

表 IV-52 抗酸菌のRunyon 分類

分類		菌種名
培養可能菌	遅発育菌	結核菌群 <i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. microti</i> <i>M. africanum</i>
		非結核性抗酸菌群 I 群菌 光発色菌 <i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i> <i>M. asiaticum</i>
		II 群菌 暗発色菌 <i>M. flavescens</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i>
	III 群菌 非光発色菌 <i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. celatum</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. gastri</i> <i>M. genavense</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. shimoidei</i> <i>M. terrae</i> <i>M. trivale</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. xenopi</i>	
	迅速発育菌	IV 群菌 <i>M. abscessus</i> <i>M. fortuitum</i> group <i>M. chelonae</i> group <i>M. phlei</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i>
培養不能菌		<i>M. leprae</i>

表 IV-53 世界における感染症による死亡数(2006)

感染症	死亡数(万人)
全感染症	1,400
急性呼吸器感染症	376
エイズ(結核の合併を含む)	283
下痢性疾患	168
結核	141
マラリア	89
麻疹	55
年間総死亡(参考)	約 5,800

World Health Report 2006, WHO

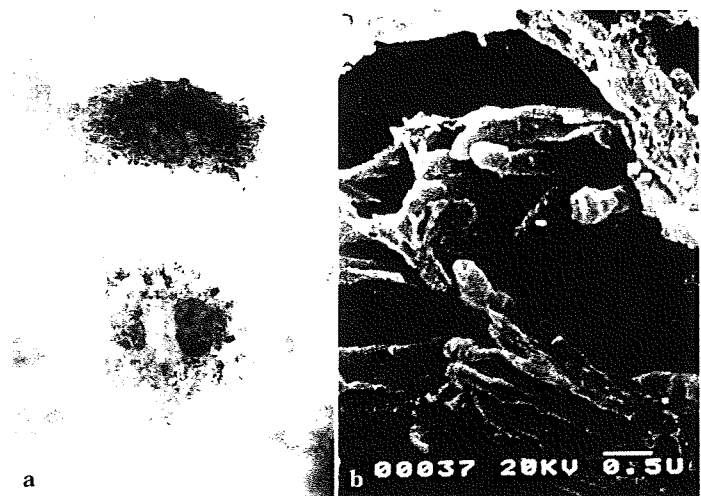


図 IV-53 結核菌の細胞内発育・増殖(a)と走査電子顕微鏡による微細構造(b)

結核菌(赤染桿菌: a)がマクロファージ細胞内で発育・増殖している。

含む)で不活化されるが、凍結や乾燥には抵抗性を示す。

結核菌やらい菌はヒトを含む温熱動物体内でのみ、発育・増殖可能である。他方、NTMは自由世代(free-living)抗酸菌なため、環境に普遍的に存在し、水(自然水や水道水)、土壌、原虫やヒトを含む動物に生息している。また、NTMはヒトや動物における正常細菌叢の構成微生物でないが、無症候性健康者の皮膚、気道、消化管や生殖器系からたびたび分離されることもある。

5 分離・同定

a 発育・増殖速度および集落の性状

至適発育温度が30~37°C領域の抗酸菌が多く、培養には30°Cと37°Cを施行する必要がある。増殖倍加時間は菌種により異なるが、2~20時間以上であり、固形培地(卵培地：レーヴェンシュタイン・イエンセン Löwenstein-Jensen 培地や小川培地、および寒天培地：Middlebrook 培地)を用いる。集落形成に8日以上を要する遅発育抗酸菌(slow growers)と7日以内である迅速発育抗酸菌(rapid growers)に大別される。集落の形状は平滑(smooth型)-不正、粗(rough型)など、多様である。なお、人工培地で培養不能な菌 *M. leprae* は培養不能抗酸菌に分類される。さらに、集落の性状として、色素産生と光反応性によ

り、光発色菌群 photochromogens(I群)、暗発色菌群 scotochromogens(II群)、非光発色菌群 nonchromogens(III群)、また、迅速発育菌群は色素産生や光反応性にかかわらず、一括して、IV群に分類される。発育・増殖速度および集落性状を加味した抗酸菌の Runyon 分類(表IV-52)がある。

b 生化学的性状

抗酸菌の代謝・酵素活性に基づく生化学的性状(表IV-54)として、

- ① ナイアシン産生は結核菌に比較的特異的であり、他の抗酸菌ではほとんど陰性である。
- ② ウレアーゼ産生は結核菌群や暗発色菌群で陽性であり、*M. avium* や *M. intracellulare* で陰性である。
- ③ 5%食塩水存在下で耐性(発育・増殖)を示す遅発育菌は *M. trivale* のみ、さらに、ほとんどの迅速発育菌は耐性である。

その他の生化学的性状として、3日培養後のアリルサルファターゼ活性(陽性：*M. fortuitum* 群、*M. marinum*, *M. asiaticum*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. trivalle* および *M. flavescens*/陰性：結核菌群、MAC や *M. kansasii*)、カタラーゼ活性(高活性：*M. kansasii*, *M. trivale*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum* group や *M. chelonae* group/低活性：結核菌群、MAC や *M. ulcerans*)、

表 IV-54 主要な培養可能抗酸菌の表現型

分類	菌種	至適発育温度(°C)	集落形状	色素産生/光反応性	ナイアシン産生	ウレアーゼ	5%食塩水耐性	核酸プローブ	
遅発育菌	結核菌群	<i>M. tuberculosis</i>	粗(R)	非光発色	陽性	通常、陽性	なし	あり	
		<i>M. bovis</i>	粗(R)	非光発色	陰性	通常、陽性	なし	あり	
	光発色菌群(I)	<i>M. kansasii</i>	35	平滑(S)/粗(R)	光発色	陰性	通常、陰性	なし	あり
		<i>M. marinum</i>	30	平滑(S)/粗(R)	光発色	通常、陰性	陽性	なし	なし
		<i>M. gordonae</i>	37	平滑(S)	光発色	陰性	一定しない	なし	あり
	暗発色菌群(II)	<i>M. scrofulaceum</i>	37	平滑(S)	暗発色	陰性	陽性	なし	なし
		<i>M. szulgai</i>	37	平滑(S)/粗(R)	暗発色	陰性	陽性	なし	なし
	非光発色菌群(III)	<i>M. avium</i>	35~37	平滑(S)/粗(R)	非光発色	陰性	陰性	なし	あり
		<i>M. intracellulare</i>	35~37	平滑(S)/粗(R)	非光発色	陰性	陰性	なし	あり
<i>M. ulcerans</i>		30	粗(R)	非光発色	陰性	一定しない	なし	なし	
迅速発育菌(IV)	<i>M. fortuitum</i>	28~30	平滑(S)/粗(R)	非光発色	陰性	陽性	あり	なし	
	<i>M. chelonae</i>	28~30	平滑(S)/粗(R)	非光発色	通常、陰性	陽性	一定しない	なし	
	<i>M. abscessus</i>	28~30	平滑(S)/粗(R)	非光発色	陰性	陽性	通常、あり	なし	
	<i>M. smegmatis</i>	28~35	平滑(S)/粗(R)	暗発色	陰性	未報告	あり	なし	
	<i>M. vaccae</i>	30	平滑(S)	暗発色	陰性	未報告	一定しない	なし	

S: smooth型, R: rough型

ピラジナミド分解酵素活性(陽性:ピラジナミド感受性結核菌, MAC, *M. fortuitum* groupや*M. chelonae* group/陰性:ピラジナミド耐性結核菌, *M. bovis*や*M. kansasii*)などがある。

ミコール酸などの細胞壁脂肪酸分析(高速液体クロマトグラフィーなど)で, ミコール酸炭素鎖長は菌属に依存し, *Corynebacterium* 属:22~38, *Rhodococcus* 属:34~52, *Nocardia* 属:44~60, *Gordona* 属:48~66, *Mycobacterium* 属:60~90であり, *Mycobacterium* 属のミコール酸炭素鎖は最長である。

従来, 抗酸菌属は発育・増殖速度および集落の性状や生化学的性状により分類されてきた。長所として, ①技術的に確立されていること, ②標準化されていること, ③比較的安価であることが挙げられるが, 短所として, ①医療情報提供に際し, 迅速性を欠くこと, ②大量の菌量を要することなどがある。これらの短所に対し, 脂質や遺伝子解析は補完的である。

④ 遺伝子解析

結核菌, *M. bovis* やらい菌の全ゲノム塩基配列が解明され, 病原性の理解, 新規診断方法, 抗菌薬やワクチンの開発, さらに, 分子疫学領域など, 今後の抗酸菌学や抗酸菌感染症の制圧対策に寄与することが考えられる。抗酸菌遺伝子解析法として, 原理的に核酸探索子(プローブ), 核酸塩基配列および核酸増幅法が開発されている。核酸探索子法は抗酸菌を同定する目的で菌種特異的リボソーム RNA(rRNA)に相補的 DNA 探索子を用いる。rRNA は固形および液体培地に培養した抗酸菌から抽出する。所要時間は約2時間である。現在, 入手可能な DNA 探索子は, 結核菌群, *M. avium* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. kansasii* などがある。核酸塩基配列法は正確, 迅速であるが, 欠点として, 高価および熟練を要するため, 限られた施設でのみ用いられている。抗酸菌の16S rRNA が超可変部であり, 菌種により異なることから, 菌種特異的核酸配列を同定に用いる。核酸増幅法は抗酸菌 DNA や RNA をポリメラーゼ連鎖反応 polymerase chain reaction(PCR)で増幅し, 増幅された DNA や RNA を菌種特異的探索子で同定する。さらに, 制限酵素を用いた DNA 指紋法 DNA

fingerprinting, restriction fragment length polymorphism(RFLP)を組み合わせるにより, 感染源の特定など分子疫学領域, さらに, 薬剤耐性抗酸菌の迅速検出にも応用されている。欠点として, 核酸増幅は菌の生死に依存しないこと, さらに, 菌数を表現することが困難, すなわち疾患活動性を反映しないこと, 精度管理(微量核酸の混入, 偽陽性や偽陰性)が困難なことなどがある。

⑥ 病原性・感染症

抗酸菌は基本的に外毒素や内毒素非産生性であるが, 例外的に *M. ulcerans* (西アフリカ諸国で猛威を奮っている Buruli 潰瘍の原因菌)が外毒素(マイコラクトン mycolactone, 別名:マクロライド毒素。宿主組織に壊死を惹起する)を産生する。炎症病変や組織傷害は抗酸菌に対する感染免疫応答過程で宿主から産生されるサイトカインをはじめとする生理活性物質に依存している。抗酸菌, 特に, 結核菌の病原性は, ①結核菌を貪食したマクロファージの宿主感染防御機構から逸脱して細胞内生存および増殖すること(細胞内寄生病原体:図IV-53)や, ②遅延型過敏反応を誘導することにより表現される。この病原性の発現には細胞壁成分(ミコール酸糖脂質, リポアラビノマンナン, 細胞壁成分による補体の活性化や熱ショックタンパク質)が関与している。細胞壁表層に存在するミコール酸糖脂質(別名:コード因子)は肉芽腫を誘導する。リポアラビノマンナンはマクロファージ活性化を阻害する一方, マクロファージから腫瘍壊死因子(TNF)- α 産生を促進し, 発熱, 体重減少や組織傷害を惹起する。さらに, インターロイキン interleukin(IL)-10産生を誘導することにより, Tリンパ球活性化を抑制する。細胞壁成分による補体の活性化がオプソニン化を誘導する結果, 結核菌が補体受容体を介してマクロファージに侵入することを促進する。結核菌由来熱ショックタンパク質はヒト由来熱ショックタンパク質と化学的に類似しているため, 宿主成分と交差免疫応答, すなわち, 自己免疫反応を誘発する。

