

総 説

薬剤耐性アスペルギルス の 現 状

田 代 将 人^{1,2}, 泉 川 公 一^{1,2}

¹長崎大学大学院医歯薬学総合研究科臨床感染症学

²長崎大学病院感染制御教育センター

要 旨

肺アスペルギルス症は死亡率が高く、重要な深在性真菌症である。しかし、抗アスペルギルス活性をもつポリエン系、アゾール系、キャンディン系のなかでも、経口投与が可能な抗真菌薬はアゾール系に限られ、日本では慢性肺アスペルギルス症の外来治療には、イトラコナゾール (ITCZ)、ポリコナゾール (VRCZ) の2種類のアゾール系薬しか使用できない。したがって、アゾール耐性アスペルギルスの出現は臨床的な脅威となる可能性がある。われわれは、日本においてもアゾール耐性の *A. fumigatus* が臨床現場において存在すること、その耐性機序はアゾール標的分子の変異が原因であること、ITCZ 長期投与により CYP51A の G54 変異が誘導され、ITCZ 耐性株が産生されることを明らかとした。現在の日本において、複数のアゾールに耐性を示す株は臨床的にも環境においてもまれであり、アスペルギルス症の初期治療において耐性株の存在を考慮する状況ではない。しかし、アゾール耐性株は世界的な拡がりが見られる問題であり、今後も臨床分離株および環境株の継続的調査が必要である。

Key words : *Aspergillus fumigatus*, azole-resistance, cyp51

はじめに

呼吸器感染症のなかでも、肺アスペルギルス症は死亡率がきわめて高く、重要な疾患である¹⁻³。その病型はアレルギー性気管支肺アスペルギルス症をのぞくと、侵襲型肺アスペルギルス症と慢性肺アスペルギルス症に大別される^{4,5}。いずれも治療の主体となる抗真菌薬の選択肢は十分といえず、治療効果も満足できるものとはいえない⁴⁻⁶。特に慢性肺アスペルギルス症の場合は月単位の治療継続が必要であり、外来で経口投与可能な抗真菌薬が用いられる^{4,5}。しかし、抗アスペルギルス活性をもつポリエン系、アゾール系、キャンディン系のなかでも、経口投与が可能な抗真菌薬はアゾール系に限られており、日本では長期の抗真菌薬投与が必要な慢性肺アスペルギルス症の外来治療には、イトラコナゾール (ITCZ)、ポリコナゾール (VRCZ) の2種類のアゾール系薬しか使用できない^{5,7}。

細菌やカンジダなどの一部の真菌に対しては薬剤耐性が臨床的に問題となっているが、アスペルギルスなどの糸状菌に対する薬剤感受性試験法は長らく定まったものがなく、国際的にも感受性のデータが乏しかった。しか

し、2008年に Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) と European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) が標準法を確立し、徐々に薬剤感受性試験の結果が集積されるようになった^{8,9}。その結果、近年アゾール系薬に耐性を示すアスペルギルスの検出が報告されており、その増加が懸念されている¹⁰⁻¹³。前述のように、アゾール系薬はアスペルギルス症治療の中心となる薬剤であり、かつ、外来で使用可能な経口薬の剤形を有する唯一の抗アスペルギルス薬である。したがって、アゾール耐性アスペルギルスの出現は臨床的な脅威となる可能性がある。

薬剤耐性アスペルギルスの定義

薬剤耐性アスペルギルスを論じるためには、薬剤耐性の定義を明らかにしておかなければならない。一般的に、抗菌薬・抗真菌薬を適切な用法用量で治療に用いたにもかかわらず、当該の微生物の薬剤感受性低下を原因として治療不良が起こる場合を薬剤耐性と呼ぶ。薬剤耐性の判定、すなわち最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) から抗菌薬化学療法成功あるいは失敗を予測するためには、臨床データや薬物

別冊請求先: 田代将人

〒852-8501 長崎県長崎市坂本1-7-1

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科臨床感染症学

Table 1. EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 8.0 valid from 2015-11-16

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/l)									
	<i>A. flavus</i>		<i>A. fumigatus</i>		<i>A. nidulans</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. terreus</i>	
	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>
Amphotericin B			1	2			1	2	—	—
Isavuconazole			1	1	0.25	0.25			1	1
Itraconazole	1	2	1	2	1	2			1	2
Posaconazole			0.12	0.25					0.12	0.25
Voriconazole			1	2						

動態学／薬力学（Pharmacokinetics/Pharmacodynamic: PK/PD）データなど種々のデータから総合的に判断される MIC のカットオフ値が必要となってくる。このカットオフ値が、いわゆる臨床的ブレイクポイントである。

アスペルギルス属に対する抗真菌薬の臨床的ブレイクポイントは確立されていない。侵襲性肺アスペルギルス症や慢性肺アスペルギルス症はいずれも、宿主の免疫能あるいは肺の局所的な破壊により抗真菌薬治療の効果判定がむずかしく、病状が増悪した場合もアスペルギルス症の増悪なのか、あるいは原疾患や他の細菌感染の増悪なのか、臨床的な判断が困難な場合も少なくないためである。PK/PD に関して、その臨床的影響は不明な点が多い。これらの問題から、CLSI はアスペルギルス属に対して抗真菌薬の臨床的ブレイクポイントは公表していないが、EUCAST は限定的ながらも一部のアスペルギルス属に対するいくつかの抗真菌薬の臨床的ブレイクポイントを提案している（Table 1）¹⁴⁾。現在、一般的に薬剤耐性アスペルギルス論を論じる際には、EUCAST が提案しているブレイクポイントに基づることが多い。この提案では、*Aspergillus fumigatus* に対する ITCZ および VRCZ の耐性基準は $> 2 \mu\text{g/ml}$ となっており、感性基準は $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ となっている。MIC が $2 \mu\text{g/ml}$ の株はどちらにも属していない点に注意が必要である。

