みちのくウイルス塾・2010

感染性病原体の新たな同定法

福島県立医科大学　微生物学講座
錫谷　達夫

感染性病原体の新たな同定法

１．感染症ってなに？

２．感染症を起こす微生物ってどんな生き物？

３．病院ではどうやって感染症を診断するの？

人類の感染症に対する理解

紀元前	Hippocrates (BC 459〜377)	ミアズマ説
1546年	Fracastoro (1478〜1553)	伝染説
17世紀	Leeuwenhoek (1632〜1723)	顕微鏡の自作
19世紀	Koch (1843〜1910)	病原菌の同定

Antonie van Leeuwenhoek
(1632〜1723)

1648年	織物商で奉公
1660年	議会の管理官
1669年	測量士
1674年	微生物発見
1677年	精子発見
1679年	ワイン計量官
1680年	ロンドン王立協会会員
1723年	気管支肺炎で死去

人類の感染症に対する理解

紀元前	Hippocrates (BC 459〜377)	ミアズマ説
1546年	Fracastoro (1478〜1553)	伝染説
17世紀	Leeuwenhoek (1632〜1723)	顕微鏡の自作
19世紀	Koch (1843〜1910)	病原菌の同定

感染症ってなに？

Robert Koch (1843-1910)

Koch の3原則

1．　その病気の病変部に必ず一定の
　　微生物が見いだされる

2．　その微生物はその病気にだけ
　　見いだされる

3．　その微生物を純培養し、
　　感受性のある動物に接種すると
　　もとと同じ病気を起こす

人類の感染症に対する理解

紀元前	Hippocrates (BC 459〜377)	ミアズマ説
1546年	Fracastoro (1478〜1553)	伝染説
17世紀	Leeuwenhoek (1632〜1723)	顕微鏡の自作
19世紀	Koch (1843〜1910)	病原菌の同定

感染性病原体の新たな同定法

１．感染症ってなに？

２．感染症を起こす微生物ってどんな生き物？

３．病院ではどうやって感染症を診断するの？

動物に感染して病気を起こす微生物

肉眼

1 mm

光学顕微鏡

100 μm

10 μm

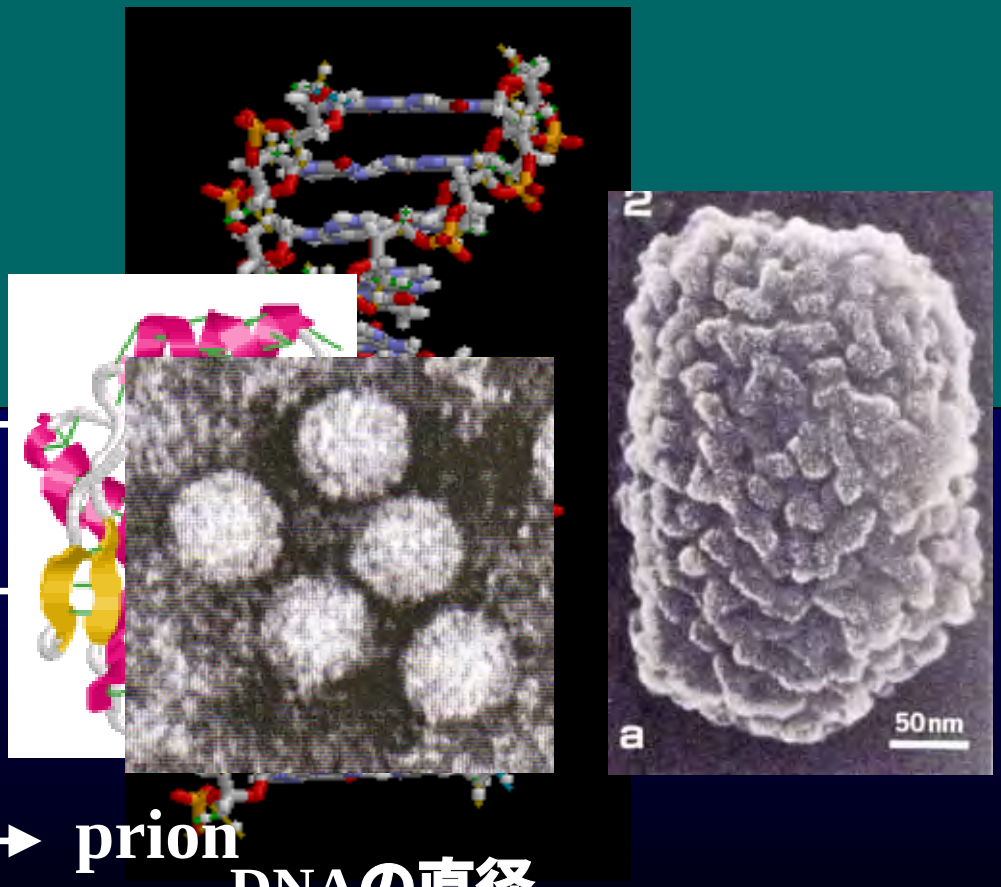
1 μm

電子顕微鏡

100 nm

10 nm

1 nm



→ prion

DNAの直径

ウイルスの増殖過程
(インフルエンザウイルスの場合)

