

- on mice. *Int J Lepr.* 48:1-6, 1980.
- 22) Grange JM. Environmental mycobacteria and human disease. *Lepr. Rev.* 62:353-361, 1991.
 - 23) Maniar AC and Vanbuckethout LR. *Mycobacterium kansasii* from an environmental source. *Can. J Public Health* 67:59-60, 1976.
 - 24) Ross BC, Johnson PDR, Oppedisano F, Marino L, Sievers A, Stinear T, Hayman JA, Veitch MGK and Robins-Brown RM. Detection of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease. *J Appl. Environ. Microbiol.* 63:4153-4138, 1997.
 - 25) Matsuoka M, Izumi S, Budiawan T, Nakata N, Saeki K. *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. *Ind. J Lepr.* 71:61-67, 1999.
 - 26) Fine PEM. Leprosy: the epidemiology of a slow bacterium. *Epidemiol. Rev.* 4:161-188, 1982.
 - 27) Clark-Curtis JE and Walsh GP. Conservation of genomic sequences among isolates of *Mycobacterium leprae*. *J Bacteriol.* 171:4844-4851, 1989.
 - 28) Williams DL, Gillis TP and Portales F. Geographically distinct isolates of *Mycobacterium leprae* exhibit no genotypic diversity by restriction fragment length polymorphism analysis. *Mol. Microbiol.* 4:1653-1659, 1990.
 - 29) Shin YC, Lee H, Walsh GP, Kim JD and Cho SN. Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. *J Clin. Microbiol.* 38:4543-4538, 2000.
 - 30) Matsuoka M, Maeda S, Kai M, Nakata N, Chae GT, Gillis TP, Kobayashi K, Izumi S and Kashiwabara Y. *Mycobacterium leprae* typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. *Int. J Lepr.* 68:121-128, 2000.
 - 31) Matsuoka M, Zhang L, Budiawan T, Saeki K and Izumi S. Analysis of leprosy transmission based on the genotyping of *Mycobacterium leprae* by TTC repeats polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* in press.
 - 32) Noordeen SK, Infectivity of leprosy. In: Chatterjee BR (ed) A window on leprosy. Chandi Memorial leprosy foundation New Delhi, pp59-63, 1978.
 - 33) Fine PEM, Sterne JAC, Ponnighous JM, Bliss L, Saul L, Chihana A, Munthali M and Warndorf DK. Household and dwelling contact as a risk factors for leprosy in Northern Malawi. *Am. J Epidemiol.* 146:91-1028, 1997.
 - 34) Schroder NW, Hermann C, Hamann L, Gobel UB, Hartung T and Schumann RR. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll-like -receptor gene detected by a novel allele-specific PCR. *J Mol. Med.* 81:368-372, 2003.
 - 35) Miura T, Fukagawa T, Igarashi T, Yamashita M, Ido E, Funahashi S, Ishida T, Washio K, Ueda S, Hashimoto K, Yoshida M, Osame M, Singhal BS, Zaninovic V, Cartier L, Sonoda S, Tajima K, Ina Y, Gojyobori T and Hayami M. Phylogenetic subtype of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:1124-1127, 1994.
 - 36) Falsh D, Wirth T, Linz B, Prichard JK, Stephens M, Kidd M, Blaster MJ, graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Megraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang X, Achtman M and Suerbaum S. Traces of human migrations in populations. *Science* 299:1528-1529, 2003.
 - 37) 埴原和郎 日本人の骨とルーツ。角川書店, 1997.
 - 38) Sonoda S, Li HC, Crayier L, Nunez L and Tajima K. Ancient HTLV type 1 provirus DNA of Andean mummy. *AIDS Res. Human Retroviruses* 16:1753-1756, 2000.
 - 39) Greenberg JH, Turner II CG and Zegura SL. The settlement of the Americas: A comparison of the linguistic, dental and genetic evidence. *Curr. Anthropol.* 27: 477-497, 1986.

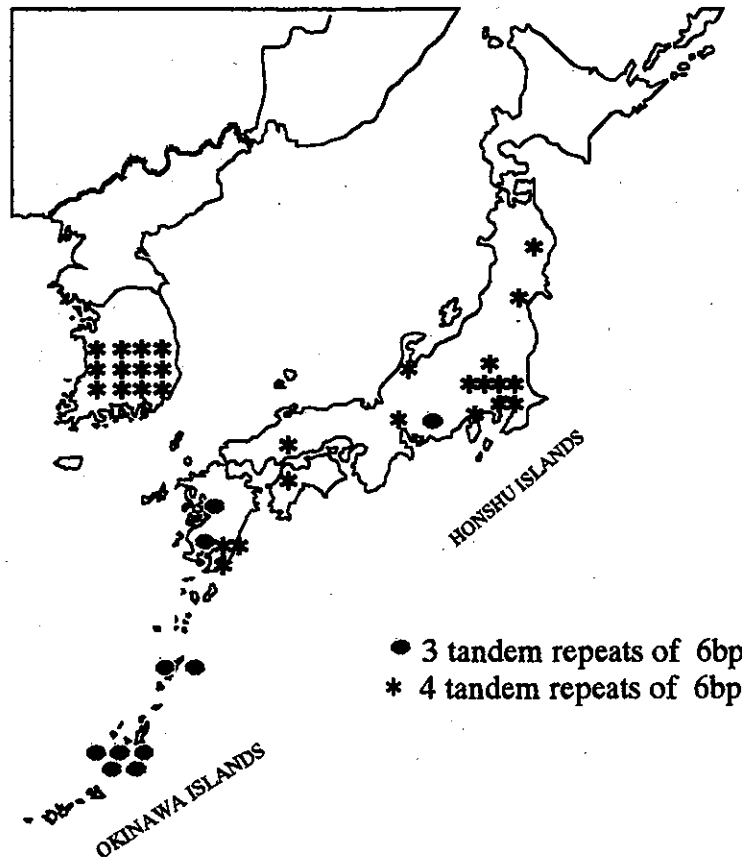


図1. 日本と韓国における異なる *rpoT* 遺伝子型の分布

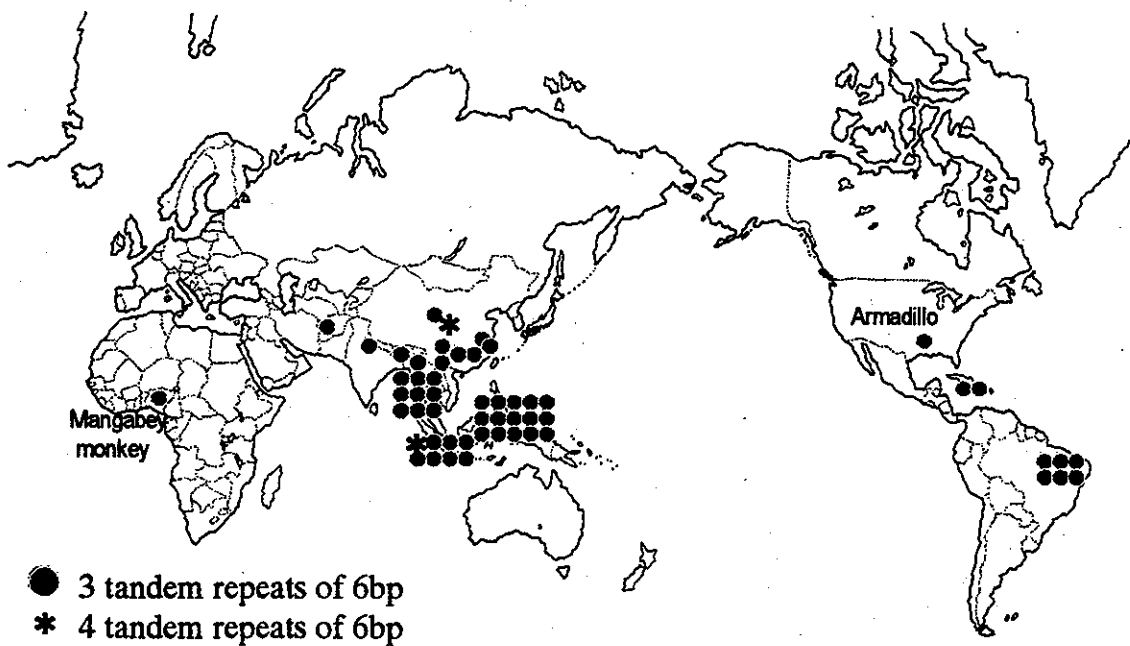


図2. 世界における異なる *rpoT* 遺伝子型の分布

Molecular epidemiology of the leprosy

Masanori Matsuoka and Liangfen Zhang*

[Received: 26 Aug. 2003]

Key words : Leprosy, *Mycobacterium leprae*, Genotyping, Transmission

Application of molecular biological techniques to the epidemiological study of leprosy is described. Studies of detecting *Mycobacterium leprae* DNA in samples of the nasal mucus are discussed in terms of the epidemiology and the significance of high prevalence. Epidemiological studies on the transmission of leprosy and correlation between geographic distribution of different *M. leprae rpoT* genotypes and prehistoric spread of the leprosy by genotyping based on the genomic polymorphism are introduced.

