

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

ハンセン病診療のネットワーク構築

研究分担者 石井則久 国立感染症研究所ハンセン病研究センター  
センター長  
研究協力者 森 修 一 国立感染症研究所ハンセン病研究センター  
感染制御部・室長  
永 岡 譲 国立療養所多磨全生園・皮膚科医長  
三好英文 厚生労働省健康局総務課・課長補佐

研究要旨 日本におけるハンセン病診療がスムーズに行われるようにネットワーク構築を目指した。28名の皮膚科医・医師にハンセン病の講習会・実習（皮膚スミア検査、神経肥厚触診、病理組織検査など）を行い、ハンセン病患者・回復者の診療体制を構築した。さらに、ハンセン病回復者が安心して一般病院を受診できるように皮膚科医の一覧を作成し、ハンセン病診療がスムーズに行われるようにした。

A. 研究目的

日本におけるハンセン病診療がスムーズに行われるようにネットワークの構築を目指す。

B. 研究方法

ハンセン病診療に欠けている要素を抽出し、それらを補う資料や情報を提供し、講習会なども開催する。また、ハンセン病の新規患者については、実際に診療方法、検査方法を指導し、主治医がハンセン病を理解し、自ら診療可能になるようにした。患者情報については入手しないため、倫理上の問題はない。

C. 研究結果

ハンセン病患者の減少のため、皮膚科医が診療する機会が殆どない。その

ため 35名に対してハンセン病講習会を実施した（参加者：皮膚科医 27名、内科医 1名、回復者 6名、新聞社員 1名）。ハンセン病の知識、回復者の心情、皮膚スミア検査実習、神経肥厚触診、病理組織検査などを実施し、知識・技術の伝達を行った。多くのハンセン病回復者から、医療面や生活面などの体験や要望をお聞きした。ハンセン病診療の座右の書として作成した「ハンセン病アトラス 診断のための指針」も配布し、当事者の他、医局員や若い皮膚科医の教育に活用することとした。

ハンセン病回復者は、過去の偏見・差別の歴史から、なかなか一般医療機関を受診する勇気がない。一般医療機関受診のチャンスを広げるため、研究分担者が作成したハンセン病患者（回

復者)向けパンフレットと医療者向けパンフレットを、国立ハンセン病資料館に配布した。さらにハンセン病の再発と皮膚病に気軽に対応できる皮膚科医の一覧表を更新した。

2009年には2名の新規ハンセン病患者がいた。2名の新規患者については主治医に対して、実際の検査の実技指導、治療の指導を行い、ハンセン病を確実に診療できる体制を確立した。

#### D. 考察

ハンセン病患者が減少し、診療する機会が減少し、教育を受けていない、一度も診療機会がない皮膚科医が大多数を占めるようになってきている。また、ハンセン病の歴史やハンセン病回復者の心情なども理解できていない。それらを解決するために、講習会を開催し、意識向上に努めた。皮膚科医は知識吸収の意欲はあり、講習会には27名の皮膚科医の他に、1名の内科医が参集した。講習会を実りあるものにするためにハンセン病回復者の方、6名にも参加いただき、彼らの現状などについて講演いただいた。今後も講習会を通じて学習意欲を持続させるために、年に一回程度の継続した教育機会を設ける必要がある。

ハンセン病回復者を一般医療機関に受診させる(インテグレーション)事は難しいが、一歩でもそれに近づける努力は必要である。そのため、気軽に相談できる皮膚科医名簿を更新し、回復者向けパンフレットに記載した。これらの皮膚科医を起点として他の診療科などに受診できることを期待したい。また、ハンセン病回復者などから生の声を聞いて、患者と医師との

あるべき関係を構築することも大事である。

ハンセン病の新規患者は減少しているが、外国人患者については鑑別にハンセン病が入っているため、診断に迷うことは多くないようである。一方、日本人患者については、ハンセン病を鑑別に入れることは難しく、診断が遅れる場合がある。数年に1名程度は日本人新規患者も登録されることがあり、必ず鑑別に「ハンセン病」を入れることが必要である。2009年は2名の新規患者が登録されたが、インドネシア人とブラジル人であった。

#### E. 結論

ハンセン病診療を皮膚科医が主体的に実施するためのネットワーク作りは、まだ始まったばかりであるが、皮膚科医の教育、ハンセン病回復者の一般医療機関への受診の動きを、引き続き行うことが重要である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Mikita N, Kanazawa N, Ozaki M, Kosaka M, Ishii N, Nishimura H, Furukawa F: No involvement of non-synonymous TLR2 polymorphisms in Japanese leprosy patients. *J Dermatol Sci* 54:48-49, 2009.
2. 石井則久、永岡 譲: ハンセン病. 皮膚感染症のすべて(渡辺晋一編集), p174-178, 南江堂(東京), 2009.
3. 石井則久: ハンセン病. 東京都感染症マニュアル 2009(東京都新た

- な感染症対策委員会監修), pp370-371, 東京都福祉保健局(東京), 2009
4. Bang PD, Suzuki K, Phuong LT, Chu TM, Ishii N, Khang TH: Evaluation of polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy. *J Dermatol* 36: 269-276, 2009.
  5. 北見由季、北見 周、飯島正文、石井則久: ネパール人男性に生じたハンセン病(BL型)の1例. *皮膚科の臨床* 51: 483-486, 2009.
  6. 森山一隆、菊池一郎、石井則久: ハンセン病患者から生まれた子供たち -奄美大島における妊娠・出産・保育・養育のシステムの軌跡-. *日本ハンセン病学会雑誌* 78: 231-250, 2009.
  7. 永岡 譲、石田 裕、鈴木幸一、石井則久: ミャンマーにおけるハンセン病制圧記念行事(2009)の報告. *日本ハンセン病学会雑誌* 78: 251-253, 2009.
  8. 金澤伸雄、三木田直哉、李 洪錦、中谷友美、尾崎元昭、小坂眞紀、石井則久、西村泰行、古川福実: 日本人のハンセン病発症における細菌センサー分子の遺伝子多型の関与. *日本ハンセン病学会雑誌* 78: 255-261, 2009.
  9. Li H-J, Kanazawa N, Nakatani Y, Furukawa F, Ozaki M, Kosaka M, Ishii N: No involvement of the NOD1 polymorphism Glu266Lys in Japanese leprosy patients. *J Dermatol Sci* 56: 72-73, 2009.
  10. 石井則久: Hansen 病の皮膚症状. *皮膚病診療* 31: 1366-1370, 2009.
  11. 石井則久: ハンセン病の現況. *日本皮膚科学会雑誌* 119: 2573-2575, 2009.
2. 学会発表
    1. 欠田成人、山中恵一、磯田憲一、黒川一郎、中村明子、和田英夫、石井則久、水谷 仁: BL型ハンセン病の1例. 第108回日本皮膚科学会総会, 福岡, 2009年4月.
    2. 石井則久、熊野公子、杉田泰之、野上玲子、細川 篤、牧野正直: 2008年のハンセン病新規患者発生状況. 第82回日本ハンセン病学会総会, 出雲, 2009年5月.
    3. 熊野公子、村田洋三、土居敏明、庄野又仁、中森利枝、三木綾子、山本維人、石井則久: フィリピン女性のBL症例新患の1例. 第82回日本ハンセン病学会総会, 出雲, 2009年5月.
    4. 細川 篤、山口さやか、宮里仁奈、上里 博、照屋 操、谷川和也、鈴木幸一、松岡正典、石井則久、矢島幹久: TT~BT型が疑われたハンセン病の1例. 第82回日本ハンセン病学会総会, 出雲, 2009年5月.
    5. 松本悠子、安岡英美、加茂真理子、大内健嗣、石河 晃、石井則久、天谷雅行: 顔面神経麻痺を伴った多菌型ハンセン病の1例. 日本皮膚科学会第824回東京地方会, 東京, 2009年6月.
  - H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
石井則久 永岡 譲	ハンセン病	渡辺晋一	皮膚感染症のすべて	南江堂	東京	2009	174-178
石井則久	ハンセン病	東京都新たな感染症対策委員会 監修	東京都感染症マニュアル2009	東京都福祉保健局	東京	2009	370-371

