

[原 著]

当院の呼吸器検体から検出された糸状菌の菌種同定および *Aspergillus fumigatus* の分子疫学解析

下坂寿希¹⁾・林 悠太²⁾・梅山 隆³⁾・泉 敦¹⁾・木下 均¹⁾
中村茂樹³⁾・中山靖子³⁾・壇辻百合香³⁾・宮崎義継³⁾・小川賢二²⁾

¹⁾ 独立行政法人国立病院機構東名古屋病院臨床検査科

²⁾ 独立行政法人国立病院機構東名古屋病院呼吸器内科

³⁾ 国立感染症研究所真菌部

(平成 29 年 6 月 30 日受付, 平成 29 年 12 月 25 日受理)

当院では喀痰などの呼吸器検体からの糸状菌検出件数が多く、特定の場所に汚染源がないか調査する必要があると考えられた。本研究は 2015 年 5 月から 11 月までの 7 ヶ月間に当院の細菌検査室にて分離同定された糸状菌 59 株について ITS, D1/D2 領域, 必要に応じて β チュープリン遺伝子の塩基配列解析により菌種同定し, さらに *Aspergillus fumigatus* については MLST (multilocus sequence typing) 法を用いたジェノタイピングを行い, 臨床情報と合わせて調査した。対象 59 株の遺伝子検査を加えた同定結果は *A. fumigatus* が 33 株 (55.9%), *Aspergillus niger* が 10 株 (16.9%), *Aspergillus tubingensis* (*A. niger* の隠蔽種) が 5 株 (8.5%), *Aspergillus flavus* が 2 株 (3.4%), *Neosartorya hiratsukae* (*A. fumigatus* の隠蔽種), *Emericella quadrilineata* (*Aspergillus nidulans* の隠蔽種) がそれぞれ 1 株ずつ (1.7%), *Aspergillus* 属以外の糸状菌が 7 株 (11.9%) でその内訳は *Trichoderma longibrachiatum*, *Exophiala dermatitidis*, *Paecilomyces variotii*, *Parenniphoria tephropora*, *Trametes* sp. が 1 株ずつ, *Lecythophora hoffmannii* が 2 株であった。

A. fumigatus の ST (sequence type) は既知の 10 種類と新規に見つけられた 5 種類を合わせて 15 種類が検出された。今回の MLST 解析においては多数のクローンが分離されており, 同一 ST であった株の検体採取時期・場所, 臨床情報に共通性は見いだせず, 特定の汚染源由来とは考えにくかった。当院の呼吸器検体からの糸状菌検出件数が多い理由として考えられたのは, 対象患者が多いこと, 真菌培養時に検体を専用培地に多量に塗るなどの工夫をしていることに加え, 臨床において医師の糸状菌培養に対する意識が高いことなどに起因するものと考えられた。

Key words: *Aspergillus fumigatus*, MLST, respiratory tract specimens, chronic pulmonary aspergillosis

序 文

糸状菌の一種である *Aspergillus* 属はヒトに主とし

て経気道的に感染または腐生することによって急性型 (侵襲型), 慢性型, アレルギー型と 3 つの病型をとる深在性真菌症の原因微生物として重要である。これらの病型のうち, 呼吸器内科領域で最も多くみられるのは, 肺結核後遺症などの呼吸器基礎疾患を有する患者に発症する慢性肺アスペルギルス症 (chronic pulmonary aspergillosis: CPA) である。感染症診断には真菌の分離培養が重要であるが¹⁾, 一般に培養陽性率は低いとされている。また *Aspergillus* 属は環境中に広く分布しており汚染菌にもなりうるため, 無菌の検体

著者連絡先: (〒474-8511) 愛知県大府市森岡町 7-430
国立研究開発法人国立長寿医療研究センター
臨床検査部
下坂寿希
TEL: 0562-46-2311
FAX: 0562-45-0145
E-mail: h-shimosaka@ncgg.go.jp

