

## 【原著・基礎】

キャンディン系抗真菌薬 micafungin の *in vitro* 抗真菌活性

池田 文昭<sup>1)</sup>, 大友 寿美<sup>1)</sup>, 中井 徹<sup>1)</sup>, 森下 佳彦<sup>1)</sup>, 牧 克之<sup>1)</sup>  
俵 修一<sup>1)</sup>, 武藤誠太郎<sup>1)</sup>, 松本 文夫<sup>2)</sup>, 桑原 章吾<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>藤沢薬品工業株式会社薬理研究所\*

<sup>2)</sup>神奈川県衛生看護専門学校付属病院

<sup>3)</sup>東邦大学医学部微生物学教室

キャンディン系抗真菌薬 micafungin (MCFG) は、深在性真菌症の主要起因菌である *Candida* 属および *Aspergillus* 属などに対して幅広い抗真菌スペクトルを示した。*Candida albicans* (fluconazole 耐性株を含む), *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* および *Aspergillus* 属菌種の臨床分離株に対して、90% 以上の株の発育を阻止する MCFG の最小薬剤濃度 (MIC<sub>90</sub>) は 0.125 μg/mL 以下であり、同効類薬 (amphotericin B, fluconazole および itraconazole) より低値を示した。MCFG の *Candida parapsilosis* および *Candida guilliermondii* に対する MIC<sub>90</sub> はそれぞれ 4 および 2 μg/mL で、同効類薬と同等ないしはやや高値を示した。*Candida* 属の大部分の菌株に対して MCFG は殺菌的に作用したが、*Aspergillus fumigatus* に対しては殺菌作用は認められなかった。MCFG は黒色真菌類にも活性を示したが、*Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* 属, *Fusarium solani*, *Pseudallescheria boydii* および接合菌類に対しては活性を示さなかった。また、二形性真菌類の菌糸形での発育に対して MCFG は活性を示したが、酵母形での発育に対しては活性を示さなかった。MCFG の *Candida* 属および *A. fumigatus* に対する MIC におよぼす培地 pH および接種菌量の影響は小さかったが、ヒト血清およびヒト血清アルブミンの添加により MIC の上昇がみられた。耐性獲得実験において MCFG に対する *C. albicans* の感受性の低下はみられず MCFG 耐性株の出現の可能性は低いことが示唆された。

**Key words:** micafungin, キャンディン系抗真菌薬, *in vitro* 抗真菌活性

全身抵抗性の減弱した Immunocompromised host における日和見感染は今日重要な問題となっているが、真菌による感染は時に重篤な深在性真菌症に進行し、その基礎疾患以上に生命を脅かす存在となる<sup>1-3)</sup>。Immunocompromised host における真菌感染症でもっとも一般的な原因菌は *Candida* 属, *Aspergillus* 属および *Cryptococcus* 属であるが、他にも多くの菌種が原因菌として報告されている<sup>4-7)</sup>。一方、現在、深在性真菌症に使用可能な抗真菌薬は amphotericin B (AMPH-B), azole 系薬剤および 5-fluorocytosine (5-FC) に限られている。AMPH-B は幅広い抗真菌スペクトルと優れた殺菌作用を有することから、いまなお、深在性真菌症の標準薬剤として用いられているが、毒性が強いことが大きな問題である<sup>8)</sup>。Azole 系抗真菌薬は、AMPH-B よりは毒性は弱いと考えられるが、重篤な深在性真菌症に対する効果は満足されていない。さらに、azole 系抗真菌薬に耐性の *Candida albicans* やその他の *Candida* 属菌種の増加が報告されている<sup>9)</sup>。このような現状から、幅広い抗真菌スペクトルを有し、殺菌的でおかつ安全な新規抗真菌薬が求められている。

その点で、多くの真菌の主要細胞壁構成成分であるグルカンは、真菌に特異的であることから魅力的な標的と考えられ

ている<sup>10)</sup>。さらに、グルカン生合成の阻害薬は、他の抗真菌薬に耐性の真菌に対しても活性を有している<sup>11)</sup>。グルカン生合成の阻害薬としては echinocandin 系誘導体 anidulafungin (LY 303366) や類似の構造を有する pneumocandin 系誘導体 caspofungin (MK-0991) などのキャンディン系抗真菌薬が開発され、臨床試験が実施されている<sup>12-14)</sup>。これらの化合物の MIC 測定法については標準化がなされていないが、各種酵母に対する MIC は、NCCLS により提案承認された既存の抗真菌薬についての標準法<sup>15)</sup>にもとづいて測定されており、この標準法は各種糸状菌に対する MIC 測定にも応用されている<sup>16-19)</sup>。Anidulafungin と caspofungin についてこのような標準的な方法で MIC を測定し、*Candida* 属および *Aspergillus* 属に対して優れた活性を示すことが報告されている<sup>14,16-19)</sup>。

Micafungin (MCFG) は *Coleophoma empetri* の培養液から単離された echinocandin 類似の構造を有する FR 901379 の半合成誘導体である<sup>20,21)</sup>。MCFG は他のキャンディン系抗真菌薬と同様に 1,3-β-D-glucan の生合成を阻害することが明らかにされている<sup>22)</sup>。本報では、MCFG の *in vitro* 抗真菌活性の特徴を明らかにするために、臨床的に重要な各

\*大阪府大阪市淀川区加島 2-1-6

種真菌類に対する *in vitro* 活性を他のキャンディン系抗真菌薬と同様に NCCLS の標準法で測定した成績を報告する。

## I. 材料と方法

### 1. 使用薬剤

Micafungin (MCFG) は、藤沢薬品工業株式会社で合成され、品質検定されたものを用いた。また、amphotericin B (AMPH-B; Fungizone® 静注用, プリストル・マイヤーズスクイブ株式会社), fluconazole (FLCZ; Diflucan® 静注液 0.2%, ファイザー製薬株式会社) および itraconazole (ITCZ; Itrizole® Cap.50, ヤンセン協和株式会社) を使用した。さらに、耐性獲得試験の比較薬剤として 5-fluorocytosine (5-FC; flucytosine, 和光純薬工業株式会社) を用いた。

### 2. 使用菌株

臨床分離株は日本国内で分離され藤沢薬品工業株式会社薬理研究所に収集保存された菌株を用いた。ただし、*C. albicans* の FLCZ 耐性株 4 株のうち 2 株は東京大学・島田教授から分与され、2 株はノースウェストメモリアル病院 (米国) より購入した。なお、ATCC 株は American Type Culture Collection より購入した。IFM 株および TIMM 株は、千葉大学・宮治教授および帝京大学・山口教授よりそれぞれ分与された。

### 3. 被験薬剤原液の調製

MCFG, AMPH-B および 5-FC は滅菌蒸留水に溶解した。FLCZ は 200 mg/100 mL の市販溶液を使用した。ITCZ は蒸留水に難溶のため、溶媒として dimethyl sulfoxide を使用し、抗真菌薬含有培地における最終濃度は 1% 以下にした。

### 4. 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法

MIC の測定には National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) の標準法 M 27-A に準拠した微量液体希釈法を用いた<sup>15)</sup>。

#### 1) MIC 測定用培地の調製

RPMI 1640 (グルタミン添加, 重炭酸ナトリウム無添加) に 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS, 終濃度 0.165 M) を加えて緩衝液とし、1 mol/L 水酸化ナトリウムを添加して pH 7.0 に調整したものを感受性測定用培地 (RPMI/MOPS) とした。なお、*Sporothrix schenckii* の酵母形培養には RPMI/MOPS に終濃度 1% になるようにグルコースを添加した。