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Makino, Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, T. Mukai.	GM-CSF mediated T-cell activation by macrophages infected with recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of <i>Mycobacterium leprae</i> .	FEMS Immunol. Med. Microbiol.	55	39-46	2009
Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, M. Makino.	Inhibition of the multiplication of <i>Mycobacterium leprae</i> by vaccination with a recombinant <i>M. bovis</i> BCG strain that secretes major membrane protein-II in mice.	Clin. Vaccine Immunol.	16	1399-1404	2009
T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, M. Makino.	Induction of cross-priming of naïve CD8 <sup>+</sup> T lymphocytes by recombinant Bacillus Calmette-Guérin that secretes heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein.	J. Immunol.	183	6561-6568	2009
Y. Fukutomi, Y. Maeda, M. Matsuoka, M. Makino.	Temperature Dependency for Survival of <i>Mycobacterium leprae</i> in Macrophages.	Jpn. J. lepr.	78	7-16	2009
Hatta, M., M. Makino, Ratnawati, Mashudi, Yadi, M. Sabir, N. Tandirogang, L. M. M. Rusyati, M. Kai, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, T. Mukai, Y. Maeda.	Detection of serum antibodies to <i>M. leprae</i> Major Membrane Protein-II in leprosy patients from Indonesia.	Leprosy Review	80	402-409	2009

Kobiyama K., Takeshita F., Ishii KJ, Koyama S., Aoshi T., Akira S., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A., Yamanaka Y., Hirano H., <u>Suzuki K.</u> , Okuda K..	A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class of vaccine adjuvant.	<i>J Immunol</i>	182	1593-1601	2009
Akama T., <u>Suzuki K.</u> , Tanigawa K., Kawashima A., Wu H., Nakata N., Osana Y., Sakakibara Y., <u>Ishii N.</u>	Whole genome tiling array analysis of <i>Mycobacterium leprae</i> RNA reveals high expression of pseudogenes and non-coding regions	<i>J Bacteriol</i>	191(10)	3321-3327	2009
Tanigawa K., <u>Suzuki K.</u> , Kimura H., Takeshita F., Wu H., Akama T., Kawashima A., <u>Ishii N.</u>	Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signalling in <i>Mycobacterium leprae</i> infection.	<i>Clin Exp Immunol</i>	156(2)	495-501	2009
Nakamura K., Akama T., Pham DB, Sekimura S., Tanigawa K., Wu H., Kawashima A., Hayashi M., <u>Suzuki K.</u> , <u>Ishii N.</u>	Detection of RNA expression from pseudogenes and noncoding genomic regions of <i>Mycobacterium leprae</i> .	<i>Microb Pathog</i>	47(3)	183-187	2009
Bang PD, <u>Suzuki K.</u> , Phuong LT, Chu TM, <u>Ishii N.</u> , Khang TH.	Evaluation of PCR-based detection of <i>Mycobacterium leprae</i> for the diagnosis of leprosy.	<i>J Dermatol</i>	36(5)	269-276	2009
Mikita N., Kanazawa N., Ozaki M., Kosaka M., <u>Ishii N.</u> , Nishimura H. Furukawa F..	No involvement of non-synonymous TLR2 polymorphism in Japanese leprosy patients.	<i>J Dermatol Sci</i>	54	48-49	2009

Li H-J, Kanazawa N., Nakatani Y., Furukawa F., Ozaki M., Kosaka M., Ishii N.	No involvement of the NOD1 polymorphism Glu266Lys in Japanese leprosy patients.	J Dermatol Sci	56	72-73	2009
鈴木幸一、 永岡 譲、 森 修一、 石井則久	2008年における世界のハンセン病の現況について	日本ハンセン病学会雑誌	78	25-34	2009
赤間 剛、 鈴木幸一、 谷川和也、 川島 晃、 Huhehasi Wu、 石井則久。	タイリングアレイを用いたらい菌全ゲノムにおける発現部位の検出	日本ハンセン病学会雑誌	78	49-54	2009
鈴木幸一、 中村和昭、 谷川和也、 川島 晃、 Huhehasi Wu、 赤間 剛、 林もゆる、 関村 慎、 Pham Dang Bang、 石井則久	らい菌ゲノム由来RNA発現の網羅的解析とその意味するもの	日本ハンセン病学会雑誌	78	61-65	2009
石井則久、 森 修一、 永岡 譲、 鈴木幸一	WHO 第9回ハンセン病制圧のための技術勧告(Technical Advisory Group: TAG)会議報告	日本ハンセン病学会雑誌	78	75-88	2009
永岡 譲、 石田 裕、 鈴木幸一、 石井則久	ミャンマーにおけるハンセン病制圧記念行事(2009)の報告	日本ハンセン病学会雑誌	78	251-253	2009
北見由季、 北見 周、 飯島正文、 石井則久	ネパール人男性に生じたハンセン病(BL型)の1例	皮膚科の臨床	51	483-486	2009
森山一隆、 菊池一郎、 石井則久	ハンセン病患者から生まれた子供たち-奄美大島における妊娠・出産・保育・養育のシステムの軌跡-	日本ハンセン病学会雑誌	78	231-250	2009

金澤伸雄、 三木田直哉、 李 洪錦、 中谷友美、 尾崎元昭、 小坂真紀、 石井則久、 西村泰行、 古川福実。	日本人のハンセン病発症にお ける細菌センサー分子の遺伝 子多型の関与	日本ハンセン病 学会雑誌	78	255-261	2009
石井則久	Hansen病の皮膚症状	皮膚病診療	31	1366-1370	2009
石井則久	ハンセン病の現況	日本皮膚科学会 雑誌	119	2573-2575	2009



#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## C

## ハンセン病

ハンセン病は顔や手足などの外観が侵されるため、古くから偏見・差別にさらされてきた。患者本人のみならず家族・親類までも差別の対象になり、生活全体にわたる迫害を受けてきた。1940年代になって治療薬が出現し、1980年代からは治癒可能な治療法も提案された。

「癩」、「らい」などと呼称されていたが、現在は「ハンセン病」が正式病名である。

## 1. 病 因

ハンセン病はらい菌 (*Mycobacterium leprae*) による慢性感染症である。らい菌は32℃前後が至適温度であるため皮膚が侵される。また、末梢神経のシュワン細胞に親和性があるために末梢神経障害（知覚障害、運動障害）も起こす<sup>1)</sup>。

