

106. 病原細菌腸管感染マウスモデルの構築

芦田 浩

*東京大学 医科学研究所 細菌感染生物学社会連携研究部門

Key words : 赤痢菌, 動物モデル, 腸内細菌

緒言

赤痢菌は細菌性赤痢の起病因であり、開発途上国では乳幼児を中心に年間1億人以上が罹患している。現在では抗生剤治療が行われているが、多剤耐性赤痢菌の出現が問題となっており、また未だに安全で有効なワクチンが存在しないことから、新たな治療法の開発が望まれている。しかしながら、ワクチンや創薬開発には動物感染実験が不可欠であるが、動物感染モデルとして最適なマウスは赤痢菌に対して自然抵抗性を示すため、経口投与では腸管感染が成立しない。この結果、基礎研究における *in vivo* での赤痢菌病因解析および赤痢ワクチン・創薬等の研究評価手段としてのマウス腸管感染モデル欠如は歴史的にも大きな障害となっていた。これまではマウス経鼻感染による肺炎惹起モデル、モルモット角結膜炎モデルといった代替手段が利用されてきたが、基礎研究、ワクチン・創薬開発スクリーニングには簡便なマウス腸管感染モデルの確立が急務とされている。一方、近年の分子生物学的手法による腸内細菌叢の解析法や網羅的代謝産物解析法の確立によって、腸管感染において腸内細菌叢は感染防御に重要な役割を担うことが明らかにされている。例えば、腸内細菌は腸管内における栄養素の代謝、パイエル板などのリンパ球の発達誘導、IgA や抗菌ペプチド産生など、宿主との相互作用により腸管免疫恒常性を維持している。特に代謝産物である短鎖脂肪酸はバリア機能の亢進、免疫細胞の分化誘導を行い、感染防御に寄与することが知られている。すなわち、腸管の粘膜組織では、病原細菌・腸内細菌・宿主免疫の3者が複雑に相互作用することで、感染の成立・防御を制御していることが示されている。事実、腸内細菌は直接的もしくは間接的に病原細菌と競合することで病原細菌の感染を妨げており、無菌マウスや抗生物質処理により腸内細菌を減少させたマウスではサルモネラ属菌や腸管出血性大腸菌などの病原細菌に対する抵抗性が減弱し、感染が成立することが報告されている¹⁾。そこで本研究では抗生物質処理によるマウス腸内細菌叢攪乱による病原細菌-腸管免疫-腸内細菌の3者相互作用変化により病原細菌腸管感染マウスモデルの構築を試みた。

方法

1. 感染実験

野生型マウスを1-2週間 co-housing させ、腸内細菌叢を均一化させた。co-housing 後、①未処理、②抗生物質処理の2群に分け、各々処理を1週間行った後、抗生物質処理前後のマウスより糞便を回収した。糞便より回収したDNAを用いてパイロシーケンス法により腸内菌叢解析を行った。また糞便希釈液より調製した培養上清を有機酸分析に供した。抗生物質処理後のマウスに赤痢菌をゾンデで経口投与し、24時間後に解剖して、腸管内容物及び腸管組織をサンプリングした。腸管組織は3分割し、各々定着菌数測定用、mRNA 調製、およびパラフィン切片作製に供した。

2. 有機酸測定

盲腸内容物5倍希釈液（あるいは糞便5倍希釈液、糞便培地）：10%過塩素酸を4:1で混合し、4℃で一晩静置した後、遠心上清をHPLCシステム（Waters）に供した。

3. DNA 抽出

凍結状態（-80℃）で保存されていた便サンプルを用いた。サンプルからの DNA 抽出は定法に従い、鋳型 DNA としてその後の実験に用いた。

4. パイロシーケンス法

マウスの糞便から調製した混合 DNA 1.5×10^6 molecule を用い、GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-L) (Roche Diagnostic) のマニュアルに従いエマルジョン PCR を行った。次いで、GS Junior Titanium Sequencing Kit (Roche Diagnostic) を用い、GS-Junior にて 16S RNA 遺伝子の V1-V2 可変領域を標的としたプライマーを用いて配列の解読を行った。その配列を QIIME (微生物群集解析用の UNIX ベースで作成された専用のソフトウェア) を用いて解析した。

