

学位論文

Lautropia mirabilis 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

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻

国際環境科学講座 口腔微生物学分野

佐藤 あやめ

Establishment of an isolation culture method for *Lautropia mirabilis* and verification of drug susceptibility of isolates

Department of Oral Microbiology,

Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Sato Ayame

緒言

Lautropia mirabilis はグラム陰性通性嫌気性菌で、1930年に“*Sarcina mirabilis*”として百日咳患者の上気道から発見された¹⁾。当時は注目されることはなかったが、1994年にヒト口腔（舌下）に存在する運動性細菌の調査がきっかけとなり、再発見されて *L. mirabilis* となった²⁾。

L. mirabilis は、歯周炎患者と比較して健常歯肉を有する者に多く存在し、歯周炎治療後に増加することが複数報告されている³⁻⁷⁾。小児においては、侵襲性歯周炎罹患群と比較して健常歯肉を有する群で *L. mirabilis* の存在比率が高く⁸⁾、う蝕に罹患している小児よりもう蝕のない小児において *L. mirabilis* の相対的存在量が多いことが報告されている⁹⁾。さらに、Kageyama らは、舌癌患者では舌切除術後に *L. mirabilis* が顕著に増加したことを報告している¹⁰⁾。これらの報告から、*L. mirabilis* は、口腔内の健康度の指標となる可能性が考えられる。一方で、嚢胞性線維症患者の口腔内¹¹⁾、¹²⁾、線維上皮性ポリープが存在する口腔内¹³⁾では本菌の存在比率が増加することが報告されている。最近では *L. mirabilis* が腹膜透析患者の腹膜炎の起因菌となった例も報告されている¹⁴⁾。また HIV 感染小児患者の口腔内においても本菌の存在比率が増加していたことが報告されている¹⁵⁾。さらに2018年に行われた我々の先行研究では、重度の口腔粘膜障害を生じた造血細胞移植患者の中に、移植後に口腔粘膜上細菌叢で *L. mirabilis* が主要構成菌となった患者が存在した¹⁶⁾。これらの報告は、*L. mirabilis* が免疫力低下を呈する疾患と正の関係にある、あるいは、病原性を有する可能性があることを示唆している。

以上のように、*L. mirabilis* は、健康にとって有益であることを示す指標となるのか、あるいは警告を示す指標となるのかは、その病原性を含めて未だ定まっていないのが現状である。また、*L. mirabilis* の菌体成分の構造や生化学的性質についての報告はこれまでもあるが¹⁷⁻¹⁹⁾、その数は僅かであり、限られている。すなわち、*L. mirabilis* の性状はその病原性を含めて、ほとんど明らかにされていない。

本研究では、*L. mirabilis* を解析するための第一段階として、ヒト口腔内から本菌を取得するための *L. mirabilis* の簡便な分離・培養法と検出法を確立することを目的とした。

得られた *L. mirabilis* 分離株の一部についてはゲノム解析を行い、さらに、分離株の薬剤感受性を検討した。

材料と方法

対象

造血細胞移植患者群の対象は、2019年4月から2021年3月の間に岡山大学病院血液・腫瘍内科で造血細胞移植を受けた20歳以上の患者24名（男性15名、女性9名、平均年齢48.1歳：23から68歳）とした。

健常者群の対象は、既往歴がなく、抗菌薬や免疫抑制剤を服用していない20歳以上の者10名（男性7名、女性3名、平均年齢32.6歳：28から56歳）とした。

なお、本研究は岡山大学生命倫理審査委員会の承認（研 1906-036）を受け、全対象に同意を得た上で実施した。

使用菌種

L. mirabilis ATCC51599 株は American Type Culture Collection (ATCC) から入手した。*Streptococcus mutans* MT8148 株は国立感染症研究所から恵与された。*Actinomyces viscosus* JCM8353 株, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JCM2434 株, *Neisseria gonorrhoeae* JCM2885 株, *Haemophilus influenzae* JCM33542 株, および *Fusobacterium nucleatum* subspecies *nucleatum* JCM8532 株は理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室から入手した。*Escherichia coli* DH5 α 株 (K12 株由来株) は株式会社ニッポンジーンから入手した。*Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 株は本研究室保存株を用いた。

使用培地

固形培地は、MacConkey 寒天培地 (Becton, Dickinson and Company) とチョコレート寒天培地 (日水製薬株式会社) を用いた。

薬剤感受性試験

薬剤感受性試験には、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) を用いた。KB ディスク® (栄研化学株式会社) と Etest® (ビオメリュー・ジャパン株式会社) を用い、VCM, TEIC, MEPM, AMPC, CAM, および AZM はディスク法と Etest を行い、LVFX, TAZ / PIPC, および CFPN はディスク法のみ行い、また CFPM は Etest のみ実施した。

検体の採取

造血細胞移植患者は、患者の体調に応じて、移植前 (移植 7 日前から移植前日までの期間) に 1 または 2 回、また移植後 (移植翌日から移植後 28 日までの期間) に検体を 1 から 4 回採取した。健常者は、同意取得後に 1 回採取した (図 1)。

