

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32625

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06668

研究課題名（和文）病原真菌アスペルギルスの感染症薬暴露による薬剤耐性機構と病原性変化

研究課題名（英文）Drug resistance mechanisms and pathogenic changes in the pathogenic fungus *Aspergillus* due to exposure to infectious agents.

研究代表者

石橋 健一（Ishibashi, Ken-ichi）

女子栄養大学・栄養学部・准教授

研究者番号：20453805

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：深在性真菌症は、がん患者等の易感染患者に対して発症することが多く、複合感染も稀ではない。よって、抗ウイルス薬と抗真菌薬が同時に投与される場合が考えられる。本研究では抗ウイルス薬添加培養 *Aspergillus* の増殖および抗真菌薬感受性について検討した。C-limiting medium を用い、抗ウイルス薬共存下に、*Aspergillus* を培養した結果、共存下において菌体の増殖促進が認められた。培養上清中の  $\alpha$ -1,3-glucan 量も増加した。共存下での *Aspergillus* 抗真菌薬感受性について検討した結果、添加培養 *Aspergillus* においてミカファンギンに対する感受性が低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高度医療が進むにつれて、感染症も複雑化してきている。耐性菌が問題になる中、抗微生物薬の適正使用が叫ばれている。生体内における複数の医薬品同士の相互作用は臨床において非常に重要な問題である。本研究を通じて、抗微生物薬（感染症薬）の薬物間相互作用に可能性があることが示唆された。今後も臨床現場においては、医薬品のより適切な使用を目指し、このような視点を持ち続けることが必要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Deep mycosis often occurs in easily infected patients, such as cancer patients, and combined infections are not uncommon. Therefore, antiviral and antifungal agents may be administered simultaneously. In this study, we investigated the growth and antifungal susceptibility of cultured *Aspergillus* strains treated with antivirals.

*Aspergillus* was cultured in the presence of antivirals in C-limiting medium, and growth of *Aspergillus* was accelerated in the presence of antivirals. The amount of  $\alpha$ -1,3-glucan in the culture supernatant was also increased, and the susceptibility of *Aspergillus* to antifungal drugs in the presence of antivirals was examined.

研究分野：生体防御学

キーワード：真菌症 薬剤感受性 真菌細胞壁 グルカン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

化学療法や移植など高度先端医療の進歩は、悪性疾患における予後の改善をもたらしたが同時に、immunocompromised host を増加させている。これらの患者は、病原性が低いか、あるいは病原性がないと考えられている微生物による日和見感染が起きる可能性が高く、臨床的に重大な問題となっている。日和見感染症のなかでも真菌が原因微生物である深在性真菌症は増加の一途を辿っており、直接死因に結びつくことも少なくない。わが国で経験される主な深在性真菌症は *Aspergillus* 症、*Candida* 症である。感染臓器としては肺感染が半分以上を占め、その原因真菌は *Aspergillus* が 70%以上を占める。

化学療法、移植医療等による免疫抑制下における易感染患者においては、真菌、細菌、ウイルスによる感染症や複合的な感染を起こすことがあり、重篤な転機を辿ることが少なくない。また、抗菌薬に対する耐性や医薬品の併用による相互作用やそれに付随する様々な影響も臨床上的な大きな問題となっており、医薬品の適正な使用が求められている。また、領域においては化学療法、移植医療が日常的に施行されていることから、感染症が大きな脅威となっており、予防投与も積極的に行われている。

### 2. 研究の目的

本研究では、感染症治療薬暴露による病原真菌の病原性への影響について、薬剤耐性と細胞壁構造変化という点から検討する。それにより、他の感染症治療薬の病原真菌への作用、病原真菌における感染症治療薬の相互作用を検討する。さらには、感染症薬暴露により変化した病原真菌の病原性へ影響を菌側または宿主応答側からの広い視点で明確にすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

