

日本感染症医薬品協会奨励賞受賞講演会記録

2013年10月3日, 学士会館 320号室

【2013年度受賞講演, 座長: 藤井 毅】

病原真菌における多剤耐性機序の解明と臨床的重要性の評価

宮崎泰可

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)

はじめに

臓器移植や免疫抑制薬, 抗癌剤などの医療の進歩やHIV/AIDS患者の増加に伴い, 日和見感染症は増加の一途にある。特に, 侵襲性カンジダ症や侵襲性アスペルギルス症のような深在性真菌症は, 有効な抗真菌薬に限られており, 治療に難渋することも少なくない。そのような中で, 多剤耐性病原真菌の出現は, 人類において, 特に免疫不全患者にとってはきわめて重大な問題である。これまで人類と病原菌の戦いは, 新規薬剤開発と耐性菌出現の“いたちごっこ”であったが, 病原真菌における抗真菌薬耐性機序の解明は, 今後の薬剤開発のみならず, 既存薬剤の有効利用にも寄与するものと考えられる。

筆者らはこれまでカンジダ属やアスペルギルス属の薬剤耐性について研究を行ってきた。2013年度の日本感染症医薬品協会奨励賞受賞講演会では, 日常診療で遭遇する頻度が最も高い深在性真菌症である侵襲性カンジダ症に焦点をあてて発表を行った。本項では侵襲性カンジダ症診療の現状とこれまでに明らかになっている抗真菌薬耐性機序を概説し, 临床上最も問題視されている *Candida glabrata* の抗真菌薬耐性に関して我々の研究内容

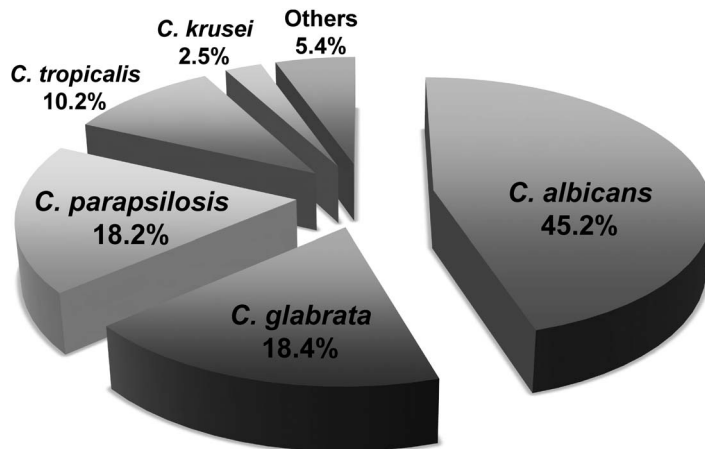
を紹介したい。

侵襲性カンジダ症診療の現状と抗真菌薬耐性が与えるインパクト

カンジダ属は, ヒトの皮膚や口腔内, 腸管, 膣などの粘膜に常在しており, 皮膚・粘膜バリアの破綻が起こると, 血液中に侵入しカンジダ血症を発症する。主要なリスク因子として, 好中球減少などの免疫抑制状態, 広域抗菌薬の使用, 中心静脈カテーテルの留置などがあげられる¹⁾。原因菌種として最も頻度が高いのは *Candida albicans* であり約半数を占める。次いで, *C. glabrata* や *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* などが分離される²⁾ (図1)。

カンジダ血症は, 初期治療の遅れにより致死率が高くなるため, 臨床症状を伴う血液培養陽性患者では, 迅速な抗真菌薬投与を検討すべきである³⁻⁶⁾。現在, カンジダ血症に対して使用される主な抗真菌薬として, アゾール系薬 (フルコナゾール, イトラコナゾール, ポリコナゾール), キャンディン系薬 (ミカファンギン, カスポファンギン), ポリエン系薬 (アムホテリシンBリボソーム製剤) がある。*C. albicans* は他のカンジダ

図1. 侵襲性カンジダ症の原因菌種



2010年～2011年に臨床分離されたカンジダ3,107株の解析 (SENTRYサーベイランスプログラム)。(文献2をもとに筆者作成)

