

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292179

研究課題名(和文) 膿皮症におけるブドウ球菌の上皮内侵入機構の解明および新規予防・治療戦略への展開

研究課題名(英文) Investigation on the mechanisms of intraepidermal invasion by staphylococci in pyoderma and development of novel prevention and therapeutic approaches

研究代表者

西藤 公司(Nishifuji, Koji)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20365422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマウスに黄色ブドウ球菌を塗布して膿痂疹モデルマウスを作成し、同マウスにおける黄色ブドウ球菌の経皮侵入機構について解析した。膿痂疹モデルマウスでは、まず好中球が表皮に侵入して角化細胞間を離開させ、その後に黄色ブドウ球菌の表皮内侵入が認められることを示した。一方で膿痂疹の病原因子である表皮剥脱毒素は、菌が表皮内侵入した後に角化細胞間をより開大させる役割を有することを示した。さらに本研究では、イヌ再発性膿皮症の症例における皮膚の脂質構成の変化について解析を行い、症例犬では健康犬よりも角層セラミド量が減少していることを示し、角層バリア機構の破綻が同症の病態に關与する可能性に初めて言及した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the pathophysiological mechanisms of intraepidermal invasion by staphylococci in a mouse model of impetigo, which was generated by topical application of *S. aureus* to the skin. This study revealed that *S. aureus* penetrate the inter-keratinocyte spaces created by skin-infiltrating neutrophils. Exfoliative toxin, a virulence factor associated with impetigo contribute to further expansion of inter-keratinocyte spaces. In the next study, we compared lipid composition in the stratum corneum of dogs with recurrent pyoderma and healthy dogs. We revealed that intracorneal ceramides are decreased in dogs with this disease, suggesting that disrupted barrier function of the stratum corneum is associated with the pathophysiology of this disease.

研究分野：獣医学

キーワード：ブドウ球菌 膿皮症 膿痂疹 表皮剥脱毒素 セラミド

1. 研究開始当初の背景

膿皮症はヒトやイヌなどの哺乳動物に発症する細菌性皮膚疾患である。とりわけイヌでは膿皮症の発症率が極めて高く、アトピー性皮膚炎や脂漏症に続発する症例が多いことが知られている。膿皮症の治療にはこれまで抗菌薬の投与が行われてきたが、近年では多剤耐性ブドウ球菌による膿皮症が医学・獣医学分野で急増していることから、抗菌薬の代替となる膿皮症の新規治療法の開発が急務となっている。ブドウ球菌は本症の代表的な原因菌であり、ヒトの病変部からは *Staphylococcus aureus* が、イヌの病変部からは *S. pseudintermedius* または *S. schleiferi* が主に分離される。

S. aureus が発現する表皮剥脱毒素 (ET) は、デスマソームの接着蛋白であるデスマグレイン 1 (Dsg1) を標的とする外毒素である。既報告において、*S. aureus* が産生する ET には 3 種の型別 (ETA, ETB, ETD) が存在することが示されている。ET を皮下投与したマウスでは、Dsg1 による細胞間接着が傷害された結果、角化細胞間の離間が認められる。また *S. pseudintermedius* が保有する ET 遺伝子が過去に 2 種類同定され、同遺伝子の組換え蛋白を皮下投与されたイヌでは前述のマウスと同様の現象が認められることが示されている。一方で *S. schleiferi* が ET を産生するかについては、研究開始当初には報告されていなかった。

近年の報告において、*S. aureus* が産生する ET は、表皮上層に存在するタイトジャンクションを通過できないことが示された。このことから ET 産生能を有するブドウ球菌株が、どのようにして角層表面から皮膚に浸入するかについては、研究開始当初には不明のままであり、病態解明が急務であった。

2. 研究の目的

本研究では *S. schleiferi* からの *et* 遺伝子の検出を試みたと共に、*et* 遺伝子を保有するブドウ球菌がどのようにして表皮内へと侵入するかを解析した。またブドウ球菌の角層通過機構について、特に角層セラミドの発現量に着目して解析を行った。

