

- Typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. 8th International Conference of Cryptococcus & Cryptococcosis(チャールストン), 2011
3. Tashiro M, Hosogaya N, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Tashiro M and Kohno S: Antifungal susceptibilities of *Aspergillus fumigatus* and sequence of *cyp51A* gene of azole-resistant isolates in Nagasaki, Japan. 21st ECCMID(ミラノ), 2011
 4. Miyazaki T, Nagayoshi Y, Izumikawa K, Tashiro M, Kohno S: Functional Characterization of Endogenous Regulators of Calcineurin in *Candida glabrata*. 21st ECCMID(ミラノ), 2011
 5. Nagayoshi Y, Miyazaki T, Izumikawa K, Tashiro M, Takazono T, Kohno S: Functional characterization of the Slt2-regulated transcription factors, Rlm1 and SBF, in *Candida glabrata*. 21st ECCMID(ミラノ), 2011
 6. Izumikawa K and Kohno S: Respiratory mycoses - pulmonary aspergillosis: pathogenesis and treatment. IUMS 2011(サッポロ), 2011
 7. Kawaguchi Y, Izumikawa K, Hirayama T, Ide S, Mihara T, Saijyo T, Takazono T, Tashiro M, Morinaga Y, Nakamura S, Yamamoto K, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Umeyama T, Ohno H, Miyazaki Y and Kohno S: Multilocus Sequence Typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. APSR 2011 (シャーンハイ), 2011
 8. Yamada K, Yanagihara K, Araki N, Harada Y, Morinaga Y, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kamihira S and Kohno S: *In vivo* efficacy of biapenem in a murine model mimicking ventilator-associated pneumonia with *Pseudomonas aeruginosa*. ASM 2011(ニューオリンズ), 2011
 9. ASM 2011(ニューオリンズ)Harada Y, Yanagihara K, Araki N, Yamada K, Morinaga Y, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kamihira S and Kohno S: Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase(ESBL) producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the Nagasaki University Hospital. ASM 2011(ニューオリンズ), 2011
 10. Yamada K, Yanagihara K, Araki N,

Harada Y, Morinaga Y, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Hasegawa S, Kamihira S and Kohno S: *In vivo* biapenem with ME1071, a novel metallo- β -lactamase inhibitor, in a murine model mimicking ventilator-associated pneumonia with metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. ICAAC 2011(シカゴ), 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

特許取得
特記事項なし

実用新案登録
特記事項なし

その他
特記事項なし

11. Harada Y, Yanagihara K, Araki N, Yamada K, Morinaga Y, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Kamihira S and Kohno S : Efficacy of Daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA)in a mouse model of haematogenous pulmonary infection. ICAAC 2011(シカゴ), 2011

国内学会

1. 泉川公一, 呼吸器感染症の検査診断法の再検討「喀痰検査・迅速検査」, 第85回日本感染症学会総会, 東京, 2011
2. 泉川公一, カンジダ症の疫学と病原因子解析, 第59回日本化学療法学会総会, 札幌, 2011
3. 泉川公一, クリプトコックス症の臨床と分子疫学研究, 第55回日本医真菌学会総会, 東京, 2011
4. 泉川公一, カンジダ症の臨床的問題点と当科の取り組み, 第55回日本医真菌学会総会, 東京, 2011
5. 泉川公一, 嚢胞性線維症と吸入療法の可能性, 第67回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部秋季学術講演会, 福岡, 2011

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「地域流行型真菌症の疫学調査、診断治療法の開発に関する研究」班
分担研究報告書

移植等の易感染性患者に発症する深在性真菌症の臨床疫学的研究

研究分担者	高倉俊二	京都大学医学研究科	臨床病態検査学
研究協力者	長尾美紀	京都大学医学研究科	臨床病態検査学
	山本正樹	京都大学医学研究科	臨床病態検査学
	一山 智	京都大学医学研究科	臨床病態検査学

研究要旨 現代の医療が発症リスクに密接に関連し増加が見込まれる深在性真菌症は、診断や抗真菌薬の進歩に伴ってその疫学（患者背景・菌種・薬剤感受性）には大きな変化がみられる。入院中の易感染性患者における真菌血症の菌種の変化、合併症としての真菌性眼内炎の発症に関する疫学解析を行った。非カンジダ真菌血症の予測・予後に関する因子として細胞性免疫抑制の重要性、カンジダ眼内炎の発症に関する菌種（*Candida albicans*）と血中 β -Dグルカンとの関わりが明らかとなった。

A. 研究目的

- (1) 酵母様真菌感染症の疫学を現在の医療状況に合うように更新する。
- (2) カンジダ血流感染の菌種分布、アゾール・キャンディン感受性、非カンジダの発生数、相対頻度を確認し、耐性カンジダ、非カンジダ酵母様真菌の発症リスク因子や早期診断のための因子を同定する。

B. 研究方法

1. 非カンジダ酵母様真菌に注目した真菌血症の予後因子の解析

2004年～2009年までの京都大学病院における全ての真菌血症症例をレビューし、臨床背景、発症時の病態、菌種、治療と予後を統計解析し、非カンジダ真菌血症の予測因子、予後因子を検索した。

2. カンジダ血症における真菌性眼内炎の発症に関連する因子の解析

2006年～2010年までの京都大学病院における全てのカンジダ血症症例をレビュー

し、臨床背景、発症時の病態、菌種と真菌性眼内炎の有無について検索し、真菌性眼内炎の発生率、発症予測因子について統計解析を行った。

C. 研究結果

1. 非カンジダ酵母様真菌に注目した真菌血症の予後因子の解析

6年間に認めた125例の真菌血症症例中11例（8.8%）が非カンジダ攻防様真菌であった。*Cryptococcus neoformans* 6例、*Trichosporon asahii* 4例、*Pichia ohmeri* 1例で、30日生存率は54.5%とカンジダ血症の20.2%より有意に高かった。ステロイド投与、血液透析、SOFAスコア高値、他部位からの検出歴が非カンジダ真菌血症の発症に関連し、ステロイド投与、血液透析は独立した死亡予測因子でもあった。

2. カンジダ血症における真菌性眼内炎の発症に関連する因子の解析

5年間で認めた124例中96症例で眼科的

精査が行われ、25例の真菌性眼内炎(20.2%、精査した患者では26.0%)の発症率であった。*C. albicans*であること、血中 β -Dグルカンが高値であることが眼内炎合併に関連する有意な独立した因子であった。

