

論文の内容の要旨

氏名：渡 部 浩 平

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：野外環境におけるアゾール耐性 *Aspergillus fumigatus* 関連種の分布特性

はじめに

近年、世界の臨床現場においてアゾール系薬に対する耐性株の出現が問題となっている。特に高い致死率を示す *Aspergillus fumigatus* における耐性化は問題とされ、耐性化のメカニズムを中心に多くの研究が行われている。一方、本種に加え世界的に注目されている分類群の一つが本種に遺伝的に近縁な *A. fumigatus* 関連種である。本分類群の複数種の臨床株でアゾール系薬に対する耐性株が相次いで報告された。臨床株を材料とした分類学的研究や耐性メカニズムの研究が進む一方で、本来の生活場所である野外環境における分布の実態はほとんど分かっていない。そこで、本研究では以下の 3 つの研究テーマを遂行することにした。第 1 章は本邦の野外環境において本分類群が分布しているかどうかの調査及び、野外環境株と臨床株を用いた薬剤感受性試験の比較を行った。第 2 章では伊豆・小笠原諸島における本分類群の分布特性の調査を行った。第 3 章では集団遺伝学的手法により本分類群の遺伝子流動の有無を検討した。

第 1 章 本邦の野外環境及び臨床から分離された *A. fumigatus* 関連種のアゾール耐性

【目的】

近年、アゾール系薬に対する耐性を示す *A. fumigatus* 関連種が複数種で報告されている。Itraconazole (ITCZ) 及び Voriconazole (VRCZ) に対して 4mg/L 以上の最小発育阻止濃度 (MIC) を示す *A. fumigatus* 関連種として *A. felis*、*A. lentulus*、*A. pseudoviridinitans*、*A. udagawae*、*A. viridinitans* が報告されている。しかし、殆どの報告は国外の臨床株に基づくものであり、野外環境株を大規模に調査した研究や野外環境株と臨床株を比較した研究は殆どない。本章では本邦の野外環境から *A. fumigatus* 関連種の分離培養を試み、得られた菌株について最新の分類体系に基づく種同定を行った後、ITCZ 及び VRCZ に対する耐性を評価した。合わせて、本邦の臨床株についても同様の評価を行い野外環境株との比較を行った。

【方法】

北海道から沖縄にわたる 17 地点の野外環境で土壌を採取した。各調査地点における植生は、裸地、草地、森林、畑地に分けることができた。採取した土壌から滅菌コーン粒を用いた土壌ベイト法により分離培養を行った。臨床株に関しては千葉大学真菌医学研究センターに寄託された菌株を用いた。これらの菌株から DNA 抽出をおこない、 β チューブリン遺伝子の部分塩基配列を決定した。得られた塩基配列を基に分子系統解析を行うと共に形態観察を行い各菌株の菌種を同定した。全ての菌株について、微量液体希釈法による ITCZ および VRCZ への薬剤感受性試験を行い MIC を決定した。

【結果および考察】

本邦の野外環境から 72 菌株の *A. fumigatus* 関連種を分離培養することができ、それらは *A. felis*、*A. lentulus*、*A. pseudoviridinitans*、*A. udagawae*、*A. wyomingensis* に同定された。*A. felis* は裸地、*A. pseudoviridinitans* は草地、*A. udagawae* は畑地で分離される頻度が高く、*A. wyomingensis* は森林のみから分離された。臨床株を含めた分子系統解析の結果、いずれの種においても環境株と臨床株は遺伝的に類似していることが明らかになった (図 1)。薬剤感受性試験の結果、ITCZ および VRCZ に対して 4mg/L 以上の MIC を示した耐性株は、それぞれ 26.4% と 79.2% であった (表 1)。このうち ITCZ および VRCZ の両方に対し、8mg/L 以上の MIC を示した種は *A. felis* および *A. pseudoviridinitans* であった。これらの結果から、ITCZ および VRCZ に耐性を示す *A. fumigatus* 関連種が、本邦の野外環境に普遍的に分布していることが明らかになった。

第 2 章 伊豆・小笠原諸島における *A. fumigatus* 関連種の分布特性

【目的】

第 1 章では本邦の野外環境に *A. fumigatus* 関連種が広く分布していること確認されたが、本分類群が具体的にどの様な野外環境に分布しているか定量的に明らかにすることはできなかった。*A. fumigatus* は中緯度の森林に多く分布する傾向があると報告されているが、*A. fumigatus* 関連種については情報が断片的で体系的に分布特性を明らかにした研究はない。そこで、本章では伊豆・小笠原諸島を調査地とした *A. fumigatus* 関連種の分布調査を行った。伊豆・小笠原諸島は海洋島で、本州からの距離に勾配があり、狭い面積の中に多様な植生がみられる。この様な特徴は各菌種の現在の分布にみられる特性や分布の形成プロセスを考察する上で適したフィールドであると考えた。

