

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591203

研究課題名(和文) バクテリオファージの溶菌活性を利用する新規ピロリ菌除菌法の開発研究
 研究課題名(英文) Development of novel method to eliminate *Helicobacter pylori* using bacteriolytic activity of bacteriophage

研究代表者

松崎茂展 (MATSUZAKI SHIGENOBU)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：00190439

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌が胃内に検出された場合、抗菌薬による除菌が推奨される。しかし、近年、この細菌は抗菌薬耐性化が進行しているため、将来も同じ除菌法が継続使用できるか危惧される。このため我々は、ピロリ菌感染症に対するファージ療法系の開発を目的として、ピロリ菌ファージの分離を試みた。結果的に、新規ピロリ菌ファージφHP33の分離に成功した。φHP33は多くのピロリ菌株に強力な感染能を有するため、治療用ファージ候補になりうると予想された。

研究成果の概要(英文)：*Helicobacter pylori* is a causative agent of gastritis and the stomach ulcer, and is also a risk factor of the stomach cancer. If *H. pylori* is detected at the patient's stomach, the elimination of it with the antibiotic agents is recommended. However, recent progress of antibiotic-resistance in *H. pylori* threatens the future of the elimination method. Therefore, we tried to get phage to develop the bacteriophage (phage) therapy system against *H. pylori* infection. As a result, a novel phage, φHP33, was isolated successfully. Phage φHP33 had a broad-host-range to many *H. pylori* strains and had strong lytic activity against them. Therefore, φHP33 is expected to be a good candidate as therapeutic phage for *H. pylori* infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：ピロリ菌、ファージ、除菌法

1. 研究開始当初の背景

現在日本では、人口の約半数(6000万人)が胃炎、胃潰瘍の原因菌、かつ胃癌のリスクファクターであるピロリ菌(*Helicobacter pylori*)に感染している予想されている。保菌が確認された場合、その除菌が強く推奨されている(日本ヘリコバクター学会ガイドラ

イン、2009年)。現在ピロリ菌除菌は、プロトンポンプ阻害薬(PPI)と2種の抗菌薬(アモキシシリン、クラリスロマイシンまたはメトロニダゾール)の3剤併用療法によって行なわれているが、近年抗菌薬(特にクラリスロマイシン)に対するピロリ菌の耐性化が進行しており、将来同様の除菌法が継続できるか

否か危惧されている。このような状況を打開するため新規の抗菌薬が開発されても、耐性菌出現は避けられず、抗菌薬開発と耐性菌出現の悪循環は繰り返されると予想される。このような抗菌薬開発と耐性菌出現の悪循環を断ち切るには抗菌薬非依存的なピロリ菌除菌法の開発が有効であると考えられる。

2. 研究の目的

抗菌薬非依存的な細菌感染症制御法の可能性の一つに、バクテリオファージ（ファージ）の溶菌活性を利用するいわゆるファージ療法がある。ファージ療法を行なうためには、対象菌種に感染するファージが必要であるが、ピロリ菌の場合、ファージそのものの報告例が極めて少ない。それゆえ、本研究では、ピロリ菌を溶菌可能なファージを分離し、その性状解析を行ない、治療用ファージとしての適格性を検討することを目的とし、研究を行なった。

3. 研究の方法

ピロリ菌ファージ検出系の検討：ブルセラ培地を基本とする、ピロリ菌ファージの検出用の軟寒天重層法を検討した。

ピロリ菌に伴伴しているファージ（溶原性あるは結合性）ファージの検出：臨床由来のピロリ菌株 38 株の培養上清を 10%ウマ血清添加ブルセラ培地あるいはマイトマイシン C (1-2 μ g/ml) 添加 10%ウマ血清添加ブルセラ培地で約 24 時間培養し、遠心上清を孔径 0.45 μ m のフィルターで除菌後、スポットテスト、プラークテストでファージの存在を検討した。

ファージの精製：ファージ増殖後、培養上清にポリエチレングルコール 6000 および NaCl を添加し、10,000x g 4°C 20 分遠心した。ペレットを DNase I, RNase A 処理後、100,000x g 1 時間不連続塩化セシウム密度勾配超遠心を行ないファージバンドを回収し、AAS で希釈を行なった。

