

## 糸状菌に対する菌糸発育抑制効果を指標にした再現性良好な 抗真菌剤の感受性試験法

牧 克之・小山 芳子・俵 修一・上村 利明

藤沢薬品工業新薬研究所\*

五島 瑛 智子

東邦大学医学部微生物学教室

(平成5年3月8日受付・平成5年6月8日受理)

糸状菌に対する抗真菌剤の再現性良好な  $IC_{50}$  値測定法について報告する。これはペーパーディスクに試験菌を浸漬させて寒天平板上に置き円形に成長したコロニーの半径を測る方法である。この方法で、*Aspergillus fumigatus* の接種菌量、温度の影響を4種類の培地を用いて検討した。試験中、コロニーの伸長は直線的で、接種菌量の影響は受けなかった。さらに、4種類の抗真菌剤、amphotericin B, miconazole, fluconazole および flucytosine の *Aspergillus fumigatus* に対する抑制効果を検討した結果、薬剤により菌の増殖が容量依存的に抑制され、 $IC_{50}$  値を得ることができた。特に、fluconazole では  $10 \mu\text{g/ml}$  以下の濃度で感度良く活性を測ることができた。これらの結果は重量法よりも濁度法に近似する値であった。

**Key words:** 抗真菌剤, 糸状菌, 感受性試験法,  $IC_{50}$ , 菌糸発育抑制

真菌感染症は、免疫低下患者にとって、ますます重要な問題となっている。この増加は抗生物質の汎用、臓器移植における免疫抑制剤、AIDS 感染およびその他が、主要因である。主な病原真菌としては *Candida albicans* (*C. albicans*), *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*), および *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) があげられる。したがって、これらの病原真菌に対し、幅広い活性をもち、しかもより有効に全身投与が可能な抗真菌剤の開発が待たれる。しかし、抗真菌剤の感受性測定法は統一されていない<sup>1-9)</sup>。かなりの進展はみられたものの、azole 剤では *in vitro* と *in vivo* との乖離がみられる<sup>1,4,5)</sup>。おそらく、*in vivo* 効果の主要因となる抗菌剤の標的部位に対する抑制作用を *in vitro* で適正に評価できていないのかもしれない。こうした相関性、再現性、および感度を改良するために、*C. albicans* で多くの報告がなされている<sup>3,6-9)</sup>。しかし、糸状菌では、液体培地で増殖させると菌糸は自己凝集し塊まりを形成し、不均一な懸濁液となる。そのため精度の良い感受性測定に支障をきたしていると思われる。一方、糸状菌の菌糸は隔壁で分画される“細胞単位 (unit)”からなり、各単位は病原性が異なると推定される。Yanagida ら<sup>10)</sup> は *in vitro* においても *Aspergillus niger* (*A. niger*) の円形なコロニーは加齢 (aging) や分化の程度に

よって、4つの領域に分類できると報告している。我々は、これらのうち菌糸の伸長がその先端部で行われる事実に着目し<sup>11,12)</sup>、抗真菌活性を菌糸の発育抑制で測定した。

### I. 材料と方法

#### 菌 株

用いた菌株はすべて臨床分離由来株で、藤沢薬品で保管し、サブロー (2% デキストロース, SDA) 斜面寒天培地で継代、維持された。次にあげる菌株を試験した。*Aspergillus fumigatus* FP 1305, 8004, 10001, *Aspergillus niger* FP 1398, および *Aspergillus flavus* FP 1022。

#### 培 地

培地はすべて、用時調整され、次にあげる培地で検討した。SDA, ポテトデキストロース寒天培地 (PDA, ニッスイ), デキストロース添加イーストナイトロゲンベース寒天培地 (YNBDA, Difco Laboratories, Detroit, Mich.), ならびに 0.5% 酵母エキス (Difco) 添加 SDA (PYGA) もしくはそのプロス (PYGB)。

#### 接種菌液の調整

*Aspergillus* spp. は PDA 斜面寒天培地で  $30^{\circ}\text{C}$ , 7 ~ 10 日間培養した。その斜面部に 0.1% Tween 80 添

