

モルモットを用いたヨーネ菌実験感染系の確立と宿主の免疫学的・病理組織学的特性

永田礼子¹⁾, 山田 学²⁾, 吉原一浩¹⁾, 西森 敬¹⁾,
百溪英一¹⁾, 田中省吾³⁾, 森 康行¹⁾

(平成 21 年 7 月 29 日 受付)

Immunological and pathological analyses of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in guinea pigs

Reiko NAGATA¹⁾, Manabu YAMADA²⁾, Kazuhiro YOSHIHARA¹⁾, Kei NISHIMORI¹⁾,
Eiichi MOMOTANI¹⁾, Shogo TANAKA³⁾ & Yasuyuki MORI¹⁾

牛を用いたヨーネ菌実験感染は本来の宿主における免疫応答や病態の解明に必須であるが、長い潜伏期間のため研究遂行には長時間を必要とする。そこで、適切な実験小動物を用いたヨーネ菌の実験感染系の確立と、その実験系を用いた本菌の感染・排菌機構、本菌に対する宿主免疫応答の解析を試みた。抗酸菌をモルモット腹腔内接種すると 1 日以内に菌は十二指腸に集まり、接種 1 日後から排菌が認められ、菌の動態を組織学的に立証することができた。また、ヨーネ菌腹腔内接種 2 か月後のモルモット十二指腸は肥厚しており、粘膜固有層に顕著な炎症性細胞浸潤が認められ、肉芽腫性病変の形成も確認された。さらに、ヨーネ菌接種モルモットの十二指腸における発現遺伝子について DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析したところ、Regenerating islet-derived 3 gamma などいくつかのヨーネ菌感染に対する宿主病変で特徴的に発現亢進及び低下している遺伝子がみつかった。このように、ヨーネ菌感染の特徴を示唆する病理組織学的、細菌学的、分子生物学的所見が得られ、個体レベルでの発病機構解明に繋がることが期待される。

はじめに

鳥型結核菌の一亜種である *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (ヨーネ菌) の経口感染によるヨーネ病は反芻獣の慢性消化器感染症である。牛のヨーネ病は法定伝染病の中でも現在最も発生数が多く、年間約 800 頭以上が摘発淘汰されている。ヨーネ病は潜伏期間が長く、無症状にもかかわらず排菌する個体も多く、増体率の低下や搾乳量の低下等による経済的損失は極めて大きい。しかし、本病の感染・発症機構に関しては不明な点が多く、ヨーネ菌抗原に対する宿主免疫応答は僅かな知見しか得られていないのが現状である。牛を用いたヨーネ菌実験感染は本来の宿主における免疫応答や病態の解明には必須であるが、牛における本病の潜伏期間

-
- 1) 動物衛生研究所 ヨーネ病研究チーム
〒 305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5
 - 2) 動物衛生研究所 ウイルス病研究チーム
〒 305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5
 - 3) 動物衛生研究所 ヨーネ病研究チーム (九州支所)
〒 891-0105 鹿児島県鹿児島市中山町 2702

* Corresponding author ; Reiko NAGATA

Research team for Paratuberculosis, National Institute
of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki
305-0856, JAPAN
Tel : 029-838-7857
Fax : 029-838-7857
E-mail : kikuma@affrc.go.jp

は6か月から数年であり, 研究遂行には長時間を必要とする。そこで, 牛に代わる適切な実験小動物を用いたヨーネ菌の実験感染系の確立と, その実験系を用いた本菌の感染・免疫機構の個体レベルでの詳細な解析はヨーネ病の発病機構の解明の観点から有用な研究戦略と考えられる。これまで, 実験小動物としてマウス・ラットが用いられることが多かったが, 我々は様々な抗酸菌をモルモットの腹腔内に接種したところ, 菌接種1-2日後から糞便中に大量に排菌される現象を見出した。そこで, モルモットを用いたヨーネ菌の実験感染系を確立し, ヨーネ菌の感染・排菌機構, 発病機構, 並びに本菌に対する宿主免疫応答の解析を試みた。さらに, ヨーネ菌以外の抗酸菌をモルモットに接種した時の宿主反応や免疫応答をヨーネ菌感染時のそれらと比較解析することにより, ヨーネ菌感染の特徴を明らかにした。

