

抗真菌剤に対する病原真菌の *in vitro* 耐性獲得に関する研究

三上 襄・矢沢 勝清・田中 泰至

千葉大学真核微生物研究センター化学療法分野\*

(平成7年3月7日受付・平成7年5月1日受理)

全身性の真菌症の治療薬として用いられている amphotericin B (AMPH-B), flucytosine (5-FC), fluconazole (FLCZ), miconazole (MCZ) および itraconazole (ITCZ) に対する酵母様および菌糸状真菌の耐性株の誘導の有無について、薬剤の濃度勾配寒天プレートを作製して検討した。その結果、5-FC では検討したほとんどの菌種で、1 から 3 代の継代で耐性株が得られた。しかし、AMPH-B では試験したいずれの菌種でも耐性株が得られなかった。アゾール系の薬剤では MCZ, ITCZ および FLCZ において用いた真菌の中で、*Candida krusei*, *Candida parapsilosis* および *Candida glabrata* で特に高度な耐性株が観察され、さらに弱いながら *Trichophyton mentagrophytes* でも耐性化現象が確認された。しかし臨床的にもっとも問題となる *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* および *Aspergillus fumigatus* では観察されなかった。

**Key words:** 抗真菌剤, *in vitro* 耐性菌, アゾール系薬剤, 耐性誘導, 濃度勾配寒天プレート

抗細菌性化学療法剤やある種の抗癌剤において、薬剤の長期間の使用に伴う耐性菌や耐性腫瘍株の出現はきわめて重要な問題である。また最近の AIDS 患者の治療における耐性ウイルス株の出現の問題も起きている<sup>1)</sup>。一方、1980 年代中頃までの全身性真菌症ではその治療が長期間におよぶにもかかわらず耐性菌あまり問題になっていなかった<sup>2,3)</sup>。その主な理由はこれらの真菌症に対する治療薬はこれまでポリエン系の amphotericin B (AMPH-B) であり、その耐性菌はほとんど出現しないことによるものと思われる。一方、ピリミジン系の抗真菌剤である flucytosine (5-FC) では耐性菌出現が問題とされていたが、臨床的には AMPH-B との併用によりその出現を抑える方策がとられている<sup>3)</sup>。近年抗真菌剤の分野にも新しい薬剤が続々と登場しているが、その多くはアゾール系薬剤である<sup>4)</sup>。アゾール系薬剤の進歩は目覚しく、fluconazole (FLCZ) の導入は、真菌症の化学療法の分野におけるアゾール系薬剤の役割を高め<sup>5-7)</sup>、さらにアスペルギルス症に有効な itraconazole (ITCZ)<sup>8)</sup> の導入により益々その重要性は増し、現在はアゾール系薬剤の全盛時代といっても良い。FLCZ<sup>9,10)</sup> はその優れた *in vivo* 活性と低い副作用のために、多くの真菌症の患者に長期間投与されており、特に AIDS 患者におけるクリプトコックス症やカンジダ症ではかなりの期間にわたり投与され、その結果、米国を中心に耐性菌が報告<sup>10,11)</sup>されるようになってきた。一方、ヨーロッパを中心に FLCZ は予防的に用いられるようになり、結果として *Candida albicans* 以外の *Candida krusei* や *Candida glabrata* 等の FLCZ にもともと非感受性である酵母様真菌が菌交代現象的に出現し<sup>12-14)</sup>、問題となっている。しかし、これらの真菌はもともと FLCZ に非感受性であり、必ずしも耐性菌としては認識されていない<sup>15)</sup>。我々は本邦およびタイ

国での AIDS 患者由来株について、耐性株の検索をしてきたが<sup>16,17)</sup>、これまでのところ検査した臨床分離株において、FLCZ を含むアゾール系薬剤に対する耐性株は確認できなかった。しかし、これら抗真菌剤の *in vitro* 耐性誘導化現象について検討した結果、*C. albicans* 以外の酵母様真菌、特に *C. krusei* で耐性株が容易に誘導されることを見いだしたので、さらにその他の真菌についても、耐性株の誘導の有無について検討したので得られた結果を報告する。

