

犬及び猫における *Staphylococcus pseudintermedius* 臨床由来株の  
バイオフィルム形成能に関する研究

(Research on the biofilm formation of *Staphylococcus pseudintermedius*  
clinical isolates from dogs and cats)

有馬 さゆり

犬及び猫における *Staphylococcus pseudintermedius* 臨床由来株の  
バイオフィルム形成能に関する研究

(Research on the biofilm formation of *Staphylococcus pseudintermedius*  
clinical isolates from dogs and cats)

有馬 さゆり

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教授：池 和憲)

平成 30 年 12 月

## 目次

序論 .....	1
----------	---

### 第1章 *Staphylococcus pseudintermedius* の分離状況と バイオフィルム形成能に関する疫学調査

1 緒言 .....	4
2 材料及び方法 .....	
2-1 調査対象と菌分離 .....	5
2-2 菌種同定 .....	5
2-3 バイオフィルム形成能の測定 .....	7
3 結果 .....	
3-1 <i>S. pseudintermedius</i> の検体分離株数 .....	7
3-2 <i>S. pseudintermedius</i> のバイオフィルム形成能の分布 .....	7
4 考察 .....	8
5 小括 .....	10
6 表 .....	12

### 第2章 バイオフィルム形成 *Staphylococcus pseudintermedius* の 薬剤耐性に関する検討

1 緒言 .....	16
2 材料及び方法 .....	
2-1 使用菌株及びバイオフィルム形成能 .....	17
2-2 使用薬剤 .....	17
2-3 薬剤感受性試験 .....	18
2-4 <i>mecA</i> 遺伝子の検出 .....	18
2-5 統計学的解析 .....	19

3 結果	
3-1 薬剤感受性試験の結果	19
3-2 MRSP 及び MSSP の検出	20
3-3 MSSP の ABPC 及び AMPC 耐性株のバイオフィーム形成能の比較	20
4 考察	21
5 小括	24
6 図及び表	25

### 第3章 バイオフィーム形成 *Staphylococcus pseudintermedius* の 炎症誘引物質に関する検討

1 緒言	32
2 材料及び方法	
2-1 使用菌株	33
2-2 使用細胞	33
2-3 RAW264.7 細胞と菌培養上清の共培養	33
2-4 炎症誘引因子の同定	34
2-5 RT-PCR	34
2-6 Real-time PCR	35
2-7 ウェスタンブロット解析	35
2-8 ドデシル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	36
2-9 凍結乾燥	36
2-10 マトリックス支援レーザー脱離イオン化ー飛行時間型質量分析法 (MALDI TOF-MS)	36
2-11 統計学的解析	37
3 結果	

3-1 バイオフィルム形成能間の炎症サイトカイン発現量の比較 .....	37
3-2 BCM 中の炎症性誘引物質の検出 .....	37
3-3 TLR シグナルの発現 .....	38
3-4 バイオフィルム形成能別の菌体外分泌タンパク質の比較 .....	38
4 考察 .....	39
5 小括 .....	41
6 図及び表 .....	43
 総括 .....	 51
 謝辞 .....	 54
 参考文献 .....	 55

## 序 論

医療現場において、細菌感染症は最も一般的な疾患である。通常、細菌感染症は、感受性を示す抗生剤の適切な使用により良好な治癒経過を示すが、何らかの要因により慢性化した場合、治療が困難となり、患者の **Quality of Life** は著しく低下する。慢性感染症の原因には、宿主の免疫状態など様々な要因が関与するが、近年、その発生の一因にバイオフィームが関与している可能性が示唆されている (Sauer ら、2002)。

バイオフィームとは、組織あるいは医療機器表面に付着した細菌が菌体外糖タンパク質を産生し、その中でコロニーを形成した状態のことである (Sauer ら、2002)。バイオフィームは、炭水化物、タンパク質及び DNA など主成分として、粘着性の高いマトリックスを形成する (Hernández-Jiménez ら、2013)。バイオフィームが形成されると、抗生剤や免疫系の刺激に抵抗性を示すことが知られているが、その理由として外界からの物理刺激がマトリックスにより菌体にまで到達しにくいことや、バイオフィーム内の細菌は静止状態にあり、そのため代謝を阻害する抗生剤などは作用できないことなどが理由として挙げられる (Lewis、2002)。

また、バイオフィーム内では、細菌間の情報伝達系により、抗生剤や免疫系に対する抵抗性が伝達、自己誘導されることが知られている (Webb ら、2003)。最近の研究において、大腸粘膜上に形成されたバイオフィームから産生する代謝物が、大腸がんの発生や進行を促進することが報告されている (Johnson ら、2015)。このことは、これまで、バイオフィームを形成することで外的刺激を回避し、静的状態で存在していると考えられていたバイオフィーム内の細菌群が、実は積極的に代謝産物を産生し、宿主の病態発生に寄与している可能性を示唆するものである。興味深いことに、バイオフィームの形成能は、同一菌種でも必ずしも一様ではなく、形成能の強弱が存在すること、またバイオフィーム強度形

成株では、薬剤耐性株が多いことなどが明らかにされている (Singh ら、2013)。これらのことから、バイオフィルムの形成は、感染症の慢性化および難治化に関連していると考えられ、感染症進行予防の観点から重要とされている。

代表的なバイオフィルム形成菌として *Staphylococcus* 属菌が挙げられ、カテーテルが関与して引き起こされるバイオフィルム感染症について問題視されている (Meije ら、2014 ; Oufriid ら、2015)。日本国内におけるカテーテル関連感染症については、厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業において報告数がまとめられ、カテーテル関連感染症の上位 3 菌種が、*Staphylococcus epidermidis*、メチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) 及びコアグララーゼ陰性 *Staphylococcus* 属菌 (CNS) と、全てが *Staphylococcus* 属菌となっている (厚生労働省、2016)。しかし、この報告ではカテーテル感染症とバイオフィルムとの関連性についての記載はなく、日本におけるバイオフィルム感染症の動態調査は行われていない。

医学領域において重要視される *Staphylococcus* 属菌は主に *S. aureus* であるが、獣医学領域、特に小動物臨床で主要な *Staphylococcus* 属菌として挙げられるのは *S. pseudintermedius* である。*S. pseudintermedius* は *S. aureus* と同様にバイオフィルムを形成し、またメチシリン耐性 *S. pseudintermedius* (MRSP) は多くの抗生剤に耐性を有することが世界各国で報告されている (Singh ら、2013 ; Abdallah ら、2014)。我が国においても、MRSP は動物病院内で起こる院内感染の原因菌として問題視されている (伊従ら、2014)。

*S. pseudintermedius* は犬膿皮症の主要な原因菌として同定されることが多く、本菌が産生する表皮剥脱毒素が、膿皮症の病態に重要であることが知られている (Kapral ら、1971)。これに加えて、*S. pseudintermedius* は外傷感染、鼻炎、腎炎、肺炎、尿路感染症および敗血症など、幅広い感染症の原因菌としても認識されている (Wettstein ら、2008 ; Kadlec ら、2010 ; Pomba ら、2010)。

*S. pseudintermedius* が犬に対して病原性を発揮するためには、宿主側の要因、

例えば、皮膚バリア機能の低下、免疫抑制、基礎疾患の有無などと密接な関係があることも明らかにされている (Bannoehr ら、2012)。*S. pseudintermedius* の犬に対する病原因子として、表皮剥脱毒素の他に、コアグラーゼ産生、サーモヌクレアーゼ産生、クランピングファクターやプロテイン A 等の菌体表層タンパク質、サイトトキシン、エンテロトキシン等の外毒素の産生が挙げられる。このように、*S. pseudintermedius* の病原性については様々な要因が明らかになっているが、一方で *S. pseudintermedius* のバイオフィルムについての報告は未だ少なく、獣医学領域におけるバイオフィルムの認知度は低いため、バイオフィルムに対する十分な *S. pseudintermedius* 感染症対策は行われていない。

本研究では、*S. pseudintermedius* のバイオフィルム形成に着目し、第 1 章では、犬猫臨床症例由来 *S. pseudintermedius* を分離・同定し、さらにそれら分離株を用いてバイオフィルム形成能を測定するとともに、バイオフィルム形成 *S. pseudintermedius* の分布状況を調査した。第 2 章ではバイオフィルム形成 *S. pseudintermedius* の薬剤耐性を調べ、抗生剤治療への影響を調べた。そして第 3 章ではバイオフィルム形成 *S. pseudintermedius* が動物細胞に及ぼす影響とバイオフィルム形成能によって誘導される炎症反応の違いについて検討した。



## 第1章 *Staphylococcus pseudintermedius* の分離状況及び

### バイオフィーム形成能に関する疫学調査

#### 1 緒言

*Staphylococcus pseudintermedius* は健康な犬の皮膚や粘膜などに常在するブドウ球菌であり、海外では 69.0～78.0 %、日本では 61.0～100 % の分離率が報告されている (Paul ら、2012; Murayama ら、2013; Kasai ら、2016; Priyantha ら、2016)。また、膿皮症を罹患している犬の *S. pseudintermedius* 分離率は、海外では 39.2 % であるのに対して、日本では 89.5 % と高い分離率を示している (Kawakami ら、2010; Wang ら、2012)。このことから、*S. pseudintermedius* は皮膚常在菌でありながら、膿皮症を発症させる主要な原因菌であり、日本において問題となっていることが考えられている。

一方で、Stefanetti らの報告 (2017) によると、全ての *S. pseudintermedius* 分離株がバイオフィームを形成し、そのうちの 88.2 % は多剤耐性を示していた。このことは、*S. pseudintermedius* 感染症に対する抗生剤治療は困難になる可能性を示唆するものである。

細菌のバイオフィーム形成能は、同一菌種にもかかわらず、菌株ごとに異なることが明らかにされている。Darwish ら (2013) は、*Staphylococcus* 属菌のバイオフィーム形成能を調べ、47.2 % が高度なバイオフィームを形成するが、全く形成しない菌株も存在することを報告している。バイオフィーム形成能の高い株については、抗生剤の浸透性に障害をもたらすため、治療が阻害され難治化することが問題となっている (奥田、2013)。*S. pseudintermedius* 感染症とバイオフィームの関連性を調べるために、病変部由来 *S. pseudintermedius* のバイオフィーム形成能のレベルを調査することは重要であるが、小動物臨床由来 *S. pseudintermedius* のバイオフィーム形成能を調査した報告は未だ少ない。

そこで、*S. pseudintermedius* のバイオフィームに関する調査を進めるにあた

り、まず、犬猫の臨床由来 *S. pseudintermedius* の分離状況を調査し、*S. pseudintermedius* 分離株のバイオフィルム形成能を検討した。

## 2 材料及び方法

### 2-1 調査対象と菌分離

2012 年 1 月から 2015 年 12 月までに日本獣医生命科学大学医療センター及び青森県、宮城県、福島県、埼玉県、千葉県、東京都、神奈川県、愛知県、岡山県の市中動物病院、27 病院に来院した犬及び猫の種々の疾患病変部位から採材された合計 1,318 検体を供試した。

輸送培地であるシードスワブ（栄研化学、東京）にて採取された検体は、5% 綿羊脱線維血液加 Heart infusion agar (HIA, Becton, Dickinson and Company; BD, USA) 及びマンニット食塩培地（栄研化学）に直接塗抹を行い、尿にて送付された検体は 6,000 rpm、5 分間遠心後、沈査を同様の培地に塗抹し、それぞれ 35℃、24 時間好気培養した。培養後、マンニット食塩培地上にコロニー形成が見られた株を HIA に培養し、グラム染色、カタラーゼ試験及び OF 試験を行い、グラム陽性球菌、カタラーゼ陽性及びブドウ糖を発酵的に分解する F 判定の分離株を *Staphylococcus* 属菌として同定した。

### 2-2 菌種同定

分離株をそれぞれ HIA で培養し、発育したコロニーを 1 エーゼ分掻き取り、滅菌蒸留水 (DW) 200 µL に浮遊させ、100℃、10 分間加熱した。12,000 rpm、5 分間遠心した後、その上清をテンプレート DNA として使用した。このテンプレート DNA は実験に用いるまで -20℃ で保存した。

菌種同定はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて行った。反応液は、Go Taq Green Master Mix (Promega, USA) のマニュアルに従い、Master Mix 5 µL、Primer-F (10 pmol) 1 µL、Primer-R (10 pmol) 1 µL 及びテンプレート DNA

1  $\mu$ L を混合し、DW 2  $\mu$ L を加え計 10  $\mu$ L とした。プライマーは、*nuc* 遺伝子をターゲットとしたものを使用した (Primer - F : TRG GCA GTA GGA TTC GTT AA、Primer - R : CTT TTG TGC TYC MTT TTG G)。サーマルサイクラーは TP100 (タカラバイオ (株)、滋賀) を使用した。PCR 反応は、95°C、2 分間加熱後、35 回の増幅反応 (95°C の熱変性を 30 秒間、60°C のアニーリング反応を 30 秒間及び 72°C の伸長反応を 60 秒間) を行い、その後 72°C で 5 分間の伸長反応により行った (Sasaki ら、2009)。PCR 後、アガロースゲル電気泳動を行った。2 % アガロースゲル (Bio-Rad、CA、USA) と 0.5  $\times$  Tris Borate EDTA (TBE、Thermo Fisher Scientific K.K.、USA) を用い、1  $\mu$ g /mL エチジウムブロマイド溶液 (株式会社ニッポンジーン、東京) を添加した後、135 V、約 12 分間泳動した。UV トランスイルミネーター (Wealtec Corp.、USA) を用いて、紫外線照射下で PCR 産物のバンドを確認した。また、PCR の陽性コントロールとして、基準株である *S. pseudintermedius* LMG20219 株を供試した。*S. pseudintermedius* と同定された分離株は、10 % skim milk (BD) 0.5 mL に浮遊させ、-80°C で保存した。

### 2-3 バイオフィーム形成能の測定

バイオフィーム形成能の測定は、Stepanivicić らの報告に準拠したクリスタルバイオレット染色法 (Stepanivicić ら、2007) により行った。分離株は HIA で 37°C、24 時間培養後、Tryptic soy broth (TSB、BD) 2.0 mL にマックファーランド標準濁度液 0.5 ( $1 \sim 2 \times 10^8$  CFU /mL) の濁度と同等になるように菌液を懸濁した。200  $\mu$ L の細菌懸濁液を、96 ウェルマイクロタイタープレート (日本ジェネティクス (株)、東京) に接種し、35°C で 24 時間、好気条件下で静置培養を行った。培養後、ウェルの内容物を捨て、1  $\times$  リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH 7.2) で 3 回洗浄した。マイクロプレートのウェル内に接着したバイオフィーム形成細菌を 200  $\mu$ L の 0.1 % (w/v) クリスタルバイオレットで 15 分間、室

温で染色し、超純水で 3 回洗浄した。95 %エタノールで 15 分間、室温で軽く振とうしながら染色液を再可溶化した後、未使用の 96 ウェルマイクロタイタープレートにエタノール可溶液 180  $\mu$ L を移し、各ウェルの吸光度 (OD) を 590 nm に設定し、定量的分光光度マイクロタイタープレートアッセイ (Bio-Rad) を用いて測定した。また、培地のみの OD 値をネガティブコントロールとした。

分離株のバイオフィーム形成能を、Singh らの報告に従い、ODcutoff (ODc) 値 = ネガティブコントロールの平均 OD<sub>590nm</sub> + (3 × ネガティブコントロールの標準偏差) に基づいて以下の分類分けを用い、バイオフィーム形成度によってバイオフィーム無形成株 (以下、無形成株)、バイオフィーム形成弱度株 (以下、弱度株)、バイオフィーム形成中度株 (以下、中度株) 及びバイオフィーム形成強度株 (以下、強度株) と分類した。本実験は 3 回繰り返し、判定は、OD<sub>590nm</sub> ≤ ODc = 無形成株、ODc < OD<sub>590nm</sub> ≤ 2 × ODc = 弱度株、2 × ODc < OD<sub>590nm</sub> ≤ 4 × ODc = 中度株及び OD<sub>590nm</sub> > 4 × ODc = 強度株とした (Singh ら、2013)。

