

症例

新たな FKS 遺伝子変異によるミカファンギン耐性獲得の経過を確認できた *Candida Glabrata* 血症の一例

1) 杏林大学呼吸器内科

2) 杏林大学臨床検査部

皿谷 健¹⁾ 渡邊 崇靖¹⁾ 辻本 直貴¹⁾ 高田 佐織¹⁾ 荒木 光二²⁾
牧野 博²⁾ 米谷 正太²⁾ 滝澤 始¹⁾ 後藤 元¹⁾

[症例] 93 歳男性

[主訴] 喀痰, 咳嗽

[既往歴] 81 歳～ 高血圧 82 歳 狭心症, 83 歳～ 慢性腎不全 (腎硬化症)

[嗜好] 喫煙歴: 50 本/日 20~50 歳, 飲酒歴: ビール 2L/日 20~50 歳

[現病歴] 1 か月前より喀痰が増加し, 右下肺野に浸潤影を認め, 外来での喀痰抗酸菌塗抹陰性であったが, Tb-PCR は陽性で, 6 週間後に *Mycobacterium tuberculosis* が培養陽性となった. 高齢および慢性腎不全を合併していたため, 肺結核の加療目的に入院となった.

[内服薬] なし

[入院時現症] 体温: 36.8℃, 血圧: 129/77mmHg, 脈拍数: 84/分, 呼吸数: 16/分 SpO₂: 97% (室内気), 眼球結膜: 黄染なし, 眼瞼結膜: 貧血なし, 呼吸音, 心音ともに異常なし, 腹部: 平坦軟, 腸蠕動音中等度, 四肢: 軽度浮腫あり, 爪白癬あり

[初診時検査所見] WBC 6700/ μ L, RBC 347 万/mL, Hb 9.2g/dL, Plt 24.3×10^4 / μ L, Alb 2.5g/dL, T-Bil 0.3mg/dL, GOT 23IU/L, GPT 21IU/L, LDH 226IU/L, Na 139mmol/L, K 5.3mmol/L, Cl 109mmol/L, BUN 74.5mg/dL, Cr 4.7mg/dL, CRP 2.0mg/dL

