

無脊椎動物を用いた革新的な皮膚感染モデルの確立と *in vivo* 薬効評価系の構築

明治薬科大学微生物学研究室

松本 靖彦

Cutibacterium acnes is a causative agent of inflammatory skin diseases such as acne vulgaris. In this study, we established a silkworm infection model to evaluate the host toxicity caused by *C. acnes*, and the efficacy of antibacterial drugs. Silkworms infected with *C. acnes* died when reared at 37°C. The dose of injected bacterial cells required to kill half of the silkworms (LD₅₀) was determined under rearing conditions at 37°C. The viable cell number of *C. acnes* was increased in the hemolymph and fat body of the infected silkworms. The survival time of silkworms injected with *C. acnes* was prolonged by the injection of antibacterial drugs such as tetracycline and clindamycin. Acute melanization, an innate immune response of silkworm, was induced by infection of *C. acnes*, but not by that of *Staphylococcus aureus* that causes a skin disease such as atopic dermatitis. Co-infection of *C. acnes* and *S. aureus* on the skin surface of silkworms led to skin melanization. These findings suggest that the silkworm *C. acnes* infection model can be used to evaluate host toxicity and innate immune response caused by *C. acnes*.

1. 緒言

皮膚は多数の細菌から構成される細菌叢によって健全な皮膚バリア機構を維持している。しかし、バランスを保っている皮膚細菌叢が何らかの原因によって崩壊することで尋常性ざ瘡やアトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患が発症する。*Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) が尋常性ざ瘡の起因菌であると考えられており、これまでにマウスを用いた尋常性ざ瘡の実験モデルが確立されている¹⁾。このような動物を用いた化合物の評価系は化粧品や医薬品の開発に重要である。

哺乳動物を使った動物実験の場合、国際指針である3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) を遵守して研究を遂行しなければならない²⁾。すなわち、多数の哺乳動物を用いて実験を行うことは動物愛護などの倫理的側面から困難になってきており、有効な化合物の探索研究などの基礎研究を行う上で生じる倫理的な問題が今後はもっと深刻になると予想される。

我々は、これらの問題点を克服する方法の一つとして、無脊椎動物であるカイコの利用を提案している。無脊椎動物であるカイコを用いることは、Replacementの中で記載されている下等生物を用いた代替実験手法の確立 (Relative Replacement) のコンセプトと合致している。よって、カイコは哺乳動物を用いた基礎研究を行うことが困

難な化粧品開発において重要な代替動物になると考えられる。一般にカイコなどの無脊椎動物は、哺乳動物と比べて、

- 1) 動物を飼育するためのコストが低い
- 2) 狭いスペースで大量の個体が飼育可能
- 3) 脊椎動物に比べ殺傷に対する倫理的問題が少ない
- 4) 個体サイズが小さく、実験に必要なサンプル量が少ない

などの利点が挙げられる。また、化合物のカイコへの毒性や抗生物質の治療効果は、マウスやラットなどの哺乳動物と類似している^{3,4)}。よって、カイコは、化合物の薬効や毒性に関する研究を行う上で有用な実験動物である⁵⁾。しかし、これまでにカイコを用いた炎症性皮膚疾患モデルは確立されていない。

カイコにおける自然免疫機構の一つに体液のメラニン化反応がある。メラニン化は、細菌や真菌などの外來の異物が体内に侵入すると体液内でメラニンを生成させて、侵入した異物を凝集させる反応である。このカイコにおける体液のメラニン化と Toll 経路を介した免疫応答は同じシグナル伝達経路を介する⁶⁾。よって、カイコにおけるメラニン化反応は、自然免疫誘導の指標となり得る。

本研究で我々は、カイコを用いて *C. acnes* に対する治療薬の薬効を評価できるカイコ感染モデルを確立した。また、カイコの体液のメラニン化を指標とした *C. acnes* の免疫活性化の評価系を構築した。さらに、*C. acnes* と黄色ブドウ球菌の共感染によるカイコの皮膚のメラニン化が誘導される感染実験系を確立した。

2. 方法

2.1. 菌の培養

本研究で我々は、*C. acnes* ATCC6919 株、及び黄色ブドウ球菌 Newman 株を使用した。*C. acnes* ATCC6919 株の培



Development of an *in vivo* drug efficacy evaluation system and a skin infection model using an invertebrate

Yasuhiko Matsumoto

Meiji Pharmaceutical University

養では、菌を GAM 寒天培地に塗布し、嫌気条件、37°C において 3 日培養した。黄色ブドウ球菌 Newman 株の培養では、菌を TSB 寒天培地に塗布し、好気条件、37°C で 1 日培養した。

