

【原著・基礎】

Miconazole など抗真菌薬の酵母様真菌に対する *in vitro* 併用効果砂田 淳子¹⁾・西 功¹⁾・豊川 真弘¹⁾・堀川 晶行¹⁾・上田安希子¹⁾・浅利 誠志²⁾¹⁾大阪大学医学部附属病院臨床検査部*, ²⁾同 感染制御部

(平成 15 年 12 月 1 日受付・平成 15 年 12 月 22 日受理)

臨床材料から分離された酵母様真菌に対する, amphotericin B (AMPH-B), flucytosine (5-FC), fluconazole (FLCZ), miconazole (MCZ), itraconazole (ITCZ), micafungin (MCFG) の *in vitro* における単剤最小発育阻止濃度 (MIC) 測定と MCZ を中心とした他の 5 薬剤との併用効果測定を実施した。*Candida* 属に対する単剤の抗真菌活性は, AMPH-B のみ低感受性株が認められず, 比較薬剤中もっとも優れていた。一方, 他の 5 薬剤では, それぞれ異なる菌種に低感受性あるいは耐性を示した。併用効果測定において相乗あるいは相加効果をもっとも示した組み合わせは FLCZ+MCZ (97.5%) であり, 以下 5-FC+MCZ (94.2%), ITCZ+MCZ (92.5%), MCFG+MCZ (90%) の順であった。一方, AMPH-B+MCZ では相乗効果が認められず, 相加効果が 50%, 拮抗作用が 17.5% の株に認められた。*Cryptococcus neoformans* に対する単剤の MIC は ITCZ がもっとも小さく, 比較薬剤中もっとも優れた抗真菌活性を示したが, MCFG では活性が認められなかった。併用効果測定ではすべての組み合わせにおいて相乗・相加効果が認められた。特に, 5-FC+MCZ, FLCZ+MCZ および MCFG+MCZ の組み合わせでは全株に対して相乗効果を示した。MCZ は他の抗真菌薬との間に良好な併用効果を示し, 臨床現場において MCZ を用いた併用療法の有効性が示唆された。

Key words: miconazole, combination effect, *in vitro* activity

好中球減少を伴う血液疾患や臓器移植などの免疫不全患者において, 日和見感染症として発症する深在性真菌症は, その基礎疾患以上に生命を脅かす存在となる¹⁾。これらの真菌症確定診断は一般的に難しく, また投与可能な抗真菌薬も amphotericin B (AMPH-B), flucytosine (5-FC), fluconazole (FLCZ), itraconazole (ITCZ), miconazole (MCZ) および micafungin (MCFG) の 6 薬剤に限られ, さらに抗真菌剤感受性検査を実施している施設が少ないため, その治療は経験的療法が中心となっている²⁾。このような現状において, 臨床の現場では耐性株の防止や適切な抗真菌薬を選択するため, 抗真菌薬感受性検査の必要性が高まっている。また, 薬剤移行性の不良な組織での感染や副作用の軽減, 単剤での薬効不足を補足するため, 重症クリプトコックス症治療に代表される 5-FC と AMPH-B および FLCZ 併用³⁾などの併用療法が試みられている。しかし, AMPH-B とアゾール系薬剤の *in vitro* での併用試験では拮抗を示す報告⁴⁻⁷⁾などもあり, 併用薬剤の選択には注意が必要である。

今回われわれは, 臨床材料から分離された酵母様真菌 44 株に対する抗真菌薬 6 薬剤の *in vitro* における単剤の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定とイミダゾール系抗真菌薬であり真菌におけるエルゴステロール生合成阻害と直接的細胞膜障害作用を有し^{8,9)}, 比較的副作用の少ない MCZ を中心とした併用効果測定の検討を行ったので報告する。

I. 材料と方法

1. 使用菌株と由来材料

当院臨床検査部感染微生物検査室において, 2000 年 1 月から 2002 年 10 月までの間に臨床材料より分離された *Candida* 属 40 株 (*Candida albicans* 20 株, *Candida glabrata* 6 株, *Candida krusei* 3 株, *Candida parapsilosis* 6 株, *Candida tropicalis* 5 株), *Cryptococcus neoformans* 4 株, 計 44 株を用いた。その由来材料は血液 33 株, 髄液 2 株, 角膜 2 株, IVH 先端 2 株, 腹水, 心嚢液, 胸骨ワイヤー, 心臓血管組織, 肺組織が各 1 株であった。

2. 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法

MIC 値の測定は National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) の標準法 M-27 A 2¹⁰⁾ に準拠した微量液体希釈法にて行った。

1) 使用培地

RPMI 1620 培地 (グルタミン添加, 重炭酸ナトリウム無添加) (SIGMA) を 0.165 M MOPS (SIGMA) 900 mL に溶解・攪拌し, その後 1 M 水酸化ナトリウムにて pH 7.0 に調整, 蒸留水を加え全量を 1 L にした後, ろ過滅菌を行った。

