

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 有馬 さ ゆ り

細菌感染症は医療現場では最も一般的な疾患の一つで、感受性を示す抗菌剤の使用により良好な治療経過を示すことが多い。一方、何らかの要因で慢性化した場合、治療が困難となることが多く、慢性感染症の原因には宿主の免疫状態などの様々な要因が関与する。その発生の一因に細菌の作るバイオフィルムが関与することが近年報告されはじめている。バイオフィルムは感染組織や医療器機表面に付着した細菌が菌体外に蛋白質を主体とした膜を形成し、その中でコロニーを形成した状態である。代表的なバイオフィルム形成菌として *Staphylococcus aureus* が挙げられるが、獣医学領域では *Staphylococcus pseudintermedius* が主要菌種であることが示され始めている。しかし本菌のバイオフィルムに関する報告は未だ少なく、その感染症に対する予防・治療の観点から本菌の形成するバイオフィルムに関する研究は重要なことである。本論文は緒論を除き本文 3 章で構成されている。

1 *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（第 1 章）

本学医療センターおよび市中の動物病院に来院した犬・猫の病変部位から採取された検体から 250 株もの *S. pseudintermedius* を分離・同定している。まずは分離株をマイクロプレートで培養し、底面に固着した膜をクリスタルバイオレット染色後、吸光度 590nm で測定することでバイオフィルム形成能を分類している。その結果は 24.8% が強度株、52.0% が中度株、そして 23.2% が弱度株であった。さらに分離株のバイオフィルム形成能という観点からの比較では犬・猫間、分離病変部位間、さらには診療施設間で差は認めていない。このこと

は *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等に限らずあらゆる場所に存在することを示している。

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

本章では、*S. pseudintermedius* 分離株のバイオフィルム形成能が薬剤耐性に与える影響を調査している。本研究での供試薬剤はアンピシリン (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 12 剤で、分離株に対する薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) ならびにバイオフィルム形成性との相関性を調べている。その結果、ABPC、AMPC、MPIPC、CEX、CFV、ERFX、OBFX、EM および GM の 9 薬剤において、MIC とバイオフィルム形成能には有意に高い正の相関性が認められ、バイオフィルム強度株は上記 9 薬剤に対する抵抗力を高めていることを明らかとなった。また、*mecA* 遺伝子保有およびオキサシリン耐性で定義付けられる昨今問題となっているメチシリン耐性株の同定を行っている。その結果、145 株 (58.0%) がメチシリン耐性 *S. pseudintermedius* (MRSP) で、75 株 (30.0%) がメチシリン感受性 *S. pseudintermedius* (MSSP) であった。一方、ペニシリン系薬剤に感受性を示すはずの 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、バイオフィルム形成能が高い株ほど ABPC 耐性率が上昇する傾向が見られている。このことは治療に抗生剤を用いることへの注意を促すものであった。

3 バイオフィルム形成 *Staphylococcus pseudintermedius* の炎症誘引物質に関する検討（第3章）

本章では、バイオフィルム形成 *S. pseudintermedius* の病原性関連物質についての検討を行っている。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、炎症反応および炎症誘引物質を調べた。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化細胞 RAW264.7 細胞と 24 時間共培養させ、炎症サイトカイン mRNA の発現量を real-time PCR で測定した。その結果、強度株の方が弱度株に比べ IL-1 β 及び腫瘍壊死因子 TNF- α の発現量が有意に高いことを認めている。さらに BCM 中に含まれる炎症誘引物質を検討するため、proteinase K、DNase、RNase、および加熱処理をした BCM を RAW264.7 細胞との共培養から炎症性サイトカイン発現量の比較を行っている。その結果、proteinase K 添加 BCM では IL-1 β および IL-6 の発現量が有意な減少を示し、DNase 添加では IL-6 と TNF- α 、RNase 添加では TNF- α の発現量の低下傾向が認められたが、有意な差はなかった。また加熱処理（95℃、10 分間）を行った BCM でも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。このことは、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を示唆していた。

炎症反応のメカニズムを解明目的として、マクロファージの Toll-like receptor (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-NF κ B p65) および total NF κ B p65 の発現をウエ

スタンプロット解析にて行ったところ、MyD88 および p-IRAK4 の発現量が増加傾向にあり、さらに p-NFκB p65 の発現量についても増加傾向が認められている。このことは 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ことから、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。さらに何れかの TLR が関与しているのかを検討するため、TLR1～9 の mRNA 発現量を real-time PCR により測定したところ、TLR5 を除く全ての TLR の mRNA が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、強度株と弱度株間の違いを調べるため、SDS-PAGE および MALDI TOF-MS による解析を行った。SDS-PAGE 像では、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、これら強度株から分泌されるタンパク質等が感染部位の炎症に関与していることを伺わせるものであった。

以上のように、本論文は犬および猫における *S. pseudintermedius* 感染症の対策を実施する上で有用な知見であり、将来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・治療対策に学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。