

【原著・基礎】

MIC 判定法を改良した真菌の感受性測定法

—従来法との比較—

柴田 明佳¹⁾・鈴木 健²⁾・福山 正文³⁾¹⁾株式会社三菱化学ビーシーエル臨床微生物グループ*

(元: 日本医科大学付属多摩永山病院中央検査室)

²⁾日本医科大学付属多摩永山病院中央検査室³⁾麻布大学環境保健学部微生物学研究室

(平成 15 年 3 月 31 日受付・平成 15 年 7 月 8 日受理)

抗真菌薬の治療法に MIC の利用が推奨されているにもかかわらず、MIC 測定に用いる濁度法による判定には攪拌の必要性、人的関与などの問題点がある。かかる問題点のない CCD カメラを用いて MIC を測定する画像法が開発されたことより、著者は真菌の ATCC 株と臨床株の MIC 測定に対する本法の有用性を、NCCLS および日本医真菌学会が推奨する標準濁度法と検討した。ATCC 5 株と臨床分離 60 株 (*Candida albicans* 22 株, *Candida glabrata* 10 株, *Candida parapsilosis* 19 株, *Candida tropicalis* 9 株) を対象とし、MIC を測定した。本法では顕微鏡用 CCD カメラにより凝集塊による透過光の減衰を撮影、その画像より得られた透過光強度をコンピュータで画像処理することにより得られた菌発育面積から菌発育終末点を決定して MIC を求めた。MIC が NCCLS M 27-T の公表値と一致したものは画像法、濁度法とも 9 検体中 6 検体であったが、日本真菌学会の公表値との一致は画像法に比べ濁度法で多かった (20 検体中 14 検体 vs 20 検体中 17 検体)。臨床株における画像法と濁度法の MIC は *C. albicans* と *C. parapsilosis* を除き 1 管差以内であったことより、両検査法の相関は高かった。臨床株への応用において、画像法を用いた MIC 測定は従来の方法と大差なく、手技の簡便性からも有用性の高い検査法と考えられた。

Key words: 画像法, image processing, MIC, microdilution, *Candida*

近年、わが国ではより経済的で効果的な治療法の確立と耐性菌¹⁻⁵⁾の検出を目的として MIC が測定されている。MIC の測定には濁度法 (NCCLS^{6,7)}, 日本医真菌学会⁸⁾, 日本化学療法学会⁹⁾, 酸化還元反応呈色色素法¹⁰⁻¹⁴⁾などがある。しかし、濁度法¹⁵⁾は真菌と抗菌薬の複合物である濁りを目視または機械で測定するため、測定前に攪拌処置が必要だけでなく、結果を検証できない欠点がある。

一般細菌感受性試験では微量液体希釈法による菌の発育状況を CCD カメラで撮影、画像を解析し、感受性値を出力し、保存する方法が開発され、すでに一般細菌検査の MIC 測定において使用されている。

著者は画像処理を用いて濁度法における真菌発育終末点を測定し、NCCLS および日本医真菌学会が推奨するいわゆる標準法と比較、画像法¹⁶⁾の臨床的有用性を検討した。

I. 材料および方法

1. 画像法, 濁度法による MIC 判定法

1) 画像法

鏡筒に顕微鏡用ビデオカメラ (IF-8500, Ikegami; コネクターレンズ×2.5), 鏡台にウエルスキャナー (WS

-R AX-C-P, 第一精密) を装着した倒立顕微鏡 (IMT-2, オリンパス; 対物レンズ×1) を用いた。撮影はマイクロプレートの全ウエルについてウエルスキャナーを移動して行い、ウエル中央を中心とした縦 7.8 mm, 横 10.5 mm の範囲を縦横 240 dot, 320 dot, 256 階調 (8 ビット) の濃淡をもった画像データ (TIFF 方式) としてパーソナルコンピュータ (EPSON PC-386 LSR, (株) セイコー・エプソン) に取り込んだ。ウエルスキャナー移動に伴う測定中心部のずれにより測定範囲にウエル周辺部が含まれる場合があるため、測定部位をウエル中央部 10 mm² の円形 ROI (region of interest) 内に限定した (Fig. 1)。凝集沈殿塊の定義は、画像データにおける濃淡 (intensity) が 170 未満、黒として表示される部位とした。Amphotericin B (AMPH-B) と 5-flucytosine (5-FC) における MIC は、ROI がすべて黒と表示された最小濃度、fluconazole (FLCZ), itraconazole (ITCZ) および miconazole (MCZ) の MIC は ROI の黒の面積が発育コントロールに対し 80% になった最小濃度とした。

