

## 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。ハンセン病に関する研究においては、らい菌感染樹状細胞が放出するエキソソームに関する研究が開始・展開された。樹状細胞にらい菌を感染させた後、らい菌由来のリポペプチドで刺激すると、MHC クラス II・クラス I 及び CD86 抗原を表面に発現するエキソソームが放出され、そのエキソソームはらい菌膜蛋白の一部を含み抗原性に富み、CD4 陽性 T 細胞を活性化することから新たな免疫療法剤となり得ること、さらにハンセン病の型別発症鑑別診断用バイオマーカーとして使用し得る可能性が明らかとなった。本研究成果は、ベルギー国ブリュッセル市で開催された第 18 回国際ハンセン病学会で報告され、ハンセン病の世界に世界で初めてエキソソームが導入されたとして非常に高い評価を受けた。また、同学会においては、当部で開発されてきたハンセン病初回免疫ワクチンとしてのリコンビナント BCG も紹介され、注目を浴びた。さらに、ハンセン病の新規発症者は世界で 20 万人前後であること、ハンセン病の濃厚流行国（地）は結核菌の蔓延国（地域）であること、さらに費用対効果を鑑みて、ハンセン病・結核共通ワクチンの開発を試み一定の成果を挙げているところであるが、ハンセン病新規発症者は総じて高齢であること、初回 BCG ワクチン接種は生後 5 カ月以内になされることを考えると、追加免疫（ブースター）ワクチンが必要と想定され、その研究が開始された。この追加免疫ワクチンについても、結核に対してもハンセン病に対しても有効であることが望ましいと考え、結核菌・らい菌共通抗原性分子に焦点を置いた研究を展開する必要性が高い。結核の研究も初回免疫ワクチン及び追加免疫ワクチンの開発が中心研究課題として据えられ、部内の数名のエキスパートがチームを組んで、ワクチン開発・評価システムの構築に全力投球がなされた。小動

物を用いたワクチン評価システムの構築には、多方面からのアドバイスを頂き、多ステップにわたる改良が取り入れられ、システムはほぼ確立された。アドバイスを頂いた多くの研究者に厚く感謝申し上げたい。初回免疫ワクチンの開発は、リコンビナント BCG の開発を中心として行われた。これまでに開発したハンセン病ワクチンの知見に基づき、結核用リコンビナント BCG の開発に取り組んだ。根幹として BCG 菌体のライソゾームへの早期移行とライソゾームでの抗原性分子の分泌方策をとり入れたが、ライソゾームで分泌されるもののライソゾームでプロセッシングを受けずに細胞質へエスケープする蛋白を再利用するためにプロテオゾームでの蛋白分解を可能とする新規リコンビナント BCG が作製された。この BCG はマウスを用いて評価する限り、結核菌の肺内増殖を 5%にまで低下させることが可能であり、日本発の新しい結核ワクチンの誕生に向けて大きな前進が図られた。今後、本ワクチンの実用化に向けた研究が大いに期待される場所である。その実用化に向けては、リコンビナント BCG 作製に際し外来遺伝子を導入するが、その外来遺伝子を保有する BCG の選択に薬剤耐性遺伝子を用いることが一般的であるが、薬剤を混入させた培地で BCG を維持すると導入した遺伝子が脱落し易い。安定供給が不可欠なワクチン株の維持に向けて様々な研究が開始された。追加免疫ワクチンの研究においては、有効性を規定する宿主因子に関する研究が行われ、試験管内ではその因子が確立された。今後小動物を用いた立証と有効なワクチンの開発が展開されるものと期待される。

最後に人事であるが、4 月 1 日付で松岡正典が再び再任用職員として採用された。

#### 業績

##### 調査・研究

#### I. 抗酸菌の病原性因子と病変発症機構に関する研究

##### 1. 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種々のサイトカイン産生を誘導するが、サイトカイン産生誘導能を示すらい菌抗原を探索するため、らい菌画分を調整したところ、らい菌膜蛋白がもっとも強いサイトカイン誘導能を示した。このことから、シュワン細胞はらい菌膜抗原を提示することにより、T細胞を活性化しうる可能性が考えられた。

[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。これまでに、らい菌感染後に脂質の蓄積や代謝に重要な宿主タンパクである ADRP や HSL の発現や局在が大きく変動することや、ハンセン病の化学療法に用いられるクロファジミンがそれを阻害することなどを明らかにした。さらに、らい菌感染後の宿主細胞に発現する遺伝子変化を DNA マイクロアレイで解析し、脂質成分を質量分析で解析するなど、詳細な検討を進めている。