発症に大きく関与する感染の機会、免疫能が完全でない乳幼児期に大量、頻回にらい菌を吸入すること（呼吸器感染）といわれている。潜伏期間は数年から数十年といわれている。感染から発病までに関与する因子は、個々人のらい菌に対する特異的な細胞性免疫能のほか、公衆衛生の程度、経済状態、栄養状態などの環境・社会的背景が重要といわれている。

日本においては毎年、日本人は数名、在日外国人は約6名の新規患者が報告されている。

## 2. 症状の特徴

皮疹は痒みのない白斑、紅斑、丘疹、結節、環状斑、びらん、潰瘍などさまざまであり、ハンセン病に特異な皮疹はない。比較的多く認められる皮疹は、紅斑、環状紅斑、丘疹、結節、衛星病巣を伴う紅斑局面などである（図1）<sup>2)</sup>。皮疹にほぼ一致して知覚（触覚、痛覚、温度覚）の鈍麻や麻痺を認める。また、末梢神経の肥厚や運動障害も



図1 ハンセン病 MB (LL)

浸潤性の紅斑局面があり、その外側には隆起性の環状紅斑を認める。らい性結節性紅斑 (ENL) を伴っている。

認める。発汗異常、脱毛などもみられる。

らい菌に対する生体の免疫能の差を病型として分類している（表1）。Ridley-Jopling分類と、WHO分類〔多菌型 (multibacillary ; MB)、少菌型 (paucibacillary ; PB)] があるが、初めて診療にあたる医師にはWHO分類は簡便である。

治療中、あるいは治療前後に急速な末梢神経の障害（疼痛、運動障害など）や皮疹の再燃や新生、発熱などが起こることがあるが、これをらい反応 (lepra reaction) とよんでいる。らい反応の症状で初診することもある。らい反応では重い後遺症を残すことがあるので、早期の治療が必要である。

## 3. 検査手順

神経学的検査（知覚、肥厚、運動など）、らい菌検出検査、病理組織検査が主体となる。ハンセ

表1 ハンセン病の病型分類

菌数による分類 (WHO 分類)	少菌型 (PB)	多菌型 (MB)
免疫学的分類 (Ridley-Jopling 分類)	(I) TT	<pre>                     B                    / \                   /   \                  BT  BB BL                     </pre> LL
細胞性免疫能	良好	低下/なし
局所の免疫	Th1, IL-2, IFN $\gamma$ , IL-12	Th2, IL-4, IL-5, IL-10
皮膚スメア検査	陰性	陽性
らい菌	少数/発見しがたい	多数
皮疹の数	少数	多数
皮疹の分布	左右非対称性	左右対称性
皮疹の性状	斑 (環状斑), 境界明瞭	紅斑 (環状斑), 丘疹, 結節
皮疹の表面	乾燥性, 無毛	光沢, 平滑
皮疹部の知覚異常	高度 (触覚, 痛覚, 温度覚)	軽度/正常
病理所見	類上皮細胞性肉芽腫 巨細胞, 神経への細胞浸潤	組織球の泡沫状変化
病理でのらい菌	陰性	陽性
主たる診断根拠	皮疹部の知覚異常	皮膚スメア検査などでらい菌の証明
感染性	なし	感染源になる

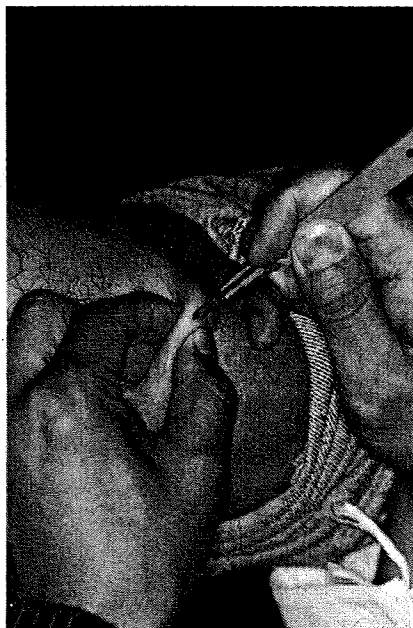


図2 皮膚スメア検査  
皮膚をつまみ上げ (血液の混入防止) メスを突き刺し, メス刃に組織液を付着させる。

ン病の検査は検体数が少ないため, ハンセン病研究センターでは, 病理組織検査, PCR 検査, 血清抗 PGL-I 抗体検査, 薬剤感受性遺伝子検査などを無料で実施している。

a. 神経学的検査

触覚, 痛覚, 温度覚などの知覚検査をする。神経の肥厚 (大耳介神経, 尺骨神経, 橈骨神経, 総腓骨神経など), 運動障害 (手足の屈曲, 物を掴む・挟む運動など) などの検査も行う。

b. らい菌検出の検査

らい菌は現在まで培養に成功していないため, 以下の検査で検出に努める。

1) 皮膚スメア検査

らい菌は皮膚 (真皮) に多く存在する。そのため皮膚組織液を採取し, 顕微鏡で検査することで, らい菌存在の有無が簡単に判明する。皮疹部, 耳朶などにメスを刺し, 組織液を掻き出す (図2)。メスに付着した組織液をスライドガラスに擦り付け, 抗酸菌染色する。その後 1,000 倍 (油浸) で検鏡する。菌の数 (菌指数: bacterial index; BI) を記載し, 病態・病型決定, 治療効果判定などに利用する。この検査は簡便であるが, 手技に慣れないと, 検出率が低下する欠点がある<sup>3)</sup>。

2) 病理組織特殊染色

病理組織を抗酸菌染色 (Fite 染色) する。手

技にばらつきはないが、Ziehl-Neelsen 染色では染色性が低下する。

### 3) PCR 検査

らい菌特異的な DNA を証明する。病変部皮膚の生標本、あるいは皮膚スミア検査に用いたメス刃を 70%エタノール入り小試験管（セラムチューブ）に入れたものを検体として用いると感受性・特異性が高くなる。

#### c. 病理組織検査

皮疹部の皮膚、肥厚した神経などを生検する。通常の HE 染色のほか、抗酸菌染色（らい菌を観察）、S100 染色（神経を観察）などを行う。

#### d. その他の検査

簡単な発汗の検査を行う。血清抗 PGL-I 抗体検査があるが、信頼性が低い。

## 4. 診断

皮疹（自覚症なし）、神経（知覚障害、肥厚、運動障害）、らい菌検出、病理組織検査の 4 項目を総合して診断する。ハンセン病と診断した場合、PB（皮膚スミア検査陰性か、皮疹が 1~5 個）か、MB（皮膚スミア検査陽性か、皮疹が 6 個以上）かを判断する。Ridley-Jopling 分類も行う。

## 5. 標準治療

治療の基本は、神経症状（神経炎、らい反応、後遺症など）を起こさず、らい菌を生体から排除することである。また、耐性菌をつくらないために多剤で治療する（多剤併用療法、multidrug therapy；MDT）。ハンセン病に用いられる治療薬は表 2 のように保険適用薬が 4 種類あるが、保険適用外にもらい菌に対して有効な抗菌薬もある。

2006 年に日本ハンセン病学会からハンセン病治療指針が提示された（表 3）<sup>4)</sup>。WHO が提示した治療<sup>5)</sup>を基本に、日本の医療事情にあわせて修飾してある。なお、WHO が世界に無料供給しているブリスターパック（毎日の内服する薬が

