

- 25) 渋谷和俊：後天性免疫不全症候群（AIDS）における真菌症に関する病理学的研究. 厚生科学研究費 新興・再興感染症研究事業「輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究」平成12年度班会議、東京、2001.1
- 26) 渋谷和俊：ラット腸間膜上でのアスペルギルスの血管侵襲に関する微速撮影による動態的観察. 厚生科学研究費 新興・再興感染症研究事業 「輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究」平成13年度班会議、2002.1
- 27) 渋谷和俊、川上和義、直江史郎、齋藤 厚：CD4障害下におけるヒトクリプトコックス肉芽腫に関する病理組織学的検討. 厚生科学研究費 エイズ対策研究事業「日和見感染症の治療に関する研究班」平成13年度第1回班会議、東京、2002.2

#### 知的財産権の出願・登録状況

特になし

後天性免疫不全症候群における真菌症、特にクリプトコックスの肺病変に関する病理組織学的研究



## *Candida albicans*におけるerg3変異株の抗真菌薬感受性について

宮崎 泰可<sup>1,2)</sup>、掛屋 弘<sup>2)</sup>、宮崎 義継<sup>2)</sup>、朝野 和典<sup>2)</sup>、河野 茂<sup>1,2)</sup>

1) 長崎大学大学院医学研究科 新興感染症病態制御学系専攻

感染分子病態学講座 病態生理制御学分野

2) 長崎大学医学部第二内科

### 研究要旨

*Candida albicans*において、delta-5,6-desaturaseの欠損が抗真菌薬感受性に及ぼす影響について検討した。delta-5,6-desaturaseは、細胞膜の主成分であるエルゴステロールの生合成経路に関与しており、*ERG3* 遺伝子によってコードされている。*ERG3*の中心部を *hisG-URA3-hisG* cassette<sup>1)</sup>で置き換えたdisruption constructを作製し、アゾール系抗真菌薬(以下アゾール)に感受性を示す *C. albicans* CAI4株<sup>1)</sup>に対して相同組換えによる遺伝子破壊を行った。*C. albicans*は diploidであるため、各々1つの alleleのみを破壊したCAD1株とCAD2株、さらに両方の alleleを破壊したCAE3D株を作製した。いずれも *in vitro*での発育速度は親株CAI4と同等であった。また、CAD1株とCAD2株のアゾール感受性は変化しなかったが、完全な *erg3*欠損株であるCAE3D株では、フルコナゾールのMICが>1024μg/mlと極めて高度な耐性が誘導され、イトラコナゾールとミコナゾールにも同様の耐性を示した。さらに、CAE3D株に対して野生型の *ERG3*を再導入するcomplementation studyにてアゾール感受性の回復を確認した。アムホテリシンBとフルシトシンに対してはいずれも親株と同等の結果であった。以上より、*C. albicans*においてdelta-5,6-desaturase (*ERG3*)の変異はアゾール高度耐性を誘導する原因の一つと考えられた。

分担研究者：河野 茂

研究協力者：宮崎泰可、掛屋 弘、宮崎義継、朝野和典

### Antifungal susceptibilities of *Candida albicans* erg3 mutant

Taiga Miyazaki<sup>1,2)</sup>, Hiroshi Takeya<sup>2)</sup>, Yoshitsugu Miyazaki<sup>2)</sup>, Kazunori Tomono<sup>2)</sup> and Shigeru Kohno<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Molecular and Clinical Microbiology, Department of Molecular Microbiology and Immunology, Nagasaki University Graduate School of Medical Sciences and <sup>2)</sup>Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine

研究目的

1980年代より AIDS 患者や高度医療に伴う免疫不全患者の増加により、日和見感染症としての深在性真菌症が問題となっている。この深在性真菌症の治療および予防にアゾール系抗真菌薬が長期またはくり返し使用され、近年、アゾール耐性を示す *Candida albicans* が報告されるようになった。現在のところ、薬剤排出ポンプによる細胞内薬剤濃度の減少と標的酵素である lanosterol demethylase (*ERG11*) の変異によるアゾール親和性の低下が主要な耐性機序とされている (*Candida albicans* においては、*ERG11* の過剰発現とアゾール耐性との関連には賛否両論である) 2)。その他にもいくつかの機序が考えられており、その一つに、*ERG3* 遺伝子によってコードされる delta-5,6-desaturase の欠損が示唆されている。本酵素は lanosterol

demethylase (*ERG11*) 等とともに細胞膜の主成分であるエルゴステロールの生合成に関与しており、lanosterol demethylase よりも下流に位置している。*Saccharomyces cerevisiae* におけるエルゴステロール生合成経路の模式図を図 1 に示す<sup>3)</sup>。1995 年に Kelly<sup>4)</sup>らは、*S. cerevisiae* におけるアゾール耐性株が、細胞膜の表現型に delta-5,6-desaturase の変異を有していたことより、本酵素の欠損はアゾール耐性機序の一つであると提唱した。一方、Geber<sup>5)</sup>らは *C. glabrata* においてはアゾール感受性に影響を及ぼさないことを証明しており、菌種間での相違が認められた。臨床的に最も重要である *C. albicans* については、本酵素の欠損がアゾール耐性の原因となるのか否かの分子生物学的な証明はなされていない。今回、野生型の *C. albicans* から delta-5,6-desaturase をコードしている *ERG3* 遺伝子の欠損株を実験的に作製し、本酵素が抗真菌薬感受性に与える影響について検討する。

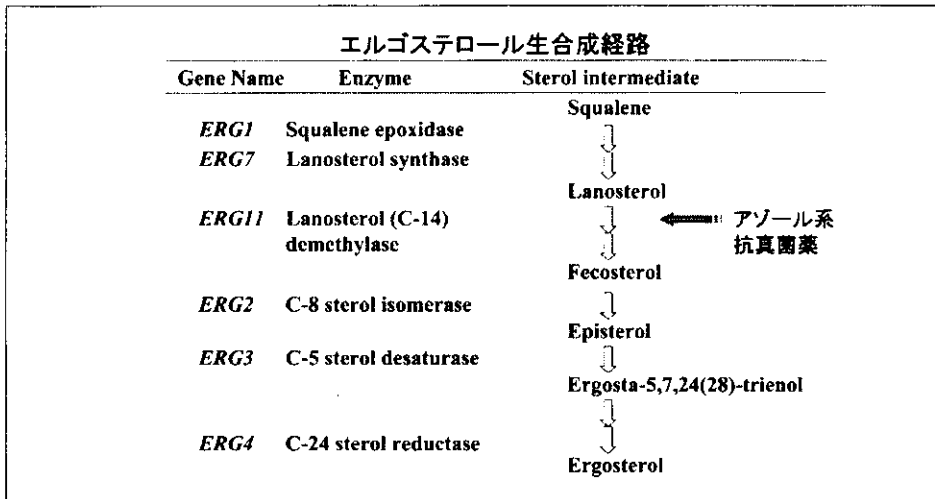


図 1

表 1

*C. albicans* strains used in this study

Strain	Parent strain	Genotype
SC5314		Wild-type azole-susceptible strain
CAF2-1	SC5314	<i>URA3/ura3Δ::imm434</i>
CA14	CAF2-1	<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>
CAD1U	CA14	<i>erg3Δ::hisG-URA3-hisG/ERG3</i>
CAD1	CAD1U	<i>erg3Δ::hisG/ERG3</i>
CAD2U	CA14	<i>ERG3/erg3Δ::hisG-URA3-hisG</i>
CAD2	CAD2U	<i>ERG3/erg3Δ::hisG</i>
CAE3DU	CAD2	<i>erg3Δ::hisG/erg3Δ::hisG-URA3-hisG</i>
CAE3D	CAE3DU	<i>erg3Δ::hisG/erg3Δ::hisG</i>
CAE3RU	CAE3D	<i>erg3Δ::hisG/erg3Δ::hisG + ERG3-URA3</i>

## 研究方法

今回使用した *C. albicans* 10 株の遺伝子型を表1に示す。*erg3*欠損株の作製にあたり、CAI4株を親株として用いた。

(1) CAI4株は *ura3*欠損株であるため、ウラシル(ウリジン)栄養要求性を示す。この性質を利用して、*URA3* を選択マーカーとする disruption construct を作製した(図2)。まず、*URA3*の両側に各1コピーの *hisG* 遺伝子を有した *hisG-URA3-hisG* cassette のプラスミド (p5921) を *Bam*HI で切断後、CAI4株 *ERG3* Open Reading Frame (ORF: 1161bp) の5'末端約300bpのPCR productを、それぞれ平滑末