マクロファージに貪食された結核菌は, 食胞体(ファゴソーム)と水解小体(リソソーム)の融合を阻害することにより, 酸性化されず, 食胞体内で生存し続ける(細胞内寄生病原体)。酸性化の抑制

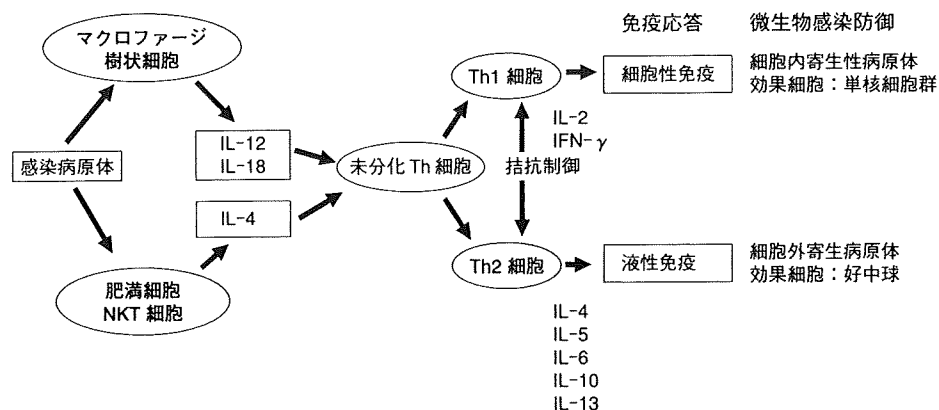


図 IV-54 微生物感染における細胞性および液性免疫応答

には結核菌のウレアーゼやマクロファージの補体やマンノース受容体を介した取り込みが関与している。

抗酸菌は細胞内寄生病原体であり、宿主防御にマクロファージ-サイトカイン-CD4陽性1型ヘルパーT(Th1)細胞応答系、すなわち、細胞性免疫が貢献している(図IV-54)。細胞性免疫の起動サイトカインとして、IL-12、IL-18やinterferon(IFN)- γ がTh1細胞分化や活性化など、重要な役割を演じている。しかし、結核菌感染に対する遅延型過敏反応を含む細胞性免疫の発現は抗結核菌防御と組織傷害に貢献、すなわち功罪の二面性(諸刃の剣)を表現する。また、遺伝的因子として、ヒト第2染色体に存在する遺伝子(NRAMPI: natural resistance associated macrophage protein 1, 別名=SLC11A1)が感染防御に関与し、この機能はマクロファージに表現されている。初回の結核菌曝露の場合、宿主の炎症応答は非特異的であり、普遍的な細菌感染に対する炎症応答に類似している。感染約4~6週後に乾酪壊死を伴う肉芽腫炎症が生じ、また、結核菌ツベルクリンタンパク質抗原に遅延型過敏反応、ツベルクリン皮内反応が成立する(図IV-55)。この機序として、病変部において炎症惹起性サイトカイン(IL-1やTNF- α)、Th1細胞関連サイトカイン(IL-12、IL-18、IFN- γ)や単球走化性ケモカイン(monocyte chemoattractant protein 1: MCP-1やmacrophage inflammatory protein 1 α : MIP-1 α など)が産生され、マクロファージの局所的集積(肉芽腫)、加えて、細胞性免疫(遅延型過敏反応を含む)が誘導される。結核菌感

染に対する宿主応答は一次感染と二次結核に大別される。

1) 一次感染

未曝露宿主が最初に結核菌を吸入した場合に生じるが、細胞性免疫の発現により感染防御が成立し、90%の感染宿主は発病を回避できる。空気感染した結核菌は肺胞マクロファージに貪食され、マクロファージとともに肺門リンパ節に移行する。未活性化マクロファージは抗菌活性を発揮できず、結核菌はマクロファージ内で発育・増殖、マクロファージを破壊、そして、周囲の未感染マクロファージに感染する。この過程で、肺から血行を介して全身播種性感染に至ることもある。

感染約4~6週後、すなわちツベルクリン皮内反応が成立する時期、結核菌により活性化されたT細胞とマクロファージの相互作用により細胞性免疫が発現する。この機序に3経路が存在する。第1の経路は、Th1細胞がIFN- γ を分泌し、IFN- γ はマクロファージを活性化し、活性化マクロファージは抗酸菌に対し殺傷能力を有する反応性窒素化合物(NO、NO₂やHNO₃)を産生し、抗結核菌防御を誘導する。この現象は類上皮肉芽腫の形成にも関連している。第2の経路は、CD8陽性T細胞、すなわち細胞傷害性T細胞が感染したマクロファージを破壊することにより、結核菌を殺傷する。第3の経路はCD4およびCD8陰性T細胞がマクロファージを破壊し、その結果、破壊されたマクロファージは乾酪壊死を伴う肉芽腫を形成する。乾酪壊死病巣に存在する抗酸菌は酸性環境や低酸素のため、発育・増殖が抑制される。最終的に、一次感染病巣は肺実質と肺門リン

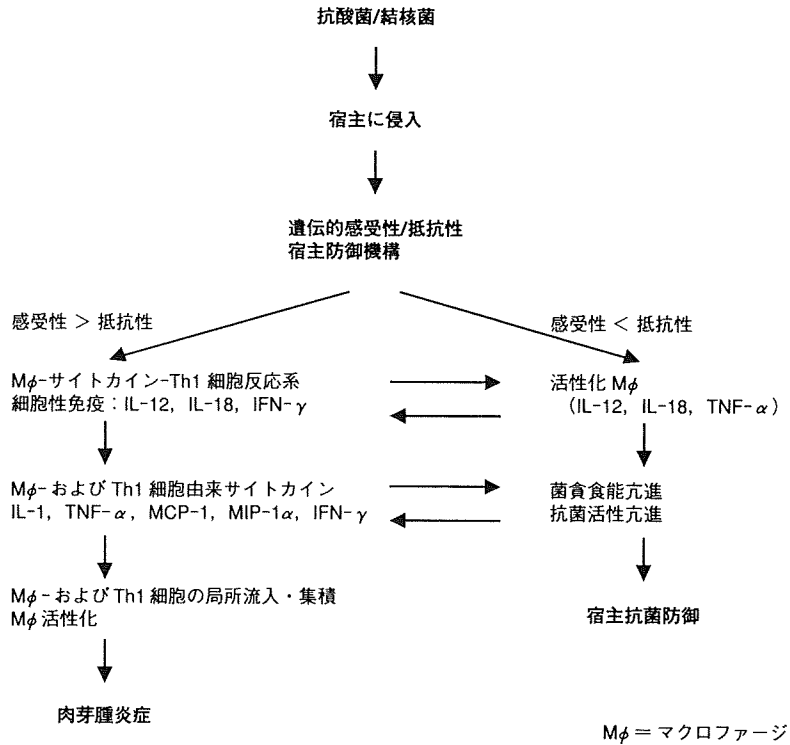


図 IV-55 抗酸菌/結核菌感染における宿主細胞および機能分子応答機構

パ節の石灰化癥痕を形成する(初期変化群: Ghon complex)。

2) 二次結核と播種性結核

宿主が結核菌に既感染し、免疫学的感作が成立している場合、すなわち外来性再感染、内因性再燃、一次感染病巣から直接、全身播種性結核に進展した場合などがある。これらの誘因には結核菌の高病原性や宿主の易感染性が関与している。二次結核における肉芽腫形成部位は肺尖部に最も多くみられるが、他部位の肺、腎臓、髄膜や骨髄などにも播種する。これらの肉芽腫病変は結核における組織傷害の主因であり、その機序には遅延型過敏反応が寄与している。二次結核に特徴的所見は乾酪壊死と空洞形成であり、これらの病変から結核菌が血行を介して全身に撒布、また、気道を介して排泄され、感染源(飛沫核感染)となる。

a 結核 tuberculosis

結核は再興感染症の代表であり、1993年に世界保健機関(WHO)、1999年に厚生省(現厚生労働省)が「結核緊急事態宣言」を発表、結核問題を

再認識し、結核制圧対策の強化に取り組んでいくことを提言している。また、2000年沖縄で開催されたG8サミットは結核、エイズとマラリアによる年間発生患者数が3億人、死亡数が500万人以上であることから、これら3感染症を人類の健康被害における重点疾患(世界三大感染症)と認識し、協調して介入していくことを決議している。結核対策は、①感染源対策(感染性の高い患者の早期発見・診断、隔離や確実な治療)、②感染経路対策(個室収容、独立空調、マスクの着用)、③感受性宿主対策(ワクチン接種や抗結核薬による化学予防)および、④一般国民や医療従事者への啓発・教育から構成される。

結核対策の目標としてWHOは、①2005年までに70%以上の感染性(喀痰塗抹陽性)結核患者の発見と85%以上の治癒、②2010年までに結核死亡や有病率を2001年の統計に比べて50%以下にすること、③2050年までに結核を世界的な公衆衛生問題からなくすことを目標設定している。

1) 発生動向

全世界では約20億人(全人口の1/3)が結核菌

表 IV-55 結核菌の特徴

細胞内寄生性	桿菌(0.2~0.6×1~10 μm), 宿主細胞, 特に, マクロファージ内で抗菌機構から逃れて増殖
細胞壁	脂質成分が豊富なため, 疎水性であり, 化学物質にも安定, グラム染色に難染色性, 抗酸性
好気性	酸素分圧の高い臓器(肺など)で増殖し, 病変を形成
遅発育性	至適温度: 37°C, 倍加時間: 約 12~15 時間, 培養集落形成に 4~8 週間
感染形式	飛沫核/空気感染
病原性	慢性炎症, 肉芽腫, 乾酪壊死, 空洞形成, 線維化
遺伝子	全ゲノム(約 4.41 Mb)の解読

Mycobacterium tuberculosis に既感染しており, 毎年 920 万人が結核を発病, 170 万人(HIV/エイズ合併を含む)が死亡し, 有病者は 2,200 万人であるといわれている。今後 10 年間, 少なくとも, 8,000 万人が発病, 2,000 万人が死亡することが推定されている。わが国では, 年間 25,300 人(罹患率人口 10 万対: 19.8)が結核を発病し, 2,200 人(死亡率: 1.7)が死亡しており, 有病者は 21,000 人(有病率: 16.2)と報告されている(2007 年)。

結核は単一病原体による感染症として, 世界最大である。疫学的に懸念される事項として, ① 急速な人口の高齢化に伴う高齢者結核の増加(70 歳以上の占める割合: 約 47%), ② 国内地域格差の拡大, ③ 多剤耐性結核菌の出現(初回耐性: 1%, 獲得耐性: 20%), ④ ヒト免疫不全ウイルス感染症(エイズを含む)の重複感染などがある。

