岐阜大学機関リポジトリ
Gifu University Institutional Repository

M抗原保有レンサ球菌群の命名とラセン菌群の培養技術の開発に関する研究

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2014-02-14
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 富田, 純子
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/42913

氏名（本籍）　**富　田　純　子**（岐阜県）

学位の種類　博　士（再生医科学）
学位授与番号　甲第　862　号
学位授与日付　平成　23　年　5　月　25　日
学位授与要件　学位規則第４条第１項該当

学位論文題目　**M 抗原保有レンサ球菌群の命名とラセン菌群の培養技術の開発に関する研究**

審査委員　（主査）教授　石　塚　達　夫
（副査）教授　國　貞　隆　弘　　准教授　竹　村　元　三

論文内容の要旨

菌種の同定は未知の分離株の特徴を解析し，既知の分類群と比較をしてどの菌種に含まれるかを決定することであるが，記載された分類群であってもその菌群の培養法が確立していない場合，同定に必要な表現形質の解析を行うことが困難になり，臨床現場では感染の原因菌の報告に遅れが生じる。本研究ではそのような同定が困難な菌群であるレンサ状球菌で Lancefield の M 抗原を持つ菌群と，血液平板状でフィルム上に発育する難培養菌であるラセン状 *Helicobacter* 属菌種の分類と同定の課題に注目し研究を行った。

Streptococcus 属菌種は Lancefield によって決定された群特異性の細胞壁多糖体によって A～V の 20 群に群別分類されている。*Streptococcus* 属菌種は多種に渡っているため，血清型の決定は菌種の同定において重用視されている。現在，レンサ状球菌で M 群抗原を有する菌株は複数株分離報告されているが，これらの菌株の系統位置が確定されていないため，M 群菌株には分類学上の名前が与えられていない。本研究ではこれら M 群抗原を保有するレンサ状球菌の *Streptococcus* 属における系統分類学的位置を解析し，菌種の分類学的記載を目指した。一方，ラセン菌の形態を持ち *Helicobacter* 属に含まれるいくつかの菌種は寒天培地に薄いフィルム状に発育し，発育の確認が困難で見逃されやすく，培養条件も特殊であるため臨床検査の現場からよりよい培養法の確立が求められている。本研究では同定が困難であるこれら二つの菌群の系統分類学的位置を決定し，臨床検査で利用可能な培養法の確立を目的とした。

【対象と方法】

Streptococcus 属の M 群抗原を保有する菌株として動物由来 4 株を使用し分類学的位置を決定した。系統解析のために 16S rRNA 遺伝子および *sodA* 遺伝子の塩基配列を決定し，得られた配列を他の *Streptococcus* 属菌種の他の基準種の塩基配列と共に NJ 法により系統解析を行った。系統的に近縁の菌種については DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験をマイクロプレート法にて実施し，DNA 相同性を算出した。さらに，生化学性状試験，DNA 塩基組成の測定等の多相解析を行い，分類学的に独立種であるかどうかの解析をおこなった。

ラセン菌群である *Helicobacter* 属菌種の培養法では平板状で薄いフィルムようの集落を作る *Helicobacter* 属 17 菌種基準株および *H. cinaedi* 分離株 13 株を用いて，最適な培養条件と培地組成を検討した。評価方法として，発育状況の目視観察，顕微鏡による形態の確認，ATP 測定による増殖菌の代謝活性の測定を行った。

【結果】

動物由来M群保有レンサ球菌4株は16S rRNA遺伝子による系統解析の結果，*Streptococcus*属のpyogenic groupに属しており，*S. marimammalium*と同じsubclusterに系統分類された。動物由来M抗原保有レンサ球菌群とその他の*Streptococcus*属菌種の基準株との16S rRNA遺伝子の相同性は全て95.6%以下しかなく独立種であった。DNA-DNAハイブリダイゼーション法による類似度の計測ではM群菌株と系統樹で最も近縁関係にあった*S. marimammalium*との相同性は15.9%以下であり，このデータでも独立種であり事が裏付けられた。また，M抗原保有4株と近縁の菌種について生化学性状を比較すると，β-ガラクトシダーゼ活性やグリコーゲンの酸化反応においてM群菌株は特徴的な性状を示していたため，近縁菌種と区別する表現形質として記載した。

ラセン菌であるフィルム状の発育をする*Helicobacter*属菌種の培養法の検討では,培地組成中に還元系色素が添加されているものは透明な培地に紫色のコロニーを形成するため，24時間後から菌の発育が確認でき，他の培地よりも迅速に発育が確認できた。培養条件については水素ガスの必要性と湿度環境の維持が発育に大きく影響することが判明した。

【考察】

これまで分類学的に整理されていなかった動物由来のM抗原保有のレンサ球菌の分類学的な位置を決定し，新菌種名*Streptococcus fryi*の提案をおこなった。この結果，20世紀前半にLancefieldが記載したレンサ状球菌の抗原型のすべてに分類学的な菌種名を付与する研究が完成した。一方，ラセン菌でフィルム状の発育をする*Helicobacter*属の菌種の培養に必要な炭酸ガス,水素ガスの濃度条件，及び湿度環境を見出し，市販培地を使った場合の最適な培養条件を記載した。今後この新しい培養法が使用されることにより，培養困難であったこの菌群による隠された感染症の実態が明らかになると期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者富田純子は本研究により分類が困難で未分類のままの残されていたM抗原保有レンサ球菌の分類学的位置を記載し，菌種名を提案した。また培養困難なラセン菌群*Helicobacter*属の各菌種の分離増菌培養に最適な混合ガス濃度と湿度を記載し，ラセン菌の分類体系の進歩に貢献した。これらの研究成果は細菌分類学及び臨床細菌学に重要な貢献をしたものと認める。

［主論文公表誌］

1）Junko Tomida, Susanne Sauer, Yuji Morita, Takayuki Ezaki, Yoshiaki Kawamura : *Streptococcus fryi* sp. nov. a novel species with Lancefield group M antigens FEMS Microbiology Letters 314, 95-100 (2011).

2）富田純子，菓子田充明，笈西一樹，遠藤隆一，森田雄二，河村好章：*Helicobacter*属菌種迅速検出のための各種市販培地の性能評価. 日本臨床微生物学雑誌 18, 227-235 (2008).