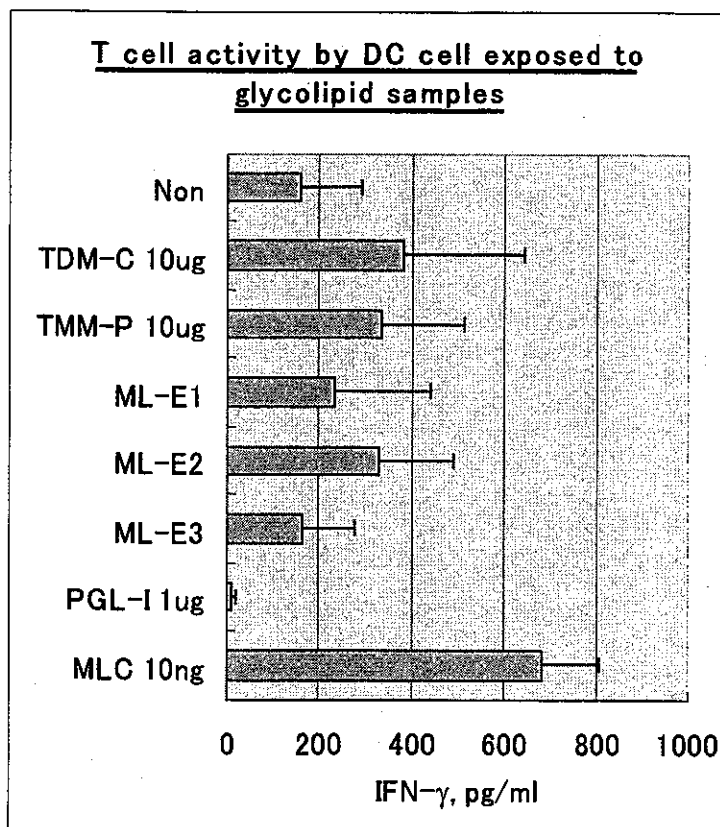


図2 樹状細胞 (DC) を用いた血清診断候補糖脂質の免疫活性化能

(糖脂質に暴露された DC で活性化した T 細胞からの IFN- γ 産生)



TDM-C: *Mycobacterium bovis* BCG connacht TDM

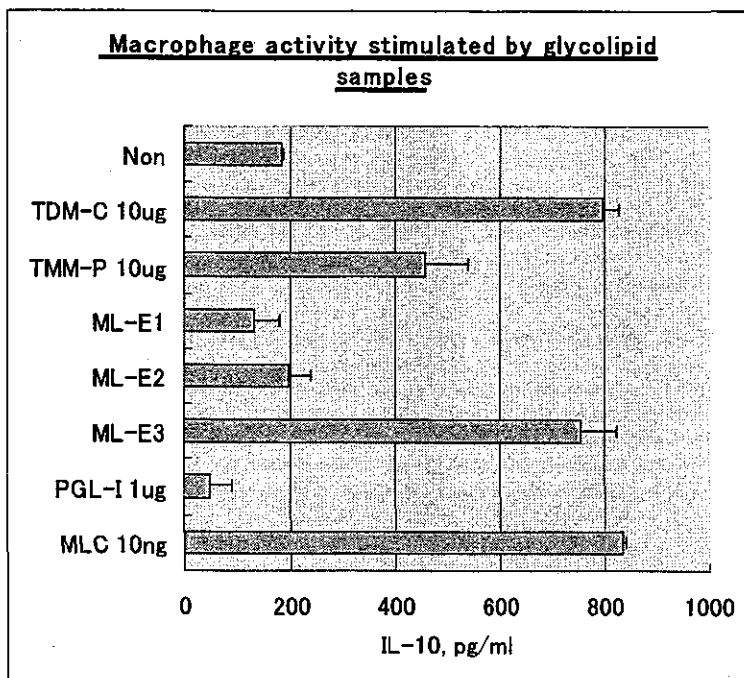
TMM-P: *Mycobacterium bovis* BCG pastuer TMM

E1, E2, E3: らい菌由来糖脂質画分

PGL-I: Phenolic glycolipid I

MLC: *Mycobacterium leprae* soluble fraction C (Positive control)

図3 マクロファージを用いた血清診断候補糖脂質の免疫活性化能
(IL-10 産生)



TDM-C: *Mycobacterium bovis* BCG connacht TDM

TMM-P: *Mycobacterium bovis* BCG pastuer TMM

E1, E2, E3: らい菌由来糖脂質画分

PGL-I: Phenolic glycolipid I

MLC: *Mycobacterium leprae* soluble fraction C (Positive control)

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16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）

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

研究要旨

TTC 塩基の繰返し数のみによるらい菌の型別を疫学解析に応用した結果、TTC 繰返し数が 10 コピーあるいは 13 コピーのらい菌が多数検出され、らい菌をより詳細に分類し、正確な疫学解析を行うための方法を必要とすることが示された。そのために、44 の Short tandem repeat (STR) についてそのバリエーションを 27 株のらい菌を用いて検討し、型別法への適応性を検討した。安定性、多型性の大きさから 9 個の STR がらい菌の遺伝子型別に最適であった。それらを用いることにより全ての分離株は独立した遺伝子型に分類可能であることが示された。9 個の多型性部位を用いて家族内に複数の同一 TTC 遺伝子型のらい菌が存在した例について解析した結果、3 家族中 1 家族は異なる遺伝子型のらい菌による感染例であり、昨年引き続き、従来言われていたような同居する多菌型患者からの感染以外のケースが示された。

