

平成 30 年 3 月 28 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462692

研究課題名(和文) バクテリオファージの溶菌活性を利用した細菌感染性眼疾患の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment by using bacteriophage for ocular diseases induced by bacterial infection

研究代表者

福田 憲 (FUKUDA, Ken)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授

研究者番号：70335751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：家兎角膜にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌を感染させて、バクテリオファージを点眼しその効果を抗菌薬点眼と比較検討した。対照群および抗菌薬点眼群に比してバクテリオファージ点眼群は有意に角膜混濁スコアが低下したが、角膜内の生菌数は統計学的有意差が得られなかった。細菌性眼内炎の動物モデルを確立するため、家兎およびマウスを用いて検討した結果、マウスの硝子体へ緑膿菌あるいは腸球菌を投与することで、多数の好中球浸潤を生じ組織破壊を伴う非常に激しい眼内炎を安定して誘導することが出来た。眼内炎を生じたマウスの硝子体にファージを投与すると、臨床スコアおよび眼内の生菌数が有意に低下した。

研究成果の概要(英文)：We examined the therapeutic effects of bacteriophage eye drop on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis in rabbit. The clinical corneal score was significantly lower in rabbits treated by bacteriophage eye drop than in those treated by anti-biotic eye drop or control. The bacterial load in cornea among the vehicle-treated rabbit, anti-biotic-treated rabbit, and bacteriophage-treated rabbit were not significantly changed. We then examined the bacterial endophthalmitis in rabbit and mouse. The injection *Pseudomonas aeruginosa* or *Enterococcus faecalis* into vitreous cavity in mice stably induced severe endophthalmitis including massive infiltration of neutrophils and destruction of tissue. Injection of phage into vitreous cavity in mice with endophthalmitis significantly suppressed clinical score and viable bacteria in the eyeball.

研究分野：眼科学

キーワード：眼感染症 細菌 バクテリオファージ 角膜潰瘍 眼内炎

1. 研究開始当初の背景

細菌感染による眼疾患は結膜炎や角膜炎などの前眼部のみならず、白内障手術後の眼内炎など種々の病態があり、視機能に直接影響を与えうる重篤な疾患である。現在の細菌感染症の治療は、抗菌薬投与による細菌の除去が中心であるが、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、バンコマイシン低度耐性黄色ブドウ球菌 (VISA) および多剤耐性緑膿菌をはじめとした薬剤耐性菌が出現し、従来の抗菌薬では難治な症例が増加している。今後はますます細菌の薬剤耐性化は進むと考えられ、既存の抗菌薬に代わる新たな細菌感染症に対する治療法が必要であるのは明白である。

バクテリオファージ (ファージ) は細菌のみに特異的に感染し、細菌のなかで増殖・自己複製して細菌を破壊するウイルスである。ファージの細菌感染症治療への応用は 1920 年代に開始されたが、西側諸国においてはペニシリンの発見に続く 1940 年代の抗生剤実用化に伴い、いったんは放棄された。しかし近年の薬剤耐性菌の増加により欧米諸国でもファージ療法の臨床応用が再び検討され、既に米国ではリステリア菌感染症予防のためのファージが食品添加物として FDA により認可されている。申請者は緑膿菌角膜炎モデルにおいて、緑膿菌特異的ファージ KPP12 の単回点眼により治療効果が認められたことを報告した¹。また研究分担者はファージそのものではなく、ブドウ球菌および腸球菌に対するファージ由来の溶菌酵素の生成に成功し²⁻³、溶菌酵素の全身投与により MRSA によるマウス敗血症モデルでの治療効果を報告した²。

2. 研究の目的

今回の研究では、ファージ療法を薬剤耐性菌による感染性眼疾患の代替療法として臨床応用することを目的に、角膜炎および眼内炎の動物モデルにおけるファージ療法、感染性ファージそのものを利用する方法とファージ由来の溶菌酵素を用いた効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) マウスの角膜炎モデルは既存の報告に従ってマウスの角膜上皮を針で擦過して傷をつけた後、細菌を点眼して発症させる。感染後に抗菌薬、ファージあるいはファージ由来の溶菌酵素を点眼しその治療効果を経時的に臨床所見を観察するとともに、眼球を摘出し、角膜内の生菌数やミエロペルオキシダーゼ活性を測定することで浸潤した好中球数を評価する。また摘出した角膜の病理所見を検討する。

