

Cryptococcus neoformans の各種抗真菌剤に対する *in vitro* 感受性の比較と、各薬剤間での相乗作用の検討

三上 襄・矢沢 勝清・宇野 潤・西村 和子

千葉大学真核微生物研究センター*

菅 野 治 重

千葉大学医学部付属病院検査部

(平成2年6月28日受付・平成2年9月28日受理)

臨床材料より分離された *Cryptococcus neoformans* 38 株、さらに研究室の保存株および標準株 12 株について amphotericin B (AMPH), fluconazole (FCZ), flucytosine (5-FC), itraconazole (ITZ) および miconazole (MCZ) の *in vitro* 活性を MIC (Minimum inhibitory concentration) 値および IC₅₀ (50% Inhibitory concentration of growth) 値で比較した。また各種抗真菌剤間での相乗作用についても検討した。その結果、MIC 値で比較した場合には、サブロー (SDA) 培地、感受性測定用 (KDA) 培地、Yeast morphology agar (YMA 培地) のいずれにおいても、AMPH は強い活性を示すが、ITZ は KDA 培地のような中性の培地で強い活性を示すこと、MCZ は酸性の SDA 培地で AMPH と同等の活性を示すことなどが明らかになり、抗真菌剤の MIC 値の測定における培地の重要性が確認された。しかし、いずれの培地でも FCZ の *in vitro* 活性は低く、*in vivo* での優れた活性と相関する値は得られなかった。5-FC に対して、50 株中 3 株が 12.5 μg/ml 以上の高い MIC 値を示した。IC₅₀ 値で比較した場合、MCZ, ITZ および AMPH では、0.07~0.1 μg/ml の値を示し、FCZ, 5-FC ではそれぞれの IC₅₀ 値は 1.91 および 2.4 μg/ml であった。薬剤間の併用で、相乗効果は、FCZ, MCZ, ITZ とアリアルミン系の terbinafine (TBF) とで認められたが、AMPH とアゾール系薬剤および TBF の間では、逆に拮抗現象が観察された。

Key words : 抗真菌剤, MIC 値, IC₅₀ 値, 相乗作用, *Cryptococcus neoformans*

クリプトコックス感染症に対する化学療法剤の分野にも、新たな進展が見られる¹⁾。アゾール系の薬剤として、新たに毒性の極めて低い fluconazole (FCZ) が臨床²⁾に供され、さらに itraconazole (ITZ) も近く臨床応用されるようになると思われる。一方古くから用いられてきた amphotericin B (AMPH) においても、経口投与方法³⁾が新たに加えられ、さらにリポソームやモノクローナル抗体による投与方法等新しい展開⁴⁾が見られるようになってきた。

そこで深在性の真菌症の治療剤として本邦で用いられている AMPH, flucytosine (5-FC) および miconazole (MCZ)、さらに最近臨床応用された FCZ、また臨床応用への基礎的研究段階にある ITZ について *Cryptococcus neoformans* に対する *in vitro* 活性を、臨床分離株 38 株、さらには教室保存および標準株を 12 株を用いて、MIC (Minimum inhibitory concentration) 値⁵⁾と IC₅₀ (50%

Inhibitory concentration of growth) 値⁶⁾について検討したので報告する。またこれらの薬剤間での、*in vitro* での併用作用を、最近経口投与での有効性が報告されているアリアルミン系の terbinafine (TBF)⁷⁾を含めて検討したので、あわせて報告する。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

千葉大学医学部付属病院中央検査部、北里大学付属病院検査部および成田日赤病院で分離された *C. neoformans* の臨床分離株 38 株、さらに標準株および研究室保存株 12 株を用いた。それぞれの菌株は、因子血清 (ヤトロン社製) により血清型を確認して用いた。

2. 使用薬剤

AMPH (日本スクイブ)、FCZ (ファイザー製薬)、5-FC (日本ロシュ)、MCZ (持田製薬)、ITZ (Janssen

Pharmaceutical Co., Ltd, Belgium) の原薬を用いた。TBF は新たに合成したものをを用いた。AMPH, FCZ, MCZ, ITZ および TBF は dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解後、等量の methanol を加え滅菌し、その後 DMSO の最終濃度が 1% 以下になるように生理食塩水で希釈した。5-FC については、生理食塩水に溶解後、methanol を等量加えて滅菌し使用した。

