

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710277

研究課題名(和文)アゾール系薬剤耐性病原真菌の地理的分布の現状と将来予測

研究課題名(英文)Geographical distribution and triazole resistant of the human pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and related species in Japan

研究代表者

廣瀬 大 (HIROSE, Dai)

日本大学・薬学部・助教

研究者番号：20513922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アスペルギルス症起因菌である *Aspergillus fumigatus* 及びその関連種を対象に、本邦の主に野外環境における地理的分布とアゾール系薬剤に対する耐性株の実態解明を試みた。*A. fumigatus* の分布密度は緯度や土壌環境に影響をうけることが示唆された。本菌のイトラコナゾール(ITCZ)及びボリコナゾール(VRCZ)に対する耐性株は発見されなかった。本菌には地理的距離に関係しない遺伝的分化があることが分かった。一方、*A. fumigatus* 関連種は分離頻度は低い、広く分布していることが明らかになった。これらの種にはITCZやVRCZに耐性のある株が高頻度で存在していた。

研究成果の概要(英文)： *Aspergillus fumigatus* is one of the most important fungal pathogens of humans. Geographical distribution and triazole resistant of *A. fumigatus* and related species have been studied in Japan. The distribution of *A. fumigatus* depended on soil environments and latitude. There was no azole-resistant isolate of *A. fumigatus* from natural environments. The results of population genetical analysis suggested that Japanese *A. fumigatus* genotypes are genetically differentiated into two populations not correlated with geographical distance. *Aspergillus fumigatus* related species were broadly distributed in Japan, though the abundances of these species were much lower than one of *A. fumigatus*. The frequencies of azole resistance of *A. fumigatus* related species from natural environments were much high.

研究分野：複合新領域

キーワード：アスペルギルス症 環境 遺伝的変異 集団遺伝 アゾール 地理的分布

1. 研究開始当初の背景

真菌感染症の中でも深在性真菌症は、ヒトの組織内に侵入して感染を引き起こし重篤化する。深在性真菌症の一つであるアスペルギルス症は、世界中の臨床現場において、特に免疫不全患者における死亡率が極めて高いため、重大な脅威であり続けている (Maschmeyer et al. 2007)。アスペルギルス症の原因菌としては、*Aspergillus fumigatus*、*A. flavus*、*A. niger*などが知られているが、中でも *A. fumigatus* が最も重要な種として認識されている。

近年、*A. fumigatus* において、アゾール系抗真菌薬の一つイトラコナゾールに耐性のある株が北ヨーロッパ各地において発見された。そのため、主に臨床における疫学的研究や薬剤耐性獲得のメカニズムに関する研究がヨーロッパを中心に盛んに行われている (例えば、Howard et al. 2008, Arendrup et al. 2010)。耐性株の存在は当初ヨーロッパでのみ報告されていたが、最近ではアメリカ、カナダ、中国などでも相次いで発見されている (Lockhart et al. 2011)。日本においても Japan Antifungal Surveillance (JAS) Program により行われた調査から、11 施設の臨床から分離された 26 菌株中 1 菌株 (4%) でイトラコナゾール耐性株が発見されており (山口ら 2011)、臨床における更なる調査の必要がある。

このような耐性株は、臨床でアゾール系薬剤に暴露し急速な自然淘汰で広がる場合と、野外環境における農薬 (殺菌剤) の使用による急速な自然淘汰で広がる場合がある (Verweik et al. 2009, Snelders et al. 2009, Snelders et al. 2011)。特に、後者の場合、多くの施設で感染の機会が増すことが想定されるため深刻な問題である。ヨーロッパ同様、本邦においてもアゾール系農薬はうどんこ病やさび病など野菜や果樹の殺菌剤として広く用いられてきたため、農耕地は耐性菌のソースになっている可能性は高い。しかし、本邦における薬剤耐性 *Aspergillus* 属菌の調査は臨床で行われているにすぎず、農耕地を含む野外環境における分布は不明である。このため、農耕地における耐性株の分布を非農耕地と比較しながら地理的なスケールで調査することは緊急に必要である。また、ヨーロッパにおける先行研究では集団遺伝学的解析は殆ど行われていないため、耐性菌の分散プロセスは殆ど分かっていない状況にある。

