

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500325

研究課題名(和文) ブルーリ潰瘍(*M. ulcerans*感染症)における末梢神経障害の
解明研究課題名(英文) Evaluation of peripheral nerve damage in Buruli ulcer (*Mycobacterium
ulcerans* infection)

研究代表者

後藤 正道(GOTO MASAMICHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・研究員

研究者番号：80325779

研究成果の概要(和文)：ブルーリ潰瘍は、抗酸菌 *M. ulcerans* 感染による痛みのない皮膚潰瘍であるが、病変に痛みがない原因は不明であった。*M. ulcerans* が産生する毒性脂質 mycolactone をマウス足底に注射すると、局所に知覚過敏の後に知覚鈍麻がおき、末梢神経にシュワン細胞の膨化と壊死が起こった。また、培養シュワン細胞に mycolactone を投与すると、シュワン細胞の壊死とアポトーシスが起こった。さらに、ヒトの治療前後の皮膚生検組織でも神経の変性所見を見出した。これらの研究結果から、ブルーリ潰瘍の無痛性は mycolactone の細胞毒性に起因することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)： Deep and painless ulcers are formed in Buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* infection). However, mechanism of painless nature was unknown. By the injection of toxic lipid mycolactone produced by *M. ulcerans* into murine footpads, initial hyperesthesia and subsequent hypoesthesia were observed. Histologically, Schwann cells showed swelling and necrosis. Cultured Schwann cells showed necrosis and apoptosis after the addition of mycolactone. Furthermore, nerve damage was observed in the skin biopsies of Buruli ulcer. These results indicate that nerve damage induced by mycolactone is responsible for the painless nature of this disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域(人体病理学、神経病理学、ハンセン病医学)

科研費の分科・細目：神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：ブルーリ潰瘍、筋・末梢神経疾患、抗酸菌による末梢神経障害

1. 研究開始当初の背景

ブルーリ潰瘍は、熱帯、亜熱帯地域の難治性皮膚疾患であり、大きく深い無痛性の皮膚潰瘍が形成される。四肢切断が必要となるような重篤な後遺症を残すこともあるため、ハ

ンセン病と同様に社会的な偏見を受けやすく、WHO はブルーリ潰瘍を、結核、ハンセン病に次いで重要な抗酸菌感染症と位置づけている。

日本においては、*M. ulcerans* の亜型である

M.shinshuense の感染症例が散発的に報告されている。

ブルーリ潰瘍では巨大な潰瘍にもかかわらずほとんど痛みがないが、その理由は全くわかっていなかった。

我々は、ブルーリ潰瘍に対する化学療法の動物実験を行う過程において、未治療の *M. ulcerans* 感染マウスを詳細に検索し、末梢神経内への抗酸菌の侵入と病変部の知覚低下を発見した(Goto *et al. Am J Pathol* 2006; 168:805-811)。これは、「末梢神経を侵す抗酸菌はハンセン病の起原菌 *M. leprae* のみ」という医学の常識を覆すものであった。

また、*M. ulcerans* は抗酸菌としては例外的に毒性脂質 mycolactone を産生するが、精製 mycolactone をマウス足底へ注入した予備実験では、投与後1週間に知覚過敏を示した。

2. 研究の目的

以下の多角的な解析によって、ブルーリ潰瘍における無痛性の原因と考えられる末梢神経障害の発生機序を明らかにする。また、必要に応じて、ハンセン病の神経病変との比較検討を行う。

(1) マウスへ mycolactone を投与することで知覚鈍麻や末梢神経障害が起きるかを、行動学的観察と病理学的観察によって明らかにする。

(2) ブルーリ潰瘍患者の治療前と治療後の皮膚組織を詳細に病理学的に検索し、末梢神経病変の有無を解明する。

また、*M. ulcerans* 接種マウスに化学療法を行い、治療前後の組織像を比較する。

(3) Mycolactone を培養シュワン細胞と培養線維芽細胞へ投与し、細胞毒性・アポトーシスなどを比較検討する。

(4) これらの研究を WHO ブルーリ潰瘍対策に参加している研究者と協力しておこない、成果を世界に発信する。

3. 研究の方法

(1) *M. ulcerans* から精製した mycolactone A/B を BALB/c マウスの足底に注射し、足底腫脹・潰瘍が形成される過程において、経時的に(1~6週間)足底の痛覚の有無を、知覚検査で確認した。また、マウスを還流固定し、足底の組織標本と電顕標本を作成して、神経病変を検索した。

