

【原著・基礎】

山梨県内で実施した *Candida* 属サーベイランス

深澤 裕美¹⁾・遠藤 武²⁾・内田 幹²⁾・三上 美恵³⁾・大屋とし子⁴⁾
井上清太郎⁵⁾・山本ひろ子⁶⁾・尾崎由基男⁷⁾

¹⁾山梨厚生病院細菌検査室*, ²⁾山梨大学医学部附属病院検査部

³⁾市立甲府病院検体検査室, ⁴⁾山梨県立中央病院検査部

⁵⁾社会保険山梨病院細菌検査室, ⁶⁾甲府共立病院検査部

⁷⁾山梨大学医学部臨床検査医学

(平成 16 年 8 月 17 日受付・平成 16 年 9 月 15 日受理)

平成 15 年 4 月から同年 9 月までの 6 カ月間に山梨県内の 6 施設において, *Candida* 属の分離頻度と耐性頻度を調査した。

調査期間中に検査依頼された検体は合計 8,496 検体であり, そのうち *Candida* 属が優位に分離されたのは 608 株 (7.2%) であった。菌種別内訳は *Candida albicans* の分離頻度が最も高く, 分離された *Candida* 属全体の 2/3 に当たる 67.3% (409 株) を占めた。次いで, *Candida glabrata* (16.0%; 97 株), *Candida tropicalis* (14.0%; 85 株) の順であり, *Candida parapsilosis* は 1.6% (10 株) であった。

分離頻度の高い *C. albicans*, *C. glabrata* および *C. tropicalis* の合計 420 株に対する感受性測定を行ったところ, amphotericin B は 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, micafungin は 0.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で全株の増殖を抑制した。しかし, fluconazole の MIC 値は 0.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に分布し, 用量依存的感性株は 2.6%, 耐性株は 2.1% 存在していた。

多施設で実施した真菌サーベイランス結果を詳細に解析することは診断と治療が困難な深在性真菌症における治療薬の選択の一助になるものと考えている。

Key words: surveillance, *Candida* spp., drug-resistance, fluconazole, micafungin

深在性真菌症は近年の易感染宿主の増加に伴い, その症例数が増加し, 急激にその症状を悪化させる場合も多い^{1,2)}。実際の医療現場では, 起因真菌の分離や同定, さらに感受性測定が困難な場合が多いことから, 適切な抗真菌薬を速やかに選択することは非常に難しい場合が多い。このため, エンピリックセラピーが行われるケースも少なくなく, 必ずしも適切な抗真菌薬の投与が行われないこともあり, 特定の菌種に耐性株がみられるようになってきている^{3,4)}。

一昨年末に新しい抗真菌薬である micafungin (MCFG) が上市されたことから, 本邦では深在性真菌症治療薬として 4 系統 6 薬剤が使用できることになり, 抗真菌薬の選択範囲が広がった。そこで, これを契機に, 真菌の分離頻度と耐性頻度を調査することは真菌感染症治療にとって, 適切な抗真菌薬選択の一助となるものと考えた。

そこで今回, 山梨県内の 6 施設の検査室に提出された各検体から *Candida* 属の分離・同定を行い, 全検体に占める真菌の分離頻度を調べ, また分離・同定された真菌について薬剤感受性を測定した。なお, サーベイランスは平成 15 年 4 月から平成 16 年 3 月までの 1 年間にわたり実施したが, 本論文はその前半に当たる平成 15 年 4 月から同年 9 月までの 6 カ月

間に得られた結果をまとめたものである。

I. 材料と方法

1. 集計期間と対象菌

平成 15 年 4 月から同年 9 月までの 6 カ月間に, 以下に示す各施設の検査室に提出された検体について, 真菌の分離・同定および感受性測定を行った。検体は血液, 中心静脈 (IVH) カテーテル, 気管支肺胞洗浄液 (BALF), 喀痰, 尿 (中間尿およびカテーテル尿) とし, *Candida* 属についてのみ集計した。なお, 汚染菌との区別を図るために判定基準を設け, 血液, IVH カテーテル, BALF およびカテーテル尿は検出されたすべての真菌を, 喀痰は常在菌数以上の菌数を示すか, あるいは 1+ 以上を, 中間尿は 10⁴ cfu/mL 以上のものについて, それぞれ集計した。

2. 参加施設

山梨厚生病院, 山梨大学医学部附属病院, 市立甲府病院, 山梨県立中央病院, 社会保険山梨病院および甲府共立病院のいずれも山梨県内に所在する 6 施設の検査室で本サーベイランスを実施した。

