

【症 状】

皮膚と末梢神経が主病変である(表 31・2)。PB の皮疹は左右非対称性で、指頭大から手掌大、辺縁やや隆起性の境界明瞭な環状斑などを少数個認める(図 31・1)。乾いた感じがし、鱗屑を伴うことも多い。皮疹には痒みはない。皮疹部に知覚の障害、発汗障害、脱毛、色素脱失などを認め、運動麻痺が起こることもある。皮疹部に一致した末梢神経の肥厚は著明である。MB の皮疹は多彩で、一般に左右対称性の紅斑や環状斑、多数の小形の黄褐色から淡紅色の丘疹や結節、板状の結節や硬結などが多数出現する(図 31・2, 31・3)。皮疹の表面は光沢をもって平滑であることが多い。皮疹の知覚は軽度低下ないし正常。神経肥厚は認められるが、神経障害は徐々に現れる。眼症状を伴うことがある。

ハンセン病には慢性の経過中に出現する急性の激しい病状(らい反応)がときに出現する。らい反応はらい性結節性紅斑(ENL)と、境界反応に分類される。

【病 理】

PB は真皮にらい菌を貪食した類上皮細胞の浸潤巣があり、巨細胞やリンパ球も混在する。神経への細胞浸潤もみられる。乾酪壊死を認めることはまれである。MB は真皮内にらい菌の増殖したマクロファージが集まって、レプローマ(らい腫)とよばれる肉芽腫を形成する。

【検査・診断】

病変皮膚からメスで組織液を採取し、抗酸菌染色してらい菌を検出する(皮膚スミア検査)。また



図 31・3 ハンセン病(多菌型, MB)

病理組織標本を抗酸菌染色してらい菌を検出する。PB では組織切片や末梢血液を用いて PCR 検査を行う。診断は知覚障害を伴う皮疹、神経肥厚や知覚・運動障害、らい菌の証明、病理組織像を総合して行う。

【経過と治療】

早期に治療を行えば後遺症を残さず治癒する。治療は WHO が推奨する多剤併用療法(MDT 療法: DDS, リファンピシン, クロファジミン)で、6 か月間(PB)ないし 1~数年間(MB)服用する。フルオロキノロン系抗菌薬も有効である。

II. 皮膚結核 cutaneous tuberculosis

ポイント

- 1) 皮膚結核は、ヒト型結核菌(*M. tuberculosis*) およびウシ型結核菌(*M. bovis*)により生ずる皮膚病変の総称
- 2) 結核菌の存在が明らかな真正(性)皮膚結核 true cutaneous tuberculosis と、結核菌ないしその代謝物に対するアレルギー反応である結核疹 tuberculid に分類される(表 31・3)。
- 3) 検査はツベルクリン反応、塗抹染色法、分離培養法(MGIT 培養, 小川培地等)のほか、PCR 法などがある。
- 4) 治療はイソニアジドとリファンピシンにエタンプトールを併用し、単剤治療を行わない。

1 尋常性狼瘡 lupus vulgaris (図 31・4=口絵 198)

【本 態】

結核に免疫のある人で、肺結核などの原病巣が

表 31・3 皮膚結核の分類

真正皮膚結核 病巣部結核菌(+)	結核疹 病巣部結核菌(-)
尋常性狼瘡	バザン硬結性紅斑
皮膚腺病	丘疹壞疽性結核疹
皮膚疣状結核	陰茎結核疹
皮膚初感染徴候	腺病性苔癬
皮膚粟粒結核	結節性結核性静脈炎
潰瘍性皮膚結核	



図 31-4 尋常性狼瘡 (口絵 198 参照)

女性に多く、好発部位は顔面である。自覚症状に乏しい。表面には鱗屑、痂皮を付着する局面を形成していた。



図 31-5 皮膚腺病 (口絵 199 参照)

AIDS 患者。両側頸部に表面淡紅色の皮下冷膿瘍を認める。膿汁の塗抹検査、培養で結核菌を確認。肺結核があり、多剤耐性結核菌であった。

ら血行性に皮膚転移や、外部からの結核菌皮膚接種で生じた病巣である。

【統計】

皮膚結核は毎年約 100 例登録されているが、内容(皮膚結核の分類)は不明である。

【症状】

好発部位は顔面であるが(図 31-4=口絵 198)、その他全身のどこにでも発症しうる。皮疹は初期には帯黄赤褐色、粟粒大丘疹であるが、徐々に融合、拡大して、局面、結節、潰瘍などになる。

【病理】

真皮は乾酪変性、類上皮細胞、ラングハンス Langhans 型巨細胞などからなる結核結節である。

【検査・診断】

組織内菌要素は検出困難なことが多い。培養で結核菌が分離可能である。サルコイドーシスの局面型皮疹との鑑別が重要である。

【経過と治療】

抗結核薬としてイソニアジド(INH)、リファンピシン(RFP)にエタンブトール(EB)を1年以上多剤併用する。

2 皮膚腺病 scrofuloderma

(図 31-5=口絵 199)

【本態】

本症はリンパ節、骨、関節、筋肉、腱などの結核病巣から直接連続性に皮膚に波及して病変を形成するか、冷膿瘍を介して皮膚に病巣をつくる。

【症状】

皮下の結節ないし膿瘍で始まり、軟化して、皮膚は淡紅色から蒼紅色、暗紅色に変色するとともに瘻孔を形成して排膿し、潰瘍、瘢痕なども混在するようになる。好発部位は頸部である。

3 バザン硬結性紅斑

erythema induratum Bazin (図 31-6)

【症状】

結核疹の中でもっとも頻度が高い。個疹は結節性紅斑に類似した皮下の結節であるが自発痛を欠く。やがてびまん性の紅斑を伴う硬結となり、1~数か月で自然に吸収される。しかし潰瘍化することもある。

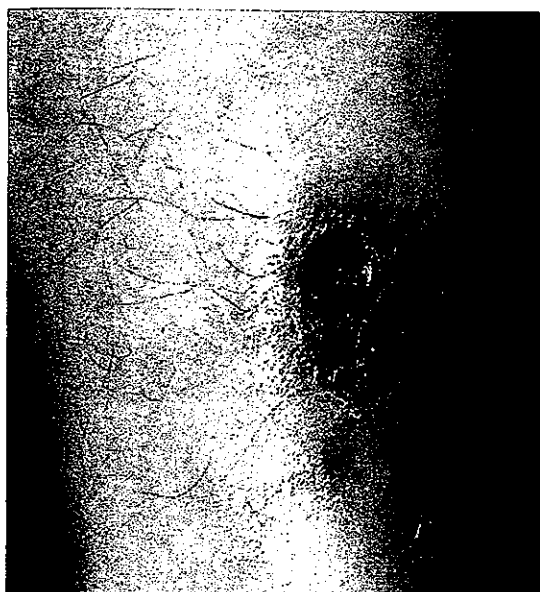


図 31・6 バザン硬結性紅斑

【病 理】

真皮下層より皮下組織における血管炎を伴った肉芽腫性病変である。

【検 査】

ツベルクリン反応は強陽性。結核菌を病巣から分離することはむずかしい。

III. 非結核性(非定型)抗酸菌症

non-tuberculous mycobacteriosis

(図 31・7=口絵 200)

ポイント

- 1) 室温で培養が可能な場合がある。
- 2) 日常生活(仕事, 趣味等)で感染する機会がある。

1) *Mycobacterium marinum* 感染症

【本 態】

魚を扱う職業の人や、趣味で(熱帯)魚を扱う人が経皮的に感染・発症することが多い。

【症 状】

外傷を受けやすく、比較的温度が低い手ないし



図 31・7 非結核性抗酸菌症(口絵 200 参照)

魚飼育を趣味とする患者。中指から手背部に表面痂皮を伴う結節を認める。痂皮, 生検皮膚の塗抹検査, 培養検査で *Mycobacterium marinum* を検出。

指の背面, 関節突出部に好発する(図 31・7)。皮疹は初期には中央部に膿疱, 痂皮などを伴う発赤, 腫脹性局面であるが, 漸次鱗屑, 痂皮を伴う紅色浸潤局面ないし結節となり, また膿瘍, 潰瘍となる。皮疹は単発のことが多いが多発することもある。皮疹は自覚症状を欠くことが多い。