このような状況を打破するため、本研究では、生態学的及び集団遺伝学的視点から、アスペルギルス症原因菌 (*A. fumigatus* 及び関連種) の、(1) 地理的分布の現状把握すること、(2) その分布と試料採取地点の環境との相関関係を明らかにすること、(3) 分布の将来予測を行うこと、を目的とした研究計画を立案した。

2. 研究の目的

近年、アスペルギルス症の主要原因菌である *Aspergillus fumigatus* において、臨床で頻繁に用いられているアゾール系薬剤に対する耐性株の出現が確認されている。本邦においても耐性株の存在が確認されているが、その分布にみられるパターンや分散プロセスは不明である。本研究では、耐性株の地理的な空間スケールでの分布を、農耕地や森林といった野外環境と臨床における調査から実証的に明らかにする。加えて、集団遺伝学的解析により耐性株の分散プロセスを推定する。本研究による分布の現状把握と将来予測に基づく耐性株拡散のリスク評価は、予防医学的に不可欠な情報を与えるだけでなく、自然界における微生物保全に関して考える糸口を提供する。

3. 研究の方法

(1) 地理的分布の実態調査：

土壌試料の採取

北海道から沖縄県に渡る 22 地域の畑地もしくは森林内において、1m 間隔で 10 箇所以上の地点で約 100g の土壌を採取した (図 1)。西駒ヶ岳、乗鞍岳、立山においては、標高間での分布パターンの比較を行うため、標高約 500m 間隔の 4-6 標高段階で土壌の採取を行った。



図 1 本研究における土壌採取地

菌の分離・培養

採取した各土壌は約 20g ずつ滅菌したガラス瓶内に入れ、その上に滅菌したコーン 10 粒を一定間隔で静置した。ラップで蓋をした後、3 - 7 日間 37℃、暗室下で培養した。培養後、コーンを回収し、0.005% Aerosol OT と滅菌水を用い表面に付着した土壌を洗い流した。洗浄したコーンは滅菌したコーンは濾紙を敷いたガラスシャーレ内で約 1 日間静置させた後、クロラムフェニコールを含有したコーンミールアガール培地 (日水製薬) に静置し室温で数日間培養した。培養後、顕微鏡下で各コーン上に形成された子実体を観察し、*A. fumigatus* 及び関連種と思われる子実体を確認したらその分生子を柄付針で単離し、新たなコーンミールアガール培地に植えた。

菌種の同定

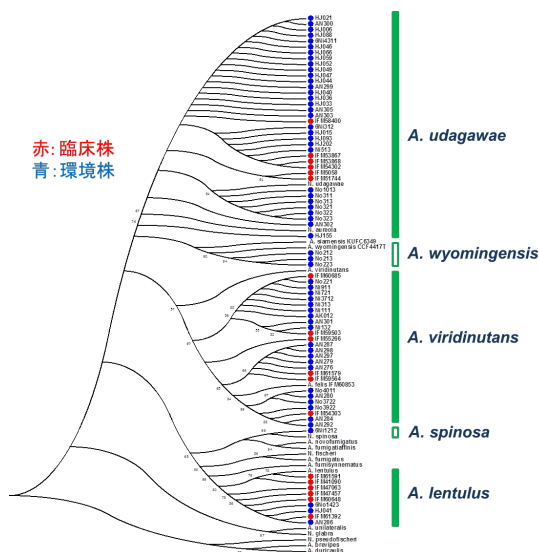


図4 チュープリン遺伝子の部分塩基配列に基づく本研究で分離された *A. fumigatus* 関連種の最尤系統樹

関連種の分布パターンを推定するために各採取地における土壌試料あたりの出現率と土壌採取月の日平均気温の関係を見た。その結果、*A. viridinutans* と *A. udagawae* は幅広い温度域に分布していると考えられた。しかし、いずれの種も出現頻度は *A. fumigatus* に比べ、かなり低く、そのためにこれまでのフロラ調査では、これらの種の存在が見逃がされてきたのかもしれない。

