

原 著

Candida 属菌種のアゾール系薬感受性試験における現行の 日本医真菌学会法、およびその改変法と NCCLS M27-A2 法 との相関性に関する検討

内 田 勝 久 西 山 彌 生 山 口 英 世

帝京大学医真菌研究センター

[受付 2 月 13 日, 2006 年. 受理 3 月 23 日, 2006 年]

要 旨

酵母のアゾール系薬感受性測定に関して、現行の日本医真菌学会法 (JSMM 現行法) の有用性を検討するために、本法によって得られる成績が NCCLS M27-A2 ミクロ法 (M27-A2 法) の成績とどの程度一致するかを最近収集された *Candida* spp. 臨床分離株 946 株を用いて比較検討した。 *C. albicans* および *C. tropicalis* に対する fluconazole (FLCZ) の MIC は、それぞれ 25.3 および 72.5% の菌株で一致せず、この傾向はトレーリング発育株でとくに顕著であった。 JSMM 法の終末判定基準を現行の IC₈₀ から IC₅₀ へ変更した JSMM 改変法を用いて M27-A2 法と比較した結果、両菌種の不一致率はそれぞれ 11.2 および 30.8% と大幅に減少した。 さらに NCCLS M27-A ガイドラインに提示されている MIC ブレークポイントの基準を適用して FLCZ と itraconazole に対する「耐性」株の頻度を比較したところ、すべての主要 *Candida* 属菌種において JSMM 改変法のほうが現行法よりも M27-A2 法とよく一致した。 以上の成績から、 JSMM 現行法によるアゾール系薬感受性測定は *Candida* spp. のトレーリング発育株など少なからぬ菌株について誤った成績を与えること、またこの問題の改善には終末点判定基準の改変が有用であることが示された。

Key words: 抗真菌薬感受性試験法 (antifungal susceptibility testing), 日本医真菌学会法 (the Japanese Society for Medical Mycology method), NCCLS M27-A2 法 (NCCLS M27-A2 method), *Candida* 属菌種 (*Candida* spp.), アゾール系抗真菌薬 (azole antifungals), トレーリング発育株 (trailing growth isolates)

はじめに

近年、深在性真菌症発症率の上昇、新規抗真菌薬の相次ぐ臨床導入、抗真菌薬耐性または低感受性真菌の出現などの状況を背景に、再現性および利便性が高く、しかも臨床的に意味のある結果を与えるような抗真菌薬感受性試験を実施するための試験法の標準化の必要性がますます増大している。その必要性がとくに高いのは、*Candida* spp. をはじめとする病原性酵母菌種のアゾール系薬感受性を測定するための試験法である。それには次の理由があげられる。(i) 主要な深在性真菌症の起因菌の大半は *Candida* spp. を中心とする酵母菌種である (例外は *Aspergillus* spp. にほぼ限られる)、(ii) *Aspergillus* spp. などの糸状菌にくらべて酵母菌種の患者由来臨床検体からの分離率のほうが圧倒的に高い、(iii) 酵母起因性深在性真菌症の治療に現在最も広く使用されている抗真菌薬は最近ようやく臨床導入されたキャンディン系薬を除けばアゾール薬、とくに fluconazole (FLCZ) お

よび itraconazole (ITCZ) である、(iv) アゾール系薬耐性 *C. albicans* が 1990 年以降 HIV 感染者から高頻度に分離される^{1, 2)}、(v) *Candida glabrata*, *Candida krusei* などの一部の *Candida* spp. の臨床分離株中にアゾール系薬耐性株または低感受性株が高頻度に見られる³⁻⁵⁾、(vi) アゾール系薬感受性測定の結果は試験条件によって大きく影響される⁶⁻⁸⁾。

アゾール系薬を含む主要な抗真菌薬を試験対象薬とする酵母の感受性試験法の標準化を目指す検討は、1980 年代以降米国をはじめわが国を含む多くの国々で行われてきた。その結果、米国 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (現 Clinical Laboratory Standards Institute; CLSI) が長年検討を重ね、M27-P (1992 年)⁹⁾ に始まり、M27-T (1995 年)¹⁰⁾、M27-A (1997 年)¹¹⁾ を経て 2002 年に発表された最新版の M27-A2¹²⁾ のガイドラインに基づく試験法が現在米国そのほか多くの国で標準法として汎用されている。

一方、わが国においては 1995 年に日本医真菌学会法が同学会より提案され¹³⁾、その後改訂されることなく現在に至っている。その結果、国内では NCCLS M27-A2 法 (以下 M27-A2 法と略) と日本医真菌学会法 (以下 JSMM

別刷請求先：内田 勝久

〒192-0395 東京都八王子市大塚 359
帝京大学医真菌研究センター

現行法と略) がいずれも酵母の標準的な感受性試験法として使用されるという状況にある。この現状を考えるならば、M27-A2法とJSMM現行法との間で得られる試験結果すなわちMIC値にどのような対応関係がみられるのかを明らかにしておくことが、抗真菌薬感受性の判定や解釈をめぐる混乱を避けるためにはきわめて重要といわなければならない。それにもかかわらず、新鮮臨床分離株に関して両法の結果について直接に比較検討した成績は見当たらず、乖離を生じている可能性を懸念する声も少なくない。

