

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

感染制御部においては、らい菌・結核菌・非結核性抗酸菌に起因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を行っている。今年度は、3月11日に発生した東日本大震災及び福島第1原発の事故による影響で夏期間中大規模な節電を余儀なくされ、オートクレーブ及び冷房の使用制限、フリーザーの運転中止など大規模な電力使用制限を行った。種々の研究業務を事実上制限せざるを得なかったが、幸いにも熱中症などの病人は出なく何とか夏を乗り切ることができた。また、12月にさいたま市大宮区の大宮ソニックシティで開催された日米医学協力計画結核・ハンセン病専門部会第46回日米合同会議を牧野が主催し、日米双方から興味深い演題が報告され、活発な討議が繰り返された。日米のメンバーならびに御協力を頂いた関係諸氏にこの場を借りて厚く御礼申し上げたい。ハンセン病の研究においては、らい菌の代謝系に関する研究が新たに開始され、日本国内外から大きく評価された。試験管内で培養できないらい菌の特殊性が反映されるものと考えられるが、他の抗酸菌とは明らかに異なる代謝産物が菌体内に蓄積されていた。今後、様々の研究に応用可能であり、ハンセン病の研究が益々進展するものと期待される。また、WHOの薬剤耐性監視事業に参加し、アジア諸国の再発患者から採取された薬剤耐性らい菌のDNAを検索し、地球規模での薬剤耐性菌の出現状況に関する疫学調査に貢献した。さらに、当部で開発したハンセン病の早期発見技術の技術移転を中国及び台湾へ送り、これらの国々におけるハンセン病制圧計画の進展に大きな貢献を果たした。昨年度まで行ってきたハンセン病のワクチン開発及び免疫療法の開発に関する研究は本年度も引き続き行われ、ワクチン開発の研究では一定の効果を有するリコンビナントBCG接種の後に追加免疫用ワクチンとして用いられるべき蛋白の開発が主な研究テーマとして設定された。ハンセン病の末梢神経障害は、化学療法により生きたらい菌を死滅させた後も悪化することから、らい菌抗原を保持する抗原

提示細胞の生体外排除法の開発が免疫療法の中心となるが、当部で発見したらい菌由来のリポ蛋白に由来するリポペプチドが、CD4陽性キラーT細胞及びCD8陽性キラーT細胞の分化誘導に極めて有用な役割を果たし、これらのT細胞は細胞内らい菌を効率的に殺戮することが明らかにされた。

結核の研究では、ワクチン開発が中心として展開された。日本の結核発症者の多くは高齢者であるため、高齢者の結核発症を予防するための基礎研究が主に行われた。キラーCD8陽性T細胞へ分化し得る長期生存型メモリーCD8陽性T細胞の機能維持が極めて重要となるが、樹状細胞との相互作用によって活性化したタイプ1CD4陽性T細胞が産生するIL-17Fが、初回免疫ワクチンにより産生されたメモリーT細胞からキラーT細胞への分化誘導に必須であることが明らかとなった。今後IL-17Fを産生する具体的ワクチンの作出への展開が期待される。また、初回免疫用ワクチンとして用いる新規リコンビナントBCGの作製が行われた。これまで開発してきたハンセン病用リコンビナントBCGの作製で得られた知見をもとに、新しいリコンビナントBCGを作出した。得られた新規リコンビナントBCGはヒト未感作CD4陽性T細胞および未感作CD8陽性T細胞を強く活性化した。今後、マウスなどの小動物を使ったワクチンとしての有用性の検討が待たれる。

非結核性抗酸菌の研究では、昨年度に引き続きブルーリ潰瘍の研究が中心に行われた。

最後に人事であるが、4月1日付で松岡正典と儀同政一が再度再任用職員として採用され、3月2日には全生園の内科医師下袴田陽子が併任者として採用された。

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. 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。らい菌感染ヒト由来シュワン細胞を用いて、heterologous T細胞の活性化能を *in vitro* で検討した結果、T細胞からの IFN γ 産生が見られた。このことから、らい菌感染シュワン細胞はT細胞を活性化する可能性が示唆された。

