

## [原 著]

*Candida* 属における微量液体希釈法と E-test を用いた薬剤感受性法の比較検討守重比路美<sup>1)</sup>・眞野容子<sup>2)</sup>・後藤美江子<sup>3)</sup>・小栗豊子<sup>4)</sup>・古谷信彦<sup>1),2)</sup><sup>1)</sup>文京学院大学大学院保健医療科学研究科<sup>2)</sup>文京学院大学保健医療技術学部<sup>3)</sup>東京大学医学部付属病院<sup>4)</sup>亀田総合病院臨床検査部

(平成23年12月1日受付, 平成24年2月10日受理)

近年、深在性真菌症の増加や fluconazole (FLCZ) 耐性 *Candida albicans* の出現などにより、正確な真菌の MIC 値を知ることが重要となっている。そこで今回、*Candida* 属菌について CLSI M27-A3 に基づく微量液体希釈法と手技の簡便な E-test による MIC 値を比較検討した。供試菌として *C. albicans* 36 株、*Candida glabrata* 20 株、*Candida tropicalis* 17 株および精度管理株 7 株の計 80 株、対象薬として amphotericin B (AMPH-B), flucytosine (5-FC), itraconazole (ITCZ), FLCZ の計 4 薬剤を使用した。両測定法間で 1 管差以内の MIC 一致率が最も高かった薬剤は 5-FC (92.5%) で、FLCZ (72.6%), ITCZ (65.0%) がこれに次いでいた。一方、AMPH-B では 96.3% の株が微量液体希釈法より E-test において 2 管以上低値となり、ITCZ では 27.5%, FLCZ では 25.0% であった。また、*C. glabrata*, *C. tropicalis* における 5-FC, *C. tropicalis* における FLCZ を除く各菌種、各薬剤について、測定法によって薬剤感受性が異なって判定される株が複数認められた。今回の検討では、管差が認められたほとんどの株で E-test の MIC 値が微量液体希釈法より低値となる傾向が見られ、判定の際には注意すべき点であると考えられた。

**Key words:** *Candida*, CLSI, broth microdilution, E-test, MIC

## 序 文

近年、免疫不全患者など高リスク患者の増加に伴い、深在性真菌症の発症例が増えている。深在性真菌症は易感染患者に併発する一般に重篤な感染症であり、特に真菌血症はいったん発症すると適切な治療が行われない限り失明や死亡など致命的な転帰をたどることが少なくない<sup>1)</sup>。近年、HIV 感染症の増加や生命維持のためのさまざまな医療技術の進歩、あるいは臓器移植といった特定の外科手技などのリスクにより、特にカンジダ症の発症頻度は急速に増加しつつある<sup>2)</sup>。また、国内外において *Candida albicans* の減少や non-*albicans Candida* 属菌の増加など、その分離頻

度に変化が見られており<sup>1,3~6)</sup>、従来深在性真菌症の第一選択薬であった fluconazole (FLCZ) に対して耐性の *C. albicans*, さらに FLCZ に自然耐性をもつとされている *Candida glabrata* や *Candida krusei* に起因する感染症も増加傾向である。これらのことから、真菌、特に *Candida* 属においても適切な薬剤を決定する薬剤感受性試験は非常に重要であると考えられる<sup>1,3~5)</sup>。しかし実際には、真菌に対する薬剤感受性試験は日常検査においてほとんど行われていないのが現状である。その原因として、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に基づく真菌の薬剤感受性試験の測定および判定が困難である点が挙げられる<sup>7)</sup>。すなわち、微量液体希釈法では、培地の濁りを目視または吸光度計で判定するために、判定前の攪拌処理が必要であるうえに、濁度判定には判定者の熟練が必要となる。一方、E-test では測定手技は簡便であるが、作製方法の煩雑な RPMI 1640 寒天培地を自家調整しなければならず、アゾール系抗真菌薬の判定においては阻止帯付近のマイクロコロニー発育によりエンドポイントの解

著者連絡先：(〒113-0023) 東京都文京区向丘 2-4-1  
文京学院大学大学院保健医療科学研究科  
微生物研究室  
守重比路美  
TEL: 03-3811-0401  
FAX: 03-3811-0439  
E-mail: 10ms214@hst.u-bunkyo.ac.jp

積が困難である<sup>8)</sup>。また、真菌に対する微量液体希釈法とE-testの測定結果の相関性について述べた論文はわれわれの知る限り国内では数報にすぎない<sup>9)</sup>。そこで今回、Candida属菌についてCLSI M27-A3に基づく微量液体希釈法と手技の簡便なE-testによる薬剤感受性試験をamphotericin B (AMPH-B), flucytosine (5-FC), itraconazole (ITCZ), FLCZの4薬剤に対して実施し、その判定MIC値を比較検討した。