3. *In vitro* 活性の測定

(1) MIC 値の測定

MIC 値はすでに報告した方法^{3,5)}に準じた寒天希釈法により行った。培地はサブロー培地 (Sabouraud dextrose agar, SDA, 栄研)³⁾、感受性ディスク用培地 (KDA, パールコア, 栄研) および Yeast morphology agar (YMA, Difco) を用いた。接種菌液は 27°C で 7 日間 0.1% yeast extract を添加した SDA スラントで培養したものより細胞濃度が 1×10^6 個/ml になるように生理食塩水で調整し、マルチポイントイノキュレータ (Multipoint Inoculator A 400, Denley, England) でスポット当り約 0.005ml を接種した。判定は 27°C で培養後、5 日目に行った。

(2) IC₅₀ 値の測定

乱数表によって、38 株から無作為に 8 株の *C. neoformans* を選んで実験した。IC₅₀ 値⁹⁾の決定は以下の微量液体培地希釈法により濁度を測定することによって行った。すなわち、マルチプレート (96 穴, 住友ベークライト) に、2 倍濃度に作製した Yeast nitrogen base (YNB, Difco) にグルコースを 2% 添加して、MOPS バッファーで pH を 7.0 に調整し (最終濃度が 1/15M)、濾過滅菌した培地 (B-YNB 培地) を作製した。薬剤は B-YNB 培地で、それぞれの薬剤の 2 倍希釈系列を作り、各ウェルあたり 100 μ l 分注した。前述の菌浮遊液、50 μ l および生理食塩水 50 μ l をさらに分注後、27°C で 1 週間静置培養し、プレートアナライザー ETY-III (東洋測器) で測定し、薬剤無添加群と薬剤添加群でまったく生育の認められない群との比較で、増殖が濁度で 50% 抑制された最小薬剤濃度をアナライザーで測定した濁度より求め、IC₅₀ 値とした。

(3) 相乗効果の測定

濾紙ディスク法により定性的に併用効果を検討した。まず 2 mg/ml 含む各薬剤液に濾紙ディスク (Advantec, Thick 8 mm) を浸して風乾した。YMA 培地で 1×10^5 個/ml の *C. neoformans* を含む寒天平板を作製し、上記薬剤含有の濾紙を寒天平板上におき、27°C で 1 週間培養後、阻止円の拡大、融合の有無を観察した。また、定量的には 96 穴のマイクロプレートを用い、IC₅₀ 値の測定に用いた条件下で、checkerboard 法による 2 倍

希釈の様々な濃度の組合せを作製し、各薬剤存在下および単独での MIC 値を測定し、その結果から FIC index⁹⁾を求めた。

II. 成 績

臨床分離株の MIC 値の分布：

臨床分離株について YMA, SDA および KDA の 3 種の培地を用いて *in vitro* 感受性分布を調べた (Fig. 1a, 1b, 1c)。AMPH に関しては、いずれの培地でもほぼ同様の低い MIC 値の分布を示したが、中でも YMA 培地で MIC 値が低くなる傾向が観察され、その時の MIC₅₀ 値は 0.15 μ g/ml であった。一方アゾール系の MCZ では SDA 培地で、低い MIC 値が観察された。FCZ では KDA 培地で MIC 値が低くなる傾向が見られた。同じアゾール系の ITZ では KDA と YMA 培地で低い MIC 値が観察された。FCZ では一般にいずれの培地でも強い活性は観察できなかったが、3 種の培地の中では、KDA 培地で最も強い活性が観察され、その時の MIC₅₀ 値は 25 μ g/ml であった。5-FC では YMA 培地で低い MIC 値が観察され、その時の MIC₅₀ 値は 0.78 μ g/ml であった。5 薬剤に対して耐性菌と考えられる株は、YMA 培地で観察された 3 株 (6%) の 5-FC 耐性菌であった。

