

Amphotericin B の血中および臓器内濃度の実験的検討

岩田和夫・長井辰男

東京大学医学部細菌学教室

(昭和 43 年 3 月 13 日受付)

Amphotericin B (以下 Am B と略す) は, GOLD *et al.*¹⁾ によつて *Streptomyces* M 4575 株から発見された polyene 系抗生物質で, 深在性真菌症, とくに, その重症の場合に現在最も信頼しうる治療薬であるが, 同時に最近諸種の広域スペクトルの抗生物質により誘発されやすい真菌による菌交代症の予防的手段としての合剤として併用されることも一般化してきた。かくて Am B については, すでに少なからざる基礎的ならびに臨床的研究がおこなわれているにもかかわらず¹⁻⁶⁾, その血中ならびに臓器内濃度については, 意外に詳細な研究報告に乏しいうらみがある。そこで, 著者らは, まず Am B を実験動物に静脈内または経口的に投与することによつて血中 (実際には血清) 濃度および臓器内濃度を正確に測定し, そのデータに基づいて人体に投与する場合の基礎的資料をうることを企図した。本論文においては, その方法論を確立し, それに基づいて実測した成績について報告する。

実験材料

1. 使用薬剤: Squibb 社製の治療用 Am B oral grade (Lot No. 6 B 844, potency 847 mcg/mg) を使用した。
2. 使用動物: 健康な白色ウサギ(市販), 雄性, 体重約 3 kg を用いた。
3. 検定菌: カンジダ性脳脊髄膜炎患者の髄液より分離された教室保存株の *Candida albicans* C-a-13 株を検定菌として選んだ。
4. 培地: 下記の組成をもつた 1% casamino acid 加半合成培地を使用した。培地組成: Na_2HPO_4 0.4 g, KH_2PO_4 1.2 g, MgSO_4 0.1 g, NaCl 2.0 g, glucose 40.0 g, casamino acid (Difco) 10.0 g, aq. dist. 1,000 ml, pH 6.0 \pm 0.1。

実験方法

1. 標準発育阻止曲線の作製

In vitro における Am B 量と菌発育阻止の量的関係について, つぎの実験をおこない, 標準曲線を作製した。すなわち, Am B を dimethyl sulfoxide に溶解して potency 800 mcg/ml の溶液をえ, さらに 0.05 M phosphate buffer, pH 6.0 で希釈した 50% dimethyl sulfoxide を加えて 20 mcg/ml の potency をもつ Am B 溶液をえ, その 0.5 ml を 1% casamino acid 加半合

成培地(pH 6.0)の 0.5 ml に加え, 2 倍希釈系列をつくつた。この系列に 37°C 24 時間振盪培養 (120 往復/分) した検定菌の 2×10^7 /ml 浮遊液を 0.1 ml ずつ加えて同様に 37°C 24 時間振盪培養し, 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0) を 4.0 ml ずつ加え, Klett-Summerson 型光電光度計で濁度を測定し, その値を兩対数方眼紙にスポットすることにより Am B の検定菌に対する発育阻止標準曲線をえた。

2. Am B の静脈内および経口投与ウサギにおける血中濃度の測定

Am B の投与量は, 静脈内投与の場合は, ウサギの体重に対して 1 mg potency/kg, 経口投与では 50 mg potency/kg とした。

投与方法としては, Am B 1 mg potency に sodium desoxycholate 1 mg を加え, 5% glucose 水溶液 20 ml に溶解し (0.05 mg/ml), その各全量を 3 羽のウサギの耳翼静脈内に注射した。また, 経口投与の場合は, 同様の溶液を経鼻食道カテーテルで同じく 3 羽のウサギの胃内へ直接注入した。

なお, これらの実験の 12 時間前からウサギには給餌給水をしなかつた。

採血時間は, 投与後 15 分, 30 分, 1 時間, 2 時間, 3 時間, 4 時間, 6 時間, 8 時間, 12 時間, 18 時間および 24 時間に反対側の耳翼静脈から, また経口投与の場合も静脈内投与の場合と同一の時間に同様に採血し, それぞれ血清を分離して測定に供した。

測定には被検血清を 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0) で 5~10 倍に希釈し, 標準発育阻止曲線の作製の場合と同様にその 0.5 ml を上記半合成培地 (pH 6.0) を 0.5 ml ずつ分注した試験管に加えて 2 倍希釈し, 被検菌の浮遊液 (生菌数 2×10^7 /ml) を 0.1 ml ずつ加え, 37°C で 24 時間振盪培養後, 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0) を 4 ml ずつ加え, Klett-Summerson 型光電光度計で濁度を測定し, 上記の標準発育阻止曲線から 1 ml 中に含有する Am B の濃度を求めた。

