

【総説】

薬剤耐性アスペルギルス の現状、耐性獲得機序と今後

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学講座（第二内科）

泉川公一、田代将人、河野 茂

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

著者連絡先

泉川公一

〒852-8501

長崎県長崎市坂本 1-7-1

9 階 教官室（#903）

TEL: (095) 819-7273

FAX: (095) 849-7285

E-mail: koizumik@nagasaki-u.ac.jp

## 要旨

医療技術の進歩に伴い、深在性真菌症は増加している。中でもアスペルギルス症は予後不良で重要な真菌症である。近年、アゾール系薬に耐性をしめすアスペルギルスの検出が世界各地で報告されている。地域による差はあるが、おおよそ 0.3-28.0 % と報告されている。耐性機序については、アゾール系薬の標的部位である CYP51 の変異によるところが多く、cyp51A 遺伝子の hot spot も複数報告されている。一方で、耐性を獲得する機序については一定の見解が得られていないが、抗真菌薬を含む農薬などの曝露により環境中で耐性を獲得するとする説と、慢性肺アスペルギルス症などのアゾール系薬が長期投与された患者の体内で獲得するという説が提唱されるが結論に至っていない。長崎大学病院で検出された *Aspergillus fumigatus* 196 株を対象とした我々の検討では、itraconazole (ITCZ)、posaconazole (POSA)、voriconazole (VRCZ) に耐性を示す株は、それぞれ、7.1%、2.6%、4.1% であった。また、これらの株が検出された患者の背景の解析では、耐性株が検出されるまでに使用された ITCZ の累積投与期間が長ければ長いほど、ITCZ の MIC が高い株が検出される頻度が高く、同様に POSA の MIC とも正の相関が認められた。一方、VRCZ とは相関関係はなく、その理由として、これらの耐性株の多くが、VRCZ の耐性とは無関係な CYP51 の 54 番目のアミノ酸変異を有していたことが考えられる。臨床的にアゾール耐性 *A. fumigatus* の分離と予後が相関するかについては未解明であるが、アゾール系薬がアスペルギルス症治療の主体であることから、新たな抗真菌薬の開発、既存の抗真菌薬を用いた新たな治療法の開発が望まれる。

## I. アスペルギルスとアスペルギルス症の特徴

深在性真菌症は、造血幹細胞移植を含む臓器移植、化学療法、免疫抑制療法の進歩に代表される医療技術の向上に伴い増加している。中でも、アスペルギルス症は、深在性真菌症全体の発症頻度としてはカンジダ症に及ばないものの、死亡率がきわめて高く重要な感染症である<sup>1</sup>。

アスペルギルス属は少なくとも 100 種類以上存在し、*Aspergillus fumigatus*、*A. flavus*、*A. niger*、*A. terreus*、*A. versicolor* といった菌種が人から検出される頻度が高い<sup>2</sup>。中でも、*A. fumigatus* はアスペルギルス症の原因菌種として大部分を占めるが、近年は、*non-fumigatus Aspergillus* と呼ばれるアスペルギルスの分離頻度が増加しているという報告があり、我々の自験例でも *non-fumigatus Aspergillus* の分離頻度が増加している<sup>3-6</sup> (図 1)。現在、アスペルギルスの菌種まで同定できる施設、検査部は限られているため、確かな疫学データは存在しないが、後述の薬剤感受性試験も含め、今後は、検査システムの構築も求められる。

アスペルギルス症は、臨床的に侵襲型、慢性型、アレルギー型などの病型に分類される。アスペルギルスの孢子を吸入することにより発症するため、呼吸器感染症がその主体となる。侵襲型は白血病、臓器移植、造血幹細胞移植患者のうち、好中球数が減少した患者に多く発症し、その死亡率は 30-60% と高率である<sup>7,8</sup>。一方、慢性型は、緩徐に進行する病型であり、慢性空洞性肺アスペルギルス症、慢性線維性肺アスペルギルス症、単純性アスペルギローマといった病型に細分類される。陳旧性肺結核、気管支拡張症、COPD などの呼吸器の器質的疾患を有する患者に、肺の器質的疾患部位にアスペルギルスが腐生し発症する。一般的に高度の免疫不全は伴わないが治療抵抗性で難治化する。慢性型は、世界で 300 万人ほどの患者がいるとされ、5 年生存率は 50% とされ、侵襲型と同様に予後不良な疾患である<sup>9</sup>。慢性に経過するために、抗真菌薬の長期にわたる経静脈投与は、患者負担や医療経済的にも現実的ではなく、経口抗真菌薬を長期に投与する必要がある。