端化して挿入した。挿入された遺伝子の方向はシーケンスで確認した。次いで、*Bgl*II切断部位にもCAI4株 *ERG3* ORFの3'末端約400bpを同様の手法で挿入した。即ち、*ERG3* ORF 1161bpの中心部468bpを選択マーカーで置き換えた状態のプラスミド (pEUE) を作製し、*Sac*I と *Pst*I で線状化して約4.7kbの disruption construct を作製した。今回選択マーカーとして使用した *hisG-URA3-hisG* cassette は5-fluoroorotic acidの存在下では *URA3* を loop outする性質があるため、くり返しマーカーとして利用することができる。

(2) この disruption construct を用いて、相同組換えを利用した遺伝子破壊を electroporation 法で行っ

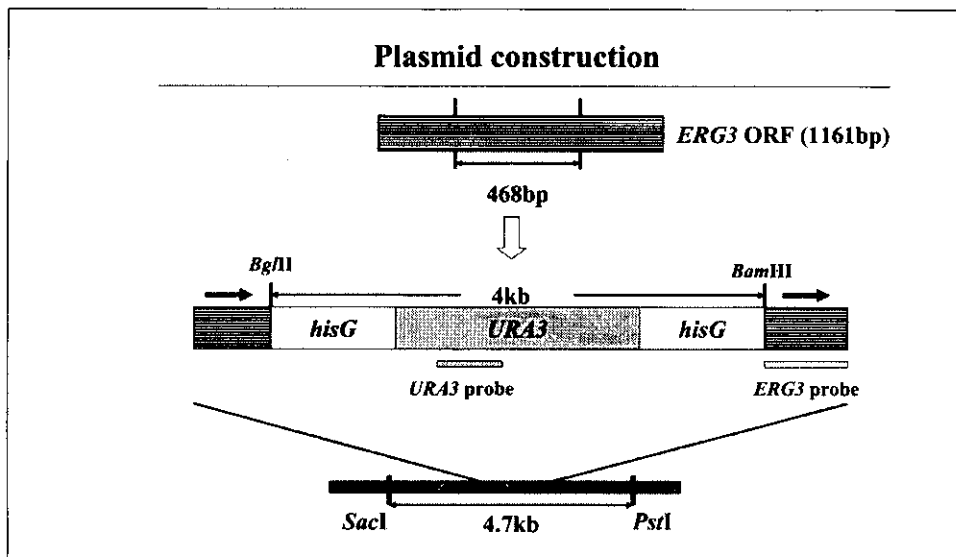


図2

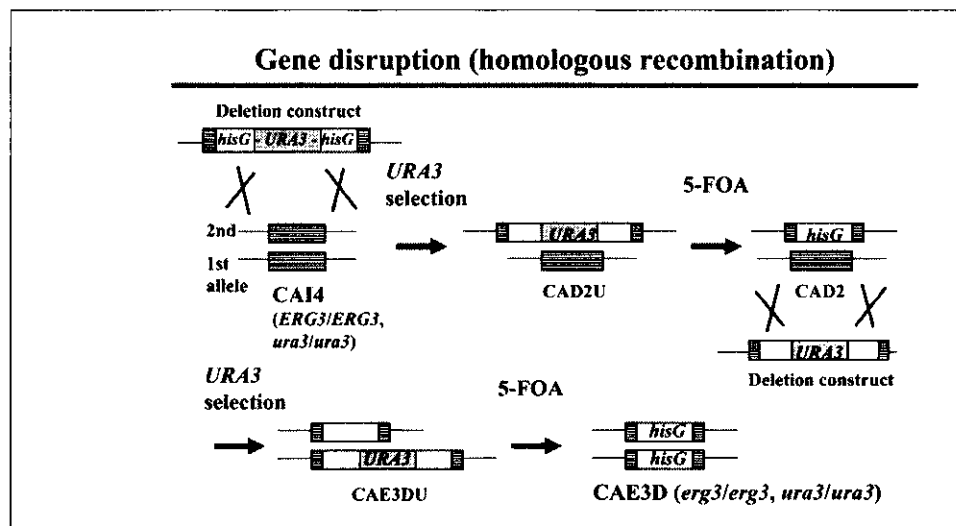


図3

た(図3)。 *C. albicans*はdiploidであるため、各々1つの allele のみを破壊したCAD1 (*erg3Δ::hisG* *ERG3*) 株とCAD2 (*ERG3 erg3Δ::hisG*) 株、さらに両方の allele を破壊したCAE3D(*erg3 ΔhisGerg3 Δ::hisG*) 株を作製した。これら形質転換株の確認には Southern blot 法を用いた(図4)。

(3) *ERG3*欠損株の発育速度と抗真菌薬感受性を親株と比較検討した。抗真菌薬はフルコナゾール、ミコナゾール、イトラコナゾール、フルシトシン、アムホテリシンBの5剤を用いた。感受性試験は National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; M27-A) 法<sup>6)</sup>に基づいて行い、フルコナゾール、イトラコナゾール、アムホテリシ

ンBにおいてはE-testも併用した。

## 結果

### 1. *Candida albicans* CAI4株における *ERG3*

ORFのシーケンス *ERG3*のORFは1161bpであるが、allele間での相違が370番目(A, G)と505番目(A, G)に認められた。

### 2. *ERG3*欠損株の作製

サザンブロット解析におけるCAI4株の6.5kbのバンドを、便宜上1st allele、5.5kbのバンドを2nd alleleとすると、CAD1U株は1st alleleがdisruptionconstructで置き換えられていることを、CAD1株はURA3がloop out

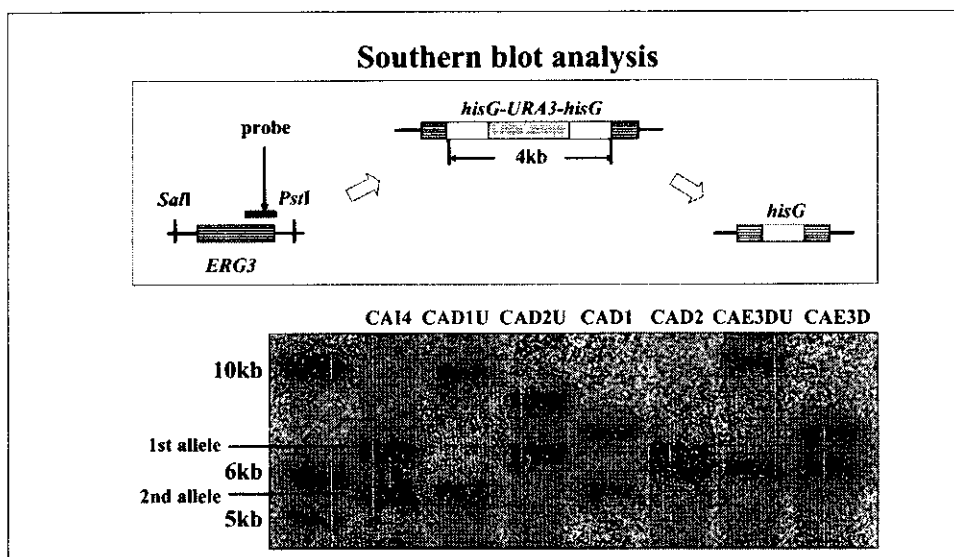


図4

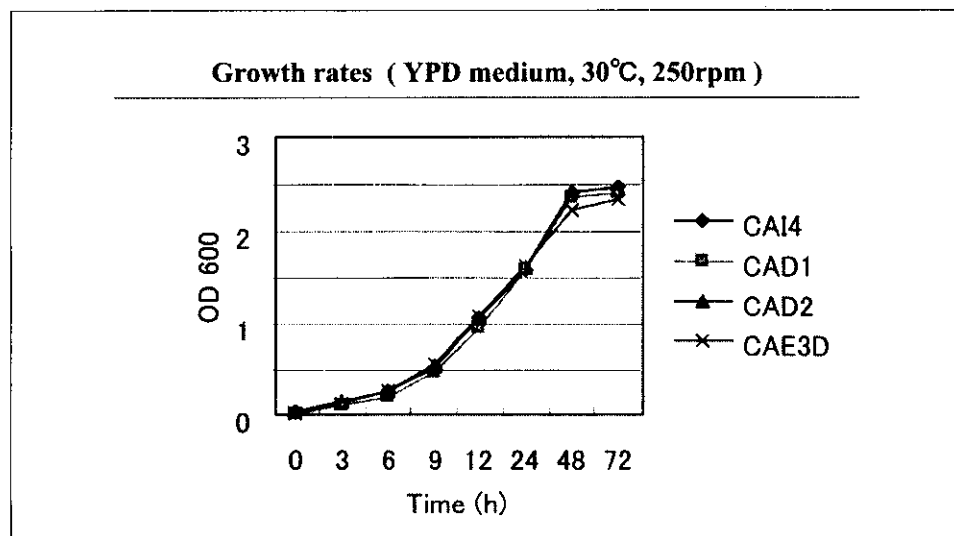


図5

されたことを示唆する。両方の allele を knock out した CAE3DU (*erg3*  $\Delta$ *hisG*-*URA3*-*hisG**erg3*  $\Delta$ *hisG*) 株は CAD2 株を親株として作製した。

