

## 23. 多剤耐性アシネトバクター・バウマニを溶菌する

### 新規バクテリオファージの探索と解析

○松田 由美恵 (大阪健康安全基盤研究所)

#### 【研究の必要性と目的】

*Acinetobacter baumannii* (AB)は主に院内感染の原因菌として知られており、自然環境に存在するため乾燥に強く、一度医療現場が汚染されると排除しにくい[1]。世界保健機関(WHO)はカルバペネム耐性ABを最も優先すべき耐性菌の一つに指定している[2]。高度耐性化した多剤耐性AB (Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: MDRAB)は有効な治療薬がほとんどないため、従来の抗菌薬に代わる新たな抗菌戦略が喫緊の課題となっている。日本国内においても海外からの持ち込みによるアウトブレイク事例が報告されており[3]、大きな脅威となっているが、現状では早期発見を目指して監視体制を強化し、院内感染対策を徹底すること以外に対抗する手立てはない。

そこで、抗菌薬に代わる新たな治療法として、細菌に感染するウイルスであるバクテリオファージ(ファージ)を利用したファージセラピーが世界中で注目を集めている。ファージセラピーの主な利点としては、人体の細胞には感染しないため副作用が少ないこと、菌種特異性が非常に高く常在細菌叢を乱さず標的細菌のみを溶菌できること、抗菌薬と異なる機序で溶菌するため薬剤耐性菌にも有効であることが挙げられる。2016年には米国のバターソン症例が大きな注目を集めた[4]。本症例では、MDRABにより昏睡状態に陥っていたトム・バターソン氏がファージセラピーにより劇的に回復した。これを契機に、ファージセラピーの研究は世界中で盛んに進められることとなった[5]。海外では、MDRABに有効なファージも報告されているが[6]、日本国内における知見は未だ少ない。ファージは多様性が非常に高く、細菌の株レベルで異なる感染性を示すため、ファージセラピーでは多様なファージのセットであるファージライブラリを構築し、そこから標的に有効なファージを選抜する。そのため、まずABのファージライブラリ構築が必要であると考えた。ファージの宿主域は非常に狭いため、異なる宿主域をもつファージをできるだけ多く見つけ出すことが重要となる。よって、本研究では、MDRABを含むABを溶菌する新規ファージの探索とその宿主域の解析を行うことにした。ファージは下水や河川などの環境中に豊富に存在するため、そこか

ら AB を溶菌するファージを探索する。

## 【研究計画】

### 1. ファージの探索

当所に保存されている臨床分離株 MDRAB (AB\_01～AB\_06) を含む AB10 株 (AB\_01～AB\_010) を宿主菌として、下水 60 サンプルからファージ探索を行った。宿主菌の培養には LB (Luria-Bertani) 液体培地を使用した。宿主菌の培養液と下水サンプルの混合液を、45℃に保温した LB Top agar (0.4% agarose) に混ぜてよく攪拌し、LB 寒天培地上に均一に注いで固化させた。その後 36℃で一晩培養し、プラーク形成の有無を確認した。

### 2. ファージの純化と精製

プラーク形成が確認された場合はプラークを採取し、LB 液体培地で一晩培養した。その上清を宿主菌培養液と混合して、再びプラーク形成の有無を確認した。この手順を 3 回繰り返すことでファージの純化を行った。純化したファージに SM buffer を添加して回収し、遠心式のフィルターユニットにより精製した[7]。

### 3. ファージの宿主域の評価

精製したファージ液を使用して、AB10 株に対するファージの宿主域を評価するためスポットテストを実施した[8]。菌液のみを添加した LB Top agar をよく攪拌し、LB 寒天培地上に均一に注いで固化させた。固化した LB Top agar 上に、15 株のファージ液と SM buffer (Negative Control) を 5μl ずつ滴下した。30 分間室温放置して乾燥させた後 36℃で一晩培養し、スポット形成の有無を確認した。スポットは、透明度が高い順に Clear (C)、Turbid (T)、Faint (F)、No spot (N) として判定した。

## 【実施内容・結果】

観察されたファージプラークの 1 例を図 1 に示す。ファージ探索の結果、AB\_01 を宿主とするファージが 12 株(下水サンプル 14, 15, 17, 22, 26, 27, 28, 29, 46, 47, 57, 59)、AB\_03 を宿主とするファージが 2 株(下水サンプル 20, 46)、AB\_07 を宿主とするファージが 1 株(下水サンプル 27)の 15 株のファージが分離された。

