

財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2013 年 3 月 11 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 横山 耕治
所属機関名：千葉大学 真菌医学研究センター
所属部署名：病原機能研究分野 職名：准教授
所 在 地：千葉市中央区亥鼻 1-8-1
電 話：043-226-2789 (直) 内線：5917

1. 助成金額： 90 万 円

2. 研究テーマ

フサリウム症原因菌と畑土壌のフサリウム属菌の生態に関する研究・調査

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 横山 耕治	職名：准教授
所属機関名：千葉大学 真菌医学研究センター	部署名：病原機能
中国側研究者氏名： 王 麗	職名：教授
所属機関名：吉林大学 白求恩医学院	部署名：病原生物学 教室

4. 当該研究における発表論文等

Dan He, Jilong Hao, Bo Zhang, Yangiu Yang, Wengang Song, Yunfeng Zhang, Koji Yokoyama, and Li Wang : Pathogenic Spectrum of Fungal Keratitis and Specific Identification of *Fusarium solani*. Immunology and Microbiology Investigative Ophthalmology & Visual Science, 52(2011),5,2804-2808

－日中医学協会助成事業－

フザリウム症原因菌と畑土壌のフザリウム属菌の生態に関する 研究・調査

研究者氏名	准教授 横山 耕治
日本所属機関	千葉大学 真菌医学研究センター
中国研究者氏名	教授 王 麗
中国所属機関	吉林大学 白求恩医学院

調査概要：

フザリウム属菌は、角膜真菌症を起こし、*Fusarium solani* によることが多い。本菌属は抗真菌剤に対して抵抗性を示し抗真菌剤による治療を難しくしている。更に、本菌属には植物病原菌を含み、作物に大きな被害を出すことから、多量の農薬を使うことがあり、薬剤に対する耐性を獲得し更に薬剤耐性度を高めていると考えられる。従って、フザリウム症原因菌と畑土壌のフザリウム属菌の生態を調査、研究する必要性と緊急性が求められている。本研究課題は吉林大学王教授と2006年以来継続して行っており、本研究助成により中国山西省、甘粛省の調査、日本飛騨、能登の調査を行なった。

中国で66試料、日本国内16試料を採取した。菌の分離作業は続いているが、現在までに分離した菌は、中国で156株、日本で15株を分離した。本調査対象であったフザリウム属菌18株、*Aspergillus niger* 近縁株33株であった。遺伝子型の解析は現在進行中である。

Key Words：フザリウム症原因菌、フザリウム属菌の生態

調査目的：

フザリウム属菌は、病原菌、植物病原菌を含み、真菌の中でも重要な菌群であり、植物病原菌は作物に大きな被害を出すことがあり、特に重要視されている。また、病原真菌として角膜真菌症を引き起こす菌を含んでおり医真菌の分野でも重要な菌群である。

病原真菌の中でフザリウム属菌は治療に用いられる抗真菌剤に対して抵抗性を示し、治療を難しくしている。更に、農業分野では大量の農薬を使用することにより、薬剤耐性菌の出現が懸念されている。

従って、フザリウム症原因菌と畑土壌のフザリウム属菌の生態を調査、研究は緊急の課題になっている。一方、本属菌は、形態的な特徴に乏しく形態的な分類が困難な菌属でもある。本菌属の分類、同定にはDNA解析が不可欠である。我々は、ミトコンドリア・チトクローム b 遺伝子の部分解析により病原真菌と近縁菌の遺伝子分類を進めてきた。このチトクローム b 遺伝子（約400bp）の解析で、真菌の同定が可能で、種内の変異も解析できることを示してきた。

本調査では、山西省、河南省、甘粛省の土壌を採取し、吉林大学で菌の分離を行い、日本での調査は飛騨、能登の土壌を採取し千葉大真菌医学研究センターで菌の分離を行い、中国と日本で分離した菌株は、吉林大学と千葉大学で保存し、千葉大で遺伝子の解析を行うこととした。

本研究調査とこれまでに継続してきた研究調査を含めてフザリウム属菌の遺伝子解析と薬剤耐性を調べることで、臨床分離株と環境分離株の遺伝子分類による株間遺伝子型と薬剤耐性の関係を明らかにしたい。

調査方法：

吉林省、貴州省の試料は、吉林大学で採取し、山西省（平成24年6月11日～17日）、河南省・甘粛省（平成24年9月9日～20日）、王教授を招へい(平成24年11月8日～15日)し、飛騨、能登の調査を行った。

フザリウムの選択培地として、知られる駒田培地を市販が中止された農薬（PCNB：75%水和剤）に変えて、その主成分であったPentachloronitrobenzene 22mgをDMSO（Dimethyl sulfoxide）1mlに溶解し500mlにくわえて変法駒田培地として、フザリウム選択培地として使用した。

変法駒田培地組成、作成法：組成（500ml水溶液中）

A液：300mlの脱塩水に

10g	D(+)-ガラクトース
1g	L-アスパラギン(1水和物)
1g	KH ₂ PO ₄
250mg	KCl
250mg	MgSO ₄ ・7H ₂ O
5mg	Fe(III)-EDTA
7.5g	寒天

オートクレーブ滅菌後約60℃まで冷ます。

B液：200mlの脱塩水に

250mg	コール酸ナトリウム(=オックスゴール)
0.5g	Na ₂ B ₄ O ₇ ・10H ₂ O
150mg	ストレプトマイシン硫酸塩

を溶解し、ポアサイズ0.2μmのフィルターで除菌したものを

A液（約60℃）に加える。

C液：22mg PCNB(Pentachloronitrobenzene)を

1ml DMSO(Dimethyl sulfoxide)に溶解し、

A+B液にC液を加える。

この時点で、pH6.8位なので、10%リン酸（約2ml）を加え、10%リン酸でpH3.8に調整する。シャーレーに流し込んで固化させる。

採取した土壌は1gを10mlの滅菌水に懸濁し、PDA(ポテトデキストロース寒天)培地及び変法駒田培地プレートに0.1mlを均一に塗布し、25℃にて培養後生育してきたコロニーから菌を分離した。

