

前言

一、噬菌體的簡介

1. 噬菌體的定義及其運用：

噬菌體(Bacteriophage 或 phage)簡單的定義就是可以生長在細菌細胞的病毒，其就像細菌一樣普遍存在於周圍環境中。由於其簡單的構造及利於實驗的生命系統，長久以來一直是研究基礎分子生物的重要工具；所以在過去的四十年間其提供許多有關分子基因、核酸複製及基因資訊的轉錄和轉譯之重要觀念，時至今日噬菌體系統仍然持續作為提供研究高等生物系統的基礎生物準則(Joklik et al., 1992)。在噬菌體的其他應用方面，其可用來對抗細菌；或者藉由利用重組的噬菌體當作載體，我們也可使細菌表現一些疫苗、診斷用的蛋白質及其他有用的蛋白如激素等等；另外，噬菌體呈現技術(phage display)和其所建立的基因庫(phage display library)也可運用於製造許多抗體及新藥開發方面(陳燕春, 2001)。

2. 噬菌體的構造：

不同的噬菌體有不同的外形構造，然而基本上噬菌體的構造不外乎一個核酸分子而外面由一個外殼蛋白稱為 coat 或 capsid 保護使核酸不被 nuclease 或有害的物質傷害；核酸分子可以是單股或雙股(single-stranded or double-stranded)，直線或圓形(linear or circular)DNA，或者是一單股，直線(single-stranded, linear)的 RNA。大致上噬菌體可分成三種構造型式，一種為只具有一二十面體的頭部(icosahedral head)而無尾巴(tailless)，如 Phi-X174；另一種為具有一二十面體的頭部與尾巴，如 Lambda, T4；還有一種是直線型(filamentous)，如 M13 (Maloy et al., 1994)。

3. 噬菌體的分類及其生命週期：

噬菌體可分成兩種：暴裂型與潛溶型噬菌體(lytic and temperate phages)。當一細菌被暴裂類型噬菌體感染後，其會使細菌變成一個製造噬菌體的工廠，大量複製子代，而後裂解細菌細胞，釋放大量子代出來，釋放出來的子代可再繼續感染下個細菌宿主，這樣的 life cycle 即稱為 lytic life cycle，T4 噬菌體就是屬於此型。而

潛溶型噬菌體則可進行 lytic cycle 或 lysogenic cycle；當其進行 lysogenic cycle 時則不會製造子代而裂解細菌，反而是把其 genome 鑲嵌入宿主的染色體中，然後進入靜止狀態；其實截至目前為止潛溶型噬菌體都是含雙股的 DNA，而且大部分的潛溶型噬菌體在不利的環境下（如乾燥、暴露在 UV 或 ionizing radiation 下和接觸突變劑等等）則會終止 lysogenic cycle，進入 lytic cycle；lambda 噬菌體就是屬於潛溶型噬菌體（Maloy et al., 1994）。

典型的含有雙股 DNA 之噬菌體其 lytic cycle 如下所述（Maloy et al., 1994）：

(1) 噬菌體吸附（Adsorption）在細菌細胞表面的特殊接受體（receptor）上：

這個步驟是由噬菌體上的 tail fibers 或其他相似的結構（在沒有 tail fibers 的噬菌體時）來辯認或媒介而且此步是可逆的。tail fibers 要接觸細菌的何種表面接受體及噬菌體對宿主之專一性（即可被噬菌體感染的細菌），通常是由噬菌體本身的 tail fibers 種類所決定。噬菌體在細菌細胞表面的接受體可以是 outer membrane proteins, LPS, pilus 或 lipoprotein 等等。

(2) 將噬菌體 DNA 通過細菌細胞壁

(3) 將宿主細胞轉成製造噬菌體的細胞（phage-producing cell）

(4) 產生噬菌體核酸分子和蛋白質

(5) 噬菌體顆粒（phage particles）的組裝（assembly）：

通常最後每個宿主細胞約會有 50-100 個的 phage particles 產生，數目因不同噬菌體及宿主細胞生理情形而異。

(6) 新合成的噬菌體之釋放：

在感染宿主的最後階段，為了釋放大量的噬菌體子代，大部分的噬菌體都會合成兩種蛋白來裂解宿主細胞：endolysin（lysin）和 holin。

Endolysin（lysin）可分解細菌細胞壁（peptidoglycan）

Holin 是一 tunnel-like 的蛋白質，可在細菌 cytoplasmic membrane 上產生非特異性的孔洞（nonspecific holes）以利 endolysin 穿透 periplasm 去分解細胞壁。

