

[総 説]

抗真菌薬感受性試験の現状と課題

山口英世

帝京大学医真菌研究センター

(平成 16 年 10 月 5 日受付)

近年、抗真菌薬のクラスや品数が徐々に増える一方で、主要な治療薬に対して低感受性または耐性を示す菌種または菌株を含む病原真菌に起因する深在性真菌症の発生率は上昇の一途をたどっている。これらの理由から、抗真菌薬感受性試験の重要性が増し、米国 NCCLS を中心に、酵母および糸状菌の感受性試験標準法の開発が進められてきた。その結果、酵母の感受性試験に関して大きな成果が得られ、特に *Candida* spp. とアゾール系薬または 5-FC との組み合わせにおいては、MIC と臨床効果との間に良好な相関性が確認されている。その一方、AMPH および糸状菌に関しては、それぞれいかなる真菌および抗真菌薬と組み合わせても明らかな *in vitro-in vivo* 相関性は得られていない。それ以上に大きな問題は、上市されて間もないとはいえすでに主要抗真菌薬の一つとして繁用されているキャンディン系薬（わが国のミカファンギン、欧米の caspofungin）について酵母、糸状菌とも感受性試験法が標準化されていないことである。こうした抗真菌薬感受性試験の現状と今後の課題を論考した。

Key words: 抗真菌薬、感受性試験、病原真菌、NCCLS M27-A, *in vitro-in vivo* 相関性

はじめに

細菌感染症の治療薬すなわち抗細菌薬についての薬剤感受性試験による最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は、30 年以上も前から日常検査として広く実施されてきた。(i) 最適薬剤および使用法 (用法・用量) の選択, (ii) 耐性菌出現状況の疫学的調査, (iii) 薬剤の薬動力学 (PK/PD) 解析, (iv) 新しい薬剤の探索・開発研究, などに必要不可欠だからである。一方、抗真菌薬については、深在性真菌症起因菌の分離率が低いことや治療に使える薬剤の種類がごく少数に限られることなどの理由から、感受性試験に対する関心は低いままにとどまっていた。しかし 1980 年代以降、深在性真菌症の発生率の上昇、新しい抗真菌薬の相次ぐ臨床導入、抗真菌薬（特にアゾール系薬）耐性菌の出現といった新しい状況が生まれるとともに、再現性が高く、しかも臨床的にも意味のある抗真菌薬感受性試験

法の必要性に対する臨床医や検査スタッフの認識も徐々に高まりつつあるように思われる。

近年、米国 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) を中心として精力的に進められてきた酵母および糸状菌の感受性試験法に関する検討は、それぞれ M27 および M38 と呼ばれる標準法として実を結んだ。いずれも再現性の点はいうに及ばず、*Candida* spp. とアゾール系薬といった特定の組み合わせについては *in vitro* 感受性と *in vivo* 臨床効果との間に、抗細菌薬の場合と同様の良好な相関性が見られることが確かめられた^{1,2)}。その結果、抗真菌薬感受性試験への関心と試験実施の必要性は一段と高まりつつある。しかし上記の組み合わせ以外の多くの真菌-抗真菌薬の組み合わせについては明確な *in vitro-in vivo* 相関性が得られていないこと、キャンディン系抗真菌薬の感受性試験法がいまだに標準化されていないことなど、今後に残された未解決の重要な問題も少なくない。

本稿では、まず国内において臨床導入されている深在性真菌症治療用の抗真菌薬と薬剤耐性についての話題を紹介し、つづいて本論ともいえるべき抗真菌薬感受性試験を巡る現在の状況と今後の検討課題について概説する。

著者連絡先: (〒192-0395) 東京都八王子市大塚 359
帝京大学医真菌研究センター
山口英世
TEL: 0426-76-3003
FAX: 0426-74-9190
E-mail: hyamaguc@main.teikyo-u.ac.jp

I. 現在の抗真菌薬と病原真菌における薬剤耐性

1. 国内で上市されている抗真菌薬

2004年9月現在、わが国では4クラス合わせて7種の抗真菌薬が何らかの深在性真菌症に対して適用承認され、臨床に導入されている(表1)。このうちミカファンギン(micafungin; MCFG)(注射剤)とホスフルコナゾール(fosfluconazole)(注射剤)は最近になって国内上市を果たした新規抗真菌薬なので、若干解説を加える。

MCFGは、図1に示す構造式からも分かるように、既存の抗真菌薬のいずれとも異なり、リボペプチドすなわち環状ペプチド部分と疎水性のアシル基側鎖部分からなる化合物である。このような基本構造をもつ抗真菌化合物は、一般にキャンディン系(candins)と総称され、MCFGのほかにはcaspofungin(CAS; 欧米ですでに上市)やanidulafungin(欧米で承認申請中)がある。MCFGは他のキャンディン系薬と同様に、真菌細胞壁の主要骨格多糖成分として知られる1,3- β -D-グルカン合成酵素を選択的な作用標的とし、細胞壁の新生を障害し、壁を破壊する³⁾。MCFGの抗真菌スペクトルはAMPHやITCZよりもやや狭いが *Candida* spp. および *Aspergillus* spp. といった主要な深在性真菌症起病因菌に対して低濃度で殺菌的または静菌的に働

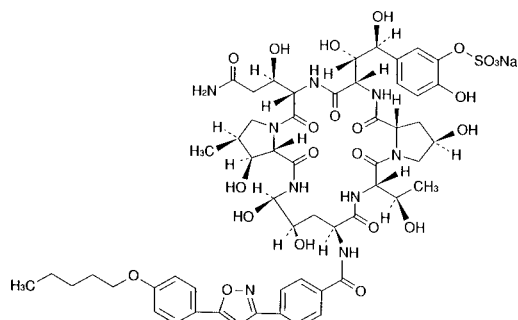


図1 ミカファンギン(micafungin)の化学構造

ミカファンギンはキャンディン系抗真菌薬の共通の特徴として、6つのアミノ酸でできた環状ペプチド部分と疎水性のアシル基側鎖部分からなるリボペプチド構造をもち、水と脂質の双方に溶けやすい性質(両親媒性)を示す。その結果、ミカファンギンは真菌の細胞膜に埋め込まれている標的分子1 $\rightarrow$ 3- β -D-グルカン合成酵素に容易に到達して阻害作用を発揮する。

く^{4,5)}。この強力な *in vitro* 活性に対応して、深在性カンジダ症およびアスペルギルス症の動物モデルにおいても十分な *in vivo* 活性を示した⁴⁾。さらに臨床試験によって両疾患の各種病型に対する予想どおりの治療効果ならびに高い安全性が確認され⁶⁾、2002年12月に

表1 現在国内で深在性真菌症の治療に用いられる抗真菌薬と主な作用メカニズム

クラス	薬 剤	上市年	主な作用メカニズム	
			標的分子	結 果
ポリエン系	アムホテリシン B (amphotericin B; AMPH)	1962 年	細胞膜エルゴステロール	細胞膜機能障害
フロロピリミジン系 (ピリミジンアナログ)	フルシトシン (flucytosine; 5-FC)	1979 年	チミジン酸合成酵素	DNA 合成阻害
アゾール系	ミコナゾール (miconazole; MCZ)	1986 年	ラノステロール 14 α -デメチラーゼ (P450 _{14DM})	エルゴステロール合成阻害 ↓ 細胞膜機能障害
	フルコナゾール (fluconazole; FLCZ)	1989 年		
	イトラコナゾール (itraconazole; ITCZ)	1993 年		
	ホスフルコナゾール (fosfluconazole)	2004 年		
キャンディン系	ミカファンギン (micafungin; MCFG)	2002 年	1,3- β -D-グルカン合成酵素	1,3- β -D-グルカン合成阻害 ↓ 細胞壁構造障害

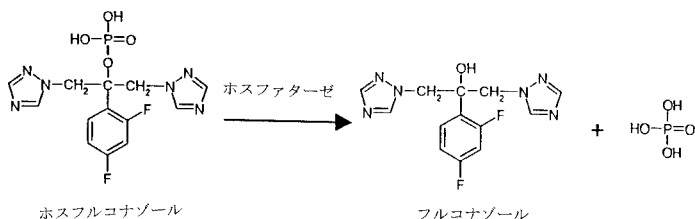


図2 ホスフルコナゾール (fosfluconazole) の化学構造とホスファターゼによるフルコナゾールへの変換
ホスフルコナゾールはフルコナゾールの水酸基をリン酸エステル化したプロドラッグであり、生体内ではホスファターゼによって速やかにしかもほぼ完全に加水分解されてフルコナゾールに変換される。

国内で上市された（米国では現在承認申請中）。MCFG の *in vitro* 抗カンジダ活性は全体的にはすべての既存抗真菌薬を上回るが、菌種（特に *C. parapsilosis* や *C. guilliermondii*）によっては菌株間で MCFG 感受性により大きな相違が見られることから^{4,5)}、感受性測定の必要性が望まれている。

