

真菌症の臨床微生物学的検査法，とくに検体の前処理，
分離培養およびミカファンギン(MCFG)の感受性測定法
の確立に関する検討

2010. 12

阿部美知子

真菌症の臨床微生物学的検査法，とくに検体の前処理，
分離培養およびミカファンギン(MCFG)の感受性測定法
の確立に関する検討

阿部美知子

Study on the Establishment of Mycological Examination Methods
in Clinical Laboratories: Specimen Pretreatment and Isolation and
a Susceptibility Testing for Micafungin

Michiko Abe

目 次

要旨	-----	1
英文要旨	-----	6
I. 真菌症の微生物学的検査法の基礎的検討	-----	12
-検体処理と分離培養-		
1. 要旨	-----	12
2. 序文	-----	12
3. 材料と方法	-----	13
1. 培養材料の遠心処理による集菌効果 および接種量の検討	-----	13
2. 培養温度の検討	-----	13
3. 臨床材料の直接鏡検成績	-----	13
4. 呼吸器系材料から真菌を分離した症例の解析	-----	13
5. 皮膚科材料の培養所要日数	-----	13
4. 成績	-----	14
1. 培養材料の遠心処理による集菌効果および 接種量の検討	-----	14
2. 培養温度による発育速度の検討	-----	14
3. 臨床材料の直接鏡検成績	-----	14
4. 呼吸器系材料から真菌を検出した症例の検討成績	-----	14
5. 皮膚科材料の培養所要日数	-----	16
5. 考察	-----	16
6. 結語	-----	18
7. 文献	-----	18

II. ミカファンギン(MCFG)の感受性測定法に関する検討	-----	20
1. 要旨	-----	20
2. 緒言	-----	20
3. 材料と方法	-----	21
1. 供試菌株	-----	21
2. 抗真菌薬	-----	21
3. 培地	-----	21
4. 感受性測定法	-----	21
5. NCCLS法によるMIC判定時の各ウエル内 の残存菌量および菌形態	-----	22
6. Neutral red染色試験	-----	22
7. MCFGのMICに及ぼす接種菌量の影響	-----	22
4. 成績	-----	22
1. 患者背景	-----	22
2. 各法によるMCFGのMIC	-----	23
3. NCCLS法によるMIC判定時の各ウエル内 の残存菌量および菌形態	-----	23
4. Neutral red染色試験	-----	24
5. 接種菌量の影響	-----	24
5. 考察	-----	24
6. 結語	-----	26
7. 文献	-----	26
8. 謝辞	-----	28

真菌症の臨床微生物学的検査法、とくに検体の前処理、分離培養

およびミカファンギン(MCFG)の感受性測定法の確立に関する検討

真菌症の微生物学的検査(直接鏡検・分離培養)に関する検査法の標準化は遅れている。一般に真菌検査は、細菌検査に準じた方法で実施されているが、真菌は細菌より発育が遅いなどの特徴があり、必ずしも臨床材料からの真菌検出は十分でなく、真菌に適した検査法の確立が望まれている。そこで、臨床材料からの真菌の直接鏡検および分離培養検査の実態を把握するため、北里大学病院の臨床検査室で取り扱った真菌検査成績について、1)直接鏡検の陽性率、2)呼吸器系疾患材料から分離された真菌(カンジダ属を除く)の菌種別分離頻度および集落数、3)内科系疾患材料からのアスペルギルスおよびクリプトコックス分離例ならびに皮膚科材料からの皮膚糸状菌分離例における集落形成までの培養日数などを回顧的に調査した。さらに、カンジダ、アスペルギルスおよびクリプトコックスの保存菌株、各3株を用いて検体の前処理としての遠心分離の有用性、至適接種量および至適培養温度について検討した。

次に、抗真菌薬における最小発育阻止濃度〔minimum inhibitory concentration(MIC)〕の測定法は、米国の Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)が世界に先駆けて酵母用および糸状菌用の各検査法を発表したが、その後も改良が続く状況にあり、我が国では、日本医真菌学会(JSMM)が CLSI 法を改良した検査法を提案している。2002 年に新規の作用機作である真菌細胞壁