#### 2) 感受性測定用マイクロプレートの作製

RPMI/MOPS を用いて被験薬剤原液を試験管で 2 倍段階希釈し、96 穴マイクロプレートの各ウエルに 100  $\mu$ L ずつ分注した。

#### 3) 菌液の調製

酵母は Sabouraud dextrose agar (SDA; 2% glucose, 1% Bacto peptone, 1.5% Bacto agar) で 35°C で発育状態を観察しながら約 24 時間好気培養した。接合菌類 (2 日間) を除く糸状菌は Potato dextrose agar (PDA)

で 30°C で 7~14 日間好気培養した。二形性真菌類は酵母状態で継代した菌体を 1% Dextrose 添加 Brain heart infusion agar (BHIA) スラントに植菌し、*S. schenckii* は 35°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養, それ以外の菌種は 37°C で 4~6 日間好気培養したものを用いた。*Penicillium marneffeii* および *S. schenckii* の菌糸形発育用には PDA スラントで 30°C, 7~10 日間好気培養して得た分生子を用いた。*Coccidioides immitis* は 1% Dextrose 添加 BHIA スラントに植菌後, 37°C で 15 日間好気培養して得た分節型分生子を用いた。菌体または分生子懸濁液の菌数を血球計算盤で計数し, 最終菌量の 2 倍濃度となるように調整したものを接種菌液とした。

#### 4) 菌液の接種

接種菌液は感受性測定用マイクロプレートの各ウエルに 100  $\mu$ L ずつ接種した。最終の菌量は 1.0~2.5 $\times$ 10<sup>8</sup> cells/mL とした。ただし、*C. immitis* を除く二形性真菌類については、一般に発育速度が遅く、その発育速度に応じて 5.0 $\times$ 10<sup>8</sup>~4.0 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/mL を接種した。

#### 5) 培養

*Candida* 属, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* 属, *Aspergillus* 属, *Pseudallescheria boydii*, 黒色真菌類および接合菌類は 35°C で好気培養した。*F. solani* は 30°C, 二形性真菌類の酵母形は 37°C, 菌糸形は 25°C (ただし、*C. immitis* は 37°C) で好気培養した。*Sporothrix schenckii* の酵母形は 35°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で振盪培養した。すべての菌種について発育対照において十分な発育が認められた時点で MIC を判定した。

#### 6) 終末点の判定

NCCLS M 27-A の基準にしたがってスコア化 (0~4) した。

#### 7) MIC の定義

酵母に対する MCFG および AMPH-B の MIC は、スコア 0 を示した最小薬剤濃度とし、ITCZ および FLCZ の MIC は、スコア 2 以下を示した最小薬剤濃度とした。糸状菌および二形性真菌類に対する MCFG, AMPH-B, FLCZ および ITCZ の MIC は、スコア 2 以下を示した最小薬剤濃度とした。

#### 8) 精度管理

精度管理株 (*Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258) またはレファレンス株 (*C. albicans* ATCC 90028) のうち少なくとも 1 株を用い、MIC 測定範囲が NCCLS M 27-A において設定されている範囲内にあることを確認した<sup>15)</sup>。

#### 5. MIC におよぼす培養条件の影響

*C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 および *Aspergillus fumigatus* TIMM 0063 について以下の条件で MIC を測定した。

Table 1. Antifungal spectrum of micafungin

Organism	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a)</sup>			
	MCFG	FLCZ	ITCZ	AMPH-B
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	0.0156	0.5	0.0313	0.5
<i>Candida albicans</i> FP 633	0.0313	0.25	0.0313	0.25
<i>Candida tropicalis</i> TIMM 0313	0.0313	4	0.125	0.5
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	0.0156	16	1	0.5
<i>Candida kefyr</i> ATCC 28838*	0.125	0.5	0.0625	0.5
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	0.125	32	0.25	1
<i>Candida guilliermondii</i> 13003	0.25	2	0.25	0.5
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	2	2	0.25	0.5
<i>Candida stellatoidea</i> IFM 5491	0.0313	0.125	0.0078	0.0625
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	0.125	2	0.25	0.5
<i>Cryptococcus neoformans</i> TIMM 0354*	>64	0.5	0.0313	0.25
<i>Trichosporon cutaneum</i> IFM 40140	>64	8	0.5	2
<i>Trichosporon asahii</i> TIMM 3144	>64	2	0.25	0.25
-----				
<i>Aspergillus fumigatus</i> TIMM 0063*	0.0078	>64	0.5	0.5
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275*	0.0078	>64	0.5	0.25
<i>Aspergillus nidulans</i> IFM 5369*	0.0078	32	0.0625	1
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9643*	0.0156	64	0.25	1
<i>Aspergillus terreus</i> IFM 40852*	0.0156	>64	0.125	1
<i>Aspergillus versicolor</i> IFM 41406*	0.0156	32	0.0625	0.5
<i>Fusarium solani</i> IFM 41532**	>64	>64	>8	0.25
<i>Pseudallescheria boydii</i> IFM 41585*	>64	16	0.5	1
-----				
<i>Cladosporium trichoides</i> IFM 4821**	0.5	4	0.0078	0.25
<i>Exophiala dermatitidis</i> IFM 4827**	2	4	0.0625	0.125
<i>Exophiala spinifera</i> ATCC 18218**	0.25	8	0.0313	0.125
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> ATCC 44356**	2	16	0.125	0.5
-----				
<i>Absidia corymbifera</i> IFM 40776	>64	>64	0.25	0.25
<i>Cunninghamella elegans</i> IFO 4447	>64	>64	0.5	0.5
<i>Rhizopus oryzae</i> IFM 46105	>64	>64	0.5	0.25
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> IFM 46417	>64	>64	0.5	0.125

<sup>a)</sup>Medium: RPMI 1640/165 mM MOPS (pH 7.0)

Inoculum:  $1.0$  to  $2.5 \times 10^3$  cells/mL

Culture:  $35^\circ\text{C}$  ( $^{\circ}30^\circ\text{C}$ ), 2 days ( $^{\circ}3$  days,  $^{\circ\circ}$  more than 4 days)

MCFG: micafungin, FLCZ: fluconazole, ITCZ: itraconazole, AMPH-B: amphotericin B

### 1) 接種菌量の影響

前述の感受性測定用マイクロプレートに菌液を最終濃度で  $1.0 \times 10^2$ ,  $1.0 \times 10^3$ ,  $1.0 \times 10^4$  および  $1.0 \times 10^5$  cells/mL になるように  $100 \mu\text{L}$  接種した。

### 2) 培地 pH の影響

RPMI 1640/MOPS に  $1 \text{ mol/L}$  水酸化ナトリウムまたは  $1 \text{ mol/L}$  塩酸を添加して pH 5, 6, 7 および 8 に調整したものを感受性測定培地として用いた。

### 3) ヒト血清添加の影響

健常成人男子から採取した血清をろ過滅菌し、 $56^\circ\text{C}$  で 30 分間加熱処理して実験用の血清とした。最終血清濃度が 10, 30 および 90% となるように RPMI/MOPS で調製したものを感受性測定培地として用いた。