## 材料と方法

### 1. 使用菌株

2009年11～12月にかけて都内の第三次医療機関より分離された*C. albicans* 20株（呼吸器由来13株，泌尿器由来7株），ITCZ耐性菌18株を含む*C. glabrata* 20株（呼吸器由来8株，泌尿器由来11株，血管内カテーテル由来1株），*Candida tropicalis* 15株（呼吸器由来7株，泌尿器由来8株）と，帝京大学医真菌センターより分与されたITCZおよびFLCZ耐性菌2株を含む*C. albicans* 7株（TIMM 3136, TIMM 3164, TIMM 3165, TIMM 3166, TIMM 3209, TIMM 3309, TIMM 3960）の咽頭由来4株，血液由来4株），千葉大学真菌医学研究センターより分与されたITCZおよびFLCZに対するトレーリング株3株を含む咽頭・口腔由来*C. albicans* 9株（IFM 46910, IFM 54354, IFM 57376, IFM 57378, IFM 57388, IFM 57389, IFM 57408, IFM 57409, IFM 57410），極東製薬工業株式会社より分与された*C. tropicalis* 2株（KYTE 1, KYTE 2）の計73株を用いた。精度管理株には*C. albicans* ATCC 66027, 24433, 90028, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. tropicalis* ATCC 750, *Candida parapsilosis* ATCC 90018, *C. krusei* ATCC 6258の計7株を使用した。

### 2. 使用薬剤

AMPH-B, 5-FC, ITCZ, FLCZの計4薬剤を対象とした。また，各抗真菌薬の設定濃度範囲はCLSI<sup>10)</sup>に基づきAMPH-B, ITCZ; 0.032～16 µg/ml, 5-FC, FLCZ; 0.125～64 µg/mlとした。

### 3. 薬剤感受性試験

(1) 微量液体希釈法：CLSI M27-A3に準拠した酵母様真菌FP‘栄研’（栄研化学）を使用した。ポテトデキストロース寒天培地（栄研化学）上で一夜培養した被検菌を滅菌生理食塩水にてMcFarland No. 0.5に調整し，菌液の10倍希釈液を解凍済みFPに0.5 µlずつ接種後，35±1℃で24時間，48時間培養し，肉眼による濁度判定を行った。

(2) E-test: 酵母様真菌薬剤感受性試験用E-test（シスメックス・ビオメリュール）を使用した。MIC測定

用培地には1 mol/L NaOHでpH 7.0±0.1に調整した2%グルコースおよび0.165 mol/L MOPS添加RPMI 1640寒天培地（L-グルタミン，フェノールレッド含有，重炭酸非含有）（Sigma-Aldrich）を用いた。さらに*C. albicans* 21株についてはグルコースをすでに含有しているRPMI 1640（GIBCO）を用いた0.165 mol/L MOPS添加RPMI 1640寒天培地（L-グルタミン，フェノールレッド含有，重炭酸非含有）も使い，AMPH-Bに対してのみ検討した。ポテトデキストロース寒天培地上で一夜培養した被検菌を滅菌生理食塩水にてMcFarland No. 0.5に調整し，培地表面に滅菌綿棒にてE-testの取扱説明書に準じて3方向から塗布し，これを2度繰り返した後，E-testストリップを配置した。35±1℃で24時間，48時間培養し，阻止帯よりMIC判定を行った。

### 4. 判定

(1) 微量液体希釈法：ウェル内の菌が均一になるように浮遊させ，その濁度を目視にて判定した。CLSI<sup>10)</sup>のスコア基準に準拠し，AMPH-BのMIC値はスコア0，すなわち完全発育阻止濃度とし，その他の抗真菌薬のMIC値はスコア2以下，すなわち対象と比較して50%程度の増殖抑制が見られた最小薬剤濃度とした。このとき，陽性コントロール混濁液と陰性コントロール内容液を等量混合したIC50ウェル（陽性コントロールの50%濃度菌液）を設け，IC50ウェルよりも濁度の薄いウェルをスコア2と判定した。

(2) E-test: AMPH-Bは完全発育阻止，5-FCは90%発育阻止，ITCZとFLCZはマイクロコロニーを無視し，80%発育が阻止されたMIC値を最小薬剤濃度とした。

## 結 果

### 1. 精度管理株による微量液体希釈法およびE-testの精度管理

各種精度管理株を用いて48時間培養における精度管理を行ったところ，AMPH-B, 5-FC, ITCZ, FLCZの4薬剤に対する判定MIC値は微量液体希釈法，E-testとも各検査キットにて示されている精度管理範囲内であった（Table 1）。

