

## 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及び希少非結核性抗酸菌に関する同定試験（依頼検査）を行っている。本年度は、研究部全体を通じてワクチン開発研究において大きな進展があった。ハンセン病及び結核のワクチンとして弱毒化牛型結核菌（*Mycobacterium bovis* BCG (BCG)）が使われてきたが、BCG のハンセン病に対する有効性は 26%と報告され、結核に対しては小児の粟粒結核・結核性髄膜炎の発症予防には有効であるが、成人及び高齢者の肺結核は予防できないと考えられている。当部においては、BCG に代わるハンセン病用リコンビナント BCG の開発を組み換え遺伝子技法を用いて行ってきた。具体的には BCG の持つ *UreC* 遺伝子をノックアウトしウレアーゼ酵素活性を除去し、BCG 菌体のライソゾームへ移行を促進させることと、免疫原性に富んだ抗原をファゴゾームあるいはファゴライソゾームで分泌させるため HSP70-MMP-II 連結遺伝子を導入することである。本外来遺伝子は、プラスミド型として BCG の細胞質へ導入するため大量の遺伝子コピーが産生され、導入した遺伝子の効果が強く発現されるものである。しかし、本年度の研究において、プラスミド型遺伝子導入した外来遺伝子は非常に高い確率で早期に脱落することが明らかにされた。この現象は、開発した BCG の安定供給に大きな妨げとなる。そこで、外来遺伝子を BCG の DNA の中へ組み込み、さらに導入遺伝子の高発現を誘導する技法の開発に着手し、その技術をほぼ確立した。BCG の DNA へ外来遺伝子を導入しても通常 1 コピーしか導入できない。そのため、外来遺伝子の発現を増強させる技術の開発が必要となるが、向井室長らの努力により、バクテリオファージ中に非常に強いプロモーター活性を有する遺伝子が同定された。さらに、この技術を応用することにより高発現型インテグレーション型リコンビナント BCG の作製が可能となった。これにより、開発された遺伝子組み換えリコンビナ

ント BCG の安定供給が可能となるものと考えられる。また、結核に対する新規リコンビナント BCG の作製も着手され、一定の効果が挙げられた。この BCG の作用は未だ不十分であるが、今後の改良によりより良き BCG ワクチンの開発が可能となるものと考えられる。また、この結核用リコンビナント BCG は結核用であるにもかかわらず、マウス生体内でらい菌の増殖を抑制することも明らかにされた。現在ハンセン病の新規発症者は 20 万人程度であることから、ハンセン病に特化したワクチンの開発を疑問視する研究者が多々存在することは事実であるが、結核とハンセン病の両者を予防し得る結核・ハンセン病共通ワクチンが開発されれば実用化への道が開けるものと期待される。本年度の成果は、この点において一歩前進したと考えることが可能と思われる。

また、ハンセン病の研究において、抗原提示細胞が放出するエキゾームに関する研究が開始された。研究は開始されたばかりであるが、すでに多くの興味深い知見が得られており、今後少菌型ハンセン病の新しい診断法の開発及び多菌型ハンセン病に対する新しい免疫療法の開発に大きな期待が寄せられている。

精製ツベルクリンの国家検定は現在細菌第二部で行われているが、同部の負担を軽減するため本国家検定の感染制御部への移行が検討されている。そのため、森室長が技術移転のためのトレーニングを開始した。

最後に人事であるが、4 月 1 日付で松岡正典が再任用職員として採用され、国立療養所多磨全生園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。これまでに、らい菌感染シュワン細胞は T 細

胞を活性化しうる可能性を見出してきたが、今回、さらに、シュワン細胞内でのらい菌の局在をリソソームのマーカーである LysoTracker Red を用いて調べた結果、約半数の菌はリソソームに局在していることが明らかとなった。