ホスフルコナゾールは、2004 年 1 月に発売が開始されたばかりの最も新しい抗真菌薬である。図 2 に示されるように、FLCZ をプロドラッグ化した薬剤であるが、FLCZ よりも水溶性が著しく高いことから、投与量が FLCZ の 1/40 で済み、ボラス投与も可能なことや、初回投与量・維持量ともに FLCZ の場合を上回る用量が承認されているので高用量療法が可能になったことなどの利点をもつ⁷⁾。また各種病型の深在性カンジダ症およびクリプトコッカス症を対象とする臨床試験においても、良好な治療成績が得られた⁷⁾。薬剤感受性の観点からは、FLCZ 療法が奏効しなかった低感受性株による感染でもホスフルコナゾールの高用量投与に反応する可能性が注目される。

2. 抗真菌薬耐性、特にアゾール耐性

薬剤耐性ととりわけ 2 次耐性の問題が最も大きな関心事となっている抗真菌薬は、アゾール系薬である。現行の抗真菌薬化学療法における中心的な薬剤であることに加えて、このクラスの薬剤間にしばしば交叉耐性が見られることによる。表 2 にアゾール系薬その他の抗真菌薬の主な耐性メカニズムをまとめた。その詳細については、最近の拙著総説⁸⁾などを参照されたい。

深在性真菌症の治療には、二つのアゾール系抗真菌薬、すなわち *Candida albicans* をはじめとする *Candida* spp. および *Cryptococcus neoformans* を主たる有効菌種とするフルコナゾール (fluconazole; FLCZ), ならびにこれらの酵母のほか *Aspergillus fumigatus* その他の *Aspergillus* spp. などの糸状菌に対しても活性をもつイトラコナゾール (itraconazole; ITCZ) による単独治療法またはアムホテリシン B (amphotericin B; AMPH) との併用が最も広く行われている。アゾー

ール系薬に対しては、*C. krusei* や *C. glabrata* の臨床分離株の多くが低感受性（1 次耐性）を示すが、*C. albicans* などの感性菌においては耐性獲得（2 次耐性）は一般に起こりにくいとされてきた。しかし 1980 年代末頃から、口腔咽頭カンジダ症 (OPC) を併発して FLCZ の反復投与を受けた HIV 感染者から FLCZ 耐性または他のアゾール系薬にも交叉耐性を示す *C. albicans* 株が高頻度に分離されるようになり^{9,10)}、この耐性問題がにわかに注目を浴びるに至った¹¹⁾。その後 NCCLS M27-A¹²⁾ ガイドラインとして酵母の抗真菌薬感受性試験法が国際的に標準化され、アゾール系薬耐性の基準が明確になったこと（後述）も加わって、アゾール耐性株に関する疫学調査ならびに耐性の分子メカニズムの研究が急速に進展しつつある。最近の国内での調査によれば、FLCZ および（または）ITCZ に耐性を示す臨床分離株の出現頻度は、*C. albicans* で 0.6%、最も高い *C. tropicalis* や *C. glabrata* で 3~4% 程度である¹³⁾。

アゾール系薬のなかでは FLCZ に対する 2 次耐性が *C. albicans* を中心に最も広く見られ、耐性メカニズムの研究も盛んに行われてきた。アゾール系薬の標的分子は、スクワレンからエルゴステロールに至るエルゴステロール生合成経路を構成する主要酵素の一つ、ラノステロール 14 α -デメチラーゼ (cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase; P450_{14DM})、である。従来はこの標的酵素（コードする遺伝子は *CYP51A1* または *ERG11* と標記される）および（または）同じ生合成経路上のほかの酵素の変化がアゾール耐性に多くかかわると考えられていた。しかし最近になって、アゾール系薬に対する透過性の変化による細胞内薬剤濃度の低下が耐性メカニズムとしてより大きな役割をもつことが判明している。この透過性の変化は、主として 2 つの排出ポンプシステムである ABC トランスポーター (ATP-binding cassette transporters) および MF (major facilitators) のいずれかまたは両者の機能亢進による。

表2 各クラス抗真菌薬に対する主要病原真菌の2次耐性に関与する菌群(種・属)別の分子メカニズム

抗真菌薬		菌群(種・属)別にみた2次耐性の分子メカニズム		
クラス	薬 剤	<i>C. albicans</i> そのほかの <i>Candida</i> spp.	<i>Cr. neoformans</i>	<i>A. fumigatus</i> そのほかの <i>Aspergillus</i> spp.
アゾール系	フルコナゾール	• P450_{14DM}^{a)}の量的/質的变化(<i>ERG11</i>の過剰発現/変異) • ABCT^{b)}/MF^{c)}の機能亢進(<i>CDRs</i>^{d)}/<i>MDR1</i>の過剰発現)	• P450_{14DM}の量的または質的变化(<i>ERG11</i>の過剰発現/変異)	— ^{e)}
	イトラコナゾール	• P450_{14DM}の量的/質的变化(<i>ERG11</i>の過剰発現/変異) • ABCT および/または MF の機能亢進(<i>CDRs</i>の過剰発現)	不 明	• P450_{14DM}の量的または質的变化(<i>ERG11</i>の過剰発現/変異) • ABCT の機能亢進(<i>CDRs</i>の過剰発現)
ポリエン系	アムホテリシン B	細胞膜におけるエルゴステロール含量の低下/ステロール組成の変化	• エルゴステロール生合成経路の異常(<i>ERG2</i>変異による$\Delta^{8,7}$-sterol isomeraseの欠損/<i>ERG3</i>変異によるΔ^5-sterol desaturaseの欠損)	不 明
フロロピリミジン系	フルシトシン	Uracil phosphoribosyl transferase 活性の低下/欠損	• UMP-pyrophosphorylase 活性の低下/欠損 • Uracil phosphoribosyl transferase 活性の低下/欠損 • Cytosine permease/cytosine deaminase 活性の低下/欠損	—
キャンディン系	ミカファンギン	• 1,3-β-D-glucan synthase の変化(<i>FKS1</i>の点変異) • ABCT の機能亢進(<i>CDRs</i>の過剰発現)	—	不 明

a) lanosterol 14 α -demethylase; b) ATP-binding cassette transporters; c) major fascilitors; d) CDR 遺伝子群特に *CDR1* および *CDR2*; e) 2次耐性未確認

アゾール耐性 *C. albicans* 臨床分離株においては、多くの場合、複数の耐性メカニズムが同時に働いていると考えられる。米国での OPC 発症 AIDS 患者由来の FLCZ 高度耐性株 (MIC, $\geq 64 \mu\text{g/ml}$) の解析によると、(i) 排出ポンプ遺伝子(*CDR1/CDR2, MDR1*)の過剰発現を主とするものが85%、(ii) P450_{14DM}のアミノ酸置換(*ERG11*の点変異)または増量(*ERG11*の過剰発現)を示すものがそれぞれ65%および35%であり、この結果から高度耐性株の75%では複数の

耐性メカニズムが組み合わされていることが示された¹⁴⁾。複数耐性メカニズムをもつ高度耐性株の存在は、国内分離株の解析でも確認されている¹⁵⁾。

各耐性メカニズムに関与する変化は、薬剤の選択圧にさらされる時間の経過とともに段階的に積み重なって生じると考えるのが妥当である。一部の症例について追跡した結果からは、(i) *MDR1*の過剰発現、(ii) *ERG11*の点変異または過剰発現、(iii) *CDR1*の過剰発現、の順に耐性メカニズムが次々とつけ加わったこ

とが示されている¹⁶⁾。

5-FCについては、アゾール系薬以上に耐性化が起こりやすいことが以前から知られている。*Candida* spp. や *C. neoformans* の 5-FC 耐性株の出現頻度は、地域差が大きいものの、5~40% の範囲にあって、既存抗真菌薬のなかで最も高い¹⁷⁾。特に *C. albicans* においてはかつて臨床分離株の 10% が 1 次耐性を示し、30% が 5-FC 治療中に 2 次耐性化すると推定されていた¹⁸⁾。しかし近年 5-FC の使用が著しく減っているためか、最近の国内分離株の調査では 5-FC 耐性を示すものがほとんど検出されていない¹³⁾。

II. 酵母の抗真菌薬感受性試験法

1. NCCLS M27 標準法の方法論と臨床的意義

冒頭に述べたように、酵母の抗真菌薬感受性試験の標準化に関する検討は、1880 年代後半から米国 NCCLS において進められた。その目標は、当時米国で上市されていた AMPH, 5-FC, ケトコナゾール (ke-toconazole; KCZ), ITCZ, FLCZ の 5 薬剤を試験対象薬としてその試験結果に影響を与える可能性のあるさまざまな変動要因 (試験培地の組成・pH, 接種菌量, 培養温度・時間, 終末点判定基準など) を一つ一つ基準化して再現性の高い測定条件を組み立て、これを標準法と定めることにあった。5 年以上の年月をかけて多くの検討を重ねた結果、1992 年の Proposed Stan-

dard (M27-P) から 1995 年の Tentative Standard (M27-T)¹⁹⁾ を経て、1997 年に Approved Standard (M27-A)¹²⁾ (表 3) の発表に至った。M27-A は、米国のみならず世界的にも広く標準法として受けられている。

