

## 抗真菌剤の MIC 値におよぼす検定用培地の影響

三上 襄<sup>1)</sup>・矢沢 勝清<sup>1)</sup>・松前 昭廣<sup>2)</sup><sup>1)</sup>: 千葉大学真核微生物研究センター\*<sup>2)</sup>: 北里大学

(平成3年1月25日受付・平成3年5月11日受理)

Amphotericin B (AMPH), fluconazole (FLCZ), flucytosine (5-FC), itraconazole (ITZ) および miconazole (MCZ) の *in vitro* 抗真菌活性を minimum inhibitory concentration (MIC) 値を中心に、7種類の検定用培地を用いて、寒天希釈法および微量液体希釈法により比較した。その結果、AMPH は寒天培地で検討した場合、*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* および *Cryptococcus neoformans* のいずれにおいても、pH を中性に修正した yeast morphology agar (B-YMA) が、一方液体培地では、感受性デスク用培地や Antibiotic assay broth で低い MIC 値が観察されること、5-FC では寒天培地および液体培地のどちらにおいても、YMA およびその液体培地で低い MIC 値が観察されること、また FLCZ, ITZ および MCZ では、液体および寒天培地のいずれにおいても、他の培地と比較して、Synthetic amino acid medium-fungal や B-YMA 等の合成培地で比較的強い活性が観察されること等が明らかになり、抗真菌剤の *in vitro* 活性の測定における検定培地の重要性を明らかにした。

**Key words:** 抗真菌剤, 検定培地, *in vitro* 活性, MIC 値

抗真菌剤の *in vitro* と *in vivo* 活性は、必ずしも相関しないことが、報告されてきた<sup>1)</sup>。特にアゾール系の薬剤が最近多く開発されるようになり、この問題が強く指摘<sup>2,3)</sup>されているが、これまでに、抗真菌剤の検定用培地を詳しく検討した報告<sup>4)</sup> は本邦では見られない。

最近、抗真菌剤の検定用培地として、有効性が報告されながら、その販売が中止されていた Synthetic amino acid medium-fungal (SAAMF)<sup>5,6)</sup> が本邦においても市販されるようになったことから、抗真菌剤の検定培地として重要と考えられる SAAMF を含む7種の培地を用いて、amphotericin B (AMPH), flucytosine (5-FC) および miconazole (MCZ), さらに最近臨床応用された fluconazole (FLCZ), また臨床応用への基礎的研究段階にある itraconazole (ITZ) について *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* および *Candida albicans* を用いて minimum inhibitory concentration (MIC) 値への影響を検討したので、得られた結果を報告する。また *C. albicans* については、さらに微量液体希釈法での MIC 値についても検討したので、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検査部で分離した *C. albicans*, *C. neoformans*, *A. fumigatus* から、それぞれ7株づつをランダムに選んで使用した。寒天希釈法では、3菌種のすべてで、微量液体希釈法では、さらに研究室保存の *C. albicans* IFM 1001 株を加えた上記の7株について検討した。

### 2) 使用薬剤

AMPH (日本スクイブ), FLCZ (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) の原末を用いた。AMPH, FLCZ, ITZ および MCZ は dimethyl sulfoxide (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<sup>7,8)</sup> 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), 感受性デスク用培地

\* 千葉市亥鼻1-8-1

(KDA, パールコア, 栄研), Yeast morphology agar (YMA, Difco) と, 同培地に 1/15 M の MOPS を加え, pH を 7.0 に調整したもの (B-YMA), さらに Kimmig agar (Kimmig), Nystatin assay agar (NAA, BBL), および SAAMF (日本生物材料センター) を用いた。Kimmig はグリセロール (0.5%), Nutrient broth (Difco, 1.3%), Bacto peptone (Difco, 0.86%), NaCl (0.9%), glucose (1.0%), Bacto-agar (Difco, 1.5%) を加え, pH を 6.9 に調節して高圧滅菌し作製した。また SAAMF では, 別に滅菌したノーブル寒天 (Difco, 3.0%) を等量加えて寒天培地を作製した。

接種菌液は Potato dextrose agar (PDA) 上で, *A. fumigatus* では 7 日間, *C. albicans* と *C. neoformans* では 3 日間 37°C で培養し, *A. fumigatus* では Tween 80 とグリセリン添加の生理食塩水で孢子液を作製し, グラスフィルター (No.3) で濾過後に, 他はそのまま生理食塩水に懸濁し, 細胞濃度が  $1 \times 10^8$  個/ml になるように調整し, 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 0.005 ml を接種<sup>9)</sup>した。判定は 27°C で培養後, 3 日目に行った。

