

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 26 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460557

研究課題名(和文) 病原性の異なるレプトスピラの比較解析によるレプトスピラ症重症化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Comparative analysis on two *Leptospira interrogans* strains which exhibit different severity to humans

研究代表者

小泉 信夫 (Koizumi, Nobuo)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：10333361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：レプトスピラ症の重症化メカニズムを明らかにするために、シリアンハムスターに対して異なる病原性を示す *Leptospira interrogans* 2株を用いた感染実験を行った。感染96時間後に強毒株接種群で尿細管の崩壊および肺出血が顕著に認められた。また肝臓において強毒株接種群の菌DNA量が有意に多かった。さらに血液、肝臓および肺臓において、強毒株接種群で複数のサイトカイン遺伝子発現が有意に上昇していた。以上の結果から、強毒株は、ハムスター肝臓を増殖の場とし、弱毒株にはない特有の臓器障害因子およびサイトカイン誘導因子を有する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism underlying the difference in virulence of the various *Leptospira* strains, experimental infections of hamsters with strains of two *L. interrogans* serovars *Manilae* (highly virulent: HV) and *Hebdomadis* (less virulent: LV) were performed. Severe disruption of renal tubules in kidney tissues and hemorrhage in lung tissues were observed in HV-infected hamsters. A significantly higher bacterial burden was observed in liver tissues of hamsters infected with HV than those infected with LV. The expression levels of multiple cytokine genes in blood, liver, and lung tissue were also significantly higher in hamsters infected with HV than those infected with LV. These results demonstrate that HV multiplied more efficiently in liver tissues and induced significantly higher expression of genes encoding pro- and anti-inflammatory cytokines than LV. In addition, our results suggest a HV-specific mechanism responsible for inducing severe damage in kidneys and hemorrhage in lung.

研究分野：細菌学

キーワード：レプトスピラ レプトスピラ症 病原性

1. 研究開始当初の背景

レプトスピラ症は、スピロヘータの1種である病原性レプトスピラによって引き起こされる人獣共通感染症である。発症者の大部分は、インフルエンザ様症状で軽快する軽症型である。一方で5~10%の患者は、黄疸・出血・腎不全を伴う重症型に発展する。

レプトスピラ症の重症化には、特定のタイプ(血清型)のレプトスピラが関与すると考えられている。またレプトスピラ症患者では、予後の悪化と血中レプトスピラ数との関連、症状の重篤度とTNF- α などの炎症性サイトカイン濃度との関連が報告されている。しかしながら、レプトスピラ血清型による宿主体内での動態の差異、またサイトカイン誘導とそれに伴うサイトカインストームの状態の違いはこれまで明らかになっていない。また、ハムスターに対して致死感染できるレプトスピラ株とその病原性を失った株をハムスターに接種し、血液細胞のサイトカイン遺伝子発現を比較した報告はあるものの、ハムスターに感染することができ、病原性が異なるレプトスピラのハムスター体内での動態、感染組織病理あるいはサイトカイン発現誘導能の比較を行った報告はない。

2. 研究の目的

レプトスピラ症重症化のメカニズムを総合的に解明することを目的として、ハムスターに対して致死性を示す *L. interrogans* 血清型 Manilae (株名 UP-MMC-NIID, 強毒株) と、致死性を示さない *L. interrogans* 血清型 Hebdomadis (株名 OP84, 弱毒株) を用いてハムスター感染実験を行い、感染ハムスター血液・組織中での動態、感染ハムスターの組織病理、および各組織でのサイトカイン・ケモカイン遺伝子発現プロファイルの比較を行う。またヒトでみられるレプトスピラに対する感受性の性差のメカニズムを明らかにするため、弱毒株を感染させたハムスター雌雄での比較を行う。また弱毒株の完全長ゲノム配列を決定し、強毒株との比較解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 感染実験

強毒株あるいは弱毒株 1×10^6 細胞を6週齢メスのシリアンハムスターの腹腔に接種した。感受性性差の実験では、弱毒株 1×10^6 細胞を6週齢のシリアンハムスター雌雄の腹腔に接種した。継時的実験では、接種12, 24, 48, 72, 96時間後に対照群、強毒株接種群、弱毒株接種群3匹ずつ解剖を行った。その後の感染96時間後の比較実験では、対照群3匹、強毒株および弱毒株接種群各8匹(強毒株接種群の1匹においては接種時に不備があったため実験は7匹で行った)を使用した。性差解析実験では、雌雄各3匹のハムスターを120時間後に解剖した。腎臓、肝臓および肺臓はパラフィン包埋切片を作製し、ヘマト

