

[原 著]

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

山口英世¹⁾・内田勝久¹⁾・奥住捷子^{*2)}・小栗豊子³⁾・安達桂子⁴⁾・川上小夜子⁵⁾・戸坂雅一⁶⁾・
川島千恵子⁷⁾・堀 雅子⁸⁾・北澤俊美⁹⁾・林 和¹⁰⁾・齋藤芳彦¹¹⁾・尾崎京子¹²⁾・
西山彌生¹⁾・抗真菌薬感受性サーベイランス研究会

- 1) 帝京大学医真菌研究センター
- 2) 東京大学医学部附属病院検査部 (*現: 獨協医科大学病院医療安全管理部)
- 3) 順天堂大学医学部附属順天堂医院臨床検査部
- 4) 東京都老人医療センター研究検査科
- 5) 帝京大学医学部附属病院中央検査部
- 6) 熊本大学医学部附属病院中央検査部
- 7) 足利赤十字病院臨床検査部
- 8) 岡山済生会総合病院中央検査科
- 9) きっこう会総合病院多根病院中央検査部
- 10) 自治医科大学大宮医療センター臨床検査部
- 11) 東北大学医学部附属病院検査部
- 12) 新潟大学医歯学総合病院検査部

(平成 16 年 9 月 14 日受付, 平成 16 年 10 月 12 日受理)

2001 年 6 月および 2002 年 3 月の 2 カ月間に全国 11 施設において臨床検体から分離された真菌 576 株について, fluconazole (FLCZ), itraconazole (ITCZ), voriconazole (VRCZ) および flucytosine に対する薬剤感受性を現行の標準的試験法に準拠して測定した。収集菌株は, 糸状菌 4 株を除きすべて酵母であり, *Candida* 属菌種が 556 株 (97%) と圧倒的多数を占めた。上位菌種は, *C. albicans* 326 株 (56.6%), *C. glabrata* 131 株 (22.8%), *C. tropicalis* 57 株 (9.9%), *C. parapsilosis* 20 株 (3.5%) の順であった。日本医真菌学会法を用いて測定した場合の FLCZ 耐性株頻度は, *C. tropicalis* で 47%, *C. albicans* その他の菌種で 5% 前後の高い値を示した。一方, trailing growth による誤判定を避けるために修正された NCCLS M27-A2 プロトコールを用いて再試験を行ったところ, *C. tropicalis* を含む主要な *Candida* 属菌種での耐性株頻度は 0～4% に低下した。ITCZ および VRCZ についてもほぼ同様の成績が得られた。今回の試験成績から, 国内における FLCZ その他のアゾール系薬剤に対する *Candida* 属菌種耐性株の出現は依然としてまれであることが示された。

Key words: 抗真菌薬感受性試験, 抗真菌薬感受性サーベイランス, 真菌臨床分離株, *Candida* 属菌種, 薬剤耐性

代表者・所属所在地: 山口英世 帝京大学医真菌研究センター (〒192-0395) 東京都八王子市大塚 359
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
内田勝久
TEL: 0426-78-3256 FAX: 0426-74-9190
E-mail: kuchida@main.teikyo-u.ac.jp

序 文

深在性真菌症のマネージメントにはアゾール系抗真菌薬、特に fluconazole (FLCZ) が最も広く使用されている。わが国で FLCZ が臨床に導入されてからすでに 15 年を経過し、この間、深在性真菌症の発生状況や起病因菌にかなりの変遷が見られる。しかし、FLCZ その他の抗真菌薬に対する臨床検体由来の分離株の *in vitro* 感受性に関する大規模な疫学的調査は 1996 年以降ほとんどなされていない。唯一、2001 年 11 月～2002 年 10 月の 1 年間にわが国 156 施設での血液分離株 535 株の薬剤感受性測定の結果が報告されているに過ぎない¹⁾。

抗真菌薬の適正な使用を図るには、深在性真菌症起病因菌の薬剤感受性に関する疫学的情報を集積するとともに、耐性菌の出現などの問題が生じた場合には速やかにその状況を把握して対応する必要がある。この目的から、われわれは FLCZ をはじめとする既存抗真菌薬、および近い将来臨床導入が予想される新規アゾール系薬剤 voriconazole (VRCZ)、の各々に対する臨床分離株の感受性の現状と動向を知るため全国 11 施設の参加のもとに「抗真菌薬感受性サーベイランス研究会」を組織し、2001 年、2003 年および 2005 年の 3 回にわたって感受性測定を実施することを計画した。今回は第 1 回 (2001 年) 試験の結果を報告する。

材料と方法

1. 菌株の収集

収集期間を 2001 年 6 月および 2002 年 3 月の 2 カ月間に限定し、この期間中に各参加施設の検査室において臨床検体から分離され、起病因菌の可能性が推定または確定された菌株を収集した。なお同一患者からいずれか 1 カ月の収集期間中の異なる日に分離された菌株については、初回の分離株と最終回の分離株の 2 株のみを収集し、検査の対象とした。

2. 菌種の同定

日常検査に使用されている方法に従い、各施設において行った。なお、同定の結果に疑問のある菌株については、帝京大学医真菌研究センターにおいて再同定を行って確認した。

3. 収集菌株の薬剤感受性測定

薬剤感受性の測定は、(株)ビー・エム・エルにおいて行った。

1) 対象薬剤

NCCLS M27-A²⁾ および M27-A2³⁾ において酵母についての感受性測定法が標準化されている次の 4 薬

剤を対象薬剤に選んだ。① FLCZ、② itraconazole (ITCZ)、③ flucytosine (5-FC)、④ voriconazole (VRCZ)、糸状菌については ITCZ および VRCZ の 2 薬剤に対する感受性を各々測定した。