Table 1. Primers and nucleotide sequences for fungal species identification

primer	size (bp)	sequence	reference
ITS1	19	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	2)
ITS4	20	TCC GCT TAT TGA TAT GC	2)
ITS5	22	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	2)
NL1	24	GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG	3)
NL4	19	GGT CCG TGT TTC AAG ACG G	3)
bTub1	19	AAT TGG TGC CGC TTT CTG G	4)
bTub2	19	AGT TGT CGG GAC GGA ATA G	4)

ではない喀痰などの呼吸器検体から検出された場合、その病的意義の解釈には注意を要する。

当院は結核療養所の流れを汲んでおり、現在も結核病棟を有し、陳旧性肺結核などの慢性呼吸器疾患患者が多い施設である。近隣の施設から特に慢性呼吸器感染症患者の診療相談が多く、2016年には呼吸器感染症センターを開設している。2007～2009年度における当院の呼吸器検体からのアスペルギルス属検出件数は年間平均95株で、近隣の国立病院機構の5医療施設（病床数400床以上の中・大規模病院）の2009年度のアスペルギルス属検出件数は1～63（各施設34, 6, 1, 18, 63）株であった。同じ国立病院機構のなかで当院のアスペルギルス属検出件数が際立って多いという現状があり、検査室あるいは院内環境からの汚染の可能性はないのか検証する必要があると考えた。そこで本研究では、呼吸器検体から検出された糸状菌について、遺伝子解析により菌種の正確な同定を行うことで、当院の糸状菌検出状況を確認した。臨床上最も重要で頻度の多い病原真菌である *Aspergillus fumigatus* と同定された場合には、MLST (multilocus sequence typing) 法を用いたジェノタイプングを行なうことで、特定の場所からの汚染がないか評価を行った。

材料と方法

2015年5月から2015年11月までの7ヶ月間に国立病院機構東名古屋病院の細菌検査室にて分離同定された糸状菌は71株あり、同一患者から同一検査材料で連日提出され重複して得られたため菌株保存していなかった5株と菌株保存の際に継代培養がうまくいかず発育しなかった7株の合計12株を除いた59株（菌株番号：HN-FF001～HN-FF059とする）を対象とした。背景として、同時期の真菌培養件数と糸状菌検出率についても調査した。

糸状菌の分離培養方法はクロモアガーカンジダ/ポ

テトデキストロース分画培地（関東化学株式会社）に通常の一白金耳の2～3倍量の喀痰などの検査材料を直接塗布し、検体間の汚染および乾燥を防ぐ目的で1検体毎にチャック付きの簡易ポリ袋に入れて、35℃にて2日～最大10日間まで培養を実施した。

対象菌株について、形態観察およびITS、D1/D2領域、必要に応じてβチューブリン遺伝子の塩基配列解析により菌種同定を行った。ガラスビーズを用いてマルチビーズショッカー（安井器械株式会社）により菌体を破碎し、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社)を用いてDNA抽出・精製を行った。リボソームRNAをコードする領域のうち、ITSおよびD1/D2領域、必要に応じてβチューブリン遺伝子をPCRで増幅した。使用したITS²⁾およびNL³⁾、bTub⁴⁾プライマーの塩基配列をTable 1に示す。PCRにはExTaq DNAポリメラーゼ (Takarabio) を用いた。増幅断片の塩基配列解析を行い、Mycobank (<http://www.mycobank.org>) にて相同性検索を行い、菌種同定を行った。

A. fumigatus のMLST解析は、Bainら⁵⁾の方法に従って行った。上記で得たDNAを鋳型にANX4/BGT1/CAT1/LIP/MAT1_2/SODB/ZRF2の7部位をPCRで増幅し (Table 2)、増幅断片の塩基配列を解析した。PCRにはMightyAmp DNAポリメラーゼ (Takarabio) を使用した。*Aspergillus fumigatus* MLST Databases (<http://pubmlst.org/A.fumigatus/>) を参照し、得られた配列からSTを割り当てた。また、得られた配列を連結し、MEGA7ソフトウェア⁶⁾を用いて系統解析を行い、系統樹を作成した。本研究は国立病院機構東名古屋病院倫理委員会の承認（承認番号：27-5）を得て施行した横断研究で、対象症例の臨床情報は診療録からレトロスペクティブに抽出した。

