

寒天平板希釈法を用いたカンジダ属に対するアンホテリシン B, フルシトシンの感受性測定に関する基礎的検討

山田 洋・河野 茂・前崎 繁文・安岡 彰
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 24 日受付・平成 3 年 3 月 20 日受理)

カンジダ属に対する薬剤感受性試験における、適切な測定条件および測定値の再現性や培地の保存性などについて基礎的検討を加えた。あわせて、当科の臨床分離カンジダ属 76 株を対象に感受性測定を行った。対象薬剤としてはアンホテリシン B (AMPH-B) とフルシトシン (5-FC) を、測定用培地としては phosphate buffered saline (pH 7.0) により溶解した Yeast morphology agar (YMA) を、対照として Sabouraud dextrose agar (SDA) を使用し、寒天平板希釈法にて測定した。

1. 測定条件

(1) 接種菌量: マルチポイントイノキュレータを用いて接種する際の菌液濃度は 1×10^8 CFU/ml が適当と考えられた。 1×10^8 CFU/ml では一部の株の発育が不良であり、 1×10^7 CFU/ml では全体に MIC 値が高く、かつ菌株間の差が出にくい傾向がみられた。

(2) 培養温度: 30°C が適当と考えられた。 37°C では MIC 値が一様に高く、 30°C に比し菌株間の差が出にくい傾向がみられた。

(3) 判定時間: 48 時間が適切と考えられた。24 時間では一部の菌株が発育不良で、72 時間では同様に、菌株間の差が出にくかった。

2. 上記条件で YMA を用いて測定した臨床分離株の MIC は、AMPH-B で $0.1 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$ 、5-FC で $0.1 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ であった。SDA を用いた測定では、AMPH-B については YMA とほぼ同等の成績が得られたが、5-FC では従来の報告と同様に著明な拮抗作用が認められた。

3. 上記方法で計 3 回測定した MIC 値は、全株において差は 1 管以内であり、再現性はきわめて良好であった。

4. 測定用培地の保存は、作成後、遮光下、 4°C の条件下において、AMPH-B で 14 日間、5-FC で少なくとも 28 日間可能であった。

5. 本法は寒天 1 枚あたり 27 株の感受性測定が可能であるため、効率的であると考えられた。

Key words: アンホテリシン-B, フルシトシン, 薬剤感受性, 寒天平板希釈法, 測定条件, 保存性, yeast morphology agar

近年の深在性真菌症の増加に伴い、迅速かつ簡便で効率的な抗真菌剤の感受性測定法の確立が望まれている。一般抗生剤の場合と異なって、抗真菌剤においてははまだ標準的な感受性試験法は確立されておらず、治療面での障害の 1 つとなっている。今回著者らは、当科にて分離同定されたカンジダ属を用い、臨床的に効率が優れた寒天平板希釈法による感受性試験法の基礎的検討を行った。

1. 材料と方法

1. 対象薬剤

Amphotericin B (AMPH-B) および flucytosine (5-FC) につき検討した。AMPH-B (Lot No. 29670) はプリストルマイヤーズ・スクイブ社より、5-FC (Lot No. A 339423) は日本ロシュ社より分与された。

* 長崎市坂本町 7-1

2. 対象菌株

1988年から1990年にかけ、長崎大学第二内科において分離同定され、保存されていたカンジダ属5菌種76株を対象とした。内訳は、*Candida albicans* 46株、*Candida glabrata* 10株、*Candida tropicalis* 8株、*Candida parapsilosis* 6株、*Candida krusei* 6株であった。菌株は、あらかじめ potato dextrose agar (Difco) 上で30°Cで48時間、前培養した後、試験に供した。