### 2. 各種測定菌株の抗真菌薬感受性

*Candida*属に対する各種抗真菌薬の測定法別MICをTable 2に示した。いずれの菌株も，AMPH-BにおけるE-testのMIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>は微量液体希釈法よりも2管以上の低値となったが，別方法にて作製した培地における*C. albicans*の検討では，MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>ともに0.5 µg/mlと，微量液体希釈法よりも1管低値に留まっ

Table 1. Comparison of broth microdilution MICs and E-test MICs for four antifungal agents against five reference strains

Organism	Agent <sup>a</sup>	Broth microdilution (µg/ml)		E-test (µg/ml)	
		Reference range	MIC	Reference range	MIC
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	AMPH-B	0.5–2	1	0.125–0.5	0.125
	5-FC	0.5–2	0.5	0.5–2	2
	ITCZ	NA <sup>b</sup>	0.125	0.064–0.25	0.064
	FLCZ	0.25–1	0.5	0.125–0.5	0.5
<i>C. albicans</i> ATCC 24433	AMPH-B	0.25–1	1	NA	0.064
	5-FC	1–4	1	NA	>32
	ITCZ	NA	0.032	NA	0.064
	FLCZ	0.25–1	0.25	NA	0.5
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	AMPH-B	0.5–2	1	NA	0.125
	5-FC	≤0.125–0.25	≤0.125	NA	0.125
	ITCZ	NA	0.25	NA	0.25
	FLCZ	1–4	1	NA	2
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	AMPH-B	0.5–2	1	NA	0.25
	5-FC	≤0.125–0.25	≤0.125	NA	0.125
	ITCZ	NA	0.125	NA	0.125
	FLCZ	0.25–1	1	NA	1
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	AMPH-B	0.25–2	2	0.5–2	0.5
	5-FC	4–16	4	NA	>32
	ITCZ	0.125–0.5	0.125	0.25–1	0.5
	FLCZ	16–64	16	NA	64

<sup>a</sup>AMPH-B: amphotericin B, 5-FC: flucytosine, ITCZ: itraconazole, FLCZ: fluconazole

<sup>b</sup>NA, not available.

た。その他、*C. albicans*の5-FCにおけるE-testのMIC<sub>90</sub>が2管以上の高値となった以外は、*C. albicans*のFLCZにおけるMIC<sub>90</sub>、*C. glabrata*のITCZにおけるMIC<sub>90</sub>、*C. tropicalis*のITCZにおけるMIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub>でE-testが2管以上の低値となった。また、全菌種ではAMPH-BのMIC<sub>50</sub>およびMIC<sub>90</sub>と、FLCZのMIC<sub>50</sub>でE-testが2管以上の低値となった。

### 3. 各種抗真菌薬の微量液体希釈法およびE-testにおける判定MIC値の一致率

48時間判定における微量液体希釈法およびE-testの相関グラフをFig. 1に示した。AMPH-Bでは微量液体希釈法のrangeが0.5–2 µg/mlと狭い範囲であるのに対して、E-testでは≤0.032–0.5 µg/mlと広範囲であった。また、各測定法間で±1管差以内にとどまる株は3株(3.8%)で、96.3%の株がE-testで2管以上低値となった。しかし、別方法にて作製した培地では、*C. albicans* 21株におけるE-test rangeが0.25–0.5 µg/mlと狭い範囲にとどまった。5-FCでは6株がE-testで2管

以上高値で、このうち4株は微量液体希釈法で≤4 µg/ml、E-testで≥64 µg/mlと判定された。しかし、両測定法とも≤0.125 µg/mlと高い感受性を示す株がほとんどであったために高い一致率となった。ITCZでは80株中22株(27.6%)、FLCZでは20株(25.1%)がE-testで2管以上低値となり、そのうち*C. albicans*の3株はITCZとFLCZの微量液体希釈法がそれぞれ≥16 µg/ml (ITCZ)、≥64 µg/ml (FLCZ)であるのに対し、E-testでは≤0.25 µg/mlに判定された。

### 4. 各種抗真菌薬の微量液体希釈法およびE-testにおける判定MIC値の管差の割合

微量液体希釈法を基準とし、E-testとの管差の割合を薬剤別に比較した(Table 3)。AMPH-Bでは77株(96.3%)がE-testで2管以上低値となり、このうち3管低値であった株が38.8%と最も多く認められた。しかし、別方法で作製したRPMIを用いた*C. albicans* 21株のMIC値は、微量液体希釈法よりもE-testで3管低く判定される株が1株あった以外は全て1管低値(95.2%)

Table 2. Comparison of MICs of four antifungal agents determined by broth microdilution and E-test among 80 isolates of *Candida* species

