

微量液体希釈法による口腔・食道カンジダ症分離株の感受性試験

— 各種抗真菌薬の *in vitro* 活性と fluconazole の *in vitro/in vivo* 活性相関 —

須藤 貴子¹⁾・榎村 浩一¹⁾・川田かおる²⁾・伊藤 章²⁾

岡 慎一³⁾・内田 勝久¹⁾・山口 英世¹⁾

¹⁾ 帝京大学医真菌研究センター

²⁾ 横浜市立大学医学部臨床検査部

³⁾ 東京大学医科学研究所感染症研究部

(現: 国立国際医療センター第四内科)

(平成 8 年 10 月 21 日受付・平成 9 年 1 月 10 日受理)

国内 2 施設の口腔・食道カンジダ症症例から分離された *Candida albicans* その他の *Candida* 属菌種 74 株および *C. albicans* 保存株 100 株の抗真菌薬感受性について、日本医真菌学会提案法にもとづいて作製した抗真菌薬感受性測定キット「酵母様真菌 FP」を用いて測定を行うとともに、fluconazole (FLCZ) 療法施行例について分離株の *in vitro* 感受性と治療への反応性との相関について検討した。本キットを用いた試験にて得られた 5 種の抗真菌薬の臨床分離株に対する MIC 値の範囲は、amphotericin B (0.12~2 $\mu\text{g/ml}$) を除けば、fluconazole $\leq 0.12 \sim > 64 \mu\text{g/ml}$, itraconazole $\leq 0.016 \sim > 8 \mu\text{g/ml}$, miconazole $\leq 0.06 \sim 2 \mu\text{g/ml}$, flucytosine $\leq 0.12 \sim 8 \mu\text{g/ml}$ と広範囲におよんでおり、各抗真菌薬特にアゾール系薬剤の MIC が比較的高い分離株の出現頻度は予想以上に高いことが示された。また臨床分離株に対する各薬剤の MIC 分布のパターンは、保存株のそれと近似していた。今回得られた分離株のなかには、アゾール系 3 薬剤すべてに低い感受性を示すものと、特定の 1 薬剤のみに感受性が低下しているものが認められた。FLCZ 治療患者群からの分離菌株の FLCZ 感受性と治療効果との間には、有意な相関性が認められた。以上の成績から、「酵母様真菌 FP」を用いた抗真菌薬感受性試験が臨床の有用性をもつ可能性が示唆された。

Key words: 抗真菌薬, 感受性試験, カンジダ症

病原性酵母, 特に *Candida* 属菌種に起因する重篤な深在性真菌症は、易感染患者の医療管理のうえで今日益々大きな問題となっている。いったん発症した患者に迅速かつ適切な抗真菌薬化学療法を実施することは医療対策としてとりわけ重要である。この目的に使用可能な抗真菌薬は、アゾール系薬剤が出現するまでは amphotericin B (AMPH-B) および flucytosine (5-FC) の 2 剤に限られていた。しかも、前者は安全性が低い点に、また後者は耐性獲得が容易に起こる点に短所があり、これが両薬剤の臨床的有用性をかなり制約してきた。本邦では 1980 年代以降、miconazole (MCZ), fluconazole (FLCZ) および itraconazole (ITCZ) の順に 3 種のアゾール系抗真菌薬が相次いで臨床へ導入され、薬剤選択の幅が広がった。しかしその一方で、臨床的にもっとも繁用されている FLCZ については、本剤の長期投与による耐性菌の出現が報告されるようになった¹⁻³⁾。これらの理由から、有効な抗真菌薬化学療法を行ううえで、標準化された薬剤感受性試験にもとづく最適治療薬の選択の必要性は、今日ま

すますます高まっている。

抗真菌薬感受性試験法の標準化の試みとしては、1992 年米国 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) の提案したマクロ液体希釈法による感受性測定法 (M-27 P) がある⁴⁾。また国内においては、M-27 P に改良を加えたマイクロ液体希釈法による感受性測定法が 1995 年に日本医真菌学会標準化委員会から提案された⁵⁾。

「酵母様真菌 FP」(栄研化学) は、日本医真菌学会提案法に準じた試験試薬として開発され、保存株を用いて行った比較試験における測定結果は日本医真菌学会提案法と高い一致率を示した⁶⁾。今回我々は、「酵母様真菌 FP」の臨床的有用性評価の一環として、国内の 2 施設における口腔・食道カンジダ症症例由来の *Candida* 属真菌の新鮮分離株を対象に本試薬キットによる抗真菌薬感受性測定を行い、保存株のそれと比較検討した。さらに fluconazole 投与を受けた一部の症例について、分離株の fluconazole 感受性による治療効果との相関性を解析した。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

