

Title	ニキビ患者における皮膚常在菌叢解析
Sub Title	Skin microbiome analysis on acne patients
Author	菅野, 奈々
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2014
Jtitle	生命と情報 No.21 (2014.) ,p.151- 158
JaLC DOI	
Abstract	<p>卒業論文のテーマである「皮膚疾患と皮膚常在菌との関係解明に向けて」から、本卒業論文ダイジェストでは、「ニキビ患者における皮膚常在菌叢解析」について述べる。ニキビは代表的な皮膚疾患の一つであり、皮膚中の毛包やその脂腺部位において細菌等との相互作用によって引き起こされる炎症性疾患である。中でも皮膚常在菌であるPropionibacterium acnesとの関連が以前より指摘されている。しかし、常在しているP. acnesの割合は健常者とニキビ患者で相違は無く、その組成は菌株レベルで異なるという報告がある。また、P. acnesによって生成されるリパーゼは皮膚中のトリアシルグリセロールを分解して遊離脂肪酸を産生し、それらがニキビの炎症に関与している可能性も示唆されている。これらのことから、ニキビは皮膚常在菌であるP. acnesと何らかの関係があると考えられるが、病理メカニズムは未だ明らかになっていない部分も多い。そこで本研究ではまず、ニキビと関連のある細菌同定のために、次世代シーケンサーであるMiSeq(Illumina)を用いて、ニキビ患者における皮膚常在菌の16S rRNA遺伝子解析を行った。東京女子医科大学の出来尾格氏から提供されたニキビ患者8名の皮膚サンプルにおいて、ニキビ発症部位である顔面、さらに発症部位でない頭部および臀部を解析対象とした。得られた結果から、ニキビ発症部位とそうでない部位における細菌叢の違い、および部位ごとのP. acnes占有率の相違などが明らかとなった。今後の展望として、健常者の同部位と比較することで、ニキビ患者に特異的な細菌叢を検出したり、検出されたP. acnesのリパーゼ活性評価を行うことで、ニキビ患者特有のP. acnes株と健常者で見られる菌株との機能面での違いを明らかにしたい。</p>
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2014年度学生論文集 卒業論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000021-0151

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.

ニキビ患者における皮膚常在菌叢解析

Skin microbiome analysis on acne patients

総合政策学部4年

菅野 奈々

要旨

卒業論文のテーマである「皮膚疾患と皮膚常在菌との関係解明に向けて」から、本卒業論文ダイジェストでは、「ニキビ患者における皮膚常在菌叢解析」について述べる。ニキビは代表的な皮膚疾患の一つであり、皮膚中の毛包やその脂腺部位において細菌等との相互作用によって引き起こされる炎症性疾患である。中でも皮膚常在菌である *Propionibacterium acnes* との関連が以前より指摘されている。しかし、常在している *P. acnes* の割合は健常者とニキビ患者で相違は無く、その組成は菌株レベルで異なるという報告がある。また、*P. acnes* によって生成されるリパーゼは皮膚中のトリアシルグリセロールを分解して遊離脂肪酸を産生し、それらがニキビの炎症に関与している可能性も示唆されている。これらのことから、ニキビは皮膚常在菌である *P. acnes* と何らかの関係があると考えられるが、病理メカニズムは未だ明らかになっていない部分も多い。そこで本研究ではまず、ニキビと関連のある細菌同定のために、次世代シーケンサーである MiSeq (Illumina) を用いて、ニキビ患者における皮膚常在菌の16S rRNA遺伝子解析を行った。東京女子医科大学の出来尾格氏から提供されたニキビ患者8名の皮膚サンプルにおいて、ニキビ発症部位である顔面、さらに発症部位でない頭部および臀部を解析対象とした。得られた結果から、ニキビ発症部位とそうでない部位における細菌叢の違い、および部位ごとの *P. acnes* 占有率の相違などが明らかとなった。今後の展望として、健常者の同部位と比較することで、ニキビ患者に特異的な細菌叢を検出したり、検出された *P. acnes* のリパーゼ活性評価を行うことで、ニキビ患者特有の *P. acnes* 株と健常者で見られる菌株との機能面での違いを明らかにしたい。

