

投稿論文

技術論文

カンジダ選択分離培地の簡易同定に関する比較検討

○塚口 扶美枝¹⁾, 木下 愛¹⁾, 谷川 翔平¹⁾, 藤村 晴香¹⁾, 清水 馨¹⁾, 林 裕司¹⁾,
池本 敏行¹⁾, 九嶋 亮治¹⁾

1) 滋賀医科大学医学部附属病院検査部

〒520-2192 滋賀県大津市瀬田月輪町

滋賀医学検査2022 vol.12 No. 1
公益社団法人 滋賀県臨床検査技師会

技術論文

カンジダ選択分離培地の簡易同定に関する比較検討

○塚口 扶美枝¹⁾, 木下 愛¹⁾, 谷川 翔平¹⁾, 藤村 晴香¹⁾, 清水 馨¹⁾, 林 裕司¹⁾, 池本 敏行¹⁾, 九嶋 亮治¹⁾

1) 滋賀医科大学医学部附属病院検査部

〒520-2192 滋賀県大津市瀬田月輪町

Key words

Candida, 選択分離培地, 発育支持能, 鑑別性能

【要約】

*Candida*属は宿主側の要因によって重篤な病態を呈するカンジダ感染症を起こすため、迅速かつ適切な抗真菌薬の投与が必要である。しかし*Candida*属は菌種により抗真菌薬の感受性が異なるため迅速かつ正確な菌種同定が重要となる。今回我々は迅速かつ正確な菌種同定が可能であるかを検証するため、5種類のカンジダ選択分離培地を用いて簡易同定に関する比較検討を行った。標準菌株3菌種を用いたMiles&Misra法による発育支持能試験ではすべての培地において同等の発育支持能を示した。臨床分離株62株を用いた色調や形態による鑑別性能では同定一致率に大きな差は認めなかった。临床上重要である*Candida albicans*と*non-albicans Candida*鑑別に関してもすべての培地において24時間培養での同定一致率が良好であり、迅速簡易同定が可能であることが示唆された。しかし、各培地に発育したコロニーの色調、発色に要する時間や形態など異なる特徴があり、各施設の運用方法に適した培地を選択する必要があると考える。

I はじめに

カンジダ感染症は*Candida*属の特定の菌種によって原発性または続発性に引き起こされる。病原性*Candida*属菌種はヒトに親和性が強く、消化管、上気道、膈などの粘膜や、全身の皮膚の表面にしばしば常在菌として定着している。そのため、宿主側の様々な要因（免疫力の低下、抗がん剤や免疫抑制剤の投与による好中球減少期間の遷延、広域抗菌薬の長期使用による日和見感染、体内留置医療器具等の汎用）によって重篤な病態を呈し、死亡率が高いカンジダ血症や播種性カンジダ症を起こすことが知られている。従って、迅速かつ適切な抗真菌薬の選択が重要である。また、*Candida albicans*の標準治療薬がamphotericinB (AMPH-B) とfluconazole (FLCZ) である一方、*Candida glabrata*や*Candida krusei*ではFLCZに対して耐性もしくは低感受性であること、*Candida guilliermondii*ではAMPH-Bに対して耐性

もしくは低感受性を示すなど、菌種により抗真菌薬の感受性が異なる¹⁾。Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)²⁾の*Candida*属感受性検査の基準は現在M27-S4であり、菌種ごとのMIC値およびカテゴリーが異なる。従って、カンジダ感染症に対して迅速かつ正確な菌種同定が重要となっている。近年、コロニーの色調などから迅速かつ簡易に同定可能なカンジダ選択分離培地が各社から開発されてきた。今回我々は、5種類のカンジダ選択分離培地を用い、発育支持能および鑑別性能について評価し、迅速簡易同定に有用であるかを検討したので報告する。

II 対象および方法

1. 比較検討培地

比較検討培地は、CHROMagar Candida II 寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン、以下Candida