1) 臨床分離株

東京大学医学研究所附属病院および横浜市立大学医学部附属病院の2施設において、1991年10月から1995年12月の期間に、口腔カンジダ症および食道カンジダ症あわせて38症例(ただしカンジダ血症発症例2例を含む)から分離された *Candida* 属真菌74株(Table 1)を用いた。全症例ともAIDS患者であった。分離株の同定は、各施設で行い、さらに帝京大学医真菌研究センターにおいて主として Vitek YBC カードを用いた自動同定システムによって確認した。

2) 保存株

帝京大学医真菌研究センター保存株のなかから任意に選んだ *Candida albicans* 100株を用いた。

2. 感受性測定法

試験菌株の抗真菌薬感受性測定には、日本医真菌学会提案法に従って作製された微量液体希釈法を原理とする抗真菌薬感受性測定用プレート「酵母様真菌 FP」を使用し、帝京大学医真菌研究センターにて測定を実施した。この試薬キットは、RPMI 1640 培地にて10段階希釈した薬液を96穴マイクロプレートの各穴に分注後、凍結保存させたものである⁹⁾。また試験対象となる薬剤とその濃度範囲は、AMPH-B: 0.03~16 $\mu\text{g/ml}$, 5-FC: 0.12~64 $\mu\text{g/ml}$, FLCZ: 0.12~64 $\mu\text{g/ml}$, ITCZ: 0.016~8 $\mu\text{g/ml}$, MCZ: 0.06~32 $\mu\text{g/ml}$ とした。接種菌液は、滅菌生理食塩水にて McFarland 標準濁度 0.5 に調整し、希釈後 $1\sim 5 \times 10^8$ 細胞/ml を接種菌量とした。培養は 35 $^{\circ}\text{C}$ にて行い、72時間を限度に24時間毎に観察し、発育コントロールの濁度が基準(液量 200 μl の場合、波長 630 nm で測定した時の濁度 0.2) に達した時点で判定を行った。終末点(end point)は、発育コントロールに対する80%発育阻止濃度(IC₈₀)とし、その値を最小発育阻止濃度(MIC)と表示した。

3. 統計処理

臨床分離株と保存株間、および2施設間でのMIC値分布の比較には2標本検定(F検定)を用い、FLCZ治療群患者からの分離株に対する本剤のMIC値と治療効果との相関は Φ 係数にもとづいて解析した。

II. 結果

1. 臨床分離株に対するMICおよび保存株との比較

36症例から分離された *C. albicans* 68株、各1症例から分離された *Candida krusei* 4株、*Candida parapsilosis* 1株および *Candida tropicalis* 1株の抗真菌薬感受性を「酵母様真菌 FP」を用いて測定した結果をTable 1に示す。大多数を占める *C. albicans* 菌株に対する各薬剤のMICについては、その分布範囲が比較的狭いといわれる AMPH-Bでも0.12~2 $\mu\text{g/ml}$ と予想以上に広いことが認められた。また5-FCは、すべての

菌株に対して $\leq 0.12\sim 1 \mu\text{g/ml}$ という比較的低いMICを示した。これらの薬剤に比べて、アゾール系3剤のMICは幅広く分布することが認められた。なかでもFLCZはもっとも広い分布範囲を示し、大多数の分離株に対するMICは $\leq 0.12\sim 4 \mu\text{g/ml}$ の範囲にあったが、それより高いMICを示す分離株が4株含まれていた。大多数の分離株に対するITCZおよびMCZのMICは、それぞれ $\leq 0.016 \mu\text{g/ml}$ および $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$ であったが、ITCZ感受性が低い分離株(MIC, $\geq 0.25 \mu\text{g/ml}$) およびMCZ感受性が低い分離株(MIC, $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$) もそれぞれ8株および6株含まれていた。

Non-*albicans Candida* spp. の分離株のなかで、*C. parapsilosis* 1株はすべての薬剤に対して大多数の *C. albicans* と同様の感受性を示した。一方、*C. tropicalis* 1株の3種のアゾール系薬剤に対する感受性は低く、FLCZ, ITCZ, およびMCZのMICはそれぞれ $>64 \mu\text{g/ml}$, $>8 \mu\text{g/ml}$ および $2 \mu\text{g/ml}$ であった。また *C. krusei* 4株は、AMPH-Bを除く4薬剤すべてに低感受性であり、各薬剤のMICは5-FC 8 $\mu\text{g/ml}$, FLCZ 16 $\mu\text{g/ml}$, ITCZ 0.25 $\mu\text{g/ml}$, MCZ 1 $\mu\text{g/ml}$ であった。

Fig. 1に *C. albicans* 臨床分離株68株の各薬剤に対するMIC分布を保存株100株のそれと比較した成績を示す。*C. albicans* 臨床分離株に対する5薬剤のMICの分布範囲は、AMPH-B 0.12~2 $\mu\text{g/ml}$, 5-FC $\leq 0.12\sim 1 \mu\text{g/ml}$, FLCZ $\leq 0.12\sim >64 \mu\text{g/ml}$, ITCZ $\leq 0.016\sim 0.5 \mu\text{g/ml}$, MCZ $\leq 0.06\sim 2 \mu\text{g/ml}$ であることが示された。これらの臨床分離株68株に対する各薬剤のMIC分布のパターンは、5-FC および ITCZ に関して保存株100株に含まれているような高度の5-FC感受性が著しく低い株(MIC, $>64 \mu\text{g/ml}$) および ITCZ感受性が著しく低い株(MIC, $>8 \mu\text{g/ml}$) が臨床分離株中には見られなかったことを除けば、全体的に保存株のそれと良く一致し、両菌株群間に有意差は認められなかった($P>0.05$) (Fig. 1)。

