

FIGURE 5. A, Expression of MMP-II on DCs. Immature DCs were either treated with 50 μM chloroquine for 2 h or untreated and subsequently infected with either BCG-261H or BCG-D70M at an MOI of 0.25. After 2 d culture in the presence of rGM-CSF and rIL-4, DCs were gated and analyzed. Dotted lines, control normal IgM; solid lines, anti-MMP-II mAb (IgM). The number in the top right corner of each panel represents the mean ± SD for six independent experiments of the difference in mean fluorescence intensity between the control IgM and the test mAb. Representative results of six separate experiments are shown. B, Effect of chloroquine treatment of DCs and macrophages on the activation of T cells. Immature DCs from 4 d of culture were treated with chloroquine (50 μM, 2 h) or untreated and subsequently infected with BCG-D70M at the indicated MOI. These DCs were used as the stimulator of responder autologous naive CD4⁺ T cells or naive CD8⁺ T cells (1 × 10⁵/well) at T/DC ratio of 40:1 or 20:1, as indicated. Macrophages from 5 d of culture in the presence of M-CSF were treated with chloroquine as above and subsequently infected with BCG-D70M at the indicated MOI. These macrophages were used as the stimulator of responder autologous unseparated CD4⁺ T cells (1 × 10⁵/well) at T/DC ratio of 20:1. IFN-γ produced by T cells was measured. C, Effect of treatment of immature DCs with brefeldin A or lactacystin on the activation of naive CD8⁺ T cells. Immature DCs from 4 d of culture were treated with the indicated dose of brefeldin A or lactacystin or untreated and subsequently infected with BCG-D70M at the indicated MOI. These DCs were used as the stimulator of responder autologous naive CD8⁺ T cells (1 × 10⁵/well) at T/DC ratio of 20:1. IFN-γ produced by T cells was measured. A representative of three separate experiments is shown. Assays were performed in triplicate, and the results are expressed as the mean ± SD. Titers were statistically compared using Student *t* test.

inhibited by chloroquine. Also, on treatment of macrophages with chloroquine, ~90% of IFN-γ produced from CD4⁺ T cells by BCG-D70M stimulation (MOI: 0.25 and 0.50) was inhibited. Similarly, the production of IFN-γ from naive CD8⁺ T cells was significantly inhibited by the chloroquine treatment of DCs, which were subsequently infected with BCG-D70M (MOI: 0.25 and 0.50). We further confirmed that BCG-D70M secreted 92 kDa protein (molecular mass: MMP-II 22 kDa and HSP70 70 kDa) *in vitro* (not shown). These results suggest the possibility that the secreted HSP70-MMP-II fusion protein is one of the responsible elements for the activation of both CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells as observed in BCG-70M. Further, we previously reported that BCG-70M stimulated naive CD8⁺ T cells through TAP- and proteasome-dependent cytosolic cross-presentation pathway, because the T cell activation was inhibited by the pretreatment of DCs with brefeldin A and lactacystin (25). In this study, we assessed whether BCG-D70M activates naive CD8⁺ T cells by using the similar cross-presentation pathway (Fig. 5C). When immature DCs were treated with either brefeldin A or lactacystin and were subsequently infected with BCG-D70M at MOI 0.25 or

0.50, the IFN-γ production from naive CD8⁺ T cells was significantly inhibited.

Effect of CD4⁺ T cells on the activation of naive CD8⁺ T cells

Because BCG-D70M activated both naive CD4⁺ T cells and naive CD8⁺ T cells, we assessed the influence of the presence of CD4⁺ T cells on the activation of naive CD8⁺ T cells (Fig. 6A). The naive unseparated T cell population was stimulated with DCs infected with BCG-261H or BCG-D70M, and CD8⁺ T cells were gated and analyzed by FACS. Compared to CD8⁺ T cells stimulated with BCG-261H, the BCG-D70M-stimulated naive CD8⁺ T cells produced significantly higher number of perforin-producing CD8⁺ T cells and CD62L^{low} CD8⁺ T cells. Further, CCR7^{low} CD8⁺ T cells and CD27^{low} CD8⁺ T cells were more efficiently produced by BCG-D70M stimulation (Fig. 6A). The efficient production of these CD8⁺ T cells was observed with different doses of BCG; however, in the absence of naive CD4⁺ T cells, these changes were not induced (not shown). Also, CD4⁺ T cells producing intracellular perforin was not produced from naive CD4⁺ T cells by the stimulation with BCG-D70M-infected

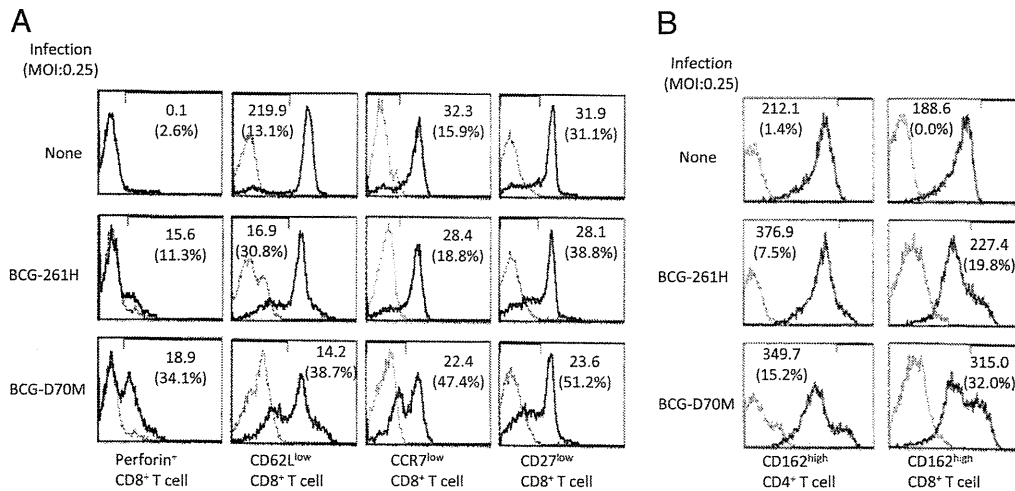


FIGURE 6. *A*, Perforin production and expression of activation or memory marker on naive CD8⁺ T cells stimulated with DCs infected with BCG-D70M. Monocyte-derived DCs were infected with either BCG-261H or BCG-D70M at an MOI of 0.25 and were cocultured with naive T cells (T/DC 20:1) for 5 d. The stimulated CD8⁺ T cells were gated and analyzed for perforin production and expression of the indicated molecules. The number in the top right corner of each panel represents the difference in the fluorescence intensity between the control IgG and the test mAb. The number in the parenthesis indicated either percent perforin-positive CD8⁺ T cells or CD8⁺ T cells expressing the test Ags among CD8⁺ T cell population. *B*, Expression of migration marker on naive T cells. Monocyte-derived DCs were infected with either BCG-261H or BCG-D70M at an MOI of 0.25 and were cocultured with naive T cells (T/DC 20:1) for 5 d. The stimulated T cells of either CD4⁺ or CD8⁺ subsets were gated and analyzed for expression of CD162 molecules. The number in the top right or left corner of each panel represents the difference in the fluorescence intensity between the control IgG and the test mAb. The number in the parentheses indicated percent CD162^{high} T cells among CD4⁺ or CD8⁺ T cell population. A representative of three separate experiments is shown. Assays were performed in triplicate, and the results are expressed as the mean \pm SD. Titers were statistically compared using Student *t* test.

DCs. These results indicate that BCG-D70M may produce effector CD8⁺ T cells having killing activity and memory type CD8⁺ T cells efficiently from naive population. When BCG is used as a vaccine, it is required to produce memory T cells having a high migratory function (34). To examine this point, we assessed the expression of CD162 molecules on both CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells, which were stimulated with DCs infected with BCG-D70M (Fig. 6*B*). On BCG-D70M stimulation, both CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells that express high levels of CD162 Ag were produced more efficiently than by the stimulation with BCG-261H. A similar difference between BCG-261H and BCG-D70M was induced when different doses of BCG were used (not shown).

Production of T cells responsive to the secondary stimulation by BCG-D70M in vivo

The ability of BCG-D70M to produce T cells highly responsive to the secondary in vitro stimulation was examined by in vivo functional studies (Fig. 7). C57BL/6 mice were s.c. inoculated with 1×10^3 /mouse of rBCGs 4 wk prestimulation in vitro. Both MMP-II and HSP70 proteins were used as a restimulator. These proteins induced IFN- γ production from T cells in all infected or uninfected mice because they have high immunogenicity, and BCG-Tokyo, a parental strain of all rBCGs, has the gene encoding BCG-derived MMP-II. However, splenic T cells from BCG-D70M-infected mice respond most vigorously to the stimulators and produced higher doses of IFN- γ (Fig. 7*A*) and IL-2 (not shown) than those from mice uninfected or infected with control rBCGs including BCG-261H, BCG- Δ UT-11-3, and BCG-70M. To examine the long-term effect of the inoculation of rBCGs on the production of such responsive T cells, C57BL/6 mice were s.c. inoculated with 1×10^3 /mouse of rBCGs 12 wk before the restimulation. Again, a significantly higher dose of IFN- γ (Fig. 7*B*) was produced from splenic T cells obtained from mice inoculated with BCG-D70M by the stimulation with MMP-II and HSP70 than those from mice uninfected or infected with control rBCGs.

Effect of BCG-D70M vaccination on the multiplication of *M. leprae* in vivo

C57BL/6 mice vaccinated with either BCG-261H or BCG-D70M (1×10^3 CFU/mouse) for 4 wk were challenged with 5×10^3 *M. leprae* in the footpad. Thirty-two weeks later, the footpad was removed, and the *M. leprae* recovered from the footpad was enumerated (Fig. 8). A total of 2×10^5 *M. leprae* were recovered from mice inoculated with PBS and challenged with *M. leprae*. Although the mice vaccinated with BCG-261H inhibited the multiplication of *M. leprae* significantly, the BCG-D70M vaccination significantly and more efficiently inhibited the *M. leprae* multiplication than BCG-261H. A similar difference was observed when 1×10^2 CFU/mouse rBCG was inoculated for the inhibition of *M. leprae*.