本研究においては、最近国内で分離された *Candida* spp. 臨床分離株を用い、M27-A2法とJSMM現行法によるFLCZおよびITCZ感受性についての試験結果を比較解析した。その結果、両試験法間にみられるMIC不一致の最も大きな原因が終末点(MIC)判定基準にあると判明したことから、JSMM現行法にM27-A2法の終末点判定基準を導入した新たな試験法(仮称、JSMM改変法、以下JSMM改変法)を組み立て、この改変法とM27-A2法との比較検討も併せて行い、両者間の乖離を最少化する可能性を探った。

材料と方法

1. 対象菌株

Japan Antifungal Surveillance Program 第1次調査(2001~2002年度)報告¹⁴⁾および同第2次調査(2003年度)報告¹⁵⁾に記載されたすべての *Candida* 属菌種分離株を解析または試験の対象とした。

総数946株の分離株のうちの最多菌種は *C. albicans* (542株)であり、全体の57.3%を占めた。次いで *C. glabrata* (223株; 23.6%), *C. tropicalis* (91株; 9.6%), *C. parapsilosis* (47株; 5.0%) の順に多かった。そのほかの *Candida* spp. の菌株としては *C. krusei* (15株), *C. guilliermondii* (11株), *C. lusitaniae* (10株), *C. dubliniensis* (3株), *C. kefyr* (2株), *C. rugosa* (1株) および *C. inconspicua* (1株) が比較的少数含まれていた。

2. 対象薬剤

NCCLS M27-Aガイドラインにおいて感受性カテゴリーを解釈するためのMICブレイクポイントが提示されているアゾール系薬として、FLCZおよびITCZの2薬剤を対象薬剤として用いた。

3. 感受性試験法

感受性測定に用いられた3つの試験法、JSMM法(現行法および改変法)ならびにNCCLS M27-A2法(M27-A2法)の概略を以下に記す。

a) JSMM現行法¹³⁾: 本法は、L-glutamineを添加したRPMI1640培地(Sigma-Aldrich Co.)に0.165 M MOPS(4-morpholinepropanesulfonic acid; Sigma-Aldrich Co.)を加え、NaOHにてpH7.0に調整した後、濾過滅菌して調製した培地を用いたマイクロ法である。被験菌株の新鮮培養菌液 $1 \sim 5 \times 10^3$ 細胞/mlを、所定の段階濃度の被

験薬剤を含むウエルに接種した。35°Cで培養を行い、24時間ごとに濁度を測定し、発育対照のO.D.が0.2に達した時点のIC₈₀値を終末点(MIC)とした。JSMM法によって得られる品質管理基準株(QC株)の測定結果は、NCCLS M27-Aマイクロ法およびマクロ法のそれとほぼ対応することが確認されている^{16, 17)}。

b) JSMM改変法: 上記のJSMM現行法のフォーマットのなかで、次の2点を改変した。

①培養時間: 24時間を原則とするが、発育対照の濁度が0.2に達しない場合、または後述のアゾール系薬感受性カテゴリーが「用量依存的感性(susceptible-dose dependent; S-DD)」に該当した場合には、48時間に延長する。

②終末点の判定基準: アゾール系薬については50%発育阻止濃度(IC₅₀)とする。

c) NCCLS法: 上述のJSMM現行法と同じ培地および接種菌量を用いた。*Candida*属菌株については、35°C、48時間培養時のScore 2(IC₅₀相当)値を終末点(MIC)とした。ただしトレーリング発育(trailing growth)株については、24時間培養時のScore 2値を終末点(MIC)とした。

d) JSMM現行法およびNCCLS法による測定の際に用いたQC株: 感受性の測定ごとに、JSMM現行法においては *C. albicans* ATCC 90028 および *C. glabrata* ATCC 90030 を、NCCLS法においては *C. parapsilosis* ATCC 22019 および *C. krusei* ATCC 6258 のそれぞれをQC株とし、MIC測定値が許容域にあることを確認した。

4. アゾール系薬感受性のカテゴリー化とMICブレイクポイント

NCCLS M27-Aガイドライン¹¹⁾に従って、NCCLS法によって測定されたFLCZのMICについては ≤ 8 , 16~32, および $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ を、またITCZについては ≤ 0.125 , 0.25~0.5 および $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$ を、それぞれ「感性(susceptible; S)」、「用量依存的感性」、および「耐性(resistant; R)」とみなした。JSMM現行法および改変法においては、このような感受性カテゴリー化のためのMICブレイクポイントは提示されていないが、NCCLS法のそれを準用することとした。

