

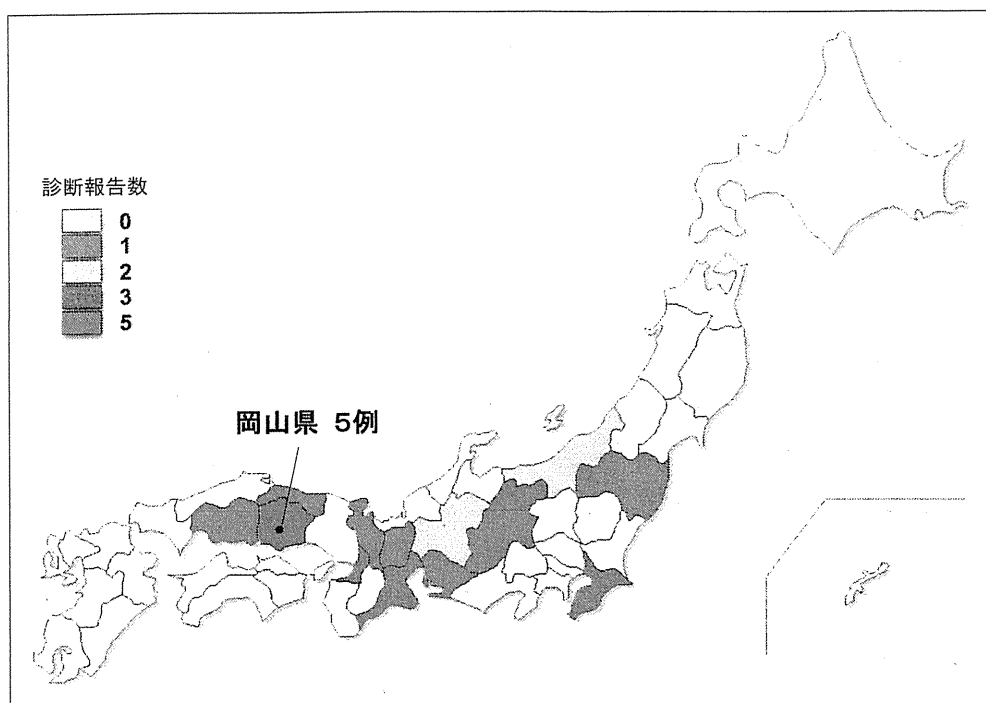


図 2.
日本のブルーリ潰瘍の分布

表 2. 日本のブルーリ潰瘍のまとめ

診断年 (WHO 登録年)	新患数	性別		年 齢								
		男	女	0～9	10～19	20～29	30～39	40～49	50～59	60～69	70～79	80～
1980	1		1		1							
2003	1		1				1					
2004	1		1							1		
2005	1		1			1						
2007	3	2	1						1		1	1
2008	2		2	1			1					
2009	5	2	3		1	1		2			1	
2010	5	1	4		1			1	2		1	
合計	19	5	14	1	3	2	2	3	3	1	3	1

も顔面 2 例，上肢と下肢はともに 9 例(重複例あり)に及ぶ(表 1)。しかし，体幹などにも病巣を作ることがあり，その限りではない。

初期には，紅斑～紅色丘疹であるが，徐々に直径数 cm 大の無痛性の皮下結節に進行する(図 3-a)。その後，数日～数週間でその中心部が自壊し，潰瘍化し拡大する。潰瘍底は白黄苔に覆われることが多い(図 3-b)。進行すると大きな潰瘍になるが，筋肉にまで及ぶことは稀である。全身状態は良好なことが多く，ブルーリ潰瘍が死因となることは稀であるが，開発途上国では抵抗力が弱い幼児・免疫不全患者などで 2 次的に敗血症や破傷風に罹患し，死亡する例がみられる。

2. 検 査

a) スメア検査

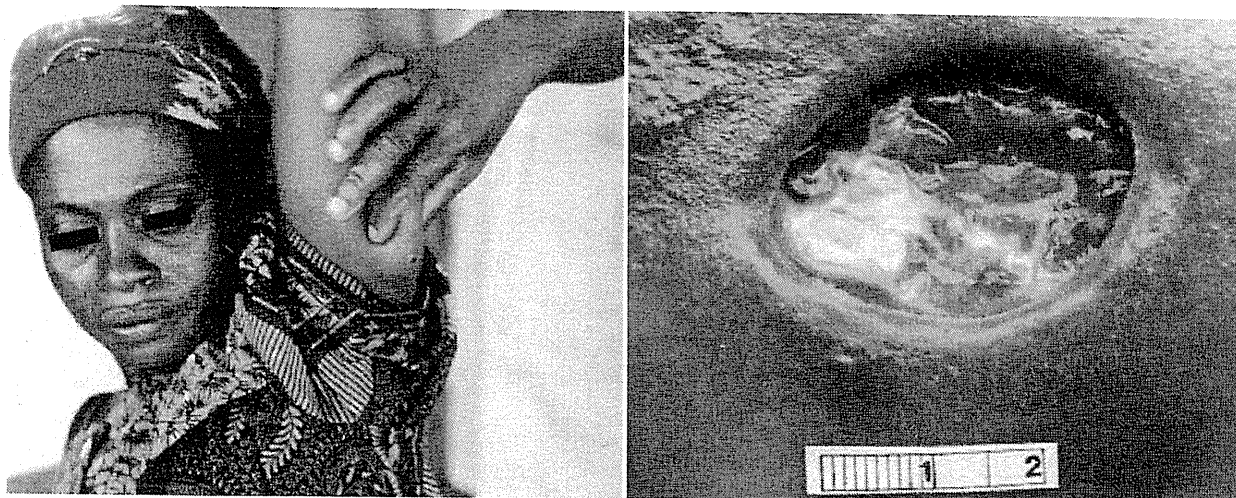
潰瘍底や潰瘍側面などを綿棒で擦過して標本としたものや，生検組織をスタンプ標本としたものを検体とする(図 4)。Ziehl-Neelsen(Z-N)染色して 1000 倍(油浸)で検鏡し，抗酸菌を検出する。

b) 培養検査

生検組織を細切，あるいは膿や潰瘍底を擦過した綿棒を用いる。液体培地と小川培地を用いるが，25℃と 37℃で培養し，小川培地については 6 か月間は廃棄しない(11 か月後の培養成功例あり)。

c) PCR 検査，分子生物学検査

生検組織，病理組織パラフィン切片などから



a|b

図 3. ブルーリ潰瘍の臨床(文献 2 より許可を得て抜粋)

a : 皮下結節

b : 数日～数週間で、結節が自壊・潰瘍化し、潰瘍は拡大する。潰瘍底は二次感染などで白黄苔に覆われることが多い。

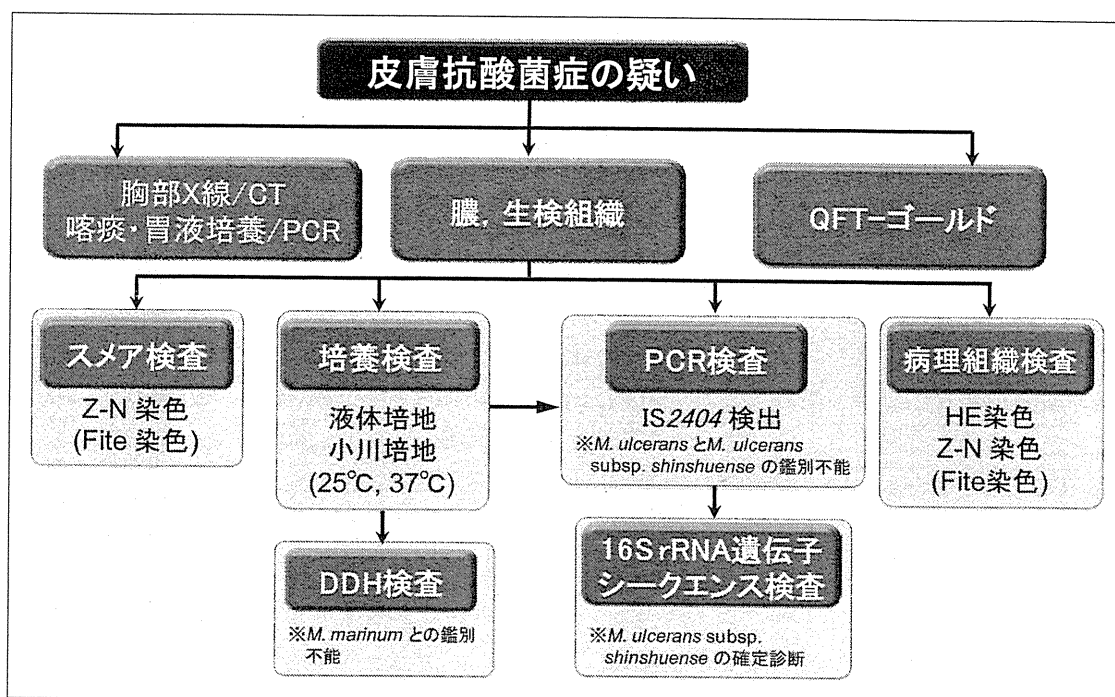


図 4. ブルーリ潰瘍診断のための検査フローチャート

PCR 検査で菌特異的な DNA 断片である IS2404 が検出されれば, *M. marinum* など他の NTM は否定され, *M. ulcerans* と診断できる(図 5). *M. ulcerans* と subsp. *shinshuense* を鑑別するためには, 16S rRNA 遺伝子シーケンス検査が必要である(表 3). 培養成功例での DNA-DNA hybridization(DDH)検査(極東製薬)では *M. marinum* と *M. ulcerans*, subsp. *shinshuense* がすべて同スポットになり, 各々の鑑別はできない. その他, 病原性プラスミド pMUM001 上の遺伝子を標的

とした PCR 法や薬剤感受性検査などがある.

d) 病理組織検査

結節部, 潰瘍境界部などから生検する. HE 染色では真皮, 脂肪織, ときには筋膜に及ぶ壊死が認められる. 真皮から脂肪織にかけてリンパ球主体の炎症細胞浸潤を認める. 肉芽腫や類上皮細胞は認めにくく, 乾酪壊死の所見も認めにくい. 脂肪織には浮腫を認める. Z-N 染色では壊死部の周辺や真皮深層～脂肪織に抗酸菌を認めることが多い.

