

令和元年6月12日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08050

研究課題名(和文) バクテリオファージを活用した鶏大腸菌症の制御法の構築

研究課題名(英文) Development of control strategies against avian colibacillosis using bacteriophages

研究代表者

村瀬 敏之 (Murase, Toshiyuki)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：20229983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：鶏の大腸菌症の抗菌薬に代わる新たな制御法として、細菌に感染したのちにそれを破壊(溶菌)するバクテリオファージ(以下、ファージ)を活用することが期待される。本研究では、環境中のファージを分離する際には温度条件が重要であること、複数のファージを組み合わせると多くの大腸菌株を溶菌できること、ファージを利用することにより、鶏舎を模した条件下の大腸菌の数を減じることや、大腸菌症の感染モデルにおいて病気を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

養鶏産業における課題のひとつである鶏大腸菌症の原因菌(APEC)は性状が多様であるほか、抗菌薬が効かない薬剤耐性菌が多いことが知られている。本研究において、環境中からファージを効率的に分離する条件を見出したため、多様なAPECを溶菌するファージを分離し、それらを組み合わせる利用することが可能となった。また、模擬的な鶏舎環境や感染モデルにおいてAPECを制御しうる成績が得られたことから、フィールドにおける応用に向けた検討が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Bacteriophages (phages) that lyse avian pathogenic Escherichia coli (APEC) can be used as a measure for controlling APEC as an alternative to antimicrobials. Results obtained in the present study are as follows: the temperature is important for isolation of phages from environmental samples; combination of multiple phage samples resulted in lysing APEC isolates with high heterogeneity; application of APEC-lytic phages reduced viable cell counts of APEC isolates in the condition imitating chicken farms; and the therapeutic effect of APEC-lytic phages on colibacillosis was found in an infectious model of this disease.

研究分野：獣医微生物学

キーワード：大腸菌 鶏 バクテリオファージ 鶏大腸菌症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鶏の大腸菌症は、呼吸器より侵入した大腸菌が急性の敗血症を起こすとともに、腸管外の全身諸臓器に病変を形成するほか、局所の感染を起こすこともある。この原因となった大腸菌を Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC)と呼んでいる。近年、わが国において薬剤耐性 APEC が分離されているので、抗菌薬によらない制御が必要である。また、研究代表者らは大腸菌症に罹患した鶏から分離された菌株の性状が極めて多様であることを報告してきた。

バクテリオファージ(ファージ)は細菌に感染するウイルスであり、菌体内で増殖し最終的に宿主菌(感染した菌)を破壊することによって菌体外に出て(溶菌)新たな細菌に感染する。APEC に感染するファージを活用することにより鶏大腸菌症の制御が期待される。このような研究は国外では数が少ないながらも実施されているが、国内では論文としての報告は無い。薬剤耐性の問題や正常菌叢への影響から、抗菌薬によらない細菌感染症の治療法としてファージの活用が見直されはじめています。

2. 研究の目的

APEC に特異的に感染するファージを分離し、溶菌性及び遺伝学的性状を明らかにすることとした。ファージの効率的な分離方法を確立する目的で、これらサンプルが存在する環境温度に着目し、ファージの分離を室温及び細菌の一般的な培養温度である 37 °C の 2 つの条件で比較することとした。環境中にファージが存在することは広く認識されているが、ファージに関する分類学上の知見が十分でないことから、環境から分離されたファージの遺伝情報を検討する必要がある。また、環境中における細菌との相互作用、また、そのファージに感受性のある細菌に感染した動物に与える影響に関する検討は十分に明らかではない。本研究では、鶏の大腸菌症という疾患を通じてこれらの疑問に対する答えを導くことを目的としている。特に、鶏舎を模した条件下及び感染モデルにおいて、ファージの APEC に対する効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) 環境材料からのファージ分離

