

各種臨床材料より分離された *Aspergillus* section *Nigri* の抗真菌薬に対する感受性

株式会社LSIメディエンス 感染症検査部 微生物検査グループ
松本 泰伸、鈴木 真言、二瓶 博義、松本 哲、三川 隆

日本医真菌学会 COI開示

筆頭発表者：松本 泰伸

演題発表に関連し、開示すべきCOI関係にある
企業などはありません

目的

黒色のアスペルギルス属である *Aspergillus* section *Nigri* の一部には標的酵素であるステロール14脱メチル化酵素の変異や薬剤排出ポンプによるアゾール耐性菌が出現しており、治療上の問題となる。特に隠蔽種と呼ばれているアスペルギルス属の中には、アゾール系抗真菌薬に対して自然耐性菌が存在することが知られており、日本由来の菌株においてもイトラコナゾール（ITCZ）やボリコナゾール（VRCZ）に対して感受性が低下した株が存在することが分かってきた。

今回我々は、耳鼻・呼吸器関連の臨床検体から分離された *Aspergillus* section *Nigri* の中の *A. tubingensis* と *A. welwitschiae* について、ITCZとVRCZに対する感受性試験を実施し、顕微鏡を用いた詳細な形態変化から感受性の低下した菌株が存在することを明らかにしたので報告する。

材料および方法

2016年3月から2019年3月に各種臨床検体からクロラムフェニコール含有サブローデキストロース培地で分離され、形態学的に *A. niger* と同定された黒色のアスペルギルス属の糸状菌35株(耳漏由来25株、呼吸器関連材料由来10株)を対象とした。

菌種同定はカルモジュリンと β チューブリン遺伝子の配列から決定した。

感受性試験はCLSI M38-A3の微量液体希釈法に準拠して実施した。目視により、明らかな濁度の低下が認められた最小濃度をMinimum inhibitory concentration (MIC)と判断した。

上記感受性測定プレートについて培養48から72時間後に倒立顕微鏡を用いて、菌糸の伸長およびその形態を観察した。接種した分生子から菌糸の発芽 (germination) と菌糸の伸長 (elongation) の無い完全抑制が見られた最小濃度をMIC-m(MIC-microscopic)とした。

