

Itraconazole の生体内活性代謝物 hydroxy-itraconazole の臨床分離株に対する  
*in vitro* 抗真菌活性

三上 襄・矢沢 勝清・西村 和子

千葉大学真核微生物研究センター\*

(平成5年10月18日受付・平成5年12月14日受理)

新しいトリアゾール系抗真菌剤 itraconazole (ITZ) の生体内活性代謝産物である hydroxy-itraconazole (ITZ-OH) の16菌種の臨床分離株に対する *in vitro* 抗真菌活性を ITZ と8種類の対照薬剤との比較で検討した。4種の培地を用いた微量液体希釈法で比較した結果、いずれの菌種に対しても ITZ-OH と ITZ との間には、活性に差が認められなかった。MIC 値におよぼす培地の影響を検討した結果、*Aspergillus fumigatus* では ITZ-OH および ITZ のいずれにおいても、brain heart infusion (BHI) 培地で低い MIC 値を示し、次に“synthetic amino acid medium-fungal” (SAAMF) 培地であった。しかし *Candida albicans* では BHI 培地での MIC 値の判定が難しかった。一方、1%グルコース含有 yeast nitrogen base (YNBG) 培地では、BHI や SAAMF 培地に比べていくぶん MIC 値が高くなる傾向が観察された。ITZ-OH は、*C. albicans* および *Cryptococcus neoformans* に対しては、8種の対照薬剤と比較した場合、同じアゾール系の KCZ と同等の低い MIC 値を示した。*A. fumigatus* に対しては、ketoconazole (KCZ) よりも強く、最も低い MIC 値を示したが皮膚糸状菌に対しては、対照薬剤である amphotericin B (AMPH-B), bifonazole (BFZ), clotrimazole (CTZ), fluconazole (FLCZ), griseofulvin (GRF), KCZ, miconazole (MCZ) とほぼ同様の MIC 値を示した。

**Key words:** 抗真菌剤, itraconazole, 活性代謝産物, hydroxy-itraconazole, MIC 値, *in vitro* 活性

アゾール系の抗真菌剤は、皮膚真菌症に対する外用薬として clotrimazole (CTZ) が初めて導入されて以来、深在性真菌症に有効な薬剤も含めて、これまで econazole (ECZ) や miconazole (MCZ) が、また最近では bifonazole (BFZ) や fluconazole (FLCZ) などが臨床的<sup>1-3)</sup>に用いられてきた。

Itraconazole (ITZ) はヤンセン社によって開発されたトリアゾール系の抗真菌剤で、多くの病原性の真菌に対して幅広い *in vitro* 活性を示すことが報告<sup>4-9)</sup>されている。また、ITZ は、臨床的には、*Aspergillus fumigatus* による感染症に対して特に優れた効果を発揮することがその特徴として報告され<sup>9-12)</sup>、本邦においても、最近上市された。ITZ の作用点は、真菌細胞膜成分であるエルゴステロールの合成の阻害であり<sup>3)</sup>、いわゆる EBI (ergosterol biosynthesis inhibitor) に属する<sup>3)</sup>。しかし ITZ は、脂溶性が高いことから、同じトリアゾール系の薬剤である FLCZ 等の親水性の強い抗真菌剤と異なった生体内動態をとること

が示唆されており、最近になり、ITZ の生体内での代謝経路も少しずつ明らかにされてきた<sup>11)</sup>。それらの研究で、ITZ の生体内での主代謝産物で、活性を有する ITZ-OH (Fig. 1) が、かなり活性発現に重要な役割を果たすことが示唆されてきた<sup>11)</sup>。本研究では、ITZ-OH の抗真菌活性を ITZ および本邦において臨床的に用いられている8種の抗真菌剤 amphotericin B (AMPH-B), bifonazole (BFZ), CTZ, FLCZ, flucytosine (5-FC), griseofulvin (GRF), ketoconazole (KCZ) および MCZ との比較で検討したので報告する。

抗真菌剤のアッセイ用培地としては、他の培地との比較で低い MIC 値を示すことが指摘<sup>9)</sup>されていながら、その作製が煩雑であるなどの理由で、これまであまり用いられることがなかった“Synthetic amino acid medium-fungal” (SAAMF)<sup>4)</sup>が本邦においても、最近市販されるようになったので、本研究では、本培地を中心に、Sabouraud dextrose broth (SAB), brain heart infusion broth

