

論 文 要 旨

**Mycolactone is responsible for the painlessness of
Mycobacterium ulcerans infection (Buruli ulcer)
- a murine study**

***Mycobacterium ulcerans* による神経障害
- mycolactone の役割について**

圓 純一郎

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

ブルーリ潰瘍は、*Mycobacterium ulcerans*感染によってひきおこされるヒトの難治性皮膚疾患であり、熱帯、亜熱帯地域で見られる。大きく深い無痛性の皮膚潰瘍が形成され、重篤な身体後遺症を残すことが多いことからハンセン病と同様に社会的な偏見を受けやすく、治療法の確立が望まれている。

我々は実験的マウスにより、Buruli潰瘍における末梢神経病変についての検討を行ない、これまでに、多くの神経束は正常に保たれているものの一部の神経束には多数の抗酸菌の侵入が見られ、電子顕微鏡による検索では、シュワン細胞の空胞変性が特徴的であること、足底の知覚検査では知覚鈍麻になることなどを報告してきた。

M. ulcerans は抗酸菌としては例外的に毒性脂質 mycolactone を産生し、mycolactone は線維芽細胞とマクロファージにアポトーシスを誘導することが知られている。本研究の目的は、Buruli 潰瘍における末梢神経病変についてこの mycolactone の役割と知覚障害の発現機構の解明に迫ることである。

【材料および方法】

Mycolactone注射マウスの足底の腫脹と知覚検査：

M. ulcerans より精製した mycolactone を、微量のエタノールで溶解後に 7H9 broth で希釈し、6週齢 BALB/C 雌マウス (n=25) の左足底に 100 μ g (25 μ l) ずつ注射し、7日目、14日目、21日目、28日目、42日目に足底の厚さをノギスで測定し、von Frey microfilament (Touch-Test Sensory Evaluator Instruments; North Coast Medical, Inc. 0.02, 0.04, 0.07, 0.4, 1, 4, 10g)を用いた知覚検査を行った。対照として、希釈に使用した溶液のみを左足底に注射した6週齢 BALB/C 雌マウス (n=5) を用いた。

Mycolactone注射マウスの組織学的検索：

7日目、14日目、21日目、28日目、42日目に4%パラフォルムアルデヒド (n=3) あるいはそれに1%グルタルアルデヒドを加えた固定液 (n=2) で灌流固定し、足底、脾、胸腺、肝、肺、腎のヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的検索と、足底のエポン包埋1ミクロン切片・トルイジンブルー染色による検索を行い、対照と比較した。

【結 果】

Mycolactone注射マウスの足底の腫脹と知覚検査：

mycolactone 100 μ g注射前には2.38 \pm 0.17mmであった足底の厚さは、注射後に発赤をともなって腫脹して7日目には3.46 \pm 0.046mm、14日目には3.49 \pm 0.35mm、21日目には3.08 \pm 0.40mm、28日目には3.02

±0.24mm、42日目には2.71±0.13mmとなり、7日目から14日目をピークに徐々に腫脹は消退していった。肉眼的には発赤も徐々に減退した。

知覚検査では、注射後7日目と14日目には対照と比較して知覚過敏を示したが、21日目には知覚は回復し、28日目と42日目には逆に知覚鈍麻が認められた。

Mycolactone注射マウスの組織学的検索：

組織学的検索では、皮膚のびらん、間質の浮腫などが見られた。また、好中球浸潤は菌接種では少なかったが、mycolactone注射では中等度認められた。びらん周辺の神経束では、注射後7日目から21日目にはシュワン細胞の核の消失と出血が見られ、一部では神経周膜に強い好中球の浸潤も認められた。また、菌接種時に認められたシュワン細胞の空胞変性と同一の病変が、注射後14日目と21日目に観察された。注射後28日目と42日目になると、炎症は見られないが、髄鞘の再生像と神経線維の減少が認められた。

【結論及び考察】

Buruli潰瘍では、骨まで達する大きな皮膚潰瘍が形成され、初期の腫脹期は有痛性であるが、その後はほとんど痛みがないため、診断や治療が遅れる大きな原因となっている。

今回の研究に於いては注射量を100 μ gに固定し、7日～42日目まで経時的に足底の厚さ、知覚、病理学的変化を観察した。その結果、mycolactone注射によって、(1)足底は14日目をピークに腫脹し、そのあと徐々に消退すること、(2)初期には知覚過敏になるものの、徐々に知覚鈍麻が起こること、(3)初期には神経周膜に好中球が浸潤すること、(4)菌接種で見られたシュワン細胞の空胞化が、14日目と21日目に見られこと、(5)知覚鈍麻期には、髄鞘再生像と神経線維の減少が見られること、が明らかになった。これらの結果は、ヒトのブルーリ潰瘍における臨床経過と良く合致するものと考えられる。今後さらに、mycolactoneが神経病変をひきおこす機序についての検索を続けて行きたい。