Species (No. of isolates)	Agent <sup>a</sup>	Method <sup>b</sup>	MIC (µg/ml)		
			Range	50%	90%
<i>C. albicans</i> (39)	AMPH-B	MD	0.5–2	1	1
		E-test	0.032–16	0.064	0.125
	5-FC	MD	0.125–64	0.125	0.5
		E-test	0.064–64	0.125	2
	ITCZ	MD	0.032–16	0.064	1
		E-test	0.032–16	0.064	0.5
FLCZ	MD	0.125–64	0.25	64	
	E-test	0.125–64	0.125	4	
<i>C. glabrata</i> (21)	AMPH-B	MD	1–2	1	2
		E-test	0.125–0.5	0.125	0.25
	5-FC	MD	0.125–0.5	0.125	0.125
		E-test	0.125–1	0.125	0.125
	ITCZ	MD	0.064–16	1	16
		E-test	0.032–4	1	4
FLCZ	MD	1–32	8	16	
	E-test	0.5–16	4	16	
<i>C. tropicalis</i> (18)	AMPH-B	MD	1–2	1	1
		E-test	0.064–0.5	0.125	0.25
	5-FC	MD	0.125	0.125	0.125
		E-test	0.064–0.125	0.125	0.125
	ITCZ	MD	0.032–0.5	0.25	0.5
		E-test	0.032–0.25	0.064	0.125
FLCZ	MD	0.25–2	0.5	1	
	E-test	0.125–2	0.25	0.5	
Total (80)	AMPH-B	MD	0.5–2	1	1
		E-test	0.032–16	0.125	0.25
	5-FC	MD	0.125–64	0.125	0.25
		E-test	0.064–64	0.125	0.5
	ITCZ	MD	0.032–16	0.125	2
		E-test	0.032–16	0.064	2
FLCZ	MD	0.125–64	1	16	
	E-test	0.125–64	0.25	8	

<sup>a</sup>AMPH-B: amphotericin B, 5-FC: flucytosine, ITCZ: itraconazole, FLCZ: fluconazole

<sup>b</sup>MD: broth microdilution

であった。5-FCでは測定法による管差が±1管差以内であった株の割合が92.5%、管差なしの割合が82.5%と、他の薬剤に比べて最も高い一致率となった。ITCZとFLCZでは、±1管差以内にとどまったのは65.0% (ITCZ)、72.6% (FLCZ)で、E-testで2管以上低値となる割合は27.5% (ITCZ)、25.0% (FLCZ)であった。

48時間判定における各種抗真菌薬の感受性の成績をTable 4に示した。AMPH-Bでは全菌種において、

微量液体希釈法で2 µg/ml以上の耐性を疑う株が8株認められたが、E-testでは全て感性和判定された。5-FCではほとんどの株が微量液体希釈法で感性和判定されたが、このうち4株はE-testにおいて耐性和判定された。一方、ITCZにおける*C. albicans*では微量液体希釈法でS-DD (用量依存的感性和)と判定された4株のうち、2株はE-testで耐性和判定された。また、微量液体希釈法で耐性和判定された5株のうち1株はE-testで感性和、2株はS-DDと判定された。*C. glabrata*

