

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：36403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08953

研究課題名(和文) バクテリオファージライシンを利用する新しい多剤耐性結核制御法の創出

研究課題名(英文) Development of the new multidrug-resistant tuberculosis control method to use bacteriophage lysin

研究代表者

松崎 茂展 (Matsuzaki, Shigenobu)

高知学園大学・健康科学部・教授

研究者番号：00190439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：結核は過去の疾患ではなく、世界的に見ると現在でも感染症のなかで最多数の年間死者を出している感染症である。治療には、抗結核薬が使用されるが、それが無効な多剤耐性結核菌が出現し治療学的に大きな問題となっている。その解決には、抗菌薬に非依存的な結核菌制御法の導入が重要であると考えられる。

本研究では、結核菌とスメグマ菌の両者に感染可能なバクテリオファージY2が保有する溶菌酵素(ライシン)群を利用する結核菌制御法の可能性を検討した。当該ライシン混合液は、スメグマ菌に対して増殖抑制・溶菌活性を示した。これは、結核制御においてファージライシン療法が適用可能であることを強く示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、ファージライシンが、従来示されてきたように、ペプチドグリカン層が細胞表層に露出している通常のグラム陽性菌を破壊できるのみならず、抗酸菌のようにペプチドグリカン層の上にミコール酸層等の複数の層がある場合でも、外部からの添加で溶菌・増殖阻害できる可能性が示されたことである。

また、社会的意義としては、結核や Mycobacterium avium-complex(MAC)などのように、細胞表層構造が複雑な抗酸菌に起因する感染症に対しても、ファージライシン療法が奏功する可能性が示されることである。

研究成果の概要(英文)：Tuberculosis is not a disease of the past, but is an infectious disease that still causes the largest number of deaths annually among infectious diseases worldwide.

Anti-tuberculosis drugs are used for treatment, but multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis that are ineffective against them have emerged and have become a major therapeutic problem. In order to solve this problem, it is important to introduce a method for controlling M. tuberculosis that is independent of antibacterial agents.

In this study, we investigated the possibility of controlling M. tuberculosis using the lytic enzyme (lysin) group possessed by bacteriophage Y2, which can infect both M. tuberculosis and M. smegmatis.

The lysin-mixed solution showed growth inhibitory and/or lytic activity against M. smegmatis. This strongly suggests that phage-lysin therapy can be applied in the control of tuberculosis.

研究分野：細菌学・バクテリオファージ学

キーワード：ファージライシン療法 結核菌 抗酸菌 スメグマ菌

1. 研究開始当初の背景

世界保健機構 (WHO, 2014) は、世界規模の抗菌薬耐性菌サーベイランスの結果を公表し、抗菌薬耐性菌の問題が世界中で深刻化していることを報告し、世界が抗生物質前の状態に逆戻りしつつあることを警告している。この状況は、結核においても同様である。多剤耐性結核 (MDR-TB) の蔓延による結核の難治化が問題となっており、更に耐性化が進行した超多剤耐性結核菌 (XDR-TB) の出現により、結核に対する抗菌薬療法が困難になることが懸念され、その対策が求められている。

WHO (2015) は、加盟各国に抗菌薬耐性の問題に対処するために、「薬剤耐性に対する国家行動計画 (Action Plan)」の作成を勧告した。日米両政府はその勧告に従い、抗菌薬耐性に対する Action Plan を作成したが、その一部に抗菌薬の代替として、細菌に感染するウイルスであるバクテリオファージ (ファージ) の溶菌活性を利用する細菌感染症制御法、いわゆるファージ療法が含まれている。

ファージ療法には、ファージ自体の溶菌活性を使用する活性ファージ療法と、ファージが子ファージを放出するために産生する細菌のペプチドグリカン層を破壊する酵素、あるいはファージの尾部先端にある尾部結合型の溶菌酵素 (いずれもファージファージライシン) を使用するファージライシン療法がある。ファージライシン療法については、ペプチドグリカン層が最表層に露出している一般のグラム陽性細菌において、多くの研究が報告されており、ペプチドグリカン層を破壊するただ一種類のファージライシンのみを使用して、その殺菌効果が実証されている。

しかし、結核菌やスメグマ菌などの、いわゆる抗酸菌の細胞表層には、ペプチドグリカン層の上に少なくともアラビノガラクトサン層、ミコール酸層を有しているが、このような複雑な細胞壁を有する細菌に対してファージライシン療法が適用可能な否かについては明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、結核菌に対するファージライシン療法の有効性を、低病原性のスメグマ菌を結核菌の代替と使用して検討することを目的とした。結核菌とスメグマ菌は、それぞれ遅速発育菌と迅速発育菌であるにも関わらず、単一の Y2 ファージが両者に感染できることから、細胞表層構造および細胞内の生理学的環境が、相互に極めて類似していると予想される。そのため、スメグマ菌は、結核菌の優れた代替となると期待される。

