

[原 著]

形態学的に *Aspergillus niger* と同定された菌株の MALDI-TOF MS と
遺伝子系統解析による同定検討

松本泰伸・鈴木真言・二瓶博義・松本 哲・三川 隆
株式会社 LSI メディエンス感染症検査部微生物検査グループ

(令和 3 年 1 月 26 日受付, 令和 3 年 8 月 4 日受理)

2016 年 1 月から 2019 年 2 月に国内医療機関より真菌検査を目的として提出された検体から分離され, 形態学的に *Aspergillus niger* と同定された 36 株を対象として, 遺伝子配列による同定と Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) による同定を実施した。その結果, 遺伝子配列による解析の内訳は *Aspergillus tubingensis* 47.2%, *Aspergillus welwitschiae* 50.0%, *Aspergillus niger* 2.8% であり, *A. niger* と同定された菌株はなかった。また, MALDI-TOF MS による同定結果は *A. niger* または *Aspergillus niger* complex までの同定レベルであり, *Aspergillus section Nigri* の正確な同定には遺伝子解析が必要となった。*Aspergillus section Nigri* において隠蔽種の一部に薬剤感受性の低下が報告されていることから, 簡便で迅速に同定可能な MALDI-TOF MS で正確な同定を行うためには更なるデータベースの拡充が求められる。

Key words: *Aspergillus niger*, *Aspergillus section Nigri*, MALDI-TOF MS, 遺伝子同定

序 文

Aspergillus niger に代表される *Aspergillus section Nigri* (以下 *A. sect. Nigri*) は 26 種以上の近縁種により構成され¹⁾²⁾, 医学, 農学, 工業分野において重要な真菌の一種である。*A. sect. Nigri* は環境中に広く分布し, 肺アスペルギルス症, 外耳道真菌症, アレルギー疾患などの原因となり, 特に耳鼻科領域の検体において *A. niger* がアスペルギルス外耳道真菌症の原因菌種として最も検出されている頻度の高い菌種である³⁾。*A. sect. Nigri* の各菌種は形態学的に鑑別が困難であり, 本菌群をまとめて *A. niger* として取り扱われることが多い。近年, 遺伝子学的手法を用いた系統解析により, 従来 *A. niger* として同定されていた菌が複数の菌種で構成され, その中にアゾール系薬剤に抵抗性を示す菌種が存在することが報告されている¹⁾。*A. sect. Nigri* を詳細に鑑別する方法は塩基配列解析による遺伝子同定法以外には無く, 日常検査で区別することは困難である。近年, 微生物検査においては, 従来の生化学的性状試験を中心とした同定方法に代わり, 簡便かつ迅速に遺伝子同定法と高い一致率の同定結果が得られる Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析, 以下 MALDI-TOF MS) が多くの施設で導入されている。データベースの拡充が進み, 細菌だけでなく真菌においても数多くの菌種が同定

できるようになってきており, *Aspergillus* 属についても主要菌の同定が可能となっている。

そこで今回我々は, 形態学的に *A. niger* と同定された菌株について, 遺伝子学的手法による同定と VITEK MS および MALDI Biotyper の 2 種類の MALDI-TOF MS による同定を実施し, 分離菌種の解析および隠蔽種を含めた MALDI-TOF MS での同定成績と有用性, 利便性を検討したので報告する。

材料と方法

1. 対象菌株

2016 年 1 月から 2019 年 2 月に国内の医療機関から真菌検査を目的に提出された耳漏, 呼吸器 (喀痰・気管支洗浄液) および胸水検体より分離し, 形態学的に *A. niger* と同定された計 36 株を用いた。

また標準株として *A. niger* NBRC 33023, *Aspergillus tubingensis* NBRC 4407, *Aspergillus welwitschiae* IFM 63864 を使用した。

2. 形態学的同定

クロラムフェニコール加ポテトデキストロース寒天培地 (コージンバイオ) にて 35℃, 5 日間, 培養を行い, コロニー形態 (表面が黒色, 白色の辺縁, 裏面は白色及びクリーム色) および形態学的特徴 (菌糸は有隔性, フィアライドは頂囊の全周を放射状に覆い, 複列性でフィアライドの 2 倍の長さのメツラを伴う) により *A. niger* と同定した⁴⁾⁵⁾。

