

【原著・基礎】

先天的複合免疫不全マウスを用いた口腔カンジダ症モデルに対する
micafungin の治療効果

中井 徹・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*

T細胞, B細胞, NK細胞を先天的に欠損する複合免疫不全の N:NIH-bg-nu-xidBR 系マウスに, fluconazole 感受性の *Candida albicans* を4日間経口接種することにより惹起した口腔カンジダ症モデルに対して, 初回接種から13日後より11日間(1日2回), micafungin (MCFG) および fluconazole (FLCZ) を投与したときの治療効果を検討した。治療開始時点より治療終了後8日目にかけて, 生理食塩液投与群 (control 群) の舌には $10^4 \sim 10^5$ レベルの生菌数が継続的に検出された。また病理組織学的には, 治療開始時点以降持続的に舌粘膜上皮角質層において菌糸状に発育した *C. albicans* の感染を認め, 治療終了時点以降にはさらにそれらにตอบสนองする炎症性細胞の浸潤を認めた。この病態モデルにおいて, MCFG の 2 mg/kg 以上を投与することにより治療終了翌日の舌内生菌数は control 群と比較して有意に減少するとともに, 舌の病理像はほぼ正常に回復した。8日間の休薬後には, 2 mg/kg 投与群では生菌数の増加とともに舌粘膜に菌集落の定着を認めたが, 5 mg/kg 以上の投与群では菌数の増加がほとんど認められず, 舌組織においても正常像が維持された。MCFG の 5 mg/kg 以上と同等の治療効果は, FLCZ の 20 mg/kg 投与群において認められた。以上のことから, MCFG は FLCZ よりも低用量でマウス口腔カンジダ症モデルに対して除菌的な治療効果を示し, MCFG が本疾患の治療薬として再発の懸念が少なく有用性が高い抗真菌薬であることが示唆された。

Key words: micafungin, 口腔カンジダ症, fluconazole

口腔あるいは食道におけるカンジダ症は, 全身的細胞性免疫不全をきたした AIDS 患者をはじめ, 治療として抗癌剤や副腎皮質ホルモン剤を投与されることにより全身的免疫能の低下をきたした悪性腫瘍, 血液疾患, 糖尿病, 膠原病などの患者に合併する¹⁾。Fluconazole (FLCZ) は本疾患に対する第一選択薬として確立された存在ではあるが, 起因菌のほとんどを占める *Candida albicans* に対するその作用が静菌的であるため, 治療がいったん奏効しても再発することが多く, 長期投与あるいは間欠投与の必要が生じる²⁾。その結果として耐性株の出現を招くこと, この耐性菌は他のアゾール系抗真菌薬に対しても交差耐性を示す場合の多いことが, 臨床重要な問題となっている^{1,3)}。また, FLCZ をはじめとするアゾール系抗真菌薬はチトクローム P 450 を介した薬物代謝を阻害することが知られており, 基礎疾患に対する治療薬や他の日和見感染症に対する予防薬を併用されることが多い本疾患の患者層において, ひとつの懸念材料となっている³⁾。さらに, FLCZ に低感受性の *Candida glabrata* が分離される場合もあるなど, FLCZ が本疾患の治療薬として真に満足されているとは言い難い。

Micafungin (MCFG) はアゾール感受性の *C. albicans* はもとより, アゾール耐性 *C. albicans*, *C. glabrata* に対しても *in vitro* において, またマウス播種性カンジダ症モデルにおいてともに優れた抗真菌活性を示し, その作用は殺菌的で

あることが知られている⁴⁻⁶⁾。さらに, MCFG はその臨床用量から考えられる血漿中濃度において, ヒト肝薬物代謝酵素系に対する阻害作用を示さないことが報告されている⁷⁾。したがって, 経口投与ができないというデメリットはあるものの, MCFG は口腔・食道カンジダ症の治療において十分にその存在価値を見出せるものと考えられる。本研究では, 先天的複合免疫不全マウスを用いた口腔カンジダ症モデルに対する MCFG の治療効果を, 病巣部における生菌数の変化および病理組織学的な変化を指標に FLCZ と比較検討した。

I. 材料と方法

1. 動物

菌接種時3~5週齢の雄性 N:NIH-bg-nu-xidBR (NIH-III) 系マウス (Charles River Laboratories) を用いた。マウスは安全キャビネット内で飼育し, 飼料および飲料水は自由に摂取させた。なお, 飼料・飲料水・床敷きおよび飼育用ケージはすべて高圧蒸気滅菌したものを使用した。

