

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：37116

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22942

研究課題名（和文）菌の動態と宿主の病理組織学的変化に着眼したレプトスピラ感染症の重症化機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of Severe Leptospira Infection Focusing on Bacterial Dynamics and Histopathological Changes in the Host

研究代表者

宮原 敏 (Miyahara, Satoshi)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：50878329

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、同一菌株（*Leptospira interrogans* L495株）を用いて、ハムスターに軽症型感染と重症型感染を起こさせることに成功した。2つのモデルの比較により、急性期の抗体価の上昇の遅れが、急性腎障害、生存率に関連しており、重症化を決める因子の一つである可能性が示唆された。また軽症型モデルの腎臓の解析により、急性期に生じた尿細管障害が慢性期も持続し、慢性期に腎障害を起こすことがわかった。レプトスピラ症が熱帯地方の慢性腎障害の一因である可能性が示唆された。さらに、レプトスピラ症の消化管病変について報告し、便が感染源になる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レプトスピラ症において腎機能障害は急性期の死因となりうるだけでなく、慢性腎障害として患者の長期的な生活の質の低下、医療経済的負担に關与する重要な臓器障害である。しかし、腎障害を予測する因子がなかったため、予防や治療介入が進んでこなかった。本研究により、レプトスピラ症における急性腎障害や慢性腎臓病の病態の一端が明らかとなり、腎障害を予測するマーカーや治療法の開発につながる成果を上げることができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we could successfully cause both mild and severe forms of infection in hamsters using *Leptospira interrogans* strain L495. The comparison of the two models suggests that the delay in the acute phase of antibody titers is associated with acute kidney injury and survival, and may be one of the factors determining the severity of the disease. Analysis of the kidneys of the mild disease model showed that the tubular damage that occurred during the acute phase persists during the chronic phase, causing chronic kidney injury. It was suggested that leptospirosis may be a contributing factor to chronic renal failure in the tropics. Furthermore, the gastrointestinal lesions of leptospirosis were reported, indicating that stool may be a possible source of infection.

研究分野：細菌学

キーワード：レプトスピラ症 ワイル病 急性腎障害 慢性腎臓病 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

レプトスピラ感染症は、病原性レプトスピラ (*Leptospira interrogans* など9種) によって起こる人獣共通感染症であり、世界中で広く発生している。ヒトにおけるレプトスピラ感染症の急性期は、発熱、悪寒、頭痛、筋痛などの非特異的な臨床像を示し、インフルエンザなどの他の急性熱性疾患との鑑別が困難な場合がある。レプトスピラ感染症の大部分は、軽症にとどまり、回復期を経て自然治癒するとされるが、一部は重症化し、肝臓、腎臓、肺などの多臓器不全を示して死に至る。世界で年間30~50万が重症化していると推測され、特に重度の肺出血を示す症例では死亡率が50%を超える。どのような病態で重症化するのか、それに関わる菌体側の病原因子が何であるのかは未だ解明されていない。

我々は、*Leptospira interrogans* serovar Manilae L495株が、人工培地で5日程度培養した短期培養株をハムスターに接種すると重症型感染症を起こすが、100日程度培養した長期培養株をハムスターに接種すると、感染は成立して体重減少や軽度の尿細管間質性腎炎は起こすものの自然治癒することを見出し、病態の違いを明らかにするための動物モデルに使用することとした。

2. 研究の目的

本研究では、短期培養株感染で起こる重症型モデルと、長期培養株感染で起こる軽症型モデルについて、病理組織学的特徴や血液生化学的所見、菌体の分布を比較することで重症化を起こす病原因子を特定することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 重症型モデル、軽症型モデルの作成

Leptospira interrogans serovar Manilae L495株は産業医科大学微生物学で維持されている菌株を使用した。菌液はハムスターの腎臓から分離後、STAFF (sulfamethoxazole, trimethoprim, amphotericin B, fosfomycin and 5-fluorouracil) 含有コルトフ培地で1週間増菌培養し、コルトフ培地に継代後、室温で設定した期間維持培養した。

感染実験は4週齢オスのシリアンハムスターに、設定した培養期間のL495株の菌液をPBSで 1×10^4 に希釈し、右大腿内側に経皮感染させた。感染したハムスターは1日1回観察と体重測定を行い、設定したエンドポイント(10%以上の体重低下、活動性の低下、毛並みの悪化等)を満たした時点で瀕死と判断し、頸椎脱臼で安楽死を行った。安楽死の際、採血し、血清を生化学的検査、免疫学的検査に使用した。また臓器を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋し、組織学的な解析に使用した。

