

伴侶動物の難治性尿路疾患由来多剤耐性大腸菌に
対するファージセラピーの検討

大橋春香

酪農学園大学大学院獣医学研究科
獣医保健看護学専攻修士課程

獣医生化学ユニット

指導教員 教授 岩野英知

2022 年度

目次

緒論	p3
第Ⅰ章 多剤耐性大腸菌 ERIKA 株に対する溶菌性ファージの分離とその性状解析	
1, 序文	p5
2, 材料と方法	p6
3, 結果	p14
4, 考察	p28
5, 小括	p32
第Ⅱ章 臨床分離株 35 株に対する溶菌性ファージの分離とその性状解析	
1, 序文	p34
2, 材料と方法	p35
3, 結果	p41
4, 考察	p66
5, 小括	p73
総括	p75
謝辞	p77
引用文献	p78

略語表

本文中において、以下の略語を用いた。

CFU : colony forming unit

DLA 法 : Double Layer Agar Method [20]

EOP : efficiency of plating

LB : lysogeny broth

OD : optical density

PFU : plaque forming unit

PoT 法 : Phage on Tap protocol [6]

SM : suspension medium

ϕ : bacteriophage

緒論

ネコの泌尿器に関する疾患において代表的なものの一つに膀胱炎がある。この病気は近年発表されたアイペット損害保険株式会社の 2021 年ペットの「保険金請求が多い傷病ランキング」においても 1 歳～6 歳では第 2 位に、7 歳以上では第 4 位にランクインしており、伴侶動物の身近な疾患でもある[42]。ネコの膀胱炎は通常下部の尿路から上部へと上行性に細菌や真菌などが侵入して発症する[45]。原因とされる代表的な細菌は大腸菌、ブドウ球菌、レンサ球菌、パストレラ菌など多種に渡るが、最も一般的な尿路疾患の病原菌は大腸菌である[45, 47]。膀胱には細菌感染に対する自然防御機構が存在するが、尿の残留や滞留、膀胱粘膜の傷害、尿量および尿組成の変化、全身性の免疫障害などの要因によりこの防御システムが働かなくなることによって感染が成立する。また膀胱炎は膀胱の構造的・機能的な異常のない個体への感染による単純性膀胱炎、構造的・機能的な異常を有した個体への感染による複合性膀胱炎、細菌の感染が繰り返される再発性膀胱炎、抗菌薬の投与にも関わらず細菌が持続感染する持続性膀胱炎の四つに分類される[46]。症状は症例によって異なり、重度の症状を認められるものから全く症状が認められないものまで多様である。臨床症状が認められるものに関しては頻尿、有痛性排尿困難、血尿、悪臭を放つ尿の排尿、不適切な場所での排尿などが挙げられる[46]。治療としては、細菌性膀胱炎の場合、感染を起こしやすくしている基礎疾患やその誘因、そして原因となる細菌を除去するため薬物療法や予防としての食事療法、さらに病気の原因そのものではなく、症状を改善させる支持療法が行われている[46, 47]。しかしこの治療にある薬物療法の抗菌薬の投与が長期にわたると経済的負担はもちろん、副作用や耐性菌の問題が懸念される[42, 46]。

1928 年に最初の抗生物質であるペニシリンが発見されて以来、様々な抗生物質が開発され今日まで世界中で使用されている[3]。しかし皮肉なことに、抗生物質の使用が高まるにつれ薬剤耐性菌が現れ、多くの命を奪う事例が起きてきており[34]、そのため抗生物質の認識と理解の向上を図り、抗生物質の使用の制限を設けるなど世界的にも薬剤耐性菌の対策に喚起を促している[41]。このような状況から今後は抗生物質のみに頼らない治療に対する新たな対応が求められており、バクテリオファージ（ファージ）を利用したファージ療法（ファージセラピー）が注

目されている。ファージとは、細菌に特異的に感染し、溶菌するウイルスである。ファージは宿主細菌膜上にあるレセプター分子を認識し、自身の頭部にあるウイルスゲノムを細菌内に送り込む。そして細菌の持つシステムを利用して娘ファージを大量に作り、その後、細胞壁を破壊する溶菌酵素（エンドライシン）によりペプチドグリカン層を破壊することで細菌を死滅させる[10, 43]。この感染、溶菌機序を利用したものをファージ療法（ファージセラピー）と言い、古くから細菌感染症の治療法として主に東欧諸国やロシアなどでおおよそ 100 年にわたり人に対しても臨床応用が行われてきた[37]。ファージセラピーの強みは、薬剤耐性菌にも応用が利くこと、特異性が高いため常在細菌叢に影響しないこと、細菌に感染することで増殖するため少ない投与回数で効果を発揮できることなどがある。また製造方法が比較的容易であり[31]、ファージの開発は抗生物質の開発と比較して、安価であることが挙げられる[9, 12]。実際にヒトにおいてのファージセラピーの緊急使用症例にて成功した報告としてパターソン症例が有名である[10, 33]。これは急性膵炎と診断されたパターソン氏から多剤耐性 *A. baumannii* が検出され、ファージセラピーにより一命を取り留めた米国で初めてのファージセラピーの成功例である。このパターソン症例におけるファージセラピーの一連の流れは、病原菌株の分離とそれに対するファージの選定、カクテル化ファージの精製、さらにファージ耐性株の分離と溶菌性ファージのカクテル化を繰り返し、おおよそ 59 日間の治療にて寛解した。また動物のファージセラピーの症例では実験的範囲において豚の腸毒性大腸菌による下痢に対してファージを使った予防及び治療の先行研究から有効的な効果が見られた報告がある[18]。その他、食中毒予防のための Intralytix 社が開発したリステリアに対するファージスプレー剤が認可されており、治療薬以外にも適用されている[10]。

そこで本研究では、再発を繰り返す難治性の大腸菌膀胱炎のネコに対してファージセラピーの臨床応用を目指し、第 I 章ではネコの膀胱炎由来多剤耐性大腸菌 ERIKA 株に対する溶菌性ファージの分離とその溶菌特性の解析、さらに臨床試験を実施し、第 II 章では宿主域が広く、ファージ耐性菌に対し有効なファージカクテルの設計を行うことで臨床応用への検討をした。

第 I 章 多剤耐性大腸菌 ERIKA 株に対する溶菌性ファージの分離と その性状解析

I. 序文

伴侶動物における膀胱炎はネコに多く、過去の研究報告においてもネコの尿から分離される病原体の多くは大腸菌が占めている[39]。罹患した際の主な治療法に抗生物質が選択されるが、その際、抗生物質の感受性を精査することなく適用される状況も多く、薬剤耐性の問題が増加している。また、人と比較して伴侶動物では長期にわたり使用することや、人と伴侶動物との密接な接触による細菌の伝播することとも関係していると考えられている [29]。そのため、抗生物質に頼らない新たな治療法が必要とされている。そこで注目されたのがファージセラピーであるが、このファージセラピーを行うにあたって、一般的にファージを複数混ぜ合わせたカクテル化が不可欠となっている。その理由には、大腸菌はファージに対し耐性化しやすいことが挙げられ、ファージ耐性菌の出現が懸念されるからである[32]。従って細菌に感染するときの認識部位が異なり、感染様式において多様性のあるファージを取得する必要がある。

そこでこの第 I 章では、慢性の膀胱炎を呈するネコから分離した多剤耐性大腸菌株である ERIKA 株を用いて主要都市部の汚水から分離した溶菌性ファージを使い、形態学的分類や濁度測定法によるファージの細菌増殖を検証したほか、そこから出現したファージ耐性菌に対抗するためのファージカクテルの作成を行った。また薬剤感受性試験や伴侶動物医療において分離された大腸菌 35 株に対する溶菌スペクトルの調査も行った。さらに今回 *in vitro* 試験で一番効果的だったカクテルファージを用いて実際に臨床試験を行い、その効果を検証した。

II. 実験と方法

1. 培地類

本研究は以下の培地類を使用した。

- ・ LB-Agar : 1%NaCl、1%Tryptone (アメリカ合衆国 Bacto™)、0.5%Yeast Extract (アメリカ合衆国 Bacto™)、1.5%Agar (アメリカ合衆国 Bacto™)
- ・ LB-Top Agar : 1%NaCl、1%Tryptone (アメリカ合衆国 Bacto™)、0.5%Yeast Extract (アメリカ合衆国 Bacto™)、0.5%Agarose ME (日本 岩井化学薬品)
- ・ LB-Broth : 1%NaCl、1%Tryptone (アメリカ合衆国 Bacto™)、0.5%Yeast Extract (アメリカ合衆国 Bacto™)

2. 試薬類

全ての生化学実験用、または最も純度の高いものを使用した。

3. 使用菌株

用いた株は全て臨床から分離した大腸菌 (*Escherichia coli*) であり、ERIKA 菌株は酪農学園大学附属動物医療センターから、またその他の株は株式会社 VDT (神奈川県藤沢市) から提供された菌株を使用した。株名と由来等を Table 1 に示した。各菌株は、LB-Agar 上に塗抹し 37℃の条件下で一晩培養しコロニー形成確認後、3ml の LB-Broth で懸濁し菌液とした。各菌液は 50%グリセリン溶液と等量混合し、-80℃で保存した。

Table 1 使用菌株

株名	ID	受付日	動物種	性別	部位
ERIKA	-----	20/9/13	ネコ	避妊雌	穿刺尿
ECud-A	31558	20/9/13	イヌ	雄	カテーテル尿
ECud-B	31544	20/9/13	イヌ	避妊雌	穿刺尿
ECud-C	31541	20/9/13	イヌ	避妊雌	自然尿
ECud-D	31539	20/9/13	イヌ	雄	穿刺尿
ECud-E	31538	20/9/13	ネコ	避妊雌	穿刺尿
ECud-F	31537	20/9/13	イヌ	雄	穿刺尿
ECud-G	31506	20/9/12	イヌ	避妊雌	自然尿
ECud-H	31486	20/9/12	イヌ	避妊雌	穿刺尿
ECud-I	31485	20/9/12	イヌ	避妊雌	穿刺尿
ECud-J	31466	20/9/12	イヌ	避妊雌	自然尿
ECud-K	31447	20/9/11	イヌ	去勢雄	穿刺尿
ECud-L	31428	20/9/11	イヌ	去勢雄	自然尿
ECud-M	31421	20/9/11	イヌ	避妊雌	穿刺尿
ECud-N	31399	20/9/10	イヌ	去勢雄	カテーテル尿
ECud-O	31393	20/9/10	イヌ	雌	皮下膿瘍穿刺尿
ECud-P	31386	20/9/10	イヌ	雌	穿刺尿
ECud-Q	31359	20/9/9	ネコ	避妊雌	自然尿
ECud-R	31350	20/9/9	イヌ	去勢雄	自然尿
ECud-S	31312	20/9/8	ネコ	去勢雄	穿刺尿
ECud-T	31297	20/9/8	イヌ	雌	自然尿
ECud-U	31292	20/9/8	イヌ	避妊雌	穿刺尿
ECud-V	31215	20/9/6	ネコ	避妊雌	穿刺尿
ECud-W	31205	20/9/5	ネコ	去勢雄	自然尿
ECud-X	31195	20/9/4	ネコ	雄	カテーテル尿
ECud-Y	31152	20/9/3	ネコ	去勢雄	自然尿
ECud-Z	31100	20/9/2	ネコ	避妊雌	穿刺尿
ECud-AA	31085	20/9/2	ネコ	去勢雄	カテーテル尿
ECud-AB	31083	20/9/2	ネコ	避妊雌	穿刺尿
ECud-AD	30812	20/8/27	ネコ	避妊雌	穿刺尿
ECud-AE	30710	20/8/25	ネコ	避妊雌	自然尿
ECud-AF	30663	20/8/24	ネコ	避妊雌	穿刺尿
ECud-AG	30593	20/8/22	ネコ	ND(※)	穿刺尿
ECud-AH	30496	20/8/20	ネコ	避妊雌	穿刺尿
ECud-AI	30446	20/8/19	ネコ	去勢雄	穿刺尿
ECud-AJ	30442	20/8/19	ネコ	避妊雌	穿刺尿

(※) ND…記録がなかったため no data とした。

4. 使用ファージ株

試験に供したファージのホスト菌株名・由来などを Table 2 に示した。

Table 2 使用ファージ株とそのホスト菌・由来

株名	ホスト菌	由来
φ 24	ERIKA	汚水②④/東京①
φ 26	ERIKA	汚水②⑥/東京②
φ 27	ERIKA	汚水②⑦/東京③
φ 30	ERIKA	汚水③⑩/福岡①
φ 31	ERIKA	汚水③⑪/福岡②
φ 32	ERIKA	汚水③⑫/福岡③
φ 33	ERIKA	汚水③⑬/福岡④

5. ファージの分離

1) ファージ分離用サンプル液の精製と前培養液の作成

ファージ分離用サンプル液の精製には、東京都及び福岡県の下水等に由来する 7 種類を用いた (Table 3)。各汚水は攪拌後、分注し、8000×g、10min、4℃で遠心した。その後、遠心上清を 0.45μm ディスクフィルターでろ過し、4℃で保存したものをファージ分離用サンプル液とした。

Table 3 サンプル名と由来

サンプル名	由来
汚水②④	東京①
汚水②⑥	東京②
汚水②⑦	東京③
汚水③⑩	福岡①
汚水③⑪	福岡②
汚水③⑫	福岡③
汚水③⑬	福岡④

2) ファージのスクリーニング

大腸菌と被験ファージサンプル液を 100 μ L ずつ混合した。この混合液を 3mL の 0.5%LB-Top Agar に加え、LB-Agar 上に重層し、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した (DLA 法 (Double Layer Method)) [20]。翌日、菌の発育により形成される菌叢を確認し、ファージによる溶菌斑 (Plaque) のあるものをファージ陽性と推測した。

3) ファージのクローニング

ファージ陽性と推定したサンプル液について、SM-Buffer (50mM Tris.HCl (pH7.5), 100mM NaCl, 8mM MgSO₄, 0.01% Gelatin) で段階希釈し、DLA 法で培養した。翌日、形成された単一の Plaque をピペットチップでくり抜き採取し、2mL の LB-Broth に溶解し、37 $^{\circ}$ Cで培養した。2~3 時間後、培養液に 100 μ L のクロロホルムを加え、4 $^{\circ}$ C、8000 \times g、5min の条件で遠心した後、遠心上清を回収した。この作業を 2 回繰り返し最終的に取れた上清を単一 (純化) ファージとした。

6. ファージの精製と力価測定

1) プレートライセート法によるファージの増幅

純化された各ファージサンプルを用いて、宿主菌株と共に全面溶菌となるよう DLA 法で培養した。翌日、培養したシャーレに 3ml の SM-Buffer を重層し、15min、37 $^{\circ}$ Cで振盪培養した (Pot Amp)。その後、ファルコンチューブに培地上の液体成分のみを回収し、8000g、10min、4 $^{\circ}$ Cで遠心した後、遠心上清を 0.2 μ m ディスクフィルター (DVANTEC® DISMIC-25CS アドバンテック東洋株式会社) でろ過したものをプレートライセート産物とした (Pot Clean up)。産物は 4 $^{\circ}$ Cで保存した。

2) ファージの濃縮・精製

プレートライセート産物を元に既報の Phage on Tap protocol (PoT 法) に従ってファージを精製した[6]。PoT 法は遠心及び 0.2 μ m ディスクフィルターによる粗精製と、分画分子量 100kDa の限外ろ過フィルター (Amicon® ウルトラ-15 遠心式フィルターデバイス Merck) による濃縮・精製及び SM-Buffer への溶媒置換を実

施する一連のファージサンプル処理法である。最終的な産物を、PoT 産物とした。産物は 4℃で保存した。

3) ファージの Titering

各ファージのプレートライセート産物あるいは PoT 産物について、SM-Buffer で段階希釈し、宿主菌と共に DLA 法で培養した。翌日、菌叢に形成された Plaque を数え、以下の計算式で当該ファージサンプルの Titer を算出した。

$$(\text{Plaque 数}) \times (\text{希釈倍率}) \times 1000/100$$

※単位：PFU/mL

7. ファージ粒子の電子顕微鏡像の撮影

SM-Buffer で希釈し、 10^8 PFU/mL に調整した PoT 法産物を用いた。具体的な撮影条件は既報の通りである[11]。

400 メッシュのグリッドを使用し、以下の方法を用いてグリッドにコロジオン膜を圧着させた。まず、グリッド上に 0.5%ネオプレン溶液を滴下して乾燥させた。一方で、直径 12cm のガラスシャーレに蒸留水を張り、白熱灯にて温めて、2%コロジオン溶液を滴下して水面に薄膜を作成した。薄膜上に乾燥後のグリッドを載せ、コロジオン膜をグリッドに圧着させた。その後、真空蒸着機（Hitachi、HUS-5GB）を用いてコロジオン膜表面にカーボンを蒸着した。カーボン蒸着したグリッドはイオンスパッター（JEOL、JFC-1100）にて 2mA で 30 秒間グロー放電して親水化処理を行った。

そして親水化処理後のグリッドにファージ溶液を 10 μ L 載せて 2～3 分間静置した。その後、溶液をろ紙で吸い取り、PBS を滴下して洗浄し、同様にろ紙で吸い取った。次いで 2%酢酸ウランを一滴載せて 10 秒間ほど静置した後に、ろ紙で吸い取りグリッドを乾燥させて電子顕微鏡観察に供した。

透過型電子顕微鏡はHitachi製 H-800を使用し、加速電圧 75kVで観察を行った。

8. 濁度測定法による解析

1) 濁度測定法を用いた液体培地中での ERIKA の増殖曲線作成

大腸菌 ERIKA の菌液を LB-Agar 上に播種し、一晚 37℃で培養した。ここから単一コロニーを 6mL の LB broth に入れて分光光度計 (ASV11D-H、大阪 アズワン) によって波長 600nm での吸光値を 30 分毎に測定しながら 37℃で 4 時間振盪培養し、測定された経時的な吸光値の変化より増殖曲線を作成した (n=3)。この実験により今後の実験の際、ERIKA の菌数を吸光値 OD₆₀₀の測定値により計算して用いた。

2) 濁度測定法を用いた野外分離ファージによる経時的な溶菌の観察

大腸菌 ERIKA 株の菌液を OD₆₀₀≒0.4 (≒10⁷ CFU/mL) に調整し、これとファージ液を 96well プレートにそれぞれ 100μL ずつ分注した後、プレートをプレートリーダー (サンライズレインボーサーモ RC、神奈川 テカンジャパン) にセットし、波長 600nm での吸光値を 15 分毎に測定しながら 37℃で 24 時間振盪培養し、測定された経時的な吸光度の変化より細菌の増殖曲線を作成した。

9. ディスク拡散法による薬剤感受性試験

抗生物質に対する菌株の感受性・耐性の確認を行うために、ディスク拡散法を行った。凍結保存した菌株を、ミューラーヒントン寒天培地及びパールコア®ミューラーヒントン S 寒天培地 '栄研' にて好気培養し、滅菌綿棒でコロニーを釣菌し、1.5mL マイクロチューブに入った 1,000μL の滅菌生理食塩水にマクファーランド濁度 0.5~1 の濁度で懸濁した。濁度液をミューヒントン II 寒天培地 (BD) とパールコア®ミューラーヒントン S 寒天培地 '栄研' (KB) それぞれに 100μL 入れ、コンラージ棒で全体に塗抹した。その後、BD センシ・ディスク™ (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社：オキサシリン・アモキシリン・セフトロキシム・イミペネム・メロペネム・ゲンタマイシン・カナマイシン・エリスロマイシン・リンコマイシン・バンコマイシン・ST 合材・オキシテトラサイクリン・ドキシサイクリン・クロラムフェニコール) と KB ディスク® (栄研化学株式会社：ファロペネム) を鑷子で軽く押さえて培地へ密着させた。この時、鑷子先端はアルコール綿で毎回拭き取った。ろ紙ディスクから寒天中へ拡散した薬剤濃度は、ディスクからの距離に応じて希釈され、細菌の発育が阻害される限界となる地点で発育阻止帯の

境界線が出現するようになる。判定は、阻止円直径を測定し、感性（S）・中間（I）・耐性（R）に類別する「判定表」に従って行った。

10. Spot Test と EOP の算出によるファージの感受性試験

1) Spot test

Spot test により分離した単一ファージが宿主菌株に対してどの程度溶菌するのか確認した。各被検菌液 100 μ L を 3mL の LB-Top Agar に加え、LB-Agar 上に播種した。その上に各純化済みのファージサンプル液（PoT 産物）及び SM-Buffer（ネガティブコントロール）を 5 μ L ずつ滴下し、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。翌日、Agar 上の各ファージサンプル液を滴下した場所を観察し、ファージの溶菌活動により形成された Spot を観察した。

2) Spot test による EOP の算出

EOP（efficiency of plating）とはコロニー形成率であり、これにより細菌株に対するファージの力価を計測し比較することができる。方法は被検菌液（ERIKA）100 μ L を 3mL の LB-Top Agar に加え、LB-Agar 上に播種した。その上に純化製剤済みの各ファージサンプル液（PoT 産物）を段階希釈したものと SM-Buffer（ネガティブコントロール）を 5 μ L ずつ滴下し、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。サンプル液はそれぞれ SM-Buffer で希釈して 10⁴ PFU/mL から 10¹ PFU/mL に調整した。翌日、Agar 上の各ファージサンプル液を滴下した場所を観察し、ファージの溶菌により形成された Spot を観察した。

Spot 内の Plaque 数をカウントし、以下の計算式により当該ファージサンプルの EOP（efficiency of plating）[26]を算出した。

$$(\text{被検菌の Plaque 数}) \times (\text{希釈倍率}) / (\text{宿主菌の Plaque 数}) \times (\text{希釈倍率})$$

11. 慢性膀胱炎を呈するネコに対するファージ投与による臨床試験

今回、多剤耐性大腸菌株の提供対象のネコ（ERIKA）に対してファージ投与を行った。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、被検対象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。

臨床試験はすべて RGU-AMC にて行われた。ファージ投与期間中、被検対象は隔離処置し、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。

φ24 と φ27 を混合し 2.0×10^9 PFU/mL)、それを生理食塩水 (1mL) で希釈したものをファージカクテル液 (1.0×10^9 PFU/mL) とし、このファージカクテル液を投与に用いた。投与経路は尿道カテーテルを使い、膀胱内投与を行った。ファージ投与は朝夕 1 日 2 回、5 日間行い、尿中の細菌数の変化をモニターした。また治療開始前、治療終了・退院時に尿中から分離した菌を宿主菌とし、濁度測定法を用いて溶菌活性を評価した。

また、今回の臨床試験に至るまでの治療歴では 2019 年 4 月 8 日に腎後性腎不全 (尿結石) が認められ、約 2 か月間の入院治療が行われた。その間、尿検査において *Klebsiella oxytoca* ESBL、*Enterobacter cloacae*、*Enterococcus faecium* が検出され、いずれも多剤耐性菌と診断された。抗菌薬治療としてアモキシシリン、オルビフロキサシン、ミノサイクリン、イミペネム、ファロペネムなどを行い、尿路感染が陰性化することもあったが、数か月後に ESBL の再発を繰り返した。

12. 統計解析

濁度測定法における細菌の増殖の経時的な解析において各ファージ添加による溶菌効果を Tukey の方法を用いた多重比較による統計解析を行った。データ解析は Excel 統計 2010 にて行った。

III. 結果

1. ファージの分離とその形態学的分類

ERIKA を宿主菌とし、溶菌性バクテリオファージの分離を試みた。その結果、7 種類の汚水からそれぞれ 1 株ずつファージを取得し、計 7 株を分離した。Fig. 1 は例として 7 株の内の 1 つである $\phi 30$ の Plaque の様子を示した。この分離された 7 株のファージをそれぞれ、 $\phi 24$ (汚水⑳)、 $\phi 26$ (汚水㉔)、 $\phi 27$ (汚水㉗)、 $\phi 30$ (汚水㉚)、 $\phi 31$ (汚水㉝)、 $\phi 32$ (汚水㉟)、 $\phi 33$ (汚水㊿) と命名し、その電顕像を Fig. 2 に示した。ファージは Tail を持つ Tailed Phage であり、正二十面体カプシドと Sheath 構造に覆われた Tail を有する[1,2,19]。ファージの古典的な形態学的分類法から、観察された Sheath に覆われた Tail の構造により、ミオウイルス科 (*Myoviridae*) に分類した[1,2,19]。

