

カビ Premium(1 遺伝子) 報告書

シリアル番号 XXXXXxx
管理番号 SIID 00000
作業完了日 202x 年 xx 月 xx 日
発行日 202x 年 xx 月 xx 日

極秘資料

本報告書の使用にあたっての確認事項

1. 本報告書は株式会社テクノスルガ・ラボ 技術責任者による承認済みです。
2. 研究発表 (論文投稿) や特許明細書への転用を除き、本報告書の一部または全部をそのままあるいは改変して第三者へ転用などされた場合には、株式会社テクノスルガ・ラボは一切の責任を負いかねます。
3. 当社受託サービス等は、試験・研究用途を目的として販売しております。当社受託サービスを医療や臨床診断などの試験・研究目的以外へご使用される場合、これに起因する損失・損害等については、当社では一切の責任を負いかねます。

技術責任者

印

株式会社テクノスルガ・ラボ 研究センター 技術部

〒424-0065 静岡県静岡市清水区長崎 388 番地の 1

TEL : 054-349-6211 FAX : 054-349-6121

Mail : tsl-contact@tecsrg.co.jp

検体情報

検体名	SIID	受取日
SAMPLE	00000	202x 年 xx 月 xx 日
備考:		

目的

巨視的および微視的形態観察（以下、カビ第一段階試験）および rDNA の ITS 領域塩基配列解析の結果から、検体の帰属分類群を推定します。

方法

1. 前培養条件

- ・ 培地 BD Difco Potato Dextrose Agar (Becton Dickinson, USA)
- ・ 培養温度 27°C
- ・ 培養期間 1 週間
- ・ その他条件 好気培養

2. rDNA の ITS 領域塩基配列解析

- ・ DNA 抽出 物理的破砕法
- ・ PCR 増幅 PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara Bio, Japan)
- ・ サイクルシーケンス BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ・ 使用プライマー¹⁾²⁾ PCR 増幅: ITS5, NL4
シーケンス: ITS5, ITS4
- ・ シーケンス ABI PRISM 3500xl Genetic Analyzer System (Thermo Fisher Scientific)
- ・ 塩基配列決定 ChromasPro 2.1 (Technelysium, AUS)
- ・ BLAST 相同性検索³⁾ 解析ソフトウェア: ENKI v3.2 (TechnoSuruga Laboratory, Japan)
データベース
DB-FU15.0 (TechnoSuruga Laboratory, Japan)
国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/GenBank)
検索日: 202x 年 xx 月 xx 日
- ・ 簡易分子系統解析 系統樹の推定: 近隣結合法⁴⁾
塩基置換モデル: Kimura-2-parameter⁵⁾
樹形の信頼性評価: ブートストラップ法⁶⁾ (1,000 反復)

* 塩基配列決定は、シーケンサーからの生データ（エレクトロフェログラム）を当社技術者が目視により確認し、修正を行った後に決定しています。

簡易分子系統樹で示す株名末尾の略記号は次の通りです。

略記号	タイプの種類
T	基準標本 / 基準株、又はどのタイプか不明な場合 / タイプ由来株
HT	ホロタイプ (Holotype, 正基準標本) / ホロタイプ由来株
NT	ネオタイプ (Neotype, 新基準標本) / ネオタイプ由来株
LT	レクトタイプ (Lectotype, 選定基準標本) / レクトタイプ由来株
IT	アイソタイプ (Isotype, 副基準標本) / アイソタイプ由来株
ET	エピタイプ (Epitype, 解釈基準標本) / エピタイプ由来株
PT	パラタイプ (Paratype, 従基準標本) / パラタイプ由来株
R	参照菌株 (Reference strain)
A	信頼における培養株 (Authentic culture / strain)

3. カビ第一段階試験

4 種類の平板培地で培養後に巨視的観察 (コロニー観察) を行ない、コロニーの直径・色調 (表面および裏面)・表面性状・可溶性色素産生の有無等に関して記録を行ないました。コロニー色調に関する記述は Kornerup and Wanscher⁷⁾ に準拠しました。また、以下をもちいて微視的観察を行いました。