[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。今回、ハンセン病の多剤併用療法に用いられる薬剤がらい菌感染マクロファージの細胞内脂質蓄積や分解機構に与える影響に関して検討を行った。その結果、クロファジミンが脂質蓄積に必要な ADRP 発現を抑制し、脂質分解に寄与する HSL 発現を誘導することを明らかにした。他の2剤であるリファンピシンとダブソンにはそのような効果は無かった。[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、樹状細胞を成熟化し、自己 T 細胞を活性化することを明らかにしてきた。今回、らい菌感染樹状細胞を LipoK で刺激した際に放出されるエキソソームの解析を行った。エキソソームをウエスタンブロットで解析をするとらい菌由来の蛋白が検出された。抗らい菌膜蛋白抗体を用いると約 28-35kD の蛋白（候補として MMP-I, groEL, eftA, mtrA, prcA）が関与していると考えられた。そこで、N 末端解析すると未知な蛋白（Exop-1）が検出された。得られたエキソソームは Exop-1 を含み T 細胞を活性化することから、Exop-1 は抗原性に関与す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]

### 2. ハンセン病のワクチン開発に関する研究

四種類のらい菌由来合成ペプチドから2種類の混合ペプチドを作製し、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回ペプチド抗原を皮下接種したのち、5000 個のらい菌を footpad に接種した。らい菌の増殖を7ヶ月後に調べた結果、Antigen 85A 反応性 T 細胞はらい菌増殖制御に関わる可能性が示唆された。

[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。幼若および妊娠およびその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。今年度、若年サル群2頭に散発的に、妊娠期接種サル1頭に、2期連続して鼻腔洗浄液よりらい菌 DNA 検出される個体が確認された。免疫抑制時の菌接種が感染効率を上昇させることが示唆された。

[向井 徹、松岡正典、片貝裕子 (予防衛生協会)、牧野正彦]

### 4. 効率的かつ安定した抗原発現を行う組換え BCG の開発

*M.bovis* 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、抗酸菌ファージプロモーター領域を用い、らい菌抗原もしくは BCG 抗原の各種融合蛋白分泌する遺伝子を BCG *Urease C* 遺伝子部位と置換し、さらに、遺伝子操作に用いた薬剤耐性遺伝子の除去を行い、安全性が高く安定した抗原の高発現各種組換え BCG の調整を行った。実用的な組換え BCG 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出来ること、TAF7 に対する miRNA を遺伝子導入し、TAF7 をノックダウンした未感作 CD4 T 細胞では TAF7 の発現量と Th1 細胞への分化の程度に正の相関があることが示され、TAF7 が Th1 細胞への分化に必須の因子であることが示された。

[田村敏生、下袴田陽子、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、Th1 細胞、Th17 細胞とは異なるヘルパー T 細胞亜集団の可能性のある IL-17F 産生細胞の分化を誘導することで樹状細胞の活性化を誘導すること、この活性化した樹状細胞が機能的細胞傷害性 T 細胞の分化・活性化を強力に増強で

きること、Peptide-25 特異的 IL-17F 産生細胞は感染局所に留まる性質を持ったメモリーT細胞に分化する可能性が示された。

[田村敏生、下袴田陽子、牧野正彦]

### (3)結核管戦線防御における濾胞ヘルパーT細胞の役割

IL-5 や IL-6 は結核菌で感作された CD4 陽性 T 細胞を結核菌体成分で再刺激した際の培養上清中に存在する抗体産生誘導活性を有するサイトカインとして同定された。このことは、結核菌は細胞性免疫を調節する Th1 細胞と液性免疫を調節する Th2 細胞の両重集団の分化を誘導する活性を有していることを示唆している。近年、B 細胞が産生する抗体のクラススイッチを調節する細胞として濾胞ヘルパーT細胞 (TFH) の存在が明らかになっている。そこで、抗酸菌感染時の TFH 細胞の活性化動態を明らかにすることを目的に解析を開始した。

