

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21405002

研究課題名(和文) 中央アジアにおける文化人類学的観点から見たヒト常在菌の遺伝子型調査

研究課題名(英文) Social anthropological study for genotypes of oral *Candida albicans* from healthy people in Central Asia

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：人の常在菌として口腔内に存在するカンジダ・アルビカンスについて、複数の遺伝子型解析により、民族毎(生活環境、人種、宗教を含めて)の特徴を見出す目的で、新疆ウイグル自治区(トルファン、イリ、カシュガル)とトルコ(アダナ)にて、健康人ボランティアからサンプル採取を行った。その結果、各地域毎に特徴的な遺伝子型と全ての地域において共通性の高い遺伝子型が認められたが、カシュガルでは明確な主要遺伝子型が確認できず、極めて多岐に渡っている事がわかった。また、アダナにおいては、genotype D の出現頻度が非常に高く、これまでの一般的な報告とは異なっていた。

研究成果の概要(英文)：Candida albicans are known to be one of normal oral resident microorganisms. We developed some tools for discrimination of C. albicans. We aim to know the relation between race and their genotypes of C. albicans. In old literature, Japanese people were originated from Central Asia (Mongolian). The Silk Road (from the ancient the Roman Empire to Japan through Turkey and Xinjiang) is very interesting route of people moving. We surveyed their genotypes in Japan, Xinjiang (Turpan, Ili, Kashgar) and Turkey (Adana).

The genotype common to all was found in comparison of the genotype for every area. Moreover, although characteristic main genotypes were found in every area, there was nothing in Kashgar. This result showed that genotypes were very various in Kashgar. In Adana (Turkey), the frequency of genotype D was very high, and the feature of this area was shown. As mentioned above, the feature peculiar to the area was able to be found out by comparison of the genotype.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：資源保全学

キーワード：カンジダ・アルビカンス 民族 常在性 遺伝子型 新疆ウイグル自治区 トルコ

### 1. 研究開始当初の背景

病原酵母である *Candida albicans* は、ヒト常在菌として知られていて口腔、外陰部、消化管などからしばしば分離される。この菌は日和見感染菌でありホストの免疫が低下することにより重篤な感染症を発症することで、エイズ、悪性腫瘍、臓器移植や一般外科手術の術後患者にとっては要注意な真菌である。一方、近年の遺伝子解析技術の進歩により様々な生物(微生物も含む)の遺伝子型が調べられるようになり、遺伝子型による分類が盛んに行なわれ、その世界的な規模での報告が相次いでいる。これまでの *C. albicans* における遺伝子型の研究は、ある種の遺伝子型 (McCullough MJ, *et al.* J Clin Microbiol 37: 417-421, 1999.) についての世界的な分布が多く、多くの研究者によって報告されている。しかしながら、このような遺伝子型では、たかだか3種類の割合を比較する程度であること。また、国別比較ではあるが、サンプルの由来(例えばカンジダ症患者か健康人か、エイズかどうか、年齢、性別、分離部位等)が統一されていないために、一元的な比較が不可能であることで有用性に欠けている。一見、中央アジアから東南アジア一帯では genotype B が多いように見えているが、ベースが統一されていないために、地理的な特徴であるとは言いがたいのである。また、多遺伝子解析(複数の遺伝子のシーケンス)による特徴付けを試みる研究者もあり、遺伝子型と病態などとの関連を示唆している報告 (Odds FC, *et al.* J Clin Microbiol 44: 3647-3658, 2006.) もある。我々は、これまでに *C. albicans* の遺伝子型の検討からさらに詳細な分類法の検討を行っており、株識別に応用できる方法 (Hattori H, Kanbe T, *et al.* J Dermatol Sci 42: 31-46, 2006.) を開発した。これらの方法を用いて、日本人由来株を中心とした調査を名古屋大学と千葉大学で行う事が真菌医学研究センター共同利用研究課題として採択された。

