

臨床分離 *Candida tropicalis* にみられた micafungin の paradoxical effect

中井 徹¹⁾・松本 哲¹⁾・池田 文昭¹⁾・三嶋 廣繁²⁾

¹⁾ アステラス製薬株式会社薬理研究所*

²⁾ 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科感染症治療学

(平成 19 年 5 月 15 日受付・平成 19 年 11 月 28 日受理)

岐阜大学病院において micafungin (MCFG) 投与中の患者血液より分離された *Candida tropicalis* が、通常の感受性レベルより高濃度の MCFG 存在下に発育した。MCFG 耐性化の懸念があったため、感染防御効果をはじめとする基礎検討により本菌株のプロファイリングを行った。CLSI の M27-A2 に準拠したマイクロ液体希釈法で測定した本菌株の MCFG 感受性は、培養 24 時間における判定では MIC 0.0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と良好であった。培養 48 時間になると、8~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度域にごく微少な発育を肉眼的に認めた。発育した菌体を光学顕微鏡下に観察すると、ブドウの房様の菌塊状を呈しており、分散した酵母状を呈する薬剤無処理菌体の形態とは大きく異なっていた。Antibiotic medium 3 を感受性測定用培地として用いると、高濃度における発育はみられず、MIC 以上の濃度で殺菌的な効果が認められた。また、cyclophosphamide 処理して好中球を減少させた雄性 ICR 系マウスに、本菌株の致死菌量を尾静脈内接種して作成した播種性感染モデルに対する ED₅₀ 値は 0.29 mg/kg (95% 信頼区間 0.18~0.41 mg/kg) であり、比較対照とした通常感受性株の 0.35 mg/kg (同 0.26~0.48 mg/kg) と同等であった。以上のプロファイルから、本菌株は通常感受性株と比較してやや浸透圧抵抗性が増大したことにより paradoxical effect を示すが、MCFG の *in vivo* 効果には影響がなかったことから MCFG 感受性と判断して差し支えないと考えられた。

Key words: micafungin, *Candida tropicalis*, paradoxical effect

MCFG は、真菌の細胞壁に特異的に存在しその強度維持に重要な役割を担っている 1,3- β -D-グルカンの生合成を阻害することにより抗真菌活性を発揮する¹⁾。その結果、臨床的に最も重要とされている *Candida* 属および *Aspergillus* 属に対して広域な抗真菌スペクトルを有する^{2,3)}。MCFG は *Candida* 属全般の菌種に対して概ね殺菌的に作用し、動物モデルおよび臨床試験のいずれにおいてもカンジダ症に対して優れた治療効果を示すことが報告されている^{4~7)}。また、2002 年の上市以来、本邦における臨床使用ならびに欧米での臨床試験を経た現在においても、MCFG に耐性化あるいは低感受性化した *Candida* の報告は非常に少ない⁸⁾。

2005 年 2 月、岐阜大学病院において、侵襲性カンジダ症(腹膜炎・真菌血症)患者の血液より *Candida tropicalis* が分離された。CLSI の標準法 M27-A2⁹⁾ に準じた感受性試験において、通常の感受性レベルよりも明らかに高い濃度域に、微少ではあるが肉眼的に確認できる菌の発育を認めた。治療成績を考慮すると耐性化が懸念されたため、分離株の性状を精査したところ、近年キャンディン系抗真菌薬 (MCFG, caspofungin) において報告が散見される “paradoxical effect” を示す株であることが判明したので、詳細について報告する。

I. 材料と方法

1. 菌株

岐阜大学病院において、MCFG を投与された侵襲性カンジダ症患者の血液より分離した *C. tropicalis* (岐阜大株) を用いた。また、正常な性状を示す対照株として、1996 年に国内医療施設における患者血液より分離されアステラス製薬薬理研究所で保存されている No. 16004 株⁹⁾ を用いた。

2. ミクロ液体希釈法による感受性試験

CLSI の標準法 M27-A2 に準じた肉眼判定法にて行った¹⁰⁾。測定培地として終濃度 165 mM の MOPS (3-Morpholinopropanesulfonic acid; 同仁化学) を加えた RPMI-1640 (L-glutamine 含有, フェノールレッド不含, 炭酸水素ナトリウム不含; Sigma-Aldrich Co.) (RPMI/MOPS) および antibiotic medium 3 (AM3; Becton, Dickinson and Company) を用いた。MCFG はアステラス製薬 (株) において合成および品質検定されたものを用い、滅菌蒸留水に溶解、測定培地で希釈して使用した。Amphotericin B (AMPH-B; Fungizone[®] 静注用, ブリストル・マイヤーズスクイブ株式会社), fluconazole

