

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10300

研究課題名(和文) 指定難病であるクローン病発症・増悪に関するKlebsiellaの感染経路の特定

研究課題名(英文) Isolation and identification methods of Klebsiella pneumoniae associated with onset of Crohn disease

研究代表者

續橋 治 (TSUZUKIBASHI, Osamu)

日本大学・松戸歯学部・准教授

研究者番号：80333110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト口腔試料を対象とした本菌を高精度に検出するための選択培地の開発を行った。また、PCR法による同定に使用する本菌特異的プライマーの設計を行った。さらに、開発した選択培地を用いて、30名を対象にヒト口腔内におけるKlebsiella属菌の分布の調査を行った。本研究において、Klebsiella属菌は被験者30名中で僅か1名からのみの検出に留まり、本属菌にとって口腔は好ましい生息部位ではないと考えられ、経口感染により本菌は口腔に住み着くことなく通過し、好ましい生息場所と考えられる消化管・腸管などに感染・常在化するものと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔試料から本菌を確実に検出・分離するための選択培地を開発することにより、K. pneumoniaeの真の口腔内分布を調査することが可能となる。近年の研究報告により本菌に脚光が集ってきた現在、申請者がこれまでに開発されていない本菌の選択培地を開発し、これまでに詳細に解明されていない口腔内分布を解明することは非常に重要なことであり、また独自性をもった研究テーマであると考えた。また、本菌が口腔常在菌ならば本菌を除菌するのに有効な薬剤を探索し、もし口腔常在菌でないのであれば様々な環境試料を集め本選択培地を用いて本菌を検出することによって感染源・感染経路を特定することは非常に有意義なことである。

研究成果の概要(英文)：Recently, Klebsiella pneumoniae is related to the onset of inflammatory bowel disease including the Crohn disease. It was frequently reported that K. pneumoniae was detected from human oral cavities. The aim of this study was to establish of the isolation and identification methods for K. pneumoniae from human oral cavities and investigate its transmission pattern. A selective medium, OKPSM, for the isolation of K. pneumoniae from oral cavities was developed in this study. Also, PCR primer for the identification and detection of K. pneumoniae was designed. OKPSM and PCR method using the primers designed in this study were useful for the isolation and identification of K. pneumoniae from human oral cavities. K. pneumoniae in 50 saliva samples was detected at 6.0%. Moreover, K. pneumoniae isolates showed same genotypes on AP-PCR using OPA-07 primer. These results indicated that human oral cavities were not suitable for the habitats of K. pneumoniae.

研究分野：口腔細菌

キーワード：Klebsiella pneumoniae クローン病 炎症性腸疾患 分離・同定 口腔細菌

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 ( 共通 )

## 1 . 研究開始当初の背景

ヒトは数兆にも及ぶ微生物と共生し , 自らが産生できない多くを微生物に頼り , 莫大な恩恵を受けている。近年のメタゲノム解析による微生物叢 ( マイクロバイオーム ) 研究が進展し , 培養可能な微生物のみではなく , すべての共生微生物を網羅的に解析することが可能となった。これらの微生物種はネットワークを形成し相互に作用し合うことで , 宿主であるヒトの免疫システムに対してもバランスを保っている。しかしながら , 抗生物質の乱用 , ストレス , 食生活や生活環境の変化などの環境因子の影響から , ひとたびこの微生物叢に乱れ ( dysbiosis ) が生じると , 宿主であるヒトの免疫バランスも破綻し , それにより多くの疾患が生じることが明らかになりつつある。

口腔を含む消化管には多様な常在細菌が存在し , ヒトの免疫系や生理機能に強い影響を与えることで , 健康維持に大きな役割を果たしている。そのため , 腸内に存在する様々な細菌種の数や割合の変動が炎症性腸疾患をはじめとする様々な病気の発症に関与していることが強く示唆されてきた。しかしながら , このような腸内細菌叢の乱れから疾患発症につながるまでのメカニズムについては , 不明な点が多く残されていた。その様な中で , Atarashi らは口腔細菌が炎症性腸疾患や大腸がんなどの患者の便中に多く検出されることに注目し , 口腔細菌が腸管内に定着することによる腸管免疫系への影響と病気との関わりについて研究を行った。その結果 , 口腔常在菌として考えられている *Klebsiella pneumoniae* ( *K. pneumoniae* ) が , 腸内細菌叢の dysbiosis により腸内に定着・増殖を起こした結果 , ヒトの Th1 細胞の過剰な活性化を引き起こし , それにより炎症反応を惹起させ炎症性腸疾患 ( クローン病や潰瘍性大腸菌 ) の発症に関与することが示唆された ( 図 1 引用文献 ; Atarashi K, et al., Science, 358(6361): 359-365, 2017. )。

