（ 様式D－２ ）
（ 別　　紙 ）

令和６年度　海外派遣研究員研究報告書〔研究実績〕

令和　7　年　9　月　10　日

日本大学理事長　　殿
日本大学学長　　殿

所　　属　　薬学部
資格・氏名　　教授・廣瀬　大

令和 6年度海外派遣研究員（短期 A）の研究実績を，下記のとおり報告いたします。

記

１　区　　分　　短期 A
２　研究課題

ハワイ諸島における病原真菌の種多様性に関する調査

３　派遣期間　　西暦　2025　年　1　月　6　日　～　2025　年　4　月　27　日
４　派　遣　先　　アメリカ合衆国
５　研究目的

真菌は胞子などの分散体を介して大陸間のような長距離を分散しているのだろうか？その可能性を評価することは、病原真菌の地理的分布の将来予測をする上で重要である。ハワイ諸島は太平洋の中央に位置する海洋島で、地球上で最も大陸から離れた島嶼の一つである。このことはハワイ諸島が真菌の長距離分散を評価するのに絶好のフィールドであることを意味している。しかし、ハワイ諸島における真菌の多様性研究は動植物に比べて遅れており、病原真菌の分布パターンが明らかにされている種は殆どない。そこで本調査では、オアフ島を中心に病原真菌種を含む属である *Aspergillus* 属と *Penicillium* 属をターゲットとした多様性調査を行うことにした。これらの属は派遣者が日本国内や欧州で多様性研究の対象としてきた材料であり、それらのデータとの比較を最終的に行うことができる。本研究の最終的な目的はハワイ諸島に分布する真菌が貿易風のような大気の流れの影響を受けて長距離分散しているかを評価することであるが、派遣期間中にはハワイ諸島の対象菌群の菌株を確保することを目標とした。

（ 様式D－２ ）

６　研　究　概　要

①　研究の方法

本研究では *Aspergillus* 属と *Penicillium* 属を調査対象としハワイ諸島における種多様性調査を行った。両属の分離源として土壌、植物根、蜂蜜を選択した。土壌と植物根はオアフ島で採取し、蜂蜜はハワイ諸島の主要な島で生産されたものを入手した。採取もしくは入手した分離源からの菌の分離培養は、土壌からは滅菌コーンを用いたベイト法、植物根からは表面洗浄法と好稠性培地を用いた選択分離法、蜂蜜からは好稠性培地を用いた希釈平板法により行った。

②　渡航先での活動内容

現地共同研究者と相談し、2025 年 2 月にオアフ島の 3 調査地（図 1; Waimānalo Research Station、Poamoho Research Station、Harold L. Lyon Arboretum）において土壌（各調査地毎に森林 10–20 箇所と草地 10 箇所、合計 70 試料）と植物根（合計 20 科 28 種 35 試料）を採取した。試料を採取後、ハワイ大学マノア校土壌微生物生態学研究室において、土壌からは滅菌コーンを用いたベイト法、植物根から洗浄法によりそれぞれから *Aspergillus* 属と *Penicillium* 属を分離培養することができた。加えて両属が頻繁に分離されている蜂蜜からの菌株の獲得を試みた。2025 年 1 月から 3 月にかけて 4 島産 59 試料（ハワイ島 27 試料、カウアイ島 7 試料、マウイ島 5 試料、モロカイ島 1 試料、オアフ島 19 試料）と比較対象のアメリカ本土産 8 試料を市場などから入手した。同研究室において DG18 培地を用いた希釈平板法による選択培養を行い、*Aspergillus* 属と *Penicillium* 属を含む純粋培養株を確立した。

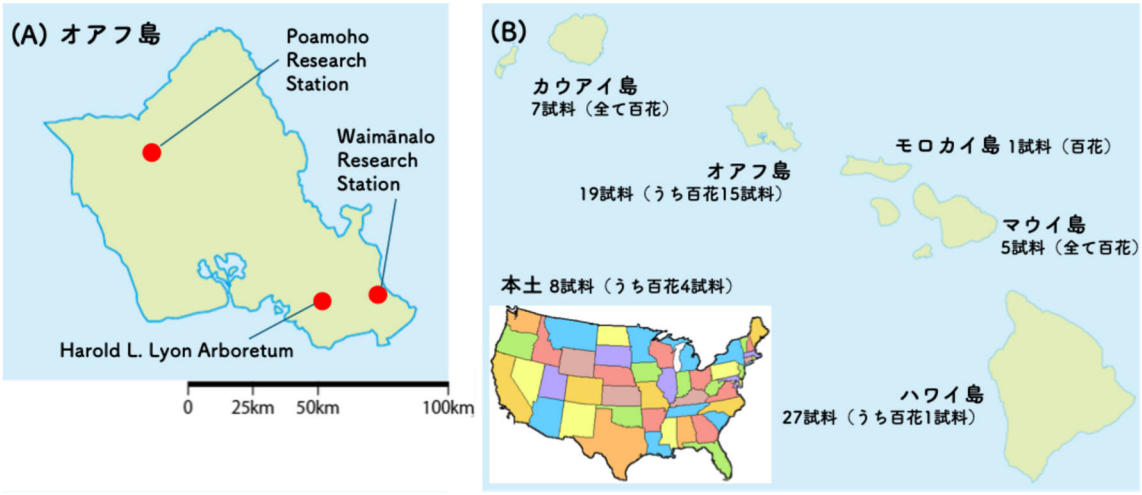


図 1　土壌及び植物根を採取した調査地(A)と調査に用いた蜂蜜の生産地(B)