完全合成液体培地 C-limiting medium に、予備検討で変化の認められた抗ウイルス薬であるアシクロビルを添加し、増殖、形態の様子をマイクロプレート法にて確認する。抗真菌薬の薬剤感受性への影響について、ミカファンジン、アンホテリシン B、ポリコナゾールなど代表的な作用機序の異なる抗真菌薬に対する最小発育阻止濃度 (MIC)、薬剤感受性について、マイクロプレート法を用い検討する。

これまでの検討で、抗真菌薬感受性で変化の見られた菌体を調製し、菌体の組成 (糖/タンパク含量、元素分析、グルカン分解酵素反応性) 及び構造的な特徴について、NMR を用いて化学的に解析する。

得られた真菌菌体 (生細胞、乾燥菌体、菌体成分) をマクロファージ培養系へ添加し、*in vitro* における炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-6) 産生を ELISA にて検討する。また、過酸化酸素 (ROS) 産生についても検討する。

### 4. 研究成果

C-limiting medium に静注用アシクロビルを添加し、*A. fumigatus* NBRC 33022 を培養し、その菌糸成長および形態変化を検討した。その結果、アシクロビル共存下において、菌糸の成長が促進された。次に、この増殖促進が静注用アシクロビル中のアシクロビルによるものであることを確認する為、試薬として購入した純度 98% 以上のアシクロビル共存下で *A. fumigatus* NBRC 33022 を培養したところ、いずれの場合も菌糸の成長が促進された。

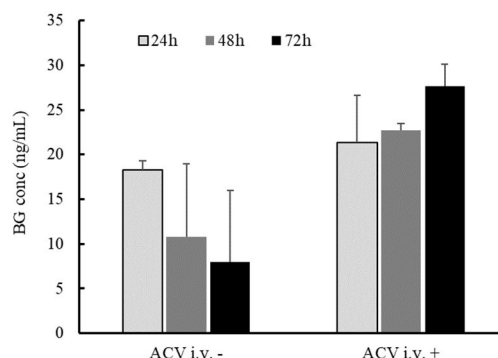


図1 抗ウイルス薬添加培養時の培養上清中グルカン濃度

これまでに、*Aspergillus* は菌体外にリムルス G 因子活性物質すなわち  $\beta$ -1,3-glucan を放出することが知られている。アシクロビル添加培養によって、菌体成長に変化が認められたことから、菌体外へ放出する抗原量も変化する可能性がある。そこで、非添加条件下に *A. fumigatus* NBRC 33022 を培養し、培養上清を経時的に回収し、 $\beta$ -1,3-glucan 含量を抗  $\beta$ -1,3-glucan モノクローナル抗体を用いた ELISA 法にて測定した (図1)。その結果、静注用アシクロビル添加培養では、非添加培養と比較し、培養上清中の  $\beta$ -1,3-glucan

濃度が上昇した。また、非添加培養では、 $\alpha$ -1,3-glucan 濃度が経時的に減少したのに対し、添加培養では経時的に濃度が上昇した。

先に示した通り易感染宿主における日和見感染に対し、抗ウイルス薬であるアシクロビルと抗真菌薬が同時に併用される状況を経験することがある。そこで、静注用アシクロビル添加培養 *Aspergillus* 菌体に対する抗真菌薬感受性について検討した。

*A. fumigatus* NBRC 33022 に静注用アシクロビルと、抗 *Aspergillus* 薬として用いられるミカファンギン、ポリコナゾールの希釈系列を作成して添加し、それぞれの *Aspergillus* 菌体の成長ならびに薬剤感受性について検討した。ポリコナゾールに対する感受性は、静注用アシクロビルの有無に関わらず菌糸成長抑制作用は同様であった。一方、ミカファンギンに対する感受性は、静注用アシクロビル共存下において、薬剤感受性が低下した。これらの結果から、*Aspergillus* は抗ウイルス薬であるアシクロビル共存下で培養することによって、抗真菌薬の感受性に影響を及ぼすことが示唆された。今回見られた現象は、抗微生物薬（感染症薬）の使用において、想定外の病状の変化が起きる可能性のあることを示唆しており、嚴重な病態の管理が必要であることを示唆している。