方 法

1) 接種菌の体内動態を探るため, 蛍光色素 Calcein-AM で染色したヨーネ菌及び鳥型結核菌の生菌, あるいは Propidium iodide (PI) で染色した死菌を 10^8 CFU/匹, 8週齢モルモット3匹ずつ腹腔内接種1日後剖検し, 腸管を十二指腸から約15cm間隔で10箇所採材し, 凍結切片上の蛍光発色菌を確認する蛍光顕微鏡検査, 病理組

織学的検査, 抗酸菌共通遺伝子 *hsp65* をターゲットとした遺伝子検査, 及び菌分離培養を行った。

2) ヨーネ菌を 10^8 CFU/匹, 4週齢モルモット3匹ずつ腹腔内接種2か月後に剖検し, 腸管材料の病理学的検査, 遺伝子検査, 菌分離を行った。病変の強い接種2か月後の十二指腸について電子顕微鏡観察を実施した。

3) ヨーネ菌以外の抗酸菌 (*Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. bovis* BCG) によるモルモット接種試験を実施し, ヨーネ菌接種時と比較検討した。

4) ヨーネ菌を腹腔内接種2か月後及び菌未接種のモルモット腸管での遺伝子発現をモルモット遺伝子マイクロアレイにより網羅的に解析した。

結 果

1) 腹腔内接種1日後の体内動態

ヨーネ菌をモルモット腹腔内に接種1日後, ヨーネ菌接種群は菌非接種群と比較して, 十二指腸の粘膜固有層にリンパ球や単球の著しい浸潤による肥厚が認められた(写真1)。腸管10箇所における菌分離及び遺伝子検査では, 十二指腸において最も多く, 結腸末端部及び直腸でも菌が検出された(図1)。凍結切片上では, 腸管のうち特に十二指腸に蛍光染色された生菌が多数認められた(写真2)。これらと比較して空腸や回腸での菌量及び菌検出頻度は低い傾向であった。腸管において検出された菌は生菌接種群の方が死菌接種群より有意に多かった。また,