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

ハンセン病の新患が来たら

尾崎 元昭

ハンセン病の疑いがある患者が受診したとき、どう診断を進め、治療していくかを、診察の流れに沿って説明した。これらは、ハンセン病の再発例や回復者(治療した患者)が一般病院の皮膚科へ受診したときにも役立つと考える。

1. 皮疹の印象

ハンセン病の皮疹は多彩で、これがあればハンセン病を疑うといった単一の皮疹はない。痒みのない紅斑・低色素斑・丘疹・環状疹、肉芽腫様の小結節・結節は、一般皮膚疾患の皮疹とどこか違うという印象を与える。有痛性の紅斑は結節性紅斑と違って全身に多発し、発熱・関節痛・眼の充血を伴い、薬疹や血管炎、結節性紅斑にしては? となる。糖尿病でもないのに熱傷や潰瘍に痛みがない、虫が這うような違和感やしびれ感、皮疹部の脱毛など、一般の皮膚疾患にはない症状がみられることがある。

皮疹部に知覚障害があるとハンセン病の疑いが強くなるが、ハンセン病の皮疹は必ずしも知覚の異常を伴わない(とくに多菌型)ことに留意しておく必要がある。

2. 問診のポイント

病歴、出身地、生活歴、家族歴、既往歴、治療歴に注意する。病歴では、主訴の症状が出る以前の初期症状を探るのが重要である。患者がハンセン病の症状と思わず、言わないこともあるので、初期に生じやすい皮疹や末梢神経障害について尋ねるようにする。

日本人の新患は沖縄出身者が多い傾向があるが、散発的にいろんな地域から出ている。外国人では、中南米の日系人や東南アジア出身者が新患の多数を占めている。日本人でもこれらの地域での生活歴がある新患が出ている。家族や周囲にハンセン病の人がいなかったか、これまでハンセン病の診断や治療を受けていな

いか(とくに再発や後遺症の可能性のある人、外国人)なども確かめておく。

3. 知覚の障害

末梢神経の傷害による支配領域の知覚障害と、皮膚部の知覚障害がある。触覚・温冷覚・痛覚の表在性知覚が侵され、分離麻痺もみられる。触覚を定量的に測定できるモノフィラメント、ボールペン式に0・10・50・60度を選んで調べることができる温覚計が便利である。多菌型(LL・BL)の皮疹は知覚障害がないことが多いので、皮疹に知覚があるからといってハンセン病を否定できる訳ではない。

皮疹に関わりない知覚障害があると、ハンセン病の疑いが強くなる。四肢末梢部では、皮疹の出現に先立って知覚の障害が現れることも多い。発汗低下による皮膚の乾燥、神経痛、錯知覚(知覚過敏、異常知覚など)を伴う場合がある。

4. 菌検査

皮膚の菌検査は皮疹部のほかに、菌検出の可能性が高い部位(眉間あたり、耳朶、手首伸側尺側など)でも行う。15号メス刃で長さ2ミリほど、真皮の深めまで皮膚を切開し、刃を創線と直角に立てて組織液を掻き取る。これをスライドグラスに塗りつけ、チール・ニールセン染色で染めて菌数を数えて菌指数(BI)を出す。組織液採取時に血液を混入しないこと、染色では脱色を軽くすることがコツである。組織液を取ったメス刃を70%エタノール液1ml容器に入れておくと、薬剤耐性の検査に使用できる。

菌陽性なら多菌型(MB)、陰性なら少菌型(PB)になる。初めから菌陰性の型があるので、この方法で菌を検出できなくてもハンセン病を否定することはできない。

5. 組織検査

生検による組織検査ができれば、皮膚科医にとってハンセン病の診断は難しくない。できればパンチではなくメスを使って、辺縁から中心にかけて紡錘状に生検するのが望ましい。生検組織の菌検査は、チール・ニールセン染色では菌が染まりにくいのでファイト染

色法を用いる方がよい。組織所見は、肉芽腫の性状、リンパ球の浸潤、末梢神経枝・付属器や表皮直下層の変化などを調べる。

6. 臨床検査

ハンセン病の診断を確定できる血清診断法はない。らい菌特異抗原 PGL-I への抗体価は補助診断および病気の動きの指標として用いられている。反応性炎症では CRP が変動し、多菌型ではときに梅毒血清反応の偽陽性、免疫グロブリン上昇、自己抗体がみられる。

7. 病型を決めて治療法を選択

臨床症状と菌検査、組織所見から病型を決定し、治療薬と治療期間を設定する。病型は Ridley-Jopling 分類 (LL, BL, BB, BT, TT, I) と WHO の MDT のための分類 (MB, PB, SLPB) を併用する。日本のハンセン病診療ガイドラインでは、MDT に準拠しながら治療期間をより弾力的にして、臨床症状の消失、菌検査陰性化などの臨床的治癒達成まで化学療法を行うことになっている。MDT/WHO では、MB で 12 カ月、PB で 6 カ月、SLPB では 1 日、規定の治療を行

文

- 1) ハンセン病治療指針：日本ハンセン病学会誌、**69**：157-177, 2000.
- 2) ハンセン病治療判定基準：日本ハンセン病学会誌、**71**：235-238, 2002.
- 3) ニューキノロン使用指針：日本ハンセン病学会誌、**73**：65-67, 2004.

う。

反応性病変の際には末梢神経障害、眼の炎症のコントロールを優先する。ステロイド剤、サリドマイド、NSAID、クロファジンなどが使用される。

8. 治癒判定

MDT/WHO では一定の治療を終えたら、臨床症状があっても治癒と判定して患者登録から外すことになっている。日本では臨床症状の消失、菌検査陰性化で治癒とする。しかし患者には、顔や四肢の変形や末梢神経障害、視力障害が元のように回復してから治癒と言ってほしいとの心理があることを理解しなければならない。

9. 後遺症・合併症

さまざまな後遺症・合併症が起こるので、治療中も注意を怠らず、障害予防・障害悪化予防に努める。治癒判定後もケアが必要なことが多い。末梢神経障害による外傷、熱傷、慢性潰瘍はさらに障害度を高め、QOL を低下させるので、日常生活の指導も必要になる。

献

- 4) 医療従事者向けのハンセン病診療手引き：厚生労働科学特別研究事業、ハンセン病患者及び元患者に対する一般医療機関での医療情報提供体制に関する研究報告書, 2004.
(入手はハンセン病研究センター石井則久医師：TEL042-391-8211へ)

ニューキノロン使用指針

儀同政一¹⁾ *、並里まさ子²⁾、熊野公子³⁾、後藤正道⁴⁾、
野上玲子⁵⁾、尾崎元昭⁶⁾

厚生労働省「新興・再興感染症研究事業」ハンセン病感染の実態把握及びその予防（後遺症の予防を含む）診断・治療法に関する研究、ニューキノロンの使用基準に関する小委員会