3. 研究の方法

(1) *S. schleiferi* 株のゲノム全塩基配列解析

S. schleiferi 株のゲノム全塩基配列を次世代シーケンサー (MiSeq System, Illumina, San Diego, CA, USA) を用いて実施した。

(2) *et* 遺伝子を保有する *S. aureus* 株の経皮侵入機構解析

etb 遺伝子を保有する *S. aureus* 株 (#TY184, #N1, #N2) を、下記の手順によりマウス耳介前縁に塗布して膿痂疹モデルマウスを作成した。

まず Balb/C Cr Slc マウス (三協ラボサービス、東京) の耳介前縁にテープストリップ法を 7 回施し、角層の一部を除去した。続いて 2×10^8 CFU の *S. aureus* 株を含むガーゼを上述の部位に貼付した。一部のマウスでは、前述の処置を施す前に cyclophosphamide 2 mg/head (CPA, エンドキサン、塩野義製薬、大阪) を 5 日連続で腹腔内投与して白血球減少症を誘導した。*S. aureus* 株の貼付から 30 分、2 時間、4 時間、6 時間後にマウスを安楽死したあとに耳介を採取し、病理組織学的解析を実施すると共に、抗 *Staphylococcus* ウサギ抗血清 (CH91, 動物衛生研究所、播谷亮先生より譲渡) および抗ケラチンマウスモノクローナル抗体 (AE1+AE3, Progen, Heidelberg, Germany) を用いた二重免疫蛍光染色により解析を行った。核染色には Hoechst 33258 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いた。

角化細胞間隙の基底膜単位長あたりにおける頻度および面積、ならびに表皮内浸潤した *S. aureus* の基底膜単位長あたりにおける頻度の解析には、GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いた。

(3) ET による表皮内膿疱形成機構の解析

3 種の *et* 遺伝子をいずれも保有しない *S. aureus* 株 (#N3, #N4, #N5) の菌液を、前述と同様の手法でマウス耳介前縁に貼付した。貼付から 6 時間後に耳介を採取し、前述と同様に病理組織学的解析及び二重免疫蛍光染色による解析を実施したとともに、角化細胞間隙の基底膜単位長あたりにおける頻度および面積、ならびに表皮内浸潤した *S. aureus* の基底膜単位長あたりにおける頻度を *etb* 遺伝子保有群と比較した。

(4) イヌ再発性膿皮症の症例における角層細胞間脂質分析

再発性表在性膿皮症を自然発症したイヌ 6 頭 (疾患群) と、疾患群と犬種・年齢・性別が合致した健常犬 6 頭 (対照群) を本研究に用いた。再発性表在性膿皮症の定義は、過去に表在性膿皮症を 3 回以上発症した履歴を有するイヌとした。また健常犬には、表在性膿皮症の既往歴をもたないイヌを用いた。試験への組入条件として、試験の 5 日前より外用薬やシャンプーの使用履歴がないこととした。

イヌの鼠径部にテープストリップ法を施して角層を採取し、ヘキサミンにテープ

を浸漬させて角層成分を抽出した。その後クロロホルム/メタノール混合液を用いて脂質を抽出した。脂質抽出物中の脂質構成を、高速薄層クロマトグラフィーにより解析した。また同様に採取したテープを 0.1N NaOH 水溶液に浸漬してタンパク成分を抽出し、BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて角層中のタンパク量を定量して、単位タンパク質あたりの脂質量を定量した。

4. 研究成果

(1) *S. scleiferi* 株のゲノム全塩基配列解析

培養上清がイヌ Dsg1 を消化する *S. scleiferi* 株についてゲノム全塩基配列解析を実施したが、*et* 遺伝子と相同性の高い塩基配列は同定できなかった。

(2) 膿痂疹モデルマウスの作出 (図 1)

etb 遺伝子を保有する *S. aureus* 株 (#TY184, #N1, #N2)の菌液をマウス耳介前縁に貼付したところ、塗布後 6 時間目には病理組織学的に膿痂疹と矛盾のない表皮内膿疱が貼付部位に認められ、膿疱内には好中球を混じていた。またグラム染色を実施したところ、膿疱内にグラム陽性球菌が認められた。

