

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591487

研究課題名(和文)新興真菌症の薬剤耐性機序 - 真菌にも耐性菌選択濃度域があるのか -

研究課題名(英文)Mechanisms of drug resistance of an emerging fungal diseases

研究代表者

時松 一成 (Tokimatsu, Issei)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：20347032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：トリコスポロンという環境に多く存在している病原性のある酵母に着目して、試験管内や臨床分離株による研究解析を行った結果、抗真菌薬の標的タンパクの構造変により、抗真菌薬へ耐性化することが明らかになった。MIC付近濃度との抗真菌薬との接触によって容易に、真菌の遺伝子に変異を生じる可能性が示唆された。抗真菌薬の使用以外に、バイオフィルムの形成によって、酵母は抗真菌薬へ耐性化することもわかった。バイオフィルム形成真菌では、抗真菌薬は無効であることも明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The amino acid substitution and the structure change caused the high resistance to antifungal resistance in pathogenic fungi, Trichosporon, which is the ubiquitous yeast around the world. This fungus have the mutant selection window (MSW) around the minimal concentration as the results of in vivo and in vitro studies and analysis.

Besides the use of antifungal agents, by formation of a biofilm, the yeast was also found to resistance of the anti-fungal agent. The antifungals is not effective to the biofilm formation cells of this yeast.

研究分野：医歯薬学

キーワード：薬剤耐性 真菌症 日和見感染症 院内感染対策 抗菌薬適正使用

1. 研究開始当初の背景

播種性トリコスポロン症の原因真菌である *Trichosporon asahii* は、担子菌系酵母の一つであり、わが国で原因の究明や治療法が確立した「夏型過敏性肺炎」の原因真菌として知られている。世界中の環境に生息しているが、日本で発生する過敏性肺炎の中で、原因が明らかなものでは最も頻度の高いアレルゲンであることより、*T. asahii* は日本の環境や人種と強く関係している真菌であると考えられる。

一方、わが国では、*T. asahii* による日和見感染症の発症報告が増加している(引用文献①)。その多くは、予後が不良であり、多臓器への侵襲性感染症を示すことより「播種性トリコスポロン症」と言われている。本症の増加の要因として、医療の発展に伴う易感染性の宿主の増加や、日本の病院内の抗真菌薬の使用が影響していると言われているが、詳細は不明である。今後、日本における播種性トリコスポロン症は、ますます増加すると考えられる。

最近、多剤の抗真菌薬に対し耐性傾向のみられる *T. asahii* が、患者血液から分離されてきている。研究代表者らは、試験管内で抗真菌薬の耐性誘導実験を *T. asahii* で行ったところ、抗真菌薬との接触により、容易に多剤耐性が誘導されることを明らかにし、抗真菌薬の標的タンパクの遺伝子に変異し、タンパク構造が変異するのではないかと報告した(引用文献②)。

一方、ヒトに病原性がある酵母様真菌のカンジダと同様に、抗真菌薬の標的タンパク構造の変化以外の耐性機序の存在が考えられている。

このように、本真菌の耐性機序の解明は、我が国における、日和見真菌感染症の制御に急務と考える。

2. 研究の目的

本研究は適正な抗真菌薬の使用法に寄与することを目的とし、わが国でその発生増加が危惧されている播種性トリコスポロン症に着目し、その病原体の抗真菌薬耐性誘導や耐性機序、真菌では未だ明らかになっていない耐性菌が高頻度を選択される領域(耐性菌選択濃度域 mutation selection window(MSW))の存在を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 試験管内における薬剤耐性誘導の安定性の確認

酵母用液体培地 (RPMI1640G) にヒトの

血液から分離された *T. asahii* ATCC MYA 1296 株 (薬剤感受性株) の MIC と等濃度のフルコナゾール (FLCZ) を混入し、30 日以上培養続けた後、培養培地より得られた多剤耐性化した MYA 1296 C16 株を、本研究に用いた。この株は、アゾール標的タンパクである *erg11* の 453 番目の塩基が、グリシンからグルタミン酸に変異 (G435E) していることが確認されている(引用文献②)。