臨床分離株中に見られたアゾール系抗真菌剤に対する低感受性株には、アゾール系3薬剤すべてに感受性低下をきたしたもの(症例No. 2, 3, 4, 20, 30)と、2薬剤に対する感受性が低下したもの(症例No. 2), および特定の1薬剤に対してのみ感受性低下を示すもの(症例No. 8, 15, 33)が認められた。

Fig. 2に2施設間での *C. albicans* 臨床分離株に対する各薬剤のMIC値分布の比較を示す。両施設の間ではどの薬剤についても有意差は認められなかった($P>0.05$)。しかし詳細に見ると、FLCZとMCZで統計量Fの値はそれぞれ2.79および1.52となり、これらの値は他の3剤の値(AMPH-B, 0.05; 5-FC, 0.65; ITCZ, 0.34)のいずれよりも高かったFLCZとMCZが他の3薬剤よりは、2施設間のMIC値分布が異なる傾向を示すことがうかがわれた。

Table 1-1. Data on patients with candidiasis and their isolates including types of infection, species of causative agent, clinical response to anti-fungal chemotherapy and *in vitro* susceptibility to 5 different antifungal drugs

Case no.	Age/Sex	Types of infection	Date of isolating	Isolated organisms	Antifungal treatment	Clinical response	Drug susceptibility of isolates as represented by MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
							AMPH-B	5-FC	FLCZ	ITCZ	MCZ
1	41/M	oral candidiasis	91.10.18	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	0.5	≤ 0.12	0.25	≤ 0.016	≤ 0.06
2	42/M	oral candidiasis/ candidemia	93. 3. 9	<i>C. albicans</i>	FLCZ/AMPH	poor	0.5	≤ 0.12	4	0.03	0.5
			93. 4.19	<i>C. albicans</i>	FLCZ/AMPH	poor	1	≤ 0.12	>64	0.5	1
3	24/M	oral candidiasis	93. 7.12	<i>C. albicans</i>	FLCZ/AMPH	poor	1	≤ 0.12	64	0.5	2
4	21/M	oral candidiasis	93.12.13	<i>C. albicans</i>	FLCZ/AMPH	poor	1	≤ 0.12	8	0.25	1
5	26/M	oral candidiasis	94. 1.28	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
6	43/?	oral candidiasis	94. 3. 8	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
			94. 5.17	<i>C. albicans</i>	untreated		1	0.25	0.25	≤ 0.016	≤ 0.06
			94. 8.16	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
			94.11.28	<i>C. albicans</i>	untreated		1	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
7	53/M	oral candidiasis	94. 3. 8	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
			94. 6. 7	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
			94. 9.27	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
			95. 1.24	<i>C. albicans</i>	untreated		1	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
8	23/M	oral candidiasis	94. 3.22	<i>C. albicans</i>	untreated		0.25	≤ 0.12	0.25	0.25	≤ 0.06
			94. 5.17	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	0.25	0.25	≤ 0.06
			94. 8. 2	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	0.25	0.25	≤ 0.06
			95. 1.10	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	0.25	0.25	≤ 0.06
9	18/M	oral candidiasis	94. 3.22	<i>C. albicans</i>	untreated		0.12	≤ 0.12	≤ 0.12	0.03	≤ 0.06
			95.10. 3	<i>C. albicans</i>	untreated		1	1	0.5	0.06	≤ 0.06
10	28/M	oral candidiasis	94. 4. 5	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	0.25	0.25	≤ 0.016	≤ 0.06
			94. 5.24	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	0.03	≤ 0.06
			95. 1.10	<i>C. albicans</i>	untreated		1	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
11	56/M	oral candidiasis	94. 4.15	<i>C. albicans</i>	untreated		1	0.25	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
12	24/?	oral candidiasis	94. 4.19	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
			94. 8.23	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
			95. 1.17	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
13	27/M	oral candidiasis	94. 5.10	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	0.25	0.03	≤ 0.06
			94. 8.16	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	0.25	≤ 0.016	≤ 0.06
			94.10.11	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
			94.11.29	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
14	?/M	oral candidiasis	94.12.20	<i>C. albicans</i>	untreated		1	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
			94. 5.13	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	0.5	≤ 0.12	0.25	≤ 0.016	≤ 0.06
15	45/F	oral candidiasis	94. 5.22	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	0.5	≤ 0.12	0.25	≤ 0.016	≤ 0.06
			94. 7. 4	<i>C. albicans</i>	FLCZ/AMPH	poor	1	≤ 0.12	8	≤ 0.016	0.25
16	34/M	candida esophagitis	94. 5.24	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	0.5	≤ 0.12	0.25	≤ 0.016	≤ 0.06
17	46/M	oral candidiasis	94. 5.31	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	1	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
			94.11. 1	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	1	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
18	25/F	oral candidiasis	94. 6.14	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	0.25	≤ 0.016	≤ 0.06
			94. 7.19	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	0.5	0.25	0.03	≤ 0.06
			94.11.15	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	0.25	≤ 0.016	≤ 0.06
19	28/M	oral candidiasis	94. 6.14	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	0.5	≤ 0.12	0.25	0.03	≤ 0.06
			94. 8.30	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	0.25	0.03	≤ 0.06
			94.12.27	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	0.25	0.03	≤ 0.06
20	21/M	oral candidiasis	94. 6.20	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	2	≤ 0.12	2	0.25	0.5
21	28/M	oral candidiasis	94. 7. 5	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06

