

目 的

エイズ患者における慢性クリプトスポリジウム症の治療には、パロモマイシンが第一選択薬として推奨されてきたが、製造中止のため現在は入手できない。アジスロマイシンも本症にある程度は有効とされ、臨床で使用されている。クラリスロマイシンはHIV感染者における非定型抗酸菌症の予防のために長期投与されることがあり、長期投与群ではクリプトスポリジウムの発症がある程度抑制されるとの報告がある。本実験の目的は、アジスロマイシンとクラリスロマイシンの抗クリプトスポリジウム効果を、SCIDマウス実験感染系を用いて、発症予防効果と発症後の治療効果について評価を試みることである。

方 法

1. 原虫

Cryptosporidium parvum (HNJ-1 株) を用いた。1989年に免疫機能の正常な患者から分離し、免疫不全マウスに感染させて継代維持している株である。感染マウスの糞便から分離・精製した新鮮なオーシストを使用した。

2. マウスへの感染

重症複合免疫不全 (SCID) マウス (C.B-17/lcr-ScidJcl, 5週齢、雌、日本クレア社) に、経口投与用金属カテーテルで 1×10^5 個のオーシストを胃内に直接投与した。

3. 薬剤の投与

アジスロマイシン (AZM) とクラリスロマイシン (CAM) の原末を使用した。両薬剤は水に溶けにくいので、均一な懸濁液にするために以下の処理をおこなった。すなわち、各薬剤の原末 80mg を蒸留水 5ml に加えて超音波で分散させ、沈殿を防ぐために、1%カルボキシメチルセルロース (CMC) 溶液 5 ml を加えてよく攪拌した。発症予防効果を検討するための投薬は、各マウスに薬剤懸濁液 0.1ml 宛とし、オーシスト投与の6時間前、直前、6時間後、および18時間後の計4回、カテーテルで胃内に注入した。1回の投与量は 40 mg/kg

に相当する。発症後の治療効果を検討するためには、オーシスト投与の2週間後に同様の投薬を開始した。無投薬対照群マウスには薬剤を含まない CMC 溶液を同様に投与した。

4. 薬剤効果の判定方法

各マウスについて1日当たりのオーシスト排出数を経日的に4週間計数し、無投薬対照群と比較した。オーシストの計数方法の概略は以下のとおりである。オーシスト投与後のマウスをフロアメッシュの下に水を張ったケージで個別に飼育し、排泄される糞便の全量を24時間毎に個別に回収し、50mlの水に攪拌懸濁し、その1mlをマイクロチューブに分取した。これを $5,000 \times g$ で3分間遠心沈殿し、沈渣 0.1ml を残して上清を除去した後に沈渣を攪拌し、これに比重 1.25 の蔗糖液 0.9ml を加えて攪拌し、直ちに Fuchs-Rosenthal 計算盤に採取した。湿潤箱内に30分間静置してオーシストを浮遊させ、 $\times 400$ の倍率で顕微鏡観察し、1~50視野中に検出されるオーシストを計数し、1日当たりのオーシスト数を算出した。この方法ではマウス1頭が1日に排出する糞便に 1×10^4 個以上存在すれば計数可能であった。

結 果

アジスロマイシンまたはクラリスロマイシンをオーシスト投与前から投薬したマウスと、無投薬マウスのオーシスト排出数の経日的推移を図1に示した。無投薬対照群マウス (Cont. 1-3) のオーシスト排出数は、オーシスト投与8日後にはすでに 2×10^5 個に達し、その後やや変動はあるが、15日後には 1×10^6 個、20日後には 5×10^6 個、28日後には 1×10^7 個と、暫時増加した。これに対し、アジスロマイシン (AZM) とクラリスロマイシン (CAM) 投与マウスでは、両者ほぼ同様のオーシスト排出パターンを示し、 1×10^4 個の排出がみられたのはオーシスト投与11日後であり、その後のオーシスト数は経日的に増加するが、対照群に比べて常に $1/100$ 程度であった。

一方、オーシスト投与の2週間後、すなわち1日当たりのオーシスト排出数が 10^6 個に達した時点、に投薬を開始したマウスでは、投薬後のオー

シスト数の減少は認められず、対照群と同様の増加パターンを示した。

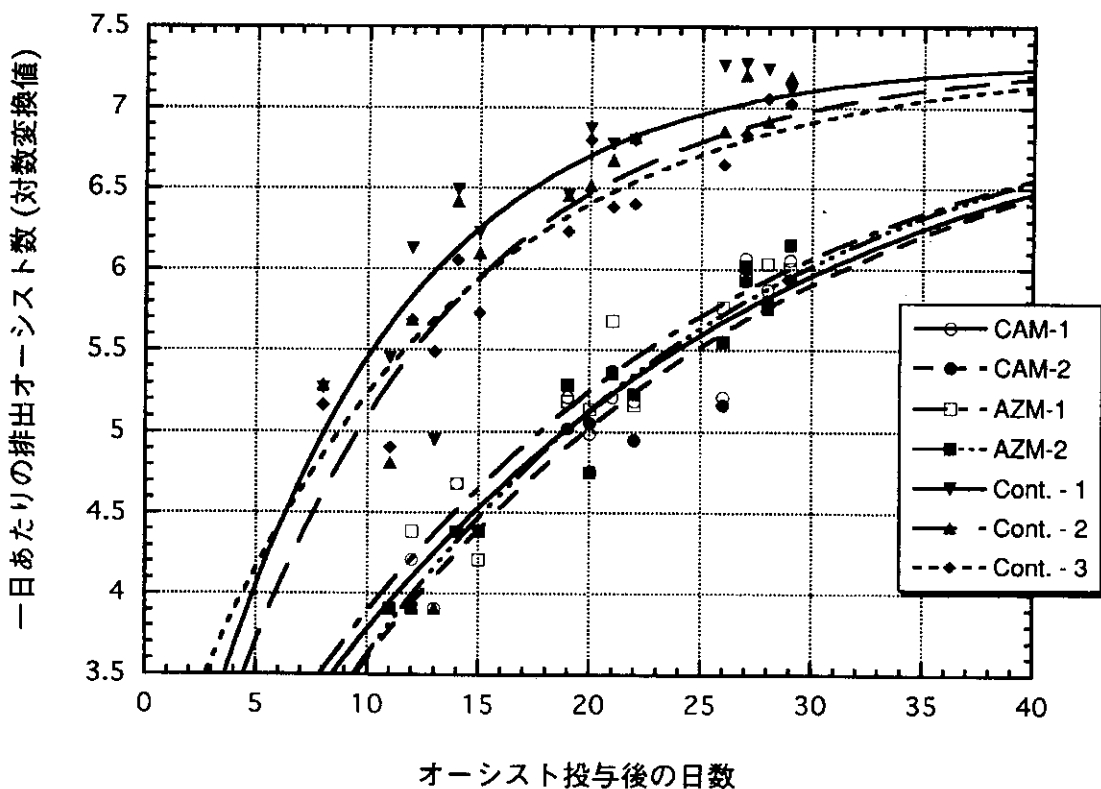
投与数や投薬量、投薬期間などを変えて、さらに詳細に検討してから結論する必要がある。

考 察

上記の結果から、アジスロマイシンとクラリスロマイシンは、オーシスト投与前から投薬すればオーシスト産生をある程度抑制することがわかった。しかし、すでに多数のオーシストを排出している段階で投薬してもオーシスト産生を抑制することはできなかった。また、予備実験として、両薬剤の原末を粉末飼料に添加して、オーシスト投与前からと、オーシスト投与2週間後から、それぞれ持続的に摂食させて投薬する実験もおこなったが、結果は前記の4回胃内直接投与の場合と同様であった(未発表)。このことは、両薬剤は発症予防にはある程度の効果を期待できるが、重症感染後の治療にはあまり期待できないと判断される。しかし、まだ実験例数が少なく、今回は予備的データしか得られていない。今後、オーシスト

結 論

SCID マウスを用いてアジスロマイシンとクラリスロマイシンの抗クリプトスポリジウム効果を評価した。両薬剤とも1回の投与量を40 mg/kgとし、投薬はオーシスト投与の6時間前、直前、6時間後、および18時間後の計4回の投薬をおこなった場合、感染を完全に抑えることはできなかったが、オーシスト排出数は対照群に比べて1/100程度に抑制された。投薬をオーシスト投与の2週間後に開始した場合は、オーシスト産生抑制効果は認められなかった。両薬剤は予防内服的に使用すればある程度の発症抑制効果はあるものの、濃厚感染したあとの治療効果は期待できないと考えられた。今後、オーシスト投与数や投薬量、投薬期間などを変えて、さらに検討する必要がある。



