

氏名(生年月日)	スギ 杉 田 知 妹
本 籍	
学位の種類	博士(医学)
学位授与の番号	乙第 2318 号
学位授与の日付	平成 17 年 4 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当(博士の学位論文提出者)
学位論文題目	PCR identification system for the genus <i>Aspergillus</i> and three major pathogenic species: <i>Aspergillus fumigatus</i>, <i>Aspergillus flavus</i> and <i>Aspergillus niger</i> (Nested PCR 系を用いた <i>Aspergillus</i> 属および主要菌種同定システムの研究)
主論文公表誌	Medical Mycology 第 42 卷 433-437 頁 2004 年
論文審査委員	(主査) 教授 永井 厚志 (副査) 教授 内山 竹彦, 大貫 恭正

論文内容の要旨

〔目的〕

近年, 日和見感染症としてのアスペルギルス症が問題となっている。本症起因菌は表現形質に乏しく, 他の環境真菌(糸状菌)との鑑別が困難な場合も少なくない。そこで私達は *Aspergillus* (A.) 属を属レベルで同定するための PCR 法と, 本症の主要起因菌: *A. fumigatus*, *A. niger* と *A. flavus* の各々 3 菌種を同定するための nested PCR 法による起因菌同定システムを開発した。

〔対象および方法〕

19 菌種 27 株の主要糸状菌標準株と, 形態学的同定が不能な, 手術検体分離株と喀痰分離株各 1 株を臨床分離株として用いた。DNA は, サブロー寒天培地で培養後, 迅速法によって抽出した。ITS1 rDNA およびその近傍の領域から新規に設計した *Aspergillus* 属同定プライマー対と, その内側に設計した 3 菌種同定(nested)プライマー対を用い, 各々 PCR と nested PCR 反応を行った。

〔結果〕

標準株の DNA を鋳型にして, *Aspergillus* 属同定 PCR 反応 (ASAP) を施行したところ, *Aspergillus* 属の 8 菌株のみが陽性となった。次に ASAP で陽性となった PCR 産物に対し, 各々 3 菌種同定プライマー対を用いた nested PCR により, 鋳型特異的な増幅反応を確認した。

手術検体分離株は ASAP は陰性であったが, 既報の真菌共通プライマー対を用いた PCR で増幅を認め, *Aspergillus* 属以外の糸状菌であることが示された。喀痰分離株は, ASAP が陽性で, nested PCR では *A. flavus* 同定プライマー対による PCR のみが陽性となり, *A. flavus* と同定できた。これらの結果は, シークエンスにより確認(前者は *Schizophyllum commune*, 後者は *A. flavus*) した。

〔考察〕

感染症起因菌となる糸状菌は, 分離培養された場合であっても, 分生子を形成しない場合には形態学的な同定は不可能となる。培養鏡検上 *S. commune* (スエヒロタケ) による菌球症例や, *Pseudoallescheria boydii* による感染症などは病理所見上アスペルギルス症と鑑別が困難であるが, 共にアンホテリシン B およびミカファンギンに対し感受性が低いことから, 治療法選択のために鑑別は必須である。また, 病理診断上および疫学上は, 起因菌を属レベルに止まらず, 菌種レベルにおいて適切に同定することが必要である。特に糸状菌の場合, 起因菌を汚染菌などと区別するためには臨床検体から同一の主要菌種を繰り返し検出することが必要となる。本 PCR システムは, これらの要請に答えるものである。

〔結論〕

抗真菌剤に対する感受性、予後等が菌種により異なることを考慮すると、治療のためには信頼性の高い手法による起因菌の同定が必須である。困難を極めるアスペルギルス症管理上、本 PCR 同定法の寄与が期待できる。

論文審査の要旨

日和見感染としてのアスペルギルス症が問題となっているが、起因菌は表現形質に乏しく他の菌との鑑別が困難であった。本研究では新規に設計したアスペルギルス固定プライマーを用いることによりアスペルギルス症の主要起因菌である *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* を nested PCR 法により同定することが可能であることが示された。

研究のデザイン、対象、方法、いずれも十分な計画のもとに行われており、考察も広い視点から深い内容で論述されている。以上より、本研究は学術的にも臨床的にも価値のあるものと評価できる。

8

氏名(生年月日)	小 林 啓 郎
本 籍	
学位の種類	博士(医学)
学位授与の番号	乙第 2319 号
学位授与の日付	平成 17 年 4 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当(博士の学位論文提出者)
学位論文題目	Gene expression of bone resorbing cytokines in rat osteolysis model (持続的と間欠的ポリエチレン注入によるラット osteolysis model における骨吸収性サイトカインの遺伝子発現パターン分析の比較)
主論文公表誌	Journal of Orthopaedic Science 第 10 巻 第 1 号 62-69 頁 2005 年
論文審査委員	(主査) 教授 伊藤 達雄 (副査) 教授 大澤真木子, 高桑 雄一

論文内容の要旨

〔目的〕

人工関節周囲の osteolysis は wear debris がマクロファージに貪食され、放出された骨吸収性サイトカインが、破骨細胞性骨吸収を刺激することにより生じると考えられている。この件に関する過去の実験は、間欠的に大量の polyethylene particle の注入により、bone-implant interface tissue を分析していたが、我々は浸透圧ポンプを用いて一定量の polyethylene particle を持続的にラット膝関節に注入する方法を開発した。

今回、持続注入法による rat osteolysis model を作製し、経時的に病理組織学所見と、骨吸収性サイトカインの遺伝子発現パターンを RT-PCR 法で分析し、10 週まで間欠的な polyethylene particle の注入と比較検討した。

〔対象および方法〕

Wistar rat の膝関節から大腿骨骨髓内に K-wire を刺入固定し、持続的注入(持続群)において、polyethylene particle を含んだラット血清溶液を注入した浸透圧ポンプを背部に埋植した。次に filling tube を浸透圧ポンプに接続し、先端を膝関節腔内に固定した。ポンプは 2 週毎に交換し、2 週毎に 10 週まで経過をみた。他方、間欠的注入(間欠群)においては、polyethylene particle を含んだラット血清溶液を、毎週注射針で膝関節内に注入した。

両群で増生した肉芽組織から、RT-PCR 法で TNF- α mRNA, IL-1 α mRNA, IL-6 mRNA について経時的に分析した。病理組織学的分析のために、K-wire を抜去した大腿骨に HE 染色と TRAP 染色を施行した。