

2009 年致病性黴菌研討會記事

張德斌 羅秀容

國家衛生研究院

前 言

近年來由於侵入性治療頻繁地使用，免疫系統不全的病患日漸增多，使得各樣的侵入性黴菌感染逐年增加。又因抗黴菌藥物使用增加，使得具抗藥性的致病菌株隨之增加，其中又以念珠菌感染 (candidiasis) 及麴菌感染 (aspergillosis) 最為嚴重，引起基礎研究與臨床醫學上高度重視。因此，為瞭解黴菌感染的現況與促進相關基礎研究的交流，謝維銓教授感染醫學文教基金會、行政院衛生署疾病管制局與國家衛生研究院共同主辦「2009年致病性黴菌研討會」，7月18日於台北台大醫學院舉行。

此研討會由台大醫院謝維銓教授揭開序幕，而後由美國加州大學洛杉磯校區海港醫學中心的 Dr. John E. Edwards Jr. 與香港中文大學的 Dr. Patrick C.Y. Woo 進行專題演講，兩位學者分別以研究不同基因為例，強調從基礎研究工作應用到臨床實際經驗之重要性。會中還由清華大學藍忠

昱博士、交通大學楊昀良博士與高雄師範大學卜樂妙博士報告基礎研究的成果。之後，Dr. Edwards 再以抗黴菌藥物之治療為題，回顧過去30年來所面對的課題，接續報告的台大醫院孔祥琪醫師則利用實際的例子說明抗黴菌藥物臨床試驗所面臨的困難與挑戰。國家衛生研究院的羅秀容博士報告台灣黴菌抗藥性監測的結果，而台灣疾病管制局的李淑英博士介紹分子快速鑑定致病性黴菌的方法及分子流行病學來探討菌株之親緣關係，最後則由中國醫藥大學附設醫院何茂旺醫師整理比較台灣地區念珠菌感染研究的現況，為此研討會劃下句點。

基礎研究工作應用到臨床經驗

白色念珠菌 (*Candida albicans*) 已是院內感染菌血症之重要致病菌種之一，其附著及穿透血管內皮後造成的菌血症，是其相當重要的致病機制。Dr. Edwards 團隊先將白色念珠菌基因庫送入不具附著性的啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中，接著

挑選能夠使之造成附着力的一群 Als 蛋白質家族。經由一系列分析後，發現 Als1p 或 Als3p 製成的疫苗可降低受感染老鼠的死亡率，並預計於一年後進行臨床實驗。此外 Dr. Woo 針對由 AIDS 病人身上分離出的 *Penicillium marneffeii* 與肺結核病人中分離出的 *Aspergillus fumigatus*，研究後發現寄主對同一群黴菌蛋白質家族 mannoprotein (在 *P. marneffeii* 中稱為 Mp1p；在 *A. fumigatus* 中稱為 Afmp1p) 產生抗體。經由免疫染色後的超微組織觀察，發現此類的蛋白質位於菌絲的細胞壁上，為黴菌細胞壁中、外層的主要結構。並經由血清學的研究，顯示將此類蛋白質作為抗原，來偵測病人是否有 *P. marneffeii* 或 *A. fumigatus* 的感染可得到很好的效果。

黴菌致病性的基礎研究與展望

白色念珠菌常見於院內感染，及免疫功能不全之病患。通常位於人類口腔、喉部、大腸、皮膚及陰道等黏膜表面；當病人抵抗力機能衰退或受藥物副作用影響，即會侵入內部器官，引發感染。此部分由以此菌為模式進行研究的 3 位博士來進行報告，除了臨床醫師的診斷與治療外，基礎研究亦提供相當重要的資訊。

藍忠昱博士說明細胞壁是白色念珠菌感染宿主時很重要的關鍵，其中 *RHB1* 和 *TOR* 位於白色念珠菌細胞壁，對其細胞壁完整性的維持極為重

要，經由研究 *RHB1* 的訊息傳遞途徑，可知道其他細胞壁蛋白質的作用，並進一步了解它們與白色念珠菌致病力的關係。藍博士的團隊發現 *RAS*, *RAF*, *RHO* 等基因，都在細胞間訊息傳導中扮演著重要的角色。藍博士也說明了 *RHEB* (Ras Homologue Enrich in Brain) 在白色念珠菌中的同源基因 *RHB1* 所參與的訊息傳遞以及功能的探討；其研究發現 *RHB1* 可能參與 *TOR* 激酶訊息傳導路徑，並在其上游扮演活化因子的角色；*RHB1* 還透過 *MEP2* 基因參與白色念珠菌受到環境中氮源缺乏刺激而產生型態變化的機制。此外，*RHB1* 也經由 *Mkc1* 激酶之訊息傳遞，參與細胞壁完整性的機制，本研究提供了白色念珠菌致病能力及因子提供了新的觀點。

