

24. ハンセン病研究センター

センター長 松尾英一

概要

ハンセン病だけについて見れば現代特に 20 世紀半ばから現在まではプロミンの有効性実証から多剤療法完成により、それまで数千年間、人類がなしえなかった本疾患の化学療法が可能となった偉大な時代である事は論を待たない。では、人類はさらに偉大な時代を期待出来るだろうか？ちなみに本疾患に残された大問題が後遺症克服と新患抑制である事は少なくとも本疾患医療関係者の多くから諒解されるであろう。よってそれらはまさに本研究センターの存在意義の中核をなすのである。

ハンセン病の化学療法の歴史を振りかえってみるとその成功にはそれを可能にした文化圏、国家、民族などに成功への道筋が準備されていた事がわかる。現在、多菌型の本疾患に対して用いられる多剤療法を構成する 3 剤のうち 2 剤はスルフォン剤である。それらは羊毛染色剤から発した化学工業の歴史と無関係ではない。また、化学療法剤として最初に用いられたスルフォン剤である赤色プロントジルは合成後 30 年近く放置された後にその抗菌作用がわかったものである。よってこの成功の背景は中世以後のヨーロッパの歴史、文化圏の共通習慣、同地の、特に近代ドイツ連邦の国家政策であったことが分かる。

翻って我が国にそれらに匹敵する背景があるだろうか？世界的な本疾患の権威の所感は明白に肯定的なものである。それは近代科学技術と知識の普及が本疾患流行期と時を同じくしたのはむしろわが国であり、近世ヨーロッパは上記知識普及の時代、すでに本疾患流行が終わっていたというのがその理由である。米国でスルフォン剤からの誘導体としてプロミンが合成された当時、米国で若干の州ではわが国とは比較にならないにしてもまだ本疾患流行期を脱していなかったことも上記の裏付けとの解釈である。

以上を勘案するとわが国の近、現代並びに将来の本疾患関連の科学、技術、医療とその政策に関する科学的で核心をついた研究結果は、わが国が国是とする国際貢献のあり方にも重要な方向性を与える可能性を秘めているといえよう。しかしそれは上記の如くわが国の歴史的経験を無駄にせず、さらに発展させる事が前提となる。その意味では平成 8 年らい予防法廃止の際、参議院厚生委員会における「らい予防法の廃止に関する法律案に対する附帯決議」で、ハンセン病治療に関して医療関係者への専門知識の普及を図ることと並び「一般市民に対して、また学校教育の中でハンセン病に関する正しい知識の普及啓発に努め、ハンセン病に対する差別や偏見の解消についてさらに一層の努力をすること」が盛り込まれた事は重要な意義があるし、その後の本疾患啓発活動に大きな影響を与えている。本研究センターの事業もまたその決議によって裏打ちされたものであり、当センター職員にその責任が課せられていることは明白である。

以上を踏まえた当センターでの事業、人事、交流の概況を以下本項で紹介するが当センターで調査、研究並びにレファレンス業務を担当する病原微生物並びに生体防御両

研究部の業績概要は本報告書において個別に紹介のとおりである。

なお平成 16 年 3 月 31 日をもって、松尾英一は退職し、後任としてウイルス第 2 部長宮村達男が就任する。

国内関係事業

1. 第 26 回ハンセン病医学夏期大学講座を医療関係者に対して開講（8 月 18-22 日）。参加者数は、54 名（うち医学部学生・研修医が 12 名）、医学コースに実験を取り入れ基礎から臨床を網羅的かつ統括的に講義・実習を行い、看護コースも設けた。実行委員はセンター、多磨全生園、全療協、入所者自治会で構成。スタッフは約 50 名。
2. 国立療養所多磨全生園の看護師に講義、研修（5 月 9 日、11 月 10 日、1 月 19 日）
3. 国際ハンセン病対策実行委員会出席（松尾センター長、6 月 26 日、2 月 9 日）
4. 国際保健協力フィールドワークフェロウシップ企画委員会に出席（松尾センター長、6 月 13 日、2 月 23 日）、並びに講義（同、於多磨全生園、8 月 8 日）。
5. 全国国立ハンセン病療養所施設長協議会に出席（松尾センター長、4 月 24 日、6 月 17 日、10 月 29 日、2 月 4 日）
6. 財団法人日弁連法務研究財団が実施する「ハンセン病問題に関する事実検証調査事業」のハンセン病問題検証会議による胎児剖検例に関して調査協力（12 月 8 日）。
7. 行政検査とらい菌の供給は後記
8. ハンセン病研究センター運営委員会（於厚生労働省、8 月 4 日）

国際協力事業

1. ハンセン病の治療及び予防の実践研修（JICA 研修）
平成 15 年 4~12 月までの 9 ヶ月間インドネシア、マレーシア、ミャンマー、タイ、ヴェトナムからの研修生を受入れた。帰国後、上記各国の行政機関並びに医療機関等で活躍している。
2. 国際共同研究と職員の海外派遣状況
ヴェトナム 血液診断の技術的技法及び薬剤耐性菌の発生状況等についての共同研究のため職員 4 名派遣。
3. 国外からの主な視察受け入れ
平成 15 年 11 月 3 日 ハンセン病専門医、研究者、支援団体役員として中国広東省広州市 漢達康福協会（ハンダリハビリテーション協会）のメンバーのうち、名誉会長楊理合教授（Dr. Yang Lihe）、同事務局長 陳志強

医師 (Dr. Micheal Chen) 、同湖北省支部長 馬鉄喜氏 (Mr. Ma Tiexi)が來所、視察並びに当方との意見交換を行った。

行政検査実績

(石井則久)

平成9年7月からハンセン病検査要項が施行され、ハンセン病研究センターで行政検査が実施されている。検査項目は、病理学的検査、血清抗体価(抗 PGL-I 抗体)検査、PCR 検査、薬剤耐性遺伝子検査である。

平成15年度(平成15年4月～平成16年3月)の検査件数は表のごとく27症例、54検査件数であった。1症例で複数回依頼(経過観察や異なる検査内容など)されるものもあった。また1回(1症例)の検査で複数の検査項目の依頼もあった。ハンセン病診断には複数の検査が推奨されており、各医療機関で実施できない検査が当センターに依頼されるため、依頼検査項目に差異が生じている。今年度は薬剤耐性遺伝子の検査依頼はなかった。最終的に新規にハンセン病と診断されたものは6例であった。

検査件数は増加傾向{平成9年度:47件、平成10年度:32件、平成11年度:34件、平成12年度:50件、平成13年度:739件(国療ハンセン病療養所から630件の血清検査の依頼があった)、平成14年度:261件(国療ハンセン病療養所から105件の血清検査の依頼があった)}にあったが、平成15年度は減少した。平成15年度の減少の理由は、ハンセン病新規患者数の減少と、ハンセン病療養所内で病状把握のため血清抗体価測定検査が減少した事による。ハンセン病新規患者数は毎年14名程度あるが、平成15年度は8名であった。

ハンセン病の発生動向と検査件数を対比すると、検査の需要があるにも関わらず、行政検査がまだ十分に利用されていない可能性もある。

今後の課題として、行政検査の各医療機関への周知徹底、検査依頼の簡素化、検体送付の迅速化、検査結果の迅速通知、臨床症状を把握したうえでの検査の指導、皮膚スミア検査の指導、知覚検査の指導、治療効果判定への検査利用、検査結果を基にしたコンサルテーション、追跡検査などがあり、患者・主治医に一層有益な検査のあり方が求められている。

平成 15 年度（2003 年度）行政検査実績

年度	2003
年度	平成15
登録検査番号	27
総検査件数	54
病理学的検査件数	13
血清抗体価検査件数	21
PCR検査件数	20
薬剤耐性遺伝子検査件数	0
実症例数	23

らい菌の供給

(松岡正典・天内肇)

平成 15 年 4 月より同 16 年 3 月までの間において、表に示すように、のべ 34 回、85 匹、6 施設、11 名の研究者に対し、らい菌感染ヌードマウス足蹠の供給を行った。

らい菌感染ヌードマウス足蹠の分与
(平成 15 年 4 月より平成 16 年 3 月)

No.	年月日	分与先		マウス匹数
	平成 15 年			
1)	4. 2	儀同	ハンセン研	2
2)	4. 21	天児	九州大	3
3)	4. 23	天児	九州大	2
4)	5. 1	福富	ハンセン研	5
5)	5. 14	山崎	ハンセン研	2
6)	5. 14	福富	ハンセン研	1
7)	5. 16	牧野	ハンセン研	1
8)	6. 10	山崎	ハンセン研	3
9)	6. 10	福富	ハンセン研	1
10)	6. 16	天児	九州大	1
11)	6. 25	儀同	ハンセン研	1
12)	7. 14	牧野	ハンセン研	1
13)	7. 31	儀同	ハンセン研	2
13)	8. 1	牧野	ハンセン研	1
14)	8. 4	天児	九州大	2
15)	8. 14	与儀	ハンセン研	2
16)	8. 15	与儀	ハンセン研	2
17)	9. 2	与儀	ハンセン研	1
18)	9. 8	天児	九州大	1
19)	9. 10	牧野	ハンセン研	3
20)	9. 16	Ranjit C.	Ananban leprosy Hospital (ネパール)	5 (DNA)
21)	9. 22	Chae G.-T.	Catholic Uni. (韓国)	10 (DNA)
22)	10. 6	向井	ハンセン研	6
23)	10. 15	向井	ハンセン研	2