種よりも病原性は高いが、アゾール系、ポリエン系、キャンディン系の全てに良好な感受性を示す。一方、non-*albicans* *Candida*は、菌種によって感受性パターンが異なる。一般に、*C. glabrata*はアゾール系薬全般に感受性が低い傾向にある。*C. krusei*はフルコナゾール耐性であるが、ポリコナゾールには感受性を示すことが多い。*C. parapsilosis*は、他のカンジダ種と比較して*in vitro*でのキャンディン感受性が低い。*C. tropicalis*は、*C. albicans*同様に3系統全ての抗真菌薬に感受性を示すことが多いが、特に好中球減少患者では病原性が高いことが報告されている⁷⁾。その他、稀に分離される菌種として、*Candida lusitanae*がアムホテリシンBに、*Candida guilliermondii*が、フルコナゾールやイトラコナゾール、キャンディン系薬に低感受性であることが多い。2000年代前半の米国におけるカンジダ血症の菌種別死亡率をみると、*C. glabrata*や*C. krusei*が原因菌種の場合、他の菌種よりも死亡率が高いことが示されている⁸⁾。患者背景の違いはあるものの、これら2菌種が他菌種よりも病原性が強いわけではないため、当時頻用されていたフルコナゾールに対して低感受性であることが要因の一つとして推察され

ている。わが国や米国の診療ガイドライン^{1,9)}は、非好中球減少患者でカンジダ血症が疑われる場合、*C. glabrata*や*C. krusei*が原因菌種であるリスク(例えば、高齢者や担癌患者、最近のアゾール系薬の使用歴など)がなく重症度が低い患者にはフルコナゾールを、それ以外の患者にはキャンディン系薬を初期治療薬として推奨している。2012年に公表された欧州の診療ガイドライン¹⁰⁾は、わが国や米国の考え方とは若干異なり、フルコナゾールの推奨度を下げ、比較的どのカンジダ種にも有効なキャンディン系薬を初期治療薬として推奨している。キャンディン系薬は安全性も高く使用しやすいため、実際わが国でもカンジダ血症治療薬として最も使用されている。日本医真菌学会のガイドラインが推奨しているカンジダ血症の標的治療薬を表1に示す。しかし、予想通りキャンディン耐性株が近年増加しており¹¹⁾、なかでもアゾール系とキャンディン系の両系統に耐性を示す*C. glabrata*の増加は特に問題視されている^{12,13)}(図2)。当然のことながら、多剤耐性株が増加すると治療薬の選択肢はきわめて限られてくる。このように、抗真菌薬耐性は侵襲性カンジダ症の予後と治療薬の選択に大きな影響を及ぼしている。

表1. カンジダ血症の標的治療

(日本医真菌学会 侵襲性カンジダ症の診断・治療ガイドライン 2013)

		F-FLCZ	VRCZ	ITCZ	L-AMB	Candin (MCFG, CPFG)
好中球減少なし	カンジダ属検出(菌種不明)	<u>A-I</u>	A-I	B-II	A-I	<u>A-I</u>
	<i>C. albicans</i>	<u>A-I</u>	B-I	B-II	A-I	<u>A-I</u>
	<i>C. glabrata</i>		B-III		B-III	<u>B-III</u>
	<i>C. parapsilosis</i>	<u>B-III</u>	C-III	C-III	B-III	C-III
	<i>C. tropicalis</i>	<u>A-I</u>	B-III	C-III	B-III	<u>B-III</u>
	<i>C. krusei</i>		B-III		C-III	<u>B-III</u>
	<i>C. lusitaniae</i>	<u>B-III</u>	C-III	C-III		<u>B-III</u>
	<i>C. guilliermondii</i>		<u>B-III</u>		<u>B-III</u>	
好中球減少あり	カンジダ属検出(菌種不明)	B-III	B-III	C-III	<u>A-II</u>	<u>A-II</u>
	<i>C. albicans</i>	B-III	B-III	C-III	<u>A-II</u>	<u>A-II</u>
	<i>C. glabrata</i>				B-III	<u>B-III</u>
	<i>C. parapsilosis</i>	<u>B-III</u>	C-III	C-III	<u>B-III</u>	C-III
	<i>C. tropicalis</i>	B-III	B-III	C-III	<u>B-III</u>	<u>B-III</u>
	<i>C. krusei</i>		B-III		<u>B-III</u>	<u>B-III</u>
	<i>C. lusitaniae</i>	<u>B-III</u>	C-III	C-III		<u>B-III</u>
	<i>C. guilliermondii</i>		<u>B-III</u>		<u>B-III</u>	

