

## 日本財団補助金による

# 1999年度日中医学協力事業報告書

－調査・共同研究に対する助成－

2000年3月13日

財団法人 日 中 医 学 協 会  
理事長 中 島 章 殿

研究代表者氏名 柏原嘉子   
所属機関名 国立感染症研究所  
ハンセン病研究センター  
職 名 病原微生物部長 年 齢 60歳  
所 在 地 〒189-0002 東京都東村山市青葉町  
4-2-1  
電話 042-391-8211 内線 22

### 1. 研究課題

らい菌の型別に関する研究

2. 研究期間 自 1999年4月1日～ 至 2000年3月15日

### 3. 研究組織

日本側研究者氏名 柏原嘉子 (60歳)  
所属機関 国立感染症研究所 ハンセン病研究センター 職名 部長

中国側研究者氏名 呉勤学 (62歳)  
所属機関 中国医学科学院皮膚病研究所  
中国協和医科大学 職名 教授/研究員

### 4. 研究報告

別添書式を参考に、報告本文 4000 字以上で作製して下さい (枚数自由・ワープロ使用)

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録等を添付して下さい。

論文発表に当たっては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

# 研 究 報 告

研究テーマ： らい菌の型別に関する研究

研究代表者氏名	柏 原 嘉 子
所 属	国立感染症研究所 ハンセン病研究センター
役 職	病原微生物部長

## 要旨：

ハンセン病の病原体であるらい菌に関して、感染源の特定や感染経路の解析に必須な分離株間の識別に有効な生物学的特質についての報告はほとんどない。分離株間でらい菌の遺伝子発現調節に関与する *rpoT* 遺伝子の構造の差異を認め、多数の分離株で調べた結果、らい菌が2つの遺伝子型に分けられること、またその分布に偏りがあることを明らかにした。中国各地からの分離株について検索した結果、日本本土・韓国に分布する型は中国北東部に、沖縄・アジア等に広く分布する型は中国南西部に分布が偏る傾向が認められた。2つの遺伝子型の分布は、わが国へのらい菌の渡来に2通りの伝播経路を推測させた。

KEY WORDS: *Mycobacterium leprae*, genotype, *rpoT* gene

## 目的：

ハンセン病は *Mycobacterium leprae* による慢性感染症で、アジア・ラテンアメリカ・アフリカでは現在なお公衆衛生上重要な疾患である。世界では、WHO をはじめとし、多剤併用化学療法によるハンセン病制圧に向けての取り組みが精力的に行われている。しかし、毎年50万人を上回る新患発生は減少傾向を示さないばかりか、近年増加傾向さえ示している。ハンセン病制圧には適切な化学療法、ワクチンによる予防、化学予防に加えて感染源や感染経路の同定とその除去が不可欠である。そのためには各症例の原因菌の異同を識別する方法の確立が求められている。ハンセン病は非常に長い潜伏期を経て発症し、また原因菌であるらい菌が人工培養不可能であるため、感染源を特定することが極めて困難である。これまで制限酵素多型(RFLP)その他の感染症原因菌で汎用されている方法でらい菌分離株の異同を識別する試みが成されてきたが、現在まで目的にかなう実用的方法の報告はない。

報告者らはらい菌の遺伝子多型に基づくらい菌の型別を意図して、由来を異にする

らい菌の遺伝子を比較した結果、らい菌の *rpoT* 遺伝子内に6塩基からなる繰り返し配列の数に差を認めた。わが国及び韓国からの分離株について検討した結果、この配列を3個持つ菌と4個持つ分離株が存在すること即ちらい菌が *rpoT* 遺伝子の型により2群に分けられること、またその分布に偏りが有ることを明らかにした。

本研究の目的は、中国のらい菌分離株について *rpoT* 遺伝子型を検索、遺伝子型の分布を調べ、わが国、韓国、並びにアジア諸国を中心とするその他の地域からの分離株の遺伝子型と比較し、この型別法の有効性を検証すると共に、らい菌のグローバルな伝播経路を推定することにある。

方法：

らい菌分離株とゲノム DNA の調製：

分離株には臨床から直接得たもの、ヌードマウスで継代した株、パラフィン包埋標本中のらい菌を含む。中国各地からは46例のハンセン病患者由来組織のパラフィン包埋標本を集めた。