下水処理場(8カ所: F, M, H, N, KH, S, C 及び A)から採取した下水をフィルター濾過し、大腸菌症例から分離された 6 株 (D353, D467, D429, D490, D488 及び D137) の APEC と混合して LB 培地に混合し、室温ないし 37 °C で培養した。培養液を遠心分離後、上清をフィルター濾過し、クロロホルム処理したサンプル(一次サンプル)について、それぞれの APEC 株に対する溶菌をスポットテストにより調べた。溶菌斑を認めた場合、ビルレントファージの存在を示す。

4 農場のプロイラー鶏舎内の異なる 20 カ所から採取した飲用水を出発材料とし、上記に準じて APEC を溶菌するファージを含有する一次サンプルを調製した。

(2) 溶菌スペクトルの評価

下水から得られた一次サンプルを、上記で用いた 6 株の APEC の個々の菌株と培養液とともに混合し、室温で培養した。培養液を遠心分離後、上清をフィルター濾過し、クロロホルム処理したサンプル(二次サンプル)について、これら 6 株の APEC を含む 40 株の APEC に対する溶菌をスポットテストにより検討した。さらに、二次サンプルを混合した場合の、上記 APEC (40 株) に対する溶菌をスポットテストにより検討した。

(3) 供試 APEC 株の細菌学的性状

供試 APEC 株の血清型、病原性関連遺伝子、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) パターン、薬剤感受性及び薬剤耐性遺伝子を解析し、これら菌株の特徴付けを行った。

(4) 鶏舎環境を模した条件における APEC に対するファージの有効性

下水から得られた二次サンプルを用いたスポットテストにおいて得られた溶菌斑からファージの純化を繰り返し、APEC 株 D137 及び D488 を、それぞれ溶菌するファージ株 C-137 及び C-488 を得た。APEC 株 D137 (3×10^4 CFU) を、ガラスシャーレに入れて滅菌済みの 4.5 cm 四方の濾紙の全面に滴下し、その直後に 10^8 PFU/ml のファージ液の 0.1 ml を濾紙全面に噴霧した。経時的に APEC の生菌数及びファージ力価を計測した。

(5) プロイラー農場由来ファージ株の遺伝学的性状及び電子顕微鏡観察

プロイラー鶏舎飲用水から得られた一次サンプルから上記の方法により二次サンプルを調製し、スポットテストにおいて得られた溶菌斑からファージの純化を繰り返し、最終的に 4 株のファージ株 (DF10, DF12, DF17 及び DF19) を得た。これらファージのゲノムサイズをパルスフィールドゲル電気泳動により解析するとともに、全ゲノム配列を次世代シーケンサー (Miseq) を用いて解析した。また、走査型電子顕微鏡による形態観察を行った。

(6) 発育鶏卵を用いた APEC 接種試験の有用性

本研究の実施以前に実験感染モデルとして鶏ひなに接種した APEC 株を用いて、発育鶏卵を用いた APEC 接種試験の有用性を検証した。すなわち、11 日齢ひなの気嚢内に接種した場合 24 時間以内に死亡させた D137 株と、接種後 7 日目までに死亡させることは無いが気嚢炎及び心膜炎の病変を形成した D445 株について、約 100 CFU の菌を 12 日齢の発育鶏卵に接種した後の死亡率を検討した。

(7) 発育鶏卵を用いた APEC 接種試験におけるファージの有効性

APEC の病原性を推定することが可能な発育鶏卵を用いた実験系で実施した。すなわち、12 日齢の発育鶏卵各 12 個に APEC 株 D488 及び D490(100-300 CFU)を接種した、また、D488 及び D490 株を溶菌するファージ株 DF17 及び DF10 を同時に接種した。接種 2 日後における鶏胚死亡率を評価した。接種 2 日後の生存卵における接種菌株の生存を確認するため、大腸菌を分離し PFGE に供した。これら菌株の鶏卵接種試験を実施した。また、生存卵から分離された大腸菌株に対するファージの溶菌活性及び吸着率を検討した。