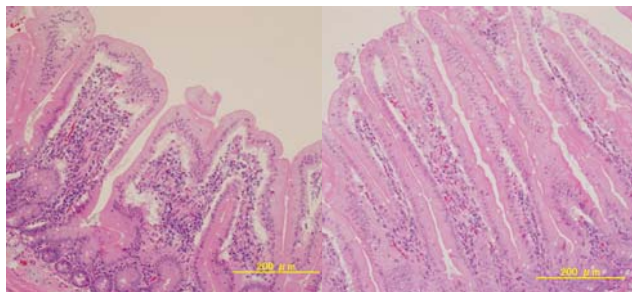


写真1. モルモット十二指腸 HE染色 Bar=200 μ m
左: 抗酸菌接種(粘膜固有層の細胞浸潤による肥厚)
右: 菌非接種

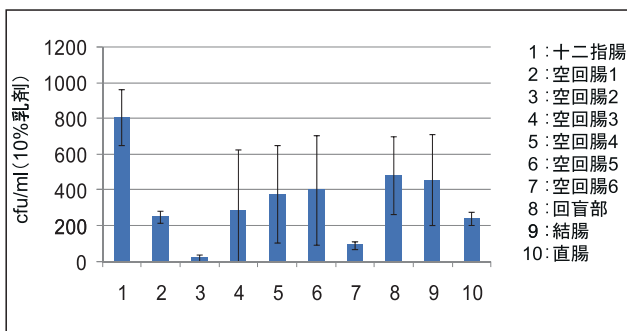


図1. ヨーネ菌接種モルモット腸管における生菌数

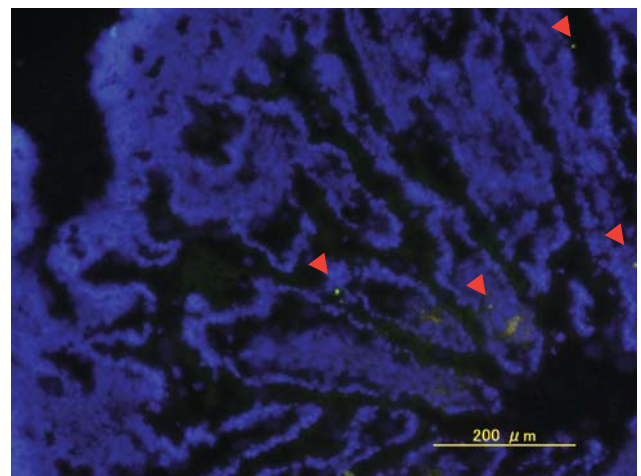


写真2. 十二指腸の凍結切片を用いた蛍光顕微鏡観察像 DAPI染色 Bar=200 μ m
矢印: 蛍光発色ヨーネ菌
左上側: 漿膜側 右下側: 粘膜側
DAPI染色で細胞核が青く染まり, 粘膜固有層に蛍光発色したヨーネ菌が認められた。

鳥型結核菌はヨーネ菌に比べて有意に多い菌数が分離培養された。

2) 腹腔内接種 2 か月後の病態

臓器の菌量及び菌検出頻度は低下し、接種 2 か月後にはほとんど菌は検出されなくなった。接種 2 か月後の病理学的検査の結果、好酸球、形質細胞、マクロファージなど炎症性細胞浸潤の顕著な十二指腸粘膜固有層に、複数の細胞が融合した合胞体巨細胞や多核細胞も認められ、肉芽腫性病変を形成していた (写真 3)。

3) ヨーネ菌以外の抗酸菌接種による病態との比較

接種 1 日後、十二指腸で高頻度に菌分離・検出されることは共通であったが、ヨーネ菌接種群は抗酸菌接種群の中で検出される菌量が少ない傾向にあった (図 2)。

一方、接種 2 か月後では、ヨーネ菌接種群において最も腸管粘膜の肥厚が顕著に認められた。腸管粘膜固有層の病理学的病変を比較すると、ヨーネ菌と鳥型結核菌 (*M. avium* subsp. *avium*) 接種群で、粘膜固有層の炎症性細胞浸潤による腸管肥厚は十二指腸から回盲部まで強いが、それ以外の抗酸菌接種群 (*M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. bovis* BCG) では、十二指腸に局限していた。

4) 腹腔内接種 2 か月後の十二指腸における発現遺伝子の解析

DNA マイクロアレイを用いて、最も病変の強い十二指腸における遺伝子発現解析の結果、ヨーネ菌接

種と菌非接種のモルモット十二指腸を比較すると、全 15,679 遺伝子のうち、シグナルの比率が 8 倍以上の亢進は 2 遺伝子 (Regenerating islet-derived 3 gamma, Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase6)、低下は 2 遺伝子 (Prostate stem cell antigen precursor, Cathepsin E precursor (EC 3.4.23.34))、4 倍以上の亢進は 17 遺伝子、低下は 11 遺伝子あり、中にはケモカインの遺伝子も含まれていた。

考 察

マウス、ラット、ウサギなど小動物を用いたヨーネ菌感染実験は多数報告されているが、免疫応答が牛とは異なる点も指摘されている。今回用いたモルモットは、結核感染に対して高い感受性を示すこと、病理組織がヒトのそれと類似することからヒト結核のモデル小動物として長年に渡り利用されてきた¹⁾。さらに我々は、ヨーネ菌接種モルモットは、ヨーネ菌抗原刺激により、サイトカインのうちインターロイキン 10 の産生が特異的である実験データを得ている⁴⁾。インターロイキン 10 は、鳥型結核菌と比べてヨーネ菌感染では発現が増強すると言われている⁷⁾。今回、モルモット腹腔内に接種された抗酸菌は 1 日以内に腸管、特に十二指腸で多数検出され、十二指腸に集まる菌の動態を組織学的に立証することができた。牛の腹腔内接種試験においても、経口感染よりかなり早期に排菌してくるという実験データがある⁶⁾。しかし、腹腔に入った菌の大部分は、まず腹腔マクロファージにより大網でトラップされるが、菌がどのよう

