

CLSI M27-A3 に準拠した *Candida* 臨床分離株の micafungin に対する感受性測定法

池田 文昭¹⁾・鈴木 真言¹⁾・長谷川美幸¹⁾・雑賀 威¹⁾・小林 寅喆²⁾

¹⁾ 三菱化学メディエンス株式会社・化学療法研究室*

²⁾ 東邦大学医学部看護学科感染制御学

(平成 21 年 10 月 13 日受付・平成 21 年 12 月 8 日受理)

CLSI の *Candida* などの酵母様真菌に対する MIC 測定に関する document M27-A3 では micafungin (MCFG) などのキャンディン系抗真菌薬が追加され、さらに、ブレイクポイント MIC も暫定的に 2 µg/mL 以下と設定された。MCFG の *Candida* に対する MIC は、従来、48 時間培養後の発育の完全阻止 (MIC-0) で判定される場合が多かったが、M27-A3 では 24 時間培養後に発育対照の濁度に比較して約 50% 減少 (MIC-2) で判定することを推奨している。われわれは、M27-A3 に準拠した MCFG の MIC 測定法の有用性を検証する目的で、日本で分離された *Candida* 臨床分離株を対象に従来法と比較検討した。

2002 年～2008 年に各種臨床材料から分離された *Candida albicans* 265 株、*Candida tropicalis* 136 株、*Candida glabrata* 100 株、*Candida parapsilosis* 137 株、*Candida krusei* 103 株、*Candida guilliermondii* 107 株に対する 48 時間培養後の MIC-0 と 24 時間培養後の MIC-2 で micafungin (MCFG) の MIC を比較した結果、*C. guilliermondii* 以外の菌種に対する MIC₅₀ および MIC₉₀ は判定基準により大きな差はなかったが、本菌種に対しては MIC-0 のほうが 4～8 倍高値を示した。また、*C. albicans* および *C. tropicalis* の各 2 株において MIC-0 と MIC-2 が大きく乖離した。M27-S3 で提案されたブレイクポイント MIC で今回の成績を分類すると、MIC-2 ではすべての株が susceptible となったが、MIC-0 では *C. albicans*、*C. tropicalis*、*C. parapsilosis* および *C. guilliermondii* の一部の株が nonsusceptible となり、特に、*C. guilliermondii* において高率に nonsusceptible の株が認められた。MCFG のブレイクポイント MIC の妥当性については、臨床効果との相関性を検討するなどさらなる検証が必要と考えられた。

Key words: *Candida* spp, micafungin, antifungal activity, CLSI

micafungin (MCFG) は 2002 年に本邦で初めて承認されたキャンディン系抗真菌薬である。キャンディン系抗真菌薬として、海外では MCFG に加えて caspofungin および anidulafungin も承認されているが、日本では MCFG のみがカンジダ症およびアスペルギルス症に対して臨床使用可能であり、現在ではカンジダ症治療の一次選択薬として幅広く使用されるにいたっている。MCFG は真菌細胞壁の構成成分である 1,3-β-D-glucan の生合成を特異的に阻害し、アゾール系抗真菌薬に耐性の菌株を含む *Candida* 属菌種に対して殺菌的に作用することが明らかにされている¹⁻³⁾。一方、最近ではキャンディン系抗真菌薬に低感受性変異株がまれに分離されることが報告されるようになり、至適投与量を設定するうえで感受性測定の必要性が指摘されている⁴⁻⁷⁾。しかしながら、MCFG に対する MIC 測定法や判定基準についてこれまで国際的に統一された方法は公表されていなかった。

米国の National Committee for Clinical Laboratory Standards (現 Clinical and Laboratory Standards Institute ;

CLSI) より 1992 年に *Candida* など酵母様真菌の抗真菌薬に対する感受性の測定法として M27-P が提案され、その後 M27-T (1995 年) を経て M27-A (1997 年) が公表された⁸⁾。2002 年には、測定法の改定と新規アゾール系抗真菌薬も加えた M27-A2 が公表され⁹⁾ 米国を中心に多くの国で標準法として繁用されている。さらに、2008 年には M27-A3 が公表され、キャンディン系抗真菌薬である MCFG、caspofungin および anidulafungin の MIC 測定法が追加された¹⁰⁾。また、キャンディン系抗真菌薬のブレイクポイント MIC も暫定的に 2 µg/mL と設定されその値を超える菌株は nonsusceptible と定義された¹¹⁾。

MCFG の *Candida* に対する MIC は、従来、48 時間培養して発育の完全阻止 (MIC-0) で判定される場合が多かった¹²⁻¹⁴⁾ が、M27-A3 では 24 時間培養で発育対照の濁度の約 50% 減少 (MIC-2) で判定することを推奨している¹⁰⁾。そこで今回、*Candida* 属菌種の日本の臨床分離株を対象に 48 時間培養後の MIC-0 と 24 時間培養後の MIC-2 を比較することにより

M27-A3 の MCFG MIC 測定法の有用性を検討し、本薬剤のブレイクポイント MIC の妥当性についても考察を加えた。

I. 材料と方法

1. 対象菌株

2002 年～2008 年に全国多数の医療機関において、真菌感染症が疑われた患者の血液、カテーテル、喀痰などより分離された *Candida albicans* 265 株、*Candida tropicalis* 137 株、*Candida glabrata* 100 株、*Candida parapsilosis* 126 株、*Candida krusei* 103 株、*Candida guilliermondii* 107 株を対象とした。精度管理株は *C. parapsilosis* ATCC22019 および *C. krusei* ATCC6258 の 2 菌株を用いた。*Candida* 属各菌株の分離・同定は CHROM agar *Candida* (日本ベクトン・ディッキンソン) および VITEK YBC カード (日本ビオメリユー) を用いて行った。なお、これらの試験菌株については“疫学研究に関する倫理指針”¹⁵⁾ を遵守し、患者プライバシーには一切抵触しないことを厳守し、菌株のみを試験に使用した。

2. MIC 測定

micafungin (MCFG: アステラス製薬株式会社) の MIC を CLSI が推奨する感受性測定標準法 M27-A3 に準じて微量液体希釈法で測定した。MIC の判定は、35°C、24 時間培養後に発育対照の濁度の約 50% 減少 (スコア 2)、48 時間培養後に目視で発育なし (スコア 0) で判定し、おのおの MIC-2 および MIC-0 とした。但し、24 時間培養後に対照ウエルにおける発育が不十分で判定が困難であった菌株については 48 時間培養後にスコア 2 でも判定を実施した。なお、*C. parapsilosis* ATCC22019 および *C. krusei* ATCC6258 に対する MCFG の MIC-2 および MIC-0 を 20 回測定し、おのおの範囲を求めた。

II. 結果

CLSI の M27-A3 において精度管理株として記載されている *C. parapsilosis* ATCC22019 および *C. krusei* ATCC6258 に対する MCFG の MIC 測定を 20 回実施した時の MIC-0 および MIC-2 の範囲を Table 1 に示した。両菌株に対する MIC-2 は MIC-0 に比較して 1 管から 2 管低値を示す傾向が認められたが、いずれも M27-A3 の精度管理基準の許容範囲内であった。

Candida 主要 6 菌株に対するキャンディン系抗真菌薬の MIC 判定において M27-A3 で推奨している 24 時間培養での発育性を目視および $A_{630\text{nm}}$ における吸光度で確認した結果、*C. albicans*、*C. tropicalis* および *C. krusei* は検討したすべての株が 24 時間培養後に MIC 判定可能な発育性 ($A_{630\text{nm}} \geq 0.1$) を示し、*C. glabrata* も 25 株中 24 株は MIC 判定可能な発育性を示した (Table 2)。一方、*C. parapsilosis* および *C. guilliermondii* において MIC 判定可能な発育が認められた株数は、おのおの 37 株中 18 株 (48.6%)、7 株中 4 株 (57.1%) であった (Table 2)。

Candida 主要 6 菌株の臨床分離株を対象に MCFG の MIC range, MIC₅₀, MIC₉₀ を MIC-0 と MIC-2 で比較検

Table 1. Micafungin MIC reproducibility against quality control strains measured 20 times

Organism	MIC range ($\mu\text{g/mL}$)	
	MIC-0 ¹	MIC-2 ²
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC22019 ³	1-4	0.5-1
<i>Candida krusei</i> ATCC6258 ⁴	0.12-0.25	0.12

¹The lowest micafungin concentration support no visible growth after 48 h incubation.

²Lowest micafungin concentration cause a 50% growth inhibition after 24 h incubation.

³CLSI-recommended 24- and 48-MIC limits for *C. parapsilosis* ATCC22019 were 0.5-2 and 0.5-4 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

⁴CLSI-recommended 24- and 48-MIC limits for *C. krusei* ATCC22019 were 0.12-0.5 and 0.12-0.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Table 2. *Candida* isolates growing in RPMI1640 after 24 h incubation at 35°C

Organism (No. of isolates)	No. of isolates grown (%)
<i>Candida albicans</i> (65)	65 (100)
<i>Candida tropicalis</i> (36)	36 (100)
<i>Candida parapsilosis</i> (37)	18 (49)
<i>Candida glabrata</i> (25)	24 (96)
<i>Candida krusei</i> (3)	3 (100)
<i>Candida guilliermondii</i> (7)	4 (57)

討した。*C. albicans*、*C. tropicalis*、*C. parapsilosis*、*C. glabrata* および *C. krusei* に対する両判定基準による MIC₅₀ および MIC₉₀ の差は 2 倍以内であったが、*C. guilliermondii* に対する MIC₅₀ および MIC₉₀ については、MIC-0 が MIC-2 に比較しておのおの 8 および 4 倍高値であった (Table 3)。MIC-0 と MIC-2 の乖離が著しかった 4 株について 24 時間および 48 時間培養後の MIC-0 および MIC-2 を Table 4 に示した。*C. albicans* 2 株では、24 時間培養後に 0.03 または 0.06 $\mu\text{g/mL}$ において発育の完全阻止が認められたが、48 時間培養後にはその濃度から 4 または 8 $\mu\text{g/mL}$ まで微小発育が連続して観察された。*C. tropicalis* 2 株では、48 時間培養後に 0.06 から 0.5 $\mu\text{g/mL}$ までいったん発育の完全阻止が認められたが、1 から 64 $\mu\text{g/mL}$ までは微小発育が連続して観察された (Table 4)。一方、*C. albicans* のなかに MIC-0 および MIC-2 のいずれにおいても MIC₉₀ よりも 32 倍高い MIC を示す株 (*C. albicans* C.I.-3) が認められた (Table 4)。

今回の対象菌株に対する MIC をキャンディン系抗真菌薬のブレイクポイント MIC の基準で susceptible と nonsusceptible に分類した結果、MIC-2 ではすべての株が susceptible となったが、MIC-0 では、*C. albicans*、*C. tropicalis*、*C. parapsilosis* および *C. guilliermondii* のおのおの 265 株中 2 株 (0.8%)、137 株中 2 株 (1.5%)、126 株中 4 株 (3.2%) および 107 株中 23 株 (21.5%) が nonsusceptible になった (Table 5)。

III. 考察

CLSI はキャンディン系抗真菌薬の *Candida* 属に対す

Table 3. Micafungin MICs against clinical isolates of *Candida* species

Organism (No. of isolates)		(μg/mL)		
		MIC-0 ¹	MIC-2 ²	MIC-0/MIC-2 ratio
<i>C. albicans</i> (265)	Range	0.004 – 4	≤ 0.002 – 0.5	
	MIC ₅₀	0.008	0.008	1
	MIC ₉₀	0.015	0.015	1
<i>C. tropicalis</i> (136)	Range	0.004 – >16	≤ 0.002 – 0.03	
	MIC ₅₀	0.015	0.015	1
	MIC ₉₀	0.03	0.03	1
<i>C. parapsilosis</i> (137)	Range	0.25 – 4	0.06 – 2	
	MIC ₅₀	1	0.5	2
	MIC ₉₀	2	2	1
<i>C. glabrata</i> (100)	Range	0.004 – 0.015	≤ 0.002 – 0.015	
	MIC ₅₀	0.015	0.008	2
	MIC ₉₀	0.015	0.015	1
<i>C. krusei</i> (103)	Range	0.12 – 0.25	0.03 – 0.25	
	MIC ₅₀	0.25	0.12	2
	MIC ₉₀	0.25	0.25	1
<i>C. guilliermondii</i> (107)	Range	0.25 – 8	0.06 – 2	
	MIC ₅₀	2	0.25	8
	MIC ₉₀	4	1	4

¹Lowest micafungin concentration supporting no visible growth after 48 h incubation.

²Lowest micafungin concentration causing a 50% growth inhibition after 24 h incubation.

Table 4. Paradoxical effect of micafungin against some isolates of *Candida* species

Organism	(μg/mL)			
	MIC-0 ¹		MIC-2 ²	
	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>C. albicans</i> C.I.-1	0.03	4	0.015	0.03
<i>C. albicans</i> C.I.-2	0.06	8	0.008	0.06
<i>C. tropicalis</i> C.I.-1	0.03	0.06/>64 ³	0.03	0.03
<i>C. tropicalis</i> C.I.-2	0.03	0.06/>64 ³	0.03	0.03
<i>C. albicans</i> C.I.-3	0.5	0.5	0.5	0.5

¹Lowest micafungin concentration supporting no visible growth after 24 and 48 h incubation.

²Lowest micafungin concentration causing a 50% growth inhibition after 24 and 48 h incubation.

³There were 2 endpoints, because inhibition was broken by the paradoxical growth from 1 to 64 μg/mL.

Table 5. Nonsusceptible isolates based on breakpoint MICs

Organism (Number of isolates)	Number of Nonsusceptible ¹ isolates (%)	
	MIC-0 ²	MIC-2 ³
<i>C. albicans</i> (265)	2 (0.8)	0
<i>C. tropicalis</i> (137)	2 (1.5)	0
<i>C. parapsilosis</i> (126)	4 (3.2)	0
<i>C. glabrata</i> (100)	0	0
<i>C. krusei</i> (103)	0	0
<i>C. guilliermondii</i> (107)	23 (21)	0
Total (838)	31 (3.7)	0

¹High-MIC isolate (MIC > 2 μg/mL) were defined as nonsusceptible.

²Lowest micafungin concentration supporting no visible growth after 48 h incubation.

³Lowest micafungin concentration causing a 50% growth inhibition after 24 h incubation.

る微量液体希釈法の MIC 測定標準化に取組み、基礎培地として RPMI-1640 を用い、MIC の判定基準として従来の 48 時間培養後に目視で発育なし (MIC-0) に替えて、24 時間培養後に対照の 50% 程度の発育阻止 (MIC-2) を採用することを推奨している。この判定基準で測定した caspofungin の MIC 値は施設内および施設間でのばらつきが少なくなり、かつ、大部分 (99.9%) の臨床分離株と Fks1p に変異を起こして caspofungin に低感受性になった株を確実に区別することができたと報告している^{16,17)}。その後、この方法を用いて、caspofungin、MCFG および anidulafungin の 3 薬剤について *Candida* 属の臨床分離株を対象に大規模なサーベイランスが実施され^{18,19)}、2008 年にはその結果を基に CLSI から document

M27-A3 および M27-S3 が公表された¹⁰⁾。今回われわれは M27-A3 に記載されている精度管理株を対象に MCFG の MIC-0 および MIC-2 を 20 回測定した結果、MIC-2 のほうが MIC-0 よりも 1~2 管低値を示したが、いずれの判定基準でも精度管理値として規定されている範囲に収まることが確認された。

次に、今回対象とした菌株について 24 時間培養時の発育性を検討した結果、*C. parapsilosis* および *C. guilliermondii* の約半数の菌株では、24 時間では発育が十分ではなく 48 時間の培養が必要であった。したがって、24 時間培養で発育不良の場合には 48 時間培養後に判定せざるをえないことが明らかになった。

Candida 属主要 6 菌種の臨床分離株を対象に MIC-0 および MIC-2 を比較した結果, *C. guilliermondii* 以外の菌種に対する MIC₅₀ および MIC₉₀ は, 両判定基準で 2 倍以内の差であったが, *C. guilliermondii* に対しては 4~8 倍の乖離が認められた。なお, *C. albicans* および *C. tropicalis* の菌株のなかに MIC-0 と MIC-2 の乖離が著しい菌株が 2 株ずつ存在したが, 高濃度域における発育性に相違が認められた。すなわち, *C. albicans* 2 株は 48 時間培養することにより trailing が認められたが, *C. tropicalis* 2 株では, 48 時間培養によりいったん発育の完全阻止が認められ, それより高濃度側において微小発育 (paradoxical growth) が観察された。このような現象は paradoxical 効果と呼ばれている²⁰⁾が, その発現様式が菌種間で異なることが示唆された。caspofungin について同様な現象がいくつか報告され, paradoxical 効果の認められた株ではキャンディン系抗真菌薬存在下で増殖させると細胞壁中の 1,3-β-glucan の量が顕著に減少するのに対し chitin の含量が増加することが明らかにされている^{21, 22)}。すなわち, 細胞壁が脆弱化するとそれを相補する cell wall integrity pathway が活性化され, 特に chitin 合成酵素の発現が亢進して細胞壁の chitin 含量が増加したと推測されている。臨床治療においてこのような現象が実際に起きて難治化に関連しているかどうかは不明であるが, われわれは以前に paradoxical 効果が認められた菌株と通常感受性株によるマウス致死感染モデルにおける MCFG の延命効果 (ED₅₀ 値) に差が認められなかったことから²³⁾, これらの株も MCFG 感受性と判断して差し支えないと考えている。

一方, *C. albicans* のなかに MIC-0 および MIC-2 とともに高い値を示す株が認められた。キャンディン系抗真菌薬に対する感受性が低下した *Candida* 属の臨床分離株の報告が散見される⁴⁻⁷⁾が, 感受性低下の機序は標的酵素である 1,3-β-D-glucan synthase の触媒サブユニットである Fks1p のアミノ酸変異であることが証明されている^{4, 24)}。この株の耐性機序は確認していないが, 恐らく *fks1* 遺伝子の変異によるものと推察され, MIC-2 判定でこの種の耐性変異株の鑑別に問題がないことが示唆された。現時点ではキャンディン系抗真菌薬低感受性株の臨床分離報告はごく限られたものであり, 今回の調査でも 1 株のみ検出されたが, 今後も臨床分離株のキャンディン系抗真菌薬に対する感受性を注意深く監視する必要があると考えられる。

CLSI からは M27-A3 と併せて M27-S3 も公表され MCFG を含むキャンディン系抗真菌薬のブレイクポイント MIC が暫定的に 2 μg/mL と設定されその値を超える菌株は nonsusceptible と定義された¹¹⁾。今回検討した *Candida* 属菌種 838 株に対する MIC 値をブレイクポイントで分類した結果, MIC-2 ではすべての株が susceptible となったが, MIC-0 では *C. albicans*, *C. tropi-*

calis, *C. parapsilosis* および *C. guilliermondii* において nonsusceptible となる菌株が認められ, 特に *C. guilliermondii* においては 22% の菌株が nonsusceptible となった。カンジダ血症および侵襲性カンジダ症を対象に MCFG と liposomal amphotericin B (AmBisome) との第三相比較試験が実施され, 菌種別の有効率および除菌率が公表されたが, *C. guilliermondii* による感染例に対しては有効率および除菌率ともに 100% であったと報告されており²⁵⁾, 例数は少ないながら M27-A3 の妥当性を裏付ける結果の一つと考えられた。また, 今回の対象とした菌株に限って言えば, MIC-2 でいずれの菌種も susceptible となるものの, *C. parapsilosis* および *C. guilliermondii* に対する MIC₅₀ および MIC₉₀ は *C. albicans* に対する MIC₅₀ および MIC₉₀ と比較しておのおの 32~64 倍および 64~128 倍高い。一方, 前述の第三相臨床試験では, *C. guilliermondii* および *C. parapsilosis* 感染に対して, *C. albicans* 感染に対するのと同様以上の有効性を示すことが立証されており, ブレイクポイント MIC と臨床効果との関係を菌種ごとにも検討していく必要性が考えられる。

M27-A3 では 50% 発育抑制をエンドポイント (MIC-2) として micafungin の MIC を判定することにより, 従来法に比較して再現性が高く, paradoxical growth や trailing の影響を受けず真に低感受性の株の検出が可能になることが判明した。一方, 培養時間として推奨されている 24 時間では十分に発育しない菌種も認められ, 菌種ごとに最適化すべきであると考えられた。また, MCFG の MIC-2 と臨床効果の相関性については未だ十分には検討されておらず, 今後, 評価症例数を追加し, 臨床的ブレイクポイントの設定も含めて, 判定基準のさらなる検証が必要と考えられる。

文 献

- 1) 池田文昭, 大友寿美, 中井 徹, 森下佳彦, 牧 克之, 俵 修一, 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 2002; 50 (S-1): 8-19
- 2) 山口英世, 西山彌生, 内田勝久, 波多野和男, 森下佳彦, 中井 徹, 他: Micafungin の *Candida albicans* および *Aspergillus fumigatus* に対する作用機序の生化学的および形態学的研究. 日化療会誌 2002; 50 (S-1): 20-9
- 3) Hatano K, Morishita Y, Nakai T, Ikeda F: Antifungal mechanism of FK463 against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. J Antibiot (Tokyo) 2002; 55: 219-22
- 4) Park S, Kelly R, Kahn J N, Robles J, Hsu MJ, Register E, et al: Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 3264-73
- 5) Katiyar S, Pfaller M, Edlind T: *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 2892-4
- 6) Laverdiere M, Lalonde R G, Baril J G, Sheppard D C, Park S, Perlin D S: Progressive loss of echinocandin

- activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 705-8
- 7) Cleary J D, Garcia-Effron G, Chapman S W, Perlin D S: Reduced *Candida glabrata* susceptibility secondary to an FKS1 mutation developed during candidemia treatment. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 2263-5
 - 8) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard M27-A. NCCLS, Wayne, Pennsylvania, 1997
 - 9) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard second edition M27-A2. NCCLS, Wayne, Pennsylvania, 2002
 - 10) Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard third edition M27-A3. CLSI, Wayne, Pennsylvania, 2008
 - 11) Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: third informational supplement M27-S3. CLSI, Wayne, Pennsylvania, 2008
 - 12) Tawara S, Ikeda F, Maki K, Morishita Y, Otomo K, Teratani N, et al: In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 57-62
 - 13) Uchida K, Nishiyama Y, Yokota N, Yamaguchi H: In vitro antifungal activity of a novel lipopeptide antifungal agent, FK463, against various fungal pathogens. J Antibiot (Tokyo) 2000; 53: 1175-81
 - 14) Takakura S, Fujihara N, Saito T, Kudo T, Iinuma Y, Ichiyama S: National surveillance of species distribution in blood isolates of *Candida* species in Japan and their susceptibility to six antifungal agents including voriconazole and micafungin. J Antimicrob Chemother 2004; 53: 283-9
 - 15) 日本臨床微生物学会: 「疫学研究に関する倫理指針」の施行等について。日本臨床微生物学会誌 2002; 12: 141
 - 16) Pfaller M A, Messer S A, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis R J, et al: Further standardization of broth microdilution methodology for in vitro susceptibility testing of caspofungin against *Candida* species by use of an international collection of more than 3,000 clinical isolates. J Clin Microbiol 2004; 42: 3117-9
 - 17) Odds F C, Motyl M, Andrade R, Bille J, Canton E, Cuenca-Estrella M, et al: Interlaboratory comparison of results of susceptibility testing with caspofungin against *Candida* and *Aspergillus* species. J Clin Microbiol 2004; 42: 3475-82
 - 18) Pfaller M A, Boyken L, Hollis R J, Kroeger J, Messer S A, Tendolkar S, et al: In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. J Clin Microbiol 2008; 46: 150-6
 - 19) Pfaller M A, Diekema D J, Ostrosky-Zeichner L, Rex J H, Alexander B D, Andes D, et al: Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. J Clin Microbiol 2008; 46: 2620-9
 - 20) Wiederhold N P: Attenuation of echinocandin activity at elevated concentrations: a review of the paradoxical effect. Curr Opin Infect Dis 2007; 20: 574-8
 - 21) Stevens D A, Ichinomiya M, Koshi Y, Horiuchi H: Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1, 6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 3160-1
 - 22) Walker L A, Munro C A, de Bruijn I, Lenardon M D, McKinnon A, Gow N A: Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. PLoS Pathog 2008; 4: 1-12
 - 23) 中井 徹, 松本 哲, 池田文昭, 三鴨廣繁: 臨床分離 *Candida tropicalis* にみられた micafungin の paradoxical effect。日化療会誌 2008; 56: 185-9
 - 24) 新見京子, 新見昌一: キャンディン系抗真菌薬と耐性機構。日医真菌会誌 2009; 50: 57-66
 - 25) Kuse E R, Chetchotisakd P, da Cunha C A, Ruhnke M, Barrios C, Raghunadharao D, et al: Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. Lancet 2007; 369: 1519-27

Antifungal susceptibility testing of micafungin according to CLSI M27-A3 against clinical isolates of *Candida* species

Fumiaki Ikeda¹⁾, Makoto Suzuki¹⁾, Miyuki Hasegawa¹⁾,
Takeshi Saika¹⁾ and Intetsu Kobayashi²⁾

¹⁾ Chemotherapy Division, Mitsubishi Chemical Medience Corp., 3-30-1 Shimura, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

²⁾ School of Nursing Faculty of Medicine, Toho University

The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) has developed methods for testing the activity of echinocandins including caspofungin, micafungin and anidulafungin against yeasts (M27-A3 and M27-S3). M27-S3 provides interpretative breakpoint MICs of $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ for echinocandins against *Candida* species.

Micafungin MICs have been conventionally defined as the lowest drug concentration preventing visible growth after 48 h incubation (MIC-0). M27-A3 defined MICs as the lowest drug concentration significantly reducing growth ($\geq 50\%$ inhibition) after 24 h incubation (MIC-2).

We determined micafungin MIC-0 and MIC-2 by broth microdilution methods according to M27-A3 against a total of 848 clinical *Candida* isolates, including 265 *Candida albicans*, 136 *Candida tropicalis*, 100 *Candida glabrata*, 137 *Candida parapsilosis*, 103 *Candida krusei*, and 107 *Candida guilliermondii* from cases of suspected fungal infection visiting medical facilities in Japan between 2002 and 2008.

No significant difference in MIC₅₀ and MIC₉₀ values was determined as MIC-0 and MIC-2 against isolates of *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei*. In contrast MIC₅₀ and MIC₉₀ against isolates of *C. guilliermondii* determined by MIC-0 were 4–8 times higher than determined as MIC-2. MIC-0 values against 4 isolates of *C. albicans* and *C. tropicalis* were markedly higher than MIC-2 values against the same isolates. Paradoxical growth of these isolates occurred at concentrations above MIC-2 values for micafungin after 48 h incubation.

Based on MIC-2 data, isolates were classified as 'susceptible' and 31 of 828 isolates (3.7%) as 'nonsusceptible' based on MIC-0 data, with 23 of 107 *C. guilliermondii* isolates (21%) designated nonsusceptible based on MIC-0 data.

Micafungin breakpoint MIC will therefore be additionally studied for isolates identified during postmarket micafungin surveillance.