(2) 家兎の角膜炎モデルは、角膜上皮を剥離して細菌を点眼する方法と、角膜実質内に細菌を注射する方法で行った。感染後に抗菌薬、ファージあるいはファージ由来の溶菌酵

素を点眼しその治療効果を経時的に臨床所見を観察するとともに、眼球を摘出し、角膜内の生菌数やミエロペルオキシダーゼ活性を測定することで浸潤した好中球数を評価する。また摘出した角膜の病理所見を検討する。

(3) 家兎およびマウスの眼内炎モデルは、麻酔後、毛様体扁平部より細菌を含んだ PBS を硝子体注射することにより発症させ、その後細菌特異的なファージを硝子体内投与する。経時的に臨床所見、眼内の生菌数や炎症細胞数、病理組織学的検討を行うことによりファージの治療効果を評価する。

4. 研究成果

(1) まず MRSA を用いて、角膜炎および眼内炎の動物モデルにおいてファージによる治療効果の検討を行った。MRSA 角膜炎モデルは、既報のマウスを用いたモデルで MRSA 角膜炎を誘導したが、感染が非常に弱く 24 時間後にはほとんどが自然治癒するため、治療薬の効果をみる検討に用いる事は不適切であると考えた。そこで次に家兎 (New Zealand white rabbit) を用いたモデルを検討した。ウサギの角膜上皮を剥離した後、MRSA (500/100 μ l) を角膜実質内に注射して感染を誘導した。翌日角膜に感染が生じているのを確認した後に、対照、MRSA ファージ、抗菌薬 (セフメノキシム) の点眼 (1 日 4 回) による治療を開始した。治療開始 2 日後、安楽死させ角膜を摘出し、角膜内の生菌数を検討した。治療開始後 2 日後では、対照群および抗菌薬点眼群に比してファージ点眼群において有意に角膜混濁スコアの低下が認められた。角膜内の生菌数は、ファージ点眼群において減少傾向が見られたが、3 群間で統計学的有意差は得られなかった。

(2) 次に家兎角膜炎モデルにおいて、角膜実質内への投与を確実にするために、投与量を前年度の半分に、反対に菌数は 2 倍にした。家兎の角膜上皮を剥離した後、MRSA (10³/50 μ l) を角膜実質内に注射し、20 時間後に対照、ファージの溶菌酵素であるリゾスタフィン (20 μ g/ml) 抗菌薬 (セフメノキシム) の点眼 (1 日 4 回) による治療を開始した。治療開始 3 日後 (10 回点眼後) 安楽死させ角膜を摘出し、角膜内の生菌数および好中球浸潤の評価のためミエロペルオキシダーゼ活性を検討した。リゾスタフィン点眼群は生菌数が減少している個体もあったが、感染が成立していない個体などがあり個体差が大きく 3 群間で統計学的有意差は得られなかった。

(3) より安定した角膜炎モデルを作製するため、角膜実質に投与する MRSA の菌数を変えて検討した。MRSA を 10¹、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶ 投与して角膜の臨床所見を観察したところ、10⁴ 投与した群が最も感染が成立することが明らかとなった。最も感染が成立し

やすかった MRSA の菌数 (10^4 /50 μ l) を角膜実質内に注射し、20 時間後に対照、リゾスタフィン (20 μ g/ml) 抗菌点眼薬 (セフメノキシム) の点眼 (1 日 4 回) を開始した。点眼開始 3 日後 (10 回点眼後) 安楽死させ角膜を摘出し、角膜内の生菌数およびミエロペルオキシダーゼ活性を検討した。リゾスタフィン点眼群は対照群、セフメノキシム点眼群に比して、角膜内生菌数およびミエロペルオキシダーゼ活性が減少する傾向にあったが、対照群で自然治癒する個体などがあり個体差が大きく 3 群間で統計学的有意差は無かった。

(4) 次に眼内炎に対するファージ療法の効果を検討した。家兎 (New Zealand white rabbit) 硝子体内に MRSA (500) を投与することで MRSA 眼内炎モデルを生じさせ、翌日に対照、ファージ、抗菌薬 (バンコマイシン) を硝子体投与して治療を行い、治療開始 2 日後に安楽死させ眼球を摘出した。治療開始後の硝子体液のミエロペルオキシダーゼ活性は 3 群間で統計学的有意差は見られなかった。治療開始 2 日後バクテリオファージおよびバンコマイシン投与群は、対照群に比して眼内の生菌数が低い傾向にあったが、個体差が大きく 3 群間で統計学的有意差は得られなかった。