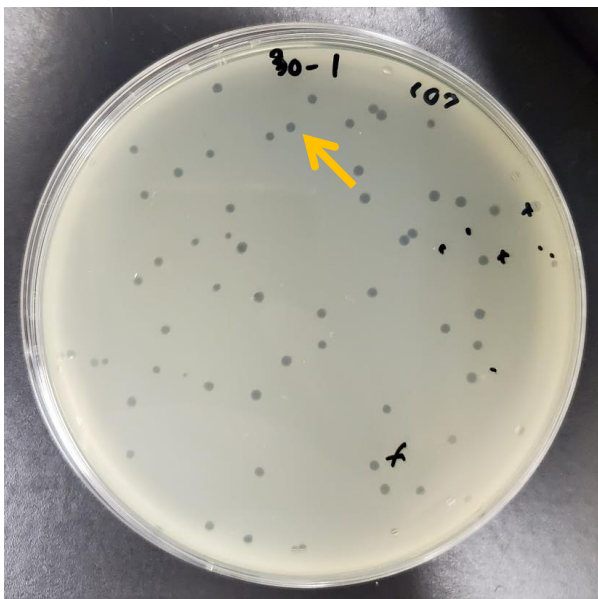


Fig. 1 汚水を用いた DLA 法による $\phi 30$ の Plaque

Fig. 1 は汚水㉚から DLA 法で分離したファージと菌叢の全体の様子を示している。矢印を指している部分がファージによって形成された溶菌斑 (Plaque) を示している。この Plaque 一つを選び取り、LB-broth に溶解させ、37℃で培養した。

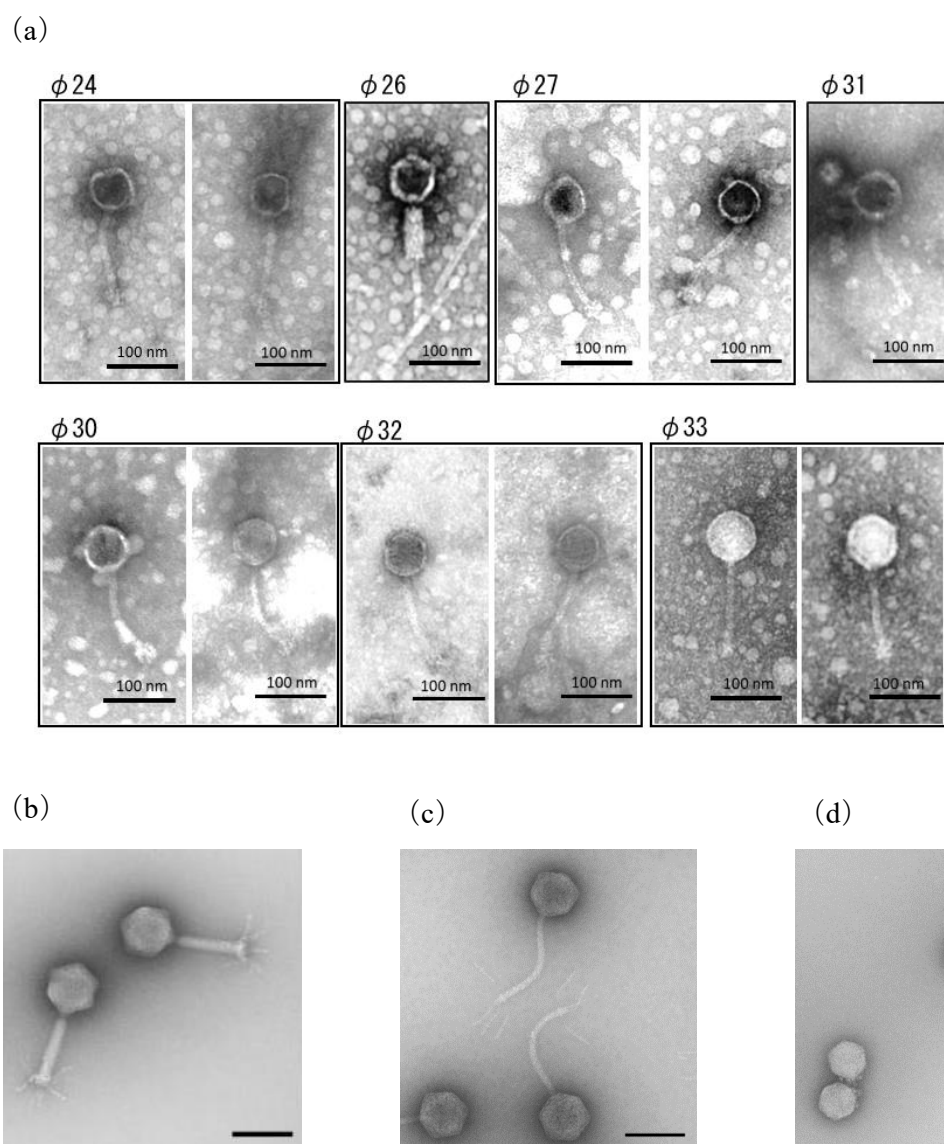


Fig. 2 分離ファージ 7 株の形態学的分類

(a) ERIKA 株を宿主菌として得られたファージ 7 株の電子顕微鏡像。(b) ミオウイルス (*Myoviridae*) に属する単離ファージの形状 (c) シフォウイルス (*Siphoviridae*) に属する単離ファージの形状 (d) ポドウイルス (*Podoviridae*) に属する単離ファージの形状 [19]。

2. 濁度測定法による ERIKA 株に対する溶菌の確認と耐性菌に対する Spot test 評価
7 株のファージと ERIKA 株に対する経時的な溶菌の変化を濁度測定法による 24 時間の細菌の増殖の変化で観察した (Fig. 3)。

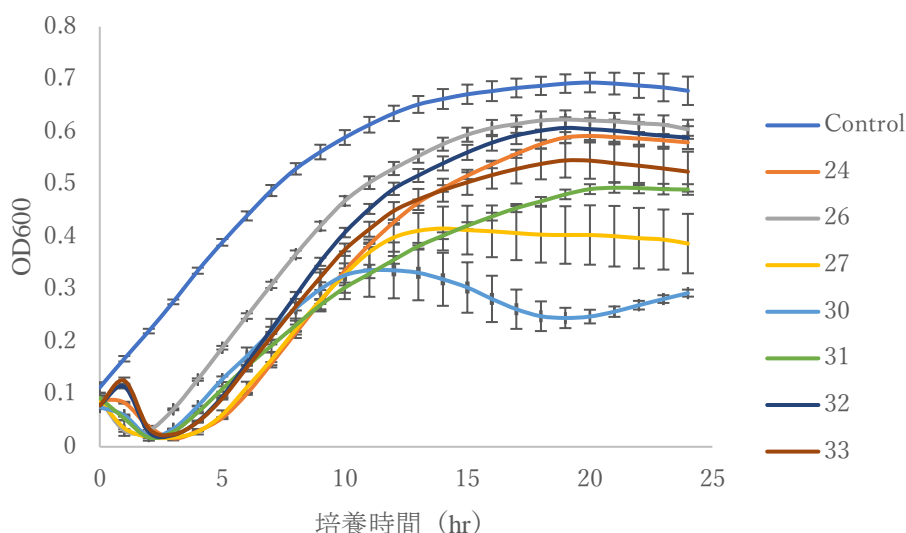


Fig. 3 濁度測定法による各ファージの細菌増殖に与える影響

Control は ERIKA 株のみの増殖曲線であり、その他は各ファージと ERIKA が MOI 1 となるように調整した溶液での増殖曲線を示す。縦軸は OD 値で、細菌の増殖を濁度で計測し、横軸は培養時間 (時間) を示している。培養は 1.0×10^7 CFU/mL から開始した。それぞれ $n=3$ の実験で行い、平均値と標準誤差をプロットしてグラフを作成した。

培養を始めた最初の段階では、どのファージも急速な強い溶菌活性が起き、濁度は低下した。しかしその後、3-4 時間程度過ぎると細菌の再増殖が生じた。この増殖の程度にはファージによる差が認められ、特に $\phi 30$ と $\phi 27$ では Control と比べ半分程度の増殖にとどまったが、他の種のファージにおいては 24 時間で Control の 7-9 割程度まで増殖していた。この再増殖をファージに対する耐性菌と考え、24 時間培養後の培養液を LB-Agar に画線塗抹し、シングルコロニーを分離培養した。そしてこれを耐性菌候補として Spot test を行い、各元のファージに対して耐性化しているかを確認した。

24 時間後の培養液から所得した菌株 7 株をそれぞれ R24、R26、R27、R30、R31、R32、R33 とし、Spot test を行った。その結果 R24、R26、R30、R31 は各々 ϕ 24、 ϕ 26、 ϕ 30、 ϕ 31 で元のファージにおいて溶菌しなかったが、R27、R32、R33 の菌株では全て元のファージにより溶菌した (Fig. 4 及び Table 4)。つまり前者は元のファージに対して耐性化していることが明らかになった。

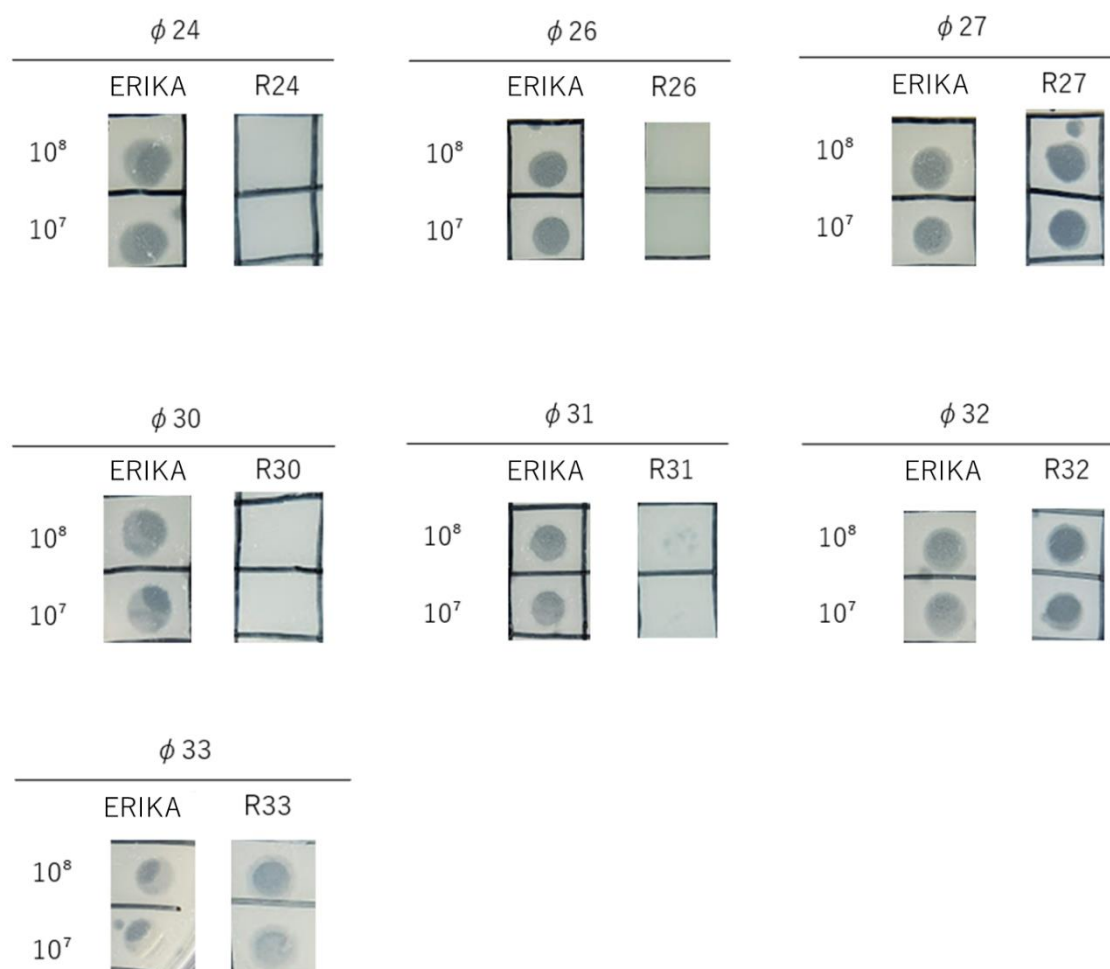


Fig. 4 ファージ耐性菌に対する Spot test

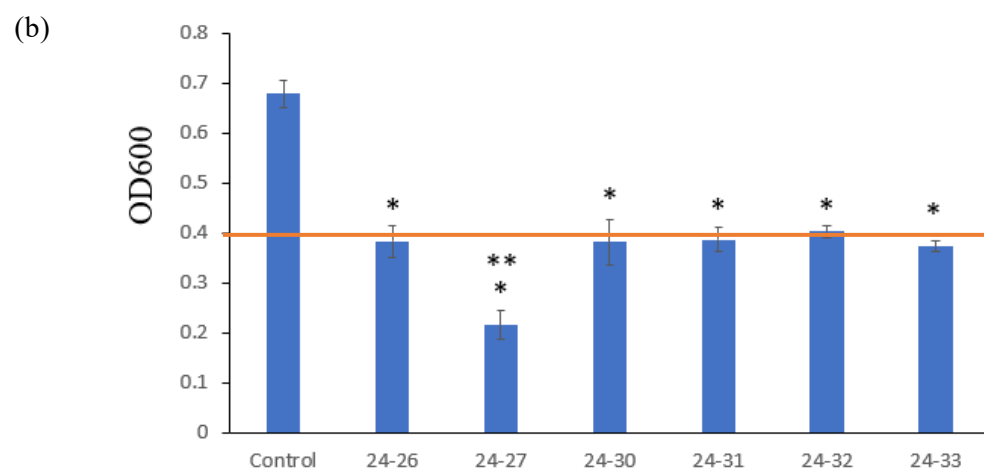
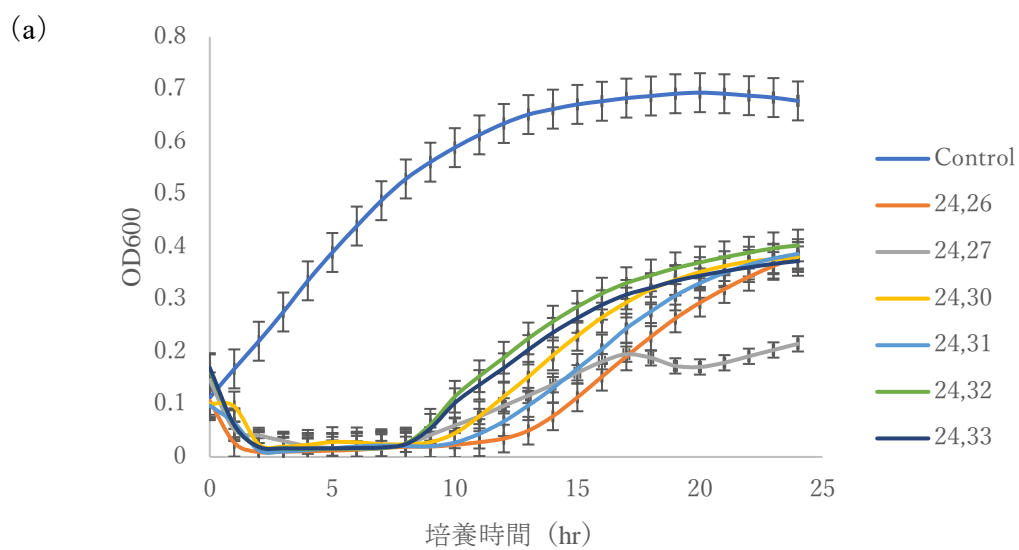
24 時間後の菌株と元の株である ERIKA 株に対して 10^7 及び 10^8 PFU/mL に希釈した手持ちのファージ 7 株の Spot test を示している。

Table 4 ファージ耐性菌を持つ株の Spot test

	ϕ 24	ϕ 26	ϕ 27	ϕ 30	ϕ 31	ϕ 32	ϕ 33
R24		○	○	○	○	○	○
R26	○						
R30	○						
R31	○	○					

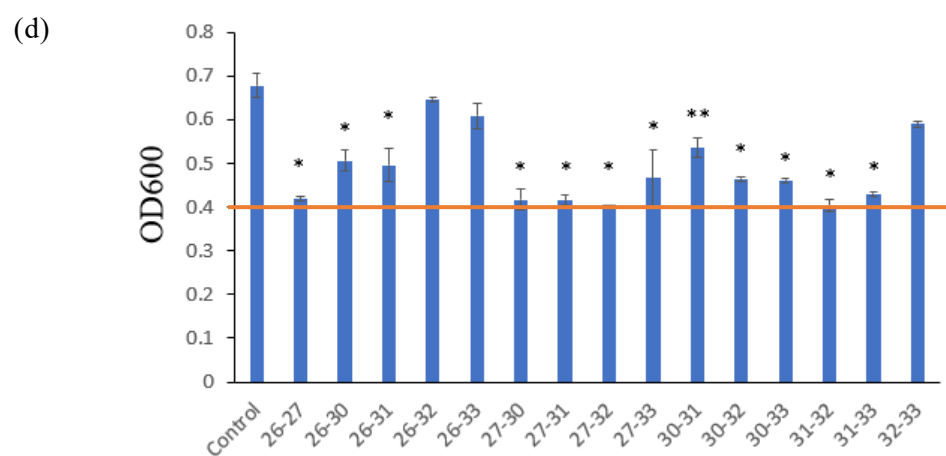
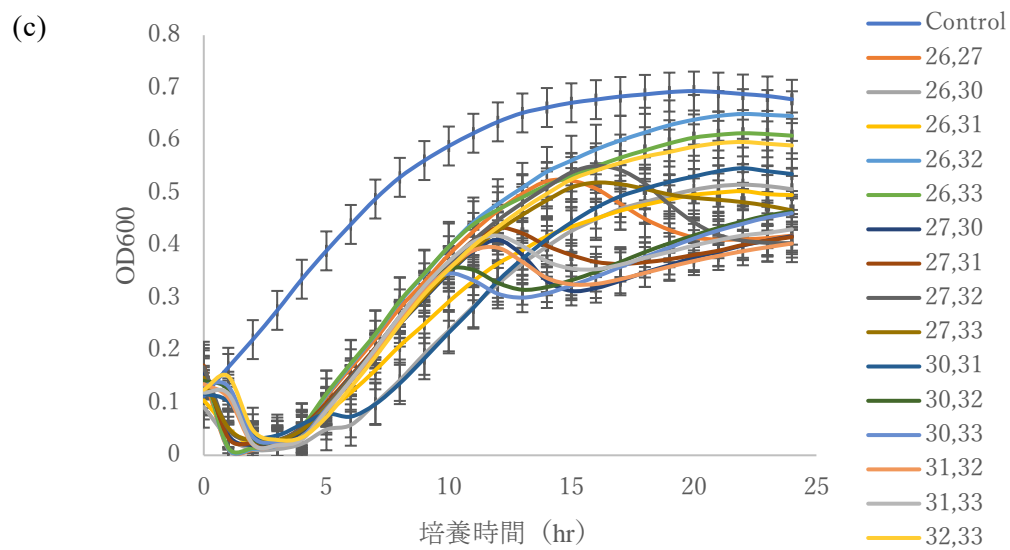
Fig.4 の溶菌判定の結果を表にした。ファージは全て 10^7 PFU/mL で調整したものであり、○は溶菌が見られたものを指し、灰色は溶菌が確認されなかったものを示している。

Fig. 4 及び Table 4 の結果から ϕ 24 と ϕ 24 以外のファージには ERIKA 株に対して溶菌作用の違いがあることが分かった。一般的にファージ耐性菌は容易に出現し、ファージセラピーの際には複数のファージカクテル化して用いることが行われている。そこで ϕ 24 と他のファージを組み合わせ (a)、 ϕ 24 を含まない組み合わせ (b)の細菌増殖に与える影響を濁度測定法により調べた (Fig. 5)。



* : Control に対して $P < 0.05$

** : Control に対して $P < 0.01$



* : Control に対して $P < 0.05$

** : Control に対して $P < 0.01$

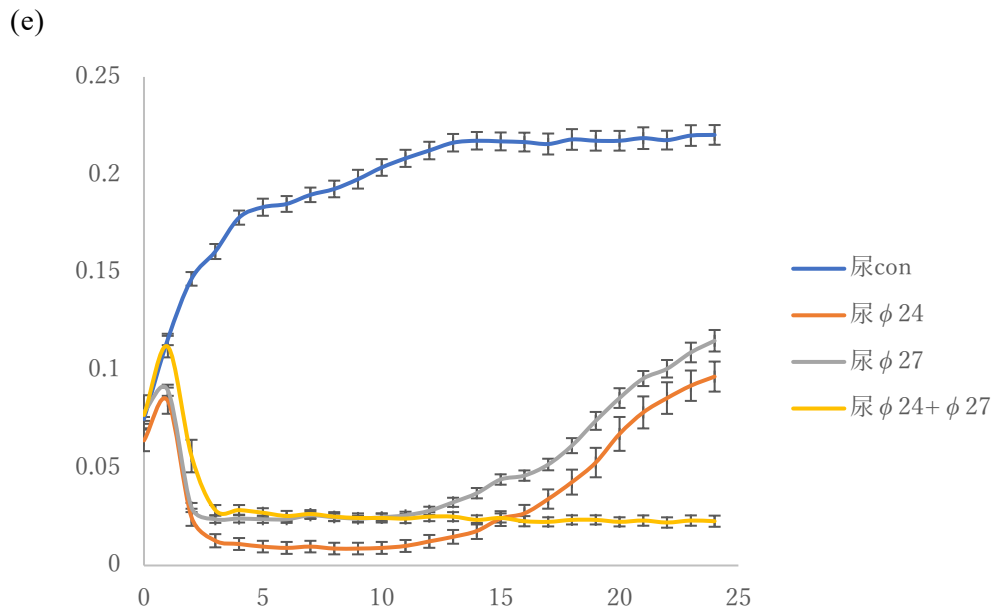


Fig. 5 濁度測定法によるファージを2株の細菌増殖に与える影響

グラフ (a) は、 $\phi 24$ とそれ以外のファージを組み合わせたそれぞれの試験群の時間ごとの細菌の増殖曲線を表し、(b) は 24 時間時点の OD 値をグラフ化したものである。グラフ (c) は $\phi 24$ 以外のファージを組み合わせたそれぞれの試験群の時間ごとの細菌の増殖曲線を表し、(d) は 24 時間時点の OD 値をグラフ化したものである。(e) は宿主菌を ERIKA 株のまま培養液を尿に変え、 $\phi 24$ と $\phi 27$ の単独とカクテルした群の時間ごとの細菌の増殖曲線を表している。Control はどのグラフも ERIKA 株の増殖変化を示し、 1.0×10^7 CFU/mL から開始した。それぞれ $n=3$ で行い、(a) と (c)、(e) のグラフでは平均値と標準誤差でグラフを作成した。また (b) と (d) のグラフにあるオレンジ線は、Control の 6 割の時を示している。* : Control に対して $P < 0.05$ 、** : Control に対して $P < 0.01$

$\phi 24$ と他のファージを組み合わせた時は、計測後 2 時間にかけて急速な強い溶菌がおこり、その後およそ 8 時間まで再増殖はみられず (Fig. 5 a)、24 時間後時点の最大の増殖でも Control の 6 割以下と増殖におさえられていた (Fig. 5 b)。一方、 $\phi 24$ 以外のファージで組み合わせた時では $\phi 24$ を組み合わせた時に比べ、およそ 3 時間までの最初の溶菌スピードが少し緩やかで、その後どの組み合わせにおいても 4 時間までには再増殖がみられ (Fig. 5 c)、24 時間後時点の最大増殖でも Control

と同程度、または少なくともどの組み合わせでも 6 割以上の増殖が観察された (Fig. 5 d)。また、宿主菌は ERIKA 株のまま培養液を LB から尿に変えて ϕ 24、 ϕ 27 の単独ファージと ϕ 24 と 27 のカクテルファージにおける溶菌活性は ϕ 24 と ϕ 27 のカクテルファージの時ほぼ再増殖がみられなかった (Fig. 5 e)。

