

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

カイコにおける *Mycobacterium ulcerans* の感染モデルの検討

徳善 英紀

Investigation of infection model of *Mycobacterium ulcerans* in silkworm

Hideki Tokuzen

22 緒言

23

24 ブルーリ潰瘍は、環境細菌である *Mycobacterium ulcerans* の感染によって引
25 き起こされる皮膚の慢性感染症であり、世界保健機構 (World Health
26 Organisation: WHO) が「顧みられない熱帯病 (neglected tropical diseases:
27 NTD)」と定義している20疾患の1つである¹⁾。現在、アフリカ、アメリカ、アジア、西太
28 平洋の世界33カ国以上で報告されており、結核症、ハンセン病に次ぐ、世界で3番目
29 に多い抗酸菌感染症である。多くは熱帯および亜熱帯地域で発生する。患者の疫学
30 的側面は国や地域によって大きく異なり、罹患者の中で15歳未満の子供が占める割
31 合は、アフリカでは約48%であるのに対して、オーストラリアでは約10%、日本では約
32 19%である。男女に有意差はない。病変は主に四肢(上肢:35%、下肢:55%)に発生
33 する。初期症状として、結節、プラーク、そして浮腫は形成されるが、痛みを伴わない。
34 未治療の場合や抗菌薬加療中に病変部位が潰瘍化する。死亡率は低い、重傷
35 化すると恒久的な外見の変化や長期的な障害につながる場合があり、WHO は警告
36 を発している²⁾。

37 ブルーリ潰瘍の原因因子は、*M. ulcerans* が産生する外毒素のマイコラクトンで
38 あり、その産生にはプラスミドが関与する³⁾。マイコラクトンにより、細胞の壊死および
39 局所の免疫抑制が引き起こされる。また、鎮痛作用も有していることから、無痛性の
40 潰瘍を形成する³⁾。マイコラクトンはマクロライドの一種で黄色を呈し、マイコラクトンを
41 産生している菌では集落に黄色の色素沈着を認める。しかし、マイコラクトンを産生し
42 ない菌の集落は非着色性である⁴⁾。

43 *M. ulcerans* およびマイコラクトンを対象とした研究は、困難であることが知られて
44 いる。その原因として、*M. ulcerans* が遅発育性であることがあげられる。倍加時間
45 は25~84時間であり、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産生
46 に関与するプラスミドが脱落しやすく、継代培養によりプラスミドが脱落し、マイコラク
47 ン非産生菌に転換する場合がある⁵⁻⁷⁾。ところで、*M. ulcerans* およびマイコラクトン

48 の病原性の評価には、哺乳類動物がモデルとして使用されているが、上記の理由に
49 より、その評価までに長期間を要し、また安定した結果を得ることが困難である^{8,9)}。

50 そこで、使用する検体量が少量でよく、かつ短期間で病原性の評価を行うことがで
51 きる方法として、新規実験モデル生物として、カイコに着目した。カイコをはじめとする
52 昆虫は、獲得免疫機構は有していないが、非獲得性免疫機構を有している¹⁰⁾。また、
53 カイコの体重はマウスの体重の約1/10であり、比較的少ない検体で評価することが
54 可能である。加えて、必要な観察期間が短いこと、コストが低いこと、また倫理的問題
55 が少ないことが知られている¹¹⁾。カイコは既に *Staphylococcus aureus* など、様々な
56 菌の病原性評価モデルとして利用されている¹²⁻¹⁴⁾。以上の背景のもと、カイコを用い
57 た *M. ulcerans* の感染モデルを作製し、*M. ulcerans* およびマイコラクトンの病原性
58 評価への応用可能性を検討した。

59

60

材料ならびに方法

61

1. 使用菌株および培養条件

62 *M. ulcerans* Agy99株は北里大学 渡邊峰雄博士より供与を受けた。*M.*
63 *ulcerans* Agy99株はアルブミン・デキストロース・カタラーゼ(ADC)添加
64 Middlebrook 7H10 (7H10-ADC)寒天培地(Difco)およびADCとTween80(終濃
65 度0.05%)を添加したMiddlebrook 7H9 (7H9-ADC-Tween80)液体培地 (Difco)
66 用いて、30℃で培養した。

68

2. プラスミド pMUM001保持の確認

69 *M. ulcerans* とプラスミド pMUM001の保持の確認は、*M. ulcerans* に特異的な
70 挿入配列 IS2404 を標的としたプライマー IS2404a; 5'-
71 GATCAAGCGTTCACGAGTGA-3' と IS2404b; 5'-
72 GGCAGTTACTTCACTGCACA-3'、および pMUM001の塩基配列の一部を標的

74 としてのプライマーpMUM001 oriF; 5'-ACTAGTGCTCGCGACGATAAGAC-3' と
75 pMUM001 oriR; 5'-ACTAGTTACGGGTGAAGACCCAG-3'を、それぞれ用いた
76 polymerase chain reaction (PCR)法により行った。

77

78 3. 精製マイコラクトン

79 精製マイコラクトンはハーバード大学 Yoshito Kishi 博士と北里大学 渡邊峰雄
80 博士より供与を受けた。使用時まで遮光容器に入れ、-80℃で保存した。

81

82 4. カイコおよび飼育条件

83 カイコは愛媛蚕種株式会社および株式会社高原社から購入し、人工飼料を用いて
84 30℃で飼育した。

85

86 5. *M. ulcerans* の毒性の評価

87 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*
88 Agy99株を、7H9-ADC-Tween80液体培地で培養した¹⁵⁻¹⁷。培養後、それぞれの
89 菌を、ホモジナイザーを用いて Middlebrook 7H9-ADC-Tween80液体培地中でホ
90 モジナイズした後、菌液の調整を行った。菌液を濁度計(CO8000 Biowave;
91 Biochrom, England)を用いて波長600 nm (OD₆₀₀)で吸光度を測定し、OD=2.0
92 (約 6.5×10^7 cell/mL)、OD=0.2 (約 6.5×10^6 cell/mL)、および0.02 (約 6.5×10^5
93 cell/mL)に調整した。各菌液50 μLを1 mL注射器と27G注射針を用いて、5週齢1
94 日目のカイコに正中を避け投与した。陰性コントロールには7H9-ADC-Tween80液
95 体培地を投与した。投与後各群のカイコの生死を毎日、投与5日後まで観察した。

96

97 6. 生菌投与によるカイコの体液および組織の変化

98 前項と同様に Agy99株を調整して投与した。投与1日後に腹側よりカイコを解剖し、
99 体液を回収した。回収した体液の吸光度(OD₄₇₀)を、マイクロプレートリーダー

100 (CORONA GRATING MICROPLATE READER SH-1000 L; コロナ電気, 茨城)
101 を用いて測定した¹⁸⁾。またカイコ体内の組織変化を確認した。

102

103 7. 精製マイコラクトンの毒性の評価

104 0.1% Triton X-100水溶液を用いて、2 mg/mL、20 mg/mL、および200 mg/mL
105 のマイコラクトン溶液を調整した。マイコラクトン溶液50 μ L(マイコラクトン量0.1 μ g、
106 1.0 μ g、10 μ g)を、1 mL注射器と27G注射針を用いて5週齢1日目のカイコに正中を
107 避け投与した。陰性コントロールとして、0.1% Triton X-100水溶液を投与した。投与
108 後各群のカイコの生死を毎日、投与5日後まで観察した。

109

110 8. 精製マイコラクトン投与による体液および組織の変化

111 0.1% Triton X-100水溶液を用いて、0.2 mg/mL、2 mg/mL、および20 mg/mL
112 のマイコラクトン溶液を調整した。マイコラクトン溶液50 μ L(マイコラクトン量0.01 μ g、
113 0.1 μ g、1.0 μ g)を、5週齢1日目のカイコに正中を避け投与した。陰性コントロールとし
114 て0.1% Triton X-100水溶液を投与した。投与1日後に体液を回収し、その吸光度
115 (OD₄₇₀)を、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。またカイコ体内の組織変化を
116 確認した。

