

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006年度～2009年度

課題番号：18405005

研究課題名（和文） 中央アジアにおける真菌症原因菌および関連菌の生態学的研究

研究課題名（英文） Study on ecology of pathogenic fungi and relative in Central Asia

研究代表者

矢口 貴志 (YAGUCHI TAKASHI)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号：60361440

研究成果の概要(和文):中央アジアにおける真菌症原因菌および関連菌を生活環境から分離し、その多様性を明らかにし、日本国内の菌株と形態的、分子系統的な違いを検討した。その結果、病原性 *Aspergillus* のうち、非典型的な *A. fumigatus* はこの地域での分離頻度が日本国内より高いことが判明した。薬剤感受性の違いから臨床上それらを迅速に識別する方法が求められていることから、分子的な手法を応用した同定法を開発した。また、関連する未知の菌種を新種として報告した。

研究成果の概要(英文): We isolated pathogenic fungi and relative species from a life environment in Central Asia, and studied their diversity and the difference from Japanese strains on morphology and phylogeny. As the results, it was clear that the isolation frequency of atypical *Aspergillus fumigatus* species was high compared with those of Japan. It is necessary to discriminate those species because their susceptibility against antifungal drugs different. Therefore we developed the methods of quick identification on those species using molecular methods. We also reported unknown strains as new species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2007年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2008年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生態・環境

キーワード：遺伝子、生態学、真菌、微生物、分類学

1. 研究開始当初の背景

中央アジアでは、衛生状態が悪いことから皮膚真菌症の患者が多く、とくに子供においては頭部白癬が頻繁に見られ、社会問題となっている。また、近年、エイズ患者など免疫不全患者の増加にともない、真菌症も増加している。また、近年、中国とは人的交流は活

発になり、穀物、野菜、果物、食肉、魚肉、加工食品など多くの食品が輸入され、さらに鳥類、爬虫類、小動物もペットとして輸入されている。そのため、真菌症原因菌が国内に流入する可能性は非常に高くなっている

この地域の菌株の遺伝子型は、歴史的なヒトの変遷と病原真菌の生態との関連があると予想され大変興味深い。

2. 研究の目的

中央アジアにおける真菌症原因菌の多様性、生態系を明らかにし、日本国内の菌株と形態的、分子系統的な違いを検討する。

3. 研究の方法

(1) 調査期間は平成 18 年は 9 月に 10 日間、平成 19 年は 9 月に 4 日間、平成 20 年は 10 月に 4 日間、平成 22 年は 8 月に 3 日間、場所は中国新疆ウイグル自治区の半砂漠やサバナなど乾燥地帯を中心に実施した。調査には新疆医科大学 惠教授、Paride Abliz 助教授が同行し、採集地選択の助言、現地案内人と意志の疎通を図った。

(2) 試料採集後、新疆医科大学の研究室で土壌から、希釈平板法およびエタノール処理法によって病原真菌関連菌、マイコトキシン生産菌およびそれらの関連真菌などを分離した。

(3) 病原性 *Aspergillus* のうちとくに、薬剤感受性が異なるため临床上重要である *A. lentulus*、*A. udagawae* など非典型的な *A. fumigatus* を中心に分離を実施した。さらに、近年、新種として報告された *A. fumigatiaffinis* も分離の対象とした。*Aspergillus* の有性型である *Neosartorya*、*Emericella* 属においては、千葉大学真菌医学研究センターで、分子系統的な検討、電子顕微鏡による微細構造の検討を実施した。

(4) *Fonsecaea* 属は、黒色真菌の 1 種であり表在性真菌症原因菌として重要である。日本産および中国産の *F. pedrosoi* において ITS 領域による系統解析を実施し、de Hoog 等 (2004) のデータを検証した。

4. 研究成果

(1) *Aspergillus* は、土壌やハウスダストをはじめとする生活環境中にきわめて多く棲息する。その中でも、真菌症原因菌種 *Fumigati*、*Nigri*、*Flavi*、*Terrei*、*Nidulantes* の各節 (Section) において、新疆ウイグル自治区と日本の土壌からの分離頻度を比較した。真菌症原因菌のうち最も重要な種は *A. fumigatus* であるが、近年、*A. fumigatus* と形態的に非常に類似するが分子系統的には区別可能な *A. lentulus*、*A. udagawae* などは薬剤感受性の違いから臨床的に重要視され、正確な同定が求められている。これら非典型的 *A. fumigatus* に着目し分離を実施した。

Aspergillus 関連菌類の出現頻度を表 1 に示した。新疆自治区の土壌からは日本と比較して非典型的な *A. fumigatus* の分離頻度が高かった。乾燥地帯であるオーストラリアでは非典型的 *A. fumigatus* である *A. viridinutans* が高頻度で分離されていた。また、スペインでは *Aspergillus* 関連菌類による真菌症のうち、非典型的な *A. fumigatus* である *A. lentulus* が原因となる比率が高くなっていった。これらは非典型的な *A. fumigatus* は乾燥地域での分布が高いという同様の結果であった。

