

Flucytosine と fluconazole の *Candida* spp. に対する *in vitro* および *in vivo* 併用効果

関根 譲・神山 智子・櫻井千寿子・有沢 幹雄
日本ロシュ株式会社研究所*

(平成5年9月28日受付・平成5年11月2日受理)

Flucytosine (5-FC) と fluconazole (FLCZ) の *Candida* spp. に対する *in vitro* および *in vivo* 抗真菌活性における併用効果, ならびに, 5-FC 耐性獲得に対する両剤の併用効果について検討を行った。

1) 5-FC と FLCZ の *in vitro* での併用は, その *Candida* spp. に対する抗真菌活性において, 一部の5-FC 高度耐性株を除くすべての株に対し, 相乗ないし相加効果を示した。

2) また, 用いた5-FC 感受性および耐性の *Candida albicans* 2株によるマウス全身カンジダ症に対しても併用効果を示した。

3) 5-FC に対する耐性獲得速度は *C. albicans* に比べ *Candida glabrata* の方が速く, 菌種による違いが見られ, また, 両菌種共に, 接種菌量の影響を受けた。

4) この5-FC 耐性獲得速度に対しても5-FC と FLCZ の併用は強い抑制効果を示した。

5) *C. albicans*, *C. glabrata* 両菌種の5-FC 耐性出現頻度は, *C. glabrata* の方が平均で約100倍高い値を示した。

6) しかし, この両菌種の5-FC 自然耐性出現頻度に対して, 5-FC と FLCZ との併用は, *C. albicans* での頻度を約1/2減少させたが, *C. glabrata* の頻度にはほとんど変化は見られなかった。

Key words: flucytosine, fluconazole, 併用効果, *Candida*, 相乗効果

近年, 抗生物質, 抗癌剤などによる化学療法や臓器移植などに見られる医療の進歩により, 社会の高齢化が進み, また患者の延命が期待されてきている。それに伴い真菌症の増加が顕著になってきている¹⁾。これに対し, 現在日本で深在性真菌症の治療に使用されている抗真菌剤は, ポリエン系抗生物質の amphotericin B (AMPH), ペリミジン系薬剤の flucytosine (5-FC), アゾール系薬剤の miconazole (MCZ) および, fluconazole (FLCZ) のわずか4剤である。遅れていた抗真菌剤の開発の方も, アゾール系薬剤を中心として活発になってきており²⁾, 今回, itraconazole (ITZ) が上市された。しかしながら, なお現存の抗真菌剤の効果は毒性面等も含め十分とは言えず, さらに新しい抗真菌剤の開発が望まれている。

このような状況の中で抗真菌剤の併用は, その効果の改善, 副作用の軽減, スペクトラムの拡大などのために有用であり, 各種の検討が行われている³⁻⁷⁾。5-FC については, AMPH との併用で多くの検討が行われており, 臨床にも広く使用されているが⁸⁻¹¹⁾, FLCZ との併用効果に関する報告は少ない。そこで今回, 5-FC と FLCZ の併用効

果を評価するため, 臨床からの分離頻度の最も高い *Candida* spp. を用い *in vitro* を中心に一部 *in vivo* を含めて検討を行ったので報告する。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

Flucytosine (5-FC: Lot No.903002) は, F. Hoffmann-La Roche 社からの原末を, fluconazole (FLCZ: ファイザー製薬) は, 市販品を抽出精製したものを用いた。

2. 試験菌株

泌尿器科領域由来の臨床分離株 *Candida albicans* 9株: CY 3003, CY 3204, CY 3215, CY 3019, CY 3220, CY 3232, CY 3235, CY 3239, CY 3240, *Candida glabrata* 5株: CY 6001, CY 6025, CY 6030, CY 6044, CY 6049, *Candida tropicalis* 3株: CY 3223, CY 3237, CY 3245 および当研究室保存の標準菌株 *C. albicans* 4株: ATCC 48130, ATCC 10231, 652, ATCC 24433, *C. glabrata* 2株: ATCC 2001, IFO 0005 を用いた。