\* 千葉市中央区玄鼻1-8-1

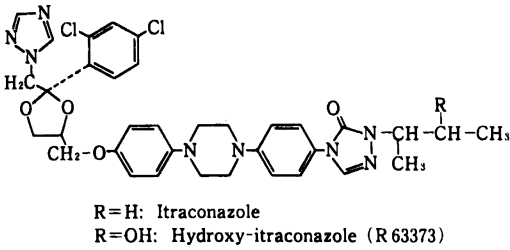


Fig. 1. Structures of itraconazole and hydroxy-itraconazole.

(BHI) および 1% グルコース添加の yeast nitrogen base (YNBG) 培地を用いて比較検討したのでその結果についてもあわせて報告する。

## I. 材料と方法

### 1. 使用菌株

千葉大学真核微生物研究センター化学療法分野において保存されている臨床分離株から、*A. fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton violaceum*, *Sporothrix schenckii* の 16 菌種からそれぞれ 4 株ずつをランダムに選んで使用した。接種菌は Potato dextrose agar (PDA) 上で、酵母様真菌は 3 日間 37°C、糸状菌は 7 日から 14 日間 27°C または 37°C で培養した。酵母様真菌は生理食塩水に懸濁した後に、また糸状菌では 0.02% tween 80 と 10% グリセリン添加の生理食塩水で孢子懸濁液 (孢子着生がほとんど認めれない菌株については、ガラス玉入り試験管で菌糸破断懸濁液を) を作製し、グラスフィルター (No. 3) かガーゼで濾過後に、それぞれ細胞濃度が  $1 \sim 10 \times 10^4$  個/ml になるように生理食塩水で菌数を調整した。また、菌糸破断液では前もって、CFU を求めて、同様の菌数に調整した菌液を保存して用いた。

### 2. 使用薬剤

AMPH-B (日本スクイブ), BFZ (バイエル薬品), CTZ (和光純薬), FLCZ (ファイザー製薬), 5-FC (日本ロシュ), MCZ (持田製薬), GRF (和光純薬), ITZ, ITZ-OH (Janssen Pharmaceutica Co., Ltd, Belgium) の原末を用いた。AMPH-B, BFZ, CTZ, FLCZ, GRF, ITZ, ITZ-OH および MCZ は dimethylsulfoxide (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。

### 3. MIC 値の測定

MIC 値は 96 穴のマイクロプレート (住友ベークライト社製) を用いた微量液体希釈法によって行った。すなわち、2 倍濃度に培地で希釈した薬剤系列を 100  $\mu$ l あて各ウェルに加えた。さらに前述の菌浮遊液を 50  $\mu$ l 加えた。培地は SAB (Difco), YNBG (Difco) と、SAAMF (日本生物材料センター) および BHI (Difco) の 2 倍濃度液を用いた。

MIC 値の判定は、肉眼的に透明な場合を 0 とし、かすかに増殖が認められて濁っている場合を +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場合を +3 のスコアとした<sup>4,13)</sup>。AMPH では 0 を、5-FC と GRF では、+1 以下を、CTZ, BFZ, ITZ, ITZ-OH, FCZ, MCZ 等では、+2 以下を MIC 値の判定基準とした。判定は *C. albicans* では 37°C, 18~24 時間で、他の *Candida* 属および *Cryptococcus*<sup>8)</sup> では 48 時間で、また *Aspergillus* 属菌では 2~3 日間培養後に行った。皮膚糸状菌で 27°C で培養後、7 日目で観察した。