[鈴木幸一]

## 3. 感染や組織傷害による自然免疫活性化機構に関する研究

らい菌は、宿主マクロファージ内に潜伏して持続感染するが、その際の viability は 20%程度であるとの報告もあり、実際には変性したり死滅したりした菌体が多く含まれている。そのような菌体の構成成分である PGN, LAM、あるいは菌のゲノム DNA 断片などは自然免疫系を活性化する。ところが、らい菌の生菌には、そのような自然免疫活性化に拮抗してそれを抑制することによって、自身の細胞内生存に有利な環境を構築する能力を有していることを明らかにした。また、そのような自然免疫活性化機構は、種々の臓器において様々な病態に関与する事を明らかにした。

[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、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、樹状細胞にらい菌を感染させ、樹状細胞から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

SBI 社のキットを用いて行った。らい菌感染樹状細胞から得られたエキソソームで上昇したマイクロ RNA のほとんどは機能が不明であったが、その中の一つ、miR373 には報告があり、E-カドヘリン蛋白を制御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

四種類の結核菌由来蛋白からなるキメラ蛋白 ID93 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。GLA-SE(TLR4 リガンド)アジュバント存在下で抗原を 3 回皮下接種したのち、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、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、妊娠期接種サル親 2 頭に、また、仔 2 頭に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。若年サル群では認められなかった。今後、仔群に何らかの徴候が出現することが期待される。

[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

*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 3 領域を用い、らい菌もしくは BCG の各種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った。安全性が高く抗原を高発現する各種組換え BCG の調整を行い、各種検討を行った。抗原発現安定性では、非常に強いプロモーターを持つ株では、培養 90 日で発現量の低下が観察されたが他の株では、安定した発現が得られた。

[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 細胞の分化と共に Th17 細胞とは異なる IL-17F 産生 CD4 陽性 T 細胞の分化を誘導すること、さらに *in vitro* 解析によって IL-17F 産生細胞と相互作用することで活性化した樹状細胞が機能的細胞傷害性 T 細胞の分化・活性化を誘導することを明らかにしてきた。今回、生体内における IL-17F の役割を解析した結果、IL-17F は生体内においても機能的細胞傷害性 T 細胞の分化・活性化を増強する機能を有していることが示された。

[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 IL-21 の役割

活性化 CD4 陽性 T 細胞が産生する IL-21 は獲得免疫担当細胞である T 細胞、B 細胞及び自然免疫担当細胞である NK 細胞の分化、活性化、生存及び増殖を制御する作用を有していることが報告されているが、抗酸菌感染後の IL-21 の動態及び抗酸菌感染防御における IL-21 の役割に関しては未だ明らかではない。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 IL-21 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活性化した CD4 陽性 T 細胞からの IL-21 産生が誘導されていることが明らかとなり、IL-21 が抗酸菌特異的獲得免疫機構を制御している可能性が示唆された。

[下袴田陽子、田村敏生、牧野正彦]

## 6. HSP70-MMP-II 融合蛋白質発現組換え BCG の改良

(1)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、結核菌に発現する CysO 遺伝子を HSP70 および MMP-II 融合蛋白質に挿入した組換え BCG を作製し、末梢血リンパ球を用いた試験管内での抗原性の解析、マウスへの噴霧感染を用いた生体内でのワクチン効果についての解析を行った。

(2) HSP70 と MMP-II の融合蛋白質および HSP70 と結核菌抗原 Ag85B との融合蛋白質を発現する組換え 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に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た。

[塚本裕美子、前田百美、牧野正彦]

### 2. ハンセン病患者における肉芽腫形成

ハンセン病における肉芽腫形成機構を解析する目的で、ヒト単球由来のマクロファージを用いて、*in vitro* で肉芽腫形成が可能か検討した。らい菌感染マクロファージ及び T 細胞・PBMC 等を共存させると試験管内で肉芽腫が形成された。肉芽腫内では 2 種類の M1 及び M2 型のマクロファージが存在することが判明した。

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

### 3. 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。さらに、日本では症例数の少ない *M. haemophilum* 感染症に関する研究を展開中である。

[中永和枝、星野仁彦、牧野正彦、石井則久]