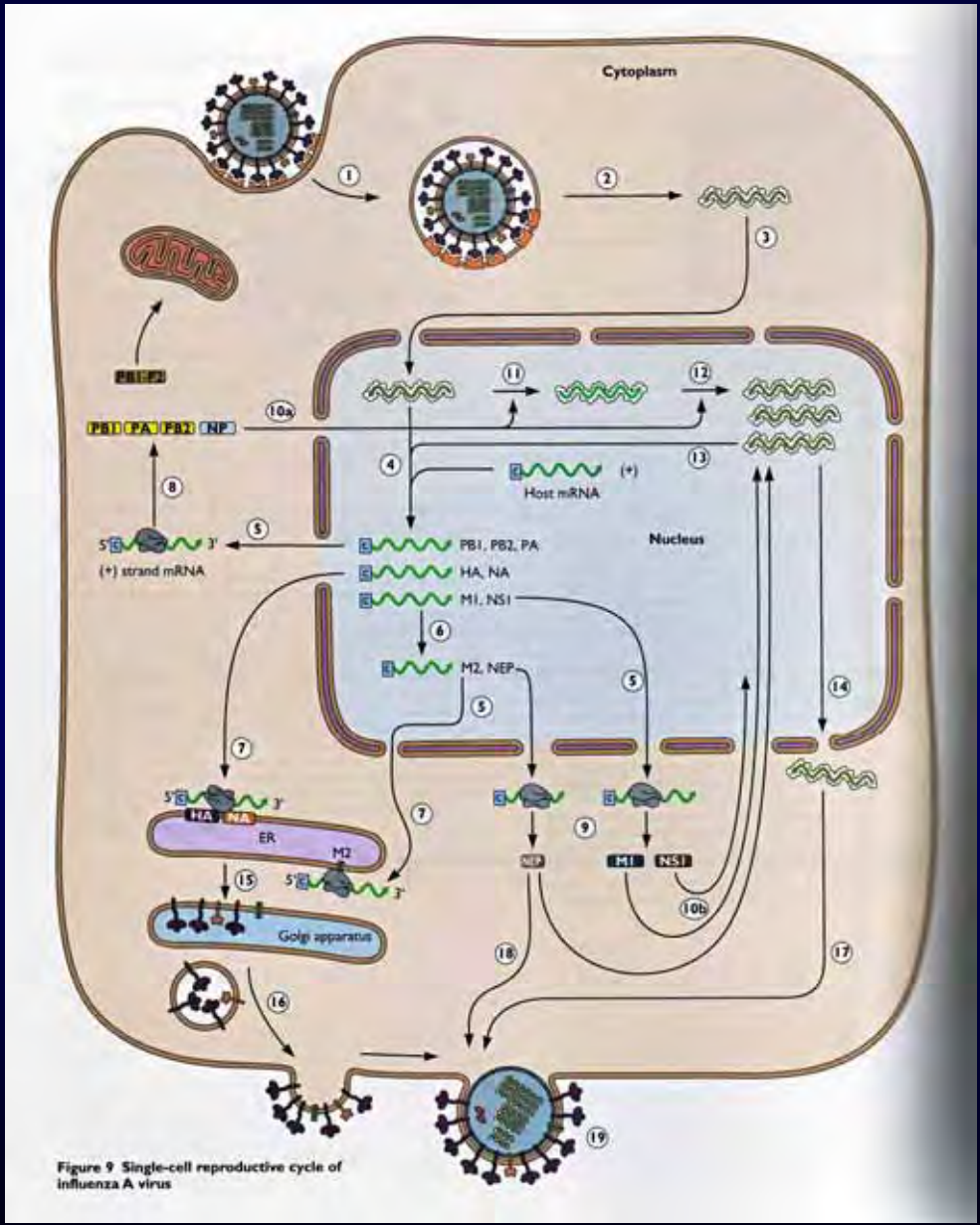
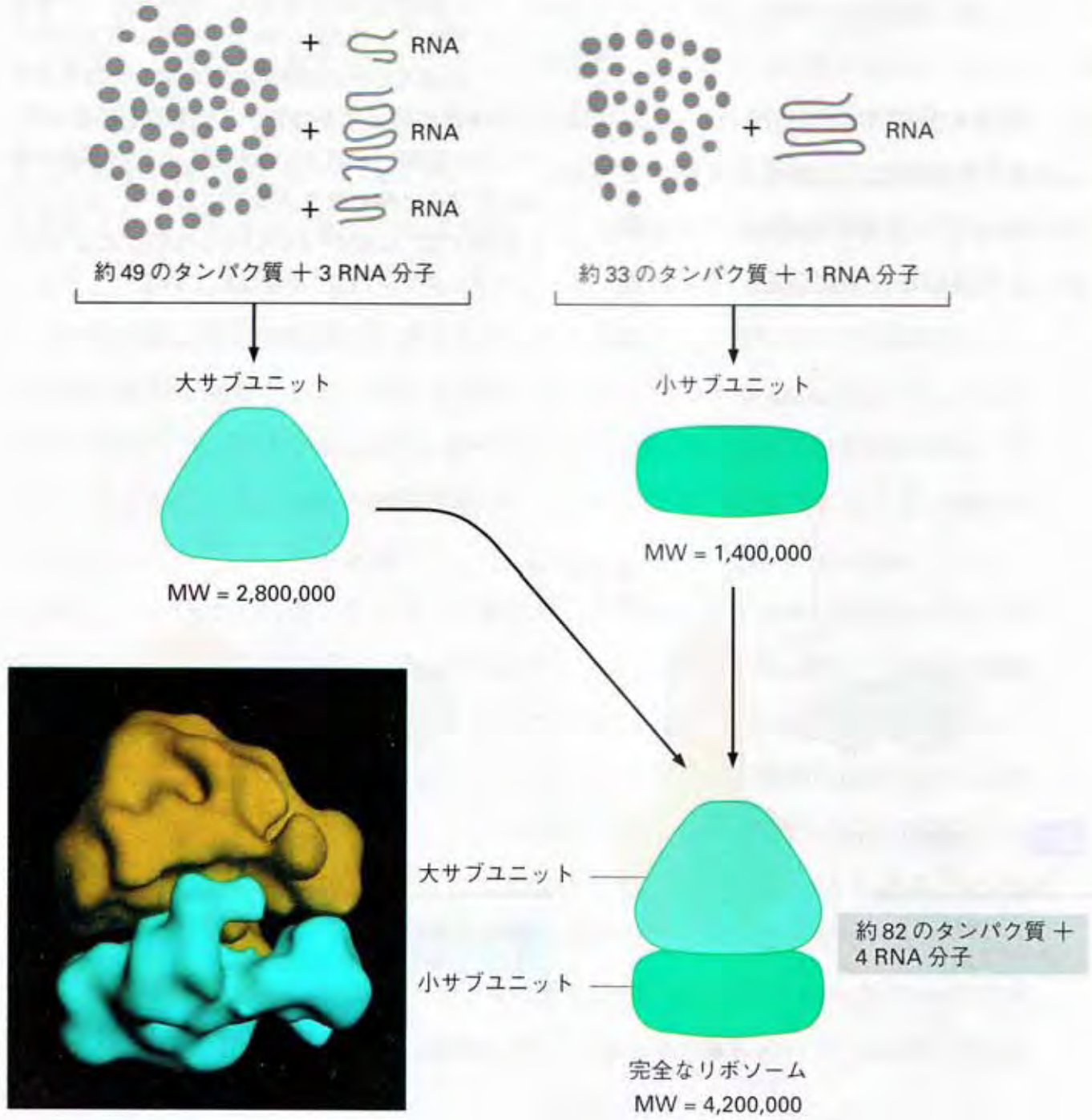


Figure 9 Single-cell reproductive cycle of influenza A virus


+ RNA
+ RNA
+ RNA
約49のタンパク質＋3 RNA分子
+ RNA
約33のタンパク質＋1 RNA分子
大サブユニット
小サブユニット
MW = 2,800,000
MW = 1,400,000
大サブユニット
小サブユニット
約82のタンパク質＋
4 RNA分子
完全なリボソーム
MW = 4,200,000