中の(1→3)- β -D-グルカンの合成を阻害するキャンディン系抗真菌薬のミカファンギン(MCFG)が我が国で開発され上市されたが、キャンディン系薬のMIC測定法は制定されていなかった。

そこで、著者はCLSI法およびJSMF法の準拠を基本として、ヒト臨床材料由来のカンジダ48株、アスペルギルス13株、精度管理用菌株2株(*Candida krusei* ATCC6258、*C. parapsilosis* ATCC22019)および参照菌株(*Aspergillus fumigatus* ATCC26430)の計64株を供試して、MCFGのMIC測定法のうちMIC値への影響が大きい終末点の判定基準および適正接種菌量について検討した。

その概要は以下のとおりである。

1)内臓アスペルギルス症と診断された27例中10例(37%)および内臓クリプトコックス症と診断された10例の12検体中10検体(83.3%)から、直接鏡検でそれぞれの真菌が確認された。

2)呼吸器系疾患材料から分離されたカンジダを除く真菌69株の菌種別内訳は、*Aspergillus fumigatus* 43株(62.4%)、*Aspergillus* spp. 13株(18.8%)、*Cryptococcus neoformans* 10株(14.5%)および*Cryptococcus* spp. 3株(4.3%)であった。アスペルギルスが分離された102検体の分離集落数は、1~3集落のものが74検体(72.5%)と最も多く、数百集落以上は8検体(7.9%)に過ぎなかった。クリプトコックスが分離された14検体では、1~3集落が7検体(50.0%)、数百集落以上は2検体(14.3%)であった。

3)アスペルギルスが分離された65検体の初発集落形成までの培養日数は、1

日が3検体(4.6%)、残り62検体(95.4%)すべてのアスペルギルス検出には6日必要であった。クリプトコックスが分離された3検体では、4日が1検体、5日が2検体であった。皮膚科材料から皮膚糸状菌が分離された46検体では、7日目までに集落を認めたのは29検体(63.1%)で、残り17検体すべての皮膚糸状菌検出には14日必要であった。

4) 保存菌株のカンジダ、クリプトコックスおよびアスペルギルスのそれぞれについて $10\sim 10^4$ cells/ml相当の菌液を作製し、遠心分離の有無による培養集落数を比較した。その結果、10 cells/mlの菌液を遠心せずに一白金耳量(約10 μ l)塗抹した場合には集落が認められなかったが、2,000G、15分遠心後の沈渣を同様に塗抹したところ、1~3集落が認められた。また、 10^2 cells/ml相当の各菌液を用いて、1日目と2日目の培養温度をそれぞれ35 $^{\circ}$ C、27 $^{\circ}$ Cとした場合、および2日間27 $^{\circ}$ Cで培養した場合の集落直径を比較した。その結果、前者の培養温度の方が、カンジダは1.2~1.4倍およびアスペルギルスは3.3~3.9倍大きくなったが、クリプトコックスは0.7~0.8倍と小さくなった。アスペルギルスは27 $^{\circ}$ C、24時間培養では集落が認められなかったが、35 $^{\circ}$ C、24時間培養で集落が認められたことから、35 $^{\circ}$ Cの培養条件はアスペルギルスの早期検出に有用であると考えられた。

5) MCFGのMIC測定時の終末点を仮設定後、MIC測定を行った結果、カンジダに対するMICはCLSI法およびJSMM法ともに目視および吸光度測定との両判定法で $\leq 0.0039\sim 1\ \mu$ g/mlとほぼ一致した。一方、アスペルギルスに対す

