

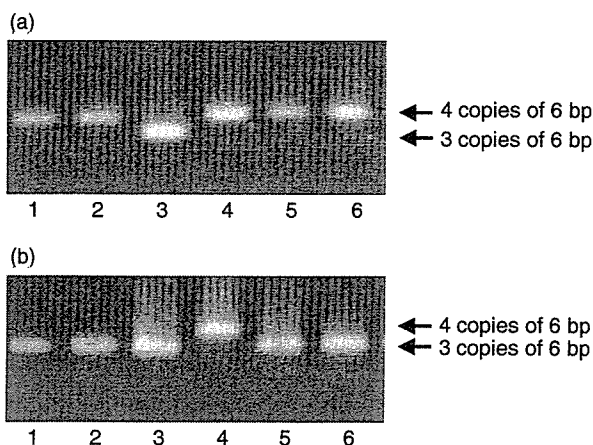
**Table 1.** Frequency of each single-nucleotide polymorphism (SNP) and *rpoT* *Mycobacterium leprae* genotype in Asian countries

Origin	SNPs				<i>rpoT</i> type	
	Type 1*	Type 2 <sup>†</sup>	Type 3 <sup>‡</sup>	Type 4 <sup>§</sup>	3 copy <sup>¶</sup>	4 copy <sup>  </sup>
Japan Mainland		<b>2</b> (C3:0,C4:2)	<b>33</b> (C3:2,C4:31)		<b>2</b>	<b>33</b>
Japan Okinawa	<b>4</b> ** (C3:4,C4:0) <sup>††</sup>		<b>7</b> (C3:7,C4:0)		<b>11</b>	
Japanese Brazilian			<b>7</b> (C3:7,C4:0)	<b>2</b> (C3:2,C4:0)	<b>9</b>	
Korea	<b>15</b> (C3:4,C4:11)	<b>4</b> (C3:0,C4:4)	<b>17</b> (C3:0,C4:17)		<b>4</b>	<b>32</b>
Indonesia	<b>12</b> (C3:10,C4:2)	<b>7</b> (C3:6,C4:1)	<b>16</b> (C3:14,C4:2)		<b>30</b>	<b>5</b>
Myanmar	<b>26</b> (C3:26,C4:0)	<b>1</b> (C3:1,C4:10)	<b>2</b> (C3:2,C4:0)		<b>29</b>	

\*CGA at positions 14676, 164275, and 2935685.

<sup>†</sup>CTA at positions 14676, 164275, and 2935685.<sup>‡</sup>CTC at positions 14676, 164275, and 2935685.<sup>§</sup>TTC at positions 14676, 164275, and 2935685.<sup>¶</sup>Three copies of 6 bp tandem repeats in the *rpoT* gene.<sup>||</sup>Four copies of 6 bp tandem repeats in the *rpoT* gene.

\*\*Bold type numbers are number of isolates with specific genotype.

<sup>††</sup>C3 and C4 are *rpoT*, three-copy or four-copy genotypes, respectively. Numbers represent numbers of isolates of each SNP type.**Fig. 1.** Electrophoresis of 91 or 97 bp PCR products from three copies of 6 bp tandem repeats or four copies of 6 bp tandem repeats in the *rpoT* gene: (a) samples from patients in mainland Japan; (b) samples from patients in Myanmar. Lane 3: 91 bp control for three copies; lane 4: 97 bp control for four copies.

localized geographic distribution (Matsuoka *et al.*, 2000, 2005). One of the prominent findings was predominance of the four-copy type in the eastern Asian countries of Korea and mainland Japan. SNP genotyping of *M. leprae* has also been demonstrated to have a characteristic worldwide geographic distribution and can be used to trace the worldwide dissemination of leprosy (Monat *et al.*, 2005). Of interest is whether there is a coincident biased distribution of specific SNP genotypes along with the prominent distribution of the four-copy type of the *rpoT* gene in Japan and Korea. More specific determination of *M. leprae* SNP genotypes in Asian countries, especially in Japan and Korea, is therefore important.

**Table 2.** Stability of single-nucleotide polymorphism (SNP) and *rpoT* genotype among strains subjected to serial passage in nude mice

Strain and generation	Genotype		
	Nucleotide*	SNP type	Copy number <sup>†</sup>
Thai-53 3rd	CGA	1	3
Thai-53 4th	CGA	1	3
Thai-53 7th	CGA	1	3
Thai-53 11th	CGA	1	3
Thai-53 12th	CGA	1	3
Kusa-6 Biopsy	CTC	2	4
Kusa-6 1st	CTC	2	4
Kusa-6 2nd	CTC	2	4
Kusa-6 3rd	CTC	2	4
Kusa-6 4th	CTC	2	4
Kyo-1 3rd	CTC	2	4
Kyo-1 5th	CTC	2	4
Kyo-1 7th	CTC	2	4
Kyo-1 8th	CTC	2	4
Zen-4 1st	CTC	2	4
Zen-4 2nd	CTC	2	4
Zen-4 3rd	CTC	2	4
Zen-4 4th	CTC	2	4
Zen-9 Biopsy	CTC	2	3
Zen-9 1st	CTC	2	3
Zen-9 2nd	CTC	2	3
Zen-9 3rd	CTC	2	3

\*Nucleotide at positions 14676, 164275, and 2935685.

<sup>†</sup>Copy number of 6 bp tandem repeats in the *rpoT* gene.

The different *rpoT* genotypes identified in mainland Japan and Okinawa were also seen in a previous study (Matsuoka *et al.*, 2000), and different SNP genotypes were also seen in this study between the two regions (Table 1). SNP type 1 was not detected in isolates from the mainland, but there were four type 1 strains in isolates from Okinawa.

These results suggest that the leprosy bacilli were distributed in Japan by different ethnic groups in a migration pattern similar to that shown for other infectious diseases (Ishida & Hinuma, 1986; Hanihara, 1991; Sugimoto *et al.*, 1997; Turan & Abe, 2004). The dual structure model is generally accepted as the history of how the present Japanese population was established (Hanihara, 1991). According to that theory, one ethnic group migrated into Japan from Southeast Asia about 30 000 years ago, and another population arrived in Japan via the Korean peninsula from 2800 to 1700 years ago. The group arriving later expanded its territory in mainland Japan. The Japanese currently living in mainland Japan are thought to be descendants of the intermixture of the two ethnic groups. On the other hand, the lineage of Okinawans derives from the first migrating ethnic group, with no subsequent intermixture with the group arriving later. There is a high incidence of human T lymphotropic virus type 1 carriers in Okinawa, but a low prevalence is noticed in mainland Japan (Ishida & Hinuma, 1986). The genotypes of microorganisms such as JC polyoma virus and hepatitis B virus also show variation between the two areas (Sugimoto *et al.*, 1997; Turan & Abe, 2004). These findings provide evidence that leprosy was introduced by different ethnic races inhabiting each region in Japan. Almost all the isolates in mainland Japan were SNP type 3 with the four-copy type VNTR, which indicates that the *M. leprae* in this area developed from very few clones.

A striking finding of this study is the detection of two strains of SNP type 4 in isolates from the Japanese Brazilian patients. These strains were not detected in Japanese patients or in patients from the other Asian countries in this study. In addition, a previous study found that two strains of 14 isolates in Brazil were SNP type 2 (Monat *et al.*, 2005). A Japanese work visa is easily obtained for Brazilians of Japanese descent. Currently, over 200 000 Japanese Brazilians live in Japan, and approximately 50% of the recent leprosy cases diagnosed in Japan were diagnosed in that population (Study Group for New Cases in Japan, 2005). The patients lived in Brazil during their childhood, and had not been living for a long period of time in Japan. The results of this study substantially support the hypothesis that these patients were infected in Brazil and developed the disease later in Japan. The seven patients with SNP type 3 along with three-copy type VNTR isolates also support the hypothesis that they were infected in Brazil, because the prevalence of this genotype in mainland Japan is very low, and this genotype has been previously identified with high frequency in Brazilian patients (Monat *et al.*, 2005).