本研究で観察されたスポットを図 2 に示す。C、T、N は観察されたが F は観察されなかった。得られたファージ 15 株の、AB10 株に対するスポットテストの結果を表 1 に、実際の結果の一部は図 3 に示した。AB\_01 を宿主とするファージ 12 株はすべて AB\_01 のみを溶菌する結果となり、判定はすべて C であった。AB\_03 を宿主とするファージ P008 と P011 は AB\_02、AB\_06、AB\_09 および AB\_010 を溶菌することがわかった。P008 の AB\_06 に対するスポットのみ T であり、他はすべて C であった。AB\_07 を宿主とするファージは AB\_07 のみを溶菌し、判定は C であった。いずれの場合も、SM buffer を滴下した場所にスポットは形成されなかった。

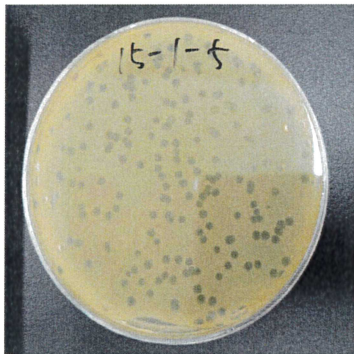


図 1. ファージプラーク

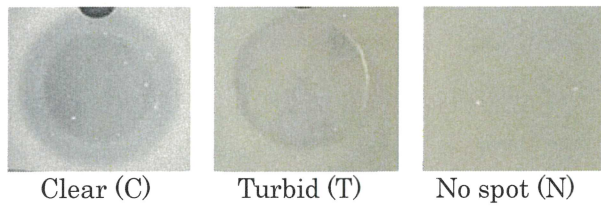


図 2. スポットの判定

C: 内部に曇りがなく明瞭

T: 辺縁部は明瞭であるが内部に曇りがある

N: スポットが観察されない

表 1. スポットテスト結果

|              |      | 菌株    |       |       |       |       |       |       |       |       |        |
|--------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
|              |      | AB_01 | AB_02 | AB_03 | AB_04 | AB_05 | AB_06 | AB_07 | AB_08 | AB_09 | AB_010 |
| ファ<br>ー<br>ジ | P001 | C     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N      |
|              | P002 | C     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N      |
|              | P003 | C     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N      |
|              | P004 | C     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N      |
|              | P005 | C     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N      |
|              | P006 | C     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N      |
|              | P007 | C     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N      |
|              | P008 | N     | C     | C     | N     | N     | T     | N     | N     | C     | C      |
|              | P009 | N     | N     | N     | N     | N     | N     | C     | N     | N     | N      |
|              | P010 | C     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N      |
|              | P011 | N     | C     | C     | N     | N     | C     | N     | N     | C     | C      |
|              | P012 | C     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N      |
|              | P013 | C     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N      |
|              | P014 | C     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N      |
|              | P015 | C     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N     | N      |

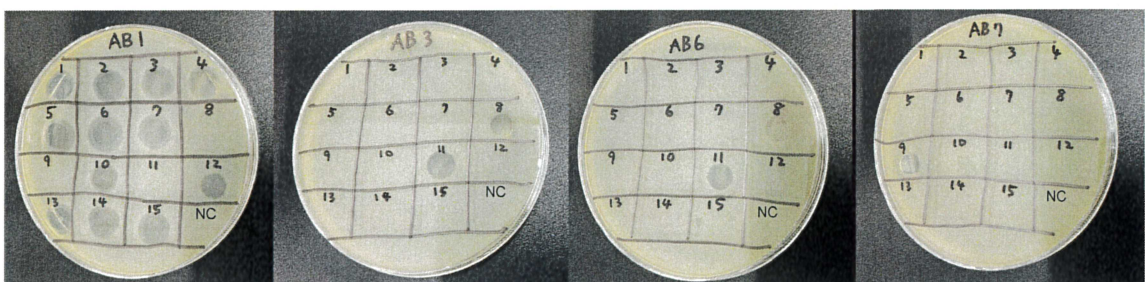


図 3. スポットテスト結果(一部)

