

動物由来腸球菌を溶菌するバクテリオファージの分離

村田 亮*・田島 三愛*・今村 尚睦*

Isolation of bacteriophages infecting Enterococci isolated from animal origin.

Ryo MURATA*, Mie TASHIMA*, Naomu IMAMURA*
(Accepted 5 December 2018)

背景と目的

近年、獣医療域における尿路感染症の重症化、慢性化が問題となっている。主な治療法は抗菌剤の投与であるが、症状が改善しやすい反面、再発や耐性菌の出現によって根治に至らず致死性的となることも少なくない^[1]。腸球菌は、ヒトや動物の腸管に常在する正常細菌叢であるが、種々の抗菌剤に対して自然耐性を持つことから、ひとたび“日和見”感染症を引き起こすと制圧が困難な病原菌でもある。伴侶動物の長寿化に伴い、免疫能の低下した個体が腸球菌、とくに *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) や *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) に感染し、難治性の膀胱炎を起こす事例が多発している。不適切な抗菌剤の投与が続けられた場合、これらの腸球菌は高度に薬剤耐性化しており、もはや治療は残されていない。

本研究では代替療法としてファージセラピーに着目し、*E. faecalis* および *E. faecium* を溶菌するバクテリオファージの探索を行った。バクテリオファージ（ファージ）とは細菌に感染するウイルスの総称であり、中でもビルレント（溶菌性）ファージは子ファージ放出の際に菌体を内側から破壊するため、宿主細菌を溶解する^[10]。また、ファージが感染し得る細菌種は限定的であるとされており、他の細菌叢に影響を及ぼす可能性が低いことから抗菌剤に替わる感染症制御のツールとして注目を集めている^[4,5,8]。

材料と方法

【供試細菌株】

ファージを感染させる細菌株には、ATCC 基準株

(*E. faecalis* 19433^T, *E. faecium* 19434^T) およびカラス、ウシ、イヌ、ネコ、カンガルー、健康補助食品などから分離した *E. faecalis* 11 株、*E. faecium* 10 株の合計 21 株を使用した。グラム染色、カタラーゼ試験、チトクローム・オキシダーゼ試験、胆汁酸塩エスクリン培地 (Fluka) による培養を行った後、Api 20 Strep (シスメックス・ジオメリユー株式会社)、PCR 法および MALDI-TOF MS により菌種を同定した。全ての細菌株は 5% ウシ血清添加 Mueller Hinton II Agar (BD) 培地上で、ディスク拡散法による薬剤感受性試験を行った。

【ファージの分離】

ファージの採集には江別市下水処理施設や畜舎由来（栃木県豚舎、愛知県牛舎）の汚水を使用した。各 2 L の汚水を遠心分離 (4℃, 10,000×g, 20 分) してゴミや細菌を沈殿させた後、上清を回収しポリエチレングリコール 6,000 (PEG, 和光純薬工業株式会社) 10%, NaCl (和光純薬工業株式会社) 4% を加え激しく混和した後に 4℃ で一晩静置、ファージを吸着させた。その後ファージ-PEG 凝集体を遠心 (4℃, 11,000×g, 90 分) し、沈殿物を SM buffer {1 L 当たり 1 M Tris-HCl (pH 7.5) 50 mL, MgSO₄ 2 g, NaCl 5.8 g, 2% ゼラチン 5 mL} に懸濁、クロロホルムを加えてファージ-PEG 凝集体を解離、雑菌を殺滅した^[3]。遠心 (4℃, 8,000×g, 10 分) により PEG を沈殿させ、上清をファージ濃縮液とした。

血液寒天培地で培養した *E. faecalis* と *E. faecium* を Luria-Broth (LB, BD) 培地 5 mL に接種後、37℃ で 4 時間培養し菌液とした。菌液 100 μL とファージ濃縮液 100 μL を混合し、吸着時間として

* 酪農学園大学獣医学群獣医学類獣医細菌学ユニット
Veterinary Bacteriology, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

