

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292182

研究課題名(和文)細菌感染症に対するファージセラピーとファージワクチンの応用研究

研究課題名(英文)Research of phage therapy and phage vaccine for bacterial infectious diseases.

研究代表者

岩野 英知 (IWANO, Hidetomo)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：60382488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤耐性の病原性細菌が獣医学領域だけでなく、世界中いろんな場面で問題視されてきている。細菌感染症に対して、新しい方策が望まれている。本研究では、「ファージセラピーの実用化への応用研究」と、「ファージワクチンの応用研究」について検討した。我々は、ファージセラピーの研究としてウマの細菌性角膜炎に対する検討を行った。ウマの角膜炎を引き起こす緑膿菌に対してとても効果的なファージを分離した。分離したファージは、角膜炎モデルマウスにおいて、角膜炎を効果的に防ぐことが出来た。また、ファージワクチンのテーマでは、マイコプラズマの抗原を発現するファージの作成を行った。

研究成果の概要(英文)：Antimicrobial resistance in bacteria is a concern not only in veterinary medicine, but also in general, worldwide. There is a demand for new strategies to treat bacterial infections. In this research, we investigated the 'phage therapy for bacterial infection' and 'phage vaccine'. We examined the use of phage to treat horse bacterial keratitis as a research of phage therapy. We isolated phages toward *P. aeruginosa* causing horse keratitis. The phages in this study could completely prevent the keratitis caused by *P. aeruginosa* in a keratitis mouse model. In the phage vaccine, we constructed phage with surface antigen of *Mycoplasma*.

研究分野：獣医生化学

キーワード：細菌感染症 バクテリオファージ 緑膿菌 黄色ブドウ球菌 ファージセラピー ワクチン

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまで細菌感染症に対する新たな治療戦略の一つとしてファージセラピーの研究開発を手がけ、特許出願してきた(2012年12月より審査請求開始)。本研究では、更なる実用化に向けた「ファージセラピーの実用化への応用研究」と、「ファージワクチンの応用研究」の2本の柱で計画した。薬剤耐性化問題やワクチン開発の難しさを抱える細菌感染症において、抗生剤開発が事実上ストップしている現在、自然界で細菌と相対して進化してきたファージの仕組みを応用していく事は、全ての細菌感染症に対して革新的な対抗手段となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、細菌にのみ感染し死滅させるバクテリオファージを使ったファージ療法ならびにワクチンデザインを主体としたファージワクチンの開発について検討を行った。ファージ療法については、黄色ブドウ球菌に感染するファージをウシ乳房炎への適用する試みと、緑膿菌ファージによるウマ緑膿菌性角膜炎への適用を試みた。また、ファージワクチンは、M13ファージによる免疫刺激効果を利用し、マイコプラズマの抗原部位をM13ファージ上に発現させ、ファージワクチンとして応用する研究である。

3. 研究の方法

1) ファージセラピーの実用化への応用研究

ア) SA 実験感染ウシ乳房炎を用いたファージセラピー実用化検討

①ウシ乳房炎への実践的な適用条件を検討

イ) 細菌性角膜炎へのファージ製剤開発

①緑膿菌に対する特異的ファージを分離してその特異性を比較した。

②角膜炎モデルマウスにて実用化への条件検討をおこなった

2) ファージワクチンの応用研究

ア) マイコプラズマボピスの抗原候補を特定して、ファージに抗原を発現させた。

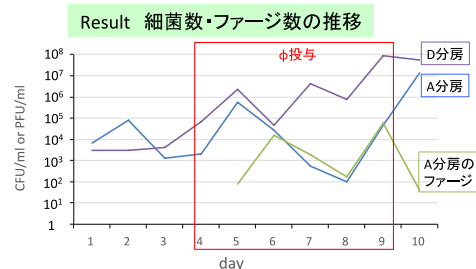
4. 研究成果

ア) SA 実験感染ウシ乳房炎を用いたファージセラピー実用化検討

①ウシ乳房炎への実践的な適用条件を検討

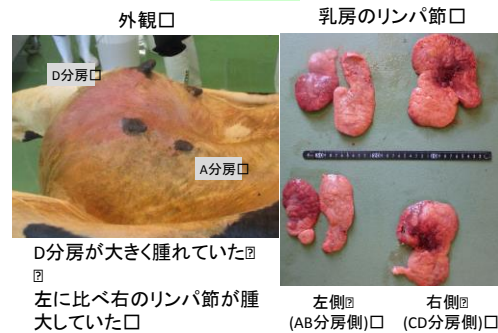
2012年度までの研究でウシ乳房炎マウスモデルにて、ファージ添加によりSAの増殖抑制効果が確認出来たため、ウシSA乳房炎感染牛を作出し、ファージ投与の効果を検証した。3頭のうち1頭でファージ投与の結果、乳中の細菌数が大きく減少したが、ファージ投与終了後、再び菌数が増

