

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08893

研究課題名(和文) 真菌関連アレルギー性気道疾患の原因真菌診断法確立

研究課題名(英文) Identification of the causative fungus of fungus-related allergic airway diseases

研究代表者

浅野 浩一郎 (ASANO, Koichiro)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：60192944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性気管支肺真菌症の原因真菌同定に次世代シーケンサーを用いた真菌叢解析を応用するため、気管支粘液栓の新鮮およびホルマリン固定パラフィン包埋標本、および便を解析した。ロングリード可能なMinIONを用いた結果、3つのPCR産物で属レベルでの定量性が確認された。新鮮粘液栓ではABPM症例の85%、真菌陰性粘液栓症例25%で真菌リード数の20%以上を占める単一真菌属を特定可能であり、粘液栓FFPE標本でも77%の症例で優位真菌属を確認可能であった。経口ステロイド薬、抗真菌薬等の治療前後の便中真菌を解析した結果、治療が奏功した例では治療中にAspergillus属真菌比率が低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真菌叢解析は細菌叢解析と比較してまだ十分確立しておらず、属レベルで定量的解析は可能となったが、種レベルの同定・定量はA. fumigatus等を除いて不確実であった。より高精度な解析手法の確立、真菌多様性に対応できるデータベース整備が重要である。

一方、ABPM患者では必ずしも喀痰が採取できる訳ではなく、治療効果を真菌量で評価することが困難であった。便中真菌解析で気道内から嚥下されて検出されていたと考えられるAspergillus属真菌量の変化を経時的に検出可能であることが明らかとなり、治療効果判定および治療終了後の再発リスク評価に有用な指標となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to apply mycobiome analysis with next-generation sequencer to identify the causative fungus of allergic bronchopulmonary fungal disease (ABPM), fresh and formalin-fixed paraffin-embedded specimens of bronchial mucous plugs and stools were analyzed. Quantitatively at the genus level was confirmed with a protocol using MinION. Fungal genera accounting for more than 20% of fungal leads were identified in 85% of ABPM cases and 25% of fungal-negative mucous plugs in fresh mucus plugs, and in 77% of mucous plugs in FFPE specimens. The proportion of Aspergillus spp. decreased in the stool samples were decreased during the successful treatments with oral corticosteroids and antifungal drugs.

研究分野：アレルギー学

キーワード：真菌 アレルギー性気管支肺真菌症 次世代シーケンサー



ーテーションを行った結果、3つのPCR産物で属レベルで比較的良好な定量性が得られた。さらに微量DNAでも検出可能な2段階PCRについても同様の手法でプロトコルを最適化した。しかし、種レベルでの定量性が担保されたプロトコルは確定できなかった。

#### (2) 気管支粘液栓内真菌の解析

2019年の診断基準を満たすABPM症例13例と粘液栓はあるがABPM診断基準を満たさず、粘液栓内に真菌を認めない症例4例について、気管支鏡あるいは喀痰から採取した新鮮粘液栓17個を上記手法で解析した結果、ABPM症例の85%、真菌陰性粘液栓症例25%で真菌リード数の20%以上を占める単一真菌属を特定可能であった。そのうち6例(43%)は*A. fumigatus*あるいはその他のアスペルギルス属真菌であったが、その他にペニシリウムや真正担子菌も認められた。さらに粘液栓FFPE標本からDNAを抽出して解析を行った。13例中10例(77%)で真菌リード数の20%以上を占める*A. fumigatus*あるいは真正担子菌等の真菌属を確認することが可能であった。真菌培養では陰性であった症例から優位真菌属を検出できた例も複数みとめられた。一方で、ABPMの原因真菌として重要と考えられるスエヒロタケ(*S. commune*)が喀痰中では検出されたにも関わらず、今回の検討では検出できなかった症例が2例あった。

#### (3) 便中真菌の解析

5名のABPM患者から採取した15セット、30検体において総真菌DNAの5%以上を占めていた頻度は、多い順に*Penicillium*属、*Aspergillus*属、*Candida*属、*Saccharomyces*属であり、さらに真正担子菌のうちアカツブダケ、ベニアワツブダケ、カワラタケ、キシメジなども7検体以上で検出された。アカツブダケ、ベニアワツブダケ、キシメジについては3日間隔で採取された便検体で同程度に検出されることが多く、かつ同じ患者で繰り返し検出されることから、食品として摂取されたキノコ由来ではなく腸管内に定着している可能性が高いと考えられた。

ABPM患者に対して、3名に経口ステロイド治療、2名に抗真菌薬治療(うち1名に抗真菌薬投与終了後に抗IL-5受容体鎖抗体投与)を実施し、治療前、治療開始4週後、16週後、治療終了4週後の便検体を採取して腸管内真菌叢を解析した。全ての患者で便中に*Aspergillus*属真菌が検出され、経口ステロイド治療を行い奏功した3例と抗真菌薬治療が奏功した1例では治療後に*Aspergillus*属真菌比率が低下した。一方、抗真菌薬治療が無効であった症例では16週後も*Aspergillus*属真菌が検出され、抗IL-5受容体鎖抗体治療に変更16週後には消失した。これらは気道内からの*Aspergillus*属真菌が嚥下されて検出されていたと考えられ、病勢を反映して菌量が増加したと考えられる。一方で、経口ステロイド治療や抗真菌薬治療に伴って*Candida*属の増加や*Saccharomyces*属の減少が認められる症例もあり、治療によって腸内真菌叢にも変化を生じていることが示唆された。なお、*Wallemia*属は2例で検出されたのみであった。

#### (4) 考察

真菌叢解析は細菌叢解析と比較してまだ十分確立していない解析手法であり、今回開発した手法で属レベルでは定量的解析は十分可能となったが、種レベルの同定・定量は*A. fumigatus*等を例外として不確実であった。メタゲノム解析等のより高精度な解析手法の確立、真菌の多様性に対応できるデータベース整備が重要である。