Keywords : 皮膚常在菌, ニキビ, *Propionibacterium acnes*

1. 序論

1.1. 皮膚常在菌とニキビについて

ヒトの皮膚表面には多数の微生物が生息しており、これらは皮膚常在菌と呼ばれる。この皮膚常在菌は、体表面の部位ごとに多様な構成を示し、これらが病原菌の増殖抑制や、皮膚タンパク質のプロセッシング、遊離脂肪酸や皮脂の生産を抑制することで、皮膚の健康維持やバリア機能に寄与していると考えられている (Roth and James, 1988)。このように皮膚に有益な役割を有し、多くの人に共通する皮膚常在菌として *Staphylococcus epidermidis* が知られており、これらは主に角質層や表皮の上層などに存在する。一方で皮膚に生息する細菌の中には、*Staphylococcus aureus* をはじめとした皮膚バリア機能を低下させる病原菌も存在する。このように皮膚の様々な部位に存在する皮膚常在菌を研究することで、皮膚の健康状態や疾患発症に関するメカニズムを解明する手がかりになる可能性が高い。

代表的な皮膚疾患の一つにニキビがある。これは皮膚の毛包やその脂腺部位で発症し、グラム陽性嫌気性細菌である *Propionibacterium acnes* が深く関与していることが知られている (Till *et al.*, 2000)。この *P. acnes* はリパーゼを生成し、皮脂中のトリアシルグリセロールを分解する。それによって生じた遊離脂肪酸が炎症メディエーターとして作用し、ニキビにつながるということが示唆されている (Toyoda and Morohashi, 2001)。しかしながら *P. acnes* は、皮膚においてグリセロールを代謝し、プロピオン酸を産生することで病原菌が皮膚に定着することを防ぐという有益な役割も有し、実際に多くの人が共通して持つ皮膚常在菌である。近年の報告により、*P. acnes* は健常者にもニキビ患者にも同様の割合で存在しているが、ニキビの有無によって定着している *P. acnes* が菌株レベルで異なることが明らかになっている (Fitz-Gibbon *et al.*, 2013)。これらのことからニキビにおいて、皮膚常在菌である *P. acnes* が菌株レベルの相違によって何らかの影響を与えている可能性が考えられる。

1.2. *P. acnes* 株とニキビとの関係

先行研究により、*P. acnes* の菌株レベルでの違いを 16S rRNA 遺伝子配列のサブタイプ (リボタイプ) や Multi Locus Sequence Typing (MLST) 法によって分類されたタイプ分けの定義がある。それによりニキビ患者に多く存在する菌株、健常者にのみ存在する菌株などがあることが明らかとなった (Fitz-Gibbon *et al.*, 2013)。例えば、*P. acnes* の基準株である KPA171202 株はリボタイプ 1 に属し、これはニキビの炎症に関係がないとされる。一方で、ニキビに関連する菌株の代表である HL096PA1 株はリボタイプ 5 という定義がなされている。また、MLST 法による複数のハウスキーピング遺伝子の塩基配列に基づく分類法においては、*P. acnes* が 8 種のタイプ (IA-1, IA-2, IB-1, IB-2, IB-3, IC, II, III) に分けられている (Tomida *et al.*, 2013)。IA-1, IA-2, IB-1, IB-2 はニキビ患者に多く見られるタイプであり、一方で IB-3 と II はニキビに関係がないと言われている。先述のように、*P. acnes* はリパーゼを生成してトリアシルグリセロールを分解することで炎症を引き起こすとの報告もあるが、IB-3 と II においてはトリアシルグリセロールリパーゼ遺伝子のプロモーター領域の欠損や、遺伝子領域中の 1 塩基欠損によるフレームシフトが起きており (Tomida *et al.*, 2013)、実験的にもこれらの菌株ではリパーゼ活性が低いことが証明されている (McDowell *et al.*, 2008)。これらの知見より、*P. acnes* のトリアシルグリセロールリパーゼ遺伝子が生成するリパーゼがニキビに関与している可能性が高いと考えられる。

