



多剤耐性緑膿菌感染への抗生物質に頼らない新規治療法

「特異抗体&バクテリオファージ併用療法」の開発

本研究成果のポイント

- 緑膿菌は医療関連感染(院内感染)として、免疫力の低下した患者に肺炎を引き起こします。緑膿菌の多くが一般的な抗生物質(βラクタム剤, アミノグリコシド剤, フルオロキノロン剤など)の複数の抗生物質に耐性を示し、これらの抗生物質に頼らない治療法の開発が望まれています。
- 緑膿菌特異抗体(PcrV抗体)は、緑膿菌の毒性を速攻に抑制できますが、殺菌作用はありません。一方で、緑膿菌に特異的なバクテリオファージは溶菌作用を持ちますが、即効性はありません。両者を組み合わせることで、それぞれの欠点を補うことができ、効果的な治療に繋がれる可能性があります。
- 本研究では、マウス肺炎モデルを用いた実験では、緑膿菌による肺炎の治療において、**緑膿菌に対する特異抗体とバクテリオファージの併用が従来の抗生物質単独療法よりも高い治療効果を示しました。生存率の向上や感染部位の細菌負荷の減少が観察されました。**
- この併用療法は、従来の抗生物質と比較して副作用が少ないとされています。特に、**腎臓や肝臓への影響が少ないことが示されており、長期間の治療に適している可能性**があります。**他の多剤耐性を示す細菌感染症に対しても同様のアプローチが有効である可能性**が示されました。

京都府立医科大学大学院医学研究科 麻酔科学 助教 木下真央, 同大学附属病院 病院長 佐和貞治, 酪農学園大学 獣医学研究科 獣医学専攻 講師 藤木純平, 同大学 学長 岩野英知らの共同研究グループは、緑膿菌性肺炎に対する特異抗体・バクテリオファージ併用療法に関する研究成果をまとめ、米国微生物学会(American Society for Microbiology)の学術誌『Microbiology Spectrum』に(2024年10月24日)付けでオンライン掲載されましたのでお知らせします。

本研究では、著者等の研究グループがこれまで開発に関わってきた**抗緑膿菌抗体療法に新たにバクテリオファージ療法を組み合わせることで、従来の抗生物質に頼らない多剤耐性緑膿菌感染症に対する強力な新規治療法の開発に繋がる成果**をあげることができました。

【論文基礎情報】

掲載誌情報	雑誌名 Microbiology Spectrum
	発表媒体 <input checked="" type="checkbox"/> オンライン速報版 <input type="checkbox"/> ペーパー発行 <input type="checkbox"/> その他
	雑誌の発行元国 アメリカ合衆国
	オンライン閲覧 可
https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/spectrum.01781-24	

