主として肺アスペルギロームより分離された *Aspergillus* 属, とくに *Aspergillus fumigatus* の薬剤耐性に関する基礎的ならびに臨床的研究

多 田 昌 弘

順天堂大学医学部第一内科教室 (主任 村上精次教授)

I 緒言

II 試験管内実験

1. 実験材料ならびに実験対象
2. 実験方法
 - A. Amphotericin B および Nystatin の *Aspergillus* 属に対する抗菌作用
 - i) 静菌の効果
 - ii) 殺菌の効果
 - a) 分生孢子に対する実験
 - b) 巨大集落に対する実験
 - B. 耐性獲得ならびに交叉耐性に関する実験
 - i) 傾斜平板法
 - ii) 増量継代法
 - C. 感応度 (耐性度) の推移・変動
 - D. 耐性株の諸種性状の変化に関する実験
 - i) 発育度
 - ii) pHの発育におよぼす影響
 - iii) 耐熱性
3. 各実験成績について

III 臨床的実験

実験方法および実験成績

IV 考按

V 結論

VI 文献

I 緒 言

1856年 Virchow¹⁾ は4例の肺アスペルギルス症の剖検例を報告したが、彼は1847年 Sluyter の報告²⁾が人に於ける嚙突であるとした。それ以来、欧米諸国では数多くのアスペルギルス症が続々と報告されてきた。

我が国においては、1908年緒方³⁾により初めて報告されて以来1945年までの間に、わずかに数例の報告があつたのみであつたが、戦後、抗生物質、副腎皮質ホルモン、抗癌剤などの薬剤の使用増加と、かつまた真菌学の知識の普及と相俟つて菌交代症や末期感染症などとして深在性真菌症、ことにアスペルギルス症の報告も急に増加して、1965年の本邦における症例集計では286例であつた⁴⁾。その後の報告や未発表のもの、そしてまた剖検できず確定診断に至らなかつたものなどを考えあわせると、その数は予想以上の数に昇つていと推察される。

従来、内科的治療法がほとんど皆無にひとしかつた深在性真菌症も、1949年 Hazen, Brown⁵⁾ が Virginia の土壤中より得た一種の放線菌より抗真菌作用を呈する抗生物質を発見して Fungicidin と命名したが、その後 Nystatin と改められ Polyene 系抗真菌剤の出現となつた。

その後1952年細谷ら⁶⁾により Trichomycin が発見され、次いで1955年 Gold, Stout⁷⁾により Amphotericin B が発見されて一層 Polyene 系化合物が注目されて来た。

最近では、また X-5079 C⁸⁾, Hamycin⁹⁾なども開発されるに至り、遅まきながらも真菌に対する化学療法も漸次進歩してきたといえる状態である。しかし現在では多種類の真菌に対しては Amphotericin B が最も強力であり、かつときには唯一つの治療薬であることは多くの医家の認めるところである。かくて Amphotericin B 静注法は深在性真菌症の治療を大きく前進させたがこの薬剤も決して未だ理想的な薬剤とはいいい難い、すなわち腸管よりの吸収が悪いこと、かつ治療量が中毒量に近く、従

Masahiro Tada.: Drug resistance of the genus *Aspergillus* isolated from the patient with pulmonary aspergilloma. From The First Department of Internal Medicine, Juntendo University School of Medicine. (Director: Prof. Seiji Murakami)

つてさまざまな副作用がみられることなどであり、今日ではその投与方法が種々検討されつつある現状である。従つて抗真菌剤の改良、ならびに新しい開発が目下重要な課題であるがまた他方、現在の薬剤について、その使用法などを検討することは重要であり、その一つとして真菌の薬剤への耐性獲得も当然、研究課題となるところであるが、従来、かかる方面の研究は比較的少ない。文献にみられるものとしては *Candida albicans* については Stout¹⁰⁾、岩田ら¹¹⁾¹²⁾、村上ら¹³⁾、宮本¹⁴⁾の報告があり *Aspergillus fumigatus* については岩田ら¹²⁾、福島¹⁵⁾、池本¹⁶⁾の報告があるが寥々たるものである。

著者は主として肺アスペルギロームの患者より分離した *Aspergillus* 属12株を使用して、Amphotericin B, Nystatin の静菌的ならびに殺菌的效果、薬剤耐性の獲得の有無と耐性度の推移・変動を検索し、耐性株については諸種性状の変化を検査した。他方臨床的に Amphotericin B 治療を行なつた肺アスペルギルス症2例ならびに無治療症例1例における *Aspergillus* 属の Amphotericin B 感受性の変動などについて検討し、かつ試験管内実験成績と比較検討したのでその成績を発表する。

II 試験管内実験

1. 実験材料ならびに実験対象

症例と分離真菌：当教室において昭和35年1月より、昭和42年6月までの間に疑症をも含めて15症例のアスペルギルス症を経験した。

その概括は表1のごとくであり、15症例はいずれも呼吸器系アスペルギルス症であり、そのうち12例は肺アスペルギロームであつた。

性別比では男10例、女5例で男性に多く、年令的には60才以上が過半数をしめていた。

肺アスペルギルス症、とくにアスペルギロームの発生部位は両肺とも上葉が圧倒的に多く、左右の差はとくに認められなかつた。自覚症状については、咳嗽、喀痰が多数に認められ、以下血痰、咯血、喘鳴などの順であつた。また基礎疾患における菌球を含有する空洞の発生機転については、従来はとくに結核の既往歴が重視されたが、結核菌が検出されたものは、15症例中わずかに2例であり、依然としてその解明は困難であつた。