なお, 投与前の血清を実験系と同様に希釈し, 培養しないで氷室(4°C)に放置したものを対照とした。

3. 臓器内 Am B 濃度の測定

Am B 1 mg potency/kg の溶液を静脈内投与の場合

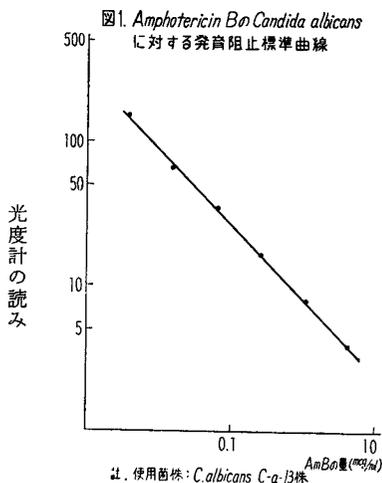
と同様にしてえ、膀胱カテーテルで排尿した1群2羽のウサギの耳翼静脈内に注射した。投与3時間および6時間後にウサギを2羽ずつ殺し、直ちに肺臓、肝臓、脾臓および腎臓内に含まれる Am B の濃度を上述の方法と同様にして測定した。なお、参考までにその各時間における血液および尿の濃度も比較測定した。

測定には、まず被検各臓器の表面を 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0) で洗浄し、濾紙で余分の水分を除去した後、秤量した。臓器により重量として5~20倍稀釈になるように 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0) を加えた後、cell homogenizer で臓器乳剤を作り、雑菌による汚染をさけるために、PLATT⁷⁾の方法に準じ、上記培地にあらかじめ streptomycin 100 mcg/ml および penicillin G 100 u/ml を無菌的に添加し、その 0.5 ml ずつを分注した試験管に加えて2倍稀釈系列を作り、被検菌 2×10^7 /ml の浮遊液を 0.1 ml ずつ接種し、37°C で 24 時間振盪培養後、0.05 M phosphate buffer (pH 6.0) を 4 ml ずつ加え、Klett-Summerson 型光電光度計で濁度を測定し(光度計の読みで表現)、標準曲線から各臓器 1g あたりの Am B の濃度を求めた。また、尿中の Am B については、薬剤投与前にウサギの膀胱内の尿をカテーテルで十分に導尿排出し、薬剤投与後の上記一定時間の検体について、また、血清中の Am B の濃度は、前述の方法で測定した。

実験成績

1. Am B の in vitro における C. albicans 標準発育阻止曲線

被検菌 C. albicans C-a-13 株に対する Am B の発育阻止濃度を上述のごとく両対数方眼紙において横軸に Am B の量 (mcg/ml)、縦軸に光度計の読み(濁度)をとり対応させてみると、図1に示すように、実測値のスポットは、Am B 0.02~0.6 mcg/ml の範囲内でほとん



ど完全に直線上に位置することが明らかとなつた。従がつて諸検査材料の Am B の濃度は、この範囲内において濁度から求めることが可能であることを、まず確立したわけである。

2. Am B 静脈内投与によるウサギの血中濃度の消長

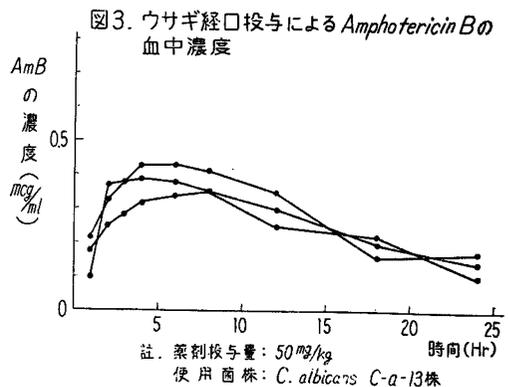
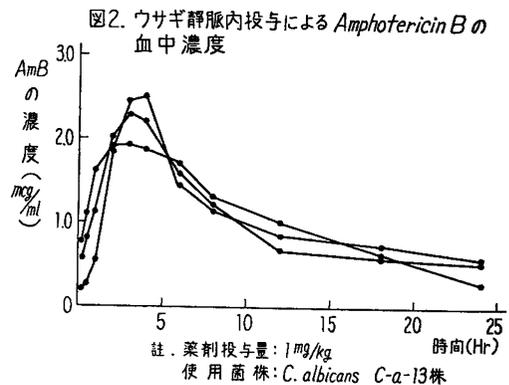
1 mg potency/kg の Am B を3羽のウサギの耳翼静脈内に投与した場合の血中(血清内)濃度の消長を図2に示した。最高血中濃度と時間は個体によつて若干差違があるが、総体的にはおおよそ同様の傾向を示した。