II), XM-Candida寒天培地 (日水製薬, 以下XM), ポアメディア®Vi Candida寒天培地 (栄研化学, 以下Vi), バイタルメディアカラーCandida寒天培地 (極東製薬工業, 以下カラーCa), CHROMagar Candida (関東化学, 以下CHROMagar) の5種類のカンジダ選択分離培地を用いた。

2. Miles&Misra法による発育支持能試験

標準菌株3菌種 (*C. albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida parapsilosis* ATCC 22019) を用いて比較検討培地の発育支持能試験を行った。菌液は、滅菌生理食塩水にてMcFarland No. 0.5に調製後、Miles&Misra法³⁾に準拠して、 10^{-1} から 10^{-7} までの希釈系列を作成した。各希釈菌液を20 μ Lずつ検討培地に滴下し、35 $^{\circ}$ C好気培養を実施し、24時間後と48時間後に発育したコロニー数を算定した。

3. 色調および形態による鑑別性能

検討菌株は当院で分離した臨床分離株62株を用いた。内訳は、*C. albicans* 22株, *C. glabrata* 19株, *C. tropicalis* 8株, *C. parapsilosis* 6株, *C. krusei* 3株, *Candida dublimiensis* 2株, *C. guilliermondii* 1株,

Candida metapsilosis 1株である。いずれも質量分析装置MALDI Biotyper (ブルカージャパン) を用いてmatrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) により同定を実施し、Score value 2.00以上の結果が得られた菌株を用いた (ソフトウェアversion MBT Compass 4.1, ライブラリー Ver.7.0.0.0 使用)。各菌株をMcFarland No. 1.0に調製後、各培地に画線塗抹し、35 $^{\circ}$ C好気培養を実施した。24時間後と48時間後に発育したコロニーの色調と形態を観察し、メーカー配布資料と見本培地 (典型的な発色を示す菌株を画線塗抹し培養した培地) を参照に簡易同定を実施、MALDI-TOF MSとの同定一致率を求めた。簡易同定は微生物検査に従事している検査技師3名 (各技師をA, B, Cと表記) と微生物検査に未経験の検査技師1名 (D) が行い評価した。

III 結果

1. Miles&Misra法による発育支持能試験

標準菌株3菌種を用いたMiles&Misra法による発育支持能試験の結果を表1に示す。いずれの培地,

表1 Miles&Misra法による発育支持能試験

菌種	時間	培地	希釈倍率						
			10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	24 h	Candida II	>100	50~100	28	5	0	0	0
		XM	>100	50~100	29	1	0	0	0
		Vi	>100	30~49	19	1	1	0	0
		カラーCa	>100	50~100	22	4	0	0	0
		CHROMagar	>100	50~100	28	4	0	0	0
		CHROMagar	>100	50~100	28	4	0	0	0
	48 h	Candida II	>100	50~100	30	5	0	0	0
		XM	>100	50~100	29	1	0	0	0
		Vi	>100	50~100	19	1	1	0	0
		カラーCa	>100	50~100	22	4	0	0	0
		CHROMagar	>100	50~100	28	4	0	0	0
		CHROMagar	>100	50~100	28	4	0	0	0
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 750)	24 h	Candida II	>100	50~100	20	1	0	0	0
		XM	>100	50~100	22	3	0	0	0
		Vi	>100	30~49	21	3	1	0	0
		カラーCa	>100	30~49	7	1	0	0	0
		CHROMagar	>100	30~49	23	1	0	0	0
		CHROMagar	>100	30~49	23	1	0	0	0
	48 h	Candida II	>100	50~100	20	1	1	0	0
		XM	>100	50~100	22	3	0	0	0
		Vi	>100	30~49	22	3	1	0	0
		カラーCa	>100	30~49	8	1	0	0	0
		CHROMagar	>100	30~49	23	1	0	0	0
		CHROMagar	>100	30~49	23	1	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	24 h	Candida II	>100	50~100	26	4	0	0	0
		XM	>100	50~100	30~49	5	0	0	0
		Vi	>100	30~49	10	3	0	0	0
		カラーCa	>100	30~49	25	4	1	0	0
		CHROMagar	>100	50~100	24	3	0	0	0
		CHROMagar	>100	50~100	24	3	0	0	0
	48 h	Candida II	>100	50~100	26	4	0	0	0
		XM	>100	50~100	30~49	5	0	0	0
		Vi	>100	30~49	12	4	0	0	0
		カラーCa	>100	30~49	28	4	1	0	0
		CHROMagar	>100	50~100	24	3	0	0	0
		CHROMagar	>100	50~100	24	3	0	0	0

