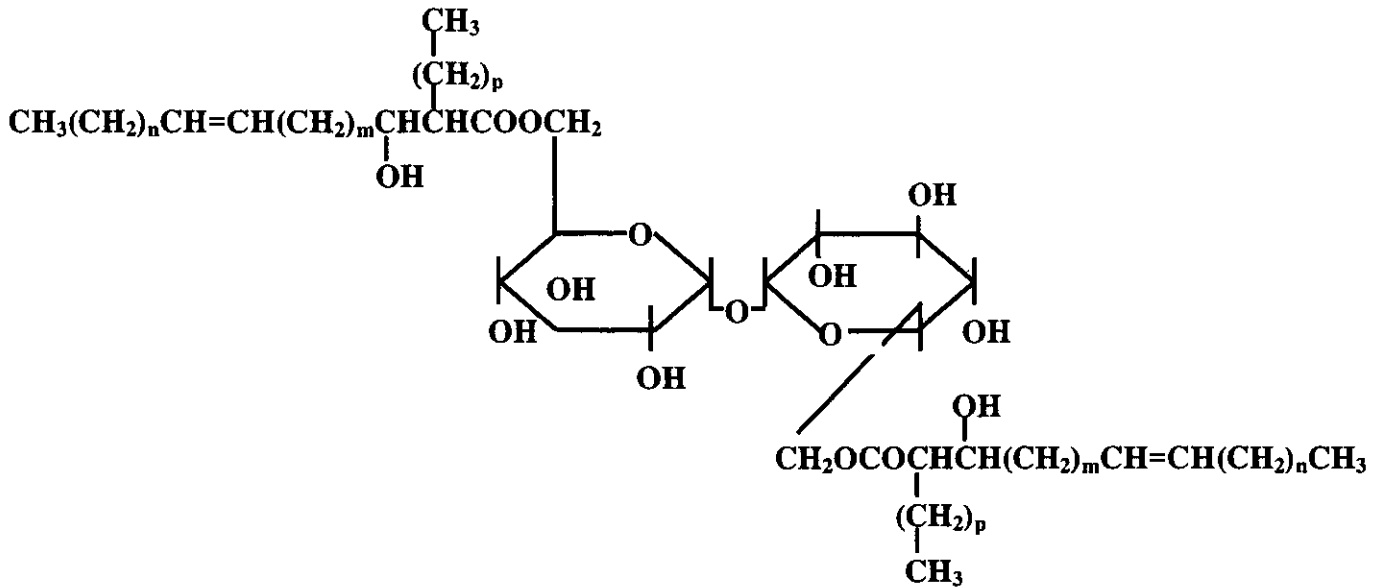


図1 抗酸菌細胞壁成分

TDM (Trehalose-6,6'-dimycolate)



TMM (Trehalose-monomycolate)