#### 2) 微量液体希釈法による MIC 値の測定:

臨床分離の *C. albicans* 7 株および基準株として研

究室保存の *C. albicans* IFM 1001 株を用いた。微量液体培地希釈法での MIC 値の測定は, マルチプレート (96 穴, 住友ベークライト) に, 2 倍濃度に作製した液体培地を 100  $\mu$ l あて加えた。液体培地としては, 上記の YMA に相当するものとして, 1% グルコース添加 Yeast nitrogen base (YNB, Difco), 同培地の pH を 1/15 M MOPS で 7.0 に調整した YNB 培地 (B-YNB), その他 SDA, KDA, SAAMF, Kimmig の液体培地, さらには NAA 培地に相当する液体培地として, Antibiotic assay broth (AAB, Antibiotic Medium 3, BBL) の 7 種を用いた。いずれの液体培地においても後に添加可能なグルコースは別々に滅菌して加えた。薬剤は, それぞれの培地で希釈後, 最終的に 400  $\mu$ g/ml として, ウエルあたり 100  $\mu$ l 分注し, 以後ウエル中で 2 倍系列を作製した。前述の菌浮遊液, 50  $\mu$ l, さらに生理食塩水 50  $\mu$ l を添加し, 37°C で 24 時間培養後, 濁度を観察した。増殖は, 肉眼的に透明な場合を 0 とし, かすかに増殖が見られて濁っている場合 (slightly hazy) を +1 とし, 薬剤無添加の対照群 (+4) に比べ明らかに濁度が減少している場合を +2, また対照群に比し, 幾分濁度が減少しているものを +3 のスコアとして, AMPH では 0, 5-FC では +1 以下を, FLCZ, MCZ および ITZ では +2 以下を MIC 値の基準とした。

Table 1. Agar and liquid media used

Media, manufacturers and abbreviations [in parentheses]	
agar media	liquid media
1. Yeast morphology agar [Difco] (YMA)	Yeast nitrogen base [Difco] + 1% glucose (YNB)
2. YMA + 1/15 M MOPS buffer, pH 7.0 (B-YMA)	YNB + 1/15 M MOPS buffer, pH 7.0 (B-YNB)
3. Synthetic amino acid medium-fungal [Nihon Seibutsu Zairyo] + 1% agar [Difco] (SAAMF)	Synthetic amino acid medium-fungal [Nihon Seibutsu Zairyo] (SAAMF-B)
4. Sabouraud dextrose agar [Nissui] (SDA)	Sabouraud dextrose broth [Nissui] (SDB)
5. Sensitivity test agar [Eiken] (KDA)	Sensitivity test broth [Eiken] (KDB)
6. Kimmig agar [laboratory preparation] (Kimmig)	Kimmig broth [laboratory preparation] (Kimmig-B)
7. Nystatin assay agar [BBL] (NAA)	Antibiotic assay broth [BBL] (AAB)

## II. 結 果

## 1. 寒天平板上での MIC 値の比較:

はじめに7株の臨床分離の *A. fumigatus*, *C. albicans* および *C. neoformans* について7種類の培地を用いて *in vitro* 感受性を比較し、その結果を Table 2 に示した。

AMPH は (Table 2 a), *A. fumigatus* と *C. albicans* において、バッファーで pH を中性に修正した B-YMA が低い MIC 値を示し、続いて pH 無修正の YMA および KDA や NAA であった。一方 SAAMF では、いずれの菌種に対しても 2~3 管程度 MIC 値が高くなる傾向が観察された。*C. neoformans* では、

KDA で低い MIC 値が観察され、YMA, B-YMA および NAA でもほぼ同様の結果であった。

FLCZ (Table 2 b) ではいずれの培地でも MIC 値は高かったが、これら7種の培地の中では、pH を 7.0 に修正した B-YMA および NAA と SAAMF で比較的低い MIC 値が観察され、特に *C. albicans* でその傾向が強く見られた。一方、pH 無修正の YMA では、明らかに MIC 値が高くなっていた。またいずれの培地においても、*A. fumigatus* では 100 µg/ml 以下の MIC 値は観察できなかった。