(CFU/20 μ L)

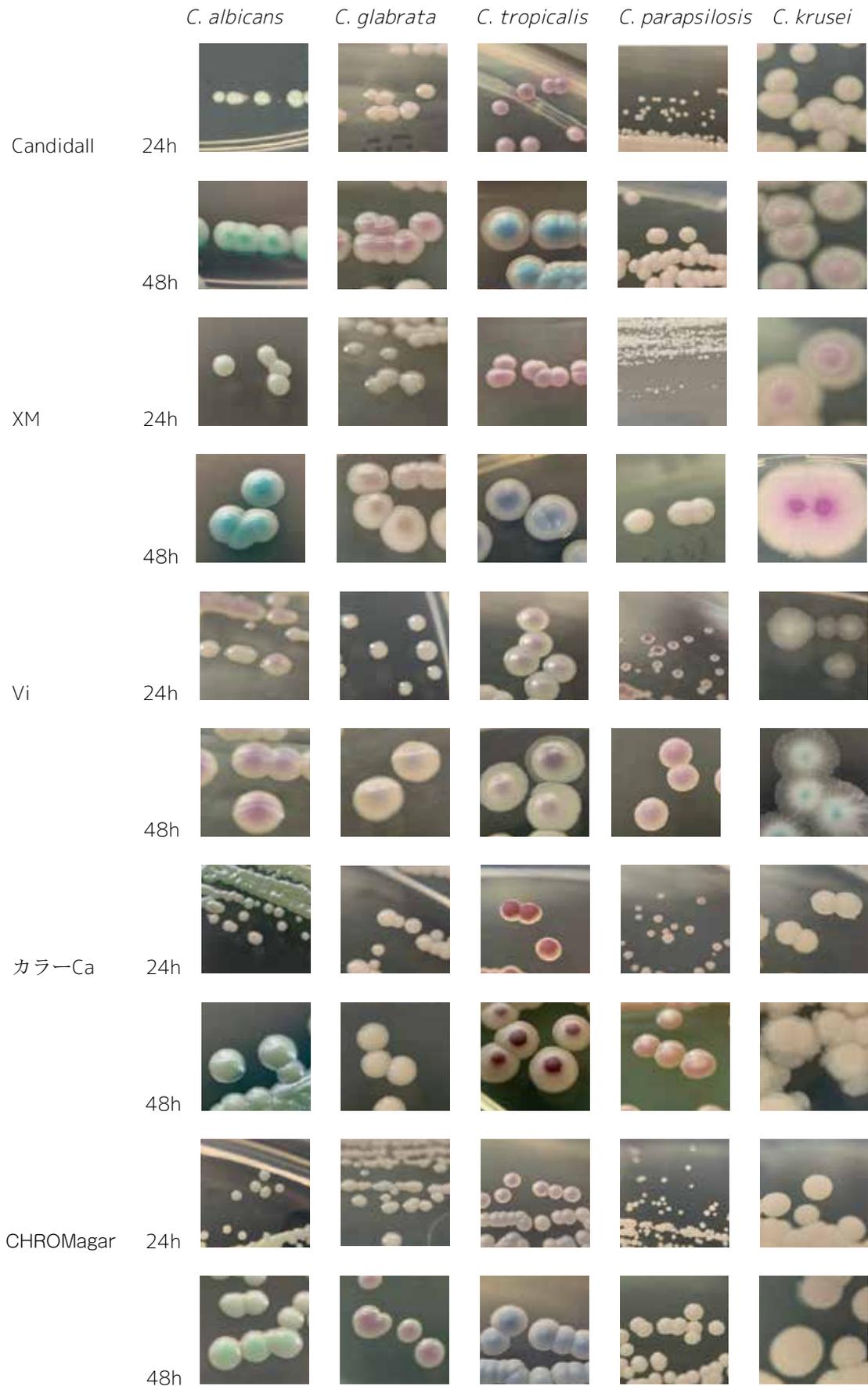


図1 各培地における主要5菌種の発育コロニー

菌種も24時間培養と48時間培養ともに 10^{-4} まで発育を認めた。コロニーの大きさにおいて菌種間差は認められたが、培地間差は認められず、発育支持能に大きな差は認められなかった。

2. 色調および形態による鑑別性能

各培地の発育コロニーを図1に示す。*C. albicans*, *C. tropicalis*および*C. krusei*では、24時間培養において、すべての培地でコロニーの特徴的な色調や形態が認められた。XMとVi, カラーCa (*C. tropicalis*のみ)では特に強い発色を呈していた。*C. glabrata*では、24時間培養において、いずれの培地も発色の程度は弱かったが、48時間培養では特徴的な色調や形態が認められた。*C. parapsilosis*においては、24時間培養ではいずれの培地も1mm以下の微小コロニーの発育であり、特にVi以外の培地では24時間培養と48時間培養ともに薄い色調であった。Viは検討した5菌種について、他の培地とは全く異なる色調であり、さらに色調の程度は明瞭であった。Candida II, カラーCa, CHROMagarは48時間培養では色調の差が明瞭であった。

各メーカーの配布資料は、実際に発育したコロニーの特徴が異なる菌種や培地を認めたため、見本

培地を作成して鑑別を行い、その同定一致率と、資料により鑑別した同定一致率を比較し、その結果を図2に示した。同定一致率は多くの培地において、資料参照により鑑別を行った結果より、見本培地を参照に鑑別を行った方が上昇した。特に、24時間培養での*C. glabrata*のすべての培地、*C. albicans*のカラーCaとCHROMagar, *C. tropicalis*のCandida II, ViおよびXMで30%以上の上昇を認めた。

配布資料と比較して見本培地の同定一致率の成績が優れていたため、見本培地を用いて鑑別を行った同定一致率を、培地と菌種および技師ごとにまとめて表2に示した。*C. krusei*の同定一致率は、すべての培地、技師において、24時間培養、48時間培養ともに100%であった。*C. albicans*においては24時間培養で80%以上、48時間培養では90%以上、*C. tropicalis*においては24時間培養で75%以上、48時間培養では85%以上であり、この3菌種については高い同定一致率を認めた。*C. glabrata*は24時間培養で5.3%~94.7%、48時間培養で26.3%~100%となり、培地間差、技師間差を認めた。*C. parapsilosis*においても24時間培養で0%~66.7%、48時間培養で0%~83.3%と培地間差、技師間差を認めた。