### 3 結果

#### 3-1 *S. pseudintermedius* の検体分離株数

調査期間内に収集された 1,318 検体から、*Staphylococcus* 属菌は 446 株分離された。その中で、*S. pseudintermedius* と同定された株は 250 株 (犬由来 228 株、猫由来 22 株) となった。本菌の主な分離病変部位は皮膚 80 株、耳 55 株、眼 39 株及び泌尿器 36 株となり、皮膚由来株の分離株数が最も多かった。診療施設別の分離株数を比較したところ、一次診療施設 (市中動物病院) 184 株、二次診療施設 (日本獣医生命科学大学動物医療センター) 66 株となり、一次診療施設が顕著に高かった (表 1-1)。

#### 3-2 *S. pseudintermedius* のバイオフィーム形成能の分布

臨床由来 *S. pseudintermedius* 250 株のバイオフィルム形成能を調べた結果、強度株 62 株 (24.8 %)、中度株 130 株 (52.0 %) 及び弱度株 58 株 (23.2 %) となり、無形成株は存在しなかった (表 1-2)。また、動物由来別にみると、双方のバイオフィルム形成株の割合は特に変わらなかった (表 1-2)。次に、各病変部位由来株別に分離率を比較したところ、最も多く分離されたのが各病変部位とも中度株であったが、病変部位間での特異的な違いは認められなかった。(表 1-3)。また、一次及び二次診療施設間におけるバイオフィルム形成能別の分離頻度においても、顕著な差は認められなかった (表 1-4)。

#### 4 考察

今回の研究から、供試した全株がバイオフィルムを形成することが示され、その中でも、70 %以上の分離株が中及び強度株に分類された。Singh らは、犬臨床由来 *S. pseudintermedius* 140 株中、強度株が 31.0 %、中度株が 34.0 %認められたことを報告している (Singh ら、2013)。Singh らの報告に比べると、今回の結果は中度株が強度株よりも分離率が高いことが分かった。他の *Staphylococcus* 属菌のバイオフィルム形成能の分布を調べると、*S. aureus* や *S. epidermidis* においては、中及び強度株は無及び弱度株よりも少ないという報告がある (Sahal ら、2014 ; Naicker ら、2016)。これらの報告から、*S. pseudintermedius* は、他の主要な *Staphylococcus* 属菌よりもバイオフィルムを強く形成する菌種である可能性が示唆された。

バイオフィルム形成の強弱について関わっている要因の 1 つとして、バイオフィルム関連遺伝子が存在している。*S. epidermidis* はバイオフィルム形成に寄与している産物をコードしている *ica* 遺伝子を持っていることが Gerke ら (1998) によって報告されている。しかし、*S. pseudintermedius* においても *ica* 遺伝子の発現は認められるが、バイオフィルム形成能との関連がないとの報告もある (Han ら、2015)。この他にも、*Enterococcus faecalis* では、プラスチ

ック面などに対する初期付着に関与するタンパク質をコードする *esp* 遺伝子を持っていることが報告されている (Toledo-Arana ら、2001 ; Asmat ら、2014)。また、*E. faecalis* の *ahrC* 遺伝子がコードする AhrC は、初期バイオフィルム形成の開始および心内膜炎の確立を促進することが明らかにされており、バイオフィルム関連感染症に関与している (Frank ら、2013)。これらの報告から、バイオフィルムに関する遺伝的メカニズムは非常に複雑であり、*S. pseudintermedius* では、まだ遺伝学的な背景は調べられていないため、今後はバイオフィルム形成能とそれに関与する遺伝子との関連性をさらに調べる必要がある。

*S. pseudintermedius* のバイオフィルム形成株が多い理由を調べるため、動物種、病変部位及び診療施設での分離状況を比較し、検討を行った。まず、動物種間を比較した結果、猫由来 *S. pseudintermedius* の臨床症例分離率は犬由来よりも顕著に低いことがわかった。他の報告でも、*S. pseudintermedius* の猫の分離率は犬に比べてきわめて低く、今回の結果と同様のものとなっている (Bardiau ら、2013)。*S. pseudintermedius* の感染リスクは犬の方が猫よりも高い可能性が示唆されたが、バイオフィルム形成能で比較すると、双方のバイオフィルム形成株の割合は特に変わらなかった。犬由来 *S. pseudintermedius* のバイオフィルム形成能の分類に関する報告はあるが (Singh ら、2013)、猫に注目した報告はなく、猫由来株と犬由来株においてバイオフィルム形成能に差はほとんどないということが今回新たに分かった。このことから、猫由来 *S. pseudintermedius* によるバイオフィルム感染症は犬と同等のリスクがある可能性が示唆された。しかし、今回調べた株は少数のため、検体数を増やし、さらなる調査が必要と考えられた。

次に、*S. pseudintermedius* は膿皮症及び外耳道炎などの重要な病原体であることから、病変部位間のバイオフィルム形成能の比較を行った。その結果、皮膚由来株あるいは耳由来株においてバイオフィルム形成能が高いことは特に認め

られなかったため、病変形成とバイオフィルム形成との関連性は明らかにすることができなかった。したがって、*S. pseudintermedius* の病原因子の一つとされるバイオフィルム形成能については、今後詳細に検討する必要があることが示唆された。

一次及び二次診療施設での分離株数を比較すると、一次診療施設が顕著に多かったが、バイオフィルム形成能に両施設間での有意差は認められなかった。二次診療施設の患者は、様々な抗生剤による治療を受けており、投薬も長期間に渡るケースがある。長期投与によって薬剤耐性の獲得や、バイオフィルム形成の増強の原因となる (Savage ら、2013) が、今回の結果から、*S. pseudintermedius* のバイオフィルムによる感染症のリスクは施設に関係なく存在することが分かった。

以上のことから、犬猫の *S. pseudintermedius* 臨床由来株ではバイオフィルムが形成され、小動物臨床領域における *S. pseudintermedius* のバイオフィルム感染症のリスクは、動物種、病変部位及び診療施設に限らず存在している可能性が示された。

## 5 小括

小動物臨床由来 *S. pseudintermedius* のバイオフィルム形成能を調査した報告は未だ少ないため、犬及び猫の臨床由来 *S. pseudintermedius* の分離状況とバイオフィルム形成能について調査した。分離株をバイオフィルム形成能別に分類したところ、強度株 62 株 (24.8 %)、中度株 130 株 (52.0 %) 及び弱度株 58 株 (23.2 %) となった。*S. pseudintermedius* 分離株数は犬由来株が猫由来株より顕著に多かったが、分離株のバイオフィルム形成能において双方の間に違いは認められなかった。また、病変部位別に評価した際、バイオフィルム形成能において特異的な差は認められなかった。さらに、一次及び二次診療施設由来株においても、バイオフィルム形成能に顕著な差は見られなかった。したがって、

*S. pseudintermedius* は、動物種、感染部位及び診療施設に限らずバイオフィルム感染症を引き起こす可能性があり、小動物臨床領域において重要な病原菌であることが示唆された。



表 1-1 犬猫臨床由来 *S. pseudintermedius* の分類 (n = 250)

分類項目		n	%
動物種	犬	228	91.2
	猫	22	8.8
病変部位	皮膚	80	32.0
	耳	55	22.0
	眼	39	15.6
	泌尿器	36	14.4
	その他	40	16.0
診療施設	一次診療施設	184	73.6
	二次診療施設	66	26.4

一次診療施設：全 27 動物病院

二次診療施設：日本獣医生命科学大学動物医療センター

表 1-2 動物種別 *S. pseudintermedius* のバイオフィーム形成能分布

バイオフィーム 形成能	動物種					
	犬		猫		合計	
	(n = 228)		(n = 22)		(n = 250)	
	n	%	n	%	n	%
強度	54	23.7	8	36.4	62	24.8
中度	120	52.6	10	45.5	130	52.0
弱度	54	23.7	4	18.2	58	23.2

表 1-3 病変部位別 *S. pseudintermedius* のバイオフィルム形成能分布

バイオフィルム形成能	病変部位									
	皮膚		耳		眼		泌尿器		その他	
	(n = 80)		(n = 55)		(n = 39)		(n = 36)		(n = 40)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
強度	22	27.5	12	21.8	10	25.6	8	22.2	10	25.0
中度	46	57.5	26	47.3	21	53.8	19	52.8	18	45.0
弱度	12	15.0	17	30.9	8	20.5	9	25.0	12	30.0

表 1-4 診療施設別 *S. pseudintermedius* のバイオフィルム形成能の分布

バイオフィルム形成能	診療施設			
	一次診療施設		二次診療施設	
	(n = 184)		(n = 66)	
	n	%	n	%
強度	48	26.1	14	21.2
中度	94	51.1	36	65.5
弱度	42	22.8	16	24.2

一次診療施設：全 27 動物病院

二次診療施設：日本獣医生命科学大学動物医療センター

## 第2章 バイオフィーム形成 *Staphylococcus pseudintermedius* の

### 薬剤耐性に関する検討

#### 1 緒言

細菌が薬剤耐性となる機序については、細菌が薬剤の分解や修飾する方法を獲得する、薬剤の結合する作用点を変化させる、薬剤を菌体外へ排出する、前駆体酵素の構造を変える等により、耐性化することが明らかにされている。これらの耐性化には、細菌自身が遺伝子の突然変異による場合と薬剤耐性遺伝子を獲得する場合があります、臨床的に問題となるのは後者による薬剤耐性化である。特に *Staphylococcus* 属菌は、 $\beta$ -ラクタム薬が結合できないペプチドグリカン合成酵素 (Penicillin binding protein 2'; PBP2') を作り出す。 *mecA* 遺伝子を獲得することによりメチシリンに耐性化し、特にメチシリン耐性 *S. aureus* が医学領域では重要な薬剤耐性菌として認識されている (山口ら、2005; Tsubakishita ら、2010)。

獣医領域においても、膿皮症の犬から分離された *S. pseudintermedius* の 66.5 %が、メチシリン耐性 *S. pseudintermedius* (MRSP) であったことが報告されている (Kawakami ら、2010)。しかし、近年では、健康犬の鼻孔から採取されたメチシリン感受性 *S. pseudintermedius* (MSSP) が多剤耐性を示しており、テトラサイクリンに関しては、当該薬剤に結合するタンパクが合成されることでリボソームへの結合を妨害し耐性化することが報告された (Gharsa ら、2013)。このことから、*S. pseudintermedius* の薬剤耐性機構には、*mecA* 遺伝子以外の要因が関与している可能性が考えられ、MSSP の薬剤耐性化についても問題となってきた。

一方で、薬剤耐性機序の一因として、バイオフィーム形成が挙げられる (Mcdougald ら、2012)。バイオフィームの高次構造によって抗生剤がバイオフィーム内部の細菌に到達することができないために抗菌効果が阻害され、従来

の抗生剤治療が困難となる (Melchior ら、2006)。また、Ferran らの報告 (2016) によると、バイオフィルムを形成した *S. pseudintermedius* は、アモキシシリン、セファレキシン、クリンダマイシン、ドキシサイクリン及びマルボフロキサシンに暴露させた場合、 $0.5 \sim 2.0 \log_{10}$  CFU しか減少せず、薬剤を使用した治療は困難を極めることが明らかにされている。

第 1 章において、犬猫臨床由来 *S. pseudintermedius* は、全ての分離菌株がバイオフィルムを形成すること、及び菌株によりバイオフィルム形成能に違いが認められることを明らかにした。本章では、これら犬猫臨床由来 *S. pseudintermedius* のバイオフィルム形成能の違いが薬剤耐性にどのような影響を与えるのかを明らかにするため、各種薬剤に対する最小発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration : MIC) を測定した。また、日本の獣医領域における MRSP 分離状況、及び薬剤耐性遺伝子をもたない MSSP の薬剤耐性とバイオフィルム形成能の関連性についても調べた。

## 2 材料・方法

### 2-1 使用菌株及びバイオフィルム形成能

第 1 章で使用した日本獣医生命科学大学動物医療センター及び市中動物病院に来院した犬及び猫から分離された *S. pseudintermedius* 250 株を用いた。各分離株のバイオフィルム形成能については、第 1 章で得られた結果を使用した。

### 2-2 使用薬剤

使用薬剤として、アンピシリン (ABPC、ナカライテスク (株)、東京)、アモキシシリン (AMPC、ナカライテスク)、オキサシリン (MPIPC、Wako、大阪)、エンロフロキサシン (ERFX、Sigma-Aldrich, Inc.、MO、USA)、オルビフロキサシン (OBFX、Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.、東京)、ゲンタマイシン (GM、Sigma-Aldrich.）、エリスロマイシン (EM、Sigma-Aldrich, Inc.)、

クロラムフェニコール (CP、Sigma-Aldrich)、バンコマイシン (VCM、Sigma-Aldrich)、セファレキシン (CEX、Wako)、セフォベジン (CFV、Zoetis Japan Inc.、東京)、ミノサイクリン (MINO、Pfizer Japan Inc.、東京) の合計 12 薬剤を使用した。いずれの薬剤も力価が明らかなものを使用した。

### 2-3 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) ガイドラインに準拠した寒天平板希釈法により実施した (CLSI、2008)。以下、CLSI ガイドラインに記載されている培養方法である。

接種菌は HIA で 35℃、24 時間培養後、数コロニーを釣菌し、TSB 2.0 mL に接種し、35℃、24 時間培養したものを接種菌液とした。ERFX 及び OBFX は 0.03~512 µg /mL、VCM は 0.03~64 µg /mL、その他の薬剤は 0.06~512 µg /mL に希釈した後、各希釈薬剤を添加した Mueller - Hinton agar (MHA、BD) を作製し、1 mm 接種ピンを装着したマイクロプランター (佐久間製作所、東京) で菌接種を行った。培養条件は 35℃、16 時間とし、接種菌の発育が完全に阻止された薬剤の最低濃度をもって MIC (µg /mL) とした。

また、接種菌の耐性あるいは感受性を決定するために用いられる各薬剤のブレイクポイントの MIC は、CLSI (2012) 及び Diagnostic center for population and animal health in Michigan State University (2014) の基準を使用し、各薬剤に対する耐性及び感受性の判定を行った。また、薬剤感受性試験の精度管理株として、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 株、*Escherichia coli* ATCC 25922 株、*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 株、*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 株を供試し、寒天平板希釈法の精度を確認した。

### 2-4 *mecA* 遺伝子の検出

*mecA* 遺伝子の検出は、PCR によって行った。PCR 反応液は Go Taq Green

Master Mix のマニュアルに従い、Go Taq Green Master Mix (Promega) 5  $\mu$ L、PrimerF (10  $\mu$ M) 1  $\mu$ L、PrimerR (10  $\mu$ M) 1  $\mu$ L 及びテンプレート DNA 1  $\mu$ L を混合し、DW 2  $\mu$ L を加え計 10  $\mu$ L とした。Strommenger らの報告 (2003) に従い、primer F (5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3') および primer R (5'-AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3') を使用し、PCR 反応は、95°C 4 分間加熱後、30 回の増幅反応 (95°C の熱変性を 1 分間、58°C のアニーリング反応を 1 分間及び 72°C の伸長反応を 1 分間) を行い、その後 72°C で 7 分間の伸長反応により、*mecA* 遺伝子の検出を行った。サーマルサイクラーは TP100 (タカラバイオ) を使用した。

PCR 反応後、アガロースゲル電気泳動を行った。2 %アガロースゲル (Bio-Rad)、0.5  $\times$  TBE (Thermo Fisher Scientific K.K.) 及び 1  $\mu$ g/mL エチジウムブロマイド溶液を用いアガロースゲルを作製し、サンプルを 135 V、約 12 分間泳動した。その後、UV トランスイルミネーター (Wealtec Corp.) を用いて紫外線照射下で PCR 産物のバンドを確認した。なお、本法での *mecA* 遺伝子に特異的な DNA 断片は、532 bp である。

## 2-5 統計学的解析

犬猫由来 *S. pseudintermedius* の MIC と、バイオフィーム形成能を測定した OD<sub>590nm</sub> の相関性については、スピアマンの順位相関係数 (*rs*) を用いて行った。また、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 3 結果