	掲載日 2024年10月24日
論文情報	<p>論文タイトル (英) Effects of the combination of anti-PcrV antibody and bacteriophage therapy in a mouse model of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pneumonia</p> <p>代表著者 京都府立医科大学大学院医学研究科 麻酔科学 木下真央</p> <p>共同著者 京都府立医科大学大学院医学研究科 麻酔科学 小原潤也 酪農学園大学大学院 獣医学研究科 獣医学専攻 藤木純平 京都府立医科大学大学院医学研究科 麻酔科学 須藤和樹 京都府立医科大学大学院医学研究科 麻酔科学 川口 顕 京都府立医科大学附属病院 集中治療部 井上敬太 京都府立医科大学大学院医学研究科 麻酔科学 内藤慶史 杏林大学医学部 麻酔科学 森山 潔 酪農学園大学大学院 獣医学研究科 獣医学専攻 中村暢宏 酪農学園大学 岩野英知 京都府立医科大学附属病院 佐和貞治</p>
研究情報	<p>研究課題名 緑膿菌性肺炎マウスモデルにおける PcrV 抗体とバクテリオファージ療法の組み合わせの効果</p> <p>代表研究者 京都府立医科大学大学院医学研究科 麻酔科学 木下真央 主たる共同研究者 京都府立医科大学附属病 佐和貞治 酪農学園大学大学院 獣医学研究科 獣医学専攻 藤木純平 杏林大学医学部 麻酔科学 森山 潔 酪農学園大学 岩野英知 他, 6名</p> <p>資金的関与 (獲得資金等)</p> <p>文部科学省科学研究費 挑戦的研究 (萌芽) 18K19590 重症緑膿菌性肺炎に対するバクテリオファージ療法の前臨床試験 (研究代表者: 佐和貞治)</p> <p>文部科学省科学研究費 基盤研究(B) 18H02905 緑膿菌病原性抗原の血清抗体価大規模疫学調査と抗緑膿菌ガンマグロブリン製剤試作 (研究代表者: 佐和貞治)</p> <p>文部科学省科学研究費 基盤研究(B) 15H05008 緑膿菌 PcrV-CpG(K3)-SPG ワクチンの開発と前臨床試験 (研究代表者: 佐和貞治)</p> <p>文部科学省科学研究費 若手研究 18K16521 緑膿菌感染症の自然免疫における抗体価の経時的解析と最適な獲得免疫の判定基準の検討 (研究代表者: 木下真央)</p> <p>文部科学省科学研究費 基盤研究(B) 23K23791 進化的トレードオフによる革新的ファージ療法の創出 (研究代表者: 藤木純平)</p> <p>文部科学省科学研究費 若手研究 JP23K14105 細菌の抗ファージ防御機構を攻略する戦略的ファージライブラリーの構築 (研究代表者: 中村暢宏)</p> <p>文部科学省科学研究費 基盤研究(A) 17H01506 次世代型ファージ療法の開発と臨床応用 (研究代表者: 岩野英知)</p>

【論文概要】

1 研究分野の背景や問題点

緑膿菌は、免疫不全患者において日和見感染として肺炎を引き起こすグラム陰性桿菌です。近年、多剤耐性緑膿菌の出現により治療が難しくなっており、抗体療法やバクテリオファージ療法など、従来の抗菌薬治療に依存しない新しい治療法が求められています。ファージ療法は薬剤耐性菌に対しても有効な治療法と考えられています。共同研究者の岩野らは過去に緑膿菌殺菌効果を発揮するファージウイルスΦR18を分離しました。緑膿菌はIII型分泌システムを介して急性肺傷害を引き起こします。過去に共同研究者の佐和らは、III型分泌システムの分泌装置のキャップタンパク質であるPcrVに対する特異的抗体が緑膿菌のIII型分泌システムの毒性を強力に抑制できることを発見しましたが、抗体自体は殺菌作用を持ちません。一方、バクテリオファージは細菌に特異的に作用して細菌溶解を誘導します。バクテリオファージの欠点は、ファージの侵入および細菌内での増殖が必要のため、細菌溶解に一定の時間を要することです。そこで、PcrV抗体療法とファージ療法を組み合わせれば、互いの弱点を補うことができます。本研究では、**緑膿菌肺炎のマウスモデルにおいてPcrV抗体とバクテリオファージの併用療法の有効性を検討**しました。