No.	年月日	分与先		マウス匹数
	平成 15 年			
24)	10.20	向井	ハンセン研	2
25)	10.20	天児	(九州大)	2
26)	10.22	鈴木	ハンセン研	3
27)	10.22	儀同	ハンセン研	2
28)	10.27	Azlan N.	National Health Lab. (マレーシア)	5 (DNA)
28)	11.9	牧野	ハンセン研	2
29)	11.9	藤村	北里大	2
30)	12.2	牧野	ハンセン研	2
31)	12.15	牧野	ハンセン研	1
	平成 15 年			
32)	1.6	牧野	ハンセン研	1
33)	1.19	天児	(九州大)	2
34)	3.13	牧野	ハンセン研	1

24. ハンセン病研究センター (i) 病原微生物部

部長 牧野正彦

概要

WHO の多剤併用療法の導入により、ハンセン病登録患者数は激減した。しかし、今尚毎年数十万人の新患患者が発症し、かつハンセン病に係る基本的科学的解明は未解決のまま取り残されている。主な問題点は、①ワクチンが存在しないこと、②感染経路が同定されていないこと、③末梢神経障害の発症機構が確立されていないこと、④薬剤耐性菌の簡便かつ網羅的同定法が確立されていないこと等が挙げられる。当部では、昨年に引き続きこれらの問題の解明に努めた。

少菌型ハンセン病患者では、宿主免疫担当細胞がらい菌抗原を認識し、強い細胞性免疫を誘導し病変を軽症化させる。少菌型患者 T 細胞が認識する抗原は新しいワクチンとなり得ると想定し、Major Membrane Protein-II (MMP-II)を見出した。今後ワクチンとしての有効性の検討が待たれる。当部において発見したらい菌由来リポタンパク (LpK) の免疫学的解析も発展させ、LpK を構成する脂質とタンパクは、細胞上の異なるレセプターに結合し、協調的に作用し強い自然免疫および獲得免疫反応を惹起することを明らかにした。今後ワクチンの開発を遂行する上で重要な知見である。

ハンセン病の感染経路の解明には、分子疫学的技法を駆使する必要がある。そのためにはそれぞれの菌を分子生物学的に識別しなければならない。従来、らい菌は多様性に乏しく、各臨床分離株間の相違を見出すことは難しいとされてきた。しかし、らい菌ゲノム DNA のタンデムリピートに着目すると、分離株間でリピートのコピー数に差が存在することを明らかにした。これらを利用すると、感染経路の解明・ハンセン病の発症機構の解明が容易になると期待される。らい菌の全ゲノム解析が行われ、らい菌の分子生物学的分野は急速に発展すると期待されている。しかし、機能が不明な遺伝子が多数存在し、これらの解析が急がれるところである。そこで、発育の速い非病原性抗酸菌を利用し、らい菌遺伝子の機能解析を試みている。その第一のステップとして、非病原性菌の特定の遺伝子を破壊することで、それぞれの遺伝子の役割を検討している。将来的には遺伝子破壊株にらい菌の対応遺伝子を挿入することで、らい菌遺伝子の機能が明らかになると予想される。

末梢神経障害の発症機構の解明のため、離乳時カニクイザルにらい菌を種々のルートから接種し、ハンセン病

の発症の有無を検討するとともに、新生仔サルよりシュワン細胞を分離・株化して、らい菌感受性を検討している。シュワン細胞は、らい菌抗原を細胞表面に発現したが、未だアポトーシスの誘導にまでは至っておらず今後の研究が急がれる。

非結核性抗酸菌症の研究は、診断に主眼を置いて展開している。これまでに有用性を確認した新たなターゲット遺伝子 *dnaA* を用い、また抗酸菌感染症は発展途上国に多いことなどを鑑み、より短時間に、かつ高価な機械を用いず遺伝子診断する方法を開発している。特に、LAMP 法に着目し、臨床問題になりやすい非結核性抗酸菌を中心に取り組んでいる。

施設整備に関しては、平成 14 年度に獲得した補正予算により、二次元電気泳動システム、画像解析装置、ゲルスポット採取装置、質量分析装置、定量 PCR 装置、タンパク分取装置を導入した。本装置により、感染の場で発現変化する抗酸菌タンパク質をプロテオーム解析手法により網羅的、経時的に分析することが可能となった。さらに、質量分析装置を用い抗酸菌菌壁に特徴的に存在する糖脂質等の成分分析も可能となった。病態解明あるいは新しい治療法および予防法の開発に繋がるものと期待される。

最後に人事関係であるが、4月1日よりヒューマンサイエンス財団より、稲垣勝也が流動研究員として入所し、3月31日には第一研究室研究員武下文彦が退職した。

研究業績

1. 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 Fibronectin-attachment protein (FAP)の生理学的解析

抗酸菌における FAP の生理学的機能を明らかにするため、*M. smegmatis* の FAP 遺伝子破壊株の作製及びその解析を行った。相同組み換え法により取得した破壊株は増殖過程において野生株に比べ強く凝集する形態を示し、さらに脂質の構成、構造に変化を生じないまま表層の疎

水性が増加していた。これらのことから FAP は抗酸菌が持つ脂質と同様に、その表層構造に影響を与える因子の一つであることが示唆された。

[宮本友司、向井 徹、武下文彦、中田 登、前田百美、甲斐雅規、牧野正彦]

2. 抗酸菌糖脂質 Glycopeptidolipids (GPLs)糖転移酵素遺伝子の解析

*M. smegmatis*の GPLs 糖転移酵素をコードすると予測される遺伝子の破壊株の作製及びその解析を行った。温度感受性ファージシステムにより染色体上の 4 種の GPLs 糖転移酵素候補遺伝子の破壊株を取得した。各破壊株より抽出した GPLs を TLC、MALDI-TOF/MS 及び GC/MS により解析した結果、4 種の内 3 種の遺伝子破壊株由来 GPLs の構造変化が認められ、これらの遺伝子が GPLs 生合成における糖転移に関与することが判明した。

[宮本友司、向井 徹、中田 登、甲斐雅規、中 崇(BCG 中央研究所)、矢野郁也(BCG 中央研究所)、牧野正彦]

3. らい菌 2 成分情報伝達系の解析

らい菌 2 成分情報伝達系 SenX3-RegX3 の機能解析を試み、これまでに第 2 成分 RegX3 が機能していないことがわかり、原因として RegX3 遺伝子上流部分の欠失のためであることを示した。今回第 1 成分 SenX3 のプロモーター活性を調べるためらい菌及び結核菌よりプロモーター領域をクローニングし lacZ 遺伝子と結合し発色で比較した結果、両者でほぼ同等の活性が観察された。さらにらい菌 SenX3-RegX3 領域を上記プロモーター活性測定用プラスミドにクローニングし同様に測定したところ活性が上昇したことかららい菌 SenX3-RegX3 はオートレギュレーションする可能性が示された。

[甲斐雅規、P. J. Brennan (コロラド州立大学)、牧野正彦]

4. らい菌に発現する遺伝子の網羅的解析に関する研究

らい菌ゲノムの塩基配列が明らかになったが、実際に発現する遺伝子の詳細については不明な点が多い。そこで、マクロファージ感染前後のらい菌から mRNA を調整し、³³P 標識 cDNA プロブとして、らい菌ゲノム全域をカバーするライブラリーから調整した DNA をスポットしたナイロン膜とハイブリダイズすることにより、発現遺伝子の網羅的解析を試みた。その結果、遺伝子とされているものでも、mRNA として発現が確認され、何らかの機能を担っている可能性が示唆された。

[鈴木幸一、中田 登、牧野正彦]

5. らい菌ゲノム DNA の多様性についての検討

らい菌ゲノム DNA の株間における差異についてはほとんど明らかとなっていない。そこで、らい菌 Thai53 株ゲ

ノム DNA のタンデムリピート 37 箇所についてコピー数を決定し既報の TN 株のゲノム DNA 配列と比較した結果、19 箇所で見られた。このうち 4 箇所について世界各地から得られた臨床分離株 31 株で比較したところ、従来の方法では分類不可能な分離株も分類可能であった。これらゲノム間の差異はハンセン病疫学調査のための型別分類に有用であるとともに、遺伝子機能を探る上でも重要であると考えられる。

