

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Electron Microscopic Study on the Effect of Newly Developed Antifungal Agents
on the Ultrastructure of *Aspergillus fumigatus*

西 山 彌 生

Yayoi Nishiyama

帝京大学医真菌研究センター

要 旨 深在性真菌症の治療薬として使用されている新規抗真菌薬、ミカファンギン、ポリコナゾール、リボソーマルアムホテリシン B、およびアムホテリシン B の 4 薬剤について、*Aspergillus fumigatus* の菌糸形態および微細構造に及ぼす影響について、電子顕微鏡を用いて解析した。その結果、ミカファンギンおよびポリコナゾールは、主として細胞壁形成を阻害し、菌糸の発育を阻害すること、アムホテリシン B およびリボソーマルアムホテリシン B は共に細胞膜、ならびにオルガネラの膜構造を破壊することによって菌糸発育を阻害することが明らかとなった。

キーワード：新規抗真菌薬、作用機序、*Aspergillus fumigatus*、電子顕微鏡、微細構造

1. はじめに

真菌、いわゆるカビや酵母がヒトの体内に侵入して発症する真菌感染症には、表在性真菌症、深部皮膚真菌症、および深在性真菌症の 3 つのタイプが知られている。このうち、感染が深部臓器や全身に及ぶ深在性真菌症は、免疫力が低下した易感染宿主に日和見感染症として発症する。重要な深在性真菌症としてはカンジダ症およびアスペルギルス症があげられる。

深在性真菌症の治療に使われる抗真菌薬の種類は、抗細菌薬のそれにくらべるとはるかに少ない。その理由は、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極めて困難だからである。国内では現在、ポリエン系、フルオロピリミジン系、アゾール系およびキャンディン系の 4 つのクラス、合わせて 9 薬剤が使用されている。図 1 に、これら 4 つのクラスの作用標的を示す。

抗真菌薬の作用機序に関する研究は、真菌細胞に存在する標的分子を特定するだけでなく、薬剤の作用様式（静菌的か、殺菌的か）を知り、さらには臨床的有用性を予測するために必須不可欠である。とくに、標的分子の阻害作用に引き続いておこる細胞内微細構造の変化は、抗真菌活性に大きく影響するため、電子顕微鏡を用いた作用機序の解析は重要である。筆者らのグループは、これまでに、多く

の新規抗真菌薬の作用機序を、主として形態学的手法を用いて解析してきた^{1~12)}。

本稿では、近年新たに臨床導入されたキャ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ポリコナゾール、およびポリエン系抗真菌薬アムホテリシン B および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 の 4 薬剤について、*Aspergillus fumigatus* (以下 *A. fumigatus* と略) の発育形態に及ぼす影響を検討した筆者らの最近の知見を紹介したい。

2. *A. fumigatus* の特徴と実験法

Aspergillus 属菌は、本来、土壌、空中など自然環境中に広く生息する真菌であるが、そのうちごく少数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*,

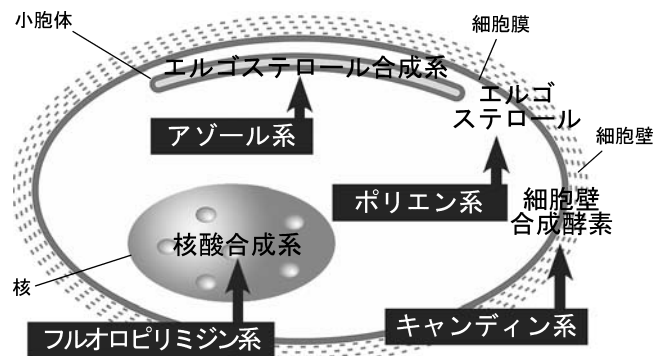


図 1 現在使用されている 4 つのクラスの抗真菌薬の作用標的

〒192-0395 東京都八王子市大塚 359
TEL: 042-678-3256; FAX: 042-674-9190
2010 年 8 月 30 日受付

A. terreus などの菌種が知られている。*Aspergillus* は、菌糸と胞子を構成要素とする糸状菌であり、図2に示すように、菌糸の一部から空中に伸びた分生子柄の先端部（分生子頭）に多数の分生子を形成する。アスペルギルス症は、免疫不全に陥った宿主が空中に浮遊した分生子を経気道的に吸入することによって発症する。