- ・ 培地 BD Difco Potato Dextrose Agar (Becton Dickinson, USA)
2% Malt Agar (MA)
Bacto Oatmeal Agar (Becton Dickinson, MD, USA) (OA)
LcA 培地 (三浦培地) (LcA)
- ・ 培養温度 27°C
- ・ 培養期間 1 週間～4 週間
- ・ 顕微鏡 光学顕微鏡 BX51 (Olympus, Japan) (微分干渉観察含む)
実体顕微鏡 SMZ800 (Nikon, Japan)
- ・ マウント液 ラクトフェノール液

* 方法に記載の会社名、製品名は一般に各社の日本および各国での商標または登録商標です。

結果

1. rDNA の ITS 領域塩基配列解析

表 1. DB-FU に対する BLAST 検索結果

相同性スコアで上位 30 に検索された rDNA の ITS 領域塩基配列解析データ

登録名	株名	Accession No.	相同率	BSL
<i>Aspergillus niger</i>	CBS120.49	AJ280006	581/581 (100.0%)	
<i>Aspergillus niger</i>	CBS554.65	FJ629337	579/579 (100.0%)	
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC16888	AF138904	579/579 (100.0%)	
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	CBS139.54	FJ629340	579/579 (100.0%)	
<i>Aspergillus niger</i>	CBS113.46	FJ629351	578/578 (100.0%)	
<i>Aspergillus tubingensis</i>	CBS643.92	AJ280008	578/581 (99.5%)	
<i>Aspergillus tubingensis</i>	CBS127.49	AJ280007	578/581 (99.5%)	
<i>Aspergillus vadensis</i>	CBS113365	FJ629368	576/579 (99.5%)	
<i>Aspergillus tubingensis</i>	CBS134.48	FJ629354	576/579 (99.5%)	
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CBS101740	FJ629321	575/580 (99.1%)	
<i>Aspergillus luchuensis</i>	KACC46772	JX500081	557/560 (99.5%)	
<i>Aspergillus niger</i>	NRRL326	EF661186	548/548 (100.0%)	
<i>Aspergillus tubingensis</i>	NRRL4875	EF661193	545/548 (99.5%)	
<i>Aspergillus sclerotium</i>	CBS115572	NR_077192	560/579 (96.7%)	
<i>Aspergillus lacticoffeatus</i>	CBS101883	FJ629336	560/579 (96.7%)	
<i>Aspergillus ibericus</i>	CBS121593	AY656625	561/582 (96.4%)	
<i>Aspergillus pulverulentus</i>	CBS55865	EU821317	509/512 (99.4%)	
<i>Aspergillus ellipticus</i>	NRRL5120	EF661194	530/549 (96.5%)	
<i>Aspergillus ellipticus</i>	CBS707.79	AJ280014	528/548 (96.4%)	
<i>Aspergillus ibericus</i>	NRRL35644	EF661200	528/549 (96.2%)	
<i>Aspergillus carbonarius</i>	NRRL369	EF661204	527/548 (96.2%)	
<i>Aspergillus piperis</i>	CBS112811	EU821316	505/514 (98.2%)	
<i>Aspergillus neoniger</i>	CBS115656	FJ491682	462/464 (99.6%)	
<i>Aspergillus hortai</i>	CBS124230	KP987087	541/593 (91.2%)	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC9197	AY939790	534/584 (91.4%)	2
<i>Aspergillus costaricensis</i>	CBS115574	DQ900602	460/468 (98.3%)	
<i>Aspergillus heteromorphus</i>	CBS117.55	EU821305	487/516 (94.4%)	
<i>Aspergillus eucalypticola</i>	CBS122712	EU482439	444/446 (99.6%)	
<i>Aspergillus luteorubrus</i>	MSTFP2246	MT179305	534/588 (90.8%)	
<i>Aspergillus felis</i>	CBS130245	KF558318	530/586 (90.4%)	