## I. 材料と方法

## 1. 使用菌株

当センター化学療法分野に保存されている真菌から *Aspergillus fumigatus* Tsukuba, *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* IFM 40118, *C. glabrata* ATCC 90030, *Candida parapsilosis* ATCC 90018, *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, *Trichophyton mentagrophytes* IFM 40369 の 7 菌種を用いた。接種菌は Potato dextrose agar (PDA Difco) 上で、酵母様真菌は 37°C で 3 日間、菌糸状菌は 30°C, 7 日から 14 日間培養した。

## 2. 使用薬剤および MIC 値の測定

AMPH-B (日本スクイブ, lot. no. 9468), FLCZ (ファイザー製薬, lot. no. 3 A 0762), miconazole (MCZ, 持田製薬, lot. no. 426868), ITCZ (Janssen Pharmaceutica Co., Ltd, Belgium, lot. no. PUA 281) および 5-FC (日本ロッシュ, lot. no. A 339243) の原末を用いた。5-FC は滅菌蒸留水に、またその他の薬剤は dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解し、その後、等量のメタノールを加えて殺菌し、最終的には DMSO およびメタノール濃度が 1% 以下になるように

\* 千葉市中央区亥鼻 1-8-1

生理食塩水で希釈した。MICの測定は96穴のマイクロプレート(住友ベークライト, MS-8096 F)を用いた微量液体希釈法により行った。また測定用培地としてはbrain heart infusion (BHI, Difco) 培地を主に用いたが、5-FCの測定はglucoseを添加したyeast nitrogen base培地(G-YNB培地, Difco)を用いた微量液体希釈法によって行った<sup>18)</sup>。接種菌液の作製は前法に準じて行った<sup>17,18)</sup>。また酵母様真菌のMIC値の判定はすでに報告したNCCLSの方法に準じ、さらにMTT assay法を用いて行った<sup>12,19)</sup>。糸状菌のMIC値の判定は前報<sup>10)</sup>に準じて行った。

### 3. 耐性菌の誘導

耐性菌の作製は、5-FCではyeast morphology agar (YMA, Difco) 培地を他の薬剤ではBHI培地を用いた。薬剤のグラジエント平板は、はじめに1 $\mu$ g/mlになるように各種の薬剤濃度を含む培地8~10 mlを分注して傾斜プレートを作り、次に薬剤無添加培地を同量分注して、薬剤グラジエント平板を作製した。ITCZの酵母様真菌に対するグラジエントプレートの場合、さらに薬剤濃度をその1/10濃度にして用いた。菌液を接種後、1週間37°Cで培養し、もっとも高い薬剤濃度で生育するコロニーを次の平板に移植することにより行った。また作製した耐性菌株については、カンジダチェック®(ヤトロン社)によって種の確認を行ってから、試験に用いた。

## II. 結 果

Fig. 1に*C. albicans* ATCC 90028株を薬剤を含有する培地で1週間毎に継代培養した株のMIC値の変動を示した。5-FC含有培地で継代した場合、約3代目ではすでに耐性株の誘導が確認され、さらに5代目の株では100倍以上のMIC値となっていた。しかし、他の薬剤ではまったく耐性株の誘導は確認できなかった。

Fig. 2に*C. glabrata* ATCC 90030株のFLCZ, AMPH, MCZ, ITCZおよび5-FC存在下での耐性度の変化を示した。その結果、5-FCでは3代目ですでに耐性株が出現していた。一方、FLCZ, ITCZおよびMCZなどのアゾール系の薬剤でも耐性株が出現し、いずれの場合でも3~4倍の希釈系列、すなわち50倍程度MIC値の上昇が観察された。しかし、AMPH-BではそのMIC値の上昇は2倍であり、耐性化の現象はほとんどないものと思われた。