* 神奈川県鎌倉市梶原 200

3. *In vitro* 併用効果

96穴マイクロプレートを用いた微量液体 checker board 法にて行った。培地は1% glucose および0.15% asparagine を添加した Yeast-nitrogen base (YNB; Difco)¹²⁾を用いた。薬剤の希釈は、FLCZ については1/2希釈系列で行ったが、5-FC については、併用効果の正確な判定を行うために3/4希釈系列にて行った。接種菌液はPYGA (1% Bacto-peptone (Difco), 0.5% Yeast extract (Difco), 1% glucose, 2% agar) 平板上で、試験菌を20~24時間37°Cで培養し、0.1% Tween 80を含むBuffered saline with gelatin (BSG)にて菌液を調整し、最終菌濃度が約10⁵ cfu/mlとなるように接種した。培養は37°C, 20時間行い判定はマイクロプレートリーダー (Corona Electric, MTP-100)で630 nmでのO.D. (O.D.₆₃₀)値を測定し、IC₉₀値 (controlの生育をO.D.₆₃₀の値で90%以上阻害する濃度)を求めた。併用効果の評価はFractional inhibitory concentration index (FIC index)を次式より算出し行った。

$$\text{FIC index} = \frac{\text{IC}_{90} \text{ of 5-FC in combination}}{\text{IC}_{90} \text{ of 5-FC alone}} + \frac{\text{IC}_{90} \text{ of FLCZ in combination}}{\text{IC}_{90} \text{ of FLCZ alone}}$$

判定はFIC indexが<0.5を相乗, 0.5~1.0を相加, >1.0を不関として行った。

4. マウス全身カンジダ症モデル

マウスはICR系, 4週齢, 雄, 体重20±1gを1群7匹として用いた。C. albicans CY 3003 (5-FC感受性株) および C. albicans ATCC 24433 (5-FC耐性株)を感染菌として用いた。PYGA平板で一夜培養後, 菌体を集菌し生理食塩水にて所定の菌量に調整した。この菌液0.1 mlを尾静脈より接種した。そして, 水に溶解した各薬剤を, 感染後ただちに経口投与し, その後毎日1回4日間治療 (5連投)を行った。22日間観察を行い, その生存匹数により薬剤の効果を判定した。

5. 5-FC耐性獲得

3の場合と同様の方法で, 96穴マイクロプレートを用いた微量液体希釈法により行った。1/2希釈系列の5-FCの各ウェルに一定濃度のFLCZを加えた1% glucose添加YNB (w/o) (Difco)培地に, C. albicans および C. glabrataを各々, 約10⁶ cfu/ml, または10⁵ cfu/mlの菌量で接種, 20時間培養しIC₉₀値を求めた。さらに, この培養プレートのcontrolと同等ないし約1/2の増殖を示した菌液 (5-FCの1/2~1/4 IC₉₀濃度のウェル)から, 菌数をおおよそ上記の接

種菌量に揃えて, 新たな薬剤含有培地の入ったプレートに接種後, 同様に培養してIC₉₀を測定した。この継代培養によるIC₉₀測定を15~30回 (15~30日間)繰り返して行った。

6. 5-FCの耐性出現頻度およびそれに対するFLCZの添加効果

Yeast Morphology Agar (YMA) 平板で37°C, 一夜培養の試験菌の懸濁液を調製し, これを5-FC (25 μg/ml)含有, または, 5-FC (12.5 μg/ml) およびFLCZ (0.78~3.13 μg/ml)含有YMA平板に1枚あたり10⁷ cfuオーダーとなるよう数枚にまき, 37°Cで5日間培養して生育してきたコロニーを耐性として薬剤無添加YMA平板で生育したコロニー数に対する割合として算出した。

II. 結 果

1. 5-FCとFLCZの*in vitro*併用効果

5-FCとFLCZの併用は試験菌株15株中6株に相乗効果, 6株に相加 (部分的相乗)効果, 3株に不関を示しており, 全体では試験した株の80%の株に対し相乗ないし相加 (部分的相乗)効果を示した。その内容を見ると, 5-FC感受性のFLCZ非感受性株に対しては, 併用はすべて相乗効果を示した。併用効果のなかった3株は5-FCのIC₉₀が>1,000 μg/mlの高度耐性株であったが, IC₉₀が500 μg/mlの5-FC耐性株には相乗効果を示し, 併用時の5-FCのIC₉₀は1 μg/mlであった。また, 両剤に感受性を示す株に対しては, すべて相加 (部分的相乗)効果を示した (Table 1)。

