

令和元年5月29日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11317

研究課題名(和文) フザリウム・ソラニ隠ぺい種におけるアゾール系抗真菌薬感受性の多様性に関する研究

研究課題名(英文) Susceptibility of azole antifungal agents in cryptic species of *Fusarium solani*

研究代表者

戸所 大輔 (Todokoro, Daisuke)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40436324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：フザリウム属真菌による角膜炎は難治であり失明を来しやすい。ポリエン系抗真菌薬が有効だが、組織移行性が悪いため深層に及んだ病変に対しては効果が弱い。アゾール系抗真菌薬の組織移行性は良好だが、*Fusarium solani*に対しては株によって有効性が異なる。我々はこの原因として、*F. solani*は性質の異なる複数の菌種を含むためと考えた。角膜炎および環境由来の多数のフザリウム株の種同定と系統解析を行ったところ、角膜炎由来のフザリウムは多系統に及んでいた。さらに眼科用剤として未市販のルリコナゾールがフザリウム属を含む抗真菌薬全般に高い抗真菌活性を有することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フザリウム属真菌による角膜炎は難治であり失明を来しやすい。本研究において角膜炎および環境由来の多数のフザリウム株の種同定と系統解析を行ったところ、角膜炎由来のフザリウムは多系統に及んでいることが分かった。さらに眼科用剤として未市販のルリコナゾールがフザリウム属を含む抗真菌薬全般に高い抗真菌活性を有することを明らかにした。今後、ルリコナゾールを眼科用剤として臨床応用することにより、真菌性角膜炎による失明を防ぐことを目指す。

研究成果の概要(英文)：Keratitis by *Fusarium* species is difficult to treat and causes corneal blindness. Polyenes are effective against *Fusarium*, but the corneal penetration are poor. Azoles have good corneal penetration, but their efficacy against *Fusarium solani* varies among strains. We hypothesized that it is derived from cryptic species of *Fusarium solani*. Species identification and phylogenetic tree analysis revealed *Fusarium* isolates from keratitis and environment belonged to several clades. Furthermore, luliconazole showed strong efficacy against broad-range filamentous fungi including *Fusarium* species.

研究分野：眼微生物学・感染症学

キーワード：眼微生物学・感染症学 *Fusarium solani* 隠ぺい種

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

感染性角膜炎は、細菌や真菌などの病原体が角膜に感染し炎症を引き起こす病態である。細菌によるものに比べ真菌とくに糸状菌による感染は診断に時間がかかることが多く、重症化しやすい。進行例では角膜混濁による失明や、炎症が強膜や眼球内へ波及することにより眼球内容除去・眼球摘出に至るなど、重篤な視力障害の原因となる。

糸状菌による角膜炎の原因菌としてはフザリウム属が最多であり、以下アスペルギルス属、ペニシリウム属、アルテルナリア属、ペシロマイセス属と続く。なかでもフザリウム属による角膜炎は進行が早く、重症化しやすいことで知られている。病初期の角膜炎に対しては角膜搔抓による病巣の除去が有効であるが、進行例では病巣を除去しきれないため抗真菌薬の併用が必須である。角膜炎の薬物治療は点眼薬が中心であり、ポリエン系であるピマリシン、アゾール系であるフルコナゾールの点眼が以前より行われてきた。しかしピマリシンは角膜毒性が強く組織移行性も高くないことや、フルコナゾールは糸状菌に対する抗真菌効果がほとんどないことから、糸状菌による角膜炎の進行例に対する治療成績は不良だった。2005年にアゾール系抗真菌薬であるボリコナゾールが上市され、内科領域では肺アスペルギルス症やカンジダ血症などの治療成績は飛躍的に向上した。保険適応外ではあるが眼科領域でもボリコナゾール点眼が使用されるようになり、アスペルギルス属・ペシロマイセス属などによる角膜炎に対する有効性が報告され (Todokoro D, et al. Int Ophthalmol 2014)、また角膜毒性も低く安全に使用できることから、現在ではボリコナゾール点眼は糸状菌による角膜炎の第一選択薬となっている。しかしながら、フザリウム属の一種である *Fusarium solani* による角膜炎に関しては、ボリコナゾールが有効であった症例と無効であったとする症例が混在している。細菌と異なり糸状菌の薬剤感受性検査は時間がかかり、また保険適応外であるために通常は施行されない。申請者らは自験例の *Fusarium solani* 角膜炎からの分離株に対し抗真菌薬感受性試験を行ったところ、ボリコナゾール・ミコナゾールといったアゾール系抗真菌薬の感受性が株によって大きく異なり、この感受性の差が視力予後に大きく影響していることを第 119 回日本眼科学会において報告した。つまり、ボリコナゾール感受性株による初期治療に反応する症例では治療に成功するのに対し、ボリコナゾール非感受性株では病変が深部へ波及し視力予後はきわめて不良となっていることが考えられる。ボリコナゾール非感受性の *Fusarium solani* 株に対しては、早期にピマリシンまたはアムホテリシン B などポリエン系抗真菌薬中心の治療に切り替え、角膜擦過や治療的角膜移植などの外科的治療をより積極的に考慮すべきだが、フザリウム属による角膜炎の進行は早いいため、薬剤感受性試験の結果が出るまでに病変は高度に拡大してしまう。したがって、古典的な薬剤感受性試験によらない、アゾール系抗真菌薬の感受性スクリーニング方法の確立が必要である。

