

氏名（本（国）籍）	伊 従 慶 太（千葉県）
主 指 導 教 員 名	東京農工大学 教授 岩 崎 利 郎
学 位 の 種 類	博士（獣医）
学 位 記 番 号	獣医博甲第345号
学 位 授 与 年 月 日	平成23年9月22日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学 位 論 文 題 目	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> 由来表皮剥脱毒素 に関する研究
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 深 田 恒 夫 副査 帯広畜産大学 教 授 山 田 一 孝 副査 岩 手 大 学 教 授 安 田 準 副査 東京農工大学 教 授 岩 崎 利 郎 副査 岐 阜 大 学 教 授 鬼 頭 克 也

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

表皮剥脱毒素（ET）は、ブドウ球菌が産生するセリンプロテアーゼ様の酵素であり、ヒト水疱性膿疱疹およびブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群ならびにブタ滲出性表皮炎の症例から分離されたブドウ球菌が、ETを産生することが過去に報告されている。ETは臨床的に皮膚に水疱やびらんあるいは表皮剥脱を起こし、病理組織学的には角化細胞の離解に伴う表皮内水疱を生じる。過去に *Staphylococcus aureus* が産生する3種のET（ETA, ETB, ETD）が、また *S. hyicus* が産生する5種のET（SHETB, ExhA, ExhB, ExhC, ExhD）が同定され、いずれも角化細胞間の接着分子であるデスモグレイン1（Dsg1）を消化することが知られている。またETが、原則として分離菌の宿主が発現するDsg1を特異的に消化する、極めて基質特異性の高い酵素であることが明らかになっている。膿疱疹は犬にも認められ、角化細胞の離開を伴う表皮内膿疱の形成を特徴とする。過去に犬の膿皮症由来の *S. intermedius* がET遺伝子（*siet*）を保有することが報告され、近年 *S. pseudintermedius* が、既知のETと高い相同性を有するET遺伝子（*exi*）を保有することも知られてきた。しかし、これらの毒素がDsg1を消化することにより、犬の膿疱疹の発症に関与しているかについては知られていない。

本研究では、*S. pseudintermedius* が保有するET遺伝子の翻訳産物が、*in vivo* で犬に表皮剥脱を生じるかを検討し、同毒素が *in vitro* で犬のDsg1を消化するかどうかを検討している。また本研究では、*S. pseudintermedius* 由来の新規ET遺伝子を同定し、犬の表在性膿皮症の病変部ならびに健常犬から分離された *S. pseudintermedius* におけるET遺伝子の分離率を検討している。

筆者は第二章で、*siet* 遺伝子の翻訳産物であるSIET、および *exi* 遺伝子の翻訳産物であるEXIの組み換え蛋白が、犬の皮膚に表皮剥脱を誘導するかを検討した。大腸菌発現系を用いて組換え毒素を産生し、正常犬に皮内投与したところ、組換えEXIを投与した部位では肉眼的に表皮剥脱が認められ、病理組織学的に表皮内水疱が認められた。免疫組織化学染色により、組換えEXIを投与部位では表皮のDsg1の染色性が特異的に消失していることを確認している。さらに組換えEXIは犬のDsg1を消化したが、組換えDsg3は消化しなかった。組換えSIETは表皮剥脱を誘導せず、*in vivo* および *in vitro* で犬の

Dsg1 を消化しなかった。以上より、EXI は犬に表皮剥脱を誘導し、かつ犬の Dsg1 を特異的に消化する ET であり、SIET は既存の ET とは異なる蛋白であると考察している。

次に第三章では、犬の膿痂疹由来の *S. pseudintermedius* から得られた新規 ET 遺伝子の組換え蛋白を作成し、同蛋白が ET としての活性を有するかを検討している。犬の膿痂疹から分離された *S. pseudintermedius* 株の全ゲノム塩基配列を解析し、既知の ET 遺伝子と相同性の高い新規翻訳領域遺伝子 (orf) を単離した。この orf 遺伝子の組換え蛋白を投与した犬の皮膚では、表皮が剥脱し、病理組織学的に表皮内水疱が認められ、さらに表皮の Dsg1 の染色性が特異的に消失した。また本蛋白は *in vitro* で犬の Dsg1 を特異的に消化した。以上より、筆者は新規 orf 遺伝子は、EXI と同様の酵素活性を有すると考えた。そこでこれらの結果から、*S. pseudintermedius* EXI を ExpA, new ORF を ExpB と再命名している。