2. マウス全身カンジダ症に対する治療効果

感受性株CY 3003による感染モデルに対し5-FC, FLCZは, 共に臨床用量で優れた治療効果を示した。一方, 5-FC耐性株ATCC 24433による感染モデルに対しては, 5-FCの治療効果は感受性株による場合に比べると弱いものであったが, FLCZは優れた効果を保持していた。

5-FCとFLCZを併用した場合, 感受性株感染マウスに対し5-FC: 50 mg/kgとFLCZ: 2 mg/kgの治療効果はFLCZ単独の4 mg/kgよりは劣るものの5-FC, 50 mg/kgおよびFLCZ, 2 mg/kgの単独治療よりも良好な結果であり, 明らかな併用効果を示した。5-FC耐性株感染マウスに対しても感受性株の場合と同様, 5-FCとFLCZの併用は, 優れた治療効果を有していた (Fig. 1)。

3. 5-FC耐性獲得速度

1) 5-FC耐性獲得速度の菌種間の比較検討

5-FCに対しIC₉₀が>100 μg/mlの耐性を獲得する

Table 1. *In vitro* effect of flucytosine combined with fluconazole on *Candida* spp.

Sensitivity type	Organism		IC ₅₀ (μg/ml)				Effect (FIC index)
			alone		in combination		
			5-FC	FLCZ	5-FC	FLCZ	
FLCZ-insensitive	<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	0.05	100	0.01	3.13	synergism (0.36)
	<i>C. albicans</i>	CY 3204	0.02	12.5	0.01	1.56	synergism (0.44)
	<i>C. albicans</i>	CY 3215	0.07	100	0.03	0.78	synergism (0.43)
	<i>C. albicans</i>	CY 3220	0.03	12.5	0.01	0.78	synergism (0.47)
	<i>C. tropicalis</i>	CY 3237	0.05	6.25	0.01	0.78	synergism (0.39)
5-FC-resistant	<i>C. albicans</i>	ATCC 24433	500	6.25	1	1.56	synergism (0.25)
	<i>C. albicans</i>	652	>1,000	6.25	>1,000	6.25	indifferent (—)
	<i>C. tropicalis</i>	CY 3223	>1,000	1.56	>1,000	1.56	indifferent (—)
	<i>C. tropicalis</i>	CY 3245	>1,000	1.56	>1,000	1.56	indifferent (—)
5-FC- & FLCZ-sensitive	<i>C. albicans</i>	ATCC 48103	0.06	3.13	0.01	1.56	additive (0.73)
	<i>C. albicans</i>	CY 3003	0.06	1.56	0.01	0.78	additive (0.68)
	<i>C. albicans</i>	CY 3019	0.06	0.78	0.01	0.39	additive (0.73)
	<i>C. albicans</i>	CY 3202	0.05	1.56	0.02	0.39	additive (0.71)
	<i>C. albicans</i>	CY 3203	0.04	1.56	0.01	0.39	additive (0.56)
	<i>C. albicans</i>	CY 3229	0.08	1.56	0.01	0.78	additive (0.63)

Inoculum size: 10⁸ cfu/ml

5-FC: flucytosine, FLCZ: fluconazole

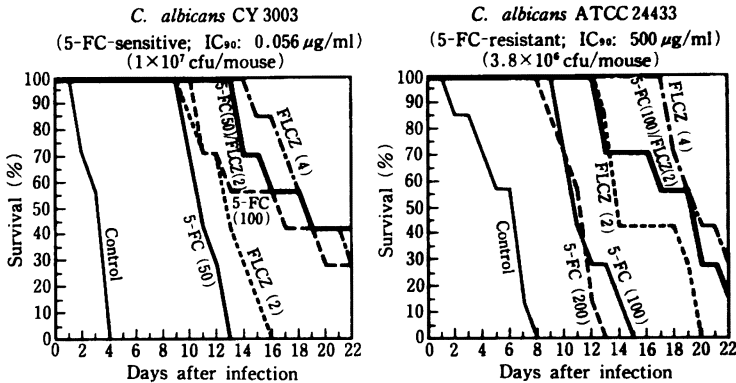


Fig. 1. Chemotherapeutic effect of combinations of flucytosine and fluconazole on murine candidiasis. Mice were infected intravenously with 1×10^7 cfu of *Candida albicans* CY 3003 or 3.8×10^6 cfu of ATCC 24433 and treated orally with flucytosine, fluconazole or flucytosine plus fluconazole once a day on days 0 through 4 for a total of 5 doses. The values in parentheses are expressed as mg/kg.

