ONE POINT MEMO No.201
臨床検査ひとくちメモ

Q

真菌の抗真菌薬感受性試験法について判定法を含めて教えてください。

A

帝京大学医真菌研究センター
山　口　英　世

はじめに

近年、免疫不全患者を中心とする高リスク患者が増加し、それに伴って侵襲型の重篤な真菌症（播種性カンジダ症、侵襲性アスペルギルス症など）の発症例が増えています[1)]。それに加えて病原真菌の各種抗真菌薬に対する耐性株の分離頻度も上昇する傾向にあり[2～11)]、いずれも大きな臨床的問題になっていることはご承知の通りです。その一方で、真菌症の治療に適用可能な薬剤の数も少しずつ増え、抗真菌薬療法がますます普及しました。こうした状況が、原因菌として臨床検体から分離される真菌菌株の抗真菌薬感受性を「適正に」測定する必要性を高めることになったのです。

真菌症発症患者に遭遇した臨床医は、治療を始めるにあたって、どんな抗真菌薬が最適であるかを判断し、さらにどの程度の治療効果が期待できるかも予測しなければなりません。そうした判断や予測に重要なのが、抗真菌薬感受性試験の結果です。ただしその試験結果が臨床医にとって真に役立つものであるためには、用いた試験法の信頼性つまり良好な再現性と *in vitro*/*in vivo* 相関性が保証されてなければなりません。先に「適正な」試験法と申し上げたのがまさしくそれであり、その標準となる試験法の確立を目指してこの20年余り、多くの研究者が努力と苦労を重ねてきました。最も精力的に検討を進めてきたのは米国の当該分野の研究者を糾合して組織されたNational Committee for Clinical Laboratory Standards（NCCLS）―現在はClinical and Laboratory Standards Institute（CLSI）と改称―の専門委員会です（以下CLSIに統一します）。1983年にスタートしたCLSIの委員会は現在に到るまでこの研究分野を先導し、標準試験法を提示してきました。これに追随するかたちでわが国では日本医真菌学会の標準化委員会が、またヨーロッパではEuropean Committee on Antibiotic Susceptibility Testing のAntifungal Susceptibility Testing Subcommittee（AFST-EUCAST）が各自の標準試験法を発表しています。しかしそのいずれもCLSIの改変版ともいえるものであり、データも十分とはいえません。したがって、現在のところCLSIの試験法が

グローバル・スタンダードとしてわが国を含めて圧倒的に広く受け入れられています[1, 12]。

こうした状況ですので、ここではCLSIの試験法に焦点を絞って解説し、ご質問に対するお答えにしたいと思います。CLSIの抗真菌薬感受性試験法としては、これまで酵母のブロス希釈法（M27法）、糸状菌のブロス希釈法（M38法）、それに酵母のディスク拡散法（M44法）が提示されています。そのなかではM27法が最も詳細に検討され、わが国を含めて最も多く利用されているので、この試験法の話が中心になります。注意して頂きたいのは、M27法に限らずどの試験法も決して完成されたものではなく、新しい知見の集積や新しい抗真菌薬の臨床導入に対応して改訂が重ねられている点です。したがって、試験の実施や試験結果の解釈にあたっては、常に後で述べるような最新版のCLSIガイドラインにしたがって行う必要があります。

Ⅰ. 感受性試験の対象となる抗真菌薬

現在わが国で深在性真菌症治療薬として承認されているすべての抗真菌薬製剤の活性本体物質が試験の対象となります。活性本体という視点からみますと、わが国では1962年のアムホテリシンB（AMPH-B）にはじまり、2005年のボリコナゾール（VRCZ）に至る40余年間に出現した抗真菌薬はわずか7種を数えるに過ぎません（**表1**）。しかしそれをクラス別に分けますと、アゾール系薬がミコナゾール（MCZ）、フルコナゾール（FLCZ）、イトラコナゾール（ITCZ）およびVRCZの4種にのぼり、全体の過半数を占める点が特徴的です（ただしMCZだけはイミダゾール系に属し、他のトリアゾール系薬とは若干性質を異にします）。しかし残りの3種については、ポリエン系のAMPH-B、フロロピリミジン系のフルシトシン（5-FC）、さらにキャンディン系のミカファンギン（MCFG）と顔ぶれが多彩です。これ以外に2004年にホスフルコナゾール、2006年にはアムビゾーム®が各々上市されていますが、前者はFLCZのプロドラッグですし、後者はAMPH-Bのリポソーム製剤ですから、活性本体は既存薬のそれと同一ということになります。

抗真菌薬のクラスが異なれば、作用メカニズムや作用様式（殺菌的かそれとも静菌的か）は無論ですが、*in vitro* 抗真菌活性に影響する培養上の可変要因に差があっても決して不思議ではありません。こうした違いが、試験法の標準化を困難にした大きな理由なのです。

Ⅱ. 感受性試験の対象となる病原真菌

以前からわが国では（欧米諸国も同じですが）次の4つの真菌症が四大真菌症として注目されてきました。（i）カンジダ症（原因菌：*Candida albicans* その他の *Candida* spp.）、（ii）アスペルギルス症（原因菌：*Aspergillus fumigatus* その他の *Aspergillus* spp.）、（iii）クリプトコックス症（原因菌：*Cryptococcus neoformans*）、（iv）接合菌症（原因菌：*Rhizopus* spp. その他の接合菌）。さらに近年は、新興真菌症としてトリコスポロン症（原因菌：*Trichosporon asahii* その他の *Trichosporon* spp.）、フサリウム症（原因菌：*Fusarium* spp.）、スケドスポリウム症（主な原因菌：*Scedosporium apiospermum* = *Pseudallescheria boydii*）

