

令和元年5月29日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19120

研究課題名(和文) 深在性フザリウム症の原因菌と環境浮遊真菌叢との関連性の解明

研究課題名(英文) Study on the relationship between the causative *Fusarium* species of invasive fusariosis and environmental fungal flora

研究代表者

村長 保憲 (Muraosa, Yasunori)

千葉大学・真菌医学研究センター・特任助教

研究者番号：10574668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では深在性フザリウム症の原因菌と室内環境真菌叢との関連性と菌種による病原性の違いを解明することを目的とした。深在性フザリウム症からは*F. petroliphilum*が最も多く分離された。また本菌が病室等の排水口から高頻度に分離されることを明らかにした。マウスを用いた感染実験では*F. petroliphilum*感染群の感染7日後の体重減少率は*F. falciforme*および*F. oxysporum*感染群と比較して有意に減少していたことから、*F. petroliphilum*による深在性フザリウム症の発症要因として環境要因に加え本菌の病原性が多少なりとも関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦ではこれまでにフザリウム症原因菌の詳細については調査されてこなかった。本研究ではフザリウム症の原因菌の詳細を明らかにし、本症の新たな基礎知見の集積に貢献した。さらに病室を含む室内の排水口が深在性フザリウム症の感染源として強く疑われることを示した。深在性フザリウム症の多くは病室内での感染が疑われることから、本研究の成果は今後の深在性フザリウム症の感染防除対策に深く寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to reveal the relationship between the causative *Fusarium* species of invasive fusariosis and environmental fungal flora and the difference of virulence. *F. petroliphilum* (a member of the FSSC) was predominately isolated from the patients with invasive fusariosis. It was revealed that *F. petroliphilum* predominately isolated from the drain ports in the room. In the infection experiments using mice, the weight loss rate at 7 days after infection in the *F. petroliphilum* infection group was significantly reduced compared to the *F. falciforme* and the *F. oxysporum* infection groups. In addition to environmental factors, it was suggested that the virulence of *F. petroliphilum* was somewhat involved in the development of invasive fusariosis.

研究分野：医真菌学

キーワード：Fusarium FSSC 病原真菌 環境調査 メタゲノム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Fusarium 属菌の多くは植物または土壌に生息する糸状真菌であるが、いくつかの菌種はヒトに病原性を示すことが知られている。ヒトのフザリウム症は、主に免疫抑制状態の患者に日和見感染症として発症する播種感染型の深在性フザリウム症と健常人にも発症する局所感染型の表在性フザリウム症(角膜真菌症や爪真菌症)に大きく分類される。近年、特に造血幹細胞移植後の免疫抑制状態の患者の間で深在性フザリウム症の発症が増加傾向を示している。深在性フザリウム症の原因菌としては *Fusarium solani* や *Fusarium oxysporum*、*Fusarium verticillioides* などが報告されているが、その中でも *F. solani* が最も高い頻度で患者から分離されてくる。近年、遺伝子解析に基づく *Fusarium* 属菌の分類の再評価が進み、既知のいくつかの菌種は複数の種の集合体であることが明らかにされ、従来の *F. solani* は *F. solani* species complex (FSSC) として扱われるようになった。このような分類の再評価に伴い、従来の菌学的特徴により同定されてきた臨床分離株の再同定がフザリウム症原因菌の実態を解明する上で必要となっている。