IC₅₀ 値での比較：

マイクロプレートリダーで測定し、決定したこれら 5 薬剤の *C. neoformans* に対する IC₅₀ 値を Table 1 に示した。38 株からランダムに選んだ 8 株の *C. neoformans* では、AMPH に対する IC₅₀ 値は 0.05 から 0.2 μ g/ml に分布し、また 8 株の平均の IC₅₀ 値は 0.10 μ g/ml であった。5-FC ではその IC₅₀ 値は、0.1~6.25 μ g/ml と幅広い範囲に分布していた。FCZ の IC₅₀ 値は 1.56~3.12 μ g/ml の範囲にあり、その平均値は 1.9 μ g/ml であった。MCZ では IC₅₀ 値が 0.05~0.2 μ g/ml で、その平均の IC₅₀ 値は 0.08 μ g/ml であった。新たに、臨床試験の研究が進んでいる ITZ では、IC₅₀ 値は、0.05~0.1 μ g/ml に分布し、その平均 IC₅₀ 値は 0.07 μ g/ml であった。

抗真菌剤の併用効果：

はじめに、ディスク法で定性観察を目的に、増大、減少および不完全阻止から完全阻止への変換を臨床分離株 38 株から、ランダムに 4 株を選び検討した。その結果を阻止円の明かな減少が観察された場合を拮抗 (A) とし、また不完全阻止像から完全阻止像への変化等明らかに阻止像の拡大や増強が認められた場合を相乗効果 (S) として、Table 2 にその結果をまとめた。また用いた 4 株はほぼ同様の阻止円を示したので、その中の *C. neoformans* CUH 12 株での阻止円について