2) 病原体

結核菌の生物学的特徴(表 IV-55)として, ① 細胞内寄生性, ② 脂質成分に富む細胞壁, ③ 好気性, ④ 遅発育性, ⑤ 飛沫核(空気)感染, ⑥ 慢性炎症, ⑦ 遺伝子の解読などがある。結核菌は好気性グラム陽性桿菌, 細胞内寄生病原体であるが, 細胞壁が長炭素鎖脂肪酸(ミコール酸)に富み, グラム染色では難染色性を示す。そのため, 抗酸性(チール・ネールゼン Ziehl-Neelsen, キニヨン Kinyoun)染色や蛍光染色が用いられる。抗酸性染色は石炭酸フクシンで加温染色後, 塩酸アルコールで脱色, メチレンブルーで後染色する。抗酸菌は“赤い桿菌”として観察される。抗酸菌以外の通常細菌やヒト組織・細胞は後染色のメチレンブルーにより“青く”対比染色される。抗酸菌をオーラミンやローダミンなどの蛍光色素を用いて染色し, 塩酸アルコールで脱色後, 蛍光顕微鏡で観察する蛍光染色法も広く用いられている。蛍光顕微鏡で観察すると, 暗い背景下に抗酸菌は“緑青-橙-

黄色”の蛍光を発する。分裂倍加時間は約 12~15 時間の遅発育菌であり, 感染伝播は飛沫核(空気)感染による。宿主防御機構では, マクロファージ-サイトカイン-T 細胞応答系, すなわち, 細胞性免疫が役割を演じ, 細胞内殺菌物質として, ガス状物質(反応性酸素化合物や反応性窒素化合物)が寄与している。その結果, 結核菌感染者の約 10% が一生涯において結核を発病する。病変は慢性炎症, 肉芽腫, 乾酪壊死, 空洞形成や線維化などが特徴的である。

M. tuberculosis H37Rv の全ゲノム塩基配列が解明された。今後, 遺伝子解析を基盤とした科学的戦略が推進され, 分子・遺伝子標的を視点とした新規診断法, 抗結核薬の開発, 薬剤耐性獲得機構の解明や新規ワクチン開発が展開されるであろう。

3) 臨床症状

結核は肺結核と肺外結核に分類されるが, 80% 以上は肺結核である。肺結核の症状として, 咳嗽や喀痰(持続性, 2 週間以上), 血痰, 胸痛, 軽度発熱, 体重減少があるが, 特に, 持続性咳嗽と喀痰は重要である。肺外結核部位として, リンパ節, 胸膜, 泌尿生殖器, 骨・関節, 髄膜・中枢神経系, 腹膜・消化管や心外膜などがある(表 IV-56)。

4) 診断

診断には, 病原体および補助診断がある(表 IV-57)。病原体診断は確定的であるが, 塗抹検査陽性(図 IV-56, 294 頁)の場合, 結核菌のみならず, 非結核性抗酸菌を考慮する必要がある(後述)。現在, 最も信頼性の高い検査は培養法(図 IV-57, 294 頁)であるが, 長期間を要することが欠点である(固形培地: 4~8 週間, 液体培地: 10~14 日間)。PCR(図 IV-58, 294 頁)などの核酸増幅法は迅速性, 感度や特異性に優れるが, 生死菌の識別や技術的問題(熟練, 偽陽性・偽陰性)がある。

表 IV-56 肺外結核の所見

病変部位	好発	臨床症状	診断	治療や管理
リンパ節	若年者-成人初期 女性 > 男性	通常, 片側性, 疼痛はない	生検や培養	抗結核化学療法
胸膜	若年者-成人	胸水, 乾性咳嗽	胸水単核細胞浸潤 胸水-結核菌塗抹検査: 陰性が多い 胸膜生検および培養	抗結核化学療法
泌尿生殖器	若年者ではまれ 女性 > 男性	腎臓, 尿管, 膀胱, 精巣, 精巣上体, 子宮, 卵管	尿培養, 生検-培養, 子宮 内容搔爬物-培養	抗結核化学療法
骨・関節	全年齢にみられる が, 高齢者に好発	高齢者: 下部胸椎や腰椎 若年者: 上部胸椎 関節可動域の制限や変形 (亀背)	生検および培養	抗結核化学療法 罹患部切除 関節癒合の防止
髄膜/中枢神経系	乳幼児や小児	発熱, 頭痛, 倦怠感, 意識 障害, 痙攣, 昏睡	腰椎穿刺による脳脊髄液検査 塗抹や培養	抗結核化学療法 副腎皮質ステロイド療法
腹膜/消化管	成人や高齢者	腹部膨満や腹痛, Crohn 病に類似	内視鏡による生検や培養	抗結核化学療法 副腎皮質ステロイド療法 癒着や閉塞に注意
播種性	幼年者や高齢者	発熱や衰弱	罹患臓器の塗抹や培養 ツベルクリン皮内反応: 約 半数が陰性 胸部 X 線異常所見: 初期 に欠き, 遅れて出現	早期の抗結核化学療法 副腎皮質ステロイド療法 の評価は未確定

IV

細菌学各論

表 IV-57 結核の診断

病原体診断	塗抹検査	抗酸菌染色 (Ziehl-Neelsen, Kinyoun 染色), 蛍光染色
	培養検査	固形培地 (卵培地: 小川, Löwenstein-Jensen, 寒天培地: Middlebrook 7H10, 7H11): 4~8 週間 液体培地 (MGIT, MB check): 10~14 日 薬剤感受性試験
	遺伝子検出	核酸増幅法: polymerase chain reaction (PCR) DNA-DNA ハイブリダイゼーション 薬剤耐性遺伝子
補助診断	胸部 X 線	中および上肺野病変 (浸潤, 結節や空洞) リンパ節腫大や石灰化 胸膜炎/胸水貯留
	病理学的検査	乾酪壊死を伴う肉芽腫
	TST	ツベルクリン皮内反応 (Mantoux) 48 時間後判定: 遅延型皮内反応 (IV 型) 陽性: 結核菌感染, BCG 陽転, 非結核性抗酸菌感染 陰性: 未感染, BCG 未接種, 免疫不全 (HIV/エイズ, 重症結核, 薬物性)
	IGRA: QFT	末梢血細胞 IFN- γ 産生・遊離試験 (IGRA, Quantiferon): <i>in vitro</i> 指標: IFN- γ 抗原: ツベルクリン蛋白質, RD1 (ESAT-6, CFP-10)
全身播種性	血行性撒布 (髄膜, 網膜, 肺, 肝, 腎臓): 小児, 免疫不全	

TST: tuberculin skin test, IGRA: interferon gamma release assay, QFT: Quantiferon

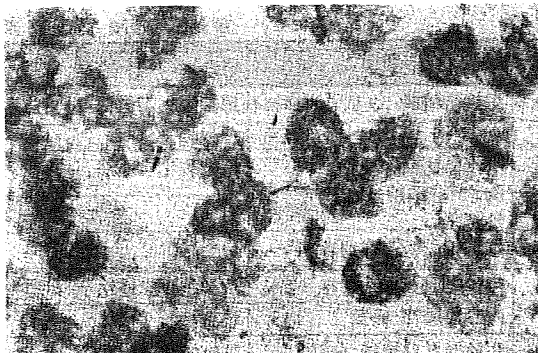


図 IV-56 結核菌の喀痰塗抹検査(Ziehl-Neelsen 染色)
結核菌は赤染されている桿菌であり、ヒト組織は青染されている。

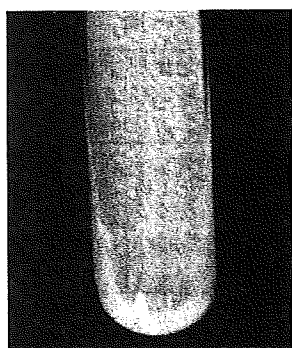


図 IV-57 結核菌の培養所見
喀痰を卵(小川)培地に接種し、6週間後に多数の集落(乳白色～薄黄色)形成を認めた。

胸部 X 線所見では、浸潤影、結節、空洞、線維化、肺門リンパ節腫大や石灰化、無気肺、胸膜肥厚・癒着、胸水貯留など多彩である(図 IV-59)。好発部位は肺尖を含む上肺や中肺野である。多発性びまん性結節陰影は播種(粟粒)性結核でみられる。これらの所見は他の炎症性や腫瘍性肺疾患にも認められる所見であり、結核特異的でなく、注意を要するため、結核の補助的診断法として用いられる。

ツベルクリン皮内反応 tuberculin skin test (TST)の陽性(わが国：紅斑長径 ≥ 10 mm, 欧米：硬結長径 ≥ 5 mm)は結核菌感染のみならず、BCG 接種や非結核性抗酸菌感染でもみられ、逆に、活動性結核患者の約 25%は陰性である。陰性は真の陰性(結核菌未感染)や偽陰性(結核菌既感染にもかかわらず陰性)を包含する。偽陰性として、栄養障害、高齢者、免疫疾患、リンパ系悪

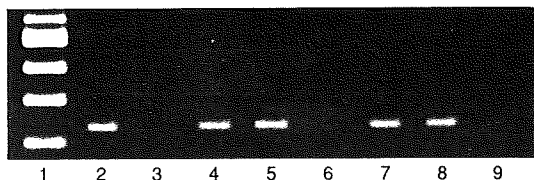


図 IV-58 核酸増幅法による結核菌遺伝子の検出
結核菌 DNA に特異的なプライマーを用い、ポリメラーゼ連鎖反応で喀痰の結核菌遺伝子を検出した。
分子サイズマーカー：レーン 1
陽性：レーン 2, 4, 5, 7, 8
陰性：レーン 3, 6, 9

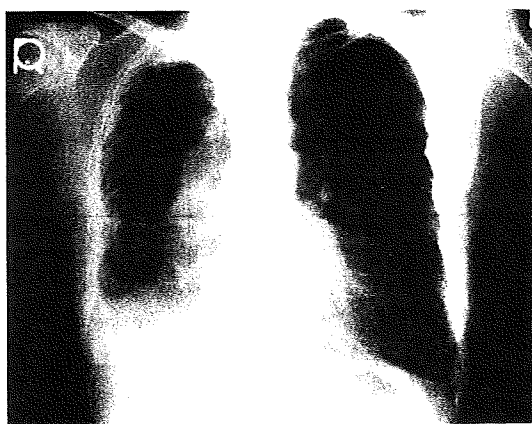


図 IV-59 肺結核の胸部 X 線所見
浸潤影、結節、線維化、肺門リンパ節腫大、胸膜肥厚・癒着や胸水貯留など、多彩な所見を認めた。

性腫瘍、副腎皮質ステロイド薬療法、慢性腎不全、サルコイドーシス、HIV 感染者(エイズを含む)や重症結核(播種性)などがある。したがって、ツベルクリン皮内反応は結核の補助的診断法である。また、ツベルクリン皮内反応陽性は感染防御の指標とならないことも留意する。

近年、結核菌特異的タンパク質抗原(ESAT-6 や CFP-10)を用いた免疫学的診断法が開発され、臨床応用されている(interferon- γ 遊離試験：IGRA, Quantiferon：QFT)。これらの抗原は BCG や多くの非結核性抗酸菌に存在しないため、結核菌感染を特異的に検出できる。原理は、末梢血に特異的タンパク質抗原を加え、培養後、産生・遊離される IFN- γ を定量する(陽性：0.35 IU/ml 以上)。検査対象として、① 潜在性結核菌感染や② 活動性結核の補助診断に応用されている。

表 IV-58 代表的な抗結核薬の作用機序と副作用

薬剤	作用機序	主な副作用
イソニアジド(INH)	細胞壁ミコール酸合成阻害	末梢神経障害, 肝障害 ビタミン B ₆ にて予防可
リファンピシン(RIF)	DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ阻害	血小板減少, 赤色尿, アレルギー: 皮疹, 肝障害
エタンプトール(EMB)	細胞壁ミコール酸合成阻害?	視力障害, 視神経炎
ピラジナミド(PZA)	pyrazinoic acid 産生	肝障害, 高尿酸血症
ストレプトマイシン(SM)	タンパク質合成阻害	第 8 脳神経障害, 腎障害