なお実験に使用した分離菌株のうち、*Aspergillus fumigatus* は野呂株 (N株と略す、以下同様)、伴株 (B株)、

表1. アスペルギルス症15例の概括

番号	診断年月	年令性別	部 位	症 状	分 離 真 菌	診 断	転帰	剖検
1	35. 1	81 ♀	右上葉	血痰、喀痰、咳嗽	<i>A. fumigatus</i>	肺アスペルギローム、	死 亡	有
2	37. 4	31 ♀	右上葉	咳 嗽	<i>Aspergillus sp.</i>	肺アスペルギローム	不 明	
3	37. 6	61 ♂	右上葉 右下葉	喀痰、喘鳴、咯血	<i>A. fumigatus</i>	肺結核、 肺アスペルギローム	死 亡	有
4	37. 11	70 ♂	左上葉	喀痰、咳嗽	なし	肺アスペルギローム	死 亡	有
5	38. 4	67 ♀	右上葉	血痰、喀痰、咳嗽	<i>A. fumigatus</i>	肺アスペルギローム クレブシェラ肺炎	治療中	
6	38. 8	50 ♂	左上葉	血 痰	<i>A. fumigatus</i>	肺アスペルギローム	治療中	
7	38. 9	31 ♂	左上葉	血痰、喀痰	<i>A. flavus</i>	肺結核 気管支肺アス ペルギルス症、	治療中	
8	40. 6	71 ♂	右上葉	喀痰、喘鳴、咳嗽	<i>A. fumigatus</i>	肺アスペルギローム、 珪肺の疑い	死 亡	なし
9	40. 7	60 ♂	右上葉	喀痰、咳嗽	<i>A. fumigatus</i>	肺アスペルギローム、	不 明	
10	41. 1	34 ♀	副鼻腔	鼻閉塞、鼻汁	<i>A. flavus</i>	副鼻腔アスペルギローム	治 癒	
11	41. 2	65 ♂	左上葉	喀痰、喘鳴、咳嗽	<i>A. fumigatus</i>	肺アスペルギローム	死 亡	なし
12	41. 2	79 ♂	左上葉	咯 血	<i>A. candidus</i> <i>P. nigricans</i>	肺菌球 肺アスペルギローム	死 亡	有
13	41. 7	57 ♂	右上葉	血痰、喘鳴	なし	肺菌球	死 亡	なし
14	42. 2	21 ♀	右上葉 左上葉	喀 痰	<i>A. fumigatus</i>	気管支肺炎 アスペルギルス肺炎	死 亡	有
15	42. 6	65 ♂	右上葉 左上葉	喀痰、咳嗽	<i>Aspergillus sp.</i>	肺化膿症 肺アスペルギローム	死 亡	有

A: *Aspergillus* P: *Penicillium*

田中株 (T株), 峰岸株 (M株), 高谷株 (Tt株), 浜島株 (H株), 奥野木株 (O株) であり, *Aspergillus flavus* は進藤株 (S株), 桑原株 (K株), *Aspergillus candidus* は佐藤株 (St株), *Aspergillus sp.* は浅尾株 (A株), *Penicillium negricans* は佐藤株 (St株) であった。なお2つの St株 は同一患者より検出されたものである。

抗真菌剤: 実験に使用した抗真菌剤は Amphotericin B (以下 AMPH と略す) と Nystatin (以下 NST と略す) であり, とくに後者は 1 mg 3600 U のものを使用した。

培地: 培地は pH 6.0 に調製した Sabouraud 液状培地, および寒天培地を使用した (以下 S 液状培地, S 寒天培地と略す)。

2. 実験方法

A. Amphotericin B および Nystatin の *Aspergillus* 属に対する抗菌作用

i) 静菌の効果

Aspergillus 属に対する AMPH, NST の最低発育阻止濃度 (Minimal Inhibitory Concentration, MIC と略す) の測定は次のごとく行なった。すなわち S 液状培地による両薬剤の倍数希釈系列を作製し, それに分生胞子の 1 白金耳量を 1 ml の生理食塩水に十分懸濁させたものを毛細ピペットで 1 滴 (約 0.02 ml) を接種し, 27°C 7 日後に肉眼的に清澄で集落の浮遊も認めないものを発育阻止と判定し, その最低濃度を求めた。

ii) 殺菌の効果

AMPH の *Aspergillus* 属に対する殺菌の効果の有無については, 分生胞子単独, および巨大集落自体に対する 2 通りの実験方法に拠ることとした。

a) 分生胞子に対する実験

5 mg/ml の AMPH を含む S 液状培地に N 株および B 株の分生胞子を十分に浮遊させ, AMPH 接触後 30 分, 1 時間, 3 時間, 6 時間と経時的に約 10 ml の S 液状培地に 1 白金耳量 (直径約 2 mm) を移植し, 27°C 7 日後にその発育の有無を肉眼的に判定した。なお白金耳に附着した AMPH の濃度は S 液状培地で十分希釈されて発育阻害には無視できることを予め確かめた。

b) 巨大集落に対する実験

S 寒天平板培地の各 2 個に菌株を接種し, 直径約 3 cm の集落になるまで発育させた後, その上に 1 mg/ml, 5 mg/ml の AMPH 溶液約 20 ml を各集落に注ぎ, 薬剤に十分浸してより各 2 時間, 4 時間, 6 時間, 9 時間, 12 時間, 24 時間, 次いで 2 日, 3 日, 4 日, 5 日, 6 日後

と経時的に 1 白金耳を鉤菌し, それを約 10 ml の S 液状培地に移植し, 27°C 3 日後, 5 日後, 7 日後にそれらの発育の有無を肉眼的に判定した。なお念のため薬剤に接触していない対照を置きそれらの発育について比較検討した。

B. 耐性獲得ならびに交叉耐性に関する実験

i) 傾斜平板法

薬剤の濃度勾配をもつた S 平板寒天培地を使用して人工的に得られた耐性株の AMPH, NST に対する感受性の変化を検査するとともに, 両薬剤間の交叉耐性についても実験を行なった。その際の MIC の測定には, 人工耐性株の分生胞子を使用し実験 A. i. (静菌の効果の項) の方法にしたがって行なった。

ii) 増量継代法

薬剤加, S 液状培地による AMPH の増量継代培養法により N 株, T 株, H 株, K 株のそれぞれの人工耐性株の作製を試みた。すなわち各菌株の分生胞子をまず 2.0 mcg/ml 加, S 液状 4 培地に移植し, 約 7 日後十分に発育した菌株を更に約倍の薬剤濃度 S 液状培地に継代し, かくして漸次高濃度の培地へと移植し, 最終的には 500 mcg/ml の AMPH 加, S 液状培地に発育した菌株が得られた。