### 4) ヒト血清アルブミン添加の影響

ヒト血清アルブミン (HSA) を RPMI/MOPS で最終濃度 0.4 および 4.0% に調製後濾過滅菌したものを感受性測定培地として用いた。

### 6. 最小殺菌濃度 (MFC) 測定法

MIC 判定後の菌液  $100 \mu\text{L}$  を SDA に接種し、 $35^\circ\text{C}$  で 72 時間以上好気培養後、発育したコロニー数が 1 個以下であった (接種菌量の 99% 以上を殺菌) 最小薬剤濃度を MFC とした。MFC は *Candida* 属および *A. fumigatus* についてのみ検討した。

### 7. 増殖曲線におよぼす作用

RPMI/MOPS を用いて試験管で MCFG および AMPH-B の 2 倍段階希釈系列を作製し、各希釈液を試験管に  $2 \text{ mL}$  ずつ分注した。*C. albicans* FP 633, *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 および *C. tropicalis* TIMM 0313 を SDA で  $35^\circ\text{C}$ , 24 時間好気培養した菌体を RPMI/MOPS で  $5.0 \times 10^4 \sim 2.0 \times 10^5$  cells/mL になるように調製し、 $35^\circ\text{C}$ , 好気条件で 1 時間静置培養した。これらを  $2 \text{ mL}$  の薬剤希釈液あるいは RPMI/MOPS (control) と混和し、 $35^\circ\text{C}$ , 好気条件で

Table 2. MICs of micafungin against clinical isolates of yeasts

Organism (no. of isolates)	Compound	MIC range <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>50</sub> <sup>b)</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>90</sub> <sup>b)</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>C. albicans</i> (55)	MCFG	0.0078 – 0.0625	0.0156	0.0313
	FLCZ	0.0625 – 4	0.25	0.5
	ITCZ	0.0078 – 0.125	0.0313	0.0625
	AMPH-B	0.00625 – 1	0.5	0.5
<i>C. albicans</i> (FLCZ resistant) (4)	MCFG	0.0156 – 0.0313	0.0156	0.0313
	FLCZ	16 – >64	64	>64
	ITCZ	1 – >8	>8	>8
	AMPH-B	0.25 – 0.5	0.5	0.5
<i>C. tropicalis</i> ** (42)	MCFG	0.0156 – 0.0625	0.0313	0.0625
	FLCZ	0.0625 – >64	0.25	2
	ITCZ	0.0078 – 2	0.0625	0.5
	AMPH-B	0.125 – 1	0.5	0.5
<i>C. glabrata</i> (36)	MCFG	0.0156 – 0.0625	0.0156	0.0313
	FLCZ	1 – >64	4	32
	ITCZ	0.125 – >8	0.5	1
	AMPH-B	0.125 – 1	0.5	1
<i>C. krusei</i> (11)	MCFG	0.125	0.125	0.125
	FLCZ	1 – 64	32	32
	ITCZ	0.125 – 1	0.5	1
	AMPH-B	1	1	1
<i>C. parapsilosis</i> (28)	MCFG	0.5 – 4	1	4
	FLCZ	0.125 – 4	0.5	1
	ITCZ	0.0313 – 0.5	0.125	0.5
	AMPH-B	0.125 – 1	0.5	1
<i>C. guilliermondii</i> (29)	MCFG	0.25 – 8	1	2
	FLCZ	1 – 16	4	8
	ITCZ	0.125 – 1	0.5	1
	AMPH-B	0.125 – 1	0.5	0.5
<i>C. neoformans</i> * (20)	MCFG	>64	>64	>64
	FLCZ	0.5 – 8	4	4
	ITCZ	0.0313 – 0.5	0.25	0.5
	AMPH-B	0.25 – 0.5	0.5	0.5
<i>T. cutaneum</i> (22)	MCFG	>64	>64	>64
	FLCZ	0.125 – 4	1	2
	ITCZ	0.125 – 0.5	0.5	0.5
	AMPH-B	0.5 – 8	2	4

<sup>a)</sup>Medium: RPMI 1640/165 mM MOPS (pH 7.0)

Inoculum:  $1.0$  to  $2.5 \times 10^3$  cells/mL

Culture:  $35^\circ\text{C}$ , 2 days (\*3 days, \*\*1 to 2 days)

<sup>b)</sup>MIC<sub>50</sub> or MIC<sub>90</sub>: The MICs at which 50 or 90% of isolates are inhibited, respectively

MCFG: micafungin, FLCZ: fluconazole, ITCZ: itraconazole, AMPH-B: amphotericin B

24時間静置培養した。薬剤を作用させてから3, 6, 9 および24時間後に菌液の一部を採取して生菌数を測定した。

#### 8. 試験管内耐性獲得試験

RPMI/MOPSを用いて試験管で各薬剤の2倍段階希釈系列を作製した。*C. albicans* ATCC 90028をSDAで $35^\circ\text{C}$ , 20時間好気培養した後, RPMI/MOPSで $1.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$  cells/mLになるように調製し, その1 mLと薬剤希釈液1 mLを試験管内で混和し, 好気条件で約48時間静置培養した。肉眼的に観察して発育対照

の菌液と比較して明らかに増殖を抑制した最小薬剤濃度をMICと判定し, その1/2濃度の菌液をRPMI/MOPSに10%接種した。 $35^\circ\text{C}$ , 好気条件で5~6時間静置培養し,  $2.0 \times 10^5$  cells/mLになるようにRPMI/MOPSで希釈した。薬剤希釈液1 mLを分注した試験管にその1 mLを接種し,  $35^\circ\text{C}$ , 好気条件で48~72時間静置培養した。以降, 同様の操作を15回繰り返した。

## II. 結 果

### 1. 抗真菌スペクトル

MCFGおよび同効類薬 (FLCZ, ITCZおよびAMPH

Table 3. MICs of micafungin against clinical isolates of *Aspergillus* species

Organism (no. of isolates)	Compound	MIC range <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	MIC <sub>50</sub> <sup>b)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	MIC <sub>90</sub> <sup>b)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
<i>A. fumigatus</i> (39)	MCFG	0.0078 - 0.0313	0.0156	0.0313
	FLCZ	8 - >64	64	>64
	ITCZ	0.0625 - 1	0.5	1
	AMPH-B	0.25 - 2	1	2
<i>A. niger</i> (11)	MCFG	0.0078 - 0.0625	0.0156	0.0313
	FLCZ	64 - >64	>64	>64
	ITCZ	0.5 - 1	1	1
	AMPH-B	0.5 - 2	1	1
<i>A. flavus</i> (11)	MCFG	0.0078 - 0.0625	0.0156	0.0313
	FLCZ	2 - >64	64	>64
	ITCZ	0.0625 - 0.5	0.25	0.5
	AMPH-B	0.25 - 2	2	2
<i>A. terreus</i> (6)	MCFG	0.0039 - 0.0156	0.0078	0.0156
	FLCZ	4 - >64	16	>64
	ITCZ	0.0625 - 0.25	0.125	0.25
	AMPH-B	0.25 - 2	0.5	2

<sup>a)</sup>Medium: RPMI 1640/165 mM MOPS (pH 7.0)

Inoculum:  $1.0 \times 10^8$  cells/mL

Culture: 35°C, 3 days

<sup>b)</sup>MIC<sub>50</sub> or MIC<sub>90</sub>: The MICs at which 50 or 90% of isolates are inhibited, respectively