[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

これまでの組換え 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。さらにその効果を高めるために、抗原性を高めるとされる配列を HSP70 および MMP-II 融合蛋白質に挿入した組換え BCG を作製し解析を開始した。

[塚本裕美子、牧野正彦]

## 7. 噴霧感染装置を使用したマウス生体内でのワクチン効果の評価

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。マウス生体内で種々のワクチンが結核菌増殖を抑制するワクチン効果について、その系を確立した。

[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。らい菌膜由来蛋白質 MMP-I は MMP-II よりも多量にらい

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、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を評価した。

[塚本裕美子、前田百美、牧野正彦]

### 2. 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]

### 4. 蛍光色素を利用した抗酸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

還元反応を受けると蛍光を発する分子である CTC は、らい菌や非結核性抗酸菌、さらには結核菌といった抗酸菌において、呼吸活性を有する生菌を検出できる有用な試薬であることが判明した。*In vitro* にてマウス腹腔由来マクロファージやヒト末梢血単球由来マクロファージにこれら抗酸菌を感染させ CTC 添加後共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、IFN $\gamma$  で刺激したマクロファージ中の抗酸菌の蛍光強度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、前田百美、星野仁彦、牧野正彦]

### 5. 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]

#### 6. 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]

### 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 Kyoto-2 株ゲノムに散在する反復配列の解析

らい菌ゲノムには大きく分けて4種類の反復配列が計60から70箇所散在しており、これらは約0.5kbから2.5kbと比較的大きいため、Illumina等の次世代型DNAシーケンサーではコピー同士の区別ができない。そこでこれら反復配列の外側にDNAプライマーを設計し、PCR増幅と旧来の方法によってコピー別に配列を決定した結果、異なるコピーで同じ位置に保存された一塩基置換が見られたのに加え、7塩基の脱落が一致するものが見られたことから、らい菌ゲノム内で相同組換えによる変化が起こっていることが強く示唆された。

[中田登、甲斐雅規、牧野正彦]

#### 2. らい菌代謝系遺伝子の解析

らい菌は特有の代謝系を保持していることが知られているが、多くは未解明である。本研究では遺伝子機能の側面から代謝系を解明することを目指し、人工培養できないため変異株を得ることが出来ないらい菌に代わり、代謝系への関与が予想される遺伝子群のホモログ変異株を *M. smegmatis* において作製した。これらのメタボローム解析の結果、一部の変異株において特定の代謝産物の動態が野生株と異なることが判明した。このことは、*M. smegmatis* での変異株の作製・解析がらい菌の代謝系を解明する上で重要な手法の一つとなり得ることを示すものであった。

[宮本友司、向井 徹、牧野正彦]

#### 3. らい菌日本株ゲノムの解析

日本の分離らい菌株である Kyoto-2 の全ゲノムシーケンスを決定し、らい菌 TN 株、Br4923 株との相互比較を行ない、Kyoto-2 株で特徴的である箇所を抽出した。その中で、全ゲノムで唯一1個の ORF に6カ所もの SNPs が存在するものに注目した。東南アジア各国由来のらい菌 DNA でこの SNPs を調べた結果、日本の沖縄以南で分離された株はすべて TN 株と同じパターンであったのに対し、日本の本州及び韓国で分離された株はすべて Kyoto-2 株と同じパターンを示した。この地理的分布はすでに報告のある *rpoT* 遺伝子内に存在する6塩基リピートの数が3コピーか4コピーかの違いの分布とほぼ同一であることが判明した。これら Kyoto-2 のパターンを示すらい菌株を Northeast Asian(NA) strain と称し、さらに解析を行っている。

[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. らい菌のフルオロキノロン耐性変異に関する研究

らい菌 *gyrBA* 遺伝子の変異とフルオロキノロン耐性を解析するために、*M. smegmatis* と *M. bovis* BCG の *gyrBA* 遺伝子をらい菌のものと交換する実験をそれぞれ行ったところ、*M. bovis* BCG のみがらい菌 *gyrBA* 遺伝子で増殖可能であることがわかった。そこで、*M. bovis* BCG を用いた実験系を使って、らい菌臨床分離株から検出された *gyrBA* 遺伝子変異について、フルオロキノロン耐性との関係を詳細に解析している。