D. 考察

非カンジダ真菌血症が細胞性免疫抑制状態においてカンジダ血症に比較してより重症で死亡率の高い合併症として発症し、菌種別の臨床的予測と抗真菌治療の選択の重要性が示唆された。また、カンジダ眼内炎は診断と治療の進歩した今なお高頻度に発症しており眼科精査の不可欠であること、菌種、 β -Dグルカン測定により高リスクを予測できることが明らかとなった。

E. 結論

酵母様真菌血症は臨床背景の複雑化、免疫抑制治療の進歩により様々な原因真菌、病態が予後に大きく左右する。早期の治療介入を推進するべく臨床的な予測因子、予後因子の解析を進めることが必要である。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

国際学会

1. Takakura S. Changing Epidemiology of Nosocomial Yeast Fungemia. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, 2011

国内学会

1. 子安聡子、長尾美紀、堀田剛 他. *Candida*血症における眼内炎発症のリスク因子に関する検討. 第54回日本感染症学会中日本地方会学術集会. 2011年.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

*Cryptococcus gattii*の免疫原性と診断応用の研究

研究分担者	金子幸弘	国立感染症研究所	生物活性物質部
研究協力者	大野秀明	国立感染症研究所	生物活性物質部
	大川原明子	国立感染症研究所	生物活性物質部
	金城雄樹	国立感染症研究所	生物活性物質部
	上野圭吾	国立感染症研究所	生物活性物質部

研究要旨 クリプトコックス症の病原性解明のため、*in vivo*および*in vitro*の解析を行った。*in vivo*の解析では、*Cryptococcus neoformans*と比較し、有意に*Cryptococcus gattii*の平均生存日数が短縮しており、*C. gattii*の臨床的な高病原性を反映する結果となった。一方、免疫と病原性との関連を解析するため、hydrocortisoneによる免疫抑制マウスを作製し比較したが、有意な相違は見られなかった。また、死菌ワクチンを用いた検討では、免疫の誘導に、莢膜の有無が一部関与している結果となった。*in vitro*での解析では、*C. gattii*は、*C. neoformans*に比べて、樹状細胞の免疫応答を刺激しにくく、*in vivo*での病原性に寄与している可能性が示唆された。また、診断応用を目的とした、新規技術による検出系の検討を開始した。

A. 研究目的

*Cryptococcus neoformans*は、HIV 感染症などの細胞性免疫不全者に感染しやすく、重篤化しやすいが、*Cryptococcus gattii*は、健常人での感染例も多く、宿主の免疫状態との関連性は不明である。*C. gattii*の病原性を知る上で、感染免疫に関する基礎的検討はきわめて重要である。

本研究では、*C. gattii*の病原性を免疫学的視点から解明することを目的として、*in vivo*および*in vitro*での検討を行った。また、診断応用を目的とした、新規技術による検出系の検討も開始した。

B. 研究方法

1. *C. gattii*の病原性および免疫原性

① 免疫不全状態における病原性

モデル動物として、8 週齢、メス、C57BL/6 マウスを用い、菌株は *C. neoformans* H99 株および *C. gattii* JP01 株を用いた。健常マウスおよび hydrocortisone により免疫抑制状態にしたマウスに、経気道的に菌を接種し、生存期間を比較した。

② 免疫における莢膜の関与

菌株は *C. gattii* 5815 株を用い、高浸透圧の培地を用いて、莢膜産生を抑制した菌 Cap(-)と、通常の培地で培養した莢膜を有する菌 Cap(+)を作製した。両者を加熱処理(60℃、1 時間)にて不活化した死菌を C57BL/6 マウスの腹腔内に投与した。また、コントロールとしてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を投与した。その 10 日後に、5815 株の生菌を経気道的に感染させ、感染 14 日

目の肺内生菌数を比較した。

③ in vitro での免疫応答

C57BL/6 の樹状細胞(JAWSII 細胞)に、*C. neoformans* H99 株および *C. gattii* JP01 株の死菌を接種し、数時間後の培養上清中に産生される IL-12 および IL-6 を ELISA で測定した。また、LPS 刺激によるサイトカイン産生への影響も検討した。

2. 新規技術による検出系の検討

飛行時間型質量分析装置(TOF-MS)やガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS)といった新規技術を使った特定分子の検出系が開発され、微生物の分野でもその有用性が期待されている。今回は、先駆的な手法として、質量分析装置を病理に応用した質量顕微鏡および GC-MS を用いた揮発性ガス検出の有用性を検討した。

C. 研究結果

1. *C. gattii* の病原性および免疫原性

① 免疫不全状態における病原性

平均生存日数は、*C. neoformans* H99 株の 34.9 日に対し、*C. gattii* JP01 株は 22.3 日と有意に短縮しており、in vivo での病原性の相違が明らかとなった。一方、hydrocortisone による免疫抑制状態は、いずれの菌株においても、生存曲線に影響しないことも判明した(図 1)。

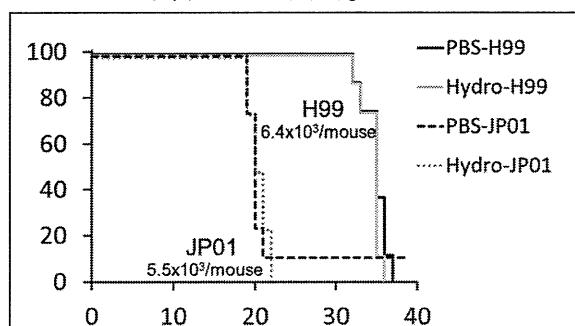


図 1 *C. neoformans* H99 株および *C. gattii* JP01 株に感染したマウスの生存率および hydrocortisone による免疫抑制の影響

② 免疫における莢膜の関与

莢膜を有する菌体ワクチン Cap(+)は、莢膜のない菌体ワクチン Cap(-)よりも、肺内生菌数を低下させる点において、ワクチン効果が優れていたが、その差はわずかであった(図 2)。