### 3-1 薬剤感受性試験の結果

犬猫由来 *S. pseudintermedius* の薬剤感受性試験の結果を表 1 に示した。表中の数値は、各 MIC を示した株数を表しており、ブレイクポイントの MIC 以上を示した菌株を耐性株と判定し、耐性株数と耐性率を算出した。その結果、



ABPC に対して 250 株中 211 株 (84.4 %) が耐性を示し、次いで OBFX に対して 79.6 %、ERFX に対して 78.4 % の菌株が耐性を示した。一方、VCM に対しては、全分離株が感受性を示した (表 2-1)。

次に、バイオフィーム形成能別に分離株を分類し、薬剤耐性株数と薬剤耐性率を比較した。その結果、ABPC、AMPC、MIPIC、CEX、CFV、ERFX、OBFX、EM 及び GM において、強度株が中度株や弱度株に比較して、薬剤耐性率が明らかに高いことが判明した (表 2-2)。特にセファロスポリン系抗菌薬において、強度株、中度株、弱度株のそれぞれの耐性率は、CEX では 77.4 %、53.8 %、43.1 %、CFV では 74.2 %、42.3 %、22.4 % と、強度株における薬剤耐性率が著しく高値を示した。

また、各薬剤の MIC とバイオフィーム形成能を示す OD<sub>590nm</sub> の相関性を調べた結果、ABPC、AMPC、MIPIC、CEX、CFV、ERFX、OBFX、EM 及び GM において正の相関性が有意に認められた ( $P < 0.01$ ) (図 2-1-1、2-1-2)。しかし、CP、VCM 及び MINO では、相関性は認められなかった (図 2-1-3)。

### 3-2 MRSP 及び MSSP の検出

MRSP は、MIPIC 耐性及び *mecA* 遺伝子陽性と定義づけられているとの報告があるため、これに準拠して検出を行った (Dziva ら、2015)。また、本研究では、MSSP の定義を MIPIC 感受性及び *mecA* 遺伝子非保有とし、MSSP の検出を行った。その結果、MRSP では 145 株 (58.0 %)、MSSP では 75 株 (30.0 %) が同定された。なお、MIPIC 耐性のみの株が 13 株 (5.2 %)、*mecA* 遺伝子保有のみの株が 17 株 (6.8 %) 存在した。動物種別に MRSP を分類したところ、犬由来 MRSP は 127/228 株 (55.7 %)、猫由来 MRSP は 18/22 株 (81.8 %) となった (表 2-3)。

### 3-3 MSSP の ABPC 及び AMPC 耐性株のバイオフィーム形成能の比較

*mecA* 遺伝子非保有及び MIPIC 感受性を示す MSSP 75 株を選抜し、ABPC 及び AMPC に対する耐性を調べたところ、ABPC 耐性株は 43 株 (57.3 %)、AMPC 耐性株は 7 株 (9.3 %) となった。それぞれの耐性株を、バイオフィーム形成能別に分類し比較すると、ABPC においてバイオフィーム形成能が高い株ほど耐性率が上昇している傾向が見られた (表 2-4)。

#### 4 考察

*S. pseudintermedius* のバイオフィーム形成能と薬剤耐性の関連性について評価した結果、今回調べた 12 薬剤中 9 薬剤において、バイオフィーム形成能に伴い薬剤耐性率が上昇傾向にあることが判明した。さらに、9 薬剤の MIC とバイオフィーム形成能の指標となる OD<sub>590nm</sub> 値に正の相関が認められ、バイオフィーム形成能の高い株ほど、高濃度の抗生剤が必要であることが判明した。

*S. aureus* において、MIC 以下の濃度の MIPIC (90 % MIC)、CEX (2.81 ~ 45 % MIC)、セファロチン (25 % MIC)、及び VCM (6.25 % MIC) の薬剤は、細菌の細胞表面に影響を及ぼし、疎水性が上昇することで接着性が高くなると推測されることから、バイオフィーム形成の作動薬として作用することが報告されている (Mirani ら、2011 ; Haddadin ら、2010 ; Subrt ら、2011)。今回の結果から、VCM は全供試株が感受性であったため、獣医領域における VCM 耐性株は出現していないことが判明し、VCM とバイオフィームの関連性について証明はできなかった。しかし、MIPIC 及び CEX に関しては、同菌属である *S. pseudintermedius* においても、バイオフィーム形成能の増強を誘導する可能性も予想される。このことから、特に犬膿皮症の治療薬として小動物臨床領域で汎用されている CEX の慎重な使用が求められる。

バイオフィームの薬剤抵抗性を調べる方法として、バイオフィーム最小撲滅濃度 (Minimum Biofilm Eradication Concentration : MBEC) の測定がある。MBEC は MIC よりも顕著に高値を示すことが報告されている (Antunes ら、

2011 ; Shimizu ら、2013)。本研究では、MBEC の測定を行っていないが、第 1 章において、犬猫由来 *S. pseudintermedius* 臨床分離株はバイオフィルムを形成することがわかったことから、*S. pseudintermedius* 感染症の詳細な治療を行うために、MBEC は今後必要な実験であると考えられた。

今回の実験で使用した薬剤の 1 つである EM は、バイオフィルムの主要構成成分であるアルギン酸塩の合成を阻害することによって抗バイオフィルム作用を有するため、バイオフィルム形成細菌に対する第一選択治療として適用される (Soto、2014; Neupane ら、2016)。同系薬剤であるクラリスロマイシン (CAM) においても、CAM の単剤投与または他薬剤との併用投与は、*S. aureus* 及び *P. aeruginosa* のバイオフィルム形成阻止に有効であることが報告されている (Sano ら、1999 ; Tateda ら、2007 ; Fujimura ら、2008 ; Skindersoe ら、2008 ; Fujimura ら、2009 ; Parra-Ruiz ら、2010 ; Cirioni ら、2011)。しかし、今回の結果から、*S. pseudintermedius* 分離株の EM 耐性率は 76.4 %と高度耐性を示した。同様の結果は過去の報告からも得られている (Feng ら、2012 ; Bardiau ら、2013)。さらに、強度株での EM 耐性率は弱及び中度株に対して高く、MIC とバイオフィルム形成能間での正の相関性も認められた。これらの結果から、マクロライド系薬剤は *S. pseudintermedius* が形成するバイオフィルムに対する効果が低いことがわかり、*S. pseudintermedius* を主因とするバイオフィルム形成性感染症への治療薬として不適當であることが示唆された。

次に、MRSP の分離状況を調べた結果、分離率は 58.0 %であった。海外の MRSP 分離率を比較すると、タイでは犬猫由来 *S. pseudintermedius* 126 株中 39 株 (30.1 %)、フィンランドでは犬猫由来 *S. pseudintermedius* 1,958 株中 266 株 (13.6 %)、リトアニアでは犬由来 *S. pseudintermedius* 51 株中 15 株 (29.4 %) と、今回の結果が非常に高値であることが示された (Kadlec ら、2016 ; Ruzauskas ら、2016 ; Grönthal ら、2017)。他の日本での報告においても、犬由来 MRSP 分離率は 69.1 %と高値を示している (Kasai ら、2016) ことから、

日本国内での MRSP の蔓延が示唆された。また、動物種別 MRSP の割合を見ると、猫由来 MRSP が 81.8 % と非常に高い分離率を示した。猫の MRSP 分離率では、ドイツでは 94.1 %、中国では 80.0 % であることが報告されている (Feng ら、2012 ; Lehner ら、2014)。 *S. pseudintermedius* 分離株数は犬が多いが、MRSP の保菌率は猫が高いことから、猫は MRSP のリザーバーとしての意義が高いことが示唆されるが、本研究において株数が少ないため、断定的な言及には及ばなかった。

今回、ペニシリン系薬剤に感受性を示すはずの MSSP における ABPC 及び AMPC 耐性株を調査した結果、ABPC 耐性 MSSP は半数以上の耐性率を占めた。さらに、バイオフィーム形成能別に分類したところ、バイオフィーム形成能が高い株ほど耐性率が上昇している傾向が見られた。この結果から、高度なバイオフィーム形成能を保有する *S. pseudintermedius* は、*mecA* 遺伝子非依存的に薬剤耐性を増加させることが示唆された。一方で、AMPC 耐性を示した MSSP は極少数であった。MSSP の AMPC 耐性にはバイオフィーム形成よりも耐性遺伝子に依存している可能性が示唆された。また、今回の研究において、プラスミド性耐性遺伝子のプロファイルについて検討していないため、更なる調査が必要である。加えて、MSSP におけるバイオフィーム形成能は、酸性条件で増加するとの報告もある (Couto ら、2015)。MSSP の薬剤耐性が環境条件に基づいて変化することも視野に入れて、今後研究を行う必要であろう。

薬剤耐性株の増加が起こることによって、抗生剤に代わる治療法を検討する必要性が考えられる。近年の報告によると、*S. aureus* のバイオフィームに対して、proteinase K や serine protease Esp といった特定のプロテアーゼを作用させ、バイオフィームを破壊できることが判明している (Boles ら、2008 ; Iwase ら、2010)。しかし、*S. pseudintermedius* が形成するバイオフィームに対するプロテアーゼの効果は、未だ報告されておらず、プロテアーゼの *S. pseudintermedius* バイオフィームに対する効果を評価し、バイオフィーム除去

に寄与する新薬の探索が必要となろう。

結論として、獣医領域におけるバイオフィルム形成 *S. pseudintermedius* 分離株は、様々な抗生剤に対して耐性を示すことがわかった。また、MSSP の ABPC 耐性機構の一つとして、バイオフィルムが関与している可能性が示唆された。*S. pseudintermedius* のバイオフィルム形成能は、薬剤耐性化を助長させる重要な特性といえる。したがって、抗生剤の単剤投与療法では、バイオフィルム感染症を治療するには不十分と考えられ、新たな医薬品の開発のためにも、*S. pseudintermedius* のバイオフィルム形成メカニズムの更なる研究が必要である。

## 2-5 小括

*S. pseudintermedius* 感染症は薬剤耐性に関与するため治療が困難となることが多い。本研究では、*S. pseudintermedius* のバイオフィルムが薬剤耐性に関与しているか否かを検討した。薬剤感受性試験の結果、9 薬剤において MIC とバイオフィルム形成能間で正の相関性が明らかとなり、バイオフィルム強度株には抗生剤に対する高度な抵抗力があることが示された。一方で、MSSP の ABPC 耐性株における、バイオフィルム強度株の *mecA* 遺伝子非依存的な薬剤耐性の増加が示された。このことから、バイオフィルム形成が MSSP の薬剤耐性に関連性があるとし唆され、MSSP に対する抗生剤治療を補填する新たな薬剤を開発するために、バイオフィルム形成機序の更なる研究の必要性が示された。

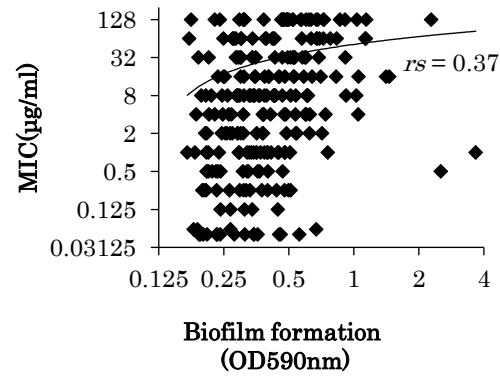
表 2-1 犬猫臨床由来 *S. pseudintermedius* 分離株の最小発育阻止濃度 (MIC) の分布 (n = 250)

薬剤名	MIC (μg / mL) を示す分離株数														ブレイクポイント (μg / mL)	耐性株数	耐性率
	≤0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	≥512			
ABPC	19	5	15	15	25	19	19	31	22	23	24	33			0.5	211	84.4 %
AMPC	10	2	4	18	15	15	21	16	7	17	44	38	22	19	8	163	65.2 %
MPIPC	23	37	32	35	13	8	1	2	6	4	4	8	21	56	0.5	158	63.2 %
CEX				8	61	9	29	30	8	6	12	21	41	25	8	143	57.2 %
CFV	19	36	32	14	20	11	4	9	5	3	2	7	3	85	8	114	45.6 %
ERFX	33	16	1	3		1	4	47	91	48	6				4	196	78.4 %
OBFX		1	27	21	1		1	1	1	67	126	3		1	8	199	79.6 %
EM	4	36	15	4										191	8	191	76.4 %
GM	33	18	3		1	5	39	71	53	17	7			3	8	151	60.4 %
CP							27	90	13	6	97	17			32	120	48.0 %
MINO	99	7	3	9	24	55	26	24	3						16	3	1.2 %
VCM				1	109	139						ND	ND	ND	16	0	0.0 %

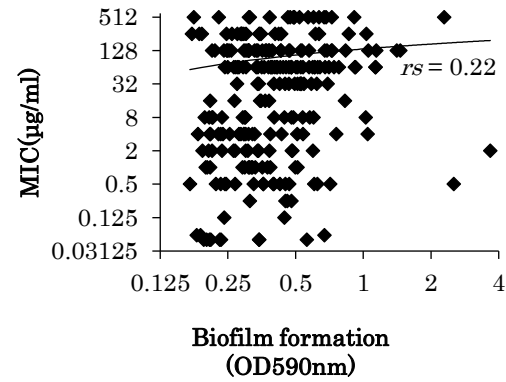
表 2-2 *S. pseudintermedius* のバイオフィルム形成能別の薬剤耐性分布

薬剤名	バイオフィルム形成能					
	強度		中度		弱度	
	(n = 62)		(n = 130)		(n = 58)	
	n	%	n	%	n	%
ABPC	60	96.8	109	83.8	42	72.4
AMPC	50	80.4	85	65.4	28	48.3
MPIPC	49	79.0	82	62.3	27	46.6
CEX	48	77.4	70	53.8	25	43.1
CFV	46	74.2	55	42.3	13	22.4
ERFX	56	90.3	101	77.7	39	67.2
OBFX	56	90.3	102	78.5	41	70.7
EM	52	83.9	99	76.2	40	69.0
GM	41	66.1	76	58.5	34	58.6
CP	26	41.9	72	55.4	22	37.9
MINO	1	1.6	1	0.8	1	1.7
VCM	0	0.0	0	0.0	0	0.0

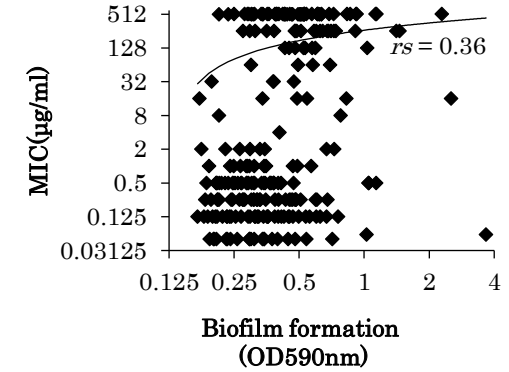
A. ABPC

 $P < 0.01$ 

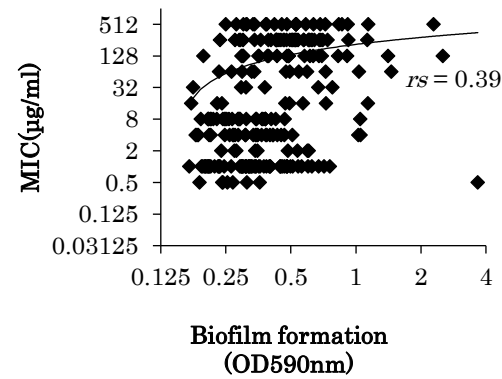
B. AMPC

 $P < 0.01$ 

C. MIPIC

 $P < 0.01$ 

D. CEX

 $P < 0.01$ 

E. CFV

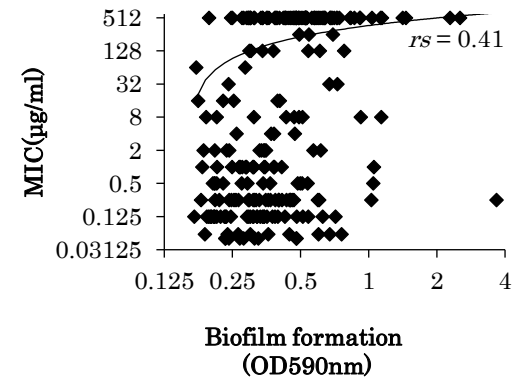
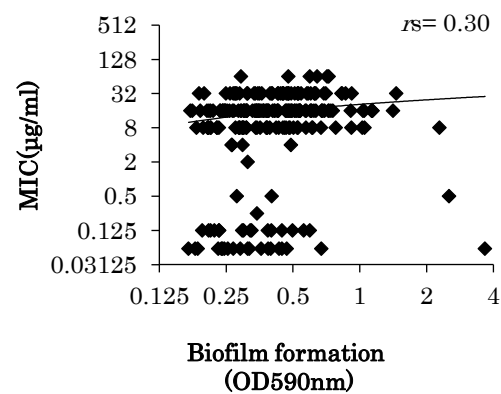
 $P < 0.01$ 