表1 現在までに国内で何らかの真菌症の治療薬として承認されている抗真菌薬の活性本体の種類と作用様式の特徴

クラス	薬剤・活性本体	上市年	作用様式	
			Candida spp.	*Aspergillus* spp.
アゾール系	ミコナゾール（MCZ）[a]	1986	静菌的	不明
	フルコナゾール（FLCZ）	1989	静菌的	—[b]
	イトラコナゾール（ITCZ）	1993	静菌的	殺菌的
	ボリコナゾール（VRCZ）	2005	静菌的	殺菌的
ポリエン系	アムホテリシンB（AMPH-B）	1962	殺菌的	殺菌的
フロロピリミジン系	フルシトシン（5-FC）	1979	静菌的	—[b]
キャンディン系	ミカファンギン（MCFG）	2002	殺菌的	静菌的

a）CLSIガイドラインでは試験対象外、b）抗菌活性は弱いかほとんどなし

なども増えつつあります。これらの病原真菌はいずれも前記のどれかの抗真菌薬に対して *in vitro* で感受性を示しますので、すべて感受性試験の対象となります。

後ほど詳しく触れますが、酵母を対象に行う試験と糸状菌のそれとでは、試験の方法が少し異なってきます。その違いは、酵母が基本的には細菌と同様に単細胞の状態で発育・増殖するのに対して、糸状菌は無性胞子（分生子）が発芽して生じた菌糸を伸ばして発育するという両者の発育形態（培養形態）上の特徴に由来します。さらに酵母と糸状菌の間では、感受性をもつ抗真菌薬の種類にも差があります。したがって酵母の感受性試験と糸状菌のそれとでは、当然ながら使用すべき抗真菌薬も違ってきます。この関係を整理して示したのが**表 2** です。

Ⅲ. 標準化以前の時代の感受性試験の状況

本論からはいささかはずれますが、試験法標準化の意義がどれほど大きいかをお分かり頂くために、それ以前の状況を少し述べておきたいと思います。真菌の感受性測定というならば、それは初期の抗真菌薬探索・開発の時代からすでに行われていました。私がこの分野の研究にかかわりはじめたのは1970 年代に入ってすぐの頃であり、5-FC の基礎的評価が最初に手掛けた仕事でした。しかし当時の感受性試験といえば、それはもっぱら臨床効果の裏付けとなる MIC の測定が目的であり、MIC エンドポイントが判定しやすい試験法や、その値が低くなる（したがって *in vitro* 活性が強いようにみえる）試験法が恣意的に選ばれることも少なくありませんでした。その結果、5-FC や初期のアゾール系薬であるケトコナゾールが欧米で臨床導入されつつあった1980 年代中頃、これらの抗真菌薬の MIC が異なる研究者間で何千倍も違うという事態が生じました[13]。それでようやく試験法を標準化しない限り、試験結果は臨床的にはほとんど意味も価値もないことが認識されるようになったのです[14, 15]。裏をかえせば、もし標準化された試験法が使われているならば、研究者間や臨床検査室間のデータのより良い比較や臨床効果のより良い予測に役立つ可能性があるということになります。

この問題に最初に取り組んだのは、英国の The British Society for Mycopathology のワーキンググループであり、1984 年に 5-FC 感受性試験法についての詳しいガイドラインを発表しています[16]。当時の私はこうした欧米での動きを横目で見ながら、試験法標準化の必要性を重々感じていました。しかし試験結果が測定条件にほとんど左右されない AMPH-B はともかくとして、5-FC やアゾール系薬とくに後者に関しては規定すべき可変要因（接種菌量、培地の pH ・組成、培養温度・時間、溶媒・希釈液など）があまりにも多いうえに、試験結果が *in vivo* 効果と果たして相関するのかといった疑念もありました。とくに大きな問題と考えたのは、当時わが国で臨床開発中だった FLCZ の *in vitro* 活性があまりにも低く、臨床的有効例の血中濃度の数十倍高い濃度での完全阻止が得られないことでした。当時は抗細菌薬と同様に、抗真菌薬についても完全阻止をエンドポイントの判定基準とすべきだと誰もがそう思って疑わなかったからです。

表 2　わが国で酵母および糸状菌の各感受性試験の対象となる主な病原真菌並びに抗真菌薬

病原真菌		試験対象抗真菌薬	備　考
酵母・糸状菌の別	主な菌種・属		
酵母	*C. albicans* Non-*albicans Candida* *Cr. neoformans* *Trichosporon* spp. その他の酵母	アゾール系薬 AMPH-B 5-FC MCFG	・*C. krusei* はアゾール系薬とくに FLCZ に対しては一般に耐性 ・*Cr. neoformans* および *Trichosporon* spp. は MCFG には不感性（治療適応外）
糸状菌	*A. fumigatus* Non-*fumigatus Aspergillus* *S. apiospermum* *Fusarium* spp. *Rhizopus* spp. その他の接合菌	アゾール系薬 AMPH-B MCFG	・FLCZ の抗糸状菌活性は一般に弱い ・*Fusarium* spp. 感染症および *S. apiospermum* 感染症に対する治療適応承認薬は VRCZ のみ ・接合菌症に対する治療適応承認薬は AMPH-B（アムビゾームを含む）のみ ・MCFG の治療適応対象はアスペルギルス症のみ

Ⅳ. 酵母の感受性試験について〔1〕：標準法の開発

感受性試験法の標準化が容易でないことは誰の目にも明らかでしたが、その可能性がまったく考えられなかったわけではありません。そのことは2つの知見から示唆されました。第1は、研究者間で感受性試験の結果、つまりMICに大きな開きがあっても感受性の順位は比較的一定していたことです[13]。第2は、試験結果（MIC）が接種菌量によってことのほか大きく影響される5-FCやアゾール系薬の場合でも、50%阻止濃度（培養の濁度をコントロールの50%に減少させる薬剤濃度）をエンドポイントにすれば接種菌量に影響されずに良好な再現性が得られたことでした[17]。