[中田 登、松岡正典(生体防御部)、甲斐雅規、鈴木幸一、牧野正彦]

6. 抗酸菌の排除と細胞内寄生に関わる因子に関する研究

抗酸菌感染マクロファージにおいては、菌の排除を行うとする自然免疫能が活性化されると同時に、菌のファゴゾーム内潜伏を許容するような細胞反応も惹起される。これらの相反する細胞反応のバランスが、持続感染と治癒という予後決定に重要である可能性を想定し、抗酸菌感染後の自然免疫反応に重要な因子である TLR 2 と菌の細胞内寄生に重要な因子である TACO の相互関係について検討を行った。その結果、TACO の存在は TLR2 シグナルに抑制的に働き、TLR2 刺激は TACO 発現量を抑制するという、相反する作用があることが明らかとなった。

[鈴木幸一、武下文彦、牧野正彦]

7. カニクイザルシュワン細胞を用いた神経障害機構解明

これまでに、サル由来シュワン細胞株を樹立し、シュワン細胞はらい菌感受性を有することを報告した。そこで、末梢神経障害の誘導機構を探るため、らい菌及びその菌体成分のシュワン細胞アポトーシス誘導能を検討した。Annexin-V、Mebstain を用いる限り、いずれも陰性であった。そこで、らい菌感染シュワン細胞の T 細胞強化化能を IFN- γ を示標に検討したところ、らい菌感染より、有意に強い IFN- γ 産生観察された。

[前田百美、遠藤真澄(生体防御部)、寺尾恵治(つくば霊長類センター)、牧野正彦]

8. らい菌感染モデルサルの樹立

ハンセン病ワクチン開発において、候補抗原の効果判定、安全性確認が必要とされる。そのため系統的ならい菌感染モデルサルの樹立を目的とした。鼻腔内、鼻尖皮下、静脈内の 3 経路各 2 頭の幼若サルヘヌードマウスより精製されたらい菌 5×10^9 頭を投与した。静脈投与群に PGL-1 抗体価の上昇をみとめた。また、鼻尖投与群では、投与域に投与 6 月後にらい菌の存在を PCR 法により確認した。

[向井 徹、松岡正典(生体防御部)、鈴木幸一、前田百美、寺尾恵治(つくば霊長類センター)、小野文子(予防衛生協会)、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. 新しいハンセン病ワクチン候補分子の同定

ハンセン病に対する有効なワクチンの開発は切望されている。少菌型ハンセン病患者 T 細胞は、らい菌のある種の抗原を認識し病変の限局化をもたらす。本抗原の同定が新たなワクチンに直接的に結びつくと思定し同定を試みた。らい菌中最も抗原性に富む菌膜をターゲットとし、菌膜をゲル濾過法で分画した後、少菌型ハンセン病患者血清を用いスクリーニングしたところ、抗原性に富む、菌膜分画に共通して存在する抗原がウエスタンブロットで確認された。この分画を抽出し、その N 末端アミノ酸を解析したところ、MMP-II が同定された。

[前田百美、山下康子、牧野正彦]

2. 新しいワクチン候補分子 MMP-II の抗原性の評価

新たに同定されたタンパク MMP-II を Native gel を用い精製した後、その抗原性を自然免疫および獲得免疫の観点より検討した。MMP-II は、TLR-2 依存性にヒト末梢単球由来樹状細胞を刺激して IL-12 p70 を産生誘導し、マクロファージを刺激して IL-10 を産生した。また、MMP-II を樹状細胞にパルスすると自己 T 細胞を刺激し、IFN- γ 産生性タイプ 1 CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞を活性化した。少菌型ハンセン病患者では、この T 細胞反応は正常健康者に比し著しく亢進していた。従って、MMP-II は生体内で認識され得る抗原性に富んだらい菌由来抗原であることが判明した。

[前田百美、向井 徹、武下文彦、
石井則久(生体防御部)、牧野正彦]

3. DC-SIGN 分子によるらい菌由来蛋白 MMP-II の認識機構

ハンセン病ワクチン開発のため、有効な抗原同定及びその宿主側の認識機構の解明は重要である。樹状細胞表面に発現する C 型レクチンの DC-SIGN は、病原体の糖脂質を認識することが知られている。しかし、蛋白であるらい菌由来 MMP-II が DC-SIGN と結合することを FACS により明らかにした。その認識機構の解明は、効果的な抗原認識誘導に有効と考えられた。

[宮本友司、向井 徹、前田百美、牧野正彦]

4. 分泌型 MMP-II 発現 BCG 菌株の作製

抗酸菌は、抗原提示細胞に吞食されるとファゴソームを形成し、宿主細胞内プロセッシング機構から回避するすべを獲得している。このことは、BCG 菌を抗酸菌症に対するワクチンとして用いる場合、必要かつ十分な抗原特異的免疫反応を妨げていると考えられる。そこで、らい菌由来 MMP-II の抗原性をより有効に発揮させるため、

MMP-II に Ag85A 由来分泌シグナルを付加したプラスミドを作製し、BCG 菌に導入した。得られたリコンビナント BCG 菌は MMP-II を分泌発現することを確認した。

[稲垣勝也、前田百美、牧野正彦]

5. らい菌由来リポ蛋白 LpK の IL-12 産生誘導機構

らい菌由来リポ蛋白 LpK の IL-12 産生誘導には、脂質附加 N 末端蛋白 (Lpk-a) が重要な役割を果たしている。IL-12 産生誘導における TLR-2 の関与を検討した結果、LpK、LpK-a 及び合成リポペプチド (LP) は TLR-2 を介した NF- κ B の活性化を誘導した。しかし、脂質を欠く LpK 蛋白 (LpK-b,-d) は関与しなかった。また、LP、LpK-b,-d は単独では十分な IL-12 産生誘導が認められず、LP は LpK-b,-d の IL-12 産生誘導を増強した。IL-12 産生誘導には脂質と N 末端蛋白の双方が必要であることが明らかとなった。

[山下康子、前田百美、牧野正彦]

6. 経鼻粘膜ワクチンの開発

らい菌の感染経路の一つとして、経鼻腔感染が考えられている。鼻腔粘膜に効率的な免疫誘導を行うため、粘膜面抗原捕捉細胞である M 細胞を標的とした抗原投与方法の開発を行った。M 細胞と特異的に結合するレオウイルスの構造蛋白 σ 因子をらい菌 MMP II 蛋白もしくは Fibronectin attachment protein との融合蛋白として調整を行い、マウス鼻腔内に投与した。その結果、 σ 因子依存的に唾液中の抗 MMP II 及び FAP 抗体価の上昇を認め、粘膜面に効率的な免疫誘導を示した。

[向井 徹、宮本友司、牧野正彦]

III. ハンセン病の診断および治療に関する研究

1. らい菌由来糖脂質の解析

抗酸菌菌体成分糖脂質の 1 つである Trehalose Dimycolate (TDM) が結核菌などの抗酸菌ではある種の病原性因子であること、また各種生物活性を示すことなどが報告されている。そこで、らい菌由来糖脂質の存在の有無及び抽出・精製を試みた。らい菌感染アルマジロの組織を溶媒抽出法で分画し薄層クロマトグラフィーを結核菌と比較したところ、結核菌の糖脂質 TDM, TMM と同等のバンドが得られた。これらのバンドを薄層プレートから切り出し粗精製した後、質量分析装置にて解析したところ、結核菌の TDM および TMM と同様の物質が存在することを明らかにした。

[甲斐雅規、藤田由希子(BCG 中央研究所)、
矢野郁也(BCG 中央研究所)、牧野正彦]

2. ハンセン病の新しい血清診断の開発

従来、ハンセン病の血清診断には、らい菌菌壁に存在する特異的抗原 PGL-I が用いられてきた。しかし、感度の点において多くの問題が存在し、特に少菌型ハンセン病の診断が極めて難しいという難点が指摘されていた。そこで血清診断用の新たな抗原を検索したところ、Major Membrane Protein-II (MMP-II) が極めて良好な成績を示した。多菌型ハンセン病患者は約 80%、少菌型ハンセン病患者では約 45% が陽性であった。新しい血清診断法の確立が期待される。

[前田百美、甲斐雅規、福富康夫、向井 徹、石井則久(生体防御部)、牧野正彦]

3. クロファジミン(B663)によるマクロファージのサイトカイン産生調節

B663 にはらい反応を抑制する等免疫調節作用があることが指摘されている。*in vitro* にてらい菌刺激マウスマクロファージから産生される TNF が B663 により増強され IL-10 は抑制されることが分かった。また、PGE2 産生も抑制された。IL-10 産生は PGE2 の受容体への結合とアデニレートシクラーゼ活性化を必要とすることから、PGE2 抑制が IL-10 抑制の因であることが示唆された。また、PGE2 は炎症因子であることから B663 の抗炎症活性は PGE2 産生抑制作用に原因があると思われた。さらに、B663 は TNF 増強を通じて宿主の抗菌活性を高める作用を持ち合わせていることが示唆された。