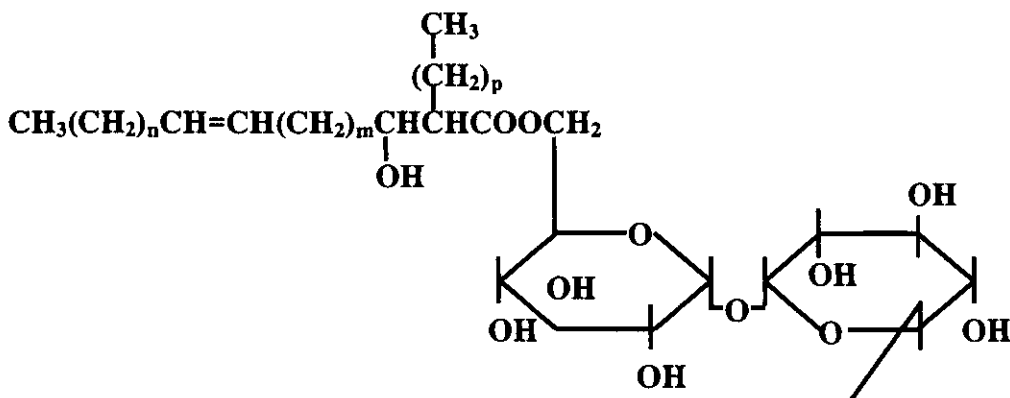


図2 TDM 及び TMM の一般的な構造

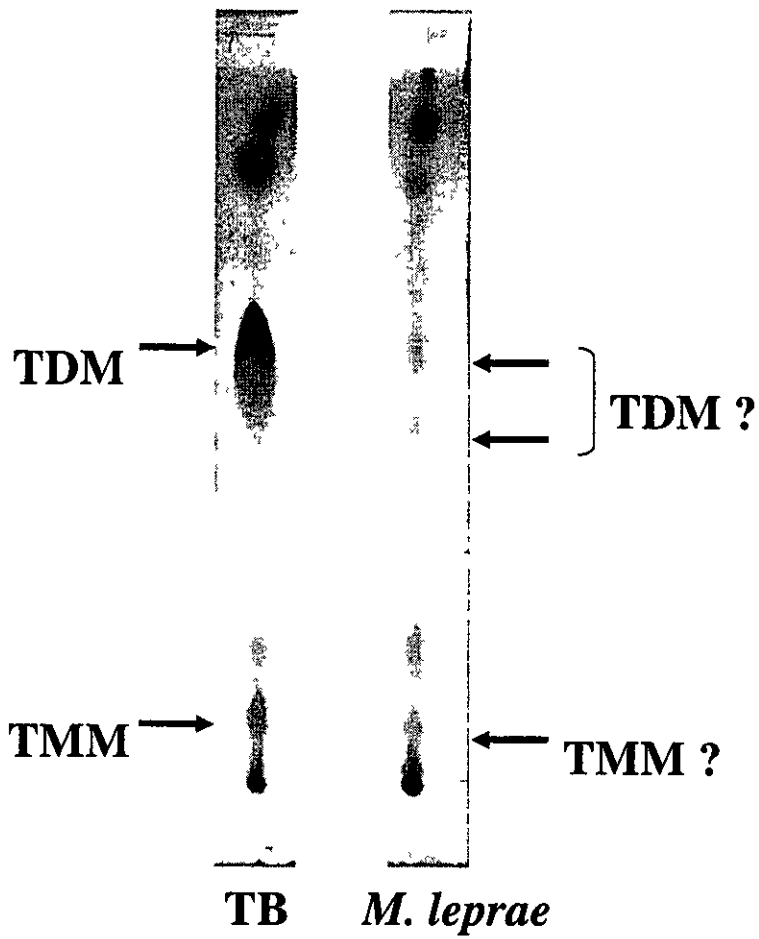


図3 薄層クロマトグラフィーによる
らい菌糖脂質解析

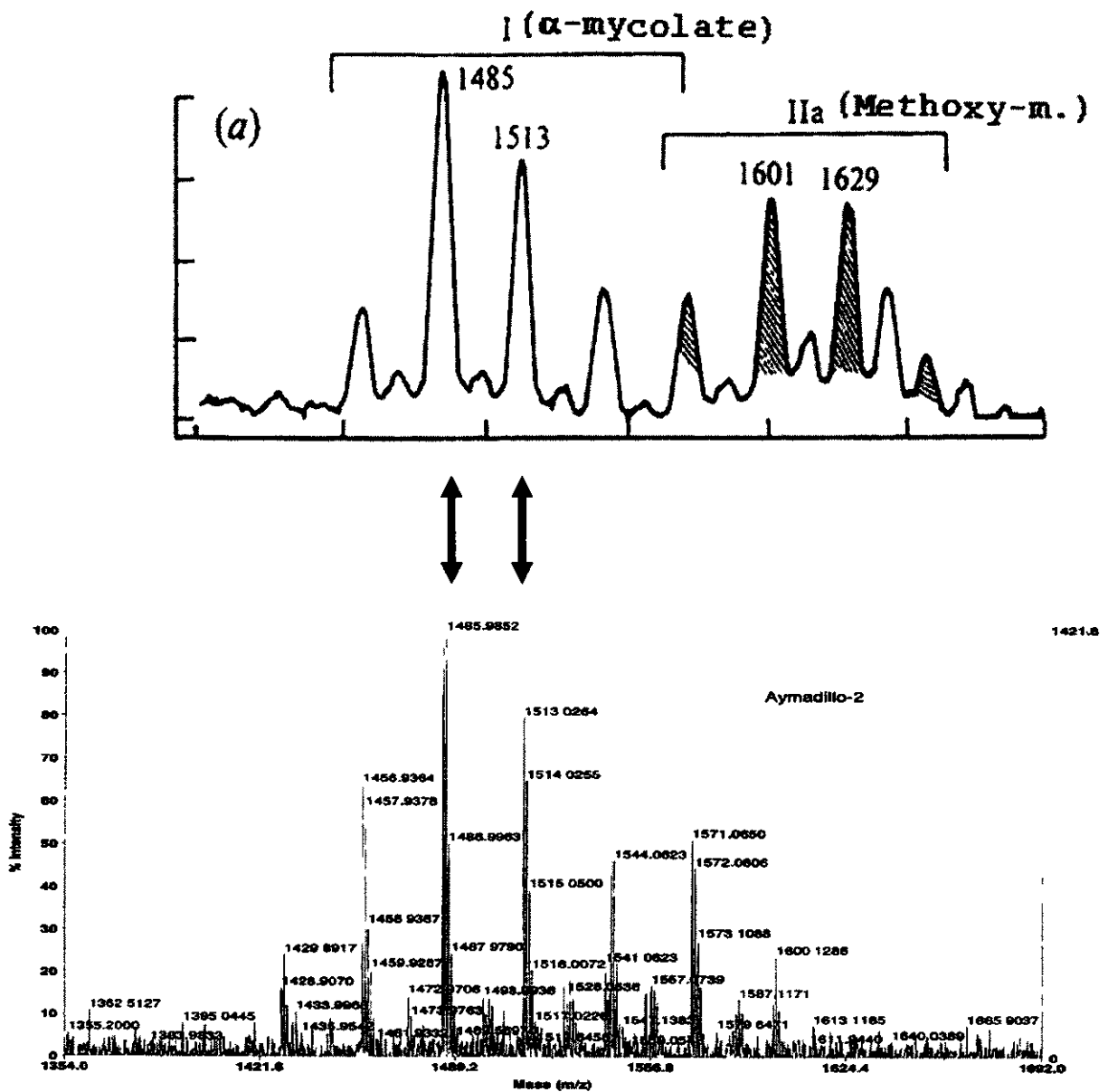


図4 らい菌より抽出した TMM (下段) と半合成 TMM (上段) の質量分析パターンの比較

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

らい菌の型別とハンセン病の分子疫学

平成 15 年度 分担研究報告書

分担研究者 松岡 正典

（国立感染症研究所 ハンセン病研究センター）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

らい菌の型別とハンセン病の分子疫学

分担研究者 松岡正典 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 室長
研究協力者 中田 登 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 研究員