2.2. カイコ感染実験

カイコの卵は、愛媛蚕種から購入して、消毒後に 25°C で孵化させた。カイコは、Silkmate 2S という抗生物質を含む人工餌を与えられた。5 齢のカイコを実験に用いた。5 齢のカイコに人工餌である Silkmate 2S を 1 日給餌させた。GAM 寒天培地上で生育した *C. acnes* を生理食塩水で懸濁した。*C. acnes* の懸濁液 50 μ L を 1 mL ツベルクリンシリンジを用いてカイコに接種した。*C. acnes* を接種したカイコを 27°C、もしくは 37°C で飼育し、カイコの生存数、もしくは体液中の *C. acnes* の生菌数を測定した。

2.3. カイコの体液のメラニン化試験

人工餌を一晩摂食した 5 齢のカイコに *C. acnes* や黄色ブドウ球菌の菌液を注射後にカイコの体液を回収した。96 ウェルマイクロプレートにカイコの体液を 50 μ L と生理食塩水を 50 μ L を添加した。BaioRad の iMarkTM マイクロプレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度 (A_{490}) を測定した。

2.4. カイコの表皮感染によるメラニン化

人工餌を一晩摂食した 5 齢のカイコの背面の体表を 70% エタノールで清拭し、30 分間室温に置いた。*C. acnes* と黄

色ブドウ球菌の生菌をオリーブオイルで懸濁して、ガーゼに染み込ませて消毒した部位に貼付した。カイコを 37°C で飼育し、24 時間後にガーゼを剥がしてカイコの背面の写真を撮った。

3. 結果

3.1. カイコ感染モデルの開発

変温動物であるカイコは、飼育温度を変えることでカイコの体温を調節でき、病原微生物ごとにカイコに対する病原性に至適な飼育温度が異なる⁷⁾。*C. acnes* は皮膚上ではおよそ 32°C で生存し、ヒトの体内では 37°C で生存する。そこで我々は、*C. acnes* がカイコに対して病原性を示す飼育温度を検討した。*C. acnes* のカイコへの接種後 37°C での飼育では、カイコに *C. acnes* を接種して 40 時間後に全てのカイコが死亡し、32°C での飼育条件より早くカイコが死亡した (図 1A、B)。37°C での飼育条件における *C. acnes* のカイコを半数を死亡させるために必要な接種菌量である LD₅₀ 値は、 $1-4 \times 10^8$ 細胞であった (図 1C)。これらの結果から、37°C 飼育条件の方が、*C. acnes* の接種によりカイコが死亡しやすく、その条件で定量的な病原性の評価に利用できる LD₅₀ 値が算出できることが示唆された。次に我々は、*C. acnes* の接種によるカイコの死が、カイコの体内での菌数の増加による感染であるか検討した。*C. acnes* をカイコに接種して 1 時間後より 24 時間後の方がカイコの体液中、及びカイコの脂肪組織である脂肪体での *C. acnes* の生菌数が多かった (図 2)。また、*C. acnes* のオートクレーブ処理