3. 研究の方法

(1) スメグマ菌の増殖は、LB 液体培地中で菌の凝集塊を作るため、濁度の測定が困難となることがしばしば起こるため、種々の界面活性剤を LB 培地に添加し、ファージ活性と宿主菌活性に影響が少なく、菌凝集が解消される界面活性剤のスクリーニングを行なった。

(2) Y2 ファージのゲノム上のライシン遺伝子群に存在する推定ペプチドグリカン分解酵素遺伝子 ORF31 (ライシン 3) と推定ミコール酸分解酵素遺伝子 ORF36 (ライシン 1) を大腸菌内で発現させ、大腸菌を破壊後、その遠心上清を調製した。可溶性画分に含まれる粗酵素を使用し、スメグマ菌 mc2-155 株に対する溶菌・増殖抑制効果を検討した。この試料においては、ライシン 1 の大部分が不溶性画分に来るため、今回使用した可溶性画分中のライシン 1 の酵素量は微量と予測される。また、ライシン 3 は、全長が 1610 アミノ酸であり、分子全体の調製が困難であるため、活性ドメインと考えられる C 末端の領域のみの試料を使用した。そのため、全長使用の場合よりも、若干活性が低いことが予想された。

(3) ライシン 1 + ライシン 3 混合試料を、複数のスメグマ菌株 (mc2-155 株に加え、ATCC607 株、Jucho 株、J15CS 株) に作用させ、この粗酵素混合液の溶菌/増殖抑制の効果が、スメグ

マ菌の複数の菌株にも及ぶか否かを検討した。

4. 研究成果

(1) 界面活性剤添加によるスメグマ菌の増殖改善の検討：

LB 培地に CHAPS, n-dodecyl-β-D-maltoside, n-octyl-β-D-glucoside, sodium-cholate, MEGA-8, n-decyl-β-D-maltoside, n-octyl-β-D-maltoside, n-MEGA-10 を種々の濃度(0.5% ~ 0.01%) で添加し、スメグマ菌の凝集状態を検討した。その結果、菌の増殖が見られ、かつ完全に菌塊の解消につながる条件は見つからなかった。しかし、そのなかでも、ファージ活性が維持され、菌凝集が若干改善されたものは、0.01% n-octyl-β-D-glucoside であった。

(2) Y2 ファージのゲノム上のライシン遺伝子群にコードされている推定ペプチドグリカン分解酵素遺伝子(ライシン 3)と推定ミコール酸分解酵素(ライシン 1)のスメグマ菌 mc2-155 株に対する効果の検討：

ライシン 1、3 を液体 LB 培地に総培地量の 1/10 量添加し、スメグマ菌 mc2-155 株を微量接種し 37 °C で 24 時間培養後、濁度 (OD₆₀₀) を測定した。ライシン無添加サンプル(コントロール)を 1 とし、その相対濁度を示した。

結果

コントロール	1	
ライシン 1 添加	0.96	濁度の変化はなかったが凝集塊が殆ど消失
ライシン 3 添加	0.38	濁度減少
ライシン 1 + ライシン 2 添加	0.57	凝集塊減少 + 濁度減少

- 以上から、ミコール酸を分解すると予想されるライシン 1 は、濁度(菌数)低下にはつながらないものの、凝集塊の解消に働いていると予想された。
- ペプチドグリカン層を破壊すると予想されるライシン 3 は、ミコール酸層が存在している場合でも機能する可能性が示唆された。
- 上記ライシン混合物の添加により、菌塊がほぐれ、かつ菌の溶菌あるいは増殖抑制が起こっていると考えられた。

(3) 上記のスメグマ菌 mc2-155 株で見られた粗酵素混合物の溶菌/増殖抑制効果が、他のスメグマ菌株でも見られるか否かを検討した

ライシン 1+ライシン 3 の粗酵素試料を各菌株と混合後約 24 時間 37 °C で保温し、その後更に 24 時間 LB 培地を添加して培養した。各実験系で、ライシン混合試料を添加しない場合の濁度を 1 とし、ライシン混合試料を添加したものの相対濁度を算出した。