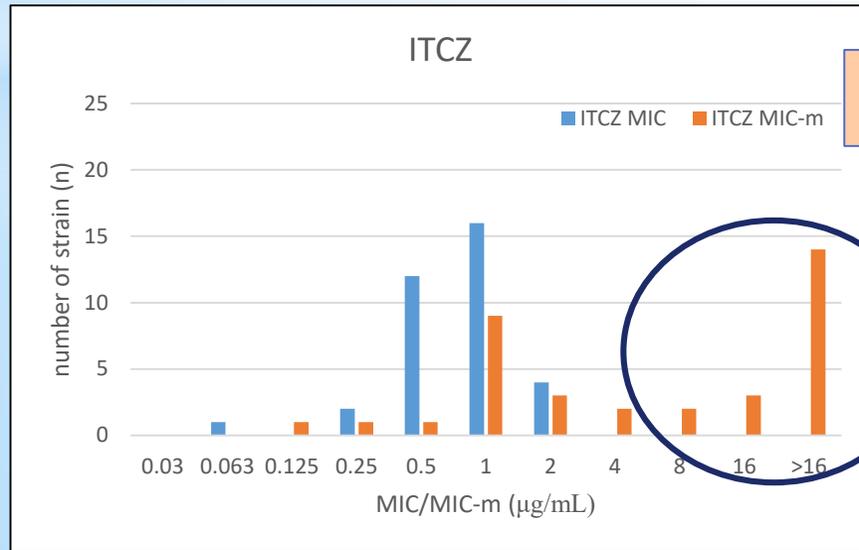
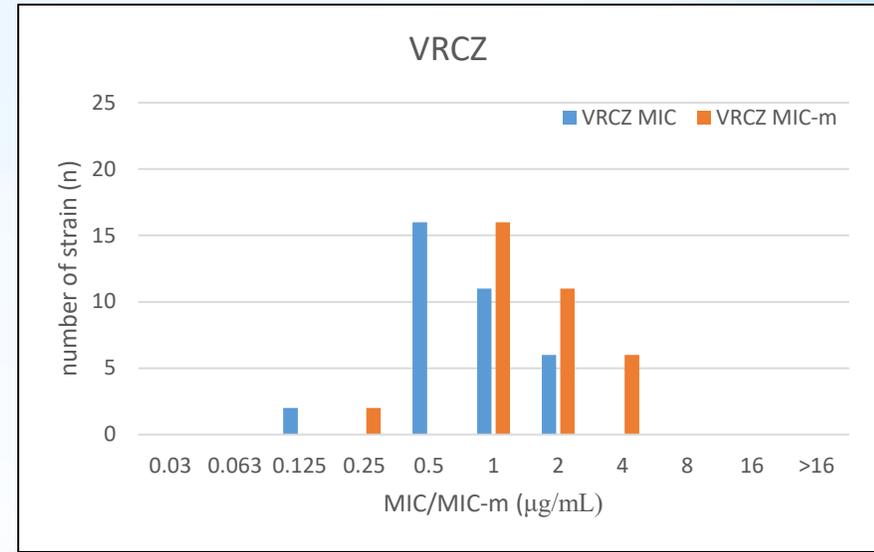
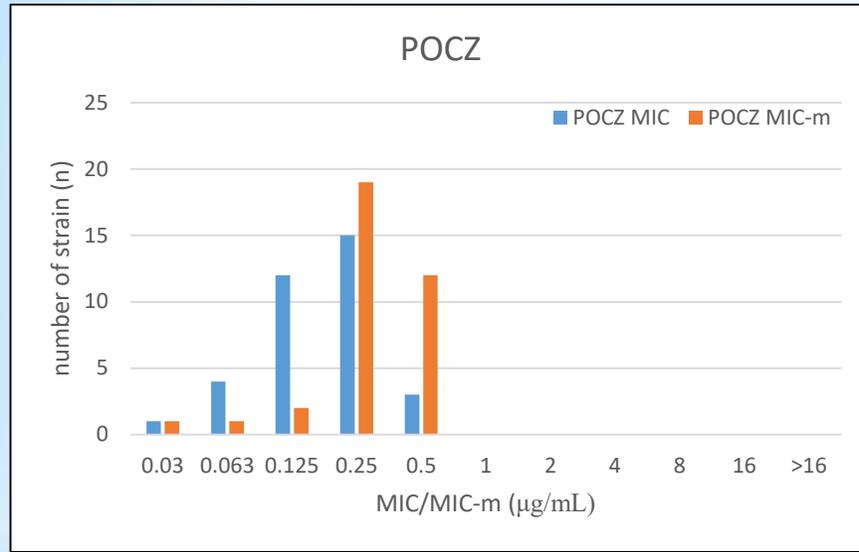
使用薬剤はポサコナゾール (POCZ)、ボリコナゾール (VOCZ)、イトラコナゾール (ITCZ)、アンフォテリシンB (AMPH-B) の4薬剤で実施した。

※追記 当初38株で検証を行っていたが、2株は遺伝子解析で菌名が決定出来なかった。また1株は遺伝子解析の結果、*Aspergillus neoniger* となった。この3株については感受性の検証から除外し、35株を検証対象とした。