滅菌綿棒 (日水製薬株式会社) 2 本を用いて両側頬粘膜全体を穏やかに擦過し、それぞれを MacConkey 寒天培地とチョコレート寒天培地に播種した。その後、37°C の好気条件下で 1 から 3 日間培養した。

DNA 抽出

PCR には、ボーリング法によって抽出した DNA を用いた。菌液 1 mL を 1.5 mL 容量の

サンプリングチューブにとり， $12,000 \times g$ で 5 分間遠心した後に上清を除去した．次にチューブに滅菌精製水 $100 \mu\text{L}$ を加え， 100°C で 10 分間煮沸した．その後， $12,000 \times g$ で 5 分間遠心することで得られた上清を DNA 溶液として使用した．

ゲノム解析には，フェノール・クロロホルムを用いて菌体から抽出した DNA を用いた²⁰⁾．はじめにチョコレート寒天培地で培養した菌体を 15 mL 容量のコニカルチューブに回収し， 5 mL の TE 緩衝液 (pH 8.0) を加えて懸濁した．次にクロロホルムとメタノールを 2 : 1 の割合で混合した溶液を等量加えて穏やかに 5 分間振盪した． $2,500 \times g$ で 20 分間遠心した後に溶液を除去し，十分に乾燥させた．その後 5 mL の TE 緩衝液 (pH 8.0) に懸濁した． 1 M のトリス-塩酸溶液 (pH 9.0) を 0.5 mL 加えることで中和したのちに最終濃度 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように卵白由来リゾチームを加え， 37°C で 16 時間反応させた．反応後，10%ドデシル硫酸ナトリウム溶液 $550 \mu\text{L}$ と $10 \text{ mg}/\text{mL}$ 濃度のプロテイナーゼ K 溶液 $55 \mu\text{L}$ を加えて， 55°C で 3 時間反応させた．その後，25 : 24 : 1 の割合で混合したフェノール・クロロホルム・イソアミノアルコール溶液を等量加えて 30 分間穏やかに攪拌した． $12,000 \times g$ で 20 分間の遠心後，水層を回収し，新しいコニカルチューブに移した．これにクロロホルムとイソアミノアルコールを 24:1 の割合で混合した溶液を等量加えて 5 分間，穏やかに振盪させた後に $12,000 \times g$ で 10 分間の遠心分離を行い，水層を新しいコニカルチューブに移した．そして，0.1 倍量の 3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.2) と等量のイソプロパノールを加えて穏やかに混合したのち， 4°C で 1 時間静置した． $12,000 \times g$ で 10 分間遠心したのちに上清を除去して 70%エタノール $100 \mu\text{L}$ を静かに加えた．直ちに $12,000 \times g$ で 5 分間遠心したのちに上清をすべて除去した．沈殿した DNA を TE 緩衝液 (pH 8.0) に溶解したものをゲノム DNA 溶液とした．

なお，得られたゲノム DNA は，吸光度比 (Abs 260 nm/Abs 280 nm) が 1.73 から 2.18 の間にあることを分光光度計により確認した．

PCR

L. mirabilis 特異的プライマーとして *recA* 塩基配列をもとに Lmrec1 : 5' - CACCCTCACGCGAGGTGCCCTCG - 3' (フォワード) と，Lmrec2 : 5' - CGAGATGCAGAAGCTGGGTGGA - 3' (リバース) を設計した．また細菌共通のプライマーとして，16SrDNA の保存領域に設計された 8F : 5' - AGAGTTTGATCATGGCTCAG - 3' (フォワード)²¹⁾ と 338R : 5' - GCTGCCTCCCGTAGGAGT - 3' (リバース)²²⁾ を用いた．プライマー-DNA の合成はシグマアルドリッチジャパン合同会社に委託した．

PCR 反応液は，PrimeSTAR®GXL DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社) $0.5 \mu\text{L}$ ，5×PrimeSTAR GXL Buffer (タカラバイオ株式会社) $5 \mu\text{L}$ ，dNTP Mixture (2.5 mM each) (タカラバイオ株式会社) $2 \mu\text{L}$ ， $0.4 \mu\text{M}$ のフォワードプライマーとリバースプライマー，そして各菌種から抽出した DNA (から 200 ng) に滅菌精製水を加えて全量を $25 \mu\text{L}$ とした．PCR 反応には TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice®Touch を用い， 98°C ，20 秒の初

期変性の後、98 °C、10 秒の熱変性、60 °C、15 秒のアニーリング、そして 68 °C、30 秒の伸長反応からなる 3 ステップを 40 サイクル行った。

電気泳動

PCR 産物の確認は、アガロースゲル電気泳動法により行った。PCR 産物 5 µL に 10×ローディングバッファー（タカラバイオ株式会社）1 µL を添加し、この混和物全量を、1.5% アガロースゲルを用いて 100 V で 25 分間泳動した。100 bp サイズマーカー（ExcelBand™ 100 bp DNA Ladder：コスモ・バイオ株式会社）を同時に泳動した。泳動後のアガロースゲルは 0.5 µg/mL 濃度のエチジウムブロマイド溶液（株式会社ニッポンジーン）で染色後、波長 312 nm の UV トランスイルミネーター上で DNA を検出した。増幅の有無を確認するとともにサイズマーカーにて増幅断片のサイズを確認した。

