

## 研究者：矢野加奈子

(所属：広島大学大学院医系科学研究科総合健康科学専攻公衆口腔保健学)

## 研究題目：有病者の口腔から分離されたカンジダ株の抗真菌薬感受性と病原因子の検討

### 目的：

真菌感染症に対する治療はこの30年で大幅に進歩したにもかかわらず、侵襲性のカンジダといった重篤な真菌感染症が、依然として高い頻度で発生している。特にカンジダ血症の致死率は約40%と高く、免疫不全患者においては病態や予後を悪化させる重大な脅威である。また、口腔カンジダ症の治療に用いられる抗真菌薬は、抗菌薬と比較しても種類が少ないため、抗真菌薬耐性のカンジダの出現は危険であり、口腔内のカンジダの抗真菌薬感受性の現状を把握することは重要である。

そこで本研究では、入院中の有病者の口腔から得られたカンジダ株の抗真菌薬感受性を明らかにすることを目的とした。

### 対象および方法：

対象は、広島大学病院の入院患者で本研究に同意の得られた成人90名。

#### 1. サンプル採取とカンジダ菌種の同定

舌背を滅菌綿棒で10回擦過し、舌前部に集めた検体を拭い取り、直接カンジダの選択培地であるクロモアガー培地（クロモアガーカンジダ<sup>®</sup>、関東化学、東京）に塗抹し、37℃で48時間培養した。

培養後に形成されたコロニーの色調と形態を観察し、菌種を同定した。

#### 2. 抗真菌薬感受性試験

酵母様真菌感受性キット（ASTY、極東製薬工業株式会社、東京）を使用し、微量液体希釈法により抗真菌薬のミカファンギン（MCFG）、カスポファンギン（CPFG）、フルシトシン（5-FC）、フルコナゾール（FLCZ）、ミコナゾール（MCZ）、イトラコナゾール（ITCZ）、ボリコナゾール（VRCZ）およびアムホテリシンB（AMPH-B）の最小発育阻害濃度（以下、MIC）を測定した。

測定は、保存菌株をそれぞれサブローデキストロール寒天培地に播種し、37℃で24時間培養した。2回前培養を行い、発育した新鮮分離株を使用した。滅菌精製水にコロニーを懸濁し、濁度計（Vi-Spec II、極東製薬工業株式会社、東京）を用いてMcFarland0.5に相当する濁度（吸光度530nm：0.08～0.1）に菌液を調整後、菌希釈液20μlを滅菌精製水2mlに加え、10秒間攪拌を行ったのち、600μlをキット付属の接種用培地に加えた。接種用培地を10秒間攪拌し、薬剤乾燥固着マイクロプレートに100μlずつ分注し35℃で好気培養を行った。

判定は、MCFGとCPFGは24時間培養後に、その他の薬剤は24時間培養後に中間観察を行

い、48時間培養後に最終判定を実施した。いずれの場合も、肉眼的に各ウェルの発育を観察し、MICを決定した。

薬剤耐性株の基準は、MCFG > 2 $\mu$ g/mL、CPFG > 2 $\mu$ g/mL、5-FC  $\geq$  32 $\mu$ g/mL、FLCZ  $\geq$  64 $\mu$ g/mL、MCZ  $\geq$  4 $\mu$ g/mL、ITCZ  $\geq$  1 $\mu$ g/mL、VRCZ  $\geq$  4 $\mu$ g/mL、AMPH-B > 1 $\mu$ g/mLとした。

## 結果および考察：

### 1. 分離した菌種の内訳

対象者90名より、107株のカンジダを分離した。最も多く分離されたのは *Candida albicans* で62株 (57.9%)、次いで *Candida glabrata* 43株 (40.2%)、*Candida krusei* 2株 (1.9%)であった。90例中17例に2菌種の混合感染を認めた。混合感染は *C.albicans* と *C.glabrata* の組み合わせが15例 (88.2%)、*C.glabrata* と *C.krusei* の組み合わせが2例 (11.8%)であった。