結 果

2015年5月から11月までに当院の細菌検査室で検

Table 2. Loci and primers used for MLST

locus	primer sequence
ANXC4	F, 5'-GCGAGATAGCAACACTTCAGT R, 5'-GGATACTGTTGCCCTAGATTTG
BGT1	F, 5'-GATCGGTTGCCAGTCTTTGA R, 5'-AATGGACGCAGAATGAAACT
CAT1	F, 5'-AGCTCAACCGTCGTGAT R, 5'-AATGGACGCAGAATGAAACT
LIP	F, 5'-CGCCTCACTTCTCCTCA R, 5'-TGGCAAATGGCTGACG
MAT1-2	F, 5'-ACACCCTTCGACTTTCCA R, 5'-GATCGCATAGTGTGAGTGG
SODB	F, 5'-GCTCCAAGAGCTGCTAC R, 5'-AAGCGCTTCTCCACAGC
ZRF	F, 5'-CTCATCCAAGCTTGTTC R, 5'-GTACCGCATCACCATCAA

査を実施した真菌培養件数は 842 件であった。その間に検出された糸状菌は同一患者の重複も含め 71 件であり、糸状菌検出率は 8.4% であった。

対象とした 59 株の遺伝子検査による最終同定結果は *A. fumigatus* が最多で 33 株 (55.9%), 次いで *Aspergillus niger* が 10 株 (16.9%), *Aspergillus tubigenis* (*A. niger* の隠蔽種) が 5 株 (8.5%), *Aspergillus flavus* が 2 株 (3.4%), *Neosartorya hiratsukae* (*A. fumigatus* の隠蔽種), *Emericella quadrilineata* (*Aspergillus nidulans* の隠蔽種) が各 1 株ずつ (1.7%), *Aspergillus* 属以外の糸状菌が 7 株 (11.9%) でその内訳は *Trichoderma longibrachiatum*, *Exophiala dermatitidis*, *Paecilomyces variotii*, *Parenniporia tephropora*, *Trametes* sp. が 1 株ずつ, *Lecythophora hoffmannii* が 2 株であった。検査材料は喀痰および吸引痰が 53 件 (89.8%), 気管支鏡による吸引痰が 2 件 (3.4%), 気管支洗浄液が 4 件 (6.8%) であった。

A. fumigatus 33 株の MLST 法による解析結果を Table 3 に示した。ST はこれまで *Aspergillus fumigatus* MLST Databases に 48 種類が登録されているが、今回当院の調査では既知の ST1, 3, 5, 10, 14, 20, 24, 25, 26, 29 の 10 種類の ST と STN1, N2, N3, N4, N5 で示す本研究で新規に検出された 5 種類を合わせて 15 種類の ST が検出された。なお、菌株 HN-FF012 および HN-FF044 の BGT1 の塩基配列は, allele type 「3」の配列から 1 塩基欠失したものであり、データベースに登録されていない新しい allele type であるため、「N1」とした。同一 ST が検出

されたのは ST5 が 6 株, ST10, 14, 26 で各 3 株, STN1 が同一患者からの重複も含め 7 株, STN2 が 2 株であった。既知の 48 種類の ST に今回の解析対象 33 株と *A. fumigatus* の標準株である Af293 を加え、最尤法を用いた分子系統解析をおこない作成した系統樹を Fig. 1 に示した。

A. fumigatus 計 33 株が分離された 30 症例の臨床情報を Table 4 に示す。平均年齢は 72.2±8.6 歳, 男性 18 例 (60%) であった。全例が呼吸器基礎疾患を有し, CPA を発症している症例は 13 例で, 残りの 17 例は colonization と判断された。半数が糖尿病, 関節リウマチ, 悪性腫瘍など免疫力低下をきたし得る全身性の基礎疾患を有していた。26.7% の症例が糖質コルチコイドなど免疫抑制作用のある薬剤を使用していた。抗真菌剤治療中にもかかわらず *A. fumigatus* が検出されたのは 2 例 (6.6%) で, いずれも itraconazole のカプセル製剤を内服中であった。各 ST に応じた CPA もしくは colonization の症例数を Fig. 2 に示した。さらに同一 ST 株の検体採取日および検体採取場所を Table 5 に示した。同一 ST の菌株の検体採取時期・場所及び臨床情報について検討したところ共通性は見られなかった。

