

埼玉県における無菌材料から分離されたカンジダ属の薬剤感受性

樽本憲人¹⁾・渡辺典之²⁾・田辺公一³⁾・橋北義一⁴⁾・高橋 俊⁵⁾・
結城 篤⁶⁾・廣瀬米志⁷⁾・関根 進⁸⁾・叶 一乃⁹⁾・霜島正浩¹⁰⁾・
金田光稔¹¹⁾・山口敏行¹⁾・大野秀明³⁾・宮崎義継³⁾・前崎繁文¹⁾

¹⁾ 埼玉医科大学感染症科・感染制御科

²⁾ 埼玉医科大学病院中央検査部

³⁾ 国立感染症研究所真菌部

⁴⁾ 埼玉医科大学国際医療センター中央検査部

⁵⁾ 埼玉医科大学保健医療学部

⁶⁾ 防衛医科大学校病院検査部

⁷⁾ 北里研究所メディカルセンター病院検査部

⁸⁾ 埼玉医科大学総合医療センター検査部

⁹⁾ 新渡戸文化短期大学

¹⁰⁾ (株) ビー・エム・エル総合研究所

¹¹⁾ 浦和医師会メディカルセンター検査部

(2014年4月8日受付)

今回、我々は埼玉県下の複数の医療機関において血液など無菌的な臨床材料から分離されたカンジダ属の各種抗真菌薬に対する薬剤感受性を検討した。対象は、平成19年11月から平成23年7月までに、埼玉県内の6施設において無菌材料から分離されたカンジダ属とした。菌株数は85株であり、内訳は、*Candida albicans* 43株 (50.6%)、*Candida parapsilosis* 24株 (28.2%)、*Candida glabrata* 5株 (5.9%)、*Candida tropicalis* 5株 (5.9%)であった。その他は、*Candida guilliermondii* 4株 (4.7%)、*Candida fermentati* 2株 (2.4%)、*Candida famata*と*Candida lusitanae*がそれぞれ1株 (1.2%)であった。各種抗真菌薬に対する薬剤感受性に関しては、amphotericin Bではすべての菌株が良好な感受性を示し、*C. albicans*におけるfluconazole耐性株も認めなかった。また、micafunginでは、*C. glabrata*の5株中3株に耐性を認めた。以上、埼玉県内で無菌材料から分離されたカンジダ属における各種抗真菌薬の薬剤感受性を検討したので、若干の考察を含め報告する。

深在性真菌症は難治性感染症の一つである。特に、カンジダ血症を含めた深在性カンジダ症は臨床的に比較的経験され、死亡率も高い。抗真菌治療において、各菌種に対する抗真菌活性が異なるた

め、原因菌種に応じた抗真菌薬の選択が必要となる。その目安の一つとして、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) は、薬剤感受性試験の標準的な測定法と、ブレイクポイントMICを公表

している^{1,2)}。さらに、2012年には、主要なカンジダ菌種毎における、micafungin (MCFG) と caspofungin を含めたキャンディン系抗真菌薬と、fluconazole (FLCZ), voriconazole (VRCZ) のブレイクポイントMICをM27-S4として公表した³⁾。

本邦では、カンジダ属をはじめとした酵母様真菌の薬剤感受性試験は保険収載されているが、抗真菌薬に対する耐性真菌は臨床的に問題となることが多くないため、日常検査として実施されない施設もある。しかし、米国感染症学会が策定したカンジダ感染症のガイドラインにおいて、今後の耐性菌の動向を監視するためにも薬剤感受性試験を実施するよう推奨されている⁴⁾。また、各地域や医療機関における抗真菌薬の薬剤感受性のパターンは異なることが報告されており⁵⁾、薬剤感受性試験を行うことが重要と考えられる。今回、我々は埼玉県下の複数の医療機関において血液など無菌的な臨床材料から分離されたカンジダ属の、各種抗真菌薬における薬剤感受性を検討したので報告する。