千葉県四街道市における森林と畑地における分布調査の結果、*A. udagawae* は *A. fumigatus* と異なり畑地の環境を好むことが示唆された (図6)。

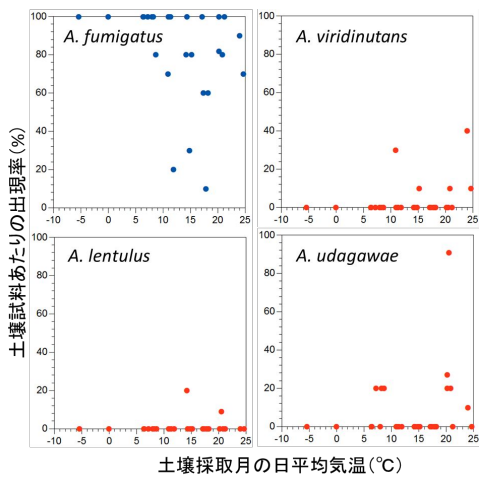


図5 *A. fumigatus* 及び関連種の土壌あたりの出現率と採取月の日平均気温との関係

分離された関連種 58 株に関して薬剤感受性試験を行った。その結果、*A. udagawae* では 34 株中 23 株 (68%) でポリコナゾールに対する耐性が確認された。*A. viridinutans* では 20 株中イトラコナゾールに耐性のある株が 11 株 (55%)、ポリコナゾールに耐性のあ

る株が 18 株 (90%) 見られた。*A. lentulus* では 3 株全てがポリコナゾールに対する耐性が確認された (表)。いずれの種においても、臨床由来の株では耐性株の存在は知られていたが、環境由来の株でもアゾール薬耐性株が高頻度で存在することが初めて明らかになった。

A. viridinutans に関して薬剤感受性と分子系統との関連性を解析した結果、遺伝的に近い株でも薬剤感受性が異なること、耐性がないという形質が派生的な形質であることが推定された (図7)。これらの結果から関連種の多くはアゾール系抗真菌薬に対して一次耐性を持っている可能性が示唆された。