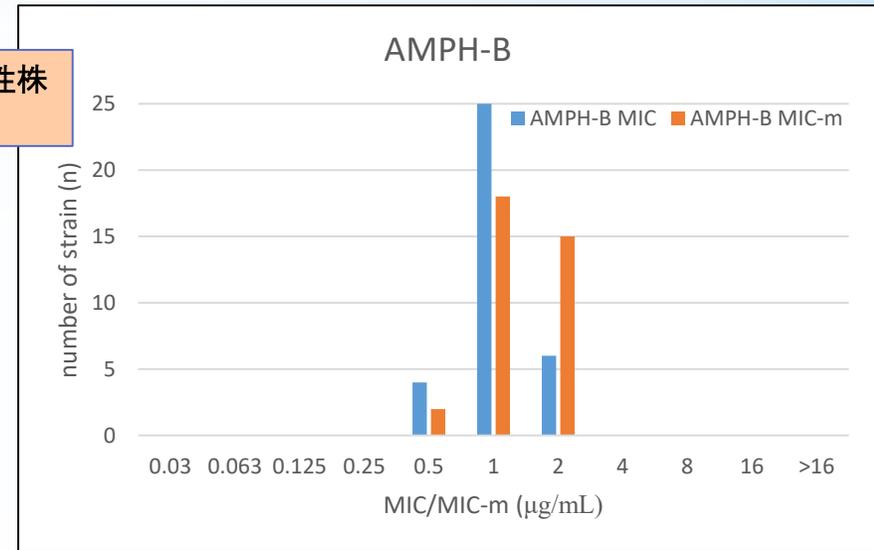
結果

目視での判定では耐性菌の確認はできなかったものの、*A. tubingensis* の15/17株と *A. welwitschiae* の5/18株が、イトラコナゾール(ITCZ)に対し高濃度においても分生子から菌糸の伸長を示しており、部分的な感受性低下株(Tolerant株)であることが顕微鏡観察により分かった。