

## 財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書－中国人研究者・技術者招聘－

2012年3月7日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った中国人研究者・技術者招聘について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：河野 茂   
所属機関名：長崎大学大学院医歯薬学総合研究科  
所属部署名：感染免疫学講座 職名：教授  
所 在 地：長崎市坂本1－7－1  
電 話：095-819-7273 内線：

1. 助成金額：1, 000, 000円

### 2. 研究テーマ

中国吉林省の HIV 浸淫地域における真菌の薬剤耐性と疫学研究

### 3. 成果の概要

中国吉林省の医療施設で分離されたカンジダ属 (*Candida albicans* 17 株、*C. guilliermondii* 8 株、*C. parapsilosis* 9 株) について抗真菌薬の感受性試験を行った。微量希釈法により得られた micafungin (MCFG) の最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) は、*C. albicans* で最も低く、*C. guilliermondii* は最も高かった。fluconazole に関して、*C. guilliermondii* は、*C. albicans* や *C. parapsilosis* に比較して高い MIC 値を示した。amphotericin B に対する感受性は 3 菌種とも感受性を示し差は認められなかった。播種性 *C. guilliermondii* マウスモデルにおける MCFG の治療効果を検討したところ、MCFG を 2.5mg/kg/日 (低用量群)、25mg/kg/日 (高用量群) の用量にて腹腔内投与したところ、高用量群では、腎臓、脾臓、肝臓での菌数が有意に減少し MCFG の有効性を示した。

### 4. 被招聘者

被招聘者氏名：贾冬梅  
所属機関名：北華大学

職名：准教授  
部署名：附属病院

### 5. 滞在日程概要 (日付・主な活動・工程など)

2011 年 9 月 9 日に長崎に到着後、当教室にて実験を開始、2012 年 2 月 26 日に長崎を出発し、帰国した。この間、臨床分離真菌の薬剤感受性試験、臨床分離真菌の薬剤感受性試験、動物モデルを使用し抗真菌薬の有効性評価を行った。



## 中国吉林省にて分離された *Candida guilliermondii* の薬剤感受性試験と播種性マウ

### スモデルにおける micafungin の有用性

研究者氏名 Dongmei Jia  
中国所属機関 北華大学附属病院、吉林市、吉林省、中国  
日本研究期間 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座  
指導責任者 教授 河野 茂  
共同研究者 泉川公一、宮崎泰可

#### 要旨

中国吉林省の医療施設で分離されたカンジダ属 (*Candida albicans* 17 株、*C. guilliermondii* 8 株、*C. parapsilosis* 9 株) について抗真菌薬の感受性試験を行った。微量希釈法により得られた micafungin (MCFG) の最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) は、*C. albicans* で最も低く、*C. guilliermondii* は最も高かった。fluconazole に関して、*C. guilliermondii* は、*C. albicans* や *C. parapsilosis* に比較して高い MIC 値を示した。amphotericin B に対する感受性は 3 菌種とも感受性を示し差は認められなかった。播種性 *C. guilliermondii* マウスモデルにおける MCFG の治療効果を検討したところ、MCFG を 2.5mg/kg/日 (低用量群)、25mg/kg/日 (高用量群) の用量にて腹腔内投与したところ、高用量群では、腎臓、脾臓、肝臓での菌数が有意に減少し MCFG の有効性を示した。

#### Key words

*Candida guilliermondii*, micafungin, 播種性, マウスモデル, 薬剤感受性

#### 緒言：

カンジダ属は院内発症血流感染症の原因菌として第 4 位を占める (1)。*C. albicans* が重症真菌感染症の原因菌として最も検出頻度が高い、他のカンジダ属も日和見感染症の原因微生物として重要である (1)。*C. guilliermondii* は、カンジダ属の中でも稀な種であり、ヒトの粘膜表面や皮膚の細菌叢として検出され、爪白癬の原因真菌として重要である (2, 3)。*C. guilliermondii* は *C. albicans* に比較して病原性は低く、易感染性宿主において播種性カンジダ症および深在性真菌症を引き起こす (1, 2)。カンジダ血流感染症の 1-3% と低い頻度ではあるが、地域により異なる疫学データを示す (4)。本菌感染症の臨床的な問題点は、本菌が fluconazole (FLCZ) やキャンディン系抗真菌薬に対して低感受性であることである (4-6)。FLCZ 耐性 *C. guilliermondii* による骨髄炎の症例では、FLCZ の 400mg/day 治療は無効で、罹患部位の切断が必要になったと報告されている (7)。キャンディン系抗真菌薬は、カンジダ症およびアスペルギルス症に使用される抗真菌薬であり、高いタンパク結合率を有する (8)。*C. guilliermondii* 感染症における MCFG の感受性や活性については報告が少ない。そこで、本研究では、*C. guilliermondii* に対して MCFG、FLCZ、AMPH-B の薬剤感受性試験を行い、MCFG の *C. guilliermondii* に対する臨床的效果を in vivo で検討した。