Azithromycin (AZM) および Clarithromycin (CAN) 投与後のオーシスト排出数の推移

研究発表

(1) 論文発表

- 1) Yamamoto, N., Urabe, K., Iseki, M., et al.: Outbreak of cryptosporidiosis after contamination of the public water supply in Saitama Prefecture, Japan, in 1996. *J. A. Inf. D.*, 76: 518~525, 2000
- 2) Wu, Z., Nagano, L., Iseki, M., et al.: Specific PCR primers for *Cryptosporidium parvum* with extra high sensitivity. *Molecul. & Cell Probes* (2000) 14: 33-39, 2000
- 3) Kanjo, Y., Kimata, I., Iseki, M., et al.: Inactivation of *Cryptosporidium* spp. oocysts with ozone and ultraviolet irradiation evaluated by *in vitro* excystation and animal infectivity. *Water Sci. & Technol.*, 41: 119-125, 2000

(2) 学会発表

- 1) 木俣 勲, 井関基弘: クリプトスポリジウム実験感染SCIDマウスにおけるマクロライド系抗生物質投与の感染予防効果と治療効果. 第70回日本寄生虫学会大会 (平成13年4月, 発表予定)



アゾール系抗真菌薬の標的酵素 14 α -Demethylaseの点変異の 耐性機序への関与

掛屋 弘、河野 茂

長崎大学医学部第二内科

研究要旨

アゾール耐性 *Candida albicans* と *Cryptococcus neoformans* の薬剤耐性機序としてアゾール系抗真菌薬の標的酵素である 14 α demethylase (14DM) をコードする *ERG11* 遺伝子の点変異に注目した。高度アゾール耐性 Darlington 株の 14DM には薬剤の進入部と考えられている Y132H と酵素活性の中心と考えられる C470 周辺のアミノ酸変異 (I471T) が耐性の機序に関わっていた。さらにその変異が両対立遺伝子に起こる (ホモ接合体) とき高度な耐性を誘導することが示唆された。

AIDS 患者由来で本邦で初めて分離されたアゾール耐性 *C. neoformans* の 14DM にもアゾール耐性 *C. albicans* に報告されている C470 周辺のアミノ酸変異に相当する G484S が認められた。そのアミノ酸変異は *C. albicans* と同様にアゾール耐性機構に関わることが明らかにされた。

分担研究者：河野 茂

研究協力者：宮崎義継、宮崎治子、中村久助、John E. Bennett

Amino acid substitutions in the 14 α -demethylase from azole resistant *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* contribute to azole resistance.

Hiroshi Kakeya¹⁾, Yoshitsugu Miyazaki¹⁾, Haruko Miyazaki¹⁾, Kyusuke Nakamura¹⁾, John E. Bennett²⁾ and Shigeru Kohno¹⁾

¹⁾ Second department of Internal Medicine, School of Medicine, Nagasaki University and ²⁾ Clinical Mycology section, NIAID, National Institutes of Health, USA

目的

1980年代から AIDS 患者の増加や臓器移植、強力な化学療法による免疫不全患者の増加により、深在性真菌症患者が増加している。その治療および予防にアゾール系抗真菌薬が長期または繰り返し使用され、近年耐性化した *Candida albicans* が報告されるようになった。その耐性機構として、(I)薬剤の細胞外排出 (efflux) の促進 (MDR、CDR、CaMDRI 遺伝子などの関与によるポンプ機構の活性化) による細胞内薬剤濃度の減少、(II)エルゴステロール合成経路の酵素 (ERG3 遺伝子にコードされる sterol delta 5, 6 desaturase) の欠損または活性低

下、(III)標的酵素 (14 α -demethylase; 14DM) 量の増加 (ERG11 遺伝子の過剰発現による)、(IV)14DM のアミノ酸変異によるアゾール系薬剤の親和性の低下などが報告されている¹⁾。

14 α -demethylase (14DM) は、真菌のステロールであるエルゴステロール合成経路の酵素の一つで、14位のメチル基を除去する反応 (脱メチル反応) を触媒する。アゾール系抗真菌薬は、その 14DM に作用して脱メチル反応を阻害することによりエルゴステロールの欠乏、および 14 α メチルステロールなどの蓄積をもたらす。これらの結果、細胞膜の構造と機能変化が起こり、真菌の発育は阻止され、死滅する。

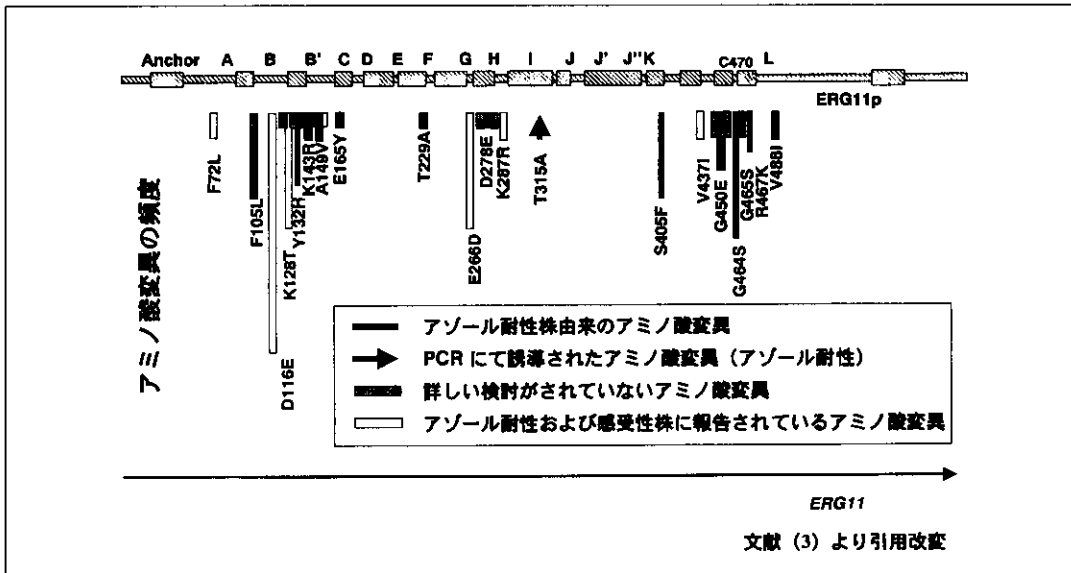


図1 ERG11 蛋白のアミノ酸変異の位置と頻度

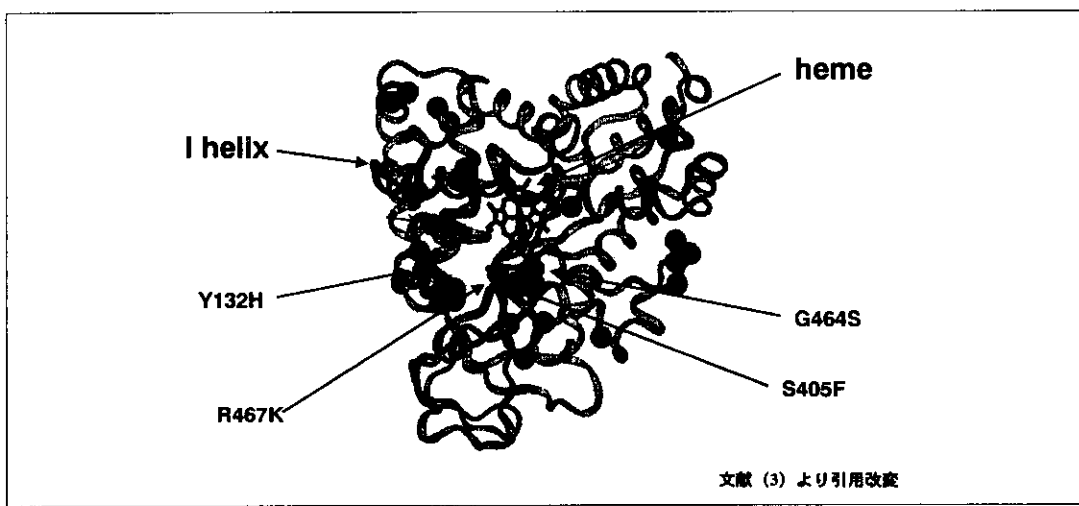


図2 *C. albicans* の 14 α -demethylase 立体構造モデル

14DMはヘムタンパク質であり、ヘム鉄上で活性化された酸素が基質結合部位に結合したステロールの14位メチル基に添加され、脱メチル化反応がおこる。アゾール系抗真菌薬はアゾール環と疎水性の置換基よりなる構造を有し、前者は酸素活性部位であるヘム鉄に結合し、後者は基質部位またはその近傍のタンパク質と相互作用する。アゾールの窒素がヘム鉄部分に結合することが阻害に必須である。一方、酵素への親和性を決定するのは置換基の構造であり、アゾールの窒素がヘム鉄に結合するものほど、低濃度で阻害作用を発揮することが知られており、アゾール系抗真菌薬による阻害作用は複数の要素が相乗的に関係していると考えられている²⁾。