この試験管内で薬剤誘導された MYA 126 C-16 株を抗真菌薬が含有されていない培地に継代培養し、薬剤感受性が元に戻らないことを確認した。

2) *Erg11* の点変異の意義の解析

野生型および変異 (G435E) 型 *erg11* 遺伝子を真菌発現ベクターに挿入し、*Saccharomyces cerevisiae* に発現させた。即ち、野生型 *erg11* 遺伝子 [*erg11::KanMX pAUR-TaERG11* (WT)] および変異 (G435E) 型 *erg11* 遺伝子 [*erg11::KanMX pAUR-TaERG11* (mut)] をもつハプロタイプ *S. cerevisiae* を作成した。これらハプロタイプ *S. cerevisiae* のフルコナゾールとイトリコナゾールに対する薬剤感受性の違いを検討した。

3) 臨床分離株の薬剤耐性の解析

トリコスポロンの疫学研究チームと協力し、臨床での患者血液から分離されたトリコスポロン株の薬剤感受性試験を行なった。耐性株については、臨床背景を解析し、さらにアゾール系薬標的タンパクをコードする *erg11* の遺伝子の変異点の有無とそのアミノ酸変化を検討した。

4) 抗真菌薬の排泄亢進や取り込み抑制による耐性化の検討

酵母様真菌に対しアゾール系薬と同様の取り込み排泄を示す物質であるローダミンを蛍光、および、ラジオアイソトープで標識し、*T. asahii* 耐性株 (臨床分離株、耐性誘導株) に接触させ、その動態を検討し、*erg11* を介する以外の耐性機序の有無、すなわち、真菌膜の抗真菌薬の取り込みや低下や、排泄ポンプの機能更新の可能性について検討した。

5) 医療デバイス上の *T. asahii* のバイオフィーム形成能と薬剤感受性の検討

酵母様真菌は尿道カテーテルや血管留置カテーテルでバイオフィームを形成し、形成した場合には極めて薬剤感受性が悪化することが知られている。我々は、この現象が *T. asahii* でも観察されるか検討した。

バイオフィーム形成には、ヒト血液から

分離された OU232 株を用いた。尿道カテーテルで広く使用されているシリコン素材のシートと、ポリウレタン製静脈留置カテーテルを用い、*T. asahii* を RPMI1640G 培地にて、OD600=0.1 になるまで培養した。シリコン片とポリウレタン片を、培養液内に完全に浸し、35°C、90 分間静置した。その後、PBS で洗浄したのち、RPMI1640G 培地で 35°C、48 時間培養したのち、シリコン片、ポリウレタン片を走査型電子顕微鏡で観察した。さらに、バイオフィーム形成菌の薬剤感受性を検討した。

6) バイオフィーム菌に対する菌破壊物質の検討

高濃度のアムホテリシン B (AMPH-B)、フ FLCZ、イトラコナゾール (ITCZ) などの抗真菌薬と、EDTA、エタノールとに接触させ、バイオフィームを破壊あるいは抑制できるかを電子顕微鏡で検討した。

抗真菌薬はそれぞれを MIC の 100 倍、500 倍溶液に調製した。EDTA は 30 μg/mL、300 μg/mL、3mg/mL、30mg/mL に、エタノールは 20%、40%、60% にそれぞれ調製した。*T. asahii* のバイオフィームが付着したシリコンを PBS (コントロール)、抗真菌薬、EDTA、エタノール溶液内に静置して 35°C で培養した。培養開始 1、3、5、7 日後におけるシリコン片への付着生菌数を測定した。

4. 研究成果

1) 試験管内における薬剤耐性誘導の安定性の確認

In vitro で誘導された多剤耐性 *T. asahii* (MYA1296 C16) 株の薬剤感受性 (表 1) は、その後、抗菌薬を含まない培地で培養続けても、薬剤感受性は変化がないことを確認した。このことは、薬剤耐性化の機序として、遺伝子変異の可能性が推測された。

表 1 *in vitro* での薬剤感受性変化 (文献①にて発表)

MYA1296	MIC (ug/ml)				
	FLCZ	ITCZ	VRCZ	MCZ	AMPH-B
臨床株	4	0.5	0.125	1	2
C16 株	64	8	4	8	2