- 1) 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
- 2) 国立療養所栗生楽泉園
- 3) 兵庫県立成人病センター
- 4) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科先進治療科学専攻腫瘍学講座人体がん病理学
- 5) 国立療養所菊池恵楓園皮膚科
- 6) 国立療養所長島愛生園皮膚科

〔受付：2003年12月16日〕

キーワード：ハンセン病、ニューキノロン、オフロキサシン（OFLX）、使用指針、
多剤併用療法（MDT）

日本ハンセン病学会は、2000年に「ハンセン病治療指針」¹⁾ 発表し、化学療法をはじめ診断と治療、後遺症の予防と治療についてのガイドラインを、2002年には、治療指針に基づいて治療を受けた患者の「ハンセン病治療判定基準」²⁾ を示した。ハンセン病の治療は、治療指針またはWHO/MDT（1997）³⁾ に基づいて治療されるが、すでにMDT 3薬中2薬に対しては多くの耐性報告がある。その対応策としてニューキノロン系薬であるオフロキサシン（OFLX・商品名タリビット）が多用された結果、OFLX耐性も増加してきている。厚生労働省「新興・再興感染症研究事業ハンセン病感染の実態把握及びその予防（後遺症の予防を含む）・診断・治療法に関する研究」の一環として、ニューキノロンの使用基準に関する小委員会はOFLXの耐性症例を調査しOFLX耐性の発生を防止する方法を検討した。その結果を踏まえて、小委員会はここにニューキノロンの使用指針を提示する。

1. OFLXの承認条件⁴⁾（2000年9月改定・ 第3版インタビューフォームより）

OFLXは、らい菌に対しDNA gyraseを抑制し

DNA複製阻害により殺菌作用を示す。しかし*in vitro*法及びヌードマウス足蹠法では抗らい菌活性が弱いことから、厚生労働省はOFLXの保険診療の適用にあたって、効能または効果に以下の承認条件を付けた。

- 1) 用法・用量：一日400～600mg（4～6錠）を2、3回に分割して経口投与する。ハンセン病については、原則として他の抗ハンセン病剤と併用すること。

*Corresponding author :
国立感染症研究所ハンセン病研究センター
〒189-0002 東村山市青葉町4-2-1
Tel:042-391-8211 Fax:042-394-9092
E-mail:m-gidoh@nih.go.jp

2) 重要な基本的注意：承認条件；ハンセン病の治療にあたっては、本剤による治療についての科学的データの蓄積が少ないことを含め、患者に十分な説明を行い、インフォームド・コンセントを得ること。

2. OFLX耐性化の原因

OFLX耐性確認症例の調査から、耐性化の主な原因として、低用量投与と不規則服用が考えられた。低用量投与とは、たとえば100～300mg/日/毎日、200mg/日/週2回投与などの方法である。OFLXの使用には、耐性発生防止のために次項のような点に注意をする必要がある。

3. OFLXまたはLVFXの治療効果の検討および使用基準

ハンセン病の抗菌化学療法では、他の感染症と比べ治療期間が長くなる。従って患者の理解と協力が得られるように、薬剤投与量を守ることと長期の治療期間の必要性、及び副作用についてよく説明する必要がある。

- ① ハンセン病の治療は「ハンセン病治療指針」に基づいて行うが、OFLXの使用が必要と判断した場合は、OFLXの単剤投与は行わず他剤との併用療法を原則とする。
- ② 使用量については低用量投与にならないよう注意する。OFLXは最少量400mg/日の毎日投与を行うか、OFLXの一方の光学活性体であるレボフロキサシン (LVFX・商品名クラビット) を200～300mg/日の毎日投与を行う。
- ③ 治療開始6ヶ月目に第一回の治療効果を判定する。治療開始後6ヶ月で臨床症状の改善や菌指数の低下傾向が見られないと判断した場合は、キノロン耐性を疑いキノロン耐性遺伝子検出の検査を依頼する。以降3～6ヶ月毎に再検討を加え、使用が2年を超えないことが望ましい。菌指数は1年で1低下するのを基準として効果を判定する。

OFLX耐性が認められた場合は、DDS・RFP・B663を基本にミノサイクリン (MINO・

商品名ミノマイシン) またはクラリスロマイシン (CAM・商品名クラリス) など作用機序の相違する薬剤に変更が望ましい。OFLX耐性が確認できなかった場合は、抗らい菌活性の強いスパルフロキサシン⁵⁾ (SPFX・商品名スパラ・200mg/日/毎日) またはガチフロキサシン⁶⁾ (GFLX・商品名ガチフロ、400mg/日/毎日) に変更が望ましい (この2薬剤については「使用上の注意」を参照すること)。

- ④ ニューキノロン系薬であっても抗らい菌活性が弱いか、ほとんど活性がない薬剤もあるので注意を要する。現在まで抗らい菌活性が確認されているニューキノロン系薬はOFLX、LVFX、SPFX、GFLXである。また抗らい菌活性を持つ薬剤は限られているので新たな薬剤の導入にあたっては慎重を期し、適正使用に留意すること。

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、日本ハンセン病学会雑誌、69 (157-177)2000.
- 2) 並里まさ子・後藤正道・儀同政一・細川篤・杉田泰之・石井則久・長尾榮治・尾崎元昭：ハンセン病治療判定基準、71(235-238) 2002.
- 3) WHO expert committee on leprosy: seventh report, Technical report series 874, WHO Geneva 1998.
- 4) 医薬品インタビューフォーム タリビット錠 オフロキサシン錠 2000年9月改定 (第3版)
- 5) Gidoh, M and Tsutsumi, S.: Activity of Sparfloxacin against *Mycobacterium leprae* inoculated into footpads of nude mice. 63:108-116(1992).
- 6) 儀同政一: ハンセン病薬物療法の改善に関する基礎的研究、特にAM-1155, DU-6859a 及びCAMの抗らい菌活性、67(47)1998.

Guideline for the Treatment of Leprosy by New Quinolones

Masaichi Gidoh ^{1)*}, Masako Namisato ²⁾, Kimiko Kumano ³⁾, Masamichi Goto ⁴⁾,
Reiko Nogami ⁵⁾, Motoaki Ozaki ⁶⁾

- 1) Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases
- 2) National Sanatorium, Kuryu-Rakusen
- 3) Hyogo Medical Center for Adults
- 4) Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences
- 5) National Sanatorium, Kikuchi-Keifuen
- 6) National Sanatorium, Nagashima-Aiseien

[Received: 16 Dec. 2003]

Key words : Leprosy, New quinolone, Ofloxacin, Guideline, Multi-drug therapy(MDT)

Ofloxacin(OFLX) is often applied today as a substitution drug of MDT for drug resistance to dapsone, rifampicin or clofazimine. However, OFLX resistance is also becoming a great concern. Low and/or irregular administration are considered to be the major causes of OFLX resistance. OFLX should be used as a combined therapy, and minimal daily dose of 400mg of OFLX or 200~300mg of levofloxacin is required. Quinolone resistance should be considered when no improvement of clinical and/or bacterial index is observed after the treatment for 6 months. In such cases, resistance gene detection is necessary.

