科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号: 17301

研究種目: 挑戦的研究(萌芽)

研究期間: 2018~2019

課題番号: 18K19684

研究課題名(和文)熱帯乾燥気候の新環境医学に関する萌芽的探索:真菌菌腫からのアプローチ

研究課題名(英文)An exploratory research for new environmental medicine at dry climate in tropical area: an approach from fungal mycetoma research

研究代表者

金子 聰 (KANEKO, Satoshi)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号:00342907

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文):マイセトーマの感染マッピングに必要となる基礎技術の開発と実証試験を目的に、スーダン・ハルツーム大学マイセトーマ臨床センターを受診する真菌菌腫患者の居住地域から土壌(70サンプル)を採取し、次世代シーケンシングによる環境DNA測定により真菌種を同定した。土壌サンプルからのDNA抽出は、エタノール沈殿法により、現地にて実施、素材移転契約(MTA)に準拠し、神戸大学に搬送、DNAライブラリ調整実験ののち、長崎大学熱帯医学研究所において、次世代シークエンサーによる解析を実施した。その結果、全サンブルを合計して21種のマイセトーマ原因真菌のDNAを検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義 熱帯乾燥地域における健康問題については、その情報が非常に不足している。中でも感染後、重症化した際には 外科的切断が必要となる真菌菌腫の問題は、公衆衛生上の大きな問題であるにもかかわらず、その対策の基礎と なる情報の収集が遅れている。本研究により、環境DNA技術を応用した同感染症のリスク・マップの作成に向け た基礎データを得ることが出来た。今後、調査地域の拡大により、真菌菌腫の原因真菌の検出と感染発生地域の 特定、さらには、対策の策定、住民への教育・予防に向けた取組に繋げ、地域における環境と予防のための情報 収集を介した熱帯乾燥地における新しい環境医学の芽生えから次の段階へと繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文): In order to establish and verify a basic technology for mapping of infectious areas of mycetoma-related fungus species, 70 soil samples were collected mostly from a region on a trial basis, mainly the residential area of mycetoma patients who visited the Mycetoma Clinical Center of Khartoum University in Sudan. We specified fungus species by environmental DNA measurement using a next-generation sequencing technology. DNAs were extracted in Sudan from soil samples by the ethanol precipitation method; which they were transferred to Kobe University according to MTA (Material Transfer Agreement) in order to prepare a DNA genome library of fungus species; then they were analyzed by a next-generation sequencer at the Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University. Finally, we identified the DNA of 21 species which cause mycetoma in total.

研究分野: 疫学

キーワード: 熱帯乾燥地域 公衆衛生 感染症 真菌菌腫 環境DNA 健康問題 アフリカ 環境医学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等に ついては、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様 式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

持続可能な開発目標(SDGs)の第3目標においては、「全ての人々に健康的な生活の確保と福祉の提供」を目指し、国際的に様々な活動が行われている。これまで、国際社会において、顧みられてこなかった熱帯感染症の一群である「顧みられない熱帯病(NTDs)」についても、同目標のターゲット3.3に記載され、一部のNTDsへの関心が高まっている。そのような中、NTDsの中でもほとんど手付かずの感染症も未だ存在している。その一つが真菌性菌腫(マイセトーマ)である。

真菌性菌腫は Madurella mycetomatis を主体とする真菌群が皮膚、もしくは皮下組織に感染し、その後、深部組織にも達する浸潤性の慢性肉芽腫を主体とする感染症である。熱帯・亜熱帯地域(北緯30度から南緯15度)に分布し、その範囲は、マイセトーマベルトと呼ばれ、感染が集中している。慢性肉芽腫がさらに進行すると、皮膚から皮下組織、骨組織まで浸潤し、治療法として外科的切断を余儀なくされる。さらに、血流やリンパ系を介して、様々な部位に転移することで重症化し、切断を要するなど、悪性腫瘍に似た進行様式を呈する。脳への転移により死に至るケースもある。また知覚障害や運動障害、社会的差別や偏見を引き起こし、社会的排除による貧困の連鎖を助長している[1]。このように重篤な感染症にも関わらず、国際的認知度が低く、診断、治療、予防のいずれにおいても十分な解明がされていないのが実態である。