3. 薬剤感受性の検証

ファージは、宿主表面の LPS やタンパク質（薬剤や様々な分子の移送を行うタンパク質など）などをレセプターとして結合する。一般にファージ耐性菌においてはこれらのレセプター分子が変異や欠損を起こし、耐性化を獲得する。また、この現象により薬剤感受性なども変化することが知られている [22, 27]。そこで本実験で得られたファージ耐性菌において薬剤感受性の変化が起きているか否かを確認するため、ERIKA 株と各種ファージ耐性株（R24、R26、R30、R31）で薬剤感受性試験を行い、その結果を Table 5 に示した。この試験結果から ERIKA 株とそれぞれのファージに対して耐性化した株（R24、R26、R30、R31）とでは薬剤に対する感受性の変化はなかった (Table 5)

Table 5 ディスク法による抗生物質薬剤感受性試験

		ERIKA		R24		R26		R30		R31	
略称	抗菌剤	阻止円 (mm)	判定	阻止円 (mm)	判定	阻止円 (mm)	判定	阻止円 (mm)	判定	阻止円 (mm)	判定
MIPIC (OXI)	オキシシリン	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
AMPC	アモキシシリン	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
CPDX	セフトロキシム	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
FRPM	ファロペネム	15	I	14	I	14	I	13	I	13	I
IPM	イミペネム	28	S	29	S	26	S	29	S	28	S
MEPM	メロペネム	30	S	26	S	29	S	28	S	26	S
GM	ゲンタマイシン	21	S	20	S	22	S	21	S	22	S
KM	カナマイシン	19	S	18	S	18	S	20	S	19	S
EM	エリスロマイシン	9	R	8	R	0	R	9	R	8	R
LCM	リンコマイシン	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
VCM	バンコマイシン	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
SXT	ST合材	17	S	17	S	17	S	17	S	17	S
OTC	オキシテトラサイクリン	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
DOXY	ドキシサイクリン	9	R	10	R	8	R	10	R	9	R
CP	クロラムフェニコール	21	S	21	S	21	S	19	S	20	S

抗生物質に対して R は耐性、I は中間、S は感受性を示している。

4. 多剤耐性大腸菌による慢性の膀胱炎の臨床試験

臨床試験ではφ24 とφ27 を混合し、生理食塩水で希釈したものをファージカクテル液とし、尿道カテーテルで対象となるネコの膀胱内へ投与した。この時の尿中の細菌数の変化を Fig. 6 に示した。朝夕 2 回、5 日間のファージ投与の結果、また症状としては改善も悪化もなく変化なく、むしろ投与開始 4 日目から菌数の増加がみられた。

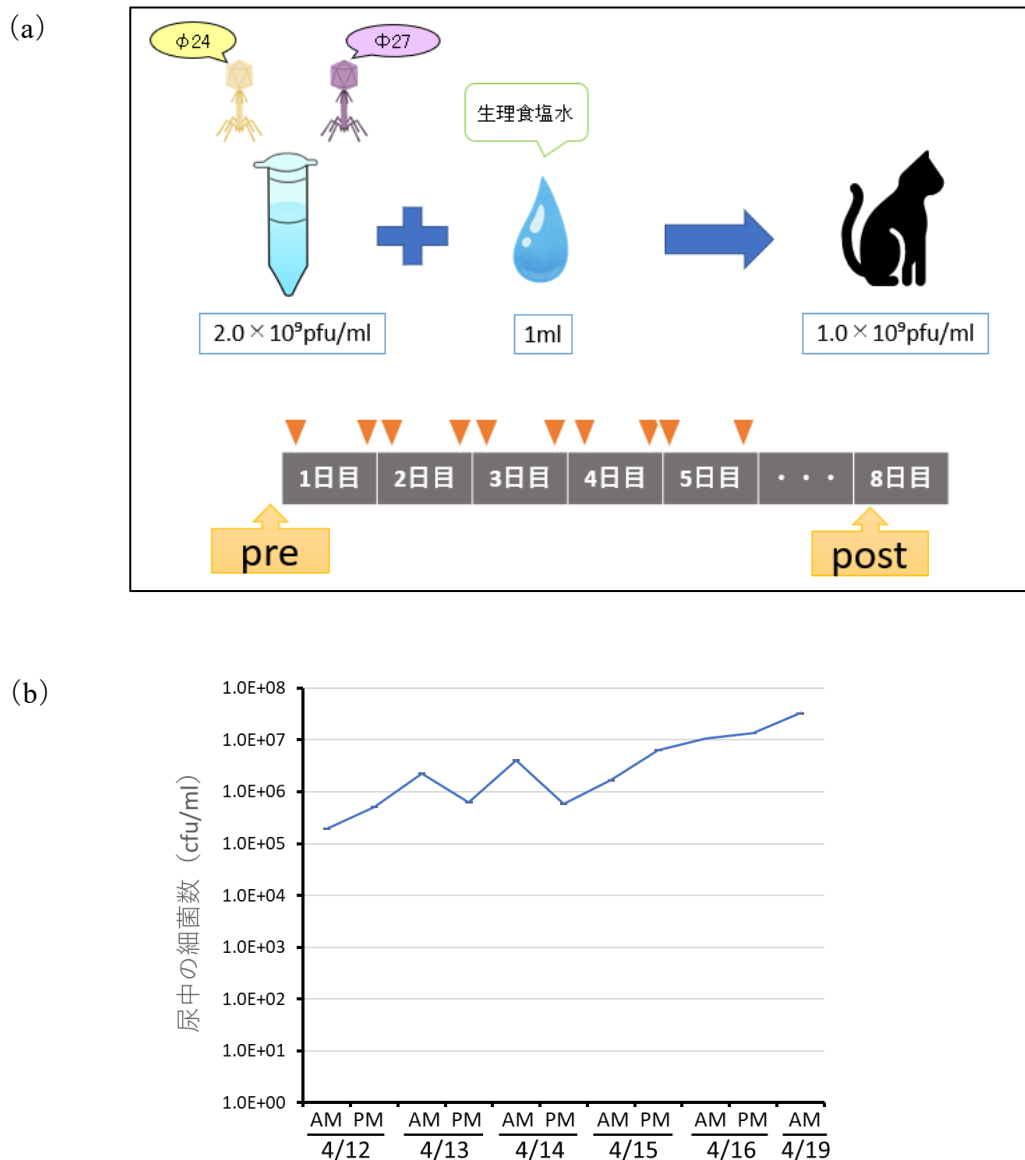


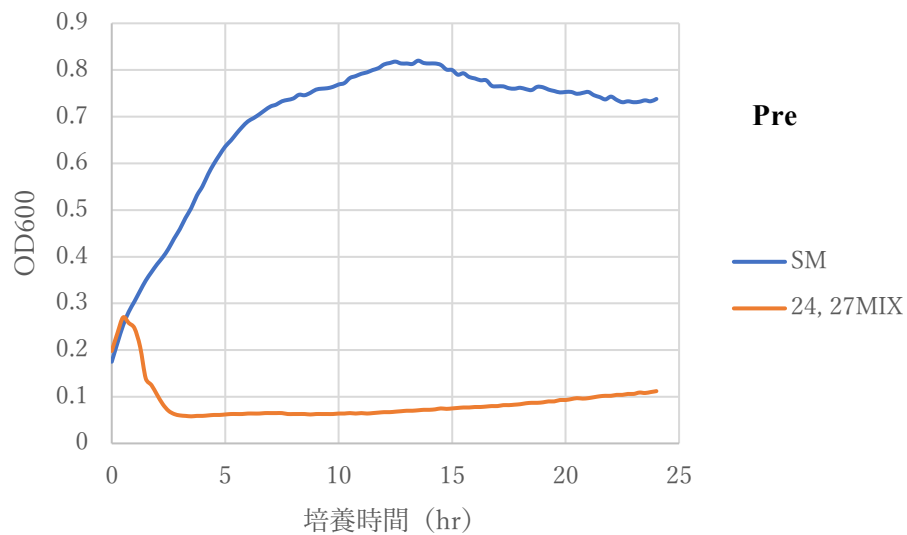
Fig. 6 濁度測定法による尿中の細菌増殖

(a) ファージ投与を朝夕 1 日 2 回、5 日間行い、尿中の細菌数の変化をモニターした。(b)また治療開始前、治療終了・退院時に尿中から分離した菌をホスト菌とし、濁度測定法を用いて溶菌活性を評価した。

また、ファージ治療前 (pre) と治療後 (post) の尿から分離された大腸菌に対してファージの感受性について調べた (Fig. 7)。治療開始前では大腸菌の再増殖はみられずほぼ一定であるのに対し、治療終了時に尿から分離した大腸菌では、溶菌後の再増殖が培養後 10 時間からみられ、膀胱内にてある一定のファージ耐性

化を獲得した株が現れていることが示唆された。これらの結果を受け、今回の試験では、ファージセラピーによる治療効果は得られないと判断し、それ以上の治療は行わなかった。

(a)



(b)

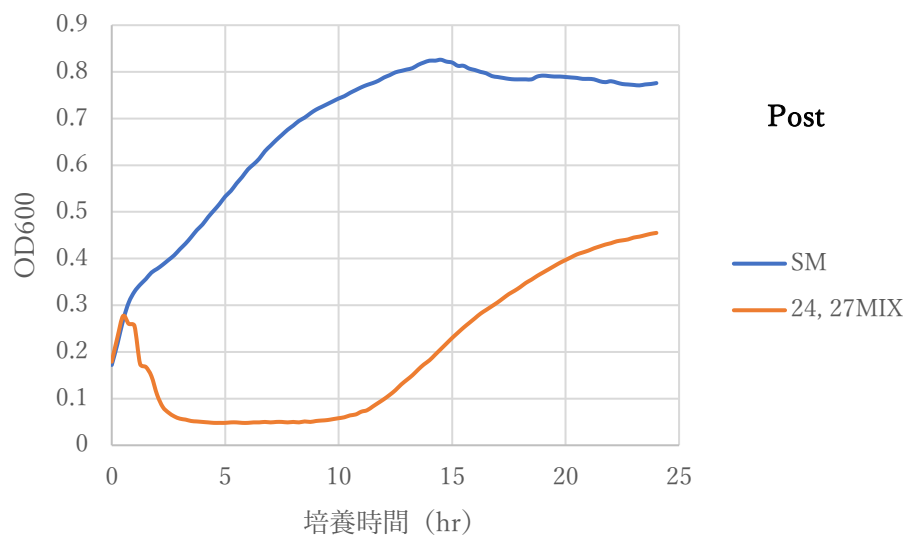


Fig. 7 治療開始前と治療終了時の尿中における細菌増殖

グラフ (a) は、治療開始前の大腸菌株を、グラフ (b) は治療終了時の大腸菌株をそれぞれ宿主菌としたとき、カクテルファージの感受性の変化を示した。

5. 臨床から分離された大腸菌 35 株に対する 7 株のファージの有効性の評価

今回、臨床試験の宿主 ERIKA 株に対して分離したファージが、他の臨床由来株に対してどのような溶菌活性を有しているかその一般性を調べるために、ERIKA 株を含む大腸菌 35 株を用いて Spot test を実施し (Fig. 8)、EOP を算出してファージの溶菌活性を評価した (Fig. 9)。その結果、7 株のファージは全 35 株中 5 株に対して溶菌活性を持っていることが分かった。 $\phi 26$ と $\phi 31$ は同じ菌株 (ECud-C、ECud-L) で溶菌活性を示したが、 $\phi 26$ はさらに ECud-Y 菌株にも溶菌活性を示した。その他、 $\phi 24$ を除く残りのファージ ($\phi 26$ 、 $\phi 27$ 、 $\phi 30$ 、 $\phi 31$ 、 $\phi 32$ 、 $\phi 33$) は ECud-L 菌株において中活性から高活性を示し、 $\phi 27$ 、 $\phi 30$ 、 $\phi 32$ 、 $\phi 33$ はこの株以外では溶菌活性を、 $\phi 24$ は元の株である ERIKA 株以外の株で溶菌活性を示さなかった。それ以外の 30 株には、本実験で分離したファージでは溶菌活性は見られなかった。

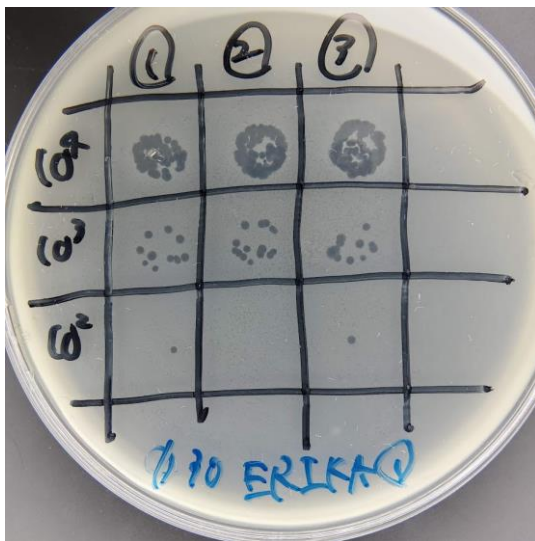


Fig. 8 段階希釈した $\phi 30$ の Spot test

10^4 PFU/mL から 10 倍ずつ段階希釈した $\phi 30$ の Spot test の様子。被検菌液 (ERIKA) 100 μ L を 3mL の LB-Top Agar に加え播種した LB-Agar 上に、SM-Buffer で 10^4 PFU/mL から 10^1 PFU/mL に希釈調整したファージサンプル液を 5 μ L ずつ滴下し、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。翌日、滴下した箇所の溶菌を観察、Plaque 数を計測し、EOP を算出して溶菌活性を評価した。

菌株	φ24	φ26	φ27	φ30	φ31	φ32	φ33
ERIKA	1	1	1	1	1	1	1
ECud-A	N	N	N	N	N	N	N
ECud-B	N	N	N	N	N	N	N
ECud-C	N	0.81333	0	N	0.721667	N	N
ECud-D	N	N	N	N	N	N	N
ECud-E	N	N	N	N	N	N	N
ECud-F	N	N	N	N	N	N	N
ECud-G	N	N	N	N	N	N	N
ECud-H	N	N	N	N	N	N	N
ECud-I	N	N	N	N	N	N	N
ECud-J	N	N	N	N	N	N	N
ECud-K	N	N	N	N	N	N	N
ECud-L	N	0.165	0.335404	0.567568	0.661972	0.593333	0.53125
ECud-M	N	N	N	N	N	N	N
ECud-N	N	N	N	N	N	N	N
ECud-O	N	N	N	N	N	N	N
ECud-P	N	N	N	N	N	N	N
ECud-Q	N	N	N	N	N	N	N
ECud-R	N	N	N	N	N	N	N
ECud-S	N	N	N	N	N	N	N
ECud-T	N	N	N	N	N	N	N
ECud-U	N	N	N	N	N	N	N
ECud-V	N	N	N	N	N	N	N
ECud-W	N	N	N	N	N	N	N
ECud-X	N	0	N	N	N	N	N
ECud-Y	N	0.073333	0	N	N	N	N
ECud-Z	N	N	N	N	N	N	N
ECud-AA	N	N	0	N	N	N	N
ECud-AB	N	N	N	N	N	N	N
ECud-AD	N	N	N	N	N	N	N
ECud-AE	N	N	N	N	N	N	N
ECud-AF	N	N	N	N	N	N	N
ECud-AG	N	N	N	N	N	N	N
ECud-AH	N	N	N	N	N	N	N
ECud-AI	N	N	N	N	N	N	N
ECud-AJ	N	N	N	N	N	N	N
R2427	N	N	N	N	N	N	N

Fig. 9 大腸菌 35 株に対するファージ 7 株の EOP

10⁴ PFU/mL から 10¹ PFU/mL まで段階希釈した 7 株のファージ PoT 産物を用いて 35 株の大腸菌に Spot test を実施した。ERIKA を基準株として EOP を算出したため、ERIKA 株の EOP は 1.0 となっている。(赤で強調) EOP : 0.5 ≦ は高活性を示すとして黄色で強調した。EOP : 0.1~0.5 を中活性として緑で、EOP : 0.001~0.1 を低活性として青で強調した。N は全く溶菌が見られなかったものを示し、0 は Plaque 数のカウントはできないがファージ以外の要因により溶菌している可能性のあるものを示す。

IV. 考察

本研究では再発を繰り返す難治性の大腸菌性膀胱炎のネコに対してファージセラピーの臨床応用を目標とし、溶菌性ファージを分離し、その溶菌特性の解析を行った。

ファージ分離にあたって生化学研究室所有の全国の下水サンプルを使用して溶菌性ファージを 7 株分離することができた。今回、Fig.2 の電子顕微鏡像から確認したファージは全てミオウイルス科 (*Myoviridae*) であることが分かった[1,2,19]。また本実験で使用した下水サンプルの内、3 つは東京都、残りの 4 つは福岡県の汚水からファージを分離した。東京都、福岡県の汚水を選んだ根拠に、人やペットの身近な環境の生活污水中には、多くの細菌種に適応するファージの多様性を見込んでの選択であったがそれが今回の溶菌性ファージの分離には功を成したと考えられる。

次に汚水から分離したファージが ERIKA 株に対してどれほど細菌の増殖に影響するかを検証するために濁度測定法を行った (Fig. 3)。各ファージと ERIKA 株の濁度測定法の結果、培養を始めてから 2 時間から 3 時間ほど強い溶菌を示したが、その後すぐに耐性化が起こった。ほとんどのファージでは 24 時間後の再増殖は Control に近い濁度を示していたが、 $\phi 30$ および $\phi 27$ のように Control と比べ半分程度の濃度を示すものもあり、最終的に各ファージ間で差があった。これは細菌のファージに対する耐性化、つまりファージの感染様式が各ファージで異なることによるものだと考えられる[4]。ファージ耐性のメカニズムにはいくつかあり、例えば、ファージに対して OMV と呼ばれる細菌の外膜のみの小胞を身代わりにして、ファージから逃れることや細菌膜表面のファージによる吸着やファージゲノム DNA の注入を阻害すること、ファージゲノム DNA の分解やゲノムの複製、ファージ粒子の構築を阻害すること、さらに感染された細菌が自殺することでファージの拡散を防ぐなどの様々な防御機構がある[4]。取得した 7 株を用いて、ファージの耐性化とファージによる溶菌活性の関係について調べるために、ファージ耐性株を分離して精査した。

Fig. 3 で 24 時間培養後の培養液から分離された各ファージ耐性候補株に対し 7 株のファージで Spot test を行った結果、実際に得られたファージ耐性菌株は 4 株

(R24、R26、R30、R31) であった (Fig. 4 および Table 4)。これらの 4 株は元のファージに対して溶菌しなかったことに加え、 ϕ 24 に対する耐性菌株 (R24) は、他の ϕ 26、 ϕ 27、 ϕ 30、 ϕ 31、 ϕ 32、 ϕ 33 の全てのファージに対して感受性があり、また ϕ 26、 ϕ 30、 ϕ 31 に対する耐性菌株 (R26、R30、R31) は、 ϕ 24 に感受性があった。このことから、 ϕ 24 とそれ以外のファージで感染溶菌の機序が異なることが示唆された。ファージに対する耐性化は前述のように様々な機構があり、ファージセラピーにおいては複数の感染溶菌機序の異なるファージをカクテル化することが細菌増殖抑制の効果が得られると考えられている。よって、グラム陰性菌の病原性に関わり、かつ、ファージの受容体でもある LPS や OMP (Outer Membrane Protein) 等を認識するファージをカクテル化することが、ファージへの耐性化の出現を低下させたり、遅らせたりすることが知られている [15, 22, 38]。故に今回得られたファージを用いて、特に ϕ 24 とその他のファージの組み合わせに注目して 2 種類のファージによる ERIKA 株の増殖に与える影響を検証した。その結果、 ϕ 24 と組み合わせた時の細菌増殖は ϕ 24 と組み合わせなかった時の細菌増殖に比べ、強い溶菌がおおよそ 8 時間継続し、24 時間後の細菌増殖の最大も Control の半分程度に抑えられたなどの有意差が見られた (Fig. 5)。中でも ϕ 24 と ϕ 27 を組み合わせたとき、その他のファージの組み合わせと比べ緩やかな細菌増殖に抑えられており、細菌増殖の最大値も一番低いことからファージ耐性化と細菌増殖の間において感染溶菌システムが異なることが考えられる。また、宿主菌株は ERIKA 株のままで培養液を LB-broth から尿に変え、 ϕ 24 と ϕ 27 の単独・カクテルファージの時の細菌増殖は、 ϕ 24 と ϕ 27 をカクテルした場合の方が溶菌し始めてから終日再増殖なく長時間の抑制がみられた (Fig. 5 e)。このように長時間細菌の再増殖を抑えていた根拠に尿は LB-broth と比較して細菌が増殖する栄養分が含まれておらず、そのため細菌が増殖する前に異なる 2 種類のファージによる溶菌効果を受けたことが考えられる。

次は濁度測定法でみられた再増殖した耐性菌株に対して薬剤感受性試験を行った。元来、ファージに耐性化した細菌株では、その表面にある LPS やタンパク質などのレセプター分子に変異や欠損が起きることによってファージによる感染から逃れることが知られている。その際、ファージから逃れることができる反面、病原性が低下したり、薬剤の感受性が高くなったりするトレードオフの関係が生まれる

ことがあると報告されている[22, 27]。つまりファージに耐性化することにより宿主細菌の性質を感染制御にとって有利な方向に変化させることができる可能性があるということになる。よって今回得たファージ耐性菌株（R24、R26、R30、R31）において、特に薬剤との間でトレードオフの関係が成り立っているのか、薬剤感受性試験を行って検証した。その結果、どの株も元の ERIKA 株と薬剤感受性に変化はなかった。本研究結果から今回取得したファージ耐性菌株について薬剤感受性の変化はみられなかったため、今回のファージは、薬剤排出ポンプなど薬剤感受性に関係するタンパク質を認識するようなファージではなかったことが示唆された。今後、ERIKA 株に対して感染溶菌の仕組みが異なる新たなファージを取得し、それらのファージが細菌のどこをターゲットとしているかを明らかにすることで、ファージ耐性菌に対し対抗策について一考の余地がある。そのためにも今後、ファージゲノム解析とファージ耐性菌株からファージがターゲットとする細菌膜表面の受容体の更なる解析を行い、そのメカニズムを検証する必要がある。

続いて行った臨床試験については、これまでの *in vitro* 試験にて一番効果的だったカクテルファージ（ $\phi 24$ と $\phi 27$ ）を用いて今回、多剤耐性大腸菌株の提供対象のネコに対し行った。しかし今回の臨床試験では、*in vitro* 試験結果と同様の有効な治療効果を得ることはできなかった。考えられる理由には、三つ挙げられる。まず一つ目は、膀胱内や移行上皮深部まで大腸菌が侵入し、ファージが届かなかった点である。今回、尿道カテーテルを用いてファージ投与を行ったが、膀胱内にある大腸菌を溶菌することができても、ファージが上皮深部まで侵入した大腸菌を溶菌する前にクリアランスされてしまう可能性が考えられる。二つ目は、今回の臨床試験対象ネコには腎臓に結石があり病巣も形成しているため、膀胱内のファージ投与では治療効果は得られなかったことが挙げられる。最後の三つめは、治療中にファージ耐性大腸菌が出現した可能性である。これはファージのみでの治療は困難であり、ファージカクテルと単独ファージの両方を使用しても、ファージ耐性変異体の発生は防げなかった過去の文献と一致している[8]。従って、今後は有効な臨床応用に向けて、感染メカニズムの異なる戦略的なファージカクテル化の設計が重要である。

最後に、今回得られたファージ 7 株が ERIKA 株を含む伴侶動物医療において分離された大腸菌 35 株に対しての有効性を Spot test による EOP の算出することで評価した (Fig. 9)。その結果、35 株中 30 株では溶菌が見られなかったが、ERIKA 株を含むその他の大腸菌 6 株では高活性または弱いプラークの形成が見られた。これらの結果から ERIKA 株から分離されたファージはその他の大腸菌株に広く感染溶菌できるファージではなく、むしろ ERIKA 株に特異性の高いことが示唆された。本実験から大腸菌に幅広く効くファージを獲得することが難しいことが明らかとなり、そのため大腸菌株ごとのファージを収集し、多種多様なファージライブラリーを作成していくことが、臨床応用を考える上で重要であることが示唆された。