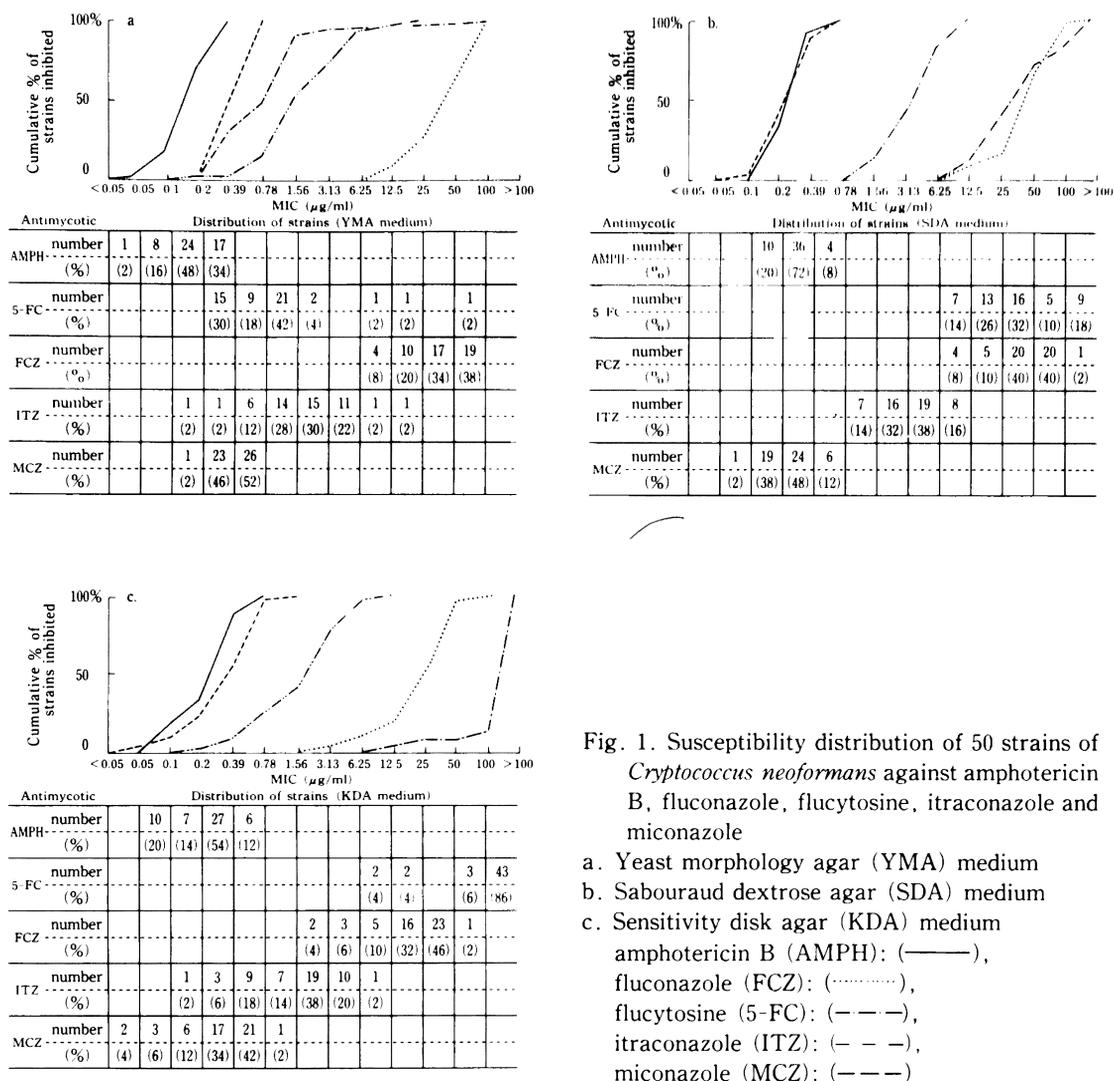


Fig. 1. Susceptibility distribution of 50 strains of *Cryptococcus neoformans* against amphotericin B, fluconazole, flucytosine, itraconazole and miconazole

a. Yeast morphology agar (YMA) medium
 b. Sabouraud dextrose agar (SDA) medium
 c. Sensitivity disk agar (KDA) medium

amphotericin B (AMPH): (—),
 fluconazole (FCZ): (·····),
 flucytosine (5-FC): (---),
 itraconazole (ITZ): (- - -),
 miconazole (MCZ): (---)

Table 1. Antifungal activity of amphotericin B, flucytosine, fluconazole, itraconazole and miconazole against *Cryptococcus neoformans* as determined by IC₅₀ values^{a)}

Organism	IC ₅₀ value ranges (μg/ml) and the mean values ^{b)}				
	AMPH	FCZ	5-FC	MCZ	ITZ
<i>C. neoformans</i>	0.05-0.2	1.56-3.12	0.1-6.25	0.05-0.2	0.05-0.1
(8 strains) ^{c)}	0.10	1.91	2.40	0.08	0.07

^{a)} See materials and methods for the determination of IC₅₀ values.

^{b)} Geometric means.

^{c)} All strains were serotype A.

Table 2. Summary of *in vitro* combination effects of antimycotics against *Cryptococcus neoformans* (by paper disk method)

Antifungals	ITZ	MCZ	FCZ	5 FC	AMPH	TBF
ITZ		N	N	N	A	S
MCZ	N		N	N	A	S
FCZ	N	N		N	A	S
5 FC	N	N	N		N	N
AMPH	A	A	A	N		A
TBF	S	S	S	N	A	

TBF, terbinafine

Combination effect: N, no effect; A, antagonistic; S, synergistic

Table 3. Combination effect of five antimycotics against four clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*

Drug combination	FIC index ^{a)} (number of strains / tested strains)	
	≤0.5 (synergy)	>0.5 (partial synergy or no interaction)
AMPH + MCZ	0 / 4	4 / 4
AMPH + ITZ	0 / 4	4 / 4
AMPH + FCZ	0 / 4	4 / 4
AMPH + 5-FC	1 / 4	3 / 4
AMPH + TBF	1 / 4	3 / 4
FCZ + TBF	4 / 4	0 / 4
MCZ + TBF	3 / 4	1 / 4
ITZ + TBF	4 / 4	0 / 4
5-FC + TBF	2 / 4	2 / 4

^{a)} FIC index was determined by the method of reference 8.

の観察結果を Fig. 2 に示した。阻止円の減少は、AMPH とすべてのアゾール系の薬剤間 (Fig. 2 a, b) で、また AMPH と TBF 間でも (Fig. 2 c) 同様に観察され、これら薬剤間では、拮抗作用が働くものと思われた。一方 TBF とアゾール系の FCZ, MCZ および ITZ (Fig. 2 d) との間では、強い完全阻止像の出現が観察され、明かな相乗効果が確認された。しかし、すでに臨床的に併用が行われている 5-FC と AMPH では、その阻止円には変化は観察できなかった。これら

観察された併用効果を、FIC index として、微量液体希釈法により検討し、その結果を Table 3 に示した。AMPH とアゾール系の薬剤間では、FIC index はすべての株でいずれも 0.5 以上を示し、拮抗作用が確認された。一方アゾール系の薬剤 (FCZ, MCZ, ITZ) と TBF の間では、ほとんどの株で FIC index が 0.5 以下と、定性的に観察された相乗効果が、定量的にも確認できた。しかし、AMPH と 5-FC 間では 4 株中 1 株に 0.5 以下の FIC index が観察されたにすぎなかった。