2 研究内容・成果の要点

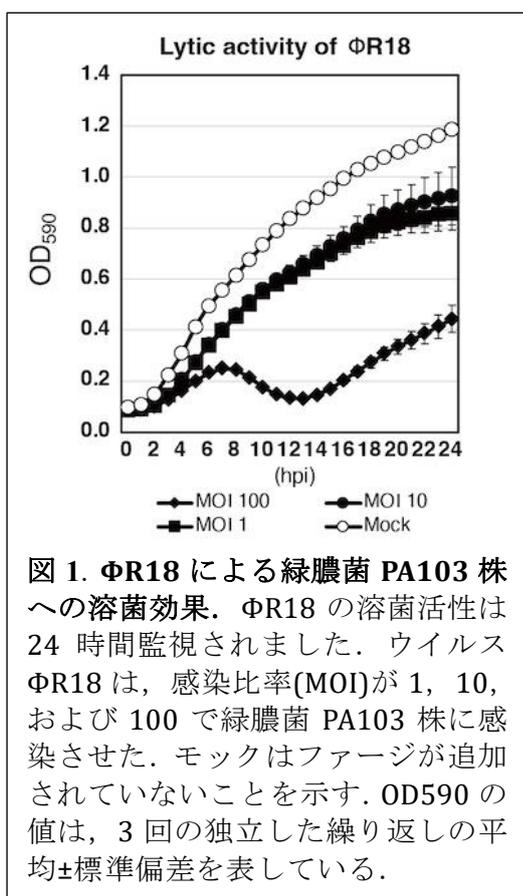


図1. ΦR18による緑膿菌PA103株への溶菌効果. ΦR18の溶菌活性は24時間監視されました。ウイルスΦR18は、感染比率(MOI)が1, 10, および100で緑膿菌PA103株に感染させた。モックはファージが追加されていないことを示す。OD590の値は、3回の独立した繰り返しの平均±標準偏差を表している。

最初に、カウドウイルス (Kochitakasuvirus) に属するポドウイルスであるΦR18の溶菌活性を評価しました。ΦR18は、一定の投与濃度 (Multiplicity of infection, MOI)を越えると強毒性の緑膿菌PA103株に対して効率的な溶菌活性を示し、感染後0から8時間でPA103の成長を抑制し、感染後8から13時間で減少しました(図1)。最初の数時間で細菌溶解が発生する前は抗体が緑膿菌PA103の毒性を抑制し、ファージは感染後約8時間で十分な細菌溶解を達成することができます。

実験プロトコルを図2に示します。マウスは、生理食塩水(60 μL)のみを気管内に投与(感染していない対照群)または緑膿菌PA103を投与されました(感染群)。最初の投与から5分後、マウスは再び麻酔され、感染した各マウスに対して第二の治療投与が行われました。この投与には、生理食塩水(生理食塩水群)、抗PcrV IgG(生理食塩水30 μL中に1 μg)、バクテリオファージ溶液(4.0×10⁷ PFU, ファージ群)、または抗PcrV IgG(1 μg)とバクテリオファージ(4.0×10⁷ PFU)の混合溶液(30 μLの生理食塩水中、抗PcrV+ファージ群)が使用されました。感染していない対照群のマウスは再び生理食塩水(30 μL)を気管内に投与されました。二回目の全身麻酔から回復した後、ケージ内でマウスは自由に動けるようになり、その後24時間にわたって生存率と体

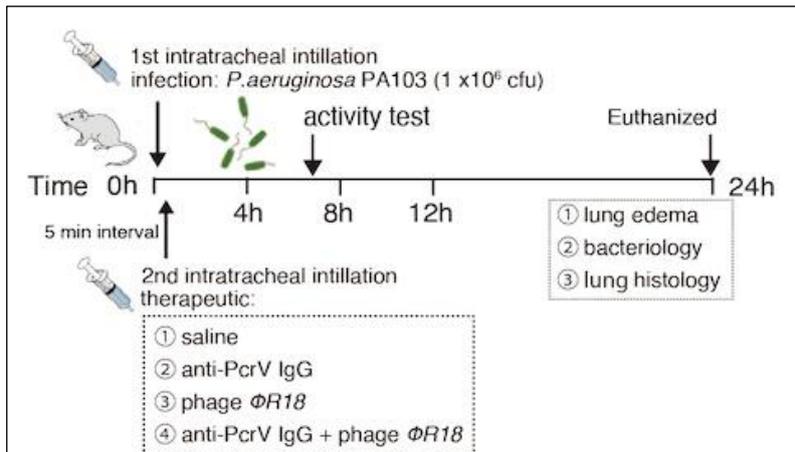


図 2. 実験プロトコール. 緑膿菌の気管内感染の 5 分後に生理食塩水, あるいは抗緑膿菌 PcrV 抗体, あるいはバクテリオファージ ΦR18, あるいは抗体とファージの両方を気管内に投与した.

26.7%, ファージ群で 41.2%, 抗 PcrV+ファージ群で 66.7% (図 3A). 抗 PcrV+ファージ群の生存率は生理食塩水群 ($p=0.01$) および抗 PcrV 群 ($p=0.025$) と比較して有意に改善しました.