Fig. 1

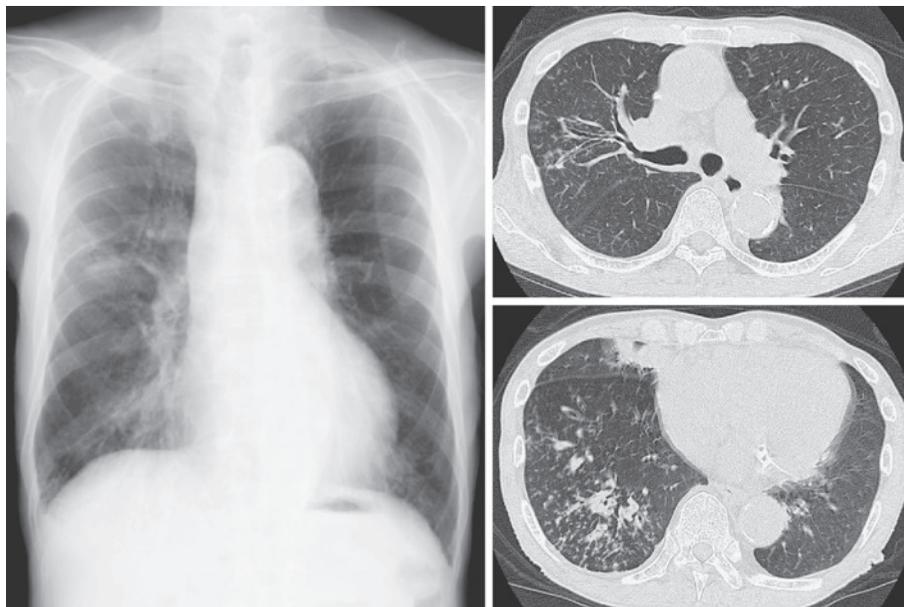


Fig. 2 臨床経過 1

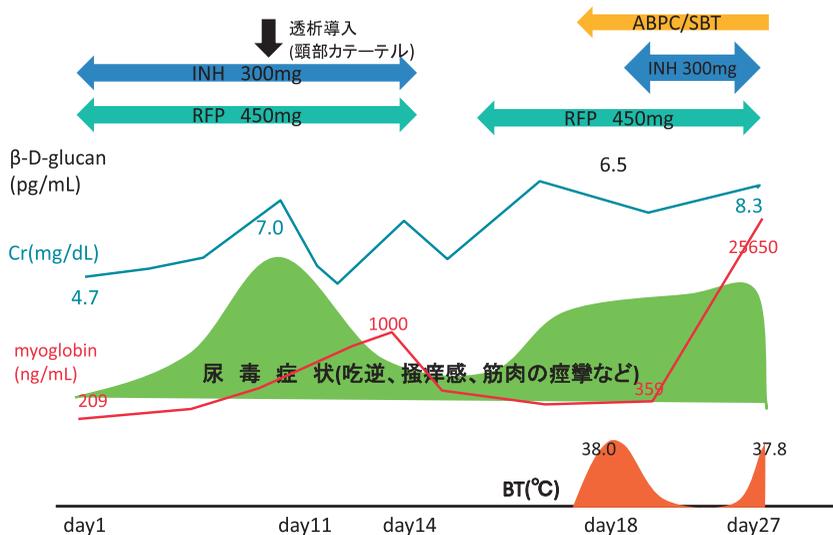
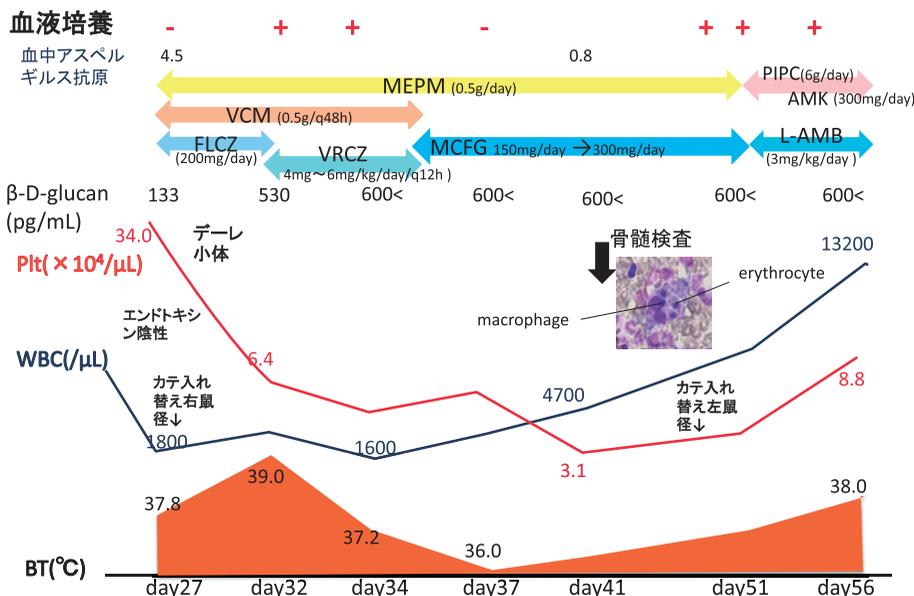


Fig. 3 臨床経過 2

FLCZ: fluconazole, MCFG: micafungin, L-AMB: Liposomal amphotericinB, MEPM: meropenem, PIPC: piperacilline, VRCZ: voriconazole



[入院胸部 X-p, 胸部単純 CT] (Fig. 1)

胸部 X-p では右中下肺野に粒状影と浸潤影を認める。胸部単純 CT では右上葉に気管支壁肥厚を認め tree-in-bud sign を伴う粒状影を認める。右下葉にも同様に粒状影を認め、気管支内に棍棒様に詰まる粘液栓を伴っている。

[臨床経過 1] (Fig. 2)

イソニアジド 300mg とリファンピシシ 450mg で治療を開始後 1 週間で腎機能が増悪し (Cr. 7.0mg/

dL), 尿毒症症状 (吃逆, 筋痙攣, 皮膚の掻痒感, クスマウル呼吸) も出現した。ミオグロビン値は高値で横紋筋融解症も来たしたため, day11 に透析用のカテーテルを挿入し, 透析導入とし, 抗結核薬は中止とした。尿毒症の改善後に抗結核薬を順次再開したところ, イソニアジドによる横紋筋融解症が再燃し尿毒症, アシドーシスの進行を認め day27 に突如のショックバイタルとなった (Fig. 2)。

Table 薬剤感受性検査

sample No.	AMPH-B	5-FC	FLCZ	MCZ	MCFG	ITCZ	VRCZ
day32	0.5	0.125	16	0.5	0.06	1	0.25
day34	0.5	0.125	8	1	0.06	1	0.5
day48	0.5	0.125	8	1	0.06	1	0.5
day51	0.25	0.125	8	0.5	2	1	0.5
day56	0.25	0.125	8	0.5	4	1	0.25

CLSI-M27-S3: candidin 系全てにおいて MIC \leq 2 なら S, MIC $>$ 2 で R

CLSI-M27-S4: S \leq 0.06, SDD 0.12, R \geq 0.25

S: Susceptible, SDD: Susceptible, dose dependent, R: Resistant

[臨床経過 2] (Fig. 3)

入院後に繰り返す誤嚥のエピソードがあり一般細菌による誤嚥性肺炎の可能性、カテーテル感染症を疑い、day27にカテーテルを入れ替え、meropenem 0.5g/day, vancomycin 0.5g/day, 及び fluconazole 200mg/day で治療を開始した。Day27の血液培養は陰性であったが、血中の β -D グルカン高値 (133pg/dmL) を認めた (day18は陰性)。day32にDay27に採取したアスペルギルス抗原陽性 (4.5) が判明し fluconazole から voriconazole (4-6mg/kg/day) へと変更した。ショックバイタルは数日で離脱したものの day35に *Candida glabrata* が検出 (day27に採取) されたため IDSA のガイドラインに準じて voriconazole を micafungin へと変更した。Day37の血液培養は陰性化し、解熱したが、血小板減少と β -D-glucan 高値は継続し day41に骨髄穿刺を施行したところ巨核球の貪食像を認め *C. glabrata* 感染に伴う血