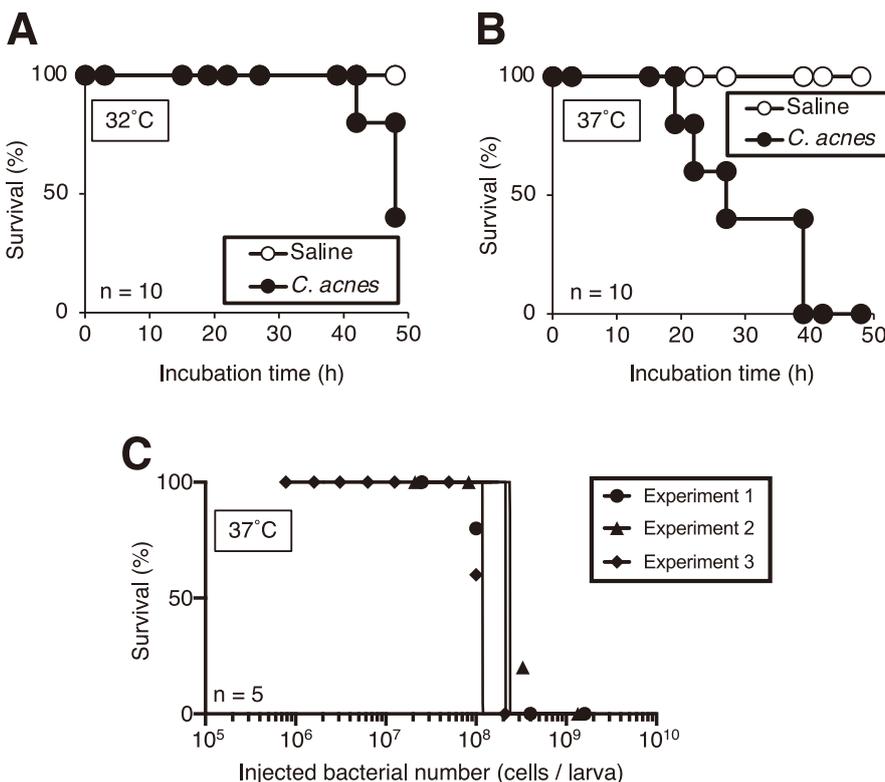


図 1 *C. acnes* によるカイコの感染死
カイコに *C. acnes* を接種後に 32°C (A)、及び 37°C (B) で飼育し、それぞれの条件におけるカイコの生存率を経時的に測定した。(C) カイコ感染実験における *C. acnes* の用量依存性試験。独立した 3 回の実験結果を示した。

菌体ではカイコが死亡しなかった(図3)。これらの結果から、カイコに対する *C. acnes* の病原性が細胞壁などの菌体成分によるショック死ではなく、生菌であることが必要な感染であることが示唆された。

3. 2. カイコ感染モデルを用いた抗菌薬の評価

次に我々は、*C. acnes* によるカイコに対する病原性に対して抗菌薬が効果を示すか検討した。*C. acnes* を接種した

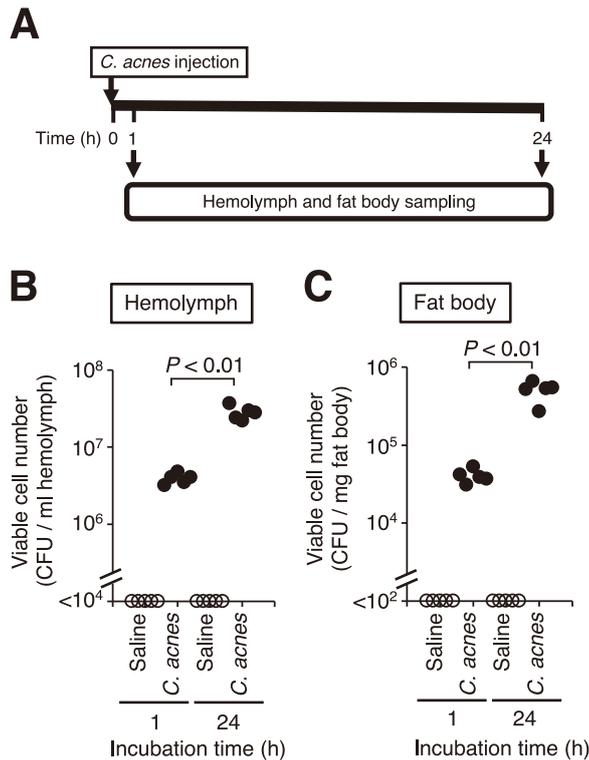


図2 カイコの体液、及び脂肪体における *C. acnes* の増殖 (A) コ感染実験のスケジュールを示した。カイコに *C. acnes* を接種して1時間後、及び24時間後に体液 (B)、及び脂肪体 (C) を採取し、*C. acnes* の生菌数を測定した。

カイコに抗菌薬であるテトラサイクリンやクリンダマイシンを投与すると、カイコの生存時間が延長した(図4)。この結果から、*C. acnes* のカイコ感染モデルを用いて *in vivo* での抗菌薬の薬効評価が行えることが示唆された。