動物に感染して病気を起こす微生物

肉眼

1 mm

光学顕微鏡

100 μm

10 μm → 真菌

1 μm → 細菌

電子顕微鏡

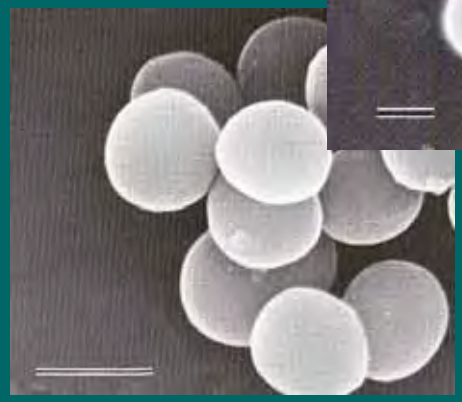
100 nm

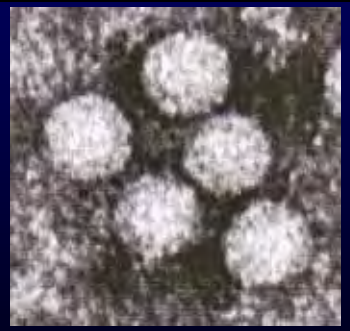
virus

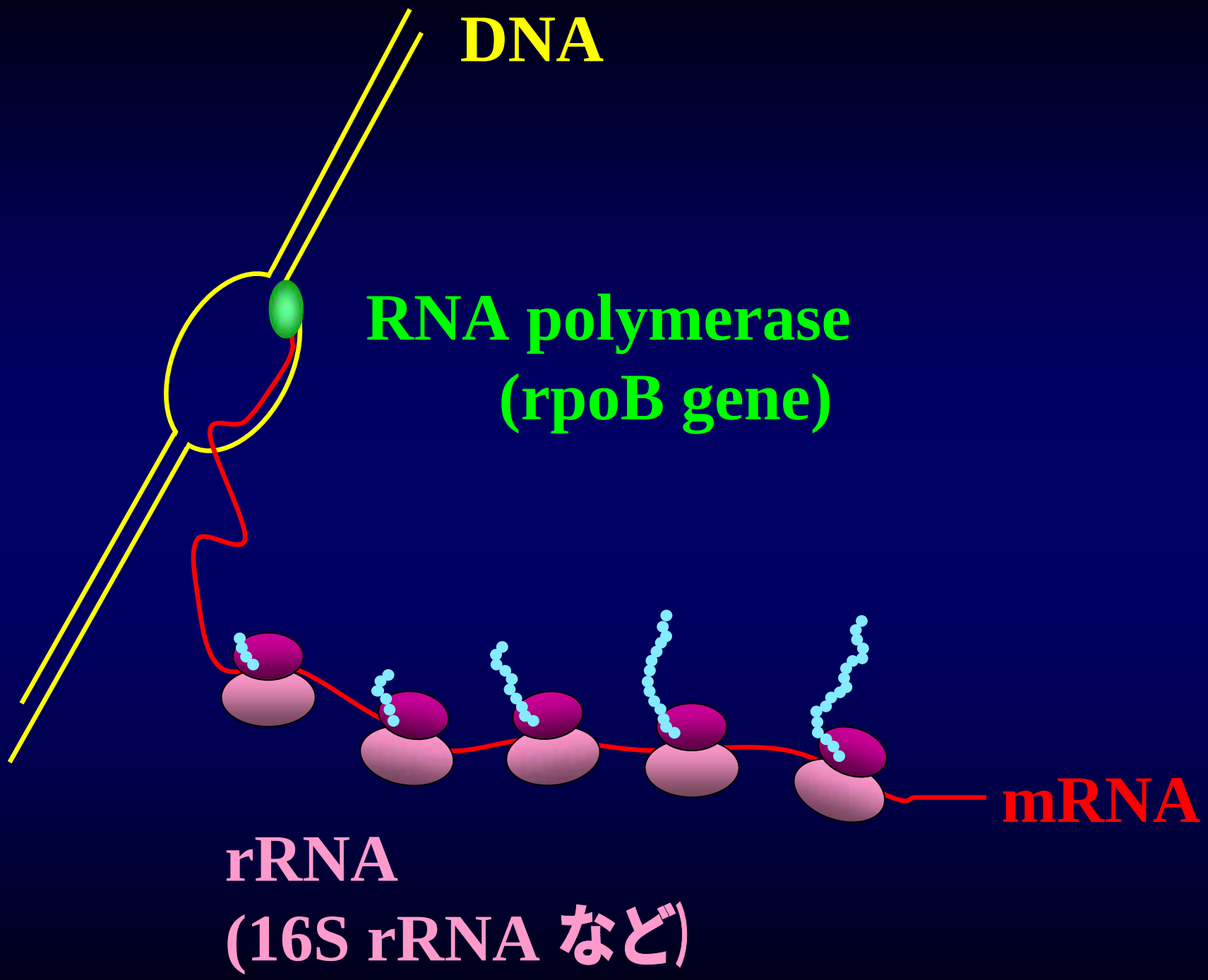
ribosome

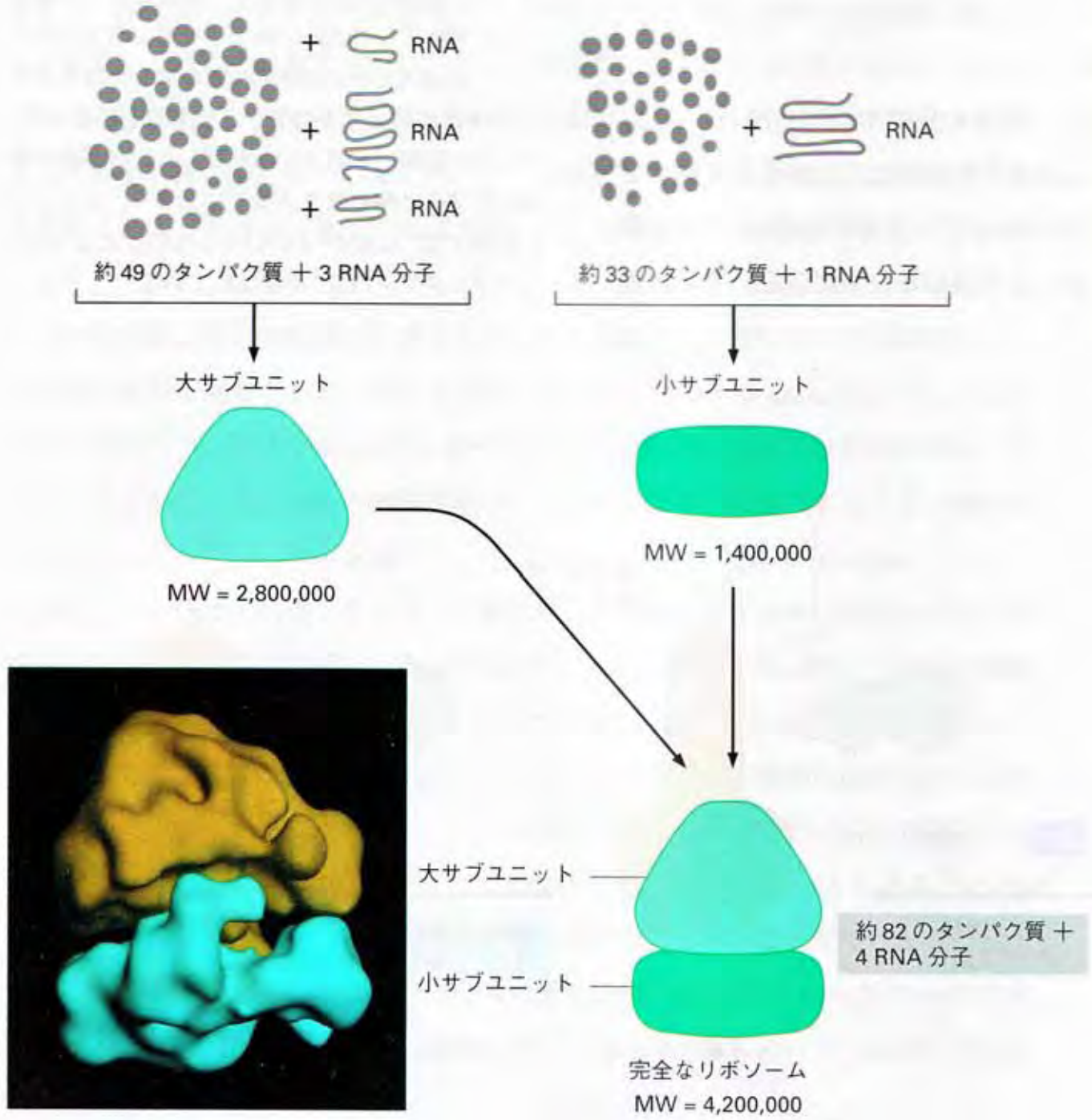
10 nm

1 nm → prion

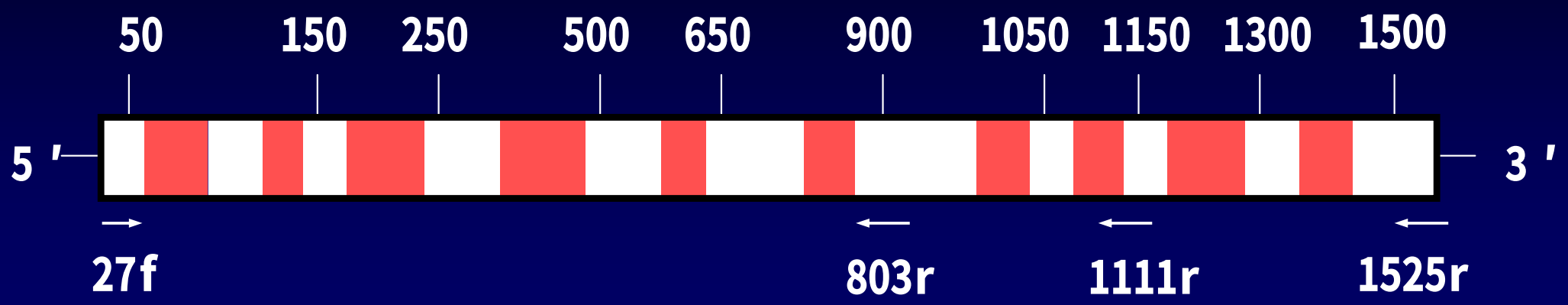





DNA
RNA polymerase
(rpoB gene)
mRNA
rRNA
(16S rRNA など)


+ RNA
+ RNA
+ RNA
約49のタンパク質＋3 RNA分子
+ RNA
約33のタンパク質＋1 RNA分子
大サブユニット
小サブユニット
MW = 2,800,000
MW = 1,400,000
大サブユニット
小サブユニット
約82のタンパク質＋
4 RNA分子
完全なリボソーム
MW = 4,200,000