凍結あるいはアルコール浸漬生検材料、皮膚擦過材料は細碎し、生食中で懸濁、遠心分離でらい菌を精製後、proteinase K および Tween 20 含有緩衝液に懸濁後凍結融解により DNA を遊離、常法に従い、またパラフィン包埋標本からは切片 (5 μm 厚) 3から5枚を用い、DEPAD (タカラ酒造製)により鋳型 DNA を調製した。

PCRおよび塩基配列決定：

*rpoT* 遺伝子の構造の差異が認められる領域を含む300塩基対の DNA 断片をPCR法で増幅、増幅産物の塩基配列を BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction キット (Perkin-Elmer Applied Biosystem 社製) を用いて決定した。塩基配列の解析は DNASIS プログラム (Hitachi Software Engineering 製) を用いた。

電気泳動：

*rpoT* 遺伝子内差異を簡易迅速に検出するために、標的部位内の更に短い断片を増幅しうるプライマーを設計し、97あるいは91塩基対の断片をPCR法で増幅し、4%MetaPhor アガロース (FMC Bioproducts 製) で電気泳動を行い、97塩基対の断片を生じる型 (4型、繰り返し配列を4個持つ型) と91塩基対の断片を生じる型 (3型、繰り返し配列を3個持つ型) の簡易検出法を確立した。

結果：

#### 1. 分離株間での *rpoT* 遺伝子の塩基配列

これまでに、マウスでの増殖速度の異なるらい菌分離株間で、結核菌や *M. smegmatis* において遺伝子の発現調節に関与することが報告されている *sigA* 遺伝子と高い相同性を有するらい菌の *rpoT* 遺伝子内に6塩基対からなる繰り返し構造の数に差異の有ることを認めた (Fig. 1)。 *rpoT* 遺伝子内の差異について地理的に異なる地域からの分離

株について検索した結果、らい菌が2群に分類可能で有ることが示された。即ち、1群は繰り返し構造を4個有し、他の1群は3個有した。575のアミノ酸をコードする *rpoT* 遺伝子の全長を比較したが、上流、下流領域を含む1900塩基対の中で、6塩基対の繰り返し構造のみが分離株間で差異を示すものであった。これらの分離株がらい菌であることは Plikytis らの方法により、*groEL* 遺伝子内のらい菌特異的配列の存在をPCR法で確認した。

## 2. *rpoT* 遺伝子構造の差異による2つの遺伝子型の簡易検出

2つの遺伝子型の簡易検出を目的として、*rpoT* 遺伝子の標的部位内にプライマーを設定、各型を区別可能にする91あるいは97塩基対のDNA断片を増幅し、4% MetaPhor アガロースによる電気泳動を行った。Fig. 2 に示すように2つの遺伝子型を示す各バンドは明瞭に分離された。各バンドはアガロースゲルより回収後、塩基配列を決定し、*rpoT* 遺伝子内の当該部位由来であることを確認した。

## 3. わが国のらい菌分離株の *rpoT* 遺伝子型

日本人から分離されたらい菌分離株25例について *rpoT* 遺伝子型別を調べた結果を Fig. 3 に示す。図から明らかなように繰り返し構造を3個有する3型と4個有する4型の2つの遺伝子型が検出されたが、その分布は際だった偏りを示した。即ち、沖縄からの分離株は全て3型であったのに対し、本土からの分離株は殆どが4型であった。3型を示した3例中の1例は日系ブラジル人由来のものであった。

## 4. 韓国からのらい菌分離株の遺伝子型

韓国からのらい菌分離株に関しても同様に *rpoT* 遺伝子型の分布を検索した。結果を Fig. 4 に示す。2つの遺伝子型が検出されたが、33例中25例が4型、3型は8例と、4型が多いというわが国本土と類似のパターンを示した。

## 5. 中国のらい菌分離株の *rpoT* 遺伝子型

46のパラフィン包埋標本から得られた鋳型DNA標品を用いてPCRを行った結果、28例で目的とするDNA断片が増幅され、2つの遺伝子型が検出された。中国における遺伝子型分布を Fig. 5 に示す。3型がやや多く検出されたが、南部では全て3型、北東部では4型の頻度が高い傾向が認められた。

