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* について細菌学的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．

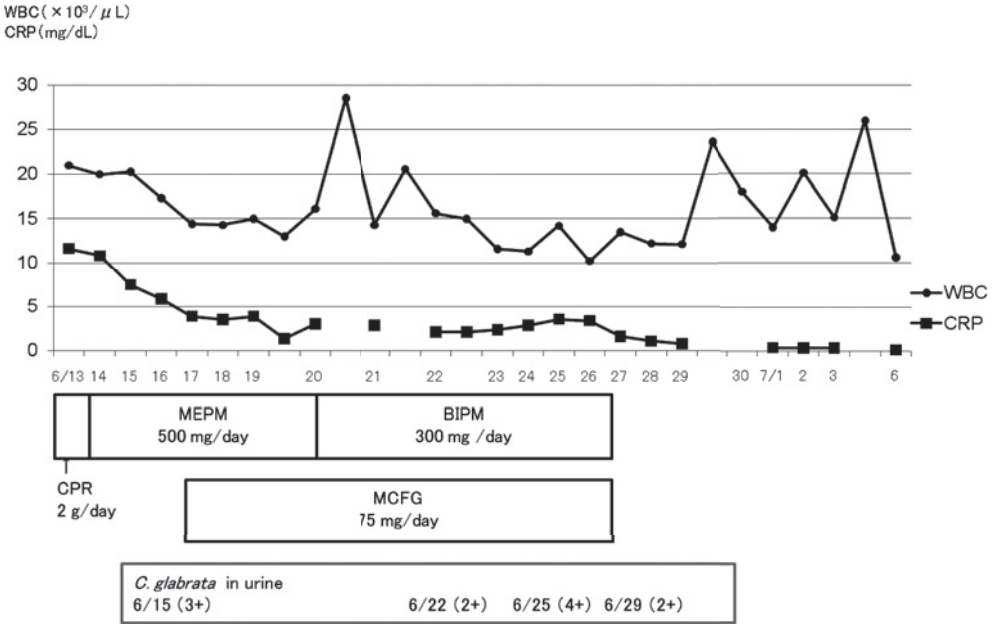
現病歴：高血圧で近医に通院中，2009年5月より浮腫が出現し，増強してきたため6月1日に他院にて急性腎炎症候群の加療をしていた．しかし，腎機能の悪化，血小板の減少が著明となり，他病院に転院となった．6月12日夕方より，左半身麻痺と意識レベル低下を認めたため MRI を実施した結果，脳梗塞が認められた．腎障害・血小板減少・神経症状があり血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）を疑ったため，6月13日精査加療目的にて当院救命救急科に入院となった．

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 210×10^2/μL，血小板数 3.0×10^4/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　75 mg/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 Rap ID 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（IC_{50}）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，CgFKS1/-498F（5'-TTGGGAAACTGCATGAACCGTGCGA-3'）と CgFKS1/6834R（5'-TTTGCTAGTTGAAGGACGATCAGTC-3'），*FKS2*（7941bp）の増幅プライマーとして，CgFKS2/-500F（5'-GTTTCTGATCTCTTCCGTCCCTCTC-3'）と CgFKS2/7441R（5'-CTAGGTCTAGTTCATGTCGAAGCAG-3'）を用いた．PCR 反応は 50μL の反応液を用い，PCR 条件は 94℃，30 秒；56℃，15 秒；72℃，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 2μg/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 2μg/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をコードする 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% の相同性があり，前者は通常の栄養発育において，後者は胞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* の場合は相同性の高い 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 μg/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 2μg/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 2μg/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 (μg/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:TCTTATTTAGTTTGGGTTACAGTTTTTGCTGCCAAATACTCTGAATCGTACTTC*TTG 1980**

1921:TCTTATTTAGTTTGGGTTACAGTTTTTGCTGCCAAATACTCTGAATCGTACTTCTTCTTG 1980

＊: deficits

平成23年 1 月20日

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≦2μg/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．日化療会誌　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micafungin感受性—第2報—．日化療会誌　2008；56：344—52.
7) 西丸智枝，佐々木惠美，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．日化療会誌　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：Micafungin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：Micafungin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，小林寅喆：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 INUI[1)], Tatsuya NAKAMURA[1)], Kouichi TANABE[2)], Hideaki OHNO[2)],
Chihiro KOIKE[1)], Kazuyuki OKUDA[1)], Chiyo NAKATA[1)], Hiroko FUJIMOTO[1)],
Hiroe OHKURA[1)], Yoshitsugu MIYAZAKI[2)] & Hakuo TAKAHASHI[1)]
[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 candin-class anti-fungal agent treatment. Candin-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〕

平成23年 1 月20日