

令和 5 年 1 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21680

研究課題名（和文）バクテリオファージを用いた新規う蝕予防法の確立

研究課題名（英文）Development of a new method for dental caries prevention by bacteriophage

研究代表者

小松澤 均（Komatsuzawa, Hitoshi）

広島大学・医系科学研究科（歯）・教授

研究者番号：90253088

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：う蝕細菌特異的に抗菌効果を発揮するバクテリオファージを同定し、ファージセラピーによる新規う蝕予防法を提唱することを目的とする。本研究期間により、*S. mutans*に対して感受性を示すバクテリオファージを同定した。得られたバクテリオファージを用いて*S. mutans*臨床分離株123株に対して感受性試験を行った結果、120株で感受性を認めた。しかし、他の口腔レンサ球菌やブドウ球菌に対して感受性を認めなかった。さらに、本ファージは*S. mutans*のスクロース存在下でのバイオフィーム形成能を阻害した。以上のことから、本ファージは*S. mutans*特異的作用を有したことから、う蝕予防効果が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において同定したう蝕原因菌に特異的なバクテリオファージを用いることで、バクテリオファージ療法という新しいう蝕予防法への応用が期待できる。口腔感染症の予防・治療に新たな治療法を提案することで、これまでの感染症治療への新規治療法の開発という大きなパラダイム・シフトをもたらすことが期待される。また、近年、口腔と全身疾患との関連性が種々報告されており、本ファージによる口腔感染症の予防は、全身疾患への予防にもつながると考える。

研究成果の概要（英文）：The aim of the study is to identify bacteriophages specifically effect to cariogenic bacteria and to propose a novel caries prevention method using phage therapy. During this study period, we identified bacteriophage susceptible to *S. mutans*. The obtained bacteriophages were tested for susceptibility to 123 *S. mutans* clinical isolates, and 120 were found to be susceptible. However, this bacteriophage had no effect on other oral streptococcal species or staphylococcus. Furthermore, the phage inhibited the ability of *S. mutans* to form biofilms. In conclusion, the phage was expected to have caries-preventive effects because of its *S. mutans*-specific effect.

研究分野：細菌学

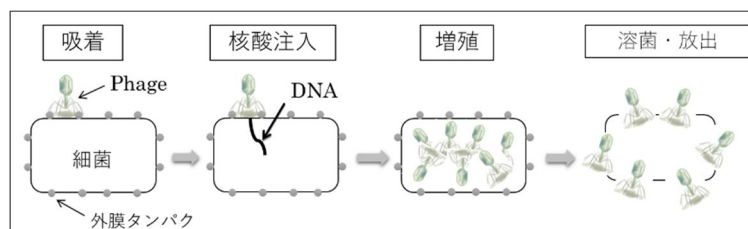
キーワード：バクテリオファージ ミュータンスレンサ球菌 う蝕

### 1. 研究開始当初の背景

世界的に薬剤耐性菌の出現および蔓延が問題視されており、世界各国で薬剤耐性菌に対する対策が講じられている。日本でも2016年にAMRアクションプランが立ち上がり、抗菌薬の適正使用が提唱されているが、それに加えて新しい治療薬の開発も本アクションプランに掲げられている。しかし、抗菌薬の開発は頭打ちの状態であり、新しい観点からの開発が必要である。

一方、2014年にnature誌から、ファージを用いた療法の有用性の報告がされた(Nature 2014.510(7503):15-16.)。これは薬剤耐性菌の問題を受け、ファージ療法が関心を集め始めていることを表している。ファージとは、細菌に特異的に感染するウイルスのことであり、正式にはバクテリオファージと呼ばれる。ファージが感染した細菌は細胞膜を破壊され、死滅する(右図)。

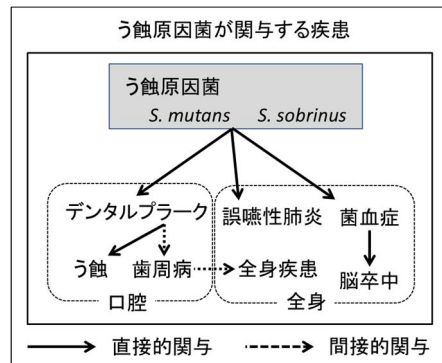
自然界には多くのファージが存在することが明らかになっており、細菌に特異的に作用することから人体には無害である。そこで、これまでの抗菌薬に次ぐ第2の抗菌剤として、病原細菌を特異的に殺菌するバクテリオファージの探査が盛んになってきている。