７　研究結果・成果

本調査により、まずオアフ島の 3 調査地 30 箇所から採取した土壌から *Aspergillus* 属 141 菌株を分離培養することができた（表 1)。*Aspergillus* 属は各調査地の景観を問わず高頻度で分離されたが、*Aspergillus fumigatus* は Waimānalo Research Station と Poamoho Research Station では草地や裸地の土壌からは分離されず、他の森林に近い景観の土壌からは 100%の頻度で分離された。次にオアフ島の 3 調査地から採取した植物根 35 試料から *Penicillium* 属 132 菌株を分離培養することができた（表 2)。Waimānalo Research Station では 10 科 12 種の植物のうち 9 科 11 種から 58 菌株、Poamoho Research Station では 11 科 12 種の植物のうち 7 科 7 種から 30 菌株、Harold L. Lyon Arboretum では 10 科 11 種の植物のうち 9 科 9 種から 44 菌株が分離された。最後にハワイ諸島及び本土産蜂蜜からは *Aspergillus* 属と *Penicillium* 属を含む 562 菌株を獲得することができた（表 3)。ハワイ島産 27 試料のうち 25 試料から 285 菌株、オアフ島産 19 試料のうち 15 試料から 110 菌株、カウアイ島産 7 試料のうち 6 試料から 52 菌株、マウイ島産 5 試料のうち 4 試料から 42 菌株、モロカイ島産 1 試料から 6 菌株、本土産 8 試料から 62 菌株が分離された。蜂蜜の採取地や蜜源植物の違いと分離菌株数の間に関係性はみられなかった。

今後、今回分離した全ての菌株について rRNA ITS 領域と *CaM* 遺伝子（*Aspergillus* 属）もしくはβチューブリン遺伝子（*Penicillium* 属）の部分塩基配列の決定と形態観察により分類学的記載を行う。その結果を日本や欧州のデータと比較を行うことで菌種レベルでのハワイ諸島の真菌相の独自性を評価する。なお、新種が発見された際には記載論文を作成する。さらに、*Aspergillus fumigatus* などについては GRAS-Di 法により一塩基多型に基づくジェノタイピングを行い、集団遺伝学的解析や分子系統学的解析により日本や欧州由来の菌株と比較し、風や海流による長距離の胞子分散の可能性を探る予定である。

〔７　研究結果・成果（つづき）〕

表１　オアフ島の３調査地の土壌から分離された *Aspergillus* 属

Site	Sampling Date	Site #	N	Soil type	Landscape	Number of isolates	Frequency of occurance (%)	
							A. fumigatus	other *Aspergillus* species
Waimānalo Research Station	2/7/2025	W-1	10	Mollisol	Mango plantation	16	100	10
		W-2	10	Mollisol	glassland	18	0	70
Poamoho Research Station	2/12/2025	P-1	10	Oxisol	bare land	25	0	100
		P-2	10	Oxisol	Lychee plantation	22	100	30
		P-3	10	Oxisol	plantation	24	100	80
Harold L. Lyon Arboretum	2/14/2025	H-1	10	Andisol	glassland (open site)	26	100	50
		H-2	10	Andisol	forest	10	100	0

表２　オアフ島の３調査地の植物根から分離された *Peniciilium* 属

Site	Sampling date	Plant species	Plant family	Number of isolates
Waimānalo Research Station	2/7/2025	*Mimosa pudica*	Fabaceae	2
		Bidens alba	Asteraceae	3
		Ipomoea obscura	Convolvulaceae	0
		Desmodium tortuosum	Fabaceae	1
		Oxalis sp.	Oxalidaceae	9
		Solanum torvum	Solanaceae	6
		Cofea arabica	Rubiaceae	4
		Theobroma cacao	Malvaceae	9
		Mangifera indica	Anacardiaceae	7
		Araucaria	Araucariaceae	3
		Erythrina	Fabaceae	5
		Macadamia integrifolia	Proteaceae	9
Poamoho Research Station	2/12/2025	*Cofea arabica*	Rubiaceae	4
		Indigo sp.	Fabaceae	2
		Manihot esculenta	Euphorbiaceae	0
		Bidens alba	Asteraceae	0
		Sonchus oleraceus	Asteraceae	0
		Lepidium didymum	Brassicaceae	0
		Plantago lanceolata	Plantaginaceae	0
		Malva parviflora	Malvaceae	1
		Stachys arvensis	Lamiaceae	2
		Macadamia integrifolia	Proteaceae	12
		Mangifera indica	Anacardiaceae	7
		Theobroma cacao	Malvaceae	2
Harold L. Lyon Arboretum	2/14/2025	*Commelina* sp.	Commelinaceae	2
		Falcataria falcata	Fabaceae	0
		Youngia japonica	Asteraceae	4
		Cibotium menziesii	Cibotiaceae	6
		Theobroma cacao	Malvaceae	0
		Acacia koa	Fabaceae	6
		Metrosideros polymorpha	Myrtaceae	3
		Oxalis sp.	Oxalidaceae	1
		Setaria palmifolia	Poaceae	1
		Clidemia hirta	Melastomataceae	2
		Rhododendron sp.	Ericaceae	19