5. トレーリング発育株の識別

アゾール系薬の広い濃度範囲にわたって部分的な発育阻止を受け、24時間培養後の判定では「感性」のカテゴリーに入るMICにとどまっているものの、48時間培養後には「耐性」のカテゴリーに属するMICに上昇するような菌株はトレーリング発育株とよばれる。NCCLS M27-A2ガイドライン¹²⁾ではトレーリング発育株に対する終末点(MIC)判定基準が明確には規定されていないが、本報告においては、このガイドラインに付記されているコメントを参考にして、24時間培養後のScore 2値をとることとした。

MIC determined by the NCCLS M27-A2 method ($\mu\text{g/ml}$)	$\geq 64^a$										3	
	32^b									1		
	16^b										1	
	8				1			3				
	4			1	3	1	7			1		
	2				2	3	4	1	1		1	
	1		1		8	5	2	3			1	2 (1) ^c
	0.5		1	6	45	20	4	3		2	3 (1)	2 (1)
	0.25	1	4	172	68 (1)	40	13	6	3		1 (1)	2 (2)
	0.13	1	25	17	11	9 (1)	3	2	1	1	1	
	≤ 0.06	7	2	7	2			1				
	≤ 0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥ 64	
	MIC determined by the currently used JSMM method ($\mu\text{g/ml}$)											

Fig. 1. Comparison between the currently used JSMM method and the NCCLS M27-A2 method in the results of determination of fluconazole MIC against 542 *C. albicans* isolates as represented by the number of isolates with the indicated MIC.

- a: Breakpoints for fluconazole resistant.
- b: Breakpoints for fluconazole susceptible-dose dependent.
- c: Number of trailing growth isolates are shown in parenthesis.

MIC determined by the NCCLS M27-A2 method ($\mu\text{g/ml}$)	$\geq 64^a$										1		
	32^b				2				1		2		
	16^b			2								1	
	8				3	2	2	1				1 (1) ^c	
	4				1	2	1	1	1	1		3	
	2				2	2	2		2	1		5 (3)	
	1					1	1		1 (1)			5 (5)	
	0.5					7	1 (1)	4 (1)	2 (1)	2 (2)		2	15 (15)
	0.25						1 (1)	1 (1)					2 (2)
	0.13												
	≤ 0.06		1	1 (1)									
	≤ 0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥ 64		
	MIC determined by the currently used JSMM method ($\mu\text{g/ml}$)												

Fig. 2. Comparison between the currently used JSMM method and the NCCLS M27-A2 method in the results of determination of fluconazole MIC against 91 *C. tropicalis* isolates as represented by the number of isolates with the indicated MIC.

- a: Breakpoints for fluconazole resistant.
- b: Breakpoints for fluconazole susceptible-dose dependent.
- c: Number of trailing growth isolates are shown in parenthesis.

結 果

I. JSMM 現行法と M27-A2 法による *C. albicans* 臨床分離株の FLCZ 感受性測定値の比較

Fig. 1 に、JSMM 現行法および M27-A2 法を用いて測定した *C. albicans* 臨床分離株 542 株に対する FLCZ の MIC の分布と両法の結果の対比関係を示す。542 株中 405 株 (74.7%) に関しては、両法での MIC の差が前後

1 ウエル (±2 倍) の範囲内に留まり, 實際上, 一致する成績が得られたので一致株とみなした. しかし残りの137株 (25.3%) はこの範囲を超える差異を示す不一致株であり, 大多数の菌株 (127株; 92.7%) に対しては M27-A2 法にくらべて JSMM 現行法のほうが高い MIC を与えた. NCCLS M27-A ガイドラインに提示されたブレイクポイント基準を M27-A2 法で得られた MIC とならんで, JSMM 現行法での値にも適用した場合には, M27-A2 法では「感性」と解釈された不一致株136株は, JSMM 現行法では「感性」119株 (87.5%), 「用量依存的感性」11株 (8.1%), および「耐性」6株 (4.4%) に分かれた. また M27-A2 法による「感性」株の不一致率 (537株中136株; 25.3%) に対して, 同法「用量依存的感性」株および「耐性」株のうち不一致例はそれぞれ2株中1株 (50%) および3株中0株 (0%) であり, 不一致の1株は JSMM 現行法では「耐性」と解釈された.

全試験菌株542株中には M27-A2 法でトレーリング発育株と判定されたものが8株 (1.5%) 含まれており, 1株のみは JSMM 法と一致する MIC を示したが, 残りの7株については不一致であった (Fig. 1). この7株のうち, JSMM 現行法で「感性」と解釈される菌株は1株にとどまり, 2株は「用量依存的感性」, 4株は「耐性」という感受性カテゴリーの著しい乖離がみとめられた.