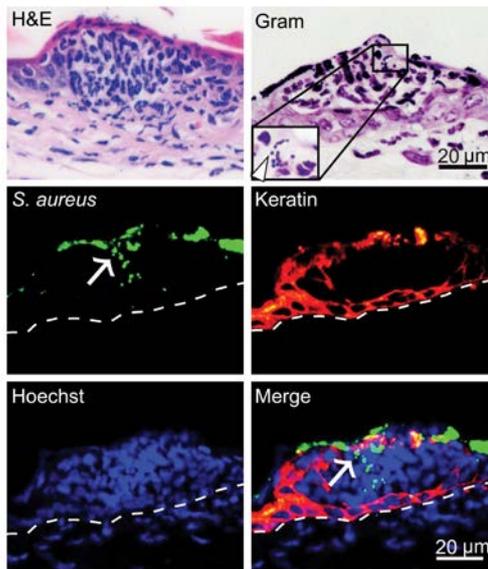


図 1 膿痂疹モデルマウスの作出。H&E: Haematoxylin and eosin. 表皮内にグラム陽性球菌を含む好中球性膿疱が認められる。二重免疫蛍光染色により、*S. aureus* の一部が表皮内裂隙に侵入する像が認められる。

二重蛍光染色法の結果、病変部ではケラチン陽性細胞に囲まれた表皮内裂隙が認められ、裂隙内には *S. aureus* が侵入していた。以上の結果より、本研究では膿痂疹の所見を再現したモデルマウスを作出することに成功した。

(3) 膿痂疹モデルマウスにおける膿疱形成機序の経時的解析

前述の膿痂疹モデルにおける膿疱形成機序を経時的に解析した (図 2)。その結果、*S. aureus* 菌液の貼付後 4 時間より好中球が表皮内へと浸潤し始め (14/18 切片)、6 時間後には全ての組織切片において大型の表皮内膿疱が形成された (18/18 切片)。一方で *S. aureus* は菌液の貼付後 4 時間までは表皮で認められたのに対し、表皮内に侵入する像は認められなかった (0/18 切片)。しかしながら貼付後 6 時間の時点では、全ての組織切片で表皮内裂隙中に *S. aureus* が認められた (18/18 切片)。

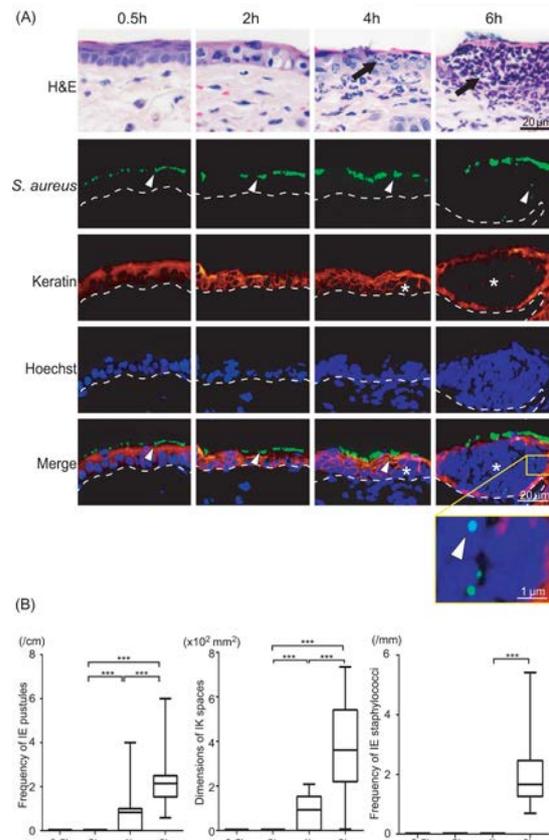


図 2 膿痂疹モデルマウスにおける膿疱形成機序の経時的解析。(A) 病理組織学的所見ならびに二重免疫蛍光染色所見。好中球は菌液の貼付後 4 時間で表皮内へと浸潤し、6 時間後には大型の表皮内膿疱を形成している。一方で *S. aureus* は菌液の貼付後 4 時間までは表皮内に認められなかったのに対し、6 時間後には表皮内裂隙中に *S. aureus* が認められる。(B) 基底膜単位長あたりの膿疱の頻度、表皮内裂隙の面積および基底膜単位長あたりの表皮内 *S. aureus* 菌株数の経時的推移。*S. aureus* は膿疱形成後に表皮内へと侵入している。