(Infection and Immunity, American Society of Microbiology Vol.76, No.5 2008年 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 88 号	学位申請者	圓 純一郎
審査委員	主査	出雲 周二	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	小田 紘	副査 金蔵 拓郎
	副査	谷本 昭英	副査 郡山 千早

Mycolactone is responsible for the painlessness of *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer) - a murine study

(*Mycobacterium ulcerans* による神経障害 - mycolactone の役割について)

Mycobacterium ulcerans (*M. ulcerans*) 感染によるブルーリ潰瘍 (Buruli ulcer) は、熱帯、亜熱帯地域で見られるヒト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。社会的な偏見を受けやすいことから、原因の究明と治療法の確立が望まれている。先行研究により、後藤らのグループはブルーリ潰瘍が無痛性であることの原因を調べ、マウスでは *M. ulcerans* が末梢神経に侵入し、一定の時期には知覚低下がおこることを明らかにした。一方、*M. ulcerans* は毒性脂質 mycolactone を産生し、mycolactone はモルモットの病変部位にアポトーシスを引き起こすことが知られている。そこで学位申請者らは、mycolactone が知覚障害と末梢神経病変をひきおこすかどうかを検討した。

方法は、*M. ulcerans* より精製した mycolactone を 6 週齢 BALB/c 雌マウスの左足底に接種し、7 日、14 日、21 日、28 日、42 日目に局所の変化の観察と、von Frey 法による知覚試験を行った。また、7 日、14 日、21 日、28 日、42 日目に 5 匹ずつ灌流固定をし、組織学的検索を行った。

その結果、本研究では以下が明らかにされた。

- 1) 7 日目においては、mycolactone 1、3、10 μ g 接種群では、肉眼的にも組織学的にも変化は認められなかったが、30、100、200 μ g 接種群では足部の腫脹、発赤とびらんが見られた。
- 2) 100 μ g 接種群を用いた知覚試験では、7 日目では知覚過敏 ($P=0.01$) となり、その後 21 日目では対照方向へ近づいたあとに、28 日目では知覚鈍麻 ($P=0.04$) を示した。
- 3) 組織学的検索では、30 μ g 以上接種のびらん周辺の神経束でシュワン細胞核の消失が見られ、一部では好中球の浸潤も認められた。
- 4) 電顕観察によりシュワン細胞の空胞変性と脱髄性病変が認められた。

本研究により、菌が産生する毒素 mycolactone の足底接種により、ヒトのブルーリ潰瘍と類似の皮膚病変が接種部位に生じ、知覚過敏に引き続く知覚鈍麻と神経束の変性が引き起こされることを明らかにした。ブルーリ潰瘍の臨床経過とよく合致している点が非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 88 号	学位申請者	圓 純一郎
審査委員	主査	出雲 周二	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	小田 紘	副査 金蔵 拓郎
	副査	谷本 昭英	副査 郡山 千早

主査および副査の5名は、平成22年2月1日、学位申請者 圓 純一郎 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) *Mycobacterium ulcerans* は人工培地上で増やすことは出来るのか。また、実験に使用した mycolactone はどのようにして手に入れたのか。

(回答) 増殖が遅いこともあり、人工培地上で増やすことは可能であるが難しい。mycolactone 自体はテネシー大学の細菌学教授 P Small 博士より分けていただいた。

質問2) 国内で14例の報告があるが、それは国内で感染したものなのか。また、感染ルートは皮膚からか。

(回答) 海外渡航歴がなく全て国内感染であると考えられる。感染経路についてはまだよくわかっていない。しかしアフリカに於いては水辺の水生昆虫や植物から *M. ulcerans* が検出されているので感染に関わっていると考えられている。またオーストラリアに於いては蚊の媒介により感染すると考えられている。

質問3) Mycolactone は菌体成分か。それとも菌から分泌されるのか。また、mycolactone A/B の A/B とは何か。

(回答) Mycolactone は *M. ulcerans* から分泌される。mycolactone A/B は mycolactone の種類を表している。

質問4) Mycolactone 100 μ g は生菌の菌数ではどれくらいに相当するのか。

(回答) 生菌の菌数については分かりかねる。

質問5) 肺での出血のメカニズムはどうなっているのか。

(回答) 今回の実験により肺に出血が見られたが、それが mycolactone の接種によるものかどうかはわからなかった。ただ実際に見られた所見なので記録を行った。

