

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06826

研究課題名（和文）伊豆・小笠原諸島における薬剤耐性ヒト病原真菌の多様性パターンの解明

研究課題名（英文）Species and genetic diversity of the azole-resistant medical fungi in the Izu and Bonin Islands

研究代表者

廣瀬 大 (HIROSE, Dai)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：20513922

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）：伊豆・小笠原諸島において *Aspergillus fumigatus* 関連種の多様性調査を行った。調査の結果、6種の分布が確認された。大島と式根島では *A. felis*、神津島から八丈島間では *A. pseudoviridinutans*、小笠原諸島では *A. udagawae* の出現頻度が高かった。島によらず森林よりも裸地や草地で関連種の出現頻度が高いことが明らかになった。高頻度種に対しゲノムワイドな遺伝子型決定を試み集団遺伝学的解析を行った結果、島間で明確な遺伝的分化はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真菌症起因菌の野外環境における生態学的特性に関する情報は世界的にみても殆どない。そのため、本研究で得られた知見は真菌の多様性科学のみならず疫学や環境医学においても重要なものであると考えられる。超高齢化社会を迎えると共に抗癌剤治療やHIV感染などにより免疫力の低下した患者が増加傾向にあることを考えると、真菌症の罹患者数は今後急激に増大すると予想される。本研究の成果はこの様な状況に備えるための生物学的な基礎情報を提供することから社会的意義は大きいと思われる。

研究成果の概要（英文）：The species diversity and distribution of *Aspergillus* sect. *Fumigati* in outdoor environments of Izu and Ogasawara Islands were investigated. Seven *Aspergillus* sect. *Fumigati* species were identified. The occurrence frequency of *A. fumigatus* was higher in forest sites on the islands, except for Ogasawara Islands, whereas that of species other than *A. fumigatus* was higher in bare land and grassland sites on all islands. Considering other *Aspergillus* species, *A. felis* showed high occurrence frequency on islands between Izu-oshima and Shikinejima, *A. pseudoviridinutans* on islands between Kozushima and Hachijojima, and *A. udagawae* on Ogasawara Islands. Genome-wide genotyping of *A. felis*, *A. pseudoviridinutans*, and *A. udagawae* was performed by GRAS-Di analysis. STRUCTURE analysis based on genotype data revealed multiple clusters based on genetic information in all species, but no clear genetic differentiation among islands.

研究分野：真菌学

キーワード：アスペルギルス症 薬剤耐性 抗真菌薬 多様性 集団遺伝 分類 島嶼

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト病原真菌が引き起こす真菌症は、癌患者など免疫不全患者にとっては脅威であり、世界的にみると結核やマラリアよりも死亡者数が多い疾患である。本邦においては真菌症に対するリスクが正当に評価されているとは言い難い状況であるが、超高齢化社会を迎えると共に抗癌剤治療や HIV 感染などにより免疫力の低下した患者が増加傾向にあることを考えると、真菌症の罹患者数は今後急激に増大すると予想される。

(2) 真菌症の中でも致死率が特に高い点、抗真菌薬耐性種が発見されている点で臨床において重要度が最も高いのはアスペルギルス症である。そのため本疾患を引き起こす *Aspergillus* 属菌はヒト病原真菌で最重要な分類群であるといえる。本属菌は元来ヒトの体内や体表ではなく野外の土壤中に生息している。それにも関わらず、ヒト病原性を有する本属菌種の野外環境における多様性や分布・生態に関する情報は極めて限られているのが現状である。

(3) 近年、起因菌として最重要種の *Aspergillus fumigatus* と形態学的に類似している複数種(以下、*A. fumigatus* 関連種)においてアゾール系抗真菌薬に対する耐性株が野外環境中から検出された。国内の臨床由来菌株の保存機関では関連種の占める割合が近年増加しているといわれている。この様な状況にも関わらず、本邦の *A. fumigatus* 関連種に関する分類学的研究は殆ど行われていないため、本邦に分布する関連種の種数や種毎の分布特性さえ分からない状況にある。

### 2. 研究の目的

本研究では、伊豆・小笠原諸島をモデルフィールドとして、アゾール系抗真菌薬に対して耐性のある *A. fumigatus* 関連種の分類学的記載と共に生態学的及び集団遺伝学的解析を行う。具体的には、(1) 各種の分布の実態調査と分布の制限要因の解明、(2) 分布の形成プロセスの推定、を目的とした。伊豆・小笠原諸島をフィールドとする理由として、(1) 温度傾度があり年較差の小さい海洋性気候である、(2) 海洋島であると共に各島の本州からの距離が異なることにより本州からの孢子分散の評価がし易い、(3) 限られた面積の中に多様な土壤環境が有る、(4) 少人数での調査対象に適したサイズであることが挙げられる。