研究要旨

ハンセン病の新たな感染を防止し、抜本的ハンセン病対策の構築に資することを目的として、流行地域における住民、感染者からのらい菌の遺伝子多型を TTC リピートにより比較し、従来言われてきたような家族内多菌型患者との濃厚接触が唯一の感染様式であるか否かを検証した。同一住居に居住する家族間、あるいは同一家族内での患者間において異なる遺伝子型のらい菌が見出され、同居する多菌型患者以外からの感染が示された。らい菌株間で相違を示す新たなゲノム DNA 領域を見出すため GCACCT リピートについてらい菌分離株の 31 株でそのコピー数を決定し比較した結果、5、6、7、8、10 コピーの 5 種が存在した。GCACCT リピートによる分類により、既報の *rpoT* 遺伝子内の GACATC リピート、および *ML2344-ML2345* 間の TTC リピートでは区別不可能な菌株についても型別分類可能であることが示された。

A. 研究目的

耐性菌の出現の防止と多菌型患者の治療による感染源を目的とした多剤併用療法が導入されて 20 年あまりが過ぎたが、新規感染者数の減少は見られず、多菌型患者が唯一の感染源とみなした対策には矛盾があることが考えられた。ハンセン病の感染経路を解明することにより、抜本的な新たな感染阻止策の構築に資する為にハンセン病の高有病率を示す地域の住民、患者からのらい菌の型別を行って、それらの感染源の解明を行った。また、らい菌株間で相違を示す新たなゲノム DNA 領域を見出し、型別分類への応用を検討するため、ゲノム DNA 上の様々なタンデムリピートについて株間における比較を行った。

B 研究方法

I 分子疫学。感染様式解明および疫学解析における TTC 遺伝子多型による型別の有用性 らい菌遺伝子中の TTC 塩基配列繰り返し数の多型性 (TTC-RV) によるらい菌の型別法の疫学解析への有用性を検討するために 11 研究室維持株についてその多型性と継代中におけるその安定性を調べた。凍結保存したハイオプシー検体および 1 代から 11 代までのそれぞれ世代を異にするヌードマウス継代材料より定法により template DNA を作成し、TTC-RV 領域を含む約 130 塩基の PCR 産物を得た。その塩基配列をダイレクトシーケンスにより決定し、繰り返し数を比較した。

インドネシア共和国の北 Maluku のハンセン病流行地域の 2 集落から得た住民の鼻粘膜材料に存在するらい菌の TTC-RV による遺伝子型別を行い、個々の住居に同居す

る住民のそれぞれの遺伝子型の分布を調べた。検査対象は5歳以上を対象とした。それぞれLおよびG集落の人口、世帯数、検体数、有病率および住民の鼻粘膜におけるらい菌の保有率は以下のとおりであった。集落L 434名、77世帯、277検体、3.3%、25.2%。集落G 509名、105世帯、353検体、4.0%、28.2%。滅菌綿棒により鼻粘膜表面を擦り、得られた材料よりtemplateを作成した。PCR産物のシーケンスによりTTC-RVを検討した。

北 Sulawesi 地方の同一家族内に複数の感染例が存在する5家族のハンセン病症例について患者の病変部よりハイオプシーにより感染らい菌を得、その遺伝子型を比較し、家族内感染例に分布するらい菌のTTC-RV遺伝子型の異同を検討した。

II らい菌ゲノムの多様性。既報のらい菌TN株のゲノムDNA配列よりコンピュータソフトウェアを用いてタンDEMリピートを検索した。該当領域のうち37箇所に関して、らい菌Thai-53株のコスミトクローンDNAを用いて塩基配列を決定しTN株と比較した。

(倫理面の配慮)

本研究の実施は所属機関の倫理委員会の承認を得て行われた。検体採取においては、研究の目的・意義について説明し、同意が得られた場合にのみ材料の提供を受けた。

C 研究結果

ヌードマウスにより維持された11株についてTTC-RVを検討した結果、株間では異なるTTCコピー数を示した。9コピー2株、10コピー3株、11コピー3株、13コピー1株、14コピー1株、16コピー1株であり、らい菌の型別への応用が可能であった。ハイオプシー材料と1代から11代のヌートマ

ウス継代株間について同一株では9、10、11、13、14、16コピーのそれぞれの株のコピー数に変化が無く長期間安定であることが示され、安定性と保存性の両条件からTTC-RVにより疫学解析が可能であることが示された。

北 Maluku のL集落住民の鼻粘膜から得たらい菌については37軒の住居に住む52名の検体がPCR陽性であり、TTC-RVの解析が可能であった。G集落の検体は31軒の49例が解析可能であった。L集落では12軒の住居で2名以上が陽性を示した。そのうち11軒の住居の住民の鼻粘膜に異なるTTCコピー数のらい菌が存在することが示された。G集落では8軒が複数の家族の陽性例があり、そのうち5軒において同一家族内で異なるTTCコピー数が分布することが示された。

