

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659224

研究課題名(和文)サルモネラ胃腸炎後脳症発症マウスモデルの作製

研究課題名(英文)Establish of a mouse model of encephalopathy after Salmonella gastroenteritis

研究代表者

水野 文子(Mizuno, Fumiko)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70271202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円、(間接経費) 450,000円

研究成果の概要(和文)：サルモネラ胃腸炎後脳症のマウスモデル作製を試みた。菌株は、経口感染後一定期間腸管に定着しかつ網内系への移行の少ないSalmonella typhimuriumSPI2- (Salmonella pathogenicity island 2 deficiency strain)を、マウスはSalmonella 感受性のC57BL/6系を用いた。

脳症を思わせる行動異常はなく、一部のマウスで網内系から菌(bacillary form)が回収された。網内系への移行なしのマウスで、脳から菌がL-formとして回収され、脳内TNF- $\alpha$ のメッセージが発現し、脳実質組織に炎症細胞浸潤が認められたものがあった。

研究成果の概要(英文)：We attempted to make a mouse model for Salmonella encephalopathy after acute Salmonella gastroenteritis. We used Salmonella typhimurium SPI2- (Salmonella pathogenicity island 2 deficiency strain), which colonized at the intestine and rarely translocated to reticuloendothelial system, and used C57BL/6 mice which were susceptible to Salmonella.

Infected mice didn't show neurological signs. In some cases bacillary form of Salmonella was recovered from spleen and liver. In other cases L-form not bacillary form Salmonella was recovered from brain, simultaneously the message of TNF- $\alpha$  from brain was expressed and inflammatory cells were accumulated in the cerebral cortex.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：サルモネラ胃腸炎後脳症 マウスモデル L form 脳内サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

Nontyphoidal *Salmonella* encephalopathy はサルモネラ急性胃腸炎後に発症し、厳密には、意識レベル・認識・人格の変化、けいれん発作などの脳症の特徴がある、便からチフス菌以外のサルモネラ属の菌が回収される、中枢神経系の異常を伴う他のウイルス・細菌感染症がない、他の神経系・全身系疾患で説明できないものとされている。米国では1990年前後のアウトブレイク時に報告されているが ( J.Infect.Dis. 1994;169:547 ) 詳細な検討はない。有井らの報告 (Neurol. 2002;58:1641) では脳症後の死亡・後遺症例もあり、脳症の発症要因の解明が求められている。脳症の原因として菌が産生する cytotoxin ( Inf.Imm. 1988;56:3089 ) や 蛋白質合成阻害因子 ( Microbiol. Pathogenesis 2001;31:283 ) の存在の可能性も示唆されたが、脳内での TNF- $\alpha$  を主とする cytokine storm が病態を引き起こす可能性が高いこと以外、現在も明確な答えには至っていない。その理由の一つに病態を再現できる動物実験モデルがないことが挙げられる。病因や発症機序が明らかでない中で *Salmonella enteritidis* 以外の菌種による胃腸炎の増加、nontyphoidal encephalopathy の症例も成人例を含め散見されている。

## 2. 研究の目的

サルモネラ急性胃腸炎発症後の脳症 ( nontyphoidal *Salmonella* encephalopathy ) は主として小児にみられ、後遺症や死亡例もある。病原因子や発症機序はいまだ明らかではない。病因解明が進まない理由の一つに適当な実験モデルがないことが考えられる。サルモネラ食中毒事例の減少により胃腸炎の総数は減少しているものの、成人例も含め脳症の報告は散見される。この脳症について、サルモネラ胃腸炎後脳症発症マウスモデルを作製し、その病因と発症機序を解明する。

## 3. 研究の方法

胃腸炎後脳症発症マウスモデルを作製し、作成できた場合、発症機序の解明を行う。

1) 使用菌株の選定：サルモネラ経口感染後、腸管に一時的に定着 ( 便中に菌が排出されているか ) し、かつ、ネズミチフス症の病態とは違い、網内系への菌の移行の少ない菌株を選定する。