4. 研究成果

(1) 環境材料からのファージ分離

室温及び 37℃ で調製した一次サンプルをスポットテストに供した。その結果、室温で処理したサンプルすべてが溶菌を起こし、そのうち 6 サンプルは 3 株以上の APEC で溶菌をみとめた(表 1)。37℃ で処理した場合は 5 サンプルで代々 2 株の APEC に溶菌を起こした。したがって、サンプル処理の温度がファージの分離効率に影響することが示唆された。

一農場(農場 A)の採取場所の異なる 2 サンプル及び他の一農場(農場 B)の 1 サンプルが APEC 株 D488 において、また、農場 B の前述とは採取場所が異なる 1 サンプルが APEC 株 D490 においてプラークを形成した。

(2) 溶菌スペクトルの評価

各一次サンプルを、一次サンプルが溶菌斑を形成した 1 株の APEC と混合し室温で培養して得られた二次サンプル(合計 25 サンプル)をスポットテストに供試した。各二次サンプルが溶菌斑を形成する APEC 株数は 0~11 株であった(表 2)。同じ下水に由来する二次サンプル、例えば下水 KH に由来する二次サンプルのうち、KH-467 により溶菌斑が形成された菌株数は 0 株であったが、KH-353 においては 5 株(D313、D353、D358、D387 及び D467)であった。このように、一次サンプルと混合した宿主菌株が異なると、得られた二次サンプルが溶菌斑を形成する APEC 株に差異を認めた。

表 1. 一次サンプル調製時の温度がファージ分離に与える影響

APEC	下水 F		M		H		N		KH		S		C		A	
	25C	37C	25C	37C	25C	37C	25C	37C	25C	37C	25C	37C	25C	37C	25C	37C
D137		+	+	+					+		+		+	+	+	+
D353	+		+		+		+		+		+		+			+
D467																
D429											+					
D490																+
D488	+		+		+						+		+	+	+	+

+、プラークの形成を示す

各二次サンプルを表 2 に示したとおり混合し、合計 13 サンプルのファージカクテルを調製して供試した。ファージカクテルにより溶菌斑が形成された APEC 株数は 3~19 株であり(表 2) 個々の二次サンプルにより溶菌斑が形成された菌株数に比べ、すべてのファージカクテルにおいて、溶菌される APEC 株の数が多かった。また、下水 KH に由来する二次サンプルを混合した cocktail KH は、12 株(D137、D313、D331、D338、D353、D358、D387、D415、D459、D467、D480 及び D514)において溶菌斑を形成したが、このうち 4 株(D338、D459、D480、D514)は、下水 KH に由来するいずれの二次サンプルによっても溶菌斑が形成されなかった株であった。このように、ファージカクテルを構成する個々の二次サンプルにおいては溶菌斑が形成されなかった菌株であっても、すべてのファージカクテルにおいて当該 APEC 株における溶菌斑の形成が観察された。したがって、宿主域の異なるファージを分離し、混合することが多様な APEC 株のコントロールを行う上で重要であると考えられる。

(3) 供試 APEC 株の細菌学的性状

表 2 に細菌学的性状を示した。血清型は O 抗原及び H 抗原ともに型別不能(Untypeable、UT)が 25 株であった。いずれかの血清型が決定したものは、O125:HUT が 4 株、O25:H4 が

3株、また、O1:H42, O125:H11, O125:H21, O125:H42, O153:HUT, OUT:H4, OUT:H21 及び OUT:H42 がそれぞれ1株であった。病原性関連遺伝子のうち *iss*, *iucD* 及び *cva* が半数以上において、他に *irp2*, *tsh*, *astA*, *papC* 及び *vat* が検出された。PFGEパターンにより23のタイプが認められた。半数以上の株がアンピシリン、セフトオフル、ジヒドロストレプトマイシン、オキシテトラサイクリン又はナリジクス酸に耐性を示した。セフトオフル耐性株においては基質拡張型 β -ラクタマーゼ耐性遺伝子として *bla*CTX-M-2, *bla*CTX-M-14, *bla*CTX-M-65 及び *bla*CMY-2 が認められた。

