



ファージセラピーの安全性を向上させる新手法

安藤 弘樹 満仲 翔一

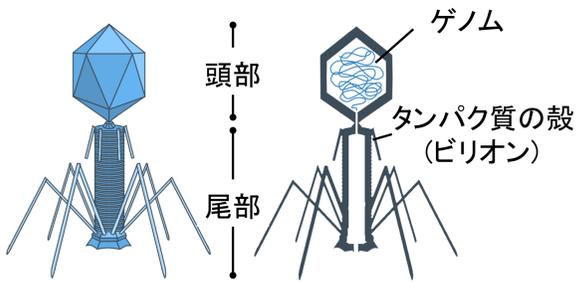
岐阜大学大学院医学系研究科病原体制御学分野

概要

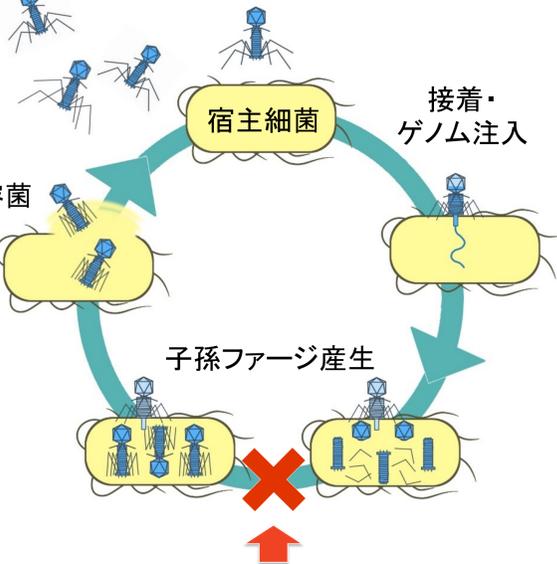
ファージは細菌に感染する天敵ウイルスである。多剤耐性細菌感染症の治療法や細菌叢の編集手法として、ファージセラピーが注目されている。ファージセラピーの有用性は明らかであるが、一方でウイルスであるファージは宿主細菌が存在する限り増殖し続けてしまい、変異の蓄積等による意図しない副作用が生じる可能性がある。そこで、ファージの感染性と殺菌性は維持したまま、一度限りしか感染できない宿主細菌特異的ナノ粒子を開発した。これは、生物学的封じ込め可能なファージと言い換えることもできる。*in vitro* 及び *in vivo* での有用性を確認している。

