

ファージ療法実用化に向けた基礎的及び臨床応用研究:ファージ耐性化に伴う  
トレードオフを利用した次世代型細菌感染症治療戦略の構築へ

酪農学園大学大学院  
獣医学研究科  
獣医学専攻博士課程

中村 暢宏

獣医生化学

指導教員 教授 岩野 英知

2021 年度

## 目次

略語表	1
緒言	3
第 I 章 黄色ブドウ球菌溶菌性ファージ phiSA012 の安定性に影響する外的要因及び イヌに対するファージ投与安全性試験	
1. 序文	6
2. 材料と方法	7
3. 結果	12
4. 考察	19
5. 小括	22
第 II 章 黄色ブドウ球菌溶菌性ファージ phiSA012 由来溶菌酵素の機能解析	
1. 序文	23
2. 材料と結果	24
3. 結果	31
4. 考察	42
5. 小括	46
第 III 章 バクテリオファージを用いた新規アトピー性皮膚炎制御戦略の構築	
1. 序文	48
2. 材料と方法	49
3. 結果	53
4. 考察	62
5. 小括	66
第 IV 章 イヌ緑膿菌性外耳炎に対するファージカクテル療法の実施と 治療過程に出現したファージ耐性菌の解析について	

1. 序文	68
2. 材料と方法	69
3. 結果	75
4. 考察	89
5. 小括	94
第Ⅴ章 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のファージ耐性化に伴う薬剤感受性上昇と 病原性低下のトレードオフ	
1. 序文	96
2. 材料と方法	98
3. 結果	109
4. 考察	124
5. 小括	128
総括	129
謝辞	132
引用文献	133
英文要旨	154

## 略語表

Amidase	AMID
Atopic dermatitis	AD
Bacterial src homology 3	SH3b
Coagulase-negative staphylococci	CoNS
Colony forming units	CFU
Coomassie brilliant blue	CBB
Cysteine, histidine dependent amidohydrolase/peptidase	CHAP
Dimethyl sulfoxide	DMSO
Dithiothreitol	DTT
Double layer agar plating method	DLA
Drug delivery system	DDS
Efficacy of plating	EOP
emergency Investigational New Drug	eIND
Ethylenediaminetetraacetic acid	EGTA
Ethylenediaminetetraacetic acid	EDTA
Fetal bovine serum	FBS
Glycerol-phosphate	Grop
Insertion/Deletion	Indel
Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside	IPTG
Japan collection of microorganisms	JCM
Lipopolysaccharide	LPS
Low dose dexamethasone suppression test	LDDST
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	MRSA
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	MRSP
Minimum bactericidal concentration	MBC
Minimum inhibitory concentration	MIC
Multi-drug resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MDRP
N-Acetylmuramic acid	MurNAc

National Center for Biotechnology Information	NCBI
Optical Density	OD
Penicillin binding protein	PBP
Phosphate-buffered saline	PBS
plaque forming units	PFU
Ribitol-phosphate	Pbop
Single Nucleotide Variant	SNV
Sodium dodecyl sulfate	SDS
Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	SDS-PAGE
Specific pathogen free	SPF
Standard deviation	SD
Standard error	SE
Staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i>	SCC <i>mec</i>
Two component system	TCS
Wall teichoic acid	WTA

## 諸言

ペニシリンの発見に続く抗菌薬開発は、人類に細菌と戦う抗菌戦略をもたらした。しかし、様々な菌種に対して広域スペクトルを持つ抗菌薬はその利便性ゆえに乱用及び不適切な使用が繰り返され、結果的に抗菌薬の効かない薬剤耐性菌が世界中で蔓延し、問題となっている[89]。英国政府のオニールらのレポートによると、薬剤耐性菌に対して何も対策が講じられなかった場合、2050年には年間約1000万人が命を落とし、がんによる年間死亡者数を超えると試算されている[122]。このような状況において、米国疾病予防管理センターは既に“ポスト抗生物質時代”が到来していると危機感を示し[95]、新たな抗菌戦略の開発が全世界的に喫緊の課題となっている。

病原性及び高頻度な薬剤耐性が問題視されている細菌はその頭文字をとってESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter species*) と呼ばれている[137]。その中で *S. aureus* や *P. aeruginosa* はヒト医療のみならず、獣医療においても薬剤耐性菌として分離されることが多く、抗菌薬による治療を困難にしている。*S. aureus* はヒトや動物の皮膚などに常在する細菌であり、特にβ-ラクタム系抗菌薬のほとんどに耐性を示すメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) による院内感染が多く報告されている[36]。ヒトでは皮膚・軟部組織感染症、手術創感染症、膿瘍などからよく分離され、獣医療では牛伝染性乳房炎の原因菌として問題となっている[97, 135]。また、犬においては同属の *Staphylococcus pseudintermedius* が膿皮症の主な原因菌として知られ、MRSA 同様、メチシリン耐性菌 (Methicillin-resistant *S. pseudintermedius*, MRSP) の出現が深刻化している[114]。また、*P. aeruginosa* も日和見感染症としてヒト医療で問題となっている他、獣医領域においても外耳炎や膀胱炎などの原因として分離される[19, 62]。特にカルバペネム耐性 *P. aeruginosa* が問題視されているが、実際には複数の抗菌薬に耐性である多剤耐性緑膿菌 (Multi-drug resistant *P. aeruginosa*, MDRP) として検出されることが多く、治療を困難としている[38, 113]。

バクテリファージ (以下ファージ) は細菌特異的に感染するウイルスの総称である[31]。ファージの感染サイクルは宿主細菌表面に存在する受容体を介して結合し、自身の核酸を注入することで始まる[15] (図 1)。その後、核酸の複製とともに構

造タンパク質が作られ、核酸を内包するファージ粒子が形成される。最終的にファージ由来溶菌酵素であるエンドライシンがペプチドグリカンを切断することで、脆弱となった細菌細胞壁は浸透圧性に破裂し、娘ファージは放出され、感染のサイクルを繰り返す[58, 119, 143]。ファージの感染サイクル最終ステップにある溶菌活性を利用し、感染細菌に対して抗菌効果を狙う治療を“ファージ療法”という[40]。ファージはペニシリンよりも早く発見され、今日まで東欧諸国であるロシア、ジョージア、ポーランドなどではファージ療法の研究と製剤化が活発的に行われている[136]。一方、欧米諸国ではペニシリンの発見以降、広い抗菌スペクトルや工業化のしやすさといった点から抗菌薬開発に舵を切り、細菌感染症治療の主役は抗菌薬となった[140]。しかし、近年の薬剤耐性菌の出現と世界的な拡大から、抗菌薬に代わる治療戦略の1つとして、ファージを用いた“ファージ療法”が欧米諸国においても注目を集めている[40]。特に米国において、多剤耐性アシネトバクターに感染し昏睡状態にまで陥った患者が、ファージ療法によって回復にまで至った“パターソン症例”は米国初のファージ療法成功例として世界的にファージ療法が注目されるきっかけとなった[65]。

当研究室では以前よりファージ療法の可能性について着目し、これまでに *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* といった病原細菌に対して溶菌活性を示すファージの分離を成功させてきた[49, 50, 160]。しかしながら、実際に臨床応用に向けたファージの基礎的な解析や溶菌酵素の応用、またファージと宿主細菌との関係性に迫った研究は少なかった。そこで本研究ではファージの基礎的性状の解析と犬を用いたファージ投与安全性試験を実施し（第I章）、ファージ由来溶菌酵素エンドライシンについてもその応用を見据えた基礎的機能解析を実施した（第II章）。また、ファージ・エンドライシンの応用例として皮膚炎の中でも代表的疾患であるヒトアトピー性皮膚炎に着目し、モデルマウスを用いてファージ療法の効果について検討した（第III章）。さらに、本学附属動物医療センター（Rakuno Gakuen University-Animal Medical Center, RGU-AMC）にて、緑膿菌感染による難治性外耳炎を罹患したイヌに対してファージ療法を実施し奏功した臨床試験の内容と臨床試験中に見られたファージ耐性菌についての解析について報告する（第IV章）。最後に、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌におけるファージ耐性化メカニズムの解明を試み、さらにはファージ耐性獲得による細菌の表現型の変化について興味深い知見が得られたので、これを報告する（第5章）。

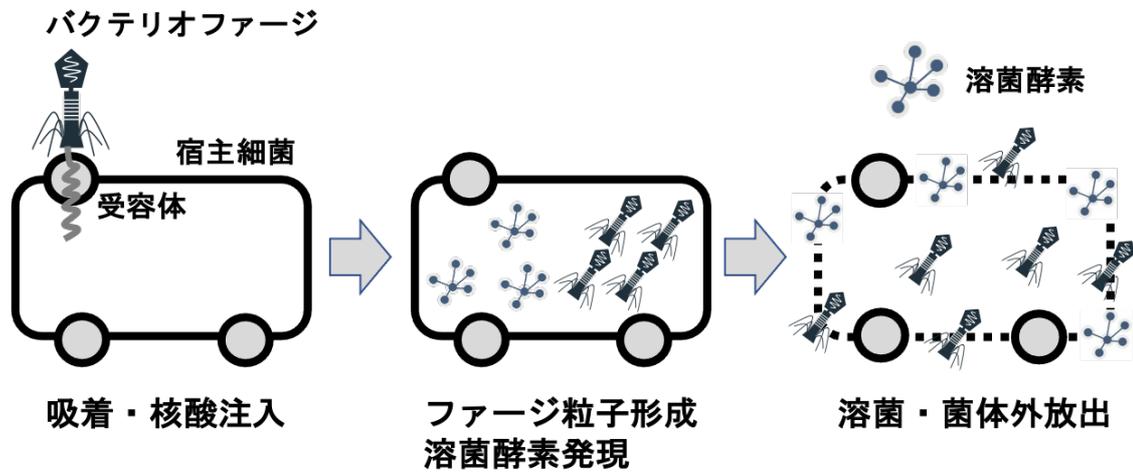


図 1. ファージの感染サイクル

ファージは宿主細菌に受容体を介して認識・結合して感染し、その後核酸を細菌内に注入する。細菌内部で核酸の複製及びファージ粒子が形成され、感染後期において溶菌酵素であるエンドライシンが発現される。エンドライシンが細菌ペプチドグリカンを経率的に切断することで溶菌を引き起こし、娘ファージは菌体外に放出される。

# 第 I 章 黄色ブドウ球菌溶菌性ファージ phiSA012 の安定性に影響する外的要因 及びイヌに対するファージ投与安全性試験

## 1. 序文

ファージは 1915 年に Frederick Twort によって発見され[171]、その 2 年後の 1917 年に Felix d'Herelle によって溶菌作用が見出された細菌特異的に感染するウイルスである[131]。1923 年には d'Herelle と George Eliava によって現在のジョージアにエリアバ研究所 (Eliava Institute) が設立され、今日までファージの研究及び細菌感染症への応用が行われている[93]。ファージは土壌や海洋、さらには動物の腸管などあらゆる環境から分離することができ、地球上に存在する細菌の約 10 倍となる  $10^{31}$ ~ $10^{32}$  ものファージ粒子が存在していると言われている[126]。ファージの溶菌スペクトルは抗菌薬と比べて狭く、一般的に種レベルあるいは株レベルの特異性を持つことが知られている[117]。感染の起点となるファージ粒子の細菌への吸着は、細菌表面に存在する膜タンパクや Lipopolysaccharide (LPS)、鞭毛、線毛、壁タイコ酸 (Wall teichoic acid, WTA) などを受容体としてファージのテールファイバーが認識・結合することで開始される[15, 42]。ゆえに、ファージの感染宿主域はファージのテールファイバーや細菌の受容体の違いなどによって変化する。

近年、薬剤耐性菌が世界中で蔓延し問題となっていることから、抗菌薬に代わる治療戦略の 1 つとしてファージの活用が欧米諸国において見直され始めている[40, 53, 140, 144, 154]。ファージ療法は古くから東欧諸国において行われており、上述の通りエリアバ研究所においてヒトの細菌感染症に対してファージを用いた治療が行われている[93]。また、ロシア、ジョージア、ポーランドにおいてはファージが製剤化されている[136]。一方、欧米諸国において細菌感染症に対するファージの使用は未だ一般的ではないものの、食品中に含まれる細菌を殺菌する目的で一部ファージが使用されている[182]。しかし、近年欧米諸国においてもファージの製剤化に向けた開発が進められており、臨床試験が行われている[48]。日本においては 2021 年現在、ファージの実用例の報告はなく、ヒト及び動物を含め臨床試験等も行われていない。

当研究室ではこれまでに牛乳房炎原因菌の 1 つである *S. aureus* に対して溶

菌活性を示すファージ phiSA012 を分離した[160]。phiSA012 は様々な *S. aureus* 臨床分離株に対して広く溶菌活性を示し、また乳房炎モデルマウスに対してファージを投与した際の有効性を確認した[75]。さらに、phiSA012 が吸着の際に関わるテールファイバー、及び細菌の受容体についても解析され、報告されている[4, 162]。このようにファージの感染メカニズムの理解や疾患に対する有効性は確認されているものの、製剤化や臨床応用に際しては製剤としての安定性や安全性が非常に重要であり、検討しなければならない課題であった。

そこで本研究ではファージ phiSA012 の実用化を目指し、*S. aureus* 以外のブドウ球菌に対する溶菌スペクトルの調査、また溶菌活性の安定性に影響を及ぼす因子及びその程度を評価した。具体的には温度、pH、血清の存在がファージの溶菌活性に与える影響について評価し、ファージの保存状況や血中での安定性について調べた。さらに、獣医療におけるファージ療法の実用化を目指し、イヌに対して3つの投与経路にてファージを投与し、安全性について評価した。

## 2. 材料と方法

### 1) 培地

Luria-Bertani (LB) broth は、1.0 % NaCl、1.0 % Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、0.5 % Bact™ yeast extract (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) を混合して作成した。

LB agar は 1.0 % NaCl、1.0 % Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、0.5 % Bact™ yeast extract (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、1.5 % agar (富士フィルム和光純薬工業 (株)、大阪、日本)を混合して作成した。

LB top agar は 1.0 % NaCl、1.0 % Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、0.5 % yeast extract (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、0.5 % アガロース ME (岩井化学薬品 (株)、東京、日本) を混合して作成した。

### 2) 使用菌株

使用した菌株は表 1 に示す[72, 73, 75, 160]。全ての細菌は LB broth を用いて 180 rpm にて 37°C 振とう培養した。

表 1. 使用菌株

Bacterial strain	Description	Reference
SA003	<i>Staphylococcus aureus</i> Clinical isolates from milk of mastitic cow and original host of phiSA012	Synnott et al. [159]
<i>S. auricularis</i> 2421	JCM strain No. 2421	
<i>S. capitis</i> 2420	JCM strain No. 2420	
<i>S. carnosus</i> 6067	JCM strain No. 6067	
<i>S. carnosus</i> 6069	JCM strain No. 6069	
<i>S. cohnii</i> 2417	JCM strain No. 2417	
<i>S. condimenti</i> 6074	JCM strain No. 6074	
<i>S. epidermidis</i> 2414	JCM strain No. 2414	
<i>S. epidermidis</i> 20345	JCM strain No. 20345	
<i>S. felis</i> 7469	JCM strain No. 7469	
<i>S. hominis</i> 31912	JCM strain No. 31912	
<i>S. intermedius</i> 2422	JCM strain No. 2422	
<i>S. lentus</i> 2426	JCM strain No. 2426	Japan Collection of Microorganisms (JCM)
<i>S. piscifermentans</i> 6057	JCM strain No. 6057	
<i>S. piscifermentans</i> 6061	JCM strain No. 6061	
<i>S. piscifermentans</i> 6063	JCM strain No. 6063	
<i>S. pseudintermedius</i> 17571	JCM strain No. 17571	
<i>S. saprophyticus</i> 2427	JCM strain No. 2427	
<i>S. schleiferi</i> 7470	JCM strain No. 7470	
<i>S. schweitzeri</i> 31983	JCM strain No. 31983	
<i>S. sciuri</i> 2425	JCM strain No. 2425	
<i>S. simulans</i> 2424	JCM strain No. 2424	
<i>S. warneri</i> 2415	JCM strain No. 2415	
<i>S. xylosus</i> 2418	JCM strain No. 2418	
<i>S. argenteus</i> 31982	JCM strain No. 31982	
MRSA1		
MRSA2		
MRSA3		
MRSA4		
MRSA5		
MRSA6		
MRSA7		
MRSA8		
MRSA9		
MRSA10		
MRSA11		
MRSA12	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>	
MRSA13	Clinical isolates from human	This study
MRSA14	in Kyoto Prefectural University of Medicine	
MRSA15		
MRSA16		
MRSA17		
MRSA18		
MRSA19		
MRSA20		
MRSA21		
MRSA22		
MRSA23		
MRSA24		
MRSA25		

表 1. 続き

Bacterial strain	Description	Reference
MRSA26		
MRSA27		
MRSA28		
MRSA29		
MRSA30		
MRSA31		
MRSA32	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>	This study
MRSA33	Clinical isolates from human	
MRSA34	in Kyoto Prefectural University of Medicine	
MRSA35		
MRSA36		
MRSA37		
MRSA38		
MRSA39		
MRSA40		
MRSA2007-13		
MRSA2007-28		Ishihara et al. [73]
MRSA2007-57	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>	
MRSA2007-93	Clinical isolates from veterinary staff	
MRSA_S119		Ishihara et al. [72]
MRSA_S176		
SAK5		
SAK12		
SAK17		
SAK18		
SAK23		
SAK25		
SAK27		
SAK34		
SAK42		
SAK44		
SAK47		
SAK48		
SAK57		
SAK62		
SAK66	<i>S. aureus</i>	Iwano et al. [75]
SAK68	Clinical isolates from milk of mastitic cow	
SAK69		
SAK72		
SAK75		
SAI1		
SAI2		
SAI3		
SAI6		
SAI9		
SAI14		
SAI20		
SAI23		
SAI42		
SAI43		

### 3) バクテリオファージ

牛乳房炎由来 *S. aureus* SA003 を宿主とし、下水処理場内の水から分離されたビルレントファージ phiSA012 (NC\_023573.1) を使用した[160]。以下、特別な記載がない限り、ファージの溶媒には SM buffer (0.1 mM NaCl、8 mM MgSO<sub>4</sub>、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.01 % ゼラチン) を使用した。

### 4) スポットテストによるファージの感染宿主域と溶菌活性評価

各菌液 100 μL を 3mL の LB top agar に加え、LB agar 上に播種した。LB top agar が固まった後、 $1.0 \times 10^8$  PFU/mL から  $1.0 \times 10^1$  PFU/mL まで 10 倍希釈ずつされた phiSA012 を 4μL 滴下し、37°C で一晩培養した。翌日、ファージによる溶菌によって形成されるプラーク数をカウントし、Efficacy of Plating (EOP) を測定してプラーク形成能を菌株間で比較した。EOP は各菌株の PFU をコントロールホストである SA003 の PFU で割ることで算出した。各菌株独立した 3 回の試行を実施し、EOP の平均値を算出した。

### 5) プラークアッセイによる溶菌活性評価

SA003 110 μL と外的刺激 (長期保存、凍結融解、熱処理、pH 変化、血清処理) に曝露させた phiSA012 110 μL を混合して室温にて 10 分間静置した。混合液 200 μL を 3mL の LB top agar に加え、その後 LB agar 上に播種し 37°C で一晩培養した。翌日、ファージによる溶菌によって形成されるプラーク数をカウントし、EOP を測定して外的刺激によるファージ力価の変化について評価した。EOP は外的刺激曝露された phiSA012 の PFU を無処理 phiSA012 の PFU で割ることで算出した。各菌株独立した 3 回の試行を実施し、EOP の平均値を算出した。

### 6) 長期間保存後のファージ溶菌活性評価

ファージ phiSA012 ( $1.0 \times 10^8$  PFU/mL) を室温または 4°C において保存し、室温の場合は 2 日目、7 日目、31 日目に、また 4°C 保存の場合は 30 日目、60 日目にプラークアッセイを実施して EOP を算出した。

### 7) 凍結融解後ファージの溶菌活性評価

ファージ phiSA012 を $-80^{\circ}\text{C}$ で 24 時間凍結後、 $37^{\circ}\text{C}$ で 5 分間融解するのを 1 サイクルとし、合計 5 サイクル実施した。また、それぞれのサイクル後にプラークアッセイを実施して EOP を算出した。

#### 8) 熱処理後ファージの溶菌活性評価

150  $\mu\text{L}$  のファージ phiSA012 をヒートブロックにて  $37^{\circ}\text{C}$ 、 $56^{\circ}\text{C}$ 、 $60^{\circ}\text{C}$ の温度で熱処理し、1 時間、5 時間、24 時間、72 時間、168 時間後にプラークアッセイを実施して EOP を算出した。

#### 9) pH 刺激後のファージ溶菌活性評価

ファージ phiSA012 を pH 1~11 の SM buffer にて 1 時間処理後、プラークアッセイを実施して EOP を算出した。pH 調整には NaOH または HCl を用いた。

#### 10) 血清存在下でのファージ溶菌活性評価

$56^{\circ}\text{C}$ 、30 分で非働化処理を行ったウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum, FBS) 、もしくは非働化処理を行っていない FBS と phiSA012 を混合し (終濃度 0%、5%、10%、20%)、室温で 10 分間静置させた。その後、プラークアッセイを実施して EOP を算出した。

#### 11) 健常犬に対するファージ投与による安全性評価試験

酪農学園大学で飼育する 6 歳~10 歳のビーグル犬 9 頭に対してファージを投与した。ファージ phiSA012 ( $1.0 \times 10^{11}$  PFU/mL) を生理食塩水にて 100 倍希釈し、 $1.0 \times 10^9$  PFU/mL としたファージ液を投与に用いた。投与経路は膀胱内投与、外耳・皮膚塗布、静脈内投与を各 3 頭ずつ実施した。膀胱内投与は全て雄イヌを使用し、用手保定後、陰茎から 6 Fr の尿道カテーテルを挿入して膀胱内の尿を全て回収した。その後、尿道カテーテルを通して phiSA012 を 1 mL 投与し ( $1.0 \times 10^{10}$  PFU/膀胱) 、さらに生理食塩水 3 mL を投与することでカテーテル内に残るファージ液を全て膀胱内に投与した。また、2 回目以降では回収した膀胱内の尿に残存するファージ力価をプラークアッセイにて毎回評価した。投与は 1 日 2 回、3 日間実施した。静脈内投与では橈側皮静脈に留置針を設置し、phiSA012 を 1 mL 投与し ( $1.0 \times 10^{10}$

PFU/head)、その後生理食塩水 1 mL でフラッシュした。投与は 1 日 2 回、5 日間実施した。外耳内投与及び皮膚塗布は同時に同じ個体を使用して実施した。外耳内投与は左耳を対照群として生理食塩水を、右耳をファージ群として phiSA012 を点眼瓶を使って 1~2 滴、滴下した。また、皮膚塗布は両側臍部をバリカンで剃毛し、左臍部を対照群として生理食塩水を、右臍部をファージ群として phiSA012 をファインアトマイザーネイザイル (フジメディカル (株)、東京、日本) を用いて各 1 mL 剃毛した臍部に噴霧した。投与は 1 日 2 回、5 日間実施した。安全性評価は投与期間中の 1 日 2 回の一般身体検査 (体重測定、心拍数測定、呼吸数測定、体温測定)、及びファージ初回投与前 5 分 (全頭)、投与後 6 時間 (静脈内投与)、12 時間 (静脈内投与)、24 時間 (全頭)、60 時間 (膀胱内投与)、72 時間 (静脈内投与、外耳・皮膚塗布)、108 時間 (静脈内投与、外耳・皮膚塗布)において血液検査 (全血球検査、血液生化学検査 (総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、AST、ALT、LDH、ALP、 $\gamma$ -GTP、CPK、アミラーゼ、リパーゼ、BUN、クレアチニン、総コレステロール、中性脂肪、ナトリウム、クロール、カリウム、カルシウム、無機リン、血糖、総胆汁酸、vc-CRP-P)) を実施し、ファージ投与によるイヌへの影響について評価した。血液検査は全て RGU-AMC 内の富士フィルム VET システムズ (ブランチラボ) にて実施した。本動物実験は本学動物実験委員会の承認を受け、実施した (承認番号: VH20B8)。

### 3. 結果

#### 3.1. phiSA012 の宿主域評価

*S. aureus* 溶菌性ファージ phiSA012 の感染宿主域を調べるため、スポットテストを実施し、Efficacy of plating (EOP) で評価・比較した (図 2)。すると、SA003 同様、乳房炎に罹患した牛から分離された *S. aureus* 29 株全てに対してプラークを形成し、溶菌活性を示すことがわかった。また、ヒト由来 MRSA に対しては牛由来 *S. aureus* に対する溶菌活性程ではないものの、46 株中 29 株に対してプラークを形成し、溶菌活性を示した。さらに、*S. aureus* 以外のブドウ球菌属に対する感染宿主域を調べるため、20 菌種、24 株のブドウ球菌属に対する溶菌活性を評価した。すると、SA003 に対する溶菌活性には劣るものの、8 菌種、計 10 株のブドウ球菌属に対

してもプラークを形成し、溶菌活性を示すことがわかった。

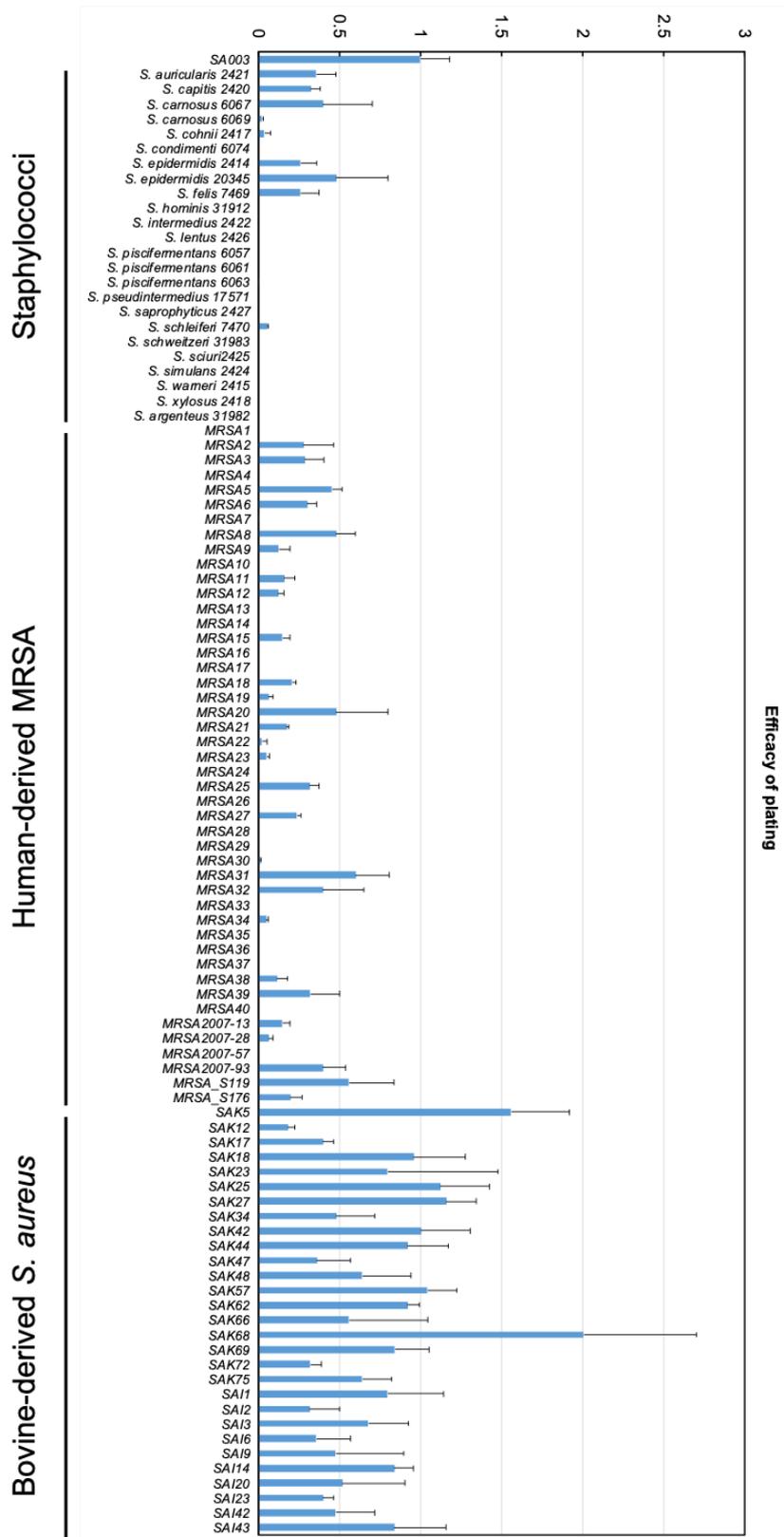


図 2. phiSA012 のブドウ球菌に対する感染宿主域と EOP

EOP は各菌株の PFU をコントロールホストである SA003 の PFU で割ることで算出した。各菌株独立した 3 回の試行を実施し、EOP の平均値±標準偏差 (Standard deviation, SD) を算出した。

### 3.2. 低温及び室温保存が phiSA012 の溶菌活性に与える影響

ファージ液 phiSA012 を 4℃、もしくは室温にて保存し、EOP で評価した。ファージ液は一般的に 4℃にて保存するが、2 ヶ月間の保存では Day 0 と比較して 78.7±13.2 (SD) % の変化で、有意な差は認められなかった (図 3A)。また、室温保存の場合、1 週間までは有意なファージ力価の変化は認められなかったものの、1 ヶ月後では Day 0 と比較して 32.4±9.5 % の変化で、有意なファージ力価の低下を認めた (図 3B)。

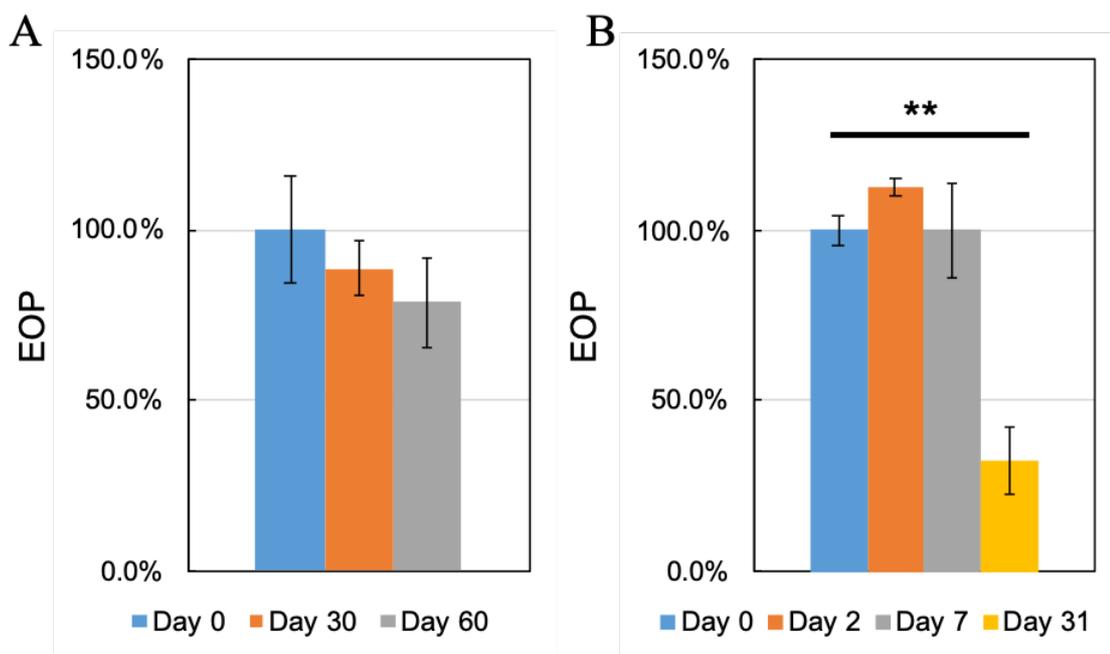


図 3. 保存温度及び保存期間の違いによるファージ力価変化

ファージを (A) 4℃、あるいは (B) 室温にて保存した際の phiSA012 の溶菌活性の変化を EOP で評価した。EOP は Day 0 の時の PFU を 100% とし、各測定日の PFU を Day 0 の時の PFU で割ることで算出した。各菌株独立した 3 回の試行を実施し、EOP の平均値±SD を示した。統計処理は Dunnett 検定を行い  $p < 0.05$  で有意差とした (\*\* $p < 0.01$ )。

### 3.3. 凍結融解が phiSA012 の溶菌活性に与える影響

ファージ液 phiSA012 を繰り返し凍結融解させた時のファージ力価の変化を評価した (図 4A)。すると、1 回の凍結融解ではほとんどファージ力価に変化が認められないことがわかった (図 4B)。一方、2 回凍結融解を繰り返すとファージ力価は減少し、3 回目以降では 1 度も凍結していないファージと比較して約 55~60%程度の力価になることがわかった (図 4B)。

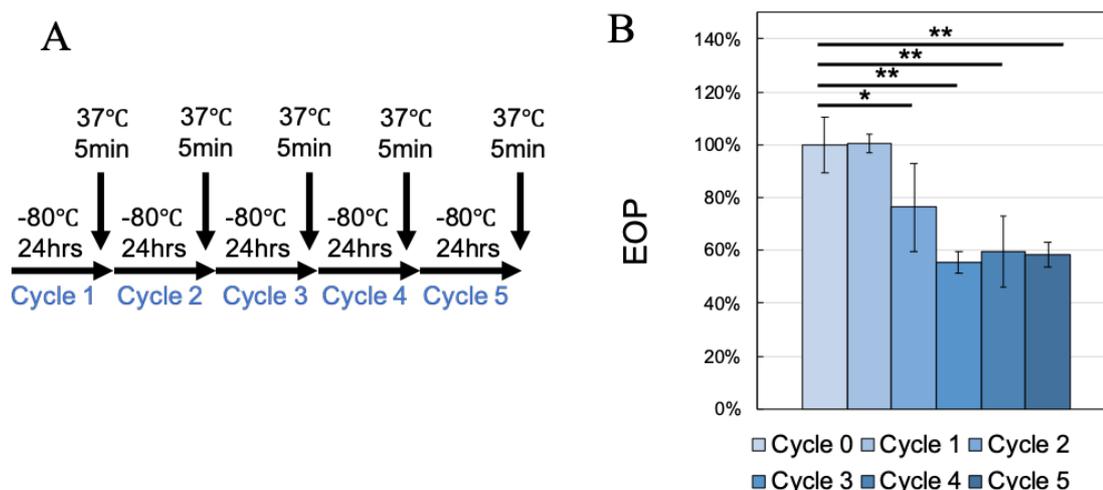


図 4. 凍結融解を繰り返すことによるファージ力価変化

(A) ファージ液の凍結融解サイクル。-80°Cで24時間凍結処理した後、37°Cでの5分間融解処置を1サイクルとし、合計5サイクル行った。(B) Cycle 0 (凍結融解処理を行っていないサンプル)の時のPFUを100パーセントとし、各サイクル後のPFUをCycle 0の時のPFUで割ることでEOPを算出した。各菌株独立した3回の試行を実施し、EOPの平均値±SDを示した。統計処理はDunnnett検定を行い $p < 0.05$ で有意差とした(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )。

### 3.4. 熱処理が phiSA012 の溶菌活性に与える影響

ヒトの生体温度に近い37°C条件下では5時間まではファージ力価の変化は認められないものの、24時間では未処理のファージ力価と比較して $67.1 \pm 13\%$ の力価となり、168時間では $16.3 \pm 4.8\%$ の力価にまで減少していた (図 5A)。また、56°C及び60°Cでは37°C条件下よりもファージ力価の減少度は大きく、56°C条件下では72時間以降で (図 5B)、60°C条件下では5時間以降でファージプラークは検出されなく

なった (図 5C)。

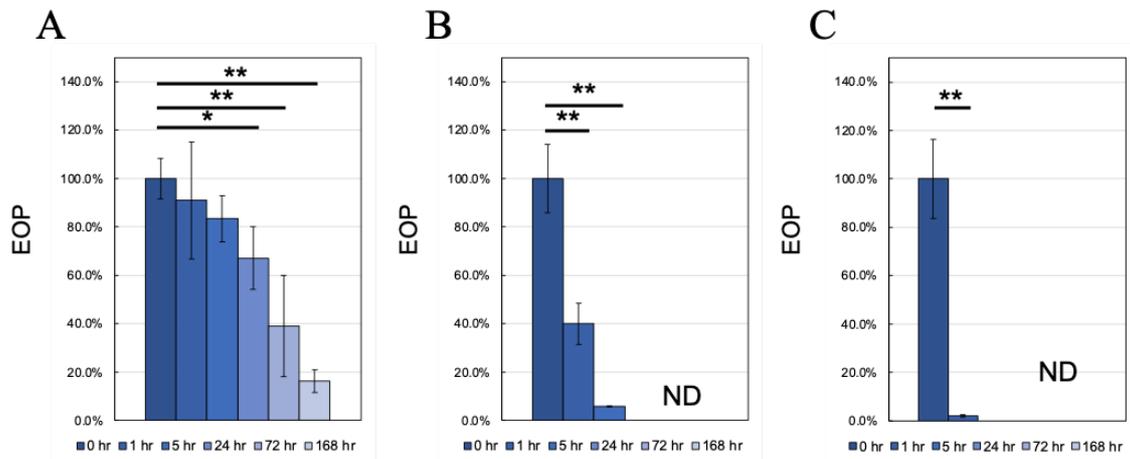


図 5. 熱処理によるファージ力価変化

ファージを(A) 37°C、(B) 56°C、(C) 60°Cの熱処理を行った際の phiSA012 の溶菌活性の変化を EOP で評価した。EOP は 0 hr の時の PFU を 100%とし、各測定時間の PFU を 0 hr の時の PFU で割ることで算出した。全くプラークの形成が認められなかった場合には Not detected (ND) と表記した。各菌株独立した 3 回の試行を実施し、EOP の平均値±SD を示した。統計処理は Dunnett 検定を行い  $p < 0.05$  で有意差とした (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )。

### 3.5. pH が phiSA012 の溶菌活性に与える影響

ファージ phiSA012 の pH 環境の違いにおける溶菌能の安定性を評価した。すると、pH 1 及び pH 11 の SM buffer で 1 時間処理したファージはプラークを全く形成せず、溶菌活性は認められなかった。一方、pH 3 ~ pH11 まではプラークが確認され、pH 7 の SM buffer で処理された際のファージ力価と比較して有意な力価の減少は認められなかった (図 6)。

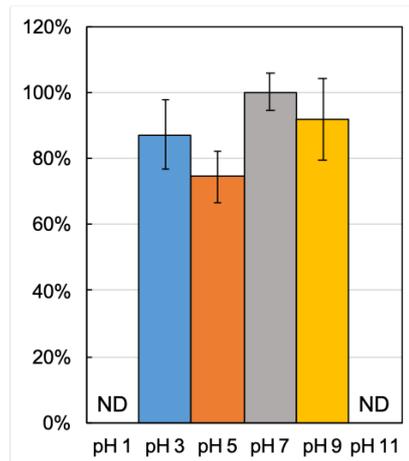


図 6. pH 処理によるファージ力価変化

ファージを pH 1~pH 11 の溶液で処理を行った際の phiSA012 の溶菌活性の変化を EOP で評価した。EOP は pH 7 の時の PFU を 100% とし、各 pH 処理時の PFU を pH 7 処理時の PFU で割ることで算出した。全くプラークの形成が認められなかった場合には ND と表記した。各菌株独立した 3 回の試行を実施し、EOP の平均値 ± SD を示した。

### 3.6. 血清が phiSA012 の溶菌活性に与える影響

ファージが血清中の物質で阻害されるか評価するため、非働化されていない、あるいは非働化済みの FBS とファージを混和させた際のファージ力価の変化を評価した。すると、非働化処理の有無に関わらず、ファージ力価の減少は認められなかった (図 7A, 7B)。また、非働化済み FBS で処理した際には僅かにファージ力価の上昇が認められた (図 7B)。

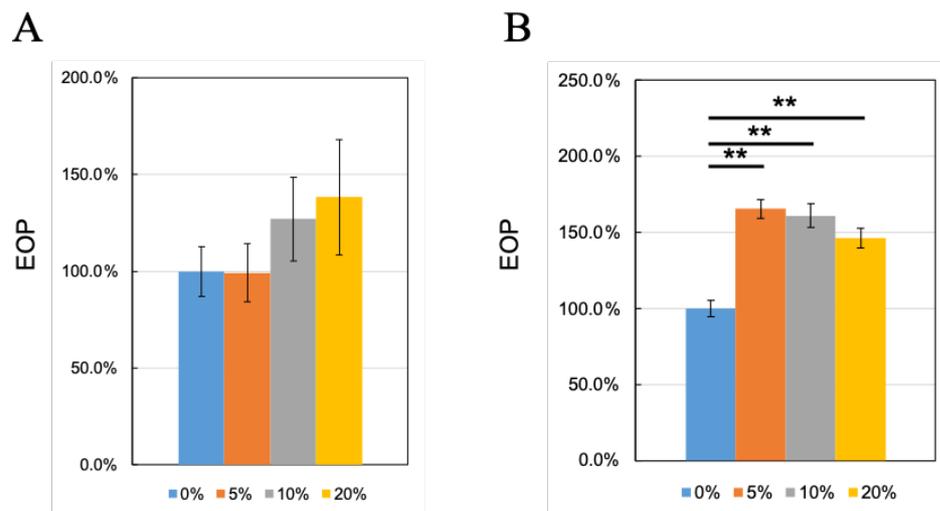


図 7. 血清処理によるファージ力価変化

(A) 未非働化処理、あるいは(B) 非働化処理済みの FBS とファージを室温にて反応させた際の phiSA012 の溶菌活性の変化を EOP で評価した。FBS 処理していない時の PFU を 100%とし、各 FBS 濃度で反応させた時の PFU を FBS 処理していない時の PFU で割ることとで算出した。各菌株独立した 3 回の試行を実施し、EOP の平均値±SD を示した。統計処理は Dunnett 検定を行い  $p < 0.05$  で有意差とした (\*\* $p < 0.01$ )。

### 3.7. 健常犬に対するファージ投与による安全性試験

獣医療におけるファージ療法実用化を目指すべく、健常実験犬に対して 4 つの投与経路でファージを投与し、その安全性を評価した。膀胱内投与、外耳・皮膚塗布、静脈内投与を各 3 頭ずつ、計 9 頭に対してファージを投与したが、ファージ投与による明らかな体調の悪化や副作用と思われる症状は確認されず、投与期間中に一般身体検査にて異常を認めた個体はなかった。また、血液検査上では基準値を大きく逸脱するような明らかな病的所見は認められなかった。外耳・皮膚塗布群においてはファージ投与部位の外耳及び皮膚の炎症など異常所見は肉眼上認められなかった(図 8A-8D)。膀胱内投与群ではファージ投与期間中に血尿など膀胱炎などを明らかに疑う所見は認められなかった。また、ファージ投与直前に採尿した尿に含まれるファージをプラークアッセイにて検出し、ファージ投与 12 時間後の膀胱内残存ファージ力価を測定した(図 8E)。ファージ投与期間中は排尿の制限などをしていなかったものの、ファージ投与 12 時間ごとの尿からは安定してファージが検出され、その力価は平均して  $1.16 \times 10^4$  PFU/mL であった。静脈内投与群では繰り返すファージの投与によるアナフィラキシーショックは認められなかった。

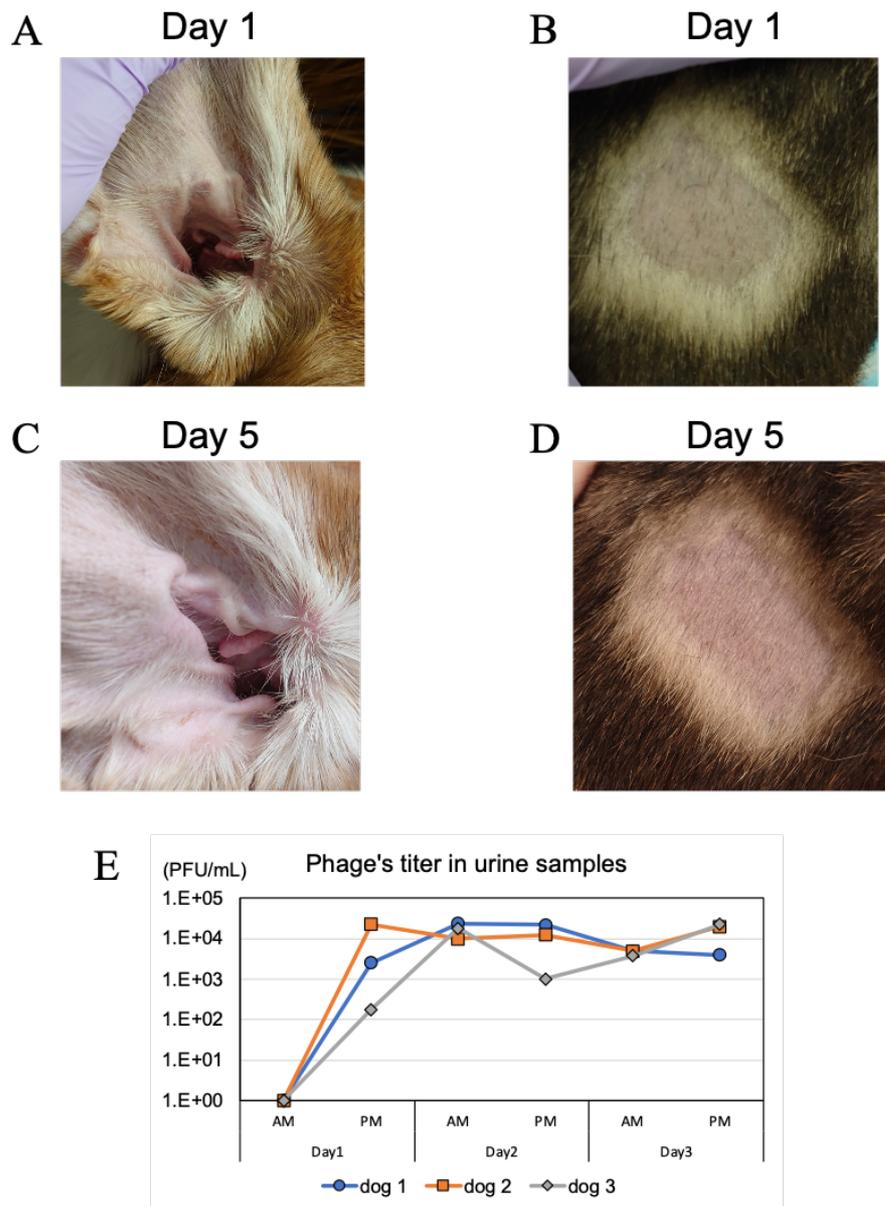


図 8. ファージ投与部位の肉眼像と尿中ファージカ価の測定

(A) ファージ投与 1 日目の耳介と (B) 皮膚の肉眼像、及び (C) ファージ投与 5 日目の耳介と (D) 皮膚の肉眼像。(E) ファージを膀胱内投与した犬 3 頭から 12 時間おきに尿を採取し、尿中のファージカ価をプラークアッセイによって測定した。

#### 4. 考察

本研究において、牛乳房炎由来 *S. aureus* SA003 を宿主とし分離されたファージ phiSA012 は、同じく牛乳房炎由来の *S. aureus* 株全てに対し高い溶菌活性を示し、

ヒト由来 MRSA の半数以上の株に対しても溶菌活性を示した。また、一般的にファージの宿主域は種レベル、あるいは株レベルであるとされているが、phiSA012 は *S. aureus* 以外の複数のブドウ球菌に対しても溶菌活性を示すことがわかった。ファージの宿主細菌への感染性は細菌上のファージレセプターの違いやレセプターをマスクするタンパク質や構造体の存在により、ファージが宿主に吸着できないことが影響する[80, 112, 117]。phiSA012 は宿主菌に吸着・感染する際にグラム陽性菌の主な細胞壁成分である WTA のバックボーン、リビトールリン酸 (Ribitol-phosphate, Rbop) の重合体をレセプターとすることが Azam らの研究によって証明されている[4]。ほとんどの *S. aureus* は Rbop によって WTA が構成されていることから[181]、*S. aureus* 間での感染性・溶菌活性の差はレセプターである WTA の構造の違いというよりも、膜タンパク質や細胞壁を覆う莢膜の違いが影響しているかもしれない[112]。実際に膜タンパク質である protein A を過剰発現させた際に、ファージの吸着性が一部阻害されたという報告がある[118]。また、I 型、及び II 型の莢膜型を示す *S. aureus* に対しては、同様にファージの宿主への吸着が阻害されることが知られている[177]。一方、*S. epidermidis* などいくつかの coagulase-negative staphylococci (CoNS) や *S. pseudintermedius* はグリセロールリン酸 (Glycerol-phosphate, Grop) の重合体によって WTA が構成されていることから、*S. aureus* 以外のブドウ球菌に対する感染性は限定的であるのかもしれない[43]。しかしながら、本研究では *S. epidermidis* に対して phiSA012 は一定の溶菌活性を示し、また他の研究においても *S. pseudintermedius* に対して溶菌活性が認められたことが報告されている[5]。従って、phiSA012 の宿主細菌への吸着にはまだ未解明のメカニズムが隠されているのかもしれない。

4°Cにおけるファージ液の管理は最も一般的なファージの保存方法であり、今回の実験においても少なくとも2ヶ月間の有意なファージ力価の減少は認められなかった。ファージの処方になされ始めているベルギーにおいても治療に使われるファージは液体の状態で保管され、最大2年間使用可能としている[109]。しかしながら4種類の *S. aureus* 溶菌性ファージの保存方法の違いによるファージ力価の変化を調べた研究では、2年間の4°C保存でファージ力価が1 log~3 log 程度減少したと報告されている[55]。また、-80°Cや液体窒素、さらには凍結乾燥処理でファージを保存することでより長期間ファージ力価の減少を抑えることができるという報告

もあることから、ファージバンクとしてマスターストックを作成する場合はこれら保存方法を採用するのが最良かもしれない[55]。一方、凍結保存の際は繰り返す凍結融解によるファージ力価の減少も考慮しなければならず、今回の実験からも2回目以降の凍結融解から有意なファージ力価の減少が認められた。凍結保存する際にはグリセロールやスキムミルク、スクロース、トレハロースなど凍結保護剤をファージ液と混合することで、凍結融解を繰り返した場合でもより力価が安定する可能性がある[55]。また、phiSA012は動物の体温とほぼ同等の37°C環境下において24時間目以降からファージ力価の減少が認められるものの、168時間(1週間)でもその減少幅は1 log以内であり、投与するファージ力価にもよるが生体の体温によってファージが完全に失活される可能性は少ないと考えられる。一方で非働化を行う際の56°C、また低温殺菌を行う60°Cの熱処理では24時間以内にプラークが検出出来なくなるまでファージ力価が減少することがわかった。phiSA012はpH 3~pH 9の範囲においては比較的安定的なファージ力価を示した。しかし、ファージの種類によってpH安定性には違いが見られ、*E. coli* 溶菌性ファージとして有名なT4ファージはpH 6.0~pH 7.4が最も安定的であり、pH 9.2では50%のファージが減少し、pH 4.0ではファージは検出されなくなったとの研究がなされている[79]。特に経口投与によるファージ療法を計画する際は、pH 1程度の胃酸に曝露されるため、投与力価や投与タイミング、またはドラッグデリバリーシステム (Drug delivery system, DDS) を用いて効率よくターゲットとなる病原体に届けることなどを考慮しなければならない。ファージを積極的に体内から排除するシステムの1つとして補体が知られ、既にファージは補体による中和作用やオプソニン化されることが報告されている[35, 68, 166]。しかし、今回FBS処理を行った実験では非働化処理の有無に関わらずphiSA012の力価減少は認められなかったことから、本研究の実験条件下ではFBS中に含まれる補体や血清タンパク質などその他成分によってphiSA012の溶菌活性が阻害されないことが示された。