## II. 成績

(1) *C. albicans* および *A. fumigatus* の 4 種の培地での MIC 値の比較

はじめに、ITZ-OH の *C. albicans* と *A. fumigatus* に対する MIC 値が、培地の違いによってどのような変動を示すかを 4 種の培地を用いて検討した (Table 1)。その結果、*C. albicans* に対しては、ITZ-OH および ITZ では、BHI および SAB 培地での MIC 値の測定、すなわち前述の判定基準の +2 である end point の測定が難しく、MIC 値の判定がほとんど不可能であった。この傾向は他のアゾール系の薬剤でも見られ、特に KCZ では、MIC 値の測定が難しかった。一方、SAAMF 培地では ITZ-OH および ITZ は、他の薬剤に比べ、低い MIC 値を示した。実際の ITZ-OH および ITZ の SAAMF 培地での平均の MIC 値は、それぞれ 0.03  $\mu$ g/ml および 0.02  $\mu$ g/ml など、対照薬剤より、さらに低い MIC 値であった。同じ合成培地の YNBG では、ITZ および ITZ-OH とも SAAMF 培地の場合より 1~2 管程度高めの MIC 値が観察された。しかし、5-FC では、YNBG 培地に比較して SAAMF 培地で MIC 値が高くなる傾向が確認された。ITZ-OH と ITZ を比較した場合、MIC 値の相違はわずかで、いずれの培地でもほぼ同等の活性を示すことが明らかになった。

Table 1. Antifungal activity of hydroxy-itraconazole and itraconazole against 4 strains of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* in 4 different media

	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )									
	ITZ	ITZ-OH	AMPH-B	BFZ	CTZ	FLCZ	5-FC	GRF	KCZ	MCZ
<i>C. albicans</i>	0.04 (0.04)	0.02-0.04 (0.03)	0.1-0.2 (0.12)	6.25 (6.25)	0.1-0.2 (0.12)	0.8-1.6 (0.95)	0.05 (0.05)	50 (50)	0.2 (0.2)	0.1-0.2 (0.12)
<i>A. fumigatus</i> YNBG	0.31-0.63 (0.45)	0.63 (0.63)	0.4-0.8 (0.48)	3.1-6.25 (3.69)	1.6 (1.6)	>100 (>100)	0.2-0.4 (0.24)	>100 (>100)	25 (25)	3.1 (3.1)
<i>C. albicans</i>	0.02-0.04 (0.03)	0.02-0.04 (0.02)	0.2 (0.2)	1.6-3.1 (1.89)	0.05-0.1 (0.08)	0.4 (0.4)	12.5 (12.5)	25-50 (35.36)	0.01 (0.01)	0.1-0.2 (0.12)
<i>A. fumigatus</i> SAAMF	0.08-0.16 (0.11)	0.08-0.16 (0.11)	1.6-3.1 (1.89)	1.6-3.1 (2.63)	0.4-0.8 (0.67)	>100 (>100)	25-50 (29.73)	>100 (>100)	1.5-3.1 (2.63)	0.2 (0.2)
<i>C. albicans</i>	ND	ND	0.05-0.1 (0.07)	3.1 (3.1)	0.3-0.6 (0.36)	3.1-6.25 (4.40)	1.6 (1.6)	50->100 (>84.09)	0.03-0.8 (0.17)	0.1-3.1 (1.31)
<i>A. fumigatus</i> SAB	0.04-0.08 (0.06)	0.08-0.16 (0.11)	0.8 (0.8)	3.1 (3.1)	0.8 (0.8)	>100 (>100)	3.1-6.25 (4.40)	>100 (>100)	12.5 (12.5)	1.6-3.1 (2.23)
<i>C. albicans</i>	ND	ND	0.1-0.2 (0.12)	1.6 (1.6)	0.3 (0.3)	0.8-6.25 (1.34)	100 (100)	>100 (>100)	ND	0.05-0.3 (0.11)
<i>A. fumigatus</i> BHI	0.04-0.08 (0.05)	0.08 (0.08)	0.8-1.6 (0.95)	1.6 (1.6)	0.8 (0.8)	>100 (>100)	100->100 (>100)	>100 (>100)	3.1-6.25 (4.40)	3.1-6.25 (4.40)

MIC values show the MIC ranges of 4 strains and the values in parentheses show geometrical means of 4 strains.