注 1) BSL (バイオセーフティレベル) はレベル 2 以上を表記し、空欄はレベル 1 を意味します。

注 2) 網掛けは、簡易分子系統解析に供した配列データを示します。

表 2. 国際塩基配列データベースに対する BLAST 検索結果
相同性スコアで上位 30 に検索された rDNA の ITS 領域塩基配列解析データ

登録名	株名	Accession No.	相同率
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	-	OW988528	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	-	OW988050	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	-	OW985914	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	-	OW983422	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus awamori</i> ^a	-	ON054324	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus awamori</i> ^a	-	ON054316	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus awamori</i> ^a	-	ON054315	581/581 (100.0%)
fungal sp.	-	MZ081452	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus niger</i>	BLH_22	OM436885	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus foetidus</i> ^a	BLH_21	OM436872	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus awamori</i> ^a	-	OM265281	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	CBS 139.54b	OL711714	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus</i> sp.	-	MZ422922	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus</i> sp.	-	MZ422921	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus welwitschiae</i>	-	MZ568150	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus</i> sp.	-	MZ568139	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus</i> sp.	-	MZ568138	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus niger</i>	-	MZ568135	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus niger</i>	-	MZ568134	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus niger</i>	-	MZ568133	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus</i> sp.	-	MZ374728	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus</i> sp.	-	MZ374618	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus</i> sp.	-	MZ374587	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus niger</i>	LCFAn40_Mutant	MZ448205	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus niger</i>	LCFS5_Wild	MZ448204	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus niger</i>	-	MZ266619	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus</i> sp.	cgys02	MZ156976	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus niger</i>	-	MW837779	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus niger</i>	IFM 61597	LC602036	581/581 (100.0%)
<i>Aspergillus foetidus</i> ^a	-	ON054326	580/581 (99.8%)

a これらの種は現在、*Aspergillus* 属の種として国際的に認められていないため、簡易分子系統解析からは除外しました (ICPA-International Commission of Penicillium and Aspergillus
(<http://www.aspergilluspenicillium.org/>))。