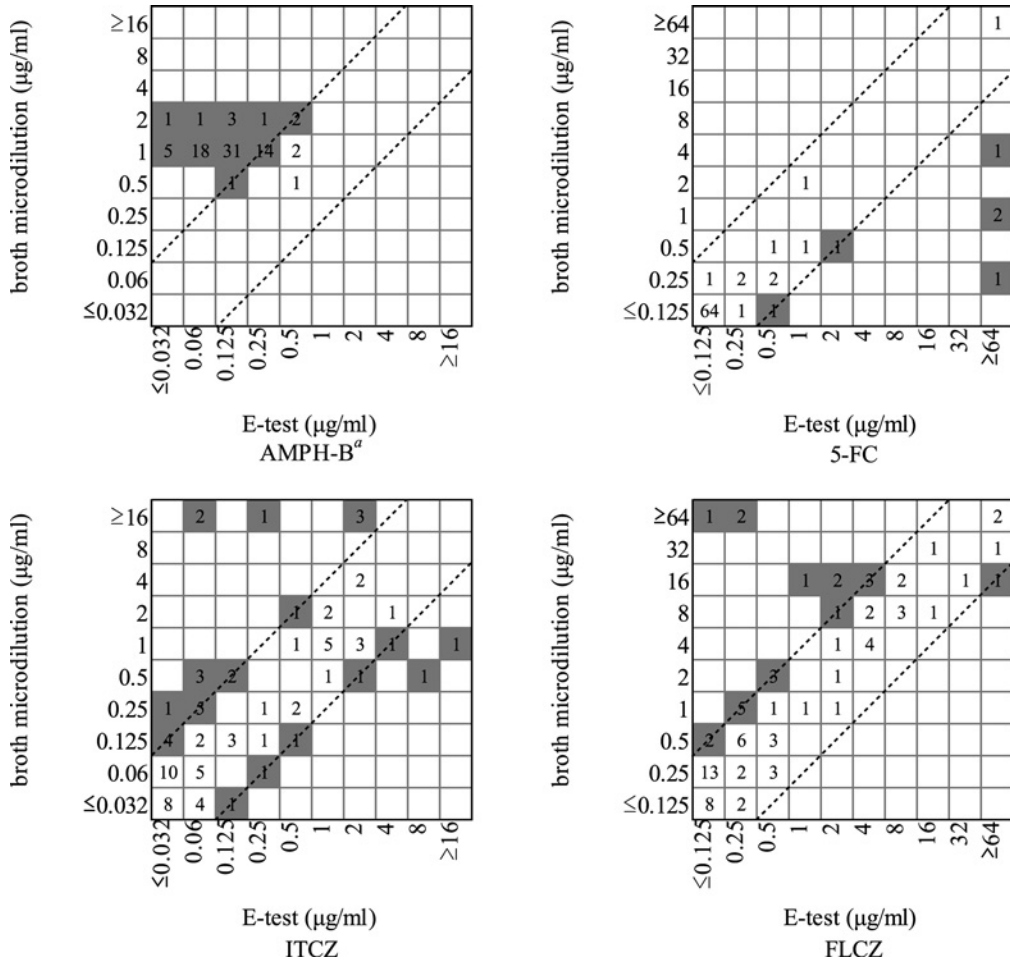


Fig. 1. Correlation between broth microdilution MICs and E-test MICs of four antifungal agents in all strains. The vertical dashed line shows within 2 fold dilution. The shaded frame shows beyond 2 fold dilution.

<sup>a</sup>AMPH-B: amphotericin B, 5-FC: flucytosine, ITCZ: itraconazole, FLCZ: fluconazole

では微量液体希釈法でS-DDと判定された2株のうち、1株はE-testで感性、もう1株は耐性と判定された。*C. tropicalis*ではS-DDと判定された株が61.1% (微量液体希釈法)、11.1% (E-test) と、大きく乖離した。FLCZにおける*C. albicans*では微量液体希釈法で耐性と判定された5株のうち、3株はE-testで感性と判定された。一方、微量液体希釈法でS-DDと判定された2株のうち、1株はE-testで耐性と判定された。*C. glabrata*ではS-DDと判定された株は微量液体希釈法で42.9%、E-testで9.5%と測定法によって大きく異なった。

## 考 察

精度管理株を用いた各薬剤感受性試験では微量液体

希釈法、E-testともMIC値はそれぞれの精度管理範囲にとどまったが、*C. albicans* ATCC 90028におけるAMPH-Bに対するE-testのMIC値が微量液体希釈法のMIC値よりも3管低値となるなど、測定法により判定MIC値にばらつきが見られた。その原因の一つとして、CLSI M27-A3に準拠した微量液体希釈法と、E-testの精度管理範囲が一部の薬剤で大きく異なることが考えられた<sup>11)</sup>。

今回の検討ではAMPH-Bの判定MIC値がE-testで著しく低値となった。このような報告は複数存在しており、Favelらの検討では、微量液体希釈法ではいずれの菌種も0.25~2 µg/mlであったのに対し、E-testでは*C. albicans*、*C. glabrata*において≤0.06~1 µg/ml、*C. tropicalis*において0.125~0.5 µg/mlとrangeが広く、か



Table 3. MIC distribution of broth microdilution and E-test for 80 isolates

Agent <sup>d</sup> (No. of isolates)	< -5	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	>5
AMPH-B (80)	1 (1.3%)	6 (7.5%)	22 (27.5%)	31 (38.8%)	17 (21.3%)	2 (2.5%)	1 (1.3%)						
5-FC (80)						4 (5.0%)	66 (82.5%)	4 (5.0%)	2 (2.5%)		1 (1.3%)		3 (3.8%)
ITCZ (80)	3 (3.8%)			7 (8.8%)	12 (15.0%)	18 (22.5%)	22 (27.5%)	12 (15.0%)	4 (5.0%)		1 (1.3%)		1 (1.3%)
FLCZ (80)	3 (3.8%)			3 (3.8%)	14 (17.5%)	26 (32.5%)	23 (28.8%)	9 (11.3%)	1 (1.3%)	1 (1.3%)			
Total (320)	7 (2.2%)	6 (1.9%)	21 (6.6%)	41 (12.8%)	43 (13.4%)	50 (15.6%)	112 (35.0%)	25 (7.8%)	7 (2.2%)	1 (0.3%)	2 (0.6%)		5 (1.6%)

