

Semisolid-SAAMF (synthetic amino acid medium, fungal) を用いた
マイクロ希釈法の酵母状真菌に対するアゾール系抗真菌剤の
薬剤感受性測定法としての有用性について

山田 洋・河野 茂・前崎 繁文

賀来 満夫・古賀 宏延・原 耕 平

長崎大学第二内科*

(平成3年1月10日受付・平成3年2月28日受理)

1989年から1990年の間に臨床分離された、カンジダ属5菌種72株、*Cryptococcus neoformans* 2株の計74株を対象として、アゾール系抗真菌剤 miconazole, fluconazole, itraconazole の *in vitro* 抗真菌活性を、96穴プレートおよび semisolid-synthetic amino acid medium, pH 7.4 (以下 semisolid-SAAMF) を用いたマイクロ希釈法により肉眼的に測定し、その臨床的有用性につき検討した。

1. Semisolid-SAAMF による48時間培養後のMIC測定値と99%発育阻止濃度(以下IC₉₉)との相関。

Miconazole, fluconazole ではきわめて良好な相関がみられたが、itraconazole では、一部の菌種において相関は不良で、24時間での判定値がより良好な相関を示した。

2. 各種病原真菌に対する抗菌力。

Candida albicans, *Candida glabrata* に対してはおおむね miconazole が優れていた。*Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Cr. neoformans* に対してはおおむね itraconazole が優れていた。いわゆる, trailing endpoint は、比較的軽度であり、多少慣れを必要とするものの容易に判定可能であった。

3. 本法は肉眼的に比較的容易に判定可能であることに加え、1プレート当たり6株の測定が可能であるため、効率性、経済性に優れており臨床的に有用であることが示唆された。

Key words: Susceptibility test, IC₉₉, miconazole, fluconazole, itraconazole, Micro-dilution method, 96-multiwell plate

近年の各科領域の真菌症、特に深在性真菌症の増加にともない、抗真菌剤の進歩も著しく、同時に、これらに対する薬剤感受性試験の確立が急務となっている。今回、病原酵母様真菌に対して、臨床的に有用と思われる測定法を検討したので報告する。

1. 材料と方法

1. 被検薬剤

Miconazole, fluconazole, itraconazole の3種のアゾール系薬剤につき検討した。Miconazole (Lot No.S 423502) は持田製薬より、fluconazole (Lot No.R-22) はファイザー製薬より、itraconazole (Lot No.A 3201) はヤンセン協和より分与を受けた。

2. 被検菌株

1989年から1990年にかけ、長崎大学第二内科において分離同定し、保存された臨床分離カンジダ属5菌種72株(*Candida albicans* 43株, *Candida glabrata* 10株, *Candida tropicalis* 8株, *Candida parapsilosis* 6株, *Candida krusei* 5株)および *Cryptococcus neoformans* 2株、計74株を対象とした。

3. 96穴プレートおよび semisolid-SAAMF を用いたマイクロ希釈法による感受性測定

まず、接種菌の発育相を一致させるために、被検菌株を改変 Sabouraud glucose broth (1% Mycological peptone, Oxoid; 0.2% glucose, pH 5.5) 中で、25°C, 20時間培養を行った。その後、滅菌生理食塩水で希釈し、10⁵ CFU/ml の濃度に調整し、これを菌液とした。測定用培地は、synthetic amino acid

* 長崎市坂本町7-1

Table 1. Contents of one well of susceptibility testing plate

Semisolid SAAMF	
SAAMF* (2×)	98 μ l
0.5% Agar Noble	98 μ l
Drug Solution (100×)	2 μ l
Cell Suspension (10^6 CFU/ml)	2 μ l
Total	200 μ l