117

118 9. マイコラクトン非産生菌と精製マイコラクトン投与による体液および組織の変化

119 0.1% Triton X-100水溶液を用いて、0.2 mg/mL、2 mg/mL、および20 mg/mL
120 のマイコラクトン溶液を調整した。それぞれのマイコラクトン溶液を用いてマイコラクトン
121 非産生 *M. ulcerans* Agy99株を懸濁し、吸光度(OD₆₀₀)を測定し、OD=2.0に調整
122 した。各菌液50 μ L(マイコラクトン量0.01 μ g、0.1 μ g、1.0 μ g)を1mL注射器と27G注
123 射針を用いて、5週齢1日目のカイコに正中を避け投与した。陰性コントロールには
124 0.1% Triton X-100水溶液、マイコラクトン非産生 *M. ulcerans* Agy99株、陽性コ
125 ントロールとしてマイコラクトン産生 *M. ulcerans* Agy99株を投与した。投与1日後に

126 体液を回収し、その吸光度(OD₄₇₀)を、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。ま
127 たカイコ体内の組織変化を観察した。

128

129 10. 統計処理

130 結果より得られたデータは、Tukey HSD 検定による多重比較を行い、危険率1%お
131 よび5%で有意差検定を行った。統計解析には解析ソフトウェア(SPSS version
132 16.0; IBM, USA)を用いた。

133

134

結果

135

136 1. 寒天培地上に形成された集落の性状

137 7H10-ADC 寒天培地で *M. ulcerans* を培養したところ、黄色集落(図1A)と白色
138 集落(図1B)の形成が認められた。*M. ulcerans* に特異的な IS2404を標的とするプ
139 ライマーIS2404a と IS2404b を用いて PCR を行ったところ、黄色集落菌および白
140 色集落菌ともに515 bp に相当する増幅産物が認められた(図1C)。一方、マイコラク
141 トン産生に關与するプラスミド pMUM001を標的とするプライマーpMUM001 oriF と
142 pMUM001 oriR を用いて PCR を行ったところ、黄色集落菌では623 bp に相当する
143 増幅産物が認められたが、白色集落菌では増幅産物は認められなかった(図1D)。
144 以上のことから黄色集落菌と白色集落菌はともに *M. ulcerans* であるが、黄色集落
145 菌は pMUM001を保持するマイコラクトン産生菌であり、白色集落菌は pMUM001
146 を保持しないマイコラクトン非産生菌であることが示された。

147

148 2. *M. ulcerans* を投与したカイコの生存率

149 マイコラクトン産生性 *M. ulcerans* 投与によるカイコへの毒性を与えるかを確認す
150 るため、菌液を投与し感染させ、死亡率を確認した。結果、黄色集落菌投与群では、
151 菌数に比例して生存率が低下する傾向が認められ、OD=2.0の菌液投与群では他

152 の群と比較して有意にカイコの生存率の低下が認められた。白色集落菌投与群およ
153 び7H9-ADC-Tween80投与群では、カイコの死亡はほとんど認められなかった（図
154 2）。

155

156 3. *M. ulcerans* 投与による体液および組織への影響

157 マイコラクトン産生性 *M. ulcerans* 投与によりカイコの死亡を認めた。そこで、菌液
158 投与によるカイコ体内での影響を確認するため、菌液投与後、体液および組織の変
159 化を観察した。結果、黄色集落菌投与群では、菌数に比例した体液の着色が認めら
160 れた(図3A)。白色集落菌投与群においても、体液の着色が認められたが、同じ菌数
161 を投与した黄色集落菌群より着色の程度は弱かった(図3A)。

162 体液の吸光度を測定した結果、黄色集落菌 OD=2.0の菌液投与群では、黄色集
163 落菌 OD=0.02、0.2の菌液投与群および7H9-ADC-Tween80投与群と比較して、
164 有意に高い吸光度が認められた。白色集落菌 OD=2.0の菌液投与群でも体液の着
165 色が認められた(図3A)が、統計学的に7H9-ADC-Tween80投与群と有意な差は認
166 められなかった(図3B)。

167 カイコを解剖し、背脈管を観察したところ、黄色集落菌 OD=2.0の菌液投与群では、
168 背脈管に強い体液の着色が認められ、一部ノジュールの着色も認められた。一方、
169 白色集落菌投与群では、背脈管における体液の着色は軽度であった。また7H9-
170 ADC-Tween80投与群では、着色は認められなかった(図3C)。

171

172 4. 精製マイコラクトンを投与したカイコの生存率

173 マイコラクトン産生性 *M. ulcerans* の投与により、カイコの死亡および組織への影
174 響を認めたことから、マイコラクトンによる影響が考えられた。そこで、マイコラクトンに
175 よるカイコへの毒性を評価するために、精製マイコラクトンを投与し、死亡率を観察し
176 た。結果、マイコラクトン10 μg 投与群では、投与1日後にすべてのカイコが死亡した。
177 1.0 μg 投与群では、2日後に1匹のカイコの死亡が認められた。0.1 μg 投与群と

178 0.1% Triton X-100水溶液投与群では死亡は認められなかった(図4)。

179

180 5. 精製マイコラクトン投与による体液および組織への影響

181 精製マイコラクトン投与により、カイコの死亡を認めた。そこで、マイコラクトン投与に
182 よるカイコ体内での影響を確認するため、精製マイコラクトン投与後、体液および組織
183 の変化を観察した。結果、精製マイコラクトン投与1日後における体液の着色は、視
184 診上ではどの投与群でも明らかな着色は認められなかった(図5A)。しかし、体液の吸
185 光度を測定した結果、マイコラクトンの濃度に比例して着色が強くなる傾向にあり、
186 1.0 μg 投与群では、0.1% Triton X-100水溶液投与群及び0.01 μg 、0.1 μg 投与
187 群と比較して有意に高い吸光度を認めた(図5B)。カイコを解剖し、背脈管を観察した
188 結果、いずれの群間でも体液およびノジュールの着色は認められなかった(図5C)。

189

190 6. マイコラクトン非産生菌と精製マイコラクトン投与による体液および組織の変化

191 精製マイコラクトンの投与では、カイコのノジュールの着色を認めなかったことから、
192 ノジュールの着色には、マイコラクトンだけでなく、*M. ulcerans* の菌体成分の関与が
193 疑われた。そこで、マイコラクトンとマイコラクトン非産生 *M. ulcerans* の菌体成分の
194 投与により、カイコ体内でノジュール着色が促進されるか確認を行った。結果、マイコ
195 ラクトン非産生菌である白色集落菌に精製マイコラクトンを加えて投与したところ、マ
196 イコラクトンの濃度に比例した体液の着色が認められた(図6A)。体液の吸光度を測
197 定した結果、白色集落菌の単独投与群に対して、白色集落菌とマイコラクトン0.1 μg
198 および1.0 μg を投与した群では、有意に高い吸光度が認められた。また白色集落菌
199 とマイコラクトン1.0 μg を投与した群では、白色集落菌投与群、白色集落菌とマイコ
200 ラクトン0.01 μg あるいは0.1 μg 投与群、および黄色集落菌投与群と比較して、有意
201 に高い吸光度が認められた(図6B)。カイコを解剖し、背脈管を観察した結果、白色
202 集落菌とマイコラクトンを投与した群では、マイコラクトンの濃度に比例した背脈管お
203 よびノジュールの着色が認められた(図6C)。

204

205

考察

206

207 カイコは、非獲得性免疫による生体防御反応を有しており、血球による細胞性防御
208 反応と血漿成分による体液性防御反応の2つに大きく分けることができる。細胞性防
209 御反応では、顆粒細胞やプラズマ細胞などが、貪食作用、ノジュール形成、包囲化
210 作用などにより外来性異物を非自己と認識し排除する⁹⁾。一方、体液性防御反応で
211 は、リゾチーム、セクロピンなどの抗菌性タンパク質やフェノールオキシダーゼ系反応
212 の活性化、レクチン、補体因子などが働き、微生物などに対抗する¹⁹⁾。これらの働き
213 により、カイコは微生物などに対抗し、恒常性を維持している。カイコにおけるフェノー
214 ルオキシダーゼ系カスケードの誘発は、細菌の細胞壁成分であるペプリドグリカン、あ
215 るいは、真菌の細胞壁成分である β -1,3-グルカンを認識することから始まる。認識後、
216 セリンプロテアーゼ前駆体が活性化され、セリンプロテアーゼによりフェノールオキシダ
217 ーゼ前駆体 (prophenoloxidase: ProPO) が活性化される。活性化されたフェノール
218 オキシダーゼにより、体液中のフェノール性物質のチロシンが酸素存在下で酸化され
219 メラニンを形成する^{20,21)}。このメラニンが侵入した細菌や真菌などの異物を包囲し、
220 増殖や分散を防ぐとともに、メラニン形成過程で生成される活性酸素種 (reactive
221 oxygen species: ROS) が細菌を死滅させる^{22,23)}。