2.研究の目的

熱帯・亜熱帯乾燥地域における環境医学の構築を目指し、感染源と考えられる土壌サンプルを用いた環境 DNA 測定による病原真菌群の検出、さらには、感染リスク・マップ作成に向けた基礎技術の開発を本研究での目的とした。

3. 研究の方法

調査対象地域を大部分が乾燥気候に属し、国土面積が日本の5倍のスーダン共和国に設定した。 同国は、真菌菌腫が多く報告される地域としても知られており、世界で唯一の真菌性菌腫を専門と するハルツーム大学真菌菌腫研究センターが設置されている。同センターには、真菌菌腫の医療 専門家がおり、同国の真菌菌腫患者のみならず、世界各地の真菌菌腫患者が受診している。本研 究では、同センターの協力を得て、真菌菌腫の病原菌に関する環境調査を実施する事とした。

(1) 遺伝資源へのアクセスと利益配分(ABS: Access and Benefit Sharing) に関する手続き スーダン国内での保健医療調査は、スーダン政府によって厳密に制限されていることから、共 同研究機関であるハルツーム大学を介して、すべての許可を取得した。 また本研究では、土壌中の真菌について、日本国内において次世代シークエンスによる解析を 行うことを計画していたこと、さらに、そのサンプルの国内への搬入、つまり、遺伝子資源へのア クセスについては、名古屋議定書および生物多様性条約に従う必要があったことから、研究開 始前に、長崎大学熱帯医学研究所、ハルツーム大学真菌菌腫研究センター、神戸大学大学院 人間発達環境学研究科の三者による MOA(合意覚書)を含んだ MTA(素材移転契約)を締結し た

(2) 土壌サンプルからの DNA 抽出法の検討と感染者発生地域の把握

スーダンでの現地調査に先立ち、スーダンの限られた研究資材と研究環境において、効率的に 土壌中の DNA を抽出するための方法を検討した。また、ハルツーム大学真菌菌腫研究センターより、同センターを受診する患者の居住地データの提供を受け、その解析から患者の出身地域・村の地理的データ解析を実施。実際にスーダンにおいて、土壌サンプルの採取地域を選別した。

(3)土壌サンプルの採取

上記解析から把握された患者発生頻度が多い地域から、10 村を選択したのち、衛生画像データを用い、 居住地域、 農耕地域、 道路、 水路近辺の分類のもと、異なる環境の土壌サンプルが入手出来るよう取得ポイントを、さらに 10 地点ずつ選定した(計 100 地点)。 GPS 測定機器に土壌サンプル採取予定の 100 地点の位置情報を転送、スーダンに移動の後、同機器のデータを用い、各地点に移動、事前に設定した地点の土壌を採取した。 土壌採取の方法は、共同研究機関である神戸大学が開発した土壌サンプリング方法に従った。 また、コンタミネーションを防ぐためゴム手袋やシューズカバー、使い捨てプラスチック製スコップを用い、採取土壌の混入を予防する措置を行った。

(4) 土壌からの DNA 抽出

採取した土壌サンプルは、その場においてドライアイスにより低温保存し、その状態でハルツーム大学真菌菌腫研究センターに搬送。その後、同センターにおいて、土壌サンプルから DNA の抽出を行った。DNA 抽出に際しては、既に確立された市販の抽出キットを改良し、サンプル添加量の多い独自手法[2]を採用した。抽出した DNA サンプルは、ドライアイスで冷凍保存し、MTAに準拠し日本に搬入した。

(5)次世代シーケンサーによる真菌遺伝子データ解析

抽出された DNA サンプルの DNA 量が少量である可能性があることを考慮しつつ、種を問わずすべての真菌の遺伝子を網羅的に増幅することを可能とするため、DNA ITS1 領域をターゲットとする実験系の設計を行った(図 1)。

共同研究機関である神戸大学において、DNA ライブラリの調整(準備実験)を行った後、長崎大学において、次世代シーケンサー(Illumina 社 Miseq)による環境 DNA 解析を行い、配列データの分析を実施した。

図1 次世代シーケンス用の遺伝子検出システム設計。共通度の高い DNA 領域を標的試薬に使用する (ユニパーサルプライマー作成) こ とで、多種多様な真菌群を同時に検出できる。

4. 研究成果

きた。

(1) 土壌サンプルからの DNA 抽出法の検討と感染者発生地域の把握 研究資源・研究機器整備が不十分なスーダンにおいても実施可能であり、常温下においても 安定的な試薬を使用する市販のサンプリングキットを改良した DNA 抽出法を確立する事がで