*SAAMF: synthetic amino acid medium, fungal

medium, fungal (以下 SAAMF, pH 7.4) に、あらかじめ調整した 0.5% agar noble (Difco) を等量加え、半流動の状態にした semisolid-SAAMF を用いた。各薬剤はいずれも終濃度の 100 倍になるように dimethyl sulfoxide (DMSO) により溶解し希釈した。終濃度としては、各薬剤とも 100 μ g/ml を最高濃度に、以下 2 倍希釈して 0.0125 μ g/ml を最小濃度とし、薬剤無添加の対照を含め 1 被検菌株あたり 15 濃度とした。したがって、96 穴プレート (FALCON 3072) を用いた本試験法においては、縦 2 列ごとに 1 株の試験が可能であり、プレート 1 枚あたり 6 株の試験が施行できた。Table 1 に実際に 96 穴プレートを用いて感受性試験用培地を作成するときの各容量を示した。プレートを作成する際は、まず、薬液、SAAMF、0.5% agar noble の順に分注し、半流動状態になったことを確認後、菌液の接種を行った。培養は 30°C、48 時間行い (一部では 24 時間もあわせて行った)、判定はコントロールが十分に発育していることを確認したのち、肉眼的に発育がまったく認められないか、著明に発育が抑制されている濃度を MIC とした。なお、以上の測定を 1 被検菌株につき duplicate で行い、これを 2 回繰り返した。また品質管理用菌株として、当科の臨床分離株である *C. albicans* YF-133 株を用い、各測定ごとに発育状況、および再現性の指標とした。

4. SAAMF による IC₉₉ の測定

前出の被検菌株の中から、*C. albicans* 5 株、他のカンジダ属からは各 2 株ずつを任意に選択し、これに *Cr. neoformans* 2 株を合わせた計 15 株を対象として、山口らの方法¹⁾にしたがい、IC₉₉ の測定を行った。すなわち、被検菌株を前出の改変 Sabouraud glucose broth 中で同様に 25°C、20 時間培養後、滅菌生理食塩水で希釈し、 10^4 CFU/ml の濃度に菌液を調整した。これを、上記と同様の段階希釈系列の薬剤を

含有する SAAMF に 1/100 容接種し、30°C、24～48 時間培養した。対照培養の菌数が 10^5 CFU/ml 以上であることを顕微鏡下で確認し、各管から菌液を採り、0.1% Tween 80 加滅菌生理食塩水で適当に希釈後、Sabouraud glucose agar 上へ塗布した。30°C、48 時間培養後、コロニー数より生菌数を算定し、対照培養の菌数に比べ 1/100 以下に菌数の増加を抑制した最小薬剤濃度を IC₉₉ とした。これを計 3 回繰り返し行い、同一菌株を対象として同じく計 3 回測定した semisolid-SAAMF による MIC 値との相関性を検討した。

II. 結 果

1. Semisolid-SAAMF による測定値と IC₉₉ との相関

Figs. 1～3 に両測定法により、繰り返し計 3 回行った測定結果を示した。

1) Miconazole (Fig. 1)

本剤に関しては、被検菌種全株で両測定値間に良好な相関が見られた ($R=0.95$)。

2) Fluconazole (Fig. 2)

本薬剤に関しても、同様に、被検菌種全株で両測定値間に良好な相関が見られた ($R=0.93$)。

3) Itraconazole (Fig. 3)

本剤では、他の 2 剤と異なり、菌種により、相関が良好なもの和不良なものに分かれた。すなわち、*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* では

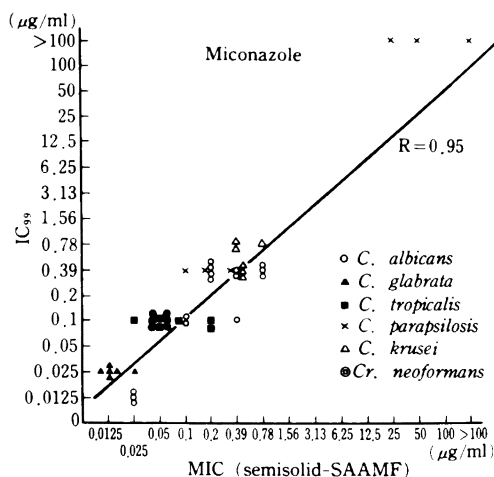


Fig. 1. Correlation between MICs obtained by semisolid-SAAMF method and IC₉₉ of miconazole.