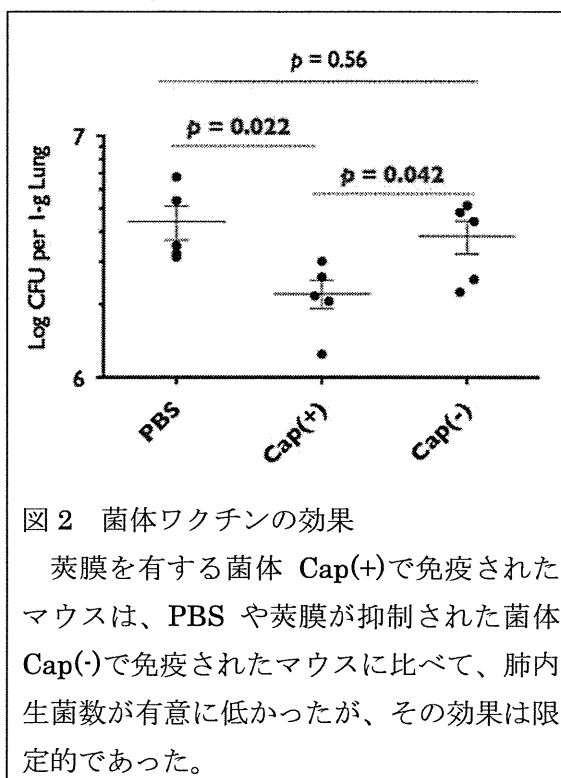


図 2 菌体ワクチンの効果

莢膜を有する菌体 Cap(+)で免疫されたマウスは、PBS や莢膜が抑制された菌体 Cap(-)で免疫されたマウスに比べて、肺内生菌数が有意に低かったが、その効果は限定的であった。

③ in vitro での免疫応答

JAWSII 細胞を、*C. neoformans* H99 株と *C. gattii* JP01 株の死菌で刺激しても、IL-12 はほとんど産生されず、両者の比較はできなかった。一方、IL-6 の産生は、H99 株では、コントロール(no yeast, no LPS)と比べて有意に高く、JP01 株では、コントロールと同等であった(図 3 左)。また、両者の死菌は、LPS 刺激により誘導された IL-6 産生をやや低下させる傾向にあったが、有意差はなかった(図 3 右)。

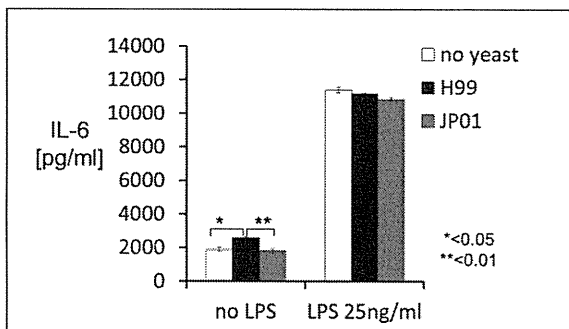


図3 *C. neoformans* および *C. gattii* の死菌および LPS 刺激による IL-6 産生の変化

2. 新規技術による検出系の検討

マウスの腎臓を用いて検討した結果、質量顕微鏡が、分子分布の解析に有用であることが確認された (図4)。

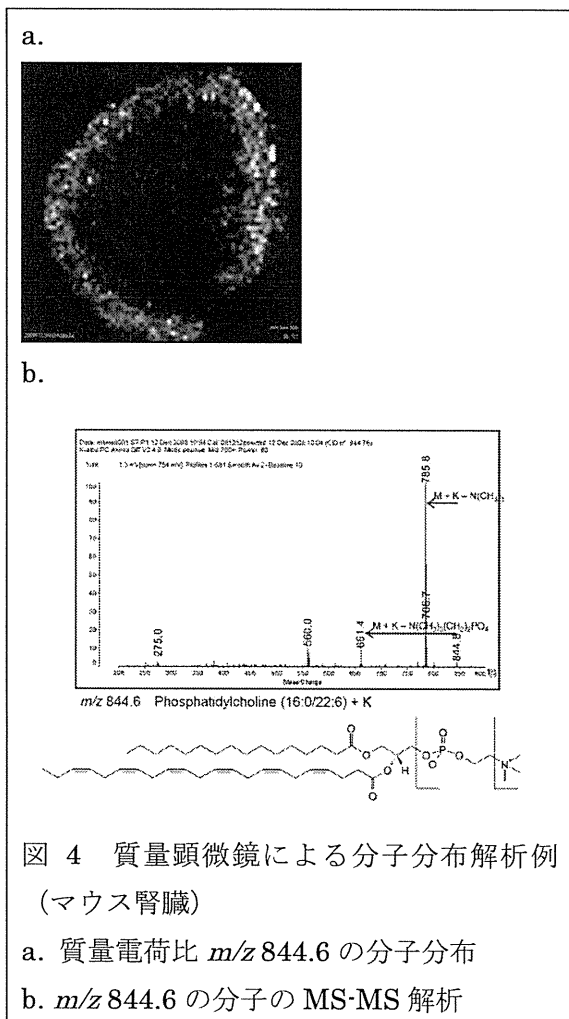


図4 質量顕微鏡による分子分布解析例 (マウス腎臓)

a. 質量電荷比 m/z 844.6 の分子分布

b. m/z 844.6 の分子の MS-MS 解析

また、非侵襲的な検査法として、GC-MS を用いた呼気の測定に関する予備検討を開始した。

D. 考察

クリプトコックス症は、免疫不全者における発病が多く、また重篤化しやすいことが知られているが、*C. gattii* の免疫不全者における病原性については明らかにされていない。今回の検討で、hydrocortisone による免疫抑制では、病原性に変化を及ぼさないことが明らかとなったが、CD4 欠損などの特異的な細胞性免疫状態における病原性の変化についても、さらに検討する必要がある。また、*C. gattii* は、厚い莢膜を有するが、莢膜の免疫防御能に与える影響については現在まで諸説あり、一定していない。死菌ワクチンを用いた検討の結果、in vivo での免疫応答には、莢膜の有無がある程度寄与していることが示唆された。

in vitro での解析では、高病原性の *C. gattii* は、*C. neoformans* に比べて、免疫を誘導しにくく、このことが病原性に寄与している可能性が示唆された。

また、診断系の新技術として、質量分析装置を組み合わせた検出系の有用性が期待される結果となった。

E. 結論

C. gattii の病原性には、*C. neoformans* とは異なる宿主側の免疫が関与していることが推測された。今後は、診断や治療に応用可能な要因を詳細に検討する必要がある。

診断法の開発では、新規技術による検出系の発展が期待される結果となった。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

英文論文

1. Kinjo Y, Illarionov PA, Vela JL, Pei B, Girardi E, Li X, Li Y, Imamura M, Kaneko Y, Okawara A, Miyazaki Y, Gomez-Velasco A, Rogers P, Dahesh S, Uchiyama S, Khurana A, Kawahara K, Yashilkaya H, Andrew PA, Wong CH, Kawakami K, Nizet V, Besra GS, Tsuji M, Zajonc DM, Kronenberg M. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat Immunol.* 12:966-974, 2011.
2. Kaneko Y, Obata Y, Nishino T, Kakeya H, Miyazaki Y, Hayasaka T, Setou M, Furusu A, Kohno S. Imaging mass spectrometry analysis reveals an altered lipid distribution pattern in the tubular areas of hyper-IgA murine kidneys. *Exp Mol Pathol.* 91:614-621, 2011.