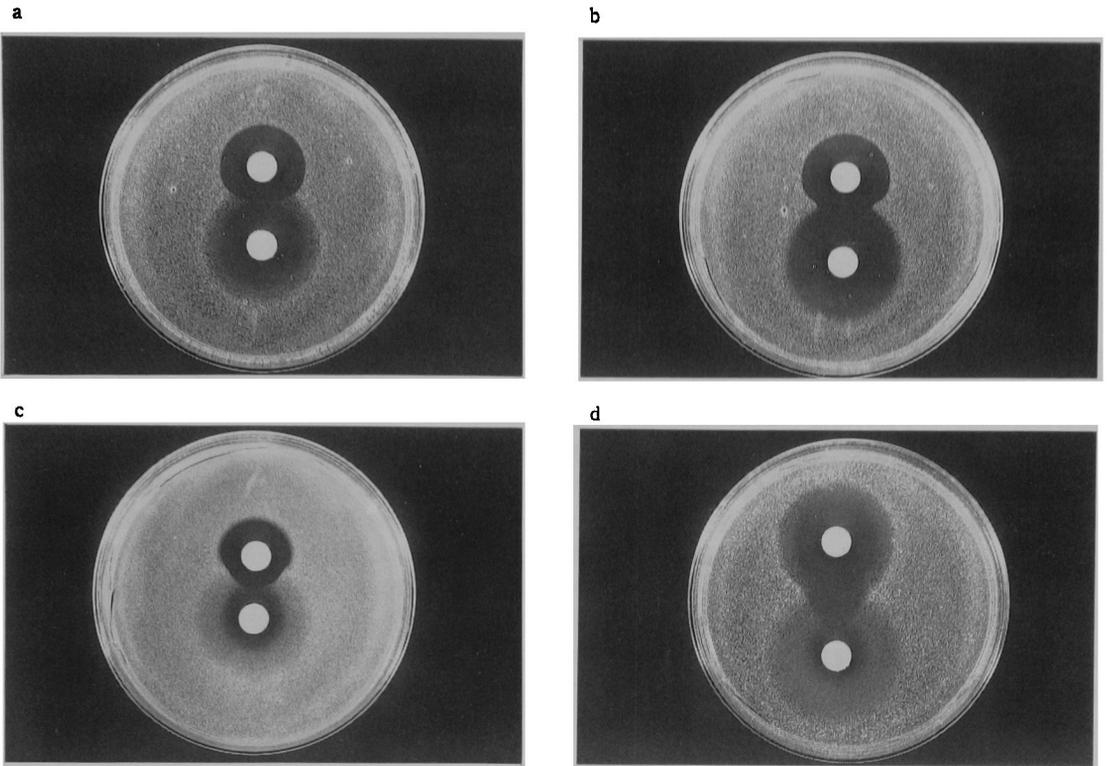


Fig. 2. *In vitro* antagonistic and synergistic effects of antimycotics against *Cryptococcus neoformans* CUH 12 strain by paper disk method

- Antagonistic effect with the combination of amphotericin B (upper disk) and miconazole (lower disk).
- Antagonistic effect with the combination of amphotericin B (upper disk) and itraconazole (lower disk).
- Antagonistic effect with the combination of amphotericin B (upper disk) and terbinafine (lower disk).
- Synergistic effect with the combination of terbinafine (upper disk) and itraconazole (lower disk).

III. 考 察

本邦においては AMPH, MCZ, 5-FC およびそれらの併用が臨床的にクリプトコックス症の治療に用いられてきた⁹⁾。最近、ヒストリアゾール系の FCZ²⁾が用いられるようになり、またケトコナゾールに構造的類似性のあるトリアゾールの誘導体 ITZ¹⁰⁾も、臨床面での基礎的研究がすみ、近い将来に臨床応用が可能と思われるなど、新しい展開が見られる。クリプトコックス症は、最近では、その診断法や、原因菌の同定法も確立¹¹⁾してきたことから、ここでは、深在性の真菌症の治療薬として用いることが可能な5薬剤について、臨床分離の *C. neoformans* に対する *in vitro* 活性を検討してみた。用いた臨床分離株についての血清型を検討