ファージは古くから東欧諸国においてヒトに対する感染症治療法の1つとして使用されており、安全性については広く認知されているものの[158]、獣医療、特に犬に対して様々な投与経路を介したファージ投与による安全性を詳細に研究した報告は筆者の知る限り存在しない。そこで、実際に小動物獣医療における臨床使用を念頭に置き、特に菌血症・敗血症を想定した静脈内投与、膀胱炎を想定した膀胱

内カテーテル投与、皮膚感染症と外耳炎を想定した皮膚噴霧、及び外耳内点耳投与の計4投与経路を介してファージを投与し、安全性を評価した。いずれの投与経路においても顕著な副作用は身体検査上、及び血液検査上認められず、短期的なファージ投与の安全性が確認された。また、膀胱内投与後12時間の尿中ファージ力価としておよそ $1.0 \times 10^4$  PFU/mL程度認められたことから、細菌性膀胱炎罹患時でファージの宿主菌が存在する場合は、ファージの感染・溶菌・増殖のサイクルが繰り返されるため、より感染性ファージが膀胱内で高濃度を維持することが期待される。

## 5. 小括

ファージの製剤化や獣医領域での臨床症例への使用を目指し、*S. aureus* 溶菌性ファージ phiSA012 の特性、及び安全性について評価した。牛乳房炎由来 *S. aureus* SA003 株を宿主として分離された phiSA012 は家畜由来 *S. aureus* 株全てに、またヒト由来 MRSA 株の約 60%程度に溶菌活性を示し、*S. aureus* 以外の 8 菌種のブドウ球菌に対しても溶菌活性を示した。phiSA012 のファージ溶液を 4°Cにて保存した際には 2 ヶ月間は有意なファージ力価の減少は認められず、-80°Cで凍結した際には 2 回凍結融解するとファージ力価の減少が認められることが明らかとなった。37°C 条件下において phiSA012 のファージ力価は時間経過とともに緩やかに減少したものの、1 週間後においてもファージ力価は 1 log 以上減少することはなかった。また、pH 3~pH 9 の範囲において phiSA012 のファージ力価は安定しており、今回の実験条件下では血清 (FBS) によるファージ力価の減少は認められなかった。さらに健常犬に対して  $1.0 \times 10^9$  PFU/mL の phiSA012 を静脈内、膀胱内、皮膚、外耳内に投与したが明らかな副作用は見られず、イヌに対するファージ投与の安全性が示された。

## 第II章 黄色ブドウ球菌溶菌性ファージ phiSA012 由来溶菌酵素の機能解析

### 1. 序文

エンドライシンはファージ由来溶菌酵素であり、ファージ感染サイクルの最終段階で発現される[58, 119, 143]。ファージは同時にホリンというタンパク質も発現させ、ホリンは細菌細胞膜に小孔を作ることでエンドライシンを細菌内からペプチドグリカン層へ届ける役割を持つ[100]。その後エンドライシンはペプチドグリカンを酵素的に切断することで細菌細胞壁は脆弱となり、浸透圧性に破裂し（溶菌）、娘ファージが菌体外へ放出される。このように、通常エンドライシンは細菌内部から作用する酵素であるが、外膜を持たないグラム陽性菌に対しては細菌の外側から添加することで露出するペプチドグリカンに直接アクセスでき、溶菌することが可能である[46]。しかしながら、*Clostridioides difficile* や *Listeria monocytogenes* に対する溶菌酵素はグラム陽性菌最大の細胞壁成分である WTA の構造によってその活性が阻害されるという報告もなされている[44, 180]。また、エンドライシンを作用させたことによるエンドライシン耐性菌の出現はほとんど認められていない[52, 76, 183]。さらに、抗菌薬は細胞増殖をほとんど行わない亜集団であるパーシスターやバイオフィルムに対しては効果が得られにくいとされる一方、エンドライシンはこれらに対しても有効であるとされることなどから、新規抗菌性物質として期待されている[39, 147]。

グラム陽性菌に対して溶菌性を示すファージのエンドライシンは大きく分けて2種類のドメインから構成されている。1つは触媒ドメインと呼ばれ酵素的にペプチドグリカンを切断する機能を、もう1つは細胞壁結合ドメインと呼ばれターゲットとするペプチドグリカンを認識・結合する機能を有する[100, 148]。ブドウ球菌溶菌性ファージとして知られる phage K や phage GH15、phage Twort がコードするエンドライシンは触媒ドメインとして cysteine, histidine dependent amidohydrolase/peptidase (CHAP)ドメインと amidase (AMID)ドメインの2種類を持ち、細胞壁結合ドメインとして Bacterial src homology 3 (SH3b) を持つことが報告されている[58, 101, 121]。また、phage K 由来エンドライシン (Lys-phiK)は特に解析が進められているエンドライシンの1つであり、ウシやヒトから分離された

ブドウ球菌に対して広く溶菌活性を示すことが報告され、タンパク質結晶構造解析も行われている[121, 141]。

そこで本研究では当研究室で保有する黄色ブドウ球菌溶菌性ファージ phiSA012 由来エンドライシン Lys-phiSA012 を大腸菌内において発現させ、*S. aureus* を含むブドウ球菌に対する溶菌活性について評価した。特に、近年小動物獣医療分野において、ヒトの MRSA 同様、イヌ膿皮症からは高確率で薬剤耐性 *S. pseudintermedius* などのブドウ球菌が分離されることから、イヌ皮膚病変部から分離された多剤耐性ブドウ球菌に対するエンドライシン Lys-phiSA012 の溶菌活性を比較し、膿皮症に対する新規抗菌戦略としての可能性について検討した。さらに、溶菌活性に必須とされるドメインの特定、及び 2 価イオンが溶菌活性に与える影響について解析を行った。

## 2. 材料と方法

### 1) 培地

Luria-Bertani (LB) broth は、1.0 % NaCl、1.0 % Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、0.5 % Bact™ yeast extract (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) を混合して作成した。

LB agar は 1.0 % NaCl、1.0 % Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、0.5 % Bact™ yeast extract (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、1.5 % agar (富士フィルム和光純薬工業 (株)、大阪、日本)を混合して作成した。

LB top agar は 1.0 % NaCl、1.0 % Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、0.5 % yeast extract (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、0.5 % アガロース ME (岩井化学薬品 (株)、東京、日本) を混合して作成した。

2×LB broth は、2% NaCl、2% Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、1% Bact™ yeast extract (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) を混合して作成した。

Tod-Hewitt broth (THB) broth はトッド・ヒューイットブイヨン (関東化学株式会

社、東京、日本) を 36.4g/L を溶解して作成した。

2×THB broth はトッド・ヒューイトブイヨン(関東化学株式会社、東京、日本) 72.8g/L を溶解して作成した。

SOC 培地は、2% Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、0.5% Bact™ yeast extract (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、10mM NaCl、2.5mM KCl を混合して作成した。

2×YT broth は、0.5% NaCl、1% Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、1.6% Bact™ yeast extract (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)を混合して作成した。

2×YT+Amp agar は 0.5% NaCl、1% Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、1.6% Bact™ yeast extract (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)を混合し、さらにアンピシリンナトリウム塩 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)を加えた (終濃度 100mg/L)。

## 2) 使用菌株

使用した菌株は表 2 に示す[72, 73, 160]。また、ブドウ球菌は LB broth、連鎖球菌は THB broth を用いて 180 rpm にて 37°C 振とう培養した。エンドライシンのプラスミド構築、及び発現には *E. coli* DH5α と BL21 (DE3) (タカラ、滋賀、日本)を用いた。

表 2. 使用したブドウ球菌株及び連鎖球菌株

Bacterial strains	Name	References and Remarks				
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA003	Original host of phiSA012			Synnott et al. [159]	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	StaH001	This study				
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	StaP001	This study				
	SP3018	This study	Antimicrobial-resistance: ERFX, OBFX, ST, CLDM, DOXY, CP			
	SP3401	This study	Antimicrobial-resistance: MIPIC, CPDX, LCM, EM, DOXY, FOM			
	SP3567	This study	Antimicrobial-resistance: MIPIC, CEX, CPDX, CFV, ERFX, MBFX, ST, CLDM, LCM, DOXY			
	SP4531	This study	Antimicrobial-resistance: MIPIC, ERFX, OBFX, GM, ST, CLDM, DOXY, CP			
	SP5158	This study	Antimicrobial-resistance: MIPIC, AMPC/CVA, CEX, CPDX, CFV, ERFX, MBFX, GM, CLDM, LCM, EM, DOXY, CP			
	SP5405	This study	Antimicrobial-resistance: MIPIC, AMPC/CVA, CEX, CPDX, CFV, ERFX, MBFX, GM, ST, CLDM, LCM, EM, DOXY, MINO, CP			
	SP5432	This study	Antimicrobial-resistance: CPDX, ERFX, OBFX, ST, CLDM, DOXY, CP			
	SP5515	This study	Antimicrobial-resistance: MIPIC, CEX, CPDX, CFV, ERFX, MBFX, GM, CLDM, LCM, EM, DOXY, MINO, CP			
	SP7369	This study	Antimicrobial-resistance: MIPIC, AMPC/CVA, CPDX, CFV, ERFX, MBFX, GM, ST, CLDM, LCM, EM			
	SP7454	This study	Antimicrobial-resistance: ERFX, GM, ST, CLDM, DOXY, CP			
	SP7542	This study	Antimicrobial-resistance: MIPIC, CPDX, CFV, ERFX, MBFX, GM, LCM, EM, DOXY, CP			
	SP7971	This study	Antimicrobial-resistance: MIPIC, AMPC/CVA, CEX, CPDX, CFV, ERFX, MBFX, GM, CLDM, LCM, EM, DOXY, CP			
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	SS3014	This study	Antimicrobial-resistance: MIPIC, CPDX, ERFX, ST, CLDM, DOXY, CP			
<i>Streptococcus agalactiae</i>	StrA001	This study				
		SCCmec	MLST	spa type	Antimicrobial-resistance	References
MRSA	MRSA 2007-13	II	NT	t002	MIPIC, GM, KM, EM, LCM, OTC, ERFX	
	MRSA 2007-28	II	NT	t1265	MIPIC, KM, EM, LCM	Ishihara et al. [73]
	MRSA 2007-57	IV	NT	t008	MIPIC, GM, KM, EM, LCM	
	MRSA 2007-93	II	NT	t062	MIPIC, KM, EM, LCM, OTC, CP, ERFX	
	MRSA VC39 Vet-1	IV	ST380	t021	MIPIC, SM, KM, GM, EM	Ishihara et al. [72]
MRSA VC50 Vet-1	IV	ST30	t1852	MIPIC, KM, GM, EM, CPFX		

MIPIC, oxacillin; AMPC/CVA, amoxicillin/clavulanic acid; CEX, cephalixin; CPDX, cefpodoxime; CFV, cefovecin; ERFX, enrofloxacin; OBFX, orbifloxacin; MBFX, marbofloxacin; GM, gentamicin;

ST, sulfamethoxazole/trimethoprim; CLDM, clindamycin; LCM, lincomycin; EM, erythromycin; DOXY, doxycycline;

MINO, minocycline; CP, chloramphenicol.

### 3) バクテリオファージとファージ DNA の回収

バクテリオファージは、東京の下水処理施設の汚水を用いて分離した *S. aureus* 溶菌性ファージ phiSA012 を使用した[160]。また、ファージ DNA の回収は既報に基づいて行った[160]。即ち、phiSA012 を PEG 沈殿させたのち、SNET buffer (400 µg/mL Proteinase K (タカラ、滋賀、日本), 20 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 1% SDS, 5 mM EDTA)にて懸濁し、55°Cで一晩反応させた。翌日、フェノール及びクロロホルムを用いてファージ DNA を抽出し、その後エタノール沈殿を行なって精製した。

### 4) エンドライシンの発現と精製

抽出した phiSA012 DNA をクローニングに用いた。エンドライシン遺伝子は Lys012-1Fw と Lys012-495Rv プライマーを用いて PCR 反応で増幅させた (表 3, 4)。増幅させた PCR 断片は FastGene™ Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス、東京、日本)を用いて精製した。In-Fusion HD cloning kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) を用いてプラスミドベクター pGEX-6P-2 (GE, Buckinghamshire, UK) の glutathione S-transferase (GST)-tag 配列下流に精製 PCR 産物をライゲーションし、エンドライシン遺伝子をコードするプラスミド pGEX-Lys012WT を構築した。構築したプラスミドはヒートショック法 (42°C、30 秒間) にて *E. coli* DH5α へ形質転換した。形質転換体は SOC broth にて 37°C、1 時間振とう培養後、2×YT +Amp agar で 37°C、一晚培養を行い、単一コロニーをピックし、その後プラスミドを精製した。精製したプラスミドはさらに *E. coli* BL21 (DE3) へ形質転換した。クローニングした遺伝子の発現は既報を元に、一部変更して実施した[11, 12]。即ち、プラスミドを形質転換した *E. coli* BL21 (DE3) をアンピシリン終濃度 100 µg/mL を添加した LB broth を用いて 180 rpm にて 30°C 振とう培養し、波長 600 nm における吸光値が 0.3~0.6 になった際に終濃度 0.1 mM になるよう isopropyl-β-thiogalactopyranoside (IPTG) (ナカライテスク、京都、日本) を添加し、エンドライシン遺伝子の発現を誘導した。その後、25°C、100 rpm にて一晚培養した。菌液を遠心分離 (7,780×g、4°C、5 分間) して上清を捨て、菌体を PBS で懸濁し、終濃度が 1M MgCl<sub>2</sub>、10% NP-40 (富士フィルム和光純薬工業 (株)、大阪、日本) となるようそれぞれ添加した。Bioruptor UCD-200 (コスモバイオ、東京、日本)を用いて超音波破碎し、遠心分離 (16,000×g、4°C、30 分間)して上清を回収した。Glutathione Sepharose 4B (GE, Buckinghamshire, UK) が充填してある Econo-Pac® Disposable Chromatography Columns (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) に回収した上清を加え、1 時間吸着させた。廃液した後 PBS で洗浄し、PreScission Protease (GE, Buckinghamshire, UK) 40µL (80U)と PreScission cleavage buffer (50mM Tris-HCl、150mM NaCl、1mM Dithiothreitol (DTT)) 960µL の混合液をカラムに加えて 4°C、4 時間反応させて GST-tag を切断し、エンドライシンのみを精製した。精製されたエンドライシンは sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)と引き続く Coomassie brilliant blue (CBB) 染色によって発現量を定量した。SDS-PAGE は濃縮ゲル

(4.5%アクリルアミド) を 10 mA、分離ゲル (10%アクリルアミド) を 20 mA でそれぞれ 1 時間ずつ電気泳動した。精製されたエンドライシンは使用するまでは-30°Cにて保存した。

表 3. プライマー配列

Primers	Sequences
Lys012-1Fw	5'-TCCCCAGGAATTCATGGCTAAGACTCAAGCAGA-3'
Lys012-161Fw	5'-TCCCCAGGAATTCATGATACCTGTAAAAGCAGGAA-3'
Lys012-386Fw	5'-TCCCCAGGAATTCATGACAAGTAGCGCA-3'
Lys012-187Rv	5'-CGCTCCAGTCGACCCCTATTTCTTTTAGGTGCAG-3'
Lys012-221Rv	5'-CGCTCGAGTCGACCCCTATGAAGAACGACCTGC-3'
Lys012-408Rv	5'-CGCTAGTCGACCCCTAAGTCCGCTACTGGTTC-3'
Lys012-495Rv	5'-CGCTCGAGTCGACCCCTACTGAATACTCCCCAGG-3'
Lys012-Δmt2Fw	5'-CACAACGATGCAGGTCGTTCTTCAAGTACACCGGCAACTAGACCAGTTAC-3'
Lys012-Δmt2Rv	5'-GTAAGTGGTCTAGTTGCCGGTGTACTTGAAGAACGACCTGCATCGTTGTG-3'

表 4. 構築プラスミド

Plasmids	Protein produced (amino acids)	Forward primes	Reverse primers	Recipient vectors
pGEX-Lys012WT	1-495	Lys012-1Fw	Lys012-495Rv	pGEX-6P-2
pGEX-Lys012Δmt1	161-495	Lys012-161Fw	Lys012-495Rv	pGEX-6P-2
pGEX-Lys012Δmt2	1-221, 390-495	1-221; Lys012-1Fw 390-495; Lys012-Δmt2Fw OR; Lys012-1Fw	1-221; Lys012-Δmt2Rv 390-495; Lys012-495Rv OR; Lys012-495Rv	pGEX-6P-2
pGEX-Lys012Δmt2'	1-221	Lys012-1Fw	Lys012-221Rv	pGEX-6P-2
pGEX-Lys012Δmt3	1-408	Lys012-1Fw	Lys012-408Rv	pGEX-6P-2
pGEX-Lys012Δmt4	386-495	Lys012-386Fw	Lys012-495Rv	pGEX-6P-2
pGEX-Lys012Δmt5	161-408	Lys012-161Fw	Lys012-408Rv	pGEX-6P-2
pGEX-Lys012Δmt6	1-187	Lys012-1Fw	Lys012-187Rv	pGEX-6P-2

#### 5) ドメイン欠失変異体エンドライシンの作成

プラスミド pGEX-Lys012WT をドメイン欠失変異体プラスミドの構築に使用した。ドメイン欠失変異体を構成する遺伝子断片は表 3 に記載したプライマーを用いて増幅した。プラスミド pGEX-Lys012Δmt2 は、アミノ酸配列で 1-221 と 390-495 に対応する 2 つの増幅された遺伝子断片を Lys012-1Fw と Lys012-495Rv のプライマーを用いてオーバーラップ PCR を行い、構築した。増幅されたエンドライシン遺伝子断片は pGEX-6P-2 へライゲーションし、上述の方法にてクローニング及びタンパク質発現を行った。

#### 6) スポットテストによるファージの溶菌活性評価

37°Cで一晩培養した各菌液 100 μL を 3mL の LB top agar に加え、LB agar 上に播

種した。LB top agar が固まった後、 $1.0 \times 10^9$  PFU/mL の phiSA012 を 4 $\mu$ L 滴下し、37°C で一晩培養した。翌日、ファージの溶菌活性により形成される溶菌斑を観察し、clear plaque (C)、turbid plaque (T)、faint plaque (F)、No plaque (N) で判定した。

#### 7) 経時的濁度測定法によるファージの溶菌活性評価

ファージ phiSA012 の溶菌活性は濁度測定法を用いて評価した。溶菌活性評価に用いた菌株は LB broth を用いて約  $1.0 \times 10^8$  CFU/ml ( $OD_{600}=1.0$  の菌液を 10 倍希釈) になるまで 37°C で振とう培養した。各菌液に phiSA012 が終濃度約  $1.0 \times 10^8$  PFU/ml (MOI = 1.0) となるように混合し、波長 595 nm における吸光値をプレートリーダー (Sunrise Rainbow Thermos RC, TECAN Austria GmbH, Salzburg, Austria) を用いて 37°C で振とうさせながら経時的に 24 時間測定した。

#### 8) 経時的濁度測定法によるエンドライシンの溶菌活性評価

エンドライシン Lys-phiSA012 及びドメイン欠失変異体の溶菌活性は濁度測定法を用いて評価した。溶菌活性評価に用いたブドウ球菌及びストレプトコッカス属菌はそれぞれ LB broth、THB broth にて  $OD_{600} = 1.0$  となるまで 37°C で振とう培養させた。各菌液を遠心分離 (2,300 $\times g$ , 4°C, 5 分間) して上清を捨て、半量の 2 $\times$ LB broth、2 $\times$ THB broth にて菌体を再懸濁した。菌液と等量のエンドライシンを加え (終濃度は各図に記載)、波長 595 nm もしくは 600 nm における吸光値をプレートリーダーにて 37°C で振とうさせながら経時的に 2 時間測定した。イヌ由来ブドウ球菌臨床分離株に対しては、測定のエンドポイントにおける菌数を希釈平板法にて測定した。

#### 9) 2 価イオン存在下におけるエンドライシンの溶菌活性評価

培養液中に含まれる 2 価イオン、特に  $Ca^{2+}$  のキレートが溶菌活性に及ぼす影響を調査するため、SA003 を使用し評価した。 $OD_{600} = 1.0$  となった菌液を遠心分離 (2,300 $\times g$ , 4°C, 5 分間) して上清を捨て、10 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) 添加 2 $\times$ LB broth にて菌体を再懸濁した。菌液にエンドライシンを加え (終濃度 64  $\mu$ g/mL)、経時的な濁度変化を上記方法にて測定した。さらに、 $Ca^{2+}$  及び

Zn<sup>2+</sup>の存在がエンドライシンの溶菌活性に及ぼす影響を調査するため、OD<sub>600</sub> = 1.0 となった菌液を遠心分離 (2,300×g、4°C、5 分間)して上清を捨て、CaCl<sub>2</sub> (終濃度 0 μM, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM) または ZnCl<sub>2</sub> (終濃度 0 μM, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 500 μM, 1 mM, 2.5 mM) が添加された Tris-Buffered Saline (TBS) (50 mM Tris-HCl, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl) にて菌体を再懸濁した。菌液にエンドライシンを加え、経時的な濁度変化を上記方法にて測定した。

#### 10) ツニカマイシン処理

WTA 合成酵素 (TarO) 阻害薬であるツニカマイシン (富士フィルム和光純薬工業 (株)、大阪、日本) は DMSO で溶解し、使用した。LB broth 2mL に 37°C で一晩前培養した SP3401 の菌液 20 μL を加え、さらにツニカマイシンを 10 μL (終濃度 0, 2, 5 μg/mL) 加え OD<sub>600</sub> ≒ 1.0 となるまで 37°C で振とう培養した。溶菌活性は上述と同様、経時的濁度測定法により評価した。エンドライシンは終濃度 37.5 μg/mL で使用した。

#### 11) MIC 及び MBC 測定

最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) と最小殺菌濃度 (minimum bactericidal concentration, MBC) は既報に基づき、一部改変して実施した [4, 60]。MIC の測定は 96 ウェルプレートに 100 μL の LB broth、10 μL の MRSA2007-57 を加え、さらにオキサシリン (終濃度 0~64 μg/mL) 及びエンドライシン Lys-phiSA012 (終濃度 0~2.0 μg/mL) をそれぞれ 2 倍ずつ段階希釈して添加し、37°C で一晩培養した。また、溶媒を 50% グリセロールに置換した Lys-phiSA012 の MIC 及び MBC を測定した (MIC 測定時、グリセロールの終濃度は 25%)。MBC は MIC 測定後の 96 ウェルプレート内溶液 10 μL を、抗菌薬の含まない新たな LB broth 100 μL へ移し、37°C 一晩培養した。溶媒のグリセロールによる影響を評価するため、グリセロールのみの MIC 及び MBC を測定した。MIC 及び MBC は一晩培養後の菌塊の状況を目視にて確認し、評価した。

#### 12) バイオインフォマティクス解析

ファージ phiSA012 (NC\_023573.1) 及びエンドライシン Lys-

phiSA012 (YP\_009006722) の塩基配列及びアミノ酸配列情報は National Center for Biotechnology Information (NCBI) に登録されているデータを利用した。エンドライシンのタンパク質ドメイン構造は、アミノ酸配列情報から InterPro を用いて推定した。CHAP 及び AMID ドメインの立体構造モデリング解析は、結晶構造解析が行われているタンパク質との相同性を利用し SWISS-MODEL sever を用いて実施した。解析に利用した相同タンパク質を表 5 に示す。

表 5. タンパク質立体構造モデリング情報

	Homologous Protein	Source Organism	Residues	Protein ID in PDBe	Seq. Identity	Ligands
Lys-phiSA012 CHAP	ORF30/31 CHAP domain	<i>Staphylococcus virus K</i> (Gene name: PhageK_071)	1-165	4ct3.1	99.39%	Ca <sup>2+</sup> Cl <sup>-</sup> Hg <sup>2+</sup>
Lys-phiSA012 AMID	Endolysin N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	<i>Staphylococcus phage GH15</i> (Gene name: GH15_071)	165-403	4ols	100%	Zn <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup> Fe <sup>3+</sup>

### 13) 統計解析

各試験はそれぞれ独立する 3 回の実験を実施し、有意差の有無を評価した。2 群間比較は F 検定による等分散性を評価したのち、その結果によってスチューデントの t 検定、あるいはウェルチの t 検定を実施した。また、多重比較は One-way ANOVA (一元配置分散分析) を行った後、Dunnett 検定、あるいは Tukey-Kramer 検定を実施した。

## 3. 結果

### 3.1. エンドライシン Lys-phiSA012 のドメイン検索と相同性比較

phiSA012 のゲノム情報を NCBI より入手し、InterPro を用いてエンドライシンのアミノ酸配列からドメイン検索を行った。エンドライシン Lys-phiSA012 遺伝子は ORF51 に存在し 495 のアミノ酸から構成されていた (図 9A)。また、エンドライシンのペプチドグリカン層への輸送を担うホリン遺伝子は ORF52 にコードされていた。また、ドメイン検索の結果、エンドライシンは 3 つのドメインから構成され、触媒ドメインとして 29~160 番目のアミノ酸からなる CHAP ドメインと 188~385 番目のアミノ酸からなる AMID ドメインの 2 つを持ち、細胞壁結合ドメインとして 409~481 番目のアミノ酸からなる SH3b を保有することがわかった (図 9B)。既報より、CHAP ドメインはペプチドグリカン架橋を構成する 5 番目のグリシンと D-ア

ラニンの結合を、AMID ドメインは N-アセチルムラミン酸 (N-Acetylmuramic acid, MurNAc) と L-アラニンの結合を切断することが知られている[11] (図 9C)。次に、他のブドウ球菌溶菌性ファージのエンドライシンである Lys-phiK、Lys-phiGH15、Lys-phiTwort と本研究で精製した Lys-phiSA012 のアミノ酸配列を比較した (図 9D)。すると、Lys-phiK (99.80%) 及び Lys-phiGH15 (98.99%) と非常に類似性が高かった一方、Lys-phiTwort (44.54%) とは類似性が低いことがわかった。また、Lys-phiK と Lys-phiSA012 はアミノ酸配列だけでなく、塩基配列も類似性が高く、Lys-phiK に非常に近縁なエンドライシン (LysK-like endolysins) であった。

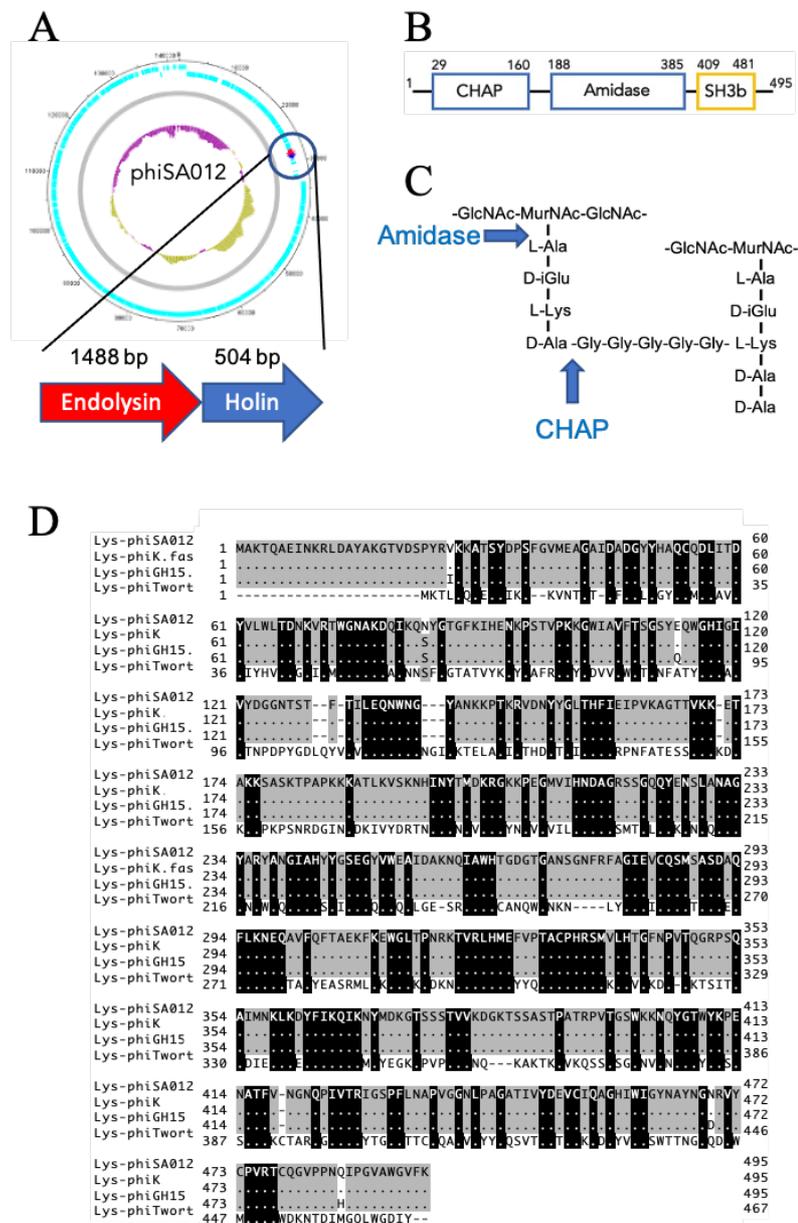


図 9. エンドライシン Lys-phiSA012 のドメイン構造の推定

(A) phiSA012 のゲノムマップ。水色は CDS を示し、赤矢印はエンドライシン遺伝子、青矢印はホリン遺伝子を示す。(B) Lys-phiSA012 のドメイン構造の模式図。495 のアミノ酸から構成され、青枠で囲まれた CHAP と AMID は触媒ドメイン、黄枠で囲まれた SH3b は細胞壁結合ドメインを示す。(C) *S. aureus* のペプチドグリカン構造と既報に基づいた CHAP と Amidase の切断サイト (D) Lys-phiSA012、Lys-phiK、Lys-phiGH15、Lys-phiTwort のアミノ酸配列のマルチプルアライメント結果。アミノ酸残基が同一であるものはドットで示し、4 つ全てのエンドライシンで共通しているものは黒色、3 つのエンドライシンで共通しているものを灰色でハイライトしている。

### 3.2. Lys-phiSA012 の溶菌活性と溶菌スペクトル

エンドライシン Lys-phiSA012 の溶菌活性について調査するため、精製した Lys-phiSA012WT を発現・精製し、濁度測定法を用いて SA003 に対する溶菌活性を評価した。図 10A にて示すように、Lys-phiSA012 は SA003 に対して非常に急速な濁度の減少、つまり強力な溶菌活性を示した。次に、*S. aureus* 以外のブドウ球菌、及びブドウ球菌属以外の細菌に対する Lys-phiSA012 の溶菌活性を評価した。すると、Lys-phiSA012 は *S. aureus* に対する溶菌活性同様、同属のブドウ球菌である *S. pseudintermedius* (StaP001)、及び *Staphylococcus haemolyticus* (StaH001) に対しても急速な溶菌活性を示した (図 10B, 10C)。一方、連鎖球菌属である *Streptococcus agalactiae* (StrA001) に対しては Lys-phiSA012 添加後も濁度の変化は見られず、明らかな溶菌は認められなかった (図 10D)。さらに、薬剤耐性菌として医療現場で問題となっている MRSA に対する Lys-phiSA012 の溶菌活性について評価した。被検菌として、メチシリンのみならず 4 つ以上の抗菌薬に対して多剤耐性を示した MRSA を使用した。すると、Lys-phiSA012 はこれら MRSA に対しても同様に、溶菌活性を示した (図 10E)。また、ブドウ球菌属 9 株に対する Lys-phiSA012 の溶菌活性を比活性 ( $\Delta OD_{600}/\text{min}/\text{mg}$ ) で比較したところ、phiSA012 を分離した際の菌株である SA003 に対する溶菌活性が最も急速であったことがわかった (図 10E)。

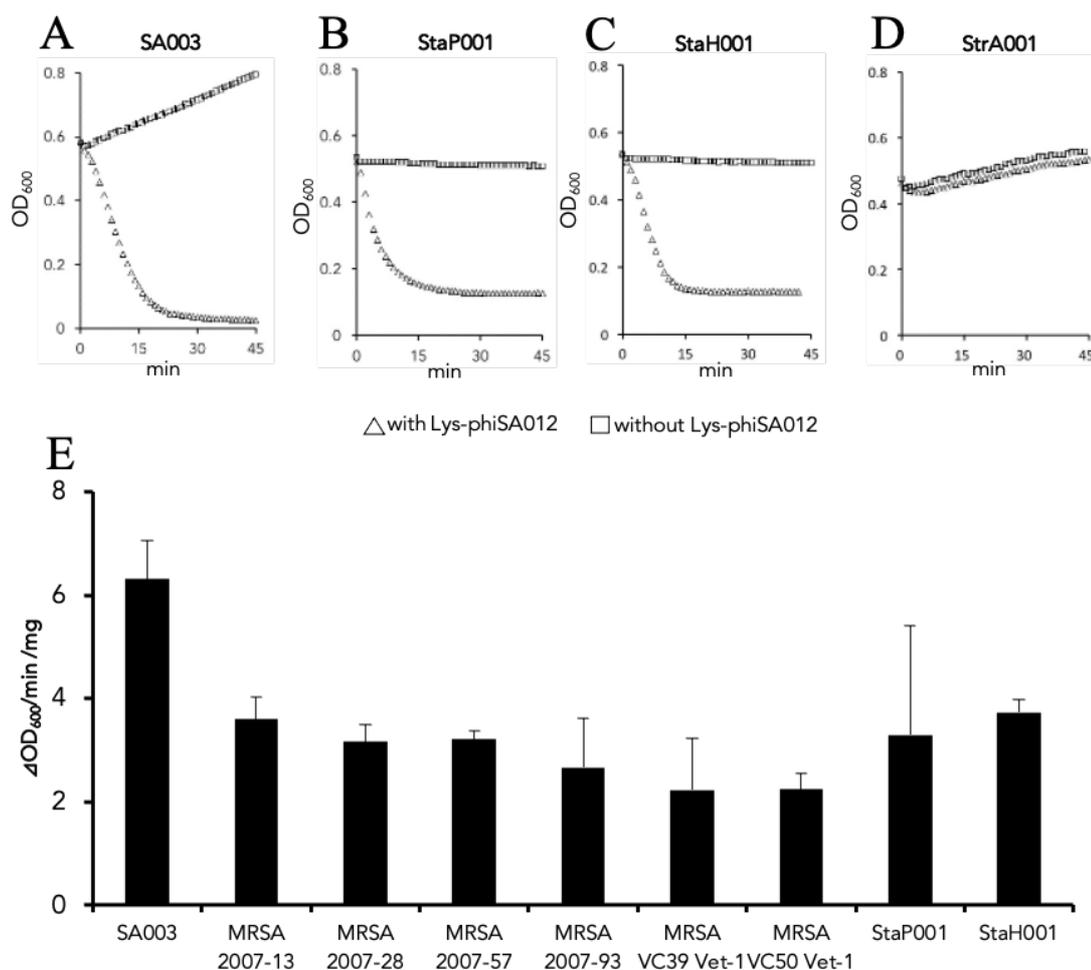


図 10. Lys-phiSA012 の溶菌スペクトル

濁度測定法を用いて、(A) SA003 (エンドライシン濃度 109  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、(B) StaP001 (エンドライシン濃度 132  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、(C) StaH001 (エンドライシン濃度 132  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、(D) StrA001 (エンドライシン濃度 106  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、及び (E) MRSA 株に対する溶菌活性を評価した。(E)は濁度の最大減少率を $\Delta\text{OD}_{600}/\text{min}/\text{mg}$ で表し、各株間で比較しエラーバーは平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD)を表す。

3.3. イヌ由来ブドウ球菌に対するファージとエンドライシンの溶菌活性比較  
 イヌ皮膚炎病変部から分離された多剤耐性ブドウ球菌に対し、ファージ phiSA012 及びエンドライシン Lys-phiSA012 両者の溶菌活性を評価し比較した。すると、phiSA012 は *Staphylococcus schleiferi* (SS3014) に対して溶菌活性を示したものの、SP3401 を除く *S. pseudintermedius* に対してはファージを添加しても濁度の減少はほとんど見られず、明らかな溶菌活性は認められなかった (図 11A)。一方、

エンドライシン Lys-phiSA012 は SP3401 を除く *S. pseudintermedius*、及び *S. schleiferi* の両者に対して広く溶菌活性を示し、2 時間以内に OD 値が 0.1 以下にまで減少した (図 11B)。さらに Lys-phiSA012 添加 2 時間後の菌数を測定したところ、添加前と比較して約 1/100~1/100000 程度まで減少していることがわかった (図 11C)。従って、phiSA012 由来エンドライシンである Lys-phiSA012 は phiSA012 がほとんど溶菌活性を示さない *S. pseudintermedius* 対しても溶菌活性を広く有することが判明した。

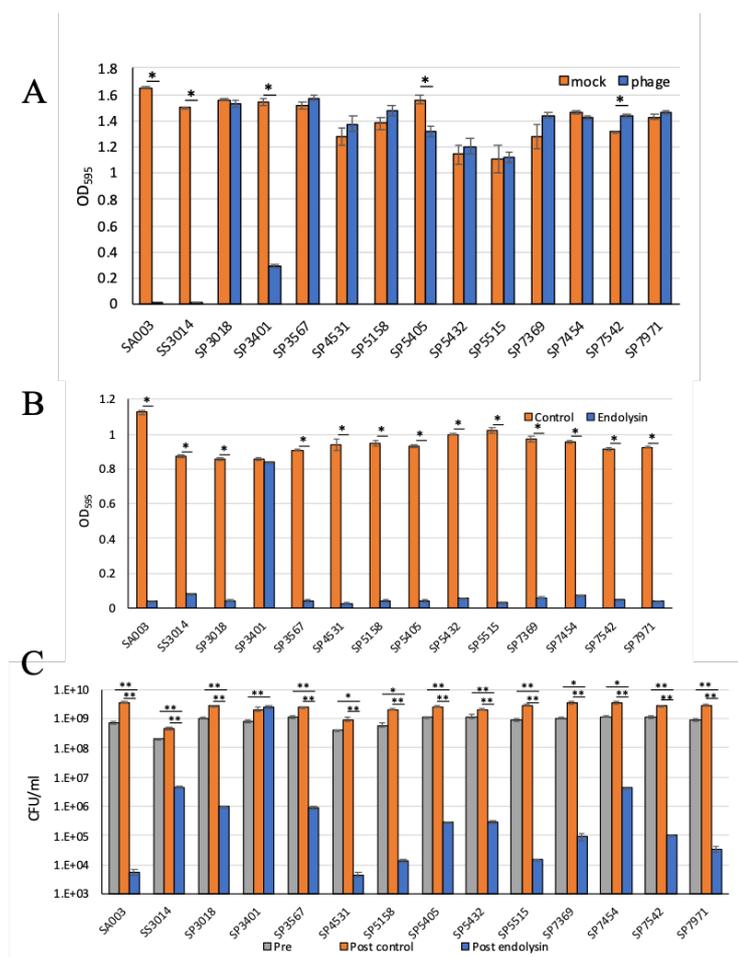


図 11. イヌ由来ブドウ球菌に対する phiSA012 と Lys-phiSA012 の溶菌活性評価 (A) 及び (B) は濁度測定法で、(C)は細菌数 (CFU)を測定し、溶菌活性を評価した。(A) mock 処理、あるいはファージ処理後 24 時間の OD<sub>595</sub> 値を表す。エラーバーは平均±標準誤差 (SE) を表し、スチューデントの t 検定にて有意差検定を行なった (\*p < 0.01)。(B) 溶媒処理、あるいはエンドライシン (終濃度 50 µg/mL) 処理後 2 時間の OD<sub>595</sub> 値を表す。エラーバーは平均±標準誤差 (SE) を表し、スチューデントの t 検定、あるいはウェルチの t

検定にて有意差検定を行なった (\* $p < 0.01$ )。 (C) 未処理 (0 時間)、溶媒処理あるいはエンドライシン処理後 2 時間時点の細菌数を CFU にて表す。エラーバーは平均±標準誤差 (SE) を表し、Dunnett 検定にて有意差検定を行なった (\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ )。

### 3.4. エンドライシン抵抗性と壁タイコ酸の関係

図 10、図 11 より Lys-phiSA012 は *S. aureus* のみならず、さまざまなブドウ球菌に急速な溶菌活性を示すことがわかった。しかし、*S. pseudintermedius* の SP3401 株に対しては唯一溶菌活性が認められなかった (図 11B, 11C)。そこで SP3401 のエンドライシン抵抗性が壁タイコ酸と関係しているか検証した。WTA 合成酵素阻害薬であるツニカマイシンを添加していなかった SP3401 は Lys-phiSA012 の添加後に濁度の減少はなく、明らかな溶菌活性は認められなかった (図 12A)。一方、ツニカマイシン処理をした SP3401 はツニカマイシンの用量依存的に濁度の減少が認められ、明らかな溶菌活性が認められた (図 12B, 12C)。

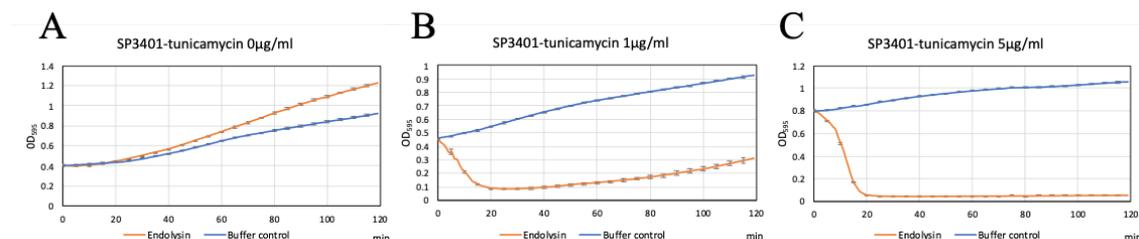


図 12. ツニカマイシン処理した SP3401 に対する Lys-phiSA012 の溶菌活性  
SP3401 をツニカマイシン 0 µg/mL (A)、2 µg/mL (B)、5 µg/mL (C) で処理後、エンドライシン (終濃度 37.5 µg/mL) を添加し濁度測定法を用いて溶菌活性を評価した。エラーバーは平均±標準誤差 (SE) を表す。

### 3.5. Lys-phiSA012 の溶菌活性に必要なドメインの特定

次に、Lys-phiSA012 のドメイン欠失させた遺伝子をコードするプラスミドを構築し、ドメイン欠失変異体として発現・精製させることで、Lys-phiSA012 の溶菌活性に必要なドメインの特定を試みた (図 13A, 13B)。すると、AMID ドメインを不完全に欠失させた変異体 (Lys-phiSA012Δmt2) が Lys-phiSA012WT と同様な溶菌活性を示した一方、他の変異体は溶菌活性を示さなかった (図 13C)。つまり、Lys-phiSA012 の溶菌活性には CHAP ドメインによる酵素活性と細胞壁結合ドメインで

ある SH3b が必須である可能性が示された。

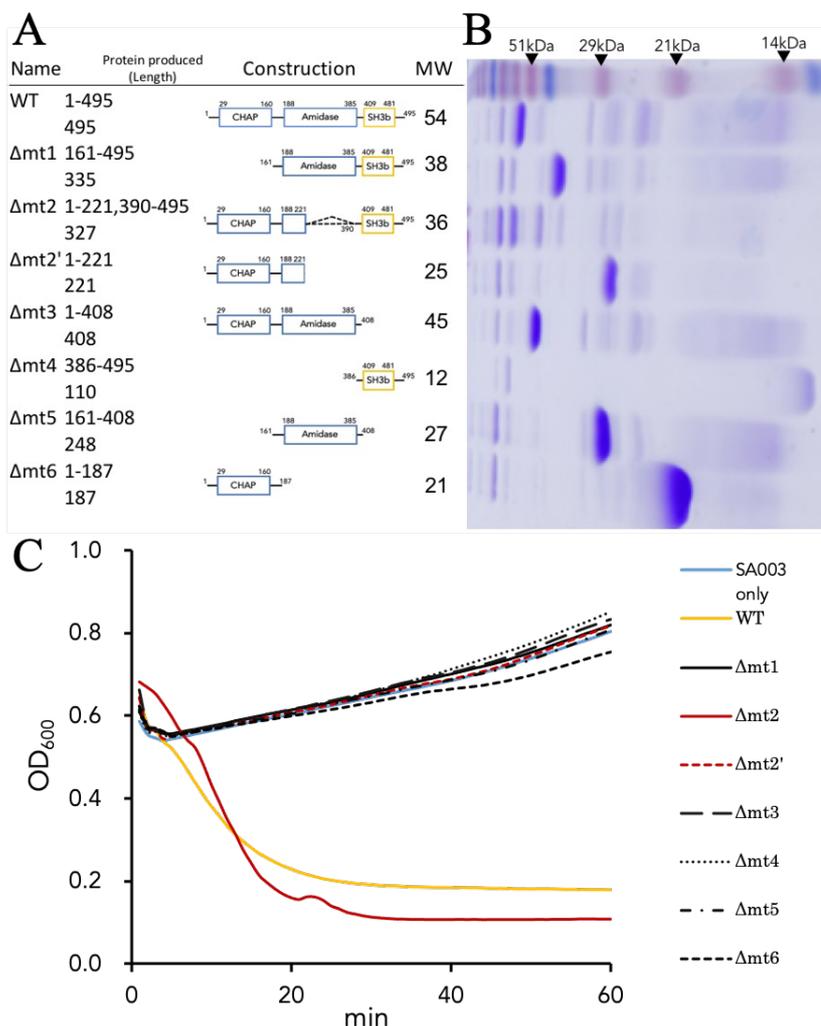


図 13. ドメイン欠失変異体の構築と溶菌活性評価

(A) 構築したドメイン欠失変異体の模式図。WT ではアミノ酸配列 29-160 に CHAP、188-385 に AMID、409-481 に SH3b が位置している。(B) 精製したエンドライシンの SDS-PAGE 像 (CBB 染色)。それぞれのレーンは左の (A) と連動している。1 番上のレーンはマーカである。(C) それぞれのドメイン欠失変異体を SA003 の菌液に加え、濁度測定法を用いて溶菌活性を評価した。Δmt2 を除き、163.8 pmol のエンドライシンを菌液に加えた。Δmt2 は 45.98pmol を加えた。

### 3.6. Lys-phiSA012 の溶菌活性に影響を与える Ca<sup>2+</sup>と Zn<sup>2+</sup>濃度

Lys-phiSA012 の触媒ドメインにイオンの結合サイトが存在するか調査した。

SWISS-MODEL を用いて構築した立体構造モデルによると、CHAP ドメインには

Ca<sup>2+</sup>の結合サイトが存在し、Asp45、Asp47、Tyr49、His51、Asp56の側鎖と相互作用することが推定された(図14A)。また、AMIDドメインにはZn<sup>2+</sup>の結合サイトが存在し、His214、His324、Cys332の側鎖と相互作用することが推定された(図14B)。次にこれら2価イオンの存在がLys-phiSA012の溶菌活性に影響を与えるか調べた。金属イオン、特にCa<sup>2+</sup>に対して特異性を示すキレート剤であるEGTAを菌液中に添加した際のLys-phiSA012の溶菌活性を濁度測定法によって調べた(図14C)。すると、EGTAが添加された菌液中ではLys-phiSA012の溶菌活性が認められなかった。次に、Ca<sup>2+</sup>またはZn<sup>2+</sup>を添加したTBSバッファーにて懸濁した菌液中でのLys-phiSA012の溶菌活性を調べた(図14D)。Ca<sup>2+</sup>及びZn<sup>2+</sup>が添加されていないTBSバッファーで懸濁された菌液中ではLys-phiSA012を添加しても菌液の濁度に変化はほとんどなく、溶菌活性は認められなかった。一方、TBSバッファーにCa<sup>2+</sup>を添加した菌液中ではCa<sup>2+</sup>の用量依存的に菌液の濁度の減少が見られ、Lys-phiSA012の溶菌活性が増強されたことがわかった。また、バッファー中のCa<sup>2+</sup>濃度を1 mM以上にしてもそれ以上溶菌活性の増強効果は認められなかったことから、Lys-phiSA012の溶菌活性を最も引き出すには少なくとも1 mMのCa<sup>2+</sup>が存在すればよいことがわかった。また、Ca<sup>2+</sup>を添加した際の溶菌活性変化と同様に、TBSバッファーにZn<sup>2+</sup>を添加した菌液中では100 μMの濃度まで用量依存的な溶菌活性の増強が見られた。しかし、Zn<sup>2+</sup>濃度をさらに高くしていくと溶菌活性は減弱し、2.5 mMの添加ではTBSバッファーのみの菌液中と同様、溶菌活性はほとんど認められなかった。

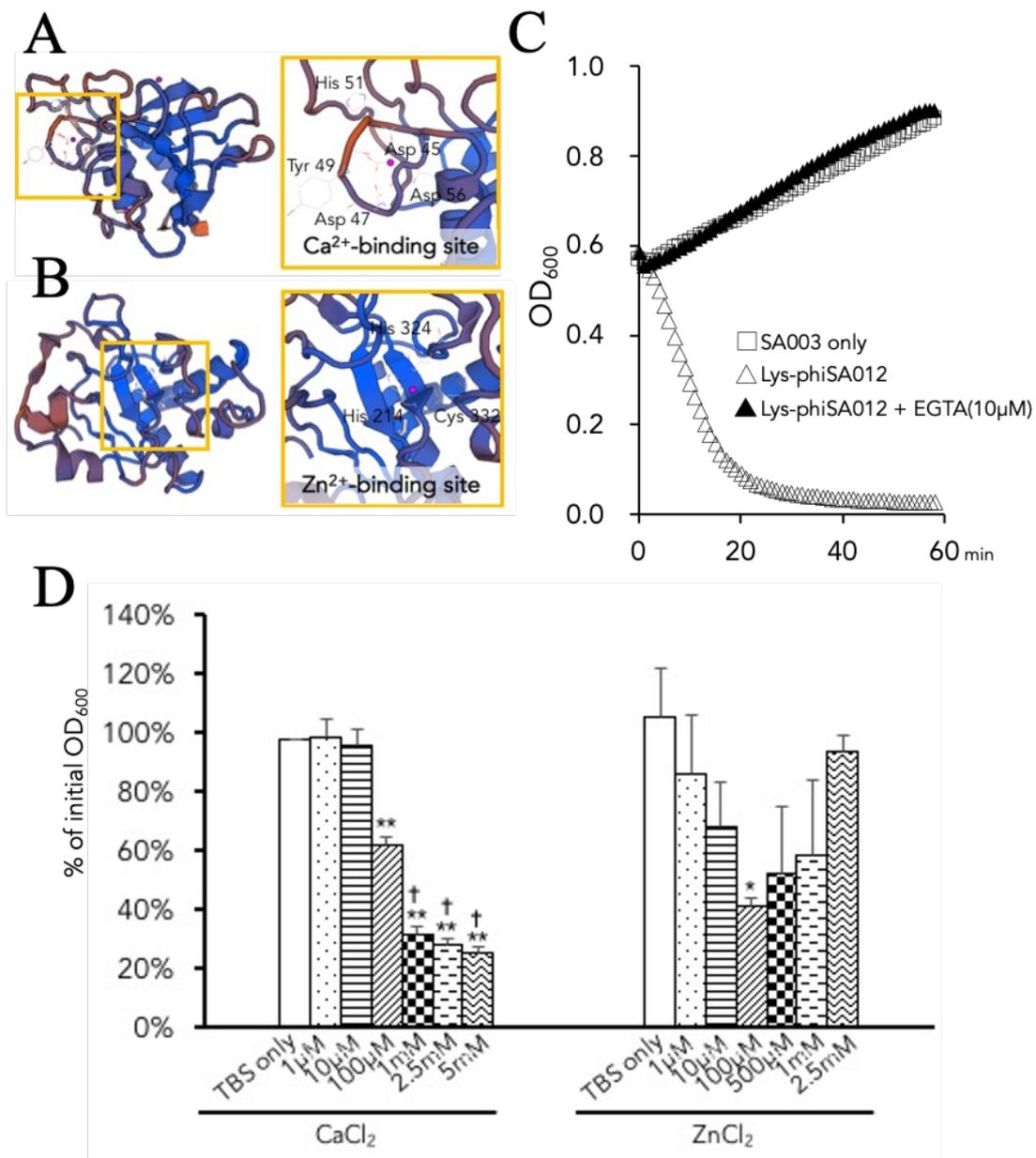


図 14.  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Zn}^{2+}$  の結合サイト及び Lys-phiSA012 の溶菌活性への影響  
 CHAP ドメイン (A) 及び AMID ドメイン (B) の立体構造モデルは相同タンパク質を用いて SWISS-MODEL sever にて構築した。  $\text{Ca}^{2+}$ 、及び  $\text{Zn}^{2+}$  の詳細な結合サイトは黄色枠にて表示した。  $\text{Ca}^{2+}$  結合サイトは Asp45、Asp47、Tyr49、His51、Asp56 にて構成され、  $\text{Zn}^{2+}$  は His214、His324、Cys332 で構成されることが予測された。(C) EGTA 処理 (10  $\mu\text{M}$ ) した処理した菌液に Lys-phiSA012 を添加し、濁度測定法を用いて溶菌活性を評価した。(D) 濁度測定法を用いて  $\text{Ca}^{2+}$ 、及び  $\text{Zn}^{2+}$  濃度が Lys-phiSA012 の溶菌活性に与える影響について評価した。 Lys-phiSA012 添加直後 (0 min) の  $\text{OD}_{600}$  を 100% とし、60 分後の

