

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	高橋 一朗
<p>学位論文題目</p> <p>Species Identification and Strain Typing of Dermatophytes by Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis of the Ribosomal DNA and Polymerase Chain Reaction Analysis of Subrepeat Elements in the Intergenic Spacer Region of <i>Trichophyton rubrum</i></p> <p>(Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) 法を用いたリボソーム DNA による皮膚糸状菌の菌種同定と菌株タイピングおよび Polymerase Chain Reaction 法によるトリコフィトン・ルブルムの Intergenic Spacer 領域にみられる繰り返し配列の解析に関する研究)</p> <p style="text-align: right;">共著者 福島和貴 宮治 誠 西村和子 浅野一弘 飯塚 一 未公表</p> <p style="text-align: center;">I. 研究目的</p> <p>皮膚糸状菌はヒトおよび動物に感染するケラチン好性真菌である。系統分類学的にアルスロデルマ科に属し、トリコフィトン属、ミクロスポルム属およびエピデルモフィトン属の 3 属からなる。菌種としては 40 種以上が知られているが、ヒトの皮膚糸状菌症の原因菌として主に分離されるものは数菌種である。通常これらの菌種の同定はコロニーの性状、顕微鏡的形態学的特徴、栄養要求性試験などからなされる。しかしこれらの手法では培養に時間を要し、また継代培養を繰り返すうちに特徴的な性状を失い、同定が困難となる場合がある。一方、分子生物学的手法に基づいた同定法は、再現性および客観性に富み、近年さまざまな手法が皮膚糸状菌の菌種の同定に利用されている。真核生物のリボソーム DNA (以下 rDNA) は通常 18S、5.8S、26S のサブユニットの繰り返し配列が Intergenic spacer (以下 IGS) 領域によって分けられる構造をとっている。Internal transcribed spacer (以下 ITS) 領域は 18S と 26S rDNA の間に、また D1/D2 領域は 26S rDNA の 5' 側に位置し、それぞれ系統解析、菌種同定などに利用されている。また IGS 領域には種々の繰り返し配列があり、rDNA 遺伝子の制御などに関与すると考えられている。今回われわれは Single-Strand Conformation Polymorphism (以下 SSCP) 法を用いて、ITS 領域から</p>			

ヒト皮膚糸状菌症の主要な原因菌種の同定を行った。さらに感染経路の推測、新たな病原性因子の解明のために、最重要病原菌種であるトリコフィトン・メンタグロファイテス、トリコフィトン・ルブルムの 2 菌種について ITS 領域、D1/D2 領域の種内多型について検討した。さらにトリコフィトン・ルブルムについては PCR 法を用いて IGS 領域の繰り返し配列による種内多型を検討した。

II. 材 料 ・ 方 法

1. 菌株

トリコフィトン・ルブルム、トリコフィトン・メンタグロファイテス、トリコフィトン・ペルコースム、ミクロスポルム・カニス、ミクロスポルム・ギプセウムおよびエピデルモフィトン・フロックスムの 6 菌種について、保存株を用いて SSCP 法によって菌種の同定を行った。さらに 55 株のトリコフィトン・ルブルム、32 株のトリコフィトン・メンタグロファイテスのヒト臨床分離株を用いて種内多型解析を行った。これらの臨床分離株の同定は通常に用いられているコロニーの性状および顕微鏡的形態学的特徴から行った。

2. DNA の抽出

各菌株はポテト・デキストロース寒天培地で 27°C、3 週間培養した。少量の菌体をかきとり、0.5% ドデシル硫酸ナトリウムを含む抽出バッファーに懸濁し、コニカル・グラインダーを用いて機械的に細胞壁を破壊した。その後フェノール抽出、クロロホルム・イソアミル抽出を各々 1 回行い、エタノール沈殿にてゲノム DNA を得た。

3. SSCP 法

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて SSCP を解析した。菌種同定のために rDNA の ITS1 領域を増幅し、SSCP 法に用いた。また種内多型解析のためにトリコフィトン・ルブルム、トリコフィトン・メンタグロファイテスについて、ITS1、ITS2、D1、D2 の各領域を増幅して SSCP 法に用いた。

4. シークエンス解析

SSCP 法により検出したトリコフィトン・メンタグロファイテスの 2 つの遺伝子型について PCR-ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。

5. intergenic spacer (IGS) 領域の PCR 反応

トリコフィトン・ルブルムについてジーンバンクに登録されている塩基配列を元にプライマーを設計し PCR 法を行った。

III. 成 績

1. SSCP 法を用いた皮膚糸状菌の菌種の同定

各皮膚糸状菌の rDNA の ITS1 領域を含む約 360 塩基を増幅したのち SSCP 法で解析したところ、菌種に特異的な泳動パターンが得られ、菌種の同定が可能であった。

2. SSCP 法を用いた種内多型の解析

トリコフィトン・メンタグロファイテス 32 株について、ITS1 領域から D1/D2 領域に及ぶおよそ 1.2 キロ塩基を、4 つの PCR 産物として増幅し、それぞれについて SSCP 法を用いて検討したところ D2 領域に 2 つの遺伝子型を検出した。塩基配列を解析したところこれらの配列の違いは 1 塩基であった。さらにトリコフィトン・ルブルム 55 株についても同じ領域について検討したが種内多型は認めなかった。

3. トリコフィトン・ルブルムの PCR 法を用いた IGS 領域による種内多型の解析

PCR 法を用いた IGS 領域の解析では 15 株を 12 種類の PCR パターンに識別することが出来た。同一患者の異なる部位から分離された菌株は同一の PCR パターンを示した。