2) 酵母の感受性試験

以下の日本医真菌学会法 (JSMM 法)⁴⁾ および NCCLS M27-A2 法を用いて行った。

a) JSMM 法: 本法は、次の培地を用いたマイクロ液体希釈法である。L-Glutamine を添加し、NaHCO₃ と phenol red を除いた 改変 RPMI 1640 培地 (Sigma-Aldrich Co.) に 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid (Sigma-Aldrich Co.) を加え、10N-NaOH にて pH 7.0 に調整した後、ろ過滅菌した。35°C で培養を行い、24 時間ごとに濁度を測定し、発育コントロールの O.D. が 0.2 に達した時点の IC₈₀ 値を終末点 (MIC) とした。本法によって得られる測定結果は、NCCLS M27-A2 法によるマイクロ液体希釈法のそれとほぼ対応することが確認されている⁵⁾。

b) NCCLS M27-A2 法: 上述の JSMM 法におけるのと同じ培地を用いたマイクロ液体希釈法である。Candida 属およびその他の酵母は 35°C、48 時間、Cryptococcus 属酵母は 72 時間培養時の IC₅₀ 値を終末点 (MIC) とした。ただし trailing growth (広い濃度範囲の薬剤によって部分的に阻止されるような発育) を示す酵母については、24 時間培養時の IC₅₀ 値を終末点 (MIC) とした。

2) 糸状菌の薬剤感受性試験

Aspergillus 属菌種などの糸状菌に対する標準的実施法である NCCLS M38-A⁶⁾ とほぼ対応する結果が得られることが確認されている⁷⁾ 日本医真菌学会提案法⁸⁾ に準拠して感受性を測定した。培地は、酵母の場合と同様に、RPMI 1640 培地を用い、酸化還元指示薬 alamar blue (Alamar Bioscience Inc.) の呈色により IC₈₀ 値を終末点 (MIC) と判定した。培養は 27°C にて 1 週間を限度とし、24 時間ごとに観察を続け、発育コントロールが明らかに赤変した時点で終末点の判定を行った。

結 果

I. 収集菌株の菌種別内訳、分離源検体の種類および検体別 *C. albicans* 分離頻度

Table 1 に示すように、収集菌株の総数 576 株のうち、糸状菌は 4 株のみで、残りの 572 株はすべて酵母であった。酵母の最多菌種は *C. albicans* (326 株) であり、収集菌株総数の 56.6% を占めた。次いで *C. glabrata* (131 株)、*C. tropicalis* (57 株)、*C. parapsi-*

Table 1. Species distribution of 576 fungal clinical isolates collected by 11 hospitals in Japan, Japan Antifungal Surveillance Program, 2001 and 2002

Rank	Species	No. (%) of isolates
1	<i>Candida albicans</i>	326 (56.6)
2	<i>Candida glabrata</i>	131 (22.8)
3	<i>Candida tropicalis</i>	57 (9.9)
4	<i>Candida parapsilosis</i>	20 (3.5)
5	<i>Candida krusei</i>	8 (1.4)
6	<i>Candida lusitaniae</i>	6 (1.1)
6	<i>Trichosporon asahii</i>	6 (1.1)
8	<i>Candida guilliermondii</i>	4 (0.7)
8	<i>Cryptococcus neoformans</i>	4 (0.7)
10	<i>Candida kefyr</i>	2 (0.4)
11	<i>Candida dubliniensis</i>	1 (0.2)
11	<i>Candida inconspicua</i>	1 (0.2)
	Other yeasts ^a	6 (1.1)
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2 (0.4)
	Other molds ^b	2 (0.4)

^a Included are: *Rhodotorula mucilaginosa* (2), *Rhodotorula glutinis* (1), *Trichosporon pullulans* (1), *Saccharomyces cerevisiae* (1), *Cryptococcus humicola* (1)

^b Included are: *Penicillium* spp. (1), *Scedosporium* spp. (1)

losis (20 株) の順に多かった。そのほかの *Candida* 属菌種の菌株としては *C. krusei* (8 株), *C. lusitaniae* (6 株), *C. guilliermondii* (4 株), *C. kefyr* (2 株), *C. dubliniensis* (1 株), および *C. inconspicua* (1 株) が比較的少数含まれていた。*Candida* 属菌種全体を合わせた菌株数は収集酵母菌株総数の 97% (556 株/572 株) にも達した。*Candida* 属以外の酵母菌種 16 株には, *Trichosporon asahii* (6 株) および *Cryptococcus neoformans* (4 株), *Rhodotorula mucilaginosa* (2 株), および *R. glutinis*, *Cr. humicola*, *T. pullulans*,

Saccharomyces cerevisiae (各 1 株) が含まれていた。真菌菌株が検出された症例における基礎疾患については, 不明例または未記入例が大多数を占めたが, 記入例の中では悪性腫瘍および血液疾患が多かった。

Table 2 に, 検体ごとの収集菌株数およびその中で *C. albicans* が占める菌株数と割合を示す。収集菌株の分離源としては, 喀痰, 気管肺胞洗浄液などの気道由来検体が 40% 弱 (223 株/576 株) と最も多く, 尿が 20% 弱 (110 株/576 株) でこれに次ぎ, 血液や血管カテーテル由来検体は 11.5% (66 株/576 株) にとどまった。また各検体分離株の中で *C. albicans* が占める割合は, 口腔・鼻咽頭検体の 76% (44 株/58 株) が最も高く, 次いで膿・分泌液の 65% (17 株/26 株) であり, 髄液, 腹水などの体液検体では 38% (4 株/11 株) と最も低かった。