ファージの形態観察：2%ウラニル酢酸で陰染色後、透過型電子顕微鏡（日立 H7100）で観察した。

ファージ吸着能：ファージを宿主菌と混合後、経時的に低速遠心し、上清中のプラーク数の低下により吸着能を検討した。

潜伏時間とバーストサイズ：ファージを宿主菌に 5 分吸着させて後、菌を洗浄後、新鮮培地に再懸濁後、経時的にプラーク計測を行ない検討した。

ファージ DNA の解析：塩化セシウム密度勾配超遠心法で精製し、AAS で希釈した後 100,000x g 1 時間超遠心を行なった。ペレットを 1% SDS で可溶化し、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ない DNA を抽出した。DNA を制限酵素で切断後、数個の断片をベクター

pUC18 にクローニングした。挿入部分の塩基配列を解読し、それをもとに合成したプライマーによりファージ DNA 配列をプライマーウオーキング法により全ゲノム DNA の塩基配列を解読し、アノテーションを行なった。

4. 研究成果

(1) ピロリ菌ファージ検出条件の検討

通常ピロリ菌の培養には、10%ウマ血清添加ブルセラ培地が使用される。下層には、1.5%寒天培地を使用し、上層には馬血清を含まないブルセラ軟寒天（0.5%寒天、50°C保温）を使用することで、10% CO₂、37°C、2-3 日の条件で、殆どのピロリ菌株が比較的均一なローンを形成することが分かった。また、ある菌株では、10%馬血清の代わりに 0.5% β シクロデキストリンを使用できることが示された。

(2) ピロリ菌に伴伴するファージの分離：臨床由来の 38 株の培養上清中からファージの分離を試みた。その内、HP33 株の培養上清中にファージが放出されていることが確認された。HP33 由来のファージは HP1 株において単一プラーク分離法によって純化され、 ϕ HP33 と命名された。この放出は、マイトマイシン C 添加に関係なく起っていた。

(3) ϕ HP33 の宿主域：ピロリ菌株計 40 株で検討したところ、25 株においてプラークを形成できる、比較的広宿主域であることが分かった。

(4) ϕ HP33 の潜伏期間とバーストサイズ：潜伏期間は 140 分、バーストサイズは 15-25 であった。ピロリ菌の倍加時間が 180 分

(5) 吸着：10 分以内に 25%のファージが吸着するが、その後は比較的ゆっくりと進行する。30 分においても、70%のファージは未吸着のまま残存しているが、その原因は不明である。

(6) 形態：電子顕微鏡顕微鏡による形態観察の結果、 ϕ HP33 は尾部保有ファージではなく球形ファージであることが示された。その直径は約 60 nm で、内部にコア構造を持つことが示された。また、クロロフォルムに感受性を示すことから脂質を含有する可能性がある。

(7) ゲノム DNA： ϕ HP33 保有の核酸は、RNase A に耐性で、DNase I に感受性出ることから DNA であることが分かった。またある種の制限酵素で分解されることから 2 本鎖 DNA と考えられた。全塩基配列の解読の結果、本ゲノムサイズは約 26 kbp であり、少なくとも 27 個の ORF の存在が示された。本ファージのゲノム構成から、これまで報告されているいずれの科にも属しないと予想され、新しい科を形成する可能性が示された。

(8) ϕ HP33 の溶菌活性と治療用ファージとしての可能性：HP1 株を指示菌として液体培地

で検討すると、ファージ投与量を調節することにより、ピロリ菌の増殖を完全に抑制できることが分かった。また、ファージ投与量を菌数より少なくすると、一旦菌増殖が起りその後強い溶菌が起った。これは、子ファージ放出時に強力な溶菌酵素を産生することを示唆している。以上から、このファージ自体の投与で除菌ができるのみならず、本ファージ保有の溶菌酵素を利用する除菌法の可能性も期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