AMPH-B: amphotericin B, 5-FC: flucytosine, FLCZ: fluconazole, ITCZ: itraconazole, MCZ: miconazole

Table 1-2. Data on patients with candidiasis and their isolates including types of infection, species of causative agent, clinical response to antifungal chemotherapy and *in vitro* susceptibility to 5 different antifungal drugs

Case no.	Age/Sex	Types of infection	Date of isolating	Isolated organisms	Antifungal treatment	Clinical response	Drug susceptibility of isolates as represented by MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
							AMPH-B	5-FC	FLCZ	ITCZ	MCZ
22	4/M	oral candidiasis	94. 7.12	<i>C. albicans</i>	AMPH	ND	0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
23	34/F	oral candidiasis	94. 7.21	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
24	46/M	oral candidiasis	94. 7.21	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
25	49/M	oral candidiasis	94. 7.22	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	0.5	≤ 0.12	0.25	≤ 0.016	≤ 0.06
26	25/?	oral candidiasis	94. 8.29	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
			94.10.11	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
			95. 1.17	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
27	55/M	oral candidiasis	94. 9.13	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	1	0.5	≤ 0.12	0.03	≤ 0.06
28	30/M	oral candidiasis	94.12. 6	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	0.03	≤ 0.06
		oral candidiasis	95. 1.13	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	0.03	≤ 0.06
		candida esophagitis	95. 1. 23	<i>C. albicans</i>	MCZ	poor	0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	0.03	≤ 0.06
29	25/M	oral candidiasis	94.12.22	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	0.5	≤ 0.12	0.25	≤ 0.016	≤ 0.06
30	47/M	oral candidiasis	94.12.22	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	0.5	≤ 0.12	4	0.12	0.5
31	45/M	oral candidiasis	95. 1.17	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	0.25	≤ 0.016	≤ 0.06
32	22/M	oral candidiasis	95. 1.31	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
33	22/M	oral candidiasis	95. 2. 7	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	0.25	0.12	≤ 0.06
			95. 2.21	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	0.03	≤ 0.06
			95. 7.18	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
34	25/M	oral candidiasis	95. 4.18	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	≤ 0.016	≤ 0.06
35	31/M	oral candidiasis	95. 7. 4	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	0.25	≤ 0.016	≤ 0.06
			95.12.26	<i>C. albicans</i>	untreated		0.5	≤ 0.12	0.25	≤ 0.016	≤ 0.06
36	25/M	oral candidiasis	95. 6.27	<i>C. albicans</i>	FLCZ	good	0.5	≤ 0.12	≤ 0.12	0.03	≤ 0.06
		candida esophagitis	95. 7.11	<i>C. parapsilosis</i>	FLCZ	good	0.5	≤ 0.12	0.5	0.03	≤ 0.06
37	22/M	candidemia	92.12.16	<i>C. tropicalis</i>	FLCZ	poor	0.5	≤ 0.12	>64	>8	2
38	36/M	oral candidiasis	95. 2.19	<i>C. krusei</i>	FLCZ	poor	0.5	8	16	0.25	1
			95. 2.20	<i>C. krusei</i>	FLCZ	poor	0.5	8	16	0.25	1
			95. 3. 1	<i>C. krusei</i>	FLCZ	poor	0.5	8	16	0.25	1
			95. 3.13	<i>C. krusei</i>	FLCZ	poor	0.5	8	16	0.12	1

AMPH-B: amphotericin B, 5-FC: flucytosine, FLCZ: fluconazole, ITCZ: itraconazole, MCZ: miconazole
 ND: no data

