抗真菌薬の作用メカニズムと病原真菌の微細構造の変化

西山 彌 生

帝京大学医真菌研究センター

はじめに

近年の医療の高度化に伴う易感染宿主の増加は、侵襲性アスペルギルス症や播種性カンジダ症など重篤な深在性真菌症の発生率を高める結果となっている。深在性真菌症治療に使われる抗真菌薬は、抗細菌薬のそれと比べると種類も数もはるかに少ない。真菌もヒトも同じ真核生物に属するために、ヒトに毒性を示さず、真菌のみに選択的に効果を示す薬剤の開発が困難だからである。しかし、近年、新規クラスの抗真菌薬の開発や既存薬または既存製剤の改良が進み、国内では現在、ポリエン系、ピリミジン系、アゾール系およびカンディン系の4クラス、合わせて10薬剤が使用可能である。

抗真菌薬の臨床的有用性を予測するためには、薬剤の作用機序を明らかにする必要がある。作用機序の研究目標は、第一に生化学的または分子生物学的手法により真菌細胞の代謝経路または細胞構造体に存在する一次作用点、すなわち標的分子を同定すること。第二は、標的分子に対する阻害作用に引き起こされる真菌の形態変化、および微細構造の変化を把握することであり、この目的には細胞学的手法、とくに電子顕微鏡を用いた解析が不可欠である。

本稿では、カンディン系抗真菌薬ミカファンギン、アゾール系抗真菌薬ボリコナゾール、ポリエン系抗真菌薬アムホテリシンBおよびリボソームアムホテリシンBの4薬剤について、*Candida* 属および *Aspergillus* 属の発育形態に及ぼす影響を電子顕微鏡を用いて解析した筆者らの最近の知見を概説する。

病原真菌の基本形態と微細構造

カビ（糸状菌）や酵母は真核細胞からなる真核性の微生物である。*Candida albicans* 酵母細胞を透過電子顕微鏡（TEM）で観察すると、細胞膜に包まれた細胞質内には、核膜で限界された核、ミトコンドリア、小胞体、液泡など、真核細胞特有のオルガネラがみられる。しかし、動物細胞とは異なり、細胞膜の外側は強固な細胞壁で覆われている（Fig. 1）。

深在性真菌症の原因菌として最も重要な菌種は

Aspergillus 属および *Candida* 属である。*Aspergillus* 属は、土壌、空中など自然界に広く生息するカビであるが、一部の菌種がヒトに病原性を示す。アスペルギルス症の原因菌として最も重要な菌種は *A. fumigatus* であり、この他に *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* などが知られている。*Aspergillus* は菌糸と分生子を構成要素とし、菌糸の一部から気中に伸びた分生子柄の先端（分生子頭）に多数の分生子を産生する。*A. fumigatus* および *A. niger* の走査電子顕微鏡（SEM）像を Fig. 2 に示す。免疫力の低下した宿主が大気中に飛散した分生子を経気道的に吸入することによって、日和見感染型のアスペルギルス症を発症する。

Candida 属の多くは健常人の皮膚、消化管、上気道、粘膜などにしばしば常在する。病原性が最も強い *C. albicans* は常在菌として存在する場合には酵母形を示し、出芽によって増殖する（Fig. 3）。一方、感染組織内では、酵母細胞から形成された発芽管（germ tube）が伸長して、菌糸（真正菌糸）形を呈することが多い（Fig. 4）。また、出芽によって生じた娘細胞が細長く伸びて、あたかも菌糸のようにみえる仮性菌糸を作る場合もある（Fig. 5）。*Candida* 属によって引き起こされるカンジダ症の病型は多彩であり、深部臓器・組織を侵す深在性真菌症に限らず、皮膚、爪、口腔・膣粘膜などに表在性

Fig. 1. *Candida albicans* の微細構造

Fig. 2. *Aspergillus* 属の分生子頭および分生子の SEM 像 Fig. 3. *Candida albicans* の酵母形細胞と出芽の SEM 像 Fig. 4. *C. albicans* の真正菌糸 Fig. 5. *C. albicans* の仮性菌糸