Table 1. Frequencies of isolation of *Candida* spp. Specimen

Specimen	Samples	<i>Candida</i> isolates	Frequency of isolation (%)
Blood	1,401	11	0.8
IVH catheter	372	8	2.2
BALF ^{a)}	261	9	3.4
Sputum	3,463	475	13.7
Urine	2,999	105	3.5
Total	8,496	608	7.2

^{a)} bronchoalveolar lavage fluid

Table 2. Frequencies of isolation of *Candida* spp. Facility

Facility	Samples	<i>Candida</i> isolates	Frequency of isolation (%)
University of Yamanashi Hospital	1,646	84	5.1
Kofu Municipal Hospital	1,203	185	15.4
Yamanashi Kosei Hospital	1,037	90	8.7
Yamanashi Prefectural Central Hospital	1,862	76	4.1
Yamanashi Hospital of Social Insurance	415	44	10.6
Kofu-Kyoritsu Hospital	2,333	129	5.5
Total	8,496	608	7.2

3. 分離および同定方法

Candida 属の分離・同定は各施設の検査室で実施した。すなわち、通常の院内ルートで各施設の検査室に提出された各検体より、CHROM agar *Candida* 培地(関東化学)を用いて、*Candida* 属の分離を行った。さらに、分離された *Candida* 属は集落形状や色調により肉眼的同定を行った後、各施設の検査室あるいは株式会社ビーエムエルにおいて、感受性測定実施まで保存した。

4. 感受性測定

保存真菌の感受性測定は株式会社ビーエムエルにおいて一括測定を実施した。なお、測定は市販の感受性測定用キットを用いて、NCCLS 法に準じた微量液体希釈法で実施した。

II. 結 果

1. 分離頻度

本サーベイランス実施6カ月間に各施設の検査室に提出された検体は毎月約1,400検体で、合計8,496検体であり、喀痰が最も多く、次いで尿、血液の順であった。このうち、*Candida* 属が分離されたのは608株(7.2%)であった。また、*Candida* 属が分離された検体別の内訳では喀痰が最も多く、次いで尿の順であった(Table 1)。なお、施設別の *Candida* 属の分離頻度は4.1%から15.4%であり、施設間でバラツキがあった(Table 2)。

2. 菌種別分離頻度

分離された *Candida* 属608株についての同定結果では、*Candida albicans* が最も多く、全体の2/3に相当する67.3%を占めた。次いで *Candida glabrata* (16.0%)、*Candida tropicalis* (14.0%) の順であり、*Candida parapsilosis* は1.6%であった。なお、*C. glabrata*、*C. tropi-*

calis、*C. parapsilosis* および *Candida krusei* のいわゆる non-*albicans Candida* 属の占める割合は全体の1/3であった(Table 3)。

3. 感受性測定

分離頻度の高い *C. albicans*、*C. glabrata* および *C. tropicalis* について、amphotericin B (AMPH-B)、flucytosine、miconazole、fluconazole (FLCZ)、itraconazole および MCFG の感受性測定を実施し、その結果を Fig. 1~3 および Table 4 に示す。

C. albicans (296株)に対するMIC値はMCFGが最も小さく、0.13 µg/mLで、またAMPH-Bは1 µg/mLで全株の発育を阻止した。一方、FLCZのMIC値は0.13 µg/mLから128 µg/mLに分布し、MIC₉₀値は2 µg/mLであった。

C. glabrata (73株)に対してもMCFGのMIC値が最も小さく、0.06 µg/mLで全株の発育を阻止した。FLCZは最も劣っており、MIC値は0.25 µg/mLから128 µg/mLに分布し、MIC₉₀値は8 µg/mLであった。