一方で、MIC から臨床的治療効果を予測するブレイクポイントと異なり、MIC の分布から薬剤感受性が低下している一群を選択するためのカットオフ値は epidemiological cut off value (ECV) と呼ばれる^{15, 16)}。*A. fumigatus* の MIC 分布から設定された ECV を基にすると、ECV 以上の MIC を示す株は非野生株 (non-wild type) と呼ばれ、これらの株は種々の耐性機構を保持していることが明らかとされている¹⁷⁾。現在用いられている ECV では、ITCZ および VRCZ の non-wild type の基準が $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ とされている¹⁸⁾。

いずれのカットオフ値を用いた場合も「耐性株」と呼ばれることがあるため、「耐性率」の数字をみる際には、どちらのカットオフ値に基づいたものが確認する必要がある。すなわち EUCAST のブレイクポイントに基づけば、ITCZ あるいは VRCZ の MIC が $2 \mu\text{g/ml}$ の株を耐性株とはしないが、いくつかの論文では MIC が $2 \mu\text{g/ml}$

の株を耐性株に含めている場合がある。本稿では便宜的に、ECV を用いて判定した低感受性株は「non-wild type」、EUCAST のブレイクポイントを用いて判定した株は「耐性株」と記載する。

日本におけるアゾール耐性 *Aspergillus fumigatus* の現状

ヒトに病原性を示すアスペルギルス属は複数存在するが、それらのなかでもアスペルギルス症の半数以上の原因となっているのは *A. fumigatus* である¹⁹⁾。1997 年に Denning らが ITCZ 耐性 *A. fumigatus* の存在を報告し、2000 年代後半からオランダやイギリスを中心として、アゾール耐性 *A. fumigatus* の増加傾向が報告されるようになった^{12, 20, 21)}。

われわれは長崎大学病院の呼吸器内科において、1994 年から 2010 年にかけて収集してきた 196 株の *A. fumigatus* の臨床分離株を対象に薬剤感受性試験を実施した²²⁾。感受性試験法は CLSI M38-A2 の微量液体希釈法に準じて行った。その結果、ITCZ、ポサコナゾール (PSCZ: わが国未承認)、VRCZ の non-wild type の割合は、それぞれ 7.1%、2.6%、4.1%であった。さらに個人からの複数回分離の問題を検討するために、1人1株で割合を検出したが、ほぼ同様の割合であった。これらの結果から、PSCZ はわが国で使用されていないにもかかわらず、低感受性株が存在することが明らかとなった。Asano らは E-test を用いて 19 株の *A. fumigatus* を調べ、1 株の耐性株を見出ししている²³⁾。また、Kikuchi らは全国から収集した *A. fumigatus* の薬剤感受性試験の結果を報告しており、それによれば耐性株の割合は ITCZ で 1.2%、VRCZ で 0.6%と報告されている。われわれの報告で non-wild type の割合がより高かった理由は、われわれの検討した株のほとんどが呼吸器内科領域で分離された株であるためだと思われる。

non-*fumigatus* アスペルギルスの薬剤感受性

アスペルギルス症の原因となる non-*fumigatus* アスペルギルスには、*A. flavus*、*A. nidulans*、*A. niger*、*A. terreus*、*A. versicolor*、*A. sydowii* などが知られている。*A. terreus* がアムホテリシン B に自然耐性である

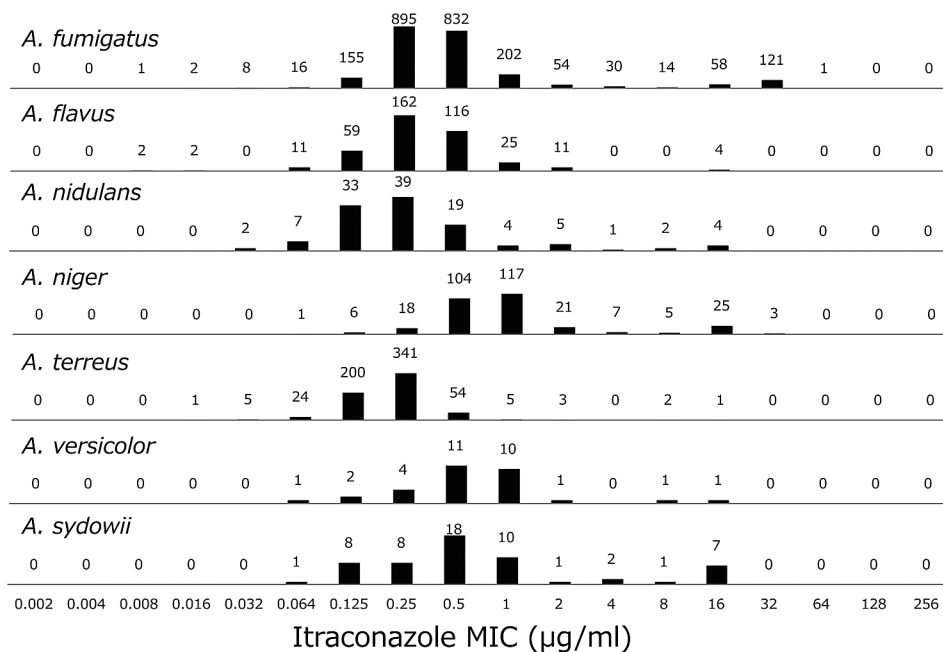


Fig. 1. Itraconazole MIC distributions for *Aspergillus* species. Left side is low MIC and right side is high MIC. The numbers show number of each isolates.