Fig. 3には*C. parapsilosis* ATCC 90018株での結果を示した。5-FCでは継代後1代目で耐性株が確認された。一方アゾール系のITCZでは5代目から、またMCZでも5代目から、さらにFLCZでも耐性株が誘導されることが明らかになった。FLCZでは耐性株の誘導は段階的であった。MCZおよびFLCZでのMIC値の上昇は16~32倍であったが、ITCZに対するMIC値の変化は100倍以上であった。AMPH-Bではまったく耐

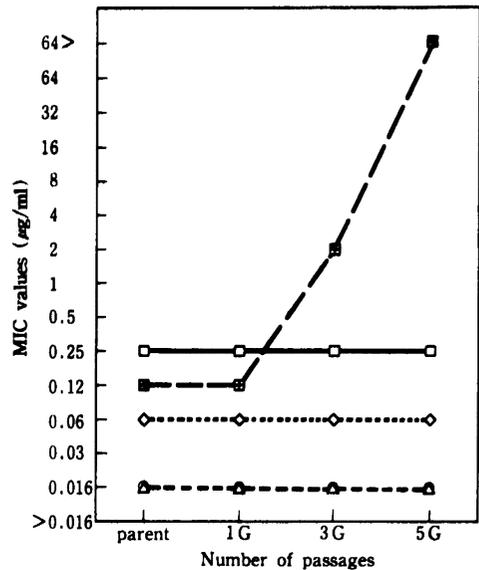


Fig. 1. Changes in MIC values of *Candida albicans* ATCC 90028 strain after successive passages on plates containing individual drugs. FLCZ (□), AMPH-B (◇), MCZ (○), ITCZ (△), 5-FC (⊞)

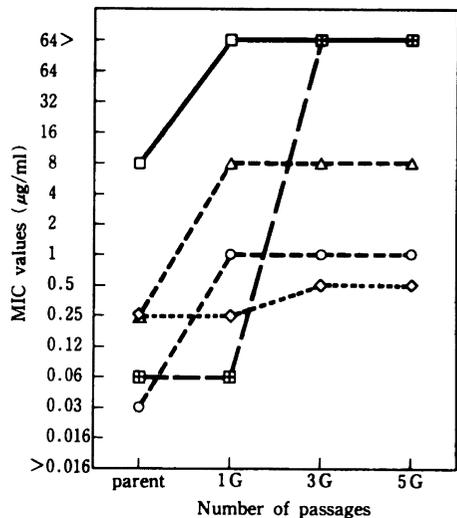


Fig. 2. Changes in MIC values of *Candida glabrata* ATCC 90030 strain after successive passages on plates containing individual drugs. FLCZ (□), AMPH-B (◇), MCZ (○), ITCZ (△), 5-FC (⊞)

性株の誘導は観察できなかった。

Fig. 4に*C. krusei* IFM 40118での結果を示したが、もともとこの菌種はアゾール系の薬剤、特にFLCZに対して高いMIC値を示すことから、その耐性度の変化は観察できなかった。しかしITCZでは32倍程度の、またMCZでは4倍程度の耐性度の上昇が観察され、アゾール系の薬剤に対して耐性株が出現していた。

Fig. 5に*C. neoformans* ATCC 90112株の継代に伴うMIC値の変化を示したが、MIC値の明らかな変化が

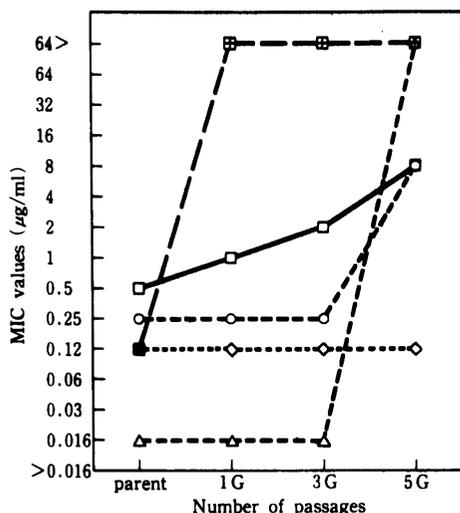


Fig. 3. Changes in MIC values of *Candida parapsilosis* ATCC 90018 strain after successive passages on plates containing individual drugs. FLCZ (□), AMPH-B (◇), MCZ (○), ITCZ (△), 5-FC (⊕)