本研究でネコ膀胱炎由来の大腸菌株である ERIKA 株に特異的なファージを分離することができた。そしてその分離したファージのうち、 $\phi 24$ とその他のファージとの組み合わせにより急速な溶菌とおおよそ 8 時間の細菌の再増殖を抑えたことに加え、その中でも $\phi 24$ と $\phi 27$ の組み合わせでは緩やかな細菌の増殖がみられた。そしてこの二つファージを組み合わせたカクテルを使い、臨床試験を行ったが、症状としての改善や悪化は見られず、また治療終了時に細菌の再増殖みられた。考えられる要因として様々な点が挙げられるが、中でも *in vitro* や *in vivo* のどちらでも見られたファージ耐性菌の出現が大きな課題となってくる。よって、今後は臨床分離株からの新たなファージの分離、特に細菌のファージ受容体が異なる複数のファージを獲得し、ファージ耐性化のメカニズムを検証し、感染メカニズムが異なる多様性のあるファージのカクテル化設計を行っていく必要がある。

V. 小括

伴侶動物における膀胱炎はネコでよく見られ、その病原体の多くは大腸菌が占めている[47, 39]。治療には抗生物質が選択されるが、この抗生物質の不適切な使用による薬剤耐性の問題が懸念されており[29]、その対策としてファージセラピーが注目されている。感染様式の異なる複数のファージを組み合わせたカクテル化が重要となっている [32]。第 I 章では、多剤耐性大腸菌 ERIKA 株をターゲットにした溶菌性ファージの分離とその性状解析を行い、ERIKA 株由来ファージで設計したカクテルファージの有効性を検証した。

1. 大腸菌 ERIKA 株から分離した 7 株のファージは、電子顕微鏡像の写真より正二十面体型カプシドと Sheath 構造に覆われた Tail を持つことから全てミオウイルス科 (*Myoviridae*) に分類された。
2. 濁度測定法からファージをカクテル化することでより効果的に細菌の増殖を抑えることができた。特に $\phi 24$ とその他のファージを組み合わせたときの細菌増殖に与える影響はファージ 1 株並びに $\phi 24$ 以外のファージを 2 株組み合わせたときに比べ約 3 倍の時間内での再増殖がみられず、24 時間後時点の最大増殖でも Control の 6 割以下に抑えられた。
3. ファージ耐性菌株 (R24、R26、R30、R31) による薬剤感受性試験の結果、全ての株で ERIKA 株との変化は見られなかった。
4. 臨床試験の結果、*in vitro* 試験結果と同様の有効な治療効果を得ることができなかった。また症状としては改善も悪化もなく変化は見られなかった。
5. 臨床大腸菌 35 株に対して 7 株のファージの有効性判定を Spot test で行った結果 ERIKA 株を含む 6 株ではプラークの形成が見られたが、35 株中 30 株では溶菌は見られなかった。

以上のことから、ERIKA 株から分離されたファージの性状を解明することができた。今後の研究では、伴侶動物臨床由来の様々な大腸菌株より溶菌性ファージの分離を行い、ファージの耐性化した細菌株のゲノム解析を行うことで細菌に対

するファージ受容体を明らかにし、多様性のあるファージライブラリーを構築していく必要がある。

第Ⅱ章 臨床分離株 35 株に対する溶菌性ファージの分離とその性状解析

I. 序文

ファージセラピーによる治療において、大きな妨げの要因の一つにファージ耐性菌の出現がある[5, 22]。実際に第Ⅰ章では、臨床試験においてファージを投与しても 5 日の治療終了後には細菌のファージ耐性化がみられ、*in vitro* において懸念されたファージ耐性菌の出現が治療を難しくしている結果となった (Fig.7b)。これは細菌がファージによる選択圧に対しその環境下に有利な細菌、すなわちファージから逃れることのできた変異を持つ細菌が選抜された結果である。このファージ耐性菌は細菌の受容体の変異と関係がある。例えばグラム陰性菌の大腸菌は、リポ多糖 (LPS) と外膜タンパク質 (OMP) を持ち、これら二つは病原性に関わっており、ファージ受容体でもある[13]。特に内毒素を持つ LPS は多くのファージにより認識されており、ここに変異が生じると宿主細菌は、ファージに対する抵抗性を持つと共に、そのトレードオフとして病原性の低下を引き起こすという報告がある[32, 36]。また OMP においては、大腸菌の場合、OmpW と OmpA と言ったタンパク質が免疫系の回避に関与しているという報告があり、中でも OmpA の変異が細菌の接着や免疫の回避させている可能性が示唆されている[30]。さらに、薬剤耐性化を担う薬剤排出ポンプを認識するファージにより、耐性化した細菌が薬剤感受性の回復が起こることが報告されている[30]。

以上のことからこの第Ⅱ章では、難治性尿路疾患に関する大腸菌に対する新たなファージの分離を行うこと、特に細菌のファージ受容体が異なるファージを分離し、そのファージ耐性菌株を作成することでファージがターゲットとする受容体を明らかにする。そしてこれらの解析により、感染メカニズムにおいて多様性のあるファージカクテル化を設計することを目的とした。

II. 材料と方法

1. 培地類

材料は第 I 章と同様に行った。

2. 試薬類

全ての生化学実験用、または最も純度の高いものを使用した。

3. 使用菌株

試験に供した大腸菌株は第 I 章と同様に、株式会社 VDT（神奈川県藤沢市）から提供された臨床分離株 35 株を使用した。

各菌株は、LB-Agar 上に塗抹し 37℃の条件下で一晩培養しコロニー形成確認後、3ml の LB-Broth で懸濁し菌液とした。各菌液は 50%グリセリン溶液と等量混合し、-80℃で保存した。

4. 使用ファージ株

試験に供したファージの宿主菌株名・由来などを Table 6 に示した。

また、カクテル汚水は『汚水②④・汚水②⑦・汚水②⑧・rgu』4 つの汚水を混ぜ合わせたものを使用し、場所はそれぞれ『東京①・東京③・鹿児島・酪農学園大学』である (Table 7)。

Table 6 使用ファージ株とそのホスト菌・由来

株名	ホスト菌	由来
φECud- A24	ECud- A	汚水②④/東京①
φECud- F24	ECud- F	汚水②④/東京①
φECud- H24	ECud- H	汚水②④/東京①
φECud- C26	ECud- C	汚水②⑥/東京②
φECud- C27	ECud- C	汚水②⑦/東京③
φECud- H27	ECud- H	汚水②⑦/東京③
φECud- A28	ECud- A	汚水②⑧/鹿児島
φECud- C28	ECud- C	汚水②⑧/鹿児島
φECud- F28	ECud- F	汚水②⑧/鹿児島
φECud- H28-2	ECud- H	汚水②⑧/鹿児島
φECud- A32	ECud- A	汚水③②/福岡③
φECud- H32	ECud- H	汚水③②/福岡③

5. ファージの分離

1) ファージ分離用サンプル液の精製と前培養液の作成

ファージ分離用サンプル液の精製には、東京都・福岡県・鹿児島県・酪農学園大学の下水等に由来する 6 種類を用いた (Table 7)。各汚水は攪拌後、分注し、8000×g、10min、4℃で遠心した。その後、遠心上清を 0.45μm ディスクフィルターでろ過し、4℃で保存したものをファージ分離用サンプル液とした。

Table 7 サンプル名と由来

サンプル名	由来
汚水②④	東京①
汚水②⑥	東京②
汚水②⑦	東京③
汚水②⑧	鹿児島
汚水③②	福岡③
rgu	酪農学園大学

2) ファージのスクリーニング・単一培養

第 I 章に記載した方法と同様に行った。

6. ファージの精製と Titering

1) プレートライセート法によるファージの増幅

純化された各ファージサンプルを用いて、ホスト菌株と共に全面溶菌となるよう DLA 法で培養した。翌日、培養したシャーレに 3ml の SM-Buffer を重層し、15min、37°Cで振盪培養した (Pot Amp)。その後、ファルコンチューブに培地上の液体成分のみを回収し、8000g、10min、4°Cで遠心した後、遠心上清を 0.45 μ m のディスクフィルターで滅菌したものをプレートライセート産物とした (Pot Clean up)。産物は 4°Cで保存した。

2) ファージの濃縮・精製・Titering

第 I 章に記載した方法と同様に行った。

7. ファージ粒子の電子顕微鏡像の撮影

第 I 章に記載した方法と同様に行った。

8. 濁度測定法による解析

大腸菌株臨床分離株の菌液を第 I 章の ERIKA 株と同様に、 $OD_{600} \div 0.4$ ($\div 10^7$ CFU/mL) に調整し、これとファージ液を 96well プレートにそれぞれ 100 μ L ずつ分注した後、プレートをプレートリーダー (サンライズレインボーサーモ RC、神奈川 テカンジャパン) にセットし、波長 600nm での吸光値を 15 分毎に測定しながら 37°Cで 24 時間振盪培養し、測定された経時的な吸光度の変化より増殖曲線を作成した。

9. Spot Test の算出によるファージ感受性試験

第 I 章に記載した方法と同様に行った。

10. ファージ耐性菌株の分離

LB broth を用いて 37℃、180rpm にて一晩振とう培養した臨床分離株 ECud-H の菌液 40 μ L を LB broth 4mL に加え、37℃、2 時間振とう培養した後、 ϕ ECud-F24 と ϕ ECud-H27 (各々 1.0×10^8 PFU/mL) 40 μ L 加え、さらに 37℃ で 2 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℃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℃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 50 パーセントグリセリンの状態で -80℃ 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 Spot test とプレートリーダーによる経時的濁度測定法にて検証した。Spot test では元株である ECud-H 菌株と比較し、溶菌斑の形成が認められなかったものを、そして経時的濁度測定法にて減少がみられず増加し続けたもの、それぞれを満たした株をファージ耐性しているものと判断した。

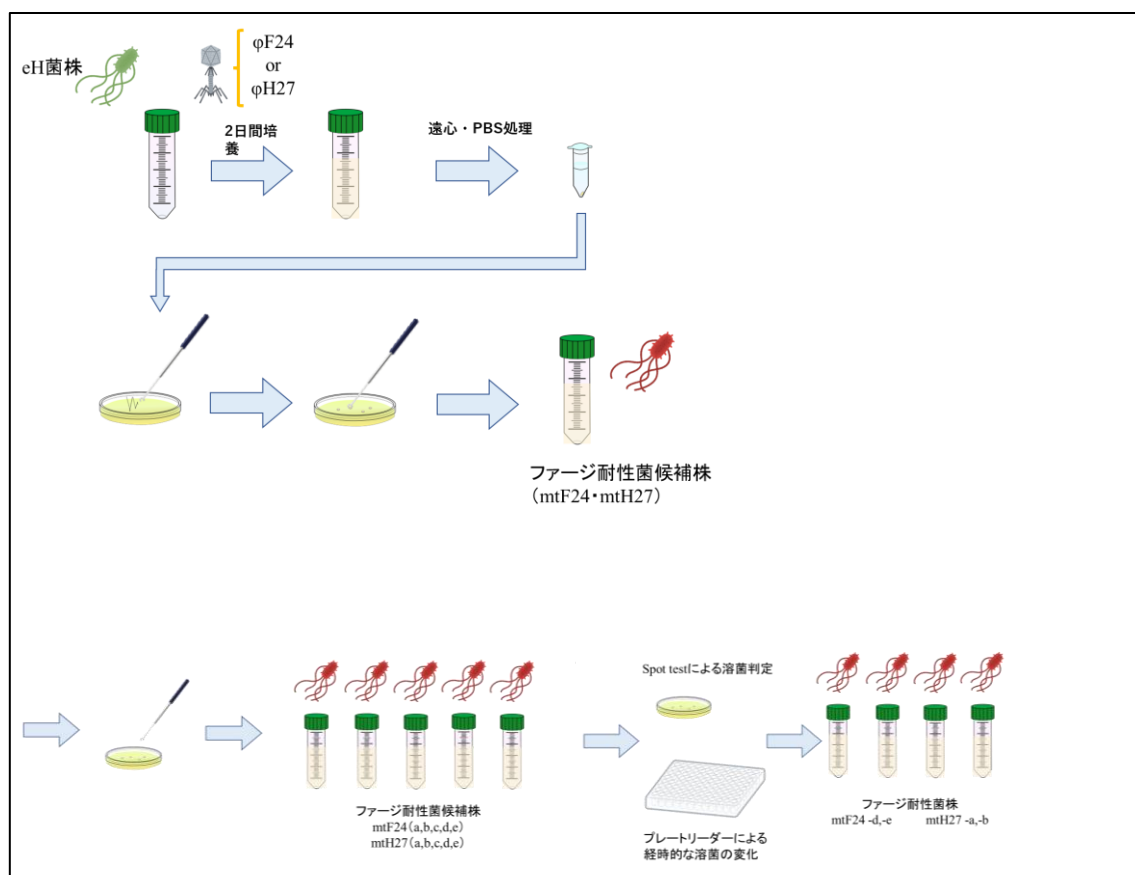


Fig.10 ファージ耐性菌株作成手順

11. 分離ファージのゲノム解析

1) ファージゲノムの抽出

SM Buffer で希釈し、 10^8 PFU/mL に調節した PoT 法産物について、Phage DNA Isolation Kit (カナダ Norgen Biotec Corp.) を用いて実施した。

2) シーケンス

Nextera XT DNA Library Kit (米国 Illumina, Inc) を用いてライブラリを調整し、MiSeq システム (米国 Illumina, Inc) でシーケンスをした。MiSeq システムは北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターより貸与された。

完全ゲノムの決定は、MiSeq システムより得られたリードデータの処理及び *de novo* アセンブリは、CLC Genomics Workbench v.12.0 (デンマーク CLC bio) で実施した。

アノテーションは PATRIC で行った[40]。

3) 系統解析

系統解析は各ファージゲノムの塩基配列を用いて、VICTOR を用いて作成した[25]。リファレンスの選択基準としては、ICTV Master Species List 2018b.v2[21]に記載のあるミオウイルス科 (*Myoviridae*) ファージ Type Species のうち腸内細菌科 (*E.coli*) を宿主菌とする ECud-H 菌 (1 株) に加え、分離した 4 株のファージの計 5 株とした。

12. 大腸菌のゲノム解析

臨床分離株 ECud-H 株およびファージ耐性菌株 (mtF24c・mtF24e・mtH27a・mtH27b) 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。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

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。

13. ファージ耐性菌株の変異解析

Fig. 10 で得られたファージ耐性菌株 (mtF24c・mtF24e・mtH27a・mtH27b) それぞれを LB-Broth にて 37℃、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、その後のゲノム解析は、国立感染研究所に依頼した。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 を用いてマッピング状況を目視で確認して検出した。

III. 結果

1. ファージの分離と Spot test によるファージの宿主域判定

Table 1 にある臨床分離株 ECud-A、ECud-C、ECud-F、ECud-H の 4 株を宿主菌とし、溶菌性バクテリオファージの分離を試みた。その結果、5 種類の汚水からそれぞれ 1 株ずつ宿主菌に対して溶菌活性を示すファージを分離し、合計 12 株の溶菌性ファージを分離した (Fig. 11)。

		汚水サンプル				
		東京①	東京②	東京③	鹿児島	福岡③
		汚水②④	汚水②⑥	汚水②⑦	汚水②⑧	汚水③②
臨床分離株	ECud-A	φECud-A24			φECud-A28	φECud-A32
	ECud-C		φECud-C26	φECud-C27	φECud-C28	
	ECud-F	φECud-F24			φECud-F28	
	ECud-H	φECud-H24		φECud-H27	φECud-H28-2	φECud-H32

Fig. 11 汚水を用いた DLA により溶菌性ファージの分離

4 つの臨床分離株 (φECud-A、φECud-C、φECud-F、φECud-H) と 5 か所の汚水 (東京①、東京②、東京③、鹿児島、福岡③) それぞれで DLA 法を行い、12 株のファージを分離した。

この分離された 12 株のファージに、それぞれ大腸菌を意味する『EC (=E.coli)』と尿路疾患を意味する『ud (=urological disease)』という接頭語をつけ、その後に汚水番号を示す数字を用いてファージを命名した。次に得られたファージ 12 株の宿主域 (ホストレンジ) を調べるため、大腸菌臨床分離株 35 株を用いて Spot test を行い、その結果を Fig. 12 にまとめた。また、この時の Spot test の実際の溶菌形成を Fig. 13 に示した。

	ϕ ECud-											
	A24	F24	H24	C26	C27	H27	A28	C28	F28	H28-2	A32	H32
ECud-A	○	○					○		△	△	○	○
ECud-B												
ECud-C	○	○		○	○			○	○	○	○	○
ECud-D						△			△	△	△	△
ECud-E	○	○							○	○	○	○
ECud-F	○	○							○	○	○	○
ECud-G							○					
ECud-H	○	○	○			○	○		○	○	○	○
ECud-I	○	○					△		○	○	○	○
ECud-J						○	○					
ECud-K	○	○				○	○		○	○	○	○
ECud-L	○	○		○	○			○	○	○	○	○
ECud-M	○	○								○	○	○
ECud-N	○	○					○		○	○	○	○
ECud-O	○	○				○			○	○	○	○
ECud-P	△	△							△	△	△	△
ECud-Q	○	○				○			○	○	○	○
ECud-R							△					
ECud-S	△	△							○	○	△	△
ECud-T	○	○							○	○	○	○
ECud-U	△	△				○			△	△	△	△
ECud-V						△						
ECud-W	○	○				△	○		○	○	○	○
ECud-X	○	○						△	○	○	○	○
ECud-Y	○	○						△	○	○	○	○
ECud-Z	○	○							△	△	△	△
ECud-AA	○	○							○	○	○	○
ECud-AB	○	○					○		○	○	○	○
ECud-AD	○	○				△	○		○	○	○	○
ECud-AE	○	○					○		○	○	○	○
ECud-AF	○	○					△		○	○	○	○
ECud-AG												
ECud-AH	○	○					○		○	○	○	○
ECud-AI	○	○							○	○	○	○
ECud-AJ	○	○							○	○	○	○
ERIKA	○	○			○			○	○	○	○	○

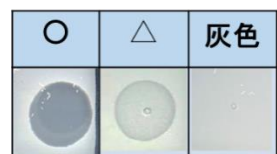


Fig. 12 Spot test による溶菌性ファージの宿主域判定

12 株のファージと 35 株の大腸菌を用いて Spot test を実施した。○はプラークがはっきり見られたもの、△は薄いプラークが見られたもの、灰色はプラークが見られなかったものを表す。またオレンジ色の背景は、ファージを分離する際に用いた宿主菌を示す。

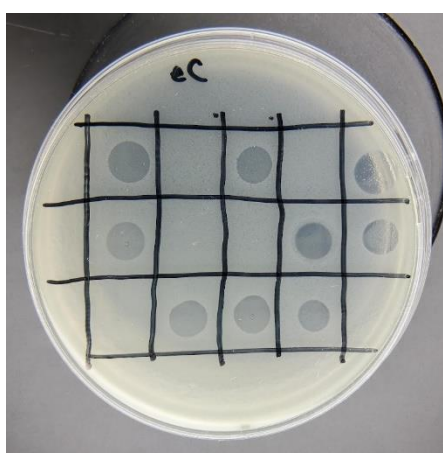
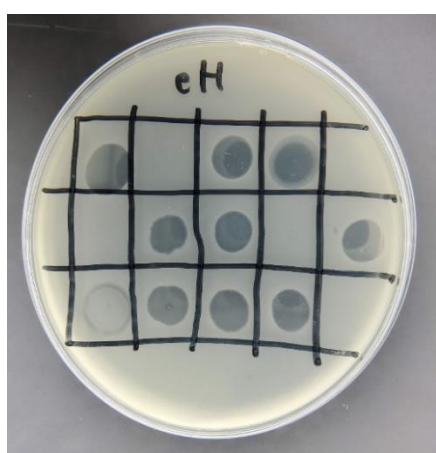
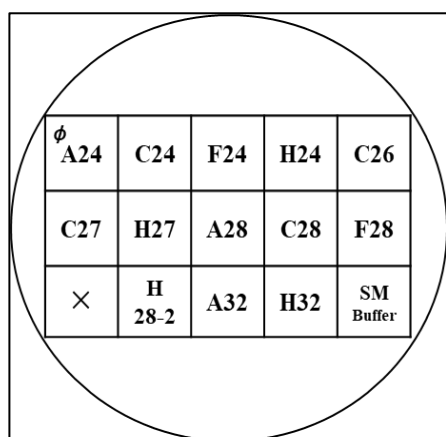


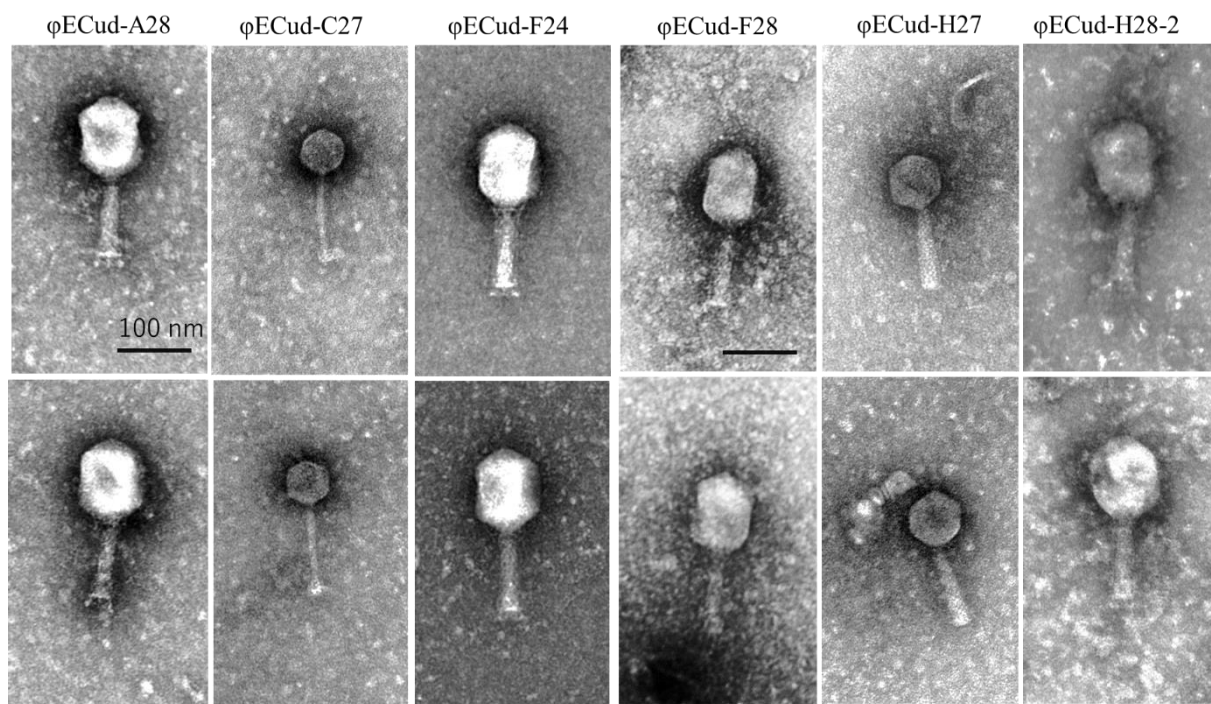
Fig. 13 Spot test による溶菌判定

臨床分離株 35 株に対し、Spot test を行った。すべてファージは 1.0×10^8 pfu/mL 希釈に統一した。

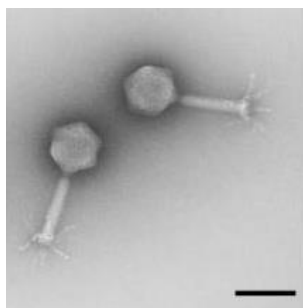
Fig. 12 と Fig. 13 の結果から、 ϕ ECud-A24・ ϕ ECud-F24・ ϕ ECud-A28・ ϕ ECud-F28・ ϕ ECud-H28-2・ ϕ ECud-A32・ ϕ ECud-H32 の 7 株は宿主域の広いファージであることが明らかとなった。一方、 ϕ ECud-H24・ ϕ ECud-C26・ ϕ ECud-C27・ ϕ ECud-H27・ ϕ ECud-C28 の 5 株では宿主域が狭いファージであることが判明した。また、臨床分離株 ECud-B 及び ECud-AG 菌株は 12 株のどのファージにおいても溶菌斑が確認できなかった。ここから宿主域の広いファージ (ϕ ECud-A28・ ϕ ECud-F24・ ϕ ECud-F28・ ϕ ECud-H28-2) と宿主域の狭いファージ (ϕ ECud-C27・ ϕ ECud-H27) に絞り、電子顕微鏡像にてさらなる解析を行った。