### 4. 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 $\gamma$  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、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)が臨床の場を使用されているが、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)、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)、松本壮吉(新潟大学細菌学)、牧野正彦]

#### 7. 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]

#### 8. 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)]

### 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 の全ゲノムシーケンスの決定に加え、Hoshizuka-4、Ryukyu-6及びThai-53のゲノムシーケンスを行った。Kyoto-2株で特徴的であった ML0411 遺伝子内の 6SNPs は日本の本州で分離された Hoshizuka-4 株と同様に見られたが、沖縄由来の Ryukyu 株では見られなかった。そ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も判明した。これら株を Northeast Asian(NA) 株と命名した。さらに NA 株の解析からこれらの SNPs の非同義置換と同義置換の比が NA 株以外のらい菌株と比べ明らかに異なることを発見した。

[甲斐雅規、中田 登、松岡正典、松原久美子、牧野正彦]

#### 2. らい菌アミノ酸代謝系の解析

らい菌の代謝系は未だその多くが不明である。本研究では主要な代謝系の一つであるアミノ酸代謝に注目し、他抗酸菌を利用した組換え株による解析を試みた。らい菌において偽遺伝子化あるいは欠失しているアミノ酸代謝関連遺伝子群のホモログの一部を *M. smegmatis* において破壊し、得られた変異株の菌体内に含まれるアミノ酸量を解析した。それらを野生株と比較した結果、複数の変異株においてアミノ酸量が野生株に比べ有意に増減していることが判明した。このことは、らい菌の偽遺伝子化と特異なアミノ酸代謝系に関連性があることを示すも

のであった。

[宮本友司、向井 徹、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* 遺伝子変異と薬剤耐性、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. bovis* BCG の *gyrBA* 遺伝子をらい菌のものとの交換した菌を作製した。この菌は 37℃ よりも 34℃ の方が速く増殖したことから、らい菌 *gyrBA* は温度感受性があることが示され、らい菌増殖の温度感受性の原因の一つであることが示唆された。一方、結核菌 *gyrBA* で置き換えた *M. smegmatis* では、薬剤耐性を示す一部の変異で温度感受性となることが示された。

[中田登、甲斐雅規、牧野正彦]

### 2. 抗酸菌のリボゾーム RNA 遺伝子変異による薬剤耐性の研究

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と考えられる。これら遺伝子の変異と薬剤感受性を直接調べるために、らい菌、結核菌、及び非結核性抗酸菌の *rrn* で自身の *rrn* を置き換えた *M. smegmatis* の作製を行っている。*M. smegmatis* は *rrn* をゲノムに 2 コピー有しており、それぞれを個別に破壊可能な実験系を作製した。これを用いて個別変異について検討を行っている。

[中田登、甲斐雅規、牧野正彦]

### 3. 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、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。さらに、試薬をプレートにコーティングすることを試み成功し、迅速で簡便な方法が確立された。本法は他にも応用が可能であることから、らい菌以外の感染症への応用も検討している。

[甲斐雅規、中田 登、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) 47 症例 (2013 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]

## 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。また、これらの記録の公益的な活用を目指して、収集資料のデータベース化を行い、部分的な公開を始めた。現在、本データベースの拡張を行っている。

[森 修一、石井則久]

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

### 1. メキシコのハンセン病と診断された症例における *Mycobacterium lepromatosis* の頻度

近年、激しい皮膚潰瘍及び脈管炎を主徴とする Lucio 現象の原因菌として *Mycobacterium lepromatosis* が提唱された。*M. lepromatosis* は *rpoT* 遺伝子中に 6 塩基からなる直列繰り返しを 4 コピー有することが示されている。これまでの研究からメキシコの西部地域にはこの 6 塩基 4 コピー直列を示すらい菌が多数分布することを明らかにしてきた。一方、同地域には古くより Lucio 現象が多く見出されている。以上の理由から、同地域においてハンセン病と診断された症例における *M. lepromatosis* の検出頻度を調査した。16srRNA および *rpoT* 遺伝子中の特異的配列を指標として検出を行った結果、PCR が陽性とな

り解析可能であった24検体中8検体が *M.lepromatosis* であった。以上の結果から、メキシコ西部地域にはこれまでハンセン病として治療されてきた症例に多くの *M.lepromatosis* 感染例が存在することが明らかとなり、今後、ハンセン病との鑑別あるいは治療方法の開発を含めた新たな対策が必要であることが示された。同菌の性状、病原因子の解析のためにはヌードマウス footpad 法などにより患者材料より菌株の分離・確立が強く望まれる。