一方、ABPM等の真菌関連アレルギー性気道疾患患者では必ずしも喀痰が採取できる訳ではなく、診断確定時に気管支鏡検査が実施されることが多い。そのため、治療効果を真菌量で評価することが困難であった。便中真菌解析で気道内から嚥下されて検出されていたと考えられる*Aspergillus*属真菌量の変化を経時的に検出可能であることが明らかとなり、治療効果判定および治療終了後の再発リスク評価に有用な指標となることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shiraishi Yoshiki, Kryukov Kirill, Tomomatsu Katsuyoshi, Sakamaki Fumio, Inoue Shigeaki, Nakagawa So, Imanishi Tadashi, Asano Koichiro	4. 巻 53
2. 論文標題 Diagnosis of pleural empyema/parapneumonic effusion by next-generation sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 450-459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/23744235.2021.1892178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asano Koichiro, Hebisawa Akira, Ishiguro Takashi, Takayanagi Noboru, Nakamura Yasuhiko, Suzuki Junko, Okada Naoki, Tanaka Jun, Fukutomi Yuma, Ueki Shigeharu, Fukunaga Koichi, Konno Satoshi, Matsuse Hiroto, Kamei Katsuhiko, Taniguchi Masami, Shimoda Terufumi, Oguma Tsuyoshi	4. 巻 147
2. 論文標題 New clinical diagnostic criteria for allergic bronchopulmonary aspergillosis/mycosis and its validation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1261 ~ 1268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2020.08.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hamada Yuto, Fukutomi Yuma, Nakatani Eiji, Saito Akemi, Watai Kentaro, Kamide Yosuke, Sekiya Kiyoshi, Nagai Tadashi, Harada Kazuki, Shiraishi Yoshiki, Oguma Tsuyoshi, Asano Koichiro, Taniguchi Masami	4. 巻 70
2. 論文標題 Optimal Aspergillus fumigatus and Asp f 1 serum IgG cut-offs for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 74 ~ 80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2020.07.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okada Naoki, Oguma Tsuyoshi, Shiraishi Yoshiki, Nishimura Takuto, Hattori Shigeaki, Tanaka Jun, Kitahara Asako, Tomomatsu Katsuyoshi, Niimi Kyoko, Hayama Naoki, Kamei Katsuhiko, Asano Koichiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Repeated exacerbation by environmental exposure and spontaneous resolution of allergic bronchopulmonary mycosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice	6. 最初と最後の頁 558 ~ 560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaip.2020.08.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asano Koichiro, Ueki Shigeharu, Tamari Mayumi, Imoto Yoshimasa, Fujieda Shigeharu, Taniguchi Masami	4. 巻 75
2. 論文標題 Adult onset eosinophilic airway diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 3087 ~ 3099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14620	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Jun, Hebisawa Akira, Oguma Tsuyoshi, Tomomatsu Katsuyoshi, Suzuki Junko, Shimizu Hiroshige, Kawabata Yoshinori, Ishiguro Takashi, Takayanagi Noboru, Ueda Soichiro, Fukunaga Koichi, Taniguchi Masami, Ono Junya, Ohta Shoichiro, Izuhara Kenji, Asano Koichiro	4. 巻 75
2. 論文標題 Evaluating serum periostin levels in allergic bronchopulmonary aspergillosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 974 ~ 977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomomatsu Katsuyoshi, Sugino Yasuteru, Okada Naoki, Tanaka Jun, Oguma Tsuyoshi, Asano Koichiro	4. 巻 69
2. 論文標題 Rapid clearance of mepolizumab-resistant bronchial mucus plugs in allergic bronchopulmonary aspergillosis with benralizumab treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 636 ~ 638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2020.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 浅野浩一郎	4. 巻 26
2. 論文標題 アレルギー性気管支肺真菌症のバイオマーカー	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギー・免疫	6. 最初と最後の頁 36-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueki Shigeharu, Fukutomi Yuma, Miyabe Yui, Yamada Takechiyo, Oguma Tsuyoshi, Asano Koichiro	4. 巻 95
2. 論文標題 Allergic fungal diseases in the upper and lower airways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ERS monograph	6. 最初と最後の頁 119 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Koichiro Asano
2. 発表標題 Allergic bronchopulmonary mycosis: clinical phenotypes and validation of diagnostic criteria based on nation-wide survey in Japan
3. 学会等名 EAACI Digital Congress 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koichiro Asano
2. 発表標題 Allergic bronchopulmonary aspergillosis/mycosis in Japan
3. 学会等名 JSA/WA02020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅野浩一郎
2. 発表標題 真菌関連アレルギー性気道疾患のスペクトラムと病態
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅野浩一郎
2. 発表標題 内科からの展望 - 成人発症好酸球性気道疾患-
3. 学会等名 第57回日本小児アレルギー学会学術大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅野浩一郎
2. 発表標題 アレルギー性気管支肺真菌症を正しく診断するために
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅野浩一郎
2. 発表標題 アレルギー性肺疾患(類縁疾患)の基本から最新情報まで - ABPM-
3. 学会等名 第6回総合アレルギー講習会(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 浅野浩一郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2079
3. 書名 今日の診断指針 デスク判 第8版	

1. 著者名 浅野浩一郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 726
3. 書名 新 呼吸器専門医テキスト（改訂第2版）	

1. 著者名 浅野浩一郎、他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 534
3. 書名 呼吸器疾患最新の治療2019-2020	

1. 著者名 浅野浩一郎、他（「アレルギー性気管支肺真菌症」研究班）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 114
3. 書名 アレルギー性気管支肺真菌症の診療の手引き	

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------