β -チュブリンなど 4 遺伝子を使用しての系統解析の結果、どの遺伝子ともほぼ同様の系統樹を示し、Section *Fumigati* に属する菌種は 5 つのクラスター I. *A. fumigatus* が属する菌群、II. *A. lentulus*、*A. fumisynnematus* が属する菌群、III. *A. fumigatiaffinis*、*A. novofumigatus* が属する菌群、IV. *A. udagawae*、*A. viridinutans* が属する菌群、V. *A. brevipes* などが属する菌群に分かれた。

表 1. *Aspergillus* 属種別の土壌から分離頻度

	新疆自治区		日本	
	376 (検体)		200 (検体)	
<i>A. fumigatus</i> s. s.	51	14%	65	33%
非典型的 <i>A. fumigatus</i>	27	7%	1	0.5%
<i>A. niger</i> 関連種	188	5%	56	28%
<i>A. flavus</i> 関連種	38	1%	5	2.5%
<i>A. terreus</i> 関連種	71	19%	27	14%
<i>A. nidulans</i> 関連種	51	14%	5	2.5%

方法: 土壌平板法, ¼ PDA + chloramphenicol, 37°C, n = 3

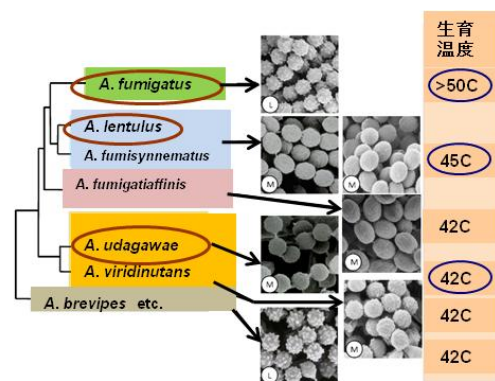


図 1. *A. fumigatus* 及び関連種の分子系統、形態、生育温度の関連

SEM による分生子の表微細構造の観察では、I、V に属する菌株は刺状突起、II、III、*M. udagawae* 近縁種は小コブ状の隆起、*A. viridinutans* は中間的な形状を示した。生育温度は、I が 50°C でもよく生育するのに対して、II、III は 45°C まで、IV、V は 42°C まで成育し、明らかな違いがみられた。

図 1 には、分子系統、分生子の表微細構造、最高生育温度の関連をまとめたが、これらには相関関係が認められ、非常に納得性のある分類と言える。このうち生育温度の違いは、簡便な分類に利用可能である。

また、各種抗真菌薬に対する感受性は、*A. lentulus*、*A. udagawae* は アムフォテリシン B およびアゾール系の薬剤に対して、最小阻止濃度 MIC が高めの値を示した。さらに、分子系統における解析結果を用いて、*A. fumigatus*、*A. lentulus*、*A. udagawae* の迅速同定法、検出法の検討を行った。各菌種それぞれに特異的なプライマーを設計し、3 種を識別することができた (図 2)。この検出用プライマーの妥当性評価を検出目的の複

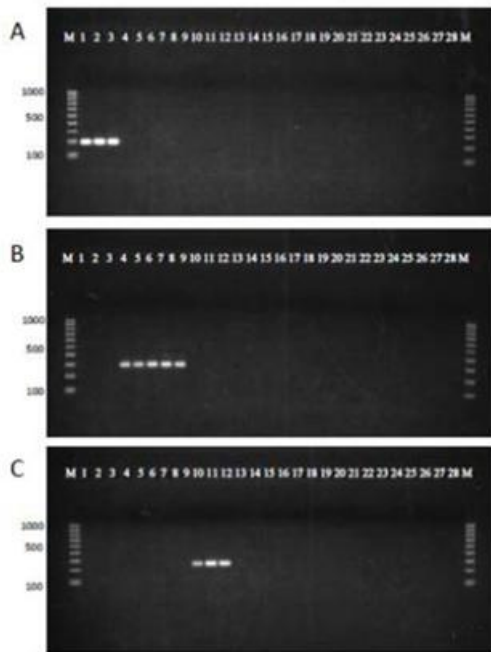


図 2. 特異的なプライマーによる PCR 反応
1-3. *A. fumigatus*, 4-6. *A. lentulus*, 7, 8. *A. fumisynnematus*, 9-11. *A. udagawae*, 12-14. *A. fumigatiaffinis*, 15. *A. novofimigatus*, 16. *A. brevipes*, 17. *A. duricaulis*, 18. *A. unilateralis*, 19. *A. viridinutans*, 20. *N. fischeri*, 21. *N. glabra*, 22. *N. hiratsukae*, 23. *N. pseudfischeri*, 24. *N. spinosa*, 25. *A. flavus*, 26. *A. niger*, 27. *A. terreus*, 28. *A. nidulans*.

