

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月30日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580390

研究課題名（和文） イヌのアトピー性皮膚炎におけるブドウ球菌エンテロトキシンの免疫学的機能解析

研究課題名（英文） Immunologic functional analysis of staphylococcal enterotoxin on canine atopic dermatitis

研究代表者

深田 恒夫 (FUKADA TSUNEO)

岐阜大学・連合獣医学研究科・教授

研究者番号：80081595

研究成果の概要（和文）：イヌのアトピー性皮膚炎（AD）におけるブドウ球菌エンテロトキシンの免疫学的機能解析にあたり、まず、犬の皮膚病由来のブドウ球菌を分離、同定した。その主なものは *Staphylococcus pseudintermedius* (SP) であり、多くはメチシリン耐性株であった。それらの株からエンテロトキシン（SEs）を産生することが判明した。その SEs を大腸菌でコンピナント蛋白（rSEC_{canine}）を作製し、精製した後に、その SEs はリンパ球刺激能を有し、イヌ KCs 培養細胞株である CPEK を刺激し、TNF- α 、CCL17 および CCL28 mRNA 発現を誘導することから、SEs は AD を含む皮膚疾患の悪化要因となる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：To study of immunologic functional analysis of staphylococcal enterotoxin on canine atopic dermatitis, *Staphylococcus* from canine pyoderma were isolated and identified. *Staphylococcus pseudintermedius* (SP) is one of the major organism and many SP are methicillin-resistant strains. These staphylococci produce staphylococcal enterotoxins (SEs). Recombinant SEC_{canine} protein (rSEC_{canine}) using expression vector system by *Escherichia coli* was purified and its rSEC_{canine} has *in vitro* canine lymphocyte-stimulating active. Using a cell line of canine epidermal keratinocyt, mRNA transcription of TNF- α , CCL17 and CCL28 was significantly augmented by rSEC_{canine} stimulation. SEC_{canine} is an important inducing factor for the production of not only TNF- α , but also CCL17 and CCL28, which are important chemokines in the pathogenesis of canine AD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：アトピー性皮膚炎，犬，エンテロトキシン，ブドウ球菌

1. 研究開始当初の背景

ブドウ球菌は多くの哺乳動物を宿主とし、

皮膚常在菌であると同時に皮膚疾患の原因菌となる。イヌにおいて最も一般的な皮膚疾

患の1つである膿皮症の主な原因菌はこれまで *Staphylococcus intermedius* とされてきた。しかしながら、実際には新たな菌種である *S. pseudintermedius* (SP) が主な原因菌であることが近年明らかになった。膿皮症の治療には一般的に抗菌薬が用いられるが、近年多剤耐性およびメチシリン耐性 (MR) ブドウ球菌の分離が多数報告され、イヌにおいて耐性菌が増加傾向にあることが示唆されている。ブドウ球菌は種々の外毒素を産生することが知られており、中でもブドウ球菌エンテロトキシン (SEs) はその産生がイヌの膿皮症病変部において認められ、疾患との関連が示唆されているものの詳細な報告はない。SEs はヒトアトピー性皮膚炎 (AD) 患者の病変部において産生が確認され、さらに表皮ケラチノサイト (KCs) に作用して TNF- α や IL-1 β の産生を誘導することが示されており、SEs はヒト AD における増悪因子と考えられている。しかしながら、イヌの皮膚における SEs の作用は報告されていない。

2. 研究の目的

イヌ膿皮症由来ブドウ球菌の性状を理解し、さらに産生される SEs の作用を解明することにより、イヌのアトピー性皮膚炎におけるブドウ球菌エンテロトキシンの免疫学的機能解析目的として、分子生物学的手法を用いて研究を行った。

(1) イヌ膿皮症の原因菌種は主に SP であり、さらに多剤耐性および MR 株が年々増加傾向にあることが示唆されているものの、最近の国内における詳細な情報の解明を行った。

(2) SEs 産生ブドウ球菌が膿皮症病変部から分離され、SEs と膿皮症との関連が示唆されるが、詳細な情報の解明を行った。

(3) ブドウ球菌は SEs の他にも種々の外毒

素および酵素を産生するため、SEC_{canine} の皮膚における機能を詳細に解析するためには可能な限り精製した。

(4) SEs はヒト AD の増悪因子であることが示されているものの、イヌの皮膚疾患における SEs の作用に関する報告はない。KCs は種々の炎症性メディエーターを産生し、中でも CCL17 および CCL28 はイヌ AD 病変部皮膚においてリンパ球の遊走に重要な役割を調べた。

