

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06419

研究課題名(和文) バクテリオファージを活用した大腸菌症の予防対策に関する研究

研究課題名(英文) Development of prevention method for Colibacillosis applying bacteriophage

研究代表者

尾崎 弘一 (OZAKI, Hiroichi)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：80396332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：鶏飼養農場の敷料から大腸菌集団、各農場の鶏の飲用水からバクテリオファージを分離した。分離したファージサンプルを噴霧すると同一農場で採取された大腸菌集団とファージの組み合わせで溶菌効率が高い傾向が認められた。次にセフトキシム耐性を付与するblaCTX-Mに対する相補的短鎖RNA発現系を構築した。セフトキシム耐性大腸菌にこの発現系を導入したところ、性状が感受性と変化した。またこの発現系をM13ファージの感染によりセフトキシム耐性大腸菌導入したところ、薬剤存在下で菌の発育は抑制された。本課題の相補的短鎖RNA発現系を導入できれば従前の薬剤を用いて病原菌の制御が可能となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題により飼養農場に存在するファージを用いることでその農場の大腸菌集団の数を減少させる効果があることが明らかとなった。またその効果は農場ごとに固有となる傾向が認められたことから薬剤ではなく農場の材料で疾病の発生リスクを減少させる可能性を見出した。相補的短鎖RNA発現系を導入した菌は耐性であった菌を再び感受性化し、これまで開発された薬剤を再度使用可能とすることを見出した。薬剤のみに頼らず、ファージを用いた飼養管理ならびに薬剤への再感受性化といった複数の方策を併用することにより包括的に鶏大腸菌症を制御することが可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)： In our project, we obtained mixed E. coli isolates from bedding samples on three chicken farms. Simultaneously mixed bacteriophages in the chicken drinking water were amplified using the mixed E. coli isolates as their hosts. The amplified bacteriophages were splayed on the plates where the mixed E. coli were spread. The mixed bacteriophages lysed mixed E. coli from an identical chicken farm at a higher rate. It indicates that each chicken farm's combination of E. coli and bacteriophage seems peculiar.

We constructed the plasmids that express complementarily small RNA against the blaCTX-M gene, giving cephalosporin resistance to bacteria. The susceptibility tests showed that the resistance trait of cephalosporin resistant E. coli was changed into susceptible. Furthermore, these express systems could deliver via M13 bacteriophage infection. The results indicate the possibility that the past antibiotics will be usable again.

研究分野：獣医学

キーワード：大腸菌症 バクテリオファージ 薬剤耐性菌 相補的短鎖RNA

1. 研究開始当初の背景

鶏大腸菌症は Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) により引き起こされる鶏の細菌感染症である。近年では多様な血清型の大腸菌感染によっても発症が認められている。肉用鶏での発生が主である一方、近年ではケージで飼養される採卵鶏での発生も報告されている。この疾病による経済的損失は甚大であり、食鳥処理場における問題の 1、2 位を争う状態である。抗生物質による化学療法はこの疾病の制御に大いに貢献してきた。一方で、昨今の発症例では多剤耐性を獲得した原因菌が多数を占めており、問題はさらに深刻化している。

ファージの実用化にあたり、これまではビルレントファージが着目されてきた。しかし先述の通り、ファージと宿主菌の関係は厳密で、対象とする標的菌に適合する特異的なファージを即座に準備することは未だ難しいと考えられる。そこで従来の抗生物質が再度効果を発揮するように薬剤耐性因子を抑制することができれば従前の化学療法とファージを用いた方法を併用できると考えられる。ファージに相補的短鎖 RNA 発現系を運ばせ、標的菌に導入することができればファージによる溶菌、ファージによる環境中の病原菌の減少、さらには薬剤耐性菌の再感受性化による化学療法と 3 方向から本疾病に対処することが可能となる。

2. 研究の目的

使用可能な抗菌薬の選択肢が狭まる問題を克服するため、本研究では鶏飼養農場の敷料中に存在する大腸菌ならびにその大腸菌を宿主とするバクテリオファージを鶏の飲水中より採取し、各農場に存在する集団としての大腸菌を減少させる効果を検証する。また近年問題となっている基質拡張型セファロスポリンを産生する病原菌に対し、*bla*_{CTX-M-2} 遺伝子特異的な相補的短鎖 RNA によって、薬剤に耐性化した大腸菌を薬剤に対して感受性化できるかを検証した。さらに飼養農場での使用を想定し、M13 ファージを用いた相補的短鎖 RNA 発現系の菌体への導入を検討した。