生存したマウスの体温 (平均±標準偏差[SD]) は, 生理食塩水群では緑膿菌投与後, 4 時間, 8 時間と次第に低下, 12 時間で $28.7^{\circ}\text{C} \pm 0.7^{\circ}\text{C}$ へと低下し, たった 1 匹のマウスのみ 24 時間で 27.1°C の重度の低体温で生存しました (図 3B). 抗 PcrV 群の生存したマウスの体温は 8 時間で $31.7^{\circ}\text{C} \pm 1.8^{\circ}\text{C}$ と一旦低下しましたが, 12 時間後には体温が $33.3^{\circ}\text{C} \pm 2.7^{\circ}\text{C}$

温を測定しました.

24 時間後, 5 つのマウス群間で生存率と体温を比較しました (図 3). 感染していない対照群を除くすべてのマウスは, PA103 (1.0×10^6 CFU) に気管内感染後, 4 時間以内に低体温および活動性の低下を示しました. 抗 PcrV IgG, ファージ, またはその両方のいずれかの治療は, いくつかのマウスで低体温と活動性の低下からの部分的な回復を誘導しました. 24 時間後の感染したマウス群の生存率は生理食塩水群で 7.1%, 抗 PcrV 群で

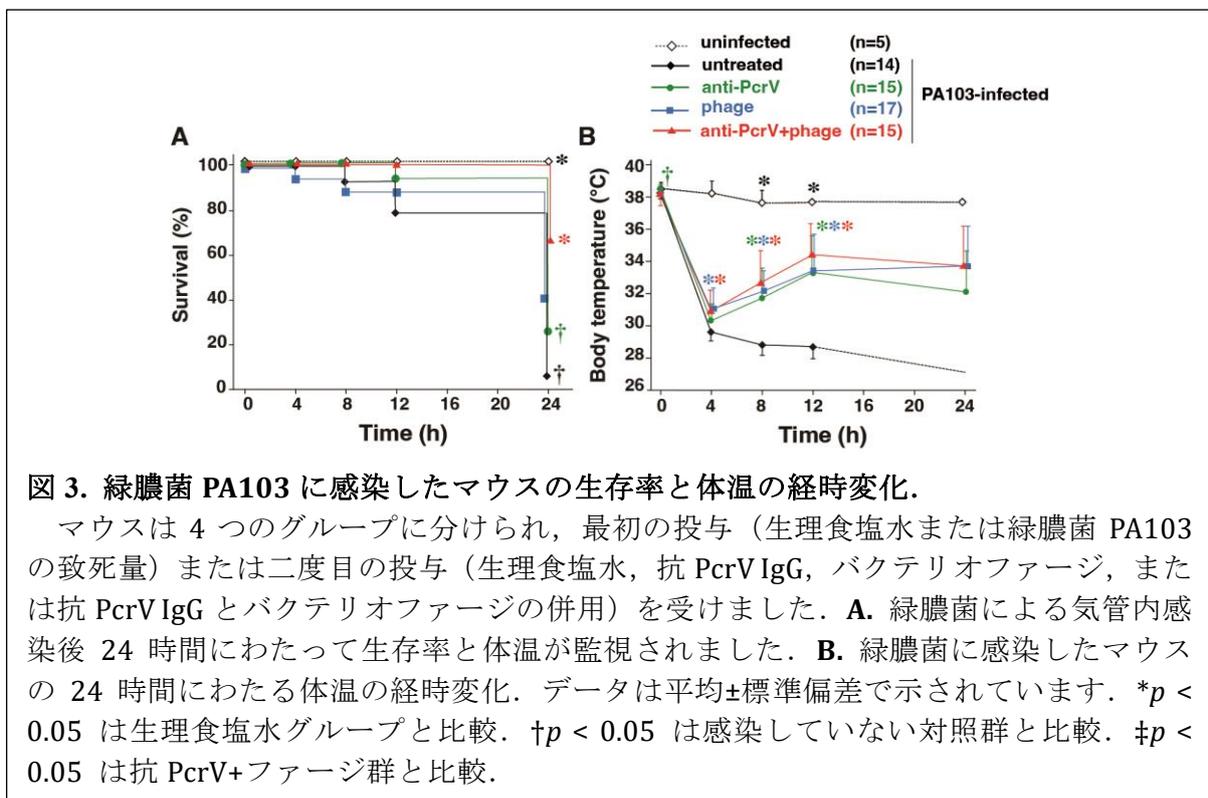


図 3. 緑膿菌 PA103 に感染したマウスの生存率と体温の経時変化.

