

【原著・基礎】

Aspergillus fumigatus によるマウス呼吸器感染に対する micafungin の防御効果

松本 哲¹⁾・若井 芳美¹⁾・渡部 悦子¹⁾・牧 克之¹⁾・池田 文昭¹⁾
 俵 修一¹⁾・武藤誠太郎¹⁾・松本 文夫²⁾・桑原 章吾³⁾

¹⁾藤沢薬品工業株式会社薬理研究所*

²⁾神奈川県衛生看護専門学校付属病院

³⁾東邦大学医学部微生物学教室

Aspergillus fumigatus によるマウス呼吸器感染に対する micafungin (MCFG) の防御効果を amphotericin B (AMPH-B), fluconazole (FLCZ) および itraconazole (ITCZ) と比較検討した。MCFG は cyclophosphamide (CY) により易感染状態を惹起したマウスの *A. fumigatus* 呼吸器感染に対して 0.5 mg/kg 以上の投与量で control 群と比較して有意な延命効果を示した (P<0.0125)。また、CY 投与マウスの *A. fumigatus* による呼吸器感染に対する MCFG の ED₅₀ 値は 0.26~0.45 mg/kg であり、AMPH-B の ED₅₀ 値とはほぼ同等の値を示し、FLCZ および ITCZ よりも明らかに小さい値であった。また、CY 投与マウスの *A. fumigatus* 呼吸器感染において感染 24 時間後から投与を開始したときの MCFG および AMPH-B の ED₅₀ 値はそれぞれ 1.21 および 0.50 mg/kg であり、感染 1.5 時間後より投与を開始したときよりそれぞれ 3.8 および 1.9 倍大きい値を示した。5-fluorouracil または hydrocortisone 投与マウスの *A. fumigatus* 呼吸器感染に対する MCFG の ED₅₀ 値は 0.66 または 1.12 mg/kg であり、AMPH-B より 1.3 または 4.1 倍大きい値を示した。以上の結果より、種々の条件で易感染状態を惹起したマウスの *A. fumigatus* による呼吸器感染に対して、MCFG の防御効果は AMPH-B と同等ないしはやや劣り、FLCZ および ITCZ よりも優れることが示唆された。

Key words: micafungin, 呼吸器感染, マウス, 肺アスペルギルス症

侵襲性肺アスペルギルス症は、血液疾患患者の主な死因となっており、特に、急性白血病、骨髄その他の臓器移植患者において発症頻度が高い¹⁾。現在、治療には amphotericin B (AMPH-B) および itraconazole (ITCZ) が用いられているが、前者は強い副作用のため、後者は薬効不足のためそれぞれ十分な治療効果が得られず、侵襲性肺アスペルギルス症は依然として死亡率の高い疾患として位置づけられている^{1,2)}。このような現状から、*Aspergillus* 属に対して優れた活性を示す新薬の登場が待望されている。

Micafungin (MCFG) は藤沢薬品工業株式会社で見出された echinocandin 様の構造をもった注射用の抗真菌薬であり³⁾、真菌に特異的な細胞壁主要構成成分である 1,3-β-D-glucan の合成を阻害することにより、*Candida* 属および *Aspergillus* 属に対して優れた *in vitro* および *in vivo* 活性を示すことが報告されている⁴⁻⁹⁾。

本研究では肺真菌症でもっとも分離頻度の高い菌種である *A. fumigatus* によるマウス呼吸器感染に対する MCFG の防御効果について検討した。

I. 材料および方法

1. 使用薬剤および試薬

MCFG は藤沢薬品工業株式会社で合成されたものを用いた。また、同効類薬として amphotericin B (AMPH-

B; Fungizone[®], ブリストル・マイヤーズスクイブ株式会社, 東京), fluconazole (FLCZ; Diflucan[®], ファイザー製薬株式会社, 東京) および itraconazole (ITCZ; Itrizole[®], ヤンセン協和株式会社, 東京) を使用した。さらに、マウスの易感染状態を惹起するために cyclophosphamide (CY; Acros organics, NH, USA), hydrocortisone (HC; ナカライテスク, 京都) および 5-fluorouracil (5-FU; Sigma Chemical, MO, USA) を使用した。