### 2. 研究の目的

*Fusarium solani* は複合種であり、形態学および 16S rRNA 系統解析のいずれを用いても区別ができない隠ぺい種をまとめて *Fusarium solani* 複合種と呼称している。したがって、臨床検査において同じ *Fusarium solani* と同定される菌株であっても、実際には性質の違いが存在すると思われる。そのひとつがアゾール系抗真菌薬に対する感受性であると思われる。本研究では、上記の背景をもとに、*Fusarium solani* 株のアゾール系抗真菌薬感受性の有無を規定している因子を明らかにし、臨床におけるボリコナゾール抵抗性の原因を探索する。さらには、新しい診断法・治療ターゲットの開発につながる知見をあきらかにすることを目標とする。

### 3. 研究の方法

*Fusarium solani* は多数の隠ぺい種を含んだ種複合体であり、臨床的な治療抵抗性を規定している多様性を解明する。具体的には、(1) 角膜炎および環境由来のフザリウム株のライブラリーを作製する。対照として、フザリウム以外の真菌株も必要となる。(2) 作製した真菌株ライブラリーを対象とし、真菌培地における発育可能温度、発育速度、形態学的観察を行う。(3) 国内未市販の薬剤も含め、抗真菌薬剤感受性試験を行う。(4) フザリウム株の DNA シークエンスを行い、系統樹解析を行う。(5) 治療薬として有効と思われる薬剤があれば、臨床応用にに向けた非臨床試験を行う。

### 4. 研究成果

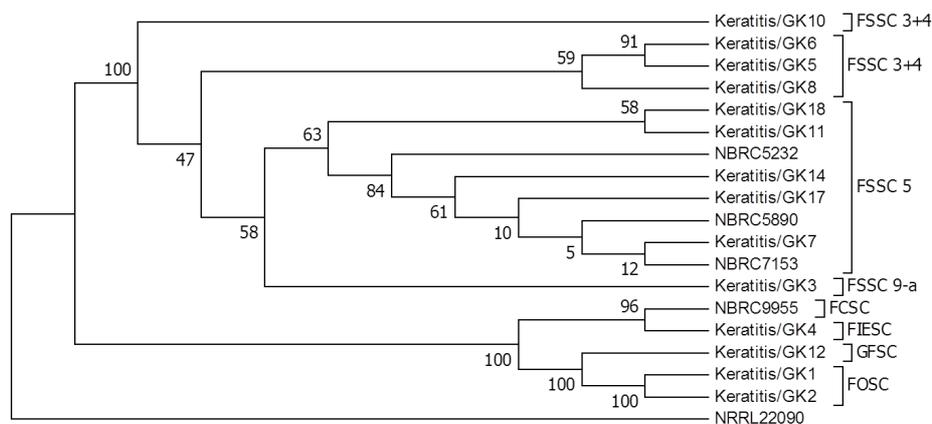
(1) 日本眼感染症学会の協力により、真菌性角膜炎全国スタディで収集したフザリウム株を分与された。これに加え、環境由来のフザリウム株と対照としてフザリウム以外の真菌株を入手し、25 株からなる真菌株ライブラリーを作製した。

(2) フザリウム株は全般に発育が早く、30℃ でよく発育した。しかしヒト角膜内での増殖能と関連する 37℃ での発育については、株による差異がみられた。巨大コロニーの形態については、典型的なクリーム色でベルベット状の巨大コロニーがみられた。しかし、一部の株で、絨毛状の外観を呈する株があった。

(3) 栄研化学へ依頼し、薬剤感受性測定プレートをオーダーメイドで作製した。測定する抗真菌薬は、ピマリシン、ルリコナゾール、ラノコナゾール、エフィナコナゾール、ボサコナゾール、ラブコナゾールも含めた。微量液体希釈法を用いて薬剤感受性測定を行った。結果、フザリウム株全般に対して *in vitro* で有効であったのはポリエン系抗真菌薬のアムホテリシン B、