抗真菌薬感受性試験法と比べ多場合の M27-A 法の最も大きな特徴は、MIC 終末点の判定基準にある。目視による完全阻止 (分光光度計測定での $IC_{>95-100}$) を基準とする AMPH を別にすれば、いずれの抗真菌薬についても特定レベルの部分的阻止を終末点とし、しかもマクロ液体希釈法 (マクロ法) とミクロ液体希釈法 (ミクロ法) とでは目視での顕著な発育減少と判読されるレベルが分光光度計測定ではそれぞれ 80% 阻止 (IC_{80}), 50% 阻止 (IC_{50}) とことなる。このようにマクロ法とミクロ法とで別々の終末点判定基準をもつことには違和感もあるが、最終的には目視判定の結果を重視するかたちで、その採用が決まった^{20~23)}。幸いなことに、アゾール系薬や 5-FC に関してはこの判定基準 (特にミクロ法での IC_{50}) に従って得られた MIC と臨床効果との間に良好な相関性が成り立つことがやがて判明し、基準設定の妥当性が支持される結果となった。このように抗真菌薬の場合には (抗細菌薬とはことなり) 薬剤の種類・クラスによって (AMPH vs. アゾール系薬または 5-FC), また試験フォーマットによっても (マクロ法 vs. ミクロ法), MIC 終末点の判

表 3 酵母の抗真菌薬感受性試験の NCCLS 標準法 (M-27A)^{a)} の要点

変動要因など	基準化された条件
● 適応菌種 ● 測定フォーマット ● 試験培地 ● 接種菌量 ● 接種菌量の標準化 ● 培養温度 ● 培養時間	<i>Candida</i> spp. その他の酵母菌種 マクロ液体希釈法またはミクロ液体希釈法 RPMI1640 (0.164 M MOPS 緩衝液で pH 7.0 に調整) $0.5 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^3$ CFU/ml 分光光度計により McFarland 0.5 に調整 ($1 \sim 5 \times 10^6$ 細胞 /ml に相当) 35°C 48 時間 (<i>Candida</i> spp.), 72 時間 (<i>C. neoformans</i>)
● 終末点	目視で濁りなし (AMPH) 約 80% 濁度減少 (5-FC およびアゾール系薬剤のマクロ液体希釈法) 顕著な濁度の減少 (5-FC およびアゾール系薬剤のミクロ液体希釈法) ^{a)}
● 試験対象薬剤	AMPH, 5-FC, KCZ, ITCZ, FLCZ
● 培地の改変に関する補足	① AMPH に対する <i>Candida</i> spp. の感受性測定においては、Antibiotic Medium3 (AM3) 液体培地を用いると、耐性株の検出が容易になる。 ② すべての薬剤に対する <i>C. neoformans</i> の感受性測定においては、Yeast Nitrogen Base (YNB) 液体培地を用いると増殖が促進され、MIC 値の臨床的関連性が改善する。 ③ すべての薬剤に対するすべての菌種の感受性測定において、培地にグルコース (20 g/L) を加えると、終末点の判定容易になる。

^{a)} 分光光度計測定の 50% 濁度減少 (50% 発育阻止; IC_{50}) に相当。

定基準が変わってくることを知っておく必要がある。

再現性よく試験薬の MIC を測定できることが感受性試験標準法の備えるべき第 1 の必要条件であることは論をまたないところである。しかしいくら MIC を測定することができたとしても、そのデータが臨床的に意味のあるもの、すなわち実際に患者に投与した場合の治療効果と関連するもの、でなければほとんど価値はない。この問題については、NCCLS M27 ガイドラインにおける感受性試験の方法論がほぼ固まった段階で、さまざまな薬剤と酵母菌種（または菌属）の組み合わせを対象に、広汎な臨床的検討が行われた。その結果、MIC 値と治療効果との相関性（*in vitro-in vivo* 相関性）の有無または良否は、次項および次々項で述べるように、薬剤-真菌（菌種・属）組み合わせによってさまざまであることが判明している。

2. 各種抗真菌薬 vs. *Candida* spp. での *in vitro-in vivo* 相関性

FLCZ, ITCZ といったアゾール系薬ならびに 5-FC と、*C. albicans* をはじめとする *Candida* spp. との間にはかなり良好な *in vitro-in vivo* 相関関係が見られることから¹⁾、NCCLS M27-A ガイドラインにはこれらの各薬剤についてブレイクポイントが記載されるようになった（表 4）。とくに FLCZ や ITCZ については、OPC²⁴⁻²⁷⁾ および侵襲性カンジダ症（重篤な深在性カンジダ症）²⁸⁾ における臨床データの解析に基づいてそれがなされている。最近、膣カンジダ症についても同様の相関性が得られている²⁹⁾。

アゾール系薬でのブレイクポイントに関して注目されるのは、感性 (susceptible; S) と耐性 (resistant; R) の間に用量依存的感性 (susceptible-dose dependent; S-DD) という新しい感受性カテゴリーが設けられている点である（表 4）。S-DD の概念は、高 MIC 分離株にとって血中または組織内の薬剤が十分な高濃度に到達することの治療的重要性を強調している。ここで注意しなくてはならないのは、同じアゾール系薬といいながら FLCZ と ITCZ とではブレイクポイントが全く異なる点である。表 4 に示されているように、FLCZ

と ITCZ の各感受性カテゴリーの MIC を比較すると、S の上限値は 8 vs. 0.125 $\mu\text{g/ml}$, R の下限値は 64 vs. 1 $\mu\text{g/ml}$, いずれも 60 倍以上の開きがある。このことからだけでも単純に MIC のみで有効性の予知や治療薬の選択を行ってはならないことが分かる。なお 5-FC については、S-DD というカテゴリーはなく、S と R の中間に相当するものとして中等度耐性 (intermediate; I) のカテゴリーが設けられている。

近年 FLCZ をはじめとして各抗真菌薬の薬物動態学的解析が急速に進んでいる。この解析はもともと薬剤の血中濃度と MIC を総合して治療効果を予測することを目的としているが、MIC と治療効果との相関性を知るうえでも役に立つ。薬剤の種類によって最大の相関性が得られる薬物動態パラメーターは異なるが、FLCZ についてのマウス感染モデルでの検討からは、 β -ラクタム系薬などと同様に、AUC/MIC がそれに該当することが示されている²²⁾。

In vitro-in vivo 相関性に関して、FLCZ と対極をなすのは AMPH である。*Candida* spp. に対する AMPH の MIC とカンジダ症治療効果との間に明白な相関性を見つけ出すことは今もって困難である。AMPH 耐性は、1970 年代から 1990 年代に至るまで *C. lusitanae*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* などの non-*albicans Candida* 分離株において *in vitro* でも *in vivo* でも確かに認められるので³¹⁻³⁹⁾、*in vitro-in vivo* 相関関係が成り立っても決しておかしくない。それを見出せない大きな理由の一つは、NCCLS M27-A 法の AMPH 耐性株選別能力に限界があることである。その後、試験培地を RPMI1640 から Antibiotic Medium 3 (2% グルコース添加, 0.1 M-リン酸緩衝液で pH 7.0 に調整) に代えて 24 時間後のみ終末点判定を行うという方法で改善が図れるとして、M27-A ガイドラインでも推奨されているが、その適否に関しては異論が少なくない。

薬剤感受性試験の臨床的価値については、30 年以上の研究の歴史をもつ抗細菌薬の領域で「90-60 の法則」という言葉で臨床効果予測の精度を表すことがあ

表 4 NCCLS M27-A ガイドラインに提示された各種抗真菌薬の *Candida* spp. に対する MIC ブレイクポイント

抗真菌薬	感受性カテゴリー, MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	感性 (S)	用量依存的感性 (S-DD)	中等度耐性 (I)	耐性 (R)
フルコナゾール (FLCZ)	≤ 8	16~32	—	64 $\leq$
イトラコナゾール (ITCZ)	≤ 0.125	0.25~0.5	—	1 $\leq$
フルシトシン (5-FC)	≤ 4	—	8~16	32 $\leq$

る⁴⁰⁾。この言葉は、当該抗細菌薬が感性分離株の感染症の約 90% に、一方、耐性分離株の感染症では約 60% に、各々奏効することを意味している。使用薬剤の臨床効果が、「100-0 の法則」ではなく「90-60 の法則」に従う理由としては、薬剤の使用法や薬物動態（特に感染部位への送達、クリアランス）、宿主の感染防御能、などの違いが考えられる。いずれにせよ、アゾール系薬と *Candida* spp. のような特定の組み合わせに関しては、薬剤感受性は抗細菌薬におけるのと同様の予知的有用性をもつといってよからう。

3. 各種抗真菌薬 vs. *C. neoformans* での *in vitro*-*in vivo* 相関性

Candida spp. に比べると、*C. neoformans* の各抗真菌薬に対する耐性株の出現頻度はかなり低いとされている。しかし低頻度とはいえ、*C. neoformans* の AMPH 耐性分離株^{41, 42)}および FLCZ 耐性分離株^{43~46)}が報告されている。

M27-A ガイドラインに記されているように、*C. neoformans* の抗真菌薬（AMPH を除く）感受性の測定には、YNB 培地を用いるほうがより好適とされている（表 3）。アゾール系薬のなかでは FLCZ についてのみ、MIC と臨床効果との関係を検討した成績が少数ながら報告されている^{45~47)}。これらの報告を総合す