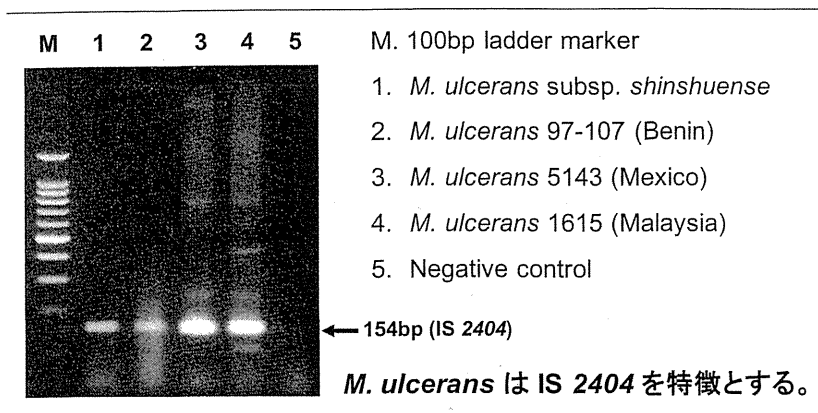


図 5.
Mycobacterium ulcerans の PCR 検査結果
(検体：生検組織，病理組織パラフィン切片
など)

表 3. *M. ulcerans* subsp. *shinshuense* と他の NTM における 16S rRNA 遺伝子シーケンスの比較

Strain	Pt. No.	Country	Underlined residue indicate following positions*			
			492	1247	1288	1499-1451
" <i>M. shinshuense</i> " ATCC 33728	1	Japan	GG <u>G</u> GA	GT <u>G</u> CA	AA <u>G</u> GC	ACCC---TTT <u>G</u>
" <i>M. shinshuense</i> " 753	2	Japan	GG <u>G</u> GA	GT <u>G</u> CA	AA <u>G</u> GC	ACCC---TTT <u>G</u>
" <i>M. shinshuense</i> " 0501	3	Japan	GG <u>G</u> GA	GT <u>G</u> CA	AA <u>G</u> GC	ACCC---TTT <u>G</u>
" <i>M. shinshuense</i> " 0401	4	Japan	GG <u>G</u> GA	GT <u>G</u> CA	AA <u>G</u> GC	ACCC---TTT <u>G</u>
" <i>M. shinshuense</i> " 0701	5	Japan	GG <u>G</u> GA	GT <u>G</u> CA	AA <u>G</u> GC	ACCC---TTT <u>G</u>
<i>M. ulcerans</i> 98912		China	GG <u>G</u> GA	GT <u>G</u> CA	AA <u>G</u> GC	ACCC---TTT <u>G</u>
<i>M. ulcerans</i> Agy99		Ghana	GG <u>A</u> GA	GT <u>G</u> CA	AA <u>C</u> GC	ACCCTTTT <u>T</u> TG
<i>M. ulcerans</i> ATCC 19423 ^T		Australia	GG <u>A</u> GA	GT <u>G</u> CA	AA <u>C</u> GC	ACCC---TTT <u>G</u>
<i>M. ulcerans</i> 1615		Malaysia	GG <u>A</u> GA	GT <u>G</u> CA	AA <u>C</u> GC	ACCC---TTT <u>G</u>
<i>M. ulcerans</i> 5143		Mexico	GG <u>A</u> GA	GT <u>G</u> CA	AA <u>A</u> GC	ACCC---TTT <u>G</u>
<i>M. ulcerans</i> ATCC 927		USA	GG <u>A</u> GA	GT <u>A</u> CA	AA <u>A</u> GC	ACCC---TTT <u>G</u>

M. shinshuense : *M. ulcerans* subsp. *shinshuense*

**E. coli* 16S rRNA 遺伝子を基準とした位置

Pt. No. は日本の症例番号

3. 鑑別診断

皮膚結核，ハンセン病，リーシュマニア症などの熱帯皮膚感染症，糖尿病性潰瘍，リポイド類壊死など。

所ハンセン病研究センターが行っている(中永和枝：nakanaga@nih.go.jp, 石井則久：norishi@nih.go.jp)。

診 断

裸露部の潰瘍を伴う皮疹において，菌検査で *M. ulcerans* を同定できれば，診断は確定する。菌の同定には，スメア検査あるいは病理組織検査で抗酸菌を確認し，培養検査，PCR 検査を行う必要がある。しかし，培養には長期間を要し，成功率も低いのが現状である。16S rRNA 遺伝子シーケンス検査は時間と費用がかかるので，*M. ulcerans* との鑑別を明確にしたい場合に行う。ブルーリ潰瘍の検査についての問い合わせは国立感染症研究

治 療

内服例としてはリファンピシン(RFP)：450 mg/日(保険適用外)，クラリスロマイシン(CAM)：800 mg/日(非結核性抗酸菌症として保険適用)，レボフロキサシン(LVFX)：500 mg/日(深在性皮膚感染症として保険適用)から2～3剤併用を行う。その他，ストレプトマイシン(SM)：15 mg/kg/日(筋注)なども考慮する。なお，WHO は RFP と SM の8週間投与を推奨しているが¹²⁾，日本では RFP, CAM, LVFX の3剤投与を勧めたい。マイコラクトンが潰瘍拡大に関係す

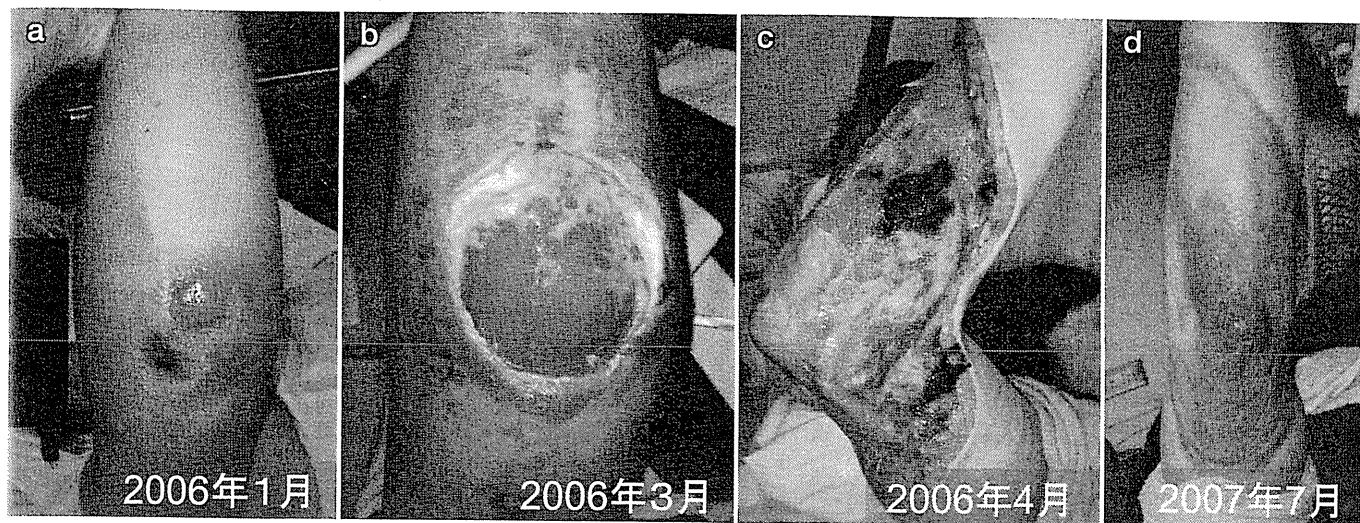


図 6. 広島例の臨床

るため、内服だけでは多くの場合治療は不十分であり、小さな病変の場合でも、外科的に病巣を潰瘍から 5 cm 程度十分に離して切除する。必要な場合は、その後皮膚移植を行う。

予後と予防

本疾患の予後については不明点が多いため、学会や論文などで公表し、今後の治療の資料とすることが大切である。BCG の効果についてははっきりとしていないが、接種後 6～12 か月間は予防効果があるとする報告や、乳児接種を受けている者では骨髓炎に進展するのを予防するという報告がある¹³⁾¹⁴⁾。

症例紹介

国立病院機構東広島医療センター整形外科の症例を、許諾のもと提示する(表 1 の症例 3)¹⁵⁾。

患者：20 歳，女性，学生。

既往歴・生活歴：特記すべきことなし。

渡航歴：なし。

現病歴：2005 年 12 月下旬より誘因なく右肘頭部に発赤・腫脹・疼痛が出現した。翌年 1 月上旬に皮膚科を受診した。蜂窩織炎の診断で種々の抗生剤で加療したが改善せず，1 月下旬に整形外科を受診した。

現 症：右肘頭を中心に上腕後面から前腕尺側にかけ発赤・腫脹・熱感を認め，肘頭部の一部は壊死に陥っていた(図 6-a)。強い自発痛・圧痛を

伴っていた。

臨床検査成績：血液一般，生化学，胸部単純 X 線像に異常なし。

病理組織所見：真皮から脂肪織まで全層にわたり凝固壊死を認め，壊死組織内には好中球，泡沫細胞の集簇，好酸球や多核巨細胞の浸潤を認めた。Langhans 型巨細胞は認められなかった(図 7-a)。皮下壊死組織部のスタンプ標本の Z-N 染色では，散在ならびに集塊をなした多数の抗酸菌を認めた(図 7-b)。

細菌学的所見：病巣部の膿を 2%小川培地，液体培地，血液寒天培地で 27℃ および 37℃ で培養を行ったところ，27℃，2%小川培地で 11 週後に黄色のコロニーを認めた。菌の遺伝子診断では，パラフィン切片および凍結皮膚を用いた PCR 検査で陽性，16S rRNA 遺伝子シーケンス検査で *M. ulcerans* subsp. *shinshuense* と同定した。

経 過：初診後よりピペラシリン(PIPC)に変更したが肘頭部の発赤は拡大し，MRI にて皮下膿瘍が疑われたため，1 月下旬に病巣郭清術を施行した。その後も潰瘍の拡大が続き，2 月上旬に行ったスタンプ標本の結果より抗酸菌感染が疑われたため，イソニアジド(INH) 300 mg/日，RFP 450 mg/日，エタンブトール(EB) 750 mg/日，CAM 500 mg/日の内服ならびに SM 750 mg×2/週の筋注を開始したが，無効であった。PCR 結果から *M. ulcerans* あるいは *M. ulcerans* subsp. *shinshuense* が疑われたことから RFP 450 mg/