楊昀良博士的研究團隊以比較基因轉錄組 (transcriptome) 的方式，鑑定有致病力野生菌株與無致病力的 *cph1/cph1 efg1/efg1* 雙突變白色念珠菌之間表現程度有差異的基因，而產生 enolase 的 *CaENO1* 基因為其一。此團隊亦證實白色念珠菌只有這個基因會產生 enolase，並發現不但與醣類代謝有密切相關外，亦與白色念珠菌型態變化及抗藥性產生有關；*efg1/efg1* 突變株對抗黴菌藥物的感受性增加，經實驗證明 Efg1p 負向調控 *ERG3*。楊博士的研究結論顯示 Efg1p 不但與致病力有關，且負向調控 *ERG3* 進而與抗藥性有關連。此外，楊博士亦說明血清不但誘發白色念珠

菌的型態變化，而且也抑制藥物幫浦 *CDR1* 的表現，進而提高菌株對抗黴菌藥物的感受性。楊博士與藍博士研究成果開啟一個新的旅程---結合病原菌抗藥性與致病力的研究。

卜博士主要研究是在於分泌性天門冬胺酸蛋白酶4、5與6 (Sap4-6)，其被認為是白色念珠菌經由訊息傳遞路徑調節菌絲生長所管控的致病因子，與系統性念珠菌感染有關。Sap4-6等蛋白酶是在一被白血球吞噬的白色念珠菌的菌絲中所發現，將白色念珠菌培養於37°C的低葡萄糖培養基(含有0.1%葡萄糖)時，有大量的Sap5和少量的Sap6被分泌出；但將其培養於葡萄糖豐富的培養基(含有2%葡萄糖)時，即使培養基中含有血清誘導菌絲形成，Sap5與Sap6的分泌皆會被抑制；而若將當白色念珠菌培養於25°C不含血清且葡萄糖豐富的培養基中時，發現Sap2會大量分泌，而Sap3僅會微量分泌。卜博士認為人體內血糖濃度高低、白色念珠菌-單核白血球細胞之間的交互作用、以及溫度與pH值的轉變，是觸發白色念珠菌表現Sap4-6與其它Sap蛋白酶的重要生理信號。這些分子生物學的證據與臨床流行病學研究結果一致指出：糖尿病、禁食與靜脈營養注射是造成全身系統性白色念珠菌感染的危險因子。

抗黴菌藥物臨床實驗之歷程

當一個新的藥物正式上市之前是

需要數10年以上的時間，經由漫長動物實驗以及人體實驗後，才能正式的用來使用於臨床治療。Dr. Edwards說明進行抗黴菌藥物臨床試驗艱鉅和複雜的過程，因為缺乏感染的替代標誌物，如何準確地定義感染型式與利用診斷工具，以及雙盲實驗的進行，都使臨床試驗複雜化，也降低了製藥公司加入研發的興趣。然而在2007年合併使用caspofungin/posaconazole藥物成功治癒*C. krusei*的感染病例，使得製藥公司開始有興趣再度投入研發抗黴菌藥物的市場。而因研發抗黴菌藥物費時耗錢，Dr. Edwards建議應以合作的方式共同開法與制訂研發策略，以期達到最大的效應。

當進入臨床試驗階段，藥物劑量的正確估算與使用，則是另一個需要關注的焦點。因amphotericin B是一很強之殺菌劑，但本身亦具有高度毒性，何時該使用較低毒性改變劑型之amphotericin B是臨床醫師的考驗。再者，減緩抗黴菌藥物與其他藥物的交互作用，也是在研發上值得探討並改進的部分。孔祥琪醫師也提出經由整理1975到2009年的文獻以及實際經驗，提出抗黴菌藥物在臨床試驗所面臨的許多挑戰，包括進行臨床試驗的病人通常已經由層層條件的篩選，而所得的結果又容易受到許多因素的影響，因而降低其代表性。基礎研究和藥物臨床試驗的相互合作，雖已有努力和共識，但如何能夠做出好的決策，以及如何在老藥中找到新的過

程，都是一個艱深但卻又不能忽視的課題。

台灣致病性酵母菌流行病學的研究

羅秀容博士研究團隊分別在1999、2002與2006年針對致病性酵母菌進行台灣黴菌抗藥性的監測計畫(Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeast; TSARY)。監測菌株是來自分佈於北中南東20多家醫學中心及區域醫院微生物實驗室，由不同病人檢體所分離之菌株。整體而言，念珠菌好發部位與其菌種的分佈沒有明顯的改變。由檢體來源區分，菌株分離率依序分別為尿液、痰液、血液與傷口；以菌種來分：白色念珠菌佔最多，其次依序為 *C. tropicalis*、*C. glabrata* 及 *C. parapsilosis*。值得一提是非白色念珠菌，在台灣 *C. tropicalis* 菌株分離率比歐美盛行 *C. glabrata* 高，此 *C. tropicalis* 菌種對常用的 fluconazole 藥物抗性比例高，是值得關注本土課題。

