

平成22年6月3日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20700594

研究課題名（和文） 有明海周辺地域特有の細菌性食中毒「バルニフィカス感染症」の新規治療方法の開発

研究課題名（英文） Development of novel method of therapy for *Vibrio vulnificus* infection unique to surrounding area of Ariake Sea

研究代表者

田代 幸寛 (TASHIRO YUKIHIRO)

西南女学院大学・短期大学部・生活創造学科・准教授

研究者番号：90448481

研究成果の概要（和文）：バルニフィカス感染性バクテリオファージの探索を行った。有明海の底泥より4種類のバクテリオファージの分離に成功した。分離バクテリオファージの宿主特異性を調べたところ、全バクテリオファージは *Vibrio vulnificus* NBRC 15645<sup>T</sup> のみに感染することを明らかにした。また、分離バクテリオファージを電子顕微鏡で観察したところ、横幅約200 nm、高さ約800 nmのバクテリオファージであることが分かった。さらに、分離バクテリオファージの溶菌曲線を作成した。また、分離バクテリオファージのゲノム抽出を試みたが、十分な収量が得られなかった。一方、*V. vulnificus* ATCC27562<sup>T</sup> および *V. vulnificus* K-6 株の培養液をC57BL/J6マウスの後肢足底部への皮下注射を行い、バルニフィカス感染症動物実験の作成に成功した。さらに、*V. vulnificus* K-6 株および感染性バクテリオファージを感染させたK-6株の溶原株（L-K-6株）をC57BL/J6マウスの足底部に皮下注射した。その結果、K-6株では6匹中4匹が死亡したが、L-K-6株では、6匹中全匹生存した。また、L-K-6株では、K-6株と比較して増殖速度の低下と溶血活性の上昇が観察された。

研究成果の概要（英文）：A bacteriophage which infects *Vibrio vulnificus* was searched, and four bacteriophages were isolated from the sediments in Ariake Sea. All isolated bacteriophages could infect only *V. vulnificus* NBRC 15645<sup>T</sup>, which resulted in a quite narrow host specificity. Electron microscopical analysis revealed that the size of bacteriophage No.1 was 200 nm×800 nm. The lysis curve of isolated bacteriophages infecting *V. vulnificus* NBRC 15645<sup>T</sup> were also investigated. Furthermore, a genome extraction from isolated bacteriophages was performed, but the yields were quite low. On the other hand, we gave a hypodermic injection of *V. vulnificus* ATCC27562<sup>T</sup> strain or *V. vulnificus* K-6 strain to C57BL/J6 mouse's hind leg at the bottom, which succeeded in animal model infected with both *V. vulnificus* strains. In addition, we also gave a hypodermic injection of K-6 strain or L-K-6 strain, which was lysogenized with its bacteriophage, to six C57BL/J6 mice's hind leg at the bottom. As a result, the injection of K-6 strain killed four of six mice while no mice were killed by L-K-6 strain. Furthermore, L-K-6 strain decreased the growth rate and increase hemolytic activity, compared with K-6 strain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：ファージセラピー

### 1. 研究開始当初の背景

“人食いバクテリア”と称されるビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*; 以下バルニフィカス菌) による感染症 (バルニフィカス感染症) は慢性肝疾患や免疫能の低下した男性に多く発症し、バルニフィカス菌によって汚染された生鮮魚介類の経口摂取や創傷部位からの経皮感染により発症する。国内発症例の約半数が有明海周辺地域で報告されているために、本感染症は有明海風土病として認識され、有明海産の生鮮魚介類に対する安全性が危惧されている。本感染症を発症した場合の致死率は50-70%にも達し、現在までに有効な治療方法はない。従って、バルニフィカス感染症に適した新しい治療方法の開発は急務である。

化学療法である抗生物質の投与は本感染症の治療には効果的ではない上に、様々な副作用が問題となっている。一方、特定の細菌にのみ感染するバクテリオファージを用いたファージセラピー (生物学療法) は食と環境に優しい治療方法として注目されるべき技術として認識されている。現在までにバルニフィカス感染症に対するファージセラピーの実施例は報告されていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的の概要は以下の通りである。

- (1) バルニフィカス菌感染性バクテリオファージの分離および性状解析
- (2) バルニフィカス感染症の動物実験モデルを用いた分離バクテリオファージによるファージセラピーの開発

すなわち、(1)項においては、様々なサンプルを分離源として、バルニフィカス菌に感染するバクテリオファージのスクリーニングを行う。さらに、分離バクテリオファージの宿主特異性や溶菌の作用機作等の性状解明を目的とする。

