

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16271

研究課題名（和文）MALDI-TOF MS(質量分析器)による黒色真菌迅速同定

研究課題名（英文）Rapid identification of black fungi by MALDI-TOF MS (Mass Spectrometer)

研究代表者

ニッ谷 剛俊（FUTATSUYA, Taketoshi）

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：80835885

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,300,000 円

研究成果の概要（和文）：黒色真菌症は稀であるが致死性であり世界中で問題となっている。黒色真菌症は菌種により治療法が異なり迅速同定が重要であるが、専門性が高く時間を要する点が問題であった。本研究は、MALDI-TOF MSを用いて黒色真菌症の中でも頻度の高いExophiala属を対象としての迅速同定を確立するものである。現在販売されているライブラリに、基準となる菌株を登録しin-houseライブラリを作成した。検査の前処理法として、斜面培地で造成したコロニーを直接利用した。

この前処理法により、MALDI-TOF MSのライブラリの充実と前処理法の工夫により、Exophiala属では同定が可能であると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黒色真菌症は稀であるが、皮膚のみでなく全身に播種し致死性であることから発展途上国を中心に世界中で問題となっている。黒色真菌症は菌種により治療法が異なり迅速に菌種を同定すること重要であるが、菌種同定は専門性が高く、時間を要する点が問題であった。MALDI-TOF MSのライブラリの充実と前処理法の工夫により、Exophiala属については同定が可能であると示唆された。また、今回確立した前処理法の様に、前処理法の工夫とライブラリの充実により、黒色真菌の迅速同定が可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Chromoblastomycosis is a rare but deadly problem worldwide. Treatment methods for chromoblastomycosis vary depending on the fungal species, and rapid identification is important. However, the problem is that it is highly specialized and time-consuming. This study uses MALDI-TOF MS to establish rapid identification of the genus Exophiala, which is a frequently occurring chromoblastomycosis. We created an in-house library by registering standard strains in currently available libraries. As a preparation method for testing, colonies created on slanted media were directly used.

With this preparation method, it was suggested that identification of the genus Exophiala is possible by enriching the MALDI-TOF MS library and devising the preparation method.

研究分野：真菌

キーワード：MALDI-TOF MS 黒色真菌 Exophiala

1 . 研究開始当初の背景

医療の発展や高齢者の増加に伴い、免疫抑制状態の患者が多くなっているが、皮膚科領域では免疫抑制患者の増加に伴い深在性皮膚真菌症を誘発することが懸念されている。当施設併設の病院でのデータ (論文未発表) では、過去 10 年間で発生した皮膚深在性真菌症 12 例中 10 例が免疫抑制状態であった。主要な原因菌である黒色真菌 (いわゆるクロカビ) は細胞壁にメラニン色素を持ち、菌糸が暗色調を示す一群の真菌であり、110 種以上の菌種が皮膚の感染症原因菌として報告されている。これらの深在性皮膚真菌症では菌名が診断に直結すること、菌種によって治療法が異なることから、迅速な菌種の同定が重要である。現在の菌種同定は培養後に集落や菌の形態から同定を行い、一部の専門機関では遺伝子配列から分子生物学的に同定を行っている。これは熟練した真菌学者や研究室レベルでなければ同定が困難であり、診断まで時間を要することから、患者はその間に適切な治療を受けることができない可能性がある。このように、黒色真菌に対する、検査室レベルでの菌種同定に用いる簡便かつ迅速な同定方法が無いことが問題となっている。

2 . 研究の目的

本研究ではMALDI-TOF MSによる黒色真菌の同定を行う上での検体処理方法の改良を行う。具体的には、糸状菌は液体培地を用いて回転振盪培養する方法をとるが、(1)培地を変更することで酵母様の発育形態の部分を検査することでMALDI-TOF MSに使用できる状態にする案や、(2)色素産生を抑えることを考慮した培養法を用いるなどの方法、(3)前処理の段階で機械的に細胞壁を破壊(ホモジナイズやカラムを使用)する方法を考えている。これにより、前処理法を確立し、最終的にライブラリ構築を行うことを目的とする。