II. JSMM 現行法と M27-A2 法による *C. tropicalis* 臨床分離株の FLCZ 感受性測定値の比較

C. tropicalis 臨床分離株91株について, JSMM 現行法と M27-A2 法による FLCZ の MIC 測定値の対比を行っ

た. その結果を Fig. 2 に示す. 両法が前後1ウエル (±2 倍) 以内の一致した MIC を与えた菌株数は25株 (27.5%) にとどまり, 残りの66株 (72.5%) は MIC に ±4 倍以上の差がある不一致株であった. このうち M27-A2 法での MIC がより高かった菌株は17株 (25.8%), また JSMM 現行法でのそれは49株 (74.2%) となり, 後者のタイプの菌株が多数を占めた. しかし M27-A2 法で「用量依存的感性」と解釈された8株についてみると, 不一致の6株のうち JSMM 現行法では5株までが「感性」, 1株が逆に「耐性」と解釈され, 感受性カテゴリーを超えるような極点な不一致を示す菌株が多いのみならず, 全体的には JSMM 現行法のほうが低い MIC を与える傾向も認められた.

C. tropicalis 株の最も目立った特徴は, トレーリング発育株の割合が高いことであり, 91株中37株 (40.7%) を占めた. 予想されたように, すべてのトレーリング発育株について, JSMM 現行法では M27-A2 法に比べて得られる MIC が多少とも高値にシフトした結果, その大半が不一致株となり (37株中33株; 89.2%), しかも「耐性」に該当する $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ の MIC をもつ菌株が26株と全体の1/4以上にも達した.

III. JSMM 改変法と M27-A2 法による *C. albicans* および *C. tropicalis* 臨床分離株の FLCZ 感受性測定値の比較

JSMM 現行法と M27-A2 法の基本的な測定条件の違いは, すでに述べたように培養時間および終末点 (MIC) 判定基準にある. JSMM 現行法を用いて測定した FLCZ の *C. albicans* に対する MIC と NCCLS 法での値がト

$\geq 64^a$											3
32 ^b										1	
16 ^b								1			
8			1	1			1	1			
4	1	3	4	1		3	1				
2		1	5	4	1	1					
1		1	12	7	1 (1) ^c	1					
0.5	2	3	58 (1)	21 (1)		1	1				
0.25	14	117	173 (4)	3	1	2					
0.13	24	41 (1)	5			1					
≤ 0.06	16	1	1	1							
	≤ 0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥ 64

MIC determined by the modified JSMM method ($\mu\text{g/ml}$)

Fig. 3. Comparison between the modified JSMM method and the NCCLS M27-A2 method in the results of determination of fluconazole MIC against 542 *C. albicans* isolates as represented by the number of isolates with the indicated MIC.

a: Breakpoints for fluconazole resistant.

b: Breakpoints for fluconazole susceptible-dose dependent.

c: Number of trailing growth isolates are shown in parenthesis

MIC determined by the NCCLS M27-A2 method ($\mu\text{g/ml}$)	$\geq 64^a$										1
	32^b			2		1				2	
	16^b	1	2								
	8		2	4	2			1 (1) ^c			
	4		2	3	1	2	1		1		
	2		2	5		7 (3)					
	1		1	1	6 (6)						
	0.5		6	27 (20)							
	0.25			5 (5)							
	0.13	1	1 (1)								
	≤ 0.06	1 (1)									
	≤ 0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥ 64

MIC determined by modified JSMM method ($\mu\text{g/ml}$)

Fig. 4. Comparison between the modified JSMM method and the NCCLS M27-A2 method in the results of determination of fluconazole MIC against 91 *C. tropicalis* isolates as represented by the number of isolates with the indicated MIC.

- a: Breakpoints for fluconazole resistant.
- b: Breakpoints for fluconazole susceptible-dose dependent.
- c: Number of trailing growth isolates are shown in parenthesis.

レーリング発育株をはじめ多数の菌株において一致しないこと、またこれらの不一致株の多数についてはJSMM現行法のMICのほうが高いことが認められた (Fig. 1). したがって両法の測定結果が乖離する主たる原因は、終末点判定基準がM27-A2法のIC₅₀に比べてJSMM現行法ではIC₈₀とより厳しく設定されていることにあると推測される. この推論を検証するために、JSMM現行法の終末点判定基準をM27-A2法のそれに合わせた新たな感受性試験法すなわちJSMM改変法を設定し、これを用いてJSMM現行法におけるのと同じの試験菌株を対象にFLCZ感受性測定を行った.

Fig. 3には、*C. albicans* 菌株に対するMIC測定結果を示す. 両法のMICが一致した試験菌株数は542株中481株 (88.8%) と高かったのみならず、感受性カテゴリーを超える乖離を示した菌株は1株もなく、トレーリング発育株8株すべてのMICが一致した. 一方、61株 (全体の11.3%) を数えた不一致株のなかでは、JSMM改変法でより低いMICが得られた菌株が8株 (13.1%) であったのに対して、M27-A2法がより高いMICを与えた菌株は53株 (86.9%) にのぼった.