考 察

喀痰から分離同定された *A. fumigatus* は必ずしも感染によるものとは限らず, 2016 年に発表された ESCMID の CPA ガイドライン⁷⁾においても, 喀痰からの *Aspergillus* 属の培養陽性のみでは診断の根拠とはしないことが記されており, 肺アスペルギルス症の診断には培養結果に加えて臨床症状, 血清学的検査, 画像所見などから総合的に判断することが必要である。

当院は近隣の国立病院機構の 5 医療施設 (病床数 400 床以上) と比較して糸状菌の検出件数が多く, 呼吸器検体から検出された糸状菌が特定の場所からの汚染によるアウトブレイクではないかという懸念が指摘された。そこで, 我々は臨床検体から得られた糸状菌の正確な菌種同定および MLST 法を用いたジェノタイプングを行うことで当院の糸状菌培養精度を検証する目的で本研究を行った。

MLST 法は微生物の分子疫学解析に用いられ, 再現性, 安定性が高く, アスペルギルスだけではなくバクテリアを含めた様々な菌種でデータベースが構築されており, 全世界的な施設間の比較にも用いることができることが利点である。長尾ら⁸⁾によると MRSA の分子疫学においては MLST 法が PFGE 法や *spa* typ-

Table 3. Allele type and sequence type of 33 *A. fumigatus* strains determined by MLST

Strain number	ANX4	BGT1	CAT1	LIP	MAT1_2	SODB	ZRF2	ST
HN-FF001	1	3	3	1	1	1	1	26
HN-FF002	1	3	2	1	2	1	2	5
HN-FF003	1	3	3	1	2	1	2	10
HN-FF004	1	3	3	1	1	1	2	N1
HN-FF005	1	1	2	1	2	1	1	20
HN-FF006	2	3	2	1	2	1	1	25
HN-FF011	1	1	3	1	1	1	1	14
HN-FF012	1	N1	3	1	1	1	1	N2
HN-FF013	1	3	2	1	2	1	2	5
HN-FF014	1	3	2	1	2	1	2	5
HN-FF015	1	3	2	1	2	1	1	3
HN-FF017	1	1	3	1	1	1	1	14
HN-FF028	1	1	1	1	1	1	1	1
HN-FF029	1	3	2	1	2	1	2	5
HN-FF030	1	1	3	1	1	1	1	14
HN-FF035	1	3	2	1	1	1	1	29
HN-FF036	1	3	3	1	2	1	2	10
HN-FF037	1	3	2	1	2	1	2	5
HN-FF038	1	3	2	1	2	1	2	5
HN-FF039	1	3	3	1	1	1	2	N1
HN-FF040	1	3	3	1	2	1	2	10
HN-FF041	1	2	3	1	1	1	2	N3
HN-FF042	1	3	2	1	1	1	2	N4
HN-FF043	1	3	3	1	1	1	2	N1
HN-FF044	1	N1	3	1	1	1	1	N2
HN-FF045	1	3	3	1	1	1	2	N1
HN-FF046	1	3	3	1	1	1	2	N1
HN-FF047	1	3	3	1	1	1	1	26
HN-FF048	1	3	3	1	1	1	2	N1
HN-FF049	1	1	3	1	1	1	2	N5
HN-FF050	2	1	2	2	2	1	1	24
HN-FF051	1	3	3	1	1	1	1	26
HN-FF052	1	3	3	1	1	1	2	N1

ing法よりも菌株の分解能が高く、再現性も優れていると述べている。また、Cliffら⁹⁾によると *C. albicans* の分子疫学調査において Ca3 タイピング法と比べ、MLST法は再現性の高いタイピング法であり、*C. albicans* の分子疫学の調査に有用な方法であることが判明したと報告している。

一方で、Klaassenら¹⁰⁾の報告によると *A. fumigatus* に関してはMLST法より microsatellite法 (TR)の方が分解能は高いとされている。また、梅山ら¹¹⁾の *Cryptococcus neoformans* のMLST解析においては8割の株が同一のSTだったという報告があり、MLST法は菌種によって分解能に大きな違いがある。