4. T4-type 噬菌體的簡介：

截至目前為止，已有許多暴裂型噬菌體被發現和研究，其中以 T4 噬菌體最被廣泛的研究與了解（Maloy, 1994）。最近的研究報告中指出有超過 140 個在型態

(Morphology) 上與 T4 噬菌體相仿的噬菌體 (稱為 T4-type 噬菌體) 已被發現 (Ackermann and Krisch., 1997; Ackermann et al., 1998)。T4 噬菌體原是由 *Escherichia coli* B 分離出來的,而這些 T4-type 的噬菌體許多是由 *E. coli* 及與 *E. coli* 相近的腸內菌種 (enterobacterial species) 如 *Klebsiella*、*Shigella* 和 *Yersinia* 中分離出來,較不常由 *Citrobacter*、*Proteus*、*Salmonella* 和 *Serratia* 中分離到,其他則繁殖於與 *E. coli* 更不相近的細菌如 *Acinetobacter*、*Aeromonas*、*Burkholderia* 和 *Vibrios* 等菌種 (Tetart et al., 2001)。

T4-type 噬菌體具有略長之二十面體的頭部 (moderately elongated icosahedral head), 長 111 nm, 寬 78 nm; 頭部底下連接一個 collar, 接著連接一個可伸縮的 tail (長 113 nm, 寬 16 nm), tail 於電顯下可看到含有一圈圈的 tail sheath (共有 24 圈), tail 的尾端有一底下接著六條長 tail fibers 的 base plate, 整個外形很像個太空登陸小艇 (Wood and Conley, 1979)。屬於 T-even 噬菌體如 T2、T4 和 T6 等的同源基因 (homologous gene) 之核? 酸序列彼此之間的差異大致上都不到 5% (Loayza et al., 1991)。然而有些擁有 T4-type 噬菌體之形態的噬菌體其 genome 序列卻與 T-even 噬菌體相距甚遠, 如 coliphages RB42、RB43 和 RB49 及 *Aeromonas* phage 44RR; 這些被稱為 pseudoT-evens 的噬菌體只有一小部份的 DNA (約 10%) 在嚴謹的條件下可與 T4 genome 雜交 (hybridization); 像在 pseudoT-evens 噬菌體中最被了解的 RB49, 利用隨機 genomic 的定序 (random genomic sequencing) 發現大約有三分之一的 RB49 DNA 完全與 T4 沒有任何相似性 (Monod et al., 1997)。有些 T4-type 噬菌體如 Tula RB69 和 SV14 似乎是界於 T-even 與 pseudoT-evens 噬菌體之間的中間體 (intermediate), 顯示在 T-even 與 pseudoT-evens 噬菌體群間會發生 (至少偶爾會發生) genomic 交換 (genomic exchange) (Monod et al., 1997)。

Tetart et al. 於 2001 發表的研究中利用電子顯微鏡 (electron microscopy) 觀看一些非由 *E. coli* 分離出來的 T4-type 噬菌體, 雖然其中某些 (如 *B. cepacia* phage 42) 的外形與 T4 噬菌體相似, 然而其他的噬菌體卻擁有長約 137 nm 之比較長的頭部如 *A. hydrophila* phage Aeh1、*A. salmonicida* phage 65 和 *V. natriegens* phage nt-1。最近也發現 *V. parahaemolyticus* 之 T4-type 噬菌體 KVP40 和 KVP20 在外形上與 *V. natriegens* phage nt-1 是一樣的 (Matsuzaki et al., 1998)。為了與擁有標準 T4 型態的 T4-type 噬菌體 (T-even 與 pseudoT-evens 噬菌體) 作區別, 這種在外形上擁有異