表2. 二次サンプル及びその混合物（ファージカクテル）による APEC 株の溶菌の例示

APEC	血清型	PFGE パターン	二次サンプル									ファージ カクテル						
			KH-137	KH-353	KH-467	KH-488	S-137	S-353	S-429	S-488	C-137	C-353	C-488	KH	S	C	S-137+ KH353	C-488+ KH353
D137	O6:HUT	A1	+				+	+			+	+	+	+	+	+	+	+
D308	O25:H4	P2						+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
D413	O25:H4	P2						+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
D488	O25:H4	P2							+	+	+				+	+	#	#
D313	O125:HUT	P3		+													+	+
D338	O125:HUT	P3												+			+	+
D387	UT	P3		+										+			+	+
D480	UT	P3												#			#	#
D514	UT	P3												#			#	#
D315	UT	P4																
D317	UT	P5								+	+				+			
D323	UT	P6																
D340	UT	P6																
D360	UT	P6																
D383	UT	P6																
D510	UT	P6																
D331	O125:HUT	P8	+							+	+	+	+		+	+	#	+
D335	UT	P9						+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
D352	OUT:H21	P11																
D353	UT	P12		+		+		+	+				+	+	+	+	+	+
D348	UT	P14											+	+				
D356	UT	P14																
D381	UT	P14																
D391	UT	P14																
D419	UT	P14																
D478	UT	P14																
D490	UT	P14																
D358	O125:H21	P15		+						+	+	+	+		+	+		+
D377	O125:H42	P18																
D407	UT	P21													#	#		
D415	OUT:H42	P22	+					+			+	+	+		+	+		+
D459	O1:H42	P22									+	+	+		#	#	+	#
D423	UT	P23																
D429	UT	P24								+					+			
D467	O125:HUT	P27		+											+		+	+
D471	O125:H11	P28																
D482	OUT:H4	P29																
D496	O153:HUT	P31																
D512	UT	P32									+					+		+
D518	UT	P33									+	+	+			+		+

ファージカクテルの名称及び混合方法は以下の通り：

- ・アルファベットの、各下水から調製された一次サンプルを混合したことを示す
- ・算用数字は、各 APEC 株を溶菌した一次サンプルを混合したことを示す
- ・S-137+ KH-353 及び C-488+KH-353 は、それぞれ、二次サンプルを混合したことを示す

+, プラークの形成を示す

#, 当該ファージカクテルを構成する個々の二次サンプルではプラークが形成されなかったことを示す

(4) 鶏舎環境を模した条件における APEC に対するファージの有効性

供試菌株 D137 の接種後に本菌株を溶菌する C-137 を噴霧した群では、24 時間後の生菌数は $1.5 \times 10^6 \pm 1.7 \times 10^6$ (CFU/sheet) であり、ファージを噴霧しない対照の $4.7 \times 10^8 \pm 6.4 \times 10^7$ に比べ有意に ($P < 0.05$) 少なかった。一方、48 時間及び 72 時間後の生菌数は、C-137 を噴霧した群で $4.9 \times 10^8 \pm 2.8 \times 10^8$ 及び $1.4 \times 10^8 \pm 1.8 \times 10^8$ 、D137 を溶菌しない C-488 を噴霧した群で $3.7 \times 10^8 \pm 3.8 \times 10^7$ 及び $4.4 \times 10^8 \pm 5.4 \times 10^7$ 、ファージを噴霧しない対照で $5.0 \times 10^8 \pm 4.0 \times 10^7$ 及び $4.4 \times 10^8 \pm 8.3 \times 10^7$ であり、いずれの時点においても、群間に有意な差はなかった。