Discussion

M. leprae is well-known as a representative slow-growing *Mycobacterium*. Usually, *M. leprae* needs 12–14 d for one division and at least 2–5 y for the manifestation of the disease. In vivo studies using the immunodeficient nude mouse indicate that adaptive immunities play an important role in inhibiting the multiplication of *M. leprae*, and the activation of both CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells is an essential element for controlling *M. leprae* infection (5, 6, 35). Although CD4⁺ T cells chiefly act at the initial phase of infection, the contribution of CD8⁺ T cells in terms of IFN- γ production and killing of mycobacteria-infected host cells is necessary in the chronic phase of the infection (36). BCG was used so far as vaccine against leprosy; however, its efficacy is nowadays considered not as convincing as expected (12). The reason for why BCG cannot prevent the leprosy manifestation convincingly may be due to its inadequate ability to stimulate T cells. The poor T cell-stimulating activity seems to be based on the intrinsic defect of BCG not being able to enter the lysosome feasibly. Also, poor stimulation of T cells would result in the meager production of competent memory T cells, including both CD4⁺ and CD8⁺ subsets, capable of convincingly responding

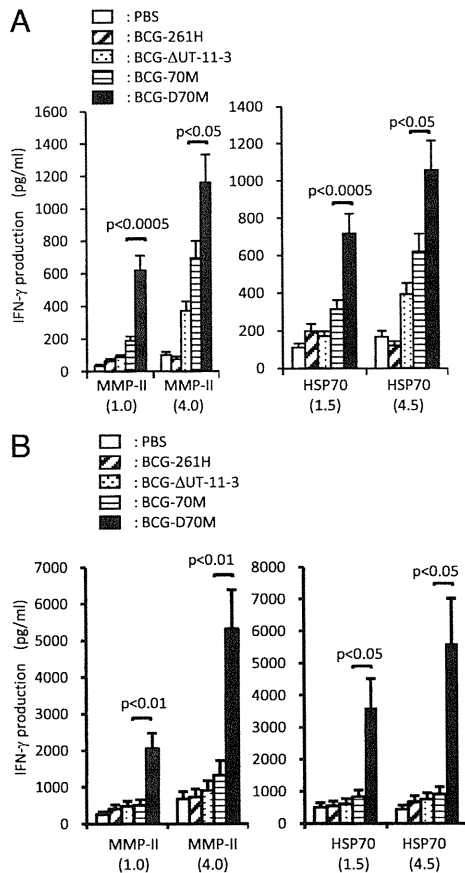


FIGURE 7. *A*, Production of T cells responsive to the secondary in vitro stimulation in C57BL/6 mice by infection with rBCG. Three 5-wk-old C57BL/6 mice per group were infected with 1×10^3 CFU/mouse BCG-261H, BCG- Δ UT-11-3, BCG-70M, or BCG-D70M s.c. Four weeks postinoculation, splenocytes (2×10^5 cells/well) were stimulated with the indicated dose of either MMP-II or HSP70 for 4 d in vitro, and IFN- γ produced in the cell supernatant was measured. *B*, Production of T cells capable of responding to the secondary stimulation in C57BL/6 mice a long time postinfection with rBCG. Three 5-wk-old C57BL/6 mice per group were infected with 1×10^3 CFU/mouse rBCGs s.c. Twelve weeks postinoculation, splenocytes (2×10^5 cells/well) were stimulated with the indicated dose of either MMP-II or HSP70 for 3 d in vitro, and IFN- γ produced in the cell supernatant was measured. Assays were performed in triplicate for each mouse, and the results of three mice per group are shown as the mean \pm SD. Representative results of three separate experiments are shown. Titers were statistically compared using Student *t* test.

to mycobacterial Ags. Especially, BCG cannot activate naive CD8⁺ T cells adequately in the absence of CD4⁺ T cell-derived help (14), so that BCG may poorly control the disease in the chronic phase or in the inhibition of disease manifestation for a long time postinfection (14). This fact is important when the growth rate of *M. leprae* is taken into account.

However, BCG has also intrinsic benefit, because it activates human naive CD4⁺ T cells to produce IFN- γ to some extent. Therefore, we tried to improve the potency of BCG, especially with regard to immunostimulatory activities. We chiefly focused on overcoming the defect of BCG—that is, the ability to avoid the fusion of BCG-infected phagosomes with lysosomes. One of the approaches we carried out previously is the production of *UreC* gene-deficient rBCG (BCG- Δ UT-11-3), which successfully produces acidic phagosomes and facilitates them to fuse with lysosomes (15). In fact, BCG- Δ UT-11-3 efficiently colocalizes with lysosomes and preferentially and effectively stimulates human naive CD4⁺ T cells (15). Therefore, the disruption of the *UreC* gene of BCG seems to be a useful strategy to translocate BCG to

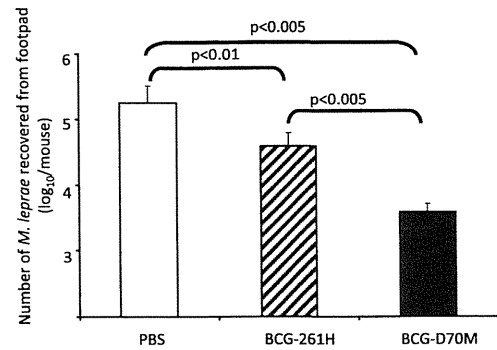


FIGURE 8. Inhibition of *M. leprae* multiplication by s.c. vaccination with BCG-D70M. Five-week-old C57BL/6 mice (5 mice/group) were vaccinated with 1×10^3 CFU/mouse either BCG-261H or BCG-D70M s.c. and were challenged with 5×10^3 bacilli/mouse *M. leprae* in footpad 4 wk postvaccination. The number of *M. leprae* recovered from the footpad at 32 wk postchallenge was enumerated by Shepard's method (33). Representative results of three separate experiments are shown. Titers were statistically compared using Student *t* test.

lysosomes. However, unfortunately, BCG- Δ UT-11-3 did not activate naive CD8⁺ T cells effectively. Then, the second approach for overcoming the lack of phagosome-lysosome fusion was carried out—that is, to induce the secretion of immunodominant Ag into phagosome. In this study, we used MMP-II as the immunodominant Ag of *M. leprae* (7). In one case, sole MMP-II protein (production of BCG-SM) and in the other case HSP70-MMP-II fusion protein (production of BCG-70M) secreting BCG was constructed (16, 25). Both BCGs were quite efficient in the induction of activation of not only naive CD8⁺ T cells, but also naive CD4⁺ T cells. However, BCG-70M was superior to BCG-SM in activating both subsets of T cells, especially naive CD8⁺ T cells (not shown). The activation of naive CD8⁺ T cells by BCG-70M is highly dependent on the secretion of HSP70-MMP-II fusion protein, because the activation seems to be induced by TAP- and proteasome-dependent cross-presentation of the secreted protein (24, 25, 37). Therefore, the secretion of MMP-II in the combination with HSP70 seems to be an efficient strategy to overcome the intrinsic defect of BCG.

Because the two independent strategies for overcoming the intrinsic defect of BCG were useful, we tried to combine both strategies and produced new rBCG (BCG-D70M), in which BCG- Δ UT-11-3 was integrated with gene encoding HSP70-MMP-II fusion protein. As previously reported (25), BCG-70M secreted 92 kDa HSP70-MMP-II fusion protein after being phagocytosed by APCs, and the secreted protein was transported to functional lysosomes. In the phagolysosomes, some portions of HSP70-MMP-II fusion protein could be degraded, but rest of the protein may be sequestered into the cytosol, where they could be degraded and used for cross-priming CD8⁺ T cells. In this respect, when immature DCs were pretreated with chloroquine and subsequently infected with newly produced BCG-D70M, both the expression of MMP-II and the activation of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells by the rBCG were inhibited. Thus, protein secreted from BCG-D70M seems to be responsible for the activation of naive T cells. Further, the activation of naive CD8⁺ T cells by BCG-D70M was also abolished by pretreatment of immature DCs with lactacystin, a proteasomal protein degradation blocker and brefeldin A that is an inhibitor of anterograde Golgi transportation and of TAP-dependent transportation. Therefore, it is highly likely that the 92-kDa fusion protein secreted from BCG-D70M could be sequestered into cytosol from lysosome, degraded in proteasome, and used for loading on MHC class I molecules through the TAP-

dependent pathway. Thus, similar to BCG-70M, BCG-D70M also used the cytosolic pathway, which is known as the most effective cross-presenting pathway (38), to cross-prime CD8⁺ T cells. In this respect, it is known that HSP plays an important role in the induction of the cytosolic cross-presentation pathway (39, 40). HSP70 secreted as a part of the fusion protein seems to be closely associated with the cross-priming CD8⁺ T cells. The activation of both naive CD8⁺ T cells and naive CD4⁺ T cells by BCG-D70M was induced in an Ag-specific fashion, because treatment of BCG-D70M-infected DCs with mAb to MHC molecules or CD86 Ag inhibited the IFN- γ production from naive T cells. However, the naive CD4⁺ T cells seemed to be polyclonally activated by the stimulation, because the treatment of DCs with mAb to MMP-II partially, but significantly, inhibited the activation (Fig. 2C). In C57BL/6 mice, a single injection of BCG-D70M produced T cells capable of responding to both MMP-II and HSP70 several weeks postinoculation. Therefore, the HSP70-MMP-II fusion protein activated both APCs and T cells by the similar mechanisms as observed in *in vitro* experiments and was probably used as antigenic molecules *in vivo*. Because *M. leprae*-infected DCs expressed MMP-II-derived antigenic determinants on their surface (7, 16), the production of T cells responsive to MMP-II *in vivo* may be useful to prevent the disease manifestation. This speculation seems to be supported by the present observation that the vaccination with BCG-D70M more efficiently inhibited the multiplication of *M. leprae* *in vivo* than that with vector control BCG.