*Corresponding author :

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

新規フルオロキノロンWQ-3345および WQ-3402の抗らい菌活性

儀同 政一*

国立感染症研究所ハンセン病研究センター

〔受付：2004年10月5日、掲載決定：2004年11月15日〕

キーワード：フルオロキノロン、多剤併用療法、Buddemeyer法、マウス足蹠法

新規フルオロキノロンWQ-3345およびWQ-3402の抗らい菌活性をBuddemeyer法とヌードマウス足蹠法で検討した。Buddemeyer法では、RFP>WQ-3402>sparfloxacin (SPFX) >gatifloxacin (GFLX) >WQ-3345>levofloxacinの順で、WQ-3402の抗らい菌活性はSPFXを凌ぎフルオロキノロン中最強であったが、WQ-3345はGFLXより弱かった。他方、ヌードマウス足蹠法ではWQ-3345とWQ-3402は何れも20mg/kg投与でらい菌増殖の不完全抑制を示すに留まった。さらに、Buddemeyer法で抗らい菌活性の強かったWQ-3402を50mg/kgに増量してヌードマウス足蹠法で検討したところ、20mg/kg投与の場合と同様に不完全抑制を認めたに過ぎなかった。以上の成績よりWQ-3402は、Buddemeyer法では強い*in vitro*抗らい菌活性を示すものの、ヌードマウス足蹠法での*in vivo*抗らい菌活性はSPFXのそれに比べては著しく劣ることが明らかになった。

はじめに

ハンセン病の治療は、多剤併用療法 (multidrug therapy, MDT) の普及により有病率は低下したが、今なお新患は60万人を超えている¹⁾。ハンセン病の治療は、ハンセン病治療指針²⁾でも少菌型で6ヶ月、多菌型で1年以上と長い治療期間を要すること、また薬剤耐性菌の増加などの問題が生じている。rifampicin (RFP) 耐性に対しRFPと同様な殺菌的薬剤はフルオロキノロンのみで、保険適用薬であるofloxacin (OFLX) の、*in vitro*, *in vivo*活性は弱く³⁾、最

も強い抗らい菌活性を持つsparfloxacin (SPFX)^{4, 5)}は、光毒性⁶⁾に問題がある。また、優れた抗らい菌活性を保持しつつ光毒性を弱めた6-fluoro-8-methoxy quinolone, gatifloxacin^{7, 8)} (GFLX)は、低血糖、高血糖^{9, 10)}の発症の克服が今後解決すべき課題として残されている。

WQ-3345^{11, 12)}は7位にアミノ基を、WQ-3402¹¹⁾は、7位にメチルアミノ基、1位に5-アミノ-2, 4-ジフルオロフェニル基を導入した新規フルオロキノロンでグラム陽性菌及びグラム陰性菌に優れた抗菌活性を有するとともに、ciprofloxacin耐性methicillin耐性黄色ブドウ球菌にも優れた抗菌活性を示す薬剤として湧永製薬で開発された^{11, 12)}。フルオロキノロンの光毒性は、SPFX>CPFAX>LVFX>GFLX>WQ-3402, WQ-3345の順で、WQ-3402とWQ-3345はキノリン骨格の8位にCH₃基を導入することで光毒性を軽減し

*Corresponding author :
国立感染症研究所ハンセン病研究センター
〒189-0002 東村山市青葉町4-2-1
Tel : 042-391-8211 Fax : 042-394-9092
E-mail : m-gidoh@nih.go.jp

た抗菌薬である^{11, 12)}。薬剤耐性化の防止または遅延、副作用軽減、治療期間の短縮に対応するため、光毒性が弱く既存の同系薬より強い抗菌活性を持つ新規フルオロキノロンWQ-3402とWQ-3345の抗らい菌活性をBuddemeyer法^{13, 14)}とヌードマウス足蹠法で検討した。

材料と方法

1) 抗菌薬

WQ-3402: 1-(5-amino-2, 4-difluorophenyl)-6-fluoro-8-methyl-7-methylamino-4-oxo-1, 4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethanolamine salt (湧永製薬)、WQ-3345: 7-amino-1-(5-amino-2, 4-difluorophenyl)-6-fluoro-8-methyl-4-oxo-1, 4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid ethanolamine salt (湧永製薬)、SPFX (大日本製薬)、GFLX (杏林製薬)、levofloxacin (LVFX, 第一製薬) は、各製薬会社から原末の提供を受けた。rifampicin (RFP) は、市販品(和光純薬)を用いた。

Buddemeyer法^{13, 14)}に用いた抗菌薬WQ-3402, WQ-3345, GFLX, LVFX, SPFXは0.2N-NaOHで、RFPはdimethyl sulfoxideで溶解後、phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.0) で最終濃度が8.0, 2.0, 0.5, 0.125 $\mu\text{g/ml}$ になるよう調整した。

ヌードマウス足蹠法に用いた薬剤は、実験1ではSPFXは10 mg/kg, WQ-3345は10, 20mg/kg, WQ-3402は10, 20mg/kg、実験2ではSPFXは10 mg/kg, WQ-3402は30, 40, 50 mg/kgになるよう0.001% Tween80含有PBS (pH7.0) で調整した。

2) 接種菌の精製

Mycobacterium leprae (Thai 53株) を接種後11ヶ月目のヌードマウス (BALB/c-*nu/nu*, 雌、5週令、日本クレア) の両後肢足蹠を切除後、3%ヨード液、70%エタノールで消毒しPBS (pH 7.0) で洗浄後、足蹠乳剤を遠心操作により集菌後、0.05%トリプシン (最終濃度) で処理、1%水酸化ナトリウム液 (最終濃度) で処理後集菌精製¹⁵⁾した。Shepard法¹⁶⁾で菌数計算後、PBS (pH 7.0) で $2 \times 10^8/\text{ml}$ に希釈した。

3) 動物

ヌードマウス (BALB/c-*nu/nu*, 雌、5週令) は、日本クレアから購入し、ビニールアイソレータ (三基科学工業株式会社) 中で滅菌したマウス用耐圧固形飼料MB-6E (船橋農場) で飼育した。

4) 抗らい菌活性の測定

Buddemeyer法: 4 mlガラスバイアル中に7H12培地 500 μl 、らい菌 ($2 \times 10^8/\text{ml}$) 100 μl 、薬剤 (最終濃度8.0, 2.0, 0.5, 0.125 $\mu\text{g/ml}$) 300 μl を加えよく混合する。このガラスバイアルのキャップを緩く締め、32°Cの炭酸ガス培養器中で4日間培養後、¹⁴C-パルミチン酸 (57mCi/mmol) 100 μl (1 μCi) を加え混合後、再びキャップを緩く締めたガラスバイアルを、NaOHとシンチレータで処理後乾燥したろ紙片を入れたプラスチックバイアルに入れキャップを強く締める。更に32°Cの培

Table 1. *In vitro* anti-*M. leprae* activities of various fluoroquinolones measured by Buddemeyer method

Drugs	$\mu\text{g/ml}$	$\bar{x} \pm \sigma$ (cpm)	Inhibition(%) ^b
Control		40,193 \pm 748 ^a
WQ-3345	8.0	7,599 \pm 633	81.1
	2.0	18,582 \pm 983	53.8
	0.5	27,243 \pm 254	32.2
	0.125	32,355 \pm 634	19.5
WQ-3402	8.0	5,443 \pm 57	86.5
	2.0	11,474 \pm 772	71.5
	0.5	23,041 \pm 211	42.7
	0.125	26,942 \pm 705	33.0
LVFX	8.0	14,050 \pm 633	65.0
	2.0	21,031 \pm 406	47.7
	0.5	30,637 \pm 804	23.8
	0.125	33,176 \pm 1,494	17.5
SPFX	8.0	8,750 \pm 158	78.2
	2.0	12,403 \pm 327	69.1
	0.5	22,175 \pm 438	44.8
	0.125	30,580 \pm 440	23.9
GFLX	8.0	11,614 \pm 1,383	71.1
	2.0	15,295 \pm 519	61.9
	0.5	25,888 \pm 797	35.6
	0.125	29,979 \pm 640	25.4
RFP	8.0	9,055 \pm 231	77.5
	2.0	10,585 \pm 562	73.7
	0.5	11,699 \pm 647	70.9
	0.125	21,861 \pm 508	45.6

a. Data are given as the mean \pm standard deviation of triplicate samples.

b. [(specimen of control group(c)-that of a drug group)/c] \times 100 (%)

養器で7日間培養を継続し、発生した¹⁴C₂O₂量を液体シンチレーションカウンターで測定し、WQ-3345, WQ-3402の抗らい菌活性をLVFX, GFLX, SPFX, RFPと比較検討した。