しかし、いずれの菌株もボリコナゾール、ポサコナゾールには高濃度でも菌糸伸長の無い完全抑制を示した。

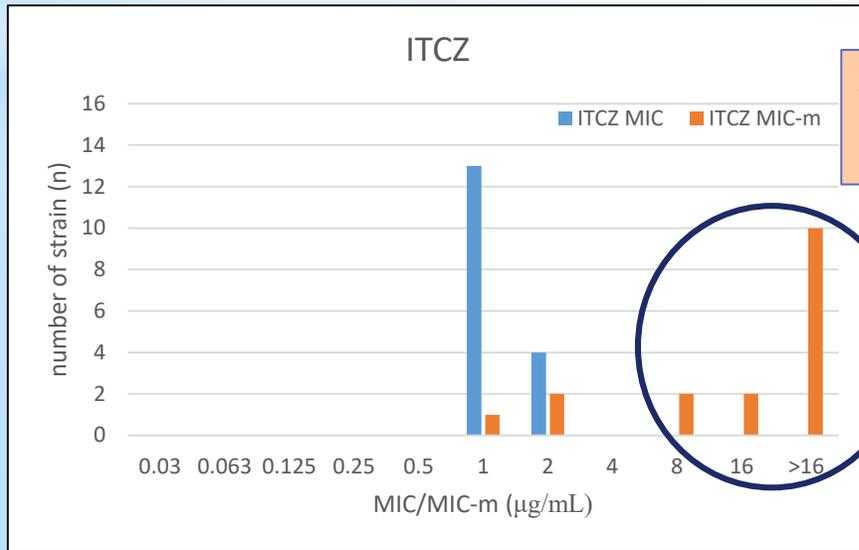
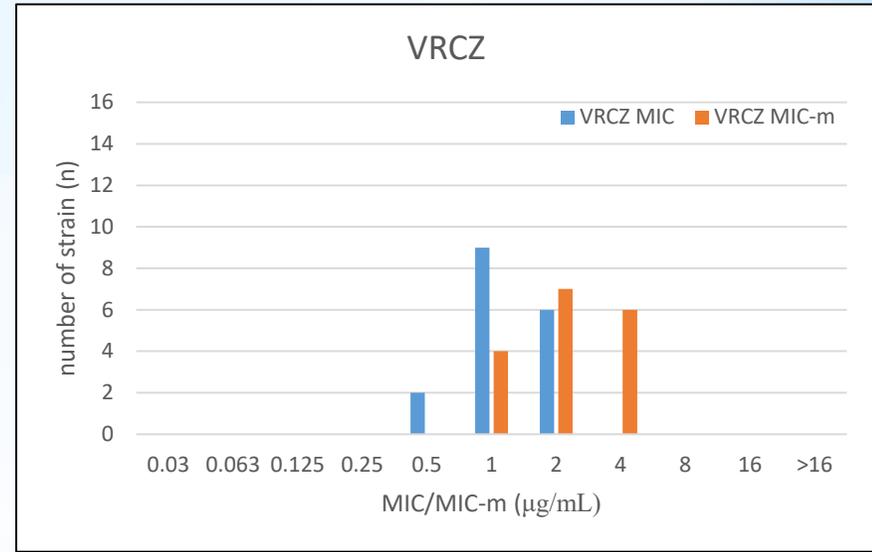
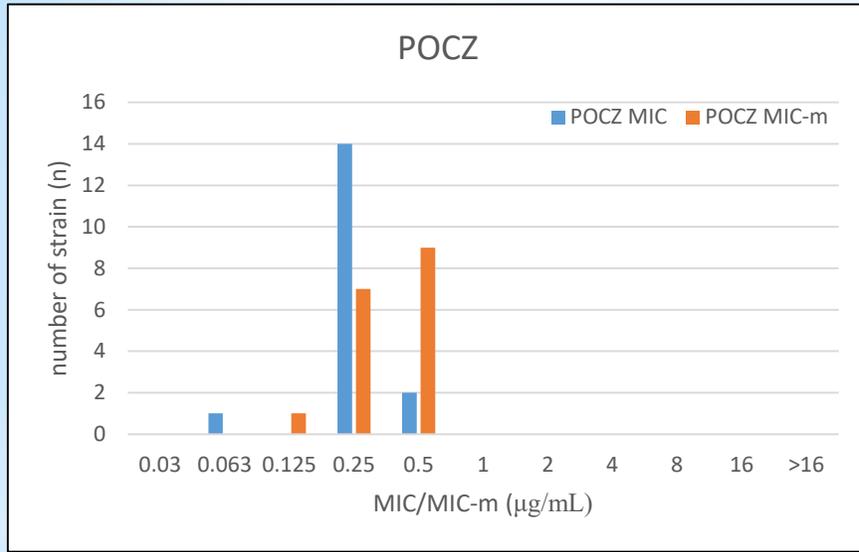
A. tubingensis と A. welwitschiae の各薬剤における感受性分布