(2) 免疫蛍光染色によるレプトスピラの標識

上記の方法で固定した組織に対して、一次抗体はウサギ抗Manilae抗血清、二次抗体はAlexa Fluor 488 ヤギ抗ウサギIgG抗体(Life Technologies)を使用して、レプトスピラを標識した。観察はVS120-L100-FL(Olympus)を使用した。

(3) Microscopic agglutination test (MAT)による血清抗体価の測定

感染したハムスターの血清中の抗体価をMATで測定した。MATはWHOの方法に準じて行った。段階希釈した血清を培養したL495株の生菌と混合し、50%以上の生菌が凝集を示す希釈倍率を抗体価として記録した。希釈倍率160倍以上の抗体価を示した場合をMAT陽性と判断した。

(4) 感染ハムスターの腸管病変の解析

Leptospira interrogans serovar Manilae L495株 1×10^4 cellsを4週齢オスのシリアンハムスターの右大腿内側に皮下接種した。感染後7, 8, 9日目に各2-4匹ずつを麻酔下に開胸、ヘパリン加生理食塩水で脱血・還流後、消化管(胃-直腸)を一塊として無菌的に摘出した。培養用サンプルとして空腸、回腸、盲腸、結腸を各1cmずつ切り取り、長軸方向に切開し、腸管内容物をPBSで洗浄して回収し、STAFF含有コルトフ培地で限界希釈培養を行った。内容物を洗浄除去した消化管は上記培地中でホモジナイズした後、限界希釈培養を行った。30°Cで4週間にわたりインキュベートし、レプトスピラの増殖の有無は各培養上清を暗視野顕微鏡下で直接観察することにより確認した。また、培養用サンプルとは別に病理学的解析用として空腸、回腸、盲腸、結腸を各1cmずつ切り取り、固定後に連続組織切片を作成し、HE染色、免疫蛍光染色を行った。感染ハムスターの肛門から2cm以内の結腸内に排泄直前の糞便が存在した場合には採取し、PBSに懸濁後、同様に限界希釈培養を行った。

4. 研究成果

(1) L495株感染による重症型モデルと軽症型モデルの作成

培養1ヶ月未満(増殖期後期~定常期相当)の*Leptospira interrogans* L495株を4週齢オスのシリアンハムスターに 1×10^4 経皮感染させると、感染6日目から10日目にかけて瀕死状態となる個体が出現し、生存率は9.3%(4/43)であった。瀕死状態を示した個体を解剖すると、すべて黄疸、肺出血、腎出血が認められ、ヒトの重症型レプトスピラ症(ワイル病)と類似した表現型を

示した。

次にコルトフ培地での培養期間が 1, 2, 3, 4, 7 ヶ月とそれぞれ異なる *Leptospira interrogans* L495 株を 4 週齢オスのシリアンハムスターに 1×10^4 経皮感染させ、生存率を比較した。培養 1, 2 ヶ月の菌では全数が瀕死となった一方で、3, 4, 7 ヶ月の菌を接種したハムスターは 60-80%が生存した(図 1)。生存したハムスター 15 匹は、10 匹が急性期に一過性の体重減少を示し、15 匹すべてが感染 15 日目の MAT でレプトスピラに対する抗体産生が確認された。また、86.7% (13/15) で、腎臓に菌体を保菌していた。以上から、L495 株は培養 2 ヶ月までで感染させるとハムスターに対する病原性が高く、致死的な重症型感染を起こす一方で、培養 3 ヶ月以上で感染させると一過性の体重減少の後に回復し、腎臓での保菌状態に移行する軽症型感染の病態を示すことがわかった。このように発症後急性期に瀕死を示す個体を重症型モデル、発症するものの急性感染ののち回復し慢性感染に移行した個体を軽症型モデルとして、以後の解析に用いた。