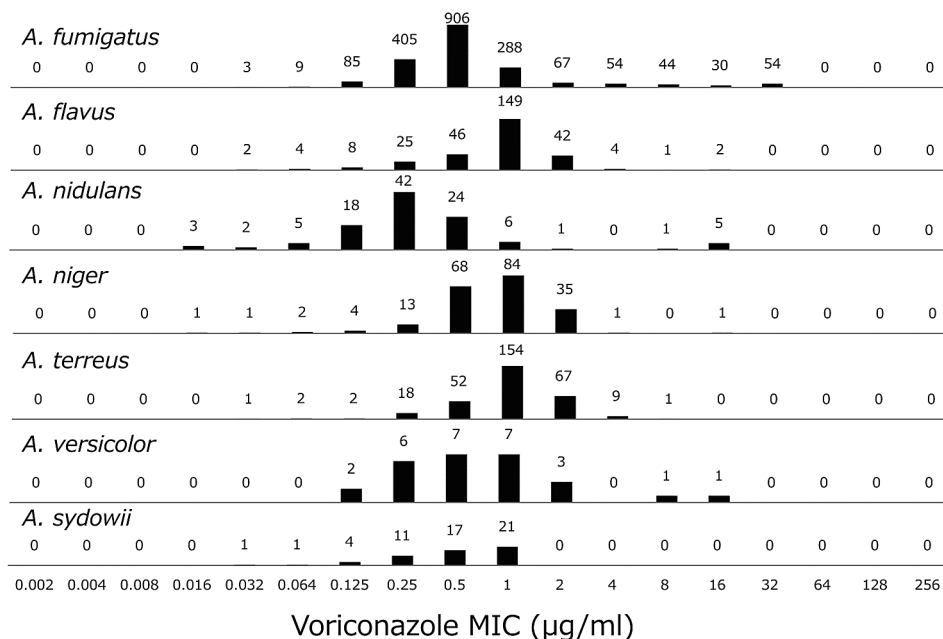


Fig. 2. Voriconazole MIC distributions for *Aspergillus* species. Left side is low MIC and right side is high MIC. The numbers show number of each isolates.

ことは知られているが、それ以外の non-*fumigatus* アスペルギルス属のアゾール耐性株の報告は少ない^{24, 25)}。われわれの検討においても、ITCZ あるいは VRCZ の MIC が 4 µg/ml 以上を示す株は *A. niger* 107 株中 1 株、*A. terreus* 34 株中 1 株のみであり、*A. flavus* 16 株中には認めなかった²⁶⁾。EUCAST が公表しているアスペルギルス属の MIC 分布をみると、*A. fumigatus* に対する ITCZ の MIC 分布のピークは 0.25 µg/ml である

一方、*A. niger* に対する ITCZ の MIC 分布のピークは 1 µg/ml と、分布の形に若干の違いがみられる (Fig. 1)。VRCZ に関して、*A. fumigatus* では MIC 分布のピークが 0.5 µg/ml にある一方、*A. flavus*、*A. niger*、*A. terreus*、*A. versicolor*、*A. sydowii* ではピークが 1 µg/ml にあり、逆に *A. nidulans* ではピークが 0.25 µg/ml と低くなっている (Fig. 2)。このように、同じアスペルギルス属であっても薬剤感受性の傾向は若干異なるよ

Table 2. MICs of *A. fumigatus* isolates with various CYP51A-mediated resistance mechanisms

CYP51A substitution	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	itraconazole	voriconazole	posaconazole
G54E,R,V,W	>8	0.12~1	0.25~>8
G138C	>8	4~>8	1~>8
P216L	>8	1	1
M220I,K,R,T,V,W	>8	0.5~2	0.25~>8
Y431C	>8	4	1
G432S	>8	0.25~0.5	0.25
G434C	>8	4	1
G448S	>8	>8	0.5~1
TR34/L98H	>8	1~>8	0.25~8
TR46/Y121F/T289A	>8	>8	0.25~4
TR53	>8	>8	0.25
F219I	>8	1~8	0.5~>16

うであるが、耐性株はまれであり、現時点では臨床現場に影響を与えるレベルではないと思われる。

一方、遺伝子学的同定方法の発展に伴い、従来の古典的手法により *A. fumigatus* と同定されてきた株のなかに、薬剤感受性の異なる別の種が混在していることが明らかとなってきた²⁷⁾。このような株は隠蔽種と呼ばれ、*A. fumigatus* の隠蔽種には *A. lentulus*, *A. udagawae*, *A. viridinutans* などが知られている。これらの *A. fumigatus* 隠蔽種はアゾール系薬やアムホテリシン B に耐性を示すことがあり、一般検査室における正確な同定手法の確立が必要とされている。