2) 感受性測定パネル

使用抗真菌薬は AMPH-B (ブリistol・マイヤーズ・スクイブ株式会社), 5-FC (日本ロシュ株式会社),

FLCZ (ファイザー製薬株式会社), ITCZ (ヤンセン協和株式会社), MCZ (持田製薬株式会社) および MCFG (藤沢薬品工業株式会社) の原末を使用した。

単剤の MIC 測定用マイクロプレートは、各薬剤の最終試験濃度が AMPH-B: 0.008~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5-FC: 0.004~8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, FLCZ: 0.03~64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ITCZ, MCZ および MCFG: 0.002~4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように指定し栄研化学株式会社に作製を依頼した。また、併用効果測定用マイクロプレートは MCZ の最終試験濃度が 0.015, 0.06, 0.25 および 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 4 濃度、併用薬剤の最終試験濃度が AMPH-B: 0.06~8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5-FC: 0.015~2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, FLCZ: 0.25~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ITCZ および MCFG: 0.008~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように指定し栄研化学株式会社に作製を依頼した。

3) 接種菌液の作成, 接種・培養

被験菌は Sabouraud dextrose agar (DIFCO) を用い、*Candida* 属は 35°C で 24 時間、*C. neoformans* は 35°C で 48 時間前培養した菌を用いた。菌液の調整は比濁法にて McFarland No. 0.5 に調整し、RPMI 1640 培地にて 50 倍希釈後、さらに同培地にて 20 倍希釈を行い、最終接種菌量の 2 倍濃度 ($1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ cells/mL) に調整した。

調整菌液 100 μL をウェルに接種し (最終菌液濃度: $0.5 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^3$ cells/mL), *Candida* 属は 35°C で 48 時間、*C. neoformans* は 35°C で 72 時間培養した。

4) 単剤測定における終末点の判定

単剤測定の判定は NCCLS M 27-A 2 に準拠しスコア化により判定を行った。AMPH-B ではスコアが 0 を示

した濃度を、一方、5-FC, FLCZ および ITCZ ではスコアが 2 以下を示した濃度を MIC とした。NCCLS の判定基準のない MCZ では他のアゾール系薬と同様にスコアが 2 以下を示した濃度を、MCFG では池田ら¹¹⁾の研究よりスコアが 0 を示した濃度を MIC とした。5-FC, FLCZ および ITCZ に関しては NCCLS の判定基準を Table 1 に示した。

3. 併用効果判定

併用効果測定の判定は、単剤測定時の MCZ の判定と同様に各薬剤ともスコアが 2 以下を示した濃度を MIC とした。併用効果は fractional inhibitory concentration (FIC) index [= (MCZ の併用時 MIC/MCZ 単剤時 MIC) + (併用薬の併用時 MIC/併用薬の単剤時 MIC)] を求め、FIC index ≤ 0.5 を相乗効果、 $0.5 < \text{FIC index} \leq 1.0$ を相加効果、 $1.0 < \text{FIC index} \leq 2.0$ を不関および $2.0 < \text{FIC index}$ を拮抗と判定した。

4. 精度管理

精度管理株 *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258 (千葉大学医真菌センターより分与) の計 2 株を用い、MIC の測定範囲が NCCLSM 27-A 2¹⁰⁾ の設定範囲にあることを確認した。

II. 結果

1. *Candida* 属に対する各薬剤の単剤での MIC

AMPH-B の MIC 分布は Fig. 1 に示すように 0.12~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の狭い範囲であった。*C. albicans* では 0.125~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 他の 4 菌種では 0.5~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に分布した。

5-FC の MIC 分布は Fig. 2 に示すように、*C. krusei*

Table 1. Interpretive guideline for *in vitro* susceptibility testing of *Candida* species

Antifungal agent	Susceptible (S)	Susceptible-dose dependent (S-DD)	Intermediate (I)	Resistant (R)
Fluconazole	≤ 8	16-32	—	≥ 64
Itraconazole	≤ 0.125	0.25-0.5	—	≥ 1
Flucytosine	≤ 4	—	8-16	≥ 32

