

## 【原著・基礎】

*Candida albicans* マウス全身感染および *Aspergillus fumigatus* マウス呼吸器感染  
に対する micafungin の最小有効血漿中濃度に関する検討若井 芳美・牛谷 友栄・松本 哲  
波多野和男・池田 文昭・武藤誠太郎

藤沢薬品工業株式会社薬理研究所\*

*Candida albicans* によるマウス全身感染および *Aspergillus fumigatus* によるマウス呼吸器感染に対する micafungin (MCFG) の最小有効血漿中濃度を算出した。すなわち、*C. albicans* FP 633 を静脈内接種または *A. fumigatus* TIMM 0063 を経鼻接種したマウスに小型の浸透圧ポンプを埋め込み、MCFG の種々の異なった血漿中濃度を一定の範囲に持続させ、それぞれの感染 5 日後の腎臓および肺内生菌数の減少効果を指標に最小有効血漿中濃度を算出した。有効血漿中濃度はマウスの血漿中に検出された MCFG およびその活性代謝物である M 1 (カテコール体) および M 2 (メトキシ体) の総和とした。また、MCFG, M 1 と M 2 の血漿中濃度の総和はポンプを埋め込んだ翌日に比べ 5 日後にはやや減少していたため、有効血漿中濃度は 5 日後の実測値と 1 日後の濃度の推定値の範囲とした。その結果、*C. albicans* 全身感染および *A. fumigatus* 呼吸器感染に対する最小有効血漿中濃度の範囲はそれぞれ 0.16~0.26  $\mu\text{g}/\text{mL}$  および 0.55~0.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となった。

**Key words:** micafungin, 全身感染, 呼吸器感染, カンジダ症, アスペルギルス症

抗菌薬の前臨床試験において、感染動物モデルにおける同効薬との薬効比較からヒトでの有効性を類推するのが一般的であるが、ヒトと動物の体内動態の違い、ヒトにおける感染病態の多様性などから、同一の用法、用量で比較するときには動物種や感染モデルの選択など解決すべき課題が多く存在する。ヒトにおける薬物の用法、用量を推定するパラメーター (Pharmacokinetics/Pharmacodynamics) として、特に抗菌薬の場合は血漿中濃度、消失半減期といった個々のパラメーターおよびそれらの組み合わせにより解析されることが多く、用法、用量の推定に役立っている<sup>1)</sup>。

また、抗菌薬の血漿中濃度を一定に維持させた時の濃度と効果の関係から最小有効血漿中濃度を算出し、ヒトにおける血漿中濃度をシミュレーションし有効血漿中濃度を維持できる投与量として臨床用量 (有効投与量) を類推することが可能であると考えられる。

Micafungin (MCFG) は echinocandin 様の構造をもった注射用の抗真菌薬であり<sup>2)</sup>、真菌に特異的な細胞壁主要構成成分である 1,3- $\beta$ -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<sup>3-5)</sup>。

本研究では、臨床用量を推定する目的で、小型浸透圧ポンプを用いて MCFG の血漿中濃度を一定の範囲に持続させたときの *Candida albicans* によるマウス全身感染および *Aspergillus fumigatus* によるマウス呼吸器感染に対する MCFG の効果から最小有効血漿中濃度を算出した。

## I. 材料と方法

## 1. 使用薬剤および試薬

MCFG および活性代謝物である M 1 (カテコール体) と M 2 (メトキシ体) 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、マウスの易感染状態にさせるため hydrocortisone (ナカライテスク, 京都) 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、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

*C. albicans* FP 633 は順天堂大学および *A. fumigatus* TIMM 0063 は帝京大学・山口教授より分与された。*C. albicans* FP 633 は Sabouraud dextrose agar (SDA; 2% glucose, 1% polypepton, 1.5% Bacto agar) で 35  $^{\circ}\text{C}$ , 1 日培養した。また、*A. fumigatus* TIMM 0063 は potato dextrose agar (Difco) で 30  $^{\circ}\text{C}$ , 7 日間培養した後、感染実験に使用した。

## 4. マウス全身感染

マウスを易感染状態にさせるため、hydrocortisone の 100 mg/kg を感染 1 日前と 1 日後に皮下投与した。培養した *C. albicans* FP 633 の菌体を生理食塩液に懸濁し、0.2 mL をマウスの静脈内より接種し ( $9.2 \times 10^4$  CFU), 全身感染を惹起させた。