The activities stimulating both subsets of naive T cells of BCG-D70M were strongest among the all rBCGs produced so far including BCG-70M. Although all of the rBCGs showed the dose-dependent effect in the T cell activation, BCG-D70M showed the strongest activity in terms of the T cell activation, even if an MOI 1.0 of BCG was used. Further, BCG-D70M most strongly activated DCs as revealed by IL-12p70 production from DCs. Because BCG-70M activated DCs through the binding of HSP70-MMP-II fusion protein with TLR2 (25), BCG-D70M seems to activate DCs with a similar mechanism, at least partially. However, it did not induce an apoptotic cell death of target APCs including DCs and macrophages, the *in vitro* growth rate of BCG-D70M was almost identical with that of BCG-261H, and further, the infectivity of these rBCGs to host cells in both *in vitro* and *in vivo* was identical (not shown). It is likely that the stronger DC- and T cell-activating ability of BCG-D70M than BCG-70M might be due to the absence of ammonia, products of *UreC* gene-encoding urease, in the phagosome. The urease depletion may facilitate the translocation of HSP70-MMP-II fusion protein secreted in phagosomes from BCG-D70M into lysosomes. However, another explanation could be that the absence of ammonia may facilitate the translocation of BCG-D70M itself to lysosomes, because it has previously reported that BCG- Δ UT-11-3 more efficiently entered lysosomes than parent BCGs, which possess the *UreC* gene (15, 19). BCG-D70M translocated into lysosomes or phagolysosomes secreted HSP70-MMP-II fusion protein. Therefore, it can be speculated that a larger dose of secreted protein that could be efficiently processed would be available in lysosomes, so that much or many types of antigenic peptides could be loaded on the MHC molecules. This speculation is important because it has recently been reported that quick activation of CD8⁺ T cells by BCG requires the high antigenic load on MHC class I molecules (41). These results indicate that the deletion of urease from BCG and integration of gene encoding fusion protein into BCG may act synergistically, although further detailed analyses is required.

The strong ability of BCG-D70M to stimulate T cells enables macrophages to activate CD4⁺ T cells. The CD4⁺ T cells stimulated by BCG-D70M through macrophages seemed to be activated

in an Ag-specific manner, because the IFN- γ production from the T cells was largely blocked by the treatment of BCG-D70M-infected macrophages with mAbs to MHC class II and CD86 Ags. So far, rBCG including BCG- Δ UT-11-3 and BCG-70M did not activate CD4⁺ T cells efficiently through macrophages in the absence of costimulators such as CD40L and IFN- γ (15, 25). The definite reason for why BCG-D70M, but not BCG-70M, could activate CD4⁺ T cells through macrophages remains unanswered. However, the secreted fusion protein either in the phagosome or phagolysosome could be associated with CD4⁺ T cell activation through macrophages, because pretreatment of macrophages with chloroquine abolished their T cell-stimulating activities. BCG infects not only DCs, but also macrophages, which are highly active in phagocytosis of bacteria; thus, the successful activation of CD4⁺ T cells by macrophages upon an infection with BCG-D70M would provide many chances to heterogeneous CD4⁺ T cells to receive antigenic stimuli. The CD4⁺ T cell activation by macrophages should contribute to the efficient production of high doses of IFN- γ and to the production and maintenance of abundant memory T cells. In addition, in the presence of the help of CD4⁺ T cells, naive CD8⁺ T cells were differentiated into CCR7^{low}CD8⁺ and CD27^{low}CD8⁺ memory type T cells by the stimulation with BCG-D70M. Also, they produced phenotypically activated CD62L^{low}CD8⁺ T cells as well as perforin-producing effector CD8⁺ T cells. Therefore, the efficient activation of naive and memory type CD4⁺ T cells may contribute to the efficient production of effector and memory CD8⁺ T cells. In our hands, we could not confirm the possibility that the functional perforin-producing CD8⁺ T cells, which are produced from naive T cells, can be further differentiated into memory subsets. If this were the case, effector CD8⁺ T cells having killing activity can be immediately and efficiently produced from such memory T cells upon an infection with *M. leprae* *in vivo*.

It has been reported that to prevent the disease manifestation induced by infection with mycobacteria, such as *M. tuberculosis*, by vaccination, the vaccinating agents should be able to produce memory T cells that have a high potency to migrate into the infection site (34). Thus, we evaluated whether BCG-D70M can produce T cells with a migration activity by monitoring the surface expression of CD162 molecules. The stimulation of naive T cells with BCG-D70M-infected DCs induced the expression of CD162 on both CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells. Therefore, it could be assumed that BCG-D70M may be a convincing stimulator of naive T cells.

Taken together, in this study, we newly constructed an rBCG that is deficient in production of urease, but instead produced HSP70-MMP-II fusion protein and is capable of effectively and strongly activating both naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells, thus overcoming the intrinsic defect of BCG. Using the triple combination of expressing HSP70 and MMP-II protein in BCG and depletion of urease may result in sufficient production of memory T cells by activating both subsets of naive T cells in human.

Acknowledgments

We thank N. Makino for help in the preparation of the manuscript. We also thank M. Hasegawa for technical support and the Japanese Red Cross Society for kindly providing PBMCs from healthy donors.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. WHO Expert Committee on Leprosy. 1982. *Sixth Report of WHO Technical Report Series 675*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

2. Ridley, D. S., and W. H. Jopling. 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 34: 255–273.
3. Sieling, P. A., D. Jullien, M. Dahlem, T. F. Tedder, T. H. Rea, R. L. Modlin, and S. A. Porcelli. 1999. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J. Immunol.* 162: 1851–1858.
4. Sieling, P. A., M. T. Ochoa, D. Jullien, D. S. Leslie, S. Sabet, J. P. Rosat, A. E. Burdick, T. H. Rea, M. B. Brenner, S. A. Porcelli, and R. L. Modlin. 2000. Evidence for human CD4⁺ T cells in the CD1-restricted repertoire: derivation of mycobacteria-reactive T cells from leprosy lesions. *J. Immunol.* 164: 4790–4796.
5. Modlin, R. L., J. Melancon-Kaplan, S. M. M. Young, C. Pirmez, H. Kino, J. Convit, T. H. Rea, and B. R. Bloom. 1988. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1213–1217.
6. Hashimoto, K., Y. Maeda, H. Kimura, K. Suzuki, A. Masuda, M. Matsuoka, and M. Makino. 2002. *Mycobacterium leprae* infection in monocyte derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infect. Immun.* 70: 5167–5176.
7. Maeda, Y., T. Mukai, J. Spencer, and M. Makino. 2005. Identification of an Immunomodulating Agent from *Mycobacterium leprae*. [Published erratum in 2005 *Infect. Immun.* 73: 4458.] *Infect. Immun.* 73: 2744–2750.
8. Makino, M., Y. Maeda, and N. Ishii. 2005. Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium leprae*. *Cell. Immunol.* 233: 53–60.
9. Lombardi, C., E. S. Pedrazzani, J. C. Pedrazzani, P. F. Filho, and F. Zicker. 1996. Protective efficacy of BCG against leprosy in São Paulo. *Bull. Pan Am. Health Organ.* 30: 24–30.
10. Pönnighaus, J. M., P. E. Fine, J. A. Sterne, R. J. Wilson, E. Msosa, P. J. Gruer, P. A. Jenkins, S. B. Lucas, N. G. Liomba, and L. Bliss. 1992. Efficacy of BCG vaccine against leprosy and tuberculosis in northern Malawi. *Lancet* 339: 636–639.
11. Sharma, P., R. Mukherjee, G. P. Talwar, K. G. Sarathchandra, R. Walia, S. K. Parida, R. M. Pandey, R. Rani, H. Kar, A. Mukherjee, et al. 2005. Immunoprophylactic effects of the anti-leprosy Mw vaccine in household contacts of leprosy patients: clinical field trials with a follow up of 8–10 years. *Lepr. Rev.* 76: 127–143.
12. Setia, M. S., C. Steinmaus, C. S. Ho, and G. W. Rutherford. 2006. The role of BCG in prevention of leprosy: a meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 6: 162–170.
13. Reyrat, J. M., F. X. Berthet, and B. Gicquel. 1995. The urease locus of *Mycobacterium tuberculosis* and its utilization for the demonstration of allelic exchange in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8768–8772.
14. Grode, L., P. Seiler, S. Baumann, J. Hess, V. Brinkmann, A. Nasser Eddine, P. Mann, C. Goosmann, S. Bandermann, D. Smith, et al. 2005. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. *J. Clin. Invest.* 115: 2472–2479.
15. Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, Y. Miyamoto, and M. Makino. 2008. CD4⁺ T-cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53: 96–106.
16. Makino, M., Y. Maeda, and K. Inagaki. 2006. Immunostimulatory activity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG that secretes major membrane protein II of *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 74: 6264–6271.
17. Maeda, Y., T. Tamura, M. Matsuoka, and M. Makino. 2009. Inhibition of the multiplication of *Mycobacterium leprae* by vaccination with a recombinant *M. bovis* BCG strain that secretes major membrane protein II in mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 16: 1399–1404.
18. Horwitz, M. A., B. W. Lee, B. J. Dillon, and G. Harth. 1995. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1530–1534.
19. Schaible, U. E., S. Sturgill-Koszycki, P. H. Schlesinger, and D. G. Russell. 1998. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *J. Immunol.* 160: 1290–1296.
20. Höner zu Bentrop, K., and D. G. Russell. 2001. Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends Microbiol.* 9: 597–605.
21. Binder, R. J., and P. K. Srivastava. 2005. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8⁺ T cells. *Nat. Immunol.* 6: 593–599.
22. Flechtner, J. B., K. P. Cohane, S. Mehta, P. Slusarewicz, A. K. Leonard, B. H. Barber, D. L. Levey, and S. Andjelic. 2006. High-affinity interactions between peptides and heat shock protein 70 augment CD8⁺ T lymphocyte immune responses. *J. Immunol.* 177: 1017–1027.
23. Tobian, A. A. R., D. H. Canaday, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2004. Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8⁺ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. *J. Immunol.* 172: 5277–5286.
24. Tobian, A. A. R., C. V. Harding, and D. H. Canaday. 2005. *Mycobacterium tuberculosis* heat shock fusion protein enhances class I MHC cross-processing and -presentation by B lymphocytes. *J. Immunol.* 174: 5209–5214.
25. Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. 2009. Induction of cross-priming of naive CD8⁺ T lymphocytes by recombinant bacillus Calmette-Guérin that secretes heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. *J. Immunol.* 183: 6561–6568.
26. Makino, M., and M. Baba. 1997. A cryopreservation method of human peripheral blood mononuclear cells for efficient production of dendritic cells. *Scand. J. Immunol.* 45: 618–622.
27. Wakamatsu, S., M. Makino, C. Tei, and M. Baba. 1999. Monocyte-driven activation-induced apoptotic cell death of human T-lymphotropic virus type 1-infected T cells. *J. Immunol.* 163: 3914–3919.
28. Makino, M., S. Shimokubo, S. I. Wakamatsu, S. Izumo, and M. Baba. 1999. The role of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-infected dendritic cells in the development of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Virol.* 73: 4575–4581.
29. Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and T. Mukai. 2007. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. *Micobes Infect.* 9: 70–77.
30. Makino, M., Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, and T. Mukai. 2009. GM-CSF-mediated T-cell activation by macrophages infected with recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 55: 39–46.
31. Maeda, Y., M. Gidoh, N. Ishii, C. Mukai, and M. Makino. 2003. Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens. *Cell. Immunol.* 222: 69–77.
32. Bardarov, S., S. Bardarov Jr, Jr., M. S. Pavelka Jr, Jr., V. Sambandamurthy, M. Larsen, J. Tufariello, J. Chan, G. Hatfull, and W. R. Jacobs Jr, Jr. 2002. Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*. *Microbiology* 148: 3007–3017.
33. Shepard, C. C., and D. H. McRae. 1968. A method for counting acid-fast bacteria. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 36: 78–82.
34. Mitrücker, H.-W., U. Steinhoff, A. Köhler, M. Krause, D. Lazar, P. Mex, D. Miekley, and S. H. E. Kaufmann. 2007. Poor correlation between BCG vaccination-induced T cell responses and protection against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 12434–12439.
35. Ramasesh, N., L. B. Adams, S. G. Franzblau, and J. L. Krahenbuhl. 1991. Effects of activated macrophages on *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 59: 2864–2869.
36. Kaufmann, S. H. E., and A. J. McMichael. 2005. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat. Med.* 11(4 Suppl): S33–S44.
37. Schiavo, R., D. Baatar, P. Olkhanud, F. E. Indig, N. Restifo, D. Taub, and A. Biragyn. 2006. Chemokine receptor targeting efficiently directs antigens to MHC class I pathways and elicits antigen-specific CD8⁺ T-cell responses. *Blood* 107: 4597–4605.
38. Burgdorf, S., and C. Kurts. 2008. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 20: 89–95.
39. Martin, C. A., D. L. Kurkowski, A. M. Valentino, and F. Santiago-Schwarz. 2009. Increased intracellular, cell surface, and secreted inducible heat shock protein 70 responses are triggered during the monocyte to dendritic cell (DC) transition by cytokines independently of heat stress and infection and may positively regulate DC growth. *J. Immunol.* 183: 388–399.
40. Ziętara, N., M. Łyszczewicz, N. Gekara, J. Puchałka, V. A. Dos Santos, C. R. Hunt, T. K. Pandita, S. Lienenklaus, and S. Weiss. 2009. Absence of IFN- β impairs antigen presentation capacity of splenic dendritic cells via down-regulation of heat shock protein 70. *J. Immunol.* 183: 1099–1109.
41. Ryan, A. A., J. K. Nambiar, T. M. Wozniak, B. Roediger, E. Shklovskaya, W. J. Britton, B. Fazekas de St Groth, and J. A. Triccas. 2009. Antigen load governs the differential priming of CD8 T cells in response to the bacille Calmette Guérin vaccine or *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 182: 7172–7177.