A. 研究目的

ハンセン病の感染源を含めた感染様式の解明を目的として、そのための必須の手段であるらい菌の型別法の確立とその疫学解析への応用を行なった。これまでハンセン病は家族内に同居する多菌型感染者を感染源として感染が成立すると言われてきたが、昨年、筆者が行なった流行地域の住民あるいは家族内複数感染例の感染菌の遺伝子型別の報告を始めとして、らい菌遺伝子の広範な住民の鼻粘膜上での存在、あるいは血清抗体価陽性者の分布状況等から、近年は家族内感染者以外からの感染の存在を指摘する報告が多数なされている。

昨年度、TTC 繰返し数の多型性(TTC-VN)を利用して流行地域の住民の保有するらい菌、及び家族内複数感染例からのらい菌の型別と疫学解析を行なったが、TTC-RV のみによる型別ではその分別能に限界があり、より詳細な型別法の開発が望まれた。型別法に有用なあらたな多型性を有する繰返し配列 (Variable number tandem repeat: VNTR) の検索とそれらの疫学解析における有用性について検討を行なった。

B. 研究方法

I. 型別に適応可能な VNTR の検索。他の研究グループによって遺伝子型別に有用と考

えられたもののその多型性と型別への適用性について詳細な検討がなされていなかった (Groathouse, N. A. et. al. 2004. J. Clin. Microbiol. 42:1666) 2塩基から27塩基までの44繰返し配列 (Short tandem repeat: STR) について、27株の研究室継代株を用いてその多型性と安定性、を比較した。対象のSTRの種類と数を以下に記す。1塩基繰返し: 12種、2塩基繰返し 13種、3塩基繰返し: 8種、5塩基繰返し: 1種。以上は Microsatellite に分類される。Minisatellite に分類されるSTRは以下のとおりである。6塩基繰返し: 3種、7塩基繰返し: 1種、10塩基繰返し: 1種、12塩基繰返し: 1種、15塩基繰返し: 1種、18塩基繰返し: 1種、21塩基繰返し: 1種、23塩基繰返し: 1種、27塩基繰返し: 1種。

9個のSTRが型別に有用と考えられたことから、4株 (Thai-53株 4、7、11代、Kyto-1株 3、5、7、8代、Zensho-1株 臨床材料、1、2、3、4代、Korea3-2株 臨床材料、1、2、3、4代) の異なる世代数のらい菌を用いて各世代間におけるそれぞれのSTRのコピー数を検査してその安定性を検討した。またそれらを用いて27の研究室維持株がどの程度細分可能であるか検討した。

II. 家族内複数感染例におけるらい菌の型別。インドネシア、北スラベシ州、マナド市周辺において5家族の家族内複数感染例のらい菌を得た。そのうちTTC-RVにより分別不可能であった3家族、計10症例について実験Iにおいて型別に有用と考えられた8個のSTRを用いてその遺伝子型を比較した。

倫理面への配慮

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。動物を用いた実験は当該研究機関の動物実験委員会の承認を得て実施された。

C. 研究結果

多型性を検討した全44個のSTR中29個が2個以上の繰返し数のバリエーションを示した (Table)。それぞれのSTRのうち、蛋白質をコードする遺伝子では6/9 (67%)、偽遺伝子では9/15 (60%)、非コード領域中では14/18 (78%)のSTRが多型性を示し、非コード領域中のSTRは、高い多型性の割合を示した。コピー数の違いは最も少ないものは2種類で、最も広い違いを示したものは10種類であった。変異の広さ及び塩基配列の判読のしやすさを基準にこれらのVNTRの中から、TTC-VN および *rpoT* における多型を含めて9種のVNCを詳しい遺伝子型別に用いるSTRとして選択した。それらの塩基とその繰返しはらい菌遺伝子のデータベースでは以下のとおりである。AC:8a、AC:8b、AC:9、TA:10、AT:17、TA:18、GTA:9、AGA (=TTC):20、TCBATG:3。すべてのSTRが4株の維持継代菌について、調べた範囲の継代では全てのVNTRは変化を認めなかった。異なる世代数でもそれぞれの株に得意的なVNTRが維持されることが示された。

9種類のVNTRの組み合わせにより、27株は全て異なる遺伝型に分類されクラスターの形成は示されず、9個のVNTRの組み合わせによる型別が疫学解析に有用であることが示された。

3家族の複数感染例のそれぞれのTTC-VNは5症例の13コピー、2症例の12コピー、2例の8コピーであった。このうち8コピ

一の2例が AT: 9 コピーと 10 コピー、GTA: 11 コピーと 12 コピーで更に細分され同一家族内の感染例でも従来の概念で感染源と目される症例とは異なるらい菌による感染であることが示された。

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てきた。それを支持するためには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証明されなければならないが、昨年筆者の報告した検討以外に細菌学的な検証は無かった。昨年度は TTC-VN のみより、ハンセン病流行地域の一般住民の鼻粘膜上のらい菌および家族内多発例の感染例からのらい菌についてその遺伝子型を比較した。その結果は家族内には異なる遺伝子型のらい菌が分布し、家族内多菌型患者以外に感染源が存在することを強く示唆したが、多くの同一 TTC-VN 株が検出され、これら同一の TTC-VN を更に細分する手技の開発により、より詳しい疫学解析を行なうことが望まれた。