## II. アスペルギルス症の問題点

アスペルギルス症に有効な抗真菌薬は少なく、日常臨床で用いられる抗真菌薬は主にアゾール系、ポリエン系、エキノキャンディン系の 3 クラスが使用される。アゾール系は注射薬、経口薬の剤型が使用可能なアスペルギルス症治療の中心をなす抗真菌薬である。ポリエン系は強力な殺真菌的作用を有するが、腎機能障害など重篤な副作用がしばしば認められる。エキノキャンディン系はもっとも新しい抗真菌薬であり、アスペルギルスには静真菌的に作用する。ポリエン系、エキノキャンディン系には経口薬がない。前述したように、外来における長期の抗真菌薬投与が必要な慢性型肺アスペルギルス症の外来治療には、

アスペルギルスに活性を有しない fluconazole を除いた itraconazole (ITCZ)、voriconazole(VRCZ)の 2 種類のアゾール系薬しか使用できない (図 2) <sup>10</sup>。

近年、アゾール系薬に感受性の低下したアスペルギルスの検出が報告されている。細菌や、ウイルス、真菌でもカンジダにおいては、薬剤耐性の研究が重点的に行われ、耐性機序や新しい治療についての解析、研究が行われている。従来、アスペルギルスに関しては薬剤感受性に関する研究はさほど重要視されていなかったが、ここ 10 年間で様々な進歩があった。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型を有する唯一の抗アスペルギルス薬である。従って、アゾール系に低感受性、耐性のアスペルギルスが出現することは臨床的な脅威となる可能性がある。

### III. アスペルギルスの薬剤感受性試験

糸状菌の薬剤感受性試験の標準法は、2008 年に、European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) と Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)により確立された <sup>11,12</sup>。これらの方法に関して、使用するメディウムの糖分量、接種菌量、細胞数のカウント法、使用するプラスチック製品の底の形状などの違いなど異なる点があるものの、両法を比較検討した結果、一致率は高いことが報告されている <sup>13</sup>。

一方、臨床的ブレイクポイントについて、MIC 分布、PK/PD データ、動物実験、臨床データより ITCZ、posaconazole (POSA、本邦では未承認)、VRCZ について以下のように提唱されている。ITCZ と VRCZ では、 $\leq 1 \mu\text{g/mL}$  (感性)、 $2 \mu\text{g/mL}$  (中間耐性)、 $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  (耐性)、POSA では、 $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$  (感性)、 $0.5 \mu\text{g/mL}$  (中間耐性)、 $\geq 1 \mu\text{g/mL}$  (耐性)と提唱されている <sup>14</sup>。一方、抗真菌薬の MIC と臨床的有効性の評価を行うにあたり、宿主の免疫状態、アスペルギルス孢子に対する抗真菌活性よりも菌糸に対する有効性の評価が重要であるなどとする理由から、CLSI では臨床的ブレイクポイントは設定されていない。代わりに epidemiological cutoff values (ECVs)が設定されている <sup>15</sup>。ECVs は、耐性化に関与する遺伝子変異を有しない野生株の MIC 分布などをもとに設定され、遺伝子学的に変異を有する耐性、低感受性株を遺伝子変異を有さない株と区別するために有用である。現在、推奨されている ECV は、ITCZ と VRCZ で  $1 \mu\text{g/mL}$ 、POSA で  $0.5 \mu\text{g/mL}$  と定められている <sup>16</sup>。

### IV. アゾール耐性アスペルギルスの現状

アゾール耐性アスペルギルスの報告は、1997 年に Denning らによる症例報告が最初であり、ITCZ 耐性の *A. fumigatus* 株に関する報告であった <sup>17</sup>。2008 年以

降に薬剤感受性試験の標準法が確立されたことより、2008 年以降の疫学データを Table 1 に示すが、アゾール耐性 *A. fumigatus* の分離率はおおよそ 0.3-28.0 % と報告されている。一方で、耐性の基準に関しては、それぞれの報告で異なっており、データの解釈には注意が必要である。