のに要した期間(耐性獲得速度:薬剂存在下で耐性を獲得するのに要した継代回数)は、株によっても異なるが、*C. albicans* (CY 3003, CY 3234) と *C. glabrata* (CY 6044, CY 6049) の菌種間で比較した場合、*C. albicans* に比べ *C. glabrata* の方が耐性獲得速度は速かった (Fig. 2 A, B)。これは、データには示

さなかったが、他の株の場合でも同様であった。

2) 5-FC 耐性獲得速度に対する接種菌量の影響
両菌種とも接種菌量を 10^8 cfu/ml から 10^9 cfu/ml へ下げると、耐性獲得までの期間が大幅に延長した (Fig. 2 A, B)。すなわち、接種菌量の影響を大きく受けた。

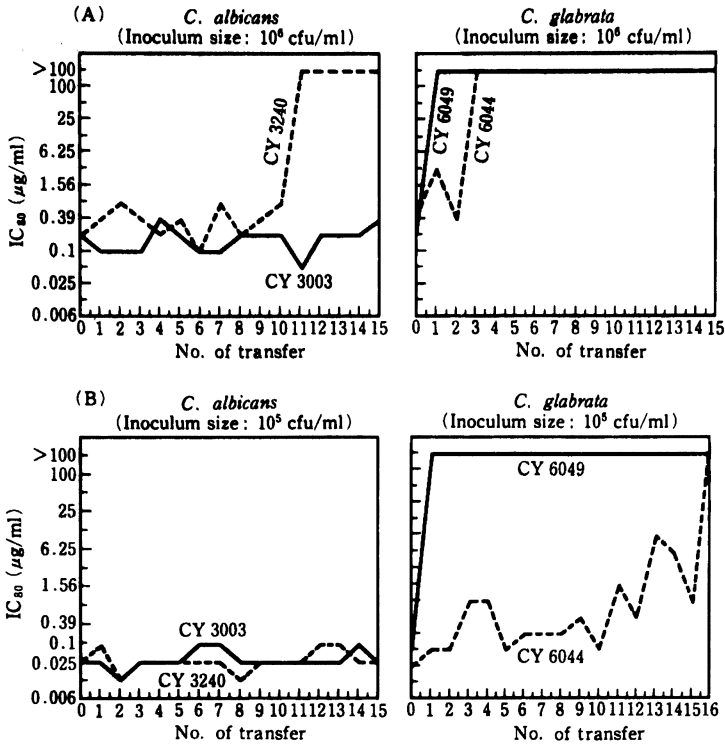


Fig. 2. *In vitro* development of resistance to flucytosine in *Candida albicans* and *Candida glabrata*.

4. 5-FC 耐性獲得に対する併用効果

C. albicans (6株), *C. glabrata* (7株) 両菌種ともに5-FC単独培地で継代中に5-FC耐性を獲得した株はすべて, FLCZを併用した場合, その耐性獲得期間は大きく延長された。すなわち, 両菌種の5-FCに対する耐性獲得をFLCZは強く抑制した (Tables 2, 3)。

5. 5-FC自然耐性出現頻度およびその頻度におよぼすFLCZとの併用の影響

菌種内でも株間で頻度の差は見られるが, 5-FC (25 μg/ml) 含有YMA平板上の*C. albicans* 7株の平均の5-FC自然耐性出現頻度は 2.9×10^{-7} で, 一方*C. glabrata* 7株では 3.3×10^{-5} と*C. albicans*に比べ*C. glabrata*の方が約2乗オーダー高い頻度であり, 菌種の違いにより, その自然耐性出現頻度に大きな差が見られた (Tables 4, 5)。