5-FC (Table 2 c) は、いずれの菌種に対しても、B-YMA で低い MIC 値を示したが、pH を修正した

Table 2a. MICs of *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* against amphotericin B on seven different agar media

Medium		MIC distribution of 7 strains of each fungus (MIC, µg/ml)										
		≥100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	≥0.1
YMA <sup>a)</sup>	A. f							3	4			
	C. a									5	2	
	C. n									5	2	
B-YMA	A. f									5	2	
	C. a									3	4	
	C. n									1	6	
SAAMF	A. f				7							
	C. a						4	2	1			
	C. n							5	2			
SDA	A. f							7				
	C. a								7			
	C. n									3	4	
KDA	A. f								1	6		
	C. a									6	1	
	C. n										2	5
Kimmig	A. f						7					
	C. a							6	1			
	C. n							5	2			
NAA	A. f								5	2		
	C. a									3	4	
	C. n									3	4	

<sup>a)</sup> See Table 1 for abbreviations of media.

A. f: *Aspergillus fumigatus*

C. a: *Candida albicans*

C. n: *Cryptococcus neoformans*

Table 2b. MICs of *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* against fluconazole on seven different agar media

Medium		MIC distribution of 7 strains of each fungus (MIC, $\mu\text{g/ml}$ )										
		$\geq 100$	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	$\geq 0.1$
YMA	A. f	7										
	C. a	5	2									
	C. n	2	5									
B-YMA	A. f	7										
	C. a		1				4	2				
	C. n		4	2	1							
SAAMF	A. f	7										
	C. a		1	2			4					
	C. n	2	4	1								
SDA	A. f	7										
	C. a	5	1	1								
	C. n	5	1	1								
KDA	A. f	7										
	C. a	3		4								
	C. n	1	3	2	1							
Kimmig	A. f	7										
	C. a	4			3							
	C. n	2	2	3								
NAA	A. f	7										
	C. a	5		2								
	C. n	1		4		2						

YMA では MIC 値がいくぶん高くなる傾向が認められた。5-FC に拮抗する物質を含むとされるペプトン含有培地では観察された MIC 値は高かった。合成培地の中で SAAMF では、期待されたよりも高い MIC 値が観察され、特に *A. fumigatus* や *C. neoformans* ではその傾向は顕著であった。

MCZ (Table 2 d) はいずれの培地でも比較的低い MIC 値を示す薬剤であった。*A. fumigatus* では SDA, SAAMF, KDA および NAA でより低い MIC 値が観察された。*C. albicans* および *C. neoformans* では、いずれの培地でも同様の低い MIC 値が観察され、さらに SDA および YMA では MIC 値がより低くなる傾向が見られた。

ITZ (Table 2 e) では *A. fumigatus* で SAAMF, B-YMA, KDA や Kimmig で、同程度の低い MIC 値が観察されたが、YMA では MIC 値が高くなる傾

向も見られた。*C. albicans* や *C. neoformans* でも、ほぼ同様の傾向が観察されたが、KDA では *C. albicans* に対する MIC 値の判定が困難であった。いずれの培地においても、ITZ は高濃度では結晶として析出し、結果的に菌が増殖し、反対に低い濃度で阻害が観察されるという現象が見られた。

## 2. 微量液体測定法による MIC 値の比較:

7 種類の液体培地で測定した 8 株の *C. albicans* について、5 薬剤での MIC 値の比較を Table 3 に示した。Table 3 a には AMPH の結果を示したが、AMPH は AAB, Kimmig-B, KDB, SDB の 4 種の液体培地で  $0.1 \mu\text{g/ml}$  以下の MIC 値を示したが、SAAMF-B, YNB および B-YNB 等の合成培地では逆に MIC 値がいくぶん高くなり、 $0.39 \sim 0.78 \mu\text{g/ml}$  であった。

FLCZ (Table 3 b) については、完全な阻害は、

Table 2c. MICs of *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* against flucytosine on seven different agar media

Medium		MIC distribution of 7 strains of each fungus (MIC, $\mu\text{g/ml}$ )										
		$\geq 100$	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	$\geq 0.1$
YMA	A. f								3	2	2	
	C. a							2	1	1	3	
	C. n								4		3	
B-YMA	A. f		1			6						
	C. a							3		4		
	C. n					4	2	1				
SAAMF	A. f	7										
	C. a			2	1	4						
	C. n	6	1									
SDA	A. f		2		4	1						
	C. a	6			1							
	C. n		1	3	3							
KDA	A. f	7										
	C. a	7										
	C. n	7										
Kimmig	A. f	5	2									
	C. a	7										
	C. n	7										
NAA	A. f	3	4									
	C. a	7										
	C. n	7										