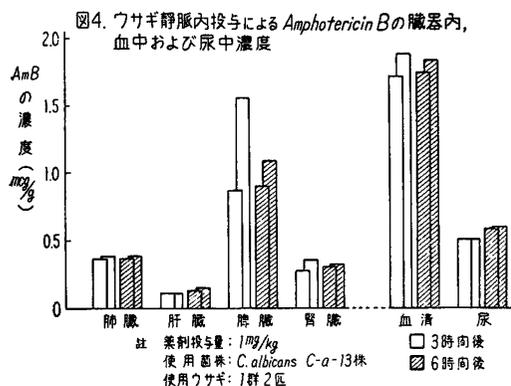
最高濃度は投与後3~4時間の間にみられ(2.5~1.8 mcg/ml)、以後だいに下降した。投与後4時間から12時間までの間に40~27%低下したが、12時間後24時間までは低濃度ながらおおよそ一定の濃度(0.6~0.5 mcg/ml)を保持し続けた。

3. Am B 経口投与によるウサギの血中濃度の消長

Am B を 50 mg/kg ずつ3羽のウサギに経口投与したときの血中濃度は、図3に示すとおりである。

この場合も、ウサギの個体差による若干の差違は認められたが、おおむね同様の消長を示した。ただし、静脈内注射の場合とある程度異なるのは、最高値がかなり低いこと、ただし、最高値を示す時間が比較的長く、低下も緩慢であるという点である。すなわち、最高値は投与後5時間にあるとみられるが、投与後4~8時間にわた





つて 0.4~0.3 mcg/ml の濃度を維持し、以下漸減し、12 時間まで 5~20% に低下したが、24 時間にわたり低度ながらも、なお検出することができた (0.2~0.1 mcg/ml)。

4. Am B 静脈内投与によるウサギの臓器内濃度の消長

Am B を 2 羽のウサギに 1 mg potency/kg ずつ 1 回静脈内に投与し、3 時間および 6 時間後に 2 羽ずつ殺し、肺、肝、脾、腎の各臓器および参考として血清および尿を採取し、それらの Am B 含有濃度を測定した結果を図 4 に示した。

個体差は脾の 3 時間値でかなり Am B の濃度に差違がみられたほかは、他の諸臓器においては著差がなく、血清ならびに尿中濃度もほとんど全く同様であった。

血清濃度は上述の実験と同様に、投与後 3~4 時間で最高値を示したが、この場合には 2 mcg/ml の値を上廻わつたものではなく、1.9~1.7 mcg/ml が最高であった。ただし、6 時間後は上述の実験とはやや趣きを異にし、まだほとんど減少は認められなかつた。

このような比較において 1 g あたりの臓器内 Am B 濃度を比較してみると、脾が最高濃度 (1.6 mcg/ml) を示し、ついで肺で、腎もほぼ同様であり、肝には著しく少量 (0.1 mcg/ml) であることが注目される。なお、尿中濃度は血清および脾内の濃度よりは低いが、肺、腎、肝のそれらよりは上廻わつた。

考 察

既述のごとく、Am B の血中および臓器内濃度については充分な研究報告がないので、著者らは動物実験によりこれらの点を明らかにしておくことは、深在性真菌症に対する適応や広域スペクトル抗生物質との合剤としての併用効果に関しても意義があると考え、本実験をおこなつた。

まず、検定菌に *C. albicans* C-a-13 株を選んだ理由は、この菌株が教室保存の同一菌種の他の株または

Candida の他の菌種、または他属の *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* 等の数株と比較して Am B に対する感受性が最も強いこと (最小発育阻止濃度 1.16 mcg/ml) を確認したことによる。また上述の半合成培地を用いたのは、光電光度計による濁度の測定上、色調が淡いこと、また接種菌量を一定にすれば、検定菌については恒常的な発育曲線がえられることをすでに確認していたためである。