これら両菌種の5-FC自然耐性出現頻度に対するFLCZとの併用の影響を見てみると, 5-FC: 12.5 μg/mlに対しFLCZ: 3.13あるいは1.56 μg/mlを併用した場合, いずれの場合も*C. albicans* 7株の平均の5-

Table 2. Effect of combined flucytosine and fluconazole on flucytosine-resistance of *Candida albicans*

Organism	No. of transfers required to reach IC ₅₀ of 5-FC >100 μg/ml	
	5-FC alone	5-FC+ FLCZ (0.78 μg/ml)
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	7	>30
<i>C. albicans</i> CY 3003	>15	>30
<i>C. albicans</i> CY 3019	12	>30
<i>C. albicans</i> CY 3232	12	>30
<i>C. albicans</i> CY 3239	>15	>30
<i>C. albicans</i> CY 3240	9	>30

Inoculum size: 10^6 cfu/ml

5-FC: flucytosine, FLCZ: fluconazole

FC耐性出現頻度は, 5-FC単独時の頻度の約1/2に低下しており, FLCZとの併用の影響がわずかに認められた。一方, *C. glabrata* 7株では, 5-FC単独の場合と併用した場合の出現頻度は, ほぼ同等であり併用の影響は認められなかった (Tables 4, 5)。

III. 考 察

現在、深在性真菌症の治療に使用されている抗真菌剤は、AMPH, 5-FC, MCZ および FLCZ の 4 剤のみであり、現状では、既存の抗真菌剤での単独治療ではまだ十分とは言えない。

5-FC は、その低い蛋白結合率と良好な組織移行性、高い選択毒性等の特長としているが、耐性獲得が単独での使用の際の問題となっている。一方、FLCZ についても、その作用が静菌的であることや、臨床において耐性菌の報告もなされている^{13,14)}。そこで、今回 5-FC と FLCZ について、より優れた抗真菌活性を得る目的で両剤の併用に関する検討を行った。

Table 3. Effect of combined flucytosine and fluconazole on flucytosine-resistance of *Candida glabrata*

Organism	No. of transfers required to reach IC ₅₀ of 5-FC >100 µg/ml	
	5-FC alone	5-FC+ FLCZ (0.78 µg/ml)
	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	>19
<i>C. glabrata</i> IFO 0005	14	>21
<i>C. glabrata</i> CY 6001	18	18
<i>C. glabrata</i> CY 6001	18	>21 (FLCZ: 1.56 µg/ml)
<i>C. glabrata</i> CY 6001	18	>21 (FLCZ: 3.13 µg/ml)
<i>C. glabrata</i> CY 6025	7	>21
<i>C. glabrata</i> CY 6030	>19	>21
<i>C. glabrata</i> CY 6044	16	>21
<i>C. glabrata</i> CY 6049	2	12
<i>C. glabrata</i> CY 6049	2	20 (FLCZ: 1.56 µg/ml)
<i>C. glabrata</i> CY 6049	2	>21 (FLCZ: 3.13 µg/ml)

Inoculum size: 10⁵ cfu/ml

5-FC: flucytosine, FLCZ: fluconazole

5-FC と FLCZ の *in vitro* での併用については、三上らは 5-FC 感受性の *C. albicans* 10 株を用いて検討を行っており、FIC index が 0.06~0.38 と相乗効果を示すことを報告している¹⁵⁾。今回の我々の結果でも、彼らと測定条件は多少異なるが、5-FC 感受性の *C. albicans* 10 株、さらに *C. tropicalis* 1 株に対し FIC index が 0.36~0.73 と相乗ないし相加 (部分的相乗) 効果を示した。この併用効果は、5-FC 感受性株の中でも FLCZ 非感受性株 (FLCZ の IC₅₀ が 6.25 µg/ml 以上の株) に対する方が、FLCZ 感受性株に対する効果より強いものであった。これは、FLCZ 感受性株では FLCZ の IC₅₀ が 5-FC との併用では 2~4 倍程度の低下に対し、FLCZ 低感受性株では IC₅₀ が 100 µg/ml を示す株でも 5-FC との併用で 3.13, あるいは 0.78 µg/ml と、感受性領域まで大幅に下がったことによる。三上らの結果にも、これと同様の傾向が見られる。一方、5-FC 耐性株については、*C. albicans* 2 株と *C. tropicalis* 2 株を用いたが、IC₅₀ 値が 1,000 µg/ml 以上を示す 3 株については併用効果は認められなかったが、IC₅₀ が 500 µg/ml の *C. albicans* CY 1007 株に対しては強い相乗効果が認められ、併用時の 5-FC の IC₅₀ 値が 1 µg/ml にまで下がった。このことは、FLCZ 非感受性株のみならず、5-FC 耐性でもある程度までの耐性株に対してならば、両剤の併用により十分な効果が得られるという結果であった。