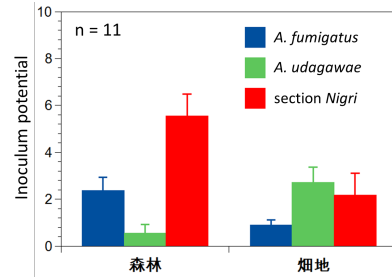


図6 四街道の異なる土壌環境下における inoculum potential の比較

表 *A. fumigatus* 関連種のイトラコナゾール (ITCZ) 及びポリコナゾール (VRCZ) に対する薬剤感受性

species	菌株名	locality	field	altitude	AMPH	ITCZ	VRCZ
Aspergillus lentulus	AN286	鹿児島県野間岳	森林	547m	2	1	>8
Aspergillus lentulus	IFM62096	千葉県四街道市	畑地	17m	2	1	4
Aspergillus lentulus	IFM62073	長野県乗鞍岳	森林	1519m	2	1	8
Aspergillus spinosa	IFM62071	長野県西駒ヶ岳	森林	1150m	1	>8	>8
Aspergillus udagawae	AN300	沖縄県西表島上原	畑地	14m	1	1	4
Aspergillus udagawae	AN303	千葉県佐倉市	森林	12.7m	1	1	4
Aspergillus udagawae	AN299	沖縄県西表島住吉	森林	20m	1	1	4
Aspergillus udagawae	IFM62097	千葉県高塚山	森林	216m	2	1	2
Aspergillus udagawae	IFM62098	千葉県高塚山	森林	216m	2	1	2
Aspergillus udagawae	IFM62099	千葉県高塚山	森林	61m	2	1	2
Aspergillus udagawae	IFM62100	千葉県高塚山	森林	61m	2	2	>8
Aspergillus udagawae	AN305	富山県立山	森林	2500m	2	1	4
Aspergillus udagawae	IFM62070	長野県西駒ヶ岳	森林	680m	1	0.5	2
Aspergillus udagawae	IFM62072	長野県西駒ヶ岳	森林	2600m	2	1	4
Aspergillus udagawae	IFM62077	長野県西駒ヶ岳	森林	680m	2	0.5	4
Aspergillus udagawae	IFM62081	長野県乗鞍岳	森林	1000m	4	0.5	2
Aspergillus udagawae	IFM62082	長野県乗鞍岳	森林	1000m	2	0.5	2
Aspergillus udagawae	IFM62084	長野県乗鞍岳	森林	1000m	8	1	4
Aspergillus udagawae	IFM62090	長野県乗鞍岳	森林	1000m	2	1	2
Aspergillus udagawae	IFM62085	長野県乗鞍岳	森林	1000m	2	1	4
Aspergillus udagawae	IFM62086	長野県乗鞍岳	森林	1000m	2	1	4
Aspergillus udagawae	IFM62087	長野県乗鞍岳	森林	1000m	2	1	2
Aspergillus udagawae	IFM62088	長野県乗鞍岳	森林	1000m	2	1	2
Aspergillus udagawae	IFM62089	長野県乗鞍岳	森林	1000m	2	1	4
Aspergillus udagawae	AN302	京都府深泥池	森林	87.5m	1	1	8
Aspergillus udagawae	IFM62095	千葉県四街道市	畑地	27m	4	1	2
Aspergillus udagawae	HJ006	千葉県四街道市	畑地	31.12m	1	1	8
Aspergillus udagawae	HJ021	千葉県四街道市	畑地	38.09m	2	1	4
Aspergillus udagawae	HJ033	千葉県四街道市	畑地	17.42m	1	1	4
Aspergillus udagawae	HJ036	千葉県四街道市	畑地	30.4m	1	1	2
Aspergillus udagawae	HJ040	千葉県四街道市	畑地	16.94m	1	1	4
Aspergillus udagawae	HJ044	千葉県四街道市	畑地	24.15m	1	1	4
Aspergillus udagawae	HJ046	千葉県四街道市	森林	29.68m	2	1	4
Aspergillus udagawae	HJ047	千葉県四街道市	畑地	31.36m	2	1	4
Aspergillus udagawae	HJ049	千葉県四街道市	森林	30.64m	2	1	4
Aspergillus udagawae	HJ052	千葉県四街道市	畑地	27.04m	2	2	8
Aspergillus udagawae	HJ059	千葉県四街道市	森林	21.27m	2	1	8
Aspergillus udagawae	HJ066	千葉県四街道市	畑地	21.75m	2	1	8
Aspergillus viridinutans	IFM62094	鳥根県出雲市	森林	255m	2	8	8
Aspergillus viridinutans	AN301	沖縄県西表島上原	畑地	14m	1	>8	>8
Aspergillus viridinutans	AN287	鹿児島県くいの松原	森林	20.6m	1	2	>8
Aspergillus viridinutans	AN292	鹿児島県くいの松原	森林	20.6m	1	2	>8
Aspergillus viridinutans	AN297	鹿児島県くいの松原	森林	20.6m	1	1	>8
Aspergillus viridinutans	AN298	福岡県宝満山	森林	380.8m	1	1	8
Aspergillus viridinutans	IFM62074	長野県西駒ヶ岳	森林	680m	2	2	4
Aspergillus viridinutans	IFM62075	長野県西駒ヶ岳	森林	680m	2	>8	>8
Aspergillus viridinutans	IFM62076	長野県西駒ヶ岳	森林	680m	2	2	2
Aspergillus viridinutans	IFM62080	長野県西駒ヶ岳	森林	2150m	2	8	8
Aspergillus viridinutans	IFM62078	長野県西駒ヶ岳	森林	680m	1	4	8
Aspergillus viridinutans	IFM62079	長野県西駒ヶ岳	森林	680m	2	>8	>8
Aspergillus viridinutans	AN284	鹿児島県野間岳	森林	547m	1	4	>8
Aspergillus viridinutans	IFM62083	長野県乗鞍岳	森林	1000m	4	0.5	2
Aspergillus viridinutans	IFM62091	長野県乗鞍岳	森林	2650m	2	4	>8
Aspergillus viridinutans	IFM62092	長野県乗鞍岳	森林	2650m	2	4	>8
Aspergillus viridinutans	IFM62093	長野県乗鞍岳	森林	2650m	2	>8	>8
Aspergillus viridinutans	AN276	北海道鶴阿寒岳	森林	976m	1	2	>8
Aspergillus viridinutans	AN279	北海道鶴阿寒岳	森林	976m	2	4	>8
Aspergillus viridinutans	AN280	北海道鶴阿寒岳	森林	976m	1	1	>8