常頭型 (aberrant head morphology) 的噬菌體，稱之為 schizoT-evens。

既然 T4 噬菌體藉由一種 head-filling 機制來組裝其 genome (Streisinger et al., 1967), 則任何頭型大小的改變都會刺激其病毒 genome 大小的改變 (Tetart et al., 2001); T4 噬菌體的 genome 大小已完全定序出來並且長度為 169 kb。其他的 T-evens (T2 和 T6) 的 genome 於電顯下顯示與 T4 大小相近 (Kim and Davidson, 1974)。而 Françoise tetart et al. 利用脈衝電泳法 (PFGE) 將一些 pseudoT-evens 和 schizoT-evens 噬菌體的 genome 與 T4 做比較, 發現 pseudoT-evens 噬菌體的 genome 大小與 T4 相近, 然而因為擁有比較長的頭部的 schizoT-evens 噬菌體, 其 genome 就顯得較大, 像 *Aeromonas. hydrophila* phage Aeh1 的 genome 估計約有 230 kb 左右; Matsuzaki et al. 最近也發表與 nt-1 相近的噬菌體 KVP40 擁有約 250 kb 左右的 genome 大小。

5. 噬菌體脫離宿主的策略：

原則上噬菌體利用兩種基本策略脫離 (escape) 他們的宿主。直線型的噬菌體 (filamentous bacteriophage) 如 M13 會合成複雜的分泌裝置 (secretion apparatus) 並不斷的從他們的宿主細胞中推出, 然而卻不會造成宿主細胞的死亡。相反的, 非直線型的噬菌體 (non-filamentous bacteriophage) 最後則會藉由使宿主細胞裂解死亡的方式 (by lysing their host) 來結束他們的寄生生活。大致上, 最後會導致宿主細胞裂解死亡的這些 lytic phage 會合成一些因子 (factors) 來破壞細菌細胞壁; 可有兩種機轉來達成, 具有 large genome 的大型噬菌體利用 holin-endolysin system 來分解細胞壁, 如含雙股 DNA 的噬菌體即是用此機轉殺死宿主; 那不同於含雙股 DNA 的大噬菌體, 含有 small genome 的小型噬菌體 (如帶有小於 6 kb genome 之 single-stranded RNA or DNA 噬菌體) 則利用 single lysis protein, 屬於此分類並較被了解的噬菌體 (皆是 Coliphages) 及其 lysis protein 分別是：

single-stranded (ss)-DNA 噬菌體 FX174 (Microviridae) 的 E protein ;

single-stranded (ss)-RNA 噬菌體 MS2 (Leviviridae) 的 L protein ;

single-stranded (ss)-RNA 噬菌體 Q β (Alloleviviridae) 的 capsid protein-A₂ ;

而且此三種 lysis protein 皆不具有分解細菌細胞壁的作用 (Thomas et al., 2002)。

二、“protein antibiotics”的發現

西元 2001 年六月由 Thomas G. B 等學者在知名期刊 Science 中發表一篇有關上述三種 single lysis protein 中的兩種蛋白（噬菌體 Q β 的 capsid protein-A₂ 和噬菌體 FX174 的 E protein）如何破壞細菌細胞壁之機轉的研究。報告中指出此兩種蛋白藉由分別作用在細菌細胞壁合成步驟中的不同位置而去影響宿主裂解，其作用與抗生素 penicillin 相似；噬菌體 FX174 的 E protein 抑制細胞壁合成步驟中的 MraY（會催化第一個 lipid-linked murein 前驅物的形成）而噬菌體 Q β 的 capsid protein-A₂ 則會去抑制細胞壁合成步驟中的 MurA（會催化 murein 生化合成中的 committed step）。因此，我們知道 E 和 A₂ 蛋白皆是細菌細胞壁的合成抑制劑，與抑制細菌細胞壁合成的抗生素作用相仿；這樣的發現使醫療界掀起另一種研究熱潮 - 即可以運用這些蛋白來研發 “protein antibiotics”，來替代或輔助現有的抗生素，以解決日益嚴重的細菌抗藥性問題（Thomas et al., 2002）。

三、噬菌體療法及其試驗

1. 噬菌體療法的起源：

細菌對大部份或全部的抗生素產生抗藥性已漸形成日益嚴重的問題，許多新型抗生素剛上市不久即已發現有耐藥菌株，因此迫使科學家們不得不去尋找替代的抗菌療法，而其中之一就是一項被重新感到興趣的研究議題—噬菌體療法（phage therapy）—此即為利用一種可專一性侵襲並殺死特有病原菌的細菌病毒（即噬菌體）來對抗細菌感染的治療方法（Levin and Bull, 1996；Lederberg, 1996；Radetsky, 1996；Barrow and Soothill, 1997）。事實上用噬菌體來對抗細菌的觀念早在 1917 年法國微生物家 Felix d’ Herellez 發現噬菌體時即提出以作為醫療上滅菌的方法；而在此後的二十年間（1920-1940）歐洲學者也進行相當多有關這方面的研究，但是因為當時發現體外與體內試驗的作用效果差距很多，加上美國學者對噬菌體療法不抱信心，而後又因 Penicillin 抗生素的出現（1940），使得噬菌體療法沉寂了一段時間，直到最近因為抗藥性的問題出現，加上現代的實驗技術之發展，才又激起各國學者的重新重視與研究（Carlton, 1999）。如今，病毒學家已經發現有幾千種不同的噬菌體存在，而且每一種只能感染少數幾種細菌，這也意謂著在運用噬菌體來治