The values are the percent of the strains exhibit the difference between E-test MIC and microdilution MIC

0: E-test MICs are equal to microdilution MICs

1: E-test MICs were 1 dilution, 2-fold, higher than microdilution MICs

-1: E-test MICs were 1 dilution, 2-fold, lower than microdilution MICs

2: E-test MICs were 2 dilutions, 4-fold, higher than microdilution MICs

-2: E-test MICs were 2 dilutions, 4-fold, lower than microdilution MICs

<sup>a</sup>AMPH-B: amphotericin B, 5-FC: flucytosine, ITCZ: itraconazole, FLCZ: fluconazole

Table 4. Distribution of 80 organisms tested according to species and susceptibility profile

Method <sup>d</sup> and species (No. of isolates)	No. (%) of isolates											
	AMPH-B <sup>b</sup>		5-FC			ITCZ			FLCZ			
	S	R <sup>c</sup>	S	I <sup>d</sup>	R	S	S-DD	R	S	S-DD	R	
<i>C. albicans</i> (39)	MD	36 ( 92.3 )	3 ( 7.7 )	38 ( 97.4 )		1 ( 2.6 )	30 (76.9)	4 (10.3)	5 (12.8)	32 ( 82.1 )	2 ( 5.1 )	5 (12.8)
	E-test	39 (100 )		35 ( 89.7 )		4 (10.3)	31 (79.5)	4 (10.3)	4 (10.3)	35 ( 89.7 )	1 ( 2.6 )	3 ( 7.7 )
<i>C. glabrata</i> (21)	MD	19 ( 90.5 )	2 ( 9.5 )	21 (100 )			1 ( 4.8 )	2 ( 9.5 )	18 (85.7)	12 ( 57.1 )		9 (42.9)
	E-test	21 (100 )		21 (100 )			2 ( 9.5 )	2 ( 9.5 )	17 (81.0)	19 ( 90.5 )		2 ( 9.5 )
<i>C. tropicalis</i> (18)	MD	16 ( 88.9 )	2 (11.1)	18 (100 )			7 (38.9)	11 (61.1)		18 (100 )		
	E-test	18 (100 )		18 (100 )			16 (88.9)	2 (11.1)		18 (100 )		
Total (80)	MD	72 ( 90.0 )	8 (10.0)	79 ( 98.8 )		1 ( 1.3 )	40 (50.0)	17 (21.3)	23 (28.8)	63 ( 78.8 )	12 (15.0)	5 ( 6.3 )
	E-test	80 (100 )		75 ( 93.8 )		5 ( 6.3 )	50 (62.5)	9 (11.3)	21 (26.3)	73 ( 91.3 )	3 ( 3.8 )	4 ( 5.0 )

S, susceptible; S-DD, susceptible dose dependent; I, intermediate; R, resistant. Values were as determined by the CLSI M27-A3 broth microdilution reference method.

<sup>a</sup>MD: broth microdilution

<sup>b</sup>AMPH-B: amphotericin B, 5-FC: flucytosine, ITCZ: itraconazole, FLCZ: fluconazole

<sup>c</sup>R: MIC  $\geq$  2  $\mu$ g/ml, There is no official breakpoint in AMPH-B MIC.

<sup>d</sup>I, intermediate interpretive category for flucytosine only.

つ低値であった<sup>12)</sup>。また、Bourgeoisらは、*C. albicans*のMIC<sub>50</sub>が<sup>3</sup>1  $\mu$ g/ml (微量液体希釈法) から0.125  $\mu$ g/ml (E-test), MIC<sub>90</sub>が<sup>3</sup>1  $\mu$ g/ml (微量液体希釈法) から0.25  $\mu$ g/ml (E-test), *C. tropicalis*のMIC<sub>50</sub>が<sup>3</sup>1  $\mu$ g/ml (微量液体希釈法) から0.25  $\mu$ g/ml (E-test), MIC<sub>90</sub>が<sup>3</sup>2  $\mu$ g/ml (微量液体希釈法) から0.5  $\mu$ g/ml (E-test) と、各々2管以上の低値になったと報告している<sup>13)</sup>。その一方で、E-testにおいて1~2管低く判定される場合はあっても、2管以内で高い一致率が得られたとの報告も複数存在する<sup>9,14,15)</sup>。今回の検討ではRPMIの作製方法、E-testの保存方法、測定手技、E-testストリップ本体の問題などを改めて検討し、繰り返し測定を試みたが再現性は得られた。一方、別方法にて作製したRPMI 1640寒天培地を使用して*C. albicans*のAMPH-B薬剤感受性を調べたところ、高い割

