との比較研究、近縁菌 *M. marinum*、*M. pseudoshottsii* などマイコラク トン産生抗酸菌との比較研究を展開中である。

[中永和枝、四津里英 (国立駿河療養所)、小椋義俊 (九州大学細菌学)、林哲也 (九州大学細菌学)、石井則久、

VII. ハンセン病の疫学に関する研究

1. ハンセン病疫学の歴史的研究

日本におけるハンセン病の流行とその終焉への過程は未だ明らかではない。また、感染症対策としてのハンセン病政策がハンセン病の流行と終焉にどのような役割を果たしたのかも不明である。これらの事柄を明らかにするために、明治期末に始まる感染症対策としての日本のハンセン病政策が新規患者の減少にどのような影響を与えたのかを、日本と世界のハンセン病医学の医学史的研究、日本のハンセン病療養所の統計記録の解析、諸外国のハンセン病政策の研究、諸外国のハンセン病療養所の統計記録の解析などから考証している。

[森 修一、石井則久]

2. ハンセン病近現代資料データベースの作成

ハンセン病の隔離政策は19世紀後半から20世紀にかけて公衆衛生政策として世界中で行われた。また、20世紀半ばからは隔離から解放医療への移行がWHO主導により行われた。しかし、世界および日本におけるこれらのダイナミズムは未だ明らかでない。これまでの一般的研究は社会科学を主としたものであるが、非常に概念的な研究が多く、その実態は見えない。本研究では医学、公衆衛生政策、ハンセン病療養所OBなどの資料を中心に研究を行うと共に、収集した資料をデータベース化して公開し（専門性の高い資料はサマライズを行う）、ハンセン病対策の進展要因（隔離→解放）を広く検証するため寄与することを目的とする。現在は数万点の資料の収集が進み、約3千点の資料のデータベース化が行われ、部分的公開が開始されている。データベース名：ハンセン病近現代資料アーカイブス（ARCHHDJP）

[森 修一、廣野義幸（東京大学大学院総合文化研究科 関連基礎科学系）]

3. 日本におけるハンセン病解放医療に関する研究

日本のハンセン病隔離政策は1907年-1996年の89年間にわたり継続されたが、戦前・戦後を通じ解放医療を目指す動きも活発であった。本研究では昭和20年代よりプロミン治療を中心として進展する解放医療の実態をハンセン病療養所OB(医師、看護師、事務官)、厚生省OB、社会復帰者(退所者)、入所者への調査から明らかにすると共に、世界の解放医療(台湾、韓国、沖縄など)との比較研究から検証している。

[森 修一、瀬川将広(国立療養所東北新生園)、廣野義幸、

VIII. 自然免疫抑制を生じるウイルス感染マウスモデルの開発と応用に関する研究

種々のウイルス(インフルエンザウイルス、RSウイルス、麻疹ウイルスなど)の感染により生体ではTLRなどの脱感作や種々の免疫応答の不全が生じる。本研究で通常のH3N2インフルエンザ株を用い、免疫抑制剤による生体免疫の操作により、スペイン風邪様インフルエンザ感染マウスモデル、トリインフルエンザ様インフルエンザ感染マウスモデルを樹立に成功し、そのモデルの細菌感染モデルへの応用を試みている。この他、RSウイルス感染マウスモデルの樹立に成功した。

[森 修一、細谷光亮、橋本浩一(福島県立医科大学小児科学講座) 佐藤由起夫(東北大学医学部)]

IX. らい菌株の樹立に関する研究

1. *M. leprae* 並びに *M. lepromatosis* の株樹立

ハンセン病の起因菌である *Mycobacterium leprae* は人工培養がまだ成功しておらず、ヌードマウスでの培養も世代時間が13日と非常に遅く、組換え体の作製もできない等の多くの制約により、十分な研究成果が得られていない。これは最近ハンセン病の起因菌として報告された *Mycobacterium lepromatosis* も同様である。しかし、菌の解析が不十分のままでも強力なハンセン病対策により世界のハンセン病が減少してきた。このことは一方で研究資源としてのらい菌の減少でもあり、研究資源としてのらい菌株の樹立が必要と考えられている。そこで、各国で獲得された患者由来皮膚生検かららい菌を抽出し、日本の実験室で唯一らい菌を培養することができる当センター施設でヌードマウスフットパッド内増殖を試みている。これまでに27株のらい菌を樹立してきたが、最近フィリピン由来のサンプルから2株の *M. leprae* を樹立した。 *M. lepromatosis* の分離が比較的多いメキシコからのサンプルを検討中ではあるが、現在のところ *M. lepromatosis* の株樹立はできていない。世界でも *M. lepromatosis* の株化はまだ例がない。

[甲斐雅規、松岡正典]