マウス足蹠法：1群10匹のヌードマウス(BALB/c-nu/nu, 雌, 5週令, 日本クレア)の両後肢足蹠にらい菌(2x10⁸/ml)の0.05mlを接種した。菌接種後60日から152日の93日間、ステンレスカテーテルで薬剤を週5日毎日経口投与した。接種後8ヶ月から11ヶ月まで4回、2匹4足蹠内のらい菌数を計数し、1足蹠当たりの平均菌数を求め、各薬剤の抗らい菌活性を求めた。

結果

Buddemeyer法の結果を表1に示した。

各抗菌薬2μg/mlでの抗らい菌活性はRFP>WQ-3402>SPFX>GFLX>WQ-3345>LVFXで、

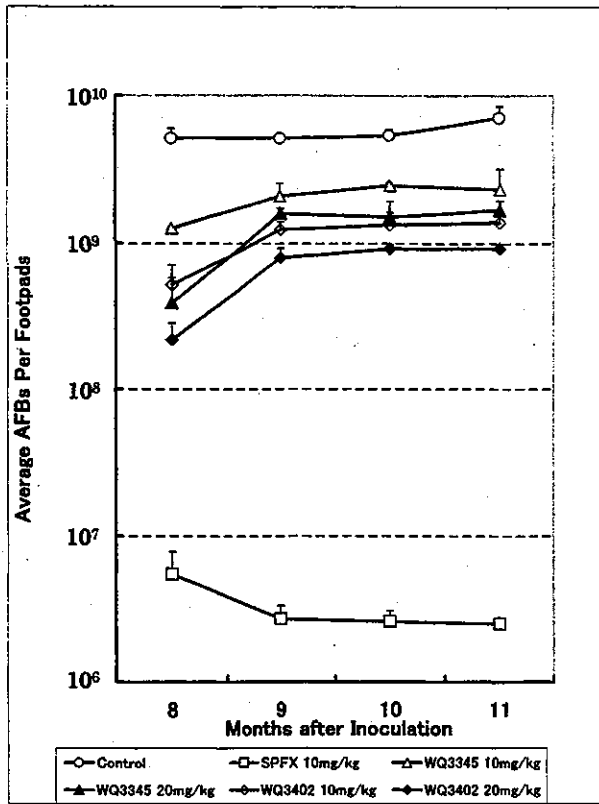


Fig. 1. Nude mice were infected with *M. leprae*, strain Thai-53, by inoculating 1x10⁷ bacilli into each of hind footpads, followed by oral treatment with WQ-3402, WQ-3345 or SPFX, given once a day, 5 times weekly, between days 60 to 152 postinfection at a daily dose of 10 or 20 mg/kg. At 8,9,10 and 11 months after inoculation, the mice were killed and the number of AFBs in the 4 hind footpads of 2 mice was counted according to the method of Shepard.

WQ-3402にフルオロキノロン中最も強いSPFXを凌ぐ強い抗らい菌活性を認めたが、WQ-3345はGFLXより弱かった。

ヌードマウス足蹠法の結果を図1・2に示した。対照薬のSPFXは10 mg/kgでヌードマウス足蹠内のらい菌の増殖を完全抑制したが、WQ-3345とWQ-3402は20mg/kgでも不完全抑制を示すに留まった(実験1)。

Buddemeyer法で抗らい菌活性の強いWQ-3402は、30, 40, 50mg/kgまで増量したが不完全抑制であった(実験2)。

考察

MDT[△](DDS,B663,RFP)に用いられている薬剤を除き、優れた抗らい菌活性を持つ薬剤は、マクロライド系ではclarithromycin, テトラサイクリン系ではminocycline、フルオロキノロン系ではSPFX, GFLX, LVFX, OFLXなどで、臨床で使用できる薬剤は少ない。抗らい菌活性の弱い

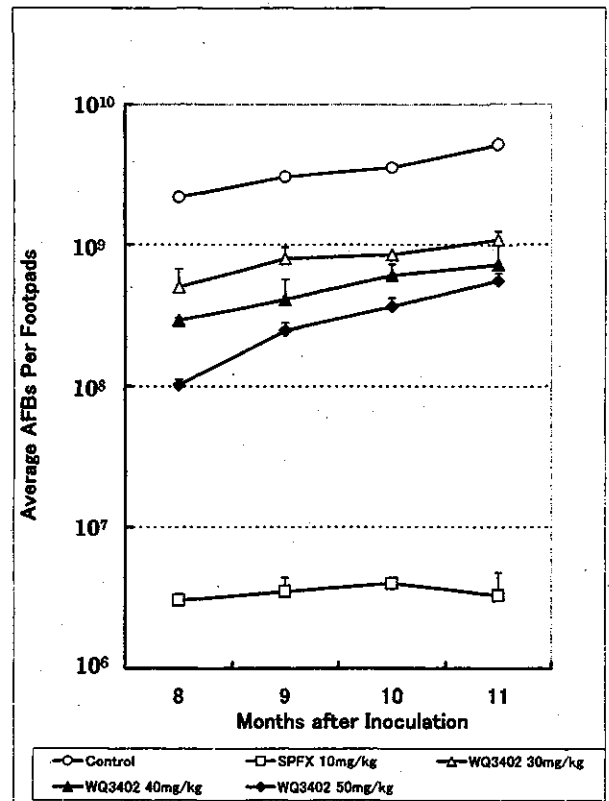


Fig. 2. Antibacterial activity at high doses of WQ-3402 against *M. leprae* inoculated into footpads of nude mice. Inoculation of *M. leprae* and counting of AFBs were performed according to the methods shown in the legend to Figure 1.

OFLXの低用量投与が行われた結果、OFLX耐性菌が増加してきている。また、ハンセン病の治療に使用されている抗らい菌薬の中で殺菌作用を持つのは、RFPとフルオロキノロンのみである。臨床からは抗らい菌活性が強く、光毒性などの副作用の少ないフルオロキノロンの開発が求められている。

新規フルオロキノロンWQ-3345の抗らい菌活性は、Buddemeyer法とヌードマウス足蹠法ともSPFX及びGFLXより弱かった、WQ3402は、Buddemeyer法では、フルオロキノロン中最強のSPFXより強い抗らい菌活性を持っていたが、ヌードマウス足蹠法は50 mg/kgでも不完全抑制で、SPFXやGFLXより弱いという結果になった。

ハンセン病は、らい菌により末梢神経や皮膚などが主に侵される慢性感染症であることから、血中濃度が持続的¹⁷⁾で良好な組織移行性、特に皮膚内移行率の高い¹⁸⁾SPFXは、*in vivo*法で強い抗らい菌活性を示すと考えられる。さらにWQ-3402 ($T_{1/2}=2.7\text{h}$)¹¹⁾は、SPFX(Dogs, per os, $T_{1/2}=8.0\text{h}$)¹⁹⁾やGFLX ($T_{1/2}=6.2\text{h}$)²⁰⁾と比べ血中半減期が短く、組織移行性や蛋白結合率など体内動態が劣ることから、*in vivo*で強い抗らい菌活性は得られなかったものと考えられる^{11, 12)}。