*東京都板橋区志村 3-30-1

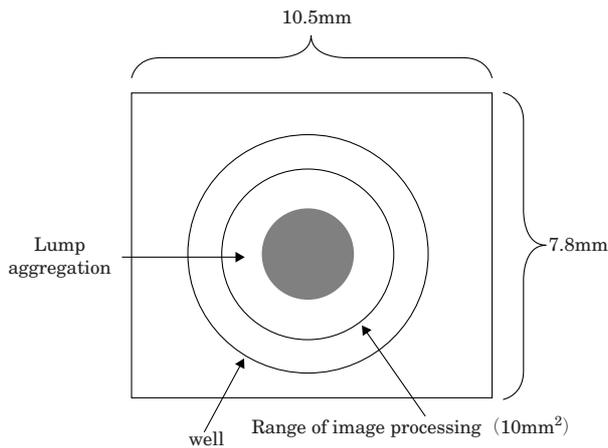


Fig. 1. Determining the area of the lump aggregation using image processing.

Microscope image data (TIFF files) for each well were analyzed by dividing the intensity of the light penetrating through the well into 256 steps of gradation (8 bits) using a personal computer. The image data was set at resolutions of 240 dots and 320 dots for 7.8 mm long and 10.5 mm widths, respectively. Consequently, one image contained 76,800 pixels, with each pixel occupying $1.0664 \times 10^{-3} \text{mm}^2$. The image-processing range for analysis was defined as the area inside a circle with an area of 10mm^2 located in the center of the well to eliminate mechanical errors. Pixels with a brightness of 170/256 gradation steps or more were displayed in white, while the remaining pixels were displayed in black. The area of the lump aggregation was shown by the black pixels.

2) 濁度法

濁度法の測定は日本医真菌学会の方法にしたがい、測定直前にプレートミキサー (EM-33, TAITEC) で1分間振盪攪拌、各ウエルの濁度はマイクロプレートリーダー (MTP-32, CORONA ELECTRIC) による単一波光 (波長 630 nm) の吸光度より算出した。AMPH-B および 5-FC の MIC はウエル内の吸光度が OD 値 0.08 と一致した濃度、すなわち完全発育阻止濃度、FLCZ, ITCZ および MCZ については発育コントロールの 80% を阻止する濃度とした。

2. 対象菌

1998年7月から1999年6月までの1年間に血液より分離された *Candida* 60株 (*Candida albicans* 22株, *Candida glabrata* 10株, *Candida parapsilosis* 19株, *Candida tropicalis* 9株) と日本医真菌学会標準化委員会における MIC 測定推奨基準株 *C. albicans* (ATCC 90028), *C. albicans* (ATCC 90029), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. parapsilosis* (ATCC 90018), および *Candida krusei* (ATCC 6258) の4菌種5株を対象とした。

3. 抗真菌薬の種類と薬物濃度

マイクロプレートはウエルに RPMI 1640 培地と抗真菌薬 AMPH-B ($16 \sim 0.03 \mu\text{g/mL}$), 5-FC および FLCZ

($64 \sim 0.125 \mu\text{g/mL}$), ITCZ ($8 \sim 0.015 \mu\text{g/mL}$), MCZ ($32 \sim 0.06 \mu\text{g/mL}$) を留置した「酵母 FP」(栄研化学)¹⁷⁻¹⁹⁾ を用いた。

4. 接種菌量の調整および接種法

臨床分離株ではサブロー・デキストロース寒天培地 (SDA) にて2回継代培養後 McFarland 1.0 とし、オートインキュレーターにより 10^3 CFU (colony forming units)/mL をウエル内に接種した。