濁度の減少率を求めた。エラーバーは平均値±SD を表し、Tukey-Kramer 検定にて TBS only 群 (\*p < 0.05、\*\*p < 0.01) あるいは 100 μM Ca<sup>2+</sup> (†p < 0.05) 群と比較した有意差検定を行なった。

### 3.7. Lys-phiSA012 添加による MRSA のオキサシリン MIC 値減少

オキサシリン耐性を示す MRSA2007-57 株を被検菌とし、エンドライシンを少量添加 (終濃度 0~2.0 μg/mL) したオキサシリンに対する MIC 値を測定し、併用効果について評価した (図 15)。MRSA2007-57 株に対するオキサシリン単独の MIC 値は 32 μg/mL であったが、エンドライシン 1.0 μg/mL もしくは 2.0 μg/mL と併用することでオキサシリンの MIC 値は 2.0 μg/mL まで減少し、より感受性が高まることがわかった。

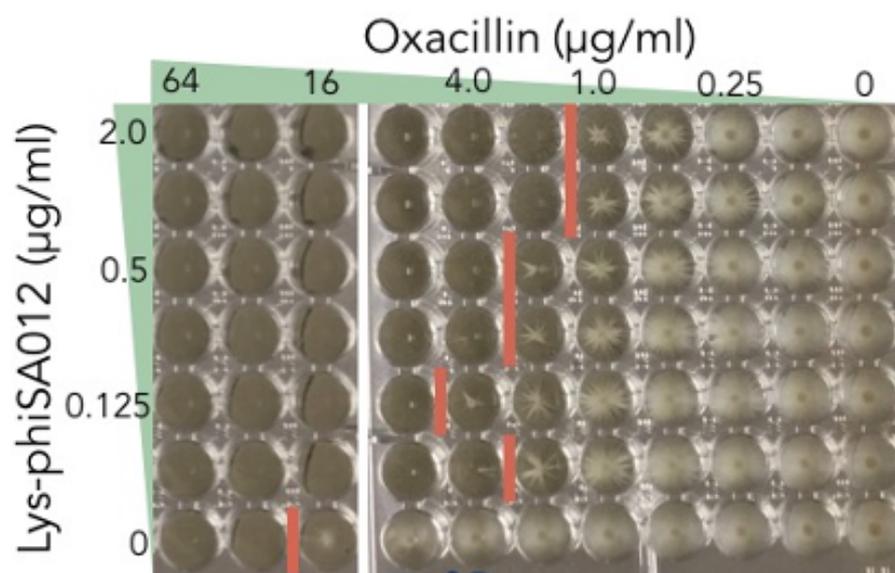


図 15. Lys-phiSA012 とオキサシリン併用時の MIC 測定

Lys-phiSA012 を添加あるいは非添加時の MRSA2007-57 株に対するオキサシリンの MIC 値を測定した。赤いバーより右側は細菌の増殖像が認められる。

3.8. グリセロールをエンドライシンの溶媒とした際のエンドライシンの MBC 値次に SA003 に対する Lys-phiSA012 の MIC 値及び MBC 値の測定を試みた。しかし、エンドライシン単独で抗菌薬同様に MIC 値を測定すると、図 15 のように 一晚培養後には全てのウェルで菌の増殖が認められた。エンドライシンは急速な溶菌

活性を有するものの (図 10A-10C)、その後酵素としては失活し、一晚培養すると溶菌しきれなかった細菌が再増殖していることが考えられる。そこで、静菌作用は示すが殺菌作用がない終濃度 25% のグリセロールを利用し (図 16A)、50% グリセロールを溶媒としたエンドライシンを作成し、等量の菌液と混合 (グリセロールの終濃度は 25%) した際の MIC 値及び MBC 値を測定した。MIC 値はグリセロールの静菌作用により菌塊が形成されず評価はできないが、MBC 測定試験では 0.815  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上のエンドライシンで菌塊が認められなかったことから SA003 に対する Lys-phiSA012 の MBC 値は 0.815  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であることがわかった (図 16B)。

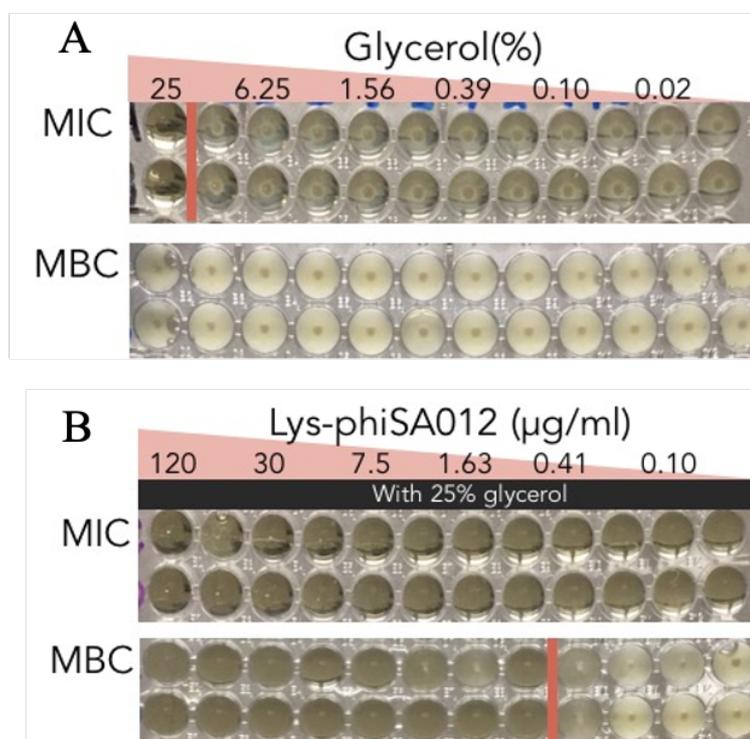


図 16. グリセロールを Lys-phiSA012 の溶媒とした時の MIC、及び MBC 測定 (A) 溶媒としたグリセロールのみの MIC、及び MBC 測定。(B) 50%グリセロールを Lys-phiSA012 を溶媒とした時の MIC、及び MBC 測定 (グリセロールの終濃度は 25%)。

#### 4. 考察

本研究で使用した Lys-phiSA012 は触媒ドメインとして CHAP と AMID を、細胞壁結合ドメインとして SH3b を保有していることが *in silico* 解析によって推定され

た。これらドメインは解析が進められている Lys-phiK、Lys-phiGH15、Lys-phiTwort が保有するドメインと同一であり、特に Lys-phiK 及び Lys-phiGH15 と Lys-phiSA012 のアミノ酸配列は約 99%と高い相同性を示した[58, 101, 121]。一方、Lys-phiTwort と Lys-phiSA012 のアミノ酸配列の相同性は 45%程度と他 2 つのエンドライシンと比較して低いことがわかった。即ち、ファージの多様性と同様に、エンドライシンにも多様性が存在し、溶菌活性や溶菌スペクトルが異なる可能性が推察される。ゆえに、抗菌戦略としてエンドライシンの使い分け、もしくは異なるエンドライシンを併用した使い方によって、より効率的な溶菌作用を得られる可能性がある。

Lys-phiSA012 はファージ phiSA012 の本来の宿主である *S. aureus* 以外に、同属であるブドウ球菌の *S. haemolyticus* や *S. pseudintermedius* に対しても急速な溶菌活性を示した。また、多剤耐性を示す *S. aureus* や *S. pseudintermedius* に対しても同様に溶菌活性が認められた。さらにはファージ phiSA012 ではほとんど溶菌されないイヌ由来ブドウ球菌臨床分離株に対しても Lys-phiSA012 は溶菌活性を示した。一方、連鎖球菌属である *S. agalactiae* に対しては溶菌活性を示さなかった。つまり Lys-phiSA012 はブドウ球菌属にのみ広く溶菌活性を示すエンドライシンであると考えられる。エンドライシンの溶菌スペクトルは細胞壁結合ドメインによって制御されており、Lys-phiSA012 をはじめ、多くの黄色ブドウ球菌溶菌性ファージ由来エンドライシン、さらには *Staphylococcus simulans* 由来のバクテリオシンとして知られる Lysostaphin は細胞壁結合ドメインとして SH3b を保有している[58, 101, 121, 167]。SH3b ドメインはペプチドグリカン構造のうち、ブドウ球菌特有のグリシン 5 つからなるペンタグリシン架橋に結合することが報告されている[54, 111]。従って、SH3b ドメインを有するこれら溶菌酵素はブドウ球菌属に対して広く溶菌活性を有する一方、ペプチドグリカンにペンタグリシン構造を持たない他の細菌に対しては溶菌活性を示さないと考えられ、今回の実験結果と一致するものとなった。しかし、ヒトの表皮に常在するブドウ球菌である *S. epidermidis* は *S. aureus* の増殖を抑えることが知られており[115]、これら善玉なブドウ球菌に対しても Lys-phiSA012 は溶菌活性を示す可能性がある。そのため、ヒトや動物に臨床応用する場合は疾患や細菌叢なども考慮し、より溶菌スペクトルの狭いファージとエンドライシンの使い分けをすることが必要である。

本研究では *S. pseudintermedius* とされる SP3401 株に対して Lys-phiSA012 が唯一溶菌活性を示さなかった。しかしながら、グラム陽性菌の細胞壁構成成分である壁タイコ酸の合成酵素を阻害するツニカマイシン処理を行うことで、Lys-phiSA012 は SP3401 株に対して溶菌活性を示すようになった。この結果は、ブドウ球菌が壁タイコ酸によってエンドライシンの溶菌活性に対する抵抗性を獲得する可能性を示唆している。*L. monocytogenes* に対するエンドライシン Ply118、Ply511、及び PlyP40 の細胞壁結合ドメインのペプチドグリカンへの結合が壁タイコ酸の存在によって制限されることがすでに報告されている[44]。また、*C. difficile* は培地やバッファーの違いによって壁タイコ酸の立体構造が変化し、*C. difficile* に対するオートライシン CD11 のペプチドグリカンへのアクセスが制限されると 2016 年に報告されている[180]。従って、本研究で確認されたエンドライシン Lys-phiSA012 に抵抗性を示す SP3401 株は、壁タイコ酸によってエンドライシンのペプチドグリカン層へのアクセスを阻害し、溶菌活性に抵抗性を示していた可能性が高い。また、溶菌活性を調べる際に全ての菌株は LB broth にて培養し、その菌液中で Lys-phiSA012 を作用させたことから、*C. difficile* のような培地成分の違いによるタイコ酸立体構造の変化が起きているとは考えにくい。ゆえに、SP3401 株は菌株特異的なタイコ酸の量、あるいは立体構造の違いによってエンドライシン抵抗性を示していると考えている。この実験結果より、エンドライシンの溶菌活性を最大限獲得するには、ツニカマイシンといったタイコ酸合成酵素阻害薬と併用し、エンドライシンをペプチドグリカン層へよりアクセスしやすい状況を作ることが重要となる。また、SP3401 株はエンドライシンには抵抗性を示すが、壁タイコ酸をレセプターとするファージ phiSA012 によって効率的に溶菌されていたことから、ファージと併用することで各々では溶菌を起しづらい株に対して両方で補い、ブドウ球菌属に対してさらに広域に作用することが期待される。

Lys-phiSA012 のドメイン欠失変異体を用いた実験では CHAP-SH3b の 2 つのドメインからなる Lys-phiSA012 $\Delta$ mt2 が Lys-phiSA012WT 同様の溶菌活性を示した一方、CHAP ドメインのみの Lys-phiSA012 $\Delta$ mt2' では溶菌活性が見られなかった。つまり、SH3b ドメインはペンタグリシン構造を認識して溶菌スペクトルを規定するだけでなく、溶菌活性に必須なドメインであることがわかった。エンドライシンである Lys-phiK、LytA、及びバクテリオシンであるリゾスタフィンにおいても

最大の溶菌活性を得るには SH3b が必須であることが報告されており [8, 11, 40]、今回の実験結果と一致するものとなった。また、CHAP ドメインを欠き、AMID-SH3b ドメインからなる Lys-phiSA012Δmt1 は溶菌活性をほとんど示さなかった。つまり Lys-phiSA012WT の溶菌活性には CHAP ドメインによる酵素的切断が非常に重要であり、一方 AMID ドメインは実質的にほとんど機能していないことが考えられる。CHAP ドメインはペプチドグリカン架橋を構成するグリシンと D-アラニンの結合を、AMID ドメインは MurNAc と L-アラニンの結合を切断することが知られている [11] (図 9C)。Lys-phiK のドメイン欠失体 AMID-SH3b を用いた試験においても、Lys-phiSA012 同様、溶菌活性がほとんど認められないことが報告されている [11]。Lys-phiSA012 の AMID-SH3b が溶菌活性をほとんど示さなかった理由として、ドメイン欠失体の作成によって本来の立体構造が失われた可能性が考えられる。また、エンドライシンは本来ファージ感染後、菌体内から作用する (lysis from within) 酵素であるが、本研究では菌体外から作用 (lysis from without) させて溶菌活性を評価している。そのためエンドライシン本来の作用ができていない可能性が考えられる。一方で、エンドライシン LysSA12 と LysSA97 は Lys-phiSA012 と同様、AMID-SH3b に溶菌活性はほとんど認められないものの、SH3b ドメインのみの場合と比較し、AMID-SH3b は菌体との結合性が高かったとの報告がなされている [67]。つまり、AMID は触媒ドメインとされるものの、補助的ながらも細胞壁に対する結合性を高める役割を持つ可能性が示されている。あるいはペプチドグリカンの MurNAc と L-アラニンとの結合が AMID によって切断されたとしても、細胞壁構造の堅牢性にはさほど影響が及ばず、溶菌が起こらない可能性も考えられる。

本研究では Lys-phiSA012 の CHAP ドメインに  $\text{Ca}^{2+}$ 、そして AMID ドメインに  $\text{Zn}^{2+}$  の結合サイトがあることを推定し、さらに  $\text{Ca}^{2+}$  は 1 mM 以上、 $\text{Zn}^{2+}$  は 100  $\mu\text{M}$  の時に Lys-phiSA012 の溶菌活性が最大となることを示した。エンドライシンの  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な溶菌活性は Lys-phiK 及び Lys-phiGH15 においても観察されており、本研究結果と一致する [57]。Lys-phiK の結晶構造解析によると、CHAP ドメインに  $\text{Ca}^{2+}$  が結合することによってエンドライシンの立体構造が安定化し、基質であるペプチドグリカンの認識に寄与していると論じている [141]。一方、 $\text{Zn}^{2+}$  は溶菌活性がほとんどないと考えられていた AMID ドメインに結合サイトがあるにも関わらず、

100  $\mu\text{M}$  までは濃度依存的に溶菌活性が上昇し、さらに  $\text{Zn}^{2+}$  濃度を上昇させることで逆に溶菌活性が見られなくなるといった現象が見られた。 $\text{Zn}^{2+}$  による溶菌活性の阻害は Lys-phiK や Lys-phiGH15 においても観察されている [57, 141]。Lys-phiK の結晶構造解析によると、AMID ドメインではなく CHAP ドメインにも  $\text{Zn}^{2+}$  が緩く結合することが示されている [141]。CHAP ドメインの  $\text{Zn}^{2+}$  結合サイトは CHAP ドメインの酵素活性中心である Cys54 に非常に近接しており、基質の活性中心へのアクセスを調節していると考えられている。従って  $\text{Zn}^{2+}$  が高濃度に存在すると活性中心 Cys54 の基質との反応を阻害し、溶菌活性が減弱したと考えている。また、ある一定濃度の  $\text{Zn}^{2+}$  においては、 $\text{Ca}^{2+}$  の代わりに  $\text{Zn}^{2+}$  が  $\text{Ca}^{2+}$  結合サイトに緩く結合することでエンドライシンの構造が安定し、溶菌活性が増強したと考えている。つまり、 $\text{Zn}^{2+}$  が Lys-phiSA012 の溶菌活性に及ぼす影響は、AMID ドメインに対してではなく CHAP ドメインに対する作用であると考えており、CHAP-SH3b ドメインからなる Lys-phiSA012 $\Delta$ mt2 を用いた際にも溶菌活性の上昇と減弱が  $\text{Zn}^{2+}$  濃度によって認められた (data not shown)。また、最低 1 mM の  $\text{Ca}^{2+}$  の存在で Lys-phiSA012 は最大の溶菌活性を得ることができるが、これは細胞外液の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 1.2 mM に非常に近く [21]、一方細胞内液の  $\text{Zn}^{2+}$  濃度は 100  $\mu\text{M}$  に近いことが知られている [82]。すなわち、エンドライシンは存在する場所によって  $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{Zn}^{2+}$  のいずれにおいても溶菌活性が最大になるよう最適化されている可能性が高い。Lys-phiK、及び LysK-like endolysin において溶菌活性を最大に得るために最適な  $\text{Ca}^{2+}$ 、及び  $\text{Zn}^{2+}$  濃度を決定したのは 2018 年時点で本研究が初めてである。

エンドライシンの殺菌効果は、上述の通りペプチドグリカンを直接酵素的に切断し、脆弱になった細胞壁が浸透圧性に溶菌することによるものである。一方、既存の抗菌薬は細胞壁合成酵素の阻害やタンパク質合成阻害など、エンドライシンの作用機序とは異なる。そこで、エンドライシンと抗菌薬の併用効果について調べるため、エンドライシンと  $\beta$ ラクタム抗菌薬であるオキサシリンとを併用した際の MIC を測定した。すると、エンドライシンを 1~2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加することで、オキサシリンの MIC は 1/16 にまで減少することがわかった。つまり、エンドライシンを抗菌薬と併用することによって抗菌薬の使用量を減らすことができることがわかった。また、溶媒をグリセロールに置換したエンドライシンを用いて MBC を測定したところ、0.815  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上で殺菌効果が見られ、ゆえに 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上のエンドラ

イシン添加で大幅にオキサシリンの必要量を減少することができたと考えられる。一方で、溶媒がグリセロールではなく一般的なバッファーだった場合には添加後に急速な溶菌活性は認められるものの、その後酵素が失活し、一晚培養すると溶菌しきれなかった細菌の再増殖が認められた。従ってエンドライシンを臨床的に応用する際には、急性感染症などに対して急速に菌数を減らすことを目的に使用すると最も効果を得られやすいと考えている。また、エンドライシンの溶媒としてグリセロールなど静菌作用のある物質や、静菌作用のある抗菌薬との併用、さらにはバクテリオファージとの併用をすることでエンドライシンの溶菌活性をさらに効率的にすることができると考えている。

## 5. 小括

本研究では黄色ブドウ球菌溶菌性ファージ phiSA012 由来エンドライシン Lys-phiSA012 を発現・精製し、溶菌活性及び機能を解析した。Lys-phiSA012 は *in silico* 解析から触媒ドメインとして CHAP、及び AMID ドメインを、さらには細胞壁結合ドメインとして SH3b を保有していることが推定され、*S. aureus* に急速な溶菌活性を示すことがわかった。また、*S. aureus* 以外にも同属の *S. haemolyticus* やイヌ臨床分離株である *S. pseudintermedius* や *S. schleiferi* に対しても同様に溶菌活性を示した。一方で、連鎖球菌である *S. agalactiae* に対しては溶菌活性を示さず、Lys-phiSA012 はブドウ球菌属特異的に溶菌活性を示す可能性が示された。また、一部のブドウ球菌株は壁タイコ酸の量もしくは構造の違いによってエンドライシンのペプチドグリカン層へのアクセスを阻害し、溶菌活性に抵抗性を示すことがわかった。Lys-phiSA012 の溶菌活性には CHAP ドメインと SH3b ドメインの両者の存在が重要であり、AMID ドメインはほとんど溶菌活性を示さないことがドメイン欠失変異体を用いた実験でわかった。特に CHAP ドメインには  $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{Zn}^{2+}$  の結合サイトが存在し、1 mM 以上の  $\text{Ca}^{2+}$  または 100  $\mu\text{M}$  の  $\text{Zn}^{2+}$  の存在下で Lys-phiSA012 は最大の溶菌活性を示すことが明らかとなった。さらに、 $\beta$ ラクタム系抗菌薬のオキサシリンと 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のエンドライシンを併用することでオキサシリンの MIC 値を単独使用の場合に比べて 1/16 にまで減少させたことから、エンドライシンと抗菌薬を併用することで抗菌薬使用量を減少させることが可能であることがわかった。

### 第Ⅲ章 バクテリオファージを用いた新規アトピー性皮膚炎制御戦略の構築

#### 1. 序文

ヒトアトピー性皮膚炎 (Atopic dermatitis, AD) は、繰り返し起こる湿疹を特徴とする皮膚の慢性炎症性疾患である[175]。AD の臨床症状としては、皮膚の乾燥、腫脹、痒みなどであり、免疫学的特徴としては、白血球によって誘導される血中 IgE 濃度の高値などが挙げられる[16, 17, 90, 178]。AD では先天的な皮膚バリア障害が報告されており、特にフィラグリン遺伝子 (*FLG*) の変異は AD の最も強い要因と考えられている[71]。一方で、*FLG* 変異保有者の 50%以上は AD の臨床症状を示さず、直接的な原因であるかどうかは未だ解明されていない[176]。また、近年の細菌叢解析の発展により、AD 罹患者の皮膚表層では細菌叢の多様性が減少していることが明らかになっている[51, 86]。これら報告は、AD が遺伝的要因だけで発症するのではなく、皮膚細菌叢の異常などの環境刺激と関連していることを強く示唆している。

*S. aureus* は、様々な炎症性疾患、敗血症、皮膚や軟部組織感染症などを引き起こす病原体であり、ヒトや動物の医療分野において最も頻繁に分離される病原体の一つである[36]。特に、ヒトの AD 患者では、*S. aureus* が圧倒的に多く検出されることが知られている[60, 67, 127, 164, 168]。Totte らの研究によると、皮膚に病変のある AD 患者の約 70%から *S. aureus* が検出され、*S. aureus* の密度は AD の重症度と相関していた一方、健康な皮膚から *S. aureus* が分離されることはほとんどなかったと報告されている[168]。また、ヒトの AD では *S. aureus* が優位に増殖してくるのに対し、犬の AD では *S. pseudintermedius* や *S. schleiferi* が多く検出されることが報告されており[149]、AD の病変部において優位に増殖するブドウ球菌の種類には動物種特異性があることがわかっている。しかし、AD においてブドウ球菌が優位に増殖してくる理由は完全には解明されていない。

AD の病態解明や治療法の開発のために、複数の AD モデルマウスが前臨床試験などに用いられている。Kim らは以前、AD モデルマウスを、i) 近交系マウス、ii) 遺伝子改変マウス、iii) 外因性薬剤誘発マウスの 3 つのグループに分類した[84]。モデルマウスはそれぞれ特長が異なり、またヒト AD を完全に模倣するマウ

スは存在しないため、各々モデルとしての限界がある。その中で、*ma/ma*、*Flg<sup>fl/fl</sup>*、NC/Tnd などの近交系モデルマウスは、ヒト AD に類似した症状の経過を示す。特に、NC/Tnd マウスは、通常的环境下では症状を自然発症する点においてヒト AD に類似するが、Specific Pathogen Free (SPF) 环境下では発症しない[87, 105]。また、NC/Tnd マウスは、AD 様症状の発症と関連するブドウ球菌の自然増生が報告されている[63]。

ヒト医療現場では、抗炎症作用のある副腎皮質ステロイド薬や免疫抑制作用のあるカルシニューリン阻害薬が従来の治療法として用いられている[26]。漂白剤を用いた入浴（ブリーチバス法）は、米国をはじめ海外において AD 患者に広く行われているが、明らかな有効性は認められていない[69]。一方、細菌叢の乱れ（dysbiosis）に伴う *S. aureus* の自然な増生が見られる遺伝子改変モデルマウス *Adam17<sup>ΔSox9</sup>* を用いた実験において、病変部の黄色ブドウ球菌を標的とした抗菌薬の全身投与を行なったところ、マウスの AD 様症状が劇的に改善したとの報告がなされている[86]。しかしながら長期的な局所及び全身的な抗菌薬投与は様々な細菌叢に悪影響を与えるとともに、薬剤耐性菌の出現を促す可能性がある。

そこで我々は、ブドウ球菌を標的としたファージ療法が AD の症状を改善するかどうかを検討した。本研究では AD 様症状を自然発症する NC/Tnd マウスの病変部に対して、*S. aureus* 溶菌性ファージ phiSA012、または phiSA012 由来溶菌酵素 Lys-phiSA012 を局所塗布し、その症状改善効果について評価した。

## 2. 材料と方法

### 1) マウス

NC/Tnd マウスを用いて実験を行った。Vehicle、ファージ、エンドライシン処理群においては通常飼育环境下で、また AD 様症状を発症しないコントロール群として SPF (Specific Pathogen Free) 条件で飼育した。動物を用いたすべての実験は、東京農工大学で実施し、東京農工大学の動物実験委員会が証明したガイドラインに規定された基準、および日本学術会議の実験動物使用ガイドラインに規定された基準に準拠した（承認番号 29-6）。

## 2) 皮膚からの細菌の分離と同定

NC/Tnd マウス (8-10 週齢) の背部皮膚病変部から採取した皮膚スワブサンプルを 500  $\mu$ L の PBS で懸濁し、各懸濁液を 5% 羊血寒天培地に播種して 37°C で一晚培養した。いくつかのコロニーを採取し、LB broth に加え、一晚 37°C で振とう培養した。培養した細菌はすべて 25% グリセロールストックとして -80°C で保存した。一晚培養した菌液からフェノールとクロロホルムを用いてゲノム DNA を抽出し、QIAamp DNA minikit カラム (Qiagen, Hilden, Germany) で精製した。16S rRNA、*dnaJ* (ヒートショックプロテイン 40、Hsp40)、*rpoB* (RNA ポリメラーゼ  $\beta$  サブユニット) 遺伝子の PCR 反応とサンガーシーケンスにより、分離株の各遺伝子配列を決定した [88, 96, 107, 151, 170]。PCR 及びシーケンス用プライマーと PCR 条件を表 6 に示す。サンガーシーケンスは北海道システムサイエンス株式会社で行い、得られた配列は BLAST で検索し、GenBank データベースに登録されている参照配列とアラインメントして種同定を行った。

表 6. 細菌種同定に用いたプライマーと PCR 条件

Target gene	Amplification primers	PCR program	Sequencing primers	Reference
16S rRNA (1466 bp)	16S_27-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 16S_1492-R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')	1. 94°C for 2 min Steps 2-4 40 $\times$ 2. 94°C for 30 sec 3. 55°C for 30 sec 4. 72°C for 2 min 5. 72°C for 5 min	16S_27-F, 16S_1492-R	Lane, 1991 [95] Turner et al., 1999 [169]
<i>dnaJ</i> (920 bp)	<i>dnaJ</i> -F (5'-GCCAAAAGACTATTATGA-3') <i>dnaJ</i> -R (5'-ATTGYTTACCYGTTTGTGTACC-3')	1. 94°C for 3 min Steps 2-4 5 $\times$ 2. 94°C for 30 sec 3. 45°C for 30 sec 4. 72°C for 60 sec Steps 5-7 30 $\times$ 5. 94°C for 30 sec 6. 50°C for 30 sec 7. 72°C for 60 sec 8. 72°C for 3 min	<i>dnaJ</i> -F, <i>dnaJ</i> -R	Shah et al., 2007 [150]
<i>rpoB</i> (740 bp)	<i>rpoB</i> 1418-F (5'-CAATTCATGGACCAAGC-3') <i>rpoB</i> 3554-R (5'-CCGTCCCAAGTCATGAAAC-3')	1. 94°C for 5 min Steps 2-4 30 $\times$ 2. 94°C for 30 sec 3. 52°C for 30 sec 4. 72°C for 60 sec 5. 72°C for 5 min	<i>rpoB</i> 1418-F <i>rpoB</i> 1975-R (5'-GCIACITGITCCATACCTGT-3')	Mellmann et al., 2006 [106]

## 3) バクテリオファージ

牛乳房炎由来 *S. aureus* SA003 を宿主とし、下水処理場内の水から分離されたビルレントファージ phiSA012 (NC\_023573.1) を使用した [160]。phiSA012 はプレート

ライセート法で増殖させた[160]。110  $\mu\text{L}$  の phiSA012 液と 110  $\mu\text{L}$  の SA003 菌液を混合して室温で 10 分間静置し、その後混合液 200  $\mu\text{L}$  を 3mL の 0.5% LB top agar に加え、LB agar 上に全量播種し、37°Cで一晩培養した。翌日、プレート上に SM buffer (100mM NaCl、8mM MgSO<sub>4</sub>、50mM Tris-HCl (pH7.5)、0.01%ゼラチン) を 3mL 加えた後、上層を削り取ってファージを抽出し、遠心分離 (10,000 $\times$ g、5 分間、4°C) して上清を回収した。さらに回収したファージ液を CsCl 密度勾配超遠心法で精製した[160]。精製した phiSA012 は力価を測定し、使用するまで 4°C で保存した。

#### 4) エンドライシンの調製

エンドライシン Lys-phiSA012 は、我々が以前報告した方法と同様に発現、精製した[47]。Lys-phiSA012 をコードするプラスミドを持つ *E. coli* BL21 (DE3) 株を、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のアンピシリンを含む LB broth で培養し、対数期 (OD<sub>600</sub> が 0.4-0.6 に相当) に IPTG を最終濃度 0.1mM になるように添加してタンパク質の発現を誘導し、25°Cで一晩振とう培養した。遠心分離 (2,300 $\times$ g、5 分間、4°C) により細胞を回収し、超音波処理によって菌体を破砕した。その後遠心分離 (10,000 $\times$ g、30 分、4°C) を行い、グルタチオンセファロース 4B を充填したクロマトグラフィーカラムを用いて、可溶性 GST タグ付きエンドライシン Lys-phiSA012 をカラムでトラップした。PreScission Protease mix (80  $\mu\text{L}$  (160 units) PreScission Protease + 920  $\mu\text{L}$  cleavage buffer (5mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Tri-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol)) をカラムに加えて 1 時間静置にて反応させ、GST タグが切断された Lys-phiSA012 を精製し、使用するまで-30°Cで保存した。

#### 5) スポットテスト

各菌液 100  $\mu\text{L}$  を 3mL の LB top agar に加え、LB agar 上に播種した。LB top agar が固まった後、 $1.0 \times 10^9$  PFU / mL の phiSA012 を 4  $\mu\text{L}$  滴下した。37°Cで一晩培養した後、ファージによる溶菌によって形成されるプラークを観察した。

#### 6) プラークアッセイと EOP の測定

各菌液 110  $\mu\text{L}$  と phiSA012 ( $1.0 \times 10^3$  PFU / mL ~  $1.0 \times 10^{11}$  PFU / mL) 110  $\mu\text{L}$  を混

合して室温にて 10 分間静置した。混合液 200  $\mu\text{L}$  を 3mL の LB top agar に加え、その後 LB agar 上に播種し 37°C で一晚培養した。翌日、ファージによる溶菌によって形成されるプラーク数をカウントし、EOP を測定して各分離菌株に対する phiSA012 の溶菌活性の強さを比較した。EOP は各分離菌株に対する phiSA012 の PFU/mL を SA003 に対する phiSA012 の PFU/mL で割ることで算出した。各菌株独立した 3 回の試行を実施し、EOP の平均値を算出した。

#### 7) 経時的濁度測定法によるエンドライシンの溶菌活性評価

分離菌株に対するエンドライシン Lys-phiSA012 の溶菌活性は濁度測定法を用いて評価した。溶菌活性評価に用いた分離菌株は LB broth にて  $\text{OD}_{600} = 1.0$  となるまで 37°C で振とう培養させた。各菌液を遠心分離 (2,300  $\times g$ , 4°C, 5 分間) して上清を捨て、半量の 2  $\times$  LB broth にて菌体を再懸濁した。菌液に等量のエンドライシンを加え、波長 595 nm における吸光値をプレートリーダー (Sunrise Rainbow Thermos RC, TECAN Austria GmbH, Salzburg, Austria) にて経時的に測定した。

8) NC/Tnd マウス皮膚病変部に対するファージ及びエンドライシンの塗布実験  
中程度の皮膚炎症状を呈する NC/Tnd マウス (8-10 週齢) を使用して実験を行った。マウスの後背部 2 cm  $\times$  2 cm の領域を剃毛した。剃毛した部位に対してファージ群は phiSA012 ( $1.0 \times 10^9$  PFU/mL) を 200  $\mu\text{L}$ 、エンドライシン群は Lys-phiSA012 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を 200  $\mu\text{L}$ 、Vehicle 群は SM buffer もしくは cleavage buffer 200  $\mu\text{L}$  を滴下した後、ピペットチップの腹の部分で塗布して馴染ませた。塗布処置は 1 日 2 回、12 日間の観察のうち土曜日及び日曜日を除く (6 日目、7 日目) 10 日間実施した。12 日目の午後にイソフルランにて麻酔処置後、心採血を行い、その後頸椎脱臼法にて安楽殺した。血液は凝固させた後、3,000 rpm、4°C、15 分間遠心分離して血清を回収した。また、後背部皮膚を切除し 4% パラホルムアルデヒドに浸漬して組織を固定した。また、AD 様症状を発症しないコントロール群は SPF 環境下で飼育し、後背部への塗布処理は行わなかった。

#### 9) 皮膚炎臨床スコア

皮膚炎臨床スコア (Clinical skin severity score) は 3 日目、7 日目、10 日目、12 日

目に評価した。皮膚炎臨床スコアは痒み、発赤・出血、浮腫、擦過傷・びらん、痂皮形成・乾燥の 5 項目について評価した。症状なし (スコア 0)、軽度 (スコア 1)、中程度 (スコア 2)、重度 (スコア 3) の 4 段階で各項目を評価し、全項目のスコアを足すことによって皮膚炎臨床スコアを算出した[105]。

#### 10) 病理組織学的検査

4%パラホルムアルデヒドにて固定した皮膚病変部組織はその後脱水処理を行い、パラフィンに包埋し、マイクロトームを用いて 4  $\mu\text{m}$  の厚みに薄切した。その後、組織切片はヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-eosin, HE) 染色、または抗 *Staphylococcus* 抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。免疫蛍光染色の際は 0.1% トリプシンにて抗原賦活処理を行い、その後 EzBlock Chemi (アトー株式会社、東京、日本) を用いてブロッッキングを行った。一次抗体はマウス抗 *Staphylococcus* 抗体 (ab37644, Abcam)、二次抗体はヤギ抗マウス抗体 (ab150113, Abcam) を使用し、それぞれ 500 倍、1000 倍の希釈濃度で使用した。蛍光顕微鏡で観察し、それぞれランダムに 5ヶ所の抗 *Staphylococcus* 抗体のシグナル強度を Image J を用いて測定し、平均値を求めて各群との比較を行った。

#### 11) IgE 濃度測定

マウス血清中 IgE 濃度は IgE mouse ELISA kit (invitrogen, USA) を用いて測定した。測定はマイクロプレートリーダー (BioRad, USA) にて 450 nm の波長で検出した。

### 3. 結果

#### 3.1. NC/Tnd マウス皮膚病変部からの菌分離と菌種同定

ファージ療法開始前に NC/Tnd マウスの皮膚病変部スワブを採取し、病変部に存在する菌種の同定を試みた。通常環境下で飼育し中等度の皮膚炎症状を呈した NC/Tnd マウス、または SPF 環境下で飼育し皮膚炎症状を呈していない NC/Tnd マウスの背部からスワブを採取し、計 18 コロニーを採取して 16S rRNA シーケンス解析を実施したところ、全てブドウ球菌属であることがわかった。加えて、*dnaJ* 及び *rpoB* シーケ

ンス解析を実施し、ブドウ球菌の種同定を行った (表 7, 表 8)。すると、いずれの環境下で飼育したマウスにおいても *Staphylococcus nepalensis* が最も多く分離された。通常環境下で飼育され皮膚炎症状を呈しているマウスでは、*S. nepalensis* に次いで *Staphylococcus agnetis* が多く分離され、13 株中 1 株において *Staphylococcus lentus* が分離された。一方、SPF 環境下で飼育され皮膚炎症状を呈していないマウスでは *S. agnetis* は分離されず、*S. lentus* が *S. nepalensis* に次いで多く分離された。

表 7. マウス分離菌株の種同定

strain	derivation of isolates	species	gene for identification
Isolate 1	Non-SPF mice	<i>Staphylococcus agnetis</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i>
Isolate 2	Non-SPF mice	<i>Staphylococcus agnetis</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i>
Isolate 3	Non-SPF mice	<i>Staphylococcus agnetis</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i>
Isolate 4	Non-SPF mice	<i>Staphylococcus agnetis</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i> , <i>rpoB</i>
Isolate 5	Non-SPF mice	<i>Staphylococcus agnetis</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i> , <i>rpoB</i>
Isolate 6	Non-SPF mice	<i>Staphylococcus lentus</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i> , <i>rpoB</i>
Isolate 7	Non-SPF mice	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i> , <i>rpoB</i>
Isolate 8	Non-SPF mice	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i> , <i>rpoB</i>
Isolate 9	Non-SPF mice	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i> , <i>rpoB</i>
Isolate 10	Non-SPF mice	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i>
Isolate 11	Non-SPF mice	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i>
Isolate 12	Non-SPF mice	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i>
Isolate 13	Non-SPF mice	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i>
Isolate 14	SPF mice	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i>
Isolate 15	SPF mice	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i>
Isolate 16	SPF mice	<i>Staphylococcus lentus</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i> , <i>rpoB</i>
Isolate 17	SPF mice	<i>Staphylococcus lentus</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i>
Isolate 18	SPF mice	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	16S rRNA, <i>dnaJ</i>

表 8. 飼育環境の違いによる分離菌種の割合

	Non-SPF mice	SPF mice
<i>S. nepalensis</i>	7/13 (53.8%)	3/5 (60%)
<i>S. agnetis</i>	5/13 (38.5%)	0/5 (0%)
<i>S. lentus</i>	1/13 (7.7%)	2/5 (40%)

3.2. マウス皮膚分離菌株に対するファージ及びエンドライシンの溶菌活性評価  
マウス皮膚から分離されたブドウ球菌株に対してファージ phiSA012 及びエンドライシン Lys-phiSA012 の溶菌活性を評価した。phiSA012 はスポットテストでは全ての菌株に対して溶菌斑を形成したが、Turbid と呼ばれる薄い溶菌斑を形成するもの

も見られた。また、プラークアッセイを実施し他ところ、分離菌 18 株中 13 株は phiSA012 の SA003 に対する溶菌活性の 40~200%程度の溶菌活性を示し、非常によく溶菌することがわかった。一方、残りの 5 株中 3 株 (Isolate 8 (*S. nepalensis*), Isolate 12 (*S. nepalensis*), Isolate 16 (*S. lentus*)) に対してはプラークを全く形成せず、溶菌活性を示さないことがわかった。

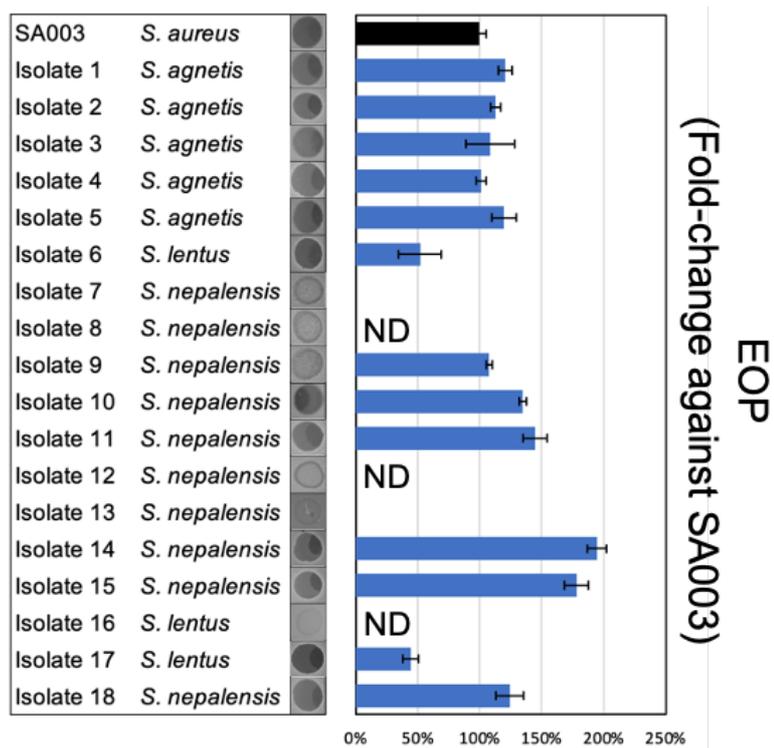
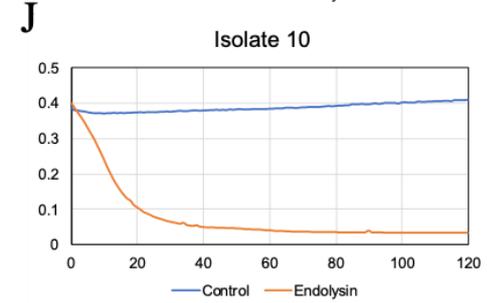
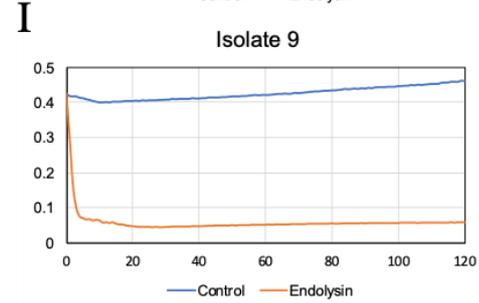
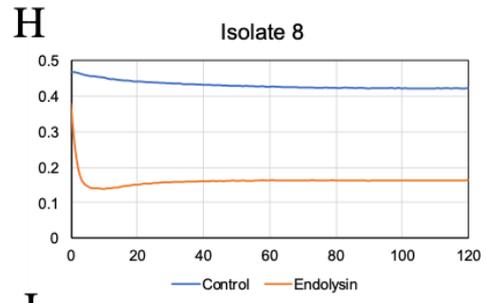
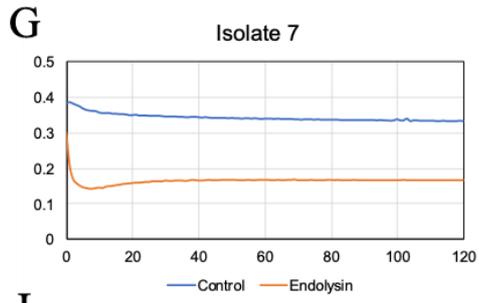
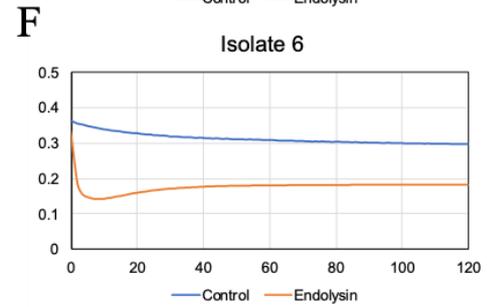
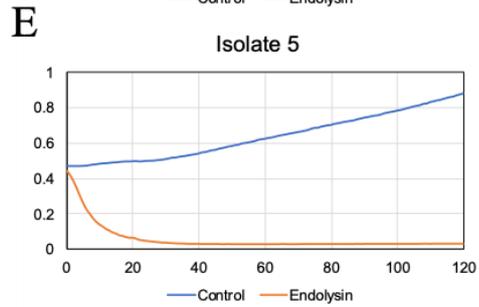
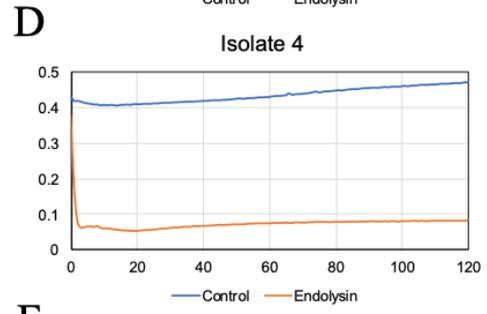
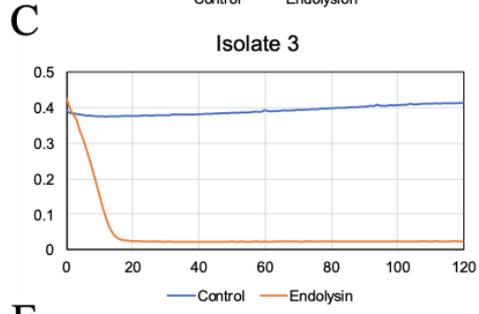
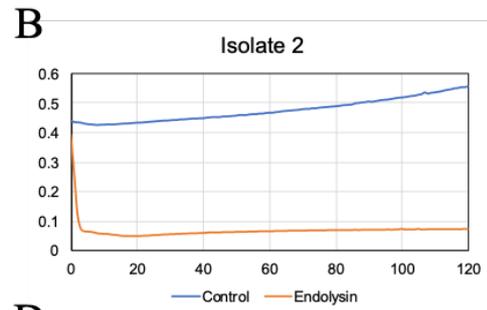
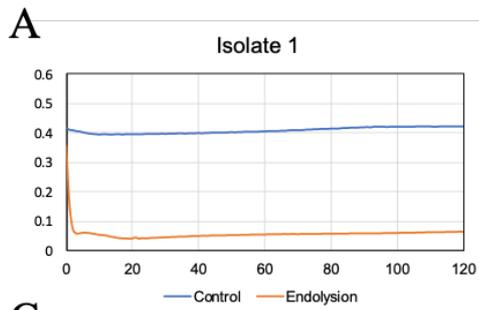


図 17. 分離菌株に対する phiSA012 の溶菌活性評価

マウス皮膚病変部分離菌株に対する phiSA012 の溶菌活性をスポットテスト (写真)、及びプラークアッセイによって評価した。EOP は各菌株に対する PFU をコントロールホストである SA003 に対する PFU で割ることで算出した。プラークアッセイは各菌株で独立した 3 回の試行を実施し、EOP の平均値±SE を示した。

また、エンドライシン Lys-phiSA012 の分離菌株に対する溶菌活性は経時的濁度測定法を用いて評価した (図 18)。すると、18 株中 17 株に対して急速な溶菌活性を示すことがわかった。また、SPF 環境下マウスから分離した Isolate 18 (*S. nepalensis*) に対してはエンドライシンの添加で全く濁度が変化せず、明らかな溶菌活性は認められなかった (図 18R)。



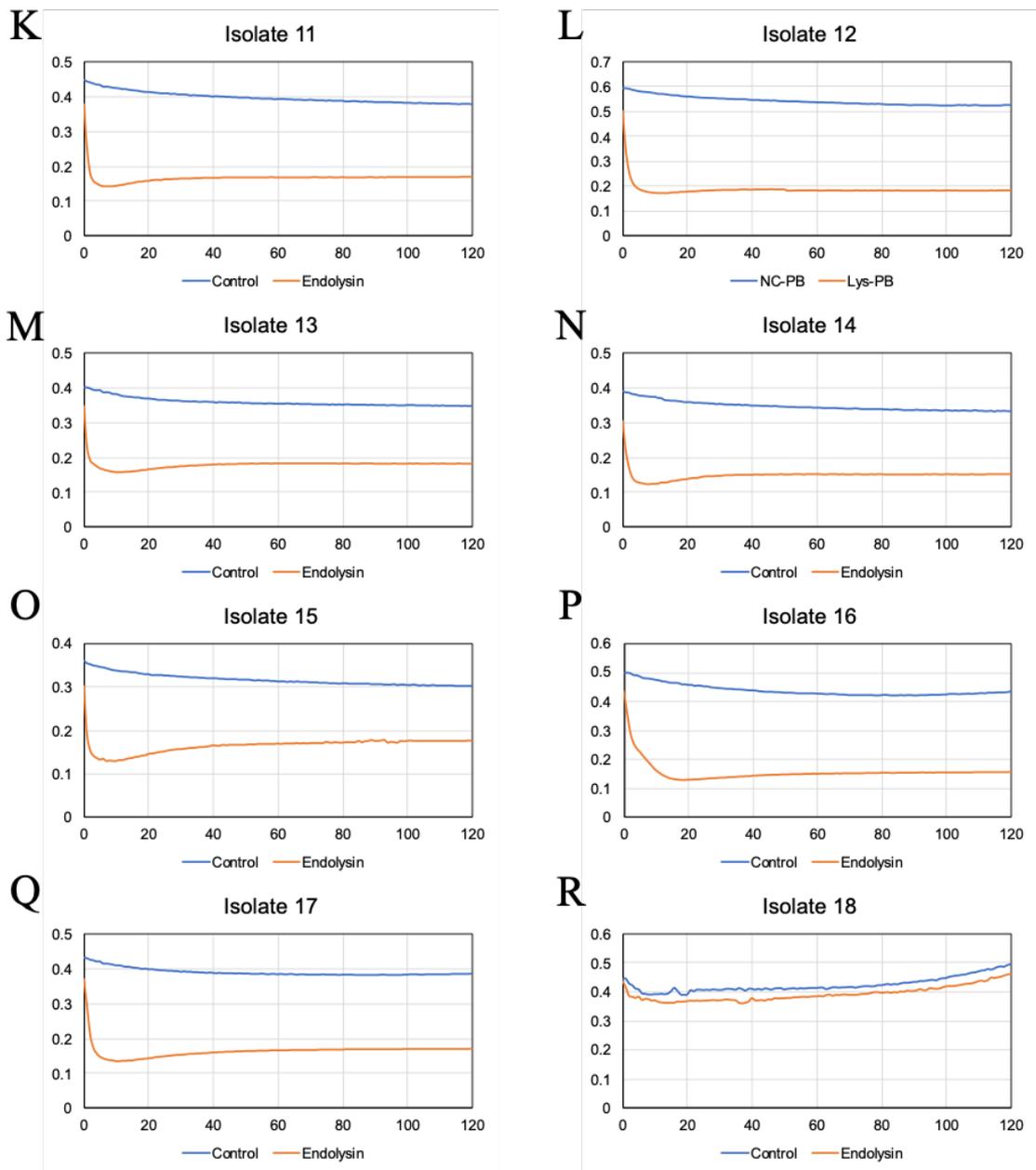


図 18. 分離菌株に対する Lys-phiSA012 に対する溶菌活性評価

マウス皮膚病変部分離菌株に対する Lys-phiSA012 の溶菌活性を経時的濁度測定法によって

評価した。縦軸は波長 595 nm における吸光値 (OD<sub>595</sub>)、横軸は時間 (分) を示す。各菌株に対して 1 回の試行を実施した。

### 3.3. NC/Tnd マウス皮膚病変部に対するファージ及びエンドライシン滴下による治療効果

ファージ phiSA012 及びエンドライシン Lys-phiSA012 は NC/Tnd マウスから分離されたほとんどのブドウ球菌に対して溶菌活性を示すことがわかったため、実際に NC/Tnd マウス皮膚病変部にファージまたはエンドライシンを滴下し、ブドウ球菌を溶菌させることによるアトピー性皮膚炎様症状の改善効果について評価した。ファージ、エンドライシン、及びそれらバッファー (vehicle 群) はマウス背部病変部に 1 日 2 回、12 日間投与した (図 19A)。すると、ファージ投与群において出血や紅斑、浮腫など症状が軽減し、顕著に肉眼的な皮膚炎症状の改善が認められた (図 19B)。一方、エンドライシン投与群においては肉眼的な皮膚炎症状の改善は認められず、vehicle 群と比較しても明らかな差は認められなかった。また、経時的に皮膚炎症状の臨床スコアを評価すると、ファージ投与群では 7 日目程度からスコアが減少し始め、10 日目以降において同時期の vehicle 群、及びファージ投与群の 1 日目のスコアと比較して有意な低値を示した (図 19C)。すなわち、ファージ投与によって症状が徐々に改善されていったことがわかった。一方、肉眼的な症状改善が認められなかったエンドライシン投与群では、その他掻痒性なども改善傾向は認められず、投与開始時の臨床スコアから明らかな変化は認められなかった。また、12 日目にマウスを安楽殺し、皮膚病変部組織切片を作成して HE 染色を行い観察したところ、vehicle 群、及びエンドライシン投与群では真皮層の肥厚が認められ、表層部には主に好中球などの炎症細胞の集簇が認められた (図 19D)。一方、SPF 群、及びファージ投与群では真皮層の肥厚や炎症細胞の集簇はほとんど認められなかった。すなわち、ヒトアトピー性皮膚炎モデルマウスである NC/Tnd マウスに対し、黄色ブドウ球菌溶菌性ファージである phiSA012 を病変部に滴下することで、顕著に皮膚炎症状が改善されることがわかった。一方、*in vitro* ではマウス皮膚病変部より分離したブドウ球菌に対してエンドライシン Lys-phiSA012 は溶菌活性を示したものの、実際にマウス皮膚病変部に滴下しても明らかな皮膚炎症状の改善は認められなかった。

