

ゴソーム内で菌の生存を可能にするような未知の因子の存在が考えられた (Fig 3)。

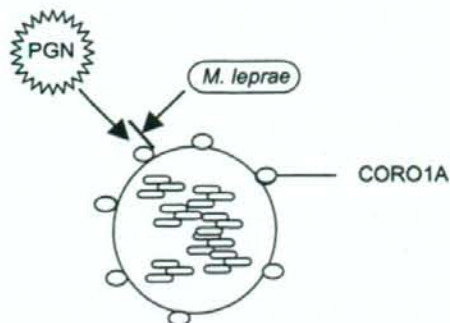


Figure 3. *M. leprae* は CORO1A の発現を抑制する PGN によるシグナルを阻害する
THP-1 細胞において、PGN による刺激により CORO1A の発現は抑制されたが、*M. leprae* では CORO1A の発現に変動が見られなかったことから、*M. leprae* は感染した際に誘導される免疫反応に対して抑制的に働くことにより生存を維持でき、その結果増殖すると考えられた。

謝 辞

第 80 回日本ハンセン病学会総会において学会長奨励賞を頂き深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J: A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97:435-447, 1999.
- 2) Jayachandran R, Sundaramurthy V, Combaluzier B, Mueller P, Korf H, Huygen K, Miyazaki T, Albrecht I, Massner J, Pieters J: Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell* 130:37-50, 2007.
- 3) Trimble WS, Grinstein S: TB or not TB: calcium regulation in mycobacterial survival. *Cell* 130:12-14, 2007.
- 4) Suzuki K, Takeshita F, Nakata N, Ishii N, Makino M: Localization of CORO1A in the Macrophages Containing *Mycobacterium leprae*. *Acta Histochem Cytochem* 39:107-112, 2006.

Molecular mechanisms for intracellular parasitisation and exclusion in macrophage infected with *Mycobacterium leprae*

Kazunari TANIGAWA *¹⁾, Koichi SUZUKI¹⁾, Akira KAWASHIMA¹⁾,
Masayo MISHIMA¹⁾, Huhehasi Wu¹⁾, Takeshi AKAMA¹⁾,
Fumihiko TAKESHITA²⁾, Norihisa ISHII¹⁾

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

2) Department of Molecular Biodefense Research, Yokohama City University School of Medicine

[Received / Accepted: 1 Nov. 2007]

Key words : CORO1A, macrophage, *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), phagosome, toll-like receptor 2 (TLR2),

It was previously demonstrated that TLR2 and CORO1A(TACO, Coronin 1, p57) localize phagosome membrane of macrophage. However, the functional relationship between TLR2 and CORO1A was not known. We show here that there is a functional counteraction between TLR2 and CORO1A.

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

輸入皮膚感染症*

石井 則久¹⁾・関根 万里²⁾・渡辺 朋美³⁾・朝比奈昭彦⁴⁾

要約 交通機関の発達により、人、動植物、物の流通が頻繁になっている。それに伴い、日本に「輸入」される皮膚感染症も増加している。輸入皮膚感染症は熱帯地方の感染症が多いが、本邦では診療する機会が少ないため、診断・治療に遅滞が生じることがある。初診時の問診アンケートなどに、外国人であれば出身国や既往歴・家族歴を、日本人であれば海外渡航歴などの項目を追加する。また、インターネットなどで世界の感染症の情報を常に更新しておくことも必要である。

キーワード 海外渡航歴、外国人、地球温暖化、デング熱、熱帯地方

石井則久：臨皮 62(5増)：22-26, 2008

はじめに

国際化が定着し、交通手段も便利、迅速になり、日本人が渡航することが容易になった。また、外国人が来日することも容易になった。出入国者数も日本人が海外へ年間1,754万人、海外から外国人が811万人〔再入国者も含む、新規入国者は673万人(2006年)〕と人の動きが頻繁になっている。人の移動と相まって物品の移動も活発になっている。それらに伴って皮膚感染症が「輸入」され発症することがある¹⁾。



輸入皮膚感染症の背景

海外で感染して日本で発症する皮膚感染症、外

国人が日本に持ち込む〔潜在(潜伏)感染が顕在化する、あるいは発症している状態〕皮膚感染症がある。さらに輸入動物(飛行機や船舶などに偶発的に紛れ込んだ蚊やクモなども含む)、物品、それらに付着するなどして日本に持ち込まれたものから感染症が発症することもある。

日本は島国であるため、かつては海外の感染症の侵入は困難であったが、船舶の往来、航空機の発達により、人、動植物、物などが海外と自由に往来が可能になった。さらに、近年の地球温暖化は熱帯地方に生息している動植物を、日本でも生息可能にしている。

* Imported infectious skin diseases

¹⁾ Norihisa ISHII：国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体防御部(主任：石井 則久部長) Department of Bioregulation, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Higashi-murayama, Japan(Chief: Dr N ISHII)

²⁾ Mari SEKINE：東京都保健医療公社荏原病院皮膚科(主任：関根 万里医長) Department of Dermatology, Ebara Hospital, Tokyo, Japan(Chief: Dr M SEKINE)

³⁾ Tomomi WATANABE：渡辺皮膚科形成外科クリニック(主任：渡辺 朋美副院長) Watanabe Dermatology and Plastic Surgery Clinic, Ueda, Japan(Chief: Dr T WATANABE)

⁴⁾ Akihiko ASAHINA：国立病院機構相模原病院皮膚科(主任：朝比奈昭彦医長) Department of Dermatology, NHO Sagami Hospital, Sagami, Japan(Chief: Dr A ASAHINA)

〔連絡先〕石井 則久：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 東京都東村山市青葉町4-2-1)

表1 皮膚科領域の主な輸入感染症

感染源		感染様式	主な疾患(症状)
食品	海産物	経口	広節裂頭条虫症
	淡水魚 (フナ, ドジョウなど)		顎口虫症(皮膚爬行疹)
	食肉(牛, 豚)		有鉤囊虫症(皮下結節)
	ヘビ, カエル		マンソン孤虫症(移動性皮膚腫脹)
昆虫	ネッタイシマカ	刺咬	デング熱(解熱後発疹)
	蚊		リンバ系糸状虫症(象皮病, 陰囊水腫)
	ダニ		ツツガムシ, 紅斑熱(刺し口, 高熱, 皮疹)
	マダニ		ライム病
	サシチョウバエ		皮膚リーシュマニア症(皮膚結節, 潰瘍)
	サシチョウバエ		皮膚粘膜リーシュマニア症(皮膚粘膜潰瘍, 組織欠損, 瘢痕性, 萎縮)
	ノミ		スナノミ症(圧痛を伴う中央に黒点を有する小結節)
	アブ		ロア糸状虫症(遊走性皮膚腫脹(腫瘤))
	ハエ		幼虫が皮膚に入り成虫になる 皮膚蠅蛆症(黒点など)
土・水	経皮	糞線虫症(痒疹, 紅斑, 線状皮膚炎) 鉤虫症(線状皮膚炎) 住血吸虫症(日本, ビルハルツ, メコン)(水疱, 虫刺様)(セルカリア経皮) <i>M. marinum</i> 感染症(結節, 潰瘍)	
患者・保菌者	STD	HIV 感染症, 疥癬, 梅毒, 淋病, 軟性下疳, 外陰・腔カンジダ症, 陰部ヘルペス, 尖圭コンジローマ, モジラミ症	
	医療行為	HIV 感染症, 梅毒, デング熱	
吸入 (呼吸器感染)	旅行など	バラコクシジオイデス症(リンパ節腫脹, 粘膜皮膚の丘疹, 潰瘍)	
	幼小児期の呼吸器感染	ハンセン病(皮疹, 末梢神経症状)	
吸入・経皮	旅行など	コクシジオイデス症(皮膚潰瘍, 中南米, 北米など土壌の真菌)	

■ ■ ■ 輸入皮膚感染症の症例

表1に示すように, 多数の輸入皮膚感染症がある。それらの中からいくつかの症例を提示する。

1. 紅斑熱(海外で刺咬後, 国内で発症)