1.3. 本研究の目的

前項までに示した知見から、ニキビは *P. acnes* をはじめとする皮膚常在菌と何らかの関係があると考えられるが、病理メカニズムや、細菌と皮膚との相互作用について、未だ明らかになっていない部分も多い。そこで本研究ではまず、ニキビ患者における皮膚常在菌の 16S rRNA 遺伝子解析を行った。ニキビ発症部位とそうでない部位における細菌叢の比較、および部位ごとにおける *P. acnes* の分布の相違などを明らかにすることで、ニキビと関連のある細菌同定を試みることにした。さらに、今後は健常者

の同部位と比較することで、ニキビ患者に特異的な細菌叢の検出や、菌株レベルの細菌の同定が期待できる。また、*P. acnes*が生成するリパーゼがニキビの炎症を引き起こす可能性があることから、ニキビ患者特有の*P. acnes*株と健康者で見られる菌株とでリパーゼ活性評価試験をしたい。これまでに治療法として*P. acnes*の除菌なども検討されてきたが、*P. acnes*は上述のように有益な面も持つことから、単にニキビ患者から*P. acnes*を排除することが適切な治療法とは言えない。そこで本研究では、ニキビ患者固有の*P. acnes*が有するリパーゼ活性を低下させ、その菌株を患者本人に塗布することで、ニキビの炎症に関与しない*P. acnes*を定着させることを試み、最終的に患者本人に塗布することで、ニキビ治療・予防に用いる新規医療基盤の創出を目指す。

2. 対象と手法

2.1. ニキビ患者の皮膚常在菌DNA抽出

ニキビ患者の皮膚常在菌における16S rRNA遺伝子解析を行うにあたり、サンプルは東京女子医科大学の出来尾格氏から提供された。8人のニキビ患者において、ニキビ発症部位である顔面、さらに発症部位でない頭部および臀部を解析対象とした。400 μ L \sim 3 mLのTE10 (1 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mM EDTA pH 8.0) に各部位を30秒こすった綿棒を浸し、 -80°C で冷凍保存されたサンプルから、DNA抽出を行った。500 μ Lに満たないサンプルにおいては、予め500 μ LになるようにTE10を加えて調整した。25 μ LのLysozyme (300 mg/mL) を加え、チューブをローテーションしながら 37°C で一晩インキュベートした。さらに、15 μ LのAchromopeptidase (20,000 units/mL) を加え、 37°C で8時間インキュベートした後、50 μ Lの10% SDS (pH 7.2) とProteinase K (25 mg/mL) を15 μ L加え、ヒートブロックを用いて 55°C で一晩インキュベートした。600 μ LのPhenol Chloroform Isoamylalcoholを加え、Micro Shakerを用いて1,500 rpm/3 min攪拌した。17,800 \times g/10 min/ 20°C で遠心し、上清に再度600 μ LのPhenol Chloroform Isoamylalcoholを加え、Micro Shakerを用いて1,500 rpm/3 min攪拌した。同条件で遠心し、上清に60 μ Lの3M Sodium Acetate (pH 5.2) を加えよく混合した。その後、1.2 mLの100% Ethanol (-30°C に冷却したもの) を加え、ボルテックスでよく混合し、 -80°C で1時間冷却した。再び同条件で遠心した後、70% Ethanolを500 μ L加え、さらに同条件で5分間遠心した。減圧乾燥器で残留するEthanolを除去した後、50 μ Lの1 \times TE Bufferを加え、Micro Shakerを用いて1,500 rpm/30 minで攪拌し、DNAを溶解した。本研究で使用したサンプルリストを以下に示す(表1)。被験者2, 3, 5, 6, 8番においてはニキビ部位の膿のサンプルが提供されたため、同様にDNA抽出を行った。さらに、この手法を用いたDNA抽出法によって抽出されてしまう、環境由来のDNAをネガティブコントロール (NC) として使用するため、サンプルの代わりに500 μ LのTE10から同様の手順でDNA抽出操作を行った。