3 . 研究の方法

(1)菌株の選別

金沢医科大学皮膚科に保存されている黒色真菌を用いる。保存株として、*Cladophialophora* 属 3 菌種、*Curvularia* 属 1 菌種、*Exophiala* 属 11 菌種、*Fonsecaea* 属 3 菌種、*Phaeoacremonium* 属 2 菌種、*Rhinocladiella* 属 11 菌種から、一部菌種では分類基準となった Type 株を含む株を使用する。これには本邦において皮膚科領域で近年分離される黒色真菌症原因菌のほとんどの種が含まれる。ここからデータベースを作成するための株を選別する。選別方法は、カルチャーコレクション株の ribosomal DNA ITS (Internal transcribed spacers) 領域を元に系統樹を作成し、株数の多い群から順に各群 1 株、2 株まで選別する (Type 株を含む場合には、Type 株を選ぶ)。

(2)培養、前処理、ライブラリ作成

菌株それぞれをサブロー液体培地、あるいは malt extract 液体培地に摂取し、回転振盪培養を行う。これにより分生子を含まない均質な菌糸塊を形成する。これを釣菌し、ターゲットプレートに展開し、蟻酸で処理する。その後乾燥させ、マトリックス試薬滴下後、マススペクトルを得る。現在市販のライブラリには黒色真菌として *Cladosporium* 属のごく少数の菌種に限られるため、スペクトルパターンを追加し、ライブラリを構築する。細胞壁を持つ糸状菌では菌体から十分量のタンパク質を抽出するために適切な前処理が必要である。特に黒色真菌の細胞壁に含まれるメラニンは物理的、化学的に壁の強靱化に関与しており、さらにメラニン自体も MALDI-TOF MS による分析を阻害する事が知られている (松井奈津子 他. 臨床と微生物 44: 421, 2017)。これに対してメラニンの合成を阻害する tricyclazole 添加培地で培養 (Buskirk AD et al. Anal Biochem 411: 122, 2011) を行うこと、強靱な細胞壁を消化する Novozyme、あるいは Zymolyase による処理を行うことで、解析に用いるパターンが得られるかを検討する。また、他の方法として細胞を物理的に破壊する方法を検討している。

(3)ライブラリの妥当性の判定

上記の検体処理法と、作成したライブラリに基づき、当施設に菌種同定依頼のあった黒色真菌株 (形態学的、分子生物学的に再同定) を MALDI-TOF MS で再度同定を行い、データベースの妥当性を確認する。

4 . 研究成果

検査の前処理法としては、現在使用されている MALDI-TOF MS で糸状菌同定する際の前処理方法は繁雑で時間を要することから、斜面培地で造成したコロニーを直接利用する前処理法と、コロニーを触接検査する最も迅速な方法を比較検討した。従来の方法と比較し、検査結果のスコアは前者の方が後者に比べて従来法との差が少なく、実臨床に適していると考えた。

この前処理法を使用して、当施設に同定依頼となった *Exophiala* 属を MALDI-TOF MS で検査を行った。照合するデータベースは従来のライブラリに加え、上記の新たに登録した in-house ライブラリを使用した。結果として、30/31 株で最もスコアの高い菌種は遺伝子同定の菌種と一致した。MALDI-TOF MS のライブラリの充実と前処理法の工夫により、*Exophiala* 属については同定が可能であると示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Futatsuya Taketoshi、Mura Tatsuki、Anzawa Kazushi、Mochizuki Takashi、Shimizu Akira、Iinuma Yoshitsugu	4. 巻 50
2. 論文標題 <scp>MALDI TOF MS</scp> identification of <i>Exophiala</i> species isolated in Japan: Library enrichment and faster sample preparation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 1313 ~ 1320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.16878	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 ニッ谷 剛，村 竜輝，安澤 数史，望月 隆，清水 晶，飯沼 由嗣
2. 発表標題 MALDI-TOF MS(質量分析器)による黒色真菌迅速同定
3. 学会等名 第66回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------