したところ、B型が2株あった以外は、他はすべてA型であった。そこでC, D型の標準株を含めて、血清型と薬剤感受性との関係について検討したが、特別な関係は観察できなかった。

今回の MIC 値のデータで特徴的な現象は、すでに *A. fumigatus* や *C. albicans* で報告^{3,5,6)}したと同様の5~10%の割合で、5-FCに耐性株が観察されたことである。これらの株の中には臨床的に5-FCの使用が確認できないものもあり、このことがすでに実験室で証明されている抗癌剤の5-fluorouracil (5-FU) により誘導される5-FC耐性菌¹²⁾とどのような関連があるのか興味ある検討課題である。いずれにしても、5-FC耐性と考えられる株が *A. fumigatus* や *C. albicans* と

同じような割合で存在することから、これら薬剤の使用に際しては、注意が必要である。

真菌の薬剤の感受性試験では、多くの場合 SDA を中心に YMA 培地およびそれらの pH を 7.0~7.4 に修正した培地が用いられている。今回は、合成培地である YMA と最もよく真菌の感受性試験に用いられている SDA 培地と、またこれまで我々が、AMPH やアゾール系の薬剤の活性の測定において、低い MIC 値や、MIC 値の判定の容易さ、さらには培地のロット間のばらつきが少ない点で優れていることを報告³⁾してきた KDA 培地を用いて検討した。その結果、*C. neoformans* に対して、AMPH では、1~2 管程度の差はあるものの、いずれの培地でも低い MIC 値が観察され、AMPH に対する耐性株の出現も見られず、依然として優れた活性を持つことが確認された。ITZ や FCZ では、KDA 培地で、より低い MIC 値が、また MCZ では SDA 培地で、低い MIC 値が観察され、同じアゾール系の薬剤でも、酸性で活性が高いものと、中性から弱アルカリ性で活性が高まるものがあることが確認された。その理由は複雑であるが、特に MCZ や ITZ では、活性の測定用の培地の成分や pH の変化により、*in vitro* 活性がかなり異なることから、溶解性が重要な役割を果たしている可能性がある。このことは、また新しい薬剤のスクリーニングにおいて、重要であるかも知れない。特に皮膚の pH が比較的酸性であることから、外用剤は酸性で活性が高い方がより有効であり、また深在性真菌症に対する薬剤は、中性から弱アルカリ性で、活性が高い方がより有利と思われる。実際に現在臨床的に用いられている薬剤の多くが、このパターンに当てはまる¹³⁾のも、興味のあることからである。

FCZ は最近臨床に供された新しいトリアゾール系の薬剤で、すでにその MIC 値に基づく *in vitro* 活性が *in vivo* 活性を反映しない代表的な薬剤として、報告¹⁴⁾されてきた。今回の *C. neoformans* に対する感受性の比較検討でも、やはり *in vivo* 効果を反映すると思われる結果は観察できなかった。そこで、最近これらアゾール系の薬剤で、*in vivo* の効果を反映する指標として、利用され始めた IC₅₀ 値を検討した。その結果は *C. albicans* や *A. fumigatus* で報告⁶⁾したように、FCZ でも IC₅₀ 値は MIC 値の 1/10~1/50 程度の低い値を示す傾向が観察され、IC₅₀ 値が、これら薬剤の臨床効果をより反映するものと思われる。一方、AMPH、ITZ、MCZ のように、低い MIC 値を示す薬剤では、IC₅₀ 値は、MIC 値の 1/3~1/10 程度とそれほど変化はないのが特徴であった。最近、我々は、米国でその臨床研究

が進み、FCZ よりさらに優れた効果を発揮するとされている SCH 39304¹⁵⁾ を化学的に合成し、その活性を検討したが、ITZ や MCZ とは異なり、その活性の発現様式は FCZ¹⁶⁾ と類似しており、高い、MIC 値を示すにもかかわらず、強い *in vivo* 効果を発揮することを確認しており(未発表データ)、このような新しいタイプのトリアゾール系の薬剤では IC₅₀ 値の示す役割がより重要と思われる。