球貪食症候群と診断した。Day48, 51の血液培養から再度 *C. glabrata* が検出されたためカテーテルを再度入れ替え (day50), MCFG 耐性が判明したため Day53より liposomal amphotericin B (3mg/kg/day) に変更した。経胸壁超音波検査 (day55) では明らかな疣贅は指摘できず、腹部エコーや胸腹部 CT では菌血症の感染巣となりうる所見は認めなかった。徐々に全身状態が悪化し、day59に菌血症にて死亡退院となった。血液培養で検出された *C. glabrata* のその後の薬剤感受性検査 (Table) (酵母真菌薬剤感受性キット ASTYASTY で測定, 極東製薬工業株式会社) では day51以降に検出された *C. glabrata* は CLSI-M27-S3 及び S-4 のどちらの基準においても MCFG 耐性であることが確認された。(Sarara T, Tanabe K et al. J. Clin. Microbiol 2014 Apr. 30. [Epub ahead of print])

“本症例の疑問点” から “研究的考察” へ

国立感染症研究所 真菌部第1室

田辺 公一 宮崎 義継

■真菌感染における MIC の測定意義について

侵襲性真菌症の主要な原因菌として、*Candida* と *Aspergillus* があげられる。これらの真菌の臨床分離株については全世界的サーベイランスが継続的に実施されており、集団としてみると薬剤感受性の著明な低下はないと考えられている¹⁾。ただし、用いられる抗真菌薬と菌種によっては高度耐性化が報告されるケースもあるため、分離株の薬剤感受性試験は定期的に行われることが望ましい。また、*Candida* 属の薬剤感受性試験における clinical break point が 2012 年に大幅に変更されたことから²⁾、これまで感性和判定されていたような菌株が耐性と判定されるケースが増加する可能性が考えられる。

■MIC の測定方法の違いについて (ASTY と CLSI)

真菌の薬剤感受性試験として、微量液体希釈法とディスク拡散法があげられる。ディスク拡散法は簡便であり、液体中で菌の発育を判定するのが困難な菌種においては有効であるが、生育阻止円の大きさは実験条件の微細な違いによって変化しうするため、正確な MIC の測定は困難である。したがって、真菌の薬剤感受性の変化を正確にモニタリングするような場合には微量液体希釈法を用いることになる。

微量液体希釈法は、CLSI が定めた標準法にしたがって行うのが望ましいが、酸化還元酵素反応量によって菌の生育を判定する酵母真菌薬剤感受性キット ASTY (極東製薬工業) も利用可能である。ASTY は CLSI と比較して若干操作が煩雑であるが、MIC の判定が極めて容易であるという大きな利点がある。また、CLSI 法と ASTY は、多検体を用いた試験において両者の結果に顕著な相違は認められない³⁾。以上の考察より、ASTY は臨床現場における通常の薬剤感受性試験に有用であると考えられる。しかし、いったん高度耐性株が検出された場合には、適切な抗真菌薬を決定する判断基準とするために、CLSI 法による追試を行って MIC を決定する必要があるだろう。

■MCFG 耐性のメカニズムはどこまでわかっているのか？

キャンディン耐性 *Candida* 株の報告例は、日本国内ではまだ少数だが⁴⁾、欧米での報告数は年々増加傾向にある。キャンディン系抗真菌薬の標的分子 (β -1,3 グルカン合成酵素) をコードする *FKS* 遺伝子上の変異が高度耐性を引き起こすと考えられている。耐性株で観察される変異はアミノ末端から 650 番目付近

Fig. 1 本症例で分離された *Candida glabrata* 株の遺伝子解析結果

Sample number	<i>FKS1</i>	<i>FKS2</i>	MLST
day32	WT	WT	22
day34	WT	WT	22
day48	WT	F659 Δ +L1767 Δ	22
day51	*gene conversion	F659 Δ	22
day56	*gene conversion	F659 Δ	22

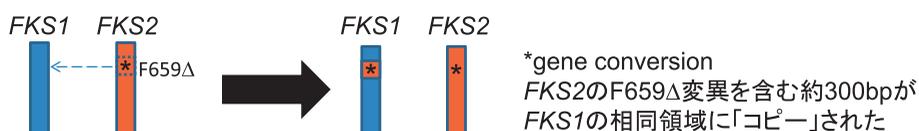
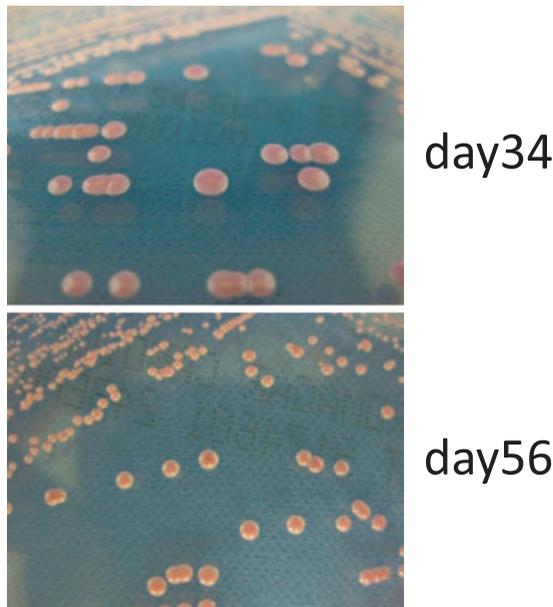


Fig. 2 本症例で分離された *Candida glabrata* 株のコロニー性状



の hot spot 領域においてアミノ酸置換を引き起こすものが多く、変異の種類もある程度限定されている。しかし、高度耐性株の変異 *FKS* 遺伝子を実験室株で発現させても耐性化しない例が報告されており⁹⁾、標的分子である 1,3-β-グルカン合成酵素の機能変化以外の耐性化のメカニズムも存在するのかもしれない。