バクテリオファージによる細菌の溶菌機序

### 2. 研究の目的

本研究では、う蝕原因菌であるミュータンスレンサ球菌群(ミュータンス菌)をターゲットし、バクテリオファージを利用した特異的排除を目的としている。ヒトの口腔に常在するミュータンス菌は *Streptococcus mutans* (Sm)と *S. sobrinus* (Ss)がある。ミュータンス菌は砂糖の成分であるスクロースを分解し、粘着性が高い不溶性グルカンを産生する。この不溶性グルカンがデンタルプラーク形成には必須の成分であり、ミュータンス菌のみが形成する。また、ミュータンス菌は酸産生能が高く、歯の成分を脱灰することでう蝕を誘発する。したがって、本菌を口腔から除去することで、デンタルプラーク形成を抑制し、う蝕の発症を阻害することができる。



これまで、う蝕予防法としてブラッシング、洗口剤などの方法があるが、本菌を排除することは困難である(右図)。また、近年、ミュータンス菌は脳卒中や認知機能障害などの関連が報告されている(Sci Rep. 2016. 6:38561.)。ミュータンス菌が菌血症により損傷した血管に付着し、血管修復を阻害することが報告されている。さらに、ミュータンス菌を除去することは、デンタルプラークの形成を阻害することになり、歯周病発症の抑制にもつながることが考えられる。歯周病は、プラークが成熟する過程で歯周病原菌が定着・増殖し歯周組織に炎症を惹起する疾患であり、プラーク形成の抑制は歯周病の発症抑制にもつながる。さらに、近年口腔と全身疾患との関連性が着目され、特に口腔細菌が糖尿病、動脈硬化症、関節リウマチ、アルツハイマー病(ALZ) がんなど様々な疾患との関連が報告されている(Biomed J. 2019. 42(1):27-35)。したがって、ミュータンス菌のファージによる特異的な排除は、QOLの向上に大きく寄与する。

### 3. 研究の方法

本研究の一部はヒト臨床検体を用いたため、広島大学臨床研究における倫理委員会の承認を得ている(承認番号 E2020-2258)。

#### 1) 唾液を用いたバクテリオファージの分離

ボランティア 11 名から唾液を採取後、遠心分離を行い、得られた上清画分を用いて、ろ過滅菌を行った。唾液サンプルと一晚培養した *S. mutans* 菌液(臨床分離株 2 株、UA159 株)を等量混合し、0.75%トリプチケース・ソイ(TS)軟寒天培地に添加後、TS 寒天培地上に播種し、37℃、一晚培養を行い、バクテリオファージの溶菌作用の際に認められるプラーク斑の同定を行った。

#### 2) *S. mutans* ゲノム情報からのバクテリオファージ遺伝子の検索

以前に当教室で明らかにした *S. mutans* のゲノム解読情報を用いて、ファージ遺伝子の同定を行った。ファージ遺伝子の同定にはファージ遺伝子検索ソフト PHASTER (URL: <https://phaster.ca/>)を用いた。

#### 3) ファージ粒子の調整

ファージゲノムが存在している菌株を用いて行った。一晚培養した菌液を少量、新しいトリプチ

ケース・ソイ液体培地(TSB)に接種・培養後、濁度が0.3に達したときにマイトマイシンC(0.1 mg/ml)を添加し、一晚培養を行った。菌液を遠心、ろ過したサンプルを超遠心し、沈査を生理食塩水で懸濁し、ファージ粒子を調整した。ファージ粒子の存在を確認するため、走査型電子顕微鏡による観察を行った。さらにファージ粒子からDNAを分離し、MiseqおよびMinIONを用いてファージゲノムの完全長を決定した。

#### 4) ファージ感受性試験

被験菌として *S. mutans*123 株、*S. sobrinus* JCM103808, *S. salivarius* GTC217, *S. sanguinis* GTC215, *L. lactis* 1306, *S. oralis* ATCC10557, *S. mitis* GTC495, *Staphylococcus aureus* MW2 株を用いた。一晚培養した各菌液を10倍希釈した菌液100 $\mu$ lを寒天培地に播種後、ファージ溶液を10 $\mu$ l滴下し、一晚培養後の溶菌斑の有無で判定を行った。

#### 5) ファージ添加による *S. mutans* 増殖能に及ぼす影響

一晚培養した *S. mutans* 菌液を少量、新しい培地に接種後、直後および濁度0.2の時点でファージ溶液を添加し、濁度を経時的に観察した。

#### 6) ファージ添加によるバイオフィーム形成能に及ぼす影響

96ウェルプレートに100 $\mu$ lの1%スクロース含有TSBを調整した。各ウェルに10<sup>5</sup>個および10<sup>7</sup>個の菌株を接種し、種々の個数のバクテリオファージを添加した。一晚培養後、培地を取り除き、生理食塩水でウェルを3回洗浄後、1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。10分後、染色液を取り除き、生理食塩水で3回洗浄後、30%酢酸により色素を抽出し、吸光度を測定した。

