

研究者：邱 辰軒（所属：北海道医療大学歯学部 口腔生物学系 微生物学分野）

研究題目：歯周病原細菌を特異的に死滅させるファージセラピーの開発に関する基礎的検討

目的：

口腔内には700種類以上の細菌が生息し、口腔機能の恒常性維持に寄与している。しかし、一部の病原性細菌が歯面や歯周組織で増殖し、バイオフィルム（細菌の集合体）を形成することで、う蝕や歯周病などの口腔疾患を引き起こすことがある。これらの疾患の治療には、バイオフィルムの機械的除去や化学的処置（消毒薬や抗菌薬の使用）が行われるが、正常細菌叢の攪乱や耐性菌の出現といった課題がある。そのため、標的病原細菌に特異的に作用し、正常な細菌叢への影響が少ない治療法の開発が求められている。

近年、細菌感染症の治療法として、細菌に感染し死滅させるバクテリオファージ（以下、ファージ）を利用した「ファージセラピー」が注目されている。ファージは菌種特異性が高く、常在細菌を損なわずに標的病原細菌のみを排除できる可能性がある。

本研究では、歯周病に対するファージセラピーの開発を目指し、歯周病の発症や進行に関与する細菌に感染し、死滅させ得るファージの分離を試みた。実験は以下の二点を中心に行った。

[実験1] *Treponema denticola* ATCC 35405 株に感染するファージの分離

[実験2] *Fusobacterium nucleatum* に感染するファージのヒト唾液検体からの分離

[実験1] に関して、すでに所属する研究グループで、*Treponema denticola* ATCC 35405 株にファージが感染していることを示している（Yokogawa *et al.*, PLoS One: e0270198, 2022）。そこで、この株からファージの分離を試みた。[実験2] では、歯周病関連細菌の中では比較的増殖が速く、実験の進行が速いことから、*F. nucleatum* を対象細菌として検討することにした。

対象および方法：

[実験1] *T. denticola* ATCC 35405 株に感染するファージの分離

T. denticola ATCC 35405 株を、ウサギ血清およびチアミンニリン酸を添加したアキュディアTM 変法 GAM 培地（mGAM 培地、島津ダイアグノスティクス）で37℃、嫌気条件下で培養した。培養上清を回収し、ファージ検出用プライマー（5'-GAAGCAGAGCTGACGAGGTTAGAG、5'-CGGACTCCAAAAGCAGGGTAG）および *T. denticola* 菌検出用プライマー（5'-GAAGCAGAGCTGACGAGGTTAGAG、5'-TCACGACATCTGTCTTTTCCCTC）を用いてPCRを行った。

[実験2] *F. nucleatum* に感染するファージのヒト唾液検体からの分離

本学附属歯科クリニックを診療した患者の唾液から *F. nucleatum* に感染するファージの分離を、以下の二通りの方法で実施した。

1. 唾液検体を *F. nucleatum* 標準株 (ATCC 25586) と混和し、mGAM 培地で培養後、ファージプラーク法によりファージの感染を検討した。
2. 唾液検体から *Fusobacterium* 属細菌の選択培地であるアキュディアTM 変法 FM 培地 (島津ダイアグノスティクス) に塗抹し、37℃、嫌気条件下で2日間培養した。コロニー形状およびグラム染色像から本属細菌と推定される細菌を分離した。続いて、16S リボソーム DNA の塩基配列から細菌種を同定した。*F. nucleatum* を長期間培養すると、ファージが遊離するという報告がある (第 66 回歯科基礎医学会)。そこで、分離した *F. nucleatum* を長期間 (2 週間) 培養し、遊離したファージが含まれると予想される培養上清を回収した。培養上清をファージプラーク法に供し、ファージの感染を検討した。

なお、本研究の実施に当たり、倫理審査委員会の承認 (承認番号: 第 188 号) を得ている。

結果および考察:

[実験 1] *T. denticola* ATCC 35405 株に感染するファージの分離

PCR の結果、ファージ検出用プライマーでは予想通りに 1700 bp のバンドが検出されたが、*T. denticola* 菌検出用プライマーでは陽性バンドが検出されなかった。このことから、培養上清に *T. denticola* 菌体は存在せず、ファージ粒子のみが存在する可能性が示された。さらに、ファージの分離を確認するために、電子顕微鏡によるファージ粒子の観察を試みている。ファージの分離を確認後、他の *T. denticola* 株への感染性や溶菌性を検討する予定である。一方、*T. denticola* は高濃度の寒天を含む硬い培地でも遊泳運動を示すため、ファージプラーク法による検出は困難である。したがって、新たな検出方法の開発が必要である。

[実験 2] *F. nucleatum* に感染するファージのヒト唾液検体からの分離

1 つ目の実験では、30 検体をファージプラーク法で検討したが、ファージによるプラークは検出されなかった。これは、唾液中に遊離しているファージの濃度が低いことによると考えられる。そこで、2 つ目の実験として、はじめに *F. nucleatum* を分離し、その後、分離した *F. nucleatum* に感染するファージを遊離させて分離する方法を試みた。また、*F. nucleatum* を長期間培養するとファージが遊離するという報告に基づき、長期間 (2 週間) 培養後、培養上清中のファージの分離を試みた。現在までに 8 検体から *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* を 1 株ずつ分離している。これらの菌株を 2 週間培養後、ファージプラーク法を実施したが、ファージは検出されなかった。ファージの誘導には、紫外線刺激や抗生物質 (マイトマイシン C) の処理が有効とされているので、今後はこれらの誘導方法を活用し、さらなるファージの分離を試みる予定である。

一方、本実験において、定常期の濁度 (菌濃度) が低く、また早期に死滅期に移行する 1 つの菌株を見出した。これは、ファージにより溶菌が生じている可能性を示唆する。そこで、この菌株の全ゲノム解析を行い、遺伝子情報からファージ遺伝子を確認することを試みている。現在、次世代シーケンサーによる解析を終え、ゲノムの構築を行っている。

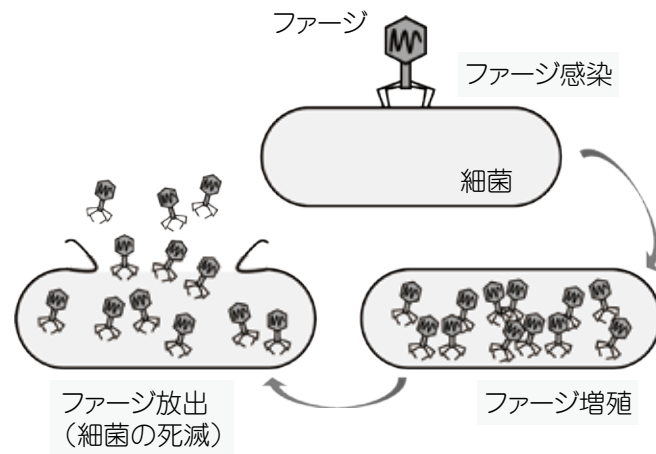


図1 ファージの感染および溶菌の概要

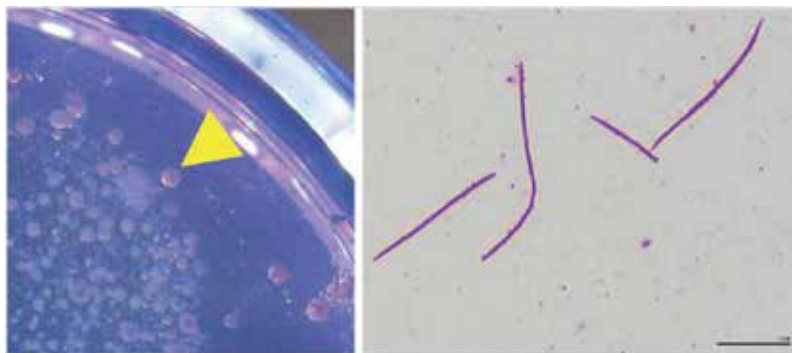


図2 ヒト唾液検体からの *F. nucleatum* の分離
変法 FM 培地上の *F. nucleatum* と推定されるコロニー（矢頭、左）とそのグラム染色像（右）。

成果発表：（予定を含めて口頭発表、学術雑誌など）

結果が得られ次第、国内学会及び学術雑誌にて発表予定