マウスは 4 つのグループに分けられ, 最初の投与 (生理食塩水または緑膿菌 PA103 の致死量) または二度目の投与 (生理食塩水, 抗 PcrV IgG, バクテリオファージ, または抗 PcrV IgG とバクテリオファージの併用) を受けました. **A.** 緑膿菌による気管内感染後 24 時間にわたって生存率と体温が監視されました. **B.** 緑膿菌に感染したマウスの 24 時間にわたる体温の経時変化. データは平均±標準偏差で示されています. * $p < 0.05$ は生理食塩水グループと比較. † $p < 0.05$ は感染していない対照群と比較. ‡ $p < 0.05$ は抗 PcrV+ファージ群と比較.

へと回復し、24 時間で $32.1^{\circ}\text{C} \pm 2.2^{\circ}\text{C}$ でした。ファージ群の生存したマウスの体温は 8 時間で $32.1^{\circ}\text{C} \pm 1.3^{\circ}\text{C}$ へと低下しましたが、12 時間後には体温が $33.4^{\circ}\text{C} \pm 2.2^{\circ}\text{C}$ へと回復し、24 時間で $33.7^{\circ}\text{C} \pm 2.3^{\circ}\text{C}$ でした。抗 PcrV+ファージ群の生存したマウスの体温は 8 時間で $32.7^{\circ}\text{C} \pm 1.9^{\circ}\text{C}$ と一旦低下しましたが、12 時間後には体温が $34.4^{\circ}\text{C} \pm 1.9^{\circ}\text{C}$ へと回復し、24 時間で $33.7^{\circ}\text{C} \pm 2.4^{\circ}\text{C}$ でした。

肺炎の重症度を評価するために、肺ホモジネートにおけるミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性アッセイを用いて、細菌投与後 24 時間で好中球のリクルートメントを定量的に測定しました (図 4)。細菌を気管内に投与されたが治療されなかったマウスは、感染していない対照群のマウスよりも肺ホモジネートの MPO 活性が高かくありました ($p < 0.05$)。この MPO 活性レベルは、ファージ群または抗 PcrV 群に比べて抗 PcrV+ファージ群では有意に低くありました (図 4A) ($p < 0.05$)。

肺ホモジネート中の炎症性サイトカインの濃度を測定しました (図 4B-D)。感染していない対照群のマウスでは、サイトカイン濃度の増加は検出されませんでした。生理食塩水群のマウスは、感染していない対照群に比べて肺における腫瘍壊死因子 (TNF)- α 、インターロイキン (IL)- 1β 、および IL-6 の濃度が高値でした (全て $p < 0.05$)。このサイトカイン濃度の増加は、ファージ療法単独または抗 PcrV 療法単独では抑制できませんでしたが、抗 PcrV とファージ療法の組み合わせにより有意に軽減されました ($p < 0.05$ vs. 生理食塩水群) (図 4B-D)。