5. 培養法

35°C にてコントロールウエル内濁度が 0.15 に達するまで 24 時間から 72 時間培養した。

II. 結 果

1. 標準株 (ATCC 株) における MIC

1) *C. albicans* (ATCC 90028)

画像法, 濁度法の MIC は AMPH-B を除き 5-FC, FLCZ, ITCZ, MCZ ではすべて一致した (Table 1)。

2) *C. albicans* (ATCC 90029)

画像法, 濁度法の MIC は AMPH-B, 5-FC, FLCZ では一致したが, ITCZ では画像法の MIC は1管低く, MCZ では少なくとも1管高かった (Table 1)。

3) *C. glabrata* (ATCC 90030)

AMPH-B, 5-FC, FLCZ, MCZ において画像法の MIC は濁度法に比べ低値であったが, ITCZ では差がなかった (Table 1)。

4) *C. parapsilosis* (ATCC 90018)

5-FC, FLCZ, MCZ では画像法と濁度法の MIC に差がなく, AMPH-B では濁度法に比べ画像法は低く, ITCZ では逆に高かった (Table 1)。

5) *C. krusei* (ATCC 6258)

AMPH-B, FLCZ, ITCZ, MCZ において画像法, 濁度法の MIC に差はなかったが, 5-FC では画像法の MIC は濁度法に比べ, わずかに低かった (Table 1)。

2. 臨床分離株における MIC

1) *C. albicans*

AMPH-B, 5-FC, における画像法の MIC₉₀ は濁度法に比べ高かったが, FLCZ, ITCZ, MCZ の MIC₉₀ に差はなかった (Table 2)。

2) *C. glabrata*

AMPH-B において画像法の MIC₉₀ は濁度法に比べ高かったが, 5-FC, FLCZ, ITCZ, MCZ ではすべて一致した (Table 2)。

3) *C. parapsilosis*

AMPH-B, 5-FC, FLCZ, ITCZ, MCZ において画像法と濁度法の MIC₉₀ はすべて一致した (Table 2)。

4) *C. tropicalis*

AMPH-B, FLCZ, ITCZ, MCZ において画像法と濁度法の MIC₉₀ は一致したが, 5-FC では画像法がわずかに高かった (Table 2)。

3. 濁度法と画像法における MIC の差

Table 1. MICs of antifungal agents in *Candida* species (ATCC)

Strain	Measurement method	MIC ($\mu\text{g/mL}$)					
		AMPH-B	5-FC	FLCZ	ITCZ	MCZ	
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	NCCLS M 27-T	0.5-2.0	0.5-2.0	0.25-1.0	—	—	
	NCCLS M 27-P	0.25-1.0	1.0-4.0	$\leq 0.125-0.5$	—	—	
	Japanese Society of Medical Mycology	0.5-1.0	$\leq 0.125-0.25$	$\leq 0.125-0.25$	$\leq 0.016-0.03$	≤ 0.06	
	image processing method spectrophotometric method	0.25 0.5	0.25 0.25	≤ 0.125 ≤ 0.125	≤ 0.015 ≤ 0.015	0.125 0.125	
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90029)	NCCLS M 27-T	—	—	—	—	—	
	NCCLS M 27-P	0.25-1.0	>64	$\leq 0.125-0.5$	—	—	
	Japanese Society of Medical Mycology	0.5-1.0	>64	$\leq 0.125-0.25$	$\leq 0.016-0.03$	≤ 0.06	
	image processing method spectrophotometric method	0.5 0.5	>64 >64	0.25 0.25	≤ 0.015 0.03	0.125 ≤ 0.06	
<i>Candida glabrata</i> (ATCC 90030)	NCCLS M 27-T	—	—	—	—	—	
	NCCLS M 27-P	0.25-1.0	≤ 0.125	8.0-16	—	—	
	Japanese Society of Medical Mycology	1.0-2.0	≤ 0.125	2.0-4.0	0.25-1.0	$\leq 0.06-0.125$	
	image processing method spectrophotometric method	0.5 2	≤ 0.125 0.25	1 2	1 1	≤ 0.06 0.125	
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 90018)	NCCLS M 27-T	0.5-2.0	$\leq 0.125-0.25$	0.25-1.0	—	—	
	NCCLS M 27-P	0.25-1.0	0.25-1.0	$\leq 0.125-0.5$	—	—	
	Japanese Society of Medical Mycology	0.25-2.0	≤ 0.125	0.5-1.0	0.06-0.25	0.25-1.0	
	image processing method spectrophotometric method	0.5 1	≤ 0.125 ≤ 0.125	0.5 0.5	0.03 ≤ 0.015	0.5 0.5	
<i>Candida krusei</i> (ATCC 6258)	NCCLS M 27-T	0.5-2.0	0.4-16	16-64	—	—	
	NCCLS M 27-P	—	—	—	—	—	
	Japanese Society of Medical Mycology	—	—	—	—	—	
	image processing method spectrophotometric method	0.5 0.5	16 32	32 32	0.5 0.5	2 2	