### 2. 研究の目的

本研究の概要は、*C. albicans* の遺伝子型を調べることにより、その保菌者(家系)の生態や分布を類推することにある。ヒトは母親の胎内では基本的に無菌状態であるが、出産を経て、家族との接触により常在菌がうつされる。おそらく成長過程において外部からの濃厚な菌の接触が無い限り、家族以外の菌が常在する可能性は低いと思われる。このようにヒトはその家族固有(父方、母方のどちらかかあるいは両者)の遺伝子型をもった *C. albicans* を常在させることになる。健康人から *C. albicans* を分離し、単に遺伝子型を調べることはさほど目新しい研究ではないが、これらの得られた遺伝子型を解析するにあたって、比較の基準とする指標をどのようにとるかが重要なポイントとなる。そこで本研究で着目したのが、地理的、宗教的、社会習慣

のような拘りによって、他のグループとは相容れない生活を長年続けてきた集落が中国新疆ウイグル自治区には多く存在することである。つまり、閉鎖的な歴史を維持してきた集落で継代されてきた常在菌の遺伝子型は、その集落固有で特徴的であると考えられる。

### 3. 研究の方法

健康人ボランティアの口腔内常在性 *Candida albicans* を分離する為に以下の方法で行った。10 ml の滅菌蒸留水(あるいは未開封のペットボトル入のミネラルウォーター)を10秒間口腔内に含んだ後、回収した漱ぎ水は遠心後、沈査を CHROMAgar CANDIA™ 平板に塗布した。37℃で培養後、生育した緑色コロニーを採取し、同定後、genotype 解析を行った。コロニー採取においては、同一検体より8個の独立したコロニーを分離した。

サンプル採取の地域は、トルファン地区、イリ地区、カシュガル地区(以上、新疆ウイグル自治区内)、アダナ地区(トルコ共和国内)で行った。比較対照として、北京市内の臨床分離株、千葉市内で妊婦検診時に採取された株、名古屋市内在住の健康人ボランティアからの口腔内分離株、チェコ産の臨床分離株(真菌センター保存株)を用いた。

Genotype 解析の方法としては、ABC genotype (McCullough MJ, *et al.* J Clin Microbiol 37: 417-421, 1999), ALTS (Mijiti J, *et al.* Jpn J Med Mycol 52: 129-138, 2010), microsatellite (Shimizu K, *et al.* Med Mycol J 52: 129-138, 2011) を用いた。

### 4. 研究成果

各地での収集サンプル数は表に示す通りであった。

	トルファン	イリ	カシュガル	アダナ
検体総数(名)	114	154	191	293
民族構成 (イスラム系:漢)	110:4	75:79	167:24	293:0
陽性検体数(名)	31	42	61	93
陽性率(%)	27.2	27.3	31.9	31.7

各地のサンプル提供者の構成内容は、表中に示す民族構成の他に年齢構成を Fig. 1 に示す。

トルファンでは、サンプル収集場所として人通りの多い市場の一角(仕立て屋)を借りて、その店主(ウイグル人女性)に声かけをしてもらった。総数114名の男女比は、男(17名):女(97名)であった。イリでは、市内の総合病院の医師の協力により、病院で働く看護師、医療業務以外の作業員、その他で全て女性であった。カシュガルでも同様に市内の総合病院内で勤務する看護師、その他作業員等で男女比は、男(84名):女(107名)であった。アダナでは、ククロバ大学歯学部(歯学)の学生と教員、研究補助者で男女比は、男

(151名): 女(141名)であった。グラフ中の「Positive」は、陽性者を示している。各地の陽性率は、トルファンが27.2%、イリが27.3%、カシュガルが31.9%、アダナが31.7%であり、一般に知られている健康者の常在菌としての分離頻度と同程度であった。