表1：16S rRNA遺伝子解析に用いたニキビ患者のサンプルリスト

被験者番号	頭部 (A)	顔面 (B)	臀部 (C)	膿 (D)
	※ニキビ発症部位			
1	1A	1B	1C	—
2	2A	2B	2C	2D
3	3A	3B	3C	3D
4	4A	4B	4C	—
5	5A	5B	5C	5D
6	6A	6B	6C	6D
7	7A	7B	7C	—
8	8A	8B	8C	8D

2.2. 16S rRNA遺伝子増幅およびIndex PCR

皮膚サンプルから細菌の16S rRNA遺伝子を増幅するために、DNA抽出によって得られた細菌のゲノムDNAをテンプレートとしてPCRを行った。増幅に用いたプライマーは、細菌特異的なユニバーサルプライマーである27F_mod (5'-AGRGTTCGATCMTGGCTCAG-3')と338R (5'-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') (Hongoh *et al.*, 2008)で、ポリメラーゼはTks Gflex (TaKaRa)を用いた。PCR条件は、初期変性反応を94°Cで5分間、その後98°Cを10秒間、55°Cを15秒間、68°Cを3分間の3ステップを、25または28サイクル行い、最終伸張反応を68°Cで3分間行った。サイクル数は事前にqPCRを行い、サンプルごとに最適値を推定した。PCR後の残留プライマーを取り除くため、Agencourt AMPure XPを用いて精製した。その後、Picogreenを用いてPCR産物の濃度を定量し、さらに2%アガロースゲル電気泳動を行い、目的の長さの塩基対が増幅されていることを確かめた。ここまで得られた結果よりPCR産物の体積モル濃度を算出し、次ステップのPCRにおいて、テンプレートDNAの終濃度が0.25 nMになるよう各サンプルを希釈し調整した。次ステップでは、MiSeq (Illumina)を用いたシーケンスに必要なアダプター配列およびサンプル識別のためのIndex配列を付加するための2nd PCR (Index PCR)を行った。増幅に用いたプライマーはForwardプライマー (5'-AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC-NNNNNNNN-TATGGTAATTGTAGRGTTCGATYMTGGCTCAG-3')、Reverseプライマー (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-NNNNNNNN-AGTCAGTCAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') (プライマー中央の8塩基がIndexを表す。これはサンプルごとに異なる塩基配列となる)で、ポリメラーゼはTks Gflex (TaKaRa)を用いた。PCR条件は、初期変性反応を98°Cで1分間、その後98°Cで10秒間、55°Cを15秒間、68°Cを30秒間の3ステップを8サイクルのみ行い、最終伸張反応を68°Cで3分間行った後、再びAgencourt AMPure XPを用いて精製した。その後、Index PCR時に付加したアダプター配列の末端付近に設計したプライマー (Forwardプライマー: 5'-GCGACCACCGAGATCTACAC-3', Reverseプライマー: 5'-CAAGCAGAAGACGGCATAAC-3')を使用してqPCRを行った。この際、濃度が既知であり、両末端に同様のアダプターが付加されているDNA (PhiX Control v3 (Illumina))を用いることで、Index PCR産物の絶対定量を行った。

2.3. MiSeqによるシーケンスラン

MiSeqによるシーケンスのため、濃度定量済みサンプルのライブラリー調製を行った。各サンプルを4 nMに希釈したライブラリー溶液を5 µLずつ取り出し、新しいチューブ中で混合し、そのうちの5 µLに0.2 N NaOHを5 µL加え、室温で5分間インキュベートすることで、ライブラリーを一本鎖に変性させた。変性後のライブラリー溶液に、氷冷したHT1 buffer (Illumina)を990 µL加えた。この溶液をHT1 bufferでさらに6 pMになるように希釈し、ライブラリー溶液570 µLと、同様の手順で作製したコントロールDNAであるPhiX DNA (6 pM) 30 µLを混合し、96°Cで2分間インキュベートし熱変性した。その後、氷上で5分間静置し、600 µL全量をMiSeqによるシーケンス解析に用いた。

