

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成23年3月31日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591923

研究課題名（和文） 培養によらない細菌・真菌の定量と菌種同定法を用いた膣常在細菌叢と疾患の解析

研究課題名（英文） Quantitative detection and identification of a wide range of bacteria and fungi composing vaginal flora without culture.

研究代表者：

錫谷 達夫（SUZUTANI TATSUO）

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40196895

研究成果の概要（和文）：微生物の多くは未だ培養法が確立しておらず、医学分野においても同定できない微生物による感染症が多数存在する。この様な細菌を培養することなく、PCRを基盤とした検査で菌種同定を行う方法が多数報告されている。本研究では培養せずに真菌を同定するための分子生物学的な方法を開発した。この方法を使って膣拭い液を調べた結果、カンジダの菌数と患者の症状やカンジダ性膣炎という医師の診断の間には相関が認められなかった。また、細菌叢の変化と真菌数の変化は全く別個に変動していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：There are many species of microbes that can not be cultured in media; therefore, many infectious diseases have been left without diagnosis. For the identification of infectious agents, novel identification methods based on PCR without culture have been reported in the field of bacteriology. In this study, we developed a novel identification method for fungi. Using these examination techniques for bacteria and fungi, we analyzed vaginal swabs taken from patients with informed consent. The results showed that there were no correlations between the number of *Candida* in the samples and symptoms or the diagnosis of *Candida* vaginitis. Moreover, bacterial flora and number of fungi in the vagina were found to fluctuate independently.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：微生物学、感染症学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード： 感染症、細菌、菌類、検査法、常在細菌叢

1. 研究開始当初の背景

感染症を診断・治療するうえで、病原菌の分離・同定は基本となるステップである。コッホの研究に始まり、過去1世紀以上にわたって病原菌をいかに分離培養し、その生化学的な性状から菌種を同定するかという命題に多くの労力が割かれてきた。その結果、感染症の大部分は自動化された細菌同定機器によって診断し、その薬剤感受性をも計測できるようになった。

しかし、実際の臨床の現場では原因菌を特定できない感染症はどの診療科にも存在する。また、現時点で感染症とは考えられていない疾患の中に、感染が誘因となっているものはまだまだ存在するに違いない。こういった疾患の原因菌や発症病理を解明できない要因として、培養法が確立していない菌が多数存在することが挙げられる。そこで培養をせずに、検体から直接調製したDNAを解析し、菌種を同定する試みが基礎的な研究として進められている。このような研究の一例として、これまで培養によって30種程度の菌種で構成されると考えられてきた膣の常在細菌叢がDNA解析によって50種を超える菌からなることが明らかにされた。

我々は遺伝子解析による菌種同定を臨床の場に導入するため、多数の臨床例の解析と検査法の改良を進めてきた。本研究ではこの技術を更に進歩させ、膣の常在細菌叢の解析を進める。

2. 研究の目的

培養によらない細菌や真菌の定量法、同定法を開発する。また、常在細菌叢の全体像を容易に把握できる terminal restriction length polymorphism (t-RFLP) も解析し、膣常在菌叢の乱れと膣炎の解析を進める。

3. 研究の方法

(1) 真菌株

菌株は German Collection of Microorganisms and Cell Cultures Biological resource Centre (Braunschweig, Germany)の菌株を使用した。酵母様菌の培養はサブロー寒天培地 (Nissui Pharmaceutical Co.Ltd., Tokyo, Japan) に接種し、25°C、2-7日培養した。糸状菌はポテトデキストロース寒天培地 (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan) で35°C、2日培養した。

(2) 臨床検体

福島県立医科大学附属病院・産婦人科外来を受診し、インフォームドコンセントを得られた109名より膣分泌物を滅菌綿棒にて採取した。超純水1ml入り滅菌試験管に菌を懸濁し、DNAを調整するまで-30°Cで保存した。膣分泌物を採取する際、膣のpH測定を行うとともに、グラム染色用プレパラートも作製した。また、年齢、月経の有無、妊娠の有無、診断名、感染症の有無を調査した。

サンプルよりDNAを調整する際、サンプルの一部をクロモアガーカンジダ培地 (関東化学) に接種し、真菌の培養を行った。

なお、本研究は福島県立医科大学倫理委員会の承認を得て行った。

(3) DNAの抽出

200 μ l の Lyticase solution [10 U/ml of recombinant lyticase (Sigma-Aldrich Inc., St.Louis, MO)、10 mg/ml of lysozyme chloride (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、10mM EDTA and 0.2% 2-mercaptoethanol] に培養した菌株のコロニーを懸濁し、超音波破碎装置