## 6. その他の地域からのらい菌分離株における遺伝子型

アジア、ラテンアメリカからの分離株およびヒト以外に由来するらい菌分離株について、バングラデシュ(3例)、インド(1例)、インドネシア(5例)、ネパール(1例)、パキスタン(1例)、フィリピン(2例) タイ(4例)、ブラジル(3例)、ハイチ(1例) および各1例ずつのマンガベイザル(ナイジェリア)、アルマジロ(アメリカ、ルイジアナ)由来のらい菌分離株について *rpoT* 遺伝子型を検索した。その結果、これらの地域からの分離株は調べた範囲で全ての株が3型を示した。アルマジロ及びマンガベイザル由来のらい菌も3型を示した。(Fig.6)

考察：

非常に顕著な所見は日本本土に見られるらい菌の遺伝子型（4型）が韓国及び中国の北東部に偏って分布していることである。この分布の偏りの理由に関しては現段階では不明である。同様な遺伝子型の偏った分布は *Helicobacter pylori* においても認められている。*H. pylori* についての分子疫学的研究から日本と韓国から分離される *H. pylori* 分離株は殆ど全てが *cag*<sup>+</sup> であるのに対し、世界の他の地域からの分離株の30-40%は *cag*<sup>-</sup> である。またアジア諸国からの *H. pylori* 株はコーカソイドから分離される株と異なることが塩基配列を基に報告されている。*H. pylori* においては遺伝子型の特異的分布は人類の移動に関連すると想定されている。今回認められたらい菌における遺伝子型分布の偏りも人類の移動に関連している可能性が考えられる。考古学的研究から、日本人形成過程で弥生人は中国・韓国を経て日本に渡来し、先住の縄文人と置き換わっていったとされている。

少なくとも本土に広く分布する4型のらい菌は中国北東部から韓国を経て我が国に伝播してきた可能性が示唆される。

一方、沖縄、奄美での分離株は本土の分離株と遺伝子型が異なり、中国南部やアジア、ラテンアメリカからの分離株で見られる3型を示した。歴史的に沖縄は19世紀まで独立国家として、日本本土よりも中国南部や東南アジア諸国と密接な交流を保っていた。沖縄・奄美で検出されるらい菌が本土で検出されるらい菌と遺伝子型を異にしているのはこれら地域へのらい菌の渡来は中国南部やアジア諸国を経由したものと推測される。

今回28の中国各地からのらい菌分離株について *rpoT* 遺伝子型を調べることができたが、らい菌のグローバルな伝播経路を明らかにするためには、中国国内の異なる地方からのより多数のらい菌分離株で *rpoT* 遺伝子型の分布を調査する必要がある。

*rpoT* 遺伝子型で3型を示すらい菌は世界に広く分布していた。感染経路や感染源解析のための疫学調査にはより細分化を可能にする遺伝子型別法の開発が必要である。Fshih と Cole は8例の分離株（臨床分離株 5例、アルマジロ継代株 3例）を用いてらい菌の *poIA* locus に遺伝子多型性があると報告している。我々は彼らの方法に従い、*rpoT* 遺伝子型で3型あるいは4型を示す分離株について *poIA* locus の多型性を検討したが、いずれも同一のタイプを示した。

らい菌分離株間の遺伝的多型性の探索にこれまで多くの試みが成されてきたが、分離株間の相違を明快に識別し疫学調査に利用可能な遺伝的多型性に関してはこの *rpoT* 遺伝子多型性以外報告がない。今回中国、韓国及びアジア・ラテンアメリカ等世界の異なる地域からの分離株で *rpoT* 遺伝子多型性が認められ、またその分布の偏りかららい菌のグローバルな伝播経路を推察する道具になる可能性が示唆された。

