

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10756

研究課題名(和文) バクテリオファージの溶菌活性を利用した慢性中耳炎の新規治療法確立のための基礎研究

研究課題名(英文) Basic research to establish Bacteriophage treatment for chronic otitis media as a novel treatment strategies using the activity of bacteriolysis

研究代表者

小森 正博 (Komori, Masahiro)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師

研究者番号：30565742

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)：ファージは細菌のみに特異的に感染し、これを破壊するウイルスである。それぞれの宿主菌に特異的なファージが存在し、常在細菌叢やヒトの細胞には感染しない。よって、宿主菌が死滅すればファージも死滅する。また、薬剤耐性の影響は受けず、バイオフィルムも破壊するとされる。慢性中耳炎に対するファージの安全性を明らかにする目的にて研究を行った。

経外耳道的に黄色ブドウ球菌ならびにファージを投与した。予想されたより高濃度の菌量が必要であったが、ファージにて炎症が消退した。体調不良例や死亡例や内耳障害が疑われた例は認められなかった。ファージ治療の有用性は示されたが、耳毒性についてはさらに検討が必要と考えられ

研究成果の概要(英文)：Bacteriophage is a virus which infects to bacterium and breaks them. Since having specificity to host bacterium, bacteriophage never infects to the indigenous bacterium and human cells. Thus, when host bacterium disappears, the bacteriophage becomes extinct. In addition, it does not have tolerance to antibiotics and also breaks the biofilms of bacterium.

This study aimed to confirm the efficacy and safety on the treatments for chronic otitis media. Staphylococcus aureus and/or bacteriophage were injected into the middle ear cavity. Although their concentration to work was much higher than expected, the inflammation disappeared by the bacteriophage treatment. No mice with bad condition, death and doubted inner ear damages were found. The study indicated the bacteriophage is effective for the treatments to the otitis media, however, further studies will be required for the toxicity.

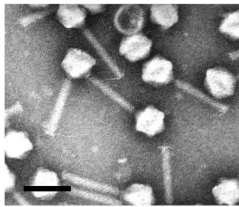
研究分野：MRSA

キーワード：ファージ療法

1. 研究開始当初の背景

ファージは細菌のみに特異的に感染し、これを破壊するウイルスである。それぞれの宿主菌に特異的なファージが存在し、常在細菌叢やヒトの細胞には感染しない。よって、宿主菌が死滅すればファージも死滅する。また、薬剤耐性の影響は受けず、バイオフィルムも破壊するとされる。ファージの溶菌活性と特異性を利用した細菌感染症治療法の総称をファージ療法という。

【ファージの電子顕微鏡写真】



頭部の直径は $62.5 \pm 2.5 \text{ nm}$ 、尾の長さは $124.2 \pm 3.4 \text{ nm}$ である。(スケール・バー: 100 nm)

Fukuda et al. PLoS One 2012

ファージの感染症治療への応用は1920年代、対黄色ブドウ球菌・対赤痢菌から始まった。1940年代にペニシリンが出現し、ファージの治療効果はそれと同等とされたが、広い抗菌スペクトルを有する抗生物質の使い易さに及ばず、西側諸国において一旦放棄された。1980年代、耐性菌の出現により再びファージ療法が注目されたが、1990年代に入って薬剤耐性遺伝子を運ぶファージが存在することや、0-157のようにそれに感染していたファージが毒素を出して病原性を示すことが明らかとなり、治療に最適で安全なファージを選別していくためにファージのゲノム解析が必須となった (Krylov V. Genetika 2001)。ここ数年、ゲノム解析にて安全性が確立されたファージを用いた研究が報告されている。米国に於いて、リステリア菌感染症予防のためのファージが食品添加物としてFDAに認可された。ベルギー、フランス、スイスは火傷後の感染 (<http://www.phagoburn.eu/>) に、米国では

下肢潰瘍に対する臨床研究が行われている。

一方、耳科領域では、2009年、イギリスにて緑膿菌による難治性のヒト慢性中耳炎12例にファージを点耳し有効性83%と報告された (Wright et al. Clin Otolaryngol)。しかし、本ファージは毒素を出すものか否かを調べられておらず、幸いにも聴力悪化例はなかったが、安全性が確立されていないファージを臨床応用することは避けるべきである。今後、ゲノム解析にて安全性が確立されたファージを用いた新しいファージ療法が期待されている。

2. 研究の目的

ファージの動態を考慮した投与経路、ファージの治療効果、内耳や中耳に対するファージ投与の安全性を明らかにすることを目的に本研究を行う。

3. 研究の方法

投与濃度の決定時には6週齢のBalb/cマウスを用いた。その後、鼓膜の観察を容易にするために、CD-1マウスへ変更した。



マウス深麻酔下に、0.1%キシロカイン (100万倍エピネフリン) にて局所麻酔

を行い、鼓膜の観察が容易になるように左図の赤線如く皮膚切開を加えた。また、4%キシロカインを外耳道内に注入し鼓膜麻酔も行った。次に、手術用顕微鏡下に26Gの注射針と1mLシリンジを用いて、経外耳道的に黄色ブドウ球菌あるいはファージにてマウスの鼓室内を満たした。処置後、体調不良例や死亡例がないことを観察し、3、5日目に鼓膜の観察を行った。