高濃度でないと観察できなかったが、+2以下の濁度を示した濃度を MIC 値とした場合、YNB、B-YNB および SAAMF-B で比較的低い MIC 値が観察できた。

5-FC では Table 3c に示したように、YNB および B-YNB で低い MIC 値が観察され、SAAMF-B では、いくぶん MIC 値は高くなっていた。

MCZ (Table 3d) は液体培地で測定すると、他のアゾール系の薬剤に比べ、殺菌的作用が高いことから、どちらかという MIC 値が判定し易い薬剤であると考えられたが、KDB や AAB では +3 が多く見られ、MIC 値を決定することは容易でなかった。MCZ の MIC 値は、YNB、B-YNB や SAAMF-B で低く観察され、また中でも判定しやすかったのは YNB および SAAMF-B であった。特に SAAMF-B は *C. albicans* の生育が薬剤無添加群で良いことから、

判定しやすい培地であった。

ITZ の液体培地での MIC 値を Table 3e に示した。ITZ は KDB 培地を除いていずれの培地でも低い MIC 値が観察され、YNB、B-YNB および SAAMF-B で判定しやすく、特に SAAMF-B は判定が容易な培地であった。

### III. 考 察

AMPH は B-YMA、SAAMF 等の合成の寒天培地で低い MIC 値が観察されたが、液体培地では NAB、KDB などの有機複合培地で低い MIC 値が観察されるという矛盾した結果が得られた。この点に関しては、今後 AMPH 寒天培地と液体培地での安定性等を含めて、さらに詳細に検討する必要がある。いずれにしても、AMPH の検定には寒天培地では B-YMA や KDA が、液体培地では NAB、KDB と言うように、それぞれに適した検定培地を用いる必要がある。

Table 2d. MICs of *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* against miconazole on seven different agar media

Medium		MIC distribution of 7 strains of each fungus (MIC, $\mu\text{g/ml}$ )										
		$\geq 100$	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	$\geq 0.1$
YMA	A. f					4	1	2				
	C. a					7						
	C. n							1	4	2		
B-YMA	A. f					4	3					
	C. a							2	5			
	C. n					1				5	1	
SAAMF	A. f						5	2				
	C. a							1	3	3		
	C. n							3	2	2		
SDA	A. f						2	5				
	C. a							2	4	1		
	C. n									4	3	
KDA	A. f						2	5				
	C. a							1	2	2	2	
	C. n							1	1	3	1	1
Kimmig	A. f					4	1	2				
	C. a						1		6			
	C. n					1		6				
NAA	A. f						4	3				
	C. a						4		1	1	1	
	C. n								5	2		

FLCZの抗真菌活性の検定においてSAAMF (SAAMF-B) や<sup>10)</sup> pHを修正したB-YNB (B-YMA) で低いMIC値を観察できることを明らかにしたが、しかしその場合でもFLCZの場合には依然としてMIC値は高く、*in vivo*の効果を反映しているとは思われない。やはり、*in vivo*との相関性をより表わすとしたら、 $IC_{99}$ 値や $IC_{50}$ <sup>7,8)</sup>値を測定するなどの方策が必要であろう。

5-FCの検定で、SAAMFにおいてMIC値が高くなる理由としては、この培地が栄養豊富なことから、5-FCのように、静菌的な作用を示し、MIC値が培養時間に左右されやすい薬剤では、対照群と薬剤添加群との差が判定しにくくなることによるものと思われる。

*A. fumigatus* および *C. albicans* のいずれにおいても、寒天と液体希釈法でYMA (YNB) で低いMIC

値が観察できたことから、現段階では、5-FCのMIC値の検定には、YMA (YNB) が適した培地と行うことができる。

MCZはアゾール系の薬剤の中でも殺菌的傾向が強く、いずれの培地でも低いMIC値を示していた。特に寒天培地ではSDAやYMAが、また液体培地ではYNBやSAAMF-BでMIC値が判定しやすいことが明らかになったことから、それぞれの目的にそって培地を選ぶ必要がある。