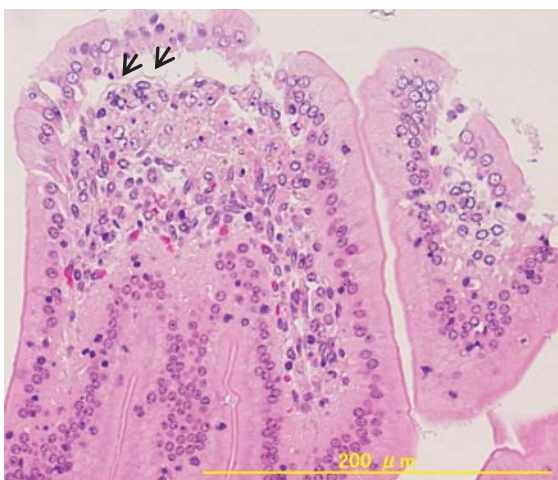


写真 3. 十二指腸粘膜固有層における肉芽腫性病変 HE 染色 Bar=200 μm
マクロファージや形質細胞の集簇と多核巨細胞 (矢印) が認められた。

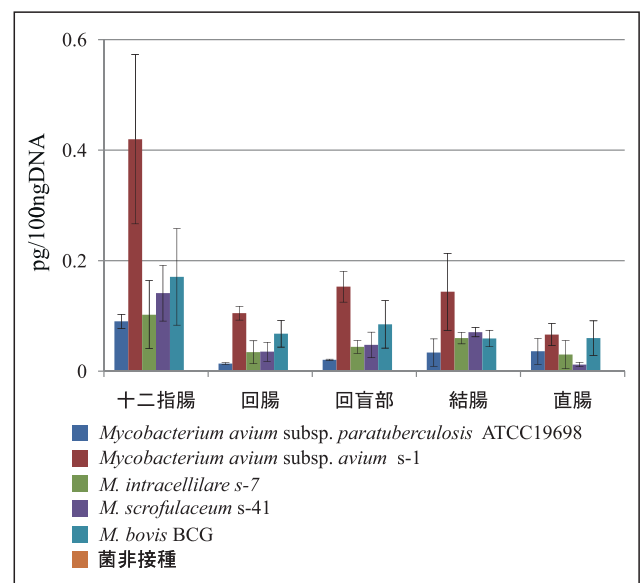


図 2. 各種抗酸菌接種モルモット腸管臓器の抗酸菌 DNA 量比較

にして腸管まで到達するかは知られていない。十二指腸に菌が多数検出されたことは、腹腔内への菌接種により、腹腔マクロファージが接種菌を貪食後、脈管系を通して十二指腸、あるいは結腸や直腸に移動した可能性も否定できない。以上から、腹腔内に接種された抗酸菌は短時間の中に腸管の上端及び下端に運ばれ、それらの部位から体外へ排菌される可能性が示唆された。ヨーネ菌と他の抗酸菌、生菌と死菌で排菌量に差が認められたが、マクロファージによる抗酸菌の貪食機構や腸管からの排菌機構について今後さらに解析する必要がある。

抗酸菌の腹腔内接種により短時間で十二指腸に炎症反応が惹起され、組織に菌が認められなくなった接種2か月後でも、炎症反応は継続していた。十二指腸粘膜固有層の炎症性細胞浸潤は、*M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* 及び *M. bovis* BCG 接種群において、十二指腸に限局していた。これに対し、ヨーネ菌接種群及び遺伝子レベルでヨーネ菌と極めて高い相同性を有する鳥型結核菌接種群において、十二指腸のみならず空回腸にもその細胞浸潤は認められた。また、小腸粘膜固有層の肥厚はヨーネ菌接種群で最も顕著であった。これらの現象は各抗酸菌種の共通のあるいは異なる感染性、抗原性、免疫原性によって誘起される宿主応答と考えられる。

またヨーネ菌腹腔内接種2か月後には、病変の顕著な十二指腸粘膜固有層に肉芽腫性病変が形成されており、腸管の病変形成部位が牛ヨーネ病と異なるのは、動物種あるいは接種方法によるものと思われる。