同様に *C. tropicalis* 菌株91株を対象として行った試験結果を Fig. 4に示す. 一致株数は62株 (68.1%) とJSMM現行法よりも2倍以上増加し、トレーリング発育株37株に対するJSMM改変法とNCCLS法のMICはいずれも一致したことから、両法の高い相関性が示唆される. 一方、不一致株29株に対するMICは、1株を除いてすべてM27-A2法の値のほうが高く、JSMM法で「感性」、M27-A2法では「用量依存的感性」と解釈される菌株も6株含まれていた.

以上の成績から、JSMM改変法を用いた場合には、JSMM現行法に比べてトレーリング発育株を含むより多くの *C. albicans* および *C. tropicalis* 菌株についてM27-A2法と一致するMICが得られることが示された. またMIC不一致株に関しては、JSMM改変法は同現行法とは反対に、M27-A2法よりも低いMICを与えることが認められた.

IV. JSMM現行法, JSMM改変法, およびM27-A2法による *Candida* 属主要7菌種の臨床分離株のFLCZならびにITCZ感受性測定値の比較

これまで述べてきたJSMM現行法とM27-A2法の間、およびJSMM改変法とM27-A2法の間で比較した *C. albicans* および *C. tropicalis* 試験菌株に対するFLCZのMICについての成績に加えて、それ以外の *Candida* spp. 5菌種の臨床分離株を被験菌としてFLCZならびにITCZのMICについて上記3試験法を用いて測定した成績を Table 1にまとめて示す. この表においては、両薬剤に対する各菌種被験菌株の感受性を3試験法の各々で測定した場合の「耐性」株の頻度を指標として比較表示した.

M27-A2法とのアゾール系薬MICの一致度を「耐性」株頻度を指標として比較すると、FLCZについては *Candida* spp. 主要5菌種すべてにおいて、またITCZについては *C. glabrata* 以外の主要菌種においてJSMM改変法のほうが同現行法よりも近似する値を示した.

なお *C. krusei* においては、終末点の判定基準をIC₅₀ 或いはIC₈₀ のいずれにしてもMICに大きな違いがなかったこと、培養時間に依存してMICが上昇したこと、

Table 1. Comparison of *in vitro* susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole and itraconazole determined by the currently used JSMM method, the modified JSMM method and the NCCLS M27-A2 method

<i>Candida</i> species (no. of isolates)	Antifungal agent	% of isolates determined resistant ^a by :		
		Current JSMM	Modified JSMM	NCCLS M27-A2
<i>C. albicans</i> (542)	Fluconazole	1.9	0.6	0.6
	Itraconazole	3.1	0.6	0.6
<i>C. tropicalis</i> (91)	Fluconazole	36.3	1.1	1.1
	Itraconazole	42.9	3.3	3.3
<i>C. glabrata</i> (223)	Fluconazole	3.6	3.1	3.1
	Itraconazole	4.9	4.5	5.8
<i>C. parapsilosis</i> (47)	Fluconazole	4.3	0	0
	Itraconazole	4.3	0	0
<i>C. krusei</i> (15)	Fluconazole	6.7	33.3	33.3
	Itraconazole	0	6.7	6.7
<i>C. guilliermondii</i> (11)	Fluconazole	0	0	0
	Itraconazole	0	0	0
<i>C. lusitanae</i> (10)	Fluconazole	10	10	10
	Itraconazole	0	0	0

^a Percent resistant according to the NCCLS interpretive breakpoints criteria.

トレーリング発育株が認められなかったことなどが原因となっており、JSMM 改変法のほうが同現行法より「耐性」株頻度が上昇し NCCLS 法とよく一致した。

以上の成績から、M27-A2 法で測定された感受性試験結果との一致度は、FLCZ のみならず ITCZ についても、また *C. albicans* や *C. tropicalis* のみならずその他の主要な *Candida* spp. においても JSMM 改変法のほうが同現行法よりも高いことが示唆された。

考 察

JSMM 現行法は、もともと NCCLS M27-P ガイドラインの発表直後に、その操作性を簡便化することと、わが国で上市されている抗真菌薬に限ってそのすべてを試験対象薬とすることを目的に、M27-P 法を改変してつくられた酵母の抗真菌薬感受性試験法である。M27-P 法と JSMM 現行法をくらべた場合の大きな違いは、①試験フォーマット、②培養時間、および③終末点 (MIC) 判定基準、の3点にあり、M27-P 法においては①マクロ法、②48時間培養、および③目視判定、と規定されている。これに対して、JSMM 現行法においては、それぞれ①ミクロ法、②大多数の菌株については24時間および③目視または分光光学的判定、という条件に変更されており、利便性の点では本法のほうが明らかに優れている。

この JSMM 現行法については、1995年に日本医真菌学会より提案されて以来、現在までまったく改訂されていないのに対して、NCCLS 法のほうは M27-P 法 (1992年)以降、たびたび改訂が重ねられ、M27-T 法 (1995年)、M27-A 法 (1997年)を順次経た後に、現在の M27-A2 法 (2002年)に至っている。この間になされた大きな改変として第1にあげられるのは、M27-T 法からはそれまでのマクロ法にミクロ法が新たに加えられた結果、ミクロ法が主流になったことと、ミクロ法の終末点判定基準がマクロ法の IC₈₀ とは別に IC₅₀ と定められたこと

