

ラット侵襲性肺アスペルギルス症モデルを用いた itraconazole 予防内服投与の評価

大坪 孝和・河野 茂・川村 純生・山本 善裕・掛屋 弘
 平潟 洋・朝野 和典・古賀 宏延・田代 隆良・原 耕平
 長崎大学医学部第二内科*

(平成 7 年 10 月 7 日受付・平成 7 年 11 月 6 日受理)

イトラコナゾール (ITCZ) の深在性真菌症に対する発症予防目的の内服投与の効果を、ラット侵襲性肺アスペルギルス症 (IPA) モデルを用いて検討した。低蛋白食とステロイドで免疫抑制状態にしたラットに、*Aspergillus fumigatus* 分生子を経気管的に感染させ、IPA モデルを作成した。同モデルに対して、ITCZ 無投与のコントロール群、感染 7 日前より感染後 7 日目まで ITCZ を経口投与した予防投与群、感染直後より感染後 7 日目まで ITCZ を投与した感染後投与群の 3 群 (各群 n = 5) を設定した。感染後 28 日目までの生存率の検討では、コントロール群では 0%、80 mg/kg/日感染後投与群では 20%であったのに対し、40 mg/kg/日予防投与群では 60%であった。菌接種 24 時間後における *A. fumigatus* の肺内生菌数の検討では、コントロール群および 40, 80 mg/kg/日感染後投与群では、いずれも $4.00 \log_{10}$ CFU/g 以上であったのに対し、40 mg/kg/日予防投与群では $2.64 \pm 0.23 \log_{10}$ CFU/g と、他群に比べ有意に生菌数が少なかった ($p < 0.02$)。感染 5 日後の肺病理組織所見では、40 mg/kg/日の同一投与量において、感染後投与群では *A. fumigatus* 菌糸の組織侵襲性の増殖が認められたのに対し、予防投与群では菌糸の増殖所見は認めなかった。以上の結果より、ITCZ の予防内服投与によって、*A. fumigatus* 分生子が下気道へ侵入したきわめて初期の段階においてその増殖が抑制され、IPA の発症も抑制されていることが示唆された。ITCZ 予防内服投与は、免疫不全状態の患者における IPA の発症予防に有効であると思われる。

Key words: itraconazole, 予防投与, 侵襲性肺アスペルギルス症モデル

免疫抑制状態の患者における深在性真菌症の発症予防は、きわめて重要な課題である。

侵襲性肺アスペルギルス症 (invasive pulmonary aspergillosis, 以下 IPA) の発症予防法として、high-efficiency particulate air (HEPA) filtration などのエアフィルターを用いた空気中のアスペルギルス分生子の除去が有効とされているが、ランニングコストが高くつく点や患者の行動範囲が制限される点、鼻腔などの気道内に定着しているアスペルギルスに対して無効であるなどの問題点が指摘されている¹⁾。臓器移植が盛んであり、AIDS 患者も多い欧米においては、IPA を含めた深在性真菌症の発症予防に、抗真菌薬の予防投与が種々検討されている。アムホテリシン B 製剤の少量投与やエアゾル吸入、フルシトシン経口投与との併用が有効であったとの報告もみられる²⁻⁴⁾。しかし、比較試験において、アムホテリシン B 製剤の少量予防投与群とプラセボ群との間に IPA の発症頻度が大きく差なかったとする報告もみられ⁵⁾、長期にわたる予防投与においては、容認性や副作用の問題から、アムホテリシン B よりもアゾール系抗真菌薬の応用が期待される。

Triazole 系抗真菌薬である itraconazole (以下 ITCZ) は、他の azole 系抗真菌薬に比べアスペルギルス属に対して優れ

た抗菌力を有しており、本邦においても 1993 年以降臨床応用されている。肺などの組織移行性にも優れ⁶⁾、比較的副作用も少ないことも知られている⁷⁾。今回、我々は ITCZ の予防投与による IPA の発症予防効果について、ラットの IPA モデルを用いて検討を行ったので報告する。

I. 材料と方法

1. ラット IPA モデルの作成

ラットの IPA モデルの作成は、Niki ら⁸⁾ の報告を参考にして行った。SD ラット (6 週齢、雄) を、8% 低蛋白食 (オリエンタル酵母工業) と塩酸テトラサイクリン (日本レダリー社) 250 mg/800 ml を含有させた飲水にて飼育を開始した。同時に、酢酸コルチゾン (和光純薬) を 130 mg/kg/日の用量で週 3 日皮下注射を行った。肺アスペルギローマ患者の喀痰より分離した、当科保存の *Aspergillus fumigatus* 臨床分離株 MF-13 (ITCZ の最小発育阻止濃度: MIC = 0.25 μ g/ml) をサブロー・デキストロース寒天培地上にて 30°C、7 日間培養し、そのコロニーより 0.02% Tween 80 含有滅菌生理食塩水にて分生子を採取し、菌液を作成した。

感染は、前述の方法で飼育を開始して 8 日目のラッ

トをエンフルラン（アボット社）にて全身麻酔し、頸部切開にて気管を露出させ、接種菌量が1匹あたり 1×10^6 個となるように調整した菌液0.1 mlを、ツベルクリン用注射針にて気管内に注入して行った。酢酸コルチゾンの投与は感染後1週間目まで行い、低蛋白食とテトラサイクリン水の投与は感染後28日目まで行った。その後、生存個体については、通常食、通常飲水にて感染3か月目まで飼育観察した。