菌種の同定

アガロースゲル電気泳動法で分離した DNA 断片は、High Pure PCR Product Purification Kit（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）を用いてアガロースゲルから精製した。塩基配列の決定には BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（ThermoFisher Scientific）を用い、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer（Applied Biosystems）で解読した。決定した 16S rDNA の塩基配列は National Center for Biotechnology Information（NCBI）が提供している Basic Local Alignment Search Tool（BLAST）（<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）を用いて属あるいは菌種を同定した。

ゲノム配列の決定

L. mirabilis ゲノムの塩基配列の解読は、大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センターに外部委託した。

ゲノムの塩基配列は MinION (Nanopore) を使用したロングシーケンスと NovaSeq6000 (Illumina) を使用したショートシーケンスとして取得した。得られた配列のアセンブリには Flye version 2.7-b1585 を使用し²³⁾、作成されたコンティグの結合には Pilon version 1.23 を用いた²⁴⁾。ゲノム配列決定後のゲノムアノテーションは DFAST²⁵⁾を用いて自動的に行った。

ゲノム配列の一致比較

株間におけるゲノム配列全体の構造類似性は、Artemis Comparison Tool (ACT) ver. 18.1.0 を用いて確認した²⁶⁾。

系統樹解析

分子系統樹解析のために、まず kSNP3.0²⁷⁾を用いて一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) を検出した。次に、検出された SNP をもとに MEGAX²⁸⁾を用いて系統樹を作成した。最適 k-mer 値の設定には、kSNP3.0 のアクセサリツールである Kchooser を用いた²⁷⁾。最尤系統樹の構築には、MEGAX によって導き出された最小ベイズ情報量規準 (Bayesian information criterion) によって選択されたガンマ分布を用いた Tamura の 3 パラメーターモデルを用いた²⁹⁾。ブーストラップ計算は、1,000 回とした。

薬剤感受性試験

チョコレート寒天培地上に発育した菌を集菌し、滅菌生理食塩水に懸濁することで濁度が McFarland No. 0.5 (吸光度 530 nm : 0.08 から 0.10) に相当する菌液を調整した。調整菌液 1 mL をチョコレート寒天培地に播種し、培地全面に菌液が均一に行き渡った状態で 5 分間静置した。過剰な菌液を除去し、培地表面が乾燥したことを確認した後、ピンセットを用いて薬剤含有ディスクと Etest®ストリップを寒天培地上に密着するように配置した。なお、薬剤含有ディスクについてはディスク間距離を 24 mm 以上とした。37 °C の好気条件下で 24 時間培養し、阻止円と最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration : MIC) の測定を行った。

阻止円はノギスを用いて測定した。感受性の判定は、阻止円の直径を用いた米国臨床検査標準協議会 (Clinical and Laboratory Standard Institute : CLSI) Document M100-S22 に基づいて作成された KB ディスク®添付文書第 9 版 (2016 年 12 月改訂) の判定法に準拠して、S (感受性) / I (中間) / R (耐性) として判定した。なお、*L. mirabilis* は CLSI において基準値が示されていないため、判定法に記載されているすべての適応菌種において阻止円の直径の中で最小値以下を示すものを R、最大値以上を示すものを S と判定することとした。

Etest®の結果の判定には、CLSI Document M100-S22 を参照した。ただし、*L. mirabilis* の基準値は示されておらず、また、CFPM についてはカテゴリーに S / I / R 判定の設定がないため、MIC 値のみを採用した。

結果

L. mirabilis の分離・培養

始めに *L. mirabilis* ATCC51599 株を MacConkey 寒天培地とチョコレート寒天培地に播種したところ、増殖することが確認された (結果は示さない)。そのため、両培地を使用して被験者から菌を分離することを試みた。その結果、チョコレート寒天培地には播種後 1 日後に多数の菌が密に増殖し、培地上の菌を単離することはできなかった。一方、MacConkey 寒天培地では、造血細胞移植患者群 24 名のうち 9 名、健常者群 10 名のうち 4 名で、播種 2 あるいは 3 日後に明瞭でかつ分離可能なコロニーが観察された。MacConkey 寒天培地上にコロニーが観察された造血細胞移植患者 9 名のうち 3 名では、さらに採取時

期の異なる複数の検体で MacConkey 寒天培地上にコロニーが形成された。形成されたコロニーはすべて紫色を呈し、それらの性状から次の 3 種類に分類された (図 2)。i) 不正円形で辺縁が裂片状を呈し、中心が凸状のコロニー (図 2-A)、ii) 円形で扁平状のコロニー (図 2-B)、および iii) 不正円形で周囲に顆粒状物を伴い、周辺が裂片状で中心が凸状のコロニー (図 2-C) である。

***L. mirabilis* 検出用 PCR プライマーの特異性**

L. mirabilis を鑑別することを目的として、*L. mirabilis* の *recA* の塩基配列をもとにプライマー Lmrec1 と Lmrec2 を設計した。このプライマーセットを用い、種々の菌種の DNA を用いることで、その特異性を調べた。図 3A に示すように、供試した 9 菌種の中で *L. mirabilis* のみ増幅が確認された。16S rDNA の保存領域に設計されたプライマー 8F と 338R を用いた場合には、供試した全ての菌種で増幅が見られた (図 3B)。このため、プライマー Lmrec1 と Lmrec2 を *L. mirabilis* 特異的プライマーとして、以降の実験に使用した。