2. 使用動物

4 週齢の雄性 ICR 系マウスを日本エスエルシー株式会社 (浜松) から購入し、給水および飼料は自由に与えた。

3. 感染菌株および培養条件

A. fumigatus TIMM 0063 は帝京大学・山口教授, *A. fumigatus* IFM 40835 および IFM 40836 は千葉大学・宮治教授より分与された菌株を使用した。*A. fumigatus* は potato dextrose agar (Difco) で 30°C, 7 日間培養した。

4. MIC (最小発育阻止濃度) 測定

MCFG, FLCZ, ITCZ および AMPH-B の *A. fumigatus* に対する MIC は National Committee for

*大阪府大阪市淀川区加島 2-1-6

Clinical Laboratory Standards (NCCLS) の M27-A ガイドラインに準拠して測定した^{6,10)}。また, MCFG, AMPH-B, FLCZ および ITCZ の MIC はスコア 2 を示した最小薬剤濃度とした。

5. マウス呼吸器感染

マウスを易感染状態にするために, CY の 200 mg/kg を感染 4 日前および 1 日後に腹腔内投与, HC の 100 mg/kg を感染 1 日前, 3 時間後, 1 および 2 日後に皮下投与, または, 5-FU の 150 mg/kg を感染 4 日前および 75 mg/kg を感染 1 日後に静脈内投与した。30°C, 7 日間培養した *A. fumigatus* の分生子を生理食塩液に懸濁し, ペントバルビタール (50 mg/kg を静脈内投与) で麻酔下のマウスの片鼻穴にその 0.05 mL を接種した。

6. 薬剤投与方法

MCFG および AMPH-B はそれぞれ生理食塩液および 5% ブドウ糖液にて溶解および希釈し, FLCZ は生理食塩液で希釈し, 感染 1.5 時間後より 1 日 1 回 4 日間

または感染 24 時間後より 1 日 1 回 4 日間, マウスの静脈内に投与した。また, ITCZ は 0.5% メチルセルロースに懸濁し, 他剤と同様の投与スケジュールで経口投与した。ただし, 5-FU を前投与した場合は, 感染 1.5 時間後より 1 日 1 回 4 日間および感染 6 日後より 1 日 1 回 5 日間の計 9 回投与した。また, control 群は生理食塩液を静脈内に投与した。各抗真菌薬投与群および control 群は 1 群 8~14 匹のマウスを用いた。

7. 統計解析方法

延命効果については感染 22 日後まで観察し, Kaplan-Meier plot し, control 群の生存率曲線に対する各投与群の生存率曲線の順位検定を Wilcoxon rank sum test および Bonferroni の補正で行った。また, 感染 15 または 16 日後の各抗真菌薬投与群の生存数より probit 法により 50% を生存させる推定投与量 (ED₅₀ 値) を算出した。

