

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2008 ～ 2009
 課題番号： 20790816
 研究課題名 (和文) 各種皮膚疾患における培養困難微生物を含む微生物叢の網羅的解析
 研究課題名 (英文) Comprehensive analysis of microbiota including unculturable microorganisms in various skin diseases
 研究代表者
 出来尾 格 (DEKIO ITARU)
 島根大学・医学部・講師
 研究者番号： 80338128

研究成果の概要 (和文)： 本研究では、各種皮膚疾患における培養困難微生物を含む微生物叢の網羅的プロファイリングを最終目的として、皮膚病変からのサンプリング法、培養による解析法、微生物ゲノム抽出法の検討を行った。サンプリング法としては **swab-wash** 法が適していることが判明し、また培養法については至適な培養条件が見つかった。しかし微生物ゲノム抽出法については、各種皮膚微生物から網羅的に抽出する手法を見出すことができなかった。副次的な成果として、アトピー性皮膚炎の皮膚局所の評価法として、テープストリッピング法によるサンプルを用いた角層中 **TARC** の測定が有用であることが示された。

研究成果の概要 (英文)： In order to investigate comprehensive profiles of microbiota including unculturable microorganisms in various skin diseases, we examined sampling method from the skin lesions, culture conditions to grow microorganisms from the samples, and extraction method of microbial genomes from the samples. Swab-wash method was found to be suitable for sampling, and optimal culture conditions for culture analysis were discovered. However, we could not find extraction method for microbial genome of various skin microorganisms. As a secondary accomplishment, measurement of TARC level in stratum corneum in the tape-stripped skin samples is revealed to be useful to evaluate severity of skin lesion in atopic dermatitis patients.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2009年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、皮膚科学

キーワード：皮膚感染症、微生物ゲノム、皮膚科学

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎や尋常性ざ瘡 (にきび)

などの皮膚の **common disease** において、皮膚の常在細菌叢は病態に重要な役割を果たすと考えられている。しかし培地や培養条件

に依存する培養法の技術的な制約から、これまで皮表に存在する細菌については培養の可能なものについてしか解明されておらず、その全体像すら明らかになっているとはいえなかった。

研究代表者は理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室との共同研究にて、細菌 16S rRNA 遺伝子を用いた細菌叢の DNA プロファイリング法を習得し、これを独自に開発した swab-wash 式皮膚細菌採取法と組み合わせて皮膚細菌叢に応用した。その結果、培養困難なために従来の培養法では検出されなかった多くの細菌（既知種および未同定細菌）が皮膚に存在することが明らかになった。

研究代表者はさらにこの結果を、5名の健康人の常在細菌叢から構築した 16Sr RNA 遺伝子クローンライブラリの解析 (Dekio et al., 2005) として報告したが、この論文において、健康人顔面皮膚上に想像を超える多様な細菌種の存在が示唆され、まだ皮膚細菌叢に同定されたことのない 9種の既知種と 13種の未同定細菌が見出された。この結果は、その後他のグループによって報告された健康人前腕皮膚における同様の手法を用いた解析と同様であった (Gao et al., 2007)。

ターミナル RFLP 法は、蛍光標識をつけたプライマーを使用して PCR を行い、さらに制限酵素処理することにより、特定の遺伝子の混合物に含まれる遺伝子断端をピークパターンとして検出する手法である。これを用いると、複雑な細菌叢に含まれる細菌種を 16Sr RNA 遺伝子の蛍光断片として簡便に可視化することができる。この手法を用いると、従来の培養法で容易に分離培養できなかった細菌種を含む細菌叢を解析することが可能である。研究代表者は、この細菌叢の網羅的可視化技術を応用して、前段の結果を踏まえ、アトピー性皮膚炎患者と健康人の顔面皮膚細菌叢の比較 (Dekio et al., 2007) を行った。