IV. 考 案

近年、抗真菌剤はそれぞれの原因菌種に対して抗菌スペクトラムを持つような方針で開発されつつあるため各菌種の正確な同定が重要である。これまで報告されてきた PCR 法を利用した菌種の同定法と比較すると、SSCP 法は感度がよく、容易に行うことが可能であり、また再現性も高い手法である。SSCP の泳動パターンはゲルの pH、温度などによって影響を受けるために、泳動条件を至適化する必要がある。われわれはグリセロールを加えないゲルを用いて明瞭な SSCP パターンを得た。また再現性を高めるために電気泳動は一定温度の条件下で行った。

皮膚糸状菌の形態学的特徴は継代培養、培養条件などによって容易に変化するため、菌株タイプング、個体識別を形態学的特徴に基づいて行うことは困難であることが多い。したがって感度が良く、再現性、客観性の高い分子生物学的な手法が必要である。SSCP 法は数百塩基中の 1 塩基多型を検出する感度があり、これまでもいくつかの病原微生物について軽微な遺伝子多型の検出、薬剤耐性機構の解明に利用されている。

トリコフィトン・ルブルムの IGS 領域にある繰り返し配列の解析では 15 株を 12 の遺伝子型に識別することが出来た。感染経路の推定に利用できると考えられる。

今回われわれが検出したトリコフィトン・メンタグロファイテス、トリコフィトン・ルブルムの遺伝子型と菌株の形態学的特徴、臨床病型との間には明らかな関連は認めなかった。

V. 結 論

皮膚糸状菌の主要な原因菌種であるトリコフィトン・ルブルム、トリコフィトン・メンタグロファイテス、トリコフィトン・ベルコースム、ミクロスポルム・カニス、ミクロスポルム・ギブセウムおよびエピデルモフィトン・フロッコースムの 6 菌種の同定において、rDNA、ITS1 領域の SSCP 法による解析は有用である。また SSCP 法および PCR 法を組み合わせることによって皮膚糸状菌の菌株タイプングが可能になり、より詳細な疫学的研究に寄与できると考える。

引用文献

1. Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **86**:2766-2770.
2. Walsh, T. J., A. Francesconi, M. Kasai, S. J. Chanock. 1995. PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. J. Clin. Microbiol. **33**:3216-3220.
3. Jackson, C. J., R. C. Barton, S. L. Kelly, E. G. Evans. 2000. Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer. J. Clin. Microbiol. **38**:4527-4534.

参考論文

望月 隆、杉田泰之、榎村浩一、Jeong Aee Kim、加納 壘、高橋一朗、Charles N. Okeke、河崎昌子. 皮膚糸状菌への分子生物学の応用. 2001. 日本医真菌学会雑誌. **42**:81-86.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	高橋一朗
<p>審査委員長 羽 田 明 ㊞</p> <p>審査委員 石 川 睦 男 ㊞</p> <p>審査委員 飯 塚 一 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Species identification and strain typing of dermatophytes by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of the ribosomal DNA and polymerase chain reaction analysis of subrepeat elements in the intergenic spacer region of <i>Trichophyton rubrum</i>.</p> <p>(Single-strand conformation polymorphism(SSCP)法を用いたリボゾーム DNA による皮膚糸状菌の筋腫同定と菌株タイピングおよび polymerase chain reaction 法によるトリコフィトン・ルブルムの intergenic spacer 領域にみられる繰り返し配列の解析に関する研究)</p>			
<p>皮膚糸状菌はヒトおよび動物に感染するケラチン好性真菌である。ヒトに対する病原性をもつ菌種としては 40 種以上知られているが、主に分離されるものは 10 種類以下である。菌種の同定には、培養によりコロニーの性状、顕微鏡による形態観察、栄養要求性試験などが必要であるが、細菌に比べて培養に時間がかかることが問題である。そこで、最近、分子生物学的手法で、菌種の同定が試みられるようになった。本研究は、比較的、手軽に安価でできる方法として、遺伝子増幅後、SSCP 法により菌種同定の方法を検討した。まず、代表的な 6 菌種につい</p>			

て、そのリボソーム DNA の ITS1 領域を含む 360 塩基を増幅した後、SSCP 法で解析したところ、菌種に特異的なパターンが得られ、同定が可能であった。

さらに、55 株のトリコフィトン・ルブルム、32 株のトリコフィトン・メンタグロファイテスのヒト臨床分離株を用いて intergenic spacer(IGS)領域の増幅、電気泳動によりおこなった。その結果、増幅された遺伝子の長さは多型性に富み、種内の菌相互の鑑別ができることが明らかとなった。以上の結果は、次のような臨床応用が考えられる。

1. 菌種同定が短時間で行えるため、今後、菌種による特異的な治療法が開発された場合、治療に応用できる。

2. 同一菌種の多型を利用した識別は、再発症例の治療効果の判定、病巣が体内の離れた場所にあった場合、同一菌が感染したのか、あるいは新たな感染が起こったのかなどが判断できるため、治療、予防に有用である。

今後、原因菌のゲノムが明らかになってくれば、新たな治療法の開発、治療経過のモニタリングなど分子生物学的手法の応用範囲は広い。本研究は、この分野において先駆的な試みであり、評価できる。

なお、各審査委員より、本論文とその関連領域に関して試問がおこなわれた結果、適切な回答が得られた。以上より、本論文を学位論文に値するものとして判定した。