こうした知見を手掛りに、CLSIは1983年に、試験法の標準化を目指して多施設共同研究を開始しました。しかし簡単な操作、良好な再現性、低いコストといった数々の要求を満たす試験系の開発の前には、いくつもの難問が立ちはだかっていました。先にも述べた多くの可変要因が試験結果に予想を超えて大きく影響すること、またその影響は酵母と糸状菌との間でも異なることが判明したからです[18]。ほぼ10年にも及ぶ検討の結果、感受性測定に通常用いられる寒天希釈法（AD法）、ブロス希釈法（BD法）およびディスク拡散法（DD法）のなかではBD法に基づく試験法が、多数の可変要因による問題を解決するのに最も適し、しかも再現性の高い試験結果を与えるとして選ばれました[18]。

とくにエンドポイントの判定法は、アゾール系薬そして時には5-FCの試験結果の検査施設間での不一致を招く大きな要因になります。いずれの抗真菌薬も*Candida* spp.などの酵母に対して完全阻止を示さないことが理由です。この問題を解決するために、CLSIはマクロBD法については80%阻止濃度（コントロールに比べて濁度を80%減少させる薬剤濃度）をエンドポイントにすることを提案しました[19]。

多数の研究者による長い年月にわたる精力的な検討を経て、1992年、MOPS緩衝（pH 7.0）RPMI-1640を試験培地とするマクロBD法が酵母の標準試験法として提案されました（CLSI・M27-P[19]）。この提案法に若干の修正を加えたものがコンセンサスを得て1997年に承認され（CLSI・M27-A[20]）、さらに2002年と2008年の2度にわたって改訂がなされ（それぞれCLSI・M27-A2[21]およびM27-A3[22]）、現在に至っています。M27-A以降は、マクロBD法（培地量、1.0 ml）とミクロBD法（培地量、0.2 ml）の2本立てになりました。しかし自動化が可能なこと、試薬の量を大幅に減らせること、マイクロプレートを使ったキットの製品化が容易なことなどの理由から、現在はミクロBD法のほうが多く用いられています。なおミクロBD法については、80%阻止濃度よりも50%阻止濃度をエンドポイントにするほうがより安定した結果を与えるとして、後者が判定基準として採用されました。

M27-AからM27-A2に改訂された大きな理由として、*Candida* spp.分離株中にトレーリング発育（trailing growth, TG）株がかなりの割合で存在することが明らかになったことがあげられます[23]。TG株とは、培養24h後にくらべて48h後ではFLCZなどのトリアゾール系薬のエンドポイントが数十倍から百倍以上も上昇するために、前者の時点では感性、後者の時点では耐性と判定されるような菌株をいいます。こうした*Candida* spp.のTG株は、動物モデルでの試験や臨床的データからは感性株と同様にアゾール系薬治療に良好に反応することが知られています。したがって感性とみなすべきなのに、通常の48h後の試験結果からは耐性と誤判定されることになりますので、TG株については24h後の結果を採用すべきなのです。しかしTG株か否かは、実際に試験をやってみなければ分かりませんから、*Candida* spp.菌株のアゾール系薬感受性については、すべて24h後と48h後の両時点で判定を行うことが必要になります。

長い間標準化から取り残されたMCFGなどのキャンディン系薬の試験法については、M27-A3でようやくそれが果たされました。これによって現在国内外で使用されている主な抗真菌薬の試験法がすべて標準化されたことになります。酵母の標準試験法としては、他にFLCZとVRCZを対象にしたDD法があります（CLSI・M44-A[24]）。この試験法は2004年に標準化されましたが、わが国ではほとんど使用されていないようですので、その説明は割愛いたします。

Ⅴ. 酵母の感受性試験について〔2〕：エンドポイントをどのように判定し、どのように解釈するか

ここではCLSI・M27-A3による試験結果の判定と解釈に関して重要と思われる留意点を述べます。

A. 判定のタイムポイントと基準.

M27-A3には、エンドポイント判定までの培養時間と判定基準が対象とする真菌または抗真菌薬の種類によってさまざまに異なることが規定されています。培養時間についていいますと、*Cr. neoformans*は発育が遅いために、すべての抗真菌薬（MCFGなどのキャンディン系薬は無効のため除く）で72h後判定を行います。一方、検査頻度が最も高い*Candida* spp.については、判定までの培養時間が薬剤によってまちまちです。**表3**は日本の状況に合せて作った私案です。基本的にはCLSI・M27-A3に準拠していますが、アゾール系薬の場合の培養時間がやや異なります。M27-A3ではFLCZのみが24h判定と48h判定がいずれも可、その他は48h判定のみが可となっています。しかしトレーリング発育が必ずしもFLCZに限った現象ではなく、ITCZやVRCZでも認められることを考えますと、すべてのアゾール系薬について24hと48hの両時点で判定を行い、そのうえでTG株のみ24h値を、非TGは48h値を採用するのがより実際的と考えました。*Trichosporon* spp.その他の病原酵母の培養時間は、M27-A3ではとくに規定されていませんが、どの薬剤についても発育に応じて24h判定または48h判定でよいと思います。

判定基準に関しては、AMPH-Bのみは完全阻止を、その他の薬剤は50%阻止（M27-A3では「明らかな濁度の減少」と表現）を、各々エンドポイントとします。とくに注意しなければならないのはMCFGなどのキャンディン系薬の場合です。その判定法をめぐって様々な議論がなされましたが、M27-M3においてはじめて24h後の50%阻止をエンドポイントとすることが規定されました。

B. *Candida* spp. TG株のエンドポイント判定（図1C参照）.

TG株は米国などでは*C. albicans*や*C. tropicalis*を中心に*Candida* spp.分離株全体の約5%を占めるといわれています[21]。一方、わが国ではその割合がさらに高く、30%以上にものぼることが全国規模の感受性サーベイランスから明らかになりました[25, 26]。したがってTG株を決して耐性株と誤らないように、エンドポイントを正しい時点（24h）で判定することが不可欠です。