好中球減少患者と非好中球減少患者に分けて、原因カンジダ種に対する初期治療薬を推奨度 (A~C) とエビデンスレベル (I~III) の組み合わせで示す。カンジダ属検出 (菌種不明) とは、血液培養で酵母様真菌が検出されたが菌種がまだ同定されていない時点を示す。第一選択薬を下線あり、代替薬を下線なしで示す。空欄は使用が推奨されない場合である。

略語: F-FLCZ, fosfluconazole; VRCZ, voriconazole; ITCZ, itraconazole; L-AMB, liposomal amphotericin B; MCFG, micafungin; CPFG, caspofungin. (文献9をもとに筆者作成)

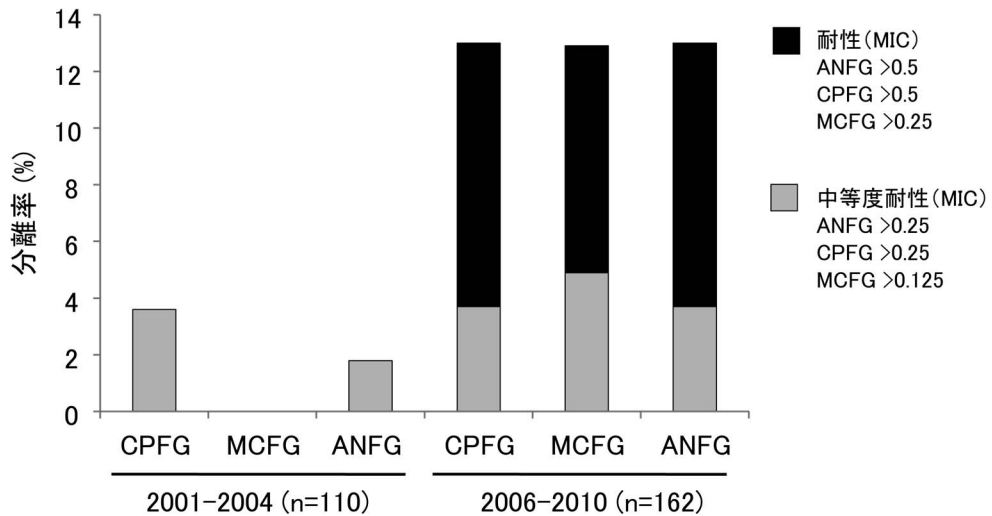
抗真菌薬の作用機序とカンジダ属における抗真菌薬耐性機序

(1) アゾール系薬

アゾール系薬の作用機序は、真菌細胞膜の主要成分であるエルゴステロールの合成阻害である。ERG11 遺伝子によってコードされている lanosterol 14 α -demethylase が標的分子であり、静真菌的に作用する。これに対しカンジダは、ERG11 の変異による薬剤親和性の低下、ERG11 の発現亢進、ERG3 遺伝子の変異による有害ステロール蓄積の回避、薬剤排出ポンプの活性化による細胞内薬剤濃度の低下などの機序によってア

ゾール耐性を獲得する¹⁴⁾。薬剤排出ポンプには、ATP-binding cassette (ABC) transporter と major facilitator superfamily (MFS) transporter があり、基質特異性などに違いがある。ABC transporter として代表的なものに Cdr1 と Cdr2 があるが、前者の方が重要な役割を担っている。複数の耐性機構が同時に存在すると、より高度な耐性が誘導されることも知られている¹²⁾ (表2)。また、カンジダが血管内デバイスなどに付着しバイオフィルムを形成すると、キャンディン系やポリエン系薬と比較してアゾール系薬の抗真菌効果は著しく低下する。

