

総 説

抗真菌薬の創薬における前臨床薬効評価の現状と課題

内 田 勝 久 山 口 英 世

帝京大学医真菌研究センター

要 旨

抗真菌薬の有効性についての前臨床評価は、基本的に薬剤の *in vitro* 抗菌活性および適切な感染モデルを用いた *in vivo* 抗菌活性（すなわち治療効果）の測定によってなされる。

In vitro 活性測定法は、再現性のよい成績が得られることを第一に要求されるが、加えて *in vivo* 活性と良好な相関性をもつことが重要な要件となる。前者の条件に関しては、近年薬剤感受性試験法の標準化を目指して米国 NCCLS および本学会標準化委員会から基準実施法が提案され、新規薬剤の活性の測定にも広く用いられている。しかしこの測定法を創薬に適用する場合に幾つかの問題点に直面する。その第一は、いずれの標準法も既存の抗真菌薬のみを対象とし、それ以外の薬剤については MIC 判定基準が定かでなく再現性の保証もないこと、第二に試験菌種に限られ抗菌スペクトル等の検討に用いるとき成績の信頼性が得られるか等の問題がある。一方、*in vivo* 評価は新規抗真菌薬の臨床効果を前臨床段階で予知する上できわめて重要である。この *in vivo* 実験系の大切な要件としては、ヒトの病態に類似した真菌症動物モデルを用い、臨床試験における薬剤投与スケジュールに相応する投与経路、投与量および投与期間等を考慮して治療効果を検討することが必要である。この点では足白癬モデルを用いる抗白癬薬の薬効試験は精度および信頼性で特筆すべき前臨床評価系であると言える。

本総説では、現状における前臨床評価試験法を *in vitro* 試験と *in vivo* 試験の両面から示し、その問題点を論ずる。

Key words: 抗真菌薬 (antifungal agents), 前臨床評価 (preclinical evaluation), 薬効評価 (evaluation of the therapeutic effects), 抗真菌活性 (antifungal activity)

はじめに

近年わが国における新規抗真菌薬の開発は、とくに皮膚科領域で適用される表在性真菌症治療薬においてきわめて活発に行われて来た。現在のところ外用剤 20 数種と経口剤 3 種が上市され、殆どの薬剤は真菌に対してエルゴステロール生合成阻害作用をもち、白癬菌、カンジダ、マラセチアに対してすぐれた抗菌活性を示す。最近開発された薬剤の多くは、用法を正しく厳守すれば完治させうる薬効を持つ薬剤である。一方、深在性真菌症に適応可能な内用薬について昨年までは、amphotericin B (AMPH), flucytosine (5-FC), miconazole, fluconazole (FLCZ), itraconazole (ITCZ) の 5 薬剤に過ぎなかった。しかもこれらの薬剤は近年問題化している重篤な真菌症や FLCZ 耐性菌による真菌症に十分な有用性をもつとは言えず、より安全性が高く治療効果のすぐれた新規抗真菌薬の開発が待望されていたが、昨年末にキャンデン系薬剤の micafungin (MCFG) が上市され、その臨床的有用性が期待されている。これらの新規抗真菌薬の開発に際して行われる非臨床試験項目としては、薬剤の物理化学的性状と安定性、一般薬理、薬効を裏付ける作

用（薬効評価）、毒性、薬物動態などがある。とくに薬効の評価は、臨床試験の成績を予知する上できわめて重要であるばかりでなく、外用剤においては基剤の選択、薬剤濃度の設定に、また内用剤では治験デザインの構築等に有用な情報を提供する。ここでは深在性真菌症および皮膚真菌症の治療薬の薬効評価に関連する試験法の現状と問題点を *in vitro* 試験と *in vivo* 試験の両面から解説する。

In vitro 抗真菌活性の測定法

薬剤の真菌に対する抗菌試験は、新規抗真菌薬の開発における前臨床的評価および臨床的評価のいずれにも欠かせない重要な試験である。従来から *in vitro* 抗真菌活性の測定は、サブローブドウ糖寒天培地を主とする寒天希釈法により行われてきた。しかし本法は再現性や信頼性の点で満足できるものでなく、かつ研究者間または研究施設間の成績の不均一性が指摘され感受性試験の基準化が要望されていた。一般に抗真菌薬感受性試験法の基準化に際して、真菌側ならびに薬剤側の問題点を考慮に入れて実施法の条件設定を行う場合、(1) 薬剤溶液の調製・保存と希釈系列作製法、(2) 試験菌種・菌株の選定、(3) 接種菌液の調製法と接種菌量、(4) 試験培地の種類（組成）と pH、(5) 培養温度と時間、(6) 終末点の測定と判定基準などの変動要因にとくに留意しなければならない