### 3. 発育速度 (図5) および抗真菌薬感受性 (表2)

CAD1 株、CAD2 株、CAE3D 株のいずれも親株 CAI4 と比較して *in vitro* での発育速度に有意な違いは認めなかった。また、CAD1 株と CAD2 株においては、アゾール感受性に変化はなかったが、完全な *ERG3* 欠損株である CAE3D 株は、フルコナゾールに対する MIC が、 $>1024\mu\text{g/ml}$  と極めて高度な耐性が誘導され、イトラコナゾールとミコナゾールにも同様の結果を示した。さらに、CAE3D 株に対して野生型の *ERG3* を再導入する complementation study にてアゾール感受性の回復を確認した。アムホテリシン B とフルシトシンに対してはいずれも親株と同等の結果であった。

## 考 察

欧米諸国ではエイズ患者に対してアゾールを頻用した結果、難治性慢性口腔咽頭カンジダ症からアゾール耐性 *C. albicans* が分離されるようになり、現在新たな問題に直面している。この耐性化を克服するには、第一に耐性機序の解明が不可欠であり、臨床分離株を中心に様々な検討がなされてきた。しかし、*S. cerevisiae* や *C. glabrata* と比して、

diploid である *C. albicans* は分子生物学的な証明が容易ではない。通常、ある遺伝子の機能を解析するにはその欠損株を作製し親株との比較検討を行うが、*C. albicans* においては *hisG-URA3-hisG* cassette を用いて *URA3* マーカーを再利用する手法が多用されている。しかし、最初に破壊された allele には1コピーの *hisG* が残存するため、次節の形質転換の際に標的とする野生型の allele よりも disruption construct との相同性が高くなる。この相同性の偏りによって、既に破壊された allele は野生型 allele と比べ形質転換効率が約50倍であったと Yesland ら<sup>7)</sup> は報告しており、実際に我々の場合も約70倍の偏りがあった。しかし、野生型 allele 由来の flanking lesion と可能であれば *hisG* を含まないマーカーを用いて disruption construct を作り直せば回避できる問題かもしれない。

今回使用した CAI4 株では *ERG3* の2つの allele 間で2個所の相違点を認めたが、いずれも欠損させた部位に含まれていた。そのため、CAD1 株と CAD2 株を用いた比較検討により、この allele 間での相違は発育速度や抗真菌薬感受性に影響しないことが確認された。一方、CAE3D 株ではフルコナゾールをはじめとするアゾールに対して極めて高度な耐性を示し、complementation study では感受性の回復が確認されたため、*C. albicans* においては *ERG3* の欠損がアゾール高度耐性を誘導する一つの原因となりうることを示された。

表2 抗真菌薬に対する感受性

	CAI4 ( <i>ERG3/ERG3</i> )	CAD1 ( <i>erg3/ERG3</i> )	CAD2 ( <i>ERG3/erg3</i> )	CAE3D ( <i>erg3/erg3</i> )	CAE3RU ( <i>erg3/erg3</i> + <i>ERG3</i> )
Amphotericin B	4	4	4	4	N.D.
Flucytosine	$>64$	$>64$	$>64$	$>64$	N.D.
Miconazole	0.13	0.13	0.13	$>32$	N.D.
Fluconazole	0.5	1	1	$>1024$	4
Itraconazole	0.5	0.5	0.5	$>16$	N.D.

NCCLS: M27-A

lanosteroldemethylase はエルゴステロール合成経路の中で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。アゾールはこの lanosterol demethylase 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 $\alpha$ メチルステロール、特に14 $\alpha$ -methyl fecosterolと diol である14 $\alpha$ -methyl-ergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diolの蓄積をもたらす。これらの細胞は細胞膜の流動性が変化し、宿主による酸素依存性の殺菌作用にも抵抗力を失う。また、diolの蓄積は細胞の発育を阻害することが知られているが、*S. cerevisiae*ではdelta-5,6-desaturaseの欠如がこのdiolの蓄積を阻止する(図6)4)。そのため、*C. albicans*においても同様の機序でdelta-5,6-desaturase (ERG3)欠損株は、不安定な細胞膜ではあるがアゾール存在下でも発育可能であると考えられた。

さらに、*S. cerevisiae*のERG3欠損株では、イオンやpHなどの様々な化学的刺激に対して抵抗力が低下すると報告されており8)、同様の変化が*C. albicans*においても予想される。今後は、病原性への影響も含め解析していく予定である。

## 結 論

*C. albicans*においてdelta-5,6-desaturase (ERG3)の欠損は、アゾール高度耐性を誘導する原因の一つであることが示された。

## 参考文献

- 1) Fonzi, W. A., Irwin, M. Y.: Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics*. 134: 717-728, 1993
- 2) Ghannoum, M. A., Rice, L. B.: Antifungal agents: Mode of action, mechanism of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Reviews*. 12: 501-517, 1999
- 3) White, T. C. et al.: Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Reviews*. 11: 382-402, 1998
- 4) Kelly, S. L. et al.: Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 $\alpha$ -methylergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207: 910-915, 1995
- 5) Geber, A. et al.: Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2708-2717, 1995
- 6) National Committee for Clinical Laboratory Standards.: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- 7) Yesland, K., Fonzi, W. A.: Allele-specific gene targeting in *Candida albicans* results from heterology between alleles. *Microbiology*. 146: 2097-2104, 2000
- 8) Hemmi, K. et al.: The physiological roles of membrane ergosterol as revealed by the phenotypes of

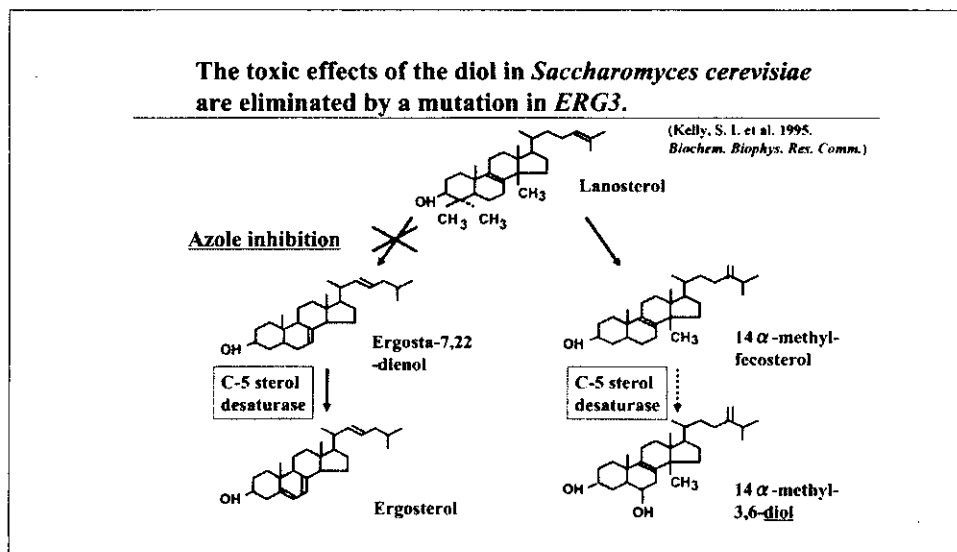


図 6

*syll/erg3* null mutant of *Saccharomyces cerevisiae*.  
Biosci. Biotech. Biochem. 59: 482-486, 1995

## 健康危険情報

特になし

## 研究発表

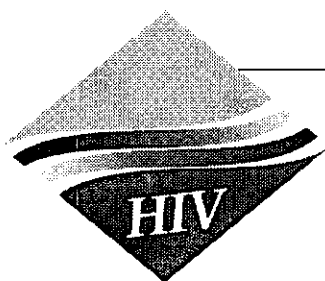
### 2. 学会発表

- 1) Miyazaki, T., Miyazaki, Y., Takeya, H., Miyazaki, H., Nakamura, K., Kohno, S.: Disruption of delta-5, 6-desaturase gene in *Candida albicans* affected azole susceptibility. 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), 2001
- 2) 宮崎泰可、掛屋 弘、宮崎義継、平湯洋一、朝野和典、田代隆良、河野 茂.: *Candida albicans*におけるdelta-5,6-desaturaseの機能解析. 第49回日本化学療法学会西日本支部総会, 2001
- 3) 崎泰可、掛屋 弘、宮崎義継、田代隆良、河野 茂.: *Candida albicans*におけるdelta-5,6-desaturaseの機能解析. 第45回日本医真菌学会総会, 2001