図2. フルコナゾール耐性 *Candida glabrata* のキャンディン系薬に対する感受性の推移



2001年～2004年と2006年～2010年の期間に分離されたフルコナゾール耐性 (MIC \geq 64 μ g/ml) *C. glabrata* の中で、キャンディン系薬に耐性および中等度耐性株の割合を示す。なお、フルコナゾール耐性株の98.8%がポリコナゾールにも非感受性であった。

略語：ANFG, anidulafungin; CPFG, caspofungin; MCFG, micafungin; MIC, minimum inhibitory concentration (μ g/ml)。(文献13をもとに筆者作成)

表2. *Candida albicans* におけるアゾール耐性機序とMICの関連

Strain	耐性機序		MIC (μ g/ml)	
	薬剤排出ポンプ	ERG11変異	VRCZ	FLCZ
DSY294	—	—/—	0.008	0.25
DSY3604	—	G464S/—	0.06	2
DSY3083	—	G464S/G464S	0.13	4
DSY3606	↑↑	—/—	0.13	4
DSY296	↑↑	G464S/G464S	2	64

薬剤標的であるERG11の変異は、ヘテロ変異よりもホモ変異の場合に、より感受性が低下する (DSY3604 vs. DSY3083)。薬剤排出ポンプの活性化とERG11変異の両者が存在すると、より高度な耐性が誘導される (DSY296)。

略語：MIC, minimum inhibitory concentration; VRCZ, voriconazole; FLCZ, fluconazole。(文献12をもとに改変)

(2) キャンディン系薬

カンジダの細胞壁は β -グルカン、マンナン、キチンなどの多糖類で構成されており、キャンディン系薬はこの中の β 1,3-D-グルカンの合成を阻害

し殺菌的に作用する。 β 1,3-D-グルカン合成酵素は、それぞれFKS遺伝子とRHO遺伝子によってコードされている触媒サブユニットと調節サブユニットからなる複合タンパクであるが、FKS遺伝

子産物がキャンディン系薬の標的分子である。*FKSI*や*FKS2*遺伝子の変異が主要なキャンディン耐性機序として知られている。

(3) ポリエン系薬

アムホテリシンB製剤の作用機序は、細胞膜エルゴステロールの直接破壊といわれている。他系統の薬剤よりも腎障害などの副作用が多い。*C. lusitaniae*のようなごく一部の菌種を除き、ほとんどのカンジダ種はアムホテリシンBに対して良好な感受性を示す。

カルシニューリン情報伝達経路と抗真菌薬耐性

これまで、*C. albicans*や*Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*などいくつかの主要な病原真菌において、カルシウム依存性タンパク質脱リン酸化酵素であるカルシニューリンが、種々のストレス応答に重要な役割を担っていることが明らかにされている^{15,16)}。カルシニューリンは、触媒サブユニット(CNA)と制御サブユニット(CNB)によるヘテロダイマーを構成しており、どちらか一方でも欠けると、その酵素活性は失われる¹⁷⁾。ある種のストレスを受けた細胞では細胞内Ca²⁺濃度が上昇し、カルモデュリン-Ca²⁺複合体が形成される。カルシニューリン触媒

サブユニットはこの複合体と結合することによって自己抑制ドメインによる触媒部位の抑制が解かれ、カルシニューリンが活性化される¹⁷⁾。活性化されたカルシニューリンは、標的分子であるCrz1転写調節因子を脱リン酸化する。細胞質内で脱リン酸化されたCrz1は、その後核内に移行し、標的遺伝子の転写を調節することによって種々の細胞反応を促進する¹⁸⁻²⁰⁾。