別刷請求先：内田 勝久

〒192-0395 東京都八王子市大塚 359
帝京大学医真菌研究センター

い、各薬剤に共通して適用可能な試験実施法を基準化するためには、上記(1)～(6)のすべての変動要因を厳密に規定しなければならない。

1. 酵母様真菌の標準的測定法

1982年に米国 NCCLS に設置された小委員会を出発点として、主要病原酵母 (*Candida* spp. および *Cryptococcus neoformans*) を対象として完全合成培地 RPMI 1640 を用いたマクロ液体希釈法を基本的な手技とする再現性の高い感受性試験基準実施法の作製作業が進められてきた。特に試験成績に大きな影響を与える測定条件の諸変動要因について多施設共同研究によって綿密に検討された¹⁻⁵⁾。その結果、1992年に“Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Proposed Standard”と題する詳細な基準実施法 (M27-P)⁶⁾が提案された。その後、1995年にミクロ液体希釈法を加えた基準法 (M27-T)⁷⁾が提案され、1997年に最終的基準法 (M27-A)⁸⁾が承認され、さらに2002年に改訂版 (M27-A2)⁹⁾が発表されるに至った。これらの測定法の詳細は文献を参照されたい。そのなかでの注目点は、M27-Aで *Candida* spp. に対する FLCZ、ITCZ および 5-FC の臨床的有効性が期待できる臨床的ブレイクポイントの仮指針が示されていることである。本法はその後世界的に受け入れられ、酵母の薬剤感受性試験並びに新規抗真菌薬の抗菌活性の測定に普遍的に使用されるようになった。一方、わが国でも本学会標準化委員会より深在性真菌症に適用される治療薬5剤を対象にして M27-P をミクロ化した基準化試案 (真菌学会法) が1995年に提案された¹⁰⁾。他方、ヨーロッパでも2002年に AFST-EUCAST 法¹¹⁾が提案されている。ここでは特に問題となるそれぞれの試験法の *Candida* spp. に対するアゾール系薬剤の MIC 判定基準を要約して Table 1 に示す。ここで注目されるのは、NCCLS M27-A の改訂版である M27-A2 で判定基準を一部修正する必要があることを示唆するコメントが追記されていることである。これは従来の判定基準がアゾール系に関する限り *in*

vitro/in vivo 相関性の観点からは厳し過ぎることを示唆する最近の研究結果を反映させたものと考えられる。これには著者はわれわれの研究結果¹²⁾からも同意見であり、NCCLS 法、真菌学会法ともにアゾール系薬終末点判定基準を明確なカタチで変更すべきであると考えている。それでは開発に関わる新薬の場合の MIC 判定基準は如何にすべきかという問題は、薬剤ごとの *in vivo* 効果に相関する *in vitro* 判定基準を定めることが必要である。

2. 糸状菌の標準的測定法

糸状菌の感受性試験の標準化については、未だ多数の問題が残されている。前述した酵母の基準法作製に際して問題となった変動要因は、当然すべて糸状菌に当てはまるが、それに糸状菌固有の問題が加わる^{13, 14)}。とりわけ大きな問題は接種菌として何 (分生子/菌糸) を使うか、終末点の判定をどのように行うかなどである。NCCLS では1998年に深在性真菌症起因菌のうち分生子を着生する糸状菌の薬剤感受性試験法 (M38-P)¹⁵⁾が提案され、さらに2002年に M38-A¹⁶⁾が発表された。われわれは、種々の変動要因の基準化と終末点の判定基準の設定を目指して、菌体 ATP 量 (発光測定法) や酸化還元指示薬の還元能 (比色法) などの生化学的活性を指標とする糸状菌の感受性試験法を検討した。ATP 法に関しては、白癬菌を試験菌として使用培地、接種菌量、培養時間等の測定条件を詳細に検討し、さらに酵母を用いて他の測定法との比較した上で試験実施法を確立した¹⁷⁾。しかし本法は、測定用機器にルミノメーターを必要とすることと実施法が少々煩雑であり、一般の日常検査に導入するには解決しなければならない問題点が残された。そこで次に、酸化還元指示薬の Alamar BlueTM (AB) に注目した。それは AB が水溶性のため MTT や XTT のような特殊な抽出操作が不要であること、真菌にまったく毒性を示さないこと、培地中で安定であり長時間のモニタリングが可能であること、色調の変化 (酸化型-青色、還元型-赤色) がきわめて明瞭で目視判定は勿論比色測定も可能であることなどが上げられる。本法は

Table 1. Standards of MIC determination of azole antifungal agents against *Candida* spp. using standard susceptibility testing method for yeasts

Standard susceptibility testing	Method	Standards of MIC determination
JSMM ¹⁾ method	Broth microdilution	35°C culture measured every 24 hours, IC ₈₀ * value when the turbidity of the positive control reaches 0.2
NCCLS ²⁾ M27-A method	Broth macrodilution	IC ₈₀ values in 46~50-hour culture at 35°C
	Broth microdilution	Score 2** in 48-hour culture at 35°C
NCCLS M27-A2 method	Broth macrodilution	IC ₈₀ values in 46~50-hour culture at 35°C
	Broth microdilution	Use score 2 in 48-hour culture at 35°C as base strain showing trailing growth*** can be read at 24-hour culture
AFST-EUCAST ³⁾ method	Broth microdilution	IC ₅₀ values in 24-hour culture at 35°C

¹⁾: The Japanese Society for Medical Mycology, Committee of Clinical Laboratory Standards-1994.

²⁾: National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA.

³⁾: Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing.

*: Equivalent to 80% growth inhibition.

**: Prominent decrease in turbidity, equivalent to 50% growth inhibition.

***: Growth from partial inhibition by drug in a wide concentration range.

Table 2. Main points of standard susceptibility test for mycelial fungi

Standard method	Test fungal species/culture temperature	MIC determination method
JSMM ¹⁾ method	Hyaline hyphomycetes, zygomycetes, dermatophytes, dematiaceous fungi, dimorphic fungi/27°C	Color change indicated by Alamar blue, IC ₈₀ value when the positive control changes to red
NCCLS ²⁾ M38-P	<i>Rhizopus</i> spp. (21~26-hours), <i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Sporothrix schenckii</i> (46~50-hours) <i>Pseudallescheria boydii</i> (70~74-hours)/35°C	Visual judgment of turbidity AMPH (score 0*), 5-FC, azoles (score 2**)
NCCLS M38-A	<i>Rhizopus</i> spp. (21~26-hours), <i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Sporothrix schenckii</i> (46~50-hours) <i>Pseudallescheria boydii</i> (70~74-hours)/35°C	Visual judgment of turbidity AMPH, ITCZ, VOR, POS, RAV (score 0), 5-FC, FLCZ, KET (score 2)

¹⁾: The Japanese Society for Medical Mycology, Committee of Clinical Laboratory Standards-1997.

²⁾: National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA.

*: 100% growth inhibition.