次に、*C. albicans* で 5-FC 耐性の ATCC 24433 株および感受性の CY 3003 株を感染菌としたマウス全身カンジダ症に対する 5-FC と FLCZ の併用効果を検討した結果、感受性株 CY 3003 による感染に対しては 5-FC: 50 mg/kg と FLCZ: 2 mg/kg で、また、

Table 4. Frequency of flucytosine-resistant strains in sensitive *Candida albicans*

Organism	Frequency resistant strains/10 ⁸	Relative frequency: 5-FC (25)=1		
		5-FC (25)	5-FC/FLCZ (25/0)	5-FC/FLCZ (12.5/3.13)
				5-FC/FLCZ (12.5/1.56)
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	2	1	2.38	0.80
<i>C. albicans</i> CY 3003	44	1	0.05	0.05
<i>C. albicans</i> CY 3019	95	1	0.41	0.59
<i>C. albicans</i> CY 3232	5.6	1	0.33	0.33
<i>C. albicans</i> CY 3235	2.8	1	0.52	0.52
<i>C. albicans</i> CY 3239	11	1	0.60	0.20
<i>C. albicans</i> CY 3240	41	1	0.50	0.81
Mean	29	1	0.68	0.47

(): drug concentration; µg/ml

5-FC: flucytosine, FLCZ: fluconazole

Table 5. Frequency of flucytosine-resistant strains in sensitive *Candida glabrata*

Organism		Frequency	Relative frequency: 5-FC (25) = 1		
		resistant strains/10 ⁷	5-FC/FLCZ (25/0)	5-FC/FLCZ (12.5/3.13)	5-FC/FLCZ (12.5/1.56)
<i>C. glabrata</i>	ATCC 2001	64	1	0.97	0.87
<i>C. glabrata</i>	IFO 0005	5.1	1	1.24	1.09
<i>C. glabrata</i>	CY 6001	3.7	1	0.99	0.72
<i>C. glabrata</i>	CY 6025	1.8	1	0.66	0.73
<i>C. glabrata</i>	CY 6030	23	1	0.88	1.00
<i>C. glabrata</i>	CY 6044	5.4	1	1.00	1.12
<i>C. glabrata</i>	CY 6049	2,200	1	0.92	0.99
	Mean	330	1	0.95	0.93

(): drug concentration; $\mu\text{g/ml}$

5-FC: flucytosine, FLCZ: fluconazole

耐性株 ATCC 24433 による感染に対しては 5-FC: 100 mg/kg と FLCZ: 2 mg/kg の両薬剤の臨床用量範囲内の併用により相加 (部分的相乗) 効果が得られた。Polak も、この両剤の併用がマウス全身カンジダ症に対し相乗効果を示したと報告している¹⁶⁻¹⁸⁾。また、Graybill らは、マウスのクリプトコックス髄膜炎モデルで、この併用が単独使用よりも優れた結果を示したとしている¹⁹⁾。