結 果

マウスを①未処理、②抗生物質処理の 2 群に分け、各々処理を 1 週間行った。抗生物質処理前後に回収したマウス糞便より菌叢構成をパイロシーケンス解析した。この結果、群集内の多様性を示す代表的な α 多様性指数である chaol index、Shannon index、Phylogenetic Diversity (PD) は、抗生物質未処理群と比較して、抗生物質投与群で多様性が減少していることが確認され、抗生物質処理により腸内細菌叢が変化したことが示された（データ未掲載）。続いて、未処理、抗生物質処理後のマウスに赤痢菌を経口投与し、感染 24 時間後に解剖、腸管を取り出し解析した。赤痢菌のマウス腸管感染を確認するため腸管の定着菌数を測定した結果、未処理マウスでは盲腸の様相変化および定着菌数は認められないものの、抗生物質処理マウスでは盲腸の肥厚、萎縮、内容物の消失といった明らかな様相変化とともに赤痢菌の定着菌数が認められた（図 1）。

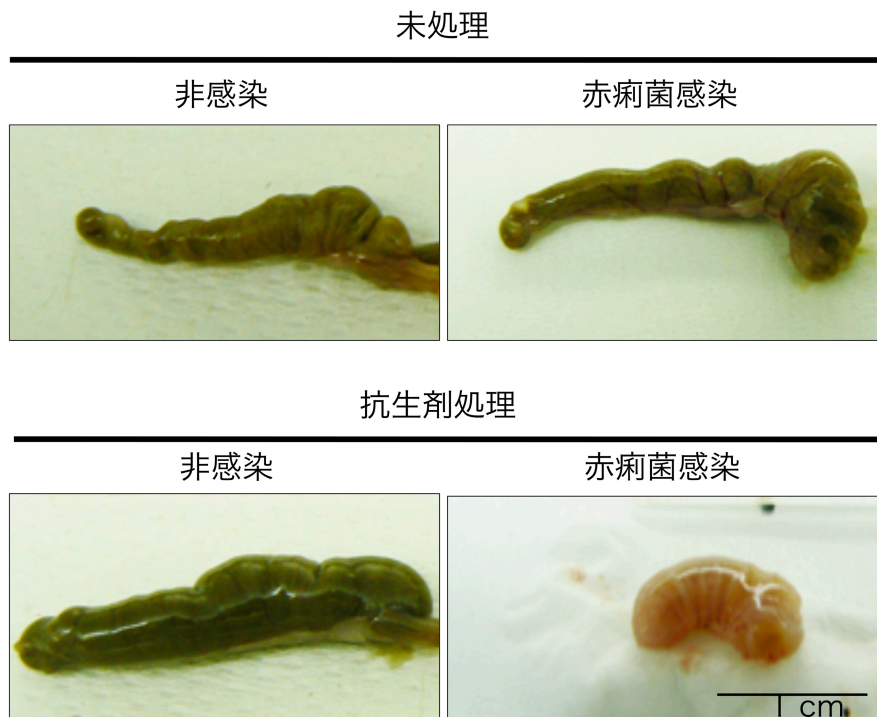


図 1. 抗生物質未処理および処理マウス盲腸

抗生物質未処理および処理マウスに赤痢菌を経口投与し、24 時間後に解剖した盲腸写真。

また、赤痢菌の定着は主に盲腸で確認され、小腸、大腸部位での感染は認められなかった（データ未掲載）。さらに感染マウス盲腸の組織切片を作製し、HE 染色による組織観察を行ったところ、未処理マウスでは著変は認められない

ものの、抗生剤処理マウス群では赤痢菌感染に伴い粘膜下層の肥厚、上皮細胞の破壊・剥離、および好中球をはじめとするリンパ球浸潤といった赤痢菌感染に伴う炎症誘導が確認された（図2）。