222 本研究において、*M. ulcerans* をカイコへ投与したところ、マイコラクトンを産生して
223 いる黄色集落菌投与群では、マイコラクトンを産生していない白色集落菌投与群に
224 比し、カイコの死亡率が有意に高かった。このことからカイコは *M. ulcerans* に感受
225 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
226 可能性が示唆された。

227 カイコでは、細菌細胞壁のペプチドグリカンなどの刺激によりフェノールオキシダーゼ
228 系の反応が促進され、細菌侵入時の体液の着色は、主にこの反応によるメラニンの
229 形成が関与していると考えられている^{20,21)}。本研究において *M. ulcerans* の菌数依

230 存的な体液の着色が認められた。また、白色集落菌投与群に比して黄色集落菌投
231 与群では、著しく強い体液の着色が認められた。カイコは開放血管系であり、心臓の
232 機能を持つ背脈管という組織を背部の皮下に有しているが、その背脈管においても
233 同様に黄色集落菌群では広範囲に強い着色が認められた。

234 細胞性防御反応である顆粒細胞などによる貪食が困難である場合、ノジュール形
235 成や包囲化などによる異物隔離やメラニンの産生が促進される²²⁾。メラニンの産生が
236 多くなると、副産物である ROS の産生も多くなるが、過剰の ROS 産生は、細菌を死
237 滅させるだけでなく、正常なカイコ組織に障害を与えることが知られている。
238 *Porphyromonas gingivalis* をカイコに投与することによりカイコが死亡した報告で
239 は、その原因は過剰な免疫反応による ROS の過剰産生としている²⁴⁾。本研究にお
240 けるカイコの解剖所見では、白色集落菌投与群ではノジュールの着色がほとんど認
241 められなかったのに対して、黄色集落菌投与群では多くのノジュールの着色が認めら
242 れた。このことから、黄色集落菌が顆粒細胞などによる免疫応答を抑制する影響を与
243 え、メラニンによるノジュールの着色を強くした可能性が考えられた。

244 マイコラクトン投与により、濃度依存的な死亡率の上昇が認められたことから、黄
245 色集落菌によるカイコの死亡にはマイコラクトンが強く関与していることが示唆された。
246 また体液の着色はマイコラクトンの濃度依存的に増強される傾向にあった。しかし、黄
247 色集落菌投与群と比較してマイコラクトン投与群は、体液およびノジュールの着色は
248 弱かった。これらのことから、黄色集落菌投与によるカイコの体液の着色は、マイコラ
249 クトンの作用だけでなく、マイコラクトン以外の菌体成分の関与が考えられた。

250 白色集落菌は、黄色集落菌からマイコラクトンの合成と産生に関与するプラスミド
251 が脱落することによって形成される。このため、体液およびノジュールの着色にはマイコ
252 ラクトンが強く関与したことが考えられる。しかし、プラスミドの有無によりマイコラクトン
253 以外の菌体成分が変化し、それらが関与した可能性は完全には否定できない。そこ
254 で、さらなる検討を行った結果、白色集落菌とマイコラクトンの投与により、マイコラク
255 トンの濃度依存的な体液およびノジュールの着色が認められたことから、黄色集落菌

256 の投与による着色は、マイコラクトンと菌体成分のどちらも関与していることが示唆さ
257 れた。

258

259

結語

260

261 1. カイコはマイコラクトン産生性 *M. ulcerans* に感受性を示した。また、精製マイコラ
262 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
263 トンの病原性の評価モデルとして、カイコが利用できる可能性が示された。

264

265 2. 本モデルは、菌投与後の観察期間がマウスと比較して顕著に短いことから、*M.*
266 *ulcerans* の病原性の評価に、本モデルは有用であると考えられる。

267

268

269

270

謝辞

271

272 稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御高閲を賜った岡山大学大学院医
273 歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻口腔微生物学分野大原直也教授そし
274 て主任教授であります岡山大学大学院医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学
275 専攻顎口腔再建外科学分野飯田征二教授に深甚なる謝意を表します。さらに、本
276 研究を行うにあたり、貴重な御援助と御助言を頂きました北里大学渡邊峰雄准教授、
277 ハーバード大学 Yoshito Kishi 教授に謹んで感謝の意を表します。また、様々な
278 面にわたり終始御指導賜り、貴重な御助言と御協力を下さいました口腔微生物学分
279 野、顎口腔再建外科学分野の諸先生に厚く御礼を申し上げます。

280

281

参考文献

- 282
283
- 284 1) Neglected tropical diseases. World Health Organisation. Available
285 at : [https://www.who.int/neglected_diseases/news/treating-more-than-](https://www.who.int/neglected_diseases/news/treating-more-than-one-billion-people-2017/en/)
286 [one-billion-people-2017/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/news/treating-more-than-one-billion-people-2017/en/). Accessed October 4, 2018.
- 287 2) Fact sheet on Buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans*). World Health
288 Organisation. Available at : [https://www.who.int/en/news-room/fact-](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/buruli-ulcer-(mycobacterium-ulcerans-infection))
289 [sheets/detail/buruli-ulcer-\(mycobacterium-ulcerans-infection\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/buruli-ulcer-(mycobacterium-ulcerans-infection)) . Accessed
290 October 4, 2018.
- 291 3)Stinear, T.P., Mve-Obiang, A., Small, P.L., Frigui, W., Pryor, M.J.,
292 Brosch, R., Jenkin, G.A., Johnson, P.D., Davies, J.K., Lee, R.E.,
293 Adusumilli, S., Garnier, T., Haydock, S.F., Leadlay, P.F., and Cole, S.T.:
294 Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin
295 of *Mycobacterium ulcerans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,101,1345–1349, 2004.
- 296 4) George, K.M., Chatterjee, D., Gunawardana, G., Welty, D., Hayman,
297 J., Lee, R., Small, and P.L.: Mycolactone: a polyketide toxin from
298 *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science*,283,854–
299 857,1999.
- 300 5)Benbow, M.E., Hall, B., Mosi, L., Roberts, S., Simmonds, R., and
301 Jordan, H.W.; *Mycobacterium ulcerans* and Buruli Ulcer. Human
302 Emerging and Re-emerging Infections Bacterial and mycotic Infections
303 (Sunit Kumar Singh. editor). 2nd, John Wiley & Sons, inc, Hoboken, New
304 Jersey, 2015, 841-862.
- 305 6) diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* disease. World Health
306 Organisation. Buruli ulcer. Available at :
307 <https://www.who.int/buruli/information/diagnosis/en/index.html>. Accessed

308 October 4, 2018.

309 7)Stinear, T.P., Hong, H., Frigui, W., Pryor, M.J., Brosch, R., Garnier, T.,
310 Leadlay, P.F., and Cole, S.T.: Common Evolutionary Origin for the Unstle
311 Virulence Plasmid pMUM Found in Geographically Diverse Strains of
312 *Mycobacterium ulcerans*. *J. Bacteriol*, 187,1668-1676,2007.

313 8)Silva-Gomes, R., Marcq, E., Trigo, G., Goncalves, C.M., Longatto-Fiho,
314 A., Castro, A.G., Pedrpsa, J., and Fraga, A.G.: Spontaneous Healing of
315 *Mycobacterium ulcerans* Lesions in the Guinea Pig Model. *PLoS Negl*
316 *Trop Dis*, 9,42-65,2015.

317 9)Bolz, M., Ruggli, N., Borel, N., Pluschke, G., and Ruf, MT.: Local
318 Cellular Immune Responses and Pathogenesis of Buruli Ulcer Lesion in
319 the Experimental *Mycobacterium Ulcerans* Pig Infection Model. *PLoS*
320 *Negl Trop Dis*, 10,46-78,2016.