感染 5 日後、腎臓を無菌的に取り出し、生理食塩液を加え均一にホモジナイズした。この原液および生理食

\*大阪府大阪市淀川区加島 2-1-6

塩液で希釈した懸濁液を SDA に接種し、35°C、2 日間培養した。増殖したコロニーを計測し、腎臓あたりの生菌数を求めた。

#### 5. マウス呼吸器感染

マウスを易感染状態にさせるため、hydrocortisone の 100 mg/kg を感染 1 日前と 1 日後に皮下投与した。培養した *A. fumigatus* TIMM 0063 の分生子を生理食塩水に懸濁し、50 mg/kg のペントバルビタールを静脈内から投与し麻酔したマウスの鼻腔内に片鼻穴より 0.05 mL を接種し ( $6.0 \times 10^4$  CFU)、呼吸器感染を惹起させた。

感染 5 日後、肺を無菌的に取り出し、生理食塩液を加え均一にホモジナイズした。この原液および生理食塩液で希釈した懸濁液を SDA に接種し、37°C、1 日以上培養した。増殖したコロニーを計測し、肺あたりの生菌数を求めた。

#### 6. 薬剤投与

ALZET mini-osmotic pump, model 2001 (Alza Corp, CA, USA) に、*C. albicans* 感染の場合は 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/mL、また *A. fumigatus* 感染の場合は 0.5, 1, 2, 4 mg/mL になるよう生理食塩液に溶解した MCFG を約 0.2 mL 注入し、感染直後に 1 群 5 例のマウスの背部皮下に埋め込んだ。Control 群は生理食塩液を pump に注入し、マウスの背部皮下に埋め込んだ。

#### 7. 薬剤濃度測定

感染 1 日後および 5 日後に浸透圧ポンプを埋め込んだマウスの心臓より採血し、血漿中の MCFG, M 1 および M 2 濃度を高速液体クロマトグラム法で別報<sup>6)</sup>にしたがって測定した。本法による MCFG, M 1 および M 2 の定量限界は 0.05  $\mu$ g/mL であった。

有効血漿中濃度は、control 群の残存生菌数に対して有意な菌数減少を示した群の推定血漿中濃度とした。

#### 8. 統計解析法

腎臓、肺内生菌数および MCFG, M 1, M 2 の血漿中濃度は、平均値  $\pm$  標準誤差で示し、検出限界以下の場合には定量限界 (0.05  $\mu$ g/mL) を代入して計算した。また、control 群の臓器内生菌数に対する各薬剤群の生菌数の有意差検定は一元配置分散分析および Dunnett の多重比較で行い、P 値が 0.05 未満のときを有意とした。

## II. 結 果

1. *C. albicans* FP 633 によるマウス全身感染に対する治療効果と血漿中濃度

感染 5 日後の MCFG, M 1 および M 2 の血漿中濃度と腎臓内生菌数の関係を Table 1 に示した。同時に、1 mg/mL を含んだ浸透圧ポンプを埋め込んだマウスについては、埋め込み翌日の血漿中濃度も測定し、Table 2 に示した。

感染 5 日後の血漿中に MCFG の未変化体および活性代謝物 M 1 が検出され、その総濃度が 0.16  $\mu$ g/mL 以上のとき、control 群に比較して有意な菌数減少効果が

Table 1. Effect of continuous infusion of micafungin on mouse kidney fungal titers in a model of disseminated candidiasis

Concentration of MCFG injected into pump (mg/mL)	Plasma concentration ( $\mu$ g/mL: mean $\pm$ SE)				Viable count (log CFU/kidney $\pm$ SE)
	MCFG+M 1+M 2	MCFG	M 1	M 2	
Control	—	—	—	—	6.36 $\pm$ 0.02
0.125 <sup>a)</sup>	0.15	0.05	0.05	0.05	6.30 $\pm$ 0.13
0.25	0.16 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01	0.05	0.05	3.81 $\pm$ 0.34**
0.5	0.26 $\pm$ 0.04	0.14 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.01	0.05	2.77 $\pm$ 0.42**
1	0.37 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.01	0.05	<1.00 <sup>b)</sup>