[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

らい菌は宿主のマクロファージに感染した後にファゴゾーム内に潜伏する。そのファゴゾーム内には豊富な脂質が蓄積しており、それが菌の細胞内寄生を可能にする重要な役割を果たすと考えられる。脂質の蓄積のためには感染後のADRPの発現誘導が必要で、蓄積された脂質の異化作用抑制にはHSLの発現抑制とともに、リン酸化も抑制されることを明らかにした。多菌型ハンセン病患者皮膚病片では、実際にHSL発現が低下しており、薬剤治療後には回復することを明らかにし、HSLが治療効果や予後判定の指標として有用である可能性を示した。

[鈴木幸一]

3. 抗酸菌代謝系の動態解析

抗酸菌の代謝機構が病原性に与える影響を解明するため、結核菌、*M. bovis BCG*、*M. avium complex* 及び *M. smegmatis* から菌体内代謝成分を抽出し、そこに含まれる化合物の構成・量比を抗酸菌間で比較した。その結果、一部の代謝系関連物質についてその構成・量比が抗酸菌間で異なる傾向を示すことが判明した。この結果は、抗酸菌の菌種間においても代謝系の仕組みに違いが存在することを示しており、病原性等の抗酸菌の特徴に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

[宮本友司、向井 徹、牧野正彦]

4. 抗酸菌の katG 遺伝子の解析

カタラーゼ-パーオキシダーゼをコードする katG 遺伝子は結核菌の病原性因子の一つであり、イソニアジド耐性に強くかかわっているが、非結核性抗酸菌 *M. smegmatis* のゲノムには3種類の異なる katG 配列が同定されている。katGI、katGII に次いで第三の katG である katGIII の破壊株を作成し、過酸化水素感受性、およびイソニアジド感受性を調べたが、変化が見られず、この遺伝子を強制発現させても両酵素活性は見られなかったことから、*M. smegmatis* は katGI、katGII により活性酸素を処理していることが示唆された。

[中田登、甲斐雅規、鈴木幸一、牧野正彦]

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 LpK の合成リポペプチド LipoK は、樹状細胞の成熟化を誘導し、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。今回詳細にマイクロアレイ 3 D-Gene Human Oligo chip 25 を用いて樹状細胞の遺伝子発現を検討した。らい菌感染樹状細胞を LipoK で刺激した細胞と CD40 リガンドで刺激後の遺伝子発現を比較すると IL-12, IL-1 β , IL-6, TNF-SF7, NF-kB12 等の発現は LipoK 刺激後の樹状細胞では8倍増加していた。同様にケモカイン CCL2, CCL7, CCL8, CCL20 等の発現も高く見られた。

[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

3種類の抗原からなる2種類の融合蛋白を大腸菌で作成し、C57BL/6J マウスを用いてらい菌の増殖制御を検討した。アジュバント存在下で3回蛋白抗原を皮下接種したのち、らい菌を footpad に接種した。らい菌の増殖を7ヶ月後に調べた結果、これら新しく作製した融合蛋白はらい菌増殖を抑え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

ハンセン病を発症する動物は、現在ヒトとサル以外に知られていない。そのためワクチン候補の効果判定・安全性確認のため、サルの感染系が必要になる。幼若および新生仔カニクイザルにらい菌を接種し、その経過解析を進めている。これまでに、新生仔接種において、散発的に鼻腔洗浄液よりらい菌 DNA 検出個体が確認された。

[向井 徹、松岡正典、片貝裕子 (予防衛生協会)、牧野正彦]

4. 効率的な抗原発現を行う 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、抗酸菌ファージプロモーター領域を用い、らい菌抗原と BCG 抗原の融合蛋白分泌する遺伝子を *Urease C* 遺伝子部位と置換した。さらに、組換え菌選択に用いた薬剤耐性遺伝子の除去を行い、安全性の高い菌各種組換え BCG の調整を進めている。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]

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 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、転写調節因子 TAF7 の発現を誘導し、*ifn- γ* 遺伝子のクロマチンリモデリングを誘導することで Th1 細胞への分化を開始し、さらに CD4 と会合している Lck などのチロシンキナーゼを介して STAT4 の活性化を誘導し IL-12 に対する反応性を獲得することで Th1 細胞への分化を決定させる活性を有していることを示した。

[田村敏生、牧野正彦]

(2) 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)は、細胞傷害性 T 細胞の活性化調節作用を有するサイトカインである IFN- γ を産生する Th1 細胞と樹状細胞の活性化誘導作用を有する可能性があるサイトカインである IL-17F を産生するヘルパー T 細胞亜集団への分化を誘導することで機能的細胞傷害性 T 細胞の分化・活性化を強力に誘導することを示した。

