

氏名（本籍）	三 浦 宏 明（北海道）
学位の種類	博 士（医学）
学位授与番号	甲 第 2 9 0 号
学位授与日付	平成 7 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Phylogenetic study and genetic detection method of unclassified <i>Mycobacterium avium</i> complex. (I) Genetic identification of mycobacterial strains in the borderland among <i>Mycobacterium avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , and <i>M. scrofulaceum</i> . (II) Specific sequences for <i>Mycobacterium interjectum</i> and detection of the species in the members previously designated as <i>Mycobacterium avium</i> complex.
審査委員	(主査)教授 江 崎 孝 行 (副査)教授 高 橋 優 三 教授 渡 邊 邦 友

論 文 内 容 の 要 旨

Mycobacterium avium complex (MAC)は*M. avium*と*M. intracellulare*を併せた名称であり、結核菌群を除く抗酸菌（非定型抗酸菌）の中では、ヒトに重篤な呼吸器疾患を起こす病原菌群として最もよく知られている。しかし、MACの2菌種は従来からの生化学的手法では鑑別が困難であり、菌種レベルまで同定できずに放置されてきた。申請者は生化学的症状でMACと同定された株を遺伝子レベルで解析し、この中に含まれる菌群の分類学的検討を行った。

対象

米国のCDCから依頼された臨床由来株で生化学的性状からMACとされた81株を使用した。

方法

1) 定量的DNA-DNAハイブリッド法による種の決定：抗酸菌主要20菌種の基準株のDNAを固定したマイクロプレートを作成し、ビオチン標識した被検菌81株のDNA反応させたのち、化学発光法でハイブリッドを形成したDNA量を定量した。被検菌1株あたり同じ実験を複数回行い、標識株と最も強くハイブリッドを形成した基準株を選択した。

2) Polymerase chain reaction (PCR) およびDNAプローブ法による種の同定：16S ribosomal RNA (16S rRNA) の遺伝子領域を*Mycobacterium*属に特異的なプライマーでPCRを行い、その産物に*M. avium*, *M. intracellulare*および*M. tuberculosis*に特異なDNAなプローブを反応させ菌種の同定を試みた。

3) 16S rRNA遺伝子配列を用いた新菌種*M. interjectum*の同定及び検出系の作成：1994年に新たに記載された*M. interjectum*が臨床材料から分離される可能性が指摘されたため、特異的なPCR用プライマーを作成し、MAC内の菌株をPCR法によって同定を試みた。

4) 16S rRNAの塩基配列を使った抗酸菌群の系統関係の解析：MAC及び*M. interjectum*を含む遅発育性抗酸菌の相互間の系統関係を調べるため、近隣接合法 (NJ法) およびUPGM法で分子進化距離を測定した。

結果

1) 81株のMACのうち、16株 (19.8%) が*M. avium*, 29株 (35.8%) が*M. intracellulare*と分類され、*M. scrofulaceum*が6株 (7.4%) このグループに混入していた。残り30株 (37.0%) がこの方法では同定不可であった。

2) 1) で*M. avium*あるいは*M. intracellulare*と種を決定した株は全てプローブ法で*M. avium*もしくは*M.*

*intracellulare*と同定され、結果は完全に一致した。残り30株は全ていずれのプロープとも反応しなかった。

3) *M. interjectum*に特異的な16S rRNAの配列を選択し、該当領域を特異的に増幅することが確認できた。16S rRNA遺伝子由来のプライマーは上記1), 2)で同定不可だった30株中、11株(36.7%, 81株中の13.6%)の16S rRNA遺伝子を増幅した。

4) *M. interjectum*はMACの2菌種とは系統的に異なる位置にphylumを形成した。これまでに記載された菌種では*M. simiae*がこの菌種に最も近く同一clusterに含まれた。

考察

DNAのデータバンクには9株の*M. avium*, 4株の*M. intracellulare*の16S rRNA遺伝子の全塩基配列が保存されているが、*M. avium*と*M. intracellulare*相互の塩基数の違いは8個から15個であり、MACと他種抗酸菌との配列の違い(21個から116個)より小さく、両者は遺伝的に類似している。全長約1,500塩基の細菌の16S rRNAには属によって異なった配列を示す可変領域があり、その中には菌種によっても異なった配列もしばしば存在する。*M. interjectum*は1994年に新しく記載された菌種であり、その臨床的意義は不明であったが、申請者は16S rRNAの180番目と460番目付近の配列とを用いて新菌種*M. interjectum*を特異的に検出する系を作成した。この方法をつかってMACの中で分類不明であった30株の中に11株と(36.7%) *M. interjectum*が高率に存在することを明らかにした。

*M. interjectum*の16S rRNAには*M. simiae*と同様、MACにはない460番目付近の12塩基の欠損領域が存在するのが特徴である。*M. interjectum*の同定用プライマーの作成に用いた遅発育性抗酸菌全24種、迅速発育性抗酸菌主要3種を含む27菌種の基準株の16S rRNA遺伝子配列をDDBJのODEN programを用いて計算し、NJ法、及びUPGM法を用いて系統樹を作成した。その結果*M. interjectum*は*M. simiae*と共に系統樹上で独立したclusterを作り、MACとは遺伝的に遠い関係にあることが明らかとなった。しかしながらこの菌種がMACに迷入することは生化学的性状の記載がまだまだ不十分であることを意味している。このため菌種の同定と分類には遺伝子レベルの検討が不可避である。*M. interjectum*が臨床材料から高頻度に分離されるとの報告は未だ無く、抗酸菌の同定分類の系に*M. interjectum*を加えたスキームを作成する必要があることがわかった。

*M. interjectum*とはほぼ同じ時期に新菌種として報告された*M. intermedium*についても同様にprimerを作成し、特異的な増幅系を作成した。この系でMACの未分類の菌株19株中、1株が*M. intermedium*であることが判明した。

この研究で最後まで残った18株はまだまだ分類されていない新菌種として位置づけることができ、今後、新たな分類学的な記載を行う必要があることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

申請者三浦 宏明は非定型抗酸菌の中の*Mycobacterium avium* complex (MAC)として一括されてきた菌群を遺伝学的に分類し、その結果系統発生的に全く異なる新菌種*M. interjectum*がこのMACに多数含まれていることを指摘し、その検出系を作成した。本研究は*M. interjectum*がヒトに対する重要な病原菌であることを認識させる貴重なデータを提供した。この新知見は微生物学の進歩に多大な貢献をするものと認める。

[主論文公表誌]

Phylogenetic study and genetic detection method unclassified *Mycobacterium avium* complex.

(I) Genetic identification of mycobacterial strains in the borderland among *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, and *M. scrofulaceum*.

平成6年6月発行 Microbiol. Cult. Coll. 10 (1) :45~57

(II) Specific sequences for *Mycobacterium interjectum* and detection of the species in the members previously designated as *Mycobacterium avium* complex.

平成6年12月発行 Microbiol. Cult. Coll. 10 (2) :21~28