

23. ハンセン病研究センター

感染制御部

部長 石井 則久

概要

感染制御部では、(1) らい菌・結核菌・非結核性抗酸菌により発症する疾病の病理・診断・治療・予防・薬剤感受性に関する研究業務に加えて、(2) らい菌の分離・同定・薬剤感受性試験（行政検査、2006年以降、日本でのほぼ全症例を行っている）、(3) 希少非結核性抗酸菌の分離・同定・薬剤感受性試験（依頼検査）、(4) ハンセン病の社会疫学に関する研究業務を行っている。

らい菌(*Mycobacterium leprae*)に関する基礎研究においては、薬剤耐性機構および簡便な検出法に対する研究に進展が見られた。

M.leprae は人工培地培養が現在まで実現しておらず、薬剤感受性試験を容易に施行することができなかったが、*M.leprae* の薬剤標的遺伝子を *M.smegmatis* の ortholog と交換することで、*M.leprae* の薬剤感受性表現型を人工培地に発育する抗酸菌で評価することに成功した。今年度はフルオロキノロン感受性に関連する *gyrase BA* の変異株を作成した。同様の解析を結核菌に対するフルオロキノロン感受性についても施行した。さらに、ハンセン病の3大主要治療薬の一つであるクロファジミンについては長い間、薬剤耐性関連遺伝子が不明であったが、クロファジミンに対する耐性株を *M.avium* を用いて作成し、全ゲノムシーケンス解析を行い、未知であったクロファジミン感受性関連遺伝子の同定に成功した。

また、途上国において利用可能な簡便な *M.leprae* 検出法の開発は喫緊の課題であり、LAMP法を用いた *M.leprae* 特異的検出法を開発した。現在、ザンビアにおいて国際共同研究が進展している。

非結核性抗酸菌に関する基礎研究は *M. ulcerans* の subspecies である *M. shinshuense* および、*M. leprae* の近縁と考えられる *M. haemophilum* の全ゲノムシーケンス解析が進展した。

M. ulcerans によって生じるブルーリ潰瘍は無痛性難治性潰瘍を特徴とする皮膚疾患である。ブルーリ潰瘍は重篤な後遺症を残す事が多く、ハンセン病同様社会的偏見差別を受けやすい。WHO はブルーリ潰瘍を Neglected

Tropical Diseases (NTDs、顧みられない熱帯病) の一つに定め、その疫学・診断・治療・予防などに精力的に活動を行っている。世界では毎年数千人規模の新規患者が登録されており、WHO の *M. ulcerans* 感染症対策には感染制御部が連携を行って活発に活動を展開している。日本においては2016年3月末までに累計58例のブルーリ潰瘍が集積されている。また、*M. shinshuense* については全ゲノム解析が行われておらず、類縁種の *M. marinum* や *M. ulcerans* との類似や相違について不明であったが、*M. shinshuense* の type strain (ATCC33728) および全臨床分離株に関して全ゲノムシーケンス解析を終了し、*M. marinum* や *M. ulcerans* との比較ゲノム解析を行った。

また、*M. haemophilum* は *M. leprae* やハンセン病類似疾患である「Lucio型ハンセン病」の起原菌である *M. lepromatosis* の近縁に位置する培養可能菌であり、これらの菌との関連やハンセン病研究への応用を目指し *M. haemophilum* の標準株および臨床分離株の全ゲノム解析を進めた。

ハンセン病に関する社会疫学研究が進展した。日本と世界のハンセン病医学に関する医学史的研究、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などが進展し、日本のハンセン病療養所の入退所者数動向を100年間のデータとして年次・法律・療養所別に明らかにした。また、ハンセン病対策の進展要因検証に寄与することを目的として、Web公開学術データベース「ハンセン病近現代資料アーカイブス」の作成を行い、ハンセン病医学・公衆衛生政策に関する資料を中心に数万点の資料をデジタル化しデータベース公開を始めた。

また、ハンセン病の血清診断、ハンセン病や結核に対する組み換え BCG ワクチンの開発に関する研究などが行われた。

BSL3、ABSL3 施設が稼動している第二研究棟で、結核菌に関する研究を行っている。結核菌の培養、保存、*in vitro* での結核菌の各種解析を行うとともにマウス、サルを使用した *in vivo* における感染実験を行っている。

