

免疫不全マウス *Exophiala dermatitidis* 全身感染モデル に対するリポソーム化 amphotericin B の *in vivo* 抗真菌活性

柏本茂樹¹⁾・竹本浩司^{1)*}・山本 寛²⁾・金澤勝則¹⁾

¹⁾大日本住友製薬株式会社・薬理第2研究部

²⁾大日本住友製薬株式会社・製品企画部

* Corresponding author

(2010年3月5日受付)

免疫不全マウス *Exophiala dermatitidis* 全身感染モデルに対するリポソーム化 amphotericin B (L-AMB) の *in vivo* 抗真菌活性を amphotericin B デオキシコール酸製剤 (D-AMB) と比較することを本研究の目的とした。Cyclophosphamide 投与により免疫不全状態を惹起させた ddY マウスに *E. dermatitidis* IFM 4827 株と IFM 53409 株の各々の分生胞子を尾静脈内に接種した。L-AMB および D-AMB の各々の最大無影響量である 10 および 1 mg/kg を最高用量とし、感染 4 時間後に L-AMB (0.3~10 mg/kg) あるいは D-AMB (0.1~1 mg/kg) を尾静脈内に単回投与した。感染 14 日後までの生存日数と最終生存率ならびに感染 4 日後の組織内菌数を指標に両薬剤の本菌に対する *in vivo* 抗真菌活性を比較した。L-AMB では両感染モデルにおいて 1 mg/kg 以上の投与群でコントロール群に対する有意な延命効果が認められた。L-AMB の 10 mg/kg 投与群の最終生存率は IFM 4827 株感染モデルでは 100%、IFM 53409 株感染モデルでは 75% と D-AMB の 1 mg/kg 投与群の 20~37.5% と比べて高値であった。また、*E. dermatitidis* IFM 4827 株感染モデルにおいて、L-AMB の 10 mg/kg 投与群の各種組織内菌数 (血液、肺、肝、脾、腎) はコントロール群および D-AMB の 1 mg/kg 投与群と比べて有意に低値であった。以上の結果から、*E. dermatitidis* に対して L-AMB は *in vivo* 抗真菌活性を示し、その活性は、最大無影響量の比較において D-AMB よりも優れていることが示唆された。

Exophiala dermatitidis は、細胞壁にメラニン色素を含有し暗色のコロニーを形成することから黒色真菌と総称される真菌の一つである¹⁾。*E. dermatitidis* などの病原性を持つ黒色真菌が皮膚の外傷部位から侵入すると深部皮膚真菌症を発症し、特に免疫不全患者では全身に播種し重篤な内臓真菌症を発症することがある¹⁾。本菌が原因となる深在性真菌症に対して本邦で効果を持つ注射用抗

真菌薬はこれまで、エクソフィアラ属の旧名²⁾であるホルモデンドラム、ヒアロホーラおよびホルミシチウムに対する効果を有する amphotericin B (AMPH-B) デオキシコール酸製剤 (ファンギゾン®: D-AMB) が唯一あるのみであった。しかしながら、D-AMB は腎臓に対する副作用の発現レベルに応じてその投与量を調節せざるを得ず、治療に際して十分量の投薬ができないという問題が

あった。一方、AMPH-Bの副作用が軽減されたりポソーム化AMPH-B（アムビゾーム®：L-AMB）も2009年6月に本症に対する効能を本邦で取得し、本症の治療にL-AMBが使用可能となった。種々の教科書や総説においては、D-AMBあるいはL-AMBが本症治療の選択肢の一つとして推奨されているが^{1,3,4)}、D-AMBと比較してL-AMBの有用性を検証した非臨床試験あるいは臨床試験の報告はない。

そこで、本研究では免疫不全マウス *E. dermatitidis* 全身感染モデルに対するL-AMBとD-AMBの *in vivo* 抗真菌活性を比較検討した。

材料および方法

1. 使用薬剤

L-AMB（アムビゾーム®点滴静注用50mg、大日本住友製薬株式会社）およびD-AMB（ファンギゾン®, プリストル・マイヤーズ株式会社）を使用した。なお、本論文ではL-AMBおよびD-AMB濃度はAMPH-B濃度として示した。