Marichalらは、報告されているアゾール耐性*C. albicans*由来の*ERG11*遺伝子がコードする14DMの点変異をまとめて示している³⁾(図1)。耐性株より105から165、266から287、405から488番に位置するアミノ酸変異が検出され報告されている。その中でも132番目のチロシン(Y)からヒスチジン(H)への変異(Y132H)が最も耐性に関与する変異であると論じられている。14DMの立体構造モデル(図2)ではY132H周辺はアゾール系抗真菌薬の進入部を形成する場所と考えられている。またヘム鉄と結合する470番目のシスチン(C470)の周囲におこったアミノ酸変異(G464S、G465S、R467K)もアゾール耐性株から報告されている。同部位は立体構造モデルではヘム鉄と結合する活性中心の部位にあたり、Y132Hの変異と同様に同部位の変異は、14DMの立体構造を変化させ、アゾール系抗真菌薬との親和性を低下させると考えられている⁴⁾。

我々は、アゾール耐性*C. albicans*として知られているDarlington株(Fluconazole(FLCZ), MIC >256 μ g/ml)の耐性機構の検討を行った。本株は口腔粘膜カンジダ症の治療に長期アゾール系抗真菌薬が投与された患者由来の*C. albicans*であり⁵⁾、その耐性機構は明らかにされていない。本株の薬剤排出ポンプは活性化していないと報告されている⁶⁾。当科の宮崎らは、本株が*ERG3*遺伝子の変異株であり、その細胞膜の脂質成分は感受性株の*ERG3*遺伝子と異なることを明らかにした。彼らはDarlington株の*ERG3*の遺伝子を変異を有さない

感受性株由来の*ERG3*遺伝子と置換し、形質転換株を作成した。その形質転換株の細胞膜ステロール成分は正常化し、その正常化が薬剤感受性に関わるかどうかを検討した。しかし、その形質転換株はアゾール高度耐性を維持しており、*ERG3*の変異は本株の耐性機構に関与しないことを示した⁷⁾。それらの結果を踏まえて、我々は14DMをコードする*ERG11*遺伝子の点変異(point mutation)に注目した。

アゾール耐性*Cryptococcus neoformans*は、未だ本邦では臨床的に問題となっていないが、欧米では多数報告されており、その耐性機構の解明は急務である。*C. neoformans*の耐性機構としてポンプ遺伝子が報告されている⁸⁾が、その他の耐性機構に関しては未だ詳細な検討がされていない。我々は、それらの耐性機構としてアゾール系抗真菌薬の標的酵素である14DMの点変異に注目した。

方法

(1)アゾール耐性*C. albicans*, Darlington株、感受性CAI4株の14DMをコードする*ERG11*のシーケンスを行い、報告されている遺伝子配列と比較した。

(2)アゾール感受性株CAI4の一つの*ERG11*の対立遺伝子をアゾール耐性株由来の*ERG11*遺伝子と置換し、形質転換株を作成した(図3)。各種制限酵素を使用し、Southern blot法にて感受性株、Darlington株、形質転換株#12を評価した。そして、その薬剤感受性をDarlington株(FLCZ, MIC 256 μ g/ml以上)と感受性株CAI4および、その親株CAF2-1、SC5314(MIC 0.5 μ g/ml)を微量液体希釈法にて比較した。

(3)どちらのアミノ酸変異が耐性機構に関わるかを明らかにするために、それぞれの点変異をもつ*ERG11*遺伝子を*Saccharomyces cerevisiae*にて過剰発現させ、その薬剤感受性を検討した(図4)。アミノ酸変異を有さない感受性株の*ERG11*(pCAI4)、両方の変異を有する*ERG11*(pDAR)をPCRにて作成した。それらを発現ベクターYEp351Gのpromoterの下流にライゲーションした。さらに*ERG11*遺伝子の*NdeI*フラグメントを置換することでY132HおよびI471T変異をそれぞれ有するプラスミドpCAI4-132HとpDAR-471Tを得た。各プ

ラスミドを薬剤排出ポンプ遺伝子 (*pdr5*) を欠失している *S. cerevisiae* (DKY1株) に導入し、プロモーター遺伝子を活性化するガラクトース寒天培地上でフルコナゾール (FLCZ) 添加 E-test を使用して、その薬剤感受性を検討した。

(4) 欧米ではアゾール耐性 *C. neoformans* は散見されるが、本邦には今まで報告がされていなかった。我々は、同一 AIDS 患者より分離された感受

性株 (1147 株) (FLCZ, MIC 4 μ g/ml) とアゾール長期投与後に分離された耐性株 (1148 株) (FLCZ, MIC 64 μ g/ml) (東京大学医科学研究所、安岡 彰先生より提供) の *ERG11* 遺伝子のシーケンスを行い、その変異に注目した。Darlington株の発現と同様に *C. neoformans* の *ERG11* 遺伝子を *S. cerevisiae* にて過剰発現させ、その薬剤感受性を検討し、変異の耐性への関与を検討した。