感染制御部

最後に人事であるが、2016年3月31日付で中永和枝が定年退官した。また、2015年10月1日付で吉田光範が研究員として着任した。

業績

調査・研究

I. らい菌の病変発症機構に関する研究

1. シュワン細胞を用いた末梢神経障害機構の解明

シュワン細胞において、らい菌感染後に細胞質内に脂肪滴が形成されることが示されており、この脂肪の蓄積がシュワン細胞の脂質代謝を調節する結果、ほぼ脂質で構成されるミエリンの再生、並びに末梢神経修復機構に影響を及ぼすことが考えられる。そこでらい菌感染による末梢神経障害機構解明の一環として、感染後のミエリン再生機能に着目し、正常、及びミエリン蛋白欠損シュワン細胞における脂質の蓄積を比較解析した。らい菌は Thai53 株を用い、その感染量、感染期間、阻害剤の添加等が脂質蓄積に及ぼす影響について検討し、脂質蓄積とミエリン再生との関連についての研究を進めていく上での基盤作りに努めた。その他、シュワン細胞とらい菌相互作用の解析に関連する研究を随時遂行した。

[遠藤真澄、前田百美]

II. 生体防御機構とワクチン開発に関する研究

1. ハンセン病のワクチン開発に関する研究

らい菌感染樹状細胞から得られたエキソソームを精製し、自己 T 細胞と混合培養すると、T 細胞が活性化し、リポペプチド LipoK によってさらに T 細胞活性が増加した。そこで、エキソソームに含まれる miRNA を網羅的に解析するため、東レ(株)らが独自に開発した高性能 DNA チップ基盤 3D-Gene で解析を行った。らい菌感染樹状細胞から得られたエキソソームは幾つかの miRNA をより多く含んでいた。ハンセン病特異的な miRNA が同定できれば、その miRNA をターゲットとした、新たな発想に基づくワクチン開発が期待できる。

[前田百美、向井 徹、福富康夫、田村敏生]

2. 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-

末梢を循環するエフェクターメモリー様細胞傷害性 T 細胞(CTL)の分化には Th17 細胞とは異なる CD4 T 細胞が産生する IL-17F と未知の液性因子の共作用によって成熟化した樹状細胞による抗原提示が必須であること、BCG 及び結核菌はエフェクターメモリー様 CTL の分化に必須の IL-17F 産生 CD4 T 細胞の分化・活性化を抑制する機構を有している可能性を明らかにした。

[田村敏生、下袴田陽子]

(2)抗酸菌感染防御における濾胞ヘルパーT細胞の役割
リンパ濾胞に存在する CD4 ヘルパーT 細胞(TFH : PD1 陽性-CXCR5 陽性)は IL-21 を産生することによって B 細胞、T 細胞及び NK 細胞の分化、活性化を制御しているが、抗酸菌感染防御における TFH の動態に関しては明らかではない。IL-21 遺伝子の片方のアレルを EGFP 遺伝子に置き換えたノックインマウスを用い、抗酸菌感染後の TFH の動態を解析した結果、抗酸菌感染後に IL-21 を産生する TFH の分化が誘導されると同時に PD1 陽性-CXCR5 陽性-Foxp3 陽性で IL で xR を産生しない抑制性 CD4 T 細胞の分化が顕著に誘導されることを明らかにした。

[下袴田陽子、田村敏生]

3. HSP70-MMP-II 融合蛋白質発現組み換え BCG の改良

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

(2)(1)の組換え BCG ワクチン株について、長期間継代した場合の安定性について解析を行った。

[塚本裕美子、前田百美、田村敏生、宮本友司、向井 徹]

4. 結核菌に対する液性免疫を利用したワクチン開発のための基礎研究

最近になって結核菌に対する新規アジュバントを用いた新規 BCG ワクチンや新規組み換え BCG ワクチンの臨床試験の結果が、次々報告されているがいずれも果々しい成績を示していない。これは結核菌に対する BCG による細胞性免疫を利用した感染防御が限界に達している可能性もある。結核菌においても現在市販されている殆どのワクチンと同様液性免疫を利用したワクチン開発の基礎研究を行い、性別年齢を一致させた健常者においては活動性結核患者と比べて結核特異的 IgA が有意に上昇していることを見出した。

[仁木満美子(大阪市大細菌学)、松本宗吉(新潟大学細菌学)、永井英明(国立病院機構東京病院)、工藤翔二(複十字病院)、星野仁彦]

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法の開発

らい菌由来膜タンパク MMP-II を使用したハンセン病の血清診断法は、従来のものより、少菌型ハンセン病患者を高感度に検出できることを明らかにした。中国南西地方で調査した結果、家族内接触者の抗体陽性者の33.3%が発病したことが明らかとなった。このことから、流行地ではハイリスク患者を発見するため、簡便、かつローコストなキットの開発が重要である。現在、キットの感度を上げるため、高純度の MMP-II の精製を行い、さらに MMP-I など、幾つかの他の抗原との組み合わせを検討している。

