

【原著・基礎】

Micafungin の代謝物 M 1, M 2 および M 5 の抗真菌活性

池田 文昭・大友 寿美・若井 芳美・武藤誠太郎

藤沢薬品工業株式会社薬理研究所*

ラットまたはイヌに micafungin (MCFG) を静脈内投与した時に臓器または体液中に検出される代謝物のうち、構造が同定されている M 1, M 2 および M 5 の各種真菌類に対する *in vitro* 抗真菌活性および肺, 肝臓および腎臓で比較的高濃度に検出される M 1 および M 2 の MIC におよぼす血清添加の影響およびマウスの *Candida albicans* 全身感染に対する防御効果を MCFG のそれらと比較検討した。M 1 は, *Candida* 属 7 菌種, *Saccharomyces cerevisiae* および *Aspergillus* 属 6 菌種に対して 0.0625 ~ 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MIC を示し, MCFG より 4~16 倍劣る活性を示した。*Cryptococcus neoformans* および *Trichosporon cutaneum* に対する MCFG の MIC は >64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であったが, M 1 はそれぞれ 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の MIC を示した。M 2 はいずれの菌種においても MCFG とほぼ同等の活性を示した。また, M 5 の *Candida* 属および *Aspergillus* 属に対する MIC は MCFG に比べて 128 倍以上高値であった。*C. albicans* FP 633 に対する MCFG, M 1 および M 2 の MIC はマウスまたはヒト血清の添加により上昇が認められ, いずれの化合物も同等の MIC を示した。さらに, マウスの *C. albicans* FP 633 全身感染に対する MCFG, M 1 および M 2 の ED₅₀ 値もほぼ同等の値を示したことから, MCFG の感染防御効果に M 1 および M 2 が寄与していることが示唆された。

Key words: micafungin, 代謝物, 抗真菌活性

ラットまたはイヌに ¹⁴C-micafungin (MCFG) を静脈内投与したときの血漿, 臓器, 尿, 糞および胆汁には少なくとも 6 種類の代謝物が確認されているが, そのうち M 1 (カテコール体), M 2 (メトキシ体), M 3 (開環体) および M 5 (側鎖の水酸化体) の構造は同定されている¹⁾。ラットに ¹⁴C-MCFG を静脈内投与したときの血漿中の主代謝物は M 5 で投与 6 時間後の放射能の 15.6% を占めるが, M 1 および M 2 濃度は非常に低い¹⁾。一方, 肺, 肝臓および腎臓では時間の経過とともに M 1 および M 2 の割合が増え, 投与 24 時間後の肝臓では M 1 および M 2 がそれぞれ 26.9% および 22.8% を占める¹⁾。

したがって実験感染において MCFG の有効性を考察するためにはそれら代謝物の抗真菌活性を考慮に入れる必要がある。そこで本報告では, M 1, M 2 および M 5 の *in vitro* 抗真菌活性と *in vivo* 感染防御活性を MCFG の場合と比較検討した。

I. 材料と方法

1. 使用薬剤

Micafungin (MCFG) およびその代謝物 M 1, M 2 および M 5 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。

2. 使用菌株

ATCC 株は American Type Culture Collection (VA, USA) 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。*Candida albicans* FP 633 は, 順天堂大学試験部より分与された。

3. MIC (最小発育阻止濃度) 測定法

MIC の測定には NCCLS の M 27-A に準拠した微量液体希釈法を用いた²⁾。

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。

2) 薬剤の調製

MCFG および M 5 は滅菌蒸留水に溶解し, M 1 および M 2 は dimethyl sulfoxide に溶解し抗真菌薬含有培地における最終濃度は 1% 以下にした。

3) 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 倍希釈し, 96 穴マイクロプレートに 100 μL ずつ分注した。

4) 接種用菌液の調製

酵母は Sabouraud dextrose agar (SDA; 2% glucose, 1% Bacto peptone, 1.5% Bacto agar) で 35°C で約 24 時間好気培養した。*Aspergillus* 属の菌株は Potato dextrose agar で 30°C, 7~10 日間好気培養した。菌体または分生子懸濁液の最終の菌量は約 1.0~2.5 $\times 10^8$ cells/mL に調製した。