表3 病原真菌−抗真菌薬の主な組み合せににについてのミクロBD法[a]による感受性測定の条件：判定までの培養時間とエンドポイント判定基準（私案）

病原真菌		抗真菌薬	培養時間	判定基準
酵母	*Candida* spp.	アゾール系薬[c]	24hおよび48h[e]	50% 阻止
		AMPH-B	24hまたは48h	完全阻止
		5-FC	48h	50% 阻止
		MCFG	24h	50% 阻止
	Cr. neoformans[b]	アゾール系薬[c]	70 ～ 74h	50% 阻止
		AMPH-B	〃	完全阻止
		5-FC	〃	50% 阻止
糸状菌（皮膚糸状菌を除く）	*Aspergillus* spp. *Fusarium* spp.	アゾール系薬[d] AMPH-B	46 ～ 50h	完全阻止
		MCFG	21 ～ 26h	MEC[f]
	S. apiospermum	アゾール系薬[d] AMPH-B	70 ～ 74h	完全阻止
		MCFG	46 ～ 72h	MEC[f]
	Rhizopus spp. その他の接合菌	アゾール系薬[d] AMPH-B	24h	完全阻止

a）酵母についてはCLSI・M27-A3、糸状菌についてはCLSI・M38-Aに基本的に準拠；b）キャンディン系薬には不感性；
c）MCZ, FLCZ, ITCZ, VRCZが該当；d）MCZ, ITCZ, VRCZが該当；
e）TG株についてのみ24h判定を、その他の株は48h判定を、各々採用；f）Minium Effective Concentration（16ページ, Ⅶ参照）

表4 *Candida* spp. に対する各種抗真菌薬の MIC を解釈するための CLSI M27 ガイドライン（文献[28]を一部改変）

クラス	抗真菌薬	感受性カテゴリーとブレークポイント、MIC（μg/ml）				
		感性（S）	用量依存的感性（S-DD）	中等度耐性（I）	耐性（R）	不感性[a)]（NS）
アゾール系	FLCZ	≦8	16～32	−	≧64	−
	ITCZ	≦0.125	0.25～0.5	−	≧1	−
	VRCZ	≦1	−	−	≧4	−
フロロピリミジン系	5-FC	≦4	−	8～16	≧32	−
キャンディン系	MCFG	≦2	−	−	−	＞2

−：ブレークポイントが設定されていない
a）基本的には耐性（R）と同じ意味と考えられるが、本ガイドラインではこのような表現が用いられている。

C. パラドックス効果を示す *Candida* spp. 菌株のエンドポイント判定（図1C 参照）.

パラドックス効果（paradoxical effect）は、MIC を超えた高濃度域で発育の増強がみられるという矛盾した現象のことであり、帯現象（zone phenomenon）またはスキップ現象とも呼ばれています。この現象は、MCFG などのキャンディン系薬を作用させた *Candida* spp.の一部の菌株にのみ認められ、しかも培養時間が長くなるほど出現しやすくなるのが特徴です[27]。しかしそれが臨床的にどんな意味をもつのかは不明です。また ITCZ についても同様の現象がみられることがありますが、この場合は ITCZ の難溶性が原因と考えられます。いずれにせよパラドックス効果が出現しても、それに惑わされてエンドポイント判定を誤らないようにしなければなりません。

D. MIC ブレークポイントに基づく試験結果の解釈.

CLSI・M27-A3 のサプリメント（M27-S3[28]）には、**表4** に示すように、*Candida* spp.に対するアゾール系薬（MCZ は対象外）、5-FC およびキャンディン系薬（MCFG を含む）の MIC の解釈すなわち治療効果が期待できる（感性）かそれとも期待できない（耐性または不感性）かの判断に役立つように、各々のブレークポイントが提示されています。したがって、*Candida* spp.分離株に対する各抗真菌薬の MIC が得られたならば、個々の薬剤の治療効果の予測や最適の薬剤と用量の決定を、このブレークポイントを参考にして行うことが奨められます。

Ⅵ. 酵母の感受性試験について〔3〕：試験の実施と市販キットの利用

試験法に関しては、各試薬や接種菌液の調製法からエンドポイントの判定法に到るまで CLSI ガイドライン（M27-A3 および M27-S3）に詳細に記述されています。最も労力と時間を要する作業は試薬の調製であり、この繁雑な仕事を臨床検査室で日常的に行うのは極めて困難です。それに対処するための良策は市販のキットを利用することです。現在、国内では3種の異なるタイプの酵母の感受性測定用のキットが市販されています。

なかでも「酵母様真菌 FP ‘栄研’」と「酵母様真菌 DP ‘栄研’」（栄研化学）は、それぞれ凍結マイクロプレートおよびその凍結乾燥処理（ドライ）マイクロプレートの違いはありますが、いずれも CLSI・M27 のミクロ BD 法に忠実に沿って製品化されたキットです。両者とも国内承認の7種の抗真菌薬すべてを測定対象とし、**図1A** に示すように各 10 段階希釈濃度系列の薬剤溶液が培地とともに各ウエルに分注されたマイクロプレート製品です。両製品とも旧版の添付文書には日本医真菌学会法[29]のエンドポイント判定基準が収載されていたために、一部の *Candida* spp.菌株とくに TG 株の判定結果に CLSI との乖離がみられました[30]。しかしこの問題は、最新版では CLSI・M27-A3 に準拠した判定法に変更された結果、ほぼ解消されました。したがって、両製品は CLSI との同等性という点では最も信頼できる市販キットと考えられます。

図1B と **図1C** は、「酵母様真菌 DP ‘栄研’」を用いて *C. tropicalis* のアゾール系薬耐性株と TG 株についてそれぞれ実施した試験例を示します。耐性株の場合は、24h 培養の時点ですでにトリアゾール系薬（FLCZ, ITCZ, VRCZ）のすべてに対して最高濃度のウェルでも明らかな発育を示しています（**図1B**）。一方、TG 株については、24h 培養の時点での各ト