321 10)Wago, H.: Cellular recognition of foreign materials by Bombyx mori
322 phagocytes: II. Role of hemolymph and phagocyte filopodia in the
323 cellular reactions. *Dev Comp Immunol*, 7,199-208,1983.

324 11)Kaito, C., and Kazuhisa, S.: A silkworm model of pathogenic bacterial
325 infection. *Drug Discov Ther*, 1,89-93,2007.

326 12) Abdelnour, A., Arvidson, S., Bremell, T., Ryden, C., and Tarkowski,
327 A.: The accessory gene regulator (agr) controls *Staphylococcus aureus*
328 irulence in a murine arthritis model. *Infect Immun*. 61,3879-3885,1993.

329 13)Mei, JM., Nourbakhsh, F., Ford, CW., and Holden, DW.: Identification
330 of Staphylococcus aureus virulence genes in a murine model of
331 bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. *Mol Microbiol*, 26,399-
332 407,1997.

333 14)Kaito, C.: Understanding of bacterial virulence using the silkworm

334 infection model. *Drug Discov Ther*, 10,30-33,2016.

335 15) Power, D.A., and Hanks, J.H.: The effect of organic acids, serum
336 albumin, and wetting agents on log phase, dispersed growth and pH
337 stilization in mycobacterial cultures. *American Review of Respiratory*
338 *Disease*, 92,83-93,1965.

339 16) Mve-Obiang, A.1., Remacle, J., Palomino, J.C., Houbion, A., and
340 Portaels, F.: Growth and cytotoxic activity by *Mycobacterium ulcerans* in
341 protein-free media. *Federation of European Microbiological Societies*,
342 181,153-157,1999.

343 17) Cadapan, L.D., Arslanian, R.L., Carney, J.R., Zavala, S.M., Small,
344 P.L., and Licari, P.: Suspension cultivation of *Mycobacterium ulcerans*
345 for the production of mycolactones. *Federation of European*
346 *Microbiological Societies*, 205,385-389,2001.

347 18) 池本 始: アワヨトウ幼虫の体液にみられる非蛋白性フォリン(Lowry)陽性物質
348 とくにメラニン生成との関係. *防虫科学* 36,59-65,1971.

349 19) Boman, H.G., Faye, I., Gudmundsson, G.H., Lee, J.Y., and Lidholm,
350 DA.: Cell-free immunity in Cecropia. A model system for antibacterial
351 proteins. *Eur. J. Biochem.*,1,23-31,1991.

352 20) Hideya, Y., Masaaki, A.: Microbial activation of two serine enzymes
353 and prophenoloxidase in the plasma fraction of hemolymph of the
354 silkworm. *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry*,16,539-545,1986.

355 21) Brey, P.T., Ahmed, A., Lee, W.J., Ashida, M., and Lehane, M.J.:
356 Tyrosinase-type prophenoloxidase distribution in the alimentary canal of
357 strains of *Anopheles gambiae* refractory and susceptible to Plasmodium
358 infection. *Experimental parasitology*, 80,654-664,1995.

359 22) Nappi, A.J.1., Vass, E., Frey, F., and Carton, Y.: Superoxide anion

360 generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites.
361 *European journal of cell biology*, 68,450-456,1995.
362 23) Nappi, A.1., Poirié, M., and Carton, Y.: The role of melanization and
363 cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila*
364 against parasitic wasps. *Advances in parasitology*, 70,99-121,2009.
365 24) Kenichi, I., Hiroshi, H., Katsutoshi, I.,Tatsuo, A., Mikio, S., Koji, N.,
366 and Kazuhisa, S.: *Porphyromonas gingivalis* Peptidoglycans Induce
367 Excessive Activation of the Innate Immune System in Silkworm Larvae.
368 *J. Biol. Chem.*, 285,33338-33347,2010.

369

370

371

372

373

図説明文

374

375 図1 マイコラクトン産生菌およびマイコラクトン非産生菌の特徴

376 (A) 7H10-ADC 寒天培地上のマイコラクトン産生性の *M. ulcerans* Agy99(黄色
377 集落)。

378 (B) 7H10-ADC 寒天培地上のマイコラクトン非産生性 *M. ulcerans* Agy99(非着
379 色性白色集落)。

380 (C) 陰性対照として滅菌精製水を用いて、*M. ulcerans*1,2(*M. ulcerans* の特異
381 的な配列である IS2404を標的)のプライマーを用いて PCR を行った。黄色集落菌お
382 よび白色集落菌どちらも陽性を示した。

383 (D) 陰性対照として滅菌精製水を用いて、pMUM001F,R(pMUM001の複製起点
384 (ori)を標的)のプライマーを用いて PCR を行った。黄色集落菌では陽性を示すが、
385 白色集落菌では陰性であった。

386

387 図2 *M. ulcerans* 生菌投与後のカイコの生存率

388 5齢1日目のカイコに50 μ L サンプルを投与し、投与後のカイコ生存率を確認した。投
389 与したサンプルは次の通りである。

390 7H9-ADC-Tween80(\circ 、n=30)、Agy99白色集落菌 OD=2.0(Δ 、n=30)、Agy99黄
391 色集落菌 OD=0.02(\square 、n=20)、Agy99黄色集落菌 OD=0.2(\diamond 、n=30)、Agy99黄
392 色集落菌 OD=2.0(\blacklozenge 、n=30)。

393 黄色集落菌 OD=2.0投与群では、有意なカイコの生存率の低下を認めた(*: p <
394 0.05、** : p < 0.01)。

395

396 図3 *M. ulcerans* 生菌投与後の体液の色調変化および組織変化

397 (A) 5齢1日目のカイコに50 μ L サンプルを投与し、投与1日後にカイコを解剖し、体
398 液を回収した。黄色集落菌では、菌数に比例した体液の着色を認めた。

399 (B) 上記と同様に回収した体液をマイクロプレートリーダーを用いて体液の吸光度を
400 測定した。黄色集落菌 OD=2.0投与群では、7H9-ADC-Tween80投与群及び黄色
401 集落菌 OD=0.02、0.2と比較して有意な体液の着色を認めた(*: p < 0.05、** : p <
402 0.01)。

403 (C) 5齢1日目のカイコに50 μ L サンプルを投与し、投与1日後にカイコを解剖し、カイ
404 コの背脈管におけるノジュールの着色を確認した。黄色集落菌 OD=2.0の菌液投与
405 群では、背脈管に強い体液の着色が認められ、一部ノジュールの着色も認められた。

406

407 図4 マイコラクトン投与後のカイコの生存率

408 マイコラクトン投与実験として、5齢1日目のカイコに50 μ L サンプルを投与し、投与後
409 のカイコ生存率を確認した。投与したサンプルは次の通りである。

410 0.1% Triton X-100(\circ)、マイコラクトン0.1 μ g(Δ)、1.0 μ g(\square)、10 μ g(\blacklozenge)。

411 マイコラクトン10 μ g 投与群では、投与1日後にすべてのカイコの死亡を認めた。

412

413 図5 マイコラクトン投与後の体液の色調変化および組織変化

414 (A) 5齢1日目のカイコに50 μ L サンプルを投与し、投与1日後にカイコを解剖し、体液
415 を回収した。どの投与群でも明らかな着色は認められなかった。

416 (B) 上記と同様に回収した体液をマイクロプレートリーダーを用いて体液の吸光度を
417 測定した。マイコラクトンの濃度に比例して着色が強くなる傾向にあり、1.0 μ g 投与群
418 では、0.1% Triton X-100水溶液投与群及び0.01 μ g、0.1 μ g 投与群と比較して有
419 意に高い吸光度を認めた(*: $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)。

420 (C) 5齢1日目のカイコに50 μ L サンプルを投与し、投与1日後にカイコを解剖し、カイ
421 コの背脈管におけるノジュールの着色を確認した。いずれの群間でも体液およびノジ
422 ュールの着色は認められなかった。