45歳, 男性, 日本人, 南アフリカ, キンバリ一滞在中(1988年2月7~9日), 灌木の中を旅行し, 虫に刺されたことがあった。帰国後, 2月20日に頭痛と発熱(39°C台), 浸潤性紅色丘疹が全身に多発した。2月24日(初診時)には漿液性丘疹も認められ(図1), 左臀部には黒色痂皮を伴うエスカーも認めた。ミノサイクリン内服にて24時間後に解熱し, 臨床症状は軽快した。血清検査などから南アフリカ紅斑熱群リケッチア症と診断し

た²⁾。発熱と皮疹で受診した某医では診断がつかず, 患者が転院して診断が確定したが, 紅斑熱は治療が遅れると死亡することがあるため, 海外渡航の間診で種々の疾患の鑑別をすることが重要である³⁾。

2. クリーピング病(海外で喫食後, 日本で発症)

58歳, 男性, 日本人, 東南アジアで生の川魚を数回摂食した。帰国後, 移動する線状皮疹が腹部に出現した(図2)。皮疹先端部とその先の無疹部も含めて切除するも, 虫体を確認できなかった。その後自然消退し, 虫の同定は行わなかった。臨床症状は典型的であり, 現在ではイベルメクチンの内服も試みる治療法であろう。クリーピング病は治療よりも予防が大切で, 海外では食品



図1 南アフリカ紅斑熱群リケッチア症
帰国後、発熱と全身多発性の浸潤性紅色丘疹と漿液性丘疹を認めた。



図2 クリービング病
東南アジアから帰国後に線状皮疹が出現した。



図3 デング熱
全身の潮紅と粟粒大の紅色丘疹がみられる。

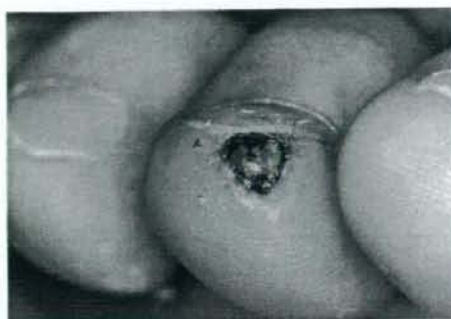


図4 スナノミ症
右第3趾尖に、中央に黒点を認める小豆大小結節、周囲に血痂を附着している。

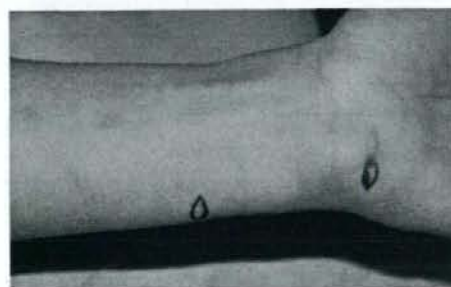


図5 ハンセン病
左前腕に知覚低下を伴う淡紅色紅斑局面を認めた。

は加熱あるいは火の通ったものを食べることを啓発する必要がある。

3. デング熱(帰国前後からの高熱と皮疹)

33歳、男性、日本人。ミャンマーへの渡航歴がある(1998年9月)。帰国前後から39°C台の発熱があり来院、入院した。CRP 6.8 mg/dl、白血球増多なし、血小板数やや減少、肝機能障害あり。全身の潮紅と粟粒大の紅色丘疹が出現し、足底も赤く腫脹した(図3)。虫刺痕あり。皮疹出現の翌日には解熱し、症状は軽快。抗体検査から、デング熱と診断した。

デング熱には出血傾向や血管透過性亢進に伴う血漿漏出症状を呈するデング出血熱といわれる重症型もあり、その場合は死亡することもある。特に皮疹と出血傾向のみられる時期が重なるため注意が必要である。治療は対症療法を行う。

デング熱はネッタイシマカやヒトスジシマカ

(やぶ蚊)が媒介するヒト→蚊→ヒトの感染サイクルをもつウイルス性疾患で、蚊は主に都市部で昼間活動する^{4,5)}。予防には昆虫忌避剤を頻回に使用するなどの防蚊対策が重要である。鑑別すべき疾患としては、従来からいわれている熱帯から亜熱帯で流行する熱性疾患のマラリア、腸チフス、発疹チフス、紅斑熱などのリケッチア症、インフルエンザなどのウイルス性疾患、またチクングニア熱もヒトスジシマカ、ネッタシシマカにより媒介される発疹を伴うウイルス性熱性疾患である。近年の地球温暖化に伴い、日本においてもデング熱媒介蚊などの生息が容易になってきている。デング熱が輸入感染症のみでなく、日本国内でもヒト→蚊→ヒトの媒介で流行することも懸念される。

4. スナノミ症(皮膚にできた異物が感染症)

48歳、男性、日本人。マダガスカルへの渡航歴あり(2002年9月初めより11月中旬)。現地では、街中を歩くときはビーチサンダル、砂浜を歩くときはズック靴を履いていたという。11月20日過ぎから膿のようなものが右足先から出てくるようになったとの訴えがあり、12月初旬に来院した。周囲に軽度の発赤と、いじっていたため付着した血痂を伴う、白色のあたかも液体窒素の治療後のような外観を呈する小豆大小結節が右第3趾尖にあり、中央に黒点を認めた(図4)。これを切除すると白色顆粒の一塊を認め、検鏡にて卵であることが確認できた。また、左足関節は現地滞在中より腫脹がみられ、虫によるものだといわれ放置していたが、発赤・腫脹と痛みが取れないため皮膚科受診2日前に整形外科を受診、蜂巣炎と診断された。しかし、皮膚科来院時に右足のような結節は残っていなかった。

スナノミは主に中南米・熱帯アフリカで砂上に生息する。受精した雌が動物に寄生、吸血し産卵する。好発部位は足で、通常、多数寄生する。臨床上、結節の中央にみられる黒点は吸血した虫体である。同地からの帰国者で足底や趾尖に黒点を有する結節があり、海岸などの砂地を裸足やサンダル履きで歩いたことがあるような場合には、本症を疑うことが大切である。診断と治療は、スナノミの摘出による。全部を摘出しないと異物肉芽

腫が残る。また、結節部がしばしば細菌感染の侵入部位となり、蜂巣炎、ガス壊疽、破傷風を生じることがある。そのため、破傷風の予防接種が勧められる。スナノミ症の予防としては靴を履くことが最善の方法である。

5. ハンセン病(本国で感染し、日本で発症)

24歳、男性、インドネシア人。2006年12月頃より左上腕から左上背部のC8神経領域にしびれが出現した。同じ頃より左前腕に皮疹が出現した。神経内科を受診し、皮疹について紹介された。左前腕10×40mmの範囲に弾性硬、淡紅色紅斑局面、皮疹部に知覚低下あり(図5)。左前腕から上腕に尺骨神経の肥厚と圧痛あり。病理組織学的に類上皮細胞性肉芽腫を認めた。皮膚スミア、病理組織抗酸菌染色、PCRにてらい菌陰性であったが、知覚低下を伴う皮疹、末梢神経の肥厚、病理組織学的所見よりハンセン病(少菌型:PB)と診断した。リファンピシン、ジアフェニルスルホン、クロファジミンによる3剤併用療法にて、皮疹は色素沈着を残してほぼ消退した。帰国時には英文の紹介状を手渡した。

ハンセン病は慢性感染症で、幼小児期の感染が発症に重要である⁶⁾。途上国の外国人が日本で就職し、発症する例が散見される。特に新規患者の多いブラジルやインドネシアなどから来日した人が発症する場合がある。途上国の外国人の皮膚病変については、知覚検査なども行うことが必要である。なお、ハンセン病については全世界的に偏見・差別の歴史が続いてきており、病名の説明などには慎重な対応が求められる。

■ ■ ■

考 按

学会発表や論文などで稀に輸入皮膚感染症が提示される。一方、多数の日本人が海外に出かけ、また多数の外国人が観光・就職などで日本全国を訪れる。皮膚科外来に輸入皮膚感染症患者が来院することが他人事ではなくなっている。輸入皮膚感染症の病原体は多数あり、臨床症状も多彩なため、皮膚科医は海外渡航歴や外国人であることから、鑑別として感染症を念頭に置く必要がある。