2. 患者分離株の FLCZ 感受性と本剤治療に対する反応性

Table 1 から明らかなように、FLCZ 投与を受けた症例 22 例のうち、有効例は 16 例、無効例は 5 例（症例 No. 2, 3, 4, 37, 38）であった。また症例 No. 15 については、第 1 回エピソードにおいては治療が奏効したが第 2 回目は無効であった。有効症例からの分離菌株の MIC は、ほとんど $0.25 \mu\text{g/ml}$ 以下の低値であったのに対し、無効例の分離株では $8 \sim 64 \mu\text{g/ml}$ 以上の高い MIC 値を示した。また同一症例にみられた口腔カンジダ症の 2 つのエピソードのうち、FLCZ 投与が奏効したほうの分離株および奏効しなかったほうの分離株に対する FLCZ の MIC は、それぞれ 0.25 および $8 \mu\text{g/ml}$ と明らかな相違を示した。これらの有効群と無

効群、および MIC が $\leq 0.12 \sim 4 \mu\text{g/ml}$ を示した群と MIC 値が $8 \sim >64 \mu\text{g/ml}$ を示した群の 4 区分を分類尺度とし、その相関指標を求めた。その結果、 $\Phi = 0.93$ となり、FLCZ 治療群より分離された菌株に対する本剤の MIC 値と治療効果との間には、明らかな相関性が認められた (Fig. 3)。また MIC の中央値は、有効群 $0.24 \mu\text{g/ml}$ 、無効群 $21.1 \mu\text{g/ml}$ であり、両群間に大差がみられた。

III. 考 察

AIDS 患者その他の易感染患者に好発する真菌症の発生頻度は益々増加する傾向にある⁷⁾。治療効果が高く、比較的安全性が高いアゾール系抗真菌薬の開発は、抗真菌化学療法の施行を容易にした反面、使用量の増加や投与の長期化を促す結果となり、耐性菌の出現が報

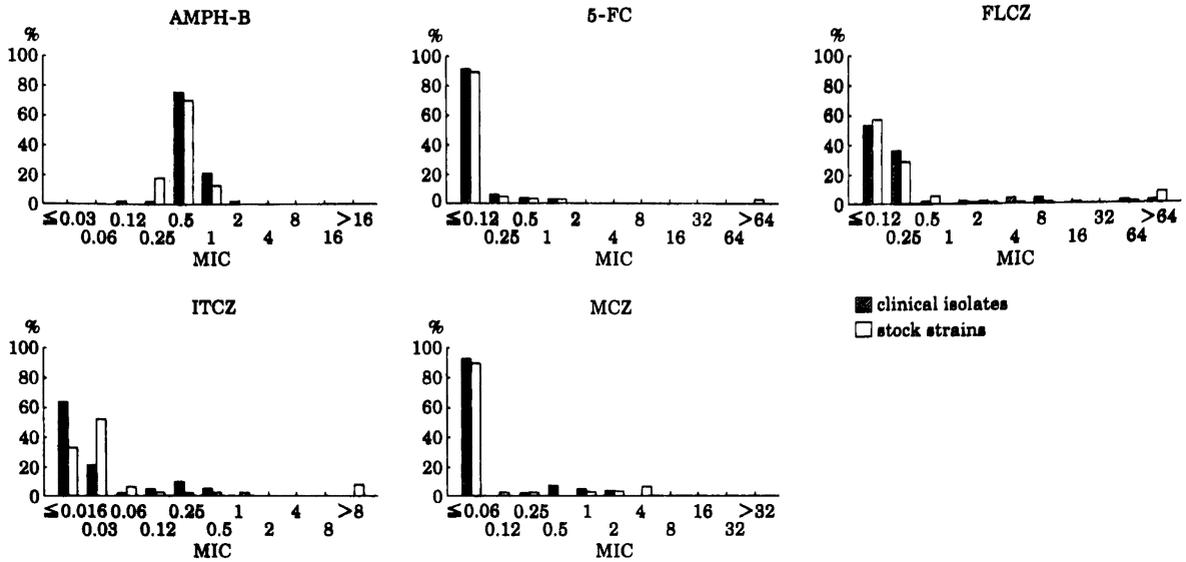


Fig. 1. Comparison between clinical isolates and stock strains of *Candida albicans* for susceptibility distribution to five antifungal drugs.