キシリン・エオシン染色を行った。

(2) リアルタイム PCR によるハムスターサイトカイン遺伝子の発現解析

感染組織からの RNA 抽出は、RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) または Protected Animal Blood Tubes (Qiagen) を用いて行った。cDNA への逆転写反応は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡) を用い、 $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ に調整した。ribosomal protein 118 を内在性コントロール遺伝子として、サイトカイン 12 遺伝子の発現をリアルタイム PCR による Ct 法あるいは検量線法より解析した。PCR には、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用い、反応は Light Cycler Nano (Roche) を、結果の解析は Light Cycler Nano Software 1.1 を用いて行った。PCR の条件およびプライマー配列は Fujita らの方法 (PLoS ONE 10(7):e0132694) の通りである。結果はマン・ホイットニーの U 検定により統計解析を行った。

(3) 感染組織中のレプトスピラ DNA 定量

感染組織からの DNA 抽出は、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて行った。レプトスピラ鞭毛遺伝子 *flaB* をターゲットとして、リアルタイム PCR による検量線法により各組織中のレプトスピラ DNA 量を定量した。コントロールには *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* を用いた。

(4) Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) 法

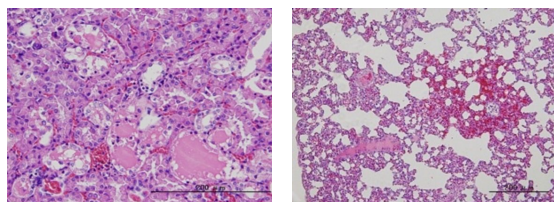
ハムスターのケモカイン遺伝子 *cc12*, *cxcl1*, *cxcl2*, *cxcl3* の完全長 cDNA を RACE 法により決定した。それぞれの遺伝子について、チャイニーズハムスター、マウス、ラットの配列の相動性が高い領域からプライマーを設計した。強毒株感染ハムスター肝臓由来 cDNA を鋳型とし、PCR および、3'-Full RACE Core Set および 5'-Full RACE Core Set (TaKaRa) を用いた 3' および 5' RACE 法により各遺伝子の完全長 cDNA を取得した。

4. 研究成果

(1) レプトスピラ DNA 量およびサイトカイン遺伝子発現量の継時的変化

強毒株接種ハムスターが死亡する前の接種後 96 時間までの強毒株、弱毒株接種ハムスターにおけるレプトスピラ DNA 量およびサイトカイン遺伝子発現誘導について継時的に比較を行った。強毒株、弱毒株感染ハムスターのいずれにおいても、血液、肝臓では感染後 48 時間から、腎臓、肺臓では感染後 96 時間でのみレプトスピラ DNA が検出された。サイトカイン遺伝子発現では、腎臓および肝臓での *inos*、血液、腎臓および肺臓での *ifngamma*、全組織での *il2*, *il4* を除いて、感染によりサイトカイン遺伝子発現の上昇が認められ、発現量は感染 96 時間後に最大

となった。組織病理では、感染 96 時間後の腎臓で尿管の崩壊が、また肺臓での出血が強毒株接種ハムスターで顕著に認められた(図)。



強毒株感染 96 時間後の腎臓(左)および肺臓(右)の HE 染色像

(2) 強毒株, 弱毒株感染 96 時間後のレプトスピラ DNA 量およびサイトカイン遺伝子発現量の比較

腎臓, 肺臓では感染後 96 時間のみレプトスピラ DNA が検出されること, またサイトカイン遺伝子発現量は感染後 96 時間で最大となることから, 供試匹数を増やして感染 96 時間後の比較を行った。強毒株接種群の肝臓におけるレプトスピラ DNA 量は, 弱毒株接種群に比べて有意に多かった。他の組織ではレプトスピラ DNA 量の差が認められなかった。また強毒株, 弱毒株両接種群において, 全ての組織で炎症性および抗炎症性サイトカイン遺伝子の発現量増加が見られた。血液中における *mip1alpha*, 肝臓における *tgfbeta*, *il1beta*, *mip1alpha*, *il10*, *tnfalpha*, *cox2* および肺臓における *tgfbeta*, *il6*, *inos*, *tnfalpha*, *cox2* については強毒株接種群で有意に遺伝子発現が上昇していた。

以上の結果から, *L. interrogans* 強毒株 UP-MMC-NIID は, シリアンハムスター肝臓を増殖の場とし, 弱毒株にはない腎臓, 肺臓を障害, またサイトカインを誘導する特有の病原因子を有する可能性が考えられた。