ND: not determined

ITZ: itraconazole, ITZ-OH: hydroxy-itraconazole, AMPH-B: amphotericin B, BFZ: bifonazole, CTZ: clotrimazole, FLCZ: fluconazole, 5-FC: flucytosine, GRF: griseofulvin, KCZ: ketoconazole, MCZ: miconazole

*A. fumigatus* に対する活性を測定した場合 (Table 1), *C. albicans* の場合と異なって, BHI および SAB 培地のいずれにおいても, end point の判定が容易であり, また ITZ-OH および ITZ のいずれにおいても, BHI と SAB 培地で低い MIC 値が観察された。BHI および SAB 培地での ITZ-OH の MIC 値は, それぞれ 0.08  $\mu\text{g/ml}$  および 0.11  $\mu\text{g/ml}$  であり, BHI 培地では, YNBG や SAAMF 培地と比較して, 1 管から 2 管程度低い MIC 値が観察された。一方, BFZ, CTZ, KCZ, MCZ では, BHI 培地より, 他の培地でより低い MIC 値が観察された。対照薬剤の中では, AMPH-B, CTZ および MCZ で低い MIC 値が観察され, 続いて KCZ であった。5-FC は *C. albicans* の場合と同様に, YNBG 培地でもっとも低い MIC 値が観察された。AMPH-B はいずれの培地でも, 同様の MIC 値を示したが, SAB, BHI でより低い MIC 値を示す傾向が観察された。

次に, 検定培地を SAAMF に限定して, ITZ-OH および ITZ の他の病原真菌に対する活性を 8 種の抗真菌剤と比較した (Table 2)。

酵母様真菌としては *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. neoformans* および *T. cutaneum*, 皮膚糸状菌である *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. violaceum*, *M. canis*, *M. gypseum*, さらに *E. floccosum* を用いて MIC 値を, 対照薬剤との比較で検討した (Table 2)。

ITZ-OH および ITZ は *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, 等の酵母様真菌に対しては, 対照として用いた BFZ, CTZ, KCZ, MCZ および AMPH-B と同等かそれ以下の MIC 値を示した。また *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. violaceum* 等の皮膚糸状菌に対しては, 対照薬である AMPH-B, BFZ, CTZ, GRF, KCZ および MCZ とほぼ同等の活性を示した。ITZ-OH および ITZ 間では, いずれの菌種でもその活性に差はほとんど認められなかった。

### III. 考 察

ITZ の生体内での主代謝活性産物である ITZ-OH について, *in vitro* 活性を臨床的に用いられている 8 薬剤との比較において検討した。その結果, ITZ-OH は真菌症の原因菌としてもっとも重要な *A. fumigatus* や *C. albicans* および *C. neoformans* に対して, ITZ と同様に強い *in vitro* 活性を示すことが明らかになった。特に *A. fumigatus* に対しては, 8 対照薬剤と比べても明らかに強い活性を有していた。

異なった培地で, ITZ-OH および ITZ の MIC 値

がどの程度, 変動するかを検討した結果, 用いた 4 種類の培地の中で, *A. fumigatus* に対しては BHI 培地が高い MIC 値を示したが, *C. albicans* では MIC 値の測定, すなわち end point の読みとりが非常に困難であり, BHI 培地は *C. albicans* に限って言えば, MIC 値の測定には不向きであった。

しかし, この結果は, *C. albicans* を除いて BHI 培地が ITZ の *in vitro* 活性の測定において低い MIC 値を示すと言う Cutsem 等<sup>9,10)</sup> の報告を支持するものであった。一方, SAAMF 培地は *C. albicans* においても MIC 値, すなわち, 薬剤の増殖の阻害点である end point (+2) の読みとりが容易であり, また他のアゾール系の薬剤においても比較的低い MIC 値を示し, 現時点では本培地はアゾール系抗真菌剤の活性の比較培地として, より適当と思われる。しかし, 5-FC や AMPH-B では, SAAMF 培地でかなり MIC 値が高くなり, これまで通り, 液体培地に限って言えば, 5-FC では YNBG を, AMPH-B では BHI や SAB 培地を使うことがより適当と思われる。また SAAMF 培地は液体培地で, 販売されており, 長期間の保存で, 結晶等の析出の問題が依然解決されていないことから, すでに報告した YNBG を MOPS バッファー等で pH を変えた培地や, 米国 (NCCLS Documents M 27-P, vol 12, No. 25) で使用されている組織培養用の培地である RPMI-1640 等についても, さらに比較検討する必要がある。