## 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





## 血液培養および血管内カテーテルからの真菌の分離状況および薬剤感受性についての検討

米山 彰子<sup>1)</sup>、三澤 慶樹<sup>2)</sup>、奥住 捷子<sup>2)</sup>、森屋 恭爾<sup>2)</sup>、中原 一彦<sup>1)</sup>、木村 哲<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 東京大学医学部附属病院検査部

<sup>2)</sup> 東京大学医学部感染制御部

### 研究要旨

東京大学医学部附属病院において1997年7月からの4年6か月間に、血液培養から36株、血管内カテーテルから28株の真菌が分離された。血液から分離された真菌の半数にあたる18株が*C. albicans*で、以下*C. parapsilosis*、*C. glabrata*、*C. tropicalis*と続きこの3菌種でnon-*albicans Candida spp*の約80%を占めた。血管内カテーテルから分離された真菌も上位4菌種は同様であった。真菌血症は悪性腫瘍患者や手術後の患者、中心静脈カテーテル挿入患者に多く、診断には $\beta$ -D-glucanが有用であったが実施率は44%と低かった。カンジダ抗原は $\beta$ -D-glucanに比べ陽性率が低かった。*C. albicans*の薬剤感受性は良好でアゾール系抗真菌薬に対する感受性株は認めなかった。non-*albicans Candida spp*の薬剤感受性は*C. albicans*より悪く菌種により違いを認めた。*C. albicans*血症は約半数が4週間以内に死亡と予後は不良で、通常の薬剤感受性試験では把握できない真菌側の要因や診断および治療法も含めて検討が必要と思われた。

分担研究者：米山彰子

研究協力者：三澤慶樹、奥住捷子、森屋恭爾、中原一彦、木村 哲

### Species distribution and antifungal susceptibility of isolates from blood and intravenous catheter

Akiko Yoneyama<sup>1)</sup>, Yoshiki Misawa<sup>2)</sup>, Katsuko Okuzumi<sup>2)</sup>, Kyoji Moriya<sup>2)</sup>, Kazuhiko Nakahara<sup>1)</sup>, Satoshi Kimura<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Laboratory Center, University of Tokyo Hospital and <sup>2)</sup>Department of Infection Control and Prevention, University of Tokyo

研究目的

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。今回は真菌血症に注目し、真菌血症の起炎菌となった真菌の菌種別分離頻度、真菌血症を起こした患者の背景、真菌血症の血清診断、予後について調査した。また分離された真菌の薬剤感受性を検討し、耐性菌の頻度を探った。

研究方法

1997年7月から2001年12月の間に、当院で血液培養および血管内カテーテルから真菌が検出された症例の患者背景、予後、真菌血症の血清診断について調査し、併せて分離された真菌の薬剤感受性を検討した。一か月以内に同一菌種が複数回分離された場合は重複してカウントせず1株とした。また血液と血管内カテーテルから同時に分離された場合は血液のみカウントした。菌株はポテトデキストロースに継代して室温保存し、カンジダGS培地にて35℃一夜あるいは室温一日放置後の集落を使用した。菌の同定にはVITEK YBCカード(日本ビオメリュー)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 ~ 16μg/ml), flucytosine (以下 5-FC, 0.125 ~ 64μg/ml), fluconazole (以下 FLCZ, 0.125 ~ 64μg/ml), itraconazole (以下 ITCZ, 0.015 ~ 8μg/ml), miconazole (以下 MCZ, 0.06 ~ 32μg/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。

研究結果

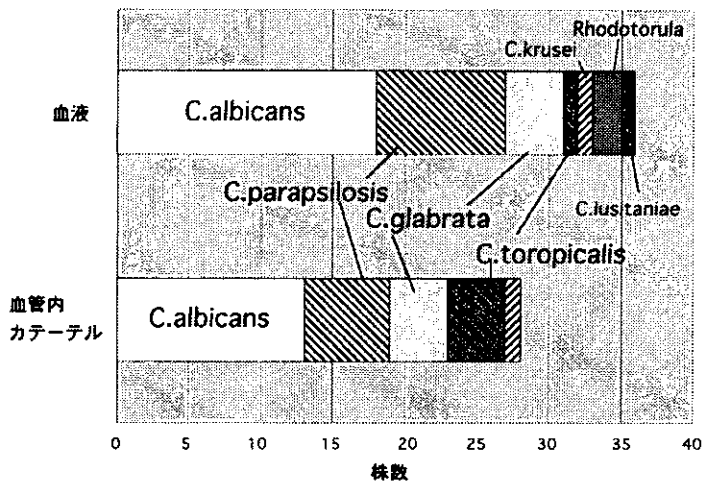
真菌の分離状況 (図1)

血液培養から36株、血管内カテーテルから28株の真菌が分離された。血液から分離された真菌の半数にあたる18株が*C. albicans*で、以下*C. parapsilosis*、*C. glabrata*、*C. tropicalis*と続きこの3菌種でnon-*albicans Candida spp*の約80%を占めた。血管内カテーテルから分離された真菌も上位4菌種は同様で、やはり*C. albicans*が約半数を占めた。

血液および血管内カテーテルから真菌が分離された患者の背景 (図2)

60症例について患者背景を検討した。診療科は外科系55%、内科系45%とやや外科系が多かった。基礎疾患は、悪性腫瘍が55%、非悪性疾患の手術後が24%と両方で約80%を占めた。血液から真菌が分離された36症例中29症例に中心静脈カテーテルが挿入されていた。糖尿病は18.3%にステロイド投与は13.3%に認めた。

血液および血管内カテーテルから分離された真菌



(図1) 真菌の分離状況

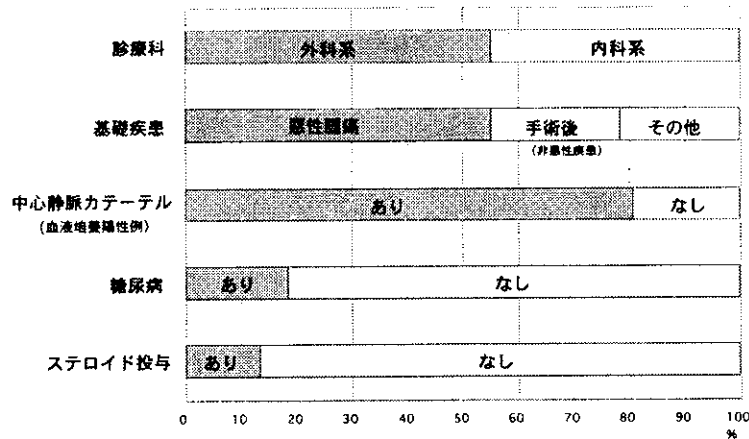
真菌血症の血清診断 (図3)

*C. albicans* による真菌血症 18 例、non-*albicans Candida spp* による真菌血症 18 例について、 $\beta$ -D-glucan および candida 抗原の結果を検討した。*C. albicans* による真菌血症 18 例のうち  $\beta$ -D-glucan が検査されていた8症例全例で陽性を示した。一方、candida 抗原は検査が行われていた10例中7例が陽性であった。non-*albicans Candida spp* においては、

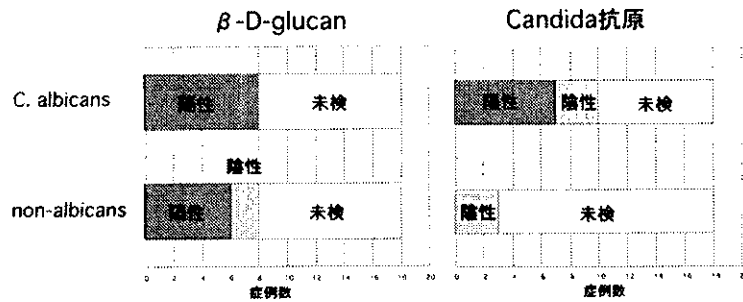
$\beta$ -D-glucan は8例中6例が陽性、candida 抗原は3例全例陰性であった。

真菌血症の予後 (図4)