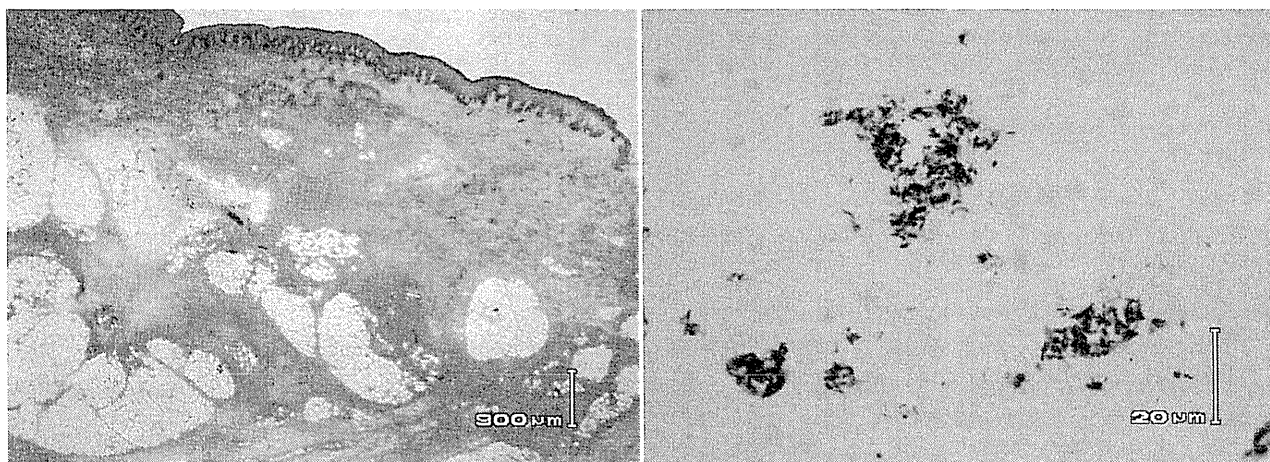


図 7. 広島例の病理組織所見

a | b

- a : 真皮中層から脂肪組織にかけ凝固壊死を認め、その周囲の細胞浸潤や肉芽腫反応は乏しい。
b : Z-N 染色にて真皮深層～脂肪組織に抗酸性の菌塊を認めた。

日、ガチフロキサシン (GFLX) 200 mg/日の内服ならびに SM 750 mg×2/週の筋注に変更した。投薬変更にもかかわらず、潰瘍は直径 10 cm にまで拡大したため(図 6-b)、同年 4 月上旬に広範囲病巣切除術を施行した(図 6-c)。術後の経過は良好で、術後疼痛は著明に改善し、5 月上旬に分層植皮を行い、治癒した(図 6-d)。RFP+GFLX+SM は、術前 4 週間、術後 12 週間投与した。

症例のまとめ：本症例は、海外渡航歴や特記すべき既往歴のない若い健常女性であった。動物、魚、土壌に接触する機会がなく感染経路は不明である。しかし、発症部位が裸露部であることから、蚊などのベクターの介在は否定できない。

本症例の特徴は、抗酸菌に対する抗菌剤投与にもかかわらず皮膚潰瘍が拡大し、壊死局面を形成したことである。病理組織所見でも真皮から脂肪組織にかけて広範囲に壊死を認めた。これらはマイコバクテリアによる症状と考えられた。潰瘍が肘関節を含み直径 10 cm にまで進展したこと、約 8 週間 RFP と SM の投与を行ったにもかかわらず症状が悪化していたことから、発症から約 4 か月後に手術的治療に至った。切除範囲の決定においては、明らかな圧痛や発赤のある部位にはマイコバクテリアの存在を考慮し、辺縁の正常部位も含めて皮膚、脂肪組織ならびに筋膜を一塊として切除した。その結果、切除範囲は 12×22 cm と広範囲になったが、感染の鎮静化に伴い分層植皮を行えた。治癒の判定が困難なため、術後 12 週間化学療法を

継続した。その後、再燃や肘関節の拘縮・可動域制限は認めていない。

世界の動向

ブルーリ潰瘍は、ハンセン病などとともに「顧みられない熱帯病(Neglected Tropical Diseases : NTDs)」(WHO)に位置づけられる。10～15 歳の若年者の四肢に好発し、機能的、美容的に大きな障害を残すことからその対応は急務であるが、その多くが開発途上国を中心に発症してきたため、十分な対応がされてこなかった。

WHO は 1998 年に Buruli Ulcer Global Initiative を発足し、日本でも国立感染症研究所ハンセン病研究センターを中核的検査センターとし、症例の集積や疫学的検討、治療法、潰瘍の治療法などの検討を行っている。

おわりに

ブルーリ潰瘍は、日本にも存在する感染症である。診断に迷うとき、鑑別診断の場合、ハンセン病研究センターに問い合わせをする。

文 献

- 1) MacCallum P, Tolhurst JC, Buckle G, et al : A new mycobacterial infection in man. *J Pathol Bacteriol*, 60 : 92-122, 1948.
- 2) Kingsley A, Scherpier R, Nyarco E, et al : Buruli

- ulcer : *Mycobacterium ulcerans* infection. World Health Organization, Global Buruli Ulcer Initiative, 2000.
- 3) Amofah G, Bonsu F, Tetteh C, et al : Buruli ulcer in Ghana : results of a national case search. *Emerg Infect Dis*, **8** : 167-170, 2002.
 - 4) Raghunathan PL, Whitney EA, Asamoah S, et al : Risk factors for Buruli ulcer disease (*Mycobacterium ulcerans* infection) : Results from a case-control study in Ghana. *Clin Infect Dis*, **40** : 1445-1453, 2005.
 - 5) Merritt RW, Walker ED, Small PLC, et al : Ecology and transmission of Buruli ulcer disease : A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*, **4**(12) : e911, 2010.
 - 6) Pimsler M, Sponsler TA, Meyers WM : Immunosuppressive properties of the soluble toxin from *Mycobacterium ulcerans*. *J Infect Dis*, **157** : 577-580, 1988.
 - 7) George KM, Chatterjee D, Gunawardana G, et al : Mycolactone : a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science*, **283** : 854-857, 1999.
 - 8) George KM, Barker LP, Welty DM, et al : Partial purification and characterization of biological effects of a lipid toxin produced by *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun*, **66** : 587-593, 1998.
 - 9) 御子柴甫ほか : *Mycobacterium ulcerans* 類似菌による非定型抗酸菌症の1例. 日皮会誌, **92** : 557-565, 1982.
 - 10) Tsukamura M, Mikoshiba H : A new *Mycobacterium* which caused skin infection. *Microbiol Immunol*, **26** : 951-955, 1982.
 - 11) 東村道雄ほか : 日本人女性に皮膚潰瘍を作った *Mycobacterium ulcerans* 類似菌. 結核, **64**(11) : 691-697, 1989.
 - 12) World Health Organization : Provisional guidance on the role of specific antibiotics in the management of *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer). Geneva (Switzerland), 2004.
 - 13) Portaels F, Aguiar J, Debacker M, et al : *Mycobacterium bovis* BCG vaccination as prophylaxis against *Mycobacterium ulcerans* osteomyelitis in Buruli ulcer disease. *Infect Immun*, **72** : 62-65, 2004.
 - 14) Nackers F, Dramaix M, Johnson RC, et al : BCG vaccine effectiveness against Buruli ulcer : a case-control study in Benin. *Am J Trop Med Hyg*, **75** : 768-774, 2006.
 - 15) 今田英明ほか : *Mycobacterium shinshuense* により生じた Buruli 潰瘍に類似した難治性肘頭部潰瘍の1例. 整形外科, **59**(12) : 1440-1445, 2008.

特集 肉芽腫性疾患—その横断的理解—

case **4** Part1. 感染性肉芽腫

J Visual Dermatol 10:1034-1037,2011

非結核性抗酸菌症

—肉芽腫を作る例と作らない例

石井 則久, 四津 里英

Key words ブルーリ潰瘍, *M. avium*, *M. haemophilum*, *M. marinum*, *M. massiliense*, *M. peregrinum*

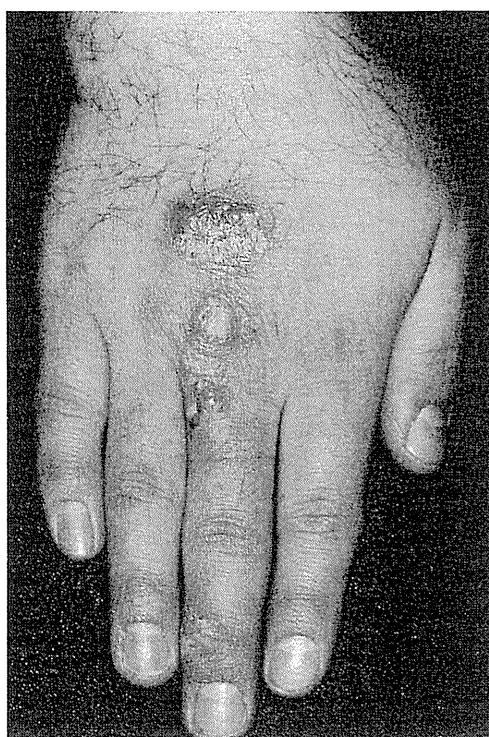


図1 成人, 男性, *M. marinum* 感染症
手指, 手背部の痂皮と紅斑を伴う結節 (皮膚リンパ管型)
(横浜市立大学 中嶋 弘 名誉教授例).

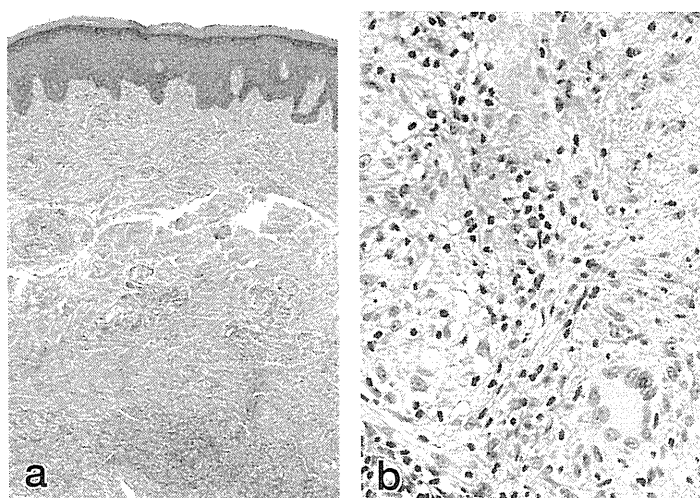


図2 *M. marinum* 感染症 (図1) の病理組織学的所見
真皮, とくに下層に炎症性細胞が浸潤している. 下層には巨細胞を伴う類上皮細胞性肉芽腫を認める (a: 弱拡大, b: 強拡大, HE 染色).