(2)項においては、分離バクテリオファージによるファージセラピーの臨床的実験の前段階として、バルニフィカス感染症動物実験モデルを構築する。構築したバルニフィカス感染症動物実験モデルに分離バクテリオファージを投与し、動物実験レベルでのファージセラピーの効能を検証することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) バルニフィカス菌感染性バクテリオファージの分離

有明海の2地点の干潟 (428 鋼管、六角川自動観測塔) の泥および海水または風呂の水、トイレの水、川水、雨水、苔、砂、海水、排水、砂、土壌を採取して分離源に用いた。遠心分離操作 (400×g, 60 min, 4°C) により回収した上清をメンブレンフィルター (孔径; 0.20 μm、材質; セルロースアセテート) (アドバンテック東洋、日本) に供したものをファージ液として用いた。指示菌には *V. vulnificus* NBRC 15645<sup>T</sup> を用いた。改変 ZoBell 培地で温度 30°C、振とう速度 200 rpm で OD<sub>660</sub>=0.3 まで培養してプラーク試験に用いた。0.5%寒天を含む ZoBell 軟寒天培地に *V. vulnificus* NBRC 15645<sup>T</sup> の培養液を接種し、上記で調製したファージ液を加えた後に 1.5%寒天を含む ZoBell 寒天プレートに重層して 30°C で1晩培養した。溶菌斑 (プラーク) 形成の観察によりバクテリオファージを検出した。

#### (2) 分離バクテリオファージの宿主特異性試験

*V. vulnificus* NBRC 15645<sup>T</sup> を OD<sub>660</sub>=0.3 まで培養して検出したバクテリオファージのプラークを1白金耳接種して温度 30°C、振とう速度 200 rpm で1晩培養した。遠心分離操作 (400×g, 60 min, 4°C) により回収した培養液の上清をメンブレンフィルター (孔径; 0.20 μm、材質; セルロースアセテート) に供したものをファージ液とした。指示菌には佐賀大学医学部付属病院より供与された F 株、K 株、P-11、P-15、A-2、K-1、K-2、K-10、L-5 を用いた。(1)と同様の操作でプラーク試験を行い、分離したバクテリオファージの宿主特異性を検討した。

#### (3) 分離バクテリオファージの電子顕微鏡観察

*V. vulnificus* NBRC 15645<sup>T</sup> を OD<sub>660</sub>=0.3 まで培養して分離バクテリオファージ No.1 のプラークを1白金耳接種して温度 30°C、振とう速度 200 rpm で1晩培養した。遠心分離操作 (400×g, 60 min, 4°C) により回収した培養液の上清をメンブレンフィルター (孔径; 0.20 μm、材質; セルロースアセテート) に供したものをファージ液とした。ファージ液を佐賀

大学総合分析実験センターに委託して電子顕微鏡観察を行った。

#### (4) 分離バクテリオファージの溶菌曲線の作成

*V. vulnificus* NBRC 15645<sup>T</sup> 株を OD<sub>660</sub>=0.3 まで温度 37°C、振とう速度 70 rpm で培養したのち、分離バクテリオファージ (No.1, 2, 3, 4) のプラークを 1 白金耳接種して温度 37°C、振とう速度 70 rpm で培養し、溶菌曲線を Bio-Photorecor -der<sup>®</sup> TVS062CA (タイテック製) により作成した。また、バクテリオファージ無接種をコントロールとした。

#### (5) 分離バクテリオファージのゲノム抽出

*V. vulnificus* NBRC 15645<sup>T</sup> を OD<sub>660</sub>=0.3 まで培養して分離バクテリオファージ No.1 のプラークを 1 白金耳接種して温度 30°C、振とう速度 200 rpm で 1 晩培養した。遠心分離操作 (400×g, 60 min, 4°C) により回収した培養液の上清をメンブレンフィルター (孔径; 0.20 μm、材質; セルロースアセテート) に供したものをファージ液 (約 8 ml) とした。ファージ液より、Lambda Mini Kit (QIAGEN 製) を用いてゲノム抽出を行った。

#### (6) マウスを用いたバルニフィカス感染症動物実験モデルの構築

C57BL/J6 マウスに *V. vulnificus* ATCC27562<sup>T</sup> の培養液 (10<sup>7</sup>cfu) を右後肢足底部への皮下注射あるいは経口投与を行った。また同様に、*V. vulnificus* K-6 株の培養液を、マウス足底部に投与した。