** : Equivalent to 50% growth inhibition.

AMPH; amphotericin B, 5-FC; flucytosine, ITCZ; itraconazole, VOR; voriconazole, POS; posaconazole, RAV; ravuconazole, FLCZ; fluconazole, KET; ketoconazole.

1999年に本学会標準化委員会から糸状菌の感受性試験法として提案された¹⁸⁾. その後、本法は各種薬剤について検討され、その有用性が実証された¹⁹⁻²¹⁾. それらの標準法の要点を Table 2 に示す. 詳細については文献を参照されたい.

3. マラセチア属菌種の測定法

Malassezia 属菌種は、癬風をはじめとして毛包炎、間擦疹、脂漏性皮膚炎およびその他の炎症性皮膚疾患に関与する好脂質性酵母である. *Malassezia* 属菌種に対する各種抗真菌薬の *in vitro* 抗菌活性に関しては、従来から測定条件によって得られた MIC 値が大きく変動することが指摘されてきた. 感受性試験の実施法は、本菌種が発育に脂質を要求することから、酵母を対象とする標準法はそのまま適応できず、未だ確立されるに至っていない. われわれは *Malassezia* 属菌種のほとんどが良好な発育を示す modified Dixon 培地を用いる寒天希釈法による各種抗真菌薬の測定結果を報告した²²⁾. 最近になって M. Garau らは Leeming-Notman 培地によるミクロ液体希釈法により *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae* の 4 菌種に対する各種薬剤の結果を報告している²³⁾. 今後本菌種に対する測定法の標準化、とくに液体希釈法による測定法の確立が望まれることから、本文献は注目に値するものといえる.

4. *In vitro* 抗菌活性に関する最近の興味ある文献

GM. Gonzalez らは *Schizophyllum commune*, *Bjerkandera adusta*, *Coprinus* spp. などの担子菌系糸状菌 44 株に対する内用抗真菌薬の抗菌活性を NCCLS M38-P により測定した結果を報告した²⁴⁾. T. Nakai らは温度依存性二形性真菌の酵母形と菌糸形の発育形態の違いにおける各種内用抗真菌薬の感受性の相違を認め、MCFG は菌糸形においてより強力な抗菌活性を示し、FLCZ などのアゾール系薬は酵母形に強い活性が示すことを報告した²⁵⁾. また G. Ramage らは *C. albicans* の biofilm に対する FLCZ と AMPH の抗菌活性を XTT assay により通常の増殖細胞系 (planktonic) と区別して測定する方法を提案した²⁶⁾. R. Ramani は flow cytometry を応用した

短時間 (2~6 hrs) 感受性測定法を考案し、NCCLS M27-A と比較した結果を報告している²⁷⁾.

以上 *in vitro* 試験について記述した. 酵母様真菌および特定の菌種の糸状菌に対する抗真菌薬感受性試験法は標準化され、日常検査における臨床分離菌株の感受性試験および新規抗真菌薬の抗菌活性の測定や抗菌スペクトルの検討に広く応用されている. 一方マラセチア属に関しては未だ確立されておらず、今後の課題として残されている. ここに述べた *in vitro* 試験の結果は、新規抗真菌薬の開発において必要不可欠の試験ではあるが、これのみで臨床効果を予測し、薬剤の優劣を占うことは出来ない.

In vivo 抗真菌活性の評価法

1. *In vivo* 薬効評価系の要件

In vivo における抗真菌薬の薬効評価を行う際にあげられる大切な要件としては、ヒトの真菌症の病態に類似した疾患モデルを作製することと、第 II 相以降に行われる臨床試験における薬剤投与スケジュールに相応する投与経路、投与量および投与間隔等を考慮して治療実験を行うことが肝要である. 薬効評価に用いる真菌症モデルは通常マウス、ラットおよびモルモット等の小動物を用いて作製される. その際もっとも重要なのは、ヒトの疾患から新鮮分離された病原真菌菌株を用いて、自然感染と同様な経路で動物に接種し、類似した病巣形成過程を経て病理組織学的所見に類似した疾患が再現性よく形成することのできる菌株を選択することである. また治療実験では、疾患モデル作製の操作の簡便性も求められる.

2. 深在性真菌症治療薬の評価に用いられる疾患モデルと治療実験

深在性真菌症治療薬の *in vivo* 実験に用いられる実験動物は、微生物学的品質管理と実験精度から主として小動物のマウスまたはラットが用いられる. 真菌の毒力是一般に弱く、無処置の正常動物の場合、感染を成立させるには 10⁶ 個以上の細胞の静脈内接種を必要とする. ヒトの真菌症の多くが日和見感染によることから、動物

Table 3. *In vivo* antifungal activity evaluation method against deep seated mycosis