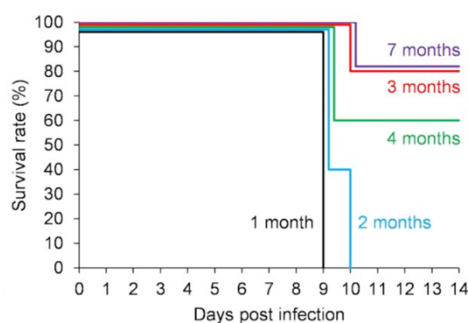


図 1 培養期間の異なる L495 株のハムスターに対する病原性の違い

(2) 重症型モデルと軽症型モデルの急性期病態の比較

重症型モデルと軽症型モデルについて、急性期に採血を行い、血清クレアチン値と MAT 値を比較した。急性期の血清クレアチニン値は重症型モデルで有意に高く ($p=0.006$)、急性腎障害を示していた。重症型モデル ($n=16$) はすべて MAT 陰性 (160 倍未満) であったが、軽症型モデル ($n=5$) はすべて MAT 陽性を示した (640-2560 倍)。急性期の抗体価の上昇が、急性腎障害、生存率に関連しており、重症化を決める因子の一つである可能性が示唆された。

(3) 重症型モデルの急性期の腎臓における菌体の分布と病理学的変化

重症型モデルにおいて、腎臓は肉眼的に感染 7 日目より点状出血を示し、9 日目にはびまん性の出血を示した。免疫蛍光染色で腎臓組織内のレプトスピラ菌体を検出したところ、感染 7 日目より菌体が皮質に巣状に分布して認められた。菌体は主に間質に存在し、特に血管に沿って集積する所見が見られた。組織学的に、腎臓はうっ血と形質細胞主体の軽度の炎症細胞浸潤が認められ、好中球の集簇は明らかではなかった。糸球体および尿細管上皮は保たれていた。感染 9 日目では腎臓は高度の出血を示しており、菌体はびまん性に分布していた。これらの所見から、重症型モデルにおいて急性期の腎臓では、血行性に播種された菌体が間質において急速に増殖して広がり、それに一致して出血等の病理学的変化により腎機能障害をきたすことがわかった。

(4) 軽症型モデルの慢性期の腎臓における菌体の分布と病理学的変化

軽症型モデルにおける慢性期 (感染 16 日目以降) の腎臓は、肉眼的に出血は確認されず、表面には瘢痕様の萎縮が認められた。組織学的に、皮質に巣状の尿細管萎縮が認められ、正常尿細管との境界は明瞭であった。萎縮部間質にはリンパ球、形質細胞主体の中等度の炎症細胞浸潤が見られたが、好中球は確認されなかった。間質のレプトスピラ菌体の分布は尿細管萎縮の分布と概ね一致していた。感染日数の異なる腎臓を用いて経時的に比較すると、間質に分布する菌体は減少傾向を示す一方で、尿細管の萎縮の範囲は変化に乏しかった。感染 28 日目以降では一部の尿細管内腔に菌体が密に分布する所見が認められた。これらの所見から、急性期に皮質に分布した菌体が尿細管を障害し、慢性期の尿細管萎縮の範囲を決めている可能性が示唆された。

(5) 軽症型モデルにおける慢性期の腎機能障害とレプトスピラの分布、病理学的変化の関係

軽症型モデルのうち、尿細管萎縮が高度であるほど血清クレアチン値が高くなる傾向が認められた ($r_s=0.78$, $p=0.01$)。一方で、腎臓内の炎症細胞浸潤の程度や、腎臓内生菌数、尿中生菌数と血清クレアチン値との間に有意な関連性は認められなかった (図 2)。

この結果から、レプトスピラ感染症の慢性期において腎機能障害の程度を決める因子は、尿細管萎縮の程度であり、従来考えられていた慢性期の腎臓

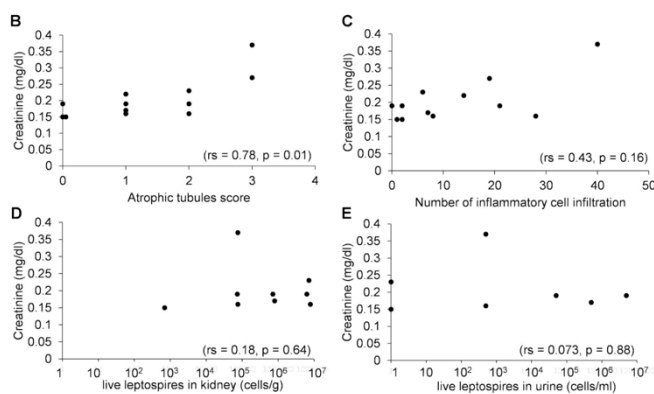


図 2 レプトスピラ感染後慢性期の腎機能障害に関わる因子

内に定着したレプトスピラや慢性期に持続した炎症の程度の関与は乏しいことが明らかとなった。上述したように、慢性期の尿細管萎縮の程度は、急性期に腎臓に分布したレプトスピラの程度によって決まっていることが予想される。そのため、感染早期から抗菌薬治療を開始することは、腎臓への菌体の移行を防ぐことで、回復後慢性期に腎機能障害を起こすことを予防できる可能性があり、早期診断、早期治療の重要性が示唆された(図3)。