[前田百美、Wang Hongsheng (Chinese Academy of Medical Sciences)、遠藤真澄、塚本裕美子、田村敏生、向井 徹]

2. ハンセン病診断抗原の開発

ハンセン病の血清診断は、PGL-1 を抗原とした凝集反応キットが市販されている。しかし、ハンセン病の病型により低い検出率である。そのため、血清診断に用いる新規らい菌抗原の検索のため、迅速発育抗酸菌である *M. smegmatis* を宿主とし、N 末および C 末に精製用 tag を付加する抗酸菌蛋白発現ベクターを構築した。さらに、公表されているらい菌塩基配列より、他の抗酸菌と相同性の低い ORF 数十種を選択し、同ベクターにクローニングを行った。今後組換えらい菌蛋白の発現精製を行い抗原性の検討により検出率の向上が図られると考えられた。

[向井 徹、宮本友司、前田百美]

3. LAMP 法によるらい菌検出法の開発

途上国において、利用可能ならい菌遺伝子検出法として、特殊ろ紙を用いた試料からの核酸抽出・保存と恒温遺伝子増幅法であるらい菌特異 LAMP 法を組み合わせ、検出感度は 50 菌体であった。この系と Nested-PCR 法との比較では、多菌型では同一の結果、少菌型ではややばらつきが認められたが、感染原の一つと考えられる無症候性排菌者の screening には十分使用可能と考えられた。試薬の乾燥化、さらなるコストの低減により実装可能な検出系開発が可能であると考えられた。

[向井 徹、宮本友司、前田百美]

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

培養や同定が困難な病原性抗酸菌について、1. 培養条件の検討、2. 菌の生化学的性状、3. 各種遺伝子の配列解析、による分離・同定および薬剤感受性に関して検討し、特に皮膚疾患における新種抗酸菌の分離・同定に成功し、症例を収集中である。また、一般の抗酸菌培養方

法では分離されにくい *M. chelonae* 感染症や *M. haemophilum* 感染症に関して、早期診断法の開発や細菌学的な研究を展開中である。

[中永和枝、宮本友司、塚本裕美子、石井則久]

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

培養や同定が困難な病原性抗酸菌について、1. 培養条件の検討、2. 菌の生化学的性状、3. 各種遺伝子の配列解析、による分離・同定および薬剤感受性に関して検討し、これまで報告のない皮膚疾患および肺疾患由来の新種抗酸菌の分離・同定に成功し、症例を収集中である。また、一般の方法では鑑別できない *M. abscessus* と *M. massiliense* 症を鑑別する簡便なマルチプレックス PCR 法を開発し、早期診断への応用を展開中である。

[中永和枝、宮本友司、塚本裕美子、星野仁彦、石井則久]

6. 病原性抗酸菌 *M. haemophilum* の遺伝子解析

M. haemophilum は、各種抗酸菌の ORF を用いた系統樹解析では、*M. leprae* や *M. lepromatosis* とどの抗酸菌よりも近縁に位置する培養可能菌である。しかし、全塩基配列は、報告されていないため、標準株、臨床分離株の全塩基配列解析を進めた。その結果、標準株の遺伝子配列の決定、および臨床分離株の配列データの取得を行った。今後これらのデータを基に細菌学的特性の解析、簡易同定法の開発を可能にすると考えられた。

[向井 徹、宮本友司、中永和枝、石井則久、甲斐雅規]

7. 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)]

8. 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）]

9. 病原性抗酸菌の分離・同定・薬剤感受性に関する研究

培養や同定が困難な病原性抗酸菌について、1. 培養条件の検討、2. 菌の生化学的性状、3. 各種遺伝子の配列解析、による分離・同定および薬剤感受性に関して検討し、これまで報告のない皮膚疾患および肺疾患由来の新種抗酸菌の分離・同定に成功し、症例を収集中である。また、水棲動物の非結核性抗酸菌症について、人への感染性を検討中である。

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

10. 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を欠失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）、鈴川真穂（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. らい菌生存度の判定に関する研究

1. らい菌 16S-rRNA 前駆体の解析

ハンセン病の起原菌であるらい菌は試験管培養することが不可能なため、ハンセン病の治療効果等の評価に不可欠であるらい菌の生存度を判定する際に困難を伴う。本研究では生存度と関連することが知られているらい菌 RNA の動きに注目し、生存度の評価においてより優れた RNA 分子の探索を試みた。その結果、これまでの研究で

知られていた 16S-rRNA よりも鋭敏に生存度を評価でき得る新たならい菌 RNA 分子 (16S-rRNA 前駆体) を同定した。

[宮本友司、甲斐雅規、向井 徹、牧野正彦]