シートに記載されており、28 日分がパックになっているカレンダーシート。多菌型：WHO/MDT/MB と、少菌型：WHO/MDT/PB の 2 種類ある）と同じ内服方法になっている（月に 1 回のみ多量に内服し、残りの 27 日間は少量）。スミア検査（BI の数値）と皮疹の数が治療方針の決め手になる。

薬剤感受性検査で「耐性」と判断された薬剤については、OFLX や CAM, MINO などに変更する。

### 私の治療のコツと工夫

表 3 に記載した治療をするためには、スミア検査の技術を習得する必要があるが、現実に診療を担当する医師はハンセン病患者を初めてみることになる。そのため、治療法は WHO/MDT/MB に統一する。すなわち、PB においても MB と同じ治療薬を用いる。次に治療期間では、PB では 6 ヶ月間、MB では 2 年間とする。ただし、MB では 2 年後も皮膚症状が残っている場合にはさらに 1 年（合計 3 年間）内服する。症状の改善が緩慢な場合、患者は内服の継続が苦痛である。特に MB では 3 年間を最長として、患者に継続内服を促す。

なお、BI は 1 年で 1 程度低下する。6+ の場合は、菌の陰性化に 6 年程度必要である。表 3 の治療法に従うと、菌の陰性化まで内服治療が必要になり、6 年近く治療が必要な場合がある。しかし、菌陰性化まで継続して治療することの必要性については疑問も投げかけられている。

## 6. 重症化した場合の対応

重症化としては、らい反応がある。表 4 のようにステロイド内服で炎症を抑制することで、神経障害を最小に抑える<sup>4)</sup>。サリドマイドはらい性結節性紅斑（ENL）には著効するが、一般外来では入手できない。なお、らい反応中もハンセン病の治療は継続する。

表2 ハンセン病治療薬一覧

## 1. 保険適用薬

薬剤一般名 (略号)	商品名 (製薬会社名)	作用機序	用量	主な副作用
ジアフェニルスルホン (DDS)	レクチゾール (田辺三菱)	静菌的	100 mg/日	溶血性貧血
クロファジミン (CLF) (B663)	ランブレン (サンド)	静菌的*	50 mg/日	色素沈着, 皮膚乾燥
リファンピシン (RFP)	数社から発売	殺菌的	600 mg/日, 朝食前 または空腹時	赤色尿, 肝障害, 過敏症
オフロキサシン (OFLX)	タリビッド (第一三共)	殺菌的	400 mg~600 mg/ 日	過敏症

## 2. 保険適用外で有効な主な薬

薬剤一般名 (略号)	商品名 (製薬会社名)	作用機序	用量	主な副作用
レボフロキサシン (LVFX)	クラビット (第一三共)	殺菌的	200~300 mg/日	過敏症
スパルフロキサシン (SPFX)	スバラ (大日本住友)	殺菌的	100~200 mg/日夕 食後または夜間	光線過敏症
モキシフロキサシン (MFLX)	アベロックス (バイエル)	殺菌的	400 mg/日	悪心, 下痢
クラリスロマイシン (CAM)	クラリス, クラリシッ ド (大正, アボット)	静菌的* (殺菌的)	400 mg/日	発疹, ショック
ミノサイクリン (MINO)	ミノマイシン (ワイス)	静菌的* (殺菌的)	100 mg/日	色素沈着, めまい, 光 線過敏症

(注) \*: 一般的には静菌的であるが, らい菌には殺菌的に作用するとの報告がある.

[後藤正道ほか: ハンセン病治療指針 (第2版), 日ハンセン病会誌 75: 191-226, 2006 より改変]

表3 わが国におけるハンセン病化学療法 of 標準的方法

	MBでBI $\geq$ 3 あるいはBI不明例		MBでBI<3 あるいは発症後6ヵ月以 内でBI $\geq$ 3		PB	
使用薬剤と 投与方法	(WHO/MDT/MB) RFP 600 mg/月1回 CLF 300 mg/月1回 DDS 100 mg/毎日 CLF 50 mg/毎日		(WHO/MDT/MB) RFP 600 mg/月1回 CLF 300 mg/月1回 DDS 100 mg/毎日 CLF 50 mg/毎日		(WHO/MDT/PB) RFP 600 mg/月 DDS 100 mg/毎日	
標準投与期間	2年間		1年間		6ヵ月	
標準投与終了 後の状態	BI>0	BI=0	BI>0	BI=0	活動性 病変(+)	活動性 病変(-)
維持療法	あと1年MDT/MB, その後はBI=0で活 動性病変(-)まで DDS+CLFなどの2 剤以上を投与		投薬中止し 1年観察	あと1年 MDT/MB	投薬中止 1年観察	DDSまた はCLFを 活動性病変 (-)まで 投薬中止

[後藤正道ほか: ハンセン病治療指針 (第2版), 日ハンセン病会誌 75: 191-226, 2006 より改変]

表4 らい反応の治療

病型	BT, BB, BL, LL	BL, LL
起こり得る らい反応	1型らい反応(境界反応)	2型らい反応(らい性結節性紅斑, ENL)
治療	軽症: 非ステロイド消炎鎮痛薬 重症: 中等量以上のステロイド: プレドニゾン 1 mg/kg/日, 神経症状の消退まで十分量で, その後徐々に漸減, 4~6週間で半量, さらに2~3ヵ月かけて離脱, 神経学的所見の悪化時, 反応の再燃時は十分量まで増量.	軽症: 非ステロイド消炎鎮痛薬 重症: ステロイド: プレドニゾン 0.5~1 mg/kg/日から開始し漸減. クロファジミン: 緩徐に奏効, 100 mg/日から開始, 50 mg/日で長期使用が可能. サリドマイドが著効: 100 mg/日から開始し, 減量. ただし, 虹彩毛様体炎には単独の効果は少なく, ステロイドの併用が必要.

[後藤正道ほか: ハンセン病治療指針(第2版), 日ハンセン病会誌 75: 191-226, 2006 より改変]

## 7. 生活指導

日本人患者の場合は, 本人および家族などに時として病気に対するいわゆる「偏見」があり, 病名の告知やカルテへの病名記載などに十分な配慮が必要である. 在日外国人患者の場合は, 言葉の問題(意思の疎通が不十分), 診療代金(高価で払えない), 雇用主との関係(解雇や帰国の可能性)などがある.

また, 療養所退所者, 当初から外来通院している元患者などのハンセン病回復者の再発の早期発見も重要である.