3. 測定用培地

1/15 M phosphate buffered saline (pH 7.0, ヤトロロン) により溶解した yeast morphology agar (Difco, 以下 YMA), および対照として Sabouraud dextrose agar (Difco, 以下 SDA) に、100倍濃度になるよう作成した薬液を1%の割合で混合し、終濃度が0.0125 µg/ml から100 µg/ml までの段階濃度薬剤および薬剤無添加コントロールの、一薬剤あたり計15枚の寒天培地を作成した。温度による薬剤の失活を防ぐため、培地を50°Cまで冷却した後、培地と薬液を混合した。培地は作成後、密閉し、4°Cの暗室内で保存した。なお、薬剤の溶解ならびに希釈には、AMPH-Bではdimethyl sulfoxide (和光純薬) を、5-FCでは滅菌蒸留水を用いた。

4. 菌の接種および培養条件

被検菌は前述のごとく前培養した後、0.1% Tween 80 (第一化学薬品) 加滅菌生食水にsuspendし、計算盤を用いて、 1×10^5 CFU/ml, 1×10^6 CFU/ml, 1×10^7 CFU/ml の3濃度の菌液にそれぞれ調製し、同時に定量培養により確認した。これらの菌液を、マルチポイントインキュレータ (佐久間製作所製) を用いて寒天培地上に接種した。培養温度は30°Cおよび37°C, 培養時間は24時間, 48時間および72時間とした。上記の測定条件の検討には、*C. albicans* より4株を、他の菌種からは2株ずつの計12株を無作為に選択し実験に供した。

5. MICの判定

判定は肉眼的に行い、コントロールの発育が充分であることを確認した後、明瞭な集落の発育が認められない最小濃度をMICとした。一般細菌における場合¹⁾と同様に、数個の集落のみの場合はvariantと解釈して発育阻止とみなした。

6. 再現性の検討

対象菌株より *C. albicans* 15株, 他の菌種から各3株ずつの計27株を選択し、使用時ごとに作成した YMA で計3回, 同様に感受性測定を行った。

7. 保存性の検討

YMA について培地作成直後, 作成後7日, 14日, および28日保存後, 同様に感受性測定を行った。対象菌株としては, 再現性の検討を行ったものと同一の菌株を使用した。

II. 結 果

1. 適切な測定条件

1) 接種菌量 (Fig. 1)

使用すべき接種菌液の濃度として、 1×10^6 CFU/ml が適当であると考えられた。 1×10^5 CFU/ml の濃度では、*C. glabrata* など、一部の菌株の発育が不良であり、 1×10^7 CFU/ml ではMIC値の高い株が存在し、また菌株間の差が出にくい傾向がみられた。

2) 培養温度 (Figs. 2,3)

30°C が適切であると考えられた。37°C では、30°C に比し、菌株間の差が出にくい傾向が認められた。

3) 判定時間 (Fig. 3)

48時間が適当と考えられた。24時間では発育が不良である株が多く、72時間では48時間と同値か、1管の上昇を認めた。

2. 臨床分離株の薬剤感受性

1) Yeast morphology agar における MIC (Table 1)

AMPH-B では、*C. albicans*, *C. glabrata* に対しては全株が0.39 µg/ml 以下の濃度で発育が抑制されたのに比し、*C. parapsilosis*, *C. krusei* に対しては、やや高いMICを示した。しかし、測定した全株に対するMICは1.56 µg/ml 以下と良好な感受性を示し、耐性株の出現は認められなかった。

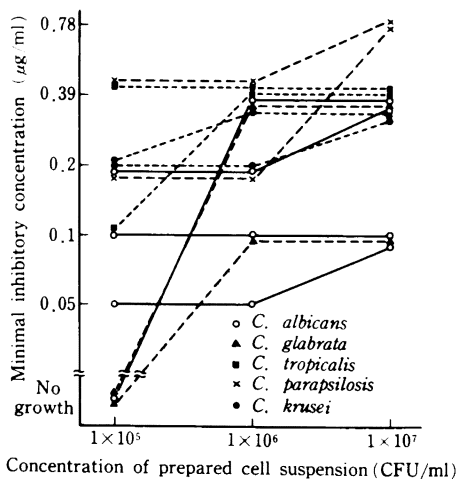


Fig. 1. Influence of inoculum size on MICs (AMPH-B, 30°C, 48 h, YMA).