昨年、他の研究グループにより 1 塩基から 27 塩基の配列が繰返している STR 領域が全部で 44 個ありらい菌の遺伝子型別に有用である可能性が報告された。しかしながらその報告ではそれぞれの STR においてどの程度の繰返し数の変化が株間に見られるかについて詳しい検討がなされなかった。我々はそれらについて 27 株の異なる菌株を用いて多型性の検討を行なったところ、これまでに多型性が報告されている TTC および TCGATG の他に 7 個の VNTR が型別に有用であることが明らかとなった。これら 9 個の VNTR を組み合わせることにより、由来を異にする 27 株は全て異なる遺伝子型に

細分されたことと、それぞれ継代を重ねた菌の間でも個々の株の全ての VNTR は変化が無かったことから、この組み合わせによる型別法は臨床材料にも応用しうる有用な型別法と考えられた。

3 例の家族内多発例において、1 家族内には TTC8 コピーの症例が 2 例存在していたがこれらは新たに加えられた 7 種の VNTR の内の 2 種類のコピー数が異なることから異なるらい菌の感染によるものであることが示された。昨年の報告で感染源について従来信じられてきた概念とは異なり、ハンセン病は家族内多菌型患者以外からの感染があることを指摘したが、本年のこの結果も更にそれを支持するものと考ええる。一方、それぞれ 5 例、及び 2 例の 2 家族では 13 コピー、12 コピーの TTC-VN を初めとして他の 8 種の VNTR も全て同一のパターンが示された。これらについては、患者以外の感染源を想定した更なる検討が必要と考ええる。

今後、ハンセン病の感染様式解明のために、いくつかの患者以外の感染源の存在が指摘されていることから、それらと患者から得られるらい菌について型別を含めた総合的な解析が必要と考ええる。

E. 結論

らい菌ゲノム中に存在する繰返し配列には菌株によってコピー数が異なるものと、全ての株で変化の無いものがあることが明らかとなった。9 個の繰返し配列の比較により詳細な型別が可能であることが示された。同一家族内に異なる遺伝子型のらい菌による感染例が存在した。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

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.42 741-745, 2004

Fukutomi Y., Matsuoka M., Minagawa F., Toratani S., McCormic G. and Krahenbuhl J. Il-10 treatment of macrophages bolsters intracellular survival of *Mycobacterium leprae*. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. Vol. 72 16-25, 2004

Kimura H., Maeda Y., Takeshita F., Takaoka L. E., Matsuoka M., and Makino M. Upregulation of T-Cell-stimulating activity of Mycobacteria-infected macrophages. Scand. J. Immunol. Vol. 60 278-286, 2004

Zhang L., Namisato M. and Matsuoka M. A mutation at codon 516 in the *rpoB* gene of *Mycobacterium leprae* confers resistance to rifampin. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. Vol. 72 (in press) 2004

Ozarmagan G., Sutlas M., Zhang L. and Matsuoka M. Detection of dapsone resistant *Mycobacterium leprae* by DNA sequence analysis from a Turkish relapsed leprosy patient. Med. Bull. Istanbul Med. Faculty Vol. 67, 153-156, 2004

Matsuoka M., Zhang L., Fafutis M., Legua P. and Wiens C. Polymorphism in the *rpoT* gene in *Mycobacterium leprae*

isolates obtained from Latin American countries and its possible correlation with the spread of leprosy. FEMS Microbio. Lett. Vol. 242 (in press) 2005

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 7-14, 2004

松岡正典:「感染症の話」ハンセン病 感染症週報 46 週号 国立感染症研究所 感染症情報センター 2004

感染症の事典「ハンセン病」松岡正典 分担執筆 国立感染症研究所学友会 編集 朝倉書店 東京 総頁 322(分担頁 201-203)2004

2. 学会発表

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

Matsuoka M.: Chemotherapy and Drug Resistance in Leprosy. Symposium on drug resistance. 40th anniversary meeting of US-Japan cooperative medical science program. Kyoto, December, 2004

Khin Saw Aye, Yin Thet Nu Oo, Kyaw Kyaw, Matsuoka M., Kai M.: Molecular Detection of Primary Dapsone Resistant *Mycobacterium leprae* in Myanmar. 40th anniversary meeting of US-Japan cooperative medical science program. Kyoto, December, 2004

Mukai T., Miyamoto Y., Matsuoka M., Yamazaki T. and Makino M.: Loop-Mediated Isothermal Amplification of the *dnaA* Sequence for Rapid Detection of *Mycobacterium leprae*. 40th anniversary meeting of US-Japan cooperative medical science program. Kyoto, December, 2004

Fukutomi Y., Takeshita F., Matsuoka M. and Makino M.: Regulation by Clofazimine of Cytokine Production in *M. leprae*-infected Macrophages. 40th anniversary meeting of US-Japan cooperative medical science program. Kyoto, December, 2004

中田登、松岡正典、甲斐雅規、鈴木幸一、牧野正彦：らい菌ゲノムの株間における多様性の検討。第77回日本細菌学会総会、大阪市、2004年4月

松岡正典、張良芬、佐伯圭介、和泉眞蔵、Teky Budiawan：らい菌の遺伝子多型に基づく感染様式の解析。第77回日本ハンセン病学会総会、さいたま市、2004年5月