和文論文

1. 金子幸弘, 宮崎義継. 新版 感染症診療実践ガイド 有効な抗菌薬の使い方のすべて VI. 主な感染症に対する実地医科の抗菌薬使用の実際/A. 主要感染症から見た抗菌薬の選択と使用の実際 43. カンジダ症, アスペルギルス症, クリプトコックス症. *M. P. Medical Practice臨時増刊号.* 28:483-490, 2011.
2. 宮崎義継, 金子幸弘. 新版 感染症診療実践ガイド 有効な抗菌薬の使い方のすべて II. 抗菌薬の特徴とそれに基づいた使い方のコツとポイント 11. 抗真菌薬. *M. P. Medical Practice臨時増刊号.* 28:137-141, 2011.
3. 金子幸弘, 宮崎義継. 特集・病原真菌と真菌症の新たな理解に向けて 臨床 4. 深在性真菌症診断の現状と今後の展望. 化学療法領域. 28:89-97, 2012.
4. 金子幸弘, 宮崎義継. 4章 真菌感染症 4-3 コクシジオイデス症. 感染症事典編集委員会編. 感染症事典. p251-254, 2012年, オーム社, 東京.

学会発表

国際学会

1. Kinjo Y, Illarionov PA, Vela JL, Pei B, Li XJ, Kaneko Y, Miyazaki Y, Nizet V, Kawakami K, Tsuji M, Kronenberg M. NKT cells recognize glycolipids from *Streptococcus pneumoniae* and GBS. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011). September

6-10, 2011, Sapporo.

2. Kaneko Y, Ohno H, Miyazaki Y. Farnesol attenuates the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011). September 6-10, 2011, Sapporo.

国内学会

1. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida albicans*の代償機構の解明とその制御による治療の可能性. 第108回日本内科学会. 4月17-18日, 2011年, 東京.
2. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. カンジダバイオフィームにおけるストレス応答とその阻害効果. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月21-22日, 2011年, 東京.
3. 金城雄樹, 金子幸弘, 樽本憲人, 大川原明子, 川上和義, 宮崎義継. 自然リンパ球による肺炎球菌認識機構の解析. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月21-22日, 2011年, 東京.
4. 大野秀明, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 宮崎義継. 遺伝子診断法を用いた土壤中に生息するヒストプラズマ属検出の試み. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月21-22日, 2011年.
5. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida*バイオフィームにおける抗真菌薬耐性関連遺伝子の発現調節. 第32回関東医真菌懇話会学術集会. 5月21日, 2011年, 東京.
6. 山越 智, 梅山隆, 田辺公一, 金子幸弘, 橋本ゆき, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus*属分泌蛋白質を標的にしたサンドイッチELISA法によるアスペルギルス症診断系構築の試み. 第32回関東医真菌懇話会学術集会. 5月21日, 2011年, 東京.
7. 田辺公一, 大野秀明, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 金城雄樹, 杉田隆, 畠山修司, 亀井克彦, 宮崎義継. 国立感染症研究所における地域流行型真菌症への対応と現状. 第32回関東医真菌懇話会学術集会. 5月21日, 2011年, 東京.
8. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida albicans*のbiofilmにおける抗真菌薬に対する代償性の遺伝子発現. 第59回日本化学療法学会総会. 6月23-25日, 2011年, 東京.
9. 大野秀明, 田辺公一, 杉田隆, 畠山修司, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 亀井克彦, 宮崎義継. 国内で初めて分離されたVGIIa型 *Cryptococcus gattii*株の

- 薬剤感受性と病原性についての検討. 第59回日本化学療法学会総会. 6月23-25日, 2011年.
10. 大野秀明, 田辺公一, 梅山 隆, 金子幸弘, 山越 智, 宮崎義継. クリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*). 衛生微生物技術協議会第32回研究会. 6月29-30日, 2011年.
 11. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida albicans*に対する既存薬と抗真菌薬との併用効果についての検討. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
 12. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. フルコナゾール感受性調整物質の探索. 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同集会. 10月26-28日, 2011年, 山形.
 13. 山越 智, 梅山 隆, 田辺公一, 金子幸弘, 橋本ゆき, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus*の分泌蛋白質B-11およびそのホモログの検出系と病原性について. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
 14. 大野秀明, 大川原明子, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 泉川公一, 藤井 毅, 竹村 弘, 岸 一馬, 河野 茂, 宮崎義継. 日本国内で分離された *Cryptococcus* 属臨床分離株の血清型解析と抗真菌薬に対する感受性動向. ワークショップ3 深在性真菌症の新たな展開—重症例、難治症例の病態と治療—. 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同集会. 10月26-28日, 2011年, 山形.
 15. 大野秀明, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 杉田 隆, 畠山修司, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. 本邦初の北米流行型 *Cryptococcus gattii* 臨床分離株の実験的病原性解析. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
 16. 田辺公一, 大野秀明, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 金城雄樹, 杉田 隆, 畠山修司, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 国内分離株の病原因子解析. 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同集会. 10月26-28日, 2011年, 山形.
 17. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. 抗真菌併用薬探索を目的とした既知化合物ライブラリースクリーニング. 2011年インターラボセミナー(日本細菌学会関東支部). 12月10日, 2011年, 東京.
 18. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. 緑膿菌における quorum sensing 欠損株とホモセリンラクトナーゼ aiiM 誘導株の病原性比較. 第53回緑膿菌感染症研究会. 2月17-18日, 2012年, 東京.
 19. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. アゾール薬との併用薬の探索. 真菌症フォーラム第13回学術集会. 2月18日, 2012年, 東京.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
- 特許取得
特記事項なし
- 実用新案登録
特記事項なし
- その他
特記事項なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Okubo Y, Shinozaki M, Wakayam a M, Nakayam a H, Sasai D, Ishiwatar i T, Nemoto T, Shibuya K	Applied Gene Histopathology: Identification of <i>Fusarium</i> species in tissue sections by In situ hybridization	Editors: Louise O'Connor and Barry Glynn	Fungal Diagnostics; Methods and Protocols	Humana Press	New York (in press)		