0.01

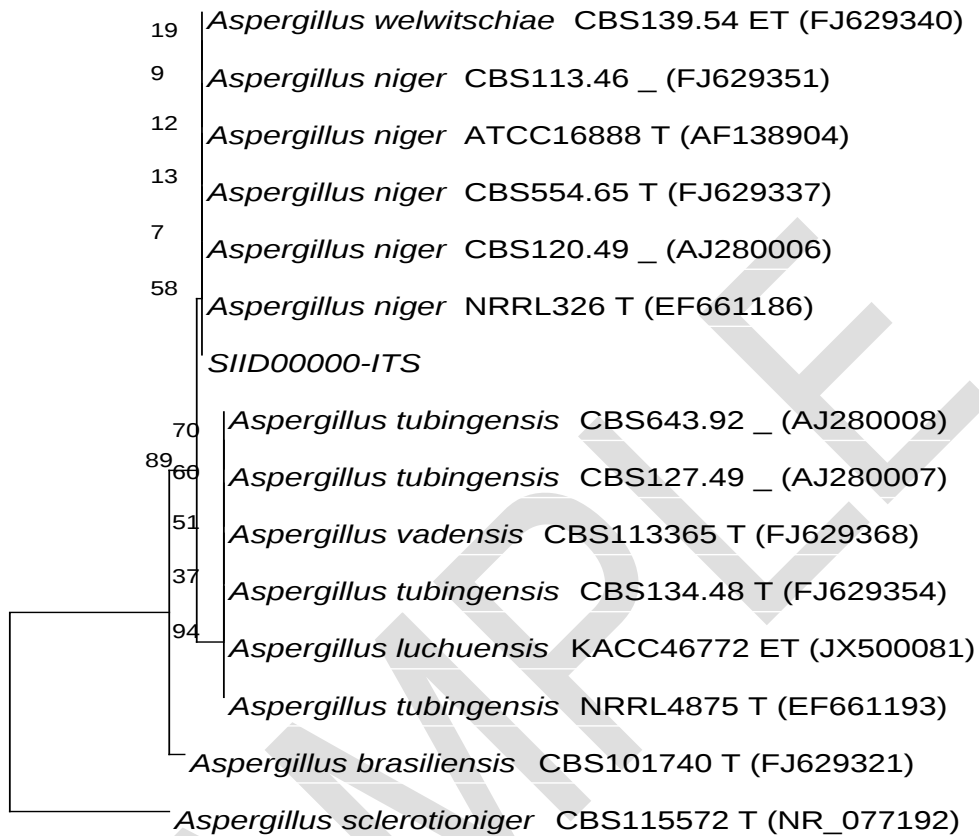


図 1. rDNA の ITS 領域塩基配列に基づく簡易分子系統樹

左上の線はスケールバー、系統枝の分岐に位置する数字はブートストラップ値、株名の末尾の略記号は菌類の命名規約上のタイプの種類を、“_” はスペース（空白）を示します。

2. 巨視的観察（コロニー観察）

コロニー観察の結果、各平板培養物には下表に示す特徴が認められました。

表 3. 巨視的観察結果（1 週間）

培地	コロニー 直径 (mm)	色調※	表面性状	可溶性色素*
PDA	65–85	表：Brownish grey (5F-2) 裏：Pale yellow (2A-3)	ビロード状	—
MA	42–45	表：Brownish grey (5F-2) 裏：Yellowish white (4A-2)	ビロード状	—
OA	62–67	表：Brownish grey (5F-2)～ White (5A-1) 裏：Pale yellow (2A-3)	ビロード状	—
LcA	65–75	Brownish grey (5F-2)～ White (5A-1)	ビロード状	—

