

バイオフィルムを標的とした難治性乳房炎に対する 新規治療法の確立

酪農学園大学獣医学類・研究生 西 航司

■ 目的

ウシ乳房炎は乳房に病原体が侵入することで誘導される重篤な炎症性疾患であり、乳腺組織の傷害に伴い生乳の生産性が著しく阻害される。乳房炎は抗生物質により治療されるが、難治性を示す症例も多く、その原因として乳房炎原因菌によるバイオフィルムの関与が考えられている。バイオフィルムとは分泌タンパク質などによって細菌同士が固着した集合体であり、抗生物質に対する抵抗性が100倍以上になることが知られている。そのため、バイオフィルムは新たな治療標的分子として注目されているものの、乳房内におけるバイオフィルムの形成メカニズムやその特性に関する知見は乏しく、未だ治療技術の確立に至っていない。本研究では、乳房炎原因菌が形成するバイオフィルムを分子生物学的および形態学的に解析し乳房内におけるバイオフィルム形成メカニズムの解明を試みる。

■ 方法

バイオフィルム形成能の評価：乳房炎乳汁を採取し黄色ブドウ球菌ならびに大腸菌を分離する。分離した細菌は特異的プライマーを用いたPCR法により同定する。分離した黄色ブドウ球菌(SA)28株と大腸菌(*E. coli*)34株を96穴プレートに播種し培養する。クリスタルバイオレット液で染色後、プレートリーダーにて吸光値550nmで測定した。

バイオフィルムの形態学的特徴：SAおよび*E. coli*のうちバイオフィルム形成能の高い1株を35mmシャーレに播種し一定時間培養する。バイオフィルムをLIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kitにて染色し共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、一定時間培養後に脱水処理を行い走査型電子顕微鏡にて観察した。

高張食塩水が黄色ブドウ球菌のバイオフィルムに及ぼす影響：SAが形成したバイオフィルムに7.2%高張食塩水を暴露し、クリスタルバイオレット染色ならびに共焦点レーザー顕微鏡により解析した。また、エンロフロキサシン(ERFX)を添加した高張食塩水をSA由来のバイオフィルムに暴露し、クリスタルバイオレット染色ならびに共焦点レーザー顕微鏡により解析した。

■ 結果および考察

分離されたSA28株のうち、5株が吸光(OD)値0.3を超える高いバイオフィルム形成能を示した。大腸菌(*E. coli*)34株のうち、4株が吸光(OD)値1.0を超える高いバイオフィルム形成能を示した。SAおよび*E. coli*ともに分離株によってバイオフィルム形成能に差が認められた。バイオフィルムは表面上への付着、増殖ならびに細胞外物質(EPS)の産生そして分散の動態を示し、これらの生成過程において、接着に関わるタンパク質やEPSの産生能に関わる因子の発現が重要であることが報告されている。本研究において、SAおよび*E. coli*の接着やEPS産生に関わる因子の発現がバイオフィルム形成能の差を引き起こしたことが推察された。

SAおよび*E. coli*のうちバイオフィルム形成能の高い1株を走査型電子顕微鏡ならびに共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。SAおよび*E. coli*ともに菌体同士の接着が認められ、*E. coli*(CO9)では菌体同士の間に糸状の構造物が観察された。共焦点レーザー顕微鏡にて観察すると、SAおよび*E. coli*のバイオフィルムともに生菌が多く認められ、死菌はほとんど観察されなかった。

SAのバイオフィルム形成能の高い株および低い株それぞれ4株ずつ96穴プレートに播種し、生理食塩水または高張食塩水を暴露後、クリスタルバイオレットにて染色した。SA26、SA18およびSA28において、コントロールと比較して高張食塩水暴露でバイオフィルムが有意に($p<0.05$)減少した。次に、ERFX含有高張食塩水を暴露しクリスタルバイオレット染色にてバイオフィルムを評価した。SA12、SA21、SA26、SA18およびSA23でコントロールと比較してERFX含有HSS暴露によりバイオフィルムが有意に($p<0.05$)減少した。SA26のバイオフィルムにHSSまたはERFX含有HSSを暴露し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。コントロールと比較して、HSSおよびERFX含有HSSの暴露によるバイオフィルムの形態に変化は認められなかったが、死菌が多く観察された。本研究により、バイオフィルムを形成した細菌に対し、高張食塩水を添加することでバイオフィルムの減少が認められたことから、高張食塩水を用いた乳房洗浄は難治性乳房炎に対する有効な治療法であることが示唆された。

■ 結語

高張食塩水はSAのバイオフィルムを減弱させることが示された。これは乳房内で形成されたバイオフィルムに対する効果的な対策であり、難治性乳房炎の有効な治療法として期待される。