この菌株を用いて改めて AMPH 感受性を検査し, 原株のそれらと比較した。

C. 感性度 (耐性度) の推移・変動

薬剤加, S 傾斜平板法で得られた AMPH 耐性株の耐性の持続, または低下については耐性 N 株, B 株, T 株, K 株を使用して薬剤を含まない S 寒天培地に移植し, 約 2 週間ごとに 5 代にわたって継代培養し AMPH 感受性の変化を追求した。また同ような方法で AMPH 治療後に得られた耐性 N 株についても 10 代にわたって継代培養を行ない AMPH 感受性の変化を検査した。

D. 耐性株の諸種性状の変化に関する実験

実験 B. ii. (増量継代法) により得られた人工耐性株, ならびに AMPH 治療後に得られた耐性株の発育度の変化, 発育におよぼす pH の影響, 耐熱性の変化などについて比較検討した。

i) 発育度

AMPH 治療後に得られた耐性 N 株, 増量継代法により得られた耐性 N 株, T 株, H 株, および K 株を使用して各原株と S 寒天平板培地に, それぞれ白金線により少数の分生胞子を培地上の中央 1 カ所に移植し, 37°C 一定時間後その発育の速度, 集落の形, 大きさなどを原株のそれらと比較した。

ii) pHの発育におよぼす影響

培地のpHの変化が耐性株の発育におよぼす影響を、各原株を対照として比較検討した。すなわちpH 4.5より8.5までの間に調製された9段階のS液状培地を作製し、原株、AMPH耐性株、NST耐性株の各分生胞子を生理食塩水に懸濁させ、毛細ピペット1滴を各培地に移植し、それらの各発育につき比較検討した。

iii) 耐熱性

耐熱性の変化についてはAMPH治療後に得られた耐性N株、および人工耐性N株、T株、H株、K株ならびに各原株の分生胞子を懸濁させたS液状培地（胞子数 $4 \sim 6 \times 10^4/\text{mm}^3$ ）を60℃恒温槽に入れてより5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、3時間後と経時的にS液状培地に移植し、27℃7日後にそれらの発育の有無・発育度につき判定した。

3. 各実験成績

A. AMPHおよびNSTの *Aspergillus* に対する抗菌作用

i) 静菌の効果：*Aspergillus* 属に対するAMPH、NSTのMIC測定の結果は表2のごとくであった。*Aspergillus fumigatus* M株および *Penicillium negricans* St株はAMPHに対し強い抵抗性が認められ、そのMICはM株 2,000 mcg/ml、St株 1,000 mcg/ml であり、NSTに対してもM株のMICは 250 mcg/ml と軽度の抵抗性を認めた。その他の *Aspergillus* 属の感受性についてはAMPHのMICは 3.8 mcg/ml～30 mcg/ml であり、NSTのMICは30 mcg/ml～120 mcg/ml と多少のばらつきが認められた。しかし全体としては感受性の菌株差はNSTの方がAMPHより少なかった。

ii) 殺菌の効果

a) 分生胞子単独で行なつたAMPHの *Aspergillus fumigatus* N株、B株に対する殺菌の効果の有無についての実験成績は表3のごとくであった。

すなわち静菌の効果は十分に認められたが最終的には発育が認められ、従つてかかる条件下においては殺菌効果がないものと判定された。

b) 巨大集落で行なつたAMPHの *Aspergillus* 属に対する殺菌的效果の有無についての実験成績は表4のごとくであった。すなわち薬剤に接触しない対照群は3日後の判定で十分な発育が認められたが、これに反してAMPH接触群はいずれも薬剤接触後、4時間より2日までの間に強い発育抑制が認められた。しかし最終判定7日後の判定では発育が些少ながら認められた。また感受

表2. 病巣由来の *Aspergillus* 属および *Penicillium negricans* に対する AMPH, NST のMIC (S液状培地希釈法) * 1mg : 3600 U.

菌 株 \ 薬 剤	Amphotericin B	Nystatin *
<i>A. fumigatus</i> N株	15.0mcg/ml	60.0mcg/ml
<i>A. fumigatus</i> B株	3.8mcg/ml	30.0mcg/ml
<i>A. fumigatus</i> T株	15.0mcg/ml	30.0mcg/ml
<i>A. fumigatus</i> M株	2000.0mcg/ml	250.0mcg/ml
<i>A. fumigatus</i> H株	7.5mcg/ml	60.0mcg/ml
<i>A. fumigatus</i> Tt株	7.5mcg/ml	60.0mcg/ml
<i>A. fumigatus</i> O株	3.8mcg/ml	30.0mcg/ml
<i>A. flavus</i> K株	3.8mcg/ml	60.0mcg/ml
<i>A. flavus</i> S株	7.5mcg/ml	60.0mcg/ml
<i>A. candidus</i> St株	7.5mcg/ml	15.0mcg/ml
<i>Aspergillus sp.</i> A株	30.0mcg/ml	120.0mcg/ml
<i>P. nigricans</i> St株	1000.0mcg/ml	120.0mcg/ml

表3. AMPHの *Aspergillus fumigatus* に対する殺菌効果その1 (被検体：分生胞子)

被検菌株 \ 薬剤接触時間	<i>A. fumigatus</i> B株	<i>A. fumigatus</i> N株
30分	+	+
1時間	+	+
3時間	+	+
6時間	+	+

—発育なし、+発育あり、

性の高い菌株ほど強度の発育抑制が認められたが、日時の経過とともに薬剤を含まない新しいS液状培地では弱いながらも発育が認められ、従つて前述のような条件のもとにおいてもAMPHは *Aspergillus* 属に対し静菌的效果は十分に認められたが、殺菌効果は認められなかつた。また薬剤との接触時間が2日以上と長くなると却つて発育の抑制が弱くなることを認めた。なおまた当然の

表 4. AMPH の *Aspergillus* 属 *Penicillium negricans* に対する殺菌効果 その 2 (被検体: 巨大集落)