※() 内は Kornerup and Wanscher ⁷⁾ で用いられている「色」の Code No. を示しています。

*「可溶性色素」の欄内の「—」は観察されなかったことを示しています。

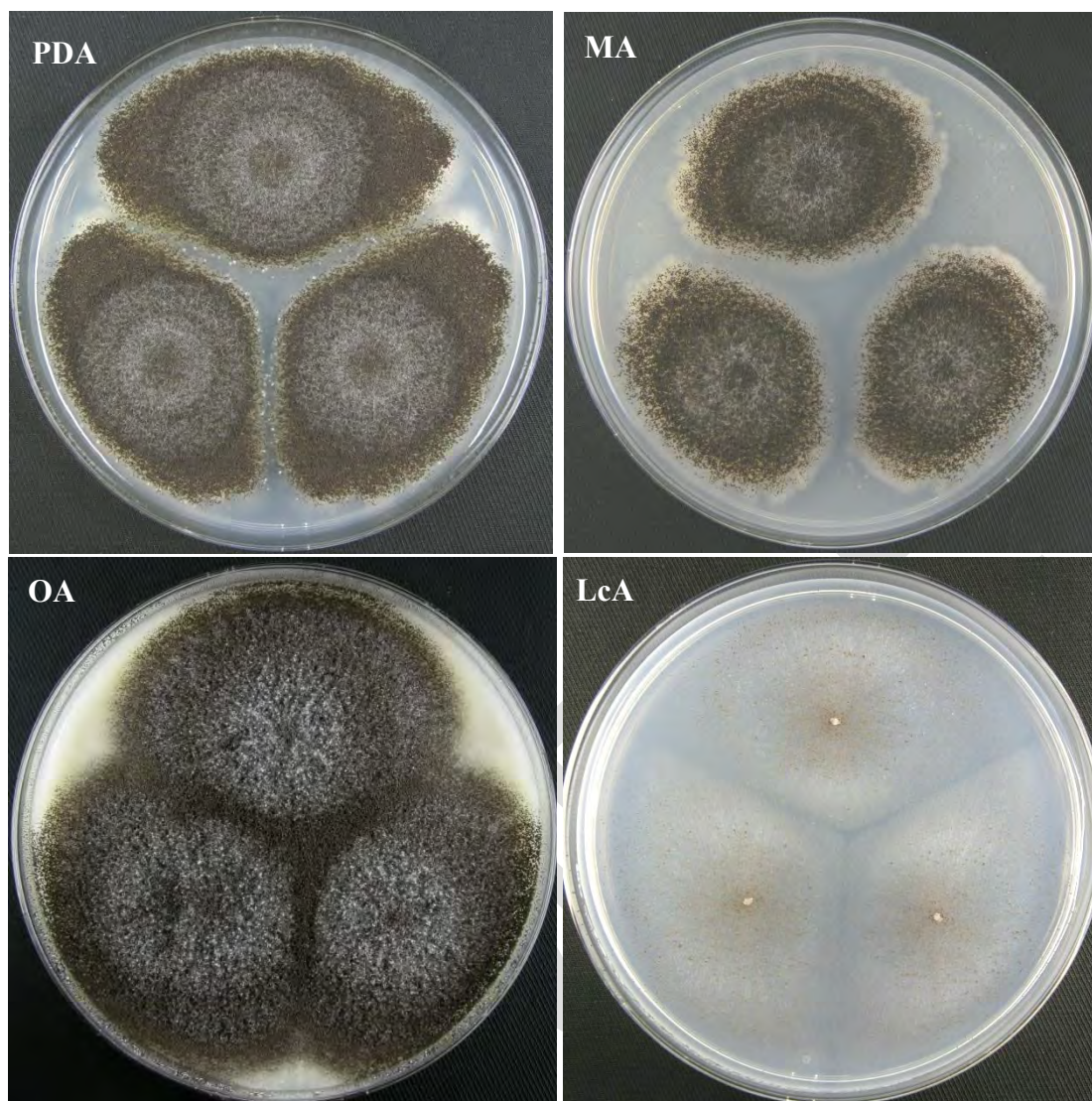


図 2. 各平板培地の巨視的観察像（1 週間）

3. 微視的観察（形態観察）

・栄養菌糸

菌糸は寒天表面上もしくは寒天内に形成され、無色～茶褐色、有隔壁菌糸の形成が認められました。

・無性生殖器官

1. 柄および分生子形成細胞

柄（分生子柄）は栄養菌糸から直立し、非分岐、無隔壁で、表面は平滑、無色～やや着色していました（図 3, 4）。柄の基部には L 字型から T 字型の柄足細胞の形成が認められました。柄の先端が膨らみ、頂囊の形成が観察されました（図 4）。頂囊は亜球形～卵形の形状を示しました（図 5）。頂囊のほぼ全縁からメトレおよび分生子形成細胞であるフィアライドが形成される単列アスペルジラムの構造を示しました（図 5, 6）。フィアライドは首の短いアンプル形でした（図 5, 6）。