[中田登、甲斐雅規、牧野正彦]

#### 2. 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、HP-rPCR 法を確立した。本法は、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 位の変異をリアルタイム PCR 法をベースに特殊なヘアピン構造の Forward プライマーでの増幅から変異の有無を知る方法である。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、その有効性が示された。さらに、より迅速で簡便にするため、試薬をプレートにコーティングすることを試み成功した。

[甲斐雅規、中田 登、松原久美子、牧野正彦]

## VI. 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に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。*mmaA4* 遺伝子破壊 BCG 菌コンノート株のらい菌類似ミコール酸から成るトレハロースダイマイコレートがコードファクターと称されることから現在コード形成と破壊株の TDM の各種活性を調べている。

[甲斐雅規、宮本友司、向井 徹、中田 登、牧野正彦]

## VII. 抗酸菌と宿主自然免疫の相互作用に関する研究

### 1. 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)* 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)* であることが明らかとなった。TDM は多くの抗酸菌が発現しているため他の抗酸菌免疫にも関連する可能性がある。*mincle* などの 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)、榊原ゆみ (東京医科歯科大学)、山崎晶 (九州大学生体防御医学研究所)]

### 2. ハンセン病における肉芽腫形成

ヒト単球由来のマクロファージを用いて、*in vitro* で肉芽腫形成を試みた。らい菌感染マクロファージのみでは見られない細胞集積 (または多核の巨細胞) が、T 細胞や PBMC 等が存在することで観察することができた。らい菌は肉芽腫内で生存可能であることが判明した。

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

## VIII. 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) 36 症例 (2012 年 12 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、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]

## IX. 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。また、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、ハンセン病医学の医学史的研究、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検証している。

[森 修一、石井則久]

### 2. 遺跡から発掘されたハンセン病疑い人骨からのらい菌 DNA の証明

中世から江戸後期にかけて主に東日本で行われた特殊な埋葬法で、頭に鉄鍋や挿り鉢を被せた鍋被り葬は、ハンセン病や梅毒などで死亡した場合に行われたのではないかと考えられている。今回、鍋被り葬人骨 3 例について許可を得て骨組織をサンプリングし、PCR 法によりらい菌 DNA の検出を試みた。その結果、古病理学的に骨にハンセン病に特徴的な所見を有した 2 例から、らい菌 DNA を検出し、鍋被り葬ではあるが骨所見を欠く 1 例からは検出されなかった。したがって、鍋被り葬の一部は確かにハンセン病患者に対して行われたものであることが分子人類学的に明らかになった。

[鈴木幸一]

## X. らい菌と *M. lepromatosis* との相違に関する研究

### 1. ハンセン病研究センターにおいて確立されたらい菌株の *Mycobacterium lepromatosis* との相違

現在、ハンセン病研究センターでは 27 株の *M. leprae* (らい菌) を継代・維持している。このうち 16 株が *rpoT* 遺伝子中に 6 塩基直列繰り返し配列を 4 コピー有する。

近年、Lucio 現象の原因菌として *Mycobacterium lepromatosis* が提唱され、*M.lepromatosis* も同様の配列を有することが報告された為、当センターにおいて保有する *M.leprae* 菌株について *M.lepromatosis* との異同を確認する必要が生じた。*rpoT* 遺伝子中のそれぞれに特異的塩基配列及び 16srRNA の配列を指標に検討した結果、16 株全てと 6 塩基繰り返し配列を 3 コピー有する 11 株いずれもが *M.leprae* 特異的配列を有し、*M.lepromatosis* ではないことが示された。

