

## 【原著・基礎】

## Micafungin と amphotericin B, itraconazole および fluconazole との併用効果

二木 芳人<sup>1)</sup>・吉田耕一郎<sup>1)</sup>・松島 敏春<sup>1)</sup>・中島 正光<sup>2)</sup>・中井 徹<sup>3)</sup>・大友 寿美<sup>3)</sup>  
若井 芳美<sup>3)</sup>・松本 哲<sup>3)</sup>・波多野和男<sup>3)</sup>・池田 文昭<sup>3)</sup>・武藤誠太郎<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>川崎医科大学呼吸器内科

<sup>2)</sup>広島大学医学部第二内科

<sup>3)</sup>藤沢薬品工業株式会社薬理研究所\*

*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* および *Cryptococcus neoformans* に対するキャンディン系抗真菌薬 micafungin (MCFG) と amphotericin B (AMPH-B), itraconazole (ITCZ) および fluconazole (FLCZ) との *in vitro* 併用効果を, チェッカーボード法を用いて検討した。*C. albicans* に対して MCFG と AMPH-B, ITCZ および FLCZ とを併用することにより, それぞれ 41%, 85% および 85% の株に相加作用が認められた。*A. fumigatus* に対しても同様に, それぞれ 67%, 87% および 13% の株に相加以上の作用を示した。*C. neoformans* に対しては, AMPH-B と併用したとき 67% の株に相乗作用, 33% に相加作用が認められた。*C. neoformans* に対して ITCZ と併用すると, 83% の株に拮抗作用が認められた。*In vitro* で相加作用が認められた *A. fumigatus* IFM 40836 を用いて, マウス肺アスペルギルス症モデルに対する MCFG と AMPH-B の *in vivo* 併用効果を検討した。感染 6 日後における MCFG の 2 mg/kg と AMPH-B の 0.5 mg/kg とを併用投与した群の肺内生菌数は, control 群だけでなくそれぞれの単独投与と比較しても有意に低値であった。病理組織学的に検討した肺組織傷害, 菌糸の伸長および好中球浸潤に対しても, 併用投与群では強い抑制効果を示した。さらに, MCFG の 1 mg/kg と AMPH-B の 0.25 mg/kg とを併用投与したとき, それらの 2 倍用量である MCFG の 2 mg/kg および AMPH-B の 0.5 mg/kg をそれぞれ単独投与したときと比較して高い有効性を示し, 治療効果が相乗的であることが示された。以上のように, *in vitro*, *in vivo* のいずれにおいても MCFG は AMPH-B との間に優れた併用効果を示し, これら 2 薬剤の併用療法が臨床的にも有効である可能性が示唆された。さらに, MCFG と他の既存薬との併用療法についても臨床での有用性が期待される。

**Key words:** チェッカーボード法, マウス, 肺アスペルギルス症, 併用効果

移植, ステロイド薬投与, AIDS などの免疫不全患者にとって, 深在性真菌症などの日和見感染症は深刻な問題である<sup>1)</sup>。特に, *Candida*, *Aspergillus* および *Cryptococcus* を起因菌とする深在性真菌症は, 診断が困難であることに加えて時に難治性であり, これらの患者にとってその基礎疾患以上に生命を脅かす存在となっている<sup>2,3)</sup>。これらの深在性真菌症に対する治療薬としては 5-fluorocytosine (5-FC), amphotericin B (AMPH-B), nystatin などのポリエン系抗真菌薬, miconazole, fluconazole (FLCZ), itraconazole (ITCZ) などのアゾール系抗真菌薬があるが, それぞれに薬効不足, 副作用あるいは耐性菌の出現といった問題を抱えており<sup>4-6)</sup>, 既存の抗真菌薬のなかには安全性および有効性の両面で真に満足されたものはない。このような現状において難治性の深在性真菌症を単剤で治療することは困難であるが, いくつかの *in vitro* および *in vivo* の非臨床研究によって AMPH-B の毒性とアゾール薬や 5-FC の薬効不足とを相補するような併用療法の有用性が示され<sup>7-12)</sup>, 臨床現場においても難治性

の深在性真菌症に対しては併用療法が推奨されている<sup>13,14)</sup>。

Micafungin (MCFG) は病原性真菌の主要な細胞壁構成成分である 1,3- $\beta$ -D-glucan 合成の選択的な阻害剤であり<sup>15)</sup>, 既存の抗真菌薬とは異なる作用メカニズムを有するため, 他剤との併用効果が期待できる。また, MCFG は *in vitro* において *Candida* 属および *Aspergillus* 属に対して幅広いスペクトルと優れた活性を有すること, さらに *in vivo* においてもマウスの播種性カンジダ症および肺アスペルギルス症モデルに対して優れた有効性を示すことが報告されている<sup>16-19)</sup>。したがって, これらの深在性真菌症に対して単独でも十分な治療効果を得られるものと推察されるが, 難治性の症例に対しては無効となることも懸念され, その場合の対処法を他剤との併用療法に求めておくことは重要である。また, 抗真菌活性の増強やスペクトルの拡大を意図するのみでなく, 負の薬物相互作用, 特に薬効面では拮抗作用の有無について検討しておくこともまた重要なことである。

このような観点から本研究では, *Candida albicans*,

\*大阪府大阪市淀川区加島 2-1-6

*Aspergillus fumigatus* および *Cryptococcus neoformans* に対する MCFG と AMPH-B, ITCZ および FLCZ との相互作用を *in vitro* で検討し、さらにマウス肺アスペルギルス症モデルに対する MCFG と AMPH-B との併用効果について検討した。

## I. 材料と方法

### 1. チェッカーボード法による *in vitro* 併用効果

#### 1) 使用薬剤

MCFG は藤沢薬品工業株式会社において合成され品質検定された原末を使用した。併用薬として AMPH-B (Fungizone<sup>®</sup>静注用; プリストル・マイヤーズスクイブ株式会社), ITCZ (Itrazole<sup>®</sup>Cap. 50; ヤンセン協和株式会社) および FLCZ (Diflucan<sup>®</sup>静注液 0.2%; ファイザー製薬株式会社) を使用した。