菌発育阻止標準曲線の適用は、Am B の濃度範囲によつて限定されることはいうまでもないが、上述のような *in vitro* の標準曲線を作製し、これによつて血中濃度などを求めることは、簡易かつ正確であるといえる。

上述のごとく、検定菌、試験用培地、試料の調製など、現行の「抗菌性物質製剤基準⁹⁾」に従わないうで、著者ら独自で改変した方法によつた理由は、上記の基準が諸点で必ずしも合理的でないと考えたためである。

Am B は投与方法により血中濃度が著しく異なることが今回の実験で確認された。すなわち、少なくともウサギを用いた限りにおいて、1 mg potency/kg 静脈内投与群の最高血中濃度は、*in vitro* の最小発育阻止濃度を充分に上廻わり、以後やや減少するが、なお 8~12 時間にわたり最小発育阻止濃度を維持し、つぎの 12 時間で 50~20% まで減少することを認めたが、LOURIA⁹⁾ も同様の傾向の成績を報告している。これに対し、50 mg potency/kg 経口投与群のそれは、前者の 1% 以下にすぎず、Am B の種々の真菌に対する *in vitro* の最小発育阻止濃度について示した GOLD *et al.*¹⁾ ならびに著者ら自身の成績に照らして、かなりそれを下廻わつている。

以上の所見は、Am B の深在性真菌症の治療に静脈内投与がはるかに有効で、経口投与の不適當であることを示唆するものであるが、ただ、ここで留意すべきは、経口投与では確かに最高値が低く最小発育阻止濃度以下であるけれども、それは *in vitro* での不完全発育阻止濃度の範囲内にあり、かつ比較的長時間それが維持されるということは、数時間ごとに反復投与するときは、生体内では必ずしも菌の発育を阻止しえないとは断定できず、今後経口投与に関してこのような視点からの検討が必要と思われる。また経口投与の場合に腸管内濃度は血中濃度よりはるかに高い濃度を維持するものと考えられるから、抗細菌性抗生物質との合剤としての腸内細菌叢の変動の抑制効果を考慮して腸管真菌症の誘発を防止し、あるいはその治療にはむしろ経口投与で腸管から吸収される率の低いほどよく、この点についても今後検討を要するところであろう。少なくとも上述の動物実験の成績からみて、経口投与されるとき Am B の吸収がき

わめて悪く、排泄も遅いことは明らかで、これは Am B が polyene 系物質で、水に溶けにくく腸管からの吸収が悪く、しかも流血中にはいると、組織蛋白との結合が強いためと考えられる。

Am B 1 mg potency/kg をウサギ静脈内に投与したときの血中濃度は、投与後約 10 時間 1 mcg/ml 以上の potency を維持したが、薬剤投与前 12 時間以降給水給餌せず、排泄物も全くなかったにもかかわらず、急激に血中濃度の減少が認められたことは、流血中の Am B が臓器内へ分布し、もしくは排泄の過程にあり、あるいは分解によるものとみなされる。Am B 投与 3 時間および 6 時間後の臓器内（同時に血中および尿中）濃度を、被検臓器 1 g あたりに含まれる Am B 量で比較してみると、脾に最も多い点が注目され、脾>肺=腎>肝の順序であった。なお、臓器別個体差は脾において最も著るしかつた。とくに、脾で最小発育阻止濃度に達したことは、血清濃度と照らし合わせ、本剤の静脈内投与の有効性の証左とするに充分である。

このような条件では、BARNER *et al.*³⁾ が述べているような Am B の副作用は認められず、肝および腎への影響も軽微であるものと思われる。なお、血中および臓器内の濃度と投与方法、とくに静脈内投与に関しての点滴注入などとの関係も、今後詳細に検討されるべきであろう。

いつぼう、Am B は排泄が遅いから急性毒性は比較的低い⁹⁾けれども、長期使用による慢性毒性は考慮せねばならないだろう。

なお、Am B の血球または組織蛋白との結合、経口投与による臓器内濃度、投与量を変えたとき、または連続投与時の血中または組織内濃度の変化などの点については、今後の検討にまきたい。

総 括

Amphotericin B の静脈内ならびに経口投与による血中濃度および前者の投与方法による臓器内濃度分布を詳細に知るために、ウサギについて経時的に追究し、つぎのような成績をえた。

まず、半合成培地を用いて *in vitro* における Am B の被検菌 *C. albicans* C-a-13 株に対する発育阻止濃度と光電光度計による濁度との関係を追跡して標準曲線を作成し、これに基づいて、血中または臓器内濃度を測定する方法を確立した。

