

各種抗真菌薬の血液由来 *Candida* 属に対する抗真菌活性

藤田 信一

金沢大学大学院医学系研究科血液情報統御学*

(平成 18 年 9 月 27 日受付・平成 19 年 4 月 20 日受理)

血液培養から分離された *Candida* 属 57 株に対する, micafungin (MCFG), amphotericin B (AMPH-B), flucytosine, voriconazole (VRCZ), itraconazole, miconazole, fluconazole (FLCZ) の最小発育阻止濃度 (MIC) と最小殺菌濃度 (minimal fungicidal concentration, MFC) を求めた。生菌数測定には菌の凝集および薬剤のキャリーオーバーを防止するために, 菌希釈用生理食塩水には polysorbate 80 を, サブロー寒天培地には polysorbate 80, lecithin および histidine を添加して使用した。MFC は接種菌数の 99% が殺菌される最小薬剤濃度とした。

Candida albicans 14 株, *Candida tropicalis* 11 株および *Candida glabrata* 14 株に対して MCFG は最も優れた殺菌効果を示した。MCFG および AMPH-B の MFC₉₀ は, それぞれ *C. albicans* に対して 0.03 μg/mL, 1 μg/mL, *C. tropicalis* に対して 0.125 μg/mL, 0.5 μg/mL, *C. glabrata* に対して 0.5 μg/mL, 2 μg/mL であった。また, FLCZ 耐性の *C. albicans* 1 株および *C. tropicalis* 1 株は他のアゾール系薬にも交差耐性を示したが, MCFG および AMPH-B はこれらの耐性株に対しても優れた殺菌作用を示した。*Candida parapsilosis* 16 株に対する発育阻止効果は VRCZ が最も優れ, MIC₉₀ は 0.008 μg/mL であったが, MFC は 0.03 から ≥32 μg/mL の範囲に分布し菌株ごとの差がみられ, MFC₉₀ は 32 μg/mL 以上であった。一方, AMPH-B と MCFG は殺菌能に優れ, MFC₉₀ はそれぞれ 2 μg/mL, 8 μg/mL であった。*Candida guilliermondii* 2 株に対しては, MCFG よりも AMPH-B の活性が優れていた。一方, 今回検討したカンジダ属菌に対するアゾール系薬の MFC₉₀ は測定濃度以上であった。以上, 臨床的に重要な血液由来 *Candida* 属に対し MCFG および AMPH-B は優れた殺菌作用を示した。

Key words: *Candida*, MIC, MFC

Candida 属による感染症は, 近年増加する傾向がみられ, 主要な院内感染起因菌の一つとなっている¹⁻⁵⁾。広域スペクトラム抗菌薬の長期投与や免疫不全患者(糖尿病, 臓器移植, 癌など), HIV 感染症の増加などが背景にあると考えられる。金沢大学医学部附属病院において血液から分離された *Candida* 属の変遷を Fig. 1 に示した。*Candida albicans* が依然として高頻度には分離されるものの, *Candida tropicalis* は経年的に減少傾向がみられたのに対し, *Candida parapsilosis* や *Candida glabrata* はやや増加する傾向にあった。

一方, 深在性真菌症の予防および治療に用いられる抗真菌薬は現在, 国内で 7 薬剤が認可を受けている。しかし, 抗真菌薬の *in vitro* 活性の評価法は, まだ十分に確立されておらず⁶⁻⁸⁾, キャンディン系の micafungin (MCFG) では MIC のブレイクポイントだけでなく判定基準も決められていない。さらに, 2004 年に発売されたアゾール系の voriconazole (VRCZ) を含めた薬剤の抗真菌活性に関する詳細な比較データは少ない。今回は, MCFG や VRCZ を含む 7 薬剤の抗真菌薬の各種 *Candida* 属に対する *in vitro* 活性を, 最小発育阻止濃

度 (MIC) だけではなく最小殺菌濃度 (minimal fungicidal concentration, MFC) にも焦点を当てて評価することを試みた。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

金沢大学医学部附属病院において, 1999 年から 2005 年の約 7 年間に血液から分離された *C. albicans* 14 株, *C. tropicalis* 11 株, *C. parapsilosis* 16 株, *C. glabrata* 14 株, *Candida guilliermondii* 2 株の計 57 株を用いた。同一患者から分離された同一菌種の株は, 最終分離株を用いた。

2. 使用薬剤および試薬

VRCZ の原末はファイザー株式会社 (東京) より提供を受けた。その他 MCFG (アステラス製薬株式会社, 東京), amphotericin B (AMPH-B, ブリストル・マイヤーズ株式会社, 東京), miconazole (MCZ, 持田製薬株式会社, 東京), flucytosine (5-FC, 和光純薬株式会社, 東京), itraconazole (ITCZ, ヤンセンファーマ株式会社, 東京), fluconazole (FLCZ, ファイザー株式会社) を用いた。ま

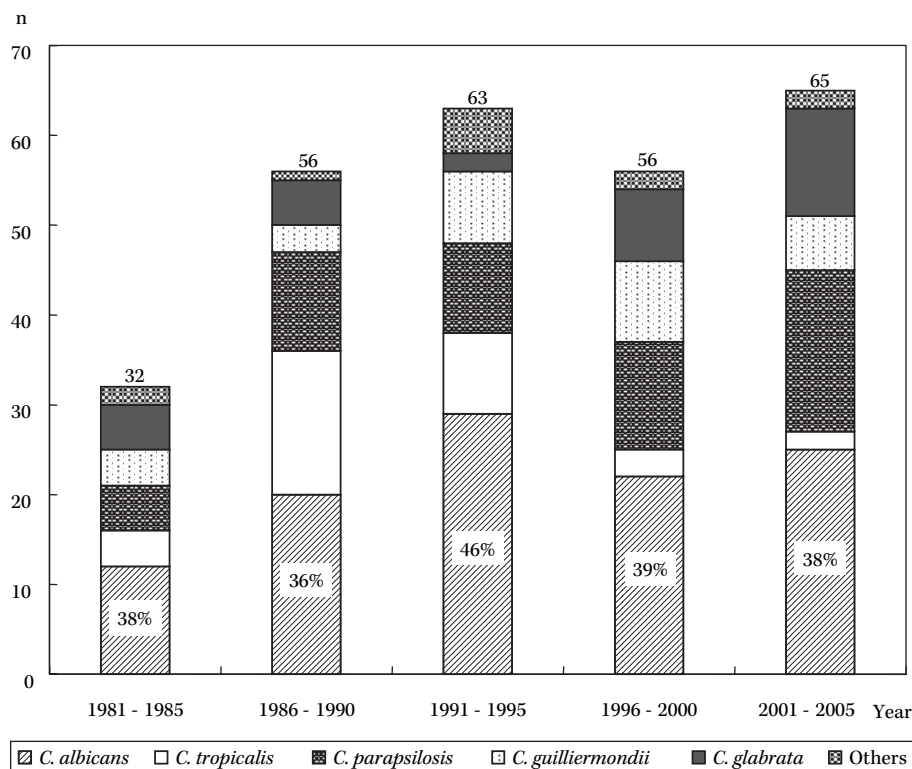


Fig. 1. Changes in the *Candida* spp. isolated by blood cultures in Kanazawa University Hospital.