*rpoT* 遺伝子の3型と4型の生理的意義とその分布の偏りに関しても今後の研究課題と考える。

文献

1. Plikaytis, B.B., Gelber, R.H., Shinnick, T.M. (1990)  
Rapid and Sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. J. Clin. Microbiol. 28: 1913-1917.
2. Achtman, M., Azuma, T., Berg, D.E., Ito, Y. Morelli, G., Pan, Z.J., Suerbaum, S., Thompson, S.A., van der Ende, A., van Doorn, L.J. (1999)  
Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. Mol. Microbiol. 32: 459-470.
3. van der Ende, A., Pan, Z.aj., Bart, A., van der Hulst, R.W.M., Feler, M., Xiao, S.D., Tytgat, G.N.J., Dankert, J. (1998)  
*cag-A*-positive *Helicobacter pylori* population in China and the Netherland are distinct. Infect. Immun. 66: 1822-1826.
4. Covacci, A., Telford, J.L., Giudice, D.G., Porsonnet, J., Rappuoli, R. (1999)  
*Helicobacter pylori*: virulence and genetic geography. Science 284: 1328-1333.
5. Fsihi, H., Cole, S.T. (1995) The *Mycobacterium leprae* genome: systematic sequence analysis identifies key catabolic enzymes, ATP-dependent transport systems and a novel pol A locus associated with genomic variability. Mol. Microbiol. 16: 909-919.

謝辞：韓国からのらい菌分離株をご提供いただいた Dr. Gue-Tae Chae(Institute of Hansen's Disease, College of Medicine, The Catholic University of Korea)をはじめ、世界各地からの分離株の供与にご協力頂いた国内外の諸先生に謝意を表します。また、国立感染症研究所ハンセン病研究センターの松岡正典、前田伸司、甲斐雅規、前田百美、橋本研が共同研究者としてこの研究の推進に携わった。

## Legends for Figures

Fig. 1. Sequence alignment of DNA fragment corresponding from 541 to 585 (for 4 tandem repeats) or 541 to 579 (for 3 tandem repeats) of the *rpoT* gene from *Mycobacterium leprae* isolates.

Sequences from 7 isolates and the reference (from Database, accession no. U15181) are shown.

Fig. 2 Genotype detection by electrophoresis in agarose.

Five  $\mu$ l of PCR products were electrophoresed in 4% Meta Phor™ agarose and then stained with ethidium bromide. Samples were lane 1, Kagoshima (Japan); lane 2, Kanazawa (Japan); lane 3, Korea-1; lane 4, Thai 53; lane 5, Okinawa-1 (Japan); lane 6, PHS-3 (Mangabey monkey); lane 7, PHS-4 (Armadillo) and lane 8, the DNA size marker of 50 bp ladder.

Fig. 3 Distribution of two genotypes of *M. leprae* in Japan.

● : *M. leprae* with 3 repeats in the *rpoT* gene; ○ : *M. leprae* with 4 repeats in the *rpoT* gene.

Fig. 4 Distribution of two genotypes of *M. leprae* in Korea.

● : *M. leprae* with 3 repeats in the *rpoT* gene; ○ : *M. leprae* with 4 repeats in the *rpoT* gene.

Fig. 5 Distribution of two genotypes of *M. leprae* in China.

● : *M. leprae* with 3 repeats in the *rpoT* gene; ○ : *M. leprae* with 4 repeats in the *rpoT* gene.

Fig. 6 Distribution of two genotypes of *M. leprae* in the world.

● : *M. leprae* with 3 repeats in the *rpoT* gene; ○ : *M. leprae* with 4 repeats in the *rpoT* gene.