(3) シリアンハムスター *ccl2*, *cxc11*, *cxc12*, *cxc13* 遺伝子の cDNA 配列の決定

チャイニーズハムスター, マウス, ラットの *ccl2*, *cxc11*, *cxc12*, *cxc13* 遺伝子の相同部位からプライマーを設計し, degenerate PCR を行った後, 3' RACE 法および 5' RACE 法により, シリアンハムスターの各ケモカイン遺伝子の完全長 cDNA 配列を決定した。シリアンハムスターの各ケモカイン遺伝子の推定アミノ酸配列とチャイニーズハムスター, マウス, ラットとの相同性を表に示した。

表. シリアンハムスター CCL2, CXCL1, CXCL2 および CXCL3 の他の動物種とのアミノ酸相同性 (%)

ケモカイン	動物種		
	チャイニーズハムスター	マウス	ラット
CCL2	86	62	64
CXCL1	94	83	83

CXCL2	93	80	78
CXCL3	84	72	73

ccl2, *cxc12* はすべての組織で発現が認められたが, *cxc11* は腎臓, 肝臓, 肺臓で, *cxc13* は肺臓でのみ発現が認められた。またこれらの遺伝子は, レプトスピラの感染によって発現量が増加した。

(4) レプトスピラ感受性性差の解析

組織病理解析では, オス 3 個体中 2 個体の肺臓で出血がみられたが, メスでは肺出血はみられなかった。腎臓では皮質に病変がみられたが, 雌雄間の差はみられなかった。肝臓では雌雄ともに顕著な病変はみられなかった。レプトスピラは雌雄とも腎臓でのみ検出されたが, 検出 DNA 量に差はみられなかった。サイトカイン 12 遺伝子のうち, メスの腎臓で *tgfbeta*, *cox2* の発現が有意に上昇していた。血清の黄疸は雌雄ともにみられた。ヒトでは腎障害, 黄疸, および肺, 胃, 結膜下, 皮膚または粘膜の出血が男性で多くみられる。ハムスターではオスの肺臓で出血がみられたが, サイトカイン発現量や菌数に雌雄差はみとめられなかった。今後, 経時的な感染実験による菌数およびサイトカイン発現量の比較や, 本研究で調査した以外のサイトカインの発現量の比較を行い, 肺出血の原因を明らかにする必要がある。

(5) *L. interrogans* OP84 株のゲノム解析

1 分子リアルタイムシーケンシング法により OP84 株の完全長ゲノム配列決定を行い, 現在先に決定した強毒株との比較解析を行っている。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Fujita R, Koizumi N, Sugiyama H, Tomizawa R, Sato R, Ohnishi M. Comparison of bacterial burden and cytokine gene expression in golden hamsters in early phase of infection with two different strains of *Leptospira interrogans*. PLoS ONE 10(7): e0132694. doi:10.1371/journal.pone.0132694, 2015. 査読有

[学会発表](計 5 件)

1. 藤田理恵, 小泉信夫, 杉山広, 大西真. Comparison of cytokine gene expression in hamsters infected with two *Leptospira interrogans* strains. 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 26 日~28 日, 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)。
2. 藤田理恵, 小泉信夫, 杉山広, 佐藤令一,

大西真．病原性の異なるレプトスピラを感染させたハムスターの比較解析．第 51 回レプトスピラシンポジウム，2014 年 3 月 29 日，国立感染症研究所（東京都新宿区）．

3. 藤田理恵，小泉信夫，杉山広，大西真．Comparison of virulence between two *Leptospira* strains using a hamster model of leptospirosis. 第 87 回日本細菌学会総会，2014 年 3 月 26 日～28 日，タワーホール船堀（東京都江戸川区）．

4. 小泉信夫．スリランカ・フィリピンにおけるレプトスピラ症の現状．第 87 回日本細菌学会総会，2014 年 3 月 26 日～28 日，タワーホール船堀（東京都江戸川区）．

5. Fujita R, Koizumi N, Sugiyama H, Sato R, Ohnishi M. Comparison of virulence between two *Leptospira interrogans* strains using a hamster model of leptospirosis. 8th Meeting of the International Leptospirosis Society, 2013 年 10 月 8 日～13 日，九州大学医学部百年講堂（福岡県福岡市）．

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 信夫 (Nobuo Koizumi)
国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官
研究者番号：10333361

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

杉山 広 (Hiromu Sugiyama)
国立感染症研究所・寄生動物部・室長
研究者番号：00145822

(4) 協力研究者

藤田 理恵 (Rie Fujita)
富澤 莉那 (Rina Tomizawa)
佐藤 万仁 (Kazuhito Satou)