療細菌感染時，必須小心地挑選出可以攻擊特定細菌的噬菌體。

2. 噬菌體療法 (phage therapy) 的動物試驗：

截至目前為止，已有許多有關噬菌體療法 (phage therapy) 之動物試驗的研究報告發表。噬菌體在治療由 *E. coli* 所引起的致命全身性感染的老鼠 (Smith and Huggins, 1982) 由 *E. coli* 所引起的致命下痢的小牛與小羊 (Smith and Huggins, 1983 ; Smith et al., 1987) 由 *S. typhimurium* 所引起的致命下痢的雞隻 (Berchieri et al., 1991) 及在預防燒傷兔子移植皮膚時被 *Pseudomonas aeruginosa* 感染破壞 (Soothill, 1992) 時皆都具有成效。Merril et al. (1996) 表示噬菌體可以治療由 *E. coli* 所爆發的菌血症 (bacteremia) 之老鼠而且 long-circulating 的噬菌體變異比野生種 (wide-type , 即有加抗生素) 來的好；同樣的於 1997 年 Levin and Bullu 也表示因為噬菌體在宿主內是以指數成長，所以給單一劑量的噬菌體對抗細菌的效果比給多次劑量的抗生素 (chloramphenicol, tetracycline 等等) 來的好。在最近 2003 年二月 Matsuzaki S 等人也在 Journal of infection disease 中發表利用腹腔給予噬菌體 phi MR11 來治療被 *Staphylococcus aureus* (包括 methicillin-resistant bacteria) 感染的老鼠的成效，而且可很快的在血液循環中發現噬菌體的存在並維持在一定的血中濃度直到細菌被根除，當單獨給予高量的噬菌體時也沒有任何因噬菌體所引起的副作用產生。

3. 噬菌體療法 (phage therapy) 的人體試驗：

另外，噬菌體療法 (phage therapy) 在人體試驗方面也有很多研究報告出爐。在波蘭由 Prof. S. Slopek 領導及其同僚包括 Dr. M. Mulczyk 和 Dr. B. Weber-Dabrowska 所組成的研究團隊 (隸屬於 the L. Hirschfeld Institute of immunology and Experimental Therapy, a branch of the Polish Academy of Sciences) ，從 1980 年以後迄今已陸陸續續利用噬菌體治療了將近 1300 位被 *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* 及 *E. coli* 感染的病人，而總治癒率 (包括各種病原菌引起的感染及感染的部位) 統計起來約將近 86% ，也發表了一系列的研究報告 (Slopek and Kucharewicz-Krukowska, 1987 ; Slopek et al., 1985 ; Kucharewicz-Krukowska et al., 1985 ; Kucharewicz-Krukowska et al., 1987)。大部分的病例都是慢性的並對所有現有的抗生素都呈現抗藥性，而且都是其他治療方法都失敗了以後，才開始使用噬菌

體療法(phage therapy)來治療病人，這顯示了通常都是在病人病程的晚期才試上噬菌體療法。這些研究員口服給予噬菌體，因為他們顧慮到注射給予的危險性（因為怕並不是所有細菌殘骸物已被清除），他們會先給予病人制酸劑與凝膠（antacids and gelatin）來保護噬菌體不被胃酸所破壞，而且也在發表的研究報告中證實病人以口服噬菌體的給與方式的確可以到達血流中（Weber-Dabrowska et al., 1987）。研究小組也篩選出了一些具 multivalent 功用的噬菌體（即廣效性的噬菌體）以用於一些在時間上來不及去確定其病原菌或選定的噬菌體之猛爆性感染（fulminant infections，如合併敗血症 septicemia 及急性呼吸窘迫症 acute respiratory distress syndrome 的情形）上（Carlton, 1999）。