2) *Erg11* の点変異の意義の解析

真菌発現ベクターに挿入した野生型および変異型 *erg11* 遺伝子を *S. cerevisiae* に導入し、それぞれの *erg11* 遺伝子をもつハプロタイプ *S. cerevisiae* の作成に成功した。抗真菌薬の感受性を調査したところ、FLCZ、イトラコナゾール (ITCZ) の薬剤感受性は、変異型では野生型に比べ、8 - 16 倍低下していた (図 1)。

今回の検討で、アゾール耐性 *T. asahii* に存在した G453R のアミノ酸変異は、薬剤耐性に重要な役割を担っていることが明らかになった。

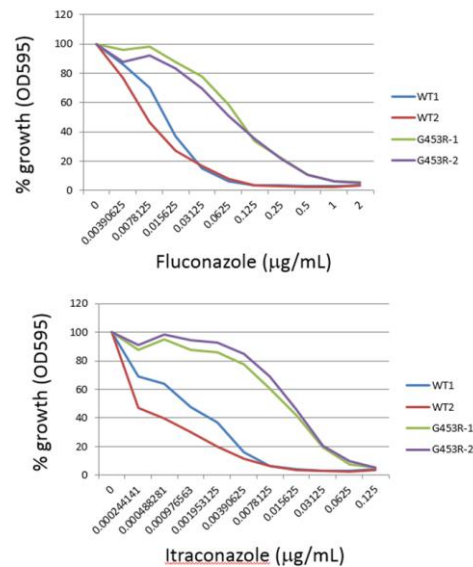


図 1 野生型および変異型 *erg11* 発現 *S. cerevisiae* の発育曲線

3) 臨床分離株の薬剤耐性の解析

臨床での患者血液から分離される *T. asahii* の耐性株 5 株の *erg11* の遺伝子の変異点を検討した結果、いずれも、G150S のアミノ酸の点変異が明らかになった。調査の中では、これらの真菌はアゾール系薬の使用例より分離されていることより、点変異はアゾール系薬の使用により誘導されたことが推測された。

4) 抗真菌薬の排泄亢進や取り込み抑制による耐性化の検討

ローダミンンの取り込みについては、感受性株、耐性株とも有意な差はなく、膜の変化や薬剤排泄機能の有無については、明らかにならなかった。

5) 医療デバイス上の *T. asahii* のバイオフィーム形成能と薬剤感受性の検討

シリコンシート表面、ポリウレタン製カテーテル表面に付着した菌体を SEM で観察したものを示す (図 2、図 3)。シリコン、カテーテル表面ともに菌体の集簇と菌糸の発育、および菌体表面にはバイオフィームと思われる薄い膜形成を認めた。

一方、OU232 のバイオフィーム形成細胞、浮遊細胞における感受性試験測定法と MIC を示す (表 2)。OU232 と浮遊細胞は MIC 値は近似したが、バイオフィーム形成細胞は OU232、

浮遊細胞と比較して、AMPH-B、FLCZ、ITCZ すべてにおいて低感受性を示した。

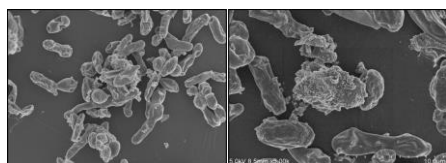


図2 シリコン表面の *T.asahii*

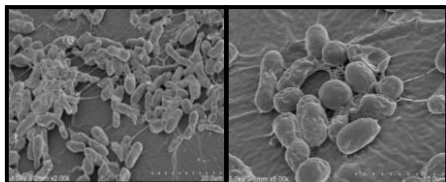


図3 ポリウレタン表面の *T.asahii*

表2 各形態における *T.asahii* の MIC

	MIC		
	OU232	浮遊菌	バイオフィルム菌
AMPH-B	2	1	32
ITCZ	8	4	>64
FLCZ	1	0.5	>64

6) バイオフィルム菌に対する菌破壊物質の検討

エタノールはいずれの濃度においても、生菌数の減少がみられた。EDTA は濃度依存性に生菌数の減少がみられた。AMPH-B、FLCZ、ITCZ では、100~500 倍の高い濃度での接触で、いずれもコントロールと比較して生菌数の減少がみられたが、エタノールや EDTA と比べると生菌数の減少に時間を要した。