[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、ハンセ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指導を行った。さらに、らい菌のゲノム解析から得られた知見に基づく Genotyping を開始した。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）を継続して行った。2012年のベトナム国、ミャンマー国、モザンビーク国でのサーベイ結果をフィリピン共和国セブで2013年2月に行われた 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) Nakanaga, K., T. Sekizuka, H. Fukano, Y. Sakakibara, F. Takeuchi, S. Wada, N. Ishii, M. Makino, M. Kuroda, and Y. Hoshino. 2013. Discrimination of *Mycobacterium* subsp. *massiliense* from *Mycobacterium abscessus* in clinical isolates by Multiplex PCR. J. Clin. Microbiol., 52: 251-259.
- 2) Yamashita, Y., Y. Hoshino, M. Oka, S. Matsumoto, H. Ariga, H. Nagai, M. Makino, K. Ariyoshi, and Y. Tsunetsugu-Yokota. 2013. Multicolor flow cytometric analyses of CD4+ T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-related latent antigens. Jpn. J. Infect. Dis., 66: 207-215.
- 3) Kai, M., N. Nakata, M. Matsuoka, T. Sekizuka, M. Kuroda, and M. Makino. 2013. Characteristic mutations found in the ML0411 gene of *Mycobacterium leprae* isolated in Northeast Asian countries. Infection, Genetics and Evolution, 19: 200-204.
- 4) Wang, H., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and M. Makino. 2013. An *in vitro* model of *Mycobacterium leprae* induced granuloma formation. BMC Infectious Diseases, 13: 279.
- 5) Nakanaga, K., R. R. Yotsu, Y. Hoshino, K. Suzuki, M. Makino, and N. Ishii. 2013. Buruli ulcer and Mycolactone-producing mycobacteria. Jpn. J. Infect. Dis., 66: 83-88.
- 6) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. R. Yotsu, M. Makino, and N. Ishii. 2013. Laboratory procedures for the detection and identification of cutaneous non-tuberculous mycobacterial infections. J. Dermatol., 40: 151-159.
- 7) Akama T., A. Kawashima, K. Tanigawa, M. Hayash, Y. Ishido, Y. Luo, A. Hata, N. Fujitani, N. Ishii, and K.Suzuki. 2013. Comprehensive analysis of prokaryotes in environmental water using DNA microarray analysis and whole genome amplification. Pathogens, 2: 591-605.
- 8) Kawashima A., K.Yamazaki, T. Hara, T. Akama, A. Yoshihara, M. Sue, K. Tanigawa, H. Wu, Y.Ishido, F. Takeshita, N. Ishii, K. Sato, K.Suzuki. 2013. Demonstration of innate immune responses in the thyroid gland: potential to sense danger and a possible trigger for autoimmune reactions. Thyroid, 23:477-487.
- 9) Uchida M, T. Ito, T. Nakamura, H. Igarashi, T. Oono, N. Fujimori, K. Kawabe, K. Suzuki, RT. Jensen, R. Takayanagi. 2013. ERK pathway and sheddases play an essential role in ethanol-induced CX3CL1 release in pancreatic stellate cells. Lab Invest., 93:41-53.
- 10) Yamagata K, C. Nakayama, K. Suzuki. 2013. Dietary beta-carotene regulates interleukin-1beta-induced expression of apolipoprotein E in astrocytes isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Neurochem Int., 62:43-49.
- 11) Yamagata K, N. Tanaka, K.Suzuki. 2013. Epigallocatechin 3-gallate inhibits 7-ketocholesterol-induced monocyte- endothelial cell adhesion. Microvasc Res., 88: 25-31.
- 12) Kobiyama K, A. Kawashima, N. Jounai, F. Takeshita, KJ. Ishii, T. Ito, K. Suzuki. 2013. Role of extrachromosomal histone H2B on recognition of DNA viruses and cell damage. Front Genet., 4:91.
- 13) Veziris N., A. Chauffour, S. Escolano, S. Henquet, M. Matsuoka, V. Jarlier, A. Aubry. 2013. Resistance of *M. leprae* to quinolones: a question of relativity? PLoS Neglected Tropical Diseases.7: pe2440.
- 14) Ohtsuka M, N. Kikuchi, T. Yamamoto, T. Suzutani, K. Nakanaga, K. Suzuki, 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 Dermatology, 150:64-67.
- 15) Tsukamoto, Y., Y. Maeda, T. Tamura, T. Mukai, and M. Makino. 2014. Polyclonal activation of naïve T cells by urease deficient-recombinant BCG that produced protein complex composed of heat shock protein 70, CysO and major membrane protein-II. BMC Infect. Dis., 14: 179.
- 16) Mukai, T., Y. Tsukamoto, Y. Maeda, T. Tamura, and M. Makino. 2014. Efficient Activation of Human T Cells of Both CD4 and CD8 Subsets by Urease Deficient-Recombinant BCG that Produced a Heat Shock Protein 70-*M. tuberculosis*-Derived Major Membrane Protein II Fusion Protein. Clin. Vaccine Immunol., 21: 1-11.
- 17) Singh P., A.J. Benjak, S. Carat, M. Kai, P Busso, C. Avanzi, A. Paniz-Mondolfi, C. Peter, K. Harshman, J. Rougemont, M. Matsuoka, S.T. Cole. 2014. Genome-wide re-sequencing of multidrug-resistant *Mycobacterium leprae* Airaku-3. Clin. Microbiol. Infect., doi: 10.1111/1469-0691.12609.