また、BALB/c マウスに *M. ulcerans* を接種して、Rifalazil 5 mg/kg/day 投与前後の組織像を経時的に比較した。

(2) ガーナのブルーリ潰瘍7例について、抗菌薬(RFP+SM)治療前と6週間の治療後の皮膚生検組織の末梢神経の形態変化と、炎症パターンを光顕と電顕で検索した。

(3) Mycolactone が末梢神経障害を来す機序を解明するために、末梢神経の主な構成細胞であるシュワン細胞に対する細胞毒性を、線維芽細胞とマクロファージへの毒性と比較検討した。

(4) WHO のブルーリ潰瘍対策国際会議のメンバーであるアメリカ、イギリス、ガーナの研究者と共同研究を実施し、この会議で毎年発表を行った。

4. 研究成果

(1) マウスへの mycolactone 投与後1週目には、足底の知覚過敏(図1左)が、4週目には知覚低下(図1右)が起きた。

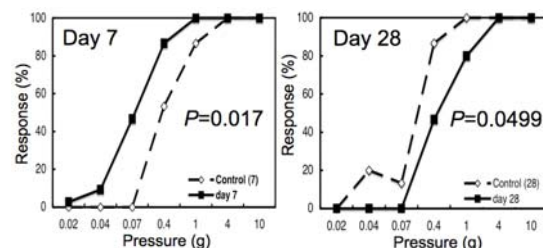


図1. Mycolactone 投与後のマウス足底の知覚の推移 (von Frey 法)

また1~2週目には神経内に出血と好中球の浸潤があり(図2左)、4週目には線維化が起こった。電顕による検索では、シュワン細胞の細胞質の空胞化が認められた(図2右↑)。

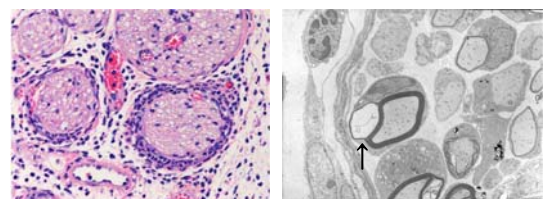


図2. Mycolactone 投与後のマウス足底の神経病変(左: HE染色、右: 電顕)

この研究によって、mycolactone による神経病変が、ブルーリ潰瘍に痛みがない原因に直接関与していると考えられた(*Infect Immun* 2008; 76:2002-7)。

(2) ヒトのブルーリ潰瘍の治療前と後では、病変内に残っている神経の浮腫を伴う変性が認められた。電顕では、神経内膜と軸索の

浮腫・変性が認められ、シュワン細胞も空胞変性を示した（図3）。

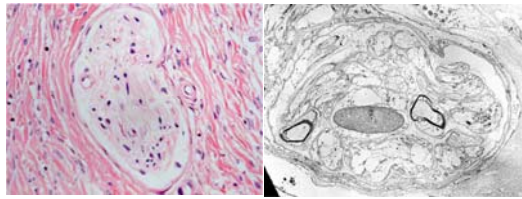


図3. ブルーリ潰瘍生検組織内の末梢神経に見られた変性（左：HE、右：電顕）

抗菌薬治療前後の皮膚組織の炎症パターンを検索したところ、治療前では壊死と軽度の急性炎症が認められた。治療開始後6週間では類上皮細胞、多核巨細胞、Tリンパ球、Bリンパ球が出現した（図4）。これらの結果から、化学療法によって菌が変性・死滅すると類上皮細胞肉芽腫が形成されることが明らかになった。

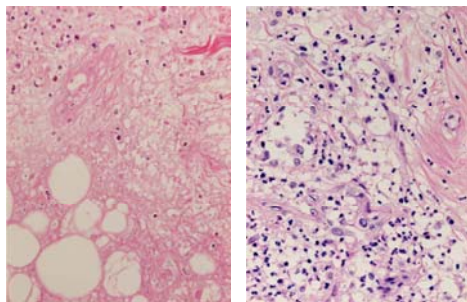


図4. 治療前（左）と治療後（右）における炎症細胞の比較

一方、*M. ulcerans* 接種マウスでは Rifalazil 治療開始後1週間までは組織壊死と間質の浮腫が残存したが、3週後から15週後にかけて徐々に菌がマクロファージに取り込まれ、類上皮細胞が出現して病変は消退した（図5）。これらの組織像の変化は、ヒトの治療前後の生検組織と類似していた。