Fig. 6. 主要抗真菌薬の作用標的

真菌症を引き起こす。

抗真菌薬の標的分子と作用メカニズム

抗真菌薬は、標的分子と作用機序によって特徴づけられる。前述のとおり真菌とヒトの細胞は真核細胞としての共通の基本構造と機能を兼ね備えているために、ヒト

細胞には害を与えず、真菌にのみ毒性を発揮するという優れた選択毒性を示す標的は限られている。深在性真菌症治療に現在使用されているポリエン系、アゾール系、ピリミジン系およびカンディン系抗真菌薬の作用標的を Fig. 6 に示す。

ポリエン系抗真菌薬アムホテリシン B は、真菌細胞膜の必須脂質成分であるエルゴステロールと特異的に結合して、細胞膜の脱分極を引き起こす。その結果、細胞

Fig. 7. *C. albicans* の正常な酵母細胞 (a), およびミカファンギン作用後にみられた大型細胞 (b) の SEM 像

膜のバリア機能が障害されて K^+ の細胞外放出および H^+ の細胞内流入による細胞内環境の劣化を引き起こし、細胞は死に至ると考えられている^{1,2)}。アムホテリシン B はヒト細胞膜を構成するコレステロールに対しても弱いながら親和性を有するために、その毒性が問題とされてきた。リボソームアムホテリシン B は、安全性の向上を目的に改良されたアムホテリシン B のリボソーム製剤であり、国内では 2006 年に承認された。

アゾール系抗真菌薬の標的分子は、エルゴステロールの合成を担うラノステロール 14α -脱メチル酵素である。この酵素の働きが阻害されてエルゴステロール合成が中断されると、有害なエルゴステロール中間体の蓄積や、エルゴステロールの欠乏が起こり、細胞膜の機能や構造に影響を及ぼす³⁾。2005 年に上市されたボリコナゾールは、新しい構造をもつ新世代のアゾール系抗真菌薬であり、従来のアゾール系薬に比べて高い脂溶性を有し、*Aspergillus* などの糸状菌に対しては殺菌的に働くことを特徴とする。

ピリミジン系抗真菌薬 5-フルオロシトシンは、核酸の合成およびタンパク合成を阻害することによって殺菌的効果を発揮する⁴⁾。

キャンディン系抗真菌薬は、真菌細胞壁の主要構成成分であるグルカンポリマーを合成する $1,3-\beta$ -D-グルカン合成酵素を特異的に阻害する新しいクラスの薬剤である^{5,6)}。真菌の細胞壁は真菌の生存・発育に必須であり、しかもヒトを含めた哺乳動物には存在しない。したがって $1,3-\beta$ -D-グルカン合成酵素はきわめて高い選択性をもつ標的分子と考えられる。当然のことながら、このクラスの抗真菌薬は $1,3-\beta$ -D-グルカンを欠く接合菌には活性を示さない。ミカファンギンはわが国で開発された薬剤であり、国内では 2002 年に承認された。2012 年 3 月にはカスポファンギンが国内 2 番目のキャンディン系抗真菌薬として承認された。

抗真菌薬の真菌発育形態および微細構造に及ぼす影響

1) *C. albicans* および *C. glabrata* に及ぼすキャンディン系抗真菌薬ミカファンギンの作用

ミカファンギン作用後の細胞形態

ミカファンギンはフルコナゾール耐性 *C. albicans*、およびアゾール系抗真菌薬に低感受性の *C. glabrata* を含む *Candida* 属に強い抗真菌活性を示す^{7,8)}。そこで、*C. albicans* および *C. glabrata* の細胞形態に及ぼすミカファンギンの影響を検討した。

C. albicans 液体培養に、発育阻止濃度 ($0.1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$) のミカファンギン作用させた場合の SEM 像を Fig. 7 (本誌 53: 161-162, 2012. Photo Quiz: Basic mycology より引用) に示す。薬剤無添加の正常細胞は、大きさ約 $3 \sim 5 \mu\text{m}$ 、楕円形、または球形の酵母細胞が大半を占め、出芽や出芽痕も認められた (Fig. 7a)。これに対してミカファンギン作用させた場合には、ほとんどすべての細胞が $5 \sim 8 \mu\text{m}$ と大きく膨化しており、細胞壁の一部が壊れて細胞内容物が流失している細胞も観察された (Fig. 7b)。この所見から、ミカファンギン作用後の *C. albicans* 細胞壁が物理的強度を失っていることは明らかであり、細胞内部の高い浸透圧に耐えられなくなった細胞が膨化して破裂・溶菌に至ることが明らかになった。