今回の検討にあたりジェノタイピングの方法として、再現性と安定性が高いことに加え、データベースがあるため施設間の比較が可能であるという理由でわれわれはMLST法を選択した。今回の結果では多種のクローンが分離されていることから、特定の汚染源からのアウトブレイクがおこっているとは考えにくかった。しかし、同じSTを示す株が多数確認されたことも事実であり、アウトブレイクを完全に否定することはできない。そのため、同一STが検出された症例の検体採取時期、採取場所、臨床病型を調査したところ、特定の時期や場所などの共通性はみられず、臨床疫学的にはアウトブレイクは否定的と考えられた。

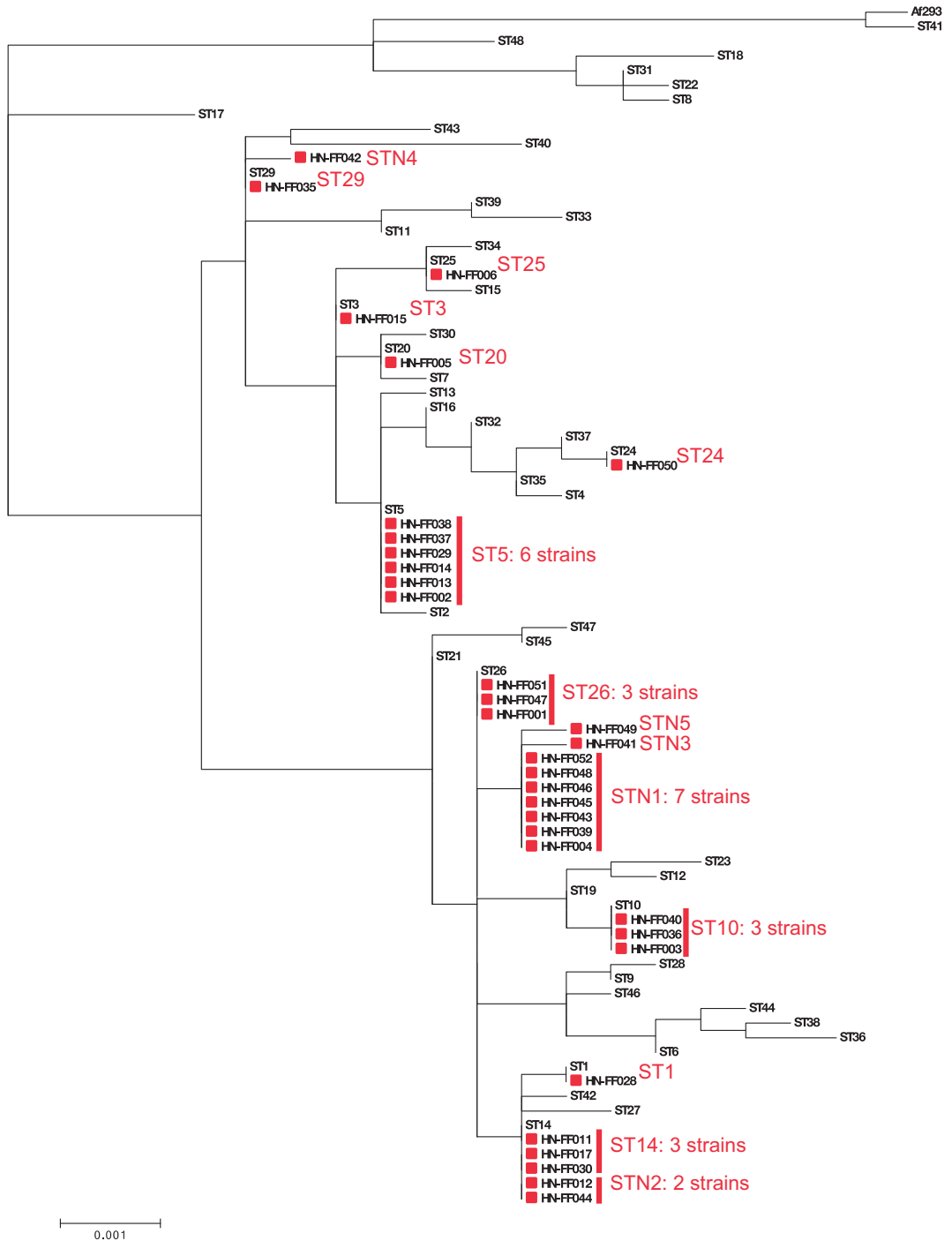


Fig. 1. Molecular phylogenetic analysis by the maximum-likelihood method of the 33 clinical isolates, Af293, and known STs of *Aspergillus fumigatus* using a concatenated data set derived from seven loci. The 33 strains isolated in our hospital were indicated by square on head. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 82 nucleotide sequences. There were a total of 3038 positions in the final dataset. bottom bar indicates genetic distance.

Table 4. Characteristics of 30 patients

Age, mean \pm SD, years	72.2 \pm 8.6
Gender (male/female), number	18/12
CPA/Colonization, number	13/17
Underlying Respiratory diseases, No. of cases (%)	30 (100)
CPA	5 (16.7)
previous pulmonary tuberculosis	12 (40)
active pulmonary tuberculosis	2 (6.7)
previous pulmonary NTM	4 (13.3)
active pulmonary NTM	12 (40)
thoracic surgical procedure	6 (20)
interstitial pneumoniae	5 (16.7)