Disease	Organism	Animal	Pretreatment	Infection route	Efficacy evaluation method
Disseminated candidiasis	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i>	Mouse, rat, Guinea pig	None, CP, CA, ME	Intravenous	Survival percent, CFU in kidneys
<i>Candida</i> endocarditis	<i>C. albicans</i>	Rat, rabbit	None	Intravenous	CFU in cardiac vegetation and kidneys
<i>Candida</i> endophthalmitis	<i>C. albicans</i>	Rabbit	None	Intravenous	CFU in choroid-retina
Gastrointestinal candidiasis	<i>C. albicans</i>	Mouse	Antibacterial agents, CA	Oral	CFU in feces and kidneys
<i>Candida</i> pyelonephritis	<i>C. albicans</i>	Mouse	None, CA	Intravenous	CFU in kidneys
Invasive pulmonary aspergillosis	<i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i>	Mouse, rat	CP, CA	Intranasal, Intrabronchial	Survival percent, CFU in lung, brain and kidneys
Disseminated aspergillosis	<i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i>	Mouse, rat	CP, CA	Intravenous	Survival percent, CFU in lung, brain and kidneys
Invasive pulmonary cryptococcosis	<i>C. neoformans</i>	Mouse, rat	None	Intranasal, Intrabronchial	Survival percent, CFU in lung and brains
<i>Cryptococcus</i> invasive encephalitis	<i>C. neoformans</i>	Mouse, rat	None	Intracerebral	Survival percent, CFU in brain and lungs
Disseminated cryptococcosis	<i>C. neoformans</i>	Mouse, rat	None	Intravenous	Survival percent, CFU in brain, lung and kidneys
Disseminated trichosporonosis	<i>T. asahii</i>	Mouse	CP, TC	Intravenous	Survival percent, CFU in kidneys
Disseminated pseudallescheriasis	<i>P. boydii</i>	Mouse	CP	Intravenous	Survival percent, CFU in spleen, kidney and brains
Disseminated fusariosis	<i>F. solani</i>	Mouse	None	Intravenous	Survival percent, CFU in kidney and livers
Invasive pulmonary histoplasmosis	<i>H. capsulatum</i>	Mouse (B6C3F ₁)	None	Intrabronchial	Survival percent, CFU in lungs
Disseminated histoplasmosis	<i>H. capsulatum</i>	Mouse	CP	Intravenous	Survival percent, CFU in kidneys
Invasive pulmonary mucormycosis	<i>R. oryzae</i>	Mouse	CA	Exposure aspiration	Survival percent, median survival times
Pneumocystosis	<i>P. carinii</i>	Mouse, rat	CA, TC, DM	Intranasal	Number of cysts in lung

CP; cyclophosphamide, CA; cortisone acetate, ME; mechlorethamine hydrochloride, TC; tetracycline hydrochloride, DM; dexamethasone. CFU; colony forming unit.

モデル作製に当たっても cyclophosphamide (CP), 5-fluorouracil または cortisone acetate (CA) 投与等の免疫抑制処置による白血球減少症動物が用いられる。代表的な感染モデルとその疾患をまとめて Table 3 に示す。これらの感染モデルを用いて新規抗真菌薬の薬効を評価する場合、薬剤の投与経路、用量、投与開始時期と回数を定めて実験スケジュールが組まれる。この際、想定される臨床試験におけるプロトコルを考慮することが肝要である。ただし投与量については、感染モデルにおける有効量は臨床における適用量より多量を必要とすることは言うまでもない。この有効量を算出する薬効の評価法は、一般に生存率、生存率から求めた ED₅₀ 値、平均生存日数および臓器培養 (target organ assay) による残存生菌数の測定等が用いられる。以下われわれの方法を含む文献等にみられる感染モデルと薬効評価法の代表例について述べる。

1) カンジダ症モデル

カンジダ感染症は、ヒトに親和性が強い *Candida* spp.

の特定の菌種によって原発性または続発性に引き起こされる。感染部位や重症度の点で様々であり、病型もまた多彩である。

a) マウスの播種性静脈内感染：薬効の評価に最も多用される動物モデルである。*C. albicans* 毒力株を ICR 系 SPF マウスに 1×10^6 の酵母形細胞を静脈内に接種すると 7~10 日を経て腎臓を主病巣とする致死感染が成立する。薬剤投与は経口または非経口 (静脈内) 的に 1 時間後または 1 日後から開始し 5~7 日間連続して投与し、その後 2~3 週間観察するのが一般的である。静脈内接種による播種性感染は付随的に心内膜炎や眼内炎を生ずる²⁸⁾。

b) マウスの侵襲性消化管感染²⁹⁾：この感染モデルは、ヒトのカンジダ症の病態を忠実に再現している点で注目される。すなわちヒトの消化管内常在菌として知られている *C. albicans* がマウスの消化管内正常細菌叢の攪乱により定着し (ただしマウスの場合 *C. albicans* は常在菌でない)、生体防御機能の低下に伴い消化管内で異常

増殖し、腸管膜リンパ節を経由して全身へ播種し、致死的感染が成立するという経過をたどる。したがって、薬剤による治療効果は、胃腸管内異常増殖の抑制および全身播種の防止の両面を別々に評価できるという利点がある。モデルの作製は、マウスに実験期間を通して1週間前から抗細菌剤を投与し、その後 *C. albicans* 1×10^7 cellsを経口的に接種し、2週間後に CA 1 mg/mouse を皮下投与すると腸管からの translocation が誘発され全身に播種し、マウスは菌接種後21~28日間に致死に至る。

c) マウスの上行性尿路感染³⁰⁾：ヒトの尿路カンジダ症はときとして見られる疾患の一つである。この動物モデルを、われわれはマウスで作製することができた。ただし本モデル作製には手術の外科的修練を必要とする点で一般向きでないが、薬効評価系として有用性があると考えられる。モデルの作製法は、膀胱内にビーズを留置した後、*C. albicans* 1×10^6 cells を尿道内に接種すると、5~10日後に腎盂腎炎による致死的感染が成立する。この際の免疫抑制処置は、特に行なわなくても感染は成立するが、CP 200 mg/kg を4日前に1回投与すると感染が促進される。治療薬は菌接種後1, 2および3日に投与し、2週間観察する。