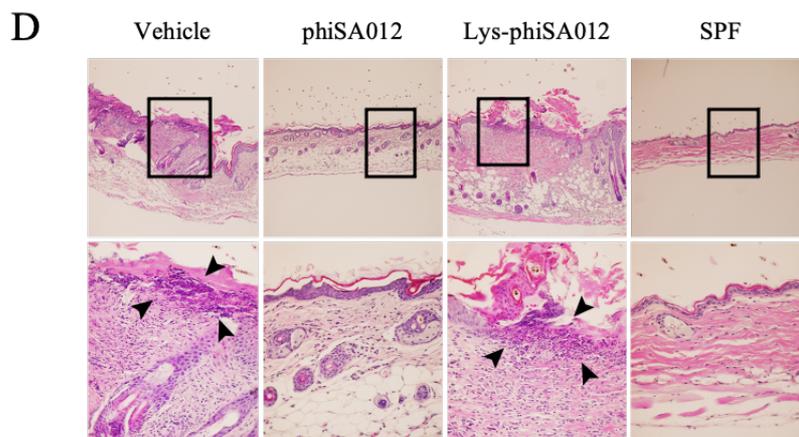
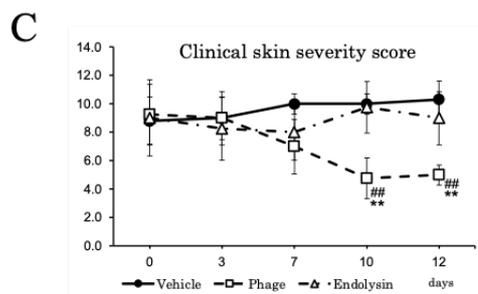
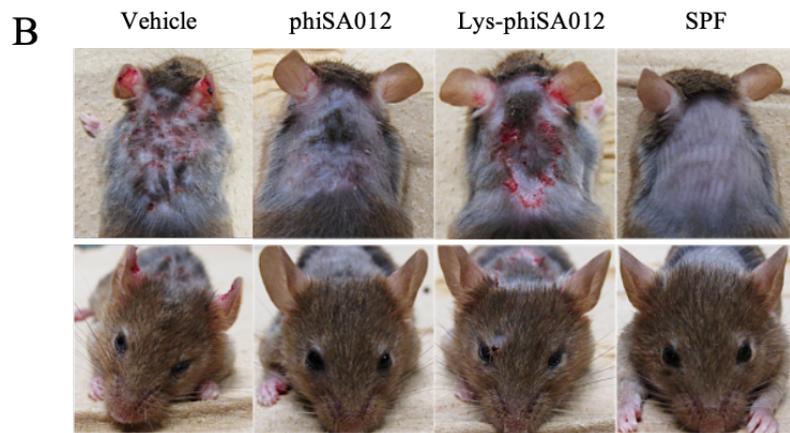
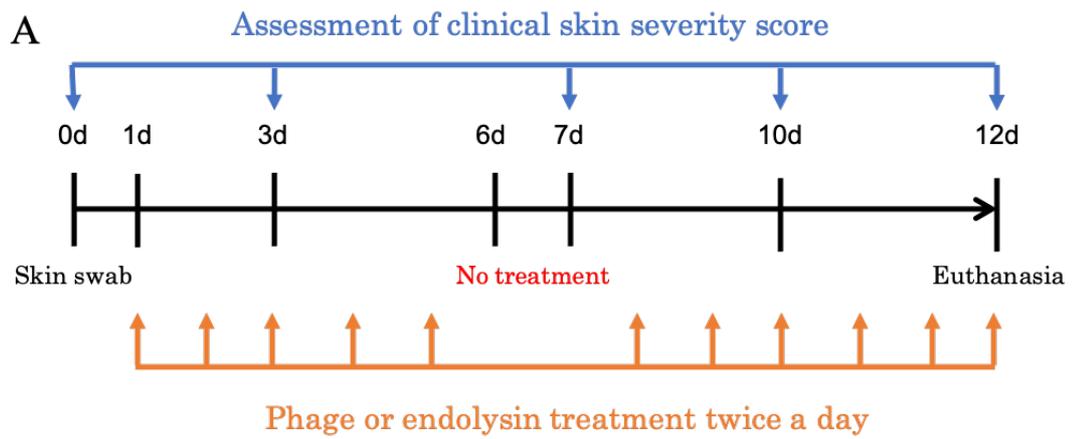


図 19. ファージ及びエンドライシン滴下による皮膚炎症状改善の改善効果

(A) 実験スケジュールを示した。ファージ投与前に病変部からスワブを採取し、菌分離・菌種同定を行った (0d)。12 日間の観察期間中、6 日目、7 日目、及び 12 日目を除き、1 日 2 回 (朝・夕) phiSA012、または Lys-phiSA012 を背部皮膚病変部に滴下した。6 日目、及び 7 日目は滴下処置を行わず、12 日目は朝の処置のみ行った。また、皮膚臨床スコアは滴下処置前、3 日目、7 日目、10 日目、12 日目に評価した。(B) 病変部の肉眼所見。上段は背部病変部、下段は顔面病変部の写真。(C) 処置開始前、3 日目、7 日目、10 日目、12 日目の Vehicle 群、Phage 群、及び Endolysin 群の皮膚臨床スコア。各群マウス 4 頭の臨床スコアの平均値±SE を示した。(D) Vehicle 群、Phage 群、Endolysin 群、SPF 群の背部皮膚組織切片の HE 染色像。上段が弱拡大 (×4.2)、下段が四角で囲んだ範囲の強拡大 (×17) である。矢頭は炎症細胞 (主に好中球) が集簇している範囲を示す。

### 3.4. ファージ及びエンドライシン投与によるマウス皮膚病変部でのブドウ球菌溶菌性評価

phiSA012、及び Lys-phiSA012 を NC/Tnd マウス皮膚病変部に滴下した際に、実際に病変部でブドウ球菌を溶菌させることができているか確認するため、皮膚病変部組織切片を免疫蛍光染色し、病変部に存在するブドウ球菌の検出を試みた (図 20A)。肉眼的、組織学的に皮膚炎症状が認められる vehicle 群では皮膚表層にブドウ球菌のシグナルが強く検出された一方、症状の改善が認められたファージ投与群では、ブドウ球菌はほとんど検出されなかった。また、エンドライシン投与群では肉眼的、組織学的には皮膚炎症状を呈していたものの、免疫蛍光染色ではファージ投与群や SPF 群と同様にほとんどブドウ球菌は検出されなかった。さらに、ブドウ球菌のシグナル強度を Image J を用いて算出して vehicle 群と比較したところ、ファージ投与群、エンドライシン投与群、SPF 群それぞれシグナル強度が有意に低値を示すことがわかった (図 20B)。

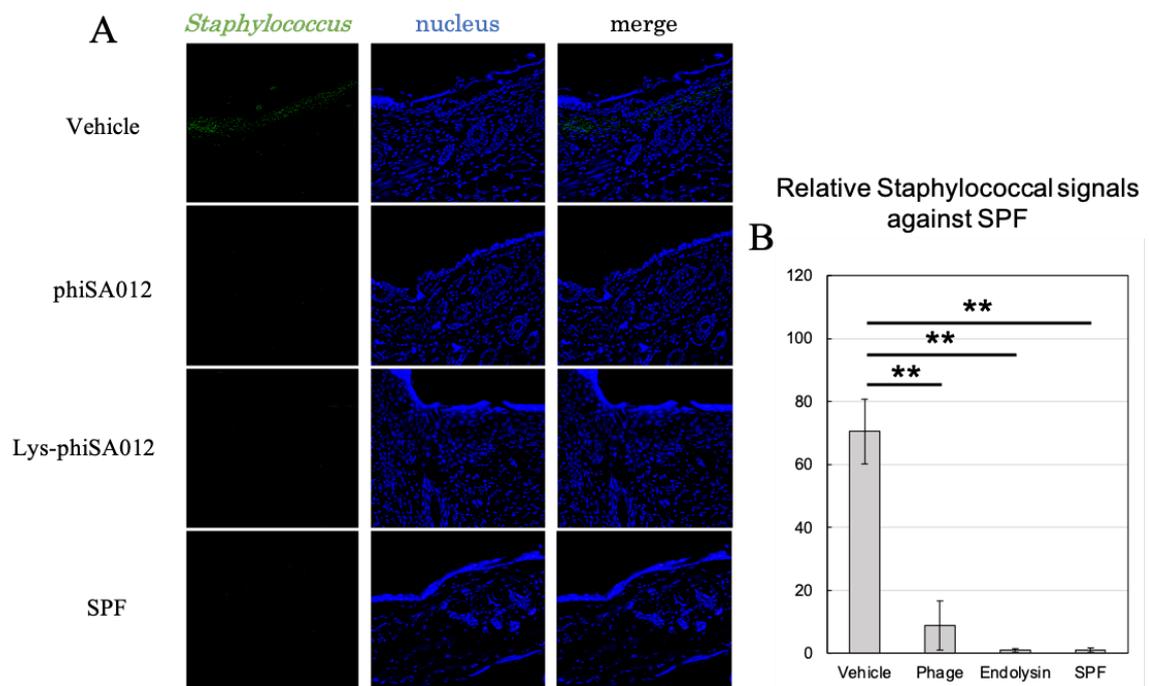


図 20. 皮膚病変部に存在するブドウ球菌の検出

(A) Vehicle 群、Phage 群、Endolysin 群、SPF 群の背部皮膚組織切片の免疫蛍光染色像。抗 *Staphylococcus* 抗体（緑色）、及び核染色（青色）にて染色した。(B) 免疫蛍光染色像のうち、ランダムに 5ヶ所の抗 *Staphylococcus* 抗体（緑色）のシグナル強度を Image J を用いて測定し、SPF 群におけるシグナル強度に対する Fold-change（平均値±SE）で示した。統計処理は Dunnett 検定を行い  $p < 0.05$  で有意差とした (\*\* $p < 0.01$ )。

### 3.5. 血清中 IgE 濃度の測定

NC/Tnd マウス病変部に対してファージ、及びエンドライシンの滴下を 12 日間した後のマウス血清総 IgE 濃度を測定した (図 21)。すると、vehicle 群と比較し、ファージ投与群では有意に IgE 濃度の低値を示した。一方、肉眼的、組織学的に症状の改善が認められなかったエンドライシン投与群では vehicle 群と比較して有意な変化は認められなかった。

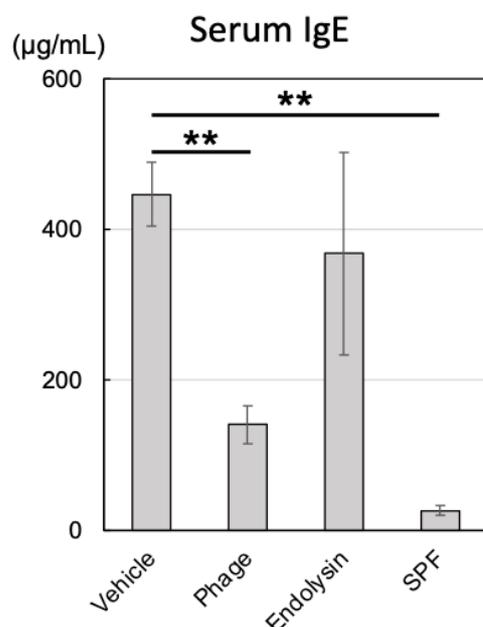


図 21. マウス血清 IgE 濃度

Vehicle 群 (n=6)、Phage 群 (n=3)、Endolysin 群 (n=3)、SPF 群 (n=4) の血清中 IgE 濃度を ELISA にて測定した。それぞれの IgE 濃度は平均値±SE で示し、統計処理は Dunnett 検定を行い  $p < 0.05$  で有意差とした (\*\* $p < 0.01$ )。

#### 4. 考察

皮膚感染症に対するファージ療法の応用を見据えた研究は近年盛んになされている。*P. aeruginosa* 感染を伴う火傷や外耳炎に対してはファージ療法の臨床試験が実施された[179]。また、*S. aureus* の皮膚や軟部組織感染症マウスモデルを用いた実験においてはファージ療法によって一定の効果を示されたと報告されている[25, 129]。近年、AD の症状増悪に細菌叢の乱れと *S. aureus* の増殖が関与していると報告され、病変部の *S. aureus* の排除を目的とした新規治療法の開発が望まれている[32, 86, 115]。ファージは宿主域が限られることから、抗菌薬等と比較した際に細菌叢を乱すことなく標的の細菌のみを排除することが可能であり、まさに AD 治療に最適であると考えた。実際に、アトピー性皮膚炎を併発する魚鱗癬症候群の 1 つ、ネザートン症候群による重度の *S. aureus* の皮膚感染を伴う症例に対して、エリアバ研究所でのファージ療法 (*S. aureus* 溶菌性ファージの局所塗布、及び経口投与)

によって症状が改善したとのケースレポートが報告されている[184]。また、他の研究では薬剤誘発性アトピー性皮膚炎モデルマウスに対して *S. aureus* 溶菌性ファージ SaGU1 と皮膚常在菌の *S. epidermidis* を病変部に塗布することで症状の改善が見られている[152]。そこで、今回の研究では、AD 様症状を自然発症し、また発症に際してブドウ球菌の自然増生が認められる NC/Tnd マウスに対し、*S. aureus* 溶菌性ファージ phiSA012、及びエンドライシン Lys-phiSA012 を病変部に滴下し、症状の改善効果について評価した。

AD 様症状を非発症 (SPF 環境下飼育)、または発症後 (通常環境下飼育) の NC/Tnd マウスの皮膚病変部から分離された細菌は全てブドウ球菌属であった。ヒト AD では病変部にブドウ球菌の中でも *S. aureus* が特に優位に増生してくるのに対し、非発症、及び発症後の NC/Tnd マウスから *S. aureus* は分離されなかった。また、ヒトの健常皮膚に多く常在し、*S. aureus* の増殖を抑制することが知られている *S. epidermidis* も NC/Tnd マウスからは分離されなかった[74, 115]。その一方で、非発症 NC/Tnd マウスからは CoNS の *S. nepalensis* と *S. lentus* が分離され、発症後 NC/Tnd ではその 2 菌種に加え *S. agnetis* が分離された。SPF 環境下飼育の C57BL/6 の常在菌を調べた研究報告によると、*S. aureus* は分離されたものの、*Staphylococcus saprophyticus* や *S. lentus*、*S. nepalensis* などの CoNS がより優位に検出されたことが示されている[165]。ゆえにヒトとイヌの皮膚に常在するブドウ球菌が異なるように (イヌでは *S. pseudintermedius* が常在)、マウスの皮膚に存在するブドウ球菌もヒトと異なることが示唆される。また、AD 様症状発症後の NC/Tnd マウスのみから分離された *S. agnetis* は潜在性牛乳房炎から初めて分離された細菌であり、近年では特にブロイラーにおいて骨髓炎を伴う細菌性軟骨壊死による破行、敗血症、さらには弁膜心内膜炎を起こす病原体として知られている[161, 163]。また、*S. agnetis* は豚滲出性皮膚炎 (スス病) の原因菌として知られる *Staphylococcus hyicus* や *Staphylococcus chromogenes* に非常に近縁であり、表皮剥離毒素 (Exfoliative toxins, ETs) などの病原性因子を保有することが報告されている[1, 163]。マウスの皮膚から *S. agnetis* が分離された報告ないものの、以上の報告より、AD 様症状発症後の NC/Tnd マウスから分離された *S. agnetis* はマウスにおいて皮膚炎症状の増悪に強く関与していることが示唆される。

NC/Tnd マウスから分離された *S. agnetis*、*S. nepalensis*、*S. lentus* の計

18株に対してファージ phiSA012 の溶菌活性を評価したところ、13株の分離菌に対し SA003 と同程度の溶菌活性を示した。特に、AD 様症状発症後の NC/Tnd マウスのみから分離され、皮膚炎症状との関連が示唆される *S. agnetis* の5株全てに対して、phiSA012 は溶菌活性を示した。また、第1章において *S. lentus* の JCM 基準株 (JCM 2426) に対して phiSA012 は溶菌活性を示さなかったものの、今回の NC/Tnd マウスから分離された *S. lentus* 3株中2株に対して溶菌活性が認められた。また、同様に分離菌株に対するエンドライシン Lys-phiSA012 の溶菌活性を評価したところ、Isolate 18 (*S. nepalensis*) を除く全ての菌株に対して急速な溶菌活性を示したことから、第2章における実験と一致し、ファージの効かないブドウ球菌であってもペンタグリシン架橋構造を一貫して持つため、Lys-phiSA012 は広く溶菌活性を示すことがわかった。また、ブドウ球菌であるにもかかわらず Lys-phiSA012 の溶菌活性に耐性を見せた Isolate 18 は第2章で言及したように、WTA の量、もしくは構造の違いによってエンドライシンのペプチドグリカンへアクセスが阻害されているのかもしれない。

phiSA012 及び Lys-phiSA012 のいずれにおいても NC/Tnd マウス皮膚に存在するブドウ球菌を排除することができ、皮膚炎症状の改善効果が期待された。実際に、phiSA012 の NC/Tnd マウス皮膚病変部への滴下は AD 様皮膚炎症状を劇的に改善することが今回の実験で示された一方、予想に反して Lys-phiSA012 の滴下は皮膚炎症状を改善させることはなかった。皮膚病理組織切片の HE 染色像においても、phiSA012 を滴下したマウスでは真皮の肥厚や好中球の集簇が見られなかった一方、Lys-phiSA012 を滴下したマウスではこれら炎症所見が認められた。さらにマウス血清中 IgE 濃度も皮膚炎症状に相関し、ファージ投与群では低値を示したのに対してエンドライシン投与群では Vehicle 群と同程度であることがわかった。しかしながら、皮膚病変部におけるブドウ球菌の存在を免疫蛍光染色によって評価したところ、ファージ投与群、及びエンドライシン投与群のいずれにおいてもほとんどブドウ球菌は検出されなかった。従って、phiSA012、及び Lys-phiSA012 は NC/Tnd マウスの皮膚病変部に存在するブドウ球菌を排除することができ、ファージ投与群では症状の改善が見られた一方、エンドライシン投与群では症状の改善が認められなかったことがわかる。エンドライシン投与群においてブドウ球菌排除に伴う AD 様症状の改善が認められなかった明確な原因は不明であるが、エンドライ

シンの急速かつ短時間の溶菌活性が影響しているかもしれない。エンドライシンは投与直後からその酵素活性により急速な溶菌作用を示すが、ブドウ球菌が溶菌する際に菌体内に含まれる毒素などの病原性因子が多数放出された可能性が考えられる。また、酵素であるエンドライシンは熱によって変性しやすくその効果も一時的なものである。実際に Lys-phiSA012 は急速な溶菌活性を示すものの、溶菌されず生き残ったごく僅かな細菌が酵素失活後に再増殖することを確認している (data not shown)。そのため、サンプリングした際の病理組織切片にブドウ球菌は認められなかったものの、エンドライシン滴下期間中は病変部においてブドウ球菌が溶菌と増殖を繰り返していた可能性が考えられる。上述したように、*S. agnetis* は表皮剥離毒素などの病原性因子を有することから[1]、Lys-phiSA012 による繰り返す溶菌とその都度毒素成分の放出が起り、エンドライシン投与群では皮膚炎症状が持続したと考えられる。一方で、ファージは宿主菌がファージ耐性化しない限り、宿主菌への感染とファージ粒子の増殖が繰り返され、常に細菌数を低くコントロールすることが可能であるため、NC/Tnd マウスに対する phiSA012 の滴下は皮膚炎症状を改善させることができたと考えられる。

ファージ phiSA012 による NC/Tnd マウスに対する劇的な皮膚炎症状の改善効果はヒト AD に対する治療効果を非常に期待させるものであった。しかし、ヒト AD への phiSA012 の適用を考える上で必須な検討事項も存在する。今回用いた NC/Tnd マウスからはヒトの AD 症状の増悪に強く関連する *S. aureus* が分離されなかったことから、*S. aureus* 感染を伴う皮膚炎モデルに対する溶菌活性と症状改善効果の検証は必須である。そのため、*S. aureus* の自然増生と AD 様症状の自然発症が認められる遺伝子改変マウス *Adam17<sup>ΔSox9</sup>*[86]に対して phiSA012 を病変部に塗布した際の治療効果について現在調査中である。また、ヒト AD に対するファージ療法を展開する上では、健常なヒトの皮膚において *S. aureus* の増殖を抑制していると言われる善良なブドウ球菌をファージによって溶菌させないことが重要であると考えられる。CoNS である *S. epidermidis* や *Staphylococcus caprae*、*S. taphylococcus hominis* は細胞密度を感知して菌種間でクロストークするシステム、クオラムセンシングや抗菌ペプチドの産生を介して同属の *S. aureus* の増殖を抑制していることが報告されている[115, 125]。そのため、phiSA012 がこれら善良な働きを有するブドウ球菌を溶菌することなく、*S. aureus* にのみ溶菌活性を有する

かは今後検証が必要である。一方、今回の実験系においてエンドライシン Lys-phiSA012 は NC/Tnd マウスの皮膚炎症状を改善させることはできなかった。しかしながら、Lys-phiSA012 に相同なエンドライシン Lys-phiGH15 は、抗炎症作用や *S. aureus* の  $\alpha$ -溶血毒素産生阻害作用を持つアピゲニンと呼ばれる植物フラボノイドと混合して軟膏にすることで、MRSA 皮膚感染症モデルマウスの菌数を減少させ、炎症性サイトカインのレベルを下げたとの報告がなされている[30]。従って、Lys-phiSA012 においても抗菌薬やその他抗炎症化合物などとの併用、最適化された投与基剤、タンパク質のドメイン組み換えなどによる酵素活性の安定化・持続時間の延長、またはエンドライシンに最適な疾患に対する適用を考慮することで、十分に応用可能であると考えている。

## 5. 小括

ヒト AD は先天的な皮膚バリア障害を伴う慢性炎症性疾患であり、病変部では皮膚細菌叢の乱れ (dysbiosis) と *S. aureus* の優位な増殖が症状の増悪に相関することが報告されている。そこで、本研究ではアトピー性皮膚炎自然発症マウスモデル NC/Tnd マウスを使用し、ブドウ球菌を特異的に排除する目的でファージ phiSA012、及びエンドライシン Lys-phiSA012 を病変部に滴下することによる治療効果について評価した。NC/Tnd マウスの皮膚から *S. aureus* は検出されず、*S. nepalensis* や *S. lentus* といった CoNS 多く分離され、皮膚炎を発症したマウスからのみ *S. agnetis* が検出された。これらマウスから分離されたブドウ球菌に対し、phiSA012 及び Lys-phiSA012 は *in vitro* において広い溶菌活性を示すことがわかった。また AD 様症状発症後の NC/Tnd マウスに phiSA012 を滴下したところ、肉眼的な皮膚炎症状が顕著に改善し、組織学的にも好中球などの炎症性細胞の浸潤やブドウ球菌はほとんど検出されず、血清中 IgE 濃度は低値を示した。一方、Lys-phiSA012 を滴下した群では病変部組織にブドウ球菌は検出されなかったものの、肉眼的・組織学的に皮膚炎症状の改善は認められず、IgE 濃度も高値を示した。以上のことより、NC/Tnd マウスにおいては *S. agnetis* が皮膚炎症状の増悪に関与している可能性が高く、phiSA012 は皮膚病変部において常に細菌数を低くコントロールしたことによって劇的な症状の改善効果が見られと考えられる。これら結果は *S. aureus* を標的としたヒト AD へのフ

ファージ療法の治療効果を提示するだけでなく、ファージの局所投与は皮膚細菌感染症に対して非常に有効な治療戦略である可能性を示唆する結果となった。

## 第IV章 イヌ緑膿菌性外耳炎に対するファージカクテル療法の実施と 治療過程に出現したファージ耐性菌の解析について

### 1. 序文

イヌの外耳炎は最も発生が多い疾患の1つであり、その罹患率は約20%にも上るとされている[2, 33]。アトピー性皮膚炎や食物アレルギーといったアレルギー疾患、ミミダニなどの寄生虫感染、異物、免疫介在性疾患、内分泌疾患などがイヌ外耳炎の主な原因とされている[9]。また、外耳炎が起こった結果として二次的に細菌や真菌の感染が多く見られる[20]。真菌であるマラセチアは外耳炎の罹患部から実に $\leq 57.1\%$ 見つかったとの報告がある[22]。また、イヌの皮膚常在菌として知られる *S. pseudintermedius* は外耳炎で最も分離される細菌である[103]。慢性外耳炎では *P. aeruginosa* が最もよく分離され、その割合は約12%とされる[85]。ブドウ球菌の薬剤耐性化と同様に、*P. aeruginosa* は獣医領域において薬剤耐性化及び多剤耐性化が深刻な細菌の1種であり、抗菌薬の選択が困難となるケースが多い[98, 106]。また、*P. aeruginosa* はバイオフィルムを形成することが知られており、イヌの外耳炎から分離された20株の *P. aeruginosa* のうち、実に19株が *in vitro* でバイオフィルムを形成したという報告がなされている[29]。抗菌薬はバイオフィルム中に存在する細菌に対して効率的に作用することができないことから、バイオフィルムを形成する細菌に対しては抗菌薬のMIC値が増加することが知られている[132]。従って、*P. aeruginosa* の感染を伴う外耳炎の治療は非常に困難であり、一時的に症状の改善が見られても再発し、慢性化するケースが多い。また、外耳炎が慢性化することで中耳や内耳への炎症の波及[10, 110]、また耳道内の病理組織学的変化が不可逆的な場合などには耳道切開術や耳道切除術といった外科手術が必要となる場合がある[10]。

ヒト医療におけるファージ療法は、古くは東欧諸国で実施されており、近年では“パターソン症例”と呼ばれる米国初のファージ療法成功例を皮切りに、欧米諸国においてもケースレポートや臨床試験の実施と報告が盛んになされるようになってきている[65]。一方、小動物獣医療においては世界的にもファージ療法の研究、及び臨床試験などの報告はほとんどない状況である。筆者が知る限り、小動物獣医療におけるファージ療法実施の報告は全て *P. aeruginosa* の感染を伴うイヌ外耳炎に対す

る適用であり、いずれにおいてもある一定の改善効果が見られたと報告されている[64, 104]。また、イヌの外耳炎に対して改善のみられたファージカクテルを用いて、ヒトの *P. aeruginosa* の感染を伴う慢性耳炎に対する臨床試験を実施したところ、安全性及び臨床症状の改善効果が認められたとの報告がなされている[179]。このように *P. aeruginosa* 感染を伴う外耳炎に対しては、ファージ療法がある一定の症状改善が見込まれるとする報告がなされるようになってきた。

今回、RGU-AMC に *P. aeruginosa* 感染を伴う難治性慢性外耳炎に罹患したイヌが来院した。RGU-AMC においても当初は耳道洗浄、ステロイドを用いた抗炎症治療、局所的・全身的な抗菌薬投与などを実施し、一時的な改善効果は見られたものの、その後再発が認められた。そこで、臨床試験として本症例に対しファージ療法の実施を決定した。本試験では主に耳道洗浄とファージカクテル液の投与による治療を行うとともに、ファージ感受性をモニタリングして常に最適なファージの組み合わせとなるよう設計して行った。また、治療過程においてファージ耐性菌と見られる *P. aeruginosa* の出現が認められたため、治療前に分離された *P. aeruginosa* の全ゲノム配列を決定したのち、ファージ耐性菌のゲノム解析を実施してファージ耐性に寄与した遺伝子の特定を試み、さらにファージ耐性化に伴う細菌の表現型変化について解析を行った。

## 2. 材料と方法

### 1) 培地

Luria-Bertani (LB) broth は、1.0 % NaCl、1.0 % Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、0.5 % Bact™ yeast extract (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) を混合して作成した。

LB agar は 1.0 % NaCl、1.0 % Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、0.5 % Bact™ yeast extract (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、1.5 % agar (富士フィルム和光純薬工業 (株)、大阪、日本)を混合して作成した。

LB top agar は 1.0 % NaCl、1.0 % Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、0.5 % yeast extract (Becton, Dickinson and Company,

New Jersey, USA)、0.5 % アガロース ME (岩井化学薬品 (株)、東京、日本) を混合して作成した。

## 2) ファージ療法被検動物 (犬) の基本情報

被検動物はイヌ (雑種、去勢雄、2008 年 3 月 10 日生) であり、ファージ療法実施時は 13 歳であった。2019 年 7 月に RGU-AMC を受診しており、その際は眼科診療科にてぶどう膜炎、老齢性白内障の診断治療を受けていた。外耳炎としての RGU-AMC の受診は 2020 年 12 月が初めてであった。2020 年 9 月末頃より外耳炎症状が認められ、かかりつけ動物病院にてセフェム系抗菌薬・フルオロキノロン系抗菌薬の内服、クロラムフェニコールの点耳薬等にて治療するも再発が認められ、RGU-AMC を受診した。RGU-AMC では当初、Tris-EDTA による耳道洗浄、ステロイドの局所・全身投与、フルオロキノロン系抗菌薬の局所・全身投与、アレルギー療法食の処方などで一時的に症状の改善は見られたものの、すぐに外耳炎の再発を認めた。稟告では元気・食欲に問題はなく、右耳以外に全身的な痒みなどは認められないとの報告だった。

## 3) 使用したファージ、及び新規ファージの分離

臨床試験において使用したファージを表 9 に示す。ファージ  $\Phi$ NK-1、 $\Phi$ LP、 $\Phi$ LC、 $\Phi$ S30-1、 $\Phi$ S30-2、 $\Phi$ S30-3 は下水処理場等の汚水を用いて今回新たに分離した。宿主菌として、被検動物がファージ療法を開始する以前に、外耳炎病変部スワブを採取して単一コロニーを分離した緑膿菌、PASz を使用した。宿主菌 PASz と汚水サンプルを混合させ、二重平板法 (Double layer agar plating method, DLA) を用いてプラークを検出した[160]。単一プラークを採取して単一ファージを分離した後、DLA 法、もしくは宿主菌と液体共培養することでファージを増幅させた。増幅させたファージはその後超遠心分離 (詳細は下記) して精製し、電子顕微鏡を用いて形態観察を行った。400 メッシュのグリットにコロジオン膜を圧着させ、膜表面にカーボン蒸着を行った後にイオンスプッター (JEOL, JFC-1100) にてグロー放電を行い親水化した。ファージ懸濁液 (10~20  $\mu$ L) を親水化処理後のグリッド上に載せて 2-3 分間静置して膜表面に試料を吸着させた。ろ紙を用いて過剰の溶液を吸い取り、PBS 等の溶媒で洗浄して余分な水分を再度ろ紙で吸い取った。その後、2%酢酸ウラン 2~3 滴を滴下し、10 秒ほど静置した後にろ紙で吸い取り乾燥させて電子顕微鏡用観察試料とした。観

察は透過型電子顕微鏡 (HT7700, Hitachi) を用いて加速電圧 80 kV にて行った。また、ΦR18 は当研究室にて以前分離し[49]、ΦPA02 は東京工業大学丹治研究室から供与していただいた[123]。

表 9. ファージ療法に使用したファージカクテル

Cocktail	Contain	Titer (PFU/mL)	Host bacteria	Dilution	Duration	Reference	Accession number
MIX1	ΦNK-1	2.5×10 <sup>9</sup>	PASz	100-fold dilution by saline	Day 1 · Day 7	This study	LC102729
	ΦLP	2.5×10 <sup>9</sup>	PASz			This study	
	ΦLC	2.5×10 <sup>9</sup>	PASz			This study	
	ΦR18	2.5×10 <sup>9</sup>	Pa18			Furusawa et al. [49]	
MIX2	ΦNK-1	3.3×10 <sup>9</sup>	PASz	10-fold dilution by saline	Day 8 (PM) · Day 13 (AM)	This study	
	ΦS30-1	4.3×10 <sup>11</sup>	PASz			This study	
	ΦS30-2+ΦS30-3	1.6×10 <sup>10</sup>	PASz			This study	
MIX2+PA02	ΦNK-1	3.3×10 <sup>9</sup>	PASz	10-fold dilution by saline	Day 13 (PM) · Day 21	This study	AP019418
	ΦS30-1	4.3×10 <sup>11</sup>	PASz			This study	
	ΦS30-2+ΦS30-3	1.6×10 <sup>10</sup>	PASz			This study	
	ΦPA02	1.5×10 <sup>9</sup>	PA01			Ong et al. [122]	

#### 4) ファージの精製

ファージ液は CsCl 密度勾配超遠心 ( $R_{max}$  111,000×g,  $R_{av}$  81,900×g, 4°C、1 時間) によって精製した[160]。超遠心産物はポア径 100 kDa の限外ろ過アミコンフィルター (Merck, Germany) を用いて溶媒を CsCl から SM buffer へと置換させた。さらにエンドトキシンアフィニティーカラム EndoTrap HD (LIONEX, Germany) を用いてファージ液中に含まれるエンドトキシンを除去した。その後、ファージ液中に含まれるエンドトキシン量は EndoLISA (Hyglos, Germany) を用いて定量し、生体にも問題ないレベルであることを確認した。ファージ液は 0.2 μm フィルターを用いて滅菌処理を行い、使用するまで 4°C にて保存した。使用時は無菌的に表の通りにファージカクテルを作製し、無菌的に生理食塩水を用いて 10 倍、または 100 倍に希釈して使用した。

#### 5) 臨床試験の実施内容

ファージ療法の臨床試験実施については RGU-AMC 運営委員会にて協議の上、承認された (RGU-AMC 2020-01)。また、被検動物のオーナーに治療方針等を説明し、インフォームドコンセントを得られた後にファージ療法を実施した。臨床試験は全て RGU-AMC にて行われた。ファージ投与期間中、被検動物は隔離入院室にて隔離処置

し、緑膿菌及び投与ファージが外部に拡散することを防ぎながら処置を行った。臨床試験実施スケジュールは図 22 に示す。術前検査として、入院初日（ファージ投与開始 1 日前）に身体検査、血液検査、麻酔下画像検査を行った。ファージ投与を含む耳洗浄処置は、最初に常温の生理食塩水 10 mL で外耳道内を洗浄し、その後希釈ファージカクテル液 1 mL を外耳道内に投与して 2~3 分浸漬させた。投与 1 日目~16 日目までは基本朝夕の 2 回、生理食塩水による耳洗浄とその後のファージ投与を行った。17~21 日目は生理食塩水による耳洗浄は 1 日 2 回実施し、ファージ投与は朝のみの 1 日 1 回実施した。また、投与 8 日目には低用量デキサメタゾン抑制試験（Low dose dexamethasone suppression test, LDDST）を実施したため、朝の耳洗浄、及びファージ投与は実施しなかった。また、投与 13 日目には術前検査にて右耳水平耳道内に発見された腫瘤性病変を麻酔下にて硬性内視鏡を用いて切除し、病変部組織は病理検査に提出した。入院治療中、1 日 2 回耳洗浄処置前に一般身体検査を実施し、また適宜血液検査を実施してファージ投与による副作用の有無について評価した。また、入院治療中は抗菌薬、及び抗炎症薬など外耳炎の症状改善に影響があると思われる薬剤の投与は一切行わなかった。ファージ投与 21 日目に被検動物は退院し、点耳薬としてオフロキサシン、ケトコナゾールおよびトリムシノロンアセトニドの合剤である犬外耳炎治療薬（ウェルメイト L3 ; Meiji Seika ファルマ、東京、日本）を 1 日 1 回で処方し、退院後 13 日目（ファージ投与初回投与から 34 日目）に再診した。

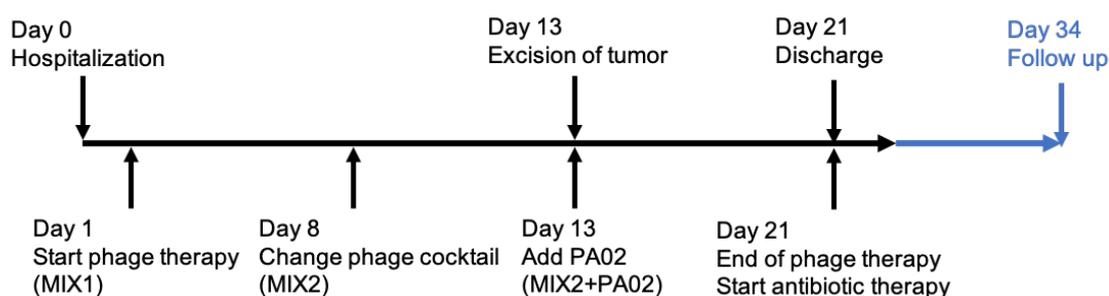


図 22. ファージ療法臨床試験の実施スケジュール

被検動物はファージ療法開始前日に入院し（Day 0）、翌日からファージカクテル MIX1 によるファージ療法を開始した（Day1）。Day 8 にファージカクテルを MIX2 へ変更し、治療を継続した。Day 13 には耳道内の腫瘤性病変を摘出し、その後ファージカクテルを MIX2+PA02 へ変更し治療を行なった。Day 21 に被検動物はファージ療法を終了し、退院した。退院時に

は抗菌薬の点耳薬（ウェルメイト L3）を処方し、Day 34 に再診した。

#### 6) 画像検査

画像検査として RGU-AMC にてレントゲン検査、麻酔下 X 線コンピュータ断層撮影（Computed Tomography, CT）検査、麻酔下耳道内内視鏡検査を実施した。

#### 7) 血液検査及び血清生化学検査

血液検査および血清生化学検査は全て富士フィルム VET システムズ（RGU-AMC ブランチラボ）にて実施した。

#### 8) 分離細菌の菌種同定

ファージ投与前日、及びファージ投与期間中は 1 日 1 回、耳道洗浄前に綿棒を用いて外耳道内のスワブを採取し、1 mL の PBS に懸濁した。菌懸濁液は LB agar に画線塗抹、または PBS で適宜希釈して 10  $\mu$ L を LB agar に滴下してコンラージ棒で播種した。37°C、一晩培養し、単一コロニーをいくつか採取し、MALDI-TOF MS を用いた Biotyper にて菌種同定した。菌種同定は酪農学園大学獣医細菌学ユニット村田講師に依頼した。

#### 9) 分離菌株に対するファージ感受性モニタリング

分離細菌の菌種同定を行う際に画線塗抹した LB agar から単一コロニーをピックし、LB broth を用いて 37°C、180 rpm にて一晩振とう培養した。翌日、菌液を LB broth で 100 倍希釈し、菌液 90  $\mu$ L とファージ療法に使用したファージカクテル 10  $\mu$ L を混合し、波長 590 nm における吸光値をプレートリーダー（TECAN Austria GmbH, Salzburg, Austria）を用いて経時的に測定した。

#### 10) 細菌叢解析

ファージ療法開始前日、初回ファージ投与後 4 日目、17 日目、21 日目、34 日目において、メタフロキパー（株式会社テクノスルガ・ラボ、静岡、日本）を用いて耳道内のスワブを採取した。DNA 抽出、ライブラリー作製、シーケンシング解析は株式会社生物技研に依頼した。Shake Master Neo（株式会社バイオメディカルサイエン

ス、東京、日本)にて細胞を破碎し、DNAを抽出した。16S rRNA V3/V4 領域をターゲットとした 2-step tailed PCR 法 (使用プライマーは表 10 に示す) を用いてライブラリーを作製し、Miseq システム (Illumina, San Diego, USA) を用いて 2×300 bp の条件でシーケンシングを実施した。FASTX-Toolkit (ver 0.0.14) を用いて得られたリード配列の読み始めが使用したプライマーと完全一致するリード配列のみ抽出した。FLASH (ver 1.2.11) を用いてペアエンドリードを結合した。Qiime2 (ver 2021.4) [18]を用いて代表配列と OTU 表を出力した。Qiime2 の feature-classifier プラグインを用いて取得した代表配列と Greengene (ver 13\_8) の 97% OTU を比較し系統推定した。

表 10. ライブラリー作製に用いたプライマー配列

Primers	Sequences
1st-341f_MIX	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-NNNNN-CCTACGGGNGGCWGCAG
1st-805r_MIX	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-NNNNN-GACTACHVGGGTATCTAATCC
2ndF	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-Index2-ACACTCTTTCCCTACACGACGC
2ndR	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-Index1-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTG

#### 11) ファージ治療前の分離菌株全ゲノム配列の決定

被検動物から分離した緑膿菌 PASz を LB broth にて 37°C、180 rpm で一晩振とう培養した。GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich, USA) を用いてゲノム DNA を抽出・精製した。DNA シーケンス解析は株式会社生物技研に委託した。MGIEasy FS DNA Library Prep Set (MGI, China)と MGISP960 (MGI, China) を用いてライブラリーを作製した後、次世代シーケンサーDNBSEQ-G400 (MGI, China) を用いて 2×200 bp の条件でシーケンシングし、ショートリード配列を取得した。また、Ligation Sequence Kit (Oxford Nanopore Technologies, UK) を用いてライブラリー調整し、GridION と R9.4.1 フローセルを用いてシーケンシングし、ロングリード配列を取得した。ショートリード配列は Cutadapt (ver 2.7) を用いてアダプター配列を除去し、Seqkit (ver 0.11.0) を用いて約 350 万リードペアの配列をサンプリングした。さらに、Sickle (ver 1.33) を用いて、クオリティ値 20 未満の塩基を取り除き、127 塩基未満になったリードとそのペアリードを破棄した。一方、ロングリード配列は Porechop (ver 0.2.3) を用いてアダプター配列を除去し、Filtlong (ver 0.2.0) を用いて 1000 塩基以下のリードを削除した。その後、Unicycler (ver 0.4.7)

のデフォルト条件でショートリード配列とロングリード配列をハイブリッドアセンブリした。Bandage (ver 0.8.1) を用いてアセンブルされたコンティググラフの結果を確認し、CheckM (ver 1.1.2) を用いてアセンブルされたゲノムデータの完全性を確認した。

## 12) ファージ耐性菌における変異遺伝子の検出

ファージ療法開始後 7 日目に採取したスワブを LB agar に画線塗抹し、37°C、一晩培養した後に検出されたコロニーをファージ耐性菌とした (PASz\_d7mt)。ファージ耐性はスポットテスト、及び濁度測定法を用いて評価した。単一コロニーをピックし、LB broth にて 37°C、一晩振とう培養した。GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich, USA) を用いてゲノム DNA を抽出・精製した。DNA シーケンス解析は株式会社生物技研に委託した。MGIEasy FS DNA Library Prep Set (MGI, China) と MGISP960 (MGI, China) を用いてライブラリーを作製した後、次世代シーケンサー DNBSEQ-G400 (MGI, China) を用いて 2×200 bp の条件でシーケンシングし、ショートリード配列を取得した。得られたリードは Trimmomatic (ver 0.3.9) を用いてアダプター配列、及び低品質リードを除去したのち、BWA (ver 0.1.17) を用いて PASz のゲノム配列にマッピングした。snippy (ver 4.6.0) を用いて一塩基多型 (Single nucleotide variant, SNV) や挿入/欠失 (Insertion/ deletion, Indel) を検出した。大規模な Indel は snippy で検出できないため、CLC Genomics Workbench (Qiagen, Germany)、及び Integrative Genome Viewer (IGV) [138] を用いてマッピング状況を目視で確認して検出した。

## 13) ファージ耐性菌の運動性評価

Swimming assay、及び Twitching assay は既報を参考に一部変更して実施した[83]。Swimming assay は LB broth にて 37°C、一晩培養した被検菌を新しい LB broth へ Sub-culture し、OD<sub>600</sub> ≒ 1.0 となるまで 37°C で振とう培養した。Swimming assay に用いる培地は試験直前に LB 0.25% agar をシャーレに 10 mL 入れ、室温にて 1 時間半静置し固形化させた。菌液 2 µL を LB agar の中心に滴下し、37°C で 16 時間培養した。Twitching assay は被検菌を前日に LB agar に画線塗抹し、翌日単一コロニーを P10 ピペットチップでピックし、LB 1% agar の中心に突き刺した。37°C で

24時間培養した後、培地を丁寧に除去し、1% クリスタルバイオレットで30分染色した後、染色された範囲の直径を測定した。

### 3. 結果

#### 3.1. 臨床試験に用いたファージ、及びファージ精製

今回、PASz 溶菌性ファージとして $\Phi$ NK-1、 $\Phi$ LP、 $\Phi$ LC、 $\Phi$ R18、 $\Phi$ S30-1、 $\Phi$ S30-2、 $\Phi$ S30-3を新規ファージとして分離し、また、当研究室保有の $\Phi$ R18、東京工業大学丹治研究室より提供された $\Phi$ PA02を使用した(図23)。新規分離したファージのうち、形態学的に $\Phi$ NK-1、 $\Phi$ LC、 $\Phi$ S30-1、 $\Phi$ S30-2、 $\Phi$ S30-3はシース構造と収縮性のある尾部を持つことから *Myoviridae* であり、 $\Phi$ LPは非常に短い尾部であることから *Podoviridae* に分類されることがわかった。宿主菌 PASz に対する各ファージの溶菌活性はスポットテスト、もしくは濁度測定法を用いて検証した (data not shown)。

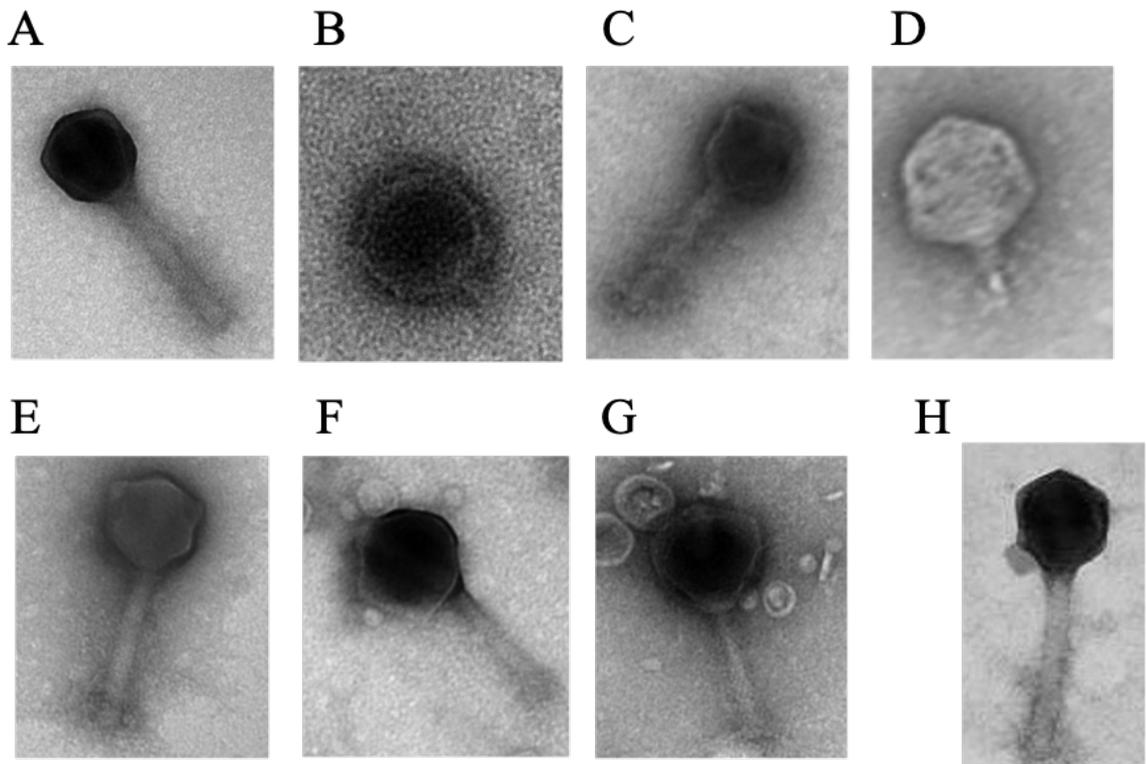


図 23. 臨床試験に用いたファージの電子顕微鏡像

透過型電子顕微鏡 (HT7700, Hitachi) を用いてファージの形態を観察した。(A) ΦNK-1、(B) ΦLP、(C) ΦLC、(D) ΦR18、(E) ΦS30-1、(F) ΦS30-2、(G) ΦS30-3、(H) ΦPA02。

### 3.2. 被検動物の病態について

ファージ療法実施前の被検動物の一般身体検査では明らかな異常は認められなかった。また、外耳炎に罹患している右耳の耳介は湿潤で、粘稠性のある耳垢、さらには外耳道から膿汁の排出が見られ (図 24A)、スワブをグラム染色するとグラム陰性桿菌の出現と多数の変性好中球の出現が認められた。さらに、右耳に触れるとかなり嫌がる仕草をすることから痛みもあると考えられた。麻酔下において CT 検査を実施すると、右耳の垂直耳道~水平耳道にかけて耳道壁の肥厚と造影増強効果が認められ、耳道の狭窄が見られた。また、右耳水平耳道に直径 10 mm 程度の腫瘍性病変が認められ (図 24B)、内視鏡を用いて耳道内部を観察した際にも腫瘍性病変は認められた (図 24C)。顕著な臨床症状は認められないものの、血清生化学検査上は Glutamic Pyruvic Transaminase (GPT) (Alanine transaminase, ALT と呼ばれる)、Alkaline Phosphatase (ALP)、 $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GTP)、リパーゼ、中性脂肪が高く、肝機能障害、または脂質代謝異常等が疑われるような状況であった (表 11)。CT 検査において、肝臓全域の腫大が認められ、造影前から CT 値の低い辺縁不明瞭な領域が散在していた。また、胆嚢内には胆泥貯留が認められた。さらに、両側の副腎は短径で 8mm 以上に腫大していたが、形状や造影パターンの変化は認められなかった。以上の血液検査、および CT 画像検査の結果等から、肝数値の上昇は胆泥症、あるいは副腎皮質機能亢進症の可能性を考えた。そこで外耳炎の主因となる内分泌疾患である副腎皮質機能亢進症、および甲状腺機能低下症の鑑別を行うべく、さらに血液検査及び血清生化学検査を行った。Thyroxine (T4)、free T4 (fT4)、Thyroid stimulating hormone (TSH) の値が基準値以内であることから甲状腺機能低下症は否定的であった。Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) 刺激試験を実施したところ、合成 ACTH 投与前の血中コルチゾルは 4.2  $\mu\text{g}/\text{dL}$  であり、投与 1 時間後の血中コルチゾルは 22.9  $\mu\text{g}/\text{dL}$  であった。また、LDDST をファージ投与 8 日目に実施したところ、投与後 4 時間の血中コルチゾル値が 1.4  $\mu\text{g}/\text{dL}$ 、投与後 8 時間で 1.0  $\mu\text{g}/\text{dL}$  であった。以上の血液検査結果から、副腎皮質機能亢進症の確定診断にまで至らなかったため、ファージ治療中は副腎皮質機能亢進症に対する治療は行わなかった (表 11)。