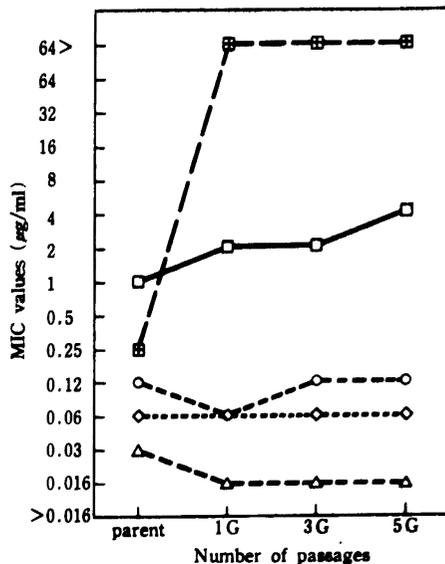


Fig. 5. Changes in MIC values of *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 strain after successive passages on plates containing individual drugs. FLCZ (□), AMPH-B (◇), MCZ (○), ITCZ (△), 5-FC (⊕)

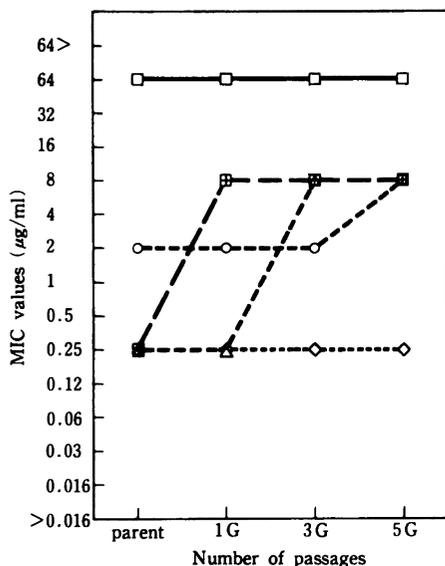


Fig. 4. Changes in MIC values of *Candida krusei* IFM 40118 strain after successive passages on plates containing individual drugs. FLCZ (□), AMPH-B (◇), MCZ (○), ITCZ (△), 5-FC (⊕)

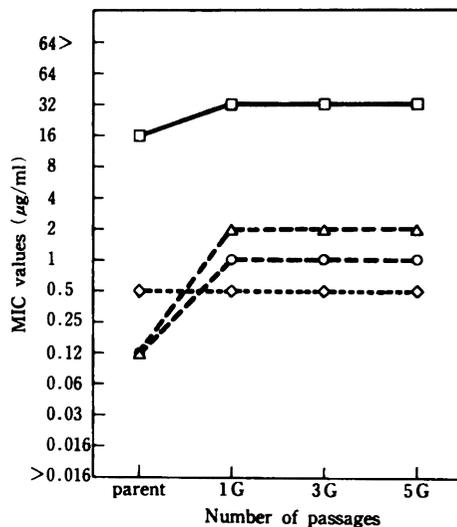


Fig. 6. Changes in MIC values of *Trichophyton mentagrophytes* IFM 40369 strain after successive passages on plates containing individual drugs. FLCZ (□), AMPH-B (◇), MCZ (○), ITCZ (△)

観察されたのは5-FCであった。その他の薬剤では、FLCZで2~4倍のMIC値の上昇が観察されただけであった。

Fig. 6に *T. mentagrophytes* IFM 40369株の継代によるMIC値の変化を示した。ITCZおよびMCZで8~16倍のMIC値の上昇が観察され、耐性株の誘導が観察された。5-FCではMIC値の決定が難しく、ここでは、その変化を観察できなかった。