謝 辞

WQ-3345, WQ-3402をご提供いただいた湧永製薬株式会社と本研究にご協力いただきました湧永製薬創薬研究所の天下嘉弘先生に深謝致します。

文 献

- 1) World Health Organization Leprosy Elimination Project, Status Report 2003. WHO, Geneva 2004.
- 2) 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。日本ハンセン病学会雑誌、69: 157-177, 2000.
- 3) Gelber, R. H., Iranmanesh, A., Murray, L., Siu, P. and Tsang, M.: Activities of various quinolone antibiotics against *Mycobacterium leprae* in infected mice. Antimicrob. Agent Chemother. 36: 2544-2547, 1992.
- 4) Gidoh, M. and Tsutsumi, S.: Activity of sparfloxacin against *Mycobacterium leprae* inoculated into footpads of nude mice. Lepr. Rev. 63: 108-116. 1992.
- 5) Gertrude P. C., Bernadette Y. G., Virginia E. C. Jocelyn B. L., Claribel L. J. Manuela Luisa R. P., Jocelyn B. L. and Franzblau S. G.: Clinical trial of sparfloxacin for lepromatous leprosy. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 61-65. 1994.
- 6) Engler, M., Rusing, G., Sorgel, F. and Holzgrabe, U.: Defluorinated sparfloxacin as a new photoproduct identified by liquid chromatography coupled with UV detection and tandem mass spectrometry. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 1151-1159. 1998.
- 7) Hosaka, M., Yasue, T., Fukuda, H., Tomizawa, H., Aoyama, H. and Hirai, K.: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 2108-2117, 1992.
- 8) Kusajima, H., Ishida, R. and Uchida, H.: Phototoxicity of gatifloxacin, a new quinolone, and its related drugs in guinea pigs. Jpn. Pharmacol. Ther. 26: 1655-1660, 1998.
- 9) Baker S. E. and Hangii, M. C.: Possible gatifloxacin-induced hypoglycemia. Ann. Pharmacother. 36: 1722-1726. 2002.
- 10) Biggs, W. S.: Hypoglycemia and hyperglycemia associated with gatifloxacin use in elderly patients. J. Am. Board. Fam. Pract. 16: 455-457, 2003.
- 11) Kuramoto Y., Ohshita Y., Amano H., Hirano Y., Hayashi N., Aoki S., Niino Y. and Yazaki A.: Structure-activity relationships of novel acid, 7-amino or 7-alkylamino-1-(5-amino-2,4-difluorophenyl)-8-methylquinolones. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2000 (Toronto, Canada).

- 12) Hayashi N., Ohshita Y., Amano H., Hirao Y., Niino Y. and Yazaki A.: WQ-3330 and WQ-2942; Structure-activity relationships of novel 8-methyl quinolones containing an aminophenyl group at the 1-position. 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1999 (San Francisco, USA).
- 13) Buddemeyer, E., Hutchinson, R. and Cooper, M.: Automatic quantitative radiometric assay of bacterial metabolism. Clin. Chem. 22: 1459-1464, 1976.
- 14) Franzblau, S. G.: Oxidation of palmitic acid by *Mycobacterium leprae* in an axenic medium. J. Clin. Microbiol. 26: 18-21, 1988.
- 15) 中村昌弘：らい菌接種ヌードマウス足蹠乳剤内迷入雑菌の除去. 日本ハンセン病学会雑誌, 64: 47-50, 1994.
- 16) Shepard, C. C. and D. H. McRae.: A method for counting acid-fast bacteria. Int. J. Lepr. 36: 78-82. 1968.
- 17) 中島光好、金丸光隆、植松俊彦、滝口祥令：ピリドンカルボン酸系抗菌剤sparfloxacinの臨床第I相試験. 臨床医薬, 7: 1639-1684, 1991.
- 18) 秋山尚範、鳥越利加子、山田 琢、阿部能子、下江敬生、神崎寛子、荒田次郎、赤木理、山本康生、池田政身：ラットにおける各種抗生物質の皮膚内移行について. 日皮会誌 101: 943-950, 1991.
- 19) 中村信一、黒部暢之、大植富夫、橋本昌久、清水當尚：Sparfloxacinの各種動物における吸収、分布および排泄. 日本化学療法学会雑誌、39, 123-130, 1991.
- 20) 大塚 毅、石川紅美、町田正明、草嶋久生、石田了三、内田 広：新キノロン系抗菌薬 gatifloxacin及びその光学異性体の体内動態. I. 各種実験動物における体内動態. 日本化学療法学会雑誌、47: 112-123, 1999.

In vitro and *in vivo* activities of newly synthesized fluoroquinolones WQ-3345 and WQ-3402 against *Mycobacterium leprae*

Masaichi Gidoh*

Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases

[Received: 5 Oct. 2004 / Accepted: 15 Nov. 2004]

Key words : fluoroquinolone, multidrug therapy, Buddemeyer method, mouse footpad method

Activities of newly synthesized fluoroquinolones WQ-3345 and WQ-3402 against *M. leprae* were measured by using the Buddemeyer method. The % inhibition of the examined drugs for *M. leprae* was in the order of RFP > WQ-3402 > SPFX > GFLX > WQ-3345 > LVFX. The anti-*M. leprae* activity of WQ-3402 was found to be strongest in these five fluoroquinolones when examined by this method, and the activity of WQ-3345 was weaker than that of GFLX.

The anti-*M. leprae* activities of WQ-3345 and WQ-3402 were measured by a mouse footpad method using nude mice. The inhibitory effects on the growth of *M. leprae* inoculated into the footpads were found to be incomplete after orally administered with WQ-3345 or WQ-3402 respectively at dosages of 10 and 20 mg/kg, and the incomplete inhibition was again found even at a dosage of 30, 40 or 50 mg/kg in the latter.

*Corresponding author :

Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases 4-2-1, Aoba-cho, Higashimurayama-shi, Tokyo, 189-0002, Japan

Tel: +81-42-391-8211 Fax: +81-42-394-9092

E-mail: m-gidoh@nih.go.jp

Studies of Lipoproteins of *Mycobacterium leprae*

Yumi Maeda^{1)*}, Patrick J. Brennan²⁾ and Masahiko Makino¹⁾

1) Department of Microbiology, Leprosy Research Center

2) Department of Microbiology, Colorado State University

[Received: 1 Dec. 2003]

Key words: lipoproteins, mycobacteria, host defense, cytokine

The deciphering of the genomic sequence of *Mycobacterium leprae* has made possible to predict the possible lipoproteins. The consensus sequence at the N-terminal region of the protein, including the cysteine residue to which the lipid moiety gets attached, provides a clue to the search. As such, more than 20 putative lipoproteins have been identified from *Mycobacterium leprae* genomic sequence. Lipoprotein LpK (Accession no. ML0603) which encodes for 371 amino acid precursor protein, was identified. Expression of the protein, in *Escherichia coli* revealed a 33 kD protein, and metabolic labeling experiments proved that the protein was lipidated. The purified lipoprotein was found to induce production of IL-12 in human peripheral blood monocytes which may imply that *M. leprae* LpK is involved in protective immunity against leprosy. Pursuit of such lipoproteins may reveal insights into the pathogenesis of the disease.

Introduction

According to World Health Organization (WHO) epidemiological survey report, the number of leprosy patients in the world was around 534000 at the beginning of 2003, as reported by 110 countries. About 620000 new cases were detected during 2002 (<http://www.who.int/lep/>). In spite of the intensive leprosy control measures taken, there is no evidence as yet of a reduction in the number of new cases¹⁾. The situation implies that there is a need to develop new vaccines and immunotherapeutic tools to con-

trol the disease. Moreover there is increased concern about the disease due to the complications due to severe reactions, peripheral nerve injury due to the tropism of the bacilli to invade Schwann cells²⁻⁴⁾ and emergence of drug resistant bacilli⁵⁾.

Bacterial lipoproteins containing N-acyl diglyceride-cysteine residues, flanked by characteristic amino acids motif that are required for post-translational processing via the signal peptidase II^{6, 7)}, have been extensively studied in Gram-positive and Gram-negative bacteria. Membrane located 17 kD lipoprotein of *Francisella tularensis* reported by Sjosted *et al.* was found to be T cell stimulatory^{8, 9)}. Lipoproteins released by pathogenic *E. coli*, *Salmonella typhimurium* and *Yersinia enterocolitica*, were found to induce proinflammatory cytokine in macrophages and ameliorate pathologic changes associated with gram negative bacterial infection in mice¹⁰⁾.

*Corresponding author :

Department of Microbiology, 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 address: yumi@nih.go.jp

Borrelia burgdorferi and *Treponema pallidum*, the etiological agents of lyme disease and syphilis, respectively, are known to possess abundant lipoproteins¹¹, which act as major antagonists with the ability to influence both innate and adaptive immune responses during infection¹². The only two well studied mycobacterial lipoproteins, are the 19 kD and 38 kD lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*¹³⁻¹⁵. These lipoproteins are therefore presumed to be involved in the host responses, inducing interleukin-12 (IL-12) from the host cells. Since IL-12 has T cell stimulatory properties, which in turn elicits production of interferon- γ (IFN- γ), and facilitates development of Th1 cells¹⁶⁻¹⁸, these lipoproteins may be involved in the induction of cellular responses to mycobacteria and thereby contributing to the development of protective immunity^{19,20}. Identification of lipoproteins in *M. leprae* seems inevitable especially in terms of host defense and for the development of new vaccines against leprosy.