【病 理】

化膿性炎症反応と類肉芽腫性反応の混在で, その程度は症例によりさまざまである。

【検査・診断】

膿汁を抗酸菌染色して鏡検する。また膿汁やホモジェネートした生検組織を培養すると, 室温で約2週間で生えてくる。また魚槽水などの感染源の培養からも菌を検出できる。

鑑別診断としては, スポロトリコーシス, クロモミコーシスなどの皮膚真菌症, 尋常性狼瘡, 皮膚疣状結核, 異物肉芽腫, 慢性膿皮症などがある。

【治 療】

テトラサイクリン系抗菌薬, リファンピシンなどを併用する。菌は37°Cではほとんど発育しないので, 使い捨て化学カイロによる局所温熱療法も有効である。

2 その他の非結核性抗酸菌症

M. ulcerans によるブルーリ潰瘍 (Buruli

ulcer) は結核, ハンセン病に次いで患者の多い抗酸菌感染症で, 四肢などに潰瘍を起こす。アフリカ, オーストラリアなどで発症している。

B 一般細菌感染症 bacterial infections

オリエンテーション

- 1) 皮膚から分離される細菌は, 常在菌と通過菌に分けられ, 常在菌による皮膚変化と通過菌による一般細菌感染症がある。
- 2) グラム陽性球菌である黄色ブドウ球菌とレンサ球菌を原因菌とする膿皮症が, 代表的な皮膚感染症である。
- 3) 膿皮症は感染経路により毛嚢性, 汗腺性, 非付属器性の3種類に分けられる。
- 4) グラム陽性桿菌, グラム陰性桿菌による感染症は, 常在菌による皮膚変化と考えられるものが多く, 宿主の側の要因が発症に関与する。
- 5) 治療は原因菌に感受性のある抗菌薬の選択投与と, 消毒, 切開, デブリドマン débridement などの局所処置を行う。

I. 皮膚の細菌学

bacteriology of the human skin

皮膚から分離される細菌は, 常在菌 resident flora と通過菌 transient flora あるいは一時的な停留菌とに分けられるが, 両者の区別は明瞭なものではなく, 常在菌による皮膚変化と通過菌による皮膚変化が起こりうる。通過菌による皮膚変化が一般的な感染症となるが, 宿主側の条件次第で常在菌による感染症も発症する。常在菌による皮膚変化の中には尋常性痤瘡, 紅色陰癬, 腋臭, 黄菌毛, pitted keratolysis, 脂漏, フケ dandruff などがあるが, これらの症状あるいは疾患は感染性はほとんど有していない。しかしその発症においてはいずれも細菌がなんらかの形で関与しており, 治療における抗菌薬の投与が有効である。

正常な皮膚から分離される細菌を表 31・4 にまとめた。 *Malassezia furfur* は酵母であるが, 脂漏部位, 頭部の皮表, 毛嚢内から分離される。糸状菌 (*Trichophytes*) も皮膚の湿潤部位から分離される。この二者は皮膚の菌叢 skin flora のメンバーとして欠かすことはできない存在であるため右端に加えた。下段に症状あるいは疾患名を入

た。

皮膚の菌叢は腸内, 口腔内, 腔内と比較すると単純であり, 部位により分離される菌種はさらに限定される。分離される部位と菌種を表 31・5 に示した。前額, 鼻前庭, 腋窩, 会陰, 第4趾間の5か所は, それぞれ人体の菌叢を特徴的に表す部位である。前額部は代表的な脂漏部位であり, 鼻前庭部は気道, 口腔と外界との接点であって湿潤部位である。腋窩は有毛部位であり, 汗腺が多く存在し, 擦過部位であり湿潤部位でもある。会陰部は腔内, 腸内, 尿道内の菌叢の影響を受ける湿潤部である。第4趾間は通常趾間の中でももっとも間隔が狭く, 密着しており, 湿潤部位である。

II. グラム陽性球菌感染症

皮膚の細菌感染症の多くはグラム陽性球菌であるブドウ球菌属 *Staphylococcus* と溶血性連鎖球菌属 *Streptococcus* を原因菌としており, これらの菌によって生じる疾患が膿皮症である。これら以外では近年, *Micrococcus sedentarius* が pitted keratolysis の原因菌であることが確認されている (表 31・6)。

す。血液中にあるHIV-1の蛋白に反応する特異的抗体、およびHIV-1抗原自体を検出することによって判定します。

血清学的診断の問題点は、感染してから特異的抗体が検出されるまでおよそ1カ月かかることです。このため、感染急性期には血清学的診断では判定できないことがあります。この空白の1カ月をウィンドウピリオドと呼んでいます。ウィンドウピリオドの問題は急性感染が見落とされるだけでなく、輸血用血液の汚染の危険性を高めるなど、多くの問題をはらんでいます。

最近ではこのウィンドウピリオドを短くするために、従来の血清学的診断だけではなく、HIV-1のRNA（リボ核酸）を増幅検出する方法も併せて利用されています。

治療の方法

HIV感染症の治療薬剤は現在17種類あります。逆転写酵素阻害薬と呼ばれる

はれるものが7種類あります。これらの薬剤を3剤以上組み合わせた多剤併用療法が、標準的な治療法として行われています。

多剤併用療法は著しい効果をあげており、この治療方法が始まってから、エイズで亡くなる患者さんの数は大幅に減りました。それでも、多剤併用療法でHIV感染症を根治することはできないため、患者さんは生涯薬をのみ続けなければなりません。

病気に気づいたらどうする

もしHIV-1に感染したのではないかと心配になったら、もよりの保健所あるいは病院に相談してください。保健所では匿名で無料の検査を受けることができます。検査は通常の採血（5ml程度）により行われます。

なお、献血はHIV-1検査の代わりにはならないので、注意してください。

感染症／皮膚

ハンセン病	石井則久	2689
帯状疱疹	本田まりこ	2690
単純疱疹（ヘルペス）	〃	2692
尋常性疣贅（いぼ）	〃	2693
伝染性軟属腫（みずいぼ）	〃	2693
皮膚真菌症（白癬）	〃	2694

ハンセン病

どんな感染症か

らい菌による慢性感染症で、主に皮膚と末梢神経に病変が生じます。日本では感染源になる人はほとんどいません。たとえ感染しても、現在の日本では発症することはまずありません。もちろん遺伝はしません。

従来「らい」「癩」などの言葉が用いられてきましたが、現在は偏見・差別を助長するものとして使えません。

症状の現れ方

自覚症状のない皮疹や、知覚障害によるやけどやけがなどで気づきます。ハンセン病の皮疹はかゆみのない紅斑、丘疹、結節、環状斑などさまざまで、ハンセン病に特異な皮疹はありません。

皮疹にはほぼ一致して知覚（触った感じ、痛み、熱い冷たいの感覚）が鈍くなったたり麻痺を認めます。診断や治療が遅れると神経がはれたり、運動障害（手足が曲がるなど）を伴うこともあります。

検査と診断

らい菌の検出が重要です。現在のところ、らい菌の培養は不可能なので、①皮膚症状のある部位にメスを刺して組織液を採取する皮膚スメア検査、②皮膚の病理組織を抗酸菌染色する検査、③らい菌の特異的な遺伝子（DNA）を証明する検査がありますが、これらのうち複数の検査が行われています。

障害なども調べます。

日本では、①皮疹（自覚症状なし）、②神経症状（知覚障害、肥厚、運動障害）、③らい菌の検出、④病理組織検査の4項目を総合して診断します。なお、発展途上国では世界保健機関（WHO）の簡便な診断法が用いられています。

治療の方法

治療はWHOの推奨する多剤併用療法に準じて行われています。抗生物質（リファンピシン、DDS、クロファジミン）を内服します。

ハンセン病は治る病気ですが、早期診断、早期治療、確実な内服を心がけ、後遺症を残さず耐性菌をつくらないようにすることが大切です。らい菌が多い（多菌型）患者さんは1〜数年間、らい菌の少ない（少菌型）患者さんは6カ月間の内服で治ります。

病気に気づいたらどうする

皮膚科で診察を受けてください。診察はまず問診と出身地・出身国、小児期の居住歴を聞き、必要に応じて検査を行います。

やけどの既往など）を行い、その後、皮膚症状、神経の所見、らい菌の証明、病理組織学的検査などを行います。

ハンセン病の歴史

有効な治療薬がない時代には、病状が進み、顔面、手足などに皮疹および末梢神経障害などを形成しました。そのため、外見上の問題と手足の不自由による就労の困難などから、住民から疎外され、宗教上も差別され、法律でも隔離などの対策がとられました。

