

## リポ化アンホテリシン B によるマウス深在性真菌症の治療

宮崎 幸重・河野 茂・安岡 彰・前崎 繁文  
山田 洋・笹山 犬・道津 安正・山口 恵三  
広田 正毅・原 耕平

長崎大学第2内科\*

岩本 清・村橋 直一・渡辺 純男  
エーザイ(株) 筑波研究所

(平成2年1月16日受付・平成2年2月5日受理)

アンホテリシン B をイントラリポス 20%® にてリポ化し、リポ化アンホテリシン B を作製した。リポ化アンホテリシン B の LD<sub>50</sub> は 5.0 mg/kg 以上であり、アンホテリシン B (ファンキゾン®) の急性毒性 (LD<sub>50</sub> 1.2 mg/kg) を軽減できた。

マウスカンジダ症およびマウスクリプトコックス症における治療実験でも、ファンキゾン® に比べて、すぐれた治療効果が得られ、臨床応用の可能性が示唆された。

**Key words:** Amphotericin B, Lipid emulsion, Murine candidiasis, Murine cryptococcosis, Therapy

アンホテリシン B は、深在性真菌性の第一選択薬として臨床的に使用されているが、その副作用が強いため、十分な臨床効果を得ることが困難である。我々はアンホテリシン B の急性毒性を軽減するため、リポソーム封入アンホテリシン B を作製し、このものが著しく毒性の軽減に役立ったことを報告した<sup>1-3)</sup>。しかしリポソーム封入アンホテリシン B は、その製剤としての安定性と大量作製時の均一性ならびにリポソームの安全性など、臨床的に使用する場合には解決しなければならないいくつかの問題がある<sup>4)</sup>。

一方、リポソームと同様に優れた薬物担体である脂肪微粒子 (リピット・マイクロソフェア) は高カロリー輸液時のイントラリポス® などとして使用され、臨床的にその安全性が確認されていて、すでにステロイドおよびプロスタグランディンのリポ化製剤は市販されている<sup>5)</sup>。我々はアンホテリシン B をリポ化することによりその急性毒性をリポソーム封入時と同程度まで軽減させることができ、またマウスでの実験的カンジダ症およびクリプトコックス症において優れた治療効果が得られたので、その成績について報告する。

### I. 材料および方法

#### 1 菌株および培地

新井 正 千葉大学元教授より分与いただいた *Candida albicans* 7 N 株と、当院での臨床分離株

*Cryptococcus neoformans* C-28 株を使用した。 *Candida albicans* 7 N 株はサブロー培地にて 37°C、12 時間培養した後、生食水で 2 回遠心して洗浄後使用した。 *Cryptococcus neoformans* C-28 株はポテトデキストロース寒天培地で、30°C、72 時間培養した後、同様に生食水で 2 回遠心洗浄して用いた。

#### 2. マウス播種性カンジダ症の作製

BALB/C 5 週齢の雄 (21.8±0.9 g) に尾静脈より 1.0×10<sup>7</sup> CFU/ml の *Candida albicans* 7 N 株浮遊液 0.1 ml を静注し、播種性カンジダ症を作製した。

#### 3. マウスクリプトコックス感染症モデルの作製

同様に BALB/C 5 週齢の雄に、3.3×10<sup>7</sup> CFU/ml に調整した *Cryptococcus neoformans* C-28 株菌液 0.03 ml を脳内に接種した。

#### 4. リポ化アンホテリシン B の作製

K<sub>IRSH</sub> R らの方法に準じて作製した<sup>6)</sup>。すなわち dimethylacetamide (和光純薬) 1.0 ml あたりに 20 mg の sodium deoxycholate (Sigma) を加え、30°C にて種々の濃度のアンホテリシン B (Sigma) を溶解した。さらに、イントラリポス 20%® (ミドリ十字) にてリポ化を行い、0.25 mg/ml、0.50 mg/ml、1.0 mg/ml の濃度のリポ化アンホテリシン B を作製した。