高濃度の抗真菌薬や EDTA、エタノールはいずれも *T. asahii* のバイオフィルム形成を抑制するが、生菌数を比較した場合にはエタノールが最も有効と考えられた。

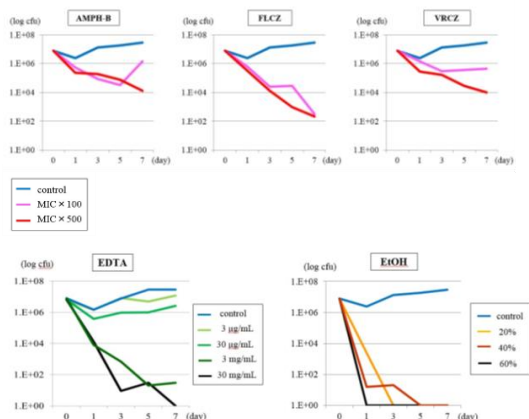


図4 様々な物質に接触させたあとの *T. asahii* バイオフィルム形成菌の菌数変化

以上、まとめると、*T. asahii* は、抗真菌薬の影響を受けやすく、抗真菌薬の標的タンパクの構造の変化による耐性化を起こす。特に、*T. asahii* と MIC 濃度の抗真菌薬との長期接触により、耐性遺伝子を有する株が誘導、あるいは選択されることが示され、*Trichosporon* では、細菌と同様 mutant selection window が存在することが示唆された。

その他の耐性機序としてバイオフィルム形成が明らかになった。バイオフィルムが形成されたものでは、既存の抗真菌薬による通常量の抗真菌作用は望めず、高濃度の抗真菌薬や EDTA、エタノールによる真菌の抑制効果がみられた。

これらの現象は、播種性トリコスポロン症のみならず、カンジダやクリプトコックスなど、他の真菌感染の耐性化や病態解明への手がかりになると思われる。

<引用文献>

- ① 時松一成, 門田淳一: 新興深在性真菌症—トリコスポロン症の臨床—, 感染症学雑誌, 80, 2006, 196-202.
- ② Kushima H, Tokimatsu I, Ishii H, Kawano R, Shirai R, Kishi K, Hiramatsu K, Kadota J: Cloning of the lanosterol 14 α -demethylase (ERG11) gene in *Trichosporon asahii*: a possible association between G453R amino acid substitution and azole resistance in *T. asahii*. FEMS Yeast Research, 12, 2012, 662-667.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Tokuisi K, Yamashita S, Hashimoto T, Moroga T, Miyawaki M, Chujo M, Yamamoto S, Kawahara K, Tokimatsu I, Kashima K, Bronchial stump aspergillosis after stapled lobectomy for lung cancer, The Annals of Thoracic Surgery, 査読有、94、2012、pp. 1324-1326.
- ② Hashino S, Takahashi S, Morita R, Kanamori H, Onozawa M, Kawamura T, Kahata K, Kondo T, Tokimatsu I, Sugita T, Akizawa K, Asaka M, Fungemia due to *Trichosporon dermatitis* in a patient with refractory Burkitt's leukemia, Blood Research, 査読有、48、2013、pp. 154-156.
- ③ Suzuki Y, Kawasaki K, Sato Y, Tokimatsu I, Itoh H, Hiramatsu K, Takeyama M, Kadota J, Is peak concentration needed in therapeutic

drug monitoring of vancomycin? A pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis in patients with methicillin-resistant Staphylococcus aureus pneumonia、Chemotherapy、査読有、58、2013、pp. 308-312.