Table 1. Representative results of the MIC of micafungin against the patient-derived *C. tropicalis* at 48 h. The paradoxical growth was seen only in RPMI/MOPS medium at 8 to 32 $\mu\text{g/mL}$. GC; growth control.

| | MCFG concn ($\mu\text{g/mL}$) | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|---------------------------------|----|----|---|---|---|---|-----|------|-------|--------|--------|--------|--------|-----------------|
| | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.0625 | 0.0313 | 0.0156 | 0.0078 | GC ^d |
| MIC score ^a | | | | | | | | | | | | | | | |
| RPMI ^b | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| AM3 ^c | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 |

^aThe visual-reading scores were according to CLSI M27-A2.

^bRPMI1640 with 165 mM MOPS (RPMI/MOPS)

^cAntibiotic medium 3

^dGrowth control



Fig. 1. Light-microscopic observations of patient-derived *C. tropicalis* treated with 16 $\mu\text{g/mL}$ micafungin (A) and 0.0625 $\mu\text{g/mL}$ micafungin (B) and drug-free medium (C) in RPMI/MOPS. The paradoxical growth (A) was morphologically characterized by diagnostic swelling and aggregation.

(FLCZ; Diflucan[®]静注液 0.2%, ファイザー製薬株式会社) および itraconazole (ITCZ; Itrizole[®] Cap.50, ヤンセンファーマ株式会社) はそれぞれ市販製剤を購入し使用した (itraconazole はアステラス製薬にて抽出精製したものをを用いた)。なお, M27-A2 の定める精度管理株 *Candida parapsilosis* ATCC 20019 および *Candida krusei* ATCC 6258 に対する対照薬の MIC が指定範囲内にあることをあらかじめ確認した。接種菌液はサブローデキストロース寒天 (SDA) 平板上で 35°C, 24 時間培養した被験菌株を滅菌生理食塩液に懸濁し, 血球計算盤で菌数を計測した後測定培地で希釈し, 最終接種菌量が約 1.0×10^3 cells/mL となるように調製した。薬剤をあらかじめ分注した 96 穴平底プレートに接種した後, 35°C で好気培養し, 培養開始から 24 および 48 時間後に MIC を判定した。肉眼判定は M27-A2 に従い, 各ウェルの濁りの程度をスコア化して記録した。MCFG の MIC エンドポイントはスコア 0 とし, 対照薬は M27-A2 の記載に従った。また, 培養 48 時間後に感受性試験プレートの各ウェルを倒立型光学顕微鏡で観察した。

3. 感染治療効果

動物は感染時 4 週齢の雄性 ICR 系マウス (日本エスエルシー) を用いた。マウスには飼料および飲料水を自由に摂取させた。なお, 動物実験に関するすべての手順は, 「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (日本学術会議)」 および 「動物実験に関する指針 (アステラス製

薬)」 に従って実施した。

接種 4 日前および 1 日後に 200 mg/kg の cyclophosphamide (Sigma-Aldrich Co.) を腹腔内投与して好中球減少状態を惹起したマウス (1 群 8 例) に, 岐阜大株および対照株 (No. 16004) の致死菌量をそれぞれ尾静脈内接種することにより播種性カンジダ症モデルを作製した。感染マウスには接種から 1 時間後に 1 回, 翌日より 1 日 1 回 3 日間の計 4 回 MCFG (0.32, 1, 3.2 および 10 mg/kg) を尾静脈内に投与した。感染 14 日後の生存数をもとに, probit 法¹¹⁾により ED₅₀ 値を推定した。