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

Table 2. MIC_{90S} and MIC_{95S} of five antifungal agents in clinically isolated *Candida* species (N=60)

Strain	Measurement method	AMPH-B		5-FC		FLCZ		ITCZ		MCZ				
		MIC _{90S}	MIC _{95S}											
<i>Candida albicans</i>	image processing method	0.25	0.5	≤0.125	0.25	0.25	2	≤0.125-0.5	0.06	0.5	0.03-1	0.125	0.25	≤0.06-4
	spectrophotometric method	0.25	0.25	≤0.03-0.25	≤0.125	0.25	2	≤0.125-0.25	0.06	0.5	0.03-1	0.125	0.25	≤0.06-2
<i>Candida glabrata</i>	image processing method	0.125	0.5	0.125-0.5	≤0.125	2	4	0.5-4	0.5	2	0.25-2	0.5	2	0.125-2
	spectrophotometric method	0.125	0.25	0.06-0.25	≤0.125	2	4	0.5-8	0.5	2	0.25-2	0.5	2	0.125-4
<i>Candida parapsilosis</i>	image processing method	0.125	0.125	≤0.03-0.25	≤0.125	1	1	0.5-2	0.25	0.25	≤0.015-0.5	2	2	0.25-4
	spectrophotometric method	0.06	0.125	≤0.03-0.25	≤0.125	0.5	1	0.5-2	0.25	0.25	0.06-0.5	2	2	0.25-4
<i>Candida tropicalis</i>	image processing method	0.25	0.25	≤0.03-0.25	≤0.125	0.25	2	0.5-4	0.25	1	0.06-1	1	4	≤0.06-4
	spectrophotometric method	0.125	0.25	≤0.03-0.25	≤0.125	0.25	2	0.5-4	0.25	1	0.06-1	1	4	0.125-4

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

Table 3. Comparison of MICs measured using spectrophotometric and image processing methods

Strain	Antifungal agent	Discrepancy of MICs			
		0	±1	±2	±3≤
<i>Candida albicans</i>	AMPH-B	5	8	9	—
	5-FC	16	5	1	—
	FLCZ	21	1	—	—
	ITCZ	21	1	—	—
	MCZ	20	2	—	—
	total (%)	83 (75)	17 (15)	10 (9)	0 (0)
<i>Candida glabrata</i>	AMPH-B	7	3	—	—
	5-FC	10	—	—	—
	FLCZ	7	3	—	—
	ITCZ	10	—	—	—
	MCZ	9	1	—	—
	total (%)	43 (86)	7 (14)	0 (0)	0 (0)
<i>Candida parapsilosis</i>	AMPH-B	11	7	1	—
	5-FC	18	—	1	—
	FLCZ	16	3	—	—
	ITCZ	18	—	1	—
	MCZ	18	1	—	—
	total (%)	81 (85)	11 (12)	3 (3)	0 (0)
<i>Candida tropicalis</i>	AMPH-B	5	4	—	—
	5-FC	6	3	—	—
	FLCZ	8	1	—	—
	ITCZ	8	1	—	—
	MCZ	8	1	—	—
	total (%)	35 (78)	10 (22)	0 (0)	0 (0)
Total (%)	242 (81)	45 (15)	13 (4)	0 (0)	