【方法】

2018 年から 2020 年にかけて大島、利島、式根島、神津島、三宅島、八丈島（以上、伊豆諸島）、鴛島、父島、母島（以上、小笠原諸島）において調査を行った。各調査地点の植生は裸地・草地（19 地点）及び、森林（49 地点）が含まれていた。各地点で 8-15 個の土壌を採取した。第 1 章と同様のベイト法で *A. fumigatus* 関連種の分離培養を行い、カルモジュリン遺伝子の部分塩基配列に基づく分子系統解析と形態観察に基づき菌種の同定を行った。菌株の種同定の結果を基に、各菌種の調査地点毎の土壌試料数あたりの出現頻度及び、各種が量的にどのくらい分布するかを示すアバンダンスを算出した。アバンダンスを基にした NMDS 解析を行い、クラスター間の距離を算出した。これらの調査に加え、三宅島の草地および森林の 2 地点において、2019 年 9 月から 2 か月毎に土壌を採取し、*A. fumigatus* 関連種の種構成が調査時期によって変化するか検討した。

【結果および考察】

伊豆・小笠原諸島において *A. felis*、*A. pseudoviridimitans*、*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. pseudoviridimitans* の出現頻度が高かった。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* の出現頻度が高い事が明らかになった（図 2）。また、島間で優占する菌種が異なっており、大島から式根島間で *A. felis*、神津島から八丈島間で *A. pseudoviridimitans*、小笠原諸島で *A. udagawae* が優占して分布していた。*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。NMDS 解析では、*A. felis*、*A. pseudoviridimitans*、*A. udagawae*、の各のクラスターと *A. fumigatus* の 3 つのクラスターの合計 6 つのクラスターを形成していた（図 3）。クラスター間では、島間または植生間で各菌種の出現頻度が高い調査地の集団同士の距離が近く、異なる菌種間では距離が離れて配置された（図 3）。出現頻度及びアバンダンスから、*A. fumigatus* 関連種及び *A. fumigatus* の分布特性にはパターンが見られ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. pseudoviridimitans* 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。

第 3 章 伊豆・小笠原諸島でみられる *A. fumigatus* 関連種の遺伝子流動

【目的】

第 2 章では *A. fumigatus* 関連種は野外環境に一樣に分布しているのではなく裸地や草地に広く分布していることが明らかになった。この様な環境は同一島内では連続的に分布していることが多いが、島間では不連続になる。そのため本菌群が分布を拡大するためには島間を孢子で分散し定着する必要がある。本章では各島で分離された菌株の遺伝情報を用い、各菌種の島間での遺伝子流動の程度を明らかにすることを目的とした。

【方法】

伊豆・小笠原諸島に広く分布する *A. felis* (39 菌株)、*A. pseudoviridimitans* (33 菌株)、*A. udagawae* (29 菌株) を研究対象とした。DNA を抽出後、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 (SNP) を網羅的に検出できる GRAS-Di 解析を行い、各菌株の遺伝子型を決定した。得られた

SNP データを基に菌種毎に分子系統解析を行うと共に、遺伝子流動を評価するパラメータの一つである F_{ST} を各島間で算出した。さらに、ベイズ法を用いたクラスタリングにより各菌株が由来する祖先集団を推定する STRUCTURE 解析を行った。

【結果および考察】

GRAS-Di 解析により、*A. felis* で 27847 ケ所、*A. pseudoviridinutans* で 17165 ケ所、*A. udagawae* で 4128 ケ所の SNP に基づき各菌株の遺伝子型を決定できた。これらのデータを基に分子系統解析と F_{ST} を算出した所、*A. felis* では式根島と三宅島が遺伝的に類似している一方、伊豆大島はこれらの島よりも北海道の十勝岳と類似していることが明らかになった (図 4)。*A. pseudoviridinutans* では、島間の距離が近い三宅島と神津島の間よりも、三宅島と八丈島の方が遺伝的に類似していることが明らかになった (図 4)。*A. udagawae* では、小笠原諸島の島間では頻りに遺伝子流動が行われている一方、これらの島々と伊豆諸島との間では遺伝子流動の頻度が低いと考えられた (図 4)。STRUCTURE 解析の結果は、*A. felis* の一部を除き、各島間で遺伝子流動が生じていることが明らかになった。これらのことから少なくとも *A. felis* と *A. pseudoviridinutans* については分布拡大のプロセスにおいては地理的な距離以外の要因も重要であることが示唆された。