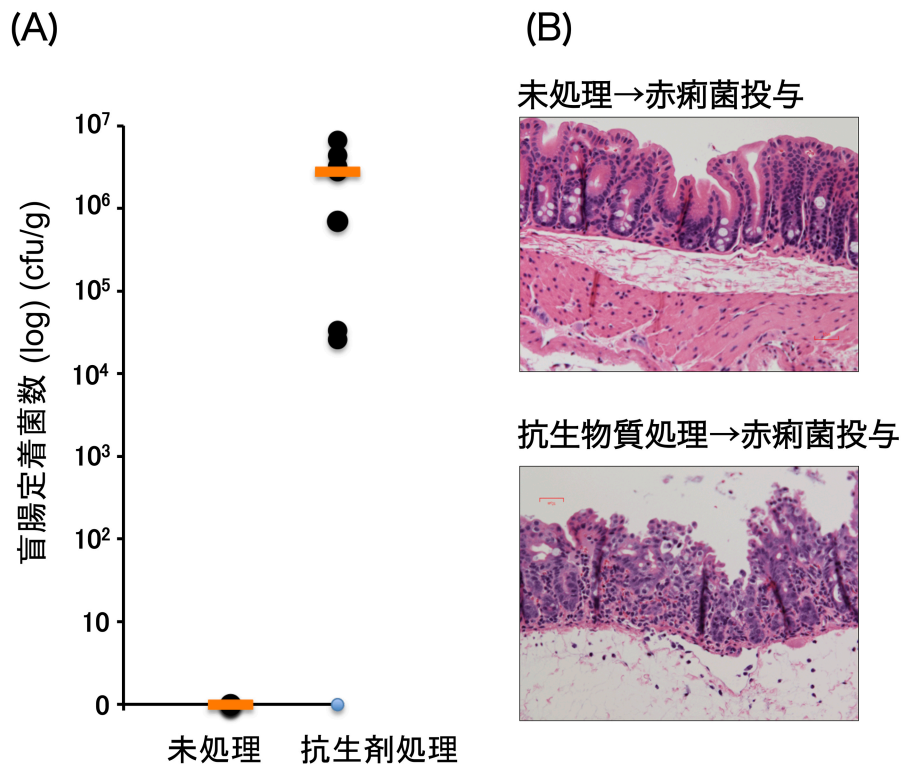


図2. 盲腸定着菌数および病理組織図
 (A) マウス盲腸の赤痢菌定着菌数。
 (B) 感染マウス盲腸病理組織図。倍率：200倍。

また、感染マウス盲腸よりRNAを調製し、qPCRによりmRNA発現上昇を確認したところ、抗生剤未処理マウスでは各種炎症性サイトカインmRNA発現上昇が認められないのに対し、抗生剤処理マウスでは赤痢菌感染により、炎症性サイトカインTNF- α 、Cxcl2のmRNA発現が認められたことから、赤痢菌感染による炎症反応の惹起が確認された。また、抗生剤処理マウスの中でも症状の重篤なマウスでは感染に伴い肛門部位での激しい汚れが認められ、下痢様の軟便を呈していた。さらにマウス盲腸粘膜においては細胞侵入性細菌である赤痢菌が腸管上皮細胞内に侵入している像が認められたことから、赤痢菌の腸管感染が示唆される結果となった。以上の結果より、マウスに抗生物質処理を行い、腸内細菌叢を攪乱させることでこれまで困難とされていた赤痢菌腸管感染モデルを作製することに成功した。

考 察

本研究では抗生剤処理による腸内細菌叢の攪乱により、今まで困難とされていた赤痢菌腸管感染マウスモデルの構築に成功した。本研究結果より、抗生物質投与によって腸内細菌叢の多様性が有意に低下すると、赤痢菌感染率の上昇が認められた。この結果は、腸内細菌叢の多様性の低下が赤痢菌に対する易感染性と関連することを示唆しており、宿主腸管において多様性を有する正常な腸内細菌叢を構築することが、種々の腸管病原細菌に対する感染防御機能の構築に繋がることが推定された。今後はEHECやコレラ菌といったマウス腸管モデルの存在しない他の腸管病原細菌感染においても本モデルが有効であるかを確認するとともに、赤痢菌感染に対するマウス抵抗性・感受性規定宿主因子の特定を試みる。腸管病原細菌のマウス抵抗性の一つには腸内細菌叢による感染防御が挙げられることから、本研究の発展は今

後、腸管病原細菌を標的としたワクチン・創薬開発の評価ツールとして有効であるのみならず、プロバイオティクス、プレバイオティクスといった病原細菌に対する新たな治療法の開発に役立つことが期待される。

文 献

- 1) Stecher B, Hardt WD. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Curr Opin Microbiol.* 2011 14(1): 82-91. doi: 10.1016/j.mib.2010.10.003. PubMed PMID:21036098