リアゾール系薬のMICは感性または用量依存的感性の範囲内（**表4**）にありますが（**図1C-①**）、48h後ではいずれの値も数十倍から百倍以上も上昇し、耐性と判定されるようになります（**図1C-②**）。この間、トリアゾール系以外の薬剤のMICはたとえ上昇してもせいぜい2倍程度とほとんど変わっていません。また偶々ですが、この菌株では48h後にMCFGの高濃度域（16～0.5μg/ml）のウェルでの発育陽性つまりパラドックス効果が認められます。

一般にBD法、とくにミクロBD法の欠点とされているのは、濁度の減少に基づいてエンドポイントを判定するために、目視判定がしばしば困難になることです。酵母の試験では発育不良菌株やTG株でとりわけその傾向が顕著にみられます。この問題は濁度を分光光度計で測定することによってほぼ解決されるのですが、目視判定が簡単にできるならばそれに越したことはありません。それを目的に、いくつかの改変法が開発されました。その代表的な測定系の1つが、培地に添加した酸化還元指示薬の色調の変化を利用した比色BD法です。この方式を用いた製品としてわが国では「酵母真菌薬剤感受性キット　ASTY」（極東製薬）が市販されています。酸化還元指示薬にレザズリンを使用し、その色調が真菌の発育に応じて赤色から青色に変わることを指標にしてエンドポイントを判定します。ASTYの試験結果については、CLSI・M27-Aとの良好な相関性を示す報告[31]はあるものの、その後に追加された抗真菌薬（MCFG, VRCZ）やTG株に関してM27-A3とどの程度の相関がみられるかは不明です。

もう1つの国内市販キットは「酵母様真菌薬剤感受性試験用　Etest®」（シメックス・ビオメリュー）です。Etestは上記のいずれのキットとも異なり、DD法を改変した寒天ベースの測定系であり、もともと抗細菌薬の感受性測定に国内外で広く使われてきましたが、その測定範囲を抗真菌薬にも拡げたものです。所定の濃度勾配の抗真菌薬をしみ込ませた目盛（薬剤濃度に対応）つきのプラスチック製ストリップを、あらかじめ試験菌が塗布された寒天培地表面に載せて培養します。楕円形の阻止帯が生じたら、その下端の値をストリップ上の目盛で読みとり、MICを判定します。Etestは、寒天培地さえあれば比色BD法よりもさらに操作が簡単であり、しかも*Candida* spp.のAMPH-B耐性検出能が高いことや、M27-Aとの相関性を示すデータが多数報告されていることなどの利点をもっています。しかしアゾール系薬のMIC判定が困難な場合が少なくないこと、キャンディン系薬の測定ができないこと、TG株での試験結果が解釈できないこと、などの問題点があります。

Ⅶ. 糸状菌の感受性試験について〔1〕：標準法の開発

CLSIは酵母の感受性試験法と並んで、糸状菌の試験法についても標準化に取り組んだのですが、その作業ははるかに難航しました。最大の障害は、発育とともに単細胞の分生子から長く複雑に分岐しながら伸びる菌糸へと形態を変える糸状菌に対して、抗真菌薬の発育阻止効果を定量化することが完全阻止の場合を除けばきわめて困難だという問題でした。また接種菌として用いる分生子のサイズや発育速度が菌種（または属）によって著しく違うことも標準化を妨げる大きな原因になりました。

多くの検討がなされた結果、接種菌液の濃度調製を分光光学的に行う、培養時間を菌種ごとに定める、といった方策によって問題を処理し、1998年にようやく標準法の原案（CLSI・M38-P[32]）まで漕ぎつけました。測定方式は基本的にはM27-Aのミクロ BD法と何ら変わりありません。したがって好都合なことに、感受性測定には酵母の試験用につくられた前述の‘栄研’キットがそのまま使えるわけです。またEtestについても糸状菌の感受性測定に好適なことが海外から多数報告されています。

M38-Pの提案後、VRCZをはじめとする新世代アゾール系薬の追加と合せて、完全阻止を全アゾール系薬のエンドポイントとするという変更を行った標準法（M38-A[33]）が2002年に、さらにその改訂版（M38-A2[34]）が2008年に、各々公表され、現在に至っています。それにしても、ITCZやVRCZが*Aspergillus* spp.などの糸状菌に対して、酵母とは違って殺菌的に作用し、その結果、完全阻止を示したことはまさしく幸運でした。

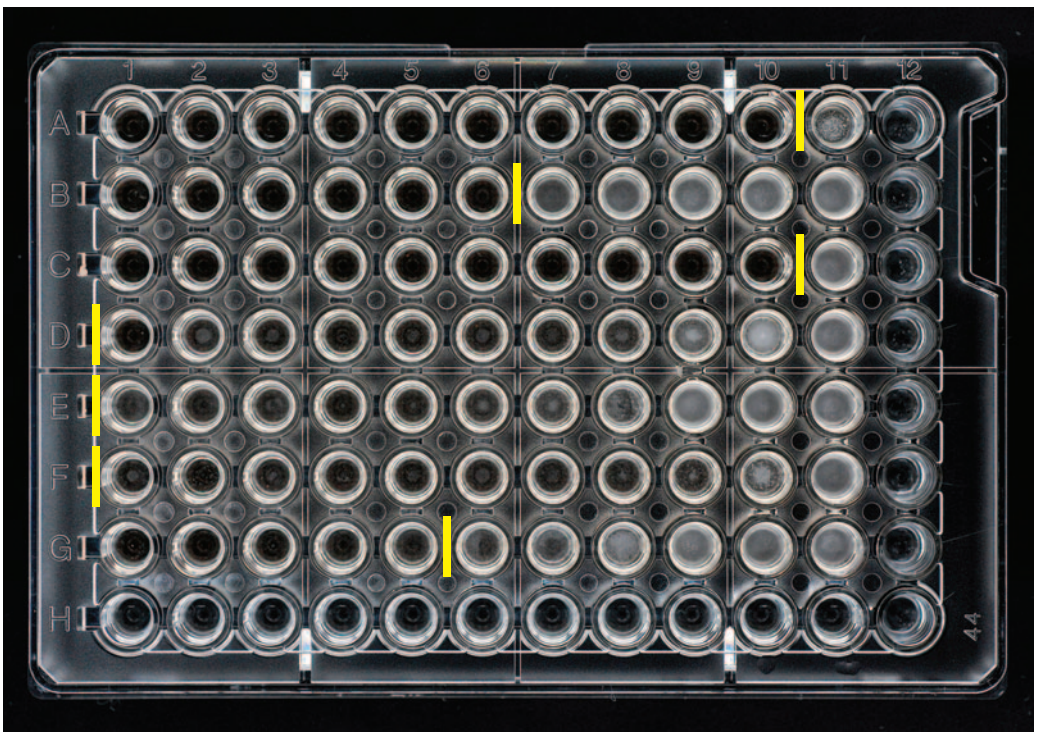
残された問題は、MCFGなどキャンディン系薬の試験法とくにエンドポイント判定法です。このクラスの薬剤の特徴として*Candida* spp.には殺菌的に作用する反面、*Aspergillus* spp.その他の感性糸状菌に対しては静菌的作用しか示しません（**表1**）。それも