これにより、患者と健康人では培養困難な細菌を含めた細菌構成の全体像が大きく異なっていることが判明した。すなわち健康人皮膚には「善玉菌」である分離培養困難な *Dietzia maris* が高頻度に存在し、またアトピー性皮膚炎患者皮膚には「悪玉菌」である分離培養困難な *Stenotrophomonas maltophilia* が高頻度に存在していた。これらの常在細菌種が病態にどのように関わっているかは未だ明らかではないが、今後生体における何らかの役割が解明されることが期待される。

また研究代表者は、この細菌叢の網羅的可視化技術 (ターミナル RFLP 法) を、手掌足底に出現する稀な皮膚疾患である circumscribed palmar hypokeratosis の病態

解明に応用することを試みた。本疾患は特に誘因なく表皮の一部が欠損した部位が生じるのが特徴であるが、培養法にて細菌・真菌ともに検出されないことが知られている。難培養難分離の細菌を含めた検出が可能なこの網羅的可視化技術を適用したところ、病変部と近傍の非病変部ともに細菌叢は類似したパターンを示した (Ishiko et al., 2007)。その結果、病態において難培養難分離の細菌を含め細菌叢の関与は考えにくいことが判明した。今後この手法を用いて、病態がはっきりしない皮膚疾患について解明を進めることが可能になると考えられる。

2. 研究の目的

研究目的： 各種皮膚疾患における培養困難微生物を含む微生物叢の網羅的解析

皮膚科領域には臨床的に微生物の強い関与が疑われるにもかかわらず、培養法による解析では病態が明らかにならなかった疾患がいくつも存在する。本研究では、非培養的な分子生物学的解析法が試されていない各種皮膚疾患を対象として、難培養難分離の細菌を含めた微生物叢の解析をすることを目的とした。さらに、網羅解析により各種皮膚疾患における「善玉菌」「悪玉菌」の候補を挙げることを目指した。

3. 研究の方法

本研究においては、常在微生物の関与が臨床的に疑われる各種皮膚疾患のサンプルそれぞれについて、培養法・分子生物学的手法を組み合わせることを目指している。

当初本研究は慶應義塾大学医学部で遂行される計画であったが、研究代表者の転勤により平成 20 年 4 月より島根大学医学部で遂行されることとなった。そのため慶應義塾大学において使用していた研究設備が使用できないこととなり、まず島根大学医学部に研究設備の立ち上げを行った。

具体的にはまず、ヒト皮膚の常在好気性細菌・常在嫌気性細菌・常在真菌を培養法により網羅的に解析するための島根大学医学部にはない嫌気培養器などの器具の購入と設定を行い、さらに培養法による解析のための培地の選択と購入・試験解析を行った。さらに最適化された培養法のプロトコルを用いて、実際の検体について定量的な培養法による解析を開始した。また、分子生物学的解析を行うためのサンプルの蓄積を行った。

次に、分子生物学的解析に必要なサンプル破碎法の検討を行った。近年のメタゲノム解析の流れを受け、できるだけゲノム DNA の損傷が少なくメタゲノム解析にも応用可能

な破砕法を検討した。従来利用されている破砕法の中から、試薬・酵素のみを利用し DNA 損傷が少なく済む数種類の手法を選び、これらを組み合わせることにより細菌・真菌の細胞壁が等しく破砕されることを目指した。具体的には、皮膚から分離した微生物株の懸濁液を用いて、ボイル法、液体窒素を用いた凍結融解法、NaOH・リゾチーム・SDS・プロテアーゼを用いた各種細胞壁融解法、これらの組み合わせ法により抽出された DNA を定量した。

また、皮膚のサンプリング法検討の過程で、アトピー性皮膚炎患者皮膚よりテープストリッピング法によりサンプル採取を行い、並行して重症度スコアリングを行った。このサンプルを用い、角層サイトカインの検出に関連した共同研究を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト皮膚の常在好気性細菌・常在嫌気性細菌・常在真菌を培養法により定量的・網羅的に解析するプロトコルの最適化