表 IV-59 薬剤耐性結核の出現状況

全体		初回耐性		獲得(再治療)耐性	
いずれの1薬剤	多剤耐性	いずれの1薬剤	多剤耐性	いずれの1薬剤	多剤耐性
12.6%	2.2%	9.9~10.7%	1.0~1.4%	23.3~36.0%	9.3~13.0%

いずれの1薬剤: イソニアジド(INH), リファンピシン(RIF), エタンプトール(EMB), ストレプトマイシン(SM)

5) 治療および予防

治療の原則は多剤併用抗結核化学療法である(表 IV-58)。結核菌の薬剤耐性は、各抗結核薬の標的に関与した遺伝子の変異により獲得され、多剤耐性はこれらの遺伝子の変異が集積することにより、出現する。抗結核薬により、耐性菌出現頻度は異なるが、1薬剤あたり、 $1/10^6 \sim 10^9$ であるため、薬剤を併用することにより、耐性菌の出現頻度を低下させることが可能となる。ただしこの場合、確実に服用することが絶対条件である。そのため、WHO は直接監視下短期化学療法 directly observed treatment, short course(DOTS) を推進している。標準的な治療で、服薬期間は約6か月である。組み合わせでは、最初の2か月: イソニアジド(INH)+リファンピシン(RIF)+エタンプトール(EMB)〔あるいはストレプトマイシン(SM)〕+ピラジナミド(PZA)、その後4か月: INH+RIF を用いる〔最近の米国疾病管理予防センター Centers for Disease Control and Prevention(CDC)の治療指針では SM 耐性結核菌の増加に伴い、SM は抗結核薬としての選択順位が低下した〕。

薬剤耐性結核 drug-resistant tuberculosis(表 IV-59)の原因は不適切な結核医療、すなわち、抗結核化学療法薬の不適切な選択や使用、治療中断や脱落であり、医療関係者や患者の対応に起因する man-made disease である。全世界で5,000万

人以上が多剤耐性結核菌(INH と RIF に同時耐性, multidrug-resistant tuberculosis: MDR-TB)に既感染しており、医療費は薬剤感受性結核に比べ、3~100倍を要している。MDR-TBの性状に加え、フルオロキノロンとカプレオマイシンの2薬剤に耐性、かつ、カナマイシンおよびアミカシンの少なくとも1薬剤に耐性である超多剤耐性結核 extensively/extremely drug-resistant tuberculosis(XDR-TB)が最近報告されている。薬剤耐性結核(菌)の出現や蔓延は結核制圧対策における大きな課題である。

予防は、感染源対策として患者の早期発見、治療、接触者(家族、学校、会社など)の調査、さらに、予防接種や化学予防(無症候潜在性結核菌感染の治療)がある。予防接種は弱毒ウシ型結核菌 bacille Calmette-Guérin(BCG)が汎用され、乳幼児結核(全身播種性結核や髄膜結核)の予防に効果(70~80%)が認められているが、成人型肺結核の予防効果は疑問視されている。化学予防は INH を服用し、発症を防止する(効果: 70~80%)。ただし、感染結核菌が INH 感受性であることが不可欠である。

2007年4月の改正感染症法の施行に伴い、結核予防法は「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(感染症法)」に統合された。結核は2類感染症に位置づけられ、結核を診断した場合、医師は直ちに最寄りの保健所長を経

表 IV-60 非結核性抗酸菌感染症と原因菌

疾患	主要な病原体 (Runyon 分類)	抗菌薬
肺感染症	<i>M. avium</i> (III) <i>M. intracellulare</i> (III) <i>M. kansasii</i> (I) <i>M. abscessus</i> (IV) <i>M. xenopi</i> (II)	クラリスロマイシン, アジスロマイシン, エタンプトール クラリスロマイシン, アジスロマイシン, エタンプトール リファンピシン, イソニアジド, エタンプトール アミカシン, シプロフロキサシン, クラリスロマイシン クラリスロマイシン, リファンピシン, エタンプトール
リンパ節炎	<i>M. avium</i> (III) <i>M. intracellulare</i> (III) <i>M. scrofulaceum</i> (II)	クラリスロマイシン, アジスロマイシン, エタンプトール クラリスロマイシン, アジスロマイシン, エタンプトール クラリスロマイシン, アジスロマイシン(外科的切除)
皮膚感染症	<i>M. marinum</i> (I) <i>M. fortuitum</i> (IV) <i>M. chelonae</i> (IV) <i>M. abscessus</i> (IV) <i>M. ulcerans</i> (III)	ドキシサイクリン, リファンピシン, エタンプトール アミカシン, シプロフロキサシン, クラリスロマイシン アミカシン, シプロフロキサシン, クラリスロマイシン アミカシン, シプロフロキサシン, クラリスロマイシン クラリスロマイシン, リファンピシン, エタンプトール
播種性感染症	<i>M. avium</i> (III) <i>M. intracellulare</i> (III) <i>M. kansasii</i> (I) <i>M. chelonae</i> (IV) <i>M. abscessus</i> (IV) <i>M. haemophilum</i> (III)	クラリスロマイシン, アジスロマイシン, エタンプトール クラリスロマイシン, アジスロマイシン, エタンプトール リファンピシン, イソニアジド, エタンプトール アミカシン, シプロフロキサシン, クラリスロマイシン アミカシン, シプロフロキサシン, クラリスロマイシン クラリスロマイシン, リファンピシン, エタンプトール

表 IV-61 主要な非結核性抗酸菌感染症の特徴

菌種	頻度	至適温度(°C)	感染源, 経路	抗菌薬感受性
<i>M. avium complex</i>	最頻(70%)	37	水, 土壌, 鳥類	耐性
<i>M. kansasii</i>	頻(20%)	37	水, 土壌	感受性
<i>M. marinum</i>	少ない	30	水, 魚類	感受性
<i>M. ulcerans</i> (Buruli 潰瘍)	頻(アフリカ, オセアニア)	30	経皮感染, 動物由来?	耐性

由し都道府県知事に届け出なければならない。

b 非結核性抗酸菌感染症
nontuberculous mycobacterial infections

結核菌以外の抗酸菌(非結核性抗酸菌 nontuberculous mycobacteria (NTM), 非定型抗酸菌 atypical mycobacteria, mycobacteria other than tuberculosis (MOTT), potentially pathogenic environmental mycobacteria (PPEM)ともいう)は、環境(土壌や水など)に広く分布し、多くの場合、健常者に対し、病原性を示すことは少ない。したがって、ヒト-ヒト感染はない。わが国では、結核などを含めた全抗酸菌陽性患者の約20%が非結核性抗酸菌感染症と考えられている(表 IV-60)。

非結核性抗酸菌による肺感染症の原因菌として、

M. avium, *M. intracellulare*(*M. avium* と *M. intracellulare* は細菌学的に極めて類似しているため、一括して *M. avium complex* (MAC) と表すことがある), *M. kansasii* が多く、MAC が 70~80%, *M. kansasii* が 20% を占める(表 IV-61)。リンパ節炎は MAC や *M. scrofulaceum*。皮膚感染症は *M. marinum* (魚槽肉芽腫 fish tank granulomas), *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus* や *M. ulcerans* (Buruli 潰瘍)。重度の免疫不全の場合、播種性感染症は MAC, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. abscessus* や *M. haemophilum* などが多い(表 IV-60)。

NTM の易感染性要因として、進行した後天性免疫不全症候群(末梢血 CD4 陽性 T 細胞数 $\leq 100/\mu\text{l}$) など免疫不全や肺基礎疾患(気管支拡張症, 肺嚢胞, 塵肺や陳旧性結核など)が知られて

表 IV-62 らい菌の特徴

至適発育温度	30~33°C
遅発育性	分裂倍加時間, 11~13 日
らい菌特異的抗原	フェノール抽出性糖脂質(PGL)
感染経路	気道感染 > 経皮感染
好発部位	皮膚および末梢神経(Schwann 細胞親和性)
病変・症状	皮膚: 皮疹, 結節 神経: 知覚・運動障害, 神経肥厚

いるが、これらの状況を欠如した症例もしばしば認められる。MAC は多くの抗結核薬に耐性を示すことが多く、比較的有効な新規マクロライド系抗菌薬(クラリスロマイシンやアジスロマイシン)が用いられているが、根治は困難である。なお、*M. kansasii* は通常の抗結核薬(前出)に感受性を示すことが多い。NTM はヒト-ヒト感染しないので、隔離は不要である。

C ハンセン病 leprosy, Hansen's disease

ハンセン病は慢性らい菌感染症である。らい菌の至適発育温度が 30~33°C 前後のため、皮膚、末梢神経、上気道粘膜および眼など体表部に好発する。ハンセン病に特徴的な症状として、① 知覚(触覚, 痛覚, 温冷覚)障害を随伴した皮疹(斑, 丘疹, 結節など)、② 末梢神経の肥厚および神経支配領域における知覚または運動障害がある。

1) 発生動向

わが国におけるハンセン病療養所の入所者は約 2,700 人であり、そのほとんどは治癒(らい菌陰性化)しているが、後遺症のため入所している。入所者の高齢化が進み、平均年齢は約 80 歳である。「らい予防法の廃止に関する法律」が 1996(平成 8)年 4 月 1 日より施行されたことにより、患者の届け出が廃止された。したがって、らい予防法廃止後、患者発生動向の詳細は不明であるが、わが国における年間の新規発生患者は 10 人以下(半数以上が在日外国人)である。世界における登録患者は約 22 万人(2006 年)、年間新規発生患者は 26 万人(2006 年)であり、患者の多い国々はインド、ブラジル連邦共和国、マダガスカル共和国、アンゴラ共和国、中央アフリカ共和国、コンゴ民主共和国、モザンビーク共和国、ネパールやタンザニア連合共和国である。ハンセン病流行地域に

表 IV-63 ハンセン病の病型

	類結核型	らい腫型
病変部らい菌数	少菌性	多菌性
免疫応答	細胞性	液性
レプロミン皮内反応(Mitsuda)	陽性	陰性
抗 PGL 抗体	陰性	陽性

おける新規患者は 10~20 歳代と 40~60 歳代にピークがあり、二峰性分布を示すが、わが国を含め低蔓延地域では 60 歳代以降に多い。

2) 病原体

らい菌 *Mycobacterium leprae* は抗酸菌の一種で、細胞内寄生性細菌である(表 IV-62)。しかし、今日までらい菌は試験管内培養に成功していない。らい菌はグラム陽性、抗酸性を示し、抗酸菌染色(Ziehl-Neelsen, Kinyoun や Fite 法)により赤染する。らい菌は葉巻タバコ状 bundles of cigars といわれる一定の方向性のもとに散在性、塊状あるいはらい球 globi と呼ばれるらい菌特有の集簇を形成し、マクロファージに貪食され、また、末梢神経の Schwann 細胞に親和性が高く、これらの細胞内で増殖する。世代時間は 11~13 日と考えられ、遅発育菌である結核菌の世代時間(約 12~15 時間)と比較しても著しく発育の遅い菌で、感染した場合、発症までの潜伏期間は数週~数十年(平均 3~5 年)を要する。至適発育温度は 30~33°C 前後、感染のための最少菌数は 3~40 個といわれているが、病原性は極めて弱い。らい菌に対する宿主防御機構は T 細胞が中心的役割を果たす細胞性免疫である。らい菌は経気道および経皮的に感染するが、らい菌の病原性は極めて弱く、感染しても発病することはまれである。