#### 2) 使用菌株

藤沢薬品工業株式会社薬理研究所において収集保存された *C. albicans* 27 株, *A. fumigatus* 30 株, および *C. neoformans* 18 株を使用した。*C. albicans* および *C. neoformans* は使用直前に Sabouraud dextrose agar (SDA) 上で 35℃, 24 時間前培養した菌体を用いた。*A. fumigatus* は Potato dextrose agar (PDA) 上で 30℃, 7 日間前培養し、分生子を採取して使用時まで 4℃ で保存した。

#### 3) 薬剤プレートの作製

MCFG および AMPH-B は滅菌蒸留水に、ITCZ は dimethyl sulfoxide に溶解した。これらの原液および FLCZ の市販溶液を測定培地 [RPMI 1640 (グルタミン添加, 重炭酸ナトリウム無添加)/0.165 M 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (pH 7.0)] で希釈し、最終試験濃度 [*C. albicans* に対して MCFG; 0.125~0.002, AMPH-B; 8~0.0156, ITCZ; 0.5~0.001, FLCZ; 4~0.0078 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), *C. neoformans* に対して MCFG; 16~0.25, AMPH-B; 2~0.0039, ITCZ; 0.5~0.001, FLCZ; 32~0.0625 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), そして *A. fumigatus* に対して MCFG; 0.125~0.002, AMPH-B; 8~0.0156, ITCZ; 4~0.0078, FLCZ; 64~0.125 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )] の 4 倍濃度液を調製した。MCFG の一濃度液を 96 穴マイクロプレートの横方向のウエルに、併用薬を縦方向に、全試験濃度について各 50  $\mu\text{L}$  ずつ分注して混合し、2 つの薬剤の設定濃度におけるすべての組み合わせの混合液を作製した。

#### 4) 菌液接種

前培養プレートから生理食塩液に懸濁した *C. albicans* および *C. neoformans* の菌液、および *A. fumigatus* の保存分生子懸濁液中の細胞数を、血球計算盤を用いて計測した。測定培地で希釈して最終接種菌量の 2 倍濃度に調製し、マイクロプレートの各ウエルに 100  $\mu\text{L}$  ずつ接種した (最終接種菌量は *C. albicans* が  $1 \times 10^8$ , *C. neoformans* が  $2.5 \times 10^8$ , *A. fumigatus* が  $1$

$\times 10^8$  cells/mL)。

#### 5) 培養および判定

菌液を接種したプレートをプレートミキサーで振盪して菌液と薬剤混合液とを十分に混和し、35℃ で 48 時間 (*C. albicans*) または 72 時間 (*C. neoformans* および *A. fumigatus*) 好気培養した。各ウエルの発育の程度はリーディングミラーで観察し、NCCLS の抗真菌薬感受性測定試験ガイドライン M 27-A<sup>20</sup> の基準にしたがってスコア化 (0~4) した。MIC (最小発育阻止濃度) 判定のエンドポイントは AMPH-B との併用の場合、*C. albicans* および *C. neoformans* に対してはスコア 0, *A. fumigatus* に対してはスコア 2 以下を示した最小薬剤濃度とし、ITCZ および FLCZ との併用の場合は全菌種に対してスコア 2 以下を示した最小薬剤濃度とした。

#### 6) 併用効果の判定

併用効果の評価は、fractional inhibitory concentration (FIC) index [= (MCFG の併用時 MIC/MCFG の単独時 MIC) + (併用薬の併用時 MIC/併用薬の単独時 MIC)] にもとづいて行った。FIC index を求めるウエルは、併用効果が相乗的または相加的な場合は FIC index が最小となるウエルとし、併用効果が拮抗的な場合は FIC index が最大となるウエルとした。FIC index  $\leq 0.5$  ならば相乗作用,  $0.5 < \text{FIC index} \leq 1$  ならば相加作用,  $1 < \text{FIC index} \leq 2$  ならば無作用, そして FIC index  $> 2$  ならば拮抗作用と判定した<sup>12)</sup>。

### 2. マウス肺アスペルギルス症モデルに対する *in vivo* 併用効果

#### 1) 使用薬剤

MCFG および AMPH-B を、両剤ともに 5% ブドウ糖液に溶解して使用した。

#### 2) マウス肺アスペルギルス症

5 週齢の雄性 BALB/c 系マウスを日本チャールス・リバー株式会社より購入し、飲料水および飼料を自由に与えた。PDA 上で 30℃, 7 日間培養した *A. fumigatus* IFM 40836 の菌体から分生子を採取し、 $\text{OD}_{600\text{nm}} = 2.5$  となるように生理食塩液に懸濁して接種菌液とした。易感染状態を惹起するために 100 mg/kg の hydrocortisone (ナカライテスク) を感染 1 日前および 3 時間前に皮下投与したマウスに、ペントバルビタール (50 mg/kg, 静脈内投与) による麻酔下で、接種菌液 50  $\mu\text{L}$  を経鼻的に接種した。感染菌量は  $4.9 \times 10^8$  CFU であった。また、感染マウスの易感染状態を維持するために 100 mg/kg の hydrocortisone を感染 1 日後に、さらに 50 mg/kg を感染 3, 6 および 9 日後に皮下投与した。

#### 3) 薬剤投与

薬剤は感染 1 日後より 9 日間、マウス尾静脈内に投与した。投与用量は MCFG が 1 および 2 mg/kg, AMPH-B が 0.25 および 0.5 mg/kg とし、さらにそれらの低用量どうしおよび高用量どうしを併用投与した。Con-

control 群には5%ブドウ糖液を投与した。なお、MCFGの1 mg/kg 投与群, AMPH-Bの0.25 mg/kg 投与群およびそれらの併用群を低用量グループ, MCFGの2 mg/kg 投与群, AMPH-Bの0.5 mg/kg 投与群およびそれらの併用群を高用量グループとした。