SAAMF: synthetic amino acid medium, fungal
IC₉₉: 99% inhibitory concentration

両測定値間の差は2管以内とほぼ良好な一致を認めたが、*Cr. neoformans*では6回の測定中2回に両測定値間で3管の差がみられた。しかし、*C. albicans*では相関が不良であり、semisolid-SAAMFによるMIC値がIC₉₉に比較してすべて高い傾向がみられた。特に、一部の菌株では、IC₉₉が0.025 µg/mlであったのに対し、semisolid-SAAMFによるMICは100 µg/ml以上と大きな解離が認められた。しかしながら、closed circleで示したように判定時間を24時

間とした場合、比較的良好な相関が得られ、*C. albicans*では、48時間より24時間での判定が望ましいものと考えられた。本条件下で測定した場合、全菌株における相関計数は0.66であった。

2. Semisolid-SAAMFによるアゾール系薬剤の各種臨床分離株に対する感受性

1) Miconazole (Fig. 4)
カンジダ属5菌種の中では、*C. glabrata*は本剤に対し最も高い感受性を示し、全株が0.0125 µg/mlと、きわめて低い濃度で発育が抑制された。ついで、*C. tropicalis*、*C. albicans*、*C. krusei*、*C. parapsilosis*の順であり、MIC₈₀はそれぞれ、0.1、0.39、0.78、6.25 µg/mlであった。また、*C. parapsilosis*については感受性群と非感受性群の二峰性を示し、耐性化が一部にみられた。*Cr. neoformans*は菌株数が少ないものの、0.05 µg/mlで発育が抑制された。

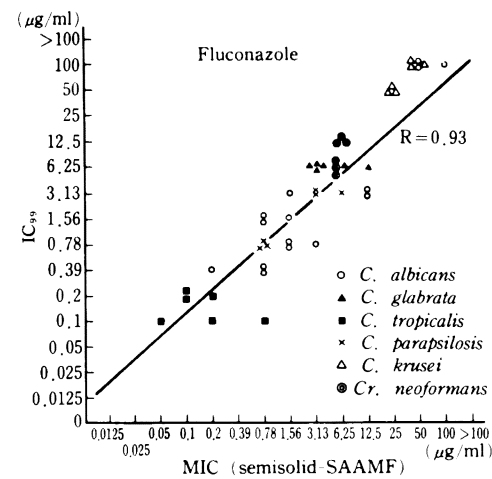


Fig. 2. Correlation between MICs obtained by semisolid-SAAMF method and IC₉₉ of fluconazole.

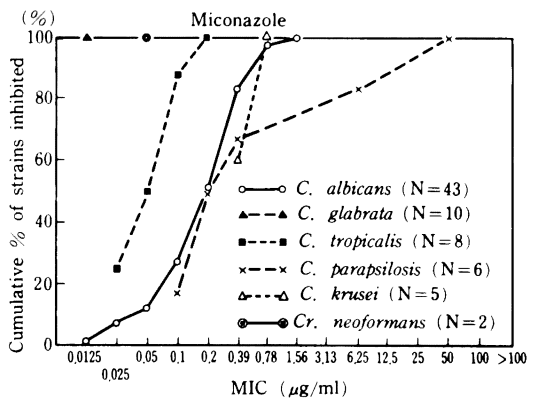


Fig. 4. Sensitivity distribution of clinical isolates of miconazole.