\* 大阪市淀川区加島 2-1-6

加生理食塩水 5 ml を入れ、白金耳で斜面部を擦って、分生子を採取した。得られた懸濁液を金網で濾過し、生理食塩水で洗浄後、再懸濁させた。接種菌液は生菌数を指標に所定菌量に調整した。

#### 薬 剤

Amphotericin B (AMPH-B), flucytosine (5-FC), miconazole (MCZ), および fluconazole (FLCZ) の 4 種の薬剤について検討した。AMPH-B, および MCZ は dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解し、滅菌水で希釈した。この場合、DMSO は最終濃度で 1% を越えないようにした。また、5-FC は滅菌水のみで溶解した。

#### ディスク法

寒天平板希釈法にしたがって、抗真菌剤の 2 段階連続希釈液 1 ml を含む 10 ml の寒天培地をシャーレ (85 mm 径) に入れ平板とし、薬剤希釈液を含まない寒天培地を対照とした。プレートは、約 1 時間乾燥させ、滅菌ペーパーディスク (Toyo Roshi; 8 M/M DIA, Thin) を接種菌液に浸し、過剰の液は濾紙で除き、ただちに寒天培地上に張りつけた。その後、プレートを 30°C もしくは 37°C で培養した。培養後、増殖した菌の最長半径をノギスで計測し、この値を薬剤濃度の対数値に対してプロットし、IC<sub>50</sub> 値を求めた。IC<sub>50</sub> 値は、対照の菌糸発育を 50% 以下に抑制する薬剤の最小濃度とした。

#### 微量液体希釈法

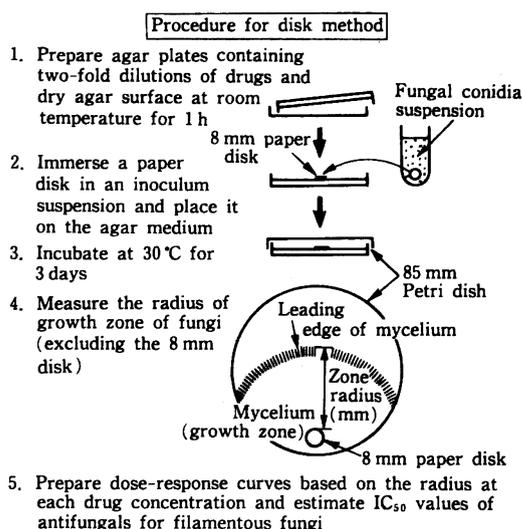


Fig. 1. Procedure for disk method. Details are described in Methods.

*A. fumigatus* FP 1305 の分生子液を  $1 \times 10^6$  conidia/ml となるように PYGB に接種した。次に各種濃度に調整した薬剤の 20  $\mu$ l/well を入れたマイクロプレート (SUMILON®, sumitomo) に PYG 菌液の 180  $\mu$ l/well を添加しマイクロミキサー (SANKO JUNYAKU) で攪拌し、プレートは 30°C で 3 日間、静置培養した。発育した菌糸の濁度はマイクロプレートリーダー (Immuno Reader, NJ-2001, Japan Inter Med.) で A<sub>620</sub> を測り、IC<sub>50</sub> 値はディスク法と同様に求めた。

#### 重量法

液体希釈法に準じて行った。実験条件は、試験管に最終量 5 ml というのを除いて微量液体希釈法と同様に行った。所定培養後、試験管内容液をミリポアフィルターで濾過し、滅菌水で洗浄後、120°C で一晩、乾燥させた。フィルター上の菌体は電子天秤で秤量し、菌体重量を測定した。IC<sub>50</sub> 値はディスク法と同