ると、*in vitro*-*in vivo* 相関性は RPMI1640 培地では得られないが、YNB 培地では良好であること、また MIC が 2~4 $\mu\text{g/ml}$ になると治療不成功例が見られるようになり、 $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ ではほぼ全例が治療に反応しなくなることが認められる。しかし現在のところ MIC ブレークポイントは特に提示されていない。

5-FC についても *C. neoformans* 特異的なブレークポイントは提案されていない。しかし *Candida* spp. におけるのと同じブレークポイントを適用してよさそうである。

AMPH の場合には、*Candida* spp. におけるのと同様に、試験培地としては RPMI1640 よりも AM3 培地のほうが感受性選別能が高いとして推奨されているものの、試験法自体にもまだ多くの解決困難な問題が残されている。当然ながらブレークポイントの提案には至っていない。

マイクロ法に比べて Etest などの寒天希釈法や、最小殺菌濃度の測定のほうが有用とする意見もある。いずれにせよ感受性試験に際しては、参考株（reference strain）および耐性株を同時に並べて比較することが必要である。

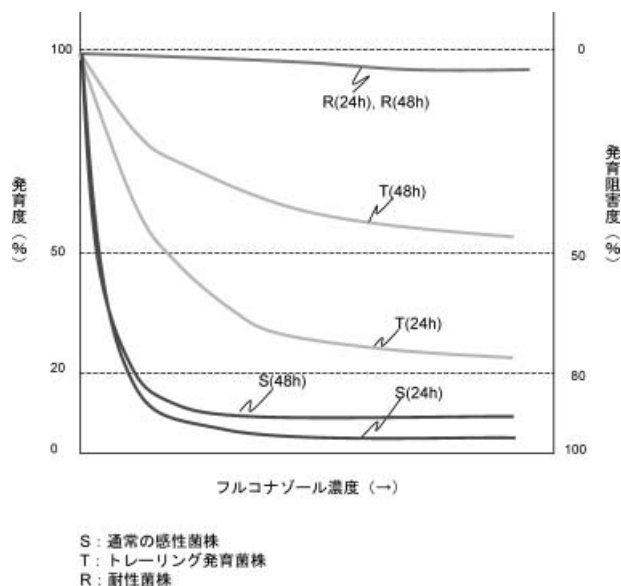


図3 トレーリング発育 (trailing growth) を示す *Candida albicans* または *C. tropicalis* 分離菌の発育度及ばずフルコナゾール (FLCZ) の濃度と作用時間（培養時間）の影響を示す模式図。通常の感性菌株 (S) を 24 または 48 時間培養した場合には、比較的低い FLCZ 濃度下でも発育阻止は 80% (IC₈₀) 以上に達する。一方、トレーリング発育菌株 (T) においては、培養 24 時間の場合の発育阻止は 50% (IC₅₀) を超すものの、48 時間後では FLCZ 高濃度域でも IC₅₀ に達しなくなる。

表5 NCCLS M27-A ガイドラインの改訂版である M27-A2 ガイドラインに新たに付記されたトレーリング発育を示す *Candida* spp. に関するコメント

- (1) 培養 48 時間のみならず 24 時間の時点でも終末点判定を行うこと（両者の MIC に著しい相違があれば 24 時間判定の値をとる）。
- (2) これによって臨床効果との相関性の高い MIC が得られる。
- (3) 培養 48 時間の判定結果では「耐性 (R)」のカテゴリーに入るが、24 時間判定では「感性 (S)」のカテゴリーに入る。（表 4 参照）
- (4) *Candida* spp. 臨床分離株の約 5% がトレーリング発育株に該当する。

4. *Candida* spp. のトレーリング発育 (trailing growth) 株と NCCLS M27-A ガイドラインの改訂

Candida spp. の大多数の臨床分離株については、培養時間が 24 時間または 48 時間のいずれであっても、MIC 終末点の値に大差はなく、したがってブレイクポイントの感受性カテゴリー（表 4）を変更する必要はまず生じない。しかし 5% 程度の分離株（特に *C. albicans* と *C. tropicalis* に多い）においては、24 時間後と 48 時間後の間で MIC 値が劇的に（～128 倍）上昇し、前者では感性、後者では耐性と解釈されるようになる^{48, 49)}。この特徴的パターンの発育すなわち、抗真菌薬の広い濃度範囲にわたって部分的に阻止されるような発育はトレーリング発育 (trailing growth) と呼ばれる（図 3）。わが国では特に *C. tropicalis* のトレーリング発育分離株が著しく多く、本菌種分離株全体の 30～50% にも及ぶ^{13, 50)}。播種性カンジダ症マウスモデルを用いた実験的研究からは、トレーリング発育分離株は実は耐性ではなく、感性のカテゴリーに入れるべきことが示された^{2, 44, 48)}。この考え方は、*C. albicans* のトレーリング発育株に起因する AIDS 患者の OPC が低用量の FLCZ 療法に良好に反応したという

臨床的知見⁵²⁾からも支持される。トレーリング発育は試験培地の pH を 5 またはそれ以下に低下させると消去される⁵³⁾。一方、感受性試験の主な変動要因とされる培養時間（24 vs. 48 時間）およびマイクロ法での分光光学的終末点判定基準（50 vs. 80% 阻止；IC₅₀ vs. IC₈₀）の再評価がなされた結果、発育株については前者の条件を、また終末点としては IC₅₀ を、各々とるべきことが示唆された^{51, 52, 54, 55)}。これらの検討結果を受けて、NCCLS は M27-A ガイドラインのマイクロ法の終末点判定基準に、「トレーリング発育株については 24 時間培養の時点でも判定を行う」などのコメントを付記した修正を加え、これを M27-A の第 2 版 (M27-A2) ガイドライン⁵⁶⁾として発表した（表 5）。

最近、トレーリング発育とアゾール系薬耐性遺伝子の発現との関連性に関する分子生物学的解析が行われている^{57～59)}。*C. albicans* 発育株は、FLCZ 存在下では S-DD 株や R 株と同様の耐性メカニズムを発現するが、その制御の仕組みは異なるようである⁵⁹⁾。

5. わが国とヨーロッパで提案されている標準法
NCCLS M27-P ガイドラインが発表された直後から、日本医真菌学会の標準化委員会では国内で市販されている抗真菌薬を対象とする酵母の感受性試験標準

表6 NCCLS M27 ガイドラインをベースにしてわが国およびヨーロッパでつくられた酵母の抗真菌薬感受性試験標準法の特徴

試験性	測定フォーマット	NCCLS M27-A ミクロ法との主な相違点
日本医真菌学会法 (日本, 1995 年)	ミクロ法	● 終末点: 24 時間ごとに分光光学的に濁度を測定し、発育対照の濁度が ≥ 0.2 に達した時点での IC₈₀ (80% 発育減少) 値
EUCAST ^{a)} 法 (ヨーロッパ, 2002 年)	ミクロ法	● 適応菌種: 発酵性酵母のみ^{b)} ● 試験培地: 0.165 M-MOPS 緩衝 (pH 7.0) RPMI1640 に 2% グルコース添加 ● 接種菌量: $0.5 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^5$ CFU/ml ● 培養時間: 24 時間 ● 終末点: フルシトシン (5-FC) およびアゾール系薬については、分光光学的に測定した IC₅₀ (50% 発育減少) 値。

^{a)} The European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing の略

^{b)} 病原性酵母のなかでも *C. neoformans*, *Trichosporon* spp. などの非発酵性酵素菌種は含まれないことになり、したがって *Candida* spp. にはほぼ限られる。

表7 国内で市販されている酵母の抗真菌薬感受性測定用キット

商品名（メーカー）	測定フォーマット	測定対象薬剤	備 考
- 酵母様真菌 FP “栄研”（栄研化学） - 酵母様真菌 DP “栄研”（栄研化学）	日本医真菌学会法に準拠したマイクロ液体希釈法	アムホテリシン B (AMPH) フルシトシン (5-FC) ミコナゾール (MCZ) フルコナゾール (FLCZ) イトラコナゾール (ITCZ) ミカファンギン (MCFG)	- 日本医真菌学会法のみならず NCCLS M27-A ミクロ法との一致率も高い - 目視判定または自動化システムにより分光光学的に判定（濁度） - 近く NCCLS M27-A2 ガイドラインに準じて終末点判定基準が変更される予定
酵母真菌薬剤感受性キット ASTY（極東製薬）	NCCLS M27-A ミクロ液体希釈法の变法	アムホテリシン B (AMPH) フルシトシン (5-FC) ミコナゾール (MCZ) フルコナゾール (FLCZ) イトラコナゾール (ITCZ) ミカファンギン (MCFG)	- NCCLS M27-A ミクロ法との一致率高い - 酸化還元指示薬を用いた比色測定法 - 色調変化を目視判定
Etest「アスカ」（アスカ純薬）	ディスク拡散法	アムホテリシン B (AMPH) フルシトシン (5-FC) ミコナゾール (MCZ) フルコナゾール (FLCZ) イトラコナゾール (ITCZ)	- NCCLS M27-A ミクロ法との相関性高い - 発育阻止帯サイズを目視判定 <i>Aspergillus</i> spp. などの糸状菌の試験にも適用可能