3. 研究の方法

(1) 鶏舎由来サンプルからの大腸菌集団・ファージの分離

西日本 3 か所の農場(SRF、MWF 及び KMDF)において、1 か所につき交換前敷料 1 サンプルと鶏の飲用容器内の交換前飲用水 5 サンプルを採取した。ここから大腸菌集団ならびにファージサンプルを調製した。以下の実験に供するファージサンプルとした。スポットテストならびにプラークアッセイにてファージの存在ならびに力価を確認した。ファージサンプルの名称は各農場について飲水サンプル 5 種類ずつあるため、「農場名④」～「農場名⑤」と表記した。

(2) 噴霧試験

3 農場の飲用水由来ファージサンプルのうち、SRF③および④ではスポットテストで溶菌斑が確認されなかったため用いなかった。残りの 13 ファージサンプルについて噴霧試験を実施した。大腸菌集団のサンプルを LB 寒天平板に画線し、37°Cで一晩培養した。10²CFU/0.1mL に調整した大腸菌集団 LB 寒天平板に塗布した。ファージの力価を 1.0×10⁷PFU/0.1mL に調整し小型スプレーを用いて菌を塗布した平板に 2 または 4 回噴霧した。ファージ噴霧後のシャーレを 25°Cで一晩培養し、発育した菌数を計数し、平均溶菌効率(%)を算出した。

(3) ESBL 産生大腸菌モデルの構築

*bla*_{CTX-M-2} を保有する D404 株、*bla*_{CTX-M-14} を保有する D1047 株、*bla*_{CTX-M-15} を保有する D1633 株から *bla*_{CTX-M} とそのすぐ上流に存在する *ISEcp1* とプロモーター領域を PCR 増幅した。これらを pMW219 に挿入した (*ISEcp1*-*CTXM2*/pMW219、*ISEcp1*-*CTXM14*/pMW219、及び *ISEcp1*-*CTXM15*/pMW219)。結合したプラスミドで DH5α、及び JM109 を形質転換した。

(4) 相補的短鎖 RNA 発現プラスミドの構築

相補的短鎖 RNA の発現には pUC119 プラスミドを使用した。相補的短鎖 RNA として Suzuki らの報告[Suzuki *et al.*, 2020]を参考に *bla*_{CTX-M-2} の mRNA に対する標的部として、以下に示す 24ヌクレオチドからなる領域を選

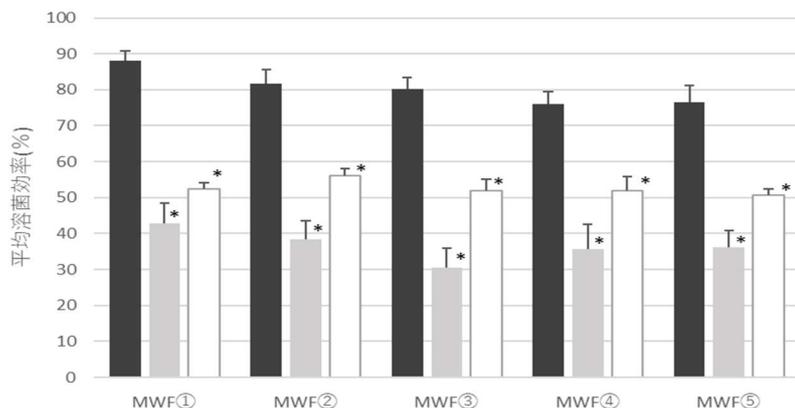


図3. 農場 MWF 由来のファージを用いた噴霧試験における溶菌効率

農場 MWF(■)、SRF(■)及び KMDF(□)由来大腸菌集団(それぞれ 10^2 CFU)を塗布した LB 寒天平板に、各ファージサンプルを 2 回噴霧した。