#### 4) 肺内生菌数の測定

感染6日後に各群5匹のマウスをペントバルビタール麻酔下で脱血屠殺した後, 肺を摘出した。肺を滅菌生理食塩液中でホモジナイズした後, 常法にしたがって肺内生菌数(logCFU/肺)を測定し, 各群の平均値および標準誤差を求めた。

#### 5) 病理組織学的評価

感染6および10(併用群のみ)日後に各群5匹(control 群は3匹)のマウスをペントバルビタール麻酔下で脱血屠殺した後, 肺を摘出した。また, 非感染群としてhydrocortisoneのみを投与した3匹のマウスを感染10日後に屠殺し, 同様に肺を摘出した。肺は10%リン酸緩衝ホルマリン液にて固定後パラフィンに包埋し,

薄切した切片にヘマトキシリン・エオジン(HE), 過ヨウ素酸Schiff(PAS)およびGrocott染色を施した。標本は光学顕微鏡(AX80-64DIC, オリンパス)で観察し, 感染6日後の標本について組織傷害, 好中球浸潤(気管支, 肺胞), 肺胞内のマクロファージおよび菌糸の伸長(気管支, 肺胞)の程度を評価した。得られた所見を以下の定義によりスコア化し, 各群のスコアの平均値および標準誤差を算出した。スコアの定義は, 著変なし(-); 0, 軽度(±); 1, 中等度(+); 2, 高度(++); 3, およびきわめて高度(+++); 4とした。また, 典型的な病理像について写真撮影を行った。

#### 6) 統計学的解析

平均値の差の検定として肺内生菌数にはTukeyの多重比較, 病理スコアにはノンパラメトリックなTukeyの多重比較を用いた。各用量グループにおいて, control 群と各群との比較およびグループ内での群間比較を行い, 有意差を5%水準で検定した。

Table 1. Effects of micafungin and other antifungal agents combined *in vitro*

| Organism<br>(no. of isolates)            | Combined<br>drug | Combination effect <sup>a)</sup> |                        |                           |                            |
|--|------------------|----------------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------------|
|  |                  | synergistic <sup>b)</sup>        | additive <sup>b)</sup> | indifferent <sup>b)</sup> | antagonistic <sup>b)</sup> |
| <i>C. albicans</i><br>(27) <sup>c)</sup> | AMPH-B           | 0                                | 11 (41%)               | 16 (59%)                  | 0                          |
|  | ITCZ             | 0                                | 22 (85%)               | 4 (15%)                   | 0                          |
|  | FLCZ             | 0                                | 22 (85%)               | 4 (15%)                   | 0                          |
| <i>A. fumigatus</i><br>(30)              | AMPH-B           | 1 (3%)                           | 19 (63%)               | 10 (33%)                  | 0                          |
|  | ITCZ             | 1 (3%)                           | 25 (83%)               | 4 (13%)                   | 0                          |
|  | FLCZ             | 0                                | 4 (13%)                | 26 (87%)                  | 0                          |
| <i>C. neoformans</i><br>(18)             | AMPH-B           | 12 (67%)                         | 6 (33%)                | 0                         | 0                          |
|  | ITCZ             | 0                                | 0                      | 3 (17%)                   | 15 (83%)                   |
|  | FLCZ             | 0                                | 0                      | 18 (100%)                 | 0                          |

<sup>a)</sup> *In vitro* checkerboard technique was performed according to the NCCLS M 27-A microdilution method.

<sup>b)</sup> FIC index ≤ 0.5: synergistic, 0.5 < FIC index ≤ 1: additive, 1 < FIC index ≤ 2: indifferent, FIC index > 2: antagonistic.

<sup>c)</sup> 26 isolates were tested in the combination study with ITCZ and FLCZ.

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

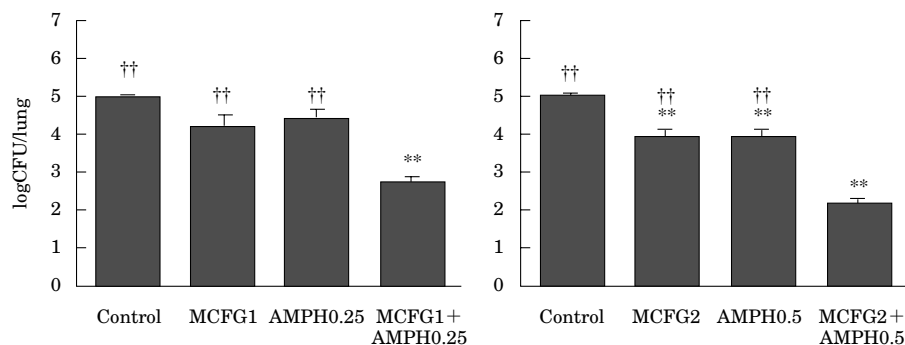


Fig. 1. Effect of micafungin and amphotericin B in combination on fungal colony counts in lungs of pulmonary aspergillosis in mice.

MCFG: micafungin, AMPH: amphotericin B(mg/kg). Values are given as means ± S.E. \*\* and †† indicate significant difference ( $P < 0.01$ ) from the controls and the combinations, respectively, assessed by Tukey multiple comparisons.