結果

各コントロール	1
mc2-155	0.24
Jucho	0.46
ATCC607	1.2
J15SC	0.98

- 菌の凝集塊形成の低減は、すべての菌株で認められた。
- mc2-155 株については、前回と同様に濁度の減少が認められた

- c) Jucho 株においても、濁度低下が認められた。
- d) 残りの 2 株においては、濁度低下は認められなかった。

考察

- 1) ライシン 1 は、ホスフォエステラーゼ活性を持つと予想されるため、脂質であるミコール酸を分解することが予想される。今回の酵素試料では微量のライシン 1 が作用していると予想されるが、微量でもミコール酸を局所的に分解し、細菌間の結合力を緩め、凝集の解消に機能しているのではないかと考えられた。
- 2) ライシン 3 は、ペプチドグリカン分解活性を有すると予想されるが、今回の酵素試料は N-末端領域を欠失しているにもかかわらず、mc2-155 株において濁度低下が認められ、溶菌あるいは増殖抑制が起こっていると考えられた。これは、ミコール酸層が残存していても、本酵素がペプチドグリカン層に到達できる可能性を示している。更に Jucho 株においても濁度低下が認められたため、この効果は mc2-155 株に限定されないことが明らかとなった。
- 3) 他方残りの 2 菌株 (ATCC607, J15SC) においては、mc2-155、Jucho 株とは異なり、凝集塊形成の抑制は認められたものの、濁度低下は認められなかった。これは、これらの菌株においてライシン 1 がペプチドグリカン層に届き、活性を発揮するためには、今回の試料では、量的・質的に十分ではなかったためと考えられる。
- 4) 本研究において、ファージライシンを使用する結核制御法は、適用の可能性が示された。
- 5) 今後、ライシン 1 の調製時における可溶性画分への移行法の改良、ライシン 3 の全長での調製法あるいは N 末端側半分と、C 末端側半분을個別に調製し、それを混合使用するなどの方法で活性の上昇を図る等の改善が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kamiya R, Uchiyama J, Matsuzaki S, Murata K, Iwasaki K, Miyazaki N.	4. 巻 30
2. 論文標題 Acid-stable capsid structure of Helicobacter pylori bacteriophage KHP30 by single-particle cryoelectron microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 300-312.e3.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.str.2021.09.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi M, Matsumoto Y, Ujihara T, Maeda H, Hanazaki K, Nagasaki K, Takeuchi H, Matsuzaki S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Helicobacter pylori Strain 3401, a Suitable Host for Bacteriophages KHP30 and KHP40	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiol Resour Announc	6. 最初と最後の頁 :e0064721.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00647-21.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 The Efficacy of Phage Therapy in a Murine Model of Pseudomonas aeruginosa Pneumonia and Sepsis. Yang X, Haque A, Matsuzaki S, Matsumoto T, Nakamura S.	4. 巻 12
2. 論文標題 The Efficacy of Phage Therapy in a Murine Model of Pseudomonas aeruginosa Pneumonia and Sepsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Microbiol .	6. 最初と最後の頁 682255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.682255.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Knezevic P, Hoyle NS, Matsuzaki S, Gorski A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Editorial: Advances in Phage Therapy: Present Challenges and Future Perspectives	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Microbiol .	6. 最初と最後の頁 701898
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.701898.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kishimoto T, Ishida W, Nasukawa T, Ujihara T, Nakajima I, Suzuki T, Uchiyama J, Todokoro D, Daibata M, Fukushima A, Matsuzaki S, Fukuda K.	4. 巻 9
2. 論文標題 In Vitro and In Vivo Evaluation of Three Newly Isolated Bacteriophage Candidates, phiEF7H, phiEF14H1, phiEF19G, for Treatment of Enterococcus faecalis Endophthalmitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms9020212.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nasukawa T, Sugimoto R, Uchiyama J, Uchiyama I, Murakami H, Fukuda K, Matsuzaki S, Sakaguchi M	4. 巻 172
2. 論文標題 Purification of membrane vesicles from Gram-positive bacteria using flow cytometry, after iodixanol density-gradient ultracentrifugation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Res. Microbiol	6. 最初と最後の頁 103792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resmic.2020.11.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitamura N, Sasabe E, Matsuzaki S, Daibata M, Yamamoto T.	4. 巻 165
2. 論文標題 Characterization of two newly isolated Staphylococcus aureus bacteriophages from Japan belonging to the genus Silviavirus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arch Virol .	6. 最初と最後の頁 2355-2359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-020-04749-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imai M, Mine K, Tomonari H, Uchiyama J, Matsuzaki S, Niko Y, Hadano S, Watanabe S	4. 巻 91