### 2. 対象者の背景

対象者の性別は男性69名 (76.7%)、女性21名 (23.3%)、平均年齢は72.4  $\pm$  9.4歳であった。入院の対象となった疾患は、悪性腫瘍79名 (87.8%)、間質性肺炎3名 (3.3%)、非結核性抗酸菌症3名 (3.3%)、その他の疾患5名 (5.6%)であった。

### 3. 抗真菌薬感受性

キャンディン系抗真菌薬のMCFGにおいてMIC > 2 $\mu$ g/mL以上の耐性菌の検出は認められなかった (図1)。

同じくキャンディン系のCPFGにおいても、MIC > 2 $\mu$ g/mL以上の耐性菌は認められなかった (図2)。

フッ化ピリミジン系の抗真菌薬5-FCのMICはMIC  $\geq$  32 $\mu$ g/mL以上の耐性株が *C.krusei* より2株 (*C.krusei* 検出中100%) 検出され、いずれもMIC > 64 $\mu$ g/mLの非常に高い耐性を示した (図3)。

アゾール系のFLCZはMIC  $\geq$  64 $\mu$ g/mL以上の耐性菌が *C.glabrata* より2株 (*C.glabrata* 検出中4.7%) 検出された (図4)。

アゾール系のMCZではMIC  $\geq$  4 $\mu$ g/mL以上の耐性株が4株検出され、その内訳は *C.glabrata* より2株 (*C.glabrata* 検出中4.7%)、*C.krusei* より2株 (*C.krusei* 検出中100%)であった (図5)。

アゾール系のITCZにおいてMIC  $\geq$  1 $\mu$ g/mL以上の耐性株が34株と他の抗真菌薬と比較し非常に多く検出された。34株の内訳は *C.albicans* 1株 (*C.albicans* 検出中1.6%)、*C.glabrata* 32株 (*C.glabrata* 検出中74.4%)、*C.krusei* 1株 (*C.krusei* 検出中50%)であった。検出された耐性株のうち、MIC > 8 $\mu$ g/mLの非常に耐性の高い株も *C.glabrata* より1株検出された (図6)。

アゾール系のVRCZはMIC  $\geq$  4 $\mu$ g/mL以上の耐性株が *C.glabrata* より2株 (*C.glabrata* 検出中4.7%) 検出され、いずれもMIC > 8 $\mu$ g/mLの非常に高い耐性を示した (図7)。