2. 使用動物

5週齢のddY系雄性マウス（日本エスエルシー）を用いた。大日本住友製薬株式会社研究本部「動物実験規約」に従い、動物実験を実施した。

3. 使用菌株

千葉大学真菌医学研究センターより分与された *Exophiala dermatitidis* IFM 4827株および *E. dermatitidis* IFM 53409株を使用した。

4. *In vitro* 抗真菌活性測定試験

最小発育阻止濃度（MIC）の測定はClinical and Laboratory Standards Institute M38-A2 2008に準じた微量液体希釈法にて実施した⁵⁾。添付文書に従い調製したL-AMBの4mg/mL溶液およびD-

AMBの5mg/mL溶液を0.165M MOPS緩衝RPMI 1640培地（pH 7.0）（RPMI-MOPS）を用いて目的の濃度となるように希釈し、96穴マイクロプレートに100μL/wellで分注した。菌株をポテトデキストロース寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を用いて35°Cで7日間培養し、生理食塩液への懸濁とフィルター濾過により分生孢子懸濁液を調製した。この分生孢子懸濁液をRPMI-MOPSを用いて希釈し、上記96穴マイクロプレートに100μL/wellで分注した（最終接種菌量は2~3×10³ conidia/mL）。35°Cで3日間培養した後、肉眼的に真菌の発育が認められない最小濃度をMICとした。

5. 免疫不全マウス *E. dermatitidis* 全身感染モデル

Cyclophosphamide（エンドキサン®, 塩野義製薬株式会社）を感染2日前に200mg/kg、感染1日後に100mg/kgをマウスの背部皮下に投与することで白血球数減少状態を惹起させた。免疫不全マウスに分生孢子懸濁液を0.2mL/mouseで尾静脈内接種することで全身感染モデルを作製した。*E. dermatitidis* IFM 4827株およびIFM 53409株の接種菌量はそれぞれ1×10⁷および5×10⁶ conidia/mouseとした。

感染4時間後にL-AMBでは最大無影響量⁶⁾である10mg/kg以下の投与量（0.3, 1, 3, 10mg/kg）で、D-AMBでは最大無影響量⁶⁾である1mg/kg以下の投与量（0.1, 0.3, 1mg/kg）で尾静脈内に単回投与した。感染後14日間マウスの生死を観察することで両薬剤の延命効果ならびに救命効果を検討した。また、両薬剤の組織内生菌数減少効果を検討するために、感染4日後の感染マウスから、血液、肺、肝臓、脾臓および腎臓を無菌的に採取し、それらのホモジェネート希釈液をポテトデキストロース寒天培地に塗抹することで組織内菌数を測定した。

6. 統計解析

50% Effective dose (ED₅₀) とその 95% 信頼区間は probit 法を用いて算出した。各群間の生存日数は log-rank test を用いて比較した。各群間の組織内菌数は Student's *t* test を用いて比較した。これらの解析には “The SAS system for Windows Release 8.02” のソフトウェアを用い、有意水準は両

側 5% とした。

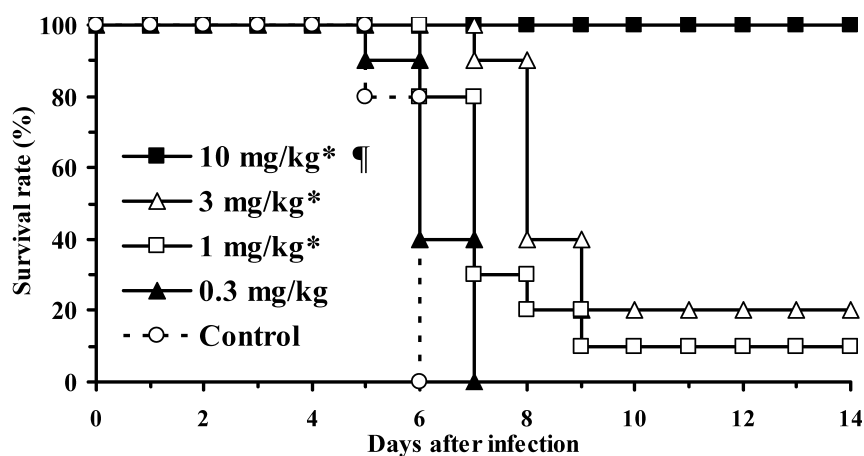
結果

1. *In vitro* 抗真菌活性 (MIC)