本邦のデータとして我々のデータを示す。長崎大学病院の主に呼吸器病棟で分離された *A. fumigatus* 196 株について、薬剤感受性を CLSI 法によって測定、ECVs に基づく耐性基準で判定した結果、ITCZ、POSA、VRCZ に対する耐性率は、それぞれ 7.1%、2.6%、4.1%であった<sup>18</sup>。

## V. アゾール耐性アスペルギルスの耐性機序

*A. fumigatus* のアゾール系薬に対する耐性機序について、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<sup>19</sup>。アゾール系薬の標的部位は、*cyp51A* によってコードされる 14  $\alpha$ -demethylase (CYP51) 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。変異を来しやすい箇所、いわゆるホットスポットは多数確認されている<sup>20</sup>。Table 2 に CYP51 の主要なアミノ酸変異と耐性の表現型の関係について示す。ITCZ に耐性を示す株は、POSA (74%)、VRCZ (65%) に交叉耐性を示すことが知られている<sup>21</sup>。CYP51 の 54、98、220 番目のアミノ酸変異は高頻度に認められる変異である<sup>21-30</sup>。さらに 98、138、431、448 番目のアミノ酸変異は、全てのアゾール系薬に耐性を示すことが知られている<sup>20,21</sup>。一方で、46、172、248、255、266、427 番目のアミノ酸変異は、アゾール感受性、耐性のいずれの株にも認められている<sup>18,21</sup>。

*cyp51A* のプロモーター領域の 34bp のタンデムリピート配列と CYP51 の 98 番目のロイシンからヒスチジンへの変異は、複数のアゾール系薬に耐性を示すことが判明している。プロモーター領域のタンデムリピートは単独で、野生株と比較して 8 倍の耐性を誘導し、さらに CYP51 の 98 番目のアミノ酸変異が加わることにより、複数のアゾール系薬に耐性を示すようになる。一方で、*cyp51A* の変異は、全てのアゾール耐性 *A. fumigatus* に認められる訳ではない<sup>21</sup>。我々の解析では、前述の 196 株の *A. fumigatus* 株において、ITCZ、POSA、VRCZ に低感受性、耐性であった 22 株について、そのプロファイルは Table 3 にしめす。CYP51 の 54 番目のアミノ酸変異が、ITCZ 耐性株で 64.2%に、POSA 耐性株に 100%の頻度で認められた。一方で、CYP51 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。従って、当科で検出された ITCZ 耐性株は、VRCZ との交叉耐性を認めなかった<sup>18</sup>。さらに、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あることが判明した<sup>18</sup>。その機序として、排出ポンプの活性化が考えられる。排出ポンプとアゾール系薬への耐性に関しては、カンジダでよく研究されている<sup>31</sup>。これらの薬剤排出ポンプは、ATP-binding cassette transporter (ABC) トランスポーターや major facilitator superfamily (MFS) トランスポーターと呼ばれる。*A. fumigatus* は、少なくとも 49 個の ABC トランスポーターと 278 個の MFS トランスポーターを有すると報告されている<sup>32</sup>。理論的には、アスペルギルスの細胞内に取り込まれたアゾール系薬は、これらの排出ポンプにより細胞外に排出されることが考えられる<sup>27</sup> が、十分な解析は行われておらず、今後の研究成果が待たれる<sup>31,33</sup>。

