

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
印	
印	
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 口腔微生物学分野	身分 大学院生	氏名 佐藤 あやめ
論 文 題 名 <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		
論文内容の要旨 (2000字程度)		
<p><i>Lautropia mirabilis</i> は 1930 年に百日咳患者の上気道より”<i>Sarcina mirabilis</i>”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 <i>L. mirabilis</i> 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、<i>L. mirabilis</i> 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 <i>L. mirabilis</i> が主要構成菌となった患者が存在した。<i>L. mirabilis</i> 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、<i>L. mirabilis</i> 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。</p> <p>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。</p> <p>PCR による検出では、すべての細菌が保有する <i>recA</i> 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 <i>L. mirabilis</i> 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。</p> <p>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。</p>		

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。