

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	牧 克之
論文題目	抗真菌薬の <i>in vivo</i> 効果を予測可能にした <i>in vitro</i> 評価法の確立		
(論文内容の要旨)			
<p>深在性真菌症は宿主の免疫低下が原因となる日和見感染症で近年増加傾向にあり、新規の抗真菌薬が待望されている。しかし抗真菌薬開発上の課題は、<i>in vitro</i>抗菌力の最小発育阻止濃度 (MIC) と<i>in vivo</i>感染モデルに対する薬効が相関せず、適正な化合物が選択できないことであった。これは薬物の蛋白結合や体内動態では説明できず、MIC測定法に原因があると考えられた。本研究では真菌の細胞型 (酵母型と菌糸型) と病原性に関する先行研究を考慮して、主要菌種である<i>Candida albicans</i>を用いて<i>in vivo</i>薬効を予測する<i>in vitro</i>評価法を確立し、薬動学的解析とechinocandin系抗真菌薬開発への応用を試みた。</p>			
第一章 血清を添加した抗真菌活性評価系の確立			
<p><i>C. albicans</i>では菌糸型が病原性と関連が強いという知見から、菌糸発育抑制効果を指標とすることにより<i>in vitro</i>と<i>in vivo</i>活性の乖離を解消できると考えた。そこで血清成分が菌糸型細胞を誘導することを考慮して、感染モデルと同じマウス由来の血清を培養液とし、菌とpH緩衝剤のみを添加する培養法を確立した。そしてMIC判定基準は、静菌的に作用するアゾール系薬は菌糸型細胞の伸長に対する最小抑制濃度 (MIC for mycelial elongation; mMIC) として、殺菌的作用のアムホテリシンBは菌の増殖抑制を指標とした最小濃度 (MIC for microbial growth; gMIC) とした。次に血清添加培地のMIC測定原理を応用した<i>ex vivo</i>アッセイを樹立した。抗真菌薬を投与したマウスから血清を経時的に採取後、正常マウス血清で希釈し、<i>ex vivo</i>アッセイにおいて抗真菌活性を検出できる最大希釈度を求めて血中抗菌価とした。すなわち血中抗菌価が1の時の薬物濃度は、各々mMICやgMICに相当する。薬物投与後のマウスから採取した血清中の薬物濃度は、理論的には血中抗菌価と血清存在下で得たmMICあるいはgMICとの積として推定されるが、実際に薬物の血中濃度は血中抗菌価による推定値とHPLCで定量した値が近似した。イトラコナゾールでは両方法間で相関性が低かったが、検討の結果、この原因が活性代謝物の産生によるものであることが判明し、この活性代謝物が母化合物と共に治療効果に寄与することが示唆された。</p>			
第二章 血中抗菌価による感染防御効果との相関性と薬動学的解析			
<p>マウスに静脈内接種された菌は血行性に腎臓に集積することが知られている。そこで薬物投与後のマウスの血中抗菌価と腎内生菌数との相関性を検証した。既存の抗真菌薬の延命効果は、腎内生菌数に対する抑制効果と相関した。さらに血中抗菌価と腎内生菌数との関係は、アゾール系薬とアムホテリシンBについて類似の結果が得られた。すなわち血清添加培地を用いて得られるmMICやgMICは、薬物の腎内生菌数に対して抑制効果をもたらす最小有効血中濃度とほぼ一致した。また活性代謝物が産生されるイトラコナゾールの場合でも、その血中抗菌価は最小有効血中濃度とほぼ一致した。</p>			
現行の抗真菌薬の薬動学的解析では、最小有効濃度が未検証のまま、薬物が濃度依存			

性あるいは時間依存性に効果が増大するかを解析されている。しかし上述の血中抗菌価を用いた解析では、抗真菌薬には各々、最大薬効を示す濃度非依存性効果と依存性効果を示す濃度域が存在し、最大効果を発揮するためには濃度非依存性の効果を維持することが重要であると考えられた。さらに抗菌価を用いて最小有効濃度以下に低下しても持続する抑制効果（PAFE）の推定も可能となった。感染マウスにアゾール系3薬物の腎内生菌数を増加させない最小1日用量を投与した際の濃度非依存性並びに濃度依存性効果、そしてPAFEの持続時間は薬物間において類似し、アゾール系薬物の薬効機序の推定が可能であった。

第三章 血清添加培地の最小発育阻止濃度（gMIC）によるechinocandin系化合物の*in vivo*効果予測

今回確立したマウス血清添加のMIC測定法を、FR901379の環状ペプチド構造に付加した脂肪酸側鎖を変換することによる抗真菌活性の向上に応用した。Echinocandin誘導体のスクリーニングにおいて求められるgMICと薬物のマウス体内動態パラメーターから延命効果をestimated ED₅₀ (est. ED₅₀) として推定し、実験的に求めたexperimental ED₅₀ (exp. ED₅₀) と比較した。このgMICを元にした延命効果の予測において、exp. ED₅₀測定値の精度を考慮して3倍以内の誤差を許容範囲とした。誘導体15検体のうち10検体のexp. ED₅₀は、gMICによって3倍以内の精度で予測が可能であったが、5検体は3倍以上の乖離があった。この乖離をHPLC法で求めた薬物動態パラメーター（AUCや投与30分後の血中濃度[C_{0.5hr}]）で補正した処、13検体のexp. ED₅₀値は、C_{0.5hr}とgMICから推定したest. ED₅₀と2倍以内の誤差で近似し、残り2検体は乖離が3倍以内の誤差であった。一方、世界的な標準法である血清非添加のClinical and Laboratory Standards Institute M27-A2法（CLSI法、2002）によるMIC値は、Exp. ED₅₀との相関性も低く10倍以上の乖離を示す化合物も複数個存在した。これらの結果から、本研究で確立したgMIC測定は標準法と比べて*in vivo*効果を良好に予測できることが示された。

本解析でgMIC値の改善が見られたechinocandin系誘導体について大動物における体内動態や毒性試験の成績から選択した候補化合物の中で、側鎖にイソキサゾール環を有する誘導体ミカファンギンが、難治性の*Aspergillus fumigatus*に対して最も感染治療効果が優れることを見出した。ミカファンギンはアゾール系薬やアムホテリシンBと同様に、血清添加培地で測定されたgMICがマウスにおける腎内生菌数抑制に要する有効濃度とほぼ一致し、かつ*C. albicans*の酵母型と菌糸型細胞の両者に殺菌的に作用した。

以上、本研究で確立した血清添加培地を用いるMIC測定法は、薬物の有効血中濃度を推定し薬動学的解析にも応用できる点で、CLSI標準法を大きく改善した。本法は、新規抗真菌薬の創出や臨床治療の最適化にとって有用な評価法として期待される。

(論文審査の結果の要旨)

深在性真菌症は宿主の免疫低下が原因となる日和見感染症で近年増加傾向にあり、新規の抗真菌薬が待望されている。しかし抗真菌薬開発上の課題は、in vitro抗菌力の最小発育阻止濃度 (MIC) とin vivo感染モデルに対する薬効が相関せず、適正な化合物が選択できないことであった。これは薬物の蛋白結合や体内動態では説明できず、MIC測定法に原因があると考えられた。本研究では真菌の細胞型 (酵母型と菌糸型) と病原性に関する先行研究を考慮して、主要菌種であるCandida albicansを用いてin vivo薬効を予測するin vitro評価法を確立し、薬動学的解析とechinocandin系抗真菌薬開発への応用を試みた。

第一章 血清を添加した抗真菌活性評価系の確立

C. albicansでは菌糸型が病原性と関連が強いという知見から、菌糸発育抑制効果を指標とすることによりin vitroとin vivo活性の乖離を解消できると考えた。そこで血清成分が菌糸型細胞を誘導することを考慮して、感染モデルと同じマウス由来の血清を培養液し、菌とpH緩衝剤のみを添加する培養法を確立した。そしてMIC判定基準は、静菌的に作用するアゾール系薬は菌糸型細胞の伸長に対する最小抑制濃度 (MIC for mycelial elongation; mMIC) として、殺菌的作用のアムホテリシンBは菌の増殖抑制を指標とした最小濃度 (MIC for microbial growth; gMIC) とした。次に血清添加培地のMIC測定原理を応用したex vivoアッセイを樹立した。抗真菌薬を投与したマウスから血清を経時的に採取後、正常マウス血清で希釈し、ex vivoアッセイにおいて抗真菌活性を検出できる最大希釈度を求めて血中抗菌価とした。すなわち血中抗菌価が1の時の薬物濃度は、各々mMICやgMICに相当する。薬物投与後のマウスから採取した血清中の薬物濃度は、理論的には血中抗菌価と血清存在下で得たmMICあるいはgMICとの積として推定されるが、実際に薬物の血中濃度は血中抗菌価による推定値とHPLCで定量した値が近似した。イトラコナゾールでは両方法間で相関性が低かったが、検討の結果、この原因が活性代謝物の産生によるものであることが判明し、この活性代謝物が母化合物と共に治療効果に寄与することが示唆された。

第二章 血中抗菌価による感染防御効果との相関性と薬動学的解析

マウスに静脈内接種された菌は血行性に腎臓に集積することが知られている。そこで薬物投与後のマウスの血中抗菌価と腎内生菌数との相関性を検証した。既存の抗真菌薬の延命効果は、腎内生菌数に対する抑制効果と相関した。さらに血中抗菌価と腎内生菌数との関係は、アゾール系薬とアムホテリシンBについて類似の結果が得られた。すなわち血清添加培地を用いて得られるmMICやgMICは、薬物の腎内生菌数に対して抑制効果をもたらす最小有効血中濃度とほぼ一致した。また活性代謝物が産生されるイトラコナゾールの場合でも、その血中抗菌価は最小有効血中濃度とほぼ一致した。

現行の抗真菌薬の薬動学的解析では、最小有効濃度が未検証のまま、薬物が濃度依存性あるいは時間依存性に効果が増大するかを解析されている。しかし上述の血中抗菌価を用いた解

析では、抗真菌薬には各々、最大薬効を示す濃度非依存性効果と依存性効果を示す濃度域が存在し、最大効果を発揮するためには濃度非依存性の効果を維持することが重要であると考えられた。さらに抗菌価を用いて最小有効濃度以下に低下しても持続する抑制効果（PAFE）の推定も可能となった。感染マウスにアゾール系3薬物の腎内生菌数を増加させない最小1日用量を投与した際の濃度非依存性並びに濃度依存性効果、そしてPAFEの持続時間は薬物間において類似し、アゾール系薬物の薬効機序の推定が可能であった。

第三章 血清添加培地の最小発育阻止濃度（gMIC）によるechinocandin系化合物のin vivo効果予測

今回確立したマウス血清添加のMIC測定法を、FR901379の環状ペプチド構造に付加した脂肪酸側鎖を変換することによる抗真菌活性の向上に応用した。Echinocandin誘導体のスクリーニングにおいて求められるgMICと薬物のマウス体内動態パラメーターから延命効果をestimated ED50（est. ED50）として推定し、実験的に求めたexperimental ED50（exp. ED50）と比較した。このgMICを元にした延命効果の予測において、exp. ED50測定値の精度を考慮して3倍以内の誤差を許容範囲とした。誘導体15検体のうち10検体のexp. ED50は、gMICによって3倍以内の精度で予測が可能であったが、5検体は3倍以上の乖離があった。この乖離をHPLC法で求めた薬物動態パラメーター（AUCや投与30分後の血中濃度[C0.5hr]）で補正した処、13検体のexp. ED50値は、C0.5hrとgMICから推定したest. ED50と2倍以内の誤差で近似し、残り2検体は乖離が3倍以内の誤差であった。一方、世界的な標準法である血清非添加のClinical and Laboratory Standards Institute M27-A2法（CLSI法、2002）によるMIC値は、Exp. ED50との相関性も低く10倍以上の乖離を示す化合物も複数個存在した。これらの結果から、本研究で確立したgMIC測定は標準法と比べてin vivo効果を良好に予測できることが示された。

本解析でgMIC値の改善が見られたechinocandin系誘導体について大動物における体内動態や毒性試験の成績から選択した候補化合物の中で、側鎖にイソキサゾール環を有する誘導体ミカファンギンが、難治性のAspergillus fumigatusに対して最も感染治療効果が優れることを見出した。ミカファンギンはアゾール系薬やアムホテリシンBと同様に、血清添加培地で測定されたgMICがマウスにおける腎内生菌数抑制に要する有効濃度とほぼ一致し、かつC. albicansの酵母型と菌糸型細胞の両者に殺菌的に作用した。

以上、本研究で確立した血清添加培地を用いるMIC測定法は、薬物の有効血中濃度を推定し薬力学的解析にも応用できる点で、CLSI標準法を大きく改善した。本法は、新規抗真菌薬の創出や臨床治療の最適化にとって有用な評価法として期待される。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成25年8月20日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。