

氏名	佐藤 あやめ		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第6613号		
学位授与の日付	令和4年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	<i>Lautropia mirabilis</i> の分離・培養法の確立と分離株における薬剤感受性の検討		
論文審査委員	仲野 道代 教授	岡元 邦彰 教授	山本 直史 准教授

学位論文内容の要旨

Lautropia mirabilis は 1930 年に百日咳患者の上気道より”*Sarcina mirabilis*”として発見され、1994 年にヒト口腔内(舌下)から再発見されたグラム陰性通性嫌気性球菌である。これまでに *L. mirabilis* が口腔内の健康度の指標となる可能性があることを示唆する報告は複数ある。一方で、*L. mirabilis* が疾患と正の関係にあることを示唆する報告も複数ある。我々の先行研究では、造血細胞移植患者の中に、移植後に口腔内で *L. mirabilis* が主要構成菌となった患者が存在した。*L. mirabilis* が健康にとって有益であるか、あるいは有害であるかはその構造、生化学的性質および病原性を含めて未だ分かっていない。本研究では、*L. mirabilis* を解析するための第一段階として、本菌の簡便な分離・培養法と検出法の確立を目指した。そして得られた分離株のゲノム解析と薬剤感受性試験を行った。

岡山大学病院血液・腫瘍内科で 2019 年 4 月から 2021 年 3 月に造血細胞移植を受けた患者 24 名と、抗菌薬および免疫抑制剤を使用していない者 10 名を対象とし、前者を造血細胞移植患者群、後者を健常者群とした。滅菌綿棒で頬粘膜を擦過して検体を採取した。検体採取は造血細胞移植患者群では移植 7 日前から移植前日までに 1~2 回、移植翌日から 28 日後までの期間に 1~4 回、患者の体調に応じて行った。健常者群では同意取得後 7 日以内に 1 回行った。採取した検体を MacConkey 寒天培地とチョコレート寒天培地に播種して 37°C の好気条件で 1~3 日間培養した。

PCR による検出では、すべての細菌が保有する *recA* 遺伝子を標的としてプライマーを設計した。標準株である *L. mirabilis* ATCC51599 株と口腔常在菌を含む 8 菌種を用いて PCR を行い、設計したプライマーの精度を確認した。

患者分離株 5 株と健常者分離株 2 株は大阪大学微生物病研究所にゲノム解析を外部委託するとともに、ディスク法と Etest®を用いて薬剤感受性試験を行った。薬剤感受性試験では、造血細胞移植や歯科領域等で汎用される、バンコマイシン (VCM)、テイコプラニン (TEIC)、レボフロキサシン (LVFX)、メロペネム (MEPM)、タゾバクタム/ピペラシリン (TAZ/PIPC)、セフェピム (CFPM)、アモキシシリン (AMPC)、クラリスロマイシン (CAM)、アジスロマイシン (AZM)、セフカペン (CFPN) を使用した。

recA を標的として設計したプライマーを用いて PCR を行ったところ、*L. mirabilis* の特異的な増幅が確認できた。頬粘膜由来検体を培養したところ、MacConkey 寒天培地上に少数のコロニーが形成された。形成されたコロニーの性状は 3 種類であり、肉眼で区別することが可能であった。そのうちの 1 つのコロニーが、16SrDNA 配列の決定により *L. mirabilis* と同定された。以上より、MacConkey 培地により効率的に *L. mirabilis* を分離・培養することができ、*recA* を標的とした PCR で *L. mirabilis* が特異的に検出されることが示された。なお、チョコレート寒天培地では多数の菌が培養され、*L. mirabilis* を単離することは困難であったが、分離された *L. mirabilis* を短期間で培養することが可能であり、純培養に有用と考えられた。

ゲノム解析では、造血細胞移植患者群と健常者群において系統的な関係性はみられなかった。しかし、今までフルゲノム解析されている *L. mirabilis* は 1 株のみであり、今回 7 株についてフルゲノム解析を行ったことで、ゲノムデータベースの拡充を図ることができた。