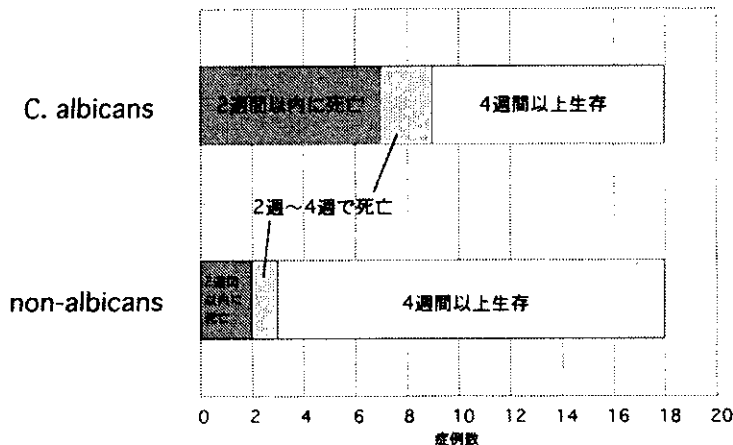
*C. albicans* による真菌血症 18 例中7例が2週間以内に死亡し、4週間までにさらに2例が死亡し、あわせて半数が4週間以内に死亡した。これに対し、non-*albicans Candida spp* においては4週間以内



(図2) 血液および血管内カテーテルから真菌が分離された患者の背景



(図3) 真菌血症の血清診断



(図4) 真菌血症の予後

に死亡したのは18例中3例のみであった。

分離された真菌の薬剤感受性

調査期間以前の分離株も含めて薬剤感受性を検討した。

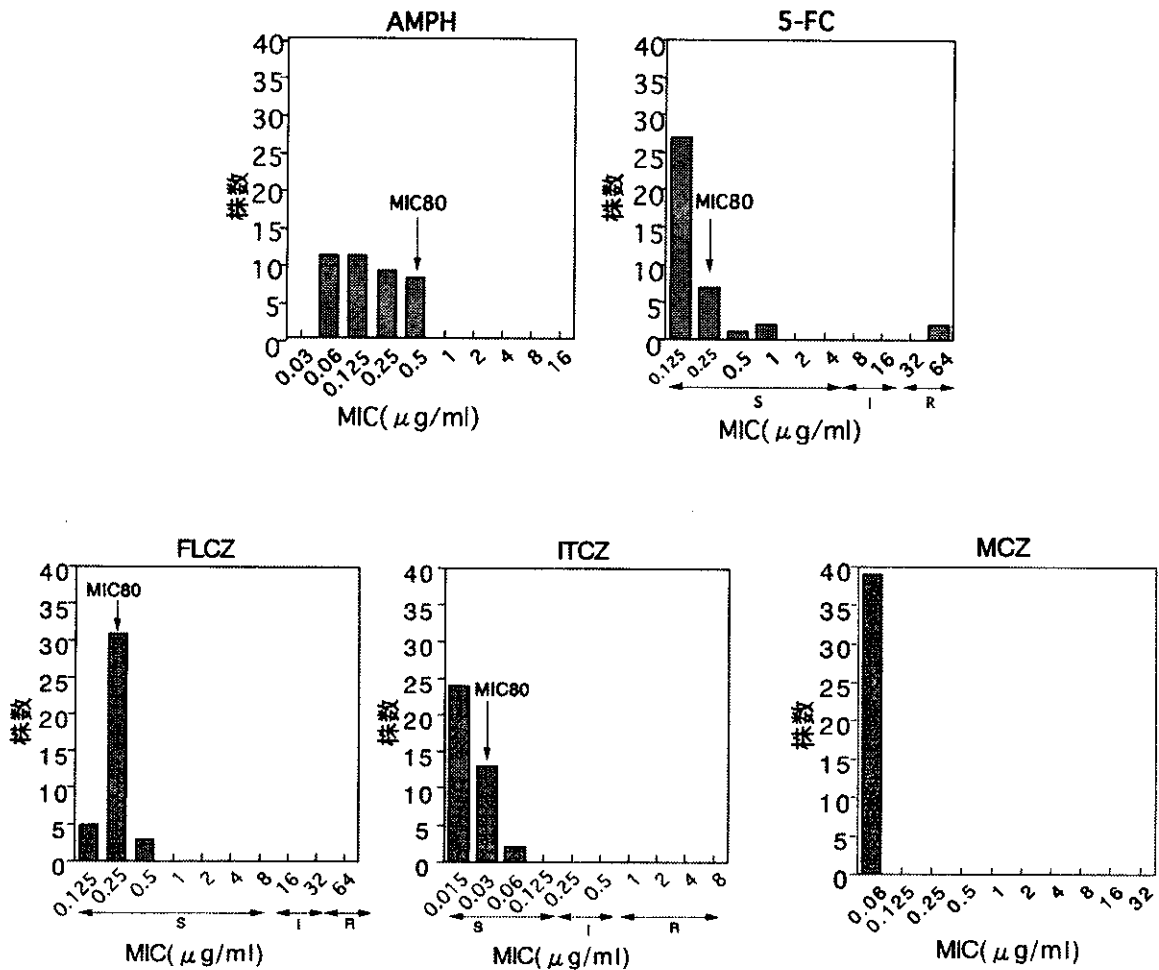
1. *C. albicans* の薬剤感受性 (図5)

AMPH-BのMICは0.06から0.5 $\mu$ g/mlに分布しMIC80は0.5 $\mu$ g/mlと感受性は良好であった。5-FCのMIC80は0.25 $\mu$ g/mlであったが2株だけ耐性株を認めた。FLCZ、ITCZ、MCZのMIC80はそれぞれ0.25, 0.03, 0.06 $\mu$ g/mlで耐性株はなかった。

2. non-*albicans Candida* spp の薬剤感受性 (図6)

AMPH-BのMICはいずれの菌種でも0.03から1

の間に分布したが、*C. albicans*に比べると耐性傾向であった。5-FCの感受性は*C. krusei*以外の菌種では良好であった。FLCZの薬剤感受性は、*C. parapsilosis*、*C. tropicalis*、*C. lusitanae*はいずれもMIC2以下で感受性と判定されたが*C. albicans*に比べると高めのMICを示した。*C. glabrata*、*C. krusei*は高めのMIC値であった。ITCZについては、*C. tropicalis*、*C. krusei*、*C. lusitanae*はいずれの株も感受性と判定されたが、*C. glabrata*、*C. parapsilosis*にはintermediateやresistantと判定される株があった。MCZについてはMIC 0.125から1 $\mu$ g/mlに分布する株が多く、*C. albicans*よりも耐性傾向であった。



(図5) *C. albicans* の薬剤感受性

AMPH ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.03	0.125	0.5	2	8
	0.06	0.25	1	4	16
<i>C.glabrata</i>		1 3	1 4	1	
<i>C.parapsilosis</i>	1	3 4	5 1		
<i>C.tropicalis</i>		1 4	1		
<i>C.krusei</i>			1 1		
<i>C.lusitaniae</i>				1	
<i>Rhodotorula</i>			1	1	
5-FC ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.125	0.5	2	8	32
	0.25	1	4	16	64
<i>C.glabrata</i>	10				
<i>C.parapsilosis</i>	12	2			
<i>C.tropicalis</i>	6				
<i>C.krusei</i>				1	1
<i>C.lusitaniae</i>	1				
<i>Rhodotorula</i>	1	1			
FLCZ ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.125	0.5	2	8	32
	0.25	1	4	16	64
<i>C.glabrata</i>				6	3
<i>C.parapsilosis</i>		3 8	3		
<i>C.tropicalis</i>		4 2			
<i>C.krusei</i>					1 1
<i>C.lusitaniae</i>			1		
<i>Rhodotorula</i>					2
ITCZ ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.015	0.06	0.25	1	4
	0.03	0.125	0.5	2	8
<i>C.glabrata</i>		1 1	4 1	1 1	2
<i>C.parapsilosis</i>	2	4 5	1 2		
<i>C.tropicalis</i>	1		2 3		
<i>C.krusei</i>	1			1	
<i>C.lusitaniae</i>			1		
<i>Rhodotorula</i>					2
MCZ ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.06	0.25	1	4	16
	0.125	0.5	2	8	32
<i>C.glabrata</i>		6 2	1 1		
<i>C.parapsilosis</i>		2 7	4 1		
<i>C.tropicalis</i>			3 2	1	
<i>C.krusei</i>	1		1		
<i>C.lusitaniae</i>		1			
<i>Rhodotorula</i>				1	1

(図6) non-*albicans* *Candida* spp の薬剤感受性

考 察

東京大学医学部附属病院において1997年7月からの4年6か月間に、血液培養から36株、血管内カテーテルから28株の真菌が分離された。前者は真菌血症の起炎菌と考えられるが、後者については、血液培養がなされていない例、血液培養が陰性であった例が混在しており、全身的な感染症を生じていない症例も含まれていると思われる。