WHO・薬剤耐性らい菌拠点監視事業に関する会議 報告

松岡正典*、甲斐雅規

国立感染症研究所ハンセン病研究センター

〔受付・掲載決定：2010年12月6日〕

平成22年11月9日、10日の両日、国立感染症研究所、戸山庁舎においてWHO, South-East Asia Region Office (SEARO), Global Leprosy Programme (GLP) による第3回 Meeting on Sentinel Surveillance for Drug Resistance in Leprosy が開催された。事業の概要と今回の会議について報告する。

経緯

ハンセン病の治療は、WHO が推進し 1980 年代に始まった多剤併用化学療法 (MDT) により多大な効果が見られ、世界のハンセン病有病率は著しく低下した。しかしながら他の感染症において広く知られているように、ハンセン病においても抗生物質に対する耐性菌の出現が危惧された。事実、MDT が導入される前には多くの dapsone あるいは rifampicin に対する単剤耐性菌の増加あるいは多剤耐性菌の例が報告され、MDT 導入後においても主として再発例において、耐性例の報告がなされた。しかしながらそれらのほとんどは散発的なケースレポートであり、包括的なデータに基づいて耐性菌の伝搬状況を正確に把握できるものではなかった。かつて、結核は BCG と化学療法により予防と治療が可能であり、容易に制御できるものと考えられたが、近年の耐性結核菌の出現は結核対策を極めて困難なものとしている。GLP の担当官はハンセン病においても同様な轍を踏まないためにも、現行の MDT 下における耐性菌の伝搬状

況を把握し、その有効性を維持することを意図していた。しかしながら、周知のとおり、らい菌の薬剤感受性は、従来マウス footpad によって実施されてきたため、多数の症例について検査し、包括的情報の収集に基づいた実態の把握は不可能であった。

2005 年 4 月、Scotland の Aberdeen において開催された第 8 回 WHO Technical Advisory Group on the Leprosy Control に参加した邑久光明園の副園長であった畑野研太郎現園長は、当時 GLP team leader であった Dr. Vijaykumar Pannikar から簡便な方法により、高ハンセン病有病率を示す国々で得た材料を解析する方法がないか相談を受けた。Dr. Pannikar は rifampicin が MDT においてその高い bactericidal 作用から、かなめの薬剤となっていることに鑑み、その耐性は現行の化学療法に基づくハンセン病対策を危うくするものであると考え、その実態把握が重要と考えた。これに対し、畑野園長は日本においては 1990 年代後半より遺伝子変異の検索により、難治例、再発例を初めとして dapsone, rifampicin, quinolone に対する耐性の有無を検査していることを報告した。

これまで行われた会議における 議題と討議の結果

以上の経緯を踏まえ、2006 年 4 月 30 日および

* Corresponding author:

国立感染症研究所ハンセン病研究センター
〒189-0002 東京都東村山市青葉町 4-2-1
TEL: 042-391-8211 FAX: 042-394-9092
E-mail: matsuoaka@nih.go.jp

5月1日に、インドのAgraにおいてRifampicin Resistance in Leprosy と題する非公式協議会がSEAROにより企画された。会議には松岡も含め、11カ国16名が参加した。利用可能な薬剤耐性菌の検出技術、rifampicin耐性菌検出例に関する知見等が報告された。rifampicin耐性菌について早急に拠点監視体制を確立することが確認され、その伝播について動向を知るために、選定された場所において長期にわたり観察を継続することが合意され、「ハンセン病の薬剤耐性拠点監視事業」として当面は再発例での耐性菌の伝播状況を把握することから開始することとなった。耐性菌を検出する方法はPCR direct-sequencing法により行うこととした。検査方法のガイドラインが策定され、rifampicin以外の薬剤の検査についても協議された。

続いて2008年10月20日から22日にベトナムのHanoiにおいて第1回の「ハンセン病の薬剤耐性拠点監視事業に関するワークショップ」が、National Institute of Dermato-VenereologyのDr. Tran Hau Khang所長の運営により開催された。12

カ国より32名、WHOより8名が参加した。日本からは、松岡、甲斐と北海道大学の鈴木教授が参加した。会議においては事業遂行のための技術的諸問題、監視対象地域の選定、それらにおけるハンセン病の実態及び対策が報告され、監視拠点と検査を担当する研究機関との連携について討議された。監視対象地域には6カ国の14カ所が選定され、ハンセン病研究センターをはじめ10カ所の研究施設が遺伝子の解析を担当することになった。会議後、コロンビア、中国が加わった。ハンセン病研究センターはミャンマーの2カ所、ベトナムの1カ所について収集された検体について検査を担当することとした。拠点および検査担当機関について表1に示した。また当センターはquality controlを担当することになった。検体はslit skin法により採取され、従来我々が行ってきた方法である70%エタノールにより保存して検査施設に送付することで合意された。FTAカードの有用性が提案され、次回会議までに適応の可否を検討するデータを得ること等についても合意した。