筆者らの実験においては、*A. fumigatus* の分生子を液体培地で一夜培養することによって発芽させた発育菌糸を試験菌として使用した。薬剤濃度は、*in vitro* 抗真菌薬感受性試験法から得られた最小発育阻止濃度（minimum inhibitory concentration 以下MICと略）を基準とし、これより高濃度、または低濃度を設定した。発育菌糸に所定の濃度の薬剤を加えた液体培養を経時的に採取し、菌糸形態および菌糸細胞の微細構造の変化を走査型電子顕微鏡（SEM）、および透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて観察した。薬剤無処理の正常な発育菌糸のSEM像およびTEM像を図3に示す。

3. *A. fumigatus* 発育菌糸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

キャンディン系抗真菌薬ミカファンギンは、真菌の細胞壁形成に必須な1,3-β-D-グルカン合成酵素を作用標的とする新しいクラスの薬剤であり¹³⁾、国内では2002年に上市された。筆者らは、病原酵母 *Candida albicans*、および *A. fumigatus* に対するミカファンギンの作用を形態学的に解析し、その成績についてはすでに報告している^{8,10,12)}。ここでは、*A. fumigatus* に対する形態学的効果の一部を簡単に紹介する。

A. fumigatus の発育菌糸に、ミカファンギン(10-MIC; 0.1 μg/ml) を作用させた場合の電子顕微鏡像を図4に示す。最も特徴的な変化は、薬剤無添加の正常な菌糸(図3A)が分岐を繰り返しながら伸張していくのに対して、菌糸の伸張が抑制され、菌糸側壁から短い分岐が多数形成されることである(図4A)。菌糸内部では隔壁の形成に異常がみられ(図4B)、

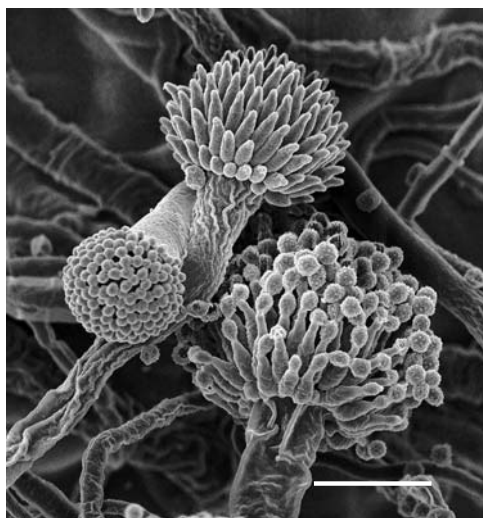


図2 *A. fumigatus* の分生子頭と分生子。Bar = 10 μm

この変化が菌糸の伸張阻害を引き起こす原因と考えられた。一方、ミカファンギン作用後にみられる最も激しい形態変化は、図5にみられるように菌糸先端部の破裂である。糸状菌においては、菌糸先端は最も生理活性の高い部位である。1,3-β-D-グルカン合成酵素が局在するこの部位にミカファンギンの影響が強く発揮され、物理的強度を失った菌糸の先端細胞は破裂、溶菌に至ることが示唆された。これらの形態学的所見からミカファンギンは菌糸の発育阻害作用、または細胞壁の構造破壊に基づく強力な抗真菌活性を発揮することが明らかとなった。