(5) これらの結果より家兎を用いた細菌性眼内炎モデルは、眼内の生菌数や臨床所見などの個体差でのばらつきが大きく薬剤の治療効果を検討する実験のモデルとしては安定したモデルではないと考え、マウスを用いた細菌性眼内炎のモデルの確立を行った。眼内に摂取する菌は緑膿菌と腸球菌を用いて、C57BL/6 マウスの硝子体へこれらの菌を投与することで、マウス細菌性眼内炎モデルを発症するか検討した。まず投与する菌量の至適量を検討した。緑膿菌においては、12,500、125,000、1,250,000 の 3 つの菌数を 0.5 μ L の懸濁液として硝子体内に投与した。24 時間後にはどの群においても眼内から生菌が検出されたが、125,000 以上の投与で安定して眼内炎が発症することが分かった。再検討においても 100000 bacteria/0.5 μ L を硝子体に投与すると 24 時間後には眼内の生菌数は約 1000000 CFU/eye が検出され、臨床スコアも悪化し、ミエロペルオキシダーゼ活性を用いて評価した好中球の浸潤も有意に促進された。腸球菌においては、1,250、12,500、125,000 の菌量を硝子体に投与した結果、感染 24 時間後では 12,500 以上の投与で安定して眼内炎が生じることが分かった。10000 を硝子体に投与すると 24 時間後には眼内の生菌数は約 100000000 CFU/eye に増加し、臨床所見も増悪し、好中球の浸潤も有意に促進し、至適濃度と考えた。菌を投与後、6、9、12、19、24 時間後の病理所見および好中球の浸潤を検討したところ、病理所見もミエロペルオキシダーゼ活性を用いて評価した好中球の浸潤も菌投与後 19 時間から生じることが明

らかとなった。これらの動物モデルを用いてファージ療法の効果を検討した。

(6) マウスの硝子体に腸球菌 (10^4) を投与し眼内炎を誘導し、感染 6 時間後にファージを硝子体に投与する群としない群で治療効果を比較検討した。腸球菌感染 24 時間後には眼内炎が生じ、前房内のフィブリン析出あるいは出血により眼底は透見できなくなった。感染後にファージを投与した群においては、臨床スコア、ミエロペルオキシダーゼ活性および眼内の生菌数が有意に低下した。

< 引用文献 >

1. Fukuda K, Ishida W, Uchiyama J, Rashel M, Kato S, Morita T, Muraoka A, Sumi T, Matsuzaki S, Daibata M, Fukushima A. *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice: effects of topical bacteriophage KPP12 administration. PLoS One. 7, 2012, e47742.
2. Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, Uehara Y, Kuramoto S, Sugihara S, Yagy K, Muraoka A, Sugai M, Hiramatsu K, Honke K, Matsuzaki S. Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11. J Infect Dis. 196, 2007, 1237-1247.
3. Uchiyama J, Takemura I, Hayashi I, Matsuzaki S, et al. Characterization of lytic enzyme open reading frame 9 (ORF9) derived from *Enterococcus faecalis* bacteriophage phiEF24C. Appl Environ Microbiol. 77, 2011, 580-585.

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1件)

福田 憲、人畜共通感染症、眼科、査読無、Vol. 58、2016、pp.559-565.

[学会発表](計2件)

福田 憲、石田 わか、内山 淳平、松崎 茂展、福島 敦樹、眼感染症に対するファージ療法の研究開発および臨床応用への問題点。第 158 回日本獣医学会学術集会。北里大学獣医学部 (青森県十和田市)。2015 年 9 月 7~9 日

福田 憲、石田 わか、原田 陽介、福島 敦樹、リボ多糖による角膜実質細胞の自然免疫応答およびマウス角膜炎に対する

LL37 の抑制作用. 第 120 回日本眼科学会
総会 . 仙台国際センター(宮城県仙台市).
2015 年 4 月 7~10 日

〔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 0 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〕

ホームページ等 : <http://www.kochi-eye.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 憲 (FUKUDA, Ken)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部
門・准教授

研究者番号 : 70335751

(2) 研究分担者

松崎 茂展 (MATSUZAKI, Shigenobu)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部
門・准教授

研究者番号 : 00190439

内山 淳平 (UCHIYAMA, Junpei)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号 : 20574619

(3) 連携研究者

()

(4) 研究協力者

()