10 分間静置した後に 45℃ に維持しておいた LB 軟寒天培地 {LB, 0.5% アガロース ME (中電気浸透) クラシックタイプ (ナカライテスク株式会社)} を 3 mL 加え混釈した後, Trypticase Soy Agar (TSA, BD) 培地に重層して 37℃ で一晩好気培養し, プラーク, つまりファージによる溶菌反応の有無を観察した。観察されたプラークについては, ピペットで軟寒天部分吸い取り, 2 mL の LB 培地へ接種, その後 37℃ で 2~3 時間振盪培養を行うことでファージの単離を試みた。この培養液にクロロホルムを 50 μ L 加えて激しく混和, 宿主細菌を殺滅後, 遠心分離 (4℃, 10,000 \times g, 5 分) を行って上清のみを 4℃ で保存した。

【ファージ溶菌活性の評価】

45℃ に維持した LB 軟寒天培地に, *E. faecalis* または *E. faecium* の full growth 菌液 100 μ L を混合した後, TSA 培地に重層した。この軟寒天重層培地上に単離したファージ液を 5 μ L 滴下後 37℃ で一晩好気培養し, プラークの形成を観察して溶菌活性 (プラークなし; -, 境界が不明瞭なプラーク; \pm , 境界は明瞭であるが完全に透明化していないプラーク; +, 完全に透明化しているが直径 5 mm 未満のプラーク; ++, 直径 5 mm 以上の明瞭なプラーク; +++) の判定を行った。

【電子顕微鏡撮影】

濃縮ファージ液, full growth *E. faecalis* 菌液を準備し, ファージ液, 菌液, ファージと菌液を混和したものをそれぞれ 2 mL 作成した。それぞれの液をパラフィルム上に滴下して液滴を形成させ, マイクログリッドを貼りつけたメッシュを被せ, 10 分程静置し, メッシュにファージ, 菌液を吸着させた。ネガティブ染色は 1% 燐タンゲステン酸を使用し, 染色液上にメッシュを 1 秒載せ, 液滴を変えてこれを 3 回行った。自然乾燥させた後, 透過型電子顕微鏡 (HITACHI, H7700) で観察した。

【バイオフィーム形成腸球菌に対するファージの抗菌活性】

バイオフィーム形成後の腸球菌に対するファージの溶菌効果を調べた^[2]。供試菌 21 株全てについて, Brain Heart Infusion (BHI, BD) にて 37℃ 24 時間培養した。マクファーランド濁度が 0.5~1 番になるように調整した菌液を 96 ウェルプレートに 200 μ L ずつ滴下し, 37℃ で 72 時間培養し, バイオフィームの形成させた。その後スポットテストにより溶

菌活性が最も高かったファージ No.35 液を 20 μ L 加え, 30 分, 60 分, 120 分感作させた後に PBS で 3 回洗浄した。新鮮な BHI を 200 μ L 滴下し再び 37℃ で 72 時間培養した。その後 PBS で 2 回洗浄し, 1% クリスタルバイオレット加ホルマリン生理食塩水で 15 分間染色した。染色後 PBS で 1 回洗浄後, エタノール-アセトン (8:2) を滴下し, クリスタルバイオレットを抽出した。吸光度計 (iMark™ Microplate Reader, バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社) で OD 値 595 nm を測定し, 抽出されたクリスタルバイオレット濃度をバイオフィーム濃度として考察した。

成 績

【被験菌の薬剤感受性】

E. faecalis ではリネゾリド, テイコプラニンに対して全ての菌株が感受性を示し, *E. faecium* でも耐性を示したのは 1 株のみであった。ミノマイシンについても有効性が高いことが示唆された。一方で, 両菌種ともにリファンピシンに対して高い耐性率が観察された (表 1)。

【バクテリオファージの分離】

腸球菌株にファージ濃縮液を接種したところ, 多数のプラークが観察された (図 1)。単離されたファージは *E. faecium* 由来のものが合計 24 種, *E. faecalis* 由来のものは合計 18 種にのぼり, 特に豚舎由来の汚水に多く腸球菌溶菌性ファージが多く含まれていた (表 2)。

【ファージ溶菌活性の評価】

単離された 42 種のファージのうち, *E. faecalis* 11 菌株全てを溶菌可能なファージは 8 種, *E. faecalis* 10 菌株を溶菌できるファージは 2 種存在した。中でもファージ No.35 および No.36 は, 種を超えて全ての供試菌株を溶菌したことから, 腸球菌に対して強い殺菌能を有していた (表 3)。