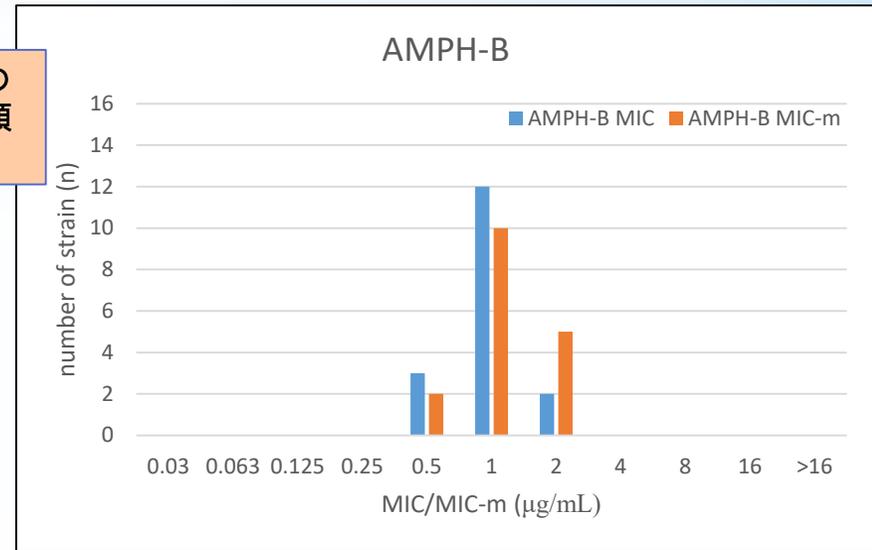
ITCZのMIC-mで低感受性株が認められた



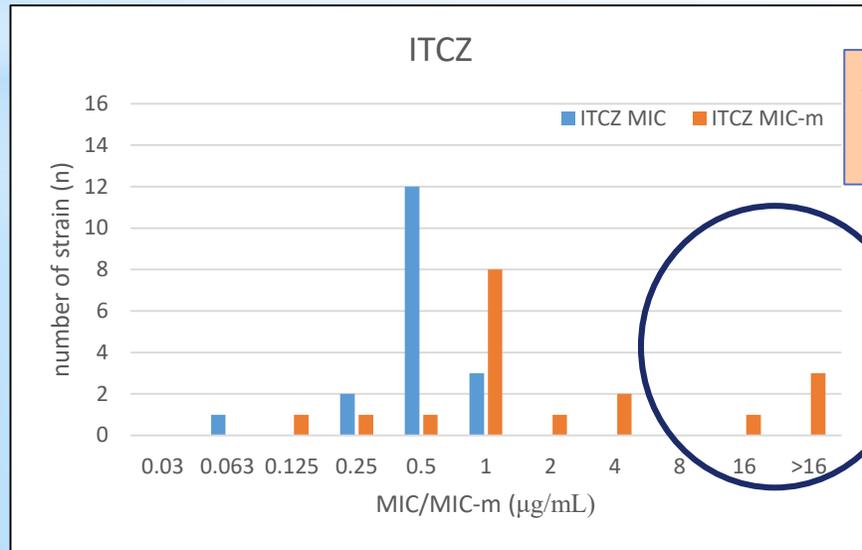
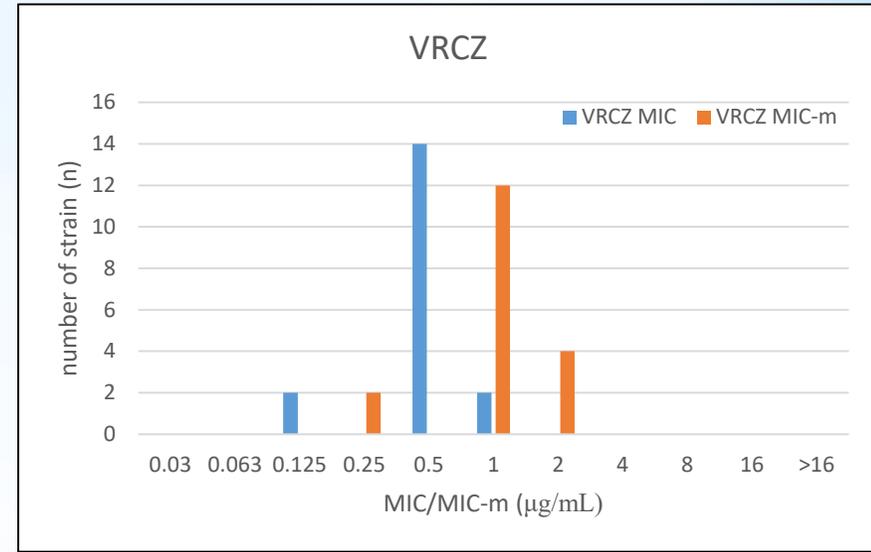
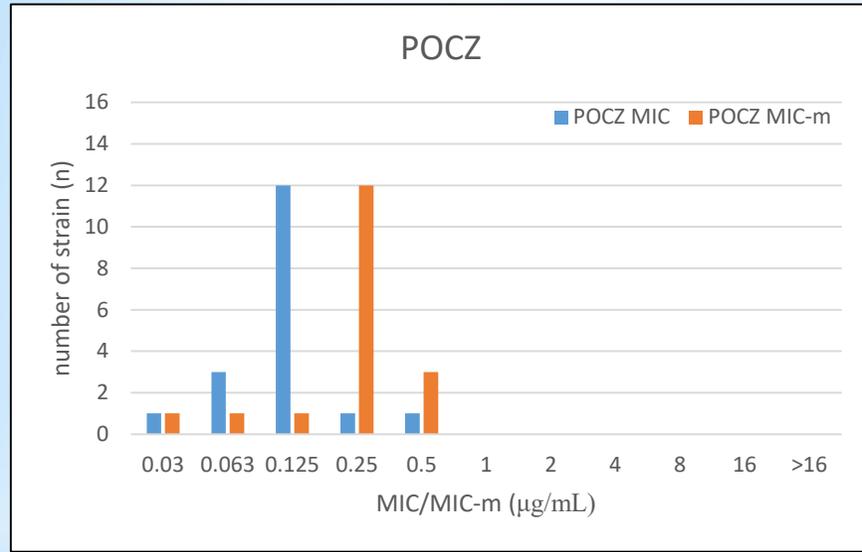
A. tubingensis の各薬剤における感受性分布