筆者は第四章で、様々な病型を示す犬の表在性膿皮症の病変部、ならびに健常な犬より *S. pseudintermedius* 株を分離し、各菌株における *expa*, *expb* ならびに *siet* 遺伝子の保有率を PCR 法により検索した。その結果、*expa* および *expb* 遺伝子は犬の表在性膿皮症の様々な臨床病型からのみ検出されたが、*siet* 遺伝子は、犬の膿皮症症例および健常犬より分離した全ての *S. pseudintermedius* 株から検出された。

以上の結果より、筆者は *S. pseudintermedius* ExpA ならびに ExpB は、犬の角化細胞が発現する接着分子を標的とする事で、表在性膿皮症の病変形成に幅広く関与していると推察している。一方で *siet* 遺伝子は ET をコードする遺伝子ではな可能性を示唆した。*S. pseudintermedius*, *S. aureus* ET および *S. hyicus* Exh は、いずれも宿主由来の Dsg1 を標的とすることから、ET がブドウ球菌属の宿主特異性を決定している要因の一つとなると考察している。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、ヒトの *Staphylococcus aureus* と同様に、犬の皮膚由来のブドウ球菌である *Staphylococcus pseudintermedius* が産生した外毒素が、犬の表皮の細胞接着に傷害を与える可能性について *in vivo* を含めて初めて言及したものである。また、この一連の研究はブドウ球菌外毒素の宿主特異性についても比較動物学的見地から新しい知見を与えるものである。

表皮剥脱毒素 (ET) は、ブドウ球菌が産生するセリンプロテアーゼ様の酵素である。ヒトやブタの水疱性疾患の原因となるブドウ球菌が ET を産生することが知られており、ET はデスモゾーム蛋白であるデスモグレイン 1 を消化することが知られている。

犬の ET としては *S. pseudintermedius* から *siet* および *exi* 遺伝子が ET 遺伝子を保有すると報告されている。両遺伝子から組み換え蛋白 (SIET および EXI) を作製し、犬の皮膚に *in vivo* で表皮剥脱を誘導するかどうかを検討している。その結果、SIET 蛋白は表皮剥脱を誘導しなかったが、EXI 蛋白は犬の皮膚に表皮内水疱を生じさせ、かつ犬デスモグレイン 1 を特異的に消化することを明らかにしている。

次に犬の膿痂疹由来の *S. pseudintermedius* から新たな ET 遺伝子を採取し、その組み換え蛋白を作製して、*in vivo* で活性を有するかどうかを調査している。その結果、新規に認められた ET は肉眼的に表皮剥脱を誘導し、病理組織学的に表皮内水疱が認められている。また、犬デスモグレイン 1 を特異的に消化したことから、従来の *S. pseudintermedius* EXI を ExpA, 新規のものを ExpB と再命名している。

最後には、様々な臨床病態を示す犬の表在性膿皮症および正常犬の皮膚から *S. pseudintermedius* を分離し、臨床症状と ET 遺伝子の存在について比較検討を試みている。その結果、*expa* および *expb* 遺伝子は膿疱など表在性膿皮症を示す犬から分離されたが、*siet* 遺伝子は表在性膿皮症、正常犬にかかわらず検出されたことから、ExpA および ExpB は犬の膿皮症と関連すると推察している。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があるものと認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Identification of a novel *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin gene and its prevalence in isolates from canines with pyoderma and healthy dogs

著 者 名 : Iyori, K., Hisatsune, J., Kawakami, T., Shibata, S., Murayama, N., Ide, K., Nagata, M., Fukata, T., Iwasaki, T., Oshima, K., Hattori, M., Sugai, M. and Nishifuji, K.

学術雑誌名 : FEMS Microbiology Letters

巻・号・頁・発行年 : 312(2): 169-175, 2010

- 2) 題 目 : *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin EXI selectively digests canine desmoglein 1 and causes subcorneal clefts in canine epidermis

著 者 名 : 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.

学術雑誌名 : Veterinary Dermatology

巻・号・頁・発行年 : 印刷中

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : 非感染性の膿疱症が疑われたもののホスホマイシン投与後に皮疹の改善を認めたバーニーズ・マウンテン・ドッグの1例

著 者 名 : 村山信雄, 西藤公司, 伊従慶太, 吉村正幸, 永田雅彦

学術雑誌名 : 獣医臨床皮膚科

巻・号・頁・発行年 : 15(3): 135-140, 2009