法の作成作業を開始した。試験培地その他の基本的な条件は M27-P に準拠したが、M27-P ではマクロ液体希釈法のみを提示したのに対して、日本医真菌学会法はマイクロ法を採用し、1995 年に発表された⁶⁰⁾（表 6）。NCCLS は M27-T 以降マイクロ法も併せて標準化し、現在はこのフォーマットが主流になっているが、日本医真菌学会は M27-A ガイドラインに先行してマイクロ化をはかった点でその先見性が評価されよう。表 3 に示すように、M27-A ミクロ法とのほとんど唯一の違いは、終末点判定基準にある。大多数の分離株については試験結果にほとんど差は見られない。しかし先に述べたトレーリング発育株については M27-A 以上に問題を生じることが判明しており²⁾、早急な改訂が必要である。

ヨーロッパ諸国では、長年 NCCLS M27 ガイドラインに従って感受性試験を行っていたが、発育株の問題を契機に、The Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (AFST-EUCAST) は、2002 年に独自の標準法を提案した（EUCAST 法）⁶¹⁾。この方法は、NCCLS M27-A ミクロ法を土台にしているが、測定法の自動化を可能にすることおよび培養時間を 48 時間から 24 時間に短縮することを目的として、試験培地へのグルコースの添加および接種菌量の増加という改変がなされている^{62, 63)}。本法は

M27-A 法と高い一致率を示すと報告されている^{62, 64)}。

6. わが国で市販されている MIC 測定キット

現在国内では (i) 酵母様真菌 FP（または DP）“栄研”，(ii) 酵母真菌薬剤感受性キット ASTY，(iii) Etest「アスカ」、以上 3 種の酵母の抗真菌薬感受性測定用キットが保険適応製品として市販されている。各キットの特徴を表 7 に示す。(i) は日本医真菌学会法をそのままキット化した製品であり、したがって本法および M27-A 法との一致率も高い。終末点 (IC₈₀) の濁度を目視または分光光度計により判定する。加えて、OPC 症例からの *C. albicans* 分離株に対する FLCZ の効果を検討した試験により、本キットでの MIC 測定値と臨床成績との間に良好な相関性が得られている⁶⁵⁾。これに対して、(ii) は同じマイクロ法ながら、試験培地に添加された酸化還元呈色色素レザズリンの発色（赤変）を利用して終末点の目視判定を容易にしている点に特徴がある。このキットによる測定データは、M27-A 法のそれと良好に相関することが示されている⁶⁶⁾。

(i), (ii) とはことなり、(iii) は Etest と呼ばれる寒天拡散法に基づく MIC 測定法である。抗真菌薬の濃度勾配を含む目盛のついたストリップと発育阻止帯が交叉する点を読み、その目盛の値を MIC とする。菌の発育が不均一であったり、トレーリング発育を示すような場合には、終末点判定が困難になる。一定の経験と

標準的な技術を備えていれば、アゾール系薬とくに FLCZ と *Candida* spp. の組み合わせに関しては NCCLS ミクロ液体希釈法と矛盾のないデータが得られるようである^{67, 68)}。しかし FLCZ と *C. tropicalis* または *C. glabrata* の場合の一致率は 50% 以下とする報告⁶⁹⁾もあり、データの解釈には注意を払わなければならない。本法の利点は、AMPH の MIC 測定に優れていることであり、特に RPMI1640 をベースとする寒天培地を用いた場合には高い信頼性をもって AMPH 耐性株を特定できるといわれる。また酵母のみならず糸状菌に対しても適用できる点でも本法は利用価値があり、AMPH や ITCZ に関しては糸状菌の抗真菌薬感受性試験標準法とされる NCCLS M38 法(次項参照)の結果と良好に相関することが示されている^{71, 72)}。

III. 糸状菌の抗真菌薬感受性試験の標準法

1. NCCLS M38 標準法

糸状菌の感受性試験については、変動要因特に接種菌量と接種菌の調製法の基準化が困難なこと、明確な耐性分離株が得られないことなどの理由から、標準化の作業は難航した。ようやく 1998 年に至って米国 NCCLS は、酵母の感受性試験標準法 M27-A ミクロ法と基本的に同じ方法論を用いたミクロ法を標準法

M38-P として提案した⁷²⁾。その後、*Aspergillus* spp. などに有効な新世代アゾール系薬 (voriconazole, ravuconazole, posaconazole) が開発されたために、これらの薬剤を試験対象薬リストに加えるとともに、これらの薬剤のほか ITCZ についても終末点を IC₅₀ から IC₁₀₀ に変更するという改訂を行った M38-A ガイドラインが 2002 年に発表された⁷³⁾(表 8)。上記アゾール系薬の終末点判定基準の変更は、*Aspergillus* spp. 耐性株の検出能を高めるためとされている⁴⁰⁾。M38-A 法は、現時点での糸状菌の感受性試験標準法として一応は容認されているものの、どの薬剤-真菌の組み合わせをとっても *in vitro-in vivo* 相関性を支持する報告は見当たらず、したがってブレイクポイントも提示されていない。今後の大きな検討課題である。

2. わが国で提案されている標準法

日本医真菌学会は、M38-P が公表された翌年の 1999 年に、より容易な終末点判定および適応菌種の拡大を目的として M38-P を改変した日本医真菌学会法を提案した⁷⁵⁾(表 8)。しかし本試験法もまた M38-A 法と同じ問題点を抱えていることはいうまでもない。

表 8 糸状菌の抗真菌薬感受性試験の NCCLS 標準法 (M38-A) と日本医真菌学会法の要点

変動要因など	基準化された条件	
	NCCLS M38-A 法	日本医真菌学会法
● 適応菌種 ● 測定フォーマット ● 試験培地 ● 接種菌量 ● 接種菌量の標準化 ● 培養温度 ● 培養時間	分生子または孢子を形成する糸状菌 ミクロ法 M27-A に準じる $0.5 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^3$ CFU/ml 分光光度計を用いる (菌属によってことなる標的濁度を特定) 35°C 24 時間 (<i>Rhizopus</i> spp.), 72 時間 (<i>Pseudallescheria boydii</i>), 48 時間 (<i>Fusarium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Sporothrix schenckii</i> を含む大多数の糸状菌)	無色不完全糸状菌, 接合菌, 皮膚糸状菌, 二形性真菌, 黒色真菌 同左 指示薬 (Alamar Blue) を含む RPMI1640 同左 同左 27°C 発育対照の色調が Alamar Blue の代謝によって赤変するまでの期間
● 終末点	対象と比べて明らかな発育減少 ($\approx$ IC ₅₀): 5-FC, FLCZ 目視で濁りなし (IC _{≥95}): AMPH, ITCZ, 新世代アゾール系薬)	分光光学的測定による IC ₈₀
● 試験対象薬剤	AMPH, 5-FC, FLCZ, 新世代アゾール系薬 (voriconazole, ravuconazole, posaconazole)	AMPH, ITCZ

VI. キャンディン系抗真菌薬についての感受性試験法

先に述べたように、キャンディン系は最も新しい抗真菌薬のクラスであり、2002年に米国などで caspofungin (CAS) が、また同年日本ではミカファンギン (micafungin; MCFG) が上市された。このように臨床導入からまだ日が浅いこともあって、キャンディン系薬については、酵母、糸状菌の感受性試験はいずれもまだ標準化に至っていない。しかし本系薬はカンジダ症、アスペルギルス症といった主要な深在性真菌症の治療に広く使用されている。そのためにすでに国内外の多くの研究グループが実際に感受性試験を行っており、米国においては試験法の標準化を目指した検討が主として CAS を対象として進められている。

1. Caspofungin (CAS) についての感受性試験

Candida spp. の CAS 感受性を検討した代表的な報告は, Pfaller et al.⁷⁶⁾ のそれである。世界中の 99 施設から収集した約 4,000 の *Candida* spp. 分離株の *in vitro* CAS 感受性を NCCLS M27-A2 法に準拠して (終末点: IC₁₀₀) 測定し, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* および *C. glabrata* は最も高い感受性 (MIC₉₀: 0.25~0.5 µg/ml) を、一方 *C. guilliermondii* は最も低い感受性 (MIC₉₀: >8 µg/ml) を各々示すこと、また *C. albicans* のアゾール系薬 (FLCZ, ITCZ) 高度耐性株でも CAS 感受性が高い (MIC₉₀: ≤1 µg/ml) ことを報告している。この報告に限らず, *Candida* spp. については M27-A 法を準用する限り、研究グループ間ではほぼ一致した成績が得られている。また前出の EUCAST 法および Etest を用いて *Candida* spp. の CAS 感受性を測定し, M27-A 法と比較検討した報告もある⁷⁷⁾。それによると, EUCAST 法 (終末点: 培養 24 および 48 時間後の IC_{≥95}) での結果は M27-A 法で高い (94%) 一致率を示し, それよりやや劣るものの Etest でも良好な一致率が得られた。これらの報告から, CAS と *Candida* spp. の組み合わせに関しては, NCCLS M27-A 法および EUCAST 法 (いずれも終末点を培養 24 または 48 時間後の IC_{≥95-100} とした場合) は, (i) 両法ともに信頼性の高い感受性試験法であること, (ii) 両法の成績は基本的に一致すること, (iii) Etest もまた代替試験法になりうること, が知られた。