第2回会議は2009年10月26日、27日両

表1. 耐性菌監視拠点と検査担当施設

国名	監視拠点		検査担当施設
	施設		
Brazil	1, Laboratório de Hanseníase FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ	1, Laboratório de Hanseníase Instituto Oswaldo Cruz (IOC)	National Institute of Infectious Diseases, Leprosy Research Center, Tokyo, Japan
	2, Centro de Referência em Dermatologia Snitária Dona Libânia, Fortaleza, CE	2, Instituto Lauro de Souza Lima Bauru,	
	3, Fundação Alfedo da Matta, Manaus, M	3, Centro de Referência Estadual em Dermatologia Sanitária em Hanseníase	
	4, Instituto Lauro de Souza Lima Bauru, SP		
	5, Centro de Referência Estadual em Dermatologia Sanitária em Hanseníase, Uberlândia		
Ethiopia	1, Dermatology Department, ALERT Hospital, Addis Ababa	National Reference Center on Mycobacteria, Faculte de Medicine Pitie-Spétriere, Paris, France	1, Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, South Korea 2, National Institute of Infectious Diseases, Leprosy Research Center, Tokyo, Japan
	2, Armauer Hansen Research Institute (AHRI) Addis Ababa		
India	1, TLM Community Hospital, Shahdara, New Delhi	1, Stanley Brown Laboratory, New Delhi	Institute of Dermatology and National Center for Leprosy Control, Nanjing, China
	2, JALMA, Agra	2, JALMA, Agra	
	3, Hospital of Schieffelin Institute of Health Research and Leprosy Center, Karigili	3, Laboratory of Schieffelin Institute of Health Research and Leprosy Center, Karigili	
Mali	Centre for Vaccine Development-Mali (CVD-MALI), Ministry of Health, CNAM-ex-Institute Marchoux, Bamako	National Reference Center on Mycobacteria, Faculte de Medicine Pitie-Spétriere, Paris, France	Institute of Dermatology and National Center for Leprosy Control, Nanjing, China
Myanmar	1, Central Special Skin Clinic, Yangon General Hospital, Yangon 2, Central Special Skin Clinic, Mandalay General Hospital, Mandalay		National Institute of Infectious Diseases, Leprosy Research Center, Tokyo, Japan
Vietnam	1, National Institute of Dermatology and Venerology, Hanoi 2, Quyhoa National Leprosy Dermatology Hospital, Quynhon		1, Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, South Korea 2, National Institute of Infectious Diseases, Leprosy Research Center, Tokyo, Japan
Philippines	Skin Clinic, Leonard Wood Memorial, Cebu,		National Hansen's Disease Programs Laboratory Research Branch, Baton Rouge, USA
China	Institute of Dermatology and National Center for Leprosy Control, Nanjing, China		Institute of Dermatology and National Center for Leprosy Control, Nanjing, China
Colombia	Institute Colombiano de Medicina Tropical		Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA

日、フランスの Paris において Prof. Emanuelle Cambau により運営された。20 カ国より 51 人と WHO の GLP より 3 名、WHO の各地域事務局担当者 5 名が参加した。9 カ国からハンセン病の現状の報告と Hanoi 会議以後行った検査結果について報告された。各国の本事業に対する取り組みにはかなりの隔たりがあり、検査体制の確立、データの収集における方法の統一等が望まれた。検査結果の詳細については Weekly epidemiological record 2010, 85 281-284 に記載されている。quality control の結果、FTA カードの有用性を検討した結果について報告されたが、本事業への導入は決定されなかった。検査機関からの検査結果の報告と過去 1 年間に検査を実施した際に問題となった技術的な件に関し改善のための提案がされた。本事業における感受性検査は PCR direct sequencing によるが、一方で新薬の有効性の検証にはマウス footpad 法による検査が必要であることから、その技術と施設の維持の重要性が認識された。新たにインドネシア、ナイジェリア、ブルキナファソが事業への参加を表明した。次回までに行われるべき課題として、より多くの再発例の検査、各拠点における再発について診断と管理をより適切に行うこと、新薬の検索を続けることが指摘された。

Paris で行われた会議において、第 3 回の会議は報告者らが世話人となって東京で行うことが決定された。

東京会議の概要

冒頭に記したとおり、会議は 11 月 9 日および 10 日に国立感染症研究所、戸山庁舎において開催された。18 カ国からと WHO の GLP チームメンバー、地域事務所の担当者も含め 42 名が参加した。各国のハンセン病対策担当官 6 名、監視拠点担当者 7 名、検査機関から 6 名のほか、専門家、ハンセン病支援団体からの参加があった。(図 1、2)

初めに GLP team leader の Dr. Myo Thet Htoon が過去 2 年間の検査状況について報告した。これまでにブラジル (135 例)、中国 (10 例)、コロンビア (6 例)、ベトナム (12 例)、ミャンマー (23 例)、インド (27 例) において合計 213 例の再発について検査され、dapsons については 92 例が解析可能でそのうち 12 例が耐性であった。rifampicin は PCR 陽性の 108 検体中、9 例が耐性菌と判定され、国によって違いがあるものの、いずれも約 10% に耐性が認められた。

続いて、ブラジル、中国、マダガスカル、イエメン、パキスタン、マリより各国の状況について報告された。

ブラジルでは患者として登録される症例の約 3% が再発であることが示された。これらに対する薬剤耐性の検査は国内 5 検査機関において PCR により増幅された遺伝子を同国の中枢研究機関で

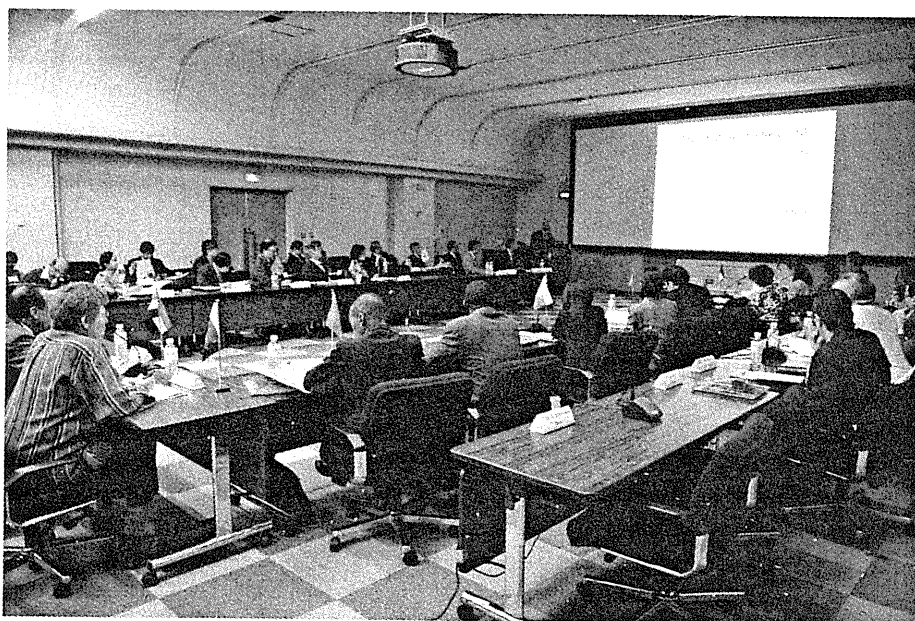


図 1

ある Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) においてまとめてシーケンスをする体制を敷いていることが示された。これに対し、PCRを担当する各施設間での能力の差について懸念が示され、技術の向上と統一の必要性が指摘された。

中国においては MDT 完了後も菌検査が行われ、陰性化するまで active case として登録され、その後は年一回パラメディカルにより、経過の観察が行われ、再発例の発見に努めていることが示された。2009 年を例にとると、新患として 1597 例が登録され、これに対し、再発の割合は MDT 以前の治療患者からは 79 例、MDT による治療を受けた者からは 69 例であることが示された。同国のハンセン病発生状況に照らし、15 省を監視拠点として選定し、監視事業が行われている。

マダガスカルからは同国のハンセン病対策の組織体制が報告され、2009 年には 1588 例の新患が登録されたことが報告された、しかしながら、2006 年までパスツール研究所と共同で行われていた再発に関する研究は打ち切りとなり、再発発見のための体制は整備されておらず、再発の実態把握はされていないことが示された。

イエメンのハンセン病は多くはなく、2009 年の有病率は 0.19/10,000、新患発見は 1.7/100,000 であった。2009 年には 6 例の再発が報告され、検体はスイスの Global Health Institute の Prof. Stewart Cole の研究室において検査された。3 例が解析

可能であったが、何れにも耐性と認められる変異は検出されなかった。

パキスタンのハンセン病対策は多くの NGO の援助を受けて実施されていることが報告され、2009 年には 865 例の新患が登録され、11 例の再発があったことが示された。報告は同国のハンセン病は症例が少なく WHO の本事業の遂行については困難であるとの見解を示した。筆者の印象では同国におけるハンセン病対策が整備されていないことに対する懸念を強く感じた。

マリのハンセン病対策の概要について説明され、2009 年には 346 例が新患登録され (2.6/100,000)、有病率は 0.31/10,000 であった。再発は 2001 年から 2009 年の間で 6 例であったと報告された。同国における再発発見のための体制が示されなかったため、はたしてこの数字が同国の再発に実態を示すものなのか否か疑問が持たれる。

続いて 9 日の午後は最初に、松岡が各 reference center に対して行った quality control について報告した。11 施設に 9 種の検体を送付し、*folP1*, *rpoB*, *gyrA* の drug resistance determining region に対する PCR の感度およびシーケンスの結果の報告を求めた。8 施設より報告があり、3 施設において PCR の感度が低くその改良が望まれた。negative control に対する false positive の例は無かったもの、2 施設のシーケンスの 4 例の結果は配布された検体とは異なるものであり、技術的



図 2

問題があると思われた。前年度の会議においては FTA カードの導入が見送られたが、ミャンマーにおいて行われた 70% エタノール法と FTA カードにより保存された検体の PCR 陽性率に差が無かったことから、本事業での FTA カードの利用が再提案された。続いて甲斐は PCR 感度向上のために nested PCR あるはサイクル数を増加した single PCR の適用により guide line にある方法の変更を提案した。また少数例ながら非特異的増幅が見られることから RLEP 領域の増幅の有無により得られた PCR 陽性が、らい菌の DNA によるものであるか否かを確認することが提案された。

コロラド州立大学の Dr. Wei Li は変異検出の新しい方法として real time PCR と high resolution melting analysis を紹介した。

フランスの National Reference Center for Mycobacteria and Resistance to Anti-tuberculosis Drugs 所属 Prof. E. Cambau はそれぞれエチオピア 7 例、パキスタン 8 例の再発例の解析結果を報告した。4 例が PCR 陽性であったが全て感受性菌であった。FTA カードに比して biopsy 検体の方が、陽性率が高いことを示し、PCR も含め、それぞれの施設で確立した方法で解析することが提案された。これについては quality control を厳重にすることを前提として reference center 間の合意が得られた。

Global Health Institute の Prof. S. Cole はボリビア 11 例、ブラジル 14 例、ベネズエラ 192 例、ウルグアイ 2 例の南米の新患例での耐性菌の伝播について調査した結果を報告し、2 例の dapsone 耐性が検出された。rifampicin, quinolone に対する耐性は検出されなかった。続いてドイツ人の MDT 治療により症状が改善しなかった症例について報告した。この患者はしばしばブラジルに長期滞在し、SNP typing からブラジルで感染を受けたと推定された。遺伝子変異の検査結果は dapsone, rifampicin, quinolone に対しても感受性であることを示した。上述のイエメンの検体の検査結果についても報告された。