である¹⁰⁻¹²⁾。第2は、M27-A 法が発表された後にその存在が見出された *Candida* spp. のトレーリング発育株に対応するために、M27-A 法から M27-A2 法への改変がなされたことである^{11, 12)}。これはトレーリング発育株が *in vivo* では FLCZ 治療に反応するにもかかわらず、M27-A 法では「耐性」と判定されるという *in vitro*/*in vivo* 活性の乖離が生じたことに基づいている^{18, 19)}。その結果、NCCLS M27-A2 法はトレーリング発育株を含むすべての酵母の感受性試験に適用可能な試験法として今や世界的に広く受け入れられている。

一方、わが国では NCCLS 法とならんで、JSMM 現行法が依然として酵母の標準的な感受性試験法として扱われている。これらの2つの試験法が標準法として並立している現状を考えるならば、両者の試験結果がどの程度良好に対応するのか、またはしないのかを明らかにしておく必要があることは論をまたないところである。そこで最近われわれの研究グループが収集した *Candida* spp. 臨床分離株を被験菌としてアゾール系薬とくに FLCZ に対する感受性について両法による比較測定を行った結果、MIC が一致しない菌株が占める割合は、*C. albicans* で25.3%、*C. tropicalis* に至っては72.5%にも達した。しかもこれらの不一致株の多くについては、M27-A2 法に比べて JSMM 現行法での MIC が高いほうにずれていること、またこのずれはトレーリング発育株でとくに顕著であり、本来「感性」と判定されるべきトレーリング発育株の大半が NCCLS M27-A ガイドラインに提示されている MIC ブレークポイントに従えば「耐性」と解釈されることが知られた。この問題はかねてより指摘されていたところであり²⁰⁾、それが事実であることは本研究であらためて確認された。*C. tropicalis* 菌株でとくに著しい MIC 並びに感受性カテゴリーの乖離がみられた理由は、トレーリング発育株が高い割合を占めていたことによって説明される。トレーリング発育株が FLCZ 治療に

良好に応答する感性株に属することは、動物モデルを用いた幾つもの *in vivo* 試験によって確認されている¹⁸⁻²⁰⁾。したがって、トレーリング発育株の大半を「耐性」と誤判定する JSMM 現行法は感受性試験法としては最早不適格であるといわざるを得ない。NCCLS M27-A2 法においては、終末点判定の時点を培養 48 時間後から 24 時間後にくり上げることによって、トレーリング発育株に対する誤判定の問題が克服された。一方、JSMM 現行法においては、発育速度が著しく遅い少数の菌株を除けば培養 24 時間後に終末点判定がなされることから、この点についてはもともと問題はほとんどないはずである。したがって、誤判定の最大の原因は終末点判定基準が NCCLS M27-A2 法の IC₅₀ に対して JSMM 現行法では IC₈₀ とより厳しく設定されていることにあると考えるほかない。

そこで JSMM 現行法における終末点判定基準を IC₈₀ から IC₅₀ に変更した JSMM 改変法を用いて再試験を行った結果、予想通り、すべてのトレーリング発育株について MIC は NCCLS M27-A2 法のそれと一致した。一方、トレーリング発育を示さない通常の菌株については、JSMM 改変法での MIC のほうが低値を示す不一致株が一部認められ、これも予想されたところであり、本法では終末点判定の時点を一律に培養 24 時間後としたことによるものと考えられる。しかしこの JSMM 改変法は、試験対象 *Candida* 属菌種としては *C. albicans* や *C. tropicalis* のみならず、*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* など他の主要菌種についても、また試験対象薬剤としては FLCZ のほか ITCZ についても、NCCLS M27-A2 法とは良好な MIC の対応関係を示した。これらの成績は、JSMM ガイドラインに従って、またはそれに準拠した感受性測定キットを使用して *Candida* spp. のアゾール系薬感受性の測定を行う場合には、終末点判定基準を現行の IC₈₀ から IC₅₀ へ変更する必要があることを強く示唆している。

NCCLS M27-A2 法は、*Candida* spp. を中心とする酵母の抗真菌薬感受性試験を行うには、現在のところ最も信頼性の高い標準的な試験法とみなされている。本法について欠点をあげるとすれば、*Candida* spp. のアゾール系薬感受性の測定に際しては少なくともトレーリング発育株を比較的高い割合で含む主要菌種、とくに *C. albicans* や *C. tropicalis*、に関しては培養 48 時間後の終末点判定に加えて 24 時間後にも判定を行う必要があるという試験時間の長さつまり迅速性に欠ける点と 2 度の判定を必要とするという煩雑さである。これに対して、JSMM 現行法は現在、国内の一部の施設や研究者が使用するにとどまっているものの、すべての *Candida* spp. 菌株について培養 24 時間後の 1 時点での判定で済むこと、また判定の自動化が可能であるという利点をもっている。こうした利点を生かしながら、終末点判定基準の変更などを通して M27-A2 法との読みかえ可能な改訂を早急に行うことが望まれる。