3. 遺伝子同定

菌種の解析は, カルモジュリンおよび β チューブリン遺伝子により行った⁶⁾⁷⁾。MasterPure Yeast DNA Purification Kit (Epicentre, Biotechnologies, Madison, U.S.A.) を用いて DNA を抽出, 精製した。プライマーは cmd5 (5'-CCG

著者連絡先: (〒174-8555) 東京都板橋区志村 3-30-1
株式会社 LSI メディエンス感染症検査部微生物検査グループ
松本泰伸
TEL: 03-5994-2333
FAX: 03-5994-2939

AGTACAAGGAGGCCTTC-3'), cmd6 (5'-CCGATAGAGG TCATAACGTGG-3'), および Bt2a (5'-GGTAACCAAATC GGTGCTGCTTTC-3'), Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGA CCCTTGGC-3') を使用し, PCR はサーマルサイクラー Applied Biosystems 2720 (Thermo Fisher Scientific) を用いて, 94℃・30 秒, 55℃・30 秒, 72℃・1 分 30 秒 で 30 サイクルの増幅を行った。PCR 産物のシーケンス反応には, Big Dye Terminator Cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific) を用い反応産物を精製した後, ABI 3130XL キャピラリーシーケンサー (Thermo Fisher Scientific) を用いて塩基配列を決定した。シーケンスデータは NCBI のデータベースと相同性検索を行い, 系統樹の作成は GENETYX Ver.13 を用いて編集し, 近隣結合法により行った。

4. MALDI-TOF MS 同定

サブローデキストロース寒天培地 (コージンバイオ) にて, 27℃, 3 日間培養した菌株について, MALDI Biotyper (ブルカー・ジャパン 糸状菌ライブラリー Ver. 2.0) および VITEK MS (バイオメリュー・ジャパン ナレッジベース Ver. 3.0) の 2 種類の質量分析装置を用いて同定した。

1) MALDI Biotyper による同定

メーカーのマニュアルに従い, コロニーから直接塗布するダイレクトスメア法により同定を行った。コロニーの辺縁より爪楊枝を用いて菌糸を採取し, サンプルプレートに直接塗布後, HCCA マトリックス試薬 (ブルカー・ジャパン) を 1 µl 滴下し乾燥後に測定した⁸⁾。菌種同定の採用スコアとして 2.00 以上を種レベルで信頼性の高い結果とし, 1.70-1.99 を属レベルで整合性のある結果として採用とした。

2) VITEK MS による同定

ギ酸・アセトニトリル抽出法で同定した。ギ酸・アセトニトリル抽出法は, メーカーのマニュアルに従い行った。コロニーの中心部から辺縁部にかけてスワブで菌糸および分生子をかきとり, 70% エタノール 900 µl に懸濁した。14,000 g, 2 分間遠心後上清を取り除き, 70% ギ酸溶液 40 µl およびアセトニトリル 40 µl を添加しよく混和した。この溶液 1 µl をサンプルプレートに滴下, 乾燥後マトリックス試薬 (バイオメリュー・ジャパン) を滴下して乾燥後測定した⁸⁾。また, マニュアルに記載はないが MALDI Biotyper と同様にコロニーの辺縁より爪楊枝を用いて菌糸を採取し, サンプルプレートに直接塗布後マトリックス試薬を 1 µl 滴下し乾燥後に測定した。VITEK MS の菌種同定の採用スコアとして 99.9% を採用とした。なお, 精度管理株として *Aspergillus brasiliensis* ATCC16404 を使用した。

結 果

1. 遺伝子による同定結果

形態学的に *A. niger* と同定された菌株計 36 株について遺伝子解析を実施した結果, *A. tubingensis* 17 株 (47.2%), *A. welwitschiae* 18 株 (50.0%), *Aspergillus neoniger* 1 株 (2.8%) であり, *A. niger* と同定された菌株はなかった (Table 1, Fig. 1)。材料別の内訳は, *A. tubingensis* が耳漏では 46.2%, 呼吸器関連材料では 50.0%, *A. welwitschiae* は耳漏では 50.0%, 呼吸器関連材料では 50.0% とほぼ同じ割合となった。耳漏の 1 株 (3.8%) のみ *A. neoniger* となった (Ta-