る MIC は CLSI 法が目視判定および吸光度を測定し IC₅₀ による判定で、ともに 0.0078~0.0313 μ g/ml を示したが、IC₈₀ で判定した場合には >4 μ g/ml と大幅に異なる結果が得られた。JSMM 法は両判定法ともに \leq 0.0039~0.0156 μ g/ml であった。その際の CLSI 法での精度管理および参照菌株の各ウエルの吸光度値は、カンジダ 2 株では MIC より高濃度域で発育コントロールの 0~1% の吸光度に激減したが、アスペルギルスは目視判定の MIC より高濃度域で発育コントロールの 28~48% の吸光度を示していた。そのため MIC 測定後の各ウエル内の培養液中の菌体を光学顕微鏡で鏡検すると、目視判定の 1/2MIC でカンジダは菌体の膨化、アスペルギルスは菌糸先端の破裂などの形態変化（変形菌体）がそれぞれ認められたが、カンジダは MIC より高濃度域で菌体を認めないのに対し、アスペルギルスは最高濃度まで変形菌体が認められた。

次いで、MIC 測定後の各ウエルにニュートラルレッド液を添加してウエル内の生菌を染色し、その呈色液の吸光度を測定して各濃度別残存生菌量を測定した。その結果、カンジダは MIC より高濃度域で発育コントロールの 2~6% の生菌量であったが、アスペルギルスでは目視判定の MIC より高濃度域で 12~19% 相当の生菌が残存することを確認した。

6) 10^2 ~ 10^6 cells/ml の範囲で適正接種菌量を検討した結果、カンジダは CLSI 法および JSMM 法ともに、いずれの接種菌量でも同じ MIC を示した。アスペルギルスは JSMM 法ではいずれの接種菌量もほぼ同じ値を示したが、CLSI 法では 10^5 cells/ml 以上では、それ以下の接種菌量より 9 管以上高い MIC を示し

た。

以上のように、臨床検査成績の精査によって、呼吸器系疾患材料に含まれる真菌は少量であることが明らかになった。喀痰を検体とする場合はプロテアーゼなどの溶解剤を用いて液化後、遠心分離した沈渣を塗抹標本および分離培養の試料とすること、分離培養の接種量は一滴(約 $30\mu\text{l}$)の大量とすること、アスペルギルスおよびカンジダを対象とする場合は初日の培養温度を 35°C とすること、培養期間は内科系疾患材料では 7 日、皮膚科材料は 3~4 週間は必須であることを明らかにした。

また、MCFG の MIC 測定法は、カンジダは CLSI 法および JSMM 法のいずれでも問題がないが、アスペルギルスは多用されている CLSI 法には問題が多く、接種菌量は 10^4cells/ml を越えないこと、目視判定では「ウェル内の菌塊から菌糸の発育を認めない」点、吸光度測定では IC_{50} を、あらたな終末点とする必要性を明らかにした。

Study on the Establishment of Mycological Examination Methods in Clinical Laboratories: Specimen Pretreatment and Isolation and a Susceptibility Testing for Micafungin

At present, no standardized method of clinical mycological examination has been established. Mycological examination in clinical laboratories (e.g., isolation of pathogenic fungi from clinical specimens) is usually performed according to a clinical bacteriological examination method. However, fungi have features that differ from bacteria, such as slow growth rate, which means that the mycological examination must be performed in a different way from that for bacteria.

So, the author analyzed mycological examination reports of clinical specimens obtained at the Kitasato University Hospital to investigate the applicability of a clinical mycological examination method. The author wanted to identify the detective rate of fungi that were observed in direct smear preparations, the frequency of the fungi except for *Candida* spp. and the number of fungal colonies isolated from respiratory specimens, and the incubation days needed to isolate both *Aspergillus* spp. and *Cryptococcus* spp. from clinical specimens including dermatophytes from scales.

Furthermore, using prepared fungal suspensions of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*, the effect for a concentration of the samples by centrifugation, the appropriate inoculum size to isolation medium, and the incubation temperature for isolating the fungi were examined.

The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) suggested a standard susceptibility testing manual for yeast in 1992, and for filamentous fungi in 1998. Since

these CLSI manuals were first proposed, improvements to these manuals have continued until now. In Japan, the Japanese Society for Medical Mycology (JSMM) has proposed a susceptibility testing method modified from the CLSI method for yeast and for filamentous fungi.

