

# 論 文 要 旨

## *Mycobacterium leprae* in Neurons of the Medulla Oblongata and Spinal Cord in Leprosy

ハンセン病剖検例における延髄と脊髄の

神経細胞内のらい菌の証明

THIDA AUNG

### Introduction and Purpose

Leprosy is a chronic, infectious, neurodegenerative human disease caused by *Mycobacterium leprae* and is still a major global health problem. Neurotropism and involvement of *M. leprae* in the peripheral nervous system (PNS) have been commonly reported as a cause of neuropathy, but less attention has been paid to central nervous system (CNS) damage in patients with leprosy, despite several reports of this phenomenon. Furthermore, the human brain and spinal cord have been considered to be free from bacilli in leprosy. In leprosy, although nerve damage and paralysis are most often associated with an attack of acute or sub-acute neuritis as part of the reaction episode, often nerve trunks become paralyzed quietly without such manifestations; a condition known as quiet nerve paralysis (silent neuropathy).

To date, the exact etiology and pathogenesis of motor paralysis in leprosy have not been identified. However, degeneration of motor neurons occurs in patients with motor neuron diseases such as amyotrophic lateral sclerosis, and in this study we looked for similar nerve damage in leprosy.

### Materials and Methods

Autopsy cases of cured lepromatous leprosy (n=67) from the National Hansen Disease Hospital Hoshizuka-Keiaien, Kagoshima, Japan and autopsy cases of non-leprosy patients (n=15) as control cases from Kagoshima University Hospital were selected for the study. Autopsy records and the patients' clinical charts were reviewed and searched for the clinical information.

All H & E stained sections were reviewed. For cases with obvious morphological changes (vacuolar changes of neurons) in both the medulla oblongata (MO) and spinal cord (SC) (n=19), cases without any morphological changes (n=8) and control cases (n=10 for MO and SC, and n=5 for SC and dorsal root ganglia {DRG}), the following experiments were performed: sections of the MO and SC were cut into slides of 4- $\mu$ m thickness for hematoxylin and eosin (H & E) staining, Fite-Faraco acid-fast staining, immunohistochemistry for *M. leprae*-specific anti-phenolic glycolipid-1 (PGL-I) and Anti-BCG, a TUNEL assay, and serial sections of 10- $\mu$ m thickness were mounted on membranes for laser-captured micro-dissection. Additionally, specimens from DRG taken from lepromatous leprosy cases (n=27/67) and those of control cases (n=5) were examined for similar study.

DNA extraction was performed from micro-dissected tissue. A nested PCR targeting the *M. leprae*-specific repetitive sequence (RLEP) was performed yielding a 129-bp outer product and a 99-bp nested product. The following oligonucleotides primers were used: LP-1, 5'-TGCATGTCATGGCCTTGAGG-3'; LP-2, 5'-CACCGATACCAGCGGCAGAA-3'; LP-3, 5'-TGAGGTGTCGGCGTGGTC-3'; and LP-4, 5'-CAGAAATGGTGCAAGGGA-3'. Gel electrophoresis was performed and DNA was visualized by ethidium bromide and ultraviolet light. Nucleotide sequencing of amplified DNA was performed using an

automated sequencer.

## Results

Majority of the patients showed evidence of neurological complications such as bending of the fingers, shortening of the extremities, lagophthalmos and/ or blindness. These features were recorded according to WHO disability grading. 97% (65/67) had grade 2 disability, and 3% (2/67) were free from disability (grade 0). No clinical evidence of bulbar palsy was noted.