より厄介な問題は *Aspergillus* spp. に対する MIC の測定法である。同じ NCCLS M38 法 (72 時間培養後に終末点判定) を用いても, 得られた CAS の幾何平均 MIC は研究グループによって 0.06~12 µg/ml⁷⁸⁾ から >16 µg/ml⁷⁹⁾ まで極端な違いを示す。その大き

な原因と考えられるのは終末点判定基準であり, 完全阻止 (IC₁₀₀) または部分的阻止 (IC₈₀ または IC₅₀) のいずれをとるべきかも不明のままになっている。この問題に関連して, CAS の *in vitro* 活性の合理的な指標として挙げられてきたのが, 「最小有効濃度 (minimal effective concentration; MEC)」である。これは発育菌糸の形態異常をもたらす最小薬剤濃度を意味し, 従来の MIC よりも確実な終末点の指標になることを主張する研究者も少なくない^{79~83)}。しかし実際に MEC を測定するとなると, 顕微鏡でいちいち観察するのは, 時間と労力と経験を必要とし, しかも得られる結果は主観的である。この問題を解決するために, Imhof et al.⁸³⁾ は RPMI1640 (+2% グルコース) 寒天培地上での *Aspergillus* spp. の発育コロニーの肉眼的形態の違い (対照培養における菌糸の放射状発育を示すコロニーに対して, 薬剤の影響を受けて発育を阻止された培養は顆粒状の小さなコロニーをつくる) に基づいて MIC を判定する寒天希釈法を考案した。この方法で得られた MIC は, MEC と高い一致率 (95%) を示し, ガラクトマンナン抗原の遊離量とも一致したが, NCCLS M38 ミクロ液体希釈法とは相関しなかった。本法は特に低感受性株の検出に優れていたという。

CAS 感受性試験法としては, ほかに Etest やディスク拡散法も検討されている^{84~86)}。しかし Etest で詳細な MIC 測定を行うのは信頼性の点で疑問視されているようである^{84, 85)}。

MIC 終末点の指標と並んで注目されているもう一つの変動要因は, 試験培地である。いくつかの研究グループによるこれまでの検討結果では, *Candida* spp., *Aspergillus* spp. とともに RPMI1640 よりも AM3 のほうが例外なく低い MIC を与え^{79, 86, 87)}, 再現性も良好である⁸⁸⁾。こうした理由から, AM3 を適切な試験培地として推奨する向きもある。

CAS 感受性試験の標準法に関する十分なコンセンサスが得られていないこともあって, 本薬の *in vitro-in vivo* 相関性の検討結果の報告例は極めて少ない。Mora-Duarte et al.⁸¹⁾ は *C. albicans* とそれよりも *in vitro* CAS 感受性が低いとされる *C. parapsilosis*⁴²⁾ の各々に起因するカンジダ血症における CAS の効果を比較し, 両者での有効率に差がないこと (13/20 vs. 14/20) から, FLCZ に見られるような良好な相関関係は得られなかったと報告している。これに対して Hernandez et al.⁸²⁾ は, アゾール系薬不応答性の OPC の同一患者から, CAS 治療が奏効した最初の治療の開始日 (Day-1) および Day-511 に分離した 2 つの *C.*

albicans 感性株 (MIC: M27 法でいずれも 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), それに CAS 再治療が不成功に終わった Day-553 に分離した耐性株 (MIC: $>64 \mu\text{g}/\text{ml}$), 以上 3 株を用いてマウス感染モデルをつくり, CAS の効果を比較した。その結果, 前 2 株に比べて第 3 の株に対する治療効果は明らかに低く, *in vitro-in vivo* 相関性が示唆された。この結論は興味深いものの, 前報⁸¹⁾のそれとは相反するものであり, さらに多くの臨床的ならびに実験的検討とデータの集積が必要と考えられる。

2. ミカファンギン (MCFG) についての感受性試験

MCFG 感受性試験法そのものの検討は, CAS の場合ほど詳しくはなされていない。一般には, *Candida* spp. の感受性は NCCLS M27-A 法 (終末点: $\text{IC}_{\geq 95}$), *Aspergillus* spp. その他の糸状菌では NCCLS M38-P 法または日本医真菌学会法 (終末点: IC_{80}) が用いられ, *in vitro* 活性 (MIC) に関する成績がいくつもの論文に報告されている (詳細は池田ら⁴⁾および筆者⁵⁾の総説を参照されたい)。同じキャンディン系に属するとはいえ, MCFG は CAS に比べて *in vitro* 活性が強い (MIC が低い) ようであり, また MCFG に特徴的な帯現象 (zone phenomenon)—発育阻止濃度域よりさらに高い濃度では逆に発育阻止が見られなくなる現象—も CAS では報告されていない。このことは, CAS についての感受性試験法をそのまま MCFG に適用することに疑問を投げかけるものであり, MCFG に適した独自の感受性試験法の確立を目指して検討を図るべきであろう。

おわりに

深在性真菌症の治療は, 過去十余年余主として第 2 世代の二つのアゾール系抗真菌薬, FLCZ と ITCZ, ならびに AMPH を用いて行われてきた。ところが 2002 年の暮れにキャンディン系と呼ばれる既存薬とは全くことなる作用メカニズムをもつ新しいクラスの抗真菌薬 MCFG が登場し, 抗真菌化学療法に大きな変革をもたらしつつある。また本年 (2004 年) に入って FLCZ のプロドラッグの臨床導入に伴って, 事実上の FLCZ 高用量療法が可能となったことによる治療上のインパクトも見過ごせない。こうした抗真菌薬の品数の増加に加えて, 起因菌種の多様化および薬剤耐性株の出現は, 抗真菌薬感受性試験をこれまで以上に重要なものになっている。

近年, 酵母の抗真菌薬感受性試験法は大きく前進した。NCCLS M27-A 法 (*Candida* spp. のトレーリング発育株については M27-A2 法) に準拠して MIC 測定

を行う限り, 2 つの主力アゾール系薬 FLCZ および ITCZ の *Candida* spp. に対する *in vitro* 活性 (MIC) と *in vivo* 活性 (臨床効果) との間には良好な相関性が認められ, 治療への応答, 不応答をそれぞれ予測させる感性, 耐性の MIC ブレックポイントもすでに提示されている。このようにアゾール系抗真菌薬と *Candida* spp. の組み合わせについては, 感受性試験の臨床的価値はかなり大きいというべきである。また 5-FC と *Candida* spp. との組み合わせについても, 同様の *in vitro-in vivo* 相関性が成立すると考えられるところから, この場合も感受性試験は有用といつてよからう。

酵母の感受性試験に関して, 最近大きな問題となったのは, *C. albicans* や *C. tropicalis* の臨床分離株のなかにアゾール系薬の存在下でトレーリング発育を示すものが多数含まれていることである。これらの分離株は, 従来の酵母の感受性試験の標準法とされた NCCLS M27-A 法を用いてアゾール系薬の MIC を測定した場合には耐性と判定されるが, *in vivo* では感性を示す (アゾール系薬治療に反応する)。この矛盾を解消して MIC と臨床効果との相関性を高めるべく, M27-A における MIC 終末点の判定基準が改訂版 M27-A2 で修正されたことは当を得たものである。しかしわが国では, どの市販の感受性測定キットも M27-A に準拠しており, トレーリング発育株への配慮がなされていない。この問題については早急に改善を図るとともに, トレーリング発育株に対する一般の認識を高める必要がある。

C. neoformans とアゾール系薬または 5-FC との組み合わせにおいても YNB 培地を試験培地として用いる限り, 比較的良好な *in vitro-in vivo* 相関性が得られる。しかし RPMI1640 培地ではそうした相関関係が見られないことから, この培地を使った測定キット市販品での試験結果には, 十分な注意が必要である。

アゾール系薬や 5-FC とは対照的に, AMPH については, *Candida* spp., *C. neoformans* などの酵母の感受性試験の成績と臨床効果との間ではいまだに明確な相関関係が示されていない。さらに糸状菌にいたっては, 一応は標準法として NCCLS M38-A が承認されているものの, いずれの薬剤-真菌の組み合わせにおいても *in vitro-in vivo* 相関性が得られていないために, 試験データの臨床的意味づけがほとんど不可能である。その結果, 残念ながら感受性試験の成績よりも菌種の正しい同定のほうが薬剤選択に役立つといわれても仕方がないのが実情である。それ以上に大きな問題は, 国内外を通してキャンディン系薬感受性試験法の標準化がなされていないことにある。特にわが国に

において MCFG がカンジダ症およびアスペルギルス症の治療薬として主要な地位を占めていることを考えると、標準法の作成に向けて早急に取り組む必要がある。いずれにせよ、現状においては薬剤と真菌の組み合わせしだいで、感受性試験データの臨床的価値が大きくなることを認識しておかなければならない。