方法

対象は、平成19年11月から平成23年7月の期間に、埼玉県内の6施設において無菌材料から分離されたカンジダ属を対象とした。カンジダ属の同定は、各医療機関の微生物検査室においてCHROMagar™ *Candida* (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いて行われ、さらに全例、Vitek Yeast Biochemical Card (シスメックス・ピオメリユー) を用いて生化学的に確認された。薬剤感受性試験は、菌株を一か所に集め、一人によって判定がなされた。CLSIの標準プロトコールであるM27-A3 (液体希釈法) に準じ¹⁾、酵母様真菌FP‘栄研’ (栄研化学) を用いた微量液体希釈法にて amphotericin B (AMPH-B), FLCZ, itraconazole (ITCZ), VRCZ, miconazole (MCZ), MCFG,

flucytosine (5-FC) の7薬剤の薬剤感受性を測定した。薬剤感受性結果のブレイクポイントMICの判定については、M27-S4³⁾ に準じ、これに記載のない薬剤および菌種はM27-S3²⁾ に準じて行った。生化学的検査では同定困難であったものは、シーケンス解析を行った。すなわち、YPD培地で培養後、コロニーからDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて核酸を抽出し、ITS領域に存在する特徴的な配列を元に判定した⁶⁾。

結果

1) 菌種の内訳

対象となった菌株は85株であった。検体は血液76株、カテーテル先端4株、腹水4株、腹腔ドレーン液1株であった。菌種別の内訳は、*Candida albicans* が43株 (50.6%)、*Candida parapsilosis* が24株 (28.2%)、*Candida glabrata* が5株 (5.9%)、*Candida tropicalis* が5株 (5.9%) であった。その他は*Candida guilliermondii* が4株 (4.7%)、*Candida fermentati* が2株 (2.4%)、*Candida famata* と *Candida lusitanae* がそれぞれ1株 (1.2%) であった。なお、*Candida krusei* は分離されなかった。

生化学的に同定が困難であった菌株は3株あり、3株とも *C. famata* または *C. guilliermondii* と判定されていたため、これらに対してシーケンス解析が行われた。この結果、*C. guilliermondii* が2株、*C. fermentati* が1株であった。

2) 各種抗真菌薬に対する薬剤感受性試験の成績

それぞれのカンジダ属における各種抗真菌薬に対する薬剤感受性試験の成績をTable 1に示す。*C. albicans* では、FLCZのMIC rangeは ≤ 0.125 から $1 \mu\text{g/ml}$ であり、耐性株は認められなかった。ITCZではMIC₉₀が $0.03 \mu\text{g/ml}$ であり、用量依存的感性 (susceptible dose dependent, S-DD) を示す株が認められなかった。VRCZではMICは全て

Table 1. Antifungal activity of drugs against clinical isolates of *Candida* species

Organism (number)	Drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			resistant (%)	
		Range	50%	90%	S-DD	R
<i>C. albicans</i> (n=43)	AMPH-B	0.125 - 0.5	0.25	0.5	-	-
	FLCZ	\leq 0.125 - 1	0.25	0.25	0	0
	ITCZ	\leq 0.015 - 0.03	\leq 0.015	0.03	0	0
	MCZ	\leq 0.03 - 0.06	\leq 0.03	0.06	-	-
	VRCZ	\leq 0.015 - \leq 0.015	\leq 0.015	\leq 0.015	0	0
	MCFG	\leq 0.015 - 1	\leq 0.015	0.03	-	2.3
	5-FC	\leq 0.125 - 64	\leq 0.125	0.25	-	2.3
<i>C. parapsilosis</i> (n=24)	AMPH-B	0.06 - 1	0.5	1	-	-
	FLCZ	0.25 - 4	1	2	4.2	0
	ITCZ	\leq 0.015 - 0.125	0.03	0.125	0	0
	MCZ	\leq 0.03 - 4	1	4	-	-
	VRCZ	\leq 0.015 - 0.06	0.03	0.06	0	0
	MCFG	0.5 - 4	2	4	-	0
	5-FC	\leq 0.125 - 0.5	\leq 0.125	0.25	-	0
<i>C. glabrata</i> (n=5)	AMPH-B	0.06 - 0.25	0.125	0.25	-	-
	FLCZ	0.25 - 16	0.5	16	100	0
	ITCZ	\leq 0.03 - 0.5	0.125	0.5	0	20
	MCZ	\leq 0.015 - 4	\leq 0.015	4	-	-
	VRCZ	\leq 0.015 - 0.5	\leq 0.015	0.5	-	-
	MCFG	\leq 0.015 - 1	0.25	1	-	60
	5-FC	\leq 0.125 - \leq 0.125	\leq 0.125	\leq 0.125	-	0
<i>C. tropicalis</i> (n=5)	AMPH-B	0.25 - 0.5	0.5	0.5	-	-
	FLCZ	0.25 - 2	0.5	2	0	0
	ITCZ	\leq 0.03 - 2	0.25	2	20	0
	MCZ	\leq 0.015 - 0.5	0.06	0.5	-	-
	VRCZ	\leq 0.015 - 0.25	0.03	0.25	20	0
	MCFG	0.03 - > 16	0.03	> 16	-	20
	5-FC	\leq 0.125 - \leq 0.125	\leq 0.125	\leq 0.125	-	0
Other <i>Candida</i> spp. (n=8)	AMPH-B	0.06 - 0.5	0.25	0.5	-	-
	FLCZ	0.5 - 8	4	8	0	0
	ITCZ	0.03 - 0.5	0.125	0.5	50	0
	MCZ	0.06 - 4	2	4	-	-
	VRCZ	\leq 0.015 - 0.25	0.03	0.25	0	0
	MCFG	0.25 - 16	2	16	-	25
	5-FC	\leq 0.125 - 1	\leq 0.125	1	-	0