ITZはその溶解性に問題があり、特に液体培地では高濃度で、薬剤の沈澱がみられ、接種菌も沈澱物と一緒に存在する現象も観察されている。したがってITZのMIC値の測定は、高濃度では意味がなく、逆に混乱することから、低い濃度からの検定が望まれる。また同時に、今後ITZに適した溶媒の検討も必要であろう。一方、活性の面から言えば、ITZは*A.*

Table 2e. MICs of *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* against itraconazole on seven different agar media

Medium		MIC distribution of 7 strains of each fungus (MIC, $\mu\text{g/ml}$ )										
		$\geq 100$	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	$\geq 0.1$
YMA	A. f						7					
	C. a					7						
	C. n								5	2		
B-YMA	A. f								2	4	1	
	C. a							1	2	2	2	
	C. n							2	5			
SAAMF	A. f								5	2		
	C. a						2	4	1			
	C. n							1	3	2	1	
SDA	A. f								7			
	C. a						4	3				
	C. n								7			
KDA	A. f								4	3		
	C. a								ND <sup>b)</sup>			
	C. n								5	2		
Kimmig	A. f								7			
	C. a				2	5						
	C. n							2	2	3		
NAA	A. f			7								
	C. a	1	3		1			1				
	C. n			3	3			1				

<sup>b)</sup> Not determined.

*fumigatus* に対してより強い活性を示す特徴あるアゾール系の薬剤であると言えることができる。

今回の実験を通して、抗真菌剤の検定における培地の重要性が確認され、それぞれの抗真菌剤と検定条件に適した培地の採用が必須であることが強く示唆された。しかし、MIC 値の検定用培地としては、低い MIC 値を示すことは重要なことであるが、必ずしも絶対条件ではなく、培地の条件に限っていえば、培地の供給が容易であること、培地ロット間のバラツキが少ないこと、保存が容易であること、さらに実験者間での判定誤差が少ないこと等を総合的に判断して採用することが必要である。それらの点を考慮した場合、B-YMA (B-YNB) は 5-FC で幾分 MIC 値が高くなる傾向が観察されるものの、いずれの薬剤でも使用可能であり、その作製も簡単であり、今後、抗真菌剤の

共通の検定用培地の一つとして、本培地の使用を薦めたい。一方 SAAMF に関してはアゾール系の薬剤の測定に優れていることが報告<sup>10)</sup>され、我々の今回の結果もそのことを確認できたこと、さらに最近では本邦においても SAAMF が市販されるようになり、今後、多用されるようになると思われる。また最近、組織培養に汎用されている RPMI 1640 がより低い MIC 値を示し、液体培地での検定では研究室間での読み取りで最も誤差が少ない培地であることが米国において報告<sup>6)</sup>されている。しかし、本培地に関しては、本邦においてはデータの蓄積も少ないことから比較もできず、今後詳細な検討が望まれる。

液体培地における活性の判定基準は、アゾール系の薬剤では完全阻害が観察しにくい薬剤が多いことから、今後は IC<sub>50</sub> や IC<sub>99</sub> 値での測定が主流となると思

Table 3a. MICs of amphotericin B against *Candida albicans* in seven different liquid media

Medium	MIC distribution of 8 strains of <i>Candida albicans</i> (MIC, $\mu\text{g/ml}$ )										
	$\geq 100$	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	$\geq 0.1$
YNB							1*	6	1		
B-YNB								1	7		
SAAMF-B					1	2	5				
SDB											8
KDB											8
Kimmig-B											8
AAB											8

See Table 1 for abbreviations of media.

\* Strain number (8 strains were used).

Table 3b. MICs of fluconazole against *Candida albicans* in seven different liquid media

Medium	MIC distribution of 8 strains of <i>Candida albicans</i> (MIC, $\mu\text{g/ml}$ )										
	$\geq 100$	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	$\geq 0.1$
YNB						3	1	4			
B-YNB					2		1	2	2	1	
SAAMF-B		1					3	4			
SAB		4	1		1		2				
KDB*											
Kimmig-B	7	1									
AAB*											

\* Not determined.

