

# (住吉誠) 論文内容の要旨

主 論 文

Novel and potent antimicrobial effects of caspofungin on drug-resistant *Candida* and bacteria

多剤耐性カンジダおよび細菌に対するカスポファンギンの新たな抗微生物活性

住吉 誠、宮崎泰可、Juliann Nzembi Makau、水田賢志、田中義正、石川岳志、  
榎村浩一、平山達朗、高園貴弘、西條知見、山口博之、島村真太郎、  
山本和子、今村圭文、坂本憲穂、尾長谷靖、泉川公一、柳原克紀、河野 茂、迎 寛

Scientific Reports • 10, Article number:17745 (2020)  
(<https://doi.org/10.1038/s41598-020-74749-8>)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻  
主任指導教員：迎 寛 教授

## 緒 言

近年、*Candida auris* などの多剤耐性真菌が出現しており、世界中でも懸念が高まっている。また、バイオフィーム形成カンジダや細菌との polymicrobial バイオフィームは、抗菌効果が減弱し、治療難治化の一因となっている。新規抗真菌薬の開発が滞っているため、既存薬剤を有効利用した新たな治療戦略が必要とされている。我々は、キャンディン系抗真菌薬であるカスポファンギンが特定の条件下で劇的な殺微生物作用を示し、その効果はキャンディン耐性カンジダや細菌にも及ぶことを見出した。また、これは他のキャンディン系薬にはないカスポファンギン特有の現象であり、従来の作用機序である  $\beta$  1, 3-D-glucan 合成酵素阻害とは異なる機序が関与していると考え、そのメカニズムと臨床への応用について検討した。

## 対象と方法

カンジダ属や細菌に対するカスポファンギンの抗微生物活性を、様々な培養液 (YPD、SC、RPMI-1640、Minimal medium) や溶解液 (PBS、生理食塩水、蒸留水、5%ブドウ糖液など) で検証した。*C. albicans* SC5314、*C. glabrata* CBS138、*C. auris* NCPF8984 および NCPF8985、MSSA ATCC25923、MRSA ATCC43300 の標準株、また、*C. glabrata* CGL305 (血液由来)、MRSA40 (肺由来)、MDRP1481 (尿由来) の臨床分離株を使用した。浮遊細胞に対しては Time-kill assay、バイオフィーム細胞に対しては 96 ウェルマイクロプレートを用いた XTT reduction assay と Crystal Violet assay で抗微生物活性を評価した。次に、nuclear magnetic resonance (NMR) によるカスポファンギン分子の構造解析、活性酸素種 (ROS) 測定、FITC 融合カスポファンギンを使用した薬剤の局在解析を行った。さらに、*C. auris* を用いた中心静脈カテーテル感染モデルを作製し、カテーテル関連血流感染症に対する臨床応用の可能性について検討した。新規機序によるカスポファンギンの抗微生物活性が、ヒト細胞に及ぼす影響を検討する目的で、NHLF 細胞 (Clonetics Human Lung Fibroblasts) と A549 細胞 (human lung carcinoma

ATCC CCL-185) を用いて MTT assay による毒性試験を行った。

## 結 果

カンジダが増殖できない生理食塩水 (0.9% NaCl) や PBS 内ではカスポファンギンの抗真菌活性はみられなかった。これは、増殖していない状態の真菌に対しては無効であるというキャンディン系薬の従来の特性として矛盾しなかった。しかし、蒸留水や 5%ブドウ糖液内では、カンジダが増殖していないにも関わらず、カスポファンギン 0.5 mg/L は 30 分で浮遊細胞数を 1/100 - 1/1000 に減少させた。さらに、カスポファンギン耐性 *C. auris*、MRSA、MDRP にも同様の殺菌作用を示した。また、臨床現場で使用される薬剤濃度 500 mg/L (50 mg / 100 ml) のカスポファンギンは、*C. albicans* および *C. auris* のバイオフィルム細胞に対して、>99%の抗バイオフィルム活性を 5 分で示し、MSSA や MRSA との polymicrobial バイオフィルムに対しては、>80%の抗バイオフィルム活性を示した。この作用は NaCl や KCl などのイオン化合物が存在している条件下では減弱し、カスポファンギンによる抗微生物活性の程度はイオン濃度依存性に変化することが確認された。NMR による化学構造分析では、イオン濃度依存性にカスポファンギンの分子構造の変化が認められた。また、FITC 融合カスポファンギンの真菌細胞内分布を観察したところ、RPMI-1640 では細胞の辺縁にリング状に分布しており、蒸留水や 5%ブドウ糖液中では細胞内にカスポファンギンが蓄積していた。さらに、蒸留水や 5%ブドウ糖液内では、イオンが含まれる溶液と比較し、カスポファンギンに暴露されたカンジダ細胞の ROS 産生が高い傾向にあり、細胞死との関連が示唆された。NHLF 細胞および A549 細胞を用いた毒性試験では、カスポファンギンの溶解液間で毒性に差は認められなかった。

## 考 察

従来、キャンディン系薬が有する抗真菌作用とは異なる機序でカスポファンギンが抗微生物活性を示した。低イオン濃度の条件下にあるカスポファンギン分子は、高イオン濃度の場合と比較し、細胞内により多く分布する傾向があり、さらに、ROS の過剰産生により細胞死が誘導されると考えられた。低イオン濃度でカスポファンギンの細胞内移行性が亢進する機序については、カスポファンギン分子の構造変化が関連していると推察されるが、今後より詳細な解析が必要である。カスポファンギンは日常臨床で幅広く使用されている薬剤であり、カテーテル内で薬剤耐性真菌および細菌に対して迅速かつ高い抗微生物効果を示すため、カテーテル抜去が困難な場合などにカテーテルロック療法としての臨床応用が期待される。