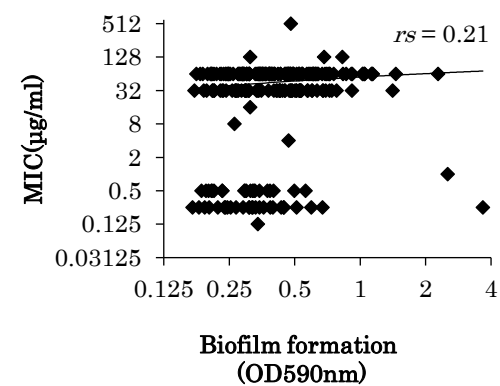
図 2-1-1 *S. pseudintermedius* の MIC 値及び  $\text{OD}_{590\text{nm}}$  値の相関図 (ペニシリン系、セフェム系薬剤)



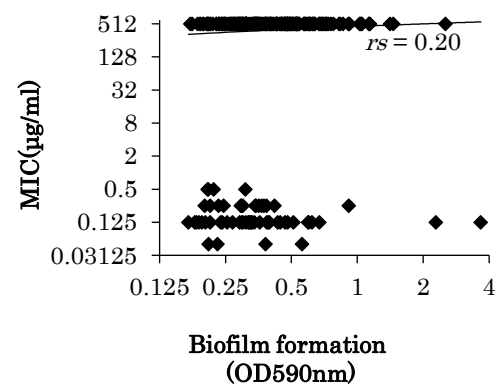
F. ERFX

 $P < 0.01$ 

G. OBFX

 $P < 0.01$ 

H. EM

 $P < 0.01$ 

I. GM

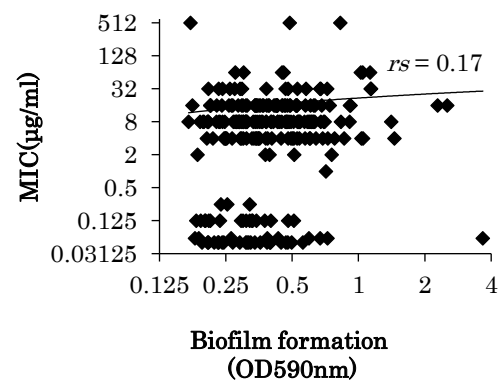
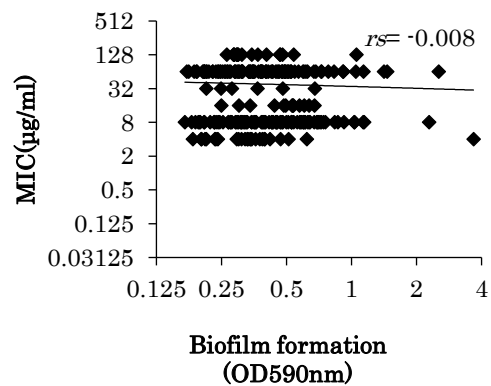
 $P < 0.01$ 

図 2-1-2 *S. pseudintermedius* の MIC 値及び OD<sub>590nm</sub> 値の相関図 (ニューキノロン系、マクロライド系、アミノグリコシド系薬剤)

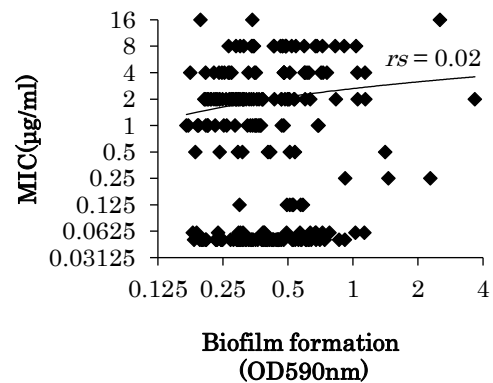
J. CP

$P = 0.89$



K. MINO

$P = 0.65$



L. VCM

$P = 0.06$

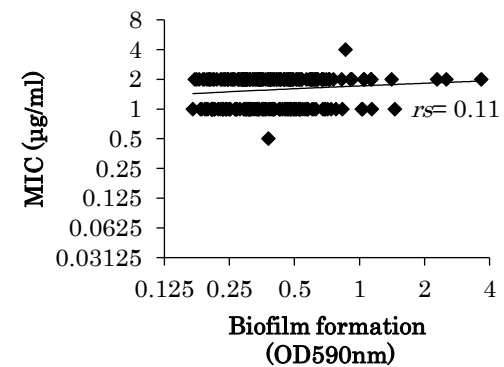


図 2-1-3 *S. pseudintermedius* の MIC 値及び OD<sub>590nm</sub> 値の相関図 (クロラムフェニコール系、テトラサイクリン系、ポリペプチド系薬剤)

表 2-3 動物種別 MRSP 及び MSSP 分布

<i>mecA</i>	MPIPC ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	定義	犬		猫		合計	
			(n = 228)		(n = 22)		(n = 250)	
			n	%	n	%	n	%
+	$\geq 0.5$	MRSP	127	55.7	18	81.8	145	58.0
+	$< 0.5$		16	7.0	1	4.5	17	6.8
-	$\geq 0.5$		12	5.3	1	4.5	13	5.2
-	$< 0.5$	MSSP	73	32.0	2	9.1	75	30.0

表 2-4 MSSP におけるバイオフィルム形成能別 ABPC 及び AMPC 耐性分布

薬剤名	バイオフィルム形成能							
	強度		中度		弱度		合計	
	(n = 10)		(n = 44)		(n = 21)		(n = 75)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
ABPC	9	90	27	61.4	7	33.3	43	57.3
AMPC	2	20	4	9.1	1	4.8	7	9.3

### 第3章 バイオフィルム形成 *Staphylococcus pseudintermedius* の

#### 炎症誘引物質に関する検討

##### 1 緒言

バイオフィルムは、菌体外に分泌された多糖体やタンパク質などから構成されており、慢性及び難治性感染症の原因としてしばしば問題視されている (Seth ら、2012 ; Di Domenico、2015 ; Percival ら、2015)。バイオフィルム内の細菌は休止状態であるため、分裂・増殖を活発に行っている細菌に対して特異的に働く  $\beta$ -ラクタム系、ニューキノロン系及びアミノグリコシド系などの抗生剤に対して耐性を示すことから、治療に障害が生じることが報告されている (Peterson、2005)。また、*Pseudomonas aeruginosa* が産生したバイオフィルムは、インターロイキン 18 (IL-18) 及び腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) 誘導、好中球侵入の亢進及び続発的な組織損傷を引き起こすことが明らかにされている (Mittal ら、2009)。これらの報告から、バイオフィルムは組織のホメオスタシスに対して局所的な影響を及ぼすことが示唆される。

Pompilio らの報告 (2015) は、人の損傷関連感染症から分離される *S. pseudintermedius* はバイオフィルムが病原因子である可能性を、明らかにしている。*S. pseudintermedius* は犬や猫の膿皮症、膀胱炎、腎炎、肺炎、化膿性脳室炎及び円板脊椎炎などの様々な炎症性病変から分離されることから (Kadlec ら、2010 ; Rubin ら、2011 ; Casagrande Proietti ら、2012 ; Foster ら、2014 ; Headley ら、2017)、*S. pseudintermedius* 感染症による炎症反応の一因として、バイオフィルムが関与している可能性が考えられる。さらに、バイオフィルム産生菌の代謝物が大腸がんの発生や進行に関与しているとの報告も存在している (Johnson ら、2015)。しかし、*S. pseudintermedius* のバイオフィルムは、遷延性炎症性疾患を伴う可能性が示唆されているのみで、バイオフィルムによる直接的な炎症性反応についての報告は未だない。

今回の研究では、バイオフィルム形成過程で産生される代謝産物に着目し、*S. pseudintermedius* のバイオフィルムがマクロファージに及ぼす影響を *in vitro* で検討した。また、第 1 章において、同一菌種間バイオフィルム形成能に差があることがわかったので、強度株と弱度株間において炎症反応に差はあるのかを調べた。

## 2 材料・方法

### 2-1 使用菌株

犬猫由来 *S. pseudintermedius* 250 株より、強度株と弱度株からランダムに選抜し、各実験に供した。

### 2-2 供試細胞

供試細胞はマウスマクロファージ由来株細胞である RAW264.7 細胞 (American Type Culture Collection、USA) を使用した。RAW264.7 細胞は、6 ウェルプレート (日本ジェネティクス、東京) 内に細胞密度を  $3.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$  に調整し、30 %グルコース加ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM、日水製薬、東京) に 10 %牛胎仔血清 (FBS)、1 % ペニシリン・ストレプトマイシン (PS) を調整し培養したものを実験に用いた。

### 2-3 RAW264.7 細胞と菌培養上清の共培養

HIA で 37℃、24 時間培養した *S. pseudintermedius* を 30 %グルコース加 DMEM にマックファーランド標準濁度液 0.5 ( $1 \sim 2 \times 10^8 \text{ CFU / mL}$ ) の濁度と同等になるように懸濁し、35℃、24 時間静置培養しバイオフィルムを形成させた。培養後、12,000 rpm、5 分間遠心し、上清を 0.22  $\mu\text{m}$  メンブランフィルター (Sartorius Stedim Biotec GmbH、ドイツ) でろ過を行い、細菌を除去した。この工程を経て、バイオフィルム代謝産物を含む、バイオフィルム形成した

細菌の培養上清（Biofilm conditioned medium : BCM）を作製した。BCM 20 mL に対し、FBS 2 mL、PS 200  $\mu$ L、50 % NaHCO<sub>3</sub> 2 mL を加え、コンフルな状態まで培養した RAW264.7 細胞に 2 mL ずつ接種し、37°C、24 時間、5 % CO<sub>2</sub> 培養を行った。なお、第 1 章と異なる条件で培養しているが、*S. pseudintermedius* 分離株のバイオフィーム形成能にはほとんど影響がない方法であることを確認している。

#### 2-4 炎症誘引因子の同定

BCM 中に含まれる RAW264.7 細胞の炎症を惹起する物質を同定するため、BCM を proteinase K (0.5 U /mL ; Roche、スイス)、DNase (10 U /mL ; タカラバイオ) 及び RNase (12 U /mL ; タカラバイオ) により、37°C、24 時間の条件下で処理した。Proteinase K 及び DNase を失活させるため、95°C、10 分間加熱処理を行った。また、加熱による影響を比較するため、加熱処理のみを行ったサンプルも用意した。なお、未処理の BCM を比較対照とした。

#### 2-5 RT-PCR

BCM と共培養した RAW264.7 細胞 2 mL に対し、TRI Reagent<sup>®</sup>TM (コスモバイオ、東京) を 1 mL ずつ加え -80 °C で一晩静置した。TRI Reagent<sup>®</sup>TM のマニュアルに従い、RNA を抽出し、High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific K.K.) を用いて RT-PCR を行った。1 検体あたりの組成は、RT buffer 2.0  $\mu$ L、dNTP 0.8  $\mu$ L、Random primer 2.0  $\mu$ L、RT 1.0  $\mu$ L、RNase Inhibitor 1.0  $\mu$ L、DW 3.2  $\mu$ L、RNA 1  $\mu$ L の計 10  $\mu$ L である。RT-PCR プロトコールは High capacity cDNA Reverse Transcription Kit の説明書に従い、25°C、10 分間、37°C、120 分間、85°C、5 分間行い、4°C で静置した。

#### 2-6 Real-time PCR

Go Taq qPCR Master Mix (Promega) を用い、BCM と共培養させた RAW264.7 細胞における IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、Toll-like receptor (TLR) 1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9 の mRNA 発現量を  $\Delta\Delta$ Ct 法により定量した。Real-time PCR に用いたプライマーは既報のものを使用し、表 3-1 に記載した (Nishiumi ら、2010 ; Takeuchi ら、2012 ; Nishida ら、2013 ; Milora ら、2014 ; Ren ら、2016)。また、各々のプライマーが載っている論文に準拠し、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子を内因性コントロールとして用い実験を行った。1 検体あたりの real-time PCR 組成は、Master Mix 10  $\mu$ L、Primer forward (10  $\mu$ M) 0.4  $\mu$ L、Primer reverse (10  $\mu$ M) 0.4  $\mu$ L、cDNA 0.5  $\mu$ L、DW 8.7  $\mu$ L、合計 20  $\mu$ L である。Real-time PCR プロトコールは Go Taq qPCR Master Mix (Promega) の説明書に従い、95 $^{\circ}$ C、2 分、95 $^{\circ}$ C、3 秒、60 $^{\circ}$ C、30 秒を 40 回の増幅反応を行い、60 $^{\circ}$ C で静置した。

## 2-7 ウェスタンブロット解析

BCM とコンフル状態の RAW264.7 細胞を 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で、5 分間、15 分間、30 分間及び 1 時間共培養させた。その後 RAW264.7 細胞を回収し、Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4、150 mM NaCl、1% Triton X-100、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1 mM EDTA、10 mM NaF) を用いて全細胞懸濁液を作製した。ウェスタンブロット法を用いて、RAW264.7 細胞内に存在する TLR シグナル伝達系に関わるタンパク質の発現量を、各培養時間別に比較した。今回標的としたタンパク質は、myeloid differentiation primary response 88 (MyD88)、phospho-interleukin-1 receptor associated kinase 4 (p-IRAK4)、total IRAK4 (t-IRAK4)、phospho-nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) p65 (p-p65) 及び total NF $\kappa$ B p65 (t-p65) である。この実験に用いた各タンパク質の一次抗体は Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA) で購入



し、500 倍希釈して使用した。また、二次抗体として抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (Cell Signaling Technologies) を 1,000 倍希釈して使用した。内因性コントロールとしては GAPDH を用いた。

## 2-8 ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

BCM 19 mL に 2 % デオキシコール酸ナトリウム 400  $\mu$ L を入れ、4 $^{\circ}$ C で 30 分間静置した。その後、100 % トリクロロ酢酸 1.5 mL 入れ、4 $^{\circ}$ C で一晩静置し、アセトン 10 mL を加え 15,000 rpm、5 分間遠心を 2 回行い、沈殿物を 1 $\times$  TNE バッファー (Tris 10 mM、NaCl 200 mM、EDTA 1 mM) 100  $\mu$ L で溶解した。このサンプルを SDS-PAGE 用のサンプルバッファー (ナカライテスク) 20  $\mu$ L に混合し、100 $^{\circ}$ C、5 分加熱して泳動用サンプルを作製した。Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific K.K.) を用いて総タンパク量を測定し、分離用ゲル e・パジエル 7.5 % (アトー、東京) を用いて、タンパク質量が 20  $\mu$ g ずつ入るようウェルに分注し、泳動用バッファー (Tris 25 mM、Glycine 192 mM、0.1 % SDS) を用い、電圧は 30 mA、100 V で泳動を行った。泳動終了後、EzStainSilver (アトー) のマニュアルに従い、鍍銀染色を行った。

## 2-9 凍結乾燥

15 mL コニカルチューブに BCM 2 mL を入れ、-80 $^{\circ}$ C で凍結させた。凍結乾燥機 FDU-1200 (EYELA、東京) を用いて一晩かけ BCM を乾燥させ、0.1 % トリフルオロ酢酸 (TFA) 100  $\mu$ L に溶解した。