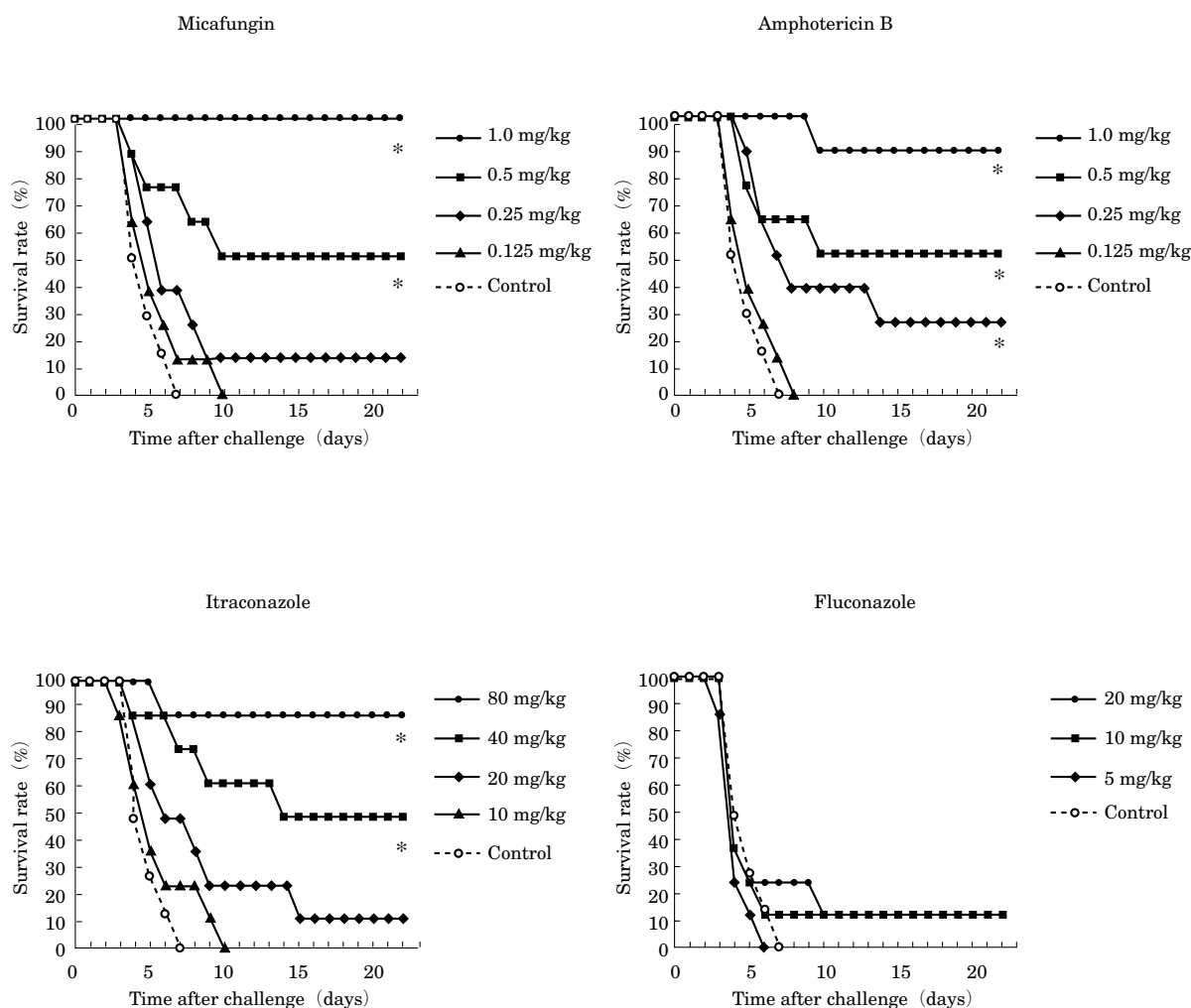


Fig. 1. Efficacy of micafungin, amphotericin B, itraconazole and fluconazole in mouse survival model of pulmonary aspergillosis.

*Statistical analysis was performed by Wilcoxon rank sum test against the control group (significantly different from the control ($P < 0.0125$) by Bonferroni correction)

II. 結 果

1. 延命効果

CYを投与したICR系雄性マウスに*A. fumigatus* IFM 40836を経鼻接種し、1.5時間後より1日1回4日間、MCFG、AMPH-B、FLCZまたはITCZを投与したときの生存率曲線をFig. 1に示した。Control群は感染7日後で全例死亡したが、MCFGは0.5 mg/kg以上の投与量でcontrol群と比較して有意な延命効果を示し ($P < 0.0125$)、1.0 mg/kgでは感染後22日間、マウスを全例生存させた。一方、AMPH-BおよびITCZは、それぞれ0.25および40 mg/kg以上の投与量でcontrol群に比較して有意な延命効果を示した ($P < 0.0125$) が、FLCZでは20 mg/kgの投与においても延命効果は認められなかった。