2. 溶菌性ファージの形態学的分類とゲノム解析

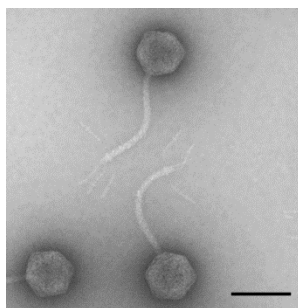
(a)



(b)



(c)



(d)

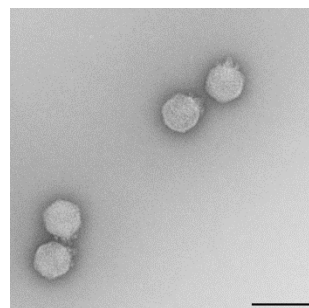


Fig. 14 分離ファージ 6 株の形態学的分類

(a) 大腸菌臨床分離株から分離して得られたファージ 6 株の電子顕微鏡像。

(b) ミオウイルス (*Myoviridae*) に属する単離ファージの形状 (c) シフォウイルス (*Siphoviridae*) に属する単離ファージの形状 (d) ポドウイルス (*Podoviridae*) に属する単離ファージの形状 [19]。

これらファージは正二十面体の capsid と長い tail、さらに tail sheath 構造を持つことから、すべてミオウイルス科 (*Myoviridae*) だと判明した。次に溶菌性バク

テリオファージのゲノム配列を用いて系統樹解析を行った (Fig. 15)。系統樹は VICTOR で実施した。

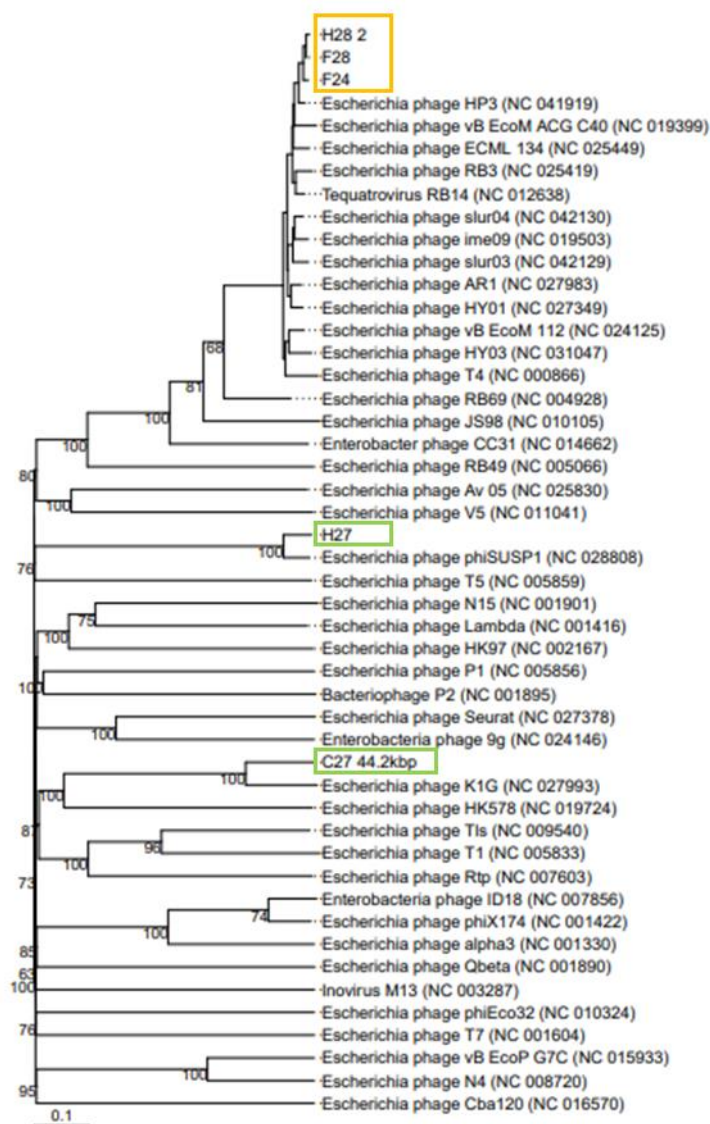


Fig.15 ゲノム配列を用いた溶菌性ファージの系統樹

黄色枠は宿主域が広いファージ、緑色枠は宿主域が狭いファージを示している。すべてファージは 1.0×10^8 PFU/mL に希釈したものを使用した。

ゲノムの解析により宿主域の広いファージと狭いファージの間では系統的に離れていることが分かり、ここから感染のメカニズムに違いがあると推測された。そこで Fig. 12 及び Fig. 13 の Spot test の結果から判明した宿主域が広いファージ

(ϕ ECud-F24) と宿主が狭いファージ (ϕ ECud-H27)、そして 12 株ファージ全てで溶菌が見られる組み合わせの臨床分離株 ECud-C・ECud-H 菌株を使って、次は 24 時間で培養したときの経時的な溶菌の変化を観察することにした。

3. 細菌増殖におけるファージの溶菌活性

Spot test (Fig. 12) でプラークが確認できたファージのうち、宿主域の広いファージ (ϕ ECud-F24・ ϕ ECud-A28・ ϕ ECud-F28・ ϕ ECud-H28-2・ ϕ ECud-H32) と宿主域の狭いファージ (ϕ ECud-C27・ ϕ ECud-H27) を用いて、濁度測定法による経時的な溶菌の変化を見た (Fig. 16)。

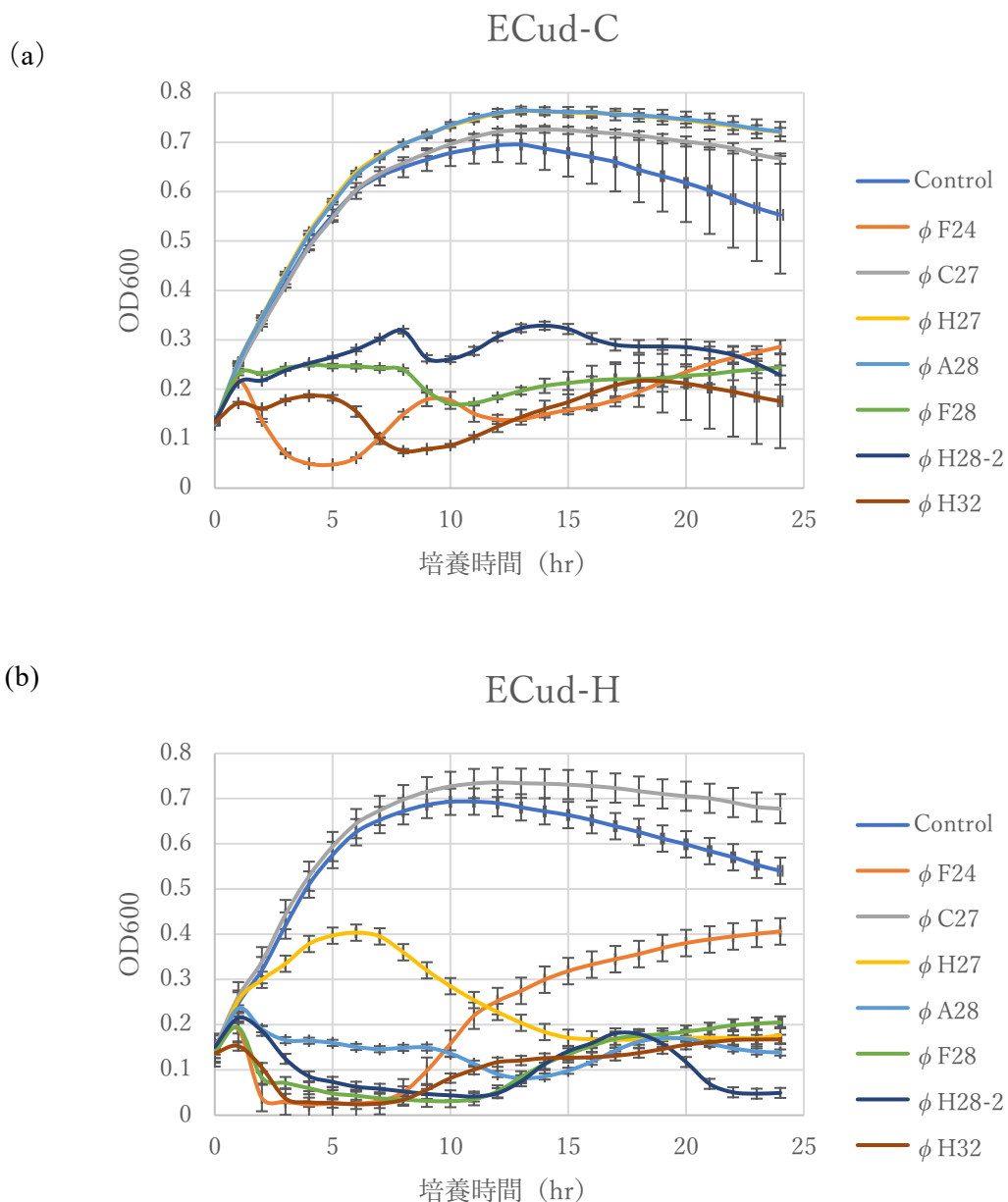


Fig. 16 濁度測定法による各ファージの細菌増殖に与える影響

グラフ (a) は、宿主菌を臨床分離株 ECud-C 菌株の時にファージ、グラフ (b) は、宿主菌を臨床分離株 ECud-H 菌株の時の時間ごとにプロットしたものである。Control は、(a) では ECud-C 菌株を、(b) では ECud-H 菌株を表している。また縦軸は OD 値で、細菌の増殖を濁度により計測しており、横軸は培養時間 (時間) を示している。培養は ERIKA 株の培養時間を参考に同様の数値 (1.0×10^7 CFU/mL) から開始し、それぞれ $n=3$ で行った。

濁度測定法による溶菌 (Fig. 16) と Spot test (Fig. 12、Fig. 13) の結果でより、はっきりと溶菌斑が確認できたファージであっても、液体培養中においては強い溶菌効果により増殖を長時間抑制しているわけではないことが明らかとなった (Fig. 13、Fig. 16)。例えば、Spot test (Fig. 12、Fig. 13) の結果にある ECud-C 菌株では ϕ C27 の Spot 箇所溶菌斑が形成されていたが、濁度測定法の結果では効果的な溶菌は見られず、Control 群と同様な増殖を示すことが明らかとなった。また 24 時間の経時的な溶菌の変化を見ると、それぞれの菌株によってファージの効果が異なっていた (Fig. 16)。ECud-C 菌株に対して ϕ ECud-H27 は溶菌効果が認められず、 ϕ ECud-F24 では溶菌は見られるものの 13 時間後以降からは再増殖していた (Fig. 16 a)。一方、ECud-H 菌株に対しては、 ϕ ECud-F24 は急速な溶菌が起こり、培養し始めてから約 8 時間を過ぎると再増殖が始まった。反対に ϕ ECud-H27 では最初の約 6 時間かけて緩やかに増殖し、その後同じく緩やかに減少していった (Fig. 16 b)。このようにそれぞれの菌株において ϕ ECud-F24 と ϕ ECud-H27 は再増殖が起こりやすく、増殖パターンも異なっていたことがわかった。以上より、長時間の液体培養において、細菌の再増殖がみられることから、第 I 章と同様にファージ耐性菌が出現している可能性が示唆された。そこで二つのファージ (ϕ ECud-F24 と ϕ ECud-H27) を元にこれらのファージ耐性菌株を作成し、ファージ感染のターゲットとなる宿主細菌のレセプターを同定することで感染メカニズムの一端を解明することとした。

4. ファージ耐性菌の作成及び検証

作成手順は方法 10 に記述した通りに行った (Fig. 10)。この時得られた 10 株のファージ耐性菌候補株 (mtF24-a,b,c,d,e 及び mtH27-a,b,c,d,e) が、元のファージに対して耐性を獲得しているかを検証するべく、Spot test (Fig. 17)、濁度測定法 (Fig. 18) による溶菌活性を評価した。Spot test において各ファージ耐性菌候補株は、 ϕ ECud-F24、 ϕ ECud-H27 のそれぞれに対し明確な溶菌斑は形成されず、耐性化していることが明らかとなった (Fig. 17 赤枠)。一方、その他の既存ファージにおいて、溶菌できるファージも明らかとなった (Fig.17 青枠)。

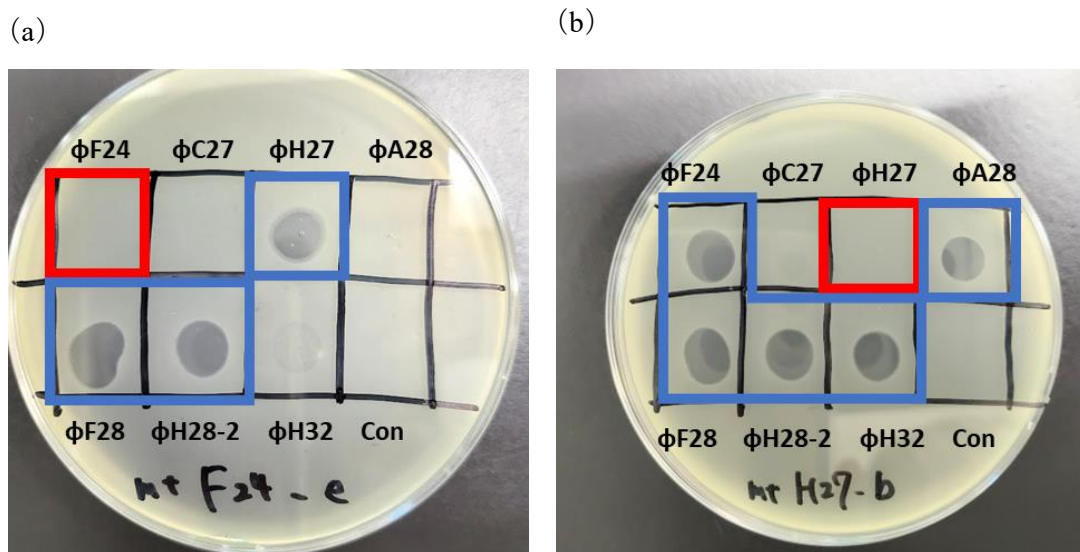


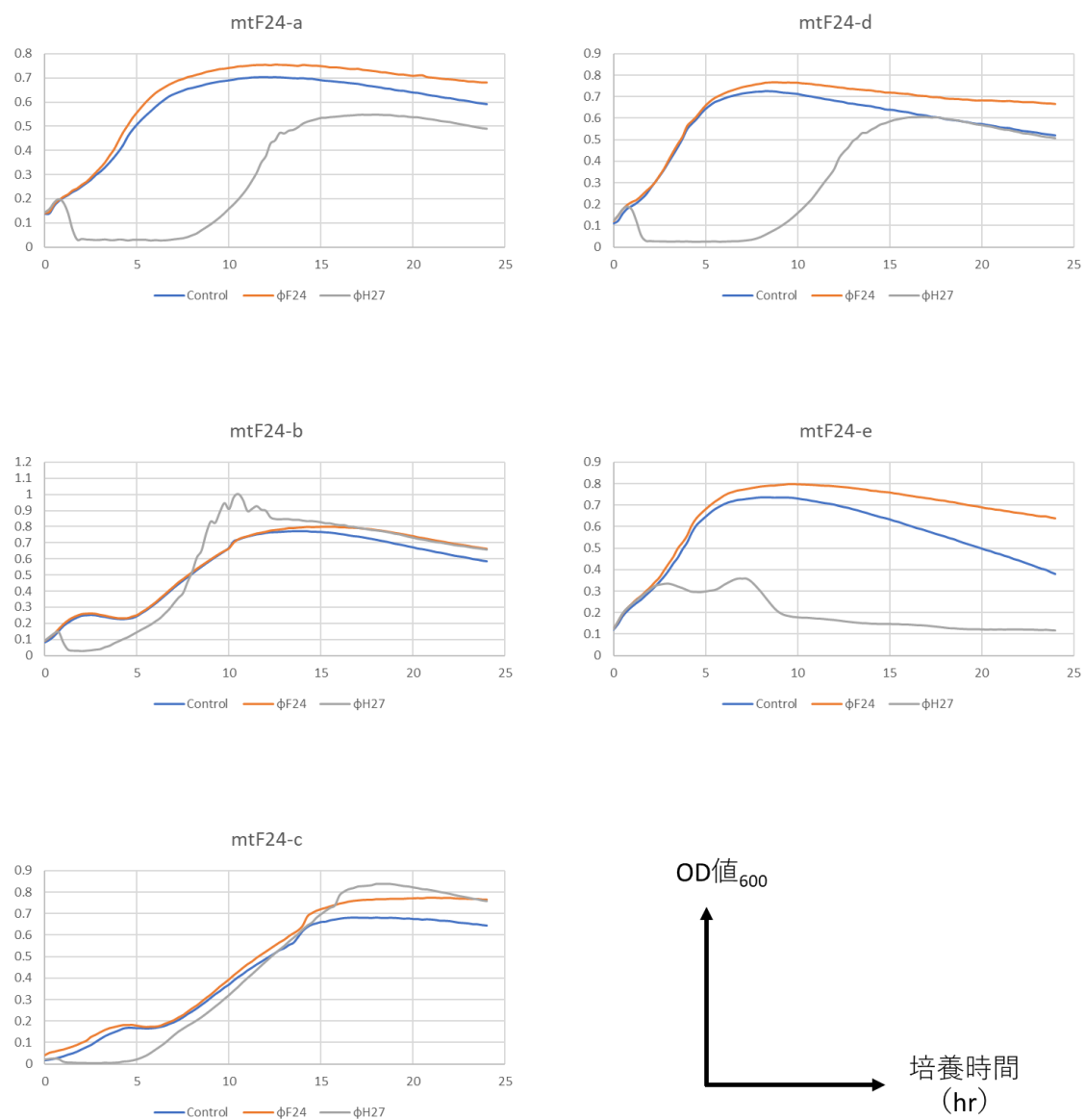
Fig. 17 Spot test によるファージ耐性化評価

各々5株あるファージ耐性化候補株の中で代表的な Spot test の結果を示す。

(a) は mtF24e、(b) mtH27b 候補菌株である。ファージは 1.0×10^8 PFU/mL に統一して行った。赤枠は元のファージを滴下した箇所であり、青枠はファージ耐性菌に対してプラークの形成が見られたファージを示す。

ϕ ECud-F24、ϕ ECud-H27 に対して耐性化した各 5 株について濁度測定法によりファージ耐性化の検証を行った。濁度測定法の結果より、それぞれのファージ耐性菌候補株は元のファージに対して Control 群と同様に増殖し、元のファージに対して耐性化していると裏付けられた。しかし、同じ菌株培地から分離した株でもコロニーごとに細菌の増殖が異なっていた。例えば、mtF24 菌株においては、細菌の増殖が最大に達した時の時間は、a と e は約 10 時間、b と c は約 15 時間、d は約 8 時間とそれぞればらつきがあり、ϕ ECud-H27 による感受性が異なっていた。また、mtH27 菌株に関しては 5 つの株すべてにおいての細菌の増殖の最大時はほぼ同時刻ではあったが、ϕ ECud-F24 による感受性が異なっていた。

(a)



(b)

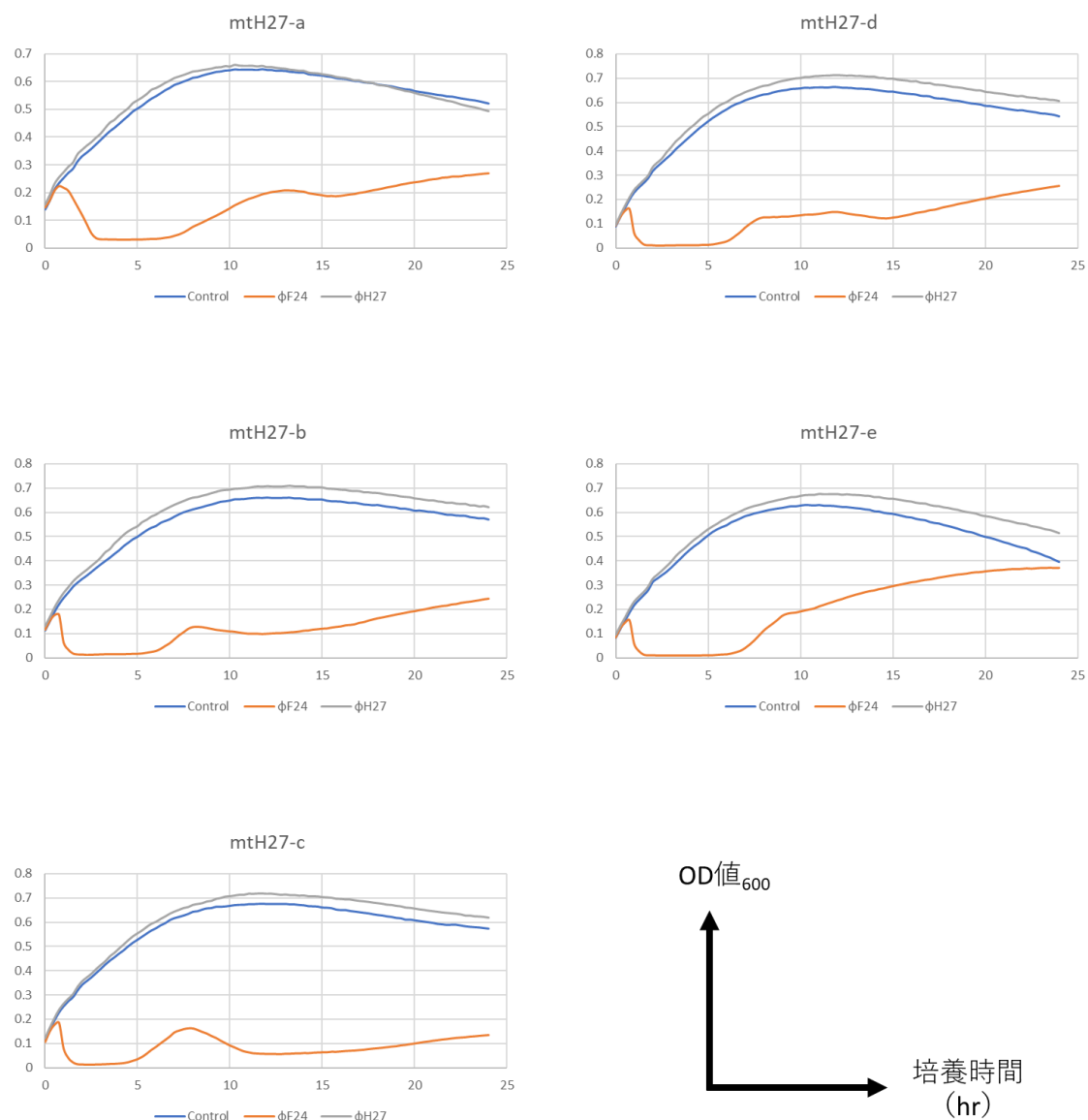


Fig. 18 ファージ耐性菌候補株の濁度測定法による細菌増殖

(a) は ϕ F24 に対するファージ耐性候補株 mtF24 菌株 (-a,b,c,d,e)、(b) は ϕ H27 に対するファージ耐性菌候補株 mtH27 菌株 (-a,b,c,d,e) である。Control は、ファージを加えていない mtF24 (a)、mtH27 (b) の増殖曲線を示す。また縦軸は OD 値で、細菌の増殖を濁度により計測しており、横軸は培養時間 (時間) を示している。培養は ERIKA 株の培養時間を参考に同様の数値 (1.0×10^7 CFU/mL) から開始し、それぞれ $n=3$ で行った。