薬剤感受性試験では、すべての株が VCM と TEIC に耐性を示した。また、患者分離株の中に LVFX と CFPN に耐性を示す分離株が 1 株、LVFX に中間を示す分離株が 2 株存在した。その他の薬剤に対してはすべての株が感受性を示した。LVFX に対して耐性あるいは中間を示した 3 株はすべて LVFX 使用中に分離された株であったことから LVFX の使用によって耐性を獲得した可能性が考えられた。

最後に、本研究では幾つかの限界があり、課題が残っている。まず、本研究で行った conventional PCR での検出は定性的であるため、今後はメタゲノムや 16SrRNA 解析を用いた定量的な把握が課題と考えられる。また、分離株の中で均一な菌液調整に抵抗を示した株が存在し、薬剤感受性試験を行うことができなかったため、その要因を探索し、より多くの臨床分離株における薬剤感受性について検証することが求められる。さらに、今後は本研究で確立された *L. mirabilis* の分離・培養法および検出法を基盤としてより多くの臨床分離株を獲得し、病原性を含めた性状について調査することが課題である。

論文審査結果の要旨

Lautropia mirabilis (*L. mirabilis*) は 1930 年に“*Sarcina mirabilis*”として発見され、1994 年にヒト口腔内から再発見された細菌である。先行研究において、造血細胞移植後に口腔内で本菌が主要構成菌となった患者が存在したことを報告したが、本菌の病原性を含めた性状は今のところ不明点が多い。よって、本菌を解析する第一段階として、口腔内からの分離・培養法と検出法の確立を目指した。岡山大学病院で 2019 年 4 月から 2021 年 3 月に造血細胞移植を受け、本研究への参加に同意した患者 24 名を患者群、抗菌薬と免疫抑制剤を使用していない者 10 名を健常者群とし、頬粘膜から検体を採取した。MacConkey 寒天培地から得たコロニーに対して、すべての細菌が保有する遺伝子である *recA* を標的としたプライマーを設計し PCR を行い、菌種を同定した。分離株 7 株については、ゲノム塩基配列の解読を行い、ゲノム塩基配列の取得には MinION (Nanopore) と NovaSeq6000 (Illumina) を使用し、アセンブリには Flye version 2.7-b1585 を使用した。Pilon version 1.23 を用いてコンティグを結合し、アノテーションは DFAST を用いて行った。ゲノム配列の構造類似性は Artemis Comparison Tool ver. 18.1.0 を用いて確認し、系統樹は MEGAX を用いて作成した。また、分離株 7 株についてはディスク拡散法および E-test により 10 種の抗菌薬に対する薬剤感受性試験を行った。主要な研究結果は以下のとおりである。

- 1) MacConkey 寒天培地を用いることで *L. mirabilis* が口腔内から選択的に分離され、*recA* を標的とした PCR を組み合わせることで効率的に *L. mirabilis* を検出できる可能性が示された。
- 2) 分離株 7 株のゲノムサイズ、タンパク質コード領域数、GC 比、ゲノム全体の構成や遺伝子配列は株間での変化に乏しく、安定したゲノム構造が保持されていることが示された。
また、系統樹解析では患者分離株と健常者分離株それぞれにおけるクラスターの形成はなく、由来となる宿主に依存した特徴は認められなかった。
- 3) すべての分離株がバンコマイシンおよびテイコプラニンに対して耐性を示した。レボフロキサシンとセフカペンに耐性を示す患者分離株が 1 株、レボフロキサシンに中間を示す患者分離株が 2 株存在したが、これら 3 株はいずれもレボフロキサシン使用中に検出されていたため、レボフロキサシンの使用により耐性を獲得した可能性が考えられた。

本研究で行った手法により *L. mirabilis* を口腔内から分離・検出できることが示された。
ゲノム配列解読により分離した株は本菌であることが確定され、薬剤感受性についても明らかにされた。

本研究によって得られた知見は、今後 *L. mirabilis* の病原性を含めた性状について解析する上で有意義な基盤となる可能性があり、今後のさらなる発展が望まれる新規性が認められた。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。