2. 和文発表

- 1) 牧野正彦. 結核ワクチン作製の試み. 第 86 回日本ハンセン病学会レビュー, Jpn. J. Lepr., 82: 107-110, 2013.
- 2) 木村 博昭, 鈴木 幸一: 肉芽腫 -免疫を中心に-. Monthly Book Derma 204:8-14, 2013.
- 3) 鈴木 幸一: 損傷細胞由来 DNA と自己免疫疾患. 臨床免疫・アレルギー科 60:247-257, 2013.
- 4) 田村敏生, 下袴田陽子, 牧野正彦. 新たな結核・ハンセン病ワクチン開発に向けて -Th1 分化誘導型ペプチドによる細胞障害性記憶 T 細胞の分化誘導機構の解析-. Jpn. J. Lepr., 82:111-117, 2013.
- 5) 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. Jpn. J. Lepr., 82:59 -69, 2013.
- 6) 梅林芳弘, 真鍋求, 中永和枝, 石井則久. 秋田県で発生した Buruli 潰瘍. 皮膚病診療 35:669-672, 2013.
- 7) 石井則久, 中永和枝, 四津里英. 抗酸菌検査の進歩. 皮膚科の臨床 55: 1576-1579,2013.
- 8) 石井則久, 四津里英, 中永和枝: ブルーリ潰瘍 (*M. ulcerans* 感染症)を疑った場合の細菌検査. 検査と技術 41:1072-1076, 2013.
- 9) 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.
- 10) 甲斐雅規. Hp-rPCR 法を用いたらい菌薬剤耐性変異の検出. Jpn. J. Lepr., 83: 6-13, 2014.

II. 学 会 発 表

1. 国際学会

- 1) R. R. Yotsu, K. Nakanaga, Y. Hoshino, K. Suzuki, N. Ishii. Buruli ulcer in Japan: the current situation. WHO Meeting on Buruli ulcer Control and Research. 25-27 Mar, 2013. Geneva, Switzerland.
- 2) Kai. M. Analysis of knockout mutants of *Mycobacterium bovis* BCG gene involved in mycolic acid synthesis pathway. 1<sup>st</sup> Front Range Mycobacteria (FRM) meeting. 19-21 June, 2013, Colorado, USA.
- 3) Matsuoka M. Drug resistance in leprosy -an update. International leprosy Summit: overcoming the remaining challenges. 24-26 July 2013, Bangkok, Thailand.