Of the 67 cases of leprosy, 44 (67%) had vacuolar changes of motor neurons either in medulla oblongata (nucleus ambiguus, hypoglossal nucleus) or spinal cord. The neurons were swollen and showed foamy changes; although the normal shape was preserved for some neurons, the whole cytoplasm of others has been replaced by tiny vacuoles. No acid fast bacilli were identified by Fite staining, but PGL-I and BCG immunostaining were positive in vacuolated areas. Most cases showed strong staining intensity and PGL-I staining showed an intracytoplasmic vacuolar and granular pattern. PCR revealed *M. leprae*-specific genomic DNA in 18/19 of cases (95%) with vacuolated changes and 5/8 (63%) without vacuolated changes. DNA sequencing result demonstrated more than 99% homology with *M. leprae* specific genomic sequences. In DRG 21/27 cases of lepromatous leprosy showed vacuolated neurons and 22/27 were positive for PGL-I. Endothelial cells of 2 lepromatous leprosy cases also showed PGL-I positive vacuolative changes. All above findings were negative in control cases. TUNEL staining did not show significant increase of apoptosis in the neurons. The PCR positivity had a significant correlation with PGL-I immunostaining ( $P < 0.05$ ). Presence of vacuolar changes in the spinal cord was correlated with hands and feet deformity grades ( $P = 0.04$ ). Neuronal loss was evaluated by counting the number of spinal anterior horn neurons from leprosy cases and age matched control cases. Cervical and lumbar cords were counted separately, (cervical cord of leprosy ( $n = 22$ ),  $56.3 \pm 30.8$ ; cervical cord of control ( $n = 6$ ),  $48.0 \pm 27.6$ ; lumbar cord of leprosy ( $n = 22$ ),  $64.5 \pm 28.9$ ; lumbar cord of control ( $n = 10$ ),  $71.1 \pm 28.9$ ). There was no statistically significant neuronal loss between leprosy and control cases. (cervical,  $P = 0.67$ ; lumbar,  $P = 0.24$ ).

## Discussion and Conclusion

Our immunohistochemical data show the presence of mycobacterial antigens in neurons of the central nervous system in cases of leprosy. PGL-I is a phenolic-diacylphthiocerol triglycerides and forms a loose capsule around the bacillus and is known to be specific to *M. leprae*. Treated patients still frequently harbor a significant level of antibodies to PGL-I, and detectable by immunohistochemistry in tissue sections from leprosy specimens. All our cases were long-term cured leprosy cases (disease-free for more than ten years and slit skin smear-negative), and therefore only dead organisms were thought to be present in CNS. This may explain the lack of acid fastness, although conversion to the non-acid fast, cell wall-deficient dormant form found in *M. tuberculosis* may also have occurred, and the negative results in Fite staining are in accordance with this. Highly sensitive methenamine silver was performed in CNS specimens of lepromatous leprosy cases and motor neurons were not stained by this method, and only doubtful staining of fragmented bacilli was identified in endothelial cells which were also positive for PGL-I.

The presence of *M. leprae*-specific genomic DNA was further confirmed by nested PCR. In addition to the histopathological and immunohistochemical findings, the DNA analysis confirms the persistence of *M. leprae* in the CNS even after long-term clinical cure; this is the first demonstration of this phenomenon. The route of entry of *M. leprae* into motor neurons is not yet proven. Neural spread of bacilli may occur via motor nerve axon to motor neuron or anterograde spread via sensory nerve axon to motor neuron. Hematogenous spread should also need to be considered. In conclusion, our results confirms that there is clear morphological change in motor neurons of lepromatous leprosy patients associated with PGL-I and mycobacterial DNA. This study provides significant additional evidence to indicate that *M. leprae* is present in the CNS in a subset of patients. Further investigation is required to correlate this finding to motor dysfunction and silent neuropathy in leprosy.

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 19 号	学位申請者	ティダ アウン
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	梅北 善久	副査 郡山 千早

### ***Mycobacterium leprae* in Neurons of the Medulla Oblongata and Spinal Cord in Leprosy**

(ハンセン病患者の延髄と脊髄の神経細胞内におけるらい菌の証明)

ハンセン病はらい菌による慢性炎症性疾患であり、多発性単神経炎による後遺症を残すことが多いことから、末梢神経障害について多くの研究がなされてきた。一方、活動性の神経炎が治癒した後も徐々に筋力低下をきたす症例 (Quiet nerve paralysis, Silent neuropathy) も少なくないが、神経障害における中枢神経の関与についてはほとんど注目されなかった。学位申請者らは、Silent neuropathy に中枢神経病変が関与する可能性を考え、国立療養所星塚敬愛園のハンセン病剖検例 67 例と、鹿児島大学の剖検例 15 例 (陰性対照) の、脳幹部と脊髄のパラフィン切片に、HE 染色、抗酸菌染色、免疫組織化学などを行い、さらにらい菌特異抗原陽性部位をレーザーマイクロディセクションによって採取して、らい菌ゲノムを PCR で解析した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