(ELESTEIN035 cross ultrasonic homogenizer, Elekon Led, Tokyo, Japan) で3分間、超音波処理を行った。37°Cで30分間保温して細胞壁をlyticaseで溶解後、再び超音波処理を5分間行った。18,000 rpm (30,000 \times g)で10分間遠心後、上清を捨て、ペレットを滅菌水200 μ lに懸濁した。この懸濁液から QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen Science, Hilden, Germany)を用い、使用説明書に従ってDNAを抽出した。

膣分泌物からのDNA調整は以下のように実施した。サンプル200 μ lに1200 μ lの赤血球溶解液(10mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH7.4, 5mM MgCl₂)を加え12,000 rpm、10分間遠心した。そのペレットを200 μ lのlyticase solution (10U/ml lyticase, 10mg/ml lysozyme, 50mM Tris-HCl pH7.5, 10mM EDTA, 0.2% 2-メルカプトエタノール)に浮遊させ、閉鎖式超音波破碎機で3分間処理後37°Cにて30分インキュベートし、細菌と真菌をspheroplastとした。さらに5分間の超音波処理を加え、12,000rpm、10分間遠心した後、沈渣に超純水200 μ lを加えてキアゲンのカラムでDNAを精製した。

(4) real-time PCR

real-time PCR で腔の真菌数と細菌数を定量した。真菌数と細菌数定量のための real-time PCR は ABI PRISM 7000 Sequence Detection System を用いて行った。真菌数定量の反応は $0.2 \mu\text{M}$ のプライマー、 $10 \mu\text{l}$ SYBR Premix EX Taq (TaKaRa)、 $2 \mu\text{l}$ の DNA 検体を混合し、精製水で最終容量を $20 \mu\text{l}$ として行った。用いたプライマー ITS86M-F には非特異反応を抑えるために 5' 端に 7ヌクレオチドを、ITS4M-R の 5' 端には GeneScan 解析のために蛍光物質である NED を結合させたものを用いた。PCR は 95°C 10 秒熱変性後、 95°C 5 秒、 66°C 31 秒のサイクルを 35 回繰り返した。細菌数定量の反応は $0.15 \mu\text{M}$ のプライマー、 $10 \mu\text{l}$ Power SYBR Green PCR Master mix (ABI)、 $1 \mu\text{l}$ の DNA 検体を混合した $20 \mu\text{l}$ の液で行った。用いたプライマー bacteria-16S (F) の 5' 端には蛍光物質の NED を結合させ、bacteria-16S (R) には非特異反応を抑えるために 5' 端に 7ヌクレオチドを結合させたプライマーを用いた (ABI)。PCR の条件は、 95°C 10 分熱変性後、 95°C 15 秒、 61°C 60 秒のサイクルを 35 回繰り返した。標準となる DNA を $10^0 - 10^6$ コピー加えた系で標準曲線を作成し、サンプル中の DNA 量を決定した。

(5) t-RLFP

真菌の GeneScan は real-time PCR 産物の $1 \mu\text{l}$ を最終量 $10 \mu\text{l}$ の系で制限酵素処理を行った。(制限酵素を加えない未処理の系も行う。) その $1 \mu\text{l}$ を $10 \mu\text{l}$ の capillary electrophoresis mixture ($9.5 \mu\text{l}$ Hi-Di formamide に $0.5 \mu\text{l}$ GENESCAN 44HD size standard を加えたもの) に混合し、ABI PRISM 3100 genetic analyzer にて GeneScan analysis software ver. 3.7 (ABI) を用いて解析した。real-time PCR のプライマーの reverse 側に NED ラベルしたものを使っているため、制限酵素未処理のものでは PCR 産物の全長を、制限処理酵素処理を行ったものでは 3' 端の断片長がこの方法で決定できた。細菌の GeneScan はリアルタイム PCR とは別に PCR を行い、その産物を使用した。PCR は $0.1 \mu\text{M}$ のプライマー、 $2 \mu\text{l}$ の DNA 検体、Expand High Fidelity enzyme mix (Roche)、を混合した $30 \mu\text{l}$ の液で行った。用いたプライマー 16S - 27F の 5' 端には GeneScan 解析のために蛍光物質である FAM を結合させ、16S - 926 R には非特異反応を抑えるために 5' 端に 7ヌクレオチドを結合させ用いた (ABI)。PCR 産物の $2 \mu\text{l}$ を最終量 $20 \mu\text{l}$ の系で制限酵素処理を行った。その $2 \mu\text{l}$ を $20.5 \mu\text{l}$ の capillary electrophoresis mixture ($20 \mu\text{l}$ Hi-Di formamide に $0.5 \mu\text{l}$ GENESCAN

