

別紙様式 3

4 大学連携研究（公募型）支援費に係る研究成果（ホームページ用）

事 項	(所 属)	(職 名)	(氏 名)
共同研究 代表者	京都工芸繊維大学	教授	亀井加恵子
研究組織 の体制	京都府立医科大学	教授	佐和貞和
	株式会社日吉	研究員	近藤昭宏
研究の名称	ファージによる緑膿菌特異的除菌剤の開発研究		
研究のキーワード（注1）	ファージ、緑膿菌、除菌		
研究の概要 （注2）	<p>緑膿菌は生活環境中に広く常在し、医療機関内においても洗面台、浴室など湿潤な環境で検出される。緑膿菌の病原性は低いが、免疫力が弱った人では容易に感染が成立し、肺炎、尿路感染症、術創部感染症、菌血症等を引き起こす。緑膿菌は強い薬剤抵抗性を持ち、多剤耐性菌も出現しているため、院内感染の防止の観点からも医療機関の環境中に存在する緑膿菌の除菌は重要である。天然に普遍的に存在するバクテリオファージ（ファージ）は、細菌を菌種特異的に殺す（溶菌する）。宿主特異性が厳密であり、動植物には感染せず、無害であるため、医療、食品製造、農業などにおける除菌剤、殺菌剤としてファージの実用化が進められている。本研究では、環境中の緑膿菌の除菌、特に院内感染防止のための医療機関の水まわりの除菌を目的に、緑膿菌を溶菌するファージの単離・精製とその形態を解析した。</p>		



図. ドロップテストの結果. 緑膿菌 PA103 を培養し、左から ϕ PA103-1、 ϕ PA103-2、 ϕ PA103-3 をドロップした。クリアなプラークが形成したことから、緑膿菌を溶菌していることが分かる。

<p>研究の背景</p>	<p>抗生物質耐性菌が蔓延すれば、世界の医療レベルは100年前の抗生物質の開発以前に戻ると言われるほど、抗生物質耐性菌の問題は深刻な脅威となっている。一方、新たな抗生物質の開発は進んでおらず、抗生物質代替品の開発が求められている。我々が着目した緑膿菌は生活環境中に広く常在し、免疫力が弱った人では肺炎、尿路感染症等を引き起こす。加えて、緑膿菌は強い薬剤抵抗性を持ち、抗生物質耐性菌が出現しやすいことから、環境中に存在する緑膿菌の除菌方法の開発は重要である。</p> <p>バクテリオファージ（ファージ）は、細菌を菌種特異的に溶菌するウイルスであり、その宿主特異性が非常に厳密である。人を含む動植物には感染せず、無害であり、また自然界に普遍的に存在するため、ファージ利用による環境への影響はほとんど無い。以前からファージの感染症の治療薬や除菌剤としての応用は試みられてきたが、抗生物質耐性菌の問題が深刻になるとともに、ファージセラピーをはじめとするファージ活用が注目されるようになった。</p> <p>以上を背景に、本研究は臨床分離した緑膿菌の研究を続けてきた京都府立医科大学教授佐和とファージ研究を続けている京都工芸繊維大学教授亀井との共同研究により、病院等で使用できる除菌剤としてのファージ製剤の開発を目的として実施したものである。</p>
<p>研究手法</p>	<p>京都市上下水道局の異なる取水口より採取した下水および協力研究者から提供された下水を用い、宿主として緑膿菌PA01株およびPA103株を用いてファージをスクリーニングした。なお、本研究で用いた緑膿菌PA103株は京都府立医科大学佐和教授によって単離された臨床分離株であり、強い細胞毒性が認められている。また、PA01株は広く研究に用いられる標準的な株である。</p> <p>ファージは2重平板法によってプラークの形成の有無によって検出し、単一プラークの採取を数回繰り返して、ファージを単離した。ファージはネガティブ染色の後、走査型透過電子顕微鏡を用いてTEMモードで形態を観察した。</p>
<p>研究の進捗状況と成果</p>	<p>下水を用い、緑膿菌PA01株およびPA103株を溶菌するファージをスクリーニングした。その結果、PA01を溶菌するファージ1種(φ PA01)、PA103株を溶菌するファージ3種(φ PA103-1、φ PA103-2、φ PA103-3)の単離に成功した。</p> <p>得られたφ PA01は緑膿菌PA01株を溶菌するが、緑膿菌PA103株を溶菌できなかった。一方、3種類のPA103ファージはいずれもPA01株を溶菌できなかった。このことより、単離したファージは少なくとも2種類の緑膿菌に対してそれぞれ特異的であることが判明した。今後、佐和教授が保有する緑膿菌の臨床分離株の提供を受け、宿主特異性の解析を進める予定である。</p> <p>電子顕微鏡による形態解析の結果、φ PA01およびφ PA103-1は頭部とフレキシブルな尾部を持つことから <i>Siphoviridae</i> 科、φ PA103-2は頭部と短い尾部を持つ <i>Podoviridae</i> 科のウイルスであると同定した。φ PA103-3は尾部が観察できなかったことから、球状ファージもしくは尾部が脱落した可能性が考えられる。以上の結果より、本研究で得られた緑膿菌ファージ4種類は宿主特異性が異なるか、もしくは異なる科に属することが明らかとなった。現在、ファージの増殖パラメータの解析を進めているところである。</p>

	<p>ファージを除菌剤として活用する上で克服しなければならない課題は、ファージに対する耐性を獲得した細菌の出現である。ファージ耐性菌の発生を抑制するためには、複数のファージを混合したカクテルの作成が有効であることが報告されている。我々の先行研究において、感染機構の異なる複数のファージのカクテル作成が、耐性菌発生抑制により有効であることを明らかにしている。本研究で得たPA103株ファージ3種類は異なる科に属しており、緑膿菌に対して異なる感染機構を持つ可能性があるため、耐性菌発生を抑制する効果の高いファージカクテルを作成するのに有効であると考えられる。今後、得られたファージのカクテル化によるファージ耐性菌発生抑制効果を確認する予定である。</p>
<p>地域への研究成果の還元状況</p>	<p>今後、ファージ製剤の除菌剤としての開発に成功すれば、多様なアプリケーションが考えられることから、地域への貢献が可能になると考えている。</p>
<p>研究成果が4大学連携にもたらす意義</p>	<p>本研究期間内で複数の異なる科に属するファージを単離できたことから、最終目標であるファージを用いた除菌剤の開発につながる大きな成果が得られた。今後、京都府立医科大学との連携研究の継続によって、ファージカクテルの安定性試験、実用化試験等を行う予定である。これによって、病院など免疫力が低下した人が多く集まる環境を浄化し、感染を抑制するための除菌剤として開発を進める予定である。</p>
<p>研究発表 (注3)</p>	<p>なし</p>

(注1) 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

(注2) 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて作成すること。

(注3) 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

(注4) 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

(注5) 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。