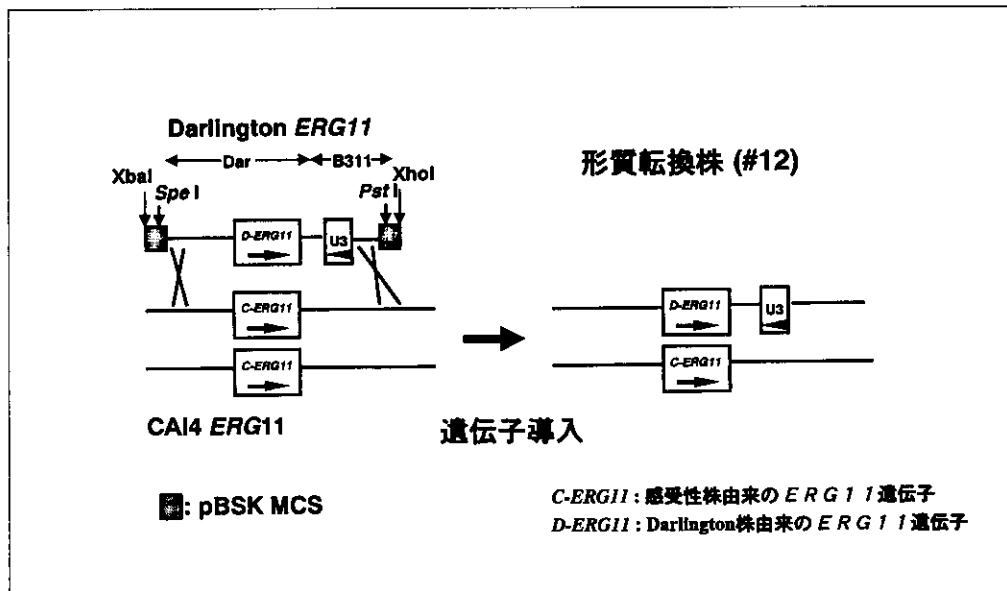


図3 アゾール感受性 CAI4 株における *ERG11* 遺伝子置換

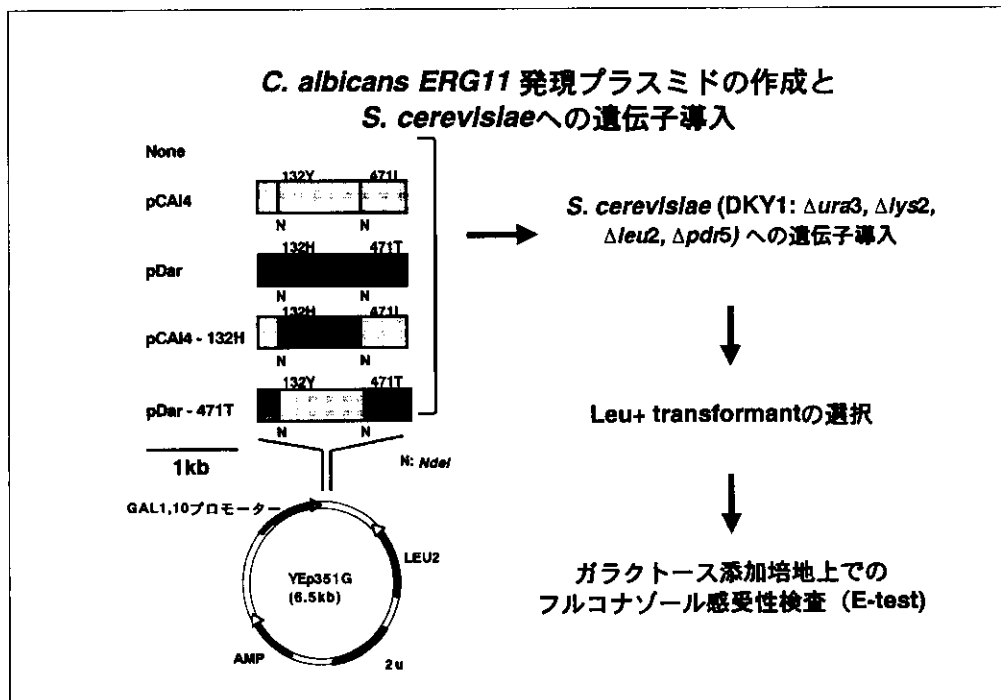


図4 *C. albicans* *ERG11* 発現プラスミドの作成と *S. cerevisiae* への遺伝子導入

結果

1. *ERG11*遺伝子のシーケンス

Darlington株の *ERG11* の遺伝子配列を報告されている感受性株⁹⁾と比較した結果、本株には報告されているY132Hと471番目のイソロイシン(I)がスレオニン(T)へのアミノ酸変異(I471T)が認められた(表1)。さらにDiploidである *C. albicans* の両対立遺伝子に両変異があり、両アミノ酸変異に関してホモ接合体であることが分かった¹⁰⁾。また、両アミノ酸変異は、種族間で保存されている領域に位置していた(表2)。*C. albicans* の14DMのI471T変異が耐性機構に関与する報告はされていないが、アゾール系抗真菌薬に自然耐性である *C. glabrata*, *C. krusei* の14DMにはI471T変異が報告さ

れており¹¹⁾、そのI471T変異のアゾール耐性機序への関与が示唆された。

感受性株(CIA4)の一つの *ERG11* 遺伝子は(1st allele)は、報告されているものと同一であった。もう一方(2nd allele)には感受性株にも報告されているD116EとK128Tが認められた(表1、図1)。

2. *ERG11*遺伝子の置換による形質転換

*ERG11*の点変異が耐性に関わるかどうかを実験的に確かめるために、アゾール感受性 *C. albicans* (CAI4)の一つの *ERG11* 遺伝子をDarlington株由来の *ERG11* 遺伝子にて置換した(図3)。各種制限酵素を使用し、Southern blot法にてその制限酵素部位を検討した(図5、6)。

表1 *ERG11*シーケンス

感受性株由来の <i>ERG11</i> *	Darlington株		差 違	
	1st allele	2nd allele	アミノ酸	制限酵素部位
394 TAT	CAT	CAT	Y132H	<i>Rca</i> I
1411 ATT	ACT	ACT	I471T	<i>Bsr</i> I
感受性株由来の <i>ERG11</i> *	CAI4株		差 違	
	1st allele	2nd allele	アミノ酸	制限酵素部位
313 TTT	TTT	TTC	D116E	<i>Hind</i> III
346 GAT	GAT	GAA		
355 AAA	AAA	AAG	K128T	<i>Rsa</i> I
380 AAA	AAA	ACA		
409 TCC	TCC	TCT		
658 CTA	CTA	TTA		
1018 TTA	TTA	TTG		
1108 CTC	CTC	CTT		
1438 TTA	TTA	TTG		
1468 AAT	AAT	AAC		

* 感受性株 (SC5314) 由来の *ERG11* 遺伝子 (Lai & Kirsh, 1989)

表2 14 α -demethylaseのアミノ酸配列の比較

	132 ↓	471 ↓
<i>Rat</i>	TTPVFGKGVAYD	PFGAGRHRRCIGENFAY
<i>Homo sapiens</i>	TTPVFGKGVAYD	PFGAGRHRRCIGENFAY
<i>Candida albicans</i>	TTPVFGKGVAYD	PFGAGRHRRCIGEQFAY
<i>Candida tropicalis</i>	TTPVFGKGVAYD	PFGAGRHRRCIGEQFAY
<i>Candida glabrata</i>	TTPVFGKGVAYD	PFGAGRHRCT
<i>Candida krusei</i>	TTPVFGKGVAYD	PFGAGRHRCT
<i>S. cerevisiae</i>	TTPVFGKGVAYD	PFGAGRHRRCIGEHFAY
Darlington株 (<i>C. albicans</i>)	TTPVFGKGVAYD	PFGAGRHRCTGEQFAY

Darlington 株の T1412C (I471T) の変異は *BsrI* による新たな制限酵素部位を生じた (表1)。この制限酵素を使用し、各株を検討した。*BsrI* digestにて Darlington 株(Lane 1)は 1.0kb、CAI4 株(Lane 2)は 1.4kbの単一の fragment を示した。一方、形質転換株 #12(Lane 3)は、1.4kb と 1.0kb を示した。また、この fragment の比(1.4kb/1.0kb)は 1.0 であり、diploid である *C.neoformans* の *ERG11* 遺伝子の一つが Darlington 株由来の *ERG11* に置換されたことを示唆した。さらに、*SpeI* digest では、Darlington 株(Lane 1)、CAI4 株(Lane 2)とも約 8.0kb の fragment を示し

た。形質転換株 #12(Lane 3)も同様に約 8.0kb の fragment を示していた。置換に用いた遺伝子 (図3) の 5 末端に存在する Multiple cloning site の *SpeI* の消失は、置換遺伝子の 5 末端が homologous に置換されたことを示唆していた。*PstI* digest では、Darlington 株 (Lane 1)、CAI4 株 (Lane 2)が 2.2kb の単一の fragment を示したのに対して、形質転換株 #12 (Lane 3)は、2.2kb と 5.5kb の fragment を示した (2.2kb/5.5kb=1.0)。この結果は、遺伝子の 3 末端の領域が URA3 領域を含み置換されたことを示した。

Darlington 株の *ERG11* 遺伝子の A394C (Y132H)

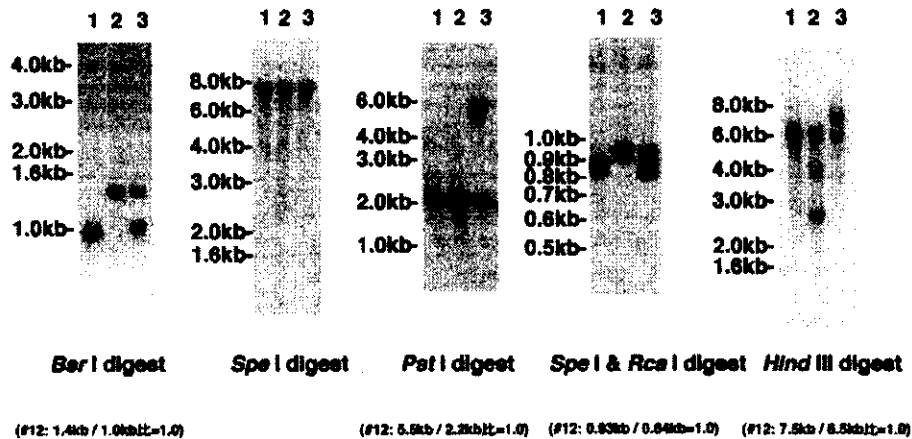


図 5

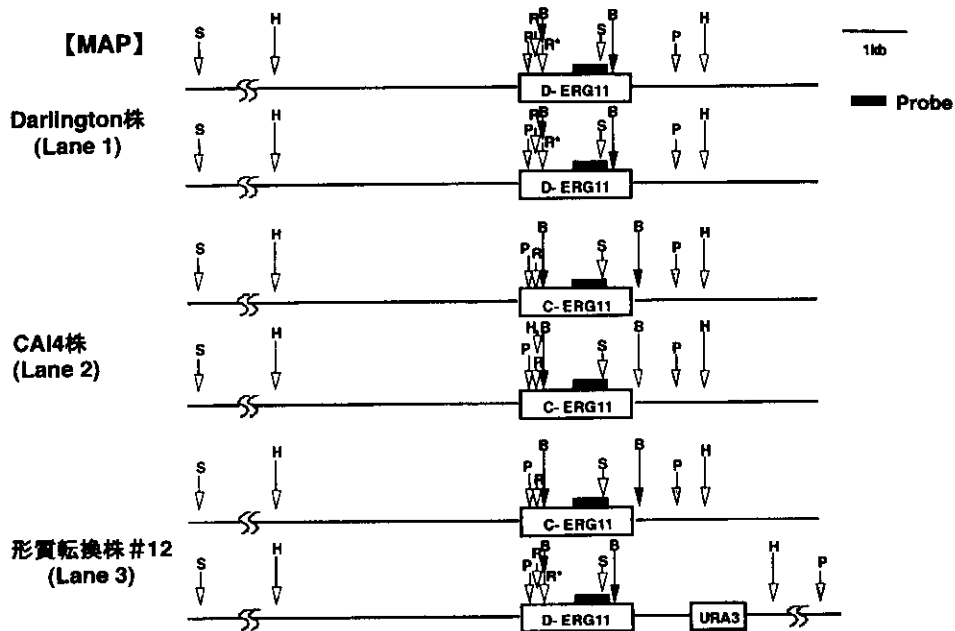


図 6

は、新たな *RcaI* 制限酵素部位を生じた(表1)。この制限酵素を利用して、*SpeI+RcaI* digestを行った。Darlington 株(Lane 1)および CAI4(Lane 2)は、それぞれ 0.84kb、0.93kb の fragment を示したのに対して、形質転換株 #12(Lane 3)は、両 fragment を示した (0.84kb/0.93kb=1.0)。この結果は、形質転換株の一つの *ERG11* 遺伝子には Y132H 変異が存在することを示した。