(2)土壌サンプルの採取

首都ハルツームから南東方向に約 250km 離れて位置するセナール州の河川沿いの地域を対象地域とし、同地域 10 村、計 100 地点における土壌サンブルの採取を行う事を計画し、2019 年

10 月にスーダンに渡航、計画した地点からの土壌サンプルの採取をハルツーム大学真菌菌腫研修センター研究員とともに実施した。最終的に、設定した 100地点のうち、悪天候によりアクセスが不可能であった3村を除き、7村、70地点での表層土壌サンプルを採取する事ができた。(図 2)。

(注:本調査に関しては、2019年3月、スーダンにおいてクーデターが発生し、現地新政府による非常事態宣言が発令されたことから、外務省による渡航注意勧告に従いスーダンへの渡航を延期したことにより、スーダンの渡航と調査が8ヶ月ほど遅延した。)



図2 土壌サンプル採取の様子。住環境付近や農地など様々な場所を選定した。

(3) 土壌からの DNA 抽出

採取した 70 土壌サンプルは、ハルツーム大学真菌 菌腫研究センターに搬入し、DNA の抽出を実施した。同センターの実験機器の不調により 6 サンプルを失い、最終的に、64 土壌サンプルから、DNA の抽出に成功した(平均濃度 1.2ng/µl 程度)。土壌採取から DNA 抽出まで(その間、ドライアイス、冷凍庫において保管)の期間は 2 日以内に終了した。

(4)次世代シーケンサーによる真菌遺伝子データ解析

抽出した DNA を日本に搬入し、解析を実施した。解析の結果、菌種の原因となり得る 55 種の 真菌群のうち、16 種の DNA が土壌から検出された。また 7 村 70 地点のうち、54 地点から、少 なくとも 1 種以上の原因となる真菌が生息している可能性があるという結果が出た(図 3)。

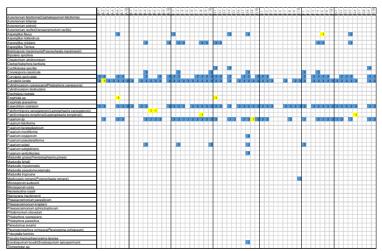


図3 次世代シーケンサーで検出された菌種とサンプリング地点。 黄色は原因 真菌が検出された地点、青色は生息可能性がある地点を示す。 更なる解析が必要である。

村間での検出種数に差は見られず、またサンプル採取場所の環境や土壌成分との影響はまだ確認されていない。一方で、最も菌種の原因として名前の知られている Madurella mycetomatis が検出されなかった。先行研究[3]では、同種を別の手法で検出する必要があると報告もあることから、次世代シーケンサー用に設計した検出試薬の検証が必要であり、現在、追加解析の検討を行っている。

<まとめ>

本研究により、環境 DNA 技術を応用した同感染症のリスク・マップの作成に向けた基礎データを得ることが出来た。今後、調査地域の拡大により、真菌菌腫の原因真菌の検出と感染発生地域の特定、さらには、対策の策定、住民への教育・予防に向けた取組に繋げ、地域における環境と予防のための情報収集を介した熱帯乾燥地における新しい環境医学の芽生えから次の段階へと繋がることが期待できる。

<引用文献>

- [1] Zijlstra, Eduard E., et al. The Lancet Infectious Diseases 16.1 (2016): 100-112.
- [2] Sakata, Masayuki K., et al. Environmental DNA. 00 (2020): 1-14.
- [3] Ahmed, Abdalla., et al. Journal of clinical microbiology 40.3 (2002): 1031-1036.

5	主な発表論文等
J	工体光化硼人豆

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

_

6.研究組織

6	.研究組織				
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考		
	加藤 健太郎	長崎大学・熱帯医学研究所・助教			
研究分担者	(KATO Kentaro)				
	(50508885)	(17301)			
	源 利文	神戸大学・人間発達環境学研究科・准教授			
研究協力者	(MINAMOTO Toshifumi)				
	ファハール アーメド	ハルツーム大学・真菌菌腫研究センター・教授			
研究協力者	(FAHAL Ahmed)				
	川原 尚行	長崎大学・熱帯医学研究所・客員教授			
研究協力者	(KAWAHARA Naoyuki)				