以上の結果からファージ耐性化においては、ある一定の増殖曲線を示す耐性菌においてもコロニーに銘々レベルの多様性があることが明らかになったため、得られたファージ耐性菌株の中でそれぞれ2株ずつについてさらにゲノムレベルでの解析をすることとした (Table 8)。φ ECud-F24 に耐性を持つ菌株 mtF24c・mtF24e と φ ECud-H27 に耐性を持つ菌株 mtH27a・mtH27b、そしてファージ耐性化になる前の菌株 ECud-H 菌株のゲノム解析を行った結果を Table 9 に示した。

Table 8 作成したファージ耐性菌株

株名	ファージ	菌株
mtF24c	φ ECud-F24	ECud-H
mtF24e	φ ECud-F24	ECud-H
mtH27a	φ ECud-H27	ECud-H
mtH27b	φ ECud-H27	ECud-H

Table 9 mt菌株DNA解析による変異遺伝子の検出

CHROM	POS	TYPE	REF	ALT	EVIDENCE	FTYPE	STRAND	NT_POS	AA_POS	EFFECT	LOCUS_TAG	GENE	PRODUCT
mtH27-a sequence1	102874	del	TA	T	T:300 TA:0	CDS	+	753/1017	251/338	frameshift_variant c.753delA p.Lys251fs	LOCUS_00850	waoO	LPS 1,3-galactosyltransferase
mtH27-b sequence1	104068	sup	G	T	T:363 G:0	CDS	+	907/996	303/331	stop_gained c.907G>T p.Glu303*	LOCUS_00860	waaT	LPS 1,2-glucosyltransferase
sequence2	88407	sup	C	T	T:589 C:0	CDS	-	573/2508	191/835	synonymous_variant c.573G>A p.Leu191Leu	LOCUS_45650		outer membrane usher protein
mtF24-C sequence1	3076625	sup	C	G	G:247 C:4	CDS	+	579/1053	193/350	stop_gained c.579C>G p.Tyr193*	LOCUS_28460	ompA	porin OmpA
mtF24-e sequence1	3076335	ins	G	GGCGTTCA	GGCGTTCA:244 G:12	CDS	+	299/1053	100/350	frameshift_variant c.292_298dupGTTTCAGC p.Leu100fs	LOCUS_28460	ompA	porin OmpA

ファージ耐性菌株のゲノム解析の結果、ファージ耐性菌株は元の菌株である ECud-H 菌株に対しそれぞれゲノム配列に変異が生じていることが分かった。mtH27a 菌株では、LPS 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを認識する遺伝子 waaO に 753 番目の T の欠損によりフレームシフトが起こり、タンパク質の機能が欠失すると推定されるものであった。mtH27b 菌株では二か所の変異が起きており、一つ目が LPS 1,2-グルコシルトランスフェラーゼを認識する遺伝子 waaT で 907 番目の G が T に変異し、その結果終止コドンとなりタンパク質の機能が欠失すると推定されるものであった。mtH27b 菌株のもう一つの変異においては一部塩基が置き換わったが、アミノ酸の変化はないサイレント変異であり、ファージ耐性化には関与しないと考えられた。mtF24c 菌株と mtF24e 菌株はどちらも OmpA タンパク質を認識する遺伝子に変異が生じていた。mtF24c 菌株では 579 番目の C が G へ変異し、終止コドンが出現することが明らかとなり、また mtF24e 菌株では挿入によるフレームシフトがおこり、どちらもタンパク質の機能が欠失すると推定されるものであった。以上の結果から、ファージ耐性菌株に起きた変異は、それぞれのファージが認識するレセプターに関係するということも示唆された。つまりこの異なる受容体を認識するファージを組み合わせて、カクテル化することでファージ耐性菌の出現をより抑える戦略的なファージカクテル製剤となる可能性がある。これらの知見を得て、多剤耐性大腸菌 ERIKA 株に対し、第 II 章で分離した臨床分離株由来ファージの溶菌活性を検証した。

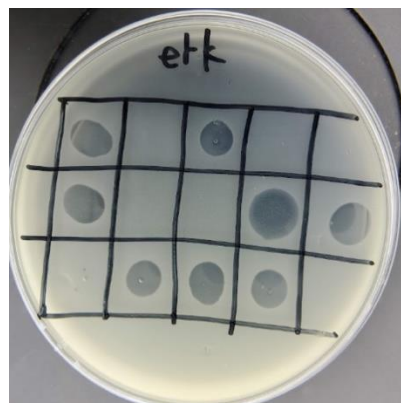
5. 臨床分離株由来ファージと多剤耐性大腸菌 ERIKA 株の有効性の検証

第 I 章で取り上げた多剤耐性大腸菌 ERIKA 株と第 II 章で新たに分離した臨床分離株由来ファージ 7 株の溶菌活性を Spot test と濁度測定法にて評価した。Spot test の結果より第 II 章で得られた溶菌性ファージは ERIKA 株に対して有効であることが分かった (Fig.19 a)。また、Fig. 12 と同様に 7 株のファージと ERIKA 株に対する経時的な溶菌の変化を濁度測定法による 24 時間の細菌の増殖の変化で観察した (Fig. 19 b)。濁度測定法の結果、ファージによる細菌の増殖抑制効果は時間経過と共に変化し、明らかなファージ耐性化がみられるものと (φ ECud-F24、φ ECud-C27、φ ECud-H27、φ ECud-A28)、シングルファージで比較的長い増殖抑制を示すものが見られた (φ ECud-F28、φ ECud-H28-2、φ ECud-H32)。特に長時間

増殖を抑制したファージに関しては、シングルフアージにもかかわらず ERIKA 株由来ファージよりも溶菌効果が高く (Fig. 3, Fig. 19 b)、カクテル化においては、第 I 章の $\phi 24$ と $\phi 27$ カクテルよりも第 II 章のカクテル 4 の方でより細菌の再増殖を抑えていた (Fig. 5 a, Fig. 19 c, Table 9)。

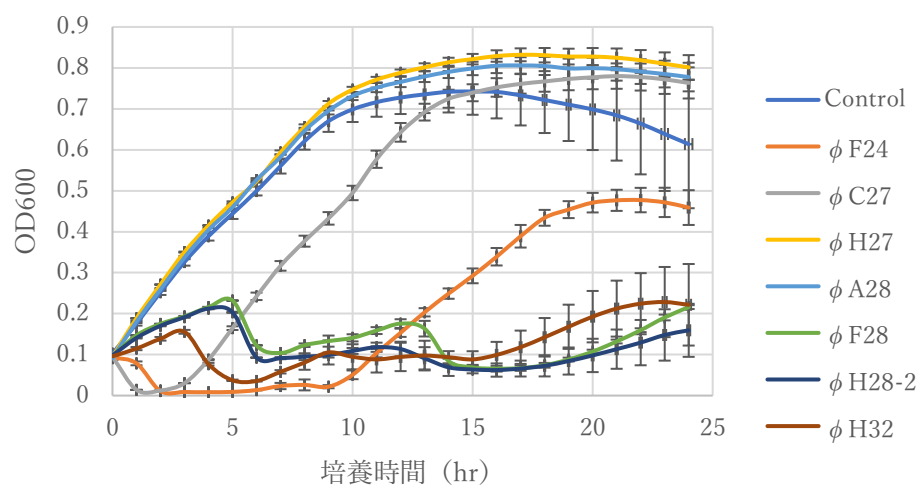
(a)

ϕ A24	C24	F24	H24	C26
C27	H27	A28	C28	F28
×	H 28-2	A32	H32	SM Buffer



ERIKA

(b)



(c)

ERIKA

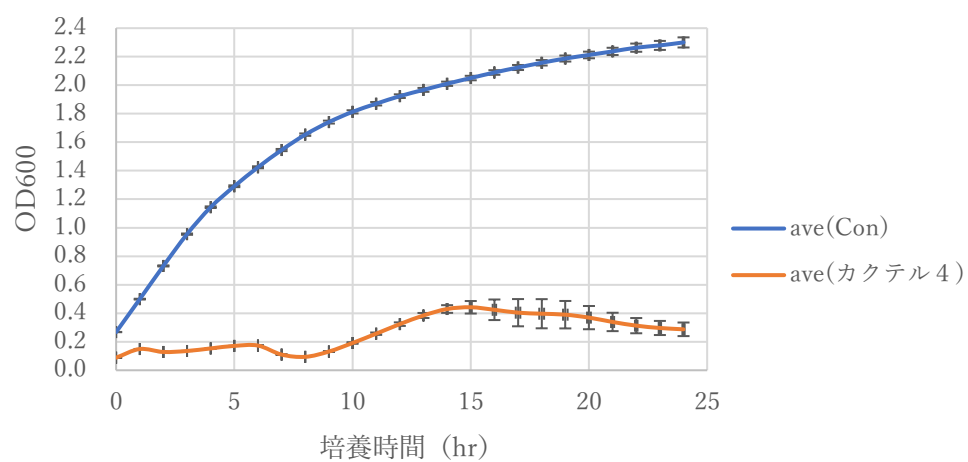


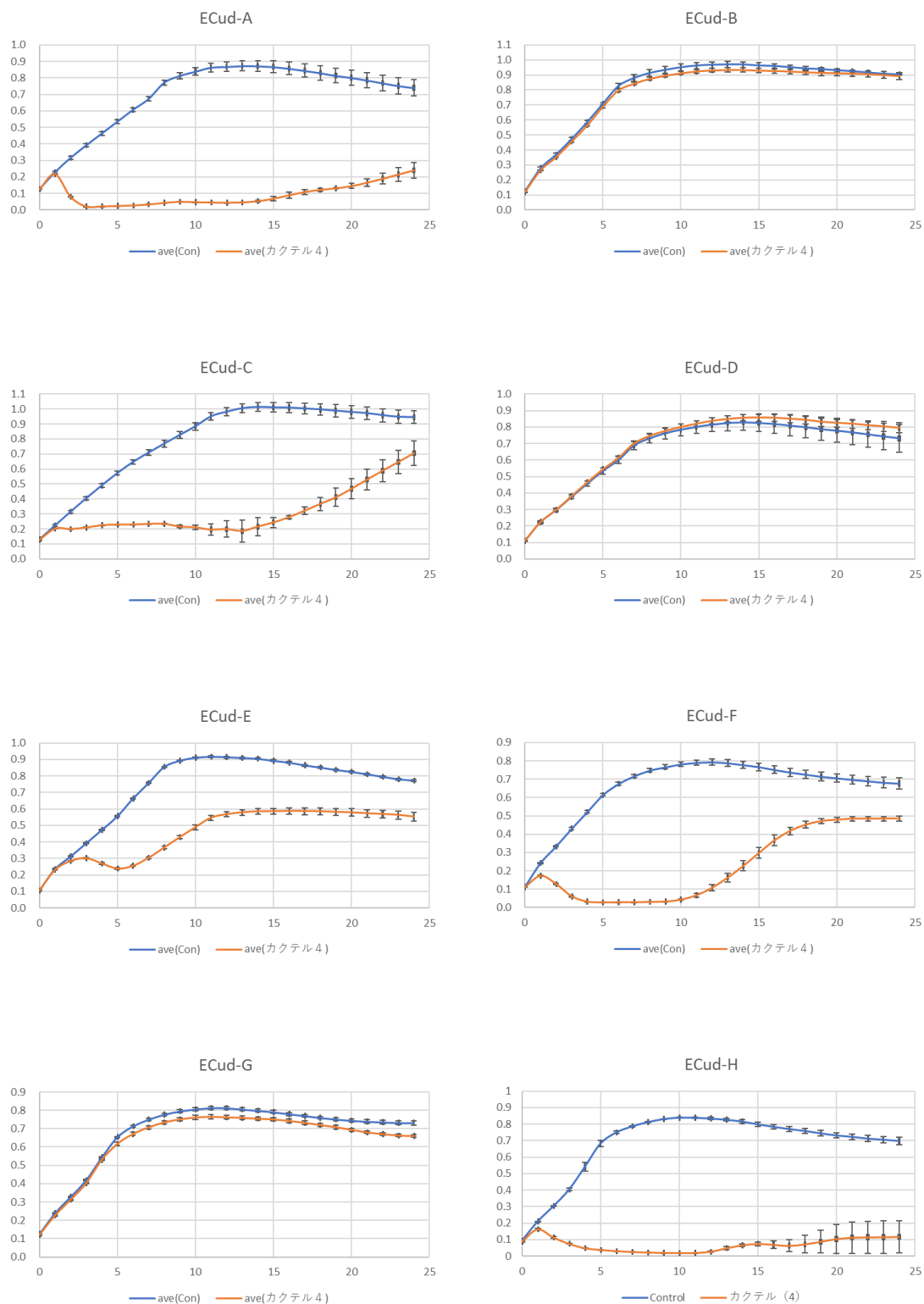
Fig. 19 濁度測定法による経時的な溶菌の変化

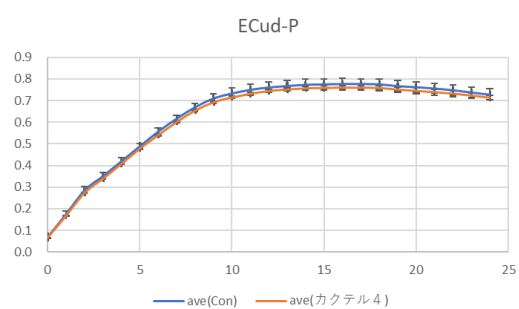
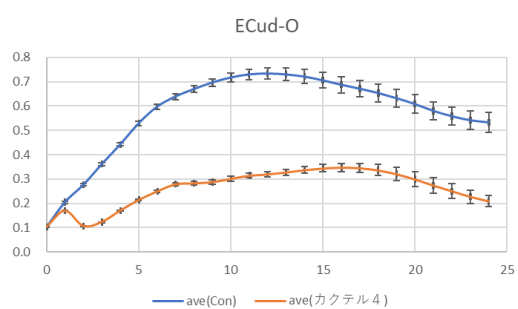
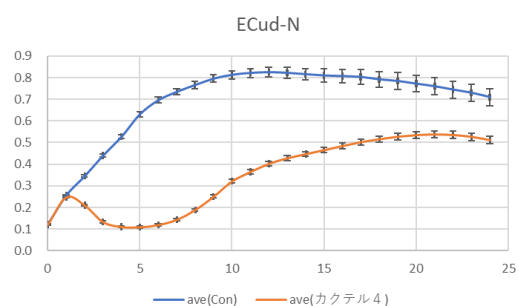
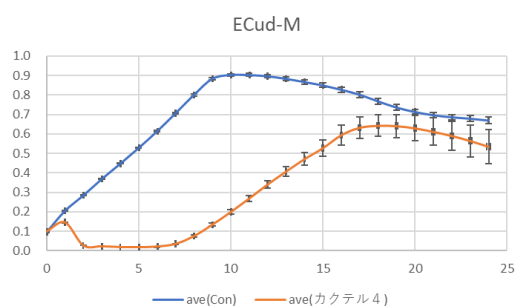
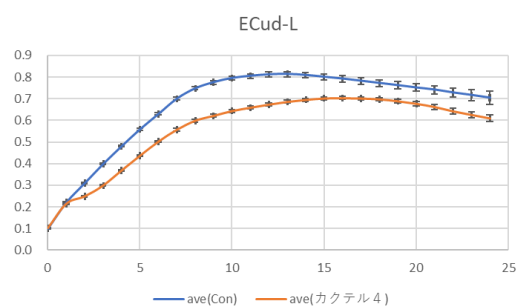
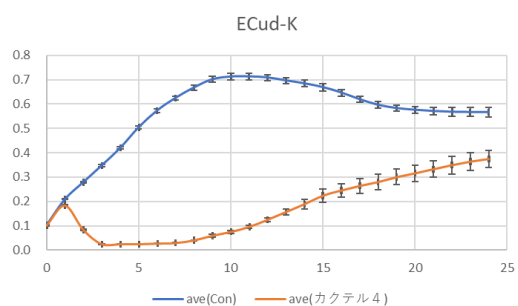
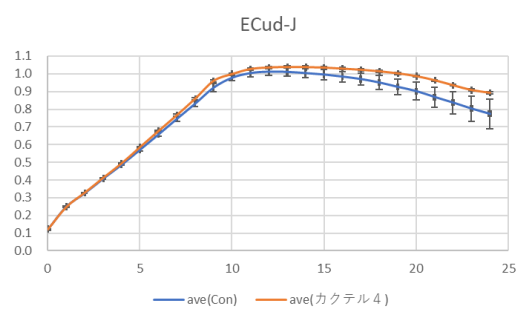
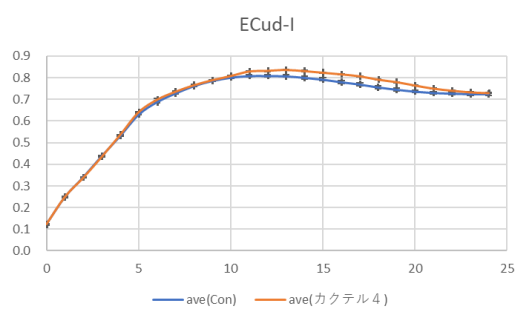
ホスト菌 ERIKA 株とし、(a) は臨床分離株由来ファージの Spot test による溶菌判定。(b) はシングルファージの時、(c) は 4 種類のファージを組み合わせたカクテル 4 (ϕ ECud-F24 \cdot ϕ ECud-H27 \cdot ϕ ECud-F28 \cdot ϕ ECud-H28-2) の時の菌の増殖を表している。また縦軸は OD 値で、細菌の増殖を濁度により計測しており、横軸は培養時間 (時間) を示している。培養は 1.0×10^7 CFU/mL から開始した。それぞれ $n=3$ で行った。またファージはすべて 1.0×10^8 PFU/mL の MOI1 で行った。

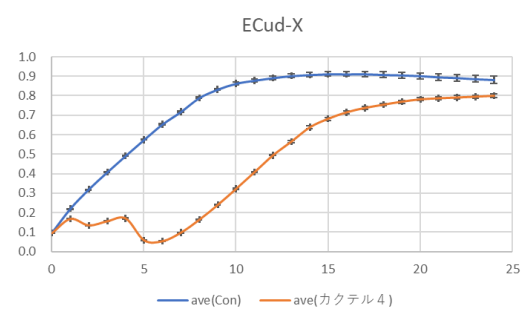
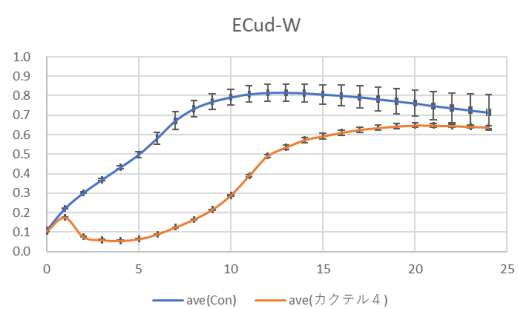
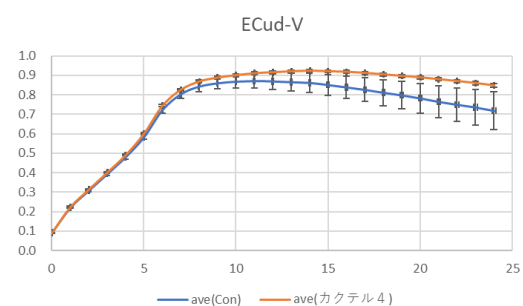
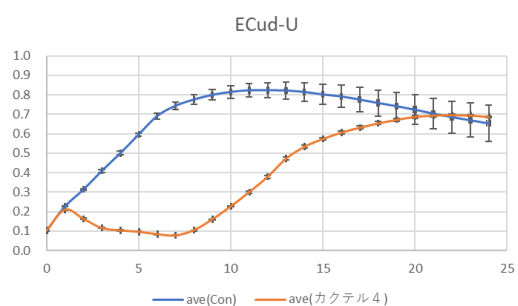
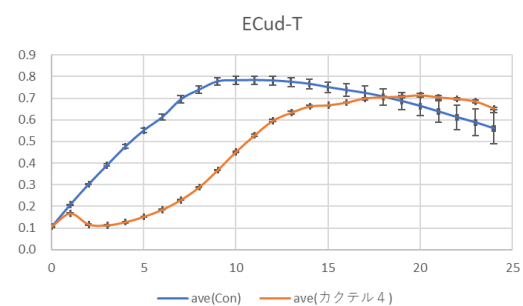
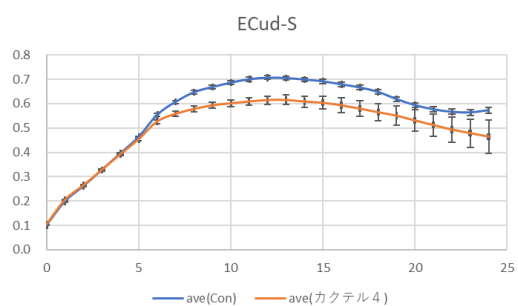
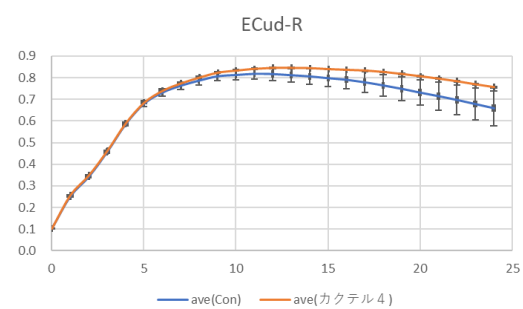
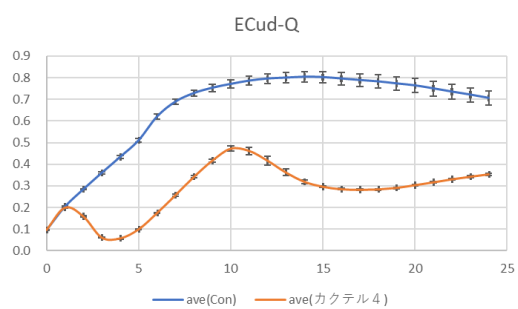
これらの結果と、ホストレンジの広さを考慮して (Fig. 12)、4 種のファージ (ϕ ECud-F24 \cdot ϕ ECud-H27 \cdot ϕ ECud-F28 \cdot ϕ ECud-H28-2) によるカクテル化の効果を検証した (Fig. 19 c)。4 種のファージのカクテル化 (カクテル 4) により、長時間において細菌の増殖を抑制できることが明らかとなった。