3) 臨床症状

ハンセン病の病型分類は、基本的にらい腫型 lepromatous と類結核型 tuberculoid から構成される(表 IV-63)。また、経過中に急性症状を呈することがあり、らい反応と総称する。

① らい腫型 lepromatous(図 IV-60)

らい菌に対する細胞性免疫応答を欠如し、そのため、多数のらい菌を病変部に認める(多菌型 multibacillary)。症状として、斑, 丘疹, 結節(らい腫)などの皮疹が混在して対称性に多数生じ、進行性である。また、末梢神経症状として、知覚



図IV-60 ハンセン病(らい腫型)の皮膚病変(a)と組織学的所見(b)
b: Ziehl-Neelsen 染色, らい菌特有の集簇: らい球 globi を多数認めた。

障害や発汗障害をしばしば認めるが, 神経肥厚は顕著でないことが多い。

② 類結核型 tuberculoid

らい菌に対する細胞性免疫応答が強く, 病変部にらい菌はほとんど存在しない(少菌型 paucibacillary)。通常, 経過は良好で, 安定している。境界明瞭な斑(紅斑, 色素脱失斑など)が主であり, 限局した1~数個の皮疹が非対称性に出現する。神経肥厚はしばしばみられ, 部位では尺骨, 大耳介や腓腹神経に好発する。そのため, 支配領域の知覚・運動障害を生じることが多い。

③ らい反応

ハンセン病は, 通常, 慢性に経過するが, 時に急性症状を呈することがあり, らい反応と総称する。境界群に発生する境界反応とらい腫型に発生するらい性結節性紅斑反応がある。末梢神経障害, 眼(虹彩毛様体炎, ぶどう膜炎), 免疫複合体性糸球体腎炎など重大な合併症をきたすことがあるので迅速な処置が必要であり, さらに入院加療を要することもある。

4) 診断

病原体診断が確定診断となるが, 臨床所見(皮膚および末梢神経病変)に加えて, らい菌が培養不能であることや少菌型(類結核型)を考慮して総合的に進める。

① 細菌学的検査

皮膚や鼻粘膜擦過面からの組織液, 病変部組織やホモジネートを抗酸菌染色し, 光学顕微鏡的観察により, らい菌を検出する。

② 病理組織学的検査

病変部と健常部を含めて生検し, 各種組織染色および抗酸菌染色標本を光学的顕微鏡観察する

(図IV-60)。

③ 特異的抗体検査

らい菌に特有なフェノール抽出性糖脂質(PGL)に対する血清抗体を検出する。この抗体はらい腫型に陽性であるが, 類結核型では陰性であることが多い。

④ らい菌特異的遺伝子増幅検査

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を利用し, らい菌特異的遺伝子を検出する。

⑤ レプロミン皮内反応

らい菌に対する細胞性免疫応答を調べるものであり, ハンセン病の病型分類には有用であるが, 診断には通常用いない。らい腫型ハンセン病に陰性であるが, 類結核型では陽性であることが多い。

5) 治療および予防

確実な治癒と耐性菌出現を防止するため原則として, 多剤併用化学療法を行う。標準的な多剤併用化学療法として, リファンピシン, ジアフエニルスルホン, クロファジミンを投与する。

なお, らい反応のために化学療法薬を中止したり, 変更する必要は通常ない。らい反応が出現した場合, 炎症反応を抑制するために, 非ステロイド性抗炎症薬, 副腎皮質ステロイド薬やTNF- α の拮抗薬であるサリドマイドなどが用いられる。なお, サリドマイドは催奇形性を有しているため, 妊婦には禁忌である。

1996(平成8)年4月より「らい予防法」が廃止され, 患者の届け出, 隔離, 消毒や行動制限などは撤廃された。

(小林和夫)

190 結核（非結核性〈非定型〉抗酸菌症）

1. 概念

結核は結核菌群 *Mycobacterium tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. bovis* や *M. africanum*) を起炎菌とする慢性感染症であり、ほとんどは結核菌 *M. tuberculosis* による。日本の新規発生結核患者数（2007年）は約2.5万人、罹患率19.8（対人口10万人）であり、現在においても甚大な健康被害を及ぼしている。病変部位により、肺結核、肺外結核、粟粒（全身播種性）結核に分類される。結核菌群および培養不能のらい菌 *M. leprae*（ハンセン病の原因菌）を除く他の *Mycobacterium*（抗酸菌）属が非結核性〈非定型〉抗酸菌であり、結核を含む全抗酸菌感染症の15～20%を占める。*M. avium-intracellulare* (MAI/MAC) が最頻（70%）、次いで *M. kansasii* (20%)、散発的に *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. goodii*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai* などが原因菌となる。抗酸菌細胞壁は脂質に富むため Ziehl-Neelsen 法や蛍光などの特殊染色（抗酸性染色）を行う。しかし、一旦染色されると塩酸などでも脱色され難いことから抗酸菌（acid-fast bacilli）と呼ぶ。抗酸菌はグラム陽性好気性桿菌で一般的に遅発育性である（固形培地で集落形成は1週間以上）。結核菌群は生化学的にナイアシンを産生し、他の抗酸菌と区別される。結核、非結核性抗酸菌症ともに HIV 感染症/AIDS における日和見感染症としても重要である。また、抗微生物薬耐性結核菌や非結核性抗酸菌の出現頻度が増加し、化学療法に抵抗性を示すこともある。結核の予防ワクチンとして弱毒ウシ型結核菌由来生ワクチンの BCG が汎用されている。乳幼児における BCG 接種は有効であり、生後6カ月までに直接接種する（予防接種法）。しかし、成人への効果は疑問視されているため、通常、再接種は不要である。

2. 病態生理

喀痰に含まれる結核菌の飛沫核（空気）感染によ

り、結核はヒト-ヒト感染伝播する。感染しても発病は生涯を通じて約10%で、90%は感染した結核菌が休眠状態 dormancy で宿主体内に残存する (persister)。結核菌は細胞内寄生菌であるため、宿主マクロファージに貪食された後、殺菌されずに増殖する。一部は肺門など、所属リンパ節に運ばれる。感染部位にはマクロファージ・リンパ球が集積し、肉芽腫を形成するが、マクロファージは形態学的に類上皮細胞や Langhans 多核巨細胞を呈する。さらに、病巣中心部は乾酪壊死を起こす。これを初期変化群と呼ぶ。細胞性免疫が十分で病巣が小さい場合、石灰沈着を伴い治癒する。そのまま進展すれば初感染結核が起こる。一部は乾酪性肺炎になり、乾酪用物質が排出され空洞が形成されることがある。胸膜に波及し、胸水を伴う浸出性炎症を起こす。肺門リンパ節内の菌はリンパ行性に静脈角リンパ節を経由し、血行に入り菌血症を起こす。すなわち、全身播種性（粟粒性）結核である。微量の菌の場合、菌が運ばれた先の臓器に結核病変を形成する。二次結核症は初期病変の内因性再燃により生じるが、既に成立している免疫の存在下で起こる。リンパ節の関与は少なく、増殖性の関与が強く、空洞形成が起こる。空洞内は酸素が豊富で大量の菌が増殖し、感染源および肺内散布の原因となる。

非結核性抗酸菌は環境（土壌、水など）からヒトへ感染すると考えられるが、通常、ヒト-ヒト感染はない。発病は稀で、日和見的に発症する。AIDS など免疫不全の場合、全身播種性病変、顕著な免疫不全がない場合、中年以降の女性に好発する。

3. 臨床症状

2週間以上持続する咳嗽、喀痰や発熱が最も多い。全身倦怠、血痰、胸痛、体重減少、寝汗や食欲低下などを伴うこともある。なお、約20%は自覚症状の有無にかかわらず、健康診断で発見される。

4. 検査・診断 (表1)

a. 感染病原体の検出や同定が最も重要であり、結核の場合、確定診断となる。

1) 集菌法による喀痰塗抹検査

Ziehl-Neelsen 法や蛍光染色, 3 回連続検痰を行う。

2) 培養法

固形培地: 小川培地, Lowenstein-Jensen 培地, Middlebrook 7H 10 や 7H 11

液体培地: MGIT や MB check

表1 結核の診断

病原体診断	塗抹検査	抗酸菌染色 (Ziehl-Neelsen, Kinyoun 染色), 蛍光染色
	培養検査	固形培地 (卵培地: 小川, Lowenstein-Jensen, 寒天培地: Middlebrook 7H 10, 7H 11): 4~8 週間 液体培地 (MGIT, MB check): 7~14 日 薬剤感受性試験
	遺伝子検出	核酸増幅法: polymerase chain reaction (PCR) DNA-DNA ハイブリゼーション 薬剤耐性遺伝子
補助診断	胸部 X 線	中および上肺野病変 (浸潤, 結節や空洞) リンパ節腫大や石灰化 胸膜炎/胸水貯留
	病理学的検査	乾酪壊死を伴う肉芽腫
	TST	ツベルクリン皮内反応 (Mantoux) 48 時間後判定: 遅延型皮内反応 陽性: 結核菌感染, BCG 陽転, 非結核性抗酸菌感染 陰性: 未感染, BCG 未接種, 免疫不全 (HIV/AIDS, 重症結核, 薬物性) 末梢血細胞 IFN- γ 産生・遊離試験 (IGRA, Quantiferon): In vitro 抗原: ESAT-6, CFP-10
	IGRA: QFT	

培養期間: 固形培地 4 週間以上, 液体培地 1 週間以上

3) 生化学試験法

極東抗酸菌鑑別キットやキャピリア TB

4) 遺伝子検査法

PCR など核酸増幅法, DNA プローブ法や DNA-DNA ハイブリゼーション法

b. 補助的: 陽性, あるいは, 陰性所見を問わず, 確定診断でないことに留意

1) 画像診断

胸部 X 線や CT 検査: 上中肺野を中心として散布を伴う不規則, 大小不同の陰影, 空洞, 石灰化・癒着像, 胸水貯留, 粟粒陰影, 肺門リンパ腫腫大

2) 病理組織学的検査

乾酪壊死を伴う肉芽腫病変

3) 免疫学的診断法

ツベルクリン皮内反応: 精製ツベルクリン皮内注射, 紅斑径 10 mm 以上が陽性

結核菌特異抗原による末梢血単核細胞 interferon- γ 遊離試験 (IGRA, QuantiFERON): 0.35 IU/mL 以上が陽性

c. 薬剤感受性試験

小川培地や液体培地を用いた薬剤感受性試験

d. 非結核性抗酸菌症の検査・診断 (米国胸部疾患および感染症学会の診断基準 2007 年)

環境菌のため, 診断には画像診断 (胸部 X 線や CT 検査), 非結核性抗酸菌の検出および他疾患の除外を要する。

e. 届出など行政対応

「感染症の予防及び感染症患者に対する医療に関する法律」の規程により, 結核を診断した医師は最寄りの保健所長に直ちに届け出る。なお, 非結核性抗酸菌症は法律の対象外であり, 届出は不要である。