[福富康夫、武下文彦、松岡正典(生体防御部)、牧野正彦]

4. らい菌感染マクロファージを用いた抗らい菌剤感受性試験法の確立

らい菌の薬剤感受性試験を行なうために、ヌードマウスから回収したらい菌を *in vitro* にてマウスマクロファージに感染させて、リファンピシン存在下で 33 度にて数日間培養した。そして、らい菌を回収しラジオレスピロメトリー法にて代謝活性を測定したところ、リファンピシン添加により著明な代謝抑制作用がみられた。人工培養できないらい菌を抗酸菌培地で培養し薬剤を添加して放射性同位元素の代謝減少をみて評価するというラジオレスピロメトリー法よりも、より生体内に近い状態での薬剤評価方法になりうると考えられた。

[福富康夫、松岡正典(生体防御部)、牧野正彦]

IV. 薬剤耐性らい菌に関する研究

1. *M. smegmatis* トランスポゾン挿入 *kat G* 変異株解析

トランスポゾンの挿入変異株ライブラリーの中から *kat G* にトランスポゾンが挿入した変異株について解析を行った。*Kat G* はカタラーゼ活性とペルオキシダーゼ活性を持ち、さらに抗酸菌治療薬イソニアジドを活性型にすることが知られているが、親株と変異株の溶菌液を作成

し活性染色を行った結果、変異株がカタラーゼ活性及びペルオキシダーゼ活性を失っていることが確認できた。また、イソニアジド含有培地での増殖の有無を調べた結果、変異株はイソニアジドに耐性を示すことがわかった。このことから変異株では *kat G* 遺伝子が働かないことからイソニアジドを活性型にすることはできないこと、すなわち *kat G* が完全に機能していないことが証明された。

[甲斐雅規、中田 登、牧野正彦]

2. らい菌の薬剤感受性に関するモデル菌の開発

らい菌の薬剤感受性試験を容易にするため、我々は薬剤感受性に関するモデル菌の開発を行っている。ハンセン病治療薬ダブソンの標的をコードする遺伝子が *folP* 遺伝子であることから、らい菌の *folP* 遺伝子を持つプラスミドを迅速発育性抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* に導入した後、温度感受性ファージを利用した遺伝子破壊システムにより *M. smegmatis* の *folP* 遺伝子を破壊することにより遺伝子を置換した。この系を用いて現在ダブソン耐性変異の解析を行っている。

[中田 登、甲斐雅規、松岡正典(生体防御部)、鈴木幸一、牧野正彦]

V. 結核菌と非結核性抗酸菌に関する研究

1. 結核菌の迅速薬剤感受性試験法に関する研究

(1) 多剤併用療法に則した薬剤感受性試験法の検討

昨年度に続き、RFP0.010 μ g/ml、INH0.10 μ g/ml、SM1.0 μ g/ml (あるいは EB1.0 μ g/ml) の混合薬剤に対する併用効果を、結核菌参照菌 6 株と臨床分離菌 20 株について調べた。RFP と INH の両薬剤耐性菌株でなければ、単剤試験法にて耐性菌と判定された菌株であっても、本法では感性菌と判定され、多剤併用療法による実際の治療結果と一致していた。また、ATP 測定法では、5 日間で判定が可能であり、新しい迅速薬剤感受性試験法 (ATP 法) の確立ができた。さらにマイクロプレートを用いた検討により、ミクロ化も可能になった。

[山崎利雄; 佐藤直樹、山下研也、岡沢 豊(極東製薬工業)]

(2) 二次抗結核薬を用いた場合の ATP 法の有用性の検討

二次抗結核薬である Capreomycin (CPM)、Cycloserine (CS)、Ethionamide (TH)、para-Aminosalicylic acid (PAS)、Emviomycin (EVM) について ATP 法の有用性を検討した。結核菌 H37Rv 株を用いて ATP 法による結果の再現性を確認した。臨床分離菌 49 株を用いた ATP 法と寒天比率法との一致率は、各薬剤とも 92% 以上であり、ビットスペクトル法との一致率は、88% 以上と比較参照法との一致率は高く、二次抗結核薬についても、結核菌の ATP 測定による薬剤感受性試験法は有用であると考え

られた。

[山崎利雄; 佐藤直樹、山下研也、岡沢 豊(極東製薬工業)]

2. ATP 測定法によるらい菌の薬剤感受性試験法の検討

現行の *in vitro* の薬剤感受性試験法である Buddemeyer 法に代わる、非放射性のらい菌の薬剤感受性試験法の確立をするために ATP 測定による検討を行った。抑制率が 50% 以上を示す場合に薬剤効果ありと判定する場合、ATP 法に用いる薬剤濃度は、RFP 0.5、CLF 2.0、CAM 0.5、MINO 2.0 μ g/ml が適当であると思われたが、OFLX8.0 μ g/ml の濃度は、更なる検討が必要であった。ATP 法 10 日目と Buddemeyer 法 7 日目の判定結果は、同一薬剤濃度での抑制傾向は、良く一致した。

[山崎利雄; 儀同政一、松岡正典(生体防御部)]

3. 飼いイヌの臓器からの抗酸菌の分離

飼い主が結核患者であり、イヌの咽頭部ぬぐい液より、結核菌が分離されたため、安楽死させたイヌの肺、肺門リンパ節、肝臓より抗酸菌を分離した。脾臓からは分離できなかった。各臓器由来の分離菌の同定試験の結果は、*M. tuberculosis* であった。分離菌は、主要抗結核薬すべてに感受性菌であった。イヌの結核症は非常に稀であり、RFLP 分析の結果、飼い主から感染したものであろうと推察された。

[山崎利雄; 芳賀伸治、渡邊治雄(細菌第一部)、
神山恒夫(獣医科学部)、高橋光良(結核研究所)
宇根有美(麻布獣医科大)]

4. 非結核性抗酸菌症迅速診断法の開発

非結核性抗酸菌の同定法開発のため *dna A* 遺伝子配列内に抗酸菌種特異領域を同定した。本領域を用い簡便な同定法の確立のため、等温遺伝子増幅法である Loop-mediated amplification method(LAMP 法)への応用を行った。鑑別困難である *M. kansasii* と *M. gastri* を用い検討したところ、非結核性抗酸菌 20 種のゲノム DNA とは交差せず各菌特異的に増幅する系を開発した。

[向井 徹、宮本友司、山崎利雄、牧野正彦]

VI. 国際共同研究

1. ベトナム国におけるフィールド調査

これまでパキスタン国のハンセン病流行地域において種々の基盤的検査技術を供与するとともに、らい菌の PGL-I 抗原に対する抗体検査および薬剤耐性菌の疫学調査をおこなってきたが、今回さらにベトナム国で同様の技術供与および疫学調査を行うため北部ハノイのバックマイ病院並びに中部クイニョンのクイホーハンセン病院において現地調査を行った。

[甲斐雅規、福富康夫、前田百美、向井 徹、武下文彦、
中田 登、山崎利雄、鈴木幸一、牧野正彦]

発表業績一覧

1. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Maeda Y., Gidoh M., Ishii N., Mukai C. and Makino M.: Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens. Cell. Immunol., 222:69-77, 2003.
- 2) Maeda Y., Brennan P. J. and Makino M.: Studies of lipoproteins of *Mycobacterium leprae*. Jpn. J. Leprosy, 73: 209-215, 2004.
- 3) Kondo T., Nakamura N., Suzuki K., Murata S., Muramatsu A., Kawaoi A. and Katoh R.: Expression of human pendrin in diseased thyroids. J. Histochem. Cytochem., 51:167-73, 2003.
- 4) Toda S., Aoki S., Suzuki K., Watanabe K., Koike K., Koike N. and Sugihara H.: Thyrocytes, but not C cells, actively undergo growth and folliculogenesis at the periphery of thyroid tissue fragments in three-dimensional collagen gel culture. Cell Tissue Res., 312:281-289, 2003.
- 5) Yamaguchi H., Osaki T., Taguchi H., Sato N., Toyoda A., Takahashi M., Kai M., Nakata N., Komatsu A., Atomi Y. and Kamiya S.: Effect of bacterial flora on postimmunization gastritis following oral vaccination of mice with *Helicobacter pylori* heat shock protein 60. Clin Diagn Lab Immunol., 10:808-812, 2003.
- 6) Krutzik S.R., Ochoa M.T., Sieling P.A., Uematsu S., Ng Y.W., Legaspi A., Liu P.T., Cole S.T., Godowski P.J., Maeda Y., Sarno E.N., Norgard M.V., Brennan P.J., Akira S., Rea T.H. and Modlin R.L.: Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. Nat. Med. 9: 525-532, 2003.
- 7) Nakayama K., Maeda Y. and Jigami Y.: Interaction of GDP-4-keto-6-deoxymannose-3, 5-epimerase-4-reductase with GDP-mannose-4, 6-dehydratase stabilizes the enzyme activity for formation of GDP-fucose from GDP-mannose. Glycobiol. 13:

673-680, 2003.