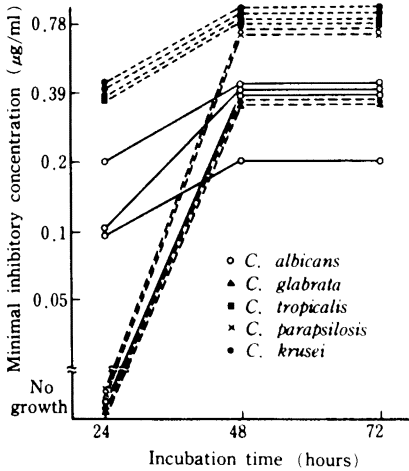


Fig. 2. MICs incubated at 37°C (AMPH-B, YMA).

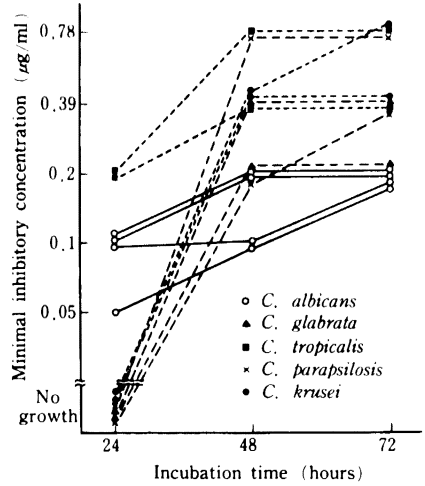


Fig. 3. Influence of incubation time on MICs (AMPH-B, 30°C, YMA).

Table 1. Antifungal activities of amphotericin B and flucytosine against clinical isolates of *Candida* species determined by an agar dilution method on YMA (pH 7.0)

Fungal species	No. of strains tested	Antifungal agent	MIC range (µg/ml)	Geometric mean (µg/ml)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)
<i>C. albicans</i>	46	AMPH-B	0.1 - 0.39	0.16	0.2	0.2
	46	5-FC	0.1 - 50	2.15	0.39	0.78
<i>C. glabrata</i>	10	AMPH-B	0.1 - 0.39	0.24	0.2	0.39
	10	5-FC	0.05 - 50	5.06	0.05	0.1
<i>C. tropicalis</i>	8	AMPH-B	0.39 - 0.78	0.49	0.39	0.78
	8	5-FC	0.39 - 1.56	0.78	0.39	1.56
<i>C. parapsilosis</i>	6	AMPH-B	0.2 - 1.56	0.88	0.78	1.56
	6	5-FC	0.39 - 0.78	0.72	0.78	0.78
<i>C. krusei</i>	6	AMPH-B	0.39 - 1.56	0.72	0.39	1.56
	6	5-FC	25 - 50	41.6	50	50

AMPH-B, amphotericin B; 5-FC, flucytosine.

一方、5-FCでは *C. albicans*, *C. glabrata* の一部および *C. krusei* の全株に対して低感受性であった。*C. tropicalis*, *C. parapsilosis* に対しては良好な感受性を示し、同一菌種内の差はほとんど見られなかった。

2) Sabouraud dextrose agar における MIC (Table 2)

AMPH-Bでは、*C. albicans*, *C. glabrata* に対する抗菌力はほぼ同程度であった。これらに対し、*C.*

tropicalis, *C. krusei* ではやや劣っていた。YMA を用いた MIC 値と比較して、全体的に1管程度上昇する傾向が認められた。5-FCでは、試験菌株全株で YMA における MIC 値に比べ、著明に高い値を示した。

3. 再現性に関する検討

前述の測定条件下で、計3回感受性検査を施行した結果、AMPH-B、5-FC両薬剤ともに、MIC 値は1

Table 2. Antifungal activities of amphotericin B and flucytosine against clinical isolates of *Candida* species determined by an agar dilution method on SDA (pH 7.0)