はじめに

結核とハンセン病を除いた抗酸菌感染症を非結核性抗酸菌症 (nontuberculous mycobacterioses : NTM 症) という. 皮膚 NTM 症の原因菌は 20 種類以上あると考えられる. 主な原因菌は *Mycobacterium* (*M.*) *marinum*, *M. avium*, *M. haemophilum*, *M. ulcerans* subsp. *shinshuense*, *M. peregrinum*, *M. kansasii*, *M. abscessus* などである. 最近日本で初めて同定された *M. massiliense* などもある.

皮膚 NTM 症に対する生体防御の主たるものは細胞性免疫能である. しかし, 病理組織像では肉芽腫を作るものと, 作らないものがある. 病理組織像の形成には, 菌数, 抗酸菌の生体に対する異物性, 病期 (感染・発病からの期間), 生体の免疫能, 抗酸菌を排除する能力などさまざまな要因が関係する. 実際の病理組織像でも, 非特異的な急性/慢性炎症像, 化膿/膿瘍形成, 乾酪性/非乾酪性肉芽腫など多彩であり, また同一症例で複数の病理組織像を観察できる場合もある.

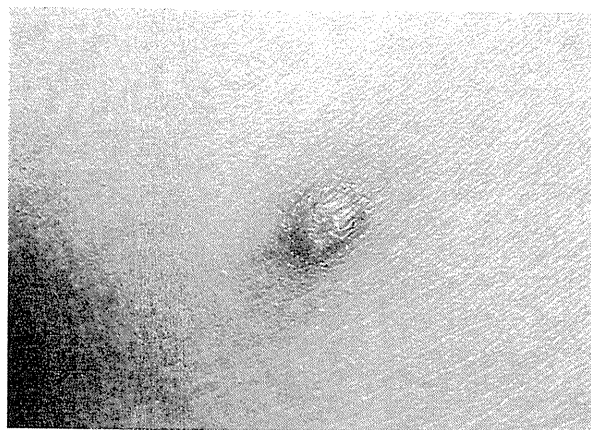


図3 45歳, 男性, *M. avium* 感染症
 臂部に表面褐色調で隆起し, 皮下に及ぶ結節. 24時間風呂使用.
 息子(14歳), 娘(11歳)にも同様の皮疹あり(横浜市立大学例).

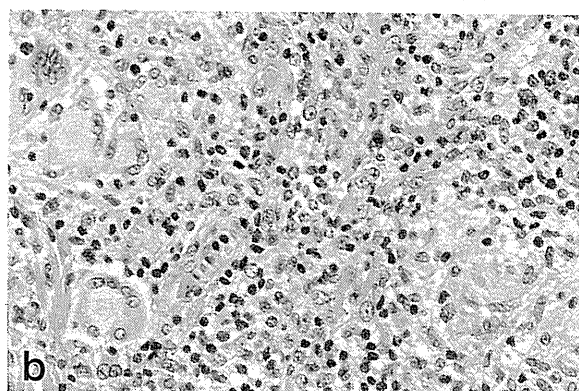


図4 *M. avium* 感染症(図3)の病理組織学的所見
 真皮に巨細胞を伴う類上皮細胞性肉芽腫を認める(a:弱
 拡大, b:強拡大, HE染色).

■ *M. marinum* 感染症(図1, 2)

本邦で症例が一番多い皮膚NTM症である。菌は汽水域(河口などの淡水と海水が混在した水域)に主に生息しているため, 魚を扱う人(漁業関係者, 熱帯魚飼育者, 水族館職員等)などに多くみられる。好発部位は手指, 手背などである。感染から受診までは1~数カ月経過することが多く, 結節などの所見が多い(図1)。

病理組織像は真皮全層に細胞浸潤を認めるが, とくに真皮下層に類上皮細胞性肉芽腫を認める(図2)。

健康成人への感染であり, *M. marinum* の発育至適温度が22~33℃であること, 感染してから数カ月経過していることが多く, 病理組織像では慢性炎症像とともに巨細胞を伴う肉芽腫を形成することが多い。

■ *M. avium* 感染症(図3, 4)

毎年数例報告されている。24時間風呂利用者での発症例も報告されている。

自験例においても健康成人で, 発症から受診までに2カ月経過しており(図3), 病理組織像では, 類上皮細胞

性肉芽腫を認める(図4)¹⁾。

■ *M. haemophilum* 感染症(図5, 6)

免疫不全患者に発症し, 本邦では2010年末現在で3例報告されている²⁾。菌に対する細胞性免疫が機能しないため, 病態としてはハンセン病のLL型に類似する(図5)。

病理組織像では, 菌がマクロファージ内に取り込まれ, 泡沫細胞になり, 黄色腫と鑑別を必要とする組織像になる(図6)。抗酸菌染色すると泡沫細胞内に多数の抗酸菌が存在し, LL型ハンセン病と同様の像を示す。

菌学的にも, らい菌と *M. haemophilum* は近縁で, らい菌の同定に用いる通常のプライマーを用いたPCR検査では, 両者が同一のバンドに表示される。そのため nested PCR や抗酸菌の16S rRNA 遺伝子配列検索などでの同定が必要である。

■ ブルーリ潰瘍

■ (*M. ulcerans* subsp. *shinshuense* 感染症)(図7, 8)

NTM症のなかでは唯一, 菌名と異なる病名をもっている。これはブルーリ潰瘍が世界で3番目に患者が多いこと, 病気

特集 肉芽腫性疾患—その横断的理解—

case 4 非結核性抗酸菌症—肉芽腫を作る例と作らない例

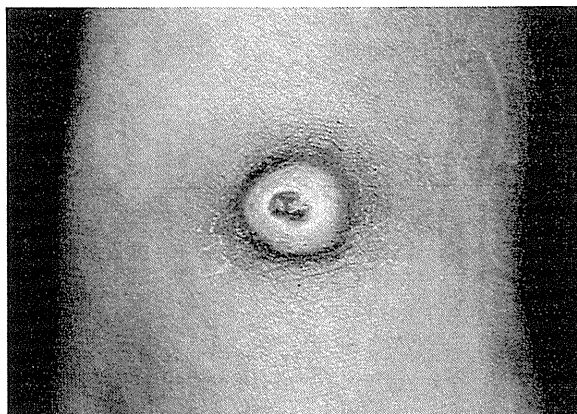


図5 53歳、男性、*M. haemophilum* 感染症
HIV陰性の免疫不全がある。左足背部の疼痛のある中央潰瘍を伴う紅色ドーム状結節（北野病院 戸田憲一 先生例）。

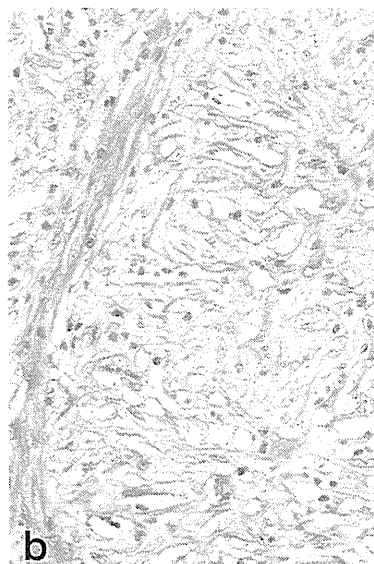
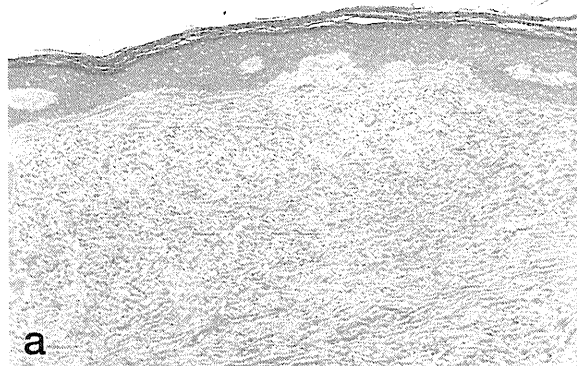


図6 *M. haemophilum* 感染症（図5）の病理組織学的所見
泡沫細胞がびまん性に認められる。LL型ハンセン病類似の所見（a：弱拡大，b：強拡大，HE染色）。抗酸菌染色を行うと泡沫細胞内に多数の抗酸菌を認める。



図7 20歳、女性、右肘部のブルーリ潰瘍（*M. ulcerans* subsp. *shinshuense* 感染症）
発赤、腫脹し、その後潰瘍になり拡大する（国立病院機構 東広島医療センター整形外科 今田英明 先生例）。

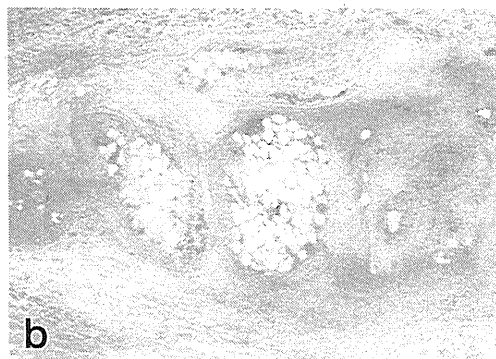
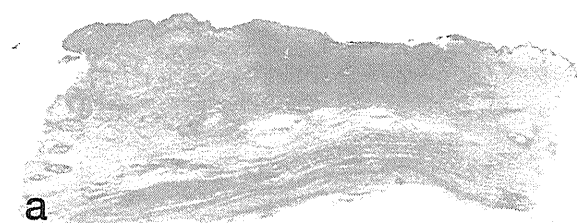


図8 ブルーリ潰瘍（図7）の病理組織学的所見
一部表皮を欠損している。細胞浸潤は少なく壊死像を認める。巨細胞は認めない。皮下組織にも壊死像を認める（a：弱拡大，b：強拡大，HE染色）。