*K. pneumoniae* ( 肺炎桿菌 ) は Friendländer ( 1882 ) が肺炎患者から分離した細菌で , 肺炎などの呼吸器感染症 , 尿路感染症 , 肝・胆道系の感染 , 敗血症 , 髄膜炎 , 腹膜炎の原因菌となる。本菌は口腔を含む消化管の常在菌と考えられてきたが , 申請者が文献を検索したところ , 本菌が全てのヒト口腔に常在しているか否かを詳細に研究報告しているものは皆無であった。また現在 , 本菌は 3 つの亜種に分類されている ( subsp. *pneumoniae*, *ozaenae*, *rhinoscleromatis* )。当然のことながら , 口腔内におけるこれら 3 亜種の分布や頻度などは全く不明である。また , 本菌を選択的に分離・検出するための選択培地は未だに開発されていないのが現状である。

## 2 . 研究の目的

本研究の目的は , 雑多な微生物が生息する口腔から確実に本菌を検出・分離するための選択培地を開発し , 本選択培地を用いて口腔試料から本菌を検出・分離することにより , 本菌が口腔常在菌なのか否かを調査することである。また , もし口腔常在菌ならば本菌を除菌するのに有効な薬剤を探索し , また口腔常在菌でないのであれば様々な環境試料を集め本選択培地を用いて本菌を検出することによって感染源・感染経路を特定することであった。

## 3 . 研究の方法

( 1 ) 本研究は , ヒトから採取された唾液試料を用いるため , 日本大学松戸歯学部倫理審査委員会に本研究の申請を行い , 承認を得ている。なお , 本研究で対象となる被験者は , 試料採取時に 2 ヶ月間抗菌薬の服用がないこと , 全身疾患を有さない者とした ( 承認番号 EC20-017 )。

( 2 ) ヒト口腔試料を対象とした *K. pneumoniae* を高精度に検出するための選択培地の開発を行った。申請者が所属する研究室には *K. pneumoniae* の認定株を 6 株保有している ( *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* JCM 1662<sup>T</sup> , JCM 20034 , JCM 20348 , JCM 20507 , また *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* JCM 1663<sup>T</sup> , さらに *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* JCM 1664<sup>T</sup> )。この 6 株を用いて , 最も *K. pneumoniae* の発育に適した基礎培地の検討を行った。また , より良

好な発育が得られる様に、*K. pneumoniae* の発育因子の検索も併せて行った。分離した目的外菌の複数株と *K. pneumoniae* 認定株の 6 株に対して、抗菌薬ディスクを用いた薬剤感受性試験を実施した。それにより、目的とする *K. pneumoniae* の発育を阻害せず、かつ目的外菌のみの発育を阻害する抗菌薬の選定を行った。最も *K. pneumoniae* の発育が良好であった基礎培地に、*K. pneumoniae* のみ発育が阻害されない抗菌薬を添加した選択培地を作製して、10 名から採取されたヒト唾液試料をその培地に接種・培養後、実際の臨床で本選択培地が有用であるか否かを検討し、有用性が確認された選択培地をヒト口腔試料を対象とした *K. pneumoniae* 検出用選択培地とした。

(3) 菌種同定は PCR 法によって行うため、感度に優れた *K. pneumoniae* 特異的プライマーの設計を行った。PCR プライマーは、DDBJ から得られたピロリ菌 *K. pneumoniae* とその類縁菌 5 菌種の 16S rDNA の配列に基づき、CLUSTAL W を用いてマルチプル・シーケンス・アライメント解析を行うことにより設計した。その後、設計したプライマーの特異性は BLAST search により検索した。

(4) 開発した選択培地を用いて、ヒト口腔内における *K. pneumoniae* の分布の調査を行った。本研究協力に同意が得られた被験者 50 名から採取した唾液試料を適当な濃度へ段階希釈し、開発した選択培地へ接種し、30℃、24 時間の好気培養を行った。総菌数に対する比率も算定するために総菌用培地にも同様に唾液試料を適当な濃度へ段階希釈し、接種・培養を行った。総菌用培地には BHI 寒天平板培地を用いた。総菌用培地は、37℃、3 日間、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養を行った。培養後に、培地上に形成された集落数から集落形成単位 (CFU) を算定することにより菌数算定を行った。菌種同定は、設計した *K. pneumoniae* 特異的プライマーを用いた PCR 法によって実施した。これらの結果により、口腔内におけるピロリ菌保菌者率、唾液中の総菌数に対する *K. pneumoniae* の比率を求めた。