また、再診時に尿中コルゾル・クレアチニン比 (UCC) を測定したところ、30.65 と高値を示し、ALP アイソザイム分析を実施したところコルチコステロイド誘発性 ALP (C-ALP) の割合が 54.7% (基準値: 0~42.3%) と高値を示した (data no shown)。

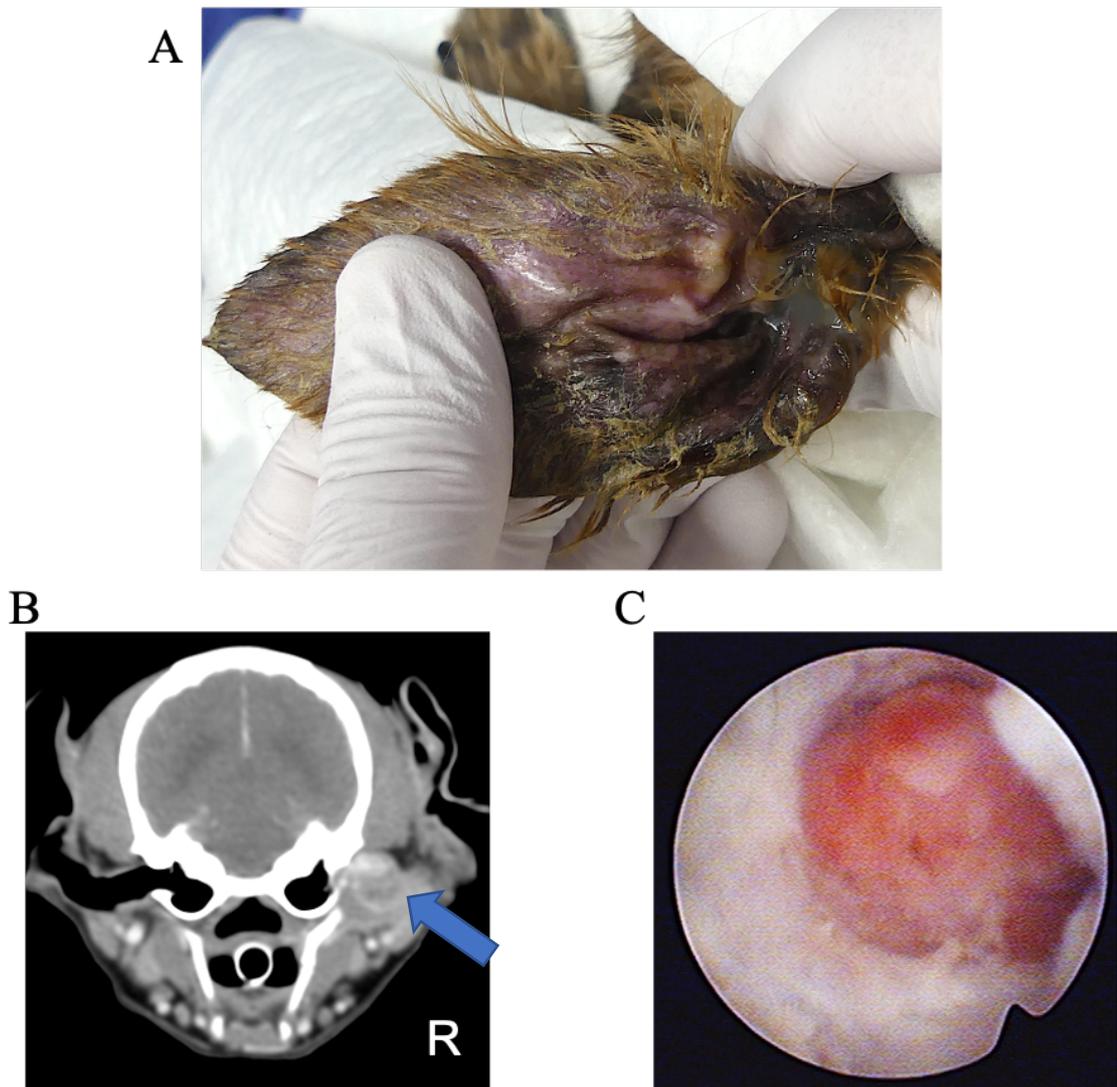


図 24. フェージ療法実施前の罹患耳の状況

(A) フェージ治療前日 (Day 0) の外耳炎罹患耳の肉眼所見。外耳道には膿汁が貯留していた。  
(B) 頭蓋領域の麻酔下 CT 画像所見。右耳の垂直耳道~水平耳道は狭窄し、水平耳道には腫瘤性病変が認められた (矢印)。(C) 右耳の内視鏡画像検査。水平耳道領域に腫瘤性病変が認められた。

表 11. 血液検査及び血清生化学検査結果

		Day 0	Day 8	Day 20	Day 34	Unit	Reference ranges
CBC	WBC	7700	16600	11700	6800	/ $\mu$ l	600~17000
	RBC	664	617	605	636	$\times 10000/\mu$ l	550~850
	Hb	15.4	14	14.2	14.8	g/dl	12~18
	Ht	44.7	41.4	40.3	43.2	%	37~55
	MCV	67.3	67.1	66.6	67.9	fl	60~77
	MCH	23.2	22.7	23.5	23.3	pg	19.5~26.0
	MCHC	34.5	33.8	35.2	34.3	%	32~36
	PLT	55.4	81.7	86.4	68.8	$\times 10000/\mu$ l	20~40
Biochemical test	TP	6.7	6.7	6.3	6.4	g/dl	5.0~7.2
	ALB	2.8	2.7	2.5	2.7	g/dl	2.6~4.0
	A/G	0.7	0.7	0.7	0.7		0.7~1.9
	T-BIL	0.1	0.1	0.1	0.1	mg/dl	~0.5
	GOT (AST)	41	42	47	50	IU/l	17~44
	GPT (ALT)	154	151	174	186	IU/l	17~78
	ALP	814	911	937	883	U/l	~89
	$\gamma$ -GTP	34	34	39	39	IU/l	~14.0
	LIPA	410	539	446	473	IU/l	10~160
	BUN	19.6	18.6	28.1	20.4	mg/dl	9.2~29.2
	CRE	0.43	0.43	0.88	0.47	mg/dl	0.4~1.4
	T-CHOL	200	183	181	200	mg/dl	115~337
	TG	421	200	338	301	mg/dl	23~149
	Na	147	147	146	146	mEq/l	141~152
	Cl	110	106	108	108	mEq/l	102~117
K	4	4.6	4.8	4.4	mEq/l	3.8~5.0	
Ca	9.5	9.6	9.5	9.5	mg/dl	9.3~12.1	
P	2.9	4.8	4.3	3.4	mg/dl	1.9~5.0	
GLU	110	117	126	103	mg/dl	75~128	
Others	CRP	1.1	0.3	0.3		mg/dl	0~1
	ft4	1				ng/dl	0.5~3.0
	v-T4	1.01				$\mu$ g/dl	1.0~2.9
	TSH	0.24				ng/ml	0.08~0.32
	v-CORpre	4.2	4.3			$\mu$ g/dl	1.0~6.0
	v-CORpost (1 hr)	22.9				$\mu$ g/dl	
	v-CORpost (4 hr)		1.4			$\mu$ g/dl	
	v-CORpost (8 hr)		1			$\mu$ g/dl	
	ACTH		15			pg/ml	5~36
	URE-COR				38	$\mu$ g/dl	
	URE-CRE				38.2	mg/dl	190~350
	UCC				30.65		~1.35

3.3. ファージカクテル MIX1 の耳道内投与と臨床所見・ファージ感受性の推移  
 ファージ投与開始前日の被検動物外耳炎罹患耳の膿汁スワブを採取し (図 25A)、LB agar に播種すると、大型、中型、小型のさまざまなサイズのコロニーが形成された (図 25B)。サイズの異なるコロニーを採取し、Biotyper によって菌種同定したところ、いずれも *P. aeruginosa* であることがわかった (表 12)。また、これらサイズの異なる

コロニーを形成した分離菌株に対して濁度測定法を用いてファージカクテル MIX1 の溶菌活性を評価した。すると、いずれの菌株に対しても MIX1 は菌液の濁度を減少させ、溶菌活性を示すことがわかった (図 25C-25E)。そこで、生理食塩水による耳洗浄と、ファージカクテル MIX1 の耳道内投与によるファージ療法を 1 日 2 回、7 日間実施した。すると、徐々に排膿は減少し、粘稠性のある耳垢も減少して症状の改善効果が認められた (図 25F)。しかしながら、依然耳道内スワブからはコロニーが検出され、大型や小型コロニーは見られない一方、中型のコロニーが多数検出された (図 25G)。ファージ投与 5 日目の耳垢スワブから分離された中型コロニーに対するファージカクテル MIX1 の溶菌活性を調べたところ、ファージ投与前日より濁度減少までに要する時間が長く、また濁度減少の程度も小さいことから MIX1 に対するファージ耐性菌の出現が考えられた (図 25H)。そこで新たなファージカクテル MIX2 を調整し、溶菌活性を評価したところ、MIX1 よりも濁度の増加を抑え、高い溶菌活性が認められた (図 25H)。従って、8 日目からはファージカクテル MIX2 を使用することとした。

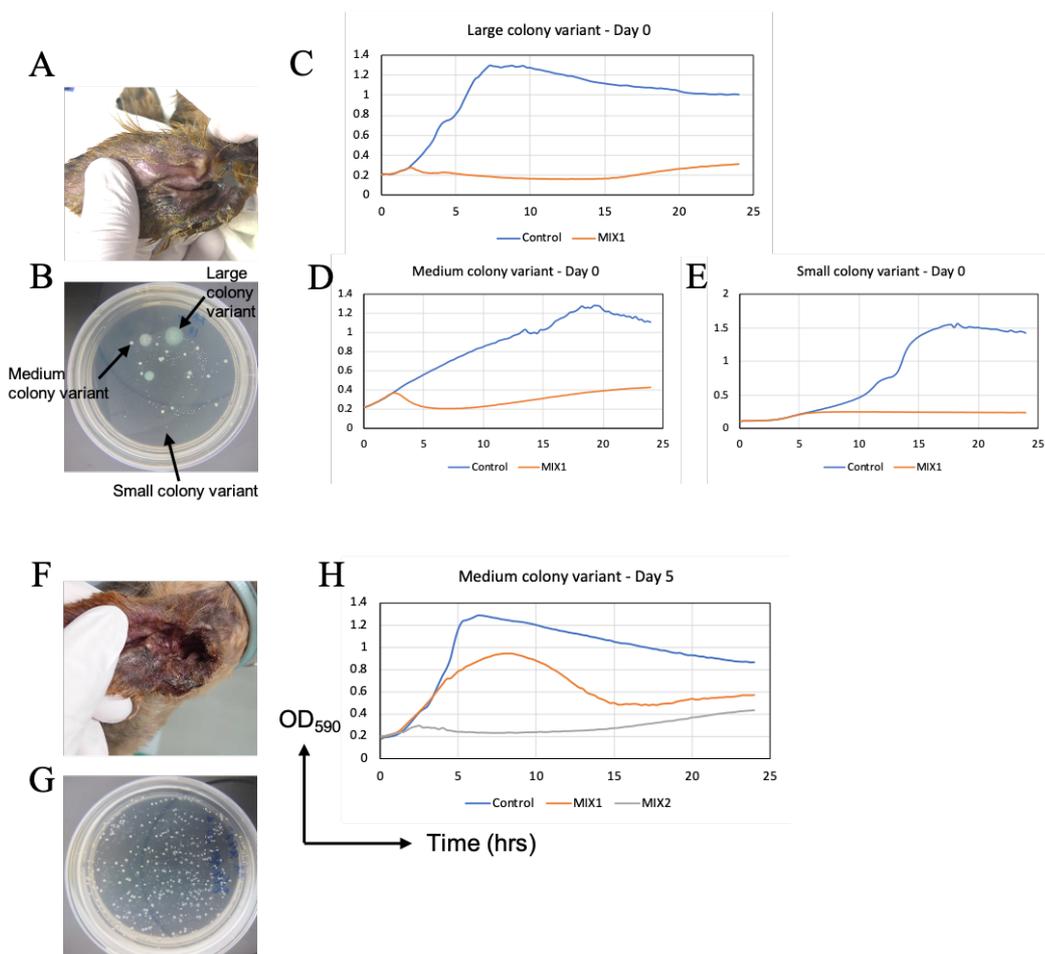


図 25. ファージカクテル MIX1 投与による臨床所見・ファージ感受性の推移

(A) ファージ療法開始前日 (Day 0) の外耳炎罹患耳の肉眼所見。(B) Day 0 の耳垢スワブを LB agar に播種し、37°C 一晚培養した際に形成されたコロニー。(C) Day 0 のスワブから分離された大型コロニー (Large colony variant - Day 0) に対するファージカクテル MIX1 の溶菌活性評価。(D) Day 0 のスワブから分離された中型コロニー (Medium colony variant - Day 0) に対するファージカクテル MIX1 の溶菌活性評価。(E) Day 0 のスワブから分離された小型コロニー (Small colony variant - Day 0) に対するファージカクテル MIX1 の溶菌活性評価。(F) Day 5 の外耳炎罹患耳の肉眼所見。(G) Day 5 の耳垢スワブを LB agar に播種し、37°C 一晚培養した際に形成されたコロニー。(H) Day 5 のスワブから分離された中型コロニー (Medium colony variant - Day 5) に対するファージカクテル MIX1 及び MIX2 の溶菌活性評価。ファージの溶菌活性の評価は濁度測定法を用いて行なった。

表 12. スワブから分離された菌種同定結果

Day	Bacteria species
Day 0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Day 2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Day 3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Day 4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
Day 5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Day 6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Day 7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Day 9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Neisseria zoodegmatis</i>
Day 10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Day 11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Neisseria zoodegmatis</i>
Day 12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Neisseria zoodegmatis</i>
Day 13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Day 14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

### 3.4. ファージカクテル MIX2 の耳道内投与と臨床所見・ファージ感受性の推移

8 日目からファージカクテルを MIX2 に変更し、ファージ療法を継続した。臨床所見上、明らかな悪化や良化は認められなかった。しかし、9 日目のスワブから分離された細菌に対する MIX2 の溶菌活性は既に低下しており、MIX1 の溶菌活性と同程度となっていた (図 26A, 26B)。そこで、新たにファージ  $\Phi$  PA02 の分離菌株に対する溶菌活性を評価すると、MIX1 および MIX2 と比較して  $\Phi$  PA02 単独で濁度の増加を抑え、強い溶菌活性を示した (図 26B)。そこで、MIX2 に  $\Phi$  PA02 を追加した新たなファージカクテルで 13 日目からファージ治療を行うこととした。MIX2+ $\Phi$  PA02 ファージカクテルは 13 日目のスワブから分離された細菌に対しても MIX2 と比較して濁度の増加を抑えることがわかった (図 26C, 26D)。また、耳道内に存在する腫瘤性病変が治療抵抗性の原因となっている可能性を考慮し、同じく 13 日目に内視鏡を用いて腫瘤性病変を摘出した (図 26E, 26F)。また、後日の病理検査によって腫瘤性病変は耳垢腺腫であることが判明した。

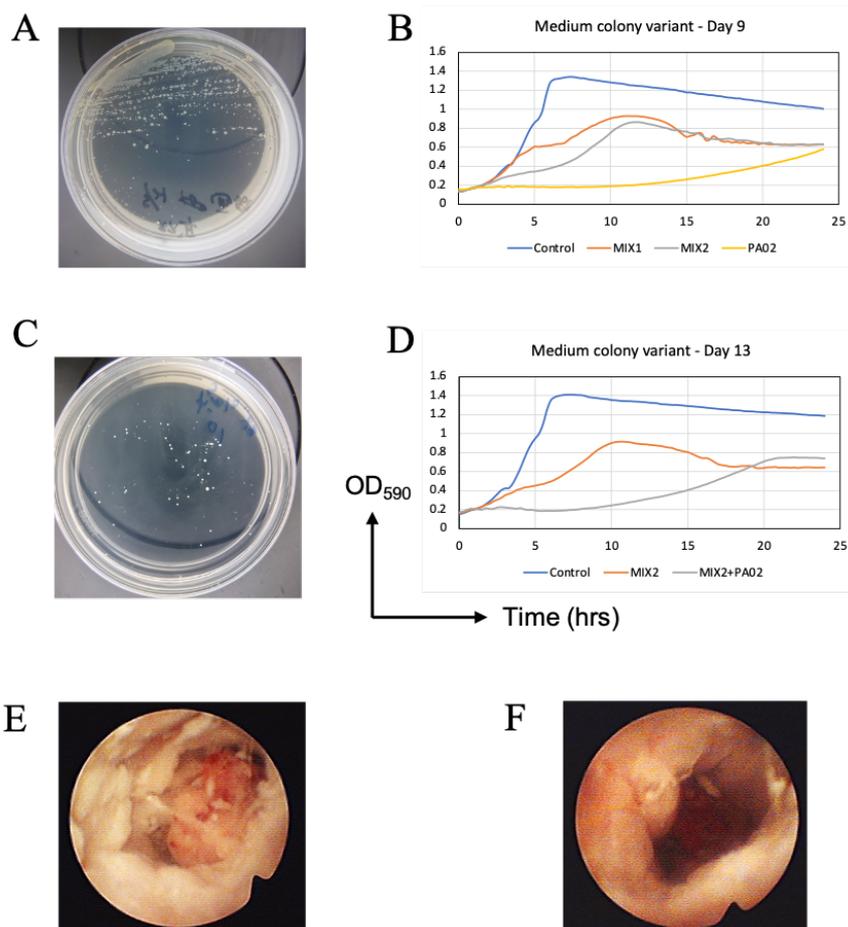


図 26. ファージカクテル MIX2 と  $\Phi$  PA02 の溶菌活性と腫瘤性病変の摘出

(A) Day 9 の耳垢スワブを LB agar に播種し、37°C 一晚培養した際に形成されたコロニー。  
(B) Day 9 のスワブから分離された中型コロニー (Medium colony variant – Day 9) に対するファージカクテル MIX1、MIX2、及び  $\Phi$  PA02 単独の溶菌活性評価。(C) Day 13 の耳垢スワブを LB agar に播種し、37°C 一晚培養した際に形成されたコロニー。(D) Day 13 のスワブから分離された中型コロニー (Medium colony variant – Day 13) に対するファージカクテル MIX2、及び MIX2+PA02 の溶菌活性評価。Day 13 における腫瘍摘出前の右耳内視鏡画像。(F) Day 13 における腫瘍摘出後の右耳内視鏡画像。ファージの溶菌活性の評価は濁度測定法を用いて行なった。

### 3.5. 腫瘍性病変摘出後のファージカクテル MIX2+ $\Phi$ PA02 投与による治療

ファージ投与 13 日目に水平耳道内の腫瘍性病変を摘出し、ファージカクテル MIX2 に  $\Phi$  PA02 を追加してファージ治療を継続すると、粘稠性のある耳垢や排膿はさらに減少し、耳道内スワブから分離される菌数も減少傾向となった。また、スワブから分離された細菌に対するファージカクテル MIX2+ $\Phi$  PA02 の溶菌活性は、退院時の 21 日目まで一定の溶菌活性を保っていたことがわかった (図 27A-27D)。退院とともにファージ療法は終了し、自宅にて 1 日 1 回の抗菌薬点耳、及び耳道内洗浄を指示した。初回ファージ投与から 34 日目に再診したところ、耳介は乾燥しており、排膿は全く認められなかった (図 27E)。また、耳道内にも耳垢はほとんど存在せず、耳道内スワブから細菌は検出されなかった (図 27F)。

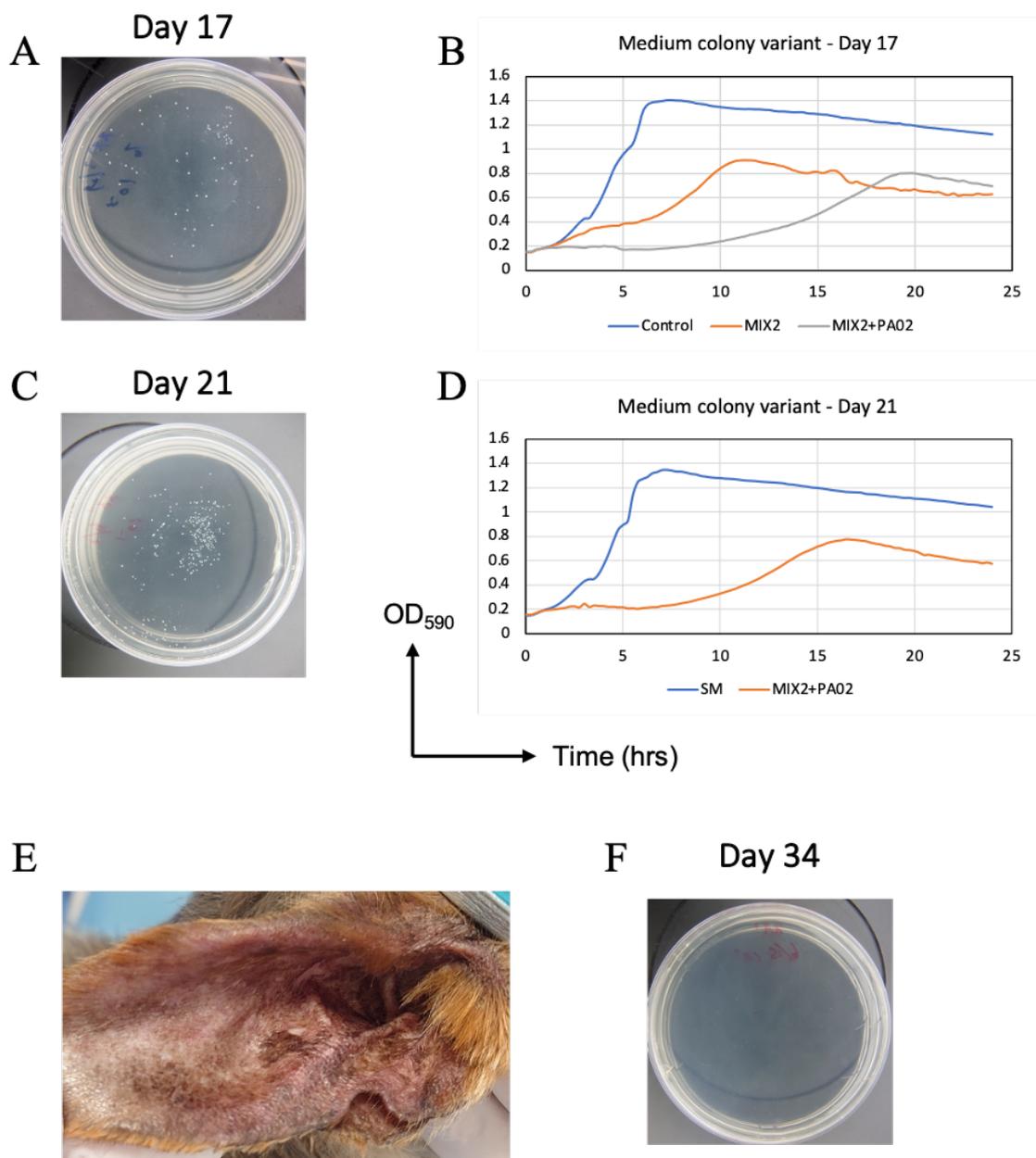


図 27. ファージカクテル MIX2+Φ PA02 の溶菌活性と再診時の状況

(A) Day 17 の耳垢スワブを LB agar に播種し、37°C 一晚培養した際に形成されたコロニー。  
 (B) Day 17 のスワブから分離された中型コロニー (Medium colony variant – Day 17) に対するファージカクテル MIX2、及び MIX2+Φ PA02 の溶菌活性評価。  
 (C) Day 21 の耳垢スワブを LB agar に播種し、37°C 一晚培養した際に形成されたコロニー。  
 (D) Day 21 のスワブから分離された中型コロニー (Medium colony variant – Day 21) に対するファージカクテル MIX2+Φ PA02 の溶菌活性評価。  
 Day 34 の外耳炎罹患耳の肉眼所見。(E) Day 34 の耳垢スワブを LB agar に播種し、37°C 一晚培養した。コロニーは検出されなかった。ファージの溶菌

活性の評価は濁度測定法を用いて行なった。

### 3.6. 耳道内スワブ細菌叢解析

ファージ療法の実施に伴う耳道内の細菌叢、特に *P. aeruginosa* の分布の推移を調べるために、耳道内のスワブを採取し、16S rRNA アンプリコンシーケンス解析 (V3-V4 領域) を実施した (図 28)。すると、*P. aeruginosa* が属する *Pseudomonadaceae* (シュードモナス科) はファージ療法開始前日に全体の 20.2% を占めていたものの、ファージ投与 4 日目では 15.5% と減少傾向であり、引き続き 17 日目では 11.6%、さらに退院時の 21 日目では全体の 0.4% となるまで減少していたことがわかった。また、初回ファージ投与から 34 日目の再診時では *Pseudomonadaceae* が占める割合は 0.7% であり、さらにファージ投与前日と比較して、細菌叢の多様性が見られるようになってきたことがわかった。

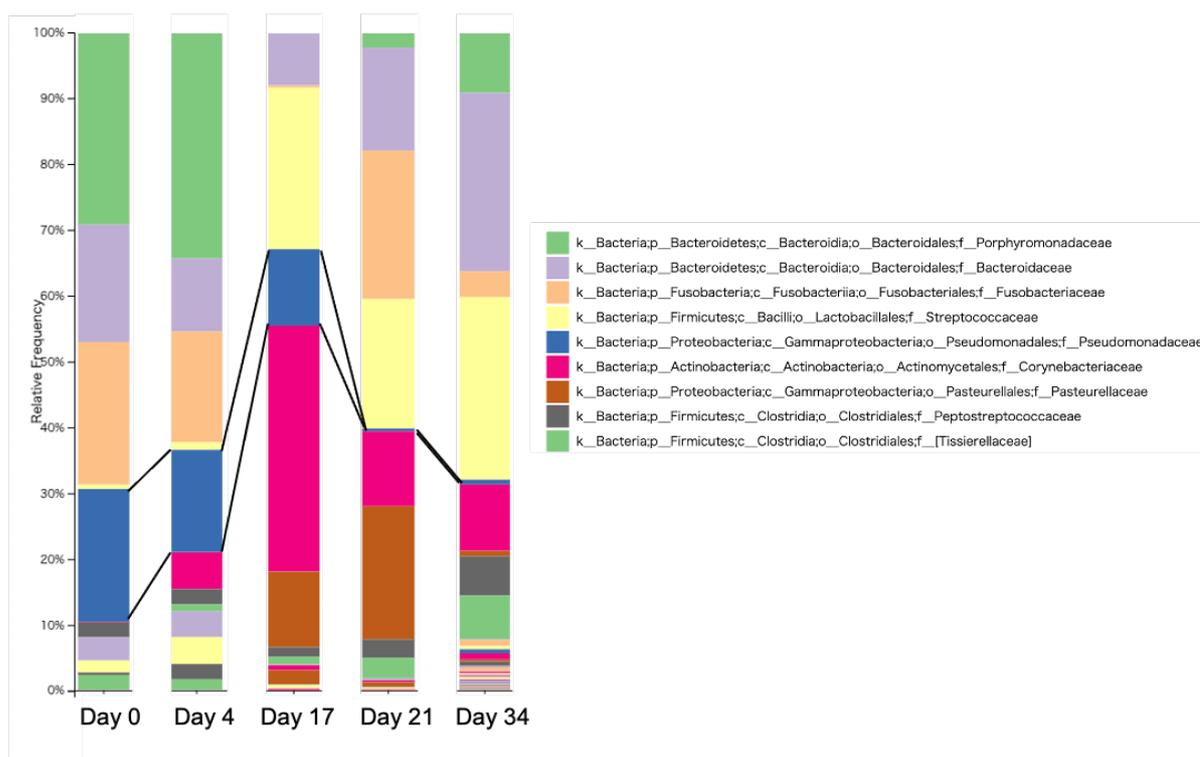


図 28. ファージ療法の実施に伴う耳道内細菌叢の推移

Day 0、Day 4、Day 17、Day 21、Day 34 の耳道内のスワブを採取し、16S rRNA アンプリコンシーケンス解析 (V3-V4 領域) を実施した。2 本の黒いバーで挟まれた青色の棒グラフの範囲は *Pseudomonadaceae* の割合を表し、その推移を示した。

### 3.7. ファージ耐性菌の変異解析

ファージ投与 7 日目の耳道内スワブから分離された菌株に対し (図 29A)、ファージカクテル MIX1 は溶菌活性をほとんど示さなかったことから (図 29B)、この菌を MIX1 に対するファージ耐性菌 PASz\_d7mt とし、次世代シーケンサーを用いた変異解析を実施した。次世代シーケンサーによって得られた PASz\_d7mt のショートリードデータを PASz の全ゲノム配列にマッピングしたところ、マッピング率は 99.93% であり、カバレッジの中央値は 414 であった。また、USG-1 (Aspartate-semialdehyde dehydrogenase) と FimV (type IV pilus assembly protein) をコードする遺伝子にまたがる領域、1232 bp のカバレッジが全くなく、この領域の塩基配列は欠損していることがわかった (図 29C)。さらに、SNV、Indel として 7 つの遺伝子に変異が生じていることがわかった (表 13)。

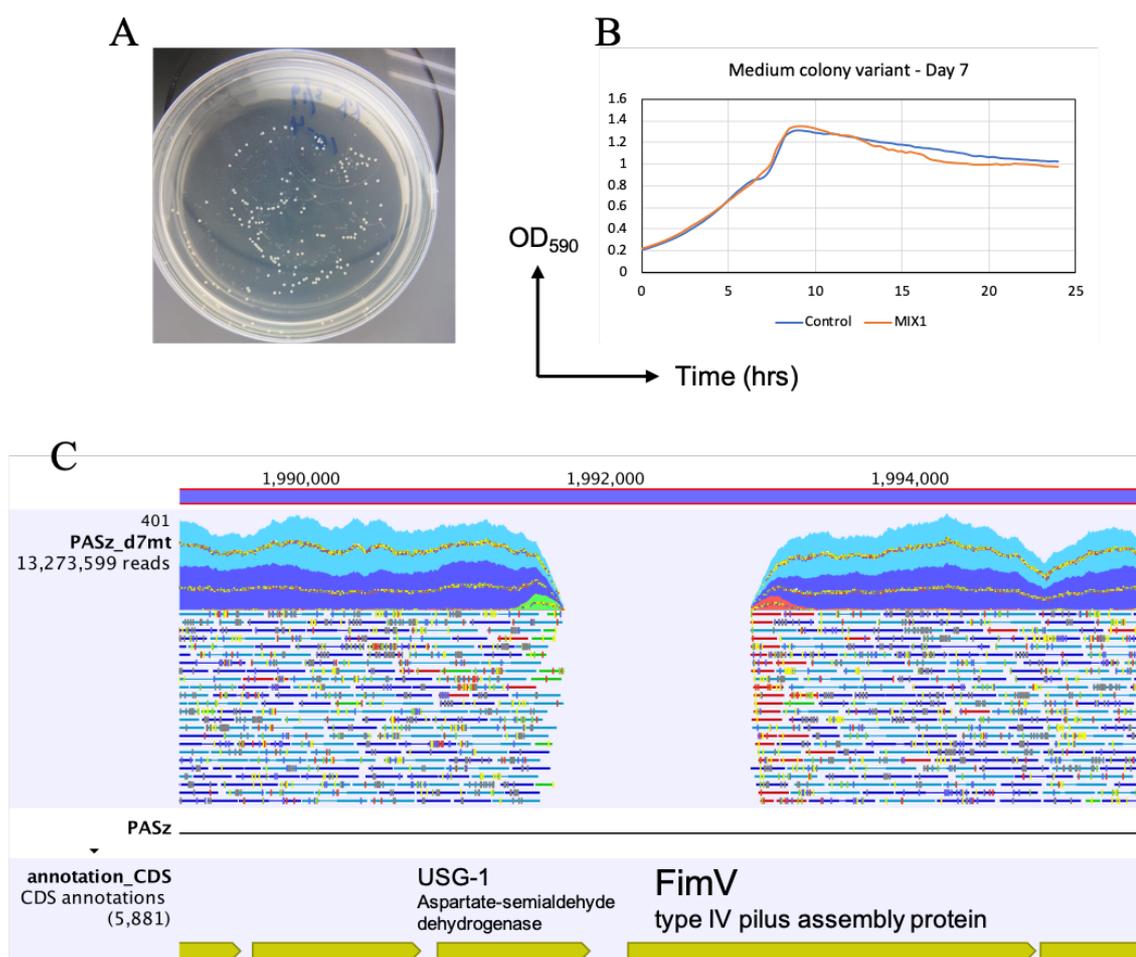


図 29. PASz\_d7mt のファージ抵抗性および変異解析

(A) Day 7 の耳垢スワブを LB agar に播種し、37°C一晩培養した際に形成されたコロニー。

(B) Day 7 のスワブから分離された中型コロニー (Medium colony variant – Day 7) に対するファージカクテル MIX1 の溶菌活性評価。(C) PASz\_d7mt のショートリードデータを PASz 全ゲノム配列にマッピングした際のマッピング状況。上段はカバレッジを表し、下段は CDS 領域を示す。USG-1 と FimV をコードする領域 1232 bp のカバレッジがなく、欠損していたことがわかった。

表 13. PASz\_d7mt の SNV, Indel

POS	TYPE	REF	ALT	EFFECT	COVERAGE (%)	NT_POS	AA_POS	GENE	PRODUCT
1936559	snp	A	G	missense_variant Asn87Asp	370 (100%)	259/2772	87/923	gyrA	DNA gyrase subunit A
2798765	snp	A	G	missense_variant Leu67Pro	402 (100%)	200/564	67/187	pvdS	pyoverdine signaling pathway sigma factor
3588743	snp	A	G	missense_variant Val211Ala	408 (99.8%)	632/1281	211/426	clpX_2	protease ATP-binding subunit
4332862	del	GAC	G	frameshift_variant Val166fs	415 (100%)	497/1017	166/338	fliG	Flagellar motor switch protein
4767264	del	CGCGCCGGG TTCGCCGA	C	frameshift_variant Arg263fs	258 (100%)	788/969	263/322	cmoB	tRNA U34 carboxymethyltransferase
5339255	snp	A	G	missense_variant Asp329Gly	374 (100%)	986/2847	329/948	parA	chromosome partitioning protein
5849334	snp	A	C	missense_variant Met31Leu	376 (100%)	91/405	31/134		hypothetical protein

del, deletion; snp, single nucleotide polymorphism.

### 3.8. ファージ耐性化に伴う運動性の変化

ファージ耐性菌 PASz\_d7mt に認められた変異遺伝子のうち、*fliG* と *fimV* に着目した。FliG は C リングと呼ばれる鞭毛の基部を形成するタンパク質であり [173]、FimV は IV 型線毛の組み立てに重要な役割を持つタンパク質である [150]。鞭毛、および IV 型線毛は *P. aeruginosa* の運動性に強く関与しており、さらに運動性はバイオフィーム形成や細胞への接着にも密接に関与することが報告されている [23, 37, 146]。そこで、PASz と鞭毛及び IV 型線毛の機能異常が予測される PASz\_d7mt の運動性を評価し、比較した。鞭毛を介した運動性を評価する Swimming assay では、PASz はスポットした培地中心点からシャーレの外縁に迫る程に菌の増生が見られる一方 (図 30A)、PASz\_d7mt は PASz よりも狭い範囲でしか増菌が見られなかった (図 30B)。また、IV 型線毛を介した運動性を評価する Twitching assay においても PASz は同心円状にシャーレの底を移動した様子が見られるのに対し (図 30C)、PASz\_d7mt ではほとんど移動している様子が認められなかった (図 30D, 30E)。つまり、ファージ耐性菌

PASz\_d7mt において鞭毛、及びIV型線毛を介した運動性の低下が認められた。

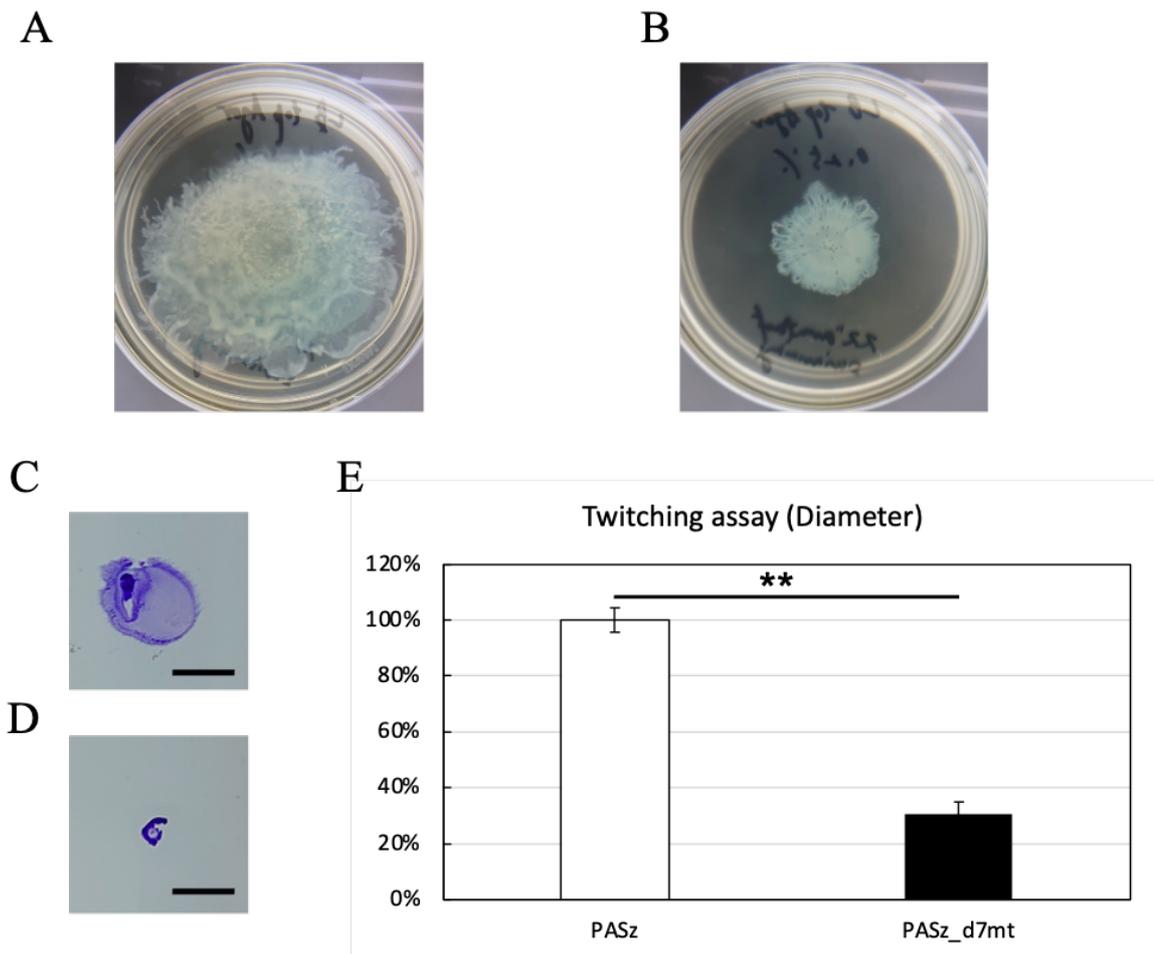


図 30. ファージ耐性菌の運動性評価

(A) PASz、及び (B) PASz\_d7mt の Swimming assay。固形化させた 0.25%Agar の LB agar の中心に OD=1.0 の菌液を滴下し、37°C で 16 時間培養して観察した。(C) PASz、及び (D) PASz\_d7mt の Twitching assay。1%Agar の LB agar の中心に新鮮な単一コロニーをピックしたチップを突き刺し、37°C で 24 時間培養したのち直径を測定した。スケールバーは 5 mm を表す。(E) Twitching assay にて PASz が染色された直径を 100%とした時の PASz\_d7mt が染色された直径の割合を表した。各独立した 3 回の試行を実施し、平均値±SE で示した。統計処理は F 検定にて等分散性を確認したのち、スチューデントの t 検定を実施し、 $p < 0.05$  で有意差とした (\*\* $p < 0.01$ )。

#### 4. 考察

伴侶動物医療におけるファージ療法の実施はわずか2例の報告のみである[64, 104]。いずれもイギリスの研究チームでイヌの *P. aeruginosa* 感染を伴う細菌性外耳炎を対象としていた。2006年に初めて報告されたケースレポートでは5歳のセントバーナードにファージ療法を実施し、臨床データや使用したファージの詳細なデータの記載がほとんどないものの、点耳投与した27時間後に劇的な症状の改善が見られ、また副作用等も見られなかったと報告がなされている[104]。また、2010年には10頭のイヌに対し、各  $1.0 \times 10^5$  PFU/mL のファージを6種混合したカクテルを点耳薬として単回投与して48時間後に評価したところ、耳道内の緑膿菌数は治療開始前の67%と減少したことがわかった[64]。しかしながらファージは単回投与のみでその後の治療は行われず、また残念ながらカクテルに用いたファージの詳細なデータの記載はなかった。いずれの報告も限定的な情報ではあるものの、*P. aeruginosa* 感染を伴うイヌ細菌性外耳炎に対するファージの局所投与の有効性を示唆する研究である。そこで、本研究ではRGU-AMCに来院し、既存治療に抵抗性を示した *P. aeruginosa* 感染を伴う難治性慢性外耳炎に罹患したイヌに対し、ファージ療法を実施するとともにその詳細な治療経過とファージ耐性菌について解析を行なった。

イヌの外耳炎の病態に関与する要因はPSPP分類によってカテゴリー化され、主因 (Primary causes)、副因 (Secondary causes)、増悪因 (Perpetuating factors)、素因 (Predisposing factors) の4つに分けて考えられる[110]。主因は単独で外耳炎を発生させる因子であり、*P. aeruginosa* をはじめとする細菌感染症は含まれない一方、アトピー性皮膚炎や食物アレルギーなどのアレルギー疾患、脂漏症といった角化異常症、甲状腺機能低下症や副腎皮質機能亢進などの内分泌失調などが含まれる。一方、細菌感染症やマラセチアの感染は副因に含まれ、外耳炎が起こった結果として2次的に付随する因子とされている。つまり、*P. aeruginosa* 感染は外耳炎を引き起こす直接的な原因ではなく、外耳炎の結果として感染・増殖したということである。そのため、包括的な外耳炎の治療には主因を見つけ出し、治療の介入によりコントロールすることが重要である。また、増悪因は外耳炎が起こった後に発生する耳の構造上の変化であり、耳道の浮腫や狭窄といった耳道の変化、分泌腺の変化、中耳の変化などが含まれ、外耳炎をより重症化させうる因子とされる。素因は外耳炎が起こる前か

ら存在し外耳炎の発生リスクを高める因子として、ポリープや腫瘍による耳道の閉塞性病変や垂れ耳などの耳の形態的問題、湿性環境などが含まれる。従って、本症例の外耳炎を PSPP 分類に従って要因を分類すると、主因としては年齢や血液検査、画像検査所見を踏まえると食物アレルギーと副腎皮質機能亢進症が考えられ、副因は *P. aeruginosa*、増悪因は耳道の狭窄といった耳道の変化が挙げられ、素因としては耳垢腺腫による閉塞性病変が存在していた。今回、主因として肝数値の上昇や両側の副腎腫大などの所見から副腎皮質機能亢進症を疑ったが、副腎皮質機能亢進症を疑う明らかな臨床兆候（持続的な多飲多尿や腹囲膨腹、非掻痒性両側性脱毛など）に乏しく、また ACTH 刺激試験や LDDST などにおいても確定診断に至る数値ではなく、治療の介入は行わなかった。しかしながら、日によっては多飲多尿を示し、また UCC や C-ALP が高値示したことから完全に副腎皮質機能亢進症を否定することは難しく、今後主因特定のために再度精査するべきである。また、食物アレルギー用の療法食を処方していたが、除去食試験や完全な食事制限は入院期間中に行うことはできず、食物アレルギーの関与を完全には否定できなかつた。一方、外耳炎の素因となる腫瘍性病変（耳垢腺腫）を摘出した直後より外耳炎の症状は劇的に改善し、排膿や顕著な細菌数の減少が認められた。耳道内に腫瘍といった閉塞性病変が存在することで外耳炎になるリスクが常に高く、また細菌が増殖しやすい環境が作られ、さらには抗菌薬やファージを耳道内に局所投与した際にも感染巣へのアクセスが阻害され、効率的な殺菌・溶菌作用を得ることができなかつたと考えられる。本研究では外耳炎の主因の特定と治療の介入には至らなかつたものの、耳道内の腫瘍性病変の摘出といった素因に対する治療介入と *P. aeruginosa* 感染に対するファージ療法を組み合わせることにより慢性難治性外耳炎が奏功した世界で初めての報告である。また、外耳炎のコントロールには細菌を排除することだけに注力するのではなく、外耳炎発症の背景に存在する要因に目を向けた包括的な治療の介入が重要であるという知見が得られた。

今回のファージ臨床試験実施に際し、治療に使用したファージは被検動物から事前に分離した *P. aeruginosa* PASz に対して溶菌活性を有するファージを選択、または新規分離して常に最適なファージカクテルとなるよう設計した、いわゆる個別型ファージ療法 (Personalized phage therapy) を実施した。このようなファージ療法はアメリカにおける最初のファージ療法成功例である“パターンソン症例”や、ベルギーでは Magistral phage therapy と呼ばれ、実際に開始されている [65, 130]。決め

られたファージを事前にカクテル化して使用する固定型ファージ療法 (Fixed phage therapy) と異なり、患者、及び原因菌に対してオーダーメイド型の治療を提供することが可能である。使用するファージがその都度異なることから製剤として承認させるのは難しいものの、アメリカ FDA は未承認の薬剤であってもエンドトキシンレベル、及び無菌性が実験室レベルで確保されている場合に限り、緊急的な使用を可能としている (emergency Investigational New Drug, eIND)[65]。本臨床試験で用いたファージのほとんどはゲノム情報が未知な新規ファージであったものの、eIND の考えに基づき、有効性、エンドトキシンレベル、及び無菌性を実験室レベルで確保して治療を行なった。特に、エンドトキシンはグラム陰性菌に対して溶菌性を有するファージを増幅させる際に必ず宿主を溶菌する過程を介するため、未精製のファージ試料には多くのエンドトキシンが混入していることが考えられる[66]。実際、今回の臨床試験に際し増幅させた未精製ファージ試料中にはエンドトキシンが含まれており、また CsCl 密度勾配を用いた超遠心法、及びポア径 100 kDa フィルターを用いた限外濾過を実施してもエンドトキシンレベルが減少することはなかった (data not shown)。一方、エンドトキシン除去カラム (EndoTrap HD) を使用するとエンドトキシンレベルが減少したため、臨床試験に使用したファージは全てこの除去カラムによる精製処理を実施した。本結果は様々な手法によるファージ試料中のエンドトキシン除去率を比較検討した Hietala らの研究結果と一致していた[66]。局所投与に用いる薬剤のエンドトキシンレベルの規格は存在しないため、本研究では静脈内投与の規格、5.0 Endotoxin Units (EU)/kg/hr に準ずるよう必要において生理食塩水で希釈してファージ試料を作製した[66]。また、21 日間のファージ療法実施期間中、及び退院 2 週間後の再診時においてファージ投与による顕著な副作用は身体検査上、及び血液検査上認められなかった。ファージ療法によって耳道内の *P. aeruginosa* が溶菌されるとエンドトキシンが放出されることが予想されたが、エンドトキシンによる反応も確認されなかった。従って、今回の臨床試験を通し、イヌ外耳炎に対してエンドトキシンレベル、無菌性を確保したファージカクテルの (局所投与) 点耳投与の安全性が示された。

パターソン症例では *Acinetobacter baumannii* 感染に対するファージ療法が成功したが、ファージ療法開始後 8 日目にてファージ耐性菌の出現が認められている[65]。しかし、ファージ耐性菌出現確認後 72 時間以内に新規ファージの分離が開始

され、新たなファージカクテルを設計して治療を継続したことにより奏功するに至った。今回の臨床試験においても投与開始 5 日目にはコロニー性状の異なる *P. aeruginosa* が分離され、本菌に対するファージカクテル MIX1 の溶菌活性は低下し、ファージ耐性菌の出現が認められた。その後迅速にファージカクテルを新調し対応するも再びファージ耐性菌が出現し、合計 2 回ファージカクテルを変更することとなった。このように細菌は抗菌薬に対して耐性を獲得するのと同様、ファージに対しても耐性を獲得することが知られている[120]。特に細菌表面に存在する莢膜や LPS、線毛、WTA、膜タンパク質などはファージのレセプターとして使用されるため、遺伝子変異などによりこれら構造体に変化、あるいは完全に欠損することでファージは宿主に感染できなくなり、細菌はファージ耐性を獲得することが知られている[6, 112, 120]。従って、常に病原菌に対する溶菌作用を持つファージを投与するためには、頻繁に病巣から菌を分離し、ファージ耐性菌出現の有無をモニタリングする必要がある。ファージ耐性菌が出現した際には、迅速に溶菌作用を示すファージを選択し直す、あるいは新規分離する必要がある。また、あらかじめ異なるレセプターを認識するファージをカクテル化することによりファージ耐性菌の出現を防ぐ、または耐性菌が出現するまでの時間を稼ぐことが可能であるとされている[65]。従って、ファージを分離した際にゲノム情報の決定、及びレセプターを特定し、異なるレセプターを認識するファージを多数集めたファージバンクを作成することで、ファージ耐性菌の出現しにくいカクテル、また耐性菌に対する新たなカクテルの設計が迅速に行うことができる。一方、細菌のファージ耐性獲得は細菌に適応コスト (fitness cost) を強いるとされ、特にファージのレセプターとして使われる細胞壁構造は病原性因子としても使われることから、これらの変異は細菌の病原性を低下させうることが示唆されている[59]。実際にパターンソン症例において出現が確認されたファージ耐性 *A. baumannii* 株 TP3 では莢膜が欠損し、ファージと抗菌薬を併用した際の殺菌効果の増強が確認されている[65]。今回の臨床試験においても 7 日目に出現したファージ耐性菌 PASz\_d7mt の変異解析を実施したところ、複数の遺伝子に変異が認められた。一般的に *P. aeruginosa* 溶菌性ファージは宿主菌の LPS や IV 型線毛をレセプターとして使用しており[15]、ファージ耐性菌においてこれらの構成に関わる遺伝子に変異が認められることが多いとされている[172]。今回の PASz\_d7mt の変異解析において IV 型線毛の組み立てに関与する FimV をコードする遺伝子の一部に欠損が認められたことから、フ

ファージカクテル MIX1 にIV型線毛をレセプターとして認識するファージが混在していたことがわかった。また、IV型線毛及び鞭毛の機能が *P. aeruginosa* の運動性に強く関与しており、さらにこれら運動性は細胞への接着、バイオフィーム形成等にも密接に関与することが報告されている[23, 37, 146]。PASz\_d7mt は FimV の他に、Cリングと呼ばれる鞭毛の基部を形成するタンパク質である FliG 遺伝子の変異が認められたため[173]、運動性の変化について評価した。するとファージ耐性菌 PASz\_d7mt はIV型線毛、及び鞭毛を介した運動性が顕著に低下していた。従って、PASz はファージカクテル MIX1 に対してファージ耐性を獲得した一方、IV型線毛と鞭毛を介した運動性が低下し、それに伴って細胞への接着性やバイオフィーム形成能が低下していることが考えられる (図 31)。ゆえに、今回の臨床試験におけるファージ療法による耳道内の細菌数の減少と外耳炎症状の改善は、単にファージカクテルによる溶菌作用だけではなく、細菌のファージ耐性化に伴い外耳道内から排除されやすい表現型へ変化してしまったことが寄与している可能性がある。今後、ファージ耐性化と耐性獲得に伴う表現型変化による病原性の低下といったトレードオフの関係とその法則を見出すことができれば、細菌のファージ耐性化を逆手に取った次世代型の細菌感染症治療を展開することが可能となるかもしれない。