A new antifungal agent, Micafungin (MCFG) developed by Astellas Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo in 2002, is a member of the candins and inhibits the synthesis of 1,3- β -D-glucan in fungal cell walls. Although susceptibility testing is necessary for evaluating the clinical effect, the susceptibility testing method of MCFG has not been clarified in these manuals.

Therefore, the author examined the susceptibility testing method for MCFG according to four manuals of two methods: CLSI M27-A2 (turbidity measurement for yeast) and CLSI M38-A (turbidity measurement for filamentous fungi) from the CLSI method, and JSMM-Y (turbidity measurement for yeast) and JSMM-F (colorimetric method for filamentous fungi) from the JSMM method, by using 48 clinical isolates of *Candida* spp., 13 clinical isolates of *Aspergillus* spp., two strains as the quality control (*Candida krusei* ATCC6258 and *Candida parapsilosis* ATCC22019), and a reference strain (*Aspergillus fumigatus* ATCC26430). The author also determined the end point and the inoculum size of the fungi for minimum inhibitory concentration (MIC) measurement.

The results are summarized below:

- 1) Detective rate of fungi from direct smear preparation was 37.0% in 27 deep-seated aspergillosis, and 83.3% in 10 cases of lung or central nervous system cryptococcosis.
- 2) Frequencies of fungi, except for *Candida* spp., isolated from respiratory specimens included *Aspergillus fumigatus* (62.4%), *Aspergillus* spp. (18.8%), *Cryptococcus*

neoformans (14.5%), and *Cryptococcus* spp. (4.3%).

In 72.5% of 102 respiratory specimens where *Aspergillus* spp. were isolated, the number of isolated colonies was one to three, and in only 7.9% of specimens, more than 100 colonies were isolated. Also, in 50% of 14 specimens where *Cryptococcus* spp. were isolated from lung or bronchial alveolar lavage fluid, the number of isolated colonies was one to three, and in 14.3% of specimens, more than 100 colonies were isolated.

3) The incubation period needed to isolate all of the 65 isolates of *Aspergillus* spp. from respiratory specimens was 6 days. In three respiratory specimens isolated *Cryptococcus* spp., the time required to isolate *Cryptococcus* spp. was 4 days in one specimen and 5 days in two specimens. In 46 scale samples, the required incubation period to isolate all of 46 dermatophyte isolates was 14 days.

4) Using a preparation of $10\sim 10^4$ cells/ml suspensions for *C. albicans*, *C. neoformans* and *A. fumigatus*, the number of recovered colonies in each suspension with or without centrifugation was compared. In samples containing 10 cells/ml in each suspension, no colonies were detected in the medium without centrifugation; yet some colonies were observed after 15 min centrifugation at 2,000 g.

Using a preparation of 10^2 cells/ml in each suspension of *C. albicans*, *C. neoformans* and *A. fumigatus*, the recovered colony size was compared with two incubation conditions: Condition 1, incubation at 35°C for the first 24 h and at 27°C for the next 24 h; and Condition 2, incubation at 27°C for 48 h. *C. albicans* and *A. fumigatus* formed larger sized colonies on the plate in Condition 1 than in Condition 2, while *C. neoformans* formed a larger colony on the plate in Condition 2. In addition, *A. fumigatus* did not develop any colonies in the first 24 h of incubation at 27°C in

Condition 2, but developed colonies in the first 24 h of incubation at 35°C in Condition 1. Therefore, the author believes that Condition 1 is the preferred technique for rapid isolation of *A. fumigatus*.

5) The MIC value for MCFG using the tentative endpoints was 0.0039-1 µg/ml against clinical isolates of *Candida* spp. in both methods, and the MIC against clinical isolates of *Aspergillus* spp. was 0.0078-0.0313 µg/ml by visual judgment using the CLSI method. A value of >4 µg/ml was judged using IC₈₀ as the endpoint and 0.0078-0.0313 µg/ml using IC₅₀ as the endpoint by spectrophotometry with the CLSI method, and a value of ≤0.0039-0.0156 µg/ml was judged with the JSMM method.

