

氏名(本籍)	たて いし たけし 立石 毅 (神奈川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第1,723号
学位授与年月日	平成9年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Karyotyping by PFGE of clinical isolates of <i>Sporothrix schenckii</i> (パルスフィールドゲル電気泳動法を用いた <i>Sporothrix schenckii</i> 臨床分離株の核型解析)
主査	筑波大学教授 医学博士 林 英生
副査	筑波大学教授 医学博士 林 浩一郎
副査	筑波大学教授 医学博士 本村 幸子
副査	筑波大学教授 医学博士 三輪 正直
副査	筑波大学助教授 獣医学博士 八神 健一

論文の内容の要旨

(目的)

Sporothrix schenckii はヒトに病原性のある真菌であり、二形性の不完全菌に属する真菌である。自然界においては土壌中や植物表面に腐生し、ヒトの皮膚表面の微小な外傷から侵入し、スポロトリコーシスを惹起する。わが国では年間約150例の発症報告があり、特に関東および九州地方に発症頻度が高い。病型には(1)固定型、(2)皮膚リンパ管型、(3)播種型、および(4)皮膚以外の感染の4型があるが、(1)および(2)の病変が大部分を占める。本菌の診断は主として培地上に形成される形態的特徴によるが、疫学的にはより客観的で詳細な同定法、例えば遺伝子型などによる同定が望まれている。真菌の遺伝子解析法にはパルスフィールドゲル電気泳動法による核型解析、18SリボソームRNAの遺伝子解析、RFLP法によるミトコンドリアDNA解析などが試みられており、*Candida* 属、*Aspergillus* 属、*Cryptococcus* 属などではこれらの方法による同定法がほぼ確立されているが、*Sporothrix schenckii* においては18SリボソームRNAの遺伝子解析や、ミトコンドリアDNAのRFLP法による解析の試みが数例報告されているのみである。本研究では *Sporothrix schenckii* の同定をパルスフィールドゲル電気泳動法を用いて核型解析が実用化できないかと考え、筑波大学附属病院において臨床的に分離された菌株についてその診断的、疫学的有用性について検討することを目的とした。

(材料と方法)

供試菌には1991年から1992年の間に筑波大学附属病院で分離された8株を供した。菌はブレインハートインフュージョン液体培地で7日間培養した。供試したDNAは染色体DNAの断裂を防ぐために、(1)菌をアガロースゲル内に包埋して溶菌する方法、(2)あらかじめ溶菌した菌体をゲルに包埋する方法を用いた。パルスフィールドゲル電気泳動にはBio-Rad社製、CHEF DRII及びDRIII, Mapperを使用した。

(結果)

DNAの調整方法は(1)の方法で、より明瞭なバンド像が得られた。電気泳動の条件を種々検討し、設定条件を選定した。その結果、本菌の染色体は6から8本より成り、総ゲノムサイズは約28 Mbpであることが判明した。核型パターン(DNAサイズ)は460 kbp, 1.1 Mbp, 3.0 Mbp, 3.4 Mbp, 3.9 Mbp, 4.6 Mbp, 5.6 Mbp, および6.2 Mbpの8本であることが明らかになった。電気泳動の条件に限度があるため6.2 Mbpバンドはもっと大きい

可能性があるが全ての菌株で同一の大きさに泳動された。供試した8株のうち、5株は8本の全てのバンドが一致したが、2株では460 kbp および1.1 Mbp のバンドが欠落し、1株は460 kbp のバンドのみ欠落していた。すなわち核型として3つの異なる型が同定できた。

(考察)

Sporothrix schenckii の同定は従来より形態学的、生化学的、血清学的な性状により行なわれてきたが、本研究では核型分類により *Sporothrix schenckii* はさらに3つの型に分類できることが判明した。茨城県という狭い地域の罹患者から分離された8菌株が3つの異なる型を示すことの意義を検討するには供試株数が少なすぎるが、さらに検体数をふやすことで本法の意義は明らかになると思われる。この方法の有用性・普遍性の検討にはさらに多くの菌株、特に地域を異にする分離株を供して調べることが必要であるが、先に報告されている18S リボソーム RNA の遺伝子解析や、ミトコンドリア DNA の RFLP 法による解析では、遺伝子の1塩基変異でもパターンに差異が生じ、分類には煩雑過ぎるきらいがあるので、核型同定法がより有用である可能性は高い。また本法により菌の系統発生も追跡できる可能性もある。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は病理真菌、*Sporothrix schenckii* を遺伝子的に同定し、疫学的解析に応用できるような方法を確立することを目的として、パルスフィールドゲル電気泳動法により核型を同定することを試みたものである。供試菌株は限られた範囲の臨床分離株8株のみで、疫学的な意義付けをするにはサンプル数が少なすぎる。しかし、本著者はこの方法を用いて、さらに国内分離株23株、海外分離株10株について解析し、本法の有用性を確認し、系統樹の作成をも試みて国際学会のプロシーディングに発表している(参考論文、筆頭著者)。本論文はその基本的手技を確立したことにオリジナリティーがあると認め、引き続いてこの研究を発展させた業績を考慮して、学位に値する論文であると判定した。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。