[田村敏生、牧野正彦]

6. 組み換え BCG を用いた結核菌新規ワクチン開発

(1) HSP70-MMP-II 融合蛋白質発現組み換え BCG の作製

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 の融合蛋白質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らい菌の増殖を抑制することが明らかになっている。結核菌の新規ワクチン開発のため、HSP70 と結核菌由来膜蛋白質 MMP-II の融合蛋白質を発現する組み換え BCG を作製し、解析を開始した。

[塚本裕美子、牧野正彦]

(2) HSP70-MMP-II-CysO 融合蛋白質発現組み換え BCG の作製

結核菌の活動期に強く発現する遺伝子である CysO を HSP70-MMP-II 融合蛋白質に更に融合させた HSP70-MMP-II-CysO を発現する組み換え BCG を作製し、結核菌に対するワクチン効果についての解析を開始した。

[塚本裕美子、牧野正彦]

7. 噴霧感染装置を使用したマウスへの結核菌感染方法の確立

結核菌は主に飛沫感染することが知られているため、

実験動物をモデル系として使用する場合にも飛沫感染により結核菌を感染させることが望ましい。そこで噴霧感染装置を使用したマウスへの結核菌感染の条件検討を行い、安定的に結果を再現できる条件を決定した。さらに、先行研究と比較しやすい条件を得るため詳細な条件検討を行い、実験に使用できる条件を決定した。

[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、ベトナムの患者血清中の抗 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。前回中国の患者血清はインドネシアと比べて比較的低い抗体値(OD)を示したことを報告した。プロトコルを改善した結果、多菌型患者 (n=45) では 82% と高い陽性率を示した。

[前田百美、Wang Hongsheng (Chinese Academy of Medical Sciences), 甲斐雅規、牧野正彦]

2. 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らい菌への感染を検出できることが明らかになっている。らい菌由来膜蛋白質 MMP-I は MMP-II よりも多量らい菌の膜画分に存在し、より高感度に血清診断を行える可能性がある。そこで、らい菌由来膜蛋白質 MMP-I を抗酸菌 *M. smegmatis* に発現させ、His タグを用いて精製し ELISA 法によりハンセン病の血清診断を試みた。

[塚本裕美子、牧野正彦]

3. ハンセン病の有効な検査法の開発改良

らい菌は試験管内培養が出来ないために、菌の同定には PCR 法が用いられているが必ずしも感度および特異性が十分では無い。そこで、様々な PCR プライマーを設計し、他の抗酸菌と交叉反応が無く、かつ感度良く検出できる方法について検討を行い、RLEP に対する nested PCR の有用性を確認した。また、侵襲性の低い皮膚スミア検査材料から、菌や宿主の遺伝子発現レベルから病態を反映する指標を検討するために、多くのプライマーを用いて臨床材料でのデータを集積した。

[鈴木幸一]

4. 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)が臨床の場に使用されているが、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)、牧野正彦]

5. 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)、横田恭子(免疫部)、松本壮吉(大阪市立大学細菌学)、有吉紅也(長崎大学熱研内科)、牧野正彦]

6. 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、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。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) 星野仁彦、牧野正彦、石井則久]

7. 抗酸菌のフルオロキノロンの耐性変異に関する研究

M. smegmatis の *gyrB* 遺伝子、および *gyrA* 遺伝子をそれぞれ単独で結核菌のものと交換することにより、これら遺伝子上の変異とフルオロキノロン耐性の関係を直接試験できる実験系を開発済みであるが、*gyrBA* 遺伝子を

一括して交換する系を新たに開発した。さらに *M. bovis* BCG をホスト菌として用い、*gyrBA* 遺伝子導入ベクターを改良することによってさらに正確な試験が可能となった。開発した試験系を用いて *gyrBA* 遺伝子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]

8. らい菌の薬剤耐性菌遺伝子変異の迅速検出法に関する研究

ハンセン病治療薬に対する耐性と遺伝子変異の検出で、より簡便、迅速な新しい検査法確立を目指した。ダブソン耐性で *folP1* の 53 位と 55 位の変異、リファンピシン耐性では *rpoB* の 410 位、420 位、425 位、427 位の変異、キノロン耐性は *gyrA* の 89 位、91 位の変異に関し、各変異部位を Forward プライマーの 3' 末端とし、末端塩基のみ異なる 4 種のプライマーを設計しそれらと共通の Reverse プライマーによるリアルタイム PCR 法により増幅効率の違いから末端塩基を同定し変異の有無を知る方法を確立した。また、ベトナムのハンセン病患者由来臨床サンプルを用いて、通常の PCR 法及びシーケンスによる結果と比較した結果、その有効性が示めされた。

[甲斐雅規、中田 登、松原久美子、牧野正彦]

9. 研究蛍光色素を利用したマクロファージ内抗酸菌の生死鑑別

Cyano-tetrazolium chloride CTC は還元反応を受けると蛍光を発する分子であり、呼吸活性を有する生菌の検出に利用できる試薬として注目されている。そこで、*in vitro* 培養におけるマクロファージ内抗酸菌の生死判別への利用を試みた。マウスから腹腔細胞を回収して培養し、ガラス付着性マクロファージを得て *M. avium complex* (MAC) を感染させて培養を継続した。CTC 添加後共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、IFN- γ で刺激したマクロファージ中の MAC の蛍光強度が対照培養マクロファージ中の MAC に比べて著明に低下していたことから、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、星野仁彦、前田百美、牧野正彦]

10. ヒトマクロファージの抗らい菌活性発現機構の解明

M-CSF 存在下で培養して得られた末梢血単球由来マクロファージに oregon green で標識したらい菌を添加し食させた後、48 時間培養した。IFN- γ 存在下で培養すると、ウエスタンブロット法のより NADPH オキシダー

ぜを構成する phox タンパクの発現が著明に増強することが分かった。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察により、IFN γ マクロファージではらい菌周囲への phox タンパクの集積が観察され、さらに、CTC の蛍光分子への還元反応が低下したことかららい菌の呼吸活性の低下が認められた。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]

IV. らい菌の生理機能及び遺伝情報に関する研究

1. らい菌ゲノムの次世代シーケンズ解析

次世代ゲノムシーケンサーにて、増殖速度が標準株 Thai-53 と比べ遅い株である Kyoto-2 の全シーケンスが決定した。現在 DNA データバンクへの登録中である。全ゲノムシーケンズが解明されているらい菌 TN 株、Br4923 株との相互比較を行ない、Kyoto-2 株から、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。これまでに、Kyoto-2 株で特徴的であり、増殖能に関与することが疑われる箇所を 4 か所同定した。また、これまで同定してきた SNPs 情報より、らい菌の分子疫学に利用できそうな SNPs パターンを発見したので、検討を行っている。

[甲斐雅規、中田 登、松岡正典、牧野正彦]

V. 抗酸菌の抗原性および補助因子に関する研究

1. ミコール酸合成系に関する研究

ミコール酸合成系のうち mmaA4 及び mmaA2 遺伝子の破壊株を BCG 菌コンノート株で作成した。破壊株の構成ミコール酸を調べたところ mmaA4 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。変異株の電子顕微鏡観察を行ったところコード形成に違いが見られた。そこで、破壊した元の遺伝子を持つプラスミドを、破壊株に戻した復帰変異株を作成し、電子顕微鏡像とコード形成能について解析を行っている。コード形成能を電顕によらず簡便し測定する方法が確立したので、現在コード形成に関与する各遺伝子機能を解析している。

[甲斐雅規、宮本友司、向井 徹、牧野正彦]

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

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) 34 症例を収集し、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、星野仁彦、四津里英 (国立国際医療研究センター)、牧野正彦、石井則久]

VII. ハンセン病の疫学に関する研究

1. 日本の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。本研究ではハンセン病を疑われるヒト骨化石から、らい菌の DNA を検出し、その SNPs を調べ、各時代にどの地域でハンセン病の流行があったのか、その菌は世界のどこから伝搬したのか、埋葬の形式などにハンセン病特有の文化的扱いがあるのかなどを調べた。現在はこの事例を増やしている。また、明治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、ハンセン病療養所の統計記録や、諸外国のハンセン病政策研究、諸外国のハンセン病療養所の統計記録などから考証している。

[森 修一、鈴木幸一、石井則久]

らい菌の供給

平成 23 年 4 月より同 24 年 3 月までの間において、26 回、62 匹、5 施設 (国内 3、国外 2)、11 名 (国内 9、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]

らい菌感染ヌードマウス足蹠の分与
(平成 23 年 4 月より平成 24 年 3 月)

No.	年月日	分与先		マウス匹数
	平成 23 年	Thai53		
1)	4.19	前田	ハンセン研	2
2)	4.26	前田	ハンセン研	1
3)	5.26	前田	ハンセン研	1
4)	5.26	宮本	ハンセン研	1
5)	6.7	天児	九大	1
6)	6.8	前田	ハンセン研	1
7)	6.8	中田	ハンセン研	1
8)	6.24	甲斐	ハンセン研	2
9)	6.24	甲斐	ハンセン研	2
10)	7.20	前田	ハンセン研	1
11)	8.11	前田	ハンセン研	1
12)	8.29	松岡、WHO	ハンセン研	2
13)	9.1	甲斐	ハンセン研	8
14)	9.12	松岡、福富	ハンセン研	3
15)	10.18	天児	九大	1
16)	11.9	甲斐	ハンセン研	1
17)	11.10	前田	ハンセン研	1
18)	11.21	増澤	北里大	2
19)	12.1	前田	ハンセン研	1
20)	12.22	甲斐	ハンセン研	10
21)	平成 24 年 1.31	D. Williams (松岡)	ルイジアナ州立大	12
22)	2.2	前田	ハンセン研	1
23)	2.29	松岡、WHO (Cambau)	フランス	2
24)	3.1	藤村	北里大	2
25)	3.7	前田	ハンセン研	1
26)	3.16	前田	ハンセン研	1

40+22(外部)=62

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Tsukamoto Y., Endoh M., Mukai T., Maeda Y., Tamura T., Kai M., and Makino M. 2011. Immunostimulatory activity of major membrane protein II from *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Vaccine Immunol. 18:235-242.
- 2) Nakata N., Kai M., and Makino M. 2011. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae* *folP1* gene and dapsone resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 55:762-766.
- 3) Kai M., Nguyen Phuc N. H., Nguyen H. A., Pham T. H., Nguyen K. H., Miyamoto Y., Maeda Y., Fukutomi Y., Nakata N., Matsuoka M., Makino M., and Nguyen T. T. 2011. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam. Clin. Infect. Dis 52:e127-e132.
- 4) Nakanaga K., Hoshino Y., Era Y., Matsumoto K., Kanazawa Y., Tomita A., Furuta M., Washizu M., Makino M., and Ishii N. 2011. Multiple cases of cutaneous *Mycobacterium massiliense* infection in a “hot spa” in Japan. J. Clin. Microbiol. 49:613–617.
- 5) Fukutomi Y., Maeda Y., and Makino M. 2011. Apoptosis-inducing activity of clofazimine in macrophages. Antimicrob. Agents Chemother. 55:4000-4005.
- 6) Naka T., Nakata N., Maeda S., Yamamoto R., Doe M., Mizuno S., Niki M., Kobayashi K., Ogura H., Makino M., and Fujiwara N. 2011. Structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. J. Bacteriol. 193:5766-5774.
- 7) Nakanaga K., Hoshino Y., Yotsu R. R., Makino M., and Ishii N. 2011. Nineteen cases of Buruli ulcer diagnosed in Japan from 1980 to 2010. J. Clin. Microbiol. 49:3829-3836.
- 8) Maeda Y., Tamura T., Fukutomi Y., Mukai T., Kai M., and Makino M. 2011. A lipopeptide facilitate induction of *Mycobacterium leprae* killing in host cells. PLoS Neglected Tropical Diseases 5:e1401.
- 9) Nakamura T., Ito T., Oono T., Igarashi H., Fujimori N., Uchida M., Niina Y., Yasuda M., Suzuki K., and Takayanagi R. 2011. Bacterial DNA promotes proliferation of rat pancreatic stellate cells thorough toll-like receptor 9: potential mechanisms for bacterially induced fibrosis. Pancreas 40:823-831.
- 10) Suzuki K., Akama T., Kawashima A., Yoshihara A., Yotsu R. R., and Ishii N. 2011. Current status of leprosy: epidemiology, basic science and clinical perspectives. J. Dermatol. 38:1-9.
- 11) Kobayashi H., Nolan A., Naveed B., Hoshino Y., Segal L., Fujita Y., Rom W. N., and Weiden M. D. 2011. Neutrophils activate alveolar macrophages by producing caspase-6 mediated cleavage of interleukin-1 receptor associated kinase-M. J. Immunol. 186:403-410.
- 12) Aye K. S., Matsuoka M., Kai M., Kyaw K., Win A. A., Shwe M. M., Thein M., Htoo M., and Htoon M. T. 2011. FTA card utility for PCR detection of *Mycobacterium leprae*. Jpn. J. Infect. Dis. 64:246-248.
- 13) Kobashi Y., Mouri K., Obase Y., Miyashita N., Nakanaga K., and Oka M. 2011. Pulmonary *Mycobacterium massiliense* disease with septicemia during immunosuppressive treatment. Internal Medicine 50:1069-1073.
- 14) Ariga H., Nagai H., Kurashima A., Hoshino Y., Shoji S., and Nakajima Y. 2011. Stratified Threshold Values of QuantiFERON Assay for Diagnosing Tuberculosis Infection in Immunocompromised Populations. Tuberculosis Research and Treatment Article ID 940642.
- 15) Suzuki K., Tanigawa K., Kawashima A., Miyamura T., and Ishii N. 2011. Chimpanzees used for medical research shed light on the pathoetiology of leprosy. Future Microbiol. 6:1151-1157.
- 16) Yokoyama K., Kim H., Mukai T., Matsuoka M., Nakajima C., Suzuki Y. 2012. Amino acid substitutions at position 95 in GyrA can add fluoroquinolone resistance to *Mycobacterium leprae*. Antimicrob. Agents Chemother. 56: 697-702.
- 17) Li W., Matsuoka M., Kai M., Thapa P., Khadge S., Hagge D. A., Brennan P. J., Vissa V. 2012. Real-time PCR and high resolution melt analysis for rapid detection of *Mycobacterium leprae* drug resistance mutations and strain types. J. Clin. Microbiol. 50: 742-53.
- 18) Rocha A.S., Cunha M. G., Diniz L., Salgado C., Aires M. A., Nery J. A., Gallo E., Miranda A., Magnanini M., Matsuoka M., Sarno E., Sufys P. and Oliveira M. 2012. Drug and multiple-drug Resistance Among *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian relapsed leprosy patients. J. Clin. Microbiol. 50: 1912-1917.