[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

ベトナム国とミャンマー国において実施している国際協力研究では、ハンセン病の早期診断法に結核で確立されている免疫学的な診断法である IGRA(interferon- $\gamma$  release assay)法の検討を行っている。さらにゲノム解析から得られた知見に基づく Genotyping を実施するための研究打ち合わせを始めた。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）を継続して行うとともに新たに担当国となったモザンビークとの協力関係の構築を開始した。2011 年のサーベイ結果をベニン共和国で行われた WHO によるワークショップにて報告した。

[甲斐雅規、福富康夫、向井 徹、前田百美、宮本友司、松岡正典、牧野正彦]

## 発表業績一覧

### I. 誌上発表

#### 1. 欧文発表

- 1) Critical role of AIM2 in *Mycobacterium tuberculosis* infection. Int. Immunol., 24: 637-644, 2012. Saiga H., Kitada S., Shimada Y., Kamiyama N., Okuyama M., Makino M., Yamamoto M., and Takeda K.
- 2) Present situation of leprosy in Japan, 2006-2010: Analysis of drug resistance in new registered and relapsed cases by molecular biological methods. J. Dermatol. Sci., 67: 192-194, 2012. Mori S., Yotsu R. R., Suzuki K., Makino M., and Ishii N.
- 3) *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, 2012. Nakanaga K., Hoshino Y., Wakabayashi M., Fujimoto N., Tortoli E., Makino M., Tanaka T., and Ishii N.
- 4) *Mycobacterium pseudoshottsii* isolated from 24 farmed fishes in western Japan. J. Vet. Med. Sci., 74: 275-278, 2012. Nakanaga K., Hoshino Y., Hattori Y., Yamamoto A., Wada S., Hatai K., Makino M., and Ishii N.
- 5) Mutation analysis of mycobacterial *rpoB* genes and rifampicin resistance using recombinant *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob. Agents Chemother., 56: 2008-2013, 2012. Nakata N., Kai M., and Makino M.
- 6) Essential role of hormone-sensitive lipase (HSL) in the maintenance of lipid storage in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. Microb. Pathog., 52: 285-291. 2012. Tanigawa K., Yan D., Kawashima A., Akama T., Yoshihara A., Ishido Y., Makino M., Ishii N., and Suzuki K.
- 7) Amino acid substitutions at position 95 in GyrA can add fluoroquinolone resistance to *Mycobacterium leprae*. Antimicrob. Agents Chemother., 56: 697-702, 2012. Yokoyama K., Kim H., Mukai T., Matsuoka M., Nakajima C., and Suzuki Y.
- 8) Real-time PCR and high resolution melt analysis for rapid detection of *Mycobacterium leprae* drug resistance mutations and strain types. J. Clin. Microbiol., 50: 742-753, 2012. Li W., Matsuoka M., Kai M., Thapa P., Khadge S., Haggge D. A., Brennan P. J., and Vissa V.