Fungal species	No. of strains tested	Antifungal agent	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	*Geometric mean ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)
<i>C. albicans</i>	46	AMPH-B	0.2 - 1.56	0.51	0.39	0.78
	46	5-FC	6.25 - >100	80.8	100	>100
<i>C. glabrata</i>	10	AMPH-B	0.39 - 0.78	0.51	0.39	0.78
	10	5-FC	12.5 - 50	27.5	25	100
<i>C. tropicalis</i>	8	AMPH-B	0.39 - 0.78	0.73	0.78	0.78
	8	5-FC	6.25 - 100	33.6	25	100
<i>C. parapsilosis</i>	6	AMPH-B	0.39 - 1.56	0.98	0.78	1.56
	6	5-FC	50 - >100	83.3	>100	>100
<i>C. krusei</i>	6	AMPH-B	0.78 - 1.56	1.43	1.56	1.56
	6	5-FC	100	100	100	100

* Values of >100 were treated as 100.

AMPH-B, amphotericin B; 5-FC, flucytosine.

管以内の差にとどまり、非常に良好な再現性を示した。

4. 培地の保存性に関する検討

1) AMPH-B

培地作成直後と7日保存後の比較では、MIC測定は全27株中9株が1管の低下、2株が1管の上昇を認めた。14日保存後の培地での測定では、MIC値の1管の上昇を10株に、2管の上昇を1株に認めた。さらに、28日保存後の培地では、全株において、作成直後に比しMICは高値を示し、1管の上昇にとどまった*C. albicans*、*C. krusei*各1株を除いて、他の全株で2管から5管におよぶMIC値の上昇を認めた。

2) 5-FC

本剤のMICは、AMPH-Bと異なり、7日、14日、28日保存後のいずれにおいても、作成直後と比較して全株が1管以内の差にとどまっていた。

III. 考 察

抗真菌剤の感受性試験法は種々の問題点からいまだ確立されておらず、各施設ごと、あるいは、各薬剤ごとに異なった方法で行われている。今回の対象薬剤であるAMPH-Bは、その強い毒性にもかかわらず、深在性真菌症治療の場において今なお第一線の薬剤である²⁾。近年、より副作用の少ないアゾール系薬剤が多数開発されつつあるが、その優れた抗菌活性を生かし、drug delivery systemの考えを取り入れることな

どにより、毒性を軽減し臨床応用を広げる試みが精力的に行われている。また同様に、臨床に用いられて久しい5-FCは、主としてuridine monophosphate (UMP) pyrophosphorylase 欠損あるいは部分欠損に基づく耐性菌の報告^{3,4)}が見られるものの、併用療法その他において、重要な位置を占める薬剤と思われる。これら2薬剤の感受性試験における問題点としては、まずAMPH-Bは、酸性領域で不安定であり、光や温度で分解を受け、さらに不飽和度が高いため、自己酸化または過酸化されやすい性質を有している。またピリミジンアナログである5-FCは、周知のごとく、種々のプリンおよびピリミジン塩基やヌクレオチドの存在により、その抗菌活性が拮抗される。さらに、酵母状真菌の感受性試験に共通する問題点として、培養温度、接種菌量、pH、測定培地の種類などが測定結果に大きく影響をおよぼすことも報告されている⁵⁻⁸⁾。そのため、培地の選択を含めた培養条件の設定は非常に重要な問題であるが、現在のところ統一されたものはないため、今回これらの点を中心に検討を行った。

現在までのAMPH-Bおよび5-FCの感受性試験法に関する報告を見ると、yeast nitrogen baseを用いて5-FCのMICを検討したもの^{9,10)}、両薬剤およびketoconazoleについてbuffered yeast nitrogen, synthetic amino acid medium fungal, RPMI-1640およびhigh resolution antifungal assay mediumを用い、