続いて *S. aureus* の表皮内浸潤における好中球の役割について解析を行った。

CPA を腹腔内投与したマウス(n=6)の耳介に *S. aureus* 菌液を貼付し、6 時間後における組織学的変化を対照マウス (n=6) と比較した (図 3)。その結果、CPA 投与マウスでは菌液の貼付後 6 時間において表皮への好中球浸潤が認められず、また表皮内にグラム陰性球菌または *S. aureus* が侵入する像も認められなかった (0/18 切片)。

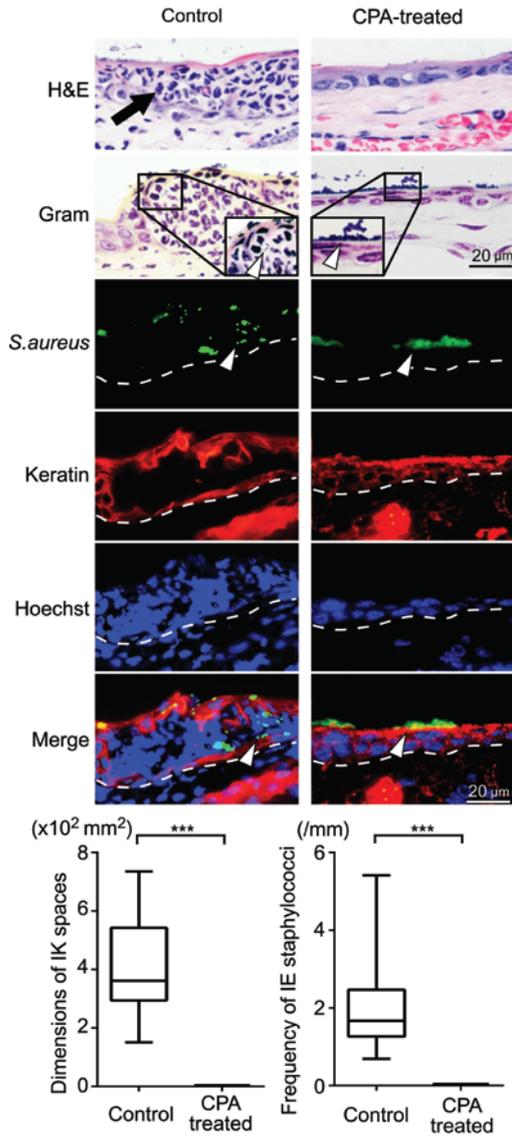


図 3 CPA 非投与マウスおよび投与マウスにおける菌液貼付後 6 時間の組織学的変化。非投与マウスでは好中球性膿疱および *S. aureus* の表皮内侵入が認められるのに対し、投与マウスではいずれの所見も認められない。両群における表皮内裂隙の面積および基底膜単位長あたりの表皮内 *S. aureus* 菌株数の比較を下グラフに示す。投与マウスではいずれの個体でも表皮内膿疱や表皮内 *S. aureus* が認められない。

以上の結果より、膿疱疹モデルマウスにおける膿疱形成の初期においては、*S. aureus* は単独で表皮内へと侵入出来ず、好中球性膿疱が形成された後に表皮内へと侵入出来ることが示された。この事実は *S. aureus* が、好中球により形成された角化細胞間の裂隙を介して表皮内へと侵入する可能性を示唆する結果となった。

(4) 膿疱疹モデルマウスにおける ETB の役割
膿疱疹モデルマウスにおける ETB の詳細な役割について検討するため、以下の検討を行った。*etb* 遺伝子保有株 (n=3) と *et* 遺伝子非保有株 (n=3) (図 4) の菌液を、それぞれマウス耳介前縁に貼付して膿疱疹モデルマウスを作成し、形成された膿疱について比較検討を行った (図 5)。