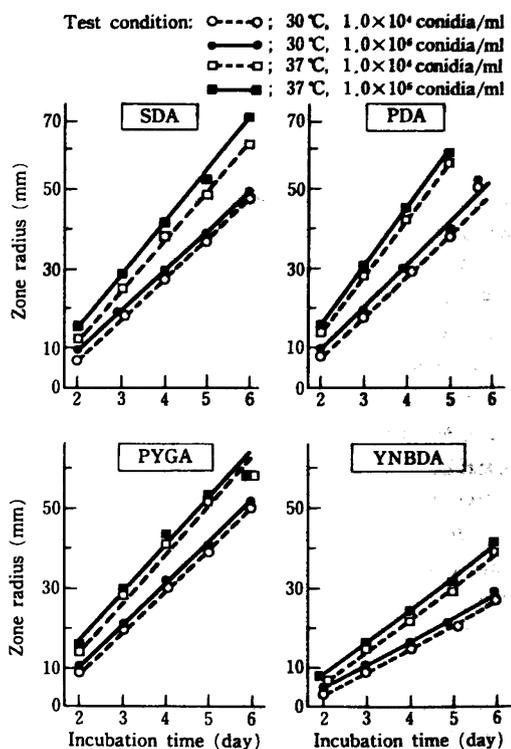


Fig. 2. Effects of inoculum size, incubation temperature and agar medium on mycelium growth of *Aspergillus fumigatus* 8004. Readings were made daily for 2 to 6 days. The averages of triplicate measurements are plotted.

Table 1. Effects of inoculum size, incubation temperature and agar medium on mycelium growth 4 days after inoculation of *Aspergillus niger* FP 1398

	Zone radius (mm)			
	30°C		37°C	
	10 <sup>4</sup> a)	10 <sup>6</sup> b)	10 <sup>4</sup> a)	10 <sup>6</sup> b)
SDA	33.9	35.8	26.3	26.1
PYGA	35.9	37.2	33.5	34.0
PDA	24.9	25.7	24.8	24.8
YNBDA	22.9	23.4	22.3	22.7

Inoculum size: a) 1×10<sup>4</sup>, b) 1×10<sup>6</sup> conidia/ml.  
Averages of triplicate measurements are given.

様に求めた。

画線法

寒天プレートはディスク法と同様に調整し、これに 1×10<sup>6</sup> conidia/ml の菌液を画線塗抹器で接種した。プレートは 30°C, 3 日間培養し, MIC は増殖が抑制されている薬剤の最小濃度とした。

II. 結 果

ディスク法の操作手順

糸状菌の分生子をディスクを用いて寒天培地に接種すると, 放射状に菌糸が発育するので, 培地上の菌の増殖域の最長半径をノギスで測定した。詳細は方法の項および Fig. 1 説明文に記載した。

*A. fumigatus* の菌糸発育

*Aspergillus* spp. の 3 株について, 4 種類の寒天培地上での *A. fumigatus* 8004 の菌糸発育に対する温度, および接種菌量の影響を検討した (Fig. 2)。使