(5) 分離された *K. pneumoniae* 分離株に対して、AP-PCR 法を利用した遺伝子多型解析を行った。AP-PCR に用いるプライマーは、Paju らが設計した AP-PCR 用ランダムプライマーを用いた (J Clin Microbiol, 36:2019-2022, 1998)。本プライマーを用いた PCR 後、増幅パターンを解析することにより、感染経路や感染様式について調査した。

#### 4. 研究成果

(1) *K. pneumoniae* の選択培地に使用する基礎培地を検討した結果、普通寒天培地 (Nutrient agar) が良好な発育を示し、また *K. pneumoniae* 以外の口腔細菌の発育を抑制したために、これを選択培地に使用する基礎培地とした。次に、*K. pneumoniae subsp. pneumoniae* は乳糖を特異的に代謝して酸を産生するために、基礎培地に乳糖と pH 指示薬である bromocresol purple を添加すると *K. pneumoniae subsp.*

*pneumoniae* 集落が特異的に黄色を呈して判別が容易になるため、基礎培地に乳糖と Bromocresol purple を添加することとした。また、選択培地に使用する抗菌薬の選定を行った結果、*K. pneumoniae* は bacitracin, lincomycin および

penicillin に対して非感受性を示した。以上の結果から、選択培地の組成は普通寒天培地に乳糖と bromocresol purple, また bacitracin, lincomycin および penicillin, さらに抗真菌薬である amphotericin B を添加したものとし、OKPSM と命名した。当講座が保有している *K. pneumoniae* 認定株 6 株の OKPSM 上での発育は、非選択培地である普通寒天培地と比較して同程度であっ

Table 1 Recovery of *K. pneumoniae* on BHI-Y and OKPSM

Strain	BHI-Y	OKPSM	Recovery, %
	CFU/ml, × 10 <sup>8</sup>	CFU/ml, × 10 <sup>8</sup>	
<i>K. pneumoniae subsp. pneumoniae</i>			
JCM 1662	4.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.3	98.2
JCM 20034	6.9 ± 0.2	6.8 ± 0.3	97.9
JCM 20348	5.6 ± 0.3	5.5 ± 0.2	97.5
JCM 20507	3.3 ± 0.1	3.3 ± 0.2	99.5
<i>K. pneumoniae subsp. ozaenae</i>			
JCM 1663	5.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.0 ± 0.3	97.5
<i>K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis</i>			
JCM 1664	1.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.3	97.9

た (Table 1)。また、*K. pneumoniae subsp. pneumoniae* は乳糖を特異的に代謝して酸を産生するために、OKPSM 上で *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* 集落のみが特異的に黄色を呈した (Fig 1)。