我々は、*C. glabrata*のカルシニューリン情報伝達経路と抗真菌薬耐性の関連を調べるため、カルシニューリンの制御サブユニットをコードしている*CNB1*遺伝子、およびカルシニューリンの標的転写因子をコードしている*CRZ1*遺伝子の欠損株をそれぞれ作製し、その表現型の解析を行った²¹⁾。各*C. glabrata*株に対するアゾール系薬の最小発育阻止濃度(minimum inhibitory concentration: MIC)を表3に示す。カルシニューリン欠損株($\Delta cnb1$)は、野生株と比較して高いアゾール感受性を示したが、Crz1転写調節因子欠損株($\Delta crz1$)ではアゾール感受性の増強は認められなかった。このことより、*C. glabrata*のカルシニューリンはCrz1非依存性の機序でアゾール耐性に関与している可能性が示唆された。次に我々は、標準的なtime-kill assay²²⁾を用いて、フルコナゾール存在下での経時的な生菌数のモニタリングを行った(図

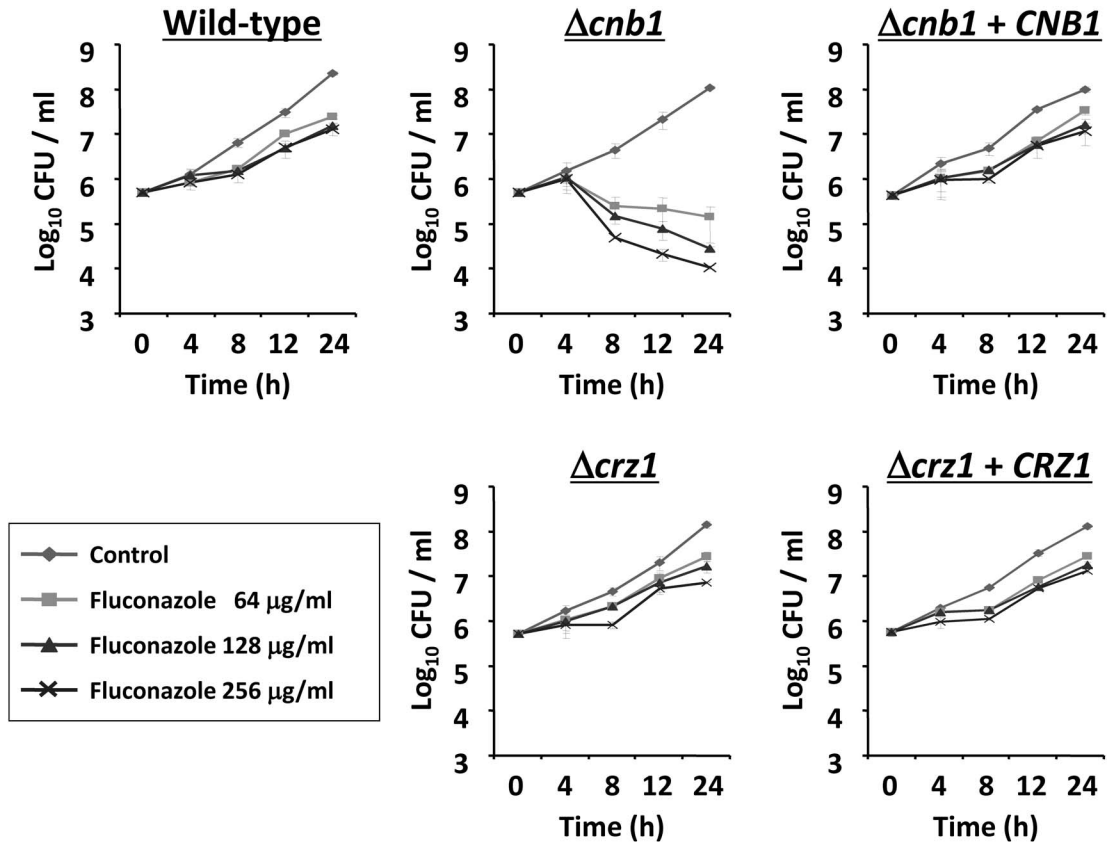
表3. *Candida glabrata*のカルシニューリン欠損株($\Delta cnb1$)と $\Delta crz1$ 欠損株のアゾール系薬に対する感受性

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	FLCZ	ITCZ	VRCZ
Wild-type	16	2	0.25
$\Delta cnb1$	4	0.5	0.125
$\Delta cnb1 + CNB1$	16	2	0.25
$\Delta crz1$	32	1	0.5
$\Delta crz1 + CRZ1$	16	1	0.25