Zhang Liangfen, Masanori Matsuoka Teky Budiawan Eudaldo C. Dela Cruz Indropo Agusni, Ratna Wahyuni : Prevalence of drug resistant leprosy case in Southeast Asian countries. 第77回日本ハンセン病学会総会、さいたま市、2004年5月

儀同政一、松岡正典：OFLX 耐性らい菌に対するSPFXの抗らい菌活性。第77回日本ハンセン病学会総会、さいたま市、2004年5月

山崎利雄、松岡正典、儀同政一：生物発光法を用いたらい菌の薬剤感受性試験法。第77回日本ハンセン病学会総会、さいたま市、2004年5月

藤村響男、佐藤直哉、与儀ヤス子、狩野真帆、宮田聡子、増澤真実子、松岡正典、増澤幹男、勝岡憲生：*mce1* 蛋白によるらい菌の上皮細胞への侵入。第77回日本ハンセン病学会総会、さいたま市、2004年5月

谷合啓明、天児和暢、松岡正典、吉田眞一：*Acanthamoeba culbertsoni* は、*Mycobacterium leprae* の生存をサポートする。第57回日本細菌学会九州支部総会、福岡市、2004年9月

並里まさ子、柏原嘉子、松岡正典、藤原 剛、小川秀興、Khin Nwe Oo, Kyaw Kyaw:ミャンマーの農村におけるハンセン病の疫学調査。第45回日本熱帯医学会総会、東京、2004年10月

鈴木幸一、武下文彦、中田登、松岡正典、牧野正彦：抗酸菌感染マクロファージにおける菌の細胞内寄生と排除に関わる分子機構。第45回日本組織細胞化学会、鹿児島、2004年10月

並里まさ子、柏原嘉子、松岡正典、藤原 剛、小川秀興、Khin New Oo, Kyaw Kyaw:ミャンマーの農村におけるハンセン病の疫学調査。45回日本熱帯医学会、東京、2004年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

TABLE Variation of allelic diversity at STR loci in *M. leprae* isolates

No	Locus ID	Number of repeat & range	No.	Locus ID	Number of repeat & range	No	Locus ID	Number of repeat & range
1	(T)8(A)6	No variation	16	(AC)9★	7,8,9,10	31	(GTA)9★	8,9,10,11,12,13,14,15,16,18
2	(T)6(N)7(D)8	No variation	17	(CA)6	6,7	32	(AGA)20★	9,10,11,12,13,14,15,16,25
3	(A)9	8,9	18	(TA)8	6,7,8,9,10	33	(CACCG)3	No variation
4	(G)9	9,10	19	(TA)9	6,7,8,9,10,11,12,14	34	6-3a★	3,4
5	(C)9	9,10,11,12	20	(TA)10★	7,9,10,11,12,13,14,15,16	35	6-3b	No variation
6	(G)10a	7,8,9,10,12,13	21	(TA)13	15,16,17,18,19,20,21,22,23,24	36	6-7	5,6,7,8,9,10
7	(G)10b	9,10,11,12,13	22	(AT)10	7,8,9,10,12,14	37	7-3	No variation
8	(G)11	10,11,12,13,14	23	(AT)15	13,14,15,16,17,18,19,20,21	38	10-4	No variation
9	(G)12	9,10,11,12,14	24	(AD)17★	10,11,12,13,14,15,16,18	39	12-5	3,4
10	(C)16(G)8	7,8 & 10,12,13, 14, 15,16,15,17,18,19	25	(TA)18★	11,12,13,14,15,16,17,19	40	15-3	No variation
11	(C)20	8,9,10,11,12,13, 14,15,14,15,16	26	(ACC)5	No variation	41	18-8	7,8
12	(G)22	9,10,12,13,14,15,16,17,18,19	27	(GGT)5	4,5,6	42	21-3	1,2,3
13	(CG)6	No variation	28	(AGT)5a	No variation	43	23-3	2,3
14	(AC)8a★	6,7,8,9,10,11,12	29	(AGT)5b	No variation	44	27-5	3,5
15	(AC)8b★	6,7,8,10	30	(ACD)5	No variation			

Protein coding genes are in bold type. Pseudogenes are underlined. Intragenic genes are in standard type.

★ Selected loci for genotyping

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16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）

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 国内の活動性ハンセン病患者についてらい菌の遺伝子変異検査による耐性菌の発生状況を調査し、すでに新しい治療薬への耐性患者および多剤耐性患者が出ていることを明らかにした。耐性確認後の経過を調査し、この検査の結果がその後の治療に活用されていることを認めた。今のところ耐性患者からの感染例は出ていない。

A. 研究目的

まだ治癒していない多菌型患者の菌の遺伝子変異検査を実施し、国内の耐性菌発生状況を調査する。この調査結果に基づき、耐性発現予防の対策を講じる。耐性判明例の治療を検討し、遺伝子変異検査の臨床的有用性を検証する。耐性患者からの二次感染による耐性菌伝播について検討する。