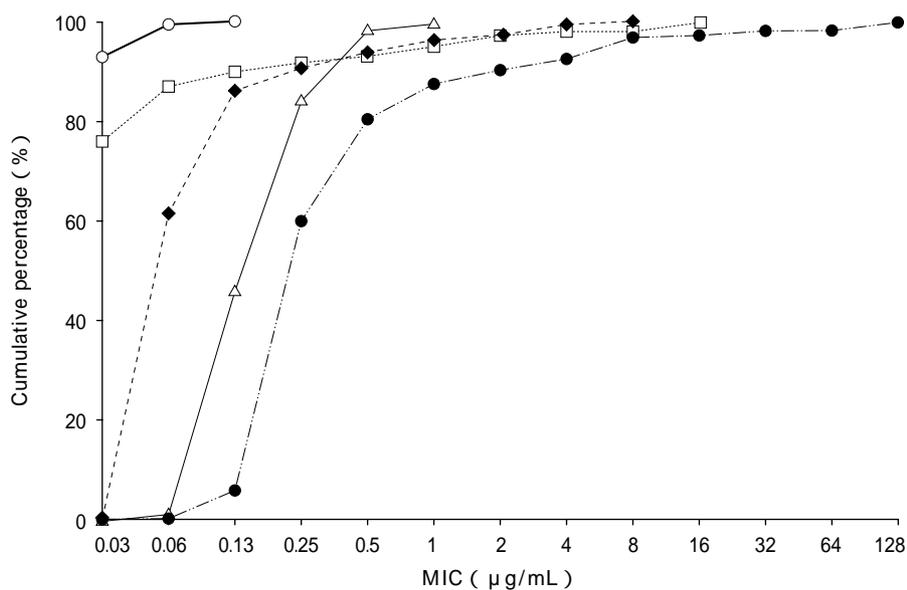
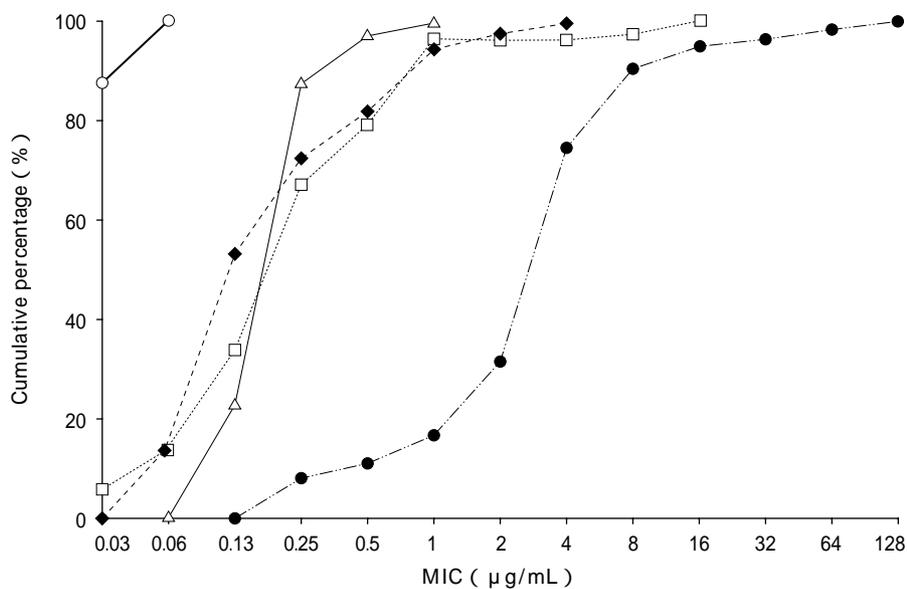
C. tropicalis (51株)に対してもMCFGのMIC値が最も低く、0.13 µg/mLで全株の発育を阻止した。FLCZのMIC値は0.25 µg/mLから128 µg/mLに分布し、MIC₉₀値は8 µg/mLであった。

III. 考 察

深在性真菌症の2大起因菌として重要な *Candida* 属および *Aspergillus* 属については、いくつかの分離頻度調査があるが、細菌のそれらに比べると明らかに少ない。最近報告された諸家⁵⁻⁹⁾の報告では、分離される *Candida* 属の種類には変化がみられ、non-*albicans Candida* 属といわれる *C. glabrata* や *C. krusei* などの FLCZ 低感

Table 3. Frequencies of isolation of genus *Candida*

Organism	<i>Candida</i> isolates	Frequency of isolation (%)
<i>Candida albicans</i>	409	67.3
<i>Candida glabrata</i>	97	16.0
<i>Candida tropicalis</i>	85	14.0
<i>Candida parapsilosis</i>	10	1.6
<i>Candida krusei</i>	4	0.7
<i>Candida</i> spp.	3	0.5
Total	608	100

Fig. 1. Cumulative percentage of 296 strains of *Candida albicans* inhibited by amphotericin B (○), miconazole (□), fluconazole (△), itraconazole (◇) and micafungin (●).Fig. 2. Cumulative percentage of 73 strains of *Candida glabrata* inhibited by amphotericin B (○), miconazole (□), fluconazole (△), itraconazole (◇) and micafungin (●).