CIA4 株の一つの *ERG11* 対立遺伝子上の T348A (D116E)は、*HindIII* 制限酵素部位を生じた(表1)。この制限酵素を使用し、どちらの allele (対立遺伝子) が置換されたかを検討した。プローブとして

ERG11 全 ORF を使用した。Darlington 株(Lane 1)は、6.5kb の単一の fragment を示したのに対し、CAI4 株(Lane 2)は、一つの対立遺伝子 *ERG11* 由来の 6.5kb ともう一つの対立遺伝子 *ERG11* 由来の 4.0kb と 2.5kb の fragment を示した。形質転換株 #12 (Lane 3)は、6.5kb と新たな 7.5kb の fragment を示した (6.5kb/7.5kb=1.0)。4.0kb と 2.5kb の fragment の消失は、2nd allele の *ERG11* 遺伝子(表1)が Darlington 株由来の *ERG11* と置換されていることを示していた。

これらの Southern blot 法の結果は、Darlington 株が、Y132H および I471T の点変異に関してホモ接

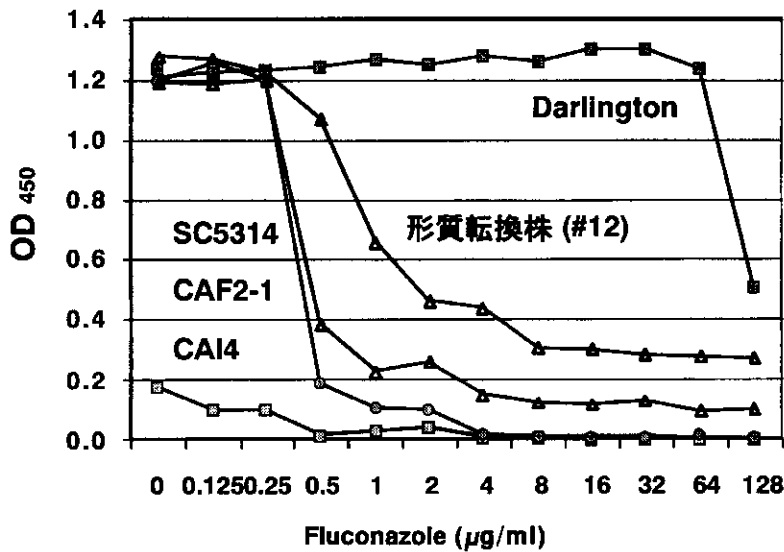


図7 FLCZ growth inhibition in *C. albicans* at day 4

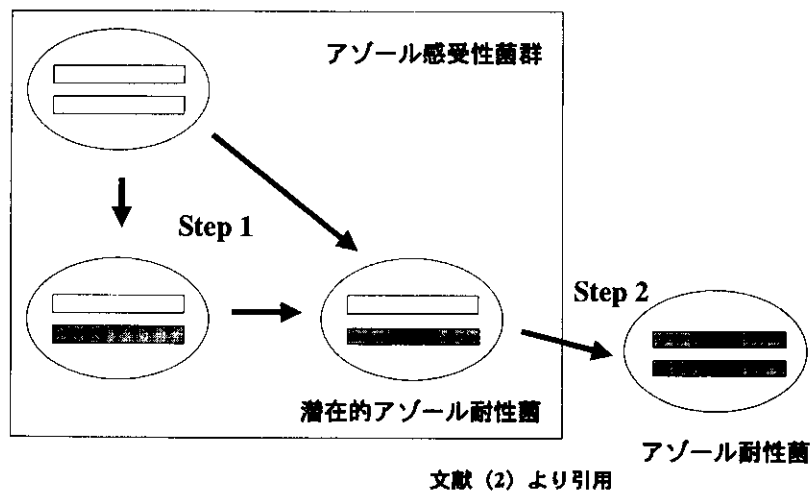


図8 *ERG11* 遺伝子の変異によるアゾール耐性菌の出現機構を示す模式図

合体で、形質転換株#12は、CAI4株の一つの*ERG11*がDarlington株由来の*ERG11*に置換された株（ヘテロ接合体）であることを示した。

3. 形質転換株#12の薬剤感受性検査

形質転換株#12のFLCZに対する薬剤感受性をDarlington株および感受性株と比較した(図7)。その結果、Darlington株はどの薬剤濃度においても高い懸濁度を示し、高度耐性であることを示していた。形質転換株#12は、Darlington株には及ばないものの感受性株より高い懸濁度を示し、遺伝子置換による14DMにおける2つのアミノ酸変異がアゾール耐性に関わることを示唆していた。

4. 各アミノ酸変異の耐性への関与の検討

さらに我々は、どちらのアミノ酸変異が耐性機構に関わるかを明らかにするために、それぞれの点変異をもつ*ERG11*遺伝子を過剰発現させ、その薬剤感受性を検討した(図4)。その結果、DKY1のみでは0.25μg/ml、DKY1にempty plasmid導入株では0.064μg/ml、感受性の*ERG11*遺伝子を有するpCAI4導入株では1.5μg/ml、Darlington株の*ERG11*遺伝子を有するpDAR導入株では>256 μg/ml、Y132Hのみを有するpCAI4-132H導入株では16μg/ml、I471Tのみを有するpDAR-471T導入株では6μg/mlであった。感受性株の*ERG11*遺伝子の効果と比べ、各アミノ酸変異を有する株はより耐性を示し、両変異ともアゾール耐性に関わることを観察された。さらに両変異が同時に起こることにより高度なアゾール耐性を生じること（相乗効果）が示された。

5. *C. neoformans* の*ERG11*遺伝子の変異によるアゾール耐性機構への関与

アゾール耐性*C. neoformans*の*ERG11*遺伝子には感受性株と比較して、1つのアミノ酸変異(G484S)を引き起こす点変異が認められた。*S. cerevisiae*を用いた薬剤感受性検査にて1447(感受性)株の*ERG11*(484G)導入株では1.5μg/ml、1148(耐性)株の*ERG11*(484S)導入株では8μg/mlを示し、*C. neoformans*の14DMに起こったアミノ酸変異(G484S)がアゾール耐性に関わることを示された。

考 察

アゾール系抗真菌薬で長期間治療を受けている患者からアゾール耐性*C. albicans*が多数分離されている。Whiteらは、口腔粘膜カンジダ症を繰り返し、長期間FLCZで治療された同一患者より分離された*C. albicans*の薬剤感受性とその耐性機構を検討した¹²⁾。FLCZの総量の増加と共に分離株はFLCZに対する薬剤感受性を低下させた。その耐性機構として治療初期にはATP非依存性のポンプ機構をコードする*MDR*遺伝子のmRNAの増加、中期には*ERG11*遺伝子のmRNAの増加、点変異、および両対立遺伝子の変異の獲得による標的酵素の増加及び変異が耐性機構に加わった。さらに後期には*CDR*遺伝子のmRNAの増加が認められ、ATP依存性のポンプ遺伝子活性化が起こり耐性化が進行することを報告している。

Darlington株の*ERG11*遺伝子上のA394C(Y132H)およびT1412C(I471T)の点変異は、それぞれ*RsaI*、*BsrI*の新たな制限酵素部位を生じた(表1)。これらの制限酵素を使用すれば、アゾール耐性臨床株において*ERG11*の点変異が耐性の機構に関わるかどうかをスクリーニングすることが可能となる。さらに*BpmI*(S405F)、*AccI*(R467K)、*AccI*(A129G)などの制限酵素も各変異の検出に有効であることが報告されている¹³⁾。

*ERG11*遺伝子の変異が耐性機構に関わる*C. albicans*が出現する機構として、長期のアゾール系抗真菌薬の暴露により、その標的酵素(14DM)をコードする遺伝子(*ERG11*)の一つの対立遺伝子に変異が起こり、潜在的アゾール耐性のヘテロ接合体が生じる(Step 1)。さらにその群から遺伝子組み換えにより、ホモ接合体である高度アゾール耐性の*C. albicans*が選択され、出現する(Step 2)と考えられる²⁾(図8)。Darlington株はY132HとI471Tのアミノ酸変異を有するホモ接合体であり、ヘテロ接合体の形質転換株(#12)に比べ、高度耐性を示し、その一連の選択の中で出現した耐性株であると考えられた。