2) アスペルギルス症モデル

アスペルギルス症の動物モデル作製の試みは、従来から種々行われてきたが、治療実験に用いられるモデルは、静脈内接種による播種性アスペルギルス症モデルが殆どで、しかもマウス・ラットでは主病巣が肺でなく腎臓であるなど肺アスペルギルス症に対する正当な薬効評価が行われなかった。または一般に行なわれる経鼻接種による肺アスペルギルス症モデルでは接種された分生子は肺胞まで到達せず、気道感染に止まる場合が多い。そこでわれわれは、菌接種に先立ち、マウスに dimoroholamine と xylazine および pentobarbital sodium を含む混合麻酔液を腹腔内投与し十分麻酔をかけた後、先端を丸くしたポリエチレンチューブで保護した注射針をマウスの咽頭内から気管内に留置し、それを経由して *A. fumigatus* または *A. flavus* の分生子液を接種した。マウスは菌接種3~5日後に急性肺感染で死亡した。死亡マウス肺の病理組織学的所見は、菌の増殖による多発性結節性病変が形成され、この炎症反応は質的にヒトのアスペルギルス症を忠実に再現していることが確認され、薬効評価系として極めて有用性の高い疾患モデルであると判断された。薬効評価は、菌接種後1~5日間毎日1~2回投与し、2週間の観察期間における生存率、観察終了時における肺、脳および腎臓等の生菌数の測定により行なう³¹⁾。

3) クリプトコックス症モデル

本症は、肺、中枢神経系および皮膚に病変を生じる播種性の慢性、亜急性あるいは急性に進行する感染症として知られる。いずれの場合も、*C. neoformans* の栄養形である酵母細胞または有性胞子の担子胞子を吸入して起こる肺感染で始まる点で共通する。薬効評価に用いられる動物のクリプトコックス症モデルにおいても、自然感染経路と同じマウス鼻腔内への菌接種による非観血的気道

感染モデルが有用である³²⁾。

4) トリコスポロン感染症およびその他の新興真菌感染症モデル

近年易感染患者において、従来病原真菌と認識されなかった真菌によって起因する新興真菌感染症の増加が注目されるようになってきた。これらの疾患に対する薬効を評価する *in vivo* 試験として、マウスの *Trichosporon asahii*³³⁾, *Pseudallescheria boydii*³⁴⁾, *Fusarium solani*³⁵⁾ 等による播種性感染モデルが用いられる。これらの感染モデルを用いた評価法は、その他の新興真菌感染症にも応用することができる。

5) 最近の文献にみられるその他の深在性真菌症モデル

二形性真菌による地域流行型深在性真菌症に対する新薬の薬効評価は、特に米国で活発におこなわれている。そのなかで最近の文献では *Histoplasma capsulatum* による B6C3F₁ マウス (CD4- and CD8-depleted) を用いた侵襲性肺ヒストプラズマ症および免疫抑制マウスの播種性ヒストプラズマ症モデルがみられた³⁶⁾。その他の真菌症モデルとしては *Rhizopus oryzae* の曝露によるマウスの侵襲性肺ムーコル症³⁷⁾と *Pneumocystis carinii* の径鼻接種によるカリニ肺炎モデル³⁸⁾があげられ、将来薬効評価系として不可欠なものと予想され注目された。

3. 表在性真菌症治療薬の評価に用いられる疾患モデルと治療実験 (Table 4)

1) 白癬モデルを用いた治療効果と発症予防および再発防止効果の検討

皮膚真菌症治療薬の薬効評価のための *in vivo* 試験は、従来からモルモット背部皮膚に *Trichophyton mentagrophytes* を感染させて作製した体部白癬モデルが広く用いられ、外用抗真菌薬の治療効果および感染予防効果が検討されてきた。しかし、この動物モデルはその臨床症状と病巣形成過程がヒトの体部白癬と類似しないこと、比較的速やかに自然治癒に向かうこと、および感染の推移の再現性が欠如していることなどが指摘されている³⁹⁾。それに対して S. Fujita ら⁴⁰⁾が確立したモルモットの足白癬モデルは自然治癒をみることなく慢性感染が持続し、ヒトの角質増殖型足白癬にきわめて類似した病態を示すことが明らかにされた。従ってこの白癬モデルは、難治性白癬に対する経口抗真菌薬の薬効評価に最適の実験系であるとともに、外用薬の薬効も正當に評価できる方法として、近年多くの薬剤の薬効評価に用いられている。その際われわれは、実験スケジュールを設定に当たって足白癬モデルの特徴を十分に引き出し得るよう配慮し治療開始時期を可能な限り遅らせて、外用薬は菌接種3週間後から、また経口薬は12週間後から薬剤投与を開始している。治療期間についてはヒトの足白癬治療に対応させて4週間と定めた。一方、治療効果の判定法は臨床症状改善度と真菌学的陰性化率により行われる。後者は治療後の局所皮膚の培養試験として行われるのが一般的である。また培養試験によって生じたコロニーの大きさから菌数の推定または培養試験に替わる局所皮膚に存

Table 4. *In vivo* antifungal activity evaluation method against superficial mycosis

Disease	Organism	Animal	Pretreatment	Infection method	Efficacy evaluation method
Tinea pedis	<i>T. mentagrophytes</i>	Guinea pig	None	Applied to plantar area	Infection intensity based on culture positive rate of plantar skin
Tinea corporis	<i>T. mentagrophytes</i>	Guinea pig	Removal of hair	dorsal skin	Local lesion score, infection intensity based on culture
Cutaneous candidiasis	<i>C. albicans</i>	Mouse, rat	Removal of hair, PD	dorsal skin	Culture positive rate
Oropharyngeal candidiasis	<i>C. albicans</i>	Mouse, rat	Antibacterial agents, PD	oral cavity	Local lesion score, CFU of oral cavity
Vulvovaginal candidiasis	<i>C. albicans</i>	Rat	Hystero-oophorectomy, ED	vagina	CFU of vagina

PD; prednisolone, ED; estradiol dipropionate.

CFU; colony forming unit.