あわせて複数施設間の再現性を検討したもの¹¹⁾、さらに miconazole, econazole, tioconazole, clotrimazole を加え同様の検討を行ったもの¹²⁾などがあるが、今回我々は臨床的効率を考慮して寒天平板法を選択した。すなわち、マルチポイントイノキュレータを用いることにより、1枚の寒天に27株の処理が可能であった。測定培地には AMPH-B, 5-FC いずれに対しても適当であると推奨¹³⁾されている PBS (pH 7.0) にて調製した yeast morphology agar を用いた。対照としては、Sabouraud dextrose agar を用い前者との比較を行った。適切な諸測定条件の選択にあたっては、標準的測定法が未確立で、臨床上使用可能な抗真菌剤に限られている現状を考慮し、多少とも対象菌株間における感受性の差を検出すべく留意した。

まず、接種菌量の検討では、 1×10^5 CFU/ml、 1×10^6 CFU/ml、 1×10^7 CFU/ml の3濃度の菌液を用いて比較を行った。これらの菌液を1回あたり $50 \mu\text{l}$ ずつ寒天上に塗布するマルチポイントイノキュレータを用いて接種しているため、実際の菌量としては、各々 5×10^2 CFU、 5×10^3 CFU、 5×10^4 CFU を用いた。Fig. 1 に示したように、 1×10^5 CFU/ml では菌の発育が主に *C. glabrata* で不良であり、 1×10^7 CFU/ml では発育が良好なためか、菌株間の差が出にくい傾向が認められた。 1×10^6 CFU/ml はこれらの問題点を補い、適当な接種菌液濃度と思われた。

次に培養温度であるが、接種菌液を 1×10^6 CFU/ml として、 30°C および 37°C での比較を行った (Figs. 2, 3)。その結果、 37°C では 30°C に比べ、菌の発育が良好なためか、菌株間の差が出にくい傾向が認められた。また 37°C では、一部の病原真菌が発育できない点や、固形培地の脱水や乾燥が問題となり、薬剤の安定性にも悪影響をおよぼす可能性が考えられたため、不適当であると判断した。

培養時間は、菌の発育、菌株間の差の分離性、迅速性の面から、48時間が適切であると考えられた (Fig. 3)。

以上のように、寒天平板希釈法によるカンジダ属に対する AMPH-B ならびに 5-F の MIC 測定条件としては、接種菌液濃度 1×10^6 CFU/ml、培養温度 30°C 、培養時間 48 時間が適当であると考えられた。

さらに、本測定系における MIC 値の再現性、および培地の保存性について検討を加えた。再現性に関しては、計3回同様の測定を行った結果、両薬剤ともきわめて良好な結果を示し、充分信頼性の高い方法と思われた。また従来、AMPH-B は薬理学的に不安定であることが指摘されてきた。しかし、溶解され段階希

釈寒天培地の状態での安定性に関しては、現在までほとんど知られていないものと思われるが、実際の臨床の場においては重要な問題である。今回の検討では、遮光、 4°C の条件下で AMPH-B 含有 YMA は 14 日の保存に、5-FC 含有 YMA は少なくとも 28 日の保存に耐えうるものと考えられた。

次に、本条件下で、臨床分離カンジダ属計 76 株に対する両薬剤の抗真菌活性を測定した。まず AMPH-B は YMA および SDA 両測定培地において全菌株が $1.56 \mu\text{g/ml}$ 以下で発育が抑制され、今なお優れた抗菌力を有していた。特に、臨床的に重要な *C. albicans* に対する MIC₉₀ は、YMA で $0.2 \mu\text{g/ml}$ ときわめて良好であった。また、5-FC は *C. krusei* の全株と *C. albicans*、*C. glabrata* の一部で明らかに耐性化が認められた。

以上のように、今回検討した2種類の測定用培地を比較すると、AMPH-B では両培地間での MIC 値の差異は大きなものではなく、SDA を用いてもある程度の有用性は認められたが、5-FC では、従来の報告¹³⁾通り、SDA を用いた測定は不適当であった。