Amphotericin B を 1 mg/kg ウサギに静脈内注射することにより血中には約 10 時間以上 1 mcg/ml 以上（最高 4 時間値 2.5 mcg/ml）の濃度を示し、臓器内では脾>肺=腎>肝の順序で、脾に最も多量に分布し、最高

値 3 時間後約 1.5 mcg/g であつた。

これに対し、50 mg/kg 経口投与の場合は、血中に最高 4~6 時間後 0.4 mcg/ml で、血中へ移行は、かなり少なかった。

要するに、Am B は、ウサギを用いる実験に関する限り、静脈内投与の場合は、血中または臓器内濃度は比較的高く、*in vitro* の菌発育阻止濃度を上廻るが、経口投与では血中濃度はかなり低く、菌発育阻止最小濃度を下廻ることが確認された。ただし、後者の場合、ある程度の菌発育不完全阻止濃度を比較的長時間維持することが明らかとなつたので、経口投与の治療的效果について、必ずしも否定することはできないであろう。

おわりに Amphotericin B を提供された日本スクイブ株式会社医学部の御厚意に謝意を表する。

本論文の要旨は第 16 回日本化学療法学会、1968 年 5 月 10 日において発表した。

文 献

- 1) W. GOLD, H. A. STOUT, J. F. PAGANO, and R. DONOVIC: Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a Streptomyces. I. *In vitro* studies. *Antibiotics Annual*, 579~586, 1955~1956
- 2) J. VANDEPUTTE, J. L. WACHTLE, and E. T. STILLER. Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a Streptomyces. II. The isolation and properties of the crystalline amphotericins. *Antibiotics Annual*, 587~591, 1955~1956
- 3) ELLIOT BARTNER, HAROLD ZINNES, ROBERT A. MOE and JOSEPH S. KULESZA: Studies on a new solubilized preparation of amphotericin B. *Antibiotics Annual*, 53~58, 1957~1958
- 4) EARL G. MCNALL, CARLYN HALDE, VICTOR D. NEWCOMER and THOMAS H. STERNBERG: A biological assay for the determination of amphotericin A and B in biological fluids. *Antibiotics Annual*, 131~136, 1957~1958
- 5) R. L. TAYLOR, H. P. LYNCH, R. R. TAYLOR and O. L. WEISER: The determination of serum concentration of amphotericin B in man. *Amer. Rev. of Respiratory Disease Tubercul.* 77(6), 1023~1025, 1958
- 6) DONALD B. LOURIA: Some aspects of the absorption, distribution, and excretion of amphotericin B in man. *Antibiotic medicine and clinical therapy*, 5, 291~301, 1958
- 7) T. B. PLATT: Personal communication
- 8) 厚生省編抗菌性物質製剤基準, 497~503, 1962
- 9) 日本スクイブ株式会社医学部: Personal communication.

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE AMPHOTERICIN B
CONTENT IN THE BLOOD AND VARIOUS ORGANS
BY INTRAVENOUS AND ORAL
ADMINISTRATIONS

KAZUO IWATA and TATSUO NAGAI

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

Summary

In an attempt to investigate in detail the amphotericin B content in the blood and various organs by intravenous and oral administrations, experiments using rabbits and the test strain, *Candida albicans* C-a-13 were performed and the following results were obtained.

A standard *in vitro* inhibition curve of amphotericin B against the growth of the test strain was obtained using the semisynthetic medium in terms of turbidity by means of electrophotometer. Based on this curve, the antibiotic content in the blood and organs was determined as follows.

When administered the antibiotic at the rate of 1 mg/kg intravenously into the rabbits, the blood content reached the maximum of 2.5 mcg/ml which exceeded the minimum inhibitory concentration *in vitro*, after 4 hours, henceforth keeping the level of around 1 mcg/ml for 10 hours long, and as to the content in the organs, the spleen was the highest in about 1.5 mcg/g, came next the lung and kidney and the liver the lowest in the same grade.

In case of oral administration of the drug at the rate of 50 mg/kg, the blood level reached the maximum of 0.4 mcg/ml after 3~6 hours, reducing very slowly.

These results suggest that the intravenous administration of amphotericin B would be much more effective than its oral administration in systemic mycoses; however, in case of the latter application its curative efficacy could not be always denied in view of maintenance of its partial inhibitory concentration in the blood for a relatively long period even by a single application.