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

臨床分離株 60 株において、希釈系列より得られた MIC を用い画像法と濁度法の管差について検討した (Table 3)。各菌種とも管差なしが 75% 以上と高く、*C. glabrata* と *C. tropicalis* では差が 1 管以内であった。一方 *C. albicans* と *C. parapsilosis* において 2 管差以上をそれぞれ 9%、3% 認めたにすぎず、両検査法における一致率は良好であった。

III. 考 案

1. MIC 測定における画像法の特徴と有用性

抗真菌薬の使用法は細菌感染症に対する治療法の進歩に伴い改変され、近年では MIC を用いた方法が推薦されている²⁰⁻²²⁾。

抗真菌薬の MIC 測定に用いる菌発育終末判定法には濁度法、酸化還元反応呈色色素法、凝集法などがあり、本邦では主に NCCLS と日本医真菌学会法が推奨する濁度法が用いられている。濁度法における菌発育終末点は、マクロ法、ミクロ法とも濁りを目視または細い透過光により判定するため、判定前にウエル内の凝集塊を攪拌して濁りを均一化する必要がある。特に濁りを観察者

の眼で行う目視法では、観察者の判定能力が測定結果に関与する一方、透過度を吸光度で表現する透過法では、測定結果の検証ができない欠点が存在する。

本研究では顕微鏡用 CCD カメラを用いて凝集塊を撮影してコンピュータに取り込み、画像処理する方法により菌発育終末判定を行った。本法は一般細菌検査の分野ではすでに臨床応用されており、ウエル内にある凝集塊の大きさと透過光減衰の程度を CCD カメラで撮影し、コンピュータで定量化して菌発育終末点を判定する。そのため、測定前にウエルを攪拌する必要がなく、測定値に対する人的誤差も排除できる利点がある。しかし、鏡筒に装着された CCD カメラが連続移動するウエルを撮影して行うため、撮影の進行に伴いウエル中心とカメラ中心にずれが生じ、凝集塊周辺部に測定誤差が出現する欠点がある。著者らは凝集が沈殿する際、セル凹部の中心部に集まる特性に着目し、ウエル中心部の 10 mm² 円内を測定部位として常に安定した MIC 値が得られるように改良した。

1998 年、荻原らはこの装置を用い、攪拌したにもかかわらず濁度測定時には再凝集する凝集性の強い ATCC 株の *Candida* の MIC を問題なく測定ができたことを報告した¹⁶⁾。かかる研究の共同研究者であった著者は、本装置が臨床株を対象とした薬剤感受性試験にも有用であると判断し、本研究において使用した。

2. 濁度法と画像法の比較

NCCLS は本研究で使用した *C. albicans* (ATCC 90028), *C. albicans* (ATCC 90029), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. parapsilosis* (ATCC 90018) および *C. krusei* (ATCC 6258) に対する AMPH-B, 5-FC, FLCZ の濁度法による MIC を公表し^{6,7)}、日本医真菌学会も *C. krusei* (ATCC 6258) を除いたすべての菌種の AMPH-B, 5-FC, FLCZ, MCZ, ITCZ に対する MIC を示している⁸⁾。*C. albicans* (ATCC 90028), *C. albicans* (ATCC 90029), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. parapsilosis* (ATCC 90018) における AMPH-B, 5-FC, FLCZ の MIC は NCCLS と日本真菌学会の公表値および NCCLS 公表値における濁度マイクロ法 (NCCLS M 27-T) と濁度マクロ法 (NCCLS M 27-P) の間に若干の差が認められる。本研究において MIC が NCCLS M 27-T の公表値と一致したものは画像法、濁度法とも 9 検体中 6 検体と差がなかった。日本真菌学会公表値との一致は濁度法 20 検体中 17 検体に比べ画像法 20 検体中 14 検体と画像法で低かった。一致率に違いを認めた理由として、画像法では ROI のデータを菌種にかかわらず画一的に intensity 170 以上と未満に分割し、170 未満を黒と表示して凝集沈殿塊と定義したことが関与していると考えられた。