2. 蛍光色素を利用したらい菌の生死鑑別法の開発

これまで、RI 標識脂肪酸を基質とした代謝系に着目し、マウスやヒトマクロファージの活性化状態と同細胞中のらい菌の生存率との関係を検討してきた。また、CTC と呼ばれる分子が、生菌の電子伝達系を介した呼吸反応により還元され蛍光発光を伴う CTF に変化するのに着目し、共焦点レーザー顕微鏡を利用して細胞内らい菌の生死を評価してきた。その結果、マクロファージの活性化が高まると中のらい菌の代謝は減少し CTC 発光率も減少し、さらに、抗菌薬によりらい菌の代謝が低下するのに伴い、CTC から CTF への変換も低下した。以上のことから、蛍光色素を用いた方法は RI を利用した測定法に劣らず鋭敏にらい菌の生存率を評価できることが示唆された。

[福富康夫、前田百美、星野仁彦]

V. 抗酸菌の病原性と薬剤耐性に関する研究

1. らい菌 *gyrBA* 遺伝子のフルオロキノロン耐性と温度感受性に関する研究

M. smegmatis の *gyrBA* をらい菌の *gyrBA* と交換した菌を作製したところ、得られた菌は 33°C で良好に増殖し、37°C で増殖しないことがわかった。この菌を用いてオフロキサシン耐性変異株を 20 株程度分離したところ、*gyrA* のコドン 95 に 3 種類の変異が見られ、これらのうち 2 種類はらい菌ではまだ報告されていない変異であった。

[中田 登、吉田光範、星野仁彦]

2. 結核菌 *gyrBA* 遺伝子のフルオロキノロン耐性に関する研究

フルオロキノロン耐性を示した結核菌臨床分離株に見られる *gyrBA* 変異について文献調査を行い、*M. smegmatis* の *gyrBA* を結核菌の変異型 *gyrBA* と交換した株を 27 種作製した。変異株セットに対して 5 種類のフルオロキノロンの感受性試験を行ったところ、シタフロキサシンの菌に対する増殖抑制効果が特に高いことがわかった。さらに、作成した 27 変異株の倍加時間を比較したところ、フルオロキノロン耐性に加えて、高い増殖能をもつ *gyrBA* 変異株の存在が示唆された。

[吉田光範、中田 登、星野仁彦]

3. 抗酸菌のクロファジン耐性に関する研究

クロファジンはハンセン病主要治療薬の一つであるが、*M. avium* を用いて分離した2種類のクロファジン耐性変異株は、親株に対してそれぞれ4倍、16倍の最小発育阻害濃度を示した。全ゲノム解析の結果、両株は共に *mmpL* 遺伝子と *tetR* 遺伝子に非同義変異が見られ、それらの変異は両株で2遺伝子とも異なるものであった。
[中田 登、吉田光範、小椋義俊 (九州大学細菌学)、林 哲也 (九州大学細菌学)、星野仁彦]

VI. ブルーリ潰瘍および近似疾患に関する研究

1. *M. ulcerans* および *M. shinshuense* のゲノム解析

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) 58 症例 (2016 年3月末まで) を収集し、世界のブルーリ潰瘍との比較ゲノム研究、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ゲノム研究を展開中である。

[星野仁彦、吉田光範、中永和枝、宮本友司、小椋義俊 (九州大学細菌学)、林 哲也 (九州大学細菌学)、石井 則久]

2. ブルーリ潰瘍に関する疫学研究

M. ulcerans によるブルーリ潰瘍は難治性の皮膚疾患である。これまでに、日本のブルーリ潰瘍 (“*M. ulcerans* subsp. *shinshuense*”感染症) 58 症例 (2016 年3月末まで) を収集し、世界のブルーリ潰瘍との比較研究を展開中である。特に小児について、治療経過が不良な罹患例もみられることから、治療経過を予測できる検査法の開発をめざしている。

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

VII. ハンセン病の社会疫学に関する研究

1. ハンセン病疫学の歴史的研究

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

究、日本のハンセン病療養所の統計記録の解析、諸外国のハンセン病政策の研究、諸外国のハンセン病療養所の統計記録の解析などから考証している。

[森 修一]

2. ハンセン病近現代資料データベースの作成

ハンセン病の隔離政策は19世紀後半から20世紀にかけて公衆衛生政策として世界中で行われた。また、20世紀半ばからは隔離から解放医療への移行がWHO主導により行われた。しかし、世界および日本におけるこれらのダイナミズムは未だ明らかでない。これまでの一般的研究は社会科学を主としたものであるが、非常に概念的な研究が多く、その実態は見えない。本研究では医学、公衆衛生政策、ハンセン病療養所OBなどの資料を中心に研究を行うと共に、収集した資料をデータベース化して公開し(専門性の高い資料はサマライズを行う)、ハンセン病対策の進展要因(隔離→解放)を広く検証するため寄与することを目的とする。現在は数万点の資料の収集が進み、約5千点の資料のデータベース化が行われ、公開が開始されている。データベース名「近現代ハンセン病近現代資料アーカイブス: The archives of materials on Hansen's disease in modern times (ARCHHDJP)