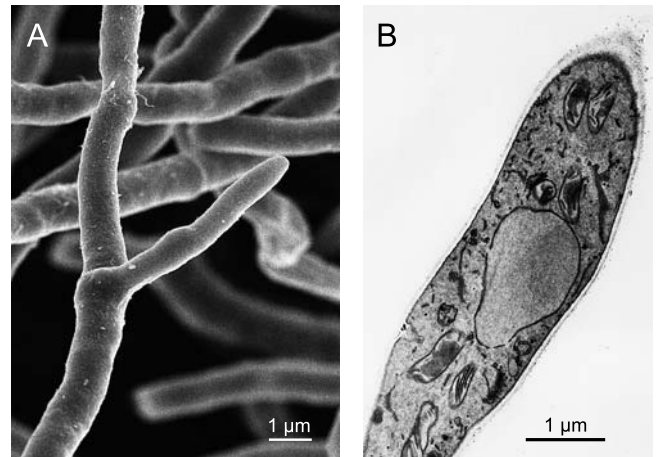


図3 *A. fumigatus* の正常な発育菌糸像 (A) SEM像 (B) TEM像

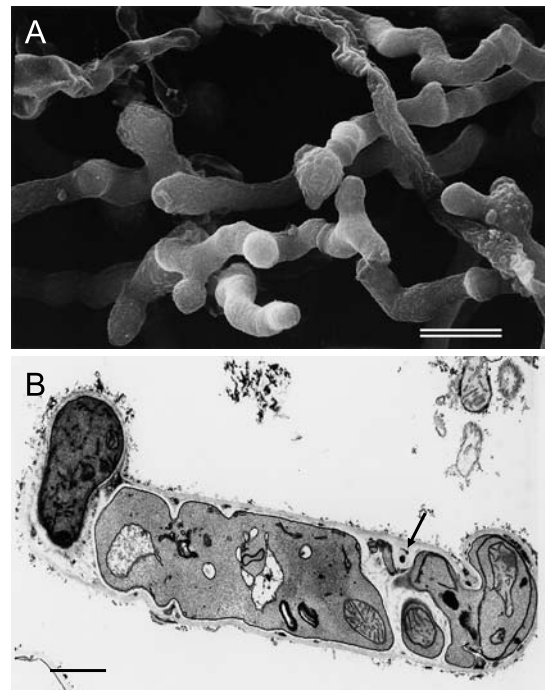


図4 ミカファンギン 10-MIC (0.1 μg/ml) 作用後の発育菌糸のSEM像(A)およびTEM像(B)。

(A) 菌糸側壁から短い分岐が多数形成されている。Bar = 5 μm (B) 細胞内部では、隔壁形成に異常が見られ(矢印)、細胞の分裂が阻害されている。文献12)より転載



図5 ミカファンギン 1-MIC (0.01 $\mu\text{g/ml}$) 作用後にみられた菌糸先端の破裂像の SEM 像 (A) および TEM 像 (B). (A) 菌糸先端が破裂し (矢印) 細胞内容物が細胞外に流失している. Bar = 5 μm (B) 菌糸先端部の細胞壁の厚さが薄くなり, この部位から破裂している. Bar = 1 μm 文献 12) より転載

4. *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

アゾール系抗真菌薬は真菌のエルゴステロール合成系のシトクロム P-450 依存性のラノステロール 14 α -脱メチル酵素を標的として, エルゴステロールの合成を阻害する. その結果, 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ことが知られている. 2005 年に上市されたポリコナゾールは, 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効果を発揮することを特徴とする.

低濃度 (1/10-MIC; 0.1 $\mu\text{g/ml}$) のポリコナゾールで処理した菌糸の電子顕微鏡像を図 6 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る (図 6A). この菌糸先端部位を TEM で観察すると, 細胞質やオルガネラに異常はみられないが, 先端部の細胞壁の肥厚や, 高電子密度の顆粒の蓄積, および隔壁の異常形成などの変化が認められた (図 6B). 壁内にみられる顆粒構造は, エルゴステロール中間体が蓄積したものと考えられ, 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 $\mu\text{g/ml}$) に高めた場合には, 細胞膜およびオルガネラの膜構造の崩壊による溶菌像が観察された (図 7). これらの所見から, ポリコナゾールの作用によ