Both SNPs and variation in the *rpoT* gene were maintained stably in isolates passaged for many generations in nude mice. Thus, genotyping by examining a combination of two types of genetic polymorphisms that have a small range of variation is a robust and useful tool for the

detailed epidemiological analysis of the global movement of leprosy.

Two hypotheses for the origin of leprosy were formulated from the previous study of SNPs (Monat *et al.*, 2005). The population of SNP type 3 increases with distance from India like ripples in a pond. Logically, the SNP type 2 isolate could be derived from progenitor type 1 by a single-nucleotide mutation, followed by SNP type 3 and 4 derivatives. The data presented in the current study support this hypothesis by demonstrating a predominance of SNP type 3 strain in mainland Japan, Okinawa, Korea, and Indonesia. These ideas support the previous hypothesis for the origin of leprosy (Monat *et al.*, 2005), and suggest that the ancient origins of leprosy were in the Indian subcontinent (Browne, 1985).

Because many new cases have been detected from Japanese Brazilians, public advisories for early diagnosis of leprosy were issued to clinicians and the Japanese Brazilian communities. The results in this study indicate that Japanese Brazilians are already infected when they arrive in Japan. Therefore, intensive monitoring to detect the early signs of leprosy should be conducted. This policy should apply to other countries that accept immigrants from regions with a high prevalence of leprosy. Awareness of global transmission of leprosy by immigrant populations is vital to effective global control of leprosy.

## Acknowledgements

This study was supported by the following grants: a Health Research Grant of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, Ministry of Health, Labour and Welfare, Government of Japan; a grant from the Foundation for Hansen's Disease in Asia; and a grant from the U.S.–Japan Cooperative Medical Science Programs.

## References

- Browne SG (1985) The history of leprosy. *Leprosy* (Hastings RC, ed), pp. 1–14. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, *et al.* (2001) Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* **409**: 1007–1011.
- Groathouse NA, Rivoire B, Kim H, Lee H, Cho S-N, Brennan PJ & Vissa VD (2004) Multiple polymorphic loci for molecular typing of strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol* **42**: 1666–1672.
- Hanahara K (1991) Dual structure model for the population history of the Japanese. *Japan Rev* **2**: 1–33.
- Ishida T & Hinuma Y (1986) The origin of Japanese HTLV-I. *Nature* **322**: 504.
- Matsuoka M, Maeda S, Kai M, Nakata N, Chae G-T, Gillis TP, Kobayashi K, Izumi S & Kashiwabara Y (2000) *Mycobacterium leprae* typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. *Int J Leprosy* **68**: 121–128.

- Matsuoka M, Zhang L, Budiawan T, Saeki K & Izumi S (2004) Genotyping of *Mycobacterium leprae* on the basis of polymorphism of TTC repeats for analysis of leprosy transmission. *J Clin Microbiol* **42**: 741–745.
- Matsuoka M, Zhang L, Morris MF, Legua P & Wiens C (2005) Polymorphism in the *rpoT* gene in *Mycobacterium leprae* isolates obtained from Latin American countries and its possible correlation with the spread of leprosy. *FEMS Microbiol Lett* **243**: 311–315.
- Monat M, Honore N, Garmier T, *et al.* (2005) On the origin of leprosy. *Science* **308**: 1040–1042.
- Shin YC, Lee H, Lee H, Walsh GP, Kim JD & Cho SN (2000) Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. *J Clin Microbiol* **38**: 4535–4538.
- Study Group for New Cases in Japan (2005) New cases detected in 2004. *Jpn J Leprosy* **74**: 245 (in Japanese).
- Sugimoto C, Kitamura T, Guo J, *et al.* (1997) Typing of urinary JC virus DNA offers a novel means of tracing human migrations. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9191–9196.
- Turan HT & Abe K (2004) Molecular epidemiology of hepatitis B and C virus infections in Asia. *Pediatr Int* **46**: 223–230.
- Zhang L, Budiawan T & Matsuoka M (2005) Diversity of potential short tandem repeats in *Mycobacterium leprae* and application for molecular typing. *J Clin Microbiol* **43**: 5221–5229.

# 生物発光法による抗らい菌活性測定法の開発

山崎利雄\*・儀同政一・松岡正典

国立感染症研究所ハンセン病研究センター

〔受付：2005年11月2日、掲載決定：2006年5月10日〕

キーワード：生物発光法、薬剤感受性試験、らい菌、adenosine triphosphate (ATP)、Buddemeyer法

生物発光法によるハンセン病治療薬の抗らい菌活性測定法 (ATP法) の開発のために、らい菌 Thai 53株を用いてATP抽出温度、抽出時間、接種菌数および均等菌浮遊液調整法、培養液のpHなどについて基礎的検討を行った結果、ATP法が薬剤の抗らい菌活性測定法として有用であると思われた。さらに、ハンセン病治療薬に感受性ならい菌 Thai 53株を用いてリファンピシン (RFP)、クロファジミン (CLF)、オフロキサシン (OFLX)、クラリスロマイシン (CAM) の各薬剤の最終濃度 0、0.125、0.5、2、8  $\mu\text{g/ml}$  について、ATP法と現行の抗らい菌活性測定法として用いられているBuddemeyer法による成績を比較検討した。ATP法とBuddemeyer法における同一薬剤濃度での抗らい菌抑制効果は、良く一致したことから、ATP法はBuddemeyer法に匹敵する *in vitro* 抗らい菌活性測定法と考えられた。

## はじめに

ハンセン病の治療は、World Health Organization (WHO) の推奨しているジアミノジフェニルスルホン (DDS)、リファンピシン (RFP)、クロファジミン (CLF) などの化学療法薬を組み合

わせた多剤併用療法 (multi-drug therapy; MDT) の導入によって、確実な治療と耐性菌出現の予防または遅延効果をもたらしている<sup>1) 2)</sup>。ハンセン病の治療薬の抗らい菌活性を知ることが、効率的な治療に重要である<sup>3)</sup>。治療薬の抗らい菌活性を調べる方法としては、マウス足蹠内接種法<sup>4)</sup>、Buddemeyer法<sup>5)</sup>、BACTEC 460 TB system法<sup>6)</sup>がある。らい菌は、結核菌の様に試験管内培養法を用いた薬剤感受性試験をする事ができないため、ヌードマウスの足蹠内接種らい菌の局所での増菌後、薬剤感受性試験を行うので、約2年間という長い期間と多くの経費を要する。Buddemeyer法とBACTEC 460 TB system法は、いずれも放射性物質を使用するため、放射性物質取り扱い施設の整っている施設でのみ検査が可能であること、廃棄物処理、高コスト等の問題がある。他方、放射性物質取り扱い施設を持たない施設でも、らい菌の薬剤感受性試験を簡便に行い得る方法として、らい菌のadenosine triphosphate (ATP) を測定する方法<sup>7) ~ 9)</sup>が報告されている。しかし、これらのATPを測定する方法は、Buddemeyer法より感度が悪いいため、抗らい菌活性測定法としては活用されていない。近年、薬剤耐性に関与する遺伝子の変異を調べる方法<sup>10)</sup>が報告され、薬剤耐性菌の検出は迅速化されたが、適用薬剤の種類が限られ、また変異と耐性の相関性は十分に明らかにされていない。そこで先に、著者の一人である山崎が、生物発光を用いた結核菌のATPを測定する薬剤感受性試験法 (ATP法)<sup>11)</sup>

\*Corresponding author:

国立感染症研究所ハンセン病研究センター  
〒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: toshiyam@nih.go.jp

を開発したが、今回は本法が治療薬の抗らい菌活性測定法として用い得るかどうかの基礎的検討、更にその結果に基づいて行ったATP法とBuddemeyer法による結果と比較し検討した。

## 材料と方法

### 1. 供試菌

らい菌Thai53株の足蹠内接種後10~12ヶ月後のヌードマウスの足蹠から中村法<sup>12)</sup>により雑菌処理と菌精製を行い、供試菌を得た。得られた菌は、10% Glycerol、0.01% Tween 80加Hanks' balanced salt solution (HBSS) 溶液に浮遊した。菌数を $2.0 \times 10^8$ /mlに調整し、4℃に1日保存した浮遊液、または、-80℃に保存した浮遊液を用いた。浮遊液の希釈および培養のためには、Middlebrook 7H9 broth (7H9 broth) を用いた。