A. *fumigatus* のアゾール耐性機序

A. fumigatus のアゾール系薬に対する耐性機序については、アゾール系薬の標的分子の変異による標的部位に対する親和性の低下、標的部位の過剰発現、ならびに排出ポンプの活性化などが報告されている²⁸⁻³⁰⁾。アゾール系薬の標的部位は、*cyp51A* によってコードされる 14 α -demethylase (CYP51A) であるが、アゾール系薬が同部位に結合することによりアスペルギルスの細胞膜のエルゴステロール合成が阻害される。一方、CYP51A に変異が誘導されるとアゾール系薬が結合できなくなり耐性化する^{31, 32)}。

A. fumigatus のアゾール耐性機序のなかでも、主たるものは CYP51A の変異とプロモーター領域のタンデムリピート (TR) である。アゾール耐性に関与する種々の hot spot 変異が報告されており、それぞれの hot spot ごとにアゾール耐性の程度は異なっている (Table 2)。それらの hot spot のなかでも最も影響が問題視されている変異が TR34/L98H と TR46/Y121F/T289A である³³⁾。これらの変異は侵襲性肺アスペルギルス症の

第一選択薬である VRCZ に対して耐性を誘導することや、世界中の環境からみついていることから、特に問題視されている。日本においても、すでに TR46/Y121F/T289A の変異を有する耐性株が臨床現場で見い出されており、臨床現場における今後の拡がり懸念される³⁴⁾。

われわれの解析では、前述の 196 株の *A. fumigatus* 株において、ITCZ, PSCZ, VRCZ の感受性が低下していた 22 株について、CYP51A の 54 番目のアミノ酸変異が、ITCZ 耐性株で 64.2% に、PSCZ 耐性株に 100% の頻度で認められた。一方で、CYP51A の 54 番目のグリシンのアミノ酸変異は、VRCZ の結合部位に関与しない。したがって、当科で検出された ITCZ 耐性株は、VRCZ との交差耐性を認めなかった。VRCZ に低感受性の株については CYP51A に変異を認めず、CYP51A の変異以外の耐性機序が関与している可能性が示唆された。

慢性肺アスペルギルス症患者におけるアゾール耐性株の誘導

抗アスペルギルス活性をもつ抗真菌薬が限られることから、アゾール耐性アスペルギルスを生み出さない最大限の努力が必要である。そのためには、アゾール耐性アスペルギルスがどこで誘導されているのか、それを明らかにし介入手段を考えなければならない。一般的には、アゾール系抗真菌薬が長期間・大量に使用されている環境で誘導されているという仮説が考えやすい。1 つは慢性肺アスペルギルス症患者への長期アゾール系薬投与により、患者体内で耐性が誘導される可能性が考えられる³⁵⁻³⁷⁾。

われわれは耐性獲得機序を確認するために、長崎大学病院呼吸器内科で収集した 154 株の *A. fumigatus* 株の臨床背景を検討し、ITCZ の投与歴とアゾール系薬の薬

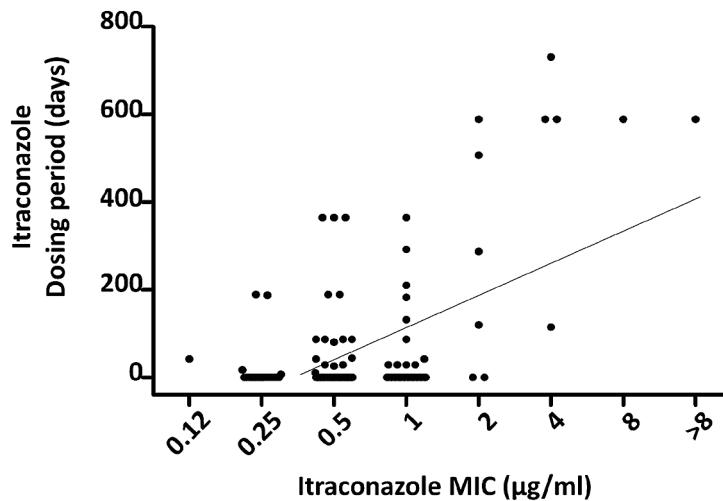


Fig. 3. Relationship between itraconazole MICs and the history of itraconazole usage for 154 *A. fumigatus* clinical isolates.

Table 3. Characteristics of the 9 isolates obtained from patients infected with azole-resistant *A. fumigatus*

Patient no.	Isolate no.	Date of isolation	itraconazole exposure (days)	MIC (µg/ml)			CYP51A substitution
				itraconazole	posaconazole	voriconazole	
1	MF-368	2000/8/16	189	0.5	0.06	0.5	I266N
	MF-367	2000/8/16	189	0.5	0.06	0.25	I266N
	MF-370	2000/9/7	189	0.25	0.06	0.25	I266N
	MF-439	2001/10/19	507	2	0.5	0.25	G54E I266N
	MF-452	2002/4/3	589	>8	0.5	0.5	I266N
	MF-454	2002/4/17	589	2	0.5	0.125	G54E I266N
	MF-460	2002/5/8	589	4	2	0.25	G54E I266N
	MF-468	2002/5/22	589	4	0.5	0.25	G54E I266N
	MF-469	2002/5/29	589	8	1	0.25	G54E I266N