なお、(1)-(5)の内容は、PLoS Neglected Tropical Disease 誌に投稿し、掲載された(Maruoka T, Nikaido Y, Miyahara S, Katafuchi E, Inamasu Y, Ogawa M, Fukuda K, Nakayama T, Horishita T, Saito M. Correlation between renal distribution of leptospires during the acute phase and chronic renal dysfunction in a hamster model of infection with *Leptospira interrogans*. PLoS Negl Trop Dis. 2021 Jun 18;15(6):e0009410.)。

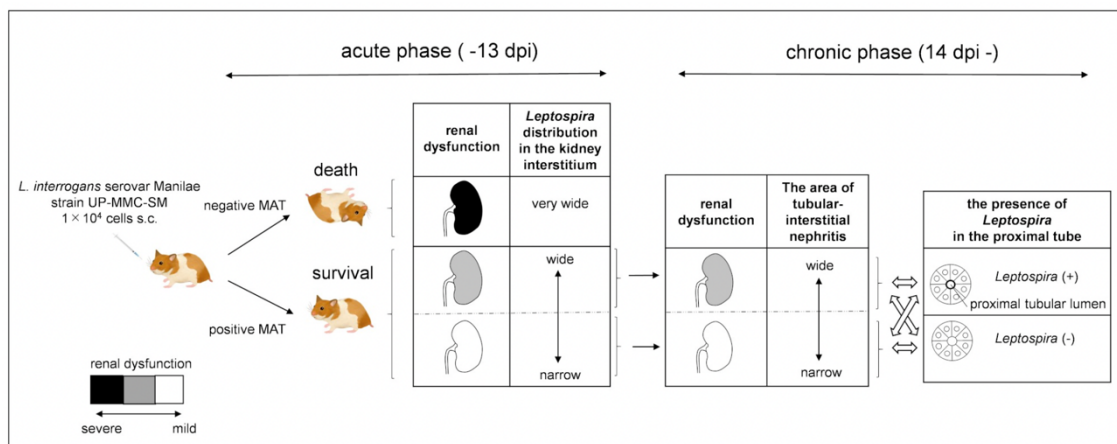


図3 レプトスピラ感染による腎障害と菌体の分布の関係

(6) 重症型モデルにおける消化管病変と便中への生菌の排泄

重症型モデルで瀕死を示した個体では、肉眼的に空腸、回腸が顕著な発赤を示した。同部位は組織学的に、粘膜下の出血を示したが、好中球浸潤は確認されず、活動性炎症の所見は乏しかった。腸管内容物に血便や下痢は見られず、結腸内では有形便が確認された。レプトスピラの生菌が空腸～結腸壁組織、内容物、便から分離された。免疫蛍光染色で菌体を標識すると、粘膜下組織から上皮に向かって菌が侵入し、上皮細胞間を通過して内腔側に出ていく所見が認められた。

このようなレプトスピラの消化管病変については過去に報告がなく、レプトスピラ症患者で見られる腹痛等の消化器症状の病態を説明する現象である可能性がある。また、これまで保菌動物から排泄される尿が主な感染源と考えられていたが、今回の結果から便も感染源となりうるということがわかり、保菌動物の便に対する感染対策が必要と考えられた。

なお、(6)の内容は、Microbial Pathogenesis 誌に投稿し、掲載された(Inamasu Y, Nikaido Y, Miyahara S, Maruoka T, Takigawa T, Ogawa M, Nakayama T, Harada M, Saito M. Dissemination of *Leptospira* into the intestinal tract resulting in fecal excretion in a hamster model of subcutaneous infection with *Leptospira interrogans*. Microb Pathog. 2022 Apr;165:105481.)。