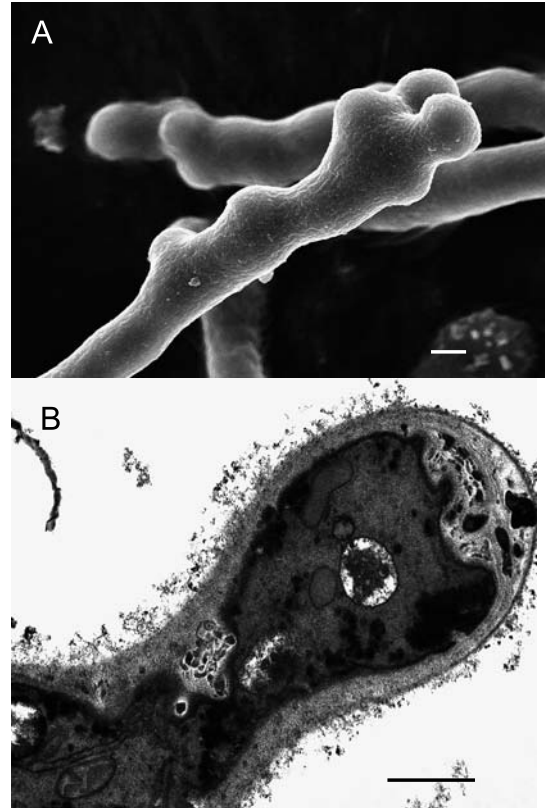


図6 低濃度 (1/10-MIC; 0.1 $\mu\text{g/ml}$) のポリコナゾール作用後にみられた菌糸先端の SEM 像 (A) および TEM 像 (B). (A) 菌糸先端部が膨化し, こぶ状の突起が形成されている. (B) 菌糸の先端細胞の細胞壁が肥厚し, 壁内にはエルゴステロール中間体と思われる高電子密度の顆粒構造が蓄積している. Bar = 1 μm

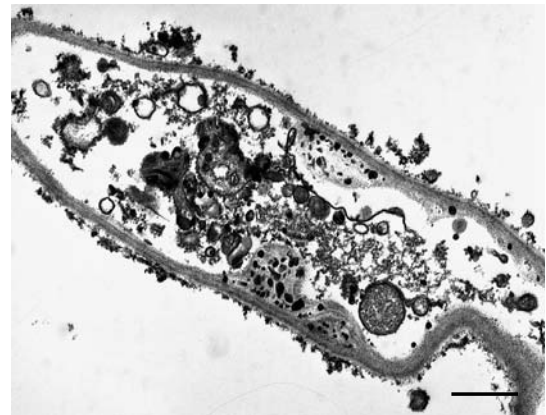


図7 ポリコナゾール (1-MIC; 1 $\mu\text{g/ml}$) 作用後にみられた菌糸の溶菌像. 細胞膜やオルガネラの膜は断裂・崩壊し, 細胞は空胞化している. Bar = 1 μm

てエルゴステロール合成が阻害されると, 細胞膜に分布する細胞壁合成酵素が影響を受け, 正常な壁形成が阻害されて菌糸発育を阻害すること, さらに, 膜障害作用によって細胞を死滅させるという強力な抗真菌活性を示すことが明らかとなった.