同一家族内に複数の感染例が存在する5家族のハンセン病症例のらい菌のTTCコピー数は以下のとおりであった。症例1 10、10 症例2 18、10 症例3 13、13、13、13、13、13 症例4 8、8 症例5 12、12、14。検査した5家族の家族内複数感染症例中2例に明らかに異なるTTCコピー数を有するらい菌が存在した。症例2の18コピーのらい菌は父親から10コピーのらい菌はその息子からのもので、症例5のらい菌は3兄弟のハンセン病感染例からのらい菌であった。

これまでに構築したらい菌Thai-53株ゲノムDNAの整列クローンライブラリを用い、ゲノムDNA中のリピートについて既報のTN株と比較検討した結果、37箇所のうち19箇所てTN株とのコピー数の相違が見られた。このうち10カ所は遺伝子-遺伝子間、6カ所は偽遺伝子内、3カ所は遺伝子内に存在するリピートであった。ML1505遺伝子内

の GCACCT リピートについて、タイ、インドネシア、フィリピン、韓国、日本で得られたらい菌臨床分離株 31 株より当該領域を PCR にて増幅後塩基配列を決定し比較したところ、株により様々なコピー数を示すことがわかった (表 1)。

国	コピー数					計
	5	6	7	8	10	
タイ	-	3	-	-	-	3
インドネシア	-	1	-	-	-	1
フィリピン	-	-	7	1	-	8
韓国	-	-	1	-	-	1
日本	1	12	2	2	1	18

表 1 らい菌臨床分離株での GCACCT リピートのコピー数

そこで、日本国内で分離されたらい菌臨床分離株のうち、従来の *rpoT* 遺伝子内 GACATC リピートおよび *ML2344-ML2345* 間の TTC リピートの比較で区別不可能な株 5 株について、GCACCT リピートのコピー数を比較したところ、3 株は同じコピー数を示したが、2 株がコピー数を異にすることが示された (図 1)。

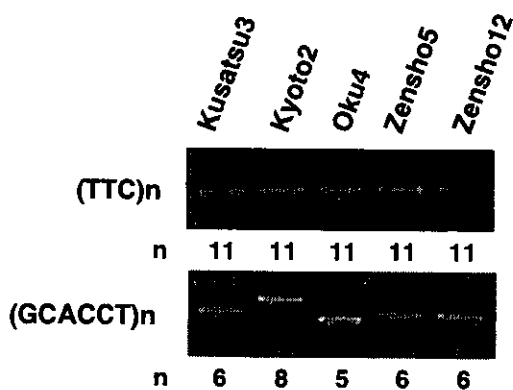


図 1 TTC リピートにおいて同一コピー数を示す分離株の GCACCT リピートのコピー数

一方、リピートの安定性を評価するため、同一の分離株でヌートマウスでの継代数の異なる菌体試料におけるリピートの比較を Kyoto-1 株、Zensho-2 株、Thai-53 株の 3 株について行った。その結果全ての株において継代数の違いによる GCACCT リピートのコピー数に違いは見られなかった。

D 考察

これまでハンセン病の主たる感染様式は家族内の多菌型患者との濃厚接触によると説明され、現行の WHO による多剤併用療法は感染者の治療と同時に多菌型患者の治療による感染源の除去とそれによる新たな感染の防止も併せて目的としている。その一方、世界の新規感染例の発見数は一向に減少を見ていない。感染源と推察される症例と感染を受けたとされる症例の間で菌の異同についての細菌学的な検証は無く、また家族内に患者がある場合の感染率は優位に高いものの家族内接触などの濃厚接触歴が明らかな感染例は全新患例の 15% であったとするアフリカでの調査結果があり、家族内濃厚接触が主たる感染様式ではないことが示唆されている。

感染症の伝播様式の解明のためにはその原因となる微生物の型別が必須の手段となるか、らい菌の型別については phenotype, genotype ともに多型性が極めて乏しく、ごく最近までその手段が無かった。2000 年に *rpoT* 遺伝子中 6 塩基繰返し数の違いにより 2 群に分類可能であることが筆者らにより報告され、また遺伝子中の他の部位には TTC 3 塩基の繰返しがあり (TTC-RV)、株によりその数が異なることが報告された。らい菌は TTC 繰返し配列を 10 から 37 コピー有するものがあることが示されたことから、この多型性を応用して感染源の解明を行う

ことを意図した。

TTC コピー数が頻繁に変化する場合には疫学解析に用いることには妥当性を欠くか、ヌードマウスで継代の後、11 代を経ても同じコピー数が示されたことから、それぞれのらい菌における TTC 3 塩基配列のコピー数は安定して保存され、疫学解析に有用であると考えられた。

本研究では仮に同一家族内の多菌型患者が唯一の感染源であるとしたならば、同一住居に居住する家族あるいは同居人からは同一の遺伝子型のらい菌が分離されるはずであるという作業仮説に基づいてハンセン病流行地域の住民に分布するらい菌の型別を行った。インドネシア共和国の北 Maluku 地方の 2 集落では同居する家族間に明らかに TTC-RV を異にするらい菌が分布する家も複数あり、そこに生活する住民は住居以外に存在する感染源から感染を受けたことが示された。また同一家族の患者感同士でも異なる遺伝子型のらい菌の存在が示され、従来 Index case と目される家族内の多菌型患者ではない感染源から異なる機会にそれぞれ感染を受けたと考えられた。以前、阿部らは沖縄において一般住民のらい菌特異抗体の陽性率を調べ、その抗体陽性者の割合がハンセン病の有病率と一致しないことからハンセン病の感染源について今回我々が示した意見と同一の推測を述べた。特定の家族にハンセン病患者が集積する傾向が認められそのことか同一家族内多菌型患者感染源説の根拠ともなっているか、そのような集積性は個人の感受性差に起因するのではないかと考える。今後、多菌型以外の感染源の具体的な証明が必要と考える。