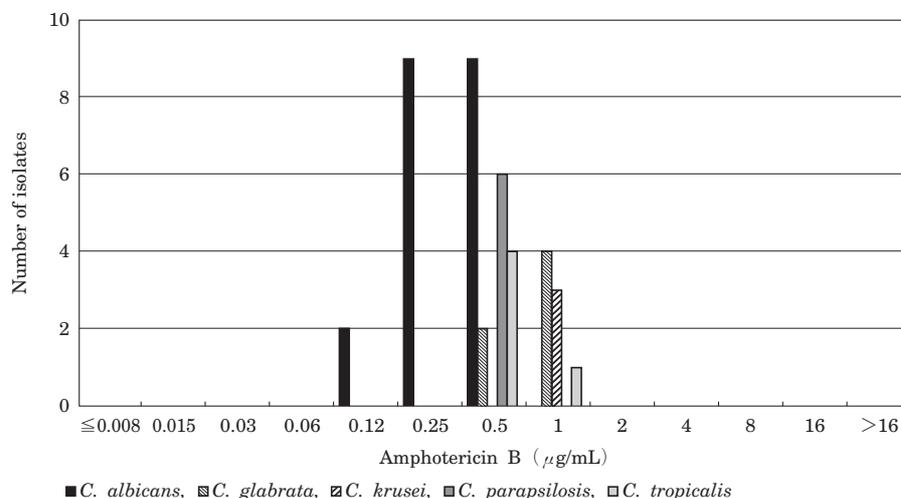


Fig. 1. Distribution of MICs of amphotericin B for *Candida* species.

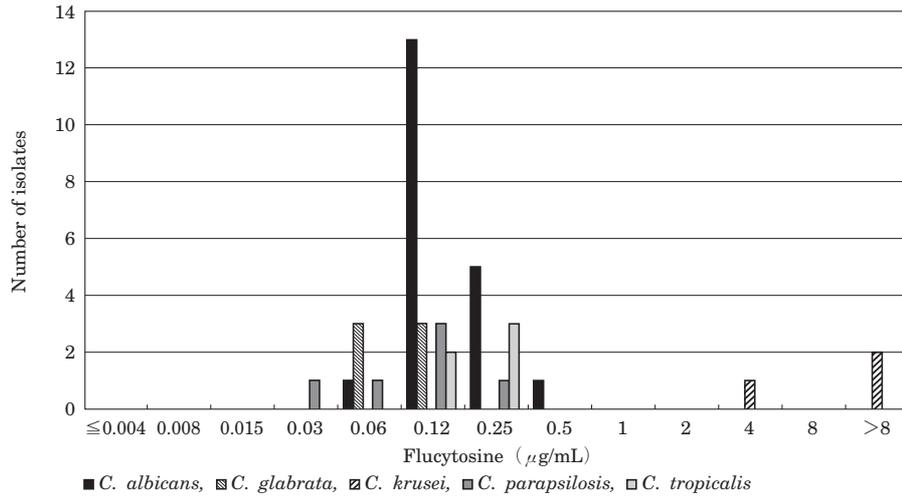


Fig. 2. Distribution of MICs of flucytosine for *Candida* species.

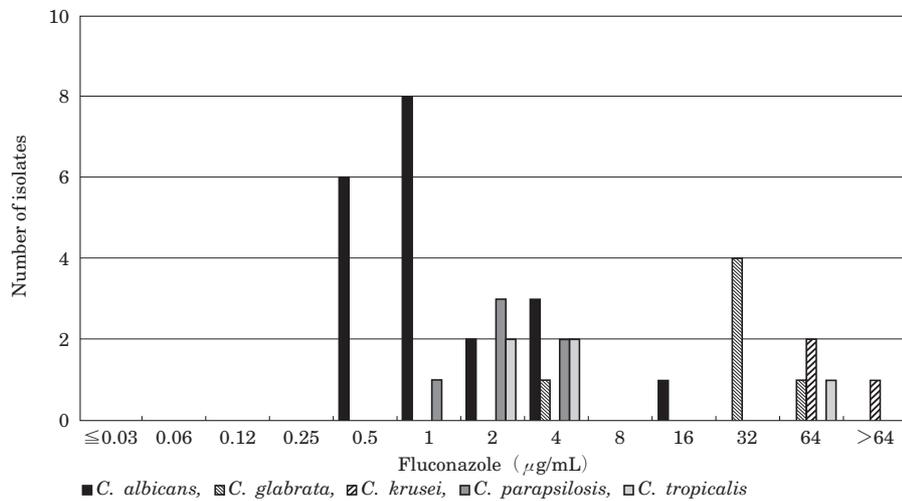


Fig. 3. Distribution of MICs of fluconazole for *Candida* species.

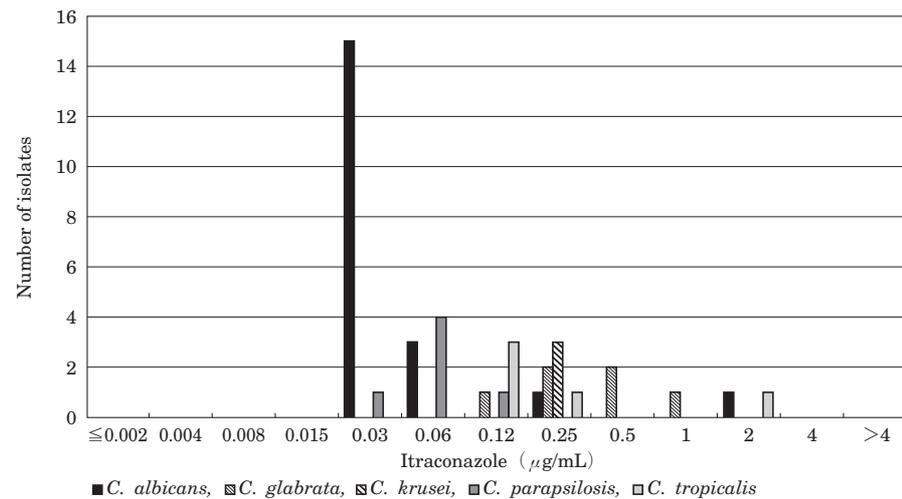


Fig. 4. Distribution of MICs of itraconazole for *Candida* species.

