

氏名	徳善 英紀		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5940号		
学位授与の日付	平成31年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	カイコにおける <i>Mycobacterium ulcerans</i> の感染モデルの検討		
論文審査委員	岡元 邦彰 教授	浅海 淳一 教授	稲葉 裕明 准教授

## 学位論文内容の要旨

論文内容の要旨（2000字程度）

### 【緒言】

ブルーリ潰瘍は、*Mycobacterium ulcerans* によって引き起こされる。病原因子として外毒素であるマイコラクトンが知られており、その合成にはプラスミドが関与する。*M. ulcerans* は遅発育性であり、集落形成に6~8週間以上を要する。またマイコラクトンの合成に関与するプラスミドは脱落しやすく、マイコラクトン非産生菌に転換する場合がある。ところで、*M. ulcerans* 及びマイコラクトンの病原性の評価にはマウスをはじめとする哺乳類が用いられるが、多量の試料と長期の評価期間を要し、また安定した結果を得ることは困難である。使用する試料が少量でよく、かつ短期間で評価を行うことができる方法として昆虫であるカイコを用いた実験系に着目した。カイコは、非獲得性免疫反応を有し、少量の試料で、短期間で評価できることから、様々な病原体の病原性の評価に利用されている。本研究では、*M. ulcerans* のカイコ感染モデル有用性に着目し、*M. ulcerans* 及びマイコラクトンの病原性評価への応用可能性を検討した。

### 【材料ならびに方法】

#### 1. 培養条件およびプラスミド pMUM001 保持の確認

*M. ulcerans* Agy99 株はアルブミン・デキストロース・カタラーゼ (ADC) 添加 Middlebrook 7H10 (7H10-ADC) 寒天培地および ADC と Tween80 (終濃度 0.05%) を添加した Middlebrook 7H9 (7H9-ADC-Tween80) 液体培地を用いて、30°C で培養した。*M. ulcerans* とプラスミド pMUM001 の保持の確認は、*M. ulcerans* に特異的な挿入配列 *IS2404* を標的としたプライマーおよび pMUM001 の塩基配列の一部を標的としたプライマーをそれぞれ用いた polymerase chain reaction (PCR) 法により行った。

#### 2. *M. ulcerans* の毒性の評価

マイコラクトン産生 *M. ulcerans* Agy99 株とマイコラクトン非産生 *M. ulcerans* Agy99 株を、それぞれホモジナイザーを用いて Middlebrook 7H9-ADC-Tween80 液体培地中で均一化した後、菌液の調整を行った。菌液を波長 600nm (OD<sub>600</sub>) で吸光度を測定し、OD=2.0 (約 6.5×10<sup>7</sup>cell/mL)、OD=0.2 (約

6.5×10<sup>6</sup>cell/mL), および 0.02 (約 6.5×10<sup>5</sup>cell/mL) に調整した. 各菌液 50μL を 5 齢 1 日目のカイコに第 6 節より投与した. 投与後各群のカイコの生死を 5 日後まで確認した.

### 3. 生菌投与によるカイコの体液および組織の変化

前項と同様に *M. ulcerans* Agy99 株を調整してカイコに投与した. 投与 1 日後にカイコを解剖し, 体液を回収した. 回収した体液の吸光度 (OD<sub>470</sub>) を測定した. また, カイコを解剖して体内の組織変化を肉眼的に観察した.

### 4. マイコラクトンの毒性の評価

0.1% Triton X-100 水溶液を用い, 精製マイコラクトンを, 2 mg/mL, 20 mg/mL, および 200 mg/mL の濃度に調整した. 各 50μL を 5 齢 1 日目のカイコに投与し, 1 日毎に生死を確認した.

### 5. マイコラクトン投与による体液および組織の変化

前項と同様にマイコラクトン溶液 50μL を, 5 齢 1 日目のカイコに投与した. 投与 6 時間後に, 3 に準じて体液を回収し, 体液の吸光度 (OD<sub>470</sub>) を評価した. また, 解剖してカイコ体内の組織変化を確認した.

## 【結果】

1. 7H10-ADC 寒天培地上で *M. ulcerans* を培養したところ, 黄色集落と白色集落の形成が認められた. PCR 法の結果より, 両者はともに *M. ulcerans* であるが, 黄色集落菌は pMUM001 保持菌であり, 白色集落菌では pMUM001 非保持菌であることが示唆された.

2. 黄色集落菌投与群では, 他の群と比較して生存率の低下が認められた.

3. 黄色集落菌投与群では, 菌数に比例した体液の着色および背脈管における強い体液の着色がみとめられ, 一部ノジュールの着色も認められた. 白色集落菌投与群では体液および背脈管における体液の着色は軽度であった.