ble 2)。

2. MALDI-TOF MS による同定結果

2 種類の MALDI-TOF MS で分析を行った結果, MALDI Biotyper のダイレクトスメア法では, 33 株 (91.7% Score Value 2.00-2.30) が *A. niger* と同定され 3 株 (8.3% Score Value 1.78-1.99) が *Aspergillus* spp. と属名までの同定結果となった。VITEK MS のダイレクトスメア法は 36 株中 23 株 (69.4%) が *A. niger* complex と同定され, ギ酸・アセトニトリル抽出法は 36 株中 7 株 (22.2%) が *A. niger* complex と同定された。なお, VITEK MS において *A. niger* は *A. niger* complex と同定され, 菌種名の区別はできない。既知の同定株の結果は, VITEK MS では *A. niger* NBRC 33023 が *A. niger* complex と同定できたが, *A. tubingensis* NBRC 4407 および *A. welwitschiae* IFM 63864 は同定不能であった。MALDI Biotyper では, *A. niger* NBRC 33023, *A. tubingensis* NBRC 4407, *A. welwitschiae* IFM 63864 の 3 株すべてが *A. niger* と同定された。VITEK MS の精度管理株である *Aspergillus brasiliensis* ATCC16404 は, いずれの測定でも 99.9% の同定結果となった。

考 察

糸状菌の同定は形態学的に行われてきたが, 現在は分子生物学的に系統解析が行われ, 菌種の再編や隠蔽種の存在が明らかになりつつある。*Aspergillus* 属においては, *Aspergillus* section *Fumigati*, *Aspergillus* section *Flavi*, *A. sect. Nigri* 等で形態学的には区別が付かず, 遺伝子解析を行うことにより鑑別が可能となる隠蔽種が報告されている。一部の隠蔽種においては, アムホテリシン B やアゾール系抗真菌薬に抵抗性を示す株の存在が明らかにされ臨床的に問題となっている。今回検討を行った *A. sect. Nigri* においても, アゾール系薬に抵抗性を示す *A. tubingensis* の存在が報告されており¹⁾, 菌種同定の必要性が認識されつつある。今回解析を行った 36 株の内訳は, 遺伝子配列による解析の結果より *A. tubingensis* 17 株 (47.2%), *A. welwitschiae* 18 株 (50%), *A. neoniger* 1 株 (2.8%) となり, *A. niger* は 1 株も認められなかった。Howard らは, 英国の臨床検体より分離された *A. sect. Nigri* は *A. tubingensis* が 17.8%, *A. welwitschiae* が 55.6%, *A. niger* 13.3%, *Aspergillus acidus* 6.7%, 未知種 6.7% の割合であったことを報告している⁹⁾。また, Hagiwara らは外耳道真菌症の患者より分離した *Aspergillus* 属について β チュープリン遺伝子による解析の結果, 出現頻度が一番高かったのは *A. niger sensu stricto*, 次いで *A. tubingensis* であったことを報告している³⁾。今回の我々の耳漏検体による遺伝子同定結果は, *A. welwitschiae* 13 株 (50%), *A. tubingensis* 12 株 (46.2%), *A. neoniger* 1 株 (3.8%) であり *A. sect. Nigri* の隠蔽種が多く分布していた点では既報と同様の傾向を示した。Hashimoto らは, 日本における *A. sect. Nigri* の抗真菌薬感受性の検討報告の中で, イトラコナゾールまたはボリコナゾールに低感受性の株の存在を確認しており, *A. niger* 30~55%, *A. tubingensis* 79.5~89.7%, *A. welwitschiae* 6.8~18.6% と, 低感受性株に種差が見受けられる結果を報告している¹⁰⁾。耳漏検体から分離される *A. sect. Nigri* には, アゾール系の薬剤に抵抗性を示す菌種が多く分布しており薬

Table 1. Identification by MALDI Biotyper and VITEK MS of strains morphologically identified as *Aspergillus niger*