さらに日本では、有効な治療薬の出現後も1996年まで「らい予防法」が存在し、偏見・差別、人権無視の長い歴史が続きました。

带状疱疹

どんな感染症か

体の左右どちらかの片側に、帯のように水ぶくれ（水疱）の集まりができる疼

は、顔や手足の神経学的検査が行われています。

はまず問診と出身地・出身国、小児期の居住歴を聞き、必要に応じて検査を行います。

に水ぶくれ（水疱）の集まりができる疼

回ただ規定どおり測ることもまた愚かである。高熱疾患患者, また解熱薬を使用している患者などでは, 1日5~7回, あるいはそれ以上測定するほうが診断・治療の助けになる。また, 測る場合は正しく体温が測定されているか否か, 必要によってはベッドサイドで観察する。

最近の薬物療法の事故で多いもののひとつが

急速解熱によるショックである。前述した解熱薬使用のメリット, デメリットを十分理解し, それに対応した看護を行うことが必要である。

また, 解熱薬を使用し, 急速な解熱が得られた場合, 患者の状態をよく観察することが, とくに重症患者, 高齢患者の場合に重要である。

(水島 裕)

○ 皮膚の痛み, 知覚異常

skin pain, and disorders of sensory nerve

□ 概念・分類・診断

皮膚感覚のなかで患者の愁訴として多いものはかゆみである。そのほか痛み, 知覚異常(おもに触覚, 痛覚, 温覚, 冷覚などの低下)など

がある。

分類・診断

◆皮膚の痛み◆

まず痛みを伴う疾患については, 帯状疱疹,

表1 痛みを伴う皮膚疾患の鑑別

疾患名	痛みの程度	痛みの種類	痒 痒	皮 疹	原 因	好発患者
帯状疱疹	中~高度	灼熱感, 疼痛	なし	水疱が帯状に集簇	水痘・帯状疱疹ウイルス	成人~老人
丹毒	中程度	圧痛	なし	浮腫性紅斑	化膿連鎖球菌	中高年
毒蛾皮膚炎	中程度	ピリピリする痛み	あり	紅色小丘疹の集簇	毒蛾の毒毛	全年齢
医動物刺咬症	中~高度	激痛	なし	紅斑, 蕁麻疹	クラゲ, ハチ, アリ, クモ, ムカデなど	海水浴客など
線状皮膚炎	中程度	灼熱感, 疼痛	なし	線状の発赤と腫脹	アオバアリガタハネカクシの体液	全年齢
顎口虫病	軽度	圧痛, 自発痛	あり	遊走性限局性蕁麻疹様紅斑	有棘顎口虫	生食愛好家
熱傷	種々	種々	なし	紅斑, びらん, 潰瘍	種々	全年齢
放射線皮膚炎	種々	種々	なし	紅斑, びらん, 潰瘍	種々	放射線治療者
アフタ	中~高度	疼痛	なし	口腔粘膜の潰瘍	種々	女性に多い
Raynaud症候群	高度	疼痛	なし	指趾の白紫紅色変化	種々	女性に多い
結節性紅斑	中程度	圧痛, 自発痛	なし	潮紅を伴う皮下結節	多病因性	女性に多い
Sweet病	種々	自発痛, 圧痛	なし	滲出性紅斑	種々	中年女性に多い
痛風	高度	激痛	なし	関節腫脹	高尿酸	中年男性
Buerger病	高度	反復性疼痛	なし	患肢末端壊死	閉塞性血管炎	中年男性
Osler結節	中程度	疼痛	なし	紅斑	亜急性細菌性心内膜炎	成人
Mondor病	軽度	牽引痛	なし	索状皮下硬結	血管炎	女性に多い
皮膚紅痛症	種々	灼熱痛, 触痛	なし	潮紅腫脹	血行障害など	成人

表2 知覚異常を伴う皮膚疾患の鑑別

疾患名	皮疹	触覚	痛覚	温覚	冷覚	掻痒	好発年齢
Hansen 病(少菌型： I, TT, BT)	環状の紅斑など	低下	低下	低下	低下	なし	成人～老人
Hansen 病(多菌型： LL, BL, BB, BT)	紅斑局面など多彩	やや低下	やや低下	やや低下	やや低下	なし	成人～老人
皮膚結核	種々	正常	正常	正常	正常	なし	中年～老人
梅毒	種々	正常	正常	正常	正常	なし	青年～成人
糖尿病による皮疹	種々	低下	低下	低下	低下	なし	成人～老人
尋常性白斑	境界鮮明な白斑	正常	正常	正常	正常	なし	全年齢
サルコイドーシス	種々	正常	正常	正常	正常	なし	成人～老人

丹毒、毒蛾皮膚炎、熱傷、結節性紅斑などがある。多くの場合は、皮疹の状態や既往歴、問診などから容易に診断できる。痛みの種類には、刺痛、灼熱痛、疼痛の3種が区別される。刺痛は針で刺すような痛みで、刺激が加わるとただちに感じるため fast pain と呼ばれるが、刺激を取り除くとただちに感じなくなる。灼熱痛は痛みを感じるまでに時間を要する slow pain で、刺激を取り除いても数秒間は残る。疼痛は身体の深部などがズキズキしたり、うずく痛みで、痛い場所を決めかねることもあり、また関連痛を伴うこともある。刺痛は A δ 線維に、灼熱痛は無髄の C 線維に属する線維によるとされている。皮膚の痛みのおもなものを表1に示した。

◆知覚異常◆

知覚神経終末は触覚、痛覚、温覚、冷覚を感じ、知覚神経→脊髄→脳幹→視床→大脳皮質へと伝わる。

皮疹を伴う知覚低下はまれで、表2に示した。触覚検査はしばしば圧痛覚と混同するので、綿球を少しばらして数本の綿にしたもの、または柔らかい筆の先などで軽くなでる。閉眼させ皮疹部と、反対側の正常部を交互に軽く触知し、

正常(たとえば10として)に比較して、どの程度低下しているかを数値で患者に答えさせる(5, 0などと)。

痛覚低下の検査は針の先で軽くはねるか突いて調べる。つよすぎると圧覚と混同する場合がある。所見は触覚と同様に記載する。

2 治療・看護の指針

痛みの治療

治療は原因を取り除くことである。帯状疱疹の疼痛について述べると、発症初期には抗ウイルス剤と鎮痛剤の内服を行う。また温めたり(温浴など)、気分転換をはかると痛みは緩和する。

知覚低下の治療

知覚低下があると、外傷や熱傷などがあっても気づかず、治療も遅れがちで、その場合には変形が残ったり切断することもある。とくに足部では注意が必要で、患者には毎日足底を眼で見、手で触って異物や外傷の有無を検査するよう指導する。また疾患治癒後にも知覚低下は改善しないことが多いので、引き続き外傷に注意させる。(石井 則久)

○ 浮腫(むくみ) edema

1 概念と発現機序

浮腫とは、皮下組織内に間質液が異常に貯留した状態を指す。間質液とは血漿が毛細血管よ

り血管外へ濾過されたものであり、したがって毛細血管から血漿の濾過を促進するような因子が働くときに浮腫が生じる。通常、アルブミン

CORRESPONDENCE¹

This department is for the publication of informal communications that are of interest because they are informative and stimulating, and for the discussion of controversial matters. The mandate of this JOURNAL is to disseminate information relating to leprosy in particular and also other mycobacterial diseases. Dissident comment or interpretation on published research is of course valid, but personality attacks on individuals would seem unnecessary. Political comments, valid or not, also are unwelcome. They might result in interference with the distribution of the JOURNAL and thus interfere with its prime purpose.

Active Surveillance of Leprosy Contacts in Country with Low Prevalence Rate²

ABSTRACT

For advanced control of leprosy in Pakistan where the World Health Organization leprosy elimination goal was achieved in 1996, we conducted surveillance of *Mycobacterium leprae*-seropositive patients and their contacts and drug resistant strains of *M. leprae*.