さらに、この 5-FC と FLCZ の併用が、5-FC の単独使用の際に問題となる耐性の獲得に対しどの程度の効果を示すのかを検討した結果、*C. albicans* および *C. glabrata* 両菌種の 5-FC 耐性獲得までの期間 (継代培養回数) は、FLCZ: 0.78~3.13 $\mu\text{g/ml}$ の存在下で延長され、特に、*C. albicans* では 10^6 cfu/ml の接種菌量において、7 あるいは 9 回の継代培養で IC₅₀ が 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の 5-FC 耐性を獲得した株でも、FLCZ: 0.78 $\mu\text{g/ml}$ 共存下では 30 回 (1 か月) の継代培養を行っても耐性の獲得はなかった。この 5-FC 耐性獲得速度は、*C. albicans* に比べ *C. glabrata* の方が速かった。これは、*C. glabrata* が haploid であり、diploid である *C. albicans* よりも自然耐性出現頻度が高いことによると考えられた²⁰⁾。そこで、両菌種の 5-FC 耐性出現頻度を 5-FC: 25 $\mu\text{g/ml}$ 単剤の場合と 5-FC: 12.5 $\mu\text{g/ml}$ に FLCZ: 3.13 および 1.56 $\mu\text{g/ml}$ を共存させた場合の 5-FC 自然耐性出現頻度を算出し比較することで、この耐性出現頻度に対する FLCZ の添加の効果を検討した。その結果、5-FC 単剤の場合、5-FC 耐性出現頻度は株間での差はあるものの、両菌種各々 7 株の平均の頻度は、*C. albicans* の 2.9×10^{-7} に比べ、*C. glabrata* では 3.3×10^{-5} と *C. glabrata* の方が約 2 乗オーダー高く、両菌種間の 5-FC

耐性獲得速度差は、この自然耐性出現頻度の差によると考えられた²⁰⁾。しかし、FLCZ が共存した場合の頻度は、*C. glabrata* の場合、5-FC 単剤の場合のそれとほとんど差はなく、差が見られた *C. albicans* でも、平均で約 1/2 の抑制に留まった。よって、5-FC と FLCZ の併用による 5-FC 耐性獲得速度の抑制効果は、自然耐性出現頻度に対する効果では説明できない。この点に関しては、さらに検討を要する。

以上、5-FC と FLCZ の併用は、*in vitro* あるいは *in vivo* において *Candida* で相乗ないし相加 (部分的相乗) 効果を示すことが確認された。

In vitro において FLCZ 非感受性株に対して特に優れた併用効果を示したことは、今後さらに、FLCZ の使用に伴い FLCZ 非感受性菌が増加してくることも予想され^{13,14)}、これに対する治療として、5-FC との併用が有効な手段となる可能性が示唆された。加えて、5-FC の弱点である耐性獲得が抑制されたことは、これが臨床に反映されれば意義のあることとなる。

臨床においては、最近、Scheven らが *C. albicans* による敗血症の治療を FLCZ と 5-FC の併用で行い成功したと報告している²¹⁾。また、*C. albicans* 以外でも、Taillan らは、blastomycosis に対し有効な治療結果を得ている²²⁾。河野は、続発性肺クリプトコックス症において両剤の併用が有効であったと報告している²³⁾。