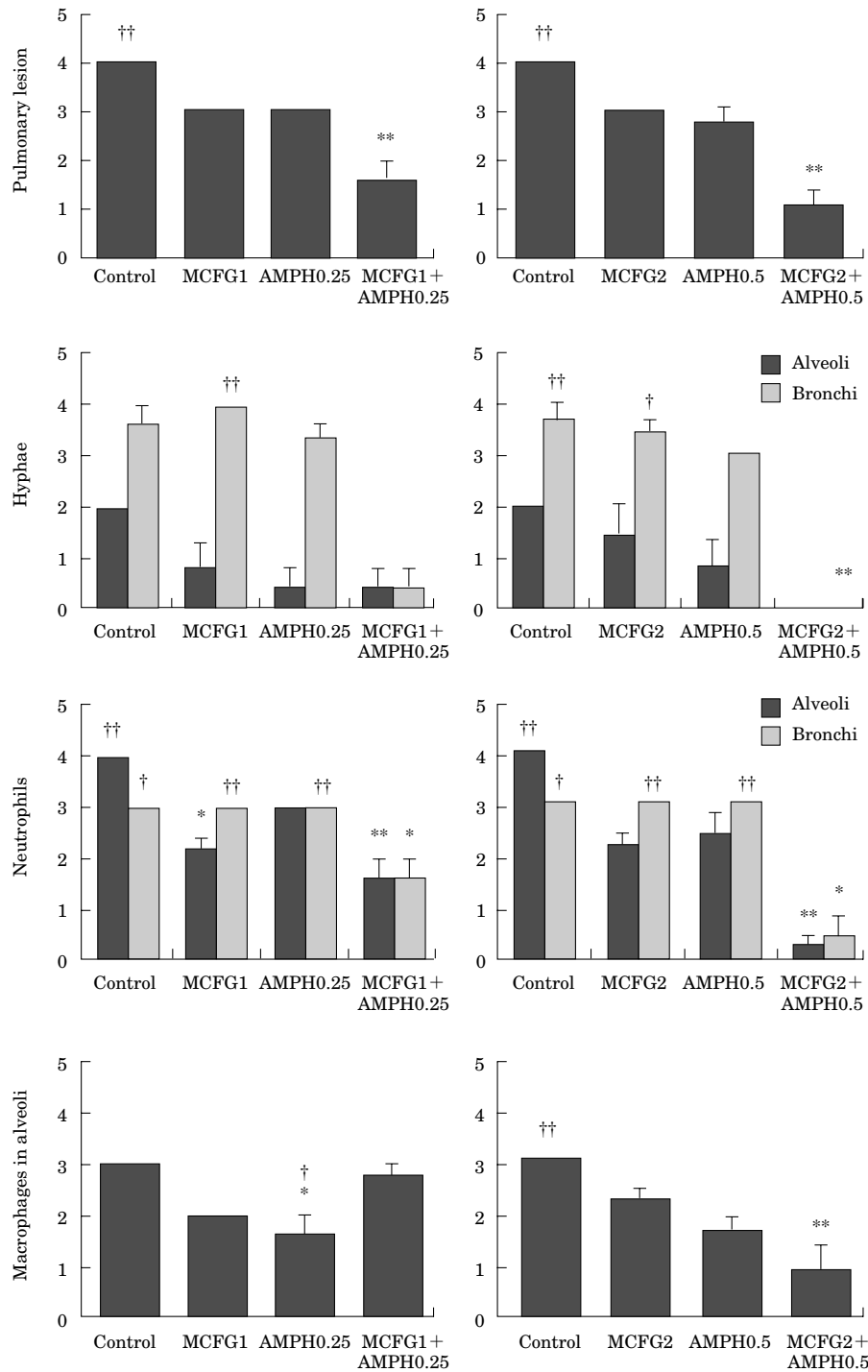


Fig. 2. Effects of micafungin and amphotericin B in combination on histopathological scores of pulmonary aspergillosis in mice.

MCFG: micafungin, AMPH: amphotericin B (mg/kg). Values are given as means of scores  $\pm$  S.E. \* and \*\* indicate significant difference ( $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively) from the controls assessed by non-parametric Tukey multiple comparisons. † and †† indicate significant difference ( $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively) from the combinations assessed by non-parametric Tukey multiple comparisons.

## II. 結 果

### 1. チェッカーボード法による *in vitro* 併用効果

*C. albicans* 27 株 (ITCZ および FLCZ は 26 株), *A. fumigatus* 30 株および *C. neoformans* 18 株に対する

MCFG と AMPH-B, ITCZ および FLCZ との *in vitro* における併用効果を, チェッカーボード法を用いて検討した成績を Table 1 に示した。

