

【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

泉川 公一・田代 将人・河野 茂

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）*

（平成 25 年 1 月 25 日受付・平成 25 年 1 月 31 日受理）

医療技術の進歩に伴い、深在性真菌症は増加している。なか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示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いたっていない。長崎大学病院で検出された *Aspergillus fumigatus* 196 株を対象としたわれわれの検討では、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。

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

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。なかでも、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¹⁾。

アスペルギルス属は少なくとも 100 種類以上存在し、*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor* といった菌種が人から検出される頻度が高い²⁾。なかでも、*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、われわれの自験例でも non-*fumigatus Aspergillus* の分離頻度が増加している^{3~6)} (Fig. 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。アスペルギルスの胞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^{7,8)}。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推定され、5 年生存率は 50% 程度と、侵襲型と同様に予後不良な疾患である⁹⁾。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。

*長崎県長崎市坂本 1-7-1

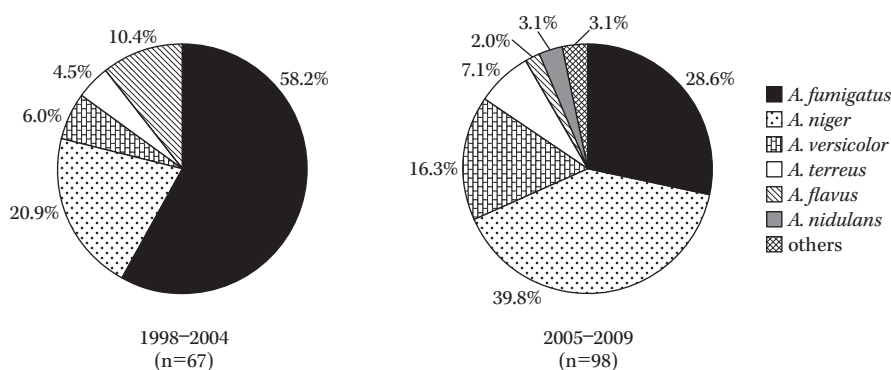


Fig. 1. Comparison of *Aspergillus* spp. isolated during 1998–2004 and 2005–2009 from adults in a pneumology ward of Nagasaki University Hospital in Nagasaki, Japan. *A. fumigatus* was the most commonly isolated species between 1998 and 2004; however, between 2005 and 2009, the frequency of isolation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