図 31. PASz のファージ耐性化と病原性低下のトレードオフ関係の模式図

ファージ投与開始前に被検動物から分離された PASz が存在する外耳道内に、IV型線毛をレセプターとすると思われるファージを含むカクテル MIX1 を点耳投与するとIV型線毛の組み立てに関与する *fimV* の変異を有し MIX1 に耐性を示す PASz\_d7mt が分離された。また、PASz\_d7mt は鞭毛を構成する *fliG* にも変異を有し、IV型線毛及び鞭毛を介した運動性の低下が認められた。運動性の低下は鞭毛やIV型線毛の機能不全、あるいは欠損を示唆している。

これら運動は組織定着性やバイオフィーム形成にも関与するため、これら能力も低下していることが示唆される。

## 5. 小括

イヌの外耳炎は最も発生が多い疾患の1つであり、特に薬剤耐性及びバイオフィーム形成能を持つ *P. aeruginosa* の感染を伴う外耳炎の治療は非常に困難であることが知られている。今回、RGU-AMC に来院し、既存治療に抵抗性を示した *P. aeruginosa* 感染を伴う難治性慢性外耳炎に罹患したイヌに対し、ファージカクテル療法を実施するとともに治療過程において出現が認められたファージ耐性菌について解析を行なった。被検動物は持続的に外耳炎を罹患する右耳から膿汁が排出されており、耳道の狭窄がみられ、水平耳道には直径 10 mm 程度の腫瘤性病変が確認された。ファージ投与開始前に被検動物の耳垢スワブから単離した *P. aeruginosa* PASz に溶菌性を示すファージを選択、及び新規に分離しファージカクテル設計して点耳投与によるファージ療法を行なった。ファージ療法を開始すると一部症状の改善が認められたものの完全には奏功せず、またファージ耐性菌の出現が認められた。ファージ耐性菌に対して溶菌活性を示すファージを新たに分離し、また耳道内の腫瘤性病変を摘出して治療を続けた。すると、さらに外耳炎症状は改善し、再診時には耳垢スワブから *P. aeruginosa* は検出されなかった。耳道内の皮膚細菌叢解析を実施して *P. aeruginosa* を含む *Pseudomonadaceae* の分布の推移を調査したところ、ファージ療法開始前は全体の約 20%程度を占めていたが、治療開始とともに減少し、退院時及び再診時では全体の 1%以下となっていた。また、治療 7 日目に分離されたファージカクテル MIX1 に対するファージ耐性菌 PASz\_d7mt の変異解析を実施したところ、IV型線毛の組み立てに関わる *fimV* や鞭毛を構成する *fliG* などに変異が認められた。ファージ耐性菌 PASz\_d7mt における運動性を評価したところ、IV型線毛及び鞭毛を介した運動性が低下していることがわかった。本研究における実際の細菌感染症症例に対するファージ療法の実施はヒトを含め日本では初の実施である。本研究を通じ、耳道内の腫瘤性病変の摘出とファージカクテル療法を組み合わせることによって、慢性難治性のイヌ外耳炎症例を奏功させるに至った。また、ファージ療法実施に伴うファージ耐性菌の出現可能性について言及し、ファージ耐性化によるトレードオフを利用した次世代型

の細菌感染症治療法の展開を示唆する結果を示した。

## 第V章 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のファージ耐性化に伴う 薬剤感受性上昇と病原性低下のトレードオフ

### 1. 序文

WHO は、2017 年 2 月に薬剤耐性菌の中でも新たな抗菌薬開発の緊急性が高い薬剤耐性菌 12 種類がリストアップされた「priority list」を公表し、その中で MRSA はカテゴリー「High」に分類され、報告数は最も多い[3]。MRSA が分離される主な疾患として肺炎、菌血症、皮膚・軟部組織感染症、手術創感染症、尿路感染症などがある[36]。また、人の医療現場のみならず、家畜動物や伴侶動物などの獣医領域でも検出され[72, 73]、MRSA に対する新たな治療戦略の開発が全世界の医療、そして獣医療で求められている。

*S. aureus* は、ペンタグリシン側鎖を持つペプチドグリカン前駆物質がペニシリン結合タンパク質 (Penicillin binding proteins, PBPs) の働きによって架橋を形成することで、堅牢性のある細胞壁を合成する[142]。β-ラクタム系抗菌薬はこの細胞壁合成酵素である PBPs に結合・ペプチドグリカン合成を阻害することで殺菌作用を示す[155]。しかしながら、MRSA は Mobile genetic element として知られる Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) を外来性に獲得することでβ-ラクタム系抗菌薬に耐性を示すようになる[128]。SCC*mec* 内の *mecA* がコードする PBP2a (PBP2'とも呼ばれる) は本来持っている内在性の PBPs とは異なり、β-ラクタム系抗菌薬と低親和性であり、β-ラクタム系抗菌薬存在下で内在性 PBPs の機能が阻害されている状況においても PBP2a によってペプチドグリカンを架橋形成することができる[128]。

MRSA など薬剤耐性菌に対する治療戦略の1つとして、バクテリオファージを用いたファージ療法の実用が近年期待される一方、細菌はファージに対しても耐性化することが報告され、治療に用いる際の懸念材料となっている[120]。実際のヒト医療におけるファージセラピー応用例であるパターンソン症例においてもファージ耐性菌の出現が確認されており[65]、また第4章で述べたように、RGU-AMCにて実施された *P. aeruginosa* 感染を伴う外耳炎に対するファージ療法臨床試験実施の際もファージ耐性菌の出現が確認された。細菌のファージ耐性化機構は大きく5つのステップ

からなり、1) 宿主レセプターへの吸着阻害、2) 宿主菌内へのファージ DNA の注入阻害、3) ファージ DNA 合成阻害、4) ファージ粒子形成阻害、5) エンドライシンの溶菌作用に対する阻害が知られている[112]。 *S. aureus* の多くはファージレセプターの変異による吸着阻害や制限修飾系によるファージ DNA の切断によってファージ耐性を獲得することが知られており、一方でファージ DNA の注入阻害やエンドライシンの溶菌作用に対する阻害によるファージ耐性は報告がない[112]。 phiSA012 を含む *S. aureus* 溶菌性ファージの多くは壁タイコ酸 (wall teichoic acid, WTA) をレセプターとしており、WTA 合成酵素の変異によってファージの吸着が阻害され、ファージ耐性を獲得することが報告されている[4, 7]。

細菌はファージによる溶菌を逃れるために様々な戦略を駆使してファージ耐性を獲得する一方、fitness cost として細菌にとって不利益な表現型となってしまうことが近年報告されつつある[59]。 *P. aeruginosa* 溶菌性ファージ OMKO1 は細胞膜に存在する薬剤排出ポンプをレセプターとするファージであり、OMKO1 に耐性を獲得した多剤耐性 *P. aeruginosa* は薬剤排出ポンプで排出されるはずだった抗菌薬に対して感受性を示すようになるといった報告がされている[27, 28]。また、第 4 章で述べたように、RGU-AMC にて *P. aeruginosa* 感染を伴う外耳炎に対してファージ療法を実施した際に出現したファージ耐性菌について解析したところ、運動性、バイオフィルム形成、組織定着性に関わる鞭毛とIV型線毛をコードする遺伝子に変異が認められ、運動性の低下という表現型の変化を確認した。一方、*S. aureus* のファージ耐性に伴う表現型の変化についての報告は少なく、筆者が知る限り、ファージ MSa に耐性を獲得した *S. aureus* A172 株において、増殖率の減少、いくつかの病原性遺伝子発現量の減少、莢膜産生量の変化が見られたという報告と[24]、ファージ PYO<sup>Sa</sup> に耐性を獲得した *S. aureus* Newman 株において、小型のコロニーを形成し、ペプチドグリカン合成に関わる *femA* 変異とともにオキサシリン感受性の上昇が認められた報告の 2 例のみである[14]。このように、どちらの報告においてもファージに対する耐性を獲得する一方で、細菌にとって不利益な表現型となってしまうという進化的トレードオフの関係性が成り立つことを示唆している。このファージ耐性化に伴うトレードオフ関係を明らかにすることで、溶菌作用による細菌数の減少を図る従来のファージ療法とは異なり、細菌がファージ耐性化することを前提に、抗菌薬感受性の向上や病原性の低下を狙った新たなファージ療法の展開が可能となる。

そこで、本研究では多剤耐性および病原性タンパク質を産生する MRSA に着目し、*S. aureus* 溶菌性ファージ phiSA012 に対するファージ耐性化メカニズムの解明とファージ耐性獲得に伴う表現型の変化について解析した。ファージ耐性を獲得した臨床分離株 MRSA2007-13 のゲノム解析を実施し、ファージ耐性化に寄与する責任遺伝子の特定を行った。変異遺伝子として細胞壁合成酵素および転写調節因子をコードする遺伝子が検出されたため、細胞壁ペプチドグリカン構造の解析、及び RNA-seq による網羅的な発現変動遺伝子の検出を行った。さらに、ファージ耐性菌の表現型の変化を捉えるため、抗菌薬感受性、及び病原性の変化について解析を行なった。

## 2. 材料と方法

### 1) 培地

Luria-Bertani (LB) broth は、1.0 % NaCl、1.0 % Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、0.5 % Bact™ yeast extract (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) を混合して作成した。

LB agar は 1.0 % NaCl、1.0 % Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、0.5 % Bact™ yeast extract (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、1.5 % agar (富士フィルム和光純薬工業 (株)、大阪、日本)を混合して作成した。

LB top agar は 1.0 % NaCl、1.0 % Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、0.5 % yeast extract (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)、0.5 % アガロース ME (岩井化学薬品 (株)、東京、日本) を混合して作成した。

### 2) 使用菌株

今回用いた細菌は表 14 に示す。全ての細菌は LB broth を用いて 37°C、180 rpm にて振とう培養して使用した。

表 14. 使用菌株

Bacterial strains	Description	Reference	Accession number
MRSA2007-13	Clinical isolates from human	Ishihara et al. [73]	AP024511, AP024512
MRSA2007-13 SAm1-101	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-102	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-103	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13SAm1-104	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-105	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-202	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-203	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-204	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-205	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-206	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-207	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-208	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-209	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-210	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-211	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-212	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-213	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-214	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-215	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	
MRSA2007-13 SAm1-216	phiSA012-resistant variant of MRSA2007-13	This study	

### 3) バクテリオファージ

牛乳房炎由来 *S. aureus* SA003 を宿主とし、下水処理場内の水から分離されたビルレントファージ phiSA012 (NC\_023573.1) を使用した[160]。

### 4) スポットテストと EOP 測定

各菌液 100  $\mu$ L を 3mL の LB top agar に加え、LB agar 上に播種した。LB top agar が固まった後、 $1.0 \times 10^8$  PFU/mL から  $1.0 \times 10^1$  PFU/mL まで 10 倍希釈ずつされた phiSA012 を 4 $\mu$ L 滴下し、37°C で一晩培養した。翌日、ファージによる溶菌によって形成されるプラーク数をカウントし、Efficacy of Plating (EOP) を測定してプラーク形成能を菌株間で比較した。EOP は各菌株の PFU をコントロール宿主である SA003 の PFU で割ることで算出した。各菌株独立した 3 回の試行を実施し、EOP の平均値を算出した。

### 5) MRSA2007-13 のファージ耐性菌株の分離

LB broth を用いて 37°C、180 rpm にて一晩振とう培養した臨床分離株 MRSA2007-

13の菌液 40  $\mu$ L を LB broth 4mL に加え、37°C、2 時間振とう培養した後、phiSA012 (1.0 $\times$ 10<sup>9</sup> PFU/mL) 40  $\mu$ L を加え、さらに 37°C で 6 日間振とう培養した。その後、1mL の PBS にて 4 度洗浄を繰り返し、LB agar に画線塗抹した。37°C で一晩培養後、培地上に形成された単一コロニーを採取し、それぞれを 3mL の LB broth に加え、37°C で一晩振とう培養しクローニングした。これをファージ耐性菌候補株として終濃度 25%グリセリンの状態で-80°Cにて保存した。クローニングされた耐性菌候補株のファージ耐性はスポットテストにて検証した。スポットテストにて Wild type (WT) である MRSA2007-13 と比較し、EOP の減少が認められなかった菌株はファージ耐性を獲得していないとして、以降の試験から排除した。また、スポットテストにおいて Turbid な溶菌斑は確認されるものの、プラーク形成が認められなかった株は SAm1-100 番台、全く溶菌斑が形成されなかったものは SAm1-200 番台の菌株名をつけて管理した (表 12)。さらに、ファージ耐性は経時的濁度測定法を用いても検証を行なった。

#### 6) 経時的濁度測定法によるファージ溶菌活性評価

濁度測定法を用いてファージ phiSA012 の被検菌株に対する溶菌活性を評価した。溶菌活性評価に用いた菌株は LB broth を用いて約 1.0 $\times$ 10<sup>8</sup> CFU/ml になるまで 37°C で振とう培養した。各菌液に phiSA012 が終濃度約 1.0 $\times$ 10<sup>7</sup> PFU/ml (MOI  $\approx$  0.1) となるように混合し、波長 590 nm における吸光値をプレートリーダー (Sunrise Rainbow Thermos RC, TECAN Austria GmbH, Salzburg, Austria) を用いて経時的に測定した。3 回の独立した実験を行い、エラーバーは 1 時間毎に平均値 $\pm$ 標準誤差 (mean $\pm$ SE) を示した。

#### 7) MRSA2007-13 の全ゲノム解析

MRSA2007-13 株を LB broth にて 37°C、一晩振とう培養した。GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich, USA) を用いてゲノム DNA を抽出・精製した。DNA シーケンス解析は株式会社生物技研に委託した。MGIEasy FS DNA Library Prep Set (MGI, China) と MGISP960 (MGI, China) を用いてライブラリーを作製した後、次世代シーケンサーDNBSEQ-G400 (MGI, China) を用いて 2 $\times$ 200 bp の条件でシーケンシングし、ショートリード配列を取得した。また、Ligation Sequence

Kit (Oxford Nanopore Technologies, UK) を用いてライブラリー調整し、GridION と R9.4.1 フローセルを用いてシーケンシングし、ロングリード配列を取得した。ショートリード配列は Cutadapt (ver 2.7) を用いてアダプター配列を除去し、Seqkit (ver 0.11.0) を用いて約 350 万リードペアの配列をサンプリングした。さらに、Sickle (ver 1.33) を用いて、クオリティ値 20 未満の塩基を取り除き、127 塩基未満になったリードとそのペアリードを破棄した。一方、ロングリード配列は Porechop (ver 0.2.3) を用いてアダプター配列を除去し、Filtlong (ver 0.2.0) を用いて 1000 塩基以下のリードを削除した。その後、Unicycler (ver 0.4.7) のデフォルト条件でショートリードとロングリードをハイブリッドアセンブリした。Bandage (ver 0.8.1) を用いてアセンブルされたコンティググラフの結果を確認し、CheckM (ver 1.1.2) を用いてアセンブルされたゲノムデータの完全性を確認した。アノテーションは DDBJ Fast Annotation and Submission Tool (DFAST) を用いて付与した。MRSA2007-13 の完全長ゲノム及びプラスミドは DDBJ に登録し、アクセッション番号はそれぞれ AP024511、AP024512 である。

#### 8) ファージ耐性 MRSA2007-13 株の変異解析

ファージ耐性菌株である MRSA2007-13 SAm1-108 株、MRSA2007-13 SAm1-201 株それぞれを LB broth にて 37°C、一晩振とう培養した。GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich, USA) を用いてゲノム DNA を抽出・精製した。DNA シーケンス解析は株式会社生物技研に委託した。MGIEasy FS DNA Library Prep Set (MGI, China) と MGISP960 (MGI, China) を用いてライブラリーを作製した後、次世代シーケンサーDNBSEQ-G400 (MGI, China) を用いて 2×200 bp の条件でシーケンシングし、ショートリード配列を取得した。得られたリードは Trimmomatic (ver 0.3.9) を用いてアダプター配列、及び低品質リードを除去したのち、BWA (ver 0.1.17) を用いてファージ療法開始前に分離された菌株のゲノム配列にマッピングした。snippy (ver 4.6.0) を用いて一塩基多型 (Single nucleotide variant, SNV) や挿入/欠失 (Insertion/ deletion, Indel) を検出した。大規模な Indel は snippy で検出できないため、CLC Genomics Workbench、及び IGV を用いてマッピング状況を目視で確認して検出した。

## 9) サンガーシーケンシング

ファージ耐性菌株をそれぞれ LB agar に画線塗抹し、37°Cで一晩培養した。翌日、LB agar 上に形成された単一コロニーを PCR に供した。コロニーPCR は1 サンプルあたり KOD FX Neo (東洋紡 (株)、大阪、日本) 0.4  $\mu$ L、2 mM dNTPs (東洋紡 (株)) 4  $\mu$ L、2 $\times$  PCR Buffer for KOD FX Neo (東洋紡 (株)) 10  $\mu$ L、各プライマー (5 pmol) 1 $\mu$ L、滅菌水 3.6  $\mu$ L を混和したものに、滅菌ピペットチップで単一コロニーを釣菌したものを加えた。使用したプライマーは表 14 に示す。PCR 反応は C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, California, CA, USA) を使用して 94°C 2 分の反応後、98°C 30 秒・58°C 30 秒・72°C 1 分 30 秒を 35 サイクル実施し、最後に 72°C 5 分にて反応させた。得られた PCR 産物は FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス株式会社、東京、日本) を用いて精製した。サンガーシーケンシングは北海道システム・サイエンス株式会社に受託した。プライマーはコロニーPCR を実施した際と同一のプライマーを使用した。シーケンシングした波形データは GeneStudio で解析し、CLC Genomics Workbench にてアライメントして変異の有無を確認した。

表 15. コロニーPCR 及びサンガーシーケンシングに用いたプライマー配列

Primers	Sequences	Reference
<i>femA</i>	Fw: 5'-CAAAGCCATCATTCTCACGGG-3'	This study
	Rv: 5'-CAGAGGGGAAATAGAAAACTGC-3'	This study
<i>mgrA</i>	Fw: 5'-AACGTGGTTTTACCACTACCC-3'	This study
	Rv: 5'-ACAAGCTTACGCGTGCTAATTG-3'	This study

## 10) 吸着試験

MRSA2007-13、及びファージ耐性菌株を一晩前培養し、OD<sub>600</sub> = 1.0 になるように LB broth で希釈した菌液 900  $\mu$ L に phiSA012 (1.0 $\times$ 10<sup>6</sup> PFU/mL) 100  $\mu$ L を混合して氷上で 20 分間静置した。その後、10,000 $\times$ g、1 分、4°C で遠心し、上清を回収して SM buffer を用いて 100 倍に希釈した。上清中には菌に吸着できなかった phiSA012 が含まれているため、この上清をファージ液としてプラークアッセイを実施した。MRSA2007-13 110  $\mu$ L と 100 倍希釈した遠心上清 110  $\mu$ L を混合して室温に

て 10 分間静置した。混合液 200  $\mu$ L を 3mL の LB top agar に加え、その後 LB agar 上に播種し 37°C で一晩培養した。翌日、ファージによる溶菌によって形成されるプラーク数をカウントし、以下の計算式に基づき吸着率を算出した。3 回の独立した実験を行い、エラーバーは平均値  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  SE) を示した。統計処理は多重比較検定である Dunnett 検定を用いて有意差を評価した。p < 0.05 の場合を有意差ありとした。

$$\frac{\text{元ファージ液力価} - \text{上清中ファージ力価}}{\text{元ファージ液力価}} \times 100$$

#### 11) 透過型電子顕微鏡による細胞壁構造の観察

一晩前培養した被検菌液を half Karnovsky 固定液 (2.5% グルタルアルデヒドと 2% パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸ナトリウム (pH 7.4)) にて固定した。その後、1% オスミウム水溶液にて同様に固定を行った。遠心分離後の細菌ペレットに 2% 低融点アガロース溶液を加えて懸濁し、ゲル化させた。固定化細菌が混入したゲルを 1  $\times$  1  $\times$  1 mm 四方ブロックに切り出し、ブロックごとエタノールに浸漬して脱水した。その後、電子顕微鏡用置換剤 QY-1 溶液に合計 2 回、それぞれ 30 分間ずつ浸漬した。その後、QY-1: Quetol mix (Methyl nadic anhydride: Quetol 812: Dodecenyl succinic anhydride: DMP-30 = 5:10:5:0.1) に浸漬し、室温で 1 時間振とうしたのち、Quetol mix で再度 1 時間振とうした。最後にシリコンカプセルに予め Quetol mix を入れ、試料を添加した後に 60°C で 48 時間保持して Quetol 樹脂を固形化させた。固形化した樹脂の試料部分から 100 nm の超薄切片を作製し、200 メッシュのグリットにすくい取り、乾燥させた。4% 酢酸ウランで 20 分間、クエン酸亜鉛で 10 秒間染色を行い、透過型電子顕微鏡 (HT7700, Hitachi) を用いて加速電圧 80 kV で観察を行った。

#### 12) ペプチドグリカン抽出

既報に基づき、一部変更して実施した [91]。MRSA2007-13、及びファージ耐性株 MRSA2007-13 SAm1-201 を一晩前培養した菌液 2ml を 16,440  $\times$  g、2 分、4°C で遠心した。遠心後上清を捨て、ペレットを 0.25% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium

dodecyl sulfate, SDS) 添加 0.1 M Tris-HCl (pH 6.8) 1 mL で懸濁し、100°C で 20 分加熱した。加熱後、16,440×g、2 分、4°C で遠心して上清を捨て、1.5 mL の蒸留水で 3 回洗浄し、SDS を完全に取り除いた。1 mL の蒸留水で再懸濁し、30 分 (30 秒破碎・30 秒氷冷×30 セット) 超音波破碎した後、0.1 M Tris-HCl (pH 6.8) を 500 μl 加え、1 時間 37°C で振とう培養した。トリプシン (50 μg/mL) を 500 μl 加え、さらに 1 時間 37°C で振とう培養した。その後、100°C で 3 分加熱し、16,440×g、2 分、4°C で遠心し、ペレットを蒸留水 1 mL で洗浄した。洗浄後、1 M HCl 500 μL でペレットを再懸濁し、4 時間 37°C で振とう培養した。培養後、16,440×g、2 分、4°C で遠心し、ペレットを 4 回蒸留水で洗浄した。200 μL の 12.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5.5) でペレットを再懸濁し、さらに 20 μL のリゾチーム (2×10<sup>7</sup> units/mL) を加え、37°C で一晩振盪培養した。翌日、100°C で 3 分間加熱し、15,880×g、5 分、4°C で遠心し、上清を新しいチューブに移し、50 μL の reduction solution (10mg/mL NaBH<sub>4</sub>、0.5M ホウ酸、pH 9.0) を加え、室温で 20 分振とう培養した。培養後、10 μL の 85% リン酸を加え、pH が 2~3 になっていることを確認し、液体クロマトグラフィー質量分析計 (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) を用いたペプチドグリカンの構造解析を実施した。

### 13) LC-MS を用いたペプチドグリカン構造解析

LC-MS によるペプチドグリカン構造解析は北海道大学薬学研究院創薬科学研究教育センター有機合成医薬学部門にて実施した。Prominence-I LC-2030C Plus (島津, 京都, 日本)、LCMS-8040 (島津, 京都, 日本) を用いて、精製したペプチドグリカンサンプルを分析した。移動相 A には 0.1% 蟻酸、移動相 B にはアセトニトリルを使用した。移動相 A: 移動相 B の組成を 95:5 から開始し、30 分で 70:30 となるようにグラジエント溶離を実施した。70:30 の条件を 10 分間維持し、その後 10:90 を 5 分間、5:95 の条件を 10 分間維持した。ペプチドグリカン精製サンプルの原液 10 μL 使用し、Shim-pack Scepter C18-120 (粒子径 3 μm, 3.0×100 mm) カラム (島津, 京都, 日本) を用いて分離し、UV 検出器の検出波長 210nm で検出した。MS はエレクトロスプレーイオン化法 (Electro-Spray Ionization, ESI) で試料をイオン化し、検出範囲を m/z 150 – 2000 とし、検出した。

#### 14) Lysostaphin 溶菌活性試験

一晩前培養した被検菌液を  $OD_{600} = 1.0$  になるように LB broth で希釈した。希釈した菌液を  $10,000 \times g$ 、5 分、 $4^{\circ}C$  で遠心して上清を捨て、1/2 量の  $2 \times$  LB broth を加えて懸濁した。96 ウェルプレート各ウェルにつき、菌液  $100 \mu L$  と Lysostaphin  $100 \mu L$  (終濃度  $50 \mu g/mL$ ) を加えた。波長  $590 \text{ nm}$  における吸光値をプレートリーダー (Sunrise Rainbow Thermos RC, TECAN Austria GmbH, Salzburg, Austria) を用いて経時的に測定した。3 回の独立した実験を行い、エラーバーは 5 分毎に平均値  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  SE) を示した。

#### 15) エンドライシン溶菌活性試験

一晩前培養した被検菌液を  $OD_{600} = 1.0$  になるように LB broth で希釈した。希釈した菌液を  $10,000 \times g$ 、5 分、 $4^{\circ}C$  で遠心して上清を捨て、1/2 量の  $2 \times$  LB broth を加えて懸濁した。96 ウェルプレート各ウェルにつき、菌液  $100 \mu L$  とエンドライシン Lys-phiSA012  $100 \mu L$  (終濃度  $50 \mu g/mL$ ) を加えた。波長  $590 \text{ nm}$  における吸光値をプレートリーダー (Sunrise Rainbow Thermos RC, TECAN Austria GmbH, Salzburg, Austria) を用いて経時的に測定した。3 回の独立した実験を行い、エラーバーは 5 分毎に平均値  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  SE) を示した。

#### 16) Pull-down assay

既報に基づき、一部変更して実施した [180]。MRSA2007-13、及びフェージ耐性菌 MRSA2007-13 SAm1-201 を一晩前培養した菌液を  $OD_{600} = 1.0$  になるように LB broth で希釈し、5 mL の菌液を  $8,000 \times g$ 、5 分、 $4^{\circ}C$  で遠心して上清を取り除いた。菌体は 1 mL の LB broth で懸濁し、使用した。CHAP ドメインの酵素活性中心をアミノ酸置換し、酵素活性を欠いたエンドライシン Lys-phiSA012 (C54A)  $100 \mu L$  (終濃度  $25 \mu g/mL$ ) と菌液  $100 \mu L$  を混和し、30 秒静置した。その後、 $16,440 \times g$ 、1 分、 $4^{\circ}C$  で遠心して上清を非結合エンドライシンとして回収した。沈殿した菌体は  $200 \mu L$  の PBS でリンスし、10 秒間 vortex した。これを再度  $16,440 \times g$ 、1 分、 $4^{\circ}C$  で遠心して上清を取り除き、 $200 \mu L$  の PBS で再懸濁してこれを結合エンドライシンとした。回収した非結合エンドライシン、または結合エンドライシンは  $5 \times$  サンプル緩衝液と  $4 : 1$  で混合し、 $30 \mu L$  ずつアプライして SDS-PAGE を実施した。ゲルは CBB

染色を行って約 54 kDa の大きさにある Lys-phiSA012 (C54A) のバンドで菌体に非結合、あるいは結合したエンドライシン量を比較した。

#### 17) 薬剤感受性試験

微量液体希釈法により抗菌薬の MIC を測定した。アモキシシリン (AMPC)、セファゾリン (CEZ)、オキサシリン (MIPIC)、ファロペネム (FRPM)、メロペネム (MEPM)、イミペネム (IPM)、リンコマイシン (LCM)、オキシテトラサイクリン (OTC)、ドキシサイクリン (DOXY)、カナマイシン (KM)、エンロフロキサシン (ERFX) の MIC 測定は日本動物特殊診断株式会社にて実施した。薬剤は滅菌蒸留水にて培地中最終薬剤濃度が 0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ~ 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるよう調整し、96 ウェルプレートに 100  $\mu\text{L}$  ずつ分注した。MIPIC の MIC 測定ではミューラーヒントン液体培地 (pH 7.2~7.4、 $\text{Ca}^{2+}$  50 mg/L、 $\text{Mg}^{2+}$  2mg/l、2% NaCl)、その他の薬剤には NaCl を含まないミューラーヒントン液体培地を使用した。被検菌株を LB agar に画線塗抹して 37°C 一晩培養し、単一コロニーを釣菌してマクファーランド濁度で 0.5 となるよう滅菌生理食塩水に懸濁した。この菌液をさらに滅菌生理食塩水で 10 倍希釈し、薬剤の入ったプレートに 5  $\mu\text{L}$  ずつ接種し、37°C で一晩培養した。翌日、菌体の沈渣を認める場合、増殖 (+) と判定し、沈渣の認められない薬剤濃度最小値を MIC 値とした。また、ベンジルペニシリン (PCG)、スルバクタム/アンピシリン (SBT/ABPC)、セフジトレン (CDTR)、セフカペン (CFPN) はドライプレート DPD2 (栄研化学株式会社、栃木、日本) を用いて MIC を測定した。一晩前培養した被検菌液を  $\text{OD}_{600} = 0.26$  になるように滅菌生理食塩水で希釈し、菌液 25  $\mu\text{L}$  をミューラーヒントン液体培地 12 mL (栄研化学株式会社、栃木、日本) に加えた。この菌液 100  $\mu\text{L}$  をドライプレートのウェルに分注し、37°C で 20 時間培養し、ドライプレートの判定基準に基づき MIC を測定した。

#### 18) オキサシリンによる増殖抑制試験

一晩前培養した菌液を  $\text{OD}_{600} = 0.26$  になるように滅菌生理食塩水で希釈し、菌液 25  $\mu\text{L}$  をミューラーヒントン液体培地 12 mL (栄研化学株式会社、栃木、日本) に加えた。96 ウェルプレートの各ウェルにつき、菌液 198ml と各濃度のオキサシリンナトリウム (富士フィルム和光純薬、大阪、日本) を 2  $\mu\text{L}$  (終濃度 0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ~ 128

μg/mL) 加えた。波長 590 nm における吸光値をプレートリーダー (Sunrise Rainbow Thermos RC, TECAN Austria GmbH, Salzburg, Austria) を用いて経時的に測定した。3 回の独立した実験を行い、エラーバーは 1 時間毎に平均値±標準誤差 (mean±SE) を示した。

#### 19)RNA 抽出

MRSA2007-13、及びファージ耐性菌 MRSA2007-13 SAm1-201 を LB broth にて 37°C、180 rpm で一晩前培養した菌液を新しい LB broth に加え、OD<sub>600</sub> = 1.0 になるまで 37°C、180 rpm で振とう培養した。菌液 1 mL を遠心分離して上清を捨て、ペレットを TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) 1mL で懸濁し、さらに φ0.1 mm Zirconia beads 500 μL を加えて破砕機 (Mixer Mill MM300, Retsch, Germany) にて 5 分間、30 Hz で菌体を破壊した。破砕後、遠心分離して上清を回収し、クロロホルム、及びエタノールを用いて RNA 分画を抽出し、サンプル中に含まれる DNA は TURBO DNA-free kit (Thermo Fisher Scientific, USA) で消化した。

#### 20)Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

ReverTra Ace (東洋紡、東京、日本) 及び Random Primer (N)<sub>6</sub> (タカラバイオ、滋賀、日本) を用いて逆転写し、抽出した RNA より complementary DNA (cDNA) を得た。遺伝子発現量は cDNA と THUNDERBIRD SYBR qPCR mix (東洋紡、東京、日本) を用いて CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio Rad, USA) で解析した。解析に使用したプライマーは表 16 に示す。各遺伝子の発現量は *gyrB* の発現量で補正した[81]。

表 16. qRT-PCR に使用したプライマー配列

Primers	Sequences	Reference
<i>gyrB</i> (274 bp)	Fw: 5'-TTAGTGTGGGAAATTGTCGATAAT-3'	Joost et al. [81]
	Rv: 5'-AGTCTTGTGACAATGCGTTTACA-3'	Joost et al. [81]
<i>cidA</i> (88 bp)	Fw: 5'-AGCCGGCAGTATTGTTGGTC-3'	This study
	Rv: 5'-GTTTGCACCGTCTTCTACCC-3'	This study
<i>lrgA</i> (104 bp)	Fw: 5'-ACGCATCAAAAACCAGCACAC-3'	This study
	Rv: 5'-TGCAGGCATAGGAATTGGCA-3'	This study
<i>lytN</i> (150 bp)	Fw: 5'-TGAACCTGGGGACTTAGTGG-3'	This study
	Rv: 5'-TCTGCTTTACGCCATCCACC-3'	This study
<i>lytS</i> (98 bp)	Fw: 5'-GTATATGGGTGGGGCGGATG-3'	This study
	Rv: 5'-GCTTGCGTCTTTGAGCTTGT3'	This study

## 21) RNA-seq 解析

抽出したライブラリー調整、及び RNA シーケンシングは株式会社 Rhelixa に依頼した。Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit (Illumina, USA)、及び NEB Next Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, USA) を用いてライブラリーを作製し、Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, USA) を用いて 150 bp×2 の条件でシーケンシングを行った。得られたリードは Trimmomatic (ver 0.3.9) を用いてアダプター配列、及び低品質リードを除去したのち、HISAT2 (ver 2.1.0) を用いて MRSA2007-13 ゲノム配列にマッピングした。featureCounts (ver 2.0.1) を用いて遺伝子ごとにリードカウントし、TCC-GUI を用いて TMM 正規化をし[157]、発現変動遺伝子の検出を行った。

## 22) マウス腹膜炎モデルを用いた病原性評価

MRSA2007-13、及びフェージ耐性菌 MRSA2007-13 SAm1-201 を一晩前培養した菌液を新しい LB broth に加え、OD<sub>600</sub> = 1.0 になるまで 37°C で振とう培養した。菌液を遠心分離 (8,000×g、4°C、5 分) して、1.0×10<sup>10</sup> CFU/mL となるように PBS で

ペレットを懸濁した。8 週齢メス BALB/c マウス (三協ラボサービス、東京、日本) に菌液 100  $\mu$ L を腹腔内投与し ( $1.0 \times 10^9$  CFU/head)、投与後 48 時間まで 12 時間おきに生存確認を行った。本動物実験は本学動物実験委員会の承認を受け、実施した (承認番号: VH21A13)。各群 n=8 頭で試験を実施し、ログランク検定にて  $p < 0.05$  の時に有意差ありとした。

### 23) マウス皮膚膿瘍モデルによる病原性評価

MRSA2007-13、及びファージ耐性菌 MRSA2007-13 SAm1-201 を一晩前培養した菌液を新しい LB broth に加え、 $OD_{600} = 1.0$  になるまで  $37^\circ\text{C}$  で振とう培養した。菌液を遠心分離 ( $8,000 \times g$ 、 $4^\circ\text{C}$ 、5 分) して、 $2.0 \times 10^9$  CFU/mL となるように PBS でペレットを懸濁した。8 週齢メス BALB/c マウス (三協ラボサービス、東京、日本) に 3 種混合麻酔 (0.75 mg/kg メデトミジン、4 mg/kg ミダゾラム、5 mg/kg ブトルファノール) を腹腔内投与し、麻酔下にて両脇腹から大腿部分をバリカンにて剃毛し、70%アルコールで皮膚表面を消毒した。その後菌液 50  $\mu$ L を皮下投与したのち、0.75 mg/kg アチパメゾールで覚醒させた。投与後は 1 日 1 回膿瘍サイズを測定 (長径 (mm)  $\times$  短径 (mm) =  $\text{mm}^2$ ) し、投与後 7 日目に麻酔処置をしてマウスを安楽殺した。病変部の菌数を測定するため、病変部を採取して細切し、PBS 200  $\mu$ L と  $\phi 5$  mm ジルコニアボールを入れ、組織を破碎してライセートを作製し、平板希釈法を用いて菌数を測定した。本動物実験は本学動物実験委員会の承認を受け、実施した (承認番号: VH21A13)。

## 3. 結果

### 3.1. ファージ耐性 MRSA 株の分離

分離した菌株のファージ耐性を検証するため、phiSA012 を使ったスポットテストを実施し、分離菌株に対するファージの溶菌活性を評価した (図 32A-32D)。すると、プラークを形成せずファージの溶菌活性が全く認められない菌株と (図 32C)、完全なファージ耐性ではないものの、Turbid と呼ばれる淡い溶菌斑が形成され、ファージの溶菌活性が減弱した菌株の 2 パターンが分離された (図 32D)。また、濁度測定法を用いてこれら分離菌株に対する phiSA012 の経時的な溶菌活性を評価した (図

32E-32G)。ファージ耐性のない Wild-type の MRSA2007-13 株に対しては 3 時間付近から濁度の減少が認められ、phiSA012 の溶菌活性が認められたが (図 32E)、スポットテストにて全くプラークを形成しなかった MRSA2007-13 SAm1-201 株では全く濁度の減少は認められず、phiSA012 の溶菌活性に対して完全に耐性を獲得していたことがわかった (図 32F)。一方、スポットテストにて Turbid と呼ばれる淡い溶菌斑の形成が認められた MRSA2007-13 SAm1-106 株に対しては 7-8 時間目付近から緩やかな濁度の減少が認められた (図 32G)。すなわち、phiSA012 は MRSA2007-13 SAm1-106 株に対して溶菌活性を有するものの、その活性は Wild-type の MRSA2007-13 株より減弱し、部分的にファージ耐性を獲得していることがわかった。次に、ファージ耐性の原因が宿主菌表面に存在するレセプターへの吸着阻害によるものかどうかを検証するため、ファージ吸着試験を行った (図 32H)。すると、phiSA012 の吸着率は MRSA2007-13 SAm1-201、MRSA2007-13 SAm1-106 の両株とも Wild-type の MRSA2007-13 株と比較し、有意に減少していることがわかった。つまり、ファージの宿主菌表面への吸着率の低下がファージ耐性、及び部分耐性に寄与していることがわかった。さらに、ファージの宿主菌への吸着率低下の原因を探るため、透過型電子顕微鏡を用いて Wild-type の MRSA2007-13 株とファージ耐性株の MRSA2007-13 SAm1-201 株の細胞壁構造を観察した。すると、MRSA2007-13 SAm1-201 株においてペプチドグリカン層の上部に Wild-type には認められない不整な構造体が認められた (図 32I, 32J)。ゆえに、ファージ耐性株ではこのような細菌細胞壁構造の変化によりファージの宿主細菌レセプターへの吸着が阻害され、溶菌活性の減弱、あるいは全く活性が認められなくなったと考えられる。

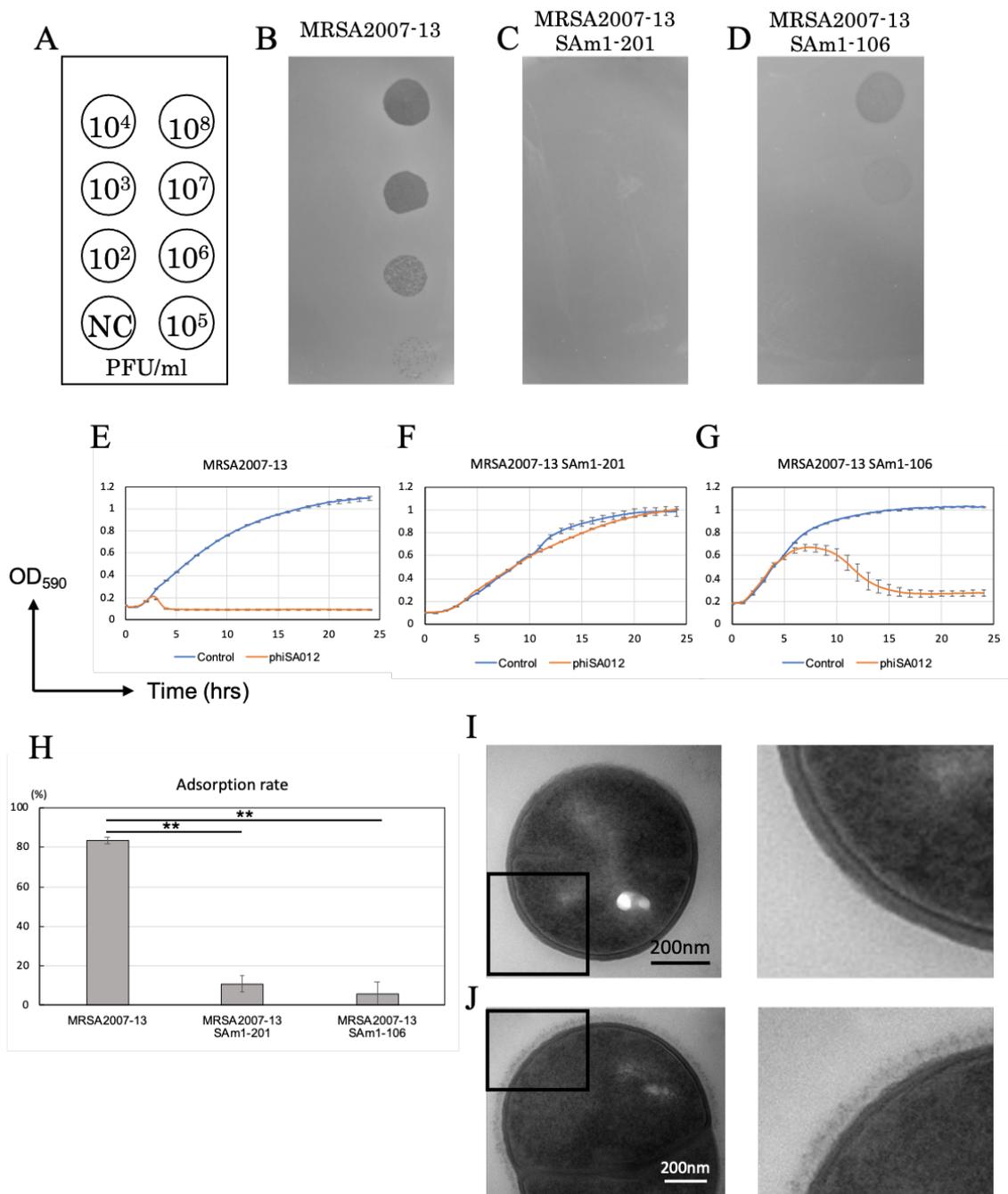


図 32. MRSA2007-13 のファージ耐性獲得とファージ吸着性の変化

(A)~(D) スポットテストによるファージ耐性評価。(A) スポットした場所と phiSA012 の希釈系列の模式図。NC は phiSA012 の溶媒である SM buffer を滴下した。(B) スポットテストによる MRSA2007-13 株、(C) MRSA2007-13 SAm1-201 株、(D) MRSA2007-13 SAm1-106 株に対する phiSA012 の溶菌活性評価。(E) MRSA2007-13 株、(F) MRSA2007-13 SAm1-201 株、(G) MRSA2007-13 SAm1-106 株に対する phiSA012 の溶菌活性を濁度測定法により評価した。“Control” は菌液に SM buffer を、“phiSA012” は菌液に MOI≒0.1 となるよう

phiSA012 を加えた。各菌株独立した 3 回の試行を実施し、波長 590 nm における吸光値を平均値±SE で示した。(H) phiSA012 の各菌株に対する吸着性を測定した。各菌株独立した 3 回の試行を実施し、吸着率を平均値±SE で示した。統計処理は Dunnett 検定を行い、 $p < 0.05$  で有意差とした (\*\* $p < 0.01$ )。 (I) 透過型電子顕微鏡を用いた MRSA2007-13 株、及び (J) MRSA2007-13 SAm1-201 株の細胞壁構造観察。左側の黒四角で囲まれた範囲の拡大像を右側に示した。

### 3.2. MRSA のファージ耐性に寄与する遺伝子変異の特定

MRSA2007-13 SAm1-201 株、及び MRSA2007-13 SAm1-106 株の phiSA012 に対する耐性獲得に関与する遺伝子を特定するため、両分離菌株のゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer, NGS) を用いてショートリードデータを取得し、Wild-type である MRSA2007-13 株の全ゲノム配列にマッピングして変異遺伝子を特定した (表 17)。すると、phiSA012 に対して完全な耐性を獲得していた MRSA2007-13 SAm1-201 株では *femA* のミスセンス変異 (G316V) と *mgrA* の 1 塩基挿入によるフレームシフト変異が認められた。また、phiSA012 に対して部分耐性を示し、溶菌活性の減弱が認められた MRSA2007-13 SAm1-106 株においては 3 遺伝子にまたがる 2544 bp の領域が欠失しており、その領域には、MRSA2007-13 SAm1-201 株において遺伝子変異が認められた *mgrA* を含んでいることがわかった。FemA は *Staphylococcus* 属菌特有のペプチドグリカン構造であるペンタグリシン架橋を合成する酵素の 1 つである [13, 145, 156]。また、MgrA は Rat (Regulator of autolysis) とも呼ばれ、Autolysis や薬剤耐性、さらには病原性遺伝子など 350 程度の遺伝子発現を直接、あるいは間接的に調節する転写制御因子として知られている [70, 102]。以降はこれら 2 遺伝子に着目して解析を進めた。MRSA2007-13 SAm1-201 株、及び MRSA2007-13 SAm1-106 株以外のファージ耐性分離株における *femA*、*mgrA* の変異の有無について調べるため、サンガーシーケンシングによって各ファージ耐性株の *femA*、及び *mgrA* の塩基配列を決定した (表 18)。すると、全てのファージ耐性株において *mgrA* の変異が認められ、PCR 反応で遺伝子増幅が認められずに欠失が疑われる株、Indel によるフレームシフト変異、ミスセンス変異、さらにはトランスポゾン配列の挿入など、多岐に渡る変異パターンが認められた。一方、*femA* 変異は MRSA2007-13 SAm1-201 株を含めた 22 株中、16 株 (72.7%) に認められ、ミ

スセンス変異や Indel によるフレームシフト変異が認められた。また、*femA* 変異を持つ菌株はスポットテストにおいて MRSA2007-13 SAm1-201 と同様、ファージの溶菌作用によるプラークを全く形成せず、完全にファージ耐性を獲得していた (図 33A-33C)。一方、*femA* 変異を持たない菌株は MRSA2007-13 SAm1-106 株と同様に Turbid と呼ばれる淡い溶菌斑を形成することがわかった (図 33D, 33E)。さらに、濁度測定法を用いてファージ耐性を検証したところ、*femA* 変異を持つ菌株は全く濁度の減少が認められなかったのに対し (図 33F, 33G)、*femA* 変異を持たない菌株では 5-7 時間付近から緩やかに濁度の減少が見られた (図 33H, 33I)。従って、全てのファージ耐性株で認められた *mgrA* 変異は、ファージの宿主菌への吸着を阻害することによって部分的なファージ耐性を付与するのに対し、*femA* 変異はファージの溶菌活性に対して完全な耐性を獲得する上で必要な因子である可能性が示唆された。

表 17. NGS を用いた変異遺伝子の検出

STRAIN	POS	TYPE	COVERAGE (%)	STRAND	NT_POS	AA_POS	EFFECT	GENE	PRODUCT
MRSA2007-13	737264	snv (C→A)	439 (100%)	-	947/1263	316/420	Gly316Val	<i>femA</i>	glycine glycytransferase FemA
SAm1-201	1381976	insertion (G→GT)	457 (99.1%)	+	331/444	111/147	Asn111fs	<i>mgrA</i>	MarR family transcriptional regulator
MRSA2007-13	1379526		0	-	1-867/909	1-289/302	deletion		aldo/keto reductase family oxidoreductase
SAm1-106	-	deletion	0	-	1-927/927	1-308/308	deletion		GTP-binding protein
	1382069		0	+	1-422/444	1-141/147	deletion	<i>mgrA</i>	MarR family transcriptional regulator

表 18. サンガーシーケンシングによる *femA*、*mgrA* 変異の検出

strain	<i>femA</i>		<i>mgrA</i>		
	NT_POS	Type	NT_POS	Type	
SAm1-101				deletion	
SAm1-102				deletion	
SAm1-103	Non-mutantation			deletion	
SAm1-104			289/444	transposon ins (IS256)	
SAm1-105				deletion	
SAm1-202	1222/1263	ins (G→GCA)	125/444	transposon ins (IS256)	
SAm1-203	947/1263	snv (G→T)	289/444	transposon ins (IS256)	
SAm1-204	1222/1263	ins (G→GCA)	125/444	transposon ins (IS256)	
SAm1-205	1123/1263	del (GAAGATGCTG→G)	289/444	transposon ins (IS256)	
MRSA2007-13	SAm1-206	1206/1263	del (TAAACCTGTTTACGCAG→T)	289/444	transposon ins (IS256)
	SAm1-207	1222/1263	ins (G→GC)	373/444	del (GATGAAG→G)
	SAm1-208	986/1263	snv (C→A)	241/444	ins (T→TAGACT)
	SAm1-209	1206/1263	del (TAAACCTGTTTACGCAG→T)	289/444	transposon ins (IS256)
	SAm1-210	1206/1263	del (TAAACCTGTTTACGCAG→T)	289/444	transposon ins (IS256)
	SAm1-211	1222/1263	ins (G→GCA)	125/444	transposon ins (IS256)
	SAm1-212	1206/1263	del (TAAACCTGTTTACGCAG→T)	289/444	transposon ins (IS256)
	SAm1-213	947/1263	snv (G→T)	289/444	transposon ins (IS256)
	SAm1-214	1221	del (AG→A)	143/444	snv (G→A)
	SAm1-215	1206/1263	del (TAAACCTGTTTACGCAG→T)	289/444	transposon ins (IS256)
	SAm1-216	1222/1263	ins (G→GCA)	125/444	transposon ins (IS256)

del, deletion; ins, insertion; snp, single nucleotide polymorphism.