3. 研究の方法

(1) 二次診療動物病院において分離されたイヌ膿皮症由来ブドウ球菌における菌種、抗菌薬耐性および MR 株を調べた。

(2) SEs が膿皮症病変形成の悪化要因の1つである可能性を検証するため、上記において分離同定したブドウ球菌における SEs (ブドウ球菌エンテロトキシン A-D [SEA-D]) の産生および *sec* 遺伝子の保有状況を調べた。

(3) 発現ベクターおよび大腸菌を用いてイヌの皮膚における SEC_{canine} の機能解析に利用可能なリコンビナント蛋白 (rSEC_{canine}) を作製し、そのリンパ球刺激能を確認した。

(4) rSEC_{canine} によってイヌ KCs 培養細胞株である CPEK を刺激し、その後 *in vitro* の CPEK における TNF- α 、CCL17 および CCL28 mRNA 発現変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 膿皮症病変部から SP および *S. schleiferi* subsp. *coagulans* の2菌種が同定され、これら2菌種が膿皮症の主な原因菌種であることを明らかにした。また分離株の多くが多剤耐性であり、さらに MR 株の割合は過去の報告と比較して高かったことを示した。これらのことからイヌ膿皮症の病変部には多剤耐性および MRSP が高率に存在し、治療の際には適切な抗菌薬を選択すること

が重要であると再確認された。

(2) SPにおいてSEAおよびSECの産生、さらに *sec* 遺伝子の保有が確認された。膿皮症病変部由来 SPにおいてSEs産生株の存在が確認されたもののその割合は同時期における海外の報告と比較して低く、SEs産生株の存在率には地域差が存在する可能性が示唆された。さらに *sec* の多くが *sec*_{canine} と呼ばれるイヌ由来株特異的な遺伝子配列であったことから、イヌの皮膚において産生される主なSEsはSEC_{canine}であることを明らかにした。

(3) イヌリンパ球刺激能を示す rSEC_{canine} を得た。これにより、rSEC_{canine} を用いてイヌ皮膚における作用を解析することが可能となった。

(4) rSEC_{canine} 添加後の CPEK における TNF- α 、CCL17 および CCL28 mRNA 転写はいずれも有意に増強されることが明らかとなった。SEC_{canine} は炎症性サイトカインである TNF- α だけでなく、AD の病態に重要なケモカインである CCL17 および CCL28 の産生誘導因子であることが示唆された。

本研究より、イヌの皮膚由来 SP には多剤耐性菌および MRSP が高率に存在し、さらに SP により産生される SEC_{canine} は KCs に作用して TNF- α 、CCL17 および CCL28 mRNA 転写誘導作用を示すことによって AD を含む皮膚疾患の悪化要因となる可能性が示された。今回の結果から、膿皮症のみならず AD の治療においても適切な抗菌薬による SP 感染のコントロールがこれまで以上に重要であることを明らかにした。

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 1 件)

Kawakami T, Shibata S, Murayama N, Nagata M, Nishifuji K, Iwasaki T, Fukada T. Antimicrobial Susceptibility and Methicillin Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* Subsp. *coagulans* Isolated from Dogs with Pyoderma in Japan. *J Vet Med Sci*. 72,1615-1619,2010 査読有

[学会発表] (計 1 件)

川上哲司、柴田早苗、林玲子、深町綾、村山信雄、永田雅彦、西藤公司、岩崎利郎、深田恒夫、膿皮症由来 *Staphylococcus pseudintermedius* における多剤耐性およびメチシリン耐性状況、第 13 回日本獣医皮膚科学会 (2010 年 3 月 14 日、東京)

[図書] (計 1 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 1 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深田 恒夫 (FUKADA Tsuneo)

岐阜大学大学院・連合獣医学研究科・教授
研究者番号：80081595

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

柴田 早苗 (SHIBATA Sanae)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

川上 哲司 (KAWAKAMI Tetsushi)

岐阜大学・大学院連合獣医学研究科・院生

井上 育生 (INOUE Ikuo)

岐阜大学・大学院連合獣医学研究科・院生