***L. mirabilis* 特異的 PCR による菌種の同定**

プライマー Lmrec1 と Lmrec2 を用いた PCR を行うことで、MacConkey 寒天培地に形成されたコロニーを同定することを試みた。造血細胞移植患者群 9 名と健常者群 4 名の合計 13 名から得られたのコロニーを試した。なお、各人からは同じ形状のコロニーが得られており、異なる形状のコロニーが得られた被験者はいなかった。Lmrec1 と Lmrec2 を用いた PCR を行ったところ、造血細胞移植患者群 7 名のコロニーで、また、健常者群 2 名のコロニーで DNA の増幅が見られた。増幅された DNA 断片に対して、プライマー 8F と 338R を用いたダイレクトシーケンスを行うことで塩基配列を決定した。得られた配列を BLAST で検索した結果、Lmrec1 と Lmrec2 を用いた PCR で PCR 産物が得られた造血細胞移植患者 7 名および健常者 2 名のコロニーは、いずれも *L. mirabilis* と推定され、相同性は 100.00% であった。これらのコロニー性状はいずれも不正円形で辺縁が裂片状を呈し、中心が凸状であった。*recA* を標的とした PCR の結果と 16SrDNA の塩基配列をもとにした BLAST 検索の結果は一致していた。*L. mirabilis* と同定された患者から分離された株を P1 から P7、健常者から分離された株を H1, H2 とした。一方、Lmrec1 と Lmrec2 を用いた PCR で PCR 産物が得られなかった造血細胞移植患者群 2 名と健常者群 2 名の株は、BLAST 検索の結果、それぞれ *Neisseria sicca* (accession No. MF578773.1) (相同性 100.00%) と *Haemophilus parainfluenzae* (accession No. FJ939586.1) (相同性 98.60%)、*Neisseria mucosa* (accession No. CP028150.1) (相同性 100.00%) と *H. parainfluenzae* (accession No. CP035368.1) (相同性 98.60%) と同定された。

ゲノム解析

Lautropia 属の中では、唯一 *L. mirabilis* NCTC12852T 株のみ完全長ゲノムの情報が整

理されて公開されている (accession No. NZ_LR134378). *L. mirabilis* の株間のゲノム構造の違いを明らかにすることを目的として、今回分離した中で 7 株 {造血細胞移植患者分離株 5 株 (P1 から P5 株) と健常者分離株 2 株 (H1, H2 株)} を選択し、それらのゲノムの塩基配列を解読した. 解析を行った 7 株のゲノムサイズは 3,131,150 bp から 3,205,328 bp (平均 3,160,269 bp), タンパク質コード領域 (coding sequence, CDS) 数は 2,540 から 2,607 (平均 2,574), そして GC 比は 65.2% から 65.5% (平均 65.4%) であった (表 1). NCTC12852T 株ではそれぞれ 3,172,010 bp, 2,523, 65.5% であり, 株間での変化は少ないことが推測された. 次にゲノム中における遺伝子の並びを検討した. 図 4 に示すように, ゲノム全体の構成や遺伝子の並びについては, NCTC12852T 株を含めて株間で変化に乏しいことが示された.

系統樹解析

造血細胞移植患者の分離株と健常者の分離株の間で遺伝学的に違いがあるかを調べるために, 造血細胞移植患者分離株 5 株 (P1 から P5 株) と健常者分離株 2 株 (H1, H2 株) のゲノムの配列を, NCTC12852T 株のゲノム配列, INSD に登録されている *L. mirabilis* の他の 5 株のドラフトゲノム配列 (Assembly ID: GCA_015254865. 1, GCA_015254895. 1, GCA_015254855. 1, GCA_015254875. 1, および GCA_015254885. 1), および *Lautropia dentaris* KCOM2505T 株のドラフトゲノム配列 (GCA_003892345. 1) を外群として, 分子系統樹解析を行った. その結果, 図 5 に示すように造血細胞移植患者分離株と健常者分離株はいずれもクラスターを形成せず, 由来となる宿主に依存した特徴は見られなかった.

薬剤感受性

ゲノムの塩基配列を決定した 7 株について薬剤感受性試験を行った. 表 2 に薬剤感受性試験を行った株 (P1 から P5 株) を保有していた患者の造血細胞移植における抗菌薬の投与スケジュールを示す. そして, 表 3 にディスク法と Etest® による薬剤感受性試験の結果を示す. 表 3 に示されるように, すべての株は VCM と TEIC に耐性を示した. ディスク法の結果から, P1 株は LVFX と CFPN にも耐性と判定され, また, P3 株と P4 株は LVFX に中間と判定された. その他の株については, VCM と TEIC 以外の 8 種類の抗菌薬に対してはすべて感受性と判定された.

考察

本研究では, i) *L. mirabilis* を分離して, 簡便に同定する方法の確立, ii) 得られた株のゲノム解析, そして iii) 薬剤感受性試験を行った.

