

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07491

研究課題名(和文) ヒト気道に潜む新規微生物(IOLA)の培養法の確立と遺伝的多様性の解明

研究課題名(英文) Establishment of culture methods and genetic diversity of a novel microorganism (IOLA) lurking in the human respiratory tract

研究代表者

福田 和正 (FUKUDA, Kazumasa)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40389424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：いまだに培養法が確立されておらず、その性状についてはほとんど不明である新規な細菌IOLAは、小児鼻汁検体において5.4%(103/1,920検体)頻度で検出された。IOLAの検出には地域性、季節性は認められず、症状における検出頻度の違いも認められなかった。IOLAの病原性については未だ不明であるが、IOLA 16S rRNA遺伝子配列には、5つの配列系統が存在し、系統別の病原性に違いがあることが強く示唆された。また、ヒト由来気道上皮細胞との共培養により IOLAの増殖が可能であることが示された。本研究で得られた成果は、IOLAの培養法の確立や病原性の解明に極めて有用な情報になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性下気道感染患者由来の気管支肺胞洗浄液から検出された細菌IOLAは、病原性が強く疑われる科のレベルで新規な細菌である。しかし、未だに培養法が確立されておらず、その性状についてはほとんど不明である。IOLAは培養法で検出できないだけでなくグラム染色でも検出できず、医療従事者はその存在にすら気づくことができない状況であり、IOLAの病原性解明は喫緊の課題である。本研究ではIOLA検出頻度や遺伝的多様性等を明らかにし、身近な病原体候補であることを明らかにした。本結果は、IOLAの培養法の確立、性状や病原性の解析に寄与する情報であり、今後IOLAと原因不明疾患の相関解明等に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：A novel bacterium, IOLA, which has not yet been established culture-method and which properties are unknown, was detected in 5.4% (103/1,920 samples) of pediatric nasal discharge samples. There was no regional or seasonal difference in the detection of IOLA, nor was there any difference in frequency of detection based on symptoms. Although the pathogenicity of IOLA is still unknown, the IOLA 16S rRNA gene sequence has five phylotypes, strongly suggesting that there are differences in the pathogenicity of each phylotype. It was also shown that IOLA can be propagated by co-culture with human-derived airway epithelial cells. The results obtained in this study are very useful information for establishing a culture method of IOLA and elucidating its pathogenicity.

研究分野：病原微生物学

キーワード：新規感染性微生物 呼吸器感染症 小児鼻汁 16S rRNA遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、疾患と細菌叢との相関解明を目的として、様々な臨床検体を対象とした 16S rRNA 遺伝子クローンライブラリー法による菌叢解析を実施してきた。その過程で、慢性下気道感染症患者由来の気管支洗浄液 (BALF) から、既知菌種との相同性が 80%以下という極めて新規性の高い 16S rRNA 遺伝子配列を得た。申請者は本配列を有する細菌を Infectious Organism Lurking in human Airways (IOLA) と命名し、IOLA の一部の生物学的特徴を報告した (引用文献 1)。IOLA 類似の 16S rRNA 遺伝子配列は公的データベース上に 8 配列が登録されているが、興味深いことに全てが呼吸器疾患患者から検出されたものであり、新規な病原体であることが強く示唆されている。しかし IOLA の分離培養は未だ成功しておらず、その詳細については明らかになっていない。下気道感染症患者由来の BALF 検体は IOLA の研究試料として有望であるが、検出頻度が 2.4%と低いこと、および、BALF 試料の採取が侵襲性を伴うことから、IOLA の研究試料として IOLA 含有検体入手することは極めて困難である。申請者らは、小児鼻汁の細菌叢解析において比較的高頻度 10% (4/40 検体) に IOLA が検出されることを見出した (引用文献 2)。

### 2. 研究の目的

IOLA は、今のところ培養方法が確立されておらず、基本的な性状や病原性に関しては不明である。本研究では小児鼻汁検体を主な対象とし、IOLA の遺伝的多様性や病原性等に関する知見を得ることを目的とした。また、検出された IOLA 陽性検体を用いて IOLA の培養法について検討を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 研究材料：2つの異なる市に位置する市中小児科クリニック (北九州市、福岡市) を受診した小児のうち、鼻汁症状があり、鼻汁をアスピレーションによる吸引除去する必要があった患者を対象とした。受診時に臨床情報として性別、年齢、体温、症状、および受診1ヶ月以内における抗菌薬使用の有無等について医師もしくは看護師が問診した。検体は各クリニックで隔週 20 検体 (40 検体/月) 採取し、合計 1920 検体収集した。