## VI. アゾール耐性の獲得機序

アゾール耐性機序に関しては、分子生物学的アプローチで解明が進んでいるが、自然界でどのように耐性を獲得しているかという点については、未解明である。現在、2つの仮説があり、①環境に由来する説と②患者体内でアゾール系薬投与により誘導されるとする説が提唱されている。環境由来説において、アスペルギルスは自然環境に存在する環境真菌であるが、アゾール系抗真菌薬を含有した農薬などの使用により環境で耐性を獲得し、その耐性菌をヒトが吸入することにより発症するとされている<sup>34,35</sup>。この仮説は、オランダにおけるアゾール耐性株の *genotype* が、*cyp51A* のプロモーター領域のタンデムリピートと CYP51 の L98H のアミノ酸変異の組み合わせを有する株が大部分であること、また、オランダの田畑では、sterol demethylation inhibitor を含有する肥料をきわめて多く使用しているという理由から支持されている<sup>35</sup>。この sterol demethylation inhibitor はヒトに使用されているアゾール系抗真菌薬と交差耐性を示すことが分かっており、約 30 種類の農薬のうち、実に 7 つの農薬は本剤を含有している<sup>9</sup>。また、アゾール系薬の投与歴がない患者においても、この変異を有する株が検出されていることから、体内でのアゾール系薬の曝露で耐性が誘導されたわけではないことを示している。また、この変異を有する株は、スペインでも高頻度で認められているほか、中国やインドでも認められている<sup>22,36,37</sup>。我々の検討においては、上記の変異を有する株は検出されなかった<sup>18</sup>。Howard らは、これらの農薬の使用を抑制することで耐性化誘導を抑制できる可能性があるとは指摘しているが、現在、アゾール系薬に耐性を示す同一の表現型の株は、ヨーロッパのみならず中国まで拡散しており実質的な抑制効果はないものと考えられている<sup>20</sup>。もう一つの仮説は、患者の体内に腐生したアスペルギルスが、アゾール系薬に曝露されることにより、耐性を獲得しているのではないかとする説である<sup>30,38</sup>。実際に、アゾール耐性株の多くが、アゾール系薬を長

期投与（1-30 ヶ月）する慢性肺アスペルギルス症の患者から検出されているとする報告もある<sup>30,39</sup>。上述のように、慢性肺アスペルギルス症の患者における治療の主体は経口アゾール系薬であるため、この仮説を唱える根拠となり得る。

長崎大学病院で分離された 154 株の *A. fumigatus* 株の臨床背景を検討し、ITCZ の薬剤感受性との相関をみた。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( $r=0.5700$ ,  $P<0.0001$ )<sup>40</sup>。また、ITCZ の累積投与期間と POSA、VRCZ の MIC との相関を検討したところ、POSA の MIC とは正の相関を認めた( $r=0.5237$ ,  $P<0.0001$ )<sup>40</sup>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、POSA、VRCZ の MIC とは相関を認めなかった。我々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<sup>40</sup>。以上から、ITCZ の長期投与は、ITCZ 耐性株を産生する可能性があることに留意し使用すべきである。

## VII. アゾール耐性株の特徴と今後

アゾール系薬に耐性を示す株によるアスペルギルス症が、感受性株の感染症に比較して予後が不良となるかという点に関する検証は限られており、予後不良と関連すると報告した症例報告があった<sup>21,41</sup>。最近の van der Linden らの報告では、12 週間における死亡率は、アゾール耐性株による感染症では 88%と、感受性株による感染症より 2-3 倍の高率になると報告している<sup>42</sup>。

我々は同一の患者から分離された複数の *A. fumigatus* 株において、microsatellite 法で、同一の由来であることが確認された ITCZ の感受性株と耐性株を保有している。一般的に薬剤耐性を獲得すると病原性が低下することが知られているが、侵襲性肺アスペルギルス症のマウスモデルで検討した結果、これらの株の病原性に差はないことが確認された(data not shown)。

さらに、正確な臨床的ブレイクポイントが設定されていないために、in vitro の薬剤感受性試験結果が、in vivo での治療効果と相関するかについては疑問が残るところであるが、前述の侵襲性肺アスペルギルス症のマウスモデルにおいて、ITCZ 経口投与による治療効果を見たところ、感受性株と耐性株では治療効果が異なっていた。すなわち、耐性株では、感受性株に比較して治療抵抗性が示され、in vitro の感受性結果との相関が認められた (data not shown)。現在、これらの株を用いた抗真菌薬の吸入治療などの新治療について解析を行っている。

一方で、アゾール系薬の曝露が耐性を誘導する可能性があることについて、耐性を獲得させないための投与量、投与期間などについて、PK/PD パラメータ

を用いた解析、検討も必要であり、VRCZのみならず ITCZ についても TDM を施行すべきと考えている。しかし、アゾール耐性アスペルギルス感染症の根本的な治療解決策として、新たな抗真菌薬の開発はやはり必須であり、現状では注射剤しか使用できないエキノキャンディン系やポリエン系の経口薬など、新たな剤型の開発も求められている。元来、予後不良な疾患であるアスペルギルス症において薬剤耐性の問題が加わったことは、きわめて憂慮すべきことであり、この領域の今後の研究の更なる発展が望まれる。