2. 感染

感染には口腔カンジダ症患者より分離され, 藤沢薬品工業 (株)・薬理研究所において保存されている *C. albicans* 19002 を用いた。本菌株に対する MCFG および FLCZ の MIC (NCCLS の標準法 M 27-A による) はそれぞれ 0.0156 および 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり, 本菌株は

*大阪府大阪市淀川区加島 2-1-6

FLCZ 感受性であった。Sabouraud dextrose agar (SDA) 上で 35°C, 約 24 時間培養した菌体を滅菌生理食塩液に懸濁し, 血球計算盤にて細胞数を計測した後, 滅菌生理食塩液で希釈して接種菌液を調製した。感染初日を day 0 として day 0~3 の 4 日間, マウスに 0.1~1 × 10⁷ cells/0.2 mL/mouse の菌液を経口接種した。

3. 被験薬剤

MCFG は藤沢薬品工業 (株) において合成され品質検定された原末を生理食塩液で溶解, 希釈して使用した。FLCZ (Diflucan[®] 静注液 0.2%; ファイザー製薬) は同じく生理食塩液で希釈して使用した。MCFG (2, 5 および 10 mg/kg/回) および FLCZ (5, 10 および 20 mg/kg/回) を day 13~23 の 11 日間, 1 日 2 回静脈内に体重 10 g あたり 0.1 mL の容量で投与した。Control 群には生理食塩液を投与した。

4. 舌内生菌数による治療効果の評価

治療開始日 (day 13), 治療終了翌日 (day 24) および治療終了後 8 日目 (day 31) にマウスを安楽死させた後, 舌を無菌的に摘出した。左右に等分割した一方に 0.5 mL の滅菌生理食塩液を加えてホモジナイズし, その原液および滅菌生理食塩液で 100 倍希釈したものを SDA に接種して 35°C で 48 時間培養した。増殖したコロニー数をもとに舌内生菌数を算出し, 各群の平均値および標準誤差 (対数値) を求めた。検出限界は 10 CFU/舌であり, 検出限界未満の場合は値を 10 CFU として扱った。群間の比較は同一時点においてのみ行い,

control 群を対照として各薬剤投与群との間の有意差をノンパラメトリックな Dunnett の多重比較を用いて検定した (有意水準 5%)。

5. 病理組織学的評価

等分割して生菌数測定に供したもう一方の舌組織を, 10% リン酸緩衝ホルマリン液に浸漬して固定した。次いで常法にしたがいパラフィンに包埋し, 厚さ 3 μm の薄切切片を作製して過ヨウ素酸 Schiff (PAS) 染色を施した。光学顕微鏡 (AX 80-64 DIC, オリンパス) にて観察し, PAS 陽性の菌体量および炎症の程度について以下の基準にしたがいスコア化し, 各群の平均値を求めた。[0: 著変なし, 1: 軽度, 2: 中等度, 3: 高度]。また, 典型的な病理像について写真撮影を行った。

II. 結 果

1. 舌内生菌数に対する減少効果

マウス口腔カンジダ症モデルに対する MCFG および FLCZ の治療効果を, 本疾患の標的臓器のひとつである舌における生菌数を指標として評価した (Table 1)。Fig. 1 に実験スケジュールを示す。実験は 3 度に分けて行い, いずれの実験にも control 群および MCFG の 5 mg/kg 投与群を設けた。これらの群における結果は, すべての実験を通してほぼ一定であった。治療開始前の舌の生菌数は 4.0~5.1 log₁₀CFU であり, 生理食塩液のみを投与した control 群では治療終了翌日 (day 24), 治療終了後 8 日目 (day 31) とともに, 治療開始前と同レベルの生菌数が継続的に検出された。MCFG 投与群では day

Table 1. Tissue colony counts in tongue of micafungin- and fluconazole-treated oropharyngeal candidiasis in mice