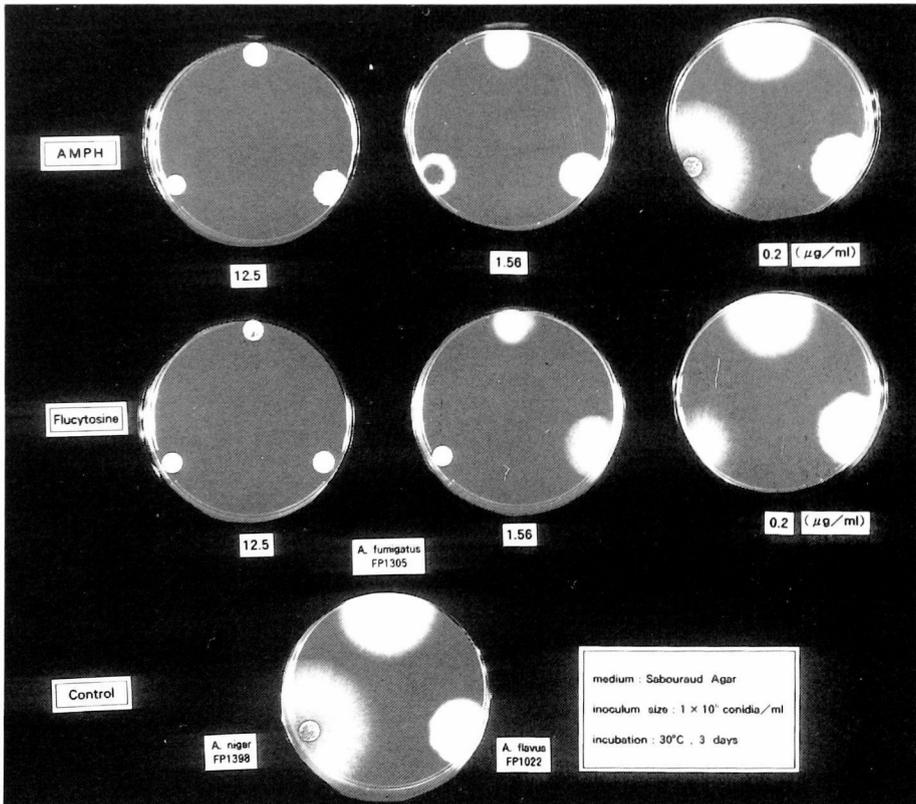


Fig. 3. Outgrowth pattern of *Aspergillus* spp. on disk-inoculated plates and its regressive response to amphotericin (AMPH) and flucytosine. Disks contained *Aspergillus fumigatus* FP 1305 (upper), *Aspergillus niger* FP 1398 (left) and *Aspergillus flavus* FP 1022 (right). Tests were made on SDA medium with an inoculum of 1×10<sup>6</sup> conidia/ml incubated at 30°C for 3 days.

用した培地種によって菌糸の発育速度がかなり異なった。しかし、いずれの培地においても増殖は接種菌量の影響を大きく受けなかった。成長速度は30°Cより37°Cのほうが速かったが、2~6日目まで直線的であった。これらの結果は菌糸発育が試験期間中、初期の速度のまま進んだこと、さらに菌糸の成長が一点でのみおこるということを示唆する。同様の結果は *A. fumigatus* FP 1305 でもみられたが、37°C, PYG 培地ではその速度は減少した。Table 1 は *A. niger* の4日目の菌糸半径を示したが、*A. fumigatus* の場合とは異なり、37°Cよりも30°Cの方が成長は速く、かつ、接種菌量の影響はほとんどみられなかった。

#### 抗真菌剤の菌糸発育抑制と IC<sub>50</sub> 値

*Aspergillus* spp. の3株の菌糸発育に対する AMPH-B および 5-FC の抑制の様子を Fig. 3 に示した。実験は、SDA 培地で30°C, 3日間で行ったが、3株とも、薬剤の有無にかかわらず放射状の菌糸を形成した。対照の発育半径は *A. fumigatus* FP 1305, 17.8 mm; *A. niger* FP 1398, 24.1 mm; *A. flavus* FP 1022, 10.9 mm であった。これに対し、AMPH-B 0.2 µg/ml では菌糸は対照とほぼ同じ発育を示し、抑制効果は認められなかった。さらに 1.56 µg/ml で部分抑制を、12.5 µg/ml では完全抑制を示した。薬剤が5-FC の場合も同様に用量依存的な抑制効果がみられた。

SDA および YNBDA を用いた場合の *A. fumigatus* FP 1305 に対する AMPH-B, MCZ, FLCZ および 5-FC の用量反応曲線を Fig. 4 に示した。各培地の抑制曲線は両培地間で異なり、特に5-FC は YNBDA 培地で強く拮抗され<sup>1)</sup>、曲線が高濃度側に移動した。