次に微細構造の変化を TEM で調べた。薬剤無添加培養では、正常な出芽による分裂像 (Fig. 8) が観察されるが、ミカファンギン作用後には変形した大型の細胞が多数認められた (Fig. 9)。細胞の微細構造でとくに目立つ変化としては、細胞壁の薄層化 (Fig. 9. 矢印)、および異常な隔壁の形成であった。*Candida* の細胞壁は、最外層のマンナンタンパク層、および、その内側のグルカン層から構成されるが、ミカファンギン作用後には低電子密度を呈するグルカン層の厚さが減少していた。以上の微細形態学的所見から、ミカファンギンは、*C. albicans* の細胞壁を脆弱化させ溶菌・死滅させること、ならびに $1,3-\beta$ -D-グルカンの欠如が細胞壁形成に影響を及ぼし、出芽による正常な細胞分裂を阻害することが明らかとなった^{9,10)}。

ミカファンギンは *C. glabrata* に対しても優れた抗真菌活性を示す^{7,8)}。しかし、これまでに述べた *C. albicans* に対するミカファンギンの作用とは異なった興味

Fig. 8. *C. albicans* の出芽像. Bar : 1 μ m. Fig. 10. ミカファンギン作用後にみられた *C. glabrata* の出芽の破裂 (矢印). Bar : 1 μ m.

ある形態変化がみられたので紹介する。

C. glabrata は *Candida* 属の中では最も小さい酵母であり、しかも菌糸をつくらないという特徴を有する。しかし、細胞形態および微細構造は基本的には *C. albicans* と変わりはない。*C. glabrata* にミカファンギンを作用させた場合の最も特徴的な形態変化は、薬剤作用後短時間のうちに出芽（娘細胞）の先端部が破裂することである（Fig. 10）。この出芽細胞を TEM で観察すると、出芽先端部の細胞壁は開裂しており、そこから細胞内容物が流失していた。母細胞では、細胞膜の剥離や波状化、ならびに細胞壁と細胞膜の間に形成された間隙に高電子密度の小胞構造が多数認められた（Fig. 11）。このように *C. glabrata* にミカファンギンを作用させた場合には、*C. albicans* でみられたような細胞壁の薄層化や隔壁の形成異常がみられず、出芽先端部の細胞壁の破壊という特異的な変化を示した。恐らく薬剤の効果がきわめて短時間で発揮されるために、壁の構造変化を引き

Fig. 9. ミカファンギン作用後の *C. albicans* の TEM 像. Bar : 1 μ m. Fig. 11. ミカファンギン作用後にみられた *C. glabrata* の出芽先端の破裂像 (矢印). Bar : 1 μ m.

起こす間もなく、脆弱化した出芽先端の細胞壁が細胞内部の高い膨圧によって瞬時に破壊されるものと考えられた¹¹⁾。

2) *A. fumigatus* 発育菌糸に及ぼすミカファンギンの作用

Aspergillus は菌糸細胞が連なってフィラメントをつくる糸状菌であり、先端成長によって発育・増殖する。低濃度のミカファンギンを *A. fumigatus* 液体培養に作用させた場合には、薬剤無添加の正常菌糸が先端成長によって直線状に伸張しているのに対して（Fig. 12a）、菌糸側壁に多数の短い分岐が形成された（Fig. 12b）。菌糸の内部構造を TEM で観察すると隔壁の形成に異常がみられ、この変化が正常な菌糸の伸長を妨げる一因と考えられた（Fig. 13）。他方、MIC 濃度のミカファンギンを作用させた場合には、菌糸先端部の破裂という激しい形態変化が SEM および TEM 観察から認められた（Fig. 14）。糸状菌の菌糸先端細胞には 1,3- β -D-グルカン合成酵素をはじめ細胞壁の新生に関与する酵素類が多数局