MCFG: micafungin, FLCZ: fluconazole, ITCZ: itraconazole, AMPH-B: amphotericin B

-B) の各種酵母および糸状菌に対する抗真菌スペクトルを Table 1 に示した。MCFG は, *Candida* 属, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus* 属および黒色真菌類の菌種に対して活性を示したが, *C. neoformans*, *Trichosporon* 属, *F. solani*, *P. boydii* および接合菌類の菌種には活性を示さなかった。

## 2. 臨床分離株に対する MIC

### 1) 酵母

*Candida* 属, *C. neoformans* および *Trichosporon cutaneum* に対する MIC を Table 2 に示した。*C. albicans* (FLCZ 耐性株を含む), *C. tropicalis*, *C. glabrata* および *C. krusei* に対する 90% 以上の株の発育を阻止する MCFG の最小薬剤濃度 (MIC<sub>90</sub>) は 0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下で同効類薬より低値を示した。*C. parapsilosis* および *C. guilliermondii* に対する MCFG の MIC<sub>90</sub> はそれぞれ 4 および 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で, 同効類薬と同等ないしはやや高値を示した。一方, *C. neoformans* および *T. cutaneum* に対する MCFG の MIC は >64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。

### 2) *Aspergillus* 属

*Aspergillus* 属に対する MIC を Table 3 に示した。*Aspergillus* 属 4 菌種に対する MCFG の MIC<sub>90</sub> は 0.0313  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下で, 同効類薬より低値であった。

### 3) 黒色真菌類

黒色真菌類 (一部標準株を含む) に対する MIC を Table 4 に示した。*Exophiala spinifera*, *Fonsecaea pedrosoi* および *Cladosporium trichoides* に対する

Table 4. MICs of micafungin against dematiaceous fungi

Organism (no. of isolates)	Compound	MIC range <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
<i>E. dermatitidis</i> (6)	MCFG	1 - >64
	FLCZ	2 - 16
	ITCZ	0.0313 - 0.125
	AMPH-B	0.125 - 0.5
<i>E. spinifera</i> (6)	MCFG	0.125 - 2
	FLCZ	4 - 16
	ITCZ	0.0313 - 0.125
	AMPH-B	0.125 - 0.5
<i>F. pedrosoi</i> (6)	MCFG	0.5 - 8
	FLCZ	2 - 16
	ITCZ	0.0156 - 0.125
	AMPH-B	0.25 - 0.5
<i>C. trichoides</i> * (5)	MCFG	0.125 - 0.5
	FLCZ	4 - 8
	ITCZ	0.001 - 0.0625
	AMPH-B	0.125 - 0.25

<sup>a)</sup>Medium: RPMI 1640/165 mM MOPS (pH 7.0)

Inoculum:  $1.0 \times 10^8$  cells/mL

Culture: 35°C, 3 to 6 days (\*5 to 10 days)

MCFG: micafungin, FLCZ: fluconazole, ITCZ: itraconazole, AMPH-B: amphotericin B

MCFG の MIC は, 0.125~8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であり, FLCZ と同等ないしは低値であったが, ITCZ および AMPH-B よりは高値を示した。*Exophiala dermatitidis* の 6 株中 3 株に対する MCFG の MIC は 1~4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であったが, 残りの 3 株には活性を示さなかった (>64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

Table 5. MICs of micafungin against dimorphic fungi

Organism (no. of isolates: yeast-like form/mycelial form)	Compound	MIC range <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )					
		Yeast-like form			Mycelial form		
<i>H. capsulatum</i> (3/2)	MCFG	32	–	>64	0.0313	–	0.0625
	FLCZ	1	–	2	4	–	16
	ITCZ	0.0078	–	0.0156	0.0156	–	0.0313
	AMPH-B	0.25	–	0.5	0.0625	–	0.125
<i>B. dermatitidis</i> (4/4)	MCFG	32	–	>64	0.0078	–	0.0313
	FLCZ	1	–	4	16	–	32
	ITCZ	$\leq 0.0039$	–	0.0156	0.0078	–	0.0313
	AMPH-B	0.125			0.0156		
<i>P. brasiliensis</i> (6/6)	MCFG			>64	4	–	16
	FLCZ	0.125	–	0.5	0.25	–	1
	ITCZ	$\leq 0.0039$			$\leq 0.0039$	–	0.0078
	AMPH-B	0.125	–	0.25	0.0078	–	0.0625
<i>P. marneffei</i> (5/4)	MCFG	4	–	16	0.0313	–	2
	FLCZ	1	–	2	2	–	4
	ITCZ	0.0156	–	0.0313	0.0078	–	0.0625
	AMPH-B	0.25	–	0.5	0.125	–	0.25
<i>S. schenckii</i> (4/5)	MCFG	16	–	>64	0.5	–	1
	FLCZ	16	–	>64			>64
	ITCZ	1	–	2	0.5	–	1
	AMPH-B	0.5	–	1	1	–	2
<i>C. immitis</i> (–/4)	MCFG			— <sup>b)</sup>			0.0156
	FLCZ			— <sup>b)</sup>			4
	ITCZ			— <sup>b)</sup>	0.0625	–	0.125
	AMPH-B			— <sup>b)</sup>	0.0625	–	0.25

<sup>a)</sup>Medium: RPMI 1640/165 mM MOPS (pH 7.0)

Inoculum: Yeast-like form,  $2.0$  to  $5.0 \times 10^4$  (*P. marneffei*  $5.0 \times 10^5$ , *S. schenckii*  $1.0 \times 10^5$ ) cells/mL

Mycelial form,  $1.0$  to  $5.0 \times 10^4$  (*P. brasiliensis*  $4.0 \times 10^5$ , *C. immitis*  $1.0 \times 10^8$ ) cells/mL

Culture: Yeast-like form  $37^\circ\text{C}$ , 4 to 8 days, aerobic culture

(*S. schenckii*,  $35^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , with shaking)

Mycelial form,  $25^\circ\text{C}$  (*C. immitis*,  $37^\circ\text{C}$ ), 3 to 8 days, aerobic culture

<sup>b)</sup>—: Not tested

MCFG: micafungin, FLCZ: fluconazole, ITCZ: itraconazole, AMPH-B: amphotericin B

#### 4) 二形性真菌類

二形性真菌類 (一部標準株を含む) に対する MIC を Table 5 に示した。 *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *P. brasiliensis*, *P. marneffei* および *S. schenckii* の酵母形での発育に対して MCFG は弱い活性を示すか無効であったが, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *S. schenckii* および *C. immitis* の菌糸形での発育に対する MIC は  $0.0078 \sim 1 \mu\text{g}/\text{mL}$  で, ITCZ と同等かやや高値, AMPH-B と同等かやや低値であり, FLCZ よりも低値であった。 *P. marneffei* の菌糸形での発育に対する MCFG の MIC は  $0.0313 \sim 2 \mu\text{g}/\text{mL}$  であり, ITCZ および AMPH-B よりも高値であったが FLCZ よりも低値であった。 *P. brasiliensis* の菌糸形での発育に対する MCFG の MIC は  $4 \sim 16 \mu\text{g}/\text{mL}$  で, 同効類薬よりも高値であった。

#### 3. MIC におよぼす培養条件の影響

培地 pH, 接種菌量, ヒト血清およびヒト血清アルブ

ミン (HSA) の MCFG の MIC におよぼす影響を Table 6 に示した。 *Candida* 属および *A. fumigatus* に対する MCFG の MIC におよぼす接種菌量の影響は小さかったが, 培地 pH が 8 の条件においてやや高値を示す傾向が認められた。また, ヒト血清および HSA の添加は MIC を上昇させた。