臨床株を対象とした画像法と濁度法の MIC₅₀ と MIC₉₀ の比較において、MIC₅₀ が一致したものは Table 2 に示

すごとく各 20 組の検体中 17 組、MIC₉₀ では 16 組であった。一致しなかった検体の MIC₅₀, MIC₉₀ はともに画像法が高値であった。しかし、その乖離に特定の菌種や抗真菌薬に対する一定の傾向は見られず *Candida* の生物学的多様性によるものと考えられた。一方、画像法と濁度法の MIC の乖離は *C. albicans* の AMPH-B を除きほぼ 1 管差以内であった。

本研究で著者は、抗真菌薬の MIC 測定に用いられる濁度法の濁度を、CCD カメラを使用して評価する画像法の有用性を検討した。画像法による ATCC 株および臨床株に対する MIC は、従来の濁度法に比べ著明な差はなかったが、一部の菌において画像処理条件を一定にしていたためと思われる数値の差を認めた。しかし画像法は、従来の濁度法で必須であった測定前の攪拌処理が必要でなく、測定状況の検証が容易な点などの利点があるため、菌種による画像処理条件のさらなる検討を行うことにより、臨床での MIC 測定法として一層有用性の高い検査法と考えられ、濁度法 (NCCLS^{6,7)}、日本医真菌学会⁸⁾ との併用はより信頼性の高い MIC の測定に寄与できると期待される。

文 献

- 1) Galgiani J N, Rinaldi M G, Polak A M, et al.: Standardization of antifungal susceptibility testing. *J. Med. Vet. Micro.* 30: 213~224, 1992
- 2) 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
- 3) 伊東 章: 抗真菌剤をめぐる話題。産婦人科治療 74: 391~393, 1997
- 4) 前崎繁文, 河野 茂: 深在性真菌症の臨床。臨床検査 43: 140~148, 1999
- 5) 小栗豊子, 森 健: 薬剤耐性感染症, リスクファクターと診療のポイント, カンジダ。感染と抗菌薬 1: 40~47, 1998
- 6) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast: Proposed M 27-P, Pennsylvania, NCCLS, 1992
- 7) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): Reference Method for, Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast: Tentative Standard M 27-T, Pennsylvania, NCCLS, 1995
- 8) 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)。日本医真菌学会誌 36: 61~86, 1995
- 9) 五島瑳智子, 岡田 淳, 小栗豊子, 他: 日本化学療法学会抗真菌薬感受性測定法検討委員会報告。日化療会誌 38: 101~105, 1990
- 10) Pfaller M A, Vu Q, Lancaster M, et al.: Multisite Reproducibility of Colorimetric Broth Microdilution method for Antifungal Susceptibility Testing of Yeast Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1625~1628,