菌種別の頻度では *C. albicans* が約半数を占め、以下 *C. parapsilosis*、*C. glabrata*、*C. tropicalis* と続いた。これは海外等の真菌血症の起炎菌の報告と似通った結果であったが、*C. albicans* の比率や non-*albicans* *Candida* spp の中での分離頻度の順位は施設

により報告が異なる。患者の基礎疾患の違い、抗真菌薬や抗真菌薬の使用状況の違いなどが反映される可能性がある。

患者背景を検討すると、患者の半数強が悪性腫瘍患者で非悪性疾患の手術後をあわせて約8割を占めたこと、中心静脈カテーテル挿入率が高いことが特徴的であった。真菌血症患者の約8割に中心静脈カテーテルが挿入されていたが、これは infection control team のサーベイランスによる当院の中心静脈ライン使用比 (2001年6-9月) 0.138 に比べて著明に高い値で、従来から指摘されてきた真菌血症と中心静脈カテーテルの関連を改めて示唆する結果であった。

真菌血症の血清診断については、 $\beta$ -D-glucan お

よびcandida抗原の実施率と有用性を検討した。検査の実施率は、 $\beta$ -D-glucan44%、candida抗原36%であった。 $\beta$ -D-glucanは*C. albicans*血症18例中8例で検査され全例で陽性であった。non-*albicans Candida spp*による真菌血症では8例中5例が陽性であった。non-*albicans Candida spp*で陰性例が目立った理由については不明だが、真菌そのものの要因による可能性、真菌血症の病態や重症度による可能性があり、今後検討が必要と思われた。いずれにしても真菌血症診断における $\beta$ -D-glucanの有用性は高く、今後もっと活用されるべきと思われた。candida抗原は、*C. albicans*血症18例中10例で検査され7例で陽性であった。non-*albicans Candida spp*による真菌血症では検査された3例すべて陰性であった。真菌血症診断におけるcandida抗原の有用性は $\beta$ -D-glucanより低いと思われた。

血液および血管内カテーテルから分離された真菌の薬剤感受性を検討すると、*C. albicans*はおおむね良好な感受性を示し、特に広く用いられているアゾール系抗真菌薬に対する耐性菌は全く認めなかった。non-*albicans Candida spp*については、*C. albicans*にくらべ薬剤感受性は悪い傾向にあり、*C. glabrata*、*C. krusei*にはFLCZ耐性株も認めたが、他の検査材料から分離された株に比べ特に感受性が低くはなかった。

真菌血症の予後を検討すると、4週間以内の死亡が*C. albicans*血症では50%、non-*albicans Candida spp*による真菌血症で16.7%と、*C. albicans*血症の予後が不良であった。悪性腫瘍患者も多く、真菌血症が直接死因であった患者ばかりではないが、薬剤感受性の良好な株での真菌血症の予後不良の原因については、真菌側の要因、患者側の要因、治療を含めて検討が必要と思われた。

## 結 論

東京大学医学部附属病院において1997年7月からの4年6か月間に、血液培養から36株、血管内カテーテルから28株の真菌が分離された。その約半数が*C. albicans*で、以下*C. parapsilosis*、*C. glabrata*、*C. tropicalis*と続き、真菌血症の起炎菌として*C. albicans*の重要性が示された。真菌血症は悪性腫瘍

患者や手術後の患者、中心静脈カテーテル挿入患者に多く、診断には $\beta$ -D-glucanが有用であったが実施率は44%と低かった。*C. albicans*の薬剤感受性は良好であったが、約半数が4週間以内に死亡と予後は不良で、通常の薬剤感受性試験では把握できない真菌側の要因や診断および治療の方法も含めて検討が必要と思われた。

## 健康危険情報

特になし

## 研究発表

### 2. 学会発表

- 1) 三澤慶樹、奥住捷子、米山彰子、森屋恭爾、中原一彦、木村哲：血液培養とカテ先から分離された*Candida*属の菌種別分離頻度および薬剤感受性 第48回日本臨床検査医学会総会（横浜）、2001

## 知的財産権の出願・登録状況

なし



## 当センターのHIV感染入院患者における血液培養陽性例の臨床的検討

川田 真幹<sup>1)</sup>、照屋 勝治<sup>1)</sup>、源河いくみ<sup>1)</sup>、立川 夏夫<sup>1)</sup>、菊池 嘉<sup>1)</sup>、安岡 彰<sup>1)</sup>、岡 慎一<sup>1)</sup>、木村 哲<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>国立国際医療センター エイズ治療研究開発センター

<sup>2)</sup>東京大学医学部附属病院感染症内科

### 研究要旨

HIV 感染者では「特徴的な日和見疾患」の合併が問題となるが、その一方で「一般細菌・真菌による菌血症」を起こし、時として重篤な病態を呈することがある。そこで我々は1997年10月から2001年9月までの計4年間に当センターへ入院したHIV感染者で、血液培養から一般細菌もしくは真菌(抗酸菌は除く)が検出された24症例、入院のべ28件、菌血症38のエピソードを対象として、その臨床的背景・予後をレトロスペクティブに調査・検討した。

血液培養からの分離頻度が最も高かったのは Coagulase-negative staphylococci(以下 CNS)で12件(32%)に及び、以下 Staphylococcus aureus 5件(13%)、Pseudomonas aeruginosa 4件(11%)と続いた。菌血症38件中34件(89%)は院内発症であり、CNS 12件中11件(92%)、S.aureus 5件中2件(40%)を含む多くのケースで、中心静脈カテーテル由来の感染を否定できなかった。Nontyphoidal Salmonella を3件(8%)、Cryptococcus neoformans を1件(3%)認めたことは HIV 感染者に特徴的と考えられた。

菌血症発症時に抗 HIV 療法を行っていたのは38件中9件(24%)のみで高度の細胞性免疫障害を有する例が目立ち、CD4 陽性リンパ球数の中央値は  $13/\mu\text{l}$  と極めて低値であった。また、菌血症発症時の白血球数は  $2000/\mu\text{l}$  未満が13%、 $4000/\mu\text{l}$  未満が42%を占め、HIV 感染者でしばしば見られる好中球減少症が、その菌血症発症に深く関与している可能性が示唆された。菌血症を認めた入院28件中11件(39%)で“当該入院中の死亡”に至り、うち7件(64%)が菌血症関連死と考えられた。なかでも緑膿菌では4件中2件(50%)が菌血症関連死を来しており、予後の悪さが窺えた。

分担研究者：安岡 彰、木村 哲

研究協力者：川田真幹

### Nonmycobacterial bacteremia and fungemia in hospitalized patients infected with human immunodeficiency virus-1 : A review of 38 episodes

Miki Kawada<sup>1)</sup>, Katsuji Teruya<sup>1)</sup>, Ikumi Genka<sup>1)</sup>, Natsuo Tachikawa<sup>1)</sup>, Yoshimi Kikuchi<sup>1)</sup>, Akira Yasuoka<sup>1)</sup>, Shinichi Oka<sup>1)</sup> and Satoshi Kimura<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>AIDS Clinical Center, International Medical Center of Japan and <sup>2)</sup>Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, University of Tokyo

## 研究目的

HIV感染者では免疫不全の進行とともに「特徴的な日和見疾患」の合併が問題となるが、その一方で「一般細菌・真菌による菌血症」を起こし、時として重篤な病態を呈することがある。そこで我々は、当センターへ入院したHIV感染者で、血液培養から一般細菌もしくは真菌(抗酸菌は除く)が検出された全症例を対象として、その臨床的背景・予後を検討することとした。

## 研究方法

1997年10月から2001年9月までの計4年間に当センターへ入院したHIV感染患者で、血液培養から一般細菌もしくは真菌(抗酸菌は除く)が検出された24症例、入院のべ28件、菌血症38のエピソード(発症時の平均年齢は38.9±13.7歳)について、その臨床的背景(HIV感染症の治療状況を含む)と予後をレトロスペクティブに調査・検討した。

## 研究結果

### (1) 血液培養分離菌の内容

図1に血液培養分離菌の菌種別頻度を示した。HIV感染者から4年間に検出した38菌株を、当院のHIV非感染者から1年間(2000年1月～12月)に検出した435菌株と比較した。

Coagulase-negative staphylococci(以下 CNS)と

*Staphylococcus aureus*の分離頻度が高いのは両者共通であったが、Nontyphoidal Salmonellaを3件(8%)認めたことはHIV感染者に特徴的であり、HIV非感染者(0.2%)と比べ有意に高い割合であった( $p<0.05$ )。