Strains	Gene sequencing	MALDI TOF-MS		
		MALDI Biotyper	VITEK MS	VITEK MS
		Directly method	Directly method	Extraction method
1	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i>	ND †	ND
2	<i>A. tubingensis</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	ND	ND
3	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i>	ND	ND
4	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	ND
5	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i>	ND	ND
6	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i>	ND	ND
7	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i>	ND	ND
8	<i>A. tubingensis</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. niger</i> complex	ND
9	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i>	ND	ND
10	<i>A. tubingensis</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	ND	ND
11	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	ND
12	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	ND
13	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	ND
14	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	ND
15	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i>	ND	ND
16	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	ND
17	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	ND
18	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	ND	<i>A. niger</i> complex
19	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	ND	<i>A. niger</i> complex
20	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	ND
21	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	<i>A. niger</i> complex
22	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	ND
23	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	<i>A. niger</i> complex
24	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	ND
25	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	ND
26	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	ND	ND
27	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	ND
28	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	<i>A. niger</i> complex
29	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	<i>A. niger</i> complex
30	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	ND
31	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	ND	ND
32	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	ND
33	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	ND
34	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	ND
35	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	<i>A. niger</i> complex
36	<i>A. neoniger</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	ND
NBRC 33023	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> complex	<i>A. niger</i> complex
NBRC 4407	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. niger</i>	ND	ND
IFM 63864	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. niger</i>	ND	ND

†; Not detected (*A. tubingensis*, *A. welwitschiae* and *A. neoniger* is not in the DB of MALDI TOF-MS.)

剤感受性が異なることから、早期に菌名が判明することにより薬剤選択の短縮や早期治癒ができるものと考えられる。

Aspergillus 属の同定は形態学的に行うことが一般的であるが、同定に必要な分生子形成には時間が必要なため迅速な同定はできない。MALDI-TOF MS では、分生子形成を認めなくても培養2~3日のコロニー辺縁部の菌糸をもとに解析を行うことができることから、比較的早期の同定が可能である点がMALDI-TOF MSの大きなメリットである。糸状菌を質量分析で測定を行う際には前処理を実施することが推

奨されている。また、糸状菌は菌糸および分生子の状態によってタンパク量や構成に差が生じる可能性も考えられる。VITEK MSにおいて菌糸、分生子どちらをサンプリングするか区別はないが、MALDI Biotyperにおいては基本的に菌糸体でデータベースが構築されている。MALDI Biotyperは、ダイレクトスメア法にて同定できなかった場合、エタノール・ギ酸抽出法を行い、それでも同定できない時は液体培地を用いた抽出法が記載されている。今回VITEK MSにおいてもMALDI Biotyperと同じダイレクトスメア法を試みた