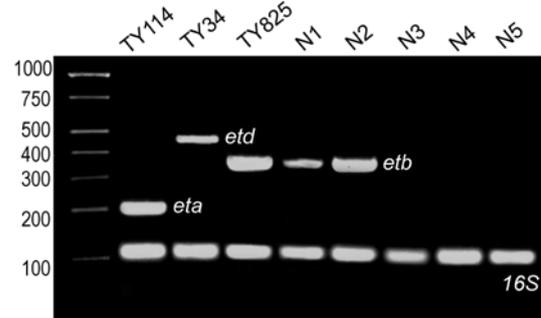


図 4 Multiplex PCR 解析による *S. aureus* *et* 遺伝子の検出。

その結果、*etb* 遺伝子保有株と *et* 遺伝子非保有株のいずれも、菌液の貼付後 4 時間から表皮内裂隙を形成し (*etb* 遺伝子保有株貼付群: 14/18 切片、*et* 遺伝子非保有株貼付群: 12/18 切片)、貼付後 6 時間では全ての組織切片で表皮内裂隙が認められ、裂隙内には *S. aureus* が認められた (18/18 切片)。

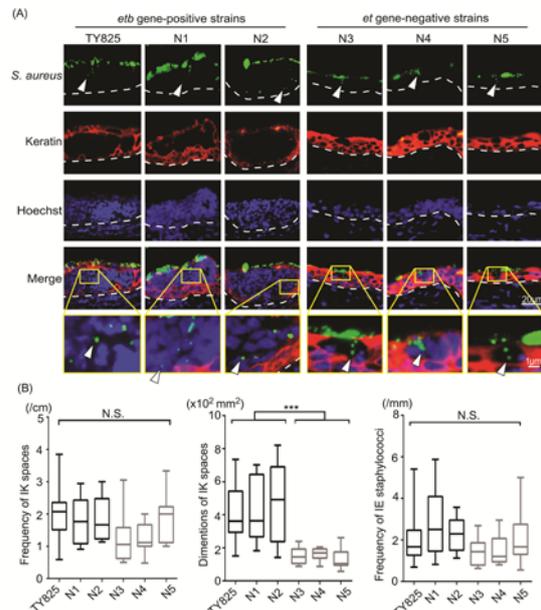


図5 *etb* 遺伝子保有株貼付マウスおよび *et* 遺伝子非保有株貼付マウスにおける菌液貼付後6時間の組織学的変化。(A) いずれの菌液を貼付したマウスでも好中球性膿疱および *S. aureus* の表皮内侵入が認められる。(B) 基底膜単位長あたりの膿疱の頻度、表皮内裂隙の面積および基底膜単位長あたりの表皮内 *S. aureus* 菌株数の菌株間比較。*etb* 遺伝子保有株貼付群では *et* 遺伝子非保有株貼付よりも表皮内裂隙の面積が広い。

菌液の貼付後6時間における表皮内裂隙の面積については、*etb* 遺伝子保有株を貼付した群では *et* 遺伝子非保有株貼付群よりも有意に高値を示した ($p < 0.001$)。しかしながら基底膜単位長あたりの表皮内裂隙の頻度や表皮内 *S. aureus* の菌株数には、両群間で差が認められなかった ($p > 0.05$)。

以上の結果より、*etb* 遺伝子保有株貼付群では *et* 遺伝子非保有株貼付群よりも、表皮内裂隙の面積が広いことが示された。このことからETBは、菌株が表皮内へと侵入した後に、好中球による菌の貪食から逃れるために細胞間裂隙を開大させる役割を有する可能性が示唆された。

(5) イヌ再発性膿皮症の症例における角層細胞間脂質分析

再発性膿皮症症例犬および健常犬の間で、角層細胞間脂質である総セラミド (CER)、遊離脂肪酸 (FFA) およびコレステロール (CHO)、ならびに皮脂成分であるコレステロールエステル (CE)、ワックスエステル (WE) およびトリグリセリド (TG) の発現量を比較した。