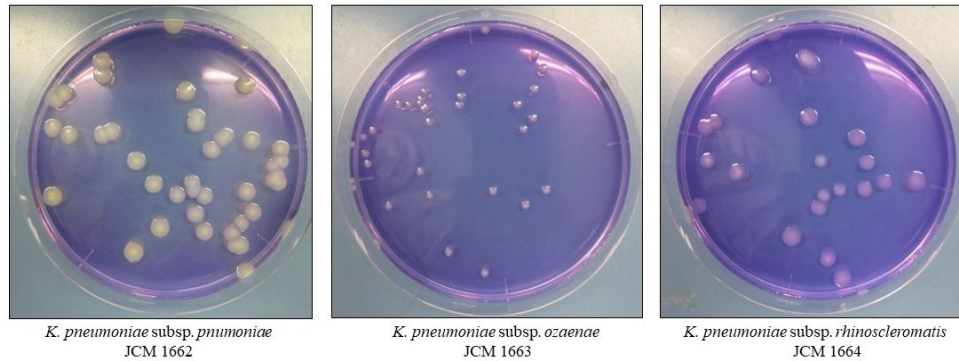


Fig. 1 Stereomicroscope image of *Klebsiella pneumoniae* colonies on OKPSM

(2) 本研究で設計した PCR 法による菌種同定に用いるピロリ菌特異的プライマーの配列を Fig 2 に示す。

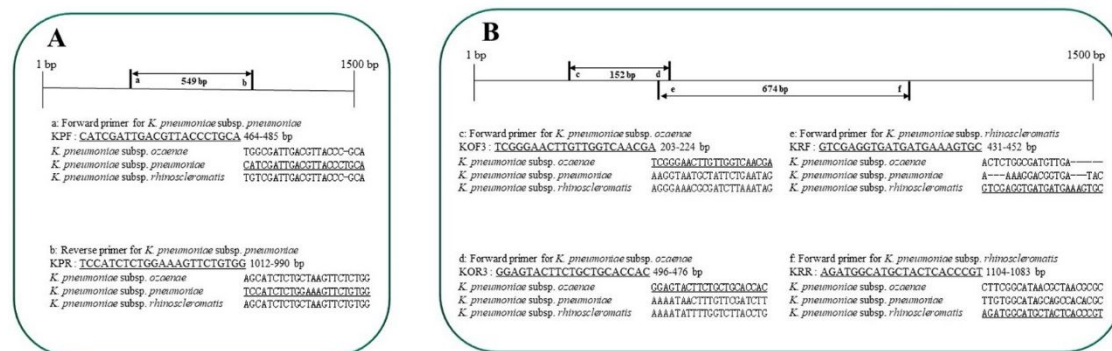
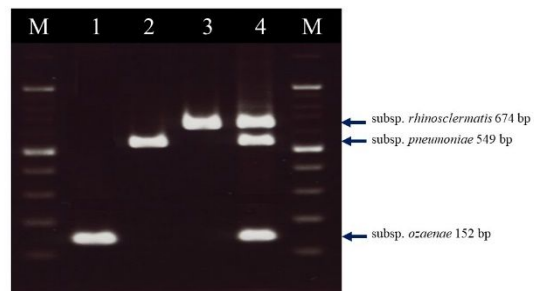


Fig. 2 Locations and sequences of species-specific primers designed in this study

The nucleotide sequence of each primer has been underlined. A: Species-specific primers for 16S rRNA gene of *K. pneumoniae subsp. pneumoniae*, B: Species-specific primers for the *wzc* gene of *K. pneumoniae subsp. ozaenae* and *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis*

Fig. 3 は、本研究で設計した *K. pneumoniae* 特異的プライマーによる Multiplex PCR 法の結果を示す。本 PCR プライマー使用による PCR 法は、PCR テンプレートに 5 CFU の *K. pneumoniae* が含まれていれば検出可能であり、高感度であることが判明した。また、開発した本 Multiplex PCR 法は *K. pneumoniae* の 3 つの亜種 (*subsp. pneumoniae*, *ozaenae*, *rhinoscleromatis*) を明確に区別することが可能であった。偽陰性や偽陽性などの交差反応は全く認められなかった。以上のことから、本研究で設計したプライマーによる Multiplex PCR 法は高感度かつ特異的に優れ、雑多な口腔試料から *K. pneumoniae* を亜種レベルで検出・菌種同定するのに有用であることがわかった。(3) 開発した選択培地を用いて、被験者 30 名から採取した唾液試料における *K. pneumoniae* の分布の調査を行った結果を Table 2 に示す。 *K. pneumoniae* が検出されたのは僅か 3 名 (6.0%) であ



Lane: 1, *K. pneumoniae subsp. ozaenae* JCM 1663; 2, *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* JCM 1662; 3, *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* JCM 1664; 4, Mixture of *K. pneumoniae subsp. ozaenae* JCM 1663, *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* JCM 1662 and *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* JCM 1664. M, molecular size marker (100 bp DNA ladder).

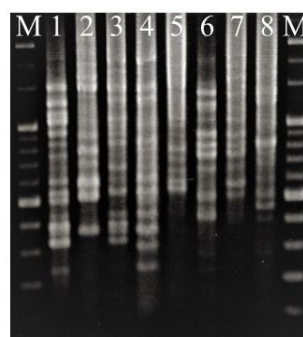
Fig. 3 Multiplex PCR for *Klebsiella pneumoniae* subspecies level

り，検出された *K. pneumoniae* は全て subsp. *pneumoniae* であった。この 3 名の唾液中の総細菌数は  $7.8 \times 10^7$  CFU/ml，*K. pneumoniae* 数は  $7.4 \times 10^2$  CFU/ml で総細菌数に対する本菌の割合は 0.00001% であった。また，OKPSM 上に認められた *K. pneumoniae* 以外の細菌の発育は僅かであり，その発育を 99.99981% 阻害した。これらの結果から，OKPSM は選択性に優れ，唾液などの口腔試料から *K. pneumoniae* を検出するのに有用であることが示唆された。

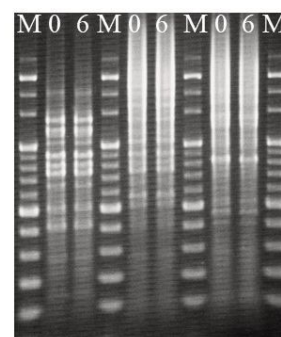
**Table 2 Detection frequencies of *K. pneumoniae* in saliva samples**