3. 3. *C. acnes* によるカイコの体液のメラニン化

C. acnes によるカイコの体液のメラニン化を免疫誘導能の指標として評価できる条件の検討を試みた。*C. acnes* の

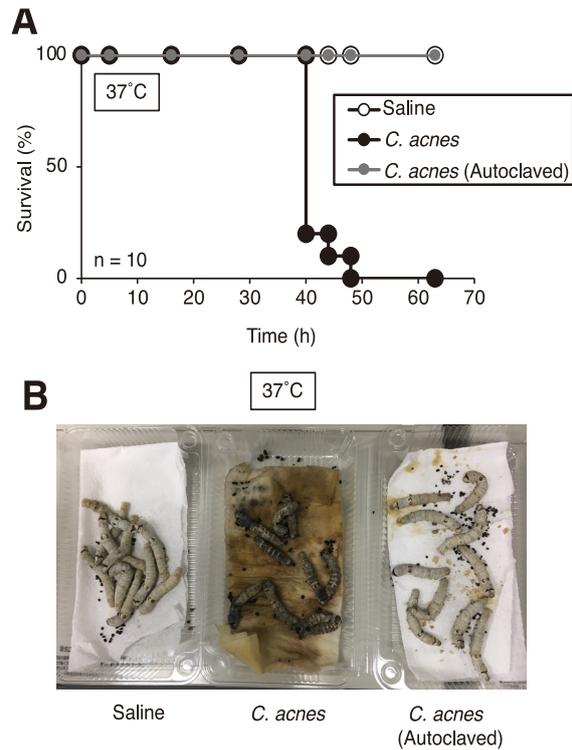


図3 熱処理による *C. acnes* のカイコに対する毒性の消失 (A) カイコに *C. acnes* の生菌、及び高圧蒸気滅菌した *C. acnes* を接種してカイコの生存率を経時的に測定した。(B) *C. acnes* の菌体サンプルを接種して48時間後のカイコを示す。

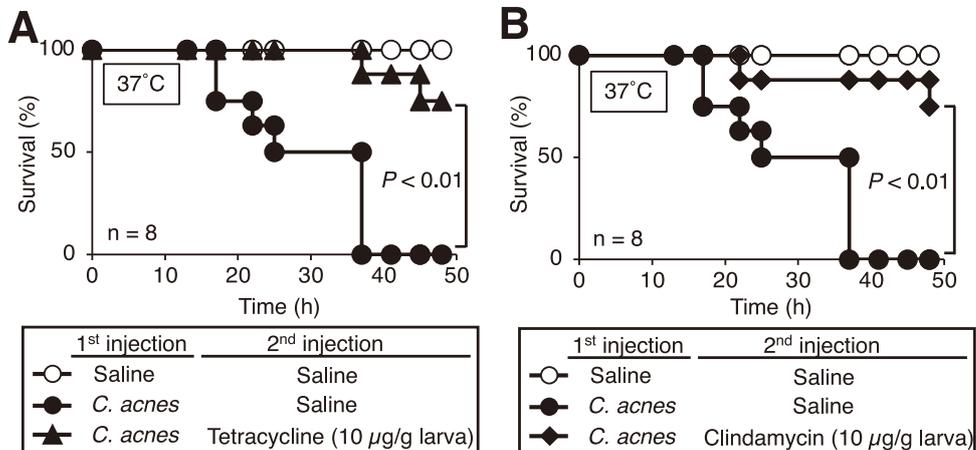


図4 抗菌薬の投与による *C. acnes* が感染したカイコの延命効果
カイコに *C. acnes* を接種後、すぐにテトラサイクリン(A)、及びクリンダマイシン(B) を接種し、生存率を経時的に測定した。

カイコへの接種後に 37°C の飼育条件で 3 時間以内にカイコの体液の黒色化が確認された (図 5)。次に *C. acnes* 以外のグラム陽性細菌と免疫誘導能を比較するために、表皮に存在してアトピー性皮膚炎の増悪化に関わる黄色ブドウ球菌を用いて検討した。*C. acnes* を接種した方が黄色ブドウ球菌よりカイコの体液のメラニン化が亢進していた (図 6)。以上の結果は、*C. acnes* が黄色ブドウ球菌よりカイコの免疫を強く誘導する活性があることを示唆している。

3. 4. *C. acnes* と黄色ブドウ球菌の共感染によるカイコの皮膚のメラニン化

C. acnes の菌体をカイコの皮膚に塗布することでカイコの皮膚でのメラニン化が起こるか検討した。*C. acnes* や黄色ブドウ球菌の単独感染ではカイコの皮膚上のメラニン化の誘導は起こらなかった (図 7)。一方、*C. acnes* と黄色ブドウ球菌をカイコの皮膚上で共感染させることでカイコの

皮膚でのメラニン化が誘導された (図 7)。これらの結果は、*C. acnes* によるカイコの皮膚上でのメラニン化の誘導に黄色ブドウ球菌が補助的な役割を演じる可能性を示唆している。