輸入皮膚感染症の診断には、①問診・問診票などで海外渡航歴や出身国などを把握する、②海外

での感染症の動向をインターネットや学会報告・論文などで入手する。③鑑別が必要な場合は、各疾患に造詣の深い医師・研究者に問い合わせるなど、積極的に情報を入手する。最終診断や治療については、専門の医師や研究者と協議して決定していく。

人の移動で海外の皮膚感染症が日本国内に持ち込まれるほかに、海外から輸入される動植物や、物品に付着している病原体やベクター(病原体を媒介する動物)などから、国内で輸入感染症が発症する可能性がある。さらに地球温暖化によっ

て、熱帯で生息する病原体やベクターが日本でも生息可能になることで、「日本で感染・発症した熱帯皮膚病」の症例が現実化することが危惧される。熱帯の皮膚病についても鑑別可能な知識が必要になっている。

文 献

- 1) 石井則久：皮膚臨床 41(特 39)：870, 1999
- 2) 石井則久，他：臨皮 43：801, 1989
- 3) 石井則久：皮膚病診療 12：573, 1990
- 4) 中尾由絵，関根万里：日皮会誌 117：1721, 2007
- 5) 四ノ宮成祥，他：防衛衛生 54：227, 2007
- 6) 石井則久：診断と治療 59：1591, 2007

Derm.
2008

衛生説

橋爪秀夫(浜松医科大学皮膚科)

ちょっと意外なことだが、と同期の友人が切り出した。患者の前で“指導”されたことを不服として、若い医師が、突然登校拒否ならぬ“通勤拒否”を起こしたらしい。詳しい事情はわからないが、全く唐突なことで驚いたという。なんとなく他人事ではすまされないような危機感をもった。人間関係を結ぶことが不得手である若者が増加していると聞く。もしかしたら、医療の世界にもこのような若者たちが増えているのかもしれない。

近年の恐るべきコンピュータの発達には、コミュニケーションの形態を大きく変えてしまっている。隣に座っているのに、メールで会話するという嘘のような話がすでに現実となっているのだ。社会もこの恩恵によって、人を介さないシステムが主流となりつつある。一方、いくら世の中が進んだとしても、医療や教育の世界では人との接触は不可欠だ。特に皮膚科のような小所帯では、患者さんはもとより、上司、看護師、他科の医師やコメディカルと上手くやることが、仕事を円滑にする大きな鍵となっているような気がしている。

子どもは叱らないと、精神的に成熟しないらしい。いつも心地良い精神状態にいると、精神的に大きな痛みを負ったときに対応する術をもたないとメディアは分析している。なるほど精神的にひ弱であつては、厳しい現実には打ちのめされ、立ち直れなくなることだってありうる。逆に少々怒られても、すみませんと頭を下げた後にはつらつと仕事をこなす若者には、むしろ愛嬌さえ感じるものだ。頑固親父を地でいけない私にとっては、耳の痛い話である。

アトピー性皮膚炎発症の仮説として信じられている衛生説は、無菌的な状況下で育った免疫がうまく教育されないために、Th2シフトという免疫学的不均衡を起こし、アレルギーの発症につながるというものだ。これは人の心にも当てはまるのではないか。幼いころの苦い経験は、それを痛みとして受け止めると同時に、それを聞き入れたり排除したりする判別能力を磨くのではないか。苦悩や挫折を経験しない無菌的な社会で育った若者においては、社会に出て初めて遭遇する他者の忠告は、理解されないうちに拒否反応が進んでしまうのかもしれない。

若者のヘッドフォンが、大人の言葉を拒絶しているように映るのは、私が年をとったせいだけだろうか。明日から、きりりとした頑固親父を演じようと心に決めた私である。(● 431-3192 浜松市東区半田山1-20-1)

一 綜 説 一

ハンセン病の最近の話題

石井 則久

ハンセン病は主に皮膚と末梢神経に病変を形成する慢性抗酸菌感染症である。発症には乳幼児期における鼻粘膜を介したらい菌曝露が重要とされている。現在、日本では新規患者はほとんどなく年に8~10名程度である。皮膚症状は環状紅斑や紅斑局面、結節など多彩である。治療が遅れると、知覚神経や運動神経が侵され麻痺が生じる。治療はWHOの推奨する多剤併用療法に準じて行われている。治療薬のうちリファンピシムはらい菌に対して殺菌効果が高く、治療薬の中心となるが、耐性を生じないように確実な内服が求められており、また、他剤との併用が原則である。

ハンセン病の歴史は偏見・差別の歴史でもあった。さらに「らい予防法」という法律によりそれらが増長された。医師、医療関係者は、ハンセン病の歴史を正しく認識し、今後の診療に生かしていくべきである。(皮膚の科学, 7: 416-420, 2008)

キーワード: 世界保健機関, 多剤併用療法, 偏見・差別, らい菌, らい予防法

はじめに

ハンセン病は抗酸菌の一種であるらい菌 (*Mycobacterium leprae*) による慢性感染症で、主に皮膚と末梢神経が侵される¹⁾。らい菌に対する個々人の細胞性免疫能の違いによって病像に差がみられる。また、ハンセン病は医学面のみならず社会面においても課題が多い。

I. 皮膚科が関わるハンセン病患者

1. いわゆる「ハンセン病患者」とは: Fig 1に示すように、新規患者と、ハンセン病既往歴のある人(再発のチェック、後遺症の診療)が皮膚科医と関係する「ハンセン病患者」である²⁾。既往歴のある人は、「ハンセン病回復者」、「ハンセン病元患者」などとも呼ばれ、生活の場はハンセン病療養所(入所者とも呼ばれる)と、一般社会に分けると理解しやすい。

2. 新規患者: Fig 2, Table 1に示すように日本人の新規患者は激減し、最近では年間0~1人程度までになっ



Fig. 1 ハンセン病医療の対象

ており、そのほとんどは高齢者である³⁾。本土の減少は急激であったが、沖縄県の減少は緩やかであった(Fig 2)。1960年頃からは、新規患者の半数を沖縄県が占めている。これは、患者が多い沖縄県において、隔離政策の遅れ(感染源対策)と経済的立ち遅れなどが影響していると考えられている⁴⁾。

新規患者は、ほとんどの例で皮膚科医によって診断されている。診断後も継続して治療を受けている。

一方、在日外国人の新規患者は毎年8人程度で(Table 1)、約半数はブラジル人である。日系人はビザ

Norihisa ISHII, M.D.
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 東京都東村山市青葉町4-2-1
2008年7月26日掲載決定

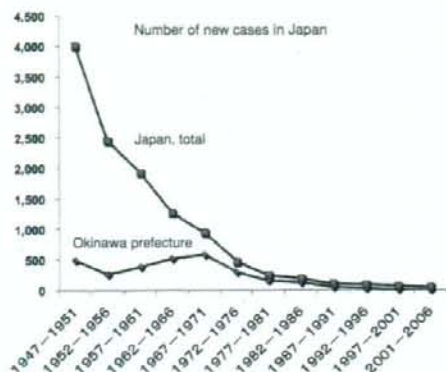


Fig. 2 日本の新規患者数
日本全土（沖縄県を含む）と沖縄県の新規患者数を、
5年間毎の総計で示した。

Table 1 日本のハンセン病新規患者数

日本人			外国人				
計	女	男		計 (ブラジル人 数、再掲)		外国人の割合(%)	
				男	女		
8	1	7	1993	9	1	10 (2)	55.6
9	7	2	1994	4	2	6 (2)	40
8	3	5	1995	9	1	10 (6)	55.6
6	2	4	1996	14	4	18 (10)	75
6	3	3	1997	6	2	8 (4)	57.1
5	2	3	1998	2	3	5 (2)	50
8	2	6	1999	7	4	11 (4)	57.9
6	4	2	2000	5	3	8 (3)	57.1
5	2	3	2001	5	3	8 (4)	61.5
7	3	4	2002	6	3	9 (6)	56.3
1	0	1	2003	6	1	7 (3)	87.5
4	2	2	2004	7	1	8 (5)	66.7
0	0	0	2005	5	1	6 (4)	100
1	0	1	2006	6	0	6 (2)	85.7
1	0	1	2007	9	1	10 (4)	90.9