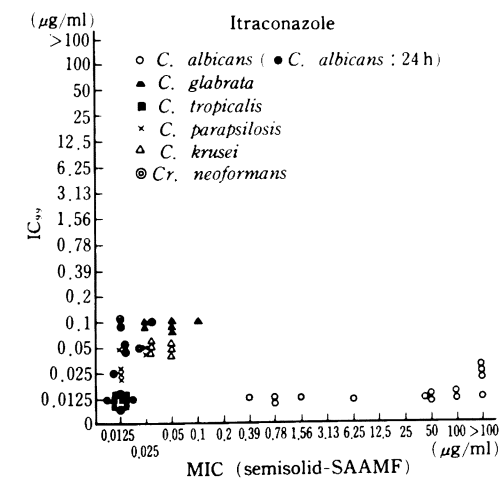


Fig. 3. Correlation between MICs obtained by semisolid-SAAMF method and IC₉₉ of itraconazole.

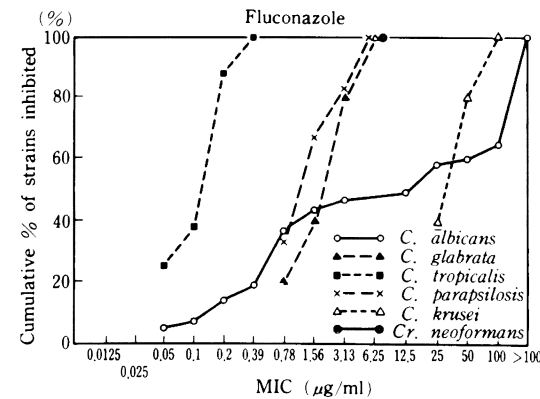


Fig. 5. Sensitivity distribution of clinical isolates of fluconazole.

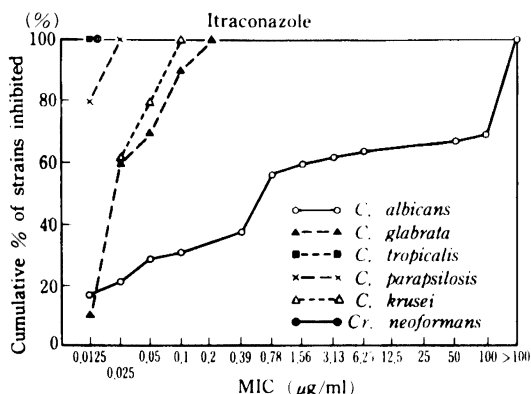


Fig. 6. Sensitivity distribution of clinical isolates of itraconazole.

2) Fluconazole (Fig. 5)

全体的に MIC 値は高く、カンジダ属菌種の MIC₅₀ は、良好な順に各々、*C. tropicalis* で 0.2 µg/ml, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* はともに 3.13 µg/ml, *C. krusei* で 50 µg/ml, *C. albicans* では 100 µg/ml 以上であった。*C. albicans* では、高感受性群と非感受性群の二峰性の分布が認められた。*Cr. neoformans* の MIC は 6.25 µg/ml であった。

3) Itraconazole (Fig. 6)

48 時間後の判定における結果を示した。*C. albicans* では、fluconazole と同様に高感受性と非感受性の二峰性に分かれる傾向を示した。他の菌種では良好な感受性を示し、それぞれ MIC₅₀ は *C. parapsilosis* で 0.0125 µg/ml, *C. krusei* で 0.05 µg/ml, *C. glabrata* で 0.1 µg/ml であり、*C. tropicalis*, *Cr. neoformans* では全株が 0.0125 µg/ml の低濃度で発育が抑制された。

III. 考 察

抗真菌剤の感受性測定試験における現在の問題点は、第一に標準法と呼べるものがなく、臨床的側面から考えると、従来法の多くは、やや煩雑に過ぎると思われること、第二に *in vitro* と *in vivo* における成績が、一部の薬剤を除いて相関に乏しいことの、ほぼ二点に集約されると思われる。今回、我々は、精力的に開発が進められているアゾール系薬剤について、効率的な感受性測定法を検討した。