以上、今回の実験結果と、これらの報告から 5-FC と トリアゾール系薬剤である FLCZ との併用は、今後の臨床での検討と、その効果が期待される。

文 献

- 1) 奥平雅彦: 病理解剖からみた真菌症の現況。医学の

- あゆみ 154: 283~287, 1990
- 2) 山口秀世: 抗真菌剤—開発の現況と今後の動向—医学のあゆみ 154: 304~308, 1990
 - 3) Sugar A M, Goldani L Z, Picard M: Treatment of murine invasive candidiasis with amphotericin B and cilofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2128~2130, 1991
 - 4) Albert M M, Graybill J R, Rinaldi M G: Treatment of murine cryptococcal meningitis with an SCH 39304-amphotericin B combination. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1721~1725, 1991
 - 5) Sugar A M: Interactions of amphotericin B and SCH 39304 in the treatment of experimental murine candidiasis: lack of antagonism of polyenazole combination. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1669~1671, 1991
 - 6) Hanson L H, Perlman A M, Clemons K V, Stevens D A: Synergy between cilofungin and amphotericin B in a murine model of candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1334~1337, 1991
 - 7) Larsen R A, Leal M A E, Chan L S: Fluconazole compared with amphotericin B plus flucytosine for cryptococcal meningitis in AIDS. *Ann Int Med* 113: 183~187, 1990
 - 8) Klainer A S, Beisel W R: Opportunistic infection. A review *Am J Med Sci* 258: 431~456, 1969
 - 9) Polak A, Scholer H J, Wall M: Combination therapy of experimental candidiasis, cryptococcosis and aspergillosis in mice. *Chemotherapy* 28: 461~479, 1982
 - 10) 神保武夫, 手島吉彰, 池本秀雄: クリプトコックス髄膜炎に対する 5-fluorocytosine, amphotericin B および両者併用の効果。真菌誌 18: 125~135, 1977
 - 11) 村瀬勢津子, 吉山友二, 朝長文弥, 久米 光: Flucytosine と Amphotericin との併用効果に関する基礎的研究。真菌誌 25: 125~138, 1984
 - 12) Shadomy S, Pfaller M A: Laboratory studies with antifungal agents: Susceptibility test and quantitation in body fluids. *Manual of Clinical Microbiology*, Fifth ed. (Balows Aed.), p.1173~1183, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991
 - 13) Fox R, Neal K R, Leen C L S, Ellis M E, Mandal B K: Fluconazole resistant candida in AIDS. *J Infect* 22: 201~212, 1991
 - 14) Kitchen V S, Savage M, Harris J R W: *Candida albicans* resistance in AIDS. *J Infect* 22: 204~205, 1991
 - 15) Scalapone G M, Mikami Y, Kurita N, Yazawa K, Uno J, Miyaji M: In vitro comparative evaluation of the postantifungal effect: synergistic interaction between flucytosine and fluconazole against *Candida albicans*. *Mycoses* 34: 405~410, 1991
 - 16) Polak A: Combination therapy of experimental candidiasis, cryptococcosis, aspergillosis, wangielliosis in mice. *Chemotherapy* 33: 381~395, 1987
 - 17) Polak A: Combination therapy for systemic mycosis. *Infection* 17: 203~209, 1989
 - 18) Walsh T J, Van Custem J, Polak A M, Graybill J R: Immunomodulation and antifungal therapy of experimental invasive candidosis, histoplasmosis and aspergillosis: recent advances and concepts. *J Med Vet Mycol* 30 (S 1) : 225~240, 1992
 - 19) Allendoerfer R, Marquis A J, Rinaldi M G, Graybill J R: Combined therapy with fluconazole and flucytosine in murine cryptococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 726~729, 1991
 - 20) Fasoli M, Kerridge D: Isolation and characterization of fluoropyrimidine-resistant mutants in two *Candida* species. *Ann N Y Acad Sci* 554: 260~263, 1988
 - 21) Scheven M, Jünemann K, Schramm, H, Hühn W: Successful treatment of a *Candida albicans* sepsis with a combination of flucytosine and fluconazole. *Mycoses* 35: 315~316, 1992
 - 22) Taillan B, Ferrari E, Cosnefroy J Y, Gari-Toussaint M, Michiels J F, Paquis P, Lefichoux Y, Dajardin P: Favourable outcome of blastomycosis of the brain stem with fluconazole and flucytosine treatment. *Ann Med* 24: 71~72, 1992
 - 23) 河野 茂: 次世代抗真菌薬の開発動向, アムホテリシン B およびフルシトシン。総合臨床 42: 303~308, 1993

In vitro and *in vivo* effects on *Candida* spp. of flucytosine combined with fluconazole

Yuzuru Sekine, Tomoko Kamiyama, Chizuko Sakurai
and Mikio Arisawa

Nippon Roche Research Center, 200 Kajiwara, Kamakura, Kanagawa 247, Japan

The antifungal activities of flucytosine (5-FC) combined with fluconazole (FLCZ) against *Candida* spp. were tested *in vitro* and *in vivo*. The combined effects of 5-FC and FLCZ on the development of resistance of *Candida* spp. to 5-FC were also studied *in vitro*.

1) The interaction of combined 5-FC and FLCZ was synergistic or additive for all strains tested except for two highly 5-FC-resistant strains.

2) The combination of 5-FC and FLCZ showed partial synergism in murine candidiasis due to 5-FC-sensitive and -resistant *Candida albicans*.

3) The resistance of *C. albicans* to 5-FC was slower to develop than that of *Candida glabrata*. The rate was influenced by the inoculum size.

4) FLCZ suppressed the development of resistance to 5-FC in both *C. albicans* and *C. glabrata*.

5) The size of the 5-FC-resistant population in 5-FC-sensitive *C. glabrata* strains was in general larger than that in *C. albicans*.

6) The combination of both drugs reduced the frequency of 5-FC-resistant strains in sensitive *C. albicans* by half, but not in *C. glabrata*.