(7) 軽症型と重症型を分ける菌体因子の解析

病態の違いをもたらす菌体の因子について、培養期間が長くなるに従って、軽症型を示す個体の割合が増加することが示された。まず短期培養株と長期培養株で、培地中での増殖速度およびコロニーの形態等の in vitro での表現型を検討した。検証した範囲において、2株に有意な差は見られず、in vivo での病原性の違いが病態の違いに関与すると考えられた。次に、in vivo での病原性を分ける因子が菌体内に存在するか、菌体外に存在するか調べるため、短期培養株と長期培養株をそれぞれ培養上清、十分に洗浄した菌体のみに分けて、異なる組み合わせで接種する実験を行った。結果として、長期培養株を十分に洗浄してから接種すると重症型の病態を示すこと、また短期培養株を長期培養株の培養上清とともに接種すると軽症型の病態を示す現象が確認された。この結果から、培養期間の違いでもたらされる菌体外成分の違いが病態を決める可能性が示唆された。これは重症化をもたらす因子の解明のための重要な知見であり、今後も解析を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Inamasu Yoshinori, Nikaido Yasuhiko, Miyahara Satoshi, Maruoka Tsukasa, Takigawa Tomoya, Ogawa Midori, Nakayama Toshiyuki, Harada Masaru, Saito Mitsumasa	4. 巻 165
2. 論文標題 Dissemination of Leptospira into the intestinal tract resulting in fecal excretion in a hamster model of subcutaneous infection with Leptospira interrogans	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbial Pathogenesis	6. 最初と最後の頁 105481 ~ 105481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micpath.2022.105481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maruoka Tsukasa, Nikaido Yasuhiko, Miyahara Satoshi, Katafuchi Eisuke, Inamasu Yoshinori, Ogawa Midori, Fukuda Kazumasa, Nakayama Toshiyuki, Horishita Takafumi, Saito Mitsumasa	4. 巻 15
2. 論文標題 Correlation between renal distribution of leptospires during the acute phase and chronic renal dysfunction in a hamster model of infection with Leptospira interrogans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 e0009410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pntd.0009410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Oyamada Yuji, Ozuru Ryo, Masuzawa Toshiyuki, Miyahara Satoshi, Nikaido Yasuhiko, Obata Fumiko, Saito Mitsumasa, Villanueva Sharon Yvette Angelina M., Fujii Jun	4. 巻 16
2. 論文標題 A machine learning model of microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0259907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0259907	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Honda Yuto, Ichikawa Ryosuke, Choi Yong Joon, Murakami Kensuke, Takahashi Kazuhiro, Noda Toshihiko, Sawada Kazuaki, Ishii Hiromu, Machida Katsuyuki, Ito Hiroyuki, Miyahara Satoshi, Nikaido Yasuhiko, Saito Mitsumasa	4. 巻 61
2. 論文標題 Detection system for Legionella bacteria using photogate-type optical sensor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 SD1010 ~ SD1010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ac5a25	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 丸岡司, 宮原敏, 福田和正, 小川みどり, 齋藤光正
2. 発表標題 ハムスターモデルにおけるレプトスピラ症と慢性腎機能低下の関係性
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾鶴亮, 小山田雄仁, 増澤俊幸, 宮原敏, 二階堂靖彦, 齋藤光正, Sharon Y. A. M. Villanueva, 藤井潤
2. 発表標題 細菌検査を自動化するーレプトスピラ症の顕微鏡下業種試験(Microscopic Agglutination test; MAT) を例に
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻高寛, 小幡史子, 尾鶴亮, 宮原敏, 齋藤光正, 藤井潤
2. 発表標題 免疫不全マウスを用いた新たな劇症型溶血性レンサ球菌感染症マウスモデルの開発
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲益良紀, 二階堂靖彦, 宮原敏, 丸岡司, 瀧川友哉, 小川みどり, 福田和正, 齋藤光正
2. 発表標題 レプトスピラ感染ハムスターモデルでの糞便排出を伴った消化管の解析
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuto Honda, Yong-Joon Choi, Kensuke Murakami, Kazuhiro Takahashi, Toshihiko Noda, Kazuaki Sawada, Hiromu Ishii, Katsuyuki Machida, Hiroyuki Ito, Satoshi Miyahara, Yasuhiko Nikaïdo and Mitsumasa Saito
2. 発表標題 Detection system of bacteria, Legionella by photogate type optical sensor
3. 学会等名 34th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関