

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16634

研究課題名(和文) 新たな皮膚真菌症～昆虫病原糸状菌がどうしてヒトに危害を与えたのか？

研究課題名(英文) New dermatomycosis -how entomopathogenic fungi attacked human?

研究代表者

伴 さやか (Ban, Sayaka)

千葉大学・真菌医学研究センター・助教

研究者番号：90834664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚炎症部位から *Lecanicillium coprophilum* が分離された。本種と近縁である *Parengyodontium album* は皮膚感染症、角膜炎、心内膜炎を起こすこと、また昆虫病原性糸状菌の関連属であるため、本菌種の病原性リスクを調査した。室内空気中から検出されず、培地上ではプロテナーゼ産生能がわずかに認められたが、関連酵素の活性は検出限界以下であった。また35℃で生育できないため、本菌が直接皮膚に感染する能力はないと結論づけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの皮膚の炎症部位から昆虫病原菌の仲間の真菌が分離された。そこで本菌がヒトへ感染することが可能か検証した。屋内環境中の浮遊量は検出されず、タンパク質分解酵素も産生しないか微量であった。抗真菌剤は効果が薄かったが、生育適正温度が体温の35℃以下でしかなかったため、ヒトへ加害することは極端に稀であると結論づけた。リスク評価では病原性が全くゼロであることを示すのは難しいが、本菌群は病原菌と呼べる要素は一つないと言える。

研究成果の概要(英文)：We newly reported *Lecanicillium coprophilum* was isolated from dermatitis patients, and investigated its biological properties and distribution in the human living environment to evaluate their pathogenic risks. That is related to insect pathogens and *Parengyodontium album* that has been known causing keratitis, cutaneous infection, rarely endocarditis. However, proteinase and chitinase activities were not detected in the culture, and the fungi could not grow at more than 35℃. No isolate was obtained from room air for 3 years. Thus, we concluded *L. coprophilum* is not air-borne nor human pathogen.

研究分野：菌学、感染症、医真菌

キーワード：皮膚糸状菌 昆虫病原性糸状菌 分類 リスク評価 Cordycipitaceae *Lecanicillium Parengyodontium album*

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの皮疹から分離された 2 菌株 (IFM 61953、IFM 62528) をリボソーム DNA ITS 領域の遺伝子配列により相同性検索を行ったところ、ノムシタケ科であるが、既知の種とは一致しないことが明らかとなった。ノムシタケ科は、いわゆる“冬虫夏草類”として知られており、節足動物(昆虫、クモ、ダニ等、以下便宜的に昆虫という)に寄生し、肉眼で観察できる大きさの子実体(キノコ)を作る仲間である。

“冬虫夏草類”は、昆虫の外骨格の主要成分であるキチンを分解することに優れることから、キチンを有する他の菌類(特に地下生菌)に寄生するサブグループが存在する。菌類側の進化系統と、宿主昆虫側の進化系統はほとんど一致せず、比較的容易に宿主を変えながら進化していることが示唆された<sup>1)</sup>。一方で、1種の菌が複数の昆虫に寄生する多犯性も報告されている<sup>2)</sup>。更に、自分の宿主である昆虫を待ち受けるために植物の導管や根圏に入り込む能力も有する<sup>3)</sup>。近年のゲノム解析研究から、環境変化に素早く対応できるよう、代謝系の遺伝子セットが非常に豊富に存在することが確認されている<sup>4)</sup>。

環境には多く生息している昆虫病原性糸状菌は、これまではヒトの病原菌として考えられなかったが、実際の症例を経験したことによりヒトへの感染源として深く検討すべきであると考えられた。

### 2. 研究の目的

新種と思しきヒトの皮疹から分離された無色糸状菌が、ヒトの病原菌 *Parengyodontium album* と、主要な昆虫病原性糸状菌の仲間、子囊菌のノムシタケ科 (*Cordycipitaceae*) であると簡易同定された。環境には多く生息している昆虫病原性糸状菌は、これまではヒトの病原菌として考えられなかったが、実際の症例を経験したことによりヒトへの感染源として深く検討すべきであると考えた。

本研究では、この新感染症が将来の超高齢社会及び都市型住宅環境において、どの程度人体にリスクを引き起こすかを調査することを目的とし、分類学的研究、疫学的研究および感染メカニズムの特定へ向けた菌の動態調査を行う。