### 2. 薬剤

DDS (和光純薬)、CLF (Sigma)、オフロキサシン (OFLX, Sigma)、RFP (和光純薬) は市販品を用い、クラリスロマイシン (CAM) は大正製薬から原末の提供を受けた。

### 3. ATP測定法

結核菌薬剤感受性試験用ルシミックMTB-SRキット (極東製薬工業) の前処理試薬、抽出試薬および発光試薬 (ルシフェリン・ルシフェラーゼ) を用いて発光量によりATPを測定した。すなわち、試料液0.1mlを測定用チューブに採取し、adenosine phosphate deaminase を含む前処理試薬0.05mlを添加し、室温に30分間放置後、ATP抽出試薬0.05mlを加え、加熱して、菌体からATPを抽出した。抽出されたATPに、発光試薬0.1mlを加え、軽く混和し、直ちにルミノメーター (ルミテスターK210型; キッコーマン) を用いて相対光量 (relative light unit; RLU) 値を測定した。ATP測定用検量線作成には、ATP標準液 ( $2 \times 10^{-6}$  M、キッコーマン) を7H9 brothで100倍希釈し、標準液 ( $2 \times 10^{-8}$  M) として用いた。

上記ATP測定にあたり以下に示す基礎的検討条件の検討も行った。

1) HBSSの濃度: らい菌は、HBSSに浮遊するた

め、HBSSの濃度によっては、前処理液に含まれるATP分解酵素の活性を阻害する恐れがあると考えた。そこで、HBSSの7H9 brothによる0、5、10、20、100倍各希釈溶液0.99mlに、ATP標準液0.01mlを加えたものを標準液 (ATP濃度  $2 \times 10^{-8}$  M) とし、それらの0.1mlについてRLU値を測定した。

2) ATP抽出温度と抽出時間: らい菌の7H9 brothによる5倍希釈 ( $4.0 \times 10^7$ /ml) 液1.0mlに前処理液0.5mlを加え、室温に30分放置後、ATP抽出試薬0.5mlを加え、200  $\mu$ l宛を1.5mlのキャップ付チューブに分注し、60℃および100℃で0~10分間加熱した。2分ごとにチューブをとり出し水中に保った後、12,000  $\times$  g、数秒間遠心し、全量 (らい菌数  $2.0 \times 10^7$ ) を測定用チューブに移し、発光試薬0.1mlを加えてRLU値を測定した。

3) 均等浮遊液作成法: 指先でチューブの下部を弾いてある程度均等化したらい菌 ( $2.0 \times 10^8$ /ml) を二分し、一方を更にVortexミキサーの回転速度を最高にして5秒間激しく攪拌後、それぞれの0.2mlを7H9 broth 1.8mlに接種し、32℃で培養した。菌液接種後、0、7、10、14日後に各0.1mlを採取し、RLU値を測定し、激しい攪拌処理の影響を調べた。また、均等菌液調整に超音波洗浄器 (UC-1型; 池田理化) を用い、周波数38KHZで、0~180秒間超音波処理を行い、その菌に及ぼす影響を調べた。

4) らい菌培養におけるpHの影響: -80℃に保存したらい菌の浮遊液 ( $2.0 \times 10^8$ /ml) の0.2mlをpH6.5、7.0および7.5に調整した7H9 broth 1.8mlに接種し、32℃で培養し、0、3、5、7、10および14日目にそれぞれ、0.1ml宛を採取してATP量を測定した。

5) 供試菌の凍結の有無: 新たに調整したらい菌 (菌数  $2.0 \times 10^8$ /ml) のHBSS浮遊液を4℃に1晩保存後、二分し、一方を-80℃に凍結し、翌日再溶解したものと、他方凍結することなく4℃に1日保存したものの各0.2mlずつを1.8mlの7H9 brothに接種後、0、7、10、14日目にそれぞれ0.1ml宛を採取し、ATP抽出後、RLU値を測定した。

6) ヌードマウス足蹠内のATP測定: らい菌非接

種マウス足跡を、中村法<sup>12)</sup>に準じて処理・調整したHBSSによる組織浮遊液を7H9 brothで5倍希釈し、その0.1mlを前処理液による処理の有無並びに60℃5分間処理の有無によるATPの測定値に及ぼす影響について検討した。

#### 4. 抗らい菌活性測定法

RFP、CLF、OFLX、CAMを供試し、各薬剤の最終濃度0、0.125、0.50、2.0、8.0  $\mu\text{g/ml}$ について試験した。

1) ATP法：薬剤非含有対照並びに薬剤含有7H9 broth 1.0mlに供試菌浮遊液0.1ml接種し、32℃、通常大気下で0～14日間培養後、その0.1mlを採取し、ATPを抽出し、ルミテスター (K210型) を用いてRLU値を測定し、次式によって薬剤のらい菌抑制率を求めた。

$$\left\{ \frac{\text{対照培養液のRLU値} - \text{薬剤含有培養液のRLU値}}{\text{対照培養液のRLU値}} \right\} \times 100$$

2) Buddemeyer法：Middlebrook 7H12液体培地0.5 mlにヌードマウス足跡より調製したらい菌浮遊液 ( $2 \times 10^8/\text{ml}$ ) 0.1ml並びに各濃度の薬剤と対照にPBS 0.3 mlを加えてよく混和し、32℃の炭酸ガス孵卵器で4日培養後、<sup>14</sup>C-パルミチン酸0.1ml (1  $\mu\text{Ci}$ ) を添加して更に7日培養し、継時的にらい菌の代謝により発生した<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>量を液体シンチレーションカウンターで測定し、抑制率を求めて、薬剤の抗らい菌活性を判定した。

## 結 果

### 1. ATP測定のための基礎的検討

1) HBSS濃度がATP測定値に及ぼす影響：表1に示すように、7H9 brothでATP標準液を100倍に希釈 ( $2 \times 10^{-8}\text{M}$ ) し、前処理を行わない場合の測定値は、33,200RLUであったが、前処理を行うことにより、ブランク値 (6RLU) に近い9RLUまで低下した。ところが、HBSS存在下 (原液～100倍希釈液) でも前処理を行わないと、RLU値にはオーダーの違いは見られなかったが、前処理を行うと、HBSS原液を用いた場合には、28,527RLUから1,364RLU (約1/20) への減少が見られたのに対して、HBSS 5倍～100

倍希釈では約1/2,400以上に減少した。従って、らい菌浮遊液を7H9 brothで5倍以上に希釈すれば、その影響は無視できることが分かった。

2) ATP抽出温度と抽出時間：らい菌からのATPの抽出温度と抽出時間の検討成績は、図1に示すとおりである。これから分かるように、らい菌のATPは、室温 (25℃)、30分では抽出されなかった。抽出温度60℃と100℃では、100℃の方が60℃よりも高い測定値が得られたが、60℃では、測定用チューブを用いて直接抽出することができるので、能率面を考慮して、60℃で行うこととした。また抽出時間は、60℃と100℃のいずれの場合も4分～10分では、大差がなかったので、5分間を採用した。

3) 均等浮遊液調整法：図2に示すようにVortexミキサーの回転速度を最高にして5秒間程度の攪拌処理では測定値は高く、菌液調整日から、10日間でのRLU測定値には大差がなかったことから、5秒間程度の攪拌であれば、らい菌には、ほとんど影響がないことが分かった。また、浮遊液均等化のための超音波処理が、らい菌に及ぼす影響については図3に示すように、60秒で最高の5,187 RLUを示し、以後90秒まではRLU値に差が見られなかったことから、超音波処理時間は60秒とした。