本症例において分離された *C. glabrata* の *FKS* 遺伝子 (*FKS1* と *FKS2*) の塩基配列を決定したところ、day48 に分離された感性株の *FKS2* に 659 番目のフェニルアラニンの欠失変異 (F659Δ) が認められ、day51 および day56 の耐性株において *FKS2* の F659Δ 変異を含む約 300bp の領域が、*FKS1* の相同領域に遺伝子変換 (gene conversion) されていた (Fig. 1)。また MLST 解析の結果、いずれの株も遺伝子型 22 であったことから、本症例で分離された *C. glabrata* 株はいずれも単一の親株に由来する株である可能性が高いと考えられた。

FKS2 の F659Δ 変異は、多くのキャンディン耐性株で報告されている変異であり、耐性化の原因であると考えられているが、本症例の day48 の株は感性のままであった。この結果は文献 4 の結果を支持するものであり、耐性化に関わると予想されているすべての *FKS* 遺伝子の変異が耐性化に寄与するわけではないことを示唆している。ただし、day48 株の *FKS2* にはカルボキシル末端近傍に L1767Δ 変異も認められ、これまでに報告のないこの遺伝子変異が

キャンディン感受性に及ぼす影響については検証が必要である。また、*FKS2* から *FKS1* への gene conversion が生じた 2 株がいずれもキャンディン耐性であることから、この gene conversion が耐性化を引き起こしたと考えられる。これまでに遺伝子組み換えのキャンディン耐性化への関与を報告した例はなく、本症例は *C. glabrata* における新規の分子機構によるキャンディン耐性化の一例であると考えられる。

また興味深いことに、day51 および day56 に分離されたキャンディン耐性化 *C. glabrata* は、クロムアガーカンジダ培地上でそれまでに分離されていた感性の *C. glabrata* と比較して濃色でサイズの小さいコロニーを形成した (Fig. 2)。耐性株で観察された *FKS* 遺伝子変異は、*C. glabrata* にキャンディン耐性を付与する代わりに、野生型よりもグルカン合成酵素活性を低下させ、薬剤の存在しない培地での生育速度を低下させたと推測することができる。本症例は特殊な一例かもしれないが、今後耐性株が分離された際にコロニー形態以外にも多面的にデータを蓄積していけば、真菌の薬剤耐性化を簡便に識別できる検査法開発に役立てられるかもしれない。

文献

- 1) Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M: Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. *J Clin Microbiol.* 2013 Aug; 51 (8): 2571—81.
- 2) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement: CLSI M27-S4, 2012.
- 3) 山根誠久, 猪狩 淳: 酵母真菌を対象とする Colorimetric Broth Microdilution 法での抗真菌剤薬剤感受性試験の検討—国内 17 施設での共同評価. *臨床病理* 1997; 45 (2): 190—9.
- 4) 乾佐知子, 中村竜也, 田辺公一, 大野秀明, 小池千裕, 奥田和之, 他: *FKS2* 遺伝子内変異による Micafungin 低感受性 *Candida glabrata* が検出された 1 例. *感染症誌* 2011; 85: 49—53.
- 5) Katiyar SK, Alastruey-Izquierdo A, Healey KR, Johnson ME, Perlin DS, Edlind TD: *Fks1* and *Fks2* are functionally redundant but differentially regulated in *Candida glabrata*: implications for echinocandin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Dec; 56 (12): 6304—9.

症 例

FKS2 遺伝子内変異による Micafungin 低感受性 *Candida glabrata* が
検出された 1 例

¹⁾ 関西医科大学附属枚方病院臨床検査部, ²⁾ 国立感染症研究所生物活性物資部

乾 佐知子¹⁾ 中村 竜也¹⁾ 田辺 公一²⁾ 大野 秀明²⁾
小池 千裕¹⁾ 奥田 和之¹⁾ 中田 千代¹⁾ 藤本 弘子¹⁾
大倉ひろ枝¹⁾ 宮崎 義継²⁾ 高橋 伯夫¹⁾

(平成 22 年 2 月 1 日受付)

(平成 22 年 10 月 5 日受理)

Key words: *Candida glabrata*, drug resistant, micafungin, FKS2 gene

序 文

カンジダ症は、広域抗菌薬の使用、中心静脈カテーテルの使用、好中球減少、人工器官の移植や免疫抑制剤使用などがリスク要因となっており¹⁾、免疫不全症を代表とする感染抵抗力の低下した宿主に感染しやすい内因性の日和見感染症となる場合があり、主に呼吸器感染症、婦人科領域感染症、性感染症、尿路感染症などで検出される²⁾。

現在、真菌症治療には、ポリエン系、ピリミジン系、アゾール系、キャンディン系の 4 系統の抗真菌薬が承認され使用されている。ポリエン系薬剤の amphotericin B (AMPH-B) は最も幅広い抗真菌活性を示し *Candida* 属および *Aspergillus* 属に対し殺菌的に作用するが、副作用が強い。Fluconazole (FLCZ) に代表されるアゾール系薬剤は安全性や体内動態の面で AMPH-B より優れているが、*Candida glabrata* に対して低感受性を示すことが多く、アゾール系薬剤耐性株の多くはアゾール系薬剤全般に交叉耐性を示す。2002 年より本邦で承認・発売されたキャンディン系薬剤の Micafungin (MCFG) は、ヒトには存在しない真菌細胞壁の主要構成成分である 1,3-β-D-グルカンの生合成を阻害することにより *Candida* 属に対しては殺菌的に *Aspergillus* 属に対しては静菌的に作用し、優れた抗真菌活性を示すことが報告^{3)~7)}されており、臨床で広く使用されている。