を入手しやすい事と、ブラジル本国で患者が多いことも影響している。近年はインドネシアやフィリピン出身の新規患者も散見される。ただし、新規患者の1/3は診断確定後帰国している。今後、来日する外国人の増加が予想されるため、これから約10年間の新規外国人患者は毎年5名から10名程度発生すると考えられる。

3. 社会に暮らす回復者：

過去に療養所に入所して現在社会で生活している人、また療養所入所歴が無く、外来で治療を受け、社会で生活している人がいる。実数は把握されていないが、2,000人から2,500人程度と考えられる。彼らの多くは静菌剤であるDDSの単剤のみで治療終了している場合が多い。そのため、再発の可能性を否定できない。彼らの再発は数%程度と考えられる。彼らは過去の苦い経験などから、ハンセン病の既往歴を話さないことも多い。そ

のためもあり、受診医療機関はハンセン病療養所の事が多い。彼らも高齢に近づき、近在の皮膚科で再発のチェックや皮膚科関係の後遺症の治療をすべきである。

数年前から彼らの診療に対応できる皮膚科医を養成するための講習会なども開催し、ハンセン病を「普通の皮膚病」として「一般の医療機関で診療する」(integration) 努力を行っている。彼らが一般社会で普通の生活(normalization)ができるように、皮膚科医も応援したい。

4. ハンセン病療養所入所者：

ハンセン病療養所(国立13施設、私立2施設)に入所している約2,700人は施設内で医療・看護・介護・福祉などを受けており、皮膚科医が関与することは少ない。現在平均年齢が80歳であり、近い将来、入所者減になり、その対応が課題となる。

II. ハンセン病はどうやって診断するのか

問診で知覚の異常(ケガをしても痛くない、頻回の火傷、痛み・痒みのない皮疹)を開発途上国出身者、高齢日本人などの場合は鑑別の一つとしてハンセン病を頭の片隅に入れておく。

らい菌を検出することは診断に直結するが、らい菌の試験管内培養はいまだ成功していない³⁾。そのため、以下の中から複数の検査を組み合わせることでらい菌を証明する。

a) 皮膚スミア検査：らい菌は皮膚(真皮)に多く存在するので、皮疹部などにメスを刺し、組織液を採取する。組織液をスライドグラスにすり付け、抗酸菌染色し、検鏡する。十分量の組織液を採取できるかがポイントである^{6,7)}。

b) 病理組織特殊染色：病理組織を抗酸菌染色(Fite染色)し、400倍で検鏡する。

c) PCR検査：らい菌特異的なDNAを証明する。病変部皮膚生検標本や、皮膚スミア検査で用いたメス刃をエタノール漬けて運搬して検査すると感受性・特異性が高くなる。

鑑別すべき疾患は、サルコイドーシス、皮膚結核、非結核性抗酸菌症、環状肉芽腫、結節性紅斑、強皮症、スウィート病、薬疹、中毒疹など多数である。肉芽腫や泡沫細胞などの病理組織学的所見が診断の手がかりになることが多い。

患者の病態を検査すると、皮疹の数や形態、神経肥厚や知覚・運動障害の程度、病理組織所見にかなりの違いがみられるが、これはらい菌に対する生体の免疫能の差を反映するものであり、これを基に病型分類を行う。ハンセン病患者を初めて診療する医師にとってはまず、らい菌を検出しにくい少菌型(paucibacillary:PB)と、らい菌を検出できる多菌型(multibacillary:MB)とに分類すると理解しやすい(Fig 3)。なお、PBとMBの分類は

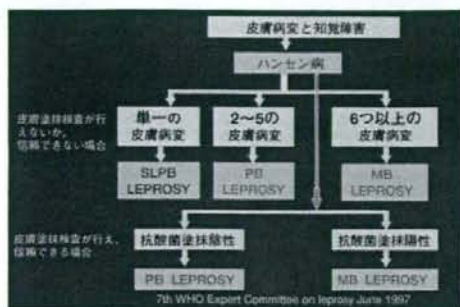


Fig. 3 WHOの病型分類

SLPB: single lesion of PB (皮疹が1個のみのPB例)。

治療法の選択にも応用され、WHO分類として知られている⁹⁾。PBでは皮疹の数は少なく、MBでは多い。PB、MBの分類後に改めてRidley-Jopling分類をする。病型を決定することが困難な症例もあるので、その場合は、臨床・病理などの所見を併記しておく。

Ⅲ. ハンセン病の治療はどうするのか

治療の基本は、神経症状をコントロールしながら、らい菌を生体から排除することである。特にシュワン細胞内のらい菌を、炎症を惹起せずに排除することで、合併症や後遺症が抑制できる。薬剤耐性発現予防のためWHOの推奨する多剤併用療法 (multidrug therapy: MDT) を基本に治療する。リファンピシン (RFP, 殺菌作用)、ジアフェニルスルホン (DDS, 静菌作用)、クロファジミン (CLF, 静菌作用) の3種類をPBでは6ヶ月間、MBでは1~3年間内服する⁹⁾。患者には内服が長期にわたること、治療中にらい反応が出現する可能性のあること、および不定期内服により治癒が遅延し耐性菌が出現する可能性のあることを十分説明することが必要である。診療や検査、入院などでは通常の感染予防の対応を行う。

なお、フルオロキノロン (オフロキサシン、レボフロキサシン、スパルフロキサシンなど)、ミノサイクリン、クラリスロマイシン、リファブチンなどもらい菌に対して有効である。

Ⅳ. らい反応対策

らい反応とは、らい菌の菌体成分が抗原となり細胞性免疫が惹起されたものである (1型反応、境界反応)。またIII型アレルギー反応 (2型反応、ENL) も惹起する¹⁰⁾。らい反応においては、らい菌の存在する部位が炎症の中心になるため、シュワン細胞 (末梢神経) や、眼、皮膚などに傷害をきたす。抗原は同定されていないが、マクロファージ内やシュワン細胞内のらい菌が抗原提示されない方策を考えることも、らい反応予防になるかも

しれない。

らい反応の治療はステロイドや非ステロイド系抗炎症薬などの内服を行う。ENLにはサリドマイドが著効するが、現在の日本では国立ハンセン病療養所内でしか使用許可されていない。多発性骨髄腫に適用後にENLに対しても使用可能になるかもしれない。なお、ペントキシフィリン (pentoxifylline, 脳循環代謝改善薬のトレンタール[®], 現在販売中止) もENLに対して有用との報告がある¹¹⁾。

Ⅴ. 皮膚科医のハンセン病医療への取り組み

新規患者の減少から、日本におけるハンセン病は終焉が目前である。それに呼応するかのようには、ハンセン病診療経験のある皮膚科医は減少し、診断力の低下が危惧される現況である。現在、新規患者を診療する医師は引き続き治療も行い、ハンセン病診療経験を積んでいる。ハンセン病回復者への医療は、スミア検査などの実習を含めた講習会を実施して、知識・技能の向上と、回復者の心情を理解できることを目指している。

ハンセン病のコンサルティング体制も整いつつある。患者が減少していく病気において、病気の知識や歴史を継承していくことは困難を窮める。日本皮膚科学会でも、毎年の総会において教育すべき疾患にハンセン病を指定し、若い医師への教育を行っている。

Ⅵ. ハンセン病の歴史

ハンセン病は有効な治療薬がない時代には病状が進行し、顔面、手足に皮疹および末梢神経障害による痛覚麻痺、変形、運動障害などを形成した。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、更に宗教上の問題などから、世界のどの地域においても偏見・差別、排除の対象となった。日本では明治時代になって救済から隔離に進む、「癩予防ニ関スル件」(1907年、明治40年)、「癩予防法」(1931年、昭和6年)、さらにハンセン病に有効な治療薬が開発されていた1953年 (昭和28年) に至っても「らい予防法」として綿綿とハンセン病に関する法律が継続した。医学的進歩、人権思想の高まりと共に改変されるべき法律が1996年まで存続してしまっ。医療関係者は単に医学の進歩を追求するのみならず、病気に関連する法律や社会的状況なども考慮して、病める人々へ、人間として最善を尽くすことが必要である。