その結果、角層細胞間脂質のうち総CER量については、症例犬群で対象犬群よりも有意に低値を示したのに対し ($p < 0.01$)、FFA量およびCHO量については両群間で差は認められなかった ($p > 0.05$) (図6, 7)。

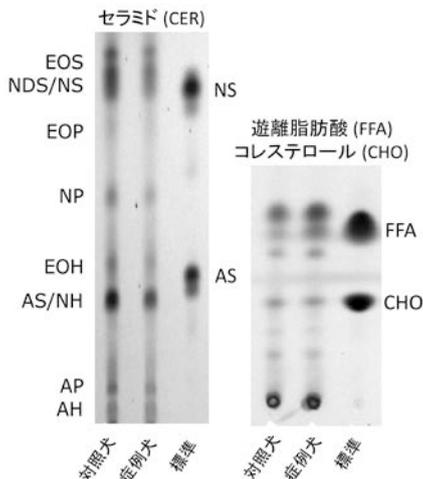


図6 薄層クロマトグラフィーによるCER, FFAおよびCHOの分画。

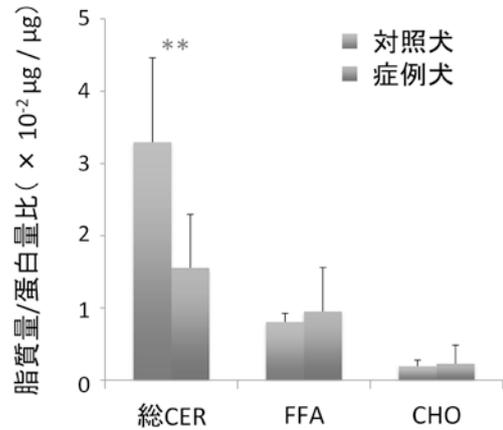


図7 対照犬及び症例犬における総CER量、FFA量およびCHO量の比較。**: $p < 0.01$ 。

一方で皮脂を構成するCE, WE, TG量については、症例犬と対照犬との間で有意な差は認められなかった ($p > 0.05$) (図8)。

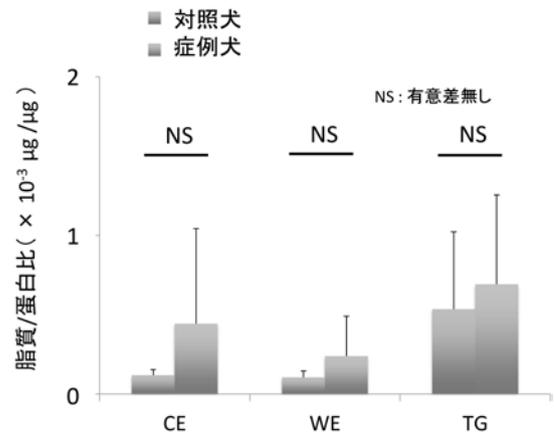


図8 対照犬及び症例犬におけるCE量、WE量およびTG量の比較。

以上の結果より、イヌ再発性膿皮症の症例では健常犬と比較して、角層細胞間脂質の重要な成分であるセラミド量が減少していることが示された。このことから本症の発症機序において、角層における脂質バリア機能の低下が重要な役割を示す可能性が示唆されたとともに、脂質バリアの補充が本症の予防に有効となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Chimura N, Iio A, Ozaki E, Mori T, Ito Y, Murayama N, Nagaata M, Ide K, Nishifuji K, Kamishina H, Maeda S. Transcription of chemokine receptors, cytokines, cytotoxic markers in peripheral blood of dogs with epitheliotropic cutaneous lymphoma. **Vet Dermatol** **24**: 628-631, 2013. 査読有
2. Winfield LD, White SD, Affolter VK, Renier AC, Dawson D, Olivry T, Outerbridge CA, Wang YH, Iyori K, Nishifuji K. Pemphigus vulgaris in a Welsh pony stallion: Diagnosis, attempted treatment and demonstration of antidesmoglein autoantibodies. **Vet Dermatol** **24**: 269-273, 2013. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