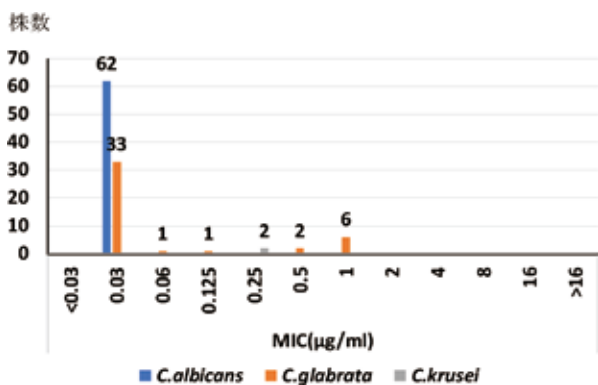


図1 ミカファンギン (MCFG) の MIC の分布

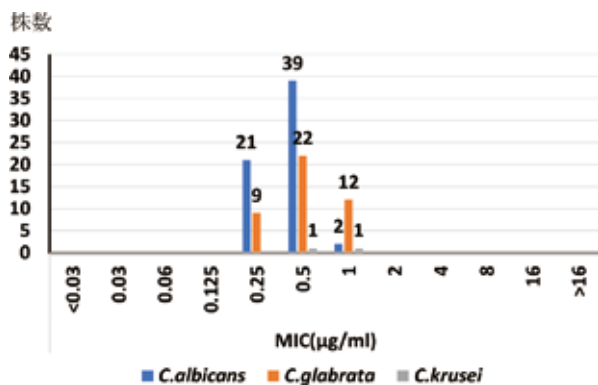


図2 カスポファンギン (CPFG) の MIC の分布

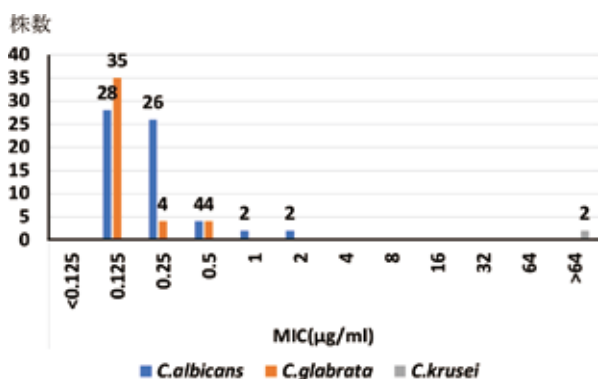


図3 フルシトシン (5-FC) の MIC の分布

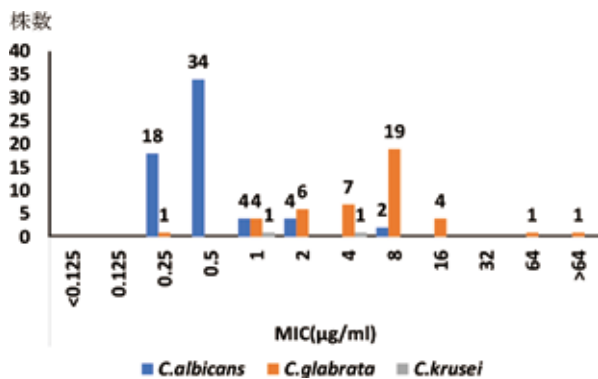


図4 フルコナゾール (FLCZ) の MIC の分布

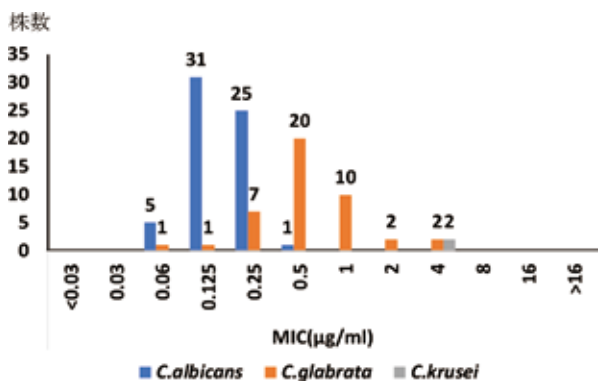


図5 ミコナゾール (MCZ) の MIC の分布

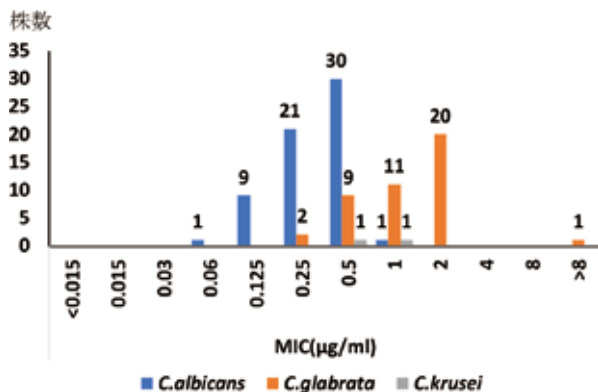


図6 イトラコナゾール (ITCZ) の MIC の分布

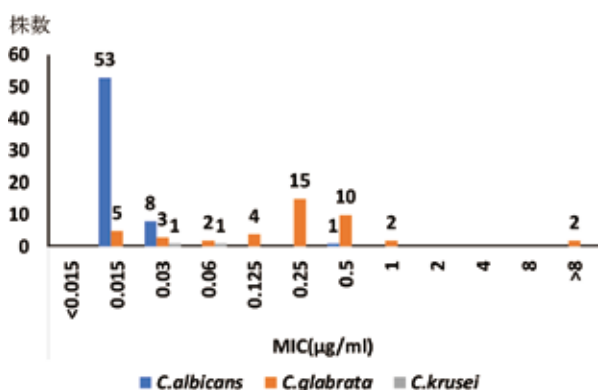


図7 ボルコナゾール (VRCZ) の MIC の分布

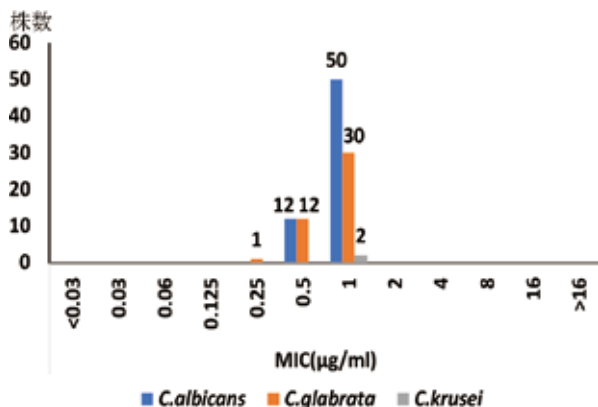


図8 アムホテリシンB (AMPH-B) の MIC の分布

ポリエン系の AMPH-B は MIC が  $> 1\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の耐性菌は認められなかった (図 8)。

本研究の結果、抗真菌薬 8 剤のうち 5 剤より 44 株 (*Candida* 検出中 41.1%) の耐性株が検出された。44 株中 6 株に 2 剤以上の多剤耐性株が検出され、2 剤の耐性を示したのは 4 株で 5-FC と MCZ の組み合わせ 1 株 (*C.krusei*)、FLCZ と ITCZ の組み合わせ 1 株 (*C.glabrata*)、MCZ と ITCZ の組み合わせ 1 株 (*C.glabrata*)、ITCZ と VRCZ の組み合わせ 1 株 (*C.glabrata*) であった。