II. *Candida* 属菌種の薬剤感受性

Candida 属全菌株について, JSMM 法を用いて感受性測定を行うとともに, NCCLS M27-A プロトコールなど^{1-3,9)}に示された各薬剤についての耐性 MIC 基準すなわち FLCZ \geq 64 μ g/ml, ITCZ \geq 1 μ g/ml, VRCZ \geq 2 μ g/ml および 5-FC \geq 32 μ g/ml に準拠して耐性株の出現頻度を算出した。その結果を Table 3 にまとめて示す。*C. albicans* に対する FLCZ の 50%MIC および 90%MIC はそれぞれ 0.5 μ g/ml および 2 μ g/ml であり, 耐性株頻度は 3.7% であった。他の二つのアゾール系薬剤はいずれも抗 *C. albicans* 活性が FLCZ より強く, 50%MIC および 90%MIC の値は FLCZ のそれぞれの値の 1/10~1/20 以下であった。しかし耐性株頻度の点では 3 薬剤ともさほど違わず, 3~5% 程度の値を示した。また *C. albicans* の 5-FC 感受性も十分に高く, 耐性株は全く検出されなかった。

Non-*albicans Candida* 上位 8 菌種の中では, *C. parapsilosis* および比較的菌株の少なかった *C. guil-*

Table 2. Specimen-based number of isolates and frequencies of *C. albicans* isolation

Specimens	No. of isolates	% <i>C. albicans</i>
Blood, vessel catheter, etc.	66	31 (47.0)
Oral cavity, tongue, pharynx, nasal cavity	58	44 (75.9)
Sputum, bronchoalveolar lavage fluid, etc.	223	129 (57.9)
Urine	110	56 (50.9)
Bile, stool, gastric juice	66	38 (57.6)
Liquor (spinal fluid, ascites, etc.)	11	4 (38.4)
Pus, other exsudates, etc.	26	17 (65.4)
Unknown	16	7 (43.8)
Total	576	326 (56.6)

Table 3. *In vitro* susceptibilities of 556 clinical isolates of *Candida* species against fluconazole, itraconazole, voriconazole and flucytosine as determined by the Japanese Society for Medical Mycology (JSMM) method

Species (no. of isolates)	Antifungal agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		Range	50% ^a	90% ^a	% Resistant ^b
<i>C. albicans</i> (326)	Fluconazole	0.063->64	0.5	2	3.7
	Itraconazole	0.0078->8	0.031	0.125	5.2
	Voriconazole	≤ 0.0039 ->8	0.016	0.063	3.4
	Flucytosine	≤ 0.031 -2	0.125	0.25	0
<i>C. glabrata</i> (131)	Fluconazole	0.25->64	4	8	5.4
	Itraconazole	0.031->8	0.25	0.5	5.4
	Voriconazole	0.0078->8	0.063	0.25	5.4
	Flucytosine	≤ 0.031 ->64	0.063	0.125	1.6
<i>C. tropicalis</i> (57)	Fluconazole	0.5->64	32	>64	47.4
	Itraconazole	0.0078->8	1	>8	45.6
	Voriconazole	0.031->8	0.25	>8	43.9
	Flucytosine	≤ 0.031 ->64	0.125	0.25	1.8
<i>C. parapsilosis</i> (20)	Fluconazole	0.25-64	0.5	2	5.0
	Itraconazole	0.016-2	0.063	0.25	5.0
	Voriconazole	0.0078-0.25	0.016	0.031	0
	Flucytosine	≤ 0.031 -0.25	0.125	0.125	0
<i>C. krusei</i> (8)	Fluconazole	0.25-64	16	64	12.5
	Itraconazole	0.016-0.5	0.25	0.5	0
	Voriconazole	0.0078-1	0.25	1	0
	Flucytosine	0.063-16	8	16	0
<i>C. lusitaniae</i> (6)	Fluconazole	0.25-64	0.5	64	16.7
	Itraconazole	0.031-0.5	0.031	0.5	0
	Voriconazole	0.0078-1	0.016	1	0
	Flucytosine	≤ 0.031 -0.063	≤ 0.031	0.063	0
<i>C. guilliermondii</i> (4)	Fluconazole	2-4	4	4	0
	Itraconazole	0.063-0.5	0.25	0.25	0
	Voriconazole	0.063-0.5	0.125	0.5	0
	Flucytosine	0.063-4	0.063	4	0
<i>C. kefyr</i> (2)	fluconazole	0.25, 0.5			0
	Itraconazole	0.031, 0.063			0
	Voriconazole	0.0078, 0.031			0
	Flucytosine	0.016, 2			0
<i>C. dubliniensis</i> (1)	Fluconazole	2			0
	Itraconazole	0.031			0
	Voriconazole	0.031			0
	Flucytosine	0.25			0
<i>C. inconspicua</i> (1)	Fluconazole	32			0
	Itraconazole	0.25			0
	Voriconazole	1			0
	Flucytosine	16			0

^a 50% and 90%, MICs at which 50 and 90% of isolated, respectively, are inhibited.