### 3. 研究の方法

(1) 野外調査は9島嶼[東京から近い順に大島(A)、利島(B)、式根島(C)、神津島(D)、三宅島(E)、八丈島(F)(以上が伊豆諸島)および賀島(G)、父島(H)、母島(I)(以上が小笠原諸島)]で行なった(図1)。

(2) 分布の実態調査では、① *A. fumigatus* 関連種の種構成の季節変化と、② 植生や島間の違いが出現菌種に及ぼす影響を調査した。前者の調査は E の植生の状態の異なる 2 つの調査地で行った。②の調査においては各島内で可能な限り複数の植生遷移の調査地を合計で 68 地点選定した(図1)。①の調査では草地(E3)と森林(E7)の2地点で1年間2ヶ月毎に各地点で土壌を10サンプル採取し、②の調査では各調査地点において8-17地点で土壌を採取し実験室に持ち帰った。採取した土壌から、滅菌コーンを用いたベイト法を用いて *Aspergillus* 属を分離し、カルモジュリン遺伝子の部分塩基配列と形態学的特徴に基づき菌種の同定を行なった。その結果を基に、各菌種の調査地点毎の土壌試料数あたりの出現頻度を算出した。

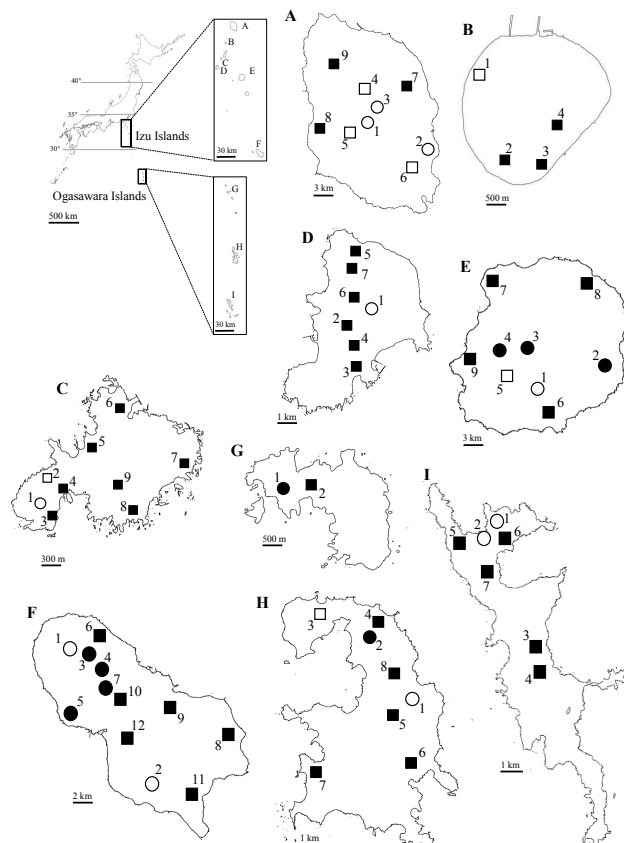


図1 調査地

(3) 分布の形成プロセスの推定を行うために調査地で広く分離された *A. felis* (39 菌株)、*A. pseudoviridinutans* (33 菌株)、*A. udagawae* (29 菌株) を対象に GRAS-Di 解析を行い、各菌

株の遺伝子型を決定した。本解析は、次世代シーケンサーを用いてゲノム中に散在する大量の一塩基多型 (SNPs) を網羅的に検出できる解析法の一つである。得られた遺伝子型データに基づき STRUCTURE 解析を行なった。

#### 4. 研究成果

(1) 分布の実態調査の結果、伊豆・小笠原諸島において *A. felis*、*A. pseudoviridinutans*、*A. udagawae*、*A. arcoverdensis*、*A. lentulus*、*A. spinosus* の 6 種の *A. fumigatus* 関連種の分布が確認され、中でも *A. felis*、*A. udagawae*、*A. pseudoviridinutans* の出現頻度が高いことが明らかになった。島間で共通する分布に関する特徴として、裸地や草地では *A. fumigatus* 関連種の出現頻度が高く、森林では *A. fumigatus* の出現頻度が高いことが分かった (図 2)。また、*A. udagawae* を除く菌種では八丈島以南で孢子による分散が制限されていることが明らかになった。三宅島における通年調査の結果、*A. pseudoviridinutans* が草地において年間を通して高い出現頻度で確認されたことから、*A. fumigatus* 関連種の季節的な種構成の変化がみられる可能性は低いと考えられた。