図9 45歳、男性、*M. peregrinum* 感染症
熱帯魚飼育が趣味。皮疹が出現した約6カ月後に受診。前腕屈側部に小結節が環状に配列している。

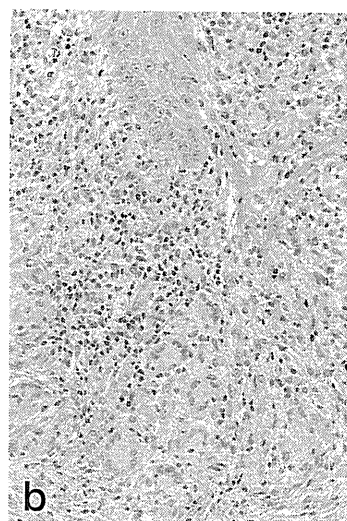
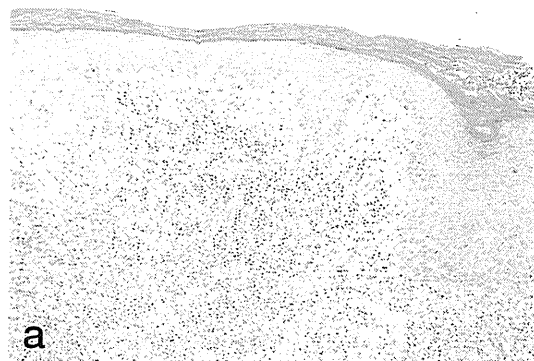


図10 *M. peregrinum* 感染症(図9)の病理組織学的所見
角質層肥厚と不全角化、表皮内細胞浸潤を認める。真皮には巨細胞を認める類上皮細胞性肉芽腫がみられる(a:弱拡大, b:強拡大, HE染色)。

が病原菌よりも先に世界に知られたためでもある(図7)³⁾。

ブルーリ潰瘍の特徴は、菌自体は *M. marinum* の近縁であるが、mycolactone (マイコラクトン) という脂質毒素を分泌することである。mycolactone は免疫抑制作用と細胞壊死作用(アポトーシス)を示すため、病理組織像でも壊死が目立ち、細胞浸潤は軽度である(図8)。肉芽腫形成もほとんど認められない。

■ *M. peregrinum* 感染症(図9, 10)

速育菌であり、皮疹も急性から慢性の経過をたどる。

臨床では結節となり(図9)、病理組織像では巨細胞を混じる類上皮細胞性肉芽腫が認められる(図10)⁴⁾。

■ ポイント

M. haemophilum のように正常のヒトには感染・発病しない抗酸菌から、菌を異物として排除する細胞性免疫能が働く *M. marinum* など、菌に対する生体の反応はさまざまである。さらにブルーリ潰瘍では毒素の作用で病理組織像が修飾される。また、感染から発病あるいは受診までの期間も、皮膚 NTM 症における肉芽腫の病態形成の大きな要因となる。

文献

- 1) Sugita Y et al: Br J Dermatol 142: 789, 2000
- 2) 斎藤 肇ほか: 感染症誌 78:389, 2004
- 3) 今田英明ほか: 整形外科 59: 1440, 2008
- 4) Ishii N et al: Acta Derm Venereol 78: 76, 1998

石井 則久 Ishii, Norihisa

〒189-0002 東村山市青葉町 4-2-1
国立感染症研究所ハンセン病研究センター
E-mail: norishii@nih.go.jp

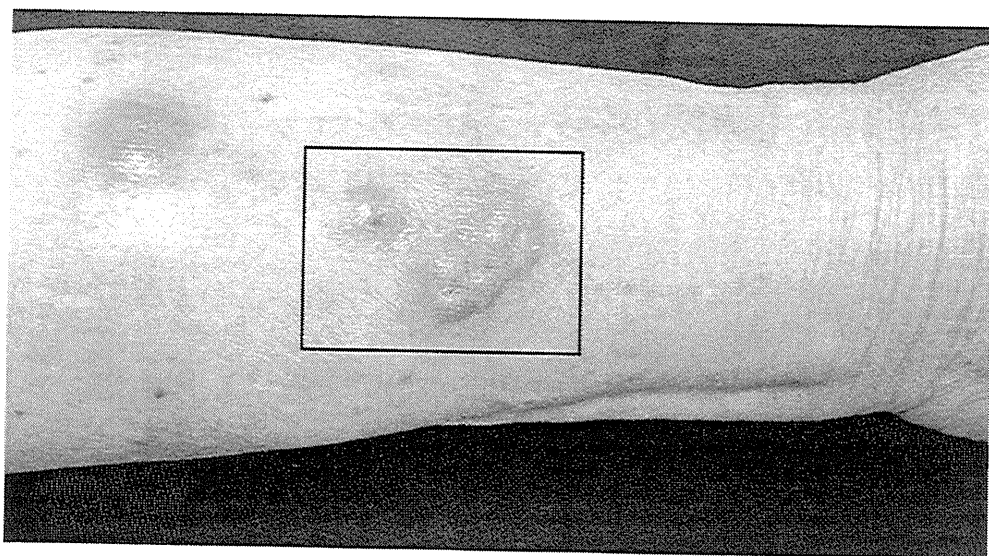
四津 里英 Yotsu, Rie

国立国際医療研究センター病院皮膚科
〒162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1

多剤併用療法が奏効したブルーリ潰瘍
(*Mycobacterium ulcerans* subsp. *Shinshuense* 感染症) の 1 例

湊 はる香 若狭 朋子 松村 由美 中永 和枝
星野 仁彦 石井 則久 堀口 裕治

CLINICOLOR



1



2

症例解説

多剤併用療法が奏効したブルーリ潰瘍 (*Mycobacterium ulcerans* subsp. *Shinshuense* 感染症) の 1 例

湊 はる香^{*1} 若狭 朋子^{*2} 松村 由美^{*3} 中永 和枝^{*4}
星野 仁彦^{*4} 石井 則久^{*4} 堀口 裕治^{*1}

患 者 70 歳，女性
職 業 主婦
主 訴 右前腕の浸潤に触れる隆起性紅斑
既往歴 子宮筋腫。結核の既往はない。海外渡航歴はない。

生活歴 自宅の庭にドラム缶を置き，雨水をためて庭木に水撒きをする習慣がある。

現病歴 2010 年 4 月中旬より右前腕に浸潤に触れる紅斑が生じた。その後，皮疹は徐々に隆起して，表面が潰瘍化してきたため近医を受診した。リンパ腫の疑いで当科を紹介され受診した。

初診時現症 大小 3 つの不正形で盛り上がる紅斑を認める。大きさは最大のものが 3.5×2.0 cm，最小のものは 1.5×1.5 cm である。いずれも浸潤に触れ，中央には細長い潰瘍がみられる（クリニカラー 1 図，2 図）。

病理組織学的所見 表皮真皮接合部には液状変性があり，表皮内にもリンパ球が浸潤している。

真皮全層に多数の組織球様細胞が増殖しており，類上皮細胞肉芽腫を形成する。一部には好中球が多数浸潤し，膿瘍を形成している。Ziehl-Neelsen 染色で抗酸菌を認める。

細菌学的検査 Polymerase chain reaction (PCR) 法により分離菌を *Mycobacterium ulcerans* subsp. *Shinshuense* と同定した。

治療および経過 クラリスロマイシン 800 mg/日とリファンピシン 450 mg/日，レボフロキサシン 500 mg/日を内服し，局所にはナジフロキサシンを外用した。治療開始とともに徐々に皮疹が縮小したため外科的切除術をせずに保存的に経過を見たところ，約 6 カ月間の治療で皮疹はわずかな癒痕を残すのみとなり，皮膚表面は色素沈着となった。

詳細は，本文 1301 頁参照

^{*1} Haruka MINATO & Yuji Horiguchi, 大阪赤十字病院，皮膚科（主任：堀口裕治部長）

^{*2} Tomoko WAKASA, 同，病理部

^{*3} Yumi MATSUMURA, 京都大学，皮膚科

^{*4} Kazue NAKANAGA, Yoshihiko HOSHINO & Norihisa ISHII, 国立感染症研究所，ハンセン病研究センター

多剤併用療法が奏効したブルーリ潰瘍 (*Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense* 感染症) の 1 例

湊 はる香^{*1} 若狭 朋子^{*2} 松村 由美^{*3} 中永 和枝^{*4}
星野 仁彦^{*4} 石井 則久^{*4} 堀口 裕治^{*1}

要 約

70 歳, 女性。右前腕に大小 3 つの浸潤に触れる不正形の隆起性紅斑を認めた。紅斑の中央には一部潰瘍がみられたが, 疼痛はなかった。ツベルクリン反応は陽性であった。皮膚組織の PCR 検査で *Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense* の遺伝子を確認した。ブルーリ潰瘍の診断のもとにクラリスロマイシン 800 mg/日とリファンピシン 450 mg/日, レボフロキサシン 500 mg/日を内服し, 局所にはナジフロキサシンを外用したところ, 皮疹は徐々に縮小し, わずかな癒痕を残すのみとなった。*Mycobacterium ulcerans* 感染症でも早期診断と速やかな多剤併用療法を行えば外科的処置をしないでも対応ができるものと思われた。

キーワード: ブルーリ潰瘍, 非結核性抗酸菌感染症, *Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense*

I. はじめに

ブルーリ潰瘍は *Mycobacterium ulcerans* (以下 *M. ulcerans*) 感染が原因で生じる無痛性の皮膚潰瘍であり, 1960 年代にこの潰瘍が蔓延したウガンダの地名 (Buruli County, 現在 Nakasongola District) にちなんで名付けられた。現在なお, この地方では疫学的に多発し, WHO によって積極的な対策事業が図られている。本症は結核, ハンセン病について多い抗酸菌感染症であり, 熱帯や亜熱帯の国々を中心に 30 カ国以上で報告されている¹⁾。最近, 本邦でも各地からの報告が散発し, 皮膚科医が遭遇する可能性がある感染症である。我々は, 本症の 1 例を経験し, 速やかな診断の

とに多剤併用療法を始めたところ, 外科的処置をしないで軽快に至ったので報告する。

II. 症 例

患 者 70 歳, 女性

職 業 主婦

体 重 62 kg

初 診 2010 年 4 月下旬

主 訴 右前腕の浸潤に触れる隆起性紅斑

既往歴 子宮筋腫。結核の既往はない。

生活歴 自宅の庭にドラム缶を置き, 雨水をためて庭木に水撒きをする習慣がある。

海外渡航歴 なし

現病歴 2010 年 4 月中旬より右前腕に浸潤を

^{*1} Haruka MINATO & Yuji HORIGUCHI, 大阪赤十字病院, 皮膚科 (主任: 堀口裕治部長)

