慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Genetic identification and detection of human pathogenic Rhizopus species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internal transcribed spacer region of rRNA gene.
Sub Title	ムーコル症の主病原菌、Rhizopus属のmultiplex PCR法を用いた同定および検出
Author	永尾, 圭介(Nagao, Keisuke)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.2 (2005. 6) ,p.37-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050602-0037

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Genetic identification and detection of human pathogenic *Rhizopus* species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internal transcribed spacer region of rRNA gene.

（ムーコル症の主病原菌、*Rhizopus*属のmultiplex PCR法を用いた同定および検出）

永　尾　　圭　介

内容の要旨

［目的］ムーコル症は真菌による日和見感染症で、死後剖検にて診断されることが多い。本研究の目的は、主要病原菌*Rhizopus*属のmultiplex PCR法での同定と臨床検体からの遺伝子検出を行うことである。

［材料・方法］以下の*Rhizopus*属５菌種を対象とした：*R. oryzae*, *R. azygosporus*（RA）、*R. microsporus*（RM）var. *microsporus*（RMM）、var. *oligosporus*（RMO）、var. *rhizopodiformis*（RMR）、*R. stolonifer*、*R. schipperae*. rRNA遺伝子ITS領域の塩基配列を決定し、特異的プライマーを作成した。PCR法はmultiplex PCR法で行った。菌種の相違は走査型電顕（SEM）にて確定した。臨床応用として皮膚ムーコル症３例より分離させた菌株、検体（病理組織切片３例、血清１例）を使用した。

［結果］*Rhizopus*属５菌種に対して４ペアの特異的プライマーを作成することが出来た。RAとRMのITS領域および表現型は極めて類似しており、これらは同じプライマーセットで同定した。Multiplex PCR法を試行したところ、一度の反応で菌種の鑑別を行うことが出来た。RAとRMが鑑別できなかったため、詳細な塩基配列の解析を行ったところ、RAのITS領域には特徴的な遺伝子多形が数箇所存在することが分かりこれらは塩基配列で鑑別することが可能であった。臨床分離株３株についても検討を加えた。その結果、*R. oryzae*（２株）、RA/RM（１株）と同定し、SEMによる形態学もこれに合致するものであった。臨床検体として、皮膚ムーコル症のパラフィン切片３例、血清２本をPCR法にて評価したところ、それぞれ分離株に合致した菌種の遺伝子が検出された。

［考案と結語］RAとRMはSEMやPCR法で区別することが出来なかったが、RAの塩基配列には特徴的な遺伝子多型が存在し、それぞれの配列はRMMかRMRと完全に一致していた。RMMとRMRの交配でRA様の株が得られることより、RAはRMの変種間交配より生じたものと推測されている。本研究の結果もこれを支持するものであった。過去のPCR法による*Rhizopus*属の同定は18S･28S rRNA遺伝子などを用い、２菌種のみで成功している。本研究では変異に富むITS領域を標的にし、*Rhizopus*属５菌種を４つに区別することができた。アスペルギルス症でも報告されているとおり、血清を含めた臨床検体にて真菌遺伝子を検出することが出来たことはPCR法が菌株の同定のみならず、スクリーニング法としての可能性が示唆された。

論文審査の要旨

本研究は、日和見感染症であるムーコル症の主要病原菌である*Rhizopus*属のmultiplex PCR法による同定と検出を試みたものである。すなわち、人に病原性を示したことのある*Rhizopus*属５菌種を研究の対象とし従来からの胞子嚢胞子の走査型電子顕微鏡（SEM）による観察と真菌のrRNA遺伝子ITS（internal transcribed spacer）領域を増幅し塩基配列を決定する方法を用いた。得られた塩基配列およびGenbankに登録されているデータより各菌種に対する特異的プライマーを設計した。胞子嚢胞子の形態は概ね過去の記載と合致するものであった。しかし、形態およびITS領域の塩基配列では*R. microsporus*と*R. azygosporus*を鑑別することができず、これらに関しては同一のプライマーで同定を行った。５菌種に対して作成した４セットのプライマーを混合し、multiplex PCR法を行ったところ、一度の反応で対象菌種を同定することができた。臨床分離株に応用し、形態学的所見と合致する結果を得た。ムーコル症３例からの臨床検体（病理組織切片および血清）についても検討したところ病理組織切片から各分離菌と合致するPCRの結果を得ることが出来た。ある症例では未治療時、ならびに治療後の血清を得ることができ、その両方から*Rhizopus*属の遺伝子を検出することが出来た。血清から真菌遺伝子を検出出来たことから、今後PCR法が内臓ムーコル症などのスクリーニングにも応用出来る可能性が示唆された。本研究では*R. azygosporus*と*R. microsporus*をPCR法で鑑別することは出来なかったが、詳細な遺伝子解析で*R. azygosporus*の特徴的な遺伝子多型はこの菌種が*R. microsporus* var. *rhizopodiformis*と*R. microsporus* var. *microsporus*の自然界で交配したことによって生じた可能性が示唆された。

審査ではまず真菌感染症の分子生物学的手法による原因菌同定の意義が問われた。近年抗真菌剤の開発も積極的に行われており、類似した病態を示しうる*Aspergillus*属と接合菌属は薬剤感受性が異なるため、同定は適切な治療戦略を組み立てる上で必要と回答された。また、菌種レベルまで鑑別することは現段階で治療戦略におよぼす影響は少ないが、今後臨床分離株に対する薬剤感受性の確認を行う必要がある。さらに、臨床検体より真菌遺伝子を検出したことは臨床上有意義なことであるが、検討出来た血清が１症例のみだったことを指摘された。疾患の稀さ故に今後症例の蓄積と多くの血清で検討することが今後の課題であると回答され了解された。*R. azygosporus*の特徴的な遺伝子多型についても興味深い現象であるが、このような現象が他の微生物で知られているかが問われた。現在のところ、ある菌種の亜種同士が交配し、安定した菌種が得られている可能性があるのは今回報告した*R. azygosporus*のみであると回答された。

以上のように、本研究には今後さらに検討すべき点を残しているものの、診断が困難な深在性真菌感染症であるムーコル症ならびにその原因菌同定に関して新しい分子生物学的手法が診断に導入しうる可能性を検討した研究として意義あるものと評価された。

論文審査担当者　主査　皮膚科学　西川　武二
微生物学・免疫学　石川　博通　微生物学・免疫学　小安　重夫
内科学　池田　康夫
学力確認担当者：北島　政樹、石川　博通
審査委員長：石川　博通

試問日：平成17年 2月 8日