4. 考 察

本研究で我々は、*C. acnes* の宿主障害性を評価するための実験条件を見出し、*C. acnes* のカイコ感染モデルを用いた抗菌薬の薬効評価系を確立することができた。また、カイコの免疫応答であるメラニン化の亢進を指標に *C. acnes* の過剰免疫応答を評価できることが示唆された。さらに、*C. acnes* と黄色ブドウ球菌の共感染により、カイコの皮膚にメラニン化が起こる条件を見出した。我々は、*C. acnes*

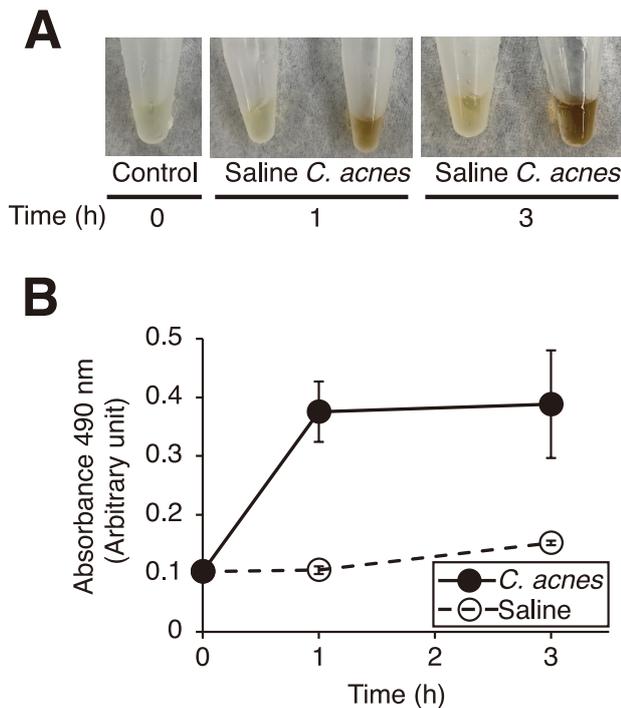


図 5 *C. acnes* によるカイコの体液のメラニン化
カイコに *C. acnes* を接種し、カイコの体液を経時的に採取し、490 nm の吸光度を測定した。

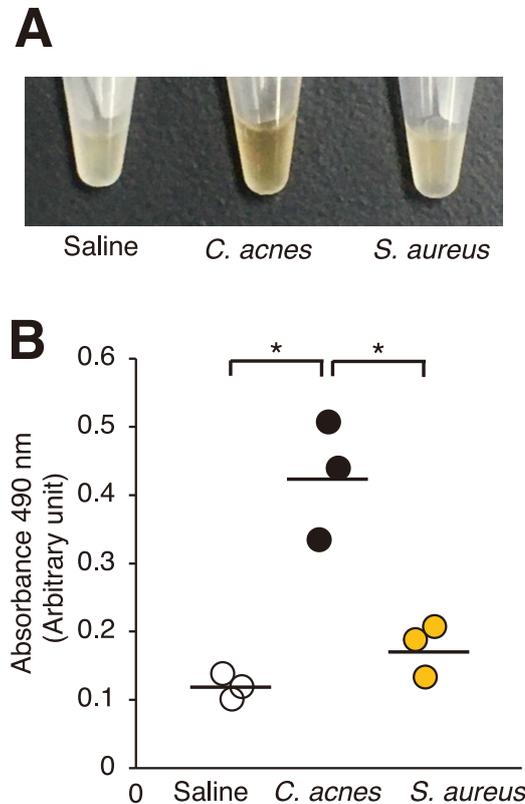


図 6 カイコの体液のメラニン化の誘導における細菌間の比較
カイコに *C. acnes*、及び黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) を接種して 3 時間後にカイコの体液を採取し、490nm の吸光度を測定した。

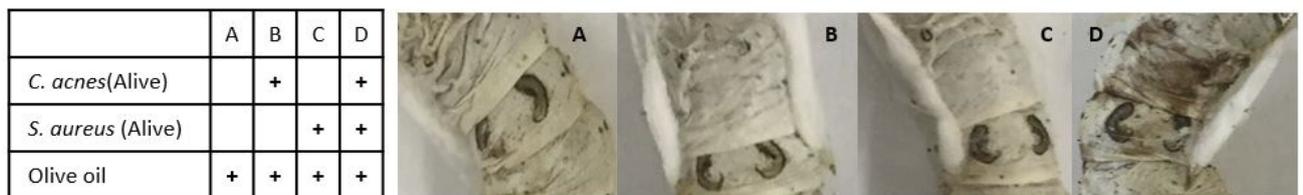


図 7 *C. acnes* と黄色ブドウ球菌の共感染によるカイコの体表のメラニン化
C. acnes、及び黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) をオリーブオイルで懸濁してガーゼに染み込ませてカイコの体表に貼付した。感染させて 24 時間後のカイコの体表を示す。