- 9) Drug and multiple-drug Resistance Among *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian relapsed leprosy patients. J. Clin. Microbiol., 50: 1912-1917, 2012. 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.
- 10) Cutaneous *Mycobacterium massiliense* infection: a sporadic case in Japan. J. Dermatol., 39: 569-572, 2012. Otsuki T., Izaki S., Nakanaga K., Hoshino Y., Ishii N., and Osamura K.
- 11) Buruli ulcer accompanied by pain in a Japanese patient. J. Dermatol., 39: 869-870, 2012. Onoe H., Yotsu R., Nakanaga K., Hoshino Y., Ishii N., and Takeuchi T.
- 12) Buruli ulcer and current situation in Japan: a new emerging cutaneous Mycobacterium infection. J. Dermatol., 39: 587-593, 2012. Yotsu R. R., Nakanaga K., Hoshino Y., Suzuki K., and Ishii N.
- 13) Detection of antibiotic resistance in leprosy using GenoType®LepraeDR, a novel ready-to-use molecular test. PLoS Neg. Trop. Dis., 6: e1739. doi:10.1371, 2012. Cambau E., Nevejans A. C., Tejmar-Kolar L., Matsuoka M., and Jarier V.
- 14) Genotyping of *Mycobacterium leprae* in Myanmar and supposed transmission mode. Jpn. J. Lepr., 81: 191-198, 2012. Khin S. A., Yin T. N. O., Kyaw K., Aye A. W., and Matsuoka M.
- 15) Impact of amino acid substitution in B subunit of DNA gyrase in *Mycobacterium leprae* on fluoroquinolone resistance. PLoS Negl. Trop. Dis., 6: e1838, 2012. Yokoyama K., Kim H., Mukai T., Matsuoka M., Nakajima C., and Suzuki Y.
- 16) A case of mycobacterial skin disease caused by *Mycobacterium peregrinum*, and a review of cutaneous infection, Case Reports. Dermatology, 4: 76-79, 2012. Kamijo F., Uhara H., Kubo H., Nakanaga K., Hoshino Y., Ishii N., and Okuyama R.
- 17) Bacteremia due to *Mycobacterium massiliense* in a patient with chronic myelogenous leukemia: case report. Diagn. Microbiol. and Infect. Dis., 74: 183-185, 2012. Hamamoto T., Yuki A., Naoi K., Kawakami S., Banba Y., Yamamura T., Hikota R., Watanabe J., Kimura F., Nakanaga K., Hoshino Y., Ishii N., Shimazaki H., Nakanishi K., and Tamai S.
- 18) A case of *Mycobacterium haemophilum* infection in a Japanese renal transplant patient and a review of