## 2-10 マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析法 (MALDI TOF-MS)

ZiptipC<sub>18</sub> (Merck、ドイツ) を用いて、マニュアルに従い、凍結乾燥サンプルの脱塩及び濃縮を行い、サンプルを ZiptipC<sub>18</sub> 内のフィルターに吸着させた。

TA30 (アセトニトリル 30  $\mu$ L、0.1 % TFA 70  $\mu$ L) を溶媒とした  $\alpha$ -cyano-4-hydroxyl cinnamic acid (HCCA) 飽和溶液 2  $\mu$ L を作製し、ZiptipC<sub>18</sub> に吸着したタンパク質をターゲットプレート上に直接溶出し、乾燥させた。測定には autoflex speed TOF /TOF (Bruker Daltonics、ドイツ) を用い、測定用ソフトウェアには flexControl、解析には flexAnalysis を使用した。パラメーターファイルとして「RP-1-5kDa.par」を使用し、Reflector Positive モードで 500 ~ 5,000 Da の範囲を測定した。また、Peptide calibration standard (Bruker) で分子量の校正を行った。

## 2-11 統計学的解析

各実験における有意差を調べるため、Wetch's test、Quade test、Steel test、Kruskal-Wallis test 及び Brunner-Munzel test を用いて統計学的解析を行った。(BellCurve for Excel, Social Survey Research Information Co., Ltd.、東京)。  
また、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 3 結果

### 3-1 バイオフィーム形成能間の炎症サイトカイン発現量の比較

強度株及び弱度株間での炎症反応の比較を行うため、ランダムに選抜したバイオフィーム弱度株 35 株及び強度株 37 株の BCM を、RAW264.7 細胞とそれぞれ共培養を行った。弱度株の炎症性サイトカイン発現量を比較対照として、real-time PCR にて測定した結果、IL-1 $\beta$  発現量は 4.97 倍、TNF- $\alpha$  発現量は 3.76 倍、弱度株より強度株の方が有意に高いことが判明した (\*\*:  $P < 0.01$ ; 図 3-1)。

### 3-2 BCM 中の炎症性誘引物質の検出

Proteinase K、DNase 及び RNase を BCM に加え、無添加 BCM と比較対象とし、炎症性サイトカイン発現量を測定し、BCM 中に含まれる炎症誘引物質の

検出を行った。この時、バイオフィーム形成強度株 4 株を選抜し、実験に供した。Proteinase K 添加 BCM は無添加 BCM に比べて、IL-1 $\beta$  発現量は 0.46 倍、IL-6 発現量は 0.40 倍、有意に低下していることが分かった (\*:  $P < 0.05$ )。また、DNase 添加 BCM の IL-6 及び TNF- $\alpha$  発現量と RNase 添加 BCM の TNF- $\alpha$  発現量の低下傾向が見られた。これに対し、熱処理 BCM では、全ての炎症性サイトカイン発現量に特異的な変化は認められなかった (図 3-2)。このことから、炎症誘引物質は耐熱性の菌体外分泌タンパク質であることが判明した。

### 3-3 TLR シグナルの発現

強度株 1 株の BCM を用いて、TLR と炎症反応の関連性を調べたところ、MyD88 及び p-IRAK4 のタンパク質発現量が処理 15 分後において増加傾向にあることがわかった。また、p-p65 のタンパク質発現量は、処理 15 分及び 30 分後においても、増加傾向が認められた (図 3-3)。従って、Myd88 の発現量の増加と、IRAK4 及び p65 のリン酸化が認められた。

また、強度株 3 株を用いて、TLR の mRNA 発現量を BCM との反応時間ごとに比較したところ、TLR1、2、3、4、6、7、8 及び 9 において 15 分後に上昇する傾向が見られたが、Kruskal - Wallis test を用いて統計的解析を行ったところ、有意差は認められなかった。また、TLR5 は反応が確認されなかった (図 3-4)。

### 3-4 バイオフィーム形成能別の菌体外分泌タンパク質の比較

弱度株と強度株を比較し、強度株に特異的な BCM 中のタンパク質を同定するため、弱度株 3 株及び強度株 3 株を選抜した。BCM 中に含まれるタンパク質を抽出し、SDS-PAGE にて形成能別にタンパク質のバンドパターンの比較を行った。その結果、15~140 kDa のバンドが見られた。強度株で特異的なバンドが 35 kDa 及び 50 kDa に存在していた。また、39、42、及び 60~120 kDa 以

上のバンドが強度株で増強していることが認められた (図 3-5)。

次に、SDS-PAGE で区別できない低分子タンパク質の比較を MALDI TOF-MS を用いて解析した結果、強度株に特異的なピークが 2,715 Da 及び 2,789 Da で観察された (図 3-6)。

これらの結果から、強度株からは特異的なタンパク質が分泌されていることがわかった。

#### 4 考察

第 1 章より、バイオフィルム形成能には同一菌種間においても差があることから、本研究では、バイオフィルム形成能が宿主炎症反応にも影響する可能性に着目した。そして、炎症反応とバイオフィルム形成能との関係性を評価するために、*S. pseudintermedius* の弱度株及び強度株の BCM を用いて RAW264.7 細胞の炎症性サイトカイン発現量を調べたところ、強度株は、弱度株と比較して IL-18 及び TNF- $\alpha$  が有意に高いことがわかった。近年の報告より、*S. aureus* 強度株を接種したマウスの TNF- $\alpha$  発現量が、*S. aureus* 弱度株を接種したマウスの TNF- $\alpha$  発現量より、1.47 倍有意に高いことが報告された (Gogoi-Tiwari ら、2017)。このことから、強度株は炎症反応を増強する可能性が示唆された。また、第 2 章及び他の報告により、強度株は高度な薬剤耐性を示すことが明らかにされている (Sahal ら、2014)。過去の報告と今回の結果から、*S. pseudintermedius* 強度株は、抗生剤治療だけでは完治させることが難しく、さらに、宿主組織の炎症を誘発することが示唆された。

強度株の BCM 中に含まれる炎症誘引物質を探索するため、各酵素を添加し、RAW264.7 細胞に反応させた結果、熱処理 BCM で特異的な変化が見られなかったこと、及び proteinase K 添加で炎症性サイトカインが有意に低下したことから、炎症誘引物質は耐熱性タンパク質であることが示唆された。この耐熱性タンパク質が関与する炎症反応メカニズムについて調べるため、TLR との関連性

を調査した。TLR とは、病原体に特異的な分子パターンを認識するレセプター（pattern recognition receptor : PRR）の代表的な存在であり、病原体の構成成分を認識することによって、IRAK4 や MyD88 などの細胞内アダプター分子を介してシグナルが伝達され、NFκB の活性化がおこり炎症性サイトカインの発現を誘導するなど、自然免疫応答において重要な役割を果たしている（Kumar ら、2011）。今回の実験の結果、MyD88 及び IRAK4 の発現が認められた。このことから、炎症性サイトカインの発現は、RAW264.7 細胞内の TLR シグナル伝達経路の刺激を経て誘発されたことが示唆された。過去の報告から、マクロファージ内の TLR シグナル伝達経路は、炎症性サイトカインの発現を調整することが分かっている（Ness ら、2006 ; Shintani ら、2013）。副鼻腔炎の病態と関連があるバイオフィームは、副鼻腔組織内の TLR2 及び NFκB を介して炎症を引き起こしているということが報告されている（Sun ら、2012）。本実験では、MyD88 の発現及び IRAK4 のリン酸化が認められたことから TLR が関与していること、p65 のリン酸化が認められたことから NFκB の関連性を示していることが判明したため、TLR シグナル伝達経路から炎症性サイトカインの発現が誘導されていることが示された。また、BCM と共培養させた RAW264.7 細胞の TLR の発現量を比較し、RAW264.7 細胞で炎症反応に関係する特異的な TLR を調べた。細菌由来のタンパク質に関与があるとされるのは TLR1、2 及び 6 と報告されている（Kawai ら、2011）。本研究では、TLR5 以外の TLR の発現量増加が認められたことから、BCM 中に含まれる炎症誘引物質は、TLR1、2 及び 6 に限らず、様々な TLR に関与していることが示唆された。したがって、炎症誘引物質として、有意差の認められなかった DNA や RNA の可能性も否定できないため、今後更なる調査が必要と考えられる。また、今回の研究では強度株及び弱度株の TLR シグナルの比較まで至っていないため、バイオフィーム形成能別の検討も今後必要と考えられる。

今回確認された耐熱性タンパク質について、強度株及び弱度株での比較を行

った。SDS-PAGE の結果より、強度株において特異的なバンドが複数観察された。Secor らの報告によると、*S. pseudintermedius* を静置及び振とう培養で比較すると、菌体外分泌タンパク質が異なるということがわかった (Secor ら、2011)。今回のバイオフィーム形成能の比較においても、SDS-PAGE のバンドパターンより、分泌タンパク質が異なることが判明した。一方、MALDI TOF-MS で確認された強度株に特異的な低分子タンパク質は、検出率が低かったために、アミノ酸配列を同定するまでには至らなかった。しかし、強度株及び弱度株を区別するための指標になり得る可能性が示唆された。*S. pseudintermedius* が分泌する主要な炎症誘因物質として、表皮剥奪毒素や毒素性ショック症候群毒素-1 などがあり、様々な耐熱細菌外毒素を産生している (Iyori ら、2011; Garbacz ら、2013)。しかし、外毒素とバイオフィームとの関連性についての報告は認められず、今後は、バイオフィーム形成能で異なる菌体外分泌タンパク質を同定し、炎症反応との関連性を調べる必要があるであろう。

以上のことから、*S. pseudintermedius* 分離株が形成するバイオフィーム形成時の分泌タンパク質は、RAW264.7 細胞の TLR シグナルを介して、炎症性反応を誘発する耐熱性タンパク質であることが示唆された。そして、強度株による感染症は、炎症性反応を強く促進させる可能性が示唆された。今回の結果から示された耐熱性タンパク質は、*S. pseudintermedius* によるバイオフィーム関連炎症を引き起こしている因子である可能性が考えられた。今後は、*S. pseudintermedius* のバイオフィーム形成能で異なる分泌タンパク質を明らかにし、TLR に特異的な作用機序を明らかにすることで、バイオフィーム関連感染症の病態メカニズムの解明及びその治療方針の検討に役立つ可能性がある。

### 3-5 小括

細菌の形成するバイオフィームは慢性及び難治性の感染症の原因となっている。*S. pseudintermedius* のバイオフィームと炎症反応との関連性は示唆されて

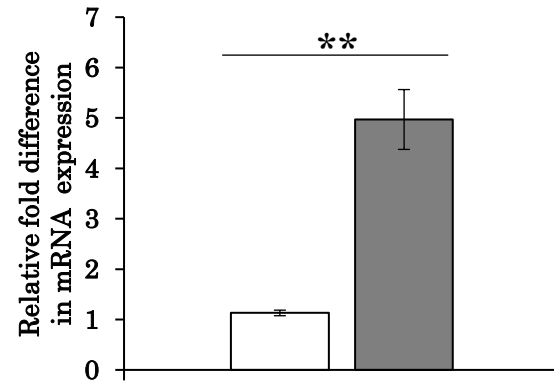
いるものの、未だ詳細な報告はない。本研究では、バイオフィーム形成過程において産生される代謝産物に着目し、犬及び猫の病変部位から採取された *S. pseudintermedius* のバイオフィームがマクロファージに及ぼす影響を *in vitro* で検討した。バイオフィーム形成能の異なる菌株の BCM と RAW264.7 細胞をそれぞれ共培養させたところ、強度株は弱度株よりも、IL-1 $\beta$  及び TNF- $\alpha$  発現量の有意な増加が認められた。次に、強度株の BCM 中に含まれる炎症誘引物質を調べた結果、proteinase K 添加による炎症性サイトカイン発現量の抑制が認められたこと、及び熱処理を行っても炎症性サイトカイン発現量に変化が見られなかったことから、耐熱性の菌体外分泌タンパク質が炎症反応を誘引していることが明らかとなった。この炎症反応経路を調べたところ、MyD88 の発現と、IRAK4 及び p65 のリン酸化がウエスタンブロット法により認められたため、TLR シグナル伝達経路を経て炎症性サイトカインの発現が誘導されていることが判明した。また、SDS-PAGE 及び MALDI TOF-MS を用いて強度株及び弱度株での比較を行ったところ、強度株に特異的なタンパク質のバンド (35 kDa 及び 50 kDa) 及びピーク (2,715 Da 及び 2,789 Da) を示した。今後、これらのタンパク質を同定し、TLR に特異的な作用機序を調査することで、バイオフィーム関連感染症の病態メカニズムが解明され、*S. pseudintermedius* 感染症の治療方針の検討に役立つ可能性がある。

表 3-1 Real-time PCR 解析に用いたプライマーの塩基配列

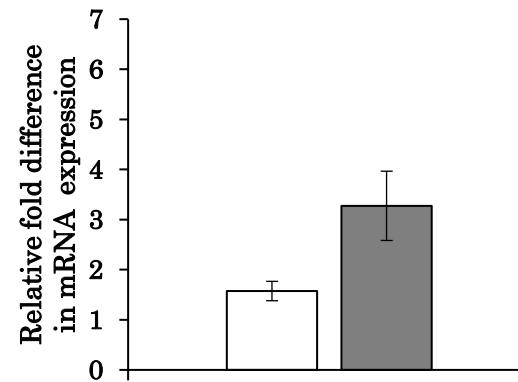
遺伝子名	塩基配列 (5'-3')	引用文献
GAPDH-F	ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG	Ren ら
GAPDH-R	CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC	
IL-18-F	AAA GAT GAA GGG CTG CTT CC	Nishida ら
IL-18-R	TTC TCC ACA GCC ACA ATG AG	
IL-6-F	GAT GGA TGC TAC CAA ACT GG	Milora ら
IL-6-R	TCT GAA GGA CTC TGG CTT TG	
TNF- $\alpha$ -F	CCA AAG GGA TGA GAA GTT CC	Nishiumi ら
TNF- $\alpha$ -R	TCC ACT TGG TGG TTT GCT AC	
TLR1-F	GTC AAA GCT TGG AAA GAA TCT GAA G	Takeuchi ら
TLR1-R	AAT GAA GGA ATT CCA CGT TGTT TC	
TLR2-F	GAA TTG CAT CAC CGG TCA GAA	
TLR2-R	CCT CTG AGA TTT GAC GCT TTG TC	
TLR3-F	CGA AAG TTG GAC TTG TCA TCA AAT C	
TLR3-R	ACT TGC CAA TTG TCT GGA AAC AC	
TLR4-F	TTC AGA ACT TCA GTG GCT GGA TT	
TLR4-R	CCA TGC CTT GTC TTC AAT TGT TT	
TLR5-F	CAG TCC TGG AGC CTG TGT TGT	
TLR5-R	ACC CGG CAA GCA TTG TTC T	
TLR6-F	TGA ATG ATG AAA ACT GTC AAA GGT TAA	
TLR6-R	GGG TCA CAT TCA ATA AGG TTG GA	
TLR7-F	TGC CAC CTA ATT TAC TAG AGC TCT ATC TTT AT	
TLR7-R	TAG GTC AAG AAC TTG CAA CTC ATT G	
TLR8-F	GAA GCA TTT CGA GCA TCT CC	
TLR8-R	GAA GAC GAT TTC GCC AAG AG	
TLR9-F	CTC CAT CTC CCA ACA TGG TTC T	
TLR9-R	GCC AGC ACT GCA GCC TGT A	