#### 4. 殺菌作用

##### 1) 臨床分離株に対する MFC

*Candida* 属および *A. fumigatus* に対する MFC を Table 7 に示した。 *C. albicans*, FLCZ 耐性の *C. albicans*, *C. glabrata* および *C. krusei* に対する MCFG の  $\text{MFC}_{90}$  は, それぞれ  $0.25$ ,  $0.5$ ,  $0.0313$  および  $0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$  であり, AMPH-B よりも低濃度で殺菌作用がみられた。ただし, *C. tropicalis* および *C. guilliermondii* に対する MCFG の  $\text{MFC}_{90}$  は  $>64 \mu\text{g}/\text{mL}$  であり, 殺菌されない菌株も存在した。 *C. parapsilosis* に対する

Table 6. Influence of culture conditions on MIC

Culture condition		MIC <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			
		<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>A. fumigatus</i> * TIMM 0063
pH <sup>b)</sup>	5	0.0313	0.25	0.0313	0.0078
	6	0.0156	0.5	0.0625	0.0039
	7	0.0156	1	0.125	0.0078
	8	0.0156	1	0.125	0.125
Inoculum size <sup>c)</sup> (cells/mL)	$1 \times 10^2$	0.0156	1	0.125	0.0039
	$1 \times 10^3$	0.0156	1	0.125	0.0078
	$1 \times 10^4$	0.0156	2	0.0625	0.0078
	$1 \times 10^5$	0.0156	2	0.0625	0.0156
Addition of human serum <sup>d)</sup> (%)	0	0.0156	1	0.125	0.0078
	10	0.25	8	2	0.125
	30	1	32	4	0.5
	90	2	64	8	0.5
Addition of HSA <sup>d)</sup> (%)	0.4	0.125	16	0.5	0.0625
	4.0	2	64	8	0.5

<sup>a)</sup>Culture : 35°C, 2 days (\*3 days)

<sup>b)</sup>RPMI 1640/165 mM MOPS was adjusted to a pH of 5, 6, 7 and 8 with 1 mol/L HCl or 1 mol/L NaOH, Inoculum size was  $1.0 \times 10^3$  cells/mL

<sup>c)</sup>RPMI 1640/165 mM MOPS (pH 7.0) was used as a test medium

<sup>d)</sup>RPMI 1640/165 mM MOPS (pH 7.0) was used as a test medium, inoculum size was  $1.0 \times 10^3$  cells/mL

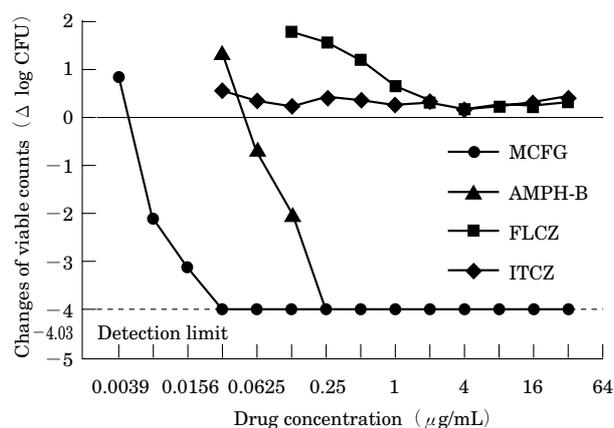
MCFG の  $\text{MFC}_{90}$  は  $8 \mu\text{g}/\text{mL}$  と AMPH-B よりも高値であった。*Candida* 属に対する FLCZ および ITCZ の  $\text{MFC}_{90}$  はそれぞれ  $>64 \mu\text{g}/\text{mL}$  および  $>8 \mu\text{g}/\text{mL}$  であった。*A. fumigatus* のすべての被験菌株に対する MCFG の  $\text{MFC}$  は  $>64 \mu\text{g}/\text{mL}$  であり、殺菌作用は認められなかった。

## 2) 24 時間作用時の濃度殺菌曲線

MCFG および同効類薬を *C. albicans* FP 633 に 24 時間作用させたときの生菌数変化と薬剤濃度との関係を Fig. 1 に示した。MCFG は  $0.0078 \mu\text{g}/\text{mL}$  から明らかな殺菌作用 (接種菌量から 99% 以上の菌数減少) を示し、AMPH-B よりも低濃度から殺菌的であった。一方、FLCZ および ITCZ はともに  $32 \mu\text{g}/\text{mL}$  まで作用させたが、殺菌作用は認められなかった。

## 3) 増殖曲線におよぼす作用

*C. albicans* 2 株, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* および *C. tropicalis* 各 1 株の増殖曲線におよぼす MCFG および AMPH-B の作用を Fig. 2 に示した。*C. albicans* 2 株, *C. glabrata* および *C. krusei* に対して MCFG は、MIC 以上の濃度で 24 時間後に接種菌量の 99% 以上を殺菌したが、*C. parapsilosis* および *C. tropicalis* に対しては明らかな殺菌作用を示さなかった。*Candida* 属に対する MCFG の殺菌作用は MIC 以上の濃度においてほぼ同程度であり、濃度依存的な殺菌作用を示す AMPH-B とは異なった。また、被験菌株に対して殺菌作用の認められる濃度域で MCFG と AMPH-B の作用を比較すると、3, 6 および 9 時間作用後の菌数



MCFG: micafungin, AMPH-B: amphotericin B, FLCZ: fluconazole  
ITCZ: itraconazole

Fig. 1. Fungicidal activity against *Candida albicans* FP 633 after 24 hours exposure.

$\Delta \log \text{CFU}$ : logarithm of CFU after 24 hours exposure - logarithm of CFU at time zero

減少効果は AMPH-B の方が優れていた。

## 5. 試験管内耐性獲得

*C. albicans* ATCC 90028 を MIC の 1/2 濃度の MCFG を含有する培地で 15 回継代したときの耐性化の有無を同効類薬と比較した成績を Fig. 3 に示した。*C. albicans* の MCFG に対する感受性は、15 回までの継代でほとんど変化しなかった。FLCZ および AMPH-B に対しても同様であったが、5-FC に対しては 3 回の継代により著しい耐性化が認められた。

Table 7. MFCs of micafungin for clinical isolates of *Candida* species and *Aspergillus fumigatus*

