

| | | |
|---------------|---|------------------------------------|
| | 氏 名 | ぐえん そんはん NGUYEN SONG HAN |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (学 術) | |
| 学 位 記 番 号 | 博 1 1 3 1 号 | |
| 学 位 授 与 の 日 付 | 令和 6 年 9 月 25 日 | |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 | |
| 研 究 科 ・ 専 攻 | 工芸科学研究科 物質・材料化学専攻 | |
| 学 位 論 文 題 目 | Study on Bacteriophages for Controlling Pathogenic Bacteria. (病原性細菌を制御するためのバクテリオファージに関する研究) | |
| 審 査 委 員 | (主査)教授 亀井加恵子 教授 堀内 淳一 教授 黒田 浩一 | |

論文内容の要旨

食中毒は世界的な公衆衛生上の大きな問題となっている。一般的に細菌感染症の治療には抗生素が用いられるが、抗生物質耐性菌の発生が深刻な問題となっており、抗生物質代替の開発が急務となっている。本論文では、細菌性食中毒の代表的な原因菌である腸炎ビブリオ菌、大腸菌およびサルモネラ菌を対象に、細菌の菌種特異的に感染し、溶菌することができるバクテリオファージについて抗生物質代替としての可能性を検討した。本論文は、以下に示す 6 章から構成される。

第 1 章「序論」：本論文で扱う細菌性食中毒を引き起こす主要な 3 種の細菌、腸炎ビブリオ菌、大腸菌およびサルモネラ菌について概説した。また、抗生物質耐性菌を含む細菌を菌種特異的に溶菌するバクテリオファージ（以下、ファージ）を説明した。ファージは人を含む動物や植物には感染せず、環境中に普遍的に存在することから、抗菌剤や抗生物質の代替としてファージは安全であることが知られており、人の感染症治療、畜産業、農水産業、食品生産業において活用が始まっている。さらに、本論文の目的が、畜産業や水産業において、より現場に近い状態、すなわち複数の細菌が存在する環境において、宿主菌種の異なるファージを混合したファージカクテルの有効性を検討することであると述べている。

第 2 章「研究手法と材料」：ファージのスクリーニングに用いた材料、ファージの単離方法、形態観察法、宿主特異性や増殖パラメーターなどファージの特性解析法、ゲノム解析法、ファージカクテルの作成法と増殖阻害活性の評価方法など、本論文で使用し研究手法と材料について記述した。

第 3 章「腸炎ビブリオ菌に対する新規ビブリオファージ KIT04 の単離、特性解析および全ゲノム配列の決定」：ムール貝より腸炎ビブリオ菌を特異的に溶菌するファージ KIT04 の単離に成功した。全ゲノム配列解析の結果、ビブリオファージ KIT04 はインテグラーゼ、溶原性関連遺伝子の両方を保有しないことが明らかとなり、腸炎ビブリオに対する生物防除剤の候補となる可能性が示唆された。

第 4 章「ナリジクス酸耐性大腸菌を制御できる大腸菌ファージ KIT06 の全ゲノム解析」：鴨の腸

より大腸菌に感染するファージ KIT06 を単離した。抗生物質ナリジクス酸に対する耐性大腸菌 ATCC700609 株を含む 11 株中 7 株に感染した。ファージ KIT06 は大腸菌のリポ多糖に吸着後、外膜タンパク質であるヌクレオシド特異的チャネル形成タンパク質 tsx に付着し、細菌への感染を開始することを明らかにした。さらに、KIT06 のゲノムには病原性や溶原性に関連する遺伝子が存在しないことから、ファージ KIT06 はファージセラピーに活用可能であることを示した。

第 5 章「C3 形態を持つ新規サルモネラファージ KIT07 の単離、特性解析、ゲノムおよびプロテオミクス研究」：鶏肉からサルモネラ (*Salmonella enterica*) ファージ KIT07 を分離した。ファージ KIT07 は、非常にユニークな C3 形態を持つポドウイルスであり、サルモネラ菌に加え大腸菌も溶菌することができる。ファージ KIT07 は 4°C から 55°C、pH6 から pH11 で活性を保持し、ゲノム中に毒性遺伝子および溶原性関連遺伝子は検出されなかった。これらのことから、ファージ KIT07 はサルモネラ菌および大腸菌の生物防御に活用可能であることが明らかとなった。

第 6 章「バクテリオファージカクテルによる混合細菌の制御」：ファージは特定の標的細菌に対してのみ感染する厳密な特異性を有する。しかし、畜産業や水産業において抗菌剤としてファージを応用する場合、現場では複数の細菌が混在していることが問題となる。その解決策として、異なる菌種を溶菌するファージを混合したファージカクテルの利用が考えられる。本研究では、KIT04、KIT06、KIT07 から構成されるファージカクテルを作成した。カクテルをそれぞれの宿主菌（腸炎ビブリオ、大腸菌およびサルモネラ菌）の混合物に添加し、培養を継続すると、混合菌の増殖を抑制する効果は認められたものの、その効果は弱く、実用化に適さないことが明らかとなった。一方、KIT06 と KIT07 の 2 つのファージからなるカクテルは、それぞれの宿主菌の混合物（大腸菌とサルモネラ菌）の増殖を強く抑制し、その抑制効果はそれぞれのファージ単独の抑制効果を足し合わせたものより強く、ファージカクテルの有効性が明らかとなった。