500ROX size standard を加えたもの) に混合し、ABI PRISM 3100 genetic analyzer にて GeneScan analysis software ver. 3.7 (ABI) を用いて解析した。5' 端の断片長がこの方法で決定できた。

4. 研究成果

(1) 真菌用ユニバーサルプライマーの開発
全ての病原菌の ITS2 領域を増幅するが、哺乳動物の DNA は増幅しないユニバーサルプライマーセット (ITS86M-F と ITS4M-R) を開発した。この PCR で増幅される部位は遺伝子ではないため、菌種毎の違いが大きく、菌種同定には有用であった。特許取得を目指し検索したところ、今回開発したプライマーと似たものが既に報告されており、優位性を十分に証明しがたかったことから断念した。

(2) 真菌用 real-time PCR と t-RLFP の開発

上記のプライマーに NED をラベルして real-time PCR を行うことで総菌数を定量出来るようになった。また、PCR 産物を制限酵素で切断後、キャピラリー電気泳動で DNA 断片を解析することによっておおよそその菌種を同定できる t-RLFP が開発できた。

(3) 臨床検体の解析

我々が開発した真菌検査法に加え、既に報告されている細菌用の検査法を使って産婦人科を受診した患者さん 109 名の腔拭い液の解析を行った。その結果、以下のことが明らかとなった。

- ① 真菌数は検出できない人から 1,000,000 以上の菌が常在している人まで様々であった。医師が Candida 腔炎と診断した人の真菌数は必ずしも多いとは限らず、なかにはほとんどいない患者もいた。

医師がカンジダ性腔炎と診断した症例

年齢	月経	真菌数	細菌数
25	有	6.1×10^5	8.5×10^5
28	有	6.2×10^4	3.1×10^7
45	無	(-)	1.2×10^4
56	無	(-)	2.5×10^5
33	有	(-)	8.6×10^5

- ② 真菌数と共存する細菌数や細菌叢の状態には関係が認められなかった。つまり、Lactobacillus 優位の健康な細菌叢、Lactobacillus が少ない細菌性腔症の状態に係わらず、真菌は検出されない場合から 10^6 いる状態まで様々である。細菌叢と真菌叢は別個に変動していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Kawakami Y, Oyama N, Sakai E, Nishiyama K, Suzutani T, Yamamoto T. Childhood tinea incognito caused by *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale* mimicking pustular psoriasis. *Pediatr Dermatol* (in press) 査読有り
- ② Soeta N, Terashima M, Gotoh M, Mori S, Nishiyama K, Ishioka K, Kaneko H, Suzutani T. An improved rapid quantitative detection and identification method for a wide range of fungi. *J Med Microbiol* **58**; 1037-1044, 2009. 査読有り

[学会発表] (計4件)

- ① 岡崎友亮、西山恭子、石岡 賢、金子久俊、錫谷達夫。正常細菌叢中に存在する真菌の新しい定量法。第63回日本細菌学会東北支部総会。2009.8.20 盛岡
- ② 西山恭子、岡崎友亮、石岡 賢、金子久俊、錫谷達夫。培養によらない分子生物学的手法を用いた腔常在細菌叢の検討。第63回日本細菌学会東北支部総会。2009.8.20 盛岡
- ③ 錫谷達夫。培養によらない細菌・真菌の定量的検査法～産婦人科領域での応用～第540回日本産婦人科学会宮城地方部会集会。(特別講演)2008.12.20. 仙台市
- ④ 錫谷達夫。培養によらない細菌・真菌検査。第125回日本産婦人科学会東北連合地方部会学術集会。(特別講演)2008.6.8. 福島市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

錫谷 達夫 (TATSUO SUZUTANI)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：40196895

(2) 研究分担者

佐藤 章 (AKIRA SATO)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：30004948

石岡 賢 (KEN ISHIOKA)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：50305356

金子 久俊 (HISATOSHI KANEKO)
福島県立医科大学・医学部・助教

(3) 連携研究者
なし