これと同様の動きは、すでに欧米においてもみられ

る。EU 諸国の専門家が参加して構成された The Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (AFST-EUCAST) は、2002 年に独自の抗真菌薬感受性試験法 (EUCAST 法) を提案した²¹⁾。この方法は、終末点判定の自動化ならびに培養 24 時間判定を目標に、試験培地へのグルコース添加および接種菌量の増加という M27-A2 法の改変がなされていることを特徴とする^{22, 23)}。EUCAST 法は M27-A2 法と高い一致率を示す試験結果を与えるとされ²⁴⁾、感受性サーベイランスなどにすでに利用されている^{25, 26)}。さらに M27-A2 法を中心とする NCCLS 法自体に関しても、通常菌株についての培養 24 時間後の終末点判定を支持する意見が NCCLS 内部の委員から出されているという²⁷⁾。

このような情勢を眺めてみると、NCCLS 法を含めて終末点判定の実施時点を培養 24 時間後に設定することは今や世界的な動向と見なすことができよう。JSMM 法に関しても、この動向に沿って改変を加えてゆく必要があることは論をまたないところである。抗真菌薬感受性実施の必要性に対しては依然として否定的意見も少なくない²⁸⁾。しかし少なくともアゾール系薬については、Takakura *et al.*²⁹⁾ の報告にみられるように、耐性と臨床効果の間に明らかな関係がみられることから、感受性試験の臨床的役割は大きいというべきであろう。JSMM 法のアゾール系薬に関する当面の課題は、新規薬とくに voriconazole を対象薬に加えた改訂法の策定およびその方法で得られた MIC の臨床的意義の解釈すなわち当該被験菌株の感受性カテゴリーの推定に役立つ MIC ブレークポイント基準の明確化にあり、この面での早急な対応が望まれる。

謝 辞

本抗真菌薬感受性サーベイランスに対する Pfizer Pharmaceuticals, New York の Research Grant (Study No.: DIF-2003-001) による助成および感受性測定を施行して頂いた (株) ビー・エム・エルに深謝いたします。

引用文献

- 1) Vuffray A, Durussel C, Boerlin P, Boerlin-Petzold F, Bille J, Glauser MP, Chave JP: Oropharyngeal candidiasis resistant to single-dose therapy with fluconazole in HIV-infected patients. *AIDS* 8: 708-709, 1994.
- 2) Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C: 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.
- 3) Malani A, Hmoud J, Carver PL, Bielaczyc A, Kauffman CA: *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. *Clin Infect Dis* 41: 975-981, 2005.
- 4) Munoz P, Sanchez-Somolinos M, Alcalá L, Rodriguez-Creixems M, Pelaez T, Bouza E: *Candida krusei*