数菌株及び様々なカビの DNA を用いて行ったところ、疑陽性、疑陰性共に認められず、プライマーの妥当性が認められた。

(2) *Neosartorya*、*Emericella* の新種と思われる菌株においては、分子系統、微細構造などさらに詳細な検討を実施し、新種としての妥当性を評価した。その結果、検討した複数の遺伝子による系統樹において、複数株が単系統の分岐群を示し (図 1 1)、形態的のも既存の種と違いが認められた (図 3-1 0)。以上より、新種 *Neosartorya shendawei* Yaguchi, Abliz & Y. Horie, sp. nov.、*Neosartorya tsunodae* Yaguchi, Abliz & Y. Horie, sp. nov. として発表した。

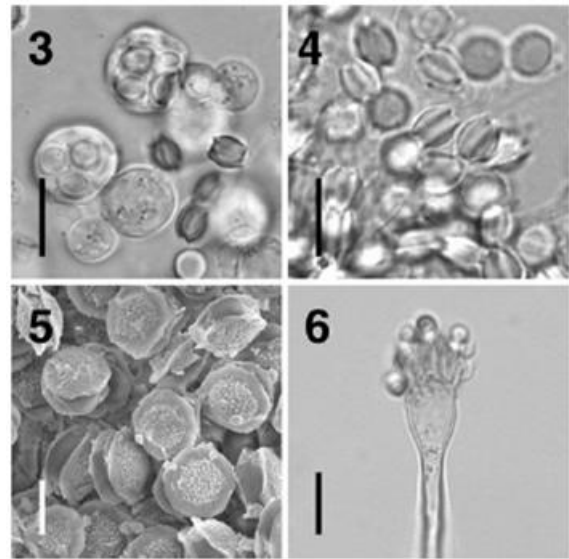


図 3-6. *Neosartorya shendawei*.

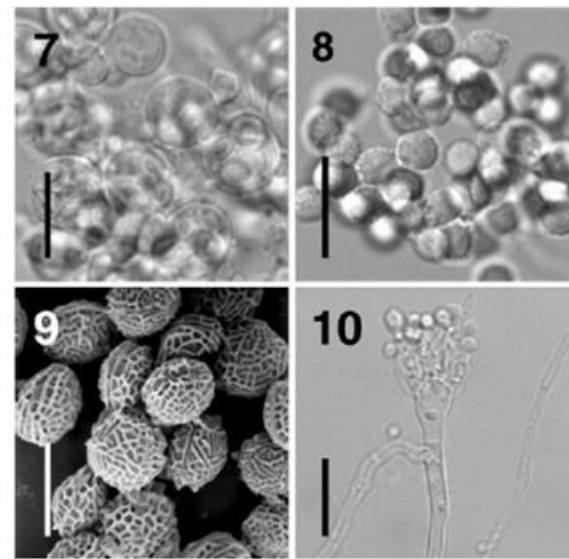


図 7-1 0. *Neosartorya tsunodae*.

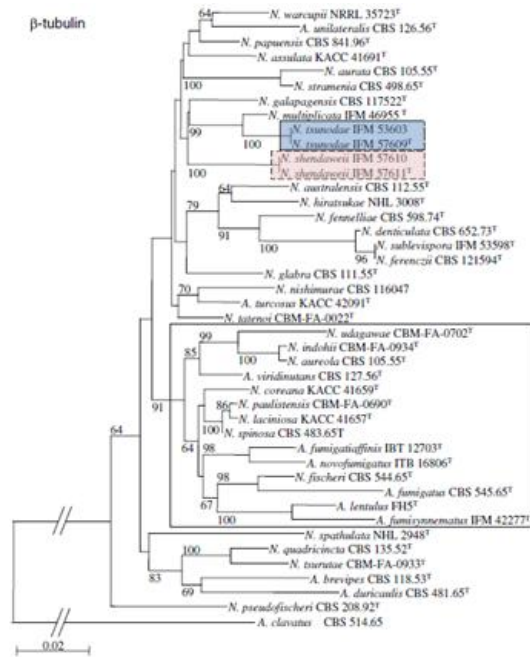


図 1 1. *Neosartorya* 属および関連種の系統関係 (β -チューブリン 遺伝子、近隣結合法)。

(3) 日本、中国産の *F. pedrosoi* は彼らの提唱する *F. monophora* と同一種内のクラスターとして 1 つにまとまった。さらに、*F. monophora* の種内において系統が 3 つに分かれ、分離地域との関連みられ、日本、中国産の株は、他の地域産の株と別系統であることがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Yaguchi T, Matsuzawa T, Tanaka R, Abliz P, Hui Y, Horie Y: Two new species of *Neosartorya* from soil in Xinjiang, China. *Mycoscience* **51**: 253-262, 2010. (査読有)
- ② Matsuzawa T, Tanaka R, Horie Y, Gono T, Yaguchi T: Development of rapid and specific molecular discrimination methods in the pathogenic *Emericella* species. *Jpn J Med Mycol* **51**: 109-116, 2010. (査読有)
- ③ Mijiti J, Pu XM, Erfan A, Yaguchi T, Chibana H, Tanaka R: Genotyping of fluconazole-resistant *Candida albicans* isolated from Uighurian living in Xinjiang (China), using