薬 物 接 触 時 間	判定 日数	<i>A. fumigatus</i> N 株		<i>A. fumigatus</i> B 株		<i>A. fumigatus</i> T 株		<i>A. fumigatus</i> M 株		<i>A. fumigatus</i> H 株		<i>A. fumigatus</i> Ti 株		<i>A. fumigatus</i> O 株		<i>A. flavus</i> K 株		<i>A. flavus</i> S 株		<i>A. candidus</i> St 株		<i>Aspergillus</i> sp. A 株		<i>P. negricans</i> St 株	
		1mg	5mg	1mg	5mg	1mg	5mg	1mg	5mg	1mg	5mg	1mg	5mg	1mg	5mg	1mg	5mg	1mg	5mg	1mg	5mg	1mg	5mg	1mg	5mg
2 時 間	3日 5日 7日	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4 時 間	3日 5日 7日	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6 時 間	3日 5日 7日	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
9 時 間	3日 5日 7日	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
12 時 間	3日 5日 7日	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
24 時 間	3日 5日 7日	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 日	3日 5日 7日	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3 日	3日 5日 7日	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4 日	3日 5日 7日	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5 日	3日 5日 7日	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6 日	3日 5日 7日	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

一発育なし, +発育弱し, ++発育強し,

ことながら薬剤は高濃度ほど強く発育を抑制した。

B. 耐性獲得ならびに交叉耐性に関する実験

i) 傾斜平板法により得られた AMPH 耐性株の AMPH ならびに NST 感受性の変化は表5のごとくであった。傾斜平板法で得られた耐性株と考えられる菌株に対する AMPH の MIC は原株に比べて2倍より8倍に上昇しており、この AMPH 耐性株に対する NST の MIC も原株に比べて4倍までの上昇が認められた。従つて AMPH 耐性株は NST に対しても耐性を獲得したものと考えられた。

表5. AMPH耐性株に対する AMPH ならびに NST の MIC (S 液状培地希釈法)
* 1mg : 3600 U.

菌 株 \ 薬 剤	Amphotericin B	Nystatin *
<i>A. fumigatus</i> 耐性 N 株	60.0mcg/ml (4倍)	120.0mcg/ml (2倍)
<i>A. fumigatus</i> 耐性 B 株	30.0mcg/ml (8倍)	120.0mcg/ml (4倍)
<i>A. fumigatus</i> 耐性 T 株	60.0mcg/ml (4倍)	60.0mcg/ml (2倍)
<i>A. fumigatus</i> 耐性 M 株	2000.0mcg/ml 以上	500.0mcg/ml (2倍)
<i>A. fumigatus</i> 耐性 H 株	30.0mcg/ml (4倍)	120.0mcg/ml (2倍)
<i>A. fumigatus</i> 耐性 Tt 株	15.0mcg/ml (2倍)	60.0mcg/ml (1倍)
<i>A. fumigatus</i> 耐性 O 株	15.0mcg/ml (4倍)	60.0mcg/ml (2倍)
<i>A. flavus</i> 耐性 K 株	30.0mcg/ml (8倍)	120.0mcg/ml (2倍)
<i>A. flavus</i> 耐性 S 株	15.0mcg/ml (2倍)	120.0mcg/ml (2倍)
<i>A. candidus</i> 耐性 St 株	15.0mcg/ml (2倍)	30.0mcg/ml (2倍)
<i>Aspergillus sp.</i> 耐性 A 株	120.0mcg/ml (4倍)	250.0mcg/ml (2倍)
<i>P. nigricans</i> 耐性 St 株	2000.0mcg/ml 以上	500.0mcg/ml (4倍)

() 倍は原株と比較した MIC の上昇度

傾斜平板法で得られた NST 耐性株の NST ならびに AMPH 感受性の変化は表6のごとくであった。すなわち耐性株と考えられる菌株に対する NST の MIC は原株に比べて2倍より8倍に上昇しており、この NST 耐性株に対する AMPH の MIC も原株に対し4倍までの上昇が認められた。従つて NST 耐性株は AMPH に対しても同じく耐性を獲得しており、以上の2つの実験成績から両薬剤間に交叉耐性の存在することが認められ

表6. NST耐性株に対する NST ならびに AMPH の MIC (S 液状培地希釈法)
* 1mg : 3600 U.

菌 株 \ 薬 剤	Amphotericin B	Nystatin *
<i>A. fumigatus</i> 耐性 N 株	15.0mcg/ml (1倍)	120.0mcg/ml (2倍)
<i>A. fumigatus</i> 耐性 B 株	15.0mcg/ml (4倍)	250.0mcg/ml (8倍)
<i>A. fumigatus</i> 耐性 T 株	30.0mcg/ml (2倍)	120.0mcg/ml (4倍)
<i>A. fumigatus</i> 耐性 H 株	15.0mcg/ml (2倍)	500.0mcg/ml (8倍)
<i>A. fumigatus</i> 耐性 Tt 株	7.5mcg/ml (1倍)	120.0mcg/ml (2倍)
<i>A. fumigatus</i> 耐性 O 株	7.5mcg/ml (2倍)	120.0mcg/ml (4倍)
<i>A. flavus</i> 耐性 K 株	15.0mcg/ml (4倍)	250.0mcg/ml (4倍)
<i>A. flavus</i> 耐性 S 株	7.5mcg/ml (1倍)	120.0mcg/ml (2倍)
<i>A. candidus</i> 耐性 St 株	7.5mcg/ml (1倍)	60.0mcg/ml (4倍)
<i>Aspergillus sp.</i> 耐性 A 株	60.0mcg/ml (2倍)	500.0mcg/ml (4倍)

() 倍は原株と比較した MIC の上昇度

た。

ii) AMPH の増量継代法によつて作製された AMPH 耐性株に関しては、AMPH の MIC はいずれも 250 mcg/ml 以上となり、原株に比べて16倍以上の耐性上昇が認められた。