B. 研究方法

菌陽性の多菌型患者の菌を採取し、遺伝子変異を検査して DDS・RFP・OFLX への耐性発現を調べる。耐性発現例では耐性発生の要因を探るとともに、その後の治療に検査結果が活用されたかどうかを検証する。耐性検査結果により化学療法の指針作成を検討する。耐性患者の周辺に二次感染例が出ていないかどうか、疫学的検討を行う。

（倫理面への配慮）

この研究の調査に関しては、調査対象の人権保護と情報管理に留意し、患者の個人情報から個人が特定されたり、個人情報

流出したりしないよう十分に配慮して行う。

C. 研究結果

2004 年までに 49 例の遺伝子変異検査が実施された。DDS の耐性出現を示す *foIP* では PCR 法陽性の 35 例中 19 例、RFP の *rpoB* では 33 例中 12 例、OFLX の *gyrA* では 28 例中 7 例に変異が認められた。3 剤への耐性出現例が既に 5 例あり、1 例は外国人の新患であった。

これらの検査結果が臨床にどう活用されたかを追跡調査中であるが、中間集計では耐性例では化学療法剤の選択に利用され、経過良好なものが多数であった。

新キノロン剤への耐性が出ていることから、今後の治療のために標準的使用法を検討して使用指針を作成、公開した。

D. 考察

検査対象のうち再発・治癒遷延例の大半は療養所の入所者であった。入所中の活動性多菌型患者の大部分に検査を実施できたので、この結果は療養所の現状を現してい

ると考えられる。DDS への耐性出現が多いのは、スルホン剤単独投与時代の反映であろう。

RFP 耐性例の多くで、低用量の使用、単独投与、DDS 耐性菌への DDS との併用が誘因となっていると推測された。OFLX への耐性出現は、OFLX 自体が耐性を生じやすい薬剤であること、菌への殺菌力が必ずしも強くないこと、使用量や併用に問題があることなどが誘因となっていると考えられる。新キノロン剤の使用に関する指針を作成したが、今回の臨床資料からみると指針が順守されるかどうか不安がある。

耐性判明例の治療とその後の経過はおおむね良好であるが、一部に患者のコンプライアンスが悪く、改善を見ていない例があった。遺伝子変異検査が化学療法に有用であることが明らかになったので、今後はルーチン化していくこと、ルーチン化できる体制をハンセン病研究センターに設けることが必要と考える。

新患での検査実施例は外来診療施設で行われたものが多い。3剤への耐性を示した1例は外国人の症例で、出身国で耐性菌によって発病したのかどうか、来日以前に治療を受けていないかどうかなど、不明の点が多い。今のところ、これらの耐性例周辺に新患が出て耐性菌の二次感染を疑わせるような例は報告されていない。今後慎重に観察を続ける必要がある。

E. 結論

らい菌の遺伝子変異検査による耐性の検査は化学療法の遂行と改良に必須となることが明らかである。臨床医、とくに新患を診察する機会の多い一般皮膚科医に、この

検査法についての認識を高める必要がある。

遺伝子変異検査が実施できる体制をハンセン病研究センターに整え、発展途上国のハンセン病対策に活用されることが望まれる。

F. 健康危険情報

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誌 73 巻：65-67、2004.

2. 学会発表

1) 尾崎元昭：教育講演 ハンセン病の新患が来たら、第 103 回日本皮膚科学会総会、京都、2004 年 4 月。

2) 尾崎元昭：ハンセン病の現在一菌とヒトとの興味深い関係、第 39 回神戸皮膚科臨床研究会、2004 年 10 月。

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16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4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。新規フルオロキノロン系抗菌薬 moxifloxacin(MFLX)とステロイド系抗菌薬 fusidic acid(FA)をヌードマウス足蹠法と Buddemeyer 法で検討した。MFLX はヌードマウス足蹠法で 10 mg/kg で足蹠内のらい菌の増殖を完全抑制し、SPFX に匹敵する強い抗らい菌活性を示した。FA は、Buddemeyer 法で SPFX 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、70mg/kg でも不完全抑制であった。OFLX 耐性らい菌(Zensho-4)に対する新規フルオロキノロンの抗らい菌活性は WQ-3402,MFLX,STFX が最も強い抗らい菌活性を示し、OFLX 耐性患者に臨床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 60 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遂行を困難にしている。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抗菌薬である moxifloxacin(MFLX),WQ-3402 とステロイド系抗菌薬 fusidic acid(FA)の抗らい菌活性を Buddemeyer 法とヌードマウス足蹠法で検討した。さらに OFLX 耐性らい菌 (Zensho-4) に対する新規フルオロキノロン系抗菌薬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)、sitafloxacin(STFX,第一製薬)、sparfloxacin(SPFX,大日本製薬)、gatifloxacin(GFLX,杏林製薬)、levofloxacin(LVFX,第一製薬)、clarithrimycin(CAM,大正製薬)、minocycline(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)、fusidic acid(FA,SIGMA)、diaphenylsulfone(DDS,吉富製薬)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(2x10⁷)、抗菌薬 (最終濃度 : 32, 8, 2.0, 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($1\mu\text{Ci}$)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、FAの抗らい菌活性をDDS,SPFX,CAM,MINO,RFPと比較検討した。またOFLX耐性らい菌に対する新規フルオロキノロンOFLX,LVFX,GFLX,SPFX,STFX,MFLX,WQ-3402の抗らい菌活性を検討した。