- ④ Kushima H, Ishii H, Komiya K, Tokimatsu I, Kadota J、Prognostic significance of β -D-glucan in 78 patients with Trichosporon fungemia、International Journal of Infectious Diseases、査読有、17、2013、pp. e134-135.
- ⑤ Mukai Y, Nureki S, Hata M, Shigenaga T, Tokimatsu I, Miyazaki E, Kadota J, Yarita K, Kamei K、Exophiala dermatitidis pneumonia successfully treated with long-term itraconazole therapy、Journal of Infection and Chemotherapy、査読有、20、2014、pp.446-449.
- ⑥ 時松一成、Trichosporonosis. Medical Mycology Journal、査読無、53、2012、pp. 169-174.
- ⑦ 串間尚子、時松一成、門田淳一、真菌症ー最近 10 年で最も進歩した研究分野を検証する、呼吸、査読無、31、2012、pp. 861-863、2012.
- ⑧ 竹末芳生、大曲貴夫、笠原 敬、関 雅文、高倉俊二、高橋佳子、時松一成、松元一明、三嶋廣繁、木村利美、谷川原祐介、五十嵐正博、岡田賢二、木村匡男、小林昌宏、西 圭史、浜田幸宏、望月敬浩、抗菌薬 TDM ガイドライン、日本化学療法学会雑誌、査読無、60、2012、393-445.
- ⑨ 浜田幸宏、時松一成：ポリコナゾールの TDM こうすれば上手いく！抗菌薬 TDM ガイドラインの実践的活用法、月刊 薬事、査読無、55、2013、pp. 71-76.
- ⑩ 時松一成、深在性トリコスポロン症、感染症診断 治療と感染制御、感染制御、査読無、9、2013、pp. 351-356.

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① Tokimatsu I, Kushima H, Toba S, Kadota J、Influence of voriconazole on survival outcome of trichosporonoemia: results epidemiological study in Japan. The 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco (U.S.A), 2012.
- ② Toba S, Tokimatsu I, Kushima H, Ishii H, Shirai R, Kishi K, Hiramatsu K, Kadota J, Sugita T、Examination of rhodamine 6G accumulation in multi-azoles resistant Trichosporon asahii : possible role for drug efflux.: The 52nd Interscience Conference on

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco (U.S.A), 2012.

- ③ 串間尚子、時松一成、播種性トリコスポロン症の診断・治療への挑戦ーカンジダ症との相違を含めー、第 86 回 日本感染症学会総会、長崎ブリックホール (長崎市・長崎県)、2012.
- ④ 時松一成、串間尚子、鳥羽聡史、門田淳一、トリコスポロンと過敏性肺炎、真菌感染症と免疫研究の最前線と今後の展望. 第 57 回日本医真菌学会総会、京王プラザホテル新宿 (新宿区・東京都)、2013.
- ⑤ 串間尚子、時松一成、門田淳一、稀な菌種による深在性真菌症、深在性真菌症の変貌ー最近の 10 年間と今後ー. 第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会 合同学会、ヒルトンホテル福岡 (福岡市・福岡県)、2014.

〔図書〕(計 4 件)

- ① 時松一成、(矢崎義雄ほか編集)、朝倉書店、肺真菌症 朝倉 内科学 第 10 版第 II 巻、2013、765-767.
- ② 時松一成、日本臨牀社、トリコスポロン症 感染症症候群 第 2 版 上、2013、591-594.
- ③ 時松一成、(竹末芳生、三嶋廣繁編集)、医薬ジャーナル社、抗真菌薬のブレイクポイントのとらえ方 侵襲性カンジダ症、2014、159-164.
- ④ 泉川公一、岡 慎一、小川賢二、門田淳一、亀井克彦、神田善伸、木村哲也、渋谷和俊、高倉俊二、高田 徹、竹末芳生、照屋勝治、時松一成、福田隆浩、前崎繁文、榎村浩一、三嶋廣繁、光武耕太郎、宮崎義継、森 雅亮、安岡 彰、矢野啓子、山中 昇、吉田 稔 (深在性真菌症のガイドライン作成委員会委員長 河野 茂)、協和出版、深在性真菌症の診断・治療ガイドライン 2014、1-261.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

時松 一成 (Issei Tokimatsu)
大分大学医学部・講師
研究者番号：20347032

(2) 研究分担者

門田 淳一 (Junichi Kadota)
大分大学医学部・教授
研究者番号：50233838

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

串間 尚子 (Hisako Kushima)
鳥羽 聡史 (Satoshi Toba)
河野 利恵 (Rie Kawano)
田辺 公一 (Kouichi Tanabe)