2. 他の抗真菌薬との防御効果の比較

CYを投与したICR系雄性マウスに*A. fumigatus* TIMM 0063, IFM 40835およびIFM 40836の3株を経鼻接種し、1.5時間後より1日1回4日間、MCFG、AMPH-B、FLCZまたはITCZを投与したときの感染15日後の生存数から推定したED₅₀値をTable 1に示した。*A. fumigatus* 3株によるマウス呼吸器感染に対して、MCFGのED₅₀値は0.26~0.45 mg/kgであり、ITCZより86~130倍小さく、AMPH-Bとはほぼ同等の値を示した。一方、これらの感染に対するFLCZのED₅₀値は20 mg/kg以上であった。また、感染に使用した各菌株に対するMCFG、FLCZ、ITCZおよびAMPH-Bの

MICをTable 2に示した。MCFGの感染菌株に対するMICは0.0078または0.0156 μg/mLであり、FLCZ、ITCZおよびAMPH-Bより低値を示した。

3. 5-FU, HC 投与マウスにおける感染防御効果

5-FUまたはHCを投与したICR系雄性マウスに*A. fumigatus* IFM 40836を経鼻接種し、MCFG、AMPH-B、FLCZおよびITCZを投与したときの感染15日後の生存数から推定したED₅₀値をTable 3に示した。5-FUまたはHC投与による易感染マウスの呼吸器感染に対するMCFGのED₅₀値は0.66または1.12 mg/kgであり、AMPH-Bより1.3または4.1倍大きい値を示した。一方、これらの感染に対するITCZおよびFLCZのED₅₀値は、それぞれ80および20 mg/kg以上であった。

4. 感染防御効果におよぼす投与開始時期の影響

CYを投与したICR系雄性マウスに*A. fumigatus* IFM 40836を経鼻接種し、MCFG、AMPH-BおよびFLCZを投与し、感染16日後の生存数から推定したED₅₀値をTable 4に示した。感染24時間後から投与を開始したときのMCFGおよびAMPH-BのED₅₀値は、それぞれ1.21および0.50 mg/kgであり、感染1.5時間後より投与を開始したときよりそれぞれ3.8および1.9倍大きい値を示した。

なお、1.5または24時間後よりFLCZを投与開始したときのED₅₀値はいずれも>20 mg/kgであった。

Table 1. Efficacy of micafungin in mouse models of pulmonary aspergillosis

Organism	Inoculum (CFU)	ED ₅₀ : mg/kg (95% confidence interval)			
		MCFG	FLCZ	ITCZ	AMPH-B
<i>A. fumigatus</i> TIMM 0063	8.0 × 10 ⁵	0.33 (0.23-0.45)	>20.0	28.3 (20.5-38.6)	0.25 (0.16-0.36)
<i>A. fumigatus</i> IFM 40835	8.3 × 10 ⁵	0.26 (0.18-0.36)	>20.0	34.0 (-) ^{a)}	0.25 (0.16-0.36)
<i>A. fumigatus</i> IFM 40836	7.0 × 10 ⁵	0.45 (0.32-0.64)	>20.0	40.3 (28.0-62.4)	0.46 (0.31-0.76)

^{a)}Not calculated

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

Table 2. MICs of micafungin for strains used for mouse infection

Organism	MIC ^{a)} : μg/mL			
	MCFG	FLCZ	ITCZ	AMPH-B
<i>A. fumigatus</i> TIMM 0063	0.0078	>64	0.5	0.5
<i>A. fumigatus</i> IFM 40835	0.0156	>64	0.5	0.5
<i>A. fumigatus</i> IFM 40836	0.0156	>64	1	2

^{a)}MIC values were determined by broth microdilution method according to the M 27-A guideline.

