

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 古澤 貴章

学位の種類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当

学位論文の題目 病原性細菌に対するバクテリオファージの応用に関する研究

審査委員

主査 教授 岩野 英知（獣医生化学）

副査 教授 小岩 政照（生産動物内科学Ⅱ）

副査 教授 樋口 豪紀（獣医衛生学）

副査 教授 横田 博（獣医生化学）

論文審査の要旨および結果

1 論文審査の要旨および結果

審査は、1)体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2)科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

論文の概要について

薬剤耐性菌が世界中で分離されている一方で製薬企業での抗生物質開発事業は縮小しつつある。薬剤耐性菌は抗生物質の濫用により増加するため、抗生物質だけに頼らない新たな感染症治療法の開発が望まれている。そこで我々はバクテリオファージ(ファージ)を用いたファージセラピーに着目した。野外サンプルから6株のファージを分離し緑膿菌に対する溶菌活性と宿主域を調べたところ全68株中56株に溶菌活性が見られた。角膜炎モデルマウスを用いた実験では菌液滴下から3時間以内のファージ適用により角膜炎の発症を阻止できた。また、ファージのゲノム配列を調べたところ安全性が高いことがわかった。ファージがコードする溶菌酵素を発現、精製し、緑膿菌に対する効果を調べた実験では溶菌が確認された。ファージを細菌感染症の治療や予防に応用することで薬剤耐性菌の減少や耐性菌の伝播の阻止などが期待でき、薬剤耐性菌問題解決の一助となることが確信できる報告である。

研究の背景と目的

現在、薬剤耐性菌問題は世界的に危機的状況に置かれている。世界保健機構は耐性菌に関するレポートを報告しており、日本国内でも耐性菌に関する国家行動計画を策定している。2016年に行われたG7伊勢志摩サミットでも耐性菌問題は主要議題として扱われており、まさに世界規模で耐性菌に対抗しなければならない事態になっている。薬剤耐性菌が増加する原因は抗生物質の濫用であることから、研究者たちは抗生物質だけに頼らない新たな感染症治療法の開発を要求されている。そこで本研究ではバクテリオファージ(ファージ)を利用した新たな治療戦略としてファージセラピーに着目し、その有用性を検討した。ファージは細菌に特異的に感染するウイルスであり、最終的に宿主菌の溶菌を引き起こす。その標的細菌として日和見感染症の原因菌であり、薬剤耐性化が頻繁に報告されている緑膿菌を選んだ。競走馬の世界でも緑膿菌は問題になり、角膜炎を起こした場合は急速に進行する。現在はレース後に抗生物質を点眼しているが、有効濃度を長時間保つことはできず発症してしまう。また、予防的な点眼薬の投与は薬剤耐性菌の増加を引き起こすため、その代わりになるものとしてファージセラピーの応用を考えた。本研究ではファージの緑膿菌に対する有効性とその安全性を明らかにすること、及び、ファージが持つ酵素が緑膿菌に対して有効かどうかを明らかにする目的で実験を行った。すなわち、緑膿菌に対する

ファージを野外から分離し、その溶菌活性や緑膿菌性角膜炎に対する治療効果を評価した。更に全ゲノム解析を行うことで安全性を検討し、また、ファージが持つ溶菌酵素(エンドライシン)遺伝子を特定した。最後にファージのエンドライシンの溶菌活性を検討することで幅広い応用の可能性を調べた。

研究の成果

下水処理場から回収したサンプルから 6 株のファージを分離し、イヌ及びウマ疾病由来緑膿菌に対する宿主域判定では、それぞれのファージの宿主域を組み合わせることで全 68 株中 56 株に明らかな溶菌活性を発揮した。この緑膿菌の中にはフルオロキノロン系薬剤高度耐性菌が 6 株含まれており、そのうち 5 株を溶菌することができた。ウマの角膜炎に対しては点眼薬としての応用を考えているため、ファージの吸着速度を調べたところ 30 秒で 80%以上のファージが吸着することが明らかになった。ファージを点眼する際には直ちに菌に吸着し、角膜炎点眼薬としての効果が確認できた。角膜炎モデルマウスを用いた実験では菌滴下から 3 時間以内のファージ適用により菌の増殖を抑制し、角膜炎の発症を阻止した。更に 2 種類のファージをカクテル化することで単独で使うよりも高い増殖抑制効果を示した。