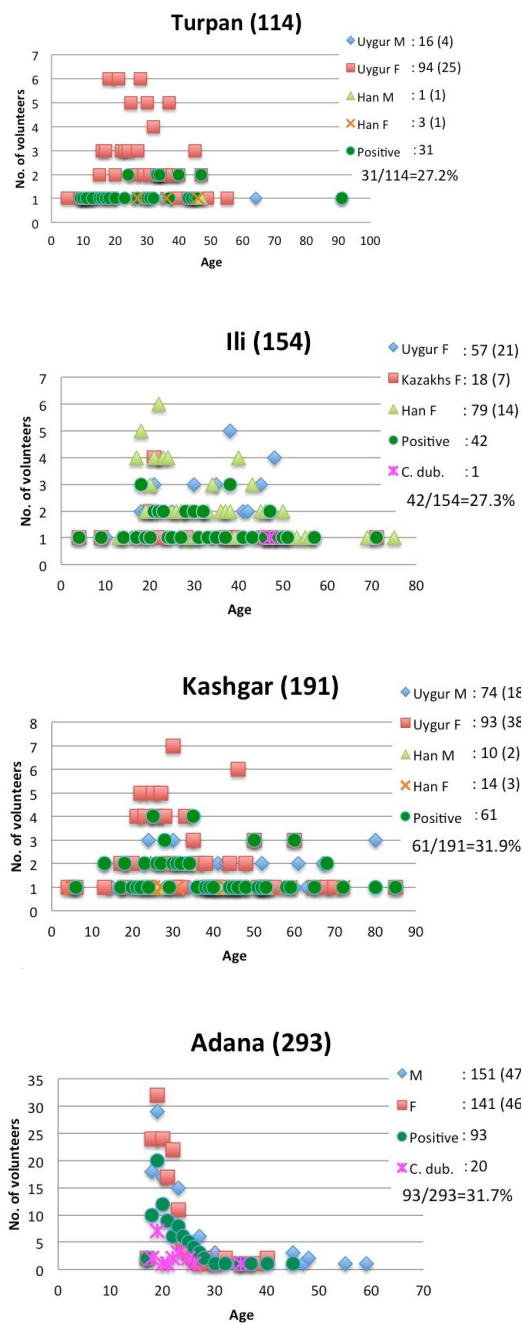


Fig. 1

陽性コロニーの ABC genotype の結果を以下の表に示す。

Genotype	トルファン	イリ	カシュガル	アダナ	北京
A	48%	43%	71%	31%	31%
B	28%	43%	22%	32%	32%
C	24%	11%	7%	15%	15%
D	0%	3%	0%	22%	22%

比較を容易にする為に上記の結果を円グラフとして示したのが Fig. 2 である。

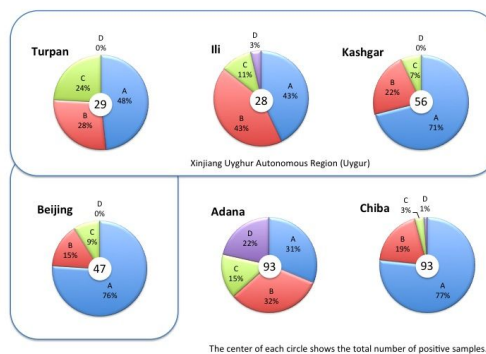


Fig. 2

ここで特に目を引いた結果として、*C. dubuliniensis* (genotype D) の分離頻度がアダナにおいて顕著に高くなっていた事である。これまでのいろいろな報告から、*C. dubuliniensis* の分離頻度は1%程度であると言われており(山口英世, モダンメディア 58: 261-277, 2012 等), 今回のアダナの結果はその常識をはるかに越えていた。しかしながら、我々の結果の他に、小学生(健康なボランティアからの口腔分離)を対象にした報告では、東京では0%であるのに対して沖縄では50%と言う値であった(Maeda N, et al. Adv Dent Res 19: 13-138, 2006)。アダナはトルコ共和国の東部に位置し、周囲を砂漠に囲まれた環境で、沖縄はもちろん周囲は海に囲まれどちらも周辺地域とは隔離された環境である事が共通している。これらの結果は、口腔内常在菌の出現頻度は地域的な要因が大きく影響していると考えられた。すなわち固有のフローラを形成しやすい環境とも言える。

ALTS に関する結果は Fig. 3 に示すように各 ABC genotype の中でもさらに遺伝子型が異なっている事を示しているが、母数が多くなればそれに伴って ALTS の種類も増加していた。

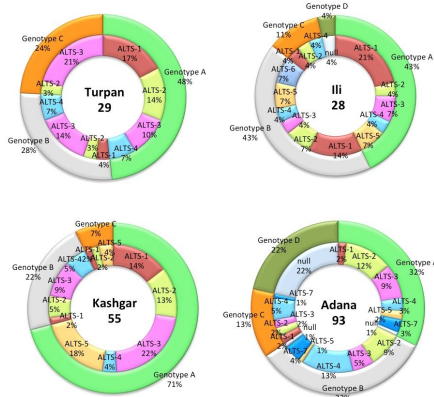


Fig. 3

ここまでの結果をまとめ、各個人毎に遺伝子型の異なる株を有している比率を採取地ごとにまとめた。

	Turpan	Ili	Kashgar	Adana
Mix genotype ratio	2/31 (6.45%)	5/42 (11.9%)	4/61 (6.56%)	6/93 (6.45%)