ALTS/RFLP and μ -TGGE method. *Jpn J Med Mycol* **51**: 165-168, 2010. (査読有)

- ④ Yaguchi T, Horie H, Tanaka R, Matsuzawa T, Ito J, Nishimura K: Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from clinical specimens in Japan. *Jpn J Med Mycol* **48**: 37-46, 2007. (査読有)
- ⑤ Yaguchi T, Tanaka R, Nishimura K, Udagawa S: Molecular phylogenetics of strains morphologically identified as *Fonsecaea pedrosoi* from clinical specimens. *Mycoses* **49**: 255-260, 2007. (査読有)
- ⑥ Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, Hong S-H, Yaguchi T, Varga J, Samson RA: *Aspergillus* Species Identification in the Clinical Setting. *Studies in Mycology* **59**: 39-46, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 38 件)

- ① Yaguchi T, Matsuzawa T, Imanishi Y, Tanaka R: Identification and discrimination of the pathogenic *Aspergillus fumigatus* and relative species. The 5th Thai Mycological Conference, Bangkok, Thailand. Abstracts Book p9, December 7, 2010.
- ② Yaguchi T, Imanishi Y, Matsuzawa T, Tanaka R, Horie Y: Identification and discrimination of the pathogenic *Aspergillus fumigatus* and relative species. 9th International Mycological Congress IMC9: The Biology of Fungi, August 1-6, 2010.
- ③ Yaguchi T, Matsuzawa T, Imanishi Y, Tanaka R: Development of rapid and specific molecular discrimination methods in the pathogenic *Aspergillus fumigatus* and relatives. The First Forum on Advances of *Aspergillus* and Aspergillosis, Chengdu, China. Proceedings p113, July 16-18, 2010.
- ④ Yaguchi T, Matsuzawa T, Imanishi Y, Tanaka R: Development of rapid and specific molecular discrimination methods in the pathogenic *Aspergillus fumigatus* and relatives. 4th Advances Against Aspergillosis, Rome, Italy. February 4-6, 2010.
- ⑤ Yaguchi T, Tanaka R, Matsuzawa T, Abliz P, Hui Y, Horie Y: Classification of the pathogenic *Aspergillus* section *Fumigati* and

Neosartorya based on phylogenetic analysis, and value based on the morphology. The 17th Congress of ISHAM, Tokyo, May 25-29, 2009.

- ⑥ Yaguchi T, Hiro Y, Matsuzawa T, Tanaka R, Hosoya K, Nakayama M, Tokuda H: Classification and distinction for pathogenic species of *Aspergillus* section *Fumigati*. The 17th Congress of ISHAM, Tokyo, May 25-29, 2009.
- ⑦ Yaguchi T, Horie Y, Matsuzawa T, Tanaka R, Abliz P, Hui Y: Polyphasic taxonomy of pathogenic *Aspergillus fumigatus* and related species in Japan and Xinjiang, China. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum Symposium, Proceedings p 53, Changchun, China, July 29, 2008.
- ⑧ Yaguchi T: Classification of the genus *Neosartorya* based on morphology. 25th Annual Conference Microscopy Society of Thailand, Proceedings pp. 4-5, Phitsanulok, Thailand, January 10, 2008.
- ⑨ Yaguchi T: Pathogenic species in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Aspergillus* systematics in the genomic era An international workshop. Programme, participants and abstracts pp34-35, Utrecht. April 13, 2007.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: アスペルギルスフミガタス (*Aspergillus fumigatus*) 類縁菌の検出方法

発明者: 細谷 幸一、中山 素一、徳田 一、矢口 貴志、弘 佑介

出願人: 花王株式会社、国立大学法人 千葉大学

種類: 特許

番号: 特開 2010-115122

出願年月日: 平成20年11月11日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢口 貴志 (YAGUCHI TAKASHI)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号: 60361440

(2) 研究分担者

田中 玲子 (TANAKA REIKO)

千葉大学・真菌医学研究センター・助教

研究者番号: 60143319

(3) 連携研究者

堀江 義一 (HORIE YOSHIKAZU)

千葉大学・真菌医学研究センター・非常勤講師

研究者番号: 40092093

(H18→H20: 研究分担者)