現在は, 各医療機関で患者を診断した場合, 引き続き治療も行い, 普通の病気として対応してい

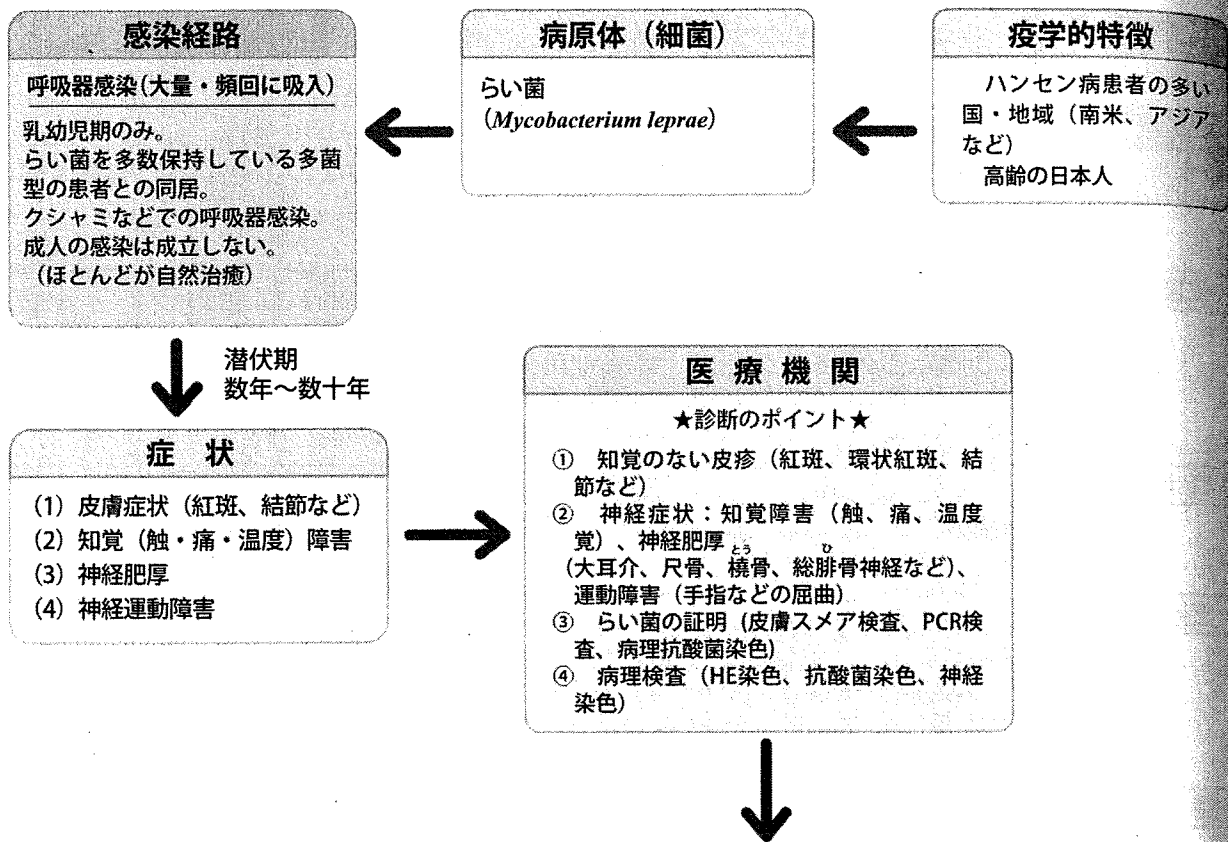
る. そのなかで診療や検査, 治療などの不明点などについてサポートすることで, 一般医療へのハンセン病の定着に努力している.

## 文献

- 1) 石井則久, 永岡 譲: Hansen 病. 診断と治療 95: 1591-1596, 2007
- 2) 小野友道ほか(編): ハンセン病アトラス, 金原出版, 東京, 2006
- 3) 石井則久ほか: 皮膚スメア検査のアンケート調査結果. 日ハンセン病会誌 76: 227-232, 2007
- 4) 後藤正道ほか: ハンセン病治療指針(第2版). 日ハンセン病会誌 75: 191-226, 2006
- 5) WHO: WHO のハンセン病欄 (<http://www.who.int/lep>).

# (17) ハンセン病

## Hansen's disease (Leprosy)



### ハンセン病の病型と治療

Ridley&Jopling 分類		LL	BL	BB	BT	TT	I
WHO 分類		多菌型 (MB)			少菌型 (PB)		
臨床	皮膚 (皮膚疹)	概ね 6 個以上 紅斑、小結節、結節 ほぼ左右対称性			概ね 1～5 個 紅斑、環状紅斑など 非対称性		
	神経	知覚障害は軽度 / 正常			知覚(触・痛・温度)障害高度		
皮膚疹部の菌		陽性			陰性		
治療	(WHO/MDT を改変)	リファンピシン 600 mg 1×/月 クロファジミン 300 mg 1×/月 クロファジミン 50 mg / 日 DDS 100 mg / 日			リファンピシン 600 mg 1×/月 DDS 100 mg / 日		
		} 1～3 年間			} 6 か月		

## 参考図書

- (1) 石橋康正他監修『ハンセン病の外來診療』メジカルセンス 1997
- (2) 厚生省『ハンセン病診断・治療指針』1997
- (3) 後藤正道他『ハンセン病治療指針(第2版)』(日本ハンセン病学会雑誌) 2006
- (4) 小野友道他『ハンセン病アトラス』金原出版 2006
- (5) 石井則久『皮膚抗酸菌症』金原出版 2008

## 発生状況

日本では、新規患者を毎年少数認める。日本人は数名で、高齢者の発症である。在日外国人は約8名で、ブラジルやアジア出身者が多い。2007年の全世界の新規患者数は約26万人と、減少している。

## 臨床症状

下記の診断ポイントが重要

- ① 知覚障害を伴う皮疹
- ② 手足の知覚麻痺(気づかぬ火傷、外傷もおこる)
- ③ 末梢神経の肥厚(大耳介、尺骨神経など)

病型は、各個人のらい菌に対する特異的な免疫能の低下の程度と生体内のらい菌の菌数により、多菌型(multibacillary:MB)(従来のLLなどが相当)と、少菌型(paucibacillary:PB)(従来のTTなどが相当)に分類する。

ハンセン病の治療前、治療中、治療後に急性の炎症性反応が起こることがあり、「らい反応」という。急速に皮疹が増加したり再燃、また神経痛や末梢神経腫脹、眼の炎症などがおこる。

## 検査所見

皮膚スミア検査を実施し、らい菌の有無を検索

PCR検査(らい菌に特異的なDNAの検出)

鑑別:サルコイドーシス、皮膚リーシュマニア症、皮膚結核、リンパ腫、梅毒、環状紅斑、環状肉芽腫、尋常性白斑、レックリングハウゼン病、多発性単神経炎など種々の疾患がある。

## 病原体

らい菌(*Mycobacterium leprae*)。抗酸菌の一種で、現在まで人工培養できていない。

## 感染経路

多菌型(MB)未治療患者との乳幼児期における大量・頻回の接触(呼吸器感染)。

発病力は極めて弱い。らい菌に対して特異的に免疫の低下している乳幼児が、MB患者と長期間にわたる接触(呼吸器感染)により感染するが、多くは自然治癒する。ごく稀に長期間の潜伏を経て発病する。発病にいたるには、各個人の免疫能力のほかに、栄養状態、経済状態、衛生状態など多くの因子が関与する。

## 潜伏期

数年～数十年

## 治療方針

ハンセン病は感染症であり抗菌薬治療が基本であり、WHOの推奨する多剤併用療法(multidrug therapy:MDT)を改変して治療する。

多菌型(MB)では殺菌力の強いリファンピシンの他にクロファジミンとDDSの合計3剤を用いる。少菌型(PB)ではリファンピシンとDDSの2剤(クロファジミンを追加しても可)を用いる。治療期間は、MBでは臨床症状と菌の減少を勘案して1～3年間、PBでは6か月間とする。

らい反応では、ハンセン病の治療を継続したまま、ステロイド剤の内服を行う。



# GM-CSF-mediated T-cell activation by macrophages infected with recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *Mycobacterium leprae*

Masahiko Makino, Yumi Maeda, Masanori Kai, Toshiki Tamura & Tetsu Mukai

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

**Correspondence:** Masahiko Makino, Department of Microbiology, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-2-1 Aobacho, Higashimurayama, Tokyo 189-0002, Japan. Tel.: +81 42 3918059; fax: +81 42 3918212; e-mail: mmaki@nih.go.jp

Received 14 July 2008; revised 18 October 2008; accepted 23 October 2008.  
First published online 8 December 2008.