Fusarium 属菌の感染経路については、表在性フザリウム症のひとつである角膜フザリウム症では植物の葉や枝などによる角膜の外傷により原因菌が直接感染することが知られている。これに対し、深在性フザリウム症の感染経路は環境中に浮遊している胞子の吸入による経気道感染が疑われているが、その証明はされていない。これまでに真菌培養による環境中の浮遊真菌叢の解析結果がいくつか報告されているが、空気中からの *Fusarium* 属菌の分離頻度が低いことが報告されている。我々が事前に行ったサンパウロ州立カンピーナス大学(ブラジル)との共同調査では、空気中から分離されてくる *Fusarium* 属菌のうち、深在性フザリウム症の原因菌として最も報告の多い FSSC の分離頻度が低いことを見出している。これらの調査結果は、深在性フザリウム症の原因菌として FSSC が最も高頻度に分離されてくる報告と一見矛盾する。我々はこれらの結果を説明する仮説の一つとして、FSSC が他の *Fusarium* 属菌と比較してヒトに対する強い感染力を持つことを考えた。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの事前調査の結果をもとに、本研究では、まだ詳細な調査が行われていない深在性フザリウム症の原因菌について、室内環境中の真菌叢との関連性や菌種による病原性の違いなどの基礎的な所見を集積し、新たな早期診断法や治療法の開発などの臨床応用に繋がる基盤研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Fusarium* 臨床分離株の遺伝子解析による菌種同定：これまでに全国の医療機関のフザリウム症患者から分離された臨床分離株がナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)の病原微生物中核機関である千葉大学真菌医学研究センターに寄託保存されている。これらの臨床分離株の一部は遺伝子解析による同定が未実施であるので、正確な菌種同定を行うために Elongation factor-1 (EF-1) 遺伝子およびリボソーム RNA 遺伝子 ITS 領域の塩基配列相同性解析による再同定を行った。これと並行して、全国の医療機関のフザリウム症患者から分離された *Fusarium* 臨床分離菌を収集し、上述の方法を用いて菌種同定を実施した。さらに、これらの菌株の臨床情報をもとに深在性フザリウム症分離株と表在性フザリウム症分離株に分類し、感染型と原因菌種との間の関連性について解析した。

(2) 室内環境中の糸状真菌の分離培養と同定：深在性フザリウム症の感染経路は空気中に浮遊している胞子を吸入することによる経気道感染であると考えられている。深在性フザリウム症の原因菌種と室内環境真菌叢との関連性を解明することを目的に、医療機関および一般住居の空気中と浴室・台所などの排水口から糸状真菌の分離培養を実施した。菌種同定は *Fusarium* 属菌特異的リアルタイム PCR を用いて *Fusarium* の簡易同定を行った後、EF-1 および ITS 領域の塩基配列相同性解析による詳細な菌種同定を行った。さらに、これらの *Fusarium* 環境分離株と *Fusarium* 臨床分離株の関連性について解析した。

(3) メタゲノム解析による室内環境真菌叢の解析：真菌分離培養による菌叢解析は培養できる菌のみしか評価できない。そこで培養できない菌も網羅的に検出することができる次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を実施した。具体的には、医療機関および一般住居の空気中と浴室・台所などの排水口から採取した環境サンプルから遺伝子抽出を行い、PCR によりリボソーム RNA 遺伝子 ITS1 領域を増幅し、次世代シーケンサー(MiSeq: イルミナ社)を用いてメタゲ

ノム解析を行った。

(4) FSSC と他 *Fusarium* 属菌の病原性の評価：深在性フザリウム症の病原菌として最も分離頻度が高かった *F. petroliphilum* (FSSC)の病原性を評価するために、マウスを用いた感染実験を実施した。具体的には、*F. petroliphilum* (FSSC), *F. falciforme* (FSSC), *F. oxysporum* (FOSC)の分生子を免疫抑制処置を施したマウスに静脈内接種し、感染後14日間の生存率を評価した。

4. 研究成果

(1) *Fusarium* 臨床分離株の遺伝子解析による菌種同定：深在性フザリウム症分離株と表在性フザリウム症分離株の両病型ともに原因菌の7割程度がFSSCであることが明らかとなった。さらにFSSCについて詳細な菌種同定を行った結果、病型により原因菌種の分布が異なり、その中でも *F. petroliphilum* が深在性フザリウム症から高頻度に分離されるのに対し、表在性フザリウム症からはほとんど分離されないことを明らかにした(図1、図2)。