4. マイコラクトン 10μg 投与群では, 投与 1 日後にすべてのカイコが死亡した. 0.1μg 投与群と 0.1% Triton X-100 水溶液投与群では死亡は認められなかった.

5. マイコラクトン投与 6 時間後における体液の着色は, マイコラクトンの濃度に比例して強くなる傾向にあったが, 有意差は認められなかった. またいずれの群間でも背脈管の着色は認められなかった.

## 【考察】

黄色集落菌投与群では, 白色集落菌投与群に比し, カイコの死亡率が有意に高かったことから, カイコは *M. ulcerans* に感受性を有し, *M. ulcerans* の投与によるカイコの死亡にはマイコラクトンが関与している可能性が示唆された.

黄色集落菌と白色集落菌の体液の着色の違いは, マイコラクトンがカイコの防御反応に影響を与えた結果による可能性が考えられた.

マイコラクトン投与による濃度依存的な死亡率の上昇が認められ, 濃度依存的に体液の着色を示す傾向も認められたことから, カイコはマイコラクトンの毒性に感受性を有することが示唆された. 一方で, マイコラクトン投与群では, 生菌投与群と比較して, 解剖時の背脈管の着色は乏しく, ノ

ジュール形成も認められなかったことから、カイコの背脈管および体液の着色は主にマイコラクトン以外の菌体成分によって促進されることが示唆された。

#### **【結語】**

カイコはマイコラクトン産生性 *M. ulcerans* に対する感受性を有することが認められた。また、マイコラクトンに対する感受性も認められた。これらのことから、*M. ulcerans* およびマイコラクトンの病原性の評価モデルとしてカイコが応用可能であることが示された。

## 論文審査結果の要旨

ブルーリ潰瘍は、*Mycobacterium ulcerans* が原因で発症する感染症である。外毒素であるマイコラク トンは、プラスミド pMUM001 にコードされている酵素によって合成される。現在、*M. ulcerans* およびマイコラク トンの病原性の評価には、哺乳類動物が使用されているが、多量の試料と 長期の評価期間を要する。そこで、少量の試料かつ短期間で評価を行うことができる方法としてカ イコ細菌感染モデルに着目した。本研究では、本モデルを利用した *M. ulcerans* およびマイコラク トンの病原性評価の可能性について検討した。

### 【材料および方法】

PCR 法により *M. ulcerans* とプラスミド pMUM001 の保持の確認を行い、マイコラク トン産生 *M. ulcerans* とマイコラク トン非産生 *M. ulcerans* を認めた。マイコラク トン産生 *M. ulcerans* の毒性の 評価のため、それぞれの菌液を OD=0.02、0.2、2.0 に調整し、カイコに投与した。結果、マイコラク トン産生 *M. ulcerans* OD=2.0 投与群では、生存率の低下が観察された。同様に菌液を調整し、カイ コに投与した。投与 1 日後、カイコの体液および組織の変化を確認した。結果、マイコラク トン産 生 *M. ulcerans* では、菌数に比例した体液の着色およびノジュールの着色を認めた。一方、マイコラ クトン非産生 *M. ulcerans* では、体液の着色は軽度であった。続いてマイコラク トンの毒性評価のため、精製マイコラク トン溶液を 0.1、1.0、10 $\mu$ g に調整し、カイコに投与した。結果、マイコラク トン 10 $\mu$ g 投与群では、投与 1 日後に顕著な生存率の低下を認めた。また、精製マイコラク トン溶液を 調整し、カイコに投与した。投与 1 日後、カイコの体液および組織の変化を確認した。結果、マイ コラク トンの濃度に比例した体液の着色を認めたが、ノジュールの着色は認めなかった。マイコラ クトンと *M. ulcerans* が保有する菌体成分による影響を明らかにするためマイコラク トン非産生 *M. ulcerans* OD=2.0 に精製マイコラク トン 0.01、0.1、1.0 $\mu$ g を添加し、カイコに投与した。投与 1 日後、 カイコの体液および組織の変化を確認した。結果、マイコラク トンの濃度に比例した体液の着色お よびノジュールの着色を認めた。

### 【結果および考察】

カイコはマイコラク トン産生 *M. ulcerans* に対して受性を有していることが示唆された。また、カ イコはマイコラク トンに対する感受性を有していることが示唆され、マイコラク トン産生 *M. ulcerans* によるカイコの死亡にはマイコラク トンが関与していることが強く示唆された。さらに、マ イコラク トン産生 *M. ulcerans* 投与によるカイコの体液の着色およびノジュールの形成は、マイコラ クトンだけでなく、菌体成分の関与が強く示唆された。

本論文は、カイコの *M. ulcerans* 感染モデルを確立し、病原性を評価するモデルとしての有用性を証 明した。今後、本菌による感染症治療モデルとして新たな可能性を示した重要な知見であり、大変意 義のあるものと思われる。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認 める。