- ①Murakami M, Imajoh M, Ikawa T, Nakajima H, Kamioka M, Nemoto Y, Ujihara T, Uchiyama J, Matsuzaki S, Sano S, Daibata M. Presence of Merkel cell polyomavirus in Japanese cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Virol*. 2011. 50:37-41. 査読有
- ②Uchiyama J, Takemura I, Hayashi I, Matsuzaki S, Satoh M, Ujihara T, Murakami M, Imajoh M, Sugai M, Daibata M. Characterization of lytic enzyme open reading frame 9 (ORF9) derived from *Enterococcus faecalis* bacteriophage phiEF24C. *Appl Environ Microbiol*. 2011. J77:580-585. 査読有
- ③Hoshihara H, Uchiyama J, Kato S, Ujihara T, Muraoka A, Daibata M, Wakiguchi H, Matsuzaki S. Isolation and characterization of a novel *Staphylococcus aureus* bacteriophage, ϕ MR25, and its therapeutic potential. *Arch Virol*. 2010 155:545-552. 査読有
- ④Nishioka M, Takeuchi H, Con SA, Uehara Y, Nishimori I, Okumiya T, Kumon Y, Sugiura T. The mechanical binding strengths of *Helicobacter pylori* BabA and SabA adhesins using an adhesion binding assay-ELISA, and its clinical relevance in Japan. *Microbiol Immunol*. 2010. 54:442-451. 査読有
- ⑤Con SA, Takeuchi H, Nishioka M, Morimoto N, Sugiura T, Yasuda N, Con-Wong R. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* babA2 and babA2/B in Costa Rica and Japan. *World J Gastroenterol*. 2010. 16:474-478. 査読有
- ⑥Yamanaka S, Kumon Y, Matsumura Y, Kamioka M, Takeuchi H, Sugiura T. Link between pericardial effusion and attenuation of QRS voltage in patients with hypothyroidism. *Cardiology* 116:32-36. 査読有
- ⑦Uchiyama J, Maeda Y, Takemura I, Chess-Williams R, Wakiguchi H, Matsuzaki S. Blood kinetics of four intraperitoneally administered therapeutic candidate bacteriophages in healthy and neutropenic mice. *Microbiol Immunol*. 2009. 53:301-304. 査読有
- ⑧Matsushita K, Uchiyama J, Kato S, Ujihara T, Hoshihara H, Sugihara S, Muraoka A, Wakiguchi H, Matsuzaki S. Morphological and genetic analysis of three bacteriophages of *Serratia marcescens* isolated from environmental water. *FEMS Microbiol Lett*. 2009. 291:201-208. 査読有
- ⑨Uchiyama J, Rashel M, Matsumoto T, Sumiyama Y, Wakiguchi H, Matsuzaki S. Characteristics of a novel *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage, PAJU2, which is genetically related to bacteriophage D3. *Virus Res*. 2009. 139:131-134. 査読有
- ⑩Con SA, Takeuchi H, Con-Chin GR, Con-Chin VG, Yasuda N, Con-Wong R. Role of bacterial and genetic factors in gastric cancer in Costa Rica. *World J Gastroenterol*. 2009. 15:211-218. 査読有
- ⑪Imadome K, Shimizu N, Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, Fujiwara S. CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells. *Microbes and infection* 57:11343- 11348. 査読有
- ⑫Trang VT, Takeuchi H, Kudo H, Aoki A, Katsuno S, Shimamura T, Sugiura T, Ukeda H. Antimicrobial activity of aminoreductone against *Helicobacter pylori*. *J Agric Food Chem*. 2009. 57(23):11343-11348. 査読有
- ⑬Con SA, Takeuchi H, Con-Chin GR, Con-Chin VG, Yasuda N, Con-Wong R. Role of bacterial and genetic factors in gastric cancer in Costa Rica. *World J Gastroenterol*. 2009. 15:211-218. 査読有
- ⑭Rashel M, Uchiyama J, Takemura I, Hoshihara H, Ujihara T, Takatsuji H, Honke K, Matsuzaki S. Tail-associated structural protein gp61 of *Staphylococcus aureus* phage ϕ MR11 has bifunctional lytic activity. *FEMS Microbiol Lett*. 2008. 284:9-16. 査読有
- ⑮Uchiyama J, Rashel M, Takemura I, Wakiguchi H, Matsuzaki S. In silico and in vivo evaluation of bacteriophage ϕ EF24C, a candidate for treatment of