DOI:10.1111/j.1574-695X.2008.00495.x

Editor: Patrick Brennan

## Keywords

macrophage; *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette–Guerin (BCG); *Mycobacterium leprae*; GM-CSF; T-cell activation; interleukin-10.

## Introduction

Leprosy is a chronic infectious disease induced by parasitic infection with *Mycobacterium leprae* (Stoner, 1979). Despite the marked reduction in the number of both registered leprosy cases and new cases, a significant number of new cases (254 525 for the year 2007) are still detected each year (World Health Organization, 2008). The emergence of multidrug-resistant *M. leprae* (Kai *et al.*, 2004), although still few in number, and the complexity of leprosy reactions are distressing (Moschella, 2004). These observations indicate the urgent need to develop an efficacious vaccine against leprosy. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette–Guerin (BCG) has been known to provide partial protection against the development of leprosy (Ponnighaus *et al.*, 1992). However, meta-analyses conducted by Setia *et al.* (2006) demonstrated an overall protective effect of only 26% against leprosy. There seem to be several reasons why BCG is not as effective as previously predicted. One of them may be

## Abstract

The potential of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette–Guerin (BCG) needs to be augmented to efficiently activate CD4<sup>+</sup> T cells through macrophages. *Mycobacterium leprae*-derived recombinant major membrane protein (MMP)-II induced GM-CSF production from macrophages. A recombinant BCG-SM that secretes MMP-II more efficiently produced GM-CSF and activated interferon (IFN)- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells than did vector control BCG when infected with macrophages. The T-cell activation by BCG-SM was dependent on the GM-CSF production by macrophages. Interleukin (IL)-10 production by macrophages stimulated with *M. leprae* was inhibited in a GM-CSF-dependent manner when the precursor monocytes were infected with BCG-SM. BCG inducing GM-CSF production was effective in macrophage-mediated T-cell activation partially through IL-10 inhibition.

that the human immune cells most susceptible to BCG infection are macrophages (Grode *et al.*, 2005). On entry into macrophages, mycobacteria inhibit phagosome–lysosome fusion, which results in a less efficient stimulation of interferon (IFN)- $\gamma$ -producing type 1 CD4<sup>+</sup> T cells (Ridley & Jopling, 1966; Frehel & Rastogi, 1987). Further, BCG as well as pathogenic mycobacteria can induce the production of an abundant amount of interleukin (IL)-10 from macrophages (Yamamura *et al.*, 1991), which inhibits activation of CD4<sup>+</sup> T cells (Jonuleit *et al.*, 2001; Granelli-Piperno *et al.*, 2004). Moreover, it has been demonstrated in a murine study that BCG primarily infects macrophages *in vivo*, and the active proliferation of T cells *in vivo* needs the enrolment of dendritic cells (DC). Further, DC are known to be the most professional antigen-presenting cells (APC) in terms of T-cell activation. Thus, the transfer to DC of antigens produced by the processing of intracellular BCG or of proteins secreted from the mycobacteria in macrophages, seems to be important (Winau *et al.*, 2006).

We previously identified major membrane protein (MMP)-II (gene name, *bfrA* or ML2038), which is originally identified as bacterioferritin (Pessolani *et al.*, 1994) and localized in the cell membrane, as one of the dominant antigen of *M. leprae* (Maeda *et al.*, 2005; Makino *et al.*, 2005). Recombinant (r) MMP-II-pulsed DC activate naïve CD4<sup>+</sup> T cells to produce IFN- $\gamma$  in an antigen-specific manner, and also stimulate T cells from not only paucibacillary leprosy, a representative clinical leprosy at one pole of the clinical spectrum, but also multibacillary leprosy, a representative leprosy at the opposite pole (Makino *et al.*, 2005). The activation of type 1 CD4<sup>+</sup> T cells is closely associated with the inhibition of the spread of *M. leprae in vivo* as observed in paucibacillary leprosy (Sieling *et al.*, 1999). In this respect, it was interesting to find that T cells from some paucibacillary leprosy patients seemed to be primed with MMP-II antigen *in vivo* (Makino *et al.*, 2005). Therefore, MMP-II was considered to be an immunodominant antigen of *M. leprae*. We constructed an rBCG strain (BCG-SM) that secretes MMP-II of *M. leprae* (Makino *et al.*, 2006). BCG-SM-infected DC stimulated quite efficiently both human naïve CD4<sup>+</sup> T cells and naïve CD8<sup>+</sup> T cells *in vitro*, and MMP-II-specific memory T cells were produced in mice inoculated with BCG-SM (Makino *et al.*, 2006).

Macrophages are heterogeneous in various aspects (Randolph *et al.*, 1999), and their differentiation is largely influenced by the cytokine milieu (Nakata *et al.*, 1991; Akagawa, 2002). Previously, we analysed the characteristics of two distinct macrophage subsets: rGM-CSF-mediated macrophages (GM-M $\phi$ ) and rM-CSF-mediated macrophages (M-M $\phi$ ) (Makino *et al.*, 2007). Both macrophages were equally susceptible to mycobacterial infection *in vitro*, but M-M $\phi$  infected with *M. leprae* did not activate CD4<sup>+</sup> T cells even after activation using both CD40 ligand and exogenous IFN- $\gamma$ . Likewise, *Mycobacterium tuberculosis*-infected M-M $\phi$  failed to stimulate T cells (Verreck *et al.*, 2004). Further, a large amount of IL-10 was produced from M-M $\phi$  on stimulation with mycobacteria. Therefore, the fact that mycobacteria are highly susceptible to phagocytosis by M-M $\phi$  and poorly stimulate T cells through M-M $\phi$ , may be closely associated with the affinity of mycobacteria to macrophages, the induction of a latent infection and, in some cases, the development of disease. Likewise, M-M $\phi$  is one of the major target immune cells of BCG infection. However, to control the subsequently invading pathogenic mycobacteria, such as *M. leprae*, by producing memory T cells, modified BCG including the newly developed recombinant BCG-SM is required to be able to fully stimulate T cells even if M-M $\phi$  are the initial target host cells.

In this report, we examined the T-cell-stimulating ability of BCG-SM-infected M-M $\phi$ , and further assessed the influence of BCG-SM on the IL-10-producing activity of M $\phi$  upon a challenge with *M. leprae*.