Ⅶ. 最近のハンセン病の話

ハンセン病を簡便な方法で早期発見し、早期診断することが重要である。多くの患者が開発途上国にいるが、そこでは血液を介した多くの感染症の危険性やサンプル運搬の困難さから、簡易検査法が模索されている。血清検査では、抗PGL-I抗体検査が知られているが、感受性・特異性共に低く、一般検査化には難点がある。新たにらい菌膜表面抗原MMP-II (major membrane protein-II)

に対する抗体検査が試みられおり、抗PGL-I抗体検査よりも好成績を示しているが、実用化へのハードルはまだ高い¹⁰⁾。

治療では、WHOの推奨するWHO/MDTは、MDT治療終了後の再発が1%程度であり、現在最も優れて、安価な治療法である。しかし、耐性菌の出現、治療が長期間のため、新たな治療薬の開発とともに、治療期間を短縮し、らい反応を防ぐ方法を開発する必要がある。しかし、患者の減少から試験が困難で、*in vitro*、および*in vivo*の研究も進まず、少数例の使用経験から結果を導くことになる。

神経障害をおこさない、すなわち、らい菌とシュワン細胞との親和性を低下させ、らい菌が神経で生存できない状態にすること、らい菌を神経から排除するなどの研究も、障害予防・後遺症対策として必要である。

開発途上国における取り組みでは、主たる保菌者は未治療の患者であるので、患者の早期発見、化学療法による治療が重要で、発見・治療により他人、特に小児へ感染させる危険性は大幅に低下し、障害・後遺症も軽度で留まる。その方策として学校教育は有効で、早期発見に大きな効果を上げることができる。さらに、障害・後遺症の予防ないし悪化予防も日常生活上で重要であるが、WHOやGO（政府機関）の援助後退により、資金が払底してきている。しかし、患者、回復者、市民が主体となって障害・後遺症予防対策を実践することで、偏見・差別の解消につながることを期待したい。

疾患感受性遺伝子としては、パーキンソン病関連遺伝子PARK2および共調節を受ける遺伝子PACRGに共通する5'調節領域とオーバーラップする約80kbの区間に位置する17のマーカークとハンセン病との間に優位な関連が認められ、17のリスク対立遺伝子のうちわずかに2個を持つだけでハンセン病の予測性が非常に高いことが明らかとなってきた¹¹⁾。さらにHLAとの関連なども検討することで、ハンセン病に罹患しやすい生体側の因子を解明できる可能性が高い。

自然免疫の関与としては、Toll様受容体（TLR）の中でTLR2がらい菌排除に重要である。一方、TLR2に拮抗するCORO1Aも知られており、両者のバランスが感染初期のらい菌と生体に大きな影響を与えていると考えられる¹²⁾。

今後の研究テーマとしては、分子生物学的なアプローチ、早期発見の検査法の開発、末梢神経の修復・再生の研究などが考えられる。しかし、ハンセン病やらい菌をテーマとする研究者は日本のみならず世界的に少数で、学問的興味も減じているようである。他の疾患と重複、例えばハンセン病と糖尿病の末梢神経障害の共同研究、創傷治癒の研究、偽遺伝子の解析¹³⁾など、他の研究者や

他の研究分野との共同研究が必要である。

Ⅷ. 国際協力

開発途上国においては、患者の早期発見と後遺症対策、さらに偏見・差別の解消が今後に残された課題と考えられる。しかしWHOは資金が無く、GOやNGO（民間援助団体）もハンセン病から人的にも資金的にも手を引きつつある。開発途上国内においても感染症のプライオリティはHIV/AIDS、マラリア、結核などが上位を占め、ハンセン病はかなり下位である。

このような状況で日本の国際協力も、国立国際医療センターの研究費の他は、民間団体の協力のみであり、皮膚科の出番がなかなか見つからない。しかし、開発途上国への臨床および研究の国際協力は推進すべきで、ハンセン病のみならず他の皮膚科領域においても推進していきたい。

Ⅸ. おわりに

ハンセン病が日本において終焉するときに、東南アジアを含めた世界においても同じ状況を作ることも皮膚科医の夢としたい。

文 献

1. 石井則久, 小坂眞紀, 永岡 謙: ハンセン病の診断・治療—最近のトピックス, MBデルマ 2007; 127: 59-654
2. 石井則久: ハンセン病の現況, 日皮会誌 2007; 117: 2226-2227
3. 石井則久, 朝比奈昭彦: ハンセン病の現状, MBデルマ 2006; 114: 39-45
4. 犀川一夫: 不治の時代の政策, ハンセン病政策の変遷 (犀川一夫編集), 沖縄県ハンセン病予防協会, 那覇, 1999, 188-203
5. 鈴木幸一, 石井則久: 抗酸菌検査, 皮膚臨床 2006; 48 (suppl 46): 1371-1375
6. 石井則久, 中永和枝, 松岡正典, 鈴木幸一: らい菌の遺伝子診断の現状, 日ハンセン病会誌 2006; 75: 261-264
7. 石井則久, 鈴木幸一, 竹崎伸一郎, 永岡 謙: 皮膚スミア検査のアンケート調査結果, 日ハンセン病会誌 2007; 76: 227-232
8. WHO: WHOのハンセン病ホームページ欄, (<http://www.who.int/lcp>)
9. 後藤正道, 野上玲子, 畑野研太郎, 他: ハンセン病治療指針 (第2版), 日ハンセン病会誌 2006; 75: 191-226
10. 熊野公子: らい反応について, 日ハンセン病会誌 2002; 71: 3-29

11. Sehgal VN, Sharma V, Sharma VK: The effect of anti-reactional drugs on complement components in the type II, erythema nodosum leprosum, reaction. *Br J Dermatol* 1988 ; 119 : 255-258
12. Maeda Y, Mukai T, Kai M, et al : Evaluation of major membrane protein-II as a tool for serodiagnosis of leprosy. *FEMS Microbiol Lett* 2007 ; 272 : 202-205
13. Mira MT, Alcasis A, Nguyen VT, et al : Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 2004 ; 427 : 636-640
14. 谷川和也, 鈴木幸一, 川島 晃, 他:らい菌感染マクロファージにおける細胞内寄生と排除に関わる分子機構. *日ハンセン病会誌* 2008 ; 77 : 57-61
15. Suzuki K, Nakata N, Bang PD, Ishii N, Makino M : High-level expression of pseudogenes in *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol Lett* 2006 ; 259 : 208-214

Recent Advances of Leprosy

Norihisa Ishii

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

Key words : *Leprosy Prevention Law, multidrug therapy:MDT, Mycobacterium leprae, prejudice and discrimination, WHO*

Hansen's disease, leprosy, is one of infectious diseases caused by *Mycobacterium leprae*. Infection occurs in young age when *M. leprae* is inhaled through the respiratory tract upon exposure to leprosy patients discharging a large number of bacilli.

Recently, there are about 10 new patients per year, and non-Japanese patients (imported cases) have been on the increase since roughly 1991, counting about 8~10 patients per year. It is, therefore, anticipated that there will be no leprosy patients among Japanese in near future. Non-Japanese patients, however, appear among a large number of employees.

The multidrug therapy (MDT) has been recommended by WHO. In Japan, MDT has been modified by adding other drugs or prolonging the medication period.

Leprosy patients used to develop deformities of appearances and extremities, and thereby suffered from prejudice and discrimination. Even nowadays, this line of hostility can still be seen.

Skin Research, 7 : 416 - 420, 2008

The frequency of drug resistance mutations in *Mycobacterium leprae* isolates in untreated and relapsed leprosy patients from Myanmar, Indonesia and the Philippines

MASANORI MATSUOKA*, TEKY BUDIAWAN**,
KHIN SAW AYE***, KYAW KYAW****, ESTERLINA
VIRTUDES TAN*****, EDUARDO DELA CRUZ*****,
ROBERT GELBER*****, PAUL SAUNDERSON*****,
VICTORIA BALAGON***** &
VIJAYKUMAR PANNIKAR*****

*Leprosy Research Centre, National Institute of Infectious Diseases,
Tokyo, Japan

**Leprosy-TB Programme, Provincial Health Service, Manado,
North Sulawesi, Indonesia

***Department of Medical Research, Yangon, Myanmar

****Central Special Skin Clinic, Yangon, Myanmar

*****Leonard Wood Memorial, Cebu, Philippines

*****WHO Global Leprosy Program, New Delhi, India

Accepted for publication 20 December 2007

Summary

Introduction The magnitude of drug resistance in *Mycobacterium leprae* to dapsone, rifampicin, and ofloxacin was studied in three Southeast Asian countries with a high prevalence of leprosy.