謝 辞

抗真菌剤原末を提供して頂いたプリストルマイヤー・スクイブ社、日本ロシュ社に深謝致します。

なお、本論文の要旨は第38回日本化学療法学会総会 (1990年5月、長崎) にて発表した。

文 献

- 1) 日本化学療法学会 MIC 小委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について. *Chemotherapy* 29: 76 ~ 79, 1981
- 2) Lombardi G, Gramegna C, Cavanna C, et al.: Itraconazole vs amphotericin B: *in vitro* comparative evaluation of the minimal inhibitory concentration (MIC) against clinically isolated yeasts. *Mycopathologia* 106: 31 ~ 34, 1989
- 3) Kerridge D, Nicholas R O: Drug resistance in the opportunistic pathogens *Candida albicans* and *Candida glabrata* J Antimicrob Chemother. 18, Suppl. B: 39 ~ 49, 1986
- 4) Kerridge D, Nicholas R O, Waymen F J: Resistance to clinically important antimycotic drugs in *Candida* spp. *Ann Ist Super Sanita* 23: 827 ~ 834, 1987
- 5) 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
- 6) Hoepflich P D, Finn P D.: Obfuscation of the

- activity of antifungal antimicrobics by culture media. *J Infect Dis* 126: 353 ~ 361, 1972
- 7) Minagawa H, Kitaura K, Nakamizo N: Effects of pH on the activity of ketoconazole against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 23: 105 ~ 107, 1983
- 8) Brass C, Shainhouse J Z, Stevens D A: Variability of agar dilution replicator method of yeast susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 15: 763 ~ 768, 1979
- 9) Shadomy S: Further *in vitro* studies with 5-fluorocytosine. *Infect Immun* 2: 484 ~ 488, 1970
- 10) Holt R J, Newman R L: The antimycotic activity of 5 fluorocytosine. *J Clin Path* 26: 167 ~ 174, 1973
- 11) Pfaller M A, Rinaldi M G, Galgiani J N et al.: Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 34: 1648 ~ 1654, 1990
- 12) Guinet R, Nerson D, De Closets F et al.: Collaborative evaluation in seven laboratories of a standardized micromethod for yeast susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 26: 2307 ~ 2312, 1988
- 13) 山口英世: 抗真菌剤の感受性試験. *検査と技術* 17: 889 ~ 894, 1989

BASIC EXAMINATIONS OF SUSCEPTIBILITY TESTING FOR AMPHOTERICIN-B AND FLUCYTOSINE AGAINST *CANDIDA* SPECIES USING AN AGAR DILUTION METHOD

Hiroshi Yamada, Shigeru Kohno, Shigefumi Maesaki, Akira Yasuoka
Mitsuo Kaku, Hironobu Koga and Kohei Hara

Second Department of Internal Medicine, School of Medicine,
Nagasaki University, 7-1 Sakamoto-machi, Nagasaki, Japan

We examined the appropriate conditions for measuring the susceptibility to amphotericin-B (AMPH-B) and flucytosine (5-FC) of *Candida* species. Yeast morphology agar (YMA, pH 7.0) was used as the testing medium and Sabouraud dextrose agar (SDA, pH 7.0) as control medium. Seventy-six strains clinically isolated from 1989 to 1990 in Nagasaki University Hospital were tested in this study to provide the following results.

1. Appropriate measuring conditions. (1) Inoculum size: 5×10^3 CFU in absolute values (or concentration of 1×10^6 CFU/ml using a multipoint inoculator), (2) Incubation temperature: 30°C, (3) Incubation time: 48 hours. These conditions were suitable for cell growth and determination of MIC values.

2. Antifungal activities against clinical isolates. MIC ranges of AMPH-B and 5-FC were 0.1–1.56 μ g/ml and 0.1–50 μ g/ml on YMA. Although AMPH-B had excellent activity also on SDA, activity of 5-FC was markedly inhibited on it, as stated in past reports.

3. Reproducibility of MIC values. In triple serial measurement by the method mentioned above, all results agreed within one twofold dilution.

4. Valid Period of ready-to-use susceptibility agar: 14 days for AMPH-B and 28 days for 5-FC under dark conditions at 4°C.

5. Our method was so efficient that twenty-seven strains were treated on one agar plate and visual evaluation of endpoints was easy.