\*\*Significantly ( $p < 0.01$ ) different from the control (one way layout analysis of variance and Dunnett's multiple comparison)

<sup>a)</sup>Plasma concentrations of MCFG, M 1 and M 2 were less than the lower limit of quantification

<sup>b)</sup>All of mice in the group of 1 mg/mL MCFG were under the detection limit and was not calculated for statistical analysis

MCFG: micafungin

Table 2. Plasma concentration in mice continuously infused with micafungin — comparison between 1 and 5 day after infection —

Organisms	Concentration of MCFG injected into pump (mg/mL)	Plasma concentration ( $\mu$ g/mL: mean $\pm$ SE)		Ratio 1 day/5 days
		MCFG+M 1+M 2	MCFG+M 1+M 2	
		1 day	5 days	
<i>C. albicans</i> FP 633	1	0.59 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.04	1.60
<i>A. fumigatus</i> TIMM 0063	4	2.24 $\pm$ 0.36	1.55 $\pm$ 0.17	1.44

MCFG: micafungin

Table 3. Effect of continuous infusion of micafungin on mouse lung fungal titers in a model of pulmonary aspergillosis

Concentration of MCFG injected into pump (mg/mL)	Plasma concentration ( $\mu\text{g/mL}$ : mean $\pm$ SE)				Viable count (log CFU/kidney $\pm$ SE)
	MCFG+M 1+M 2	MCFG	M 1	M 2	
Control	—	—	—	—	3.99 $\pm$ 0.18
0.5	0.23 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.01	0.05	3.71 $\pm$ 0.22
1	0.55 $\pm$ 0.13	0.36 $\pm$ 0.09	0.15 $\pm$ 0.04	0.05	2.82 $\pm$ 0.22*
2	0.91 $\pm$ 0.19	0.65 $\pm$ 0.15	0.21 $\pm$ 0.05	0.05	2.14 $\pm$ 0.35**
4	1.55 $\pm$ 0.17	0.99 $\pm$ 0.12	0.50 $\pm$ 0.05	0.06 $\pm$ 0.01	1.71 $\pm$ 0.29**

\*\*\*Significantly (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) different from the control (one way layout analysis of variance and Dunnett's multiple comparison)

MCFG: micafungin

認められ ( $P < 0.01$ ), 血漿中総濃度が  $0.37 \mu\text{g/mL}$  の時には検出限界以下 ( $< 10 \text{ CFU/kidney}$ ) まで除菌した。なお, 感染後 5 日間, 一定の血漿中濃度を維持したかどうかを確認するために, 感染マウスに  $1 \text{ mg/mL}$  の MCFG を含む浸透圧ポンプを埋め込んだ翌日および 5 日後の血漿中未変化体および活性代謝物の総濃度を測定したところ, それぞれ  $0.59$  および  $0.37 \mu\text{g/mL}$  であった。感染翌日の血漿中総濃度が 5 日後の約 1.60 倍であったことから, MCFG の血漿中未変化体および活性代謝物の総濃度が  $0.16 \mu\text{g/mL}$  からその 1.60 倍の  $0.26 \mu\text{g/mL}$  がマウスの *C. albicans* 全身感染に対する最小有効血漿中濃度と推定された。

## 2. *A. fumigatus* TIMM 0063 によるマウス呼吸器感染に対する治療効果と血漿中濃度

感染 5 日後の MCFG, M 1 および M 2 の血漿中濃度と肺内生菌数の関係を Table 3 に示した。同時に,  $4 \text{ mg/mL}$  を含んだ浸透圧ポンプを埋め込んだマウスについては, 埋め込み翌日の血漿中濃度も測定し, Table 2 に示した。