2.4. QIIMEによる解析

MiSeqによるシーケンス解析によって得られたデータを、次世代シーケンサーデータの解析ソフトウェアであるQIIME (Quantitative Insight Into Microbial Ecology)を用いて解析を行った。解析を行うにあたり、シーケンサーであるMiSeqから得られたデータをQIIMEで解析可能なfasta形式に変換を行った。その際、本研究ではペアエンドによるシーケンスを行っているため、Read 1配列とRead 2配列をアセンブルし、Q valueの平均値が25以下のリードは解析から除去した。このfasta形式のファイルを用い、QIIMEによる解析を行った。まず得られたサンプルの遺伝子配列のうち、相同性が97%以上のものでOperational Taxonomic Units (OTU)を作成し、RDP (Ribosomal Database Project)のデータベースと比較することで各OTUの近縁種の推定を行った。さらに、OTUの情報をを用いてサンプル間のUniFrac distanceを計算し、主座標分析を行った。

3. 結果と議論

3.1. UniFrac解析による主座標分析

MiSeqによる細菌叢解析の結果、NCを含む全29サンプルから平均で76,756リードの塩基配列が得られた。これらの塩基配列からQIIMEによってOTUを構築し、最も近縁な細菌群を特定した。そこで、皮膚の部位ごと、さらに被験者ごとの細菌叢の関係を視覚化するために、PCoA (Principal Coordinate Analysis: 主座標分析)を行った。PCoAは、細菌叢の違いを数値化したUniFrac distanceという距離情報に基づいて実施した。細菌の種類および各細菌の存在比を考慮したWeighted UniFrac distance, および細菌の種類のみを考慮したUnweighted UniFrac distanceを用いたPCoAの結果を示す(図1)。皮膚において、細菌叢は同一人の異なる部位よりも、異なる人の同一部位の方が似ていることが知られているが(Grice *et al.*, 2009), 本研究においても被験者ごとにクラスターは形成されず(図1B), 部位ごとにクラスターを形成していることがわかる(図1A)。

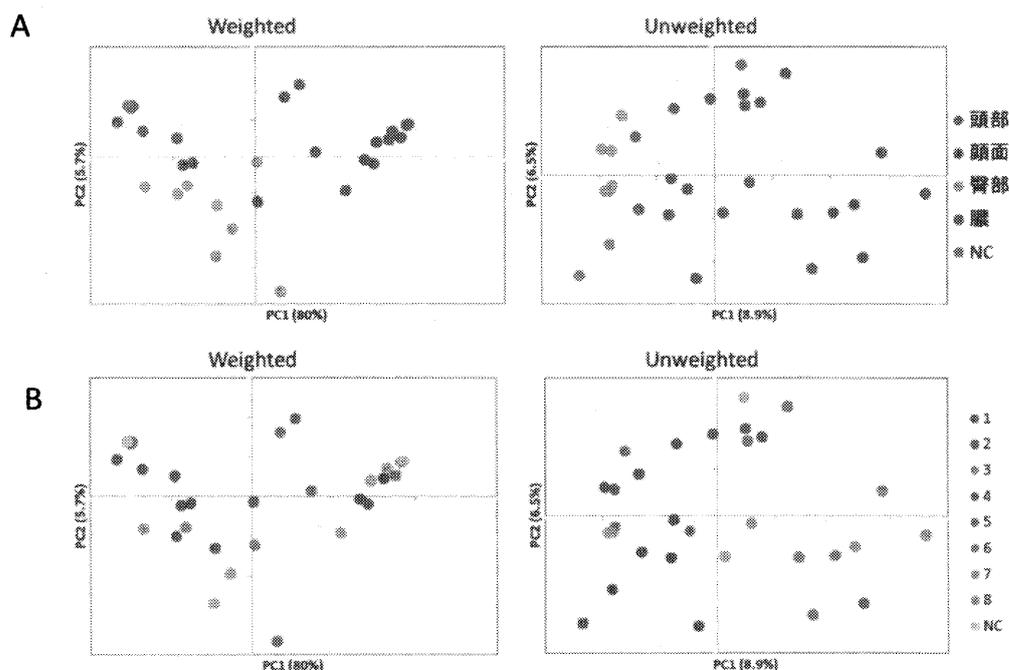


図1: UniFrac解析によるPCoA

各サンプルにおいて、WeightedおよびUnweighted UniFrac解析を行った際のPCoAの結果を示す。(A)各部位ごとに色分けを行った際のPCoA結果。色は各部位を表す。(B)サンプルの被験者番号ごとに色分けを行った際のPCoA結果。色は各被験者の番号を表す。