2. 分生子

分生子はフィアロ型分生子で、球形、1 細胞、表面は棘状、無色～茶褐色でした（図 6）。

・有性生殖器官

約 4 週間の培養検体からは有性生殖器官の形成は確認出来ませんでした。

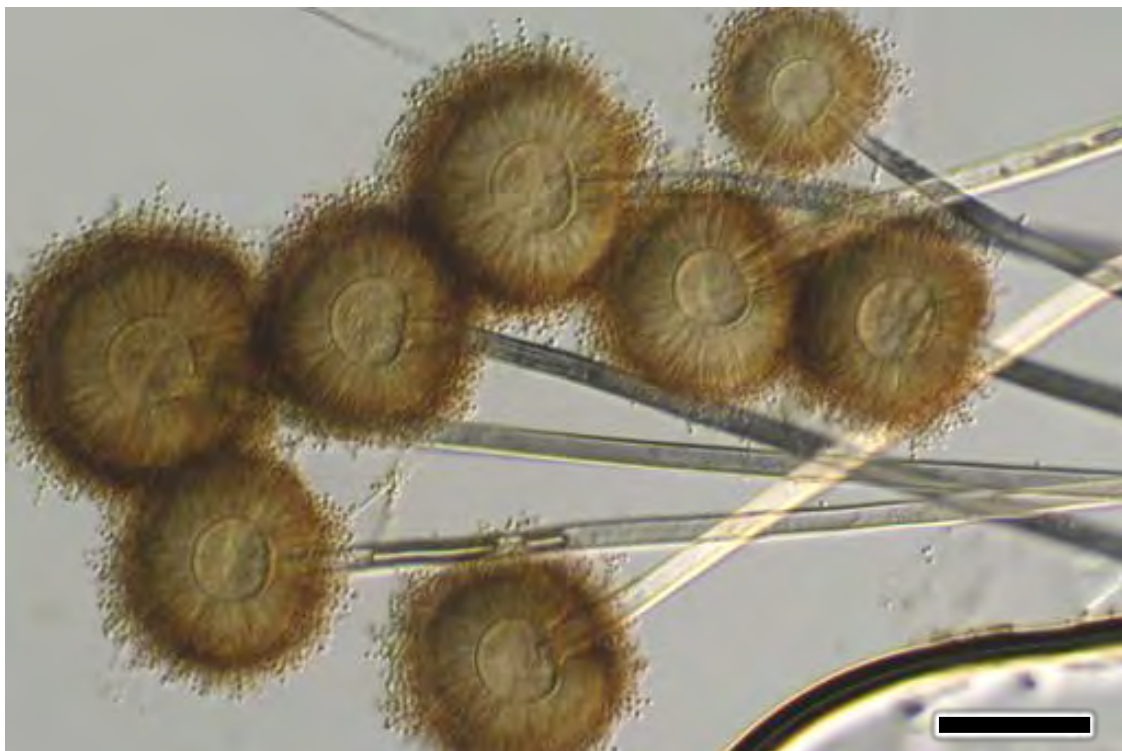


図 3. 微視的観察像（スケールバーは 50 μm ）



図 4. 微視的観察像（スケールバーは 10 μm ）



図 5. 微視的観察像：分生子形成構造（スケールバーは 10 μm ）



図 6. 微視的観察像：分生子（スケールバーは 5 μm ）

考察

微生物同定システム「ENKI」を用いた DB-FU および国際塩基配列データベースに対する BLAST 相同性検索の結果、検体の rDNA の ITS 領域塩基配列は子囊菌門の一種である *Aspergillus niger* および *Aspergillus welwitschiae* の複数の塩基配列に対し相同率 100%の相同性を示しました (表 1, 2)。

DB-FU に対する相同性検索で得られた塩基配列を基に解析した分子系統樹 (図 1) において、検体は *Aspergillus niger* の系統群に属し、その中でも *Aspergillus niger* および *Aspergillus welwitschiae* の複数の塩基配列と同一の分子系統学的位置を示しました。

コロニー性状および形態観察の結果、検体は各種平板培地で黒色～黒褐色、ビロード状、裏面が白色～淡黄色に着色するコロニー性状を示し (図 2、表 3)、栄養菌糸から直立した柄の先端部が膨らみ、その周囲からメトレおよびフィアライドが形成され、1 細胞で球形～亜球形、黒褐色、表面が微棘状のフィアロ型分生子が形成される様子が観察されました (図 3～図 6)。検体で観察された特徴は、rDNA の ITS 領域塩基配列解析で検体の帰属が推定される *Aspergillus niger* group の特徴⁸⁾ に類似していると考えられました。しかし、今回の観察結果から種レベルの帰属分類群の推定は難しく、より詳細な観察が必要だと考えられます。

以上のことから、今回の rDNA の ITS 領域塩基配列解析および形態観察の結果において、検体を *Aspergillus niger* または *Aspergillus welwitschiae* と同定いたします。

まとめ

検体名	SIID	帰属分類群	バイオセーフティレベル
SAMPLE	00000	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh. または <i>Aspergillus welwitschiae</i> (Bres.) Henn.	レベル 1

バイオセーフティレベルについて

菌類についてのバイオセーフティレベルの分類指針は、微生物株保存機関や文献により若干異なりますので、本報告書においては Atlas of clinical Fungi⁹⁾ を参考に示します。

レベル	内容
GRAS	食品にひろく応用利用されている危険性の少ない生物。
1	無脊椎動物に棲息、共生する腐生菌または植物病原菌。ヒト（動物）への感染は、偶発的、表在性であり、非深部性あるいは軽症である。
2	基本的には無脊椎動物に棲息するが、ヒト（動物）組織内においても比較的生育性を示す菌種。重度の免疫不全患者では、深部性かつ日和見感染性の真菌症を引き起こす。また、表在性の感染を引き起こす病原菌も、本レベルに分類される。
3	健康人でさえも、重篤な深在性真菌症を引き起こす可能性のある病原菌。