総合考察

本研究により、本邦の野外環境にはアゾール耐性 *A. fumigatus* 関連種が分布し、それらは臨床で検出された菌株と遺伝的に極めて近いことが明らかになった。また、伊豆・小笠原諸島における野外調査の結果、本分類群は裸地・草地のような土壌環境の変化が著しい場所に多く分布していることが分かった。ゲノムワイドな遺伝子型データに基づく解析からは、*A. felis* 及び *A. pseudoviridinutans*、*A. udagawae* の孢子による長距離分散の可能性が示唆された。孢子分散後に辿り着いた場所で定着し分布域を拡大することは通常ではその場所に既に定着している他の菌種との競争などで簡単にはできないと思われる。しかし本研究の結果を踏まえると、森林伐採や地球温暖化による森林の衰退が進めば潜在的にはアゾール耐性 *A. fumigatus* 関連種の分布が拡大する可能性があると考えられる。

表 1 ITCZ および VRCZ に対する薬剤感受性試験の結果

種名	種数	分離源	MIC (mg/L)			
			ITCZ	VRCZ		
<i>A. felis</i>	14	野外	4	4	6	14
	4	臨床	3	1		2
<i>A. lentulus</i>	4	野外	4			4
	6	臨床	6			1
<i>A. pseudoviridinutans</i>	17	野外	1	3	13	2
	3	臨床	1	2		1
<i>A. udagawae</i>	34	野外	32	2		11
	8	臨床	8			2
<i>A. wyomingensis</i>	3	野外	3			2

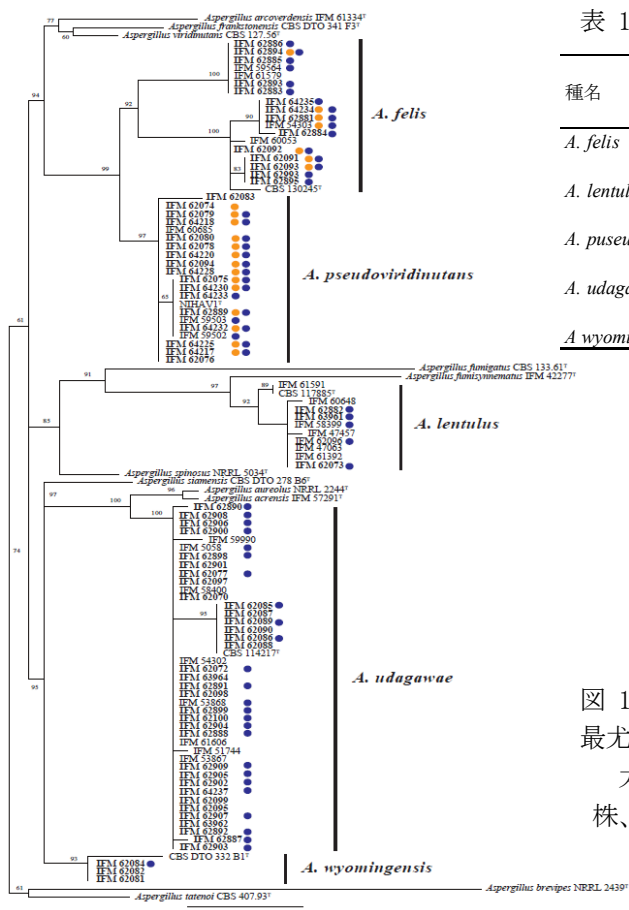


図 1 β チューブリン遺伝子領域の部分塩基配列に基づく最尤系統樹

太字の菌株名は環境由来株、オレンジ丸は ITCZ 耐性株、青丸は VRCZ 耐性株の (MIC \geq 4 mg/L) を示す

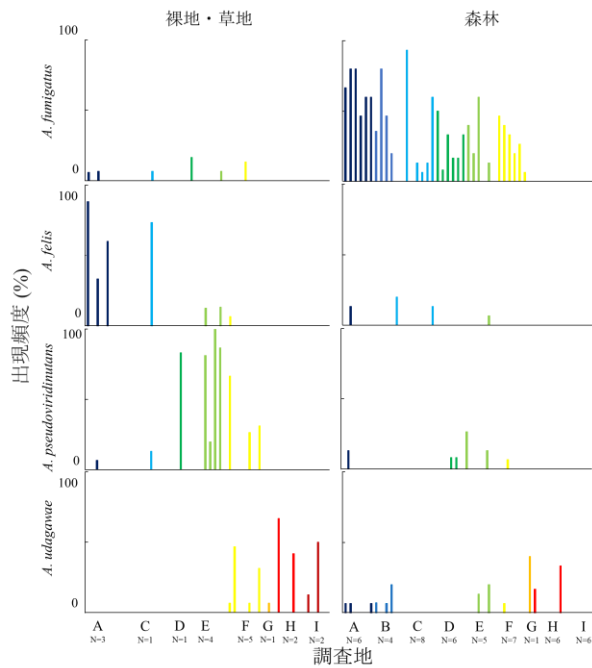


図2 各調査地点における菌種毎の出現頻度
 調査地は、A：大島、B：利島、C：式根島、D：神津島、E：三宅島、F：八丈島、G：聳島、H：父島、I：母島を示す。各調査地の下部のNは調査地点数を示している。