423

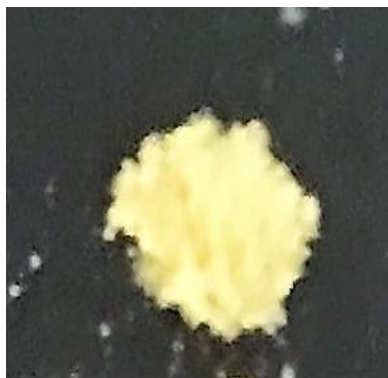
424 図6 マイコラクトン非産生菌と精製マイコラクトン投与による体液および組織の変
425 化

426 (A) 5齢1日目のカイコに50 μ L サンプルを投与し、投与1日後にカイコを解剖し、体液
427 を回収した。マイコラクトンの濃度に比例した体液の着色が認められた。

428 (B) 上記と同様に回収した体液をマイクロプレートリーダーを用いて体液の吸光度を
429 測定した。白色集落菌とマイコラクトン0.1 μ g および1.0 μ g を投与した群では、白色
430 集落菌の単独投与群と比較して有意に高い吸光度が認められた(*: $p < 0.05$ 、** : p
431 < 0.01)。

432 (C) 5齢1日目のカイコに50 μ L サンプルを投与し、投与1日後にカイコを解剖し、カイ
433 コの背脈管におけるノジュールの着色を確認した。

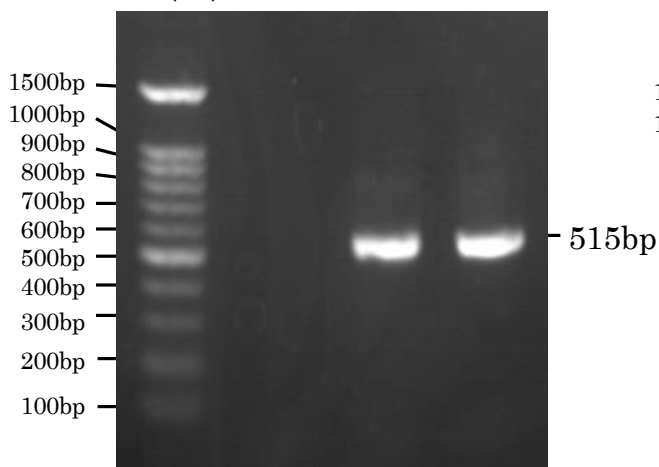
(A)



(B)



(C)



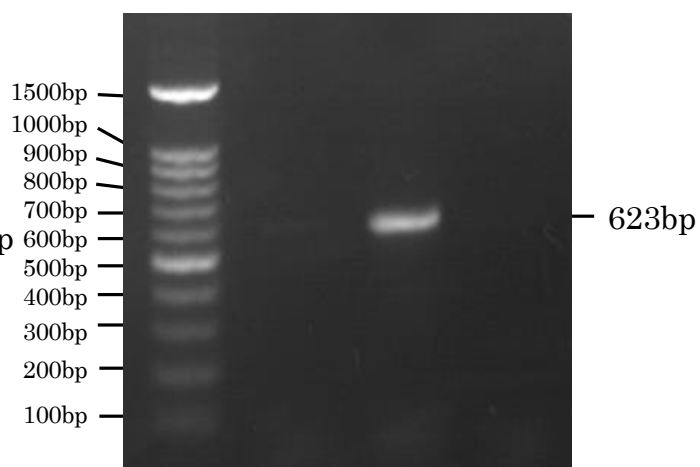
100bp ladder

陰性对照

黄色集落菌

白色集落菌

(D)



100bp ladder

陰性对照

黄色集落菌

白色集落菌

图1 德善 英纪

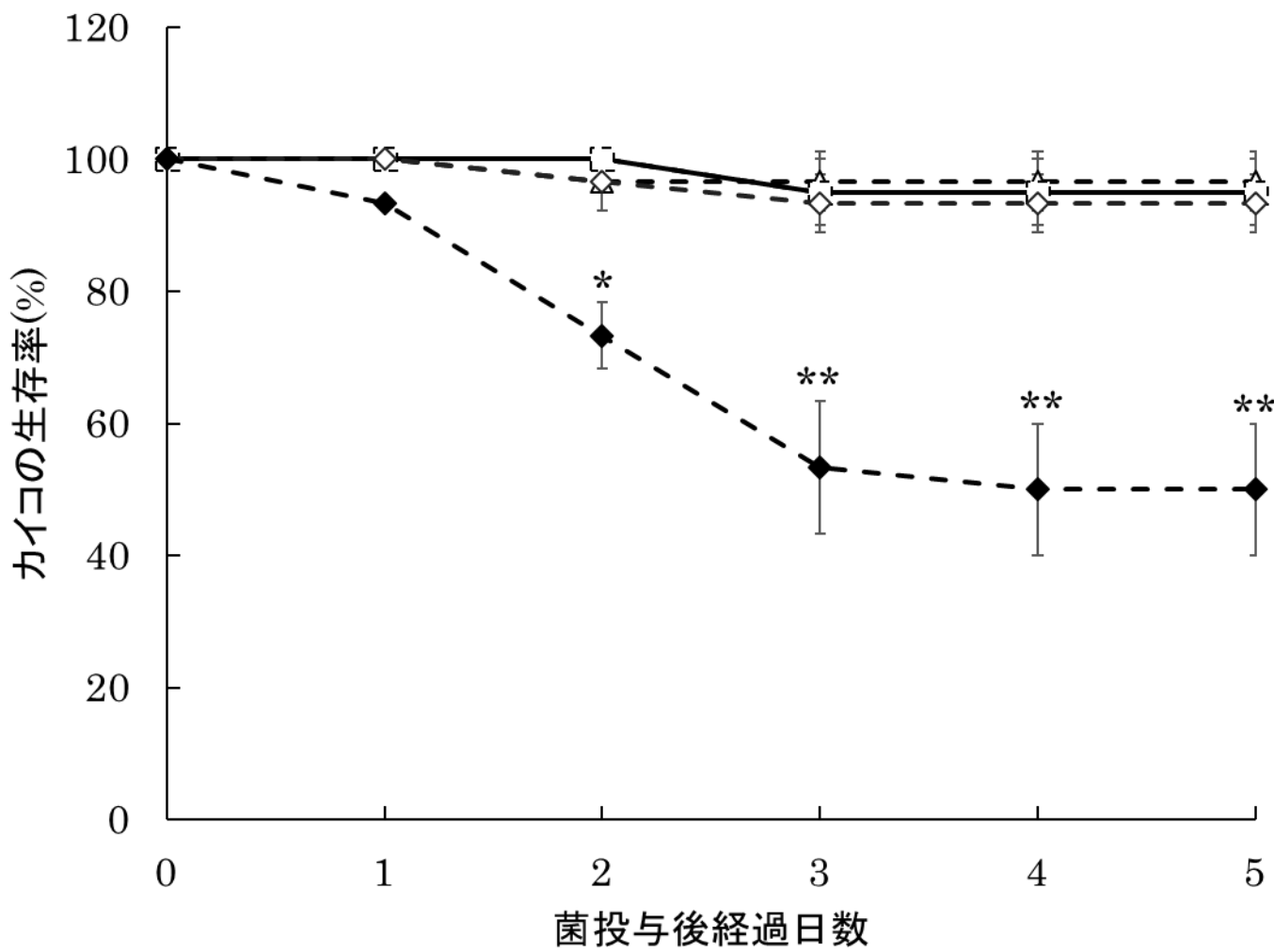
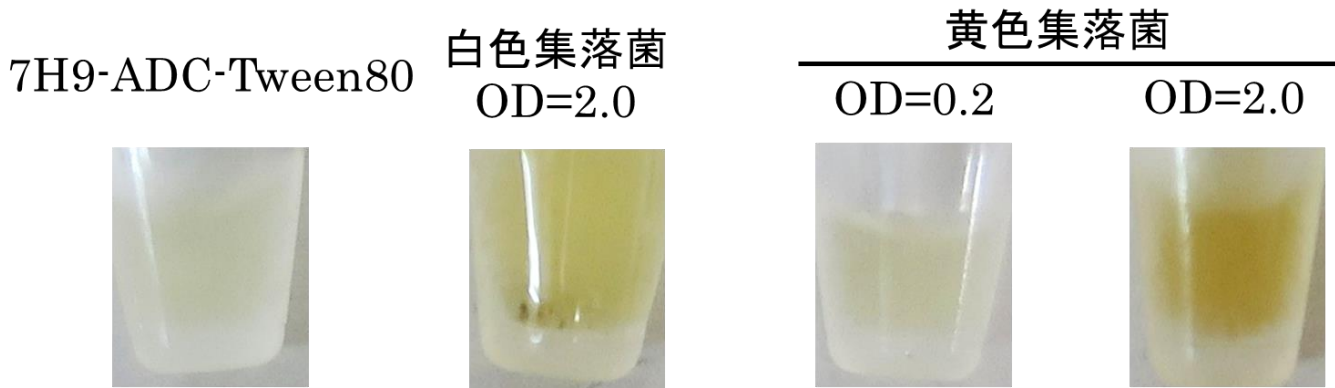