3 剤に耐性を示したのは 2 株で、その組み合わせは 5-FC と MCZ と ITCZ の組み合わせが 1 株 (*C.krusei*)、FLCZ と ITCZ と VRCZ の組み合わせ 1 株 (*C.glabrata*) であり、多剤耐性を示したのはすべて *non-albicans* 種であった。系統別にみると、キャンディン系 2 剤とポリエン系 1 剤からは耐性株は検出されなかったが、フッ化ピリミジン系 1 剤とアゾール系は 4 剤すべてから耐性株が検出された。アゾール系抗真菌薬は MCZ がミコナゾールゲル、ITCZ がイトラコナゾール内用液として口腔カンジダ症の保険適応薬で頻用されている。

今回の調査では、*C.glabrata* 検出中 74.4% と非常に高い割合で ITCZ の耐性を示す株が検出されており、口腔カンジダ症の原因菌として *C.glabrata* が検出された場合は、特にアゾール系抗真菌薬の抵抗性を考える必要があると考えられた。

一方で、最も分離頻度の高い *C.albicans* は、検出された 62 株中、耐性株は 1 株 (*C.albicans* 検出中 1.6%) と抗真菌薬に対しほとんどの株で感受性を示したが、感染力は *C.glabrata* と比較し *C.albicans* のほうが高いとされている。カンジダは酵母系と菌糸系の 2 つの発育形態を示し、口腔粘膜上皮に付着した後、付着が持続すると、増殖状態の菌糸系に変化し、菌糸を伸ばし上皮を穿孔し強固な付着となった後、ホスホリパーゼなどの細胞外酵素を分泌し、口腔粘膜上皮細胞の細胞膜を破壊して細胞を溶解するのみならず、細胞膜表面の性質を変化させ、さらに菌の付着を容易にし、菌の侵入を促進するとされている。*C.glabrata* は増殖期間であっても酵母系を維持し菌糸や仮性菌糸を形成しないことから感染力は弱いとされているが、*C.albicans* は増殖の際に菌糸形成を示すため、*C.albicans* は感染力が高いとされている。

そのため、今後はホスホリパーゼ産生能といった病原因子についても解析を行い、有病者におけるカンジダの現状をさらに明らかにしていく必要があると考える。

**成果発表：**(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

- ・病原因子の解析後、発表予定。