Methods *M. leprae* from the skin of leprosy patients was collected in North Maluku and North Sulawesi in Indonesia, Yangon in Myanmar, and Cebu in the Philippines. Mutations in the drug resistance determining regions in the *folP1*, *rpoB*, and *gyrA* genes, which have been proven to confer resistance, were analysed. In addition, samples from 51 newly diagnosed cases and 13 patients with leprosy relapse in Cebu were submitted for susceptibility testing in the mouse footpad.

Results Of 252 isolates obtained from new cases, 3% were dapsone resistant and 2% were rifampicin resistant. In samples taken from patients with relapsed leprosy ($n = 53$), significantly more resistance mutations were detected: 15% had dapsone resistance mutations, and 8% had rifampicin resistance mutations. Two patients

Correspondence to: Masanori Matsuoka, Leprosy Research Centre, National Institute of Infectious Diseases, 4-2-1, Aobacho, Higashimurayama-shi, Tokyo 189-0002, Japan (Tel: +81 42 3918211; Fax: +81 42 3949092; e-mail: matsuoka@nih.go.jp)

with relapsed leprosy had mutations for both dapsone and rifampicin resistance. No mutations conferring quinolone resistance were detected. No mutations were detected in the *folP1* gene of *M. leprae* isolates with a low degree of resistance to dapsone.

Discussion Detection of drug-resistant cases by mutation detection in the drug resistance determining region of the genome is a practical method for monitoring resistance. A comparison of the results obtained in this study with previous data obtained prior to the use of multidrug therapy (MDT), does not indicate clearly whether the magnitude of drug resistance has changed. Larger studies of resistance mutations in *M. leprae* isolated from patients with relapsed leprosy are needed to confirm our results.

Conclusion We recommend monitoring the magnitude of drug resistance globally, by testing *M. leprae* DNA from relapse cases and a representative sample of new cases.

Introduction

Multidrug therapy (MDT) was introduced for leprosy control to minimise the development of drug resistance in *Mycobacterium leprae*.¹ Implementation of MDT in leprosy control markedly decreased the global prevalence of the disease during the last two decades, as expected,² but isolates with resistance to one or more antibiotics have been detected in many areas.³⁻⁹ Comprehensive data on the magnitude of drug resistance is crucial to evaluate the efficacy of MDT and to maintain the effectiveness of the current leprosy control strategy; the mouse footpad method for drug susceptibility testing is not, however, applicable for large-scale surveillance of the global level of resistance, because it is cumbersome, time-consuming, and available in only a few laboratories in the world. Also, although knowledge of the drug susceptibility of the causative organism of individual patients initiating treatment may be beneficial, the footpad method is impractical for this purpose. Resistance to the anti-leprosy drugs, dapsone, rifampicin and ofloxacin, evolves by amino acid substitution at the binding sites of these drugs. The elucidation of mechanisms for resistance enables us to examine susceptibility to these drugs by a DNA-based assay of PCR-direct DNA sequencing.⁴⁻¹⁶

In the present study, the frequency of *M. leprae* mutations in the drug resistance determining region (DRDR) in the *folP1*, *rpoB*, and *gyrA* genes, which have been proven to confer resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin, respectively, were examined. With this methodology, a large number of isolates were tested to obtain useful data for exact analysis of drug resistance levels, and the frequency of drug resistance was determined by pertinent DNA sequencing of *M. leprae* isolates from new and relapse cases in three Southeast Asian countries, namely, Indonesia, Myanmar, and the Philippines.

Materials and Methods

M. leprae from the skin of leprosy patients was collected in North Maluku and North Sulawesi in Indonesia (2000-2005), Yangon in Myanmar (2003-2005), and Cebu in the Philippines (2001-2006). The samples were obtained from patients before starting MDT (new cases), from patients treated with MDT for up to 4 months (recent cases), and from patients with relapse (defined as patients who developed new skin lesions after the completion of MDT and whose BI had increased by more than 2 log units at any site¹⁷).

Bacterial specimens were obtained from the skin lesions of patients by the standard slit skin smear method commonly utilised for assessment of the bacterial index (BI), using a disposable scalpel blade.¹⁸ The material remaining on the blade after doing the smear was used for the study, the blade being soaked in 1 ml of 70% ethanol and kept in a separate vial at room temperature until analysis.

Additionally, *M. leprae* from skin biopsies from 64 patients, including 51 newly diagnosed and 13 relapse cases in Cebu, was submitted for susceptibility testing in the mouse footpad.¹⁹ Groups of mice were infected in both hind footpads with 5000 *M. leprae* and fed continuously a diet containing either no drug, dapsone 0.01%, dapsone 0.001%, dapsone 0.0001%, or clofazimine 0.001%, while other mice received rifampicin 10–20 mg/kg/5 times weekly by gastric gavage. Six months after footpad inoculation *M. leprae* was enumerated from those footpads. Drug resistance was deemed to be present when the number of *M. leprae* exceeded 100,000 viable bacilli in drug treated mice. Sequences in the DRDR of each gene were analysed, in DNA recovered from bacilli which grew in the footpads of mice treated with dapsone.

For the analysis of drug resistance by mutation detection, the blades were sent to Japan in separate, labeled tubes and the bacilli-containing tissues were removed from the tip of the blade using a sterile toothpick. One toothpick was used for each blade to avoid cross-contamination. DNA templates were prepared using a previously described method.²⁰ Mutations in the *folP1*, *rpoB*, and *gyrA* genes were analysed by PCR-direct DNA sequencing. DNA fragments containing codons known to be associated with resistance for dapsone, rifampicin, and ofloxacin were amplified by nested PCR. Nested PCR was carried out using a G mixture of the FailSafe PCR System (EPICENTRE, Madison, WI, USA) in a 25 µl volume.

Primers were designed according to the sequence of *folP1* (accession No. AL583917, Gene ML0224), *rpoB* (accession No. AL583923, Gene ML1891), and *gyrA* (accession No. AL583917, Gene ML0006) of *M. leprae*. The sequences of the primers are listed in Table 1.

DNA fragments corresponding to the whole *folP1* gene of isolates found to be dapsone resistant to a low degree, were sequenced as described by Kai *et al.*¹⁵ The PCR programme consisted of one hold cycle of 2 min at 94 °C linked to a three-step cycle of 30 s at 94 °C, and 30 s at 56 °C, and 30 s at 72 °C for 30 cycles followed by a final hold cycle of 5 min at 72 °C. PCR fragments were purified and sequenced according to the same protocol as previously described.²⁰

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers for *M. leprae*

		Primer	Sequence (5'-3')
<i>folP1</i> gene	Outer primers	folP1-F1	CTTGATCCTGACGATGCTGT
		folP1-R1	CCACCAGACACATCGTTGAC
	Inner primers	folP1-F2	GATCCTGACGATGCTGTCCAG
		folP1-R2	ACATCGTTGACGATCCGTG
<i>rpoB</i> gene	Outer primers	rpoB-F1	ACGCTGATCAATTATCCGTCC
		rpoB-R1	GTATTCGATCTCGTCGCTGA
	Inner primers	rpoB-F2	CTGATCAATATCCGTCCGGT
		rpoB-R2	CGACAATGAACCGATCAGAC
<i>gyrA</i> gene	Outer primers	gyrA-F1	ATGACTGATATCACCGTGCCA
		gyrA-R1	ATAACGCATCGCTGCCGGTGG
	Inner primers	gyrA-F2	GATGGTCTCAAACCGGTACATC
		gyrA-R2	ACCCGGCGAATTGAAATTG

Isolates with mutations at codons 53 and 55 in the *folP1* gene, at codons 407, 410, 420, 425, 427, in the *rpoB* gene, and at codon 91 in the *gyrA* gene were defined as resistant to dapsone, rifampicin, and ofloxacin, respectively. These mutations have been confirmed to confer resistance to the drug, dapsone,^{5,6,8,9,15,16} rifampicin,^{4-8,10,13} or quinolone^{4-6,8} by the mouse footpad susceptibility test and by mutation detection in the DRDR for each drug. Frequencies of resistance were compared by the Fisher's exact test.