のみが 4.0~>8.0 µg/mL と高く、他の 4 菌種では 0.03~0.5 µg/mL の感受性 (S) に分布した。

FLCZ の MIC 分布は Fig. 3 に示すように 0.5~>64

µg/mL であり、Susceptible-dose dependent (S-DD) に 5 株 (*C. albicans* 1 株, *C. glabrata* 4 株), Resistant (R) に 5 株 (*C. glabrata* 1 株, *C. tropicalis* 1 株, *C. krusei*

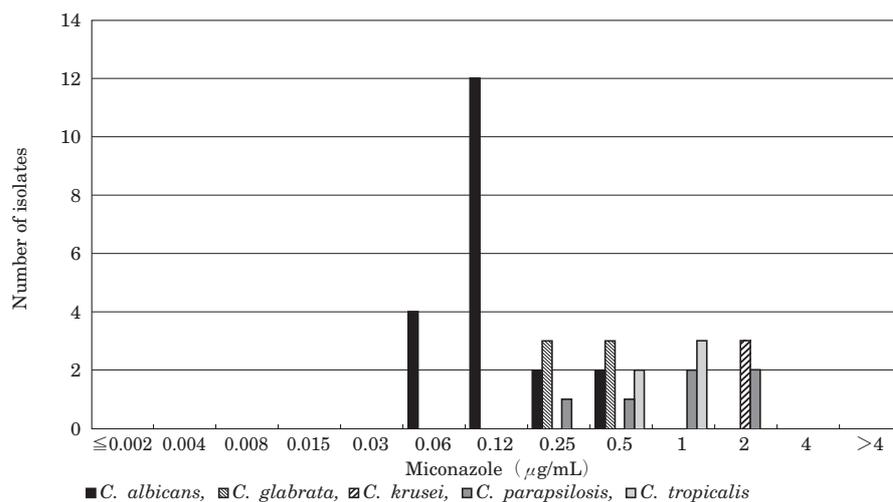


Fig. 5. Distribution of MICs of miconazole for *Candida* species.

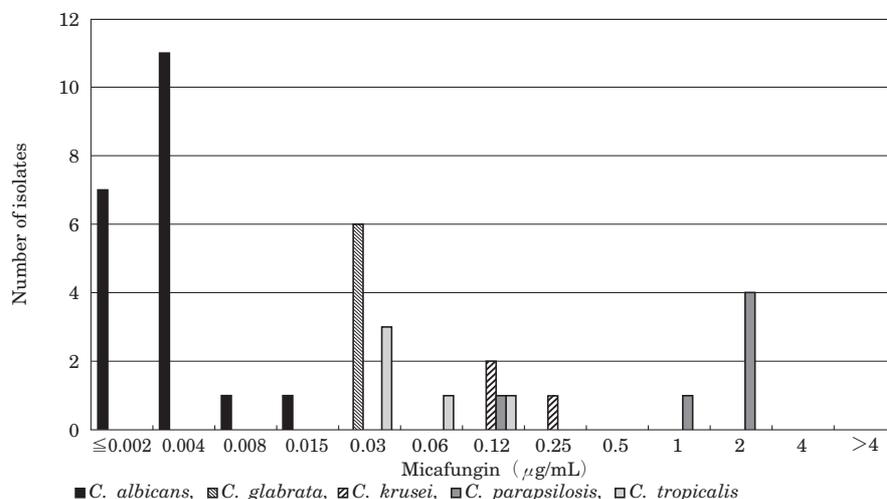


Fig. 6. Distribution of MICs of micafungin for *Candida* species.