同一住居内には同じ TTC-RV のみが分布する家も特に 1 集落において多かったが、これは TTC-RV による型別の限界によるの

ではないかと考えられた。したがってそのような例においては真に同一のらい菌が分布するのか否かについて、らい菌分離株を更に詳細に型別可能な手法によりその検討が必要と思われる。

これまでらい菌ゲノム DNA は株間における相違に乏しいと考えられてきたが、Thai-53 株と TN 株との比較から、ゲノム中のタンデムリピートに様々なパターンが見られることが明らかとなった。このうち、*ML1505* 遺伝子内の GCACCT リピートについて 5 カ国から得られた臨床分離株 31 株で調べたところ、5 コピーから 10 コピーまでの 5 種類のパターンを示した。それぞれのコピー数の分布では、6 コピーを示すものが 16 株と最も多かったか、フィリピンで得られた株については 8 株中 7 株が 7 コピーを示した。日本で得られた分離株で既報の TTC リピートについて同一のコピー数を示すものについて調べたところ、3 種類のものに分類されたことから、従来の方法による分類では区別不能な分離株についても分類可能であることが示された。リピートの安定性を評価したところ、GCACCT リピートは少なくともヌードマウスにおける継代ではコピー数が容易に変化するものではないことが示された。また、アルマジロから得られたらい菌 Thai-53 株から作製したゲノム DNA ライブラリを用いて決定したコピー数もヌードマウスから得られたものと同じであったことから、動物種を越えた接種においてもコピー数は容易に変化しないことが示唆された。これらの結果から、GCACCT リピートを利用したらい菌の型別は、ハンセン病感染経路の特定に有用であると考えられる。GCACCT リピートは *ML1505* 遺伝子の中に存在することから、蛋白質に翻訳され発現されていると考えられる。菌株により

このリピートは5コピーから10コピーの違いを見せたが、これはアミノ酸10残基分の蛋白質構造の相違に相当する。このような菌株間の相違が菌のビルレンスやハンセン病の病型に影響を与えていることも考えられ、今後調査の必要かあると考えられる。

E 結論

ハンセン病流行地域の住民の鼻粘膜上に存在するらい菌のTTC繰り返し配列は広い多型性を示した。同一家族でも異なる遺伝子型のらい菌が分布することが明らかとなり、また家族内複数感染例でも異なる遺伝子型のらい菌の感染が示され、家族内多菌型患者以外の感染源の存在が示唆された。

ML1505 遺伝子内のGCACCTリピートは株により5種のコピー数を示し、ハンセン病感染経路の特定のために有用であると考えられる。

F 健康危険情報

無し

G 研究発表

1 論文発表

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* Vol 47 265-270 2003

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* Vol 47 387-394 2003

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 Diseases* Vol 71 240-243 2003

Matsuoka M, Zhang L, Budiawan T, Saeki K and Izumi S Analysis of leprosy transmission based on the genotyping of *Mycobacterium leprae* by TTC repeats polymorphism *J Clin Microbiol* Vol 42 (in press) 2004

松岡正典、張良芬 ハンセン病の分子疫学。日本ハンセン病学会雑誌 73 巻 1 号 (印刷中) 2004

2 学会発表

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, May, 2003

Matsuoka M, Zhang L and Budiawan T Analysis of leprosy transmission based on genotyping 38th US-Japan Tuberculosis-Leprosy research conference Newark, July, 2003

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, October, 2003

Matsuoka M Genotyping of *Mycobacterium leprae* and its application for analysis of leprosy transmission Symposium of leprosy Guadarajara, January, 2004

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-抗酸菌シャトル庫墨度を用いたらい菌 Thai-53 株整列クローンライブラリの作成と解析。第 76 回日本細菌学会総会、熊本、2003 年 4 月

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、千葉、2003 年 5 月

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、千葉、2003 年 5 月

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、千葉、2003 年 5 月

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、千葉、2003 年 5 月

天児和暢、高出明美、梅田昭子、松岡正典、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

松岡正典、張良芬、佐伯圭介、和泉眞蔵、Teky Budawan 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

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

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

松岡正典 らい菌の環境中での存在と感染源としての可能性。第 6 回 VNC 研究会 東京、2004 年 2 月

H 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

薬剤耐性菌の伝播解明に関する研究

平成 15 年度 分担研究報告書

分担研究者 尾崎 元昭

(国立療養所長島愛生園)

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

薬剤耐性菌の伝播解明に関する研究

分担研究者 尾崎元昭 国立療養所長島愛生園皮膚科 医長

研究要旨 再発・治癒遷延例と新患の菌遺伝子変異検査を継続し、国内の薬剤耐性菌の発生状況を調査した。耐性患者の治療を追跡調査し、耐性例の治療と発生予防のために新キノロン剤の使用指針を作成した。国外との比較のために、ミャンマーで同様の検査を実施できるよう現地のハンセン病医療担当者と協議した。

A 研究目的

薬剤耐性菌の発生状況を把握し、再発や新しく発病する患者の耐性発現の監視、耐性患者の治療の追跡調査を通して耐性菌の伝播解明の基本的情報を集める。ハンセン病流行地のMDT実施後の耐性発生を調査し、日本の状況との比較研究を行う。

B 研究方法

ハンセン病の再発例、治癒遷延例、新患について、らい菌遺伝子変異の検索を行い、DDS・リファンピシン（RFP）・オフロキサシン（OFLX）の耐性発生状況を調査した。すでに耐性の判明している患者について、現在の治療状況を検討し、新キノロン剤の使用指針を作成した。比較研究の対象フィールドとしてミャンマーを選び、現地のハンセン病診療担当者および研究者に菌の遺伝子変異検査の説明と共同研究の申し入れを行った。

（倫理面への配慮）この研究の調査は日常診療の範囲内で行われた検査を基に実施され、個人情報推測できないようデータ処理した。菌の遺伝子変異検査を含めて倫

理的な問題はないと判断した。

C 研究結果

今年度実施した耐性検査は、新患7名、再発6名である。DDS・RFP・OFLXのうち2剤ないし3剤に耐性が生じていた症例について、担当医とともに診察して治療状況を検討した。クロファジミン（CLF）、ミノサイクリン（MINO）、クラリスロマイシン（CAM）かおもに2剤、ときに3剤で使用され、臨床症状の改善を見ていた。これらを長期連用するのは望ましくないと判断し、維持療法にはCLFを用いることとした。これらの症例の周囲から新たに発生した患者はなく、耐性菌の伝播は防かれていると判断した。

ハンセン病の新患がまだ多く、WHO/MDTが実施されているミャンマーに班員の松岡、尾崎が出張し、MDT実施後の耐性発生調査の可能性について予備調査を実施した。ミャンマーのハンセン病研究者、診療担当者に菌の遺伝子変異の手法と意義を説明し、今後の検査体制について協議した。

D 考察

ハンセン病治療薬への耐性が活動性患者に多数発生していることは先に報告した。これらの既治療患者の耐性発生には過去の不規則治療や少量療法が関与しているとみられる。2000年に治療指針が出されているか、一部の施設でまだ少量投与が行われていたことが明らかになった。ハンセン病診療施設へのより強力な働きかけが必要とみられる。新キノロン剤の治療指針を作成、公表するが、一般感染症に広く新キノロン剤が使用されている現状から、耐性発生を予防するのは困難と推測される。らい菌により殺菌性のある数種の新キノロン剤については、療養所での使用に注意を呼びかける必要があると考えられる。こうした耐性例の治療にはミノサイクリン、クラリスロマイシンなどの薬剤が使用されて順調に治りつつあることを確認した。しかし、最近ミノサイクリン耐性例が出現したため、これらの薬剤についても慎重な使用が望まれる。ミャンマーでは現在 JICA がハンセン病対策のプロジェクトを推進中であり、遺伝子変異検査の技術移転の意味も含めて、ミャンマーの研究者との協力体制を築く条件が整っていると考えられる。

E 結論

薬剤耐性検査としてのらい菌遺伝子変異検査は、再発や治癒遷延例だけでなく、新患にも実施されるようになり、ハンセン病研究センターが中央検査センターとしての役割を果たすようになった。今後はデータを蓄積していき、全国のサーベイランス

実施および耐性菌伝播の把握を進めていく必要がある。OFLX の治療指針を作成、学会誌に投稿して公開する。耐性が確認された症例の治療成績を追跡し、治療指針（2000）更新の必要性を認めた。専門医ネットワークなどを通じて、耐性発生の予防と耐性患者の治療についての取り組みを徹底していきたい。ハンセン病流行地での MDT 後の耐性発生調査に着手した。ミャンマーでの国際協力機構（JICA）のプロシエクトと提携してこの調査を進める予定である。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

儀同政一、並里まさ子、野上玲子、後藤正道、熊野公子、尾崎元昭 ニューキノロンの使用基準、日本ハンセン病学会誌、73 巻（印刷中）2004

2 学会発表

松岡正典、柏原嘉子、尾崎元昭 国内再燃、難治例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、2003 年 5 月 浦安

H 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得 なし
- 2 実用新案登録 なし
- 3 その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

新規抗らい菌薬と多剤併用療法の開発

平成 15 年度 分担研究報告書

分担研究者 儀同 政一

（国立感染症研究所 ハンセン病研究センター）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

新規抗らい菌薬と多剤併用療法の開発

分担研究者 儀同 政一

国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部第四室長

研究要旨 治療期間の短縮と薬剤耐性に対応するため新規抗らい菌薬の開発を行った。新規ニューキノロン系抗菌薬 WQ 3402、Moxifloxacin(MFLX)、Tosufloxacin (TFLX)を、ヌードマウス足蹠法と Buddemeyer 法で検討した。WQ 3402 は、Buddemeyer 法で RFP に匹敵する強い抗らい菌活性を示したが、ヌードマウス足蹠法では 50mg/kg でも不完全抑制であった。MFLX は Buddemeyer 法で Sparfloxacin(SPFX)を凌ぎ RFP に匹敵する強い抗らい菌活性を示し、ヌードマウス足蹠法で SPFX に匹敵する強い抗らい菌活性を示した。TFLX の抗らい菌活性は弱かった。SPFX は OFLX 耐性らい菌に対し 40mg/kg で完全抑制を示したことから、SPFX は OFLX 耐性患者に併用療法薬として使用できる可能性を示唆した。