*大阪府大阪市淀川区加島 2-1-6

Table 1. Antifungal activity of metabolites of micafungin

Organism	MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^{a)}			
	MCFG	M 1	M 2	M 5
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	0.0078	0.0625	0.0078	8
<i>Candida tropicalis</i> TIMM 0313	0.0313	0.25	0.0313	32
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	0.0156	0.125	0.0313	32
<i>Candida kefyr</i> ATCC 28838*	0.0625	1	0.125	64
<i>Candida krusei</i> IFM 5460	0.125	1	0.25	>64
<i>Candida parapsilosis</i> IFM 5774	0.5	4	1	>64
<i>Candida stellatoidea</i> IFM 5491	0.0156	0.0625	0.0313	16
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	0.0625	0.5	0.125	>64
<i>Cryptococcus neoformans</i> TIMM 0354*	>64	16	>64	>64
<i>Trichosporon cutaneum</i> IFM 40140	>64	16	>64	>64
<i>Aspergillus fumigatus</i> TIMM 0063*	0.0078	0.125	0.0156	1
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275*	0.0156	0.0625	0.0078	4
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9643*	0.0156	0.25	0.0156	16
<i>Aspergillus terreus</i> IFM 40852*	0.0156	0.125	0.0156	4
<i>Aspergillus nidulans</i> IFM 5369*	0.0156	0.125	0.0156	8
<i>Aspergillus versicolor</i> IFM 41406*	0.0156	0.125	0.0156	2

^{a)}Medium: RPMI 1640/165 mM Mops (pH 7.0)

Inoculum size: 1.0 to 2.5×10^3 cells/mL

Culture: 35°C, 2 days (*3 days)

MCFG: micafungin

5) 培養

35°C, 2日ないしは3日間好気培養した。

6) 終末点の判定

各ウエルの発育の程度をリーディングミラーで観察し、M 27-A の基準によりスコア化 (0~4) した。

7) MIC の定義

酵母に対する MIC は、スコアが 0 を示した最小薬剤濃度とし、*Aspergillus* 属に対する MIC は、スコアが 2 以下を示した最小薬剤濃度とした。

4. 血清添加の影響

健康成人男子および ICR 系マウスから採取した血清を 0.22 μm ミリポアフィルターでろ過滅菌し、56°C で 30 分間加熱処理して用いた。血清濃度が 10, 30, 90% となるように RPMI/MOPS で調製した。この調製培地を用いて *C. albicans* FP 633 に対する MIC を前述の MIC 測定法にしたがい測定した。

5. マウス全身感染

マウス (ICR 系雄性, 4 週齢, 日本エスエルシー (株), 浜松) に、cyclophosphamide (200 mg/kg/day) を感染 4 日前および 1 日後に腹腔内投与し顆粒球減少症を惹起した。Sabouraud Dextrose Agar で 35°C, 24 時間好気培養した *C. albicans* FP 633 の菌体を生理食塩液に懸濁し、適宜生理食塩水で希釈して 2.2×10^4 CFU/mouse の菌量をマウスの静脈より接種した。MCFG, M 1 および M 2 はポリエチレングリコール (PEG 400) で溶解し、生理食塩液で希釈して投与液中の PEG 400 の終濃度が 20% になるように調製した。この投与液を、感染 1 時間後より 1 日 1 回 4 日間静脈内に投与した。

感染後のマウスの生死を感染 15 日後まで観察し、感染後 15 日目の各薬剤投与群の生存数をもとに probit 法³⁾により ED₅₀ 値を算出した。

II. 結 果

1. 抗真菌スペクトル

MCFG の 3 種の代謝物, M 1, M 2 および M 5 の各種真菌類に対する MIC を MCFG と比較検討した成績を Table 1 に示した。*Candida* 属 7 菌種, *S. cerevisiae* および *Aspergillus* 属 6 菌種に対する M 1 の MIC は 0.0625~4 $\mu\text{g/mL}$ で、MCFG と比較すると 4~16 倍劣った。また、*C. neoformans* および *T. cutaneum* に対する MCFG の MIC は >64 $\mu\text{g/mL}$ であったが、M 1 の MIC はともに 16 $\mu\text{g/mL}$ を示した。一方、*Candida* 属 7 菌種, *S. cerevisiae* および *Aspergillus* 属 6 菌種に対する M 2 の MIC は、0.0078~1 $\mu\text{g/mL}$, *C. neoformans* および *T. cutaneum* に対する MIC は >64 $\mu\text{g/mL}$ であ

Table 2. Influence of serum on MIC of micafungin, M 1 and M 2

Organism	Addition of serum	MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^{a)}		
		MCFG	M 1	M 2
<i>C. albicans</i> FP 633	none	0.0156	0.0625	0.0313
	10% (Hunan)	0.25	0.25	0.25
	30% (Hunan)	1	1	1
	90% (Hunan)	2	1	2
	90% (Mouse)	1	1	2

^{a)}Medium: RPMI 1640/165 mM Mops (pH 7.0)

Inoculum size: 1.0×10^3 cells/mL

Culture: 35°C, 2 days

MCFG: micafungin

Table 3. Efficacy of micafungin, M 1 and M 2 in mouse model of disseminated candidiasis^{a)}

Organism	Inoculum ^{b)} (CFU)	ED ₅₀ : mg/kg ^{c)} (95% confidence intervals)		
		MCFG	M 1	M 2
<i>C. albicans</i> FP 633	2.2 × 10 ⁴	0.18 (0.13–0.25)	0.15 (0.11–0.21)	0.16 (0.12–0.22)

^{a)} Male 4-weeks-old ICR mice (8 mice per group) were used.