た、抗真菌薬の中和剤として polysorbate 80(和光純薬株式会社), lecithin(和光純薬株式会社), L-histidine hydrochloride monohydrate(和光純薬株式会社)を使用した。

3. MIC 測定

日本医真菌学会標準法⁹⁾に準じ、微量液体希釈法により行った。RPMI1640/MOPS(pH7.0)培地に約 2×10^3 cells/mL の真菌を接種し、35°C、24 時間培養後に MIC を判定した。MCFG および AMPH-B は目視にて発育がみられなかった最小濃度、5-FC およびアゾール系薬は、濁度にてコントロールの 80% 以上の発育を阻害した最小濃度を MIC とした。また、試験した 90% の菌株の発育を阻止する最小濃度を MIC₉₀ とした。なお、薬剤プレートの作成は栄研化学株式会社に依頼した。

4. 24 時間後殺菌活性の測定と MFC

MIC 判定後、各濃度の菌液 0.1 mL を 2% polysorbate 80 を添加した生理食塩水で 10 倍希釈系列を作成し、それぞれの 0.1 mL をサブロー寒天培地 10 mL に混釈した後培養した。この際に菌液中に含まれる薬剤のコロニー形成への影響(キャリアオーバー)を除くためにサブロー寒天培地に 3 種類の添加剤(3% polysorbate 80, 0.3% lecithin および 0.1% histidine hydrochloride monohydrate)を加えた。35°C、24 時間培養後に形成されたコロニー数から残存菌数を算出して薬剤間の殺菌活性を比較した。接種菌量の 1/100(約 20 cells/mL)以

上の菌数が認められなかった最小濃度(99% 殺菌濃度)を MFC とし、試験した菌株の 90% を殺菌する最小濃度を MFC₉₀ とした。なお、MIC と MFC の測定は BML 総合研究所に依頼した。

II. 結 果

1. *C. albicans* に対する MIC および MFC

Fig. 2 に抗真菌薬 7 薬剤の *C. albicans* 14 株に対する MIC と MFC の分布を示した。MIC₉₀: MFC₉₀ は、MCFG が 0.016: 0.03 μg/mL と MIC と MFC の差がほとんどなく、優れた殺菌作用を示し、次いで AMPH-B 0.25: 1 μg/mL および 5-FC ≤ 0.125: 1 μg/mL が優れていた。一方、アゾール系 4 薬剤の MIC₉₀: MFC₉₀ は、VRCZ 0.03: >16 μg/mL, ITCZ 0.03: >8 μg/mL, MCZ 0.125: >16 μg/mL および FLCZ 1: >64 μg/mL であり、MFC はほとんどの株に対して測定濃度範囲をはずれ、高濃度においても殺菌作用は認められなかった。FLCZ の MIC > 64 μg/mL の耐性株が 1 株あり、アゾール系の他の 3 薬剤にも交差耐性を示した。この FLCZ 耐性株を除くと、*C. albicans* に対する VRCZ の MIC₉₀ は 0.008 μg/mL と最も小さな値であった。

2. *C. albicans* 以外の *Candida* 属に対する MIC および MFC

C. tropicalis 11 株 (Fig. 3) および *C. glabrata* 14 株 (Fig. 4) に対しても、MCFG は AMPH-B より MIC と MFC

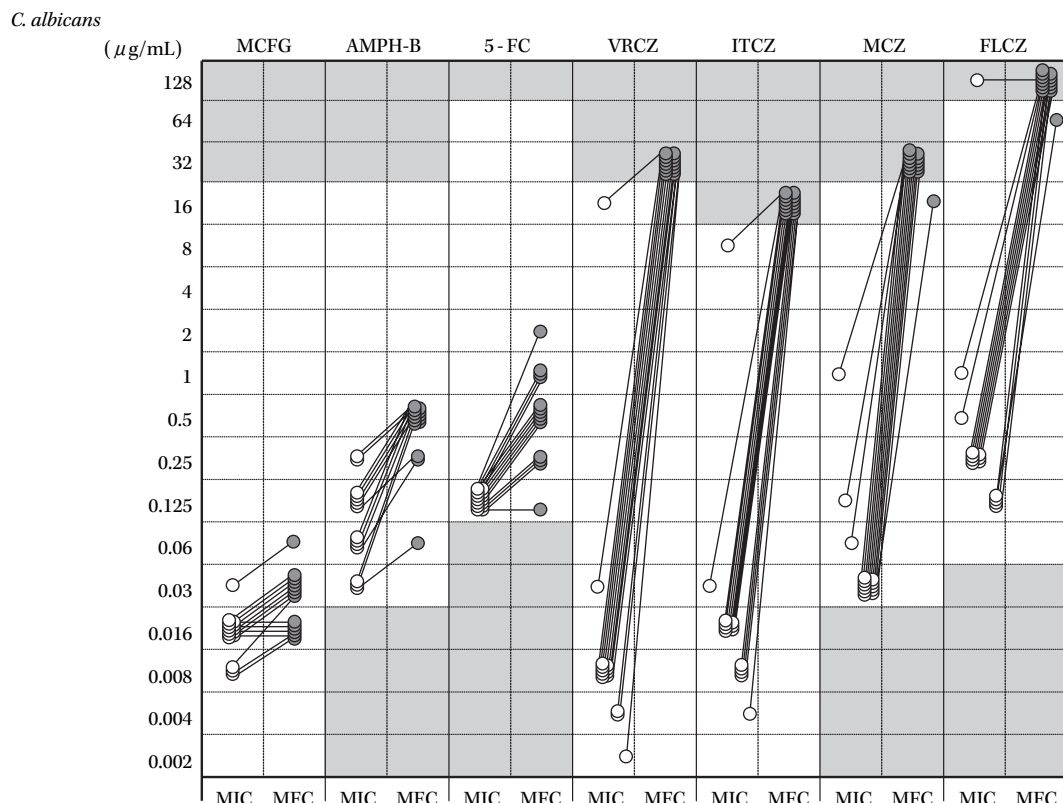


Fig. 2. Distribution of the MICs and MFCs of 7 antifungal agents for 14 *Candida albicans* strains.