4)ヌードマウス足蹠法

ヌードマウス(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91日間、ステンレスカテーテルで各薬剤を週5日毎日経口投与した。菌接種後8ヶ月から11ヶ月まで毎月、ヌ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. MFLX(10,20,30,40mg/kg)の抗らい菌活性をSPFX(10mg/kg)と比較検討した。

b. FA(15,30,50,70mg/kg)の抗らい菌活性をDDS(15mg/kg)と比較検討した。

(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) MFLXの抗らい菌活性

MFLXは10mg/kgでヌードマウス足蹠内のらい菌の増殖を完全抑制しSPFXに匹敵する強い抗らい菌活性を示した。結果を図1に示す。

2) FAの抗らい菌活性

Buddemeyer法でのFAの抗らい菌活性は、RFP,CAM<FA,SPFX,MINOの順でSPFXに匹敵する強い抗菌活性を認めた。ヌードマウス足蹠法では、70mg/kgでも不完全抑制であった。結果を図2,3に示す。

3) OFLX耐性らい菌(Zensho-4)に対する新規フルオロキノロンの抗らい菌活性は、OFLX<LVFX<GFLX,SPFX<STFX,MFLX<WQ-3402の順でWQ-3402が最も強くSTFX,MFLXに強い抗菌活性を認めた。結果を図4a,4bに示す。

D. 考察

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。

1) MFLXはBuddeneyer法とヌ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ながら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。

2) FA の *in vitro* 活性 SPFX や MINO に匹敵する抗らい菌活性を示したが、*in vivo* 活性は 70mg/kg までは不完全抑制を示した。今後、投与量を増やすかマウス足蹠法を検討している。

3) OFLX 耐性らい菌(Zensho-4 株：OFLX 150 mg/kg で不完全抑制)に対し WQ-3402,STFX,MFLX に強い抗らい菌活性を認めた。OFLX の *in vitro*, *in vivo* 抗らい菌活性は弱く、低度キノロン耐性と考えられ、抗らい菌活性の強い WQ-3402,STFX,MFLX の臨床使用が示唆された。

E. 結論

1) MFLX は Buddemeyer 法で SPFX を凌ぎ RFP に匹敵する強い抗らい菌活性を、ヌードマウス足蹠法では 10 mg/kg で完全抑制を示し、SPFX に匹敵する強い抗らい菌活性を示した。

2) FA は、Buddemeyer 法では、SPFX, MINO 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、70 mg/kg でも不完全抑制であった。

3) OFLX 耐性らい菌(Zensho-4 株)に対し WQ-3402,STFX,MFLX は、強い抗らい菌活性を示した。

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, 73:65-67 (2004).

2) 儀同政一: 新規フルオロキノロン

WQ-3345, WQ-3402 の抗らい菌活性、日本ハンセン病学会雑誌、74:43-48(2005).

3) 牧野正彦、鈴木幸一、福富康夫、山下康子、前田百美、宮本友司、向井 徹、中田 登、甲斐雅規、山崎利雄、儀同政一、松岡正典: ハンセン病基礎研究のトピックス、日本ハンセン病学会雑誌、74:3-22(2005).

2. 学会発表

1) 儀同政一: MFLX と TFLX の抗らい菌活性. 第 77 回日本ハンセン病学会総会. 日本ハンセン病学会雑誌、73:153(2004).

2) 儀同政一: OFLX 耐性らい菌に対する SPFX の抗らい菌活性、日本ハンセン病学会総会、日本ハンセン病学会雑誌、73:154(2004).

3) 山崎利雄, 松岡正典, 儀同政一: 生物発光法を用いた薬剤感受性試験法の検討、第 77 回日本ハンセン病学会総会. 日本ハンセン病学会雑誌、73:150 (2004).

4) 儀同政一: 新しい抗菌薬の抗らい菌活性. 日本化学療法学会総会、日本化学療法学会雑誌、52:117(2004).

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. Activities of MFLX against *M.leprae* in nude mice