細菌の分離および培養においては, 多種多様の細菌を分離・培養する非選択培地と特定の菌種を選択的に分離・培養するための選択培地が使用される. 論文中には示していないが,

本研究を遂行するために *L. mirabilis* 標準株 ATCC51599 を用いて培養の予備実験を行った。これまでに、5%または 10%馬血液寒天培地、チョコレート寒天培地、CAMP 寒天培地、TGY 寒天培地、Levinthal 寒天培地、Tween 80 寒天培地、MacConkey 寒天培地、および Regan-Lowe チャコール寒天培地は *L. mirabilis* の培養に用いられた報告がある^{2), 15)}。予備実験では、非選択培地であり口腔内細菌の分離・培養にも汎用される Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地 (Becton, Dickinson and Company) と、前出の培地の中で入手が容易であり、*L. mirabilis* を選択的に分離できることが推察される培地に着目し、MacConkey 寒天培地とチョコレート寒天培地を使用した。また、液体培地として BHI 液体培地 (Becton, Dickinson and Company) と Trypticase Soy (TS) 液体培地 (Becton, Dickinson and Company) を供試した。その結果、これらのすべての培地において *L. mirabilis* の増殖が確認された。BHI 寒天培地上に形成された *L. mirabilis* のコロニーは、表層が滑沢で円形を呈していた。また、MacConkey 寒天培地に形成されたコロニーは、不正円形で辺縁が裂片状、中心凸状のコロニーであった。この性状は、Rossmann らの報告¹⁵⁾ と類似していた。MacConkey 寒天培地は 1905 年に細菌学者 Alfred T. MacConkey (1861-1931) にちなんで名付けられた古典的な培地であり³⁰⁾、*E. coli* などの主にグラム陰性の腸内細菌の分離や同定に使用されている³¹⁾。乳糖を含み、また、グラム陽性菌の発育を抑制するために胆汁酸を含有している。一方、チョコレート寒天培地は *Haemophilus influenzae* のような発育要求性の厳しい細菌の培養や病原性のある *Neisseria gonorrhoeae* の同定に使用される栄養豊富な培地である³²⁾。

予備実験で MacConkey 寒天培地とチョコレート寒天培地の両方の培地で *L. mirabilis* の発育が確認できたため、両培地を用いることで、口腔内由来の検体から *L. mirabilis* を分離・培養することを試みた。滅菌綿棒で採取した検体を塗抹したところ、MacConkey 寒天培地上には 1 から 400 個のコロニーが形成され、計測可能であるとともに、コロニー性状を観察することが可能であった。結果の項に示したように、コロニー性状から *L. mirabilis* であるかを推測できたため、*L. mirabilis* の分離・培養には適した培地であると考えられる。一方のチョコレート寒天培地では増殖した菌数が多かったため、*L. mirabilis* を選択的に分離することは困難であった。しかし、MacConkey 寒天培地に形成された *L. mirabilis* のコロニー中の菌をチョコレート寒天培地上に継代培養すると、1 日後には白色の辺縁粗造なコロニーが形成された。Gerner-Smidt らは、チョコレート寒天培地上では *L. mirabilis* は短時間で増殖することを報告しており²⁾、今回の結果と一致する。チョコレート寒天培地は分離された *L. mirabilis* の純培養に有用と考えられた。ヒト口腔内から選択的に *L. mirabilis* を分離・培養することを試みたのは本研究が初めてである。

続いて、本研究では分子生物学的に *L. mirabilis* を検出する方法を検討した。検出法の確立において PCR プライマーの標的となった *recA* は DNA 損傷時の DNA 修復に重要な役割を果たし、一本鎖 DNA を二重らせん内部にある相同な領域と対合させる作用をもつ必須遺伝子である³³⁾。今までに *Burkholderia* species の識別のための PCR プライマーとして

標的にされた報告がある³⁴⁾。なお、*L. mirabilis* の *recA* 配列は *Pigmentiphaga* sp. と最も類似しており、その相同性は 85.18%であった。*recA* を標的としたプライマーを用いた PCR では明瞭なシングルバンドがみられ、この PCR 産物の塩基配列を決定した結果 *L. mirabilis* であることが確認された。以上のことから *recA* を標的とした PCR を行うことで *L. mirabilis* を特異的に検出できることが示された。

PCR 法では損傷菌や死菌まで検出する点に留意が必要であるが、迅速で感度や特異度が高い検出法であるため、より簡便で迅速な同定が求められる臨床分野においては有用である。現在のところ *L. mirabilis* の病原性は明確になっていないが、嚢胞性線維症¹¹⁾ ¹²⁾や腹膜透析患者の腹膜炎¹⁴⁾等の疾患に関係し、感染症の起因菌として作用する可能性も考えられるため、PCR 法の確立により簡便に *L. mirabilis* を検出できることは、今後臨床分野において有益になる可能性がある。一方で、性状や薬剤感受性について検証する場合には培養法が必要であり、目的に応じて PCR 法と培養法を組み合わせる必要がある。