4. 研究成果

中耳炎モデルの作製(4匹ずつ)
黄色ブドウ球菌 $5 \times 10^9 \text{ cells/mL}$

希釈倍率	中耳炎	死亡
X10	2 匹 (+) OMA	(-)
X100	2 匹 (±) OME	(-)
X1,000	(-)	(-)
X10,000	(-)	(-)

中耳炎治療モデル

左耳：黄色ブドウ球菌 5x10⁹cells/mL

右耳：黄色ブドウ球菌 2.5x10⁹cells/mL + ファージ 5x10¹¹cells/mL

左	中耳炎モデル	右	治療モデル
	OMA		(-)
	OMA		OMA
	(-)		OMA
	(-)		(-)

シャム手術例 4 匹：すべて両耳 (-)

最終的なモデル

左耳：黄色ブドウ球菌 1.9x10¹⁰cells/mL+生食

右耳：黄色ブドウ球菌 1.9x10¹⁰cells/mL + ファージ 1.2x10¹²cells/mL

左	中耳炎モデル	右	治療モデル
6 匹	OMA	6 匹	(-)
	1 匹	両耳	OME

体調不良ならびに死亡例 (-)

考察

2014 年 3 学会合同抗菌薬感受性サーベイランスでは、慢性中耳炎は 50%が重症例であり、重症化に伴い黄色ブドウ球菌の比率が増加し、重症例の 47% (うち MRSA 32%) を占めた。全国的に耐性菌による慢性中耳炎の治療に難渋していることは明らかである。日常診療において、MRSA 感染にて保存的治療に抵抗し、外科的治療を行っても感染の制御が困難な症例をしばしば経験する。最近の当科の検討では、バンコマイシンの 55%(6/11)、リネゾイドの 45%(5/11)に MIC 値が感受性判定の境界値 (2µg/ml) にあり、薬剤耐性化

の進行を危惧している。また、患者の高齢化に伴う腎機能の低下から抗 MRSA 薬の使用を憂慮する症例が増えている。よって、既存の抗菌薬に代わる新たな治療法の開発も必要であると考えた。

本研究では、本学が保持している黄色ブドウ球菌にて、中耳炎マウスモデルが作製できることが示された。肺炎モデルでは、免疫抑制剤と併用することにより肺炎モデルが作製された (Takemura-Uchiyama, et al.

Microbes Infect 2014)。免疫抑制剤は用いられなかったが、鼓室内に投与された本菌株の濃度は 1.9x10¹⁰cells/mL と予想したよりも高濃度であった。本中耳炎マウスモデルにおいて、投与されたファージは有効であることも明らかにされた。一方、体調不良例や死亡例は認められなかった。飼育中の状況から内耳障害が疑われた例もなかった。

今後、菌株を変更することや、菌株の投与とファージ投与の間に間隔をあける感染モデルを検討する必要があると考えられた。

引用文献

- Fukuda K, Ishida W, Uchiyama J, Rashel M, Kato S, Morita T, Muraoka A, Sumi T, Matsuzaki S, Daibata M, Fukushima A. *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice: effects of topical bacteriophage KPP12 administration. *PLoS One*. 2012;7(10):e47742.
- Krylov VN. [Phagotherapy in terms of bacteriophage genetics: hopes, perspectives, safety, limitations]. *Genetika*. 2001 Jul;37(7):869-87. Review. Russian.
- Wright A, Hawkins CH, Anggård EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol*. 2009

Aug;34(4):349-57.

Takemura-Uchiyama, I. et al.

Experimental phage therapy against lethal lung-derived septicemia caused by *Staphylococcus aureus* in mice. Microbes Infect. 2014 Jun;16(6):512-7.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

Matsuzaki S, Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Daibata M. Isolation of Bacteriophages for Fastidious Bacteria. *Methods Mol Biol.* 2018;1693:3-10. 査読有, doi: 10.1007/978-1-4939-7395-8_1.

Uchiyama J, Taniguchi M, Kurokawa K, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Shimakura H, Sakaguchi Y, Murakami H, Sakaguchi M, Matsuzaki S. Adsorption of *Staphylococcus* viruses S13' and S24-1 on *Staphylococcus aureus* strains with different glycosidic linkage patterns of wall teichoic acids. *J Gen Virol.* 2017 Aug;98(8):2171-2180. 査読有, doi: 10.1099/jgv.0.000865.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小森 正博 (KOMORI, Masahiro)

高知大学教育研究部医療学系臨床医学部門・講師

研究者番号 : 30565742

(2)研究分担者

松崎 茂展 (MATZUZAKI, Sigenobu)

高知大学教育研究部医療学系基礎医学部門・准教授

研究者番号 : 00190439

内山 淳平 (UCHIYAMA, Junpei)

麻生大学・獣医学部・講師

研究者番号 : 20574619

小林 泰輔 (KOBAYASHI, Taisuke)

高知大学教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号 : 30253313