1. ハンセン病 L 型治癒期の剖検 67 例中の 44 例 (66%) において、延髄疑核と脊髄前角の運動神経核に神経細胞の腫大と空胞変性が認められた。
2. Fite 法とメセナミン銀法の抗酸菌染色は陰性であったが、らい菌特異的抗原 PGL-I に対するモノクローナル抗体による免疫組織化学が空胞変性部位に一致して陽性であった。多くの抗酸菌と交叉反応する抗 BCG ポリクローナル抗体も、PGL-I とほぼ同一の染色態度を示した。
3. マイクロディセクション採取組織における、らい菌特異的な DNA 塩基配列 (RLEP) に対する nested PCR では、空胞変性のある症例の 95% (18/19) に PCR が陽性で、Sequencing によってらい菌ゲノムと 99%以上の相同性が確認された。
4. 陰性対照には空胞変性、免疫組織化学、PCR は全て陰性であった。
5. TUNEL 法ではアポトーシスの増加は確認できず、神経細胞の減少も明らかではなかった。
6. 手足の変形の程度と空胞変性の有無は正の相関を示した ( $p=0.04$ )。

本研究は、ハンセン病 L 型治癒期の多くでらい菌が中枢神経内の運動ニューロンへ感染していることを、免疫組織化学と PCR を組み合わせることによって、初めて明らかにした。ハンセン病の神経障害の発症機序に中枢神経へのらい菌の感染が関与する可能性を示した点で意義深く、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 19 号	学位申請者	ティダ アウン
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	梅北 善久	副査 郡山 千早

主査および副査の5名は、平成19年6月13日、学位申請者 ティダ アウン さんに面接し、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) 検索対象症例は全て長期治療例で、菌は10年以上陰性と書いてあるが、一般的に死菌や菌抗原がそんなに長期間、組織内に残存できるのか。

(回答) らい菌のDNAは、600年から1000年以上前に埋葬された考古学標本からも抽出できている。今回使用した短い塩基配列を検出するPCRは、治療された症例や考古学標本の中の断片化あるいは変性した菌のDNAを検出できる方法である。また、ハンセン病L型では治療によって抗PGL-I抗体は低下するが、菌が陰性化しても血清抗体が陽性のままの症例もあり、免疫組織化学によって組織内に証明できる。

質問2) 生きた菌はこれらの細胞の中には残っていないのか。

(回答) 今回の研究では抗酸菌染色によって菌体を確認することはできなかった。結核菌と同様に、らい菌も休眠期の状態で体内に残っている可能性もある。

質問3) 図1-3では、PGL-IとBCGの免疫染色は陽性だが、抗酸菌染色は陰性である。この点について、もう少し詳しい説明を。

(回答) 抗酸菌染色の原理は、カルボールフクシンが脱色後も菌の細胞質に残ることである。結核菌と同じく、らい菌も細胞壁の構造が変化して抗酸性をなくしているのであれば、細胞壁の構造とは無関係な免疫染色が陽性であっても矛盾はしないと考えられる。

質問4) 標本を観察するのに、油浸の高倍率レンズを使用したか。免疫染色では菌の形はわかったか。

(回答) 抗酸菌染色の観察には油浸レンズを使用したか、HEと免疫染色の観察には用いなかった。免疫染色では、桿菌の形をした染色は認められなかった。

質問5) 1990年にはどれくらいの入所者が敬愛園にはいたのか。剖検率はどれくらいか。

(回答) 1990年の入所者は636名で、1990-2000年の剖検率は47.3% (96/203)である。

質問6) 神経細胞の空胞変性の病理学的な意味は何か。

(回答) 細胞内に菌が蓄積することによって神経細胞の腫大が起こる。この細胞内蓄積によって神経細胞の機能が障害されると推測されるが、証明はできていない。一方、脂肪肝においては肝細胞内に脂肪が蓄積して肝機能障害がおり、テイ・サックス病やニーマン・ピック病などのリポドーシスでは、脂肪の神経細胞内蓄積によって神経機能が障害されることが知られている。

質問7) 電子顕微鏡によって、細胞内の自己融解(autophagy)が認められたか。

(回答) 今回の検索対象はパラフィン切片であり、神経細胞の電顕による観察はできなかった。今後の研究で明らかにしたい。

質問8) DNAのシーケンスに関して、症例4の延髄ではチミンの挿入が見られているが、同じ症例の脊髄では挿入がない。これはどうしてか。

(回答) 感染したらい菌が複数のクローンからなっている可能性、あるいは長期感染によって片方が変異を来した可能性が考えられる。

質問9) らい菌は末梢神経から中枢神経に向けて上行性に侵入するとし、一方、表2で中枢神経の空胞変

性と手足の変形の頻度は有意に相関すると示している。らい菌が、末梢神経にとどまっている場合、手足の変形は来たさないのか。

(回答) らい菌が末梢神経のシュワン細胞内にとどまっていて炎症が全くない場合には、神経障害はほとんど来たさないことがわかっている。しかし、ほとんどの場合には末梢神経に炎症が起こるため、変形がおこることが多い。