著者氏名	論文タイトル名	雑誌名	巻	ページ	出版年
Kaneko Y, Obata Y, Nishino T, Takeya H, Miyazaki Y, Hayasaka T, Setou M, Furusu A, Kohno S	Imaging mass spectrometry analysis reveals an altered lipid distribution pattern in the tubular areas of hyper-IgA murine kidneys	Exp Mol Pathol	91	614-621	2011
Miyazaki T, Izumikawa K, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Yasuoka A, Kohno S	The glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl protease Yps1 is transcriptionally regulated by the calcineurin-Crz1 and Slt2 MAPK pathways in <i>Candida glabrata</i>	FEMS Yeast Res	11	449-456	2011
Tomita H, Muroi E, Takenaka M, Nishimoto K, Takeya H, Ohno H, Miyazaki Y, Utani A	<i>Rhizomucor variabilis</i> infection in human cutaneous mucormycosis	Clin Exp Dermatol	36	312-314	2011
堀内一宏, 山田萌美, 白井慎一, 高橋育子, 加納崇裕, 金子幸弘, 秋沢宏次, 梅山 隆, 宮崎義継, 矢部一郎, 佐々木秀直	脳室内抗真菌薬投与が奏効した <i>Cryptococcus gattii</i> による脳および肺クリプトコックス症の1例	臨床神経学			in press
Shimamura T, Kubota N, Nagasaka S, Suzuki T, Mukai H, Shibuya K	Establishment of a Novel Model of Onychomycosis in Rabbits for Evaluation of Antifungal Agents	Antimicrob Agents Chemother	55(7)	3150-3155	2011
杉田 隆, 池田玲子, 西川朱實, Nanthawan Mekha, Natteewan Poonwan, Pathom Sawanpanyalert	アゾール薬に低感受性を示す新興深在性真菌症トリコスポロン症起因菌 <i>Torichosporon asahii</i> 株に対する amphotericin B の効果 - Time-kill 法による評価 -	臨床と微生物	38	93-98	2011

Shimodaira K, Okubo Y, Nakayama H, Shinozaki M, Sasai D, Takahashi K, Saji T, Shibuya K	Trends in incidence of invasive fungal infections emerged from analysis of annual records of autopsy cases of Toho University	Mycoses				in press
笹井大督, 石渡 誉朗, 大久保陽 一郎, 井手忠, 根本哲生, 若山 恵, 渋谷和俊	環境由来カビによる 感染症の診断	かびと生活	4	113-119	2011	
Kohno S, Izumikawa K, Kakeya H, Miyazaki Y, Ogawa K, Amitani R, Niki Y, Kurashima A	Clinical efficacy and safety of micafungin in Japanese patients with chronic pulmonary aspergillosis: a prospective observational study	Med Mycol	49(7)	688-693	2011	
Tashiro T, Izumikawa K, Tashiro M, Takazono T, Morinaga Y, Yamamoto K, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Kohno S	Diagnostic significance of <i>Aspergillus</i> species isolated from respiratory samples in an adult pneumology ward	Med Mycol	49(6)	581-587	2011	

Tashiro M, Izumikawa K, Minematsu A, Hirano K, Iwanaga N, Ide S, Mihara T, Hosogaya N, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Kurihara S, Imamura Y, Miyazaki T, Nishino T, Tsukamoto M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Tashiro T, Kohno S	Antifungal susceptibilities of <i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i> clinical isolates in Nagasaki, Japan	Antimicrob Agents Chemother	56(1)	584-587	2011
Takazono T, Izumikawa K, Nagayoshi Y, Tanaka A, Mihara T, Kosai K, Saijo T, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kamihira S, Kohno S	Evaluation of the Cica Fungi Test <i>Candida</i> , a novel serum <i>Candida</i> mannan antigen kit, and its comparison with Cand-Tec in candidemia patients	Jpn J Infect Dis	64(2)	116-120	2011
Miyazaki T, Izumikawa K, Nagayoshi Y, Saijo T, Yamauchi S, Morinaga Y, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S	Functional characterization of the regulators of calcineurin in <i>Candida glabrata</i>	FEMS Yeast Res	11(8)	621-630	2011

Tashiro M, Kimura S, Tateda K, Saga T, Ohno A, Ishii Y, Izumikawa K, Tashiro T, Kohno S, Yamaguchi K	Pravastatin inhibits farnesol production in <i>Candida albicans</i> and improves survival in a mouse model of systemic candidiasis	Med Mycol				Epub ahead of print
Kobayashi T, Takeya H, Miyazaki T, Izumikawa K, Yanagihara K, Ohno H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S	Synergistic antifungal effect of lactoferrin with azole antifungals against <i>Candida</i> <i>albicans</i> and a proposal for a new treatment method for invasive candidiasis	Jpn J Infect Dis	64(4)	292-296	2011	
泉川公一	アスペルギルスの薬 剤耐性機序に関する 疫学研究と治療法の 最適化研究	Japanese Journal of Antibiotics	64(1)	22-34	2011	
掛屋弘, 今村圭 文, 宮崎泰可, 泉川公一, 山本 善裕, 田代隆良, 河野茂	慢性真菌感染症, 最新 の知見	感染症学雑誌	85(4)	333-339	2011	

Antifungal Susceptibilities of *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates Obtained in Nagasaki, Japan

Masato Tashiro,^a Koichi Izumikawa,^a Asuka Minematsu,^a Katsuji Hirano,^a Naoki Iwanaga,^a Shotaro Ide,^a Tomo Mihara,^a Naoki Hosogaya,^{a,b} Takahiro Takazono,^a Yoshitomo Morinaga,^c Shigeki Nakamura,^a Shintaro Kurihara,^d Yoshifumi Imamura,^a Taiga Miyazaki,^a Tomoya Nishino,^a Misuzu Tsukamoto,^d Hiroshi Kakeya,^a Yoshihiro Yamamoto,^a Katsunori Yanagihara,^c Akira Yasuoka,^d Takayoshi Tashiro,^e and Shigeru Kohno^a

Department of Molecular Microbiology and Immunology^a and Department of Health Sciences,^e Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, and Department of Laboratory Medicine^c and Nagasaki University Infection Control and Education Center,^d Nagasaki University Hospital, Nagasaki, Japan, and Department of Internal Medicine II, University of Yamanashi, Chuo, Japan^b

We investigated the triazole, amphotericin B, and micafungin susceptibilities of 196 *A. fumigatus* clinical isolates in Nagasaki, Japan. The percentages of non-wild-type (non-WT) isolates for which MICs of itraconazole, posaconazole, and voriconazole were above the ECV were 7.1%, 2.6%, and 4.1%, respectively. A G54 mutation in *cyp51A* was detected in 64.2% (9/14 isolates) and 100% (5/5 isolates) of non-WT isolates for itraconazole and posaconazole, respectively. Amphotericin B MICs of ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ and micafungin minimum effective concentrations (MECs) of ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ were recorded for two and one isolates, respectively.