- 8) Kai M., Maeda Y., Maeda S., Fukutomi Y., Kobayashi K., Kashiwabara Y., Makino M., Abbasi M.A., Khan M.Z. and Shah P.A.: Active surveillance of leprosy contacts in country with low prevalence rate. *Intl. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, in press, 2004.
- 9) Miyamoto Y., Mukai T., Takeshita F., Nakata N., Kai M. and Makino M.: Aggregation of mycobacteria caused by disruption of fibronectin-attachment protein-encoding gene. *FEMS Microbiol. Letters*, in press, 2004.
- 10) Kimura H., Maeda Y., Takeshita F., Takaoka L.E., Matsuoka M. and Makino M.: Up-Regulation of T cell stimulating activity of mycobacteria infected macrophages. *Scan. J. Immunol.*, in press, 2004.
- 11) Yamashita Y., Maeda Y., Takeshita F., Brennan P.J. and Makino M.: Role of the polypeptide region of a 33 kDa mycobacterial lipoprotein for efficient IL-12 production. *Cell. Immunol.*, in press, 2004.

2. 和文発表

- 1) 牧野正彦：らい菌と樹状細胞の相互作用. *臨床免疫*, 39:109-115, 2003.
- 2) 鈴木幸一：甲状腺濾胞形成機構研究の新しい展開. *ホルモンと臨床*, 51: 3-10, 2003.
- 3) 鈴木幸一：サイログロブリンによる甲状腺濾胞機能の自己調節機構. *内分泌・糖尿病科*, 16: 172-183, 2003.
- 4) 鈴木幸一：ペンドレド症候群と PDS 遺伝子異常症. *内分泌・糖尿病科*, 17: 410-416, 2003.

11. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Makino M., Maeda Y., Kimura H., and Takeshita F.: Up-regulation of antigen presenting function of mycobacteria infected macrophage. 38th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Newark, USA, July, 2003.

2. 国内学会

- 1) 牧野正彦、前田百美：タイプ1細胞性免疫を誘導するらい菌抗原の探索. 第76回日本細菌学会総会、熊本、2003年4月.
- 2) 中田 登、甲斐雅規、鈴木幸一、前田伸司、松岡正典、牧野正彦：大腸菌 - 抗酸菌シャトルコスミドを用いたらい菌 Thai53 株整列クローンライブラリの作製と遺伝子解析. 第76回日本細菌学会総会、熊本、2003年4月.
- 3) 山崎利雄、芳賀伸治、佐藤直樹、山下研也、岡沢 豊、三輪昭成、田村俊秀：生物発光を用いた結核菌の多剤併用薬剤感受性試験法の検討. 第78回日本結核病学会総会、倉敷、2003年4月.
- 4) 山崎利雄、芳賀伸治、佐藤直樹、山下研也、岡沢 豊、三輪昭成、田村俊秀：結核菌の多剤併用薬剤感受性試験法の検討. 第73回実験結核研究会、倉敷、2003年4月.
- 5) 福富康夫、松岡正典：ハンセン病におけるマクロファージのサイトカイン産生機構. 第102回日本皮膚科学会総会、浦安、2003年5月.
- 6) 戸田修二、鈴木幸一、杉原 甫：甲状腺濾胞上皮細胞は、上皮-間葉相互作用を介して骨髄由来間質細胞の血管内皮細胞への分化転換を促進する. 第76回日本内分泌学会学術総会、横浜、2003年6月.
- 7) 前田百美：らい菌のリポ蛋白に関する研究. 第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月.
- 8) 宮本友司、武下文彦、中田 登、前田百美、甲斐雅規、牧野正彦、向井 徹：抗酸菌 Fibronectin-attachment protein の機能解析. 第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月.
- 9) 福富康夫・虎谷聡・松岡正典：らい菌貪食マクロファージにおいて誘導される PGE2 とらい菌の細胞内生存との関係. 第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月.
- 10) 武下文彦、向井 徹、宮本友司、牧野正彦：らい菌 Fibronectin Attachment Protein (FAP) を標的にした DNA ワクチンの検討. 第76回日本ハンセン病学会総会・学術大会、神戸、2003年7月.
- 11) 山崎利雄、松岡正典、儀同政一：らい菌の ATP 測定による薬剤感受性試験法の検討. 第76回日本ハンセン病学会、神戸、2003年7月.

ハンセン病研究センター

- 12) 前田百美、遠藤真澄、寺尾恵治、牧野正彦：シュワ
ン細胞とらい菌の相互作用の解明. 第 76 回日本ハン
セン病学会総会・学術大会、神戸、2003 年 7 月.
- 13) 福富康夫：ハンセン病研究の最近のトピックス、県
民参加のハンセン病講座、神戸、2003 年 7 月.
- 14) 甲斐雅規、藤田由希子、矢野郁也、牧野正彦：らい
菌由来糖脂質の解析. 第 76 回日本ハンセン病学会総
会・学術大会、神戸、2003 年 7 月.
- 15) 甲斐雅規、中田 登、牧野正彦：速発育性抗酸菌 *M.*
smegmatis のトランスポゾン変異株ライブラリーの
作製と解析. 第 86 回日本細菌学会関東支部総会、横
浜、2003 年 10 月.
- 16) 鈴木幸一：サイログロブリンの新しい作用－濾胞機
能の negative feedback 調節因子として－. 第 46 回
日本甲状腺学会シンポジウム「甲状腺研究の update」、
名古屋、2003 年 11 月.
- 17) 戸田修二、小池英介、広松雄治、鈴木幸一、杉原 甫：
Air-Liquid Interface は甲状腺濾胞上皮細胞の増
殖・分化と maf 転写因子の発現を促進する. 第 46
回日本甲状腺学会、名古屋、2003 年 11 月.
- 18) 宮本友司、武下文彦、中田 登、前田百美、甲斐雅
規、牧野正彦、向井 徹：Fibronectin-attachment
protein 遺伝子破壊株による抗酸菌表層疎水性の検
討. 第 26 回日本分子生物学会年会、神戸、2003 年
12 月.
- 19) 牧野正彦、前田百美、木村博昭、武下文彦、稲垣勝
也：らい菌感染マクロファージの抗原提示能の増強
第 33 回日本免疫学会総会、福岡、2003 年 12 月.
- 20) 福富康夫、牧野正彦：マクロファージ内におけるら
い菌増殖機構. 第 33 回日本免疫学会総会、福岡、2003
年 12 月.
- 21) 奥儀ヤス子、鈴木幸一：らい菌は IL-10 が増強され
た宿主でよく増殖する. 第 33 回日本免疫学会総会、
福岡、2003 年 12 月.
- 22) 赤川清子、金澤祐子、山崎利雄、岸文雄、芳賀伸治：
ヒトマクロファージの結核菌の増殖抑制機構および
それに関連したシグナル伝達機構の解析. 平成 15 年
度日米医学協力結核ハンセン病専門部会議、京都、
2004 年 3 月.
- 23) 稲垣勝也、前田百美、牧野正彦：らい菌由来抗原
MMP-II 分泌型 BCG 株の作製とその免疫学的性状解
析. 第 48 回日本農芸化学会大会、広島、2004 年 3
月.

24. ハンセン病研究センター (ii) 生体防御部

生体防御部長 石井 則久

概 要

ハンセン病はらい菌による慢性感染症で、皮膚と末梢神経が主に侵される疾患である。世界の新規患者数はほぼピークに達し、今後は減少に向かうと考えられる。2002年の世界の新規患者数は約62万人であった。患者数減少に関わらず、ハンセン病の病態解明は今だ研究途上である。

ハンセン病の研究推進には実験動物の開発は重要であり、モデル動物として高血圧ヌードラットを開発し、IL-10やIL-12等の免疫応答に重要なサイトカインの発現解析を行ったところ、らい菌に高感受性ラットではIL-10の産生が認められ、1型サイトカインの産生亢進が病態に関与していることが判明した。

らい菌の多型性のひとつであるTTC繰返し数の多型性を比較し、同一家族内の複数の患者間で異なる遺伝子型のらい菌による感染が存在し、感染様式は単純でないことが考えられ、今後も感染源の同定、感染経路について検討が必要である。

ハンセン病の治療は化学療法が主流である。現在の問題点は治療期間が長期（6ヶ月間、1年間、等）に亘ること、らい反応が起こること、耐性菌が出現すること、などである。今年度は治療期間短縮と耐性菌対策として新たな殺菌力の強い抗菌剤の検討を行った。新規フルオロキノロンMFLXの*in vitro*活性はRFP>MFLX>SPFX>GFLX>LVFX>TFLXの順で*in vivo*でもMFLXはSPFXと同等の活性を示した。