D137 を接種後に C-137 を噴霧した群では、ファージ力価は接種後 0 時間で $1.6 \times 10^6 \pm 8.6 \times 10^5$ (PFU/sheet) であったのに対し、24 時間後では $1.0 \times 10^8 \pm 2.4 \times 10^7$ と有意に ($P < 0.05$) 高い値であった。48 時間及び 72 時間後のファージ力価は $1.0 \times 10^9 \pm 6.3 \times 10^8$ 及び $1.1 \times 10^{11} \pm 8.8 \times 10^9$ と接種後 0 時間に比べて高い傾向にあった。一方、D137 を接種しない対照では接種後 0 時間の C-137 のファージ力価は $4.1 \times 10^6 \pm 7.9 \times 10^5$ であったのに対し、24 時間、48 時間及び 72 時間後でそれぞれ $1.3 \times 10^6 \pm 4.6 \times 10^5$ 、 $9.6 \times 10^5 \pm 3.2 \times 10^5$ 及び $1.0 \times 10^6 \pm 9.0 \times 10^4$ と接種後 0 時間に比べて有意に ($P < 0.05$) 低い値であった。D137 を接種後に C-488 を噴霧した群では、接種後 0 時間のファージ力価に対する、24 時間から 72 時間後までの力価に有意な差は見られなかった。

このように、鶏舎を模した疑似的環境では、ファージが APEC の増殖を制御できる可能性が示唆された。すなわち、濾紙上に接種した APEC D137 株の 24 時間後の生菌数は、D137 を溶菌するファージ株 C-137 を噴霧した群において、接種しない対照に比べ有意に少なかった。さらに、この時点におけるファージ力価は接種後 0 時間と比べて有意に高い値であったことから、濾紙上で C-137 が増殖するとともに APEC を溶菌したと考えられる。したがって、環境中において宿主となる APEC が存在する場合、これを溶菌するファージの感染及び増殖が起こり、結果として APEC の増殖を抑制するものと考えられた。また、宿主菌が存在しない場合、環境中のファージ力価は減少するか、環境条件によっては維持される可能性が示唆された。

(5) プロイラー農場由来ファージ株の遺伝学的性状及び電子顕微鏡観察

純化により、D488 においてプラークを形成したファージ株 DF10 及び DF12 (A 農場由来) 及び DF19 (B 農場由来) 並びに、D490 においてプラークを形成した DF17 (B 農場由来) の 4 株を得た。

ファージ株のゲノム DNA の PFGE により観察されたバンドを、分子量マーカーと比較した結果、DF10、DF12 及び DF19 のゲノムサイズは 264kb、また、DF17 は 56kb であると推定された。

供試したいずれのファージもエンベロープが観察されなかった。DF10 は、直径 50nm で正二十面体構造の頭部、並びに、長さ 58nm で鞘状構造物に覆われた尾部が観察された。DF12 は、直径 88nm で正二十面体構造の頭部、並びに、長さ 73nm で鞘状構造物に覆われた尾部が観察された。DF19 は、直径 85nm で正二十面体構造の頭部、並びに、長さ 70nm で鞘状構造物に覆われた尾部が観察された。DF17 は、直径 61nm で正二十面体構造の頭部、並びに、長さ 16nm の尾部が観察された。

DF10、DF12、DF17 及び DF19 について、それぞれ 5870678、8195662、11245875 及び 1851061 リードからアセンブルした結果、DF10、DF12 及び DF19 からは 128 ~ 178 個の、DF17 からは約 73kb の長さを含む 54 個のコンティグが得られた。それぞれを BLAST サーチにて相同配列を検索したが、ヒットした配列はバクテリアゲノムの一部であり、これまでに報告されている大腸菌ファージのゲノム配列と一致するものは検出されなかった。形態学的に特定されたファージ科に属するファージゲノム特異的な領域を推定し、ファージの基本コンポーネントを特定することが必要と考えられた。