3株)が分布した。

ITCZのMIC分布はFig. 4に示すように0.03~2.0 µg/mLであり、S-DDに9株(*C. albicans* 1株, *C. glabrata* 4株, *C. krusei* 3株, *C. tropicalis* 1株), Rに3株(*C. albicans* 1株, *C. glabrata* 1株, *C. tropicalis* 1株)が分布した。*C. albicans*においてFLCZにS-DDを示した株とITCZにRを示した株, また*C. tropicalis*においてFLCZとITCZともにRを示した株は同一株であった。

MCZのMIC分布はFig. 5に示すように0.06~2.0 µg/mLであった。*C. albicans*は0.06~0.5 µg/mL, その他の4菌種は0.25~2.0 µg/mLに分布した。

MCFGのMICはFig. 6に示すように≤0.002~2.0 µg/mLであり, その分布は比較薬剤中もっとも広範囲であった。*C. albicans*は0.015 µg/mL以下, *C. glabrata*は0.03 µg/mL, *C. tropicalis*は0.03~0.12 µg/mL, *C. krusei*は0.12~0.25 µg/mL, *C. parapsilosis*は0.12~2.0 µg/mLに分布し, 菌種ごとに分布濃度の差異が認

められた。

2. *Candida* 属に対するMCZと各薬剤の併用効果

MCZと各薬剤の*Candida*属に対する*in vitro*での併用効果(相乗, 相加, 不関, 拮抗)をTable 2に示した。AMPH-B+MCZの組み合わせでは相乗効果が認められず, 相加効果が40株中20株(50%)に認められた。拮抗は*C. albicans* 3株, *C. glabrata* 1株, *C. tropicalis* 3株の計7株(17.5%)に認められた。不関は40株中13株(32.5%)に認められ, *C. krusei*は全株が不関であった。

5-FC+MCZの組み合わせでは相乗効果が35株中11株(31.4%), 相加効果が35株中22株(62.8%)に認められた。*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*の3菌種では拮抗, 不関ともに認められなかったが, *C. tropicalis*では拮抗および不関を示した株がそれぞれ1株認められた。また, 終末点の判定不能であった株は判定保留とした。*C. krusei*は5-FC単剤でのMICが高く, 今回作成したプレートでは併用効果測定が行えなかった

Table 2. Effect of miconazole and other antifungal agents combined *in vitro* for *Candida* species

Combined drug	Organism (no. of isolates)	Combination effect				
		synergistic	additive	indifferent	antagonistic	avaluative
Amphotericin B	<i>C. albicans</i> (20)	0	12 (60%)	5 (25%)	3 (15%)	0
	<i>C. glabrata</i> (6)	0	5 (83.3%)	0	1 (16.7%)	0
	<i>C. krusei</i> (3)	0	0	3 (100%)	0	0
	<i>C. parapsilosis</i> (6)	0	3 (50%)	3 (50%)	0	0
	<i>C. tropicalis</i> (5)	0	0	2 (40%)	3 (60%)	0
	Total	0	20 (50%)	13 (32.5%)	7 (17.5%)	0
Flucytosine	<i>C. albicans</i> (20)	7 (35%)	13 (65%)	0	0	0
	<i>C. glabrata</i> (6)	1 (16.7%)	5 (83.3%)	0	0	0
	<i>C. krusei</i> (3)	0	0	0	0	3
	<i>C. parapsilosis</i> (6)	3 (50%)	3 (50%)	0	0	0
	<i>C. tropicalis</i> (5)	0	1 (33.3%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	2
	Total	11 (31.4%)	22 (62.8%)	1 (2.9%)	1 (2.9%)	5
Fluconazole	<i>C. albicans</i> (20)	9 (45%)	10 (50%)	0	1 (5%)	0
	<i>C. glabrata</i> (6)	6 (100%)	0	0	0	0
	<i>C. krusei</i> (3)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	0	0	0
	<i>C. parapsilosis</i> (6)	6 (100%)	0	0	0	0
	<i>C. tropicalis</i> (5)	2 (40%)	3 (60%)	0	0	0
	Total	24 (60%)	15 (37.5%)	0	1 (2.5%)	0
Itraconazole	<i>C. albicans</i> (20)	10 (50%)	8 (40%)	1 (5%)	1 (5%)	0
	<i>C. glabrata</i> (6)	4 (66.7%)	2 (33.3%)	0	0	0
	<i>C. krusei</i> (3)	2 (66.7%)	1 (33.3%)	0	0	0
	<i>C. parapsilosis</i> (6)	4 (66.7%)	2 (33.3%)	0	0	0
	<i>C. tropicalis</i> (5)	2 (40%)	2 (40%)	1 (20%)	0	0
	Total	22 (55%)	15 (37.5%)	2 (5%)	1 (2.5%)	0
Micafungin	<i>C. albicans</i> (20)	0	0	0	0	20
	<i>C. glabrata</i> (6)	5 (83.3%)	1 (16.7%)	0	0	0
	<i>C. krusei</i> (3)	0	2 (66.7%)	1 (33.3%)	0	0
	<i>C. parapsilosis</i> (6)	5 (83.3%)	1 (16.7%)	0	0	0
	<i>C. tropicalis</i> (5)	1 (20%)	3 (60%)	0	1 (20%)	0
	Total	11 (55%)	7 (35%)	1 (5%)	1 (5%)	20