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

Table 3. Influence of immunosuppression on efficacy of micafungin in mouse models of pulmonary aspergillosis

Host condition	Inoculum (CFU)	ED ₅₀ : mg/kg (95% confidence intervals)			
		MCFG	FLCZ	ITCZ	AMPH-B
5-fluorouracil	2.7 × 10 ⁵	0.66 (0.43–1.06)	>20	>80	0.51 (0.34–0.75)
Hydrocortisone	5.1 × 10 ⁴	1.12 (0.72–1.77)	>20	>80	0.27 (0.17–0.40)

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

Table 4. Influence of starting time of treatment on efficacy of micafungin in mouse models of pulmonary aspergillosis

Organism	Inoculum (CFU)	Starting time of treatment after infection	ED ₅₀ : mg/kg (95% confidence intervals)		
			MCFG	FLCZ	AMPH-B
<i>A. fumigatus</i> IFM 40836	1.5 × 10 ⁶	1.5 hours	0.32 (0.14–0.71)	>20	0.27 (0.15–0.46)
		24 hours	1.21 (0.43–4.93)	>20	0.50 (0.28–1.18)

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

III. 考 察

CY 投与マウスの *A. fumigatus* IFM 40836 による呼吸器感染において、MCFG, AMPH-B および ITCZ の有意な延命効果を示す投与量は、それぞれ 0.5, 0.25 および 40 mg/kg であり、感染 15 日後の生存率から推定した各薬剤の ED₅₀ 値である 0.45, 0.46 および 40.3 mg/kg と比較的近似した値を示した。また、MCFG, AMPH-B および ITCZ の ED₅₀ 値近辺の投与量における生存率曲線を比較すると、類似したパターンが認められることから、菌株、感染菌量および宿主条件などの相違により一概には言えないが、ED₅₀ 値の比較から MCFG と同効類薬との感染防御効果の優劣を推定することは可能であると考えられた。CY 投与マウスの *A. fumigatus* 3 株による呼吸器感染に対する MCFG の ED₅₀ 値はマウスの全身感染モデルにおける成績^{7,8)}と同様に AMPH-B とほぼ同等の値であり、FLCZ および ITCZ よりも明らかに小さい値を示した。5-FU または HC により易感染状態にしたマウスの *A. fumigatus* 呼吸器感染に対する MCFG の ED₅₀ 値は 0.66 または 1.12 mg/kg であり、MCFG の防御効果は宿主の状態によって極端に減弱するものではないことが示唆された。一方、CY 投与マウスの *A. fumigatus* 呼吸器感染に対して感染 24 時間後から治療を開始したときの MCFG の ED₅₀ 値も、AMPH-B より 2.4 倍大きい値を示し、AMPH-B よりも投与開始時期の影響を受けやすいことが示唆された。種々の易感染条件や感染後の投与開始時期の影響などを検討した結果より、マウスの *A. fumigatus* 呼吸器感染モデルに対する MCFG の防御効果は FLCZ および ITCZ よりも優れ、AMPH-B と同等ないしはやや劣ることが示唆

された。

マウス全身感染⁸⁾と同様にマウス呼吸器感染においても、MCFG は AMPH-B よりも低い MIC を示すにもかかわらず ED₅₀ 値は AMPH-B と同等ないしはやや大きい値を示した。MCFG はヒトおよび各種動物の血清蛋白に対して高率に結合する¹⁵⁾ため、*A. fumigatus* に対する MIC はヒト血清や血清アルブミンの添加により著しく上昇することから⁶⁾、マウスの感染防御実験においても血清アルブミンとの結合が防御活性に影響をおよぼしていると考えられた。

MCFG は *in vitro* において、同じ 1,3-β-D-glucan 合成阻害薬である anidulafungin (LY 303366) および caspofungin (MK-0991) と同様に、*A. fumigatus* に対してきわめて低濃度から菌糸の伸長阻害作用を示すがそれ以上の高濃度を作用させても完全増殖阻止作用は認められず、殺菌的に作用する AMPH-B とは異なる作用様式であることが報告されている^{6,11,12)}。また、持続的な顆粒球減少状態を惹起した家兎の *A. fumigatus* 呼吸器感染モデルにおける LY 303366 の効果を検討した成績では、肺組織からの除菌は認められなかったが生存率や肺の障害は改善し、病理学的には肺組織に存在する菌糸の膨化や著しい伸長の抑制などの形態変化が認められている¹³⁾。持続的な顆粒球減少宿主における侵襲性肺アスペルギルス症の病原性発現において菌糸の血管への侵襲による肺塞栓や出血性壊死が重要であると考えられている¹⁴⁾。1,3-β-D-glucan 合成阻害薬が *A. fumigatus* 呼吸器感染に対して優れた延命効果を示すのは、肺組織に定着した *A. fumigatus* の菌糸の伸長を阻害することにより菌糸の血管侵襲を防御し、生存率や肺病変を改善