Fig. 7に *A. fumigatus* TSUKUBA株の継代による

MIC値の変化を観察した結果を示したが、耐性株の誘導が観察されたのは5-FCに対してのみで、他の薬剤では耐性化の現象はほとんど観察できなかった。

### III. 考 察

臨床的に用いられている抗真菌剤に対する *in vitro* 耐性株の誘導実験を行った。その結果、AMPH-Bではいずれの菌種でも耐性菌はまったく観察できなかった。しかし、5-FCでは *T. mentagrophytes* を除いた菌種すべてにおいて、薬剤含有プレートに1および3代継代することにより耐性菌が得られることにより、あらためて5

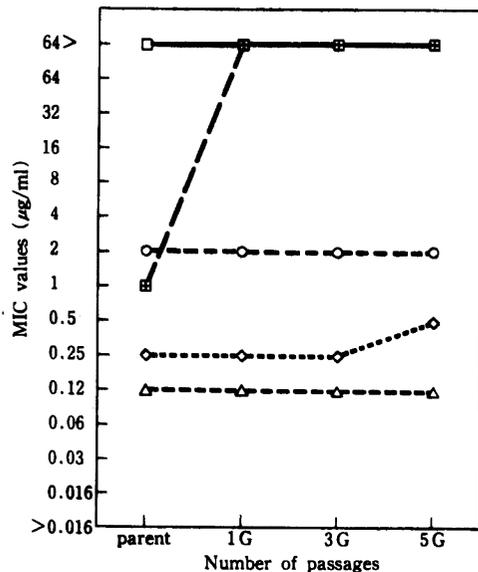


Fig. 7. Changes in MIC values of *Aspergillus fumigatus* TSUKUBA strain after successive passages on plates containing individual drugs. FLCZ (□), AMPH-B (◇), MCZ (○), ITCZ (△), 5-FC (⊕)

-FCが耐性株<sup>20)</sup>の出現を導きやすい薬剤であることが確認できた。臨床的には5-FCの耐性菌の出現に対する対策としては、AMPH-Bの静脈内投与による併用療法が行われ、すでにその問題は解決されていると考えられている<sup>3)</sup>。しかし、我々が実際にタイ国のAIDS患者からの分離した臨床分離株、特に*C. neoformans*を50株用いて検討した結果や<sup>16)</sup>、本邦の臨床分離株の検討結果<sup>17)</sup>でも5-FC耐性株が約10%の割合で観察されており、厳密には5-FC耐性菌の出現の問題は、いまだ解決できていないように思われた。今回の実験で観察されたアゾール系薬剤に対して誘導された耐性菌は主に*C. krusei*および*C. glabrata*であった。これらの*Candida*はもともと、アゾール系薬剤、特にFLCZには非感受性でMIC値も比較的高く、得られた株が真に耐性株であるかどうかを確認するためには、親株との比較が重要である。これらの菌株については、MIC値に関するデータも比較的少なく、さらに詳細な研究が必要である。また今回の実験でも明らかなように、アゾール系薬剤に対する耐性菌の耐性度は最大限でも100倍程度であり、もともときわめて低いMIC値を示すITCZやMCZなどでは耐性菌でも菌種によっては、それほど高いMIC値とはならない。したがって臨床的には、異なったアゾール系薬剤による治療で、すなわちFLCZ耐性株にITCZを使うこと等により治癒可能な場合もあるものと考えられる。