(6) 発育鶏卵を用いた APEC 接種試験の有用性

心膜炎及び肝被膜炎を呈した産卵鶏から分離された APEC 株 D137 を 12 日齢の発育鶏卵に接種し 2 日後の死亡率は 92% であり、本菌株を 11 日齢ひなの気嚢内に接種した場合 24 時間以内に死亡させた。卵管炎を呈した産卵鶏から分離された D445 株を発育鶏卵に接種したところ死亡率は 17% であり、本菌株をひなに接種した場合 7 日目までに死亡させることは無いが気嚢炎及び心膜炎の病変を形成した。したがって、APEC は菌株により病態発現機序が異なることが示唆された。

(7) 発育鶏を用いた APEC 接種試験におけるファージの有効性

12 日齢の発育鶏卵に APEC 株 D490 を接種し、その 2 日後における発育鶏卵の死亡率は 39% であったのに対し、D490 を溶菌するファージ株 DF17 を D490 株と同時に接種した場合の発育鶏卵の死亡率は 13% であった。したがって、ファージ接種により鶏胚の防御効果を認めたと考えられたが、生存卵の漿尿液から接種菌株 (D490) と同一の PFGE 電気泳動パターンを示す菌株 (D490-DF17) が分離された。DF17 は本菌株に溶菌活性を示さず、吸着率 (43%) は親株 D490 (96%) の 0.45 倍と低値を示した。したがって、D490 から派生した D490-DF17 はファージ株 DF-17 の吸着を阻害する機構あるいは菌体内に注入された DF17 のゲノムを排除する機構により耐性を獲得した可能性が示唆された。D490 から派生した D490-DF17 を発育鶏卵に接種したところ死亡率は 17% であり、D490 株のみを接種した場合 (上述) よりも低値であったことから、病原性が低下していることが明らかとなった。

APEC 株 D488 を接種し、その 2 日後における発育鶏卵の死亡率は 39% であったのに対し、D490 を溶菌するファージ株 DF17 を D490 株と同時に接種した場合の発育鶏卵の死亡率は 17% であった。APEC 株 D488 を溶菌するファージ株 DF10 を D488 株と同時に発育鶏卵に接種した場合の生存卵からも、D488 から派生した菌株 (D488-DF10) が分離された。しかし、これに対するファージ DF10 の溶菌活性が認められるとともに吸着率 (84%) は親株の D488

に対する値（80％）と差が無かった。また、D488-DF10 の発育鶏卵接種試験における死亡率は D488 と同程度であった。このことから、D488-DF10 にはファージ耐性の獲得や病原性に係る表現型の変化が生じていないと考えられた。したがって、D488 を溶菌するファージ株 DF10 を D488 株と同時に発育鶏卵に接種した場合における鶏胚死亡の抑制に係る要因を明らかにすることが、本モデルにおけるファージの有効性の理解につながると考えられた。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Ozaki H, Yonehara K, and Murase T. Virulence of *Escherichia coli* isolates obtained from layer chickens with colibacillosis associated with pericarditis, perihepatitis, and salpingitis in experimentally infected chicks and embryonated eggs. *Avian Diseases*. 査読有. 62 巻, 2018 年, 233-236. DOI: 10.1637/11685-060717-ResNote.1

(2) Ozaki H., Matsuoka Y., Nakagawa E., and Murase T. Characteristics of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with colibacillosis in commercial farms from a common hatchery. *Poultry Science*. 査読有. 96 巻, 2017 年, 3717-3724. DOI: 10.3382/ps/pex167

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 尾崎 弘一、関原 雄大、村瀬 敏之 .発育鶏卵に接種した Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) のバクテリオファージによる病原性抑制効果 . 第 161 回日本獣医学会学術集会, 2018 年.

(2) 尾崎 弘一、中村 あさひ、村瀬 敏之 . Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) を溶菌するバクテリオファージの分離条件の検討 . 第 160 回日本獣医学会学術集会, 2017 年.

(3) 尾崎 弘一、関原 雄大、村瀬 敏之 . 鶏飼養農場からのバクテリオファージの分離と性状解析 . 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016 年.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。