5-FC では、IC₅₀ 値がかなり変動する結果が得られたが、その理由としては、5-FC 処理により、すでに報告したように *C. neoformans* 細胞のサイズが増大¹⁷⁾ することが考えられる。したがって、5-FC の IC₅₀ 値の測定法としては、すでに報告⁵⁾した微生物自動増殖解析システムのように、測定の時間を正確にコントロールして行う方法がより優れているかも知れない。しかし、96 穴のプレートを用いる本法は、高価な微生物自動増殖解析システムを用いる場合と違って、実験室に一般的に備えられている読みとり装置で行うものであり、一枚のプレートで 8 被検菌の IC₅₀ 値が測定可能で、その上、本法は、特にアゾール系の薬剤の IC₅₀ 値の測定に適していることや、さらに薬剤および培地成分も微量ですむなどの利点もあることから、5-FC の活性の測定に関してはさらに検討を進める予定である。

抗細菌化学療法の分野ではすでに多くの薬剤間で併用療法が試みられているが、抗真菌剤に関しては、AMPH と 5-FC との併用が、クリプトコックス症の治療に用いられているにすぎない。今回明らかになったことは、AMPH とアゾール系の ITZ、FCZ および MCZ との間では、その作用は拮抗的であり、特に AMPH の作用が抑制される傾向にあることが明らかになった。一方すでに臨床的に用いられている AMPH と 5-FC との間では、相乗作用はペーパーディスク法では観察できなかったが、FIC index の結果からでは、弱いながら相乗効果の観察される株も見られた。やはり、この場合の AMPH の相乗作用は、生体内での耐性菌の出現の減少に関係している可能性が高いように思われる。

ITZ、FCZ や MCZ などのアゾール系の薬剤と TBF との間での、*in vitro* での相乗効果は *C. albicans* についても報告¹⁸⁾してきたが、今後詳細な動物実験での研究が望まれる。アリルアミン系やアゾール系の薬剤の主たる作用は、いずれも真菌細胞のエルゴステロール合成阻害であり、TBF がスクワレンエポキシゲナーゼという、比較的初期の段階を、またアゾール系の薬剤が比較的後期の段階を障害するという相違点があるものの、共通の代謝経路上に作用点を持つ物質が示す相乗

機構のメカニズムの解析は興味あることからである。TBFは担子菌系の酵母を除いて、一般には酵母型真菌にはほとんど活性を示さず、静菌的な作用を示すことを特徴とするが、今回のこの相乗作用が殺菌的作用の増強だけを導くのかどうかの検討も必要である。抗真菌剤の真菌細胞に対する作用様式は、同一の薬剤でも、いくつかの異なった機構の存在が報告されている。また *in vitro* の阻止円だけを観察しても、完全阻止像から不完全阻止像、さらには菌の形態変化の誘導等、極めてその作用は複雑である。やはり、抗真菌剤の相乗効果の測定には、動物モデルで行うことが必須のように思われる。

謝 辞

臨床菌株を分与して下さった北里大学医学部病理、久米 光先生に感謝致します。また *C. neoformans* の血清型決定のための因子血清を分与していただいたヤトロン株式会社に感謝します。本研究の一部は千葉大学真核微生物研究センター共同研究経費（'89-7）で行った。

文 献

- 1) Saag M S, Dismukes W E: Azole antifungal agents: Emphasis on new triazoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1~8, 1988
- 2) 岡 慎一, 時津 学, 毛利 洋, 中田 光, 後藤美江子, 後藤 元, 島田 馨: Fluconazoleの臨床的検討。 *Jpn. J. Antibiot.* 42: 31~39, 1989
- 3) 三上 襄, 陳 豪勇, 矢沢勝清, 宇野 潤, 新井正, 菅野治重: Amphotericin Bの *in vitro* および *in vivo* 活性の再評価。 *真菌誌* 28: 373~384, 1987
- 4) Gondal J A, Swartz R P, Rahman A: Therapeutic evaluation of free and liposome-encapsulated amphotericin B in the treatment of systemic candidiasis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1544~1548, 1989
- 5) Yazawa K, Mikami Y, Uno J: *In vitro* susceptibility of *Nocardia* sp. to a new fluoroquinolone, tosofloxacin (T-3262). *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 2140~2141, 1989
- 6) 三上 襄, 矢沢勝清, 宇野 潤, 松前昭廣: 臨床分離 *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* および *Trichosporon beigelii* の amphotericin B に対する *in vitro* 感受性, 特に IC₅₀ 値での flucytosine, miconazole および fluconazole との比較。 *Chemotherapy* 38: 1039~1047, 1990
- 7) Stutz A: Synthesis and structure-activity corre-

lations within allylamine antimycotics. *Ann. New York Acad. Science* 544: 46~62, 1988