	No. of subjects n=30 (%, frequency)	No. of total bacteria	No. of <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (CFU/ml)	No. of <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozakenae</i> (CFU)	No. of <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> (CFU)
<i>K. pneumoniae</i> positive	3 (6.0)	$7.8 \times 10^7$	$7.4 \times 10^2$	0	0
<i>K. pneumoniae</i> negative	27 (94.0)	$5.9 \times 10^7$	0	0	0

(3) *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 標準菌株および *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* が検出された 3 名の被験者から分離した各分離株 3 株に対して，AP-PCR 法を用いて遺伝子多型解析を行った結果を Fig. 4 に示す。1 から 5 は *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 標準菌株，6 は被験者 A，7 は被験者 B および 8 は被験者 C から分離した菌株であり，AP-PCR 法の結果から，標準菌株および分離菌株を問わず全て異なる遺伝子型を示した。以上のことから，*K. pneumoniae* は僅か 3 名からのみの検出に留まったことより，*K. pneumoniae* にとって口腔は好ましい生息部位ではなく，外部から経口感染により本菌は口腔に住み着くことなく口腔を通過し，好ましい生息場所と考えられる消化管・腸管などに感染・常在化するものと考えられた。また AP-PCR 法の結果から，ピロリ菌の口腔内への感染は頻繁に起こるものではないことが示唆された。



Lane: 1, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* JCM1663;  
2, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* JCM20034;  
3, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* JCM20348;  
4, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* JCM20507;  
5, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* JCM20694;  
6, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* isolate from subject A  
7, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* isolate from subject B  
8, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* isolate from subject C  
Fig 4. Genetic differences among *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* reference strains and isolates from subject A, B, and C with AP-PCR.



Lane: 0, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* isolates from each subject at 0 month; Lane 6, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* isolates after 6 months; Lane M, molecular size maker (100 bp DNA ladder).  
Fig 5. Genetic differences among *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* isolates from each subject at 0 month and after 6 months with AP-PCR.

< 引用文献 >

1. Bruce SK, Chick DG, Tanaka L, Jimenez EM, and Montgomerie JZ, Selective Medium for Isolation of *Klebsiella pneumoniae*, J Clin Microbiol, 13, 1114 - 1116, 2014.
2. WONG SH, Cullimore DR and Bruce DL, Selective Medium for the Isolation and Enumeration of *Klebsiella* spp. Appl Environ Microbiol, 49, 1022-1024, 1985.

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 1件）

1. 著者名 Osamu Tsuzukibashi, Akira Fukatsu, Mana Fuchigami, Satoshi Uchibori, Chiaki Komine, Koji Umezawa, Sachiyo Hayashi, Takashi Asano, Taira Kobayashi, Masahiko Fukumoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Isolation and Identification Methods for Actinomyces israelii Involved in Actinomycosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Open Journal of Stomatology	6. 最初と最後の頁 108-118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4236/ojst.2022.124011	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 Osamu Tsuzukibashi, Satoshi Uchibori, Mana Fuchigami, Yuji Takahashi, Chiaki Komine, Yoshimi Konishi, Yuki Ogura, Hiroko Omori, Akira Fukatsu, Masahiko Fukumoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Novel selective medium for the isolation of Helicobacter pylori and its prevalence in oral cavities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Society for Evidence and the Dental Professional	6. 最初と最後の頁 20-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 續橋 治, 淵上真奈, 梅澤幸司, 林 佐智代, 高橋祐次, 小峯千明, 小西賀美, 内堀聡史, 小倉由希, 大森寛子, 深津 晶, 福本雅彦
2. 発表標題 Klebsiella属菌の分離・同定法の確立と本菌の口腔内分布
3. 学会等名 第15回日本口腔検査学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 續橋 治, 内堀聡史, 高橋祐次, 淵上真奈, 梅澤幸司, 林 佐智代, 小峯千明, 小西賀美, 小倉由希, 大森寛子, 深津 晶, 福本雅彦
2. 発表標題 ヒト口腔からのKlebsiella属菌の分離・同定法の確立
3. 学会等名 第14回日本口腔検査学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 續橋 治、淵上真奈、内堀聡史、高橋佑次、小峯千明、小西賀美、小倉由希、大森寛子、鈴木秀紀、浅賀勝寛、深津 晶、福本雅彦
2. 発表標題 ヒト口腔からのピロリ菌検出法の確立と唾液を介した家庭内感染の実態調査
3. 学会等名 第13回日本口腔検査学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------