3.2. 菌属レベルにおける細菌叢解析

UniFrac解析によって、各被験者よりも各部位の細菌叢組成が似ていることが示唆された(図1)。そこで次に、サンプルごとに菌属レベルでの細菌叢の内訳を示した(図2A)。菌属レベルにおいて、全体的に多くの割合を占める菌属のうち、*Renibacterium*属や*Ralstonia*属はNCにおいても高い割合を示した。これらは広く存在している環境由来の細菌叢であると考えられる。さらに、被験者1(1A, 1B, 1C)は他サンプルと異なり、皮膚をこすった綿棒をTE10に浸したものを50倍希釈された状態で提供されたため、皮膚由来から抽出されたDNA濃度が低かった可能性があり、そのためNCと似た組成になっているものと考えられる。一方で、2番目以降の被験者においては*Propionibacterium*属や*Staphylococcus*属の割合が多く、8Dにおいては90%以上を*Propionibacterium*属が占めている。

これらのように、NCサンプルにおいて検出された菌属の一部は検体サンプルからも検出された。そこで、環境由来のDNAの影響を除去するため、PCRのサイクル数がNCと異なるサンプルについては、各菌属に対して「NCで検出された割合/ 2^{Δ} (NCとサンプルのサイクル数の差)*」を差し引いた。このように処理を施した後の細菌叢組成を菌属レベルで示した(図2B)。環境由来のDNAと考えられる*Renibacterium*属や*Ralstonia*属などが除去され、各サンプルはそれぞれ*Propionibacterium*属や*Staphylococcus*属、*Corynebacterium*属が優位を占めている。また*Propionibacterium*属は、2B, 8A, 8Dの90%以上を占めているが、ほぼ全てが*P. acnes*であった。被験者1番目の細菌叢組成から明らかのように、皮膚サンプルにおいて得られる細菌DNAの濃度は低く、環境由来のDNAの影響を大きく受けるため、サンプルを希釈することなくDNA抽出に用いることが望ましいと考えられる。また先述したように、ニキビの発症においては*P. acnes*が何らかの影響を与えていると考えられているが、被験者においてニキビ部位である顔面(サンプルB)とニキビ部位でない頭部、膿(サンプルA, D)における*P. acnes*の存在比に有意差はなく(図3)、本研究では119のOTUが検出された。しかしながら同部位においてもその存在比にかなりのばらつきが見受けられる。また、*P. acnes*が検出された26サンプル中21サンプルで、共通した一つのOTUが優位であった。これらは、健常者も含め多くの人に存在するニキビに関連のない*P. acnes*である可能性が考えられたため、今後は健常者の同部位と比較したい。さらに、サンプル2Bにおいては90ものOTUが検出された。また被験者3や6のニキビ部位である顔面(サンプルB)においては、*Staphylococcus*属の方が優勢を占めるなど、その他の細菌種が病変部に関与している可能性も示唆される。一方で臀部(サンプルC)においては*Propionibacterium*属の割合が全体的に低く(図3)、この部位においては、低脂質であるため*P. acnes*が存在しにくいと考えられる。ニキビの膿(サンプルD)に関しても、比較的*P. acnes*の割合が大きいが、3Dのように他の菌属で占められるものもあり、一様には言えない。さらに総合的に*P. acnes*の存在比が大きかったのはニキビ部位でない頭部(サンプルA)であり、これはニキビ患者特有の現象であるか、健常者の頭部との比較が望まれる。