- 8) 大井好忠, 川原元司, 島田 剛, 後藤俊弘: β -Lactam 薬とアミノ配糖体の *in vitro* に於ける併用効果。 *臨床医* 12: 170~174, 1986
- 9) 伊藤 章: 抗真菌剤の使い方, 医薬ジャーナル社, 1988
- 10) Van Cutsem, J, Van Gerven F, Van De Ven M A, Borgers M, A J Jansen P: Itraconazole, a new triazole that is orally active in aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26: 527~534, 1984
- 11) 池田貞雄, 小西孝明, 石田久雄, 塩田哲広, 端健, 小崎 寛, 光岡明夫, 畠中睦郎, 松原義人, 船津武志: 肺クリプトコックス症の血清学的診断。 *真菌誌* 31: 39~65, 1990
- 12) 三上 襄, 新井 正: 抗真菌化学療法剤, 5-fluorocytosine の作用機序, とくに *Candida albicans* に対する選択毒性に関する研究。 *真菌誌* 16: 41~49, 1975
- 13) Van Cutsem J, Van Gerven F, A J Janssen P: The *in vitro* evaluation of azoles. 1st Ed., *In vitro* and *in vivo* evaluation of antifungal agents. (Iwata K and Vanden Bossche H) pp. 51~64, 1985
- 14) Fisher M A, Shen S-H, Haddad J, Tarry W F: Comparison of *in vivo* activity of fluconazole with that of amphotericin B against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1443~1446, 1989
- 15) Mcintyre K A, Galgiani J N: *In vitro* susceptibility of yeasts to a new antifungal triazole. SCH 39304: Effects of test conditions and relation to *in vivo* efficacy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1095~1100, 1989
- 16) Troke P F, Andrews R J, Mammaer K W, Marriott M S, Richardson K: Efficacy of UK-49, 858 (fluconazole) against *Candida albicans* experimental infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 815~818, 1985
- 17) Arai T, Mikami Y, Yokoyama K, Kawata T, Masuda K: Morphological changes in yeasts as a result of the action of 5-fluorocytosine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 255~260, 1977
- 18) 宇野 潤, 三上 襄: アリルアミン系抗真菌剤およびアゾール系抗真菌剤の併用効果。 *日細菌誌* 44: 460, 1989

COMPARISON OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF
AMPHOTERICIN B, MICONAZOLE, ITRACONAZOLE, FLUCYTOSINE
AND FLUCONAZOLE AGAINST CLINICALLY ISOLATED
CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS BY MIC AND IC₅₀ VALUES,
AND THEIR COMBINATION EFFECTS

Yuzuru Mikami, Katsukiyo Yazawa, Jun Uno and Kazuko Nishimura

Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses,
Chiba University, 1-8-1, Inohana, Chiba, 280 Japan

Harushige Kanno

Clinical Laboratory, Chiba University Hospital

We studied the *in vitro* antifungal activity of amphotericin B (AMPH), flucytosine (5-FC), itraconazole (ITZ), miconazole (MCZ) and fluconazole (FCZ) against 50 strains of *Cryptococcus neoformans*. Among the cryptococci, three isolates were resistant to 5-FC, but no strains resistant to the other antimycotics were observed. As test media for the assay of AMPH and ITZ, yeast morphology agar medium (YMA) and sensitivity test medium (KDA) were found to exhibit higher activity. On the other hand, lower MIC values were confirmed with MCZ in SDA medium. Although the IC₅₀ (50% inhibitory concentration of growth) values of AMPH, ITZ, MCZ and 5-FC were very similar to those of each MIC value, considerable differences between IC₅₀ and MIC values were observed for FCZ. Synergistic effects between azole antimycotics (FCZ, ITZ and MCZ) and an allylamine antimycotic (terbinafine) were confirmed by checkerboard as well as paper disk method. But the combination of AMPH and azole antimycotics, or AMPH and terbinafine, was antagonistic.