II. 結 果

1. 岐阜大株の MCFG 感受性

RPMI/MOPS 培地で測定した MCFG の岐阜大株に対する MIC は, 培養 24 時間後には一点のエンドポイントによって定められた 0.0625 $\mu\text{g/mL}$ であった。培養 48 時間後になると, 24 時間後には肉眼的に発育の認められなかった濃度域 (8~32 $\mu\text{g/mL}$) に微少な菌の発育が観察され, MIC を決定するエンドポイントが二点存在する状態となった (Table 1)。倒立顕微鏡下で観察した微少発育の形態は, 膨化した酵母状菌体が分離せずにごぼう房様の菌塊を呈するというものであった (Fig. 1)。一方, 対照株に対する MCFG の MIC は, 24 時間後および 48 時間後で変化はなく, 高濃度域における微少発育は肉眼的にも顕微鏡下でもみられなかった。

測定培地として AM3 を用いて同様の検討を行った。

Table 2. Antifungal susceptibility of *C. tropicalis* isolated from a patient with invasive candidiasis at Gifu University Hospital

| | MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^a | | | |
|----------------|---------------------------------------|------------------------|-----------|--------|
| | Gifu Univ. | | No. 16004 | |
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| Micafungin | 0.0625 | 0.0625/64 ^b | 0.0156 | 0.0156 |
| Fluconazole | 2 | nd ^c | 0.25 | nd |
| Itraconazole | 0.5 | nd | 0.125 | nd |
| Amphotericin B | 2 | nd | 0.5 | nd |

^aMinimum drug concentration at which no visible growth was observed (micafungin and amphotericin B) or prominent decrease in growth as compared with the growth control (fluconazole and itraconazole).

^bThere were two endpoints, because inhibition was broken by the paradoxical growth (8 to 32 $\mu\text{g/mL}$).

^cNot determined.

岐阜大株に対する MCFG の MIC は、培養 24 時間後、48 時間後ともに 0.0156 $\mu\text{g/mL}$ と、RPMI/MOPS の場合と比較して 4 倍低い値であった。また、高濃度域における発育は、肉眼的にも顕微鏡下でもみられなかった (Table 1)。参考として市販対照薬 AMPH-B、FLCZ および ITCZ に対する感受性を測定し、Table 2 に示した。

2. 感染治療効果

Paradoxical effect が MCFG の *in vivo* 効果に与える影響を知る目的で、致死性の播種性感染モデルに対する MCFG の延命効果を岐阜大株および対照株の間で比較した。まず、両株の病原性が異なる可能性が考えられたため、その影響を最小限にするために、あらかじめ求めた両株の最小致死菌量 (岐阜大株 8.3×10^5 cfu, 対照株 3.6×10^4 cfu) による感染モデルでの比較を行った。無治療 control 群のマウスは、両株とも全例が観察期間中に死亡した。MCFG による治療効果は両株に対して同様の用量反応性を示し、0.125 mg/kg では全例が死亡したが、1 mg/kg で全例を生存させた。感染 14 日後の生存率から算出した ED₅₀ 値は、岐阜大株 0.29 mg/kg/day に対して対照株 0.35 mg/kg/day と、ほぼ同等の値を示した。

III. 考 察

“Paradoxical effect” とは、いったんある濃度で抗菌活性を示しながら、より高濃度で活性が減弱するという現象で、過去にはペニシリン系抗菌薬において “Eagle effect” として注目された¹²⁻¹⁴⁾。近年では、MCFG と同じキャンディン系抗真菌薬である caspofungin において類似の現象が報告され、臨床効果への影響が懸念されている。Caspofungin に限って言えば、この現象は比較的幅広い *Candida* 属菌種 (*Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Candida dubliniensis*) に認められ¹⁵⁻¹⁹⁾、さらには *Aspergillus fumigatus* においても発現することが知られている²⁰⁾。現在までに、発現メカニズムに関する知見はいくつか報告されており、細胞壁強度の維持を掌る PKC

Table 3. Protective effect of MCFG against systemic *C. tropicalis* infection in mice caused by a paradoxical effect-positive strain.

| | Survival rate | |
|--|-------------------------|--------------------|
| | Gifu Univ. ^a | No. 16004 |
| Control | 0% | 0% |
| 0.125 mg/kg | 0% | 0% |
| 0.25 mg/kg | 62.5% | 12.5% |
| 0.5 mg/kg | 87.5% | 87.5% |
| 1 mg/kg | 100% | 100% |
| ED ₅₀ (95% CI) ^b ; mg/kg | 0.29 (0.18 - 0.41) | 0.35 (0.26 - 0.48) |

^aSystemic *C. tropicalis* infections were induced by intravenous challenge with a strain isolated from a patient with invasive candidiasis at Gifu University Hospital (paradoxical effect-positive) and a normal strain No. 16004 (paradoxical effect-negative).