^b Percent resistant according to the NCCLS interpretative breakpoints criteria.

guilliermondii や *C. kefyr* などは *C. albicans* と同程度のアゾール系薬剤感受性を示した。これらの菌種の中で耐性株が認められたのは、*C. parapsilosis* の FLCZ 耐性株および ITCZ 耐性株のみであり、出現頻度はいず

れも 5.0% であった。これに対して、non-*albicans Candida* の残りの 4 菌種、*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* および *C. lusitaniae* においては、FLCZ をはじめとするアゾール系薬剤に対する感受性がより低

Table 4. *In vitro* susceptibilities of 556 clinical isolates of *Candida* species against fluconazole, itraconazole, voriconazole and flucytosine as determined by the NCCLS M27-A2 microdilution method

Species (no. of isolates)	Antifungal agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
		Range	50% ^a	90% ^a	% Resistant ^b
<i>C. albicans</i> (326)	Fluconazole	0.031->64	0.25	0.5	0.6
	Itraconazole	≤ 0.0039 ->8	0.016	0.031	0.6
	Voriconazole	≤ 0.0039 ->8	0.0078	0.031	0.6
	Flucytosine	≤ 0.031 -2	0.063	0.125	0
<i>C. glabrata</i> (131)	Fluconazole	0.125->64	2	4	3.8
	Itraconazole	0.0078-2	0.125	0.25	2.3
	Voriconazole	≤ 0.0039 -2	0.063	0.125	3.1
	Flucytosine	≤ 0.031 ->64	≤ 0.031	≤ 0.031	1.5
<i>C. tropicalis</i> (57)	Fluconazole	0.25->64	0.5	2	1.8
	Itraconazole	0.0078->8	0.031	0.125	3.5
	Voriconazole	0.0078->8	0.031	0.125	1.8
	Flucytosine	≤ 0.031 ->64	≤ 0.031	0.125	0.02
<i>C. parapsilosis</i> (20)	Fluconazole	0.125-1	0.25	1	0
	Itraconazole	0.0078-0.125	0.031	0.063	0
	Voriconazole	≤ 0.0039 -0.063	0.0078	0.031	0
	Flucytosine	≤ 0.031 -0.25	≤ 0.031	0.063	0
<i>C. krusei</i> (8)	Fluconazole	0.25-32	8	32	0
	Itraconazole	0.016-0.5	0.063	0.5	0
	Voriconazole	0.0078-1	0.125	1	0
	Flucytosine	≤ 0.031 -16	4	16	0
<i>C. lusitanae</i> (6)	Fluconazole	0.125-64	0.125	64	16.7
	Itraconazole	0.0078-0.25	0.031	0.25	0
	Voriconazole	≤ 0.0039 -0.5	0.0078	0.5	0
	Flucytosine	≤ 0.031	≤ 0.031	≤ 0.031	0
<i>C. guilliermondii</i> (4)	Fluconazole	2-4	2	4	0
	Itraconazole	0.031-0.5	0.25	0.5	0
	Voriconazole	0.063-0.125	0.063	0.125	0
	Flucytosine	≤ 0.031 -0.5	≤ 0.031	0.5	0
<i>C. kefyr</i> (2)	fluconazole	0.25, 0.5			0
	Itraconazole	0.031			0
	Voriconazole	0.0078			0
	Flucytosine	≤ 0.031 , 1			0
<i>C. dubliniensis</i> (1)	Fluconazole	2			0
	Itraconazole	0.031			0
	Voriconazole	0.031			0
	Flucytosine	≤ 0.031			0
<i>C. inconspicua</i> (1)	Fluconazole	16			0
	Itraconazole	0.25			0
	Voriconazole	0.5			0
	Flucytosine	2			0

^a 50% and 90%, MICs at which 50 and 90% of isolated, respectively, are inhibited.

^b Percent resistant according to the NCCLS interpretative breakpoints criteria.

く、FLCZ 耐性株頻度はそれぞれ 5.4, 47.4, 12.5 および 16.7% という比較的高い値を示した。また *C. glabrata* と *C. tropicalis* では ITCZ 耐性株および VRCZ 耐性株も同様の頻度で認められたが、他の菌種ではい

ずれの耐性株も検出されなかった。5-FC に関しては、*C. glabrata* と *C. tropicalis* においてのみ、それぞれ 1.6 および 1.8% という低頻度で耐性株が出現した。

C. tropicalis のアゾール系薬剤耐性株頻度が異常に

高いことから、NCCLS M27-A2 プロトコールに採用された新しい終末点判定基準を用いてすべての収集酵母菌株について再試験を行った。その結果を Table 4 に示す。*C. albicans* をはじめとする *Candida* 属各菌種に対するアゾール系 3 薬剤の 50% MIC および 90% MIC は、Table 3 に示された JSMM 法での対応する値と比べると、*C. tropicalis* の場合を除いて、いずれも 1/2~1/4 程度低くなった。これに対応して、各薬剤耐性株の頻度も低下し、FLCZ 耐性株については、*C. albicans* 0.6%、*C. glabrata* 3.8%、*C. krusei* 0% であった。そのほか JSMM 法で VRCZ および (または) ITCZ に対する耐性株が認められた *C. albicans*、*C. glabrata* および *C. parapsilosis* についても、*C. albicans* の ITCZ 耐性株および VRCZ 耐性株の頻度がともに 0.6%、*C. glabrata* の ITCZ 耐性株と VRCZ 耐性株の頻度がそれぞれ 2.3% および 3.1%、*C. parapsilosis* の ITCZ 耐性株の頻度が 0% といずれも低い値を示した。