加した。ファージの効果は見られたが、乳房炎を完治させるには、ファージを乳房全体に行き渡らせるための工夫などが必要ではないかと考えられた。今後、さらなる検証が必要である。

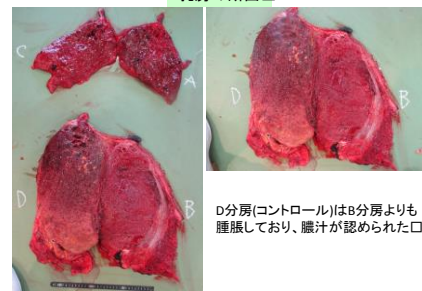


- ・ファージ投与中はA分房での菌数が減少した
- ・D分房は最後まで菌数が増加していた
- ・ファージは菌数の増減に応じて増減した
- ・ファージの投与が終わった後は速やかにファージの数は減少し、菌数はまた増加した

病理解剖口



乳房の断面口



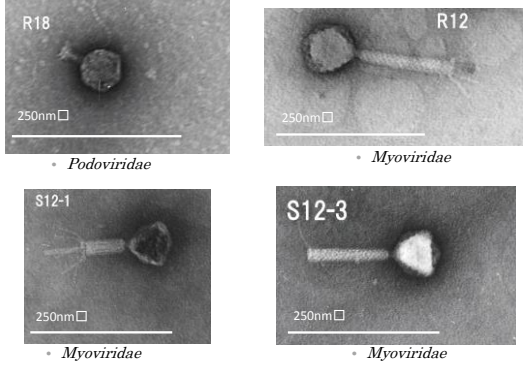
乳房の断面口



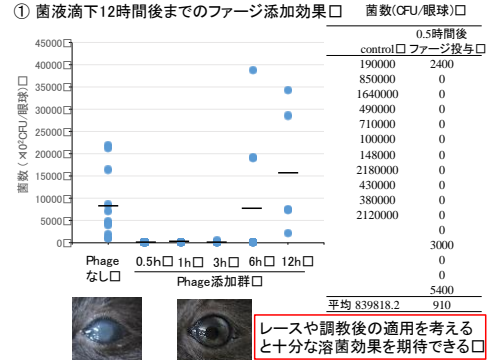
イ) 細菌性角膜炎へのファージ製剤開発
①緑膿菌に対する特異的ファージを

分離してその特異性を比較した。
ファージを分離し、宿主域が広く、
吸着効率の高い有効なファージを分
離できた。

分離したファージの電子顕微鏡写真

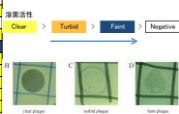


- ・MOI100にて角膜炎の発症に対して、十分な抑制効果が得られた。
- ・ファージをカクテル化することにより、さらに抑制効果が高くなることが分かった。



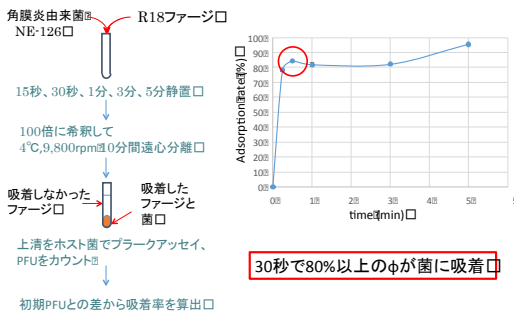
菌株名	血清型	由来	R12	S12-1	S12-3	R18	R26	SSO
NE-12	A	角膜炎	C	C	C	C	C	C
NE-15	G	角膜炎	N	N	F	C	C	C
NE-16	G	角膜炎	C	C	C	C	C	C
NE-89	G	角膜炎	C	C	C	C	C	C
NE-94	D	角膜炎	N	T	T	N	N	N
NE-95	G	角膜炎	N	F	F	C	C	N
NE-128	-	角膜炎	C	C	C	C	C	C
NE-149	A	角膜炎	C	C	C	F	C	T
NE-150	D	角膜炎	N	T	T	N	N	N
NE-153	H	角膜炎	N	N	N	N	N	N
NE-167	G	角膜炎	T	F	F	T	C	C
NE-193	-	角膜炎	F	F	N	C	N	N
NE-95	G	肺炎	C	C	C	C	C	C
NE-98	I	BALF	N	F	F	T	C	C
NE-100	G	BALF	C	C	C	C	C	C
NE-102	G	BALF	C	C	C	T	C	C
NE-112	D	BALF	N	T	T	C	C	C
NE-117	C	副鼻腔炎	C	F	F	N	F	C
NE-120	G	BALF	C	C	C	C	C	C
NE-121	G	BALF	C	C	C	C	C	C
NE-124	H	肺炎	N	N	N	N	N	N
NE-125	B	BALF	N	C	C	C	C	C
NE-129	G	肺炎	C	C	C	C	T	T
NE-132	G	肺炎	T	C	C	C	C	C
NE-137	-	肺炎	C	T	C	T	T	T
NE-138	B	BALF	N	N	N	N	N	N
NE-158	-	皮膚炎(関節腫痛)	N	T	F	T	C	T
NE-169	-	BALF	N	F	F	C	C	T
NE-168	-	副鼻腔炎	T	C	C	C	C	C