分離菌は、吉林大学と千葉大学で保存し、遺伝子解析は千葉大学真菌医学研究センターで行った。

調査地、土壌採取地：

表 1

山西省調査試料採取	
地名	日付
山西省洪洞	H24. 6. 12
山西省臨汾	H24. 6. 12
山西省 王家大院1, 2, 3	H24. 6. 13
山西省 五台山2, 3, 4	H24. 6. 14
山西省 大同五台山	H24. 6. 14
山西省 吉県	H24. 6. 15
山西省 懸空寺1, 2	H24. 6. 15

表 2

河南省、甘肅省調査試料採取	
地名	日付
河南省 洛陽 龍門石窟 1, 2, 3, 4, 5	H24. 9. 11
甘肅省 天水市麦積山1, 2, 3, 4, 5	H24. 9. 12
甘肅省 甘谷大像山1, 2, 3, 4, 5	H24. 9. 13
甘肅省 武山水簾洞1, 2, 3, 4, 5	H24. 9. 13
甘肅省 永靖炳靈寺	H24. 9. 15
甘肅省 蘭州 蘭山	H24. 9. 15
甘肅省 張掖丹霞山1, 2	H24. 9. 16
甘肅省 張掖馬蹄寺1, 2	H24. 9. 16
甘肅省 張掖大佛寺1, 2	H24. 9. 16
甘肅省 嘉峪関文殊山	H24. 9. 17
甘肅省 嘉峪関長城第一墩	H24. 9. 17
甘肅省 敦煌榆林1, 2	H24. 9. 18
甘肅省 敦煌陽関1, 2, 3	H24. 9. 18
甘肅省 敦煌莫高窟1, 2, 3	H24. 9. 19

調査結果：

調査地(表 1－4)に示す調査地点で合計82試料を採取し、表5に示すように分離株180株、*Fsarium*属菌18株、2006年以来継続して行っている*A. niger* 33株を分離した。

表 3

王麗教授招へい調査	
地名	日付
高山市郊外	H24. 11. 12
飛騨古川駅	H24. 11. 12
飛騨古川大銀杏下	H24. 11. 12
荘川桜	H24. 11. 12
御母衣	H24. 11. 12
白川郷 展望台	H24. 11. 12
五箇山 相倉合掌集落	H24. 11. 13
五箇山 ダム湖	H24. 11. 13
五箇山 菅沼集落	H24. 11. 13
金沢市郊外	H24. 11. 13
能登 柳田	H24. 11. 13
輪島	H24. 11. 14
輪島 白米町 千枚田	H24. 11. 14
能登	H24. 11. 14
能登 三崎町	H24. 11. 14
能登 見附島	H24. 11. 14

表 4

吉林大学 採取

試料採取地
長春 実験室浮遊菌 1, 2
重慶 武隆土壌 1, 2
貴陽 盆景園土壌 1, 2
吉林 長白山積雪草土壌 1, 2
吉林 長春 南湖土壌 1, 2
吉林 三角龍湾土壌 1, 2
吉林 長春 花園土壌

<i>F. solani</i>	2株
<i>F. oxysporum</i>	5株
<i>F. poae</i>	2株
<i>F. semitectum</i>	2株
<i>F. tricinctum</i>	1株
<i>Fsarium</i> sp.	6株

は、それぞれに同定された。

分離株180株で未同定株については、遺伝子解析を進める。

A. niger に関しては継続的にチトクロームb遺伝子とリボゾーム遺伝子のD1D2領域を調べ、遺伝子型の分類と地域特性について解析を進める。

調査に関する考察：

F. solani は臨床分離株として高頻度に分離され、*F. oxysporum* は、植物病原菌として高頻度に分離される。今後継続して、これらの菌の薬剤感受性試験を行い、薬剤耐性菌の出現率や体性の程度を把握し、*Fusarium* 属菌の生態とともに明確にしていく。

本研究課題は、本年の研究助成以前から吉林大学王麗教授との共同研究で進められており、その成果は、Investigative Ophthalmology & Visual Science, April

2011, Vol. 52, No. 5. P2804-2808 に、角膜真菌症の原因菌種のスペクトラムと原因菌である*F. solani* の迅速同定プライマーについて報告した。

本研究成果は、*Fusarium* 属菌の生態と薬剤耐性菌の分布、耐性メカニズムの解明に貢献できると確信している。

発表論文：

Dan He, Jilong Hao, Bo Zhang, Yangiu Yang, Wengang Song, Yunfeng Zhang, Koji Yokoyama, and Li Wang: Pathogenic Spectrum of Fungal Keratitis and Specific Identification of *Fusarium solani*. Immunology and Microbiology Investigative Ophthalmology & Visual Science, 52(2011), 5, 2804-2808

表 5

採取土壌数			
	吉林、貴州	15	
	山西省	12	
	甘肅省	39	66
	飛驒、能登	16	
		合計	82
分離株数			
	吉林、貴州	22	
	山西省	28	
	河南、甘肅省	115	165
	飛驒、能登	15	
		合計	180
<i>Fsarium</i> 属菌			
	吉林、貴州	8	
	山西省	1	
	河南、甘肅省	9	
	飛驒、能登	0	
		合計	18
<i>A. niger</i>			
	吉林、貴州	8	
	山西省	1	
	河南、甘肅省	6	15
	飛驒、能登	18	
		合計	33

作成日：2013年 3月12日