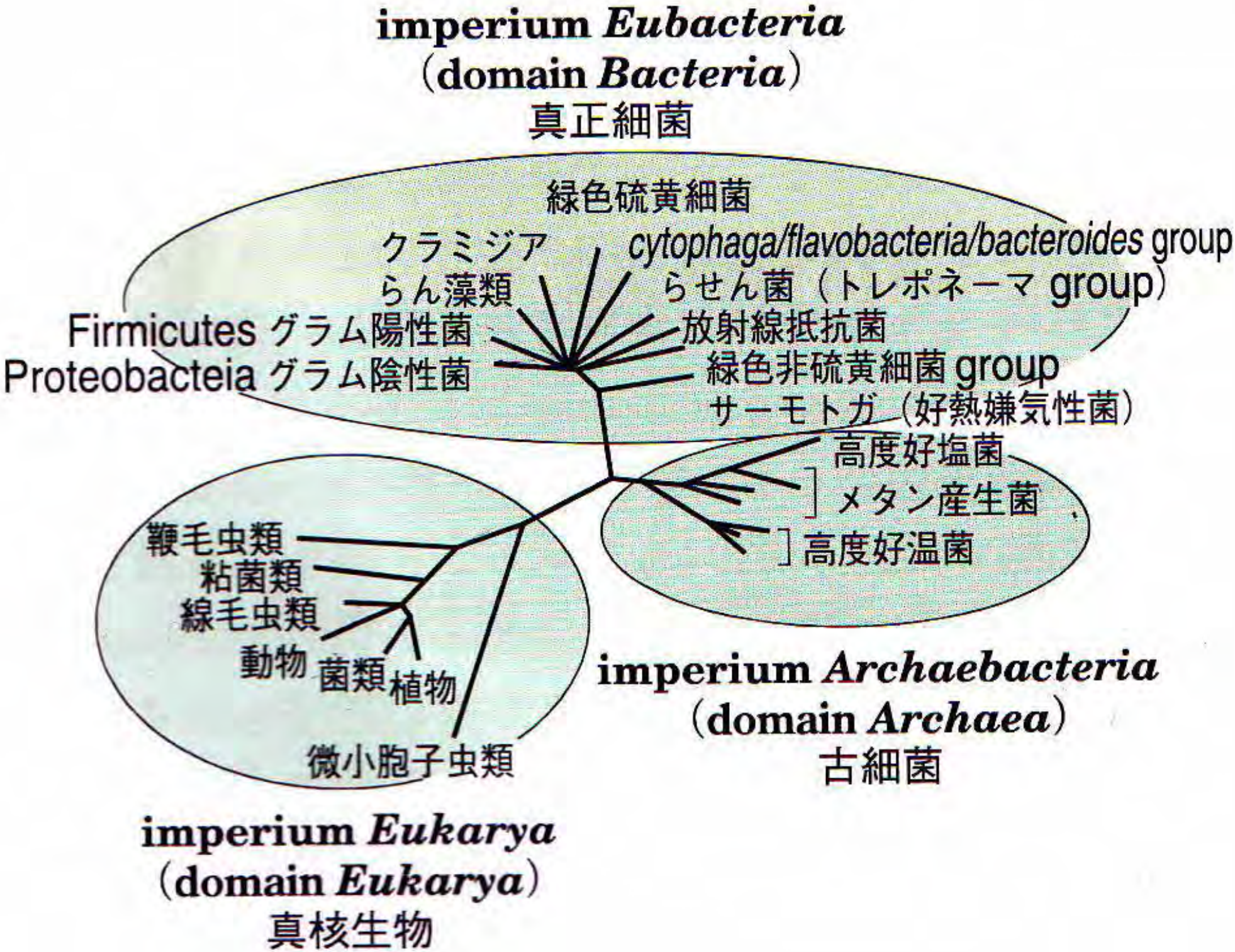
16S rRNA 遺伝子とプライマーの位置

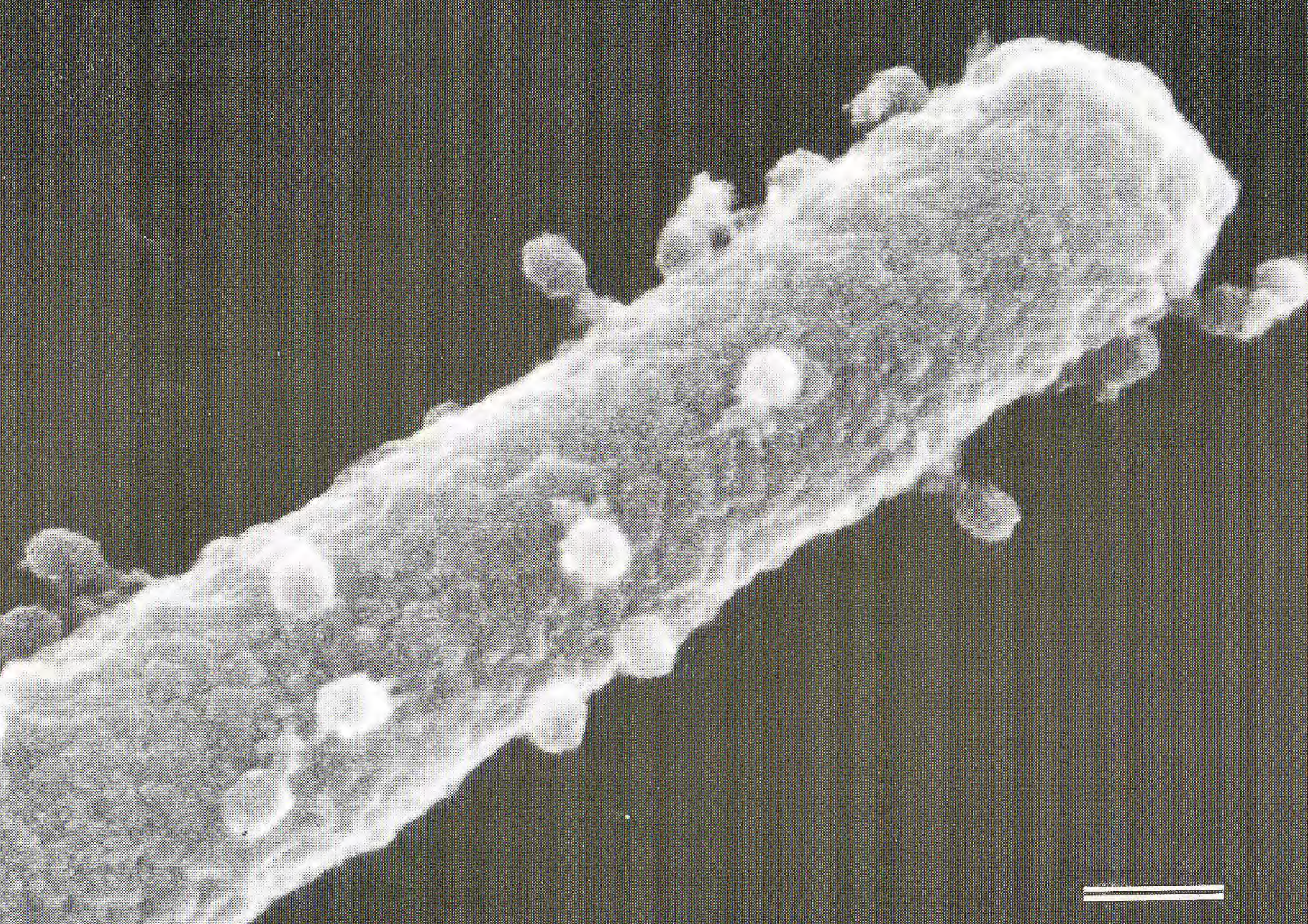


可変領域（ variable region ）

保存領域 （ conserve region ）

プライマー	方向性	塩基配列
27f	forward	5′ - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3′
803r	reverse	5′ - CATCGTTTACGGCGTGGAC - 3′
1111r	reverse	5′ - TTGCGCTCGTTGCGGGACT - 3′
1525r	reverse	5′ - AAAGGAGGTGATCCAGCC - 3′


imperium *Eubacteria*
(domain *Bacteria*)
真正細菌
緑色硫黄細菌
クラミジア
cytophaga/flavobacteria/bacteroides group
らん藻類
らせん菌（トレポネーマ group）
Firmicutes グラム陽性菌
放射線抵抗菌
Proteobacteia グラム陰性菌
緑色非硫黄細菌 group
サーモトガ（好熱嫌気性菌）
高度好塩菌
メタン産生菌
高度好温菌
鞭毛虫類
粘菌類
線毛虫類
動物
菌類
植物
微小胞子虫類
imperium *Archaebacteria*
(domain *Archaea*)
古細菌
imperium *Eukarya*
(domain *Eukarya*)
真核生物