これらの菌種の場合以上に JMSS 法と NCCLS M27-A2 法との間で耐性株頻度に顕著な相違を呈したのは、*C. tropicalis* である。後者の方法で測定を

行った結果、48 時間判定では 40% 以上の菌株が耐性とみなされたものの、24 時間判定では大半の菌株が感性とみなされ、したがって trailing growth であることが示された。その結果、各アゾール系薬剤の 50% MIC および 90% MIC は JSMM 法で得られた値に比べて NCCLS M27-A2 法では 1/50 以下となり、各薬剤で 40% を超えていた耐性株頻度も 1~3% 台に激減した (FLCZ, 47.4% vs 1.8%; ITCZ, 45.6% vs 3.5%; VRCZ, 43.9% vs 1.8%)。

5-FC 感受性に関しても *C. tropicalis* を含むすべての *Candida* 属菌種において、NCCLS M27-A2 法による測定値が JSMM 法のそれよりも低くなる傾向が認められた。しかし JSMM 法を用いた場合でも耐性株は *C. glabrata* で少数検出され (頻度, 1.8%) だけであったことから、試験法変更の耐性株頻度への影響もほとんど見られなかった。

III. *Candida* 属以外の酵母および糸状菌の薬剤感受性

Table 5 に *Candida* 属以外の酵母菌種として *Trichosporon asahii* 6 株および *Cryptococcus neoformans*

Table 5. *In vitro* susceptibilities of 16 isolates of non-*Candida* yeasts against four antifungal agents and four isolates of molds against two antifungal agents

Species (no. of isolates)	Antifungal agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Range	50%	90%
<i>Trichosporon asahii</i> (6)	Fluconazole	2-8 ^a /0.5-4 ^b	8/2	8/4
	Itraconazole	0.031-0.5/0.031-0.5	0.25/0.25	0.5/0.5
	Voriconazole	0.031-0.25/0.031-0.125	0.063/0.063	0.25/0.125
	Flucytosine	16->32/8->32	>32/16	>32/>32
<i>Cryptococcus neoformans</i> (4)	Fluconazole	2-8/1-8	4/2	8/8
	Itraconazole	0.125-0.25/0.031-0.25	0.125/0.063	0.25/0.25
	Voriconazole	0.031-0.125/0.031-0.063	0.063/0.031	0.125/0.063
	Flucytosine	4/2-4	4/2	4/4
Other yeasts (6) ^c	Fluconazole	0.5->64/0.5->64	16/16	>64/>64
	Itraconazole	0.031-4/0.031-1	0.5/0.125	4/1
	Voriconazole	0.0078->8/0.0078-4	0.5/0.063	>8/4
	Flucytosine	≤ 0.031 ->32/ ≤ 0.031 ->32	0.125/0.063	>32/>32
<i>Aspergillus fumigatus</i> (2)	Itraconazole	0.5		
	Voriconazole	1		
Other molds (2)	Itraconazole	0.5, >8		
	Voriconazole	0.25, 0.5		

^a MICs for yeasts were determined by the JSMM method for yeasts (upper column) and ^b the NCCLS M27-A2 microdilution method (lower column), and MICs for molds were determined by the JSMM method for molds.

^c Included are: *Rhodotorula mucilaginosa* (2), *R. glutinis* (1), *T. pullulans* (1), *Saccharomyces cerevisiae* (1), *Cr. humicola* (1).

^d Included are: *Penicillium* spp. (1), *Scedosporium* spp. (1).

mans 4株を含む計16株、ならびに *Aspergillus fumigatus* 2株を含む糸状菌4株、に対する薬剤感受性を測定した成績を示す。酵母については、FLCZ、ITCZ、VRCZ および5-FC合わせて4薬剤のMICをJSMM法とNCCLS M27-A2法によって測定した値を併記し、糸状菌についてはITCZとVRCZの2薬剤のMICのJSMM法による測定値を記した。

酵母に対する各薬剤のMICを二つの試験法の間で比較すると、JSMM法に比べてNCCLS M27-A2法では一部の菌株のMICが1/2~1/4に低下し、それが50%MICや90%MICにも反映された。MICに基づいて比較すると、アゾール系各薬剤に対する *T. asahii* や *Cr. neoformans* の感受性は *C. albicans* のそれよりも1/10程度低く、また薬剤間の比較ではVRCZ感受性が最も高かった。またこれらの担子菌系2菌種とくに *T. asahii* の5-FC感受性は *C. albicans* などの *Candida* 属菌種に比べて著しく低かった。

A. fumigatus などの糸状菌は、ITCZおよびVRCZに対して多少とも感受性をもつことが示唆されたが、被検菌株数が少なく、今回の試験からはその詳細を知ることができなかった。

考 察

近年、悪性腫瘍などの免疫不全をもたらす基礎疾患をもつことに加えて、高度の医療管理や侵襲的治療を受けることなどによってさらに高リスクとなった患者の増加に伴って、こうした易感染患者に好発する深在性真菌症マネジメントはますますその重要性を増している。深在性真菌症の併発が患者の病態と予後を大きく左右するからである。なかでも最も発生頻度の高い侵襲性のカンジダ症次いでアスペルギルス症に対する治療対策を適切に実施することがとくに強く要望されている。