#### (7) バルニフィカス感染症動物実験モデルへの分離バクテリオファージの投与

佐賀大学医学部より分離された K-6 株感染性バクテリオファージを K-6 株 (宿主株) に感染させた溶原株 (L-K6) を作成した。少量投与群 (10<sup>2</sup> CFU/マウス)、中等投与群 (10<sup>4</sup> CFU/マウス)、大量投与群 (10<sup>6</sup> CFU/マウス) に分類した K-6 株および L-K6 株をそれぞれ、C57BL/J6 マウス足底部に投与した。また、溶原株と宿主株の増殖曲線と溶血活性を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) バルニフィカス菌感染性バクテリオファージの分離

有明海 2 地点の干潟泥 (428 鋼管、六角川自動観測塔) より調製したファージ分離液から多数のプラーク形成が認められた (図 1)。よって、*V. vulnificus* NBRC 15645<sup>T</sup> に感染性を示す 4 種類のバクテリオファージ (No.1 - No.4) の分離に成功した。

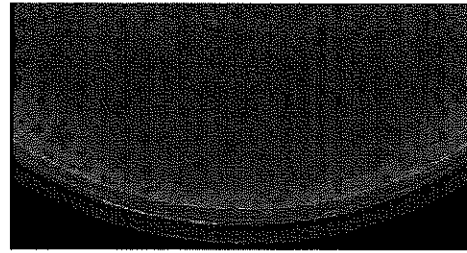


図 1. *V. vulnificus* NBRC 15645<sup>T</sup> を指示菌とした寒天平板上に認められた No.4 のプラーク

#### (2) 分離バクテリオファージの宿主特異性試験

4 種類の分離バクテリオファージ (No.1 - No.4) はいずれも *V. vulnificus* NBRC 15645<sup>T</sup> にのみ感染したことから、極めて高い宿主特異性を有することが明らかとなった。

#### (3) 分離バクテリオファージの電子顕微鏡観察

分離バクテリオファージ No.1 のファージ液を用いて電子顕微鏡観察を行った。その観察結果を図 2 に示す。分離バクテリオファージ No.1 は横幅約 200 nm、高さ約 800 nm の形体であることが明らかになった。

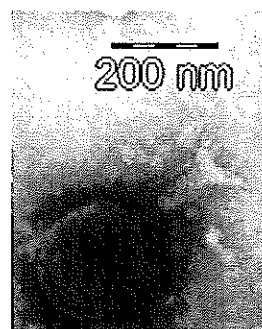


図 2. 分離バクテリオファージ No. 1 の電子顕微鏡写真

#### (4) 分離バクテリオファージの溶菌曲線の作成

分離バクテリオファージ (No.1-No.4) の *V. vulnificus* NBRC 15645<sup>T</sup> に対する溶菌曲線を作成した。No.1 と No.3 の結果を図 3 に示す。No.1 と No.3 ではコントロールと比較して明らかな増殖速度の低下および菌体濃度の減少が観察された。また、No. 2 と No.4 はコントロールと比較して差がほとんどなかったことから、溶原性バクテリオファージであることが示唆された。

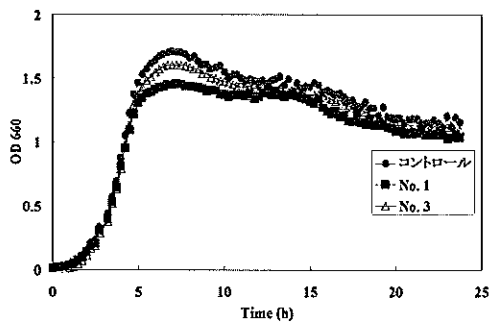


図 3. No.1 (青)、No.3 (黒)、コントロール (赤) の増殖曲線

(5) 分離バクテリオファージのゲノム抽出

4 種類の分離バクテリオファージ (No.1 - No.4) から市販のキットを用いてゲノム抽出を行った。残念ながら、いずれも十分な収量 (0.20 ng/μL 以下) が得られなかった。ファージの濃縮操作などの必要性が示唆された。

(6) マウスを用いたバルニフィカス感染症動物実験モデルの構築

C57BL/36 マウスに *V. vulnificus* ATCC27562<sup>T</sup> の培養液 (10<sup>7</sup>cfu) を右後肢足底部への皮下注射あるいは経口投与を行った。その結果、経口投与した場合、四肢に腫脹等の目立った変化は見られず、肝臓、胃、小腸においても特異的な所見は見られなかった。一方、皮下注射した場合、投与 2 時間後程度から *V. vulnificus* 摂取側下肢の腫脹が認められ (図 4)、6 匹中 2 匹が投与後 26 時間以内に死亡し、その下肢浸出液から *V. vulnificus* が検出された。同様に、*V. vulnificus* K-6 株の培養液を、マウス足底部に投与した場合も腫脹が認められた。よって、バルニフィカス感染症動物感染モデルの構築に成功した。