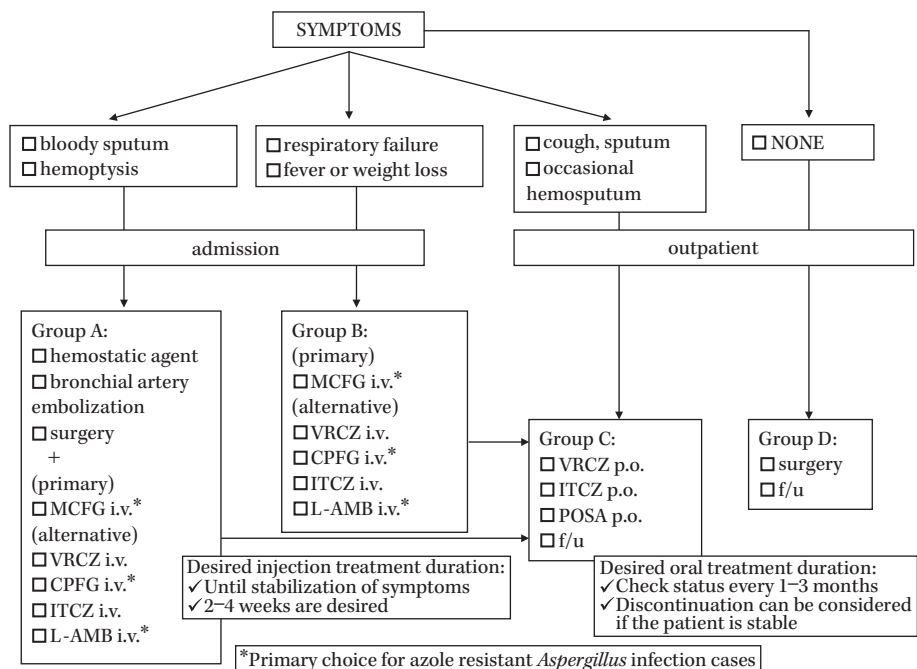


Fig. 2. Proposal for the management of chronic pulmonary aspergillosis in Japan based on the severity of symptoms and the status of the patient. The intravenous administration of antifungals may be needed for 2–4 weeks, followed by oral antifungals. MCFG, micafungin; VRCZ, voriconazole; CPFZ, caspofungin;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

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、エキノカンディン系の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。エキノカンディン系は最

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、エキノカ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 (Fig. 2)¹⁰⁾。

近年、アゾール系薬に感受性の低下したアスペルギル

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 et al.	2008	374	0 (voriconazole)	0.0	Spain	43)
Snelders et al.	2008	1,912	32 (itraconazole)	1.7	The Netherlands	26)
Rodriguez-Tudela et al.	2008	393	32 (itraconazole)	8.1	Spain, The Netherlands, UK, France	22)
Espinel-Ingroff et al.	2008	292	1 (voriconazole)	0.3	North America	44)
Howard et al.	2009	519	34 (itraconazole)	0.6	UK	21)
Pfaller et al.	2009	637	43 (itraconazole)	6.8	Worldwide	15)
Baddley et al.	2009	181	1 (itraconazole)	0.6	North America	2)
Amorim et al.	2010	159	1 (posaconazole)	0.6	Portugal	45)
Bueid et al.	2010	230	62 (itraconazole)	28.0	UK	46)
Lockhart et al.	2011	497	29 (itraconazole)	5.8	Worldwide*	36)
Chowdhary et al.	2012	103	2 (itraconazole)	1.9	India	37)
Tashiro et al.	2012	196	14 (itraconazole)	7.1	Japan	18)

* , Itraconazole resistant strains were mainly detected in China.

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年間でさまざまな進歩があった。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。したがって、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^{11,12)}。これらの方法に関して、使用するメディアの糖分量、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¹³⁾。

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¹⁴⁾。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¹⁵⁾。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¹⁶⁾。

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年の 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¹⁷⁾。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われわれのデータを示す。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¹⁸⁾。

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¹⁹⁾。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²⁰⁾。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

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 ($\mu\text{g/mL}$)			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

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²¹⁾。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²¹⁻³⁰⁾。さらに98, 138, 431, 448番目のアミノ酸変異は、すべてのアゾール系薬に耐性を示すことが知られている^{20, 21)}。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^{18, 21)}。

*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、野生株に比較して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、すべてのアゾール耐性*A. fumigatus*に認められるわけではない²¹⁾。われわれの解析では、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以下のものであった (Table 3)。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。したがって、当科で検出されたITCZ耐性株は、VRCZとの交差耐性を認めなかった¹⁸⁾。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¹⁸⁾。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³¹⁾。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³²⁾。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²⁷⁾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^{31,33)}。

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^{34,35)}。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³⁵⁾。この sterol demethylation inhibitor はヒトに使用されているアゾール系薬と交差耐性を示すことがわかっており、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⁹⁾。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^{22,36,37)}。われわれの検討においては、上記の変異を有する株は検出されなかった¹⁸⁾。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²⁰⁾。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^{30,38)}。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カ月)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^{30,39)}。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える。

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見た。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 ($r=0.5700$, $P<0.0001$)⁴⁰⁾。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 ($r=0.5237$, $P<0.0001$) 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。われわれ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⁴⁰⁾。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る^{21,41)}。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⁴²⁾。

われわれ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、現状では注射薬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さら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「上田泰記念感染症・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。