We measured anti-PGL-I antibody level in sera from leprosy patients and their contacts for early detection of *M. leprae* infection. Out of 34 leprosy patients undergoing treatment, 4 lepromatous leprosy patients were antibody positive, and 6.8 to 23.7 percent of occupational or household contacts were seropositive. Furthermore, three cases (1.2%) had a high antibody titer. For surveillance of drug resistant strains of *M. leprae*, dapsone and rifampin were targeted. Four out of 18 polymerase chain reaction (PCR) positive samples had mutation in *folP* gene, and among 10 PCR positive samples, one had a mutation in the *rpoB* gene.

These results indicate that serological analysis of patient contacts might be useful to find out high risk individuals, and there are *M. leprae* strains resistant to chemotherapeutic agents in Pakistan.

RÉSUMÉ

Dans le cadre du contrôle avancé de la lèpre au Pakistan où le programme de l'Organisation Mondiale de la Santé a atteint son but d'élimination en 1996, nous avons mené une étude d'épidémiologie-surveillance des patients séropositifs contre *Mycobacterium leprae*, de leurs contacts et des souches résistantes de *M. leprae* aux médicaments.

Nous avons mesuré les niveaux d'anticorps anti-PGL-I dans le sérum de patients lépreux et des personnes en contact avec ces derniers afin d'effectuer une détection précoce de l'infection par *M. leprae*. Parmi 34 patients actuellement sous traitement, 4 patients lépromateux étaient positifs à l'examen sérologique, et 6,8 à 23,7 pour cent des personnes en contact, soit professionnel, soit domestiques, furent séropositifs. De plus, 3 cas (1,2%) présentaient un titre élevé. La résistance à la dapsone et la rifampicine furent évaluées pour la surveillance des souches résistantes de *M. leprae*. Quatre des 18 échantillons positifs par PCR présentaient des mutations du gène *folP* et, parmi 10 échantillons positifs par PCR, une avait une mutation du gène *rpoB*.

Ces résultats indiquent que l'analyse sérologique des contacts proches de patients hanoïsiens pourrait bien être utile pour découvrir les individus à haut risque et qu'il existe des souches de *M. leprae* résistantes aux médicaments chimiothérapeutiques au Pakistan.

RESUMEN

Se hizo un estudio en Pakistán, donde la meta de la OMS de eliminación de la lepra se logró en 1996, para evaluar la evolución de los pacientes séro-positivos a *Mycobacterium leprae* y sus contactos, y para detectar cepas de *M. leprae* resistentes a las drogas antileprosas.

¹ Received for publication 27 May 2003. Accepted for publication 11 October 2003.

² Reprint requests to Dr. Masanori Kai, Dept. of Microbiology, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-2-1 Aoba-cho, Higashimurayama, Tokyo, 189-0002, Japan. E-mail: mkai@nih.go.jp

Se midió la presencia de anticuerpos anti-PGL-I en los sueros de los pacientes y sus contactos para detectar la infección temprana por *M. leprae*. De los 34 pacientes en tratamiento, 4 pacientes con lepra lepromatosa (11.7%) tuvieron anticuerpos anti-PGL-I, además de que 6.8% de los contactos ocupacionales y 23.7 % de los contactos convivientes también fueron sero-positivos. Tres casos (1.2%) tuvieron anticuerpos anti-PGL-I a títulos elevados. También se estudió la resistencia de las cepas a dapsona y rifampina. Cuatro de 18 muestras positivas por la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR) tuvieron una mutación en el gene *folP*, y una de 10 muestras positivas por PCR tuvo una mutación en el gene *rpoB*.

Estos resultados indican que el análisis serológico de los pacientes puede ser útil para detectar a los individuos de alto riesgo, y que en Pakistán hay cepas resistentes a la quimioterapia.

TO THE EDITOR:

In Pakistan, the multi-drug therapy (MDT) program against leprosy conducted by the World Health Organization (WHO) to eliminate the disease was quite successful, and the present prevalence rate is 0.1 per 10,000 inhabitants. However, there are "hot spot areas" where the prevalence rates are still as high as 3.4 per 10,000. Although a significant reduction of the total number of cases registered was observed, no apparent reduction of new cases was achieved⁽⁹⁾, and the WHO has now recognized a necessity of a serious concern for leprosy control. One of the ways to achieve disease elimination is an active epidemiological surveillance of patient contacts in highly endemic "hot spot areas," which will be directly associated with detection of leprosy patients at an early stage.

On the other hand, although MDT was designed to prevent the emergence and spread of drug resistant strains, resistant *Mycobacterium leprae* strain have emerged. A strain showing resistance to both dapsone and rifampin was reported in 1993⁽³⁾ and, at present, there are even reports indicating the emergence of a strain resistant to multi-

ple drugs⁽⁶⁾. These drug resistant strains provide another serious problem and should not be ignored, especially in countries where the leprosy elimination goal has been achieved. Therefore, the development of a useful tool for early detection of leprosy and drug resistant strains is necessary for the prompt initiation of better medication.

In this study, we conducted serological surveillance of household and occupational contacts, and detected drug resistant strains in Karachi, a representative endemic area in Pakistan.

Serological test for leprosy. A total of 300 sera from various individuals, including in-and-out patient of CDGK Leprosy hospital, were obtained with informed consent. These sera were donated by 34 leprosy patients under treatment, 193 household contacts, 59 occupational contacts, and 14 non-contact healthy individuals living in Karachi (Table 1). Infection with *M. leprae* was assessed by using SERODIA[®]-leprae kit (Fuji Rebio Inc., Tokyo, Japan), which detects antibody against phenolic glycolipid-I (PGL-I)⁽¹⁾. Four leprosy patients under treatment were still found to be anti-PGL-I antibody positive (Table 1), and they were

TABLE 1. Detection of anti-PGL-I antibody in sera from leprosy patients and their contacts.^a

Group	No. of sera examined	No. of positive sera	Percent positivity	No. of positive sera at each serum dilution				
				1:32	1:64	1:128	1:256	1:>512
Lepromatous leprosy patients	20	4	20	0	2	0	0	2
Borderline leprosy patients	8	0	0	0	0	0	0	0
Tuberculoid leprosy patients	6	0	0	0	0	0	0	0
Household contacts (children)	61	7	11.5	0	3	0	3	1
Household contacts (adults)	132	9	6.8	4	2	1	2	0
Occupational contacts	59	14	23.7	2	5	3	2	2
Non contacts	14	3	21.4	0	1	1	1	0
Total	300	37	12.3	6	13	5	8	5

^aDetection of anti-PGL-I antibodies in serially diluted sera by ELISA using NT-P-BSA antigen coated gelatin particles.

Serum dilution of more than 1:32 showing agglutination was taken as positive.

TABLE 2. Detection of drug resistant associated gene mutations of clinical isolates of *M. leprae*.*

Place	No. of samples	<i>folP</i> gene		<i>rpoB</i> gene	
		No. amplified [†]	Mutation	No. amplified	Mutation
Karachi	24	8	1	5	1
Peshawar	5	5	1	5	0
Balakot	10	5	2	0	0
Total	39	18	4	10	1

* Drug resistance related-genes, *folP* and *rpoB* were amplified by PCR, sequenced, and compared with control *M. leprae* strain, Thai 53.

[†] Number of samples successfully amplified by PCR.

all lepromatous leprosy patients. However, borderline or tuberculoid leprosy patients had no antibodies against PGL-I. We then examined 193 household and 59 occupational contacts. Among household contacts, 11.5% of children had the antibody as did 6.8% of adult contacts (Table 1). Furthermore, 23.7% of occupational contacts had the antibody. Three out of 14 non-contacts were antibody positive. Further studies should be conducted with a larger number of non-contacts, but presently, we could not obtain informed consent from them. The titers among child contacts and occupational contacts are surprisingly high, which may indicate that some individuals were exposed to *M. leprae*. This is in accordance with a report that the seroprevalence rate was 26 to 28% in the high endemic area, and 7% in the low endemic area in Sulawesi, Indonesia (7). When we measured the antibody in a semi-quantitative fashion, individuals having high antibody titer were found in household and occupational contacts. The titers of antibody varied from low (1:32) to high (1:>512) values. Three cases out of 252 (1.2%) samples showed quite high (1:>512) antibody titer. These individuals should have a clinical examination to monitor the leprosy manifestation. It has been reported that anti-PGL-I antibody level can reflect the disease activity (2). Therefore, it might be reasonable to speculate that the antibody production was suppressed by successful MDT treatment.