図1「酵母様真菌 DP‘栄研’」を用いた *C. tropicalis* のアゾール系薬剤耐性株（R 株）およびトレーリング発育株（TG 株）の感受性測定実施例（エンドポイントのウェルとそれに達しない薬剤濃度のウェルとの境界をタテの黄色バーで示す）

A. マイクロプレート各ウェルにおける薬剤と最終濃度（μg/ml）の配置図
（PG-C は薬剤無添加の陽性コントロール）

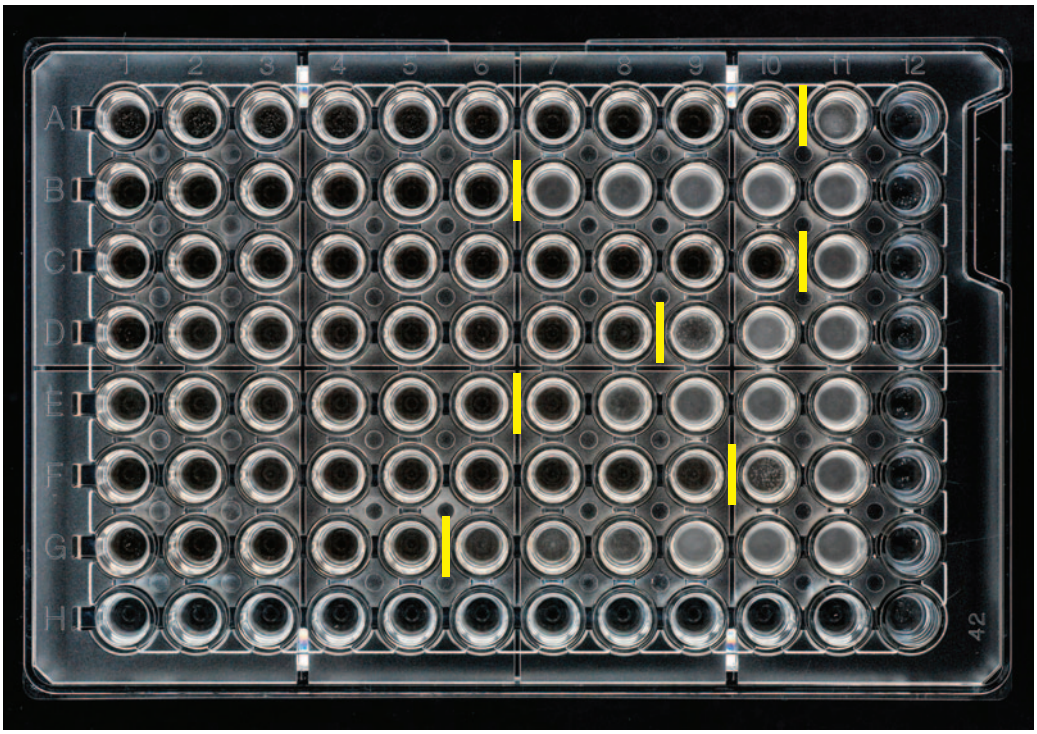
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MCFG	A	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	
AMPH-B	B	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	PG-C	
5-FC	C	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PG-C	
FLCZ	D	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	PG-C	
ITCZ	E	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PG-C	
VRCZ	F	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	PG-C	
MCZ	G	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	PG-C	
	H												