^{*2} Tomoko WAKASA, 同, 病理部

^{*3} Yumi MATSUMURA, 京都大学, 皮膚科

^{*4} Kazue NAKANAGA, Yoshihiko HOSHINO & Norihisa ISHII, 国立感染症研究所, ハンセン病研究センター
別刷請求先 湊はる香: 大阪赤十字病院皮膚科 (〒543-0027 大阪市天王寺区筆ヶ崎町 5-30)

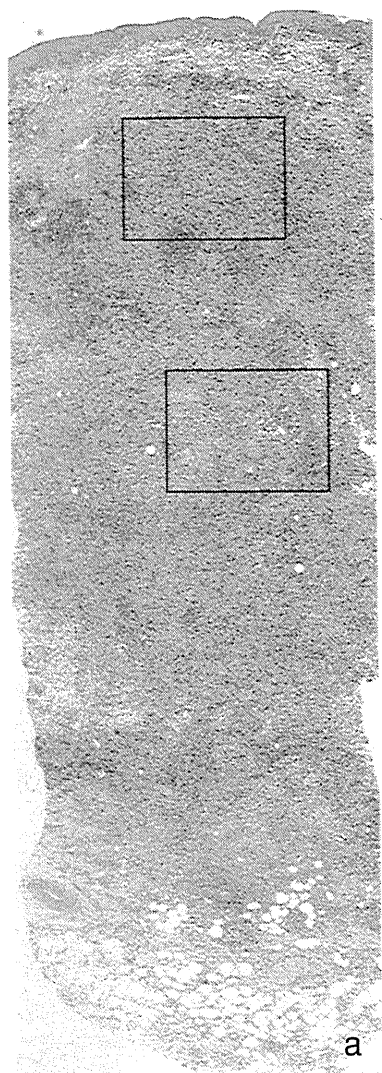
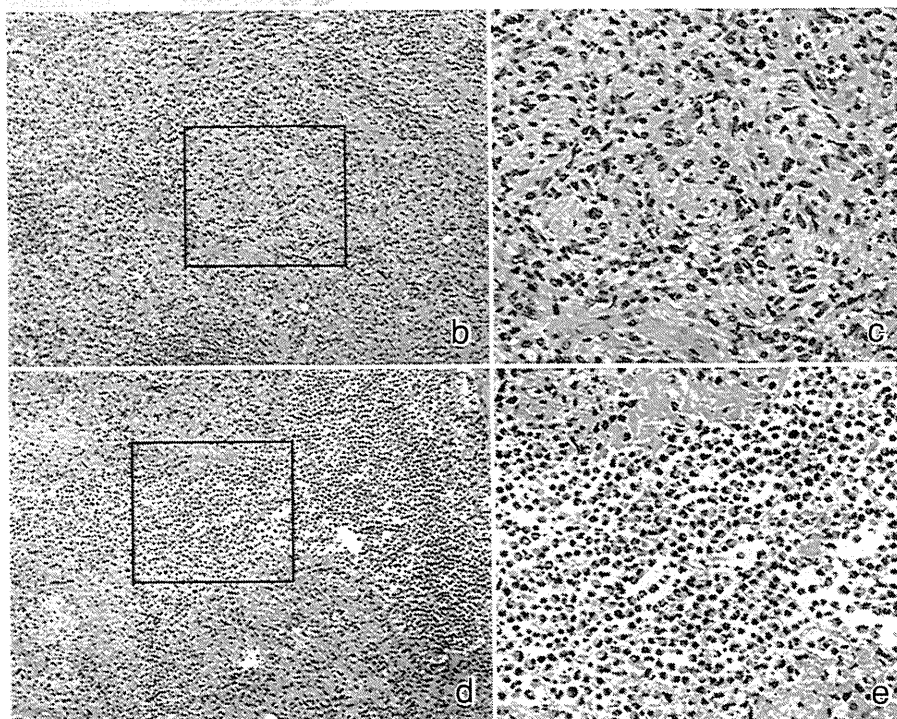


図1 病理組織像

- a : 表皮真皮接合部には液状変性を認め、真皮全層にわたって多数の細胞浸潤がみられる。
- b, c (b の拡大) : 真皮上層の拡大；多数の組織球様細胞の浸潤を認め、類上皮細胞肉芽腫を形成している。
- d, e (d の拡大) : 真皮中層の拡大；一部には好中球が多数浸潤し、膿瘍を形成している。



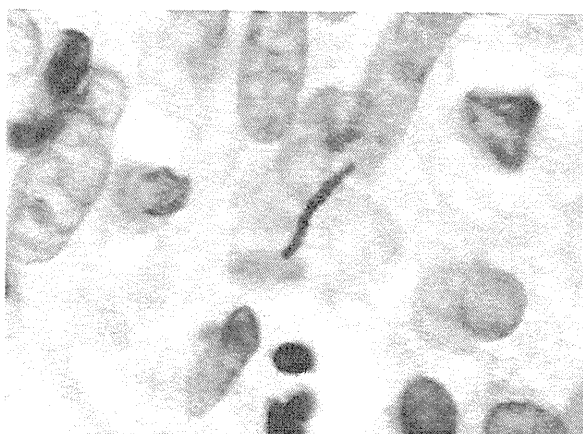


図2 Ziehl-Neelsen 染色：全視野で抗酸菌を4菌体認めた。



図3 内服治療を6カ月継続した時点の臨床像：色素沈着を伴う浅い瘢痕となっている。

触れる紅斑が生じた。その後皮疹は徐々に隆起して、表面が潰瘍化してきたため近医を受診した。リンパ腫の疑いで当科を紹介され受診した。

現 症 大小3つの不正形で盛り上がる紅斑を認める（クリニカラー1図参照）。大きさは最大のものが 3.5×2.0 cm, 最小のものは 1.5×1.5 cmである。いずれも浸潤を触れ、中央には細長い潰瘍がみられるが、疼痛や圧痛などの自覚症状は特になく（クリニカラー2図参照）。

検査所見 血算、生化学に異常所見はない。胸部X線検査では異常陰影はない。ツベルクリン反応は陽性（ 25×19 mmで浸潤を触れたが、硬結は認めない）。クオンティフェロン® TB-2 Gは施行していない。創培養からは一般細菌、抗酸菌ともに陰性であった。

病理組織学的所見 表皮真皮接合部には液状変性があり、表皮内にもリンパ球が浸潤している（図1-a）。真皮全層に多数の組織球様細胞が増殖しており、類上皮細胞肉芽腫を形成する（図1-b, c）。一部には好中球が多数浸潤し、膿瘍を形成している（図1-d, e）。Ziehl-Neelsen染色で抗酸菌（全視野に4菌体）を認め（図2）、S100染色では膿瘍周囲および肉芽腫の組織球が陽性に染色された。PAS染色およびGrocott染色は陰性であった。また明らかな巨細胞はなかった。

皮膚組織の遺伝子検査 ブルーリ潰瘍を疑い、治療開始時に再度皮膚組織を採取して遺伝子解析を行った²⁾。PhillipsらのPCR法に従い *M. ulcer-*

ans のインサージョンシーケンス (IS) 2404 を検討したところ、標的サイズ 154 bp の陽性バンドが検出された³⁾。さらに 16S rRNA のシーケンス解析で、492, 1288 の位置が両者ともグアニン、グアニンであったため、アデニン、シトシンを示す *M. ulcerans* ではなく *M. ulcerans* subsp. *shinshuense* を起因菌と判定した⁵⁾。

治療および経過 上記の検査結果より、*M. ulcerans* subsp. *shinshuense* 感染によるブルーリ潰瘍と診断した。クラリスロマイシン（クラリス®）800 mg/日とリファンピシン（リファジン®）450 mg/日、レボフロキサシン（クラビット®）500 mg/日を内服し、局所にはナジフロキサシン（アクアチム®）クリームを外用した。治療開始とともに徐々に皮疹が縮小したため外科的切除術をせずに保存的に経過をみたところ、約6カ月間の治療で、皮疹はわずかな瘢痕を残すのみとなり、皮膚表面は色素沈着となった（図3）。

Ⅲ. 考 案

本邦では自験例を含め、2010年末現在19例のブルーリ潰瘍の報告がある²⁾。本邦での報告例では、*M. ulcerans* との細菌学的性状の違いから *M. ulcerans* 類縁の新種として *M. ulcerans* subsp. *shinshuense* という種名を用いており²⁾⁴⁾⁵⁾、最初の報告は1982年である⁶⁾。*M. ulcerans* と *M. ulcerans* subsp. *shinshuense* は遺伝子学的に相同性が高く、その違いはPCR法で16S rRNAのシーケン

ス解析をしたときに、*M. ulcerans* では 492 と 1288 の位置がアデニン、シトシンであるのに対し、*M. ulcerans* subsp. *shinshuense* ではグアニン、グアニンを示すことである。*M. ulcerans* 感染と *M. ulcerans* subsp. *shinshuense* 感染ではほぼ同じ臨床症状を呈するため、両者は極めて近い亜種あるいは同一の種と考えられている⁵⁾。潰瘍は四肢に好発し、初期には紅斑や硬い皮下結節であるが、次第に中央部が自壊し、皮膚や軟部組織を破壊しながら徐々に大きな潰瘍を形成する。早期に治療を開始できれば抗菌薬が著効するが、治療が遅れると不可逆性の四肢の変形や機能障害を引き起こし、致死的な感染症が生じることもある¹⁾。

感染経路は特定されていないが、河川や土壌物からの感染あるいは昆虫の媒介が疑われている⁷⁾。自験例では雨水をためて庭に撒く習慣があったことが発症に関係しているかもしれない。

ブルーリ潰瘍は無痛性であることが多い。これは、*M. ulcerans* が産生するマイコラクトンという毒素の性質による。マイコラクトンは脂質の毒素であり、皮下脂肪組織の壊死をきたすとともに Schwann 細胞を侵害し、変性させる。そのため疼痛を感じにくくなる⁷⁾。また、この毒素は抗原提示細胞に対して抑制的に作用し、単核球やマクロファージによる TNF- α 産生を阻止する⁷⁾。これにより局所に炎症細胞が浸潤しにくくなり自覚症状の乏しい潰瘍になると考えられる。*M. ulcerans* subsp. *shinshuense* もこの毒素を有している⁷⁾。マイコラクトンの種類は少なくとも 5 つあるとされ、*M. ulcerans* や *M. ulcerans* subsp. *shinshuense* が持つマイコラクトンの毒性はそれらのなかで最も強い⁷⁾。