アゾール系薬剤の感受性試験法における問題は、まず、MIC 値が種々の条件により影響を受けやすいこと、すなわち、接種菌量や培地の種類、pH、被検菌の発育相や発育速度、培養条件などにより、同一菌株の同一薬剤に対するものであっても、感受性は著しく

異なることが報告されている²⁻⁴⁾。

従来の酵母様真菌に対する肉眼的な感受性測定法としては、大別して、寒天平板法⁵⁾、液体培地法、および中間的な半流動培地法などがあり、それぞれの施設で、独自の方法で施行されているのが現状と思われる。寒天平板法は、一度に多数の菌株の感受性試験が施行できる利点があるが、培地の作成が煩雑であること、薬剤と接種菌の接触が充分でないため、一般に MIC 値が高い傾向を示すなどの点が指摘できると思われる。液体培地では培地の作成は比較的簡便であるが、多数の菌株の処理に適当でないこと、一部の菌種では菌膜形成傾向があるために、肉眼的判定に困難をきたすことがある。今回、我々が検討した半流動培地法は、試験培地の作成が、やや煩雑であるものの、これらの欠点のある程度補い、被検菌の充分な発育と、薬剤との良好な接触が比較的両立されるものとして期待されうる。また、液体培地を用いて、MIC 2000 による半自動化の試み⁶⁾もあるが、前述の理由で、ある程度の限界があるように思われる。

半流動培地法における使用培地は、これまで、種々のものが使用されてきたが、我々は、栄養的に優れ、緩衝能が良好で、成分が明確である SAAMF を用い、これに 0.25% となるように agar noble を加え、半流動培地とした。また、本法による MIC 値を比較する対象として、標準法がない現在、最も信頼すべき試験法として、山口らの方法による IC₉₉ 値を用いた。

本法による MIC 値と IC₉₉ 値は、miconazole, fluconazole ではきわめて良好な相関を示したが、itraconazole において、特に *C. albicans* で相関が不良であったが、判定時間を他の 48 時間から 24 時間へ短縮することにより、良好な相関となり、24 時間での判定がこの系においては適当であることが示唆された。

Fluconazole の MIC 値は、全般的に、他の抗真菌剤に比較して著しく高値であった。従来から、優れた *in vivo* 実験効果^{7,8)}や臨床効果と一致しない傾向が指摘されていた^{9,10)}が、本法においても、やはり同様の傾向が認められ、*in vivo* 効果との解離は、依然として大きな問題であった。

また、アンホテリシン B では、あまり問題にならないが、本系薬剤では、薬剤濃度を上昇させても完全発育阻止を示さないことが報告されている⁶⁾。いわゆる trailing endpoint が、薬剤や被検菌の種類により程度に差はみられるものの、避けられないことである。つまり、判定に際しては、判定者の主観を完全に除くことは不可能であると思われる。今回の検討により、

trailing endpoint は miconazole で見られないが、最も軽度でほとんど無視しうる程度であったが、fluconazole, itraconazole では軽度見られた。そのため、判定には多少慣れを必要とするものの、肉眼的に容易に判定可能であった。

本法の臨床的有用性としては、第一に肉眼的に比較的容易に判定可能であること、第二に 1 プレートあたり 6 株の感受性が測定でき、これまで報告された諸法に比し効率的であること、第三に培地および試薬が微量で済むため、経済的であることが指摘できる。しかし、測定用培地の作成自体は煩雑ではないものの、従来法と比べ、きわだって簡便とは言えず、改良の余地を残している。

謝 辞

抗真菌剤原末の御提供を頂いた、持田製薬、ヤンセン協和、原末および培地を提供して頂いたファイザー製薬に深謝致します。また、本研究の実施にあたり、協力を頂いた野田哲寛氏に感謝致します。