#### 7) 共培養試験

一晚培養した *S. mutans* 株および口腔レンサ球菌/乳酸菌株を各10<sup>7</sup>個/mlになるように調整した。調整した *S. mutans* 菌液10 $\mu$ lおよび他の菌株10 $\mu$ lを500 $\mu$ lのTSBに接種し、8時間培養を行った。その後、菌体を遠心により回収後、DNAを抽出した。得られたDNA抽出画分を用いて、菌種特異的プライマーを用いた定量性PCR法により、サンプル中の各菌株量を算定し、各菌株の割合を算定した。

#### 8) 組換えエンドライシンタンパクの作製

His-tag融合発現ベクターであるpQE30を用いて、エンドライシンをコードする遺伝子を組み込んだプラスミドを作成し、大腸菌発現株を作成した。

### 4. 研究成果

#### 1) 唾液を用いたバクテリオファージの分離

ボランティア11名から唾液を用いて検討した結果、検討した *S. mutans* 株に対して溶菌斑を認めることができなかった。

#### 2) *S. mutans* ゲノム情報からのバクテリオファージ遺伝子の検索

*S. mutans*123株のゲノム情報からバクテリオファージ遺伝子検索ソフトPHASTERを用いて検討した結果、5株でファージゲノム領域を確認できた。さらに、ファージの各構成成分をコードする遺伝子を検討し、最終的に1株で完全長のファージゲノムを同定した。

#### 3) ファージ粒子の同定およびファージゲノム完全長の塩基配列の決定

上記方法によりファージ粒子を調整した。電子顕微鏡による観察では頭部、胴体、尾部からなるファージ粒子が観察できた(図1)。また、ファージゲノムの完全長を決定したことで、本ファージ粒子は *S. mutans* を含む口腔レンサ球菌および乳酸菌などで報告されている Siphoviridae 科のファージであることが明らかになった(図2)。

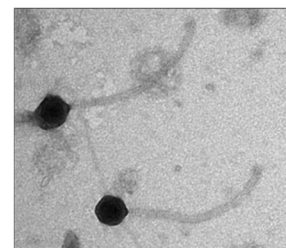


Fig.1 microscopy image of phage

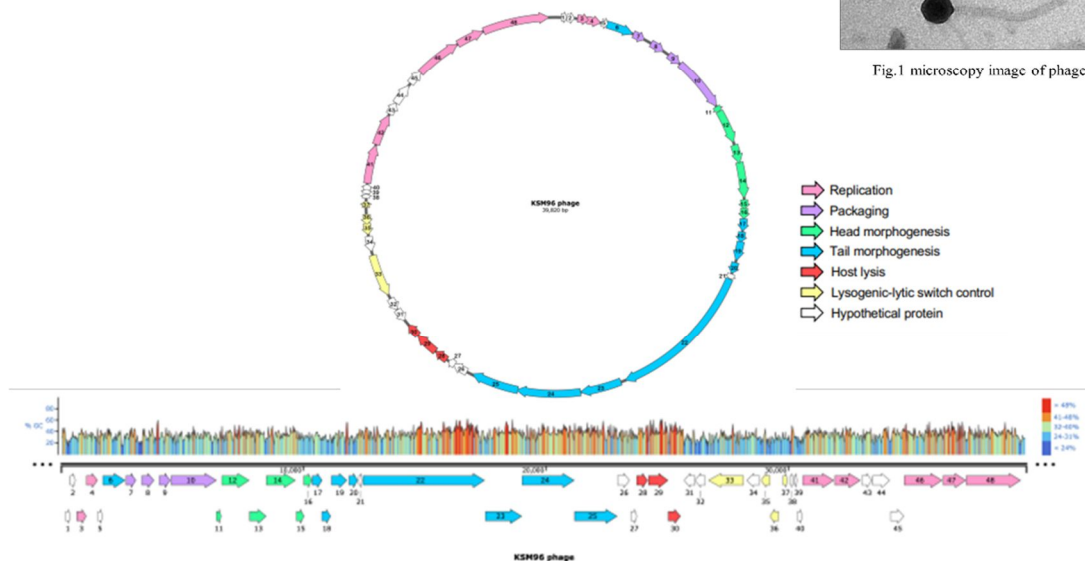


Fig.2 Genetic characterization of KSM96: (A) Schematic representation of the KSM96 DNA sequence.