Enterococcus faecalis infections. Appl Environ Microbiol. 2008. 74:4149-4163. 査読有

- ①⑥ Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, Takemura I, Hoshiba H, Matsuzaki S. A novel site-specific recombination system derived from bacteriophage ϕ MR11. Biochem Biophys Res Commun. 2008. 368:192-198. 査読有
- ①⑦ Morishita S, Nishimori I, Minakuchi T, Onishi S, Takeuchi H, Sugiura T, Vullo D, Scozzafava A, Supuran CT. Cloning, polymorphism, and inhibition of beta-carbonic anhydrase of *Helicobacter pylori*. J Gastroenterol. 2008. 43:849-857. 査読有

[学会発表] (計 24 件)

- ① 門田陽集、竹内啓晃、森本徳仁、公文義雄、杉浦哲朗、*Helicobacter pylori*における細胞分裂制御Minシステムの解析、第56回日本臨床検査医学会中国・四国支部総会、2011. 2. 5-6、岡山大学医学部 (岡山県)
- ② 竹村伊代、内山淳平、氏原隆子、松崎茂展、村上雅尚、大畑雅典、黄色ブドウ球菌バクテリオファージ (ファージ) S13' 及び S24-1 の比較ゲノム解析による尾部吸着タンパク質の同定、第 63 回日本細菌学会中国・四国支部総会、2010. 10. 16、松山大学 (愛媛県)
- ③ 内山淳平、竹村伊代、氏原隆子、松崎茂展、村上雅尚、大畑雅典、巨大黄色ブドウ球菌バクテリオファージの解析、第 63 回日本細菌学会中国・四国支部総会、2010. 10. 16、松山大学 (愛媛県)
- ④ 内山淳平、松崎茂展、大畑雅典、ファージ療法およびファージを利用する新しい細菌検出法の開発：高知大学の取り組み、大阪大学蛋白質研究所セミナー、2010. 9. 9、大阪大学蛋白質研究所 (大阪府)
- ⑤ 竹村伊代、内山淳平、氏原隆子、松崎茂展、村上雅尚、今城雅之、大畑雅典、黄色ブドウ球菌バクテリオファージ S13' 及び S24-1 の比較ゲノム解析と尾部吸着タンパク質の特徴付け、大阪大学蛋白質研究所セミナー、2010. 9. 10、大阪大学蛋白質研究所 (大阪府)
- ⑥ 竹村伊代、内山淳平、氏原隆子、松崎茂展、村上雅尚、今城雅之、大畑雅典、T4 関連ファージグループにおけるセラチアファージ KSP90 の系統学的位置、大阪大学蛋白質研究所セミナー、2010. 9. 10、大阪大学蛋白質研究所 (大阪府)
- ⑦ 森下慶子、竹内啓晃、杉本千鶴子、島村智子、受田浩之、山本哲也、杉浦哲朗、ヘリコバクター・ピロリのSODに関する検討、第