2 日目の午前は初日に続き、各国のこれまでの検査結果について報告が行われた。ブラジルからは 135 例の再発例中、*rpoB* 遺伝子の 531 位 (TCG) においてそれぞれ 1 例が、ATG および TTG に変異し、他の 2 例が TTC の変異を示し、3 例は *folP1*

遺伝子の 55 位 (CCC) が CGC の変異を示したことが報告された。再発例からの再発前と後で *gyrA* 遺伝子の 99 位に異なる遺伝子型が見出され、再発として観察される症例には再感染が含まれるのではないかと指摘された。

ミャンマーでは 2007 年には 22 例、2008 年には 19 例、2008 年には 35 例の再発が認められ、2010 年の 10 月末までにヤンゴンおよびマンダレーの監視拠点において 26 例の再発が報告された。21 例について変異の検索が行われた結果、ヤンゴンの 2 例とマンダレーの 1 例に dapsone 耐性となる変異が検出された。*rpoB* および *gyrA* に変異は無かった。

インドからは Blue Peter Public Health & Research Center (BPHRC) および Stanley Browne Laboratory (SBL) の 2 拠点からの報告があった。BPHRC では 15 例の再発例を検査し、5 例が *folP1* に dapsone 耐性となる遺伝子の変異が検出された。SBL においては 2009 年には 27 例、2010 年には 16 例の再発が検査され、3 例の dapsone 耐性、2 例の quinolone 耐性が検出された。そのうちの 1 例は 2 剤同時耐性であった。

コロンビアでは 3 州が監視拠点であり、60 名が MDT 治療後の観察下にある。過去 1 年間に 5 例の再発があり、2 例について遺伝子解析が可能であった。いずれも薬剤耐性を惹起する変異は検出されなかった。

中国からは 2010 年中に再発を示した 9 例と 7 例の難治例について遺伝子解析の結果が報告され、それぞれ *folP1* に 1 例ずつ、53 位の ACC が GCC に変異が見られた。

パキスタンにおける本事業の取り組みについて報告され、同国では Rawalpindi のハンセン病病院が監視拠点とされ、2009 年から 7 例の再発例について検査された。遺伝子解析は Prof. E. Cambau の施設で実施された。7 例中 4 例が遺伝子解析可能であったが、3 遺伝子のいずれにも耐性を惹起する変異は示されなかった。

フィリピンはセブ島を中心とする中部地域の再発について報告された。年間約 200 例の新患が登録され、2010 年にはこれまで 3 例の再発例が報告されている。遺伝子解析は National Hansen's Disease Programs at LSU School of Veterinary

MedicineにおいてDr. Thomas Gillisが担当している。3例の何れにも薬剤耐性となる遺伝子の変異は検出されなかった。長期間にわたる23例の再発に関する観察は治療後6年から16年の間に再発を発生していた。

ベトナムでは2010年中に6例の再発があり、5例について遺伝子変異の検索が行われた。5例中2例が*folP1*の55位に変異が検出された、*rpoB*、*gyrA*には変異が見いだされなかった。

インドネシアのハンセン病の現状が説明され、依然として年間17,000例前後の新患者の発生が見られ、地域により著しい違いがあることが示された。同国では2施設が遺伝子解析を担当することになっているが、今回はスラバヤからの検査結果について報告された。新患例を含めて50例の*folP1*遺伝子PCR陽性検体中、2例の再発例が耐性と判定される変異を示した。また他の1例がdapsone耐性であった。7例の再発例を含め94検体について*rpoB*遺伝子解析を行ったが、耐性となる変異は検出されなかった。同国における、よりシステマティックな監視体制の確立が必要であることが指摘された。

10日の午後は初めに、マウスfootpad法が実施されている研究施設の現状とハンセン病研究におけるその必要性について前年度に続いて提案された。現在マウスによる実験が稼働している施設は非流行地ではアメリカ、フランス、日本の3カ所であり、流行地域ではインドで4カ所、ブラジルの3カ所、およびネパールだけである。熟練し

た技術者の確保、動物実験に関する規制と標準化、新規マウスの導入等の問題があるが、マウスfootpad法は遺伝子変異と薬剤耐性の関連の解析、らい菌株の確立維持、菌のviabilityの測定、新規薬剤の効果の評価等、その有用性が示され、今後も実験が必要であることが示された。

Dr. T. Gillisはらい菌の薬剤耐性メカニズムについてreviewし、これまでに報告されたclofazimineの抗菌作用と薬剤耐性例が少ない理由について説明した。

引き続き、図3に示した検査手順において用いられる書式について、これまでの経験を踏まえて改正が検討され、一部の修正が加えられた。

最後に今回の会議により得られた合意と勧告について検討された。その要約を以下に示す。1)ハンセン病における薬剤耐性は未だ深刻な状況には至っていないものの、合意されたガイドラインに沿って引き続き監視が必要である。2)監視拠点から検査機関へ送付する検体は、従来の70%エタノール法あるいはFTAカードによるものとする。3)検査機関で得られたシーケンスの結果はGlobal Health Instituteに集約され今後の研究に活用する。4)マウスfootpad法を実施している施設の重要性について認識が一致した。5)各監視拠点は可及的多数の検体について検査するよう努力する。6)それぞれの検査機関はPCRの感度の向上に向けて検討を続ける。7)検査方法は各検査機関が確立した方法によっても実施されることを容認するが、厳重な精度管理を実施する。

次回については開催場所について決定されなかったが、GLPのDr. Myo Thet Thoonは来年度も会議を行うことを表明した。

謝 辞

昨年の会議において東京での開催を引き受けたものの、様々な制約の下で今回の会議の開催に至るためには大変な時間と労力を費やした。一方、さしたる混乱もなく会議を完了したことに安堵している。そのためには多方面の方々のご協力とご援助を賜った。国立感染症研究所の関係部所、ご協力いただいたハンセン病研究センターの職員、不躰なお願いにも拘わらず援助をいただいた笹川

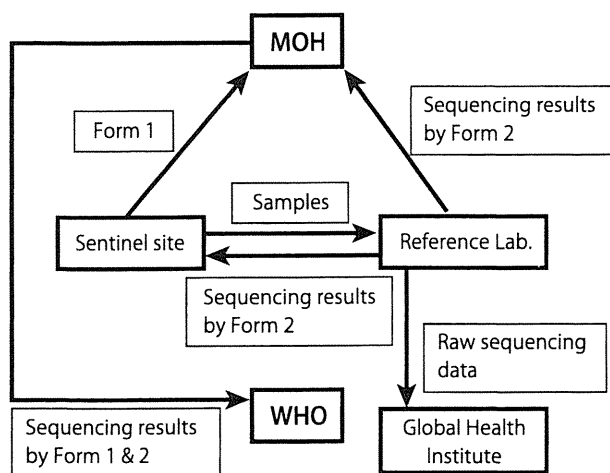


図3. 検査体制の概要

記念保健協力財団、NGO おうえんの並里先生、アジアのハンセン病を考える会の牧野先生はじめ、皆様に厚く御礼申し上げます。今回、我々が東京での開催を依頼された背景にはハンセン病研究センターが培ってきたらい菌の薬剤耐性に関する実

績があればこそそのことと自負している。このような実績は、元ハンセン病研究センター部長、柏原嘉子先生の多大なご指導とご支援により築かれたものであることを記し、深く謝意を表します。

WHO第10回ハンセン病制圧のための技術勧告 (Technical Advisory Group: TAG) 会議報告書

石井則久*¹⁾、スマナ バルア²⁾、森 修一¹⁾、永岡 譲³⁾、鈴木幸一¹⁾

- 1) 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
- 2) 世界保健機関南東アジア事務局地域アドバイザー
ハンセン病対策プログラム
- 3) 国立療養所多磨全生園皮膚科

[受付・掲載決定：2009年10月1日]

キーワード：制圧、世界保健機関、多剤併用療法、ハンセン病

世界保健機関（WHO）は2009年4月23日にインドのニューデリーで、第10回ハンセン病制圧のための技術勧告会議（Tenth Meeting of the WHO Technical Advisory Group on Leprosy Control）を開催し、その内容が報告書としてまとめられ、WHO南東アジア事務局から出版された。会議では、世界のハンセン病の状況が報告されるとともに、今後のハンセン病制圧活動の課題が討議された。

今回、世界保健機関（WHO）が、2009年4月23日にインドのニューデリーで開催した第10回ハンセン病制圧のための技術勧告会議（Tenth Meeting of the WHO Technical Advisory Group on Leprosy Control）の報告を許可を受け、日本語訳を行った（原著の著作権はWHOにある）。世界のハンセン病の現状とWHOの制圧戦略を理解して頂き、大いに活用して頂きたい。

目次

1. 序論
2. 第9回TAG会議の報告
3. 強化されたハンセン病の世界戦略（2011 - 2015）の推奨とその活動指針

4. 世界達成目標経過監視システム
 5. ハンセン病薬剤耐性の世界的サーベイランスのガイドライン：次のステップ
 6. 多施設でのUniform-MDT(U-MDT)研究の経過報告
 7. ブラジルにおける24カ月MB-MDT治療と12カ月MB-MDT治療の比較研究の進行状況
 8. より有効な抗ハンセン病薬と併用療法の可能性と挑戦
 9. ハンセン病の感染力
 10. その他
 11. 結論と勧告
- 付録
- ハンセン病制圧におけるWHO Technical Advisory Groupについて
 - プログラム（翻訳省略）
 - 参加者（翻訳省略）

* Corresponding author:

国立感染症研究所ハンセン病研究センター
〒189-0002 東京都東村山市青葉町4-2-1
TEL: 042-391-8211 FAX: 042-391-8210
E-mail: norishii@nih.go.jp