近年アゾール耐性の*C. neoformans*が報告されているが、今までその耐性機構に関する報告はない。我々は、その*ERG11*遺伝子(14DM)の点変異に注目した。耐性株の14DMのG484Sは、アゾー

ル耐性 *C. albicans* の 14DM の G464S に相当する (図 1、図 2)。同部位は、14DM の酵素活性の中心部にあたり、*C. neoformans* においても、同部位のアミノ酸の変化によりアゾール系薬剤との親和性が低下すると考えられた。

結 論

C. albicans および *C. neoformans* の 14DM におけるアミノ酸変異がアゾール耐性機構への関与することが示された。

参考文献

- 1) Ghannoum, M. A., Rice L. B. : Antifungal agents: Mode of action, Mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinic. Microbiol. Reviews.* 12: 501-517 (1999)
- 2) 吉田雄三: 抗真菌薬の薬理学. “深在性真菌症「これまでに解決したこと、これから解決すべきこと」”. 河野 茂編. 診療新社、大阪 p72-84 (2000)
- 3) Marichal, P. et al. : Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology.* 145: 2701-2713 (1999)
- 4) Kelly, S. L. et al. : Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem. *FEMS Microbiol Lett.* 180: 171-175 (1999)
- 5) Warnock, D. W. et al. : Modified response to ketoconazole of *Candida albicans* from a treatment failure. *Lancet*, 19: 642-643 (1983)
- 6) Albertson, G. D. et al. : Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2835-2841 (1996)
- 7) Miyazaki, Y. et al : Cloning, sequencing, expression and allelic sequence diversity of ERG3 (C-5 sterol desaturase gene) in *Candida albicans*. *Gene.* 236: 43-51 (1999)
- 8) Thornewell, S. J. et al: Cloning and characterization of *CneMDR1*: a *Cryptococcus neoformans* gene encoding a protein related to multidrug resistance proteins. *Gene* 201: 21-29 (1997)
- 9) Lai, M. H., D. R. Kirsh. : Nucleotide sequence of cytochrome P450 L1A1 (lanosterol 14 α -demethylase) from *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res.* 17: 804 (1989)
- 10) Kakeya, H. et al : Genetic analysis of azole resistance in the Darlington strain of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2985-2990 (2000)

- 11) White, T.C. : The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14- α -demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1488-1494 (1997)
- 12) White, T. C. : Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlated with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1485-1487 (1997)
- 13) Sanglard, D. et al : Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14- α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 241-253 (1997)

健康危機情報

特になし

研究発表

(1)論文発表

- 1) Kakeya H., Miyazaki Y., Miyazaki H., Nyswaner K., Grimberg B., Bennett J. E.; Genetic analysis of azole resistance in the Darlington strain of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2985-2990, 2000

(2)学会発表

- 1) 日本化学療法学会西日本地方会 (京都) 2000,12 第2回医真菌フォーラム (東京) 2001,1

知的財産権の出願・登録状況

- (1) 特許取得: なし
- (2) 実用新案登録: なし
- (3) その他: なし



抗真菌剤投与中の患者からの真菌の 分離状況と薬剤感受性についての検討

米山 彰子¹⁾、奥住 捷子¹⁾、中原 一彦¹⁾、木村 哲²⁾

1) 東京大学医学部附属病院検査部

2) 東京大学医学部感染制御学教室

研究要旨

アゾール剤をはじめ抗真菌剤が多用されるに伴い今後 *Candida* spp の耐性化が懸念されるが、抗真菌剤の効果的な投与方法を探る目的で、抗真菌剤投与中の患者からの真菌分離状況とその薬剤感受性を検討した。抗真菌剤投与中の血液疾患患者75症例中20症例から真菌が分離された。*C. albicans* は6症例から検出されたのみで、non-*albicans Candida* spp の比率が高く、特に *C. glabrata* が12症例から分離された。検出された真菌の薬剤感受性を検討すると、*C. glabrata* を中心に分離株の約 1/5 が耐性：R(resistant)であった以外は感受性：S(sensitive)あるいは中間値：I(intermediate)とされる MIC を示した。抗真菌剤予防投与にあたっては効果的な decontamination と耐性菌増加防止の両者を考慮して最適な方法を検討することが必要と思われた。

分担研究者：米山彰子

研究協力者：奥住捷子、中原一彦、木村 哲

Trends in species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from patients under antifungal therapy

Akiko Yoneyama ¹⁾, Katsuko Okuzumi ¹⁾, Kazuhiko Nakahara ¹⁾ and Satoshi Kimura ²⁾

¹⁾ Laboratory center, University of Tokyo Hospital and ²⁾ Department of Infection Control and Prevention, University of Tokyo

目 的

真菌感染症はHIV感染をはじめとする免疫能低下時の日和見感染症として重要である。AIDS患者に fluconazole を長期投与した場合に耐性 *Candida albicans* が出現した報告があるが、国内においては酵母様真菌のアゾール系薬剤耐性化は問題になっていない。しかしながら抗真菌剤が多用されている血液疾患患者から分離された *C. albicans* は耐性化傾向にあることを報告した。そこで抗真菌剤の効果的な投与方法を探る目的で、抗真菌剤投与中の患者からの真菌分離状況とその薬剤感受性を検討した。

方 法

対象は2000年5月から8月の間に当院血液腫瘍内科に入院した血液疾患患者で、予防あるいは治療目的で抗真菌剤を投与された75例(図1)。使用抗真菌剤はFLCZ 50例、ITCZ 3例、AMPH-B 1例、複数薬剤(併用および変更)21例(詳細は図1)。主に呼吸器系検体および便について真菌の検出状況と分離株の薬剤感受性を検討した。培養にあたり、少量の複数種以上の真菌も検出できるようクロモアガー・カンジダ培地を用いた。薬剤感受性試験は日本医真菌学会標準化委員会報告提案抗真菌剤感受性試験法に準じ、フローズプレート(酵母様真菌FP‘栄研’：栄研化学株式会社)を用

いて行った。試験薬剤および薬剤濃度は、amphotericin B (以下 AMPH-B, 0.03 ~ 16 μ g/ml), flucytosine (以下 5-FC, 0.125 ~ 64 μ g/ml), fluconazole (以下 FLCZ, 0.125 ~ 64 μ g/ml), itraconazole (以下 ITCZ, 0.015 ~ 8 μ g/ml), miconazole (以下 MCZ, 0.06 ~ 32 μ g/ml)。感受性の判定基準は 5-FC, FLCZ, ITCZ については、NCCLSの基準(M27-A, 1997)に従った。

結 果

1. 真菌の分離状況

75症例中20症例から真菌が分離された。基礎疾患別ではATL, 多発性骨髄腫、AML, MDSで検出率が高い傾向を示した(図2)。真菌が検出された20症例の一覧を図3に示す。*C. albicans* が6症例, *C. glabrata* 12症例, *C. krusei* 4症例, *C. tropicalis* 2症例, *C. parapsilosis* 1症例, *C. guilliermondii* 1症例、他の *Candida spp* 3症例であった。20症例中、7症例では複数種類の真菌が分離された。

2. 分離された真菌の薬剤感受性

1. *C. albicans* の薬剤感受性(図4)

6症例から分離された7株(症例5から別薬剤投与中の2株を含む)を検討した。FLCZ投与中の2株、ITCZ投与中の3株ともMICはNCCLSの基準でSであった。AMPH-B投与中の2株のMIC(μ g/ml)は、0.125、0.5であった。