- 4) Takatsuka Y, S. Murata, M. Komine, N. Maki, T. Maekawa, M. Nozaki, K. Nakanaga, N. Ishii, M. Ohtsuki. A case of Buruli ulcer in Tochigi prefecture, the temperate climate area of Japan. 9th Asian Dermatological Congress, 10-13 July, 2013, Hong Kong.
- 5) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Makino. Enhancing effect of Peptide-25 on the induction of functional activation of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 6) Shimohakamada, Y., T. Tamura, M. Makino, and S. L. Nutt. The role of follicular helper T cell in mycobacterial infection. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 7) Tsukamoto, Y., Y. Maede, T. Tamura, T. Mukai, and M. Makino. Development of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG for the inhibition of *M. tuberculosis* multiplication in lung. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 8) Mukai, T., Y. Miyamoto, M. Matsuoka, Y. Maeda, and M. Makino. Construction of stable recombinant BCG which secretes HSP70-MMP-II fusion protein by chromosomal integration of the gene for leprosy vaccine. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 9) Maeda, Y., T. Tamura, T. Mukai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Exosomes derived from *Mycobacterium leprae* infected dendritic cells stimulated with a lipopeptide participate in intercellular communication. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 10) Miyamoto, Y., T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Biosynthetic characterization of glucuronic acid-containing glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 11) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Makino. The role of *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein in



- the induction of Th1 immune response. 15th International Congress of Immunology. 22-27 August, 2013. Milano, Italy.
- 12) Shimohakamada, Y., T. Tamura, M. Makino, and S.L. Nutt. The role of follicular helper T cells in mycobacterial infection. 15th International Congress of Immunology. 22-27 August, 2013, Milano, Italy.
  - 13) Makino, M., T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, Y. Tsukamoto, and M. Matsuoka. Novel vaccine development against leprosy. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
  - 14) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Metabolome analysis of *Mycobacterium leprae*. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
  - 15) Tsukamoto, Y., Y. Maeda, and M. Makino. Evaluation of major membrane protein-I for the serodiagnosis of leprosy. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
  - 16) Maeda, Y., T. Mukai, Y. Fukutomi, T. Tamura, and M. Makino. Exosomes released from *Mycobacterium leprae* infected human dendritic cells can activate T cells. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
  - 17) Kai, M., N. Nakata, G. T. Chae, P. Saunderson, A. A. Naghanoy, M. Balagon, M. Matsuoka, T. Sekizuka, M. Kuroda, and M. Makino. Characteristic SNPS in *Mycobacterium leprae* isolated in Japan. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
  - 18) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. Mutation analysis of *Mycobacterium leprae* genes and drug resistance using cultivable mycobacteria. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
  - 19) Matsuoka, M., T. Budiawan, T. Mukai, and S. Izumi. *Mycobacterium leprae* in daily used water in endemic area; its quantification and evaluation of the viability. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
  - 20) R. R. Yotsu, K. Nakanaga, Y. Hoshino, K. Suzuki, N. Ishii. Epidemiology and clinical characteristics of Buruli ulcer in Japan. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
  - 21) P. S. Rosa, S. M. Diório, A. F. F. Belone, I. M.F.D. Baptista, P. N. Suffys, L. R V Fachin, L. M. Trino, B. G. C. Sartori, L. R. De Lamano, M. I. de Araujo, W. F. B. Delanina, F. B. Marques, S. Ura, C. T. Soares, M. B. Xavier, M. T. Mira, M.O. Moraes, M. Matsuoka, M. Kai, M. C. L. Virmond. Evidence of active transmission of drug resistant *Mycobacterium leprae* strain in Brazil. 18<sup>th</sup> International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
  - 22) Matsuoka M., M. Kai, and M. Fautis. Identification of *M.lepromatosis* with the bacilli obtained from Mexican leprosy cases, and *M .leprae* isolates maintained in Leprosy Research Center. 1st Korea-Japan Leprosy meeting, 15-16 November, 2013, Seoul, Korea.
2. 国内学会
- 1) 甲斐雅規, 中田 登, 松岡正典, 関塚剛史, 黒田 誠, 牧野正彦. SNPs 解析により示されたらい菌日本株ゲノムの特徴. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
  - 2) 向井 徹, 宮本友司, 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 組換えらい菌株構築への基礎的検討. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
  - 3) 牧野正彦. 結核ワクチン作製の試み. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
  - 4) 田村敏生, 下袴田陽子, 牧野正彦. 新たな結核・ハンセン病ワクチン開発に向けて—Th1 分化誘導型ペプチドによる細胞障害性記憶 T 細胞の分化誘導機構の解析—. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
  - 5) 福富康夫, 前田百美, 松岡正典, 牧野正彦. 蛍光色素を利用したマクロファージの抗らい菌活性発現機構の解明. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
  - 6) 下袴田陽子, 田村敏生, Stephan Nutt, 牧野正彦. 抗酸菌感染における濾胞ヘルパーT 細胞の動態. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
  - 7) 鮫島朝之, 前田百美, 後藤正道, 牧野正彦. 皮疹の出現前後に MMP-II 血清抗体価の変化が観察できたハンセン病少菌型の 1 例. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
  - 8) 宮本友司, 松岡正典, 福富康夫, 向井 徹, 甲斐雅規, 前田百美, 牧野正彦. *Mycobacterium leprae* の