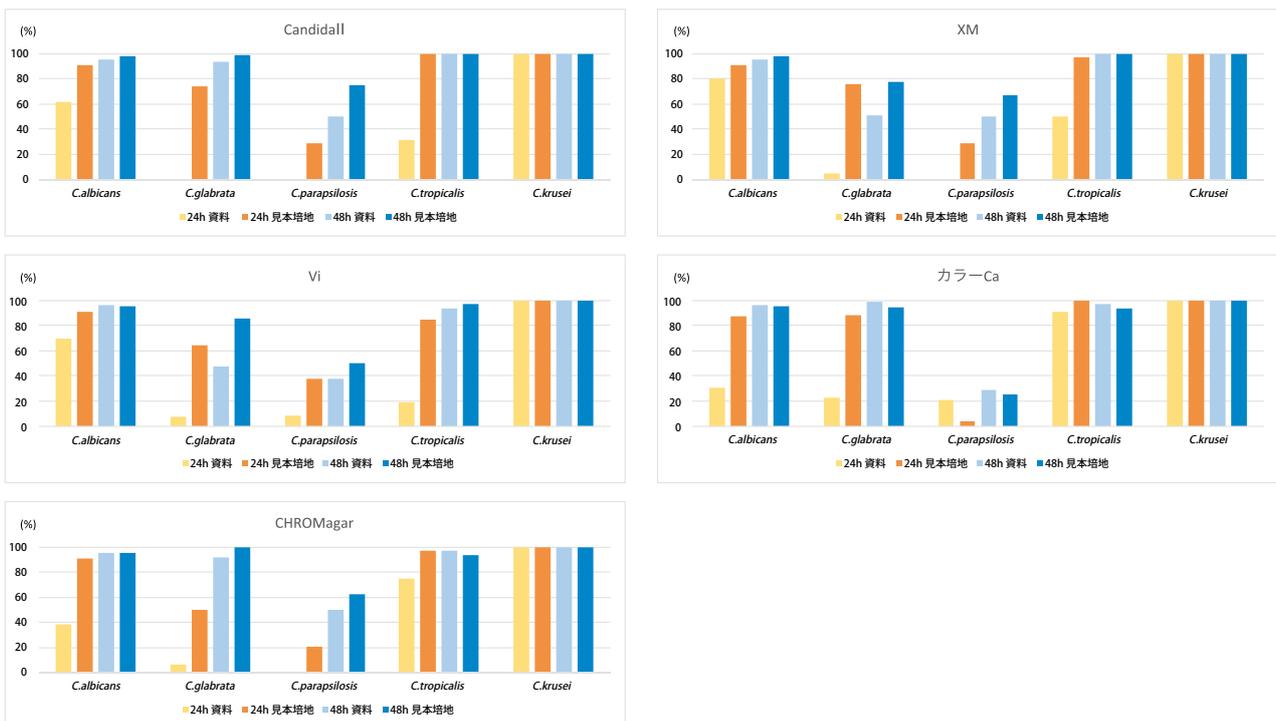


図2 資料と見本培地を用いた同定一致率の比較

表2 臨床分離株（5菌種）を用いた鑑別性能を指標とした同定一致率（%）

菌種	技師	培地									
		Candida II		XM		Vi		カラー Ca		CHROMagar	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>C. albicans</i> (n=22)	A	90.9	95.5	90.9	100	90.9	95.5	81.8	95.5	90.9	95.5
	B	90.9	95.5	90.9	95.5	90.9	95.5	86.4	95.5	90.9	95.5
	C	90.9	100	90.9	100	90.9	95.5	90.9	95.5	90.9	95.5
	D	90.9	100	90.9	95.5	90.9	95.5	90.9	95.5	90.9	95.5
<i>C. glabrata</i> (n=19)	A	63.2	100	47.4	94.7	68.4	78.9	84.2	94.7	5.3	100
	B	89.5	100	84.2	100	57.9	94.7	84.2	94.7	63.2	100
	C	57.9	94.7	94.7	26.3	57.9	73.7	89.5	94.7	68.4	100
	D	84.2	100	78.9	89.5	73.7	94.7	94.7	94.7	63.2	100
<i>C. tropicalis</i> (n=8)	A	100	100	100	100	87.5	100	100	100	100	100
	B	100	100	100	100	75.0	100	100	100	100	100
	C	100	100	87.5	100	87.5	100	100	87.5	100	87.5
	D	100	100	100	100	87.5	87.5	100	87.5	87.5	87.5
<i>C. parapsilosis</i> (n=6)	A	0	83.3	33.3	66.7	33.3	33.3	0	16.7	33.3	83.3
	B	0	83.3	16.7	66.7	16.7	50.0	0	66.7	0	50.0
	C	50.0	50.0	16.7	50.0	50.0	33.3	0	0	16.7	33.3
	D	66.7	83.3	50.0	83.3	50.0	83.3	16.7	16.7	33.3	83.3
<i>C. krusei</i> (n=3)	A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	B	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	C	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	D	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