これまでのところ、*L. mirabilis* のゲノム解析においてアノテーションまで終了した株は 1 株のみである。従って、菌株間におけるゲノム配列の比較は皆無である。株間におけるゲノム構成の違いを明らかにするため、造血細胞移植患者から分離した株 5 株と健常者から分離した株 2 株の計 7 株のゲノムの塩基配列を決定して比較検討した。その結果、参照株 NCTC12852T 株も含めて、ゲノム内で大きな組換えはみられず、また、大きな重複や挿入などもみられなかったことから、安定したゲノム構造を保持していることが示された。ただし、各株の配列それぞれに欠失している領域もあり、今後それらの部位を調査することで特性が明らかになる可能性が考えられる。系統樹においては分離株間で特異的なクラスターはみられず、参照株と造血細胞移植群および患者群の分離株の間に系統的な関係性はみられなかった。本研究の結果からは、いずれの分離株も分子進化的に区分化されることはないと考えられた。今までにフルゲノム解析されている *L. mirabilis* は参照株として使用された *L. mirabilis* NCTC12852T 株のみであり、今回得られた計 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に貢献することができた。

L. mirabilis の薬剤感受性については、錠剤拡散法によりペニシリン、アンピシリン、エリスロマイシン、ピペラシリン、セフロキシム、ゲンタマイシンに感受性を示すことが報告されている¹¹⁾。本研究では、ゲノム解析を行った造血細胞移植患者分離株 5 株と健常者分離株 2 株の計 7 株について、造血細胞移植や歯科領域等で頻用される抗菌薬に対する薬剤感受性を新たに調査した。その結果、すべての株は VCM と TEIC に対しては耐性を示し、VCM、TEIC、LVFX および CFPN 以外の抗菌薬に対してはすべての株が感受性を示した。VCM と TEIC については分子量が大きくグラム陰性菌外膜を通過できないことから、グラム陰性菌である *L. mirabilis* に対する抗菌活性はなく、*L. mirabilis* は自然耐性を示したことが考えられた。LVFX と CFPN に耐性を示した分離株は 1 株、LVFX に中間を示す分離株は 2 株存在した。これら 3 株はすべて造血細胞移植患者から分離された株で、LVFX 使用中に分離された株であった。その他の 4 株は抗菌薬を使用していない健常者および抗

菌薬使用前の造血細胞移植患者から分離された株であった。LVFX 使用中に分離された造血細胞移植患者分離株 3 株がディスク法において LVFX に耐性の傾向を示したことから、これら 3 株は LVFX の使用によって耐性を獲得した可能性が考えられた。また、本研究のきっかけとなった先行研究において、造血細胞移植後に口腔粘膜上細菌叢で *L. mirabilis* が優位となった患者では、その検体を得た際に LVFX のみが使用されていた¹⁶⁾。検体採取前には本研究ですべての分離株が感受性を示した MEPM, CFPM の使用歴があったが¹⁶⁾、それにも関わらず *L. mirabilis* が分離された要因の 1 つとしては、使用した抗菌薬が殺菌的ではなく静菌的な効果を示した可能性が考えられる。さらに、検出された *L. mirabilis* が LVFX に耐性を示し、菌交代現象の結果相対的に優位となったことが推測された。本研究の結果より LVFX に耐性の傾向を示す株が複数存在したことを考えると、先行研究において LVFX 使用中に *L. mirabilis* が優位に検出されたことは矛盾しない結果であると考えられた。*L. mirabilis* が、MEPM や CFPM といった *in vitro* 試験では感受性を示した抗菌薬を使用した後に検出された例があることを鑑みると、造血細胞移植における抗菌薬の使用については注意が必要と考えられる。

本研究では口腔内からの *L. mirabilis* の簡便な分離・培養法および検出法の確立を目指し、MacConkey 寒天培地での分離・培養法と *recA* を標的とした PCR での検出法を確立したが、幾つかの限界や課題も残っている。まず、本研究で行った conventional PCR を用いた検出法は定性的であるため、得られた検体における *L. mirabilis* の存在の有無の確認としては有用であるが、今後は定量的な把握が課題と考えられる。具体的にはメタゲノムや 16S rRNA 解析等を用いた *L. mirabilis* の口腔内における存在比率の検証が考えられる。また、一部の均一な菌液調整に抵抗性のあった株についてはその要因を探索し、すべての分離株において統一して MIC 測定や S/I/R の正確な判定ができるような方法の構築を検討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と考えられる。

結語

本研究では、MacConkey 寒天培地を使用することにより *L. mirabilis* をヒト口腔内から選択的に分離・培養でき、さらに、*recA* を標的としたプライマーでの PCR を組み合わせて行うことにより効率的に *L. mirabilis* を検出できることが示唆された。また、口腔内からの分離株のゲノム配列に大きな変異はなく安定した構造を保持しており、菌株間での系統的な関係性もないことが示された。さらに、分離株のほとんどは造血細胞移植や歯科領域などで汎用される抗菌薬に対して感受性を示したが、造血細胞移植患者分離株において LVFX と CFPM に耐性を示す株が 1 株、LVFX に中間を示す株が 2 株存在することを確認できた。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始温かい御指導と御高閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻国際環境科学講座口腔微生物学分野大原直也教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を行う貴重な機会を与えてくださり、研究の遂行に際して御協力いただきました岡山大学病院医療支援歯科治療部の曾我賢彦准教授に謹んで感謝申し上げます。そして、本研究を進めるにあたり貴重な御指導と御援助をいただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻国際環境科学講座口腔微生物学分野中山真彰助教に心より感謝いたします。さらに、ゲノム解析およびその貴重なデータを御供与くださり、データ解析にご協力いただきました大阪市立大学大学院生活科学研究科和田崇之教授、大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センター元岡大祐助教、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻国際環境科学講座病原細菌学分野後藤和義助教に深謝申し上げます。また、本研究の遂行に際して御理解、御協力をいただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻腫瘍制御学講座血液・腫瘍・呼吸器内科学分野前田嘉信教授と松岡賢市准教授、岡山大学病院輸血部藤井伸治講師に厚く御礼申し上げます。そして最後に、多くの御助言をいただきました岡山大学病院医療支援歯科治療部の諸先生方に感謝の意を表します。