The abbreviations are AMPH-B, amphotericin B; FLCZ, fluconazole; ITCZ, itraconazole; MCZ, miconazole; VRCZ, voriconazole; MCFG, micafungin; 5-FC, flucytosine.

Table 2. Minimum inhibitory concentration against rare *Candida* species

Organism	AMPH-B	FLCZ	ITCZ	MCZ	VRCZ	MCFG	5-FC
	MIC ($\mu\text{g/ml}$)						
<i>C. guilliermondii</i> (n=4)	0.06	4	0.06	0.125	0.03	0.5	≤ 0.125
	0.125	4	0.25	2	0.125	1	1
	0.25	8	0.25	2	0.125	2	0.5
	0.125	4	0.25	2	0.125	4	0.25
<i>C. fermentati</i> (n=2)	0.5	4	0.125	4	0.03	2	≤ 0.125
	0.25	4	0.125	1	0.03	16	≤ 0.125
<i>C. famata</i>	0.25	8	0.5	4	0.25	8	1
<i>C. lusitaniae</i>	0.25	0.5	0.03	0.06	≤ 0.015	0.25	≤ 0.125

The abbreviations are AMPH-B, amphotericin B; FLCZ, fluconazole; ITCZ, itraconazole; MCZ, miconazole; VRCZ, voriconazole; MCFG, micafungin; 5-FC, flucytosine.

0.015 $\mu\text{g/ml}$ 以下で感性であった。また、MCFGのMIC₉₀は0.03 $\mu\text{g/ml}$ であり、感受性は良好であったが、1株 (2.3%) のみMICが1 $\mu\text{g/ml}$ と耐性を示した。

*C. parapsilosis*では、AMPH-BのMIC₉₀が1 $\mu\text{g/ml}$ と他の菌種と比較して高値であった。FLCZでは、24株中1株 (4.2%) のみがS-DDを示した。VRCZでは耐性株は認めず、MCFGではMIC rangeは0.5から4 $\mu\text{g/ml}$ で、3株 (12.5%) が中等度耐性であった。

*C. glabrata*ではFLCZのMIC rangeは0.25から16 $\mu\text{g/ml}$ であり、全ての菌株がS-DDを示した。MCFGのMIC rangeは ≤ 0.015 から1 $\mu\text{g/ml}$ であり、MICが0.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性株が5株中3株 (60%) に認められた。

*C. tropicalis*では、FLCZのMIC rangeは0.25から2 $\mu\text{g/ml}$ と感受性を示したが、ITCZはMIC₉₀が2 $\mu\text{g/ml}$ であり耐性を示す菌株が認められた。VRCZはMIC rangeが ≤ 0.015 から0.25 $\mu\text{g/ml}$ であり、1株 (20%) のみ0.25 $\mu\text{g/ml}$ で、残り4株は0.03 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった。また、MCFGではMICが16 $\mu\text{g/ml}$ 以上と高度耐性株を1株 (20%) 認め