A:IL-1 $\beta$



B:IL-6



C:TNF- $\alpha$

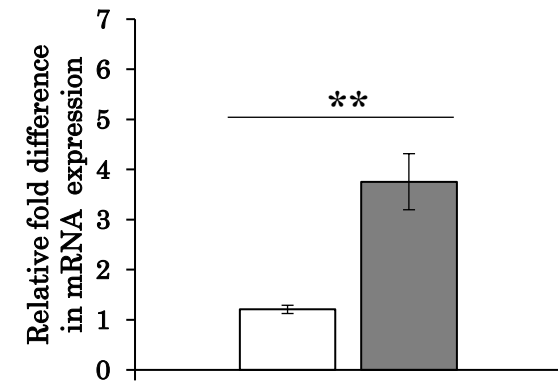


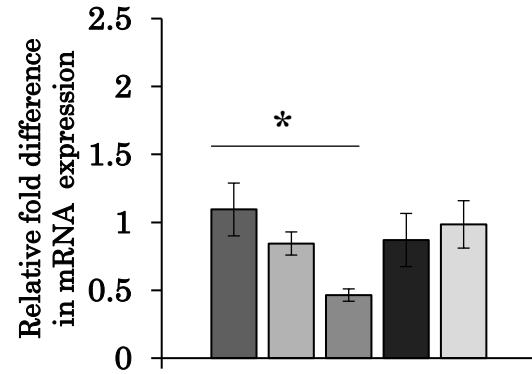
図 3-1 *S. pseudintermedius* のバイオフィルム形成能別の BCM における炎症性サイトカイン発現量の比較

(A) IL-1 $\beta$ 、(B) IL-6 及び (C) TNF- $\alpha$

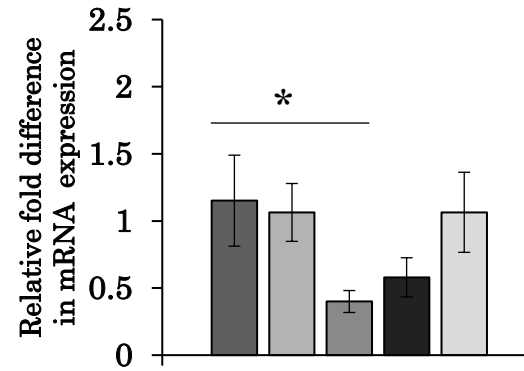
(□) ; バイオフィルム弱度形成弱度株 (n = 35)、(■) ; バイオフィルム強度形成強度株 (n = 37)

Brunner-Munzel test. \*\*:  $P < 0.01$ 。

A:IL-1 $\beta$



B:IL-6



C:TNF- $\alpha$

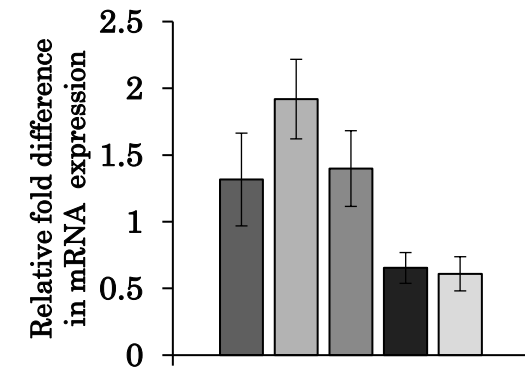


図 3-2 *S. pseudintermedius* バイオフィルム強度形成株由来 BCM の炎症性サイトカインの発現量の比較 (n = 4)

(A) IL-1 $\beta$ 、(B) IL-6 及び (C) TNF- $\alpha$ 。(■) ; 未処理、(□) ; 熱処理、(■) ; proteinase K 処理、(■) ; DNase 処理、(■) ; RNase 処理。Quade and Steel tests. \*:  $P < 0.05$ .

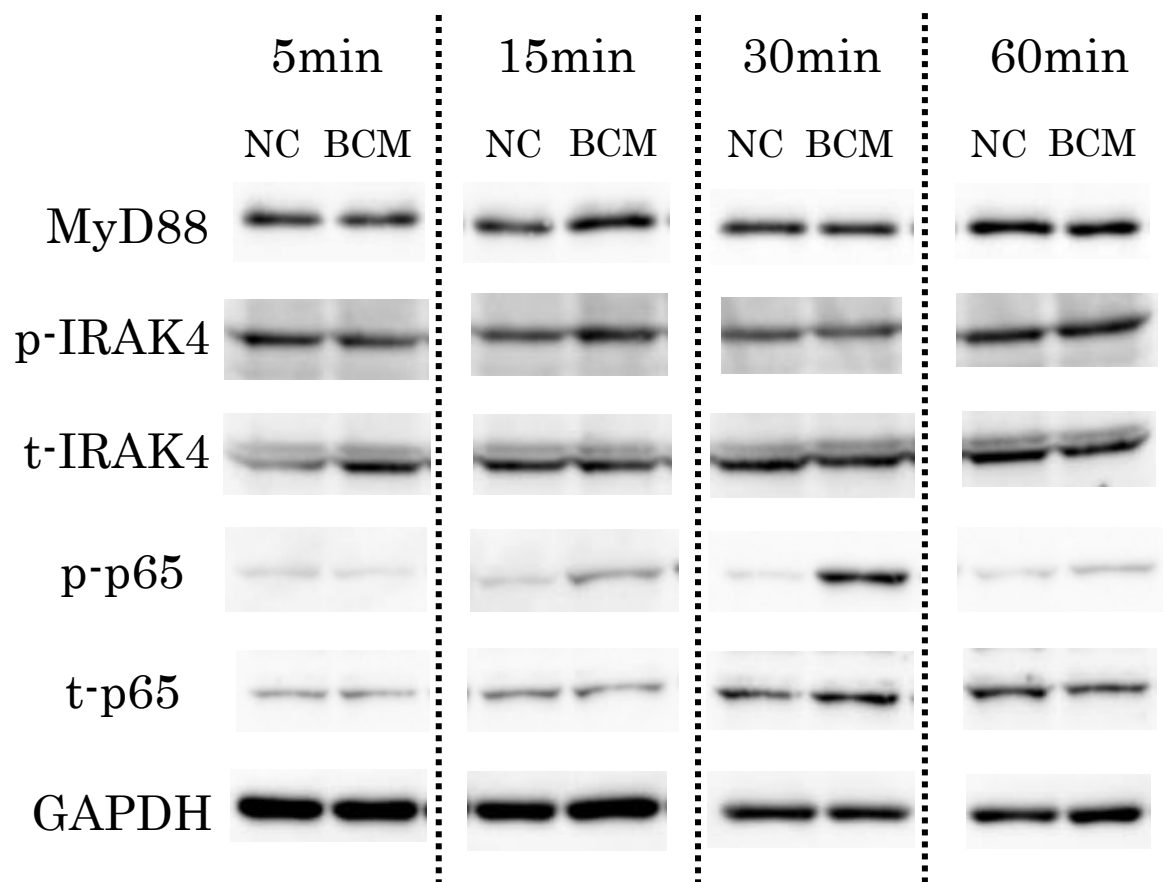


図 3-3 バイオフィルム形成強度株 BCM と共培養させた RAW264.7 細胞の  
TLR シグナルのウエスタンブロット解析

NC ; DMEM のみ BCM ; バイオフィルム形成培養上清

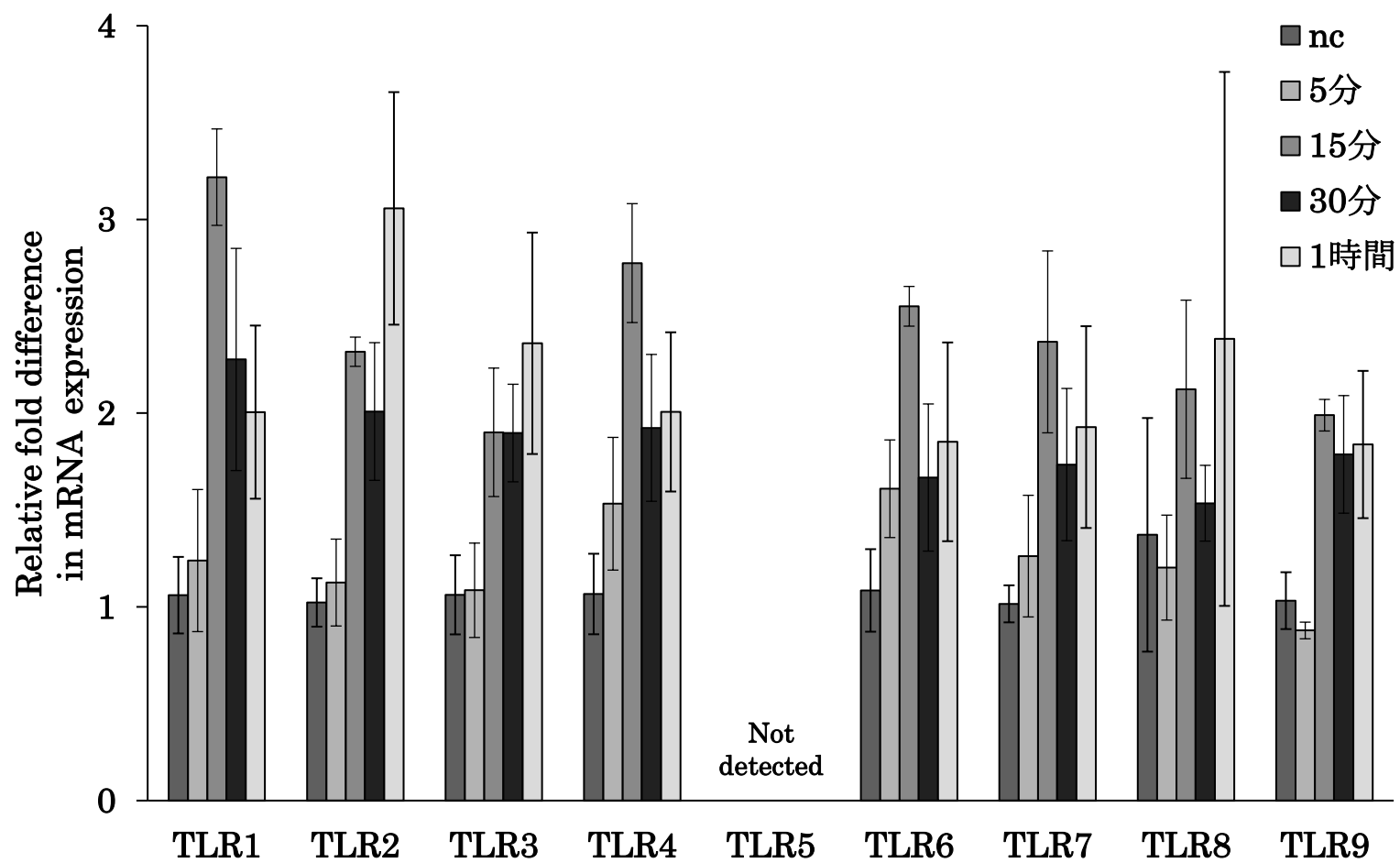


図 3-4 RAW264.7 細胞及びバイオフィルム形成強度株 BCM の共培養時間ごとにおける TLR の mRNA 発現量の比較

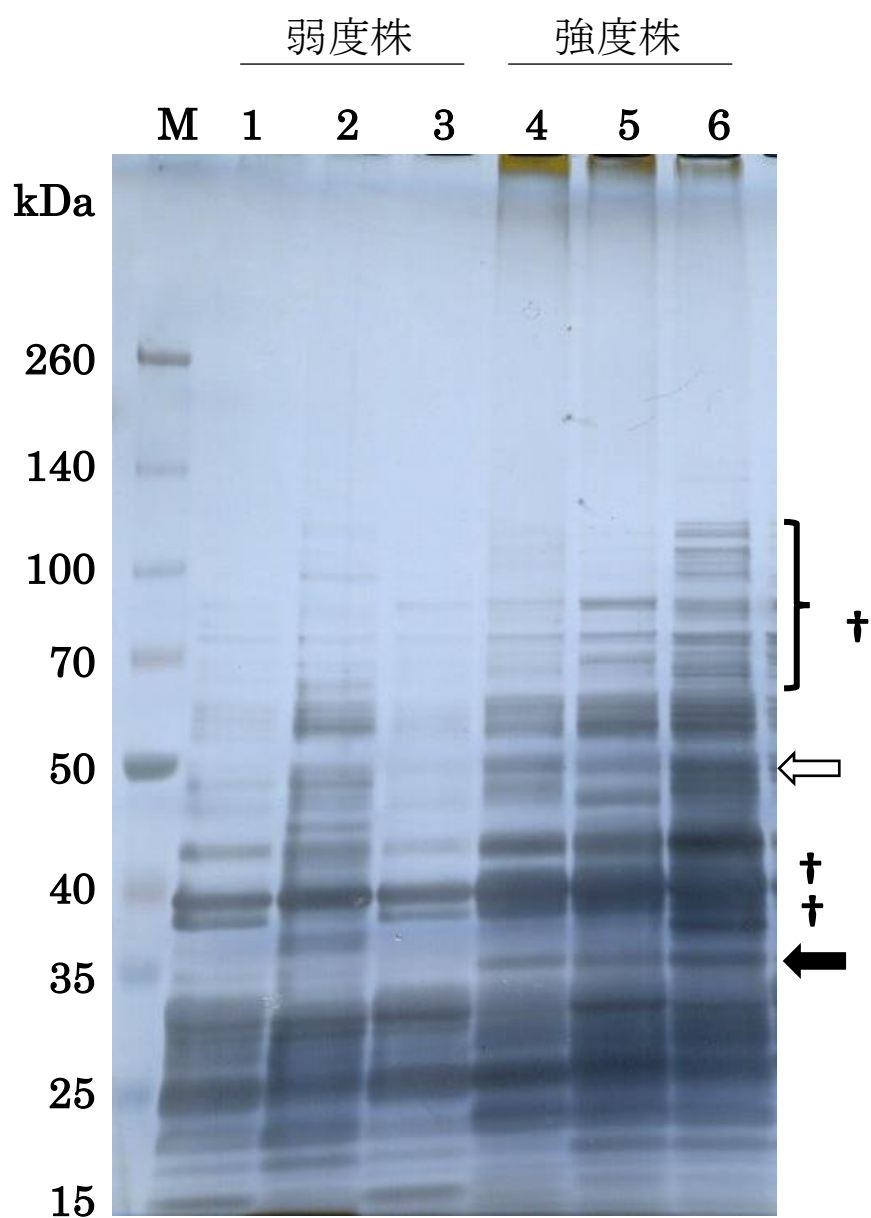


図 3-5 バイオフィーム形成弱度株 (n=3) 及び強度株 (n=3) の SDS-PAGE 像  
 Lane M ; 分子量マーカー、Lane1-3 ; バイオフィーム形成弱度株、Lane4-6 ; バイオフィーム形成強度株、白及び黒矢印 ; バイオフィーム形成強度株で特異的なバンド、† ; バイオフィーム形成強度株で増加しているバンド