推定帰属菌種の分離源情報

推定菌種	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	BSL	レベル 1
分離源	世界各地に分布 土壌、植物、果実、豆類、食品、空中、繊維、木材、皮革、ハウスダスト、プラスチック、等		
引用文献	Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. <i>Food and Indoor Fungi</i> . Utrecht: CBS KNAW Fungal Biodiversity Centre; 2010.		
備考	簡易分子系統解析において、検体とクラスターを形成した種の情報です。		

推定菌種	<i>Aspergillus welwitschiae</i> (Bres.) Henn.	BSL	レベル 1
分離源	各種植物体上（裸子植物ウェルウィッチア <i>Welwitschia</i> 、ニンニク、ブドウ、ドライフルーツ、コーヒー、ココアなど）		
引用文献	Horn S-B, Lee M, Kim D-H, Varga J, Frisvad JC <i>et al.</i> <i>Aspergillus luchuensis</i> , an industrially important black <i>Aspergillus</i> in East Asia. <i>PLoS ONE</i> 2013;8:e63769.		
備考	簡易分子系統解析において、検体とクラスターを形成した種の情報です。		

本報告書に付随する電子データ一覧

データ内容	形式
塩基配列テキストファイル	txt
エレクトロフェログラム	ab1
画像	jpg

補足

1. 本報告書における学名表記は Dictionary of the fungi 第 10 版¹⁰⁾ のウェブ版である Index Fungorum に基づいています。
2. データベース DB-FU は、当社と国立遺伝学研究所との共同開発品です。当データベースの塩基配列データは、GenBank、DDBJ、ENA などの国際塩基配列データベースに登録されている膨大なデータを吟味した上で、「菌種の絞り込み」に有効と考えられる塩基配列データを選抜し、収録したものです。
3. 国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/GenBank) に対する相同性検索の結果は、検索を実施した時点の情報です。国際塩基配列データベースの登録情報は常に更新されており、論文などを投稿する前には再度相同性検索することをお勧めします。
4. 今回の解析結果のうち、簡易分子系統樹はアライメント結果の編集は行っておらず、論文等の投稿を前提としたものではありません。
5. バイオセーフティレベル (BSL) は、当該種に対し定められています。従って、本報告書で示す検体の BSL はあくまでも目安であり、お預かりした検体の帰属分類群の推定が困難な場合には BSL が示せないこともあります。BSL は最低でもレベル 1 となりますが、レベル 1 であっても日和見感染が報告されている種もあり、その安全性を保障するものではありません。また、検体の近縁菌種の BSL が 2 以上である場合、その検体は同等の取扱いをされることをお勧めいたします。本報告書でお知らせした BSL は、微生物株保存機関である ATCC (American Type Culture Collection)、CBS (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute) および Atlas of clinical Fungi⁹⁾ によります。また、当該菌種の BSL に関する情報が見当たらない種については「不明」と表記しています。「不明」の場合も微生物同定用 DNA データベース DB-FU の BLAST 検索結果の表では出力されていません。
6. 本報告書に関するご質問等につきましては、株式会社テクノスルガ・ラボ 技術部までお問い合わせください。

引用文献

- 1) **White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (editors). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press; 1990. pp. 315–322.
- 2) **O'Donnell K.** *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR and Taylor J (editors). *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. Wallingford: CAB International; 1993. pp. 225–233.
- 3) **Altschul SF, Madden TF, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z et al.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389–3402.
- 4) **Saitou N, Nei M.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–425.
- 5) **Kimura M.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111–120.
- 6) **Felsenstein J.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783–791.
- 7) **Kornerup A, Wanscher JH.** *Methuen handbook of colour, 3rd ed.* London: Eyre Methuen; 1978.
- 8) **Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B.** *Food and Indoor Fungi*. The Netherlands: CBS KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht; 2010.
- 9) **de Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ.** *Atlas of clinical fungi, 2nd edition*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2000.
- 10) **Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA.** *Dictionary of the fungi, 10th edition*. Wallingford: CAB International; 2008.