ため判定保留とした。

FLCZ+MCZ 組み合わせでは相乗効果が 40 株中 24 株 (60%)、相加効果が 40 株中 15 株 (37.5%)、拮抗が 40 株中 *C. albicans* の 1 株のみに認められた。*C. glabrata*, *C. parapsilosis* の 2 菌種は全株が相乗効果を示した。特に、*C. glabrata* では FLCZ 単剤時の MIC 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の株が MCZ との併用により 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ にまで低下した。

ITCZ+MCZ の組み合わせでは相乗効果が 40 株中 22 株 (55%)、相加効果が 40 株中 15 株 (37.5%) に認められた。拮抗は *C. albicans* 1 株、不関は *C. albicans* と *C. tropicalis* のそれぞれ 1 株に認められた。

MCFG+MCZ の組み合わせでは相乗効果が 20 株中 11 株 (55%)、相加効果が 20 株中 7 株 (35%) に認められた。拮抗は *C. tropicalis* 1 株、不関は *C. krusei* 1 株に認められた。*C. albicans* は MCFG 単剤での MIC が低く、今回作成したプレートでは併用効果測定が行えなかったため判定保留とした。

3. *C. neoformans* に対する各薬剤の MIC 値

C. neoformans に対する各薬剤の MIC 分布を Fig. 7 に示した。

もっとも抗真菌活性が高かったのは ITCZ ($\leq 0.002 \sim 0.12 \mu\text{g}/\text{mL}$) であり全株が感受性であった。AMPH-B では 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、MCZ では 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に全株が分布した。5-FC では Intermediate (I) に 2 株、FLCZ は S-DD に 2 株が分布し、低感受性株が認められた。MCFG では全株が $>4 \mu\text{g}/\text{mL}$ を示した。

4. *C. neoformans* に対する MCZ と各薬剤の併用効果

C. neoformans に対する併用効果を Table 3 に示した。*C. neoformans* に対する併用効果試験では、すべての組み合わせにおいて拮抗および不関は認められず、5-FC+MCZ, FLCZ+MCZ, MCFG+MCZ との組み合わせでは全株が相乗効果を示した。5-FC では併用により単剤時よりも 6 管以上の MIC が低下し、MCFG では併用により全株の MIC が 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上から 0.008 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下へ低下した。

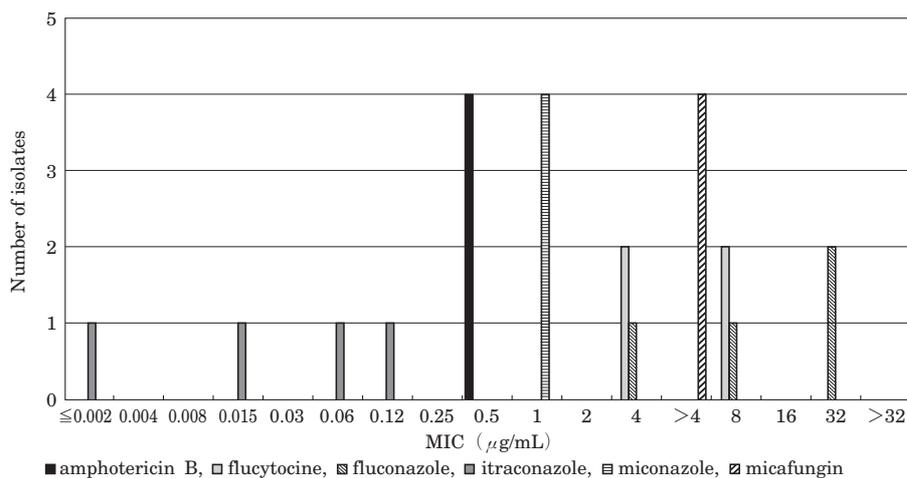


Fig. 7. Distribution of MICs for *Cryptococcus neoformans*.

Table 3. Effect of miconazole and other antifungal agents combined *in vitro* for *Cryptococcus neoformans*

Combined drug	Combination effect				
	synergistic	additive	indifferent	antagonistic	avaluative
Amphotericin B	3 (75%)	1 (25%)	0	0	0
Flucytosine	4 (100%)	0	0	0	0
Fluconazole	4 (100%)	0	0	0	0
Itraconazole	2 (66.7%)	1 (33.3%)	0	0	1
Micafungin	4 (100%)	0	0	0	0