Detection of drug resistant *Mycobacterium leprae*. Multi-bacillary (MB) type leprosy patients, either under or after MDT treatment, were targeted to obtain bacilli in the biopsy specimen. *M. leprae* genomic DNA was extracted from the specimens as described previously (5).

To detect drug resistant *M. leprae*, based on the previous studies (4, 6, 8), we targeted mutations of the *folP* gene encoding dihydropteroate synthase (DHPS) for dapsone (5), and the *rpoB* gene for rifampin resistance (4, 8). The polymerase chain reaction (PCR) conditions and primers for *folP* and *rpoB* are as described previously (5, 6). The amplified products from each primer pair were sequenced by using the ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Norwalk, CT, U.S.A.).

Thirty-nine skin samples were taken from leprosy patients in endemic areas of Pakistan such as Karachi, Peshawar, and Balakot, to detect gene mutations relating to drug resistance (Table 2). The number of samples successfully amplified using primers for *folP* gene from 39 biopsy specimens was 18. Among amplified samples, four samples showed *folP* mutations (22.2%). The *folP* gene mutations were found at position 158th (the numbering system following that of reference 5) in three samples, and position 164th in one sample. These mutations induce amino acid changes from threonine to isoleucine at position 53rd of DHPS and from proline to arginine at 55th, respectively (not shown). These mutations have most commonly been observed in dapsone resistant strains (5). Although a larger number of samples should be analyzed, these observations may indicate that there are dapsone-resistant *M. leprae* in Pakistan. In contrast to *folP* gene, primer pair for *rpoB* less frequently amplified the DNA. The possible reason for the failure might be the presence of less than detectable level of *M. leprae* bacilli. In our hands, the detection limit is approximately ten bacilli per biopsy sample. Also the different amplification efficiency between *folP*

and *rpoB* might depend on a difference of the specificity of primers for each gene. Among ten *rpoB* gene samples amplified from the 39 biopsies, one sample showed the gene mutation at position 550th of the *M. leprae* β subunit gene of RNA polymerase. This position was not a so-called "hot spot" of *rpoB*-associated resistant mutations⁽⁸⁾; however, it induced a change of amino acid residue from aspartic acid to glycine (not shown). There was no relationship among the resistant samples, and no double mutation encoding both *folP* and *rpoB* genes was observed.

It is not easy to determine whether the resistant strain developed before or after introduction of MDT. However, there might be some patients who are inadequately treated with MDT due to economical or other social reasons. These patients have a higher risk to produce multidrug-resistant strain than patients adequately treated. Active surveillance is required for control of the spread of drug resistant *M. leprae*.

Taken together, we showed that some leprosy patient contacts have been infected with *M. leprae*. Also, dapson resistance has been detected in Pakistan.

Acknowledgment. We thank Dr. Akira Kobayashi and Dr. Tetsu Nakamura (Peshawar-Kai Hospital, Peshawar, Pakistan) for supplying clinical samples. This work was supported in part by a Health Science Research Grants-Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

—Masanori Kai, Ph.D.,
Yumi Maeda, Ph.D.,
Shinji Maeda, Ph.D.,
Yasuo Fukutomi, Ph.D.,
Kazuo Kobayashi, M.D., Ph.D.,
Yoshiko Kashiwabara, Ph.D.,
Masahiko Makino, M.D., Ph.D.

Department of Microbiology, and Department of Host Defense
Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases

—Mohammad Ali Abbasi, M.D.
CDGK (Ex-Karachi Metropolitan Corporation) Leprosy Hospital
Manghopir, Karachi-26, Pakistan

—Muhammad Zubair Khan, M.D.

Department of Dermatology and Venerology
Leprosy Post Graduate Medical Institute
Government Lady Reading Hospital,
Peshawar, Pakistan

—Pervez Ali Shah, M.D.

Balakot Leprosy Hospital, Balakot,
Pakistan

REFERENCES

1. BRENNAN, P. J., and BARROW, W. W. Evidence for species specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* **48** (1980) 382–387.
2. CHO, S. N., CELLONA, R. V., VILLAHERMOSA, L. G., FAJARDO, T. T., JR., BALAGON, M. V., ABALOS, R. M., TAN, E. V., WALSH, G. P., KIM, J. D., and BRENNAN, P. J. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8** (2001) 138–142.
3. GONZALEZ, A. B., MAESTRE, J. L., HERNANDEZ, O., COLUMBIE, Y., ATRIO, N., MARTIN, M., FERNANDEZ, A. M., AND RODRIGUEZ, J. Survey for secondary dapson and rifampicin resistance in Cuba. *Lepr. Rev.* **64** (1993) 128–135.
4. HONORE, N., and COLE, S. T. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37** (1993) 414–418.
5. KAI, M., MATSUOKA, M., NAKATA, N., MAEDA, S., GIDOH, M., MAEDA, Y., HASHIMOTO, K., KOBAYASHI, K., and KASHIWABARA, Y. Diaminodiphenyl-sulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **177** (1999) 231–235.
6. MAEDA, S., MATSUOKA, M., NAKATA, N., KAI, M., MAEDA, Y., HASHIMOTO, K., KIMURA, H., KOBAYASHI, K., and KASHIWABARA, Y. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45** (2001) 3635–3639.
7. VAN BEERS, S., HATTA, M., and KLATSER, P. R. Seroprevalence rates of antibodies to phenolic glycolipid-I among school children as an indicator of leprosy endemicity. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* **67** (1999) 243–249.
8. WILLIAMS, D. L., WAGUESPACK, C., EISENACH, K., CRAWFORD, J. T., POSTAELS, F., Salfinger, M., NOLAN, C., ABE, C., STICHT-GROH, V., and GILLIS, T. P. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38** (1994) 2380–2386.
9. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy—global situation. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **77** (2002) 1–8.

らい菌のダブソン耐性変異

甲斐 雅規*

国立感染症研究所ハンセン病研究センター

〔受付：2004年7月12日〕

キーワード：ダブソン、点突然変異、ハンセン病、薬剤耐性、葉酸合成酵素

サルファ剤に耐性を示す種々の細菌が葉酸合成系酵素であるDihydropteroate synthase (DHPS) をコードする遺伝子 *folP* に変異を持つことから、ハンセン病の原因菌であるらい菌のダブソン耐性が疑われる臨床分離株を用いてそれぞれの *folP* の塩基配列を決定し解析を行った。その結果、耐性らい菌の DHPS のアミノ酸位置53位と55位に特徴的な変異を発見した。同変異位置の少なくとも一方の55位は他のサルファ剤耐性細菌でも変異が見られることから、ダブソン耐性と *folP* のこの両部位における点突然変異には強い相関があるものと考えられた。

はじめに

Diaminodiphenylsulfone (DDS) (別称ダブソン) は、ハンセン病の主要治療薬で最も古くからある薬剤の1つであり、現在もリファンピシン、クロファジミンとともに、ハンセン病流行国で行われている多剤併用療法に用いられている^{1,2)}。

ダブソンはリファンピシンやクロファジミンといった他の優れた薬剤が開発、使用され始める前から使用されてきた薬剤である^{3,4)}。そのため長期間単剤で使用されてきた例が多数あることも事実である⁵⁾。また、らい菌の増殖速度は非常に遅くその世代時間 (generation time) は、大腸菌の約20分に対し、らい菌は約11~13日という非常に遅い増殖速度であり、従って薬剤投与期間も長期

にわたることは避けられない。さらに、医療設備や制度あるいは医師、医薬品の不十分な開発途上国などでは決められたレジユメに従えず、不適切な薬剤使用例も決して少なくないと考えられる⁶⁾。そのようなことが要因になって発生すると思われる耐性菌はこの薬剤の使用が始まった初期の頃から確認、報告されてきている^{7,8)}。World Health Organization (WHO) の推進している多剤併用療法が効を奏し⁹⁾、薬剤投与期間も短縮され、個々の耐性菌は一見問題ではないような感を与えるが、やはり過去にダブソンの単剤投与例が多かったこと、抗らい菌薬として選択できる薬剤の種類が少ないこと、多剤に耐性を獲得した菌の報告もあること^{10~12)}、さらには新しい抗ハンセン病治療薬開発の手掛かりとするためにも、耐性機構の解明は重要なことと考えられる。また、耐性菌を扱う上で欠かせない薬剤感受性試験は人工培養できないらい菌では大変困難な作業となっており¹³⁾、耐性機構が解明されることにより簡易耐性菌検出法の確立が期待される場所でもある。ここでは、ダブソン耐性とそれに関わる遺伝子変異

