

【要約】

Antifungal susceptibility of *Aspergillus* section *Nigri*
strains isolated in Japan and analysis of the mechanisms
for azole-resistance

(日本で分離された *Aspergillus* section *Nigri* に
おける抗真菌薬感受性とアゾール系薬剤に対する
耐性機序の検討)

千葉大学大学院医学薬学府
先端医学薬学 専攻
(主任： 亀井 克彦 教授)
橋本 亜希

【目的】

黒麹カビである *Aspergillus niger* とその近縁種 (*Aspergillus section Nigri*) は環境中に遍在し、臨床検体からもしばしば分離される真菌である。形態のみからの詳細な菌種の同定は困難であり、calmodulin、 β -tubulin 等の遺伝子解析にて詳細な同定が可能である。日本では肺アスペルギルス症の原因菌として *A. fumigatus* に次いで *Aspergillus section Nigri* が多く分離され、菌種は *A. niger* の他に *A. tubingensis*、*A. welwitschiae* などが知られている。*Aspergillus section Nigri* の薬剤感受性を調査した海外の報告では、イトラコナゾール (ITCZ) 耐性株が多いことが指摘されているが、国内の薬剤感受性等解析株数はこれまで少数にとどまっている。また、薬剤耐性機序について、*A. fumigatus* ではアゾール系薬剤の結合標的蛋白である *cyp51A* 遺伝子の変異や *cyp51A* 蛋白の発現増加、薬剤排出ポンプの過剰発現などが知られているが、*Aspergillus section Nigri* の研究は進んでおらず、耐性機序についても明らかになっていない。今回、日本国内で分離された *Aspergillus section Nigri* の詳細な菌種同定を行い、薬剤感受性とアゾール系薬剤への耐性機序を検討することとした。

【方法】

千葉大学真菌医学研究センターが保存している臨床分離株 80 株と環境分離株 38 株、計 118 株を用い、 β -tubulin 遺伝子の部分配列から詳細な菌種を同定し、CLSI M38-A2 に基づき薬剤感受性を測定した。薬剤耐性機序の候補の一つとして *cyp51A* 変異を検討するため、すべての株でアゾール系薬剤の標的部位である *cyp51A* の全アミノ酸配列を確認した。また、*A. tubingensis* では薬剤耐性機序として *cyp51A* 蛋白の発現増加を検討するため、*cyp51A* 遺伝子発現量を real-time PCR を用いて測定した。

【結果・考察】

試験株は *A. niger* 20 株、*A. tubingensis* 39 株、*A. welwitschiae* 59 株の 3 菌種を含み、分離菌種はイギリスなど欧米からの報告と同様の結果となった。薬剤感受性は、CLSI が *A. niger* について定める epidemiologic cutoff value (ECV) に基づくと、*A. niger* 30-55%、*A. tubingensis* 79.5-89.7%、*A. welwitschiae* 6.8-18.6%が ITCZ またはポリコナゾール (VRCZ) に耐性であった。臨床分離株と環境分離株では ITCZ と VRCZ の感受性に明らかな差は認めなかった。*A. tubingensis* は他の 2 菌種よりアゾール系薬剤に低感受性であった。*cyp51A* アミノ酸配列を感性株と耐性株で比較した結果、各菌種とも *cyp51A* アミノ酸配列が同じ ITCZ、VRCZ 感性株と耐性株が存在したが、*A. niger* と *A. tubingensis* では耐性株にのみ認める変異が 18 箇所確認された。*A. welwitschiae* は耐性株のみに存在する変異は認めなかった。*A. niger*/*A. welwitschiae* と *A. tubingensis* では *cyp51A* アミノ酸配列は大きく異なっており、CYP51A 蛋白の構造の相違がアゾール系薬剤への自然耐性に関与していると考えられた。また、*A. welwitschiae* のアゾール高度感性株 3 株で、*cyp51A* 遺伝子の後半が欠損していることが判明した。当 3 株は *cyp51A* 残存部の塩基配列(1338bp)、*cyp51B*、*cdr1B* 類似配列、*calmodulin* と β -*tubulin* の部分配列が 100%一致しており、3 株の由来は近いと考えられた。他の 2 菌種より自然耐性傾向がある *A. tubingensis* において、real-time PCR を用いてアゾール結合蛋白の CYP51A の発現増加を検討した結果、ITCZ 耐性株 5 株中 1 株で *cyp51A* 遺伝子発現量が感性株より優位に上昇していた。

【結論】

日本で初めて、*Aspergillus* section *Nigri* 100 株を超える株数の詳細な菌種、薬

剤感受性、耐性機序を検討した。今回の結果から、*A. tubingensis* はアゾール系薬に自然耐性傾向があり、適切な治療薬選択のために詳細な菌種同定が重要であると考えられた。また、*cyp51A* アミノ酸変異と *cyp51A* 遺伝子発現量の増加が *Aspergillus* section *Nigri* におけるアゾール系薬剤耐性機序の一部である可能性が示唆されたが、薬剤排出ポンプの過剰発現など他の機序の可能性も含め、今後さらなる検討が必要であるとする。