教室所蔵サルモネラのうち、腸管出血性大腸菌 0157 と LPS の抗原性を同じくする *Salmonella urbana*、*S. hilversum*、*S. soerenga* の3株、サルモネラの細胞内生存に関わる *Salmonella* pathogenicity island 2 欠損株の *S. typhimurium* SPI2-株を用い、経口感染後の便中からの菌の回収の有無、肝臓・脾臓への移行の有無を確認する。

マウスはサルモネラ感受性の C57BL/6 マウスを用いた。

2) 使用薬剤の選定：菌自体が脳へ移行しない場合でも、LPS などの菌体成分の遊離による脳症発症も考えられるため、脳症発症を誘導することができる薬剤投与などの処置についても検討した。薬剤は、これまで腸管からのカンジダのトランスロケーションモデルで用いたメトトレキサートとサイクロフォスファミド、およびサルモネラ感染症治療にも用いられているセフトリアキソンを用いた。

3) 感染後のサルモネラの体内動態：腸管からの菌体そのものの移行、あるいは菌体成分の遊離を促すため、マウスを低たんぱく栄養食で3週間予備飼育し、1日絶食後10の8乗個のサルモネラを経口感染させる。投与前日からはストレプトマイシン 100 [ ] 含有の水を飲水させる。感染3日目にセフトリアキソン [ 25  $\mu$ g/g 体重 ] を腹腔内投与し、腸管からの菌体の移行あるいは菌体成分の遊離を促す。感染後、網内系への菌の移行の有無、脳内への菌の移行の

有無、行動変化の有無を確認する。

菌の回収は通常のBTB寒天培地使用によるもの以外にセレナイト培地による増菌をかける、L誘導培地を用いたL-formとしての菌の存在についても確認する。マウスはサルモネラ感受性のC57BL/6マウスを用いる。

- 4) 脳症発症に関する所見の検索：3)の結果をもとに、網内系への菌の移行がないマウスで、脳内からサルモネラのL-formが回収されたマウスについて、行動変化の有無：脳症発症と考えられる行動変化の有無を観察する。

マウス脳内のTNF- $\alpha$ メッセージ発現の有無：サルモネラ胃腸炎後脳症の臨床例では脳髄液中TNF- $\alpha$ 産生が認められることから、マウス脳内のTNF- $\alpha$ メッセージ発現の有無をリアルタイムRT-PCRにて測定する。脳組織中の炎症所見の有無：脳組織中の炎症所見の有無から、脳症発症を確認する。

- 5) 全身性因子の検索：臨床症例の報告から、脳症発症を早期に診断しうる全身性に変動する因子の検索が求められているため、感染後のマウス血清中で、主として、炎症に関連する因子の変動を測定する。

#### 4. 研究成果

- 1) 使用菌株の選定：*Salmonella urbana*, *S. hilversum*, *S. soerenga*の3株は、脾臓からの回収は見られなかったものの、便中菌数は感染後急速に減少し、10日目以降は検出されず、経口投与したサルモネラは早期に排除されると考えられた。一方、*S. typhimurium* SPI2-株は一部網内系へ菌の移行がみられたが、経口感染後14日の観察期間中便中から菌が回収された。一定期間腸管に定着し、かつ網内系への移行の少ないものとして、(0ではない)*S. typhimurium* SPI2-株を以後の実験に使用することとした。

- 2) 使用薬剤の選定：腸管からの移行を促す薬剤として、メトトレキセートは腸管の傷害が大きく、また免疫抑制剤は末梢血中白血球数を著しく減少させ、マウスが激しく衰弱するため、抗生物質のセフトリアキソンを使用することとした。

- 3) 感染後のサルモネラの体内動態：マウスを低たんぱく栄養食で3週間予備飼育し、1日絶食後10の8乗個の*S. typhimurium* SPI2-株を経口感染させる。投与前日からはストレプトマイシン100〔 〕含有の水を飲水させ、感染3日目にセフトリアキソン〔25 $\mu$ g/g体重〕を腹腔内投与した。