国内でのハンセン病患者の多くは戦後のプロミンとダブソンの単剤治療、あるいはその後リファンピシンなどの治療が行われた。そのような元患者から少数ながら再発や再燃がみられる。これらの患者の薬剤耐性の検査を進めている。OFLX耐性らい菌に対する同じフルオロキノロンのSPFXの抗らい菌活性を検討すると、交差耐性があるものの高濃度で優れた抗らい菌活性を認め、治療薬選択に幅が出ることが示唆された。

現在の日本のハンセン病で解決すべき問題の一つは後遺症である。この後遺症は末梢神経のシュワン細胞へのらい菌の浸潤によることが判明している。らい菌感染シュワン細胞がCCR5発現後根神経節神経細胞にapoptosisを誘導することを確認し、さらにらい菌感染シュワン細胞由来因子についてプロテオーム解析を行っている。

ハンセン病に対するワクチン開発にはいくつかの問題点がある。研究開発費の問題、ワクチン接種によるらい反応の誘発の問題、接種方法（注射か、複数回か、など）、MDTとの費用対効果の問題、等である。そのため、単に

ハンセン病のみでなく多くの抗酸菌や他の細胞内寄生病原体に応用出来るワクチンを開発することも考慮すべきである。今回は、外来遺伝子を強力に発現するベクターの開発に取り組み、抗原遺伝子を直列に連結したmultiple antigen expression systemの有用性が判明した。

厚生行政の一環として日本のハンセン病患者動向を明らかにすることも重要である。ハンセン病の行政、医療などの向上、偏見の解消に向けての基礎資料作成によって日本のハンセン病、しいてはWHOが主導している世界のハンセン病の制圧に貢献できる。日本における新規患者は日本人患者の減少（毎年数人）、外国人患者の減少（毎年約8人）と終焉になっている。今後は療養所外にいる元患者の治療及び後遺症を一般医療で偏見無く実施できる体制を構築する努力が必要で、その手引きの素案を作成した。またJICAのハンセン病制圧計画をサポートするため、ミャンマー連邦における過去のハンセン病政策を検証し、将来の指針作成の立ち上げを行った。

今年度も引き続き、ブルーリ潰瘍の研究を行った。らい菌類似の*M. ulcerans*による皮膚感染症で、WHOも撲滅に乗り出している。ブルーリ潰瘍の研究はハンセン病の病態解明にも大いに役立つものと期待されている。今年度は薬剤感受性の検討が行われ、リファマイシン系のリファジルが有効であることを*in vitro*及び*in vivo*の系で証明した。

病原性のある抗酸菌の分離・同定を迅速に行うための、培養、生化学的性状検査、遺伝子シーケンス等の方法を確立した。

以上、生体防御部は主に生体側の立場からハンセン病及び抗酸菌症制圧のための基礎的及び臨床的研究を遂行している。

研 究 業 績

I. らい菌の動態に関する研究

1. らい菌はIL-10が増強された宿主で良く増殖する

らい菌に高い感受性を示すSHR/NCrj-rnuと抵抗性を示すF344/NJc1-rnuの腹腔マクロファージを培養してサイトカイン産生能について検討したところ、らい菌に高

感受性 SHR/NCrj-*rnu* の常在性およびらい菌感染腹腔マクロファージからは IL-10 を主にした炎症性サイトカインの産生が見られたのに対して、らい菌低感受性の F344/NJc1-*rnu* からは高い TNF α 産生能が見られたが、IL-10 産生能は認めなかった。

〔與儀ヤス子・遠藤真澄・鈴木幸一・藤村響男(北里大)・佐藤直哉(北里大)・小林正徳(ソフトロン)・野間口博子〕

II. 抗ハンセン病薬に関する研究

1. Moxifloxacin, Tosufloxacin の抗らい菌活性

8 位にメトキシ基を導入し光毒性を軽減した新規ニューキノロン Moxifloxacin(MFLX)と 1 位にジフルオロフェニル基を導入し抗菌力を増強した Tosufloxacin(TFLX)の抗らい菌活性を検討した。Buddemeyer 法では RFP>MFLX>SPFX>GFLX>LVFX>TFLX の順で、MFLX に SPFX を凌ぐ強い抗らい菌活性を認めたが、TFLX の抗らい菌活性は LVFX より弱かった。ヌードマウス足蹠法では、MFLX の最小抑制濃度は、10 mg/kg で SPFX に匹敵する強い抗らい菌活性を持つことを認めた。

〔儀同政一〕

2. OFLX 耐性らい菌に対する SPFX の抗らい菌活性

OFLX 耐性らい菌 (Zensho-4 株) に対する SPFX の抗らい菌活性をヌードマウス足蹠法で調べた。SPFX は OFLX 耐性らい菌に対し 20 mg/kg で不完全抑制、40 mg/kg で完全抑制を示し、交差耐性があるものの優れた抗らい菌活性を認めた。現在、強い抗らい菌活性を持つ新規ニューキノロン Moxifloxacin(MFLX), SPFX, GFLX, STFX の OFLX 耐性らい菌 (Zensho-4 株) に対する抗らい菌活性を Buddemeyer 法で検討している。

〔儀同政一、松岡正典〕

III. ハンセン病の神経障害に関する研究

1. ハンセン病による末梢神経炎の発症および制御機構の解析

らい菌感染による末梢神経障害機構を解明する目的で、感染シュワン細胞由来生理活性物質の発現調節機構を解析の過程で、ラット Schwann 細胞株が β -chemokine MIP-1 α をらい菌感染時特異的に発現することを明らかにした。そして感染 Schwann 細胞が chemokine receptor CCR5 発現後根神経節神経細胞に apoptosis を誘導することを確認した。MIP-1 α 以外の神経障害に係わる因子を探索する目的で、らい菌感染 Schwann 細胞由来因子についてプロテオーム解析を行った。2D-DIGE で検出した約 2600 の spot のうち、らい菌感染により 420spot の減少、181spot の増加を認め、各々について MS 分析を含む詳細解析に移行した。

〔遠藤真澄、中田 登、山下康子、松岡正典〕

IV. ハンセン病の免疫応答に関する研究

1. DNA ワクチン用ベクターの開発

外来遺伝子を強力に発現するベクターの開発に取り組んだ。抗原遺伝子を直列に連結した multiple antigen expression system の有用性が示された。また、transgenic mouse を利用した抗原提示細胞の genetic tagging を Emory 大学の研究者らと共同で行い、成果を挙げた。現在は過給式転写増幅システムの作成、評価を行っている。

〔佐々木 津、石井則久、武下文彦(横浜市大)、Joshya Jacob(Emory Univ.)、Sanjay Garg(CDC)〕

V. ハンセン病の疫学に関する研究

1. 遺伝子型別に基づくハンセン病の感染源解析

インドネシア北マルク地方及び北スラベシ地域をフィールドとして、患者及び同居家族の鼻粘膜上に分布するらい菌の TTC 繰返し数の多型性を比較した。患者と同居する家族には異なる遺伝子型のらい菌が存在していた。また、同一家族内の複数の患者間で異なる遺伝子型のらい菌による感染が存在し、従来言われているような患者との住居内濃厚接触が唯一の感染様式ではなく、患者以外の感染源の存在が示された。

〔松岡正典、張良芬〕

2. ハンセン病発症状況の把握に関する研究

日本におけるハンセン病の新患数の把握と、統計学的解析を行った。新患について学会発表や論文等から検索を行い解析した。ハンセン病の新患は、最近 5 年間 (1999-2003 年) の平均では年間約 14.0 名で、日本人は 5.4 名で、その 66.7% は 60 歳以上であり、沖縄県出身者は 51.9% を占めていた。一方在日外国人は 8.6 名で、ブラジル人は 46.5% を占め、男性の若者が多かった。なお、平成 15 年 (2003 年) については、日本人 1 名 (沖縄県出身者)、在日外国人 7 名 (うちブラジル人 3 名) であった。それぞれの平均年齢は 72 歳、36.6 歳 (39.3 歳) であった。

〔石井則久〕

3. 開発途上国におけるハンセン病対策の適正技術の開発に関する文献的研究

ハンセン病対策の将来的戦略および開発途上国一般に必要なとされるハンセン病対策への適性技術の未来像を文献的に検討した。ミャンマー連邦は 1952 年から WHO のハンセン病制圧プログラムを順次遂行し、ハンセン病発生率の劇的低下を成功させると共に、ハンセン病医療プログラムの一般医療政策への統合が順調に進行していた。これらは多剤併用療法 (MDT) の成功とミャンマー連邦政府と WHO の連携に依ると考察された。また国民へのハンセン病の啓発も進行していた。さらに JICA の協

力がハンセン病対策に貢献できるかが問われている。
[石井則久、森 修一（福島医大）]