ITZ が生体内で酵素的に代謝を受けて排泄されることが報告<sup>11)</sup> され, それらの生体内代謝産物として, ITZ の piperazine 環や dioxolane 環, さらには triazolone 環が酸化的に開裂した代謝産物, また多くの部位での N-脱アルキル化や O-脱アルキル化された代謝産物が報告<sup>4)</sup> されている。それらの中で側鎖のメチレンが酸化された ITZ-OH がもっとも強い活性を持つとされている<sup>11)</sup>。そこで今回, その精製物を用いて活性を検討した結果, ITZ-OH は ITZ とほぼ同等の活性を有することを明らかにすることができた。これまでの研究では, ITZ-OH が ITZ 投与後ある条件下で ITZ 以上の高い血中濃度になることも報告<sup>11)</sup> されており, 今後の ITZ-OH の生体内での役割の詳細な研究は, さらに優れた ITZ 誘導体の開発につながる可能性もある。

*A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. neoformans* 以外に, ITZ はまた経口投与で皮膚糸状菌症に対してきわめて有効であることが明らかになっている。そこで GRF との比較も行った結果, ITZ-OH のみならず ITZ-OH も多くに皮膚糸状菌に対して, GRF よりも

Table 2. Comparison of antifungal activities of itraconazole and hydroxy-itraconazole against 4 strains of 14 species of pathogenic fungi in SAAMF medium

	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )									
	ITZ	ITZ-OH	AMPH-B	BFZ	CTZ	FLCZ	5-FC	GRF	KCZ	MCZ
<i>C. glabrata</i>	0.4-0.8	0.4-0.8	$\leq 0.1-0.4$	0.4-0.8	0.8-12.5	12.5-25	$\leq 0.1-0.4$	>100	0.4-3.1	0.1-0.4
<i>C. guilliermondii</i>	$\leq 0.1-0.4$	$\leq 0.1-0.8$	0.1-0.4	0.2-0.8	$\leq 0.1-0.8$	6.25->100	$\leq 0.1-0.4$	>100	$\leq 0.1-0.4$	0.2-1.6
<i>C. tropicalis</i>	<0.1	<0.1-0.4	0.1-0.4	0.8-6.25	<0.1	0.2-1.6	0.2-0.8	>100	$\leq 0.1$	<0.1-0.16
<i>C. parapsilosis</i>	<0.1-0.4	<0.1	0.1-0.2	1.6-3.1	<0.1-0.2	1.6-3.1	0.2-1.6	>100	$\leq 0.1$	0.2-0.8
<i>C. krusei</i>	0.4	0.2-0.4	0.8-0.6	0.8-3.1	0.8-1.6	1.6-25	12.5	>100	0.4-1.6	0.8-1.6
<i>C. neoformans</i>	0.04-0.16	0.08-0.16	0.1-0.2	0.8-3.1	0.4-0.8	6.25-12.5	6.25-50	>100	$\leq 0.1$	0.1-0.2
<i>T. cutaneum</i>	0.2-1.6	0.2-0.4	0.1-0.4	0.8-3.1	0.4	3.1	6.25	>100	0.8	0.4-1.6
<i>T. mentagrophytes</i>	0.6-6.25	0.8-1.6	1.6-3.1	1.0-3.1	0.4-0.8	25-50	>100	1.6-3.1	0.2-1.6	0.4-0.8
<i>T. rubrum</i>	0.2-1.6	0.2-0.8	3.1	0.2-0.8	0.4	12.5-100	>100	3.1	1.6-3.1	3.1
<i>S. schenckii</i>	0.4-0.8	0.2-1.6	0.4-1.6	0.8-3.1	0.2	50->100	>100	1.6-3.1	0.8-1.6	0.8-3.1
<i>T. violaceum</i>	0.4-0.8	0.4-0.8	0.8-3.1	0.8-1.6	0.8-1.6	50->100	>100	0.8-1.6	1.6-6.25	1.6-6.25
<i>M. canis</i>	0.2-0.4	0.2-0.4	1.6-3.1	0.8-1.6	0.2-0.4	25	>100	0.8	1.6-3.1	0.8-1.6
<i>M. gypseum</i>	1.6	0.8	1.6-6.25	1.6-6.25	0.4-1.6	25-100	>100	1.6-3.1	3.1-6.25	1.6-3.1
<i>E. floccosum</i>	0.2	0.4	1.6	0.8	0.4	1.6	>100	0.8	0.4	0.4

MIC values show the MIC ranges of 4 strains.