#### ディスク法と他の方法との比較

ディスク法と従来法(微量液体希釈法, 重量法, 寒天平板希釈法)間の測定値を比較した。この場合、PYG 培地を使用し *A. fumigatus* に対する各種抗真菌剤の IC<sub>50</sub> 値ならびに MIC を Table 2 に示した。それぞれの方法で得た IC<sub>50</sub> 値を薬剤別に比較すると、AMPH-B および MCZ の場合、3方法のうち、ディスク法と微量液体希釈法の値が2倍以内で近似し相関がみられたのに対し、5-FC は菌株によって両方法間で値が大きく乖離する株がみられ相関しなかった。5-FC の場合、いずれの方法間でも、測定値の相関性は認められなかった。また、試験菌3株に対する各真菌剤の IC<sub>50</sub> 値を測定方法別でみると、ディスク法の場合いずれの薬剤でも2倍以内の変動であったが、他の2方法では値の変動幅が大きくなり、株による測定誤差と思われた。

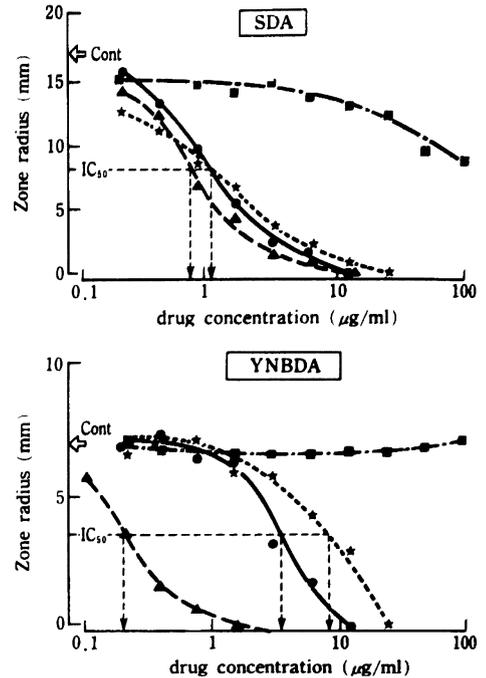


Fig. 4. Dose-response curves of amphotericin (AMPH), fluconazole (FLCZ), miconazole (MCZ) and flucytosine for *Aspergillus fumigatus* FP 1305. Test was made on an inoculum of  $1 \times 10^6$  conidia/ml incubated at 30°C for 3 dyas. IC<sub>50</sub> values were estimated as 50% inhibition points on the curves and are indicated in Table 2. ●, AMPH; ■, FLCZ; ★, MCZ; ▲, 5-FC.

#### ディスク法の感度

FLCZ の *A. fumigatus* FP 1305 に対する用量依存曲線について3方法間で比較し Fig. 5 に示した。FLCZ の静菌的な作用をディスク法がもっとも鋭敏にとらえ (<10 µg/ml) ている。したがって、ディスク法は感度の良い試験法であることが明らかである。

### III. 考 察

今回の報告では、菌糸成長の抑制を薬剤活性の指標とした。糸状菌は個体培地上で、接種点を中心にして、放射状に発達した菌糸を形成するので、真菌の成長速度はその半径で表すことができる。また、ディスク法は円形の菌糸を形成することが前提であるので、不規則なコロニーを形成する菌には適さない。

菌糸は本質的にはその先端で伸長するため、細胞膜や細胞壁に対して阻害活性を有する抗真菌剤はこれら

Table 2. A comparison of various IC<sub>50</sub> and MIC values for 3 strains of *Aspergillus fumigatus*

Drug	Strain	IC <sub>50</sub>			MIC
		disk	A <sub>620</sub>	wt.	
Amphotericin	FP 1305	1.80	2.30	0.14	3.13
	8004	1.45	1.80	1.10	3.13
	10001	1.75	0.95	NT	3.13
Miconazole	FP 1305	1.90	3.80	1.30	25.0
	8004	1.85	2.30	2.25	25.0
	10001	0.77	0.56	NT	12.5
Flucytosine	FP 1305	10.5	20.0	4.60	>100
	8004	9.40	14.5	9.50	>100
	10001	6.22	29.0	NT	>100

Tests were made on PYG medium with an inoculum of  $1 \times 10^4$  conidia/ml at 30°C for 3 days.