謝辞：

本論文は、第 60 回日本化学療法学会総会（2012 年 4 月、長崎）で受賞した「上田記念感染症・化学療法研究奨励賞」の援助により達成されたものであり、心より感謝申し上げます。

利益相反申告：

著者河野茂はファイザー株式会社、大日本住友製薬株式会社、MSD 株式会社、アステラス製薬株式会社より資金援助を受けている。



引用文献：

1. Kume H, Yamazaki T, Togano T, Abe M, Tanuma H, Kawana S, et al.: Epidemiology of visceral mycoses in autopsy cases in Japan: comparison of the data from 1989, 1993, 1997, 2001, 2005 and 2007 in annual of pathological autopsy cases in Japan. *Med Mycol J* 2011; 52: 117-27
2. Baddley JW, Marr KA, Andes DR, Walsh TJ, Kauffman CA, Kontoyiannis DP, et al.: Patterns of susceptibility of *Aspergillus* isolates recovered from patients enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3271-5
3. Tashiro T, Izumikawa K, Tashiro M, Takazono T, Morinaga Y, Yamamoto K, et al.: Diagnostic significance of *Aspergillus* species isolated from respiratory samples in an adult pneumology ward. *Med Mycol* 2011; 49: 581-7
4. Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH: *Aspergillus flavus*: an emerging non-*fumigatus* *Aspergillus* species of significance. *Mycoses* 2009; 52: 206-22
5. Hachem RY, Kontoyiannis DP, Boktour MR, Afif C, Cooksley C, Bodey GP, et al.: *Aspergillus terreus*: an emerging amphotericin B-resistant opportunistic mold in patients with hematologic malignancies. *Cancer* 2004; 101: 1594-600
6. Walsh TJ, Groll AH: Overview: non-*fumigatus* species of *Aspergillus*: perspectives on emerging pathogens in immunocompromised hosts. *Curr Opin Invest Drugs* 2001; 2: 1366-7
7. Maschmeyer G, Haas A, Cornely OA: Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. *Drugs* 2007; 67: 1567-601
8. Snelders E, Melchers WJ, Verweij PE: Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a new challenge in the management of invasive aspergillosis? *Future Microbiol* 2011; 6: 335-47
9. Denning DW, Perlin DS: Azole resistance in *Aspergillus*: a growing public health menace. *Future Microbiol* 2011; 6: 1229-32
10. Izumikawa K, Tashiro M, Kohno S: Management of chronic pulmonary aspergillosis. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1272: 40-8
11. 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* 2008; 14:982-984
12. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, 2nd ed. Document M38-A2. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008

13. Pfaller M, Boyken L, Hollis R, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S, et al.: Comparison of the broth microdilution methods of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and the Clinical and Laboratory Standards Institute for testing itraconazole, posaconazole, and voriconazole against *Aspergillus* isolates. J Clin Microbiol 2011; 49: 1110-2
14. Verweij PE, Howard SJ, Melchers WJ, Denning DW: Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. Drug Resist Updat 2009; 12: 141-7
15. Pfaller MA, Diekema DJ, Ghannoum MA, Rex JH, Alexander BD, Andes D, 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 2009; 47: 3142-6
16. Espinel-Ingroff A, Diekema DJ, Fothergill A, Johnson E, Pelaez T, Pfaller MA, et al.: 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 2010; 48: 3251-7
17. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, et al.: Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 1364-8
18. Tashiro M, Izumikawa K, Minematsu A, Hirano K, Iwanaga N, Ide S, et al.: Antifungal susceptibilities of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates in Nagasaki, Japan. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56: 584-7
19. Cowen LE: The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. Nat Rev Microbiol 2008; 6: 187-98
20. Howard SJ, Arendrup MC: Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection. Med Mycol 2011; 49 Suppl 1: S90-5
21. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, et al.: Frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. Emerg Infect Dis 2009; 15: 1068-76
22. 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 2008; 52: 2468-72
23. Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL: A point mutation in the 14alpha-sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1120-4