- 57回日本臨床検査医学会学術集会、2010. 9. 9-10、京王プラザホテル (東京都)
- ⑧ 西田愛恵、竹内啓晃、森本徳仁、杉本千鶴子、公文義雄、杉浦哲朗、*Helicobacter pylori*に対するA22の増殖抑制、第57回日本臨床検査医学会学術集会、2010. 9. 9-10、京王プラザホテル (東京都)
- ⑨ 門田陽集、竹内啓晃、森本徳仁、公文義雄、杉浦哲朗、*Helicobacter pylori*細胞分裂関連遺伝子*cdrA*の機能と*ftsZ*との関連性の解析、第42回日本臨床検査自動化学会総会、2010. 10. 7-9、神戸国際会議場 (兵庫県)
- ⑩ 川田雅彦、中川光司、池上良成、竹内啓晃、杉浦哲朗、調製海洋深層水の*in vivo*における*Helicobacter pylori*抑制効果、第42回日本臨床検査自動化学会総会、2010. 10. 7-9、神戸国際会議場 (兵庫県)
- ⑪ Masahiko Kawada, Koji Nakagawa, Yoshinari Ikegami, Hiroaki Takeuchi, Tetsuro Sugiura, *In vivo* effects of refined deep seawater (RDSW) against *Helicobacter pylori*, 110th ASM General Meeting, 2010. 5. 23-28, Convention center, San Diego, CA, (USA)
- ⑫ N. Morimoto, H. Takeuchi, Y. Kumon, M. Tsuda, T. Taniguchi, T. Sugiura, Identification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein related to *H. pylori*-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura, 110th ASM General Meeting, 2010. 5. 23-28, Convention center, San Diego, CA, (USA)
- ⑬ Trang V.T. Takeuchi H, Shimamura T, Katsuno S, Sugiura T, Ukeda H, Kashiwagi T., Antimicrobial Activity of Aminoreductone against *Helicobacter pylori*, 110th ASM General Meeting, 2010. 5. 23-28, Convention center, San Diego, CA, (USA)
- ⑭ 松崎茂展、病院感染起因菌へのファージ療法の可能性、ICD講習会、2010年3月26日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑮ 松下憲司、内山淳平、氏原隆子、杉原重喜、邑岡麻子、大畑雅典、松崎茂展、新規 *Serratia marcescens* バクテリオファージ KSP20, KSP90, およびKSP100の性状解析、日本細菌学会、2010年3月29日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑯ 内山淳平、林幾江、竹村伊代、氏原隆子、竹内啓晃、杉浦哲朗、菅井基之、大畑雅典、松崎茂展、腸球菌ファージ ϕ EF24C由来溶菌酵素ORF9の解析、日本細菌学会、2010年3月29日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑰ 内山淳平、松崎茂展、緑膿菌の新規溶原性バクテリオファージPAJU2の形態学的・遺伝学的解析、第82回日本細菌学会総会、2009. 3. 12、名古屋国際会議場 (愛知県)

- ⑱内山淳平、脇口宏、松崎茂展、マウスにおける治療用バクテリオファージの血中動態の比較検討、日本感染症学会、2009年4月24日、京王プラザホテル（東京都）
- ⑲竹村伊代、内山淳平、竹内啓晃、杉浦哲朗、松崎茂展、*Enterococcus faecalis* ファージφEF24C由来溶菌酵素ORF9の溶菌活性、日本感染症学会、2009年4月24日、京王プラザホテル（東京都）
- ⑳森本徳仁、（竹内啓晃 他）*Helicobacter pylori*膜蛋白と*H. pylori*関連慢性特発性血小板減少性紫斑病との関連性、第15回日本ヘリコバクター学会学術総会、2009年6月25日、東京サピアタワー（東京都）
- (21)森下慶子、（竹内啓晃 他）、ヘリコバクター・ピロリ臨床分離株のSOD活性と臨床病態に関する検討、第56回日本臨床検査医学会、2009年8月28日、札幌コンベンションセンター（北海道）
- (22)森本徳仁、（竹内啓晃 他）、血小板結合性を有する*Helicobacter pylori* 低分子蛋白と*H. pylori* 関連特発性血小板減少性紫斑病との関連性、2009. 3. 13名古屋国際会議場（愛知県）
- (23) 松下憲司、内山淳平、氏原隆子、杉原重喜、邑岡麻子、松崎茂展、新規*Serratia marcescens* バクテリオファージKSP90の性状解析、日本細菌学会中国・四国支部総会、2009年10月16日、広島大学（広島県）
- (24) 松崎茂展、ファージ療法：その可能性と課題、第2回バクテリオファージ研究会2008. 9. 11、佐賀大学 菱の実会館（佐賀県）

〔図書〕（計1件）

- ①Free full text Related citations
Nishimori I, et al Chapter 17:
Inhibitors of *Helicobacter pylori* α and β -carbonic anhydrases as novel drugs for gastroduodenal diseases Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural and Disease Applications、2009、pp359-374（計1022）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：抗ピロリ菌組成物

発明者：島村智子、竹内啓晃、他

権利者：高知大学、日本ミルクコミュニティ（株）

種類：

番号：特願 2009-133754

出願年月日：2009年6月3日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 茂展 (MATSUZAKI SHIGENOBU)

高知大学・教育研究部医療学系

研究者番号：00190439

(2) 研究分担者

竹内 啓晃 (TAKEUCHI HIROAKI)

高知大学・教育研究部医療学系

研究者番号：90346560