The clinical importance of *Aspergillus* infection has increased as the number of immunocompromised patients has risen (16). Antifungals recommended for treatment of patients with invasive pulmonary aspergillosis (IPA) or chronic pulmonary aspergillosis (CPA) are triazoles, amphotericin B, and echinocandins (13, 15, 37). Patients with CPA often need years of treatment (13, 37). Although oral therapy is important for carrying out long courses of treatment, azoles (with the exception of fluconazole) are the only class of oral drugs licensed for the treatment of aspergillosis (14, 37).

Aspergillus fumigatus is the most common and pathogenic species of *Aspergillus* (34, 37). Antifungal resistance of *A. fumigatus*, especially to azoles, is one of the concerns in treatment of aspergillosis. During the last decade, many cases of treatment failure due to azole-resistant *Aspergillus* infection have been reported, and in the past few years a growing body of papers about antifungal susceptibilities of *A. fumigatus* has been accumulating (1, 3–6, 9, 10, 12, 18, 23–27, 31–33, 35, 36). Even though an increased rate of azole resistance has been reported recently in the Netherlands and the United Kingdom, the prevalence of azole resistance reportedly remains low in other countries (1, 3, 6, 9, 12, 23, 25, 33).

The azole target protein lanosterol 14 α -demethylase of *Aspergillus* is encoded by the *cyp51A* gene, and mutations of *cyp51A* are a major mechanism of azole resistance (8, 17, 19, 20, 22, 32). Some mutational hotspots, such as G54, M220, and TR/L98H, have been identified as causes of azole resistance (2, 21, 22). Of these mutations, TR/L98H is especially prevalent in the Netherlands. An environmental origin (resulting from agricultural antifungal drug usage) is suspected, in spite of the fact that the mechanism(s) of mutation induction has not been shown definitively (24, 31, 32).

We studied the antifungal susceptibility of 196 *A. fumigatus* clinical isolates obtained in the Pneumology Department of Nagasaki University Hospital, Nagasaki, Japan. The isolates were collected between February 1994 and April 2010. All of the isolates were subjected to susceptibility testing and *cyp51A* sequence analysis. All isolates were identified as *A. fumigatus* by macroscopic colony morphology, micromorphological characteristics, and the ability to grow at 48°C. Non-wild-type (non-WT) isolates were

subjected to additional molecular identification by amplification of ribosomal internal transcribed spacers (ITSs) and ribosomal large-subunit D1–D2 sequencing as described previously (11). MICs of itraconazole, posaconazole, voriconazole, and amphotericin B and minimum effective concentrations (MECs) of micafungin were determined using the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M38–A2 broth microdilution method. Assays were performed using RPMI 1640 broth (0.2% dextrose), final inoculum concentrations ranging from 0.4×10^4 to 5×10^4 CFU/ml, and 48 h of incubation at 35°C (7). The MIC was defined as the lowest drug concentration that produced complete growth inhibition; the MEC was read as the lowest concentration of drug that led to the growth of small, rounded, compact hyphal forms compared to the hyphal growth seen in the control well. Susceptibility tests of non-WT isolates were performed at least three times for each isolate; each test was performed on different days. Because clinical breakpoints have not been established yet, we used epidemiological cutoff values (ECVs) to evaluate azole susceptibility (9, 25, 29). Wild-type (WT) isolates of *A. fumigatus* (MIC \leq ECV) were distinguished from non-WT isolates (MIC $>$ ECV), which may exhibit acquired low-susceptibility mechanisms. ECVs used in this study were as follows: itraconazole, 1 $\mu\text{g/ml}$; posaconazole, 0.5 $\mu\text{g/ml}$; voriconazole, 1 $\mu\text{g/ml}$, all as previously suggested (9, 25).

For sequence analyses, genomic DNA was extracted from non-WT isolates using a MasterPure yeast DNA purification kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI). The full coding region of the *cyp51A* gene was amplified as previously described (32). DNA sequences were determined using a BigDye Terminator ver-

Received 27 July 2011 Returned for modification 7 October 2011

Accepted 18 October 2011

Published ahead of print 24 October 2011

Address correspondence to Koichi Izumikawa, koizumik@nagasaki-u.ac.jp.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.05394-11

TABLE 1 MIC and MEC distributions of five antifungals

Antifungal agent	No. of isolates ^a											% of non-WT isolates
	Total	With a MIC or MEC ^b ($\mu\text{g/ml}$) of:										
		≤ 0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	≥ 16	
Triazoles												
Itraconazole	182 (14)			1	28	107	46	(8)	(4)	(1)	(1)	7.1
Posaconazole	182 (14)	14	108	35	24 (2)	(8)	(1)	1 (2)			(1)	2.6
Voriconazole	182 (14)			1 (3)	20 (7)	101 (2)	53 (1)	7 (1)				4.1
Polyene												
Amphotericin B	182 (14)		6	8 (1)	19 (1)	90 (7)	57 (5)	2				
Echinocandin												
Micafungin	182 (14)	177 (14)	2	1							2	

^a MIC distributions for each agent were obtained by subtracting from the total isolates tested the 14 non-WT isolates resistant to itraconazole. The MIC distribution for the 14 non-WT isolates is in parentheses.

^b MICs are shown for amphotericin B, itraconazole, posaconazole, and voriconazole; MECs are shown for micafungin.

sion 1.1 cycle sequencing kit (ABI) and an ABI 3100xl DNA analyzer. Sequence alignments were performed against the sequence from an azole-susceptible strain (GenBank accession no. AF338659) using MacVector10.0 software (MacVector, Inc., Cary, NC) (20). Mutations were confirmed three times by repeating the PCR and sequencing the relevant region using the closest primer.

In this study, using the ECVs, the percentages of non-WT isolates for which MICs of itraconazole, posaconazole, and voriconazole were above the ECV were 7.1%, 2.6%, and 4.1%, respectively (Table 1). To exclude the possibility of increased proportions of non-WT isolates due to clonal spread (notably, the potential repeated isolation of a drug-resistant strain originating from one patient), we confirmed those proportions on a per-case basis, which (for non-WT isolates) were 7.5%, 4.3%, and 6.5% for itraconazole, posaconazole, and voriconazole, respectively. These proportions of non-WT isolates were not much different from previous data from other regions, with the exception of data for the Netherlands and the United Kingdom (3, 9, 12, 23, 25, 33). All the itraconazole-resistant isolates (MIC $\geq 4 \mu\text{g/ml}$) were obtained from 1998 to 2001. No consistent trend of increased proportion of non-WT isolates was observed. Amphotericin B MICs of $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ were recorded for 1.0% of the isolates (2/196); micafungin MECs of $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ were recorded for 1.0% of the isolates (2/196) (Table 1). For these antifungals, the proportions of resistant isolates were low and similar to those in previous reports (3, 10, 23, 26).