アゾール系薬のMICは、酵母真菌薬剤感受性キットASTY(極東製薬工業、東京)を用いて、微量液体希釈法で測定した。

略語: MIC, minimum inhibitory concentration; FLCZ, fluconazole; ITCZ, itraconazole; VRCZ, voriconazole。(文献21をもとに改変)

図3. *Candida glabrata* のカルシニューリン欠損株に対するフルコナゾールの殺真菌効果



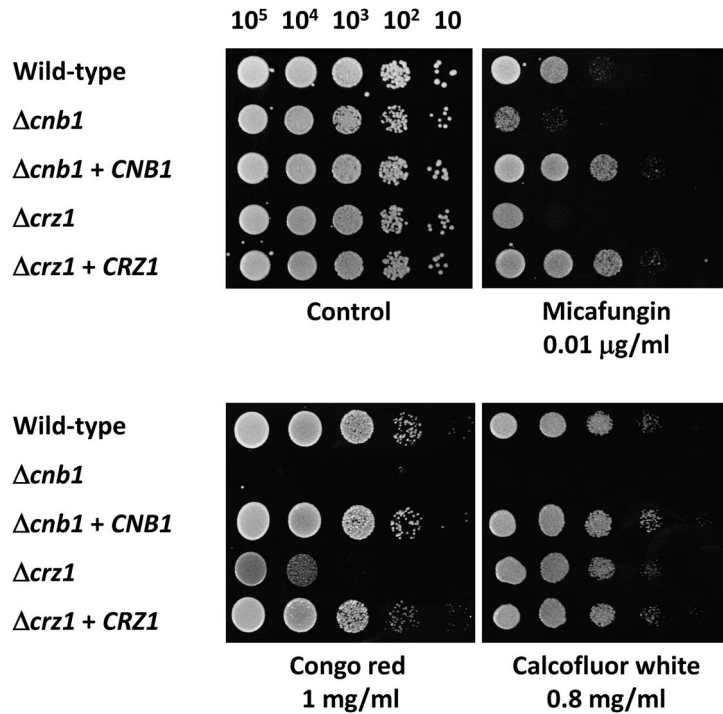
フルコナゾール存在下で培養した *Candida glabrata* 野生株、遺伝子欠損株、回復株の生菌数を経時的に解析した。(文献21をもとに筆者作成)

3). *C. glabrata* の野生株, $\Delta crz1$ 株, 各遺伝子回復株は, 高濃度のフルコナゾールに曝露されても増殖を続けることが可能であった。一方, $\Delta cnb1$ 株は, 通常の培養環境では野生株と同等の増殖能を示すが, フルコナゾール存在下では生菌数の有意な減少が確認された。アゾール系薬による真菌細胞の増殖抑制は, 通常静菌的作用であり, このことが耐性菌を生み出す一因ともされている。今回の実験結果から, カルシニューリンを阻害することによって, フルコナゾールに殺菌的作用を誘導できることが確認された。