#### 1) AMPH-B との併用効果

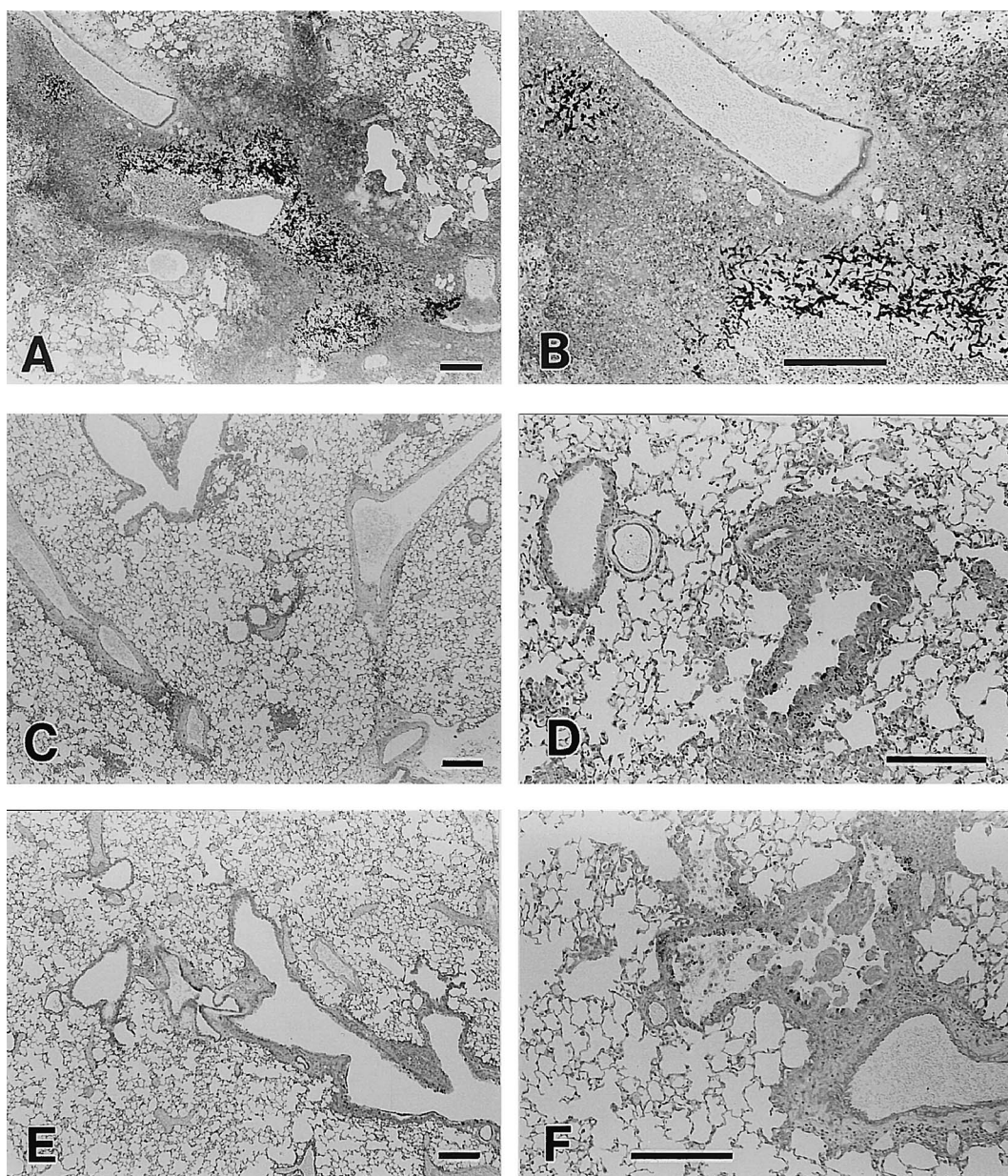


Fig. 3. Histopathological effects of micafungin (MCFG) and amphotericin B (AMPH-B) in combination on pulmonary aspergillosis in mice. (A and B) Control 6 days after infection, (C and D) 1 mg/kg MCFG plus 0.25 mg/kg AMPH-B 6 days after infection, (E and F) 1 mg/kg MCFG plus 0.25 mg/kg AMPH-B 10 days after infection. The stain was PAS and bars represent 200  $\mu$ m.

MCFGとAMPH-Bとを同時に作用させたとき、*C. albicans*の27株中11株(41%)、*A. fumigatus*の30株中19株(63%)に対して相加作用を示した。*C. neoformans*に対しては特に優れた併用効果を示し、18株中12株(67%)に相乗作用、残りの6株に相加作用が認められた。*C. albicans*および*A. fumigatus*のその他の菌株に対しては無作用であり、拮抗作用は認められなかった。

#### 2) ITCZとの併用効果

MCFGとITCZとを同時に作用させたとき、*C. albicans*の26株中22株(85%)および*A. fumigatus*

の30株中25株(83%)に相加作用、*A. fumigatus*の1株に相乗作用が認められた。一方、*C. neoformans*に対しては相加および相乗作用ともに認められず、18株中15株(83%)に拮抗作用が認められた。*C. albicans*および*A. fumigatus*に対しては拮抗作用を示さなかった。

#### 3) FLCZとの併用効果

MCFGとFLCZとを同時に作用させたとき、*C. albicans*の26株中22株(85%)および*A. fumigatus*の30株中4株(13%)に相加作用が認められた。*C. neoformans*に対してはすべての株に対して無作用であ