図 4. *V. vulnificus* ATCC27562<sup>T</sup> の皮下注射によるマウスへの感染試験

(7) バルニフィカス感染症動物実験モデルへの分離バクテリオファージの投与

C57BL/36 マウスに宿主株 (K-6 株) および K-6 株にバクテリオファージを感染させた溶原株 (L-K-6 株) を足底部に皮下注射した結

果を表 1 に示す。K-6 株の大量投与群では、6 匹中 4 匹が死亡したが、L-K-6 株の大量投与群では、6 匹中全匹生存した。

また、L-K-6 株では、K-6 株と比較して培養液の増殖速度の低下と溶血活性の上昇が観察され (図 5)、感染実験とは逆の結果が得られた。今回の結果からバクテリオファージの溶原化が溶血活性と致死性に関して別々の形質転換を引き起こしたことが示唆された。

よって、バルニフィカス感染症のファージセラピーの可能性が示唆された。

表 1. 宿主株 (K-6 株) と溶原株 (L-K-6 株) の感染実験

	宿主株 (K-6)		溶原株 (L-K-6)	
	生存	死亡	生存	死亡
コントロール群	5	0	5	0
少量投与群 (10 <sup>6</sup> cfu / mouse)	5	0	5	0
中等量投与群 (10 <sup>7</sup> cfu / mouse)	5	0	5	0
大量投与群 (10 <sup>8</sup> cfu / mouse)	6	4	6	0

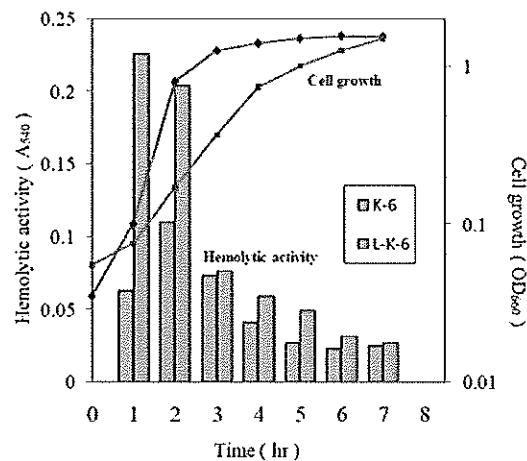


図 5. 宿主株 (K-6 株) と溶原株 (L-K-6 株) の溶血活性と増殖曲線

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 14 件)

- ① 小林元太、岡宏圭、田代幸寛、加藤富民雄、神田康三、林信行、有明海由来のキシロース資化性乳酸菌の分離、日本生物工学会誌、査読有、86 巻、2008、217-220
- ② 小林元太、中川良美、田代幸寛、神田康三、加藤富民雄、A type II restriction endonuclease from novel *Leuconostoc mesenteroides* in Ariake sea、Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria、査読有、Vol.19、2008、96-99
- ③ 進藤秀彰、田代幸寛、小林元太、関口達也、花井泰三、厨祐喜、岡本正宏、園元謙二、Kinetic study of substrate dependency

for higher butanol production in acetone-butanol-ethanol fermentation、査読有、Process Biochemistry、Vol.43、No.12、2008、1452-1461