国際協力関係業務

I. ハンセン病の国際協力研究及びWHOの薬剤耐性監視事業への協力

ベトナム国において実施している国際協力研究では、らい菌の Genotyping を継続実施している。また、ハンセ

感染制御部

ン病患者及びその他皮膚疾患を示す感染症のリアルタイム PCR 法を用いた診断法確立のための予備実験を行った。さらに、薬剤耐性らい菌の検査に関しては 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、ミャンマー国及びモザンビーク国で得られた試料を用い、薬剤耐性遺伝子変異の確認)を継続して実施している。

[甲斐雅規、福富康夫、向井 徹、前田百美、宮本友司、
松岡正典、牧野正彦]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表
 - 1) Ohtsuka M, N. Kikuchi, T. Yamamoto, T. Suzutani, K. Nakanaga, K. Suzuki, and N. Ishii. 2014. Buruli ulcer caused by *Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense*: The first case of familial concurrent occurrence and detection of IS2404 from the environment in Japan. *JAMA Dermatol* 150, 64-67.
 - 2) Nagai H, M. Suzukawa, Y. Sakakibara, K. Ohta, Reche PA, K. Suzuki, and Y. Hoshino. 2014. Immunological responses and epitope mapping by tuberculosis-associated antigens within the RD1 region in Japanese patients. *J Immunol Res*, ID764028.
 - 3) Suzuki K, A. Saso, K. Hoshino, J. Sakurai, K. Tanigawa, Y. Luo, Y. Ishido, S. Mori, K. Hirata, and N. Ishii. 2014. 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(2), e88356.
 - 4) Matsumoto T, M. Suzuki, Y. Iinuma, S. Maeda, H. Ano, Y. Koshi, T. Murakawa, K. Suzuki, and Y. Hoshino. 2014. A molecular typing methodology of *Mycobacterium tuberculosis* using small genomic islet patterns (TB-SGIP): a novel genotyping methodology to discriminate clinical strains between Beijing family and T3-OSAKA. *J Infect Dis Ther* 2:35-45.
 - 5) Degang Y, K. Nakamura, T. Akama, Y. Ishido, Y. Luo, N. Ishii, and K. Suzuki. 2014. Leprosy as a model of immunity. *Future Microbiol* 9: 43-54.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) Sekizuka T, M. Kai, K. Nakanaga, N. Nakata, Y. Kazumi, S. Maeda, M. Makino, Y. Hoshino, and M. Kuroda. 2014. Comparative genome analysis of *Mycobacterium massiliense* JCM 15300 among *Mycobacterium abscessus* group reveals the potential pathogenicity related in subcutaneous tissue. *PLoS One*; doi:10.1371/journal.pone.0114848.
 - 9) Miyamoto Y, M. Komine, Y. Takatsuka, T. Maekawa, S. Murata, K. Nakanaga, N. Ishii, and M. Ohtsuki. 2014. Two cases of Buruli ulcer in Japanese brothers. *J Dermatol* 41:771-772.
 - 10) Duthie MS, RN. Coler, JD. Laurance, LH. Sampaio, RM. Oliveira, AL. Sousa, MM. Stefani, Y. Maeda, M. Matsuoka, M. Makino, and SG. Reed. 2014. Protection against *Mycobacterium leprae* infection by the ID83/GLA-SE and ID93/GLA-SE vaccines developed for tuberculosis. *Infect. Immun.* 82:3979-3985, doi: 10.1128/IAI.02145-14.
 - 11) Sugawara M, N. Ishii, K. Nakanaga, K. Suzuki, Y. Umebayashi, K. Makigami, M. Aihara. 2015. Exploration of a standard treatment for Buruli ulcer through a comprehensive analysis of all Japanese cases. *J Dermatol* 42: 588-595.
2. 和文発表
 - 1) 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, 2014.
 - 2) 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.
 - 3) 四津里英、石井則久、玉木 毅：抗酸菌の検査. MB Derma 216(増): 103-112, 2014.
 - 4) 小川佳亮、佐藤志津江、古川政雄、峰岸正明、吉川弥須子、田中孝昭、中永和枝、石井則久：*Mycobacterium arupense* による前腕軟部腫瘍の1例. 日本臨床微生物学雑誌 24: 17-22, 2014.
 - 5) 石井則久、中永和枝、四津里英：3.新しい検査法と診断法 QFT と T-SPOT 臨床皮膚科 68 (5 増)：78-81,2014.

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Kai M, N. Nakata, T. Sekizuka, A. A. Maghanoy, M. F. Balagon, P. Saunderson, M. Makino, M. Kuroda. Comparison of genome sequences between *Mycobacterium leprae* prepared before and after passaging in nude mice footpad. XVIII-International Symposium on Gnotobiology, 21-23 September, 2014.