III. 考 察

深在性真菌症に投薬可能な抗真菌薬 6 薬剤の *in vitro* での単剤 MIC 測定と MCZ を中心とした併用効果の検討を行った。

単剤の MIC 測定では比較 6 薬剤中、AMPH-B でもっとも高い抗真菌活性が確認され耐性株はみられなかった。一方、5-FC では *C. krusei* と *C. neoformans* の 2 菌種で低感受性株が認められた。5-FC は自然耐性、獲得耐性ともに抗真菌薬のなかでは高率に見られる薬剤であるが、本院の臨床分離株においてはこの 2 菌種以外に低感受性株は認められなかった。FLCZ および ITCZ のトリアゾール系薬剤では *C. parapsilosis* 以外の菌種に耐性化傾向を認めた。特に *C. albicans* と *C. tropicalis* ではこの 2 薬剤に低感受性を示した株がすべて同一株であったことより両薬剤間の交叉耐性が危惧された。イミダゾール系薬の MCZ は AMPH-B に次ぎ一峰性の狭い MIC 分布を示し、菌種による差異も少なく、トリアゾール系薬との交叉耐性も認められなかった。新薬である MCFG は比較薬剤中もっとも MIC 分布域が広く、菌種により分布濃度域の異なる特徴が認められた。以前より他のキャンディン系抗真菌薬においても、菌種による感受性の差異が報告されており^{11,12)}、MCFG においても同様な差異が確認された。

併用効果測定では AMPH-B + MCZ を除く 4 組の組み合わせにおいて、相乗または相加効果を示す結果が 90% 以上に認められ、MCZ を用いた併用療法の有効性が示唆された。

FLCZ + MCZ の組み合わせでは、検討に用いた 44 株中 *C. albicans* 1 株を除く 43 株において相加または相乗効果が得られもっとも併用効果が期待される組み合わせであった。FLCZ と MCZ の併用に関する報告は少なく、三上らは両薬剤の併用において *C. albicans* では併用効果を認め、*C. neoformans* では併用効果が認められないと報告^{16,17)}しており、両菌種ともに相乗・相加効果を認めたわれわれの成績とは異なる結果となった。また、ITCZ + MCZ の組み合わせでも、44 株中 41 株が相加または相乗効果を示した。これらの相加・相乗効果は、FLCZ、ITCZ、MCZ のエルゴステロール合成阻害にかかわる作用と、MCZ の細胞膜リン脂質と ATPase に対する直接的膜障害にかかわる作用が効率的に機能した結果であると考えられる。

MCFG + MCZ の組み合わせでは 24 株中 22 株が相加効果または相乗効果を示した。特に、単剤では活性の認められない *C. neoformans* に対し、MCFG は MCZ と組み合わせることにより全株が相乗効果を示し臨床的な有用性が期待された。Franzot らは FLCZ と caspofungin (Pneumocandin L-743,872) の併用時における *C. neoformans* の細胞障害について caspofungin が FLCZ 活性を強化することを報告している¹⁸⁾。今回の検討における *C. neoformans* に対する抗菌活性も、MCFG が細胞壁合成をわずかに抑制することにより、MCZ の細胞膜への到達量が増加する結果、MCZ の抗真菌作用が高められたためと考えられる。

一方、単剤では優れた抗菌活性を示した AMPH-B と

MCZとの組み合わせにおいては、*Candida* 属の50%が相加効果、17.5%が拮抗、32.5%が不関を示した。これらの成績はAMPH-Bとアゾール系薬との併用は拮抗が多いと報告しているCosgroveら¹³⁾の成績とは異なる。これはアゾール系薬はステロール14-脱メチル化酵素阻害によるエルゴステロール合成抑制を主たる作用機序としているため、MCZとの併用ではAMPH-Bの標的的部位となる細胞膜エルゴステロールが減少し、併用効果は期待できないとされてきた。しかし、近年 *in vivo*, *in vitro* ともにこの組み合わせにおける併用効果の有用性が多く報告^{14,15)}される傾向にある。今回の検討では *Candida* 属の半数の株が不関および拮抗を示したことより、われわれはこの組み合わせによる併用療法には注意が必要であると考えられる。

現在、いくつかの抗真菌薬感受性測定検査キットが市販されているが、一般細菌の感受性測定検査に比べ操作が煩雑であり、検査を実施している施設は少ない。2003年4月、NCCLSは“Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility testing of Yeasts; proposed Guideline. NCCLS document M44-P¹⁹⁾”を発表した。これにより国内においてもディスク拡散法による抗真菌薬感受性測定検査が広く普及していくと思われる。しかし、リポ化アムホテリシンB、FLCZ prodrug、ポリコナゾールなど将来臨床参入予定である新規抗真菌薬は、従来の抗真菌薬とは異なる薬剤型をもつものがあり、これら多種多様な薬剤型をもつ抗真菌薬を含めた感受性測定方法の確立が今後の課題である。

今回の検討においてMCZは他の抗真菌薬との間に良好な併用効果を示し、臨床現場においてMCZを用いた併用療法の有効性が示唆された。しかし、菌種・菌株によりその効果が異なる可能性も否定できないため、最適な薬剤を選択する上で使用抗真菌薬の併用効果測定が必要であると考えられる。