一方で、近年 *C. albicans* のみならず他の *Candida* 属においても欧米を中心に MCFG 低感受性株の報告が

散見され、その耐性化機構が解明されている^{8)~12)}。本邦においては MCFG 発売以降 *C. glabrata* に対する低感受性株を臨床検体から分離したとの報告は少ない。

今回、臨床検体より MCFG 低感受性 *C. glabrata* が検出され、その低感受性の原因解析を行ったので報告する。

症 例

以下の症例から検出された MCFG 低感受性 *C. glabrata* について細菌学および遺伝子学的解析を行った。

症例：79 歳、女性。主訴：左上下肢の麻痺、構音障害。既往歴：特記すべきものなし。

現病歴：高血圧で近医に通院中、2009 年 5 月より浮腫が出現し、増強してきたため 6 月 1 日に他院にて急性腎炎症候群の加療をしていた。しかし、腎機能の悪化、血小板の減少が著明となり、他病院に転院となった。6 月 12 日夕方より、左半身麻痺と意識レベル低下を認めたため MRI を実施した結果、脳梗塞が認められた。腎障害・血小板減少・神経症状があり血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) を疑ったため、6 月 13 日精査加療目的にて当院救命救急科に入院となった。

入院時現症：血圧 183/90mmHg、脈拍 108/min、体温 36.8℃。意識清明で心音・呼吸音ともに異常は認められなかった。下肢に陥凹する浮腫が認められた。

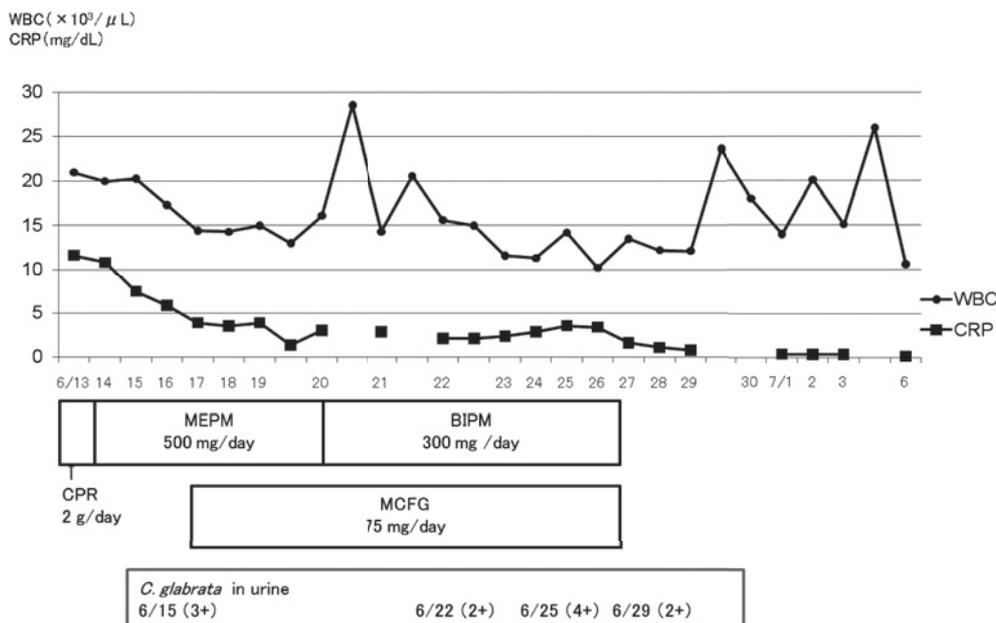
入院時検査所見：胸部 CT 検査にて両側胸水が認められた。血液検査結果は、APTT 31.7 秒、PT 活性 67.7%、フィブリノゲン 410mg/dL、FDP-D ダイマー 15.8μg/mL、アンチトロンビン III 68mg/dL、白血球数 210×10³/μL、血小板数 3.0×10⁴/μL、ヘモグロビン 8.6g/dL、BUN 38mg/dL、クレアチニン 2.66mg/dL、

別刷請求先：(〒573-1191) 大阪府枚方市新町 2-3-1

関西医科大学附属枚方病院臨床検査部

乾 佐知子

Fig. 1 Clinical manifestation, white blood cell count, and serum C-reactive protein.