5. 治療

確実な治療や薬剤耐性菌の出現防止のため, 多剤を併用した直接監視下短期抗結核化学療法 (DOTS: イソニアジド, リファンピシン, エタンブトール+ピラジナマイドの 4 薬剤を最初の 2 カ月間投与, イソニアジド+リファンピシンの 2 薬剤を残りの 4 カ月間, 合計 6 カ月間) が推奨されている。近年, 多剤耐性 (MDR) 結核 (イソニアジドとリファンピシンに同時耐性), 超多剤耐性 (XDR) 結核 (MDR でフルオロキノロン耐性, かつ, カナマ

C 抗酸菌（マイコバクテリア）感染症

イシン，アミカシン，カプレオマイシンなど注射可能薬の少なくとも1剤以上に耐性）が問題となっている。

非結核性抗酸菌症，特にMAC感染症では抗微生物薬耐性もしばしばであり，マクロライド系薬が推奨される。なお，*M. kansasii* 感染症は通常，抗結核薬に感受性である。

薬剤耐性の場合，感受性試験結果や臨床的反応性を総合し，化学療法を実施する。

病変（肺葉や肺）切除など，外科的適応はMDR-

XDR-結核やMAC感染症で心肺機能の良好な限局性肺病変や孤発性単一結節性病変に考慮する。

6. 予後

薬剤感受性結核，かつ適切な化学療法を実施した場合，再発率は5%以下である。再発は治療完了後1年以内に出現することが多い。再発の危険性が大きいと考えられる場合，少なくとも2年間，胸部X線検査，喀痰検査などの観察を行う。薬剤耐性，特に，XDR-結核は予後不良である。

Mycobacteria Exploit Host Hyaluronan for Efficient Extracellular Replication

Yukio Hirayama¹, Mamiko Yoshimura¹, Yuriko Ozeki^{1,2}, Isamu Sugawara³, Tadashi Udagawa³, Satoru Mizuno³, Naoki Itano⁴, Koji Kimata⁵, Aki Tamaru⁶, Hisashi Ogura⁷, Kazuo Kobayashi⁸, Sohkiichi Matsumoto^{1*}

1 Department of Bacteriology, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Osaka, Japan, **2** Sonoda Women's University, Amagasaki, Hyogo, Japan, **3** Mycobacterial Reference Center, The Research Institute of Tuberculosis, Kiyose, Tokyo, Japan, **4** Department of Molecular Oncology, Division of Molecular and Cellular Biology, Institute on Aging and Adaptation, Shinshu University Graduate School of Medicine, Nagano, Japan, **5** Research Complex for the Medicine Frontiers, Aichi Medical University, Yazako, Nagakute, Aichi, Japan, **6** Department of Infectious Diseases, Bacteriology Division, Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka, Japan, **7** Department of Virology, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Osaka, Japan, **8** Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

Abstract

In spite of the importance of hyaluronan in host protection against infectious organisms in the alveolar spaces, its role in mycobacterial infection is unknown. In a previous study, we found that mycobacteria interact with hyaluronan on lung epithelial cells. Here, we have analyzed the role of hyaluronan after mycobacterial infection was established and found that pathogenic mycobacteria can grow by utilizing hyaluronan as a carbon source. Both mouse and human possess 3 kinds of hyaluronan synthases (HAS), designated HAS1, HAS2, and HAS3. Utilizing individual HAS-transfected cells, we show that HAS1 and HAS3 but not HAS2 support growth of mycobacteria. We found that the major hyaluronan synthase expressed in the lung is HAS1, and that its expression was increased after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Histochemical analysis demonstrated that hyaluronan profoundly accumulated in the granulomatous lesion of the lungs in *M. tuberculosis*-infected mice and rhesus monkeys that died from tuberculosis. We detected hyaluronidase activity in the lysate of mycobacteria and showed that it was critical for hyaluronan-dependent extracellular growth. Finally, we showed that L-Ascorbic acid 6-hexadecanoate, a hyaluronidase inhibitor, suppressed growth of mycobacteria *in vivo*. Taken together, our data show that pathogenic mycobacteria exploit an intrinsic host-protective molecule, hyaluronan, to grow in the respiratory tract and demonstrate the potential usefulness of hyaluronidase inhibitors against mycobacterial diseases.

Citation: Hirayama Y, Yoshimura M, Ozeki Y, Sugawara I, Udagawa T, et al. (2009) Mycobacteria Exploit Host Hyaluronan for Efficient Extracellular Replication. PLoS Pathog 5(10): e1000643. doi:10.1371/journal.ppat.1000643

Editor: William Bishai, Johns Hopkins School of Medicine, United States of America

Received: March 24, 2009; **Accepted:** October 5, 2009; **Published:** October 30, 2009

Copyright: © 2009 Hirayama et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Japan Health Sciences Foundation; Ministry of Health, Labour and Welfare (Research on Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases, Health Sciences Research Grants); Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology; and the United States-Japan Cooperative Medical Science Program against Tuberculosis and Leprosy. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: sohkiichi@med.osaka-cu.ac.jp

Introduction

Infectious diseases caused by mycobacteria are serious threats to human health. Tuberculosis is caused by infection with mycobacteria, most frequently with *Mycobacterium tuberculosis* but also with *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, and *Mycobacterium canettii* and kills around 2 million people annually. Leprosy is caused by *Mycobacterium leprae* and the globally registered prevalence of leprosy was around 22,000 cases at the beginning of 2006.

The major portal of entry for mycobacterial pathogens is through the respiratory tract. The primary phase of the infection begins with inhalation of bacteria, which are then phagocytosed by alveolar macrophages in the periphery of the lungs. In addition, several lines of evidence indicate that mycobacteria interact with epithelial cells in the respiratory tract [1–4]. The recent reports show the significant role of type II pneumocytes in the pathology of tuberculosis [3,5,6]. The onset of mycobacterial diseases

frequently occurs after a long latent phase. Mycobacteria are an intracellular bacterium, multiplying within host cells, but also grow extracellularly [7,8].

Macrophages phagocytose mycobacteria through interaction with several cell surface receptors, including complement receptors, mannose receptors, surfactant protein A, scavenger receptors, and Fc receptors [9]. By contrast, mycobacteria attaches to or invades lung epithelial cells through interactions with glycosaminoglycans (GAG) [10]. *M. tuberculosis*, *M. bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG), and *M. leprae* produce two types of GAG interacting adhesins, heparin-binding hemagglutinin (HBHA) [10,11] and mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1, also called histone-like protein and laminin-binding protein in *M. leprae*) [1,12]. HBHA is secreted to the extracellular milieu from mycobacteria [13], whereas MDP1 is tightly attached on the mycobacterial cell wall [14].

We previously demonstrated that hyaluronan is a major portal for infection of mycobacteria into A549 human lung epithelial cells

Author Summary

Mycobacterium tuberculosis and *Mycobacterium bovis* are major bacterial pathogens that kill approximately 2 million people annually by causing tuberculosis. The *M. tuberculosis* complex has several strategies to parasitize the host. After infection is established, these pathogens are rarely eliminated from the host, and nowadays approximately a third of the world's human population is infected with the *Mycobacterium tuberculosis* complex. The elucidation of the parasitic mechanisms of the *M. tuberculosis* complex is important for the development of novel strategies against the disease. The major portal entry of *M. tuberculosis* complex is through the respiratory tract. On the surface of the airway, hyaluronan retains bactericidal enzymes so that they are "ready-to-use", protecting tissues from invading pathogens. Furthermore, fragmented hyaluronan produced as a result of infection is used by the immune system as a sensor of infection. Thus, hyaluronan plays a pivotal role in host defenses in the respiratory tract. However, in this study, we observed that the *M. tuberculosis* complex utilizes hyaluronan as a carbon source for multiplication. We also found that the *M. tuberculosis* complex has hyaluronidase activity and showed that it is critical for hyaluronan-dependent growth of the *M. tuberculosis* complex. This study demonstrates a novel parasitic mechanism of the *M. tuberculosis* complex and suggests that mycobacterial hyaluronidase is a potential drug target.

by interacting with MDP1 [1]. Hyaluronan is a nonsulfated linear GAG composed of thousands of repeating units of GlcNAc- (beta-1, 4)-GlcUA- (beta-1, 3) and is synthesized by 3 isoforms of hyaluronan synthases (HAS), designated HAS1, HAS2, and HAS3 in both mice and humans [15–18]. In vertebrates, hyaluronan is a ubiquitous structural component of the extracellular matrix, and is abundant in the chondral and vitreous tissues. Recent findings demonstrated that hyaluronan has a pivotal role in diverse dynamic biological functions such as embryonic development [19], cell migration [20,21], tumor transformation, [22,23], wound healing [24], and inflammation [25–27].

On the mucosal surface of the airway, hyaluronan retains bactericidal enzymes so that they are "ready-to-use", protecting mucosal tissues from invading pathogens [28]. Furthermore, in the alveolar tracts, released fragmented HA stimulates innate immune responses by activating Toll-like receptor 2 and 4 dependent pathways and initiating lung inflammation [25]. By contrast, during resolution of respiratory inflammation, immuno-stimulatory hyaluronan is taken up via the hyaluronan receptor CD44 on alveolar macrophages [26]. Thus hyaluronan plays a pivotal role in host defenses in the respiratory tract, but its role in mycobacterial infection had not been elucidated so far. In this study, we analyzed the role of hyaluronan after mycobacterial infection was established.

Results

Hyaluronan enhances the extracellular growth of mycobacteria after attachment to A549 cells

A549 cells, a type II human lung epithelial cell line, were exposed to recombinant BCG expressing luciferase (rBCG-Luc) under the control of the HSP60 promoter [14] at a multiplicity of infection (MOI) of 10 for 16 hours. Cells were then washed and various doses of hyaluronan added into the culture. Growth of BCG was monitored by luciferase activity at each time point,

which is indicative of viable bacteria [14,29]. We found that exogenously added hyaluronan enhances bacterial growth in a dose-dependent manner (Figure 1A). We also confirmed this effect by counting viable bacteria using a colony forming units (CFU) assay (Figure 1C).

In our experimental setting, around 60% of the bacteria adhere to the cell surface and the remaining 40% are internalized by the cells [1]. Therefore, we next examined whether hyaluronan enhances extracellular or intracellular growth by treatment with gentamicin, which kills extracellular but not intracellular bacteria. After infection, we added gentamicin (50 µg/ml) into the culture for 6 hours and then added hyaluronan after removing gentamicin. The results showed that gentamicin treatment abrogated the growth of BCG (Figure 1B), indicating that bacterial growth occurred extracellularly. The enhanced effect of hyaluronan on bacterial growth was also abolished by gentamicin treatment (Figure 1B). This suggests that hyaluronan enhances growth of BCG attached to these cells.

We next examined if the same effects of hyaluronan can be seen in *M. tuberculosis* growth after infection to A549 cells. We infected *M. tuberculosis* H37Rv to A549 cells, then added hyaluronan, and monitored growth by counting colony-forming units (CFU). Similar to the case of BCG, we found that presence of hyaluronan enhances the growth of *M. tuberculosis* in a dose dependent manner (Figure 1D). Gentamicin treatment also abrogated the growth of *M. tuberculosis* and growth-enhancing effect of hyaluronan.

BCG utilizes hyaluronan as a carbon source

To determine why hyaluronan enhances the growth of BCG, we hypothesized that BCG can utilize it as a carbon source because hyaluronan is a polymer of disaccharides. We cultured BCG-Luc in 7H9 based carbon-starved broth in the presence (0.5 mg/ml) or absence of hyaluronan. As expected, in the carbon-starved media BCG did not grow, while the addition of hyaluronan supported the growth of BCG (Figure 2A), demonstrating that BCG can utilize hyaluronan as a carbon source.