剤感受性との相関を分析した³⁸⁾。その結果、ITCZの投与された期間が長い患者において、ITCZのMICが高い株がより多く検出される傾向にあった ($r = 0.5700, P < 0.0001$) (Fig. 3)。また、ITCZの累積投与期間とPSCZ、VRCZのMICとの相関を検討したところ、PSCZのMICとは正の相関を認め ($r = 0.5237, P < 0.0001$) が、VRCZのMICとは相関を認めなかった ($r = -0.2627, P = 0.001$)。VRCZの投与期間とITCZ、PSCZ、VRCZのMICとは相関を認めなかった。われわれの保有するアゾール耐性 *A. fumigatus* 株の多くはCYP51の54番目のアミノ酸変異が耐性化の原因であると考えられ、また、同部位はVRCZの結合とは関与しないこと、さらに、ITCZの曝露ではVRCZ耐性の原因となるアミノ酸変異が誘導される可能性が少ないことが明らかとなった。

また解析の過程で、当初はITCZ感性的な *A. fumigatus* が分離されていたにもかかわらず、ITCZの1年以上の治療継続によりITCZおよびPSCZに耐性化した慢性肺アスペルギルス症の症例が判明した。それら一連

の株同士の遺伝子学的同一性をマイクロサテライト法にて検証したところ、いずれも同一の株であることが確認され、患者体内でITCZの長期曝露により感性的な *A. fumigatus* のCYP51AにG54変異が誘導され、耐性化したことが明らかとなった (Table 3)。

in vitro においても、ITCZの長期曝露がCYP51AのG54変異を誘導することが報告されており、本結果がそれを裏付ける形となった³⁹⁾。ただし、本研究ではほとんどの症例でITCZのカプセル製剤が使用されており、ITCZの血中濃度との関連が検証できていない。また、本研究ではVRCZ使用症例のほとんどで *A. fumigatus* の排菌が陰性化していたため、VRCZの長期投与がアゾール耐性を誘導する可能性は示せていない。現在はバイオアベイラビリティがより高いITCZ内用液が使用されていることや、VRCZも使用されていることから、今後も同様に慢性肺アスペルギルス症患者から耐性株が誘導されてくるのか、注意深いフォローが必要である。

環境におけるアゾール耐性アスペルギルスの誘導

もう 1 つは農薬としてアゾール系抗真菌薬が大量に使用されることで、農場で耐性アスペルギルスが生まれ、それが拡散してヒトに感染している可能性である^{40, 41)}。特に TR34/L98H および TR46/Y121F/T289A 変異を有するアゾール耐性 *A. fumigatus* は、すでに世界中の環境中において存在が確認されている³³⁾。

患者体内で誘導される場合との大きな違いは、はじめからアゾール耐性であるため、侵襲性肺アスペルギルス症に対する第一選択薬である VRCZ による治療が失敗しうることにある。よって、2015 年に発表されたアゾール耐性 *A. fumigatus* による感染症のマネージメントに関するエキスパートオピニオンでは、環境分離株の 10% 以上が耐性の地域は、初期治療に VRCZ + キャンディンあるいはリボソーム化アムホテリシン B を推奨するとしている¹¹⁾。

アゾール耐性アスペルギルスの増加が問題となっているオランダでは、TR34/L98H という同一の変異による耐性株が複数の患者から検出されたことから、環境由来の耐性株が複数患者に感染した可能性が疑われた⁴²⁾。そこで病院周辺の植物や土など *A. fumigatus* が生息している環境を調査した結果、同様の変異を有する株が複数みつき、遺伝子学的にも臨床分離株と近いことが明らかとなった⁴²⁾。

さらに環境中におけるアゾール耐性 *A. fumigatus* の探索が世界中で実施され、欧州やインド、タンザニアといった国々から、TR46/Y121F/T289A 変異を有する株が環境中に存在することが証明された。近年、日本で発見された同変異を有する臨床分離株の遺伝子学的解析でも、フランス、ドイツ、オランダといった欧州から分離された株と近いことが報告されている。これらの事実は、環境中に存在する耐性株が世界中に拡がりをみせている可能性を示唆している³⁴⁾。

日本国内の農場においてもアゾール系抗真菌薬は同様に使用されている。Kano らは日本でアゾール系薬の一種であるテトラコナゾールが 15 年以上農薬として使用されている農場でのエアサンプリングで得た 50 株の *A. fumigatus* の ITCZ 感受性を調査しているが、すべての株に対する ITCZ の MIC が $2 \mu\text{g/ml}$ 以下であったと報告している⁴³⁾。Toyotome らも同様に農場の土壌から 91 株の *A. fumigatus* の薬剤感受性試験を実施しているが、アゾール耐性株は見い出せていない⁴⁴⁾。このように、わが国においては環境におけるアゾール耐性アスペルギルスの存在は証明されていないが、今後も注意深く観察を継続することが必要である。

アゾール耐性アスペルギルスの世界的拡がり

アゾール耐性アスペルギルスはオランダおよびイギリスを中心に存在が報告されてきたが、今では世界中のさ

まざまな国から、その存在が報告されている^{13, 45-61)}。国によりアゾール耐性株の割合は大きく異なり、たとえばオランダの University Medical Center Utrecht の血液内科病棟と ICU の患者 105 人から分離された *A. fumigatus* は、16.2% (17 株) が VRCZ 耐性であったと報告されている⁶²⁾。