## Materials and methods

### Preparation of cells and bacteria

Peripheral blood was obtained from healthy purified protein derivative (PPD)-positive individuals with informed consent. In Japan, most healthy individuals are PPD-positive due to a compulsory BCG vaccination for children (0–4 years old). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using Ficoll-Paque Plus (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and cryopreserved in liquid nitrogen until use as previously described (Makino & Baba, 1997). For the preparation of peripheral monocytes, CD3<sup>+</sup> T cells were removed from freshly isolated heparinized blood or from cryopreserved PBMC using immunomagnetic beads coated with anti-CD3 monoclonal antibody (mAb) (Dynabeads 450, Dynal, Oslo, Norway). The CD3<sup>-</sup> PBMC fraction was plated on collagen-coated plates and nonadherent cells were removed by extensive washing. The remaining adherent cells were used as monocytes (Makino & Baba, 1997). Macrophages were generated by culturing monocytes in the presence of 20% foetal calf serum and either rM-CSF (R and D Systems, Abingdon, UK) (M-M $\phi$ ) or rGM-CSF (PeproTech EC Ltd, London, UK) (GM-M $\phi$ ) (Makino *et al.*, 2007). Both GM-M $\phi$  and M-M $\phi$  were pulsed with rBCGs on day 3 or 5 of culture, and were used as a stimulator of T cells on day 5 or 7 (Makino *et al.*, 2007). A recombinant BCG that secretes *M. leprae*-derived MMP-II was constructed as described previously (Makino *et al.*, 2006). In brief, a shuttle vector, pMV-261, having a kanamycin resistance gene and origins of replication for *Escherichia coli* and mycobacteria was used to construct pMV-SM (Secreting MMP-II) having the MMP-II cDNA fragment. The BCG substrain Pasteur was cultured *in vitro* using Middlebrook 7H9 broth (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA) supplemented with 0.05% Tween 80 and 10% albumin–dextrose–catalase (BD). Expression vectors were introduced into BCG by electroporation (Snapper *et al.*, 1988). Transformants were selected on Middlebrook 7H10 agar (BD) plates supplemented with 10% OADC (BD) and 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  kanamycin. Mycobacteria were subsequently grown in Middlebrook 7H9 broth containing 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of kanamycin. BCG containing pMV-SM as an extrachromosomal plasmid is referred to as BCG-SM, and BCG containing pMV-261 is referred to as BCG-pMV (vector control BCG). *Mycobacterium leprae* (Thai-53) was isolated from the footpads of BALB/c-*nu/nu* mice (McDermott-Lancaster *et al.*, 1987). The isolated bacteria were counted using Shepard's method (McDermott-Lancaster *et al.*, 1987). The multiplicity of infection (MOI) was determined based on the assumption that macrophages were equally susceptible to infection with BCG or *M. leprae* (Hashimoto *et al.*, 2002). A recombinant MMP-II protein was produced as reported previously (Maeda *et al.*, 2005). Briefly,

the MMP-II gene (ML2038) was inserted into the expression plasmid pET28 (Novagen, Madison, WI) and transformed into *E. coli* strain ER2566 (New England BioLabs, Ipswich, MA). The expressed protein was eluted using Whole Gel Eluter (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). As a control for *M. leprae* antigen, we have purified hsp18 (ML1795) in *E. coli* using the PET expression system. The cytosolic fraction of the parental BCG was obtained as described previously (Maeda *et al.*, 2003).

### Antigen-presenting function of rBCG-infected macrophages

The ability of rBCG-infected macrophages to stimulate T cells was assessed using an autologous macrophage-T cell coculture system as previously described (Wakamatsu *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2002). The responder CD4<sup>+</sup> T cells were purified from freshly thawed PBMC using a CD4-negative isolation kit (Dynabeads 450) (Wakamatsu *et al.*, 1999). The purity of CD4<sup>+</sup> T cells was > 95% as assessed by FACS. The purified responder cells ( $1 \times 10^5$  per well) were plated in 96-well round-bottom tissue culture plates and macrophages were added to give the indicated macrophage:CD4<sup>+</sup> T-cell ratio. Supernatants of macrophage-T cell cocultures were collected on day 4. To identify molecules restricting T-cell activation, the following purified mAbs were used: anti-HLA-DR Ab (L243) and anti-CD86 Ab [IT2.2, Becton Dickinson (BD), San Jose, CA]. The concentration of IFN- $\gamma$  produced by CD4<sup>+</sup> T cells was quantified using an enzyme assay kit, OptEIA Human enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Set (BD). In some cases, M-M $\phi$  were pulsed with BCG-SM in the presence of  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  of either normal rat IgG or neutralizing mAb to GM-CSF (rat IgG2a) (BD).

### Production of IL-10 and GM-CSF by macrophages

The ability of M-M $\phi$  to produce IL-10 on stimulation with *M. leprae* was assessed. The monocytes were pretreated with the indicated dose of rBCG and subsequently made to differentiate into M-M $\phi$  by culturing for 5 days in the presence of rBCG and M-CSF. These macrophages were stimulated with *M. leprae* at the indicated MOI for 24 h. In some cases, monocytes were infected with BCG-SM in the presence of  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  of neutralizing mAb to GM-CSF. Also, the ability of M-M $\phi$  to produce GM-CSF on stimulation with rBCG for 24 h was assessed. The concentration of these cytokines was quantified using OptEIA Human ELISA Set (BD).

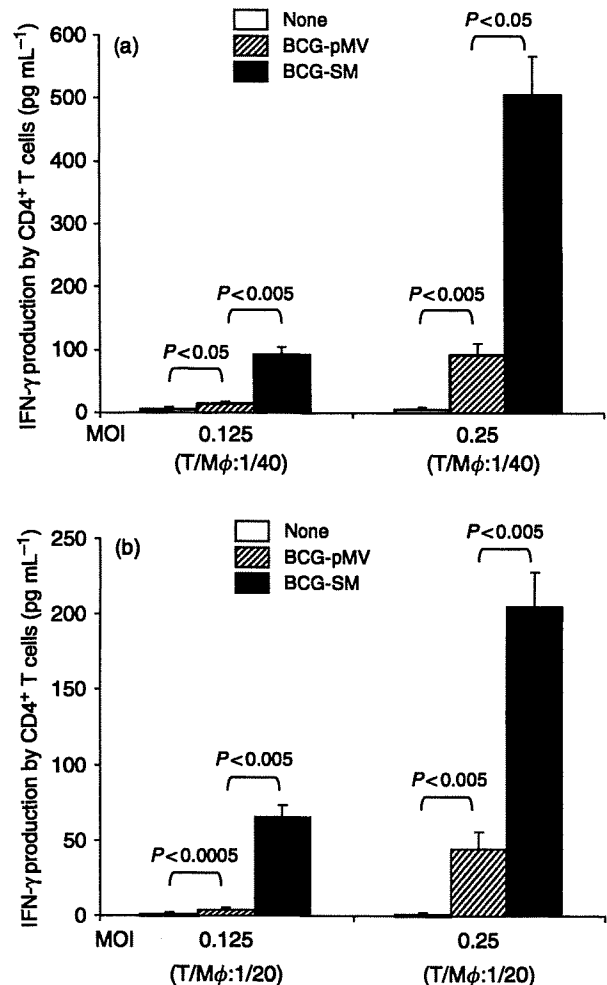
### Statistical analysis

Student's *t*-test was applied to determine statistical differences.