Analysis of a *M. leprae* lipoprotein

To date, relatively few lipoproteins of mycobacteria have been described. The database of the *M. tuberculosis* genome (http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis/) revealed that there are about a hundred putative lipoprotein coding genes, but only about 40 genes have been identified in *M. leprae* genome²¹ and almost half of the genes identified are pseudogenes. Table 1 shows the list of the putative lipoproteins. One of the predictable lipoprotein was found to be partially homologous to the precursor of the glutamine binding protein, the other one was a possible transport lipoprotein and the third one was a putative secreted protease. But all other lipoproteins had no homology to any other protein of known function. One of the more interesting candidates is the gene annotated as *lpk* (Accession No. ML0603)²². The N-terminal residues of LpK showed typical features of a signal peptide with a consensus sequence (MISALMVAVAC) for the lipid modification. A sequence homologue of *lpk* was identified in

the *M. tuberculosis* genome database using the BLASTN search tool. *M. tuberculosis* Rv 2413c (EMBL:AL123456, 316 amino acids) has 83.5% identity in the 316 amino acid overlap. However, the homologue has no consensus sequence for lipid modification. The fact that the lipid consensus sequence was missing is quite surprising since many of the *M. leprae* genes when compared to those of *M. tuberculosis* genes are pseudogenes as analyzed from the gene databases²¹. This fact may indicate that this lipoprotein may be specific to *M. leprae* and have a significant role in bacteria, specifically related to the unique features of the organism such as proclivity for Schwann cell invasion or development of reactions. Since it is not feasible to obtain adequate amount of protein from *M. leprae* for analyses, the gene was cloned and the protein expressed and purified in *E. coli* (Fig. 1). The basic lipoprotein nature of LpK was verified experimentally. Metabolic labelling of the bacterial protein with radioactive glycerol provided presumptive evidence of a covalent linkage of lipid to LpK.

Murine experiments with infectious pathogens, indicate that IL-12 plays an important role in initiation and regulation of the T cell responses such as Th1^{23,24}. *In vitro* experiments with *M. tuberculosis* suggested that IL-12 is induced rapidly after infection^{16,25,26}, and in *in vivo* IL-12 was crucial for the development of protective immunity against tuberculosis²⁷. When we examined whether IL-12 was inducible by LpK in human monocytes, LpK induced IL-12 at a significantly high level, a level that could be maintained even in the presence of polymyxin B (Fig. 2). Another *M. leprae* putative lipoprotein (gene product of Accession No. ML1699) was expressed in inclusion bodies of *E. coli*. The purified protein, of molecular weight 39 kD, did not induce any significant amount of IL-12 in human monocytes. The reason for non-inducing capability of the purified 39 kD protein, may be the lack of lipidified region, although the exact reason remains unclear.

Discussion

M. tuberculosis 19 kD lipoprotein is both cell wall associated and secreted lipoprotein which stimulate proliferation of human T cells and promotes neutrophil priming and activation^{14,28}. It is also known to induce apoptosis in macrophages through TLR2 ligation²⁹. Recently, the synthetic lipopeptide consisting of the N-terminal portion of *M. leprae* 19 kD lipoprotein is shown to induce apoptosis in human Schwann cells, also through TLR2³⁰. At present, TLR2 seems to be the only receptor known to be involved in signaling of bacterial lipoproteins and lipopeptides³¹. In likewise manner, TLR2 seems to be the receptor on antigen presenting cell, which is involved in *M. leprae* LpK lipoprotein signaling. But blocking of TLR2 with its antagonistic antibody does not completely inhibit the T cell activating ability of lipoprotein. Therefore other receptors as yet unknown, may be required for the signaling. Also, TLR2 seems to associate with TLR1 and recognise the native 19 kD *M. tuberculosis* lipoprotein and synthetic triacylated but not the diacylated lipopeptide^{32,33}. Such type of inter-related receptors may also be worth investigating.

Display of outer surface protein A (OspA) antigen as membrane associated lipoprotein by *M. bovis* bacillus Calmette-Guerin seem to be necessary for protection against *Borrelia burgdorferi* infection (Lyme disease)³⁴. But there are a few reports which considers the involvement of lipoprotein deleterious to protection against disease³⁵. Therefore it would be necessary to see whether the display of *M. leprae* lipoproteins could enhance host defense-associated immunity as well as serve in protection against the disease in *in vivo*.

IL-12 production in mycobacterial diseases is known to contribute to antimycobacterial defenses^{17,36,37}, by triggering of interferon- γ which, in turn, can reduce, for example, the bacillary load in lepromatous leprosy patients¹⁶. In this respect, we can anticipate that lipoproteins may have the potential to be used as an immunotherapeutic agent against lep-

rosy. We may have to investigate the IL-12 inducing ability of other lipoproteins of *M. leprae* and the detailed mechanism by which the signal is transduced.

In conclusion, LpK, induced the production of IL-12 which may indicate a significant role in the induction of cellular responses leading to the development of protective immunity against the intracellular organism. Although the engagement of lipoproteins in the pathogenesis of leprosy is still to be evaluated, ongoing studies are conducted to evaluate its immunogenic role on leprosy.

Acknowledgements

The work was supported in part by grants from Health Science Research Grants- Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, and Japan Health Sciences Foundation, from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. The authors are grateful to the members of the Japanese Leprosy Association for the article award.

References

- 1) World Health Organisation. Leprosy-Global situation. Wkly Epidemiol Rec 77: 1-8, 2002.
- 2) Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin- α 2 chain. Cell 88: 811-821, 1997.
- 3) Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. Cell 103: 511-524, 2000.
- 4) Job CK. Nerve damage in leprosy. Int J Lepr Other Mycobact Dis 57: 532-539, 1989.
- 5) Maeda S, Matsuoka M, Nakata N, Kai M, Maeda Y, Hashimoto K, Kimura H, Kobayashi K, Kashiwabara Y. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. Antimicrob Agents and Chemotherap 45: 3635-3639, 2001.
- 6) Wu HC, Tokunaga M. Biogenesis of lipoproteins in

- bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* 125: 127-157, 1986.
- 7) Sankaran K, Wu HC. Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* 269: 19701-19706, 1994.
 - 8) Sjostedt A, Tarnvik A, Sandstrom G. The T-cell-stimulating 17-kilodalton protein of *Francisella tularensis* LVS is a lipoprotein. *Infect Immun* 59: 3163-3168, 1991.
 - 9) Sjostedt A, Sandstrom G, Tarnvik A. Humoral and cell-mediated immunity in mice to a 17-kilodalton lipoprotein of *Francisella tularensis* expressed by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 60: 2855-2862, 1992.
 - 10) Zhang H, Niesel DW, Peterson JW, Klimpel GR. Lipoprotein release by bacteria: Potential factor in bacterial pathogenesis. *Infect Immun* 66: 5196-5201, 1998.
 - 11) Radolf JD, Arndt LL, Akins DR, Curetty LL, Levi ME, Shen Y, Davis LS, Norgard MV. *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytes/macrophages. *J Immunol* 154: 2866-2877, 1995.
 - 12) Infante-Duarte C, Kamradt T. Lipopeptides of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins induce Th1 phenotype development in alphabeta T-cell receptor transgenic mice. *Infect Immun* 65: 4094-4099, 1997.
 - 13) Oftung F, Wiker HG, Deggerdal A, Mustafa AS. A novel mycobacterial antigen relevant to cellular immunity belongs to a family of secreted lipoproteins. *Scand J Immunol* 46: 445-451, 1997.
 - 14) Young DB, Garbe TR. Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* 142: 55-65, 1991.
 - 15) Mohaghehpour N, Gammon D, Kawamura LM, van Vollenhoven A, Benike CJ, Engleman EG. CTL response to *Mycobacterium tuberculosis*: identification of an immunogenic epitope in the 19-kDa lipoprotein. *J Immunol* 161: 2400-2406, 1998.
 - 16) Zhang M, Gately MK, Wang E, Gong J, Wolf SF, Lu S, Modlin RL, Barnes PF. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Invest* 93: 1733-1739, 1994.
 - 17) Sieling PA, Wang XH, Gately MK, Oliveros JL, McHugh T, Barnes PF, Wolf SF, Golkar L, Yamamura M, Yogi Y, et al. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *J Immunol* 153: 3639-3647, 1994.
 - 18) Vordemeier HM, Harris DP, Roman E, Lathigra R, Moreno C, Ivanyi J. Identification of T cell stimulatory peptides from the 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 147: 1023-1029, 1991.
 - 19) Ngamyang M, Varachit P, Phaknilrat P, Levy L, Brennan PJ, Cho SN. Effects of vaccination with several mycobacterial proteins and lipoproteins on *Mycobacterium leprae* infection of the mouse. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 69: 43-45, 2001.
 - 20) Fonseca DP, Benaissa-Trouw B, van Engelen M, Kraaijeveld CA, Snippe H, Verheul AF. Induction of cell-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using DNA vaccines encoding cytotoxic and helper T-cell epitopes of the 38-kilodalton protein. *Infect Immun* 69: 4839-4845, 2001.
 - 21) Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409: 1007-1001, 2001.
 - 22) Maeda Y, Makino M, Crick DC, Mahapatra S, Srisungnam S, Takii T, Kashiwabara Y, Brennan PJ. Novel 33-kilodalton lipoprotein from *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* 70: 4106-4111, 2002.
 - 23) Dockrell HM, Young SK, Britton K, Brennan PJ, Rivoire B, Waters MF, Lucas SB, Shahid F, Dojki M, Chiang TJ, Ehsan Q, McAdam KP, Hussain R.

- Induction of Th1 cytokine responses by mycobacterial antigens in leprosy. *Infect Immun* 64: 4385-4389, 1996.
- 24) Manetti R, Gerosa F, Giudizi MG, Biagiotti R, Parronchi P, Piccinni MP, Sampognaro S, Maggi E, Romagnani S, Trinchieri G, et al. Cloning and expression of murine IL-12. *J Exp Med* 148: 3433-3440, 1992.
- 25) Fulton SA, Johnsen JM, Wolf SF, Sieburth DS, Boom WH. Interleukin-12 production by human monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis*: role of phagocytosis. *Infect Immun* 64: 2523-2531, 1996.
- 26) Gately MK, Brunda MJ. Interleukin-12: a pivotal regulator of cell-mediated immunity. *Cancer Treat Res* 80: 341-366, 1995.
- 27) Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 186: 39-45, 1997.
- 28) Neufert C, Pai RK, Noss EH, Berger M, Boom WH, Harding CV. *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein promotes neutrophil activation. *J Immunol* 167: 1542-1549, 2001.
- 29) Lopez M, Sly LM, Luu Y, Young D, Cooper H, Reiner NE. 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *J Immunol* 170: 2409-2416, 2003.
- 30) Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, Modlin RL. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect Immun* 71: 1427-1433, 2003.
- 31) Hertz CJ, Kiertscher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV, Roth MD, Modlin RL. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 166: 2444-2450, 2001.
- 32) Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin RL. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med* 9: 525-532, 2003.
- 33) Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169: 10-14, 2002.
- 34) Grode L, Kursar M, Fensterle J, Kaufmann SH, Hess J. Cell-mediated immunity induced by recombinant *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin strains against an intracellular bacterial pathogen: importance of antigen secretion or membrane-targeted antigen display as lipoprotein for vaccine efficacy. *J Immunol* 168: 1869-1876, 2002.
- 35) Hovav AH, Mullerad J, Davidovitch L, Fishman Y, Bigi F, Cataldi A, Bercovier H. The *Mycobacterium tuberculosis* recombinant 27-kilodalton lipoprotein induces a strong Th1-type immune response deleterious to protection. *Infect Immun* 71: 3146-3154, 2003.
- 36) Modlin RL, Barnes PF. IL12 and the human immune response to mycobacteria. *Res Immunol* 146: 526-531, 1995.
- 37) Cooper AM, Roberts AD, Rhoades ER, Callahan JE, Getzy DM, Orme IM. The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* 84: 423-432, 1995.

TABLE 1. The putative lipoproteins of *M. leprae*¹

No.	CDS Number (<i>M. leprae</i>)	No. of amino acid residues	Products
1	ML0136	233	Putative lipoprotein (lppX)
2	ML0246	218	Putative lipoprotein (lpqT)
3	ML0319	183	Putative lipoprotein (lpqE)
4	ML0489	556	Hypothetical lipoprotein
5	ML0557	238	Putative lipoprotein (lprG)
6	ML0603	371	Lipoprotein
7	ML0775	589	Putative lipoprotein (lpqB)
8	ML0902	239	Putative lipoprotein
9	ML1086	468	Probable transport protein
10	ML1093	285	lipoprotein
11	ML1099	202	Putative lipoprotein
12	ML1115	188	Possible lipoprotein
13	ML1116	187	Lipoprotein (lprC)
14	ML1177	126	Possible lipoprotein
15	ML1315	194	Probable lipoprotein (lppK)
16	ML1339	525	Putative secreted protease
17	ML1427	445	Possible transport protein
18	ML1699	302	Putative lipoprotein
19	ML1966	161	Possible lipoprotein (lpqH)
20	ML2010	153	Putative lipoprotein
21	ML2446	441	Possible lipoprotein
22	ML2593	393	Putative lipoprotein (lprK)

¹CDS from *M. leprae* Sanger database and number of amino acids in the prolipoprotein forms of the *M. leprae* lipoproteins are shown.

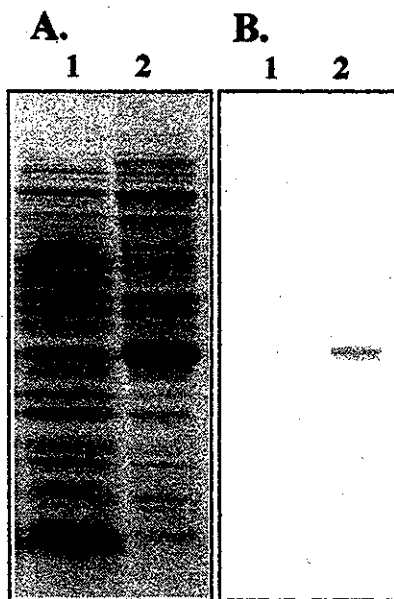


Fig. 1 : Expression and detection of *M. leprae* LpK in *E. coli*, A. Coomassie stain : 1, mock transformed and 2. *lpk* transformed *E. coli* extract. B. Western blot of the same, using monoclonal anti-His tag antibody.

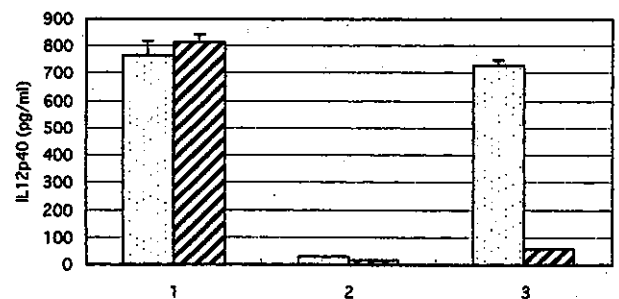


Fig. 2 : IL-12 p40 production is induced by *M. leprae* lipoprotein LpK : IL-12 p40 cytokine induction from human blood monocytes was observed using 1-LpK, 2-gene product of ML1699, 3-LPS. Hatched bar indicates the production of IL-12 p40 in the presence of polymyxin B.