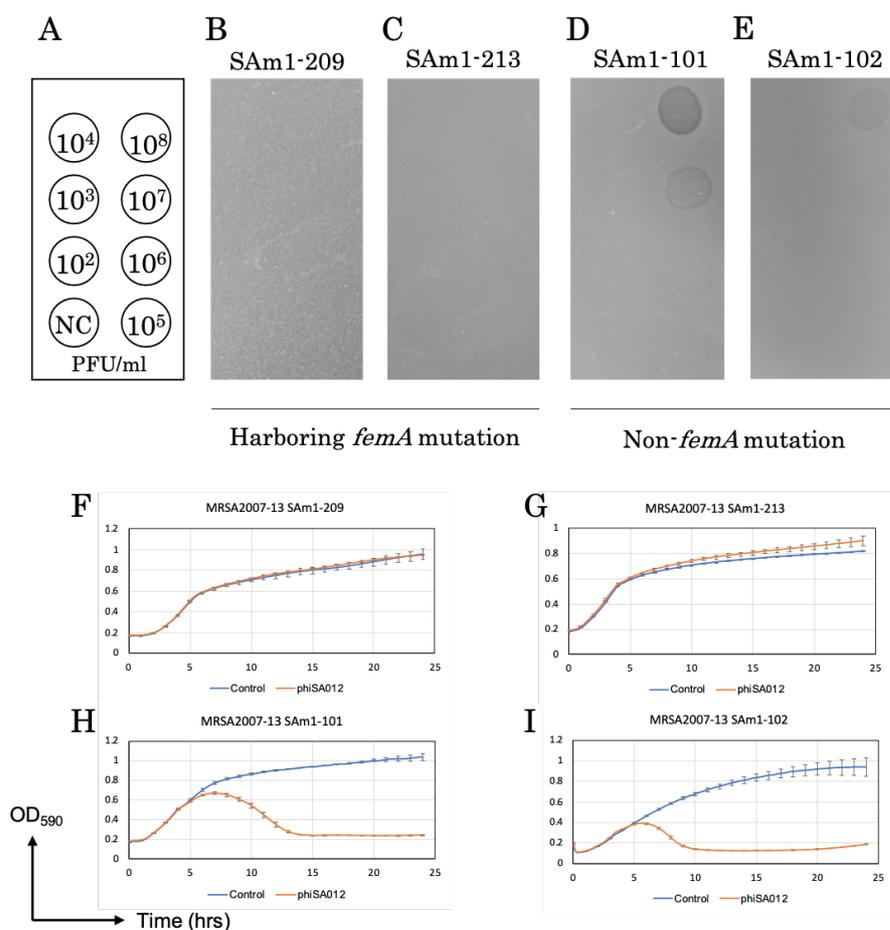


図 33. *femA* 変異の有無によるファージ溶菌活性の差異

(A)~(E) スポットテストによるファージ耐性評価。(A) スポットした場所と phiSA012 の希釈系列の模式図。NC は phiSA012 の溶媒である SM buffer を滴下した。(B) *femA* 変異を持つ MRSA2007-13 SAm1-209 株、及び(C) MRSA2007-13 SAm1-213 株、また *femA* 変異を持たない (D) MRSA2007-13 SAm1-101 株、及び(E) MRSA2007-13 SAm1-102 株に対する phiSA012 の溶菌活性をスポットテストにより評価した。(F) MRSA2007-13 SAm1-209 株、(G) MRSA2007-13 SAm1-213 株、(H) MRSA2007-13 SAm1-101 株、及び (I) MRSA2007-13 SAm1-102 株に対する phiSA012 の溶菌活性を濁度測定法により評価した。“Control” は菌液に SM buffer を、“phiSA012” は菌液に MOI≒0.1 となるよう phiSA012 を加えた。各菌株独立した 3 回の試行を実施し、波長 590 nm における吸光値を平均値±SE で示した。

3.3. *femA* 変異によるペプチドグリカン構造の変化とエンドライシン活性の低下  
FemA はペプチドグリカン構造であるペンタグリシン架橋の合成酵素であることから、*femA* 変異によるファージ耐性菌株におけるペプチドグリカン構造の変化の有無

を検証するため、LC-MSを用いて構造解析を実施した。Wild-typeであるMRSA2007-13株と *femA* 変異を有するファージ耐性株 MRSA2007-13 SAm1-201 株のペプチドグリカン精製物を比較したところ、HPLCにてファージ耐性株にのみ見られるピーク (Retention time: 4.85 min)、Wild-typeと比較してファージ耐性株において非常に高いピーク (Retention time: 6.5 min)、また Wild-type にのみ見られるピーク (Retention time: 6.817 min) がそれぞれ観察された (図 34A)。引き続きそれぞれのピークをMSにて解析した結果、Wild-typeに認められた Retention time: 6.817 minのピークにはグリシン架橋を形成するグリシンの数が 2~5 個のペプチドグリカン断片が検出され、*femA* 変異を持つファージ耐性株ではほとんど検出されなかった (図 34B、表 19)。一方、Retention time が 4.85 min、及び 6.5 min のピーク中にはいずれもグリシン 1 つで架橋を形成していると思われるペプチドグリカン断片が検出された (表 19)。従って、本来 *S. aureus* はペンタグリシンでペプチドグリカンの架橋構造が形成されるのに対し、*femA* 変異を持つファージ耐性株の架橋構造はモノグリシンとなっていることが LC-MS 解析によって判明した (図 34C)。

次に、ペプチドグリカン構造の変化がペプチドグリカン切断酵素の溶菌活性に影響するかを調べるため、ファージ耐性菌に対する Lysostaphin の溶菌活性を評価した。Lysostaphin はペンタグリシンを形成する 2 番目と 3 番目、及び 3 番目と 4 番目のグリシン間を切断する触媒ドメインと、ペンタグリシンを認識して結合する SH3b ドメイン (細胞壁結合ドメイン) からなるペプチドグリカン切断酵素として知られている [55, 107, 168] (図 34B)。Lysostaphin は wild-type の MRSA2007-13 と *femA* 変異を持たない MRSA2007-13 SAm1-106 株に対しては急速な濁度の減少を引き起こす一方、*femA* 変異を持つ MRSA2007-13 SAm1-201 株に対しては濁度の減少は見られず、溶菌活性は認められなかった (図 34D-34F)。また、同様にファージ由来溶菌酵素であるエンドライシン Lys-phiSA012 のファージ耐性菌に対する溶菌活性を評価した。第 2 章でも述べたように、Lys-phiSA012 は主な酵素活性としてペンタグリシンを形成する 5 番目のグリシンと D-アラニン間を切断する CHAP ドメインと、Lysostaphin 同様ペンタグリシンを認識して結合する SH3b ドメインからなるペプチドグリカン切断酵素である。Wild-type の MRSA2007-13 株と *femA* 変異を持たない MRSA2007-13 SAm1-106 株は Lys-phiSA012 によって溶菌される様子が見られた一方、*femA* 変異を持つ MRSA2007-13 SAm1-201 株に対して Lys-phiSA012 は全く溶

菌活性が認められなかった (図 34G-34I)。さらに、MRSA のエンドライシン感受性の変化の原因を探るため、Lys-phiSA012 の *femA* 変異を持つファージ耐性菌への結合性を pull-down assay によって評価した。ペプチドグリカンへの結合性を有しながら酵素活性を欠いたエンドライシンを手に入れるため、CHAP ドメインの酵素活性中心をアミノ酸置換し、溶菌活性を欠損させた Lys-phiSA012 (C54A) を作製した。Lys-phiSA012 (C54A) と菌株を混和して一定時間おき、遠心分離後にペレットから検出されたエンドライシンは MRSA と結合していたもの (Bound, B)、一方上清中から検出されたエンドライシンは結合していなかったもの (Unbound, U) として評価した。すると、wild-type である MRSA2007-13 株では結合していたエンドライシンが検出された一方、*femA* 変異を持つ MRSA2007-13 SAm1-201 株では結合していたエンドライシンはほとんど検出されなかった (図 34J)。従って、*femA* 変異はペプチドグリカンの架橋構造をペンタグリシンからモノグリシンへと変化させ、ファージ由来溶菌酵素であるエンドライシンの SH3b がモノグリシンには結合できずペプチドグリカンを切断することができないため、ファージ phiSA012 の溶菌活性に完全な耐性を獲得したことがわかった。

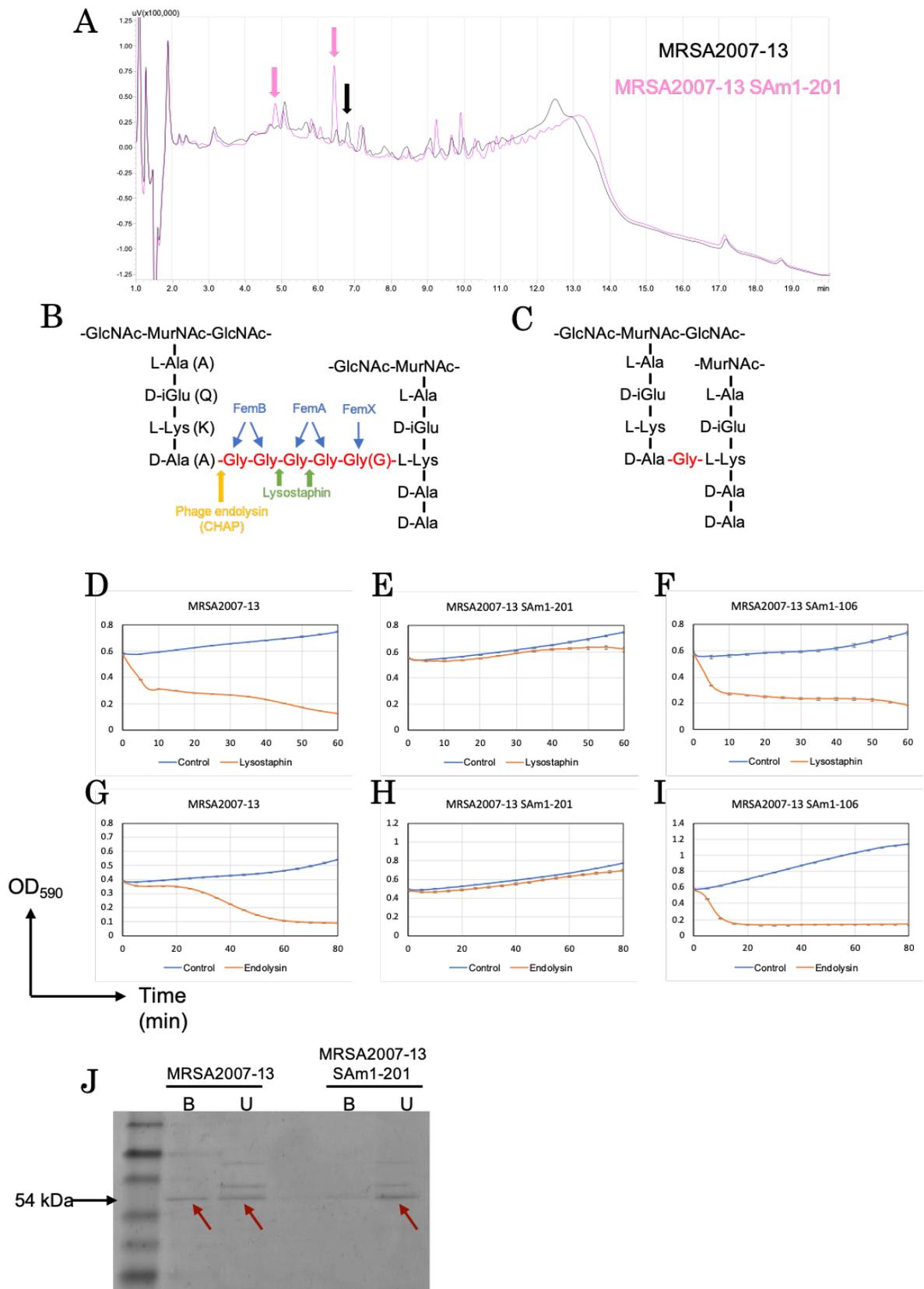


図 34. *femA* 変異に伴う細胞壁構造の変化と溶菌酵素感受性の変化

(A) LC-MS 解析のうち、HPLC にて検出されたペプチドグリカン断片のピークプロファイル。黒線は MRSA2007-13 株、ピンク線は MRSA2007-13 SAm1-201 株から精製したペプチドグリカン解析の結果。矢印で示したピークは MS で解析し、結果を表 19 に示した。(B) *Staphylococcus* 属菌のペプチドグリカン構造。(C) LC-MS 解析より予測された MRSA2007-13 SAm1-201 株のペプチドグリカン構造。モノグリシンによる架橋構造となっている。(D) MRSA2007-13 株、(E) MRSA2007-13 SAm1-201 株、(F) MRSA2007-13 SAm1-106 株に対する Lysostaphin (終濃度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の溶菌活性を濁度測定法にて評価した。(G) MRSA2007-13 株、(H) MRSA2007-13 SAm1-201 株、(I) MRSA2007-13 SAm1-106 株に対する Lysostaphin (終濃度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の溶菌活性を濁度測定法にて評価した。各菌株独立した 3 回の試行を実施し、波長 590 nm における吸光値を平均値 $\pm$ SE で示した。(J) Pull-down assay による MRSA2007-13 株、及び MRSA2007-13 SAm1-201 株に対する Lys-phiSA012 (C54A) のエンドライシン結合性評価。B は結合分画 (沈殿) を示し、U は非結合分画 (上清) を示す。

表 19. LC-MS 解析にて検出されたペプチドグリカン断片

Retention time (min)	m/z		Proposed sum formula	Predicted structure	MRSA2007-13	MRSA2007-13 SAm1-201
	Observed	Calculated (H <sup>+</sup> )				
4.850	1023.4	z=1	1023.4841			
	512.4	z=2		C41H71N10O20	GlucNAc-MurNAc-AQK(G <sub>2</sub> )AA	ND
	503.3	z=2	-H <sub>2</sub> O			
6.500	1023.5	z=1	1023.4841			
	512.5	z=2		C41H71N10O20	GlucNAc-MurNAc-AQK(G <sub>2</sub> )AA	UP
	503.3	z=2	-H <sub>2</sub> O			
6.817	591.0	z=2	1181.5401(2H)	C46H79N13O23	GlucNAc-MurNAc-AQK(G <sub>2</sub> )A	ND
	1080.4	z=1	1080.5055	C43H74N11O21	GlucNAc-MurNAc-AQK(G <sub>2</sub> )AA	DOWN
	540.9	z=2				
6.817	1137.6	z=1	1137.5270	C45H77N12O22	GlucNAc-MurNAc-AQK(G <sub>2</sub> )AA	ND
	569.2	z=2				
	626.4	z=2	1252.5772 (2H)	C49H84N14O24	GlucNAc-MurNAc-AQK(G <sub>2</sub> )AA	DOWN
	597.9	z=2	1195.5557 (2H)	C47H81N13O23	GlucNAc-MurNAc-AQK(G <sub>2</sub> )AA	DOWN

### 3.4. ファージ耐性と $\beta$ -ラクタム系抗菌薬感受性の関係性

既報において、*femA* 変異によるペンタグリシン構造の変化によって抗菌薬感受性が上昇するという報告があることから[14, 92, 155, 156]、ファージ耐性菌株の抗菌薬 MIC 値を測定し、wild-type である MRSA2007-13 と比較した (表 20)。すると、*femA* 変異を持つファージ耐性菌株は wild-type と比較して一様に  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の MIC 値が大幅に減少し、感受性が上昇していることがわかった。Wild-type の MRSA2007-13 株では最高濃度の 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のセファゾリン、オキサシリン、ファ

ロペネム存在下においても菌の増殖が見られたものの、*femA* 変異を有する MRSA2007-13 SAm1-201 株では 1/1000 量の 0.125 µg/mL においても菌の増殖が抑制されていた。一方で、*femA* 変異を持たないファージ耐性菌の β-ラクタム系抗菌薬の薬剤感受性は変化しなかった。また、*femA* 変異の有無に関わらず、ファージ耐性菌においてテトラサイクリン系抗菌薬とフルオロキノロン系抗菌薬の MIC 値が wild-type の MRSA2007-13 株と比較し、1/4~1/2 と僅かに減少し、感受性が上昇している株も認められた。一方で、*femA* 変異の有無に関わらずリンコマイシン、及びカナマイシンの薬剤感受性の変化は認められなかった。さらに、濁度測定法を用いてオキサシリンによる細菌の増殖抑制効果を調べた。すると、MRSA2007-13 株と MRSA2007-13 SAm1-106 株は 128 µg/mL のオキサシリン存在下においても 18 時間付近から菌の増殖が見られた一方、*femA* 変異を有する MRSA2007-13 SAm1-201 株では 0.125 µg/mL のオキサシリンで菌の増殖は抑えられ、MIC 値と一致する結果となった (図 35)。

表 20. ファージ耐性菌に対する抗菌薬 MIC 値

Antibiotics (µg/mL)	MRSA2007-13						
	WT	Harboring <i>femA</i> mutation			Non- <i>femA</i> mutation		
		SAm1-201	SAm1-209	SAm1-213	SAm1-101	SAm1-102	SAm1-106
AMPC	64	8	16	2	64	64	64
CEZ	>128	0.125	1	0.25	>128	>128	>128
MPIPC	>128	0.125	4	0.125	>128	>128	>128
PCG	>16	2	2	4	>16	>16	>16
S/A	8/16	0.5/1	0.5/1	0.5/1	8/16	8/16	8/16
CDTR	>2	<0.5	<0.5	<0.5	>2	>2	>2
CFPN	>2	<0.5	<0.5	<0.5	>2	>2	>2
FRPM	>128	<0.125	0.25	0.125	>128	>128	>128
MEPM	32	<0.125	4	0.125	32	32	32
IPM	64	<0.125	1	0.125	64	>128	>128
LCM	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
OTC	128	64	128	128	128	64	64
DOXY	8	4	8	4	8	8	8
KM	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ERFX	128	64	64	32	64	64	64

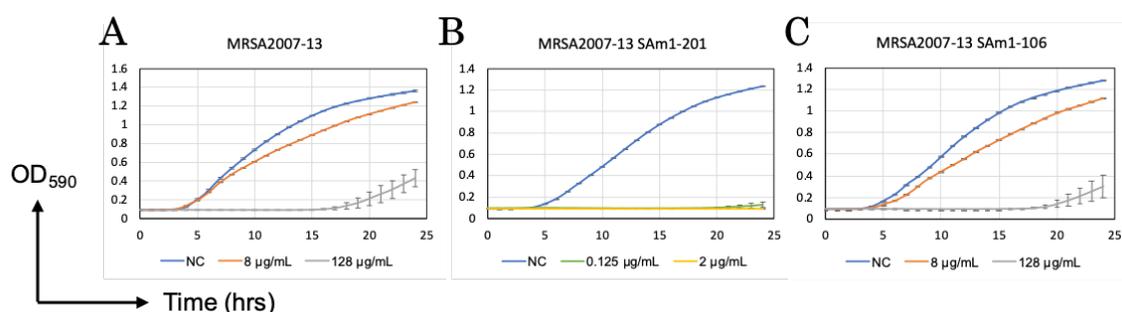


図 35. オキサシリンによる細菌増殖抑制評価

(A) MRSA2007-13 株、(B) MRSA2007-13 SAm1-201 株、及び (C) MRSA2007-13 SAm1-106 株に対するオキサシリンの増殖抑制効果を濁度測定法により評価した。各菌株独立した 3 回の試行を実施し、波長 590 nm における吸光値を平均値±SE で示した。

### 3.5. ファージ耐性菌における *mgrA* 変異と Autolysis の活性化

細菌は細胞壁合成、細胞の二分分裂、ペプチドグリカンのターンオーバーやリサイクルをするために、Autolysin と呼ばれる様々な溶菌酵素を自ら産生・作用させている [108]。Autolysin は細胞壁を破壊し、溶菌を引き起こす活性を持つことから (Autolysis)、その遺伝子発現や酵素活性は転写制御因子や膜タンパク質によって制御されている [70, 108, 133]。細菌は細胞壁の合成と Autolysis による細胞壁破壊のバランスを保つことで細胞壁の完全性を維持しているが、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬は細胞壁合成阻害作用を利用してこのバランスを崩し、Autolysis によって細菌を死滅させる効果を示す [169]。MgrA は Regulator of autolysis とも呼ばれる転写制御因子であり、Autolysis を負に制御している。MgrA は LytM や LytN と呼ばれる Autolysin や Autolysin を細胞内からペプチドグリカン層へと輸送するホリン CidA の遺伝子発現を抑制し、さらには二成分制御系 (Two component system, TCS) と呼ばれる LytSR の遺伝子発現を亢進させることで CidA と拮抗するアンチホリン LrgA の遺伝子発現を正に制御している [78] (図 36A)。ゆえに、全てのファージ耐性菌に見られた *mgrA* の変異によって Autolysis が活性化し、その結果として  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の感受性が上昇したのかを検証した。界面活性剤である Triton-X を用いて Autolysis assay を実施したところ、*femA* 変異の有無に関わらず、ファージ耐性菌は wild-type の MRSA2007-13 株と比較して Autolysis の活性化が認められた (図 36B)。また、ファージ耐性菌 MRSA2007-13 SAm1-201 株の Autolysis に関連する遺伝子の発現量を

qRT-PCRにて比較定量した。すると、wild-typeのMRSA2007-13株と比較して、Autolysin *lytN*は約14倍、ホリン *cidA*は約4倍遺伝子発現量が上昇していた(図36C, 36D)。一方、Autolysisを負に制御する *lytS*、及び *IrgA*の遺伝子発現量はいずれもwild-typeと比較して減少していた(図36E, 36F)。従って、*mgrA*の変異は部分的にファージ耐性を獲得させる一方、細菌のAutolysisを活性化させることがわかった。しかしながら、*femA*変異を持たないファージ耐性菌ではAutolysisが活性化しているもののβ-ラクタム系抗菌薬の感受性が変わらないことから、β-ラクタム系抗菌薬感受性の上昇には *femA*の変異が重要であることがわかった。

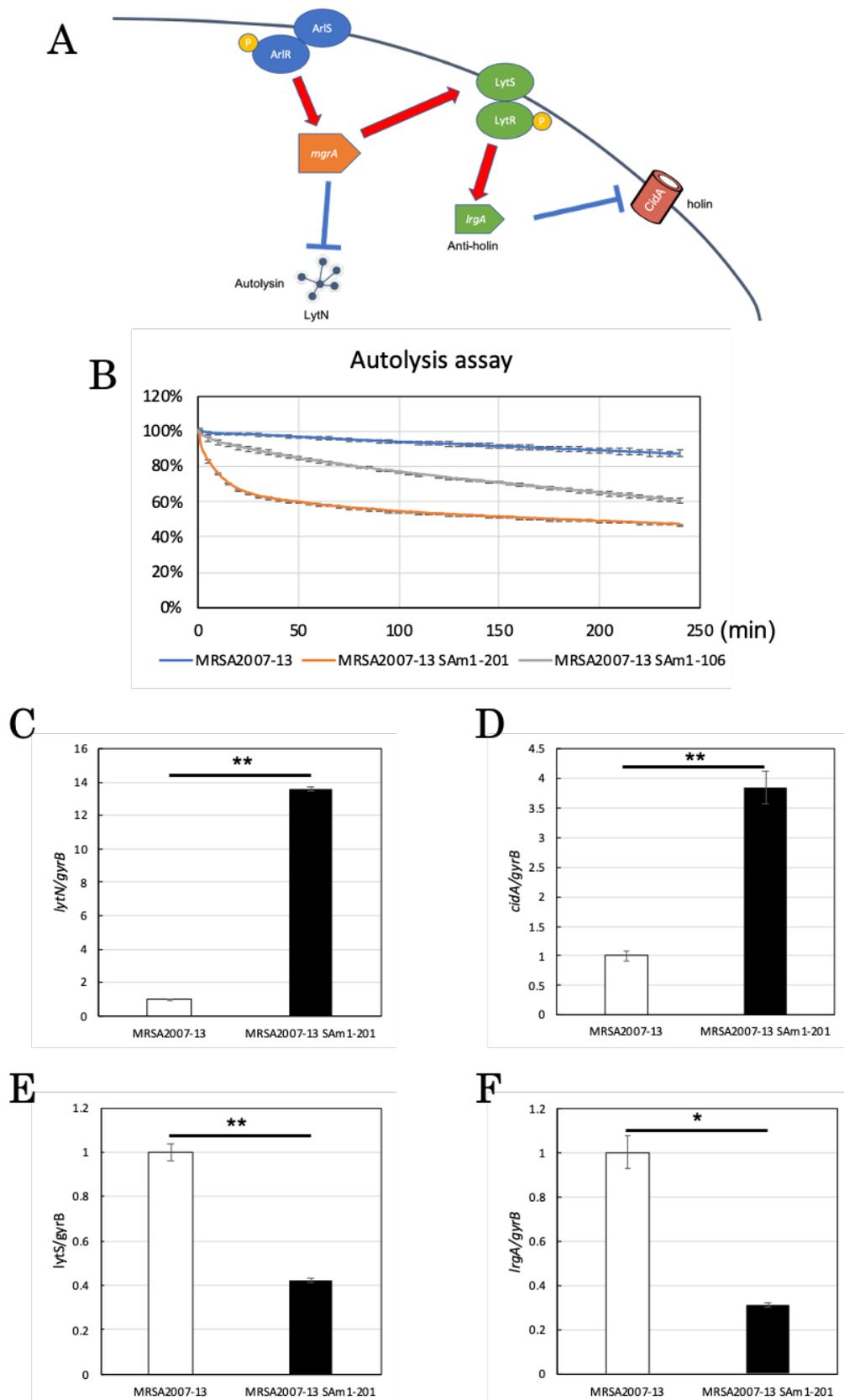


図 36. ファージ耐性菌における Autolysis 活性評価

(A) Autolysis を負に制御する MgrA の模式図。MgrA は autolysin である *lytN* 及びホリン *cidA* の遺伝子発現を抑制し、また TCS として知られる *lytSR* の遺伝子発現を亢進することで間接的にアンチホリン *lrgA* の遺伝子発現を亢進させている。(B) TritonX-100 を用いた各菌株の Autolysis 評価。各菌株独立した 3 回の試行を実施し、0 min 時点の波長 590 nm における吸光値を 100%とし他時の吸光値の変動を平均値±SE で示した。(C) 対数増殖期における *lytN*、(D) *cidA*、(E) *lytS*、及び (F) *lrgA* の遺伝子発現量を qRT-PCR にて評価した。遺伝子発現量は *gyrB* の発現量で補正し、MRSA2007-13 の遺伝子発現量を 1 としたときの Fold-change で比較した。各遺伝子独立した 3 回の試行を実施し、平均値±SE で示した。統計処理は F 検定による等分散性を評価したのち、ステューデントの t 検定、あるいはウェルチの t 検定を実施し、 $p < 0.05$  で有意差とした (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )。

### 3.6. フェージ耐性菌における *mgrA* 変異が及ぼす遺伝子発現変動

MgrA は Autolysis に関わる遺伝子のみならず、数多くの遺伝子発現を制御する因子として知られている [34, 78, 102]。そこで、*mgrA* 変異を持つフェージ耐性菌の表現型変化を推定するため、MRSA2007-13 SAm1-201 株の RNA-seq 解析を実施し、網羅的に遺伝子発現量の変化を調査した。すると、wild-type の MRSA2007-13 株と比較し、細胞表面に発現するタンパク質である *sasG*、*ebh*、*sraP* や、*sarV* などの転写制御因子、1 型莢膜合成酵素、さらには尿素代謝に関わるタンパク質など、多岐にわたる遺伝子の発現量が上昇していた (表 21)。一方で、VII 型分泌タンパク質や *lukGH* と呼ばれる白血球溶血毒素、エンテロトキシンなど病原性に関わる遺伝子や薬剤排出ポンプ、さらには 8 型莢膜合成酵素の遺伝子発現量が減少していたことがわかった (表 22)。

表 21. MRSA2007-13 SAm1-201 株において発現量が上昇していた遺伝子の一部

Genes up >2-fold in phage-resistant MRSA			
	gene name	Fold change	Function
Cell surface protein	<i>sasG</i>	127.7	Surface protein G
	<i>ebh</i>	52.5	Hyperosmolarity resistance protein
	<i>sraP</i>	6.1	Serine-rich repeat glycoprotein adhesin
Transcriptional regulators	<i>sarT</i>	9.9	HTH-type transcriptional regulator
	<i>sarU</i>	45.7	HTH-type transcriptional regulator
	<i>sarV</i>	6.3	HTH-type transcriptional regulator
Capsular polysaccharide	<i>cap1A</i>	10.2	Type 1 capsular polysaccharide synthesis protein
	<i>cap1B</i>	12.8	Type 1 capsular polysaccharide synthesis protein
	<i>cap1C</i>	12.0	Type 1 capsular polysaccharide synthesis protein
Urea metabolism		8.0	Urea transporter
	<i>ureA</i>	121.7	Urease subunit gamma
	<i>ureB</i>	78.7	Urease subunit beta
	<i>ureC</i>	48.4	Urease subunit alpha
	<i>ureE</i>	26.9	Urease accessory protein
	<i>ureF</i>	26.4	Urease accessory protein
	<i>ureG</i>	16.3	Urease accessory protein
	<i>ureD</i>	12.7	Urease accessory protein

表 22. MRSA2007-13 SAm1-201 株において発現量が減少していた遺伝子の一部

Genes down >2-fold in phage-resistant MRSA			
	gene name	Fold change	Function
Virulence factors	<i>esaA</i>	3.7	Type VII secretion protein
	<i>esaB</i>	2.7	Type VII secretion protein
	<i>esaC</i>	3.9	Type VII secretion protein
	<i>essA</i>	4.1	Type VII secretion protein
	<i>essB</i>	4.6	Type VII secretion protein
	<i>essC</i>	4.0	Type VII secretion protein
	<i>esxA</i>	2.8	Type VII secretion protein
	<i>esxB</i>	3.4	Type VII secretion protein
	<i>rna III</i>	5.6	RNAIII / $\delta$ -hemolysin)
	<i>lukH</i>	3.8	Bi-component leukocidin LukGH subunit
	<i>lukG</i>	2.7	Bi-component leukocidin LukGH subunit
	<i>nuc</i>	12.1	Thermonuclease family protein
	<i>ss111</i>	7.1	Superantigen-like protein 11
	<i>sak</i>	3.7	Staphylokinase
	<i>seo</i>	2.2	Staphylococcal enterotoxin type O
	<i>scin</i>	2.6	Complement inhibitor
Efflux pump	<i>norB</i>	20.1	Multidrug efflux MFS transporter
	<i>tet38</i>	6.3	Tetracycline efflux MFS transporter
Capsular polysaccharide	<i>cap8A</i>	3.2	Type 8 capsular polysaccharide synthesis protein
	<i>cap8B</i>	2.7	Type 8 capsular polysaccharide synthesis protein
	<i>cap8C</i>	2.1	Type 8 capsular polysaccharide synthesis protein
	<i>cap8D</i>	2.1	Type 8 capsular polysaccharide synthesis protein
	<i>cap8F</i>	2.3	Type 8 capsular polysaccharide synthesis protein
	<i>cap8G</i>	2.2	Type 8 capsular polysaccharide synthesis protein

### 3.7. MRSA 感染症モデルマウスを用いたファージ耐性菌の病原性評価

*mgrA* 変異を有するファージ耐性菌 MRSA2007-13 SAm1-201 株の RNA-seq 解析の結果より、様々な病原性遺伝子の発現量低下が認められたため、マウスモデルを用いてファージ耐性菌の病原性を評価した。Wild-type である MRSA2007-13 株を腹腔内投与したマウスは 24 時間以内に全頭死亡したが、ファージ耐性菌 MRSA2007-13 SAm1-201 株を投与したマウスの 48 時間生存率は 50%であり、生存率に大幅な違いが見られた (図 37A)。また、8 週齢の BALB/c マウスの皮下に菌液を投与 ( $1.0 \times 10^8$  CFU/site) して膿瘍モデルマウスを作出したところ、Wild-type の MRSA2007-13 株を投与したマウス 3 頭のうち、1 頭は投与 2 日後に敗血症様症状のため死亡し、もう 1 頭は観察期間中を通し左右の病変部が交連し、それぞれの膿瘍サイズの測定ができなかった。投与後 7 日間観察したが、ファージ耐性菌 MRSA2007-13 SAm1-201 株を投与したマウスでは wild-type の MRSA2007-13 株を投与したマウスの病変部と比較し、形成された膿瘍サイズは顕著に小さかった (図 37B-37D)。また、7 日目に病変部組織を摘出し、組織中の菌数を測定したところ、ファージ耐性菌を投与したマウス病変部からは wild-type の MRSA を投与した病変部より検出された菌数の約 1/50 程度の菌数が検出された (図 37E)。以上のことより、マウス腹膜炎モデル、及びマウス皮膚膿瘍モデルマウスの両方において、ファージ耐性菌 MRSA2007-13 SAm1-201 株は wild-type の MRSA2007-13 株と比較し、マウスへの病原性が低下していることがわかった。

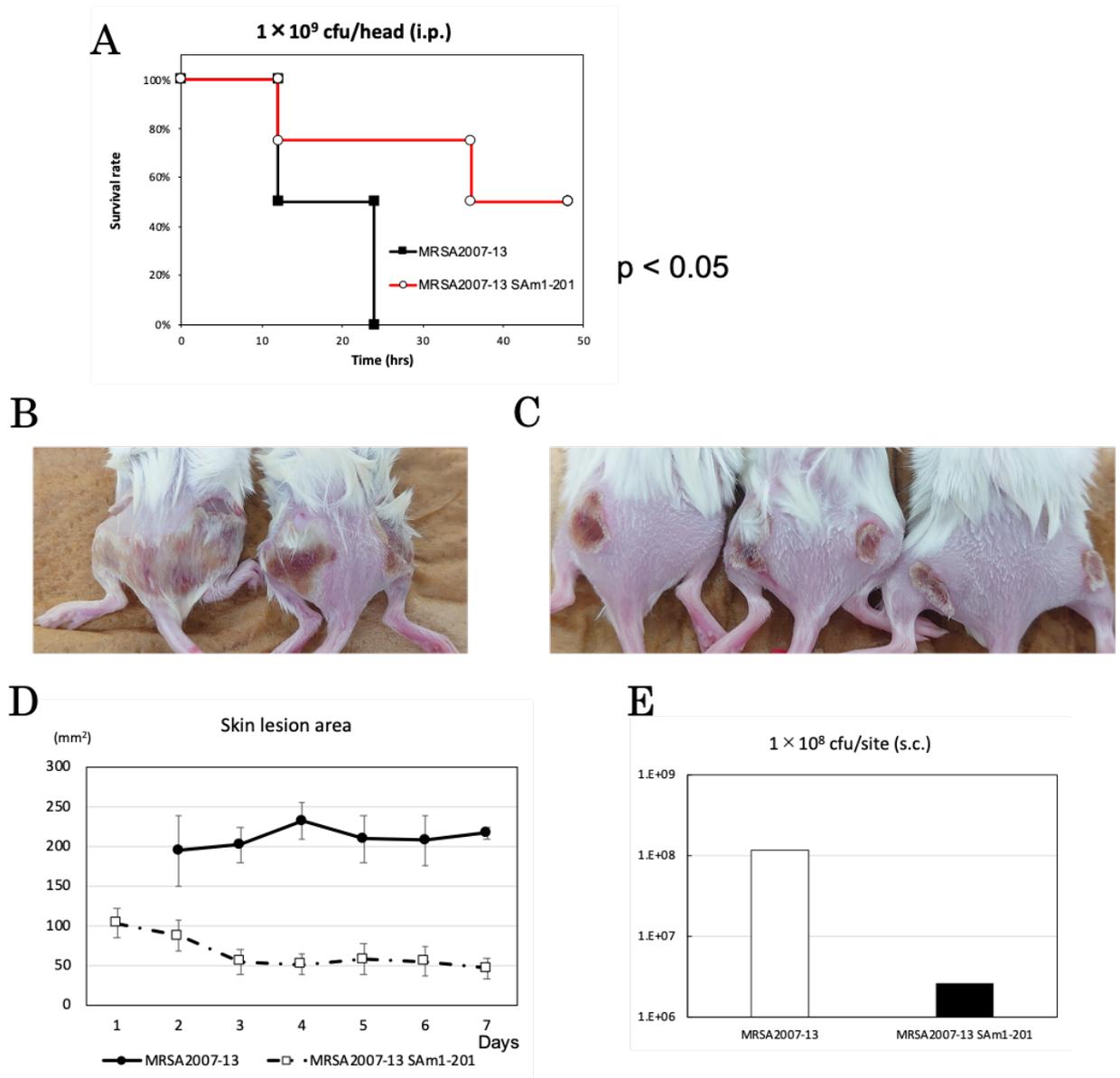


図 37. マウスモデルを用いたファージ耐性菌の病原性評価

(A) メス 8 週齢の BALB/c マウスに MRSA2007-13 株、または MRSA2007-13 SAm1-201 株を腹腔内投与 ( $1.0 \times 10^9$  CFU/head) した時の生存率。各群  $n=8$  頭実施し、統計処理はログランク検定にて  $p < 0.05$  で有意差ありとした。(B) メス 8 週齢の BALB/c マウスに MRSA2007-13 株、または (C) MRSA2007-13 SAm1-201 株を両脇腹~大腿部付近に皮下投与 ( $1.0 \times 10^8$  CFU/site) し、7 日後の病変部の肉眼所見、及び (D) 7 日間にわたる膿瘍サイズの推移 (平均値  $\pm$  SE)。(E) MRSA 接種 7 日後にマウスを安楽殺し、病変部組織を摘出し、組織中の菌数を LB agar を用いて評価した (各  $n=1$ )。

#### 4. 考察

MRSA2007-13 株が phiSA012 に耐性を獲得すると、完全にファージの溶菌作用から逃れる耐性株 (MRSA2007-13 SAm1-201 など) と、溶菌はされるもののファージの溶菌活性は減弱し、部分的なファージ耐性を示す耐性株 (MRSA2007-13 SAm1-106 株など) の 2 種類に大別されることがわかった。多くのファージ耐性は細菌表面のファージレセプター分子の変異に伴う宿主菌への吸着阻害によるものと考えられており [6, 112, 172]、今回いずれのファージ耐性株においても phiSA012 の吸着率の低下が認められていたことから (図 32H)、phiSA012 がレセプターとする WTA 合成酵素の変異を疑って NGS を用いた変異解析を実施した。しかし結果は予想に反し、WTA 合成酵素に変異は認められなかった。一方で、完全に phiSA012 の溶菌作用に耐性を示す株では *Staphylococcus* 属菌特有のペンタグリシン架橋を合成する酵素 *femA* の変異が認められ、また、ファージ耐性菌として分離された株の全てにおいて転写制御因子である *mgrA* の変異が認められた (表 16, 17)。2021 年に報告された他の研究において、*S. aureus* 溶菌性ファージ PYO<sup>Sa</sup> に耐性を獲得した *S. aureus* Newman 株で見られた小型コロニーバリエントの全てで *femA* の変異が認められ、また一部の株では *mgrA* の変異も認められていたことを報告している [14]。しかし、*femA* 及び *mgrA* 変異とファージ耐性獲得の関係性については言及していなかった。そこで本研究では 2 つの遺伝子の変異に伴うファージ耐性化メカニズムを詳細に解析し、さらには表現型の変化についても調査した。

*Staphylococcus* 属菌特有のペンタグリシン構造は FemX、FemA、FemB の 3 つの酵素によって連続的にグリシンが結合されることで形成されるが、FemA の遺伝子を欠損させると架橋を構成するグリシンが 1 つになることが知られている [77, 156]。 *femA* に変異が認められたファージ耐性菌 MRSA2007-13 SAm1-201 株のペプチドグリカンを経験して LC-MS 解析をすると、予想通り架橋構造がグリシン 1 つとなっていることが判明した (図 33A, 表 19)。ファージはエンドライシンを作用させてペプチドグリカンを切断することで溶菌作用を示すが、phiSA012 由来エンドライシンは細胞壁結合ドメイン SH3b を介してペプチドグリカンのペンタグリシンに結合することで溶菌活性を発揮することを第 2 章で証明した (図 13C)。そこで *femA* 変異を有する MRSA2007-13 SAm1-201 株に対する Lys-phiSA012 の溶菌活性、及び

結合性を評価したところ、溶菌活性は認められず、酵素が菌に結合できていないことがわかった (図 33)。従って、*femA* 変異によりモノグリシンへと変化した架橋構造に、エンドライシン Lys-phiSA012 は結合することができず、ペプチドグリカン切断することができないため、ファージ phiSA012 の溶菌活性に完全な耐性を獲得することがわかった。エンドライシン活性に対する阻害による *S. aureus* のファージ耐性化はこれまで報告がないことから、今回の研究が世界で初めての報告となる。また、*femA* 変異を有する株において  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の感受性が飛躍的に上昇したが、その理由もグリシン架橋構造の違いに起因する可能性が高い。本来 *Staphylococcus* 属菌はペプチドグリカン断片同士がペンタグリシンの 5 番目のグリシンと L-アラニンが PBP2 によって結合し、重合していくことによって堅牢性のある細胞壁を構成する [142]。  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬はこの PBP に結合して作用を阻害することによってペプチドグリカンは重合できず、細菌は Autolysis が優位となり死滅するが、MRSA は PBP2a を産生することができるため  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬存在下においてもペプチドグリカンを重合することができ死滅しない [128]。しかしながら、PBP2a は架橋を構成するグリシンの数によりその酵素活性が異なり、グリシンの数が 5 つまたは 3 つの場合はペプチドグリカンを重合することができるが、グリシンの数が 1 つの場合は PBP2a の活性が見られず、グリシンと L-アラニンは結合されない [155]。一方、内在性の PBP2 はグリシンの数に関わらず架橋を形成することができる [155]。従って、*femA* 変異により架橋を構成するグリシンが 1 つとなったファージ耐性 MRSA 株では、通常 PBP2 によってモノグリシン架橋でペプチドグリカンを重合することができるが、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬存在下では PBP2 は阻害され、また PBP2a ではモノグリシンによる架橋を形成することができないためペプチドグリカンは重合できず、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の感受性が劇的に上昇したと考えられる。

また、phiSA012 は *mgrA* に変異を持つ分離株に対する吸着率が低下したものの、*mgrA* 変異のみでは完全なファージ耐性は見られず、弱い溶菌活性を示した (図 31G, 32H, 32I)。電子顕微鏡を用いてファージ耐性菌を観察したところ、*femA* と *mgrA* の両方に変異を持つ MRSA2007-13 SAm1-201 株において顕著な細胞壁表面構造の違いが認められ (図 32J)、また *mgrA* 変異のみ持つファージ耐性菌においても同様な細胞壁表面構造の変化が認められている (data not shown)。細胞壁表面構造の変化は *mgrA* 変異に伴う下流遺伝子の発現の変化によるものだと考え、RNA-seq

による網羅的な遺伝子発現解析を実施した。すると細胞壁表面構造に関わる因子として、8型莢膜合成酵素の遺伝子発現が低下し、一方で1型莢膜合成酵素の遺伝子発現が上昇していることがわかった。また、細胞表面に発現する大型のタンパク質である SasG、Ebh、SraP の遺伝子発現量が上昇していることがわかった。既報によるとほとんどの *S. aureus* の莢膜型はファージの吸着を阻害しない5型あるいは8型であるが[116]、1型及び2型莢膜は粘液様の巨大な莢膜によって菌体を被包し、ファージの吸着が阻害されることが示されている[124, 177]。また、膜タンパク質であるプロテイン A を過剰発現させた *S. aureus* に対してファージの吸着率が低下したといった報告もなされている[118]。また、高発現していた膜タンパク質である SasG は *S. aureus* のバイオフィーム形成に関わることが知られているが[34]、バイオフィームがファージの吸着を阻害するといった報告はなされていない[112]。また、Ebh や SraP の高発現は *S. aureus* のフィブリノーゲンを介した細菌同士の凝集（クラumping）を阻害する因子として知られる[34]。従って、*mgrA* 変異によるファージの吸着率低下は莢膜型の変化、あるいは大型の膜タンパク質の高発現によって、ファージがレセプターである WTA への吸着を阻害されたことによるものだと考えられる。しかし、ファージレセプターである WTA は変異していないため、少数のファージ粒子は宿主菌に吸着・感染でき、*femA* 変異を持たないファージ耐性菌ではエンドライシンによる溶菌も可能であることから、緩やかな溶菌活性が遅れて見られたと考えられる（図 32G, 33H, 33I）。また、Mgr A は非常に多くの病原性遺伝子の発現を正に制御しているため、*mgrA* を欠損させた *S. aureus* や MRSA ではマウスを用いた腹膜炎及び膿瘍モデル、ウサギを用いた敗血症及び心内膜炎モデルにおいていずれも顕著な病原性の低下が報告されている[34, 94, 134]。また MgrA を阻害する化合物によって *S. aureus* の病原性低下を狙った新規治療戦略の研究も行われている[159]。実際、ファージ耐性菌 MRSA2007-13 SAm1-201 株の RNA-seq 解析では複数の病原性関連遺伝子の発現量が低下しており、この耐性菌をマウスに接種した実験では、腹膜炎モデル及び膿瘍モデルのいずれにおいても wild-type と比較して明らかにファージ耐性株の病原性の低下が認められた。

今回、ファージ phiSA012 を使ってファージ耐性菌を作出したところ、上記のように *mgrA* と *femA* の2つの遺伝子変異に集約された。一方、Azam らの研究によると、耐性菌作出の方法が異なるものの、phiSA012 を分離した際の宿主菌である

SA003 株が phiSA012 に耐性を獲得した際にはこれら遺伝子の変異は認められず、一方で WTA 合成酵素などに変異が認められた[4]。今回見出された *mgrA* 及び *femA* の変異による phiSA012 耐性化メカニズムの一般性を評価するため、臨床分離株 MRSA2007-93 株においてもファージ耐性菌を作出し、検証した。すると MRSA2007-13 と同様、MRSA2007-93 のファージ耐性菌株において *mgrA* のみ、または *mgrA* 及び *femA* の両方の変異を持つ株が分離され、*femA* 変異を持つ菌株では Lys-phiSA012 の溶菌活性の低下と  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬感受性の上昇が認められた (data not shown)。今後、*femA* 及び *mgrA* 変異による phiSA012 耐性化の一般性をさらに拡大して調査し、ファージと耐性化メカニズムの関係、また耐性化に伴う抗菌薬感受性や病原性変化の法則性をより詳細に理解することで、細菌の変異と表現型変化の方向性をコントロールすることのできる次世代型ファージ療法の展開が可能となると考えている。

## 5. 小括

多剤耐性および病原性タンパク質を産生する MRSA に着目し、臨床分離株 MRSA2007-13 株が *S. aureus* 溶菌性ファージ phiSA012 に対して耐性化する際のメカニズムの解明とファージ耐性獲得に伴う表現型の変化について解析した。取得したファージ耐性株全てにおいて転写制御因子である *mgrA* に変異が認められ、また 70% 以上にペプチドグリカンのペンタグリシン架橋を合成する *femA* に変異が認められた。*mgrA* のみに変異を有するファージ耐性株はファージの宿主菌への吸着を阻害するものの、弱い溶菌活性を示した。一方、*mgrA* と *femA* 両方に変異を有するファージ耐性株は phiSA012 の溶菌活性に完全なファージ耐性を獲得していた。*femA* 変異を有するファージ耐性菌は、ペプチドグリカンがモノグリシンによって架橋されることで、エンドライシン Lys-phiSA012 がペプチドグリカンに結合せず溶菌できないため、phiSA012 の溶菌活性に完全な耐性を示していたことがわかった。また、*femA* 変異を有するファージ耐性菌では  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の感受性が飛躍的に上昇していた。一方、*mgrA* 変異は下流の遺伝子発現を変動させ、莢膜型の変化あるいは大型膜タンパク質の発現によってファージのレセプターへの吸着が阻害された可能性が考えられた。また、*mgrA* 変異に伴い複数の病原性遺伝子の発現が抑制され、マウス腹

膜炎モデル及び膿瘍モデルにおいてファージ耐性菌は低い病原性を示すことが明らかとなった。本研究は *S. aureus* における *femA* と *mgrA* の変異を介したファージ耐性メカニズムを解明した初めての報告であり、ファージ耐性化に伴って抗菌薬感受性の上昇と病原性の低下が同時に起こる可能性を見出した。これら知見は、ファージを単なる抗菌性ウイルスとして使用するのではなく、ファージ耐性化を利用した次世代型の細菌感染症治療法の展開を期待させるものである。

## 総括

本研究では抗菌薬に代わるファージ療法の運用に向けて、基礎的性状解析から実際の臨床応用にまで至る包括的な研究を展開した。すなわち、ファージの宿主域やファージ力価の安定性を評価し、犬を用いたファージ投与安全性試験を実施した（第1章）。また、ファージ由来溶菌酵素エンドライシンについてもその応用を見据えた基礎的機能解析を実施した（第2章）。ファージ、及びエンドライシンの応用例として代表的疾患な皮膚疾患であるヒトアトピー性皮膚炎に着目し、モデルマウスを用いてファージ療法の効果を評価した（第3章）。また、RGU-AMCにて、緑膿菌感染による難治性外耳炎を罹患したイヌに対してファージ療法を実施し、治療中に確認されたファージ耐性菌についての解析を実施した（第4章）。さらに、ファージ耐性化に伴う表現型の変化に着目し、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌がファージ耐性を獲得した際に薬剤感受性や病原性が変化するトレードオフの関係を見出した（第5章）。

第1章では *S. aureus* 溶菌性ファージ phiSA012 の宿主域や安定性などの基礎的性状について解析した。ファージ phiSA012 は *S. aureus* のみならず、その他同属のブドウ球菌についても一定の溶菌活性を示すことを明らかにした。また、ファージの保存方法や外的因子によるファージ力価への影響を評価した。phiSA012 は 4℃ における保存で 2 ヶ月間非常に安定的であり、繰り返す凍結融解によりファージ力価は低下した。また、pH 3~pH 9 の間にてファージ力価は安定していた。さらに、健常イヌに対し、静脈内、膀胱内、皮膚噴霧、外耳内の 4 つの経路で phiSA012 を投与したところ、ファージ投与による顕著な副作用は認められず、イヌに対するファージ投与の安全性が確認された。

第II章では phiSA012 由来溶菌酵素であるエンドライシン Lys-phiSA012 を発現・精製し、溶菌活性及び機能解析を実施した。Lys-phiSA012 は *in silico* 解析から触媒ドメインとして CHAP、及び AMID ドメインを、さらには細胞壁結合ドメインとして SH3b を保有していることが推定され、*S. aureus* やその他同属のブドウ球菌に対して急速な溶菌活性を示すことが明らかとなった。また、ドメイン欠失変異体を用いた実験により、Lys-phiSA012 の溶菌活性には CHAP ドメインと SH3b ドメインの両者の存在が重要であることがわかった。特に CHAP ドメインには Ca<sup>2+</sup>及び Zn<sup>2+</sup>の結合サイトが存在し、それら 2 価イオン濃度が Lys-phiSA012 の溶菌活性に影響

響を及ぼすことが示された。さらに、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬のオキサシリンにエンドライシン加えることでオキサシリンの MIC 値を 1/16 にまで減少させることがわかった。

第Ⅲ章では、AD 自然発症マウスモデル NC/Tnd マウスを使用し、ブドウ球菌を特異的に排除する目的でファージ phiSA012、及びエンドライシン Lys-phiSA012 を病変部に滴下することによる治療効果について評価した。NC/Tnd マウス皮膚病変部から分離されたブドウ球菌に対し、phiSA012 及び Lys-phiSA012 は *in vitro* において広い溶菌活性を示すことがわかった。また AD 様症状発症後の NC/Tnd マウスに phiSA012 を滴下したところ、肉眼的な皮膚炎症状が顕著に改善し、組織学的にも顕著な炎症所見やブドウ球菌はほとんど検出されず、血清中 IgE 濃度は低値を示した。一方、Lys-phiSA012 を滴下した群では症状の改善は認められなかった。phiSA012 は皮膚病変部において常に細菌数を低くコントロールしたことによって劇的な症状の改善効果が見られと考えられる。

第Ⅳ章では、既存治療に抵抗性を示した *P. aeruginosa* 感染を伴う難治性慢性外耳炎に罹患したイヌに対し、ファージカクテル療法を実施した。ファージ療法開始前に被検動物の耳垢スワブから単離した *P. aeruginosa* PASz に溶菌性を示すファージを選択、及び新規に分離しファージカクテル設計して点耳投与によるファージ療法を行なった。ファージ療法を開始すると一部症状の改善が認められたものの完全には奏功せず、またファージ耐性菌の出現が認められた。ファージ耐性菌に対して溶菌活性を示すファージを新たに分離し、水平耳道内に認められた腫瘍性病変を摘出して治療を継続した。すると、外耳炎症状はさらに改善し、再診時には耳垢スワブから *P. aeruginosa* は検出されなかった。耳道内の皮膚細菌叢解析を実施して *P. aeruginosa* を含む *Pseudomonadaceae* の分布の推移を調査したところ、ファージ療法開始前は全体の約 20%程度を占めていたが、治療開始とともに減少し、退院時及び再診時では全体の 1%以下となっていた。また、治療 7 日目に分離されたファージカクテル MIX1 に対するファージ耐性菌 PASz\_d7mt の変異解析を実施したところ、IV型線毛の組み立てに関わる *fimV* や、鞭毛を構成する *fliG* などに変異が認められた。ファージ耐性菌 PASz\_d7mt における運動性を評価したところ、IV型線毛及び鞭毛を介した運動性が低下していることがわかり、ファージ耐性の獲得に伴う病原性の低下が示唆された。