2. 論文標題 Dark-field microscopic detection of bacteria using bacteriophage-immobilized SiO ₂ @AuNP core-shell nanoparticles.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anal Chem.	6. 最初と最後の頁 12352-12357.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b02715	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kishimoto T, Ishida W, Fukuda K, Nakajima I, Suzuki T, Uchiyama J, Matsuzaki S, Todokoro D, Daibata M, Fukushima A	4. 巻 63
2. 論文標題 Therapeutic effects of intravitreally administered bacteriophage in a mouse model of endophthalmitis caused by vancomycin-sensitive or -resistant <i>Enterococcus faecalis</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrob Agents Chemother.	6. 最初と最後の頁 e01088-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.01088-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imanishi I, Uchiyama J, Tsukui T, Hisatsune J, Ide K, Matsuzaki S, Sugai M, Nishifuji K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Therapeutic Potential of an Endolysin Derived from Kayvirus S25-3 for Staphylococcal Impetigo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v11090769.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 那須川忠弥, 杉本良輔, 内山淳平, 内山伊代, 村上裕信, 福田憲, 松崎茂展, 坂口雅弘
2. 発表標題 密度勾配超遠心法とフローサイトメトリーを併用したグラム陽性細菌が産生する膜小胞試料の調製法の検討
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下智史, 仁子陽輔, 波多野慎悟, 渡辺茂, 内山伊代, 内山淳平, 松崎茂展
2. 発表標題 バクテリオファージを利用した細菌の金ナノ粒子凝集比色検出
3. 学会等名 日本化学会春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金木 真央, 内山 淳平, 松崎 茂展, 内山 伊代, 小方 雅也, 阪口 雅弘
2. 発表標題 Staphylococcus pseudintermediusに対する新規エンドライシンの分離と解析
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 那須川忠弥, 杉本良輔, 島倉秀勝, 小方雅也, 福田憲, 松崎茂展, 内山淳平
2. 発表標題 グラム陽性菌が産生する膜小胞の精製法の検討
3. 学会等名 第93回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小方雅也, 内山淳平, 松井秀仁, 内山伊代, 那須川忠弥, 松崎茂展, 花木秀明, 坂口雅弘
2. 発表標題 妊婦のGBSスクリーニングテストの検査精度を向上する試薬の開発
3. 学会等名 第93回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今西市郎, 内山淳平, 津久井利広, 久恒順三, 井手香織, 松崎茂展, 菅井基行, 斎藤広司
2. 発表標題 組換えendolysinのブドウ球菌に対する溶菌反応ならびに膿痂疹モデルマウスにおける発症抑制効果
3. 学会等名 93回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小方 雅也, 松井 秀仁, 内山 淳平, 東出 正人, 内山 伊代, 金木 真央, 松崎 茂展, 花木 秀明, 阪口 雅弘
2. 発表標題 GBS培養検査の精度を改善する選択的抗菌剤の技術開発
3. 学会等名 神奈川医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金木 真央, 内山 淳平, 松崎 茂展, 内山 伊代, 小方 雅也, 林 俊治, 阪口 雅弘
2. 発表標題 エンドリシン製剤開発に向けて ブドウ球菌ファージS6の新規エンドリシンの分離
3. 学会等名 神奈川医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本良輔, 那須川忠弥, 内山淳平, 内山伊代, 村上裕信, 福田憲, 松崎茂展, 阪口雅弘
2. 発表標題 フローサイトメーターを利用したグラム陽性細菌の膜小胞の新規分離法
3. 学会等名 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松崎茂展、岩野英知
2. 発表標題 シンポジウム46 ファージ・シンポジウム-忘れられた治療法の復活
3. 学会等名 第94回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fukuda K, Kishimoto T, Ishida W, Suzuki T, Uchiyama J, Matsuzaki S, Daibata M, Fukushima A
2. 発表標題 Therapeutic effects of intravitreal bacteriophage on Enterococcus faecalis endophthalmitis in mice.
3. 学会等名 ARVO 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸本達真、中島勇魚、石田わか、鈴木 崇、内山淳平、松崎茂展、大畑雅典、福田 憲、福島敦樹.
2. 発表標題 バンコマイシン耐性腸球菌眼内炎に対するファージ療法の効果
3. 学会等名 第56回日本眼感染症学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nasukawa T, Uchiyama J, Tsurui H, Sakamoto S, Higuchi T, Iyori K, Shimoike K, Shimakura H, Matsuzaki S, Sakaguchi M.
2. 発表標題 Search for Staphylococcus pseudointermedius molecules exacerbating canine atopic dermatitis
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Uchiyama J, Matsui H, Nasukawa T, Sakaguchi Y, Mizukami K, Sakaguchi M, Matsuzaki S, Hanaki H.
2. 発表標題 Potential improvement of prenatal Group B Streptococcus screening using phages
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Matsuzaki S, Uchiyama J	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer, Switzerland,	5. 総ページ数 16
3. 書名 Phage pharmacokinetics: Relationship with administration route	

〔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
研究分担者	山本 哲也 (Yamamoto Tetsuya) (00200824)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授 (16401)	
研究分担者	内山 淳平 (Uchiyama Jumpei) (20574619)	麻布大学・獣医学部・准教授 (32701)	
研究分担者	渡辺 茂 (Watanabe Shigeru) (70253333)	高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・教授 (16401)	
研究分担者	福田 憲 (Fukuda Ken) (70335751)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授 (16401)	
研究分担者	北村 直也 (Kitamura Naoya) (70351921)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師 (16401)	

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
---------	---------