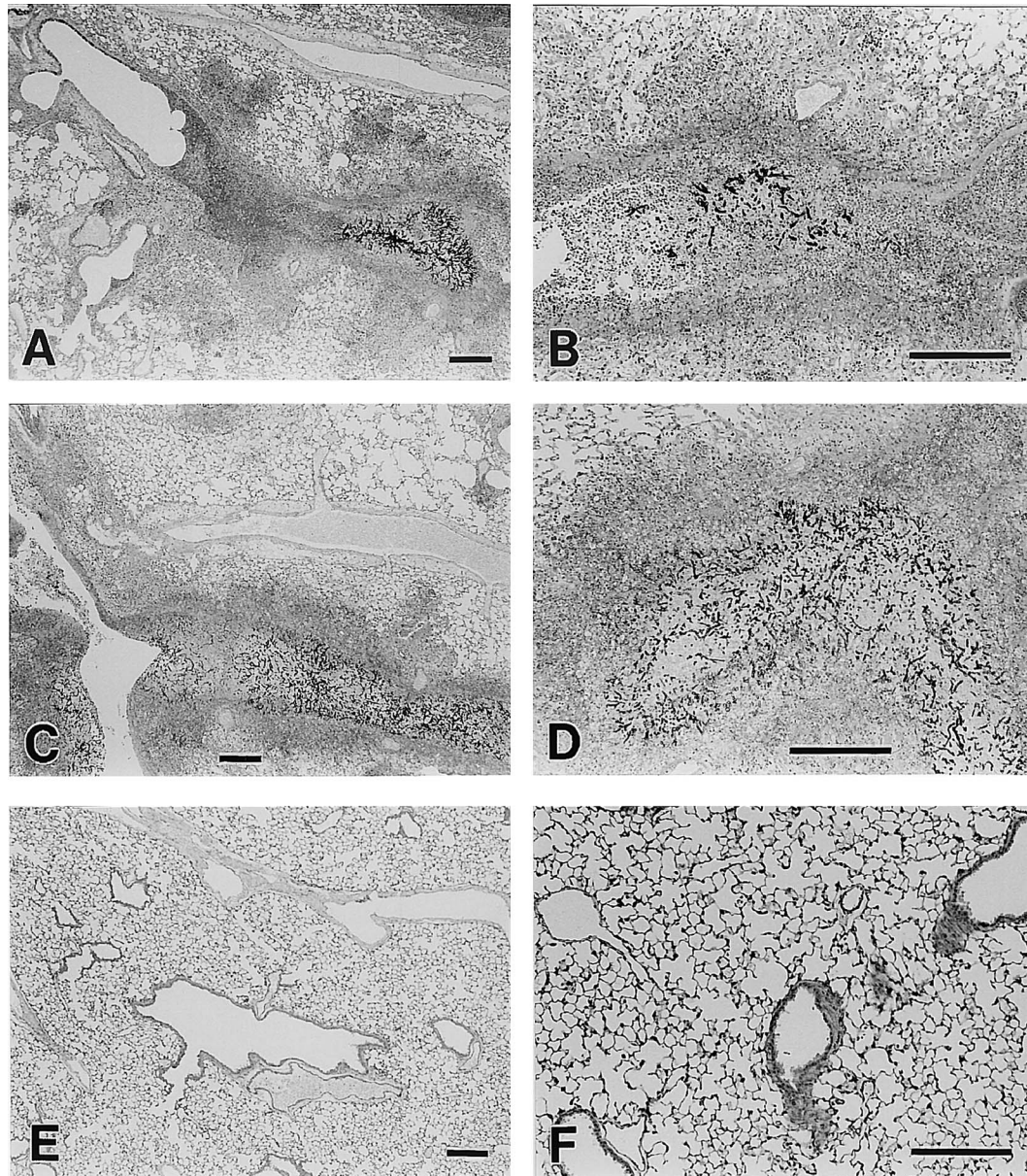


Fig. 4. Histopathological effects of micafungin (MCFG) and amphotericin B (AMPH-B) in combination on pulmonary aspergillosis in mice. (A and B) 2 mg/kg MCFG alone 6 days after infection, (C and D) 0.5 mg/kg AMPH-B alone 6 days after infection, (E and F) uninfected. The stain was PAS and bars represent 200  $\mu$ m.

った。いずれの菌種に対しても拮抗作用を示さなかった。

## 2. マウス肺アスペルギルス症モデルに対する *in vivo* 併用効果

### 1) 肺内生菌数の減少効果

実験的肺アスペルギルス症を惹起したマウスに、感染1日後より毎日1回MCFGおよびAMPH-Bをそれぞれ単独投与、または両薬剤を併用投与した実験における感染6日後の肺内生菌数をFig. 1に示した。MCFGの1 mg/kgおよびAMPH-Bの0.25 mg/kgをそれぞれ単独投与したときには、control群と比較して有意な肺内生菌数減少効果はみられなかったが、両薬を併用投与することにより明らかな効果が認められた ( $P < 0.01$ )。

また、MCFGの2 mg/kgおよびAMPH-Bの0.5 mg/kgの場合は、単独投与でもcontrol群と比較して有意な菌数減少効果が認められたが(両薬ともに $P < 0.01$ )、両薬を併用投与することによりさらに著明な効果が認められた。この効果は、control群に対して有意な効果を示した単独投与群と比較しても有意な菌数減少効果であった(両薬に対してともに $P < 0.01$ )。

### 2) 病理組織学的評価

感染6日後のcontrol群では、気管支を中心とした高度の菌集落と、それを取り囲むような高度の炎症像が観察された(Fig. 3-A, B)。MCFG, AMPH-Bともに単独投与では、高用量においても菌の増殖や炎症に対する

効果は認められず、control群と同様の病理像を示した (Fig. 4-A~D)。一方、感染6日後の併用投与群においては、低用量においても菌集落がほとんど認められず、炎症の程度もcontrol群および単独投与群と比較して軽度であった (Fig. 3-C, D)。感染10日後の併用投与群ではさらに炎症の程度は軽度であり、ほぼ正常に近い病理像を示した (Fig. 3-E, F)。これらの病理像から組織傷害、菌糸の伸長、好中球およびマクロファージの浸潤についてスコア化し、Fig. 2に示した。高用量併用投与群では、組織傷害、菌糸の伸長 (気管支)、好中球浸潤 (気管支・肺胞) およびマクロファージ (肺胞) の各スコアがcontrol群と比較して有意に低値であった。そのなかでも、菌糸の伸長および好中球浸潤を特に強く抑制した。低用量併用投与群においても組織傷害および好中球浸潤 (気管支・肺胞) の各スコアがcontrol群と比較して有意に低値であり、control群との間に有意差はなかったものの、気管支における菌糸の伸長も強く抑制した。肺胞における菌糸の伸長に関しては、control群のスコアが低かったため、薬剤の作用は明確にならなかった。また、低用量併用群の肺胞へのマクロファージ浸潤に対する作用は弱く、control並のスコアであった。なお、非感染群の病理所見はすべて陰性であった。

### III. 考 察

MCFGは既存の抗真菌薬とは異なり、真菌細胞壁の1,3- $\beta$ -D-glucan合成を阻害するという作用メカニズムを有する<sup>15)</sup>。そのため、既存の抗真菌薬と併用することにより、抗真菌スペクトル拡大あるいは抗真菌活性増強の可能性があると考えられる。MCFGとAMPH-B、ITCZおよびFLCZとの併用効果を*in vitro*で検討したところ、*C. albicans*に対してITCZおよびFLCZとの併用が、*A. fumigatus*に対してはAMPH-BおよびITCZとの併用が高い効果を示した。MCFGは*C. albicans*に対して低濃度から殺菌的に作用するが、*Aspergillus*に対しては*in vitro*では殺菌的に作用しないことが知られており、これらの併用により*Aspergillus*に対する殺菌効果が高まるのであれば、臨床的な有用性が期待される<sup>16)</sup>。*C. neoformans*に対してはAMPH-Bとの間に優れた併用効果を示し、18株中12株で相乗作用 (FIC index $\leq$ 0.5)、残りの6株にも相加作用 (0.5<FIC index $\leq$ 1)が認められた。*C. neoformans*に対する併用効果は、同じ作用機序を有するMK-0991 (caspofungin)とAMPH-Bとの間にも認められており、この併用効果は主たる作用機序に由来するものであることが示唆された<sup>21)</sup>。*C. neoformans*に対するMCFGのMICは $>64 \mu\text{g/mL}$ であるが、AMPH-Bとの間に相乗効果が認められた株における併用時のMICは $\leq 0.25 \sim 8 \mu\text{g/mL}$ であった。MCFGの50 mgをヒトに投与したときの最高血漿中濃度は約 $3.4 \mu\text{g/mL}$ であるが、血清蛋白との結合による影響のため、血清蛋白添加培地での

MICは非添加時と比較して50~100倍程度上昇する<sup>16,22)</sup>。したがって、臨床的に到達可能な血漿中濃度で相乗効果を得ることは難しいと推察される。また、*C. neoformans*に対してはITCZとの間にかかなり高率に拮抗作用が認められており、注意が必要である。