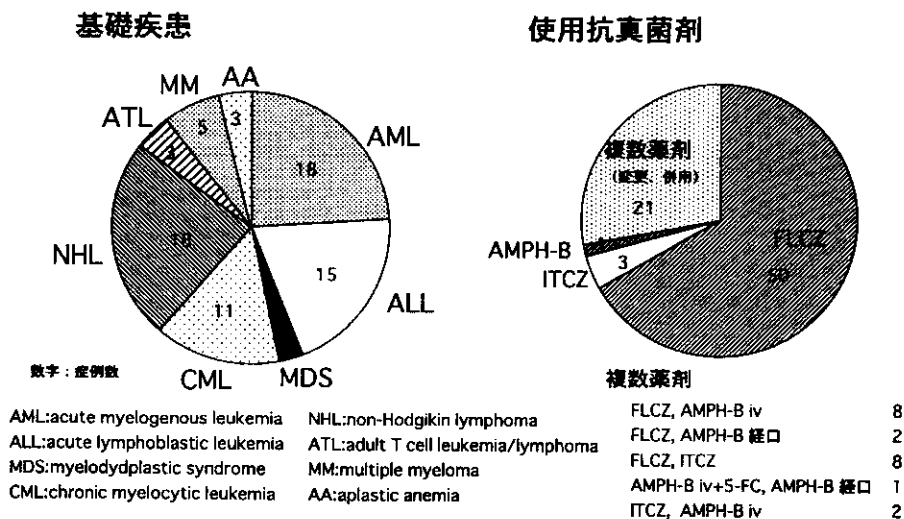


図1 対象症例の基礎疾患および使用抗真菌剤

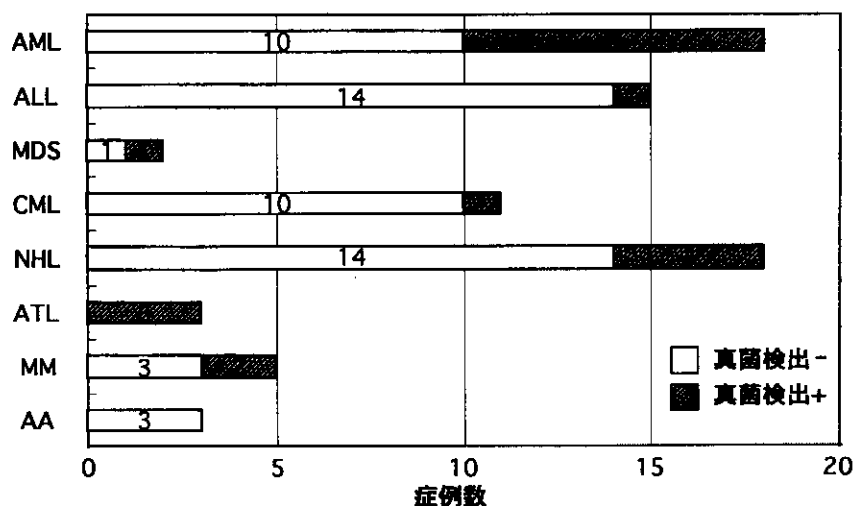


図2 基礎疾患別の真菌検出状況

	診断	抗真菌剤	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	その他の <i>Candida</i>
症例1	AML	FLCZ	便						
症例2	ATL	ITCZ	咽頭 便						
症例3	NHL	ITCZ, FLCZ	便	便			便		
症例4	NHL	FLCZ	喀痰					喀痰	
症例5	MM	ITCZ, AMPH-B	咽頭	喀痰	咽頭				
症例6	AML	FLCZ	喀痰			咽頭			
症例7	AML	FLCZ		咽頭、便					
症例8	AML	FLCZ, ITCZ		咽頭					
症例9	AML	FLCZ, AMPH-B		便					
症例10	MM	ITCZ		咽頭					
症例11	NHL	FLCZ		咽頭					
症例12	AML	FLCZ		咽頭					
症例13	MDS	FLCZ, AMPH-B		咽頭					
症例14	ATL	FLCZ		喀痰、便、尿					
症例15	CML	FLCZ, AMPH-B		咽頭					
症例16	AML	AMPH-B		咽頭					咽頭
症例17	NHL	FLCZ			便				
症例18	ATL	FLCZ, ITCZ			便				
症例19	AML	FLCZ, AMPH-B			喀痰				便
症例20	ALL	5-FC, AMPH-B				咽頭			喀痰

図3 抗真菌剤投与中に真菌が検出された症例

2. *C. glabrata* の薬剤感受性 (図4)

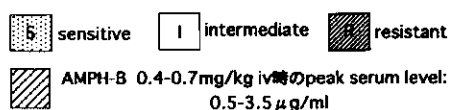
12症例から分離された13株(症例13から別薬剤投与中の2株を含む)を検討した。FLCZ投与中の6株中2株がR、4株がS(ただしMIC値は4、8と高め)であった。ITCZ投与中の株中3株がR、1株がSであった。AMPH-B投与中の3株のMIC($\mu\text{g/ml}$)は、0.06、0.5、0.5であった。

3. *C. krusei* の薬剤感受性 (図4)

4症例から分離された4株のうち3株を検討した。FLCZ投与中の2株はいずれもI、AMPH-B投与中の株のMIC($\mu\text{g/ml}$)は2と高い値であった。

4. 他の菌種 (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, 他の *Candida* spp) の薬剤感受性 (図4)

これらの菌株もMICはSあるいはIに分類されるものが多かった。



● 抗真菌剤投与中の分離株のMIC

C. albicans

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	64<
FLCZ						●								
ITCZ		●	●●											
AMPH-B				●		●								
5-FC														

C. glabrata

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	64<
FLCZ									●●	●●				
ITCZ	●													
AMPH-B			●			●●								
5-FC														

C. krusei ▲ *C. tropicalis* ★ *C. parapsilosis* ▼ *C. guilliermondii* ■ その他 ◆

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	64<
FLCZ						◆		★	■		▲▲	◆		
ITCZ					▼									
AMPH-B		◆		★				▲						
5-FC														

図4 抗真菌剤投与中に検出された真菌の薬剤感受性 (投与中の薬剤のMIC値)

2. 各抗真菌剤投与中に分離された真菌の薬剤感受性

1. FLCZ投与中に検出された真菌とその薬剤感受性 (図5)

FLCZはいずれも200mg経口投与であった。*C. albicans* が2症例、*C. glabrata* 6症例、*C. krusei* 2症例、*C. tropicalis* 1症例、*C. guilliermondii* 1症例、他の *Candida* sppが2症例から検出された。薬剤感受性はR:2株、I:4株、S:8株であった。しかしS

と判定された8株のうち6株のMIC($\mu\text{g/ml}$)は4~8と比較的高い値であり、MIC4 $\mu\text{g/ml}$ 以上の株が14株中12株を占めた。

2. ITCZ投与中に検出された真菌とその薬剤感受性 (図6)

C. albicans が3症例、*C. glabrata* 4症例、*C. parapsilosis* が1症例から検出された。薬剤感受性はR:2株、I:1株、S:5株であった。MIC0.015 $\mu\text{g/ml}$ の *C. glabrata* が検出された症例はITCZの投与量が100mgと他の症例より少なかった。