ファージの宿主域と溶菌活性
馬疾病由来菌



29株中の26株に明らかな溶菌活性があった

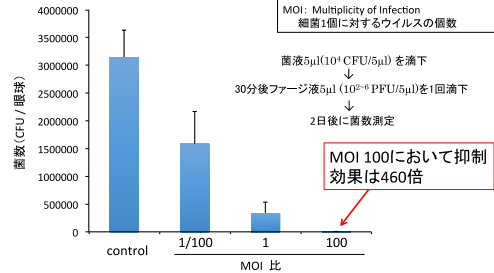
ファージの菌に対する吸着時間と吸着率



②角膜炎モデルマウスにて実用化への条件検討をおこない、以下の3つの結果を得た。

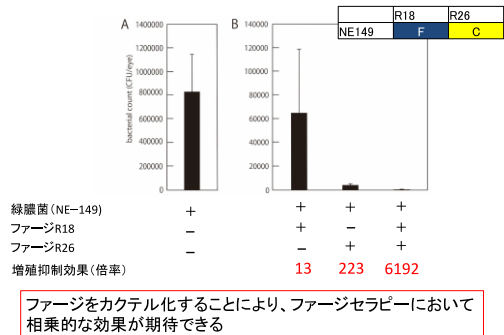
- ・ファージは角膜炎モデルマウスにおいて、菌投与後から3時間まで有効であった。

② 菌とファージのMOI比の検証



MOI 100において十分な溶菌効果を生揮して、角膜炎の発症を抑制できることが明らかとなった。

③ファージカクテル化によるファージセラピーの効果



2) ファージワクチンの応用研究

ゲノム比較解析により、マイコプラズマボビスの持つVSP: variable membrane surface lipoproteinの配列から候補部位を決定し、M13ファージ表面に発現させた。今後このファージのワクチン効果を検証していく予定である。

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 15 件)

1. Complete Genome Sequences of Broad-Host-Range Pseudomonas aeruginosa Bacteriophages Φ R18 and Φ S12-1. Furusawa T, Iwano H, Higuchi H, Usui M, Maruyama F, Nakagawa I, Yokota H, Tamura Y. Genome Announc. 2016 May 5;4(3).
2. Bacteriophage can lyse antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from canine diseases. Furusawa T, Iwano H, Higuchi H, Yokota H, Usui M, Tamura Y. J Vet Med Sci. 2016 in press.
3. Cytokine mRNA profiling and the proliferative response of bovine peripheral blood mononuclear cells to Mycoplasma bovis. Gondaira S, Higuchi H, Iwano H, Nakajima K, Kawai K, Hashiguchi S, Konnai S, Nagahata H. Vet Immunol Immunopathol. ;165:45-53. 2015
4. Antimicrobial susceptibilities of Mycoplasma isolated from bovine mastitis in Japan. Kawai K, Higuchi H, Iwano H, Iwakuma A, Onda K, Sato R, Hayashi T, Nagahata H, Oshida T. Anim Sci J. 2014 ;85: 96-9.
5. The Role of Flies in Disseminating Plasmids with Antimicrobial Resistance Genes Between Farms. Usui M, Shirakawa T, Fukuda A, Tamura Y. Microbial Drug Resistance 21: 562-569. 2015.
6. Characterization of Campylobacter jejuni DNA gyrase as the target of quinolones. Changkwanyun R, Usui M, Kongsoi S, Yokoyama K, Kim H, Suthienkul O, Changkaew K, Nakajima C, Tamura Y, Suzuki Y. J Infect Chemother. 21: 604-609. 2015.
7. Antimicrobial Susceptibilities of Mycoplasma Isolated from Bovine Mastitis in Japan. Kawai, K., Higuchi, H., Iwano, H., Iwakuma, A., Onda, K., Sato, R., Hayashi, T., Nagahata, H. and Oshida, T. Anim. Sci. J. 86: 96-99. (2014)
8. Genetic relatedness between Japanese and European isolates of Clostridium difficile originating from piglets and their risk associated with human health. Usui M, Nanbu Y, Oka K, Takahashi M, Inamatsu T, Asai T, Kamiya S, Tamura Y. Front Microbiol. 5. 513. 2014
9. Antimicrobial susceptibility of indicator bacteria isolated from chickens in Southeast Asian countries (Vietnam, Indonesia, and Thailand). Usui M, Ozawa S, Onozato H, Kuge R, Obata Y, Uemae T, Ngoc PT, Heriyanto A, Chalemchaikit T, Makita K, Muramatsu Y, Tamura Y. J. Vet. Med. Sci. 2014. 76:685-692.
10. Mycoplasma species isolated from intramammary infection of Japanese dairy cows. Higuchi, H., Gondaira, S., Iwano, H., Hirose, K., Nakajima, K., Kawai, K., Hagiwara, K., Tamura, Y., Nagahata, H. Vet. Rec. 172:557. (2013)
11. Effects of vitamin E supplementation on cellular α -tocopherol concentrations of neutrophils in Holstein calves. Higuchi H, Ito E, Iwano H, Oikawa S, Nagahata H. Can J Vet Res. 77:120-125. (2013)
12. Relationship between concentration of lingual antimicrobial peptide and somatic cell count in milk of dairy cows. Kawai, K., Akamatsu, H., Obayashi, T., Nagahata, H., Higuchi, H., Iwano, H., Oshida, T., Yoshimura, Y., Isobe, N. Vet. Immunol. Immunopathol. 15:298-301. (2013)
13. Amino acid substitutions in GyrA and ParC are associated with fluoroquinolone resistance in Mycoplasma bovis isolates from Japanese dairy calves. Sato, T., Okubo, T., Usui, M., Higuchi, H., Tamura, Y. J. Vet. Med Sci. 75:1063-1065. (2013)
14. Effect of antimicrobial exposure on AcrAB expression in Salmonella enterica subspecies enterica serovar Choleraesuis. Usui M, Nagai H, Hiki M, Tamura Y, Asai T. Front. Microbiol. 4:53.
15. Phage vaccine displaying an epitope peptide for immunotherapy of Alzheimer's disease. Osako T, Kawabata S, Tsurumaru T, Uehara K, Hashiguchi S, Sugimura K. Peptide Science 2012 (K. Sugimura Ed.), pp237-240, 2013