COPD	3 (10)
Bronchiectasis	2 (6.7)
Underlying Systemic diseases, No. of cases (%)	15 (50)
Diabetes mellitus	3 (10)
Rheumatoid arthritis	5 (16.7)
Other collagen diseases	4 (13.3)
Malignant tumor	4 (13.3)
Hematological diseases	1 (3.3)
Immunosuppressive agents, No. of case (%)	8 (26.7)
Corticosteroids	7 (13.3)
Methotrexate	2 (6.7)
Biologics	1 (3.3)
Antifungal agents, No. of cases (%)	2 (6.6)
Itraconazole	2 (6.6)

CPA: chronic pulmonary aspergillosis, NTM: nontuberculous mycobacteriosis

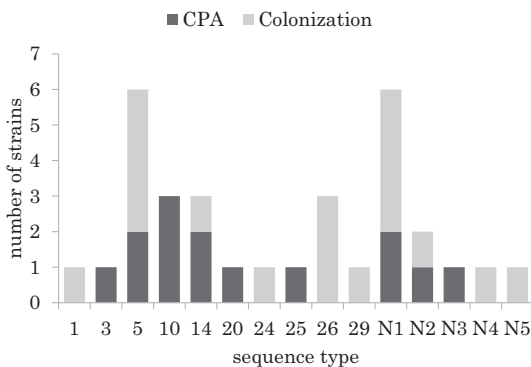


Fig. 2. Number of cases per sequence type
CPA (dark bar), Colonization (light bar)

時間的にも地理的にもあきらかに異なる起源である既知のSTと同一のSTを示す株も今回多数検出されており、分解能には限界がみられた。更に正確な遺伝子情報レベルでの菌の同一性あるいは違いを証明するた

めには全ゲノム解析が必要であり、今後はそちらが主流になると考えられるが、現時点では *A. fumigatus* に対する MLST 法の限界を踏まえた上で、臨床情報と組み合わせることで今回の目的のような小規模の分子疫学解析に MLST 法を応用してもよいと考えられた。

また、同一患者から短期間に繰り返し検出された *A. fumigatus* において異なった ST が見つかったことから複数のクローンによる混合感染（ポリクローナル感染）の可能性が示唆された。しかし、ポリクローナル感染を証明するためには同一検体からの複数コローンを検査する必要があるため今回の調査では行っていないため確定は出来ない。

CPA を発症している症例から検出された *A. fumigatus* は環境からの直接汚染由来ではないであろうという仮定のもと、菌株と臨床情報についても検討した。今回 *A. fumigatus* が検出された症例は全例呼吸器基礎疾患を有していたが、そのうち CPA を発症していたのは 30 例中 13 例 (43.3%) であった。これは