最も危惧されるのは、前述のように環境に存在する特定の耐性株がグローバルに拡散する可能性である。たとえば、TR34/L98H や TR46/Y121F/T289A を伴う耐性株は、欧州だけでなく、アフリカ、中東、アジア、オーストラリア、米国といった地理的に離れた場所からも報告されており、すでに世界中に拡がっている可能性が示唆される^{6, 54-57, 61)}。各国で分離された耐性株の関係を明らかとするため、Abdolrasouli らはオランダ、イギリス、インドで得られた臨床分離株および環境分離株の全ゲノムシークエンスを行い、SNP を解析している⁶³⁾。彼らが解析した耐性株は TR34/L98H 変異を多く保有していたが、いずれの耐性株も遺伝学的に多様に富んでいた。例外として、インドで分離された株は、1,000 km 以上離れた場所で分離された株同士でも遺伝学的に類似していた。これらの結果から、TR34/L98H 変異を有する耐性株は、それぞれ独立した環境で生まれている可能性が示唆され、それは日本においても例外ではなく、今後出現してくる可能性は否定できない。

おわりに

一連の研究結果より、日本においてもアゾール耐性の *A. fumigatus* が臨床現場において存在すること、その耐性機序はアゾール標的分子の変異が原因であること、ITCZ 長期投与により CYP51A の 54 番目のアミノ酸変異が誘導され、ITCZ および PSCZ 耐性株が産生されることが明らかとなった。

現在の日本において、複数のアゾールに耐性を示す株は、臨床的にも環境においてもまれであり、アスペルギルス症の初期治療において耐性株の存在を考慮する状況ではない。しかし、アゾール耐性株は世界的な拡がりが見られる問題であり、今後も臨床分離株および環境株の継続的調査が必要である。また、ITCZ の長期投与により ITCZ および PSCZ 耐性が誘導される可能性があるため、定期的な喀痰培養検査および薬剤感受性試験が望ましい。

利益相反 なし

文 献

- 1) Patterson KC, Strek ME: Diagnosis and treatment of pulmonary aspergillosis syndromes. *Chest* **146**: 1358-1368, 2014.
- 2) Kosmidis C, Denning DW: The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax* **70**: 270-277, 2015.
- 3) Schelenz S, Barnes RA, Barton RC, Cleverley JR, Lucas SB, Kibbler CC, Denning DW: British Society for Medical M. British Society for Medical Mycology best practice recommendations for the diagnosis of serious fungal diseases. *Lancet Infect Dis* **15**: 461-474, 2015.
- 4) Denning DW, Cadranel J, Beigelman-Aubry C, Ader F, Chakrabarti A, Blot S, Ullmann AJ, Dimopoulos G, Lange C: Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J* **47**: 45-68, 2016.
- 5) 深在性真菌症のガイドライン作成委員会：深在性真菌症の診断・治療ガイドライン 2014, pp.120, 協和企画, 東京, 2014.
- 6) Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyannis DP, Marr KA, Morrison VA, Segal BH, Steinbach WJ, Stevens DA, van Burik JA, Wingard JR, Patterson TF: Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **46**: 327-360, 2008.
- 7) Izumikawa K, Tashiro M, Kohno S: Management of chronic pulmonary aspergillosis. *Ann N Y Acad Sci* **1272**: 40-48, 2012.
- 8) Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. 2nd ed. Approved standard M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- 9) Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the ESCMID : EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clin Microbiol Infect* **14**: 982-984, 2008.
- 10) Bueid A, Howard SJ, Moore CB, Richardson MD, Harrison E, Bowyer P, Denning DW: Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *J Antimicrob Chemother* **65**: 2116-2118, 2010.
- 11) Verweij PE, Ananda-Rajah M, Andes D, et al: International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist Updat* **21-22**: 30-40, 2015.
- 12) Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, Laverdiere M, Arendrup MC, Perlin DS, Denning DW: Frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis* **15**: 1068-1076, 2009.
- 13) Lazzarini C, Esposto MC, Prigitano A, Cogliati M, De Lorenzis G, Tortorano AM: Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates from an Italian Culture Collection. *Antimicrob Agents Chemother* **60**: 682-685, 2015.
- 14) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs version 8.0, valid from 2015-11-16 http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/Antifungal_breakpoints_v_8_0_November_2015.pdf 2015.
- 15) Espinel-Ingroff A, Diekema DJ, Fothergill A, Johnson E, Pelaez T, Pfaller MA, Rinaldi MG, Canton E, Turnidge J: Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *J Clin Microbiol* **48**: 3251-3257, 2010.
- 16) Rodriguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Monzon A, Cuenca-Estrella M: Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 2468-2472, 2008.
- 17) Pfaller M, Boyken L, Hollis R, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S, Diekema D: Use of epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Aspergillus* species to the triazoles. *J Clin Microbiol* **49**: 586-590, 2011.
- 18) Pfaller MA, Diekema DJ, Ghannoum MA, et al: Wild-type MIC distribution and epidemiological cutoff values for *Aspergillus fumigatus* and three triazoles as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. *J Clin Microbiol* **47**: 3142-3146, 2009.
- 19) Tashiro T, Izumikawa K, Tashiro M, Takazono T, Morinaga Y, Yamamoto K, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Kohno S: Diagnostic significance of *Aspergillus* species isolated from respiratory samples in an adult pneumology ward. *Med Mycol* **49**: 581-587, 2011.
- 20) Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, Warnock DW, Kelly SL: Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 1364-1368, 1997.
- 21) Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, Rijs AJ, Varga J, Samson RA, Mellado E, Donders AR, Melchers WJ, Verweij PE: Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med* **5**: e219, 2008.
- 22) Tashiro M, Izumikawa K, Minematsu A, et al: Antifungal susceptibilities of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates obtained in Nagasaki, Japan. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 584-587, 2012.
- 23) Asano M, Kano R, Makimura K, Hasegawa A, Kamata H: Molecular typing and *in-vitro* activity of azoles against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* and *A. niger* in Japan. *J Infect Chemother* **17**: 483-486, 2011.
- 24) Lass-Flörl C, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Perkhof S, Rodriguez-Tudela JL: *In*