また, *C. glabrata* におけるカルシニューリンの欠損は, キャンディン系薬ミカファンギンに対する感受性も高めることが確認された²¹⁾。キャン

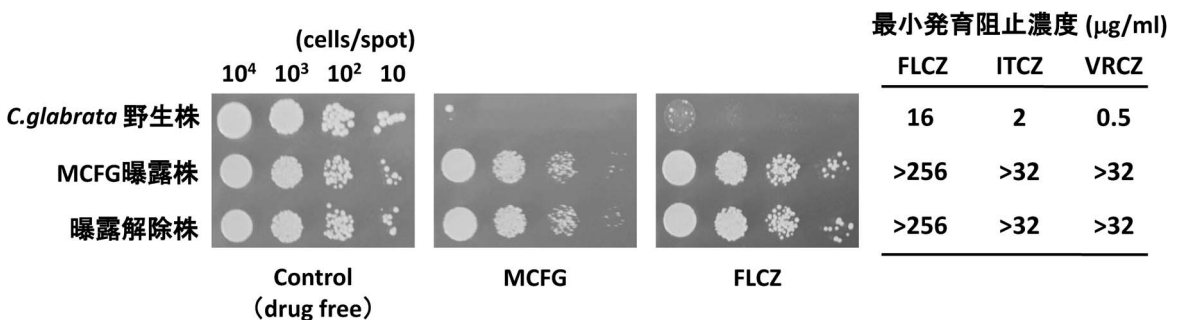
ディン系薬の他に, β -D-グルカンとキチンのファイバー形成を阻害する Congo red やキチンのポリマー形成を阻害する calcofluor white など細胞壁ストレスを誘導する薬剤として知られている。 $\Delta cnb1$ 株ではこれらの薬剤に対する寛容性が著しく低下しており, カルシニューリンは細胞壁ストレス応答にも重要な役割を担っていることが示唆された(図4)。一方, $CRZ1$ の欠損は, $\Delta cnb1$ 株とほぼ同等のミカファンギン感受性を誘導したが, Congo red に対してはわずかに感受性を高めたのみで, calcofluor white 感受性に対しては全く影響を及ぼさなかった。このことより, 細胞が受けたストレスの種類に応じて, カルシニューリンは Crz1 依存性および非依存性の機序でストレス

図4. *Candida glabrata* のカルシニューリン欠損株 ($\Delta cnb1$) と $\Delta crz1$ の細胞壁ストレスに対する感受性



10倍ずつ段階希釈した *Candida glabrata* 細胞をコントロール培地および薬剤含有培地に接種し、30°Cで48時間培養後に増殖能を評価した。(文献21をもとに改変)

図5. 低濃度ミカファンギンへの曝露により誘導されたミカファンギンおよびアゾール系薬に対する感受性の低下



曝露解除株は、ミカファンギンを含まない培地で20日間継代培養し作製した。10倍ずつ段階希釈した *Candida glabrata* 細胞をコントロール培地および薬剤含有培地に接種し、30°Cで48時間培養後に増殖能を評価した。

最小発育阻止濃度は、酵母真菌薬剤感受性キットASTY（極東製薬工業、東京）を用いて、微量液体希釈法で測定した。

略語：MCFG, miconfungin; FLCZ, fluconazole; ITCZ, itraconazole; VRCZ, voriconazole。

応答に関与していることが示唆された。

C. glabrata はアゾール系薬に低感受性であることが最も重要な問題であるが、カルシニューリン

を阻害することによって、フルコナゾールによる殺菌作用を誘導し、また、他のアゾール系薬やミカファンギンに対しても感受性を高めることが可

能であった。

C. glabrataにおける多剤耐性機序の解明

上述したようにC. glabrataは臨床上重要な菌種であるが、加えて、本真菌を用いた分子生物学的研究には以下のような利点がある。(1) haploidであり遺伝子操作が比較的容易であること、(2) モデル酵母であるSaccharomyces cerevisiaeに遺伝子背景が近いこと、S. cerevisiaeで得られた知見や実験ツールがある程度応用可能であること、(3) S. cerevisiaeでは行えない病原性の研究に利用できることなどである。尚、C. glabrataのgenome databaseは、フランス・パスツール研究所を中心としたゲノムプロジェクトによって作られ、Genolevures (<http://www.genolevures.org/>) に公開されている²³⁾。

キャンディン系薬の使用頻度が増加するにつれて、キャンディン低感受性あるいは耐性を示すC. glabrata株が臨床現場で分離されるようになってきた。そのため実験的に、C. glabrataの野生株をin vitroでミカファンギンに曝露したところ、容易にミカファンギン低感受性のC. glabrata細胞を創り出すことができた。さらに驚くことに、このC. glabrata細胞は、キャンディン系薬とは作用機序が異なるアゾール系薬（フルコナゾール、イトラコナゾール、ボリコナゾール）に対しても高度耐性を獲得していた（図5）。その後ミカファンギンを含まない培地で20日間継代培養しても、耐性を保持していた。この耐性獲得株は、キャンディン系薬とアゾール系薬の標的遺伝子であるFKS遺伝子やERG11に変異を有していなかったため、未知の耐性機序によるものと推察された。今後は、カルシニューリンとの関連なども含め、詳細なメカニズムを分子生物学的に解明していく必要がある。また、海外の共同研究者と協力しながら臨床分離株の解析を行うことで、臨床的な重要性も評価していく予定である。