さらに、ヨーネ菌感染による宿主免疫応答の特徴を詳細に調べるため、DNA マイクロアレイを用いて十二指腸における遺伝子発現を網羅的に調べた結果、ヨーネ菌接種十二指腸で特徴的に発現が亢進あるいは低下している遺伝子の候補が見つかった。近年、DNA マイクロアレイを用いたヨーネ菌遺伝子及び宿主側遺伝子の発現解析が進められている。様々な感染動物種から分離された鳥型結核菌群の遺伝子発現解析の報告⁵⁾や、ヨーネ菌感染マクロファージの遺伝子発現³⁾やヨーネ菌感染牛腸管におけるサイトカインプロファイルなどの報告²⁾はいくつかあるが、ヨーネ菌感染機構を特徴づける宿主の遺伝子に関する知見は乏しい。今回、感染宿主病変において全遺伝子を網羅的に解析することで、新たな宿主側の病原性や菌の生存に関係する分子や、病態形成に必須の役割を担う分子などが同定される可能性がある。

謝 辞

本研究は、平成19～20年度動物衛生研究所・重点強

化研究の助成を受けて実施した。

引用文献

- 1) Balasubramanian, V., Wiegshaus, E.H., Smith, D.W.: Mycobacterial infection in guinea pigs. *Immunobiol.* 191, 395-401(1994).
- 2) Coussens, P.M., Verman, N., Coussens, M.A., Elftman, M.D., McNulty, A.M.: Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infect. Immun.* 72, 1409-1422 (2004).
- 3) Murphy, J.T., Sommer, S., Kabara, E.A., Verman, N., Kuelbs, M.A., Saama, P., Halgren, R., Coussens, P.M.: Gene expression profiling of monocyte-derived macrophages following infection with *Mycobacterium avium* subspecies *avium* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Physiol. Genomics.* 28, 67-75 (2006).
- 4) Nagata, R., Kawaji, S., Minakawa, Y., Wang, X., Yanaka, T., Mori, Y.: A specific induction of interleukin-10 by the Map41 recombinant PPE antigen of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (in press)
- 5) Paustian, M.L., Zhu, X., Sreevatsan, S., Robbe-Austerman, S., Kapur, V., Bannantine, J.P.: Comparative genomic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies obtained from multiple host species. *BMC Genomics.* 9, 135(2008).
- 6) Stabel, J.R., Palmer, M.V., Harris, B., Plattner, B., Hostetter, J., Robbe-Austerman S.: Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in neonatal calves after oral or intraperitoneal experimental infection. *Vet. Microb.* 136, 306-313(2009).
- 7) Weiss, D.J., Evanson, O.A., Moritz, A., Deng, M.Q., Abrahamsen, M.S.: Differential response of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infect. Immun.* 70, 5556-5561(2002).

Summary

Immunological and pathological analyses of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in guinea pigs

Reiko NAGATA¹⁾, Manabu YAMADA²⁾, Kazuhiro YOSHIHARA¹⁾, Kei NISHIMORI¹⁾,
Eiichi MOMOTANI¹⁾, Shogo TANAKA³⁾ & Yasuyuki MORI¹⁾

The aims of this study are to establish a small animal model for the study of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) infection, and to elucidate the mechanism of infection and fecal shedding of MAP, instead of a time consuming bovine experimental model. Guinea pigs were inoculated intraperitoneally with different species or subspecies of mycobacterium in order to characterize MAP infection. We have found that the inoculated organisms aggregate in the duodenum, and are excreted into feces within 24 hours after inoculation. Because it has been reported that the aggregation of macrophages in the tip of intestinal villi of guinea pigs, the macrophages ingested organisms seems to be involved in this *in vivo* dynamics of inoculated mycobacterium. Furthermore, thickening of the duodenum caused by infiltration with marked inflammatory cells and granulomas in the lamina propria mucosa have been observed after two months in guinea pig infected with MAP. Besides, exhaustive analysis of differentially expressed genes in the duodenum from infected and non-infected guinea pigs was performed by DNA microarray, and found Regenerating islet-derived 3 gamma which is one of the unique host gene expression characteristic for MAP infection. These histopathological, bacteriological and molecular biological results may be useful for understanding mycobacterium infections including MAP.