[森 修一、廣野義幸 (東京大学大学院総合文化研究科 関連基礎科学系)、川西健登 (国立療養所松丘保養園)]

3. 日本におけるハンセン病解放医療に関する研究

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

[森 修一、瀬川将広(国立療養所東北新生園)、廣野義幸 (東京大学大学院総合文化研究科関連基礎科学系)、田中丹史 (東京大学大学院総合文化研究科関連基礎科学系)]

VIII. 新規ウイルス感染マウスモデルの開発と応用に関する研究

1. 自然免疫抑制を生じるウイルス感染マウスモデルの開発と細菌感染モデルへの応用に関する研究

種々のウイルス(インフルエンザウイルス、RSウイルス、麻疹ウイルスなど)の感染により生体ではTLRなどの脱感作や種々の免疫応答の不全が生じる。本研究で通

[甲斐雅規、中島千絵（北大）、鈴木定彦（北大）]

常の H3N2 インフルエンザ株を用い、免疫抑制剤による生体免疫の操作により、スペイン風邪様インフルエンザ感染マウスモデル、トリインフルエンザ様インフルエンザ感染マウスモデルの樹立に成功し、これらのモデルへ、らい菌・結核菌・非結核性抗酸菌の重感染を行うという方法でこれらの抗酸菌の感染モデル樹立を試みている。この他、新たな感染マウスモデルの樹立を目指し、RS ウイルス臨床分離株、麻疹ウイルス臨床分離株を試みている。[森 修一、細谷光亮(福島県立医科大学小児科学講座)、橋本浩一(福島県立医科大学小児科学講座) 佐藤由起夫(東北大学医学部)]

IX. 新しいハンセン病の病原体 *M. lepromatosis* に関する研究

1. *M. lepromatosis* の検出と薬剤耐性変異

2008 年、メキシコのハンセン病患者から *M. leprae* と非常に似ているが異なる *M. lepromatosis* が報告された。我々はメキシコ患者由来バイオプシーサンプルを得たので、本菌の検出、薬剤耐性関連遺伝子の変異の有無を調べた。検出では 16S rDNA と *rpoT* の特徴的な塩基配列の違いを指標にした PCR 法にて 19 サンプル中 2 サンプルで *M. lepromatosis* を検出した。2 サンプルの薬剤耐性遺伝子配列で数カ所の変異を検出したが、ほとんどがアミノ酸置換のないマイナー変異であった。1 カ所だけアミノ酸の置換を伴う変異がダブソン耐性と関連する遺伝子 *foiP1* の既知耐性変異領域近傍にあり、2 サンプルともに同じ変異を持つことが判明した。今後、この変異がダブソン耐性に影響するかどうかを検討する。

[甲斐雅規、松岡正典、宮本友司、向井 徹]

X. ハンセン病の伝播に関する研究

1. らい菌の環境リザーバー探索とハンセン病の伝播に関する研究

ハンセン病の感染ルートとしては主に濃厚接触によりヒトからヒトへ移ると考えられているが、多剤併用療法によりハンセン病の発生が顕著に減少してきたにもかかわらず、ハンセン病の伝播が相変わらず続くことから、環境中にヒト以外の感染源が存在することが疑われている。これまでに環境中の水や土壌かららい菌 DNA が検出されたという報告もある。そこで、らい菌の環境リザーバー探索とハンセン病伝播の解析のため、環境中に常在している原虫や蠕虫とらい菌との共生の有無について調査研究を開始した。これまでに実験的にらい菌がアメーバや線虫に取込まれることを確認した。