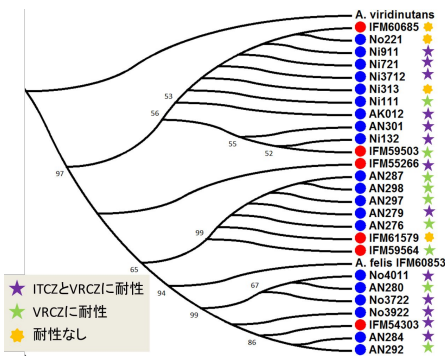


図7 *A. viridinutans* における薬剤感受性と分子系統との関連性

(2) 集団遺伝学的パターンの調査

A. fumigatus 141 株に関して RAD-Seq 法を行ったところゲノム中に散在する 390 遺伝子座で SNP を検出でき、それらに基づき各菌株の遺伝子型を決定した。

集団内（個体間）及び集団間に分かれる各階層に占める遺伝的変異の割合を示すことが出来る分子分散分析を行った結果、集団間での遺伝子の交流が著しいものの、7% 程は集団を特徴づけていることが明らかになった。集団間の遺伝的な違いの程度を評価した結果、地理的位置との関連性がみられる集団も存在すること、島嶼と亜高山帯の集団は特徴的であることが明らかになった（図 8）。STRUCTURE 解析による集団構造の推定を行った結果、地理的位置とは相関しない 2 つの集団に分けられたが、どちらの集団が祖先的であるかは分からなかった。またこの解析結果から、本州の低地では集団 2 の比率が高いこと、島嶼における 2 つの集団の比率の変化と本州からの地理的距離との間に相関があることが明らかになった（図 9）。さらに、集団間で遺伝的多様性を比較した結果、高標高集団でも高い遺伝的多様性を維持していること、島嶼では本州からの地理的距離と共に多様性が減少していることが明らかになった（図 10）。

これらの結果から、本邦における *A. fumigatus* の種及び遺伝的変異の分布にはパターンがみられる可能性が示唆された。しかし、その制限要因は现阶段では未解明であり、多くの生物で制限要因とされる地理的距離や気候帯だけではないものと思われる。

本研究の結果、*A. fumigatus* 関連種ではイトラコナゾールやボリコナゾールに耐性のある株が環境中から分離されたが、分離頻度が低すぎるため、その拡散リスクの評価に至らなかった。*A. fumigatus* に関してはこれらの薬剤に対する耐性株は確認されなかった。しかし、近年臨床由来ではあるがアジア諸国において耐性株の存在が確認されており、拡散リスクの評価は緊急を要する。本研究で得られた結果から判断すると、体系立てたサンプリングを継続し、集団遺伝学的解析を行うことにより、自然環境中における本種

の分散プロセスを解明できると考えられる。加えて、島嶼における集団遺伝学的パターンから判断すると、大陸スケールでの分布調査を進めることにより、地理的距離に対応した遺伝的構造がみえてくる可能性も否定できない。このような理解によって、*A. fumigatus* における地球環境変動による分布変化予測や薬剤耐性菌の拡散リスクの評価につながると思われる。