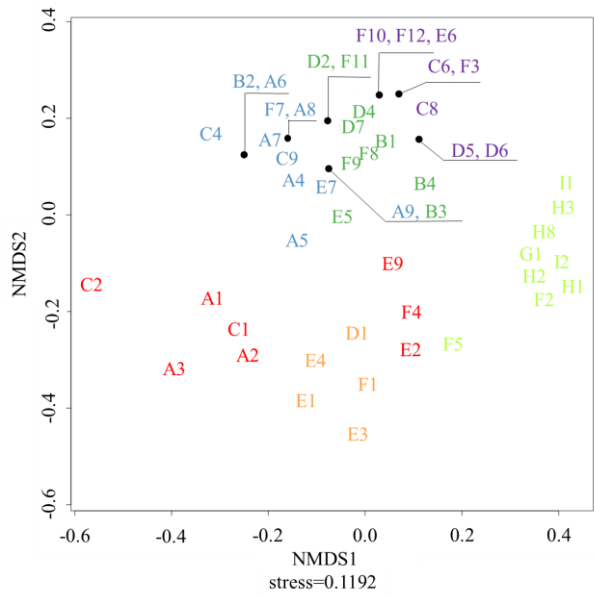


図3 アブundanceに基づく NMDS 解析の結果
 英数字は調査地点の番号を示す。

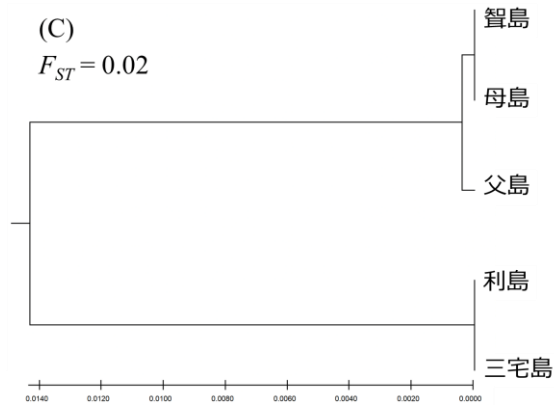
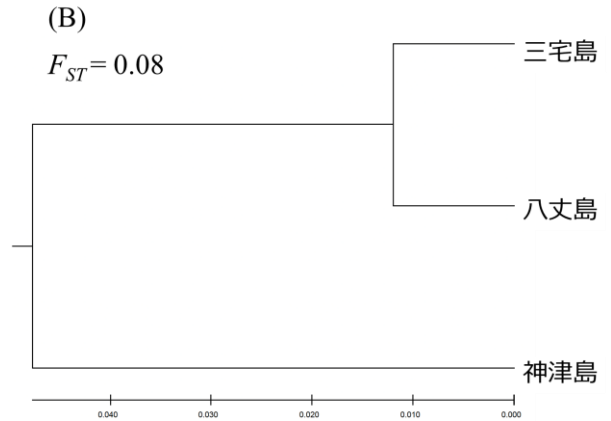
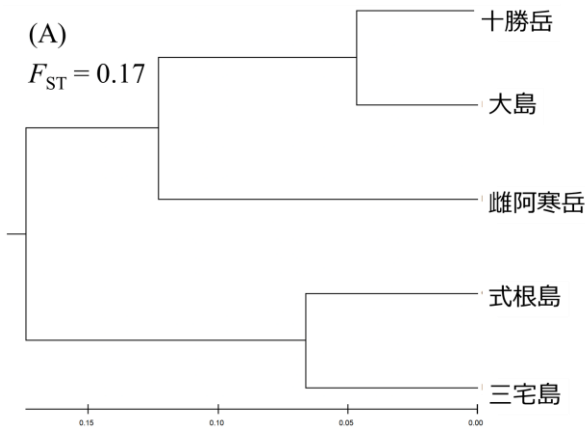


図4 F_{ST} に基づく *A. fumigatus* 関連種の集団間の遺伝的類縁関係
 (A) : *A. felis*, (B) : *A. pseudoviridinutans*, (C) : *A. udagawae* を示している。