A 研究目的

ハンセン病は、多剤併用療法の普及により有病率は低下したが、いまなお約 70 万人の新患発生があるばかりか、耐性菌の増加により治療を困難にしている。治療期間の短縮と薬剤耐性に対応するため新規フルオロキノロン系薬剤である WQ 3402、Moxifloxacin(MFLX)、Tosufloxacin (TFLX)の抗らい菌活性をヌードマウス足蹠法で検討した。OFLX 耐性らい菌 (Zensho-4) に対する SPFX の抗らい菌活性を検討した。

B 研究方法

1) らい菌(Thai 53 株), (Zensho 4 株) ヌードマウス(BALB/c)足蹠より集菌 精製し、Shepard 法により菌数計算後所定の

濃度に希釈し実験に用いた。

2) 抗菌薬 WQ-3402(湧永製薬)、MFLX(Bayer)、TFLX(富山化学)、SPFX(大日本製薬)、GFLX(杏林製薬)、LVFX(第一製薬)、CAM(大正製薬)、MINO(日本レダリー)は、各製薬会社から原末の提供を受けた。RFP(和光純薬)は、市販品を用いた。

3) Buddemeyer 法 4 ml のガラスバイアル中に 7H12 培地、らい菌(2×10^7)、抗菌薬(最終濃度 8, 20, 0.5, 0.125 $\mu\text{g/ml}$)を加えよく混合する。このガラスバイアルのキャップを緩く締め、32°C の炭酸ガス培養器で 4 日間培養後、 ^{14}C パルミチン酸(1 μCi)を加え混合後、再び

キャップを緩く締めたガラスバイアルを、NaOH シンチレータで処理済みろ紙片を入れたプラスチックバイアルに入れキャップを強く締める。さらに 32°C の培養器で 7 日間培養を継続し、発生した $^{14}\text{CO}_2$ 量を液体シンチレーションカウンターで測定し、WQ-3402, MFLX, TFLX の抗らい菌活性を SPFX, GFLX, LVFX, CAM, MINO, RFP と比較検討した。

4) ノードマウス足蹠法

ノードマウス (BALB/c, 5 週令・雌) の両後肢足蹠に 10^7 のらい菌を接種した。菌接種後 60–150 日の 90 日間、ステレスカテーテルで各薬剤を毎日経口投与した。菌接種後 8 ヶ月から 11 ヶ月まで毎月 4 回ノードマウス足蹠内のらい菌数を計測し各薬剤の抗らい菌活性を求めた。

- a WQ 3402 (30, 40, 50 mg/kg) の抗らい菌活性を SPFX (10 mg/kg) と比較検討する。
- b MFLX (10, 20, 30, 40 mg/kg) の抗らい菌活性を SPFX (10 mg/kg) と比較検討する。
- c OFLX 耐性らい菌 (Zensho 4, 150 mg/kg) に対する SPFX (10, 20, 40 mg/kg) の抗らい菌活性を検討する。

(倫理面での配慮)

使用マウスは、頸骨脱臼により安楽致死させてから所定の実験に用いた。

C 研究成果

1) WQ 3402 の抗らい菌活性

WQ 3402 は、Buddemeyer 法で、SPFX を凌ぎ RFP に匹敵する強い抗らい菌活性を示した。ノードマウス足蹠法では、50 mg/kg でも不完全抑

制であった。結果を図 1、2 に示す。

2) MFLX の抗らい菌活性

MFLX は Buddemeyer 法で、SPFX を凌ぎ RFP に匹敵する強い抗らい菌活性を示した。ノードマウス足蹠法では SPFX に匹敵する強い抗らい菌活性を示した。結果を図 3、4 に示す。

3) OFLX 耐性らい菌 (Zensho 4) に対する SPFX の抗らい菌活性

OFLX 耐性らい菌 (OFLX 150 mg/kg で不完全抑制) に対し SPFX は、40 mg/kg でらい菌の増殖を完全抑制した。結果を図 5 に示す。

D 考察

1) 多剤併用療法の普及により有病率は低下したが、6 ヶ月から 1 年に及ぶ長い治療期間のため不規則治療、治療中断また低用量長期投与により DDS, B663, RFP のみならず近年開発された OFLX, CAM にも耐性が増加し治療を困難にしている。これら薬剤耐性に対応するため臨床から新規抗らい菌薬の開発が求められている。

2) 今回 MFLX は Buddemeyer 法とノードマウス足蹠法の結果からは、SPFX より強い抗らい菌活性を認めた。強い抗らい菌活性を保持して光毒性などの副作用の少ないフルオロキノロンとして臨床導入が期待される。またシプロフロキサシン耐性菌にも抗菌活性を示す WQ 3402 は Buddemeyer 法で RFP に匹敵する強い抗らい菌活性を認めたが、ノードマウス足蹠法では 50 mg/kg でも不完全抑制であった。

3) OFLX 耐性らい菌 (150 mg/kg) に対し SPFX は、40 mg/kg でノードマウス足蹠内のらい菌の増殖を完全抑制した

ことから SPFX は OFLX 耐性患者に併用療法薬として使用できる可能性を示唆した。強い抗らい菌活性を示した MFLX についても、ヌードマウス足蹠法で OFLX 耐性らい菌に対する最少抑制濃度を検討する。