文献

- 1) Orskov J. Untersuchungen über einen in mundhöhle und oberen luftwegen häufig vorkommenden, zur Sarcinagruppe gehorigen mikroben, der eigentümliche morphologische verhältnisse aufweist. *Acta Pathol Micmbiol Scand Suppl* III: 519-541, 1930
- 2) Gerner-Smidt P, Keier-Nielsen H, Dorsh M, Stackebrandt E, Ursing J, Blom J, Christenen AC, Christensen J, Frederiksen W, Hoffmann S, Holten-Andersen W, Ying YT. *L. mirabilis* gen. nov., sp. nov., a Gramnegative motile coccus with unusual morphology isolated from the human mouth. *Microbiology* **140**: 1787–1797, 1994
- 3) Colombo APV, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, Socransky SS, Hasturk H, Dyke TEV, Paster BJ. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis and periodontal health using the Human Oral Microbe Identification Microarray (HOMIM). *J Periodontol* **80**: 1421–1432, 2009
- 4) Colombo APV, Bennet S, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, Socransky SS, Hasturk H, Dyke TEV, Dewhirst FE, Paster BJ. Impact of periodontal therapy on the subgingival microbiota of severe periodontitis: comparison between good responders and “refractory” subjects by the Human Oral Microbe Identification Microarray (HOMIM). *J Periodontol* **83**: 1279–1287, 2012
- 5) Al-Kamela A, Baraniyab D, Al-Hajja WA, Halboubd E, Abdulrabe S, Chenf T, Al-Hebshi NN. Subgingival microbiome of experimental gingivitis: shifts associated with

- the use of chlorhexidine and N-acetyl cysteine mouthwashes. *J Oral Microbiol* **11**: 1608141, 2019
- 6) Papapanou PN, Park H, Cheng B, Kokaras A, Paster B, Burkett S, Watson C W.M., Annavajhala M, Uhlemann A.C., Noble JM. Subgingival microbiome and clinical periodontal status in an elderly cohort: The WHICAP ancillary study of oral health. *J Periodontol* **91**: 56–67, 2020
 - 7) Ikeda E, Shiba T, Ikeda Y, Suda W, Nakasato A, Takeuchi Y, Azuma M, Hattori M, Izumi Y. Japanese subgingival microbiota in health vs disease and their roles in predicted functions associated with periodontitis. *Odontology* **108**: 280–291, 2020
 - 8) Shaddox LM, Huang H, Lin T, Hou W, Harrison PL, Aukhil I, Walker CB, Klepac-Ceraj V, Paster BJ. Microbiological characterization in children with aggressive periodontitis. *J Dent Res* **91**: 927–933, 2012
 - 9) Qudeimat MA, Alyahya A, Karched M, Behbehani J, Salako NO. Dental plaque microbiota profiles of children with caries-free and caries-active dentition. *J Dent* **104**: 103539, 2021
 - 10) Kageyama S, Nagao Y, Ma J, Asakawa M, Yoshida R, Takeshita T, Hirose A, Yamashita Y, Nakayama H. Compositional shift of oral microbiota following surgical resection of tongue cancer. *Front Cell Infect Microbiol* **10**: 600884, 2020
 - 11) Dekhil SMB, Peel MM, Lennox VA, Stackebrandt E, Sly LI. Isolation of *L. mirabilis* from sputa of a cystic fibrosis patient. *J Clin Microbiol* **35**: 1024–1026, 1997
 - 12) Voronina OL, Kunda MS, Ryzhova NN, Aksenova EI, Gintsburg NE. On *Burkholderiales* order microorganisms and cystic fibrosis in Russia. *BMC Genomics* **19**: 77–90, 2018
 - 13) Perera M, Al-hebshi NN, Perera I, Ipe D, Ulett GC, Speicher DJ, Chen T, Johnson NW. Inflammatory bacteriome and oral squamous cell carcinoma. *J Dent Res* **97**: 725–732, 2018
 - 14) Tan RYP, Tan BQ, Rao N. The first case of peritoneal dialysis-associated peritonitis due to *L. mirabilis*. *Nephrology* **26**: 633–634, 2021
 - 15) Rossmann SN, Wilson PH, Hicks J, Carter B, Cron SG, Simon C, Flaitz CM, Demmler GJ, Shearer WT, Kline MW. Isolation of *L. mirabilis* from oral cavities of human immunodeficiency virus-infected children. *J Clin Microbiol* **36**: 1756–1760, 1998
 - 16) Muro M, Soga Y, Higuchi T, Kataoka K, Ekuni D, Maeda Y, Morita M. Unusual oral mucosal microbiota after hematopoietic cell transplantation with glycopeptide antibiotics: potential association with pathophysiology of oral mucositis. *Folia Microbiologica* **63**: 587–597, 2018
 - 17) Daneshvar MI, Douglas MP, Weyant RS. Cellular fatty acid composition of *L.*