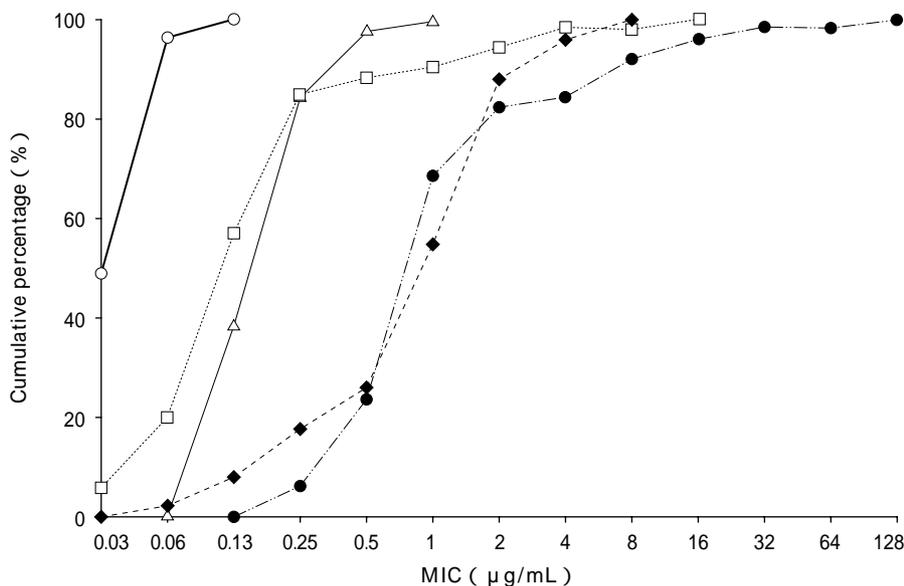


Fig. 3. Cumulative percentage of 51 strains of *Candida tropicalis* inhibited by amphotericin B (○), miconazole (□), fluconazole (△), itraconazole (◇) and micafungin (●) ()

Table 4. Antifungal activity of micafungin and other antifungal agents

Organism (strains)	Antifungal agent	Minimum inhibitory concentration (µg/mL)													
		0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	
<i>Candida albicans</i> (296)	Amphotericin B		3	134	113	42	4								
	Flucytosine			132	143	19	1	1							
	Miconazole		182	74	13	9	7	3	7	1					
	Fluconazole			17	160	61	21	9	6	13	1	3	1	4	
	Itraconazole	225	33	8	5	5	6	6	2	1	5				
	Micafungin	275	20	1											
<i>Candida glabrata</i> (73)	Amphotericin B			17	47	7	2								
	Flucytosine			62	5	1	2		1	1				1	
	Miconazole		10	29	14	7	9	2	2						
	Fluconazole				6	2	4	11	31	12	3	1	1	2	
	Itraconazole	4	6	15	24	9	12			1	2				
	Micafungin	64	9												
<i>Candida tropicalis</i> (51)	Amphotericin B			20	23	7	1								
	Flucytosine			24	24	3									
	Miconazole		1	3	5	4	15	17	4	2					
	Fluconazole				3	9	23	7	1	4	2	1		1	
	Itraconazole	3	7	19	14	2	1	2	2		1				
	Micafungin	25	24	2											

受性菌の分離頻度が年々増加傾向にある。また、FLCZ低感受性の *C. albicans* の分離頻度も高くなっており、これらは抗真菌薬選択についての課題を突きつけている。しかしながら、これらの報告は単一施設での結果が多いために、その分離頻度や感受性測定結果は施設間で大きく変動する要素を含んでおり、当該施設での抗真菌薬の使用状況にその結果は大きく左右されると考えられる。このため、多施設での結果を提示することはきわめ

て意義は高いと考え、今回山梨県内で *Candida* 属に関するサーベイランスを実施することとなった。

平成 15 年 4 月から同年 9 月までの 6 カ月間に、本サーベイランスに参加した山梨県内の 6 施設で検査された検体数は 8,496 検体であった。そのうち、*Candida* 属が分離・同定されたのは 608 株、分離頻度は 7.2% であった。高橋ら⁸⁾は酵母様真菌の分離頻度は 15.4% (208 株/1,354 株)、また太田ら⁹⁾は *Candida* 属の分離頻度は 21.9% (468