In the CLSI method, the absorbance of each well at the MIC in both quality control strains of *Candida* spp. decreased sharply, and the absorbance of the wells at or above the MIC were 0-1% of each growth control. On the other hand, in the *A. fumigatus* reference strain, the absorbance of the well at the MIC declined when judged visually, but the absorbance of the wells above the MIC was 28-48% of the growth control.

When the MIC of *C. krusei* as quality control strain and *A. fumigatus* as reference strain were measured with the CLSI method, the microscopic morphology of the organisms in each well was examined simultaneously. The morphological changes in the organisms, the swelling of the cells in *C. krusei* and the rupture on the top of the hyphae in *A. fumigatus* were observed at half the concentration of each MIC. The transformed organisms in *C. krusei* were not observed in the wells at or above the MIC, but were observed in *A. fumigatus* up to the maximum concentration of MCFG.

For the observation of the rate of viable cells treated with each concentration of MCFG, neutral red staining was performed in each of the wells containing *Candida* spp. as the quality control, and *A. fumigatus* as the reference strain after measurements of MIC

were carried out using the CLSI method. The rate of viable cells of *Candida* spp. as the quality control decreased to 2-6% of the growth control at concentrations above each MIC, and in *A. fumigatus* as the reference strain, the rate of viable cells declined at the MIC, but viable cells were observed at a rate of 12-19% of the growth control at concentrations above the MIC.

6) To observe the effect of the inoculum size against MIC values, the inoculum size of the quality control and reference strains were investigated within a range of 10^2 - 10^6 cells /ml. MIC values for *Candida* spp. as the quality control were similar for all inoculum sizes. However, for *A. fumigatus* as the reference strain, the MIC at an inoculum size of 10^5 - 10^6 cells /ml was over 9 times higher than that for an inoculum size of 10^2 - 10^4 cells /ml.

From these results, the author concludes that:

1) The number of fungal colonies isolated from respiratory specimens was very low according to the mycological examination reports of the Kitasato University Hospital. Therefore, the author proposes that the treatment of clinical specimens, especially respiratory samples, is to dissolve the sputum with proteases, centrifuge the dissolved sputum and then use the pelleted sample for direct smear preparation and isolation. The author also proposes that large amounts of the inoculum at 30 μ l should be added to the isolation medium, 35°C incubation temperature for the first 24 h should be used for rapid isolation of *C. albicans* and *A. fumigatus* from clinical specimens. And the author also emphasizes that the incubation period for isolating fungi from clinical specimens requires 7 days for internal specimens and 21 days for dermatological specimens.

2) After studying the susceptibility testing method for MCFG, the author concludes that the MIC measurement for MCFG against *Candida* spp. is acceptable by both CLSI and JSMM methods. However, when measuring MCFG against *Aspergillus* spp., the CLSI method has some problems. The inoculum size in the well of the microtiter plate should not exceed 10^4 cells/ml, and new endpoints should be used. This includes the visual endpoint provided in this study for visual judgment and the IC_{50} endpoint by spectrophotometry. For MIC measurement of MCFG against *Aspergillus* spp. in the CLSI method, the author recommends the use of these new endpoints.

謝辞

本研究の遂行に際し、終始ご指導頂き、ご校閲頂いた北里大学医療衛生学部 医療検査学科 小川善資准教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究の遂行に有益なご助言、ご示唆を頂いた麻布大学大学院環境保健学研究科 福山正文教授、松田基夫教授および山本静雄教授に深甚なる感謝の意を表します。さらに、本研究に際し、臨床分離株を分与頂いた北里大学病院臨床検査部細菌検査室およびMCFG 希釈系列の凍結乾燥マイクロプレートを作製頂いた、関東化学株式会社伊勢原研究所の中野倫太研究員、栗原 誠所長に深甚なる謝意を表します。