Treatment (mg/kg)	Mean colony count ^a ; log ₁₀ CFU/tongue		
	day 13	day 24	days 31
Exp. 1			
Control	4.9 (0/4)	5.0 (0/5)	4.7 (0/5)
MCFG 2		<1.6 (3/4) ^c	4.3 (0/3)
5		<1.0 (5/5) ^b	<1.0 (5/5) ^b
10		<1.0 (5/5) ^b	<1.3 (4/5) ^c
Exp. 2			
Control	4.0 (0/4)	4.7 (0/5)	5.0 (0/5)
MCFG 5		<1.0 (5/5) ^b	<1.7 (4/5) ^b
FLCZ 5		<1.9 (2/5)	4.3 (0/5)
10		<1.3 (4/5) ^c	<2.4 (2/5)
Exp. 3			
Control	5.1 (0/6)	5.5 (0/6)	5.0 (0/5)
MCFG 5		<1.2 (5/6) ^b	<1.0 (6/6) ^b
FLCZ 20		<1.0 (6/6) ^b	<1.2 (6/7) ^b

day 13: pre-treatment, day 24: 1 day after end of treatment, day 31: 8 day after end of treatment

^aLimit of detection was 1.0 log₁₀CFU/tongue and values below the detection limit were considered to be 1.0. Each parenthesis beside the value includes the number of animals in which ≤1.0 log₁₀ CFU/tongue were detected per the number of animals tested.

^bP<0.01, ^cP<0.05: significantly low colony count was detected as compared to the control of each experiment (non-parametric Dunnett's multiple comparison test).

MCFG: micafungin, FLCZ: fluconazole

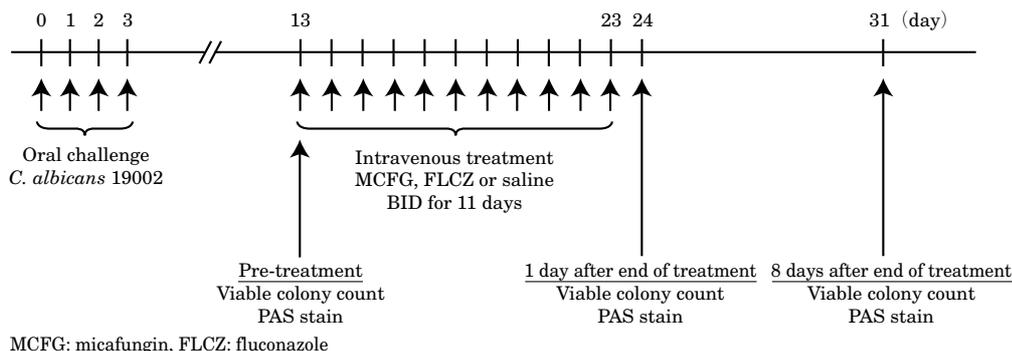


Fig. 1. Experimental scheme to evaluate the therapeutic effects of micafungin and fluconazole on a murine model of oropharyngeal candidiasis.

Male 3–5 weeks old N:NIH-*bg-nu-xid* BR mice were used. The mice were orally challenged with $0.1\sim 1 \times 10^7$ CFU of *Candida albicans* 19002 for 4 days and intravenously treated with each drug or saline from 13 to 23 days after initial challenge, twice daily.

24の全用量において、control群と比較して有意な菌数減少効果が認められた。検出された菌数は2 mg/kgの4例中3例、5 mg/kgおよび10 mg/kgの全5例において検出限界(10 CFU)以下であった。Day 31には2 mg/kg投与群で菌数の増加が認められたが、5および10 mg/kg投与群では引き続き菌数減少効果が認められ、菌数は10 mg/kg投与群の1例を除き検出限界以下であった(exp. 1)。一方、FLCZ治療群では10 mg/kg投与群においてday 24にcontrol群と比較して有意な菌数減少効果が認められ、菌数も5例中4例で検出限界以下であったが、day 31には菌数の増加が認められた。5 mg/kg投与群では、day 24に菌数減少傾向のみが認められたが、day 31にはcontrol群と同レベルまで増加した(exp. 2)。20 mg/kgにおいてはMCFGの5 mg/kg以上と同様に、いずれの測定時点においても明らかな菌数減少効果を示し、菌数はほぼすべてのマウスで検出限

界以下であった(exp. 3)。

2. 病理組織学的な治療効果

舌粘膜に感染した*C. albicans*の菌体量および炎症の程度をスコア化し、各群の平均値をTable 2に示した。*C. albicans*を初回接種した日から13日後の治療開始日(day 13)に、舌の粘膜上皮角質層に菌糸状発育した*C. albicans*の感染を認めた。Day 24およびday 31のcontrol群ではさらに、角質層深部への菌糸の侵入に伴う炎症性細胞の浸潤が認められた(Figs. 2-A, 3-A)。これに対してday 24のMCFG投与群では、2 mg/kg投与群の1例において舌粘膜表面の角質層にごくわずかな残存菌が認められたが(Fig. 2-B)、この部位以外に変化らしい変化はまったく認められず、すべてのマウスにおいて正常な組織像を呈した。MCFGの5および10 mg/kg投与群ではday 31でもこのような組織像に変化はなく正常像を維持したが(Fig. 3-C)、2 mg/kg