文 献

- 1) 河野 茂: Compromised hostにおける深在性真菌症。真菌誌 41: 71~76, 2000
- 2) 深在性真菌症のガイドライン作成委員会: 深在性真菌症の診断・治療ガイドライン (第1版), p.vii-ix, 医歯薬出版, 東京, 2003
- 3) Saag M S, Graybill R J, Larsen R A, et al.: Practice guidelines for the management of Cryptococcal Disease. Clin Infect Dis 30: 710~718, 2000
- 4) Vazquez J A, Arganoza M T, Vaishampayan J K, et al.: In vitro interaction between amphotericin B and azoles in *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 40: 2511~2516, 1996
- 5) Louie A, Kaw P, Banerjee P, et al.: Impact of the order of initiation of fluconazole and amphotericin B in sequential or combination therapy on killing of *Candida albicans* in vitro and in a rabbit model of endocarditis and pyelonephritis. Antimicrob Agents Chemother 45: 485~494, 2001
- 6) Sugar A M: Use of amphotericin B with azole antifungal drugs: What are we doing? Antimicrob Agents Chemother 39: 1907~1912, 1995
- 7) Watson P F, Rose M E, Kelly S L: Isolation and analysis of ketoconazole resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Med. Vet. Mycol. 26: 153~162, 1988
- 8) Sud I J, Feingold D S: Mechanisms of action of the antimycotic imidazoles. J invest Dermatol. 17: 438~441, 1981
- 9) Sud I J, Feingold D S: Heterogeneity of action of mechanisms among antimycotic imidazoles. Antimicrob Agents Chemother 20: 71~74, 1981
- 10) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. NCCLS document M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 2002
- 11) 池田文昭, 大友寿美, 中井 徹, 他: キャンディン系抗真菌薬 micafungin の *in vitro* 抗真菌活性。日化療会誌 50(S-1): 8~19, 2002
- 12) Zhan G G, Kaplowsky J A, Harding G A, et al.: In vitro activity of a new semisynthetic echinocandin, LY-303366, against systemic isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Aspergillus* species. Antimicrob Agents Chemother 41: 863~865, 1997
- 13) Cosgrove R F, Beezer A E, Miles R J: In vitro studies of amphotericin B in combination with the imidazole antifungal compounds clotrimazole and miconazole. J. Infect. Dis. 138: 681~685, 1978
- 14) Ghannoum M A, Fu Y, Ibrahim A S, et al.: In vitro determination of optimal antifungal combinations against *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 39: 2459~2465, 1995
- 15) Rex J H, Pappas P G, Karchmer A W, et al.: A randomized and blinded multicenter trial of high-dose fluconazole plus placebo versus for candidemia and its consequences in nonneutropenic subject. Clin Infect Dis 36: 1221~1228, 2003
- 16) Mikami Y, Takahashi A, Yazawa K, et al.: Synergistic interaction of miconazole and fluconazole at sub-MIC level on *Candida albicans*. Mycoses 35: 321~327, 1992
- 17) 三上 譲, 矢沢勝清, 宇野 潤, 他: *Cryptococcus neoformans* の各種抗真菌薬に対する *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
- 18) Franzot S P, Casadevall A: Pneumocandin L-743,872 enhances the activities of amphotericin B and fluconazole against *Cryptococcus neoformans* in vitro. Antimicrob Agents Chemother 41: 331~336, 1997
- 19) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility testing of Yeasts; proposed Guideline. NCCLS document M44-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 2003

In vitro antifungal activity of miconazole studies alone and
in combination against clinical isolates of yeasts

Atsuko Sunada¹⁾, Isao Nishi¹⁾, Masahiro Toyokawa¹⁾, Masayuki Horikawa¹⁾,
Akiko Ueda¹⁾ and Seishi Asari²⁾

¹⁾Laboratory for Clinical Investigation, Osaka University Hospital, 2-15 Yamadaoka,
Suita, Osaka, Japan

²⁾Department of infection control and prevention, Osaka University Hospital

The activity of amphotericin B (AMPH-B), flucytosine (5-FC), fluconazole (FLCZ), miconazole (MCZ), itraconazole (ITCZ) and micafungin (MCFG) was studied alone and in combination against 44 clinical isolates of yeast. The combination effect was determined between MCZ and 5 other agents. Among antifungal agents, amphotericin B showed the highest activity, because AMPH-B was confirmed no low activities for *Candida* species, although 5 other agents were resistant to different strains. FLCZ and MCZ showed the most synergistic and additive effects in all combination of *Candida* species (97.5%), followed by 5-FC and MCZ (94.2%), ITCZ and MCZ (92.5%), MCFG and MCZ (90%). AMPH-B and MCZ were not synergistic, additive was 50%, and antagonism was 17.5%. The highest activity of antifungal agents against *Cryptococcus neoformans* was ITCZ, followed by AMPH-B, MCZ, 5-FC, and FCZ, but MCFG was confirmed no activities. Synergistic and additive effects were found in all combination, especially 5-FC and MCZ, FLCZ and MCZ, and MCFG and MCZ were accepted synergistic against all 4 strains. MCZ showed good effects in combination with other antifungal agents, and the usefulness of combination therapies by MCZ are suggested in the clinical fields.