図2 徳善 英紀

(A)



(B)

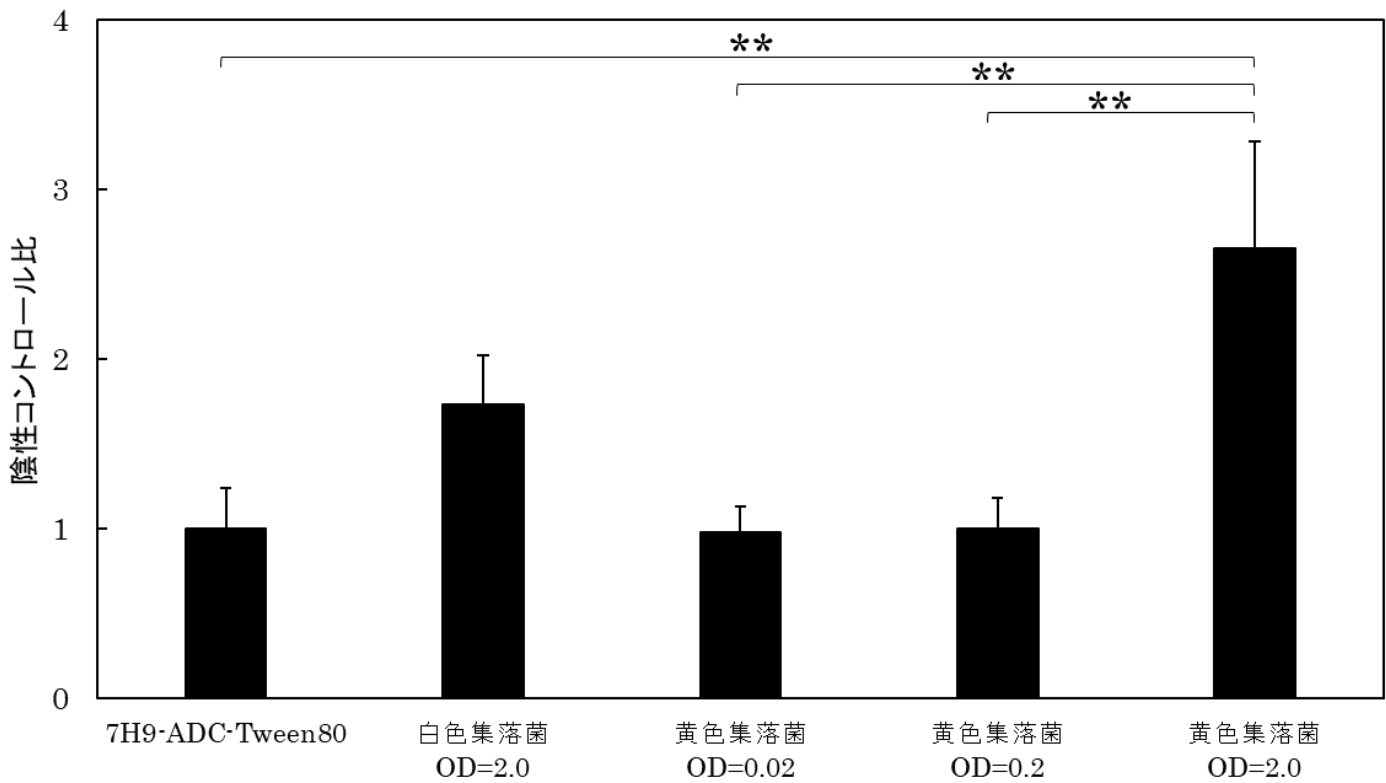


図3 徳善 英紀

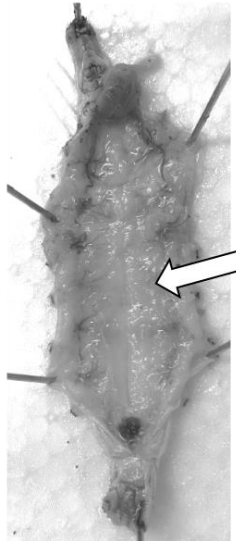
(C)

カイコ解剖写真

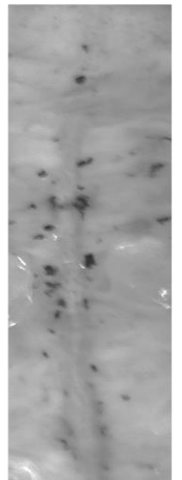
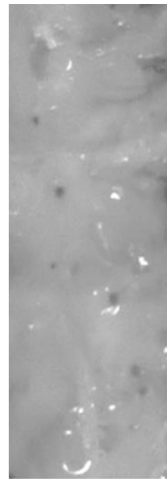
7H9-ADC-Tween80