- vitro* activities of various antifungal drugs against *Aspergillus terreus*: Global assessment using the methodology of the European committee on antimicrobial susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 794-795, 2009.
- 25) Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope WW: Breakpoints for antifungal agents: an update from EUCAST focussing on echinocandins against *Candida* spp. and triazoles against *Aspergillus* spp. *Drug Resist Updat* **16**: 81-95, 2013.
- 26) 吉田将孝, 泉川公一, 平野勝治, 小佐井康介, 森永芳智, 栗原慎太郎, 中村茂樹, 今村圭文, 宮崎泰可, 塚本美鈴, 掛屋 弘, 柳原克紀, 安岡 彰, 田代隆良, 河野 茂: non-*fumigatus* *Aspergillus* の薬剤感受性及び臨床的背景の検討. *感染症誌* **87**: 261, 2013.
- 27) 亀井克彦, 渡辺 哲: Current Opinion 肺真菌感染症の診断と治療. *呼吸と循環* **63**: 893-897, 2015.
- 28) Rajendran R, Mowat E, McCulloch E, Lappin DF, Jones B, Lang S, Majithiya JB, Warn P, Williams C, Ramage G: Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 2092-2097, 2011.
- 29) Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Sanglard D: Probing the role of point mutations in the *cyp51A* gene from *Aspergillus fumigatus* in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Med Mycol* **49**: 276-284, 2011.
- 30) Slaven JW, Anderson MJ, Sanglard D, Dixon GK, Bille J, Roberts IS, Denning DW: Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, *atrF*, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. *Fungal Genet Biol* **36**: 199-206, 2002.
- 31) Snelders E, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Verweij PE, Melchers WJ: Azole resistance profile of amino acid changes in *Aspergillus fumigatus* CYP51A based on protein homology modeling. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 2425-2430, 2010.
- 32) Liu M, Zheng N, Li D, Zheng H, Zhang L, Ge H, Liu W: *cyp51A*-based mechanism of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: Illustration by a new 3D Structural Model of *Aspergillus fumigatus* CYP51A protein. *Med Mycol* **54**: 400-408, 2016.
- 33) Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJ, Meis JF: Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? *Clin Infect Dis* **62**: 362-368, 2016.
- 34) Hagiwara D, Takahashi H, Fujimoto M, Sugahara M, Misawa Y, Gono T, Itoyama S, Watanabe A, Kamei K: Multi-azole resistant *Aspergillus fumigatus* harboring *Cyp51A* TR/Y121F/T289A isolated in Japan. *J Infect Chemother* 2016. [Epub ahead of print]
- 35) Camps SM, van der Linden JW, Li Y, Kuijper EJ, van Dissel JT, Verweij PE, Melchers WJ: Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: a case study and review of the literature. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 10-16, 2011.
- 36) Arendrup MC, Mavridou E, Mortensen KL, Snelders E, Fridmodt-Møller N, Khan H, Melchers WJ, Verweij PE: Development of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy associated with change in virulence. *PLoS ONE* **5**: e10080, 2010.
- 37) Belleste B, Raberin H, Morel J, Flori P, Hafid J, Manh Sung RT: Acquired resistance to voriconazole and itraconazole in a patient with pulmonary aspergilloma. *Med Mycol* **48**: 197-200, 2010.
- 38) Tashiro M, Izumikawa K, Hirano K, et al: Correlation between triazole treatment history and susceptibility in clinically isolated *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 4870-4875, 2012.
- 39) Escribano P, Recio S, Peláez T, González-Rivera M, Bouza E, Guinea J: *In vitro* acquisition of secondary azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates after prolonged exposure to itraconazole: presence of heteroresistant populations. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 174-178, 2012.
- 40) Mortensen KL, Mellado E, Lass-Flörl C, Rodriguez-Tudela JL, Johansen HK, Arendrup MC: Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergilli* in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 4545-4549, 2010.
- 41) Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ: Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis* **9**: 789-795, 2009.
- 42) Snelders E, Huis in't Veld RA, Rijs AJ, Kema GH, Melchers WJ, Verweij PE: Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl Environ Microbiol* **75**: 4053-4057, 2009.
- 43) Kano R, Kohata E, Tateishi A, Murayama SY, Hirose D, Shibata Y, Kosuge Y, Inoue H, Kamata H, Hasegawa A: Does farm fungicide use induce azole resistance in *Aspergillus fumigatus*? *Med Mycol* **53**: 174-177, 2015.
- 44) Toyotome T, Fujiwara T, Kida H, Matsumoto M, Wada T, Komatsu R: Azole susceptibility in clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus* from eastern Hokkaido, Japan. *J Infect Chemother* 2016. [Epub ahead of print]
- 45) Chowdhary A, Kathuria S, Randhawa HS, Gaur SN, Klaassen CH, Meis JF: Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India. *J Antimicrob Chemother* **67**: 362-366, 2012.
- 46) van der Linden JW, Arendrup MC, Warris A, et al: Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg Infect Dis* **21**: 1041-1044, 2015.
- 47) Thors VS, Bierings MB, Melchers WJ, Verweij PE, Wolfs TF: Pulmonary aspergillosis caused by a pan-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in a 10-year-old boy. *Pediatr Infect Dis J* **30**: 268-270, 2011.
- 48) Mortensen KL, Jensen RH, Johansen HK, Skov M, Pressler T, Howard SJ, Leatherbarrow H, Mellado E, Arendrup MC: *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic

- fibrosis: a laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. *J Clin Microbiol* **49**: 2243-2251, 2011.
- 49) Mortensen KL, Johansen HK, Fursted K, Knudsen JD, Gahrn-Hansen B, Jensen RH, Howard SJ, Arendrup MC: A prospective survey of *Aspergillus* spp. in respiratory tract samples: prevalence, clinical impact and antifungal susceptibility. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **30**: 1355-1363, 2011.
- 50) Lockhart SR, Frade JP, Etienne KA, Pfaller MA, Diekema DJ, Balajee SA: Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance is primarily due to the TR/L98H mutation in the *cyp51A* gene. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 4465-4468, 2011.
- 51) Arabatzis M, Kambouris M, Kyprianou M, et al: Polyphasic identification and susceptibility to seven antifungals of 102 *Aspergillus* isolates recovered from immunocompromised hosts in Greece. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 3025-3030, 2011.
- 52) Brillowska-Dabrowska A, Mroczyńska M, Nawrot U, Włodarczyk K, Kurzyk E: Examination of *cyp51A* and *cyp51B* expression level of the first Polish azole resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolate. *Acta Biochim Pol* **62**: 837-839, 2015.
- 53) Wu CJ, Wang HC, Lee JC, Lo HJ, Dai CT, Chou PH, Ko WC, Chen YC: Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates carrying TR₃₄/L98H mutations in Taiwan. *Mycoses* **58**: 544-549, 2015.
- 54) Kidd SE, Goeman E, Meis JF, Slavin MA, Verweij PE: Multi-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* infections in Australia. *Mycoses* **58**: 350-355, 2015.
- 55) Özmerdiven GE, Ak S, Ener B, Ağca H, Cilo BD, Tunca B, Akalin H: First determination of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR34/L98H mutations in Turkey. *J Infect Chemother* **21**: 581-586, 2015.
- 56) Liu M, Zeng R, Zhang L, Li D, Lv G, Shen Y, Zheng H, Zhang Q, Zhao J, Zheng N, Liu W: Multiple *cyp51A*-based mechanisms identified in azole-resistant isolates of *Aspergillus fumigatus* from China. *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 4321-4325, 2015.
- 57) Chowdhary A, Sharma C, van den Boom M, Yntema JB, Hagen F, Verweij PE, Meis JF: Multi-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment in Tanzania. *J Antimicrob Chemother* **69**: 2979-2983, 2014.
- 58) Ahmad S, Khan Z, Hagen F, Meis JF: Occurrence of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in outdoor and hospital environment in Kuwait. *Environ Res* **133**: 20-26, 2014.
- 59) Badali H, Vaezi A, Haghani I, Yazdanparast SA, Hedayati MT, Mousavi B, Ansari S, Hagen F, Meis JF, Chowdhary A: Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in the *cyp51A* gene in Iran. *Mycoses* **56**: 659-663, 2013.
- 60) Bader O, Weig M, Reichard U, Lugert R, Kuhns M, Christner M, Held J, Peter S, Schumacher U, Buchheidt D, Tintelnot K, Groß U: *cyp51A*-Based mechanisms of *Aspergillus fumigatus* azole drug resistance present in clinical samples from Germany. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 3513-3517, 2013.
- 61) Wiederhold NP, Gil VG, Gutierrez F, Lindner JR, Albataineh MT, McCarthy DI, Sanders C, Fan H, Fothergill AW, Sutton DA: First Detection of TR34 L98H and TR46 Y121F T289A Cyp51 Mutations in *Aspergillus fumigatus* Isolates in the United States. *J Clin Microbiol* **54**: 168-171, 2016.
- 62) Führen J, Voskuil WS, Boel CH, Haas PJ, Hagen F, Meis JF, Kusters JG: High prevalence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from high-risk patients. *J Antimicrob Chemother* **70**: 2894-2898, 2015.
- 63) Abdolrasouli A, Rhodes J, Beale MA, Hagen F, Rogers TR, Chowdhary A, Meis JF, Armstrong-James D, Fisher MC: Genomic Context of Azole Resistance Mutations in *Aspergillus fumigatus* Determined Using Whole-Genome Sequencing. *MBio* **6**: e00536, 2015.

The Current Status of Drug-resistant *Aspergillus*

Masato Tashiro^{1,2}, Koichi Izumikawa^{1,2}

¹Department of Infectious Diseases, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

²Nagasaki University Infection Control and Education Center, Nagasaki University Hospital

Aspergillus spp. are important fungi because of the high mortality associated with aspergillosis. However, we have only three classes of anti-aspergillus drugs available; and only two drugs, itraconazole (ITCZ) and voriconazole (VRCZ), are available as oral agents in Japan. If azole-resistant *Aspergillus* causes chronic aspergillosis, we cannot treat such patients with oral azoles on an outpatient basis. As is the case with foreign countries, we found the existence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in clinical settings in Japan. Resistance was attributed to mutations of the target protein (CYP51A). Additionally, we also found that long-term itraconazole treatment induced G54 substitution in CYP51A, causing itraconazole-resistance. Although there are few resistant *Aspergillus* strains existing in Japan now, we have to continue to find such resistant isolates, which are spreading worldwide.