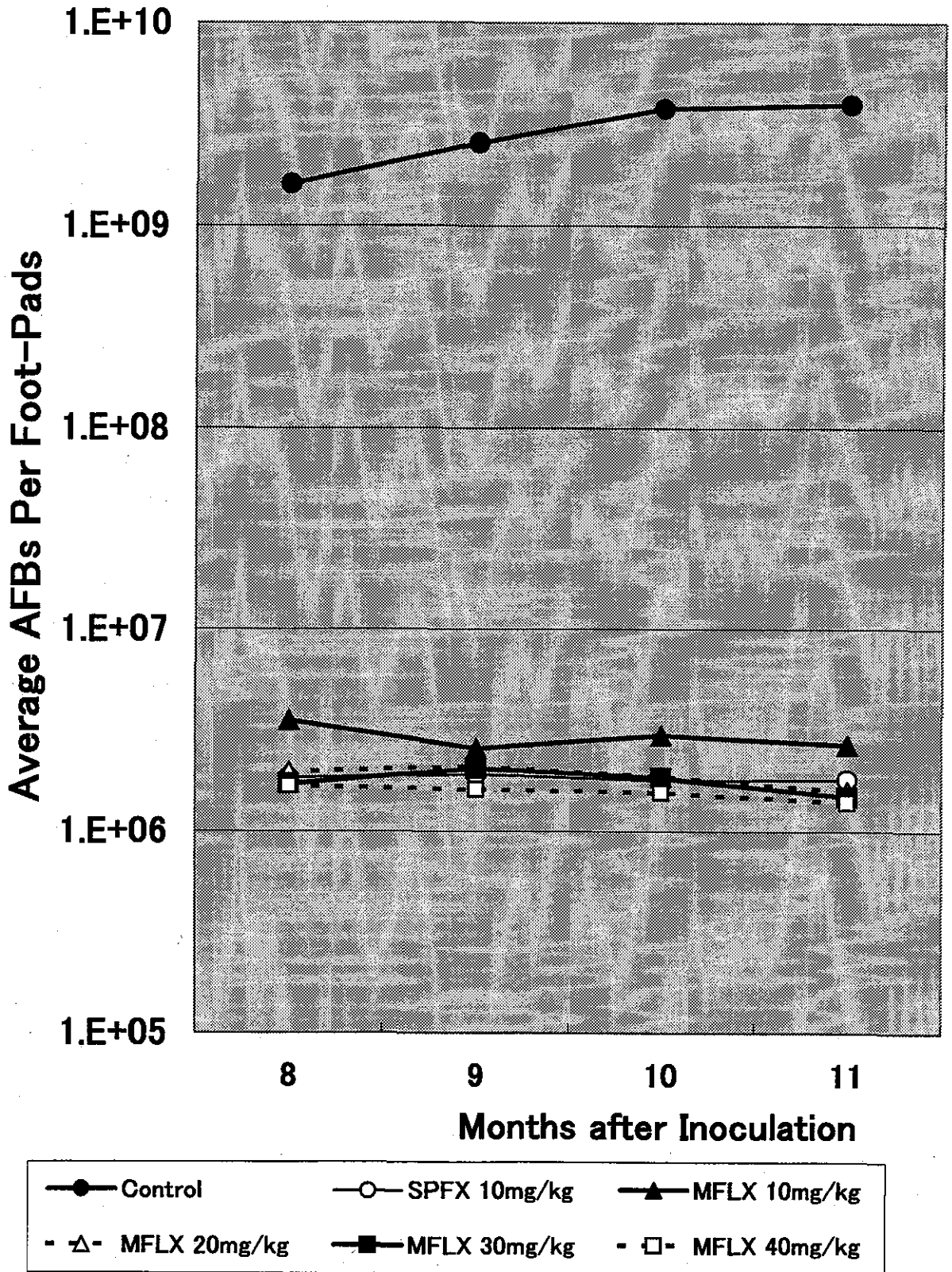


Fig. 2. *In Vitro* Activities of Fusidic Acid against *M.leprae*

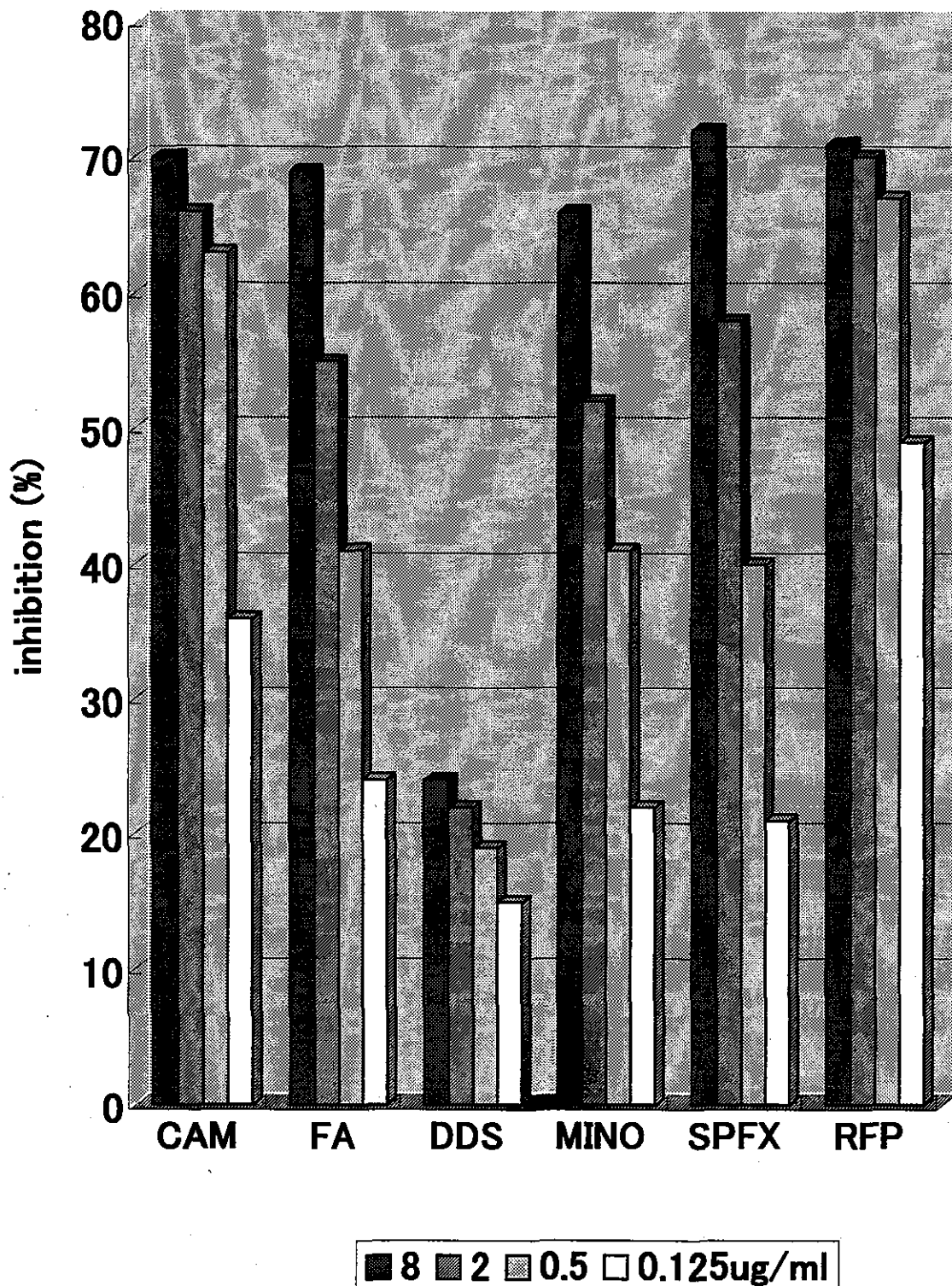