- St. Petersburg, Russian Federation.
- 2) Maeda S, N. Nakata, T. Naka, and N. Fujiwara: Isolation of Mycobacterial Mutants that Disrupted the Phospholipid Synthetase Gene, and Their Properties. FEBS-EMBO 2014, September 2014. Paris, France.
 - 3) Yotsu R R, C. Murase, M. Sugawara, K. Suzuki, K. Nakanaga, N. Ishii: Buruli ulcer in Japan: update, WHO Meeting on Buruli ulcer, 23–25 March 2015. Geneva, Switzerland.
 - 4) Murase C., M. Sugawara, R. R. Yotsu, K. Suzuki, K. Nakanaga, N. Ishii, M. Kono, M. Akiyama: A case of Buruli ulcer caused by *Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense*: Treatment approach with negative-pressure wound therapy, WHO Meeting on Buruli ulcer, 23–25 March 2015. Geneva, Switzerland.
 - 5) Suzuki K, Y. Degang, Y. Luo, M. Ohtsuka, Y. Ishido, K. Nakanaga, N. Ishii: Detection of *Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense* DNA from a water channel in familial Buruli ulcer cases in Japan, WHO Meeting on Buruli ulcer, 23–25 March 2015. Geneva, Switzerland.
 - 6) Sugawara M, C. Murase, R. R. Yotsu, K. Nakanaga, K. Suzuki, N. Ishii: Exploration of a standard treatment for Buruli ulcer through a comprehensive analysis of all cases diagnosed in Japan, WHO Meeting on Buruli ulcer, 23–25 March 2015. Geneva, Switzerland.
2. 国内学会
- 1) 若林麻記子、藤井紀和、田中俊宏、佐々木一夫、中永和枝、石井則久：ブルーリ潰瘍の1例。第113回日本皮膚科学会総会 2014年5月 京都市
 - 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。2014年9月 所沢市
 - 3) 森 修一、田中丹史、廣野善幸：1961年WHOマニラ講習会が日本ハンセン病外来診療に与えた影響- 石原重徳資料から見えてくるもの - 第87回日本ハンセン病学会総会。2014年9月 所沢市
 - 4) 森山一隆、森 修一：アメリカ軍政下の奄美諸島での隔離政策の進展とその要因に関する研究 第87回日本ハンセン病学会総会。2014年9月 所沢市
 - 5) 瀬川将広、久保瑛二、森 修一、横田 隆：東北新生園における社会復帰研究会の活動について（第一報）第87回日本ハンセン病学会総会。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、2014年9月 所沢市
 - 7) 甲斐雅規：ハンセン病の基礎医学分野のトピックス（シンポジウム）。第87回日本ハンセン病学会総会。2014年9月 所沢市
 - 8) 圓純一郎、鈴木幸一、北島信一、Htet Lin, Kyaw Kyaw, 米澤傑、後藤正道：ハンセン病による末梢神経障害の神経生理学的評価及び電気刺激を用いた治療についての研究(第1報)。第87回日本ハンセン病学会。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らい菌活性の新しい評価法-薬剤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) 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
 - 11) 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
 - 12) 堤 玲子、山田七子、吉田雄一、山本 修、中永和枝、石井則久：関節リウマチ患者に生じた *Mycobacterium chelonae* 感染症の1例。第66回日本皮膚科学会西部支部学術大会 2014年11月 高松市
 - 13) 本田聡子、内藤洋子、増地 裕、中永和枝、石井則久：認知症患者に生じたブルーリ潰瘍の一例。第66回日本皮膚科学会西部支部学術大会 2014年11月 高松市
 - 14) 大日方夏美、常深祐一郎、中永和枝、石井則久：皮膚 *Mycobacterium colombiense* 感染症の一例。第858回日本皮膚科学会東京地方会 2014年12月 東京
 - 15) 三井田 博、有波 浩、三輪 仁、池滝勝史、石井則久、中永和枝：新潟県で4例目となるブルーリ潰瘍の1例。第376回日本皮膚科学会新潟地方会 2014年12月 新潟市
 - 16) Tsukamoto Y, and T. Tamura: Functional improvement of *Mycobacterium bovis* BCG as a vaccine against tuberculosis. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月 京都市
 - 17) 田村敏生、下袴田陽子、梅村正幸: Effect of peptide-25

of Ag85B on the induction of functional activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月 京都市

- 18) 下袴田陽子、田村敏生: The role of follicular helper T cells in mycobacterial infection、第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月 京都市
- 19) 梅村正幸、福井雅之、山崎雅俊、福井知穂、田村敏生、中江 進、松崎吾朗: Involvement of IL-33 in the protective immunity against lung mycobacterial infection. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月 京都市
- 20) 関塚剛史、甲斐雅規、中永和枝、中田登、前田伸司、牧野正彦、黒田誠: 比較ゲノム解析により明らかとなった *Mycobacterium massiliense* の脂質代謝関連ゲノムアイランド 第88回日本細菌学会総会 2015年3月 岐阜市
- 21) Nakata N, M. Kai, and M. Makino: Analysis of mycobacterial rrl genes and macrolide resistance. 第88回日本細菌学会総会 2015年3月 岐阜市
- 22) Kai M, N. Nakata, T. Sekizuka, M. Kuroda, and M. Makino: Genotyping and analyses of *Mycobacterium leprae* Kyoto-2 isolated in Japan. 第88回日本細菌学会総会 2015年3月 岐阜市