ファージの安全性を確かめるために全ゲノム解析を行ったところ、分離された R18 及び S12-1 ファージには毒性因子や、溶原性ファージマーカークドされていないことが確認された。既存の毒性因子をコードしていないということから安全性は高いと考えられる。また、ファージがコードする溶菌酵素であるエンドライシン遺伝子を特定することができた。

R18 ファージが持つエンドライシン遺伝子を、大腸菌を用いて発現・精製した。精製されたエンドライシンを用いて緑膿菌の溶菌活性を確認した。溶菌は緑膿菌の培養液が OD₆₆₀=1.0 のときにエンドライシンを添加し、OD 値の低下により評価した。その結果エンドライシンは EDTA と同時に投与されたときのみ溶菌活性を示した。また、由来菌株のほか由来ファージが溶菌できなかった緑膿菌やキノロン系薬剤耐性菌、角膜炎由来菌にも効果を示した。

研究の評価

昨今、薬剤耐性菌の出現が問題になるなかで新薬開発はなかなか進まず、これまでとは発想の異なる化学物質に頼らない抗菌剤の開発が望まれている。バクテリオファージは、地球上で細菌の 10 倍以上の 10^{32} という数で存在し、細菌と共進化しながら生き抜いてきた。つまりファージセラピーは、ファージの多様性をうまく利用して感染症対策に対応しようということである。本研究は、古くて新しいファージセラピーの応用研究を果敢に行い、臨床応用可能な成果をクリアなデータで示し、論文を 3 報、関連学会での受賞など輝かしい業績を得ることができた。その実績から大学院卒業規定に達し、3 年での卒業が認められた。本業績は論文公表後、学会や企業からのオファーも多く、今後の研

究展開も大変期待されており、その扉を開いた研究として高く評価できる。以下、公表した論文と関連学会での受賞（共同受賞）である。

<公表論文>

- 1) *Applied and Environmental Microbiology*. 82(17):5332-9. (2016)
- 2) *Genome Announcements*. 4(3) pii: e00041-16. (2016)
- 3) *Journal of Veterinary Medical Science*. 78(6):1035-8 (2016)

<受賞>

- 1) 北海道地区学会長賞（北海道獣医師会／2014年9月）
「競走馬の細菌性角膜炎に対するファージセラピーの検討」
- 2) 獣医学術学会賞(日本獣医師会／2015年2月)
「競走馬の細菌性角膜炎に対するファージセラピーの検討」

以上のことから、古澤 貴章 氏は、博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

2 最終試験の結果

審査委員4名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2017年 2月15日

審査委員

主査	教授	岩野	英知
副査	教授	小岩	政照
副査	教授	樋口	豪紀
副査	教授	横田	博

学位論文要旨

病原性細菌に対するバクテリオファージの応用に関する研究

古澤 貴章

現在、薬剤耐性菌問題は全世界で危機的状況にあり、世界保健機構は国や年齢問わずその脅威にさらされる可能性があるとして指摘している。抗生物質の使用に対しても慎重に運用するよう警鐘を鳴らしている。これを受けて日本では2016年4月に「国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議」により薬剤耐性対策アクションプランが決定された。5月に行われたG7伊勢志摩サミットにおいても主要課題の1つとしてこの薬剤耐性菌問題が挙げられ、この危機感を世界中で共有している。