*Corresponding author :

国立感染症研究所ハンセン病研究センター病原微生物部
〒189-0002 東京都東村山市青葉町4-2-1
Tel : 042-391-8211 Fax : 042-394-9092
E-mail : mkai@nih.go.jp

について得られた知見を述べたい。

ダブソンの作用とサルファ剤の耐性機構

ダブソンの化学構造はサルファ剤と類似している¹⁴⁾。本剤の標的は、構造的に類似した他のサルファ剤と同様にハンセン病の原因菌であるらい菌が持っている葉酸合成系であると考えられている。葉酸合成系はヒトなどの動物細胞は持っていない代謝系であり、そのためいわゆる選択毒性があり比較的副作用も少ない薬剤となっている。標的である葉酸合成系には種々のステップがあり、それぞれのステップで異なる酵素が関与し中間物質が合成されているが、その中の1つのステップに作用しその中間産物の合成を阻害して、結果として増殖を抑制するものと考えられている^{15,16)}。

らい菌以外の細菌でサルファ剤に耐性を獲得した例は多数あり、そのような耐性菌を用いた耐性機構の解析の報告も多数存在する^{17,18)}。それらの報告からサルファ剤耐性機構として次の4つが考えられる。第一に前述の葉酸合成系の酵素の1つであるDihydropteroate synthase (DHPS) (EC 2.5.1.15) をコードする遺伝子 *folP* の変異^{17,18)}、第二に主にプラスミド性のDHPSをコードする遺伝子 *sul1*, *sul2* の有無¹⁹⁾、第三にDHPSが作用する基質である *para*-aminobenzoic acid (PABA) の産生量の増加による耐性、第四に、薬剤の透過が減退するような膜の変化による耐性が考えられている²⁰⁾。これらのうち一、二、三の耐性様式が主流であると考えられている。二番目の *sul1* と *sul2* (最近 *sul3* も見つかった) ²¹⁾ では、*sul* 遺伝子にコードされたDHPSは薬剤親和性が低いことからこの遺伝子を持つ菌は耐性を獲得する。*sul* 遺伝子は主にグラム陰性菌で見られ、プラスミドを介することがほとんどであるのでらい菌のダブソン耐性機構には当てはまらないものと考えられる。

しかし、この研究を行った1998年当時、らい菌のリファンピシン耐性と *rpoB* 変異の関連はすでに報告されていたもの^{22, 23)}、ハンセン病の主要薬剤であるダブソン耐性についての報告は皆無であった。そこでらい菌のダブソン耐性と葉酸合成系酵素の変異の相関について調べた。

ダブソン耐性臨床分離株の遺伝子変異とダブソン耐性機構

らい菌は国内のハンセン病療養所から薬剤耐性が疑われる例を中心として供給を受けた生検サンプルからハンセン病研究センターで松岡が分離した。ダブソン感受性は Shepard らの方法に従い¹³⁾、 1×10^4 個のらい菌を後肢足蹠に感染させた BALB/c マウスを菌接種4週間後よりダブソン含有飼料で約30週飼育した後の増加菌数で決定した。薬剤量を低度、中度、高度と3つに分け、それぞれで増菌が確認されたものを低度耐性、中度耐性、高度耐性とした。対照菌はダブソン感受性である Thai53 株を用いた。

らい菌の DHPS をコードする遺伝子 *folP* の塩基配列をデータベースより²⁴⁾ 調べプライマーを設定 (FP-F: 5'-GCTTCTCGTGC CGGAAGCGCTCG-3', FP-R: 5'-CGCAACTCCATTCGGTCAGCCATC-3') し、遺伝子全域をPCR法にて増幅した。ここで *folP* にはゲノムデータベース上に2種類のものがあり、後に Gillis らはそれを *folP1*, *folP2* と称している²⁵⁾。ここで我々が解析した *folP* は *folP1* と同一のものであるが、ここでは単に *folP* と記載する。遺伝子内に数種のプライマーを設定し各分離株由来遺伝子のダイレクトシークエンスを行い、薬剤感受性である対照の Thai53 株の配列と比較した (図1)。

	158 ¹⁾	164		
Thai-53	CGTCGGTGGC	GAATCGACCC	GGCCCCGGT	} DDS 感受性菌
Kanazawa	CGTCGGTGGC	GAATCGACCC	GGCCCCGGT	
Zensho-2	CGTCGGTGGC	GAATCGACCC	GGCTCCGGT	} DDS 耐性菌及び耐性が疑われた菌
Zensho-5	CGTCGGTGGC	GAATCGACCC	GGCTCCGGT	
Airaku-2	CGTCGGTGGC	GAATCGACCC	GGCTCCGGT	
Airaku-3	CGTCGGTGGC	GAATCGATCC	GGCCCCGGT	
Zensho-4	CGTCGGTGGC	GAATCGATCC	GGCCCCGGT	
Shinsei-1	CGTCGGTGGC	GAATCGCCCC	GGCCCCGGT	

¹⁾ *folP* 遺伝子の塩基番号
*太字は変異箇所

図1 らい菌分離株から増幅した *folP* 遺伝子の部分塩基配列

その結果ダブソン耐性株で *folP* 遺伝子の塩基番号157, 158, 164位が変異していることがわかった。この変異はミスセンス変異でありアミノ酸の変異を伴うものであった。すなわちアミノ酸配列で53位のトレオニンがイソロイシンもしくはアラニンに、55位のプロリンがロイシンにそれぞれ変異するものであった (表1)。

同様の報告はWilliamsらが示している²⁵⁾。さらにその後の前田や松岡らによる研究からもこの部分がダブソン耐性変異のホットスポットであることが裏付けられている^{11, 12)}。因みに*folP2*についてはやはりWilliamsらがDHPSに変異がないことを報告している²⁵⁾。

ここで、他のサルファ剤耐性菌の持つDHPS遺伝子変異部位を比較してみると、表2で示すように大腸菌やナイセリア菌でも同様にらい菌の55位に相当する部位のアミノ酸変異が見られている²⁶⁾。

サルファ剤はDHPSの基質となるPABAの代わりにDHPSに結合し拮抗阻害をおこすことで薬酸合成を停止させ菌の増殖を阻害するが、そのDHPSとPABAの結合部位の1つは大腸菌のX線結晶構造解析からDHPSの63位アルギニン(らい菌での54位アルギニン)であることが分かった²⁶⁾。その位置と我々の発見したアミノ酸変異位置と照らし合わせてみると、まさにその変異はDHPSとPABAの結合位置54位の両隣であることがわかった。このことはその後さらに結核菌を用いたDHPSのX線結晶構造解析からも裏付けられた²⁷⁾。ダブソン耐性らい菌ではDHPSの53位もし

くは55位アミノ酸に変異が生じ、立体構造に変化をきたし本来の基質であるPABAは結合するが、ダブソンは結合できなくなっていることが示唆された。

考 察

以上はダブソン耐性が疑われる臨床分離株を用いた解析から得られた結果であり、DHPSの53位あるいは55位の変異とダブソン耐性の間の強い相関を示すものであることは事実であるが、ではその部分に変異がなければ100%ダブソン感受性かどうかとなるとそうとは言えないようである。前述のようにマウスを用いたダブソン感受性試験で使用される薬剤濃度には0.01%、0.001%、0.0001%と3種類を用い、耐性度の異なる分離株が存在するわけである。例えば、0.0001%のダブソン含有飼料を食べているマウスでは増殖が見られるが0.001%では増殖しない、このようないわゆる低度耐性菌の中にはこのホットスポットに変異が認められない可能性もある。また、ダブソン耐性がDHPSの立体構造の変化によるものならば、まだ見つかってはいないような他の部位の変異に伴う立体構造の変化が耐性化をもたらすという可能性も否定できない。さらに前述の4つの耐性機構の中のDHPSの変異以外のものの関与も当然検討すべきことと考えられる。そのような他の変異もしくは耐性機構の存在、あるいはそれら耐性機構のいくつかのコンビネーションによって耐性度の違いが表現型となって現れてきていると考えることも可能である。