Medium: SAAMF medium was used.

ITZ: itraconazole, ITZ-OH: hydroxy-itraconazole, AMPH-B: amphotericin B, BFZ: bifonazole, FLCZ: clotrimazole, CTZ: clotrimazole, 5-FC: flucytosine, GRF: griseofulvin, KCZ: ketoconazole, MCZ: miconazole

強い *in vitro* 活性を示した。またこれらの菌種に対して ITZ-OH と ITZ に差は認められなかった。

アゾール系特にトリアゾール系の薬剤は MIC 値にもとづく *in vitro* 活性が *in vivo* 活性を反映しない代表的な薬剤として報告<sup>4,15,16)</sup>されてきた。事実、寒天希釈法等では、明らかに高い MIC 値が得られ、アゾール系の薬剤では、MIC 値を決定するための end point の判定も容易でなく、実験毎に MIC 値がバラつくことから、結果的に高い MIC 値がでてしまうことが明らかになっている。また通常の抗細菌剤の活性測定に用いられる接種菌量では、高い MIC 値がでてくるとも報告されている。したがってアゾール系の薬剤の活性の測定には、特別の工夫があることが指摘されてきた。これらのことから抗真菌剤の分野では *in vivo* と *in vitro* での高い相関性が発揮されるアッセイ系を求めて、改良が盛んになされてきた<sup>17-19)</sup>。その主な改良点は培地成分であり、接種菌量や MIC 値の測定時間等であった。今回我々が用いた MIC 値の測定法では前回にならって、MIC 値の判定において、阻害程度を 4 段階に分けて MIC 値の判定基準を細かく定義した。さらに接種菌量も少なくして、MIC 値の判定をより容易にした。またアゾール系の薬剤に対する MIC 値の判定が特に難しい *C. albicans* では測定時間を短くしたことなど、きめ細かく条件を設定したことにより、ITZ-OH のみならず ITZ において、*in vivo* 効果を十分説明できる *in vitro* 活性が認められた。しかしながら、皮膚糸状菌では、*T. mentagrophytes* や *S. schenckii* の一部の菌株を除いて、均一な孢子液の作製が容易でなく、必ずしも期待通りの均一な接種液とならず、MIC 値の変動をしばしば経験した。したがってこれらの真菌では、いかに孢子の着生率を高めるかは、MIC 値の測定には重要な検討課題である。

MIC 値の客観的な測定法に関しては、我々は最近、SAAMF および YNBG 培地に MTT 色素法を組み合わせることにより、比較的客観的に、MIC 値を測定する方法を報告した<sup>20)</sup>。またさらに最近では MTT 色素より取扱いが容易な色素、XTT や MTS<sup>21)</sup> が報告されており、抗真菌剤の *in vitro* アッセイ法にも、より客観的に測定できる方法の検討がはじまっている。