4) らい菌培養におけるpHの影響：pHを6.5、7.0、7.5に調整した7H9 brothにらい菌を接種して、培養におけるpHの影響を調べたところ、図4に示すように、らい菌は、7H9 brothでは、培養できないために、pH未調整の対照培地 (pH6.6) であってもATP量は測定日毎に減少したが、その測定値は、pH6.5>7.0>7.5であった。従って、通常の7H9 broth (pH6.6) の使用で問題はないことが分かった。

5) 供試菌の凍結の影響：図5に示すように、非凍結のらい菌では、10日までは、RLU値に殆ど変動化は見られなかったが、凍結すると、その当日でも凍結前の4/5程度の低下、7日目で1/5程度の低下が見られた。従って、供試菌の凍結は可及的しないほうが望ましいことが分かった。

6) ヌードマウス足跡由来ATPの測定：供試らい菌を、ヌードマウスの足跡から精製することから、足跡由来のATP量がどの程度存在するか

を、らい菌非接種ヌードマウスについて調べた。その結果、表2に示すように、サンプルを前処理することなく60℃ 5分間加熱抽出した場合1,791RLU、前処理後、60℃ 5分間ATP抽出を行った場合59RLU、前処理のみで加熱しない場合16RLUであった。従って、前処理することにより、ヌードマウスの足蹠由来のATP量は、無視できる値まで低下することが分かった。

## 2. ATP法とBuddemeyer法による薬剤感受性検査成績の比較

ATP法とBuddemeyer法によるRFP、CLF、OFLX、CAMの抗らい菌活性を測定し、抑制率を比較した結果、表3に示すような成績が得られた。供試したらい菌Thai 53株は、マウス足蹠内接種法でテストした場合、供試薬剤（RFP0.01%、CLF0.03%、OFLX0.15%、CAM0.03%）の全てに感受性であると判定されている菌株である<sup>14)</sup>。ATP法の7日目の判定では、CLFの2および8  $\mu$ g/ml以外の供試薬剤のいずれの試験濃度でも、36.2%以下の低い抑制率を示すにすぎなかったが、10並びに14日目では、RFP0.125、CLF2、OFLX2、CAM0.125  $\mu$ g/mlの濃度以上で50%以上の高い抑制率を示し、他方、Buddemeyer法では、薬剤によっては4日目でも>50%の高い抑制率を示した薬剤もあったが、7並びに10日目では、RFP0.125、CLF2、OFLX8、CAM0.125  $\mu$ g/ml以上で $\geq$ 50%の高い抑制率を示した。ATP法10日目とBuddemeyer法7日目の抑制率は、OFLXを除いては、ATP法の方がBuddemeyer法よりも高い抑制率を示した。同一薬剤濃度での抑制傾向は、両法間で良く一致していた。

## 3. ATP法の再現性

RFP、CLF、OFLXおよびCAMの各3濃度のらい菌に対する、ATP法10日目とBuddemeyer法7日目による抑制率を3回の実験を行って求め、両法の再現性を検討した。その結果、表4に示すように、抑制率の値には、ATP法、Buddemeyer法のいずれにおいても2~3回の実験値の間かなりのばらつきがあった。しかし、各薬剤濃度について得られた3回の平均抑制率を表3に示された各薬剤濃度におけるそれらと比較すると、 $\geq$ 50%

および $\leq$ 50%抑制率について見るとATP法でCLF0.5  $\mu$ g/mlおよびOFLX8  $\mu$ g/ml、Buddemeyer法でのCLF0.5  $\mu$ g/mlを除いては、全て良く一致した。

## 考 察

ヌードマウスの足蹠内で増菌したらい菌を中村法<sup>12)</sup>で精製し、10%Glycerolおよび0.01%Tween 80加HBSS溶液に再浮遊し、供試したが、多量の供試浮遊液を得る事が難しいため、ATP法とBuddemeyer法とは、全く同一条件下の菌を供試した成績ではない。そのため、ATP法とBuddemeyer法の最終の抑制率の傾向こそ一致したが、測定値は、必ずしも一定の値を示さず、また、実験毎の数値のばらつきが大きかった。これは、同一菌株で同一菌数に調整しても、生菌活性はロットによって異なる為であろうと考えられた。また、実験するに当たっては、-80℃に凍結保存したらい菌を供試する機会が多い。しかし、図4に示したように凍結7日目で1/5程度のRLU値の低下が見られたことから、なるべく凍結せず、4℃に冷蔵し、かつ可及的速やかに供試することが望ましい。

均等菌浮遊液を得るために、Vortexや超音波処理が行われるが、過度の処理は、らい菌に傷害を与え、死菌の増加をもたらす可能性がある。しかし、Vortexで最高速、5秒間程度の攪拌（図2参照）、あるいは38KHZで60秒間程度の超音波処理（図3参照）であれば、その影響は少ない。

中村ら<sup>13)</sup>は、10%牛胎児血清を含む0.05Mリン酸緩衝液でらい菌を30℃、4週間培養したところ、pH7.0の場合が最も高いATP値を示したと報告している。今回我々が検討に用いた7H9 brothでのATP量は経日的に減少したが、その測定値はpH6.5>7.0>7.5の順に高かったことからして、日常的に用いられている7H9 broth (pH6.6) で特にpHの修正は必要ない事が分かった。

ATP法は、まず培養液に前処理液を加え、室温に30分間放置して、培養液中に存在する遊離のATPを分解し、その後、60℃ 5分間加熱することによって、菌体のATPを抽出する。この際、供試菌浮遊液中に残存するヌードマウスの足蹠の組織

由来のATPの存在が問題となるが、これは表2に示すように、59RLUであったので、ほとんどATP法の測定結果に影響を与えないものと考えられた。従って本法は、生菌由来のATPのみを測定していることになると言えよう。

ハンセン病患者症例の臨床検体中に含まれるらい菌の数は少ない。また、試験管内で培養できないため、薬剤感受性試験結果を得るには1年以上という長期間を要する<sup>14)</sup>。そのため、薬剤耐性に関与する遺伝子をPCRにて増幅後、遺伝子内の変異を調べる迅速な方法が研究されている。しかし、新薬の開発のためには、抗らい菌活性測定は必須である。現行の抗らい菌剤の活性測定法であるBuddemeyer法は、放射性物質を使用するために実験が煩雑となり、より簡便な測定法が望ましく、その一つとして、ATP法について検討した。らい菌Thai53株を用いてATPの抽出温度と抽出時間、接種菌数および均等浮遊液調整法、培養液のpHなどの基礎的検討を行なった結果、抗らい菌活性測定法として用いることを確認した。そこで、ATP法の精度を確認するために、RFP、CLF、OFLX、CAMのらい菌に対する抗菌活性をBuddemeyer法によるそれと比較検討した。ATP法ではらい菌は、7H9 brothで増殖できず死滅して行くので、薬剤非含有（対照）培地であっても

ATP測定値は減少したが、薬剤含有培地での測定値の値の方が大きい（抑制率が高い）場合には、その濃度で抗らい菌活性ありと判定、対照培地の測定値と同等あるいはそれ以上の場合（抑制率が低い）には、抗らい菌活性は弱いと判定することができた。

DDSは、ATP法、Buddemeyer法とも32 $\mu$ g/mlといった高濃度でも50%を超える抑制率を示さず、in vitro-抗らい菌活性は弱かった。OFLXは、殺菌的薬剤であるが、表3に示したように、8 $\mu$ g/mlでの抑制率が50%以上を示すのに要した日数は、ATP法では14日、Buddemeyer法では10日であった。他方、ATP法では2 $\mu$ g/ml、14日で抑制率が50%を越えたが、Buddemeyer法では10日での抑制率は27.5%と極めて低かった。この原因は、接種した供試菌の生菌活性の違いによるものと思われる。従って、抗らい菌剤の抗菌活性を調べる場合には、MICによる固定濃度法は判定を誤る恐れがある。RFP、CLF、CAMについては、ATP法10日目とBuddemeyer法7日目の判定結果は、同一薬剤濃度で抑制傾向が良く一致したことから、ATP法は、再現性におお検討の余地を残すが、Buddemeyer法に匹敵し、試験費用も比較的安価で、廃棄物処理も容易な抗らい菌活性測定法である。