〔７　研究結果・成果（つづき）〕

表３　ハワイ諸島及び本土産蜂蜜の由来と分離された菌株数

Island	Honey #	Date of Purchase	Experimental Date	Source of honey	Numbers of isolates
Big Island	4	1/17/2025	2/13/2025	Christmas berry	17
	9	1/25/2025	2/14/2025	Christmas berry	1
	11	1/25/2025	2/18/2025	Christmas berry	16
	39	2/10/2025	2/26/2025	Christmas berry	30
	25	1/29/2025	2/20/2025	Eucalyptus	11
	41	2/10/2025	2/27/2025	Eucalyptus	16
	18	1/25/2025	2/19/2025	Guava	0
	43	2/10/2025	2/27/2025	Java plum	19
	10	1/25/2025	2/14/2025	Kiawe	15
	49	2/17/2025	2/28/2025	Kiawe	11
	6	1/25/2025	2/14/2025	Macadamia	21
	7	1/25/2025	2/14/2025	Macadamia	1
	13	1/25/2025	2/18/2025	Macadamia	11
	14	1/25/2025	2/18/2025	Macadamia	1
	22	1/27/2025	2/20/2025	Macadamia	1
	42	2/10/2025	2/27/2025	Macadamia	17
	40	2/10/2025	2/26/2025	Multi-floral	18
	1	1/11/2025	2/13/2025	Ohia Lehua	21
	3	1/12/2025	2/13/2025	Ohia Lehua	14
	12	1/25/2025	2/18/2025	Ohia Lehua	14
	17	1/25/2025	2/19/2025	Ohia Lehua	7
	19	1/27/2025	2/19/2025	Ohia Lehua	0
	20	1/27/2025	2/19/2025	Ohia Lehua	2
	23	1/27/2025	2/20/2025	Ohia Lehua	1
	27	1/29/2025	2/24/2025	Ohia Lehua	1
	44	2/10/2025	2/27/2025	Ohia Lehua	19
	16	1/25/2025	2/19/2025	Orange	0
Oahu Island	26	1/29/2025	2/24/2025	Christmas berry	13
	47	2/15/2025	2/28/2025	Christmas berry	4
	21	1/27/2025	2/20/2025	Kiawe	5
	24	1/27/2025	2/20/2025	Macadamia	2
	2	1/11/2025	2/13/2025	Multi-floral	0
	5	1/25/2025	2/13/2025	Multi-floral	14
	8	1/25/2025	2/14/2025	Multi-floral	1
	15	1/25/2025	2/18/2025	Multi-floral	1
	28	1/29/2025	2/24/2025	Multi-floral	16
	36	2/15/2025	2/26/2025	Multi-floral	0
	37	2/15/2025	2/26/2025	Multi-floral	1
	38	2/15/2025	2/26/2025	Multi-floral	0
	45	2/12/2025	2/27/2025	Multi-floral	5
	46	2/15/2025	2/28/2025	Multi-floral	1
	48	2/17/2025	2/28/2025	Multi-floral	0
	64	3/22/2025	3/25/2025	Multi-floral	23
	65	3/22/2025	3/25/2025	Multi-floral	1
	66	3/22/2025	3/25/2025	Multi-floral	12
	67	3/22/2025	3/25/2025	Multi-floral	11
Kaua'i Island	33	1/30/2025	2/25/2025	Multi-floral	4
	34	1/30/2025	2/25/2025	Multi-floral	6
	35	1/30/2025	2/25/2025	Multi-floral	10
	50	2/23/2025	2/28/2025	Multi-floral	0
	51	2/23/2025	3/3/2025	Multi-floral	6
	52	2/23/2025	3/3/2025	Multi-floral	7
	53	2/23/2025	3/3/2025	Multi-floral	19
Maui Island	30	1/30/2025	2/24/2025	Multi-floral	0
	31	1/30/2025	2/25/2025	Multi-floral	20
	32	1/30/2025	2/25/2025	Multi-floral	9
	54	2/16/2025	3/6/2025	Multi-floral	10
	55	2/23/2025	3/6/2025	Multi-floral	3
Morokai Island	29	1/30/2025	2/24/2025	Multi-floral	6
Mainland	56	2/23/2025	3/7/2025	Multi-floral	9
	57	2/23/2025	3/10/2025	Multi-floral	5
	61	2/20/2025	3/11/2025	Multi-floral	9
	62	2/20/2025	3/11/2025	Multi-floral	2
	58	2/23/2025	3/10/2025	Orange	5
	60	2/23/2025	3/11/2025	Orange	8
	63	2/20/2025	3/11/2025	Orange	11
	59	2/23/2025	3/10/2025	Tupelo	13

以　　上