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Wang H, W. Liu, Y. Jin, M. Yu, H. Jiang, T. Tamura, Y. Maeda, and M. Makino. 2015. Detection of antibodies to both *M. leprae* PGL-I and MMP-II to recognize leprosy patients at an early stage of disease progression. 2014. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 83: 274-277. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.07.012.
- 2) Hoshino Y, and K. Suzuki. 2015. Differential diagnostic assays for discriminating mycobacteria, especially for nontuberculous mycobacteria: what does the future hold? *Future Microbiol* 10: 205-216. doi: 10.2217/fmb.14.120.
- 3) Reche P.A, E. Fernandez-Caldas, D. R. Flower, M. Fridkis-Hareli, and Y. Hoshino. 2015. Peptide-Based immunotherapeutics and vaccines 2015. *J Immunol Res*. 2015: 349049.
- 4) Fukano H, S. Wada, O. Kurata, K. Mizuno, K. Nakanaga and Y. Hoshino. 2015. Nontuberculous mycobacteriosis in farmed thread-sail filefish *Stephanolepis cirrhife*. *Fish Pathology* 50: 68-76.
- 5) Niki M, M. Suzukawa, S. Akashi, H. Nagai, K. Ohta, M. Inoue, M. Niki, Y. Kaneko, K. Morimoto, A. Kurashima, S. Kitada, S. Matsumoto, K. Suzuki and Y. Hoshino. 2015. Evaluation of humoral immunity to *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens for correlation with clinical status and effective vaccine development. *J Immunol Res*. 2015: 527395. doi:10.1155/2015/527395
- 6) Luo Y, D. Yang, M. Ohtsuka, Y. Ishido, N. Ishii, and K. Suzuki. 2015. Detection of *Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense* DNA from a water channel in familial Buruli ulcer cases in Japan. *Future Microbiol* 10: 461-469.
- 7) Sugawara M, N. Ishii, K. Nakanaga, K. Suzuki, Y. Umabayashi, K. Makigami, and M. Aihara. 2015. Exploration of a standard treatment for Buruli ulcer through a comprehensive analysis of all cases diagnosed in Japan. *J Dermatol* 42: 588-595.
- 8) Ishii K, N. Ishii, K. Nakanaga, K. Nakano, I. Saito, and A. Asahina. 2015. *Mycobacterium haemophilum* infection with prominent facial manifestation mimicking leprosy. *J Dermatol* 42: 992-995.
- 9) Murase C, M. Kono, K. Nakanaga, N. Ishii, and M. Akiyama. 2015. Buruli ulcer successfully treated with negative- pressure wound therapy. *JAMA Dermatol* 151: 1137-1139.
- 10) Yotsu RR, C. Murase, M. Sugawara, K. Suzuki, K. Nakanaga, N. Ishii, and K. Asiedu. 2015. Revisiting Buruli ulcer. *J Dermatol* 42: 1033-1041.
- 11) Enomoto Y, M. Oba, N. Ishii, K. Nakanaga, Y. Yagi, H. Hasegawa, Y. Ozawa, T. Matsui, K. Yokomura, and T. Suda. 2015. Rhinosinusitis and disseminated cutaneous infection caused by *Mycobacterium chelonae* in an immunocompromised patient. *J Infect Chemother* 21: 691-694.
- 12) Asakura T, M. Ishii, T. Kikuchi, K. Kameyama, H. Namkoong, N. Nakata, K. Sugita, S. Tasaka, T. Shimizu, Y. Hoshino, S. Okamoto, T. Betsuyaku, and N. Hasegawa. 2016. Disseminated *Mycobacterium marinum* infection with a destructive nasal lesion mimicking extranodal NK/T cell lymphoma. *Medicine (Baltimore)*, 95: e3131. doi: 10.1097/MD.0000000000003131 2016.
- 13) Hatano S, T. Tamura, M. Umemura, G. Matsuzaki, N. Ohara, and Y. Yoshikai. 2016. Recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin expressing Ag85B-IL-7 fusion protein enhances IL-17A-producing innate $\gamma\delta$ T cells. *Vaccine* 34: 2490-2495.
- 14) Tsutsumi R, N. Yamada, Y. Yoshida, K. Nakanaga, N. Ishii, and O. Yamamoto. 2016. Disseminated *Mycobacterium chelonae* infection identified by repeated skin sampling and molecular methods in a patient with rheumatoid arthritis. *Acta Derm Venereol* 96: 132-133.
- 15) Hattori M, S. Motegi, H. Amano, N. Ishii, and O. Ishikawa. 2016. Borderline lepromatous leprosy: Cutaneous Manifestation and type 1 reversal reaction. *Acta Derm Venereol* 96: 422-423.
- 16) Yotsu RR, N. Ishii, and S. Rajagopalan. 2016. Leprosy. Taylor and Kelly's Dermatology for Skin of Color, 2nd Ed, (Kelly AP, Taylor SC ed.) pp469-474, McGraw-Hill Education, New York.

2. 和文発表

- 1) 結城明彦、浅野幸恵、伊藤 薫、中永和枝、石井則久: *Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense* による Buruli 潰瘍の 1 例. 臨床皮膚科 69: 337-342, 2015.