謝辞

2013年度の日本感染症医薬品協会奨励賞受賞にあたり、これまでご指導いただいた長崎大学第二内科の河野 茂教授および諸先生方、本賞の選考委員の先生方に心より感謝申し上げます。

文献

- 1) PAPPAS, P. G.; C. A. KAUFFMAN, D. ANDES, *et al.*: Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. 48: 503~535, 2009
- 2) PFALLER, M. A.; S. A. MESSER, L. N. WOOSLEY, *et al.*: Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. J. Clin. Microbiol. 51: 2571~2581, 2013
- 3) GAREY, K. W.; M. REGE, M. P. PAI, *et al.*: Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. Clin. Infect. Dis. 43: 25~31, 2006
- 4) KOLLEF, M.; S. MICEK, N. HAMPTON, *et al.*: Septic shock attributed to Candida infection: importance of empiric therapy and source control. Clin. Infect. Dis. 54: 1739~1746, 2012
- 5) PATEL, G. P.; D. SIMON, M. SCHEETZ, *et al.*: The effect of time to antifungal therapy on mortality in candidemia associated septic shock. Am. J. Ther. 16: 508~511, 2009
- 6) TAUR, Y.; N. COHEN, S. DUBNOW, *et al.*: Effect of antifungal therapy timing on mortality in cancer patients with candidemia. Antimicrob. Agents Chemother. 54: 184~190, 2010
- 7) CHAI, L. Y.; D. W. DENNING & P. WARN: Candida tropicalis in human disease. Crit. Rev. Microbiol. 36: 282~298, 2010
- 8) WISPLINGHOFF, H.; T. BISCHOFF, S. M. TALLENT, *et al.*: Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a

- prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 39: 309~317, 2004
- 9) 日本医真菌学会 侵襲性カンジダ症の診断・治療ガイドライン作成委員会 編：侵襲性カンジダ症の診断・治療ガイドライン2013。日本医真菌学会，東京，2013
- 10) CORNELLY, O. A.; M. BASSETTI, T. CALANDRA, *et al.*: ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 18 (Suppl. 7): 19~37, 2012
- 11) PFALLER, M. A.; M. CASTANHEIRA, S. A. MESSER, *et al.*: Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2009). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 69: 45~50, 2011
- 12) PFALLER, M. A.: Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am. J. Med.* 125: S3~13, 2012
- 13) PFALLER, M. A.; M. CASTANHEIRA, S. R. LOCKHART, *et al.*: Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J. Clin. Microbiol.* 50: 1199~1203, 2012
- 14) ANDERSON, J. B.: Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 547~556, 2005
- 15) COWEN, L. E.: The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 187~198, 2008
- 16) STEINBACH, W. J.; J. L. REEDY, R. A. JR. CRAMER, *et al.*: Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 418~430, 2007
- 17) HEMENWAY, C. S. & J. HEITMAN: Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochem. Biophys.* 30: 115~151, 1999
- 18) CAI, L.; C. K. DALAL & M. B. ELOWITZ: Frequency-modulated nuclear localization bursts coordinate gene regulation. *Nature* 455: 485~490, 2008
- 19) MATHEOS, D. P.; T. J. KINGSBURY, U. S. AHSAN, *et al.*: Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 11: 3445~3458, 1997
- 20) STATHOPOULOS, A. M. & M. S. CYERT: Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.* 11: 3432~3444, 1997
- 21) MIYAZAKI, T.; S. YAMAUCHI, T. INAMINE, *et al.*: Roles of calcineurin and Crz1 in antifungal susceptibility and virulence of *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 1639~1643, 2010
- 22) PFALLER, M. A.; D. J. SHEEHAN & J. H. REX: Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 268~280, 2004
- 23) DUJON, B.; D. SHERMAN, G. FISCHER, *et al.*: Genome evolution in yeasts. *Nature* 430: 35~44, 2004