次いでピマリシンであった。ポリコナゾール、ミコナゾールなどのアゾール系の最小発育阻止濃度(MIC)が高い株がほとんどであったが、一部に低い株もみられた。アゾール系抗真菌薬が *in vitro* で有効であった株と、37 の発育能、巨大コロニーの外観との関連は認められなかった。眼科用剤としては未市販のルリコナゾール、ラノコナゾールがフザリウム株を含むすべての糸状菌に対して低いMIC値を示すことが分かった。

(4) フザリウム株の EF-1 遺伝子シーケンスをもとに系統樹解析を行った。本研究で対象としたフザリウム株では、*Fusarium solani* 種複合体 (Clade 5) が最も多かった(下図)。



(5) ルリコナゾール点眼薬を作製し、白色家兎の角膜上皮創傷治癒モデルを作製し薬剤毒性の有無を検討した。コントロール(点眼溶媒)と比較して角膜上皮創傷治癒率には差が認められなかった。

研究成果を総括すると、当初は角膜炎の原因となるフザリウムのうちポリコナゾールの有効な株を早期に診断できる方法を検索することを目的としていたが、結果は一部の例外を除くほとんどのフザリウム株においてポリコナゾールの有効性は期待できないと考えられた。一方、ルリコナゾールがフザリウムだけでなく糸状菌全般に極めて高い効果があることが分かった。したがって、今後は真菌性角膜炎に対しルリコナゾールの臨床応用をすすめていくことを目指し非臨床試験を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

Efficacy of luliconazole against broad-range filamentous fungi including *Fusarium solani* species complex causing fungal keratitis. Todokoro D, Suzuki T, Tamura T, Makimura K, Yamaguchi H, Inagaki K, Akiyama H. *Cornea* (2019) 38(2): 238-242 DOI: 10.1097/ICO.0000000000001812 (査読あり)

*Scedosporium apiospermum* infectious scleritis following posterior subtenon triamcinolone acetonide injection: a case report and literature review. Todokoro D, Hoshino J, Yo A, Makimura K, Hirato J, Akiyama H. *BMC Ophthalmol* (2018) 18:40 DOI.org/10.1186/s12886-018-0707-4 (査読あり)

再発後に治療的角膜移植術を要した *Beauveria bassiana* による真菌性角膜炎の1例. 戸所大輔, 岡野崇子, 斎藤千真, 木村圭吾, 矢口貴志, 平戸純子, 秋山英雄. *日眼会誌* 122: 523-528, 2018 (査読あり)

### 〔学会発表〕(計8件)

一般講演(ポスター)「ステロイド点眼中に *Didymella gardeniae* による真菌性角膜炎を発生した1例」宮久保朋子, 戸所大輔, 榎村浩一, 中村孝介, 秋山英雄 角膜カンファランス 2019 2019年2月7日

一般講演(口演)「角膜炎から分離された *Fusarium* に対するルリコナゾールの抗真菌活性」戸所大輔, 鈴木崇, 田村俊, 榎村浩一, 山口英世, 秋山英雄 第55回日本眼感染症学会 2018年7月14日

一般講演(口演)「1%ルリコナゾール点眼における毒性の検討」鈴木崇, 戸所大輔, 榎村浩一, 長井寛明, 塩見涼, 西土井悠作, 堀裕一 第55回日本眼感染症学会 2018年7月14日

一般講演(ポスター)「移動性の黒色上皮病変を呈した *Exophiala lecanii-corni* 角膜炎」戸所大輔, 佐竹良之, 榎村浩一, 宮久保純子, 秋山英雄 角膜カンファランス 2018 2018年2月15-16日

シンポジウム 眼感染症の新しい展開 新種・新薬・新疾患 「抗真菌薬の進歩 期待される新薬」戸所大輔 第71回日本臨床眼科学会 2017年10月13日

再発後に治療的角膜移植術を要した *Beauveria bassiana* による真菌性角膜炎の 1 例 . 戸所大輔、岡野崇子、斎藤千真、秋山英雄 . 日本眼感染症学会 第 54 回日本眼感染症学会 2017 年 7 月 15 日

教育セミナー「重症角膜真菌症の起因菌と薬剤感受性」戸所大輔 第 54 回日本眼感染症学会 2017 年 7 月 15 日

一般講演 (ポスター)「トリアムシノロンのテノン嚢下注射後に発症した *Scedosporium apiospermum* による眼球周囲感染症の一例」戸所大輔、星野順紀、楊彩佳、榎村浩一 真菌症フォーラム第 22 回学術集会 2016 年 5 月 21 日

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名 : 鈴木 崇

ローマ字氏名 : Takashi Suzuki

所属研究機関名 : 東邦大学

部局名 : 医学部

職名 : 客員准教授

研究者番号 (8 桁) : 70398048

研究分担者指名 : 榎村 浩一

ローマ字氏名 : Makimura Koichi

所属研究機関名 : 日本大学

部局名 : 医学部

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 00266347

### (2)研究協力者

研究協力者氏名 : 該当なし

ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。