Disk; Disk method, A<sub>620</sub>; turbidimetric method, wt; dry weight method, MIC; streak method.

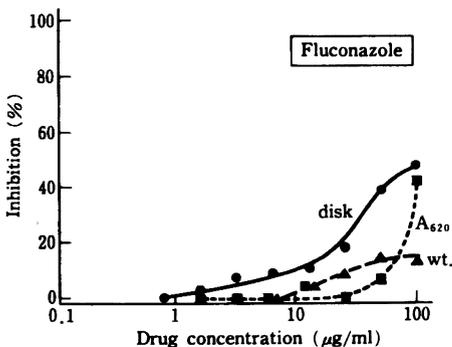


Fig. 5. A comparison of dose-response curves of fluconazole for *Aspergillus fumigatus* FP 1305 obtained by the disk method and traditional mycological methods. Details are described in the legend to Table 2. disk, disk; wt., dry weight; A<sub>620</sub>, turbidimetric method.

の過程で最大限にその活性を発揮していると推定される。*A. fumigatus* の菌糸発育は一定速度で進み、接種菌量の影響をほとんど受けなかった ( $10^4$  vs  $10^6$  conidia/ml) ことから、我々のデータは部分的にはあるが先端発育を支持する。これらの結果は菌糸先端での伸長速度は接種された分生子の量ではなくてその部位での菌の“生育力 (viability)” に依存することを示唆する。したがって、ディスク法で得られた

IC<sub>50</sub> 値は菌糸がその先端で伸長しようとする生育力を 50% 抑制する薬剤濃度と解釈され、IC<sub>50</sub> 値も接種菌量に影響されなかった (データ一示さず)。

次に、ディスク法において使用した菌が直線的に成長する事実は、薬剤が絶えず一定の生育力をもつ成長点に接し続けるという特長を有する。また、測定感度の点からは FLCZ の例で示した通り、微量液体希釈法や菌体重量法に比べて感度良く測定できることを示した。

一方、*A. fumigatus* の病原性は、病原因子と免疫反応によって、規定されるとされており<sup>13,14</sup>、病原因子としては組織への侵入を促進すると考えられる各種の酵素や毒素を分泌している<sup>15-17</sup>。また、Arruda ら<sup>18,19</sup> は細胞毒性活性を有し、炎症反応を引き起こす *A. fumigatus* の Asp f I は増殖の初期の過程で放出され、胞子にはほとんど含まれないことを、さらに、Wösten ら<sup>20</sup> は *A. niger* のグルコサミラーゼの分泌が主として、成長している菌糸の先端でおこり、増殖を止めると分泌が抑制されることを報告している。このような観点から、もし糸状菌のプロテアーゼや毒素が同じような機構で分泌されるならば、菌糸先端の発育速度を測定することは抗真菌剤のスクリーニングや評価にとって、より重要な意義をもつと考えている。