## Results

### Effect of rBCG-infected macrophages on T-cell-stimulating activity

We analysed the T-cell-stimulating activity of rBCG-infected GM-M $\phi$  and M-M $\phi$  (Fig. 1). GM-M $\phi$  infected with either BCG-SM or BCG-pMV significantly stimulated CD4<sup>+</sup>



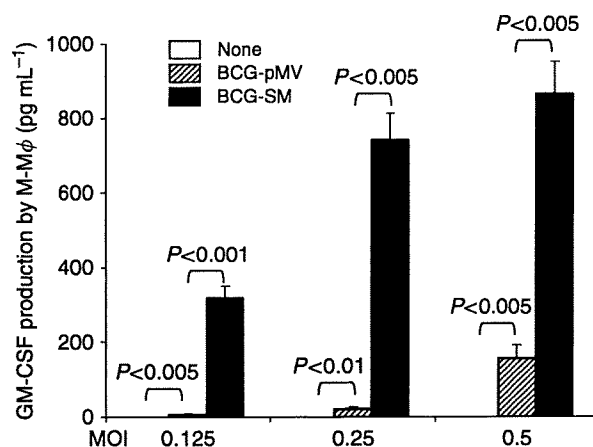
**Fig. 1.** Production of IFN- $\gamma$  by CD4<sup>+</sup> T cells. (a) GM-M $\phi$ , differentiated by 3 days of culture with rGM-CSF from monocytes, were infected with BCG-pMV (vector control BCG) or BCG-SM (rBCG that secretes MMP-II) at the indicated MOI, and cultured for another 2 days. These GM-M $\phi$  were used as a stimulator of CD4<sup>+</sup> T cells ( $1 \times 10^5$  cells per well) at a T cell : GM-M $\phi$  ratio of 40 : 1 in a 4-day culture. (b) M-M $\phi$ , differentiated by 5 days of culture with rM-CSF from monocytes, were infected with BCG-pMV or BCG-SM at the indicated MOI, and cultured for another 2 days. M-M $\phi$  were then used as a stimulator of CD4<sup>+</sup> T cells ( $1 \times 10^5$  cells per well) at a T cell : M-M $\phi$  ratio of 20 : 1 in a 4-day culture. A representative experiment based on three separate experiments conducted using three separate PPD-positive individuals is shown. Assays were performed in triplicate and the results are expressed as the mean  $\pm$  SD. Titres were statistically compared using Student's *t*-test.

T cells. However, a larger amount of IFN- $\gamma$  was produced by the T cells when GM-M $\phi$  were infected with BCG-SM (Fig. 1a), although BCG vaccination did not prime for MMP-II-specific T-cell response (not shown). We then analysed the T-cell-stimulating activity of BCG-infected M-M $\phi$  (Fig. 1b). Again, M-M $\phi$  infected with BCG-SM induced a higher amount of IFN- $\gamma$  production by T cells than did BCG-pMV-infected M-M $\phi$ , although the IFN- $\gamma$  production was less efficient than that induced by rBCG-infected GM-M $\phi$  even though higher doses of BCG-infected M-M $\phi$  were used as a stimulator.

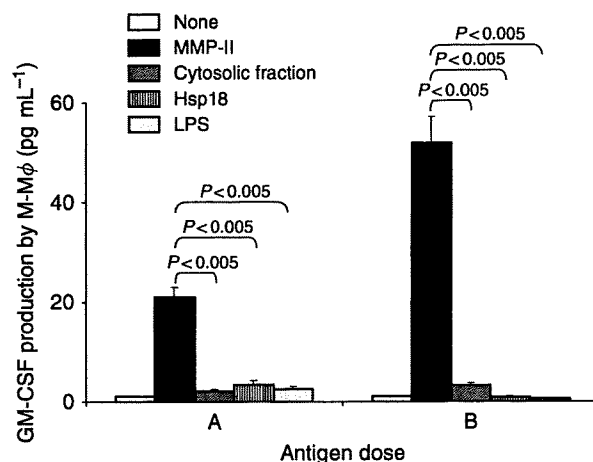
### Factors associated with the induction of the T-cell-stimulating activity of M-M $\phi$

To define the factors associated with the CD4<sup>+</sup> T-cell activation by BCG-SM-infected M-M $\phi$ , we phenotypically analysed M-M $\phi$  infected with either BCG-pMV or BCG-SM. There was no significant difference between BCG-pMV-infected M-M $\phi$  and BCG-SM-infected M-M $\phi$  in the expression of HLA-DR, CD86 or CD40 molecules (not shown). The cytokines produced by M-M $\phi$  stimulated with rBCGs, including GM-CSF and IL-23, were examined. Both rBCGs induced GM-CSF production, but BCG-SM did so more efficiently than BCG-pMV (Fig. 2). However, IL-23 was not produced by M-M $\phi$  on stimulation with either BCG-pMV or BCG-SM. We also assessed whether rMMP-II protein can induce GM-CSF production in macrophages. Whereas *M. leprae*-derived cytosolic protein (not shown), other mycobacterial proteins such as BCG-derived cytosolic protein (5–10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), control recombinant *M. leprae* antigen (hsp18), and lipopolysaccharide (amount present with rMMP-II protein) did not stimulate M $\phi$ , MMP-II induced GM-CSF production in a concentration-dependent manner (Fig. 3). rMMP-II also efficiently induced the production of other cytokines including tumour necrosis factor (TNF) $\alpha$  and IL-12p40 from M $\phi$  (not shown).

We examined the influence of surface antigens on M-M $\phi$ . The T-cell-stimulating activity of BCG-SM-infected M-M $\phi$  was significantly inhibited when the infected M-M $\phi$  were pretreated with the mAb to HLA-DR or CD86 antigens, whereas the control IgG did not affect IFN- $\gamma$  production by T cells (Fig. 4a). However, IFN- $\gamma$  production was partially inhibited when BCG-SM-infected M-M $\phi$  were treated with the mAb to MMP-II (not shown). Next, we examined the effect on T-cell activation of GM-CSF produced by M-M $\phi$  stimulated with BCG-SM (Fig. 4b). When M-M $\phi$  were infected with BCG-SM in the presence of the neutralizing mAb to GM-CSF, IFN- $\gamma$  production by CD4<sup>+</sup> T cells was significantly inhibited. The T-cell-stimulating activity of BCG-SM-infected M-M $\phi$  was not affected by normal rat IgG.



**Fig. 2.** Production of GM-CSF by M-M $\phi$ . M-M $\phi$  differentiated by 5 days of culture with rM-CSF from monocytes, were stimulated with BCG-pMV or BCG-SM for 24 h at the indicated MOI. A representative experiment based three separate experiments conducted using three separate PPD-positive individuals is shown. Assays were performed in triplicate and the results are expressed as the mean  $\pm$  SD. Titres were statistically compared using Student's *t*-test.



**Fig. 3.** GM-CSF production by M-M $\phi$ . M-M $\phi$  obtained after 5 days of culture with rM-CSF were stimulated for 24 h with rMMP-II, the BCG-derived cytosolic fraction or *Mycobacterium leprae*-derived hsp18 antigen [dose of antigen in (a) 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and that in (b) 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]. Lipopolysaccharide, assumed to be present with rMMP-II protein (660  $\text{ng mg}^{-1}$  MMP-II protein), was used as a negative control (lipopolysaccharide in (a) 3.3  $\text{ng mL}^{-1}$  and that in (b) 6.6  $\text{ng mL}^{-1}$ ). A representative experiment based on three separate experiments conducted using three separate PPD-positive individuals is shown. Assays were performed in triplicate and the results are expressed as the mean  $\pm$  SD. Titres were statistically compared using Student's *t*-test.

### Effect of infection of monocytes with BCG on IL-10 production by M-M $\phi$

Macrophages are one of the cells most sensitive to *M. leprae* infection and M-M $\phi$  produce abundant IL-10 when infected with the bacteria (Makino et al., 2007). As precursor