### 3. 研究の方法

#### 1) 分類学的及び疫学的研究

光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態観察、複数遺伝子領域 (rRNA SSU、ITS、LSU、*-tub*、伸長因子、RPB1、RPB2) を用いた系統解析により種同定を行う。

#### 2) 培養性状調査

過去に分離された菌株ライブラリー(千葉大学真菌医学研究センター等、国内外の微生物保存機関の菌株)の近縁種の菌株を取り寄せ、それらの分離された基質、環境、地理的分布、病気の発生の傾向を文献等の資料から調査するとともに、抗真菌剤に対する薬剤感受性試験を行う。

生育温度の調査では、PDA 培地に  $10^5$  個/mL に調整した菌液を 3 点、 $2\mu\text{L}$  ずつ接種し、4 つの温度帯での生育をコロニー直径で計測した。スキムミルク寒天平板培地(スキムミルク 5%、寒天 1.5%)とゼラチン斜面培地(ゼラチン 12%、酵母エキス 0.1%、BHI 2.5%)を用いて基質の溶解の有無を肉眼にて確認する。

#### 3) 病原因子となりえる菌の各種基質に対する分解性能について、昆虫病原性とヒト皮膚に炎症を起こす菌種で比較する。

#### 4) 住環境中、都市型生活、高齢者に注目した環境からのエアースンプラーによる空中浮遊菌叢、拭き取り、土壌からの釣餌法によるサンプリングを実施する。

#### 5) 皮膚に炎症を起こす原因因子の特定

*Parengyodontium album* ではプロテアーゼ K が皮膚の炎症に関与すること、加えて、ゲノム解析された昆虫病原菌の多くはタンパク質分解酵素の遺伝子クラスターを複数持つことが知られている<sup>4)、5)</sup>。おそらく表皮の擦過傷から類似のプロテアーゼ関連酵素が作用するのではないかと仮説をたて、プロテアーゼ関連酵素の単離・精製・同定と菌株の産生能について調査する。

#### 4. 研究成果

対象の2菌株は2018年に中国で記載された新種 *Lecanicillium coprophilum* に最近縁だったが、IFM 61953は系統的位位置ではやや疑問が残る。いずれの菌株でも37℃、PDA培地ではまったく生育しなかった。薬剤感受性試験では30℃でも72時間で対照区の生育も認められなかったため、25℃で試験を行なった。

この結果から、少なくとも深在性の感染症は引き起こすことは考えにくい。皮膚の表面温度は35℃と言われているため、健康なヒトを積極的に侵害するリスクがあるとは言えない。

次に、培養性状調査：スキムミルク培地ではプロテアーゼ生産菌株であればカゼインが消化されて透けて見える。*Parengyodontium album* IFM 57481 (=CBS 121919; 参照株として入手)を除いて、関連種はこの活性が高い傾向が認められた。ゼラチン培地でゲル化させて穿刺培養すると、ゼラチン分解菌株であれば、液化し氷温に戻しても固まらなくなる。*B. bassiana*、*A. muscarius*、*L. tenuipes*ではゼラチン分解能が認められたが、その他の菌株では認められなかった。

続いて、キチン及びケラチンに対する分解活性測定を実施した。

**Table 1 Substrate decomposition performance by culture test.** Substrate dissolution was examined by eight different substrates\* and evaluated visually (-, ±, +, ++).

IFM No.	25 , 10days		30 , 20days					
	Casein	Gelatin	Keratin	Ke + Cz	Chitin	Ch+Cz	Cellulose	Ce+Cz
61953	++	-	±	+	±	±	-	±
62528	+	-	-	+	-	-	-	-
56535	++	-	±	+	-	-	-	±
65740	-	-	±	-	±	±	-	-
57116	±	+	-	+	+	-	-	-
65666	++	±	-	++	-	±	-	-
47175	+	+	±	-	-	-	-	-
57481	-	-	±	-	±	-	-	+

\* **Casein** agar plate:5% skim milk, 1.5% agar, **Gelatin** slant:12% gelatin, 0.1% yeast extract, 2.5% Brain Heart Infusion (BD), **Keratin** agar plate:3% keratin, 1.5% agar, **Ke + Cz**apeck (Cz) agar plate: Ke +Czapeck-dox (OXOID), **Chitin** agar plate: 1% chitin, 1.5% agar, **Chitin + Cz**, **Cellulose** agar plate, 1.5% cellulose, 1.5% agar, **Cellulose + Cz**