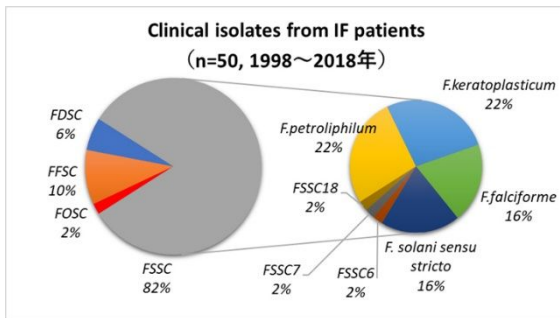


図1 深在性フザリウム症分離株の同定結果

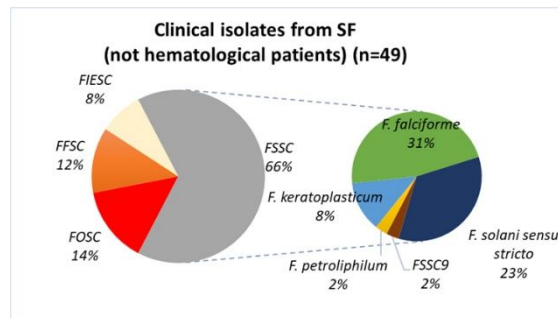


図2 局在性フザリウム症分離株の同定結果

(2) 室内環境中の糸状真菌の分離培養と同定：我々がブラジルで実施した先行調査の結果に反し、本邦では医療機関および一般住居の空気中から *Fusarium* 属菌はほとんど分離されてこなかった。これに対し、浴室・台所等の排水口からは高頻度に *Fusarium* 属菌が分離された。排水口から分離された *Fusarium* 属菌を FSSC 特異的リアルタイム PCR で同定した結果、約70%がFSSCであった。さらにこれらのFSSCをEF-1とITS領域の塩基配列相同性解析により菌種同定した結果、FSSCの中でも *F. petroliphilum* が最も多く分離されてくることが明らかとなった(図3)。

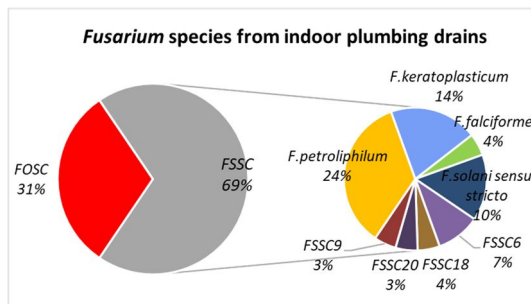


図3 排水口から分離された *Fusarium* の同定結果

(3) メタゲノム解析による室内環境真菌叢の解析：医療機関および一般住居の空気サンプルからは *Fusarium* 属菌は僅かしか検出されなかったが、浴室・台所等の排水口サンプルからは *Fusarium* 属菌が高い頻度で検出された。

(4) FSSC と他 *Fusarium* 属菌の病原性の評価：深在性フザリウム症の病原菌として最も分離頻度の高い *F. petroliphilum* の病原性を評価するために、マウスを用いた感染実験を実施した。具体的には、*F. petroliphilum*, *F. falciforme*, *F. oxysporum* の分生子を免疫抑制処置を施したマウスに静脈内接種し、感染後14日間の生存率を評価した。その結果、*F. petroliphilum* 感染群の生存率は *F. falciforme* 感染群および *F. oxysporum* 感染群と比較して有意な差は認められなかった。しかし、*F. petroliphilum* 感染群の感染7日後の体重減少率は *F. falciforme* 感