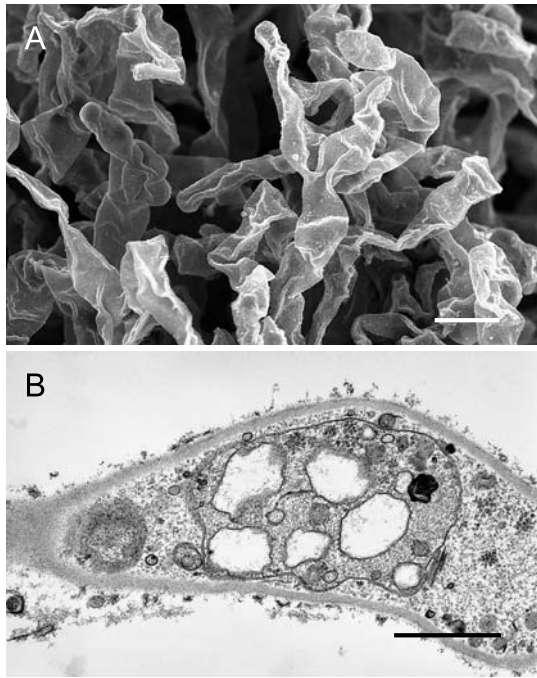


図8 アムホテリシン B (1-MIC; 1 µg/ml) 作用後の菌糸の SEM (A) 像および TEM (B) 像. 菌糸は潰れ (A), 細胞内膜構造の崩壊によって細胞は空胞化している (B). Bar = 1 µm

5. ポリエン系抗真菌薬アムホテリシン B, およびリポソーマルアムホテリシン B の作用

ポリエン系抗真菌薬アムホテリシン B は, 真菌細胞膜の主成分であるエルゴステロールと結合して, 膜の流動性を変化させる. その結果, 膜の透過性が亢進し, 細胞内必須成分の細胞外漏出が起こり, 殺菌的效果を発揮する. しかし, アムホテリシン B はヒト細胞膜の主要成分であ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. リポソーマルアムホテリシン 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 のリポソーム製剤であり, 国内では 2006 年に承認された.

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, 形態学的研究はきわめて少ない. とくに *A. fumigatus* を試験対象にした報告は知られていない. 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.

図 8 にアムホテリシン B を 1-MIC (1 µg/ml) 作用させた場合の電子顕微鏡像を示す. 菌糸は潰れ, リボン状に変形している (図 8A). 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が寸断され, 細胞質の流失により空胞化した細胞が観察された (図 8B). 一方, 低濃度 (1/10-MIC; 0.1 µg/ml) を作用させた場合には, 細胞膜やオルガネラに目立った変化は見られないが, 隔壁形成部位には高電子密度の顆粒構造が蓄積し, 異常な形態を示す隔壁が形成

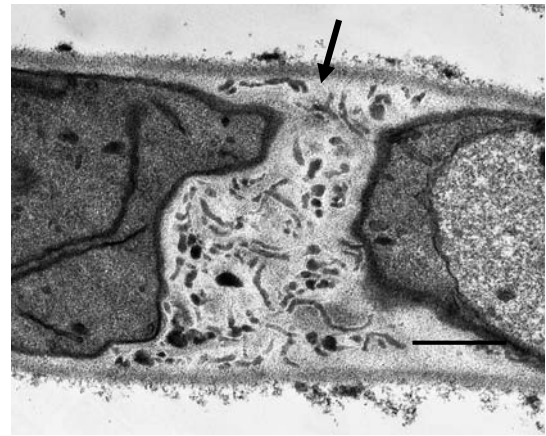


図9 低濃度 (1/10-MIC; 0.1 µg/ml) のアムホテリシン B 作用後にみられた隔壁の異常形成像. 隔壁形成部位 (矢印) に高電子密度の不定形物質が蓄積している. Bar = 1 µm

されていた (図 9).

次に, *A. fumigatus* に対するリポソーマルアムホテリシン B の影響を検討した. リポソーマルアムホテリシン B は, アムホテリシン B に比べると数倍高い薬剤濃度で同等の抗真菌活性を示したが, 薬剤作用後に観察された形態学的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, リポソーム化による真菌細胞への影響は見られないことが明らかとなった (データ省略).