此團隊亦分別於1999、2001、2002及2005年對高危險群 HIV 感染的病人進行口咽採樣。目前發現所分離的菌種數有逐年增加的趨勢，同一檢體分離出多於一種菌種的個案亦明顯增加；另外，在與 TSARY 合作醫院的感控醫師共同努力下，發現正在服用抗結核菌藥物 (antituberculosis agent) 的病人，與分離出具抗藥性菌株有明顯的關連性。研究團隊藉監測計畫能在第一時間鑑定出新興的致病

菌種與抗藥性的問題，可提供全國黴菌感染之流行病學資訊，也提高醫護人員對黴菌感染的關注，因此將 TSARY 四年全台採樣一次的頻率，提高為每三年採樣一次。

台灣黴菌感染分子流行病學與其快速檢驗系統之建立

黴菌感染日漸普及，急需有效監測與感染管控策略，而建立更有效且穩定的分子鑑定方法，成了勢在必行的趨勢。李淑英博士介紹了近年來多種分子快速鑑定的方法，例如逢機增幅 DNA 多態型 (rapid amplified polymorphic DNA; RAPD)、脈衝式電泳法 (pulsed field gel electrophoresis; PFGE)、重複序列 PCR (repetitive sequence-based PCR; rep-PCR)、增幅片段長度多態型 (amplified fragment length polymorphism; AFLP) 以及多重基因座序列分型法 (multilocus sequence typing; MLST)。而台灣疾管局也已發展出 PCR、PCR-EIA、real-time PCR 以及微珠陣列分析法 (microsphere beads array method) 來鑑定檢體中 18S rDNA 與內轉錄區 (internal transcribed spacer; ITS)，用以區別其中多種病原菌。

此團隊以分子分型分析全省收集之菌株，發現其型別與抗藥性高低、地理區、分離部位以及院內感染與否無關；另以 MLST 方法比較台灣菌株和世界其它地區所分離的菌株之親緣關係，得知台灣除少數來自愛滋病人

的菌株外，多半獨立於歐美主要菌株群外，而與日本類源性較近。而根據1999-2006年TSARY的資料，發現*C. tropicalis* 雙套序列基因型 (diploid sequence types; DST) 與抗藥性的關聯：*C. tropicalis* 的DST 98與DST-140對於fluconazole的抗性 (MICs $\geq 64\mu\text{g/mL}$)，以及DST 164之於flucytosine的抗性 (MIC $\geq 8\mu\text{g/mL}$) 皆未受到時間與空間的影響且有顯著的相關，並持續在台灣各區出現，這一現象值得我們關注。目前全球MLST資料庫中之DST共有724筆資料，對偶基因 (alleles) 共有619筆，經李博士研究團隊的努力，台灣目前提供之新的DST計有44筆 (6.1%)，新的對偶基因計有26筆 (4.2%)，除了利於與國際接軌，更有助於了解念珠菌全球分子流行病學。

台灣念珠菌感染研究之現況

何茂旺醫師比較台灣與國外念珠菌感染的研究情形，發現台灣有較嚴重的念珠菌血流感染，其中以白色念珠菌為最常見，約佔51%，其次為*C. tropicalis*，約佔20%。而以中國醫藥

大學小兒科2002-2007年間的小兒菌血症個案進行研究發現，也發現類似的比例 (白色念珠菌仍為最高45%，次高則為*C. parapsilosis*，32%)。依據近20年統計也發現，台灣地區念珠菌菌血症的死亡率43.1-60.7%和歐美國家的37.9-39.2%不同。黴菌感染流行病學的研究結果會因不同區域及研究族群而異，因此在進行念珠菌菌血症監控與管理時，地區性基礎研究相較於全球性研究更加重要。

總 結

人類與黴菌感染的戰爭持續進行著，如何在其中達到一個更好的平衡點，是我們一直努力的方向。即使在研發新藥與臨床實驗過程中有許多困難，抗黴菌療法的策略制訂仍有其不易之處，欣慰的是有越來越多的專家學者與臨床醫師投入這方面的研究。同時，由我們自己進行本土資料的研究與分析，更顯得其中的可貴。以期藉由大家共同的合作，提供更多的資訊，激盪出更旺盛的火花，為台灣黴菌感染流行病學的基礎與臨床研究，開創一條嶄新且更好的道路。