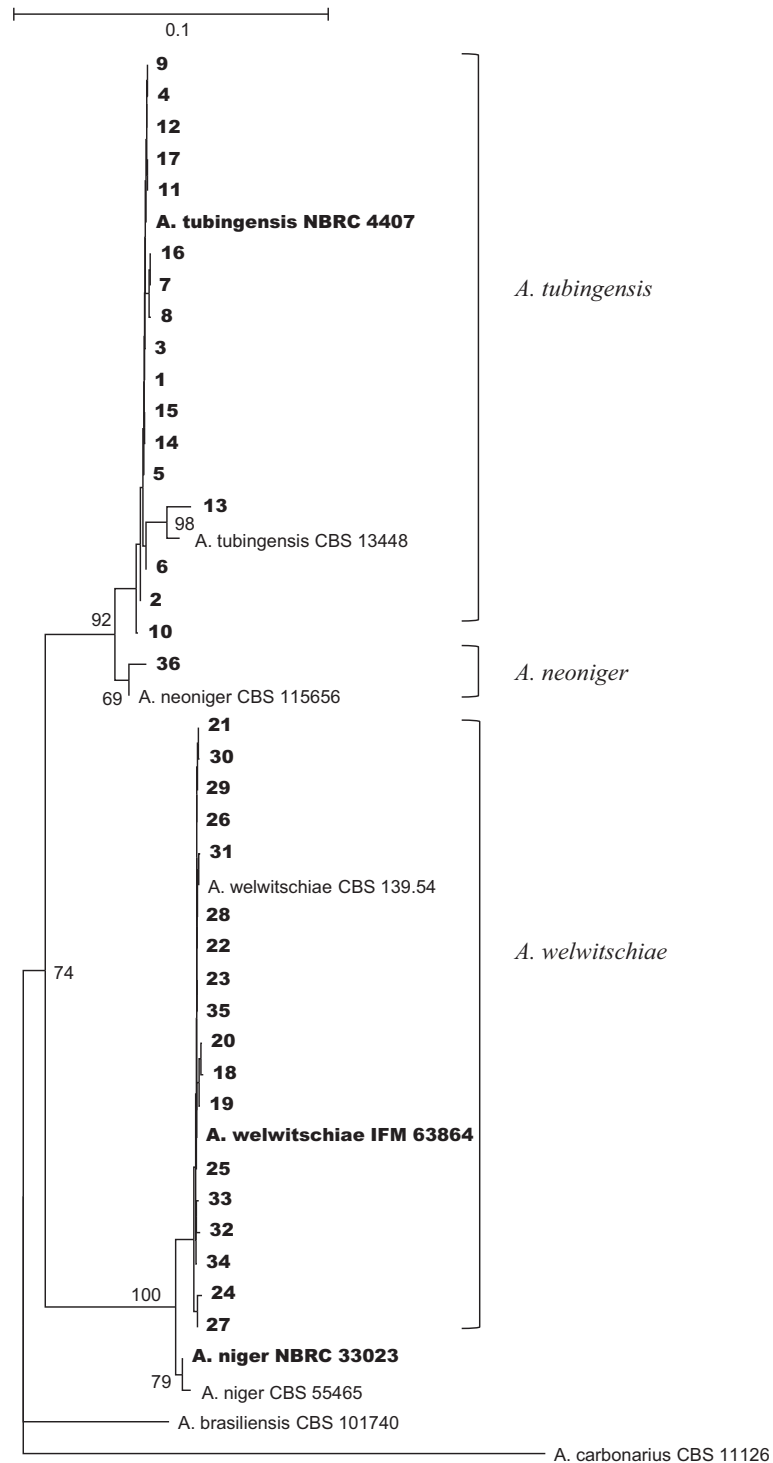


Fig. 1. Phylogenetic tree of 36 isolated strains by Neighbor-Joining analysis based on combined-dataset of β -tubulin/calmodulin sequences. Bootstrap values >50% (1,000 replicates) are shown near nodes. Sequences determined in this study are highlighted in bold-face. The scale bar indicates substitution in NJ analysis.

が、現時点では正確性を述べるにはデータが乏しいと考えられる。しかし今回、ギ酸アセトニトリル抽出法よりダイレクトスメア法で同定株が多いことと、こうした簡便な方法での VITEK MS の測定法には直接サンプルプレート上でギ酸処理を行い、良好な結果が出たという報告¹¹⁾もあるため、処理

方法等の改善によってはダイレクトスメア法での同定も期待できると思われる。質量分析装置での同定においてギ酸・アセトニトリル処理法は 1 検体当たり約 10 分で前処理ができ、測定時間も 1 件当たり約 5 分で菌種が同定できる。ダイレクトスメア法ではさらに簡便な方法でサンプルプレートに直接

Table 2. Number of *Aspergillus* species from each specimen

Specimen (N = 36)	Number of strains		
	<i>Aspergillus tubingensis</i>	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	<i>Aspergillus neoniger</i>
Ear discharge (N = 26)	12	13	1
	46.2%	50.0%	3.8%
Respiratory material (N = 10)	5	5	ND*
	50.0%	50.0%	

*: Not detected

菌糸を塗布するだけで測定が可能である。

今回の MALDI-TOF MS の同定結果は、MALDI Biotyper では *A. niger* 33 株、VITEK MS では *A. niger* complex と同定された菌株は抽出法で 7 株、ダイレクトスミア法で 23 株であった。今回使用した両機種種のデータベースには *A. tubingensis*, *A. welwitschiae*, および *A. neoniger* の菌名は登録されておらず、これらの菌種は *A. niger* あるいは *A. niger* complex として同定される可能性が高いと考えられる。現時点では、MALDI TOF-MS による *A. sect. Nigri* の同定精度については、種名までの信頼性は現状の In Vitro Diagnosis (IVD) レベルのデータベースでは乏しく、菌名が得られたとしても隠蔽種も含めた包括的な菌名であり、*A. sect. Nigri* の多様な菌種を含んでいると考えることが妥当である (Fig. 1)。