(2) DNA 抽出と IOLA 16S rRNA 遺伝子の検出：鼻汁 100  $\mu$ L を PBS900  $\mu$ L に加え、マイクロスマッシュで攪拌均一化後、3%SDS 溶液とグラスビーズを加えマイクロスマッシュ (トミー精工) を用いて DNA を抽出した。フェノール抽出後、アミコンウルトラ-100K を用いて精製濃縮した。PBS100  $\mu$ L を同様に処理して得た DNA 溶液を PCR の陰性コントロールとして用いた。IOLA 16S rRNA 遺伝子は、既報 (引用文献 1) に従い IOLA 特異的 PCR により検出した。

(3) IOLA 16S rRNA 遺伝子の系統解析：IOLA 陽性検体から抽出した DNA 溶液を鋳型として用い、IOLA 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長についてネステッド PCR を行なった。1<sup>st</sup> PCR は IOLA27F:5' GAGTTTGATCCTGGCTCAG3'、IOLAnR1:5' GTCAAAAGCGCAGGTTTCAC3'、および AmpliTaq Gold 360 マスターミックスを用いた 20  $\mu$ L の反応液を調整し、96 5 分間の後、96 30 秒、52 30 秒、72 2 分を 30 サイクル行い、最後に 72 5 分インキュベーションした。この 1<sup>st</sup> PCR 反応液を TE 緩衝液で 10 倍希釈したもの 1  $\mu$ L を鋳型とし、プライマーは IOLA27F と IOLAnR2:5' GTTACCTACACTTACCTTG3' を用いて 2<sup>nd</sup> PCR を行なった。反応後、1% アガロースゲル電気泳動を行い、約 1,500bp の増幅産物を確認した。プライマーと未反応の dNTP を除去した後、BigDye Terminator Cycle sequencing Kit v3.1 および、3130xl Genetic Analyzer を用いて塩基配列を決定した。アッセンブル後、1,436bp について最尤法 (ML) による系統解析を行った。すべての配列は日本 DNA データバンク (アクセッション番号: LC759651-LC759753) で公開されている。

(4) IOLA 陽性検体を用いた IOLA 培養法の検討

材料：IOLA 陽性鼻汁検体のうち、採取後 3 日以内のもので、検体が 200  $\mu$ L 以上残っている検体を IOLA 培養の出発試料とした。IOLA のゲノム解析から、IOLA は寄生性もしくは共生性が強く示唆されていることから、宿主 (ヒト) 由来の細胞であるヒト気道上皮細胞 (HNEpC、BEAS-2B) を供試細胞として用いた。細胞培養には、BEGM 培地 (ロンザ株式会社) および、ウマ血清を用いた。IOLA と共培養する為、HNEpC 細胞および BEAS-2B 細胞を約  $1 \times 10^6$  cells を含む BEGM 培地 5mL を T-25 フラスコに入れ、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37 °C) でセミコンフルエントになるまで培養 (1~2 日) した。

IOLA 陽性の鼻汁検体 100  $\mu$ L を BEGM 培地 1000  $\mu$ L に入れ、ピペッティングにより懸濁し、5  $\mu$ m メッシュフィルター (ザルトリウス・ジャパン株式会社) を用いてヒト由来細胞を除去した。濾液約 1mL をアンピシリン (50  $\mu$ g/mL) および 20%ウマ血清を含む 4mL の BEGM 培地と共に、セミコンフルエント状態の培養細胞の T-25 フラスコの培養液と置換した。

ヒト気道上皮細胞と共培養開始後、経時的に培養液を 500  $\mu$ L 採取し、それぞれ 400  $\mu$ L に 140  $\mu$ L の PBS、60  $\mu$ L の 30%SDS 溶液を加え、トータル 600  $\mu$ L から上記と同様に DNA を抽出した。各 DNA 溶液を用いて IOLA 特異的 PCR により IOLA 16S rRNA 遺伝子を検出し、その増加により IOLA の増殖を確認した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 小児鼻汁を対象とした IOLA サーベイランス

患者の特徴：2 年間にわたり北九州市及び福岡市の小児科クリニックで各 960 検体、合計 1920 の鼻汁検体を収集した。患者の年齢は 0~12 歳の範囲で、平均年齢は 1.04 歳であった。男女比 = 47.8:52.2。38 を基準とした熱発時の検体は 449 検体 (23.4%)。受診前 1 ヶ月における抗菌薬の使用があった患者は 9.2%であった。診断名は、Acute bronchitis (49.9%) が最も多く、Acute upper respiratory tract inflammation (35.4%)、Respiratory syncytial virus infection (7.1%)、Acute pneumonia (2.6%) の順であった。