ABC genotype と ALTS の結果からは、少なくとも 6.5% 程度の割合で同一人物でも異なる遺伝子型の株を保有している事が示され、イリではやや高い値を示した。

続いて、さらに詳細なタイプ分けが可能となる microsatellite による比較を行った。ABC genotype では明確な区別がつかなかった新疆ウイグル自治区内の株について名古屋市内分離株との比較を行った。(Fig. 4)

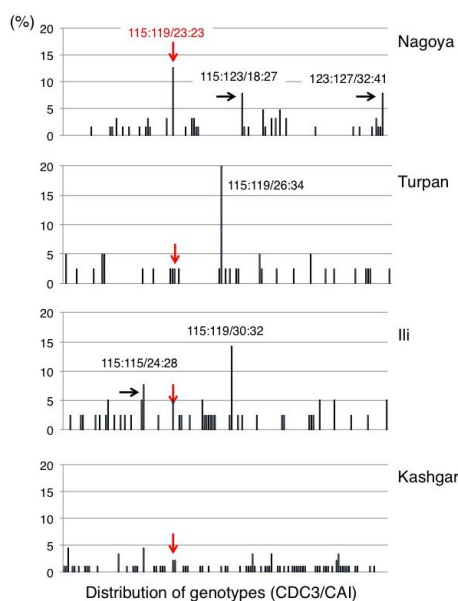


Fig. 4

予想通り ABC genotype や ALTS よりも多くのタイプに分けることができた。カシュガル以外の地域では、明確な主要遺伝子型が確認された(名古屋:3種,トルファン:1種,イリ:2種)。カシュガルにおいては他の採取地で見られる様な主要遺伝子型は確認できなかった。一方、名古屋にて高頻度に分離された図中赤矢印で示す遺伝子型(115:119/23:23)は、頻度は様々であるが全ての採取地に共通していた。

次に主要遺伝子型と共通遺伝子型の出現頻度について日本(名古屋市内)、中国新疆ウイグル自治区(トルファン,イリ,カシュガル)、チェコをまとめた表を以下に示した。

C. albicansの主要遺伝子型および共通遺伝子型の出現頻度(国別比較)

Genotype (CDC3/CA)	Japan (Nagoya)	China (Xinjiang)			Czech Republic
		(Turpan)	(Ili)	(Kashgar)	
115:115/24:28			7.7		6.1
115:119/23:23	12.7	2.5	5.1	2.2	1.0
115:119/26:34		20.0			
115:119/30:32			14.3		
115:123/28:28	7.9				7.1
115:127/32:32	7.0				
123:127/32:41					

各国で得られた主要遺伝子型はそれぞれ異なり、新疆ウイグル自治区内においても地域毎に固有のタイプであった。Fig. 4と同様に、本表中にも赤字で表記した遺伝子型(115:119/23:23)は、全ての国(地域)で認められ極めて共通性の高いタイプである事がわかった。また、カシュガルでは他の地域のような明確な(出現頻度の高い)主要遺伝子型が確認できず、遺伝子型が極めて多岐に渡る事がわかった。

Fig. 5に示すようにカシュガルは自治区内でも最も西側に位置し、多くの他の民族と接している。歴史的には中央アジアの文化圏に属しておりトルコ系であると言われている。現在でははっきりとした国境線により分断されているものの文化圏としては中央アジア独特な特徴を維持し続けており、そのような多民族性の流れをカシュガルでは未だに継承していることに起因しているかも知れない。