- ④ 田代幸寛、光武奈緒子、小林元太、加藤富民雄、神田康三、有明海における細菌相解析、査読無、佐賀大学有明海総合研究プロジェクト成果報告集、Vol.4、2008、113-120
- ⑤ 小林元太、田代幸寛、光武奈緒子、加藤富民雄、神田康三、有明海と伊勢湾・三河湾における細菌相の比較、査読無、佐賀大学有明海総合研究プロジェクト成果報告集、Vol.4、2008、105-112
- ⑥ 加藤富民雄、中川良美、小林元太、田代幸寛、神田康三、有明海に生息する乳酸菌の生産するII型制限酵素、査読無、佐賀大学有明海総合研究プロジェクト成果報告集、Vol.4、2008、99-104
- ⑦ 大石浩隆、中島幹夫、田代幸寛、小林元太、富田由紀子、松本浩一、大重賢治、ビブリオ・バルニフィカス感染症対策—基礎医学的アプローチ(第三報)—、査読無、佐賀大学有明海総合研究プロジェクト成果報告集、Vol.4、2008、137-142
- ⑧ 田代幸寛、大城麦人、園元謙二、廃棄物からのバイオブタノールの製造と高効率生産システムの開発、査読無、分離技術、Vol.38、No.4、2008、241-245
- ⑨ 大城麦人、田代幸寛、園元謙二、アセトン・ブタノール発酵における新バイオディーゼル燃料の生産、査読無、廃棄物学会誌、Vol.19、No.6、2008、271-277
- ⑩ 田代幸寛、進藤秀彰、林実希、馬場俊一、小林元太、園元謙二、静止菌体を用いた酪酸からの新奇な高効率ブタノール生産システムの構築、査読無、日本生物工学会誌、Vol.87、No.2、2009、79
- ⑪ 大城麦人、進藤秀彰、田代幸寛、三輪典子、関口達也、岡本正宏、石崎文彬、園元謙二、Kinetic Modeling and Sensitivity Analysis of Xylose Metabolism in *Lactococcus lactis* IO-1、査読有、Journal of Bioscience and Bioengineering、Vol.108、No.5、2009、376-384
- ⑫ 小林元太、田中重光、中園唯、田代幸寛、加藤富民雄、神田康三、分子生物学的手法による有明海底泥中の細菌相解析、査読無、佐賀大学有明海総合研究プロジェクト成果報告集、Vol.5、2009、121-126
- ⑬ 田代幸寛、代謝工学とは？その発展と応用性、査読無、日本生物工学会誌、Vol.87、No.5、2009、237
- ⑭ 田代幸寛、園元謙二、高速高効率バイオブタノール生産システムの開発、査読無、日本生物工学会誌、Vol.87、No.10、2009、484-486

[学会発表] (計11件)

- ① 田代幸寛、光武奈緒子、小林元太、加藤富民雄、有明海における細菌相解析、平成19年度佐賀大学有明海総合研究プロジェクト成果公開シンポジウム、2008年5月24日、佐賀大学
- ② 園元謙二、田代幸寛、進藤秀彰、Development of novel butanol production system with non-growing cells、The 11th Swiss-Japanese Joint Meeting on Biotechnology and Bioprocess Development、2008年10月26日、スイス、Locarno
- ③ 張楠、柴田圭右、猪熊健太郎、田代幸寛、善藤威史、西愛子、佐藤光、園元謙二、Matching of lactic acid bacteria and fermentation material of non-food biomass --lactic acid fermentation with mutant rice starch、第15回日本生物工学会九州支部熊本大会(2008)、2008年12月6日崇城大学
- ④ 金子涉、柴田圭右、猪熊健太郎、田代幸寛、善藤威史、園元謙二、新奇D-乳酸生産菌の分離と発酵特性、第15回日本生物工学会九州支部熊本大会(2008)、2008年12月6日崇城大学
- ⑤ 金子涉、柴田圭右、猪熊健太郎、田代幸寛、善藤威史、園元謙二、新奇D-乳酸生産菌の分離と発酵特性、日本農芸化学大会2009、2009年3月28日、マリンメッセ福岡
- ⑥ 田代幸寛、張楠、柴田圭右、猪熊健太郎、善藤威史、西愛子、佐藤光、園元謙二、デザインバイオマスを発酵基質とした直接L-乳酸発酵、第61回日本生物工学会大会(2009)、2009年9月23日、名古屋大学
- ⑦ 大城麦人、田邊優子、田代幸寛、猪熊健太郎、花田克浩、園元謙二、乳酸、酢酸を用いたバイオブタノール生産、第61回日本生物工学会大会(2009)、2009年9月23日、名古屋大学
- ⑧ 田村佐和子、阪本直茂、花田克浩、田代幸寛、善藤威史、園元謙二、グリセロールを原料とした乳酸発酵システムの検討、2009年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本合同大会、2009年10月31日、琉球大学
- ⑨ 孫燕旗、金子涉、柴田圭右、猪熊健太郎、田代幸寛、善藤威史、園元謙二、Optimization of D-lactate fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* QU 41、第16回日本生物工学会九州支部大会(2009)、2009年12月5日、九州工業大学
- ⑩ 田中重光、田代幸寛、小林元太、池上徹、根岸秀之、榊啓二、膜分離抽出発酵によるバイオブタノール生産の高効率化、日

本農芸化学大会 2010、2010年3月28日、  
東京大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.seinan-jo.ac.jp/univers/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田代 幸寛 (TASHIRO YUKIHIRO)

西南女学院大学・短期大学部・生活創造学  
科・准教授

研究者番号：90448481