The study was approved by the institutional ethics committee of the National Institute of Infectious Diseases, Japan, and the three local institutional review boards. Informed consent was obtained prior to the collection of bacterial samples.

Results

Biopsies and slit skin smears were analysed from 121 new or recent cases and 10 relapse cases from Indonesia, 54 new or recent cases and 24 relapse cases from Myanmar, and 77 new or recent cases and 19 relapse cases from Cebu. All newly detected cases were treated with WHO MDT.²¹ Almost all patients in Indonesia who relapsed were retreated with same WHO regimen. The MB patients who relapsed in Cebu, were retreated with monthly doses of rifampicin 600 mg, ofloxacin 400 mg and minocycline 100 mg for a total of 12 doses. In Myanmar, when susceptibility test results were known after relapse, patients with susceptible bacilli were treated with same WHO regimen. If dapsone resistance was found, patients were treated with clofazimine 300 mg monthly, clofazimine 50 mg daily, and rifampicin 600 mg monthly for one year. In general, these patients have responded well to the alternative treatment, although final follow-up details are not yet available.

The frequency of drug resistance to the three antibiotics studied varied between countries, and between new and relapse cases (Table 2).

In Indonesia, dapsone resistance mutations was found in 1/121 (1%) new and recent cases and 1/10 (10%) relapse cases; in Myanmar, in 4/54 (7%) new and recent cases and 2/24 (8%) relapse cases; and in the Philippines in 2/77 (3%) new cases and 5/19 (26%) relapse cases. In Indonesia, 4/121 (3%) of *M. leprae* isolates from new and recent cases were found to have rifampicin resistant mutations, while 2/10 (20%) relapse cases were found to have rifampicin resistant mutations. In Myanmar, 1/54 (2%) *M. leprae* isolates from new and recent cases were found to have rifampicin resistance mutations, while isolates from 2/24 (8%) relapse cases had rifampicin resistance mutations. In the Philippines, 0/77 (0%) *M. leprae* from new and recent cases had rifampicin resistance mutations and 0/19 (0%) relapse cases had

Table 2. Prevalence of drug resistance in *M. leprae* isolates from Asian countries

	New or recent case			Relapse case		
	Dapsone	Rifampicin	Ofloxacin	Dapsone	Rifampicin	Ofloxacin
Indonesia (North Maluku and North Sulawesi)						
1/121 (0.8%)	4/121 (3.3%)	ND	1/10 (10%)	2/10 (20%)	ND	
Myanmar (Yangon)						
4/54 (7.2%)	1/54 (1.8%)	0/54	2/24 (8.3%)	2/24 (8.3%)	0/24	
Philippines (Cebu)						
2/77 (2.6%)	0/77	0/77	5/19 (26%)	0/19	0/19	

rifampicin resistance mutations. The frequency of resistance mutations for both dapsone and rifampicin was consistently higher in patients with leprosy relapse than in new cases, in each of the areas studied. In fact, the frequency of both dapsone and rifampicin resistance mutations was significantly higher in the full cohort of relapse cases than in new and recent cases, $P < 0.001$ and $P < 0.05$ respectively. Ofloxacin resistance was not evaluated in patients in Indonesia, and was found in no new cases (131) or patients with relapse (43) in Myanmar or the Philippines.

Dapsone resistance mutations in isolates in new or recent cases were detected in all three areas. Four isolates with rifampicin resistance mutations were detected in Indonesia and one in Myanmar, among new or recent cases. An isolate with dapsone resistance mutations was found in an Indonesian patient treated for 2 months. Of four patients with dapsone resistance mutations in Myanmar, three were collected before the start of MDT, and one was from a patient treated for 2 months. Two isolates with dapsone resistance mutations were obtained from patients in Cebu before starting MDT. Of four new or recent cases in Indonesia with rifampicin resistance mutations, one sample was obtained before the start of MDT, two were from patients treated for 2 months, and one was from a patient treated for 4 months with MDT. One isolate from a newly diagnosed case in Myanmar had rifampicin resistance mutations. One isolate in Myanmar and another in Indonesia, both from patients with relapse, had both dapsone and rifampicin resistance mutations. No Multidrug resistance was detected other than these two cases, in all three areas.

The mutations detected were as follows. Mutations in the *folP1* gene included one case of ACC to GTC (Thr → Val) and one case ACC to AGA (Thr → Arg) at codon 53; seven cases of CCC to CTC (Pro → Leu), two cases to TCC (Pro → Ser), two cases to CGC (Pro → Arg), and two cases to CGT (Pro → Arg) at codon 55. Mutations in the *rpoB* gene included one case of GAT to TAT (Asp → Tyr) at codon 410, one case of CAC to GAC (His → Asp) at codon 420; six cases of TCG to TTG (Ser → Leu) and one case of TCG to ATG (Ser → Met) at codon 425. The high frequency of the mutation TCG to TTG at codon 425 is the same result as previously observed in other areas.^{10,12} No mutation was demonstrated in the *gyrA* gene of isolates from any area.

Of 64 isolates tested by the mouse footpad method, one isolate had dapsone resistance mutations to a high degree (HD), two had dapsone resistance mutations to an intermediate degree (ID), and 5 had dapsone resistance mutations to a low degree (LD) (Table 3).

Table 3. The results of susceptibility testing for dapsone by the mouse footpad method and sequencing of the *folP1* gene in *M. leprae*

Isolate	Mutation		Degree of resistance	Mouse footpad method results			
	DHPS substitution	<i>folP1</i> mutation		0.0001%	0.001%	0.01%	Controls
01Mat02	Thr53Val	ACC53GTC	High	5/5	5/5	5/5	5/5
NCR	Thr53Arg	ACC53AGA	Intermediate	5/5	6/6	0/6	7/7
02Mat47	Pro55Leu	CCC55CTC	Intermediate	5/6	4/4	0/5	6/6
01Mat01	None	None	Low	5/5	0/3	0/6	3/6
01Mat03	None	None	Low	5/8	0/7	0/7	8/8
02Mat25	None	None	Low	4/5	0/5	0/5	5/5
EER	None	None	Low	5/7	0/5	0/8	11/11
MMR	None	None	Low	3/5	0/6	0/6	6/6

The mutation ACC to GTC at codon 53 in the *folP1* gene was detected in the HD isolate, while mutations ACC to AGA at codon 53, and CCC to CTC at codon 55 were detected in the ID isolates. No mutation was demonstrated at either codon in the *folP1* gene of the five isolates with LD in Cebu.

Discussion

The proportion of isolates with dapsone resistance mutations among new and recent cases was 0.8%, 7.2% and 2.6% in Indonesia, Myanmar and the Philippines, respectively. These frequencies of primary dapsone resistance, though of some concern in Myanmar, are generally low, as previously found in San Francisco²² and the Philippines,²³ and are far lower than the almost 1/3 of cases found in Louisiana,²⁴ Ethiopia²⁵ and later in the Philippines,²⁶ the latter groups being almost entirely LD resistance without known mutation of the *folP1* gene. While the number of patients with leprosy relapse assessed for dapsone resistance in this study was small, fully 8/53 (15%) were found to harbour dapsone-resistant genes. Though this frequency is high, except for the two relapse cases with both dapsone and rifampicin resistance, the reinstitution of WHO MDT, containing the only bactericidal agent in that regimen, rifampicin, as well as clofazimine, currently recommended by the WHO for leprosy relapse following MDT,²¹ would likely prove effective. It is unclear whether or not the frequency of dapsone resistance has declined since the wide implementation of MDT, since prior to that time the majority of patients with isolates with dapsone resistance mutations harboured LD strains in many areas²⁴⁻²⁶ for which there is no identifiable mutation in the *folP1* gene.