のカイコ感染モデルを用いた抗菌薬の評価やカイコのメラニン化を基軸とした皮膚感染モデルの確立ができたと考えている。

カイコに病原性微生物を接種させた時に菌体成分によるショック死が起こることがある⁸⁾。菌周病菌をカイコに接種するとカイコは死亡するが、その熱処理死菌でもカイコは死亡する⁸⁾。このショック死の条件だと抗生物質で治療することはできない⁸⁾。本研究での*C. acnes*のカイコ感染モデルでは、熱処理死菌の投与ではカイコが死なず、また抗菌薬で治療ができることから、カイコの体内で*C. acnes*が増殖することがその病原性に重要であることが考えられる。

尋常性ざ瘡は*C. acnes*による過剰免疫応答による疾患である。哺乳動物細胞において、この*C. acnes*の菌体成分による過剰免疫応答にはToll like Receptorが関与している。カイコのメラニン化反応も菌体成分を認識してToll経路の活性化と並行して起こる免疫応答である⁶⁾。よって、我々はカイコのメラニン化反応を定量することで*C. acnes*の免疫誘導活性を評価できるのではないかと考えている。さらに、*C. acnes*と黄色ブドウ球菌をカイコの皮膚上で共感染させることでカイコの皮膚でのメラニン化が誘導された。黄色ブドウ球菌は、溶血毒素やプロテアーゼなどの表皮細胞を障害するタンパク質を放出する。黄色ブドウ球菌が表皮細胞を障害した後に*C. acnes*のメラニン化の誘導物質が真皮に届き、メラニン化を誘導した可能性があると考えている。

本研究では、カイコで炎症性皮膚疾患を引き起こす*C. acnes*の宿主障害性や免疫誘導活性の評価ができる可能性が示された。今後は抗菌薬や化粧品の候補となる化合物の薬効評価が行えるかが課題となるだろう。

5. 総括

本研究で我々は、*C. acnes*の体液内への摂取によりカイコが死亡すること、並びにそのカイコ感染モデルを用いて抗菌薬の薬効評価が行えることを見出した。我々の知見は、カイコ感染モデルが*C. acnes*の感染における病原性や抗菌薬の薬効評価に有用であることを示唆している。カイコを用いた実験は哺乳動物を用いた実験より倫理的な問題を回避する上で有用であると考えられる。今後さらに厳しくなる動物実験の制限に対応する上で、カイコを実験動物とし

て採用することは次世代の化粧品開発の基盤的技術として重要性は高いと考えられる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご支援いただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝申し上げます。

本研究助成により得られた成果

Matsumoto Y, *et al*, Evaluation of Antibacterial Drugs Using Silkworms Infected by *Cutibacterium acnes*. *Insects*, **12**:619 (2021)

(引用文献)

- 1) Kolar SL, *et al.*, *Propionibacterium acnes*-induced immunopathology correlates with health and disease association. *JCI Insight*, **4**:e124687 (2019)
- 2) Weihe WH. Use and misuse of an imprecise concept: alternative methods in animal experiments. *Lab Anim.*, **19**:19-26 (1985)
- 3) Usui K, *et al.*, Acute oral toxicity test of chemical compounds in silkworms. *Drug Discov Ther.*, **10**:57-61 (2016)
- 4) Paudel A, *et al.*, Pharmacokinetic parameters explain the therapeutic activity of antimicrobial agents in a silkworm infection model. *Sci Rep.*, **8**:1578 (2018)
- 5) Matsumoto Y. Facilitating Drug Discovery in Human Disease Models Using Insects. *Biol Pharm Bull.*, **43**:216-220 (2020)
- 6) Geng T, *et al.*, Lineage-specific gene evolution of innate immunity in *Bombyx mori* to adapt to challenge by pathogens, especially entomopathogenic fungi. *Dev Comp Immunol.*, **123**:104171 (2021)
- 7) Matsumoto Y, and Sekimizu K, Silkworm as an experimental animal for research on fungal infections. *Microbiol Immunol.*, **12**:619 (2019)
- 8) Ishii K, *et al.*, *Porphyromonas gingivalis* peptidoglycans induce excessive activation of the innate immune system in silkworm larvae. *J Biol Chem.*, **285**:33338-47 (2010)