感染性病原体の新たな同定法

１．感染症ってなに？

２．感染症を起こす微生物ってどんな生き物？

３．病院ではどうやって感染症を診断するの？

感染症の診断法

【鉄則】

患者さんから原因微生物を証明する。

しかし、ウイルスでは困難。

↓

抗体価の測定

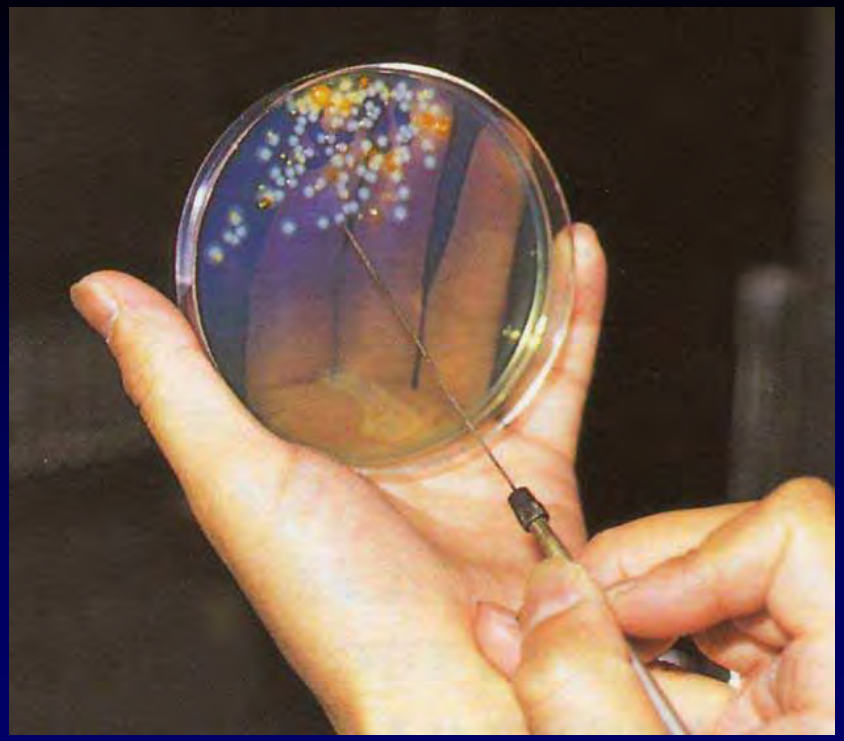
ＰＣＲによる核酸の証明

迅速診断キットによる微生物のタンパク（抗原）の証明

現行の分離同定法の問題点

1） 検体の種類から原因菌を予想して培養

- 頻度の低い原因菌を対象とした培養は行わない



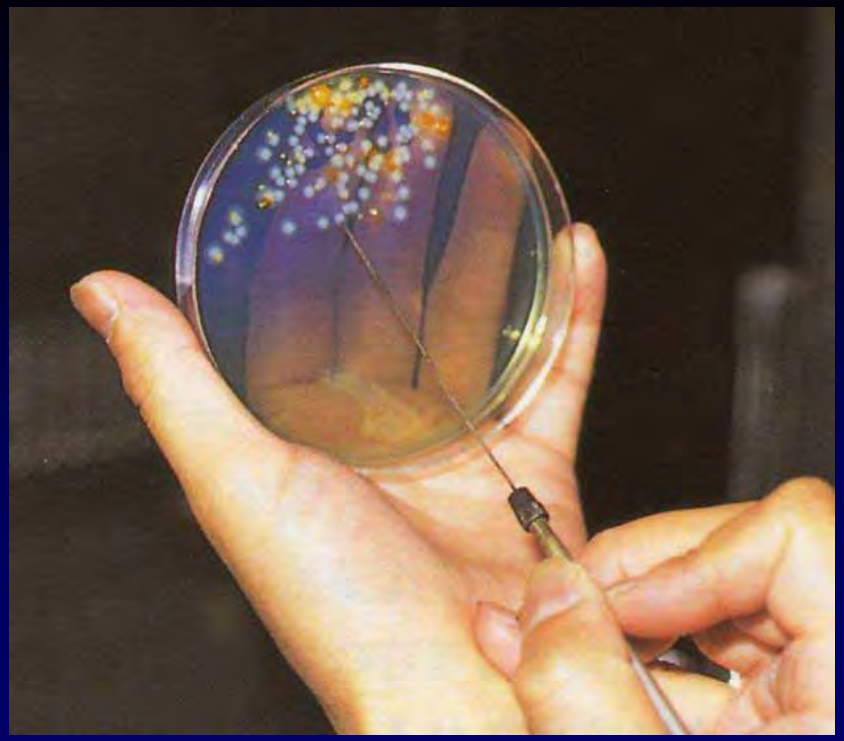
市中肺炎の主な起炎微生物

肺炎球菌	20~30％
インフルエンザ菌	15~25％
肺炎マイコプリズマ	15~20％
肺炎クラミドフィラ	15~20％
アンギノーサス菌群	10~20％
レジオネラ	5~10％
黄色ブドウ球菌	5~10％
嫌気性菌	5~10％
肺炎桿菌	3~ 8％
緑膿菌	2~ 5％