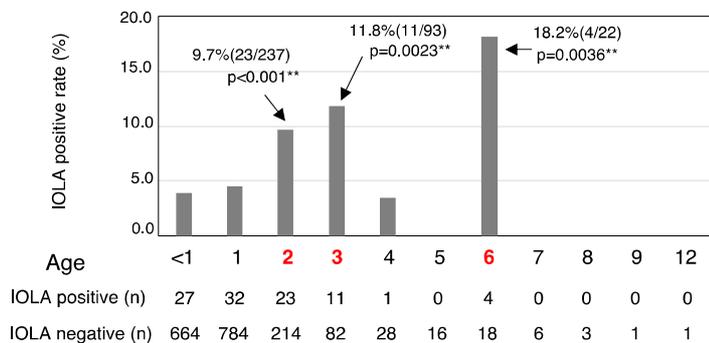


図 1. 患者年齢における IOLA 陽性率

患者の年齢による IOLA 陽性数と陰性 IOLA 数の差は、ピアソンのカイニ乗検定によって確認した ( $p < 0.01$ )。棒グラフは、各年齢の IOLA 陽性率を示し、数字は陽性率と残差解析結果 (両側 P 値)、括弧内の数字は検体数 (IOLA 陽性/全検体) を示す。

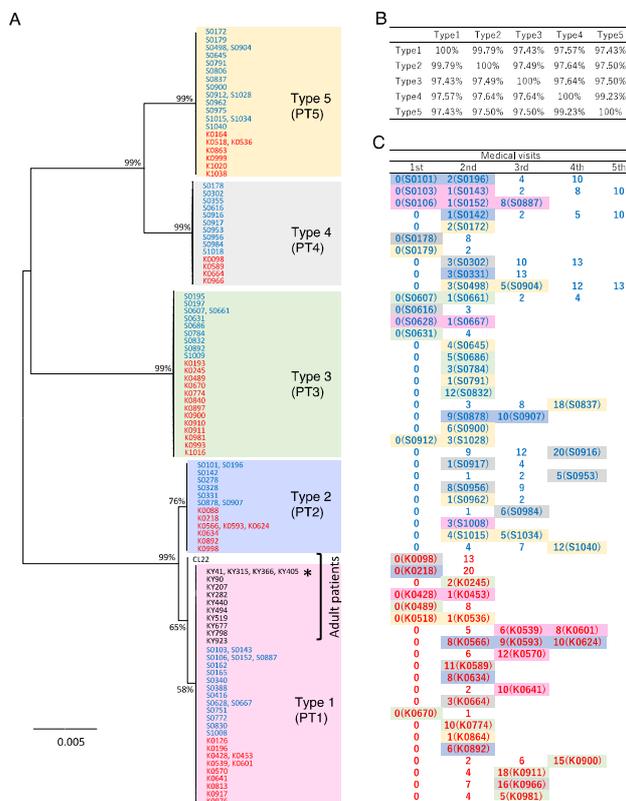


図 2. 小児の鼻汁および呼吸器疾患を有する成人患者の BALF から得られた IOLA-16S rRNA 遺伝子配列の系統解析

(A) IOLA-16S rRNA 遺伝子配列の系統樹(最尤法)。北九州市で採取された小児の鼻水の検体名を青色、福岡市で採取された小児の鼻汁の検体名を赤色で示す。黒文字はこれまでの研究で成人呼吸器疾患患者の BALF から得られた検体名を示す。(B) 各 IOLA 系統型の配列類似性プロファイル。(C) 複数回来院した IOLA 陽性患者における IOLA 特異的 PCR 結果の推移。数字は、最初の訪問を 0 としてからの経過月数、色付きのボックスは IOLA 陽性検体を示し、色は各系統型を示す。

合計で 103 検体から IOLA の 16S rRNA 遺伝子が検出され、検出率は 5.4%であった。各クリニックにおける検出率はそれぞれ北九州市 6.3%、福岡市 4.5%であった。場所や採取時期に依存した IOLA 検出率の共通性は見られず、また、性差、発熱の有無、及び抗菌薬使用による IOLA 検出率の違いも認められなかった。しかし、患者の年齢による IOLA 陽性患者の分布は有意に異なり、2~3 歳、及び 6 歳での陽性率が高い傾向が見られた (図 1)。これらの年齢は、保育園や幼稚園への入園と小学校入学時期に相当し、集団生活開始時に IOLA が水平伝播していることが推察された。

IOLA 陽性検体から得られた 103 配列と、先の研究で得られた成人の肺疾患患者由来の IOLA 配列 14 配列合計 117 配列を用いて構築した MLTree (図 2 A) は、IOLA 16S rRNA 遺伝子には 5 つの系統があることを示した。PT1 と PT2、PT3、PT4 と PT5 はそれぞれ 97% の相同性であり、配列が大きく異なった (図 2 B)。

また、興味深いことに、1 つを除く成人の肺疾患患者由来の配列全てが PT1 に属していた。これらの結果により、IOLA の病原性に系統別の違いがあることが示唆された。IOLA の病原性については未だ不明であるが、IOLA の検出は多くの患者で一過性であったことから、少なくとも IOLA は常在細菌ではなく、症状は軽くとも患者の生体内で一旦増殖し、一定期間を置いて消失しているものと考えられた (図 2 C)。