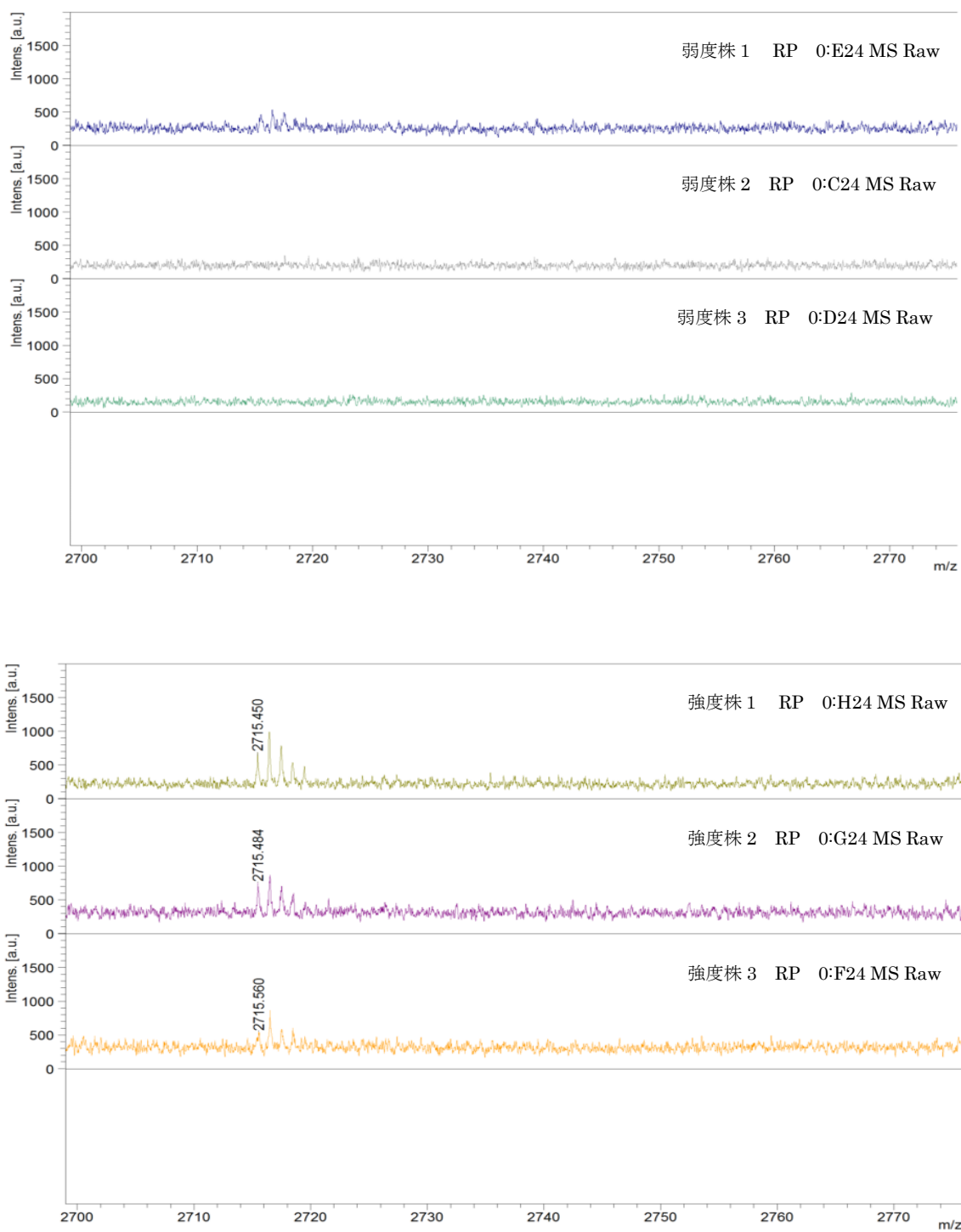


図 3-6-1 *S. pseudintermedius* のバイオフィーム形成弱度及び強度株 3 株の TOF-MS 解析

(2,700 ~ 2,776 m/z)

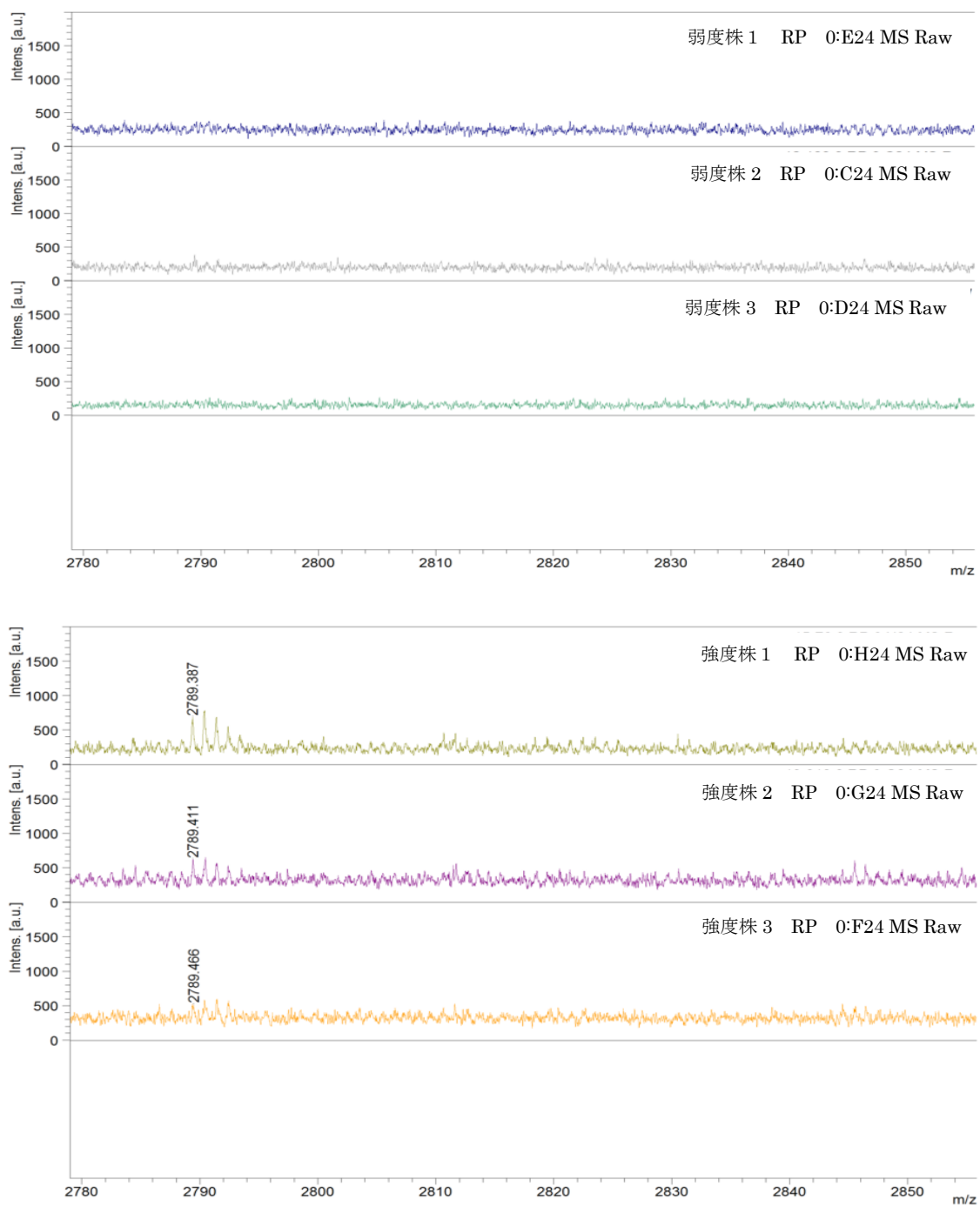


図 3-6-2 *S. pseudintermedius* のバイオフィルム形成弱度及び強度株 3 株の TOF-MS 解析

(2,780 ~ 2,856 m/z)

## 総括

小動物領域における *S. pseudintermedius* のバイオフィルム関連感染症対策を行うために、犬及び猫の臨床由来 *S. pseudintermedius* の分離状況及びバイオフィルム形成能の測定を行い、薬剤耐性への関与を検討し、バイオフィルムと炎症反応の関連性について評価した。その結果、以下の成績が得られた。

1. 犬及び猫の臨床由来 *S. pseudintermedius* 分離株のバイオフィルム形成能の評価を行い、動物種、病変部位及び診療施設とバイオフィルム形成能との関連性について調べた。*S. pseudintermedius* 分離株 250 株全てがバイオフィルム形成能を有することが判明し、それらのバイオフィルム形成能を分類したところ、強度株 62 株 (24.8%)、中度株 130 株 (52.0%) 及び弱度株 58 株 (23.2%) となった。*S. pseudintermedius* 分離株数は犬由来株が猫由来株より顕著に多かったが、バイオフィルム形成能を比べた結果、特に違いは認められなかった。また、バイオフィルム形成能に基づき、病変部位及び診療施設別に分離したところ、顕著な差は見られなかった。したがって、小動物臨床領域における *S. pseudintermedius* バイオフィルム感染症のリスクは、動物種、感染部位及び一次・二次診療施設などの由来には関連性がないことが明らかとなった。

2. 犬及び猫由来の臨床由来 *S. pseudintermedius* の薬剤感受性を調べ、薬剤耐性とバイオフィルム形成能の関連性について調査した。ペニシリン系、セファロスポリン系、ニューキノロン系、マクロライド系及びアミノグリコシド系薬剤において、MIC とバイオフィルム形成能との間で正の相関性が明らかになり、バイオフィルム形成能の高い株は抗生剤に対する抵抗力が高いことが判明した。小動物臨床領域におけるメチシリン耐性 *S. pseudintermedius* (MRSP) の分離率を調べた結果、猫由来 MRSP の割合が犬由来 MRSP よりも上回ったことか



ら、猫は MRSP のリザーバーとしての意義が高いことが示唆された。また、MIPIC 感受性及び *mecA* 遺伝子陰性であるメチシリン感受性 *S. pseudintermedius* (MSSP) は 75 株 (30 %) 分離され、これらにおける ABPC 耐性株は 43 株 (57.3 %) と高値を示した。ABPC 耐性株をバイオフィーム形成能別に分類し比較すると、バイオフィーム形成能が高い株ほど、耐性率が上昇している傾向が見られた。このことから、バイオフィーム形成能が MSSP の薬剤耐性に関連性があることが示唆された。

3. バイオフィームが慢性及び難治性感染症を引き起こす原因として、薬剤耐性化の増強のほかに、炎症反応との関連性が指摘されている。バイオフィーム形成 *S. pseudintermedius* が動物細胞に与える影響を検討するため、バイオフィーム形成過程において産生される代謝産物に着目し、炎症反応及び炎症誘引物質について調べた。バイオフィーム形成能の違いを調べた結果、強度株における BCM は、弱度株の BCM よりも、マウスマクロファージ由来株細胞である RAW264.7 細胞に対して IL-1 $\beta$  及び TNF- $\alpha$  の発現量の有意な増加を誘導していることが判明した。次に、強度株の BCM 中に含まれる炎症誘引物質を検討したところ、菌体外分泌タンパク質であることが示唆された。炎症反応経路を調べた結果、TLR を介して炎症を惹起していることがわかった。弱度株及び強度株の菌体外分泌タンパク質の比較を行うため SDS-PAGE 及び MALDI TOF-MS を実施したところ、強度株における特異的なバンド及びピークが明らかになった。このことにより、バイオフィーム形成能の違いによって、菌体外分泌タンパク質にも差が見られることが判明した。今後、今回の実験で明らかとなった強度株由来タンパク質を同定し、TLR に特異的な作用機序を明らかにすることで、バイオフィーム関連感染症の病態メカニズムの解明及び治療方針の検討に役立つ可能性がある。

本研究は犬及び猫の病変部位から分離した *S. pseudintermedius* の多くの株がバイオフィルムを中度から強度形成し、このバイオフィルムによって薬剤耐性や炎症の助長を起こすことを初めて明らかとした。本研究で得られた成果は、犬及び猫の *S. pseudintermedius* 感染症の治療を実施する上で有用な知見であり、小動物臨床領域におけるバイオフィルム関連感染症対策に貢献するものと考ええる。

## 謝辞

はじめに本研究を行うに際して終始懇篤なる御指導とご鞭撻を賜りました、日本獣医生命科学大学獣医寄生虫学研究室 池 和憲教授に深甚なる謝意を表します。

本研究に対し有益な御指導とご援助を賜りました、日本獣医生命科学大学獣医病理学研究室 高橋公正名誉教授、獣医微生物学研究室 片岡康准教授、木邊量子助教、東京医科歯科大学細胞生理学分野 越智広樹助教に深く感謝の意を表します。

また、本研究を行うに際して終始多大な御助言、ご協力を頂き、数々の御配慮を賜りました日本獣医生命科学大学獣医外科学研究室 原康教授、日本獣医生命科学大学生体分子化学研究室 片山欣哉准教授、佐藤稲子講師に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり終始多大なご協力を頂きました、有里怜学士、三橋真沙美学士、Napat Ruamrungsri、Wannapimol Kriangwanich の各氏に深く感謝の意を表します。

## 参考文献

- Abdallah. M., Chataigne. G., Ferreira-Theret. P., Benoliel. C., Drider. D., Dhulster. P. and Chihib, N. E. 2014. Effect of growth temperature, surface type and incubation time on the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. Appl Microbiol Biotechnol. 98: 2597-2607.
- Antunes, A. L. S., Bonfanti, J. W., Perez, L. R. R., Pinto, C. C. F., Freitas, A. L. P., Macedo, A., J. and Barth, A. L. 2011. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. Mem Inst Oswaldo Cruz. 106: 51-55.
- Asmat, A., Dada, A. C. and Gires, U. 2014. Biofilm formation, *gel* and *esp* gene carriage among recreational beach Enterococci. Glob J Health Sci. 6: 241-253.
- Bannoehr, J. and Guardabassi, L. 2012. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. Vet Dermatol. 23: 253-266.
- Bardiau, M., Yamazaki, K., Ote, I., Misawa, N., and Mainil, J. G. 2013. Characterization of methicillin - resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs and cats. Microbiol Immunol. 57: 496-501.
- Beenken, K. E., Blevins, J. S. and Smeltzer, M. S. 2003. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. Infect Immun. 71: 4206-4211.
- Boles, B. R. and Horswill, A. R. 2008. *agr*-mediated dispersal of

*Staphylococcus aureus* biofilms. PLoS Pathog. 4: e1000052.

Casagrande Proietti, P., Bietta, A., Coletti, M., Marenzoni, M. L., Scorza, A. V. and Passamonti, F. 2012. Insertion sequence IS256 in canine pyoderma isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with antibiotic resistance. Vet Microbiol. 157: 376-382.

Cirioni, O., Ghiselli, R., Silvestri, C., Minardi, D., Gabrielli, E., Orlando, F., Rimini, M., Brescini, L., Muzzonigro, G., Guerrieri, M. and Giacometti, A. 2011. Effect of the combination of clarithromycin and amikacin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in an animal model of ureteral stent infection. J Antimicrob Chemother. 66: 1318-1323.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard-Third Edition CLSI document M31-A3 Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-Second Informational Supplement (M100-S22) . Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Couto, N., Belas, A., Oliveira, M., Almeida, P., Clemente, C. and Pombo, C. 2015. Comparative RNA-seq-based transcriptome analysis of the virulence characteristics of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from small animals. Antimicrob Agents Chemother. 60: 962-967.

- Darwish, S. F. and Asfour, H. A. 2013. Investigation of biofilm forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *Sci World J.* 378492.
- Di Domenico, E. G. 2015. Microbial biofilms in dermatology: A matter of skin. *Esperienze Dermatologiche.* 17: 163-166.
- Dziva, F., Wint, C., Auguste, T., Heeraman, C., Dacon, C., Yu, P. and Koma, L. M. 2015. First identification of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains among coagulase-positive staphylococci isolated from dogs with otitis externa in Trinidad, West Indies. *Infect Ecol Epidemiol.* 5: 29170.
- Feng, Y., Tian, W., Lin, D., Luo, Q., Zhou, Y., Yang, T., Deng, Y., Liu, Y-H and Liu, J-H. 2012. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in pets from South China. *Vet Microbiol.* 160: 517-524.
- Ferran, A. A., Liu, J., Toutain, P. L. and Bousquet-Mélou, A. 2016. Comparison of the in vitro activity of five antimicrobial drugs against *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Front Microbiol.* 2: 1187.
- Foster, J. D., Trepanier, L. A. and Ginn, J. A. 2014. Use of linezolid to treat MRSP bacteremia and discospondylitis in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* 50: 53-58.
- Frank, K. L., Guiton, P. S., Barnes, A. M., Manias, D. A., Chuang-Smith, O. N., Kohler, P. L., Spaulding, A. R., Hultgren, S. J., Schlievert, P. M. and

Dunny, G. M. 2013. AhrC and Eep are biofilm infection-associated virulence factors in *Enterococcus faecalis*. Infect Immun. 81: 1696-1708.

Fujimura, S., Sato, T., Kikuchi, T., Gomi, K. and Watanabe, A. 2009. Efficacy of clarithromycin plus vancomycin in mice with implant-related infection caused by biofilm-forming *Staphylococcus aureus*. J Orthop Sci. 14: 658-661.

Fujimura, S., Sato, T., Mikami, T., Kikuchi, T., Gomi, K. and Watanabe, A. 2008. Combined efficacy of clarithromycin plus cefazolin or vancomycin against *Staphylococcus aureus* biofilm formed on titanium medical devices. J Antimicrob Agents. 32: 481-484.

Garbacz, K., Zarnowska, S., Piechowicz, L. and Haras, K. 2013. Pathogenicity potential of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine carriers and from dogs with infection signs. Virulence 4: 255-259.