質問 1 0) WHO の grade 2 の変形を示した 2 症例は、表 1 の 27 例には含まれているか。

(回答) これらの 2 症例は脊髄か延髄のいずれかに空胞変性があるもので、表 1 には含まれていない。

質問 1 1) 対照症例には神経疾患や結核は含まれているか。また、対照症例はどのように選んだのか。

(回答) 対照症例のほとんどは悪性腫瘍などで死亡しており、神経疾患や結核は含まれていない。中枢神経が検索されていて、ハンセン病と年齢が一致する(60 歳以上)剖検は非常に少なく、最近 10~20 年の剖検例から条件に一致するものを全て使用した。

質問 1 2) 使用した PCR のプライマーは、PGL-I をコードしている部位か。

(回答) 今回使用した RLEP は非コード領域であり、PGL-I をコードしていない。

質問 1 3) 結果を見ると、PGL-I 免疫染色の陽性率が PCR 陽性率よりも高い。これらの感度の違いをどう説明するか。

(回答) PGL-I 免疫染色も PCR もハンセン病に特異的な検査方法であるが、化学療法の後では、らい菌ゲノムがランダムに分断されている症例があり、それらが PCR 陰性になったと考えられる。

質問 1 4) ハンセン病に対する発症予防ワクチンはあるか。BCG による発症予防効果はあるのか。

(回答) ハンセン病に対する予防ワクチンはまだ開発されていない。1970 年代に、途上国において結核に対して BCG 接種がなされたが、この BCG はハンセン病の発症を低下させているので、一定の効果はあると思われる。

質問 1 5) PGL-I 以外にもらい菌に特異的な構造や抗原はあるのか。

(回答) 現在のところ PGL-I が最も特異的と言われているが、最近、MMP II (major membrane protein II) がハンセン病の血清診断に有効との報告がなされている。

質問 1 6) 今回使用した DNA シークエンス方法は何か。

(回答) Oligo-synthesis 法を、Hokkaido System Science に依頼して行った。

質問 1 7) ハンセン病 L 型の症例を検索しているが、L 型は Ridley-Jopling 分類の LL か。

(回答) ほとんどの症例は LL であるが、69 例のうち 3 例は BL である。

質問 1 8) PGL-I は神経細胞以外にニューロピルにも陽性である。神経細胞の中の PGL-I は DNA を含まずにニューロピルにらい菌 (DNA) があって、PCR 陽性になった可能性はないか。マイクロディセクションでニューロピルを含まない神経細胞だけを切り出すことはできなかったか。

(回答) 今回は PGL-I 陽性の神経細胞とその周囲のニューロピルを同時に切り出したが、ニューロピルにも PGL-I が陽性の症例はごく少数であり、指摘された可能性は低いと考えられる。

質問 1 9) 今回の研究は全てハンセン病治癒症例であるが、活動性のハンセン病での研究はあるか。

(回答) 球麻痺をおこしたハンセン病女性の剖検で延髄の疑核の神経細胞の空胞化、血管周囲のリンパ球浸潤とわずかな類上皮肉芽腫があったという症例報告がある。

質問 2 0) 中枢神経の運動神経、脊髄根、末梢神経を比較検討することが重要であるが、行ったか。

(回答) 末梢神経の系統的な検体保存がなされていないため、実施できなかった。

質問 2 1) 神経細胞の空胞変性について、同様の変化が他の疾患でもおこることがあるか。

(回答) 中心性染色質溶解(central chromatolysis)において、ニッスル小体が消失し、細胞質が膨化して核が辺縁に寄ることがある。またニーマン・ピック病やクロイツフェルト・ヤコブ病などでも神経細胞の膨化と空胞化が見られる。しかし、これらのパターンは今回見られた所見とは異なる。

質問 2 2) 運動ニューロンの軸索が障害された場合の逆行性神経変性との鑑別が重要だが、検討したか。

(回答) 逆行性神経変性では central chromatolysis で細胞の腫大がおこるが、今回のような微小空胞変性は見られないので、異なるものと考えられる。

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。