現行の分離同定法の問題点

1） 検体の種類から原因菌を予想して培養

- 頻度の低い原因菌を対象とした培養は行わない
- 培養法が確立していない菌は培養できない



地球上には何種類の細菌･真菌がいるのだろうか？

１００万種いると予想する学説がある

↓

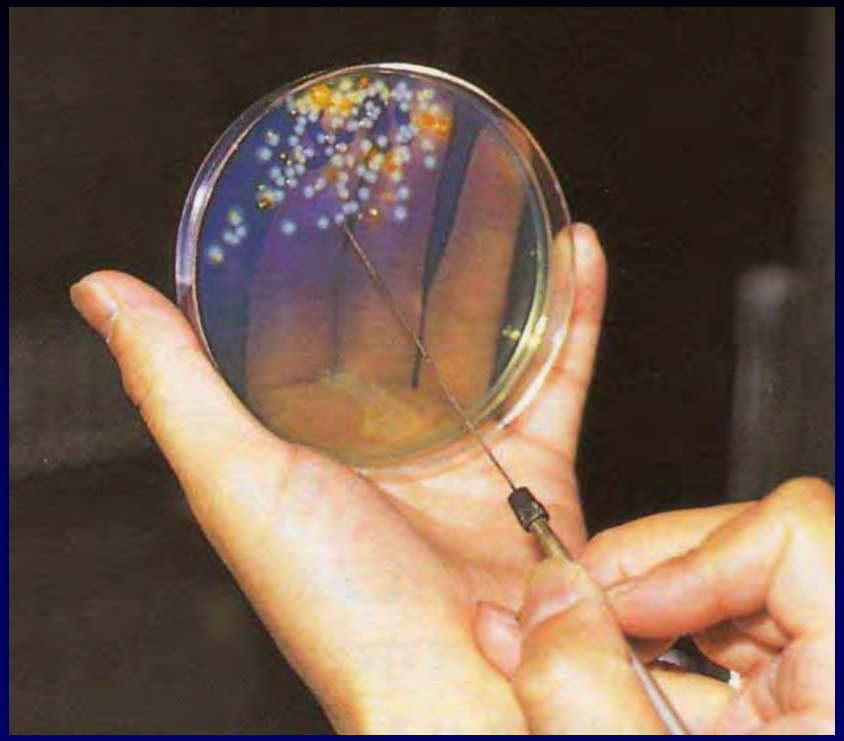
現在名前が付けられている菌はおよそ1万種

検体中の菌を培養せずにＤＮＡの解析から菌種を調べるという分野が発展してきた

・ 大腸には７０～８０種の菌がいる → １５０種いる

→ １０００種いる

現行の分離同定法の問題点



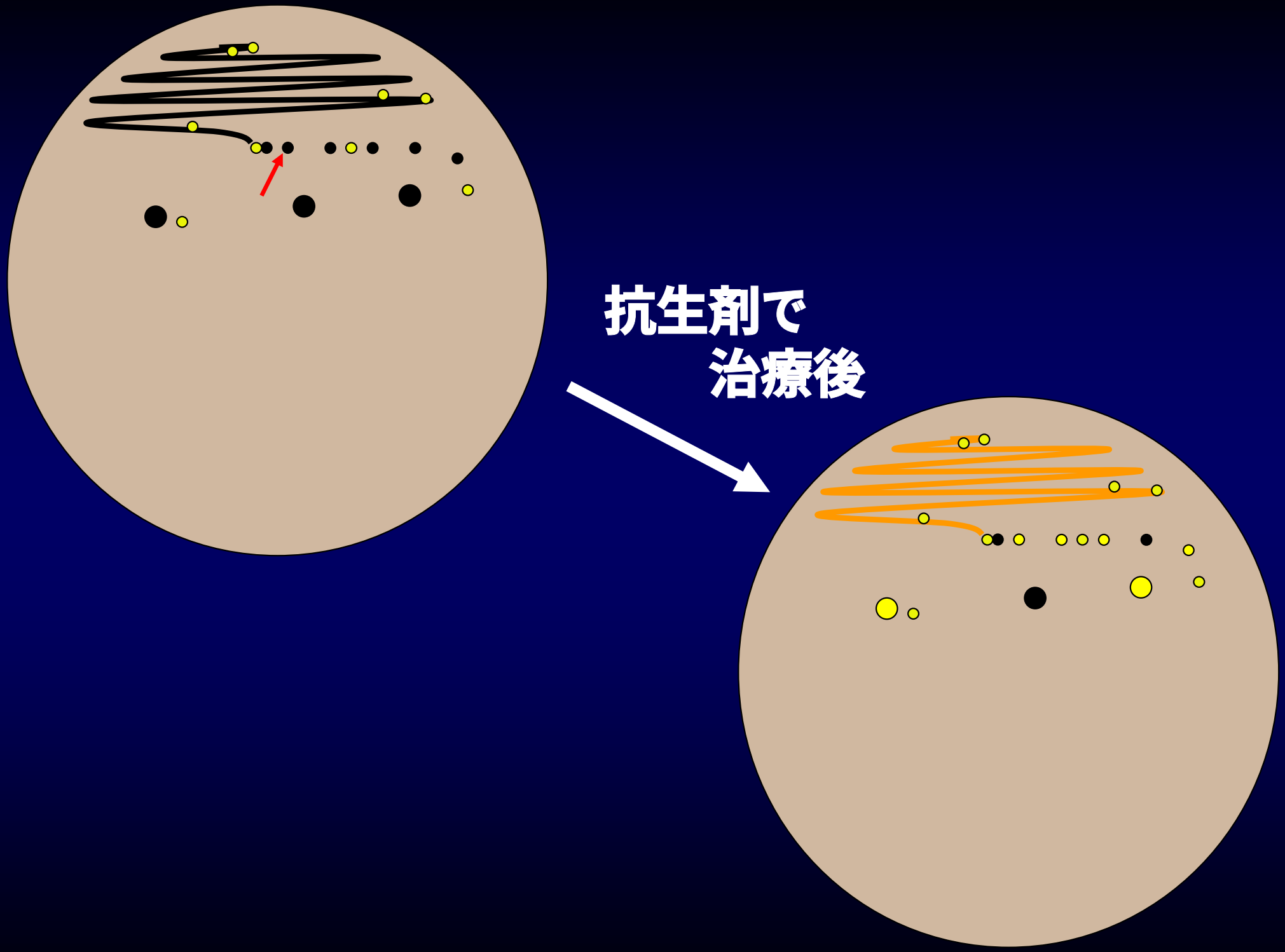
1） 検体の種類から原因菌を予想して培養

- 頻度の低い原因菌を対象とした培養は行わない
- 培養法が確立していない菌は培養できない

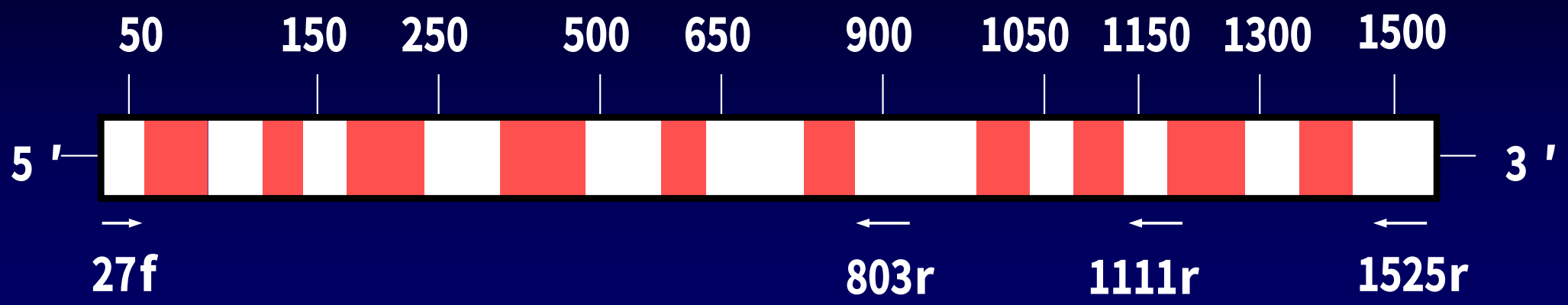
2） 生化学的な性状から同定できない菌がある

3） 多数あるコロニー中、1つ釣菌し、同定にまわす

- 一人から分離される1菌種が1株とは限らない


抗生剤で
治療後

16S rRNA 遺伝子とプライマーの位置



可変領域（ variable region ）

保存領域 （ conserve region ）

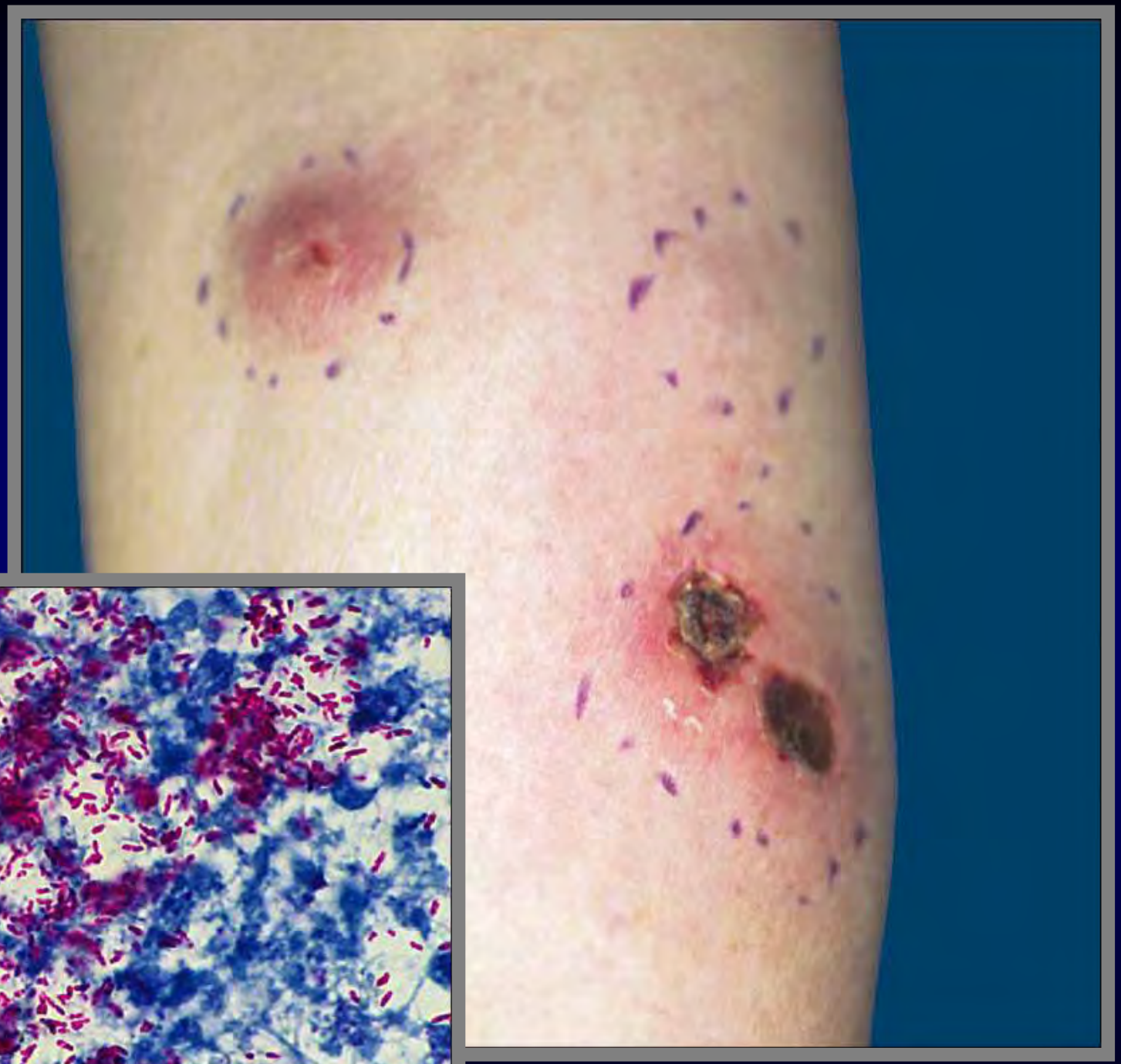
プライマー	方向性	塩基配列
27f	forward	5′ - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3′
803r	reverse	5′ - CATCGTTTACGGCGTGGAC - 3′
1111r	reverse	5′ - TTGCGCTCGTTGCGGGACT - 3′
1525r	reverse	5′ - AAAGGAGGTGATCCAGCC - 3′

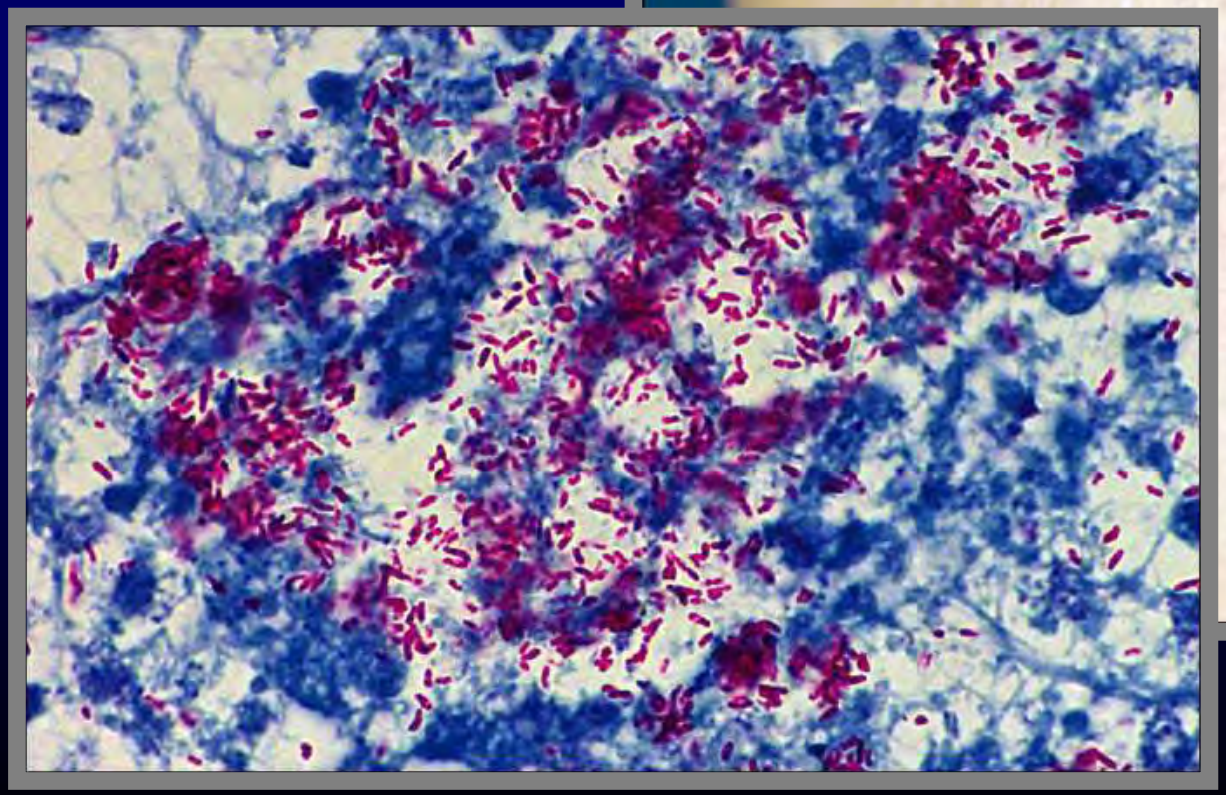
福島医大で分離された（2001～2004年）非結核性抗酸菌 214 株の解析結果