株/2,136株)であると報告しているが、これらと比較すると、今回の結果では *Candida* 属の分離頻度は明らかに低いものと考えられる。この要因については不明であるが、集計のための判断基準の違いによる可能性が考えられるが、一方で施設間で差があるために、今後詳細な解析が必要である。また、血液およびIVHカテーテルから分離された *Candida* 属は、われわれの成績ではいずれも1%程度であったが、小栗⁷⁾はいずれも7.7%の分離頻度であることを報告しており、明らかな差があった。これについても患者背景など、今後詳細な解析が必要である。

CHROM agar *Candida* 培地は各種基質に対する真菌の酸化還元能の違いを利用し、培地中に含有される酸化還元色素の発色色調の違いから菌種を識別する培地であり、コロニーの色調と形状の違いにより、*Candida* 属を菌種まで推定することができる。そこで、この培地を用いて *Candida* 属の同定を行ったところ、*C. albicans* は分離された *Candida* 属の2/3(409株)を占めた。一方、non-*albicans* *Candida* 属は1/3を占め、そのうち *C. glabrata* は分離された *Candida* 属の16.0%、*C. tropicalis* は14.0%であったが、*C. parapsilosis* や *C. krusei* の分離頻度はかなり低い値であった。この結果から、分離頻度の順位は高橋ら⁸⁾、太田ら⁹⁾や小幡ら¹⁰⁾と同様であったが、その分離頻度には若干の違いがあり、われわれの成績では *C. albicans* の分離頻度が明らかに高かった。なお、今回の結果ではカテーテル感染に關与の深い *C. parapsilosis* の分離頻度は1.6%であり、明らかに低かった。

次に今回の検査で分離頻度が高かった *C. albicans*、*C. glabrata* および *C. tropicalis* の合計420株について感受性測定を実施した。MCFGは0.13 µg/mLで、AMPH-Bは1 µg/mLで全株の発育を阻止した。一方、FLCZのMIC値は0.13 µg/mLから128 µg/mLに分布していた。FLCZについてはブレイクポイント基準¹¹⁾が設定されており、MIC値が8 µg/mLを感性、16~32 µg/mLを用量依存的感性、64 µg/mLを耐性としている。今回の試験結果から、通常の投与量では満足した治療効果が得られない可能性がある用量依存的感性には全体の2.6%の株が、耐性には2.1%の株が該当した。ブレイクポイントから考察した場合、FLCZ低感受性菌および耐性菌の分離頻度は全体で4.7%(20株)であり、分離頻度に差はあるものの、いずれの菌種でもFLCZ低感受性菌あるいは耐性菌は存在しており、諸家の報告^{9,10,12-14)}と一致した。

深在性真菌症の問題点はその診断と治療の困難性であり、臨床医は患者状態の把握からその発症を予測し、数限られた抗真菌薬を用いた治療を行ってきた。2003年2月に深在性真菌症の診断・治療ガイドライン 第1版¹⁵⁾が発行され、真菌症の診断と治療の指標になったことは事実である。しかし、実際の医療現場では、起因真菌の検出ができない場合が多く、仮に起因真菌が検出される

場合であっても、その分離・同定や感受性測定には、かなり長時間を要することは否めない。また、真菌症疑い例で実施されるエンピリックテラピーでは起因真菌が不明であるために、治療薬選択には苦慮することが多い。そこで今回の真菌サーベイランスの結果を真菌症治療薬選択に十分に活用したいと考えている。すなわち、今まで安全性が高いことから繁用されてきたFLCZには低感受性菌や耐性菌が存在することを認識し、起因真菌が不明な真菌症に対しては、現在最も感受性の高いMCFGを選択すべきであると考えている。なお、MCFGは *C. parapsilosis* に対して抗真菌活性が低いといわれているが¹⁶⁾、今回の検査では分離頻度は1.6%程度であるために、確率的に本菌による感染症の可能性は非常に低いものと考えている。

現在、平成15年10月から平成16年3月までに実施した同じ6施設でのサーベイランスの成績をまとめており、第2報として本誌での公表を予定している。今回の成績も含め、1カ年間に及ぶ多施設でのサーベイランス結果を詳細に解析することにより、診断と治療が困難な深在性真菌症での治療薬の選択の一助になると考えている。