We next compared hyaluronan with other GAG in terms of their growth supporting effect. BCG-Luc was cultured in 7H9-based carbon starved media or media including 0.5 mg/ml of each GAG as the sole carbon source. The results showed that BCG did not grow in the media supplemented with heparin or heparan sulfate. Both hyaluronan and chondroitin sulfate encouraged the growth, but hyaluronan sustained higher growth rates of BCG than chondroitin sulfate (Figure 2A). We also demonstrated that the growth supporting effect of hyaluronan is comparable to an equivalent amount of glucose (0.5 mg/ml) (Figure 2B).

In order to evaluate uptake of hyaluronan during hyaluronan-dependent growth of mycobacteria, we cultured BCG in the presence of ³H-labeled hyaluronan in the media containing hyaluronan as a sole carbon source. As shown in Figure 2C, live BCG incorporated hyaluronan, whereas heat-killed bacteria did not, showing actual uptake of hyaluronan into bacteria.

M. tuberculosis can utilize hyaluronan as a carbon source, whereas neither *M. avium* nor *M. smegmatis* can

We next assessed the action of hyaluronan in the growth of virulent *M. tuberculosis* (strain H37Rv), and environmental mycobacterial species such as *M. smegmatis* (strain mc²155) and *M. avium* (ATCC25291). In carbon-starved media, none of the three strains grew. However, *M. tuberculosis* H37Rv, along with BCG, multiplied in the media containing hyaluronan as a sole carbon source while neither *M. smegmatis* nor *M. avium* proliferated. After 12 days culture, optimal density (OD) at 630 nm of *M.*

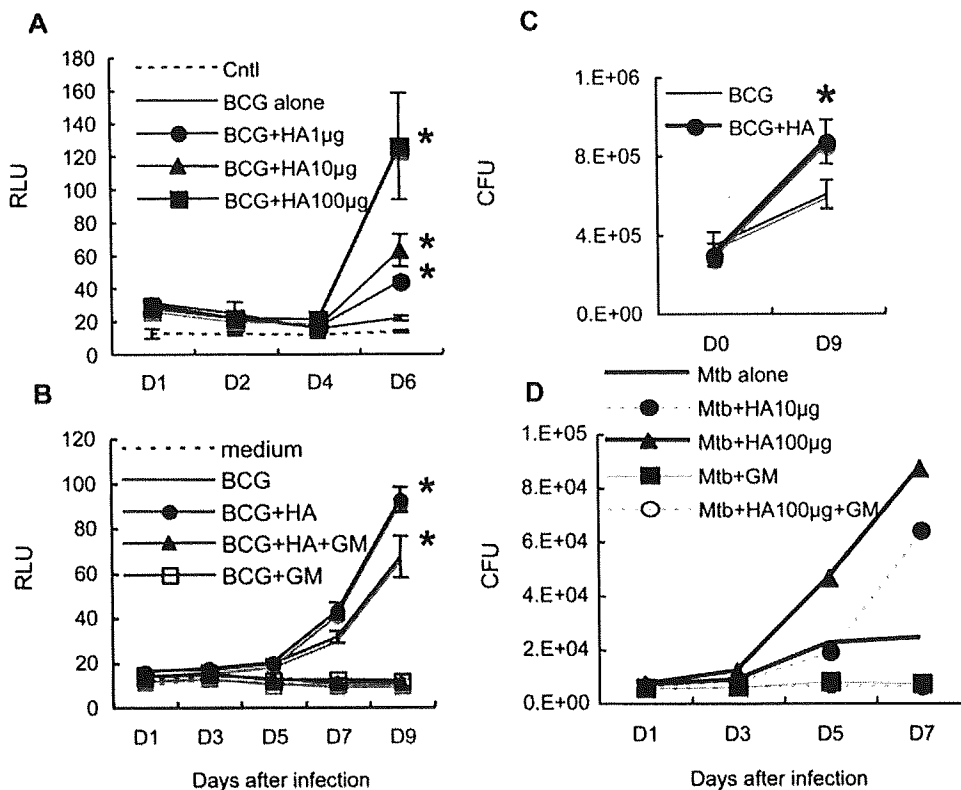


Figure 1. Effect of exogenously added hyaluronan on the growth of BCG and *M. tuberculosis* after infection of A549 cells. (A), A549 cells were infected with BCG-Luc for 16 hours at a multiplicity of infection (MOI) of 10. After removal of non-infected bacteria, different amounts of hyaluronan (HA) were added; 0 μg/200 μl (BCG alone), 1 μg/200 μl (BCG+HA1μg), 10 μg/200 μl (BCG+HA10μg), and 100 μg/200 μl (BCG+HA100μg) before culture at 37°C under 5% CO₂. Cells were lysed by adding 5% Triton X (0.5% final) at each time point (1, 2, 4, and 6 days) and bacterial growth was monitored by luciferase activity. The results are expressed as mean±the standard deviation (n=3). Relative luciferase unit (RLU). Cntl, control without BCG-Luc infection. For statistical analysis, a two-way ANOVA with Bonferroni Post tests were used to obtain *P*-values for each time point, comparing the various growth conditions to the control. **P*<0.01. (B), Gentamicin (GM) treatment abrogated the growth of BCG-Luc after infection of A549 cells. A549 cells were infected with BCG-Luc for 16 hours at MOI of 10. After removal of non-infected bacteria, hyaluronan was added to be 500 μg/ml for some wells (BCG+HA, BCG+HA+GM) and cultured at 37°C under 5% CO₂ in the presence or absence of 10 μg/ml GM (BCG+HA+GM, BCG+GM). Growth of BCG was monitored by luciferase activity. The results are expressed as mean±the standard deviation (n=3). RLU. Cntl, control without BCG-Luc infection. (C), The enhancing effect of hyaluronan on BCG growth was confirmed by colony forming unit (CFU). A549 cells were infected with BCG-Luc for 16 hours at MOI of 10. After removal of non-infected bacteria, BCG-Luc was grown in the presence or absence of 50 μg/ml HA. Cells were lysed at each time point and serial 10-fold dilutions were plated in duplicate on Middlebrook 7H11 agar (Difco) supplemented with oleic acid, albumin, dextrose and catalase (Difco). After incubation for 3–4 weeks at 37°C, colonies were counted and the number of CFU was calculated per well (1 ml). The results are expressed as mean±the standard deviation (n=6). (D), A549 cells were infected with *M. tuberculosis* H37Rv and then different amounts of hyaluronan (HA) were added; 0 μg/200 μl (Mtb alone), 10 μg/200 μl (Mtb+HA10μg), and 100 μg/200 μl (Mtb+HA100μg). Gentamicin (50 μg/ml) was added to some wells with (Mtb+HA100μg+GM) or without (Mtb+GM) 100 μg/200 μl hyaluronan. Cells were lysed by adding 5% Triton X (0.5% final) and the number of viable bacteria was determined by plating dilutions of the samples for CFU on 7H11-OADC agar.

doi:10.1371/journal.ppat.1000643.g001

tuberculosis culture increased to 0.32 ± 0.038 from 0.01 (day 0). We then compared hyaluronan and other GAGs in terms of growth supportive effects on *M. tuberculosis*. Similar to the case of BCG, hyaluronan most effectively enhanced the growth of *M. tuberculosis* among tested GAGs (Figure 3).

Detection of hyaluronidase activity in mycobacteria

Because hyaluronan is a long chain consisting of the repeat of two monosaccharides at over 2×10^5 Da, we hypothesized that extracellular cleavage of the polymer would be required before taken up by cells. Therefore, we next assessed hyaluronidase activity in mycobacteria. Hyaluronan was incubated in the presence or absence of cell lysates derived from BCG before precipitation by phenol/chloroform extraction. Precipitates were then fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and visualized by alcian blue staining as described previously [30].

Hyaluronan was separated into discrete ladder-like bands by electrophoresis after incubation with BCG lysate (Figure 4A), demonstrating that BCG possesses hyaluronidase activity.

Hyaluronidase activity is critical for hyaluronan-dependent growth

We then addressed whether hyaluronidase activity is crucial for hyaluronan -dependent growth of mycobacteria. L-Ascorbic acid 6-hexadecanoate (Vcpal) is shown to be a potent inhibitor of hyaluronidase [31]. We investigated the effect of Vcpal on hyaluronidase activity of BCG and found that hyaluronidase activity was abolished in the presence of 25 μM Vcpal (Figure 4A, lane 4).

We next examined the effects of Vcpal on the growth of BCG. BCG-Luc was cultured in modified 7H9 media containing hyaluronan (0.5 mg/L) as the sole carbon source or 7H9-ADC

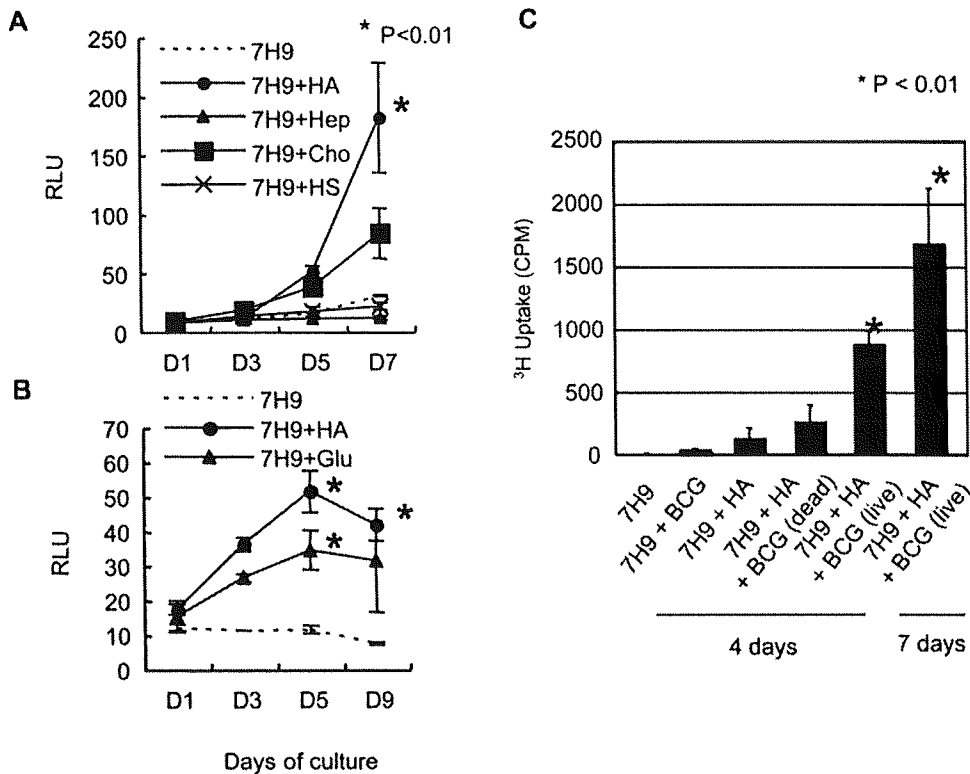


Figure 2. Effect of hyaluronan on BCG growth in carbon-starved 7H9 media. (A) (B), BCG-Luc was cultured in carbon-starved 7H9 media (7H9), or carbon-starved 7H9 media supplemented with 500 μ g/ml of HA (7H9+HA), heparin (7H9+Hep), chondroitin sulfate C (7H9+Cho), heparan sulfate (7H9+HS), or glucose (7H9+Glu) at 37°C. Growth of BCG was monitored by luciferase activity. The results are expressed as mean \pm the standard deviation ($n=3$). For statistical analysis, a two-way ANOVA with Bonferroni Post tests were used to obtain P -values for each time point, comparing the various growth conditions to the control. * $P<0.01$. (C), Uptake of ^3H -hyaluronan (HA) by BCG in carbon-starved 7H9 media. Live and heat-killed BCG cells were cultured in carbon-starved 7H9 media in the presence or absence of ^3H -labeled hyaluronan for 4 or 7 days. The uptake of ^3H -labeled hyaluronan was measured by a gamma counter. doi:10.1371/journal.ppat.1000643.g002

complete media, which contains Tween 80, glycerol, and dextrose as carbon sources and BSA. We found that 25 μ M Vcpal did not change the growth rate of BCG in 7H9-ADC complete media, while it abolished the growth of BCG in the media containing hyaluronan as the sole carbon source (Figure 4B).