WHO が推奨するブルーリ潰瘍の治療は、リファンピシンとストレプトマイシンあるいはアミカシンを 8 週間投与方法である。同時に壊死組織の除去や皮膚欠損部の被覆、変形した部分の修正を行う¹⁾。ブルーリ潰瘍は四肢に好発するため、機能障害をできるだけ少なくする工夫が必要である。

ブルーリ潰瘍は治療が遅れると患肢の切断が必要となることもある。著者らの一人は以前にこの疾患を経験したことがあり、正しい診断に至るまでに長い時間がかかった。そのため治療には極めて難渋した⁸⁾。その経験を生かし、自験例では初診時に抗酸菌感染症を疑い、抗酸菌染色と抗酸菌培養を試みた。菌の発育はみられなかったが、抗酸菌染色でごくわずかな数ではあったが菌体を確認した。そこで、国立感染症研究所ハンセン病研究センターに再度採取した皮膚組織を送り、起原菌の同定を依頼し、遺伝子検査で菌を同定することができた。このように自験例では発症早期に診断でき、速やかに抗菌薬の多剤併用療法をはじめたため、内服療法のみで皮疹は軽快し、患肢の切断は免れた。本邦における過去の報告では、抗菌薬の内服による保存的加療で治癒した例は 2 例のみで⁴⁾⁹⁾、外科的治療を要した例がほとんどである²⁾。現在本邦でのブルーリ潰瘍の報告はまだ少ないが、世界的にはまれな疾患ではない。自覚症状に乏しい皮膚潰瘍をみたときには、ブルーリ潰瘍の可能性を考え、専門施設に菌の同定を依頼するなどして早期に診断を確定することが重要である。

本症例は第 110 回日本皮膚科学会総会で発表した。

(2011 年 6 月 20 受理)

文 献

- 1) WHO のブルーリ潰瘍サイト (<http://www.who.int/gtb-buruli/>)
- 2) 石井則久ほか：臨皮，**64**：8-12，2010
- 3) Phillips R et al：J Clin Microbiol，**43**：3650-3656，2005
- 4) 鈴木智子ほか：皮膚診療，**30**：145-148，2008
- 5) Nakanaga K et al：J Clin Microbiol，**45**：3840-3843，2007
- 6) 御子柴甫ほか：日皮会誌，**92**：557-565，1982
- 7) Demangel C et al：Nature Review Microbiology，**10**：50-60，2009
- 8) Matsumura Y et al：J Dermatol（印刷中）
- 9) Kondo M et al：Int J Dermatol，**48**：1330-1333，2009

◎ M. avium 感染症**【R 処方例】** 下記 1), 2) のいずれかを用いる。

- 1) クラリス錠 (200 mg) 2-3 錠 分 2-3 回, およびリファジンカプセル (150 mg) 3 カプセル 分 1 朝食前
- 2) クラリス錠 (200 mg) 2-3 錠 分 2-3 回, およびシプロキサニ錠 (200 mg) 2-4 錠 分 2

また、温熱療法は無効とされる。治療困難例も多い。

ハンセン病

Hansen's disease, leprosy

石井則久 国立感染症研究所ハンセン病研究センター・センター長 (東京)

病態と診断

ハンセン病は、らい菌感染によって主に皮膚と末梢神経が侵される疾患である。

診断は①知覚低下を伴う皮疹、②末梢神経の知覚麻痺・肥厚・運動障害、③らい菌検出、④病理組織所見の 4 項目を総合して行う。

生体のらい菌に対する特異的免疫能の差によって臨床、病理、神経障害などの病像が異なる。皮膚スミア検査、または病理での抗酸菌染色のいずれかでらい菌を検出できる多菌型 (multibacillary: MB) と、らい菌を検出しにくい少菌型 (paucibacillary: PB) に分類して治療するのが簡単である。

治療方針

神経障害などの後遺症を残さず、耐性菌を生じさせないために早期診断、早期治療、定期内服を心がける。神経痛、皮疹の増悪や再発、発熱などを認めた場合はらい反応を鑑別し、直ちに治療を行う。

ハンセン病は治癒する病気であるが、治療終了後も皮疹の再燃、らい反応、神経障害などのフォローのため数年間は定期的に通院させる。

治療は WHO の推奨する多剤併用療法 (multi-drug therapy: MDT) を修飾して治療する。日本ハンセン病学会は治療指針を作成し公開している。

【A 多菌型 (MB)】**【R 処方例】** 下記 1) - 3) を併用する。

- 1) リファジンカプセル (150 mg) 4 カプセル 分 1 朝食前 月 1 回 (2 年間)
- 2) レクチゾール錠 (25 mg) 4 錠 分 2 朝・夕食後 毎日 (2 年間)
- 3) ランプレンカプセル (50 mg) 1 カプセル 分 1 朝食後 毎日 (2 年間)

2 年後、臨床症状や皮膚スミア検査によって治療の見直しを行う。特に臨床症状の沈静化を治療終了の目標にする。

【B 少菌型 (PB)】**【R 処方例】** 下記の 1) と 2) を併用する。可能な限り 3) を追加する。

- 1) リファジンカプセル (150 mg) 4 カプセル 分 1 朝食前 月 1 回 (6 か月間)
- 2) レクチゾール錠 (25 mg) 4 錠 分 2 朝・夕食後 毎日 (6 か月間)
- 3) ランプレンカプセル (50 mg) 1 カプセル 分 1 朝食後 毎日 (6 か月間)

◎ らい反応**【R 処方例】** 上記 A ないし B の内服を継続しながら下記の 1) と 2) を追加する。

- 1) ランプレンカプセル (50 mg) 1 カプセル 分 1 朝食後 毎日
- 2) プレドニン錠 (5 mg) 6-15 錠 分 3 食後 毎日 (症状を改善させてから漸減、健胃薬を併用)

患者説明のポイント

- ・ハンセン病は単なる感染症であり、特別視するものではないことを説明する。
- ・確実に内服することで後遺症なく治癒する病気であることを十分説明する。
- ・ランプレンは可逆的な色素沈着を起こすことを説明する。
- ・治療中に皮疹や全身状態が悪化する場合は速やかに主治医に連絡する (らい反応の疑い)。

皮膚糸状菌症 (白癬)

tinea, dermatophytosis

阿部真也 金沢医科大学講師・環境皮膚科学

病態と診断**【A 病態】**

皮膚糸状菌症 (白癬) は、皮膚糸状菌が皮膚の角層や皮膚付属器に寄生して生じる疾患である。菌の寄生部位により浅在性と深在性に分類されるが、ほとんどの例が浅在性である。角層は主にケラチンという強固な蛋白質で構成されているが、これを分解できる皮膚糸状菌は角層を栄養として発育する。

病型分類は部位により行われ、菌が頭部の毛髪に寄生するものは頭部白癬、生毛部に寄生するものは体部白癬、手掌に寄生するものは手白癬、足底や趾間に寄生するものは足白癬、爪に寄生するものは爪白癬とよばれる。一般に足白癬は水虫、体部白癬は

Immunostimulatory Activity of Major Membrane Protein II from *Mycobacterium tuberculosis*^{∇‡}

Yumiko Tsukamoto,[†] Masumi Endoh,[†] Tetsu Mukai, Yumi Maeda, Toshiki Tamura, Masanori Kai, and Masahiko Makino*

Department of Mycobacteriology, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-2-1 Aobacho, Higashimurayama, Tokyo 189-0002, Japan

Received 29 September 2010/Returned for modification 10 November 2010/Accepted 7 December 2010

Previously, we observed that both major membrane protein II of *Mycobacterium leprae* (MMP-ML) and its fusion with *M. bovis* BCG (BCG)-derived heat shock protein 70 (HSP70) (Fusion-ML) are immunogenic and that recombinant BCG secreting either of these proteins effectively inhibits the multiplication of *M. leprae* in mice. Here, we purified *M. tuberculosis*-derived major membrane protein II (MMP-MTB) and its fusion with HSP70 (Fusion-MTB) in a lipopolysaccharide-free condition and evaluated their immunostimulatory abilities. Both MMP-MTB and Fusion-MTB activated monocyte-derived dendritic cells (DC) in terms of phenotype and interleukin-12 (IL-12) production, but Fusion-MTB more efficiently activated them than MMP-MTB did. The IL-12 production was a consequence of the ligation of those recombinant proteins with Toll-like receptor 2. The *M. tuberculosis*-derived and *M. leprae*-derived recombinant proteins activated naïve T cells of both CD4 and CD8 subsets, but *M. tuberculosis*-derived proteins were superior to *M. leprae*-derived proteins and fusion proteins were superior to MMP, regardless of the origin of the protein. Memory-type CD4⁺ T cells obtained from BCG-vaccinated healthy individuals seem to be primed with MMP-MTB by the vaccination, and both *M. tuberculosis*-derived recombinant proteins produced perforin-producing CD8⁺ T cells from memory-type CD8⁺ T cells. Further, infection of DC and macrophages with *M. tuberculosis* H37Ra and H37Rv induced the expression of MMP on their surface. These results indicate that *M. tuberculosis*-derived MMP, as a sole protein or as part of a fusion protein, may be useful for developing new vaccinating agents against tuberculosis.

Tuberculosis is a chronic infectious disease caused by intracellular infection with *Mycobacterium tuberculosis* (20). It is estimated that one-third of the global population is latently infected with this inhaled pathogen, which infects primarily macrophages and dendritic cells (DC), and tuberculosis is responsible for more than two million deaths yearly worldwide (11, 34, 36). The emergence of multidrug-resistant strains of *M. tuberculosis* mandates the development of more effective preventive and therapeutic strategies, including the development of improved vaccines (48). Protective immunity against *M. tuberculosis* is conducted chiefly by adaptive cellular immune responses, and gamma interferon (IFN-γ)-producing type 1 CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells are key components of this immunity (1, 12, 16). IFN-γ produced by activated T cells is believed to be an essential element of the host defense against *M. tuberculosis* (13). Further, the contribution of CD8⁺ T cells to protection by lysing infected cells is also important for bacterial killing (7, 19). CD8⁺ T cells can kill *M. tuberculosis*-infected host cells via a granule-dependent mechanism involving perforin and granulysin, which has a direct antimicrobial activity (42, 49).