Fig. 1

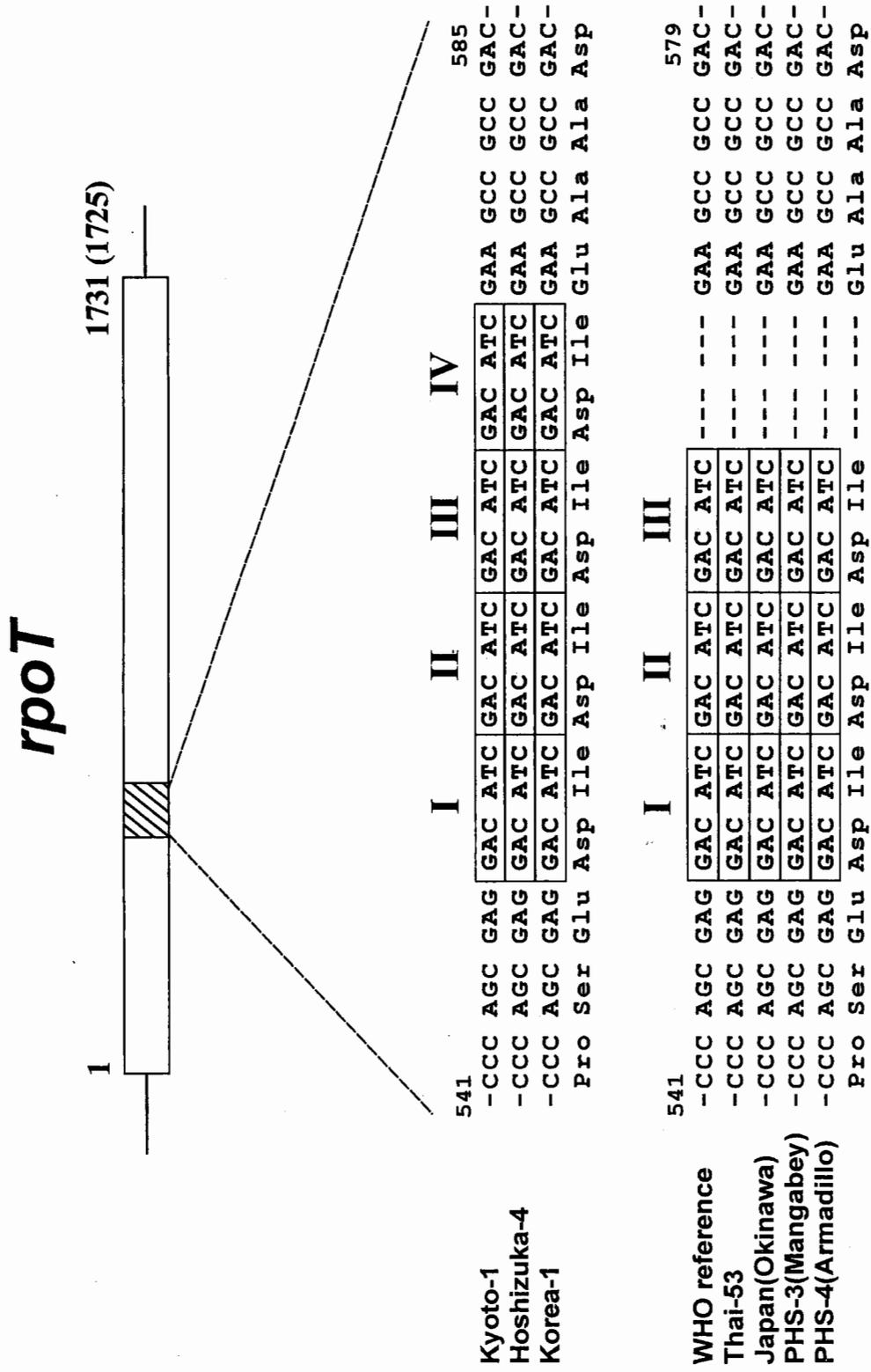


Fig. 2

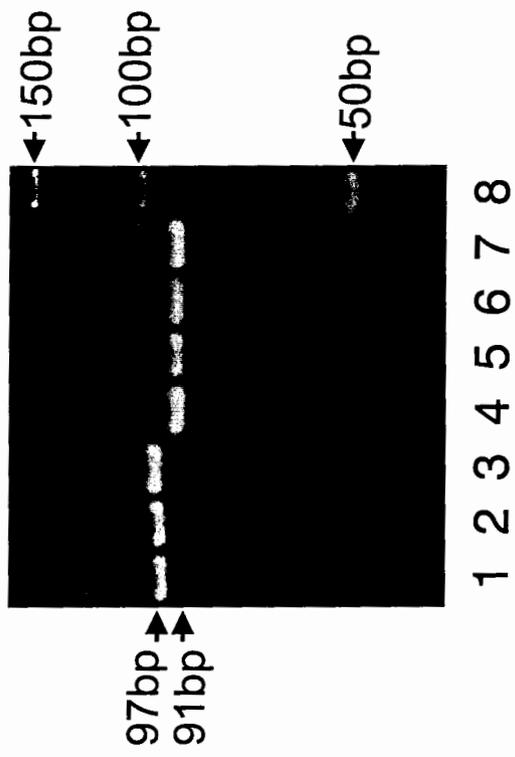