文 献

- 1) Wade J C: Treatment of fungal and other opportunistic infections in immunocompromised patients. *Leukemia* 11 (Suppl 4) S38~39, 1997
- 2) 河野 茂: Compromised host. *Jpn J Med Mycol* 41: 71~76, 2000
- 3) 山口英世: 真菌症の化学療法剤と薬剤耐性. *臨床と微生物* 28: 51~58, 2001
- 4) 新見昌一, 新見京子: 抗真菌薬耐性の問題. *臨床医* 29: 215~218, 2003
- 5) Patterson T F: Role of newer azoles in surgical patients. *J Chemother* 11: 504~512, 1999
- 6) Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, et al: The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis* 24: 1112~1118, 1997
- 7) 小栗豊子: カンジダ症の疫学. *臨床と微生物* 28: 155~160, 2001
- 8) 高橋敏夫, 斎藤敏晴: 当院における酵母様真菌の検出状況の検討. *臨床と微生物* 28: 120~121, 2001
- 9) 太田忠信, 竹岡泰信, 赤堀美佳, 他: 近年増加している真菌症の市中病院での原因菌種の変遷と治療の現状. *大阪医学* 34: 94~96, 2000
- 10) 小幡 進, 平田泰良, 砂川慶介, 他: 当院における過去25年間に分離された真菌の検査動向. *感染症誌* 75: 863~869, 2001
- 11) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts: Approved standards. Document M27-A, Vol. 17 (9) Wayne, Pa, 1997
- 12) 小原忠博, 上岡恵美, 小勝負恭子, 他: 造血器悪性腫瘍患者における血中分離真菌とその薬剤感受性に関する検討. *日赤医学* 53: 323~328, 2002
- 13) 明見能成, 許 泰一, 麻奥英毅, 他: キャンディン系抗真菌薬 micafungin (FK463) の *in vitro* 抗真菌活

- 性 血液疾患患者の真菌血症より分離された *Candida* 株を対象として。新薬と臨床 52: 593 ~ 597, 2003
- 14) 小松 方, 相原雅典, 島川宏一, 他: 天理病院で分離された酵母様真菌に対する抗真菌薬の抗菌力について 特にキャンディン系抗真菌薬ミカファンギンの抗菌力。Jpn J Antibiot 56: 705 ~ 711, 2003
- 15) 深在性真菌症のガイドライン作成委員会 編: 深在性真菌症の診断・治療ガイドライン(第1版), 医歯薬出版, 東京, 2003
- 16) 池田文昭, 中井 徹, 若杉昌宏, 他: 新鮮臨床分離 *Candida* 属, *Aspergillus* 属株の micafungin に対する感受性。日化療誌 51: 485 ~ 489, 2003

Survey of *Candida* species in Yamanashi

Hiromi Fukasawa¹⁾, Takeshi Endo²⁾, Takashi Uchida³⁾, Mie Mikami³⁾,
Toshiko Ohya⁴⁾, Seitaro Inoue⁵⁾, Hiroko Yamamoto⁶⁾ and Yukio Ozaki⁷⁾

¹⁾Bacteriological Examination Room, Yamanashi Kosei Hospital, 860 Ochiai, Yamanashi, Japan

²⁾Clinical Laboratory, University of Yamanashi Hospital

³⁾Department of Clinical Laboratory, Kofu Municipal Hospital

⁴⁾Department of Inspection, Yamanashi Prefectural Central Hospital

⁵⁾Bacteriological Examination Room, Yamanashi Hospital of Social Insurance

⁶⁾Department of Inspection, Kofu-Kyoritsu Hospital

⁷⁾Clinical and Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Yamanashi

During the 6 months between April and September 2003, we monitored the frequency of *Candida* spp. isolation and resistance at 6 facilities in Yamanashi.

Samples numbered 8,496, and *Candida* spp. was predominantly isolated from 608 isolates (7.2%). By species, *Candida albicans* was most frequently isolated, accounting for 67.3% of all *Candida* isolates. The second and third most frequent isolates were *Candida glabrata* (16.0%; 97 isolates) and *Candida tropicalis* (14.0%; 85 isolates). *Candida parapsilosis* accounted for 1.6% (10 isolates)

Frequently isolated *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. tropicalis*, numbering 420 isolates, were subjected to susceptibility testing, and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of amphotericin B and 0.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of micafungin inhibited the growth of all isolates tested. The MIC of fluconazole distributed from 0.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to $\geq 128 \mu\text{g}/\text{mL}$, and 2.6% of isolates were susceptible dose-dependently, while 2.1% were resistant.

Analysis of multicenter survey results may thus help in selecting therapeutic agents for deep mycosis, which is difficult to diagnose and treat.