The only approved vaccine currently available against tuberculosis is *M. bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG), an attenuated strain of *M. bovis*. More than four billion doses of BCG have been administered so far, and is established as a safe vaccine (29). BCG appears to be effective at preventing diseases such as tuberculous meningitis and miliary tuberculosis in newborns and toddlers; however, it has no apparent effect on pulmonary tuberculosis in adults (3, 9). The reason why BCG cannot prevent disease development is not fully known, but one of the reasons is based on the fact that BCG has a capacity to block phagosome maturation to inhibit antigen (Ag) processing and presentation to type 1 T cells (14, 32, 38). Indeed, although *M. tuberculosis* directly delivers Ag to the major histocompatibility complex (MHC) class I processing pathway, BCG was less able to activate CD8⁺ T cells (35, 41). Further, BCG growing in human macrophages was not recognized by immune CD4⁺ T cells, although BCG-infected macrophages continued to express MHC class II molecules (35). These observations indicate the need for the development of a new vaccine against tuberculosis.

Various new vaccine candidates which are based on Ags that are recognized in infected individuals are currently in clinical trials, including early secretory antigenic target 6 (ESAT-6), the Ag85 family, and a polyprotein Ag, designated Mtb72F, derived from *M. tuberculosis* proteins Mtb32 and Mtb59 (1, 2, 17, 18, 37, 39). However, a fully reliable new vaccine has not been established yet.

A situation similar to that of tuberculosis can be found in leprosy, which is caused by infection with *M. leprae*, and the development of a new vaccine capable of inhibiting the multi-

* Corresponding author. Mailing address: Department of Mycobacteriology, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-2-1 Aobacho, Higashimurayama, Tokyo 189-0002, Japan. Phone: 81-42-391-8059. Fax: 81-42-391-8212. E-mail: mmaki@nih.go.jp.

‡ Supplemental material for this article may be found at <http://cvi.asm.org/>.

† Contributed equally.

[∇] Published ahead of print on 15 December 2010.

plication of *M. leprae* is highly desirable. In both tuberculosis and leprosy, the activation of T cells is induced by DC loaded with bacilli or their components, which display various antigenic molecules on their surface, including the immunodominant Ags (15, 30), although there are conflicting results indicating that *M. leprae* inhibits the activation and maturation of DC (33). We are of the opinion that future vaccines, to be successful, must (i) be highly antigenic, (ii) have the capacity to activate both naïve CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells, and (iii) have the ability to be expressed on the surface of mycobacterium-infected Ag-presenting cells (APCs) such as macrophages and DC. Previously, we identified major membrane protein (MMP; gene name, *bfrA* or ML2038) as one of the immunodominant Ags of *M. leprae* (21). *M. leprae*-derived MMP (MMP-ML) ligates Toll-like receptor 2 (TLR2) and consequently activates the NF- κ B pathway of host cells (21). DC pulsed with MMP-ML activate memory-type CD4⁺ and CD8⁺ T cells to produce IFN- γ in an Ag-specific fashion (21, 26). Further, MMP-ML is supposed to be recognized *in vivo* by T cells of *M. leprae*-infected individuals, including paucibacillary leprosy patients (26).

Further, when we introduced MMP-ML with the Ag85A secretion signal of *M. tuberculosis* into BCG, the modified BCG, termed BCG-SM, secreted MMP-ML, enhanced the ability of BCG to activate naïve CD4⁺, and further, successfully activated naïve CD8⁺ T cells (25). Furthermore, BCG-SM at least partially inhibited the growth of *M. leprae* in C57BL/6 mice subsequently challenged by injection in the footpads (22). These observations indicate that MMP-ML could be a target molecule to be further analyzed as a vaccine candidate, and the fact that BCG-SM can activate both subsets of naïve T cells to produce IFN- γ indicates that secretion of MMP-ML, presumably in the phagosome of APCs, is a useful strategy to activate T cells (25). We sought another strategy to further enhance the T cell-stimulating activity of BCG, especially of the ability to activate IFN- γ -producing CD8⁺ T cells quickly and strongly. To this end, we used heat shock protein 70 (HSP70) as a fusion partner (6, 10, 44, 45). The gene encoding HSP70 of BCG was directly linked with that of MMP and extrachromosomally transformed into BCG (BCG-70 M) (31). BCG-70 M secreted the HSP70-MMP fusion protein (Fusion-ML) and activated not only Ag-specific naïve CD8⁺ T cells polyclonally but also naïve CD4⁺ T cells strongly (31). Further, the secreted Fusion-ML protein activated DC in terms of phenotype and the production of cytokines such as interleukin-12 (IL-12) (31). Thus, the production and secretion of HSP70 in phagosomes along with MMP-ML, using BCG as a vector, seem to be effective in activating human naïve CD8⁺ T cells. These observations led us to speculate that the use of MMP, which is commonly present in pathogenic mycobacteria, or of the HSP70-MMP fusion protein may be useful in inhibiting the multiplication of *M. tuberculosis*. However, the MMP homology between *M. leprae* and *M. tuberculosis* (MMP-MTB; gene name, *bfrA* or Rv1876) is 90.6% at the amino acid level. Therefore, in this study, we purified *M. leprae*- or *M. tuberculosis*-derived MMP and a fusion protein composed of HSP70 and *M. leprae*- or *M. tuberculosis*-derived MMP by using *M. smegmatis* and evaluated their immunostimulatory activities.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of cells and Ags. Peripheral blood was obtained from healthy, purified protein derivative-positive individuals after informed consent was obtained. In Japan, BCG vaccination is compulsory for children (0 to 4 years old). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using Ficoll-Paque Plus (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and cryopreserved in liquid nitrogen until use, as previously described (23). The viability of T cells obtained from cryopreserved PBMCs was more than 90%, and no functional selection was induced in either monocytes or T cells by the cryopreservation of PBMCs. For the preparation of peripheral monocytes, CD3⁺ T cells were removed from either freshly isolated heparinized blood or cryopreserved PBMCs using immunomagnetic beads coated with anti-CD3 monoclonal antibody (MAB; Dynabeads 450; Dynal Biotech, Oslo, Norway). The CD3⁺ PBMC fraction was plated on collagen-coated plates, and the non-plastic-adherent cells were removed by extensive washing. The remaining adherent cells were used as monocytes (47). Monocyte-derived DC were differentiated as described previously (23, 28). Briefly, monocytes were cultured in the presence of 50 ng of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rGM-CSF; PeproTech EC Ltd., London, England) and 10 ng of rIL-4 (PeproTech) per ml (28). On day 4 of culture, immature DC (purity, 70%) were pulsed with recombinant protein and on day 6 of culture, DC were used for further analyses of surface Ag and for mixed-lymphocyte assays. Macrophages were differentiated as described previously (24, 27). In brief, monocytes were cultured in the presence of 10 ng of rM-CSF (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) per ml. On day 5 of culture, macrophages were pulsed with recombinant protein and on day 7 of culture, they were used for further analyses of surface Ag and for mixed-lymphocyte assays.

Preparation of *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* strains H37Ra and H37Rv, which were originally purchased from the American Tissue Culture Collection, were kindly donated by T. Yamazaki, National Institute of Infectious Diseases. Both H37Ra and H37Rv were cultured *in vitro* using Middlebrook 7H9 broth (BD Biosciences, San Jose, CA) supplemented with 0.05% Tween 80 and 10% albumin-dextrose-catalase (BD Biosciences). The bacilli were grown to log phase and stored at 10⁸ CFU/ml at -80°C. Before the infection of DC and macrophages, H37Ra and H37Rv bacteria were counted by the colony assay method.

Construction of vectors for production of *M. leprae*- or *M. tuberculosis*-derived recombinant MMP and HSP70-MMP fusion protein (Fusion-ML) or Fusion-MTB. An *Escherichia coli*-*Mycobacterium* shuttle vector, pMV261 (43), was used as a parent vector. To replace the kanamycin resistance gene with a hygromycin resistance cassette, the XbaI-NheI fragment from pYUB854 (5) was cloned into SpeI-NheI-digested plasmids. The resultant vector was a hygromycin-resistant pMV261 vector, pMV261H. The acetamidase promoter was amplified from *M. smegmatis* mc²155 genomic DNA. The primers used were F Pace Xba (5'-TTA ATC TAG AGA AGT GAC GCG GTC TCA AGC GTC-3' [underlining indicates an XbaI site]) and R Pace Bam (5'-TTT AGG ATC CGT GGA CTC CCT TTC TCT TA-3' [underlining indicates a BamHI site]). The *Hsp60* promoter region in pMV261H was replaced with the amplified PCR products, and the resulting vector was named p2H Pace.

We inserted an N-terminally His-tagged gene sequence encoding MMP-ML, MMP-MTB, HSP70-MMP-ML fusion (Fusion-ML), or HSP70-MMP-MTB (Fusion-MTB) into the p2H Pace vector using the In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc.). Briefly, the linearized p2H Pace vector for the In-Fusion reaction was prepared by PCR with F ter (5'-TAG TTA ACT AGC GTA CGA T-3') and R Pace H6 (5'-GTG ATG GTG GTG ATG GTG CAT GTG GAC TCC CTT CTT AT-3'). PCR primers for inserts were designed that share 15 bases of homology with the sequences at the ends of linearized p2H Pace. These primers were used to amplify the insert DNAs for MMP-ML, MMP-MTB, Fusion-ML, and Fusion-MTB. The resulting PCR products were combined with the linearized vector in the In-Fusion cloning reaction and then transformed into *E. coli*. All clones were verified by sequencing.

Expression and purification of recombinant proteins in *M. smegmatis*. *M. smegmatis* mc²155 was cultured *in vitro* using LB broth supplemented with 0.05% Tyloxapol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Expression vectors were introduced into *M. smegmatis* by electroporation (40). Transformants were selected on LB agar (BD Biosciences, San Jose, CA) plates containing 50 μ g/ml hygromycin. The selected clone was grown in LB broth with 150 μ g/ml hygromycin. During the logarithmic phase, acetamide was added to the culture medium at a final concentration of 0.2% (8). After an additional 16 h of culture, recombinant *M. smegmatis* was centrifuged and resuspended in lysis buffer (50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 3 M guanidine-HCl) containing proteinase inhibitor and disrupted by sonication. The suspension was centrifuged at 27,000 $\times$ g for 15 min. The supernatant was further filtered through a 0.45- μ m filter and used as starting material. MMP-ML and MMP-MTB were purified by metal affinity