- 1994
- 11) 山根誠久, 戸坂雅一, 岡沢 豊: 酸化還元反応呈色色素を用いた微量液体希釈法での抗真菌薬剤感受性試験の検討—National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M 27-P との比較評価試験—. 臨床病理 44: 67~75, 1996
 - 12) 山根誠久, 猪狩 淳: 酵母真菌を対象とする Colorimetric Broth Microdilution 法での抗真菌薬剤感受性試験の検討—国内 17 施設での共同評価. 臨床病理 45: 190~199, 1997
 - 13) 松岡喜美子, 永富由美子, 今西啓子, 他: 呈色色素反応—ドライプレート法による微量液体希釈法—を用いた抗真菌薬剤感受性試験. 臨床と微生物 23: 101~110, 1996
 - 14) 松延直子, 村上紀之, 高田 徹, 他: 酵母様真菌感受性測定キット‘ASTY’を用いた真菌感受性試験の検討と同キットによる臨床分離株 MIC の測定. 医学検査 48: 67~73, 1999
 - 15) Pfaller M A, Messer S A, Coffmann S: Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D 0870. J. Clin. Microbiol. 33: 1094~1097, 1995
 - 16) 萩原利彦, 高本雄治, 柴田明佳, 他: 画像処理を用いた菌発育終末点の新しい判定法. 日治療会誌 46: 107~111, 1998
 - 17) 須藤貴子, 田村 俊, 槇村浩一, 他: 抗真菌薬剤感受性試験用プレートの評価. 日本細菌学雑誌 51: 321, 1996
 - 18) 櫻田政子, 安達桂子, 安中めぐみ, 他: 血液培養から分離された酵母様真菌の年次推移と薬剤感受性. 日本臨床微生物学雑誌 9: 17~23, 1999
 - 19) 渋谷康寛, 羽石恵理子, 木村由美子, 他: 酵母様真菌感受性測定キットを用いた臨床分離株の感受性の検討. 日本臨床微生物学雑誌 10: 28~35, 2000
 - 20) 山口英世: 抗真菌剤の感受性試験法の現状と課題. 臨床と微生物 20 (臨時増刊): 229~235, 1993
 - 21) 槇村浩一: 病原真菌の抗真菌薬耐性機構. 最新医学 54: 50~55, 1999
 - 22) 須藤貴子, 槇村浩一, 川田かおる, 他: 微量液体希釈法による口腔内・食堂カンジダ症分離株の感受性試験—各抗真菌薬の活性と fluconazole の *in vitro/in vivo* 活性相関—. 日治療会誌 45: 115~122, 1997

Assay of MIC for *Candida* by modified endpoint determination

—Comparison with the method using turbidity—

Akiyoshi Shibata¹⁾, Takeshi Suzuki²⁾ and Masahumi Fukuyama³⁾

¹⁾Clinical Microbiology Division, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratory, Inc., 3-30-1 Shimura, Itabashi-ku, Tokyo, Japan (Formerly: Department of Clinical Laboratory, Nippon Medical School Tama-Nagayama Hospital)

²⁾Department of Clinical Laboratory, Nippon Medical School Tama-Nagayama Hospital

³⁾Department of Microbiology, Azabu University

Although the MIC of antifungal agents is usually used as the recommended treatment dosage, determining the MIC using the turbidity method requires stirring and is non-quantitative. The newly developed imaging method for measuring MIC, which utilizes a CCD camera, does not have these drawbacks. We investigated the usefulness of the imaging method for measuring MICs for define and clinically obtained fungal strains by comparing our results obtained using the imaging method with those obtained using the standard turbidity method recommended by define and the Japanese Society for Medical Mycology. Using *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida albicans* (ATCC 90029), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida parapsilosis* (ATCC 90018), *Candida krusei* (ATCC 6258) and 60 other *Candida* strains (*C. albicans*: 22; *C. glabrata*: 10; *C. parapsilosis*: 19; *C. tropicalis*: 9) isolated from blood, the MIC of various was measured using “Yeast FP” (Eiken Kagaku). With this method, antifungal agents the attenuation of transmitted light produced by yeast aggregation was recorded using a CCD camera attached to a microscope. The intensity of the transmitted light was then determined using image processing to obtain the growth area; the growth endpoint was then determined from the growth area, and the MIC was calculated. The MICs were consistent with the values published by NCCLS M 27-T in six out of nine samples measured using the imaging and turbidity methods. However, the results of the turbidity method were more consistent with the values published by the Japanese Society for Medical Mycology than the results of the imaging method (14 out of 20 samples for the turbidity method vs. 17 out of 20 samples for the imaging method). The differences between the imaging-measured MICs and the turbidity-measured MICs were within one standard deviation of each other for all clinically isolated strains expect for *C. albicans* and *C. parapsilosis*; thus, the two measurement methods were highly correlated. MIC measurements in clinical isolates using the imaging method were not significantly different from those obtained using the conventional method. In view of the simplicity of its procedure, the imaging method may be very useful for calculating the MIC of antifungal agents in clinical isolates.