We also examined the effect of Vcpal on the growth of *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* H37Rv was cultured in the media with or without Vcpal (50 and 100 μ M). Vcpal suppressed the growth of *M. tuberculosis* in the media containing hyaluronan as a sole carbon source but not the growth in conventional 7H9-ADC media (Figure 4C). Other hyaluronidase inhibitors, such as apigenin and quercetin [32], also inhibited hyaluronan dependent growth of *M. tuberculosis* as shown in Figure S1. These results indicate that hyaluronidase activity is essential for both BCG and *M. tuberculosis* when utilizing hyaluronan as a carbon source.

Vcpal blocks growth of BCG after attachment to A549 cells

We next examined whether Vcpal suppresses the enhancing effect of hyaluronan on the growth of BCG after attachment to A549 epithelial cells. After exposure to BCG-Luc, hyaluronan was added with or without Vcpal (25 μ M) into the culture and growth of BCG was monitored by measuring luciferase activity. After 6 days culture, RLU values of BCG-Luc increased to 36.6 ± 7.5 RLU or 52.6 ± 18.7 RLU in the absence or presence of hyaluronan, respectively. Adding Vcpal abrogated the enhanced

effects of hyaluronan (29.3 ± 2 RLU), demonstrating that BCG utilized exogenously added hyaluronan as a carbon source after infection to A549 cells.

BCG and *M. tuberculosis* efficiently utilize hyaluronan synthesized by HAS1 and HAS3

This work so far on the growth of mycobacteria has been performed with hyaluronan purified from human umbilical cord (Sigma). In order to elucidate whether mycobacteria can use hyaluronan actually synthesized *in situ* by mammalian cells, we employed the previously established stable human HAS1–3 expressing rat 3Y1 fibroblasts [15]. 3Y1 rat fibroblasts do not produce detectable hyaluronan themselves but each transfectant produces different sized hyaluronan. Both HAS1 and HAS3 transfectants secrete hyaluronan with broad size distributions with molecular masses between 2×10^5 to $\sim 2 \times 10^6$ Da, while the HAS2 transfectant secretes extremely large hyaluronan at an average molecular mass of $>2 \times 10^6$ Da [15]. We analyzed the level of hyaluronan production by utilizing a hyaluronan-binding protein (HABP)-based ELISA assay and confirmed that the HAS2 transfectant produced high levels of hyaluronan (235.7 μ g/mL in the culture media), while the HAS3 transfectant synthesized the smallest amount of hyaluronan (15.9 μ g/mL). The HAS1 transfectant produced moderate levels of hyaluronan (85.3 μ g/mL), and the empty vector transfectant did not produce detectable amounts of hyaluronan.

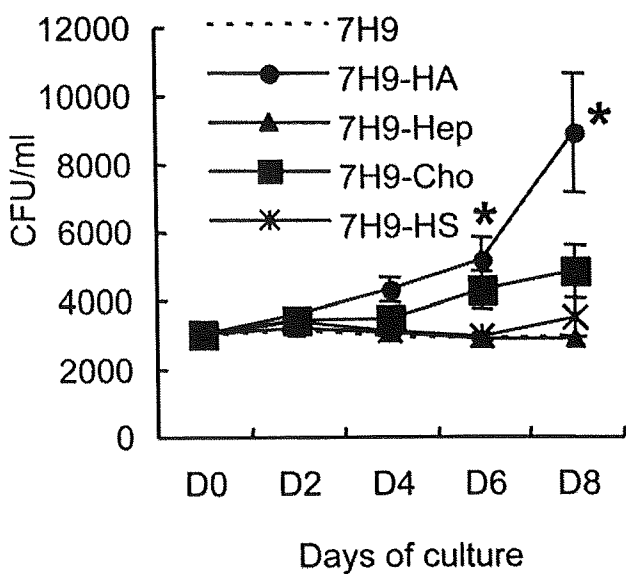


Figure 3. Effect of GAG on the growth of *M. tuberculosis* in carbon starved media. *M. tuberculosis* H37Rv was cultured in carbon-starved 7H9 media (7H9), or carbon-starved 7H9 media supplemented with 500 µg/ml of HA (7H9+HA), heparin (7H9+Hep), chondroitin sulfate C (7H9+Cho), or heparan sulfate (7H9+HS) at 37°C. Bacterial numbers were monitored by determining CFU at each time point. The results are expressed as mean±the standard deviation (n=3). For statistical analysis, a two-way ANOVA with Bonferroni Post tests were used to obtain P-values for each time point, comparing the various growth conditions to the control. *P<0.01. doi:10.1371/journal.ppat.1000643.g003

Each human HAS transfectant was exposed to BCG-Luc and the growth kinetics of the bacteria were monitored by luciferase activity. The results showed that BCG grew after attachment to 3Y1 cells transfected with HAS1 and HAS3 but not with HAS2 or empty vector (Figure 5A). In addition, we found that hyaluronidase treatment of HAS1 transfected cells enhanced the growth of BCG (Figure 5B). These results suggest that shorter sized chains of hyaluronan are preferential for BCG growth.

We also monitored the growth of *M. tuberculosis* H37Rv after infection to these HAS transfectant cells. Along with the case of BCG, HAS1 and HAS3 but not HAS2-transfectants supported the growth of *M. tuberculosis* (Figure 5C).

Production of hyaluronan in *M. tuberculosis*-infected lungs

To see if hyaluronan is present at the site of infection of *M. tuberculosis*, we assessed the expression of hyaluronan synthases (HAS1, HAS2, and HAS3) in the lungs of BALB/c mice infected with the *M. tuberculosis* H37Rv strain, using the low-dose aerosol infection model. Total RNA was extracted from the lungs after 1, 3, 5, 7, 14, and 21 days of infection, and analyzed for HAS1, HAS2, and HAS3 mRNA transcription by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) (Figure 6A). The data showed that HAS1 mRNA expression increased after infection and was maintained at all time points (Figure 6A).

We next determined if hyaluronan is present in alveoli using biotin-conjugated hyaluronan-binding protein (HABP) and histochemical analysis. Before infection, hyaluronan was located on the surface of the airways and alveoli (Figure 6B). After *M. tuberculosis* infection, hyaluronan levels were profoundly increased and accumulated in the granulomatous lesion (Figure 6B). Taken

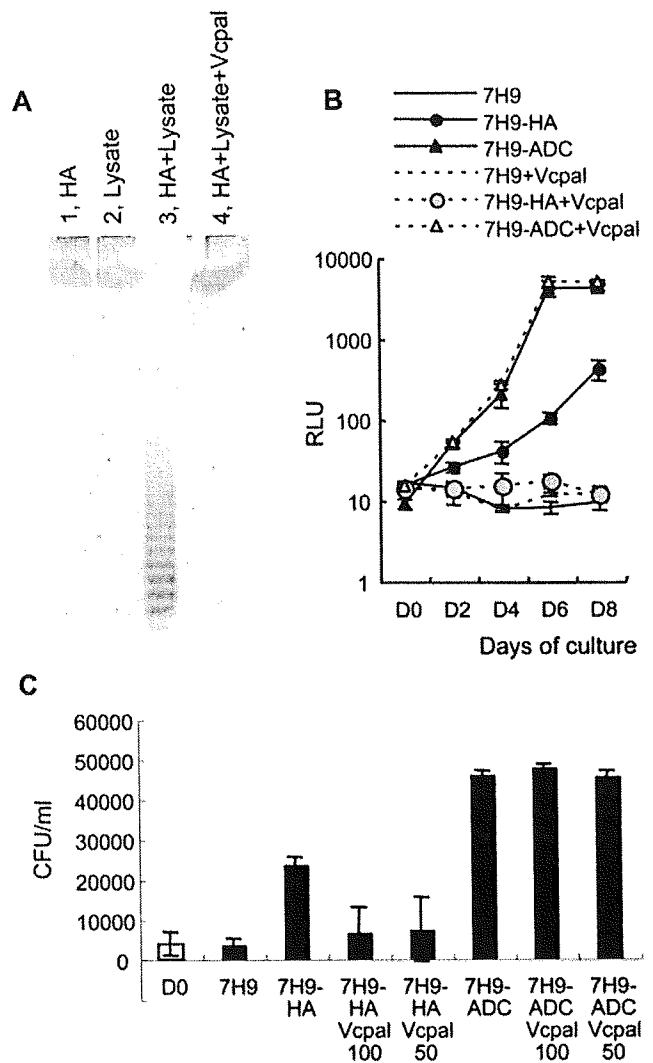


Figure 4. Hyaluronidase activity in mycobacteria and the effect of hyaluronidase inhibitor on hyaluronan-dependent growth of BCG and *M. tuberculosis*. (A), One mg/ml of hyaluronan and 700 µg/ml of BCG cell lysate was mixed and incubated for 3 days in the presence (HA+Lysate+Vcpal) or absence (HA+Lysate) of ascorbic palmitate (Vcpal), an inhibitor of hyaluronidase. As controls, hyaluronan alone (lane 1, HA) or BCG cell lysate alone (lane 2, Lysate) was treated in the same way. Hyaluronan was precipitated by ethanol after phenol extraction and resolved in water. Then hyaluronan was fractionated by PAGE gel electrophoresis and visualized by staining with alcian blue. (B), BCG-Luc (0.01 OD at 630 nm) was cultured in carbon-starved 7H9 media (7H9), media containing hyaluronan (500 µg/ml) as a sole carbon source (7H9-HA), or complete 7H9-ADC media (7H9-ADC) in the presence or absence of 25 µM Vcpal (+Vcpal), an inhibitor of hyaluronidase. The growth of bacteria was monitored by luciferase activity. RLU, relative luciferase unit (RLU). The results are expressed as mean±the standard deviation (n=3). (C), The effect of Vcpal on the growth of *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* H37Rv was cultured in carbon starved 7H9 media (7H9), media containing 100 µg/ml hyaluronan as a sole carbon source (7H9-HA), or conventional 7H9-ADC media (7H9-ADC) with or without 50 (50) or 100 (100) µM of Vcpal for 8 days (closed bars). Bacterial number was determined by plating dilutions for CFU on 7H9-OADC agar and compared to that of Time 0 (D0, open bar). doi:10.1371/journal.ppat.1000643.g004

together, these data indicate that the major hyaluronan synthase in the lungs is HAS1 both before and after *M. tuberculosis* infection and hyaluronan accumulates in the tuberculosis lesion.