- 19) Ito A., Yoshida Y., Higaki-Mori H., Watanabe T., Nakanaga K., Ishii N., Yamamoto O. 2012. Multiple skin lesions caused by *Mycobacterium scrofulaceum* infection. *European J. Dermatology* 21:1014-1015.
 - 20) Nakanaga K., Hoshino Y., Hattori Y., Yamamoto A., Wada S., Hatai K., Makino M., Ishii N. 2012. *Mycobacterium pseudoshottsii* isolated from 24 farmed fishes in western Japan. *J. Veterinary Medical Science* 74:275-278.
 - 21) Kamijo F., Uhara H., Kubo H., Nakanaga K., Hoshino Y., Ishii N., Okuyama R. 2012. A Case of Mycobacterial Skin Disease Caused by *Mycobacterium peregrinum*, and a Review of Cutaneous Infection. *Case Rep. Dermatol.* 4:76-79.
 - 22) Nakanaga K., Hoshino Y., Wakabayashi M., Fujimoto N., Tortoli E., Makino M., Tanaka T., Ishii N., 2012. *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.
 - 23) Takeo N., Hatano Y., Okamoto O., Saruwatari K., Nakanaga K., Ishii N., Yokoyama S., Fujiwara S. 2012. *Mycobacterium haemophilum*, Japanese, renal transplant, immunocompromised host, cutaneous infection. *J. Dermatol*, in press.
 - 24) Otsuki T., Izaki S., Nakanaga K., Hoshino Y., Ishii N., and Osamura K. 2012. Cutaneous *Mycobacterium massiliense* infection: a sporadic case in Japan. *J. Dermatol*, in press.
 - 25) Onoe H., Yotsu R., Nakanaga K., Hoshino Y., Ishii N., and Takeuchi T. 2012. Buruli ulcer accompanied by pain in a Japanese patient. *J. Dermatol*, in press.
 - 26) Yotsu R. R., Nakanaga K., Hoshino Y., Suzuki K., and Ishii N. 2012. Buruli ulcer and current situation in Japan: a new emerging cutaneous Mycobacterium infection. *J. Dermatol*, in press.
2. 和文発表
 - 1) 儀同政一. 2011. 新しい抗ハンセン病薬の現状と展望. 国立ハンセン病資料館研究紀要2:39-42.
 - 2) 石井則久、鶴殿俊史、藤澤道子、伊谷原一、谷川和也、宮村達男、鈴木幸一. 2011. チンパンジーとハンセン病. 日本ハンセン病学会誌80:29-36.
 - 3) 森修一、鈴木幸一、スマナバルア、石井則久. 2011. 2010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80:37-46.
 - 4) 四津里英、鈴木幸一、森修一、石井則久. 2011. ハンセン病の診断. 日本ハンセン病学会誌80:59-70.
 - 5) 石井則久、鶴殿俊史、藤澤道子、伊谷原一、谷川和也、宮村達男、鈴木幸一. 2011. チンパンジーとハンセン病. 日本ハンセン病学会誌80:29-36.
 - 6) 鈴木幸一. 2011. 「ハンセン病は遺伝病」ではない. 日本ハンセン病学会誌80:244
 - 7) 鈴木幸一. 2011. 遺跡発掘と感染症の可能性. 日本医事新報 No.4550, 62-63.
 - 8) 四津里英、中永和枝、石井則久. 2011. 皮膚科医のための感染症マニュアル:アフリカの抗酸菌症が日本にも—ブルーリ潰瘍— *MB Derma* 183:41-49.
 - 9) 湊はる香、若狭朋子、松村由美、中永和枝、星野仁彦、石井則久. 2011. 多剤併用療法が奏効したブルーリ潰瘍 (*Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense* 感染症) の一例皮膚科の臨床 53:1301-1304, 1219-1220.
- ## II. 学会発表
1. 国際学会
 - 1) Ishii, N., K. Suzuki. Overview of Mycobacterioses. 22nd World Congress of Dermatology, Mycobacterial Skin Disease Symposia, May 24-29, 2011, Seoul, Korea.
 - 2) Matsuoka M. WHO drug resistance screening and surveillance program in leprosy. International Symposium on Mycobacteria and Drug resistance. July 2011 Uberlandia., Brazil.
 - 3) Tamura, T., and M. Makino. Peptide-25 of Ag85B induces Th1 differentiation in a T-bet-independent manner. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 4) Maeda, Y., T. Tamura, M. Kai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Induction of intracellular killing of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells by a lipopeptide-mediated activation of T cells. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 5) Nakata, N., M. Matsuoka, M. Makino, and M. Kai. Whole-genome comparison of *Mycobacterium leprae* strains differing in growth rate. XIII International

- Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 6) Matsunaga I, S. Maeda, N. Nakata, T. Naka, N. Fujiwara, and M. Sugita. Biosynthesis of Mycoketide and the related compounds in mycobacteria. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 7) Mukai, T., M. Matsuoka, Y. Maeda, Y. Miyamoto, Y. Fukutomi, and M. Makino. Identification of novel promoter of mycobacteriophage TM4 to obtain fluorescent-*Mycobacterium leprae*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 8) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Characterization of intracellular metabolites from *Mycobacterium leprae*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 9) Kai, M., H. Yamada, N. Fujiwara, S. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, I. Yano, and M. Makino. Establishment and characterization of knockout mutants of *Mycobacterium bovis* BCG gene involved in mycolic acid synthesis pathway. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 10) Tsukamoto, Y., M. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. Activation of human naïve T cells of both CD4 and CD8 subsets by *Mycobacterium tuberculosis* major membrane protein II. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 11) Suzuki, K., T. Uono, M. Fujisawa, K. Tanigawa, G. Idani, T. Miyamura and N. Ishii. Infection during infancy and long incubation period of leprosy: A West African chimpanzee shows signs of leprosy after 30 years in Japan. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 12) Uhara H, F. Kamijyo, H. Kubo, K. Nakanaga, Y. Hoshino, N. Ishii, R. Okuyama. A case of Mycobacterial skin disease caused by *Mycobacterium peregrinum*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 13) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae* rpoB gene and rifampicin resistance using recombinant *Mycobacterium smegmatis*. 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 17-20 September, 2011, Chicago, USA.
 - 14) Makino, M., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and T. Mukai. Naïve T cell activation by urease-deficient recombinant BCG that produces HSP70-MMP-II fusion protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 15) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Metabolome analysis of mycobacteria. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 16) Tamura, T., and M. Makino. The role of *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein in the induction of Th1 immune response. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 17) Mukai, T., Y. Maeda, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Development of a stable and high recombinant protein expression system in mycobacterium. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 18) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. Anti-*M. leprae* activity and phox localization in human macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 19) Maeda, Y., T. Tamura, M. Kai, T. Mukai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Increased expression of cytolytic effector proteins in human T cells co-cultured with dendritic cells by stimulation with *Mycobacterium leprae* lipopeptide. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama,