- Japanese cases. *J. Dermatol.*,39:968-969, 2012. Takeo N., Hatano Y., Okamoto O., Saruwatari K., Nakanaga K., Ishii N., Yokoyama S., and Fujiwara S.
- 19) The polyketide synthase-associated multidrug tolerance in *Mycobacterium intracellulare* clinical isolates. *Chemotherapy*, 58,341-348,2012. Matsunaga I, Maeda S, Nakata N., and Fujiwara N.
  - 20) Genotyping of *Mycobacterium leprae* in Myanmar and supposed transmission mode. *Jpn. J. Lepr.*, 81:191-198, 2012. Khin S.A., Yin T.N.O., Kyaw K., Aye .A. W., Matsuoka M.
  - 21) Impact of aminoacid substitution in B subunit of DNA gyrase in *Mycobacterium leprae* on fluoroquinolone resistance. *PLoS. Negl. Trop. Dis.*, 6: e1838. 2012. Yokoyama K., Kim H., Mukai T., Matsuoka M., Nakajima C., Suzuki Y.
  - 22) Anti-viral and anti-bacterial activities of an extract of the Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). *Microbiol. Immunol.*, 56:805-809.2012. Ikuta K., Hashimoto K., Kaneko H., Mori S., Ohashi K., and Suzutani T.
  - 23) Clofazimine modulates the expression of lipid metabolism proteins in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. *PLoS. Negl. Trop. Dis.*, 6: e1936, 2012. Degang Y., Akama T., Hara T., Tanigawa K., Ishido Y., Gidoh M., Makino M., Ishii N., and Suzuki K.
  - 24) Buruli ulcer and mycolactone-producing mycobacteria. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 66: 83-88, 2013. Nakanaga K., Yotsu R. R., Hoshino Y., Suzuki K., Makino M., and Ishii N.
  - 25) Laboratory procedures for the detection and identification of cutaneous nontuberculous mycobacterial (NTM) infections. *J. dermatol.*, 40:151-159, 2013. Nakanaga K., Hoshino Y., Yotsu R., Makino M., and Ishii N.
2. 和文発表
- 1) 松岡正典：ハンセン病の基礎医学分野における日韓協力について. *日本ハンセン病学会雑誌* 81: 205-207, 2012
  - 2) 石井則久、四津里英、浅野裕子、圓 純一郎、清島真理子、常深祐一郎、中永和枝、濱田利久、星野仁彦、渡邊徹心：ブルーリ潰瘍. *日本臨床皮膚科医会雑誌* 29: 376-383, 2012.
  - 3) 今長慶志、星野洋良、藤本典宏、小林孝志、多島新吾、中永和枝、星野仁彦、石井則久：*Mycobacterium massiliense* 皮膚感染症の 1 例. *皮膚臨床* 54: 1207-1211, 2012.
  - 4) 竹村佳純、上田幹雄、中西雅樹、小森敏明、藤田直久、中永和枝、星野仁彦、石井則久、岩崎吉伸：浸潤型胸腺腫・重症筋無力症治療中に発症した *Mycobacterium massiliense* による播種性非結核性抗酸菌症の 1 例. *呼吸* 31: 1070-1076, 2012.
  - 5) 森 修一、スマナ バルア、鈴木幸一、石井則久、四津里英:2011 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雑誌* 81:145-154, 2012
  - 6) 森 修一、スマナ バルア、鈴木幸一、四津里英、石井則久：2012 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雑誌* 82:59 -69, 2013.
- II. 学 会 発 表
1. 国際学会
    - 1) Matsuoka M. Improving quality control: technology, logistics and reporting. Fifth meeting on Sentinel Surveillance for Drug Resistance in Leprosy. Cotoonu, Benin, 13 November, 2012
    - 2) Yotsu R R, Nakanaga K., Hoshino Y., Suzuki K., Ishii N: Buruli Ulcer in Japan: the current situation. WHO Meeting on Buruli ulcer Control and Research Geneva, Switzerland, 25–27 March 2013.
    - 3) Nakanaga K., Yotsu R R, Hoshino Y., Ishii N: Laboratory Examination of Buruli Ulcer in Japan 2010-2012. WHO Meeting on Buruli ulcer Control and Research Geneva, Switzerland, 25–27 March 2013.
  2. 国内学会
    - 1) 星野仁彦、中永和枝、鹿住祐子、前田伸司、石井則久：*M. massiliense* の全ゲノムシーケンス. 第 87 回日本結核病学会総会 広島 2012 年 5 月
    - 2) 中永和枝、星野仁彦、石井則久：マルチプレックス PCR 法を用いた *M. massiliense* と *M. abscessus* 鑑別診断法の開発. 第 87 回日本結核病学会総会 広島 2012 年 5 月
    - 3) 星野仁彦、深野華子、中永和枝、和田新平、石井則久：迅速発育菌 *M. abscessus* と *M. massiliense* の薬剤感受性について. 第 87 回日本結核病学会総会 広島 2012 年 5 月
    - 4) 中永和枝、星野仁彦、石井則久：本邦の” *M. ulcerans* subsp. *shinshuense*” を起因菌とするブルーリ潰瘍症