Organism (no. of isolates)	Compound	MFC range <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MFC <sub>50</sub> <sup>b)</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MFC <sub>90</sub> <sup>b)</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>C. albicans</i> (12)	MCFG	0.0156 - 4	0.0313	0.25
	FLCZ	>64	>64	>64
	ITCZ	>8	>8	>8
	AMPH-B	0.5 - 1	0.5	1
<i>C. albicans</i> (FLCZ resistant) (4)	MCFG	0.0156 - 0.5	0.0313	0.5
	FLCZ	>64	>64	>64
	ITCZ	>8	>8	>8
	AMPH-B	0.5 - 2	0.5	2
<i>C. tropicalis</i> (12)	MCFG	0.0313 - >64	0.0625	>64
	FLCZ	0.25 - >64	>64	>64
	ITCZ	0.0625 - >8	>8	>8
	AMPH-B	0.25 - 2	1	2
<i>C. glabrata</i> (15)	MCFG	0.0156 - 0.0313	0.0156	0.0313
	FLCZ	4 - >64	>64	>64
	ITCZ	0.5 - >8	>8	>8
	AMPH-B	1 - 2	1	2
<i>C. krusei</i> (10)	MCFG	0.125 - 0.25	0.125	0.25
	FLCZ	64 - >64	>64	>64
	ITCZ	1 - 8	1	8
	AMPH-B	1 - 2	1	2
<i>C. parapsilosis</i> (10)	MCFG	2 - 16	4	8
	FLCZ	16 - >64	>64	>64
	ITCZ	0.5 - >8	8	>8
	AMPH-B	1 - 4	2	2
<i>C. guilliermondii</i> (10)	MCFG	1 - >64	8	>64
	FLCZ	>64	>64	>64
	ITCZ	>8	>8	>8
	AMPH-B	0.5 - 2	1	1
<i>A. fumigatus</i> (18)	MCFG	>64	>64	>64
	FLCZ	64 - >64	>64	>64
	ITCZ	0.25 - 4	1	2
	AMPH-B	1 - 4	2	4

<sup>a)</sup>MFC: Minimum fungicidal concentration (more than 99% of the original inoculum was killed)

Medium: RPMI 1640/165 mM MOPS (pH 7.0)

Inoculum: 1.0 to  $2.5 \times 10^3$  cells/mL

<sup>b)</sup>MFC<sub>50</sub> or MFC<sub>90</sub>: The MFCs at which 50 or 90% of isolates are inhibited, respectively

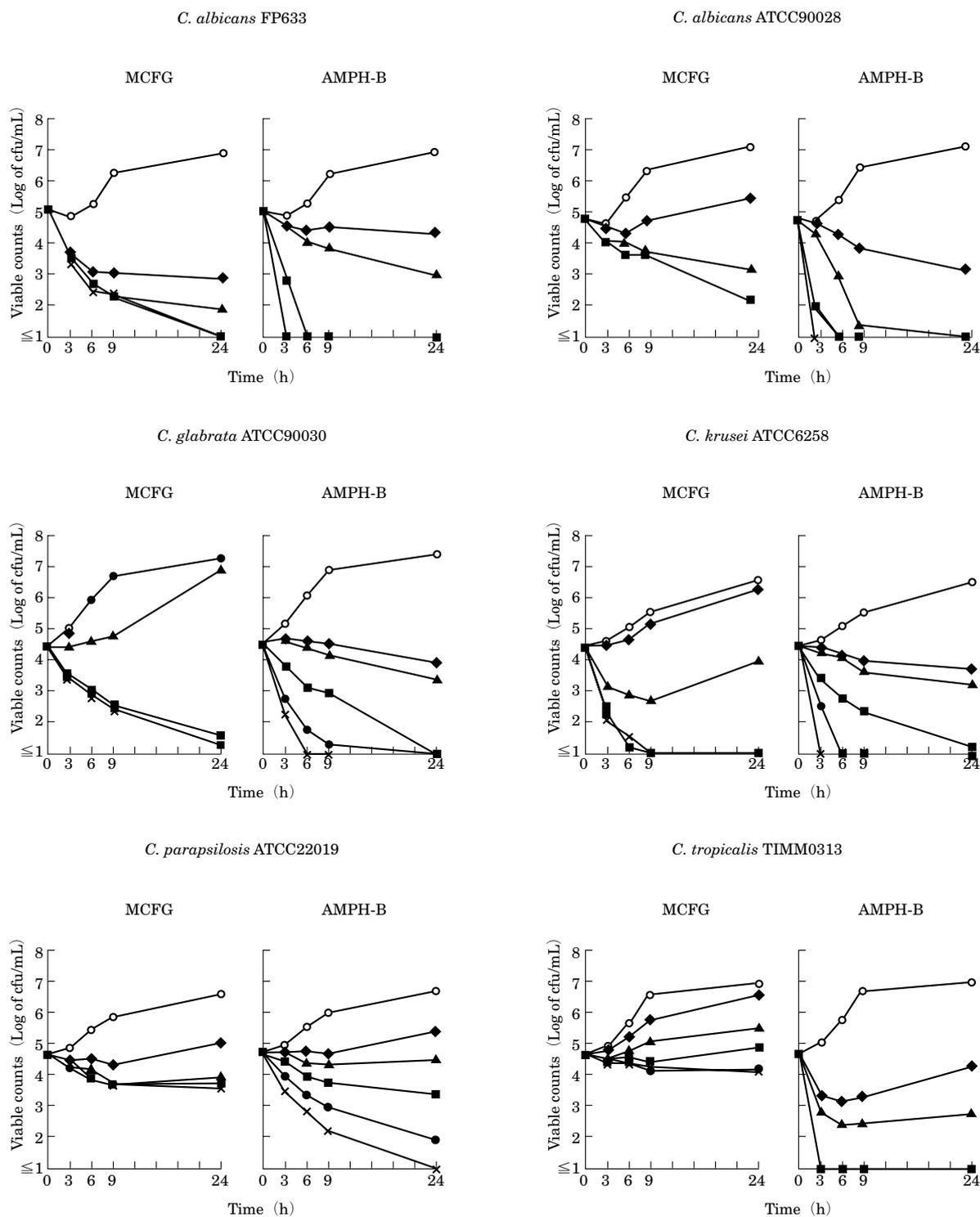
MCFG: micafungin, FLCZ: fluconazole, ITCZ: itraconazole, AMPH-B: amphotericin B

### III. 考 察

本研究では、MCFGの臨床的に重要な各種真菌に対する *in vitro* 活性を NCCLS の標準法 M 27-A<sup>15)</sup> に準拠した微量液体希釈法で測定した。MCFG は *Candida* 属菌種に対して増殖の完全阻止作用が認められたので、酵母に対する MIC は増殖を完全に阻止し肉眼的に透明になる最小薬剤濃度と定義した。MCFG の MIC と判定した終末点は M 27-A におけるスコア 0 であり、AMPH-B の MIC の終末点と同じである<sup>15)</sup>。MCFG は、*Candida* 属の菌種に対して強い *in vitro* 活性を示し、特に *C. albicans*、*C. tropicalis*、*C. glabrata* および *C. krusei* に対しては、比較した薬剤のなかでもっとも低い MIC<sub>90</sub> を示した。被験菌株のなかには FLCZ 耐性株も含まれ

ていたが、MCFG はこれらの菌株に対しても優れた活性を示し、交差耐性は認められなかった。また、*C. albicans* が 5-FC に対しては 3 回の継代により著しい耐性化が認められた条件において、MCFG に対しては 15 回までの継代でも感受性はほとんど変化せず、5-FC に比較して耐性化を起しにくいことが示唆された。MCFG の *C. parapsilosis* および *C. guilliermondii* に対する MIC は前述の菌種に比べると高く、ITCZ および AMPH-B よりも高値であった。*Candida* 属の菌種間で認められた MCFG に対する感受性の差異は、他のキャンディン系抗真菌薬に対しても認められているが、その原因は明らかにされていない<sup>14, 16, 19)</sup>。

MCFG は *C. albicans* FP 633 および ATCC 90028 に



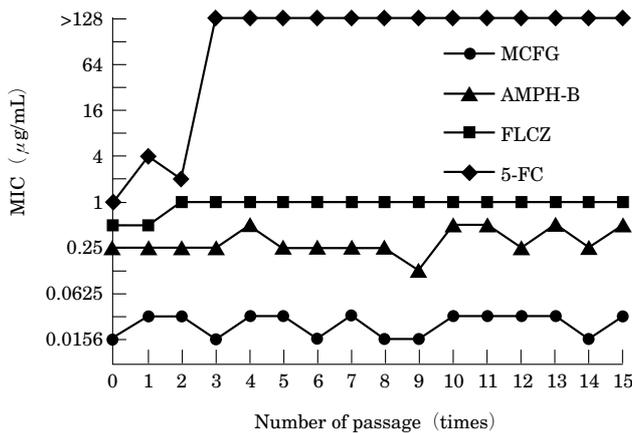
MCFG: micafungin, AMPH-B: amphotericin B

Fig. 2. Time-kill curve against *Candida albicans* FP 633, *C. albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *Candida tropicalis* TIMM 0313.