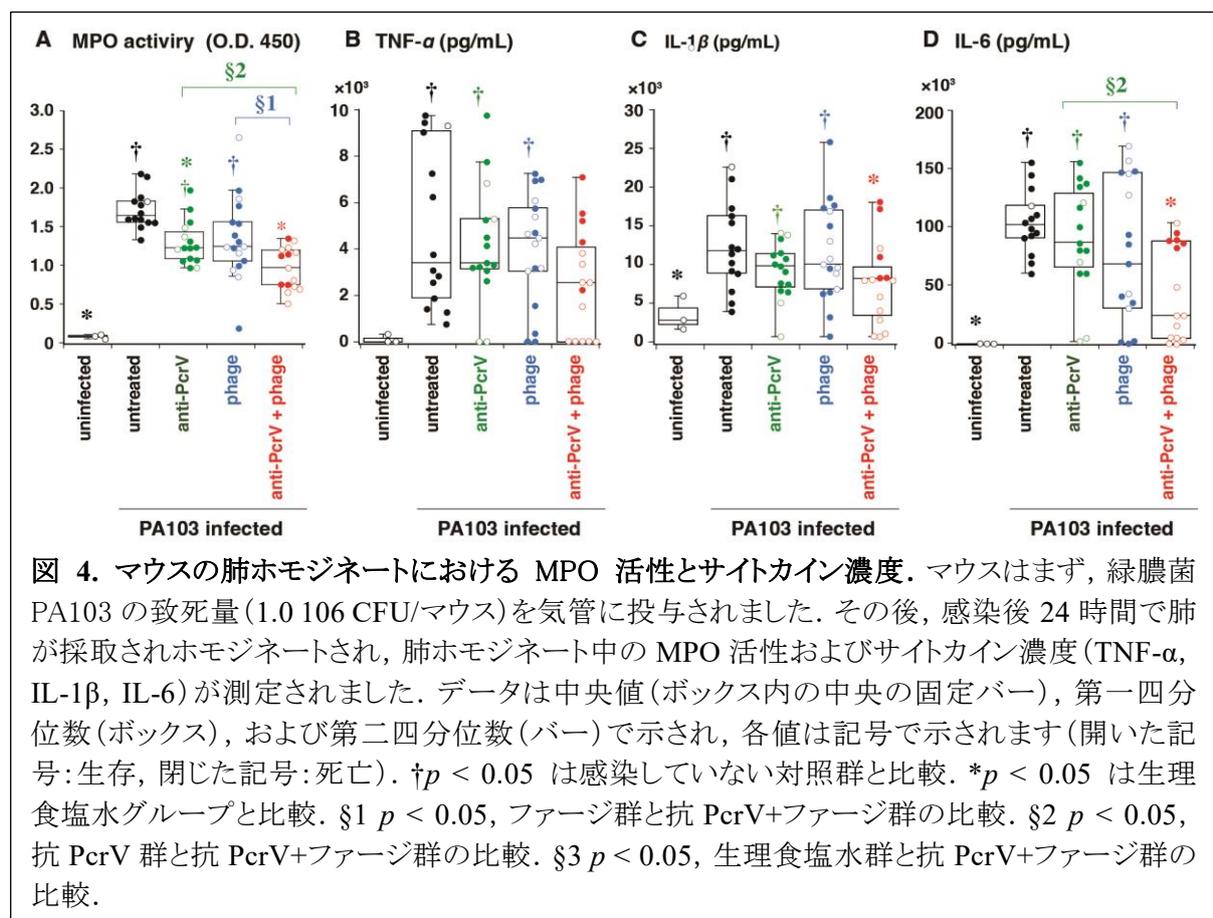


図 4. マウスの肺ホモジネートにおける MPO 活性とサイトカイン濃度. マウスはまず、緑膿菌 PA103 の致死量 (1.0×10^6 CFU/マウス) を気管内に投与されました. その後、感染後 24 時間で肺が採取されホモジネートされ、肺ホモジネート中の MPO 活性およびサイトカイン濃度 (TNF- α , IL- 1β , IL-6) が測定されました. データは中央値 (ボックス内の中央の固定バー)、第一四分位数 (ボックス)、および第二四分位数 (バー) で示され、各値は記号で示されます (開いた記号: 生存, 閉じた記号: 死亡). † $p < 0.05$ は感染していない対照群と比較. * $p < 0.05$ は生理食塩水グループと比較. §1 $p < 0.05$, ファージ群と抗 PcrV+ファージ群の比較. §2 $p < 0.05$, 抗 PcrV 群と抗 PcrV+ファージ群の比較. §3 $p < 0.05$, 生理食塩水群と抗 PcrV+ファージ群の比較.