*は、農場 MWF 由来大腸菌における溶菌効率との間に有意差があることを示す($p < 0.05$)。

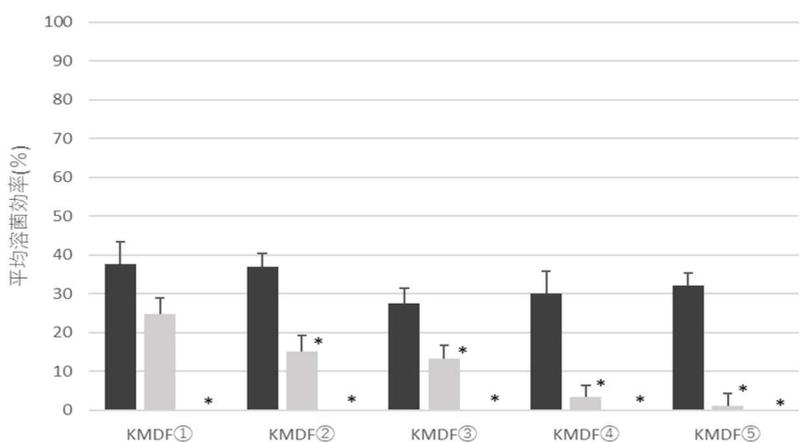


図4. 農場 KMDF 由来のファージを用いた噴霧試験における溶菌効率

農場 KMDF(■)、SRF(■)及び MWF(□)由来大腸菌集団(それぞれ 10^2 CFU)を塗布した LB 寒天平板に、各ファージサンプルを 2 回噴霧した。

*は、農場 KMDF 由来大腸菌における溶菌効率との間に有意差があることを示す($p < 0.05$)。

(2) 薬剤感受性試験

ISEcp1-CTXM2/pMW219 を導入した DH5 α が CTX に耐性であることを確認するため、薬剤感受性試験を行った(表1)。ISEcp1-CTXM2/pMW219 導入株における CTX ディスクに対する阻止円が 18 mm であった。また CTX の MIC は 32 μ g/ml であった。この結果からプラスミドを導入した菌は CTX になっていることが確認された。

先述の ISEcp1-CTXM2/pMW219 導入株に相補的短鎖 RNA 発現プラスミドまたは対照のプラスミドを導入した株において阻止円の直径はそれぞれ as-A: 27mm、as-B: 30mm、as-C: 29mm となり、ISEcp1-CTXM2/pMW219 のみを導入した株と比べて 9-12mm の拡大が認められた(表2)。また CTX の MIC はいずれの発現系導入株も 2 μ g/ml と 1/16 に低下しており、発現した短鎖 RNA 配列間に起因する感受性化の程度に差は認められなかった。対照のプラスミドを導入した株では ISEcp1-CTXM2/pMW219 のみを導入した株と同様の成績であった。以上の成績から相補的短鎖 RNA 発現プラスミドの導入により、CTX-M-2 産生株が CTX に対し感受性化することが示された。次に構築した相補的短鎖 RNA 発現系と遺伝的にグループの異なる bla_{CTX-M} 遺伝子との交差反応性を検証した(表3)。CTX-M-2 とは別のグループに属する CTX-M 産生株として作出した CTX-M-14 産生株、及び CTX-M-15 産生株に対照のプラスミドを導入した結果、いずれの株も CTX に対して耐性を示した。次に相補的短鎖 RNA 発現系を導入したところ、CTX-M-14 産生株ではいずれの相補的短鎖 RNA 発現系導入株においても阻止円直径の変化は 1~2 mm の縮小に留まった。MIC は as-A、及び as-B 導入株は対照と比べ変化は認められなかったが、as-C 導入株における MIC は対照と比べ 1/2 に減少した。いずれの相補的短鎖 RNA 発現系導入した CTX-M-15 産生株でも、阻止円直径は 1 mm の縮小に留まり、MIC は変化しなかった。as-B ならびに as-C のような $bla_{CTX-M-2}$ の翻訳開始領域を含む相補的短鎖 RNA の導入ではグループの異なる CTX-M 産生株は CTX に対して感受性化しなかった。