現在我々は臨床分離の*C. krusei*株を数株用いて耐性株の誘導実験を進めているが、菌株に関係なく耐性が誘導されることを確認している。またそれらの耐性株につ

いて、その耐性の安定性等を検討しているが、数代の継代培養によっても、耐性の変化は見られていない。アゾール系の薬剤の耐性機構については、(i)膜の透過性の変化、(ii)アゾール系薬剤の標的酵素であるcytochrome P 450の薬剤に対する結合性の変化、さらには(iii)その標的酵素の大量生産の3つが考えられている<sup>11)</sup>。もっとも可能性のあるアゾール系薬剤に対する耐性機構として、透過性の変化(i)が考えられる。今回、我々が分離した耐性株においては、アゾール系の薬剤間で交差耐性が観察されており、共通の耐性機構が関与しているものと思われる。そこでこれらの耐性機構の解明を目的に現在パルスフィールド電気泳動を用いて耐性に関与する遺伝子の特定を進めている。

今回の実験を通して、*C. albicans*、*C. neoformans*および*A. fumigatus*でなぜアゾール耐性株が得られないかについては、不明である。その理由としては、今回は継代での耐性誘導であり、変異剤を用いないことと、さらに*C. albicans*が2倍体<sup>21)</sup>であることで変異しにくいこと等が上げられるが、いずれにしても、このように単なる継代では簡単に変異株が得られないことによるかも知れない。しかし、臨床的には*C. albicans*のアゾール耐性株が増えていることから、さらに詳細な耐性誘導に関する研究が必要である。また、*C. neoformans*および*A. fumigatus*で耐性株が観察されない理由についても検討を有する事柄である。

我々は最近、FLCZなどのアゾール系薬剤が臨床的に無効であると判断された患者由来株の酵母様真菌について、菌種の同定および薬剤感受性の試験を行っているが、その同定結果は*C. albicans*以外の菌種であることが多く、*C. krusei*、*C. glabrata*や*Trichosporon cutaneum*である場合が多かった(未発表データ)。Wingardら<sup>12)</sup>はFLCZの予防的投与はしばしば*C. krusei*の感染を導くこと、さらにJohns Hopkins大学での検討結果では約6か月間のFLCZの投与でその約75%が*C. glabrata*による感染で、また12.5%が*C. krusei*による感染であること等を報告している。

我々の最近の研究で患者由来の*C. krusei*から耐性コロニーの存在も確認しており(未発表データ)、アゾール系の薬剤の長期投与により、このような耐性株が簡単に選択される可能性がある。しかし、本実験はあくまでも試験内の実験であり、臨床的に、このような耐性株が誘導されるかどうかは、今後の継続研究を含めて、重要な検討課題である。またこれまでアゾール系の薬剤に非感受性と考えられた*C. krusei*および*C. glabrata*について、本当の意味での非感受性なのか、さらには耐性コロニーの混在なのか等の詳細な検討も必要である。

#### 文 献

- 1) Bpyer P L, Ding J, Arnold E, Hughes S H: Subunit specificity of mutations that confer resista-