Fig. 12. *A. fumigatus* の正常菌糸 (a), およびミカファンギン作用後の分岐の異常形成 (b)

Fig. 13. ミカファンギン作用後にみられた隔壁の異常形成像

在しているため、ミカファンギンの影響がこの部位に強く発揮されたものと考えられ、菌糸先端の破裂によって菌糸細胞が死滅していくことが示唆された。これらの形態学的所見から、ミカファンギンは *Aspergillus* 菌糸細胞の細胞壁形成を阻害することによって菌糸の伸長阻害を引き起こし、さらには脆弱化した菌糸先端の細胞壁を破壊して強力な抗真菌活性を発揮することが明らかとなった^{10, 12-14)}。

3) *A. fumigatus* 発育菌糸に及ぼすアゾール系抗真菌薬ポリコナゾールの作用

A. fumigatus 液体培養に、低濃度 (1/10-MIC ; 0.1 µg/ml) のポリコナゾールを作用させた場合の菌糸の変化像を Fig. 15 に示す。SEM 観察からは菌糸先端部がこぶ状に膨らんだ変形像が認められた (Fig. 15a)。この菌糸先端部位を TEM で観察すると、細胞質は高電子密度を保っており、オルガネラの構造にも異常はみられなかった。しかし、菌糸先端部の細胞壁が肥厚しており、細胞壁内、および壁と細胞膜の間隙に高電子密度の顆粒が多数認められた (Fig. 15b)。この顆粒は、エルゴステロール中間体の蓄積物と考えられ、真菌細胞にアゾール系抗真菌薬を作用させた場合にみられる特徴的な変化像^{1-5, 7)} である。一方、処理濃度を 1-MIC (1 µg/ml)

Fig. 14. ミカファンギン作用後にみられた *A. fumigatus* 菌糸先端破裂の SEM 像 (a) および TEM 像 (b)

に高めた場合には、細胞膜およびオルガネラの崩壊による溶菌像が観察された (Fig. 16)。これらの所見から、ポリコナゾールは、細胞膜の機能、とくに細胞膜に局在する細胞壁多糖合成酵素にも影響を及ぼし、細胞壁形成を阻害して菌糸発育を阻害すること、さらに、MIC 濃度下では本薬剤の高い脂溶性に由来する強い膜障害作用を発揮して細胞を死滅させることが明らかとなった^{13, 14)}。

4) *A. fumigatus* 発育菌糸に及ぼすポリエーテル系抗真菌薬アムホテリシン B、およびリポソーム化アムホテリシン B の作用

真菌細胞に対するアムホテリシン B の影響を検討したこれまでの研究の大半は、生化学的手法によるもので、

Fig. 15. 低濃度のポリコナゾール作用後の *A. fumigatus* 菌糸の SEM 像 (a) および TEM 像 (b). Bars : 1 μ m.

Fig. 16. MIC 濃度のポリコナゾール作用後の *A. fumigatus* 菌糸の SEM 像 (a) および TEM 像 (b). Bars : 1 μ m.

Fig. 17. アムホテリシン B 作用後の *A. fumigatus* 菌糸の SEM 像 (a) および TEM 像 (b). Bars : 1 μ m.

形態学的研究はほとんど知られず、とくに *A. fumigatus* に関する報告はない。そのため、筆者らは、まず *A. fumigatus* 発育菌糸に対するアムホテリシン B の影響を検討した。

A. fumigatus 液体培養にアムホテリシン B を 1-MIC (1 μ g/ml) 作用させた場合の菌糸を SEM で観察すると、菌糸は潰れ、リボン状に変形していた (Fig. 17a)。この菌糸の細胞内部を TEM で観察すると、細胞膜、およびオルガネラの膜構造が寸断され、細胞内は空胞化していた (Fig. 17b)。

A. fumigatus にリボソーマルアムホテリシン B を作

用させた場合の菌糸形態および微細構造の変化は、基本的にはアムホテリシン B のそれと大差がなく、リボソーマ化による真菌細胞への影響はみられなかった (データ省略)。