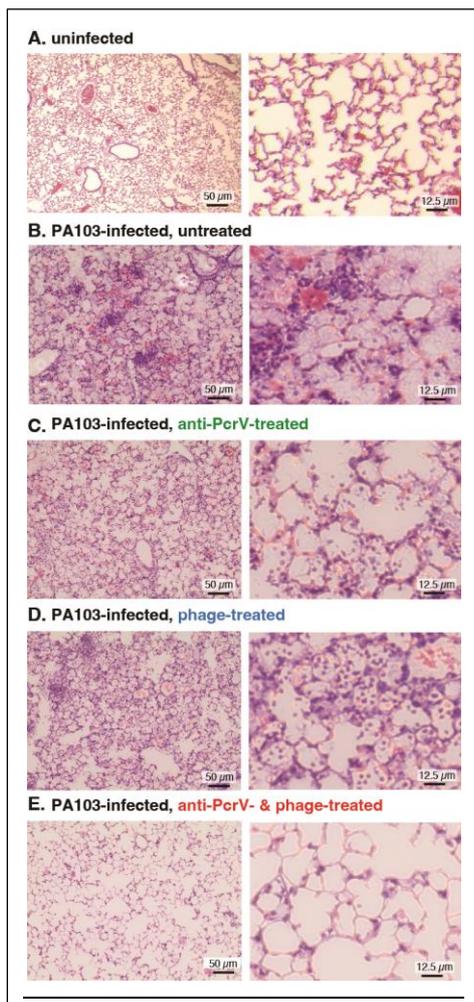


図 5. 緑膿菌に感染後 24 時間のマウスの肺組織学。マウスは最初の投与（生理食塩水または緑膿菌 PA103 の致死量）と二度目の投与（生理食塩水, 抗 PcrV IgG, バクテリオファージ, または抗 PcrV IgG とバクテリオファージの併用）を受けた 4 つのグループに分けられました。感染後 24 時間でマウスの肺は固定されました。ヘマトキシリン・エオジン染色は, 10%ホルムアルデヒド固定およびパラフィン包埋後に行われました。A. 感染していない対照群, B. 生理食塩水群 (感染したマウス), C. 抗 PcrV 群 (感染したマウス), D. バクテリオファージ群 (感染したマウス), E. 抗 PcrV+ファージ群 (感染したマウス)。左側: ×200 倍率, スケールバー = 50 μm. 右側: ×400 倍率, スケールバー = 25 μm.

感染後, 24 時間で生存したマウスの肺における組織学的変化を評価しました。生理食塩水群のマウスの肺では, 好中球の浸潤が増強され, 肺胞出血や肺胞構造の破壊が観察されました(図 5)。対照的に, 抗 PcrV 群およびファージ群のマウスの肺は, 他の群のそれよりもはるかに炎症変化が少ないことが示されました。PcrV 抗体またはファージで治療されたマウスの肺では, ほとんど炎症変化が検出されませんでした。

3 今後の展開と社会へのアピールポイント

グラム陰性細菌の中で最大のゲノムを持つ緑膿菌は, 既に様々な抗菌耐性機構を持っているだけでなく, 新たに獲得することもできる主要な多剤耐性細菌の一つです。異なる抗生物質への耐性により高い死亡率を伴う様々な感染症を引き起こす多剤耐性緑膿菌株の出現は, 抗生物質以外の代替および補助治療の必要性を高めています。従来の抗生物質に対する耐性が世界的に広がる中, 従来の抗生物質に頼らない新しい治療法の開発への努力は重要です。抗緑膿菌 PcrV 抗体の開発は, 複数の研究グループにて臨床第二相試験レベルで進行しています。PcrV 抗体とファージの併用療法は, 感染症治療の将来の選択肢として潜在的な医薬品革新と考えられます。

結論として, 緑膿菌肺炎のマウスモデルにおいて, PcrV 抗体とバクテリオファージの併用療法は, それぞれの治療単独と比較して急性肺傷害を軽減し, 生存率を向上させました。この組み合わせ療法は従来の抗生物質に依存しないため, 多剤耐性緑膿菌感染症の新しい治療戦略を構成する可能性があります。

<p><研究に関すること> 麻酔科学 助教 木下真央 電話: 075-251-5633 E-mail: mao6515@koto.kpu-m.ac.jp</p>	<p><後方に関すること> 事務局企画広報課 担当: 堤 電話: 075-251-5804 E-mail: kouhou@koto.kpu-m.ac.jp</p>
---	--