C. 感度度(耐性度)の推移・変動

AMPH との接触により得られた *Aspergillus* 属の薬剤耐性度の変動は、薬剤を含まない培地に継代培養することにより菌株差はあるが、いずれもその減少する傾向が認められた。すなわち試験管内で作製された耐性株の5代継代培養による *Aspergillus* 属の AMPH に対する MIC の変化は表7のごとくであった。すなわち実験に使用された耐性 B 株、K 株(耐性比8倍)および耐性 N 株、T 株(耐性比4倍)ともに感受性の増加の速度差は認められたが、5代の継代培養後に AMPH 感受性はほぼそれぞれ原株の感受性に復帰した。

一方、AMPH 治療後に得られた耐性 N 株(MIC 500mcg/ml 以上)は10代の継代培養により、その MIC は 30mcg/ml となり原株の MIC (15mcg/ml) の2倍にまで復帰したことを認めた。

D. 耐性株の諸種性状の変化

i) 発育度

表7. AMPH耐性株に対する継代培養によるAMPHのMICの変化

継代培養	耐性株MIC	1代後MIC	2代後MIC	3代後MIC	4代後MIC	5代後MIC
K株	30mcg/ml (8倍)	15mcg/ml (4倍)	15mcg/ml (4倍)	7.5mcg/ml (2倍)	7.5mcg/ml (2倍)	3.8mcg/ml (1倍)
B株	30mcg/ml (8倍)	15mcg/ml (4倍)	7.5mcg/ml (2倍)	7.5mcg/ml (2倍)	3.8mcg/ml (1倍)	3.8mcg/ml (1倍)
N株	60mcg/ml (4倍)	30mcg/ml (2倍)	15mcg/ml (1倍)	15mcg/ml (1倍)	15mcg/ml (1倍)	15mcg/ml (1倍)
T株	60mcg/ml (4倍)	60mcg/ml (4倍)	30mcg/ml (2倍)	30mcg/ml (2倍)	15mcg/ml (1倍)	15mcg/ml (1倍)

() 倍は原株と比較したMICの上昇度

写真1 原株(上), 治療後に得られた耐性株(向つ右), および人工耐性株(向つて左)のS寒天平板培地上の発育状態(37°C, 2日培養)

試験管内で得られた人工耐性株, ならびに治療中に患者より得られた耐性株のS寒天平板培地上における発育状態は弱く, 集落がより小さいことが認められた。

ii) pHの発育におよぼす影響

培地のpHの変化が *Aspergillus* 属の発育におよぼす影響は原株・耐性株の間には特に差異は認められず, アルカリ側において耐性株の発育が原株に比べてやや弱いように思われた。

iii) 耐熱性

耐性株の耐熱性の変化については原株に比べて耐性株は高温に対して弱く, その結果は表8のごとくであった。すなわち原株群においては60°C恒温槽に入れてより3時間後も発育が認められ, かつ発育状態にも, ほとんど変化は認められなかった。しかし人工耐性株および治療により生じたとされる耐性N株は当初より発育が微弱であり, 60°Cでは1時間を前後に於て発育が認められなかった。なお人工耐性N株, 患者より検出された耐性N株との間には, とくに差異は認められなかった。

III 臨床的実験

実験方法

今日の基礎的研究はもともと臨床治験より着想を得て始められたものである。すなわち肺アスペルギローームや気管支肺アスペルギルス症の化学療法は薬剤の試験管内抗菌力より推量して局所投与がより有効な療法と思われる。そこでAMPHの気管内注入療法¹⁶⁾¹⁷⁾を行なつたわけであるが, 予想通りの効果が得られた。そして一方, AMPH治療中または治療後に検出された *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* のAMPH感受性を治療前のそれと比較検討を試みた。さらにAMPH治療を行なわなかつた肺アスペルギローームの患者についても検出された *Aspergillus fumigatus* の薬剤感受性の変化をも追求した。

次に対象に選んだ患者, AMPHの治療法などにつき簡単に触れる。

i) 症例1. 咳嗽, 喀痰, 血痰などがあり肺結核として治療を受けていたが自覚症状は消失せず, その後喀痰より *Aspergillus fumigatus* が検出されて初めて肺アスペルギローームと診断され, AMPH気管内注入を1回15mg宛, 隔日に施行して総量180mg施行したところ多数の菌塊の喀出をみ, その後X線検査で菌球像も消失するに至つた。なお本症例は喀痰中に常時 *Klebsiella pneumoniae* が検出されたので PC-G 10×10⁴ U の注入もあわせて行なつた。

ii) 症例2. 喀痰・血痰があり肺結核として治療を受けていたが, 気管穿刺痰より *Aspergillus flavus* が検出され, 気管支肺アスペルギルス症と診断された。本例に対しAMPH気管内注入を1回15mg宛, 総量150mg行なつたところ喀痰中の *Aspergillus flavus* は急激に減少し, 治療中止時には真菌培養は陰性となつた。なお本症例は喀痰より結核菌が培養で1回検出されたため抗結核剤と

表8. 原株, 治療後に得られた耐性株, ならびに人工耐性株の耐熱性試験 (60°C恒温槽)

時 間	<i>A. fumigatus</i> N株			<i>A. fumigatus</i> T株		<i>A. fumigatus</i> H株		<i>A. flavus</i> K株	
	原 株	耐性株 (治療による)	耐性株 (人工)	原 株	耐性株 (人工)	原 株	耐性株 (人工)	原 株	耐性株 (人工)
5分	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15分	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30分	+	+	+	+	+	+	—	+	+
45分	+	—	+	+	+	+	—	+	+
1時間	+	—	—	+	—	+	—	+	+
2時間	+	—	—	+	—	+	—	+	—
3時間	+	—	—	+	—	+	—	+	—

—発育なし, +発育あり.

の併用治療を行なつた.

iii) 症例3. 血痰があり, 胸部X線検査により菌球像がみられ, 喀痰より *Aspergillus fumigatus* が検出され肺アスペルギロームと診断された. しかし本症例は諸症状軽度のため特に治療を施すことなく, 目下経過観察中である.