- 2) 四津里英、村瀬千晶、石井則久: 潰瘍を伴う抗酸菌症－Buruli 潰瘍とその病理－. 病理と臨床 33: 862-868, 2015.
- 3) 大橋理加、谷 冨香、辻岡 馨、井上真一、中永和枝、石井則久: *Mycobacterium haemophilum* による皮膚非結核性抗酸菌症の 1 例. 臨床皮膚科 69: 868-872, 2015.
- 4) 石井則久: 総論. 非結核性抗酸菌の基礎と臨床 (藤田次郎、阿部千代治、一山 智、飯沼由嗣、森 享、石井則久編集), p530-532, 医薬ジャーナル社 (大阪), 2015.
- 5) 齋藤 肇、石井則久: *Mycobacterium marinum* 症. 非結核性抗酸菌の基礎と臨床 (藤田次郎、阿部千代治、一山 智、飯沼由嗣、森 享、石井則久編集), p533-547, 医薬ジャーナル社 (大阪), 2015.
- 6) 堀田亜紗、大川智子、石田修一、山口由衣、中永和枝、石井則久、相原道子: 皮膚 *Mycobacterium abscessus* 感染症の 1 例. 皮膚臨床 58: 445-450, 2016.
- 6) Mukai T. S. Srisungngam, J. Rudeeaneksin, S. Sangkitporn, A. Ruch, S. Hamada, Y. Suzuki, M. Matsuoka, and B. Phetsuksiri: Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Mycobacterium leprae*. 50th Anniversary of the U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, 13-14 January 2016. Bethesda, MD, USA.
- 7) Miyamoto Y. T. Mukai, M. Matsuoka, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino: Comprehensive profiling of cellular components: an approach to understanding the characteristic physiology of *Mycobacterium leprae*. 50th Anniversary of the U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, 13-14 January 2016. Bethesda, MD, USA.
- 8) Maeda Y.: Detection of MMP-II antibody coupled to PGL-I antibody in the sera of leprosy patients, facilitate diagnosis of leprosy. 50th Anniversary of the U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, 13-14 January, 2016. Bethesda, MD, USA.
- 9) Maeda Y., Y. Miyamoto, and T. Mukai: Development of kits for measuring antibody titer for the diagnosis of leprosy. The 1st International conference on the control measure of neglected tropical diseases. 7 March, 2016. Lusaka, Zambia.
- 10) Mukai T. S. Srisungngam, J. Rudeeaneksin, S. Sangkitporn, A. Ruch, S. Hamada, Y. Suzuki, M. Matsuoka, and B. Phetsuksiri: Development and evaluation of loop - mediated isothermal amplification for rapid detection of *Mycobacterium leprae*. The 1st International conference on the control measure of neglected tropical diseases. 7 March, 2016. Lusaka, Zambia.

II. 学 会 発 表

1. 国際学会

- 1) Tsukamoto Y., Y. Maeda, T. Tamura, T. Mukai, Y. Miyamoto, and M. Makino: 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. 4th Global Forum on TB vaccines, 21-23 April 2015. Shanghai, China.
- 2) Ishii N.: Introduction. Symposium “Cutaneous TB and Atypical Mycobacterioses”. 23rd World Congress of Dermatology, 8-13 June 2015. Vancouver, Canada.
- 3) Ishii N.: Atypical mycobacterioses. Symposium “Cutaneous TB and Atypical Mycobacterioses”. 23rd World Congress of Dermatology, 8-13 June 2015. Vancouver, Canada.
- 4) Tsukamoto Y., Y. Maeda, T. Tamura, T. Mukai, S. Mitarai, S. Yamamoto, and M. Makino: Development of recombinant BCG utilizing major membrane protein (MMP)-II . 50th Anniversary of the U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, 13-14 January 2016. Bethesda, MD, USA.
- 5) Shimohakamada Y., T. Tamura, and M. Umemura: Enhancing effect of Peptide-25 on the induction of functional activation of CD8 cytotoxic T lymphocytes. 50th Anniversary of the U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, 13-14 January 2016. Bethesda, MD, USA.
- 1) 村瀬千晶、河野通浩、松本高明、横田憲二、長谷川佳恵、中永和枝、石井則久、秋山真志: 日本におけるブルーリ潰瘍の疫学と新規治療法の提唱. 第 114 回日本皮膚科学会総会. 2015 年 5 月 横浜市
- 2) 鶴飼佳子、杉本俊郎、川内康弘、大井綱郎、藤井紀和、中西健史、石井則久: 日本で発症したフィリピン人の BL 型ハンセン病の 1 例. 第 114 回日本皮膚科学会総会. 2015 年 5 月 横浜市