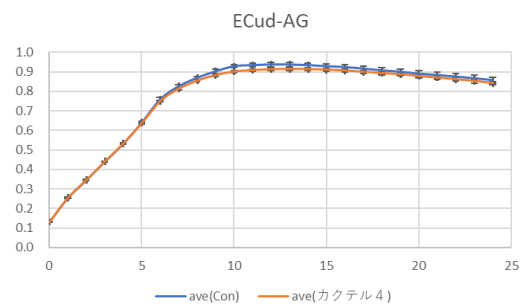
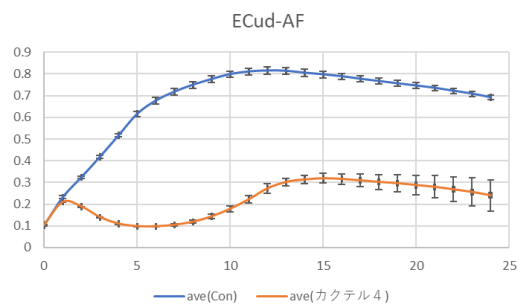
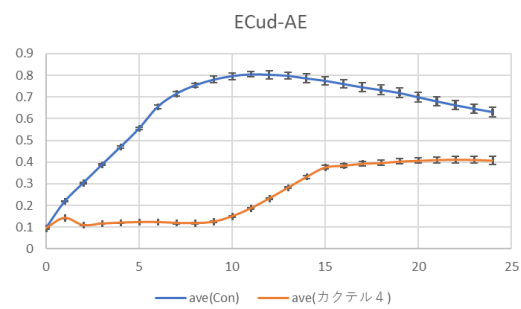
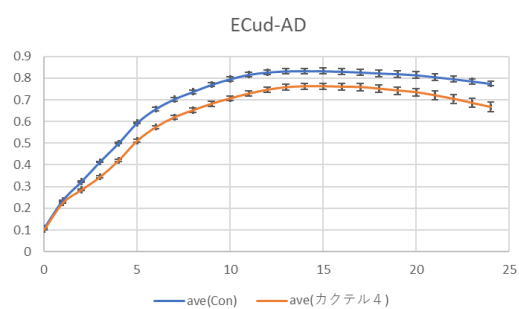
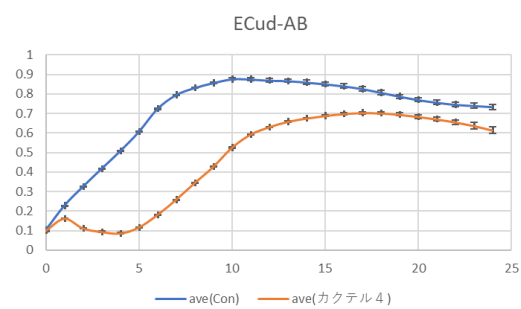
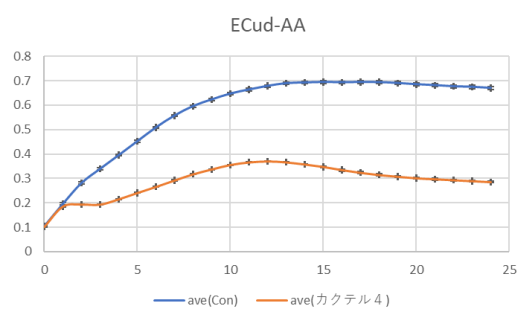
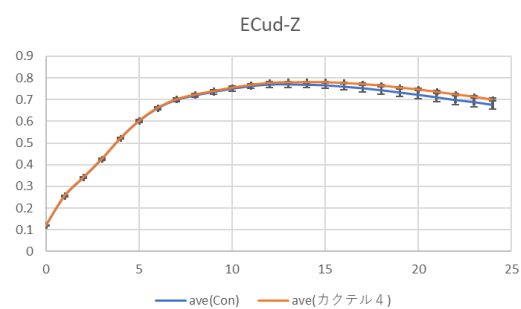
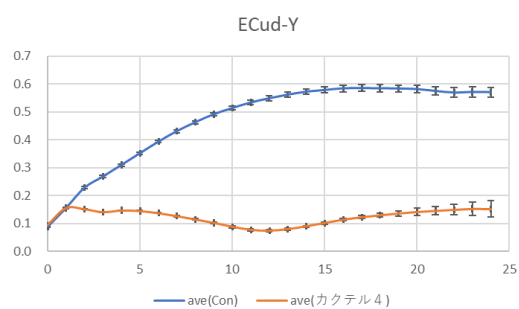
6. 有効なカクテルファージの設計とその溶菌効果

ERIKA 株において、カクテル 4 の効果を実証できたため、その効果が広く臨床株に効果があるのか、より検証した。









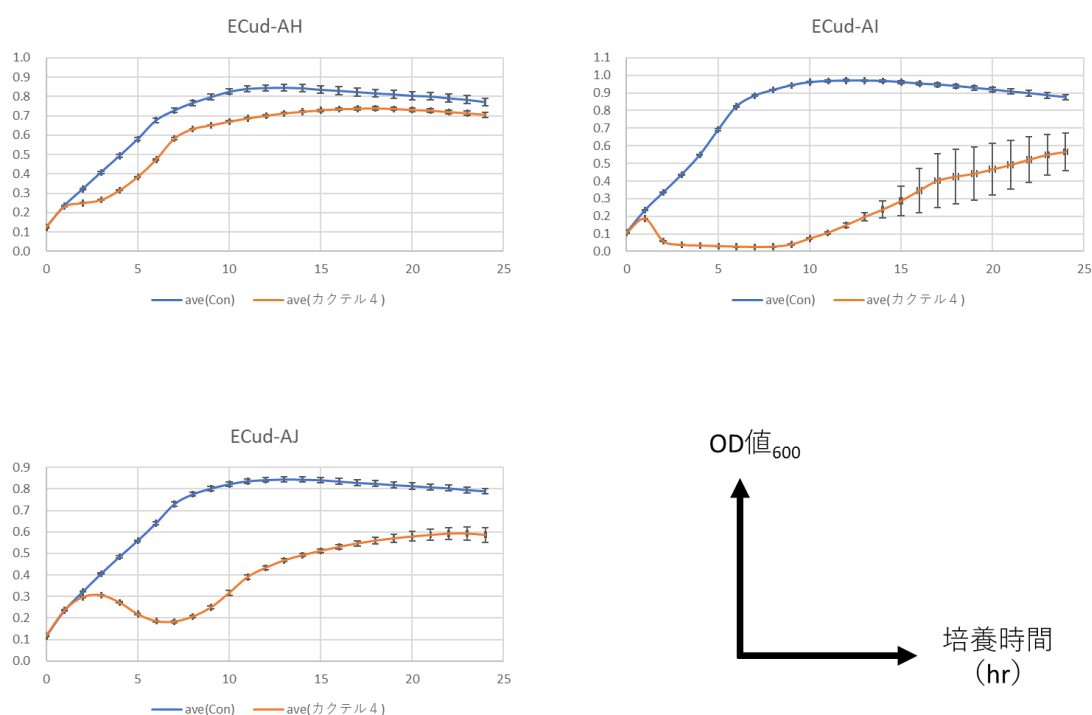


Fig. 20 大腸菌臨床分離株 35 株とカクテルファージによる溶菌活性

縦軸は OD 値で、細菌の増殖を濁度により計測しており、横軸は培養時間（時間）を示している。Control はそれぞれの菌株の増殖具合を示しており、培養は ERIKA 株の培養時間を参考に同様の数値（ 1.0×10^7 CFU/mL）から開始した。カクテル 4 は、 ϕ ECud-F24・ ϕ ECud-H27・ ϕ ECud-F28・ ϕ ECud-H28-2 をカクテルし、できたカクテルファージ液を 1.0×10^8 PFU/mL に調節したものを使用した。それぞれ n=3 で行った。

全体的に、カクテル 4 のみでは、長時間において細菌の増殖を抑え続けることは難しいことが明らかとなった。今回一番溶菌効果が見られた株はファージ耐性菌株を作るときに親株とした ECud-H 菌株であった。溶菌効果が見られなかったものについて、Spot test の結果（Fig. 12）でカクテル 4 に使用したファージすべてに溶菌斑が形成されていなかった ECud-B・ECud-G・ECud-R・ECud-AG の菌株については、ファージを含まない Control 群と同じ曲線描いていた。次に ECud-H 菌株のように OD 値が低く一定した溶菌効果があるものは、ECud-A・ECud-Y・ERIKA 菌株の 4 株のみだった。反対に溶菌効果が全くないものは、溶菌斑がそもそも形成されていないものを除くと ECud-D・ECud-I・ECud-J・ECud-L・ECud-P・

ECud-S・ECud-V・ECud-Z・ECud-AD・ECud-AH 菌株の 10 株であった。また、再増殖したものは、それ以外の菌株計 18 株だった。

ここまでは既存ファージを組み合わせたファージカクテルで溶菌効果を検証したが、一方でファージ耐性菌株から新たに分離したファージで組み合わせたカクテルファージの場合ではどれほど溶菌効果があるのか、また今後ファージカクテルの設計の際にどちらの方がより効率的か検証するためにファージ耐性菌株（mtF24e 菌株・mtH27a 菌株）を使い、新たなファージを分離した。

7. ファージ耐性菌株から分離した溶菌性ファージによるカクテル化とその溶菌効果

ファージ耐性菌株（mtF24e 菌株・mtH27a 菌株）を宿主菌とし、また汚水サンプルは『汚水②④・汚水②⑦・汚水②⑧・rgu』4 つの汚水を混ぜ合わせたカクテル汚水を使用して、溶菌性ファージの分離を試みた（Table 10）。方法は DLA 法にて分離したファージからの Plaque 一つを選び取り、LB-broth に溶解させ、37℃で培養した。

Table 10 使用ファージ株とその宿主菌・由来

株名	宿主菌	由来
φ mtF24e	mtF24e	カクテル汚水
φ mtH27a	mtH27a	カクテル汚水

次に、ファージ耐性菌株から新たに分離したファージ（φ mtF24e・φ mtH27a）を φ ECud-F24 と φ ECud-H27 を合わせたカクテルファージを新カクテル 4 とし、ECud-C 菌株と ECud-H 菌株に対し、濁度測定法による溶菌活性を検証した（Fig. 21）。

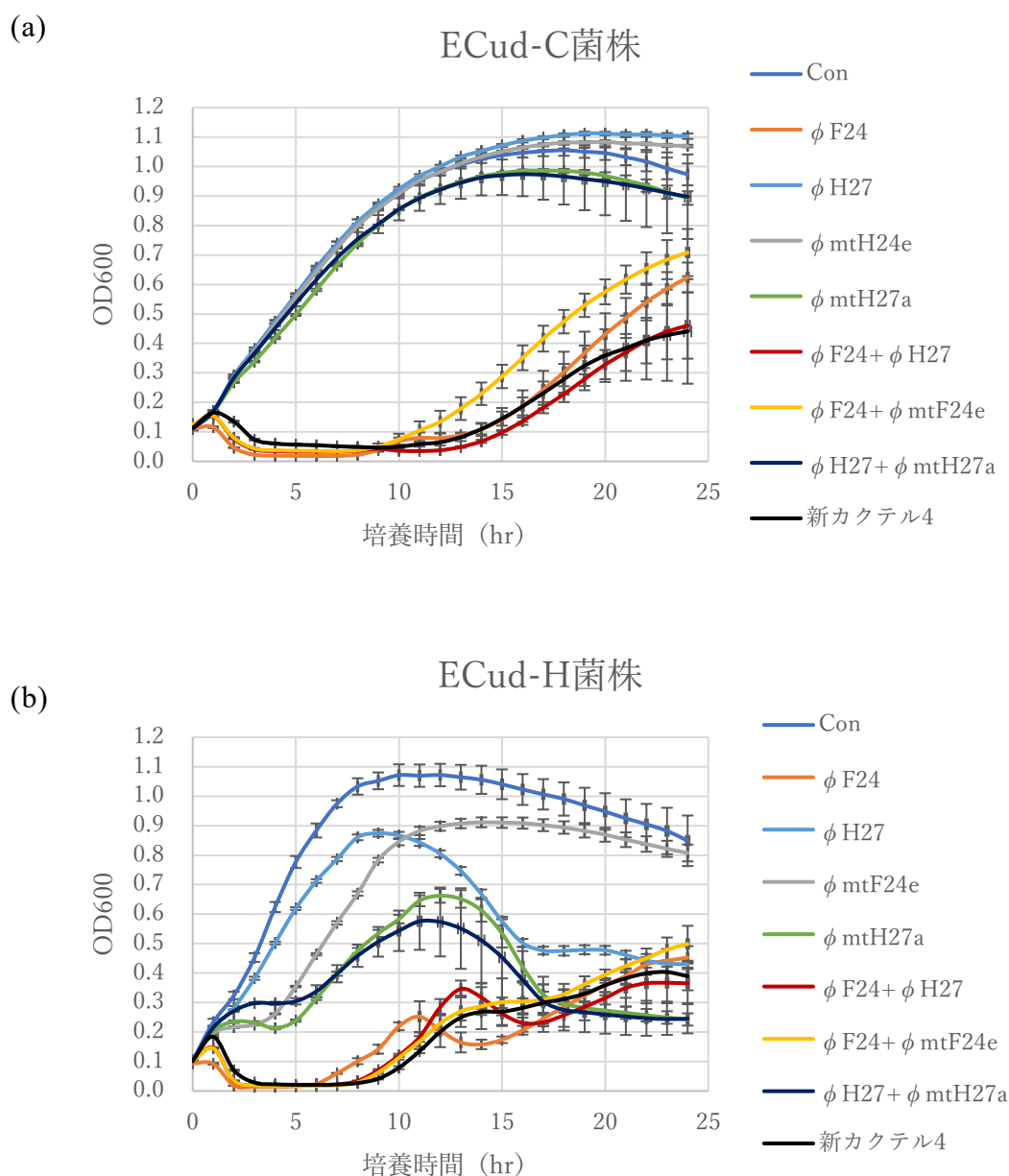


Fig. 21 新たなカクテルファージによる溶菌活性

縦軸は OD 値で、細菌の増殖を濁度により計測しており、横軸は培養時間（時間）を示している。また (a) は ECud-C 菌株、(b) は ECud-H 菌株を宿主菌とし、Control はそれぞれの菌株の増殖具合を示している。培養は ERIKA 株の培養時間を参考に同様の数値 (1.0×10^7 CFU/mL) から開始した。新カクテル4は、 ϕ ECud-F24・ ϕ ECud-H27・ ϕ mtF24e・ ϕ mtH27a をカクテルし、できたカクテルファージ液を 1.0×10^8 pfu/mL に調節したものを使用した。それぞれ $n=3$ で行った。

宿主菌はそれぞれ ECud-C 菌株と ECud-H 菌株を使用した。また、ファージは単独、2 種カクテル、4 種カクテル（新カクテル 4）の組み合わせで行った。

この新カクテル 4 による溶菌活性は、以前のカクテル 4 と比較して若干の差異があった。ECud-C 菌株では再増殖するまでの OD 値は新カクテル 4 における溶菌効果がわずかに高く、ECud-H 菌株では以前のカクテル 4 の方がより低い濃度かつ長時間、細菌の再増殖を抑制していた。つまり、この新カクテル 4 における溶菌活性もまた細菌によって異なっていた。しかしこの新カクテル 4 の場合でも、単独よりも細菌増殖を抑制していることが分かり、カクテルファージ設計にはそれぞれ単独に分離したファージによる組み合わせ、もしくはファージ耐性菌から新たに分離したファージによる組み合わせ、どちらも有効であることが示唆された。

IV. 考察

薬剤耐性菌にも有効な治療の選択肢として期待されているファージセラピーだが、次なる課題はファージ耐性菌に対してどのような効果的な対応ができるかが重要である。過去の報告のパターソン症例[10, 33]や本大学で行った犬の慢性外耳炎[48]の治療の際においても、感染性のある多様な種類のファージをカクテル化することで治療を行ったが、ファージ耐性菌の出現が問題となり、治療の妨げとなっていた。そこで第Ⅱ章では、宿主域が広く、ファージ耐性菌にも有効なファージを新たに獲得し、またファージと細菌の感染メカニズムやファージカクテルの応用について実験を行った。

臨床分離株から新たなファージを分離するために、今回は東京都や福岡県のほかに鹿児島県の汚水も加えた下水サンプルを使用して新たに分離したファージを計 12 株分離することができた。特に鹿児島県の汚水から得られたファージは Spot test (Fig. 12) の結果でも比較的に大腸菌臨床分離株に対して幅広く溶菌することがわかった。ここから考えられるものとして、鹿児島県の汚水もまた、東京都や福岡県と同様に人とペットが存在する環境下の生活汚水中に、数多の細菌種に適応するファージの存在があったからではないかと推測された。また得られた今回のファージは、Fig. 14 の電子顕微鏡像からすべてのファージがミオウイルス科 (*Myoviridae*) であることが判明した[1,2,19]。ミオウイルス科 (*Myoviridae*) は収縮性の尾を持ち、比較的広い宿主域を持つことが過去の文献にて報告されており[19, 23]、本研究の臨床分離株に対する Spot test (Fig. 12) の結果と一致していた。また系統樹解析 (Fig. 15) を行った際には、 ϕ ECud-F24・ ϕ ECud-F28・ ϕ ECud-H28-2 の 3 つのファージが、*Escherichia* phage T4 のグループに属しており、特に *Escherichia* phage HP3 に一番近縁であることが明らかとなった。この *Escherichia* phage HP3 は、強毒性のある多剤耐性菌の腸管外病原性大腸菌 (ExPEC) に感染したマウス急性感染モデルにおいて治療効果の高いファージとして知られている[14,32]。その報告では、感染モデルマウス (MDR 菌血症マウスモデル) において、*Escherichia* phage HP3 投与したマウスでは健康状態 (疾患の重症度) を大きく改善させた[14]。また今回の ϕ C27 に関しては電子顕微鏡像 (Fig. 14) を見ると、他のファージと比較して少し形状からシフォウイルス科

(*Siphoviridae*) のように見えるが、tail の長さやファージ DNA 解析の結果から、ミオウイルス科 (*Myoviridae*) と判断した。しかし ϕ ECud-C27 は Spot test (Fig. 12) の結果から宿主域が狭く、これは過去の文献で知られている同じく宿主範囲が狭いシフォウイルス科 (*Siphoviridae*) と一致していた[7]。また系統樹解析 (Fig. 15) の結果では、シフォウイルス科 (*Siphoviridae*) である *Escherichia* phage K1G[7]や *Escherichia* phage HK578[28] と ϕ ECud-C27 は近縁だった。中でも一番近縁だった *Escherichia* phage K1G は莢膜を認識するファージでもあった[7]。このことから ϕ ECud-C27 は、ミオウイルス科 (*Myoviridae*) ではあるが性質としては莢膜を認識するシフォウイルス科 (*Siphoviridae*) に近いファージと推測される。

次にこれらのファージの溶菌活性について詳しい解析を行った。Spot test の結果、 ϕ ECud-A24、 ϕ ECud-F24、 ϕ ECud-F28、 ϕ ECud-H28-2、 ϕ ECud-A32、 ϕ ECud-H32 の 6 株のファージで 35 株中 28 株、すなわち全体の 8 割以上の大腸菌に対し溶菌が確認でき、宿主域が広く行き渡っていた (Fig. 12)。これは第 I 章の実験結果 (Fig. 7) の ERIKA 株由来ファージよりも有効であると言える。反対に ϕ ECud-H24、 ϕ ECud-C26、 ϕ ECud-C27、 ϕ ECud-H27、 ϕ ECud-C28 の 5 つのファージでは 36 株中 10 株以下、すなわち 3 割以下の溶菌しか確認できないファージがあり、これらのファージは宿主域が比較的狭く限られていた。しかし宿主域が狭い ϕ ECud-C27、 ϕ ECud-C28 においては、多剤耐性大腸菌株である ERIKA 株に対しても溶菌しており、多剤耐性大腸菌のような大腸菌に対して活用できる場合がある。今回の結果から臨床分離株由来ファージは、一つの菌株に対し特異的に溶菌するものから全体に幅広く溶菌するものまで様々な溶菌形式があることが分かり (Fig. 12)、これは過去に報告されていた情報と一致することが明らかとなった[19]。一般的に、Spot test の結果は濁度測定法や EOP (Efficiency of Plating) の結果と比較して個々のファージの宿主範囲を約 50% 過大評価している報告がある[17]。そこでさらにこの溶菌活性について精査するために、臨床分離株にこれらファージを 24 時間で培養したときの経時的な溶菌の変化を濁度測定法にて確認した。今回使用した菌株は Spot test の結果 (Fig. 12) から、宿主域が広いファージ『 ϕ ECud-F24』と宿主が狭いファージ『 ϕ ECud-H27』、そして 12 株ファージ全てで溶菌が見られる組み合わせの臨床分離株 ECud-C・ECud-H 菌株を使用した。その結果、

溶菌曲線を見てみると細菌の増減の仕方が異なり、いくつかのパターンに分けられた。見られたパターンは 4 つあり、それぞれが『増加のみ』、『溶菌（減少）からの増加』、『増加から溶菌（減少）』、『増加と減少の繰り返し』に分けられた。例えば、一つ目の溶菌曲線が増加のみのパターンでは、主に細菌のみの Control 群と近い、溶菌することなく増加し続けるパターンであり、特に ϕ ECud-C27 に関しては ECud-C 菌株と ECud-H 菌株の両方で見られた (Fig. 16 a,b)。二つ目の溶菌から増加するパターンは、第 I 章のときにもよく見られた一般的なパターンであり、宿主菌 ECud-H 菌株の時の ϕ ECud-F24 が当てはまる (Fig.16 b)。三つ目は最初に菌と一緒に増加するがその後に減少、つまりは溶菌が遅れてくるパターンである。これは特に宿主菌 ECud-H 菌株の時の ϕ ECud-H27 で見られ、はじめ緩やかに増殖し、培養し始めて 6 時間を経過してから緩やかに減少していき、24 時間地点では OD 値が 0.2 まで減少していた (Fig.16 b)。最後の四つ目の増加と減少を繰り返すパターンは、比較的低い濃度で見られ、特に ϕ ECud-H28-2 に関しては ECud-C 菌株と ECud-H 菌株の両方でみられた (Fig.16 a,b)。以上の結果から、立体的に自由に移動できる液体培養時の細菌の増減は様々であり、Agar 上での制限された範囲内での溶菌効果を見る Spot test とは結果は一致しないと言える。これについては、過去の研究報告と同様で、今回の結果でもそれを裏付けられた。また同報告内で、この濁度測定法と EOP ではよりデータ的により近い関係があるが、傾向としては濁度測定法の方が EOP の分離株カバー率よりも若干低いことも挙げていた[17]。Spot test は、簡易的かつ短時間で宿主域を確認できる点もあり、今後は Spot test と濁度測定法の二重の測定が望ましいと考えられる。また溶菌曲線に焦点を当てると、溶菌が認められるファージはみなシングルファージにもかかわらず、長時間 OD 値を 0.4 以下に抑えられている。このことは第 I 章の ERIKA 株と 2 つのファージカクテルしたものよりも効果的である。しかし、今回の実験においても細菌の再増殖が確認できたことから、次はこの再増殖している菌株について詳しく検証した。

今回長時間の培養により溶菌曲線が再増加しているものとして、ECud-H 菌株に着目し、この菌株に対する ϕ ECud-F24 と ϕ ECud-H27 のファージ耐性菌株を作成することで、ファージの感染性を検証した。各ファージに耐性化したと推定されたコロニーを 5 つ選び、Spot test と濁度測定法にてファージ耐性菌の検証を行った

今回のファージ耐性菌株の作成において、濁度測定法の結果 (Fig.18) からそれぞれ 5 つのコロニーすべてがファージ耐性菌であることが確定した。この各コロニーにおける増殖スピードが、親株である ECud-H 菌株よりも落ちていることから、これは細菌がファージに対して耐性を獲得した半面に菌自体が弱体化したのではないかと考えられる。実際に過去の文献において、ファージ耐性を獲得した菌株の病原性が落ちたという報告は多数ある[30, 35, 36]。今回、ファージ耐性菌のゲノム変異解析から、mtF24 菌株は OmpA に、mtH27 菌株は LPS に変異があったことが判明した。大腸菌の LPS は外側にあるコア構造で分類することができ、ファージはその異なるタイプの LPS を認識することで感染が成立する[13]。mtH27a と mtH27b それぞれは waaO、waaT 遺伝子によるもので、これら 2 つの遺伝子の欠失は糖鎖の連結を切断し、LPS の外核多糖の構造変化をもたらすことが知られている[13]。一方、mtF24c と mtF24e はどちらも OmpA 遺伝子によるものであり、OmpA は細菌外膜に孔を形成して栄養を取り込む外膜タンパク質である[32]。この LPS や OMP には、様々なグラム陰性菌の病原性に関係しているとの報告がある[22]。このことから今回 LPS や OmpA を認識する ϕ ECud-F24 や ϕ ECud-H27 に対し耐性を獲得した菌株は、これらファージに感染できなくなる反面、元々病原性に関わっていた LPS や OmpA を合成する遺伝子に変異が生じたことから、先行研究と同様にファージ耐性菌株の病原性の低下している可能性が考えられる (Fig. 22)。また系統樹解析 (Fig. 15) にて近縁だった *Escherichia phage* HP3 に関する論文では、LPS の欠損により OmpA が外膜に適切に配置されず、ファージに対する抵抗性が生じる可能性を指摘していた[32]。また LPS は OmpA より変異しやすいか、もしくは LPS の欠損は OmpA より細菌にとっては害が少ないことも示唆されており[32]、これは LPS や OmpA を認識するファージを組み合わせることで多様なファージカクテル作成が可能となると共に、細菌の病原性を低下させることも期待できると考えた (Fig. 22)。そこで、今回レセプターが明らかとなった ϕ ECud-F24 と ϕ ECud-H27 の他に、ファージ耐性菌候補株における Spot test (Fig. 17) の結果から ϕ ECud-F28 と ϕ ECud-H28-2 を合わせた 4 種類でカクテル化したファージ (カクテル 4) の有効性について ERIKA 株や臨床分離株に対して検証した (Fig. 19 c, Fig. 20)。

