

宮崎 泰可 論文内容の要旨

主 論 文

Fluconazole treatment is effective against a *Candida albicans erg3/erg3* mutant in vivo despite in vitro resistance

(*Candida albicans erg3* 欠損株は in vitro でフルコナゾール耐性であるにも関わらず、in vivo ではフルコナゾール治療に感受性を示す)

Taiga Miyazaki, Yoshitsugu Miyazaki, Koichi Izumikawa, Hiroshi Kakeya, Shunichi Miyakoshi, John E. Bennett, Shigeru Kohno

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50:580-586, 2006.

[ページ数 7 ページ]

長崎大学大学院医学研究科 新興感染症病態制御学系専攻
(指導教授：河野 茂 教授)

緒言

カンジダ症の原因菌として最も高い頻度で分離されている *Candida albicans* はフルコナゾール (FLC) に代表されるアゾール系抗真菌薬に通常感受性であるが、近年、耐性菌の急増が問題となっている。アゾール系抗真菌薬は、細胞膜の主成分であるエルゴステロールの合成を阻害するが、*ERG3* 遺伝子によってコードされる sterol C5,6-desaturase の欠損は、このエルゴステロール合成経路に変化をきたし、アゾール耐性を誘導すると考えられている。しかし、実際に *ERG3* に変異を持つアゾール耐性臨床分離株は現在までにわずか数例の報告のみで、その臨床的意義は明らかにされていない。本研究では、*C. albicans* における *ERG3* の欠損が細胞形態、病原性、ならびに薬剤感受性に及ぼす影響を検討し、その臨床的意義を考察した。

対象と方法

C. albicans *erg3* 欠損株を作成するため、まず *URA3* 遺伝子を選択マーカーとする *deletion construct* を作成し、*ura3* 欠損株を用いて相同組み換えによる形質転換を行った。続いて、正常な *URA3* を本来の場所へ再挿入し、*ERG3* を除く他の遺伝子背景が野生株と同一となる *erg3* 欠損株を作成した。全ての遺伝子組み換えの過程はサザンブロットで確認された。

抗真菌薬感受性試験は標準プロトコールである NCCLS M27-A2 (液体希釈法) に準じて行われた。*erg3* 欠損株の病原性を調べるため、BALB/c マウス (8 週齢、雌) の尾静脈より菌液を接種しカンジダ血症を惹起後、生存率と腎内菌数のモニタリングおよび腎の組織学的検討 (Grocott methenamine silver 染色) を行った。治療実験では、菌接種 3 時間後より、FLC (40 mg/kg) を 1 日 1 回、経口投与した。対照群には生理食塩水を投与し、それぞれ 4 日間投与後、両腎を採取し腎内菌数 (CFU/g of kidney) を比較検討した。

結果

C. albicans *erg3* 欠損株作成後、まず既知の表現型 (ステロール成分や抗真菌薬感受性) を確認した。*erg3* 欠損株の *in vitro* での発育率は野生株と同等であったが、FLC の MIC₅₀ (μg/ml) は野生株で 0.125、*erg3* 欠損株では >64 であり、*erg3* 欠損株は FLC に高度耐性を示した。

C. albicans は、環境の変化に応じて異なる形態 (酵母状もしくは菌糸形成) を呈する二形性真菌であるが、菌糸性発育を誘導する環境下 (10% 血清添加培地) で、*erg3* 欠損株は菌糸の形成能に明らかな低下が認められた。同等の菌量 (5×10^5 cells/mouse) を接種したカンジダ血症マウスモデルにおいて、野生株を接種したマウスは実験終了日 (day 23) の時点で生存率 10%、一方 *erg3* 欠損株を接種したマウスの生存率は 100% であった ($P < 0.001$)。また、*erg3* 欠損株の腎内菌数は有意に少なく、組織学的にも野生株が侵襲性の菌糸性発育を呈していたのに対し、*erg3* 欠損株は酵母状細胞を少数認めたのみで正常な菌糸形成は認められなかった。

erg3 欠損株を野生株の 10 倍高い濃度で接種した場合、両者間の腎内菌数に有意差がないことを確認した後、同様の条件下で FLC を投与したところ、野生株、*erg3* 欠

損株ともにそれぞれ生食投与群と比較すると有意に腎内菌数の減少を認めた (P<0.0001 each)。

考察

本研究による新しい知見は、*C. albicans erg3* 欠損株の病原性の低下、マウス腎組織内での菌の発育能および菌糸形成能の低下、さらには *erg3* 欠損株に対する FLC 治療の有効性が *in vivo* で確認されたことである。*ERG3* の変異を有したアゾール耐性臨床分離株がこれまでにごくわずかしか同定されていないのは、この耐性メカニズムの検索が不十分であるためと考えられていたが、*ERG3* 欠損による病原性の低下が感染宿主における菌のクリアランスを容易にしていることも一因であると推察される。野生株によるカンジダ血症マウスモデルでは腎膿瘍形成後の腎不全が主要な死因である。今回確認された *erg3* 欠損株の腎内組織での発育能および菌糸形成能の低下は、病原性低下の主要因と考えられ、ステロール成分の変化が菌糸の形成能に影響を及ぼすことが示唆された。

さらに、*erg3* 欠損株は *in vitro* では高度なアゾール耐性であるにもかかわらず、*in vivo* では FLC 治療に感受性を示すことが今回明らかになり、*C. albicans* において、*ERG3* の欠損単独では臨床上 FLC 治療に対する抵抗性を誘導しえないと考えられた。また、今回の報告は臨床所見と実験室でのデータの乖離を示した一例でもあり、今後、臨床効果の予測に役立つ薬剤感受性試験の開発に寄与するものがあると考えられる。