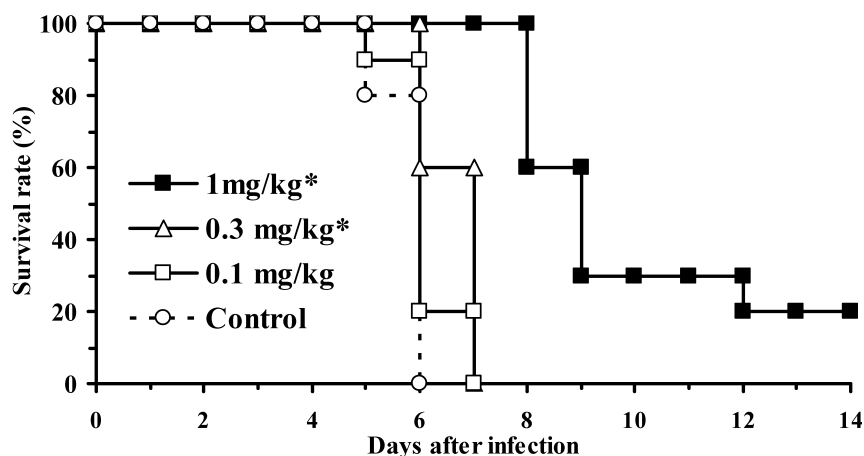
E. dermatitidis IFM 4827 株および IFM 53409 株に対する L-AMB の MIC はそれぞれ 0.5 および

Fig. 1. Survival curves of ddY mice infected intravenously with *E. dermatitidis* IFM 4827 at 1×10^7 conidia/mouse ($n=10$ /group).

(a) L-AMB



(b) D-AMB



Treatment with (a) L-AMB or (b) D-AMB was started 4 h after infection.

*, Significantly different from control ($p < 0.01$ by the log-rank test).

†, Significantly different from 1 mg/kg of D-AMB ($p < 0.05$ by the log-rank test).

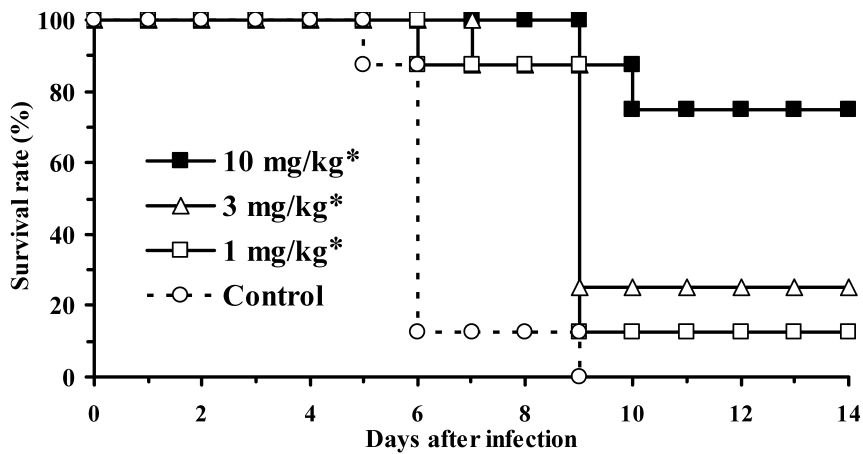
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、D-AMB の MIC はそれぞれ 0.25 および 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。L-AMB の *in vitro* 抗真菌活性は D-AMB の 1/2 であり、JESSUP らが報告している *Exophiala* 属に対する両薬剤の *in vitro* 抗真菌活性データ (L-AMB, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; D-AMB, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)⁷⁾ と同等であった。

2. 免疫不全マウス *E. dermatitidis* 全身感染モデルに対する *in vivo* 抗真菌活性

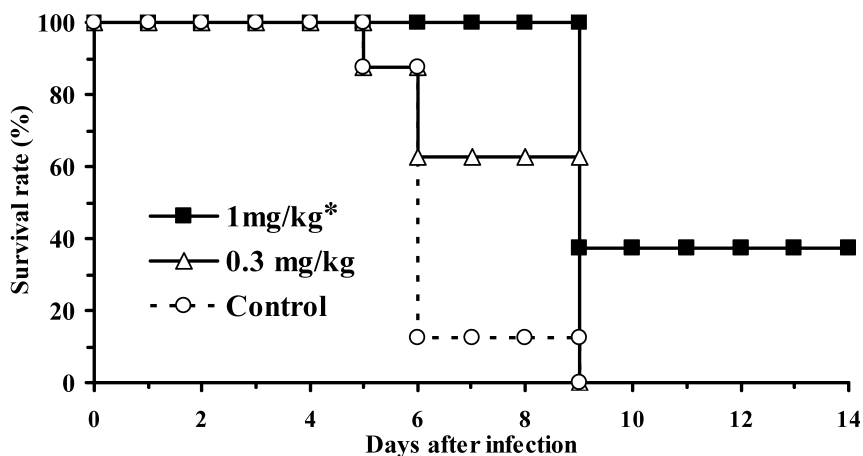
E. dermatitidis IFM 4827 株感染モデルおよび *E. dermatitidis* IFM 53409 株感染モデルにおける各薬剤投与群のマウスの生存曲線をそれぞれ Fig. 1 および Fig. 2 に示した。D-AMB では、*E. dermatitidis* IFM 4827 株感染モデルでは 0.3 mg/kg 以上の投与群で、*E. dermatitidis* IFM 53409 株感染モデル

Fig. 2. Survival curves of ddY mice infected intravenously with *E. dermatitidis* IFM 53409 at 5×10^6 conidia/mouse ($n=8/\text{group}$).

(a) L-AMB



(b) D-AMB



Treatment with (a) L-AMB or (b) D-AMB was started 4 h after infection.

*, Significantly different from control ($p < 0.01$ by the log-rank test).

ルでは1 mg/kg投与群でコントロール群に対する有意な延命効果が認められた。この結果はPOLAKが報告した*E. dermatitidis*感染モデルに対してD-AMBが有効性を示した結果と一致していた⁸⁾。一方、L-AMBでは、使用した2菌株のいずれの*E. dermatitidis*感染モデルにおいても1 mg/kg以上の投与群でコントロール群に対して生存日数が有意に延長し、延命効果が認められた。L-AMBの10 mg/kg投与群では、最終生存率がIFM 4827株感染モデルでは100%、IFM 53409株感染モデルでは75%であり、優れた救命効果が認められた。最終生存率から求めたL-AMBのED₅₀ (95%信頼区間)は*E. dermatitidis* IFM 4827株感染モデルでは3.63 mg/kg (2.32~6.47 mg/kg)、*E. dermatitidis* IFM 53409株感染モデルでは5.08 mg/kg (2.35~30.1 mg/kg)であった。一方、D-AMBの最大無影響量である1 mg/kg投与群の最終生存率はいずれのモデルにおいても50%未満であり、D-AMBのED₅₀を算出することができなかった。

L-AMBとD-AMBの*in vivo*抗真菌活性を最大無影響量で比較すると、*E. dermatitidis* IFM 4827株感染モデルにおいて、L-AMBの10 mg/kg投与群はD-AMBの1 mg/kg投与群に対して有意に優れた延命効果を示した。*E. dermatitidis* IFM

53409株感染モデルにおいては、L-AMBの10 mg/kg投与群とD-AMBの1 mg/kg投与群の生存日数に有意差は認められなかったが、L-AMBの10 mg/kg投与群の最終生存率(75%)はD-AMBの1 mg/kg投与群(37.5%)よりも高値であった。

各薬剤投与群の組織内菌数をTable 1に示した。D-AMBの1 mg/kg投与群では、肺を除く他の組織においてコントロールに対する有意な組織内菌数減少効果が認められた。L-AMBの10 mg/kg投与群では、すべての組織においてコントロール群に対して組織内菌数が有意に低く、組織内菌数減少効果が認められた。特にL-AMBの10 mg/kg投与群の血液内菌数は検出限界未満であった。L-AMBの10 mg/kg投与群はD-AMBの1 mg/kg投与群に比べて、すべての組織において菌数が有意に低く、組織内菌数減少効果がより優れていることが示された。したがって、L-AMBの10 mg/kg投与群では、D-AMBの1 mg/kg投与群よりも優れた組織内菌数減少効果を示すことが、より高い延命効果に寄与していると考えられた。

考察

黒色真菌とはメラニン色素を含有し暗色のコロ

Table 1. Tissue fungal burdens of ddY mice infected with *E. dermatitidis* IFM 4827.

Treatment ^{a)}	Log ₁₀ CFU/ml or tissue				
	Blood	Lung	Liver	Spleen	Kidneys
Control	2.36 ± 0.57	4.30 ± 0.19	5.91 ± 0.19	5.53 ± 0.57	6.17 ± 0.65
10 mg/kg L-AMB	<1.00 ^{b, c)}	3.69 ± 0.39 ^{b, c)}	2.46 ± 0.35 ^{b, c)}	2.65 ± 0.69 ^{b, c)}	3.46 ± 0.45 ^{b, c)}
1 mg/kg D-AMB	1.70 ± 0.29 ^{b)}	4.77 ± 0.52	5.06 ± 0.15 ^{b)}	4.71 ± 0.30 ^{b)}	4.84 ± 0.11 ^{b)}

^{a)} Mice were infected with 1×10^7 conidia of *E. dermatitidis* IFM 4827 via intravenous inoculation. Antifungals were administered intravenously 4 hr after infection ($n=6$ /group). The numbers of *E. dermatitidis* in tissue were determined 4 days after infection. The values represent the mean \pm standard deviation.

^{b)} Significantly different from control ($p<0.05$ by Student's *t* test).

^{c)} Significantly different from 1 mg/kg D-AMB ($p<0.005$ by Student's *t* test).

ニーを形成する真菌の総称であるが、分類学的にまとまった分類を示すものではない¹⁾。黒色真菌による感染症は、健常人に対して発症する皮膚真菌症に加え、クロモミコースス、フェオヒフォミコーススおよび菌腫の3つに分類される深部皮膚真菌症が主なものであるが、免疫不全状態を伴う患者では深在性真菌症を発症する場合がある¹⁾。黒色真菌による播種性真菌症の死亡率は79%と極めて高く、その主たる原因真菌の一つとして *Exophiala* 属が知られている⁹⁾。黒色真菌症治療の第一選択薬はイトラコナゾールを始めとするアゾール系抗真菌薬であるが、深在性真菌症の重症例では AMPH-B も第二選択薬として推奨されている³⁾。しかしながら、黒色真菌による播種性真菌症72例のケースレポートをまとめた総説によれば⁹⁾、*Exophiala* 属が原因となる深在性真菌症に対して D-AMB 治療の生存率は50% (4例中2例) であり、D-AMB の臨床効果は必ずしも満足されるものではない。種々の総説では^{4,10)}、臨床的なエビデンスはほとんどないものの、L-AMB は AMPH-B よりも副作用が軽減していることからより高用量が投与可能であり、AMPH-B よりも高い臨床効果が得られるであろうと記載されている。実際には、*Exophiala* 属が原因となった深在性真菌症に対して L-AMB の使用例がアゾールとの併用で2報あるのみであり^{11,12)}、本症における L-AMB の D-AMB に対する臨床的優位性は明確ではない。そこで我々は、免疫不全マウス *E. dermatitidis* 全身感染モデルに対する L-AMB と D-AMB の *in vivo* 抗真菌活性を比較することにした。

我々が知る限り、*Exophiala* 属に対する L-AMB の *in vivo* 抗真菌活性を検討した報告は本報がはじめてである。免疫不全マウス *E. dermatitidis* 全身感染モデルに対して L-AMB は臨床投与量 (2.5~5 mg/kg) を下回る 1 mg/kg の投与量から延命効果を示した。また、L-AMB の最大無影響量である 10 mg/kg 投与群は D-AMB の最大無影響量である 1

mg/kg よりも優れた延命効果、救命効果ならびに組織内菌数減少効果を示した。本研究結果から両薬剤の臨床効果を予見するには薬物動態学と薬力学 (PK-PD) を考慮する必要があると考えられる。両薬剤の薬効はいずれも PK-PD パラメータの C_{max}/MIC と相関することが示唆されていることから^{13,14)}、両薬剤間の C_{max}/MIC を比較することにした。ddY マウスにおける両薬剤の C_{max} データは免疫不全マウス *Candida* 全身感染モデルを用いて取得しており、L-AMB の 10 mg/kg では 201 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ¹⁴⁾、D-AMB の 1 mg/kg では 2.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (未公表データ) であった。これらのデータと本研究で用いた *E. dermatitidis* 2株に対する MIC データから、免疫不全マウス *E. dermatitidis* 全身感染モデルにおける L-AMB の 10 mg/kg の C_{max}/MIC は 201~402 であり、D-AMB の 1 mg/kg (4.62~9.24) と比べて 44 倍高いと考えられた。ヒトでの L-AMB の 10 mg/kg および D-AMB の 1 mg/kg の C_{max} はそれぞれ 119.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ¹⁵⁾ および 1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ¹⁶⁾ であり、本研究で用いた *E. dermatitidis* 2株が原因真菌と仮定した場合、臨床における L-AMB の 10 mg/kg の C_{max}/MIC (119.6~239.2) は D-AMB の 1 mg/kg (3.4~6.8) と比べて 35 倍高いと推察された。このように本感染モデルと臨床における両薬剤間の C_{max}/MIC の比率は同レベルであることから、本研究結果は臨床における両薬剤の臨床効果のある程度反映していると考えられた。以上のことから、L-AMB は *E. dermatitidis* が原因となる播種性真菌症に対して D-AMB と同等以上の臨床効果を示すことが期待され、総説等に記載された L-AMB の有用性を支持する実験結果であると考えられた。

本研究では L-AMB を感染4時間後という比較的早期の感染ステージで投与していることから、*E. dermatitidis* に対する L-AMB の empiric 治療における効果を動物モデルで検証したのと考えられる。今後、がん治療の進歩や臓器移植などの増

加により、重度の免疫不全状態が長期に持続する患者が増加していくものと考えられる。よって臨床現場においては上記のような免疫不全患者に対し真菌感染症の予防あるいは治療を目的とした抗真菌剤投与を行うなかで *E. dermatitidis* などの黒色真菌が原因となるブレイクスルー感染症のリスクが高まるものと予想される。今回の結果は、このような状況において L-AMB を empiric に使用することにより、*E. dermatitidis* による真菌症を防止できることを示唆するデータとも捉えることができる。

以上、本研究から、免疫不全マウス *E. dermatitidis* 全身感染モデルに対して L-AMB は *in vivo* 抗真菌活性を示し、その活性は、最大無影響量の比較において D-AMB よりも優れていることが示唆された。

参考文献

- 1) 山口英世：黒色真菌感染症。病原真菌と真菌症 第4版。pp. 251~256, 南山堂, 東京, 2007
- 2) MCGINNIS, M. R.; L. SIGLER & M. G. RINALDI: Some medically important fungi and their common synonyms and names of uncertain application. Clin. Infect. Dis. 29: 728~730, 1999
- 3) CHAPMAN, S. W. & D. C. SULLIVAN: Miscellaneous mycoses and algal infections. Harrison's principles of internal medicine. 17th ed. 1263~1267, McGraw-Hill Book Companies Inc., New York, 2008
- 4) REVANKAR, S. G.; D. A. SUTTON & M. G. RINALDI: Primary central nervous system phaeohyphomycosis: a review of 101 cases. Clin. Infect. Dis. 38: 206~216, 2004
- 5) Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi—Second Edition: Approved Standard M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. 22(16) 2008
- 6) TAKEMOTO, K.; Y. YAMAMOTO, Y. UEDA, *et al.*: Comparative studies on the efficacy of AmBisome and Fungizone in a mouse model of disseminated aspergillosis. J. Antimicrob. Chemother. 53: 311~317, 2004
- 7) JESSUP, C.; G. REYES, A. FOTHERGILL, *et al.*: A head-on comparison of the *in vitro* antifungal activity of conventional and lipid-based amphotericin B: a multicenter study. J. Chemother. 12: 22~29, 2000
- 8) POLAK, A.: Antimycotic therapy of experimental infections caused by dematiaceous fungi. Sabouraudia 22: 279~289, 1984
- 9) REVANKAR, S. G.; J. E. PATTERSON, D. A. SUTTON, *et al.*: Disseminated phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis. Clin. Infect. Dis. 34: 467~476, 2002
- 10) REVANKAR, S. G.: Dematiaceous fungi. Mycoses 50: 91~101, 2007
- 11) AL-OBAID, I.; S. AHMAD, Z. U. KHAN, *et al.*: Catheter-associated fungemia due to *Exophiala oligosperma* in a leukemic child and review of fungemia cases caused by *Exophiala* species. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 25: 729~732, 2006
- 12) ALABAZ, D.; F. KIBAR, S. ARIKAN, *et al.*: Systemic phaeohyphomycosis due to *Exophiala (Wangiella)* in an immunocompetent child. Med. Mycol. 47: 653~657, 2009
- 13) ANDES, D.; T. STAMSTED & R. CONKLIN: Pharmacodynamics of amphotericin B in a neutropenic-mouse disseminated-candidiasis model. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 922~926, 2001
- 14) TAKEMOTO, K.; Y. YAMAMOTO & Y. UEDA: Evaluation of antifungal pharmacodynamic characteristics of AmBisome against *Candida albicans*. Microbiol. Immunol. 50: 579~586, 2006
- 15) WALSH, T. J.; J. L. GOODMAN, P. PAPPAS, *et al.*: Safety, tolerance, and pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with *Aspergillus* species and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. Antimicrob.

Agents Chemother. 45: 3487~3496, 2001
16) HEINEMANN, V.; D. BOSSE, U. JEHN, *et al.*:
Pharmacokinetics of liposomal amphotericin

B (Ambisome) in critically ill patients. An-
timicrob. Agents Chemother. 41: 1275~
1280, 1997

In vivo activity of liposomal amphotericin B against *Exophiala dermatitidis* in a murine lethal infection model

SHIGEKI KASHIMOTO¹⁾, KOJI TAKEMOTO^{1)*}, YUTAKA YAMAMOTO²⁾
and KATSUNORI KANAZAWA¹⁾

¹⁾Pharmacology Research Laboratories, Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.

²⁾Product Management and Promotion Planning,
Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.

* Corresponding author

This study evaluated the *in vivo* activity of liposomal amphotericin B (L-AMB) and deoxycholate amphotericin B (D-AMB) in a murine model of disseminated infection caused by *Exophiala dermatitidis*. Cyclophosphamide-treated neutropenic ddY mice were inoculated intravenously with conidial suspensions of *E. dermatitidis* IFM 4827 or IFM 53409. The maximum tolerated doses of L-AMB and D-AMB were set at 10 mg/kg and 1 mg/kg, respectively. Four hours after infection, a single dose of L-AMB (0.3 to 10 mg/kg) or D-AMB (0.1 to 1 mg/kg) was administered intravenously. The efficacy of the antifungal treatment was assessed by the survival time over two weeks and the tissue fungal burdens 4 days after infection. L-AMB at a dose of ≥ 1 mg/kg significantly prolonged the survival time of mice infected with either strain compared with that of the control group. Percent survivals in the 10 mg/kg L-AMB-treated group (100% and 75%) were higher than those in the 1 mg/kg D-AMB-treated group (20% and 37.5%) in the IFM 4827 and IFM 53409 models, respectively. In the IFM 4827 model, 10 mg/kg L-AMB exhibited greater efficacy than 1 mg/kg D-AMB in terms of reducing the tissue fungal burdens (blood, lung, liver, spleen, and kidneys). These findings suggest that L-AMB was effective in the treatment of experimental disseminated *E. dermatitidis* infection, and the efficacy of L-AMB was superior to that of D-AMB.