

## 学位論文要旨

### 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

酪農学園大学獣医学研究科

獣医保健看護学専攻修士課程

獣医生化学ユニット 大橋春香

薬剤耐性菌の問題は、人だけでなく伴侶動物においても大きな問題となっている。泌尿器疾患の多いネコに関して代表的なものの一つに膀胱炎がある。この病気の発症の主原因細菌は大腸菌であり、治療の際に用いられる抗生物質の不適切な使用により薬剤耐性化することで難治性となることが多い。この問題を改善するためにバクテリオファージ（ファージ）を利用したファージセラピーが近年注目されている。ファージは細菌に特異的に感染するウイルスであり、感染後、細菌内部で増殖し、最終的にファージ由来の溶菌酵素により細菌を死滅させる。本研究では大腸菌による難治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指し、新規ファージを分離し、その性状を明らかにすることを目的とした。

第 I 章では、多剤耐性大腸菌 ERIKA 株をターゲットとした新規ファージの分離とその性状を解析し、臨床試験を実施した。ERIKA 株と全国の汚水を用いて分離した 7 株のファージは、すべてミオウイルス科 (*Myoviridae*) に分類することができた。次に濁度測定法による 24 時間培養した時の経時的な溶菌の変化において、この分離されたファージをカクテル化した場合は、単独ファージの場合よりも細菌の増殖を抑えることができた。特にファージ( $\phi$ )24 と  $\phi$ 27 の組み合わせたカクテルファージでは 24 時間時点の最大増殖を Control 群の 6 割以下に抑えられていたことから、臨床試験にてこのカクテルファージを用いて治療効果を検証した。しかし、症状の改善は見られず、この要因のひとつは、ファージ耐性大腸菌が出現した可能性が示唆された。また、35 株の大腸菌臨床分離株に対して ERIKA 株から分離された 7 株のファージによる有効性を検証したが、35 株中 30 株では溶菌効果は見られなかった。この結果から膀胱炎由来大腸菌はファージ感染に対して菌株レベルで多様性があることが考えられ、

ファージセラピーを応用するには、ファージの多様性を担保していく必要があることが示唆された。

第Ⅱ章では、難治性尿路疾患に関する大腸菌に対する新規ファージを分離し、ファージの溶菌活性を精査し、受容体が異なるファージを組み合わせたファージカクテルの設計とその検証を行った。臨床分離株 4 株から分離されたファージは 12 株であり、その内 6 株を電子顕微鏡像にて確認し、すべてミオウイルス科 (*Myoviridae*) に分類することができた。また、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** で行い、6 株のファージは宿主域が特に広いことが明らかとなった。また作成したファージ耐性菌株 (mtF24、mtH27) に対し DNA 解析を行い、 $\phi$  ECud-F24 は OmpA を、 $\phi$  ECud-H27 は LPS をそれぞれ認識することがわかった。今回レセプターが明らかとなった  $\phi$  ECud-F24 と  $\phi$  ECud-H27、そして宿主域の広い  $\phi$  ECud-F28 と  $\phi$  ECud-H28-2 の 4 株のファージを合わせたカクテルファージ (カクテル 4) を設計し、ERIKA 株や臨床分離株に対しての有効性を検証した。その結果、カクテル 4 は ERIKA 株に対し溶菌効果が高いが、臨床分離株すべての株をカバーするには至らなかった。これには臨床分離株においてのファージ受容体、または細菌側の防御システム等が異なる可能性が示唆され、菌株レベルでかなりの多様性があることが示唆された。

本研究では伴侶動物における難治性尿路疾患由来多剤耐性大腸菌に有効なファージを分離し、性状解析によりある程度多様性のあるファージカクテル化を設計することができた。しかし、今回設計したカクテルでは多様な臨床分離株に対して十分な有効性を担保することは難しく、今後はさらなるファージの分離を試みる必要がある。そしてファージ耐性菌株の解析などを推し進めることにより、ファージ耐性化を見据えた戦略的なファージカクテル剤を構築していくことで、ファージセラピーへの実用化が切り拓くものと考えられる。