質問6) どうして日本でも共同研究者のいる米国テネシー州でも稀な疾患であるブルーリ潰瘍の研究を始めたのか。

(回答) 指導教員である後藤准教授(現星塚敬愛園園長)が、実験動物の病理所見の観察を依頼されたことから一連の研究が始まった。大きな潰瘍でありながら痛みがないという点に、ハンセン病との関連で興味を持った。

質問7) Fig 2 の42日目以降、知覚はどのように予想されるか。

(回答) 42日目で知覚鈍麻になってはいるが、それ以降は知覚が戻ってくることが予想される。

質問8) 今回の実験に於いて潰瘍形成はみられたのか。

(回答) 今回の実験に於いても潰瘍は形成された。

質問9) らい菌による知覚麻痺との病理的な違いは。

(回答) らい菌によるハンセン病は先に知覚が低下し、知覚低下から潰瘍形成に気付かず潰瘍が大きくなっていく。それに対してブルーリ潰瘍は潰瘍形成が先に起こり、その部分の知覚が低下していくという経過を辿る。

質問10) 再生するシュワン細胞は、変性した細胞が回復してきているのか。

(回答) 組織学的検索から、一度変性したシュワン細胞が再生してきていると考えられる。

最終試験の結果の要旨

質問 11) 治療はどのように行うのか。

(回答) 5 cm未満の潰瘍についてはリファンピシンとストレプトマイシンを使用することで治療を行う。5 cm以上のものについては、上記に加えて潰瘍部の皮膚についての外科的切除術と皮膚移植を行う。

質問 12) 投与量を減らして頻回投与による実験は行っていないのか。

(回答) 今回の実験については頻回投与は行っていない。ブルーリ潰瘍における mycolactone の役割を調べていく上で頻回投与の実験は行っていく必要があると考えている。

質問 13) LD50 については分かっているのか。

(回答) LD50 については分かっていない。

質問 14) 投与した mycolactone の全身分布についてはどうなっているのか。

(回答) 全身分布についてはわかっていない。

質問 15) 潰瘍をつくる原因は何か。

(回答) mycolactone の毒性によって細胞が傷害されると考えられている。

質問 16) 神経障害だけが起こるのか。循環障害はないのか。

(回答) 潰瘍形成が先行して起こり、神経障害が起こることは分かっているが、循環障害が起こっているかどうかは分かりかねる。

質問 17) 国内での症例報告はどこか。熱帯・亜熱帯地方で見られる病気であるが季節性はあるのか。中国ではどこで見られるのか。また好発年齢層はどうなっているのか。

(回答) 日本では長野県で第1例が報告され、その後新潟、京都、広島で報告されている。季節性についてはわかりかねる。中国ではどこで見ついているかわからないが、日本のものと中国の菌は *M. ulcerans* の亜種として報告されている。アフリカに於いては子供から大人まで幅広い年齢層で見られるが水辺が多く、水に近づくことの出来る年齢層であると考えられる。

質問 18) Fig 1B について、コントロール群と比べて 200 μ g 接種群で足底部の Thickness にばらつきがあるが、個体差があるのか。Fig 2 のコントロール群の反応から知覚検査で学習効果が考えられないか。実験の時間は揃えているのか。またアポトーシスははっきりしなかったのは何故か。

(回答) Fig 1B について、個体差によりばらつきはあるものの、100 μ g と 200 μ g で似たような値であり無視できるものと考えられる。今回の実験系に於いて、知覚試験は人に行う方法と同じであり学習効果は考えにくい。実験を行う時間は統一している。アポトーシスが起きなかった可能性については TUNEL 法の手技の問題か、はっきりしない。

質問 19) 臨床では painless であるが他の感覚障害はどうなっているのか。また運動神経は傷害されないのか。

(回答) Von Frey 法が痛覚だけを調べているかは分かりかねるところがある。運動神経は傷害されておらず、リハビリテーションも拘縮予防が中心である。

質問 20) 基本は髄鞘が傷害されており、髄鞘の再生が主体となっているようである。また軸索の再生所見はないようであるが、無髄線維の変性や再生はないのか。

(回答) 無髄線維については今回変性及び再生について観察されなかった。

質問 21) 髄鞘が激しく傷害されている時期は7日目か。また神経束毎の病変のばらつきはあるのか。

(回答) 髄鞘が激しく傷害されている時期は7日目及び14日目である。神経束については病変のばらつきは観察された。

質問 22) 神経線維の定量的な検索は行っているのか。

(回答) 神経線維の定量的な検索は行っていない。今後の研究課題として参考にさせていただく。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。