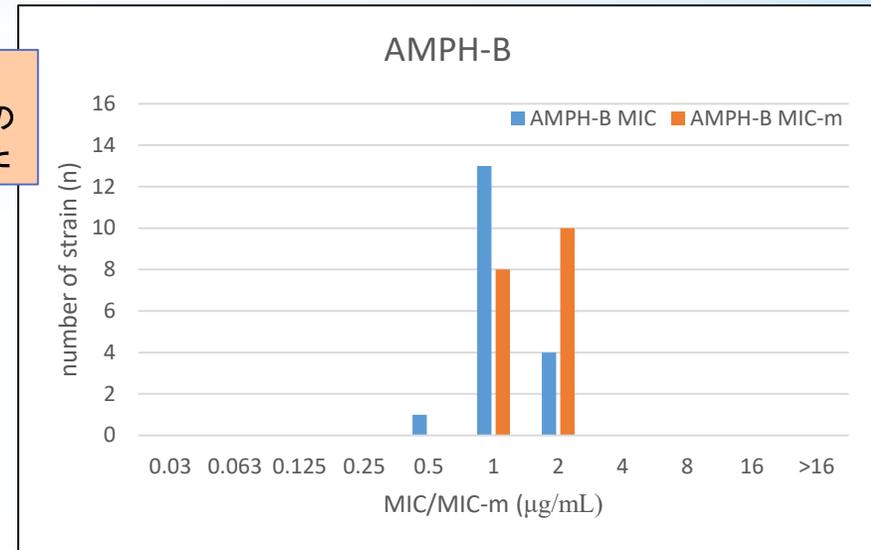
A. tubingensis でITCZのMIC-mの低感受性株が顕著に認められた



A. welwitschiae の各薬剤における感受性分布

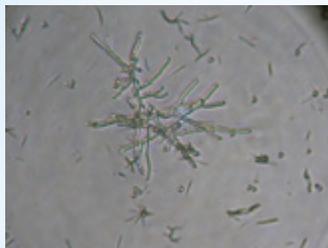


A. welwitschiae でも
ITCZのMIC-mで若干数の
低感受性株が認められた



A.tubingensis と *A.welwitschiae* の菌糸の発芽 (germination) と菌糸の伸長 (elongation) の顕微鏡画像

ITCZ; 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$



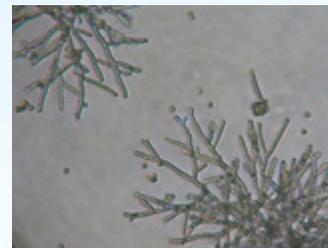
ITCZ; 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$



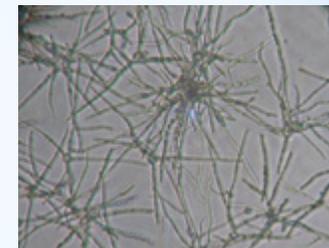
ITCZ; 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$



ITCZ; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$



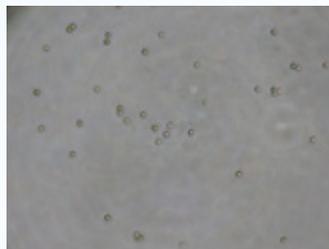
ITCZ; 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$



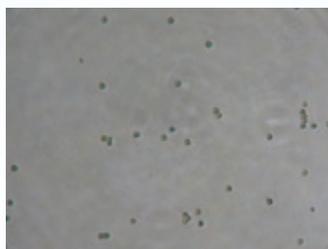
VRCZ; 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$



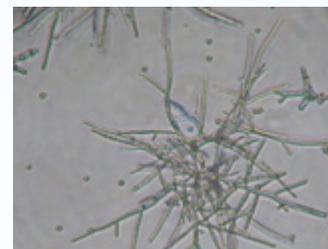
VRCZ; 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$



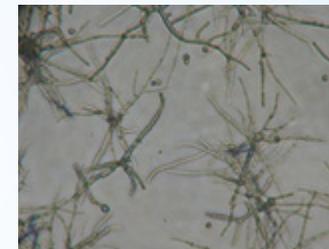
VRCZ; 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$



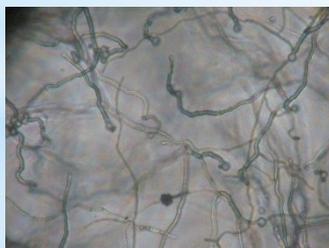
VRCZ; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$



VRCZ; 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$



Control



MIC (macroscopic): ITCZ; 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, VRCZ; 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$

MiC-m (microscopic): ITCZ; >16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, VRCZ; 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$

顕微鏡倍率100倍

目視では低感受性菌の判定は出来なかったが、顕微鏡ではITCZにおいて菌糸の発芽および伸長を確認する事が出来た。

考察

臨床分離の *Aspergillus section Nigri* の中の一部にITCZに対する感受性の低下が見られる株が存在し、抗真菌剤の臨床効果の低下が懸念されることから、詳細な感受性検査が必要であると思われた。