- メタボローム解析. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 9) 鈴木幸一, 谷川和也, Yang Degang, 赤間 剛, 川島 晃, 石藤雄子, 牧野正彦, 石井則久. らい菌感染マクロファージ内の脂質維持機構とクロファジミンによる阻害. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 10) 前田百美, 向井 徹, 福富康夫, 田村敏生, 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を構成するタンパクの分析. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 11) 塚本裕美子, 前田百美. MMP-I 抗原を使用したハンセン病の血清診断法の検討. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 12) 鈴木幸一, 谷川和也, Yang Degang, 赤間剛, 川島晃, 石藤雄子, 牧野正彦, 石井則久. らい菌感染マクロファージ内の脂質維持機構とクロファジミンによる阻害. 第 86 回日本ハンセン病学会 2013 年 5 月 さいたま市
- 13) 天児和暢, 飯田健一郎, 斉藤光正, 松岡正典, 甲斐雅規, 吉田真一. らい菌の培養、マウス組織抽出物・ヒト血漿の効果. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 14) 松岡正典. 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* との異同について. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 15) 中田 登, 甲斐雅規. 培養可能抗酸菌を用いたらい菌薬剤耐性変異解析法のフルオロキノロン耐性変異解析への応用. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 16) 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」と農業コロニー「東北農場」の設立. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 17) 森山一隆, 森 修一. 南方の療養所 (奄美和光園) 70 年の軌跡. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 18) 森 修一. 相対隔離政策から絶対隔離政策への過程を検証する研究. 第 86 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2013 年 5 月 さいたま市
- 19) 三宅知美, 宇原久, 奥山隆平, 小林法元, 河内繁雄, 中永和枝, 石井則久. 左前腕 *Buruli* 潰瘍の 1 例. 第 112 回日本皮膚科学会総会 2013 年 6 月 横浜市
- 20) 宮崎 恭平, 阿部 優, 橋本 浩一, 佐藤 晶論, 川崎幸彦, 森 修一, 錫谷 達夫, 細矢 光. リバビリン脳室内投与療法中の亜急性硬化性全脳炎患者における髄液中リバビリン代謝物濃度とその抗ウイルス効果. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 神戸
- 21) 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 共焦点レーザー顕微鏡観察によるヒトマクロファージの抗らい菌活性発現機構の解明. 第 87 回日本細菌学会総会 2014 年 3 月 東京
- 22) Yuqian Lu, 鈴木幸一, 牧野正彦. らい菌のマクロファージ内寄生における細胞内脂質代謝の変化. 第 87 回日本細菌学会総会 2014 年 3 月 東京
- 23) 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 *gyrBA* 遺伝子とフルオロキノロン耐性の解析. 第 87 回日本細菌学会総会 2014 年 3 月 東京
- 24) 甲斐雅規, 中田 登, 関塚隆剛史, 黒田 誠, 牧野正彦. らい菌日本分離株で発見された特徴的な SNPs の解析. 第 87 回日本細菌学会総会 2014 年 3 月 東京
- 25) 宮本友司, 向井 徹, 牧野正彦. 抗酸菌におけるアミノ酸生合成・代謝解析. 第 87 回日本細菌学会総会 2014 年 3 月 東京
- 26) 前田百美, 田村敏生, 向井 徹, 福富康夫, 牧野正彦. Exosomes released from mycobacteria infected human dendritic cells can activate T cells. 第 87 回日本細菌学会総会 2014 年 3 月 東京
- 27) 田村敏生, 梅村正幸, 牧野正彦. Effect of P25 of Ag85B on the induction of functional activation of cytotoxic T lymphocytes. 第 87 回日本細菌学会総会 2014 年 3 月 東京
- 28) 塚本裕美子, 向井 徹, 前田百美, 田村敏生, 牧野正彦. Efficient activation of human T cells of both CD4 and CD8 subsets by new recombinant BCG (BCG-DHTM). 第 87 回日本細菌学会総会 2014 年 3 月 東京