

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)

学位論文の内容の要約

有馬 さゆり

(指導教授：池 和憲)

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にも関わらず、抗生剤が効きにくい原因の一つとして、バイオフィルムが関与している可能性が示唆されている。バイオフィルムとは、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。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、その中でも *Staphylococcus pseudintermedius* は小動物臨床領域で主要な菌として知られている。*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ことから、以下の研究を行った。

第1章では、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市中の動物病院に来院した犬及び猫の病変部位から採取された検体をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって同定し、*S. pseudintermedius* 250株を分離した。分離株のバイオフィルム形成能を吸光度（OD）_{590nm} で測定し、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* の分離株数を比較すると、犬由来株が猫由来株より顕著に多かった。しかし、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には特異的な差は認められなかった。このことは、猫由来 *S. pseudintermedius* によるバイオフィルム感染症も犬と同等のリスクがある可能性を示唆していた。一方、病変部位別にバイオフィルム形成能を比較したところ、病変部位間に特異的な違いは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。また、一次診療施設での *S. pseudintermedius* の分離率は二次診療施設よりも高い分離率を示したが、バイオフィルム形成能別に分離株を分類したところ、顕著な差は認められなかつ

た。したがって、*S. pseudintermedius* のバイオフィルム感染症のリスクは感染部位および診療施設に限らず差異がないことが判明した。

第 2 章では、第 1 章で分離された *S. pseudintermedius* のバイオフィルム形成能が薬剤耐性に与えている影響を調査した。今回の研究では、アンピシリン (ABPC)、アモキシシリン (AMPC)、オキサシリン (MPIPC)、エンロフロキサシン (ERFX)、オルビフロキサシン (OBFX)、ゲンタマイシン (GM)、エリスロマイシン (EM)、クロラムフェニコール (CP)、バンコマイシン (VCM)、セファレキシン (CEX)、セフォベジン (CFV)、ミノサイクリン (MINO) の合計 12 薬剤を使用した。各薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) 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測定し、第 1 章で調べた各分離株の OD_{590nm} との相関性を調べた。その結果、ABPC、AMPC、MPIPC、CEX、CFV、ERFX、OBFX、EM 及び GM において、MIC とバイオフィルム形成能に有意に高い正の相関性が認められたことから、強度株はこれらの 9 薬剤に対する抵抗性が高いことが示された。また、PCR による *mecA* 遺伝子検出及び MPIPC の薬剤感受性試験によって、メチシリン耐性 *S. pseudintermedius* (MRSP) 及びメチシリン感受性 *S. pseudintermedius* (MSSP) を同定した。その結果、MRSP は 145 株 (58.0 %)、MSSP は 75 株 (30.0 %) であった。一方、MSSP の ABPC 耐性率は 43 株 (57.3 %) と高値を示し、*mecA* 遺伝子非依存的な薬剤耐性の増加が示された。さらに、バイオフィルム形成能別に分類したところ、バイオフィルム形成能に比例して耐性率が上昇している傾向が見られた。この結果から、高度なバイオフィル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。

第 3 章では、バイオフィルム形成 *S. pseudintermedius* の病原性について検討した。バイオフィルムが慢性およ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示唆されている。バイオフ

ィルム形成 *S. pseudintermedius* が動物細胞に与える影響を検討するため、バイオフィル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。まず、バイオフィルムを形成させた培養液をろ過滅菌し、バイオフィルム形成培養上清 (BCM) を作製し実験に供した。バイオフィルム形成能別に BCM を用意し、マウスマクロファージ由来株細胞である RAW264.7 細胞と 24 時間共培養させ、炎症サイトカイン発現量を real-time RT-PCR で測定したところ、強度株の方が弱度株よりインターロイキン 18 (IL-18) 及び腫瘍壊死因子 (TNF- α) の発現量が有意に高いことが判明した ($P < 0.01$)。BCM 中に含まれる炎症誘引物質を検討するため、proteinase K、DNase 及び RNase を BCM に添加し 37°C 条件下で反応させ、RAW264.7 細胞と共培養を行い炎症性サイトカイン発現量の比較を行った。その結果、proteinase K 添加 BCM において、IL-18 および IL-6 の発現量が無添加 BCM に比べて有意な減少を示した ($P < 0.05$)。また、熱処理 (95°C、10 分間) を行った BCM については、炎症性サイトカイン発現量の特異的な変化が認められなかった。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示唆された。炎症反応のメカニズムを解明するため、マクロファージの Toll-like receptor (TLR) に着目し、TLR シグナルである myeloid differentiation primary response 88 (MyD88)、phospho-interleukin-1 receptor associated kinase 4 (p-IRAK4)、total IRAK4、phospho-nuclear factor kappa B (NF κ B) p65 (p-p65) 及び total NF κ B p65 の発現の確認をウエスタンブロット解析に行ったところ、MyD88 および p-IRAK4 の発現量が処理 15 分後において増加傾向にあることがわかった。p-p65 の発現量については、処理 15 分および 30 分後においても、増加傾向が認められた。これにより、TLR シグナル関連タンパク質の発現及びリン酸化が確認されたため、BCM 中に含まれる炎症誘引物質の炎症反応は TLR を介して起こっていることが示唆された。また、どの TLR が顕著に発現しているのかを調べるため、TLR1~9 の発現量を real-time

RT-PCR により測定した。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。このことから、BCM 中に含まれる炎症誘引物質は、様々な TLR に関与していることが示唆された。

炎症誘引物質として挙げられた菌体外分泌タンパク質において、弱度及び強度株間の違いを調べるため、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) 及び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) を行った。SDS-PAGE では、強度株で特異的なバンドが 35 kDa および 50 kDa に存在していた。一方、SDS-PAGE で区別できない低分子タンパク質を MALDI TOF-MS で解析した結果、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。以上のことから、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。今後は、菌体外分泌タンパク質を明らかにし、TLR に特異的な作用機序について更なる調査を行い、バイオフィーム関連感染症への防御対策を検討することも必要である。

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ーム関連感染症の予防対策に貢献するものと考ええる。