24. Mann PA, Parmegiani RM, Wei SQ, Mendrick CA, Li X, Loebenberg D, et al.: Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome P450 14alpha-demethylase. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 577-81
25. Nascimento AM, Goldman GH, Park S, Marras SA, Delmas G, Oza U, et al.: Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1719-26
26. Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, Rijs AJ, Varga J, Samson RA, et al.: Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med* 2008; 5: e219
27. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Melchers WJ, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, et al.: A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of cyp51A alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1897-904
28. Verweij PE, Mellado E, Melchers WJ: Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 1481-3
29. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL: Substitutions at methionine 220 in the 14alpha-sterol demethylase (Cyp51A) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2747-50
30. Chen J, Li H, Li R, Bu D, Wan Z: Mutations in the cyp51A gene and susceptibility to itraconazole in *Aspergillus fumigatus* serially isolated from a patient with lung aspergilloma. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 31-7
31. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, et al.: Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 291-321, Table of Contents
32. Chamilos G, Kontoyiannis DP: Update on antifungal drug resistance mechanisms of *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist Updat* 2005; 8: 344-58
33. Slaven JW, Anderson MJ, Sanglard D, Dixon GK, Bille J, Roberts IS, et al.: Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, *atrF*, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. *Fungal genetics and biology : Fungal Genet Biology* 2002; 36: 199-206
34. 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* 2009; 9: 789-95

35. 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* 2009; 75: 4053-7
36. Lockhart SR, Frade JP, Etienne KA, Pfaller MA, Diekema DJ, Balajee SA: Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance study is primarily due to the TR/L98H mutation in the *cyp51A* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 4465-8
37. 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* 2012; 67: 362-6
38. Howard SJ, Pasqualotto AC, Denning DW: Azole resistance in allergic bronchopulmonary aspergillosis and *Aspergillus* bronchitis. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 683-8
39. Bellete 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* 2010; 48: 197-200
40. Tashiro M, Izumikawa K, Hirano K, Ide S, Mihara T, Hosogaya N, et al.: Correlation between triazole treatment history and susceptibility in clinically isolated *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 4870-5
41. 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* 2011; 30: 268-70
42. van der Linden JW, Snelders E, Kampinga GA, Rijnders BJ, Mattsson E, Debets-Ossenkopp YJ, et al.: Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1846-54
43. Guinea J, Recio S, Pelaez T, Torres-Narbona M, Bouza E: Clinical isolates of *Aspergillus* species remain fully susceptible to voriconazole in the post-voriconazole era. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 3444-6
44. Espinel-Ingroff A, Johnson E, Hockey H, Troke P: Activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B in vitro against 590 moulds from 323 patients in the voriconazole Phase III clinical studies. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 616-20
45. Amorim A, Guedes-Vaz L, Araujo R: Susceptibility to five antifungals of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from chronically colonised cystic fibrosis patients receiving azole therapy. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35: 396-9

46. Bueid A, Howard SJ, Moore CB, Richardson MD, Harrison E, Bowyer P, et al.:  
Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. J  
Antimicrobial Chemother

英文要旨：

The current status of drug-resistant *Aspergillus*, evolution of resistance and future

Koichi Izumikawa, Masato Tashiro and Shigeru Kohno

Department of Molecular Microbiology and Immunology,  
Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences,  
1-7-1 Sakamoto, Nagasaki, Japan

*Aspergillus* causes severe and sometimes incurable infection in both immune-compromised and -competent patients and its associated mortality is high. Only three classes of antifungals such as azoles, polyenes and echinocandins are currently available. Recent studies have found that azole resistance is appearing in *A. fumigatus* strains around the world and such resistance is becoming a clinical concern. Although either long-term treatment of azole treatment in chronic aspergillosis or the usage of high amount of fungicides in environment is considered as possible cause of azole resistance, it has not been revealed yet. Although the mainstay of the azole resistance mechanism is mutation of the target protein 14 alpha-demethylase encoded by *cyp51A*, other mechanisms may be involved. In this review, we showed the current status of azole-resistance in Nagasaki, Japan and indicated prolonged usage of itraconazole may be linked to resistance acquisition.