するためと推察される。

マウスの呼吸器感染モデルにおける同効類薬との薬効比較成績から、MCFG は種々の易感染宿主で発症する肺アスペルギルス症に対する有用性が示唆された。

文 献

- 1) Latge J: *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 12: 310~350, 1999
- 2) Denning D W: Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 23: 608~615, 1999
- 3) 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
- 4) 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。日化療会誌 50 (S-1): 20~29, 2002
- 5) Tawara S, Ikeda F, Maki K, et al.: In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK 463, against a variety of clinically important fungi. Antimicrob Agents Chemother 44: 57~62, 2000
- 6) 池田文昭, 大友寿美, 中井 徹, 他: キャンディン系抗真菌薬 micafungin の *in vitro* 抗真菌活性。日化療会誌 50 (S-1): 8~19, 2002
- 7) Ikeda F, Wakai Y, Matsumoto S, et al.: Efficacy of FK 463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of disseminated candidiasis and aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother 44: 614~618, 2000
- 8) 松本 哲, 若井芳美, 渡部悦子, 他: *Candida* 属および *Aspergillus fumigatus* によるマウス全身感染に対する micafungin の防御効果。日化療会誌 50 (S-1): 30~36, 2002
- 9) Matsumoto S, Wakai Y, Nakai T, et al.: Efficacy of FK 463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of pulmonary aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother 44: 619~621, 2000
- 10) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. NCCLS document M 27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 1997
- 11) 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
- 12) 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
- 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) Berenguer J, Allende M C, Lee J W, et al.: Pathogenesis of pulmonary aspergillosis. Granulocytopenia versus cyclosporine and methylprednisolone-induced immunosuppression. Am J Resp Crit Care Med 152: 1079~1086, 1995
- 15) 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, *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

Efficacy of micafungin, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of pulmonary aspergillosis

Satoru Matsumoto¹⁾, Yoshimi Wakai¹⁾, Etsuko Watabe¹⁾, Katsuyuki Maki¹⁾,
Fumiaki Ikeda¹⁾, Shuichi Tawara¹⁾, Seitaro Mutoh¹⁾,
Fumio Matsumoto²⁾ and Shogo Kuwahara³⁾

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

²⁾Kanagawa Prefecture Nursing Hygienic School Hospital

³⁾Toho University School of Medicine

The efficacy of micafungin (MCFG), a novel water-soluble lipopeptide, was evaluated in mouse models of pulmonary aspergillosis, and compared with that of amphotericin B (AMPH-B), fluconazole (FLCZ) and itraconazole (ITCZ). In pulmonary aspergillosis in mice immunosuppressed by cyclophosphamide, MCFG significantly prolonged the survival of mice infected intranasally with *Aspergillus fumigatus* at doses of 0.5 and 1 mg/kg ($P < 0.0125$). In mice with pulmonary aspergillosis caused by *A. fumigatus*, MCFG exhibited 50% effective doses (ED_{50} s) in the range of 0.26 to 0.45 mg/kg 15 days after infection, which is comparable to the efficacy of AMPH-B (ED_{50} s; 0.25 to 0.46 mg/kg), and superior to FLCZ and ITCZ. The ED_{50} of MCFG was comparable to that of AMPH-B in mice immunosuppressed by 5-fluorouracil, however, it was 4.1 times inferior to that of AMPH-B in mice immunosuppressed by hydrocortisone. When treatment with MCFG was initiated 1 day after infection, the ED_{50} of MCFG was 1.21 mg/kg, which was 2.4 times inferior to that of AMPH-B and 3.8 times inferior to that of MCFG if initiated 1.5 hours after infection. These results indicate that MCFG may be a potent parenteral administered antifungal agent for pulmonary aspergillosis, with efficacy comparable or slightly inferior to that of AMPH-B, but superior to that of FLCZ and ITCZ.