これらの所見から、アムホテリシン B ならびにそのリボソーム製剤であるリボソーマルアムホテリシン B は、いずれも細胞膜エルゴステロールと結合することによって膜に強い障害を及ぼし、細胞を死滅させる作用を発揮させることが明らかとなった^{13, 14)}。

おわりに

本稿では、薬剤の生化学的な作用機序を支持する形態学的根拠を得ること、ならびに薬剤の *in vivo* および *in vitro* 抗真菌活性を説明する細胞学的根拠を得ることを目的とした筆者らの微細形態学的研究の一端を紹介した。作用機序の異なる抗真菌薬が真菌細胞にどのような形態変化を及ぼし、抗真菌活性を発揮していくのか？この問題を解く鍵が電子顕微鏡学的研究にあることを強調したい。

文 献

- 1) Kinsky SC: Polyene antibiotics. *In*: Antibiotics (Gottlieb D, Shaw PD ed), vol. 1, pp. 122-141, Springer-Verlag, New York, 1969.
- 2) Brajturg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G: Amphotericin B: Current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* **34**: 183-188, 1999.
- 3) Vanden BH: Mode of action of pyridine, pyrimidine and azole antifungals. *In*: Sterol biosynthesis inhibitors (Berg D, Plempel M ed), pp. 78-119, Ellis Horwood, Chichester, 1998.
- 4) Polak A, Wain WH: The inhibition by 5-fluorocytosine of nucleic acid synthesis in *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*. *Chemotherapy (Basel)* **23**: 243-259, 1977.
- 5) Douglas CM, D'Ippolito JA, Shei GJ, Meinz M, Onishi J, Marrinan JA, Li W, Abruzzo GK, Flattery A, Bartizal K, Mitchell A, Kurtz MB: Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**: 2471-2479, 1997.
- 6) Hatano K, Morishita Y, Nakai T, Ikeda F: Antifungal mechanism of FK463 against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Antibio* **55**: 219-222, 2002.
- 7) Tawara S, Ikeda F, Maki K, Morishita Y, Otomo K, Teratani N, Goto T, Tomishima M, Ohki H, Yamada A, Kawabata K, Takasugi H, Sakane K, Tanaka H, Matumoto F, Kuwahara S: *In vitro* activities of a new lipopeptide antifungal agents, FK463, against a variety of clinically important fungi. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 57-62, 2000.
- 8) Uchida K, Nishiyama Y, Yokota N, Yamaguchi H: *In vitro* antifungal activity of a novel lipopeptide antifungal agent, FK463, against various fungal pathogens. *J Antibiotics* **53**: 1175-1181, 2000.
- 9) Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H: Morphological changes of *Candida albicans* induced by micafungin (FK463), a water-soluble echinocandin-like lipopeptide. *J Electron Microsc* **51**: 247-255, 2002.
- 10) 山口英世, 西山彌生, 内田勝久, 波多野和男, 森下佳彦, 中井 徹, 池田文昭, 武藤誠太郎: Micafungin の *Candida albicans* および *Aspergillus fumigatus* に対する生化学的および形態学的研究. *日本化学療法会誌* **50** (S-1): 20-29, 2002.
- 11) 西山彌生, 蓮見弥生, 山口英世: *Candida glabrata* に及ぼすキャンディン系抗真菌薬 micafungin の作用. *Medical Mycology Research* **2**: 21-32, 2011.
- 12) Nishiyama Y, Hasumi Y, Ueda K, Uchida K, Yamaguchi H: Effects of micafungin on the morphology of *Aspergillus fumigatus*. *J Electron Microsc* **54**: 67-77, 2005.
- 13) 西山彌生: 微生物をめぐる最新の知見 - *Aspergillus fumigatus* に及ぼす新規抗真菌薬の作用機序の微細形態学的解析 - . *顕微鏡* **45**: 207-211, 2010.
- 14) 西山彌生: 最終講義より - 抗真菌薬の作用機序に関する微細形態学的研究 - . *帝京医学雑誌* **34**: 333-340, 2011.