現在国内で何らかの深在性真菌症に対する適応が承認されている抗真菌薬としては、amphotericin B (AMPH)、5-FC、miconazole、FLCZ、ITCZ、micafungin、fosfluconazole と合わせて7薬剤がある。そのなかでFLCZは、1989年の上市以来、安全性、薬物動態、使用上の利便性など数々の優れた薬剤特性を備えていることから、本薬剤が深在性真菌症とくにカンジダ症をはじめとする病原性酵母に起因する感染症の化学療法の中心的役割を担うに至った。しかしながら、その後AIDS患者における口腔咽頭カンジダに対するFLCZの低用量長期治療による耐性 *C. albicans*

Table 6. Comparison of the results of preceding eight different studies and present study on the *in vitro* fluconazole-susceptibility of isolates of four major *Candida* species

Surveillance program (reference)	Yrs	No. of isolates tested	Test method ^a	% Resistant to fluconazole ^b			
				<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
CDC (15)	1992-1993	394	48 h (IC ₅₀)	1	14	2	0
	1998-2000 ^c	944	48 h (IC ₅₀)	1	10	6	0
NEMIS (16)	1993-1995	35	48 h (IC ₅₀)	0	6	3	3
EIEIO (17)	1998-2001	254	48 h (IC ₅₀)	0	10	0	0
Sweden (18)	1994-1998	233	48 h (IC ₅₀)	0	40	0	15
Canada (19)	1996-1998	442	24 h (IC ₅₀)	1	9	0	0
			48 h (IC ₅₀)	13	13	27	0
SENTRY (20)	1997-2000	2,047	48 h (IC ₅₀)	1	7	1	0
JIMS (1)	2001-2002	535	24 h (IC ₅₀)	0	1	3	0
			48 h (IC ₅₀)	2	5	36	1
Present study	2001, 2002	556	24 or 48 h (IC ₅₀) ^d	1	4	2	0
			24 or 48 h (IC ₈₀) ^e	4	6	48	5

^a Where otherwise not indicated, the results of NCCLS M-27A test were read after 24 or 48 h using the IC₅₀ values as the endpoint criteria.

^b Percent resistant according to the NCCLS interpretive breakpoints criteria for fluconazole (MIC ≥ 64 μg/ml).

^c Lyon, GM, et al., 40th ICAAC.

^d Determined by the NCCLS M27-A2 microdilution method.

^e Determined by the Japanese Society for Medical Mycology (JSMM) method for yeasts.

の出現、および FLCZ 低感受性菌とされる *C. krusei* や *C. glabrata* に起因する感染症の増加が問題視されるようになった^{10, 11)}。

こうした状況を背景に、1990年代に入って抗真菌薬感受性試験法の重要性および感受性測定標準化の必要性に対する認識が高まった。最も早くからこの課題に取り組んできたのは、米国臨床検査標準化委員会 (National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS) であり、酵母を対象とする試験法については、M27-P¹²⁾、M27-T¹³⁾ および M27-A を経て、2002年に発表された M27-A2 プロトコールに至っている。現在のところ、酵母に関しては NCCLS M27-A2 プロトコールによる感受性測定法が最も高い信頼性をもつと考えられる。その理由は、以前の方法 (NCCLS M27-P, M27-T, M27-A) では測定値すなわち MIC とマウス感染モデルにおける *in vivo* 効果や患者における臨床効果との間での乖離を生じる大きな原因となっている trailing growth 株の問題が終末点判定までの培養時間を早めるという修正によって克服されたことにある。一方、国内においては NCCLS M27-P のマクロ法をマイクロ法に改変した JSMM 法に基づいて作製された測定キットなどが検査室等で広く使用されている。しかし JSMM 法の終末点判定基準は、NCCLS M27-T 以降のマイクロ法の判定基準 (IC₅₀ 値相当) よりも厳しい IC₈₀ 値に設定されている。その結果、JSMM 法を用いて測定した場合には、trailing growth 株の多くが耐性菌と誤って判定され、それが *in vivo* 効果と乖離する主な原因となっている¹⁴⁾。

酵母の薬剤感受性試験の標準の実施法としての NCCLS M27-A2 法および M27-A 法には *Candida* 属菌種に対する FLCZ などのアゾール系薬剤ならびに 5-FC の推定ブレイクポイント基準が提示されており、現在、国際的にほぼ受け入れられている。これによって、抗真菌薬感受性サーベイランスの実施および得られた成績の解釈、さらには異なる研究グループの成績との比較は従来に比べて格段に容易になった。こうした背景の中でわれわれは、まだまとまった抗真菌薬感受性情報がほとんど得られていない国内の臨床分離株を対象として疫学的な観点から抗真菌薬感受性に関する継続的な調査研究を国内 11 施設の共同研究として実施することを計画した。感受性測定の対象薬剤は上記の理由で選んだ FLCZ、ITCZ、VRCZ および 5-FC の 4 薬剤である。また感受性測定対象菌種は、*Candida* 属菌種に限らず糸状菌まで含めて全菌種とした。しかし、結果的には分離株総数の 97% までが *Candida* 属菌種で占められたことから、主たる解析は本

属菌種とくに上位 4 菌種である *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* および *C. parapsilosis* に限って行った。