- nance to nonnucleoside inhibitors in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1909~1914, 1994
- 2) Iwata K, Yamashita Y, Uehara H, Nozawa N: In vitro thiocarbamate resistance of *Trichophyton mentagrophytes*. *Chemotherapy* 38: 435~443, 1990
  - 3) Iwata K: Drug resistance in human pathogenic fungi. *Eur J Epidemiol* 8: 407~421, 1992
  - 4) 岩田和夫: 真菌・真菌症・化学療法—抗真菌剤を中心として。ソフトサイエンス社, 1994
  - 5) Mikami Y, Scalarone G M, Kurita N, Yazawa K, Uno J, Miyaji M: Synergistic postantifungal effect of flucytosine and fluconazole on *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 30: 197~206, 1992
  - 6) Mikami Y, Takahashi A, Yazawa K, Terao K, Ueno Y: Synergistic interaction of miconazole and fluconazole at Sub MIC level on *Candida albicans*. *Mycoses* 35: 321~327, 1992
  - 7) Bodey G P: Azole antifungal agents. *Clin Infect Dis* 14 (suppl. 1): 161~169, 1992
  - 8) Cutsem J V, Gerven F V, Van De Ven, Borgers M, Janssen P A J: Itraconazole, a new triazole that is orally active in aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 26: 527~534, 1984
  - 9) Warnock D W: Azole drug resistance in *Candida* species. *J Med Microbiol* 37: 225~226, 1992
  - 10) Casadevall L A, Spitzer E D, Webb D, Rinaldi M G: Susceptibility of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis to amphotericin B and fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1383~1386, 1993
  - 11) Hitchcock C A, Pye G W, Troke P F, Johnson E M, Warnock D W: Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1962~1965, 1993
  - 12) Wingard J R, Merz W G, Rinaldi M G, Miller C B, Karp J E, Saral C B: Association of *Torulopsis glabrata* infections with fluconazole prophylaxis in neutropenic bone marrow transplant patients. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1847~1849, 1993
  - 13) Barchiesi F, Colombo A L, McGough D A, Fothergill A W, Rinaldi M G: In vitro activity of itraconazole against fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1530~1533, 1994
  - 14) Rodriguez-Tudela J L, Martinez-Suarez J V: Improved medium for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 45~48, 1994
  - 15) Wingard J R R, Merz W G, Rinaldi M G, Johnson T R, Karp J E, Saral R: Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med* 325: 1274~1277, 1990
  - 16) 三上 襄, 矢沢勝清, 宇野 潤, 清宮康子, 田中泰至, 小牧久幸, Poonwan N, Boon-Long J: MTT アッセイ法によるアゾール系抗真菌剤の活性測定について。 *Dermatological Mycology Club 例会記録集「真菌感染と生体防御」* p.94~98. ヤンセン協和, 東京, 1995
  - 17) 三上 襄, 矢沢勝清, 西村和子: Itraconazole の生体内活性代謝産物 hydroxy-itraconazole の臨床分離株に対する *in vitro* 抗真菌活性。 *Chemotherapy* 42: 290~296, 1994
  - 18) 三上 襄, 矢沢勝清, 松前昭廣: 抗真菌剤の MIC 値におよぼす検定用培地の影響。 *Chemotherapy* 39: 761~770, 1991
  - 19) Mikami Y, Sakamoto T, Yazawa K, Goni T, Ueno Y, Hasegawa S: Comparison of in vitro antifungal activity of itraconazole and hydroxy-itraconazole by colorimetric MTT assay. *Mycoses* 37: 27~33, 1994
  - 20) Scalarone G M, Mikami Y, Kurita N, Yazawa K, Miyaji M: Comparative studies on the post-antifungal effect produced by the synergistic interaction of flucytosine and amphotericin B on *Candida albicans* *Mycopathol* 120: 133~138, 1992
  - 21) Mahrous M, Lott T J, Meyer S A, Sawant A D, Ahearn D G: Electrophoretic karyotyping of typical and atypical *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 28: 876~881, 1990

*In vitro* emergence of resistant fungal strains after serial subculturing on  
gradiently increasing concentrations of five different antifungal agents

Yuzuru Mikami, Katsukiyo Yazawa and Yasushi Tanaka

Division of Experimental Chemotherapy, Research Center for Pathogenic Fungi and  
Microbial Toxicoses, Chiba University, 1-8-1, Inohana, Chuo-ku, Chiba 260, Japan

The *in vitro* resistance of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton mentagrophytes* to amphotericin B (AMPH-B), flucytosine (5-FC), miconazole (MCZ), fluconazole (FLCZ) and itraconazole (ITCZ) was studied. None of the tested fungi became resistant to AMPH-B. However, all tested fungi developed resistance to 5-FC after one or three serial transfers onto yeast morphology agar. After serial subculturing of yeast-like fungi on brain heart infusion agar containing gradiently increasing concentrations of three azole drugs, some resistant colonies appeared, and interestingly, the development of resistant strains was limited to some yeast-like fungi such as *C. krusei*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*. No resistant strains against the azoles were observed with *C. albicans*, *C. neoformans* and *A. fumigatus*.