#### 文 献

- 1) 伊藤 章: 抗真菌薬の使い方, 医薬ジャーナル社, p.1~146, 1988
- 2) Fromtling R A: Overview of medically important antifungal azole derivatives. Clin. Microbiol. Rev. 1: 187~217, 1988
- 3) Dismukes W E: Azole antifungal drugs, old and new. Ann. Intern. Med. 109, 177~179, 1988
- 4) 三上 襄, 矢沢勝清, 松前昭廣: 抗真菌剤の MIC 値におよぼす検定用培地の影響。Chemotherapy 39: 761~770, 1991
- 5) 平谷民雄, 山口英世: Itraconazole の *in vitro* 抗真菌活性に関する研究。Jap. J. Antibiot. 44: 580~587, 1991
- 6) 内田勝久, 松坂厚子, 青木興治, 山口英世: 新トリアゾール系抗真菌剤 Itraconazole の深在性真菌症患者分離株に対する *in vitro* 抗真菌活性。Jap. J. Antibiot. 44: 562~570, 1991
- 7) Odds F C, Webster C E, Abbott A B: Antifungal relative inhibition factors: BAY 1-9139, bifonazole, butoconazole, isoconazole, itraconazole (R 51211), oxiconazole, Ro 14-4767/002, sulconazole, terconazole and vibunazole (BAY n-7133) compared *in vitro* with nine established antifungal agents. J. Antimicrob. Chemother. 14: 105~114, 1984
- 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) Cutsem J V, Gerven F V, Van De Ven M, Borgers M, Janssen P A J: Itraconazole, a new triazole that is orally active in aspergillosis. Antimicrob. Agents Chemother. 26: 527~534, 1984
- 10) Cutsem J V, Gerven F V, Janssen P J: Activity of orally, topically, and parenterally administered itraconazole in the treatment of superficial and deep mycoses; animal models. Rev. Infect. Dis 9: S15~S32, 1987
- 11) Cutsem J Van: The *in-vitro* antifungal spectrum of itraconazole. Mycoses 32: 7~13, 1989
- 12) Cutsem J V: Oral, topical and parenteral antifungal treatment with itraconazole in normal and in immunocompromised animals. Mycoses 32: 14~34, 1989
- 13) 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
- 14) Heykants J A Van Peer A, Van de Velde V, Van Rooy P, Meuldermans W, Lavrijsen K, Woestenborghs R, Van Cutsem J, Cauwenbergh G: The clinical pharmacokinetics of itraconazole: An overview. Mycoses 32: 67~87, 1989
- 15) Pfaller M A, Dupont B, Kobayashi G, Muller J, Rinaldi M G, Espinel-Ingroff A, Shadomy S, Troke P F, Walsh J, Warenock D W: Standardized susceptibility testing of fluconazole: an international collaborative study. Antimicrob.

- Agents Chemother. 36: 1805~1809, 1989
- 16) Rogers T E, Galgiani 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
- 17) Mikami Y, Scalapone G M, Kurita N, Yazawa K, Uno J, Miyaji M: Synergistic postantifungal effect of flucytosine and fluconazole on *Candida albicans*. J. Med. Vet. Mycol. 30: 197~206, 1992
- 18) Mikami Y, Takahashi K, Yazawa K, Terao K, Ueno Y: Synergistic interaction of miconazole and fluconazole at sub-MIC level on *Candida albicans*. Mycoses 35: 321~327, 1992
- 19) Scalapone G M, Mikami Y, Kurita K, Yazawa K, Miyaji M: Comparative studies on the postantifungal effect produced by the synergistic interaction of flucytosine and amphotericin B on *Candida albicans*. Mycopathol. 120: 133~138, 1992
- 20) Mikami Y, Sakamoto T, Yazawa K, Gono T, Ueno Y, Hasegawa S: Comparison of *in vitro* antifungal activity of itraconazole and hydroxy-itraconazole by colorimetric MTT assay. Mycoses, in press.
- 21) Buttke T M, McCubrey J A, Owen T C: Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. J. Immunol. Methods 157: 233~240, 1993

*In vitro* antifungal activities of hydroxy-itraconazole,  
an active metabolite of itraconazole

Yuzuru Mikami, Katsukiyo Yazawa and Kazuko Nishimura

Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University,

1-8-1, Inohana, Chuo-ku, Chiba 260, Japan

The *in vitro* antifungal activity of hydroxy-itraconazole (ITZ-OH), an active metabolite of itraconazole (ITZ) was determined by a liquid microdilution assay method using four different media: Sabouraud dextrose broth (SAB), synthetic amino acid medium-fungal (SAAMF), yeast nitrogen base with 1% glucose (YNBG) and brain heart infusion broth (BHI). ITZ-OH showed almost the same antifungal activity as ITZ against all tested filamentous and yeast-like fungi. When the activities of ITZ-OH and ITZ were compared with those of 8 reference antifungals, *i. e.*, amphotericin B, bifonazole, clotrimazole, fluconazole, flucytosine, griseofulvin, ketoconazole and miconazole, both drugs were found to have much higher activities against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. However, the MIC values of ITZ-OH and ITZ against dermatophytes, including *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* were similar to those of reference antifungals. The MIC values of ITZ-OH and ITZ fluctuated depending on the medium used. The lowest MIC value was observed with *A. fumigatus* in BHI medium. However, the MIC end point of ITZ-OH and ITZ against *C. albicans* was difficult to determine in the medium. SAAMF medium was considered a good choice for MIC determination in *C. albicans*.