D'hooge らは、MALDI-TOF MS において IVD レベルのデータベースを用いた *A. sect. Nigri* の詳細同定はできなかったが、in-house のデータベースを用いた検証において *A. sect. Nigri* の詳細同定が可能であったと報告している¹²⁾。これは、MALDI-TOF MS による短時間 (培養時間も含む) の *A. sect. Nigri* の詳細同定が可能であることを示唆しており、今後、データベースの拡充が進めば、疾患治療に直結した検査結果の提供が可能となる。

今回の耳漏検体を中心とした検討では、検出された *A. sect. Nigri* の菌種の分布においては隠蔽種が存在が多く確認される結果となった。なかでも自然耐性の傾向がある *A. tubingensis* については、迅速かつ正確な菌種同定が必要である。MALDI-TOF MS による迅速同定の利点を生かすためにも、一刻も早い *A. sect. Nigri* のデータベース拡充を望む。

利益相反：申請すべき利益相反はなし

文 献

- 1) 豊留孝仁. 2016. 原因真菌から見たアスペルギルス症. Med. Mycol. J. 57J: J 149-J 154.
- 2) Valga, J, JC Frisvad, S Kocsubé, et al. 2011. New and revis-

ited species in *Aspergillus* section *Nigri*. Stud Mycol 69: 1-17.

- 3) Hagiwara, S, T Tamura, K Satoh, et al. 2019. The molecular identification and antifungal susceptibilities of *Aspergillus* species causing otomycosis in Tochigi, Japan. Mycopathologia 184: 13-21.
- 4) D.H.ラローン, 山口英世, 他. 2013. 医真菌同定の手引き, 柴研化学.
- 5) Klich, MA. 2000. Identification of common *Aspergillus* species, p.116, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- 6) Glass, N.L, G.C Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. Appl Environ Microbiol 61: 1323-1330.
- 7) Yaguchi, T, Y. Horie, R. Tanaka, et al. 2007. Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from clinical Specimens in Japan. Jpn J Med Mycol 48: 37-46.
- 8) 永澤善三, 浅原美和, 大楠清文, 他. 2017. 臨床微生物質量分析ハンドブック. 日臨微誌 27: 19-20.
- 9) Howard, S, E. Harrison, P. Bowyer, et al. 2011. Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex. Antimicrob. Agents Chemother 55: 4802-4809.
- 10) Hashimoto, A, D Hagiwara, A Watanabe, et al. 2017. Drug sensitivity and resistance mechanism in *Aspergillus* section *Nigri* strains from Japan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 61: 1-10.
- 11) Iriart, X, R.A Laverigne, J Fillaux, et al. 2012. Routine Identification of Medical Fungi by the New Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight System with a New Time-Effective Strategy. J Clin Microbiol 50: 2107-2110.
- 12) D'hooge, E, P. Becker, D. Stubbe, et al. 2019. Black aspergilli: A remaining challenge in fungal taxonomy? Medical Mycology 57: 773-780.

Evaluation of MALDI-TOF MS and phylogenetic analysis for clinical isolates of morphologically identified *Aspergillus niger*

Yasunobu Matsumoto, Makoto Suzuki, Hiroyoshi Nihei, Satoru Matsumoto, Takashi Mikawa
LSI Medience Corporation. Microbiological Testing Group, Infectious Diseases Testing Department

Thirty-six strains of filamentous fungi isolated in various specimens from medical facilities in Japan morphologically identified as *Aspergillus niger* from January, 2016 to February, 2019 were used. The purpose of this study was the evaluation of species identification of these strains by both phylogenetic analysis and Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Isolates were identified as *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus welwitschiae* and *Aspergillus neoniger* in 47.2%, 50.0% and 2.8%, respectively, and there was no *A. niger* by phylogenetic analysis. On the other hand, identification results by MALDI-TOF MS were to the extent of *A. niger* or *A. niger* complex. Therefore, identification of *Aspergillus* section *Nigri* (*A. sect. Nigri*) must be performed by phylogenetic analysis at present. These results indicate improvement of MALDI-TOF MS database with convenient and prompt method due to urgent identification of resistant and low drug susceptibility species/strain in *A. sect. Nigri* that were recently reported.