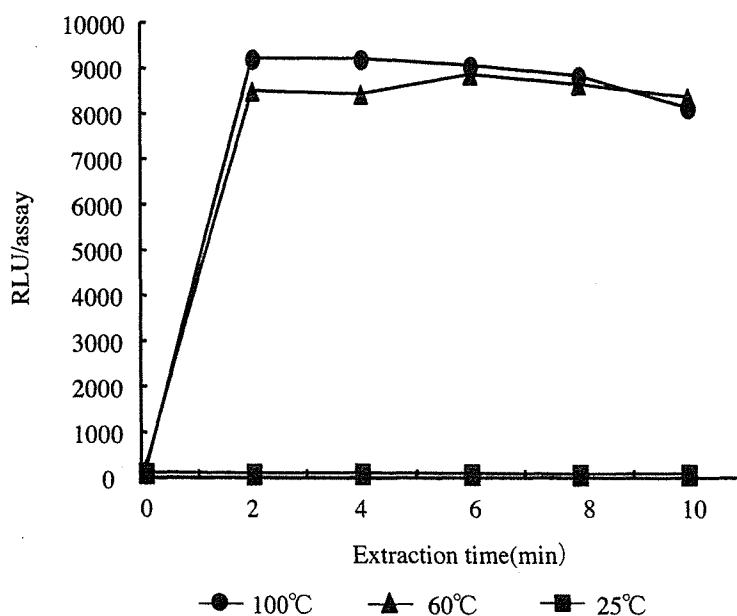


Figure 1. Effects of the temperature and incubation time on the extraction of ATP from *Mycobacterium leprae* Thai 53. ATP content was measured by bioluminescent assay and expressed as relative light units (RLU).



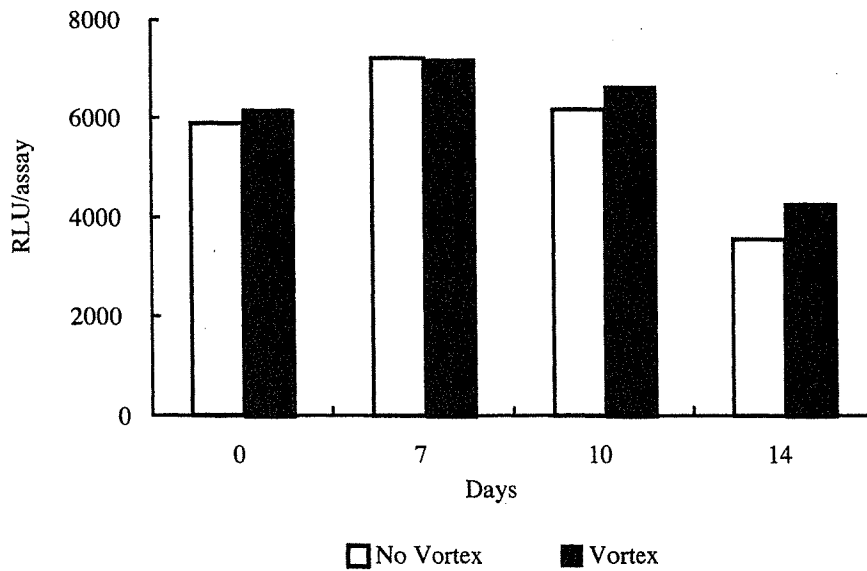


Figure 2. The influence of mixing the bacterial suspension on the bacterial viability. The bacterial suspension of *M. leprae* Thai 53 was mixed at maximum speed of a Vortex mixer for five seconds before inoculating it into culture media. 0.2ml of bacterial suspension was inoculated into 1.8ml of Middlebrook 7H9 broth and cultured at 32 °C. After inoculation, 0.1ml of bacterial suspension was collected on days 0, 7, 10 and 14 and RLU was measured.

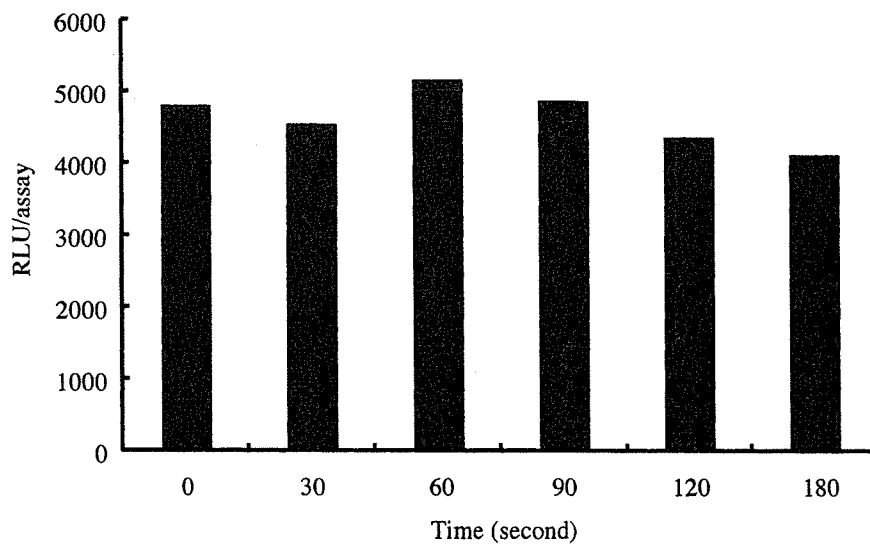


Figure 3. The influence of sonication of the bacterial suspension on the bacterial viability. The bacterial suspension of *M. leprae* Thai 53 was sonicated at 38kHz using ultrasonic cleaner UC-1 type (Ikedarika Co.) for 0-180 seconds before inoculation. ATP was extracted from 0.1ml of suspension and RLU was measured.

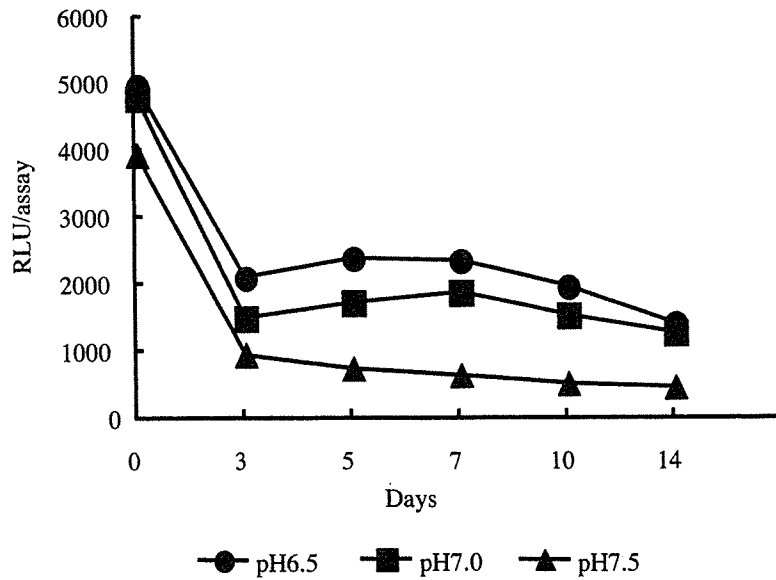


Figure 4. Influence of pH of the culture medium on *M. leprae* viability. 0.2 ml of *M. leprae* Thai 53 ( $2 \times 10^8$  bacilli/ml) suspension, which was stored at  $-80^\circ\text{C}$ , was inoculated into 1.8 ml of Middlebrook 7H9 broth whose pH was adjusted to 6.5, 7.0 and 7.5 and cultured at  $32^\circ\text{C}$ . On days 0, 3, 5, 7, 10 and 14, 0.1 ml of the culture was collected and RLU values were measured after ATP extraction.