Fig. 5



前述のABC genotypeとALTSによる同一人物での遺伝子型の混ざりについて、microsatelliteによる解析をさらに行った。

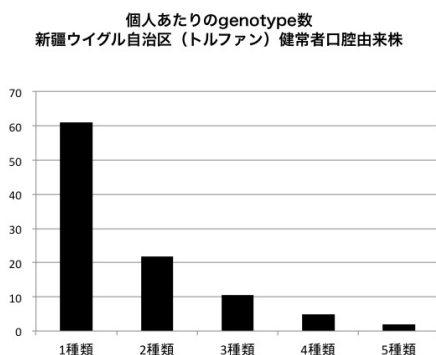


Fig. 6

Fig. 6 にトルファンの結果を示した。約60%では単一の遺伝子型を示していたが、残りの40%では、2から5種類の遺伝子型が認められた。同様の結果は、他の地域(イリ, カシュガル, 名古屋)でも同様に見られた。これらの結果より各個人の口腔内に生息する *C. albicans* の遺伝子型は均一でなく、半数近くのヒト口腔内には複数の遺伝子型を持つ *C. albicans* が生息する事が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Takagi Y, Fukano H, Shimozato K, Tanaka R, Horii T, Kawamoto F, Kanbe T: Genotypes of *Candida albicans* isolated from healthy individuals and their distribution in patients with oral candidiasis. *J Infect Chemother* 19: 1072-1079, 2013. (査読有)

DOI: 10.1007/s10156-013-0626-5

Takagi Y, Hattori H, Adachi H, Takakura S, Horii T, Chindamporn A, Kitai H, Tanaka R, Yaguchi T, Fukano H, Kawamoto F, Shimozato K, Kanbe T: Genotypes of *Candida albicans* involved in development of candidiasis and their distribution in oral cavity of no-candidiasis individuals. *Med Mycol J* 52: 315-324, 2011. (査読有)

<http://dx.doi.org/10.3314/mmj.52.315>

Shimizu K, Hattori H, Adachi H, Oshima R, Horii T, Tanaka R, Yaguchi T, Tomita Y, Akiyama M, Kawamoto F, Kanbe T: Microsatellite-based genotyping of *Candida albicans* isolated from patients with superficial candidiasis. *Med Mycol J* 52: 129-138, 2011. (査読有)

<http://dx.doi.org/10.3314/jjmm.52.129>

Mijiti J, XM Pu, 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  $\mu$ -TGGE method. *Jpn J Med Mycol* 51: 165-168, 2010. (査読有)

<http://dx.doi.org/10.3314/jjmm.51.165>

Adachi H, Shimizu K, Hattori H, Tanaka R, Chinbana H, Takagi Y, Tomita Y, Kanbe T: Genotyping of *Candida albicans* by fragment analysis of microsatellites combined with 25S rDNA and RPS-based strategies. *Jpn J Med Mycol* 50: 167-174, 2009. (査読有)

<http://dx.doi.org/10.3314/jjmm.50.167>

〔学会発表〕(計5件)

今西由巳, 李厚敏, 田中玲子, 李若瑜, 矢口貴志: *Candida albicans* 交配能に関わる現象の再検討. 第55回日本医真菌学会学術集会, *Med Mycol J* 52(増刊1号): 97, 東京, 10月21~22日, 2011.

高木雄基, 深野英夫, 田中玲子, 矢口貴志, 神戸俊夫: Microsatellite解析に基づいたカンジダ症と *Candida albicans* genotype の関係. 第55回日本医真菌学会学術集会, *Med Mycol J* 52(増刊1号): 96, 東京, 10月21~22日, 2011.

Li HM, Imanishi Y, Tanaka R, Li RY, Yaguchi T: Genetic and phenotypic heterogeneity in clinical *Candida albicans* isolates from Beijing, China. *IUMS 2011, Sapporo*, 2011. 9. 6-10.

高木雄基, 服部尚生, 足立秀禎, 田中玲子, 深野英夫, 神戸俊夫: ヒト口腔内常在性 *Candida albicans* の genotype 解析. 第54回日本医真菌学会総会, *真菌誌* 51(増刊1号): 75, 東京, 2010年10月16-17日.

Khaedir Y, Tanaka R, Tarini A, Mijiti J, Gono T: Genotyping of *Candida albicans* spp. isolated from oral candidiasis of HIV/AIDS infected patients in Indonesia: A molecular epidemiological studies. *IMC9: The Biology of Fungi*, Edinburgh, UK, 2010. 8. 1-6.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

神戸 俊夫 (KANBE Toshio)

名古屋大学・医学研究科・講師  
研究者番号: 50093018

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

松澤 哲宏 (MATSUZAWA Tetsuhiro)

千葉大学・真菌医学研究センター・技術職員  
研究者番号: 40598702