利益相反自己申告：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。

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 J W, Marr K A, Andes D R, Walsh T J, Kauffman C A, Kontoyiannis D P, 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 E K, Chandrasekar P H: *Aspergillus flavus*: an emerging non-*fumigatus* *Aspergillus* species of significance. *Mycoses* 2009; 52: 206-22
- 5) Hachem R Y, Kontoyiannis D P, Boktour M R, Afif C, Cooksley C, Bodey G P, et al: *Aspergillus terreus*: an emerging amphotericin B-resistant opportunistic mold in patients with hematologic malignancies. *Cancer* 2004; 101: 1594-600
- 6) Walsh T J, Groll A H: 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 O A: Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. *Drugs* 2007; 67: 1567-601
- 8) Snelders E, Melchers W J, Verweij P E: Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a new challenge in the management of invasive aspergillosis? *Future Microbiol* 2011; 6: 335-47
- 9) Denning D W, Perlin D S: 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: 982-4
- 12) Clinical Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, 2nd ed. Document M38-A2. CLSI, 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 P E, Howard S J, Melchers W J, Denning D W: Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resist Updat* 2009; 12: 141-7
- 15) Pfaller M A, Diekema D J, Ghannoum M A, Rex J H, Alexander B D, 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 D J, Fothergill A, Johnson E, Pelaez T, Pfaller M A, 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 D W, Venkateswarlu K, Oakley K L, Anderson M J, Manning N J, Stevens D A, 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 obtained in Nagasaki, Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 584-7
- 19) Cowen L E: The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6: 187-98
- 20) Howard S J, Arendrup M C: Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection. *Med Mycol* 2011; 49(Suppl 1): S90-5
- 21) Howard S J, Cerar D, Anderson M J, Albarrag A, Fisher M C, Pasqualotto A C, 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 J L, 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 T M, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela J L: A point mutation in the 14 alpha-sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1120-4
- 24) Mann P A, Parmegiani R M, Wei S Q, Mendrick C A, 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 A M, Goldman G H, Park S, Marras S A, 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 H A, Kuijpers J, Rijs A J, Varga J, Samson R A, 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 W J, Verweij P E, 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 P E, Mellado E, Melchers W J: 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 J L: Substitutions at methionine 220 in the 14 α -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 R D, Lamping E, Holmes A R, Niimi K, Baret P V, Keniya M V, et al: Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 291-321, Table of Contents
- 32) Chamilos G, Kontoyiannis D P: Update on antifungal drug resistance mechanisms of *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist Updat* 2005; 8: 344-58
- 33) Slaven J W, Anderson M J, Sanglard D, Dixon G K, Bille J, Roberts I S, 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 Genet Biol* 2002; 36: 199-206
- 34) Verweij P E, Snelders E, Kema G H, Mellado E, Melchers W J: 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 R A, Rijs A J, Kema G H, Melchers W J, Verweij P E: Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 4053-7
- 36) Lockhart S R, Frade J P, Etienne K A, Pfaller M A, Diekema D J, Balajee S A: 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 H S, Gaur S N, Klaassen C H, Meis J F: 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 S J, Pasqualotto A C, Denning D W: 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, Manhsung R T: 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 V S, Bierings M B, Melchers W J, Verweij P E, Wolfs T F: 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 J W, Snelders E, Kampinga G A, Rijnders B J, Mattsson E, Debets-Ossenkopp Y J, 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 S J, Moore C B, Richardson M D, Harrison E, Bowyer P, et al: Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2116-8

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 infections in both immune-compromised and immune-competent patients, with a high associated mortality. Only three classes of antifungals (azoles, polyenes, and echinocandins) are currently available. Recent studies have found that azole resistance is appearing in *Aspergillus fumigatus* strains around the world, and such resistance is becoming a clinical concern. Although long-term azole treatment in cases with chronic aspergillosis and the heavy environmental use of fungicides have both been considered as possible causes of azole resistance, the mechanism of resistance has not yet been determined. Although the mainstay of the azole resistance mechanism is a mutation in 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 that the prolonged use of itraconazole might be linked to resistance acquisition.