四、克雷伯氏肺炎桿菌的簡介及其抗藥性

Klebsiella pneumoniae 屬腸桿菌科（Enterobacteriaceae）中克雷伯士氏桿菌（*Klebsiella*），屬 G(-)兼氣性厭氧菌，為一伺機性致病菌；其形狀為長直桿狀，具有多醣類（polysaccharide）組成的莢膜。*K. pneumoniae* 一般可見於人類與其他動物的腸道中，但數目明顯少於 *E. coli*，也可存在於泌尿生殖道、呼吸道中，另於血液、皮膚、傷口及排泄物亦可被發現（Balows et al., 1991；Krieng et al., 1984）。此菌是一重要的院內感染致病源，尤其是在加護病房或燒燙傷病房中更易引起流行；其可引起肺炎（pneumoniae）、泌尿道感染（urinary tract infection）、肝腫瘍（liver abscess）、菌血症（bacteremia）及敗血症（sepsis）等等；而免疫力差的個體如小孩、老年人或免疫低下患者，以及酒精中毒、糖尿病患和慢性呼吸病患者也較易受此菌感染（Carpenter, 1990。FDe la Torre et al., 1985。FJong et al., 1995）。事實上，*K. pneumoniae* 在泌尿道感染上是僅次於大腸桿菌（*E. coli*）的病原菌。

近來許多國家也漸注意到愈來愈多的 *K. pneumoniae* 對許多抗生素產生抗藥性，尤其是可以產生超廣效乙內醯胺？ extended-spectrum β -lactamases（ESBLs）的菌種（Jacoby and Medeiros, 1991；Siro, 1995；Nordmann, 1998）；而這是和密集的使用廣效頭孢芽抗生素（expanded-spectrum cephalosporins）及院內感染有密切關係（Hanberger et al., 1999；Wiener et al., 1999；Shannon et al., 1998；Olivier et al., 1998；Dominique et al., 1997；Moosdeen, 1997；Jacoby et al., 1996；Rice et al., 1996）。

所以通常可產生 ESBLs 的菌種對新一代頭孢芽抗生素如 ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone, and aztreonam. 呈現抗藥性, 而且其可藉由質體的複製及傳播, 更可在不同的菌株間傳遞, 使原本不會產生乙內醯胺? (β -lactamase) 的腸道細菌, 也變得會製造 ESBLs, 因而增加院內病人對抗生素的抗藥性之擴展 (Hyunjoo et al., 1999 ; Liu et al., 1998 ; Livermore and Yuan, 1996) 。

五、研究動機

雖然目前已有許多以噬菌體治療 (phage therapy) 的成功研究 (動物試驗及人體試驗) 以及“protein antibiotics”的發現, 但是運用噬菌體來治療細菌感染的詳細機制仍然不是很清楚, 而隨著愈來愈多的多重抗藥性菌種 (MDR, multidrug-resistant bacteria) 的出現, 使我們對噬菌體將來運用在感染治療與預防上充滿興趣與希望; 懷抱著這份理念, 加上常是院內感染致病源的 *Klebsiella pneumoniae* 其許多抗藥菌株的出現, 於是為了篩選能溶解具 ESBLs 的 *K. pneumoniae* 之噬菌體, 以期將來能運用在治療上, 所以我們以本實驗室先前篩選到的具 ESBL 之 *K. pneumoniae* 的一些菌株如 K6、K55 等, 和可以作為噬菌體宿主細胞的 *K. pneumoniae*10693 當作 indicator cell, 將中國醫藥學院附設醫院所收集的液體 (如尿液、脊椎液、膽液、痰液、廢液等等.....) 之上清液分離到 12 隻暴裂型噬菌體 (lytic bacteriophage), 分別為 KPP2, KPP3, KPP4, KPP5, KPP6, KPP7, KPP10, KPP11, KPP30, KPP42, KPP50 和 KPP95, 並對其特性做深入研究。從這些噬菌體的一些相似基本性質如 titer、外形、genome 大小和限制? 切割圖譜之結果看來, 應都屬同一類的噬菌體; 接著我們對 KPP95 作進一步的研究如外形、genome 大小、宿主分布、各 DNA 片段的比對和建構 T4-type 噬菌體及其 gene 23 product 的種系發生樹狀圖, 而結果顯示其為一泛宿主的 pseudoT-evens 噬菌體。