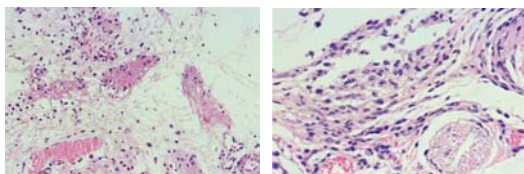


図5. *M. ulcerans* 接種マウスの化学療法後の組織像の変化（左：治療前、右：治療9週後）

(3) 人工合成mycolactone A/Bとそのジアステレオマー（ハーバード大学、岸義人教授より供与）を段階希釈し、培養線維芽細胞(L929)とマクロファージ(J774A.1)への毒性を検討したところ、先行研究とほぼ同じ30ng/mlの濃度で細胞毒性を示した。次に、培養シュワン細胞(SW10)への毒性を線維芽細胞と比較検討した。線維芽細胞と同濃度のmycolactone

投与では、シュワン細胞はより多くの細胞死（トリパンプルー染色の定量、図6）とアポトーシス（TUNEL法によるアポトーシス細胞の定量、図7）を示した。

これらの実験結果は、ブルーリ潰瘍における知覚低下がシュワン細胞への直接の傷害によって起こることを強く示唆している。

Cell death by synthetic mycolactone A/B remote diastereomer

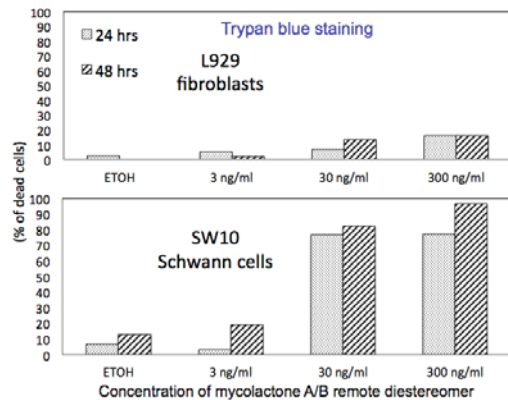


図6. 培養線維芽細胞（上段）と培養シュワン細胞（下段）の合成mycolactone投与による細胞死の比較. シュワン細胞は30 ng/ml以上の濃度ではほとんどが死滅するが、線維芽細胞は抵抗性を示す（トリパンプルー染色）。

Apoptosis by synthetic mycolactone A/B remote diastereomer

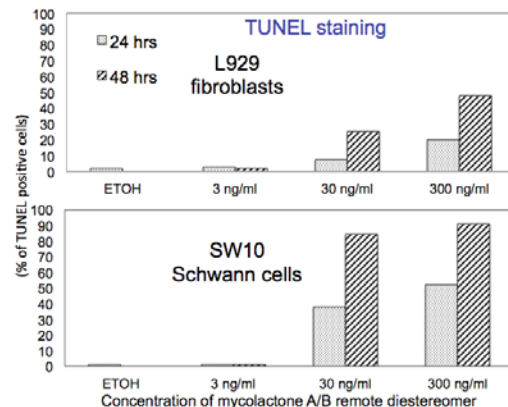


図7. 培養線維芽細胞（上段）と培養シュワン細胞（下段）の合成 mycolactone 投与によるアポトーシス出現の比較. 図6の細胞死と同様に、シュワン細胞のほとんどは30 ng/ml以上の濃度では48時間後にアポトーシスを示すが、線維芽細胞にはアポトーシスは少ない（TUNEL法）。

(4) 平成22年度より、WHOのブルーリ潰瘍対策国際会議・病因解析研究グループの委員長に選ばれ、イタリアの研究グループとの協力で、ブルーリ潰瘍の病理診断のための世界的ネットワーク構築のために、ウェブアトラスの作成を始めた(URLは備考に記載)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. 圓 純一郎, 石井則久, 後藤正道: ブルーリ潰瘍 (*Mycobacterium ulcerans* 感染症) の神経傷害における Mycolactone の役割、日本ハンセン病学会雑誌、査読有、Vol.80, No.1, 2011, pp.5-10
2. Junichiro En, Masamichi Goto, Kazue Nakanaga, Michiyo Higashi, Norihisa Ishii, Hajime Saito, Suguru Yonezawa, Hirofumi Hamada, Pamela L. C. Small: Mycolactone is responsible for the painlessness of *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer) in a murine study. Infection and Immunity, 査読有, Vol.76, No.5, 2008, pp.2002-2007