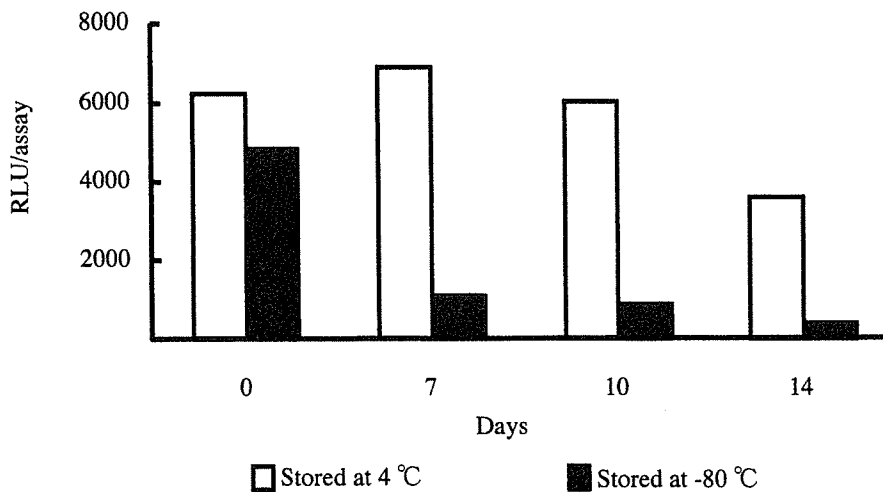


Figure 5. Influence of freezing on the viability of the bacilli. The HBSS suspension of fresh *M. leprae* Thai 53 ( $2 \times 10^8$  bacilli/ml) was stored at  $4^\circ\text{C}$  overnight. The rest of the bacterial suspension was frozen at  $-80^\circ\text{C}$ , and thawed on the next day for comparison of activity. 0.2 ml of the suspension was inoculated into 1.8 ml of Middlebrook 7H9 broth and ATP was extracted on days 0, 7, 10 and 14 of culture and RLU values were measured.

Table 1. The influence of HBSS for pre treatment of the bacilli.

ATP standard		Measured value (RLU)					
solution concentration	Preliminary treatment	Control (M.7H9 broth)	Dilution factor of HBSS by Middlebrook 7H9 broth				
			0	1/5	1/10	1/20	1/100
2×10 <sup>-8</sup> M	-	33200	28527	29340	32150	34122	31343
2×10 <sup>-8</sup> M	+	9	1364	12	10	11	9
0	+	6	5	5	6	4	5

Table 2. Negative control ATP value obtained using uninoculated nude mouse foot pad.

Preliminary treatment for 30 minutes at 22°C	ATP extraction for 5 minutes at 60°C	Measured value (RLU)
-	+	1791
+	-	16
+	+	59

Table 3. Correlation between ATP and Buddemeyer methods for the measurement of antileprosy activity using *M. leprae* Thai 53 strain.

Drug	Concentration (µg/ml)	Inhibition (%) <sup>a</sup>					
		by ATP method on day :			by Buddemeyer method on day :		
		7	10	14	4	7	10
Control	0	0	0	0	0	0	0
RFP	2	20.8	91.4	93.3	61.4	69.7	75.8
	0.5	10.0	84.9	92.5	57.6	66.5	72.0
	0.125	25.5	84.3	92.9	42.7	49.4	55.1
CLF	8	95.4	96.1	93.7	99.8	99.8	99.9
	2	57.9	85.0	92.1	30.3	51.5	61.9
	0.5	8.2	14.8	42.7	4.8	10.5	16.0
OFLX	8	12.5	48.7	79.5	44.8	43.7	52.9
	2	0.0	13.6	54.1	21.6	16.6	27.5
	0.5	0.0	0.0	42.3	6.0	9.4	16.8
CAM	2	36.2	89.3	93.1	54.6	65.5	72.9
	0.5	18.4	83.7	92.7	55.5	63.0	70.1
	0.125	0.7	65.1	92.4	22.0	35.8	94.4

<sup>a</sup> [(control group(c) - drug treated group)/c] × 100 (%)

Table 4. Reproducibility of ATP method and Buddemeyer method for the measurement of antileprosy bacillus activity.

Drug	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Inhibition (%) <sup>a</sup>							
		on day 10th by ATP method				on day 7th by Buddemeyer method			
		1st	2nd	3rd	Average	1st	2nd	3rd	Average
RFP	2.0	59.0	68.0	91.4	72.8	69.7	69.6	72.8	70.7
	0.5	58.0	66.0	84.9	69.6	66.5	61.8	71.4	66.6
	0.125	60.0	67.0	84.3	70.4	49.4	36.1	56.1	47.2
CLF	2.0	52.0	67.0	85.0	68.0	51.5	99.9	67.0	72.8
	0.5	20.0	19.0	14.8	17.9	10.5	57.5	32.5	33.5
	0.125	0	ND <sup>b</sup>	ND	ND	9.9	17.6	13.9	13.8
OFLX	8.0	60.0	51.0	48.7	53.2	ND	43.7	49.7	46.7
	2.0	0	26.0	13.6	13.2	ND	16.6	25.8	21.2
	0.5	0	11.0	0	3.7	ND	9.4	15.9	12.7
CAM	2.0	ND	72.0	89.3	80.7	65.5	69.8	ND	67.7
	0.5	ND	67.0	83.7	75.4	63.0	53.2	ND	58.1
	0.125	ND	67.0	65.1	66.1	35.8	27.2	ND	31.5

<sup>a</sup>[(control group(c) - drug treated group)/c] × 100 (%)

<sup>b</sup>not determined

## 文 献

- 1) 後藤正道、石田裕、儀同政一、長尾榮治、並里まさ子、石井則久、尾崎元昭：ハンセン病治療指針。日ハンセン会誌 69：157-177, 2000.
- 2) WHO Study Group: Chemotherapy of leprosy for control program, WHO Tech. Rep. Series, No.675, 1982.
- 3) 儀同政一、斎藤 肇：治らい薬研究の現状。日ハンセン会誌 64:174-187,1995.
- 4) 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.
- 5) Buddemeyer E, Hutchinson R, Cooper M: Automatic quantitative radiometric assay of bacterial metabolism. Clin Chem 22:1459-1464, 1976.
- 6) Franzblau S G: Drug susceptibility testing of *Mycobacterium leprae* in the BACTEC 460 system. Antimicrob Agents Chemother 33: 2115-2117, 1989.
- 7) Franzblau SG, Hastings RC: Rapid in vitro metabolic screen for antileprosy compounds, Antimicrob Agents Chemother 31:780-783, 1987.
- 8) Dhople AM, Orteg I: An in vitro culture method for screening new drugs against *Mycobacterium leprae*, Indian J Lepr 62:66-75, 1990.
- 9) Katoch VM, Katoch K, Shivannavar CT, Sharma VD, Patil MA, Bharadwaj VP: Application of ATP assay for in vitro drug screening testing against human derived *M. leprae*, Indian J Lepr 61:333-344, 1989.
- 10) Maeda S, Matuoka M, Nakata N, Kai M, Maeda Y, Hashimoto K, Kimura H, Kobayasi K, Kasiwabara Y: Multidrug resistant *Myco-*

- bacterium leprae* from patients with leprosy, Antimicrob Agents Chemother 45:3635-3639, 2001.
- 11) 山崎利雄：生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性測定、臨床検査 47：197-199、2003.
  - 12) 中村昌弘：らい菌接種ヌードマウス足蹠乳剤内迷乳雑菌の除去、日ハンセン病会誌 64:47-50, 1994.
  - 13) Nakamura M: Optimal pH for preserving the activity of *Mycobacterium leprae* during incubation of cells in a cell-free liquid medium. Int J Lepr 63:28-34, 1995.
  - 14) Matsuoka M., Kashiwabara Y. and Namisato Y.: A *Mycobacterium leprae* isolate resistant to dapson, rifampicin, ofloxacin and sparfloxacin. Int J Lepr 68: 452-455, 2000.