M. avium	131	*M. asiaticum*
M. gordonae	38	*M. fortuitum*
M. intracellulare	16	*M. triplex*
M. abscessus	7	*M. nonchromogenicum*
M. kansasii	4	*M. lentiflavum*
M. xenopi	3	*M. heckeshornense*
M. chimerae	2	*M. intermedium*
M. terrae	2	*M. gordonia*
M. shimoidei	2	
		M. gastri or kansasii

【症例】

６２歳　女性
両前腕部に
痛みのない
４つの結節
が出現





Seishima et al.
Arch Dermatol. 142: 249-250, 2006

【症例】　８６歳 / 男性

【主　訴】　背部痛

【現病歴】　平成１６年１２月誘因なく背部痛が出現し、近医受診。
化膿性脊椎炎の疑いで当科に紹介され、入院となった。

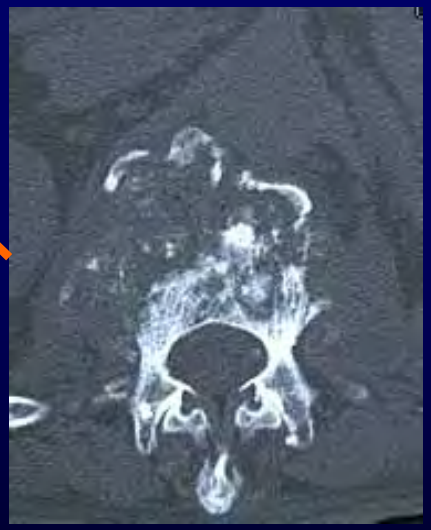
【入院時現症】　安静時痛･夜間痛なし
背部痛のため体動困難
胸腰椎移行部に棘突起部の叩打痛あり

【既往歴】　平成１４年9月　尿管腫瘍および膀胱腫瘍に対し
左腎盂尿管全摘出術と経尿道的膀胱切除術
平成１４年１０月　骨盤内動注化学療法
平成１５年　1月　ＢＣＧ療法（週1回、合計8回）

腰椎ＣＴ

矢状断像

Th12



L1

横断像

【症例】　８６歳 / 男性

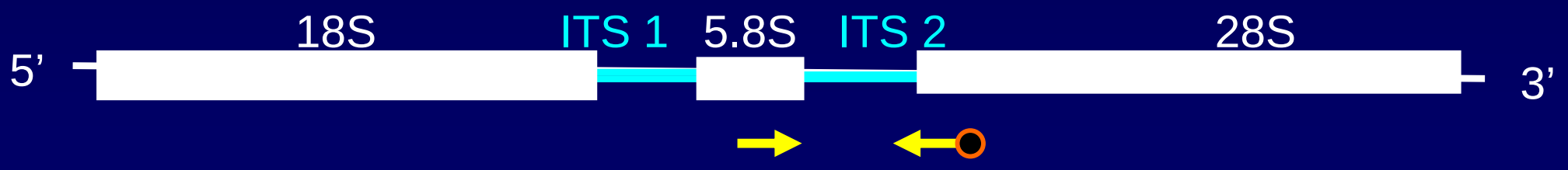
【主　訴】　背部痛

【現病歴】　平成１６年１２月誘因なく背部痛が出現し、近医受診。
化膿性脊椎炎の疑いで当科に紹介され、入院となった。

【入院時現症】　安静時痛･夜間痛なし
背部痛のため体動困難
胸腰椎移行部に棘突起部の叩打痛あり

【既往歴】　平成１４年9月　尿管腫瘍および膀胱腫瘍に対し
左腎盂尿管全摘出術と経尿道的膀胱切除術
平成１４年１０月　骨盤内動注化学療法
平成１５年　1月　ＢＣＧ療法（週1回、合計8回）