*L. coprophilum* IFM 61953, IFM 62528 と *P. album* IFM 56535 の3菌株はカゼインとケラチンを分解した。*L. tenuipes*は菌株によって異なり、IFM 56740はほとんど活性が認められなかったが、IFM 57116はカゼイン、ゼラチン、ケラチン、およびキチンの分解を示した。同様の結果が、関連する *Akanthomyces* 属と *Beauveria* 属で観察された。植物の主成分であるセルロースは、予想通り、ほとんどの株で分解しなかった。昆虫や菌類の主成分であるキチンの分解が不十分なのは、糖類など他の栄養素が不足した影響があるかもしれない。最後に、分光光度計を用いて、キチン及びケラチンの分解活性の定量的な測定を試みたが、活性の良い菌株であっても検出限界以下となり、算出できなかった。

#### 薬剤感受性試験の結果

**Table 2 Antifungal susceptibility (MIC, 25℃)**

IFM No.	MCFG	CPFG	AMPH	5-FC	FLCZ	ITCZ	VRCZ	MCZ	TBF
61953	0.5	1	>16	>64	64	>8	1	4	6.4
62528	2	4	>16	>64	>64	>8	2	2	6.4
56535	2	2	>16	>64	>64	>8	>8	8	3.2
65740	0.25	0.5	>16	>64	>64	>8	>8	>16	6.4
57116	0.12	0.5	>16	>64	>64	>8	>8	>16	6.4
65666	4	4	8	>64	32	2	2	2	3.2
47175	0.25	0.5	2	>64	32	0.5	2	1	1.6
57481	1	2	4	>64	>64	>8	>8	4	3.2

本菌群の薬剤感受性を仔細な種毎に調査した例は今回がおそらく初めてであったが、多くの菌株でVRCZ、ITCZ、(FLCZ、) AMPHに耐性がみられた。感染例は稀ではあったが、皮膚の病変部は白癬菌による症状と類似しているが、原因が白癬菌とは限らない。白癬菌と併発しているか、

または誤同定をして効果のない薬の投与をしないよう注意を要する。

コロナ禍の影響がありサンプルが自宅のみではあるが、元来昆虫病原性である本菌群が環境中でどの程度分布しているかについて、生活環境中のエアースAMPLINGを2020～2022年10日おきに36回行った。合計約800の分離株を得たが、そのうち関連種は3株のみ検出され、*L. coplophilum*は得られなかった。

室内空気中からは検出されず、現状の抗真菌薬はほとんど効果がなく、培地上ではプロテナーゼ産生能がわずかに認められたが、関連酵素の活性は検出限界以下であった。また35で生育できないため、本菌が直接皮膚に感染する能力はないと結論づけた。日和見感染菌とも考えづらいため、バイオセーフティ指針におけるリスク分類は該当なし(クラス1)として良いと考えられる。

#### 【学会発表】

- 第63回日本医真菌学会学術大会(2019年10月), 「昆虫病原性糸状菌による皮膚の症例と原因菌の同定」伴さやか, 高橋容子, 矢口貴志, 鎗田響子, 亀井克彦.
- The 8th Global Network Forum on Infection and Immunity (2020年1月), “Mycological study of *Lecanicillium* spp. causing skin irritation for human.” S. Ban, J. Ito, Y. Takahashi, T. Yaguchi.

#### 【参考文献】

- 1) Nikoh, N., & Fukatsu, T. (2000). *Molecular biology and evolution*, 17, 629-638.
- 2) Zimmermann, G. (2008). *Biocontrol science and technology*, 18, 865-901.
- 3) Posada, F., & Vega, F. E. (2005). *Mycologia*, 97, 1195-1200.
- 4) Xiao, G. et al. (2012). *Scientific reports*, 2, 483.
- 5) Tsang, Chi-Ching, et al. (2016). *Medical mycology*, 54, 699-713.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伴 さやか、高橋 容子、矢口 貴志、鎗田 響子、亀井 克彦
2. 発表標題 昆虫病原性糸状菌による皮膚の症例と原因菌の同定
3. 学会等名 第63回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Ban, J. Ito, Y. Takahashi, T. Yaguchi
2. 発表標題 Mycological study of Lecanicillium spp. causing skin irritation for human
3. 学会等名 The 8th Global Network Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------	---------