合で両測定法間のMIC値が一致した。今回作製した各RPMI 1640寒天培地の違いは、① 使用RPMI 1640粉末のメーカーが異なる、② グルコース含有または非含有のRPMI 1640粉末を使用している、③ グルコースを高圧蒸気滅菌あるいはフィルター滅菌している、という3点であった。これらについてはさらに検討を進める必要がある。

AMPH-B以外の薬剤では、CLSI M27-A3以前の標準法とE-testの結果を比較した諸家も報告<sup>9,14,16)</sup>しているように、5-FCで高い一致率が得られた一方でアゾール系抗菌薬において微量液体希釈法よりもE-testで低値に判定される場合があり、従来の複数ある報告とおおむね同様の傾向が見られた。各測定法における48時間判定MIC値を比較したとき、微量液体希釈法よりもE-testで2管以上低値となる割合が最も高

かった薬剤はFLCZ, 次いでITCZであった。これは, *C. glabrata*におけるITCZおよびFLCZと, *C. tropicalis*におけるITCZに対する感受性変動が著しいことが原因であった。われわれの検討では, ITCZ耐性*C. glabrata*は基準となる微量液体希釈法において85.7%, FLCZ S-DD株は42.9%, *C. tropicalis*のITCZ S-DD株は61.1%となり, 耐性頻度としては従来のCLSI基準に準じた複数の国内サーベイランス報告<sup>17)</sup>と合致する結果であった。

このように, 5-FCを除く薬剤では微量液体希釈法よりもE-testで低値となる割合が高く, このうち*C. albicans* 3株は48時間培養後のITCZ, FLCZにおいてMIC値が特に乖離し, 微量液体希釈法で耐性と判定されたのに対してE-testでは感性和判定された。これにより*C. albicans*のMIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>間で4管のMIC管差が生じたが, これらの株はAIDS患者の口腔内より分離されたトレーリング株であり, いずれも微量液体希釈法とE-testにおける24時間判定ではそれぞれITCZで $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$ ,  $\leq 0.125 \mu\text{g/ml}$ , FLCZでどちらも $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ の感性に判定されていた(データ未発表)。一般的に, E-testでのトレーリング判定はマイクロコロニーの影響により困難であるとされている。そのなか, 一部の報告では正確なトレーリング判定がされていたが<sup>18)</sup>, 一方でBarryらやMatarらの報告では, 微量液体希釈法における24時間培養後のMIC値とE-testの48時間培養後のMIC値が一致と, 今回の検討と同様の傾向が見られていた<sup>19,20)</sup>。また, ITCZに対する全菌種とFLCZに対する*C. albicans*, *C. glabrata*の薬剤感受性では, E-testでMICが高値に判定されることで, むしろ感性株がS-DDに, あるいはS-DD株が耐性に判定される場合があった。5-FCにおいても微量液体希釈法で感性和判定された3株が, E-testでは中間を越えて耐性に判定されていた。

今回, *Candida*属における微量液体希釈法とE-testの判定MIC値を比較したところ, 5-FC, ITCZ, FLCZでは高い一致率が得られたが, 5-FCを除く3薬剤ではE-testにおいて判定MIC値が低値となる割合が高かった。E-testの精度管理範囲設定が一部においてCLSIと大きく異なっている点や, 培地成分の影響などが原因として考えられたが, 両測定法間における判定MIC値は研究機関によってその精度にばらつきがあり, 今後条件を変えて多数株を用いて検討すべきであると考えられた。