Candida 属菌種臨床分離株についての FLCZ その他の抗真菌薬に対する感受性のサーベイランスに関しては、Table 6 にまとめて示したように、これまでにいくつかの調査が諸外国、主として米国で行われてきた。1992~1993年に CDC グループがアトランタとサンフランシスコの病院におけるカンジダ血症患者から分離した 394 株の AMPH, 5-FC, FLCZ, ITCZ に対する感受性を調べた成績が Kao, et al.¹⁵⁾ により最初に報告された。このグループの調査は 1998~2000 年にも行われている。また 1990 年代前半には、National Epidemiology of Mycosis Survey (NEMIS) と呼ばれる外科集中治療室におけるカンジダ血症患者由来株の薬剤感受性サーベイランスがなされた¹⁶⁾。1998~2001 年には Emerging Infections and the Epidemiology of Iowa Organisms (EIEIO) Study が行われている¹⁷⁾。米国以外には、スウェーデンにおける血液由来 *Candida* 属菌種 233 株についての試験 (1994~1998 年)¹⁸⁾、カナダのケベック市における *Candida* 属菌種 442 株を対象とした試験 (1996~1998 年)¹⁹⁾ などの成績の報告がある。さらに米国、カナダ、ラテンアメリカおよびヨーロッパ諸国を含む国際的規模で継続的に行われている SENTRY Antimicrobial Surveillance Program の中で、1997~2000 年の抗真菌薬についての成績が Pfaller, et al.²⁰⁾ により報告されている。

われわれはこれらの諸外国の 7 つの試験成績に、先に述べた Japan Invasive Mycosis Surveillance (JIMS) Study¹⁾ による国内成績を加えた、合わせて 7 つの研究グループからの 8 つの試験成績を、われわれの今回の試験成績と比較検討した。Table 6 には、*Candida* 属主要 4 菌種、*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* および *C. parapsilosis* の各 FLCZ 耐性株分離頻度を示した。終末点 (MIC) 判定基準として 24 時間または 48 時間培養の IC₅₀ 値をとった場合のわれわれの試験成績は、*C. albicans* および *C. parapsilosis* に関しては欧米ならびに国内の大半の試験成績とほぼ一致し、耐性株頻度はそれぞれ 1~2% および 0~3% の範囲に収まった。例外は *C. albicans* についてのカナダグループによる 48 時間判定時の成績 (13%)、および *C. parapsilosis* についてのスウェーデングループの成績 (15%) のみである。これに対して、*C. glabrata* および *C. tropicalis* についてはそれぞれ 6~40%、0~36% と、報告間のばらつきが著しい。*C. glabrata* は

C. krusei と並んで FLCZ 耐性株または低感受性株が多いことで知られており、事実、欧米の研究グループからの報告では 10% 以上の耐性株頻度を示すものが多い。一方、われわれを含めた本邦の 2 グループからの報告における耐性株頻度は 5% 以下であり、耐性株の地理的分布の相違が示唆される。

われわれが本研究で最も注目したのは *C. tropicalis* 分離株の FLCZ その他のアゾール系薬剤に対する感受性である。われわれの測定成績からは、終末点判定基準を 24 時間または 48 時間培養後の IC₈₀ とするか、または 48 時間後の IC₅₀ とした場合でも、分離株の 40% 以上が耐性と判定された。これに対して 24 時間培養後の IC₅₀ を基準とした場合には、耐性株頻度は 2% へ激減したのである。同様の結果は、JIMS グループおよびカナダグループの成績でも見られ、培養時間を 48 時間から 24 時間に短縮することによって、耐性株頻度はそれぞれ 36% から 3%、27% から 0% へいずれも低下している。これとは対照的に、それ以外の国からの報告では培養時間を 48 時間にした場合でも耐性株頻度は 0~6% にとどまっている。これらの結果は、わが国やカナダの一定の地域では *C. tropicalis* 臨床分離株中に trailing growth 株が高率に含まれる一方、他の欧米諸国ではその頻度が極めて低いことを示しており、trailing growth 株頻度の地域差を示唆するものとして興味深い。この可能性を確認するには今後さらにデータを集積する必要がある。

最近の臨床分離株について抗真菌薬感受性を測定し、解析した本報告の成績から、本来 FLCZ 高感受性菌とされる *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* などについては耐性株が 0~2% 程度しか検出されなかったこと、従来 FLCZ 感受性が低いとされてきた *C. glabrata* や *C. krusei* についても耐性株出現頻度は 4% 以下に過ぎないこと、また ITCZ および VRCZ に対する耐性株頻度もほぼ同程度に低いこと、さらに 5-FC に関しても目立った耐性株の出現は認められなかった。このことは、十分な用量で適切な期間これらの薬剤を使用する限り、ほとんどすべての *Candida* 属菌種に起因する感染症に対する有効性が期待できる可能性を示唆している。しかし真菌の抗真菌薬感受性にかかわる特性は、年月とともに変遷する可能性があることから、今後とも臨床分離株を対象とするサーベイランスを継続して実施することが重要と考えられる。

また本報告の成績は JSMM 法および NCCLS M27-A2 法の抗真菌感受性試験法の問題点も明らかにした。前者については終末点の判定基準を改訂すべき点

であり、後者については trailing growth 株の判定基準をより明確に規定すべき点である。いずれに関して今後早急な検討と対応が望まれる。

本論文の要旨は第 15 回日本臨床微生物学会総会 (平成 16 年 2 月) にて発表した。

謝 辞

本抗真菌薬感受性サーベイランスに対する Pfizer Pharmaceuticals, New York の research grant (Study No.: DIF-2003-001) による助成および感受性測定を施行していただいた(株)ビー・エム・エルに深謝いたします。