【電子顕微鏡写真】

ファージ No.35 と *E. faecalis* を透過型電子顕微鏡で観察をしたところ頭部と尾部を持つファージであることが判明した (図 2)。

【バイオフィーム形成腸球菌に対するファージの抗菌活性】

バイオフィーム形成後にファージ No.35 を感作させたところ, ファージの溶菌効果が認められない細

表1 腸球菌株の薬剤感受性試験結果

菌種	菌株	PCG	VCM	EM	MINO	CIP	LVFX	LZD	RFP	TEC
<i>E. faecalis</i>	ATCC 19433 ^T	S	I	I	S	S	R	S	R	S
	カラス肝臓1	R	I	I	S	I	S	S	R	S
	カラス肝臓2	S	S	S	S	I	S	S	R	S
	ウシ子宮	R	R	R	I	S	S	S	S	S
	ウシ乳汁1	S	I	I	S	I	I	S	R	I
	イヌ糞便1	S	R	S	S	R	I	S	R	S
	イヌ糞便2	S	I	R	R	S	S	S	I	S
	イヌ糞便3	S	I	I	S	I	S	I	R	S
	ネコ尿	S	S	S	I	I	S	S	R	S
	カンガルー口腔1	S	I	S	R	I	R	S	R	I
	カンガルー口腔2	S	I	I	I	I	S	S	R	S
	<i>E. faecium</i>	ATCC 19434 ^T	R	S	R	S	I	I	S	R
カラス肝臓3		R	S	I	S	I	R	S	R	S
ウシ乳汁2		R	S	I	S	S	R	S	S	S
イヌ膀胱		S	S	R	S	R	R	S	R	S
イヌ前立腺		R	R	R	S	R	R	R	R	R
イヌ糞4		R	S	R	S	S	S	S	R	S
イヌ糞5		S	S	I	S	R	I	S	R	S
イヌ糞6		S	S	I	S	S	S	S	R	S
イヌ糞7		R	S	R	S	I	I	S	R	S
健康食品C		R	S	I	S	S	I	S	R	S