主要5菌種以外の菌種では、*C. guilliermondii*は技師4名ともに主要5菌種とは異なると判断できたが、菌種同定は困難であった。*C. dubliniensis*は*C. albicans*と、*C. metapsilosis*は*C. parapsilosis*と酷似しており鑑別は困難であった。

IV 考察

今回我々は5種類のカンジダ選択分離培地の簡易同定に関する比較検討を行った。

Miles&Misra法による発育支持能試験ではいずれの培地においても大きな差は認められず、検出能は同等であると考えられる。

コロニーの色調および形態による鑑別性能については、メーカー配布資料と実際に発育したコロニーにおいて一部の培地および菌種で若干の色調および形態に差異を認めた。そのため、資料と見本培地を用いた同定一致率を比較すると、見本培地の方が多くの培地および菌種において同定一致率の上昇が認められた。従って、選択分離培地を導入する際にはメーカー配布資料だけでなく、見本培地を作成し、色調や形態を観察することが必要であると考えられる。

また、見本培地を参照に鑑別を行った結果は、*C. albicans*、*C. tropicalis*および*C. krusei*ではすべて

の培地において24時間培養で特徴的なコロニーの色調および形態が認められた。特にXM、ViおよびカラーCa (*C. tropicalis*のみ)では発色を強く認めたが、同定一致率において培地間差は見られず、すべての培地で良好な結果が得られた。よってこの3菌種についてはすべての培地において迅速簡易同定が可能であると考えられる。*C. glabrata*と*C. parapsilosis*におけるコロニーは24時間培養ではほとんどの培地において発色が弱い。さらに、*C. parapsilosis*のコロニーの大きさは、いずれの培地においても微小であった。しかし、カラーCaのみ*C. glabrata*の24時間培養の同定一致率が80%以上であった。これは、コロニーの色調（または発色）から判断したのではなく、コロニーの大きさによって判断したためであると思われる。この2菌種について、コロニーの大きさのみで鑑別を行うことは誤同定の要因にもなることが予想され、安易に簡易同定を行うことは避ける方が望ましいと考える。従って、*C. glabrata*と*C. parapsilosis*においてはいずれの培地においても24時間培養での簡易同定は困難であると考えられる。*C. glabrata*の48時間培養では、XM以外では特徴的な色調や形態を認め、高い同定一致率が得られた。XMについて、技師Cの24時間培養では94.7%鑑別できていたにも関わらず、48時間培養では26.3%

と大幅に低下した。これは48時間培養では*C.glabrata*と*C.parapsilosis*のコロニーの大きさに差が生じなかったために鑑別が困難であったと考えられる。しかし、XMにおける*C.glabrata*の48時間培養での色調は中心部が淡い灰色であること、他の技師は80%以上の同定一致率であったことを考えると、培地の特徴を把握することにより鑑別可能であると考えられる。従って、48時間培養においてはすべての培地において*C.glabrata*における簡易同定は可能であると考えられる。*C.parapsilosis*は48時間培養でも0%~83.3%と同定一致率に技師間差、培地間差を生じた。*C.parapsilosis*は菌株によりコロニーの色調や形態が異なる。主な菌株ではコロニーはS型を呈するが、R型のコロニーも存在する。今回準備した菌株は、S型は4株、R型は2株であり、見本培地はS型のコロニーのみであった。48時間培養では、S型のコロニーではいずれの培地においても色調や形態により鑑別が可能であったが、R型のコロニーの菌株では鑑別困難となり、同定一致率の低下につながったと考えられる。R型のコロニーも、視認性の改善を図ることにより同定一致率の向上が認められ、簡易同定が可能になると考えられる。