文 献

- 1) 山口英世, 内田勝久, 川崎賢二, 松永敏幸: 新トリアゾール系抗真菌剤 Fluconazole の *in vitro* 抗真菌活性. Jap J Antibiotics 42: 1 ~ 16, 1989
- 2) Hoeprich P D, Finn P D: Obfuscation of the activity of antifungal antimicrobics by culture media. J Infect Dis 126: 353 ~ 361, 1972
- 3) Minagawa H, Kitaura K, Nakamizo N: Effect of pH on the activity of ketoconazole against *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 23:

105 ~ 107, 1983

- 4) Cook R A, McIntyre K A, Galgiani J N: Effects of incubation temperature, inoculum size, and medium on agreement of macro and microdilution broth susceptibility test results for yeasts. Antimicrob Agents Chemother. 34: 1542 ~ 1545, 1990
- 5) 平谷民雄, 山口英世: イミダゾール系抗真菌剤 Miconazole (base) の *in vitro* 抗菌活性. Chemotherapy 32: 534 ~ 540, 1984
- 6) 山口英世: 抗真菌剤の感受性試験. 検査と技術 17: 889 ~ 894, 1989
- 7) Richardson K, Brammer K W, Marriott M A, Troke P F: Activity of UK-49858, a bistriazole derivative, against experimental infections with *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. Antimicrob Agents Chemother 27: 832 ~ 835, 1985
- 8) Troke P E, Andrews R J, Brammer K W, Marriott M S, Richardson K: Efficacy of UK-49858 (fluconazole) against *Candida albicans* experimental infections in mice. Antimicrob Agents Chemother. 28: 815 ~ 818, 1985
- 9) Odds F C, Cheesman S L, Abbott A B: Antifungal effects of fluconazole (UK 49858), a new triazole antifungal, *in vitro*. J Antimicrob Chemother. 18: 473 ~ 478, 1986
- 10) Rogers T E, Galgiani J N: Activity of fluconazole (UK 49858) and ketoconazole against *Candida albicans in vitro* and *in vivo*

EFFICACY OF MICRO-DILUTION METHOD FOR TESTING
SUSCEPTIBILITY TO AZOLE ANTIFUNGAL AGENTS
USING A SEMISOLID MEDIUM (SYNTHETIC AMINO
ACID MEDIUM, FUNGAL)

Hiroshi Yamada, Shigeru Kohno, Shigefumi Maesaki,

Mitsuo Kaku, Hironobu Koga and Kohei Hara

Second Department of Internal Medicine, School of Medicine,

Nagasaki University, 7-1, Sakamotomachi, Nagasaki, Japan

We evaluated the efficacy of a susceptibility testing method for azole antifungal agents (miconazole, fluconazole, itraconazole) using a semisolid medium [synthetic amino acid medium, fungal (SAAMF), pH 7.4, plus 0.25% agar noble (Difco)] in 96-well plates. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were measured after incubation at 30°C for 48 hours. Seventy-four strains clinically isolated 1989–1990 at Nagasaki University Hospital were tested in this study, with the following results.

1) Correlation between MICs determined in semisolid SAAMF and 99% inhibitory concentration (IC_{99}): good correlation was seen between the MIC method and IC_{99} in miconazole and fluconazole, their correlation coefficients being 0.95 and 0.93. But the correlation in itraconazole was poor, particularly in *Candida albicans*. In this strain, 24 h incubation was rather favorable.

2) Antifungal activity against clinical isolates: miconazole had excellent activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Itraconazole showed superior activity against *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans*.

3) Visual determination of endpoints: so-called trailing endpoints were seen, but they were generally weak. Hence it was not difficult to determine the endpoints.

4) Efficacy of the MIC method: firstly, the MICs could be determined visually. Secondly, the method was so efficient that six isolates could be tested on one plate. Thirdly, it was economical because only very small quantities of media and reagents were required.