2. 国内学会

- 3) 松岡正典、黒尾和久、甲斐雅規、北原 誠: 特別病室(重監房)跡地の土壌からのらい菌 DNA の検出. 第 88 回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2015 年 6 月 高松市
- 4) 北原 誠、黒尾和久、松岡正典、甲斐雅規: 特別病室(重監房)跡地の基礎調査と保全対策. 第 88 回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2015 年 6 月 高松市
- 5) 天児和暢、飯田健一郎、齋藤光正、甲斐雅規、松岡正典、吉田真一: らい菌増殖に於ける globi 形成の意義. 第 88 回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2015 年 6 月 高松市
- 6) 前田百美、田村敏生、向井 徹、牧野正彦: らい菌感染細胞が放出するエキソソームの機能解析. 第 88 回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2015 年 6 月 高松市
- 7) 森 修一、田中丹史、廣野喜幸: 台湾でのハンセン病解放医療の進展に関する研究. 第 88 回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2015 年 6 月 高松市
- 8) 瀬川将広、森 修一、横田 隆: 東北新生園における「社会復帰研究会」の活動について(第二報). 第 88 回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2015 年 6 月 高松市
- 9) 森山一隆、森 修一: 奄美大島での小笠原 登に関する研究. 第 88 回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2015 年 6 月 高松市
- 10) 向井 徹、松岡正典、宮本友司、牧野正彦: ハンセン病病原菌 *Mycobacterium lepromatosis* の簡易判別法の開発. 第 88 回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2015 年 6 月 高松市
- 11) 福富康夫: マクロファージの抗らい菌活性発現機構のヒトマウス間の比較—ヒトハンセン病において IFN γ はマクロファージの抗らい菌活性を誘導するサイトカインとして機能しているのか—. 第 88 回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2015 年 6 月 高松市
- 12) 高濱英人、村井見華、中永和枝、石井則久: 健康女性に皮膚潰瘍を多発した皮膚 *Mycobacterium abscessus* 感染症の 1 例. 第 31 回日本臨床皮膚科会総会・臨床学術大会. 2015 年 6 月 網走市
- 13) 水野雄貴、伊藤 満、周 円、清島真理子、中山麻美、山内雅裕、石井則久: 滞日東チモール人にみられた多菌型ハンセン病の 1 例. 第 272 回日本皮膚科学会東海地方会. 2015 年 6 月 名古屋市
- 14) 石井則久: 皮膚非結核性抗酸菌症. 第 66 回日本皮膚科学会中部支部学術大会. 2015 年 10 月 神戸市
- 15) Tsukamoto Y. and T. Tamura: Improvement of *Mycobacterium bovis* BCG as a vaccine against tuberculosis by the usage of proteolysis-inducing signal. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会. 2015 年 11 月 札幌市
- 16) 梅村正幸、福井雅之、山崎雅俊、福井知穂、照屋尚子、田村敏生、中江 進、岩倉洋一郎、松崎吾朗: マイコバクテリア感染肺における IL-17 サイトカイン・ファミリーの防御能の相違. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会. 2015 年 11 月 札幌市
- 17) 下袴田陽子、田村敏生、梅村正幸: The role of IL-21 producing and non-producing follicular helper T cells in mycobacterial infection. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会. 2015 年 11 月 札幌市
- 18) 田村敏生、下袴田陽子、梅村正幸: Enhancing effect of Peptide-25 on the induction of functional activation of CD8 cytotoxic T lymphocytes. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会. 2015 年 11 月 札幌市
- 19) 甲斐雅規: らい菌日本株のゲノム解析. 第 49 回日本無菌生物ノートバイオロジー学会. 2016 年 1 月 仙台市
- 20) 上條宏章、青笹尚彦、五十棲 健、中永和枝、石井則久: 左前腕に生じた *Mycobacterium marinum* による非結核性抗酸菌症の 1 例. 第 79 回日本皮膚科学会東京・東部支部合同学術大会. 2016 年 2 月. 新宿区
- 21) 海野俊徳、久保仁美、夏目岳典、塚原恵子、天野芳郎、岩澤幹直、中永和枝、石井則久: 広範囲のデブリードメントを行った小児の *Buruli* 潰瘍の 1 例. 第 79 回日本皮膚科学会東京・東部支部合同学術大会. 2016 年 2 月 新宿区
- 22) 石井則久、四津里英: 日本におけるハンセン病新規患者の動向. 日本皮膚科学会第 76 回沖縄地方会. 2016 年 2 月 中頭郡
- 23) 天児和暢、飯田健一郎、齋藤光正、甲斐雅規、小椋義俊、吉田真一、林 哲也: らい菌増殖に於ける globi 形成の意義. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016 年 3 月 大阪市