Concentrations: ○Control, ◆1/4 MIC, ▲1/2 MIC, ■1 MIC, ●2 MIC, ×4 MIC

対して AMPH-B よりも低濃度から殺菌作用を示し, *C. albicans* の臨床分離株に対する  $MFC_{90}$  の比較でも AMPH-B より低値であった。MCFG の *C. albicans* 以外の *Candida* 属の臨床分離株に対する MFC を測定し

た結果, 大部分の菌株に対して AMPH-B よりも低い濃度から殺菌作用を示すことが判明した。MCFG の *Candida* 属に対する殺菌作用は MIC 以上の濃度において認められたが, さらに高濃度を作用させても菌数減少



MCFG: micafungin, AMPH-B: amphotericin B, FLCZ: fluconazole  
ITCZ: itraconazole

Fig. 3. Change in the susceptibility of *Candida albicans* ATCC 90028 to micafungin (MCFG) after repeated exposure to sub-inhibitory concentrations of MCFG.

効果は同程度で、殺菌作用示す濃度域においても濃度依存性を示した AMPH-B とは異なり、最小殺菌濃度以上では濃度非依存的な殺菌作用を示す性質が認められた。また、被験菌株に対して殺菌作用の認められる濃度域で MCFG の作用を AMPH-B と比較すると、AMPH-B よりも短時間で殺菌力は劣り、本化合物の効果的な作用発現には、MIC 以上の濃度を持続的に作用させることが重要であると考えられた。

MCFG や他のキャンディン系抗真菌薬は、*A. fumigatus* に対して優れた *in vivo* 活性を示す<sup>12, 13, 23, 24</sup>。しかし、これらの化合物の *A. fumigatus* に対する MIC を微量液体希釈法で測定すると、菌糸の発育は低濃度から阻害されるものの高濃度域においても増殖の完全な阻止作用は認められなかった<sup>14, 25</sup>。それゆえに、MCFG の *Aspergillus* 属に対する MIC は *in vivo* 効果を反映すると思われる判定基準として発育対照と比較して明らかに濁度が減少している最小薬剤濃度と定義して測定した。MCFG の MIC と判定した終末点は M 27-A におけるスコア 2 であり<sup>15</sup>、この方法で測定した MCFG の *Aspergillus* 4 菌種の臨床分離株に対する MIC<sub>90</sub> は、AMPH-B よりも明らかに低値を示した。

次に、その他の臨床的に重要な酵母および糸状菌に対する MCFG の MIC を測定したところ、*C. neoformans*, *T. cutaneum*, *T. asahii*, *F. solani*, *P. boydii* および接合菌類には活性を示さなかった。一方、黒色真菌類には増殖抑制作用が認められたが、*Aspergillus* 属に対する作用と同様に MCFG の MIC 値を越えても増殖を完全に抑制することはできなかった。MCFG のこれらの真菌類に対する抗真菌スペクトルは、caspofungin および anidulafungin とほぼ同様であった<sup>14, 17-19</sup>。

MCFG の *H. capsulatum* および *B. dermatitidis* に対する活性はそれらの発育形態により大きな差異が存在

し、25°C で培養し菌糸形で発育させたものに対してはきわめて低濃度から活性を示したが、37°C で培養して酵母形で発育させたものに対しては無効であった。*C. immitis* は菌糸形に対してのみ MIC を測定したが、*H. capsulatum* および *B. dermatitidis* の菌糸形に対する MIC とほぼ同レベルであった。*P. brasiliensis* においては菌糸形に対する MIC が 4~16 μg/mL と比較的高値であったが、酵母形に対する MIC (>64 μg/mL) との間にはやはり差異は存在した。*P. marneffei* および *S. schenckii* に対しても発育形態による MIC の差異が認められたが、これら 2 菌種の菌糸形に対する MCFG の作用は *H. capsulatum* および *B. dermatitidis* に対する作用ほど強いものではなかった。

最近、1,3-β-D-glucan 合成酵素遺伝子である *FKS 1* が *C. neoformans* からも見出され、*FKS 1* が本菌種の生育に必須であることが証明された<sup>26</sup>。にもかかわらず、*C. neoformans* が 1,3-β-D-glucan 生合成の阻害薬に対して低感受性であることから、本菌の 1,3-β-D-glucan 合成酵素に対するこれらの薬剤の親和性についてさらなる研究が必要であると考えられている。一方、接合菌類は主に chitin および chitosan を細胞壁成分として有し、1,3-β-D-glucan を主要な成分としてもたないために、MCFG をはじめとする 1,3-β-D-glucan 生合成の阻害薬は接合菌類に活性を示さないものと考えられる<sup>27</sup>。*F. solani*, *P. boydii* および黒色真菌類に関しては、われわれの知る限り細胞壁成分について詳細に検討した報告はないが、二形性真菌類である *B. dermatitidis* や *P. brasiliensis* の菌糸形においては β-glucan、酵母形では α-glucan が多いということが知られており<sup>28-31</sup>、MCFG の活性が発育形態により大きく異なることのひとつの理由であると推察される。しかし、二形性真菌類は感染病巣で酵母形を呈するため<sup>32, 33</sup>、酵母形に対して無効である MCFG が *in vivo* で有効性を示す可能性は低いと考えられる。

MCFG の MIC はヒト血清を添加することにより明らかに上昇した。また、ヒト血清アルブミンを添加しても同程度の MIC の上昇が認められたので、MCFG の血清添加による MIC の上昇は本薬が血清アルブミンに高率に結合すること<sup>34</sup>が主因と考えられた。

以上のように、MCFG は、深在性真菌症の主要起因菌である *Candida* 属および *Aspergillus* 属などに幅広い抗真菌スペクトルを有し、優れた活性を示すことから、これらの菌種による深在性真菌症に対する臨床的な有用性が期待される。

#### 文 献

- 1) Anaissie E: Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review. *Clin Infect Dis* 14: S 43~S 53, 1992
- 2) Hadley S, Karchmer A W: Fungal infections in solid