Table 5. Sampling date and place of the strains with the same ST

Sequence type	Sampling date		Sampling place			
ST5	5/22	7/15	7/29	8/26	9/3	9/29
	room G	room E	room A	outpatient	outpatient	room C
ST10	6/19	9/29	10/16			
	room B	room F	room F			
ST14	7/10	8/7	9/7			
	outpatient	patient's home	patient's home			
ST26	5/18	11/11	11/16			
	outpatient	room D	patient's home			
STN1	6/22	9/30	10/21	10/29	11/13	11/26
	outpatient	outpatient	outpatient	radiation room*	patient's home	outpatient
STN2	7/10	10/21				
	outpatient	outpatient				

* Two strains were simultaneously obtained from the same patient using bronchoscopy (bronchial lavage and sputum aspiration) were treated as one strain.

Ohba らによる報告¹²⁾で *Aspergillus* 属が検出された全 187 例中 90 例が *A. fumigatus* でそのうち 51 例 (56.7%) が CPA であったのと比べると若干割合が少なかった。Ohba らの報告では *Aspergillus* sp. と正確な菌種同定まで至らなかった症例が 29 例含まれており、その中では CPA は 10 例 (34.5%) であったのに対し、われわれの検討では遺伝子検査も加えて全例が菌種同定されていることが関係しているのかもしれない。また、各 ST と臨床病型について調べたが症例数が少ないため関連を評価することはできなかった。

MLST 法による分子疫学解析や検体採取状況の調査で明らかな集積がみられなかったため、今回は環境調査としてのエアースAMPLINGまで行っていないが、環境からの汚染を否定するために細菌検査室などの環境調査を行っていないことが本研究の限界として考えられた。

今回の検討を行うきっかけとなった、当院の呼吸器検体からの糸状菌の検出件数が近隣の国立病院機構の 5 医療施設と比べ多い理由として考えられるのは、当院は呼吸器基礎疾患を有する対象症例が多いこと、真菌培養時の検体を専用培地に一般細菌で行う塗布量より 2~3 倍量 (約 30 μ l) に多くするなど工夫していること、肺アスペルギルス症が強く疑われる症例に対して複数回にわたって培養検査を依頼するなど医師の真菌培養に対する意識の高さに起因するものと考えられた。真菌培養時の検体を専用培地に塗布する際、通常

の一般細菌で行う 1 白金耳量 (約 10 μ l) より多くすることにに関して、日常微生物検査における標準的真菌検査マニュアル (2013)¹³⁾では、喀痰や気管支肺胞洗浄液検体では検出率を上げるために分離培地にできるだけ多く (ほぼ小豆大) 接種することが大切であるとされている。また阿部ら¹⁴⁾の報告によると、真菌の検出率を向上させるためには呼吸器系材料を液化し、遠心した沈査を大量に (約 30 μ l) 塗布し、アスペルギルス为目的とする場合は 1 日目の培養温度は 35°C、培養期間は少なくとも 7 日間必要であると述べている。また、国立病院機構の某医療施設にて、真菌培養時の検体を専用培地に塗布する際、通常の一般細菌で行う量の 2~3 倍量にすることを指導・変更した前後では、アスペルギルスの検出件数が月平均 1.3 件から 5.4 件に増加したというデータがあり、先に述べたことを裏付けるものと思われる。

今回の検討が必ずしも当院の糸状菌検査の精度を保証するものではないが、臨床現場において検査に対する一定の信頼感が得られたことの意義は大きい。一般に低いとされる *Aspergillus* 属の検出率が向上する (感度が上昇する) と colonization の症例が増える (特異度が下がる) と考えられるが、まずは病原微生物を検出しないことには治療ターゲットを決めることができない。また、近年問題となっている薬剤耐性アスペルギルス¹⁵⁾を検出するために薬剤感受性試験を行うには、培養で菌を検出しないことには不可能であり、培