CRP 11.614mg/dLであった。

臨床経過：TTP治療として血漿交換，血液透析，ステロイド療法が行われた。入院時に感染症が疑われたため，血液培養検体採取後に抗菌薬投与開始となった。6月13日にcefpirome (CPR) 2g/日 (1g×2)が1日投与され，6月14日から19日までmeropenem (MEPM) 500mg/日が投与された。6月15日の尿培養から*C. glabrata*が検出されていたため，尿路感染症の可能性も考慮し6月17日から26日までMCFG 75mg/日が追加投与された。6月20日からMEPMからbiapenem (BIPM) 300mg/日に変更され26日まで投与された。各種培養，画像診断にて明らかな感染源は認められず，CRPは低下し，白血球数はCastleman's diseaseにより産生されるインターロイキン-6により好中球の活性が上昇していることが考えられたため，6月27日より一旦抗菌薬および抗真菌薬は中止された。その後，発熱や炎症反応の悪化は認められなかった (Fig. 1)。なお，本患者は当院においては尿道カテーテルの留置はされていなかった。

1. 細菌学的検査

*C. glabrata*の検出は，クロモアガーカンジダ寒天培地 (日本BD) を使用した。同定はスライド培養法 (コーンミール培地を使用) による菌糸形成試験およびRapID Yeast Plus (アムコ) を使用した。薬剤感受性試験はCLSI M27-A3の実施基準に基づいた酵母様真菌FP '栄研' (栄研化学) を使用し，MCFG, AMPH-B, flucytosin (5-FC), FLCZ, itraconazole (ITCZ), voriconazole (VRCZ), miconazole (MCZ) の7薬剤で測定した。判定は，AMPH-Bは完全発育阻止を，そ

れ以外の薬剤は陽性コントロールに対して50%の発育阻止 (IC₅₀) を基準とし，それ未満の発育を発育阻止としてMIC値を求めた。

2. 遺伝子学的解析

MCFG低感受性の原因と考えられる*FKS1*および*FKS2*領域の遺伝子の変異を解析した。MCFG低感受性株からGENとるくん (TAKARA) によってゲノムDNAを抽出し，*FKS1*および*FKS2*をコードする領域の全長をそれぞれPCRによって増幅した。*FKS1* (7332 bp) の増幅プライマーとして，Cg*FKS1*/-498F (5'-TTGGAAACTGCATGAACCGTGCGA-3') とCg*FKS1*/6834R (5'-TTTGCTAGTTGAAGGACGATCAGTC-3')，*FKS2* (7941bp) の増幅プライマーとして，Cg*FKS2*/-500F (5'-GTTTCTGATCTCTTCCGTCCTCTC-3') とCg*FKS2*/7441R (5'-CTAGGTCTAGTTCATGTTCGAAGCAG-3') を用いた。PCR反応は50μLの反応液を用い，PCR条件は94°C, 30秒; 56°C, 15秒; 72°C, 4分の計35サイクルで行った。また，PCR酵素にはPhusion DNA High-Fidelity DNA Polymerases (FINNZYMES) を用いた。反応後，PCR産物はExoSAP-IT (GEヘルスケア) を用いて精製し，Dye terminator法 (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) にて*FKS1*および*FKS2*の塩基配列を決定した。塩基配列決定にあたっては*FKS1*，*FKS2*ともに全長を12個の部分に分割して塩基配列を決定し，最終的に全てをつなぎ合わせ全長の塩基配列とした。*FKS1*はGenBank accession number; XM_446406を，*FKS2*はXM_448401を野生型株の塩基配列として比較解析を行った。

結 果

1. 細菌学的検査

C. glabrata は 6 月 15 日, 22 日, 25 日, 29 日の尿から検出された。25 日の尿培養において, 菌量も多く, 塗抹にて貪食像も見られたため感受性試験も行った。Rap ID Yeast Plus による同定は, 99.9% の確率で *C. glabrata* と同定された。また, クロモアガーカンジダ寒天培地によるコロニーの発色は典型的なコロニー色であった。スライド培養法による菌糸形成試験において, 菌糸の発育は認められなかった。薬剤感受性試験の結果を Table 1 に示した。MCFG の MIC 値は 2 μ g/mL と低感受性を示した。

2. 遺伝子解析

6 月 25 日に検出された MCFG の MIC 値 2 μ g/mL を示した *C. glabrata* 株の FKS1 および FKS2 の塩基配列を決定した結果, 野性株と比較して FKS2 遺伝子上の 659 番目のフェニルアラニンにコードする 1975~1977 番目の 3 塩基 TTC の欠失変異が認められた (Fig. 2)。FKS1 遺伝子には変異は認められなかった。

考 察

キャンディン系抗真菌薬の作用機序は, 真菌細胞壁を構成するために必要な 1,3- β -D-グルカン合成酵素の触媒サブユニットを標的としており, 酵素活性が阻害されると 1,3- β -D-グルカンの合成が止まり菌は膨化して溶菌し死滅する。1,3- β -D-グルカン合成酵素は, 細胞膜内在性の触媒サブユニット (FKS 遺伝子産物) と細胞質内に存在する調節サブユニット (RHO 遺伝子産物) からなる複合タンパクであり, 触媒サブユニット遺伝子は FKS1, FKS2, FKS3 が同定されている。FKS1 と FKS2 の間ではアミノ酸レベルで 85% の同一性があり, 前者は通常の栄養発育において, 後者は孢子

形成の際に発現し, この遺伝子の破壊は致死的である。耐性株では, この FKS にあるキャンディン耐性 (EchR) 領域と呼ばれる部位に単一アミノ酸置換変異がおこることでキャンディンが標的分子を阻害できなくなると推測されており, 新見ら¹¹⁾は, アミノ酸置換変異と耐性との関係を実験的に証明するため, 感受性株を用いて部位特異的変異導入を行い, それらの変異が耐性獲得に寄与すること, またその過程で *C. albicans* の場合は単一の遺伝子が, *C. glabrata* の場合は同一性の高い 2 つの遺伝子がそれぞれ酵素複合体タンパクの触媒サブユニットを構成していることが示唆されている。