Table 2. Histopathological findings in tongue of micafungin- and fluconazole-treated oropharyngeal candidiasis in mice

Treatment (mg/kg)	Mean histopathological score ^{a)}					
	PAS-positive fungi			inflammation		
	day 13	day 24	days 31	day 13	day 24	days 31
Exp. 1						
Control	2.25 (0/4)	2.60 (0/5)	2.20 (4/5)	0.50 (2/4)	1.40 (1/5)	1.80 (4/5)
MCFG 2		0.25 (3/4)	1.00 (1/3)		0.00 (4/4)	0.33 (2/3)
5		0.00 (5/5)	0.00 (5/5)		0.00 (5/5)	0.00 (5/5)
10		0.00 (5/5)	0.00 (5/5)		0.00 (5/5)	0.00 (5/5)
Exp. 2						
Control	NT	2.00 (1/5)	2.40 (0/5)	NT	0.80 (2/5)	1.00 (2/5)
MCFG 5		0.00 (5/5)	0.40 (4/5)		0.00 (5/5)	0.20 (4/5)
FLCZ 5		0.40 (3/5)	0.80 (1/5)		0.00 (5/5)	0.20 (4/5)
10		0.00 (5/5)	0.40 (4/5)		0.00 (5/5)	0.00 (5/5)

day 13: pre-treatment, day 24: 1 day after end of treatment, day 31: 8 day after end of treatment

NT: not tested

^{a)}Histopathological findings were scored as follows: 0; no, 1; slight, 2; moderate, 3; high. Each parenthesis beside the value includes the number of animals whose score was 0 per the number of animals tested.

MCFG: micafungin, FLCZ: fluconazole

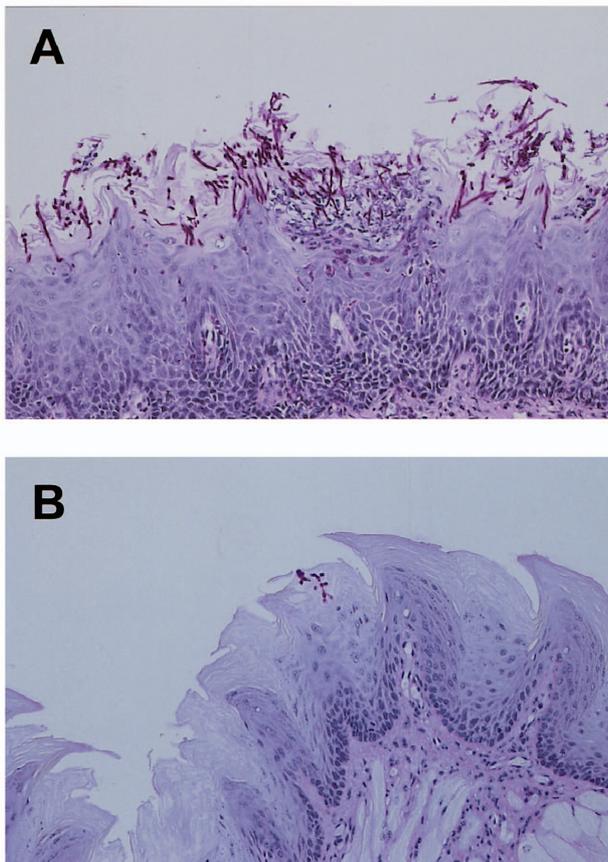


Fig. 2. Histopathological effects of micafungin on oropharyngeal candidiasis of tongue in mice, 1 day after the end of treatment.

(A) control, (B) micafungin 2 mg/kg. The stain was PAS and the magnification is $\times 110$.