*Aspergillus* 細胞壁は、galactomannan、 $\alpha$ -1,3-glucan、 $\beta$ -1,3-glucan、chitin などの多糖と少量の脂質、タンパク質から構成されている。細胞壁を構成する多糖は、真菌における病原関連分子パターンとして、*Aspergillus* に対する宿主免疫応答に関与していることが知られている。そこで、抗微生物薬の有無による *Aspergillus* 細胞壁構成成分の変化を検討した。

C-limiting medium で *A. fumigatus* NBRC 33022 を静注用アシクロビル添加、非添加条件で 5 日間培養し、得られた乾燥菌体について検討した。糖含量は、添加培養 22.5%、非添加培養 23.5%、タンパク含量は、添加培養 13.5%、非添加培養 15.5%と同等であった。次に、各菌体を  $\alpha$ -1,3-glucanase である zymolyase で消化し感受性部の割合を比較したところ、添加培養 71.1%、非添加培養 68.7%であった (Table 2-3)。次に、各菌体を次亜塩素酸酸化し、得られた glucan 画分の C-NMR を解析したところ、 $\alpha$ -1,3-glucan、 $\beta$ -1,3-glucan に帰属されるピークが認められ、両菌体間でシグナル強度に顕著な違いは認められなかった (図 2)。

静注用アシクロビル添加、非添加培養で得られた *A. fumigatus* NBRC 33022 菌体に対するマクロファージ応答の違いを検討するために、マウス腹腔滲出細胞の活性酸素産生能を比較した。両条件下で菌を培養し、アセトン脱脂処理を行うことで乾燥菌体を調製した。それらの菌体でマクロファージを刺激した。その結果、両菌体刺激によって活性酸素種産生が認められ、添加培養菌体の方が、高い活性酸素種産生を示した。静注用アシクロビル添加培養によって、*Aspergillus* 菌体の細胞壁構成、形態に影響を与え、それらが白血球相互作用に影響し、炎症作用に違いを生じることが示唆された。

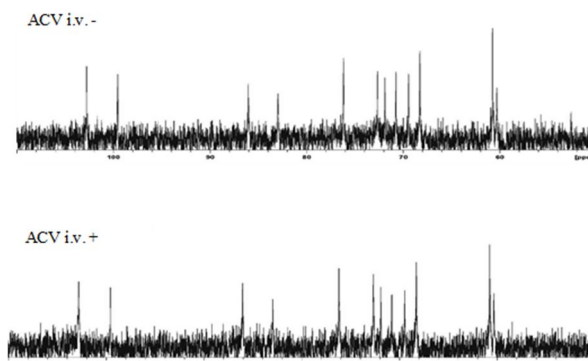


図 2 抗ウイルス薬添加培養 *Aspergillus* の細胞壁グルカン C-NMR 解析

*Aspergillus* は抗ウイルス薬であるアシクロビル共存下で培養することによって、その抗真菌薬の感受性に影響を及ぼすことが示唆された。今回見られた現象は、抗微生物薬（感染症薬）の使用において、より適切な使用が必要であると考えられた。

高度医療が進むにつれて、感染症も複雑化してきている。耐性菌が問題になる中、抗微生物薬の適正使用が叫ばれている。生体内における複数の医薬品同士の相互作用は臨床において非常に重要な問題であるが、本研究によって、複数の抗微生物薬が、病原微生物を介した相互作用を示すことが示唆された。病原真菌 *Aspergillus* においても環境外に接する環境、物質によって、変化を起こすことが明らかになった。これらことは適切な感染症薬物療法を提供するうえで、新たな重要な点であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山中優弥, 畔蒜祐一郎, 石橋健一, 山中大輔, 安達禎之, 大野尚仁
2. 発表標題 Aspergillus抗真菌薬感受性への感染症治療薬の影響
3. 学会等名 日本薬学会第140回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 畔蒜祐一郎, 石橋健一, 安達禎之, 大野尚仁
2. 発表標題 Aspergillus の病原性に及ぼす抗微生物薬の影響
3. 学会等名 第67回 日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------