Table 3c. MICs of flucytosine against *Candida albicans* in seven different liquid media

Medium	MIC distribution of 8 strains of <i>Candida albicans</i> (MIC, $\mu\text{g/ml}$ )										
	$\geq 100$	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	$\geq 0.1$
YNB									1		7
B-YNB									1	3	4
SAAMF-B						2	3	2	1		
SAB	4	4									
KDB	3		5								
Kimmig-B	8										
AAB	2				2	4					

Table 3d. MICs of miconazole against *Candida albicans* in seven different liquid media

Medium	MIC distribution of 8 strains of <i>Candida albicans</i>										
	(MIC, $\mu\text{g/ml}$ )										
	$\geq 100$	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	$\leq 0.1$
YNB											8
B-YNB				1	1						6
SAAMF-B											8
SAB											8
KDB*											
Kimmig-B		1									7
AAB*											

\* Not determined.

Table 3e. MICs of itraconazole against *Candida albicans* in seven different liquid media

Medium	MIC distribution of 8 strains of <i>Candida albicans</i>										
	(MIC, $\mu\text{g/ml}$ )										
	$\geq 100$	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.2	$\geq 0.1$
YNB											8
B-YNB											8
SAAMF-B											8
SAB											8
KDB*											
Kimmig-B											8
AAB											8

\* Not determined.

われるが、しかしその手順は煩わしく、それに代わり得る判定基準の設定が望まれる。その点、今回我々が基準として用いた Pfaller 等<sup>6)</sup> のスコア法がより実際的な判定法に思われる。

## 謝 辞

SAAMF 培地の供与を受けたファイザー製薬株式会社 に感謝致します。

## 文 献

- 1) Rogers T E, Galagiani J N: Activity of fluconazole (UK 49,858) and ketoconazole against *Candida albicans* *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 418~422, 1986
- 2) Saag M S, Dismukes W E: Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1~8, 1988
- 3) Drouhet E, Dupont B, Improvisi, Viviani M A, Tortorano A M: *In vitro* and *In vivo* Evaluation of Antifungal Agents. Elsevier Science Publishers B. V. Disc agar diffusion and microplate automatized technics for *in vitro* evaluation of antifungal agents on yeasts and sporulated pathogenic fungi (Iwata K and Vanden Bossche) pp. 31~49, 1986
- 4) 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
- 5) Hoerich P D, Finn P D: Obfuscation of the activity of antifungal antimicrobials by culture media. *J. Infect. Dis.* 126: 353~361, 1972
- 6) Pfaller M A, et al. (11 different laboratories): Collaborative investigation of variables in suscep-

- tibility testing of yeasts. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 1648~1654, 1990
- 7) 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 IC<sub>50</sub> 値での flucytosine, miconazole および fluconazole との比較. Chemotherapy 38: 1039~1047, 1990
- 8) 三上 襄, 矢沢勝清, 宇野 潤, 西村和子, 菅野治重: *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. Chemotherapy 39: 1~8, 1991
- 9) Yazawa K, Mikami Y, Uno J: *In vitro* susceptibility of *Nocardia* sp. to a new fluoroquinolone, tosufloxacin (T-3262). Antimicrob. Agents Chemother. 33: 2140~2141, 1989
- 10) 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. Jpn. J. Antibiot. 42: 1~16, 1989

## EVALUATION OF *IN VITRO* ANTIFUNGAL ACTIVITY OF AMPHOTERICIN B, FLUCONAZOLE, FLUCYTOSINE, ITRACONAZOLE AND MICONAZOLE ON SEVEN DIFFERENT ANTIFUNGAL ASSAY MEDIA

Yuzuru Mikami<sup>1)</sup>, Katsukiyo Yazawa<sup>1)</sup> and Akihiro Matsumae<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>: Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chiba, Japan

<sup>2)</sup>: Kitasato University

We determined the antifungal activity of five clinically useful antimycotics against *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* by two assay methods, namely agar dilution and liquid microdilution, using seven different media: Sabouraud dextrose, synthetic amino acid medium-fungal, yeast nitrogen base, buffered-yeast nitrogen base, nystatin assay, Kimmig and sensitivity test medium. The minimum inhibitory concentration (MIC) of amphotericin B fluctuated depending on the medium used and the lowest MICs were observed with buffered yeast nitrogen base medium (in agar) or sensitivity test medium (in liquid) to all fungi tested. The lowest MIC of flucytosine against both *A. fumigatus* and *C. albicans* was found in non-buffered yeast nitrogen base medium. Synthetic amino acid medium-fungal was a good choice for determining the MICs of azole antimycotics: miconazole, fluconazole and itraconazole.