4. 一般医療機関でのハンセン病医療の現状に関する研究

一般医療機関（医師会員、大学診療科）におけるハンセン病回復者及び患者のハンセン病及びその後遺症、一般医療等の実態把握のためアンケート調査を実施した。開業医はハンセン病及び回復者の診療経験はほとんど無く、ハンセン病に対する知識も不十分なので、生涯教育としてハンセン病を繰り返し取り上げていき、知識の向上を図る必要があった。一方、大学病院では各診療科とも診療の対応は可能であるが、ハンセン病に関する知識が不十分であるため、ハンセン病に関する情報の入手が必要であった。

[石井則久]

5. 一般医療機関での医療提供体制に関する研究

ハンセン病回復者が安心して一般医療機関を受診できるように「一般医療機関（病院）受診の手引き」、また医療関係者が他の患者と同じように回復者を診療できるように「医療従事者向け手引き」を作成した。さらにハンセン病に造詣の深い医師を「ハンセン病診療協力ネットワーク」として一覧にした。これらの「手引き」を早期に作成完成し、使用・配布することで、回復者が他の患者と同様の医療を享受出来ることが可能になる。

[石井則久、中嶋 弘（横浜市アレルギーセンター）、尾崎元昭（長島愛生園）、後藤正道（鹿児島大）、熊野公子（兵庫県立成人病）]

VI. 抗酸菌感染症に関する研究

1. *Mycobacterium ulcerans* 感染症に関する研究

抗酸菌感染症のひとつであるブルリー潰瘍の有効な化学療法は確立されていない。我々は、ブルリー潰瘍に有効な治療薬・ワクチン等の開発を目的として、*M. ulcerans* のマウス実験感染モデル系を確立した。これまでに同モデル系を用いて、Rifalazil の有効性を見出し、現在他の薬剤との併用効果、間欠的投与効果等について検討中である。

[中永和枝、石井則久、齋藤肇（広島県環境保健協会）]

2. 病原性抗酸菌の分離・同定に関する研究

病巣から培養不能の、あるいは培養されても同定不能の抗酸菌の検体について、1.各種培養条件による培養、2.培養菌の生化学的性状、3.16SrRNA 遺伝子シーケンス等によりこれら病原性抗酸菌の同定を試みた。これまでに、日本では例数の少ない *M.lentiflavum*, *M.intermedium* および *M.haemophilum* の分離・同定に成功した。今後は治療法の改善を目的として、さらに薬剤感受性の検討もあわせて行う予定である。

[中永和枝、石井則久、齋藤肇（広島県環境保健協会）]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Takeda A., Umeda A., Matsuoka M., Yoshida S., Nakamura M. and Amako K.: Comparative studies of the cell structures of *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis* using the electron microscopy freeze-substitution technique. *Microbiol. Immunol.* 47: 265-270, 2003.

2) Amako K., Takeda A., Umeda A., Matsuoka M., Yoshida S. and Nakamura M.: Degradation process of *Mycobacterium leprae* cells in infected tissue examined by the freeze-substitution method in electron microscopy. *Microbiol. Immunol.* 47: 387-394, 2003.

3) Matsuoka M., Kashiwabara Y., Zhang L., Gotoh M. and Kitajima S.: A second case of multidrug resistant *Mycobacterium leprae* isolated from a Japanese patient with relapsed lepromatous leprosy. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 71: 240-243, 2003.

4) Sasaki S., Takeshita F., Xin K-Q., Ishii N. and Okuda K: Adjuvant formulation and delivery systems for DNA vaccines. *Methods* 31: 243-254, 2003.

5) Maeda Y., Gidoh M., Ishii N., Mukai C. and Makino M: Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens. *Cell. Immunol.* 222: 69-77, 2003.

6) Ishii N: Recent advances in the treatment of leprosy. *Dermatol Online J* 9, 2003.

7) Garg S., Oran A., Wajchman J., Sasaki S., Kapp J. and Jacob J.: Genetic tagging shows increased frequency and longevity of antigen-presenting, skin-derived dendritic cells *in vivo*. *Nature Immunol.* 4:907-912. 2003.

2. 和文発表

1) 石井則久：ミャンマーで考えたこと。日本ハンセン病学会雑誌 72: 45-47, 2003.

2) 石井則久、向井秀樹、菅原 信、原 紀道、岡村理栄子、大路昌孝、山本 泉：東京都皮膚科医会及び

- 神奈川県皮膚科医会の疥癬に関するアンケート調査結果. 日皮会誌 113: 281-288, 2003.
- 3) 石井則久: Hansen 病. 皮膚疾患最新の治療 2003-2004 (新村真人、瀧川雅浩編集), p137, 南江堂(東京), 2003.
- 4) 石井則久: ハンセン病. 新世紀の感染症学, p531-535, 日本臨床社(大阪), 2003.
- 5) 石井則久、佐々木 津: 皮膚結核(症). 最新皮膚科学大系第14巻(玉置邦彦総編集), p130-142, 中山書店(東京), 2003.
- 6) 石井則久、佐々木 津: 皮膚知覚異常. 最新皮膚科学大系第18巻(玉置邦彦総編集), p298-300, 中山書店
- 7) 石井則久: 抗抗酸菌薬. 最新皮膚科学大系第2巻(玉置邦彦総編集), p100-102, 中山書店(東京), 2003.
- 8) 石井則久: 皮膚結核による潰瘍を治す. 皮膚科診療プラクティス 15 難治性皮膚潰瘍を治すスキル(橋本公二、宮地良樹、瀧川雅浩編集), p225-229, 文光堂(東京), 2003.
- 9) 石井則久、小茂田昌代: 疥癬に対するイベルメクチンの効果. 臨床皮膚科 57(suppl): 135-138, 2003.
- 10) 石井則久: 抗酸菌感染症. p1-12, 日本皮膚科学会研修委員会(東京), 2003.
- 11) 石井則久: 結核、梅毒、ハンセン病. 皮膚科専門医試験問題解説集(小野友道、溝口昌子編集), p174-179, 金原出版(東京), 2003.
- 12) 石井則久: 皮膚感染症の検査と診断. 今日の治療 11: 873-875, 2003.
- 13) 石井則久、佐々木 津: 抗結核薬の使い方. MB デルマ 76: 61-66, 2003.
- 14) 前田 学、山崎隆治、荒木麻里、遠渡 舞、佐々木 津、石井則久: 環状紅斑を主訴としたハンセン病(B群)のブラジル人女性例. 西日本皮膚科 65: 351-354, 2003.
- 15) 中山聡子、上坂義和、國本雅也、三方崇嗣、清水 潤、石井則久: 急性発症の疼痛をともなった上肢多発性単神経炎型ハンセン病ニューロパチーの1例. 臨床神経学 43: 265-269, 2003.
- 16) 石井則久: 抗酸菌感染症(皮膚結核とハンセン病)の診断と治療. p1-10, 日本皮膚科学会研修委員会(東京), 2003.
- 17) 石井則久、佐々木 津: 熱帯医学の動向と輸入感染症. MB デルマ 78: 17-23, 2003.
- 18) 市川栄子、大塚藤男、堀井のり子、田中未知、石井則久、杉田泰之、小関正倫: ハンセン病患者の2例. 日本ハンセン病学会誌 72: 271-273, 2003.
- 19) 杉田泰之、吉仲 真、武川るみ、大沼すみ、石井則久、中嶋 弘: 多菌型ハンセン病の1例. 日本ハンセン病学会誌 72: 279-281, 2003.
- 20) 鈴木陽子、瀧川雅浩、石井則久: 多菌型ハンセン病として治療したが最終診断未定の症例. 日本ハンセン病学会誌 72: 287-290, 2003.
- 21) 雄山瑞栄、清島真理子、石井則久: 少菌型 Hansen 病. 皮膚病診療 25: 1223-1226, 2003.
- 22) 石井則久: ハンセン病. 医学のあゆみ 207: 1020-1021, 2003.
- 23) 山田知加、瀧川雅浩、戸倉新樹、三田 均、小関正倫、石井則久: インドネシア人に発症した少菌型ハンセン病. 皮膚臨床 45: 1276-1277, 2003.
- 24) 石井則久: ハンセン病. 日本皮膚科白書(日本皮膚科学会編集), 264-267, 金原出版(東京), 2003.
- 25) 石井則久: 「SARS」最新情報. 神奈川救急医療感染症懇話会誌 1: 30-38, 2003.
- 26) 石井則久: ハンセン病. ヴィジュアル ダーマトロジー 2: 1060-1061, 2003.