B. R 株の 24h 培養

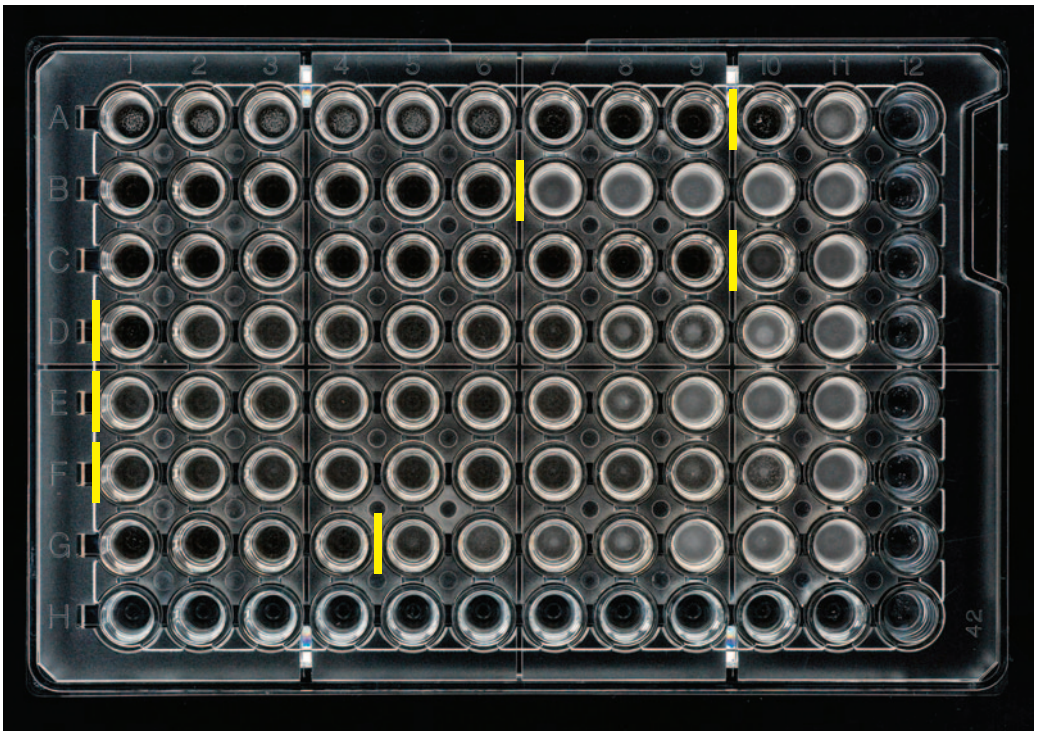


C. TG 株の 24h 培養と 48h 培養の比較

①24hr 培養



②48hr 培養



菌糸の新生や先端部の発育を阻止するだけです。そうした一部の菌糸のみに対する伸長阻止効果は、顕微鏡下では容易に観察できますが、定量化が不可能なことから他の薬剤の場合のような目視や分光光度計による判定法は使えません。この問題に対処するために、M38-A2 では Minimum Effective Concentration（MEC）という新しいパラメータが導入され、これがエンドポイント判定基準として採用されたわけです。この MEC は、菌糸伸長が部分的に阻止されることによって生じる目視可能な顆粒状の小菌塊が認められる最小薬剤濃度を意味しています。

Ⅷ. 糸状菌の感受性試験について〔2〕：試験実施の意義

試験法の標準化が達成されたとはいっても、糸状菌の場合にはどんな抗真菌薬−真菌の組み合せをとっても試験結果を解釈するためのブレークポイントは確立されていません。したがって、せっかく感受性測定を行っても、残念ながらその臨床的意味づけにかなりの限界があることは事実です。それでも糸状菌の感受性試験の重要性をうかがわせる知見が近年得られています。

A. fumigatus をはじめとする *Aspergillus* spp.は糸状菌感染症として最も頻度が高く、しかも予後が不良なことで知られるアスペルギルス症の原因菌です。この糸状菌については、近年、ITCZ や VRCZ に対する耐性化が大きな問題になっています。またブレークポイントは公式には提示されていませんが、両アゾール系薬とも 1μg/ml 以下を感性、4 ～ 8μg/ml 以上を耐性とみなすのが一般的です。これを基準にした *Aspergillus* spp.耐性株の分離頻度についての欧米の多くの報告では、ITCZ 耐性が 2 ～ 5%、VRCZ 耐性は 1%以下とされています[35 ~ 38]。わが国にはこの種の疫学的データがほとんどありませんが、私達が全国多施設の臨床検査室と共同で行った抗真菌薬感受性サーベイランスで 2005 年に収集された *Aspergillus* spp.臨床分離株 18 株中に ITCZ の MIC が 8μg/ml 以上、したがって耐性と推定される A. *fumigatus* が 1 株見つかりました[39]。こうした耐性株は、治療のうえで大きな問題となりますし、今後ますます増えることも予想されます。このことからも糸状菌の感受性試験の重要性があらためて示唆されるのではないでしょうか。

おわりに

AMPH-B の臨床導入から約半世紀を経てすべての抗真菌薬とすべての主要病原真菌をカバーする感受性試験の標準法が CLSI によって確立されました。1990 年代初期まではまったく標準化がなされていなかったのですから、この 20 年間における進歩は目覚ましいの一言に尽きます。しかし最も完成度が高いとされる CLSI・M27 にしても、AMPH-B 耐性株と感性株の識別が不能なこと、いくつもの抗真菌薬−真菌の組み合せでブレークポイントが示されていないこと、キャンディン系薬についてはエンドポイントの判定やその解釈がしばしば困難なこと、など解決または改善すべき数々の問題が残されています。CLSI・M38 に至ってはさらに多くの問題点をかかえています。

このように各試験法に少なからず限界があるとはいえ、試験結果とその適正な解釈は治療を行う臨床医にとって有用な情報となることは疑いないところです。使用すべき薬剤とその用量の選択に役立つことは無論ですが、そればかりではありません。信頼できる MIC なしでは薬物動態（PK/PD）解析も、施設内外の感受性サーベイランスも不可能になるからです。

試験の実施にあたっては、大半の施設では市販キットを利用すると思われます。各々のキットには特徴がありますから、目的や施設の状況に適したものを選ぶべきです。例えば、正確を期すなら ‘栄研’ キットを、判定の容易さや簡便性を優先するなら ASTY や Etest を、といった具合にです。そして何よりも強調したいのは、真菌症患者から原因菌と思われる病原真菌が分離された場合には、酵母、糸状菌の別なく可能な限り感受性試験を実施することです。

文　献

1）山口英世：病原真菌と真菌症 改訂 4 版、南山堂、東京、2007.

2） Bennett JE, Dismukes WE, Duma RA, et al : A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. N Engl J Med, **301** : 126-131, 1979.