これらの成績から, アムホテリシン B ならびにそのリポソーム製剤であるリポ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の機能を障害し, 殺菌的作用を発揮することが明らかとなった. さらに, 低濃度では, 膜に局在する細胞壁合成酵素の働きを阻害し, その結果, 分裂異常を引き起こし菌糸の発育を阻害することが判明した. とくに, 後者の変化像については, 電子顕微鏡を用いた筆者らの解析から初めて明らかにされたものであり, 作用機序研究における微細形態学的解析の重要性が示された.

6. おわりに

本稿では, キャ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ポリコナゾール, およびポリエン系抗真菌薬アムホテリシン B およびアムホテリシン B 脂質製剤の作用機序, ならびに各薬剤の抗真菌作用を形態学的に裏付けた筆者らの研究成果の一部を紹介した. 本研究によって得られた知見が, 薬剤耐性機序の解析や新規抗真菌物質の探索等, 今後の抗真菌薬研究の一助となれば幸いである.

謝 辞

本研究は, 山口英世名誉教授, 安部茂教授, 蓮見弥生さんをはじめとする帝京大学医真菌研究センターの多くのスタッフに支えられて行なわれました. また一部の研究は, 大日本製薬株式会社研究本部の山本寛博士, 竹本浩司博士との共同

研究であり、ここに謝意を表します。また、Pfizer Pharmaceuticals (New York) の Independent Research Grant (Study ID: VFD-2006-003) のご支援に感謝いたします。

文 献

- 1) Nishiyama, Y., Maebashi, K., Asagi, Y., Hiratani, T. and Yamaguchi, H.: *Jpn. J. Med. Mycol.*, **32**, 43–54 (1991)
- 2) Nishiyama, Y., Asagi, Y., Hiratani, T., Yamaguchi, H., Yamada, N. and Osumi, M.: *Jpn. J. Med. Mycol.*, **32**, 165–175 (1991)
- 3) Nishiyama, Y., Asagi, Y., Hiratani, T., Yamaguchi, H., Yamada, N. and Osumi, M.: *Jpn. J. Med. Mycol.*, **32**, 227–237 (1991)
- 4) Nishiyama, Y., Asagi, Y., Hiratani, T., Yamaguchi, H. and Osumi, M.: *Clin. Exp. Dermatol.*, **17**(Suppl. 1), 13–17 (1992)
- 5) Nishiyama, Y., Itoyama, T. and Yamaguchi, H.: *Microbiol. Immunol.*, **41**, 395–402 (1997)
- 6) Watanabe, M., Nishiyama, Y., Inouye, S., Yamaguchi, H., Kondo, S. and Takeuchi, T.: *Microbiol. Immunol.*, **45**, 365–370 (1998)
- 7) Nishiyama, Y., Nakaoka, C., Hiratani, T., Abe, S., Uchida, K. and Yamaguchi, H.: *J. Electron Microsc.*, **50**, 41–49 (2001)
- 8) Nishiyama, Y., Uchida, K. and Yamaguchi, H.: *J. Electron Microsc.*, **51**, 247–255 (2002)
- 9) Maebashi, K., Kudoh, M., Nishiyama, Y., Makimura, K., Uchida, K., Mori, T. and Yamaguchi, H.: *Microbiol. Immunol.*, **46**, 317–326 (2002)
- 10) Yamaguchi, H., Nishiyama, Y., Uchida, K., Hatano, K., Morishita, Y., Nakai, T., Ikeda, F. and Mutoh, S.: *Jpn. J. Chemother.*, **50** S-1: 20–29 (2002)
- 11) Maebashi, K., Kudoh, M., Nishiyama, Y., Makimura, K., Kamei, K., Uchida, K., Mori, T. and Yamaguchi, H.: *Microbiol. Immunol.*, **47**, 117–124 (2003)
- 12) Nishiyama, Y., Hasumi, Y., Ueda, K., Uchida, K. and Yamaguchi, H.: *J. Electron Microsc.*, **54**, 67–77 (2005)
- 13) Hatano, K., Morishita, Y., Nakai, T. and Ikeda, F.: *J. Antibiotics.*, **55**, 219–222 (2002)