E 結論

WQ 3402 は Buddemeyer 法では SPFX を凌ぐ強い抗らい菌活性を示したが、ヌードマウス足蹠法では 50 mg/kg でも不完全抑制であった。

MFLX は Buddemeyer 法で SPFX を凌ぎ RFP に匹敵する強い抗らい菌活性を示したが、TFLX の抗らい菌活性は OFLX レベルで弱かった。ヌードマウス足蹠法では SPFX に匹敵する強い抗らい菌活性を示した。

OFLX 耐性らい菌(OFLX 150 mg/kg で不完全抑制)に対し SPFX は 40 mg/kg で完全抑制を示した。

F 健康危機情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

1) 儀同政一, 並里まさ子, 熊野公子, 後藤正道, 野上玲子, 尾崎元昭 ニューキノロン使用指針、日本ハンセン病学会雑誌, 73 (2004) (in press)

2) Yumi Maeda, Masaichi Gidoh, Norihisa Ishii, Chifumi Mukai and Masahiko Makino Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens Cellular Immunology 222, 69-77

(2003)

2 学会発表

1) 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 日本ハンセン病学会雑誌 72 140 (2003)

2) 山崎利雄, 松岡正典, 儀同政一 第 75 回日本ハンセン病学会 らい菌の ATP 測定による薬剤感受性試験法の検討、日本ハンセン病学会雑誌, 72 137 (2003)

H 知的財産権の出願 登録状況

- | | |
|----------|----|
| 1 特許取得 | なし |
| 2 実用新案登録 | なし |
| 3 その他 | なし |

Fig. 1. *In Vitro* Activities of Novel Quinolones against

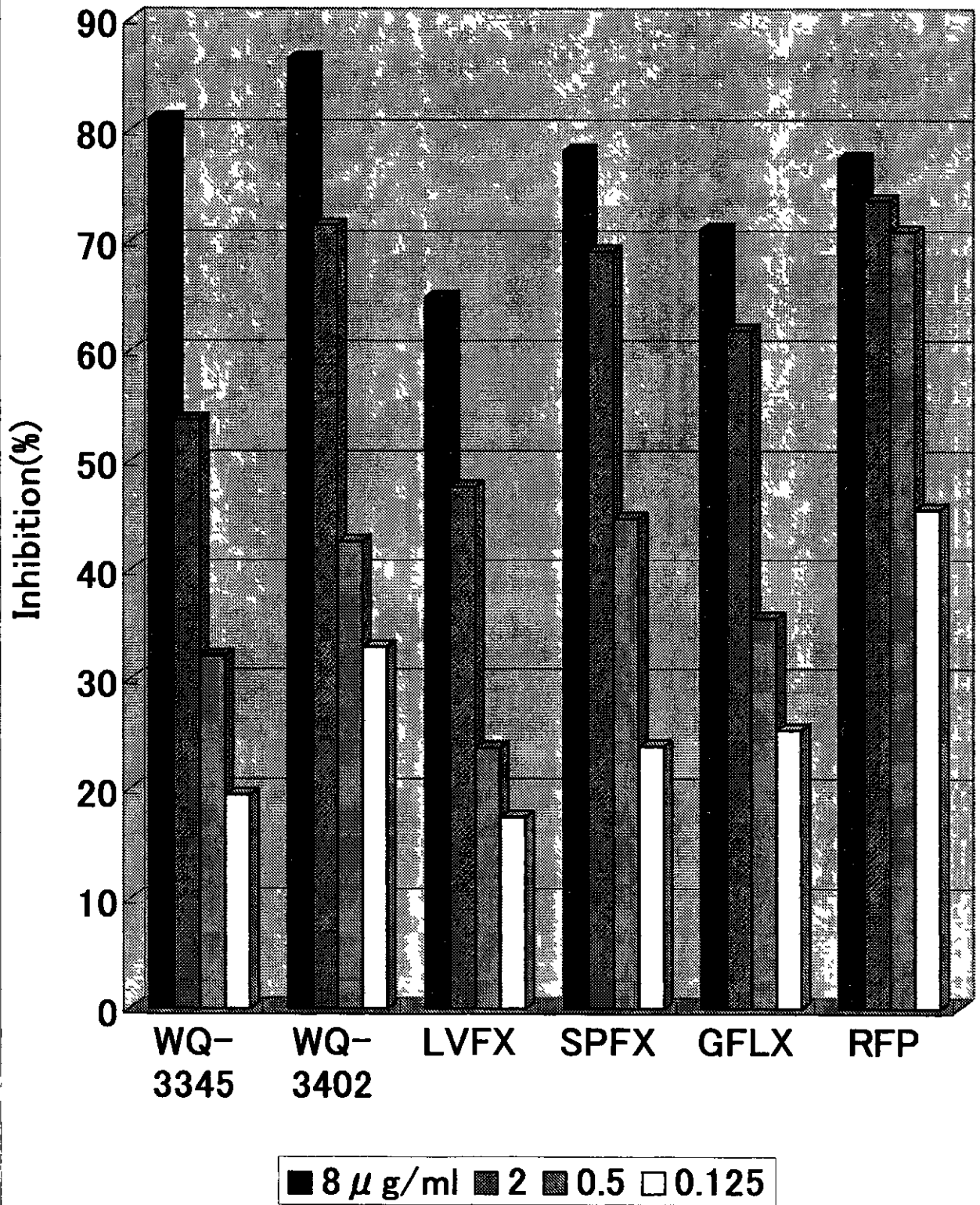


Fig. 2. Activities of New Quinolones against *M.leprae* in Nude Mice