試行錯誤の結果、ヒト皮膚を Swab-wash 法にてサンプリングし解析する場合、希釈系列にて $10^3 \cdot 10^4 \cdot 10^5$ を作成し、各 $50 \mu\text{l}$ ずつを摂取するのが適切と考えられた。また、使用する培地として、常在好気性細菌・常在嫌気性細菌についてはウマ血液添加 TS 培地を使用し、常在真菌についてはクロモアガーカンジダ/マラセチア培地を用いるのが最適と判断した。

(2) 分子生物学的解析に必要なサンプル破砕法の検討

各種の細胞壁破砕法の組み合わせを試し、それぞれの微生物のいずれもが効果的に破砕される手法を探したが、残念ながらこのような手法は頻用されている手法の組み合わせでは不可能であることが判明した。しかし、Snailase などの入手の難しい酵素を使用することで目的を達成できる可能性が示された。

(3) テープストリッピング法により採取したサンプルを用いた共同研究

61 名のアトピー性皮膚炎患者から採取したサンプルにおいて、蛍光抗体法により角層中 TARC を測定した。その結果、角層中 TARC はアトピー性皮膚炎の臨床スコア (SCORAD) と強い相関がみられ、新規の皮疹重症度定量法として有用であることが証明された。この共同研究においては、本研究において副次的に得られたサンプルの提供を行った。

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 5 件)

① I. Dekio, E. Morita. The weight of a finger-tip unit of ointment in 5-gram tubes. Journal of Dermatological Treatment, 査読有, in press 2010.

② E. Morita, H. Takahashi, H. Niihara, I. Dekio, Y. Sumikawa, Y. Murakami, H. Matsunaka. Stratum corneum TARC level is a new indicator of lesional skin inflammation in atopic dermatitis. Allergy, 査読有, in press 2010.

③ S. Dekio-Hotta, T. Kojima, S. Karino, T. Yamasoba, I. Dekio, Y. M. Ito, H. Satake, K. Kaga. N1 component reflects difference of terminal chords in three-chord sequences. Neuroreport. 査読有, 20:251-256, 2009.

④ M. Miura, I. Dekio, Y. Yamasaki, M. Ohyama. Sparing of the bulge area could preserve intact lower portion of hair follicles in a case of tufted folliculitis. J Eur Acad Dermatol Venereol, 査読有, 23:87-89, 2009.

⑤ T. Sasaki, J. Kudoh, T. Ebihara, A. Shiohama, S. Asakawa, A. Shimizu, A. Takayanagi, I. Dekio, C. Sadahira, M. Amagai, N. Shimizu. Sequence analysis of filaggrin gene by novel shotgun method in Japanese atopic dermatitis. J Dermatol Sci, 査読有, 51:113-120, 2008.

[学会発表] (計 4 件)

① I. Dekio, H. Takahashi, Y. Sumikawa, E. Morita. Optimization of procedure for destructing mixture of bacteria and yeast for metagenomics. Society for General Microbiology Spring 2010 Meeting, Edinburgh, 2010. 3. 29-4. 1.

② Y. Sumikawa, H. Takahashi, S. Kaneko, K. Kusatake, I. Dekio, M. Furumura, E. Morita. The roles of the earwax type determination gene (ABCC11) in steroid resistance of atopic dermatitis patients. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Fukuoka, 2009. 12. 4-6.

③ 横澤恵美子, 村上有美, 松中 浩, 高橋仁, 新原寛之, 出来尾 格, 森田栄伸. アトピー性皮膚炎患者の表皮角層中プロテアーゼ.

第 108 回日本皮膚科学会総会, 福岡, 2009. 04. 24-26.

④I. Dekio, M. Sakamoto, H. Hayashi, T. Ebihara, E. Morita, M. Suematsu, M. Amagai, Y. Benno. Comprehensive characterization of skin microbiota in patients with atopic dermatitis and normal subjects using T-RFLP method.

The International Investigative Dermatology 2008, Kyoto, 2008.05.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出来尾 格 (DEKIO ITARU)

島根大学・医学部・講師

研究者番号: 80338128

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: