

新抗真菌剤の血中濃度測定に関する基礎的研究

八木 滋子* 阿多 実茂

Study on Serum Concentration Assay *In Vitro* for New Antifungal Drugs

Shigeko YAGI* and Saneshige ATA

緒 言

真菌症は病原性真菌による感染症である。原発性疾患でもあるが何らかの基礎疾患に続発することが少なくない。その場合共通していえることは、宿主生体の免疫不全がその基盤をなしていることである。このような真菌症の治療には、起因病原真菌に対する抗真菌剤の投与のほかに何らかの免疫不全改善の為の処置が必要である。現在、免疫不全の箇所、程度を知る方法は確立されておらず基礎疾患の治療も決して満足すべきものではない。その上に臨床的に効果の高い抗真菌剤もいまだ登場していない状態であって、真菌症の治療は困難を極めている。とは言え、慢性および急性の血液疾患、ガン、結核症などを基盤とする真菌症の治療には Amphotericin B (AMPH-B) が現在頻用の傾向にある。本薬剤は気管支真菌症、肺真菌症、真菌性膿胸などの治療の難しい深在性真菌症に効果的に使用されている。広い抗真菌スペクトルを示すが、食欲不振等の副作用が強い欠点を持ちながら過去20年間、抗真菌剤としての王座を占めている薬剤である。新抗真菌剤の一つ Clotrimazole (BAY-b5097)⁴⁾ は、経口投与方法による長期療法的抗真菌剤として1969年バイエル社により開発されたものであるが、酵母と糸状菌に有効でその抗真菌スペクトルは極めて広い。とくに内臓カンジダ症への効果が期待されている。ただ、内服後腸管からの吸収はよいが体内で代謝をうけやすいこともあって、血中の活性濃度はやや低いのではないかといわれている。もう一つの新抗真菌剤として登場した 5-Fluorocytosine (5-FC)⁴⁾ は fluorinated pyrimidine の一つとして1957年 Hoffman-La Roche 社で合成された抗真菌剤で、抗菌スペクトルがやや狭くクリプトコックス症、カンジダ症などが主な対象疾患とされている。しかし副作用は極めて少なく、しかも内服後の血清、髄液、喀痰中の濃度が高いのが特長である。そこでわれわれはいまだ確立されていない新抗真菌剤 BAY-b および 5-FC の血中濃度の測定法を動物実験により検討し、さらに治療に投与されたヒトの血中濃度の測定に応用し、臨床検査に使用しうる可能性を認めたので報告する。

実験材料および実験方法

I. 実験材料

1. 試験菌株：教室保存の *Candida pseudotropicalis* 4 (C.-pt.-4) を用いた。

* 名古屋大学医学部医真菌研究施設

Institute of Medical Mycology, School of Medicine, Nagoya University

2. 使用培地：培地組成，条件を表1に示した。

3. 使用動物：体重2.5~4.5 kgの家兎，雌を使用した。

4. 使用薬剤 BAY-b 5097 はバイエル社より分与された原末を DMSO (ジメチルスルホオキシド) で溶解したもの，5-FC は日本ロッシュ社より分与された原末を50°C滅菌水で溶解したものを使用した。

II. 実験方法

(A) BAY-b5097 の場合

① 最小発育阻止濃度(MIC)の測定

C. -pt. -4 を培地Aで37°C, 24時間培養後，滅菌水で洗い 1×10^4 cells/ml に調整する。BAY-b フリーおよび0.01~0.5 $\mu\text{g/ml}$ 濃度を含む培地B, 4.5ml に，調整菌液を1滴 (0.03ml) 加えて37°C, 24~48時間静置培養し，菌の発育のみられない最大希釈段階の濃度を求めた。

② 標準発育阻止曲線の作成法

標準薬剤の基準液⁵⁾は BAY-b 5097 10,000 $\mu\text{g/ml}$ DMSO を50% DMSO で 1,000 $\mu\text{g/ml}$ に希釈，さらに25% DMSO で 100 $\mu\text{g/ml}$ に希釈した後，所要濃度になるまで滅菌水で倍数希釈して得た。培地 B, 9ml に標準薬剤0.5ml 加え37°C 温浴中で24時間振とう培養する。培養後3倍希釈ホルマリン 0.5ml を加えて固定した後，島津製スペクトロニック20で O. D. 値を測定した。片対数グラフ用紙の横軸対数目盛に BAY-b5097 の濃度をおき，縦軸に O. D. 値をとり標準曲線を求めた。

③ 血中濃度の測定法

正常ウサギは体重 2.5kg の雌で4日間ほど体調を整えた後，15時間前より絶食させておく。BAY-b5097 を0.5% カルボキシメチルセルローズナトリウム (CMC) 生食水に浮遊し，175mg/kg 経口投与する。投与後1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 24, 48時間に耳翼静脈より 3ml 採血し血清を分離する。培地 B 9ml に被検血清 0.5ml, 試験菌液 0.5ml を加え37°C温浴中で24時間振とう培養する。その後3倍希釈ホルマリン 0.5ml を加えて固定した後，スペクトロニック20で 600m μ の O. D. 値を測定し標準発育阻止曲線から濃度を求めた。

感染ウサギは，正常ウサギ 4.5kg に *Candida albicans* 533 1.2×10^7 cells/ml を耳翼静

表1 培地組成および条件

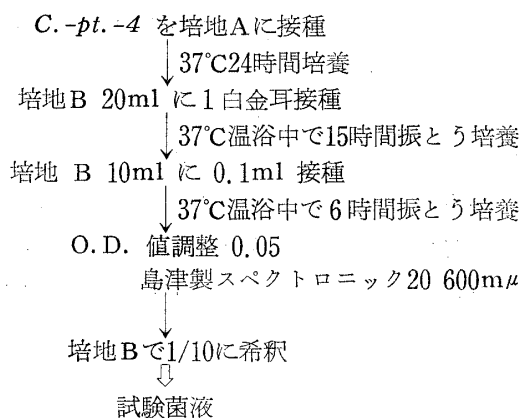
BAY-b Bioassay 用培地		5-FC カップ法用培地	
固型培地Aおよび液体培地B		固型培地	
Na ₂ HPO ₄	2.8g	Bacto Yeast Morphology	
KH ₂ PO ₄	1.2g	Agar (BYMA)	35g
MgSO ₄	0.1g	(Difco)	
NaCl	2.0g	蒸留水	1,000ml
C ₆ H ₁₂ O ₆	40.0g		
酵母エキス	10.0g		
寒天	15.0g		
蒸留水	1,000ml		
pH	6.5±0.3		
110°C 10分		121°C 15分	

培地A：試験菌継代用培地

培地B：試験菌接種用および定量用培地

BはAから寒天を除いたもの

表2 試験菌液の調整法



脈に接種後3日目に BAY-b5097 を 200mg/kg 経口投与し、同様に血中濃度を測定した。

ヒトの場合は、2g/day を3分割して2~3時間後に採血、血清分離したものについて同様に血中濃度を測定した。

(B) 5-FC の場合

① MIC の測定

C. -pt. -4 をサブローグルコース寒天斜面に37°C24時間培養後菌浮遊液とし、530m μ で O. D. 値を測定し 0.02 になるように調整する。50°C滅菌水で 5-FC を溶解し 10,000 μ g/ml の基準液をつくり、滅菌水で2倍希釈系列を得、50°Cに保った BYMA に混釈して、5-FC の終末濃度 500~0.97 μ g/ml を含む平板の系列をつくる。O. D. 値 0.02 の菌液を一白金耳量、平板上に約 1 cm の長さに画線し37°Cで48時間培養後、完全発育阻止を示す寒天平板の最大希釈倍数 (μ g/ml) をもって MIC とした。

② 標準発育阻止曲線の作製法

標準薬剤の基準液⁶⁾は 200 μ g/ml とし、5-FC 1mg を 50°C 仔牛血清 5ml に溶解した。さらに仔牛血清で 20 μ g/ml および 4 μ g/ml に希釈し、ついで所要濃度になるまで希釈をすすめた。まず試験菌 *C. pt. -4* を BYMA で37°C、24時間培養後 7×10^6 cells/ml の菌浮遊液をつくる。菌液 0.1ml を50°Cに保った BYMA 20ml に混釈して、シャーレ中央にカップを1つおき平板をつくる。固化後カップをとり除き、そのあとに標準希釈液 0.2ml ずつ分注し、37°C 18時間培養後阻止帯の直径をとり標準曲線を求める。

③ 血中濃度の測定法：正常ウサギ体重 2.25kg の雌に 5-FC 330mg/kg^{1) 2) 3)} を経口カテーテルで投与し、経時的に、1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48時間に耳翼静脈より 3ml 採血し血清を分離し、II. (A)③同様処置により標準発育阻止曲線より求めた。

結果および考察

A. BAY-b5097 の血中濃度測定

① 使用菌株の選定 (MIC の測定)：教室保存の株について培地 B における MIC の測定をしたところ、*C. -pt. -4* が 0.02 μ g/ml で感受性が一番高いので試験菌として選んだ。他は 0.25 μ g/ml といずれも感受性が低かった。最小殺菌濃度 (MFC) は 0.04 μ g/ml であった。岩田ら⁶⁾の試験菌 *Candida albicans 104 (C. -a. -104)* は MIC 0.063 μ g/ml, MFC 0.5 μ g/ml (カンジダ GS 培地) で私どもの *C. -pt. -4* より感受性の低い菌種が使用されている。培地は BAY-b フリーの時の菌の発育阻止が鋭敏にみられる培地組成を検討した。その結果、表 1 の培地を決定し使用した。岩田らも本培地を使用している。

② 標準発育阻止曲線は図 1 に示す通りで *in vitro* における BAY-b 濃度と試験菌発育阻止との関係が求められた。測定可能域は 0.032~0.5 μ g/ml である。*C. -a. -104* の測定可能域は 0.032~0.25 μ g/ml でわれわれの *C. -pt. -4* の域より若干狭い。

③ 血中濃度の測定：正常ウサギおよび *C. -a. -533* 感染ウサギにおける BAY-b175~200 mg/kg 経口投与による血中濃度の経時的变化は図 2 に示す通りである。両者とも最高値に達するのは投与後 1~2 時間で、24 時間を過ぎるとほとんど測定されない。*C. -a. -104* を使用した岩田らによると投与量が 20mg/kg と少ないにもかかわらず、投与後 4 時間で最高値 1.4~1.9 μ g/ml に達し 24 時間を過ぎると急激に減少するが、48 時間でもまだいくらか測定された。この違いはおそらく使用したウサギの個体差によるものであろう。

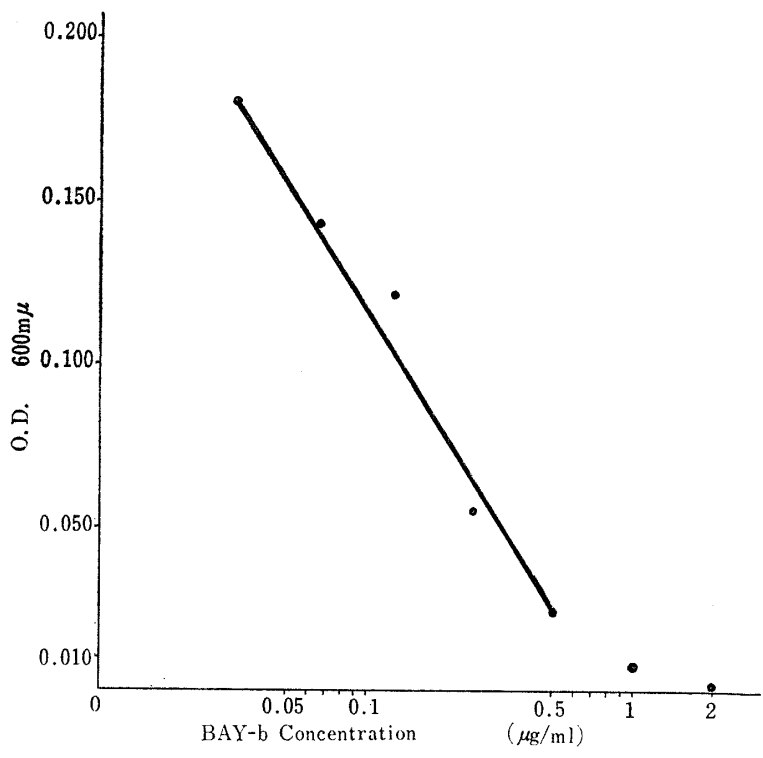


Fig. 1 Standard Curve of Growth Inhibition for BAY-b 5097

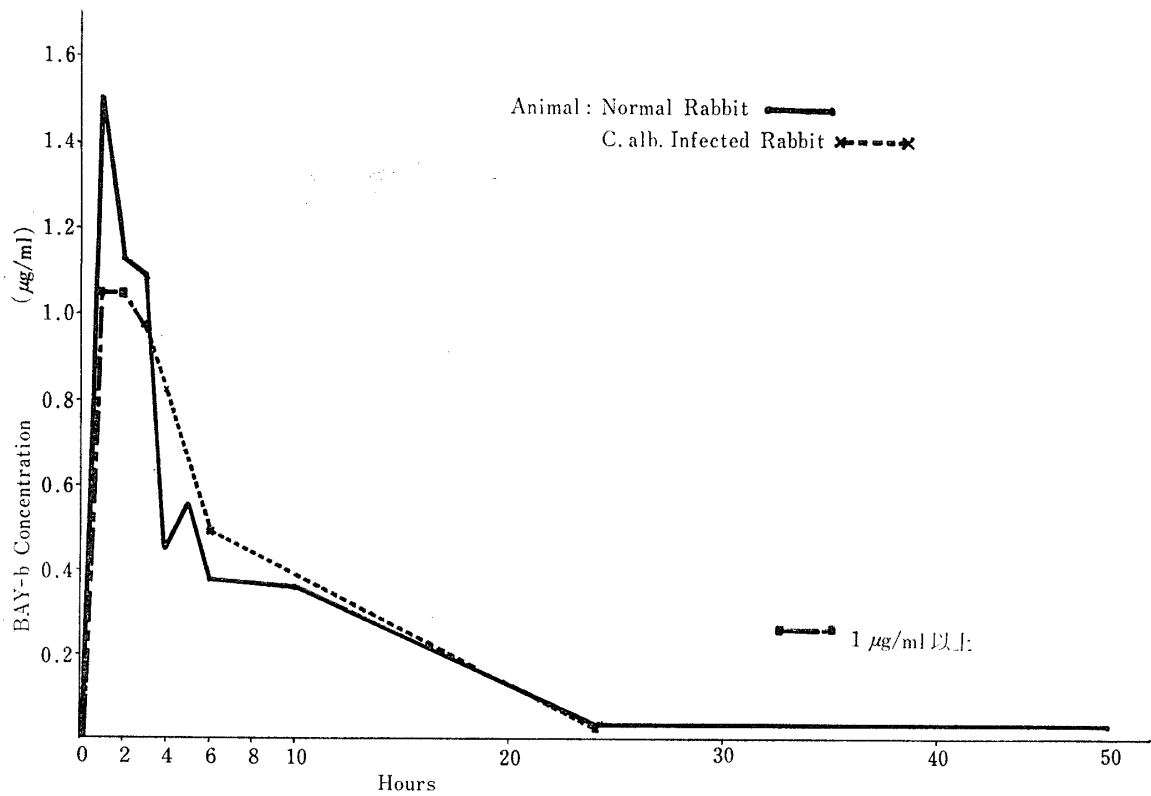


Fig. 2 Time Course of Serum Concentration with BAY-b per Oral Animals

ヒトの場合、1973年4月18日より1975年8月13日までに真菌感染症患者血清164検体の血中濃度を測定したが、0.032 μ g/ml以下のもの132検体、0.032~0.5 μ g/ml 24検体、0.5 μ g/ml以上7検体であった。高値を示した患者では症状が改善され、投与効果が認められた。

B. 5-FC 血中濃度測定

① 使用菌株の選定 (MIC の測定) : 教室保存の *C.-pt.-4*, 東大応用微生物研究所より分与された *Saccharomyces cerevisiae* (*Sa.-5*) および *C.-a.-104* の3菌種株について表3に示す半合成培地を用い、5-FC に対する感受性を測定した。結果は表4に示す通りである。半合成培地における MIC の測定は培地Aに 37 $^{\circ}$ C, 24時間培養, 1×10^4 cells/ml の菌液を調整後, 培地B 4.75ml に 5-FC の希釈系列0.25 ml を加え菌液を1滴滴下し37 $^{\circ}$ C, 48時間培養する。培養後完全発育阻止を示す試験管の最大希釈倍数 μ g/ml をもって MIC とした。表4からもわかるように, BYMA における *C.-pt.-4* の感受性が一番高いので以後 BYMA での試験菌とした。半合成培地ではいずれの菌種も感受性が低いので, 今回は使用しなかった。しかし培地組成を考慮することにより感受性が高くなる可能性もあるので, 今後の検討課題とした。試験菌 *S.-c.-ATCC 9763* 株, BYMA, カップ法, 37 $^{\circ}$ C18時間で 5-FC の検量線を求めた岩田ら⁶⁾によると測定域は 1~100 μ g/ml でわずかに広い。また, 松本ら⁷⁾によると *Staphylococcus aureus 209P*

を試験菌とし, Muller Hinton Agar (MHA) で薄層カップ法により 5-FC の測定を行っているが接種菌量の再現性に問題点があるように思う。

② 標準発育阻止曲線は仔牛血清を用いたとき, 図3の通りで, 測定可能域は 2.5~100 μ g/ml である。岩田らもほぼ同じ方法で 1 μ g/ml から測定が可能であるという。

③ 血中濃度の測定結果を図4に示す。5-FC 投与後1時間で最高値に達し, 3~5時間がピークで12時間まで検

表3 5-FC 感受性測定用培地組成

固型培地Aおよび液体培地B		
K ₂ HPO ₄	1.2g	
NaH ₂ PO ₄	2.16g	
MgSO ₄	0.1g	pH6.5 \pm 0.3
NaCl	2.0g	110 $^{\circ}$ C10分
ブドウ糖	40.0g	
カザミノ酸	1.0g	
酵母エキス	0.5g	
蒸留水	1,000ml	
寒天	15.0g	

A : 試験菌継代用培地

B : 試験菌定量用培地

BはAから寒天を除いたもの

表4 2種培地における3菌種株の5-FC感受性 μ g/ml

	BYMA	半合成培地B
<i>C.-104</i>	0.125	2.0
<i>C.-pt.-4</i>	0.016	0.25
<i>Sa-5</i>	0.063	1.0

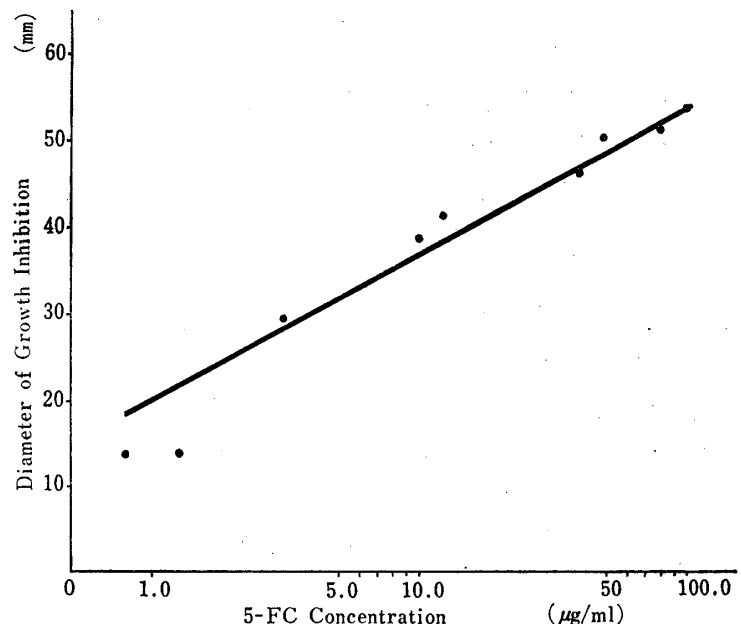


Fig. 3 Standard Curve of Growth Inhibition Diameter for 5-FC

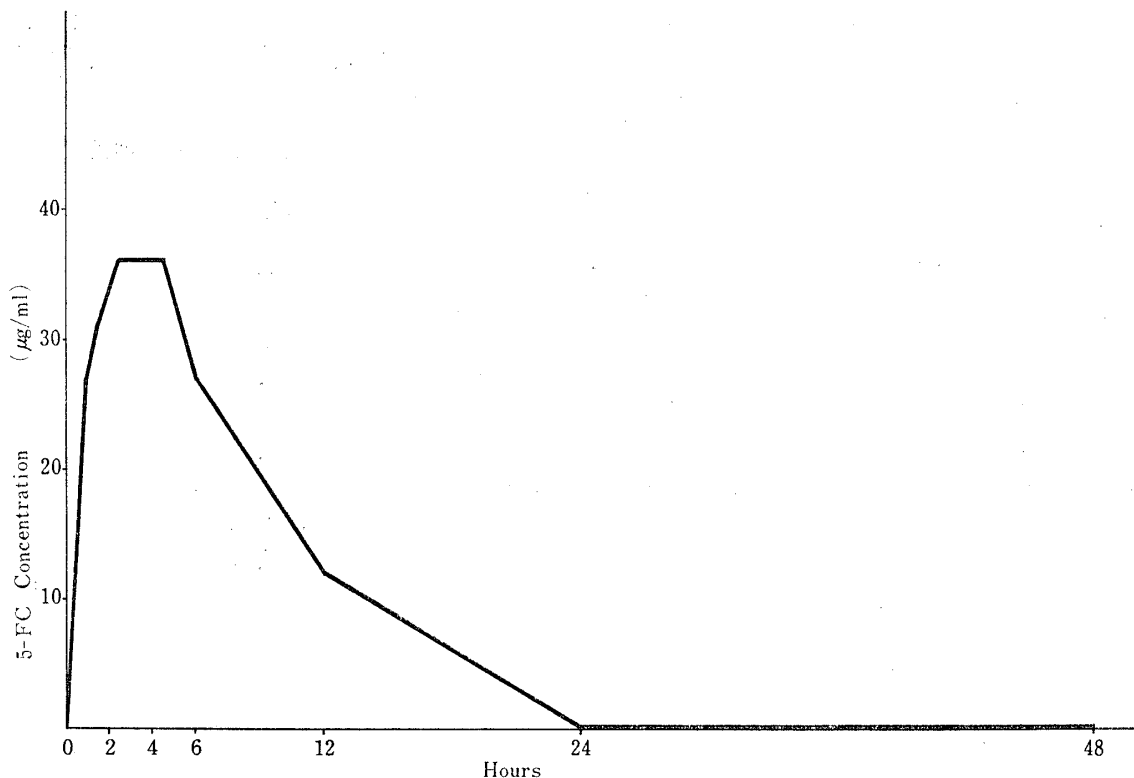


Fig. 4 Time Course of Serum Concentration for Treatment with 5-FC per Oral Animal

出されるが24時間以後は測定されなかった。しかし、ウサギ正常血清で作成した標準発育阻止曲線を使用すると、ピーク時の測定値は仔牛血清の時の約3倍の高値となった。使用する血清の種類により測定値に相違がみられる点は、標準発育阻止曲線作製時考慮を要する。

要 約

1. BAY-b5097 の血中濃度測定は *C. -pt. -4* を試験菌とし、半合成培地B を使用して Bioassay 比濁法により行なった。
2. 標準発育阻止曲線より得られる測定可能域は $0.032 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$
3. 正常ウサギにおける BAY-b 5997 血中濃度は投与1時間後に最高値に達し、5時間まで高濃度が続き、以後減少して24時間以降はほとんど検出されない。
4. *C. -a. -533* 感染ウサギにおける BAY-b 血中濃度は、正常ウサギのそれより低いが、推移は同じで1～2時間後に最高値となり、以下3～6時間維持される。24時間以後はほとんど検出されない。
5. ヒト血中濃度においては、164検体中 $0.032 \mu\text{g/ml}$ 以下が132検体、 $0.032 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ が24検体、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 以上7検体であった。
6. 5-FC の血中濃度測定は MIC 0.016g/ml の *C. pt. -4* を試験菌とし、BYMA を使用してカップ法により行なった。
7. 標準発育阻止曲線より得られる 5-FC 測定可能域は $2.5 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ 。
8. 正常ウサギにおける 5-FC 血中濃度は、経口投与後1時間で最高値に達し、3～5時

間がピークで12時間では最高値の1/3以下, 24時間以後はほとんど検出されない。

最後にこの実験を行なうにあたり当研究施設の近藤譲, 神戸俊夫両助手および森友世, 末吉真知子両技官に御協力をいただきました。御高礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Smith, Shadmy: *Am. Soc. for Microbiol.*, **6**, 871-877 (1969)
- 2) Paul, L. S., et al.: *Ann. of Int. Med.*, **76**, 15-22 (1972)
- 3) J. K. Dawborn, M. D. Page and D. J. Schiavone: *Bri. Med. J.*, **4**, 382-384 (1973)
- 4) バイエル薬品KK: 今日の医学, **60**, 66-72 (1976)
- 5) 岩田和夫: 私信「BAY-b5097 の生物学的定量法試案」(1973)
- 6) 岩田和夫: 私信「5-FC 血中濃度測定法」(1975)
- 7) 松本慶蔵他: 日本化学療法学会総会, 第24回, 11 (1967)