In Japan, posaconazole has not been approved for clinical use; nonetheless, non-WT isolates for posaconazole already existed (Table 1). Resistance in these isolates might reflect native biological variability. Alternatively, this phenomenon could be associated with cross-resistance between itraconazole and posaconazole, because 80% (4/5) of non-WT isolates for posaconazole were also non-WT isolates for itraconazole (Table 2). In addition, non-WT isolates for itraconazole tended to be more resistant to posaconazole, though not to voriconazole (Table 1). Cross-resistance between itraconazole and posaconazole, but not with voriconazole, may result from the G54 mutation of *cyp51A*, which was present in 64.2% (9/14) of the non-WT isolates for itraconazole and also present in 100% (5/5) of the non-WT isolates for posaconazole (Table 2). There is a known structural basis for the association of the G54 mutation with this pattern of cross-

resistance among the azoles: unlike voriconazole, itraconazole and posaconazole have long side chains that clash with the amino acid side chain of the residue replacing G54 in the mutated CYP51A protein (8, 27, 32, 38).

Among mutations of the *cyp51A* gene, TR/L98H has received the most attention, notably because this mutation was seen in a specific country and found in *A. fumigatus* isolated from the environment (17, 22, 24, 31–33). Similarly, TR/L98H was recently detected in a multi-azole resistant isolate in China (17), suggesting that the TR/L98H mutation could be selected in Asia as well as in Europe. Of all 22 non-WT isolates in our study of Japanese isolates, CYP51A mutations were detected as follows: G54W, two isolates; G54R, one isolate; I266N, two isolates; G54E plus I266N,

TABLE 2 MICs and Cyp51A substitutions in 22 non-WT *Aspergillus fumigatus* isolates

Isolate	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			Cyp51A substitution
	Itraconazole	Posaconazole	Voriconazole	
MF-452	>8	0.5	0.5	I266N
MF-469	8	1	0.25	G54E, I266N
MF-460	4	2	0.25	G54E, I266N
MF-357	4	0.5	0.5	I266N
MF-468	4	0.5	0.25	G54E, I266N
MF-329	4	0.5	0.25	None
MF-331	2	>16	0.25	G54W
MF-327	2	2	0.12	G54R
MF-439	2	0.5	0.25	G54E, I266N
MF-473	2	0.5	0.25	G54E, I266N
MF-454	2	0.5	0.12	G54E, I266N
MF-472	2	0.5	0.12	G54E, I266N
MF-843	2	0.25	2	None
MF-748	2	0.25	1	ND ^a
MF-1011	1	2	0.12	G54W
MF-855	1	0.25	2	None
MF-336	1	0.25	2	None
MF-486	1	0.25	2	None
MF-520	1	0.25	2	None
MF-1091	0.5	0.25	2	None
MF-474	0.5	0.25	2	None
MF-303	0.5	0.12	2	None

^a ND, not determined.

seven isolates (Table 2). No TR/L98H-bearing isolates were detected. The I266N mutation, which has (to our knowledge) not been reported previously, was also seen in other azole-susceptible isolates; therefore, it might not be directly related to azole resistance. Of 21 non-WT isolates, 9 had no CYP51A substitution (Table 2). Interestingly, most non-WT isolates for voriconazole did not possess a *cyp51A* mutation. Although Bueid et al. reported an increase of frequency of azole-resistant isolates without *cyp51A* mutations, other possible resistant mechanisms (e.g., upregulation of efflux pump) have not yet been fully identified (6, 28, 30), and further analysis is warranted.

Only a few previous analyses have examined changes in susceptibility over time; therefore, it is not clear that the frequency of azole-resistant *A. fumigatus* is increasing worldwide (12, 25, 33). Nevertheless, mechanisms of resistance induction in clinical settings or the environment (e.g., selection following agricultural antifungal exposure) remain poorly understood. Given that azole usage varies from one country to another, the mechanism of azole resistance may differ between regions.

In this study, we found a low prevalence of resistance to triazoles in Japanese isolates of *A. fumigatus*, a clinically important fungus of increasing concern in respiratory medicine. The proportions of non-WT isolates were similar to those previously reported for other countries. In the future, Japanese *A. fumigatus* isolates may develop azole resistance by different mechanisms (such as TR/L98H); therefore, we urge the continued monitoring of azole susceptibility in this species.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Kayo Yamakoshi for technical assistance.