Figure legend:

Figure 1. Comparison of *Aspergillus* spp. isolated during 1998 – 2004 and 2005 – 2009 from adults in a pneumology ward of Nagasaki University Hospital in Nagasaki, Japan. *A. fumigatus* was the most commonly isolated species between 1998 and 2004; however, between 2005 and 2009 its frequency of isolation had decreased by approximately half, while *A. niger* increased approximately two-fold to become the most commonly isolated species.

Figure 2. Proposal for the management of chronic pulmonary aspergillosis in Japan based on the severity of symptoms and status of the patient. The intravenous administration of antifungals may be desired for 2–4 weeks, followed by oral antifungals. MCFG, micafungin; VRCZ, voriconazole; CPFG, caspofungin; ITCZ, itraconazole; L-AMB, liposomal amphotericin B. f/u stands for follow-up.

Table 1. Epidemiological studies of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*

Reported by	Year reported	Number of tested isolates	Number of azole resistant isolates (azole tested in each study)	Rate of azole resistant strains (%)	Region	Reference
Guinea <i>et al.</i>	2008	374	0 (voriconazole)	0.0	Spain	<sup>43</sup>
Snelders <i>et al.</i>	2008	1912	32 (itraconazole)	1.7	The Netherlands	<sup>26</sup>
Rodriguez-Tudela <i>et al.</i>	2008	393	32 (itraconazole)	8.1	Spain, The Netherlands, UK, France	<sup>22</sup>
Espinel-Ingroff <i>et al.</i>	2008	292	1 (voriconazole)	0.3	North America	<sup>44</sup>
Howard <i>et al.</i>	2009	519	34 (itraconazole)	0.6	United Kingdom	<sup>21</sup>
Pfaller <i>et al.</i>	2009	637	43 (itraconazole)	6.8	Worldwide	<sup>15</sup>
Baddley <i>et al.</i>	2009	181	1 (itraconazole)	0.6	North America	<sup>2</sup>
Amorium <i>et al.</i>	2010	159	1 (posaconazole)	0.6	Portugal	<sup>45</sup>
Bueid <i>et al.</i>	2010	230	62 (itraconazole)	28.0	United Kingdom	<sup>46</sup>
Lockhart <i>et al.</i>	2011	497	29 (itraconazole)	5.8	Worldwide*	<sup>36</sup>
Chowdhary, <i>et al.</i>	2011	103	2 (itraconazole)	1.9	India	<sup>37</sup>
Tashiro <i>et al.</i>	2011	196	14 (itraconazole)	7.1	Japan	<sup>18</sup>

\*; itraconazole resistant strains were detected mainly from China.



Table 2. Mutations in the *cyp51A* gene identified in azole resistant *Aspergillus fumigatus* isolates and typical phenotype

Genotype	Amino acid substitutions	ITCZ	POSA	VRCZ
G54	E, K, R, V, W	Resistant	Resistant	Susceptible
L98	H	Resistant	Resistant	Resistant
M220	K, I, T,V,R,W	Resistant	Resistant	Susceptible
N22	D	Resistant	Susceptible	Susceptible
S52	T	Resistant	Resistant	Resistant
G138	C, R	Resistant	Resistant	Resistant
Q141	H	Resistant	Resistant	Resistant
H147	Y	Resistant	Resistant	Resistant
P216	L	Resistant	Resistant	Susceptible
M236	K, T, V	Resistant	Susceptible	Susceptible
S297	T	Resistant	Resistant	Susceptible
P394	L	Resistant	Susceptible	Susceptible
Y431	C	Resistant	Resistant	Resistant
G434	C	Resistant	Resistant	Resistant
T440	A	Resistant	Susceptible	Susceptible
G448	S	Resistant	Resistant	Resistant
Y491	H	Resistant	Susceptible	Susceptible
F495	I	Resistant	Resistant	Susceptible

Table 3. MICs and CYP51 substitutions in 22 non-WT *Aspergillus fumigatus* isolates

