

氏名	Kunyaluk Chaicumpar		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	第3347号		
学位授与年月日	平成9年9月30日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者		
学位論文名	Studies of Polymorphic DNA Fingerprinting and Lipid Pattern of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Patient Isolates in Japan (日本国内患者分離結核菌株のDNAフィンガープリント多型性と脂質パターンの多様性に関する研究)		
論文審査委員	主 査 教 授 矢野 郁也	副主査 教 授 巽 典之	
	副主査 教 授 市原 宏介		

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

感染症の分子疫学的解析に最近病原体のDNA制限酵素処理画分の多様性(RFLP)が利用されつつあるが、この方法は人型結核菌の感染源の特定化にも導入されつつある。結核菌は、人類に対する病原菌として長い歴史をもち、菌株間で不均一な性質をもつことで知られるが、特に人からの分離菌株は特定地域によってvirulenceに差があり、これと関連して結核菌のvirulence factorの本体の解明が望まれてきた。著者は大阪市内の患者から分離された結核菌のIS6110を用いるRFLPパターンがどのような多様性を示すかを明らかにすることによって感染源の多様性を探るとともに、各菌株について抗原性やvirulenceがどのような差を示すかを明らかにするために菌体表層脂質（リン脂質および糖脂質）の組成を二次元薄層クロマトグラフィー(2D-TLC)を用いて検討した。その結果この方法で感染源の同定のみならず、DNAフィンガープリントパターンの多様性が、脂質特に糖脂質パターンの多様性と関連していることが明らかとなった。

【方法】

患者分離結核菌よりDNAを抽出後、制限酵素Pvu IIにより処理し、agarosegel電気泳動にて分画し、これをナイロン膜に転写したのち、polymerase chain reaction(PCR)法により増幅して得られたIS6110とhybridizeしたのち、DNA画分を発色して各菌株のRFLPパターンを得た。各菌株からの脂質の抽出は、クロロホルム・メタノール(4:1,3:1及び2:1,v/v)により行い、シリカゲル薄層クロマトグラフィー(TLC)により展開してリン脂質はDittmer試薬により、糖脂質は50% H_2SO_4 スプレー後加熱により発色させたのち、既知標とRf値及び色調を比較して同定した。未知の脂質については水解前・後の各成分をガスクロマトグラフィー又は質量分析法により同定して行った。

【結果と考察】

患者から分離した66株の結核菌は1～24コピーからなるIS6110を有しており、そのパターンは極めて変化にとむものであった。66株中50株がことなつたRFLPパターンを示し、12種のRFLPパターンは2株以上の菌株で共通であった。RFLPパターンのData分析の結果から我々が分離した株のうち95%のものが7群(A,B,C,D,E,F及びGとする)に分けられることが明らかとなった。これに対して菌体脂質の分析結果では、リン脂質組成は各菌株で殆どその組成に差がみられず、一方糖脂質パターンには著名な差があることがみいだされた。特に結核菌に占くより知られている特徴的な糖脂質であるcord factor(trehalose 6,

6'-dimycolate)は、すべての菌株に存在していたのに反して、virulence factorの一つとされる sulfolipid(2,3,6,6'-tetraacyltrehalose 2'-sulfate)は菌株によってその含有が著しくことなり、全く検出されないものからcord factorと略同量に含まれている菌株までみいだされた。又、多くの株では、このようなsulfolipidの存在とDNAフィンガープリントパターンがよく一致していたが、稀に不一致な場合が認められた。又一方、菌株によって稀ではあるが、cord factorにRf値が近似する未知の糖脂質の存在を示すものがあり(No.249株)、この糖脂質の分析結果からrhamnoseと2-O-methyl rhamnoseを1:1で含むphenolglycolipid中間体と予想された。この糖脂質は、cord factorと類似の貧食作用の阻害、phagosomelysosome fusionの阻害を示し、新しい病原因子の一つと考えられる。これらの糖脂質はいずれも患者血清とのELISA法で抗原体を示したが、その反応性はcord factorが最も普遍的であった。以上の結果は、IS6110を用いるRFLP分析と脂質パターンの分析の組み合わせが、感染源の特定化に有用であるばかりでなく、菌株の抗原性や病原性の強弱を知るためにも有用な情報を与えることから、今後分子疫学的手法として広い応用性を示すものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

感染症の分子疫学的診断法としてDNAの制限酵素処理画分の電気泳動パターン(RFLP)が導入されつつあり、感染源の同定に威力を発揮しているが、RFLPパターンと他の表現型との関連性をくみ合わせた研究は未だみられない。本論文は、大阪市内でヒトから分離した結核菌の遺伝学的多様性と各種virulence factorの分布をしらべ、分離菌のvirulenceのheterogeneityをも明らかにしようとしたものである。方法は、患者分離菌よりDNAを抽出後、制限酵素Pvu IIにより処理し、agarose gel電気泳動にて分画し、これをナイロン膜に転写したのち、polymerase chain reaction(PCR)法により増幅して得られたIS6110とhybridizeしたのち、DNAを発色して各菌株のRFLPパターンを得た。また各菌株からクロロホルム・メタノール系混合溶媒で脂質を抽出し、シリカゲル二次元薄層クロマトグラフィー(TLC)にて展開してリン脂質及び糖脂質を検出し、TLC上の挙動から、各成分を同定した。

その結果、患者から分離した結核菌66株は、1~24コピーからなるIS6110を有し、そのパターンは極めて変化にとむものであり、66株中50株がことなるRFLPパターンを示した。又12種のRFLPパターンは2株以上の菌株で共通で、分離株中95%のものが7群(A,B,C,D,E,F及びG)に分けられることが判った。このことは古くより知られているようにヒトから分離される結核菌が遺伝学的に幅広い変異をもっていることを示すとともに、大阪市内で分離される結核菌は遺伝学的に極めて多様性にとみ広範囲の地域から、侵入していることを示唆していた。一方、菌体成分の中でvirulence factorと考えられているcord factor(trehalose 6,6'-dimycolate)は全ての菌株に存在していたのと比べて、sulfolipid(2,3,6,6'-tetraacyl trehalose 2'-sulfate)は菌株によって含量に差があり、32株中5株には全く存在しなかった。又菌株によってcord factorにRf値に近い未知の糖脂質が検出され(249X)、この脂質はrhamnoseと2-O-methyl rhamnoseを1:1(モル比)で含む新しいphenol glycolipidの一種と考えられた。なお結核患者の血清は上記の糖脂質抗原中、cord factorには最も普遍的に高い抗体価を示して反応した。以上の結果は、IS6110を用いるRFLP分析と脂質パターン分析の組み合わせが感染源の菌株特定化に有用であるばかりでなく、菌株の抗原性や病原性の推定にも有用な情報をあたえることから、結核感染の新しい細菌学的診断に貢献するものと考えられ、著者はよって博士(医学)の学位を授与されるに値するものと判定された。