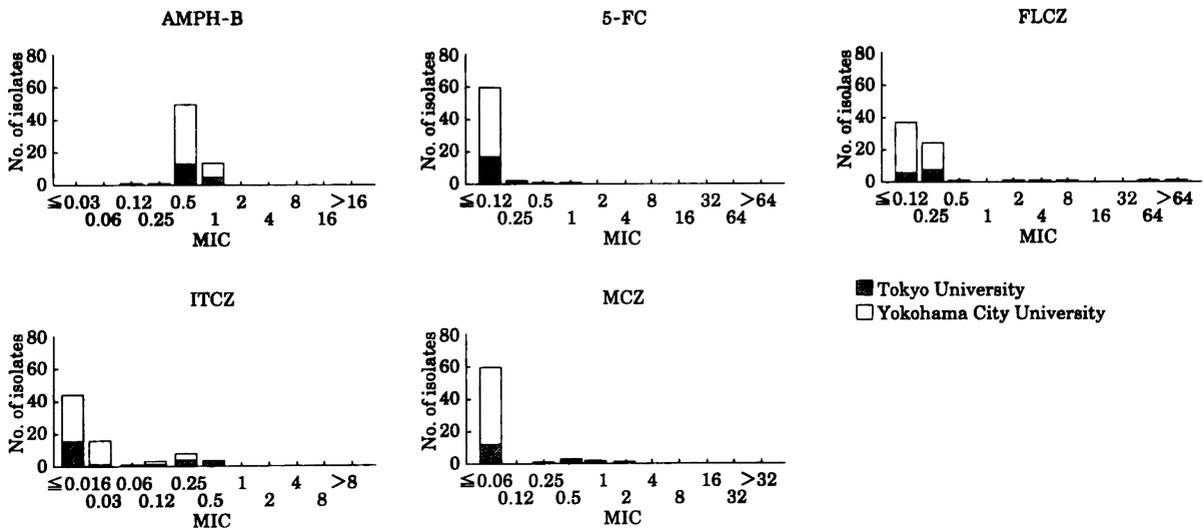


Fig. 2. Comparison between the two hospitals for susceptibility distribution of clinical isolates of *Candida albicans* to five antifungal drugs.

告されるようになった^{1)~8,9~10)}。特に、カンジダ症の治療に頻用されている FLCZ の場合、数か月にわたる投与期間および (または)、総投与量 10 g 以上の場合に起因菌の耐性化が見られるとの報告もあることから²⁾、アゾール剤については、抗真菌薬の長期投与による耐性菌の出現と同様の問題を生じていると考えられる。このような耐性を獲得した真菌の出現に対応するためにも、適切な抗真菌薬の選択はきわめて重要であり、これが抗真菌薬感受性試験の必要性を高めている¹¹⁾。

抗真菌薬の *in vitro* 抗真菌活性と *in vivo* 治療効果との相関性は、確定診断および (または) 治療効果判定の困難な真菌症症例が少なくないことなどの理由から、一般に不明確とされてきた。そこで今回日本医真菌学

会提案法にもとづいて作製した抗真菌薬感受性測定キット「酵母様真菌 FP」の評価を行うに当たっては上記の問題点が比較的小さい口腔カンジダ症を主たる対象疾患として選んだ。

今回「酵母様真菌 FP」を用いて測定した *Candida* 属酵母菌種臨床分離株の 5 薬剤に対する感受性は、後述の FLCZ その他の薬剤に対して低い感受性を示した一部の菌株を除けば、比較対照として用いた *C. albicans* 保存株 100 株について得られた値とはほぼ同程度であり、特に FLCZ および ITCZ の MIC は広い濃度範囲に分布した。また同一症例においてもエピソードによって分離株の薬剤感受性が異なり、FLCZ などの抗真菌薬に対する反応性も異なる場合があることが認め

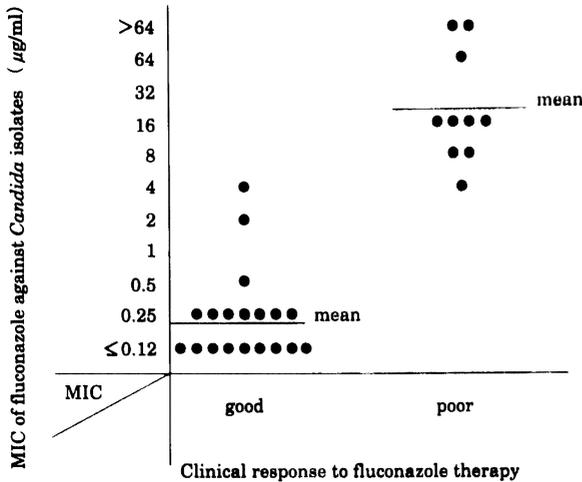


Fig. 3. Relationship between *in vitro* and *in vivo* activity of fluconazole against *Candida* in patients with oral candidiasis or other candidal infections.

られた。これらの成績は、すべての症例さらにはすべてのエピソードについて、分離株の同定とならんで抗真菌薬感受性試験を実施する必要があることを示唆するものである。今回の試験に参加した横浜市立大学医学部附属病院と東京大学医科学研究所附属病院の2施設間で分離株の抗真菌薬感受性に差があるか否かを比較検討した結果、後者での分離株に対する FLCZ および MCZ の MIC が高い傾向が認められた。その原因としては、FLCZ 治療実施例が東京大学医科学研究所附属病院では 18 例中 16 例と高いのに対し、横浜市立大学医学部附属病院では 20 例中 6 例に過ぎないこと、その投与期間も短期であることなどが考えられる。もし、これが事実とすれば、抗真菌薬化学療法が繁用される施設ほど感受性の低い菌株の出現頻度が高まり、したがって抗真菌薬感受性試験の必要性も高まることになる。