R：耐性, I：間性, S：感受性

PCG：ペニシリン 10, VCM：バンコマイシン 30, EM：エリスロマイシン 15,

MINO：ミノサイクリン, CPFX：シプロフロキサシン 5, LVFX：レボフロキサシン 5,

LZD：リネゾリド, RFP：リファンピシン 5, TEC：テイコプラニン 30

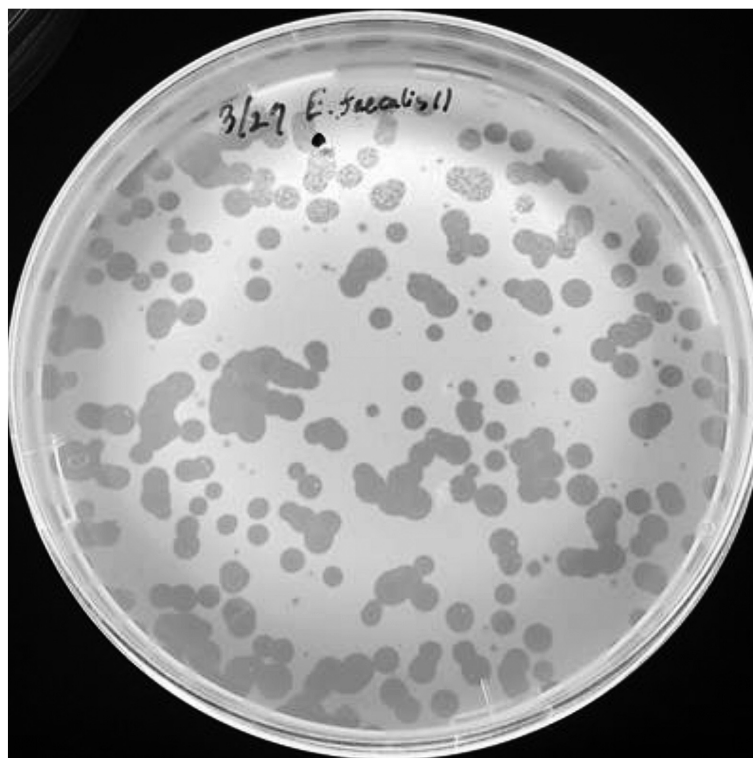


図1 プラークアッセイ

E. faecalis (カンガルー口腔2株) を混釈した培地上に栃木県豚舎汚水から濃縮したファージ液を添加した様子。大小さまざまな大きさのプラークが混在し、様々な溶菌活性を持ったファージが存在していることが分かる。



図2 ファージの電子顕微鏡写真

E. faecalis 表面に、多面体の頭部と尾部を持つ全長約 200 nm のファージが吸着している様子が観察された。

菌株が存在した。供試腸球菌株について PCR 法にて病原遺伝子 (*esp*, *pilA*, *pilB*, *fms8*, *sgrA*) の有無を調べたところ、溶菌効果が減弱した *E. faecalis* 株は全て *esp* を保有していた (表 4)。他の遺伝子については全ての供試菌株で保有が認められなかった。

考 察

本研究の目的は、尿路感染症起因菌の 1 つである腸球菌を標的とするバクテリオファージの探索であった。プラークアッセイとスポットテストの結果より、合計 42 種のビルレントファージを得ることができた。実際に電子顕微鏡によりファージの形態が観察され、頭部と尾部を持つファージであることが判明した。ファージの形態から多面体の頭部と収縮性の尾部を持つ Myoviridae に属すると推察される。

単離されたファージの中には菌種を超えて溶菌活性を示すファージが 2 種含まれていた。バクテリオファージは宿主となる細菌種に特異的に感染するといわれているが、種や属を超えて溶菌活性を示すファージも見付かっている。このようなファージをファージセラピーに使用する際は、広い殺菌作用が期待できる反面、正常細菌叢への負の影響について検証する必要があるだろう。腸球菌は種々の日和見

感染症の原因となる一方、健康な動物の腸管にも存在している常在菌叢の 1 つである。実際、本研究内でも、“プロバイオティクス”として販売されている「健康補助食品 C」から分離された *E. faecalis* 株が、他の菌株同様にファージによって溶菌される結果となった。今後は病原遺伝子を持つ特定の菌株のみを溶菌する、宿主特異性の高いファージを探索する必要があるかもしれない。

ディスク試験による薬剤感受性試験の結果、*E. faecalis* 株では 11 株中 9 株、*E. faecium* 株では 10 株中 9 株がリファンピシンに対して顕著に耐性を示したことから、動物由来の腸球菌株は高頻度でリファンピシン耐性を持つと考えられる。また、他の抗菌剤に対しても *E. faecium* 株には耐性が多く観察されたが、これはこの菌種は耐性菌株の割合が高いという既知の情報と矛盾しない^[6,9]。リファンピシン耐性株に対してもファージが溶菌活性を示していることから、抗菌剤に代わってファージに殺菌効果が期待できることが示唆された。

腸球菌はバイオフィルムを形成することにより、より薬剤および環境耐性を増すことが知られている。尿道カテーテルなどにこのバイオフィルムが形成された場合、ファージの菌体への吸着が阻害されて、十分な溶菌活性が得られない可能性がある^[7]。今回、*esp* 遺伝子を保有している *E. faecalis* 株では、

表4 バイオフィーム形成後のファージ No.35 の溶菌効果

菌種	菌株	NC ¹⁾	ファージ感作時間			esp 遺伝子の保有
			30 min.	60 min.	120 min.	
<i>E. faecalis</i>	ATCC 19433 ^T	0.129	0.211	0.213	0.215	+
	カラス肝臓 1	0.369	0.250	0.484	0.382	-
	カラス肝臓 2	0.395	0.219	0.201	0.162	-
	ウシ子宮	0.257	0.572	0.565	0.431	+
	ウシ乳汁 1	0.143	0.186	0.163	0.131	-
	イヌ糞便 1	0.310	0.156	0.229	0.135	-
	イヌ糞便 2	0.175	0.162	0.179	0.175	-
	イヌ糞便 3	0.250	0.259	0.289	0.221	-
	ネコ尿	0.174	0.261	0.311	0.182	-
	カンガルー口腔 1	0.140	0.211	0.144	0.130	-
	カンガルー口腔 2	0.109	0.176	0.155	0.183	+
<i>E. faecium</i>	ATCC 19434 ^T	0.173	0.256	0.162	0.173	-
	カラス肝臓 3	0.204	0.197	0.280	0.176	-
	ウシ乳汁 2	0.155	0.274	0.335	0.208	-
	イヌ膀胱	0.164	0.247	0.231	0.214	-
	イヌ前立腺	0.140	0.176	0.230	0.257	-
	イヌ糞 4	0.169	0.189	0.206	0.160	-
	イヌ糞 5	0.115	0.134	0.151	0.149	-
	イヌ糞 6	0.398	0.260	0.212	0.163	-
	イヌ糞 7	0.265	0.293	0.210	0.234	-
	健康食品 C	0.357	0.208	0.307	0.136	-