臨床実験の成績

i) 症例1. AMPH注入開始後より喀痰中の *Aspergillus* の量は急増し, さらに菌塊の喀出が見られるようになったが, 喀痰より検出された *Aspergillus fumigatus* のAMPH感受性は急に低下した. しかし治療中止後は感受性も徐々に上昇し, 約1年後には治療前とほぼ同一の感受性に復帰した. なお菌株の集落・形態ともに特に差異は認められなかつた. すなわち感受性の変化は表9のごとく, 治療前のAMPHのMICは15mcg/mlであつたが, AMPH60mg注入後のMICは30mcg/mlと2倍に上昇し, さらに180mg注入後のMICは500mcg/ml以上となつた. しかし治療中止4ヵ月後のMICは250mcg/mlと感受性は再びやや上昇し, さらに1年後のMICは15mcg/mlとなり, さらに1年後に喀痰より分

表9. AMPH治療により *Aspergillus fumigatus* N株に対するAMPHのMICの変動

<i>Aspergillus fumigatus</i> N株		
使用期間	使用量	MIC mcg/ml
使用前	0	15
15日	60mg	30
38日	180mg	> 500
4ヵ月		250
1年		15
2年		15

離された *Aspergillus fumigatus* のMICも15mcg/mlと感受性に変化は認められなかつた.

ii) 症例2. 喀痰より多数検出された *Aspergillus flavus* は治療開始により減少し AMPH 150mg 注入後より真菌は検出できなかつた. なお感受性の変化は表10のごとくであつた. すなわち治療前のAMPHのMICは3.8mcg/mlであつたが, 80mg注入後のMICは30mcg/mlと急増し, 150mg注入後は7.5mcg/mlと却つて減少した. その後, 喀痰より *Aspergillus flavus* は検出されないため遺憾ながら感受性の変化を追求することはできなくなつた.

表10. AMPH治療により *Aspergillus flavus* K株に対するAMPHのMICの変動

<i>Aspergillus flavus</i> K株		
使用期間	使用量	MIC mcg/ml
使用前	0	3.8
15日	80mg	30.0
23日	150mg	7.5

iii) 症例3. 特殊治療を施さなかつた症例のMICは15mcg/mlであつたが, 2年後に分離された *Aspergillus fumigatus* のAMPHのMICは同じく15mcg/mlであり, AMPH治療例に対して感受性の変化は認められなかつた.

IV 考 按

近年, 肺アスペルギルス症は漸増の傾向にある. 空洞内遊離型のアスペルギロームはむろんのこと, 気管支断端アスペルギルス症, さらにはアスペルギルス肺炎など

も生前診断の機会も増加している。従つて当然治療が問題となるが、内科的には化学療法がもつとも重要であるが、細菌におけると同様に真菌の薬剤耐性も必然的に研究課題となるところである。しかしながらかかる方面の研究は内外ともに極めて少ないようである。

肺アスペルギローームを主体とした肺アスペルギルス症の患者より分離した *Aspergillus* 属の薬剤感受性については AMPH では高度の自然耐性を有する *Aspergillus fumigatus* M 株 (MIC 2,000mcg/ml), *Penicillium negricans* St 株 (MIC 1,000mcg/ml) があり、また NST に対しても M 株 (MIC 250mcg/ml) などは中等度の耐性があり、このように *Aspergillus* 属の AMPH 感受性には菌株によつてかなりの格差が認められたが、岩田ら¹²⁾も同様のことを報告している。

今日、深在性真菌症とくにアスペルギルス症の化学療法としては X-5079 C⁸⁾、Hamycin⁹⁾ などの研究段階にあるものは別として、AMPH が全身投与できるという点では唯一の治療薬といつても過言ではないと思惟される。しかし AMPH 点滴静注では患者の薬に対する認容量を考慮するとき、前記のような *Aspergillus* 属の発育を阻止するに十分な血中濃度を得ることはとうてい望むべくもない。従つてその点では局所投与法によることが唯一の治療法と考えられる現状である。

NST は注射による投与はできないが、本剤も AMPH と同様に経口投与では腸管よりの吸収が至つて悪く、そのため治療に用いるとすれば当然局所投与によるものが最も効果が望まれる。肺アスペルギルス症に対する局所投与としては気管内注入と、Aerosol 療法が考えられるが、後者では病巣に十分な薬剤濃度が到達するとは考えにくいので、気管内注入が残された方法である。かかる方法で肺アスペルギローームの菌球消失をみたという報告も福島¹⁸⁾、池本ら¹⁷⁾、Ramirez-R¹⁹⁾ によりなされているが、他方治療を中止すると再発をみることが多いことも記されている。しかし池本²⁰⁾は菌球消失後約4年間にわたつて遠隔成績を追求した症例で再発を全くみなかった例を報告している。

肺アスペルギローームの AMPH 治療中に *Aspergillus* 属が耐性を獲得したとの報告は至つて少なく福島¹⁵⁾¹⁷⁾、池本¹⁶⁾の報告にみられるのみである。

なお *Candida* については、1952年 Kass ら²¹⁾は肺カンジダ症において Brilliant green 吸入療法中に *Candida albicans* が原株に比べて 250 倍も耐性化したと報告している。

なお著者らの経験では肺アスペルギローーム例の無特殊治療のもので2年間隔で分離した *Aspergillus fumigatus* の AMPH 感受性には差がなかった例があり、このことから耐性例は(少数例の経験ではあるが) AMPH 治療を施したことが耐性獲得の動機となつた原因と推定されるのである。かかる臨床治験における *Aspergillus* 属の AMPH 耐性化の現象にもとづき、試験管内においても同様な問題について研究したのであるが、真菌におけるかかる基礎的な研究は細菌のそれに比べるといたつて少ない。ただ工業用の醗酵に利用される真菌に関しては、薬物・毒物に対する適応性、耐性獲得については細菌における歴史より古いことであつたといわれている。

病原性真菌についての薬剤耐性に関する研究は1949年 Sing²²⁾により Curamycin に対して約3倍の耐性 *Trichophyton* を得たことと、臨床例において前述の Kass らの報告が初期のものと思われる。