Isolate no.	MIC (µg/ml)			CYP51 substitutions	
	ITCZ	POSA	VRCZ		
MF-452	>8	0.5	0.5		I266N
MF-469	8	1	0.25	G54E	I266N
MF-460	4	2	0.25	G54E	I266N
MF-357	4	0.5	0.5		I266N
MF-468	4	0.5	0.25	G54E	I266N
MF-329	4	0.5	0.25		none
MF-331	2	>16	0.25	G54W	
MF-327	2	2	0.12	G54R	
MF-439	2	0.5	0.25	G54E	I266N
MF-473	2	0.5	0.25	G54E	I266N
MF-454	2	0.5	0.12	G54E	I266N
MF-472	2	0.5	0.12	G54E	I266N
MF-843	2	0.25	2		none
MF-748	2	0.25	1		not determined
MF-1011	1	2	0.12	G54W	
MF-855	1	0.25	2		none
MF-336	1	0.25	2		none
MF-486	1	0.25	2		none
MF-520	1	0.25	2		none
MF-1091	0.5	0.25	2		none
MF-474	0.5	0.25	2		none
MF-303	0.5	0.12	2		none

Figure 1.

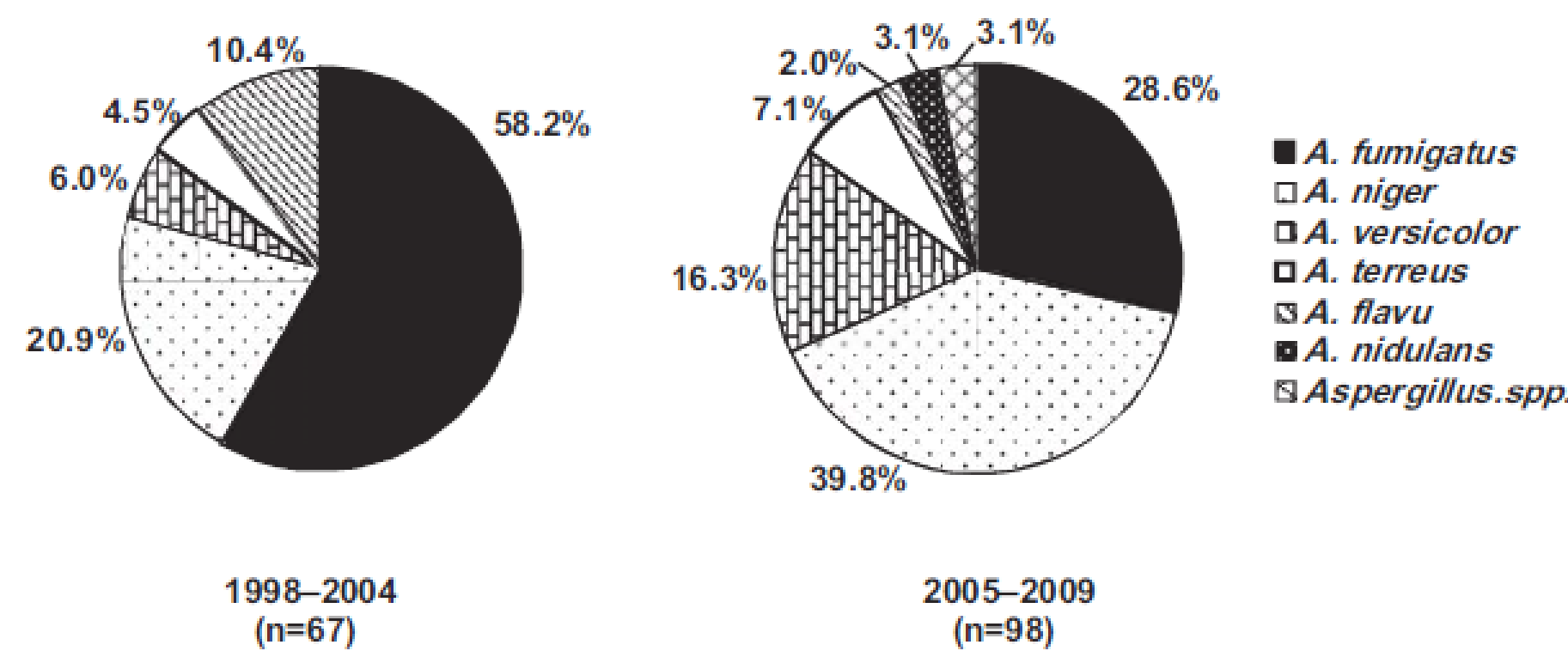


Figure 2.