なお、対照としては sodium deoxycholate と溶解剤

\*長崎市坂本町 7-1

をして含むファンギゾン® (スクイブ社) を用いた。

### 5. 正常マウスに対する LD<sub>50</sub> の測定

BALB/C 5 週齢の雄に尾静脈より種々の濃度のリポ化アンホテリシン B を投与し、6 週間観察し、LD<sub>50</sub> を測定した。placebo としてはイントラリポス 20%® (ミドリ十字) を用いた。

### 6. マウスカンジダ症およびクリプトコックス症の治療実験

上に述べた 2 つの感染モデルにおいて治療実験を行った。カンジダ症は接種後 24 時間後に、またクリプトコックス症は脳内投与後 2 時間後に、尾静脈より薬剤を 1 回静注し、生存曲線を観察した。

## II. 結 果

### 1. リポ化によるアンホテリシン B の急性毒性の軽減

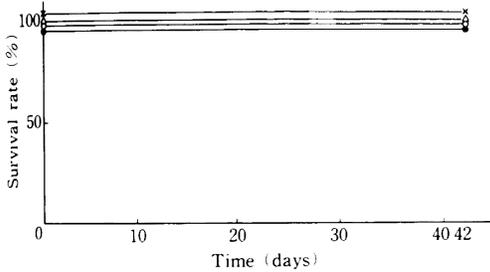


Fig. 1. Toxicity of amphotericin B lipid emulsion in normal mice (n=10) (BALB/C, 5 wks, male). LD<sub>50</sub> > 5.0 mg/kg

- ×—× Intralipos 20%®
- △—△ Amph. B emulsion 1.25 mg/kg
- Amph. B emulsion 2.5 mg/kg
- Amph. B emulsion 5.0 mg/kg

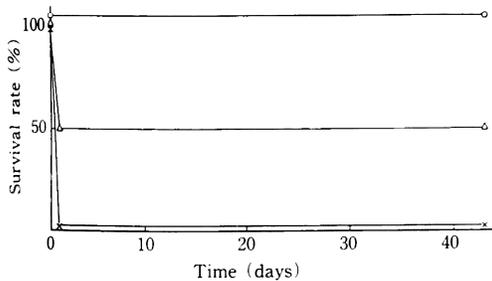


Fig. 2. Toxicity of conventional amphotericin B in normal BALB/C mice (n=10) (5 wks, male). LD<sub>50</sub> 1.2 mg/kg

- Amph. B 0.8 mg/kg
- △—△ Amph. B 1.2 mg/kg
- ×—× Amph. B 2.4 mg/kg

Fig. 1 に正常マウスに種々の濃度のリポ化アンホテリシン B を静注した場合の生存曲線を、Fig. 2 には、無処理のアンホテリシン B (ファンギゾン®) を静注した場合の生存曲線を示した。Fig. 2 に示したようにファンギゾン® の LD<sub>50</sub> は 1.2 mg/kg であったが、リポ化アンホテリシン B の LD<sub>50</sub> は 5.0 mg/kg 以上であり、リポ化することで急性毒性が著しく軽減せしめ得るとの成績が得られた。

リポ化アンホテリシン B は 5.0 mg/kg の濃度で、まったく死亡例がなく、安全に投与できたので、以下の実験ではこの量を使用した。なお、対称とするファンギゾン® は 0.8 mg/kg で使用した。

### 2. 播種性カンジダ症の治療実験

Fig. 3 に示したように BALB/C 5 週齢の雄に  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml の *C. albicans* 7 N 株浮遊液 0.1 ml を静注し、24 時間後に placebo としてイントラリポス 20%® 0.1 ml を投与した場合には、7 日以内に 100% のマウスが死亡した。

ファンギゾン® 0.8 mg/kg での治療群の生存率は 42 日後 20% であったのに対して、リポ化アンホテリシン B 5.0 mg/kg 治療群ではまったく死亡例がなかった ( $P < 0.01$ )。

### 3. クリプトコックス症感染マウスの治療成績

$3.3 \times 10^7$  CFU/ml の *Cryptococcus neoformans* C-28 株浮遊液 0.03 ml を脳内接種した場合、placebo 治療群は 12 日以内に全例死亡し、ファンギゾン® 0.8 mg/kg 治療群も 18 日目までにすべて死亡した。これに対して、リポ化アンホテリシン B 5.0 mg/kg 投与群

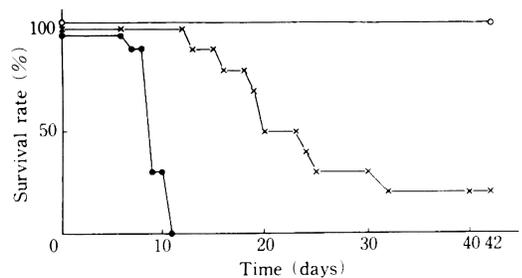


Fig. 3. Efficacy of amphotericin B lipid emulsion in the treatment of murine disseminated candidiasis. A dose of 5.0 mg/kg of amphotericin B emulsion were given 24 after venous inoculation of *Candida albicans* 7 N strain ( $1.0 \times 10^6$  CFU/mouse) (n=10)

- Intralipos 20%®
- ×—× Amph. B, 0.8 mg/kg
- Amph. B emulsion, 5.0 mg/kg

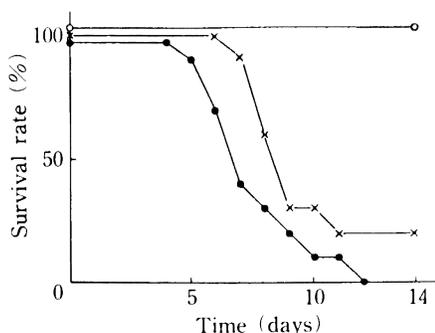


Fig. 4. Efficacy of amphotericin B lipid emulsion in the treatment of murine cryptococcosis. A dose of 5.0 mg/kg of amphotericin B emulsion as given 2 h after intracranial inoculation of *Cryptococcus neoformans* C-28 stain ( $1.0 \times 10^6$  CFU/mouse) (n=10)

- Intralipos 20%<sup>1)</sup>
- ×—× Amph. B, 0.8 mg/kg
- Amph. B emulsion, 5.0 mg/kg

は、14日目まで死亡例がなかった。しかし、その後徐々に死亡し、26日目までに全例死亡した (Fig. 4)。

### III. 考 察

アンホテリシン B は、その急性毒性が強いため、十分な臨床効果を挙げることができない。ところが、人工脂肪膜であるリポソームにアンホテリシン B を封入すると、その急性毒性が著しく軽減され、治療開始当初より充分量のアンホテリシン B を投与することができることが報告されている<sup>1-3)</sup>。また、すでに欧米では一部臨床的にも応用もされている<sup>7)</sup>。

しかし、リポソーム封入アンホテリシン B を臨床応用する場合には、いくつかの問題が残されており、それは、①作製後の安定性に問題があり、長期に保存できない、②均一な製剤を大量にくりかえしつくるのが困難である、③リポソームの安全性に疑問が残る、等である<sup>4)</sup>。

一方リポソームとならび、薬剤のキャリアーとして注目されている脂肪微粒子 (リピッド・マイクロスフェア) は、高カロリー液の目的で、イントラリポス等としてすでに臨床的にも使用されており、その安全性に問題はない。また、ステロイドやプロスタグランジンなどはすでにリポ化製剤として、応用されている<sup>5)</sup>。これらの点より、アンホテリシン B の担体として、リポソームに代えてリピッドマイクロスフェアを用いることを試みた。

アンホテリシン B のリポ化についての文献は散見されるが<sup>6,7)</sup>、直試してみると一定した成績が得られなかった。そこで今回、KIRSH らの方法<sup>6)</sup>でリポ化を行ってみたところ、急性毒性が軽減でき、リポソームに封入した場合とはほぼ同程度の治療成績が得られた。