1) NC はファージを感作させずにバイオフィームを染めたウェルの OD 値

バイオフィームに対するファージの抗菌効果が観察されなかった。*esp* 遺伝子保有菌株は、より強力なバイオフィームを形成することができ、それによりファージの効果が十分に得られなかったのではないかと考えられる。Garg ら^[2] は、*esp* 遺伝子はバイオフィーム形成をするための必須遺伝子ではないが、その存在がバイオフィーム形成を促進する可能性があることを示している。ファージセラピーでは複数株のファージを混合し、ファージカクテルとして使用することで相乗的な溶菌効果をもたらすことができるとされているため、強い溶菌活性を持つファージ株の探索を継続することで、尿路感染症および院内感染に対して有効な治療法としての応用が期待できるだろう。

謝 辞

この研究は、2017 年度酪農学園大学共同研究の助成を受け実施された。

引用文献

- Freitag, T., Squires, R. A., Schmid, J. 2008. Naturally occurring bacteriophages lyse a large proportion of canine and feline uropathogenic *Escherichia coli* isolates in vitro. *Res. Vet. Sci.* **85**: 1-7.
- Garg, S., Mohan, B., Taneja, N. 2017. Biofilm formation capability of enterococcal strains causing urinary tract infection vis-a-vis colonisation and correlation with enterococcal surface protein gene. *Indian. J. Med. Microbiol.* **35**: 48-52.
- 川崎健, 山田隆 2016. いまどき? いまこそ! プラークアッセイ — 新奇ジャンボファージ取得のためのプラークアッセイのすゝめ —. *生物工学会誌* **94**: 492-495.
- Khalifa, L., Brosh, Y., Gelman, D., Copenhagen-Glazer, S., Beyth, S., Poradosu-Cohen, R., Que Y. A., Beyth, N., Hazan, R. 2015. Targeting *Enterococcus faecalis* biofilms with phage therapy. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 2696-2705.
- 小熊恵二, 有坂文雄 2009. バクテリオファージ pp.77-78. *医科ウイルス学*, 第三版 (高田賢藏 編), 南江堂, 東京.
- Santos, B. A., Oliveira, J. S., Cardoso, N. T., Barbosa, A. V., Superti, S. V., Teixeira, L. M., Neves, F. P. G. 2017. Major globally disseminated clonal complexes of antimicrobial resist-

- ant enterococci associated with infections in cancer patients in Brazil. *Infect. Genet. Evol.* **55**: 56-62.
7. Soheili, S., Ghafourian, S., Sekawi, Z., Neela, V., Sadeghifard, N., Ramli, R., Hamat, R. A., 2014. Wide distribution of virulence genes among *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* clinical isolates. *Scientific World Journal*.
8. 内山淳平 2018. バクテリオファージ pp. 44-48. 獣医微生物学, 第四版 (関崎勉, 遠矢幸伸, 福士秀人, 堀本泰介, 村瀬敏之 編), 文永堂, 東京.
9. 山口敏行 2008. 4. 腸球菌. 日本内科学会雑誌 **97**: 2684-2694.
10. 米崎哲朗, 大塚祐一 2010. 新世代のファージ研究. 生産と技術 **62**: 55-58.

Summary

Enterococcus spp. have emerged as important pathogens in urinary tract infection, especially in companion animals. Enterococci show intrinsic resistance to a large number of antibiotics. Phage therapy is widely being reconsidered as an alternative to antibiotics. In this study, we have isolated forty-two virulent phages using *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from animal origin.

