

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670207

研究課題名(和文) コモンマーモセットによる細菌感染症研究の基盤形成

研究課題名(英文) Establishment of basic research system of bacterial infections in common marmoset

研究代表者

中根 明夫 (NAKANE, AKIO)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30164239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 医科学研究の生体レベルの研究にはマウスやラットなどの実験動物が使用されているが、生物学的にヒトと大きく乖離している。本研究者は、その乖離を埋める実験動物としてコモンマーモセットを用い、細菌感染症研究における有用性を検討した。

黄色ブドウ球菌産生毒素を用いて、催吐活性及び下痢原活性を評価した結果、コモンマーモセットはブドウ球菌エンテロトキシン(SE)の経口投与により嘔吐活性を示し、SEの催吐活性測定系を確立した。さらに、これまで報告されていない下痢原活性をSEが有すること、他の黄色ブドウ球菌産生毒素の中にも催吐活性を示すものがあることを発見した。

研究成果の概要(英文)： Experimental animals including mice and rats are usually used in research on medical science. However, we should recognize that experimental data from these animals may dispartate in humans. We investigated availability of a small rodent, common marmoset, in research on bacterial infections containing toxins produced from Staphylococcus aureus.

Oral administration of staphylococcal enterotoxins (SEs) induced emesis in common marmosets. Moreover, we found that SEs induced diarrhea and other staphylococcal toxins can induce emesis in common marmosets. Therefore, common marmoset is a useful animal model for research on bacterial infections.

研究分野：医歯薬学

キーワード：感染症 霊長類 毒素 細菌 嘔吐 下痢 肥満細胞 セロトニン

1. 研究開始当初の背景

医科学などゴールがヒトを標的とした研究を行う場合、動物実験に頼らざるを得ない。多くはマウス、ラットを含む齧歯類を用いて、生体レベルの研究を行っている。本研究者らもマウスを用いて、黄色ブドウ球菌やリステリア感染に対する生体防御に関する研究を行ってきた。しかし、常に伴うのは、その結果がヒトに再現できるかという疑問である。一方、そのギャップを埋めるためにサル類を用いることを考えた場合、法律的・倫理的規制、経済的及び供給の難しさなど、通常の実験室ではあきらめざるを得ない。近年、そのギャップを埋める霊長類として注目されているのがコモンマーモセットである。コモンマーモセットは、分類学的にマカク属サルと同様に霊長類真猿類に属し、ヒトに近縁の動物である。ラットと同程度の大きさ(体重250-400g)で、ハンドリングも容易で、他のサルのような厳しい法的規制もなく、実験動物として有用であると考えられる。さらに、2009年に遺伝子導入コモンマーモセットの作製に成功した報告がなされ(Sasaki E et al, Nature 459:523,2009)、遺伝子改変動物としての発展性も大いに期待される。

本研究者らは、ブドウ球菌エンテロトキシンA(SEA)の嘔吐誘導活性メカニズムを解明すべく、SEAにより嘔吐を惹起する小動物を検索した結果、スunksが嘔吐を惹起することを見だし、スunksを用いて研究を進めている(Hu DL et al, Cell Microbiol 9:2267,2007, ibid, J Infect Dis 199:302,2009, Ono HK et al, FEMS Immunol Med Microbiol 64:392,2012)。しかしながら、スunksとヒトの間には大きなバリアがあることには変わりはない。そこで、コモンマーモセットを本研究に導入すべく動物の確保・繁殖の確立の準備をしてきた。

その準備も安定したことから、SEAによる嘔吐誘導機序の研究等を端緒に、コモンマーモセットを細菌感染症研究の有用なモデルとしての基盤を形成するために本申請を行うに至った。

2. 研究の目的

本研究は、まだ研究がほとんど行われていない細菌毒素及び細菌感染症のコモンマーモセットモデルを確立し、霊長類における細菌学研究的基盤形成を行うものであり、これまで超えられなかった小動物とヒトのバリアを超えるブレークスルーを起こす研究であり、当該分野の今後の研究発展に大いに貢献できる。

3. 研究の方法

(1) コモンマーモセットの飼養：

コモンマーモセット[EDM:C.Marmoset (Jic)]は雌雄で日本クレアから購入し、弘前大学大学院医学研究科動物実験施設で飼養及び繁殖を行った。コモンマーモセットの飼養

及び実験には日頃からのハンドリングが影響するため、コモンマーモセットの実験者及び飼養者を限定し、動物倫理に則った日常飼養を行った。

コモンマーモセットは他のサル類に比べ人獣共通感染症の感受性が低いと言われていたが、コモンマーモセットの実験者及び飼養者は、予防接種法で定期接種が行われている麻疹、風疹、ポリオ抗体陽性者が担当した。また、コモンマーモセットの実験者及び飼養者がインフルエンザ等の呼吸器感染症、下痢感染症、皮膚感染症など感染症に罹患あるいは疑いがある場合、回復するまで飼養室に入室しないことにより、コモンマーモセットに対するヒトによる感染症を予防した。

動物実験は、弘前大学動物実験規程及び動物実験に定められた動物実験安全管理マニュアルに定められた動物倫理を遵守して実験を行い、致命的な実験は行わなかったが、最終的には安楽措置によって安楽死させた。コモンマーモセットは、弘前大学大学院医学研究科附属動物実験施設内の厳重に逃亡防止措置を施した専用の部屋で飼養及び実験を行った。