### 【考察と今後の課題】

本研究で分離されたファージは、AB\_01 を宿主とするファージ、AB\_03 を宿主とするファージ、AB\_07 を宿主とするファージの 3 グループに分けられる。これら 3 グループのファージは全く異なる宿主域を持つことから、それぞれ異なるレセプターを認識していることが示唆された。ファージレセプターとなる菌体表面構造は多様性が高く、AB と同じグラム陰性菌に分類される大腸菌では、LPS や膜タンパクである OmpC などがレセプターとなっているという報告がある[9, 10]。LPS は、リピド A、コア多糖、O 抗原により構成され、酵素により多段階的に合成されているが[11]、それらの酵素の変異により、ファージ耐性化が起こることが知られている[12]。ファージの感染は、レセプターを認識し吸着することで始まるため、認識するレセプターの違いは宿主域選択に大きく関係する。ファージライブラリ構築には、異なる宿主域をもつファージをできるだけ多く見つけ出すことが重要なため、今回ファージによる溶菌が確認されなかった AB\_04、AB\_05、AB\_08 について、今後もファージ探索を継続していく必要がある。加えて、本研究の結果より、宿主菌が同一な場合は分離されるファージの性質も似てしまうため、多様な宿主菌を用いることもファージ探索における重要な要素と考えられる。今後は宿主菌の選定に主眼を置いて、ファージ探索を実施する必要がある。

スポットテストでは、ファージ吸着から溶菌までのステップが正常である場合にスポットが観察される。そのため、ファージ P008 において AB\_06 に対するスポットのみ T、他の判定はすべて C となったことは、ファージ吸着から溶菌までのステップで、ファージ耐性化などの何らかの問題が生じていることを示唆している。また、No spot の場合、ファージは吸着しているが、その後に細菌の防御システムにより排除されたことで溶菌が起こらなかった可能性も考えられる。よって、今後は培養液の濁度を評価するプレートリーダーを用いて、経時的なファージの溶菌効果を測定することで、ファージ耐性化なども検出していく必要があると考えられる。

AB\_01 を宿主とするファージ 12 株や AB\_03 を宿主とするファージ 2 株など、同じ菌株を宿主とするファージについては、同一ファージではないことを確認するためゲノムによる分類を実施する予定である。また、ファージには宿主細菌を殺す溶菌サイクルと宿主ゲノムに組み込まれて共生する溶原サイクルの 2 つの生活環がある。この 2 つの生活環を持つ溶原ファージは、ゲノムインテグラーゼ遺伝子を持ち、宿主間を移動することで病原遺伝子や薬剤耐性遺伝子を水平伝播する可能性があるため、ファージセラピーには望ましくない。よって、溶菌サイクルのみを持つ溶菌ファージであることを確認する必要がある。そのため、今後 Miseq によりゲノムデータを取得し、ファージの持つ遺伝子を同定する。

現在、ゲノム解析に向けて DNA 抽出 (NORGEN、Phage DNA Isolation Kit、TURBO DNA-free Kit) を実施している。ゲノムデータを取得次第、解析を進める予定である。

### 【参考文献】

1. Ibrahim S, Mol Biol Rep, 2021, Oct;48(10):6987-6998
2. WHO bacterial priority pathogens list, 2024
3. 上地幸平, 日本臨床微生物学雑誌, 2018, Vol. 28 No. 2
4. Schooley RT, Antimicrob Agents Chemother, 2017, Sep 22;61(10):e00954-17
5. Pirnay JP, Viruses. 2018 Feb 6;10(2):64
6. Peters DL, Viruses, 2023 Mar 13;15(3):739
7. Bonilla N, PeerJ, 2016, Jul 26;4:e2261
8. Synnott AJ, Appl Environ Microbiol, 2009, Jul;75(13):4483-90
9. Washizaki A, Microbiologyopen, 2016 Dec;5(6):1003-1015
10. Islam MZ, PLoS Pathog, 2019 Dec 19;15(12):e1008193
11. Maldonado RF, FEMS Microbiol Rev, 2016 Jul;40(4):480-93
12. Cota I, PLoS Genet, 2015 Nov 19;11(11):e1005667

### 【経費使途明細】

| 使 途                                | 金 額       |
|------------------------------------|-----------|
| 試薬(Invitrogen、TURBO DNA-free Kit)  | 109,560 円 |
| メルクミリボア、アミコンウルトラー15 100K           | 125,961 円 |
| 試薬(NORGEN、Phage DNA Isolation Kit) | 63,819 円  |
| 振込手数料                              | 660 円     |
| 合 計                                | 300,000 円 |
| 大同生命厚生事業団助成金                       | 300,000 円 |