[学会発表] (計 13 件)

1. Masamichi Goto, Junichiro En: Cytotoxic effect of mycolactone produced by *M. ulcerans*, Annual Meeting of the WHO Global Buruli ulcer Initiative, 2011.3.29, Geneva, Switzerland
2. Masamichi Goto, et al.: Murine and human histopathology of Buruli ulcer (*M. ulcerans* infection) after chemotherapy, 45th U.S.-Japan Tuberculosis and leprosy conference, 2010.7.13-15, Boston, USA
3. 圓 純一郎, 後藤正道, 他: ミャンマー国 Central Special Skin Clinic (CSSC), Yangon General Hospital における EMG トレーニング報告 (第 1 報)、第 83 回日本ハンセン病学会総会、2010.5.28-29、鹿児島
4. Masamichi Goto, et al.: Comparison of murine and human histopathology after chemotherapy. Annual Meeting of the WHO Global Buruli ulcer Initiative, 2010.3.21-23, Geneva, Switzerland
5. Kyaw Kyaw, Masamichi Goto, et al.: Analysis of pure neural leprosy in Myanmar. 44th U.S.-Japan Tuberculosis and leprosy conference, 2009.7.29-31, Fukuoka
6. 後藤正道, 他: ミャンマーにおける純神経型ハンセン病の皮膚病変、第 50 回日本神

経病理学会総会、2009.6.4-6、高松

7. 後藤正道, 他: ミャンマーにおける純神経型ハンセン病の検討 (第 3 報)、第 82 回日本ハンセン病学会総会、2009.5.14-15、出雲
8. 圓 純一郎, 後藤正道, 他: ハンセン病の運動麻痺に対する総合電流刺激装置 (EMS) を用いた治療法の検討、第 82 回日本ハンセン病学会総会、2009.5.14-15、出雲
9. Junichiro En, Masamichi Goto, et al.: Mycolactone is responsible for the painlessness of *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer). 43rd U.S.-Japan Tuberculosis and leprosy conference, 2008.7.8-10, Baltimore, USA
10. 圓 純一郎, 後藤正道, 他: *Mycobacterium ulcerans* による神経障害の研究—Mycolactone の役割について—、第 42 回日本作業療法学会、2008.6.20-22、長崎
11. 後藤正道, 他: 純神経型ハンセン病の皮膚はハンセン病の保菌状態を示すか (第 2 報)、第 81 回日本ハンセン病学会、2008.5.22-23、熊本
12. 圓 純一郎, 後藤正道, 他: 適切な訓練と装具を用いることによって手の機能改善ができたハンセン病後遺症の一症例、第 81 回日本ハンセン病学会、2008.5.22-23、熊本
13. Junichiro En, Masamichi Goto, et al.: Pathological findings of Buruli ulcer lesions during antibiotic treatment. 10th Annual meeting of the Global Buruli Ulcer Initiative, 2008.3.31-4.3, Geneva, Switzerland

[図書] (計 2 件)

1. 中永和枝, 石井則久, 斎藤肇, 後藤正道, 岩本朋忠: *Mycobacterium ulcerans subsp. shinshuense*, 非定型抗酸菌の基礎と臨床 (分担執筆) (斎藤肇ら編集)、医薬ジャーナル社、大阪、印刷中
2. 後藤正道: ハンセン病、新臨床内科学 第 9 版 (分担執筆) (高久史磨ら編集)、医学書院、東京、2009.1、pp 1335-1336

〔その他〕
ホームページ等
ブルーリ潰瘍のウェブアトラス(英文)
<http://www.siapec.it/index.php?Mod=Pagina&Pagina=2747&ENG=1>

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 正道 (GOTO MASAMICHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・研究員
研究者番号：80325779

(2)研究協力者

圓 純一郎 (EN JUNICHIRO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・研究員
研究者番号：30587879