感染 5 日後の血漿中に MCFG の未変化体および活性代謝物が検出され (M 1 はいずれの群においても検出され, M 2 は  $4 \text{ mg/mL}$  の MCFG を含む浸透圧ポンプを埋め込んだ群においてのみ検出された), その総濃度が  $0.55 \mu\text{g/mL}$  以上のとき, control 群に比較して有意な菌数減少効果が認められた ( $P < 0.05$ )。なお, 感染後 5 日間, 一定の血漿中濃度を維持したかどうかを確認するために, 感染マウスに  $4 \text{ mg/mL}$  の MCFG を含む浸透圧ポンプを埋め込んだ翌日および 5 日後の血漿中未変化体および活性代謝物の総濃度を測定したところ, それぞれ  $2.24$  および  $1.55 \mu\text{g/mL}$  であった。感染翌日の血漿中総濃度が 5 日後の約 1.44 倍であったことから, *A. fumigatus* 呼吸器感染に対する MCFG の最小有効血漿中濃度は  $0.55 \mu\text{g/mL}$  からその 1.44 倍の  $0.80 \mu\text{g/mL}$  と推定された。

## III. 考 察

ALZET mini-osmotic pump, model 2001 は生体内

において浸透圧により一定量 (約  $1 \mu\text{L/hour}$ ) を持続的に放出し, およそ投与 24 時間後から 7 日間, 一定の血漿中濃度を持続させることが可能な浸透圧ポンプで, 広く研究に利用されている<sup>7,8)</sup>。このポンプを感染モデル動物に埋め込み, 一定の血漿中濃度を持続させたときの有効性の評価から, 有効血漿中濃度を求めることが可能である。

本実験で用いた 2 種の感染マウスに ALZET mini-osmotic pump により MCFG を持続注入した場合, 浸透圧ポンプを埋め込んだ翌日の MCFG の血漿中濃度が 5 日後の血漿中濃度の 1.60 ないしは 1.44 倍であったため, 有効血漿中濃度は 5 日後の実測値とこの比率から求められる投与翌日の推定値との範囲にあるものと考えられた。

浸透圧ポンプを埋め込んだマウスの血漿中には MCFG 以外にその代謝物である M 1 (カテコール体) および M 2 (メトキシ体) も検出された。M 1 および M 2 は *Candida* 属および *Aspergillus* 属の菌種に対して MCFG と同等もしくはやや高い MIC を示し, M 1 および M 2 を静脈内投与したときのマウスの *C. albicans* 全身感染に対する  $\text{ED}_{50}$  値も MCFG と近似した値を示した<sup>9)</sup>。これらのことから M 1 および M 2 は MCFG と同等の抗真菌活性を有するものと考えられたため, MCFG, M 1 および M 2 のそれぞれの濃度を高速液体クロマトグラフ法により測定し, 3 化合物の濃度の総和を有効血漿中濃度の算出に用いた。さらに, 5 日間持続注入後の M 1 および M 2 の血漿中濃度は MCFG に比べ低く, それぞれ  $0.25$  および  $2 \text{ mg/mL}$  以下の MCFG を注入した浸透圧ポンプを埋め込んだ群では検出限界以下になった (Tables 1, 3)。ただし, 最小有効血漿中濃度の算出にあたっては, 各個体における検出限界以下の化合物については, 検出限界の値,  $0.05 \mu\text{g/mL}$  を代入して計算した。

このような条件で *C. albicans* による全身感染マウスの背部皮下に浸透圧ポンプを埋め込み MCFG を 5 日間持続注入させたとき, MCFG とその活性代謝物である

M1およびM2の血漿中濃度の総和が0.16~0.26  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のとき、control群に対して有意な腎臓内生菌数の減少効果がみられ、この範囲がMCFGの*C. albicans*によるマウス全身感染に対する最小有効血漿中濃度と考えられた。また、腎臓内生菌数を検出限界以下まで除菌するためには、0.37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の血中濃度の維持が必要であることが示された。同様に、*A. fumigatus*による呼吸器感染マウスにおいて血漿中濃度が0.55~0.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のとき、control群に対して有意な肺内生菌数の減少効果がみられ、この範囲が最小有効血漿中濃度と考えられた。しかし、有効血漿中濃度とした0.55~0.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度においても濃度依存的に菌数減少効果が認められたものの、1.55  $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても全例のマウスから菌が検出された。