クリプトコックスを脳内接種した例では、リポ化製剤を使用しても長期にわたれば全例死亡したが、これは感染2時間後1回のみでの投与であり、分割してくりかえし投与すれば十分な治療効果が得られるものと思われた。

今後は、リポ化アンホテリシン B の臨床応用に向け、製剤の安定性や安全性について十分な検討を行いたいと考えている。

### 文 献

- 1) KOHNO S, MIYAZAKI T, YAMAGUCHI K, TANAKA H, HAYASHI T, HIROTA M, SAITO A, HARA K, SATO T, SUNAMOTO J: Polysaccharide coated liposomes with antimicrobial agents against intracytoplasmic pathogens and fungi. *J Bioact Compat Polym* 3: 137~147, 1988
- 2) 河野 茂, 宮崎幸重, 道津安正, 原 耕平: 感染症のターゲティング療法. *臨床と研究* 66: 1823~1828, 1989
- 3) 原 耕平, 宮崎幸重: 感染症におけるターゲティング療法の意義. *今日の臨床免疫* 17: 287~292, 1989
- 4) OLIGO M J: Liposomes. *Scientific American* 256: 90~99, 1987
- 5) MIZUSHIMA Y, HAMANO T, YOKOYAMA K: Tissue distribution and anti-inflammatory activity of corticosteroids incorporated in lipid emulsion. *Ann Rem Dis* 41: 263~267, 1982
- 6) KIRSH P, GOLDSTEIN R, TARLOFF J, PARRIS D, HOOK J, HANNA N, BUGELSKI P, POSTE G: An emulsion formulation of amphotericin B improves the therapeutic index when treating systemic murine candidiasis. *J Infect Dis* 158: 1065~1070, 1988
- 7) LOPES-BERESTEIN G, FAINSTEIN V, HOPFER R et al: Liposomal amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patients with cancer: A preliminary study. *J Infect Dis* 151: 704~710, 1985
- 8) SINGH M, RAVIN L J: Parenteral emulsions as drug carrier systems. *J parent Science Technol* 40: 34~41, 1986
- 9) DAVIS S S, WASHINGTON C, WEST P, ILLUM L, LIVE RSIDG G, STERNSON L, KIRSH R: Lipid emulsions as drug delivery systems. *Ann N Y Acad Scine* 507: 75~88, 1988

## A LIPID EMULSION FORMULATION OF AMPHOTERICIN B FOR THE TREATMENT OF MURINE CANDIDIASIS AND CRYPTOCOCCOSIS

TAKASHIGE MIYAZAKI, SHIGERU KOHNO, AKIRA YASUOKA,  
SHIGEFUMI MUESAKI, HIROSHI YAMADA, KAZUO SASAYAMA,  
YASUMASA DOHITSU, KEIZO YAMAGUCHI, MASAKI HIROTA  
and KOHEI HARA

Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki, Japan

KIYOSHI IWAMOTO, NAOKAZU MURAHASHI and TADAO WATANABE  
Eizai Co.

Amphotericin B was incorporated into lipid emulsion using the method of KIRSH R et al. Shortly 20 mg of sodium deoxycholate were dissolved in 1.0 ml of dimethylacetamide. This solution was used to solubilize the amphotericin B at various concentrations, and then Intralipos 20%® was added.

The LD<sub>50</sub> of amphotericin B lipid emulsion was more than 5.0 mg/kg in normal BALB/C mice, compared with 1.2 mg/kg for conventional amphotericin B (Fungizone®).

In a study of experimental murine disseminated candidiasis, the survival rate of mice given conventional amphotericin B at a dose of 8.0 mg/kg (the maximal tolerated dose without acute lethality) was 20%, whereas the animals treated with amphotericin B in lipid emulsion all were alive 42 days after inoculation ( $p < 0.01$ ).

In the case of experimental murine cryptococcosis, amphotericin B in emulsion also produced higher survival rates than commercial amphotericin B.