1. Imanishi I, Hattori S, Hisatsune J, Ide K, Sugai M, Nishifuji K. Staphylococci penetrate the living epidermis through inter-keratinocyte spaces created by neutrophils in the mouse model of impetigo (口頭・決定). 8th World Congress of Veterinary Dermatology. 2016.6.4. Bordeaux, France.
2. Iyori K, Toyoda Y, Tamagawa S, Iwasaki T, Nishifuji K. Clinical efficacy of artificial carbonated water therapy for canine superficial pyoderma caused by *Staphylococcus pseudintermedius* (口頭・決定). 8th World Congress of Veterinary Dermatology. 2016.6.3. Bordeaux, France.
3. Nishifuji K. Skin Wars Episode II – Attack of the Staph Clones (招待講演・決定). 8th World Congress of Veterinary Dermatology. 2016.6.3. Bordeaux, France.
4. 西藤公司. 多剤耐性菌を想定した犬膿皮症の治療対策. 第 35 回動物臨床医学会年次大会 (招待講演). 2014.11.15. 大阪府大阪市.
5. 久恒順三、平川英樹、伊從慶太、西藤公司、大嶋健志郎、服部正平、菅井基行. 犬膿皮症由来 *S.pseudintermedius* 表皮剥脱毒素 ExpB 産生株のゲノム解析 (口頭). 第 59 回日本ブドウ球菌研究会. 2014.8.4. 東京都府中市.
6. 伊從慶太、野口洋大、井手香織、西藤公司. *Staphylococcus pseudintermedius* におけるセフポドキシム感受性ディスク試験のカットオフ値の設定と臨床的有用性の評価 (口頭). 第 59 回日本ブドウ球菌研究会. 2014.8.4. 東京都府中市.
7. Iyori K, Noguchi Y, Ide K, Nishifuji K. Evaluation of cefpodoxime disk diffusion breakpoint for *Staphylococcus pseudintermedius* and clinical outcome of cefpodoxime-treated canine superficial pyoderma (口頭). 28th North

American Veterinary Dermatology Forum. 2014.4.10. Phoenix, AZ, USA.

8. 磯部杏子、伊從慶太、関口麻衣子、西藤公司. 深在性膿皮症と診断した犬の 8 例 (ポスター). 第 17 回日本獣医皮膚科学会学術大会. 2014.3.16. 埼玉県大宮市.
9. 穴倉拓、小林哲郎、永尾啓介、西藤公司. 表皮シートおよびフローサイトメトリー法を用いたイヌ皮膚免疫細胞の可視化および動態解析 (口頭). 第 17 回日本獣医皮膚科学会学術大会. 2014.3.16. 埼玉県大宮市.
10. 西藤公司. 犬膿皮症の深い話～バイオロジーから治療コンセプトまで～(招待講演). 第 10 回日本獣医内科学アカデミー学術大会. 2014.2.9. 横浜.
11. Nishifuji K. Canine Pyoderma (招待講演). AiCVD/AiSVD Workshop of Dermatology. 2013.9.3. Bogor, Indonesia.

[図書] (計 2 件)

1. 西藤公司. 動物の自己免疫性水疱症. 2014. 古江増隆、天谷雅行 編. 皮膚科臨床アセット 19 水疱性皮膚疾患. 中山書店, 東京.
2. Nishifuji K. Skin barrier and its role in the pathophysiology of atopic dermatitis. 2014. In. Noli C, Foster AJ, Rosenkrantz W: Veterinary Allergy, pp42-50, Wiley Blackwell, Oxford.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

西藤 公司 (NISHIFUJI Koji)
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 2 0 3 6 5 4 2 2

(2)研究分担者

菅井 基行 (SUGAI Motoyuki)
広島大学・医歯薬保険学研究院・教授
研究者番号: 1 0 2 0 1 5 6 8

井手 香織 (IDE Kaori)
東京農工大学・大学院農学研究院・講師
研究者番号: 4 0 5 5 0 2 8 1

水谷 哲也 (MIZUTANI Tetsuya)
東京農工大学・農学部・教授
研究者番号: 7 0 2 8 1 6 8 1

(3)連携研究者

なし