Fig. 3

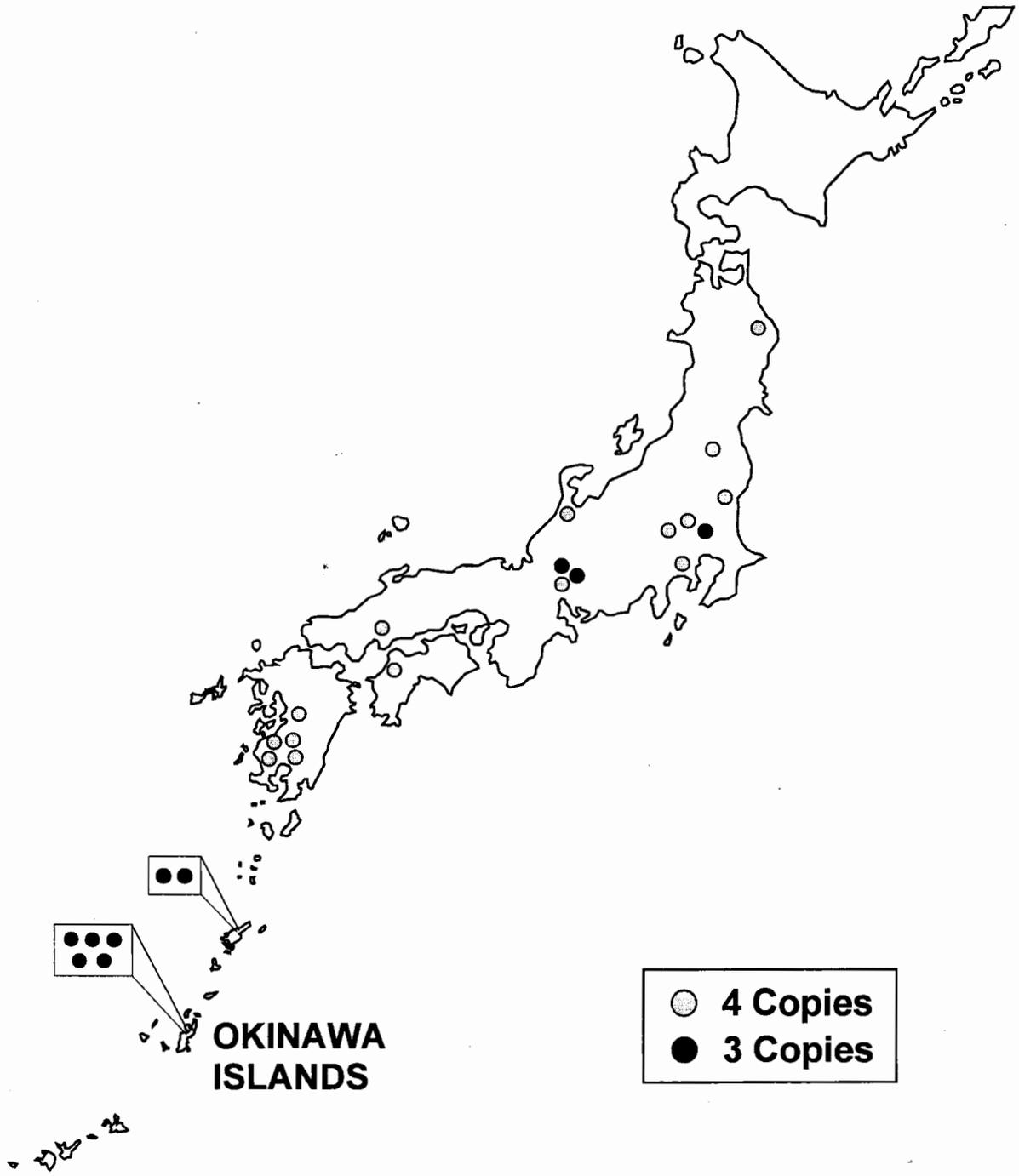


Fig. 4