その他主要5菌種以外の菌種について、*C.dubliniensis*はどの培地も*C.albicans*と酷似しており、選択分離培地での鑑別は困難である。*C.dubliniensis*は*C.albicans*と形態学的特徴が類似しており、42℃での発育性、キシロースと α -メチル-D-グルコシドの利用能が異なる点で識別可能である。しかし、選択分離培地上ではこれらの性状を確認することができないため、迅速にこの2菌種を識別することは困難である。*C.dubliniensis*は*C.albicans*の第一選択薬であるFLCZに対して高い感受性を示し、臨床的観点からはこの2菌種を迅速に識別する必要性は低いと考えられる。*C.guilliermondii*はすべての培地で主要5菌種とは異なると判断できたが、菌種推定には至らなかった。添付文書では、唯一鑑別可能な培地はXMのみであり、臨床材料からの検出の経験を積むことで鑑別の向上が期待できると思われる。*C.metapsilosis*は

*C.parapsilosis*と酷似しており、すべての培地で*C.parapsilosis*と鑑別されていた。*C.parapsilosis*は、以前はグループI、II、IIIに分けられていたが、2005年にグループIを*C.parapsilosis*、グループIIを*C.orthopsilosis*、グループIIIを*C.metapsilosis*と分類された⁴⁾。もとは複合群であったこと、*C.metapsilosis*の病原性が低いこと、さらに抗真菌薬に対して高い感受性を示すことから、この3菌種の識別までは行う必要がないと考えられる。主要5菌種以外の稀な菌種や発育が典型的でないものに関しては、従来同様に形態学的特徴の観察や同定キット、MALDI-TOF MS等を用いることが必要であると考えられる。

カンジダ感染症の原因菌として*C.albicans*が多くを占め、その他にnon-*albicans Candida* 4菌種(*C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.krusei*)の検出頻度が高い。治療薬は菌種ごとで異なり、*C.albicans*に対してはAMPH-BとFLCZが標準治療薬となる。一方、non-*albicans Candida*ではFLCZなどのアゾール系抗真菌薬に耐性、もしくは低感受性の菌種が多いため、臨床的有効性が高いと言われているmicafunginが第一選択薬となる⁵⁾。従って、早期に治療薬を選択する上で迅速な菌種同定が重要となる。すべての培地で*C.albicans*の24時間培養における同定一致率の結果に大きな差は認めず、*C.albicans*とnon-*albicans Candida*との識別だけに限定すると迅速簡易同定は可能であると考えられる。また、薬剤感受性検査においてサブロー寒天培地に純培養した場合とMIC値に差を認めないと報告されている選択分離培地もあり⁶⁾、運用の方法によっては時間とコストの削減に貢献できると考えられる。

V 結語

5種類のカンジダ選択分離培地の簡易同定に関する比較検討を行った。発育支持能については各培地に大きな差は認められず、同等であると考えられる。また、24時間培養、48時間培養における鑑別性能に関しても同定一致率に大きな差は認められなかつ

た。臨床上重要となる*C.albicans*と*non-albicans Candida*との鑑別に関しては、すべての培地において24時間培養の同定一致率は良好な結果が得られ、迅速簡易同定が可能であることが示唆された。

それぞれの培地には、発育したコロニーの色調、発色に要する時間、形態など異なる特徴があり、各施設の運用方法に適した培地を選択する必要があると考える。

■文献

- 1) 山口英世：「日和見感染型深在性真菌症」, 病原真菌と真菌症改訂4版, 158-169, 株式会社南山堂, 東京, 2007.
- 2) Clinical and Laboratory Standards Institute “Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Fourth informational supplement M27-S4”. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.
- 3) 坂崎利一, 吉崎悦郎, 三木寛二：「培地の評価法」, 新細菌培地講座培地上第二版, 182-192, 近代出版, 東京, 1986.
- 4) 山口英世：「病原カンジダ菌種の多様化とその医真菌学的インパクト」, モダンメディア, 2012; 58: 261-277.
- 5) 深在性真菌症のガイドライン作成委員会：「深在性真菌症の疫学, 診断法および治療戦略」, 深在性真菌症の診断・治療ガイドライン 2014, 101-114, 深在性真菌症のガイドライン作成委員会 (編), 協和企画, 東京, 2014.
- 6) 杉山知代, 他：「*Candida*属分離・鑑別用培地としてのバイタルメディアカラー*Candida*寒天培地の有用性」, 医学検査, 2010; 59: 1050-1056.