#### 4) ファージ感受性試験

感受性試験の検討の結果、本ファージは *S. mutans* 123 株の中で 120 株に感受性を認めた。また、他の口腔レンサ球菌および黄色ブドウ球菌には感受性を認めなかった (表 1)。

	Susceptibility (Number of strains) high	Susceptibility (Number of strains) low
<i>S. mutans</i>	120	3
<i>S. sobrinus</i> JCM103808	1	0
<i>S. sarivarius</i> GTC217	1	0
<i>S. sanguinis</i> GTC215	1	0
<i>L. lactis</i> 1306	1	0
<i>S. oralis</i> ATCC10557	1	0
<i>S. mitis</i> GTC495	1	0

Table.1. Antibacterial effect of purified phage on various bacteria

#### 5) ファージ添加による *S. mutans* 増殖能に及ぼす影響

接種菌量に対して 100 倍量のファージを同時に添加することで増殖能に抑制傾向が認められ、1000 倍量添加することで著名な増殖阻害効果を認めた。しかし、ファージ非感受性菌ではファージ添加による増殖阻害効果は認められなかった。さらに、ファージ感受性を認めた 14 株についても検討した結果、同様に大幅な阻害効果が認められた。また、濁度が 0.2 の時点でファージを作用させた際にも同様に増殖阻害効果を認めた。

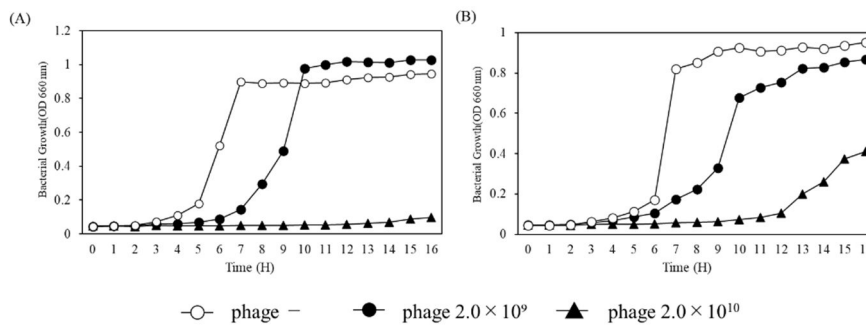


Fig. 3 Efficiency of phage for growth of *S. mutans* strains  
(A) High susceptible strains A  $1.0 \times 10^7$  CFU (B) High susceptible strains B  $1.0 \times 10^7$  CFU

#### 6) ファージ添加によるバイオフィーム形成能に及ぼす影響

接種菌量に対して 10 倍量のファージを添加することによりバイオフィーム形成阻害効果が認められ、100 倍量の添加では大幅な阻害効果が認められた (図 4)。

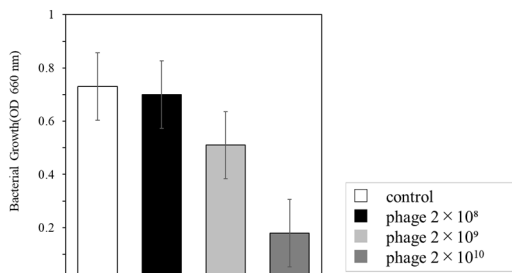


Fig.4. Inhibitory effect of bacteriophage on *S. mutans* biofilm  
*S. mutans* cells  $10^8$  CFU

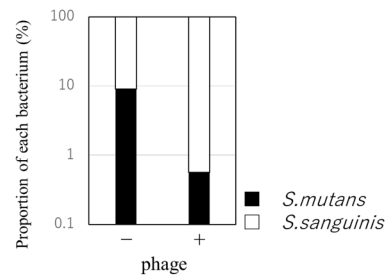


Fig.5. Coculture of *S. mutans* with *S. sanguinis*

#### 7) 共培養試験

*S. mutans* と *S. sanguinis* との共培養試験の結果、ファージを添加することで、*S. mutans* の占める割合は 10 倍以上減少した。ほかの口腔レンサ球菌や乳酸菌との共培養試験の結果についても、同様の効果が認められた (図 5)。

#### 8) 組換えエンドライシンの精製

His-tag 融合組換えタンパクの発現を確認し、精製を行った。しかし、精製過程で本タンパク精製画分は水溶液中でタンパクが析出し、活性の確認ができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 バクテリオファージ及びその利用	発明者 小松澤均他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-159774	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	松尾 美樹  (Matsuo Miki)  (20527048)	広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授    (15401)	
研究分担者	柴 秀樹  (Shiba Hideki)  (60260668)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授    (15401)	
研究分担者	岩野 英知  (Iwano Hidetomo)  (60382488)	酪農学園大学・獣医学群・教授    (30109)	
研究分担者	比地岡 浩志  (Hijioka Hiroshi)  (70305150)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師    (17701)	

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