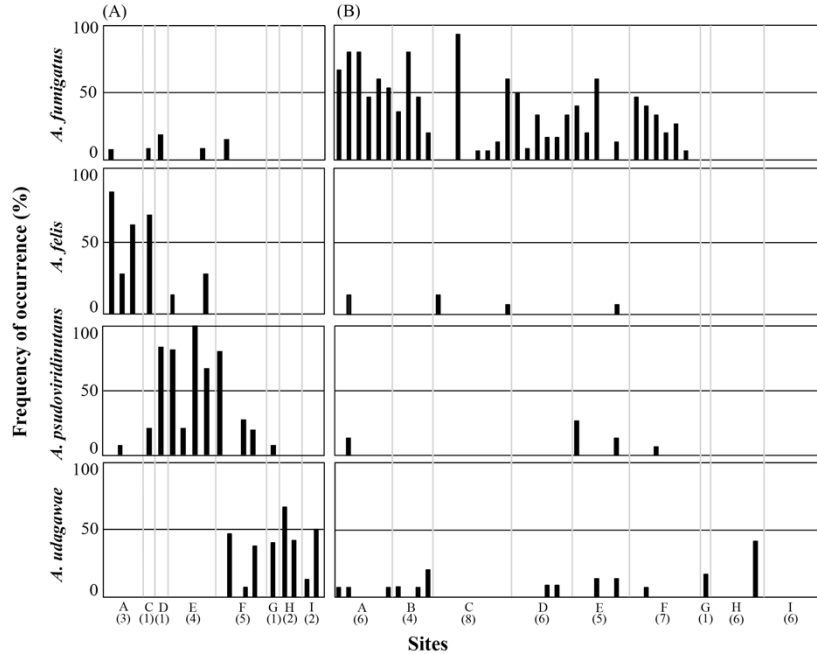


図2 *Aspergillus fumigatus* 及び関連種の出現頻度

(2) GRAS-Di 解析により、*A. felis* で 11517 ケ所、*A. pseudoviridinutans* で 16778 ケ所、*A. udagawae* で 3471 ケ所の SNPs に基づき各菌株の遺伝子型を決定することができた。STRUCTURE 解析の結果について、Structure Harvester で対数尤度 LnP (D) と  $\Delta K$  の変化を調べたところ、クラスター数は *A. felis* で 2、*A. pseudoviridinutans* で 3、*A. udagawae* で 4 が最適であるとされた (図 3)。*A. udagawae* では集団間で明瞭に分化したクラスター構造はみられなかったことから、島間で遺伝的交流が頻繁に起きている可能性がある。*A. pseudoviridinutans* では式根島 (C) とそれ以外の島で明瞭に分化したクラスター構造がみられた。*A. felis* では大島 (A) で割合の高いクラスターが式根島 (C) と三宅島 (E) で低くなる傾向がみられた。*A. felis* と *A. pseudoviridinutans* については Q 値が 0.9 以上の他のクラスターとの交流が殆どない菌株が多数を占めたことから、無性生殖もしくは同一クラスター内での有性生殖を行うことで現在の集団が形成されていると推定される。これらの種では分布形成のプロセスにおいて、地理的な距離のような分散制限以外の要因も重要であることが示唆された。

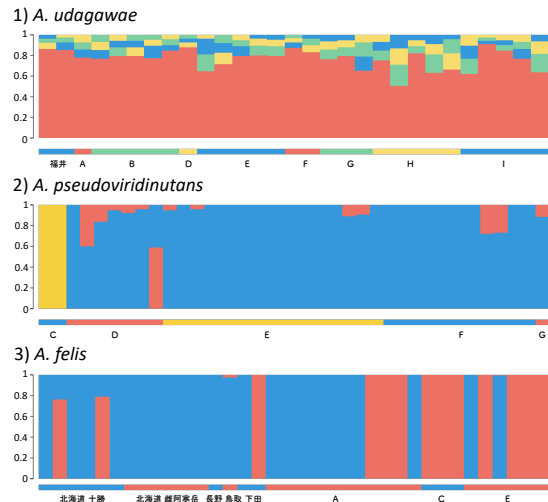


図3 STRUCTURE解析の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kohei Watanabe, Takashi Yaguchi, Dai Hirose	4. 巻 62
2. 論文標題 Ubiquitous distribution of azole-resistant <i>Aspergillus fumigatus</i> -related species in outdoor environments in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Mycology Journal	6. 最初と最後の頁 71-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3314/mmj.21-00014	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 Dai Hirose, Kohei Watanabe, Ryo Hagiuda, Ryuri Tachikawa, Takashi Kamijo, Takashi Yaguchi, Mitsuru Hirota	4. 巻 63
2. 論文標題 Diversity and Distribution of <i>Aspergillus fumigatus</i> and Its Related Species in Izu and Ogasawara Islands, Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Mycology Journal	6. 最初と最後の頁 99-107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3314/mmj.22-00017	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 Ryo Hagiuda, Tadashi Itagaki, Dai Hirose	4. 巻 73
2. 論文標題 <i>Aspergillus verrucosus</i> sp. nov., a xerophilic species isolated from house dust and honey in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 5727
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.005727	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣瀬大
2. 発表標題 アスペルギルス症起因菌の野外環境における分布の謎に迫る
3. 学会等名 第19回糸状菌分子生物学コンファレンス札幌大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------