感染後、14日(観察期間)まで便中から菌が回収された。約半数のマウスで脾臓から、2割で肝臓から菌(bacillary form)が回収された。

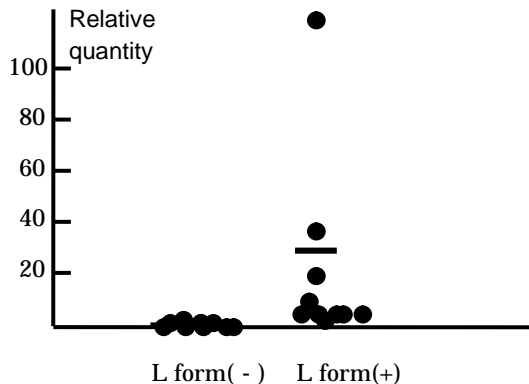
脾臓や肝臓など網内系への移行が認められなかったマウスの一部の脳からL formが検出され、DNAを抽出し、サルモネラ特異的プライマーを用いたPCR法によりサルモネラと確認した。

- 4) 脳症発症に関する所見の検索：

- 3)でサルモネラ経口感染後、網内系への菌の移行が認められず、脳からサルモネラL formが検出されたマウスにおいて、感染初期に動きが鈍くなった以外に脳症に関連すると考えられる行動変化は認められなかった。

マウスの脳から抽出したRNAを用いたリアルタイムRT-PCRの結果、一部のマウスで、感染後5日以降にTNF- $\alpha$ のメッセージ発現が認められた。網内系に菌の移行が認められたマウスでは、明らかに発現量は多いが、それと比較すると、網内系に菌の移行が認められず脳内からサルモネラL formが検出されたマウスでは発現量は少なかった。今回L formの定量はしていないので、L form数〔L.F.U.:L forming units〕との関連は不明である。

Expression of messages of TNF-  
in the brain (L-form positive) of mice  
infected with *S. typhimurium* SPI2<sup>-</sup>



L form が検出されたマウス脳組織所見で、  
脳実質組織内に細胞の集積が認められ、  
炎症が惹起されていると考えられた。

- 5) 全身性因子の検索：経口感染後、脳症発  
症と連動する全身性の変化の有無を確認  
するため、マウス血清中の CRP を ELISA 法  
にて測定した。その結果、マウス血清中で  
CRP の上昇は、網内系に菌が移行したマウ  
スを含めて、全く認められなかった。

サルモネラ経口感染後、その一部が L form  
となって脳内に存在し、同時に脳内で炎症性  
サイトカインの一つである TNF- メッセー  
ジの発現がみられ、組織像では炎症細胞の浸  
潤が認められたことから、サルモネラの L  
form そのものによる脳内炎症惹起か或いは、  
bacillary form から L form に変換した時に  
遊離した LPS による作用が考えられた。サル  
モネラ胃腸炎後脳症の臨床症例の多くで、脳  
脊髄液中で炎症性サイトカインの産生が認  
められ、脳内のサイトカインストームが脳症  
の本態であるという推測がなされている。本  
研究において脳内炎症の所見は得られたが、  
脳症と考えられるマウスの行動異常は認め  
られず、サルモネラ胃腸炎後脳症の病態解析  
につながるマウスモデルの作製にはいたら  
なかった。

また客観的な評価法の候補としての血中 CRP  
も変動がなく、脳症発症の指標となる因子の  
検索も並行して検討する必要がある。

## 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)

[学会発表](計 1 件)

西川(水野)文子、東 伸岳、喜多英二、  
Analysis of pathogenic mechanism of  
Salmonella encephalopathy in mice、  
第 87 回日本細菌学会総会、平成 26 年 3 月 27  
日、東京都江戸川区船堀

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水野 文子 (MIZUNO, Fumiko)

奈良県立医科大学・細菌学教室・講師

研究者番号：70271202