*C. albicans*による全身感染に対する最小有効血漿中濃度は用いた菌株のMIC (0.0313  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )<sup>4)</sup>に比べ5.1~8.3倍高くなり、また、*A. fumigatus*呼吸器感染の場合、最小有効血漿中濃度は用いた菌株のMIC (0.0078  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )<sup>4)</sup>に比べ71~100倍高くなった。最小有効血漿中濃度がMICより高くなったことからMCFGの薬効は血清蛋白結合<sup>6)</sup>などの影響を受けるものと考えられた。また、*A. fumigatus*呼吸器感染に対するMCFGの最小有効血漿中濃度とMICとの差が、*C. albicans*全身感染の場合に比べ大きくなったことは、MCFGが*C. albicans*には殺菌的に作用するのに対して、*A. fumigatus*には菌糸の伸長を抑制するが明らかな殺菌作用が認められないことが要因の一つと推定された<sup>3,4)</sup>。

MCFGの臨床推定用量は、第I相反復投与試験(25 mg)の成績をもとに、マウスでの真菌感染モデルにおける有効血漿中濃度を維持できる投与量を推定した<sup>10)</sup>。その結果、定常状態と考えられた第4日から第8日のトラフ値は0.59~0.64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ となり、半分量の12.5 mgにおいても*C. albicans*によるマウスの全身感染において算出された有効血漿中濃度を定常状態下で終日維持できると考えられた。一方、本薬を25 mg 1日1回1時間点滴静注で反復投与することより、*A. fumigatus*によるマウス呼吸器感染において算出された有効血漿中濃度を定常状態下ではほぼ終日維持できると考えられた。よって、カンジダ症には12.5 mgを1日1回、アスペ

ルギルス症には25 mgを1日1回点滴静注による反復投与で有効性が期待できると考えられた。

しかし、ヒトの深在性真菌症の病態ならびに感染病巣は多様であり、基礎疾患やその病勢にも患者間に差がある。また、マウス感染モデルと比較して感染病態の質および感染病巣への薬物の移行性などに相違がある可能性も考えられることから、重篤な感染においてはさらに高い用量が必要であると考えられた。

#### 文 献

- 1) Craig W A: Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. Clin Infect Dis 26: 1~12, 1998
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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): 30~36, 2002
- 5) 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): 37~42, 2002
- 6) 山戸康弘, 金子勇人, 片島正貴, 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): 43~47, 2002
- 7) Karyotakis N, Anaissie E J: Efficacy of continuous flucytosine infusion against *Candida lusitanae* in experimental hematogenous murine candidiasis. Antimicrob Agents Chemother 40: 2907~2908, 1996
- 8) Vyas S P, Sood A, Venugopalan P, et al.: Circadian rhythm and drug delivery design. Pharmazie 52: 815~820, 1997
- 9) 池田文昭, 大友寿美, 若井芳美, 他: Micafungin の代謝物 M 1, M 2 および M 5 の抗真菌活性。日化療会誌 50 (S-1): 54~57, 2002
- 10) 東 純一, 中原邦夫, 加賀山彰, 他: Micafungin の第 I 相試験。日化療会誌 50 (S-1): 104~147, 2002

Minimum effective concentrations of micafungin for the treatment  
of disseminated *Candida albicans* infection and pulmonary  
*Aspergillus fumigatus* infection in the mouse

Yoshimi Wakai, Tomoe Ushitani, Satoru Matsumoto, Kazuo Hatano,  
Fumiaki Ikeda and Seitaro Mutoh

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

The activity of micafungin (MCFG), a novel water-soluble lipopeptide, was evaluated in a disseminated candidiasis and pulmonary aspergillosis target organ assay to determine the minimum effective plasma concentration. Immunosuppressed mice were challenged intravenously with *Candida albicans* or intranasally with *Aspergillus fumigatus* and treated with various concentrations of MCFG infused continuously via a subcutaneously implanted pump. Efficacy was evaluated on the basis of a comparison of the mean  $\log_{10}$  CFU in kidney or lung in groups treated with MCFG and in control groups, 5 days post-infection. Plasma concentration of MCFG included the active metabolite M 1 (catechol form) and M 2 (methoxy form). As plasma concentrations of MCFG 5 days post-infection were lower than that 1 day post-infection, the minimum effective plasma concentration had a range between the plasma concentration 5 days post-infection and the calculated plasma concentration 1 day post-infection. The estimated minimum effective plasma concentrations of MCFG were 0.16–0.26  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 0.55–0.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in mouse candidiasis and aspergillosis, respectively.