投与群では舌粘膜表面の角質層に菌の定着が観察された (Fig. 3-B)。しかし、炎症像はほとんど認められず、control 群と比較して病態は明らかに軽度であった。FLCZ 投与群では、いずれの用量においても MCFG と同様に、day 24 には明らかな変化は認められなかった。Day 31 においても 10 mg/kg 投与群では明らかな変化は認められなかった (Fig. 3-E)。Day 31 の 5 mg/kg 投与群では MCFG の 2 mg/kg と同様に、角質層に菌の定着が観察されたが炎症像は control 群よりも明らかに軽度であった (Fig. 3-D)。

III. 考 察

口腔・食道カンジダ症に関していくつかの動物モデルが提唱されているが⁸⁻¹⁰、本検討に使用した N:NIH-bg-nu-xid BR マウスは T 細胞、B 細胞、NK 細胞など複数の免疫細胞を先天的に欠損した重度免疫不全マウスであり、*C. albicans* を経口接種するだけで舌や食道における粘膜カンジダ症を発症する初の動物モデルとして報告された⁸。このマウスはみずからの生体防御機構による菌の排除が困難であるため、薬剤投与終了時にわずか

でも生菌が残存していると休薬後に再増殖すると推察され、抗真菌薬の評価においてはかなりシビアなモデルであるが、除菌的な効果を評価するには最適モデルであると考えられる。本疾患の主治薬であるアゾール系抗真菌薬は、その静菌的作用ゆえの再発という懸念材料を抱えている^{2,11}。したがって、再発の懸念が少ないいわゆる「切れ味のよい」抗真菌薬は、その存在価値が大きいと考えられる。そこで本疾患モデルに対する治療効果を評価するにあたって、舌の定着菌に対する薬剤投与終了時の菌数減少効果だけでなく、休薬後の再発の有無についても検討した。

すべての実験において、治療開始時点 (day 13) より治療終了後 8 日目 (day 31) にかけて、control 群の舌には $10^4 \sim 10^5$ レベルの生菌数が継続的に検出された。病理組織学的検討からはさらに、治療開始時点で認められた菌糸状 *C. albicans* の粘膜角質層への感染は、day 24 から day 31 にかけて角質層深部への菌の侵入、およびそれに応答した炎症細胞の浸潤を伴うという、高い生菌数レベルの持続という事実からだけではうかがい知れない一連の質的な変化がとらえられた (Figs. 2-A, 3-A)。このような疾患モデルに対して、MCFG の 3 用量 (2, 5 および 10 mg/kg) すべてにおいて治療終了翌日 (day 24) には control 群と比較して明らかな菌数減少効果が認められ、組織像は正常に回復した。MCFG の 5 および 10 mg/kg 投与群では 8 日間の休薬後 (day 31) においても明らかな菌数減少効果および舌組織の正常像は持続したことから、これらの用量での治療効果は除菌的であると推察された。また、MCFG の 2 mg/kg 投与群では休薬後に菌数の増加が認められ、舌組織には菌の再定着が認められた。しかし、control 群の組織像と比較すると炎症細胞の浸潤が認められず、病変は明らかに軽度であった。このことから、2 mg/kg 投与群では治療による菌数の減少効果に伴いほとんど病変がほぼ消失したが、わずかに舌の粘膜に残存した菌あるいは消化管内に存在する菌が再度増殖したと考えられた。一方、FLCZ は *C. albicans* に対して *in vitro* では殺菌的な作用を示さないため、高用量でも除菌的な効果は望めないものと予想された。それに反して 20 mg/kg の用量では MCFG の 5 mg/kg 以上と同様その効果は除菌的であった。また、Table 1 での比較から FLCZ の 5 mg/kg の治療効果は MCFG の 2 mg/kg とほぼ同等と考えられたが、治療終了翌日の除菌に至った例数を含む菌数減少効果においてやや劣った。感染に使用した菌株は FLCZ 感受性 (MIC, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$) であったが、FLCZ が MCFG と同等の効果を発現するためには、感受性菌であっても 4 倍程度の高い投与量を必要とすることが示唆された。MCFG は FLCZ に耐性の *C. albicans* および低感受性の *C. glabrata* に対しても強い活性を示すことが知られており⁴、起因菌が FLCZ に耐性あるいは低感受性を示