本邦における病原性真菌の薬剤耐性に関する研究は *Trichophyton*, *Candida* などについて岩田ら¹¹⁾、次いで村上¹³⁾、宮本¹⁴⁾の報告がある。

岩田らは、皮膚真菌の Griseofulvin に対する試験管内における耐性獲得をしらべるために Pentachlorophenol と比較し、*Trichophyton*, *Microsporum* について薬剤増量継代法により20代にわたつて継代したが、いずれも耐性の上昇を示さなかつたと報告している。

宮本は *Candida albicans* Duke 株 No. 2 を用いて Trichomycin, Polymyxin B, Brilliant green ならびに Phenyl mercury acetate の抵抗性獲得を検査し Polymyxin B に対してのみ8倍の抵抗性株が得られたが、他の3薬剤には抵抗性株は得られなかつたという。また Polymyxin B のみに耐性獲得がみられたのは Polymyxin B が高濃度でも *Candida albicans* に殺菌効果をもたぬことが一つの理由ではないかと述べている。

Polyene 系薬剤の交叉耐性に関しては *Candida* での研究で Stout ら¹⁰⁾は NST 耐性菌は Trichomycin にも耐性を示すと報告した。また Sorensen ら²³⁾は *Candida albicans*, *Coccidioides immitis* とともに AMPH 耐性株は NST にも抵抗性を示したと報告している。次に *Aspergillus* 属に対する Polyene 系薬剤耐性に関しては基礎的方面では岩田ら¹²⁾の報告があり、臨床的には福島¹⁵⁾、池本¹⁶⁾の報告がある。

岩田らは諸種病原性真菌は試験管内増量継代法によつては、諸種抗生物質に対して耐性を獲得しにくい、菌株特に *Aspergillus* 属は諸種抗生物質に対する感受性に

著るしい相違があり、かなり高い耐性を示すものがあること、そしてまた replica plating 法により同一菌株内に高度耐性の細胞がかなり高頻度に存在することを認め、かかる成績から最近臨床的に諸種真菌症の抗生物質に対する反応性の低下している傾向とあわせて考えて、真菌の耐性化の問題は楽観しえない問題であると述べている。また福島は AMPH 治療により、*Aspergillus* 属は高度の耐性上昇を呈し、AMPH 耐性菌は NST, Trichomyacin に対しても 2～5 倍の耐性上昇がみられたと報告している。

著者の実験においても多くの菌株について、傾斜平板法・増量継代法ともに耐性菌株が得られたが、傾斜平板法では増量継代法に比べあまり高度の耐性菌株は得られなかつた。また傾斜平板上の各集落の薬剤感受性の相違については、AMPHの方がNSTよりも濃度差による耐性分布がかなり判然と認められた。この点は岩田らの報告と一致している。

Sing²²⁾は薬剤耐性を獲得した *Trichophyton* について、村上ら¹³⁾は Polymyxin B 耐性の *Candida albicans* Duke 株 No. 2 について、それぞれ薬剤を含まない培地に継代培養することにより耐性の減少、または消失を報告しているが、著者の研究でも *Aspergillus* 属耐性株は薬剤を含まない S 寒天培地に継代培養を行なうことにより耐性の減少が認められた。

以上の試験管内実験成績を検討すると、まず容易に耐性獲得がみられた原因の一つとして、宮本の報告と同様に、AMPHが高濃度においても殺菌効果のないことが考えられる。しかしながら臨床的には、AMPH治療により検出された *Aspergillus* 属の感受性の変化は薬剤接触により耐性を直ちに獲得し、かつまた薬剤接触を避けることで耐性が直ちに減少したと簡単には考えにくく、集落による差や、同じ菌球を構成する真菌の一つ一つが AMPH 感受性を異にしたのではないかというような疑問も起ってくる。臨床的に患者の治療中に於てかかる実験を行なわなかつたのでいずれともいえないが、このような問題は今後に残された研究課題であると思われる。

耐性真菌の形態や生物学的性状の変化についての研究で宮本¹⁴⁾は、Polymyxin B 耐性の *Candida* について種々の検索を行なっているが、培地上ではやや集落が小さく、粗で、いくぶん乾燥している程度で、菌自体の形態には特に変化はないが、糖分解能では耐性株は酸形成度が弱く、かつガス発生度が低下していたと述べている。

著者の実験において、AMPH耐性株では発育度の低

下および耐熱性の低下が認められたが、これまでかかる方面の研究にはあまり接しないように思われる。しかしある種の細菌では薬剤耐性株は発育が弱いとの報告があるのは興味あることである。なお耐性真菌における酵素体系などの代謝面からの研究も今後の課題であると考えられる。

以上の基礎的ならびに臨床的成績よりして肺アスペルギルス症の化学療法においては、今後たとえ優れた治療薬が出現したとしても、薬剤耐性問題には、たえず注意がはらわなければならないこと、同時に治療中に於ても細菌性感染症と同様に薬剤感受性の変化について検査を怠らないことが望まれるようになると思惟される。

肺アスペルギルス症は菌球型など特殊なものを除いては、肺炎など組織侵入性の病型の生前診断は今日なおかなり困難であり、診断自体も、また重要な研究課題である。そしてまた治療面においても幾多の重要かつ困難な問題が存在する。

真菌とくに *Aspergillus* 属の薬剤耐性の問題を検討することはやや先走つたことかもしれないが、内科的治療の殆んどが化学療法によつて占められることから、いつかは解決されねばならない問題となることであろう。

V 結 論

1) 肺アスペルギローム12例、副鼻腔アスペルギローム1例、気管支肺アスペルギルス症1例、アスペルギルス肺炎1例計15例の喀痰、気管穿刺痰、手術時および剖検時の菌球や肺炎病巣などより分離した *Aspergillus fumigatus* 7株、*Aspergillus flavus* 2株、*Aspergillus candidus* 1株、*Aspergillus sp.* 1株、*Penicillium negricans* 1株を使用して抗真菌剤 Amphotericin B および Nystatin に対する感受性、耐性獲得、感性感度(耐性感度)の推移・変動、耐性株の諸種性状の変化などの諸問題について、実験的ならびに臨床的に検討を試みた。