今回検出された *C. glabrata* では, FKS1 領域のアミノ酸置換変異ではなく FKS2 領域の 659 番目のフェニルアラニンの欠損 (F659del) が認められた。F659del は, Garcia-Effron らの研究¹²⁾の中で検出された *C. glabrata* のキャンディン低感受性株 (MCFG の MIC 4 μ g/mL) の 1 つと同じタイプのものであり, 同様の機序が感受性低下の要因と考えられる。本菌株では FKS1 遺伝子には変異は認められなかったが, FKS1 遺伝子におけるアミノ酸置換変異が起こっている例では MIC が高いもので 100 倍以上増加している報告¹³⁾もあり, 今後, 臨床例においてさらに高度耐性化に発展する可能性がある。

キャンディン系抗真菌薬は, 副作用が少ないことと優れた抗菌活性から, その使用頻度は増加し続けることが予想される。一方で, 長期使用による耐性化が懸念され, FKS アミノ酸置換変異による低感受性株の出現の背景には, キャンディン系抗真菌薬の長期使用の関与が報告されている。Cleary らの報告⁹⁾では, 播種性カンジダ症患者において caspofungin による 14 日間治療後に検出された *C. glabrata* が FKS1 領域のアミノ酸置換変異 (D632E) によりキャンディン系抗真菌薬 (caspofungin, MCFG, anidulafungin) の MIC 値が 2 μ g/mL 以上を示しており, Thompson らの報告¹⁰⁾では, 肝移植患者のカンジダ症において caspofungin による治療後 40 日後に腹水から検出された *C. glabrata* が FKS2 遺伝子におけるアミノ酸置換変異 (F659V) により caspofungin の MIC 値が 2 μ g/mL 以上を示したとある。

本症例では, MCFG が 10 日間投与されており, 耐

Table 1 *C. glabrata* in vitro antifungal susceptibility
25 June 2009

Anti-fungal agents	MIC (μ g/mL)	Category (CLSI)
Micafungin	2	S
Amphotericin B	0.25	
Flucytosin	≤ 0.12	S
Fluconazole	4	S
Itraconazole	0.5	I
Voriconazole	0.12	S
Miconazole	0.12	

Fig. 2 3-base (TTC) deficits coding amino acid 659, phenylalanine in *C. glabrata* FKS2 gene isolated in this case (upper row). The lower row shows the same wild type sequence.

1921:TCTTATTAGTTTGGGTTACAGTTTTTGCTGCCAAATACTCTGAATCGTACTTC***TTG 1980

1921:TCTTATTAGTTTGGGTTACAGTTTTTGCTGCCAAATACTCTGAATCGTACTTCTTCTTG 1980

* : deficits

性化に何らかの影響があったと考えられるが、最初2回の検査では定着と考えられ感受性試験は行われず、菌株も保存されていないため、経時的なMIC値の変化や遺伝子変異の解析は不可能であった。しかし、治療面においても *C. glabrata* の消失には至っておらず、この種の耐性化により臨床的治療に難渋するケースが存在するものと考えられる。また、IDSAガイドライン¹⁾においてカンジダによる尿路感染症の治療は fluconazole または amphotericin B が推奨されており MCFG は適していない可能性があるが、本症例では腎炎を患っており入院時にはCRPや白血球数等の炎症反応の数値も高く、尿路由来の敗血症を考慮しカンジダ血症の場合に推奨される MCFG を使用したと考えられる。しかし、血液培養陰性と判明した時点で投与期間を短縮あるいは尿路感染症の推奨薬剤への変更も可能であったと考えられ、耐性獲得を避けるためにも抗真菌薬投与の見直しは必要と思われた。

日本国内での *Candida* 属に対する MCFG 耐性率の報告は少なく、ほとんどの報告は0%であるが¹⁴⁾、北陸における1999年から2005年の調査¹⁵⁾では *C. glabrata* で7% (15株中1株)であった。サーベイランス結果は少ないものの、国内においても MCFG 低感受性の症例報告が学会等で報告されている¹⁶⁾¹⁷⁾。2008年に CLSI document M27-A3 が公表され、*Candida* 属に対するキャンディン系抗真菌薬の感受性試験は50%発育抑制をエンドポイントとする判定でブレイクポイントは $\leq 2\mu\text{g/mL}$ と提案された。池田ら¹⁸⁾はこの CLSI document M27-A3 についての検証から、発育の遅い菌種もあり菌種ごとに最適化すべきでありさらなる検証が必要ではあるものの、従来法と比較して再現性が高くパラドキシカル効果やトレーリング現象の影響を受けず真に低感受性株の検出が可能であることが判明したと述べている。このように抗真菌薬の薬剤感受性試験が標準化されつつあり世界規模でサーベイランスが実施されていくなかで、今後は、更なる耐性獲得の解明や耐性状況を把握することにより、耐性株増加に注意していく事が肝要である。