# Basic evaluation for new antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium leprae* by bioluminescence assay (ATP method)

Toshio YAMAZAKI\*, Masaichi GIDOH, Masanori MATSUOKA

Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases

[Received: 2 Nov, 2005 / Accepted: 10 May, 2006]

**Key words :** *Mycobacterium leprae*, drug susceptibility test, adenosine triphosphate (ATP),  
bioluminescence assay, Buddemeyer method

Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium leprae* by non-radioactive bioluminescence assay was developed. Optimization of the assay conditions such as temperature and time for ATP extraction, bacteria dose, preparation of bacteria suspension and pH of culture medium was carried out using *M. leprae* Thai 53 strain. Samples of bacterial suspension of *M. leprae* were first treated with filamentous cell treatment reagent at room temperature for 30 minutes and ATP was extracted from the leprosy bacilli by heating at 60 degrees for five minutes. Luciferin luciferase was added to the extract after cooling to room temperature followed by measurement of relative light units (RLU) of each sample using a luminometer. The concentrations of the drugs used for the evaluation of antimicrobial activities of rifampin (RFP), clofazimine (CLF), ofloxacin (OFLX) and clarithromycin (CAM) were 0.125, 0.50, 2.0 and 8.0  $\mu\text{g/ml}$  respectively. Middlebrook 7H9 broth medium was used (pH6.6) as the basal medium and the bacilli were cultivated at 32°C for 0-14 days. ATP was extracted from 0.1ml of culture suspension and inhibition of the luminescent activity was calculated. The results were compared to that obtained by radio-active CO<sub>2</sub> detection system, Buddemeyer method which is commonly used for measuring anti-*M. leprae* activity.

There was a good correlation between the results obtained by ATP method on the tenth day of culture and the results obtained by Buddemeyer method on the seventh day of culture. ATP method may be useful for the determination of drug susceptibility of *M. leprae*.

---

\*Corresponding author :

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

# らい菌の遺伝子診断の現状

石井則久\*、中永和枝、松岡正典、鈴木幸一

国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部

〔受付・掲載決定：2006年6月12日〕

キーワード：遺伝子診断、感受性、行政検査、特異性、PCR検査

## 行政検査について

「らい予防法」が廃止され、ハンセン病は保険診療になったが、一般診療機関や検査機関ではハンセン病の臨床検査が行われていない現状があった。そこで、平成9年7月からハンセン病検査要項が施行され、ハンセン病研究センターにおいて行政検査が実施されている。検査項目は、病理学的検査、血清抗体価（抗PGL-I抗体）検査、PCR検査、抗菌剤の抗らい菌活性検査である。

各年度の検査件数は表1のごとくであった。1症例で複数回依頼（経過観察や異なる検査内容など）されるものもあった。また1回（1症例）の検査で複数の検査項目の依頼もあった。ハンセン病診断には複数の検査が推奨されており、各医療機関で実施できない検査が当センターに依頼されるため、検査項目により依頼数に差異が生じている。なお、抗菌剤の抗らい菌活性検査は検査に動物を使用し、長期間を必要としているので実施していない。しかし薬剤耐性遺伝子の検討をしており、主治医に検査結果を還元しているが、表1には記載しなかった。

## PCRを用いたらい菌の検出

行政検査ではPCR法を用いてらい菌の遺伝子診断を実施している。

使用したサンプルは病変皮膚の凍結サンプル、病理用に作製されたパラフィンブロックの切片サンプル、EDTA加末梢血液であった。ホルマリンサンプルは1例依頼があったが、DNAを採取できなかった。これらサンプルからのDNA抽出方法は表2の如くである。

用いている増幅系は表2、3のように2種類である。まずHSP70 (dnaK) 遺伝子をターゲットにしたPCRにより検討した。他の検査結果や臨床症状を勘案し、詳細な検討が必要な場合には、さらにRLEP3シーケンスをターゲットにしたnested PCRを実施した。

アガロースゲルに展開させて陽性か陰性かを判定する場合のチェックポイントを表4に示した。アガロースゲルの状態、陽性及び陰性コントロールのバンドの確認、検体からDNAが採取できているかの確認、を行って、それら全てが満たされている場合に、陽性か陰性かの判断を下している。

## PCR検査の精度

表5に行政検査の精度を示した。最終診断は臨床、神経症状、病理、皮膚スメア検査、PCR検査などを勘案して行った。精度の値を出すに当たって、プライマーの種類、同一症例での複数回の検

\*Corresponding author :

国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部  
〒189-0002 東村山市青葉町4-2-1  
TEL : 042-391-8211 FAX : 042-391-8776  
E-mail : norishii@nih.go.jp

査などの考慮はしなかった。少菌型症例が少なかったため、多菌型、少菌型に分類しての検討を行わなかった。

凍結皮膚標本では感受性77.8%、特異性95.2%であった。パラフィン切片ではそれぞれ61.3%、76.0%、末梢血液では40.0%、86.7%であった。

### 今後のPCR検査の方向性

精度の向上と共に、患者・主治医が検査を簡便に実施できることが必要である。PCRの検体としては凍結皮膚標本が一番高い精度であるが、運搬が煩雑である。一方、末梢血液は採取は簡単であるが感受性が低い。現在、皮膚スミアテストで使用されるメス刃を小試験管に70%エタノール漬けにして運搬し、そこからDNAを抽出する方法を検討している。その場合、運搬は常温で良く、検体を運搬用チューブに移す手間が省け、検体のロス

を抑制できる。

観血的検査は途上国ではウイルス性肝炎やHIV感染症などの危険性があるので、唾液や尿などを用いた早期診断法が望まれるが、現時点では検討されていない。

現在ハンセン病のPCR検査はハンセン病研究センターが実施しているが、可能ならば複数の施設で検査可能となることが望まれる。

今後ハンセン病のPCR検査は患者の減少と共に、件数が減少すると考えられるが、そのためにも鑑別診断に耐えられるように精度の高い検査が求められている。

本論文は、平成18年度厚生労働科学研究費補助金「ハンセン病の啓発と難治症例に対する予防・診断・治療に関する研究」の分担研究「ハンセン病診療のネットワーク構築」の補助金を受けた。

表1 行政検査数の推移

年度	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
	平成9	平成10	平成11	平成12	平成13	平成14	平成15	平成16	平成17
病理検査	7	5	10	19	27	43	13	23	15
血清検査	13	21	13	12	27	33	21	40	8
PCR検査	7	5	10	19	53	80	20	35	25
実患者数	22	31	21	17	41	49	23	37	15

Table 2 PCR application for leprosy diagnosis

#### 1. DNA isolation from appropriate samples

- a. Skin biopsy                      NucleoSpin tissue kit (MACHERY-NAGEL)
- b. Peripheral blood                NucleoSpin Blood QuickPure (MACHERY-NAGEL)
- c. Paraffin embedded sample    DEXPAT (TAKARA BIO)

#### 2. PCR

- a. Method by Sugita et al. (Eur. J. Dermatol 6 : 423-426, 1996)
- b. Method by Donoghue et al. (J. Med. Microbiol 50 : 177-182, 2001)

#### 3. Agarose gel electrophoresis to determine the size of amplified DNA



Table 3 Method and Primers for PCR

a. Method by Sugita et al. (Eur. J. Dermatol 6 : 423-426, 1996)	
Target	HSP70 ( <i>dnaK</i> ) gene of <i>M. leprae</i>
Primer pair	
(2004-2031)	5'TACCGACATTTCCGCGATAAAGTCGGCA3'
(2161-2140)	5'CGTCAACCACATCGTCAGTAGA3'
Size of the target band	158bp
-----	
b. Method by Donoghue et al. (J. Med. Microbiol 50 : 177-182, 2001)	
Nested PCR	
Target	RLEP3 sequence of <i>M. leprae</i>
Two primer pairs	
Outer primer pair	(490-509) 5'TGCATGTCATGGCCTTGAGG3'
	(618-599) 5'CACCGATACCAGCGGCAGAA3'
Inner primer pair	(505-522) 5'TGAGGTGTCGGCGTGGTC3'
	(603-586) 5'CAGAAATGGRGCAAGGGA3'
Size of the target band	99bp