2) 分離株の分生胞子を使用して Sabouraud 液状培地希釈法による薬剤感受性は、Amphotericin B の最低発育阻止濃度は *Aspergillus fumigatus* および *Penicillium negricans* 計2株において 500mcg/ml 以上の自然耐性株が認められたほかは、3.8mcg/ml より 30mcg/ml であった。また Nystatin の最低発育阻止濃度は 15mcg/ml より 150mcg/ml であった。

次に Amphotericin B の分離株に対する殺菌的效果を検討したところ、分生胞子についても、また巨大集落についても、5mg/ml の薬剤濃度に6日間接触した場合でも殺菌効果は認められなかつた。

3) *Aspergillus* 属の Amphotericin B 含有液状培地の増量継代法, および傾斜平板法によつても, 容易に薬剤耐性株が得られた. なお傾斜平板法による耐性株の最低発育阻止濃度は2~8倍に上昇し, また同様な方法で Nystatin に対しても最低発育阻止濃度は2~8倍に上昇した耐性株が得られた. しかも Amphotericin B 耐性株は Nystatin に対する感受性が低下し, 一方また Nystatin 耐性株も Amphotericin B に対する感受性が低下することを認めた. 従つて両者薬剤間には交叉耐性のあることが認められた.

4) 肺アスペルギローム, または気管支肺アスペルギルス症に対する Amphotericin B 療法としては, 薬剤の *Aspergillus* 属の最低発育阻止濃度より推量して, 全身の投与では有効濃度は望むべくもなく, 当然局所療法がより必要となつてくる. そこでアスペルギロームを含む2例の気管支肺アスペルギルス症に対し Amphotericin B の気管内注入療法を行なつたがその治療中, および治療後に *Aspergillus* 属の本薬剤に対する耐性獲得現象がみられた. すなわち最低発育阻止濃度は2~36倍以上に上昇した. さらに一方, 無特殊治療の肺アスペルギロームの1例では, 2年間隔で分離された菌株の Amphotericin B 感受性には変化は認められなかつた. 以上のことより耐性菌の出現は Amphotericin B の治療と何んらかの因果関係があるものと考えられた.

5) 実験的に得られた耐性株, ならびに Amphotericin B 治療後に得られた耐性株の, いずれも薬剤を含まない Sabouraud 寒天培地で5~10代の継代培養することにより, 耐性の減少および消失することが認められた. 一方, また臨床的にも1例の肺アスペルギロームの経験ではあるが, Amphotericin B 治療を中止してより各1年後, 2年後に得られた菌株の Amphotericin B に対する感受性は治療前に得られた菌株の感受性にはほぼ近くなつており, かつ集落の形, 色, 菌糸・分生孢子の形態, 発育度などの諸種性状にも, 特に相違は認められなかつた.

6) 実験的に得られた *Aspergillus* 属の人工耐性株や Amphotericin B 治療後に得られた耐性株のいずれも Sabouraud 寒天培地上における発育は原株に比べて著しく不良であつた. さらに, かかる耐性株は原株に比べて耐熱性の低下も認められた. しかし培地の pH の変動による発育度については, 特に有意の差は認められなかつた.

つた.

拙筆に当つて御指導ならびに御校閲を賜つた村上精次(主任)教授に深謝する. また直接細部にわたつて御指導賜つた池本秀雄助教授に深甚の謝意を表する. このほか真菌の同定その他の御援助に対し順天堂大学細菌学教室土屋教授, 川北博士に深謝する.

本論文の要旨は日本化学療法学会第14回東日本支部総会で発表した.

文 献

- 1) Virchow, R.: Arch. path. Anat., 9 : 557, 1856 (quoted by Landau, J.W. et al.: Mycopathol. et Mycol. Appl. 20 : 177, 1963).
- 2) Sluyter, F. T.: Diss. Inang. Berlin, p. 14, 1847 (quoted by Landau, J.W. et al.: Mycopathol. et Mycol. Appl. 20 : 177, 1963).
- 3) 緒方 鷲雄: 福岡医大誌, 2 : 20, 1908.
- 4) 福島孝吉: 真菌誌, 6 : 77, 1965.
- 5) Hazen, E.L. et al.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 76 : 93, 1951.
- 6) 細谷省吾ほか: J. Antibiotics, 5 : 564, 1952.
- 7) Gold, W. et al.: Antibiotics Annual, p. 579, 1955—1956.
- 8) Grunberg, E.J. et al.: Amer. Rev. Resp. Dis., 84 : 504, 1961.
- 9) Thirumalachar, M.J. et al.: Hindustan antibiot. Bull. 3 : 136, 1961 (quoted by Utz, J.P.: Symposium on *Candida* infection, E. & S. Livingstone, Edinburgh and London, p. 221, 1966).
- 10) Stout, H.A. et al.: Antibiotic Annual, p. 704, 1955—1956.
- 11) 岩田和夫ほか: 真菌誌, 1 : 319, 1960.
- 12) 岩田和夫ほか: 真菌誌, 3 : 85, 1962.
- 13) 村上精次ほか: 臨内小, 14 : 463, 1959.
- 14) 宮本 薫: 順天堂医誌, 5 : 59, 1959.
- 15) 福島孝吉: 真菌誌, 5 : 35, 1964.
- 16) Ikemoto, H.: Arch. Int. Med., 115 : 598, 1965.
- 17) 池本秀雄ほか: Chemotherapy, 12 : 253, 1964.
- 18) 福島孝吉: 真菌誌, 2 : 3, 1961.
- 19) Ramirez-R, J.: New Eng. J. Med., 271 : 1281, 1964.
- 20) 池本秀雄ほか: 真菌誌, 8 : 207, 1967.
- 21) Kass, I. et al.: Dis. Chest., 21 : 205, 1952.
- 22) Sing, T.B.: Dermatologica, 99 : 231, 1949.
- 23) Sorensen, L.J. et al.: Antibiotics Annual, p. 920, 1958—1959.

(昭和42年11月25日受付)