① ファージについて

ファージは細菌の天敵ウイルス

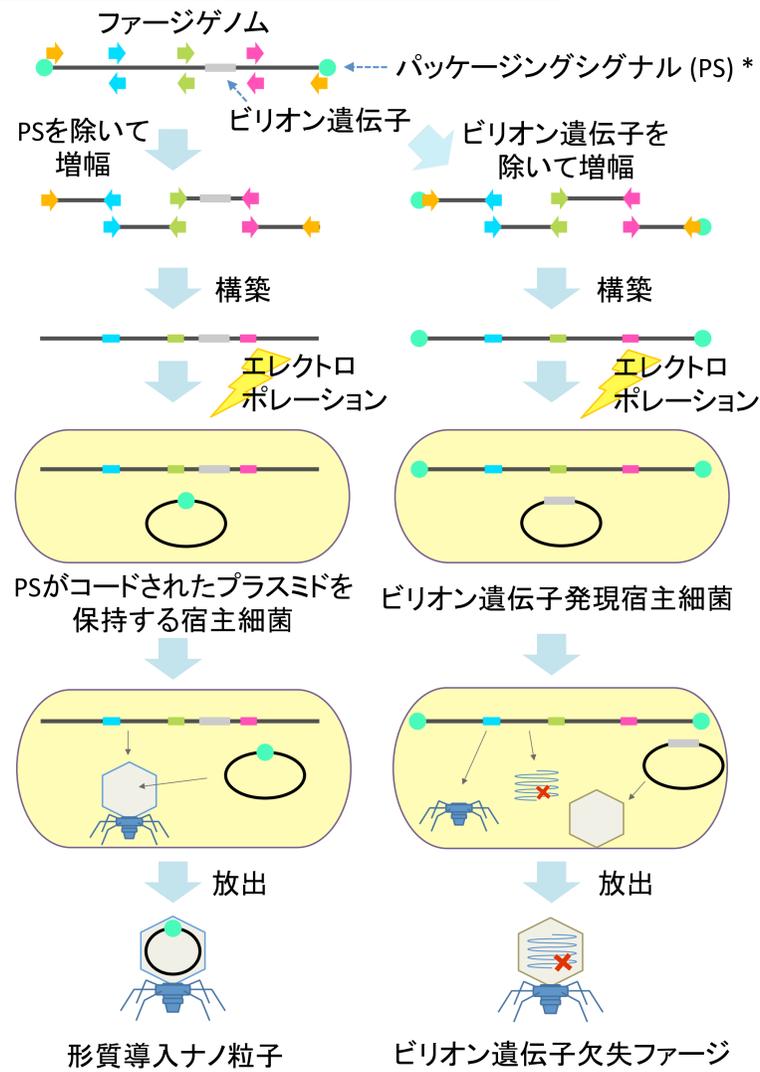


ファージの生活環



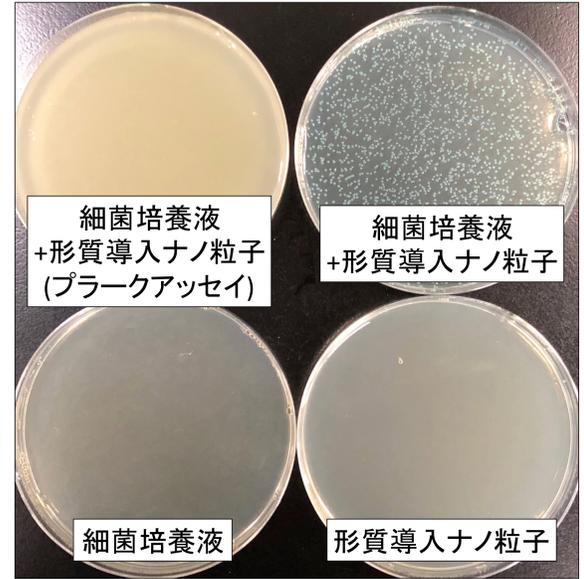
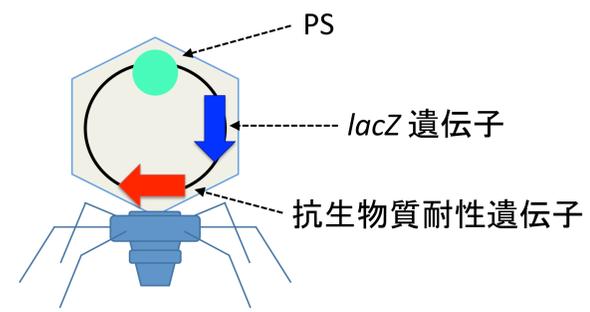
子孫ファージ産生能力を失わせ、二種類の「宿主細菌特異的ナノ粒子」を創出した。

② 宿主細菌特異的ナノ粒子の創出手順



* ファージゲノムが頭部に格納されるために必要なシグナル配列

③ 形質導入ナノ粒子



抗生物質及びX-galを含んだプレート

細菌培養液と形質導入ナノ粒子を混ぜて抗生物質及びX-galを含んだプレートに塗布した。無数の形質導入されたコロニーが生じた。一方、プラークは形成されなかったことから、野生型のファージは含まれていなかったことが示された。

④ ビリオン遺伝子欠失ファージ

+ ビリオン遺伝子

WT Δ WT Δ

頭部 欠失

Δ頭部

尾部遺伝子群 欠失 lacZ

Δ尾部

X-gal プレート

* LO: Lysis from without
ファージの増殖を伴わない溶菌

ファージは感染と溶菌を繰り返すことで細菌上にプラークと呼ばれる斑点を形成する。ビリオン遺伝子欠失ファージはビリオン遺伝子発現細菌上ではプラークを形成したが、発現しない細菌上では形成しなかった。欠失した遺伝子の代わりに任意の遺伝子を挿入・発現させることも可能。

⑤ ビリオン遺伝子欠失ファージの殺菌性評価及び封じ込め試験

A 6時間培養後

① 細菌培養液
② 細菌培養液 + 野生型ファージ (MOI = 10)
③ 細菌培養液 + 頭部遺伝子欠失ファージ (MOI = 10)
④ 細菌培養液 + 尾部遺伝子欠失ファージ (MOI = 10)

B 24時間継続培養してプラークアッセイ

LB MOI = 1

MOI = 10 MOI = 100

A. 細菌培養液にファージまたはビリオン遺伝子欠失ファージを添加して6時間培養した。充分量を加えることでビリオン遺伝子欠失ファージは野生型ファージと同程度の殺菌作用を示した。
B. 細菌培養液にビリオン遺伝子欠失ファージを添加し、24時間培養した。感染性のあるファージが存在するかプラークアッセイを行なったが、プラークは形成されなかった、すなわち100%の封じ込めに成功した。

⑥ ビリオン遺伝子欠失ファージを用いた細菌感染症治療

ファージ (静脈内投与) 5×10^7 PFU

細菌 (腹腔内投与) 1×10^5 CFU

生存率 (%)

日数

Δ頭部 $P = 0.0046$

野生型 $P = 0.0001$

コントロール

細菌をマウスの腹腔内に注射し、その後培地 (コントロール)、ファージ (野生型) またはビリオン遺伝子欠失ファージ (Δ頭部) を静脈内に注射して生存率を調べた。ビリオン遺伝子欠失ファージを注射したマウスは野生型のファージを注射したマウスと同程度の生存率を示した。