養検査の重要性を再認識し、これらの経験を情報発信することは有意義と考え報告した。

文 献

- 1) 深在性真菌症のガイドライン作成委員会編. 2014. 深在性真菌症の診断・治療ガイドライン 2014, 協利企画, 東京.
- 2) White, TJ, T Bruns, S Lee, et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315-322, In: PCR protocols: a guide to methods and applications (MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, et al ed.), Academic Press, Inc., New York, USA.
- 3) O'Donnell, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. p. 225-233, In: The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics (DR Reynolds, JW Taylor ed.), CAB International, Wallingford, UK.
- 4) Balajee, SA, JL Gribskov, E Hanley, et al. 2005. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a New Sibling Species of *A. fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 4: 625-632.
- 5) Bain, JM, A Tavanti, AD Davidson, et al. 2007. Multilocus Sequence Typing of the Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 1469-1477.
- 6) Kumar, S, G Stecher, K Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870-1874.
- 7) Denning, DW, J Cadranel, C Beigelman-Aubry, et al. 2016. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J* 47: 45-68.
- 8) 長尾美紀, 太田美智男. 2007. MLST などによる MRSA の分子疫学. *日臨微誌* 17: 159-167.
- 9) Cliff, PR, JA Sandoe, J Heritage, et al. 2008. Use of multilocus sequence typing for the investigation of colonisation by *Candida albicans* in intensive care unit patients. *J Hosp Infect* 69: 24-32.
- 10) Klaassen, CH. 2009. MLST versus microsatellites for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med Mycol* 47 (Suppl 1): S27-33.
- 11) Umeyama, T, H Ohno, F Minamoto, et al. 2013. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. *Jpn J Infect Dis* 66: 51-55.
- 12) Ohba, H, S Miwa, M Shirai, et al. 2012. Clinical characteristics and prognosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Respir Med* 106: 724-729.
- 13) Oguri, T, M Abe, R Ikeda, et al. 2013. Manual of laboratory procedures for medically important fungi (2013). *Med. Mycol. J.* 54: 345-360.
- 14) Michiko, A, Z Ogawa, et al. 2009. Study of Mycological Examination Methods in Clinical Laboratories. *Med. Mycol. J.* 50: 235-242.
- 15) Tashiro, M, K Izumikawa. 2016. The Current Status of Drug-resistant *Aspergillus*. *Med. Mycol. J.* 57: J103-J112.

Identification of filamentous fungi detected from respiratory specimens and molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus*

Hisaki Shimosaka¹⁾, Yuta Hayashi²⁾, Takashi Umeyama³⁾, Atsushi Izumi¹⁾, Hitoshi Kinoshita¹⁾, Shigeki Nakamura³⁾, Yasuko Nakayama³⁾, Yurika Dantsuji³⁾, Yoshitsugu Miyazaki³⁾, Kenji Ogawa²⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, National Hospital Organization Higashinagoya National Hospital

²⁾Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Higashinagoya National Hospital

³⁾Department of Chemotherapy and Mycoses, National Institute of Infectious Diseases

In our hospital, as there were many filamentous fungi detected from respiratory specimens, we had to investigate whether there was any contamination source in a particular place. In this study, 59 strains of filamentous fungi separated in the bacteria laboratory of our hospital during the 7 months from May 2015 to November 2015 were identified by phenotype analysis and nucleotide sequence analysis of the genes. In addition, *Aspergillus fumigatus* was genotyped using the MLST (multilocus sequence typing) method and investigated together with clinical information. The results of the identification of 59 strains were 33 strains (55.9%) of *A. fumigatus*, 10 strains (16.9%) of *Aspergillus niger*, 5 strains (8.5%) of *Aspergillus tubingensis* (cryptic species of *A. niger*), 2 strains of *Aspergillus flavus* (3.4%), *Neosartorya hiratsukae* (cryptic species of *A. fumigatus*), *Emericella quadrilineata* (cryptic species of *Aspergillus nidulans*) each one strain (1.7%), 7 filamentous fungi other than *Aspergillus* genus (11.9%). 15 types of ST (sequence type) of *A. fumigatus* were detected, including 10 known types and 5 newly found types. Many ST were detected in this MLST analysis, contamination from a specific place was considered negative, because there was no commonality in sampling time and place, clinical information among the same ST. The reason why many filamentous fungi are detected in our hospital is as follows. There are many targeted patients, clinical laboratory technicians devise cultivation, and clinicians have high awareness to filamentous fungus culture.