3）Powderly WG, Kobayashi GS, Herzig GP, et al : Amphotericin B-resistant yeast infection in severely immunocompromised patients. Am J Med, **84** : 826-832, 1988.
4）Vuffray A, Durussel C, Boerlin P, et al : Oropharyngeal candidiasis resistant to single dose therapy with fluconazole in HIV-infected patients. AIDS, **8** : 708-709, 1994.
5）Johnson EM, Warnock DW, Luker J, et al : Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconzole therapy for oral candidosis. J Antimicrob Chemother, **35** : 103-114, 1995.
6）Muller FMC, Weig M, Peter J, et al : Azole cross-resistance to ketoconazole, fluconazole, itraconazole and voriconazole in clinical *Candida albicans* isolates from HIV-infected children with oropharyngeal candidosis. J Antimicrob Chemother, **46** : 338-340, 2000.
7）Moore CB, Sayers N, Mosquera J, et al : Antifungal drug resistance in Aspergillus. J Infect, **41** : 203-220, 2000.
8）Masia-Canuto M, Gutierrez-Rodero F : Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. Lancet Infect Dis, **2** : 550-563, 2002.
9）Kontoyeannis DP, Lewis RE : Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. Lancet, **359** : 1135-1144, 2002.
10）Loeffler J, Stevens DA : Antifungal drug resistance. Clin Infect Dis, **36**（Suppl. 1）: S31-S41, 2003.
11）山口英世：病原真菌における抗真菌薬耐性．医学のあゆみ、**209** : 556-563, 2004.
12）山口英世：抗真菌薬感受性試験の現状と課題．日本臨床微生物学雑誌、**14** : 129-145, 2004.
13）Galgiani JN, Reiser J, Brass C, et al : Comparison of relative susceptibilities of *Candida* species to three antifungal agents as determined by unstandardized methods. Antimicrob Agents Chemother, **31** : 1343-1347, 1987.
14）Stevens DA : Antifungal drug susceptibility testing. A critical review. Mycopathologia, **87** : 135-140, 1984.
15）Calhoun DL, Roberts GD, Galgiani JN, et al : Results of a survey of antifungal susceptibility tests in the United States and interlaboratory comparison of broth dilution testing of flucytosine and amphotericin B. J Clin Microbiol, **23** : 298-301, 1986.
16）Speller DCE, Cartwright RY, Evans EGV, et al: Laboratory methods for flucytosine（5-fluorocytosine）. Report of a working group of the British Society for Mycopathology. J Antimicrob Chemother, **14** : 1-8, 1984.
17）Galgiani JN, Stevens DA: Antimicrobial susceptibility testing of yeasts : A turbidimetric technique independent of inoculum size. Antimicrob Agents Chemother, **10** : 721-726, 1976.
18）Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, et al : Antifungal susceptibility testing. Clin Microbiol Rev, **6** : 367-381, 1993.
19）National Committee for Clinical Laboratory Standards : Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts : proposed standard M27-P. NCCLS, Villanova, PA, USA, 1992.
20）National Committee for Clinical Laboratory Standards : Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts : Approved standard M27-A. NCCLS, Wayne, PA, USA, 1997.
21）National Committee for Clinical Laboratory Standards : Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts : Approved standard-second edition M27-A2. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2002.
22）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.
23）Arthington-Skaggs BA, Lee-Yang W, Ciblak MA, et al : Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC end point determination and evaluation of a sterol quantitation method for in vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* isolates. Antimicrob Agents Chemother, **46** : 2477-2481, 2002.
24）National Committee for Clinical Laboratory Standards : Methods for antifungal diskdiffusion susceptibility testing of yeasts : Approved guideline M44-A. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2004.
25）Takakura S, Fujihara N, Saito T, et al : National surveillance of species distribution in blood isolates of *Candida* species in Japan and their susceptibility to six antifungal agents including voricoanzole and micafungin. J Antimicrob Chemother, **53** : 283-289, 2004.
26）山口英世、内田勝久、奥住捷子、ほか：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．日本臨床微生物学雑誌、**14** : 183-193, 2004.
27）Stevens DA, White TC, Perlin DS, et al : Studies of the paradoxical effect of caspofungin at high drug concentrations. Diagn Microbiol Infect Dis, **51** : 173-178, 2005.
28）Clinical and Laboratory Standards Institute : Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts : Third informational supplement M27-S3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
29）山口英世、内田勝久、ほか：日本医真菌学会標準化委員会報告（1992 ～ 1994 年）．提案 ― 抗真菌薬感受性試験法．日本医真菌学会雑誌、**36** : 61-64, 1995.
30）内田勝久、西山彌生、山口英世：*Candida* 属菌種のアゾール系薬感受性試験における現行の日本医真菌学会法、およびその改変法と NCCLS M27-A2 法との相関性に関する検討．日本医真菌学会雑誌、**47** : 209-217, 2006.
31）Pfaller MA, Arikan S, Lozano-Chiu M, et al : Clinical evaluation of the ASTY colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing. J Clin Microbiol, **36** : 2609-2612, 1998.
32）National Committee for Clinical Laboratory Standards : Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi : Proposed standard M38-P. NCCLS, Wayne, PA, USA, 1998.
33）National Committee for Clinical Laboratory Standards : Reference method for broth dilution antifungal susceptibility

bility testing of filamentous fungi : Approved standard M38-A. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2002.
34) National Committee for Clinical Laboratory Standards : Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi : Approved standard M38-A2. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
35) Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley L, et al : Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother, **41** : 1364-1368, 1997.
36) Gomez-Lopez A, García-Effron G, Mellado E, et al : *In vitro* activities of three licensed antifungal agents against Spanish clinical isolates of *Aspergillus* spp. Antimicrob Agents Chemother, **47** : 3085-3088, 2003.
37) Messer SA, Jones RN, Fritsche TR : International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). J Clin Microbiol, **44** : 1782-1787, 2006.
38) Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, et al : *In vitro* survey of triazole cross-resistance among more than 700 clinical isolates of *Aspergillus* species. J Clin Microbiol, **46** : 2568-2572, 2008.
39) 山口英世、内田勝久、西山彌生、ほか：Japan Antifungal Sruveillance 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(3)：2005 年度報告．日本臨床微生物学雑誌、**19** : 128-141, 2009.