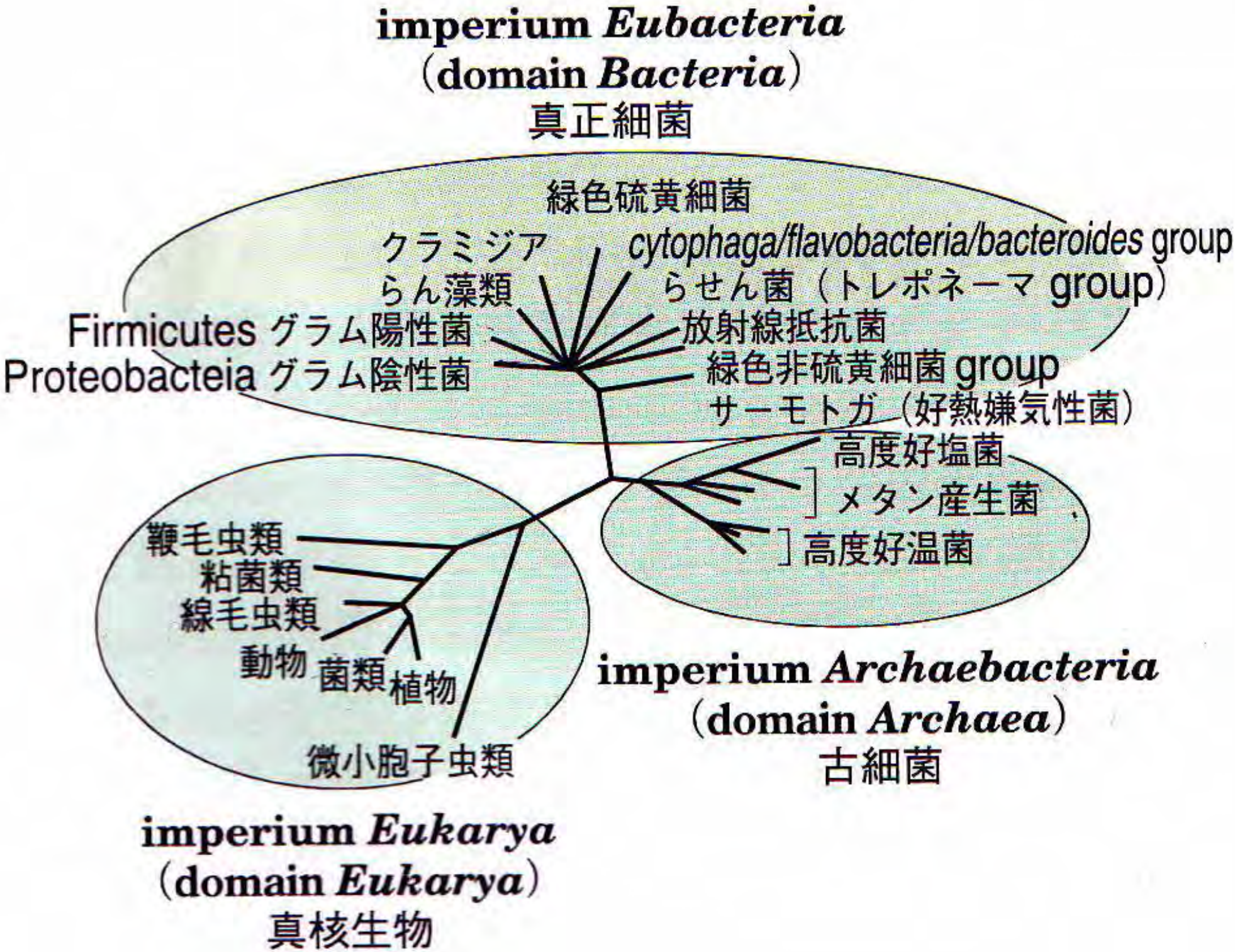
真菌のPCRターゲット領域



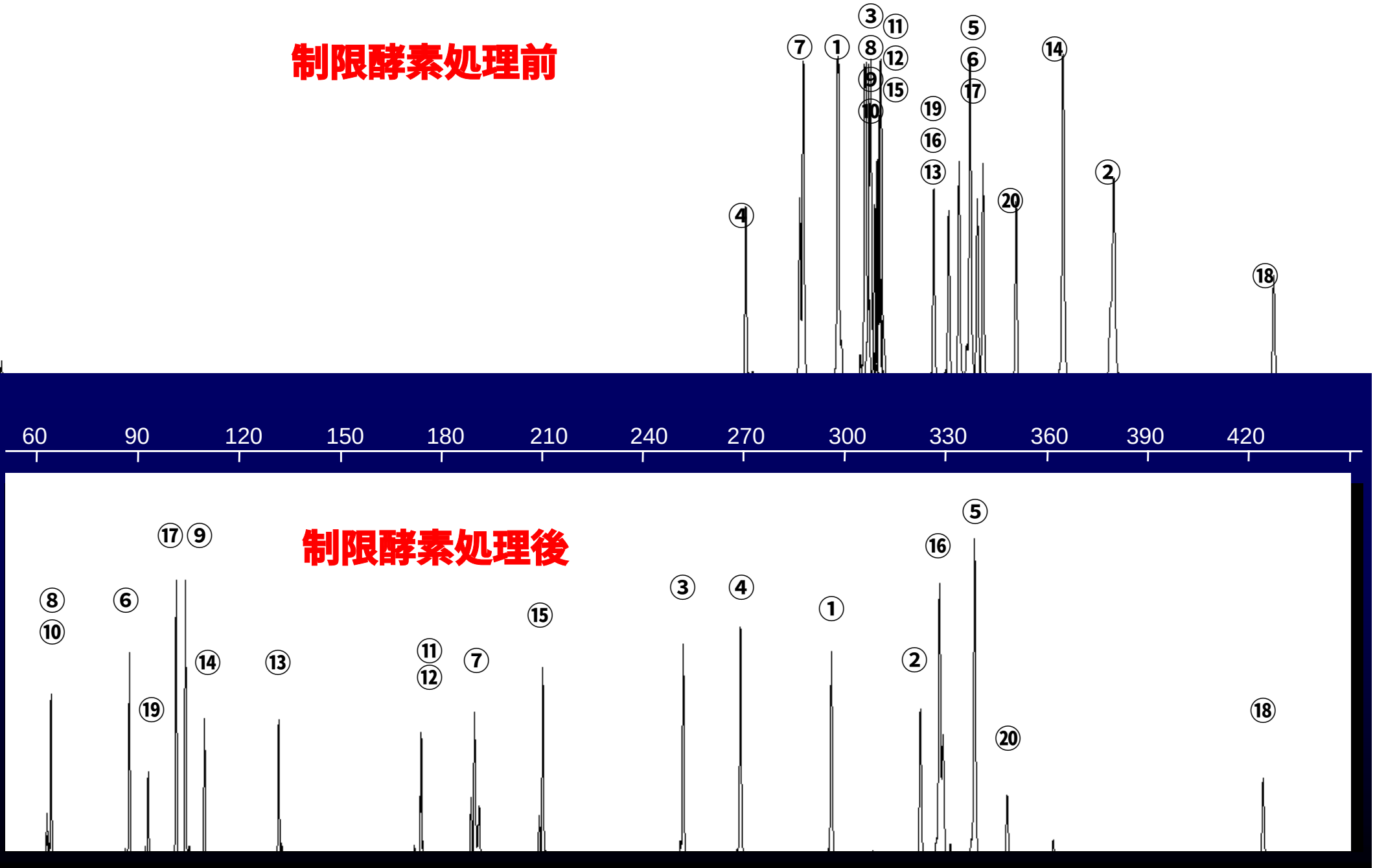
リボゾーマル RNA 遺伝子

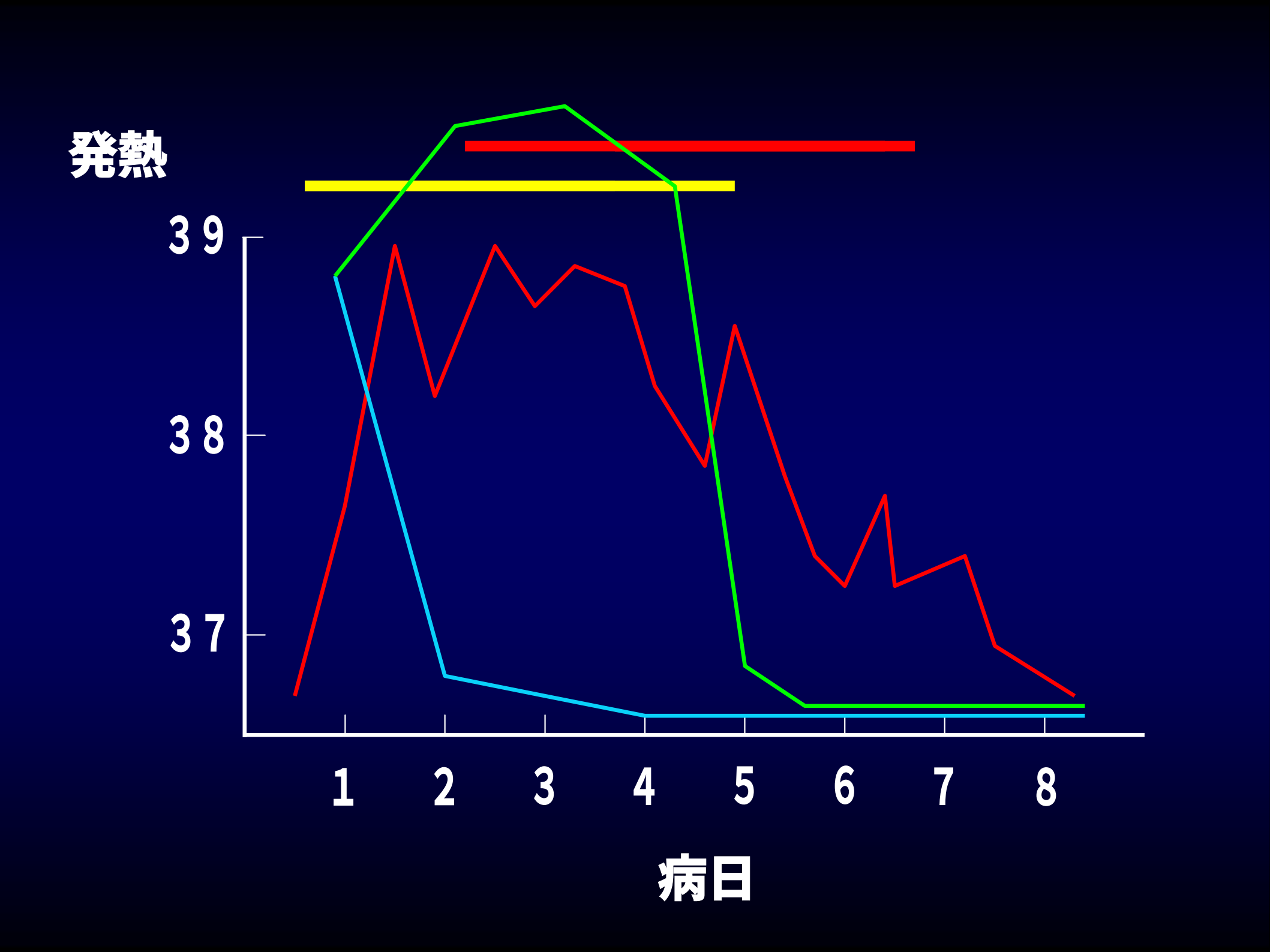
ITS 領域

5’ NED（蛍光色素）


imperium *Eubacteria*
(domain *Bacteria*)
真正細菌
緑色硫黄細菌
クラミジア
cytophaga/flavobacteria/bacteroides group
らん藻類
らせん菌（トレポネーマ group）
Firmicutes グラム陽性菌
放射線抵抗菌
Proteobacteia グラム陰性菌
緑色非硫黄細菌 group
サーモトガ（好熱嫌気性菌）
高度好塩菌
メタン産生菌
高度好温菌
鞭毛虫類
粘菌類
線毛虫類
動物
菌類
植物
微小胞子虫類
imperium *Archaebacteria*
(domain *Archaea*)
古細菌
imperium *Eukarya*
(domain *Eukarya*)
真核生物

GeneScanによる病原性真菌20種の同定




発熱
39
38
37
1
2
3
4
5
6
7
8
病日

福島県立医科大学 大学院

修士課程

博士課程