〔学会発表〕（計 7件）

1. 緑膿菌性角膜炎に対するファージセラピーの有効性について古澤貴章、岩野英知、冷清水健太郎、樋口豪紀、萩原克郎、横田博、田村豊、第156回日本獣医学学会学術集会 2013年9月22日 岐阜
2. 黄色ブドウ球菌によるウシ乳房炎へのファージ療法応用に関する検討 岩野英知 薬物作用談話会 7月20日 酪農大
3. 競走馬の細菌性角膜炎に対するファージセラピーの検討 岩野英知、冷清水雄太郎、古澤貴章、樋口豪紀、永幡肇、丹羽秀和、片山芳也、木下優太、萩原克郎、岩崎智仁、横田博、田村豊 北海道地区三学会 2014年9月 **地区学会賞**
4. 競走馬の細菌性角膜炎に対するファージセラピーの検討 岩野英知、冷清水雄太郎、古澤貴章、樋口豪紀、永幡肇、丹羽秀和、片山芳也、木下優太、萩原克郎、岩崎智仁、横田博、田村豊 獣医学術学会年次大会 2015年2月 **獣医学術学会賞**
5. 酪農場で発生したマイコプラズマ性関節炎 第42回日本マイコプラズマ学会（2015.5.22） 根布貴則、山本剛史、権平 智、岩野英知、松田一哉、小岩政照、樋口豪紀、永幡 肇
6. Mycoplasma bovis がウシ好中球のサイトカイン mRNA 発現量および活性酸素生成量に及ぼす影響 第42回日本マイコプラズマ学会（2015.5.22） 権平 智、岩野英知、樋口豪紀、永幡 肇
7. 症例の臨床病理および疫学的解析 日本獣医師会獣医学術学会（2015.2.13） 子牛中耳炎の270 小岩政照、小堤晃浩、川本 哲、樋口豪紀

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

学会賞

- 1) 北海道地区三学会 2014年9月 地区学会賞
- 2) 獣医学術学会年次大会 2015年2月 獣医学術学会賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩野 英知 (IWANO, Hidetomo)
酪農学園大学 獣医学群・教授
研究者番号：60382488

(2) 研究分担者

樋口 豪紀 (HIGUCHI, Hidetoshi)
酪農学園大学 獣医学群・教授
研究者番号：00305905

橋口 周平 (HASHIGUCHI, Shuhei)
鹿児島大学 理工学研究科・助教
研究者番号：40295275

萩原 克郎 (HAGIWARA, Katsuro)
酪農学園大学 獣医学群・教授
研究者番号：50295896

前原 誠也 (MAEHARA, Seiya)
酪農学園大学 獣医学群・准教授
研究者番号：50438363

(3) 連携研究者

田村 豊 (TAMURA, Yutaka)
酪農学園大学 獣医学群・教授
研究者番号：50382487