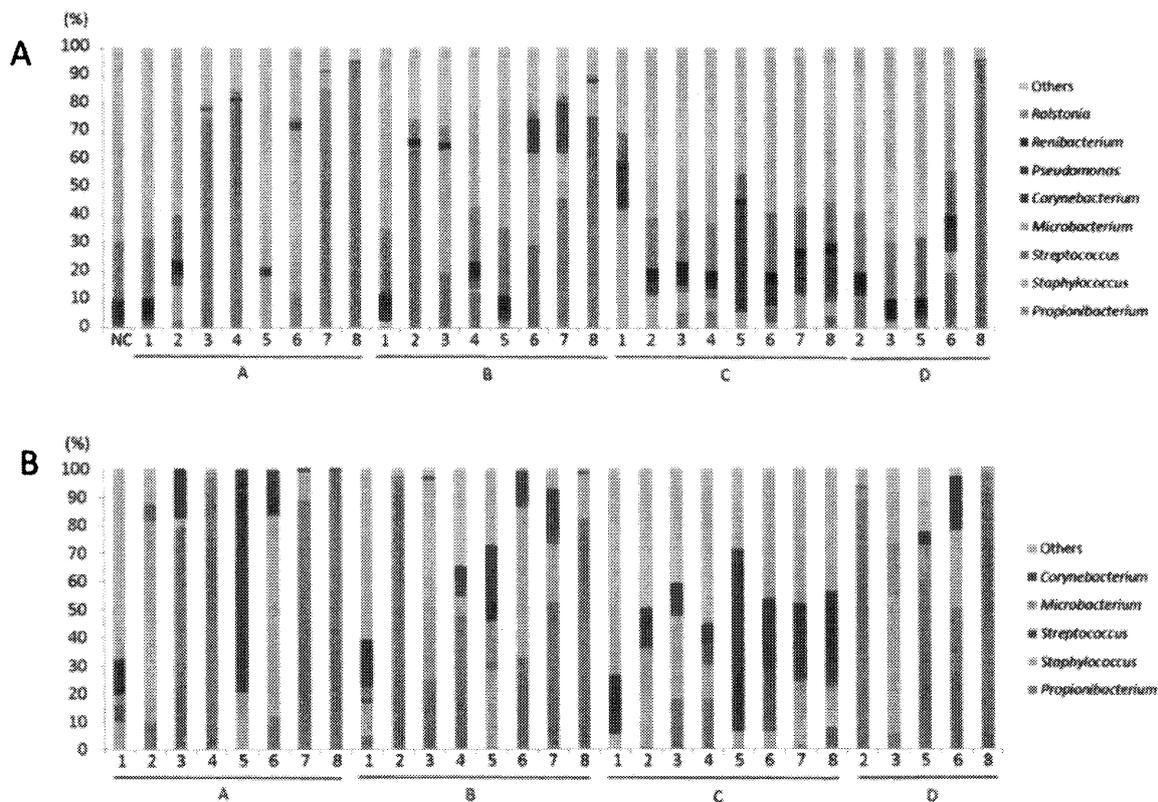


図2：菌属レベルによるサンプルごとの細菌叢の割合

棒グラフの下の英数字はサンプル番号を示す（表1参照）。（A）検出された308属のうち、皮膚常在菌、もしくは環境中に広く生息すると知られている細菌を任意に8種類抜粋し、その内訳を示した。その他はOthersとしてまとめた。（B）各サンプルよりNCで検出された菌属の割合*を差し引き、マイナスの値になった菌属においては0に変換し、（A）同様、任意に5種類の内訳を示した。*本文参照