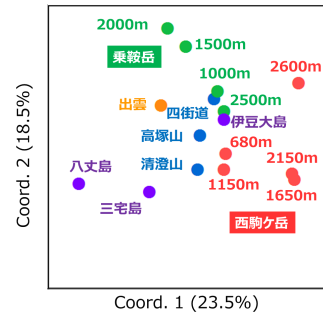


図8 *A. fumigatus* 集団間の遺伝的変異

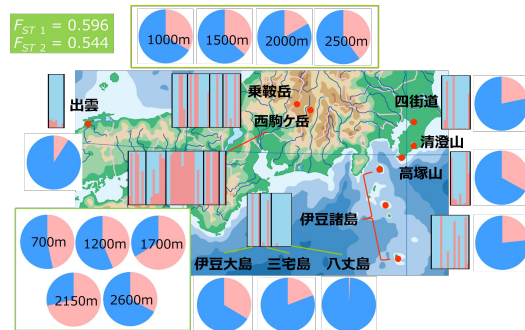


図9 STRUCTURE 解析による *A. fumigatus* の集団構造の推定

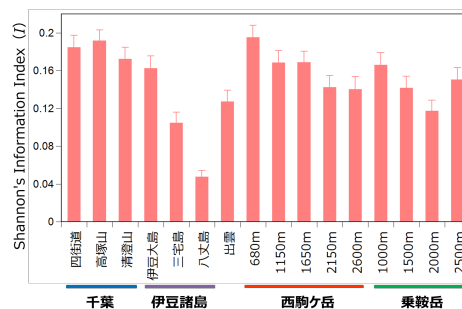


図10 *A. fumigatus* の集団内の遺伝的多様性

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Rui Kano, Erina Kohata, Akira Tateishi, Somay Yamagata Murayama, Dai Hirose, Yasuko Shibata, Yasuhiro Kosuge, Hiroaki Inoue, Hiroshi Kamata, Atsuhiko Hasegawa (2015) Does farm fungicide use induce azole resistance in *Aspergillus*

fumigatus?. *Medical Mycology*, 53: 174-177

〔学会発表〕(計 5 件)

廣瀬大・永野惇・本庄三恵・八杉公基・工藤洋・村山そう明・加納壘・小菅康弘・田中陽子「自然環境中における *Aspergillus fumigatus* の分布パターン」真菌症フォーラム第 16 回学術集会 2015 年 2 月 14 日 第一ホテル東京(東京・新橋)

矢口貴志, 伊藤純子, 今西由己, 廣瀬大「本邦環境中からの *Aspergillus fumigatus* 及び関連種の分離とその薬剤感受性」第 58 回日本菌学会 2014 年 6 月 14 日 サイエンスヒルズこまつ(石川・小松)

矢口貴志, 廣瀬大, 伊藤純子, 松澤哲宏, 村山琮明「本邦環境中からの *Aspergillus fumigatus* 関連種の分離とその薬剤感受性」第 57 回日本医真菌学会総会 2013 年 9 月 27 日 京王プラザ(東京・新宿)

廣瀬大「*Aspergillus* 属の分子生態学 - 自然環境における生活様式を探る」第 57 回日本医真菌学会総会 ワークショップ 2013 年 9 月 27 日 京王プラザ(東京・新宿)

廣瀬大「目にみえない菌類のクローナルな生き方: 主に病原菌を材料とした分子生態学研究に関する話題」シンポジウム「生物のクローン性: クローン増殖による分散と局所環境変化への応答からその有効性を考える」第 60 回日本生態学会 2013 年 3 月 7 日 静岡県コンベンションアーツセンター(静岡・静岡)

〔図書〕(計 1 件)

廣瀬大 (2015) 第 21 章 ヒトの真菌感染症
In: 感染症の生態学 共立出版

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 大 (HIROSE Dai)
日本大学・薬学部・助教

研究者番号: 20513922

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号: