

# 北海道における *Aspergillus* 属に対する抗真菌薬の MIC, MEC 分布～自家製プレートおよび市販酵母様真菌薬剤感受性キットを用いた検討

八鍬 佑貴<sup>1)</sup>・鳴海 菜月<sup>1)</sup>・佐藤 勇樹<sup>1)</sup>・佐伯 理知<sup>1)</sup>

葦澤 慎也<sup>1)</sup>・藤谷 好弘<sup>2,3)</sup>・高橋 聡<sup>1,3)</sup>

<sup>1)</sup> 札幌医科大学附属病院検査部\*

<sup>2)</sup> 北海道立衛生研究所感染症センター

<sup>3)</sup> 札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座

受付日：2021年10月20日 受理日：2022年5月9日

北海道における *Aspergillus* 属 48 株の amphotericin B (AMPH-B), itraconazole (ITCZ) および voriconazole (VRCZ) の MIC 分布, micafungin (MCFG) の Minimum Effective Concentration (MEC) 分布を Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 法にて調べ, 市販の酵母様真菌薬剤感受性キットが本菌にも転用可能かを併せて検討した。CLSI 法で感受性を調べた結果, MIC<sub>50</sub>/MIC<sub>90</sub> (μg/mL) は, AMPH-B ; 1/2, ITCZ ; 0.5/1, VRCZ ; 0.5/1, MCFG の MEC<sub>50</sub>/MEC<sub>90</sub> (μg/mL) は 0.0078/0.015 であった。このうち *A. fumigatus* 1 株 (3.6%) は, ITCZ と VRCZ の MIC が ≥16 μg/mL, 2 μg/mL を示し Non-Wild-Type (NWT) に分類され, 2 剤に対する耐性獲得が示唆された。また, CLSI 法, 酵母様真菌 DP '栄研' (DP) および酵母真菌薬剤感受性キット ASTY (ASTY) による感受性を比較したところ, DP, 菌の発育を指標とした ASTY とともに ±2 管差内ですべて一致した。さらに CLSI 法で ITCZ および VRCZ に対しそれぞれ NWT に分類された 1 株は, DP と ASTY いずれも NWT に分類され一致した結果であった。3 法間の比較では, VRCZ の判定において 1 株が DP で NWT, CLSI 法と ASTY で WT に分類されたのみだった。以上より, これらキットは本菌にも転用可能と考えられた。

**Key words:** *Aspergillus* spp., antifungal susceptibility testing, clinical and laboratory standards institute

## はじめに

肺アスペルギルス症は, 臨床的に侵襲型, 慢性型などに類型されており, その治療では抗真菌薬が使用される。しかし, 最近では, アゾール系薬剤やエキノキャンディン系薬剤に対し耐性, あるいは低感受性を示す *Aspergillus* 属<sup>1-4)</sup>が報告されているため, 薬剤感受性試験を実施し, そのうえで適切な抗真菌薬を選択することが期待されつつある。*Aspergillus* 属の薬剤感受性試験法は, Clinical and Laboratory

Standards Institute (CLSI) から 2008 年に M38-A2 が公開されている<sup>5)</sup>。しかし, 薬剤感受性パネルを自家調整する必要がある, さらに菌液調整などの操作が煩雑であるため, ほとんど実施されていない。そのため, 各種抗真菌薬に対する *Aspergillus* 属の低感受性株や耐性獲得株の有無や分布の状況については不明であり, 特に, 北海道における状況は過去に報告がない。そして, 抗真菌薬は必ずしも適切に選択されていない可能性が考えられる。そこで今回われわれは, *Aspergillus* 属を対象とし, 北海道に

\*北海道札幌市中央区南 1 条西 16 丁目 291 番

おける amphotericin B (AMPH-B), itraconazole (ITCZ), voriconazole (VRCZ) の MIC 分布, micafungin (MCFG) の最小薬剤有効濃度 (Minimum Effective Concentration : MEC) 分布を調べ, 低感受性株や耐性獲得株の有無を確認した。さらに, *Aspergillus* 属の薬剤感受性試験を市販の酵母様真菌薬剤感受性キットで行い, 実施が困難である CLSI 法を酵母様真菌薬剤感受性キットで転用可能かを評価し, 試験の簡便化を検討した。

## 1. 材料と方法

### 1. 使用菌株

臨床分離株は, 当院で 2012~2014 年に分離・同定された *Aspergillus* 属 48 株を用いた。臨床分離株の内訳は *Aspergillus fumigatus* 28 株, *Aspergillus niger* 9 株, *Aspergillus flavus* 6 株, *Aspergillus terreus* 4 株, および *Aspergillus nidulans* 1 株である。分離株の同定は, サブローデキストロース寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン) 上に形成された集落の色調および形態, スライドカルチャー後のラクトフェノール・コットンブルー染色による鏡検と, Internal Transcribed Spacer 領域や必要に応じて  $\beta$ -tubulin 遺伝子の塩基配列をダイレクト・シーケンス法で解析し<sup>6,7)</sup>, 菌種を決定した。また精度管理用株には, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 および *Candida krusei* ATCC 6258 を, 参照菌株には, *A. fumigatus* ATCC MYA-3627 をそれぞれ使用した。なお本研究は, 札幌医科大学附属病院臨床研究審査委員会の承認を得て施行した (整理番号 : 272-116)。

## 2. CLSI に準拠した薬剤感受性試験 (CLSI 法)

### (1) 自家調整パネル

各薬剤の測定濃度範囲は, AMPH-B (和光純薬工業) 0.03~16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ITCZ (和光純薬工業) 0.015~8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , VRCZ (和光純薬工業) 0.015~8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , MCFG (アステラス製薬) 0.0039~4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とし, AMPH-B, ITCZ, VRCZ は Dimethyl Sulfoxide (和光純薬工業) を用いてそれぞれ溶解, MCFG は精製水で溶解した。各薬剤溶液を RPMI-1640 培地 (シグマ・アルドリッチ) に添加後, 96 穴 U 字マイクロプレートに充填し, これを CLSI 法の測定パネルとした。

### (2) 菌液調整法および培養条件

CLSI M38-A2 に従って, 薬剤感受性試験を行っ

た。即ち, ポテトデキストロース寒天培地 (極東製薬工業) で 35°C 好氣的条件, 48~72 時間培養した集落の表面に, 1 mL の滅菌生理食塩液を滴下後, Tween 20 (和光純薬工業) を 1 滴添加した。次に, 集落表面を綿棒で軽く擦過して菌液を作製し, これを滅菌チューブに採取した。その後, 得られた菌液を 3~5 分間静置し, 菌塊を沈殿させた後, 上清の吸光度を, 530 nm で 0.09~0.13 の範囲内に調整した。調整後の菌液を RPMI-1640 培地で 50 倍希釈し, その 100  $\mu\text{L}$  を自家調整パネルの各ウエルに接種した。接種後, パネルをプラスチックバッグに入れて, 35°C 好氣的条件で培養した。

### (3) 判定

24 時間培養後に MCFG の MEC を判定し, 48 時間培養後に AMPH-B, ITCZ および VRCZ の MIC を判定した。MCFG の MEC は, ウエル内の被検菌が顆粒状に発育する最小薬剤濃度を終末点として判定した。また, AMPH-B, ITCZ および VRCZ の判定では, 菌の発育を完全に阻止する最小薬剤濃度を MIC とした。さらに CLSI M59-ED1<sup>8)</sup>に記載された Epidemiological Cutoff Values (ECVs)<sup>9)</sup>を用い, 臨床分離された *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* および *A. terreus* を, AMPH-B, ITCZ, VRCZ に対する野生型 (Wild-Type : WT) と非野生型 (Non-Wild-Type : NWT) にそれぞれ分類し, 耐性獲得の有無を評価した。

## 3. 酵母様真菌薬剤感受性キットを用いた検討

酵母様真菌 DP '栄研' (栄研化学) (以下 DP) および酵母真菌薬剤感受性キット ASTY (極東製薬工業) (以下 ASTY) を使用した。各キットに CLSI 法と同様の菌濃度を接種し培養後, 感受性を判定した。DP を用いた判定は, CLSI 法と同様に実施した。また ASTY による判定では, 添付文書の方法を一部改変し, レサズリンの色調変化を指標とする判定, 即ち色調が変化しない青色の最小薬剤濃度を MIC, MEC とした。さらに CLSI 法と同様に菌の発育を指標とした判定も併せて行った。得られた MIC と MEC を基に, 各キット方法の MIC<sub>50</sub>/MEC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>/MEC<sub>90</sub>, 最頻値および測定範囲を示し, CLSI 法, DP および ASTY の 3 法間で比較した。各キット方法による成績が他法の成績よりも高い場合には「+管差の違い」, 低い場合には「-管差の違い」として評価した。また, Wang ら<sup>10)</sup>の方法に従って,

Table 1. MIC/MECs measured against quality control strains and the reference strain

Antifungal agent	Method	MIC/MEC <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ ) range/mode		
		<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
		ATCC 22019 <sup>b</sup>	ATCC 6258 <sup>c</sup>	ATCC MYA-3627 <sup>d</sup>
	Measuring times - no	1	1	10
Micafungin	CLSI	2	0.5	$\leq 0.0039-0.0078/0.0078$
	DP	2	0.12	$\leq 0.015/\leq 0.015$
	ASTY Colorimetry Growth	1	0.25	$\leq 0.03/\leq 0.03$ $\leq 0.03/\leq 0.03$
Amphotericin B	CLSI	2	2	1-2/1
	DP	0.5	1	0.5-1/0.5, 1
	ASTY Colorimetry Growth	1	1	0.5-1/0.5 0.5-1/0.5
Itraconazole	CLSI	0.25	0.5	$\geq 16/\geq 16$
	DP	0.12	0.25	$\geq 16/\geq 16$
	ASTY Colorimetry Growth	0.5	0.5	0.25- $\geq 16/1$ $\geq 16/\geq 16$
Voriconazole	CLSI	0.06	0.25	0.5-1/1
	DP	0.06	0.12	0.5-1/1
	ASTY Colorimetry Growth	0.06	0.5	0.25-1/0.5 0.25-1/1

<sup>a</sup> MEC: Minimum Effective Concentration was applied to determination of aspergillus susceptibility to micafungin.

<sup>b</sup> Recommended MIC limits and mode for *Candida parapsilosis* ATCC 22019 by CLSI M38-A2 were 0.5-4  $\mu\text{g/mL}$  and 1  $\mu\text{g/mL}$  for micafungin, 0.5-4  $\mu\text{g/mL}$  and 2  $\mu\text{g/mL}$  for amphotericin B, 0.12-0.5  $\mu\text{g/mL}$  and 0.25  $\mu\text{g/mL}$  for itraconazole, and 0.03-0.25  $\mu\text{g/mL}$  and 0.12  $\mu\text{g/mL}$  for voriconazole, respectively.

<sup>c</sup> Recommended MIC limits and mode for *Candida krusei* ATCC 6258 by CLSI M38-A2 were 0.12-0.5  $\mu\text{g/mL}$  and 0.25  $\mu\text{g/mL}$  for micafungin, 1-4  $\mu\text{g/mL}$  and 2  $\mu\text{g/mL}$  for amphotericin B, 0.25-1  $\mu\text{g/mL}$  and 0.25  $\mu\text{g/mL}$  for itraconazole, and 0.12-1  $\mu\text{g/mL}$  and 0.25  $\mu\text{g/mL}$  for voriconazole, respectively.

<sup>d</sup> Recommended MIC limits and mode for *Aspergillus fumigatus* ATCC MYA-3627 by CLSI M38-A2 were 0.5-4  $\mu\text{g/mL}$  and 2  $\mu\text{g/mL}$  for amphotericin B,  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  and  $> 16$   $\mu\text{g/mL}$  for itraconazole, and 0.25-2  $\mu\text{g/mL}$  and 0.5  $\mu\text{g/mL}$  in voriconazole, respectively. The MEC limit and mode for micafungin were not calculable according to the CLSI guideline.

$\pm 2$  管差内を MIC/MEC 一致の許容範囲とした。

## II. 結果

### 1. 精度管理

精度管理用株と参照株を用い、CLSI 法、DP および ASTY にて各薬剤の感受性をそれぞれ測定した。その結果、CLSI 法、DP ではすべてが許容範囲内であった。一方、ASTY では、*A. fumigatus* ATCC MYA-3627 において、ITCZ に対し、色調変化を指標として判定した場合に許容範囲外の MIC がみられたが、それ以外では許容範囲内の成績が得られた (Table 1)。

### 2. 各薬剤における MIC/MEC の分布

CLSI 法で各薬剤の感受性分布を解析した結果を Table 2 および Table 3 に示した。MIC<sub>50</sub>/MIC<sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) は、AMPH-B ; 1/2, ITCZ ; 0.5/1, VRCZ ; 0.5/1, MCFG の MEC<sub>50</sub>/MEC<sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) は、0.0078/0.015 であった。このうち、*A. fumigatus* に関しては、ITCZ と VRCZ の MIC がそれぞれ  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$ 、

2  $\mu\text{g/mL}$  を示す株が 1 株 (3.6%) 存在し、両薬剤とも NWT に分類された。その他の菌種においては、3 薬剤に対してすべて WT であった。

### 3. $\beta$ -tubulin 遺伝子の配列による NWT 株の解析

ITCZ および VRCZ が NWT に分類された *A. fumigatus* 1 株を対象とし、 $\beta$ -tubulin 遺伝子の塩基配列によって詳細に菌種を決定したところ、*A. fumigatus* と判定された (*A. fumigatus sensu stricto*)。

### 4. CLSI 法および酵母様真菌薬剤感受性キットを用いた MIC/MEC の比較

CLSI 法、DP および ASTY による MIC と MEC を比較した (Table 4)。3 法による各薬剤の判定では、ASTY で色調変化を指標とした場合、AMPH-B と VRCZ の成績において、MIC<sub>50</sub>/MEC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub>/MEC<sub>90</sub>、最頻値および測定範囲が、他法と比較して  $\pm 1$  管差内で一致した (Table 4)。しかし、ITCZ の判定では、測定範囲が  $\leq 0.015 \sim 1$  ( $\mu\text{g/mL}$ )、また、MCFG の判定では MIC<sub>50</sub>/MEC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub>/MEC<sub>90</sub>

Table 2. Distribution of the MICs of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole for 48 clinical isolates of *Aspergillus* spp.

Species	No. of isolates tested	Antifungal agent	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) distribution <sup>a</sup> :									MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	
			0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	$\geq 16$			
<i>A. fumigatus</i>	28	Amphotericin B				3 (10.7)	13 (46.4)	12 (42.9)				1	2	
		Itraconazole			3 (10.7)	20 (71.4)	4 (14.3)				1 (3.6)	0.5	1	
		Voriconazole				20 (71.4)	7 (25.0)	1 (3.6)				0.5	1	
<i>A. niger</i>	9	Amphotericin B				7 (77.8)	2 (22.2)				— <sup>b</sup>	—		
		Itraconazole				2 (22.2)	5 (55.6)	1 (11.1)	1 (11.1)				—	—
		Voriconazole				4 (44.5)	3 (33.3)	2 (22.2)				—	—	
<i>A. flavus</i>	6	Amphotericin B					4 (66.6)	2 (33.3)				—	—	
		Itraconazole			1 (16.7)	1 (16.7)	4 (66.6)				—	—		
		Voriconazole					6 (100)				—	—		
<i>A. terreus</i>	4	Amphotericin B					3 (75.0)	1 (25.0)				—	—	
		Itraconazole	1 (25.0)	1 (25.0)	1 (25.0)	1 (25.0)				—	—			
		Voriconazole			1 (25.0)	1 (25.0)	2 (50.0)				—	—		
<i>A. nidulans</i>	1	Amphotericin B						1 (100)				—	—	
		Itraconazole				1 (100)				—	—			
		Voriconazole		1 (100)				—	—					
All <i>Aspergillus</i> spp.	48	Amphotericin B				10 (20.8)	22 (45.8)	16 (33.3)				1	2	
		Itraconazole	1 (2.1)	1 (2.1)	5 (10.4)	25 (52.1)	13 (27.1)	1 (2.1)	1 (2.1)	1 (2.1)			0.5	1
		Voriconazole		1 (2.1)	1 (2.1)	25 (52.1)	18 (37.5)	3 (6.2)				0.5	1	

<sup>a</sup> The number of isolates and proportion.

<sup>b</sup> ‘—’ shows that the MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values could not be calculated as < 10 isolates were tested.

<sup>c</sup> MICs in the gray area denote a Non-Wild-Type isolate according to the CLSI guideline.

Table 3. Distribution of the MECs of micafungin for 48 clinical isolates of *Aspergillus* spp.

Species	No. of isolates tested	MEC <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ ) distribution <sup>b</sup> :			MEC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MEC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
		$\leq 0.0039$	0.0078	0.015		
<i>A. fumigatus</i>	28	8 (28.6)	11 (39.3)	9 (32.1)	0.0078	0.015
<i>A. niger</i>	9		6 (66.7)	3 (33.3)	— <sup>c</sup>	—
<i>A. flavus</i>	6	1 (16.7)	2 (33.3)	3 (50.0)	—	—
<i>A. terreus</i>	4		1 (25.0)	3 (75.0)	—	—
<i>A. nidulans</i>	1			1 (100)	—	—
All <i>Aspergillus</i> spp.	48	9 (18.8)	20 (41.6)	19 (39.6)	0.0078	0.015

<sup>a</sup> MEC: Minimum Effective Concentration was applied to determination of aspergillus susceptibility to micafungin.

<sup>b</sup> The number of isolates and proportion.

<sup>c</sup> ‘—’ shows that the MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values could not be calculated as < 10 isolates were tested.

Table 4. Susceptibilities ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of 48 clinical isolates of *Aspergillus* spp. to antifungal agents determined using three different methods

Species	No. of isolates tested	Antifungal agent	CLSI method			DP test			ASTY test							
			MIC <sub>50</sub> /MEC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub> /MEC <sub>90</sub>	Mode	Range	MIC <sub>50</sub> /MEC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub> /MEC <sub>90</sub>	Mode	Range	MIC <sub>50</sub> /MEC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub> /MEC <sub>90</sub>	Mode	Range		
All <i>Aspergillus</i> spp.	48	Amphotericin B	1	2	1	1	1	0.5-2	1	1	1	0.25-2	0.5	1	0.5	0.25-2
		Itraconazole	0.5	1	0.5	0.5	0.5	0.06- $\geq$ 16	0.5	0.5	0.5	0.25- $\geq$ 16	0.25	0.5	0.25	0.015-1
		Voriconazole	0.5	1	0.5	1	2	0.12-2	1	2	1	0.12-2	0.25	0.5	0.25	0.06-1
		Micafungin	0.0078	0.015	0.0078	0.015	0.015	$\leq$ 0.0039-0.015	$\leq$ 0.015	$\leq$ 0.015	$\leq$ 0.015	$\leq$ 0.015	$\geq$ 32	$\geq$ 32	$\geq$ 32	$\leq$ 0.03- $\geq$ 32

<sup>a</sup> MEC: Minimum Effective Concentration was applied to determination of aspergillus susceptibility to micafungin.

および最頻値がそれぞれ $\geq 32$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、測定範囲が $\leq 0.03 \sim \geq 32$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )となり、他法間との比較で $\pm 2$ 管差外であった (Table 4)。一方、ASTYの判定において菌の発育を指標とした場合、MIC<sub>50</sub>/MEC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub>/MEC<sub>90</sub>、最頻値および測定範囲が、 $\pm 2$ 管差内ですべて一致した (Table 4)。また、各検査法による対象株のMICを用いてWTとNWTに分類したところ、CLSI法でITCZおよびVRCZに対しそれぞれNWTに分類された *A. fumigatus* 1株は、DPとASTYいずれでもNWTに分類され、一致した結果であった。しかし、別の *A. fumigatus* 1株は、VRCZに対しCLSI法とASTYでWTであったが、DPでNWTと分類された。

### III. 考察

本検討では、当院で臨床分離された *Aspergillus* 属48株を対象としてAMPH-B、ITCZおよびVRCZに対する耐性獲得の有無を評価し、*A. fumigatus* 28株中1株 (3.6%)がITCZとVRCZに対してNWTに分類され、耐性因子の保有が示唆された。また、この株の菌種を詳細に決定する目的で、 $\beta$ -tubulin 遺伝子の塩基配列を解析したところ、*A. fumigatus* と判定された (*A. fumigatus sensu stricto*)。広義の *A. fumigatus* (*A. fumigatus complex*)のうち、一部の株ではアゾール系薬剤に高いMICを示すことが報告されており<sup>11)</sup>、現在、CLSIによる *Aspergillus* 属の薬剤感受性試験では、*A. fumigatus sensu stricto* に対するVRCZにのみブレイクポイントが設定されている<sup>12)</sup>。そこで、本菌種のVRCZに対する薬剤感受性を確認したところ、耐性と判定され、本薬剤では必ずしも治療効果が得られないと考えられた。

CLSIでECVsが設定されていない *A. nidulans* に関しては、Espinel-Ingroffらが提唱したECVs<sup>13,14)</sup> (AMPH-B:  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、ITCZ:  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、VRCZ:  $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ )を適用した場合、いずれの薬剤に対してもWTであった。米国を中心とした国際的なサーベイランス<sup>13)</sup>では、*A. fumigatus*のITCZとVRCZに対するNWTがそれぞれ3.6%、3.1%、本邦においてはそれぞれ7.1%、4.1%と報告されており<sup>2)</sup>、われわれの成績とはほぼ同等の結果であった。両薬剤のMIC分布についても、MIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub>を用い、これまでの報告<sup>2,13)</sup>と比較したところ、 $\pm 1$ 管差以内で一致し大きな差はみられなかった。一方、本検討にお

いて *A. fumigatus* を除く4菌種では、ITCZ, VRCZ に対する NWT は検出されなかった。米国での調査<sup>13)</sup>ではこれらの菌種において、*A. niger* の7.3% が ITCZ に対して NWT (MIC が  $8 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上) に分類された以外、NWT の割合は1%未満としている。また、田代ら<sup>15)</sup>は、本邦で臨床材料から分離された株において、ITCZ あるいは VRCZ の MIC が  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上を示す株は *A. niger* 107 株中1株、*A. terreus* 34 株中1株のみであり、*A. flavus* 16 株中には認められなかったと報告しており、*A. fumigatus* を除く4菌種では、少なくとも *A. niger* に関しては、分離された国・地域によりアゾール系耐性の違いがみられる可能性が考えられる。アゾール系の抗真菌薬は、慢性肺アスペルギルス症の患者において汎用されており、しばしば投与が長期化する。特に ITCZ に関しては、長期間の薬剤曝露による耐性因子の誘導、さらに他のアゾール系薬剤に対し交差耐性を示すことが確認されているため<sup>16)</sup>、薬剤感受性試験を定期的に行うことが望ましい。

本検討では、いずれの菌株においても AMPH-B に対してはすべて WT と判定された。MIC<sub>50</sub> と MIC<sub>90</sub> を既報<sup>2,14)</sup>の成績と比較しても  $\pm 1$  管差以内で一致し、感受性は良好である可能性が示唆された。一方、MCFG に関しては、いずれの *Aspergillus* 属においても CLSI による ECVs が設定されていない。そこで、Lockhart ら<sup>17)</sup>が提唱する *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* および *A. terreus* の MCFG に対する ECVs ( $0.03 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を適用し判定したところ、すべての株が WT であった。また今回得られた MEC<sub>50</sub> と MEC<sub>90</sub> を米国の報告<sup>17)</sup>と比較した結果、両者ともに一致した。現在、VRCZ と AMPH-B は侵襲性アスペルギルス症の治療で広く用いられている。MCFG に関しては、慢性肺アスペルギルス症の治療や、造血幹細胞移植後あるいは急性骨髄性白血病治療中の好中球減少症が持続する患者において、侵襲性アスペルギルス症の予防目的で選択されることがある<sup>18)</sup>。しかし、AMPH-B に対する MIC が  $\geq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、MCFG に対する MEC が  $\geq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$  を示す *Aspergillus* 属はそれぞれ本邦においても検出されており<sup>2,16)</sup>、さらにエキノキャンディン系薬剤に関しては使用により耐性化を誘導する可能性が指摘されている<sup>3,4)</sup>。分離菌に対し薬剤感受性試験を速やかに実施して、薬剤使用の可否を推定すること

は重要である。そして、今後標準化された ECVs が設定され、NWT を速やかに検出し、被検菌の低感受性化あるいは耐性獲得の予測が容易になることが望まれる。

また、市販の酵母様真菌薬剤感受性キットが *Aspergillus* 属にも転用可能かを併せて検討した。しかしながら、精度管理用株および参照菌株を用いて CLSI 法における精度管理を実施したところ、いずれの薬剤に対しても許容範囲内であったが、すべての株で各薬剤に対し最頻値を示しておらず (Table 1)、CLSI 法により得られた MIC や MEC の成績は必ずしも真値とはならない可能性が考えられた。そこで CLSI 法、DP および ASTY の3法間の成績を比較したところ、AMPH-B, VRCZ の判定で良好な結果を示した (Table 4)。一方、レサズリンの色調で判定した ASTY の場合、ITCZ の測定範囲、MCFG では MIC<sub>50</sub>/MEC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>/MEC<sub>90</sub>、最頻値および測定範囲の成績が CLSI 法、DP のそれと乖離がみられた (Table 4)。ASTY の添付文書では対象菌種を *Candida* 属菌および類縁酵母真菌のみとしており、接種培地中に含有されるレサズリン量の記載はない。日本医真菌学会は、糸状菌の薬剤感受性試験法として CLSI 法とは別に、ASTY と同様にレサズリンを添加してウエルの色調変化を指標に判定する方法を公開している<sup>19)</sup>。阿部ら<sup>20)</sup>は *Aspergillus* 属の MCFG に対する薬剤感受性試験法の比較検討において、日本医真菌学会による方法の成績は、CLSI 法によるそれと  $\pm 1$  管差以内で一致することを報告している。このことから、本検討における ASTY のレサズリン色調変化による成績が良好ではなかった原因として、ASTY に含有されるレサズリン量では、ウエルの色調変化は必ずしも *Aspergillus* 属の発育と相関しない点が考えられたが、詳細は不明であった。そこで CLSI 法と同様に、菌の発育を指標として改めて ASTY の判定を行った結果、成績が明らかに改善した (Table 4)。この点より、DP および ASTY いずれの方法でも同様に結果が得られるが、ASTY を使用して薬剤感受性を測定する場合には、少なくとも ITCZ および MCFG の判定において、菌の発育を指標とする方法でなければ精度は低く不適と考えられた (Table 4)。また、CLSI 法、市販キット2法を用いて WT と NWT の分類を実施したところ、不一致がみら

れたのは48株中1株(2.1%)のみであり、VRCZの感受性でCLSI法とASTYでWT, DPでNWTと分類された。以上より、DPおよび菌の発育を指標とした場合のASTYは*Aspergillus*属に対して十分な性能を有していると考えられた。

本検討の結果、ITCZとVRCZに対する耐性獲得を示唆するNWTの*A. fumigatus*が1株確認された。さらに、市販の酵母様真菌薬剤感受性キットを用いた場合でも*Aspergillus*属の感受性は判定可能であると考えられた。また、検査の簡便化を図る目的で、今後さらに検証を重ね、DPやASTYを*Aspergillus*属に転用する際の標準化が必要と考える。このことにより、*Aspergillus*属の薬剤感受性試験が広く実施され、適切な真菌感染症の治療に寄与されることが望まれる。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

## 文献

- 1) Denning D W, Venkateswarlu K, Oakley K L, Anderson M J, Manning N J, Stevens D A, et al: Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1364-8
- 2) Tashiro M, Izumikawa K, Minematsu A, Hirano K, Iwanaga N, Ide S, et al: Antifungal susceptibilities of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates obtained in Nagasaki, Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 584-7
- 3) Arendrup M C, Perkhofer S, Howard S J, Garcia-Effron G, Vishukumar A, Perlin D, et al: Establishing *in vitro-in vivo* correlations for *Aspergillus fumigatus*: the challenge of azoles versus echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 3504-11
- 4) Arendrup M C, Garcia-Effron G, Buzina W, Mortensen K L, Reiter N, Lundin C, et al: Breakthrough *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* double infection during caspofungin treatment: laboratory characteristics and implication for susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 1185-93
- 5) Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard, 2<sup>nd</sup> ed. CLSI M38-A2, Wayne, PA, 2008
- 6) Hsiao C R, Huang L, Bouchara J P, Barton R, Li H C, Chang T C: Identification of medically important molds by an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3760-8
- 7) Balajee S A, Gribskov J L, Hanley E, Nickle D, Marr K A: *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell* 2005; 4: 625-32
- 8) Clinical and Laboratory Standards Institute: Epidemiological cutoff values for antifungal susceptibility testing, 1<sup>st</sup> ed. CLSI supplement, M59, Wayne, PA, 2016
- 9) Clinical and Laboratory Standards Institute: Principles and procedures for the development of epidemiological cutoff values for antifungal susceptibility testing, 1<sup>st</sup> ed. CLSI supplement, M57, Wayne, PA, 2016
- 10) Wang H C, Hsieh M I, Choi P C, Wu C J: Comparison of the Sensititre YeastOne and CLSI M38-A2 microdilution methods in determining the activity of amphotericin B, itraconazole, voriconazole, and posaconazole against *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2018; 56: e00780-18
- 11) Yoshida H, Seki M, Umeyama T, Urai M, Kinjo Y, Nishi I, et al: Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus lentulus*: Successful treatment of a liver transplant patient. *J Infect Chemother* 2015; 21: 479-81
- 12) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, 2<sup>nd</sup> ed. CLSI supplement, M61, Wayne, PA, 2020
- 13) Espinel-Ingroff A, Diekema D J, Fothergill A, Johnson E, Pelaez T, Pfaller M A, et al: Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3251-7
- 14) Espinel-Ingroff A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Ghannoum M, Johnson E, et al: Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 5150-4
- 15) 田代将人, 泉川公一: 薬剤耐性アスペルギルス の現状. *真菌誌* 2016; 57: J103-12
- 16) Tashiro M, Izumikawa K, Hirano K, Ide S, Mihara T, Hosogaya N, et al: Correlation between triazole treatment history and susceptibility in clinically isolated *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 4870-5
- 17) Lockhart S R, Zimbeck A J, Baddley J W, Marr K A, Andes D R, Walsh T J, et al: *In vitro* echinocandin susceptibility of *Aspergillus* isolates from patients enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 3944-6
- 18) Patterson T F, Thompson G R III, Denning D W, Fishman J A, Hadley S, Herbrecht R, et al: Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2016; 63: e1-60
- 19) 篠田孝子, 久米 光, 福島和貴, 島田慈彦, 村瀬勢津子, 内田勝久, 他: 日本医真菌学会標準化委員会報告(1995~1997年). 糸状菌の抗真菌薬感受性試験法. *真菌誌* 1999; 40: 243-6
- 20) 阿部美知子, 小川善資, 田沼弘之, 山崎敏和, 久米 光: ミカファンギン(MCFG)の感受性

測定に関する検討。真菌誌 2008; 49: 111-8

## Distributions of the minimum inhibitory concentrations and minimum effective concentrations of antifungal agents against *Aspergillus* spp. in Hokkaido: comparative study of the performance between a home-made plate and commercial kit for susceptibility testing of yeasts

Yuki Yakuwa<sup>1)</sup>, Natsuki Narumi<sup>1)</sup>, Yuki Sato<sup>1)</sup>, Masachika Saeki<sup>1)</sup>,  
Shinya Nirasawa<sup>1)</sup>, Yoshihiro Fujiya<sup>2,3)</sup> and Satoshi Takahashi<sup>1,3)</sup>

<sup>1)</sup> Division of Laboratory Medicine, Sapporo Medical University Hospital, 291 South-1, West-16 Chuo-ku, Sapporo, Hokkaido, Japan

<sup>2)</sup> Infectious Disease Center, Hokkaido Institute of Public Health

<sup>3)</sup> Department of Infection Control and Laboratory Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine

The distributions of the minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum effective concentrations (MECs) of amphotericin B (AMPH-B), itraconazole (ITCZ), voriconazole (VRCZ), and micafungin (MCFG) for 48 clinical isolates of *Aspergillus* spp. in Hokkaido were determined in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline. In addition, we also evaluated whether commercially available kits for yeast-like fungus drug susceptibility testing could be used for *Aspergillus* spp.. The CLSI method adopted with the home-made plate indicated that the MIC<sub>50</sub>/MIC<sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) for *A. fumigatus* was 1/2 for AMPH-B, 0.5/1 for ITCZ, and 0.5/1 for VRCZ, and that the MEC<sub>50</sub>/MEC<sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) was 0.0078/0.015 for MCFG. The MICs of ITCZ and VRCZ for one isolate of *A. fumigatus* (3.6%) were  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$  and  $2 \mu\text{g/mL}$ , respectively, and this isolate was classified as a Non-Wild-Type (NWT), with acquired resistance to the two drugs. The two log<sub>2</sub> dilutions among the CLSI method, yeast-like fungus DP testing (DP), and testing using the yeast-like fungus drug susceptibility test kit ASTY (ASTY) based on fungal growth as an indicator were fully matched. Moreover, the isolate classified as a NWT based on the MICs of ITCZ and VRCZ determined by the CLSI method was also classified as a NWT by both DP and ASTY, and the results were consistent. In the comparison of the three different methods, only one isolate was classified as a NWT by DP and as a WT by the CLSI method and ASTY. Thus, DP and ASTY can be useful alternatives to the CLSI method for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* spp..