- organ transplant recipients. *Infect Dis Clin N Am* 9: 1045~1074, 1995
- 3) Dixon D M, McNeil M M, Cohen M L, et al.: Fungal infections: a growing threat. *Public Health Re* 111: 226~235, 1996
  - 4) Morrison V A, Haake R J, Weisdorf D J: The spectrum of non-*Candida* fungal infections following bone marrow transplantation. *Medicine* 72: 78~89, 1993
  - 5) Padhye A A, Hampton A A, Hampton M T, et al.: Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *Clin Infect Dis* 22: 331~335, 1996
  - 6) Patterson T F, Andriole V T, Zervos M J, et al.: The epidemiology of pseudallescheriasis complicating transplantation: nosocomial and community-acquired infection. *Mycoses* 33: 297~302, 1990
  - 7) Singh N, Chang F Y, Gayowski T, et al.: Infections due to dematiaceous fungi in organ transplant recipients: case report and review. *Clin Infect Dis* 24: 369~374, 1997
  - 8) Thomas A H: Suggested mechanisms for the antimycotic activity of the polyene antibiotics and the *N*-substituted imidazoles. *J Antimicrob Chemother* 17: 269~279, 1986
  - 9) Hitchcock C A, Pye G W, Johnson E M, et al.: Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1962~1965, 1993
  - 10) Debono M, Gordee R S: Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu Rev Microbiol* 48: 471~497, 1994
  - 11) Vazquez J A, Lynch M, Sobel J D: *In vitro* activity of a new pneumocandin antifungal agent, L-733,560, against azole-susceptible and -resistant *Candida* and *Torulopsis* species. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2689~2691, 1995
  - 12) Verweij P E, Oakley K L, Morrissey J, et al.: Efficacy of LY 303366 against amphotericin B-susceptible and -resistant *Aspergillus fumigatus* in a murine model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 873~878, 1998
  - 13) Petraitis V, Petraitiene R, Groll A H, et al.: Antifungal efficacy, safety, and single-dose pharmacokinetics of LY 303366, a novel echinocandin B, in experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2898~2905, 1998
  - 14) Bartizal K, Gill C J, Abruzzo G K, et al.: *In vitro* preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob Agents Chemother* 41: 2326~2332, 1997
  - 15) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. NCCLS document M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 1997
  - 16) Krishnarao T V, Galgiani J N: Comparison of the *in vitro* activities of the echinocandin LY 303366, the pneumocandin MK-0991, and fluconazole against *Candida* Species and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1957~1960, 1997
  - 17) Ingroff A E: Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH 56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY 303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J Clin Microbiol* 36: 2950~2956, 1998
  - 18) Poeta M D, Schell W A, Perfect J R: *In vitro* antifungal activity of pneumocandin L-743,872 against a variety of clinically important molds. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1835~1836, 1997
  - 19) Zhanel G G, Karlowsky J A, Harding G A J, et al.: *In vitro* activity of a new semisynthetic echinocandin, LY-303366, against systemic isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Aspergillus* species. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 863~865, 1997
  - 20) Iwamoto T, Fujie A, Sakamoto K, et al.: WF 11899 A, B and C, novel antifungal lipopeptides I. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical properties. *J Antibiotics* 47: 1084~1091, 1994
  - 21) Tomishima M, Ohki H, Yamada A, et al.: FK 463, a novel water-soluble echinocandin lipopeptide: synthesis and antifungal activity. *J Antibiotics* 52: 674~676, 1999
  - 22) 山口英世, 西山彌生, 内田勝久, 他: Micafungin の *Candida albicans* および *Aspergillus fumigatus* に対する作用機序の生化学的および形態学的研究. *日化学療法誌* 50 (S-1): 20~29, 2002
  - 23) Abruzzo G K, Flattery A M, Gill C J, et al.: Evaluation of the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872): efficacies in mouse models of disseminated aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 2333~2338, 1997
  - 24) Kurtz M B, Bernard E M, Edwards F F, et al.: Aerosol and parenteral pneumocandins are effective in a rat model of pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1784~1789, 1995
  - 25) Oakley K L, Moore C B, Denning D W: *In vitro* activity of the echinocandin antifungal agent LY 303,366 in comparison with itraconazole and amphotericin B against *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2726~2730, 1998
  - 26) Thompson J R, Douglas C M, Li W, et al.: A glucan synthase *FKS 1* Homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. *J Bacteriol* 181: 444~453, 1999
  - 27) Sietsma J H, Wessels J G H: Apical wall biogenesis. *The Mycota I Growth, Differentiation and sexuality.* (Wessels J G H, Meinhardt F, eds), p.125~141, Springer-Verlag, Berlin, 1994
  - 28) Domer J E: Monosaccharide and chitin content of cell walls of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *J Bacteriol* 107: 870~877, 1971
  - 29) Kanetsuna F, Carbonell L M: Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 101: 675~680, 1970
  - 30) Kanetsuna F, Carbonell L M: Cell wall composition of the yeast-like and mycelial forms of *Blastomyces*

- dermatitidis*. J Bacteriol 106: 946~948, 1971
- 31) Kanetsuna F, Carmonell L M, Azuma I, et al.: Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Bacteriol 110: 208~218, 1972
- 32) Maresca B, Kobayashi G S: Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. Microbiol Rev 53: 186~209, 1989
- 33) San-Blas G: The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. Mycopathologia 79: 159~184, 1982
- 34) 山戸康弘, 金子勇人, 橋本知子, 他: マウス, ラットおよびイヌにおける micafungin 単回静脈内投与後の体内動態, *in vitro* 血清蛋白結合および血球移行性。日化療会誌 50 (S-1): 74~79, 2002

### *In vitro* activity of a new lipopeptide antifungal agent, micafungin against a variety of clinically important fungi

Fumiaki Ikeda<sup>1)</sup>, Kazumi Otomo<sup>1)</sup>, Tohru Nakai<sup>1)</sup>, Yoshihiko Morishita<sup>1)</sup>,  
Katsuyuki Maki<sup>1)</sup>, Shuichi Tawara<sup>1)</sup>, Seitaro Mutoh<sup>1)</sup>,  
Fumio Matsumoto<sup>2)</sup> and Shogo Kuwahara<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Medicinal Biology Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.,  
2-1-6, Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532-8514, Japan

<sup>2)</sup>Kanagawa Prefectural Nursing and Hygienic School Hospital

<sup>3)</sup>Toho University School of Medicine

The *in vitro* antifungal activity and spectrum of micafungin (MCFG) were compared with those of amphotericin-B (AMPH-B), fluconazole (FLCZ) and itraconazole (ITCZ) using a broth microdilution method as specified by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) document M 27-A. MCFG exhibited broad-spectrum activity against clinically important pathogens including *Candida* species and *Aspergillus* species, and its MIC<sub>90</sub> levels against *C. albicans* (including FLCZ-resistant *C. albicans*), *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *Aspergillus* species were  $\leq 0.125 \mu\text{g/mL}$ , which were lower than those for the other antifungal agents tested. The MIC<sub>90</sub> levels of MCFG against *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* were 4 and 2  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, which were comparable to or higher than those for the other antifungal agents tested. MCFG exhibited concentration-independent fungicidal activity at concentrations higher than the MIC against most *Candida* species. In contrast, the MFCs of MCFG against *A. fumigatus* isolates were much higher than the MICs of the other agents, indicating that its action is fungistatic against this species. MCFG showed moderate to weak activity against most dematiaceous fungi and had no activity against *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* species, *Fusarium solani*, *Pseudallesheria boydii* and zygomycetes. Although MCFG showed potent activity against the mycelial form of dimorphic fungi, it had weak or no activity against their yeast-like form. Neither the pH of the test medium nor the inoculum size greatly affected the MIC values of MCFG, while addition of human serum or human serum albumin increased the MIC values against *Candida* species and *A. fumigatus*. In experiments on resistance induction, the MIC of MCFG for *C. albicans* was not significantly changed; indicating that there is a low probability of MCFG-induced resistance.