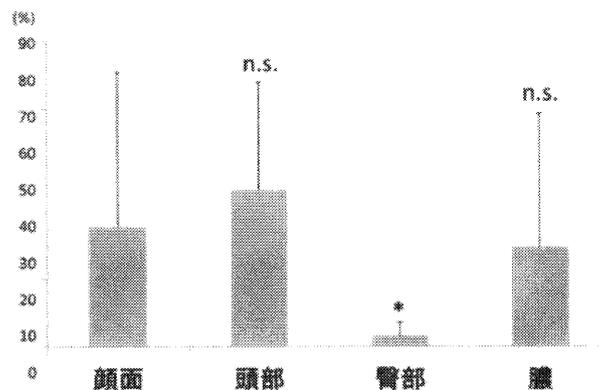


図3：各部位における*P. acnes*の割合

各部位（顔面、頭部、臀部、臍）における*P. acnes*が占める割合に関して顔面をコントロールとし、他の群と*P. acnes*占有率に差があるか示すため、多群検定を行った。S.D.: 標準偏差, 平均±S.D. (顔面, 頭部, 臀部: n = 8, 臍: n = 5), *: $P < 0.05$, n.s.: not significant (Dunnnett's test) .

4. まとめと展望

本研究では、ニキビ患者8人における病変部位、およびその他の部位の細菌叢解析を行い、それぞれの細菌組成を考察した。本研究では*P. acnes*の菌株レベルの相違に関して、全29サンプル中26サンプルから合計で119のOTUが得られた。そのうち21サンプルで得られた*P. acnes*のある1種のOTUが検出され、このOTUは健常者にも存在している可能性が高い。*P. acnes*において非常に様々な種類の菌株が存在しており、ニキビに影響を与えない菌株、影響を与える菌株それぞれの役割を各々の菌株が有していると考えられるため、展望として、これらのゲノムレベルでの相違に基づく機能面での違いを同定したり、タンデムリピート配列をとるリパーゼ遺伝子の塩基配列を、健常者からのデータも取得し比較することで、ニキビ患者特有の*P. acnes*株を特定していきたい。さらに、リパーゼ活性評価試験を行い、ニキビ患者特有の*P. acnes*株と健常者で見られる菌株とで比較をしたい。

謝辞

本研究を行うにあたり、研究の進め方等の全面的な指導をしていただいた村上慎之介さん、石井千晴さんには大変お世話になりました。また同じグループの吉川実亜さん、引地志織さんには、後輩ながら研究の相談に乗ってもらうなど助けていただきました。そして研究の方針など、様々な指導をしていただいた福田真嗣特任准教授、さらにサンプルの提供に協力して下さった東京女子医科大学の出来尾格先生、および研究に携わっていただいた皆様に深く感謝いたします。また、このような素晴らしい研究の場を与えて下さった冨田勝教授にこの場を借りて厚くお礼申し上げます。

参考文献

- Fitz-Gibbon, S., Tomida, S., Chiu, B.H., Nguyen, L., Du, C., Liu, M., Elashoff, D., Erfé, M.C., Loncaric, A., Kim, J., Modlin, R.L., Miller, J.F., Sodergren, E., Craft, N., Weinstock, G.M. and Li, H. (2013) *Propionibacterium acnes* Strain Populations in the Human Skin Microbiome Associated with Acne. *J Invest Dermatol.*, **133**, 2152-60.
- Hongoh, Y., Sharma, V.K., Prakash, T., Noda, S., Taylor, T.D., Kudo, T., Sakaki, Y., Toyoda, A., Hattori, M. and Ohkuma, M. (2008) Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **105**, 5555-60.
- McDowell, A., Perry, A.L., Lambert, P.A. and Patrick, S. (2008) A new phylogenetic group of *Propionibacterium acnes*. *J Med Microbiol.*, **57**, 218-24.
- Roth, R.R., James, W.D. (1988) Microbial ecology of the skin. *Annual Review of Microbiology.*, **42**, 465-488.
- Till, A.E., Goulden, V., Cunliffe, W.J. and Holland, K.T. (2000) The cutaneous microflora of adolescent, persistent and late-onset acne patients does not differ. *Br J Dermatol.*, **142**, 885-92.
- Tomida, S., Nguyen, L., Chiu, B.H., Liu, J., Sodergren, E., Weinstock, G.M. and Li, H. (2013) Pan-genome and comparative genome analyses of *Propionibacterium acnes* reveal its genomic diversity in the healthy and diseased human skin microbiome. *MBio.*, **4**, 3-13.
- Toyoda, M. and Morohashi, M. (2001) Pathogenesis of acne. *Med Electron Microsc.*, **34**, 29-40.