1. 序論

WHO 第 10 回ハンセン病制圧のための技術報告 (TAG) 会議はインドのニューデリーで 2009 年 4 月 23 日に開かれた。この会議の議長は WCS Smith 教授が務め、TAG メンバー (9 名、うち 1 名欠席) のほか、化学療法研究や、薬剤耐性サーベイランス、社会科学の専門家たち (6 名) が招待された。International Federation of Anti-Leprosy Associations (ILEP) や国際ハンセン病学会 (ILA) からの代表者 (2 名) と、WHO の各地域事務局の Regional Advisers (8 名) も出席した。なお、4 月 20 日から 22 日に、同地で世界ハンセン病プログラム管理者会議が行われた。

(訳注：日本ハンセン病学会の関係者では、畑野研太郎 (TAG メンバー、邑久光明園) と松岡正典 (専門家、ハンセン病研究センター) の両氏が出席した。)

2. 第 9 回 TAG 会議の報告

2008 年 3 月 6 日と 7 日にエジプトのカイロで行われた第 9 回 TAG 会議の報告が参加者全員により承認された。

3. 強化されたハンセン病の世界戦略 (2011 - 2015) の推奨とその活動指針

「2011 年から 2015 年のハンセン病による負荷のさらなる軽減のための強化された世界戦略」とそれに伴う「活動指針」は TAG メンバーによる合意の上で推奨された。これらはすでに国家ハンセン病プログラム管理者たちと、世界ハンセン病プログラム管理者会議のメンバーにより推奨されている。

ILEP 事務局長 (D Soutar 氏) は、メンバーと技術委員会が計画の方向性をより強固にする必要があると述べた。彼は WHO に対し、計画を発展させるために様々な関係者からの意見を集める機会を提供してくれたことに謝意を表した。そのうえで、国際ハンセン病学会の会長 (M Virmond 氏) も委員会のメンバーたちが 2011 年から 2015 年

のハンセン病による負荷のさらなる軽減のために強化された世界戦略の方向性を推奨すると表明した。

TAG メンバーは国レベルで計画を強化実行するための将来的な議論を支援していくことで合意した。WCS Smith 教授は世界ハンセン病計画と世界ハンセン病プログラム管理者会議準備グループに感謝の意を表明した。

この計画は 2011 年の初めに実施されるが、今後数カ月の間に、プログラム管理者会議での見直しを経て、2009 年 10 月に最終計画書が発表される。計画書は各言語に翻訳され、各地域が国家レベルの会議において内容が説明される。各国の需要度合に応じてトレーニングワークショップも同時に開催していく。

4. 世界達成目標経過監視システム

HJS Kawuma 氏は 2010 年比で、人口 10 万人あたりの新規第 2 度障害者 (Grade 2) を 2015 年末までに少なくとも 35% 減らす世界達成目標経過監視システムを提出した。新規患者数と Grade 2 数を定期的に集計することが重要となる。Smith 教授は国別の Grade 2 数の詳細な集計結果を紹介した。しかしながら、各国が提出した Grade 2 数を含む新規患者数がどれだけ信憑性のあるものかは定かでない。

▶ TAG の下に専門家による事務局作業部会を設け、各最新データを収集し、報告と分析を行うことが提案された。世界達成目標監視システムを用いることにより、最大限の恩恵を得ることができるかと確実視できる。

5. ハンセン病薬剤耐性の世界的サーベイランスのガイドライン：次のステップ

松岡氏によりハンセン病薬剤耐性の世界的サーベイランスが紹介された。新たに 3 カ国 (中国、フィリピン、コロンビア) がネットワークへの参加を表明した。そのほかのいくつかの多発国も近い将来の参加を検討している。WHO は、各国立研究機関へ耐性遺伝子検査の技術提供や、精度管理を行えるように支援していく。再発などの正確な診断や、適切なサンプルを検査のために研究機関へ搬

送することなどがサーベイランスシステムを有効に機能させていくうえで重要な要素となる。

- ▶ TAG は各国の研究を率先して支援し、WHO からの援助と共に、ILEP を含むその他の機関から各国へ援助の輪を広げられるよう支援を望んでいる。

6. 多施設での Uniform-MDT(U-MDT) 研究の経過報告

B Nagaraju 氏は少菌型ハンセン病 (PB) 患者と多菌型ハンセン病 (MB) 患者の Uniform-MDT (U-MDT) に関する多施設研究の経過について報告を行った。この研究は世界ハンセン病プログラム (Global Leprosy Programme: GLP) の協力のもと、特別研究プログラムと熱帯病トレーニング (Training in Tropical Diseases: TDR) の援助により進められている。この研究は当初 PB、MB それぞれ 2,500 症例ずつ収集する予定だったが、PB 2,094 症例、MB 1,302 症例しか収集できなかった。

2008 年 12 月の運営委員会会合において、主任研究員と共同研究員は新たに 5 つの地域で新規症例を収集し、予定のサンプルサイズの症例を集めることを提言することで合意した。追跡調査期間を 8 年間に延ばすことにより、再発症例との関連性を調査できるようにした。新たな症例の採用により、研究期間がさらに 5 から 8 年間伸び、最終的な研究結果が明らかになるのは 2015 年以降へととなった。

追跡期間の間に特別な症状が出たものは密にモニタリングされている。合計で 70 症例が 1 型反応 (境界反応) を示し、23 症例が 2 型反応 (ENL) を示し、さらに 23 症例については薬剤の副作用がみられた。230 症例についてはフォローアップできなかった。

2008 年末には 6 症例の再発が報告され、そのうちの 4 症例は MB であった。

7. ブラジルにおける 24 カ月 MB-MDT 治療と 12 カ月 MB-MDT 治療の比較研究の進行状況

MG Cunha 氏はブラジルで行っている 24 カ月 MB-MDT 治療と 12 カ月 MB-MDT 治療の比較研究

についての報告を行った。12 カ月治療グループでは、6 年間のフォローアップ期間の間に 128 症例中 1 症例に再発が認められた。24 カ月治療グループでは、8 年間のフォローアップ期間の間に 85 症例中 3 症例に再発が確認された。しかし、どちらのグループでも再発に関する統計的差異はなかった。

Cunha 氏はブラジルでの ofloxacin (OFLX) を用いた治験結果についても報告を行った。Rifampicin (RFP) と OFLX を用いた 28 日間の連日投与では、7 年間のフォローアップ期間に高い再発率があった。さらに、12 カ月間の MB-MDT に最初の 28 日間 OFLX を 400 mg を追加投与しても、再発に関しては統計的な差異は認められなかった。TAG は Cunha 氏にこの研究結果について早急に論文にまとめるように要請した。

8. より有効な抗ハンセン病薬と併用療法の可能性と挑戦

Baohong Ji 教授は有効な抗ハンセン病薬と併用療法の開発の次のステップに関する発表を行った。リファペンチン (rifapentine) や R 207910 のようないくつかの新薬は、マウスを使った抗らい菌試験で、殺菌作用の可能性があることが確認された。ヒトに対する殺菌作用や服用量を確認する試験は今後行われることになる。Moxifloxacin や clarithromycin、minocycline などいくつかの薬剤の併用は、RFP を服用できなかったり耐性のある MB 症例にも効果があることが示唆された。これらは現場で使用される前に、RFP 耐性の患者への効果と安全性を確認するために、慎重に臨床試験を行うべきである。

次の段階としては、1 つ目に新たな抗ハンセン病薬とこれまで使用されてきた抗ハンセン病薬をどのように併用するかのコンセンサスを探る、2 つ目に化学療法や臨床試験などの研究実施にあたって、その能力や器材、人材を持っている施設がどの国や研究機関にあるかの調査を行う、ということが提案されている。広範な提携や、共同研究を行う重要性が将来のハンセン病研究のために強調されている。

9. ハンセン病の感染力

P Saunderson 氏は、RFP の 1 回投与量と殺菌効果について、マウスのらい菌増殖作用を指標として、ハンセン病の感染力についてのトピックを紹介した。メンバーはハンセン病の感染力に関する以下の声明に同意した。

「ハンセン病患者の感染力は体内のらい菌数に関連している。RFP の 1 回の服用は動物モデルでも増殖できないくらいに生菌数を減らす。公衆衛生上では、多剤併用療法 (MDT) を開始することで感染力をなくすことができると結論づけるに足る合理的根拠がある」。

事務局は上記の声明の意味や重要性に関して説明を受けるよう提案された。

標とする。そのために、データ収集の方法を改善し、モニターシステムの進行具合を確認することが必要である。

- (3) TAG は、予防内服のデータを見直し、適切なガイドラインを作り、研究への助言を行い、将来のハンセン病コントロール計画策定のために TAG 支援のもとワーキンググループを設置することを推奨する。
- (4) TAG はハンセン病薬剤耐性の世界的なサーベランスを強く先導し、各地域にさらに多くの薬剤耐性の監視体制が設置されるのを推奨する。
- (5) TAG は以下の声明に同意する。「公衆衛生上、ハンセン病患者は多剤併用療法 (MDT) を開始したら感染力がなくなるとみなして差支えない」。

10. その他

- ▶ 各地域と各国でハンセン病の専門知識を維持することは重要な目標であると認められ、特にアフリカでは強調されるべきである。これは、ハンセン病に関する整った設備や高度な訓練を行える施設を作り維持していくこととも密接に関係している。
- ▶ プログラム管理者会議で議論された既定プログラムでの予防内服の活用の可能性、接触者検診や予防内服の実施環境について、詳細な提案をするためにさらなる議論が必要である。GLP はこれらの事項を検討するため、2009 年以降に TAG の援助のもとにワーキンググループを編成する予定である。

11. 結論と勧告

以下に結論と勧告を箇条書きする。

- (1) TAG メンバーは「2011 年から 2015 年のハンセン病による負荷軽減のための世界戦略」と「活動指針」について合意した。
- (2) TAG は TAG 支援のもと委員会を設置し、現況のデータの収集や報告の解析を見直し、新規患者中の第 2 度障害者 (Grade 2) 数の人口 10 万人あたりの比率を新たな世界戦略目