### (2) 菌血症発症患者の概要

菌血症38のエピソードについて、その概要を表1に示した。以下に主要菌種について簡略に述べる。

#### [CNS]

8名の患者に計12件のエピソードを認めたが、体内に異物がなく自然経過のみで解熱し、明らかに採血時のコンタミネーションであると思われたのは1件のみであった。他の11件では全て中心静脈ラインを留置されており、血管内カテーテル感染を否定できなかった。カテーテルを除去した9件では全て一旦解熱を認めたが、状態が悪いなどの理由で除去を行えなかった2件は直後にショック状態を来すなど全身状態が悪化し、それぞれ8日後と17日後に死亡に至った。

なお中心静脈ラインを留置してから、血液培養でCNSを検出するまでの期間は、最短10日、最長122日で中央値28日であった。(図2)

#### [S.aureus]

メチシリン感受性株(MSSA)4件と、耐性株(MRSA)1件の計5件を認めた。

皮下膿瘍が感染源と思われるMSSA菌血症の1例では入院時より血液培養5セット連続でMSSAを検出し、極めて難治性であったが、抗生物質と

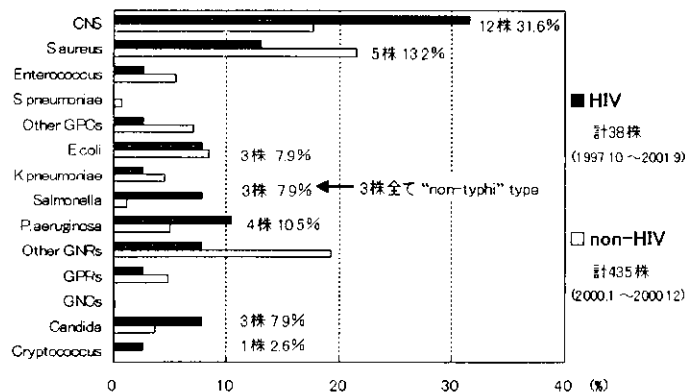


図1 血液培養分離菌の菌種別頻度

Nontyphoidal Salmonellaは、non-HIVで11株(0.2%)のみであった。



表 1-1 菌血症を発症した症例の概要 (1)

[1] コクサージ属陰性ブドウ球菌

入院病名	入院 (日)	抗 HIV 薬	CD4 (/μl)	VL (/ml)	検出 (回)	血管カテーテル 留置 (日)	WBC (/μl)	G-CSF 投与	投与した 抗生剤	カテーテル 除去	転帰
24M 血友病 C型肝硬変	5	—	27	3.1x10 <sup>5</sup>	—	—	8200	—	—	—	軽快 コタミ?
38M クリアトコカス髄膜炎	110	—	5	1.2x10 <sup>5</sup>	—	CV 44	3140	—	CTM	+	軽快
38M クリアトコカス髄膜炎	176	AZI/3TC/RTV/SQM	19	3.9x10 <sup>5</sup>	2	CV 10	1500	+	IPM VCM	—	17日後死亡
68M カビ肺炎 アーハ'赤痢	131	—	38	1.8x10 <sup>5</sup>	3	CV 31	4840	—	CAZ CLDM	—	8日後死亡
65M 血友病 感染性血腫	848	AZI/ddI/NVP	141	NDL	—	CV 122	12200	—	CEZ	+	軽快
45M アーハ'肝臓腫瘍 筋膜炎	52	—	75	9.2x10 <sup>3</sup>	—	CV 46	18000	—	IPM	+	軽快 →ヘルペス肺炎死
24M 血友病 MAC	77	d4T/3TC/IDV	7	1.8x10 <sup>5</sup>	2	CV 28	3160	—	CEZ	+	軽快
24M 血友病 麻疹脳炎	169	(21日前中止)	72	NDL	—	CV 12	3200	—	—	+	軽快 →脳炎死
34F 子宮頸癌 MAC	23	—	9	1.9x10 <sup>3</sup>	—	CV 22	1260	+	—	+	軽快
34F 子宮頸癌 MAC	86	EFV/IDV/RTV	3	NDL	—	CV 33	2640	—	CEZ	+	軽快
34F ヒストプラズマ脳腫瘍	82	—	1	5.1x10 <sup>4</sup>	—	CV 20	9600	—	VCM ST	+	軽快
24M ヒストプラズマ脳腫瘍	147	—	1	5.1x10 <sup>4</sup>	2	CV 19	1100	+	VCM	+	軽快 →CMV 脳炎死

カテーテル培養陽性

(下線付きは感受性のある抗生剤)

表 1-2 菌血症を発症した症例の概要 (2)

[2] 黄色ブドウ球菌

入院病名	入院 (日)	抗 HIV 薬	CD4 (/μl)	VL (/ml)	検出 (回)	血管カテーテル 留置 (日)	WBC (/μl)	投与した抗生剤	その他 治療	転帰	感染源
◆ MSSA											
48M 右頬部腫瘍 (MSSA)※	1	—	0	2.4x10 <sup>5</sup>	5	—	7700	CEZ IPM ST FOM MINO VCM RFP	IVIg	軽快	腫瘍
51M クリアトコカス髄膜炎	13	—	9	—	—	CV 9	2800	CMZ	CV 除去	軽快	CV (好先MSSA)
48M 血友病 尿路結石	9	AZI/ddC/IDV	290	3.1x10 <sup>5</sup>	2	DIV 9	5100	CAZ	—	軽快	外耳道炎?
61M COPD 細菌性肺炎	69	—	43	4.3x10 <sup>4</sup>	—	DIV 2	4000	CPFX CEZ	—	軽快	?
◆ MRSA											
24M 血友病 劇症肝炎	115	—	0	2.4x10 <sup>5</sup>	3	CV 18	4100	IPM VCM	—	2日後死亡	CV?

※右頬部腫瘍からの菌血症 → 入院時より血液培養5セット連続でMSSAを検出。

極めて難治性ながら、最終的に抗生剤7種と免疫グロブリンを投与し、約1月の経過で軽快した。

[3] その他のグラム陽性菌

◆ E. faecalis											
65M 血友病 感染性血腫	847	AZI/ddI/NVP	141	NDL	—	CV 121	12200	CEZ	CV 除去	軽快	血腫? CV?
◆ S. agalactiae											
24M 血友病 C型肝硬変	85	—	6	2.8x10 <sup>5</sup>	2	—	1800	CEZ	G-CSF	軽快	蜂窩織炎? →脳出血死
◆ Bacillus sp.											
51M クリアトコカス髄膜炎	122	d4T/3TC/RTV/SQM	11	2.0x10 <sup>5</sup>	—	DIV 11	1620	ABPC	G-CSF DIV 除去	軽快	DIV?

表 1-3 菌血症を発症した症例の概要 (3)

[4] 腸内細菌

入院病名	入院 (日)	抗 HIV 薬	CD4 ( $\mu\text{l}$ )	VL ( $\text{ml}$ )	検出 (回)	血管 カテテル	WBC ( $\mu\text{l}$ )	投与した 抗生剤	その他 治療	転帰	感染源
◆ E. coli											
36M かに肺炎 虚血性腸炎	65	—	48	$1.0 \times 10^5$		CV	5630	CAZ		軽快	腸管?
24M 血友病 C型肝硬変	15	—	28	$1.1 \times 10^5$		—	3800	CPFX		軽快	?
24M 血友病 C型肝硬変 *	116	—	7	$8.9 \times 10^4$		CV	8000	ST		4日後死亡	尿路?
◆ K. pneumoniae											
18M 血友病 重症肺炎	486	—	1	$8.2 \times 10^4$		CV	17420	CPZ/SBT CLDM		軽快	胆嚢炎
◆ K. oxytoca											
35F 子宮頸癌 尿路結石	11	EFV/IDV/RTV	6	NDL		DIV	3000	—	DIV 除去	軽快	尿路? DIV?
◆ Salmonella (0-4) *											
37M サルモネラ菌血症 糞線虫 (ナイジェリア出身)	1	—	4	$5.0 \times 10^5$		—	4000	CTX CPFX TFLX		ナイジェリア帰国後 1月で死亡	
(0-9)											
19M 血友病 サルモネラ菌血症	1	d4T/3TC/RTV/SQV	216	$4.3 \times 10^4$		—	6900	CPFX 9ヶ月		軽快	
34M A型肝炎	10	—	731	$1.6 \times 10^6$		—	6100	CPFX 6ヶ月		軽快	

※ 血友病、HCVによる肝機能障害のため入院。途中脳出血を起こし、その3日後の血液培養から大腸菌が検出された。  
尿路感染を疑われたが脳出血の状態も悪く、4日後に死亡している。

\* Salmonella 3例はいずれも non-typhi type.