## 文 献

- 1) 力丸 徹, 米光純子, 嶋田亜希子, 他. 2005. 真菌血症より分離された*Candida*に対する各種抗真菌薬の*in vitro*抗真菌活性. 感染症誌79(1): 20-24.
- 2) Edwards, J. E. Jr. 2005. *Candida* Species. p. 2938, In: Principles and Practice of Infectious Diseases, 6<sup>th</sup> ed. (Mandell, G. L., J. E. Bennett, R. Dolin, ed.), Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, Pennsylvania.
- 3) Clark, T. A., A. Hajjeh. R. 2002. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. Curr. Opin. Infect. Dis. 15: 569-574.
- 4) 河口 豊, 田村昌代, 濱野政弘, 他. 2009. 酵母真菌薬剤感受性検査の検討—NCCLS M27-A2 microdilution法と比較して—. 医学検査58(1): 15-21.
- 5) 山口英世. 2009. 臨床検査ひとくちメモNo. 201. モダンメディア55(12): 309-320.
- 6) Fleck, R., A. Dietz, H. Hof. 2007. *In vitro* susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and E-test. J. Antimicrob. Chemother. 59(4): 767-771.
- 7) 柴田明佳, 鈴木 健, 福山正文. 2003. MIC判定法を改良した真菌の感受性測定法—従来法との比較—. 日化療会誌51(8): 470-476.
- 8) 小野崎正修, 横村浩一. 2009. 薬剤感受性測定法と耐性菌2特殊微生物の抗微生物薬剤感受性測定法真菌. 臨床と微生物36(増刊号): 569-574.
- 9) 川上小夜子, 斧 康雄. 2009. 1薬剤感受性測定法の種類Eテスト. 臨床と微生物36: 536-543.
- 10) Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard-third edition M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- 11) AB Biodisk. 2007. Antifungal susceptibility testing for *in vitro* diagnostic use. AB Biodisk, Solna, Sweden.
- 12) Favel, A., A. Michel-Nguyen, A. Detry, et al. 2004. Susceptibility of clinical isolates of *Candida lusitanae* to five systemic antifungal agents. J. Antimicrob. Chemother. 53(3): 526-529.
- 13) Bourgeois, N., L. Dehandschoewercker, S. Bertout, et al. 2010. Antifungal susceptibility of 205 *Candida* spp. isolated primarily during invasive candidiasis and comparison of the Vitek 2 system with the CLSI broth microdilution and E-test methods. J. Clin. Microbiol. 48(1): 154-161.
- 14) Koga-Ito, C. Y., J. P. Lyon, M. A. Resende. 2008.

1) 力丸 徹, 米光純子, 嶋田亜希子, 他. 2005. 真

- Comparison between E-test and CLSI broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* oral isolates. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 50(1): 7–10.
- 15) Park, J. Y., J. H. Shin, Y. Uh, et al. 2008. *In vitro* amphotericin B susceptibility of Korean bloodstream yeast isolates assessed by the CLSI broth microdilution method, E-test, and Minimum fungicidal concentration test. Korean J. Lab. Med. 28(5): 346–352.
- 16) Park, B. J., B. A. Arthington-Skaggs, R. A. Hajjeh, et al. 2006. Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. Antimicrob. Agents Chemother. 50(4): 1287–1292.
- 17) 山口英世. 2010. 真菌の薬剤耐性化は？そして今後は？. モダンメディア 56(6): 119–138.
- 18) Pfaller, M. A., S. A. Messer, Å. Karlsson, et al. 1998. Evaluation of the E-test method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. J. Clin. Microbiol. 36(9): 2586–2589.
- 19) Barry, A. L., M. A. Pfaller, R. P. Rennie, et al. 2002. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, E-test, and disk diffusion methods. Antimicrob. Agents Chemother. 46(6): 1781–1784.
- 20) 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(5): 1647–1651.

## Comparison of Broth Microdilution Method with the E-Test for *Candida* spp. Susceptibility to Antifungal Agents

Hiromi Morishige<sup>1)</sup>, Yoko Mano<sup>2)</sup>, Mieko Goto<sup>3)</sup>,  
Toyoko Oguri<sup>4)</sup>, Nobuhiko Furuya<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>Graduate School of Health Care Science, Bunkyo Gakuin University

<sup>2)</sup>Faculty of Health Science Technology, Bunkyo Gakuin University

<sup>3)</sup>The University of Tokyo Hospital

<sup>4)</sup>Clinical Laboratory, Kameda Medical Center

Recently, the increase in incidence of deep mycoses and the occurrence of fluconazole (FLCZ)-resistant *Candida albicans* require the accurate determination of MIC against fungi. We compared and evaluated the MICs of antifungal agents by broth microdilution based on CLSI M27-A3 and E-test. In this study, we tested isolates from each of the following species: reference isolates (7 isolates), *C. albicans* (36 isolates), *Candida glabrata* (20 isolates), and *Candida tropicalis* (17 isolates). These methods were used to determine the MICs of amphotericin B (AMPH-B), flucytosine (5-FC), itraconazole (ITCZ), FLCZ for all 80 isolates. The rates of MIC agreement within 2 fold dilution between broth microdilution and E-test methods were as follows: 5-FC, 92.5%; FLCZ, 72.6%; ITCZ, 65.0%. On the other hand, MICs of E-test were lower more than 4 fold dilution than those of broth microdilution in AMPH-B (96.3%), ITCZ (27.5%) and FLCZ (25.0%). Several isolates showed discrepancies of susceptibility according to methods, strains and/or agents except for *C. glabrata* and *C. tropicalis* for 5-FC and *C. tropicalis* for FLCZ. In this study, the MICs of E-test tended to be lower than broth microdilution method against many isolates tested. Therefore, these results suggest that interpretation of susceptibility required the special attention.