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Suzuki K., Yajima M., Etuaful S., Mwanatambwe M., Asiedu K., Yamada N., Ishii N. and Asano G: In the absence of AFB(*Mycobacterium ulcerans*), immunoreactivity of phenolic glycolipid-1(PGL-1) like material in BU typical histopathological specimens. 6th WHO Advisory Group Meeting on Buruli Ulcer, Geneva, Switzerland, March 2003.
- 2) Sato N., Fujimura T., Masuzawa M., Katsuoka K., Kanou M., Yogi Y. and Matsuoka M.: Recombinant expression and functional analysis of the protein encoded by mce1A region of *Mycobacterium leprae*. 64th Congress of International Investigative Dermatology. Florida, USA, May 2003.
- 3) Saito H., Nakanaga K., Goto M. and Ishii N.: Therapeutic efficacy of Rifalazil (KRM-1648) against Experimental Buruli ulcer induced in mice. 103rd General Meeting, American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA, May 2003.

4)Matsuoka M., Zhang L. and Budiawan T.: Analysis of leprosy transmission based on genotyping. 38th US-Japan Tuberculosis-Leprosy Research Conference. Newark, USA, July 2003.

5)Goto M., Saito H., Nakanaga K., Ishii N. and Yonezawa S.: Pathological findings of mouse inoculated with *Mycobacterium ulcerans*. 38th US-Japan Tuberculosis-Leprosy Research Conference. Newark, USA, July 2003.

6)Sasaki S, and Takeshita F.: Enhancement of DNA vaccine immunogenicity by dual antigen expression system. Awajishima International Forum on Infection and Immunity, Hyogo Japan, August 2003.

7)Arakaki H., Uezato H., Hosokawa A., Matsuoka M. and Nonakai S.: Why the leprosy recurred after 34 years of DDS therapy. 13th Japan-Korea Conference of Dermatology, Dejeon, Korea, October 2003.

2, 国内学会

1)山中克二、戸倉新樹、石井則久：右頸部の紅斑。第3回浜名湖皮膚病理研究会、浜松、2003年1月。

2)中居賢司、大西誉光、渡辺晋一、石井則久：在日外国人にみられたハンセン病の1例。第66回日本皮膚科学会東京支部学術大会総会、東京、2003年2月。

3)齋藤肇、中永和枝、石井則久：慢性皮膚病巣より分離された *Mycobacterium haemophilum* - 主としてその細菌学について。第53回日本結核病学会中国四国支部学会、岡山、2003年2月。

4)齋藤肇、中永和枝、石井則久：実験的 Buruli 潰瘍に対する Rifalazil (KRM-1648) の効果。第53回日本結核病学会中国四国支部学会、岡山、2003年2月。

5)後藤正道、中永和枝、石井則久、北島信一、齋藤肇：実験的マウス Buruli 潰瘍 (*M. ulcerans* 感染症) の病理学的特徴。日米医学協力研究会結核・ハンセン病専門部会国内会議、京都、2003年3月。

6)齋藤肇、石井則久、中永和枝：*Mycobacterium haemophilum* 皮膚感染症の一例 - 主としてその細菌学的方面について。第77回日本感染症学会総会、福岡、2003年4月。

7)齋藤肇、石井則久、中永和枝：*Mycobacterium haemophilum* 皮膚感染症の一例 - 主としてその細菌学的方面について。第78回日本結核病学会総会、倉敷、2003年4月。

8)中永和枝、石井則久、齋藤肇：Rifalazil (KRM-1648) の実験的マウス Buruli 潰瘍に対する治療効果。第78回日本結核病学会総会、倉敷、2003年4月。

9)中田 登、甲斐雅規、鈴木幸一、前田伸司、松岡正典、牧野正彦：大腸菌-抗酸菌シャトルコスミドを用いたらい菌 Thai53 株整列クローンライブラリの作製と解析。第76回日本細菌学会総会、熊本、2003年4月。

10)松岡正典、柏原嘉子、尾崎元昭：国内再燃、再発および国外新患における薬剤耐性らい菌の伝播。第102回日本皮膚科学会総会、浦安、2003年5月。

11)和泉眞蔵、佐伯圭介、松岡正典：ハンセン病濃厚流行地におけるらい菌感染源に関する疫学的考察。第102回日本皮膚科学会総会、浦安、2003年5月。

12)松本和彦、酒井咲子、飯島みわ子、齋田俊明、石井則久：日系ブラジル人に発症した lepromatous leprosy の1例。第102回日本皮膚科学会総会、浦安、2003年5月。

13)堤 祐子、川上民裕、上西香子、山前恵美子、保坂恵理、芳賀恒夫、木村聡子、相馬良直、溝口昌子、石井則久：サリドマイドを併用したハンセン病の1例。第102回日本皮膚科学会総会、浦安、2003年5月。

14)福富康夫、松岡正典：ハンセン病におけるマクロファージのサイトカイン産生機構。第102回日本皮膚科学会総会、浦安、2003年5月。

15)佐伯圭介、和泉眞蔵、長尾栄治、松岡正典、テキブディアワン：生活環境中に存在するらい菌の疫学的意義。第102回日本皮膚科学会総会、浦安、2003年5月。

16)加藤正俊、富高晶子、松永佳世子、早川 敏、石井則久：インドネシア人に発症した多菌型 Hansen 病の1例。第224回日本皮膚科学会東海地方会、名古屋、2003年6月。

17)柳田美子、與儀ヤス子。インドネシア(スラヴェシ島)におけるハンセン病患者と家族の栄養状態。第12回日本健康教育学会、沖縄、2003年6月。

18)太田桂子、新倉冬子、小金平容子、久保仁美、羽生田久美子、齋田俊明、石井則久：ハンセン病の1例。日本皮膚科学会第152回信州地方会、松本、2003年6月。

19)石井則久、小原安喜子、熊野公子、佐々木 津、杉田泰之、並里まさ子、野上玲子、細川 篤、牧野正直：2002年のハンセン病新患発生状況。第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月。

20)加藤知子、柳田敦美、松本義也、杉田泰之、石井則久、富田 靖：日本で発症した在日外国人の多菌型ハンセン病の一例。第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月。

ハンセン病研究センター

- 21) 市川栄子、大塚藤男、堀井のり子、田中未知、石井則久、杉田泰之、小関正倫：ハンセン病の2例。第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月。
- 22) 杉田泰之、吉仲 真、石井則久、中嶋 弘：高齢発症の多菌型ハンセン病の1例。第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月。
- 23) 鈴木陽子、瀧川雅浩、石井則久：多菌型ハンセン病と診断したが誤診とされた症例。第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月。
- 24) 吉仲 真、小関正倫、矢島幹久、成田 稔、石井則久：手関節神経病性関節症を生じたLL型ハンセン病の1例。第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月。
- 25) 天児和暢、高出明美、梅田昭子、吉田真一：急速凍結置換法により明らかになったらい菌の変性過程。第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月。
- 26) 松岡正典、張良芬、佐伯圭介、和泉真蔵、Teky Budiawan：らい菌の遺伝子多型と感染経路解明への応用。第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月。
- 27) 清水利明、富岡治明、佐野千晶、松岡正典：*Mycobacterium leprae* および *M. avium* complex 感染マクロファージにおけるサイトカイン mRNA 発現プロファイルの検討。第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月。
- 28) 山崎利雄、松岡正典、儀同政一：らい菌のATP測定による薬剤感受性試験法の検討。第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月。
- 29) 儀同政一：WQ-3345, WQ-3402, HMR-3647 の抗らい菌活性。第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003年7月。
- 30) 與儀ヤス子、佐藤直哉、藤村響男、S.V. Muchtar, A.S. Junaedai, F.S. Ilyas, H.R. Abdullah and M.D. Amiruddin. らい菌感染組織におけるCD68陽性細胞の動態。第76回日本ハンセン病学会総会、兵庫、2003年7月。
- 31) 石井則久：免疫機能低下患者における性感染症の混合感染。パネルディスカッション「性器ヘルペスを中心とした性感染症の混合感染」。第10回ヘルペス感染症フォーラム、東京、2003年8月。
- 32) 石井則久：抗酸菌感染症。日本皮膚科学会前実績研修講習会、東京、2003年8月。
- 33) 笹木慶子、下江敬生、石井則久：1型反応を生じたBL型ハンセン病の1例。第55回日本皮膚科学会西部支部学術大会、松山、2003年10月。
- 34) 與儀ヤス子。ハンセン病患者皮膚組織におけるスカベンジャー リセプターの発現とらい菌の局在。第44回日本組織細胞化学会・学術集会、東京、2003年10月。
- 35) 石井則久：抗酸菌感染症（皮膚結核とハンセン病）の診断と治療。日本皮膚科学会前実績研修講習会、大阪、2003年11月。
- 36) 與儀ヤス子、鈴木幸一。らい菌はIL-10が増強された宿主で良く増殖する。第33回日本免疫学会総会・学術集会、福岡、2003年12月。
- 37) 藤村響男、佐藤直哉、與儀ヤス子、狩野真帆、増澤幹男、勝岡憲生。mce1A蛋白によるらい菌の上皮細胞への侵入とアポトーシスの誘導。第33回日本免疫学会・学術集会、福岡、2003年12月。