第 7 章「考察」：本研究で得られた結果をまとめ、考察を行った。宿主細菌の異なる 3 種のファージ（KIT04、KIT06、KIT07）あるいは 2 種のファージ（KIT06、KIT07）からなるカクテルによる、それぞれの宿主菌の混合物に対する増殖抑制効果は、単独のファージによる細菌抑制効果から予想される結果とは異なっていた。その原因としてファージ間の何らかの相互作用の可能性が考えられるが、そのメカニズムの解明は今後の課題である。異なる菌種を標的としたファージカクテルを実用化するためには、ファージ間の相互作用を考慮したファージの選抜が必要であると結論した。

論文審査の結果の要旨

一般的に細菌感染症の治療には抗生物質が用いられるが、抗生物質耐性菌の発生が深刻な問題となっており、抗生物質代替の開発が急務となっている。申請人は、細菌性食中毒の代表的な原因菌である腸炎ビブリオ菌、大腸菌およびサルモネラ菌を対象に、細菌に菌種特異的に感染し、溶菌することができるバクテリオファージについて抗生物質代替としての可能性を検討した

序論では、本論文で扱う細菌性食中毒を引き起こす主要原因細菌 3 種、腸炎ビブリオ菌、大腸菌およびサルモネラ菌について概説した。また、抗生物質耐性菌を含む細菌を菌種特異的に殺す（溶菌する）バクテリオファージ（以下、ファージ）を説明した。本論文の目的が、畜産業や水産業に

おいて、より現場に近い状態、すなわち複数の細菌が存在する環境において、宿主菌種の異なるファージを混合したファージカクテルの有効性を明らかにすることであると述べている。

申請者は、標的細菌の異なる3種類のファージ、すなわちムール貝より腸炎ビブリオ菌を特異的に溶菌するファージ KIT04、鴨の腸より大腸菌を溶菌するファージ KIT06、鶏肉からサルモネラ菌 (*Salmonella enterica*) を溶菌するファージ KIT07 を分離した。全ゲノム配列解析から、いずれのファージも新規であることを明らかにした。また、いずれも毒性遺伝子および溶原性に関連する遺伝子を保有しておらず、生物防御に活用可能であることを示した。また、電子顕微鏡による形態観察、宿主特異性、増殖パラメーター、安定性など各ファージの基本的な特性を明らかにするとともに、KIT06 および KIT07 に関しては感染の際にファージが利用する受容体分子を明らかにした。

ファージは特定の標的細菌に対してのみ感染する厳密な特異性を有する。しかし、畜産業や水産業においてファージを抗菌剤として応用する場合、現場では複数の細菌が混在していることが問題となる。その解決策として、異なる菌種を溶菌するファージを混合するファージカクテルの利用を考えられる。宿主細菌の異なる3種のファージ (KIT04、KIT06、KIT07) あるいは2種のファージ (KIT06、KIT07) からなるカクテルによる、それぞれの宿主菌の混合物に対する増殖抑制効果を検討した。3種のファージカクテルは腸炎ビブリオ菌、大腸菌およびサルモネラ菌の混合物に対して、その増殖抑制効果は弱く、期待した効果が得られなかった。一方、2種のファージ (KIT06、KIT07) カクテルは、大腸菌およびサルモネラ菌の混合物の増殖をほぼ完全に抑制し、それぞれ単独のファージ効果を足し合わせたよりも大きな効果が得られ、ファージカクテルの有効性の実証に成功した。これらの結果は、ファージカクテルによる混合菌の増殖抑制効果は、単独のファージによる細菌抑制効果から予想される効果とは異なることを示している。これはファージ間での何らかの相互作用が原因であると考えられるが、そのメカニズムの解明が今後の課題である。本論文の結論として、畜産業や水産業で実用化可能な異なる菌種を抑制するファージカクテルを実用化するためには、ファージ間の相互作用を考慮したファージの選抜が必要であると結論した。

本論文は、標的細菌の異なる3種の新規ファージを取得し、これらのファージからなるカクテルによる細菌混合物に対する効果を明らかにしたものである。本研究成果は、畜産業や水産業における細菌感染症対策を目的とした抗生物質代替としての、ファージカクテルの有効性を示しており、本研究の学術的な意義は高いと評価できる。

学位論文は、査読制度が確立されている下記の国際科学雑誌に掲載されている原著論文2編を基礎としている。

1. Nguyen Song Han, Mana Harada, Nguyen Huan Pham-Khanh, and Kaeko Kamei. Isolation, Characterization, and Complete Genome Sequence of *Escherichia* Phage KIT06 Which Infects Nalidixic Acid-Resistant *Escherichia coli*. *Antibiotics*. 2024, 13(7):581. doi: 10.3390/antibiotics13070581.
2. Anh Vo Thi Tu, Nguyen Huan Pham-Khanh, Song Han Nguyen, Hirofumi Sunahara, Trang Dai Thi Xuan, Kaeko Kamei. Isolation, characterization, and complete genome

sequence of vibrio phage KIT04, a novel lytic phage of the subfamily ermolyevavirinae.
Virology. 2023; 579:148-155. doi: 10.1016/j.virol.2023.01.008.