白色集落菌
OD=2.0

黄色集落菌
OD=2.0



観察部位



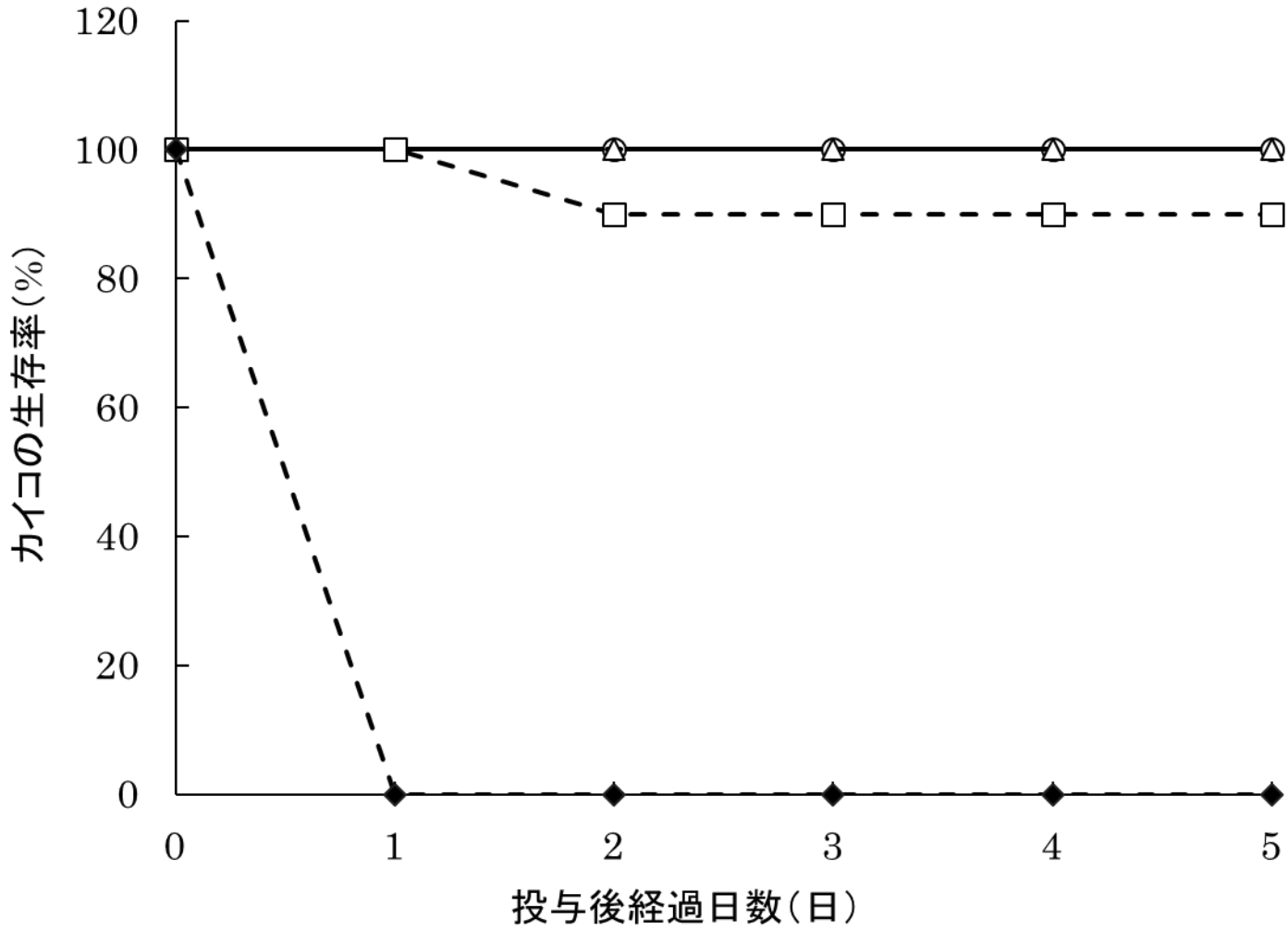
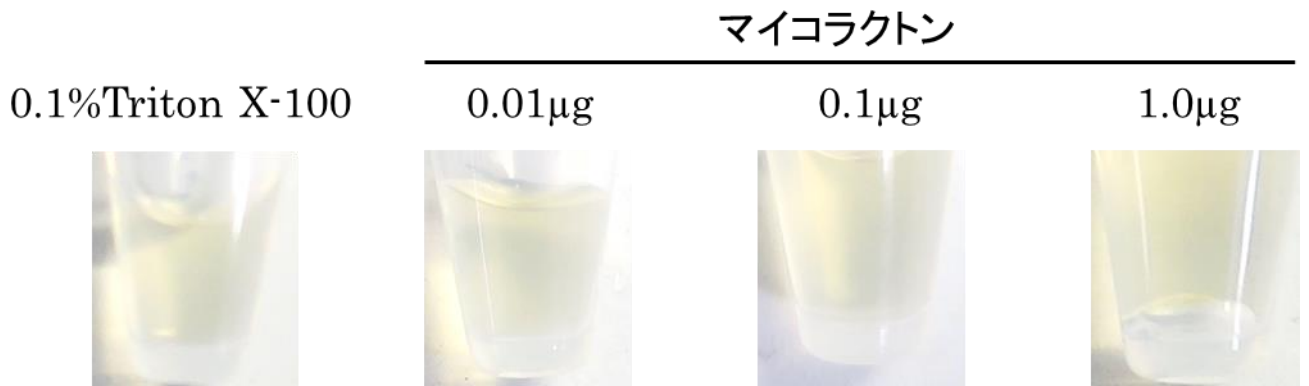


図4 徳善 英紀

(A)



(B)

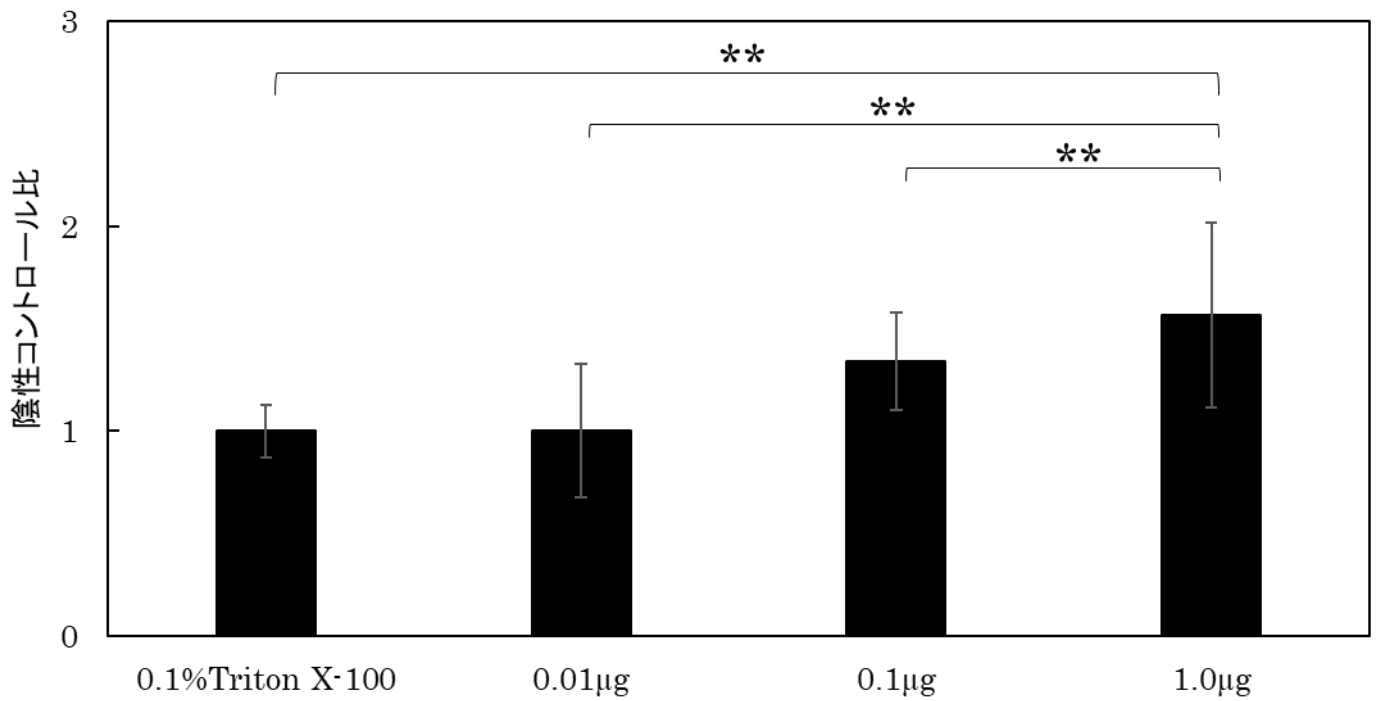
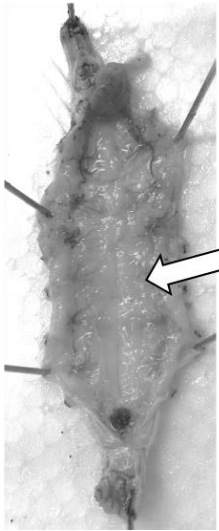


図5 徳善 英紀

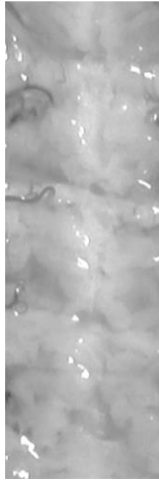
(C)