以上のようにMCFGと既存の抗真菌薬との間には、いくつかの*in vitro*併用効果が認められたが、そのうち*A. fumigatus*に対するAMPH-Bとの併用効果を、マウス肺アスペルギルス症モデルを用いて検証した。MCFGの2 mg/kgまたはAMPH-Bの0.5 mg/kgを単独投与したときに、感染6日後の肺内生菌数はいずれもcontrol群と比較して約1.1 logCFU/肺の減少効果を示したが、組織傷害スコアに対しては明らかな効果を示さなかった。また、MCFGの1 mg/kgまたはAMPH-Bの0.25 mg/kgを単独投与した場合には、肺内生菌数および組織傷害スコアのいずれに対しても明確な効果は認められなかった。このように単剤では十分な効果が得られないような病態モデルに対して2剤を併用すると、低用量 (MCFG+AMPH-B; 1+0.25 mg/kg)、高用量 (MCFG+AMPH-B; 2+0.5 mg/kg)ともcontrol群に対して有意に低い肺内生菌数および組織傷害スコアを示した。高用量併用群における肺内生菌数は、それぞれの単独投与群と比較しても明らかに低値であった。併用群では菌糸の伸長および好中球浸潤に対しても強い抑制効果が認められた。MCFGと同様に1,3- $\beta$ -D-glucanの合成阻害剤であるLY 303366は、ウサギの肺アスペルギルス症モデルにおいてAMPH-Bと同等の肺傷害改善効果を示したことが報告されている<sup>23)</sup>。この報告では、AMPH-Bはその殺菌的作用により菌糸の消失および肺内生菌数の減少効果を示し、LY 303366は肺内生菌数にはまったく影響をおよぼさなかったが菌糸に対しては伸長抑制、膨化、空胞化などの作用を示した<sup>23)</sup>。これらの知見と本実験の結果とから、肺アスペルギルス症における病態形成には組織傷害が深く関与するものと推察され、この傷害には菌糸の組織侵襲によるものと、それに応答した炎症反応によるものとが混在すると考えられた。したがって、MCFGとAMPH-Bとの併用効果は、両薬を併用することで殺菌力が高まり、肺内での*A. fumigatus*の増殖が強力に抑制された結果、菌糸そのものの侵襲および好中球浸潤などの炎症反応に起因する組織傷害が抑制されたものであると推察された。AMPH-Bの作用メカニズムは、真菌細胞膜のステロールを標的として細胞膜を傷害することであり<sup>24)</sup>、MCFGとの併用では細胞膜と細胞壁とに同時に作用することで、相加あるいは相乗的な作用が得られたものと推察された。肺胞のマクロファージに関しては組織傷害との相関が見出せなかったが、炎症により破壊された組織の修復に関与した可能性も考えられた。

本実験に使用した*A. fumigatus* IFM 40836に対して、

*in vitro* では MCFG と AMPH-B との併用により相加作用 (FIC index=1.0) が認められた。併用時の MIC 値は両剤ともに単独時の 1/2 を示しており、*in vitro* の結果がそのまま *in vivo* に反映されるならば、併用時には単独時の 1/2 の用量で同等の *in vivo* 効果が得られると考えられる。あくまで control 群との比較になるが、MCFG の 2 mg/kg または AMPH-B の 0.5 mg/kg を単独投与したときには肺内生菌数以外のパラメータに明らかな効果が認められなかったのに対し、それらの 1/2 用量の組み合わせである低用量併用群においては、肺内生菌数減少効果に加えて明らかな組織傷害の抑制効果が認められた。また、それぞれの単独投与とそれらの 1/2 量を併用した場合との防御効果における相違は、肺の病理像において明らかであった。したがって、MCFG と AMPH-B との併用効果は、*in vivo* においては相乗的であると考えられた。

難治性の侵襲性アスペルギルス症やクリプトコッカス髄膜炎に対して、AMPH-B を治療薬として用いることは不可欠である<sup>13,14,25)</sup>。AMPH-B は既存の抗真菌薬のなかで活性的には最強であるが、強い毒性のために十分な用量を投与できない現状があり、さまざまな併用療法が試みられている<sup>13,14,25-28)</sup>。AMPH-B と 5-FC との併用療法はクリプトコッカス症に有効性を示すが、アスペルギルス症にはあまり効果が期待できず、また好中球減少症患者において骨髓抑制を増悪させることが知られている<sup>13,25-28)</sup>。アゾール薬は AMPH-B との間に *in vitro* および *in vivo* で拮抗作用が認められることがあり<sup>25,26,29)</sup>、AMPH-B との併用療法はあまり一般的ではない。むしろ HIV 感染を伴うような重症患者には、アゾール薬を主に予防投与や維持療法に用いることが推奨されている<sup>13,14,25,26)</sup>。このように既存薬どうしによる併用療法には一長一短があり、確立されるには至っていない。したがって、本研究において MCFG と AMPH-B とを同時に作用させることにより *in vitro* および *in vivo* で優れた併用効果が認められたことは、今後重篤な深在性真菌症に対する最適な併用療法を模索していくうえで重要な意義をもつものと考えられる。

#### 文 献

- 1) 河野 茂: Compromised host における深在性真菌症. *Jpn J Med Mycol* 41: 71~76, 2000
- 2) Ampel N M: Emerging disease issues and fungal pathogens associated with HIV infection. *Emerg Infect Dis* 2: 109~116, 1996
- 3) Wade J C: Treatment of fungal and other opportunistic infections in immunocompromised patients. *Leukemia* 11 Suppl 4: S 38~39, 1997
- 4) Robinson R F, Nahata M C: A comparative review of conventional and lipid formulations of amphotericin B. *J Clin Pharm Ther* 24: 249~257, 1999
- 5) Vermes A, Guchelaar H J, Dankert J: Flucytosine:

- a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother* 46: 171~179, 2000
- 6) Hofmann H: Fungal infections of the skin and mucous membranes: New therapies and the development of azole resistant yeasts. *Curr Opin Infect Dis* 10: 96~100, 1997
  - 7) George D, Korfick D, Minitier P, et al.: Combination therapy in experimental invasive aspergillosis. *J Infect Dis* 168: 692~698, 1993
  - 8) Vazquez J A, Arganoza M T, Vaishampayan J K, et al.: *In vitro* interaction between amphotericin B and azoles in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2511~2516, 1996
  - 9) Sanati H, Ramos C F, Bayer A S, et al.: Combination therapy with amphotericin B and fluconazole against invasive candidiasis in neutropenic-mouse and infective-endocarditis rabbit models. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1345~1348, 1997
  - 10) Lewis R E, Lund B C, Klepser M E, et al.: Assessment of antifungal activities of fluconazole and amphotericin B administered alone and in combination against *Candida albicans* by using a dynamic *in vitro* mycotic infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1382~1386, 1998
  - 11) Louie A, Banerjee P, Drusano G L, et al.: Interaction between fluconazole and amphotericin B in mice with systemic infection due to fluconazole-susceptible or -resistant strains of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2841~2847, 1999
  - 12) Barchiesi F, Schimizzi A M, Caselli F, et al.: Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2435~2441, 2000
  - 13) Stevens D A, Kan V L, Judson M A, et al.: Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Clin Infect Dis* 30: 696~709, 2000
  - 14) Saag M S, Graybill R J, Larsen R A, et al.: Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. *Clin Infect Dis* 30: 710~718, 2000
  - 15) 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
  - 16) 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
  - 17) 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
  - 18) 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
  - 19) Maesaki S, Hossain M A, Miyazaki Y, et al.: Efficacy of FK 463, a (1,3)- $\beta$ -D-glucan synthase inhibitor, in disseminated azole-resistant *Candida*



- albicans* infection in mice. Antimicrob Agents Chemother 44: 1728~1730, 2000
- 20) 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
  - 21) Franzot S P, Casadevall A: Pneumocandin L-743,872 enhances the activities of amphotericin B and fluconazole against *Cryptococcus neoformans* *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother 41: 331~336, 1997
  - 22) 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
  - 23) 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
  - 24) Warnock D W: Amphotericin B: an introduction. J Antimicrob Chemother 28 Suppl B: 27~38, 1991
  - 25) Harari S: Current strategies in the treatment of invasive *Aspergillus* infections in immunocompromised patients. Drugs 58: 621~631, 1999
  - 26) Polak A: Combination therapy for systemic mycosis. Infection 17: 203~209, 1989
  - 27) Dismukes W E, Cloud G, Gallis H A, et al.: Treatment of cryptococcal meningitis with combination amphotericin B and flucytosine for four as compared with six weeks. N Engl J Med 317: 334~341, 1987
  - 28) Horst C M, Saag M S, Cloud G A, et al.: Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 337: 15~21, 1997
  - 29) Martin E, Maier F, Bhakdi S, et al.: Antagonistic effects of fluconazole and 5-fluorocytosine on candidacidal action of amphotericin B in human serum. Antimicrob Agents Chemother 38: 1331~1338, 1994

## Combination effect of micafungin with amphotericin B, itraconazole and fluconazole

Yoshihito Niki<sup>1)</sup>, Koichiro Yoshida<sup>1)</sup>, Toshiharu Matsushima<sup>1)</sup>, Masamitsu Nakajima<sup>2)</sup>,  
Toru Nakai<sup>3)</sup>, Kazumi Otomo<sup>3)</sup>, Yoshimi Wakai<sup>3)</sup>, Satoru Matsumoto<sup>3)</sup>,  
Kazuo Hatano<sup>3)</sup>, Fumiaki Ikeda<sup>3)</sup> and Seitaro Mutoh<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Respiratory Diseases, Department of Medicine, Kawasaki Medical School

<sup>2)</sup>Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Hiroshima University

<sup>3)</sup>Medicinal Biology Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.,

2-1-6, Kashima Yodogawa-ku, Osaka 532-8514, Japan

*In vitro* interactions between micafungin (MCFG) and amphotericin B (AMPH-B), itraconazole (ITCZ) and fluconazole (FLCZ) were evaluated using a checkerboard method based on the standard broth microdilution method M 27-A recommended by the NCCLS. When MCFG was combined with AMPH-B, ITCZ and FLCZ, additive interaction was observed for 41%, 85% and 85% of *Candida albicans* isolates, respectively, and either synergistic or additive interaction was observed for 67%, 87% and 13% of *Aspergillus fumigatus* isolates, respectively. An excellent interaction was observed for *Cryptococcus neoformans* when MCFG was combined with AMPH-B, which was synergistic for 67% and additive for 33% of isolates tested. Antagonism was observed only in the MCFG-ITCZ combination for 83% of *C. neoformans*. For the purpose of *in vivo* validation of the *in vitro* interaction of MCFG and AMPH-B, we evaluated the efficacy of combination therapy of the 2 drugs against a mouse model of pulmonary aspergillosis induced by *A. fumigatus* IFM 40836, against which the combination yielded an additive interaction *in vitro*. Combination therapy with MCFG (2 mg/kg) and AMPH-B (0.5 mg/kg) produced a significant decrease in fungal colony count in the lung compared to not only the control group but also to either dose alone 6 days after infection. The combination also strongly suppressed histopathologically determined pulmonary lesion, hyphal elongation and neutrophil infiltration. Furthermore, combination therapy of MCFG (1 mg/kg) and AMPH-B (0.25 mg/kg) was more effective than both MCFG alone (2 mg/kg) and AMPH-B alone (0.5 mg/kg), which were both double the dose used in the combination treatment. These results suggest that the interaction of MCFG and AMPH-B in this pulmonary aspergillosis model was synergistic. In conclusion, MCFG showed an excellent interaction with AMPH-B both *in vitro* and *in vivo*, suggesting that combination therapy with these 2 drugs might have utility for the treatment of severe deep-seated fungal infections. In addition, MCFG may have clinical usefulness in combination therapy with other commercially available antifungal agents.