REFERENCES

- Alanio A, et al. 2011. Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:371–374.
- Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Sanglard D. 2011. Probing the role of point mutations in the *cyp51A* gene from *Aspergillus fumigatus* in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Med. Mycol.* 49:276–284.
- Arabatzis M, et al. 2011. Polyphasic identification and susceptibility to seven antifungals of 102 *Aspergillus* isolates recovered from immunocompromised hosts in Greece. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3025–3030.
- Arendrup MC, et al. 2010. Development of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy associated with change in virulence. *PLoS One* 5:e10080.
- Bellefleur B, et al. 2010. Acquired resistance to voriconazole and itraconazole in a patient with pulmonary aspergilloma. *Med. Mycol.* 48:197–200.
- Bueid A, et al. 2010. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:2116–2118.
- Clinical Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, 2nd ed. Approved standard M38–A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. 2003. A point mutation in the 14 α -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1120–1124.
- Espinel-Ingroff A, et al. 2010. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38–A2 document). *J. Clin. Microbiol.* 48:3251–3257.
- Espinel-Ingroff A, et al. 2011. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for caspofungin and *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38–A2 document). *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:2855–2859.
- Hinrikson HP, Hurst SF, Lott TJ, Warnock DW, Morrison CJ. 2005. Assessment of ribosomal large-subunit D1–D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 43:2092–2103.
- Howard SJ, et al. 2009. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg. Infect. Dis.* 15:1068–1076.
- Izumikawa K, Takazono T, Kohno S. 2010. Chronic *Aspergillus* infections of the respiratory tract: diagnosis, management and antifungal resistance. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 23:584–589.
- Kohno S, Izumikawa K. 2010. Posaconazole for chronic pulmonary aspergillitis: the next strategy against the threat of azole resistant *Aspergillus* infection. *Clin. Infect. Dis.* 51:1392–1394.
- Kohno S, et al. 2010. Intravenous micafungin versus voriconazole for chronic pulmonary aspergillitis: a multicenter trial in Japan. *J. Infect.* 61:410–418.
- Kume H, et al. 2011. Epidemiology of visceral mycoses in autopsy cases in Japan: comparison of the data from 1989, 1993, 1997, 2001, 2005 and 2007 in annual of pathological autopsy cases in Japan. *Med. Mycol. J.* 52:117–127.
- Lockhart SR, et al. 2011. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance is primarily due to the TR/L98H mutation in the *cyp51A* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:4465–4468.
- Lockhart SR, et al. 2011. In vitro echinocandin susceptibility of *Aspergillus* isolates from patients enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3944–3946.
- Mann PA, et al. 2003. Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome P450 14 α -demethylase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:577–581.
- Mellado E, Diaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. 2001. Identification of two different 14- α sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) of *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 39:2431–2438.
- Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. 2004. Substitutions at methionine 220 in the 14 α -sterol demethylase (CYP51A) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2747–2750.
- Mellado E, et al. 2007. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:1897–1904.
- Mortensen KL, et al. 2011. A prospective survey of *Aspergillus* spp. in respiratory tract samples: prevalence, clinical impact and antifungal susceptibility. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 40:1355–1363.
- Mortensen KL, et al. 2010. Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergilli* in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:4545–4549.
- Pfaller M, et al. 2011. Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Aspergillus* species to the triazoles. *J. Clin. Microbiol.* 49:586–590.
- Pfaller MA, et al. 2010. Wild-type minimum effective concentration distributions and epidemiologic cutoff values for caspofungin and *Aspergillus* spp. as determined by Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 67:56–60.
- Pfaller MA, et al. 2008. In vitro survey of triazole cross-resistance among more than 700 clinical isolates of *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 46:2568–2572.
- Rajendran R, et al. 2011. Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:2092–2097.
- Rodriguez-Tudela JL, et al. 2008. Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:2468–2472.
- Slaven JW, et al. 2002. Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, *atrF*, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. *Fungal Genet. Biol.* 36:199–206.
- Snelders E, et al. 2009. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:4053–4057.
- Snelders E, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Verweij PE, Melchers WJG. 2010. Azole resistance profile of amino acid changes in *Aspergillus fumigatus*.

- tus* CYP51A based on protein homology modeling. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:2425–2430.
33. Snelders E, et al. 2008. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med.* 5:e219.
 34. Tashiro T, et al. 2011. Diagnostic significance of *Aspergillus* species isolated from respiratory samples in an adult pneumology ward. *Med. Mycol.* 49:581–587.
 35. Thors VS, Bierings MB, Melchers WJ, Verweij PE, Wolfs TF. 2011. Pulmonary aspergillosis caused by a pan-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in a 10-year-old boy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 30:268–270.
 36. Verweij PE, Howard SJ, Melchers WJG, Denning DW. 2009. Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resistance Updates* 12:141–147.
 37. Walsh TJ, et al. 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 46: 327–360.
 38. Xiao L, et al. 2004. Three-dimensional models of wild-type and mutated Forms of Cytochrome P450 14 α -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:568–574.

Clinical efficacy and safety of micafungin in Japanese patients with chronic pulmonary aspergillosis: a prospective observational study

SHIGERU KOHNO*, KOICHI IZUMIKAWA*, HIROSHI KAKEYA*, YOSHITSUGU MIYAZAKI†, KENJI OGAWA‡, RYOICHI AMITANI§, YOSHIHITO NIKI# & ATSUYUKI KURASHIMA\$

*Department of Molecular Microbiology and Immunology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki,

†Department of Chemotherapy and Mycoses, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, ‡Department of Pulmonary

Medicine, National Hospital Organization Higashinagoya National Hospital, Nagoya, §Department of Respiratory Medicine,

Osaka Red Cross Hospital, Osaka, #Department of Clinical Infectious Diseases, Showa University, Tokyo, and \$Department of

Respiratory Medicine, Fukujuji Hospital, Tokyo, Japan

Aspergillosis has been the prevailing deep-seated mycosis in Japan since the 1990s. Although micafungin (MCFG) has been approved in Japan for the management of patients with such infections caused by *Candida* and *Aspergillus* species, there are relatively few reports on its use in patients with chronic pulmonary aspergillosis (CPA). Therefore, we conducted a prospective observational study to evaluate the efficacy and safety of the use of MCFG in Japanese patients with CPA. The efficacy of the antifungal was assessed on the basis of improvements in clinical symptoms and radiological findings. In addition, adverse events, including abnormal laboratory findings were determined. The overall clinical efficacy rate was 68.4% (26/38 patients), which is comparable to the results obtained in clinical trials for marketing approval conducted in Japan. Although adverse drug reactions were observed in six patients (15.8%), they were not serious. The most common of these reactions was abnormal liver functions. No relationship between the incidence of adverse drug reactions and age of the patients, MCFG dose, or duration of treatment was observed. Consequently, MCFG has favorable efficacy and safety profiles in Japanese CPA patients with various backgrounds.

Keywords chronic pulmonary aspergillosis, micafungin, efficacy, safety, observational study

Introduction

The incidence of deep-seated mycoses, especially aspergillosis, has increased in recent years [1,2]. Based on results of pathology studies at autopsy, including Japanese patients, aspergillosis has been considered the prevailing systemic fungal infection since the 1990s [3,4]. Increasing numbers of immunocompromised patients associated with acquired immunodeficiency syndrome, bone marrow

transplantation, or chemotherapy are considered to be the main contributing population to this growing prevalence of aspergillosis [5,6].

Pulmonary aspergillosis is classified into three major categories: (i) invasive pulmonary aspergillosis (IPA), (ii) chronic pulmonary aspergillosis (CPA) including chronic necrotizing pulmonary aspergillosis (CNPA), chronic cavitary pulmonary aspergillosis (CCPA also known as complex aspergilloma), chronic fibrosing pulmonary aspergillosis (CFPA), and (iii) simple aspergilloma [7,8]. IPA often occurs in patients after hematopoietic stem cell transplantation or with severe hematological disorders such as acute leukemia [5,6,9–11]. IPA rapidly progresses, and a definitive diagnosis is generally considered difficult to determine [5,12]. CPA can occur in patients with

Received 21 September 2010; Received in final revised form 21 January 2011; Accepted 4 February 2011

Correspondence: Koichi Izumikawa, Department of Molecular Microbiology and Immunology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, 1–7–1 Sakamoto, Nagasaki 852–8501, Japan. Tel.: + 81 95 819 7273; fax + 81 95 849 7235; E-mail: koizumik@nagasaki-u.ac.jp

© 2011 ISHAM

DOI: 10.3109/13693786.2011.561369