カイコ解剖写真

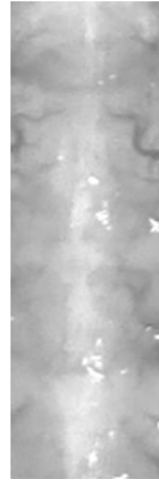


観察部位

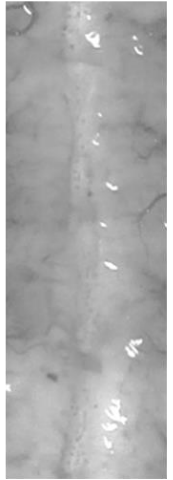
0.1% Triton X-100 0.01 μ g



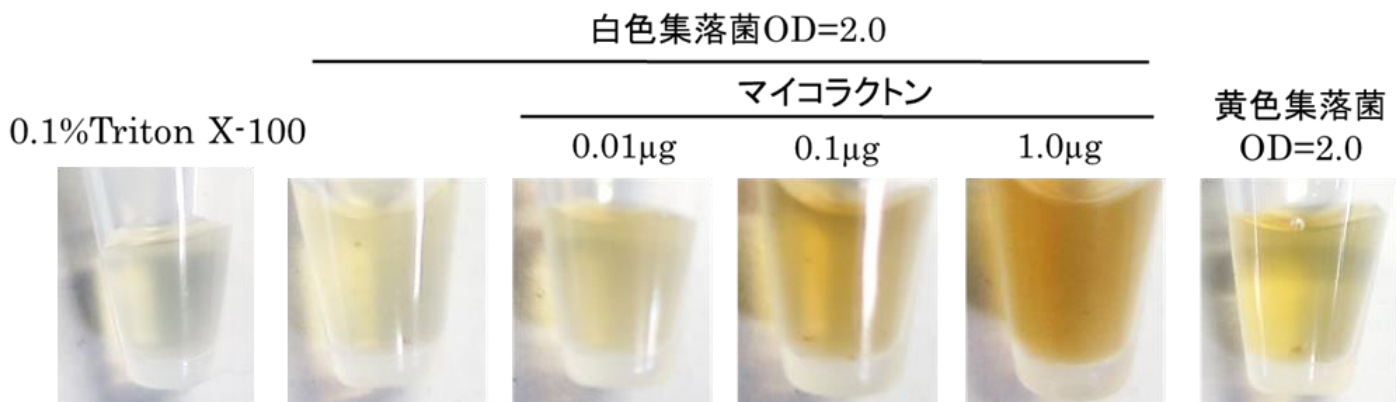
0.1 μ g



1.0 μ g



(A)



(B)

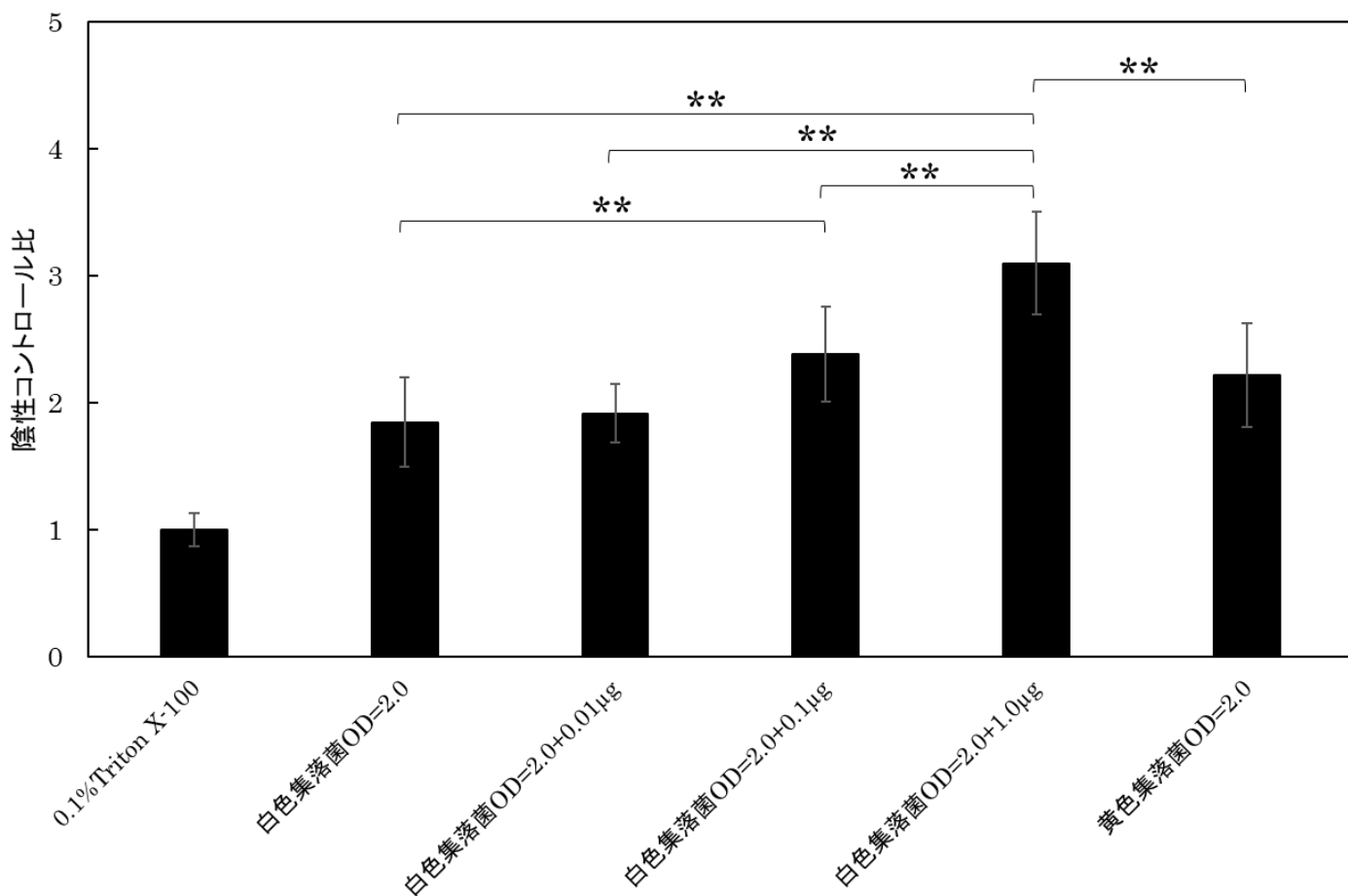


図6 徳善 英紀

(C)

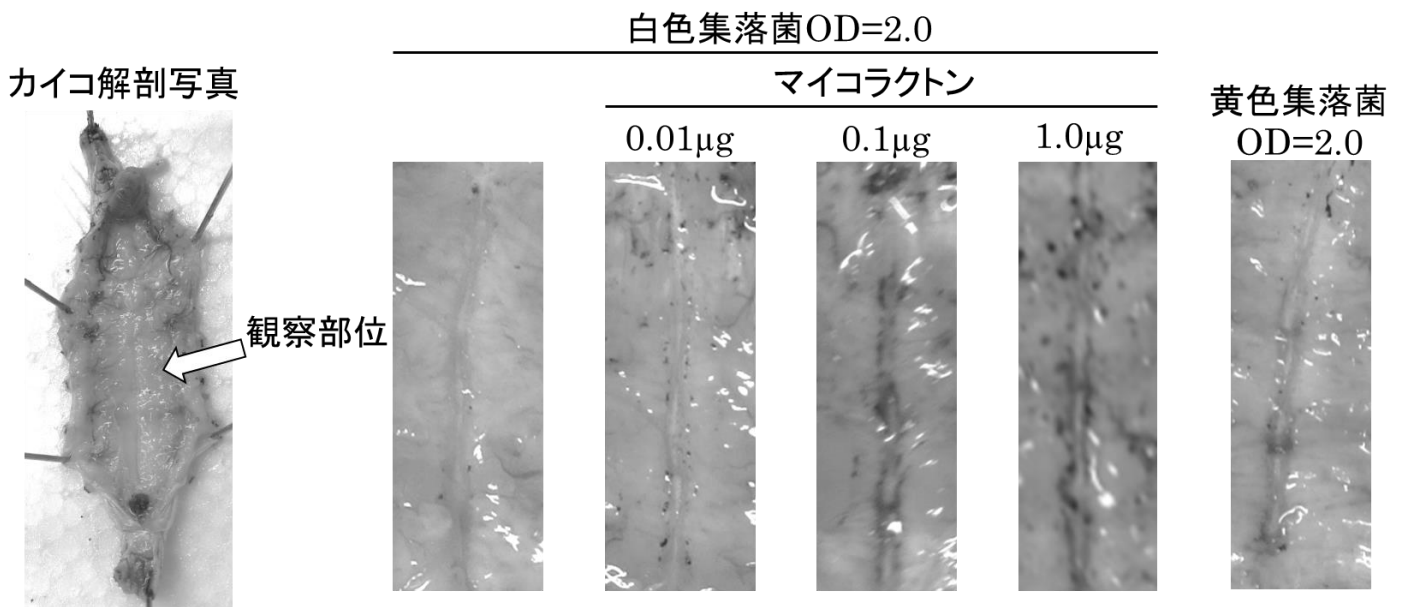


図6 徳善 英紀