Fig. 3. Activities of Fusidic Acid against *M.leprae*

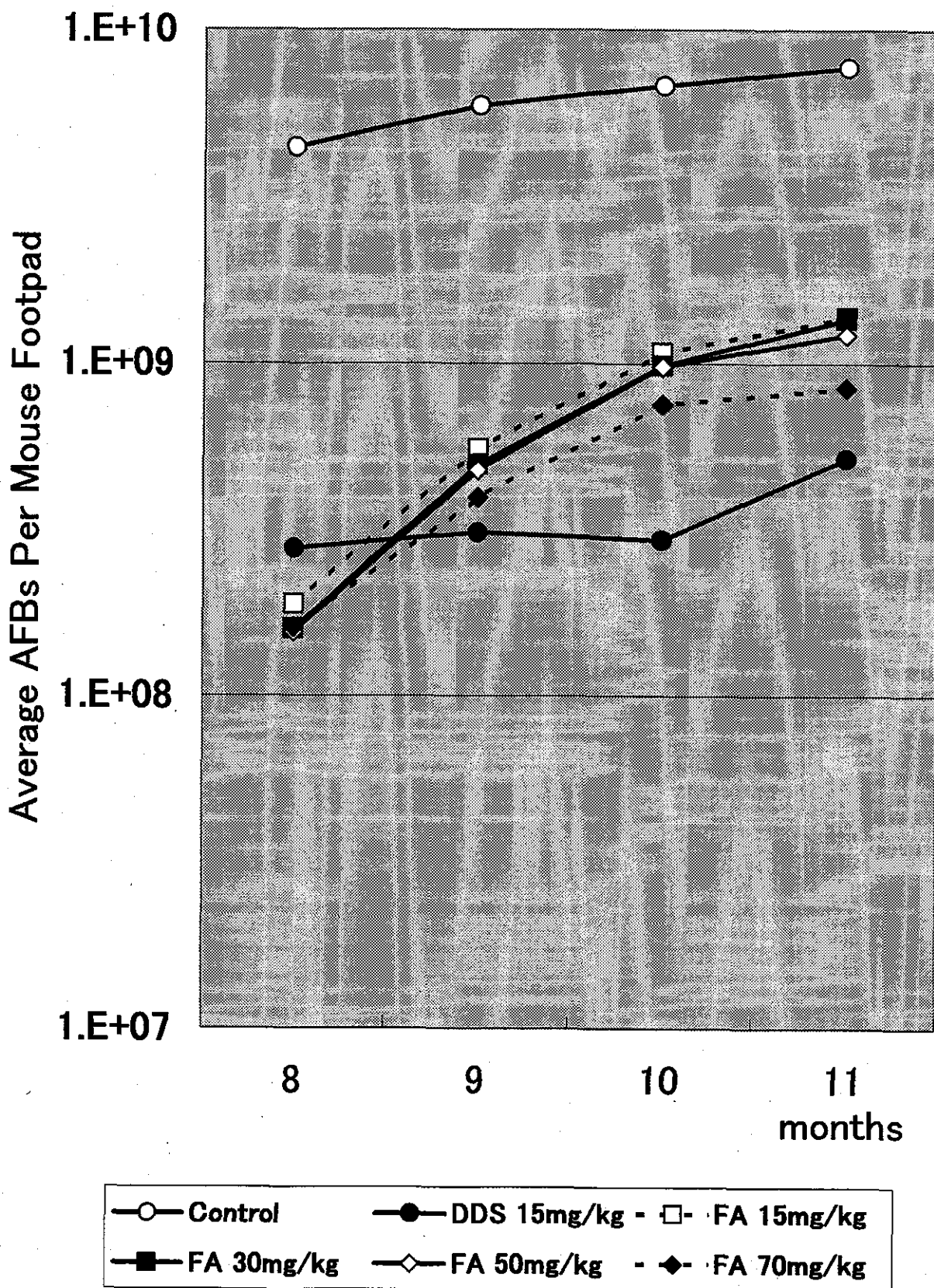


Fig. 4a. *In Vitro* Activities of Fluoroquinolones against *M.leprae*