文 献

- 1) 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.
- 2) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 17(9).
- 3) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard M27-A2, Second edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 22(15).
- 4) 山口英世, 内田勝久, 久米 光, 他. 1995. 日本医真菌学会標準化委員会報告 (1992~1994 年). *日本医真菌学会雑誌* 36: 61-86.
- 5) 篠田孝子, 槇村浩一, 小栗豊子, 他. 2002. 日本医真菌学会標準化委員会報告 (1998~2000 年); 抗真菌剤感受性試験法の標準化に関する多施設試験. *日本医真菌学会雑誌* 43: 108-110.
- 6) 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 Standard, Wayne, Pa. 22(16).
- 7) Yamaguchi, H., K. Uchida, K. Nagino, et al. 2002. Usefulness of a colorimetric method for testing antifungal drug susceptibilities of *Aspergillus* species to voriconazole. *J. Infect. Chemother.* 8: 374-377.
- 8) 篠田孝子, 久米 光, 福島和貴, 他. 1999. 日本医

- 真菌学会標準化委員会報告(1995~1997年). 日本医真菌学会雑誌 40: 239-257.
- 9) Sheehan, D. J., C. A. Hitchcock, C. M. Sibley. 1999. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 40-79.
 - 10) Willocks, L., C. L. S. Lee, R. P. Brettle, et al. 1991. Fluconazole resistance in AIDS patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 23: 937-939.
 - 11) Sanguineti, A., J. K. Carmichael, K. Campbell, 1993. Fluconazole-resistant *Candida albicans* after long-term suppressive therapy. *Arch. Intern. Med.* 153: 1122-1124.
 - 12) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Proposed standard M27-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 12(25).
 - 13) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1995. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Tentative standard M27-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 15(10).
 - 14) 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.
 - 15) Kao, A. S., M. E. Brandt, W. R. Pruitt, et al. 1999. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin. Infect. Dis.* 29: 1164-1170.
 - 16) Blumberg, H. M., W. R. Jarvis, J. M. Soucie, et al. 2001. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. *Clin. Infect. Dis.* 33: 177-186.
 - 17) Diekema, D. J., S. A. Messer, A. B. Brueggemann, et al. 2002. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and epidemiology of Iowa organisms study. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1298-1302.
 - 18) Chryssanthou, E. 2001. Trends in antifungal susceptibility among Swedish *Candida* species bloodstream isolates from 1994 to 1998: Comparison of the E-test and the Sensititre Yeast One Colorimetric Antifungal Panel with the NCCLS M27-A reference method. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4181-4183.
 - 19) St-Germain, G., M. Laverdiere, R. Pelletier, et al. 2001. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year(1996 to 1998) multicenter surveillance study in Quebec, *Canada*. *J. Clin. Microbiol.* 39: 949-953.
 - 20) Pfaller, M. A., D. J. Diekema, R. N. Jones, et al. 2000. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 to 2000. *J. Clin. Microbiol.* 40: 852-856.

Nationwide Survey of Antifungal Drug Susceptibility of Clinical Fungal Isolates in Japan from the Japan Antifungal Surveillance Program (JASP), 2001–2002

Hideyo Yamaguchi,¹⁾ Katsuhisa Uchida,¹⁾ Katsuko Okuzumi,²⁾ Toyoko Oguri,³⁾ Keiko Adachi,⁴⁾ Sayoko Kawakami,⁵⁾ Masakazu Tosaka,⁶⁾ Chieko Kawashima,⁷⁾ Yoshiko Hori,⁸⁾ Toshimi Kitazawa,⁹⁾ Mutsumu Hayashi,¹⁰⁾ Yoshihiko Saito,¹¹⁾ Kyoko Ozaki,¹²⁾ Yayoi Nishiyama¹⁾,
Association of Japan Antifungal Susceptibility Surveillance group

¹⁾ Teikyo University Institute of Medical Mycology

²⁾ The University of Tokyo Hospital (*Current address: Dokkyo University Hospital)

³⁾ Juntendo University Hospital

⁴⁾ Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital

⁵⁾ Teikyo University Hospital

⁶⁾ Kumamoto University Hospital

⁷⁾ Ashikaga Red Cross Hospital

⁸⁾ Okayama Saiseikai General Hospital

⁹⁾ Kitkohkai General Hospital Tane Hospital

¹⁰⁾ Jichi Medical School Ohmiya Hospital

¹¹⁾ Tohoku University Hospital

¹²⁾ Niigata University Hospital

We evaluated the antifungal susceptibility profile of 576 recent clinical fungal isolates collected from JASP-participating nationwide hospitals during the two months, June 2001 and March 2002. Almost all isolates were *Candida* species, with fewer numbers of non-*Candida* yeasts (16 isolates) and molds (4 isolates). *C. albicans* was the most frequent species (56.6%), followed by *C. glabrata* (22.8%), *C. tropicalis* (9.9%) and *C. parapsilosis* (3.5%). The MIC of fluconazole (FLCZ), itraconazole, voriconazole and flucytosine against *Candida* and other yeast species were determined by the Japanese Society for Medical Mycology (JSMM) microdilution method and the NCCLS M27-A2 microdilution method. Percent resistant by using the interpretive breakpoint criteria of NCCLS to FLCZ was 47% for *C. tropicalis* and around 5% for other *Candida* species including *C. albicans* and *C. glabrata* when tested by JSMM assay method, while the values were lowered to 0 to 4% for all *Candida* species when tested by the NCCLS M27-A2 protocol. A similar trend was also seen with the two other azole antifungal drugs. A difference in the results obtained between the two assay methods appeared to be due to trailing growth isolates whose azole-susceptibility is usually underestimated in the former method. This study showed that *in vitro* resistance to these azole antifungal drugs remains uncommon in almost all *Candida* species.