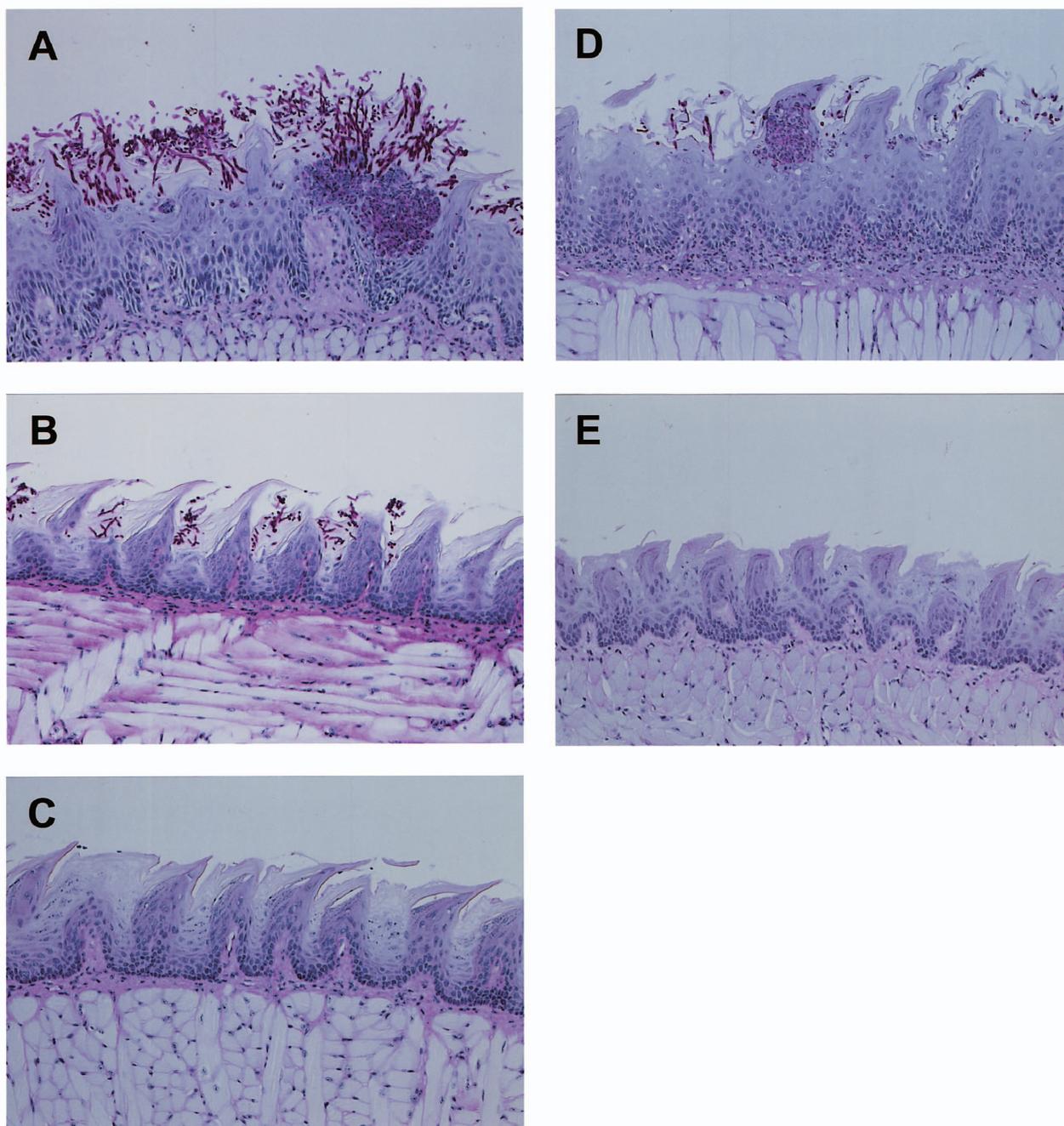


Fig. 3. Histopathological effects of micafungin and fluconazole on oropharyngeal candidiasis of tongue in mice, 8 days after the end of treatment.

(A) control, (B) micafungin 2 mg/kg, (C) micafungin 5 mg/kg, (D) fluconazole 5 mg/kg, (E) fluconazole 10 mg/kg. The stain was PAS and the magnification is $\times 110$.