の差が小さく低濃度で殺菌作用を示した。これらの菌種のアゾール系4薬剤に対する感受性は *C. albicans* より低い傾向にあり、やはり高濃度においても殺菌作用は認められなかった。*C. tropicalis* に対する MIC₉₀: MFC₉₀ は、MCFG 0.06: 0.125 µg/mL, AMPH-B 0.25: 0.5 µg/mL, 5-FC 0.25: >64 µg/mL, VRCZ 0.25: >16 µg/mL, ITCZ 0.25: >8 µg/mL, MCZ 1: >16 µg/mL, FLCZ 1: >64 µg/mL で、1株含まれていた FLCZ 耐性 *C. tropicalis* (MIC: >64 µg/mL) に対しても MCFG は最も優れた抗真菌活性を有していた。

C. glabrata の MIC₉₀: MFC₉₀ は、MCFG 0.25: 0.5 µg/mL, AMPH-B 0.5: 2 µg/mL, 5-FC <0.125: 2 µg/mL, VRCZ 0.125: >16 µg/mL, ITCZ 1: >8 µg/mL, MCZ 0.5: >16 µg/mL, FLCZ 8: >64 µg/mL であった。MIC >16 µg/mL の MCFG 耐性株が1株あり、アゾール系薬にも耐性を示した。AMPH-B および 5-FC の MFC が >16 µg/mL と高値を示した株が1株ずつ含まれたが、それぞれ異なる株であった。

C. parapsilosis 16株に対する発育阻止効果は VRCZ が最も優れ MIC₉₀ は 0.008 µg/mL であった。VRCZ の MFC は 0.03 から ≥32 µg/mL の範囲に分布し、菌株による値の差が著しかったが、MFC₉₀ は ≥32 µg/mL と殺菌力は弱かった (Fig. 5)。一方、AMPH-B および MCFG の MFC₉₀ はそれぞれ 2 µg/mL, 8 µg/mL であった。*C.*

guilliermondii に対しては、AMPH-B 次いで MCFG の抗真菌活性が優れていた (Fig. 6)。

3. 24時間培養後の殺菌活性

24時間作用後の抗真菌薬の殺菌活性を濃度に対する残存生菌数変化で比較した (Fig. 7)。*C. albicans*, *C. tropicalis* および *C. glabrata* に対して MCFG, AMPH-B および 5-FC は顕著な殺菌活性を示したのに対し、アゾール系の4薬剤はいずれも高濃度においても全く菌数減少を示さず、むしろ接種菌量を上回る菌数が計測された。FLCZ 耐性の *C. albicans* および *C. tropicalis* では他のアゾール系薬にも交差耐性を示したが、MCFG および AMPH-B はこれらの菌株に優れた殺菌作用を示した。

C. parapsilosis に対する MCFG の有効濃度は上記の3菌種より高めであったが、MIC 以上の濃度では優れた殺菌作用を示した。VRCZ の発育抑制作用が最も低濃度からみられ、菌株によっては殺菌作用を示した。*C. guilliermondii* に対しては、AMPH-B のみが優れた殺菌作用を示した。

III. 考 察

抗真菌活性を殺菌力で評価した報告は少なくない¹⁰⁻¹⁶⁾が、標準化された方法はまだない¹⁰⁾。殺菌性評価の基本となる *Candida* 属の菌数を正確に計測するためにはとりわけ次の2点に配慮が必要である。すなわち、液体培地中で糸状発育した菌を分散させることと、高濃度の薬剤の

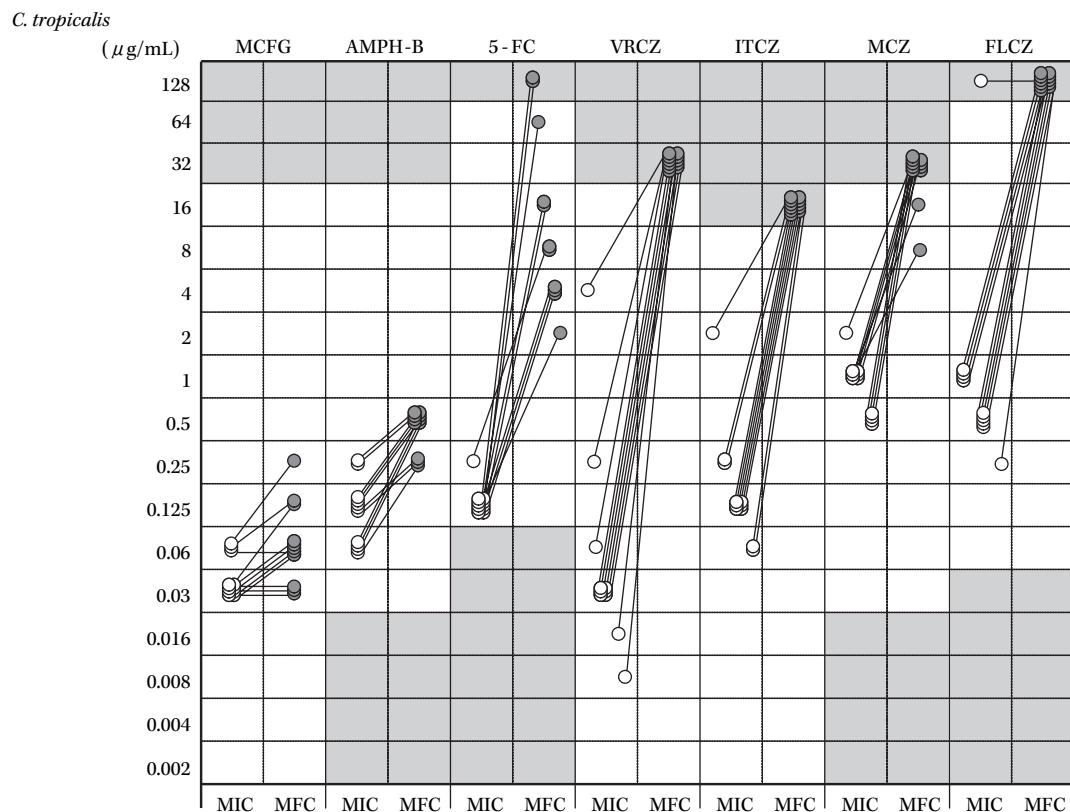


Fig. 3. Distribution of the MICs and MFCs of 7 antifungal agents for 11 *Candida tropicalis* strains.

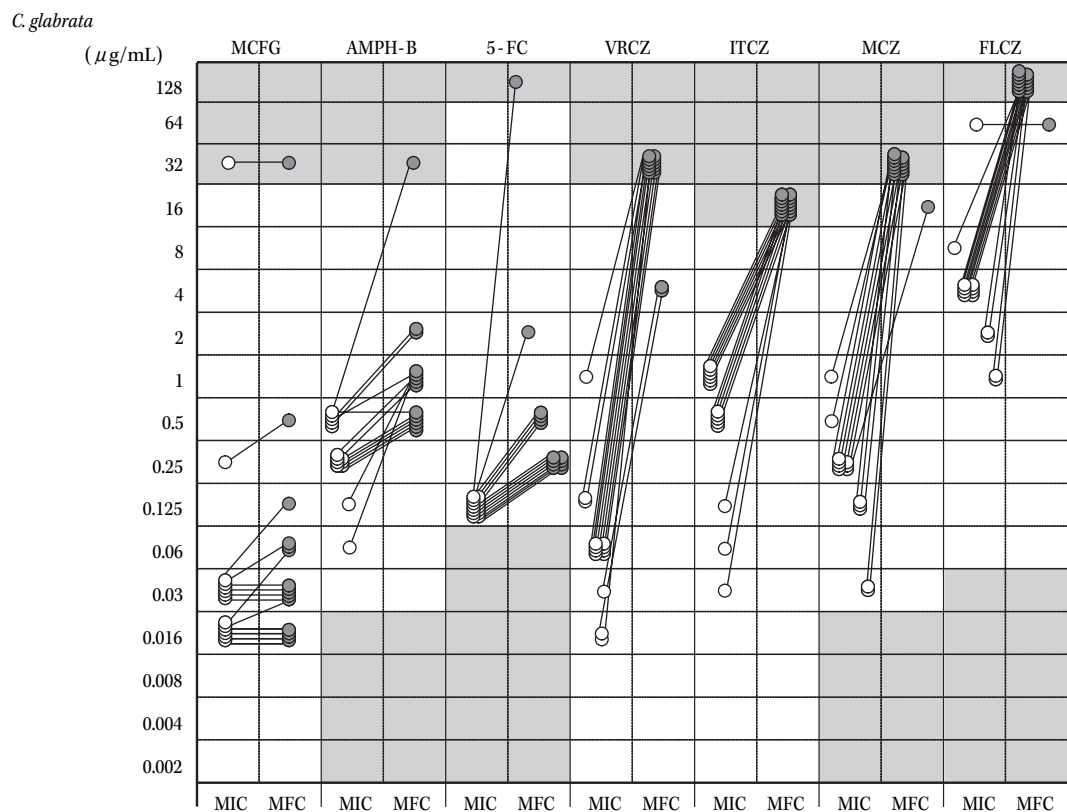


Fig. 4. Distribution of the MICs and MFCs of 7 antifungal agents for 14 *Candida glabrata* strains.

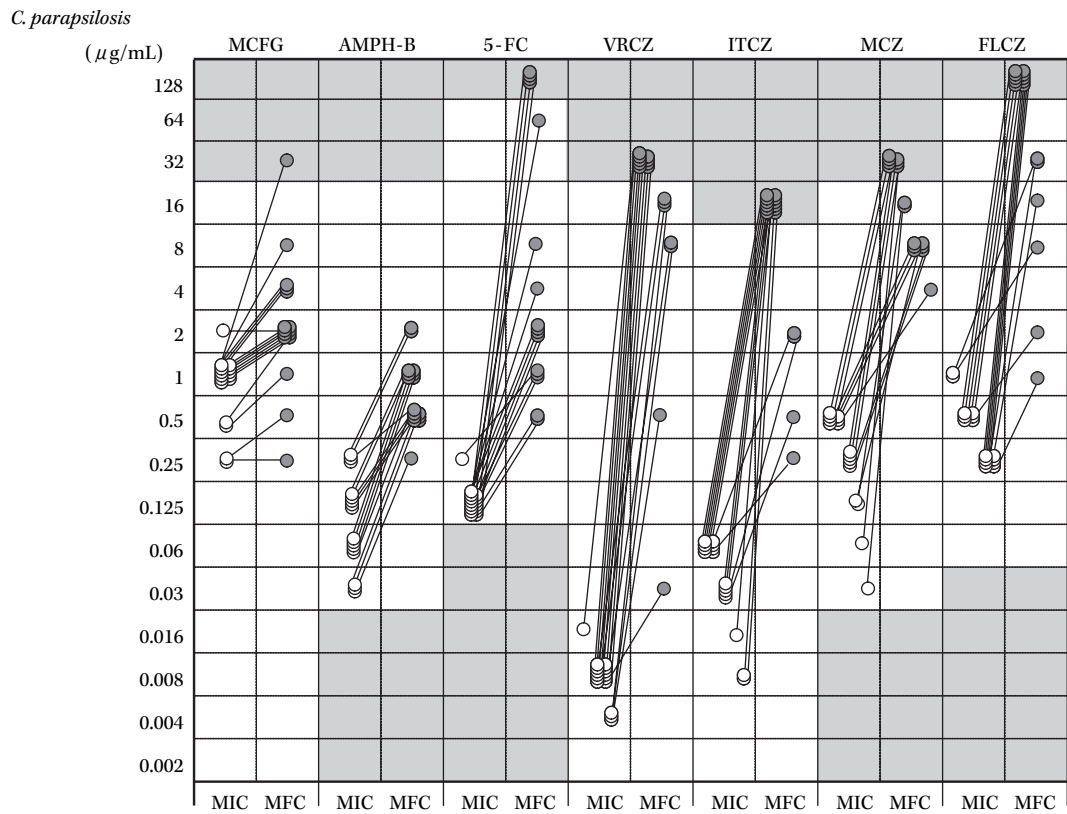


Fig. 5. Distribution of the MICs and MFCs of 7 antifungal agents for 16 *Candida parapsilosis* strains.

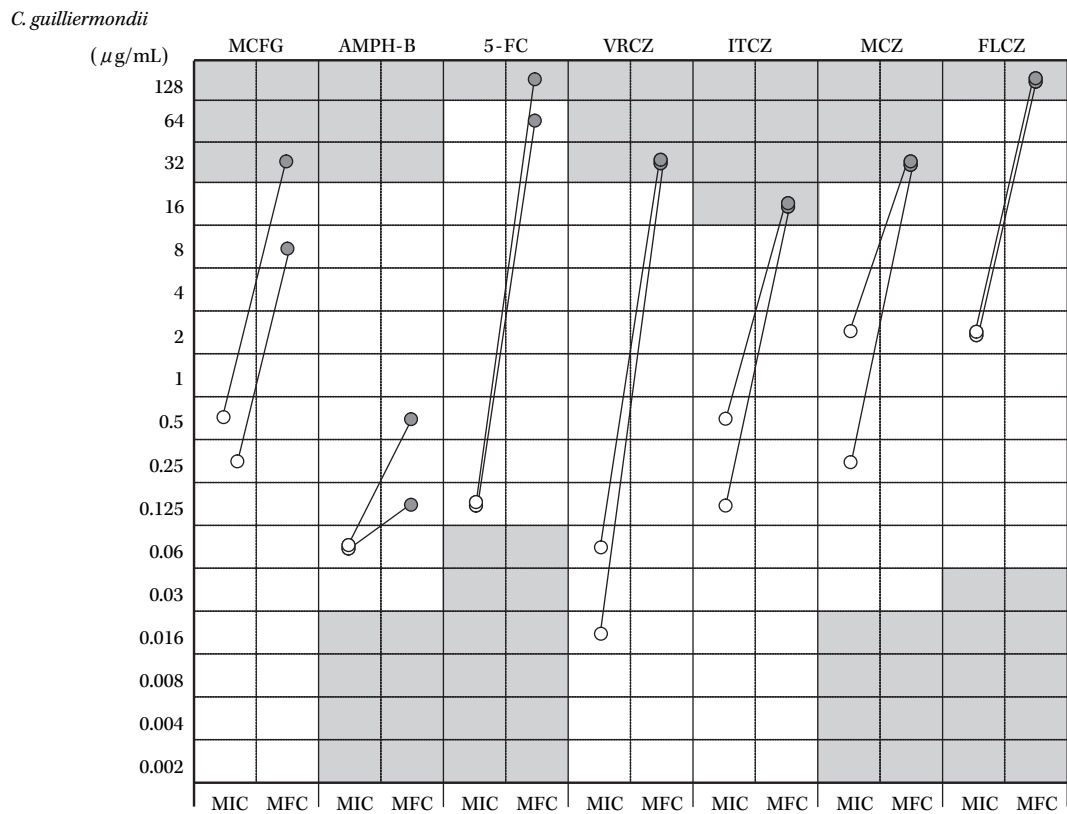


Fig. 6. Distribution of the MICs and MFCs of 7 antifungal agents for 2 *Candida guilliermondii* strains.

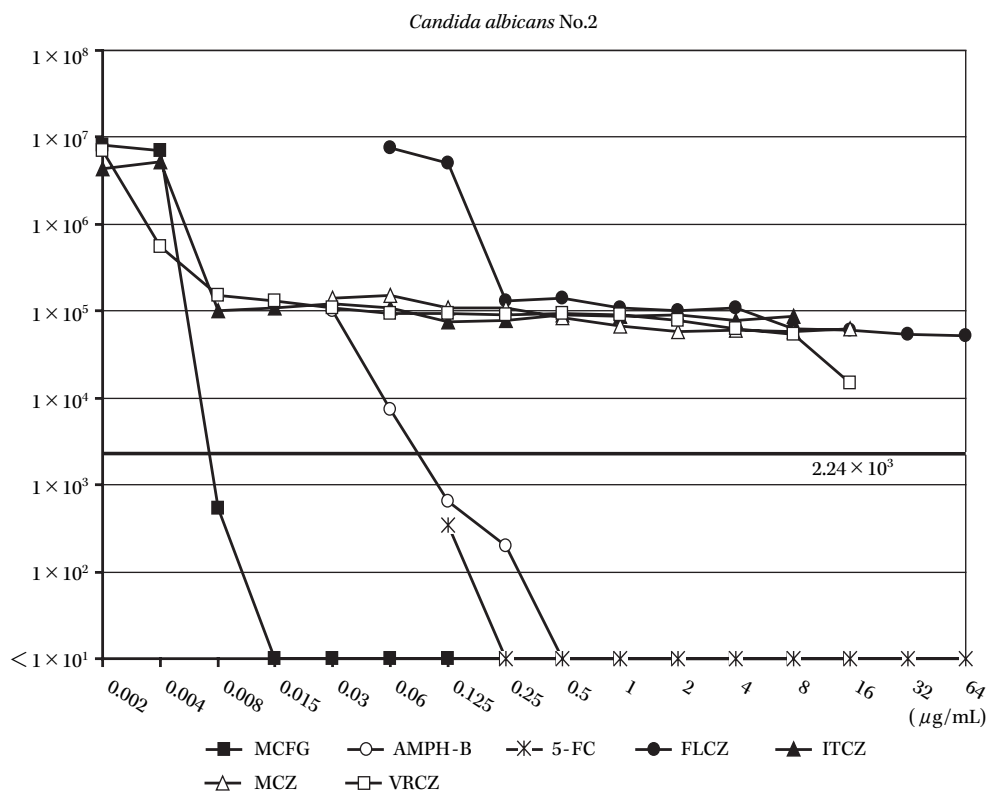


Fig. 7 A. Concentration-killing curves of 7 antifungal agents after 24 hrs' incubation against *Candida* strains belonging to five *Candida* spp.

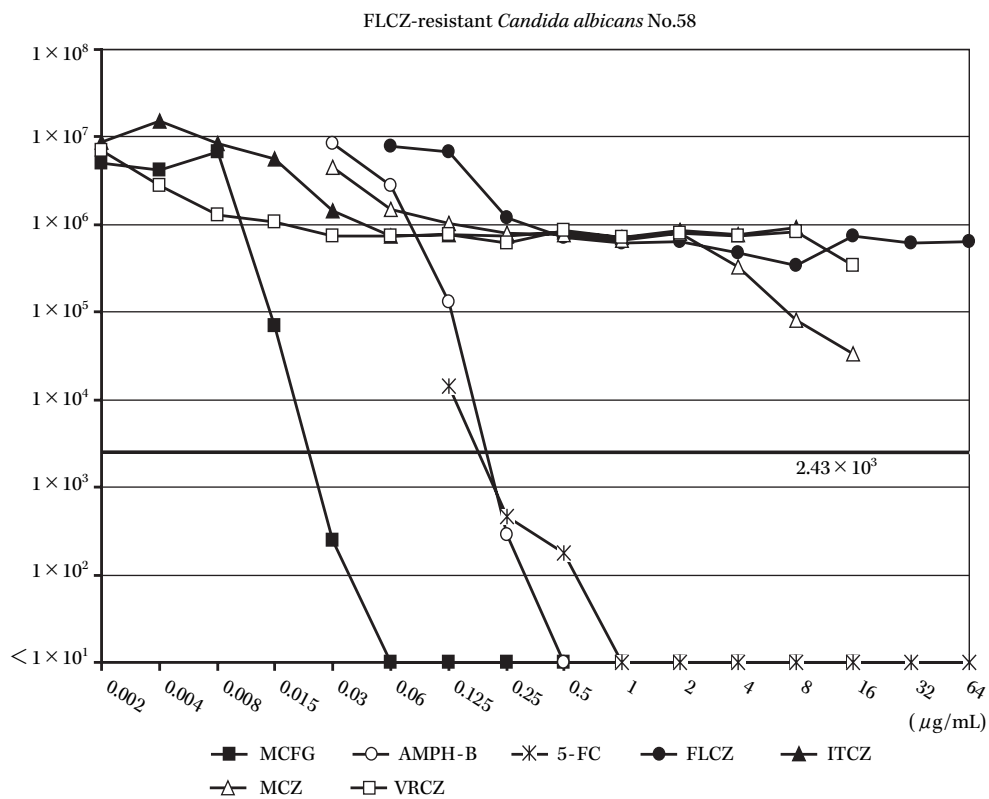


Fig. 7 B. Concentration-killing curves of 7 antifungal agents after 24 hrs' incubation against *Candida* strains belonging to five *Candida* spp.

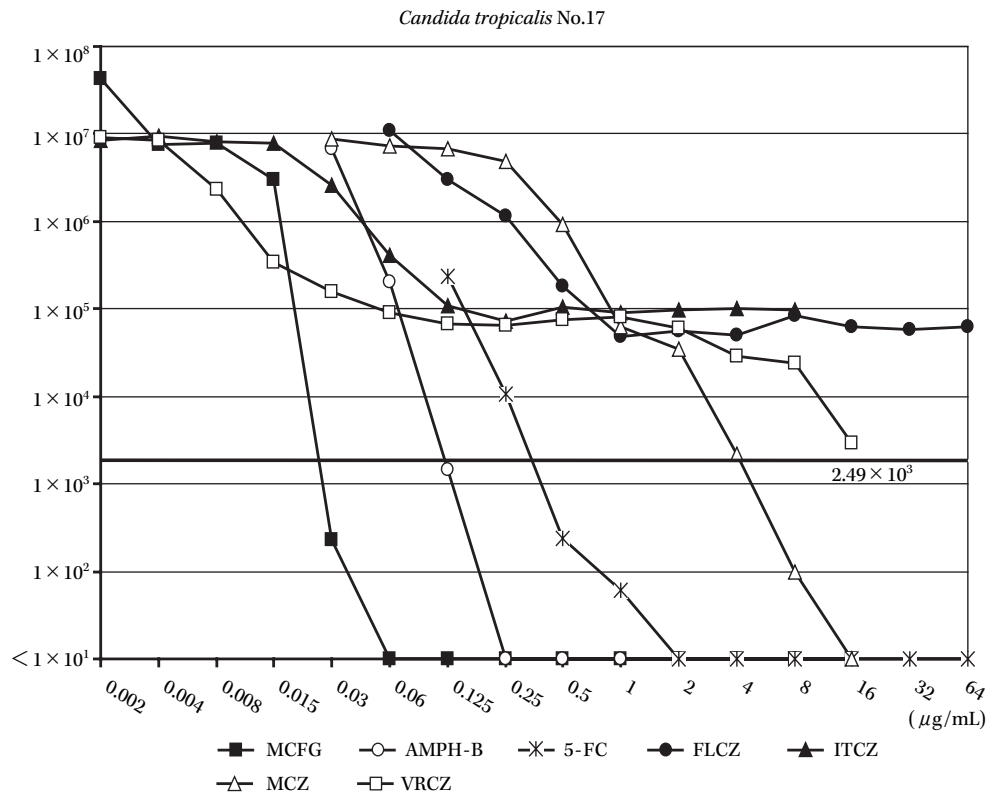


Fig. 7 C. Concentration-killing curves of 7 antifungal agents after 24 hrs' incubation against *Candida* strains belonging to five *Candida* spp.

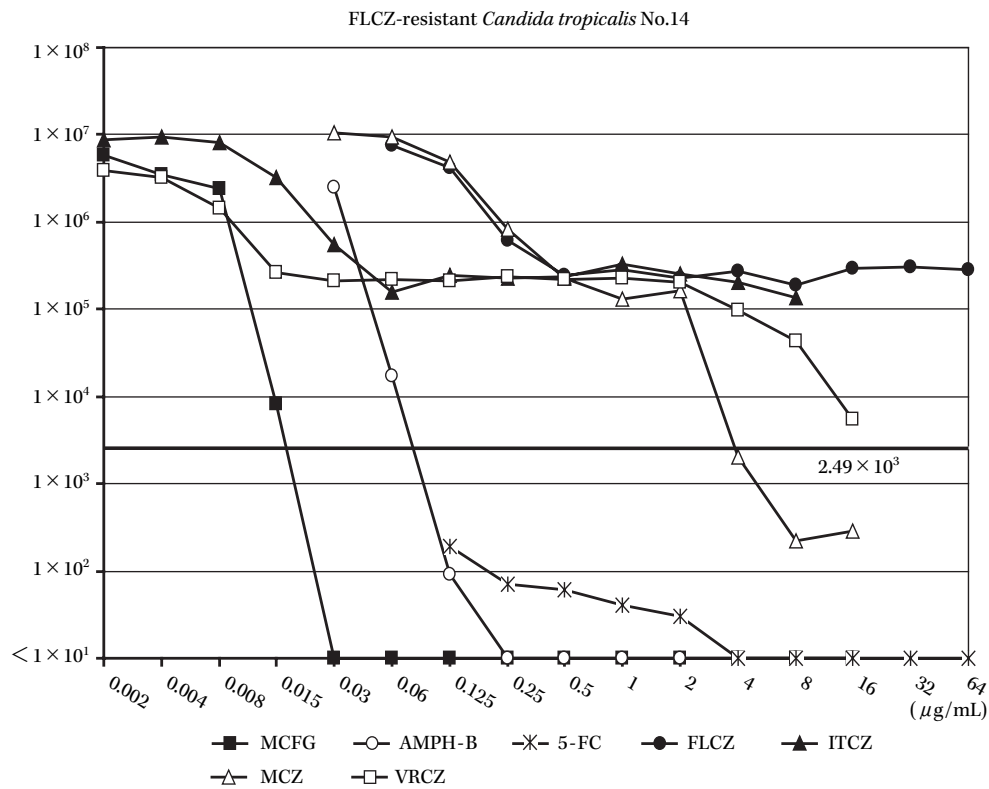


Fig. 7 D. Concentration-killing curves of 7 antifungal agents after 24 hrs' incubation against *Candida* strains belonging to five *Candida* spp.

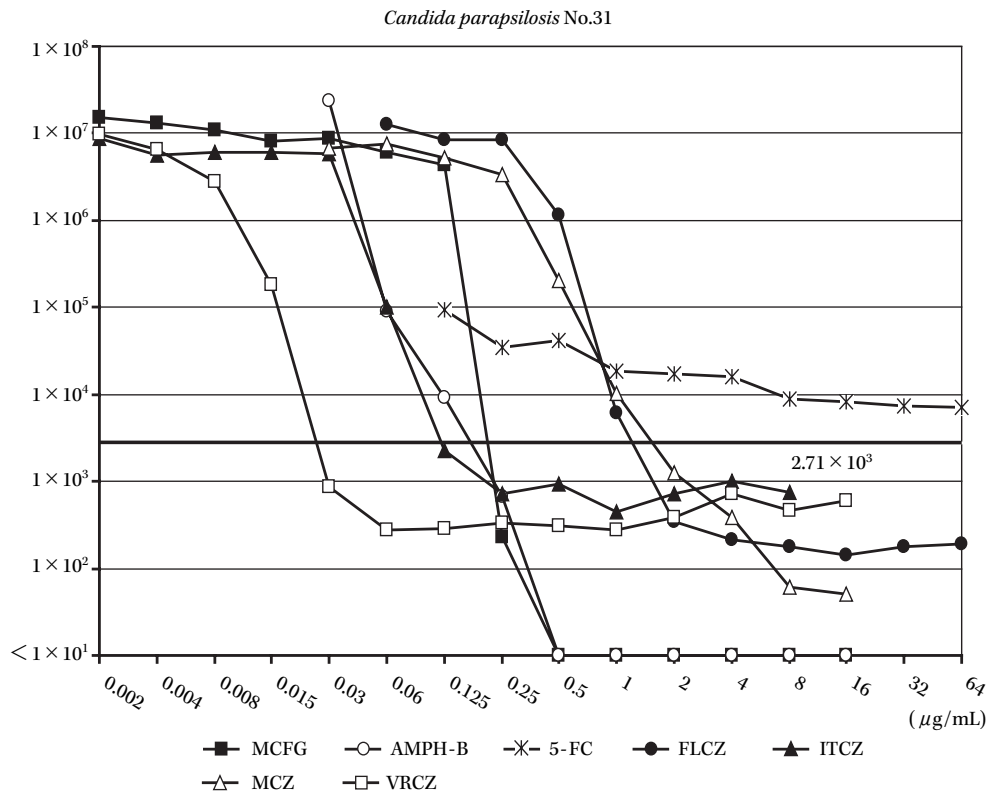


Fig. 7 E. Concentration-killing curves of 7 antifungal agents after 24 hrs' incubation against *Candida* strains belonging to five *Candida* spp.

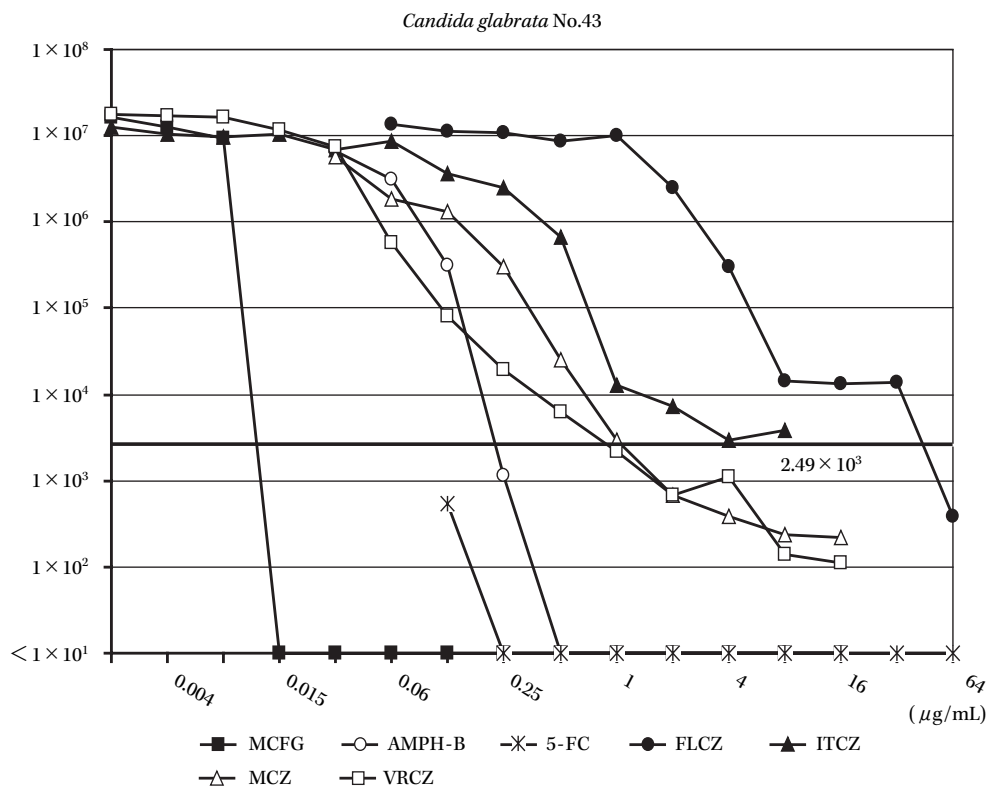


Fig. 7 F. Concentration-killing curves of 7 antifungal agents after 24 hrs' incubation against *Candida* strains belonging to five *Candida* spp.

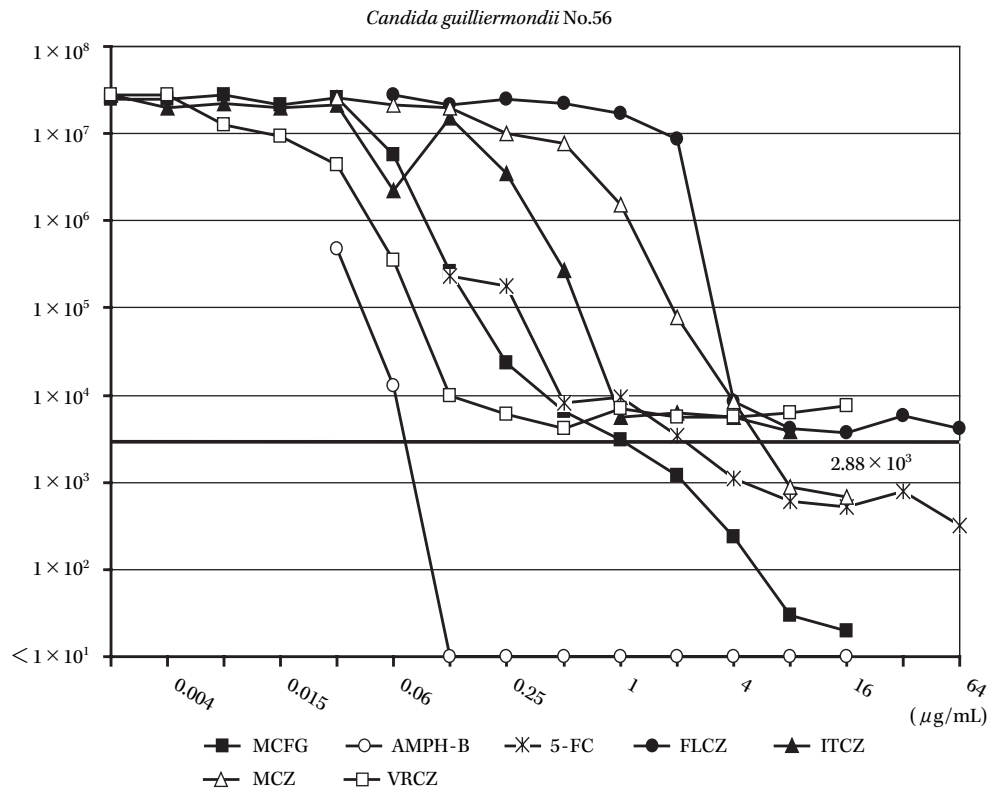


Fig. 7 G. Concentration-killing curves of 7 antifungal agents after 24 hrs' incubation against *Candida* strains belonging to five *Candida* spp.

キャリーオーバーを回避することである。前者に関しては糸状発育を軽減する振盪培養¹¹⁾、後者にはミリポア濾過¹⁰⁾などが試みられている。しかし、いずれもマルチプレートを用いた多検体の処理には適さない。培養する菌液の量を通常 100 μ L のところ 30 μ L に減らしてキャリーオーバーの影響を小さくしている報告もある¹⁰⁻¹³⁾が、99% 殺菌をみるには接種菌量を増やす必要があり、通常の MIC 測定条件で測定することができない。平板の上にスポットして菌液が乾いてから全面に塗り広げるといった方法も実施されている^{14,15)}が、貼りついた菌が均等に広がるかどうか疑問である。そこで、資料溶液中の殺菌薬の中和剤として知られている polysorbate 80¹⁷⁾ならびに lecithin¹⁸⁾に注目し、欧州薬局方に抗真菌薬の中和剤として記載のある処方例に従って¹⁹⁾、polysorbate 80 (3.0%)、lecithin (0.3%) および histidine (0.1%) を後培養培地に添加したところ、抗真菌薬のキャリーオーバーの影響を回避することができ、低い MIC 値を示す抗真菌薬の殺菌活性をより正確に評価することが可能となった。また、菌液希釈用の生理食塩水に 2% polysorbate 80 を加えることにより、*C. tropicalis* などの凝集しやすい菌種の菌数も測定することができ、予備検討では超音波処理と同等以上の効果が得られた (data not shown)。界面活性剤の利用は *Candida* 属の生菌数測定に有用であると考えられた。

今回の検討において MCFG は *C. albicans*, *C. glabrata* および *C. tropicalis* に対して優れた MIC および MFC を示した。一方、*C. guilliermondii* および *C. parapsilosis* に対する MIC は比較的高値であったが、MFC は MIC と近似しており、これらの菌種にも優れた殺菌活性が認められた。測定条件の違いがあり単純に比較できないが、MCFG や AMPH-B が殺菌的であゾール系薬は静菌的であるといった従来の成績¹²⁻¹⁶⁾と一致していた。

検討した *C. glabrata* 14 株のなかに MCFG に対する MIC が $>16 \mu\text{g/mL}$ (FLCZ に対する MIC は $>64 \mu\text{g/mL}$) の高度耐性株が 1 株含まれていた。この症例は fosfluconazole (F-FLCZ) 400 mg/日で治療開始されたが、4 日後に MCFG 100 mg/日に変更になり、12 日間投与が行われた。抗真菌薬中断後に血液培養から *C. glabrata* が分離され、この時の MIC は MCFG : $2 \mu\text{g/mL}$, FLCZ : $>64 \mu\text{g/mL}$ であった。その後、抗真菌薬が再投与され、MCFG 50 mg/日 15 日間、F-FLCZ 400 mg/日 8 日間、MCFG 50 mg/日 5 日間、MCFG 100 mg/日 7 日間、MCFG 150 mg/日 12 日間の投与となった。投与中止後 1 カ月後に再び血液から分離培養された *C. glabrata* が高度耐性化していた。これらの耐性株が同一株かどうかは不明であるが、複数の抗真菌薬が長期にわたり反復投与されたことにより出現した可能性が考えられた。このような耐性化の防止には、安全性が確立されている範囲で当

初から十分量を投与することが有用かもしれない。*C. glabrata* のなかには、検討したいずれの薬剤に対しても MIC または MFC の高い株が存在していたことから、今後の感受性動向に注意が必要である。

真菌感染症の治療にあたっては、それぞれの抗真菌薬の特徴をふまえた使い分けが必要である。*In vitro* 抗真菌活性だけで有効性を判断することはできないが、*Candida* 属の多くの菌種に優れた殺菌作用を示す MCFG は、*Candida* 属による真菌感染症の有力な治療薬になりうると考えられた。

文 献

- 1) Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent S M, Seifert H, Wenzel R P, Edmond M B: Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 309-17
- 2) Wisplinghoff H, Seifert H, Tallent S M, Bischoff T, Wenzel R P, Edmond M B: Nosocomial bloodstream infections in pediatric patients in United States hospitals: epidemiology, clinical features and susceptibilities. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 686-91
- 3) Nakamura T, Takahashi H: Epidemiological study of *Candida* infections in blood: susceptibilities of *Candida* spp. to antifungal agents, and clinical features associated with the candidemia. *J Infect Chemother* 2006; 12: 132-8
- 4) 横田恭子, 古川恵一: 深在性真菌症の診断と治療—血管内留置カテーテル関連カンジダ血症の診断と治療—. *内科* 2004; 94: 871-4
- 5) 深澤裕美, 遠藤 武, 内田 幹, 三上美恵, 大家とし子, 井上清太郎, 他: 山梨県内で実施した *Candida* 属サーベイランス. *日化療会誌* 2004; 52: 654-9
- 6) 内田勝久, 山口英世: 抗真菌薬の創薬における前臨床薬効評価の現状と課題. *真菌誌* 2004; 45: 83-91
- 7) Rex J H, Pfaller M A: Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis* 2002; 35: 982-9
- 8) Rex J H, Pfaller M A, Walsh T J, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum M A, et al: Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 643-58
- 9) 山口英世, 内田勝久, 久米 光, 篠田孝子, 渡辺一功, 楠 俊雄, 他: 日本医真菌学会標準化委員会報告 (1992~1994 年). *真菌誌* 1995; 36: 61-86
- 10) Klepser M E, Ernst E J, Lewis R E, Ernst M E, Pfaller M A: Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: Proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1207-12
- 11) Klepser M E, Ernst E J, Ernst M E, Messer S A, Pfaller M A: Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY 303366. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1387-91
- 12) Klepser M E, Malone D, Lewis R E, Ernst E J, Pfaller M A: Evaluation of voriconazole pharmacodynamics using time-kill methodology. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1917-20
- 13) Ernst E J, Roling E E, Petzold C R, Keele D J, Klepser M E: In vitro activity of micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: Microdilution, time-kill, and postantifungal-effect studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3846-53
- 14) Moore C B, Oakley K L, Denning D W: In vitro activity of a new echinocandin, LY 303366, and comparison with fluconazole, flucytosine and amphotericin B against *Candida* species. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 11-6
- 15) Canton E, Peman J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A: Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2477-82
- 16) Canton E, Peman J, Sastre M, Romero M, Espinel-Ingroff A: Killing kinetics of caspofungin, micafungin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2829-32
- 17) Erlandson A L, Lawrence C A: Inactivating medium for hexachlorophene (G-11) types of compounds and some substituted phenolic disinfectants. *Science* 1953; 118: 274-6
- 18) Cremieux A, Dumenil G, Jacquet-Francillon M L, Grebus C: Comparative study of some quaternary ammoniums neutralizing agents. Influence of the nature of the bacterial strains used. *Pathol Biol (Paris)* 1975; 23: 29-33
- 19) Microbiological examination of non-sterile products (test for specified micro-organisms). *In* European Pharmacopoeia Commission (ed.), *European Pharmacopoeia 5.0*. Council of Europe, Strasbourg Cedex, 2005; p. 156-61

Measurement of the minimal inhibitory concentrations and minimal fungicidal concentrations of antifungal agents against *Candida* strains isolated from blood cultures

Shin-ichi Fujita

Department of Laboratory Medicine, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University,
13-1 Takara-machi, Kanazawa, Ishikawa, Japan

We measured the minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal fungicidal concentrations (MFCs) of micafungin (MCFG), amphotericin B (AMPH-B), flucytosine (5-FC), voriconazole (VRCZ), itraconazole (ITCZ), miconazole (MCZ), and fluconazole (FLCZ) for 57 *Candida* strains isolated by blood cultures. In the experiment of viable cell counting, polysorbate 80 was added to the sterile saline in order to inhibit the aggregation of fungus cells, and to Sabouraud agar media, in combination with lecithin and histidine, to overcome the carryover effect of antifungal agents. MFC was defined as the lowest concentration of the drug that could kill 99% of viable cells. The MFC₉₀ values of MCFG and AMPH-B for *C. albicans* (14 strains), *C. tropicalis* (11 strains), and *C. glabrata* (14 strains) were 0.03 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.125 and 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 0.5 and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Furthermore, MCFG and AMPH-B exhibited superior fungicidal activity against azole-resistant *C. albicans* (one strain) and azole-resistant *C. tropicalis* (one strain). While the MIC₉₀ of VRCZ for 16 *C. parapsilosis* strains was 0.008 $\mu\text{g}/\text{mL}$, showing the greatest growth-inhibitory activity, the MFCs of VRCZ for *C. parapsilosis* ranged from 0.03 to ≥ 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the MFC₉₀ of VRCZ was 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or more. In contrast, AMPH-B and MCFG showed marked fungicidal activity, and the MFC₉₀ of AMPH-B and MCFG for *C. parapsilosis* was 2 and 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. As compared to MCFG, AMPH-B showed more marked fungicidal activity against two *C. guilliermondii* strains. The MFC₉₀ of the azoles for *Candida* strains belonging to the five *Candida* species isolated could not be defined at the concentrations tested. Our results demonstrated that MCFG and AMPH-B exhibit superior fungicidal activity against medically important *Candida* strains isolated by blood cultures.