最初に多剤耐性大腸菌 ERIKA 株から検証したが、臨床分離株由来ファージは ERIKA 株由来ファージよりも、シングルファージ、カクテルファージともに長時間の細菌の増殖を抑えていた。これはファージのカクテル数の要因以外にも臨床分離株由来ファージの方にて溶菌効果が高く、また認識する部位を解明したファージを組み合わせることが大きいと考えられる (Fig. 5 a, Fig. 19 c, Table 9)。次に 35 株の臨床分離株に対しても検証したが、カクテル 4 による溶菌効果はすべての大腸菌臨床分離株に有効ではなかった (Fig. 20)。これは臨床分離株においてファージ受容体、もしくは細菌側の防御システム等が異なる可能性が考えられ、菌株レベルでかなり多様性があることが示唆される。このような多様性に対応するファージカクテルを作成するためには、細菌ゲノムの詳細な解析をもとに LPS のタイプが異なる菌株ごとに仕分けることが重要である。その理由として大腸菌には血清型別に抗原 O、K、H の 3 種類が知られているが、特に大腸菌の LPS の O 抗原には 181 種類の血清型があり、その多様性がファージの宿主域を限定している可能性がある。そのため今後は膀胱炎の原因となる大腸菌の O 抗原のタイプを整理し、それを認識するファージを分離していくなどの戦略が必要である。また、LPS を認識するファージは野外に多く、そのため遺伝子破壊により LPS を持たない菌株を作成し、LPS 以外の膜タンパクを認識するファージを分離しやすいような手段を取ることも考慮すべき点かもしれない。加えて今回設計したカクテルファージは既存のファージを使って組み合わせで作成したが、別のアプローチとしてファージ耐性菌株から溶菌性ファージを分離し、それらのファージを組み合わせた新たなカクテルファージ（新カクテル 4）を作成し、その溶菌効果も検証した (Fig. 21)。結果として既存のファージによるカクテルファージもファージ耐性菌株から分離したファージを組み合わせたカクテルファージも細菌側によってその溶菌効果にばらつきがあった。またどちらも単独ファージよりもカクテルファージの方がより細菌の再増殖を抑えていたことから、ファージカクテル作成に関しては、通常細菌由来ファージやファージ耐性菌由来ファージどちらの組み合わせでも同程度の効果があることが示唆された。しかしファージ耐性菌由来ファージ単独の場合、ファージ耐性菌以外の菌株に対しての溶菌効果はあまり高くないことから、基本的にファージを複数組み合わせた場合にその効果が発揮できると推測される。以上のことも含め、これまでは初め感染性ファージを分離することが

主目的であったが、今後はその後のカクテル化を見据えた戦略的なファージ分離の方法を開発することが必要と考えられる。

本研究で臨床分離株より細菌のファージ受容体が異なるファージを分離し、ある程度多様性のあるファージカクテルを設計することができた。しかし、今回設計したファージカクテルでは非常に溶菌効果が見られるものもあれば、ファージ耐性化による再増殖がみられるものもあった。このように、ファージ耐性菌を抑えるにはファージ耐性化のメカニズムや既存ファージの受容体についてさらに解明する必要がある。よって今後はファージと細菌の二つの観点から以下に続く研究を考えている。まずファージに関しては、ファージ耐性菌株から分離したファージ（ ϕ mtF24e・ ϕ mtH27a）に対するファージ耐性菌株を作成し、このファージ耐性菌のゲノム変異箇所を解析することで、これらのファージがどこを認識し、吸着するかを調べ、カクテル化の検討に活用したい。例えば ϕ mtF24e の場合、OmpA を欠損した mtF24e 菌株から分離したファージであることから、このファージは LPS を認識するファージもしくは OmpA 以外の膜タンパク質を認識するファージの可能性が示唆される。これは ϕ mtH27a にも同様に、特定の LPS を欠損した mtH27a 菌株から分離されたファージであることから、LPS にあるコア多糖の基部や Omp 系の膜タンパク質を認識するファージの可能性が推測される。次に細菌に関しては、臨床分離株 35 株のゲノム解析を行うことでそれぞれの菌株の特徴を捉え、その菌株をタイプごとに分類し、新たなファージの分離やカクテルの組み合わせに活用していく必要がある。

本研究で得られた知見をもとにファージの多様性を担保したファージライブラリーが構築され、将来、人を含めたファージセラピーの臨床応用に向けて、今後さらに推進させていきたい。

V. 小括

ファージセラピーを行う中で大きな妨げの要因の一つにファージ耐性菌の出現がある[5, 22]。このファージ耐性菌の出現は、ファージによる選択圧によって自然変異や適応に応じて生まれた産物であり[22]、実際に行われたファージセラピーの治療の際にも問題となっている。第Ⅱ章では、ファージ耐性菌にも対応できる多様性の富んだ溶菌性ファージの分離やファージのターゲットとする細菌の受容体を明らかにし、また多様性のあるファージカクテル化の設計及び臨床分離株に対しての検証を行った。得られた結果は以下に示す通りである。

1. 難治性尿路疾患に関する大腸菌臨床分離株から分離した 12 株のファージの内、6 株は電子顕微鏡像よりすべてミオウイルス科 (*Myoviridae*) だと分類することができた。
2. 35 株の大腸菌臨床分離株に対して 12 株のファージの有効性判定を Spot test で行った結果、宿主域が広いファージ (ϕ ECud-A24、 ϕ ECud-F24、 ϕ ECud-F28、 ϕ ECud-H28-2、 ϕ ECud-A32、 ϕ ECud-H32) は 8 割の溶菌が、宿主域が狭いファージ (ϕ ECud-H24、 ϕ ECud-C26、 ϕ ECud-C27、 ϕ ECud-H27、 ϕ ECud-C28) は 3 割以下の溶菌見られた。
3. ホスト菌が ECud-C 菌株と ECud-H 菌株、ファージ 7 株の時による濁度測定法の経時的な溶菌の変化から、細菌の増減においてそれぞれ異なっており 4 つのパターンに分けられた。
4. 作成したファージ耐性菌株 (mtF24、mtH27) は各元のファージに対して耐性化しており、DNA 解析の結果から ϕ ECud-F24 は OmpA を、 ϕ ECud-H27 は LPS を、それぞれ認識することが判明した。
5. 多剤耐性大腸菌 ERIKA 株に対する臨床分離株由来ファージは、ERIKA 株由来ファージよりも溶菌効果が高く、さらに受容体の異なるファージで設計したカクテル 4 (ϕ ECud-F24 \cdot ϕ ECud-H27 \cdot ϕ ECud-F28 \cdot ϕ ECud-H28-2) における濁度測定法から長時間の細菌の増殖を抑えることができた。
6. 大腸菌臨床分離株に対するカクテル 4 における濁度測定法から溶菌効果が見られた株は ERIKA 株を含め 4 株のみであり、その他の株では溶菌するも

再増殖するものや溶菌効果が全くないものが見られた。また、ファージカクテル作成の際には細菌側の相性にもよるが通常細菌由来ファージ、ファージ耐性菌由来ファージどちらの組み合わせでも溶菌効果は高い。

以上のことから、大腸菌臨床分離株から分離されたファージの性状の解明とファージカクテル化の設計及び検証することができた。今後の研究では、ファージ耐性化のメカニズムやファージ受容体を明らかにするために、ファージ耐性菌から新たに分離したファージの解析とファージ耐性菌のゲノム解析の検証を試み、ファージの認識部位や細菌の病原性等の特定することでより臨床への応用に近づけたい。

総括

泌尿器系トラブルの多いネコの疾病の中に膀胱炎があり、これはアイペット損害保険株式会社による 2021 年の「保険金請求が多い傷病ランキング」にても上位にランクインする身近な疾患として知られている[42]。原因は主に大腸菌が挙げられ、下部尿路から上部へと侵入することで炎症が起こる[46, 47]。現在の治療法として抗生物質による薬物療法が行われるが、この抗生物質の長期にわたる使用や不適切な使用による薬剤耐性菌が懸念されており、特に伴侶動物は人と距離が近いことから双方の健康に悪影響を及ぼす可能性も危惧されている[29]。

本研究では伴侶動物における難治性の大腸菌膀胱炎のファージセラピーの臨床応用を目指し、溶菌性ファージの分離から臨床試験を実施し、そしてファージの性状解析からカクテルの設計までの研究を行った。すなわち、多剤耐性大腸菌の一つである ERIKA 株をターゲットにした溶菌性ファージの分離、そしてファージのカクテル化やファージ耐性菌に対する薬剤感受性試験を行い、臨床試験にてファージセラピーによる治療の効果を評価した。また、この分離した ERIKA 株由来のファージを使い、大腸菌臨床分離株に対する宿主域を調べた（第 I 章）。次に、大腸菌臨床分離株を対象に新たに分離したファージの宿主域や有効性を調べ、ファージ耐性菌を作成し、ファージがターゲットとする細菌の受容体を調べた。そしてこれらを組み合わせたカクテルファージの設計を行い、35 株の大腸菌臨床分離株に対しての溶菌活性を評価した（第 II 章）。

第 I 章では、多剤耐性大腸菌株から溶菌性ファージの分離とその性状の解析、そして臨床試験を実施した。分離した 7 株のファージ（ ϕ 24、 ϕ 26、 ϕ 27、 ϕ 30、 ϕ 31、 ϕ 32、 ϕ 33）は、すべてミオウイルス科（*Myoviridae*）であり、これらのファージをカクテル化することで単独ファージよりも効果的に細菌の増殖を抑えることができた。特に ϕ 24 と ϕ 27 の組み合わせたカクテルファージでは 24 時間後時点の最大増殖も Control 群の 6 割以下に抑えられた。一方、ファージ耐性菌株（R24、R26、R30、R31）による薬剤感受性試験では元の株である ERIKA 株との変化は見られず、臨床試験においても症状の改善は認められなかった。また大腸菌臨床分離株 35 株に対して 7 株のファージによる有効性判定を検証したが、幅広い溶菌は見られなかった。このことは ERIKA 株由来ファージは多剤耐性大腸菌の

ERIKA 株に特異的に溶菌するファージであり、その他の大腸菌に広く感染溶菌できるファージではないことが考えられる。

第Ⅱ章では、難治性尿路疾患に関する大腸菌臨床分離株から溶菌性ファージの分離とその性状の解析を行い、さらにファージ耐性菌を作成することにより分離したファージの受容体を明らかにした。そして判明した異なる受容体を持つファージカクテル化の設計と検証を実施した。この分離したファージの内 6 株はすべてミオウイルス科 (*Myoviridae*) であった。次に分離されたファージ 12 株による 35 株の大腸菌臨床分離株に対する宿主域の解析を行い、宿主域の広いファージと狭いファージが確認でき、宿主域の広いファージでは 8 割を溶菌することが分かった。また、濁度測定法による経時的な溶菌の変化では、細菌の増減が異なる 4 通りのパターンが確認できた。ここで細菌に対するファージ受容体について解析するためにファージ耐性菌株を 4 株作成し、DNA 解析により検証した。その結果、 ϕ ECud-F24 は OmpA を、 ϕ ECud-H27 は LPS を、それぞれ認識することが判明した。そしてこの二つファージと ϕ ECud-F28 と ϕ ECud-H28-2 の計 4 つのファージを組み合わせた多様なカクテルファージを設計し、ERIKA 株と臨床分離株それぞれに対して溶菌活性を評価した。この 4 つのファージを組み合わせたカクテル 4 による溶菌活性は、ファージ耐性菌株作成の元にした ECud-H 菌株に対して最も溶菌効果が高く、これに似た溶菌効果のある大腸菌株は ERIKA 株を含め 4 株のみであるのに対し、それ以外の株では溶菌効果が全く見られなかったものや再増殖がみられたものなど様々だった。これはカクテル 4 に対し、細菌側に対する感受性がそもそもなかったものやファージが感染するにあたりその認識する受容体が異なるものなどの要因が考えられる。

本研究を通して、伴侶動物におけるファージセラピーは臨床応用において有効性を見出すことができた。今後はゲノム解析を行い、他のファージの受容体の特定や細菌側の病原性や薬剤耐性の有無を検証し、臨床に用いる際の安全性をゲノムレベルで担保するとともに、薬剤との併用効果を検証していきたい。そして多様性のあるファージライブラリーを構築し、本研究をさらに発展させることで、人と動物双方の耐性菌問題の解決の一助となるよう推進していきたい。

謝辞

本稿の終わりに臨み、本研究の遂行および論文製作にあたり、懇意なるご指導並びにご校閲の労をお取りくださいました獣医生化学ユニット 岩野英知教授、獣医衛生学ユニット 樋口豪紀教授（主査）、獣医ウイルス学ユニット 桐澤力雄教授（副査）、獣医病理学ユニット 松田一哉教授（副査）、伴侶動物内科学ユニット 大田寛准教授（副査）、北澤多喜雄教授（元獣医保健看護学類、比較動物薬理学研究室）に深甚の謝意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、実験の手技や助言などご教授下さいました獣医生化学ユニット 藤木純平講師、獣医生化学ユニット 国立感染症研究所 中村暢宏研究員、獣医生化学ユニット 中村圭佑大学院生、電子顕微鏡の撮影にご協力くださいました応用生化学ユニット 岩崎智仁教授、薬剤感受性試験遂行にあたりご協力くださいました獣医細菌学ユニット 村田亮講師、臨床試験遂行にあたりご協力くださいました伴侶動物外科学ユニット 酒井俊和助教、大腸菌株の提供並びに臨床試験にてご協力くださいました猫のエリカに心より感謝申し上げます。

最後に本論文作成に対しまして種々のご協力頂きました獣医生化学ユニットの皆様、ならびに暖かいご支援をして下さったその他多くの方々に心より感謝致します。

引用文献

1. Ackermann,H.W. 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol.* 152:227-243.
2. Ackermann,H.W. 2009. Phage classification and characterization. *Methods Mol Biol.* 501:127-140.
3. Aminov,R.I. 2010. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol.* 1:134.
4. 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. *Appl Microbiol Biotechnol.* 103:2121-2131.
5. Bao,J., Wu,N., Zeng,Y., Chen,L., Li,L., Yang, L., Zhang,Y., Guo,M., Li,L., Li,J., Tan,D., Cheng,M., Gu,J., Qin,J., Liu,J., Li,S., Pan,G., Jin,X., Yao,B., Guo,X., Zhu,T. and Le,S. 2020. Non-active antibiotic and bacteriophage synergism to successfully treat recurrent urinary tract infection caused by extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect.* 9(1):771-774.
6. Bonilla, N. and Barr, J. J. 2018. Phage on Tap: A Quick and Efficient Protocol for the Preparation of Bacteriophage Laboratory Stocks. *Methods Mol Biol.* 1838:37-46.
7. Bull,J.J., Vimr,E.R. and Molineux,I.J. 2010. A tale of tails: Sialidase is key to success in a model of phage therapy against K1-capsulated *Escherichia coli*. *Virology.* 398(1):79-86.
8. Costa,P., Pereira,C., Gomes,A.T.P.C. and Almeida,A. 2019. Efficiency of Single Phage Suspensions and Phage Cocktail in the Inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: An In Vitro Preliminary Study. *Microorganisms.* 7(4):94.
9. El-Shibiny,A. and El-Sahhar,S. 2017. Bacteriophages: the possible solution to treat infections caused by pathogenic bacteria. *Can J Microbiol.* 62:865-879.
10. Fujiki,J., Higuchi,H. and Iwano,H. 2018. ファージセラピーの臨床応用と世界の動向— パターソン症例から THE CHEMICAL TIMES No.4 (通巻 250 号) 25-31

11. 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. *Appl Environ Microbiol.* 82:5332-5339.
12. Golkar,Z., Bagasra,O. and Pace,D.G. 2014. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries.* 8:129-136.
13. Gong,Q., Wang,X., Huang,H., Sun,Y., Qian,X., Xue,F., Ren,J., Dai,J. andTang,F. (2021) Novel Host Recognition Mechanism of the K1 Capsule-Specific Phage of Escherichia coli: Capsular Polysaccharide as the First Receptor and Lipopolysaccharide as the Secondary Receptor. *J Virol.* 95(18):e0092021.
14. Green,S.I., Kaelber,J.T.,Ma,L., Trautner,B.W., Ramig,R.F. and Maresso,A.W. (2017) Bacteriophages from ExPEC Reservoirs Kill Pandemic Multidrug-Resistant Strains of Clonal Group ST131 in Animal Models of Bacteremia. *Sci Rep.*7:46151.
15. Gu,J., Liu,X., Li,Y., Han,W., Lei,L., Yang,Y., Zhao,H., Gao,Y., Song,J., Sun,C. and Feng,X. 2012. A Method for Generation Phage Cocktail with Great Therapeutic Potential. *PLos One.* 7:e31698.
16. Gurney,J., Brown,S.P., Kaltz,O. and Hochberg,M,E. 2020. Steering Phages to Combat Bacterial Pathogens. *Trends Microbiol.* Feb;28(2):85-94.
17. Haines,M.E K., Hodges,F.E., Nale,J.Y., Mahony,J., Sinderen,D., Kaczorowska,J., Alrashid,B., Akter,M., Brown,N., Sauvageau,D., Sicheritz-Pontén,T., Thanki,A.M., Millard,A.D., Galyov,E.E. and Clokie,M.R J. 2021. Analysis of Selection Methods to Develop Novel Phage Therapy Cocktails Against Antimicrobial Resistant Clinical Isolates of Bacteria. *Front Microbiol.* 12:613529.
18. Jamalludeen,N., Johnoson,R.P., Shewen,P.E. and Gyles,C.L. 2009. Evaluation of bacteriophages for prevention and treatment of diarrhea due to experimental enterotoxigenic Escherichia coli O149 infection of pigs. *Vet.Microbiol.* 136:135-141.
19. Korf,I.H E., Meier-Kolthoff,J.P., Adriaenssens,E.M., Kropinski,A.M., Nimtz,M., Rohde,M., Raaij,M.J. and Wittmann,J. 2019. Still Something to Discover: Novel Insights into Escherichia coli Phage Diversity and Taxonomy. *Viruses.* 11(5):454.

20. Kropinski, A.M., Mazzocco, A., Waddell, T.E., Lingohr, E. and Johnson, R.P. 2009. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods Mol Biol.* 501:69-76
21. Lefkowitz, E.J., Dempsey, D.M., Hendrickson, R.C., Orton, R.J., Siddell, S.G. and Smith, D.B. 2018. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.* 46(D1):D708-D717.
22. León, M. and Bastías, R. 2015. Virulence reduction in bacteriophage resistant bacteria. *Front Microbiol.* 6:343.
23. Malik, S., Nehra, K. and Rana, J.S. 2021. Bacteriophage cocktail and phage antibiotic synergism as promising alternatives to conventional antibiotics for the control of multi-drug-resistant uropathogenic *Escherichia coli*. *Virus Res.* 302:198496
24. Mangalea, M.R. and Duerkop, B.A. 2020. Fitness Trade-Offs Resulting from Bacteriophage Resistance Potentiate Synergistic Antibacterial Strategies. *Infect Immun.* Jun 22;88:e00926-e01019.
25. Meier-Kolthoff, J.P. and Göker, M. 2017. VICTOR: genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses. *Bioinformatics.* 33(21):3396-3404.
26. Mirzaei, M.K. and Nilsson, A.S. 2015. Correction: Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. *PLoS One.* Mar 7;10(5):e0127606.
27. Nishino, K., Yamada, J., Hirakawa, H., Hirata, T. and Yamaguchi, A. 2003. Roles of TolC-Dependent Multidrug Transporters of *Escherichia coli* in Resistance to β -Lactams. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:3030-3033.
28. Pan, F., Wu, H., Liu, J., Ai, Y., Meng, X., Meng, R. and Meng, Q. 2013. Complete genome sequence of *Escherichia coli* O157:H7 lytic phage JL1. *Arch Virol.* 158(11):2429-32.
29. Rampacci, E., Bottinelli, M., Stefanetti, V., Hyatt, D.R., Sgariglia, E., Coletti, M. and Passamonti, F. 2018. Antimicrobial susceptibility survey on bacterial agents of canine and feline urinary tract infections: Weight of the empirical treatment. *J Glob Antimicrob Resist.* 13:192-196.

30. Rohde,C., Resch,G., Pirnay,J., Blasdel,B.G., Debarbieux,L., Gelman,D., Górski,A., Hazan,R., Huys,I., Kakabadze,E., Łobocka,M., Maestri,A., Almeida,G.M.F., Makalatia,K., Malik,D.J., Mašlaňová,I., Merabishvili,M., Pantucek,R., Rose,T., Štveráková,D., Raemdonck,H.V., Verbeken,G. and Chanishvili,N. 2018. Expert Opinion on Three Phage Therapy Related Topics: Bacterial Phage Resistance, Phage Training and Prophages in Bacterial Production Strains. *Viruses*. 10(4):178.
31. Saha D. and Mukherjee,R. 2019. Ameliorating the antimicrobial resistance crisis: phage therapy. *IUBMB Life*. 71:781-790.
32. Salazar,K.C., Ma,L., Green,S.I., Zulk,J.J., Trautner,B.W., Ramig,R.F., Clark,J.R., Terwilliger,A.L. and Maresso,A.W. 2021. Antiviral Resistance and Phage Counter Adaptation to Antibiotic-Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *mBio*. 12(2):e00211-21.
33. Schooley,R.T., Biswas.B., Gill,J.J., 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,R.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., Bishop-Lilly,K.A., Young,R. and Hamilton,T. 2017 Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 61:e00954-e01017.
34. Shaffer,R.K. 2013. The challenge of antibiotic-resistant *Staphylococcus*: lessons from hospital nurseries in the mid-20th century. *Yale J Biol Med*. 86:261-270.
35. Smith,H.W. and Huggins,M.B. 1982. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J Gen Microbiol*. 128(2):307-18.
36. Smith,H.W., Huggins,M.B. and Shaw,K.M. 1987. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *J Gen Microbiol*. 133(5):1111-26.

37. Summers,W.C. 2012. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage*. 2:130-133.
38. Tanji,Y., Shimada,T., Yoichi,M., Miyanaga,K., Hori,K. and Unno,H. 2004. Toward rational control of Escherichia coli O157:H7 by a phage cocktail. *Appl Microbiol Biotechnol*. 64:270-274.
39. Teichmann-Knorrn,S., Reese,S., Wolf,G., Hartmann,K. and Dorsch,R. 2018. Prevalence of feline urinary tract pathogens and antimicrobial resistance over five years. *Vet Rec*. 183(1):21.
40. Wattam,A.R., Davis,J.J., Assaf,R., Boisvert,S., Brettin,T., Bun,C., Conrad,N., Dietrich,E.M., Disz,T., Gabbard,J.L., Gerdes,S., Henry,C.S., Kenyon,R.W., Machi,D., Mao,C., Nordberg,E.K., Olsen,G.J., Murphy-Olson,D.E., Olson,R., OverbeekR., Parrello,B., Pusch,G.D., Shukla,M., Vonstein,V., Warren,A., Xia,F., Yoo,H. and Stevens,R.L. 2017. Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Res*. 45(D1):D535-D542.
41. WHO. Global action plan on AMR. 2016. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/>
42. アイペット損害保険株式会社 ペットの保険金請求の多い病傷のランキング 2021 | ペット保険ならアイペット損保 <https://www.ipet-ins.com/info/27775/>
43. アステラスメディカルネット 2020. バクテリオファージセラピーの現状と新しい可能性 (感染症 294 号)
44. 高麗寛紀 2013. 図解入門よくわかる微生物学の基本としくみ 株式会社秀和システム 東京.
45. 小野憲一郎, 今井壮一, 田川政弘, 安川明男, 土井邦雄 1998. イラストでみる 猫の病気 株式会社講談社 東京.
46. 全国動物保健看護系大学協会 カリキュラム検討委員会 (編) 2014. 動物看護学教育標準カリキュラム準拠 専門分野 臨床動物看護学 各論 株式会社インターズー 東京.

47. 竹村直行, イヌとネコの腎臓病・泌尿器病－丁寧な診断・治療を目指して－
Canine and Feline Nephrology and Urology, Second Edition 2015. 株式会社ファームプレス 東京.
48. 中村暢宏, 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
2021. 酪農学園大学獣医学群獣医学類 博士過程 博士論文