近年、抗真菌薬感受性試験が著しい進歩を遂げたことは疑うべくもない事実である。しかしこれまで述べてきたように未解決の重要な課題も少なからず残されており、今後基礎と臨床の両面から、よりいっそうの検討がなされることを是非とも期待したい。

文 献

- 1) Rex, J. H., M. A. Pfaller, J. N. Galgiani, et al. 1997. Development of interpretive break-points for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro*-*in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Clin. Infect. Dis. 24: 235-247.
- 2) 内田勝久, 山口英世. 2003. 抗真菌薬の感受性試験法. 医薬ジャーナル 39: 3301-3308.
- 3) 山口英世, 西山彌生, 内田勝久, 他. 2002. Micafungin の *Candida albicans* および *Aspergillus fumigatus* に対する生化学的および形態学的研究. 日本化学療法会誌 50(S-1): 20-29.
- 4) 池田文昭, 大友寿美, 中井 徹, 他. 2002. キャンディン系抗真菌薬 micafungin の *in vitro* 抗真菌活性. 日本化学療法会誌 50(S-1): 8-19.
- 5) 山口英世. 2003. 抗真菌薬ミカファンギンの基礎的位置づけ. 感染症 33: 23-28.
- 6) 河野 茂. 2003. 抗真菌薬ミカファンギンの臨床的位置づけ. 感染症 33: 39-46.
- 7) 川上 裕, 柳野健司, 新海啓介, 他. 2004. 深在性真菌症ホスフルコナゾール (プロジフ®) 静注液の非臨床試験および臨床試験. 日薬理誌 124: 41-51.
- 8) 山口英世. 2004. 病原真菌における抗真菌薬耐性. 医学のあゆみ 209: 556-563.
- 9) Vuffray, A., C. Durussel, P. Boerlin, et al. 1994. Oropharyngeal candidiasis resistant to single dose therapy with fluconazole in HIV-infected patients. AIDS 8: 708-709.
- 10) Johnson, E. M., D. W. Warnock, J. Luker, et al. 1995. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. J. Antimicrob. Chemother. 35: 103-114.
- 11) 山口英世. 2001. フルコナゾール耐性カンジダ・アルビカンス. 臨床検査 45: 879-883.
- 12) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard NCCLS document M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 17(9), Wayne, Pa.
- 13) 山口英世, 内田勝久, 奥住捷子, 他. 2004. Japan Antifungal Surveillance Program による真菌臨床分離株の抗真菌薬感受性に関する調査 (1): 2001-2002 年度報告. 本誌 14: 183-193.
- 14) Perea, S., J. López-Ribot, W. R. Kirkpatrick, et al. 2001. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 2676-2684.
- 15) Maebashi, K., M. Niimi, M. Kudoh, et al. 2001. Mechanisms of fluconazole resistance in *Candida albicans* isolates from Japanese AIDS patients. J. Antimicrob. Chemother. 47: 527-536.
- 16) White, T. C., K. A. Marr, R. A. Bowden. 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin. Microbiol. Rev. 11: 382-402.
- 17) Stiller, R. L., J. E. Bennett, H. J. Scholer, et al. 1982. Susceptibility to 5-fluorocytosine and prevalence of serotype in 402 *Candida albicans* isolates from the United States. Antimicrob. Agents Chemother. 22: 482-487.
- 18) Vanden Bossche, H., Dupont B. Warnock, et al. 1994. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. J. Med. Vet. Mycol. 32(S1): 189-200.
- 19) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1995. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Tentative standard. NCCLS document M27-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- 20) Espinel-Ingroff, A., C. W. Kish, T. M. Kerker, et al. 1992. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. J. Clin. Microbiol. 30: 3138-3145.
- 21) Odds, F. C., L. Vranckx, F. Woestenborghs. 1995. Antifungal susceptibility testing of yeasts: evaluation of technical variables for test automation. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 2051-2060.
- 22) Pfaller, M. A., S. A. Messer, S. Coffmann. 1995. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D070. J. Clin. Microbiol. 33: 1094-1097.
- 23) St. Germain, G., C. Dion, A. Espinel-Ingroff, et al.

1995. Ketoconazole and itraconazole susceptibility of *Candida albicans* isolates from patients infected with HIV. *J. Antimicrob. Chemother.* 36: 109–118.
- 24) Dannaoui, E., S. Colin, J. Pichot, et al. 1997. Evaluation of the Etest for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans* isolates from oropharyngeal candidiasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16: 228–232.
- 25) Cartledge, J. D., J. Midgley, M. Petrou, et al. 1997. Unresponsive HIV-related oro-esophageal candidosis—an evaluation of two new *in-vitro* azole susceptibility tests. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 117–119.
- 26) Quereda, C., A. M. Polanco, C. Gner, et al. 1996. Correlation between *in vitro* resistance to fluconazole and clinical outcome of oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15: 30–37.
- 27) Revankar, S. G., O. P. Dib, W. R. Kirkpatrick, et al. 1998. Clinical evaluation and microbiology of oropharyngeal infection due to fluconazole-resistant *Candida* in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin. Infect. Dis.* 26: 960–963.
- 28) Lee, S. C., C. P. Fung, J. S. Huang, et al. 2000. Clinical correlates of antifungal macrodilution susceptibility test results for non-AIDS patients with severe *Candida* infections treated with fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2715–2718.
- 29) Costa, M., X. S. Passos, A. T. B. Miranda, et al. 2004. Correlation of *in vitro* itraconazole and fluconazole susceptibility with clinical outcome for patients with vulvovaginal candidiasis. *Mycopathologia* 157: 43–47.
- 30) Louie, A., G. L. Drusano, P. Banerjee, et al. 1998. Pharmacodynamics of fluconazole in a murine model of systemic candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1105–1109.
- 31) Merz, W. G., G. R. Sanford. 1979. Isolation and characterization of a polyene-resistant variant of *Candida tropicalis*. *J. Clin. Microbiol.* 9: 677–680.
- 32) Dick, J., W. Merz, R. Saral. 1980. Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 158–163.
- 33) Seidenfeld, S. M., B. H. Cooper, J. W. Smith, et al. 1983. Amphotericin B tolerance: a characteristic of *Candida parapsilosis* not shared by other *Candida* species. *J. Infect. Dis.* 147: 116–119.
- 34) Powderly, W. G., G. S. Kobayashi, G. P. Herzig, et al. 1988. Amphotericin B-resistant yeast infection in severely immunocompromised patients. *Am. J. Med.* 84: 826–832.
- 35) Walsh, T. J., I. F. Salkin, D. M. Dixon, et al. 1989. Clinical, microbiological, and experimental animal studies of *Candida lipolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 27: 927–931.
- 36) Bryce, E., F. Roberts, A. Sekhon, et al. 1992. Yeast in blood cultures : evaluation of factors influencing outcome. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 15: 233–237.
- 37) Nguyen, M. H., J. E. Peacock, Jr., A. J. Morris, et al. 1996. The changing face of candidemia: Emergence of non-*C. albicans* species and antifungal resistance. *Am. J. Med.* 100: 617–623.
- 38) Sterling, T. R., R. A. Gasser, A. Ziegler. 1996. Emergence of resistance to amphotericin B during therapy for *Candida glabrata* infection in an immunocompetent host. *Clin. Infect. Dis.* 23: 187–188.
- 39) Nolte, F. S., T. Parkinson, D. J. Falconer, et al. 1997. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 196–199.
- 40) Rex, J. H., M. A. Pfaller. 2002. Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin. Infect. Dis.* 35: 982–989.
- 41) Powderly, W. G., E. J. Keath, M. Sokol-Anderson, et al. 1992. Amphotericin B-resistant *Cryptococcus neoformans* in a patient with AIDS. *Infect. Dis. Clin. Pract.* 1: 314–316.
- 42) Rodero, L., S. Cordoba, P. Cahn, et al. 2000. *In vitro* susceptibility studies of *Cryptococcus neoformans* isolates from patients with no clinical response to amphotericin B therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 239–242.
- 43) Currie, B. P., M. Ghannoum, L. Bessen, et al. 1995. Decreased fluconazole susceptibility of a relapse *Cryptococcus neoformans* isolates after fluconazole treatment. *Infect. Dis. Clin. Pract.* 4: 318–319.
- 44) Armengou, A., C. Porcar, J. Mascaro, et al. 1996. Possible development of resistance to fluconazole during suppressive therapy for AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clin. Infect. Dis.* 23: 1337–1338.
- 45) Witt, M. D., R. J. Lewis, R. A. Larsen, et al. 1996. Identification of patients with acute AIDS-associated cryptococcal meningitis who can be effectively treated with fluconazole: The role of antifungal susceptibility testing. *Clin. Infect. Dis.* 22: 864–866.
- 46) Aller, A. I., E. Martin-Mazuelos, F. Lozano, et al. 2000. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. *An-*