染群および *F. oxysporum* 感染群と比較して有意に減少していた。

以上より、*F. petroliophilum* は病室等の排水口に定着しているため、患者との接触機会が多い菌であると考えられた。また、患者との接触機会が多いことが、深在性フザリウム症の原因菌として *F. petroliophilum* が最も多く分離されてくる原因の一つであると考えられた。マウスを用いた感染実験では *F. petroliophilum* 感染群の感染7日後の体重減少率は *F. falciforme* 感染群および *F. oxysporum* 感染群と比較して有意に減少していたことから、*F. petroliophilum* による深在性フザリウム症の発症要因として環境要因に加え本菌の病原性が多少なりとも関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Moretti, M. L., A. F. Busso-Lopes, C. A. Tararam, R. Moraes, **Y. Muraosa**, Y. Mikami, T. Gonoi, H. Taguchi, L. Lyra, F. Reichert-Lima, P. Trabasso, G. S. de Hoog, A. M. S. Al-Hatmi, A. Z. Schreiber & K. Kamei. Airborne transmission of invasive fusariosis in patients with hematologic malignancies. PLOS ONE. 13 (4), e0196426 (2018). 査読あり
2. Uemura, S., A. Tamura, N. Yamamoto, A. Saito, S. Nakamura, T. Fujiwara, T. Tahara, A. Kozaki, K. Kishimoto, T. Ishida, D. Hasegawa, **Y. Muraosa**, K. Kamei & Y. Kosaka. Successful Combination Therapy of Liposomal Amphotericin B and Caspofungin for Disseminated Fusariosis in a Pediatric Patient with Acute Lymphoblastic Leukemia. Pediatr Infect Dis J. 37 (10), e251-e253 (2018). 査読あり
3. Okada, K., T. Endo, D. Hashimoto, T. Saga, T. Ara, R. Ogasawara, A. Yasumoto, M. Ibata, M. Takahata, A. Shigematsu, T. Kondo, **Y. Muraosa**, T. Nomura, H. Kanno-Okada, S. Hashino, S. Tanaka, K. Kamei & T. Teshima. Disseminated fusariosis emerged from prolonged local genital infection after cord blood transplantation. J Infect Chemother. 24 (8), 660-663 (2018). 査読あり
4. 浅井幸, 吉見公佑, 竹中基 宇谷厚志, **村長保憲**, 亀井克彦, 西本勝太郎. 症例 急性骨髄性白血病治療中に生じた *Fusarium* 感染症の1例. 皮膚科の臨床, 59 (1), 105-109 (2017). 査読あり
5. 黒澤修兵, 関谷紀貴, **村長保憲**, 亀井克彦, 永田啓人, 山田裕太, 小西達矢, 竹崎俊晶, 海渡智史, 阪口正洋, 原田介斗, 安田俊一郎, 吉岡康介, 稲本恭子, 遠矢嵩, 五十嵐愛子, 名島悠峰, 武藤秀治, 土岐典子, 小林武, 垣花和彦, 坂巻壽, 大橋一輝. 急性白血病の経過中に播種性フザリウム症を発症した3例の後方視的検討. 臨床血液, 58 (12), 2375-9 (2017). 査読あり
6. de Souza, M., T. Matsuzawa, K. Sakai, **Y. Muraosa**, L. Lyra, A. F. Busso-Lopes, A. S. S. Levin, A. Z. Schreiber, Y. Mikami, T. Gonoi, K. Kamei, M. L. Moretti & P. Trabasso. Comparison of DNA Microarray, Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) and Real-Time PCR with DNA Sequencing for Identification of *Fusarium* spp. Obtained from Patients with Hematologic Malignancies. Mycopathologia, 182 (7-8), 625-632 (2017). 査読あり
7. **Muraosa, Y.**, M. Oguchi, M. Yahiro, A. Watanabe, T. Yaguchi & K. Kamei. Epidemiological Study of *Fusarium* Species Causing Invasive and Superficial Fusariosis in Japan. Med Mycol J, 58 (1), E5-e13 (2017). 査読あり

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 日野裕太郎, **村長保憲**, 渡邊哲, 鎗田響子, 八尋真希, 堺田恵美子, 亀井克彦. 千葉大学真菌センターで菌種同定した血液疾患患者における侵襲性フザリウム症の解析. 第41回日本造血細胞移植学会 (2018).
2. 日野裕太郎, **村長保憲**, 渡邊哲, 鎗田響子, 八尋真希, 亀井克彦. 深在性フザリウム症の原

因菌種と室内環境中の *Fusarium* 属菌の分布との関連性の検討. 第 62 回日本医真菌学会総会・学術集会 (2018).

3. **Y. Muraosa**, M. Oguchi, M. Yahiro, A. Watanabe, T. Yaguchi, K. Kamei. Epidemiological Study of *Fusarium* Species Causing Invasive and Superficial Fusariosis in Japan. 20th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (2018).
4. **村長保憲**、大口弥里、渡辺哲、亀井克彦. *Fusarium petroliphilum* の深在性感染に関する菌学的特徴について. 真菌症フォーラム 第 23 回学術集会 (2017).
5. **村長保憲**、鎗田響子、渡辺哲、亀井克彦. 免疫不全患者の血液から分離された *Fusarium petroliphilum* について. 第 61 回日本医真菌学会総会・学術集会 (2017 年).
6. 大口弥里、**村長保憲**、渡辺哲、亀井克彦. フザリウム症の病型と *Fusarium solani* species complex (FSSC) の関連性について. 第 65 回日本感染症学会東日本地方会学術集会 (2016 年).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：大口 弥里

ローマ字氏名：Oguchi Misato

研究協力者氏名：日野 裕太郎

ローマ字氏名 : Hino Yutaro

研究協力者氏名 : 八尋 真希

ローマ字氏名 : Yahiro Maki

研究協力者氏名 : 鎗田 響子

ローマ字氏名 : Yariita kyoko

研究協力者氏名 : 渡辺 哲

ローマ字氏名 : Watanabe Akira

研究協力者氏名 : 亀井 克彦

ローマ字氏名 : Kamei Katsuhiko

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。