また、耐性菌と遺伝子の持つ変異との相関について、実験生物学的には、耐性と変異の相関をさらに証明するためには逆に実験的に作成した遺伝子変異が菌の耐性化をもたらすかどうかが決定的な裏付けとなる。これに関してはウブサラ大学のFermerらによる大腸菌の*folP*遺伝子破壊株を用いた研究²⁸⁾ およびWilliamsらによる同様の報告があり²⁵⁾、確かに53位の変異がダブソン耐性をもたらすことが証明されている。ただし、この実験は大腸菌を用いたものであるためそのままらい菌に当てはめるのは危険である。しかし、らい菌では人工培養できないことから変異株の作成ができない

表1 らい菌臨床分離株の*folP*遺伝子の変異

菌株	DDS感受性	53位アミノ酸と塩基		55位アミノ酸と塩基	
		塩基	アミノ酸	塩基	アミノ酸
Thai53	感受性	ACC	Thr	CCC	Pro
Kanazawa	感受性	ACC	Thr	CCC	Pro
Airaku-2	低度耐性	ACC	Thr	CTC	Leu
Airaku-3	高度耐性	ATC	Ile	CCC	Pro
Shinsei-1	不明	GCC	Ala	CCC	Pro
Zensho-2	高度耐性	ACC	Thr	CTC	Leu
Zensho-4	高度耐性	ATC	Ile	CCC	Pro
Zensho-5	不明	ACC	Thr	CTC	Leu

表2 種々のサルファ剤耐性株におけるDHPSの変異位置

アミノ酸残基番号(<i>M. leprae</i>)	<i>M. leprae</i>	<i>E. coli</i>	<i>N. meningitidis</i>
18	S ¹⁾	- ²⁾	-
19	F	-	F→ ³⁾ L
20	S	-	-
52	S	-	-
53	T→I,A	-	-
54	R	-	-
55	P→L	P→S	P→L,S
56	G	-	-

1) アミノ酸は一文字表

2) -はらい菌と同一アミノ酸

3) 矢印は変異によるアミノ酸置換

のは周知のことである。そこでらい菌と同じ抗酸菌の *M. smegmatis* で同様の欠損変異株を作成し、変異と耐性の相関を厳密に調べようという試みをハンセン病研究センターの中田が精力的に行っている。そのような変異株が作成できれば、各種変異と耐性化の関係を直接知ることができるようになる上、耐性度の違いをもたらす変異あるいは変異のコンビネーションの解明にも結びつくだろう。今後の研究の発展を期待したいところである。

謝 辞

らい菌分離株並びに組織試料のご提供を頂いた全国の療養所の提供者並びに療養所の先生方そして共同研究者の皆様に深く感謝致します。また、名誉ある日本ハンセン病学会賞を授けて下さった選考委員並びに関係諸氏の方々に心より感謝致します。

文 献

- 1) World Health Organization: Chemotherapy of leprosy for control programmes. Report of a WHO Study Group, WHO Technical Report Series No. 675, 33, 1982.
- 2) De Oliveira CR, De Alencar Mde J, De Sena Neto SA, Lehman LF, Schreuder PA: Impairments and Hansen's disease control in Rondonia state, Amazon region of Brazil. *Lepr Rev* 74: 337-348, 2003.
- 3) Garrett AS, Corcos MG: Dapsone treatment of leprosy. *Lepr Rev* 3-4: 106-108, 1952.
- 4) Garrett AS: Mass treatment of leprosy with D.A.D.P.S. (dapsone). *Lepr Rev* 3-4: 47-53, 1951.
- 5) Barton RP, Rees RJ, McDougall AC, Ellard GA: The nose in lepromatous leprosy; bacteriological and histopathological studies of patients treated with dapsone monotherapy for varying periods of time. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 50: 58-67, 1982.
- 6) Ishii N: Recent advances in the treatment of leprosy. *Dermatol Online J* 9: 5, 2003.
- 7) Pettit JHS, Rees RJW : Sulphone resistance in leprosy. An experimental and clinical study. *Lancet* 2:673-674, 1964.
- 8) Shepard CC, Ree RJW, Levy L, Pattyn SN, Baohong J, Dela Cruz EC: Susceptibility of strains of *Mycobacterium leprae* isolated prior to 1977 from patients with previously untreated lepromatous leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 54: 11-15, 1986.
- 9) World Health Organization: Leprosy-global situation. *Wkly Epidemiol Rec* 77: 1-8, 2002.
- 10) Cambau E, Perani E, Guillemin I, Jamet P, Ji B : Multidrug-resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin in *Mycobacterium leprae*. *Lancet* 349:103-104, 1997.
- 11) Maeda S, Matsuoka M, Nakata N, Kai M, Maeda Y, Hashimoto K, Kimura H, Kobayashi K, Kashiwabara Y: Mutidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 3635-3639, 2001.
- 12) Matsuoka M, Kashiwabara Y, Liangfen Z, Goto M, Kitajima S: A second case of multidrug-resistant *Mycobacterium leprae* isolated from a Japanese patient with relapsed lepromatous leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 71: 240-243, 2003.
- 13) Shepard CC : A kinetic method for the study of drugs against *Mycobacterium leprae* in mice. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 35:429-435, 1967.
- 14) 儀同政一、斎藤 肇：ハンセン病医学—基礎と臨床—第7章 治療薬、東海大学出版会、113-133, 1997
- 15) Richey DP, Brown GM: The biosynthesis of folic acid. IX. Purification and properties of the enzymes required for the formation of dihydropteroic acid. *J Biol Chem* 244: 1582-1592, 1969.
- 16) Baumstark BR, Spremulli LL, RajBhandary UL, Brown GM: Initiation of protein synthesis without formylation in a mutant of *Escherichia coli* that grows in the absence of tetrahydrofolate. *J Bacteriol* 129: 457-471, 1977.

- 17) Huovinen P, Sundstrom L, Swedberg G, Skold O: Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 279-289, 1995.
- 18) Vinnicombe HG, Derrick JP: Dihydropteroate synthase from *Streptococcus pneumoniae*: characterization of substrate binding order and sulfonamide inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 258: 752-757, 1999.
- 19) Kerrn MB, Klemmensen T, Frimodt-Moller N, Espersen F: Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. *J Antimicrob Chemother* 50: 513-516, 2002.
- 20) Anand N: Sulfonamides and sulfones. In *Burgey's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* (Wolff ME, ed), pp 527-573, John Wiley & Sons, New York, 1996.
- 21) Guerra B, Junker E, Helmuth R: Incidence of the recently described sulfonamide resistance gene *sul3* among German *Salmonella enterica* strains isolated from livestock and food. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2712-2715, 2004.
- 22) Ramaswamy S, Musser JM : Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 79:3-29, 1998.
- 23) Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, Crawford JT, Postels F, Salfinger M, Nolan C, Abe C, Sticht-Groh V, Gillis TP: Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 2380-2386, 1994.
- 24) GenBank accession number AL023093
- 25) Williams DL, Spring L, Harris E, Roche P, Gillis TP: Dihydropteroate synthase of *Mycobacterium leprae* and dapsone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1530-1537, 2000.
- 26) Achari A, Somers DO, Champness JN, Bryant PK, Rosemond J, Stammers DK: Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase. *Nature Struct Biol* 4: 490-497, 1997.
- 27) Baca AM, Sirawaraporn R, Turley S, Sirawaraporn W, Hol WGJ: Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* 6-hydroxymethyl-7, 8-dihydropteroate synthase in complex with pterin monophosphate: new insight into the enzymatic mechanism and sulfa-drug action. *J Mol Biol* 302: 1193-1212, 2000.
- 28) Fermer C, Swedberg G: Adaptation to sulfonamide resistance in *Neisseria meningitidis* may have required compensatory changes to retain enzyme function: kinetic analysis of dihydropteroate synthases from *N. meningitidis* expressed in a knockout mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179: 831-837, 1997.

Diaminodiphenylsulfone Resistance of *Mycobacterium leprae* due to Mutations in the Dihydropteroate Synthase Gene

Masanori Kai*

Department of Microbiology, Leprosy Research Center,
National Institute of Infectious Diseases

[Received: 12 July, 2004]

Key words : dapsone, DHPS, drug-resistance, leprosy, point mutation

The relation between diaminodiphenylsulfone (called dapsone)-resistance and point mutations of the dihydropteroate synthase (DHPS) gene was analyzed using dapsone resistant *Mycobacterium leprae* isolates derived from Japanese leprosy patients. The mutation was found at amino acid residues 53 or 55 of the DHPS. This finding suggests that two specific mutations in the DHPS gene involved in dapsone resistance of *M. leprae*.