この状況を打破する手段の一つとしてバクテリオファージ(ファージ)の応用が期待されている。ファージは1915年に発見された細菌に感染するウイルスで、1917年にはその治療的応用であるファージセラピーが提案された。アメリカでは加工肉へのファージスプレーの使用がアメリカ食品医薬品局に認可されているが、食肉加工以外での使用は未だ認められていない。また、ファージが細菌体内から放出される時に使われる溶菌酵素であるエンドライシンを利用する方法も検討されている。未だエンドライシン耐性菌の報告がなく、多くの研究者がその実用化を目指して研究を重ねている。そこで本研究では急性及び慢性感染症を引き起こし、院内感染や薬剤耐性で問題になる緑膿菌に対するファージを野外から分離しその治療的可能性、安全性の検討を行うとともにそのファージが持つエンドライシンの緑膿菌に対する有用性を検討した。

第I章では下水処理施設から得た汚水サンプルからファージを分離し、その特性を明らかにした。6株のファージを分離し、それらの宿主域を組み合わせることでイヌ病巣由来緑膿菌39株中30株に対して有効だった。その中にはフルオロキノロン系薬剤高度耐性菌も含まれており、6株中5株を溶菌した。6株のファージのうちΦR12、ΦS12-1、ΦS12-3及びΦR18に対して電子顕微鏡下で観察したところ、ΦR12、ΦS12-1及びΦS12-3が*Myoviridae*、ΦR18が*Podoviridae*に分類されることが明らかになった。

第II章では競走馬の細菌性角膜炎に対する予防的点眼使用の可能性を明らか

にした。第 I 章で分離された 6 株のファージはウマ病巣由来緑膿菌 29 株中 26 株を溶菌させた。ΦR18 は角膜炎由来緑膿菌 NE-126 株に対して迅速に吸着することが明らかになった。また、角膜炎モデルマウスを用いたことで菌液滴下から 3 時間以内のファージ適用によって劇的な菌の増殖抑制効果を示し、角膜の炎症を完全に抑えた。ΦR18 と ΦR12 を混合することで単独使用よりも増殖抑制効果が強まることも示された。以上の結果から競走馬の角膜炎に対してレース後の予防的点眼使用に十分応用可能であることが明らかになった。

第 III 章では ΦR18 と ΦS12-1 がゲノムに毒性因子をコードしていないかを確かめ、両ファージが保有するエンドライシン遺伝子を特定した。どちらも既知の毒性因子はコードされておらず、テンプレートファージのマーカーも検出されなかったため、安全性が高いといえる。また、両ファージともにエンドライシン遺伝子を保有しており、どちらもリゾチーム様ドメインを保有していた。これらより、エンドライシンを単独で発現させる事が可能になった。

第 IV 章ではファージが持つ溶菌酵素であるエンドライシンが細菌に対して有効かどうかを検討するために ΦR18 のエンドライシンを、大腸菌を用いて実際に発現・精製を行い、緑膿菌 4 株と黄色ブドウ球菌に対して溶菌活性を評価した。ΦR18 のエンドライシンは由来菌である Pa18 株だけでなくフルオロキノロン系薬剤高度耐性菌である Pa61 株や同じく耐性菌で ΦR18 が溶菌できなかった Pa17 株、角膜炎由来菌の NE-126 株に対して溶菌または増殖抑制効果を示した。一方でグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌 SA03 株に対しては溶菌効果を示さなかった。

本研究により、バクテリオファージの治療及び予防的使用の可能性、特に競走馬のレース後の点眼使用の点で大きく期待できる結果を得られた。また、ΦR18 から得られたエンドライシンが溶菌活性を持つことを明らかにした。ファージを応用することにより抗生物質使用量が減少し薬剤耐性菌が減少することが見込める。獣医師の保菌率が減り、獣医師を介した耐性菌の移行が減少するだろう。更に、これまでに耐性によって使用できなくなった旧世代の抗生物質が再賦活化されることも考えられる。世界的な薬剤耐性菌の危機を克服するためにも抗生物質以外の抗菌性物質の開発が急務となっている。本研究はその可能性を示すのに有用な成果を示したと考える。