表1. CTX-M-2 産生 DH5 α 株の薬剤感受性試験

薬剤	阻止円(mm)	MIC(μ g/ml)
CTX	18	32

表2. 相補的短鎖 RNA 発現系導入 CTX-M-2 産生 DH5 α 株の薬剤感受性試験

導入したベクター	阻止円(mm)	MIC(μ g/ml)
pUC119-T1T2	18	32
as-A/ pUC119-T1T2	27	2
as-B/ pUC119-T1T2	30	2
as-C/ pUC119-T1T2	29	2

表3. 相補的短鎖 RNA 発現系導入 CTX-M-14 産生株、及び CTX-M15 産生株の薬剤感受性試験

菌株	導入したベクター	阻止円(mm)	MIC(μ g/ml)
CTX-M-14 産生株	pUC119-T1T2	18	32
	as-A/ pUC119-T1T2	17	32
	as-B/ pUC119-T1T2	17	32
	as-C/ pUC119-T1T2	16	16
CTX-M-15 産生株	pUC119-T1T2	17	32
	as-A/ pUC119-T1T2	16	32
	as-B/ pUC119-T1T2	16	32
	as-C/ pUC119-T1T2	16	32

(3) レスキューファージによる薬剤感受性化の評価

この度得られたレスキューファージを 10 倍希釈し、ISEcp1-CTXM2/pMW219 を導入した JM109 株にそれぞれ感染させた。10⁵ cfu/ml に調整したレスキューファージ感染菌を 4 μ g/ml の CTX を添加したミューラーヒントン培地で培養し、経時的に生菌数を計測した(図5)。as-A、as-B または as-C を発現するレスキューファージが感染した株は、いずれも非感染株に比べ、検出限界を超える生菌数に達するまでの時間が 2 時間遅く、13 時間後の菌数も対照に比して低値を示した。

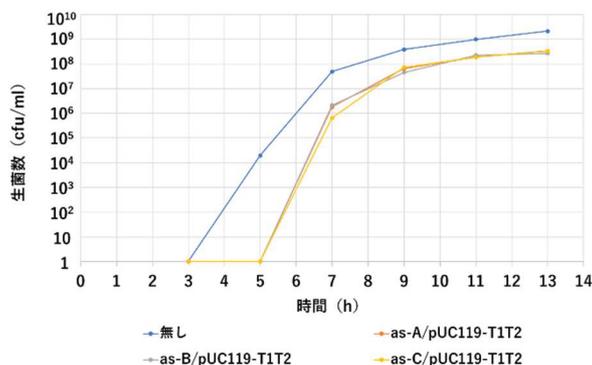


図5. レスキューファージ感染 CTX-M-2 産生株の増殖曲線

レスキューファージ感染菌を CTX(4 μ g/ml)を添加したミューラーヒントンブロスに接種した(10⁵ cfu/ml)。培養開始 3 時間後から 2 時間毎にサンプルを採取し、生菌数を計測した。青：CTX-M-2 産生菌の増殖期曲線、オレンジ：as-A 発現系導入 CTX-M-2 産生菌の増殖期曲線、グレー：as-B 発現系導入 CTX-M-2 産生菌の増殖期曲線、黄色：as-C 発現系導入 CTX-M-2 産生菌の増殖期曲線

* 引用文献

CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fourteenth Information Supplement, 2004. M100-S14, Vol.24, 32, 35

Readman JB, Dickson G, Coldham NG. Translational Inhibition of CTX-M Extended Spectrum β -Lactamase in Clinical Strains of Escherichia coli by Synthetic Antisense Oligonucleotides Partially Restores Sensitivity to Cefotaxime. 2016. Front Microbiol. 7:373.

Suzuki Y, Ishimoto T, Fujita S, Kiryu S, Wada M, Akatsuka T, Saito M, Kawano M. Antimicrobial antisense RNA delivery to F-pili producing multidrug-resistant bacteria via a genetically engineered bacteriophage. 2020. Biochem Biophys Res Commun. 530:533-540.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾崎弘一、西川永真、村瀬敏之
2. 発表標題 プラスミドから供給される相補鎖sRNAによるセフトキシム耐性菌の感受性化
3. 学会等名 第164回日本獣医学会 学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾崎弘一、伊藤榛香、村瀬敏之
2. 発表標題 環境分離ファージの噴霧による環境中Avian pathogenic Escherichia coli (APEC) の減少効果
3. 学会等名 第163回日本獣医学会 学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------