

学 位 論 文 要 旨

氏名 木下 優太

題 目 : Application of loop-mediated isothermal amplification to detect seven groups of pathogens causing lower respiratory bacterial infection in Thoroughbred racehorses and its antimicrobial susceptibility patterns

(競走馬の細菌性下気道疾患の診断における LAMP 法の応用および分離株の薬剤感受性に関する研究)

論文要旨 :

競走馬における細菌性下気道疾患は、調教や競走によるストレスあるいは長距離輸送等が要因となり引き起こされる疾患で、その主要な原因菌は *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* であることが知られている。しかし、抗菌薬投与により菌交代現象が生じると、様々な細菌が関与する混合感染へと移行する症例が多く認められ、特に偏性嫌気性菌や *Escherichia coli* による細菌性胸膜肺炎へ病態が悪化すると、致死率は時に 50% を超えることが報告されている。このことからウマ獣医療において、細菌性下気道疾患を早期に診断し、適切な治療を行うことの重要性は高い。

細菌性下気道疾患の治療において抗菌薬投与は必須であり、獣医師には迅速な原因菌同定と薬剤感受性パターンに基づく治療が求められる。Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法は遺伝子増幅法の一つであり、培養法と比較し検査結果が迅速に得られ、また、polymerase chain reaction 法と比較し簡易な設備で実施が可能となる手法である。本研究では、臨床獣医師が LAMP 法を用いて原因菌を迅速検出し、その後、最適な抗菌薬選択を治療初期から可能にすることを目的として、競走馬の細菌性下気道疾患における主要な病原細菌を検出する 5 種類の LAMP 法の作製、5 種の LAMP 法に既存の LAMP 法 2 種類を加えた 7 種類の LAMP 法の臨床検体への応用、短時間かつ実施が容易な DNA 抽出法の比較検討および上記 LAMP 法の標的細菌における薬剤感受性試験、を実施した。

第一章では、競走馬の細菌性下気道疾患において菌交代現象後の主な原因菌となる偏性嫌気性菌について主要な菌種を明らかにするため、呼吸器疾患を呈する 31 頭の競走馬から分離された 58 株の偏性嫌気性菌に対して、16S rRNA 遺伝子配列解析による細菌同定を実施した。その結果、*Bacteroides fragilis* (15 株) に代表される *Bacteroides* 属 (22 株, 37.9%) および *Prevotella heparinolytica* (9 株) に代表される *Prevotella* 属 (17 株, 29.3%) の割合が大きかった。31 頭のうち、*Bacteroides* 属菌あるいは *Prevotella* 属菌が 29 頭 (93.5%) から分離されていることから、*Bacteroides-Prevotella* グループの細菌が競走馬の細菌性下気道疾患における主要な偏性嫌気性菌であることが示唆された。*Prevotella* 属が *Bacteroides* 属に次ぐ主要な分離細菌であるとする報告はこれまでになく、本研究において *Prevotella* 属菌の重要性が明ら

かとなった。

第二章では、競走馬における細菌性下気道疾患の主要な原因菌を検出する 5 つの LAMP 法を作製した。LAMP 法の標的細菌は、*S. zooepidemicus* (Sz-LAMP)、主要な偏性嫌気性菌である *Bacteroides-Prevotella* グループの細菌 (Bac-Pre-LAMP)、*Klebsiella pneumoniae* (Kp-LAMP)、*Staphylococcus aureus* (Sa-LAMP) および *Stenotrophomonas maltophilia* (Sm-LAMP) である。Bac-Pre-LAMP 以外は種特異的 LAMP 法であること、Bac-Pre-LAMP は *Bacteroides* 属および *Prevotella* 属に加え *Porphyromonas* 属菌のみを検出することが確認された。*Porphyromonas* 属菌は、細菌性下気道疾患を発症したウマから分離されることが報告されており、Bac-Pre-LAMP は下気道疾患の病原菌となる主な偏性嫌気性菌を広く検出できることが示唆された。次に筆者は、臨床現場において短時間かつ容易に実施可能である 3 つの DNA 抽出法 (Loopamp PURE DNA Extraction Kit (栄研化学)、InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories) および煮沸法) を比較検討した。その結果、陽性反応が多くかつ偽陰性反応が少ない Loopamp PURE DNA Extraction Kit が最も適した DNA 抽出法であることが示された。上述した 5 つの LAMP 法に既報の *Escherichia coli* および *Pseudomonas aeruginosa* の種特異的 LAMP 法を加えた 7 種類の LAMP 法を臨床検体に実施し細菌分離成績との一致率を比較した。その結果、分離菌数の閾値を、臨床的意義を持つとされる菌数 (1×10^4 CFU/ml) とした際は 91.0~100%、細菌分離の検出限界 (20 CFU/ml) とした場合でも 85.1~100% と高い一致率を示したことから、競走馬の細菌性下気道疾患における原因菌の迅速検出法として本法が有用であることが示唆された。

第三章では、第二章における LAMP 法の標的細菌について薬剤感受性試験を実施した。その結果、全ての *S. zooepidemicus* 株が β ラクタム系抗菌薬に感受性であったことから、 β ラクタム系抗菌薬はこれまでと同様に第一選択薬として有効であることが示唆された。一方で、重篤な細菌性下気道疾患で使用されることのあるテトラサイクリン系抗菌薬のミノサイクリンについては、2010~2014 年に分離された *S. zooepidemicus* および *E. coli* において耐性株が増加していることから、使用前にミノサイクリンへの薬剤感受性を確認する必要があると考えられた。偏性嫌気性菌である *Bacteroides* 属および *Prevotella* 属菌については、近年ヒト医療においてメトロニダゾール耐性株が報告されているが、本研究における分離株は全てが感受性株であった。これらの薬剤感受性パターンは、日本における競走馬の細菌性下気道疾患に対する抗菌薬選択において非常に有益であると考えられる。