- fungaemia: antifungal susceptibility and clinical presentation of an uncommon entity during 15 years in a single general hospital. *J Antimicrob Chemother* **55**: 188-193, 2005.
- 5) Magill SS, Shields C, Sears CL, Choti M, Merz WG: Triazole cross-resistance among *Candida* spp.: case report, occurrence among bloodstream isolates, and implications for antifungal therapy. *J Clin Microbiol* **44**: 529-535, 2006.
 - 6) Pfaller MA, Burmeister L, Bartlett MS, Rinaldi MG: Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *J Clin Microbiol* **26**: 1437-1441, 1988.
 - 7) Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, Bartlett MS, Body BA, Espinel-Ingroff A, Fromling RA, Hall GS, Hughes CE, Odds FC: Collaborative investigation of variable in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* **34**: 1648-1654, 1990.
 - 8) Ernst EJ: Susceptibility testing methods of antifungal agents. *Methods Mol Med* **116**: 3-12, 2005.
 - 9) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Proposed standard M27-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., **12**(25): 1992.
 - 10) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Tentative standard M27-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., **15**(10): 1995.
 - 11) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard. M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. **17**(9): 1997.
 - 12) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard-Second edition M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. **22**(15): 2002.
 - 13) 山口英世, 内田勝久, 久米 光, 篠田孝子, 渡辺一功, 楠俊雄, 比留間政太郎, 石崎 宏: 日本医真菌学会標準化委員会報告(1992~1994年). *真菌誌* **36**: 61-86, 1995.
 - 14) 山口英世, 内田勝久, 奥住捷子, 小栗豊子, 安達桂子, 川上小夜子, 戸坂雅一, 川島千恵子, 堀 雅子, 北澤俊美, 林 和, 齋藤芳彦, 尾崎京子, 西山彌生, 抗真菌感受性サーベイランス研究会: Japan Antifungal Surveillance Programによる真菌臨床分離株の抗真菌薬感受性に関する調査(1): 2001~2002年度報告. *日本臨床微生物学雑誌* **14**: 183-193, 2004.
 - 15) 山口英世, 内田勝久, 西山彌生, 奥住捷子, 小栗豊子, 安達桂子, 川上小夜子, 戸坂雅一, 三澤慶樹, 川島千恵子, 堀 雅子, 北澤俊美, 林 和, 沖村幸枝, 抗真菌薬感受性サーベイランス研究会: Japan Antifungal Surveillance Programによる真菌臨床分離株の抗真菌薬感受性に関する調査(2): 2003年度報告. *日本臨床微生物学雑誌* **16**: 13-22, 2006.
 - 16) 篠田孝子, 植村浩一, 小栗豊子, 三上 襄, 久米 光, 松本忠彦, 望月 隆, 池田玲子, 森 健, 中嶋 弘: 日本医真菌学会標準化委員会報告(1998~2000年): 抗真菌剤感受性試験法の標準化に関する多施設試験. *真菌誌* **43**: 108-110, 2002.
 - 17) Makimura K, Oguri T, Mikami Y, Kume H, Hanazawa R, Abe M, Ikeda R, Shinoda T: Multicenter evaluation of commercial frozen plates for microdilution broth antifungal susceptibility testing of yeasts and comparison of MIC limits recommended in NCCLS M27-A2. *Microbiol Immunol* **49**: 97-106, 2005.
 - 18) Rex JH, Nelson PW, Paetznick VL, Lozano-Chiu M, Espinel-Ingroff A, Anaissie EJ: Optimizing the correlation between results of testing *in vitro* and therapeutic outcome *in vivo* for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 129-134, 1998.
 - 19) Arthington-Skaggs BA, Warnock DW, Morrison CJ: Quantitation of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between *in vitro* antifungal susceptibility test results and *in vivo* outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 2081-2085, 2000.
 - 20) 内田勝久, 山口英世: 抗真菌薬の感受性試験法. *医薬ジャーナル* **39**: 3301-3308, 2003.
 - 21) European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing: Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Discussion document E. Dis, 7.1. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Taufkirchen, Germany, 2002.
 - 22) Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E: Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. *J Clin Microbiol* **39**: 2513-2517, 2001.
 - 23) Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL: Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp.. *J Clin Microbiol* **39**: 525-532, 2001.
 - 24) Cuenca-Estrella M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Arthington-Skaggs BA, Mellado E, Warnock DW, Rodriguez-Tudela JL: Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3644-3647, 2002.
 - 25) Cuenca-Estrella M, Rodriguez D, Almirante B, Morgan J, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayates J, Gimenez M, Salvado M, Warnock DW, Pahissa A, Rodriguez-Tudela JL; Barcelona Candidemia Project Study Group: *In vitro* susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: results from a population-based active surveillance program, Spain, 2002-2003. *J Antimicrob Chemother* **55**: 194-199, 2005.
 - 26) Tortorano AM, Prigitano A, Biraghi E, Viviani MA on behalf of the FIMUA-ECMM Candidaemia Study Group: The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of Candidaemia in Italy: *in vitro* susceptibility of 375 *Candida albicans* isolates and biofilm production. *J Antimicrob Chemother* **56**: 777-

- 779, 2005.
- 27) Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW: Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current changes. *Clin Microbiol Rev* **14**: 643-658, 2001.
- 28) Magiorakos AP, Hadley S : Impact of real-time fungal susceptibility on clinical practices. *Curr Opin Infect Dis* **17**: 511-515, 2004.
- 29) Takakura S, Fujihara N, Saito T, Kudo T, Inuma Y, Ichiyama S; Japan Invasive Mycosis Surveillance Study Group: Clinical factors associated with fluconazole resistance and short-term survival in patients with *Candida* bloodstream infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**: 380-388, 2004.

Studies on the Correlation of the Method Currently Used by the Japanese Society for Medical Mycology and Its Modified Method with the NCCLS M27-A2 Microdilution Method for Azole Susceptibility Testing of *Candida* Species

Katsuhisa Uchida, Yayoi Nishiyama and Hideyo Yamaguchi

Teikyo University Research Institute of Medical Mycology
359 Otsuka, Hachioji-shi, Tokyo 192-0395, Japan

To evaluate the currently used Japanese Society for Medical Mycology (JSMM) method for testing the azole susceptibility of yeasts, the activities of fluconazole and itraconazole were tested against recently collected clinical isolates of *Candida* spp. (n=946) and compared with the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M27-A2 microdilution reference method. Favorable correlation with the M27-A2 method was not seen for isolates of *C. albicans*, *C. tropicalis* or other *Candida* spp., particularly their trailing-growth isolates. However, the degree of correlation and agreement of MIC values were markedly improved when testing was performed by the modified JSMM method in which the end-point to be read was changed from IC₈₀ (for the current JSMM method) to IC₅₀. These results suggest that there is an urgent need to revise the current JSMM method.