た。

さらに、分離頻度の少ない菌種における各種抗真菌薬の薬剤感受性成績をTable 2に示した。AMPH-B、5-FCに対しては、8株ともが感性を示した。FLCZ、VRCZにおいては全株感性であったが、ITCZについては、*C. guilliermondii* 4株中3株 (75%) と*C. famata*の1株がS-DDであった。MCFGに対しては、*C. guilliermondii*の1株 (25%) が中等度耐性であり、*C. fermentati*の1株 (50%) と*C. famata*の1株はMCFGに非感性であった。*C. lusitaniae*はすべての抗真菌薬に感性を示した。

考察

カンジダ属は、血流感染症の主要な原因微生物の一つである。カンジダ血症の治療には抗真菌薬が使用されるが、アゾール系抗真菌薬が臨床的に汎用されるようになり、耐性菌の出現が問題となってきた。さらに、より有効性と安全性に優れたキャンディン系抗真菌薬が登場したが、原因菌種や薬剤感受性試験の結果から適正な抗真菌薬を選択することが求められている。

今回、我々は埼玉県下の6施設において、無菌材料から分離された各種カンジダ属の抗真菌薬に対する薬剤感受性を検討した。今回の検討における各種カンジダ属の検出頻度は、米国におけるPFALLERらのデータと比較して⁷⁾、*C. parapsilosis*の頻度が高く、*C. glabrata*の頻度が低かった。このような頻度の差は、各施設や各地域によってみられるが⁵⁾、主要な5菌種が占める割合が全体の90.6%であり、これは他の報告とほぼ同じ頻度であった。また、今回の検討では、菌種の同定は各施設の検査部においてCHROMagar™ *Candida*を用い、その後生化学的に確認を行ったため、最終的な誤同定は少なかったと考えられたが、CHROMagar™ *Candida*において、*C. glabrata*、*C. famata*、*C. fermentati*、*C. guilliermondii*などのコロニーはすべてピンクから紫色になるため、CHROMagar™ *Candida*のみで菌種の同定を行う際、*C. glabrata*と考えられた場合には慎重に同定する必要がある。

また、これらのカンジダ属における各種抗真菌薬に対する薬剤感受性試験の成績では、AMPH-Bにおいては良好な感受性を示した。また、アゾール系抗真菌薬やMCFGにおいても、これまでの報告と比較して^{8,9)}、MICの上昇は認められなかった。菌種別には、*C. albicans*ではMCFG、5-FCに耐性が1株認められた。*C. tropicalis*はITCZ、VRCZと、MCFG以外の抗真菌薬に対して感性であった。*C. parapsilosis*は、MCFGに中等度耐性が3株認められたが、多くは感性を示した。それに対して、*C. glabrata*においては、MCFGのMIC 0.25 µg/ml以上の耐性株が、5株中3株あった。これまでの報告では、*C. glabrata*のMICは多くの菌株が0.12 µg/ml以下であり⁸⁻¹⁰⁾、耐性化が進んでいる可能性もあった。しかし、菌数が少ないため、今後はさらに多くの菌株を収集して、検討する必要があると考えられた。また、MCFGは現在カンジダ症の治療薬として最も汎用されている薬剤の

一つであり、今後我が国でも*C. glabrata*における耐性株の頻度が高くなれば、抗真菌薬の選択の際に考慮する必要があると考えられた。

分離頻度の少ない菌種8株の各種抗真菌薬の薬剤感受性も検討した。多くの菌種は抗真菌薬に対して良好な感受性を示したが、*C. guilliermondii*、*C. famata*、*C. fermentati*それぞれ1株ずつがMCFGに対して非感性であった。今後はカンジダ症においてMCFGの臨床的効果が不十分な症例では、このような菌種が原因菌である可能性も考慮し、正確な菌種同定とともに、薬剤感受性試験の実施が望まれる。

一般的に、薬剤感受性試験は、複数の判定者が行うと、結果に相違が出ることが知られている^{11,12)}。これは、薬剤感受性試験の成績は、施設間の評価が難しいことを示唆している。今回の検討では、特定の施設で、かつ単独の判定者が薬剤感受性試験の判定を行ったが、複数施設から収集した薬剤感受性試験の結果を報告する場合には注意が必要である。

以上、埼玉県下の複数の施設において無菌材料から分離されたカンジダ属の各種抗真菌薬に対する薬剤感受性について検討したので、若干の考察を加えて報告した。

文献

- 1) Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard third edition M27-A3. Wayne, PA, 2008
- 2) Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: third informational supplement M27-S3. Wayne, PA, 2008
- 3) Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: fourth