## (2) IOLA 陽性検体を用いた IOLA 培養法の検討

IOLA 陽性鼻汁検体を用いた予備実験において、コンフルエントまで培養したヒト気道上皮細胞 HNEpC とウマ血清を 20%添加した BEGM 培地を用いることで、培養液中で IOLA-16S rRNA 遺伝子のコピー数が増加することを見出した。培養初日、培養 6 日後、および 12 日後の培養液中の IOLA 遺伝子のコピー数は、培養開始時に比べて、6 日後に約 10 倍、12 日後には約 100 倍に増加した。12 日以降は細胞が剥がれ、IOLA 遺伝子の増加も観察されなくなった。また、細胞を除いたウマ血清 20%含有 BEGM 培地のみでは IOLA-16S rRNA 遺伝子のコピー数の増加は見られず、IOLA の増殖には細胞との共培養が必要であることが明らかになった。また、ヒト気道上皮細胞 BEAS-2B を用いた場合でも同様に IOLA の増殖が観察されたが、他の細胞については十分な検討が実施出来ておらず、細胞種に対する特異性については今後明らかにする必要がある。

IOLA の増殖は確認できたが、培養日数が 12 日になると培地の劣化が進み IOLA の増殖も鈍化した。それ以降は新鮮な細胞と培地に継代しても、IOLA の増殖は観察されなかった。複数の IOLA 陽性の鼻汁検体を用いて、同様の実験を行ったが、全ての IOLA 陽性検体で IOLA の増殖が見られたわけではなく、鼻汁中では死菌として存在している場合や、培養不能な状態で存在している場合があることが考えられた。今後、フレッシュな鼻汁検体を採取し、IOLA の安定的な培養方法や保存方法について検討する必要がある。

### <引用文献>

- 1 Fukuda, K., Yatera, K., Ogawa, M., Kawanami, T., Yamasaki, K., Noguchi, S., et al. An unclassified microorganism: novel pathogen candidate lurking in human airways. (2014). *PLoS ONE* 9, e103646. doi: 10.1371/journal.pone.0103646
- 2 Haro, K., Ogawa, M., Saito, M., Kusuhara, K., Fukuda, K. (2020). Bacterial composition of nasal discharge in children based on highly accurate 16S rRNA gene sequencing analysis. *Sci. Rep.* 10, 20193. doi: 10.1038/s41598-020-77271-z

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukuda Kazumasa, Yamasaki Kei, Ogura Yoshitoshi, Kawanami Toshinori, Ikegami Hiroaki, Noguchi Shingo, Akata Kentarou, Katsura Keisuke, Yatera Kazuhiro, Mukae Hiroshi, Hayashi Tetsuya, Taniguchi Hatsumi	4. 巻 4
2. 論文標題 A human respiratory tract-associated bacterium with an extremely small genome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02162-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Haro Kaoru, Ogawa Midori, Saito Mitsumasa, Kusuvara Koichi, Fukuda Kazumasa	4. 巻 10
2. 論文標題 Bacterial composition of nasal discharge in children based on highly accurate 16S rRNA gene sequencing analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-77271-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田和正, 山崎啓, 小椋義俊, 川波敏則, 池上博昭, 野口真吾, 赤田憲太郎, 桂啓介, 矢寺和博, 迎寛, 林哲也, 谷口初美
2. 発表標題 ゲノム解析から明らかになった病原細菌候補 "IOLA" の生物学的特徴
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎啓, 福田和正, 池上博昭, 根本一樹, 赤田憲太郎, 川波敏則, 矢寺和博
2. 発表標題 原発性免疫不全症に合併したIOLAによる慢性下気道感染症の一例
3. 学会等名 第91回日本感染症学会西日本地方学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 波呂薫、福田和正、小川みどり、齋藤光正
2. 発表標題 小児の鼻汁の網羅的細菌叢解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田和正、波呂薫、小川みどり、齋藤光正
2. 発表標題 小児の鼻汁における新規病原体候補 " IOLA " の遺伝子解析
3. 学会等名 第38回産業医科大学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田和正、波呂薫、山崎 啓、齋藤光正
2. 発表標題 小児鼻汁における病原細菌候補 " IOLA " の検出と遺伝子多型
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazumasa Fukuda, Kaoru Haro, Kei Yamasaki, Mitsumasa Saito
2. 発表標題 Phylogenetic analysis of a pathogen candidate "IOLA" detected in pediatric nasal discharge
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	波呂 薫  (Haro Kaoru)		
研究協力者	山崎 啓  (Yamasaki Kei)		
研究協力者	林 哲也  (Hayashi Tetsuya)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------