(2) マーモセットへの黄色ブドウ球菌産生毒素の投与：

ブドウ球菌エンテロトキシン(SE)ファミリー分子、毒素性ショック症候群毒素-1(TSST-1)、staphylococcal superantigen-like(SSL)5及びSSL7の遺伝子組換えタンパク質を作製し、精製した。これらの毒素を投与する前に、マーモセットの麻酔を行った。

麻酔方法としては、短時間麻酔では塩酸メドミジン(0.06 mg/kg) + ミダゾラム(0.3 mg/kg) + 酒石酸ブトルファノール(0.3 mg/kg)を筋注した。また、長時間麻酔では、イソフルラン(導入濃度3-4%、維持濃度0.5-2%)吸入麻酔を行った。不動過誤、経口カテーテルを用いて、胃内に毒素を投与した。

(3) 嘔吐の評価：

マーモセットに麻酔下で毒素を投与後、拮抗薬により覚醒させ、嘔吐の有無を5時間観察し、嘔吐回数及び潜伏時間を測定した。また、嘔吐メカニズムを解析するために、毒素投与30分前にdisodium cromoglicate(DSCG)200 mg/kg、diphenhydramine 10 mg/kg、chlorpheniramine 10 mg/kg、granisetron 1 mg/kgをそれぞれ腹腔内投与した。

(4) 下痢原性の評価：

下痢原性の評価は、小腸の結紮ループ試験により評価した。コモンマーモセットを12時間絶食させた後、常法の麻酔下、小腸を露出させ等分に結紮した。ループにSEAを導入した。陽性対象としては毒素原大腸菌LT、陰性対照としては生理的リン酸緩衝液(PBS)を用いた。注入後閉腹した。8時間後、

塩酸メドミジン 0.06 mg/kg 筋注及びペントバルビタール 120 mg/kg を腹腔内投与し、安楽死させた後、結紮ループを取り出し、腸管長及び腸管重量を測定した。

4. 研究成果

- (1) コモンマーモセットにおける黄色ブドウ球菌産生毒素による催吐活性の測定系の確立：

SEA、SEB、SEC、SEI、SEJ、SEY は 250 µg/kg 投与により、いずれも催吐活性が認められた。嘔吐回数及び潜伏時間から、SEA が最も催吐活性が高いことが示された。一方、サルやスunksで催吐活性が見られない TSST-1 はコモンマーモセットでも催吐活性が認められなかった。ところが、これまで催吐活性が知られていない SSL5 及び SSL7 で催吐活性が認められた。以上の結果から、コモンマーモセットはブドウ球菌エンテロトキシンの催吐活性測定系としては有用であることが確認された。さらに、この系を用いると SSL ファミリー分子も催吐活性を有することを新たに発見した。

- (2) SEA を用いた催吐メカニズムの解析：

本研究者がスunksを用いて SEA の催吐活性メカニズムを解析したところ、SEA が腸管でセロトニンを誘導し迷走神経を介して嘔吐中枢を刺激すること、セロトニンの由来として SEA 刺激により脱顆粒を起こしたマスト細胞が重要であることを報告してきた。そこで、コモンマーモセットにおける SEA による催吐活性メカニズムを検討したところ、マスト細胞の脱顆粒を阻害する DSCG、ヒスタミン H1 blocker である diphenhydramine や chlorpheniramine、セロトニンの antagonist である granisetron 投与で SEA の催吐活性が阻害された。これらの結果から、コモンマーモセットにおいて SEA による嘔吐は、マスト細胞から放出されるヒスタミン及びセロトニンを介していることが示唆された。

- (3) コモンマーモセットにおける黄色ブドウ球菌産生毒素による下痢源活性の測定：

ブドウ球菌性食中毒では、しばしば下痢症状が認められるが、スunksの腸管結紮ループ試験では、ブドウ球菌性食中毒の主因である SEA に下痢原性は認められなかった。そこで、コモンマーモセットの腸管結紮ループを用いて SEA の下痢原性を検討したところ、SEA に下痢原活性が認められた。

以上、コモンマーモセットにおいて、ブドウ球菌エンテロトキシンファミリー分子の催吐活性定量系を確立した。さらに、催吐活

性が報告されていない SSL ファミリーの催吐活性及び SEA の下痢原性が発見され、コモンマーモセットは、細菌感染症の解析モデルとして、きわめて有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Hirose S, Ono HK, Omoe K, Hu D-L, Asano K, Yamamoto Y, Nakane A. Goblet cells are involved in translocation of staphylococcal enterotoxin A in the intestinal tissue of house musk shrew (*Suncus murinus*). *J Appl Microbiol* 査読あり 120(3):781-9, 2016, DOI: 10.1111/jam.13029

[学会発表](計 2件)

Ono HK, Hirose S, Nakane A.

Establishment of new emetic animal model using common marmoset and analysis of the emesis induced by staphylococcal enterotoxin. 第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 3 月 23 日、大阪国際交流センター(大阪市) 小野久弥、廣瀬昌平、中根明夫. マーモセット嘔吐モデルの確立およびブドウ球菌エンテロトキシンの嘔吐発現機序の解明. 第 69 回日本細菌学会東北支部総会、2015 年 8 月 21 日、郡山ビッグアイ(福島県郡山市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

弘前大学大学院医学研究科感染生体防御学講座

<http://www.bact.hirosaki-u.ac.jp/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

中根 明夫 (NAKANE AKIO)

弘前大学 医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30164239

- (2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

成田 浩司 (NARITA KOUJI)

弘前大学 医学(系)研究科(研究
院)・助教

研究者番号： 30419220

小野 久弥 (ONO HISAYA)

弘前大学 医学(系)研究科(研究
院)・助教

研究者番号： 80704569