第Ⅴ章では、ファージ耐性化に伴う細菌の表現型変化に着目し、MRSA が

phiSA012 に耐性を獲得するメカニズムとファージ耐性株の表現型変化について解析した。臨床分離株 MRSA2007-13 のファージ耐性株全てにおいて転写制御因子である *mgrA* に変異が認められ、また 70%以上の株では *mgrA* 変異に加えペプチドグリカンのペンタグリシン架橋を合成する *femA* に変異が認められた。*mgrA* のみに変異を有するファージ耐性株はファージの宿主菌への吸着が阻害されるものの、弱い溶菌活性を示した。一方、*mgrA* と *femA* 両方に変異を有するファージ耐性株は phiSA012 の溶菌活性に完全なファージ耐性を獲得していた。*femA* 変異を有するファージ耐性菌は、ペプチドグリカンがモノグリシンによって架橋されることで、エンドライシン Lys-phiSA012 がペプチドグリカンに結合せず溶菌できないため、phiSA012 の溶菌活性に完全な耐性を示していたことがわかった。また、*femA* 変異を有するファージ耐性菌では  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の感受性が飛躍的に上昇していた。一方、*mgrA* 変異は下流の遺伝子発現を変動させ、莢膜型の変化あるいは大型膜タンパク質の発現によってファージのレセプターへの吸着が阻害された可能性が示唆された。また、*mgrA* 変異に伴い複数の病原性遺伝子の発現が抑制され、マウス腹膜炎モデル及び膿瘍モデルにおいてファージ耐性菌の病原性が顕著に低下することが明らかとなった。本研究は *S. aureus* における *femA* と *mgrA* の変異を介したファージ耐性メカニズムを解明した初めての報告であり、ファージ耐性化に伴って抗菌薬感受性の上昇と病原性の低下が同時に起こる可能性を見出した。

以上の結果より、獣医療におけるファージ療法の安全性が確認されるとともに、細菌感染症、特に皮膚感染症に対する有効性が示された。また、*in vitro* 及びファージ療法を実施した被検動物から分離されたファージ耐性菌は、病原性の低下、あるいは薬剤感受性の上昇が確認され、これらはファージ耐性化に伴うトレードオフの関係にあることを明らかとした。従って、本研究はファージを単なる抗菌性ウイルスとして使用するのではなく、ファージ耐性化を利用した次世代型の細菌感染症治療法の展開を期待させる重要な知見となった

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始親身にご指導下さりました獣医生化学ユニット岩野英知教授、藤木純平講師に心から感謝の意を表します。また、実験、及び論文作成にあたり惜しみない御協力、御助言をいただきました獣医衛生学ユニット樋口豪紀教授、権平智講師、獣医ウイルス学ユニット萩原克郎教授、獣医食品衛生学ユニット臼井優准教授、獣医麻酔学ユニット山下和人教授、獣医伴侶動物外科学ユニット酒井俊和助教、獣医伴侶動物内科学ユニット大田寛准教授、獣医細菌学ユニット村田亮講師、食と健康学類応用生化学ユニット岩崎智仁教授、早稲田大学総合研究機構ファージセラピー研究所丹治保典客員上級研究員、東京農工大学 大学院農学研究院動物生命科学部門比較動物医学研究室松田浩珍特任教授、筑波大学医学医療系松田研史郎助教、北海道大学大学院薬学研究院創薬科学研究教育センター有機合成医薬学部門市川聡教授、山本一貴助教に深くお礼申し上げます。最後に、獣医生化学ユニット所属各位、及び研究遂行を理解いただいた家族に心から感謝の意を表します。

## 引用文献

1. Al-Rubaye, A. A. K., Couger, M. B., Ojha, S., Pummill, J. F., Koon, J. A., Wideman, R. F. and Rhoads, D. D. 2015. Genome Analysis of *Staphylococcus agnetis*, an Agent of Lameness in Broiler Chickens. *PLOS ONE*. **10**: e0143336.
2. Angus, J. C. 2004. Otic cytology in health and disease. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. **34**: 411–424.
3. Asokan, G. v., Ramadhan, T., Ahmed, E. and Sanad, H. 2019. WHO global priority pathogens list: A bibliometric analysis of medline-pubmed for knowledge mobilization to infection prevention and control practices in Bahrain. *Oman Medical Journal*. **34**: 184–193.
4. Azam, A. H., Hoshiga, F., Takeuchi, I., Miyanaga, K. and Tanji, Y. 2018. Analysis of phage resistance in *Staphylococcus aureus* SA003 reveals different binding mechanisms for the closely related Twort-like phages  $\phi$ SA012 and  $\phi$ SA039. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **102**: 8963–8977.
5. Azam, A. H., Kadoi, K., Miyanaga, K., Usui, M., Tamura, Y., Cui, L. and Tanji, Y. 2019. Analysis host-recognition mechanism of staphylococcal kayvirus  $\phi$ SA039 reveals a novel strategy that protects *Staphylococcus aureus* against infection by *Staphylococcus pseudintermedius* Siphoviridae phages. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **103**: 6809–6823.
6. Azam, A. H. and Tanji, Y. 2019. Bacteriophage-host arm race: an update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **103**: 2121–2131.
7. Azam, A. H. and Tanji, Y. 2019. Peculiarities of *Staphylococcus aureus* phages and their possible application in phage therapy. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **103**: 4279–4289.
8. Baba, T. and Schneewind, O. 1996. Target cell specificity of a bacteriocin

- molecule: A C-terminal signal directs lysostaphin to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *EMBO Journal*. **15**: 4789–4797.
9. Bajwa, J. 2019. Veterinary Dermatology Dermatologie vétérinaire. *Veterinary Dermatology*. **59**: 311–313.
  10. Barnard, N. and Foster, A. 2017. *Pseudomonas* otitis in dogs: A general practitioner's guide to treatment. *In Practice*. **39**: 386–398.
  11. Becker, S. C., Dong, S., Baker, J. R., Foster-Frey, J., Pritchard, D. G. and Donovan, D. M. 2009. LysK CHAP endopeptidase domain is required for lysis of live staphylococcal cells. *FEMS Microbiology Letters*. **294**: 52–60.
  12. Becker, S. C., Swift, S., Korobova, O., Schischkova, N., Kopylov, P., Donovan, D. M. and Abaev, I. 2015. Lytic activity of the staphylolytic Twort phage endolysin CHAP domain is enhanced by the SH3b cell wall binding domain. *FEMS Microbiology Letters*. **362**: 1–8.
  13. Berger-Bächi, B., Barberis-Maino, L., Strässle, A. and Kayser, F. H. 1989. FemA, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Molecular cloning and characterization. *MGG Molecular & General Genetics*. **219**: 263–269.
  14. Berryhill, B. A., Huseby, D. L., McCall, I. C., Hughes, D. and Levin, B. R. 2021. Evaluating the potential efficacy and limitations of a phage for joint antibiotic and phage therapy of *Staphylococcus aureus* infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **118**: 1–8.
  15. Bertozzi Silva, J., Storms, Z. and Sauvageau, D. 2016. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiology Letters*. **363**: fnw002.
  16. Bieber, T. 2008. Atopic Dermatitis. *New England Journal of Medicine*. **358**: 1483–1494.
  17. Boguniewicz, M. and Leung, D. Y. M. 2011. Atopic dermatitis: A disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunological Reviews*. **242**: 233–246.
  18. Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-

- Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., Cope, E. K., da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P. C., Douglas, G. M., Durall, D. M., Duvall, C., Edwardson, C. F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J. M., Gibbons, S. M., Gibson, D. L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G. A., Janssen, S., Jarmusch, A. K., Jiang, L., Kaehler, B. D., Kang, K. bin, Keefe, C. R., Keim, P., Kelley, S. T., Knights, D., Koester, I., Kosciulek, T., Kreps, J., Langille, M. G. I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y. X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B. D., McDonald, D., McIver, L. J., Melnik, A. v., Metcalf, J. L., Morgan, S. C., Morton, J. T., Naimey, A. T., Navas-Molina, J. A., Nothias, L. F., Orchanian, S. B., Pearson, T., Peoples, S. L., Petras, D., Preuss, M. L., Priesse, E., Rasmussen, L. B., Rivers, A., Robeson, M. S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S. J., Spear, J. R., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Torres, P. J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P. J., Ul-Hasan, S., van der Hooft, J. J. J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K. C., Williamson, C. H. D., Willis, A. D., Xu, Z. Z., Zaneveld, J. R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R. and Caporaso, J. G. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*. **37**: 852–857.
19. Bourély, C., Cazeau, G., Jarrige, N., Leblond, A., Madec, J. Y., Haenni, M. and Gay, E. 2019. Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis. *Epidemiology and Infection*. **147**: e121.
20. Bradley, C. W., Lee, F. F., Rankin, S. C., Kalan, L. R., Horwinski, J., Morris, D. O., Grice, E. A. and Cain, C. L. 2020. The otic microbiota and mycobiota in a referral population of dogs in eastern USA with otitis externa. *Veterinary Dermatology*. **31**: 225-e49.
21. Bronner, F. 2001. Extracellular and intracellular regulation of calcium

- homeostasis. *TheScientificWorldJournal*. **1**: 919–925.
22. Cafarchia, C., Gallo, S., Romito, D., Capelli, G., Chermette, R., Guillot, J. and Otranto, D. 2005. Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **17**: 316–322.
  23. Caiazza, N. C., Merritt, J. H., Brothers, K. M. and O’Toole, G. A. 2007. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*. **189**: 3603–3612.
  24. Capparelli, R., Nocerino, N., Lanzetta, R., Silipo, A., Amoresano, A., Giangrande, C., Becker, K., Blaiotta, G., Evidente, A., Cimmino, A., Iannaccone, M., Parlato, M., Medaglia, C., Roperto, S., Roperto, F., Ramunno, L. and Iannelli, D. 2010. Bacteriophage-resistant *Staphylococcus aureus* mutant confers broad immunity against staphylococcal infection in mice. *PLoS ONE*. **5**: 1–13.
  25. Capparelli, R., Parlato, M., Borriello, G., Salvatore, P. and Iannelli, D. 2007. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**: 2765–2773.
  26. Carr, W. W. 2013. Topical calcineurin inhibitors for atopic dermatitis: Review and treatment recommendations. *Pediatric Drugs*. **15**: 303–310.
  27. Chan, B. K., Sistro, M., Wertz, J. E., Kortright, K. E., Narayan, D. and Turner, P. E. 2016. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*. **6**: 1–8.
  28. Chan, B. K., Turner, P. E., Kim, S., Mojibian, H. R., Eleftheriades, J. A. and Narayan, D. 2018. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Evolution, Medicine and Public Health*. **2018**: 60–66.
  29. Chan, W. Y., Hickey, E. E., Page, S. W., Trott, D. J. and Hill, P. B. 2019. Biofilm production by pathogens associated with canine otitis externa, and the antibiofilm activity of ionophores and antimicrobial adjuvants. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **42**: 682–692.

30. Cheng, M., Zhang, L., Zhang, H., Li, X., Wang, Y., Xia, F., Wang, B., Cai, R., Guo, Z., Zhang, Y., Ji, Y., Sun, C., Feng, X., Lei, L., Yang, Y., Han, W. and Gu, J. 2018. An Ointment Consisting of the Phage Lysin LysGH15 and Apigenin for Decolonization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Skin Wounds. *Viruses*. **10**: 244.
31. Cisek, A. A., Dąbrowska, I., Gregorczyk, K. P. and Wyzewski, Z. 2017. Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. *Current Microbiology*. **74**: 277–283.
32. Clowry, J., Irvine, A. D. and McLoughlin, R. M. 2019. Next-generation anti-*Staphylococcus aureus* vaccines: A potential new therapeutic option for atopic dermatitis? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **143**: 78–81.
33. Cole, L. K. 2004. Otoscopic evaluation of the ear canal. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. **34**: 397–410.
34. Crosby, H. A., Schlievert, P. M., Merriman, J. A., King, J. M., Salgado-Pabón, W. and Horswill, A. R. 2016. The *Staphylococcus aureus* Global Regulator MgrA Modulates Clumping and Virulence by Controlling Surface Protein Expression. *PLoS Pathogens*. **12**: 1–31.
35. Dąbrowska, K., Miernikiewicz, P., Piotrowicz, A., Hodyra, K., Owczarek, B., Lecion, D., Kamińczak, Z., Letarov, A. and Gorski, A. 2014. Immunogenicity Studies of Proteins Forming the T4 Phage Head Surface. *Journal of Virology*. **88**: 12551–12557.
36. DeLeo, F. R., Otto, M., Kreiswirth, B. N. and Chambers, H. F. 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*. **375**: 1557–1568.
37. Déziel, E., Comeau, Y. and Villemur, R. 2001. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpilated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *Journal of Bacteriology*. **183**: 1195–1204.
38. Di, X., Wang, R., Liu, B., Zhang, X., Ni, W., Wang, J., Liang, B., Cai, Y. and

- Liu, Y. 2015. In vitro activity of fosfomicin in combination with colistin against clinical isolates of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antibiotics*. **68**: 551–555.
39. Domenech, M., Garcíá, E. and Moscoso, M. 2011. In vitro destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **55**: 4144–4148.
40. Domingo-Calap, P., Delgado-Martínez, J., Domingo-Calap, P. and Delgado-Martínez, J. 2018. Bacteriophages: Protagonists of a Post-Antibiotic Era. *Antibiotics*. **7**: 66.
41. Donovan, D. M., Lardeo, M. and Foster-Frey, J. 2006. Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. *FEMS Microbiology Letters*. **265**: 133–139.
42. Dowah, A. S. A. and Clokie, M. R. J. 2018. Review of the nature, diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target Gram-positive bacteria. *Biophysical Reviews*. **10**: 535–542.
43. Endl, J., Seidl, P. H., Fiedler, F. and Schleifer, K. H. 1984. Determination of cell wall teichoic acid structure of staphylococci by rapid chemical and serological screening methods. *Archives of Microbiology*. **137**: 272–280.
44. Eugster, M. R. and Loessner, M. J. 2012. Wall teichoic acids restrict access of bacteriophage endolysin Ply118, Ply511, and Plyp40 cell wall binding domains to the *Listeria monocytogenes* peptidoglycan. *Journal of Bacteriology*. **194**: 6498–6506.
45. Feng, Y., Tian, W., Lin, D., Luo, Q., Zhou, Y., Yang, T., Deng, Y., Liu, Y.-H. and Liu, J.-H. 2012. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in pets from South China. *Veterinary Microbiology*. **160**: 517–524.
46. Fischetti, V. A. 2010. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. **300**: 357–362.
47. Fujiki, J., Nakamura, T., Furusawa, T., Ohno, H., Takahashi, H., Kitana, J.,

- Usui, M., Higuchi, H., Tanji, Y., Tamura, Y., Iwano, H., Fujiki, J., Nakamura, T., Furusawa, T., Ohno, H., Takahashi, H., Kitana, J., Usui, M., Higuchi, H., Tanji, Y., Tamura, Y. and Iwano, H. 2018. Characterization of the Lytic Capability of a LysK-Like Endolysin, Lys-phiSA012, Derived from a Polyvalent *Staphylococcus aureus* Bacteriophage. *Pharmaceuticals*. **11**: 25.
48. Furfaro, L. L., Payne, M. S. and Chang, B. J. 2018. Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. **8**: 1–7.
49. Furusawa, T., Iwano, H., Higuchi, H., Usui, M., Maruyama, F., Nakagawa, I., Yokota, H. and Tamura, Y. 2016. Complete Genome Sequences of Broad-Host-Range *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages  $\Phi$ R18 and  $\Phi$ S12-1. *Genome Announcements*. **4**: e00041-16.
50. Furusawa, T., Iwano, H., Hiyashimizu, Y., Matsubara, K., Higuchi, H., Nagahata, H., Niwa, H., Katayama, Y., Kinoshita, Y., Hagiwara, K., Iwasaki, T., Tanji, Y., Yokota, H. and Tamura, Y. 2016. Phage Therapy Is Effective in a Mouse Model of Bacterial Equine Keratitis. *Applied and Environmental Microbiology*. **82**: 5332–5339.
51. Geoghegan, J. A., Irvine, A. D. and Foster, T. J. 2018. *Staphylococcus aureus* and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship. *Trends in Microbiology*. **26**: 484–497.
52. Gilmer, D. B., Schmitz, J. E., Euler, C. W. and Fischetti, V. A. 2013. Novel Bacteriophage Lysin with Broad Lytic Activity Protects against Mixed Infection by *Streptococcus pyogenes* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **57**: 2743–2750.
53. Golkar, Z., Bagasra, O. and Pace, D. G. 2014. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *The Journal of Infection in Developing Countries*. **8**: 129–136.
54. Gonzalez-Delgado, L. S., Walters-Morgan, H., Salamaga, B., Robertson, A. J., Hounslow, A. M., Jagielska, E., Sabała, I., Williamson, M. P., Lovering, A. L.

- and Mesnage, S. 2020. Two-site recognition of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan by lysostaphin SH3b. *Nature Chemical Biology*. **16**: 24–30.
55. Gonzalez-Menendez, E., Fernandez, L., Gutierrez, D., Rodríguez, A., Martínez, B. and GarcíaI, P. 2018. Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of *Staphylococcus* phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products. *PLoS ONE*. **13**: 1–14.
56. Gründling, A. and Schneewind, O. 2006. Cross-linked peptidoglycan mediates lysostaphin binding to the cell wall envelope of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. **188**: 2463–2472.
57. Gu, J., Feng, Y., Feng, X., Sun, C., Lei, L., Ding, W., Niu, F., Jiao, L., Yang, M., Li, Y., Liu, X., Song, J., Cui, Z., Han, D., Du, C., Yang, Y., Ouyang, S., Liu, Z. J. and Han, W. 2014. Structural and Biochemical Characterization Reveals LysGH15 as an Unprecedented “EF-Hand-Like” Calcium-Binding Phage Lysin. *PLoS Pathogens*. **10**:
58. Gu, J., Xu, W., Lei, L., Huang, J., Feng, X., Sun, C., Du, C., Zuo, J., Li, Y., Du, T., Li, L. and Han, W. 2011. LysGH15, a Novel Bacteriophage Lysin, Protects a Murine Bacteremia Model Efficiently against Lethal Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*. **49**: 111–117.
59. Gurney, J., Brown, S. P., Kaltz, O. and Hochberg, M. E. 2020. Steering Phages to Combat Bacterial Pathogens. *Trends in Microbiology*. **28**: 85–94.
60. Guzik, T. J., Bzowska, M., Kasprowicz, A., Czerniawska-Mysik, G., Wójcik, K., Szmyd, D., Adamek-Guzik, T. and Pryjma, J. 2005. Persistent skin colonization with *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: Relationship to clinical and immunological parameters. *Clinical and Experimental Allergy*. **35**: 448–455.
61. Haddad Kashani, H., Schmelcher, M., Sabzalipoor, H., Seyed Hosseini, E. and Moniri, R. 2018. Recombinant Endolysins as Potential Therapeutics against Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*: Current Status of

- Research and Novel Delivery Strategies. *Clinical Microbiology Reviews*. **31**: e00071-17.
62. Harada, K., Arima, S., Niina, A., Kataoka, Y. and Takahashi, T. 2012. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs and cats in Japan: Current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. *Microbiology and Immunology*. **56**: 123–127.
  63. Hashimoto, Y., Kaneda, Y., Akashi, T., Arai, I. and Nakaike, S. 2004. Persistence of *Staphylococcus aureus* colonization on the skin of NC/Nga mice. *Journal of Dermatological Science*. **35**: 143–150.
  64. Hawkins, C., Harper, D., Burch, D., Änggård, E. and Soothill, J. 2010. Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: A before/after clinical trial. *Veterinary Microbiology*. **146**: 309–313.
  65. Hernandez-morales, A., Lancaster, J., Lessor, L., Barr, J. J., Reed, S. L., Rohwer, F., Benler, S., Segall, A. M., Taplitz, R., Smith, D. M., Kerr, K., Kumaraswamy, M., Nizet, V., Lin, L., Mccauley, M. D., Strathdee, S. A., Benson, C. A., Pope, R. K., Leroux, B. M., Picel, A. C., Mateczun, A. J., Cilwa, K. E., Regeimbal, J. M., Estrella, L. A., Wolfe, D. M., Henry, M. S., Quinones, J., Salka, S. and Bishop-lilly, K. A. 2017. Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **61**: 1–14.
  66. Hietala, V., Horsma-Heikkinen, J., Carron, A., Skurnik, M. and Kiljunen, S. 2019. The Removal of Endo- and Enterotoxins From Bacteriophage Preparations. *Frontiers in Microbiology*. **10**: 1–9.
  67. Higaki, S., Morohashi, M., Yamagishi, T. and Hasegawa, Y. 1999. Comparative study of staphylococci from the skin of atopic dermatitis patients and from healthy subjects. *International Journal of Dermatology*. **38**: 265–269.
  68. Hodyra-Stefaniak, K., Miernikiewicz, P., Drapała, J., Drab, M., Jonczyk-Matysiak, E., Lecion, D., Kazmierczak, Z., Beta, W., Majewska, J., Harhala,

- M., Bubak, B., Kłopot, A., Górski, A. and Dabrowska, K. 2015. Mammalian Host-Versus-Phage immune response determines phage fate in vivo. *Scientific Reports*. **5**: 1–13.
69. Huang, J. T., Abrams, M., Tloutan, B., Rademaker, A. and Paller, A. S. 2009. Treatment of *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis decreases disease severity. *Pediatrics*. **123**:
70. Ingavale, S., van Wamel, W., Luong, T. T., Lee, C. Y. and Cheung, A. L. 2005. Rat/MgrA, a regulator of autolysis, is a regulator of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*. **73**: 1423–1431.
71. Irvine, A. D., McLean, W. H. I. and Leung, D. Y. M. 2011. Filaggrin Mutations Associated with Skin and Allergic Diseases. *New England Journal of Medicine*. **365**: 1315–1327.
72. Ishihara, K., Saito, M., Shimokubo, N., Muramatsu, Y., Maetani, S. and Tamura, Y. 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among veterinary staff and dogs in private veterinary clinics in Hokkaido, Japan. *Microbiology and Immunology*. **58**: 149–154.
73. Ishihara, K., Shimokubo, N., Sakagami, A., Ueno, H., Muramatsu, Y., Kadosawa, T., Yanagisawa, C., Hanaki, H., Nakajima, C., Suzuki, Y. and Tamura, Y. 2010. Occurrence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in an academic veterinary hospital. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**: 5165–5174.
74. Iwamoto, K., Moriwaki, M., Miyake, R. and Hide, M. 2019. *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: Strain-specific cell wall proteins and skin immunity. *Allergology International*. **68**: 309–315.
75. Iwano, H., Inoue, Y., Takasago, T., Kobayashi, H., Furusawa, T., Taniguchi, K., Fujiki, J., Yokota, H., Usui, M., Tanji, Y., Hagiwara, K., Higuchi, H. and Tamura, Y. 2018. Bacteriophage  $\Phi$ SA012 Has a Broad Host Range against *Staphylococcus aureus* and Effective Lytic Capacity in a Mouse Mastitis Model. *Biology*. **7**: 8.

76. Jado, I., López, R., García, E., Fenoll, A., Casal, J., García, P., Pallares, R., de la Campa, A. G., Bouza, E., Baquero, F., Soriano, F., Prieto, J., Pallarés, R., Liñares, J., Garau, J., Martínez Lacasa, J., Latorre, C., Pérez-Trallero, E., García de Lomas, J. and Fleites, A. 2003. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **52**: 967–973.
77. Jarick, M., Bertsche, U., Stahl, M., Schultz, D., Methling, K., Lalk, M., Stigloher, C., Steger, M., Schlosser, A. and Ohlsen, K. 2018. The serine/threonine kinase Stk and the phosphatase Stp regulate cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*. **8**: 1–13.
78. Jenul, C. and Horswill, A. R. 2019. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiology Spectrum*. **7**: 1–21.
79. Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R. and Górski, A. 2011. The influence of external factors on bacteriophages-review. *Folia Microbiologica*. **56**: 191–200.
80. de Jonge, P. A., Nobrega, F. L., Brouns, S. J. J. and Dutilh, B. E. 2018. Molecular and Evolutionary Determinants of Bacteriophage Host Range. *Trends in Microbiology*. 1–13.
81. Joost, I., Blass, D., Burian, M., Goerke, C., Wolz, C., Müller, L. von, Becker, K., Preissner, K., Herrmann, M. and Bischoff, M. 2009. Transcription analysis of the extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* in authentic human infection and in vitro. *Journal of Infectious Diseases*. **199**: 1471–1478.
82. Kambe, T., Tsuji, T., Hashimoto, A. and Itsumura, N. 2015. The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiological Reviews*. **95**: 749–784.
83. Kilmury, S. L. N. and Burrows, L. L. 2018. The *Pseudomonas aeruginosa* PilSR Two-Component System Regulates Both Twitching and Swimming Motilities. *mBio*. **9**:
84. Kim, D., Kobayashi, T. and Nagao, K. 2019. Research Techniques Made

- Simple: Mouse Models of Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*. **139**: 984-990.e1.
85. Kiss, G., Radványi, S. and Szigeti, G. 1997. New combination for the therapy of canine otitis externa: I Microbiology of otitis externa. *Journal of Small Animal Practice*. **38**: 51–56.
86. Kobayashi, T., Glatz, M., Horiuchi, K., Kawasaki, H., Akiyama, H., Kaplan, D. H., Kong, H. H., Amagai, M. and Nagao, K. 2015. Dysbiosis and *Staphylococcus aureus* Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis. *Immunity*. **42**: 756–766.
87. Kohara, Y., Tanabe, K., Matsuoka, K., Kanda, N., Matsuda, H., Karasuyama, H. and Yonekawa, H. 2001. A major determinant quantitative-trait locus responsible for atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice is located on Chromosome 9. *Immunogenetics*. **53**: 15–21.
88. Kosecka-Strojek, M., Sabat, A. J., Akkerboom, V., Becker, K., van Zanten, E., Wisselink, G., Miedzobrodzki, J., Kooistra-Smid, A. M. D. and Friedrich, A. W. 2019. Development and Validation of a Reference Data Set for Assigning *Staphylococcus* Species Based on Next-Generation Sequencing of the 16S-23S rRNA Region. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. **9**: 1–19.
89. de Kraker, M. E. A., Stewardson, A. J. and Harbarth, S. 2016. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLOS Medicine*. **13**: e1002184.
90. Krakowski, A. C., Eichenfield, L. F. and Dohil, M. A. 2008. Management of atopic dermatitis in the pediatric population. *Pediatrics*. **122**: 812–824.
91. Kühner, D., Stahl, M., Demircioglu, D. D. and Bertsche, U. 2014. From cells to muropeptide structures in 24 h: Peptidoglycan mapping by UPLC-MS. *Scientific Reports*. **4**: 1–7.
92. Kusuma, C., Jadanova, A., Chanturiya, T. and Kokai-Kun, J. F. 2007. Lysostaphin-resistant variants of *Staphylococcus aureus* demonstrate reduced fitness in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**: 475–482.

93. Kutateladze, M. 2015. Experience of the Eliava Institute in bacteriophage therapy. *Virologica Sinica*. **30**: 80–81.
94. Kwiecinski, J. M., Kratofil, R. M., Parlet, C. P., Surewaard, B. G. J., Kubes, P. and Horswill, A. R. 2021. *Staphylococcus aureus* uses the ArlRS and MgrA cascade to regulate immune evasion during skin infection. *Cell Reports*. **36**: 109462.
95. Kwon, J. H. and Powderly, W. G. 2021. The post-antibiotic era is here. *Science*. **373**: 471.
96. Lane, D. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. pp. 115–176. *In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, (Stackebrandt, Erko and Goodfellow, Michael eds.) Jon Wiley & Sons, Chichester.
97. Leitner, G., Lubashevsky, E. and Trainin, Z. 2003. *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows, composition and evaluation of its immunogenicity in a mouse model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **93**: 159–167.
98. Lister, P. D., Wolter, D. J. and Hanson, N. D. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*. **22**: 582–610.
99. Loeffler, A. and Lloyd, D. H. 2018. What has changed in canine pyoderma? A narrative review. *Veterinary Journal*. **235**: 73–82.
100. Loessner, M. J. 2005. Bacteriophage endolysins — current state of research and applications. *Current Opinion in Microbiology*. **8**: 480–487.
101. Loessner, M. J., Gaeng, S., Wendlinger, G., Maier, S. K. and Scherer, S. 1998. The two-component lysis system of *Staphylococcus aureus* bacteriophage Twort: A large TTG-start holin and an associated amidase endolysin. *FEMS Microbiology Letters*. **162**: 265–274.
102. Luong, T. T., Dunman, P. M., Murphy, E., Projan, S. J. and Lee, C. Y. 2006. Transcription profiling of the mgrA regulon in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. **188**: 1899–1910.

103. Lyskova, P., Vydrzalova, M. and Mazurova, J. 2007. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*. **54**: 559–563.
104. Marza, J. A. S., Soothill, J. S., Boydell, P. and Collyns, T. A. 2006. Multiplication of therapeutically administered bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa* infected patients. *Burns*. **32**: 644–646.
105. Matsuda, H., Watanabe, N., Geba, G. P., Sperl, J., Tsudzuki, M., Hiroi, J., Matsumoto, M., Ushio, H., Saito, S., Askenase, P. W. and Ra, C. 1997. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *International Immunology*. **9**: 461–466.
106. Mekić, S., Matanović, K. and Šeol, B. 2011. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. *Veterinary Record*. **169**: 125.
107. Mellmann, A., Becker, K., von Eiff, C., Keckevoet, U., Schumann, P. and Harmsen, D. 2006. Sequencing and Staphylococci Identification. *Emerging Infectious Diseases*. **12**: 333–336.
108. Memmi, G., Nair, D. R. and Cheung, A. 2012. Role of ArlRS in Autolysis in Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Journal of Bacteriology*. **194**: 759–767.
109. Merabishvili, M., Vervaet, C., Pirnay, J. P., de Vos, D., Verbeken, G., Mast, J., Chanishvili, N. and Vanechoutte, M. 2013. Stability of *Staphylococcus aureus* Phage ISP after Freeze-Drying (Lyophilization). *PLoS ONE*. **8**: 1–7.
110. Miller, W., Griffin, C. and Campbell, K. 2012. Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, 7th Edition, 7th Editio ed., Toronto, Ontario.
111. Mitkowski, P., Jagielska, E., Nowak, E., Bujnicki, J. M., Stefaniak, F., Niedziałek, D., Bochtler, M. and Sabała, I. 2019. Structural bases of peptidoglycan recognition by lysostaphin SH3b domain. *Scientific reports*. **9**: 5965.
112. Moller, A. G., Lindsay, J. A. and Read, T. D. 2019. Determinants of phage

- host range in *Staphylococcus* species. *Applied and Environmental Microbiology*. **85**: 1–16.
113. Nakamura, I., Yamaguchi, T., Tsukimori, A., Sato, A., Fukushima, S., Mizuno, Y. and Matsumoto, T. 2014. Effectiveness of antibiotic combination therapy as evaluated by the Break-point Checkerboard Plate method for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in clinical use. *Journal of Infection and Chemotherapy*. **20**: 266–269.
  114. Nakamura, T., Kitana, J., Fujiki, J., Takase, M., Iyori, K., Simoike, K. and Iwano, H. 2020. Lytic Activity of Polyvalent Staphylococcal Bacteriophage PhiSA012 and Its Endolysin Lys-PhiSA012 Against Antibiotic-Resistant Staphylococcal Clinical Isolates From Canine Skin Infection Sites. *Frontiers in Medicine*. **7**:
  115. Nakatsuji, T., Chen, T. H., Narala, S., Chun, K. A., Two, A. M., Yun, T., Shafiq, F., Kotol, P. F., Bouslimani, A., Melnik, A. v., Latif, H., Kim, J. N., Lockhart, A., Artis, K., David, G., Taylor, P., Streib, J., Dorrestein, P. C., Grier, A., Gill, S. R., Zengler, K., Hata, T. R., Leung, D. Y. M. and Gallo, R. L. 2017. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Science Translational Medicine*. **9**: 1–12.
  116. Nilsson, I. M., Lee, J. C., Bremell, T., Rydén, C. and Tarkowski, A. 1997. The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. *Infection and Immunity*. **65**: 4216–4221.
  117. Nobrega, F. L., Vlot, M., de Jonge, P. A., Dreesens, L. L., Beaumont, H. J. E., Lavigne, R., Dutilh, B. E. and Brouns, S. J. J. 2018. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology*. **16**: 760–773.
  118. Nordström, K. and Forsgren, A. 1974. Effect of Protein A on Adsorption of Bacteriophages to *Staphylococcus aureus* . *Journal of Virology*. **14**: 198–202.
  119. Obeso, J. M., Martínez, B., Rodríguez, A. and García, P. 2008. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage ΦH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *International Journal of Food*

- Microbiology*. **128**: 212–218.
120. Oechslin, F. 2018. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. *Viruses*. **10**: 351.
  121. O’Flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W., Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P. 2005. The Recombinant Phage Lysin LysK Has a Broad Spectrum of Lytic Activity against Clinically Relevant Staphylococci, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. **187**: 7161–7164.
  122. O’Neill, J. 2014. Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*. 1–16.
  123. Ong, S. P., Azam, A. H., Sasahara, T., Miyanaga, K. and Tanji, Y. 2020. Characterization of *Pseudomonas* lytic phages and their application as a cocktail with antibiotics in controlling *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **129**: 693–699.
  124. O’Riordan, K. and Lee, J. C. 2004. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clinical Microbiology Reviews*. **17**: 218–234.
  125. Paharik, A. E., Parlet, C. P., Chung, N., Todd, D. A., Rodriguez, E. I., van Dyke, M. J., Cech, N. B. and Horswill, A. R. 2017. Coagulase-Negative Staphylococcal Strain Prevents *Staphylococcus aureus* Colonization and Skin Infection by Blocking Quorum Sensing. *Cell Host and Microbe*. **22**: 746-756.e5.
  126. Parikka, K. J., le Romancer, M., Wauters, N. and Jacquet, S. 2017. Deciphering the virus-to-prokaryote ratio (VPR): Insights into virus–host relationships in a variety of ecosystems. *Biological Reviews*. **92**: 1081–1100.
  127. Park, H. Y., Kim, C. R., Huh, I. S., Jung, M. Y., Seo, E. Y., Park, J. H., Lee, D. Y. and Yang, J. M. 2013. *Staphylococcus aureus* colonization in acute and chronic skin lesions of patients with atopic dermatitis. *Annals of Dermatology*. **25**: 410–416.
  128. Peacock, S. J. and Paterson, G. K. 2015. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Biochemistry*. **84**: 577–601.

129. Pincus, N. B., Reckhow, J. D., Saleem, D., Jammeh, M. L., Datta, S. K. and Myles, I. A. 2015. Strain specific phage treatment for *Staphylococcus aureus* infection is influenced by host immunity and site of infection. *PLoS ONE*. **10**: 1–16.
130. Pirnay, J.-P., Verbeken, G., Ceysens, P.-J., Huys, I., de Vos, D., Ameloot, C. and Fauconnier, A. 2018. The Magistral Phage. *Viruses*. **10**: 64.
131. Publications service 2007. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D’Herelle, presented by Mr. Roux. *Research in Microbiology*. **158**: 553–554.
132. Pye, C. C., Yu, A. A. and Weese, J. S. 2013. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility in vitro. *Veterinary Dermatology*. **24**: 1–6.
133. Ranjit, D. K., Endres, J. L. and Bayles, K. W. 2011. *Staphylococcus aureus* CidA and LrgA proteins exhibit holin-like properties. *Journal of Bacteriology*. **193**: 2468–2476.
134. Rauch, S., DeDent, A. C., Kim, H. K., Wardenburg, J. B., Missiakas, D. M. and Schneewind, O. 2012. Abscess formation and alpha-hemolysin induced toxicity in a mouse model of *Staphylococcus aureus* peritoneal infection. *Infection and Immunity*. **80**: 3721–3732.
135. Ray, G. T., Suaya, J. A. and Baxter, R. 2013. Microbiology of skin and soft tissue infections in the age of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **76**: 24–30.
136. Reardon, B. Y. S. 2004. News in focus: Antibiotic resistance sweeping developing world. *Nature*. **16**: 5–5.
137. Rice, L. B. 2010. Progress and Challenges in Implementing the Research on ESKAPE Pathogens. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. **31**: S7–S10.
138. Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G. and Mesirov, J. P. 2011. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*. **29**: 24–26.

139. Sader, H. S., Flamm, R. K. and Jones, R. N. 2013. Antimicrobial activity of daptomycin tested against Gram-positive pathogens collected in Europe, Latin America, and selected countries in the Asia-Pacific Region (2011). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **75**: 417–422.
140. Salmond, G. P. C. and Fineran, P. C. 2015. A century of the phage: Past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*. **13**: 777–786.
141. Sanz-Gaitero, M., Keary, R., Garcia-Doval, C., Coffey, A. and van Raaij, M. J. 2014. Crystal structure of the lytic CHAPK domain of the endolysin LysK from *Staphylococcus aureus* bacteriophage K. *Virology Journal*. **11**: 133.
142. Scheffers, D.-J. and Pinho, M. G. 2005. Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **69**: 585–607.
143. Schmelcher, M., Shen, Y., Nelson, D. C., Eugster, M. R., Eichenseher, F., Hanke, D. C., Loessner, M. J., Dong, S., Pritchard, D. G., Lee, J. C., Becker, S. C., Foster-Frey, J. and Donovan, D. M. 2014. Evolutionarily distinct bacteriophage endolysins featuring conserved peptidoglycan cleavage sites protect mice from MRSA infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **70**: 1453–1465.
144. Schmidt, C. 2019. Phage therapy's latest makeover. *Nature Biotechnology*.
145. Schneider, T., Senn, M. M., Berger-Bächi, B., Tossi, A., Sahl, H. G. and Wiedemann, I. 2004. In vitro assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*. **53**: 675–685.
146. Schniederberend, M., Williams, J. F., Shine, E., Shen, C., Jain, R., Emonet, T. and Kazmierczak, B. I. 2019. Modulation of flagellar rotation in surface-attached bacteria: A pathway for rapid surface-sensing after flagellar attachment. *PLoS Pathogens*. **15**: 1–30.
147. Schuch, R., Khan, B. K., Raz, A., Rotolo, J. A. and Wittekind, M. 2017. Bacteriophage Lysin CF-301, a Potent Antistaphylococcal Biofilm Agent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **61**: 1–18.

148. Schuch, R., Nelson, D. and Fischetti, V. A. 2002. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*. **418**: 884–889.
149. Seckerdieck, F. and Mueller, R. S. 2018. Recurrent pyoderma and its underlying primary diseases: A retrospective evaluation of 157 dogs. *Veterinary Record*. **182**: 434.
150. Semmler, A. B. T., Whitchurch, C. B., Leech, A. J. and Mattick, J. S. 2000. Identification of a novel gene, *fimV*, involved in twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. **146**: 1321–1332.
151. Shah, M. M., Iihara, H., Noda, M., Song, S. X., Nhung, P. H., Ohkusu, K., Kawamura, Y. and Ezaki, T. 2007. *dnaJ* gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **57**: 25–30.
152. Shimamori, Y., Mitsunaka, S., Yamashita, H., Suzuki, T., Kitao, T., Kubori, T., Nagai, H., Takeda, S. and Ando, H. 2020. Staphylococcal Phage in Combination with *Staphylococcus Epidermidis* as a Potential Treatment for *Staphylococcus aureus*-Associated Atopic Dermatitis and Suppressor of Phage-Resistant Mutants. *Viruses*. **13**:
153. Son, B., Kong, M. and Ryu, S. 2018. The auxiliary role of the amidase domain in cell wall binding and exolytic activity of staphylococcal phage endolysins. *Viruses*. **10**: 1–12.
154. Squires, R. 2018. Bacteriophage therapy for management of bacterial infections in veterinary practice: what was once old is new again. *New Zealand Veterinary Journal*. **66**: 229–235.
155. Srisuknimit, V., Qiao, Y., Schaefer, K., Kahne, D. and Walker, S. 2017. Peptidoglycan Cross-Linking Preferences of *Staphylococcus aureus* Penicillin-Binding Proteins Have Implications for Treating MRSA Infections. *Journal of the American Chemical Society*. **139**: 9791–9794.
156. Strandén, A. M., Ehlert, K., Labischinski, H. and Berger-BÄCHI, B. 1997. Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a

- femAB* null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. **179**: 9–16.
157. Su, W., Sun, J., Shimizu, K. and Kadota, K. 2019. TCC-GUI: A Shiny-based application for differential expression analysis of RNA-Seq count data. *BMC Research Notes*. **12**: 1–6.
  158. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. and Morris, J. G. 2001. Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45**: 649–659.
  159. Sun, F., Zhou, L., Zhao, B. C., Deng, X., Cho, H., Yi, C., Jian, X., Song, C. X., Luan, C. H., Bae, T., Li, Z. and He, C. 2011. Targeting MgrA-mediated virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Chemistry and Biology*. **18**: 1032–1041.
  160. Synnott, A. J., Kuang, Y., Kurimoto, M., Yamamichi, K., Iwano, H. and Tanji, Y. 2009. Isolation from sewage influent and characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophages with wide host ranges and potent lytic capabilities. *Applied and Environmental Microbiology*. **75**: 4483–4490.
  161. Szafraniec, G. M., Szeleszczuk, P. and Dolka, B. 2020. A review of current knowledge on *Staphylococcus agnetis* in poultry. *Animals*. **10**: 1–19.
  162. Takeuchi, I., Osada, K., Azam, A. H., Asakawa, H., Miyanaga, K. and Tanji, Y. 2016. The Presence of Two Receptor-Binding Proteins Contributes to the Wide Host Range of Staphylococcal Twort-Like Phages. *Applied and Environmental Microbiology*. **82**: 5763–5774.
  163. Taponen, S., Supré, K., Piessens, V., van Coillie, E., de Vliegher, S. and Koort, J. M. K. 2011. *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulasevariable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **62**: 61–65.
  164. Tauber, M., Balica, S., Hsu, C. Y., Jean-Decoster, C., Lauze, C., Redoules, D., Viodé, C., Schmitt, A. M., Serre, G., Simon, M. and Paul, C. F. 2016. *Staphylococcus aureus* density on lesional and nonlesional skin is strongly associated with disease severity in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **137**: 1272-1274.e3.

165. Tavakkol, Z., Samuelson, D., deLancey Pulcini, E., Underwood, R. A., Usui, M. L., Costerton, J. W., James, G. A., Olerud, J. E. and Fleckman, P. 2010. Resident bacterial flora in the skin of C57BL/6 mice housed under SPF conditions. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*. **49**: 588–91.
166. Taylor, R. P., Sutherland, W. M., Martin, E. N., Ferguson, P. J., Reinagel, M. L., Gilbert, E., Lopez, K., Incardona, N. L. and Ochs, H. D. 1997. Bispecific Monoclonal Antibody Complexes Bound to Primate Erythrocyte Complement Receptor 1 Facilitate Virus Clearance in a Monkey Model. *Journal of Immunology*. **158**: 842–850.
167. Thumm, G. and Götz, F. 1997. Studies on polysostaphin processing and characterization of the lysostaphin immunity factor (Lif) of *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. *Molecular Microbiology*. **23**: 1251–1265.
168. Totté, J. E. E., van der Feltz, W. T., Hennekam, M., van Belkum, A., van Zuuren, E. J. and Pasmans, S. G. M. A. 2016. Prevalence and odds of *Staphylococcus aureus* carriage in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Dermatology*. **175**: 687–695.
169. Trotonda, M. P., Xiong, Y. Q., Memmi, G., Bayer, A. S. and Cheung, A. L. 2009. Role of *mgrA* and *sarA* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* autolysis and resistance to cell wall-active antibiotics. *Journal of Infectious Diseases*. **199**: 209–218.
170. TURNER, S., PRYER, K. M., MIAO, V. P. W. and PALMER, J. D. 1999. Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. **46**: 327–338.
171. Twort, F. W. 1915. AN INVESTIGATION ON THE NATURE OF ULTRA-MICROSCOPIC VIRUSES. *The Lancet*. **186**: 1241–1243.
172. Vaitekenas, A., Tai, A. S., Ramsay, J. P., Stick, S. M. and Kicic, A. 2021. *Pseudomonas aeruginosa* resistance to bacteriophages and its prevention by strategic therapeutic cocktail formulation. *Antibiotics*. **10**: 1–14.

173. Wadhams, G. H. and Armitage, J. P. 2004. Making sense of it all: Bacterial chemotaxis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **5**: 1024–1037.
174. Warfield, R., Bardelang, P., Saunders, H., Chan, W. C., Penfold, C., James, R. and Thomas, N. R. 2006. Internally quenched peptides for the study of lysostaphin: An antimicrobial protease that kills *Staphylococcus aureus*. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **4**: 3626–3638.
175. Weidinger, S. and Novak, N. 2016. Atopic dermatitis. *The Lancet*. **387**: 1109–1122.
176. Weidinger, S., O’Sullivan, M., Illig, T., Baurecht, H., Depner, M., Rodriguez, E., Ruether, A., Klopp, N., Vogelberg, C., Weiland, S. K., McLean, W. H. I., von Mutius, E., Irvine, A. D. and Kabesch, M. 2008. Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **121**: 1203–1210.
177. Wilkinson, B. J. and Holmes, K. M. 1979. *Staphylococcus aureus* cell surface: Capsule as a barrier to bacteriophage adsorption. *Infection and Immunity*. **23**: 549–552.
178. Wollenberg, A., Zoch, C., Wetzell, S., Plewig, G. and Przybilla, B. 2003. Predisposing factors and clinical features of eczema herpeticum: A retrospective analysis of 100 cases. *Journal of the American Academy of Dermatology*. **49**: 198–205.
179. Wright, A., Hawkins, C. H., Änggård, E. E. and Harper, D. R. 2009. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: A preliminary report of efficacy. *Clinical Otolaryngology*. **34**: 349–357.
180. Wu, X., Paskaleva, E. E., Mehta, K. K., Dordick, J. S. and Kane, R. S. 2016. Wall Teichoic Acids Are Involved in the Medium-Induced Loss of Function of the Autolysin CD11 against *Clostridium difficile*. *Scientific Reports*. **6**: 35616.
181. Xia, G., Kohler, T. and Peschel, A. 2010. The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*. **300**: 148–154.

182. Zaczek, M., Weber-Dabrowska, B. and Górski, A. 2015. Phages in the global fruit and vegetable industry. *Journal of Applied Microbiology*. **118**: 537–556.
183. Zhang, L., Li, D., Li, X., Hu, L., Cheng, M., Xia, F., Gong, P., Wang, B., Ge, J., Zhang, H., Cai, R., Wang, Y., Sun, C., Feng, X., Lei, L., Han, W. and Gu, J. 2016. LysGH15 kills *Staphylococcus aureus* without being affected by the humoral immune response or inducing inflammation. *Scientific Reports*. **6**: 29344.
184. Zhvania, P., Hoyle, N. S., Nadareishvili, L., Nizharadze, D. and Hoyle, N. S. 2017. Phage Therapy in a 16-Year-Old Boy with Netherton Syndrome. **4**: 1–5.

A Basic and Clinical Applied Research of Bacteriophage Therapy: Next-Generation Strategy for  
Bacterial Infections by Exploiting Trade-offs Associated with Phage Resistance

Rakuno Gakuen University, Graduate School of Veterinary Medicine  
Veterinary Medicine, Doctoral Course  
Laboratory of Veterinary Biochemistry      Tomohiro Nakamura

Antibiotic-resistant bacteria have widely and rapidly spread due to overuse and misuse of antibiotics. At present, the use of bacteriophages (phages) as therapy for infectious diseases is receiving significant attention as protagonists of a post-antibiotic era. Phages are viruses that specifically infect bacteria and kill them by endolysin, which is peptidoglycan hydrolase derived from phages. In this study, we investigated characteristics of *S. aureus* phage phiSA012 and its endolysin Lys-phiSA012, and evaluated those therapeutic potential for atopic dermatitis in mouse model. Also, we treated canine chronic otitis externa using *P. aeruginosa* phages cocktail and found phage-resistant bacteria during treatment. Therefore, we analyzed mechanism of phage resistance and determined trade-off relationship between acquisition of phage resistance and antibiotic sensitivity and/or virulence reduction in *P. aeruginosa* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA).

In Section I, we investigated host range, stability and safety of phiSA012. PhiSA012 could infect not only *S. aureus* including MRSA isolated from human but also others some staphylococci. PhiSA012 retained high infectivity when stored at 4°C for 2 months, once frozen and thawed, mixed with pH 3 to pH 9 solution. Lytic activity of phiSA012 was gradually decreased by heat treatment. Fetal bovine serum (FBS) did not inhibit lytic activity of phiSA012. No side effect for dogs was confirmed when PhiSA012 was administrated intravenously, intravesically and dropped into ear canal and sprayed on skin.

In Section II, we purified an endolysin Lys-phiSA012 derived from phiSA012. We demonstrate that Lys-phiSA012 exhibits high lytic activity towards staphylococcal strains. Analysis of deletion mutants showed that only mutants possessing CHAP and SH3b domains could lyse *S. aureus*, indicating that lytic activity of the CHAP domain depended on the SH3b domain. The presence of at least 1 mM Ca<sup>2+</sup> and 100 μM Zn<sup>2+</sup> enhanced the lytic activity of Lys-phiSA012 in a turbidity reduction assay. Furthermore, a minimum inhibitory concentration (MIC) assay showed that the addition of Lys-

phiSA012 decreased the MIC of oxacillin.

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease. According to recent skin biome analysis, dysbiosis and *S. aureus* skin colonization is observed in AD patients. In Section III, we examined whether phage therapy of targeting staphylococci can improve dermatitis symptoms in AD model mice, NC/Tnd mice. PhiSA012 showed high lytic activity against almost all isolated staphylococci from mice skin. Also, phiSA012 could lyse staphylococci on skin surface, and dramatically improved dermatitis symptoms and decreased serum IgE levels.

In section IV, we performed phage cocktail therapy in dogs with chronic refractory otitis externa associated with *P. aeruginosa* infection. The phage cocktail was designed by selecting and newly isolating phages that showed lytic activity against *P. aeruginosa* PASz isolated from ear swabs before the start of phage therapy. The phage cocktail was administrated into the ear canal. After the phage therapy was started, some symptoms improved, but not completely, and phage-resistant bacteria were detected. We isolated and administrated new phages with bacteriolytic activity against phage-resistant bacteria and removed the tumor in the horizontal ear canal. The symptoms of otitis externa improved further, and *P. aeruginosa* was not detected finally. Mutation gene detection revealed phage-resistant bacterium PASz\_d7mt harbors mutations in *fimV*, which is type IV pilus assembly protein, and *fliG*, which is a component of flagella. Motility assays revealed that PASz\_d7mt reduced motility via type IV pilus and flagella, suggesting reduced virulence associated with the acquisition of phage resistance.

In Section V, we focused on the phenotypic changes of bacteria associated with phage resistance, and analyzed the mechanism by which MRSA acquired resistance to phiSA012 and the phenotypic changes of phage-resistant strains. All of the phage-resistant strains of MRSA 2007-13 harbor mutations *mgrA*, the transcriptional regulator, and more than 70% of the strains harbor mutations in *femA*, which synthesizes pentaglycine cross-bridge of peptidoglycan. The phage-resistant strains with only *mgrA* mutations showed weak lytic activity, although they inhibited the adsorption of phage to the host bacteria. On the other hand, phage-resistant strains with both *mgrA* and *femA* mutations showed complete phage resistance to the lytic activity of phiSA012. The phage resistant bacteria with *femA* mutation showed complete resistance to the endolysin because the peptidoglycan was cross-linked by monoglycine and endolysin Lys-phiSA012 could not bind to the peptidoglycan. In addition, susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics was dramatically increased in phage-resistant bacteria with *femA* mutation. On the other hand, *mgrA* mutation altered downstream gene expression, suggesting that

capsular polysaccharide type changes or high expression of large cell surface proteins may have inhibited phage adsorption to receptors. In addition, the *mgrA* mutation suppressed the expression of several virulence genes and markedly reduced the virulence of phage-resistant bacteria in mouse peritonitis and abscess models. This is the first report to elucidate the mechanism of phage resistance via *femA* and *mgrA* mutations in *S. aureus*, and we found that phage resistance may be accompanied by an increase in antimicrobial susceptibility and a decrease in virulence at the same time.

These results confirm the safety of phage therapy in veterinary medicine and demonstrate its efficacy against bacterial infections, especially skin infections. In addition, phage-resistant bacteria isolated from *in vitro* experiment and the clinical trial showed decreased virulence and/or increased antibiotic susceptibility, indicating that these are trade-offs associated with phage resistance. Therefore, this study is an important finding for the development of a next-generation strategy for bacterial infections taking advantage of phage resistance, rather than using phage simply as an antibacterial virus.