#### 材料と方法：

##### ①カンジダ臨床分離株

中国吉林省の医療施設で分離されたカンジダ属 (*C. albicans* 17 株、*C. guilliermondii* 8 株、*C. parapsilosis*

9 株)、ならびに標準株として *C. parapsilosis* (ATCC90018)、*C. krusei* (ATCC6258) を用いた。すべての臨床分離カンジダ株は、口腔内、爪、大腿から分離された。すべてのカンジダ株は、CHROMagar (関東化学) と RapID™Yeast プラグシステム (REMEL Inc) によって菌種を同定した。

## ②薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、Clinical and Laboratory Standards Institute の M27-A2 標準法による微量液体希釈法にて行った(9)。MCFG、FLCZ、AMPH-B の最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) を測定した。

## ③感染実験

5 週齢の雌 BALB/c マウス (日本クレア株式会社) を用いた。マウスの取り扱いについて、American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care criteria に基づいて行った(10)。また、本研究は、長崎大学の動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。マウスは、200 mg/kg の cyclophosphamide (Sigma-Aldrich) と 250 mg/kg の 酢酸コルチゾン (Sigma-Aldrich) を、カンジダ感染の 2 日前に腹腔内投与し、さらに感染当日にも等量の免疫抑制剤を投与し免疫抑制状態にした。臨床分離 *C. guilliermondii* は、感染前日まで YPD 液体培地 (Becton Dickinson) で 30°C、一晚、振とう培養した。感染当日に、対数期の細胞を滅菌生理食塩水にて再懸濁、洗浄し、吸光度計にて  $2 \times 10^8$ /ml に調整した。マウスの尾静脈より本菌液の 0.2 ml を経静脈的に接種した (最終接種菌量:  $4 \times 10^7$ /マウス)。MCFG による治療は、MCFG を 2.5 mg/kg ならびに 25 mg/kg を感染当日の感染後 4 時間後、その後、1 回/1 日、連日 7 日間、腹腔内投与した。対象として生理食塩水を腹腔内投与した。マウスは、7 日間観察され 7 日目に屠殺した。屠殺後に、脾臓、腎臓、肝臓を無菌的に除去し、脾臓と腎臓は滅菌生理食塩水 1 ml 中でホモジナイズした。肝臓は、滅菌生理食塩水 0.2 ml 中でホモジナイズした。ホモジネート液の段階希釈液を作成し YPD 寒天培地 (Becton Dickinson) 上に塗布し、35°C でインキュベート、各臓器におけるカンジダの菌数を計算した。感染実験は各治療群 10 匹ずつ使用し 1 回のみ行った。

## ④統計分析

動物実験における各臓器の菌数について、GraphPad Prism、バージョン 5.0 (グラフパッドソフトウェア社) を用いて行った。P<0.05 を統計学的に有意差があるとした。

## 結果:

### ①カンジダ属の薬剤感受性試験結果

表 1 に結果を示す。MCFG の MIC は *C. albicans* で最も低く、*C. guilliermondii* は最も高かった。FLCZ について *C. guilliermondii* は、*C. albicans* や *C. parapsilosis* に比較して高い MIC 値を示した。AMPH-B に対する感受性は 3 菌種で差は認められず感受性を示した。

### ②感染実験と MCFG の有効性

臨床分離 *C. guilliermondii* の各臓器からの検出菌数を、図 1 (脾臓)、図 2 (腎臓)、図 3 (肝臓) に示す。高用量 MCFG 治療群では、脾臓を除いて腎臓、肝臓において菌数を有意に減少させた。