#### 文 献

- 1) Galgiani J N: Antifungal susceptibility tests. Anti-

- microb. agents Chemother. 31: 1867~1870, 1987
- 2) Pfaller M A, Rinaldi M G, Galgiani J N, Bartlett M S, Body B A, Espinel-Ingroff A, Fromtling R A, Hall G S, Hughes C E, Odds F C, Sugar A M: Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1648~1645, 1990
  - 3) Shadomy S, Pfaller M A: Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and quantitation in body fluids, In Balows A, Hausler W J, Herrmann K L Jr., Isenger H D, Shadomy H J (ed), *Manual of clinical microbiology*, 5th ed., pp. 1173~1183, American society for microbiology, 1991 (Washington, D. C.)
  - 4) Boyle F T, Ryley J F, Wilson R G: In vitro-in vivo correlations with azole antifungals. In Fromtling R A (ed.), *Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents*, pp. 31~41, J. R. Prous science publishers, S. A., 1987 (Barcelona, Spain)
  - 5) Troke P F, Marriott M S, Richardson K, Tarbit M H: The in vitro potency and in vivo activity of azoles, In St. Giorgiev V (ed.), *Antifungal drugs*, pp. 284~293. New York Academy of Sciences, 1988 (New York)
  - 6) Galgiani J N, Stevens D A: Antimicrobial susceptibility testing of yeasts: a turbidimetric technique independent of inoculum size. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10: 721~726, 1976
  - 7) Odds F C: Antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by relative growth measurement at single concentrations of antifungals agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1727~1737, 1992
  - 8) Pore R S: Antibiotic susceptibility testing of *Candida albicans* by flow cytometry. *Curr. Microbiol.* 20: 323~328, 1990
  - 9) Tellier R, Krajden M, Grigoriew G A, Campbell I: Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1619~1625, 1992
  - 10) Yanagida T, Kogane F: Growth and cytochemical differentiation of mold colonies. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 8: 201~213, 1962
  - 11) Bartnicki-Garcia S: Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. In 23rd symposium of the society for general microbiology. University Press, 1973 (Cambridge)
  - 12) Gooday G W, Trinci A P J: Wall structure and biosynthesis in fungi. *Symposia of the society for general microbiology* 30: 207~251, 1980
  - 13) Bardana E J Jr.: The clinical spectrum of aspergillosis-part 2: classification and description of saprophytic, allergic, and invasive variants of human disease. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci.* 13: 85~159, 1980
  - 14) Schonefelder H: Pathogenetic and serological aspects of pulmonary aspergillosis. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 51: 1~62, 1987
  - 15) Rhodes J C: Virulence factors in fungal pathogens. *Microbiol. Sci.* 5: 252~254, 1988
  - 16) Reichard U, Büttner S, Eiffert H, Staib F, Rütchel R: Purification and characterisation of an extracellular serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue. *J. Med. Microbiol.* 33: 243~251, 1990
  - 17) Zhu W -S, Wojdyla K, Donlon K, Thomas P A, Eberle H I: Extracellular proteases of *Aspergillus flavus* fungal keratitis, proteases, and pathogenesis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 13: 491~497, 1990
  - 18) Arruda L K, Platts-Mills T A E, Fox J W, Chapman M D: *Aspergillus fumigatus* allergen I, a major IgE-binding protein, is a member of the mitogillin family of cytotoxins. *J. Exp. Med.* 172: 1529~1532, 1990
  - 19) Arruda L K, Good M, Platts-Mills T A E, Chapman M D, Charlottesville V A: Asp f I, a major *A. fumigatus* allergen: homology to the cytotoxin mitogillin and measurements in spore, mycelial and culture filtrate extracts. *J. allergy clin. immunol.* 87: 168, 1991
  - 20) Wösten H A B, Moukha S M, Sietsma J H, Wessels J G H: Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2017~2023, 1991

Reproducible susceptibility testing of antifungals for filamentous fungi  
by an inhibitory effect on mycelium growth

Katsuyuki Maki, Yoshiko Koyama, Shuichi Tawara  
and Toshiaki Kamimura

New Drug Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd., 2-1-6  
Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

Sachiko Goto

Department of Microbiology, Toho University School of Medicine

A reproducible *in vitro* method for the determination of  $IC_{50}$  values of antifungals for filamentous fungi is described. A paper disk in which conidium of the test fungi was immersed was placed on a susceptibility agar plate and then incubated under appropriate conditions. The fungal conidium developed radial mycelium around the disk. Fungal growth was monitored by a growth zone radius around the disk. The effects of inoculum size and temperature on the mycelium growth of *Aspergillus fumigatus* were examined using four media. During the test period, the daily radius extension was linear and was little affected by the inoculum size. The inhibitory effects of four antifungals, amphotericin B, miconazole, fluconazole and flucytosine, against *Aspergillus fumigatus* were examined. Dose-response regression of the radius was observed, and the  $IC_{50}$  value was obtained. The inhibitory effect of fluconazole could be detected sensitively even at 10  $\mu\text{g/ml}$  or less. These data were closer to those obtained by the turbidmetric method than those obtained by the dry weight method.