- timicrob. Agents Chemother. 44: 1544-1548.
- 47) Jessup, C. J., M. A. Pfaller, S. A. Messer, et al. 1998. Fluconazole susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: Comparison of two broth microdilution methods and clinical correlates among isolates from Ugandan AIDS patients. J Clin. Microbiol. 38: 341-344.
- 48) Arthington-Skaggs, B. A., D. W. Warnock, C. J. Morrison. 2000. Quantitation of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between *in vitro* antifungal susceptibility test results and *in vivo* outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive candidiasis. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 2081-2085.
- 49) Arthington-Skagg, B. A., W. Lee-Yang, M. A. Ciblak, et al. 2002. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC endpoint determination and evaluation of a sterol quantification method for *in vitro* susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and non-trailing *Candida* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 2477-2481.
- 50) Takakura, S., N. Fujihara, T. Saito, et al. 2004. 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. 53: 283-289.
- 51) Rex, J. H., P. W. Nelson, V. L. Paetznick, et al. 1998. Optimizing the correlation between results of testing *in vitro* and therapeutic outcome *in vivo* for fluconazole by testing clinical isolates in a murine model of invasive candidiasis. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 129-134.
- 52) Revankar, S. G., W. R. Kirkpatrick, R. K. McAttee, et al. 1998. Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards method. J. Clin. Microbiol. 36: 153-156.
- 53) Marr, K. A., T. R. Rustad, J. H. Rex, et al. 1999. The trailing endpoint phenotype in antifungal susceptibility testing is pH-dependent. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1383-1386.
- 54) Nguyen, M. H., C. Y. Yu. 1999. Influence of incubation time, inoculum size, and glucose concentration on spectrophotometric endpoint determinations for amphotericin B, fluconazole, and itraconazole. J. Clin. Microbiol. 37: 141-145.
- 55) St-Germain, G. 2001. Impact of endpoint definition on the outcome of antifungal susceptibility tests with *Candida* species: 24-versus 48-h incubation and 50 versus 80% reduction in growth. Mycoses 44: 37-45.
- 56) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard-second edition, M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 22(15), Wayne, Pa.
- 57) Smith, W. L., T. D. Edlind. 2002. Histone deacetylase inhibitors enhance *C. albicans* sensitivity to azoles and related antifungals: correlation with reduction in *CDR* and *ERG* upregulation. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 3532-3539.
- 58) Sanglard, D., F. C. Odds. 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infectious Diseases 2: 73-85.
- 59) Lee, M.-K., L. E. Williams, D. W. Warnock, et al. 2004. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. J. Antimicrob. Chemother. 53: 217-224.
- 60) 山口英世, 内田勝久, 他. 1995. 日本医真菌学会標準化委員会報告 (1992~1994 年), 提案—抗真菌剤感受性試験法. 日本医真菌会誌 36: 61-64.
- 61) European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. 2002. Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Discussion document E. Dis. 7. 1. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Taufkirchen, Germany.
- 62) Cuenca-Estrella, M., T. M. Diaz-Guerra, E. Melado, et al. 2001. Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. J. Clin. Microbiol. 39: 525-532.
- 63) Rodriguez-Tudela, J. L., M. Cuenca-Estrella, T. M. Diaz-Guerra, et al. 2001. Standardization of antifungal susceptibility variables for a semi-automated methodology. J. Clin. Microbiol. 39: 2513-2517.
- 64) Cuenca-Estrella, M., W. Lee-Yang, M. A. Ciblak, et al. 2002. Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 3644-3647.
- 65) 須藤貴子, 槇村浩一, 川田かおる, 他. 1997. 微量液体希釈法による口腔, 食道カンジダ症分離株の感受性試験—各種抗真菌薬の *in vitro* 活性と fluconazole の *in vitro/in vivo* 活性相関—. 日本化学療法会誌 45: 115-121.
- 66) Pfaller, M. A., S. Arian, M. Lozano-Chiu, et al.

1998. Clinical evaluation of the ASTY colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2609–2612.
- 67) Pfaller, M. A., D. J. Diekema, S. A. Messer, et al. 2003. Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: report from the ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1440–1446.
- 68) Matar, M. J., L. Ostrosky-Zeichner, V. L. Paetznick, et al. 2003. Correlation between E-test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1647–1651.
- 69) Sewell, D. L., M. A. Pfaller, A. L. Barry. 1994. Comparison of broth macrodilution, broth microdilution, and Etest antifungal susceptibility tests for fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2099–2102.
- 70) Szekely, A., E. M. Johnson, D. W. Warnock. 1999. Comparison of E-test and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of molds. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1480–1483.
- 71) Pfaller, M. A., S. A. Messer, K. Mills, et al. 2000. *In vitro* susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3359–3361.
- 72) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi: Proposed standard. M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 18(13), Wayne, Pa.
- 73) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: Approved standard. M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 22(16), Wayne, Pa.
- 74) Espinel-Ingroff, A., M. Bartlett, V. Chaturvedi, et al. 2001. Optimal susceptibility testing conditions for detection of azole resistance in *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative evaluation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1828–1835.
- 75) 篠田孝子, 内田勝久, 他. 1999. 日本医真菌学会標準化委員会報告 (1995~1997), 糸状菌の抗真菌感受性試験法. *日本医真菌会誌* 40: 243–246.
- 76) Pfaller, M. A., D. J. Diekema, S. A. Messer, et al. 2003. *In vitro* activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole against 3,959 clinical isolates of *Candida* spp., including 157 fluconazole-resistant isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1068–1071.
- 77) Chryssanthou, E., M. Cuenca-Estrella. 2002. Comparison of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing proposed standard and the E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and caspofungin susceptibility testing of yeast species. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3841–3844.
- 78) Pfaller, M. A., F. Marco, S. A. Messer, et al. 1998. *In vitro* activity of two echinocandin derivatives, LY303366 and MK-0991 (L-743, 872), against clinical isolates of *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, and other filamentous fungi. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 251–255.
- 79) Arikan, S., Chiu M. Lozano, V. Paetznick, et al. 2001. *In vitro* susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 327–330.
- 80) Kurtz, M. B., I. B. Heath, J. Marrinan, et al. 1994. Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against 1,3- β -D-glucan synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1480–1488.
- 81) Serrano, Mdel C., A. Valverde-Conde, M. M. Chavez, et al. 2003. *In vitro* activity of voriconazole, itraconazole, caspofungin, anidulafungin (VER002, LY303366) and amphotericin B against *Aspergillus* spp.. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 45: 131–135.
- 82) Shalit, I., Y. Shadkchan, Z. Samra, et al. 2003. *In vitro* synergy of caspofungin and itraconazole against *Aspergillus* spp.: MIC versus minimal effective concentration end points. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1416–1418.
- 83) Imhof, A., A. Balajee, K. A. Marr. 2003. New methods to assess susceptibilities of *Aspergillus* isolates to caspofungin. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5683–5688.
- 84) Arikan, S., V. Paetznick, J. H. Rex. 2002. Comparative evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3084–3087.
- 85) Bartizal, K., C. J. Gill, G. K. Abruzzo, et al. 1997. *In vitro* preclinical evaluation studies with the

- echinocandin antifungal agent MK-0991 (L-743, 872). Antimicrob. Agents Chemother. 41: 2326–2332.
- 86) Espinel-Ingroff, A. 2003. Evaluation of both microdilution testing parameters and agar diffusion Etest procedure for testing susceptibilities of *Aspergillus* spp. to caspofungin acetate (MK-0091). J. Clin. Microbiol. 41: 403–409.
- 87) Nelson, P. W., M. Lozano-Chiu, J. H. Rex. 1997. *In-vitro* growth inhibitory activity of pneumocandins L-733, 560 and L-743, 872 against putatively amphotericin B- and fluconazole-resistant *Candida* isolates—influence of assay conditions. J. Med. Vet. Mycol. 35: 285–287.
- 88) Bartizal, C., F.C. Odds. 2003. Influences of methodological variables on susceptibility testing of caspofungin against *Candida* species and *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 2100–2107.
- 89) Mora-Duarte, J., R. Betts, C. Rotstein, et al. 2002. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. N. Engl. J. Med. 347: 2020–2029.
- 90) Hernandez, S., J. L. López-Ribot, L. K. Najvar, et al. 2004. Caspofungin resistance in *Candida albicans*: correlating clinical outcome with laboratory susceptibility testing of three isogenic isolates serially obtained from a patient with progressive *Candida* esophagitis. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 1382–1383.

The Current Status and Challenges for Antifungal Susceptibility Testing

Hideyo Yamaguchi

Teikyo University Institute of Medical Mycology

Although new antifungal drugs of both preexisting and new classes are steadily introduced, the incidence of deep-seated fungal infections caused by *Candida* spp., *Aspergillus* spp. and other pathogenic fungi including those species or strains low-susceptible or resistant to currently available antifungal drugs is still increasing. With these situations comes a growing need for clinically relevant susceptibility testing methodologies that can be used in choosing the best treatment strategy for a given patient. Actually, antifungal susceptibility testing has evolved rapidly during the last decades and has now become a relevant clinical tool, so that routine susceptibility testing with azoles and flucytosine is appropriate for *Candida* isolates and, to a lesser degree, *C. neoformans* isolates. However, this is not the case at present for amphotericin B or mold fungi. A more problematic issue is the lack of reference method for testing the susceptibility to candins, a recently introduced major class of antifungal drugs, that warrants further investigation and development.