

# インフルエンザウイルス感染による二次性細菌性肺炎の発症機序解明に向けた

## 一細胞生体イメージング技術の開発

中村 勇紀 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 川口 敦史 (筑波大学 医学医療系)

### 【背景・目的】

日本では、季節性インフルエンザは冬季に流行し、毎年1千万人を超える感染者がみられる。季節性インフルエンザによる重症例では重篤な肺炎を引き起こし、その原因として、ウイルス性肺炎だけでなく、呼吸器の常在細菌による二次性細菌性肺炎が大きな割合を占め、公衆衛生上の大きな問題となっている。インフルエンザに続発する細菌性肺炎の原因菌として最も多いのが *Streptococcus pneumoniae* (以下、肺炎球菌) である。肺炎球菌はヒトの上気道に常在化しており、健康者では病原性を示さない。一方、インフルエンザウイルス感染によって肺炎球菌が下気道に移行することで細菌性肺炎が引き起こされるが、その詳細な発症機構は未だ明らかでない。

二次性細菌性肺炎の発症機構の解明には、肺炎球菌の生体内での動態を高感度に追跡できる実験系の構築が有用である。本研究では、レポーター遺伝子を発現する組換え肺炎球菌を用いて、生体内で非侵襲的にその動態を一細胞レベルで観察できるイメージング技術を開発し、インフルエンザウイルス感染による二次性細菌性肺炎の発症機構を明らかにすることを目的とした。

### 【材料・方法】

#### 1. レポーター遺伝子を搭載した組換え肺炎球菌の作製

レポーター遺伝子には変異型 luciferase 遺伝子である *AkaLuc* を用いた (Iwano, S *et al.*; Science 359, 935-939, 2018)。*AkaLuc* は生体組織への透過性が高い近赤外光を発するため、体内深部からでも高感度にシグナルを検出可能である。肺炎球菌のヒストン様タンパク質をコードする *HlpA* 遺伝子の下流に、肺炎球菌にコード最適化した *AkaLuc*、及びスペクチノマイシン耐性遺伝子である *aad9* を挿入し、*HlpA* プロモーター上流領域と *HlpA* 転写終結点の下流領域をそれぞれ相同組換えのアームとするゲノム組換え用の DNA 断片をオーバーラップ PCR 法により作製した (図 1)。

この DNA を肺炎球菌 EF3030 株に導入し、100 ng/μL スペクチノマイシン含有血液寒天培地上に塗布して一晩嫌気培養した。コロニーを THY 液体培地に植菌して嫌気培養し、基質である *AkaLumine* を添加して *AkaLuc* 活性を測定し、目的の組換え肺炎球菌を単離した。

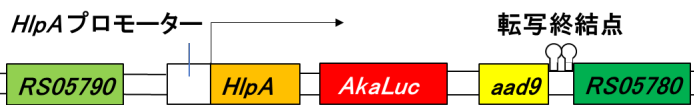


図 1. *AkaLuc* 組換え DNA のコンストラクト

#### 2. マウスへの感染と生体イメージング

組換え肺炎球菌を THY 液体培地で嫌気培養し、菌液 15 μL (1×10<sup>6</sup> cfu 相当) をマウス (C57BL/6J) に経鼻感染した。感染

直後と 24 時間後に *AkaLumine* を投与し、生体マウスにおける *AkaLuc* の発光シグナルを *in vivo* イメージングシステム NEWTON により測定した。

### 【結果】

作製した組換え用 DNA 断片を肺炎球菌にトランスフォーメーションし、スペクチノマイシン含有血液寒天培地でセレクションしたところ、数百個のコロニーが得られた。そのうち、いくつかのコロニーを単離して *AkaLuc* 活性を測定したところ、半数程度のクローンでルシフェラーゼ活性が検出された。

その中で最も高いルシフェラーゼ活性を持つクローンをマウスに感染後、*AkaLumine* を静脈内投与して発光量を測定したところ、感染直後のマウスでは鼻腔、口腔、及び喉頭にシグナルが検出された。肺炎球菌が常在化する感染 24 時間後では、口腔内にはシグナルは検出されず、鼻腔・喉頭に加えて、耳の周辺 (副鼻腔) でシグナルが検出された (図 2)。また、生体マウスでは観察出来なかったが、解剖後の臓器で測定したところ、喉頭でもシグナルが検出された。

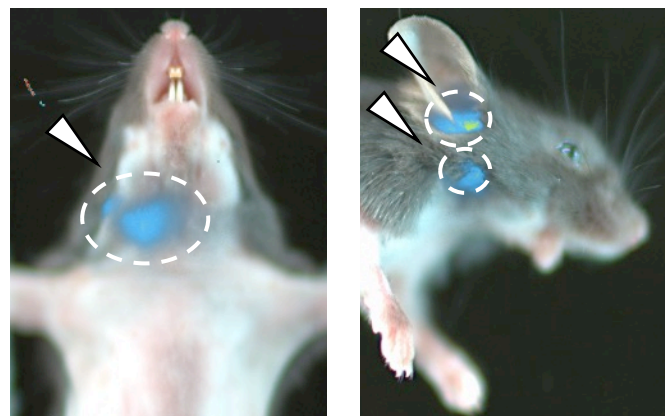


図 2. 感染 24 時間後のマウス体内における肺炎球菌の分布

### 【考察・展望】

感染 24 時間後において、組換え肺炎球菌由来の発光が鼻腔と喉頭に検出されたことから、組換え肺炎球菌でも野生型と同様に常在菌として上気道に定着していると考えられる。また、喉頭でもシグナルが検出されたことから、肺炎球菌は鼻腔だけでなく、喉頭にも定着している可能性が示唆された。今後、さらに検出感度を上げるため、より高い *AkaLuc* 活性をもつ組換え肺炎球菌株をスクリーニングする予定である。また、アルビノ系統のマウスを用いることでも、肺炎球菌の体深部での高感度イメージングを可能にし、インフルエンザウイルスとの重複感染による肺炎球菌の感染臓器特異性や常在細菌叢の変容機構を明らかにする予定である。