Cyclophosphamide was intraperitoneally administered at 200 mg/kg, 4 days before and 1 day after infection

^{b)} *C. albicans* FP 633 was suspended in saline and injected intravenously.

^{c)} Calculated based on the survival rate 15 days after infection by probit analysis.

MCFG: micafungin

り、MCFGとほぼ同等の値であった。一方、M5の *Candida* 属および *Aspergillus* 属に対するMICはMCFGに比べて128倍以上高値を示し、*C. neoformans* および *T. cutaneum* に対してはMCFGと同様に活性を示さなかった。

2. 抗真菌活性におよぼす血清添加の影響

MCFG, M1およびM2の *C. albicans* FP 633 に対するMICにおよぼすマウス血清およびヒト血清の影響をTable 2に示した。MCFG, M1およびM2のMICは血清非添加時にはそれぞれ0.0156, 0.0625および0.0313 μg/mLであったが、90%マウス血清または30%以上のヒト血清を添加することによりいずれも1~2 μg/mLまで上昇した。

3. マウス感染防御活性

C. albicans FP 633 感染マウスに対して感染1時間後より1日1回4日間、MCFG, M1およびM2を静脈内投与したときの感染15日後の生存数から推定したED₅₀値はそれぞれ0.18, 0.15および0.16 mg/kgであり、ほぼ同等であった (Table 3)。

III. 考 察

ラットにMCFGを静脈内投与した後の主要代謝物がM1, M2およびM5であることから¹⁾、これらの代謝物の *in vitro* および *in vivo* 抗真菌活性を検討し、MCFG投与による感染防御効果におけるこれら代謝物の寄与について推察した。M1, M2およびM5の *Candida* 属および *Aspergillus* 属に対するMICをMCFGと比較すると、M1はMCFGよりやや劣り、M2はMCFGと同等の活性を有するが、M5は著しく活性の弱い代謝物であった。M1およびM2はMCFGと同様に高いヒト血清蛋白結合率を示すことが報告されており⁴⁾、それを反映してMICにおよぼすマウスおよび

ヒト血清添加の影響を受け、いずれの化合物もほぼ同等のMICを示した。また、M1およびM2の *C. albicans* 感染に対する感染防御活性はMCFGとほぼ同等であった。*C. albicans* FP 633に対するM1およびM2のMICはMCFGに比べそれぞれ4倍および2倍劣るが、90%マウス血清添加時のMICはそれぞれMCFGの1倍および2倍であり、ほぼ同等の抗真菌活性であると考えられる。MCFGをラットに静脈内投与した後のこれら代謝物の生体内分布は、M1およびM2が肺、肝臓および腎臓などで高い割合で分布することが報告されている¹⁾。一方、マウスにおけるこれら代謝物の生体内分布は明確ではないが、マウスにおいてもラットと同様の代謝パターンを示すと考えられることから、マウス感染モデルにおけるMCFGの感染防御効果には、代謝物M1およびM2の抗真菌活性も寄与している可能性が示唆された。

文 献

- 金子勇人, 山戸康弘, 寺村有里子, 他: ラットおよびイヌにおける micafungin の代謝物。日化療会誌 50 (S-1): 88~93, 2002
- 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
- 吉村 功: LD 50 の推定法。毒性・薬効データの統計解析—事例研究によるアプローチ— (吉村 功 編著), p.226~233, サイエンス社, 東京, 1997
- 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

Antifungal activities of the M 1, M 2 and M 5 metabolites of micafungin

Fumiaki Ikeda, Kazumi Otomo, Yoshimi Wakai
and Seitaro Mutoh

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

The antifungal activities of the M 1, M 2 and M 5 micafungin (MCFG) metabolites were evaluated by MIC using broth supplemented with/without serum, and assessed in a murine disseminated candidiasis model. The MICs of M 1 (0.0625 to 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were 4 to 16 times greater than MCFG against *Candida* species, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus* species. Against *Cryptococcus neoformans* and *Trichosporon cutaneum*, M 1 displayed MICs of 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, whereas for MCFG the MICs were over 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The MICs of M 2 were comparable to those of MCFG against all strains used this study. The MICs of M 5 were over 128 times greater than for MCFG against *Candida* and *Aspergillus* species. MIC values for the M 1 and M 2 metabolites against *C. albicans* FP 633 in a serum-supplemented broth were comparable to those of MCFG. The therapeutic effects of the M 1 and M 2 metabolites against murine candidiasis induced by *C. albicans* FP 633 were comparable to that of MCFG, with similar ED_{50} values. These results suggest that the therapeutic effect of treatment of experimental fungal infection with MCFG reflects not only the antifungal activity of the parent MCFG, but also those of the primary metabolites, M 1 and M 2.