表 1-4 菌血症を発症した症例の概要 (4)

[5] アドノ糖非発酵グラム陰性桿菌

入院病名	入院 (日)	抗 HIV 薬	CD4 ( $\mu\text{l}$ )	VL ( $\text{ml}$ )	検出 (回)	血管 カテテル	WBC ( $\mu\text{l}$ )	投与した 抗生剤	その他 治療	転帰	感染源
◆ P. aeruginosa											
30M 肺肉腫 リンパ腫	52	—	12	$1.3 \times 10^5$		CV	2110	IPM	G-CSF	2日後死亡	腸管? (ChOP5 日目)
36M かに肺炎 両側気胸	61	—	52	$3.7 \times 10^5$	2	CV	21600	IPM AMK OFLX	IVIg	7日後死亡	尿
40M CMV 肺炎 MAC	46	(2日前まで)	6	NDL		CV	3400	CAZ PAPM TOB		DIC後 軽快 →脳リンパ腫死	尿
63M 血友病 感染性血腫	135	AZI/ddI	285	NDL		CV	29900	IPM		軽快	感染性血腫
◆ Acinetobacter sp.											
68M MAC CMV DM 腎不全	88	—	13	$1.1 \times 10^4$		DIV	2000	CAZ	DIV 除去	軽快	DIV?
◆ Bur. cepacia											
22M 血友病 MAC	3	—	162	$1.1 \times 10^5$		DIV	4300	—	DIV 除去	軽快	DIV?

[6] 真菌

◆ Candida albicans											
47M かに肺炎	12	—	2	$1.5 \times 10^5$		CV	19800	FLCZ	CV 除去	6日後死亡	CV? (12日目)
◆ Candida tropicalis											
45M アーバー肝臓癌 筋膜炎	17	—	25	$2.4 \times 10^5$	3	CV	6930	FLCZ	CV 除去	軽快→ヘルペス肺炎死	壊死性筋膜炎?
◆ Candida glabrata											
45M アーバー肝臓癌 筋膜炎	67	—	75	$9.2 \times 10^3$	2	CV	19420	FLCZ AMPH	CV 除去	軽快→ヘルペス肺炎死	壊死性筋膜炎?
◆ Crypto. neoformans											
39M クリアトコカ症 MAC	1	—	12	$1.1 \times 10^5$	3	—	3700	AMPH FLCZ		軽快	

[CVライン留置期間] 10~122日 (中央値 28日)



図2 中心静脈カテーテルを留置後、血液培養からコアグラーゼ陰性ブドウ球 (CNS)が検出されるまでの期間 (患者8名, 計12回のエピソード)

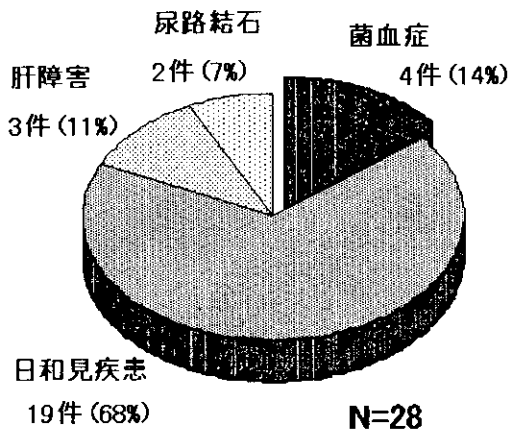


図3 入院理由

菌血症による入院は、28件中4件(14%)のみであった。  
菌血症38のエピソードのうち、院内発症例が34件(89%)を占めた。

免疫グロブリン製剤を投与して、約1月の経過で改善を認めた。

MRSAの1例は中心静脈カテーテル由来の感染と推定され、2日後に死亡に至った。

[Salmonella]

ナイジェリア人1例を含む計3例から検出され、いずれも Nontyphoidal Salmonellaであった。3例中2例は「入院時」、1例は「A型肝炎で入院後10日目」の血液培養から検出された。ナイジェリア人の1例はTFLXで加療しつつ入院3ヶ月時点で帰国したが、その後約1月の経過で死亡した。日本人2例ではCPFXを6~9ヶ月内服し再発を認めなかった。

[Pseudomonas aeruginosa]

緑膿菌は計4例で検出され、悪性リンパ腫で化学療法施行中の1例を含む計2例が7日以内に死亡に至った。他の1例でもDIC、敗血症性ショックの合併を認めた。

[真菌]

カンジダ血症を3件認め、中心静脈カテーテル由来の感染と思われる *Candida albicans* の1例が6日後に死亡した。また入院時から血液培養3セット連続で *Cryptococcus neoformans* を検出し、播種性クリプトコッカス症と診断したウガンダ人の1例では、Amphotericin Bを2週間投与して全身状態が改善を示した後にFLCZで維持療法を行い、入院2ヶ月の時点で帰国となった。

(3) 菌血症発症患者の臨床的背景

[入院理由]

菌血症による入院例(市中発症の菌血症)は、MSSA 1件、Salmonella 2件、Cryptococcus 1件の計4件で、入院全28件の14%(菌血症全38件の11%)を占めた。その他は、重篤な日和見疾患等で入院した後の“合併症”(院内発症)として菌血症を発症した。(図3)

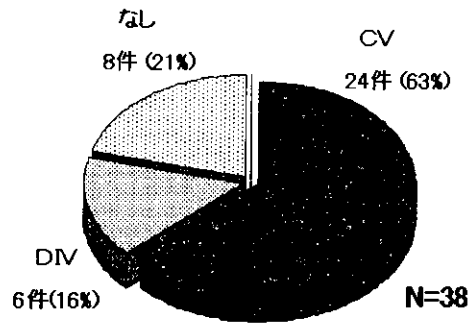


図4 血管内カテーテルの留置状況

菌血症38のエピソードのうち、中心静脈カテーテル留置例が24件(63%)を占めた。

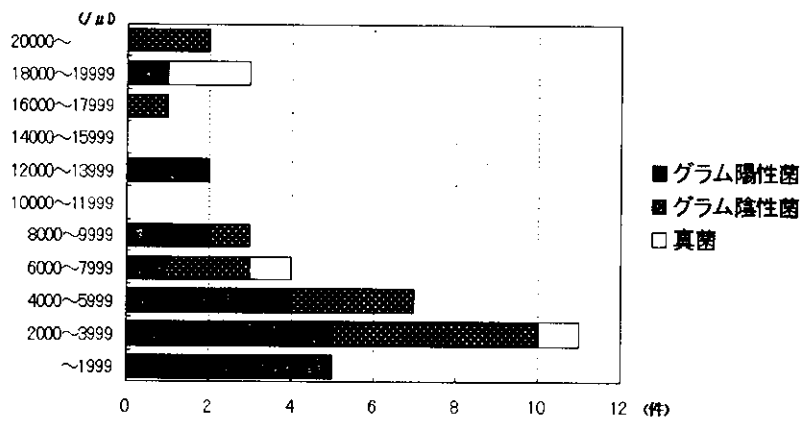


図5 菌血症発症時の白血球数

2000/ $\mu\text{m}^3$ 未満が38件中5件(13%), 4000/ $\mu\text{m}^3$ 未満が16件(42%)を占めた。

"白血球数の少ない例でグラム陽性菌による菌血症が多い"という傾向は必ずしもみられなかった。

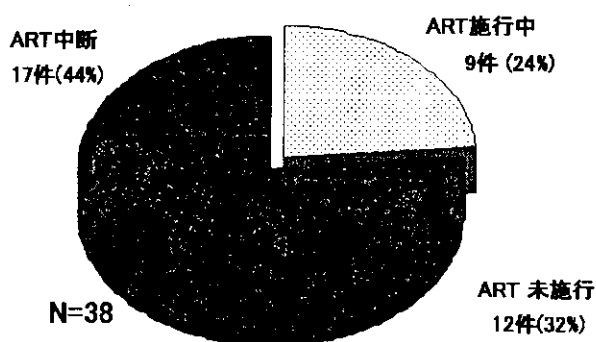


図6 抗HIV療法(ART)の施行状況

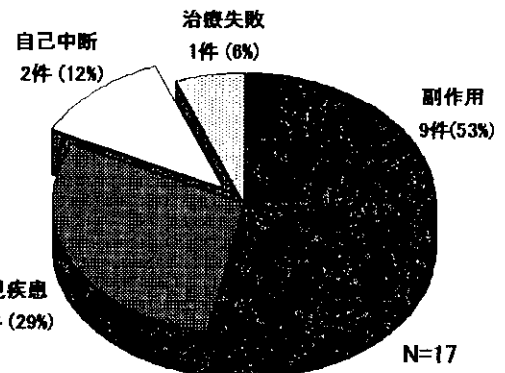


図7 抗HIV療法(ART)が中断された理由