*Corresponding author :

Department of Microbiology, Leprosy Research Center,
National Institute of Infectious Diseases, 4-2-1,
Aoba-cho, Higashimurayamashi, Tokyo 189-0002, Japan
TEL: 042-391-8211 FAX: 042-394-9092
E-mail: mkai@nih.go.jp

Aggregation of mycobacteria caused by disruption of fibronectin-attachment protein-encoding gene

Yuji Miyamoto, Tetsu Mukai *, Fumihiko Takeshita, Noboru Nakata, Yumi Maeda, Masanori Kai, Masahiko Makino

Department of Microbiology, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-2-1 Aobacho, Higashimurayama, Tokyo 189-0002, Japan

Received 21 March 2004; received in revised form 12 May 2004; accepted 26 May 2004

First published online 9 June 2004

Abstract

The fibronectin-attachment protein (FAP) is conserved among several species of mycobacteria. Although this protein is associated with attachment and internalization of bacteria to host cells via fibronectin, the physiological role of the protein still remains unclear. To investigate this point, we generated FAP gene disruptant in *Mycobacterium smegmatis*. The gene disruption, verified by Southern blot and PCR analysis, induced changes on the bacteria, which are associated with strong aggregation and alteration of cell surface properties. Increased hydrophobicity and Congo red accumulation was observed in the FAP gene disruptant. In addition, the complementation experiment demonstrated that the corresponding gene restored wild type morphology in the disruptant. These results indicate that the FAP affects the cell surface properties, and its deletion lead to enhanced aggregation of the *M. smegmatis*.

© 2004 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Fibronectin-attachment protein; Gene disruption; *Mycobacterium smegmatis*

1. Introduction

Mycobacteria, such as *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*, are the causative agents of human disease. Bacterial attachment to host cells is important in the process of infection, and fibronectin-attachment protein (FAP), a family of fibronectin-binding [1–6], is one of the representative bacterial components involved in the attachment. FAP was initially isolated from *Mycobacterium vaccae* culture and was subsequently shown to have the ability to bind to fibronectin [2]. The binding of FAP to fibronectin enhanced the bacterial binding affinity and subsequent internalization of mycobacteria to host cells. In fact, the treatment of *M. leprae* with anti-FAP antibody inhibited

its binding to peripheral nerve Schwann cells [3]. On the other hand, the FAP of *Mycobacterium bovis* BCG is thought to be capable of inducing cellular immunity, and the FAP of *Mycobacterium avium* induced strong T-cell response in mice [7,8]. Therefore, the fibronectin-binding activity of FAP is one of factors determining the mycobacterial virulence.

The mycobacterial cell wall is reported to possess the activities to protect mycobacteria from various bacteriocidal actions, including host immune system and antimycobacterial chemotherapeutic agents [9]. The deletion of the polyacetyltrehalose and glycopeptidolipids (GPLs) induced the morphological changes that may be involved in the induction of alternative host immune responses against bacteria [10,11]. In other cases, the morphological changes such as bacterial aggregation consequently triggered the biogenesis of phagolysosome in human neutrophils, while the declumped single cells possessed no ability to trigger it [12]. However, in spite

* Corresponding author. Tel.: +81-42-391-8211; fax: +81-42-394-9092.

E-mail address: tmukai@nih.go.jp (T. Mukai).

of the fact that FAP is a cell wall component of mycobacteria, it has not been clarified yet whether gene disruption of FAP induce the morphological or functional changes as lipid component do. A gene disruption is a well-established method to elucidate the direct role of each gene. Therefore, in this study, we generated FAP-deficient mutant of mycobacteria using *M. smegmatis* as a model bacteria and characterized the properties of the mutant to reveal physiological role of the FAP.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. *Escherichia coli* DH5 α was used as host strains for

cloning experiments. Mycobacterial strains were grown in Middlebrook 7H9 broth (Difco laboratories) with 0.05% Tween 80 or Middlebrook 7H10 agar with 0.5% glycerol, both supplemented with 10% ADC enrichment (Difco laboratories) and kanamycin (25 μ g/ml).

2.2. DNA techniques

Plasmids used and constructed in this study are listed in Table 1. Genomic DNA for polymerase chain reaction (PCR) and Southern blot analysis was isolated from mycobacterial strains as previously described [16]. Transformations of *M. smegmatis* strains were carried out by electroporation with a Bio-Rad Gene Pulsar (Bio-Rad) set at 1.3 V, 25 μ F, and 200 Ω as described by Parish and Stoker [17]. Sequences of the oligonucleotide primers used for PCR are shown in Table 2. Probes for

Table 1
Bacterial strains and plasmids used in this study

	Characteristics	Source/reference
Bacteria		
<i>E. coli</i>	DH5 α ; cloning host	
<i>M. smegmatis</i>	mc ² 155; wild type	[13]
	MF96; <i>fapS</i> -disruptant	This study
<i>M. leprae</i>	Thai-53	
<i>M. bovis</i> BCG	Pasteur (ATCC35734)	
<i>M. avium</i>	JATA51-01 (ATCC25291)	
Plasmid		
pUC19	<i>E. coli</i> cloning vector	
pBluescript II SK (+)	<i>E. coli</i> cloning vector	
pMV261	<i>E. coli</i> Mycobacterium shuttle vector carrying <i>hsp60</i> promoter cassette	[14]
pMV306kan	A site-specific integrating mycobacterial vector	[15]
pUDFAP	pUC19 with a 3.0 kb <i>Hind</i> III– <i>Xba</i> I fragment (upstream) and a 3.0 kb <i>Xba</i> I– <i>Kpn</i> I fragment (downstream)	This study
pUDFAPKm	pUDFAP with a 1.1 kb <i>Hind</i> III fragment (kanamycin resistant cassette)	This study
pFAPS	pMV306kan with a 1.5 kb <i>Xba</i> I– <i>Nhe</i> I fragment (FAP-S-expression cassette)	This study
pFAPL	pMV306kan with a 1.5 kb <i>Xba</i> I– <i>Nhe</i> I fragment (FAP-L-expression cassette)	This study
pFAPB	pMV306kan with a 1.5 kb <i>Xba</i> I– <i>Nhe</i> I fragment (FAP-B-expression cassette)	This study
pFAPA	pMV306kan with a 1.5 kb <i>Xba</i> I– <i>Nhe</i> I fragment (FAP-A-expression cassette)	This study

Table 2
Oligonucleotide primers used in this study

Primer	Sequences ^a	Restriction site
US1	5'-CCC <u>AAG</u> CTTTAC CTT GAC CCG GCC CGC GC-3'	<i>Hind</i> III
UA1	5'-GCTCT <u>AGA</u> CGG TCA CCG CAG CCA GCG TC-3'	<i>Xba</i> I
DS1	5'-GCTCT <u>AGA</u> CCG ATG CGC CGG AGA TGA-3'	<i>Xba</i> I
DA1	5'-GGGGT <u>ACC</u> GCA GGT CCA TCT CGT CGC GC-3'	<i>Kpn</i> I
U1	5'-CGTGG CGG TCC GGG CCT CGT CG-3'	
D1	5'-CGGGC GCT CTC GGC TTC GGC GG-3'	
S1	5'-CCCAAG <u>CTT</u> ATA TGT ACG AGT CGG AC TCG ATG-3'	<i>Hind</i> III
S2	5'-CCATC <u>GAT</u> ATC AGG CCG GAG GCA TCA TCT CC-3'	<i>Cla</i> I
B1	5'-CGGGA <u>TCC</u> CAT GCA TCA GGT GGA CCC CAA C-3'	<i>Bam</i> HI I
B2	5'-GGAA <u>TTC</u> TCA GGC CGG TAA GGT CCG CTG-3'	<i>Eco</i> R I
L1	5'-CGGGA <u>TCC</u> CAT GAA TCA GGT TGA CCT GGA C-3'	<i>Bam</i> HI I
L2	5'-AACTG <u>CAG</u> CTA TCC AAC AGG TGC CGG AGC-3'	<i>Pst</i> I
A1	5'-GGAA <u>TTC</u> ATGG ATC AGG TGG AAG CGA C-3'	<i>Eco</i> R I
A2	5'-CCATC <u>GATATC</u> AGG CCG AGA GGG TCT GCT G-3'	<i>Cla</i> I

^a Underlined indicates restriction site.