



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

レベル 2 以上の全細菌病原体のDNAチップの作成と 感染症診断法の開発

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-03-12 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 江崎, 孝行 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/539

1. 研究成果の概要

病原細菌は日本細菌学会の分類ではレベル2、レベル3でそれぞれ75属、350菌種、及びレベル3で11属33菌種が記載されている。これらの菌種は分類学的には16S rDNAの配列を使って系統的に整理されているためリボソームrDNA配列を網羅的にマイクロアレイに固定しておけば系統的な位置を判定できる。本研究を通じて上記の菌種に日和見病原体を加えて全部で415菌種のリボソームRNA遺伝子をマイクロアレイに固定した“Phylogenetic array”を作成した。このチップで未同定の菌株、及び検査材料から病原体をスクリーニングする方法を作成した。

しかし、16S rRNA情報だけでは病原因子を保有した株と保有していない株を識別出来ない。さらに16S rRNA配列は系統的に近い菌種の配列は極めて類似しているため、この配列だけでは類縁の菌種を識別できない。そこで菌種の同定には全染色体のDNAを固定した“Chromosome array”を一部の菌種について作成した。また大腸菌群の様に種の同定だけでなく、病原因子による菌種の病原細菌を識別する必要がある菌群にはさらに病原因子を固定した“Pathogen array”を作成した。我々はさらに本研究を通じて、16S rDNAと病原因子の保有を同時にマイクロアレイ上に固定することで、分離株の同定および検査材料中に病原体がいるかどうかを識別する方法を試作した。

分離菌株がレベル2及びレベル3の病原体に該当するかどうかは16S rDNAをuniversal primerを使用し増幅しアレイ上の基準株のリボソームと反応させることで系統的な位置を確認する。病原因子の保有の有無が問題になる病現体は約100菌種存在し、これらに関してはuniversal primerが存在しないので個々の病原因子に特異的な配列を使用して増幅した後、病原因子が固定されているマイクロアレイと反応させる方法を作成した。個々の病原因子は配列が大きく異なるため、100種類のPrimerを混合し一本のtubeにまとめて遺伝子増幅を行うmultiplex PCR法を利用して増幅する系を作成した。

本研究を実用化させるために民間共同研究を行い臨床材料から病原体を網羅的に検出する系と作成し、増幅産物を本研究で作成したマイクロ臨床材料から直接病原体を検出する系に関してはuniversal primerは便や喀痰のような常在菌が混

入する材料には使えない。そのために 菌種に特異的なリボゾーム配列、および属に共通のリボゾーム配列を増幅する primer をデザインし喀痰、便、土壌、尿など材料別に特異リボゾーム配列を混合し multiplex PCR 法を作成した。