施設の別なく FLCZ 治療に良好に反応した症例からの分離株に対する本剤の MIC が、例外なく $\leq 0.12 \sim 4 \mu\text{g/ml}$ と低い値を示す一方、治療が奏効しなかった症例からの分離株に対する MIC はいずれも $4 \sim > 64 \mu\text{g/ml}$ の高値域にあった。FLCZ 投与量は、 $400 \sim 600 \text{ mg/日}$ であり、この高用量でも FLCZ 単独では治療が困難であった。国内での健常成人における体内動態試験の成績によれば、FLCZ 400 mg 単回経口投与した場合の最高血漿中濃度は $7.95 \mu\text{g/ml}$ 、血漿中濃度半減期は $29 \sim 37$ 時間であった（ファイザー製薬株式会社資料）。これらの成績からも、FLCZ の MIC が $4 \mu\text{g/ml}$ 以上の高値を示す *C. albicans* または non-*albicans Candida* spp. による口腔・食道カンジダ症が FLCZ 療法に反応しない理由が説明されよう。米国のいくつかの研究グループによる検討の結果では、M 27-P によって測定された FLCZ の MIC が $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ の場合には臨床的に感受性であると報告されている^{9,12-15}。今回我々が得た成績での臨床的感受性株に対する MIC が $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ とい

う値もこれにほぼ一致するものといえよう。原因菌の薬剤感受性低下または耐性化を早期に見出すことは、適切な治療を行ううえで不可欠である。それに加えて耐性株出現誘導の抑制ならびに医療経済的効果という観点からも重要性をもつと考えられる。

FLCZ 投与を受けた症例のなかで分離株に対する本剤の MIC が高値を示した症例 No. 2, 3, 4 においては、これらの分離株は ITCZ および MCZ に対しても感受性が低下し、MIC はそれぞれ $0.25 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \sim 2 \mu\text{g/ml}$ と他の症例からの分離株よりも $4 \sim 5$ 倍高く、異なるアゾール薬間で交差耐性を示すことが見出された。このような交差耐性をもつ *Candida* 株がみられるという報告は数多くあり¹⁶⁻¹⁹、今回の試験における症例の場合も、FLCZ の投与により起因菌の交差耐性が誘導されたものと推察される。一方、症例 No. 15 の MIC 値は、ITCZ: $0.016 \mu\text{g/ml}$ 以下、MCZ: $0.25 \mu\text{g/ml}$ と FLCZ の MIC 値と同様に他のアゾール薬の MIC 値が高くなるということは見られなかった。前述の報告とは逆に、アゾール薬の交差耐性は見られないという報告もあり^{2,19}、今回検討した症例では菌株あるいは治療方法によりアゾール薬について交差耐性になる場合とない場合があることが示された。また症例 No. 38 のように、もともと FLCZ 感受性が低いとされる *C. krusei*^{13,20} の分離株に対しては、予想に違わず MIC が高く、治療にも反応しなかった。これらのことより、薬剤投与による起因菌の耐性化を観察し、より効果的な薬剤の選択を行うには、MIC 値測定による判断が有用であると考えられる。

以上述べたように、口腔・食道カンジダ症という限定された疾患・病型においてさえ、「酵母様真菌 FP」を用いて測定した場合、分離株に対する 5 薬剤の MIC がいずれも広範囲におよぶことから、本試薬キットの薬剤感受性識別能が十分高いことが示唆される。また FLCZ 治療を受けた症例から分離された菌株に対して得られる本剤の MIC は治療効果との間に明確な相関性を示すことから、本試薬キットによる測定法の妥当性と臨床的有用性が裏づけられた。加えて、FLCZ については、長期投与によりひき起こされる起因菌の低感受性化または耐性化を容易に見出しうることが示された。このように、抗真菌薬に対する感受性を適切な方法で測定することは、分離株の MIC の把握にもとづく耐性菌出現の防止とともに、最適治療薬の選択に不可欠であり、この目的に「酵母様真菌 FP」が有用であることが示された。今後この試験試薬が普及し、より多くの施設において臨床分離株についての感受性試験が実施されることを期待したい。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費補助金試験 (B) 課題番号 07557322 によってなされたものである。