Dapsone resistance in *M. leprae* is known to be the result of specific mutations in codons 53 and 55 within the *folP1* gene coding dihydropteroate synthase (DHPS).^{5,6,8,9,15,16} Cambau *et al.* showed that of 10 HD or ID isolates with dapsone resistance mutations, 9 isolates harboured mutations at codon 53 or 55, while one ID isolate showed no mutation in the *folP1* gene.⁹ Of 6 LD dapsone resistant isolates, five isolates showed no mutation and one showed a mutation at codon 53.⁹ No mutation was detected in 22 susceptible isolates.⁹ In other studies, all 15 HD isolates with dapsone resistance mutations showed mutations at codon 53 or 55, while 7 susceptible strains showed no mutation in the *folP1* gene.^{5,6,8,15,16} Five LD isolates from the Philippines in our study harboured no mutation in the *folP1* gene. These were all resistant in the mouse foot pad to 0.0001% dapsone in the diet, but not to higher levels. Therefore, almost all isolates identified as dapsone resistance by mutation detection are resistant to dapsone to a high or intermediate degree. However almost no low degree isolates with dapsone resistance mutations could be detected as resistant by mutation detection. Though Shepard²⁷ found that *M. leprae* obtained from untreated leprosy patients in an earlier era were consistently inhibited by 0.0001% dapsone in diet, Rees²⁸ found a few were not inhibited at that level. The finding that isolates in the mouse with resistance to dapsone at a concentration of 0.0001% is not associated with a mutation in the *folP1* gene suggests perhaps that resistance to that level of dapsone is found at the far extreme of the dapsone-sensitive *M. leprae* distribution. This concept is important as the vast majority of previously identified dapsone resistance, both primary and secondary, was found resistant only to this level and not higher ones. In any event, it is considered that such cases have no clinical significance, since administration of 0.0001 g DDS per 100 g mouse diet is of the same order as that observed in humans receiving 1 mg DDS daily²⁹ and the usual dosage of DDS in MDT is 100 mg daily.

As all isolates with HD or ID isolates with dapsone resistance mutations exhibited mutations at codon 53 or 55, the PCR direct sequencing method will detect all clinically significant dapsone resistant cases and the method is feasible for detecting isolates with dapsone resistance mutations.

Although two patients with dapsone resistance mutations among new or recent cases were treated for 2 months with MDT, they can be classified as primary dapsone resistant cases, since the multiplication of the bacilli is very slow. Resistant strains could not replace susceptible strains in the patient within such a short time.

A striking finding of the study is the detection of isolates with rifampicin resistance mutations amongst patients newly or recently detected and a greater frequency amongst relapse cases. Though in the areas studied the rate of primary rifampicin resistance, 2%, is reasonably low, the rate in patients with leprosy relapse, 8%, is of concern, as well as the two relapse cases who were resistant to both dapsone and rifampicin. In these two instances, retreatment with WHO MDT²¹ would need to be prolonged for the improvement of condition since MDT for these cases is monotherapy with clofazimine. Though the number of cases with leprosy relapse in this study is small and as previously mentioned, rifampicin is the key and sole bactericidal component of MDT, perhaps reconsideration of an alternative treatment for those who relapse after MDT is in order; this might reasonably include minocycline³⁰ and moxifloxacin.³¹ Larger studies of rifampicin resistance mutations in relapse cases are needed to ascertain if our current results are generally representative.

Rifampicin resistance is conferred by mutations in the beta subunit of RNA polymerase coded by the *rpoB* gene. Mutations at codon 407, 410, 420, 425 and insertions between 408 and 409 have been confirmed as associated with rifampicin resistance.^{4-8,10,11,13,14} Mutations at codons 401,⁷ 416,³² and 427^{5,7} have also been found but it has not been revealed clearly whether these mutations confer rifampicin resistance in *M. leprae*. Although mutations at 401 were detected in the *rpoB* gene of rifampicin resistance isolates,⁷ it is not proven whether this mutation is associated with rifampicin resistance or not, since the mutation occurred simultaneously with a mutation at codon 420 which is known to be associated with rifampicin resistance. Mutations at 416 were also detected but no confirmatory data from the mouse foot pad susceptibility tests were available,³² although it is known that this mutation confers rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.³¹ A mutation at codon 427 was detected in one clinical isolate⁵ and one rifampicin resistant isolate.⁷ The former case was not confirmed by the mouse footpad method and the latter one was detected concordantly with a mutation at 425, although the mutation at this position is known to be associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.³³ Clarification of the association between these mutations and rifampicin resistance by the mouse footpad method is highly recommended. In studies so far reported on the association of rifampicin resistance with mutations in the *rpoB* gene, only one rifampicin resistant isolate showed no mutation.⁵ Taking these results into consideration, detecting rifampicin resistant cases by mutation detection in the *rpoB* gene is a practical method for monitoring resistance to rifampicin.

The prevalence of rifampicin resistance mutations in cases with leprosy relapse was higher than the incidence in new cases, so this also must be monitored carefully. A previous study showed that among a total of 404 multibacillary patients who had been treated with various rifampicin containing regimens, 22 (5.4%) were resistant to rifampicin.³⁴ Although a small sample size, the prevalence of rifampicin resistance mutations in Indonesia and Myanmar is higher than that found previously, before MDT was implemented. Two possible

reasons for a high prevalence of drug resistance are poor compliance, both with self-administration of drugs and premature discontinuation of therapy,³⁵ and prior monotherapy with rifampicin, either for leprosy or as part of the standard chemotherapy for tuberculosis which would also expose leprosy patients to rifampicin monotherapy.

Of the two patients with leprosy relapse with doubly resistant mutations (dapsone and rifampicin), the one from Myanmar had previously received monotherapy with dapsone (1973–1977), followed by monotherapy with rifampicin (1982–1986).³⁶ Of the five patients with isolates with dapsone resistance mutations in the Philippines, three had received prior dapsone, one as monotherapy, and two others either as the sole agent or in one instance combined with clofazimine and in another combined with clofazimine and rifampicin. Though the other relapse patients in the Philippines, as well as those from Indonesia and Myanmar, were treated with WHO MDT, it is unclear whether patients had adhered to the regimen and completed therapy.

Five isolates with ofloxacin resistance mutations have been reported,^{4–8} all isolates having the mutation GCA to GTA (Ala → Val) at codon 91 (numbering system as used for *M. leprae*) in *gyrA* gene. A strain with the mutation GGC to TGC (Gly → Cys) at codon 89 was reported previously,⁵ but resistance to ofloxacin was not confirmed by the mouse footpad method. Two other amino acid changes, Ser at 91, and Asp at 94 (numbering system as used for *M. tuberculosis*), in the *gyrA* gene of *M. tuberculosis* are associated with quinolone resistance.³⁷ It seems mutations at the codons 89, 92, and 95 in the *gyrA* gene of *M. leprae* also cause quinolone resistance. No mutation at these codons, 89, 91, 92, and 95, was detected in the samples tested. Thus the level of quinolone resistance in the areas investigated is still very low.

The study indicated the existence of primary and secondary resistance to dapsone and rifampicin in countries where many leprosy cases are still detected. A comparison of the results obtained in this study with previous data obtained prior to the use of MDT, does not indicate clearly whether the magnitude of drug resistance has changed.^{23,26,33} We consider this study as a first effort to assess the magnitude of drug resistance in the MDT era. In order to preserve the efficacy of MDT and prevent the spread of drug resistant bacilli, carefully designed global studies are recommended, as suggested previously.³⁸ Monitoring the susceptibility of isolates from each case of leprosy relapse allows optimal treatment to be chosen, by avoiding ineffective drugs and choosing effective compounds. The longitudinal surveillance of levels of drug resistance in new cases in some areas with a high prevalence of leprosy might contribute to predicting the spread of drug resistant strains. The application of the susceptibility test by mutation detection should be attempted, especially in cases where treatment failure seems a possibility.

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; partly by a grant from International Medical Center, Ministry of Health, Labour and Welfare; and a grant from the U.S.–Japan Cooperative Medical Science Programmes.

The authors would like to thank to Dr. Masanori Kai for his excellent suggestions and help.