^bED₅₀ (50% effective dose) and 95% confidence interval (CI) were calculated by the Probit analysis.

pathway 上の calcineulin A によるキチン生合成の up-regulation という説が有力である^{17,21)}。動物モデルにおける *in vivo* 効果に対する影響を検討した報告は、われわれの知る限りでは *C. albicans* および *A. fumigatus* に関して各 1 報ずつしかないが、いずれにおいても caspofungin の除菌効果に多少なりとも反映されることが記されている^{18,20)}。

われわれは、これらの報告に先駆けて 2002 年、MCFG の paradoxical effect が *C. tropicalis* において発現することを報告した²²⁾。この現象は、株によって程度の差がみられ、高濃度における微少発育が肉眼的にみられるようになるまでの時間や発育菌量が異なる。最も顕著な paradoxical effect を示す株では、培養 48 時間での高濃度における発育が培養 24 時間での MIC 以上の全濃度域にみられ、発育菌量も最大でスコア 2 (発育対照と比べて顕著な濁度の減少) に達した。この株を用いた播種性感染モデルにおける MCFG の除菌効果は、正常株を用いた場合と同等であった。その後の検討により、この現象は浸透圧の低い AM3 培地では発現せず、AM3 に添加物を加えて浸透圧を増大させると再び発現することが明らかとなり、paradoxical effect の発現は浸透圧抵抗性の増大に因ることが推察された²³⁾。このことは、caspofungin の paradoxical effect においてキチン生合成の up-regulation が起こっているという Stevens らの報告と矛盾しないものである²¹⁾。以上のことから、paradoxical effect は *in vitro* の特殊な条件で発現するものの、*in vivo* では発現しない、あるいは発現していても治療効果には影響がないことが示唆され、この現象の有無あるいは発現濃度をもって感受性/耐性を判断すべきではないと考えられた。

今回分離された株の paradoxical effect は、ぶどうの房のような菌塊状の形態を示し、AM3 培地で消滅し、さらに MCFG の感染防御効果に影響を及ぼさなかった。これらのプロファイルは、われわれが以前に報告した

paradoxical effect を示す *C. tropicalis* のプロファイルと完全に一致した。したがって、この株についても MCFG 感受性と判断して差し支えないものと考えられる。

(本論文の内容の一部は、第 53 回日本化学療法学会西日本支部総会にて発表し、奨励賞を受賞した。)