- mirabilis*. *J Clin Microbiol* **39**: 4160–4162, 2001
- 18) Overmyer KA, Rhoads TW, Merrill AE, Ye Z, Westphall MS, Acharya A, Shukla SK, Coon JJ. Proteomics, lipidomics, metabolomics, and 16S DNA sequencing of dental plaque from patients with diabetes and periodontal disease. *Mol Cell Proteomics* **20**: 100126, 2021
 - 19) Thomas AM, Asnicar F, Kroemer G, Segata N. Genes encoding microbial acyl coenzyme a binding protein/diazepam-binding inhibitor orthologs are rare in the human gut microbiome and show no links to obesity. *Appl Environ Microbiol* **87**: e0047121, 2021
 - 20) Belisle JT, Sonnenberg MG. Isolation of genomic DNA from mycobacteria. edited by Parish T, Stoker NG, Mycobacteria Protocols. from *Methods in Molecular Biology*, vol. 101. New Jersey: Humana Press, 31–44, 1998
 - 21) Turner S, Pryer KM, Miao VPW, Palmer JD. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryotic Microbiol* **46**: 327–338, 1999
 - 22) Suzuki MT, Giovannoni SJ. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* **62**: 625–630, 1996
 - 23) Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner P. Assembly of long error-prone reads using repeat graphs. *Nat Biotechnol* **37**: 540–546, 2019
 - 24) Bruce J. Walker, Thomas Abeel, Terrance Shea, Margaret Priest, Amr Abouelliel, Sharadha Sakthikumar, Christina A. Cuomo, Qiandong Zeng, Jennifer Wortman, Sarah K. Young, Ashlee M. Earl. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One* **9**: e112963, 2014
 - 25) Tanizawa Y, Fujisawa T, Nakamura Y. DFAST: a flexible prokaryotic genomeannotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics* **34**: 1037–1039, 2018
 - 26) Carver TJ, Rutherford KM, Berriman M, Rajandream MA, Barrell BG and Parkhill. ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics* **21**: 3422–3423, 2005
 - 27) Gardner SN, Slezak T, Hall BG. kSNP3.0: SNP detection and phylogenetic analysis of genomes without genome alignment or reference genome. *Bioinformatics* **31**: 2877–2878, 2015
 - 28) Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* **35**: 1547–1549, 2018
 - 29) Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Mol Biol Evol* **9**: 678–687, 1992

- 30) MacConkey A. Lactose-fermenting bacteria in faeces. *J Hyg* **5**:333–379, 1905
- 31) Hasan MR, Suleiman M, Ilagan E, Crouch N, Lopez AP, Thomas E, Tanga P. Growth of clinically important gram-negative bacteria on MacConkey agar under aerobic versus CO₂-enriched environment. *J Clin Microbiol* **57**(12): e01441-19, 2019
- 32) Gunn BA. Chocolate agar, a differential medium for gram-positive cocci. *J Clin Microbiol* **20**: 822–823, 1984
- 33) Sutton MD, Smith BT, Godoy VG et al. The SOS response: recent insights into umuDC-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. *Annu Rev Genet* **34**: 479–497, 2000
- 34) Payne GW, Vandamme P, Morgan SH, LiPuma JJ, Coenye T, Weightman AJ, Jones TH, Mahenthiralingam E. Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Appl Environ Microbiol* **71**: 3917–3927, 2005

図の説明

図 1. 造血細胞移植患者の検体採取時期

造血細胞移植患者の検体採取時期を図に示す。移植日を 0 日とした。

検体の採取は各患者の体調に応じて行ったため、患者毎に採取回数は異なった。

健常者の検体採取は、同意を取得後 7 日以内に 1 回行った。

図 2. MacConkey 寒天培地に形成されたコロニー

A; *L. mirabilis* のコロニー。

不正円形で辺縁が裂片状を呈し中心凸状を呈した。

B; *Neisseria sicca* のコロニー。

円形で扁平状を呈した。

C; *Haemophilus parainfluenzae* のコロニー。

不正円形で周囲に顆粒状物を伴い、周辺が裂片状で中心凸状を呈した。

図 3. 種特異的プライマーを用いた種々の菌種に対する PCR 反応の結果

A; *recA* 配列をターゲットとした PCR, B; 16SrDNA 配列をターゲットとした PCR の結果を示す。

図 4. *L. mirabilis* strains 株間におけるゲノム配列比較

本研究で分離された *L. mirabilis* strains 7 株のゲノム配列を NCTC12852T 株のゲノム配列と比較した。各ゲノム配列を水平方向に並べた。2 つのゲノム配列間における相同領域は、ACT (Carver, 2005) を用いて検出した。正方向は赤線で、逆方向は青線で示した。

図 5. *L. mirabilis* 各株の最尤系統樹

樹根 (*L. dentaris* KCOM2505T) は系統樹から省いた. ◆は樹根の位置を示す.