付 録

● ハンセン病制圧における WHO Technical Advisory Group について 背景概略

1995 年、WHO 事務総長により Leprosy Elimination Advisory Group (LEAG) が創設された。これは、2000 年までに公衆衛生の問題としてハンセン病の制圧計画を実行、管理するために作られた WHO Action Programme on Elimination of Leprosy (LEP) へアドバイスをするためである。ハンセン病有病率を人口 1 万人あたり 1 以下にすることが規定された。これは 1999 年の WHO 再編成によって廃止された。

計画の強化と進行状況をモニタリングするために、MDT 支給、コミュニケーションや情報提供、モニタリングやサーベランスなどの有効な援助方法を WHO へ助言するために、事務総長は専門家を含めたハンセン病制圧における Technical Advisory Group on Leprosy Control (TAG) を創設することを決めた。現在は、全 WHO 地域から 9 名の代表者がおり、それぞれが異なった専門知識やさまざまな分野での広い経験を持っている。TAG の初会合は 2000 年にジュネーヴで開催された。

参考事項

TAG は WHO から独立した専門家で構成されている。メンバーはハンセン病の専門知識と公衆衛生管理、疫学、社会学や啓発、オペレーションズリサーチ、障害予防などの各プログラムの専門分野から選ばれている。彼らは高い専門性バランスと地域代表により強固なチームを作り上げている。

メンバーは WHO により指名され、少なくとも年 1 回の会合が開かれている。任期は 3 年だが、任期延長も認められている。

TAG の会合は各国や国際協力機関の代表者たちがオブザーバーとして参加できるようになっており、審議への参加も奨励されている。

TAG は必要に応じてハンセン病多発国の代表者や他の分野の専門家たちを会合に招へいすることがある。

- ▶世界達成目標実行のためにハンセン病の負荷の減少、ハンセン病コントロール活動の管理、

見直しを行う

- ▶ WHO に対し、必要に応じて新たな戦略や提案を行う
- ▶ハンセン病の負荷軽減のため経過をモニターする
- ▶持続可能なハンセン病コントロール活動のために技術勧告や指導を行う
- ▶障害予防やリハビリを含むハンセン病コントロール活動の質を上げるための研究計画の実行と促進
- ▶ハンセン病患者・回復者や家族へのスティグマや差別を減らすための努力を支援する

謝 辞

本論文は、平成 21 年度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「ハンセン病の再発・再燃、難治症例に対する予防・診断・治療とハンセン病の啓発に関する研究」の分担研究「ハンセン病診療のネットワーク構築」の補助金を受けた。

Report of the Tenth Meeting of the WHO Technical Advisory Group on Leprosy Control

Norihisa ISHII¹⁾ * , Sumana BARUA²⁾, Shuichi MORI¹⁾, Yuzuru NAGAOKA³⁾,
Koichi SUZUKI¹⁾

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

2) Regional Adviser, Leprosy Elimination Programme, WHO-Regional Office for South East Asia, New Delhi, India

3) Department of Dermatology, Tama-Zensho, Leprosy Hospital, Tokyo, Japan

[Received / Accepted: 1 Oct. 2009]

Key words : elimination, leprosy, multidrug therapy, WHO

The tenth meeting of the WHO Technical Advisory Group (TAG) on Leprosy Control was held in New Delhi, India on 23rd April 2009. The meeting was chaired by Professor WCS Smith and attended by TAG members, several experts, WHO secretariat, and members of the technical bodies of International Leprosy Association (ILA) and the International Federation of Anti-Leprosy Associations (ILEP) also attended the meeting.

*Corresponding author :

Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases

4-2-1 Aoba-cho, Higashimurayama, Tokyo 189-0002, Japan

TEL : +81-42-391-8211 FAX : +81-42-391-8210

E-mail : norishii@nih.go.jp

2009年における世界のハンセン病の現況について

鈴木幸一^{*1)}、森 修一¹⁾、永岡 譲²⁾、石井則久¹⁾

1) 国立感染症研究所ハンセン病研究センター

2) 国立療養所多磨全生園皮膚科

[受付・掲載決定：2009年10月15日]

キーワード：世界保健機関、多剤併用療法、ハンセン病、ハンセン病制圧、有病率

世界のハンセン病の疫学は各国の保健担当の部署から世界保健機関（WHO）に報告される。報告されたデータは WHO によってまとめられ、速報的に週間疫学記録（weekly epidemiological record）に掲載される。2009年8月に、2009年初頭のデータが報告され、これを WHO の許可を受け日本語訳を行った。世界のハンセン病制圧は着実に進行しているが、早期発見や治療が重要であることには変わりなく、また、患者や家族の困難を取り除くために、リハビリテーションや様々な支援が必要であることなどが述べられている。

2009年の世界ハンセン病状況

ハンセン病制圧は、新規患者の早期発見と多剤併用療法（MDT）による迅速な治療が主な戦略となる。これらの戦略は、全ての患者への無償の MDT 支給を行っている全ての流行国において幅広く行われている。ハンセン病制圧活動は地方においても一般保健サービスと統合され、専門医への紹介がこの統合を強く推し進めている。これらの紹介センターが、合併症を持つ患者や、障害予防あるいはリハビリが必要な患者への特別なサービスを提供する上で重要な役割を担っている。公平に供給され、手頃な値段でかつ利用しやすい、質の高い治療の供給を維持することにもさらなる配慮がされている。

* Corresponding author:

国立感染症研究所ハンセン病研究センター
〒189-0002 東京都東村山市青葉町4-2-1
TEL: 042-391-8211 FAX: 042-394-9092
E-mail: koichis@nih.go.jp

ハンセン病問題

2009年には、121の国と地域が WHO への報告を行った。内訳は、アフリカ地域31、アメリカ地域25、南東アジア地域10、東地中海地域22、西太平洋西部地域33となっている。罹患率は国連人口部門による2008年半ばの人口データ¹⁾に基づいて計算された。

2009年初頭の世界におけるハンセン病登録患者数は213,036人となっている。2008年に121カ国から報告された新規患者数は249,007人であった（Table 1）。

Table 2は2002-2008年間の地域別新規患者数を表している。世界的にみると、年間新規患者数は2002年の620,638人から2008年の249,007人へと減少し続けている。2008年の世界全体の新規患者数は2007年（126カ国からの報告）に比べて9,126例以上（3.54%）減少した。

2008年には、17ヶ国において1,000例以上の新規患者数が報告された（Table 3）。これらの国

1) United Nations Population Division. *World population prospects: the 2006 revision*, Vol. 1, Table A20. New York. 43

は 2008 年の世界新規患者数の 94% を占めている。

Table 4 は新規患者が年間 100 人以上の国を対象として WHO 地域ごとの新規患者数の詳細を示した。全地域の国で新規患者の中に多菌型ハンセン病患者 (multibacillary: MB)、幼児、女性、第 2 級障害者の割合には大きなばらつきが認められた。アフリカ地域では、MB 患者の割合はカメルーンの 19.70% からケニアの 91.62% まで及ぶ。アメリカ地域では、この割合はボリビアの 38.76% からメキシコの 78.32% に及ぶ。南東アジア地域では、バングラデシュの 44.77% から、インドネシアの 82.15% に及ぶ。東地中海地域では、ソマリアの 30.40% からエジプトの 89.46% まで及ぶ。西太平洋地域では、ミクロネシア連邦の 58.06% からフィリピンの 90.27% に及ぶ。

新規患者の中で女性でハンセン病を有する者の割合は、アフリカ地域ではマダガスカルの 22.75% からコンゴ共和国の 64.52% まで及ぶ。アメリカ地域では、アルゼンチンの 22.16% からキューバの 46.35% まで及ぶ。南東アジア地域では、インド

の 35.17% からタイの 41.65% まで及ぶ。東地中海地域ではイエメンの 32.27% からソマリアの 52% に及ぶ。西太平洋地域では、フィリピンの 12.01% からミクロネシア連邦の 43.55% までである。

新規患者数の中の子供の割合も大きなばらつきを示す。アフリカ地域ではニジェールの 0.82% からコモロの 30.95% まで及ぶ。アメリカ地域ではアルゼンチンの 0.52% からブラジルの 7.46% にまで及ぶ。南東アジア地域では、タイの 2.99% からインドネシアの 11.40% まで及ぶ。東地中海地域ではソマリアの 4% からイエメンの 15.50% まで及ぶ。西太平洋地域では、中国の 2.48% からミクロネシア連邦の 39.50% までである。

また同様に、新規患者中の第 2 級障害者数の割合も幅広いばらつきを示す。アフリカ地域では、コモロの 3.57% からベニンの 25.17% に及ぶ。アメリカ地域では、アルゼンチンの 3.09% からコロンビアの 10.33% まで広がる。南東アジア地域ではインドの 2.80% からミャンマーの 13.10% に及ぶ。東地中海地域ではソマリアの 4.00% からイエ

Table 1. Registered prevalence of leprosy and number of new cases detected, by WHO region, beginning of 2009

WHO region	Registered prevalence, ^a beginning 2009	New cases detected, ^b 2008
African	30 557 (0.45)	29 814 (4.37)
Americas	49 069 (0.54)	41 891 (4.85)
South-East Asia	120 689 (0.69)	167 505 (9.60)
Eastern Mediterranean	4 967 (0.10)	3 938 (0.80)
Western Pacific	9 754 (0.05)	5 859 (0.33)
Total	213 036	249 007

^a Values are number (rate/10 000 population).

^b Values are number (rate/100 000 population).

Table 2. Trends in the detection of new cases of leprosy, by WHO regions, 2002–2008 (excluding European Region)

WHO region	No. of new cases detected						
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
African	48 248	47 006	46 918	45 179	34 480	34 468	29 814
Americas	39 939	52 435	52 662	41 952	47 612	42 135	41 891
South-East Asia	520 632	405 147	298 603	201 635	174 118	171 576	167 505
Eastern Mediterranean	4 665	3 940	3 392	3 133	3 261	4 091	3 938
Western Pacific	7 154	6 190	6 216	7 137	6 190	5 863	5 859
Total	620 638	514 718	407 791	299 036	265 661	258 133	249 007