Gerke, C., Kraft, A., Submuth, R., Schweitzer, O. and Gotz F. 1998. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion. J Biol Chem. 273: 18586-18593.

Gharsa, H., Ben Slama, K., Gómez-Sanz, E., Lozano, C., Klibi, N., Jouini, A., Messadi, L., Boudabous, A. and Torres, C. 2013. Antimicrobial resistance, virulence genes, and genetic lineages of *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in Tunisia. Microb Ecol. 66: 363-368.

Gogoi-Tiwari, J., Williams, V., Waryah, C. B., Costantino, P., Al-Salami, H., Mathavan, S., Wells, K., Tiwari, H. K., Hegde, N., Isloor, S., Al-Sallami, H.

and Mukkur, T. 2017. Mammary gland pathology subsequent to acute infection with strong versus weak biofilm forming *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: A pilot study using non-invasive mouse mastitis model. PLoS One. 12: e0170668.

Grönthal, T., Eklund, M., Thomson, K., Piiparinen, H., Sironen, T. and Rantala, M. 2017. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and the molecular epidemiology of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* in small animals in Finland. J Antimicrob Chemother. 72: 1021-1030.

Haddadin, R. N., Saleh, S., Al-Adham, I. S. 2010. The effect of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on virulence factors expressed by *Staphylococcus aureus* biofilms. J Appl Microbiol. 108: 1281-1291.

Han, J. I., Yang, C. H. and Park, H. M. 2015. Emergence of biofilm-producing *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in South Korea. Vet Q. 35: 207-210.

Headley, S. A., Pretto-Giordano, L. G., Nóbrega, D. F., Altrão, C. S., Villas-Boas, L. A., Alfieri, A. A. and Bracarense, A. P. F. R. L. 2017. Pyogenic ventriculitis and ventricular empyema associated with *Staphylococcus pseudintermedius* in a puppy. J Comp Pathol. 156: 152-157.

Hernández-Jiménez, E., Campo, R. D., Toledano, V., Vallejo-Cremades, M. T., Muñoz, A., Largo, C., Arnalich, F., García-Rio, F., Cubillos-Zapata, C. and López-Collazo, E. 2013. Biofilm vs. planktonic bacterial mode of growth: Which do human macrophages prefer? Biochem Biophys Res Commun. 441: 947-952.



- Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., Agata, T. and Mizunoe, Y. 2010. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. Nature. 465: 346-349.
- 伊從 慶太. 2014. *Staphylococcus pseudintermedius* の Update. 獣医臨床皮膚科 20: 73-84.
- Iyori, K., Futagawa-Saito, K., Hisatsune, J., Yamamoto, M., Sekiguchi, M., Ide, K., Son, W.G., Olivry, T., Sugai, M., Fukuyasu, T., Iwasaki, T. and Nishifuji, K. 2011. *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin EXI selectively digests canine desmoglein 1 and causes subcorneal clefts in canine epidermis. Vet Dermatol. 22: 319-326.
- Johnson, C. H., Dejea, C. M., Edler, D., Hoang, L., Santidrian, A. F., Felding, B. H., Ivanisevic, J., Cho, K., Wick, E. C., Hechenbleikner, E. M., Uritboonthai, W., Goetz, L., Casero, R. A. Jr., Pardoll, D. M., White, J. R., Patti, G. J., Sears, C. L. and Siuzdak, G. 2015. Metabolism links bacterial biofilms and colon carcinogenesis. Cell Metab. 21: 891-897.
- Kadlec, K., Schwarz, S., Perreten, V., Grönlund Andersson, U., Finn, M., Greko, C., Moodley, A., Kania, S. A., Frank, L. A., Bemis, D. A., Franco, A., Iurescia, M., Battisti, A., Duim, B., Wagenaar, J. A., van Duijkeren, E., Weese, J. S., Fitzgerald, J. R., Rossano, A. and Guardabassi, L. 2010. Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America. J Antimicrob Chemother. 65: 1826-1828.
- Kadlec, K., Weiß, S., Wendlandt, S., Schwarz, S. and Tonpitak, W. 2016.

Characterization of canine and feline methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from Thailand. Vet Microbiol. 194: 93-97.

Kapral, F. A. and Miller, M. M. 1971. Product of *Staphylococcus aureus* responsible for the scalded-skin syndrome. Infect Immuni. 4: 541-545.

Kasai, T., Saegusa, S., Shirai, M., Murakami, M. and Kato, Y. 2016. New categories designated as healthcare-associated and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs. Microbiol Immunol. 60: 540-551.

Kawai, T. and Akira, S. 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity. 34: 637-650.

Kawakami, T., Shibata, S., Murayama, N., Nagata, M., Nishifuji, K., Iwasaki, T. and Fukata, T. 2010. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. J Vet Med Sci. 72: 1615-1619.

厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業、2016、ICU 部門年報、  
[https://janis.mhlw.go.jp/report/open\\_report/2016/3/3/ICU\\_Open\\_Report\\_201600.pdf](https://janis.mhlw.go.jp/report/open_report/2016/3/3/ICU_Open_Report_201600.pdf)

Kumar, H., Kawai, T. and Akira S. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. Int Rev Immunol 30: 16-34.

Lehner, G., Linek, M., Bond, R., Lloyd, D. H., Prenger-Berninghoff, E., Thom, N., Straube, I., Verheyen, K. and Loeffler, A. 2014. Case-control risk factor study of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*

- (MRSP) infection in dogs and cats in Germany. *Vet Microbiol.* 168: 154-160.
- Lewis, K. 2002. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 999-1007.
- Mah, T. F. C. and O' Toole, G. A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *Trends in Microbiol*, 9: 34-39.
- Mcdougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D. and Kjelleberg, S. 2012. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol.* 10: 39-50.
- Meije, Y., Almirante, B., Del Pozo, J. L., Martín, M. T., Fernández-Hidalgo, N., Shan, A., Basas, J., Pahissa, A. and Gavalda, J. 2014. Daptomycin is effective as antibiotic-lock therapy in a model of *Staphylococcus aureus* catheter-related infection. *J Infect.* 68: 548-552.
- Melchior, M. B., Vaarkamp, H. and Fink-Gremmels, J. 2006. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet J.* 171: 398-407.
- Milora, K. A., Miller, S. L., Sanmiguel, J. C. and Jensen, L. E. 2014. Interleukin-1 $\alpha$  released from HSV-1-infected keratinocytes acts as a functional alarmin in the skin. *Nat Commun.* 5: 5230.
- Mirani, Z. A., Jamil, N. 2011. Effect of sub-lethal doses of vancomycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*. *J Basic Microbiol.* 51: 191-195.
- Mittal, R., Sharma, S., Chhibber, S. and Harjai, K. 2009. Evaluation of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in an experimental

- pyelonephritis model induced with planktonic and biofilms cells of *Pseudomonas aeruginosa*. Can J Infect Dis Med Microbiol. 20: e35-42.
- Murayama, N., Nagata, M., Terada, Y., Okuaki, M., Takemura, N., Nakaminami, H. and Noguchi, N. 2013. In vitro antiseptic susceptibilities for *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine superficial pyoderma in Japan. Vet Dermatol. 24: 126-129.
- Naicker, P. R., Karayem, K., Hoek, K. G. P., Harvey, J. and Wasserman, E. 2016. Biofilm formation in invasive *Staphylococcus aureus* isolates is associated with the clonal lineage. Microbial Pathogenesis. 90: 41-49.
- National Institutes of Health. 2002. <https://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-03-047.html>
- Ness, T. L., Ewing, J. L., Hogaboam, C. M. and Kunkel, S. L. 2006. CCR4 is a key modulator of innate immune responses. J Immunol. 177: 7531-7539.
- Neupane, S., Pant, N. D., Khatiwada, S., Chaudhary, R. and Banjara, M. R. 2016. Correlation between biofilm formation and resistance toward different commonly used antibiotics along with extended spectrum beta lactamase production in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from the patients suspected of urinary tract infections visiting Shree Briendra Hospital, Chhauni, Kathmandu, Nepal. Antimicrob Resist Infect Cont. 5: 5.
- Nishida, M., Yoshida, M., Nishiumi, S., Furuse, M. and Azuma, T. 2013. Claudin-2 regulates colorectal inflammation via myosin light chain kinase-dependent signaling. Dig Dis Sci. 58: 1546-1559.
- Nishiumi, S., Yoshida, M., Azuma, T., Yoshida, K. and Ashida, H. 2010.

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs an insulin signaling pathway through the induction of tumor necrosis factor- $\alpha$  in adipocytes. *Toxicol Sci.* 115: 482-491.

奥田 賢一. 2013. バイオフィルム感染症の制圧に向けて. *生物工学会誌* 91: 20.

Oufrid, S., Ghazlane, Z., Jamali, L., El Otmani, F., Talmi, M., Elmdaghri, N., Zerouali, K. and Timinouni, M. 2015. Correlation between staphylococcal biofilm formation in vitro and potential for catheter-related infections. *J Infect Dev Ctries.* 9: 368-372.

Parra-Ruiz, J., Vidaillac, C., Rose, W. E. and Rybak, M. J. 2010. Activities of high-dose daptomycin, vancomycin, and moxifloxacin alone or in combination with clarithromycin or rifampin in a novel in vitro model of *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 54: 4329-4334.

Paul, N. C., Bärghman, S. C., Moodley, A., Nielsen, S. S. and Guardabassi, L. 2012. *Staphylococcus pseudintermedius* colonization patterns and strain diversity in healthy dogs: a cross-sectional and longitudinal study. *Vet Microbiol.* 160: 420-427.

Percival, S. L., McCarty, S. M. and Lipsky, B. 2015. Biofilms and Wounds: An Overview of the Evidence. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 4: 373-381.

Peterson, L. R. 2005. Squeezing the antibiotic balloon: the impact of antimicrobial classes on emerging resistance. *Clin Microbiol Infect.* 11 Suppl 5: 4-16.

Pomba, C., Couto, N. and Moodley, A. 2010. Treatment of a lower urinary

tract infection in a cat caused by a multi-drug methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and *Enterococcus faecalis*. J Feline Med Surg. 12: 802-806.

Pompilio, A., De Nicola, S., Crocetta, V., Guarnieri, S., Savini, V., Carretto, E. and Di Bonaventura, G. 2015. New insights in *Staphylococcus pseudintermedius* pathogenicity: antibiotic-resistant biofilm formation by a human wound-associated strain. BMC Microbiol 15: 109.

Priyantha, R., Gaunt, M. C. and Rubin, J. E. 2016. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* colonizing healthy dogs in Saskatoon, Canada. Can Vet J. 57: 65-69.

Ren, W., Liu, Y., Wang, X., Jia, L., Piao, C., Lan, F. and Du, J. 2016. β-Aminopropionitrile monofumarate induces thoracic aortic dissection in C57BL/6 mice. Sci Rep. 6: 28149.

Resistance breakpoints for antimicrobials used in animals. 2014. Diagnostic center for population and animal health, Michigan State University.  
<https://animalhealth.msu.edu/sections/bacteriology/webcd.bact.ref.011.pdf>

Rubin, J. E. and Gaunt, M. C. 2011. Urinary tract infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a dog. Can Vet J. 52: 162-164.

Ruzauskas, M., Couto, N., Pavilonis, A., Klimiene, I., Siugzdiniene, R., Virgailis, M., Vaskeviciute, L., Anskiene, L. and Pomba, C. 2016. Characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from diseased dogs in Lithuania. Pol J Vet Sci. 9: 7-14.

- Sahal, G. and Bilkay, I. S. 2014. Multi drug resistance in strong biofilm forming clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Braz J Microbiol.* 45: 539-544.
- Sano, M., Hirose, T., Nishimura, M., Takahashi, S., Matsukawa M. and Tsukamoto, T. 1999. Inhibitory action of clarithromycin on glycocalyx produced by MRSA. *J Infect Chemother.* 5: 10-15.
- Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirotaki, S., Kawakami, T., Fukata, T. and Hiramatsu, K. 2010. Multiplex-PCR method for Species identification of coagulase-positive Staphylococci. *J Clin Microbiol.* 48: 765-769.
- Sauer, K., Camper, A. K., Enrich, G. D., Costerton, J. W. and Davies, D. G. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184: 1140-1154.
- Savage, V. J., Chopra, I. and O'Neill, A. J. 2013. *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 1968-1970.
- Secor, P. R., James, G. A., Fleckman, P., Olerud, E. J., McInnerney, K. and Stewart, P. S. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cultures differentially impact gene expression, mapk phosphorylation, and cytokine production in human keratinocytes. *BMC Microbiol.* 143: 1471-2180.
- Seth, A. K., Geringer, M. R., Hong, S. J., Leung, K. P., Mustoe, T. A. and Galiano, R. D. 2012. *In vivo* modeling of biofilm-infected wounds: a review. *J Surg Res.* 178: 330-338.

- Shimizu, T., Harada, K. and Kataoka, Y. 2013. Mutant prevention concentration of orbifloxacin: comparison between *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus pseudintermedius* of canine origin. *Acta vet Scand.* 55: 37.
- Shintani, Y., Kapoor, A., Kaneko, M., Smolenski, R. T., D'Acquisto, F., Coppen, S. R., Harada-Shoji, N., Lee, H. J., Thiemermann, C., Takashima, S., Yashiro, S. K. and Suzuki, K. 2013. TLR9 mediates cellular protection by modulating energy metabolism in cardiomyocytes and neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110: 5109-5114.
- Singh, A., Walker, M., Rousseau, J. and Weese, S. 2013. Characterization of the biofilm forming ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. *BMC Vet Res.* 9: 93.
- Skindersoe, M. E., Alhede, M., Phipps, R., Yang, L., Jensenm P. O., Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Tolker-Nielsen, T., Hoiby, N. and Givskov, M. 2008. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 3648-3663.
- Soto, S. M. 2014. Importance of biofilms in urinary tract infections: new therapeutic approaches. *Adv Biol.* 543974.
- Stepanivić, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Ćirković, I. and Ruzicka, F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta pathol microbiol Scand.* 115: 891-899.



Strommenger, B., Kettlitz, A., Werner, G. and Witte, W. 2003. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 41: 4089-4094.

Subrt, N., Mesak, L. R., Davies, J. 2011. Modulation of virulence gene expression by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 66: 979-984.

Sun, Y., Zhou, B., Wang, C., Huang, Q., Zhang, Q., Han, Y., Dai, W., Fan, E. and Li, Y. 2012. Biofilm formation and Toll-like receptor 2, Toll-like receptor 4, and NF-kappa B expression in sinus tissues of patients with chronic rhinosinusitis. Am J Rhinol Allergy. 26: 104-109.

Takeuchi, T., Yoshida, M., Shimizu, T., Asano, A., Shimokawa, T., Nabeta, M. and Usui T. 2012. Differential expressions of toll-like receptor genes in the vagina of pregnant mice. J Vet Med Sci. 75: 561-565.

Tateda, K., Ishii, Y., Kimura, S., Horikawa, M., Miyairi, S. and Yamaguchi, K. 2007. Suppression of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems by macrolides: a promising strategy or an oriental mystery? J Infect Chemother. 13: 357-367.

Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, Ma. J., Cucarella, C., Lamata, M. and Lasa, I. 2001. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. Appl Environ Microbiol. 67: 4538-4545.

Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T. and Hiramatsu K. 2010. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance

in staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. 54: 4352-4359.

Webb, J. S., Givskov, M. and Kjelleberg, S. 2003. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. Curr Opin Microbiol. 6: 578-585.

Wettstein, K., Descloux, S., Rossano, A. and Perreten, V. 2008. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Switzerland: three cases of urinary tract infections in cats. Schweiz Arch Tierheilkd. 150: 339-343.

Wang, Y., Yang, J., Logue, C. M., Liu, K., Cao, X., Zhang, W., Shen, J. and Wu, C. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine pyoderma in North China. J Appl Microbiol. 112: 623-630.

山口 恵三. 2005. 日常診療における臨床微生物ハンドブックー検体採取から診断・治療までー. 株式会社ユニオンエース.