- Japan.
- 20) Kai, M., H. Yamada, N. Fujiwara, S. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, I. Yano, and M. Makino. Functional analysis of *mmaA2* and *mmaA4* in *Mycobacterium bovis* BCG Connaught. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
- 21) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. Yotsu, N. Ishii, and M. Makino. Nineteen cases of Buruli ulcer diagnosed in Japan, 1980-2010. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
2. 国内学会
- 1) 永岡謙、鈴木幸一、谷川和也、石井則久. 1型らい反応で再発したハンセン病の1例. 第74回日本皮膚科学会東京支部学術大会. 2011年2月 東京
- 2) 桜井準也、佐宗亜衣子、星野敬吾、谷川和也、森修一、石井則久、鈴木幸一、平田和明. 鍋被り葬と分子古病理学—らい菌DNAの検出—. 日本考古学協会第77回(2011年度)総会. 2011年5月 東京
- 3) 松尾英一、坂井哲雄、野間口博子、鈴木幸一、脇坂晟、藤岡保範、神谷茂. らい菌人工培養の完成報告、並びに派生する周辺医学知識拡大の展望. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山市
- 4) 甲斐雅規、松岡正典、宮本友司、中田 登、牧野正彦. 増殖能の異なるらい菌株間のゲノム比較解析. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山市
- 5) 福富康夫、前田百美、松岡正典、牧野正彦. ハンセン病におけるマクロファージのらい菌に対する殺菌機構の解明. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山市
- 6) 向井 徹、松岡正典、前田百美、宮本友司、福富康夫、牧野正彦. 蛍光蛋白発現らい菌構築のための検討. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山市
- 7) 中田 登、甲斐雅規、牧野正彦. 培養可能抗酸菌を利用したらい菌リファンピシ耐性変異の解析. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山市
- 8) 中永和枝、星野仁彦、四津里英、牧野正彦、石井則久. 日本のブルーリ潰瘍: 確定診断のための検査に関する検討. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山市
- 9) 松尾英一、坂井哲雄、野間口博子、鈴木幸一、脇坂晟、藤岡保範、神谷茂. らい菌人工培養の完成報告、並びに派生する周辺医学知識拡大の展望. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山市
- 10) 松岡正典. WHO Global Leprosy Programme による薬剤耐性拠点監視事業における我々の役割. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会、シンポジウム 2011年5月 岡山市
- 11) 森 修一、石井則久. 世界のハンセン病政策に関する研究 - ハワイのハンセン病政策の変遷 -. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山市
- 12) 四津里英、中永和枝、石井則久. 日本のブルーリ潰瘍: 19症例の検討 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山市.
- 13) 田村敏生、下袴田陽子、牧野正彦. 結核菌分泌蛋白由来 Peptide-25 による T-bet 非依存的 Th1 分化誘導機構の解析. 第40回日本免疫学会総会 2011年11月 千葉市
- 14) 塚本裕美子、田村敏生、牧野正彦. Immunostimulatory activity of major membrane protein II from *Mycobacterium tuberculosis*. 第40回日本免疫学会総会 2011年11月 千葉市
- 15) 鈴木幸一. 古病理学における感染症証明への分子病理学の応用. 第65回日本人類学会大会、シンポジウム5「古病理学の新たな展開」. 2011年11月 那覇市
- 16) 藤本徳毅、若林麻記子、植西敏浩、中永和枝、星野仁彦、石井則久、田中俊宏. 新菌種”*Mycobacterium shigaense*”感染症の1例. 第62回日本皮膚科学会中部支部学術大会, 2011年11月 四日市市
- 17) 高木 肇、奥村優香、松山かなこ、浅野裕子、大楠清文、黒川 景、中永和枝、石井則久. *Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense* 感染症の1例. 第62回日本皮膚科学会中部支部学術大会, 2011年11月四日市市