本研究で構築した LAMP 法は、Loopamp PURE DNA Extraction Kit と組み合わせることで、細菌性下気道疾患の原因菌を臨床現場で迅速 (90 分以内) に検出できる。さらに、本研究で得られた薬剤感受性試験の結果を参考にすることで、LAMP 法により検出した細菌に対して根拠に基づいた抗菌薬を治療初期から選択することが可能となった。本研究の実施によって可能となった原因菌の迅速検出および適切な抗菌薬使用は、競走馬の細菌性下気道疾患における治療効果の改善に繋がると考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	木下優太
審 査 委 員	主 査 : JRA 競走馬総合研究所 主査 丹羽秀和
	副 査 : 山口大学 教授 度会雅久
	副 査 : 鹿児島大学 教授 中馬猛久
	副 査 : 鹿児島大学 教授 帆保誠二
	副 査 : 山口大学 准教授 清水 隆
題 目	Application of loop-mediated isothermal amplification to detect seven groups of pathogens causing lower respiratory bacterial infection in Thoroughbred racehorses and its antimicrobial susceptibility patterns (競走馬の細菌性下気道疾患の診断における LAMP 法の応用および分離株の薬剤感受性に関する研究)
審査結果の要旨 :	
<p>競走馬における細菌性下気道疾患は、調教や競走によるストレスあるいは長距離輸送等が要因となり引き起こされる疾患で、その主要な原因菌は <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> であることが知られている。しかし、抗菌薬投与後の菌交代現象により混合感染へと移行し、細菌性胸膜肺炎へ病態が悪化すると高い致死率を示すことが報告されている。このことからウマ獣医療において、細菌性下気道疾患を早期に診断し、適切な治療を行うことの重要性は高い。Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法は遺伝子増幅法の一つであり、培養法と比較し検査結果が迅速に得られ、簡易な設備での実施が可能な手法である。本論文では、臨床獣医師が LAMP 法を用いて原因菌を迅速検出し、最適な抗菌薬選択を治療初期から可能とすることを目的として、競走馬の細菌性下気道疾患における主要な病原細菌を検出する 5 種類の LAMP 法を開発し、既存の LAMP 法 2 種類も加えた 7 種類の LAMP 法の臨床検体への応用を試みた。さらに、短時間かつ実施が容易な DNA 抽出法について比較検討するとともに、上記 LAMP 法の標的細菌の薬剤感受性を検討した。</p> <p>第一章では、競走馬の細菌性下気道疾患において菌交代現象後の主な原因菌となる偏性嫌気性菌の主要な菌種を明らかにするため、呼吸器疾患を呈する競走馬から分離された偏性嫌気性菌の 16S rRNA 遺伝子配列解析による細菌同定を実施した。その結果、<i>Bacteroides</i> 属および <i>Prevotella</i> 属の割合が高いことが明らかとなり、<i>Bacteroides-Prevotella</i> グループの細菌が主要な偏性嫌気性菌であることが示唆された。</p>	

第二章では、競走馬における細菌性下気道疾患の主要な原因菌を検出する 5 つの LAMP 法を作製した。LAMP 法の標的細菌は、*S. zooepidemicus*、*Bacteroides-Prevotella* グループの細菌、*Klebsiella pneumoniae*、*Staphylococcus aureus* および *Stenotrophomonas maltophilia* とした。*Bacteroides-Prevotella* グループの細菌を検出する LAMP 法 (Bac-Pre-LAMP) 以外は、いずれも菌種特異的 LAMP 法であることが確認された。Bac-Pre-LAMP は *Bacteroides* 属や *Prevotella* 属に加え *Porphyromonas* 属菌を検出することが確認された。*Porphyromonas* 属菌は、細菌性下気道疾患を発症したウマから分離されることが報告されており、Bac-Pre-LAMP は下気道疾患における主な偏性嫌気性菌を広く検出できることが示唆された。次に、臨床現場において短時間かつ容易に実施可能な 3 つの DNA 抽出法 (Loopamp PURE DNA Extraction Kit (PURE 法)、InstaGene Matrix、煮沸法) を比較した結果、PURE 法が最も LAMP 法との組み合わせに適した DNA 抽出法であることが示された。上述の 5 つの LAMP 法に既報の *Escherichia coli* および *Pseudomonas aeruginosa* の種特異的 LAMP 法を加えた 7 種類の LAMP 法を臨床検体に実施し細菌分離成績と比較した結果、高い一致率を示したことから、本法が競走馬の細菌性下気道疾患における原因菌の迅速検出法として有用であることが示唆された。

第三章では、第二章における LAMP 法の標的細菌について薬剤感受性試験を実施した。その結果、全ての *S. zooepidemicus* 株が β ラクタム系抗菌薬に感受性であり、 β ラクタム系抗菌薬はこれまでと同様に第一選択薬として有効であることが示唆された。一方で、重篤な細菌性下気道疾患で使用されることのあるミノサイクリンについては、2010~2014 年に分離された *S. zooepidemicus* および *E. coli* において耐性株が増加していることが明らかとなった。*Bacteroides* 属および *Prevotella* 属菌については、メトロニダゾールに対して全ての株が感受性であった。

本 LAMP 法は、細菌性下気道疾患の主要な原因菌を臨床現場で迅速 (90 分以内) に検出し、さらに本研究で得られた薬剤感受性試験の結果を参考にすることで、根拠に基づいた抗菌薬を治療初期から選択することが可能となった。本研究の実施によって得られた知見は、競走馬の細菌性下気道疾患における適切な抗菌薬使用に関して、学術上ならびに応用上貢献するところが大きい。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位論文として価値のあるものと認めた。