在する chitin⁴¹⁾ または β -glucan の定量の試みも行われている。それらの実施期日は、残存薬剤の培養成績への影響を排除するに必要な休薬期間を設け、経口薬の多くは1~2週間後、局所薬は3~5日後と定めた。培養試験の成績は、局所皮膚の感染強度として表される。これらの条件のもとに実験が実施された結果、terbinafine (TBF) の局所投与⁴²⁾ および経口投与⁴³⁾、ITCZ の経口投与⁴⁴⁾ による治療効果が明らかにされ、その後各薬剤の臨床的有用性が証明された。

また、爪白癬はきわめて難治性の真菌症であり、その約50%が足白癬と合併し、足白癬から波及して爪白癬を惹起するものと考えられている。われわれは、モルモットの足白癬モデルを12週間以上放置すると爪部に菌が侵入し実験的爪白癬が成立することを明らかにし、本症に対する TBF および ITCZ の経口治療の有効性を証明した⁴⁵⁾。

近年開発された新規抗真菌薬の多くは実験的感染モデル、そして白癬患者のいずれにおいても優れた治療効果を発揮し、真菌学的にも治癒に至ることが確認されている。それにも拘わらず白癬、特に足白癬の場合には、一旦治癒したと見なされた患者でも再発あるいは再感染の起こるケースが少なくない。こうした再発の機序については不明な点が多く今後の課題である。われわれは、薬剤による再発防止効果と臨床的治療効果の follow-up のモデル実験を行い^{42, 44, 46)}、治療直後は真菌学的に陰性化した動物でも薬剤の種類または濃度によって、再発が見られず完全治癒する場合と時の経過とともに足底部の感染が顕性化し、やがて感染強度が拡大する場合が認められ、適切な治療期間と薬剤の選択そして臨床試験における follow-up の必要性が再認識された。

2) 皮膚カンジダ症モデル

カンジダ症に関する感染モデルについては、これまで多くの報告がみられるが抗真菌薬の薬効評価を目的とする治療実験は、これまでオクルージョンまたは alloxan 前処置モルモットで作製されたモデルが主であった。われわれは、prednisolone 前処置によって他の前処置法に比べてモルモットの週令に関わりなく安定した持続的感

染が成立することを明らかにし⁴⁷⁾、このモデルを用いて種々のイミダゾール系抗真菌薬の有効性を検討した^{48, 49)}。

3) 腔カンジダ症モデル

実験的腔カンジダ症モデル作製の試みは、これ迄主として抗真菌薬の治療効果を検討する目的で行われて来た。婦人科領域において、estrogen 過剰状態がカンジダ症の促進因子の一つであることはよく知られている。そこでわれわれは、実験動物としてラットを用い卵巣摘出後 estradiol dipropionate を皮下投与して持続的な発情動物を作出し、菌接種後2週間以上に亘る実験的腔カンジダ症ラットを作製することができた⁵⁰⁾。このモデルを用いて抗真菌薬の腔座薬製剤の効果を検討した。

4. 薬効評価における今後の課題

薬効評価に関わる試験項目のなかで体内動態／薬力学的特徴 (PK/PD) と抗菌活性に関する検討については、抗真菌薬では抗菌薬に比べ立ち後れている項目であり課題といえるが、最近になって二三の文献^{51, 52)}が発表され今後に期待される。各論的な前臨床評価の課題は個々の項目のなかで既に述べてあるがここで整理すると、*in vitro* 試験では *Malassezia* spp. に対する標準的抗菌活性測定法の確立が望まれる。一方、*in vivo* 試験においては、*C. tropicalis* を除く *Non-albicans Candida* 感染症および *Malassezia* 症の動物モデルの作製と薬効評価系の確立、つぎに表在性真菌症のなかで残された課題である爪白癬モデルの作製および評価系の確立があげられ、取り残された課題は深部皮膚真菌症に関する動物モデルの作製と薬効評価系の確立である。

おわりに

抗真菌薬の薬効評価法の *in vitro* および *in vivo* 試験について現状と課題を解説した。この多岐にわたる内容を限られた紙面の都合で十分に書き尽くすことは出来なかった。説明の不十分な点は引用文献等を参考にして補って頂きたい。終わりにこの総説が今後の新規抗真菌薬の薬効評価の一助となり有用性の高い抗真菌薬の探索と開発が進展し抗真菌化学療法が確立することを心から念願している。

文 献

- 1) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Antifungal Susceptibility Testing. Committee Report, NCCLS Document M20-CR, NCCLS vol.5, no.17, 1985.
- 2) Pfaller MA, Burmeister L, Bartlett MS, Rinaldi MG: Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *J Clin Microbiol* **26**: 1437-1441, 1988.
- 3) Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, Bartlett MS, Body BA, Espinel-Ingroff A, Fromtling RA, Hall GS, Hughes CE, Odds FC, Sugar AM: Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* **34**: 1648-1654, 1990.
- 4) Espinel-Ingroff A, Kish CW, Kerkering TM, Fromtling RA, Bartizalk K, Galgiani JN, Villareal K, Pfaller MA, Gerarden T, Rinaldi MG, Fothergill A: Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J Clin Microbiol* **30**: 3138-3145, 1992.
- 5) Fromtling RA, Galgiani JN, Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Bartizal KF, Bartlett MS, Body BSA, Frey C, Roberts GD, Nolte FB, Odds FC, Rinaldi MG, Sugar AM, Villareal K: Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 39-45, 1993.
- 6) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Proposed Standard. NCCLS Document M27-P, NCCLS vol.12, no.25, 1992.
- 7) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Tentative Standard. NCCLS Document M27-T, NCCLS vol.15, no.10, 1995.
- 8) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. NCCLS Document M27-A, NCCLS vol.17, no.9, 1997.
- 9) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition. NCCLS Document M27-A2, NCCLS vol.22, no.15, 2002.
- 10) 山口英世, 内田勝久, 久米 光, 篠田孝子, 渡辺一功, 楠 俊雄, 比留間政太郎, 石崎 宏: 日本医真菌学会標準化委員会報告 (1992~1994年). *真菌誌* **36**: 61-86, 1995.
- 11) Chryssanthou E, Cuenca-Estrella: Comparison of the antifungal susceptibility testing Subcommittee of the European Antibiotic Susceptibility Testing Proposed Standards and E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and caspofungin susceptibility testing of yeast species. *J Clin Microbiol* **40**: 3841-3844, 2002.
- 12) 内田勝久, 山口英世: 深在性真菌症治療の現状と今後の展望. 抗真菌薬感受性試験法. *医薬ジャーナル* **39**: 3301-3308, 2003.
- 13) Galgiani JN: Antifungal susceptibility tests. *Antimicrob Agents Chemother* **31**: 1867-1870, 1987.
- 14) Espinel-Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, Anaissie E, Breslin B, Dixon D, Fothergill A, Paetznick V, Peter J, Rinaldi M, Walsh T: Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 314-319, 1995.
- 15) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-Forming filamentous Fungi; Proposed Standard. NCCLS Document M38-P, NCCLS vol.18, no.13, 1998.
- 16) National Committee for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standards. NCCLS Document M38-A, NCCLS vol.22, no.16, 2002.
- 17) Yoshida T, Uchida K, Yamaguchi H: An ATP bioluminescence assay applicable to rapid fluconazole susceptibility testing of dermatophytes. *Microbiol Immunol* **41**: 377-386, 1997.
- 18) 篠田孝子, 久米 光, 福島和貴, 島田慈彦, 村瀬勢津子, 内田勝久, 池田玲子, 安藤正幸, 森 健, 加藤卓郎: 日本医真菌学会標準化委員会報告 (1995~1997年). *真菌誌* **40**: 239-257, 1999.
- 19) Yamaguchi H, Uchida K, Nagino K, Matsunaga T: Usefulness of a colorimetric method for testing antifungal drug susceptibilities of *Aspergillus* species to voriconazole. *J Infect Chemother* **8**: 374-377, 2002.
- 20) Uchida K, Yokota N, Yamaguchi H: *In vitro* antifungal activity of posaconazole against various pathogenic fungi. *Int J Antimicrob Agents* **18**: 167-172, 2001.
- 21) Uchida K, Nishiyama Y, Yokota N, Yamaguchi H: *In vitro* antifungal activity of a novel lipopeptide antifungal agent, FK463, against various fungal pathogens. *J Antibiotics* **53**: 1175-1181, 2000.
- 22) Uchida K, Nishiyama Y, Tanaka T, Yamaguchi H: *In vitro* activity of novel imidazole agent NND-502 against *Malassezia* species. *Int J Antimicrob Agents* **21**: 234-238, 2003.
- 23) Garau M, Pereiro M, del Palacio A: *In vitro* susceptibilities of *Malassezia* species to a new azole, albaconazole (UR-9825), and other antifungal compounds. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2342-2344, 2003.
- 24) Gonzalez GM, Sutton DA, Thompson E, Tijerina R, Rinaldi MG: *In vitro* activities of approved and investigational antifungal agents against 44 clinical isolates of basidiomycetous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 633-635, 2001.
- 25) Nakai T, Uno J, Ikeda F, Tawara S, Nishimura K, Miyaji M: *In vitro* antifungal activity of micafungin (FK463) against dimorphic fungi: Comparison of yeast-like and mycelial forms. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1376-1381, 2003.
- 26) Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL: Standardized method for *in vitro* antifungal suscep-

- tibility testing of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother **45**: 2475-2479, 2001.
- 27) Ramani R, Chaturvedi V: Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. Antimicrob Agents Chemother **44**: 2752-2758, 2000.
 - 28) Louie A, Liu W, Miller DA, Sucke AC, Liu Q, Drusano GL, Mayers M, Miller MH: Efficacies of high-dose fluconazole plus amphotericin B and high-dose fluconazole plus 5-fluorocytosine monotherapies in treatment of experimental endocarditis, endophthalmitis, and pyelonephritis due to *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother **43**: 2831-2840, 1999.
 - 29) 内田勝久：実験的カンジダ症—動物モデル作成における常在細菌叢および宿主抵抗因子の関与—。真菌誌 **29**: 169-181, 1988.
 - 30) 押 正也, 内田勝久, 山口英世： *Candida albicans* による実験的上行性腎盂腎炎。日誌誌 **79**: 513-520, 1988.
 - 31) Kamai Y, Harasaki T, Ohya S, Uchida K, Yamaguchi H: R-120758, a novel triazole antifungal agent: *In vivo* antifungal activity. 40th ICAAC Abstract p.201, Toronto, Ontario, Canada, Sept 17-20, 2000.
 - 32) 渋谷和俊, 直江史郎, 内田勝久, 山口英世：肺クリプトコックス症の実験病理学的研究—経鼻接種による動物モデル作製—。真菌誌 **29**: 182-190, 1988.
 - 33) Yamamoto K, Makimura K, Sudo T, Shibuya K, Uchida K, Yamaguchi H: Experimental disseminated trichosporonosis in mice: tissue distribution and therapy with antifungal agents. J Med Vet Mycol **35**: 411-418, 1997.
 - 34) Gonzalez GM, Tijerina R, Najvar LK, Bocanegra R, Rinaldi MG, Loebenberg D, Graybill JR: Activity of posaconazole against *Pseudallescheria boydii*: *In vitro* and *in vivo* assays. Antimicrob Agents Chemother **47**: 1436-1438, 2003.
 - 35) Guarro J, Pujol I, Mayayo E: *In vitro* and *in vivo* experimental activities of antifungal agents against *Fusarium solani*. Antimicrob Agents Chemother **43**: 1256-1257, 1999.
 - 36) Connolly P, Wheat LJ, Schnitzlein-Bick C, Durkin M, Kohler S, Smedema M, Goldberg J, Brizendine E, Loebenberg D: Comparison of a new triazole, posaconazole, with itraconazole and amphotericin B for treatment of histoplasmosis following pulmonary change in immunocompromised mice. Antimicrob Agents Chemother **44**: 2604-2608, 2000.
 - 37) Sugar AM, Liu X-P: Combination antifungal therapy in treatment of murine pulmonary mucormycosis: Roles of Quinolone and azoles. Antimicrob Agents Chemother **44**: 2004-2006, 2000.
 - 38) Martinez A, Aviles P, Jimenez E, Caballero J, Gargallo-Viola D: Activities of sordarines in experimental models of candidiasis, aspergillosis, and pneumocystosis. Antimicrob Agents Chemother **44**: 3389-3394, 2000.
 - 39) 西本勝太郎：抗真菌剤の薬効評価とその問題点—外用剤を中心に。医薬ジャーナル, **28**: 9-17, 1992.
 - 40) Fujita S: Experimental tinea pedis induced by non-abrasive unoculation of *Trichophyton mentagrophytes* arthrospores on the planter part of a guinea pig foot. J Med Vet Mycol **25**: 202-213, 1987.
 - 41) Uchida K, Yamaguchi H: Assessment of *in vivo* activity of bifonazole against dermatophytic infection in guinea pig on the basis of the amount of a specific fungal cell wall component chitin in the infected skin. Dermatol **169**: 47-50, 1984.
 - 42) 内田勝久, 工藤道誠, 山口英世：モルモットの実験的足白癬に対する Terbinafine 局所投与による治療効果と再発予防効果の検討。Jap J Antibiot **47**: 1407-1412, 1994.
 - 43) 内田勝久, 山口英世：モルモットの実験的足白癬に対する Terbinafine 経口投与による治療効果。Jpn J Antibiot **47**: 1401-1406, 1994.
 - 44) 内田勝久, 山口英世：モルモット実験的足・爪白癬に対するイトラコナゾール経口投与による治療効果と再発防止効果の検討。真菌感染と生体防御 第2回 Dermatological Mycology Club 例会記録集 p.112-119, 1995.
 - 45) Uchida K, Yamaguchi H, Sibiya K: Production of an experimental model of tinea unguium in guinea pig. 12th Congress of the International Society for human and animal Mycology, Adelaide, 1994.
 - 46) Uchida K, Tanaka T, Yamaguchi H: Achievement of complete mycological cure by topical antifungal agent NND-502 in guinea pig model of tinea pedis. Microbiol Immunol **47**: 143-146, 2003.
 - 47) Maebashi K, Itoyama T, Uchida K, Yamaguchi H: A novel model of cutaneous candidiasis produced in prednisolon-treated guinea-pigs. J Med Vet Mycol **32**: 349-359, 1994.
 - 48) 前橋一紀, 糸山利生, 内田勝久, 山口英世：モルモットの皮膚カンジダ症モデルにおける Neticonazole (SS717) クリーム及び液剤の治療効果。Jpn J Antibiot **46**: 896-903, 1993.
 - 49) Niwano Y, Seo A, Kanai K, Hamaguchi H, Uchida K, Yamaguchi H: Therapeutic efficacy of laniconazole, a new imidazole antimycotic agents, for experimental cutaneous candidiasis in guinea pigs. Antimicrob Agents Chemother **38**: 2204-2206, 1994.
 - 50) 穂垣正暢, 三ツ井一孝, 原田郁子, 内田勝久, 山口英世, 渋谷和俊：新規ラット膣カンジダ症モデルの確立。真菌誌 **37**(S1): 106, 1996.
 - 51) Aviles P, Falcoz C, San Roman R, Gargallo-Viola D: Pharmacokinetics-pharmacodynamics of a sordarin derivative (GM 237354) in a murine model of lethal candidiasis. Antimicrob Agents Chemother **44**: 2333-2340, 2000.
 - 52) Groll AH, Mickiene D, Petraitiene R, Petratis V, Lyman CA, Bacher JS, Piscitell SC, Walsh TJ: Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of anidulafungin (LY303366): Reappraisal of its efficacy in neutropenic animal models of opportunistic mycoses of using optimal plasma sampling. Antimicrob Agents Chemother **45**: 2845-2855, 2001.

Status and Issues of Preclinical Evaluation of the Therapeutic Effects of Newly Developed Antifungal Agents

Katsuhisa Uchida, Hideyo Yamaguchi
Teikyo University Institute of Medical Mycology,
359 Otsuka, Hachioji, Tokyo 192-0395, Japan

Preclinical evaluation of the efficacy of an antifungal agent is basically conducted by measuring both the *in vitro* and the *in vivo* antifungal activity of the drug using appropriate infection models.

Although the first requisite for a method measuring *in vitro* activity is to obtain results with good reproducibility, an additional requirement is that there be good correlation with the *in vivo* activity, as described later. For the first condition, in recent years the National Committee for Clinical Laboratory Standards in the United States and the Standardization Committee of the Japanese Society for Medical Mycology have proposed reference techniques with the objective of standardizing drug susceptibility testing; these have been used extensively in measuring antifungal activities of novel agents. However, there are several issues involved when these methods are applied to newly developed drugs. First, standard methods are for particular currently available antifungal agents, but MIC determining standards have not been established for other agents. Reproducibility is therefore not guaranteed. Second, there is a question of whether reliable results can be obtained to test an antifungal spectrum with a limited number of fungal species. On the other hand, *in vivo* evaluation of novel antifungal agents is extremely important to predict the clinical outcome at the preclinical stage. The important requirements for this *in vivo* experimental system are: use of an animal model of mycosis that resembles the pathophysiology in humans; use of an administration schedule corresponding to that used in clinical studies, and evaluation of the therapeutic effect considering the dose and administration period.

This review presents the present status of preclinical evaluation test methods and discusses the issues.

この論文は、第47回日本医真菌学会総会の“シンポジウム 4: 新時代の創薬”において
発表されたものです。