文 献

- 1) Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, et al. : Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2009 ; 48 : 503—35.
- 2) 深在性真菌症の診断・治療ガイドライン作成委員会編 : 深在性真菌症の診断・治療ガイドライン 2007 [1] 疫学. 協和企画, 東京, 2007 ; p. 36—8.
- 3) 小松 方, 相原雅典, 島川宏一, 岩崎瑞穂, 長坂陽子, 福田砂織, 他 : 天理病院で分離された酵母様真菌に対する抗真菌薬の抗菌力について—特にキャンディン系抗真菌薬ミカファンギンの抗菌力—. Jpn. J. Antibiotics 2003 ; 56 : 705—11.
- 4) 深澤裕美, 遠藤 武, 内田 幹, 三上美恵, 大屋とし子, 井上清太郎, 他 : 山梨県内で実施した *Candida* 属サーベイランス. 日治療会誌 2004 ; 52 : 654—9.
- 5) 池田文昭 : キャンディン系抗真菌薬ミカファンギン. 真菌誌 2005 ; 46 : 217—22.
- 6) 小林寅喆, 鈴木真言, 雑賀 威, 池田文昭, 堀康宏, 松本 哲, 他 : 【市販後調査】臨床分離 *Candida* 属 および *Aspergillus* 属 真菌の micasfungin 感受性—第2報—. 日治療会誌 2008 ; 56 : 344—52.
- 7) 西丸智枝, 佐々木恵美, 吉森智子, 沼岡嘉子, 藤村鈴栄, 井上芳彦, 他 : 当院におけるカンジダ属の分離状況. 広島市民病院医誌 2008 ; 24 : 55—60.
- 8) Katiyar S, Pfaller M, Edlind T : *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. Antimicrob Agents Chemother 2006 ; 50 : 2892—4.
- 9) Cleary JD, Garcia-Effron G, Chapman SW, Perlin DS : Reduced *Candida glabrata* susceptibility secondary to an *FKS1* mutation developed during candidemia treatment. Antimicrob Agents Chemother 2008 ; 52 : 2263—5.
- 10) Thompson GR 3rd, Wiederhold NP, Vallor AC, Villareal NC, Lewis JS 2nd, Patterson TF : Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infection. Antimicrob Agents Chemother 2008 ; 52 : 3783—5.
- 11) 新見京子, 新見昌一 : キャンディン系抗真菌薬と耐性機構. 真菌誌 2009 ; 50 : 57—66.
- 12) Garcia-Effron G, Lee S, Park S, Cleary JD, Perlin DS : Effect of *Candida glabrata* *FKS1* and *FKS2* Mutations on Echinocandin Sensitivity and Kinetics of 1,3- β -D-Glucan Synthase : Implication for the Existing Susceptibility Breakpoint. Antimicrob Agents Chemother 2009 ; 53 : 3690—9.
- 13) Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS : Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of *FKS1* mutant glucan synthases for *Candida albicans* : implications for interpretive breakpoints. Antimicrob Agents Chemother 2009 ; 53 : 112—22.
- 14) 山口英世 : 真菌の薬剤耐性化の現状は？そして今後は？ モダンメディア 2010 ; 56 : 119—38.
- 15) 藤田信一 : 各種抗真菌薬の血液由来 *Candida* 属に対する抗真菌活性. 日治療会誌 2007 ; 55 : 257—66.
- 16) 斧 康雄, 田中孝志, 川上小夜子, 宮澤幸久, 西山彌生, 内田勝久, 他 : Micasfungin 耐性の *Candida glabrata* を検出した1症例. 真菌症フォーラム第5回学術集会抄録集. 2004 ; p. 14.
- 17) 石川崇彦, 高田 徹, 田村和夫 : Micasfungin に

低感受性を示した *Candida glabrata* 真菌血症の 1 例. 日本化学療法学会東日本支部総会 2004 ; 84.
18) 池田文昭, 鈴木真言, 長谷川美幸, 雑賀 威, 小

林寅詰 : CLSI M27-A3 に準拠した *Candida* 臨床分離株の micafungin に対する感受性測定法. 日化療会誌 2010 ; 58 : 1—6.

A Case of Micafungin-Hyposensitive *Candida glabrata* Due to *FKS2* Gene Mutation

Sachiko INUI¹⁾, Tatsuya NAKAMURA¹⁾, Kouichi TANABE²⁾, Hideaki OHNO²⁾,
Chihiro KOIKE¹⁾, Kazuyuki OKUDA¹⁾, Chiyo NAKATA¹⁾, Hiroko FUJIMOTO¹⁾,
Hiroe OHKURA¹⁾, Yoshitsugu MIYAZAKI²⁾ & Hakuo TAKAHASHI¹⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Kansai Medical University Hirakata Hospital,

²⁾National Institute of Infectious Diseases

Candida glabrata was continuously isolated in cultured urine samples from a subject with thrombotic thrombocytopenic purpura. Yeast-like fungal phagocytosis found in gram staining led to agents being tested for antifungal susceptibility, revealing hyposensitivity to micafungin (MCFG) of MIC <2mg/mL. MCFG administered for 10 days failed to cure *C. glabrata* infection. To clarify why hyposensitivity occurred, we analyzed the *FKS* gene sequence using the PCR, finding a deficit of 3 bases coding phenylalanine at *FKS2* gene amino acid 659. MCFG hyposensitivity may thus occur in long-term candidin-class anti-fungal agent treatment. Candidin-class agents have potent anti-fungal activity with fewer adverse effects and are widely used clinically. Hyposensitivity due to resistant *C. glabrata* species showed thus be considered in fungal infection treatment.

[J.J.A. Inf. D. 85 : 49~53, 2011]