- 例の増加. 第 87 回日本結核病学会総会 広島  
2012年 5月
- 5) 深野華子、中永和枝、星野仁彦、石井則久、和田新平: 迅速発育菌による皮膚疾患 2 症例と海洋生物から分離された迅速発育抗酸菌の比較検討. 第 87 回日本結核病学会総会 広島 2012年 5月
  - 6) 和田新平、深野華子、中永和枝、星野仁彦: ヒト非結核性抗酸菌症の起炎菌と類似した抗酸菌による水棲動物の疾患. 第 87 回日本結核病学会総会 広島 2012年 5月
  - 7) 星野仁彦、深野華子、中永和枝、森本耕三、吉山 崇、尾形英雄、工藤翔二、和田新平、倉島篤行: MAC 菌感染症に対する *ex vivo* 薬剤感受性試験. 第 87 回日本結核病学会総会 広島 2012年 5月
  - 8) 星野仁彦、深野華子、中永和枝、森本耕三、鹿住祐子、前田伸司、和田新平、奥村昌夫、吉山 崇、尾形英雄、工藤翔二、倉島篤行: 単一病院での過去 25 年間の肺 MAC 症における菌側因子の変遷について. 第 87 回日本結核病学会総会 広島 2012年 5月
  - 9) 鈴木幸一、谷川和也、石藤雄子、森修一、佐宗亜衣子、星野敬吾、櫻井準也、平田和明、石井則久. 鍋被り葬人骨からのらい菌 DNA の証明. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 札幌 2012年 6月
  - 10) 鈴木幸一、Yang Degang、石藤雄子、大塚幹夫、塘忠顕、斎藤一二三、小林睦生、赤間 剛、原 武史、中永和枝、星野仁彦、四津里英、牧野正彦、石井則久. Buruli 潰瘍家族発生例の住居敷地内からの *Mycobacterium ulcerans* DNA 検出. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 札幌 2012年 6月
  - 11) 向井 徹、宮本友司、福富康夫、前田百美、牧野正彦. Bioluminescence 系の抗酸菌応用への基礎的検討. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 札幌 2012年 6月
  - 12) 甲斐雅規、中田 登、松岡正典、関塚剛史、黒田 誠、牧野正彦. らい菌 Kyoto-2 株の全ゲノムシーケンスにより同定された SNPs の解析. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 札幌 2012年 6月
  - 13) Yang, D., T. Akama, T. Hara, Y. Ishido, M. Makino, N. Ishii, and K. Suzuki. Clofazimine modulates the expression of lipid metabolism in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 札幌 2012年 6月
  - 14) 前田百美、田村敏生、福富康夫、牧野正彦. らい菌感染した樹状細胞から分泌されるエキソソームの解析. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 札幌 2012年 6月
  - 15) 金 玄、横山和正、中島千絵、松岡正典、向井徹、福富康夫、鈴木定彦: らい菌 DNA のジャイレースの性状解析. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 札幌 2012年 6月
  - 16) 横山和正、金 玄、中島千絵、松岡正典、向井徹、鈴木定彦: らい菌 DNA のジャイレース A サブユニット上のアミノ酸置換とニューキノロン耐性. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 札幌 2012年 6月
  - 17) Masanori Matsuoka: Collaboration between Korea and Japan for basic research on leprosy. 第 85 回日本ハンセン病学会総会シンポジウム. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 札幌 2012年 6月
  - 18) 瀬川将広、森 修一、横田 隆: 東北新生園における入所者の退所理由別統計. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 札幌 2012年 6月
  - 19) 森 修一、石井則久: 国内ハンセン病療養所における入退所者の統計. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 札幌 2012年 6月
  - 20) Shimohakamada, Y., T. Tamura, M. Umemura, and M. Makino. Enhancing effect of Peptide-25 on the induction of functional activation of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. 第 41 回日本免疫学会総会 神戸 2012年 12月
  - 21) Miyamoto, Y., T. Mukai, and M. Makino. Metabolome analysis of mycobacteria. 第 86 回日本細菌学会総会 千葉 2013年 3月
  - 22) 福田智子、葉山惟大、中島久美子、照井正、中永和枝、石井則久: 両側上腕に生じた *Mycobacterium chelonae* の亜種による皮膚抗酸菌症の 1 例. 日本皮膚科学会第 847 回東京地方会 東京 2013年 1月
  - 23) 星野仁彦、中永和枝、鹿住祐子、前田伸司、石井則久: *Mycobacterium massiliense* の完全長ゲノム解析と *M. abscessus* group 間の比較解析. 第 88 回日本結核病学会総会 千葉 2013年 3月
  - 24) 吉川弥須子、中永和枝、小川佳亮、田中孝昭、沼尾利郎: *Mycobacterium arupense* による前腕側腫瘍の 1 例. 第 88 回日本結核病学会総会 千葉 2013年 3月