す株である場合には、この差はさらに広がるものと予想される。

以上のことから MCFG はマウス口腔カンジダ症モデルに対して、少なくとも 2 mg/kg 以上の用量で治療終了直後には菌数減少効果に伴う症状改善効果を示すこと、さらに 5 mg/kg 以上の用量では休薬後にも再発を伴わない除菌的な効果を示すことが示唆された。MCFG の体内動態はヒトとマウスとは大きく異なることが明ら

かとなっており、ヒトの 50 mg (1 mg/kg 相当) とマウスの 1 mg/kg を比較すると、 $AUC_{0-\infty}$ はそれぞれ約 61 および $16 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ であり、約 3.7 倍ヒトの方が大きい^{12,13)}。また、 β 相の消失半減期はそれぞれ 15.2 および 5.34 h であり、約 2.8 倍ヒトの方が長い^{12,13)}。消化管粘膜への移行性については不明であるが、これら体内動態の相違を考慮すると、ヒトではより低用量かつ少ない投与回数で、マウスの場合と同等の治療効果が得られる

可能性があるものと推察される。したがって、MCFG は口腔カンジダ症の治療薬として除菌を伴う確実な治療効果が期待できる、有用性の高い抗真菌薬であると考えられる。

文 献

- 1) 上田良弘: 食道カンジダ症。領域別症候群シリーズ No.24: p.342~344, 日本臨牀社, 大阪, 1999
- 2) Pons V, Greenspan D, Lozada-Nur F, et al.: Oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS: Randomized comparison of fluconazole versus nystatin oral suspensions. Clin Infect Dis 24: 1204~1207, 1997
- 3) USPHS/IDSA Prevention of Opportunistic Infections Working Group: Preface to the 1997 USPHS/IDSA guidelines for the prevention of opportunistic infections in persons infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 25 (Suppl 3): S 299~312, 1997
- 4) 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
- 5) 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
- 6) Maesaki S, Hossain M A, Miyazaki Y, et al.: Efficacy of FK 463, a (1,3)- β -D-glucan synthase inhibitor, in disseminated azole-resistant *Candida albicans* infection in mice. Antimicrob Agents Chemother 44: 1728~1730, 2000
- 7) 金子勇人, 山戸康弘, 橋本知子, 他: *In vitro* における micafungin の薬物相互作用。日化療会誌 50 (S-1): 94~103, 2002
- 8) Cantorna M T, Balish E: Mucosal and systemic candidiasis in congenitally immunodeficient mice. Infect Immun 58: 1093~1100, 1990
- 9) Flattery A M, Abruzzo G K, Gill C J, et al.: New model of oropharyngeal and gastrointestinal colonization by *Candida albicans* in CD 4⁺ T-cell-deficient mice for evaluation of antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother 40: 1604~1609, 1996
- 10) Narayanan R, Joyce W A, Greenfield R A: Gastrointestinal candidiasis in a murine model of severe combined immunodeficiency syndrome. Infect Immun 59: 2116~2119, 1991
- 11) Graybill J R, Vazquez J, Darouiche R O, et al.: Randomized trial of itraconazole oral solution for oropharyngeal candidiasis in HIV/AIDS patients. Am J Med 104: 33~39, 1998
- 12) 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
- 13) 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

Therapeutic effect of micafungin on oropharyngeal candidiasis in congenitally immunodeficient mice

Toru Nakai, 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 therapeutic efficacy of micafungin against a murine model of oropharyngeal candidiasis was evaluated. Oropharyngeal candidiasis was induced in congenitally immunodeficient N:NIH-*bg-nu-xid* BR mice by oral inoculation of *Candida albicans* cells for 4 days. The mice were intravenously administered micafungin, fluconazole, or saline alone from 13 to 23 days after initial inoculation, twice daily. Therapeutic effect was evaluated as reduction in tissue colony count and histopathology in the tongue 1 day and 8 days after the end of treatment. From the initial treatment to 8 days after the end of treatment, saline-treated control mice displayed 10^4 to 10^5 *C. albicans* in the tongue. Histopathological examination revealed continuous infection of *C. albicans* pseudohyphae in keratinized mucosal layers of the tongue throughout the experiments. In addition, this infection was accompanied by infiltration of inflammatory cells after the end of treatment. In this mouse model, micafungin showed therapeutic efficacy at 2 mg/kg or higher 1 day after the end of treatment, as demonstrated by a significant reduction in viable colony count and repaired normal morphology of the tongue. After an 8 day non-treatment interval, 5 mg/kg or higher doses were still effective in terms of both colony count and histopathology, although increased counts and re-infected tongue mucosa were observed in mice treated with 2 mg/kg micafungin. The efficacy of micafungin at 5 mg/kg or higher was comparable to that of fluconazole at 20 mg/kg. These results suggest that micafungin shows an eradicated effect at a lower dose than fluconazole in this mouse model, therefore it has potential usefulness as a therapeutic drug with a low incidence of relapse.