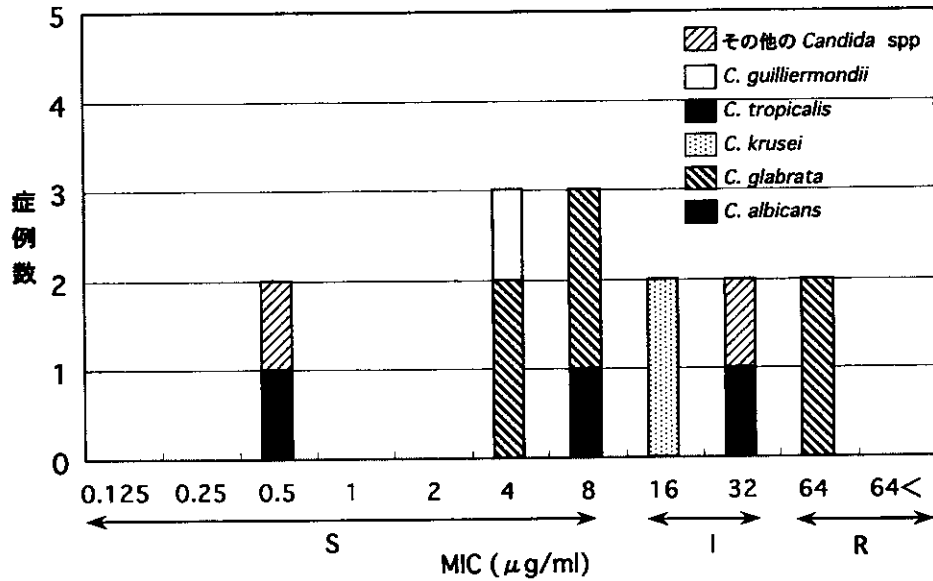


図5 FLCZ投与中に検出された真菌の薬剤感受性

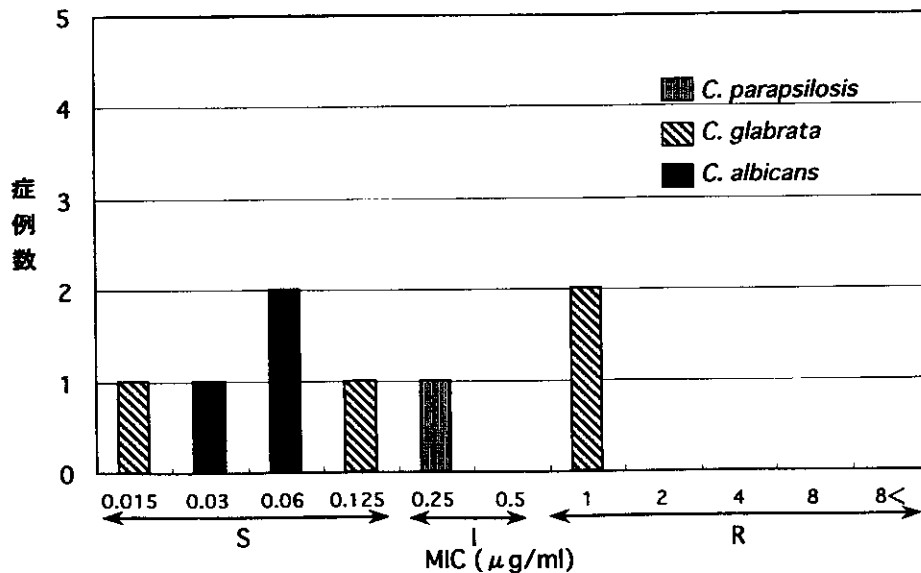


図6 ITCZ投与中に検出された真菌の薬剤感受性

3. AMPH-B投与中に検出された真菌とその薬剤感受性(図7)

C. albicans が2症例, *C. glabrata* 3症例, *C. krusei* 1症例, *C. tropicalis* 1症例、他の *Candida* sppが1症例から検出された。全例でAMPH-Bは静注投与中であつた。AMPH-BについてはNCCLSのbreakpointが示されていないが、MIC2 μ g/mlと高い株が1株、静注後の最高血中濃度から考えて比較的高い0.5 μ g/mlが3株、他の4株は0.125 μ g/ml以下の低い値であつた。AMPH-Bは投与量のばらつきが大きかつたので、投与量との関係も検討したが、1日量が30mg以下という比較的少量の投与下での分離株が6株と多数を占めた。しかし50mg投与例でもMICの低い株が検出された。

考 察

抗真菌剤が多用されている病棟から分離された *C. albicans* は耐性化傾向にあることをふまえ、抗真菌剤の効果的な使用法を探る目的で、抗真菌剤投与中の患者からの真菌の分離状況と薬剤感受性を検討した。今回の対象となつた血液内科では、抗癌剤治療中の予防投与や発熱時の empiric therapy で抗真菌剤が投与される頻度が高い。好中球減少時の予防投与に用いられる薬剤は施設により違い

が大きいのと思われるが、当院では FLCZ200mg 内服が多く用いられていた。抗真菌剤投与中にもかかわらず、約1/4の患者から真菌が検出された。急性白血病の中でも急性リンパ性白血病より急性骨髄性白血病の方が真菌の検出される率が高いなど、基礎疾患によって真菌の分離状況に違いがある可能性が示唆された。抗真菌剤投与中に分離された真菌の菌種について、non-*albicans Candida* spp の比率が高く特に *C. glabrata* が多いことは、抗真菌剤に感受性の高い *C. albicans* が抑制された結果と考えられた。検出された真菌の薬剤感受性を検討すると、*C. glabrata* を中心に分離株の約1/5が耐性株であつた以外は S(sensitive)あるいは I(intermediate)とされるMICを示した。ただしFLCZ投与中に検出された *C. albicans*、*C. glabrata* で FLCZのMICがSに分類される株もMIC値が4~8と比較的高い値のものが多くことが目立つた。FLCZ200mg内服、ITCZ200mg内服、さらにAMPH-B静注時にも耐性株以外の真菌が数多く検出された原因として、経口投与の際の吸収の問題、血中濃度が十分維持されていない可能性、薬剤の組織移行が不十分である可能性などがあげられる。特にITCZは経口投与の際の吸収の状態では血中濃度が安定しない恐れもあり、今後血中濃度と真菌の分離状況をあわせて検討する必要があると思われる

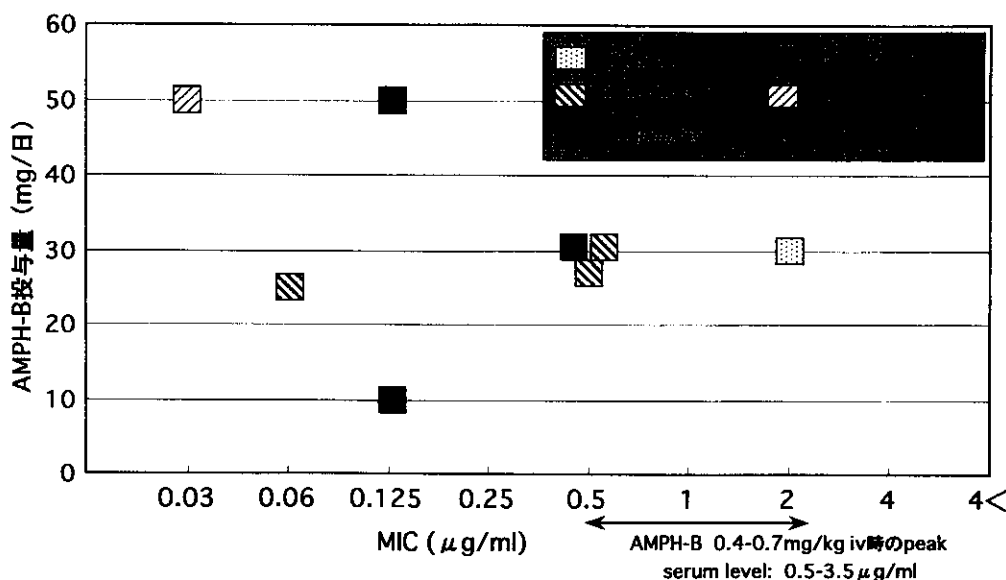


図7 AMPH-B投与中に検出された真菌の薬剤感受性

た。アゾール系抗真菌剤は副作用が少なく使いやすいこともあり国内での使用量が増加しているが、危惧される耐性菌の増加はこれまで指摘されていない。しかし、抗真菌剤が多用されている病棟における *C. albicans* の感受性低下傾向が示され、漫然と抗真菌剤が使われると今後耐性化が問題になる可能性がある。抗真菌剤投与中の患者の約1/4の患者から真菌が検出され、耐性株でないものが主体であった状況をふまえ、抗真菌剤予防投与にあたっては効果的な decontamination と耐性菌増加防止の両者を考慮して最適な方法を検討することが必要と思われた。

結 論

抗真菌剤投与中の血液疾患患者 75 症例中 20 症例から真菌が分離された。*C. glabrata* を中心に分離株の約 1/5 が耐性株であった以外は S(sensitive)あるいは I(intermediate)とされる MIC を示した。抗真菌剤予防投与にあたっては効果的な decontamination と耐性菌増加防止の両者を考慮して最適な方法を検討することが必要と思われた。

健康危険情報

特になし

研究発表

(1) 学会発表

米山彰子、青木克己、平井久丸、中原一彦：抗真菌剤投与中の血液疾患患者からの真菌の検出状況と薬剤感受性の検討。第42回日本臨床血液学会総会（倉敷）2000

知的財産権の出願登録状況

なし



Mycobacterium avium complex(MAC) に対する薬剤併用効果についての検討

米山 彰子¹⁾、奥住 捷子¹⁾、中原 一彦¹⁾、木村 哲²⁾

¹⁾ 東京大学医学部附属病院検査部

²⁾ 東京大学医学部感染制御学教室

研究要旨

Middlebrook 7H9 medium を用いた微量液体希釈法により、非定型抗酸菌に対する薬剤併用効果をcheckerboard法を用いて評価した。試験薬剤はclarithromycin (CAM)、azithromycin (AZM)、ethambutol (EB)、sparfloxacin (SPFX)、amikacin (AMK)で、単剤でのMIC値はSPFXおよびAMKが比較的低値であった。CAMとSPFX、CAMとAMK、CAMとEB、AZMとEBの組み合わせで併用効果を検討したところ相乗作用を示す株はCAMとAMKで47.7%と最も多く、続いてCAMとEB、CAMとSPFX、AZMとEBの順であった。いずれの組み合わせでも拮抗作用を示す株が3割前後認められた。単剤でのMIC値と併用時のFIC indexの間に相関を認めず、併用薬剤の異なるFIC index間にも相関は認めなかった。併用療法に際してはあらかじめ*in vitro*で併用効果の評価してから用いる必要があることが示唆された。

分担研究者：米山彰子

研究協力者：奥住捷子、中原一彦、木村 哲

Susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex(MAC) isolates—testing for synergism using checkerboard assay—

Akiko Yoneyama¹⁾, Katsuko Okuzumi¹⁾, Kazuhiko Nakahara¹⁾ and Satoshi Kimura²⁾

¹⁾ Laboratory Center, University of Tokyo Hospital and ²⁾ Department of Infection Control and Prevention, University of Tokyo