文 献

- 1) 山口英世, 西山彌生, 内田勝久, 波多野和男, 森下佳彦, 中井 徹, 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 2002; 50 (S-1): 20-9
- 2) Tawara S, Ikeda F, Maki K, Morishita Y, Otomo K, Teratani N, et al: In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 57-62
- 3) Mikamo H, Sato Y, Tamaya T: In vitro antifungal activity of FK463, a new water-soluble echinocandin-like lipopeptide. J Antimicrob Chemother 2000; 45: 485-7
- 4) Ikeda F, Wakai Y, Matsumoto S, Maki K, Watabe E, Tawara S, et al: Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of disseminated candidiasis and aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 614-8
- 5) Ninomiya M, Mikamo H, Tanaka K, Watanabe K, Tamaya T: Efficacy of micafungin against deep-seated candidiasis in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. J Antimicrob Chemother 2005; 55: 587-90
- 6) Kohno S, Masaoka T, Yamaguchi H, Mori T, Urabe A, Ito A, et al: A multicenter, open-label clinical study of micafungin (FK463) in the treatment of deep-seated mycosis in Japan. Scand J Infect Dis 2004; 36: 372-9
- 7) Andes D, Safdar N: Efficacy of micafungin for the treatment of candidemia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005; 24: 662-4
- 8) Laverdiere M, Lalonde R G, Baril J G, Sheppard D C, Park S, Perlin D S: Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 705-8
- 9) 松本 哲, 若井芳美, 渡部悦子, 牧 克之, 池田文昭, 俵 修一, 他: *Candida* 属および *A. 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 2002; 50 (S-1): 30-6
- 10) Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, 2nd ed, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2002
- 11) 吉村 功: LD₅₀ の推定法。吉村 功 編, 毒性・薬効データの統計解析—事例研究によるアプローチ—, サイエンス社, 東京, 1989; 226-33
- 12) Eagle H, Musselman A D: The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. J Exp Med 1948; 88: 99-131
- 13) Shah P M: Paradoxical effect of antibiotics. I. The 'Eagle effect'. J Antimicrob Chemother 1982; 10: 259-60
- 14) Stevens D L, Gibbons A E, Bergstrom R, Winn V: The Eagle effect revisited: efficacy of clindamycin, erythromycin, and penicillin in the treatment of streptococcal myositis. I Infect Dis 1988; 158: 23-8
- 15) Stevens D A, Espiritu M, Parmar R: Paradoxical effect of caspofungin: reduced activity against *Candida albicans* at high drug concentrations. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 3407-11
- 16) Stevens D A, White T C, Perlin D S, Selitrennikoff C P: Studies of the paradoxical effect of caspofungin at high drug concentrations. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 51: 173-8
- 17) Wiederhold N P, Kontoyiannis D P, Prince R A, Lewis R E: Attenuation of the activity of caspofungin at high concentrations against *Candida albicans*: possible role of cell wall integrity and calcineurin pathways. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 5146-8
- 18) Clemons K V, Espiritu M, Parmar R, Stevens D A: Assessment of the paradoxical effect of caspofungin in therapy of candidiasis. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 1293-7
- 19) Stevens D A, McCullough M J, Clemons K V, Martinez M C. *Candida dubliniensis*, a species with an extremely high frequency of paradoxical effect with caspofungin. Program Abstr 46th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother, abstr M-1756, 2006
- 20) Wiederhold N P, Kontoyiannis D P, Chi J, Prince R A, Tam V H, Lewis R E: Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis: evidence of concentration-dependent activity. J Infect Dis 2004; 190: 1464-71
- 21) Stevens D A, Ichinomiya M, Koshi Y, Horiuchi H: Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1, 6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 3160-1
- 22) 中井 徹, 鈴木貴子, 大友寿美, 若井芳美, 波多野和男, 池田文昭, 他: In vitro で micafungin に抵抗性を示す *Candida tropicalis* に関する検討—感受性測定のエンドポイントをどう定めるか—。臨床と微生物 2002; 29: 659-66
- 23) Nakai T, Suzuki T, Ikeda M, Hatano K, Matsumoto S, Ikeda F, et al: Paradoxical growth (PG) of *Candida tropicalis* (Ct) in response to micafungin (MCFG). In Program Abstr. 46th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother. 2006; abstr. M-1761

Paradoxical effect of micafungin on clinically isolated *Candida tropicalis*

Toru Nakai¹⁾, Satoru Matsumoto¹⁾, Fumiaki Ikeda¹⁾ and Hiroshige Mikamo²⁾

¹⁾ Pharmacology Research Laboratories, Astellas Pharma Inc., 2-1-6, Kashima, Yodogawa-ku, Osaka, Japan

²⁾ Medical Information Sciences Division, United Graduate School of Drug Discovery and Medical Information Sciences, Gifu University

A strain of *Candida tropicalis* was isolated from a blood sample of a patient undergoing treatment with micafungin at Gifu University Hospital. Paradoxically, the strain grew in the presence of higher micafungin concentrations than usual. We characterized this strain by several non-clinical experiments, including the response to therapy in animal models of infection, to investigate whether this strain is indeed resistant to micafungin. In the CLSI M27-A2 microdilution assay, growth of this strain was inhibited in the presence of 0.0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or higher concentrations of micafungin at 24 h of incubation. At 48 h, however, slight growth was visible in the range of 8 to 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The growth was microscopically observed as a grape-like aggregation. This morphology was quite different from that of the untreated control fungus, which was observed as scattered yeast-like cells. When antibiotic medium 3 was used as the test medium, the strain was killed at the MIC or higher, and the paradoxical growth was no longer seen. Micafungin was similarly efficacious against neutropenic murine models of systemic infection caused by both paradoxical effect-positive and -negative strains, with ED₅₀ values of 0.29 and 0.35 mg/kg, respectively (95% confidence interval; 0.18 to 0.41 and 0.26 to 0.48 mg/kg, respectively). These results suggest that this strain should be considered susceptible to micafungin because the paradoxical effect appears only due to varying osmotic resistivity and does not influence the *in vivo* effect of micafungin.