Table 4 Check points for PCR

I . Ladder marker bands;	The condition of the agarose gel electrophoresis
II . Positive controls;	The condition of the PCR
III . Negative controls;	The occurrences of contaminations
IV . Human $\beta$ -actin;	The condition of DNA isolation and quality of DNA
Satisfactory results with all four points, then find out the target band.	
Negative	or Positive

表5 PCR検査の精度

試料(検体数 <sup>1)</sup> )	感受性 <sup>2)</sup>	特異性 <sup>3)</sup>
パラフィン切片(25)	61.3%	76.0%
凍結皮膚標本(21)	77.8%	95.2%
ホルマリン標本(1) <sup>4)</sup>		
末梢血液(30)	40.0%	86.7%

1) PCR検査実施し最終診断が決定したものについて検討した(2000年度から2005年度まで)

2) 感受性(sensitivity) : 患者中の陽性割合

3) 特異性(specificity) : 非患者中の陰性割合

4) DNA採取できず検査未実施

# Current practice of genetic diagnosis for *Mycobacterium leprae*

Norihisa ISHII\*<sup>1)</sup>, Kazue NAKANAGA, Masanori MATSUOKA, Koichi SUZUKI

Department of Bioregulation, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo

[Received & Accepted: 29 June, 2006]

**Key words** : genetic diagnosis, susceptibility, administrative examination, specificity, PCR test

Laboratory tests necessary for the diagnosis of leprosy have not been well introduced in general hospitals and clinical laboratories. Therefore, several tests have been performed in Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases since July, 1997, as a part of administrative examinations (tests done by request of Ministry of Health, Labour and Welfare). These examinations include histopathology, serum antibody titers (anti-PGL-I antibody), PCR test and bioactivity of anti-bacterial agents.

---

\*Corresponding author :

Department of Bioregulation, Leprosy Research Center, National  
Institute of Infectious Diseases, 4-2-1 Aoba-cho, Higashimurayama,  
Tokyo 189-0002, JAPAN

Tel: +81-42-391-8211, FAX: +81-42-391-8776

E-mail: norishii@nih.go.jp

# DNAマイクロアレイを用いた *Mycobacterium leprae* の迅速薬剤感受性試験法

鈴木定彦\*<sup>1)</sup>、松岡正典<sup>2)</sup>

1) 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター国際疫学部門

2) 国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部

[受付・掲載決定：2006年6月19日]

キーワード：薬剤感受性試験、DNAマイクロアレイ、遺伝子診断、ハンセン病

## 1. はじめに

ハンセン病においてダブソン、リファンピシン、オフロキサシンに対する単剤あるいは多剤薬剤耐性例が認められ、再発例ではその割合が高いことが報告されている。このような状況において、*Mycobacterium leprae*の迅速な薬剤感受性判定は、的確な治療を施し、多剤耐性菌の出現と蔓延を防ぐために非常に重要である。しかしながら、マウス足蹠での増殖をベースとした薬剤感受性判定では、今以上の迅速化を望むのは困難と考えられる。判定結果が得られるまで、患者は標準的な化学療法を受けるほか手段がない。しかしながら、増加傾向を見せている薬剤耐性ハンセン病の現状を考えると、このような状況は好ましいものとは言い難い。現在、様々な手法を用いて*M. leprae*の薬剤感受性試験の迅速化が試みられている。本稿では我々が開発を試みているDNAマイクロアレイを応用した方法を中心に*M. leprae*の迅速薬剤感受性試験法について解説したい。

## 2. 薬剤耐性ハンセン病の状況

1949年にダブソンがハンセン病の標準化学療法薬として導入され、その後も使われ続けている。長期間に及ぶダブソンの単剤投与は本薬剤に対する耐性菌の出現を招いた。幸いにもリファンピシン、クロファジミンといった新たな薬剤が開発され、ハンセン病の治療に用いられる様になった。リファンピシンが強力なハンセン病治療薬であることは明らかであるが、リファンピシン単剤による治療はリファンピシン耐性菌の出現を招くことになる。また、ダブソン耐性ハンセン病の治療にリファンピシンとダブソンの併用療法を施せば両剤に耐性を持つハンセン病の出現を招くことになる。このような薬剤耐性ハンセン病出現の問題を招かないために世界保健機構（WHO）は多剤併用療法を推奨している。しかしながら、臨床的にダブソン耐性が疑われる症例に続いて、ヌードマウスを使った薬剤感受性試験で耐性と判定された症例が出現し<sup>1-3)</sup>、現在では多くの多剤耐性ハンセン病も見いだされている<sup>4-7)</sup>。

## 3. 抗ハンセン病薬の作用機序、*M. leprae*の薬剤耐性獲得機序および耐性獲得に関連する遺伝子変異

様々な研究グループが抗ハンセン病薬の作用機

\*Corresponding author :

北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター  
国際疫学部門

〒001-0021 札幌市北区北18条西9丁目

TEL : 011-706-7327 FAX : 011-706-7310

E-mail : suzuki@czc.hokudai.ac.jp

序とこれらに対する耐性獲得機序に着目して研究を進めてきた。その結果、以下に示す事実が明らかとなった。

**ダブソン**：本薬剤の標的は葉酸生合成経路の中で重要な役割を演じているジヒドロプロテロイン酸合成酵素である。ダブソンはジヒドロプロテロイン酸合成酵素の本来の基質であるパラアミノ安息香酸の拮抗阻害物質として作用する。大腸菌においてはジヒドロプロテロイン酸合成酵素におけるパラアミノ安息香酸結合部位でのアミノ酸置換を伴った塩基置換（ミスセンス変異）の結果としてダブソン耐性の表現型が出現することが知られていた。*M. leprae*ゲノムの全塩基配列が決定された結果、*M. leprae*もジヒドロプロテロイン酸合成酵素遺伝子を保有していることが明らかとなった。ダブソン耐性*M. leprae*の*folP*遺伝子の解析から、*M. leprae*においてもパラアミノ安息香酸結合部位でのミスセンス変異がダブソン耐性に関与していることが

示された<sup>7-13)</sup>。この領域はダブソン耐性決定領域（DRDR）と呼ばれている。

**リファンピシン**：本薬剤はハンセン病多剤併用療法の中心的な役割を果たしている殺菌作用を持つ薬剤である。大腸菌やいくつかの抗酸菌ではリファンピシンの標的がDNA依存性RNA合成酵素βサブユニットであることが明らかとなっていた。それらの細菌のDNA依存性RNA合成酵素βサブユニットの予想される一次構造を*M. leprae*のそれと比較することにより、*M. leprae*でもリファンピシンが結合する領域の構造が高度に保存されていることが示された。このことより、*M. leprae*においてもリファンピシンの標的がDNA依存性RNA合成酵素βサブユニットであると考えられた。本薬剤に耐性の型質を持つ*M. leprae*においてリファンピシン耐性決定領域（RRDR）の塩基配列が決定された結果、*M. leprae*のリファンピシン耐性も結核菌と同様にRRDRにおけるミスセンス

表1 *M. leprae*の薬剤耐性に関与する遺伝子変異とその頻度

Drugs	Responsible gene	Mutation(s)	No. of isolate(s)	Reference(s)
Dapson	<i>folP1</i>	Thr53Ala	13	8-10
		Thr53Arg	1	8
		Thr53Ile	2	10
		Thr53Ala + Pro55Leu	4	8, 11
		Pro55Arg	5	10-12
		Pro55Leu	9	8-10, 13
		Pro55Ser	2	7, 12
Rifampicin	<i>rpoB</i>	Gly401Ser + His420Asp	1	14
		Gln407Val	1	14
		Phe408/Met409:LeuPhe insertion	1	15
		Asp410Asn	1	15
		Asp410Tyr	1	13
		Asp410Asn + Leu427Pro	1	8
		Ser416Cys	1	16
		His420Asp	1	15
		His420Tyr	11	8
		Ser425Leu	34	6- 8, 12, 14-18
		Ser425Phe	1	14
		Ser425Trp	2	12, 15
		Ser425Met + Leu427Val	1	8
Ofloxacin	<i>gyrA</i>	Gly89Cys	2	8, 9
		Ala91Val	9	5, 7, 8, 12, 15