## 考察:

本研究では、中国吉林省の臨床分離カンジダ 34 株について、FLCZ、AMPH-B、MCFG に対する薬剤感受性を検討し、特に *C. guilliermondii* についてマウスにおける MCFG の有用性を検討した。薬剤感受性の結果は、欧米から報告されている種々の報告と比較して大きな差は認められなかった(11, 12)。今回の検討では、カンジダの分離株としては比較的少ない *C. guilliermondii* が多く認められたが、いずれも、FLCZ の MIC 値は高値であり、この点についても既存の報告と大差はなかった(2, 13)。MCFG について、今回検討した 3 菌種では、*C. guilliermondii* が最も高い MIC 値を示した。一方、Canton らは 10%不活化ウシ胎児血清の存在下で、*C. guilliermondii* 19 株に対する MCFG とカスポファンギン (CAS) の感受性を報告しており、MCFG はウシ胎児血清存在下で感受性が非存在下よりも 3 倍程度向上したと報告している。一方、CAS にはそのような効果は認められず、同じキャンディ

ン系抗真菌薬でも差があることを示している(14)。また、他の報告でも、同様に、血清存在下における MCFG の感受性向上が報告されている(8)。一方、*C. guilliermondii* 感染症に対する MCFG の効果を in vivo で検討した報告は少ない。今回の我々の検討では、MCFG は 2.5mg/kg の低用量では、肝臓、脾臓、腎臓における菌数の減少が認められなかったが、25mg/kg の高用量群では、脾臓を除いて、有意に菌数の減少を認め *C. guilliermondii* 感染症における MCFG の有効性を示すことができた。なお、MCFG の高用量群にて、脾臓における菌数の減少傾向は認められたが有意差は認められなかった。この点については、理由は不明であり今後の検討が待たれる。

#### 参考文献：

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol. 2004 Oct;42(10):4419-31.
2. Savini V, Catavittello C, Di Marzio I, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, Bianco A, Pompilio A, Di Bonaventura G, D'Amario C, D'Antonio D. Pan-azole-resistant *Candida guilliermondii* from a leukemia patient's silent funguria. Mycopathologia. 2010 Jun;169(6):457-9. Epub 2010 Feb 5.
3. Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R, Konnikov N, Gupta AK, Summerbell R, Sullivan S, Daniel R, Krusinski P, Fleckman P, Rich P, Odom R, Aly R, Pariser D, Zaiac M, Rebell G, Leshner J, Gerlach B, Ponce-De-Leon GF, Ghannoum A, Warner J, Isham N, Elewski B. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. J Am Acad Dermatol. 2000 Oct;43(4):641-8.
4. Pfaller MA, Diekema DJ, Mendez M, Kibbler C, Erzsebet P, Chang SC, Gibbs DL, Newell VA. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. J Clin Microbiol. 2006 Oct;44(10):3551-6.
5. Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, Hamill RJ, Larsen RA, Horowitz HW, Powderly WG, Hyslop N, Kauffman CA, Cleary J, Mangino JE, Lee J. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Oct;47(10):3149-54.
6. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. J Clin Microbiol. 2006 Mar;44(3):760-3.
7. Masala L, Luzzati R, Maccacaro L, Antozzi L, Concia E, Fontana R. Nosocomial cluster of *Candida guilliermondii* fungemia in surgical patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003 Nov;22(11):686-8.
8. Saribas Z, Yurdakul P, Cetin-Hazirolan G, Arikan-Akdagli S. Influence of serum on in vitro susceptibility testing of echinocandins for *Candida parapsilosis* and *Candida guilliermondii*. Mycoses. 2012 Mar;55(2):156-60.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth microdilution antifungal susceptibility testing of yeast, 2nd ed. Approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
10. Committee on the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Animal Resources, Commission of Life Sciences, National Research Council. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, D.C.
11. Axner-Elings M, Botero-Kleiven S, Jensen RH, Arendrup MC. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* isolates collected during a 1-year period in Sweden. J Clin Microbiol. 2011 Jul;49(7):2516-21.
12. Graybill JR, Bocanegra R, Luther M, Fothergill A, Rinaldi MJ. Treatment of murine *Candida krusei* or *Candida glabrata* infection with L-743,872. Antimicrob Agents Chemother. 1997 Sep;41(9):1937-9.

13. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Identification and Susceptibility Profile of *Candida fermentati* from a worldwide collection of *Candida guilliermondii* clinical isolates. J Clin Microbiol. 2009 Jan;47(1):242-4.
14. Cantón E, Pemán J, Sastre M, Romero M, Espinel-Ingroff A. Killing kinetics of caspofungin, micafungin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Aug;50(8):2829-3

表 1. 中国吉林省にて分離されたカンジダ属の薬剤感受性試験結果

| Candida<br>Species       | No | Geometric mean MIC (range) ( $\mu$ g/ml) obtained by: |                 |               |
|--------------------------|----|-------------------------------------------------------|-----------------|---------------|
|                          |    | MCFG                                                  | FLCZ            | AMPH-B        |
| <i>C. albicans</i>       | 17 | 0.07 (0.03-0.5)                                       | 1.21 (0.125-16) | 0.63 (0.25-1) |
| <i>C. guilliermondii</i> | 8  | 0.44 (0.25-0.5)                                       | 13.5 (4-32)     | 0.56 (0.5-1)  |
| <i>C. parapsilosis</i>   | 9  | 0.37 (0.06-1)                                         | 1.39 (0.5-2)    | 0.67 (0.25-1) |

#### 図の説明

##### 図 1. 播種性 *C. guilliermondii* 感染マウスモデルにおける MCFG の効果 (脾臓における菌数)

各ドットは各マウスから分離された *C. guilliermondii* の菌数を示している。MFG 2.5 は、MCFG 2.5mg/kg/日投与群、MFG25 は MCFG 25mg/kg/日投与群を示す。脾臓から分離された *C. guilliermondii* の菌数は、生理食塩水投与群、MCFG 投与群において有意差を認めなかった。

##### 図 2. 播種性 *C. guilliermondii* 感染マウスモデルにおける MCFG の効果 (腎臓における菌数)

各ドットは各マウスから分離された *C. guilliermondii* の菌数を示している。MFG 2.5 は、MCFG 2.5mg/kg/日投与群、MFG25 は MCFG 25mg/kg/日投与群を示す。腎臓から分離された *C. guilliermondii* の菌数は、生理食塩水投与群、MCFG 低容量群では有意差を認めなかったが、MCFG 高用量群では有意に減少した。

##### 図 3. 播種性 *C. guilliermondii* 感染マウスモデルにおける MCFG の効果 (肝臓における菌数)

各ドットは各マウスから分離された *C. guilliermondii* の菌数を示している。MFG 2.5 は、MCFG 2.5mg/kg/日投与群、MFG25 は MCFG 25mg/kg/日投与群を示す。肝臓から分離された *C. guilliermondii* の菌数は、生理食塩水投与群、MCFG 低容量群では有意差を認めなかったが、MCFG 高用量群では有意に減少した。

図1. 播種性 *C. guilliermondii* 感染マウスモデルにおける MCFG の効果 (脾臓における菌数)

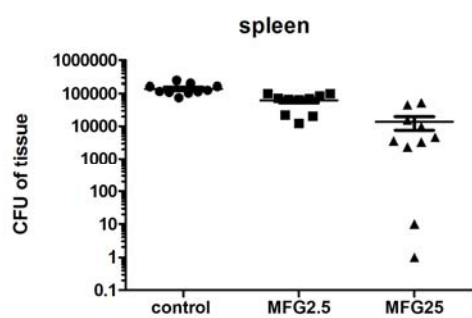


図2. 播種性 *C. guilliermondii* 感染マウスモデルにおける MCFG の効果 (腎臓における菌数)

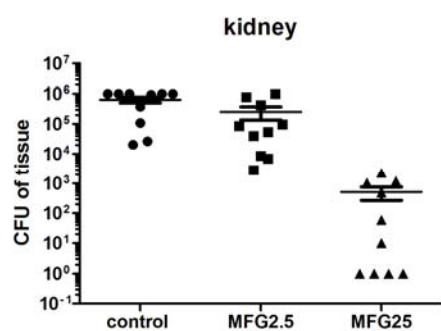
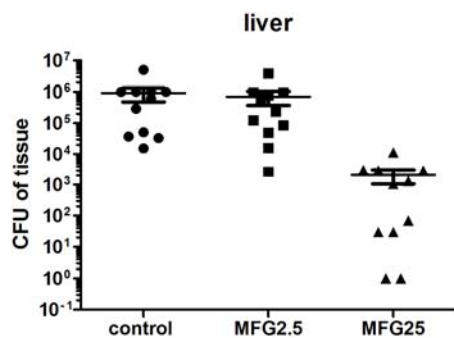


図3. 播種性 *C. guilliermondii* 感染マウスモデルにおける MCFG の効果 (肝臓における菌数)



作成日：2012年2月25日