- informational supplement M27-S4. Wayne, PA, 2012
- 4) PAPPAS, P. G.; C. A. KAUFFMAN, D. ANDES, *et al.*: Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 48: 503~535, 2009
 - 5) PFALLER, M. A. & D. J. DIEKEMA: Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 20: 133~163, 2007
 - 6) ROMI, W.; S. KEISAM, G. AHMED, *et al.*: Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. *BMC Microbiol.* 14: 52, 2014
 - 7) PFALLER, M.; D. NEOFYTOS, D. DIEKEMA, *et al.*: Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the prospective antifungal therapy (PATH Alliance (R)) registry, 2004-2008. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 74: 323~331, 2012
 - 8) 小林寅喆, 若杉昌宏, 池田文昭, 他: 臨床分離 *Candida* 属および *Aspergillus* 属真菌の micafungin 感受性。日本化学療法学会雑誌 54: 308~314, 2006
 - 9) 小林寅喆, 鈴木真言, 雜賀 威, 他: 臨床分離 *Candida* 属および *Aspergillus* 属真菌の micafungin 感受性—第2報—。日本化学療法学会雑誌 56: 344~352, 2008
 - 10) PFALLER, M. A.; L. BOYKEN, R. J. HOLLIS, *et al.*: *In vitro* susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J. Clin. Microbiol.* 46: 150~156, 2008
 - 11) ESPINEL-INGROFF, A.; F. BARCHIESI, M. CUENCA-ESTRELLA, *et al.*: International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3884~3889, 2005
 - 12) ESPINEL-INGROFF, A.; F. BARCHIESI, M. CUENCA-ESTRELLA, *et al.*: Comparison of visual 24-hour and spectrophotometric 48-hour MICs to CLSI reference microdilution MICs of fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole for *Candida* spp.: a collaborative study. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4535~4540, 2005
-

Trend of susceptibility testing of clinical isolates of *Candida* species from aseptic samples in hospitals in Saitama prefecture

NORIHITO TARUMOTO¹⁾, NORIYUKI WATANABE²⁾, KOUICHI TANABE³⁾, GIICHI HASHIKITA⁴⁾, SHUN TAKAHASHI⁵⁾, ATSUSHI YUKI⁶⁾, YONEJI HIROSE⁷⁾, SUSUMU SEKINE⁸⁾, ICHINO KANOH⁹⁾, MASAHIRO SHIMOJIMA¹⁰⁾, MITSUNORI KANEDA¹¹⁾, TOSHIYUKI YAMAGUCHI¹⁾, HIDEAKI OHNO³⁾, YOSHITSUGU MIYAZAKI³⁾ and SHIGEFUMI MAESAKI¹⁾

1) Department of Infectious Disease and Infection Control,
Saitama Medical University

2) Department of Laboratory Medicine,
Saitama Medical University Hospital

3) Department of Chemotherapy and Mycoses,
National Institute of Infectious Diseases

4) Department of Laboratory Medicine,
Saitama International Medical University Hospital

5) Faculty of Health and Medical Care,
Saitama International Medical University Hospital

6) Department of Laboratory Medicine,
National Defense Medical College Hospital

7) Department of Clinical Laboratory,
Kitasato Institute Medical Center Hospital

8) Department of Laboratory Medicine, Saitama Medical Center,
Saitama Medical University

9) Nitobe Bunka College

10) BML, Inc.

11) Department of Clinical Laboratory, Medical Diagnostic Center of
URAWA Medical Association

We investigated the susceptibility of *Candida* species from clinical aseptic samples, including blood, at some hospitals in Saitama prefecture. *Candida* spp. detected from aseptic samples in the 6 institutes in Saitama prefecture from November 2007 to July 2011 were studied. The number of isolates was 85, which are 43 (50.6%) of *Candida albicans*, 24 (28.2%) of *Candida parapsilosis*, 5 (5.9%) of *Candida glabrata*, 5 (5.9%) of *Candida tropicalis*, 4 (4.7%) of *Candida guilliermondii*, 2 (2.4%) of *Candida fermentati*, 1 (1.2%) of *Candida famata* and *Candida lusitanae*, respectively. All isolates were susceptible to amphotericin B. However, resistant isolates against micafungin were 3 in 5 of *C. glabrata*. We analyzed susceptibility of *Candida* spp. in Saitama prefecture in the article, and our study might be useful for the fungal therapy in the region.