文 献

- 1) Johnson E M, Warnock D W, Luker J, et al.: Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J Antimicrob Chemother* 35: 103~114, 1995
- 2) Millon L, Manteaux A, Reboux G, et al.: Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *J Clin Microbiol* 32: 1115~1118, 1994
- 3) McCullough M, Hume S: A longitudinal study of the change in resistance patterns and genetic relationship of oral *Candida albicans* from HIV-infected patients. *J Med Vet Mycol* 33: 33~37, 1995
- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts. Proposed standard. Document M 27-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa., 1992
- 5) 山口英世, 内田勝久, 久米 光, 他: 日本医真菌学会標準化委員会報告 (1992-1994)。真菌誌 36: 61~86, 1995
- 6) 須藤貴子, 池戸正成, 榎村浩一, 他: 抗真菌薬感受性試験用プレートの評価。真菌誌 36 (Suppl. 1): 110, D-6, 1995
- 7) 榎村浩一, 山口英世: 本邦文献にみる真菌血症起因菌の分離状況。モダンメディア 39: 231~240, 1993
- 8) Cameron M L, Schell W A, Bruch S, et al.: Correlation of in vitro fluconazole resistance of *Candida* isolates in relation to therapy and symptoms of individuals seropositive for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agent Chemother* 37: 2449~2453, 1993
- 9) Rex J H, Rinaldi M G, Pfaller M A: Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agent Chemother* 39: 1~8, 1995
- 10) Bart-Delabesse E, Boiron P, Carlotti A, Dupont B: *Candida albicans* genotyping in studies with patients with AIDS developing resistance to fluconazole. *J Clin Microbiol* 31: 2933~2927, 1993
- 11) 山口英世: 抗真菌薬の剤感受性試験法の現状と課題。臨床と微生物 20: 875~881, 1993
- 12) Barchiesi F, Hollis R J, McGough D A, et al.: DNA subtypes and fluconazole susceptibilities of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 20: 634~640, 1995
- 13) Rex J H, Pfaller M A, Barry A L, et al.: Anti-fungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of nonneutropenic patients with candidemia. *Antimicrob Agent Chemother* 39: 40~44, 1995
- 14) Ghannoum M A, Rex J H, Galgiani J N: Susceptibility testing of fungi: current status of correlation of in vitro data with clinical outcome. *J Clin Microbiol* 34: 489~495, 1996
- 15) Barry A L, Brown S D: Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 34: 2154~2157, 1996
- 16) Ryley J F, Wilson R G, Barrett-Bee K J: Azole resistance in *Candida albicans*. *Sabouraudia: J Med Vet Mycol* 22: 53~63, 1984
- 17) Smith K J, Warnock D W, Kennedy C T C, et al.: Azole resistance in *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 24: 133~144, 1986
- 18) Wardle H M, Law D, Moore C B, et al.: In vitro activity of D0870 compared with those of other azoles against fluconazole-resistant *Candida* spp.. *Antimicrob Agent Chemother* 39: 868~871, 1995
- 19) Barchiesi F, Colombo A L, McGough D A, et al.: In vitro activity of itraconazole against fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agent Chemother* 38: 1530~1533, 1994
- 20) Pfaller M A, Bale M, Buschelman B, et al.: Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards Recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, fluconazole, and flucytosine. *J Clin Microbiol* 33: 1104~1107, 1995

Evaluation of antifungal susceptibility testing by the broth microdilution method against *Candida* species: activities of 5 antifungal agents against *Candida* species isolated from oral candidiasis or other candidal infectious diseases and correlation of *in vitro* data and clinical outcome of fluconazole therapy

Takako Sudo¹⁾, Koichi Makimura¹⁾, Kaoru Kawata²⁾, Akira Ito²⁾,
Sinichi Oka³⁾, Katsuhisa Uchida¹⁾, Hideyo Yamaguchi¹⁾

¹⁾ Teikyo University Institute of Medical Mycology, 359 Otsuka, Hachioji, Tokyo 192-03, Japan

²⁾ Division of Clinical Laboratory Yokohama City University School of Medicine

³⁾ Department of Infectious Diseases Institute of Medical Science University of Tokyo (Present Address: Fourth Department of Internal Medicine, Research Institute, International Medical Center of Japan)

The *in vitro* susceptibilities of 74 clinical isolates of *Candida* from AIDS patients to 5 antifungal agents (amphotericin B, flucytosine, miconazole, fluconazole and itraconazole) were studied, in comparison with those of 100 stock cultures of *Candida albicans*, using the Frozen Plate for antifungal susceptibility testing. This testing kit was designed in accordance with the proposed reference technique of the Japanese Society for Medical Mycology. The clinical isolates from fluconazole treated patients were investigated to determine correlations between *in vitro* susceptibilities to 5 antifungal drugs and clinical responses to antifungal chemotherapy. The Frozen Plate yielded a relatively narrow range of MICs (0.12 to 2 $\mu\text{g/ml}$) for amphotericin B, but broader MIC ranges were seen for fluconazole (≤ 0.12 to $>64 \mu\text{g/ml}$), itraconazole (≤ 0.016 to $>8 \mu\text{g/ml}$), miconazole (≤ 0.06 to 2 $\mu\text{g/ml}$) and flucytosine (≤ 0.12 to 8 $\mu\text{g/ml}$). A similar MIC distribution was observed for stock cultures of *C. albicans*. Among clinical isolates of *Candida* spp. there were several with low susceptibility or resistance to one or all three of the azole drugs. There was a good correlation between the *in vitro* fluconazole-susceptibility of clinical isolates from patients treated with this antifungal drug and their clinical outcome. Our results suggest the potential value of the Frozen Plate as a convenient and useful kit for testing the susceptibilities of yeast organisms.