2. ITCZ 内服液の調整と投与

ヤンセン協和社より研究用に供与された ITCZ 原末 1 g を、propylene glycol 10 ml と 6 N 濃塩酸 0.95 ml (いずれも和光純薬) にて溶解し、hydroxypropyl- β -cyclodextrin (日本食品加工) 60 g を蒸留水にて溶解したものと同量と混和し、総量 100 ml となるようにして、ITCZ 内服液の原液 (ITCZ 10 mg/ml) を調整した。この原液を、原液より ITCZ を除いたものを希釈液として、1 回投与量が 1 ml となるように用時希釈して、胃ゾンデを用いてラットに 1 日 1 回経口投与した。なお、対照液として ITCZ を含まない希釈液を用いた。

3. ITCZ 予防投与と効果の検討

ラットは菌接種 1 週間前より対照液のみをあたえる群をコントロール群、菌接種時まで対照液を投与し菌接種後より ITCZ 溶液を投与する群を感染後投与群、および菌接種 1 週間前より ITCZ 溶液を投与する群を予防投与群とし、各群に対して ITCZ 溶液および対照液は菌接種後 1 週間目まで投与した。予防投与群への投与量の設定のため、前述の感染モデルに対し、菌接種当日より ITCZ 10, 20 および 40 mg/kg/日、8 日間連続投与による治療実験を施行した。その結果と、Van Cauteren ら⁹⁾ のラットに対する亜急性毒性試験の結果を参考とし、生存率の比較試験では感染後投与群は 40, 80 mg/kg/日の 2 群を設定し、予防投与群については、感染後投与群の各々半量である 20, 40 mg/kg/日の 2 群を設定した。対照群も含めた 5 群 (各群 n=5) については、Kaplan-Mayer 法による生存率の比較検討を行った。

4. 予防投与時の ITCZ 血中および肺組織内濃度

6 週齢、雄の SD ラットを前述の低蛋白食、酢酸コルチゾン処置にて飼育し、同時に ITCZ 40 mg/kg/日を連日 7 日間、経口投与した。その後、投与開始 24 時間後および 3, 5, 7 日目の時点 (測定検体はいずれも前日投与から 24 時間経過した時点で採取) で、3 匹ずつエンフルラン麻酔下に下大静脈よりヘパリン加採血し、血漿を分離した。採血後、生理食塩水 10 ml を右心室より注入して肺に灌流させた後、ただちに肺を摘出した。前述の血漿および肺組織の ITCZ 濃度を HPLC 法にて測定した。また、80 mg/kg/日投与開始 24 時間後のラット血中および肺組織内 ITCZ 濃度も測定した。

5. 肺内生菌量の測定と肺組織所見の検討

コントロール群、40, 80 mg/kg/日感染後投与群、40 mg/kg/日予防投与群の 4 群のラットについて、感染後 24 時間と 5 日後の 2 点で、各 3 匹ずつエンフルラン麻酔下に脱血、前述の方法で滅菌生理食塩水灌流の後、ただちに肺を摘出した。摘出肺の一部は PAS 染色にて組織所見を検討した。残りの肺の重量を測定し、重量の 4 倍量の滅菌生理食塩水とともにホモジナイズし、滅菌生理食塩水による 10 倍希釈にて 10^6 希釈まで行い、肺内生菌数の測定を行った。各希釈検体 100 μ l ずつをサブロー・デキストロース寒天培地に塗布し 30 $^{\circ}$ C、3 日間培養後、*A. fumigatus* の colony forming unit (CFU) を測定し、肺 1 g あたりの *A. fumigatus* 生菌数を算出した。結果については、student t 検定にて統計学的な比較検討を行った。

II. 結 果

1. 治療実験と予防投与の用量設定

予防投与の用量を設定する目的で行った治療実験では、Fig. 1 のごとき結果を得た。40 mg/kg/日投与群においても最終観察時の生存率が 20% と低かったため、十分な治療効果を得るためには、それ以上の投与量が必要と思われた。

2. 生存率の検討

各群の生存曲線を Fig. 2 に示す。コントロール群は感染 8 日目に全例死亡した。感染後投与と予防投与の各群は、コントロール群に比べ、有意に生存期間の延長が認められた。感染後投与群では、40 および 80 mg/kg/日の両投与量群とも感染後 20 日目までに 80% が死亡したのに対し、予防投与群では用量依存性に生存期間の延長を認めた。感染後 28 日目での生存率は、感染後投与群では、40 および 80 mg/kg/日の両投与量群

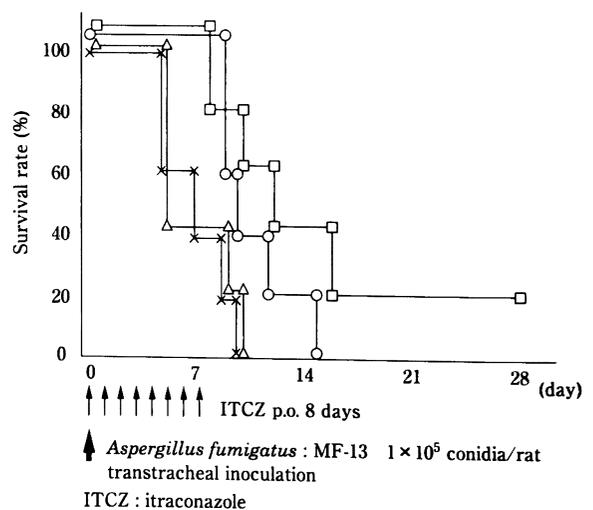


Fig. 1. Survival rates of rats with IPA, infected transtracheally with 1×10^5 conidia/body, in comparison to no treatment control (x-x-x) and oral itraconazole treatment with 10 mg/kg/day (Δ - Δ), 20 mg/kg/day (\circ - \circ), and 40 mg/kg/day (\square - \square).

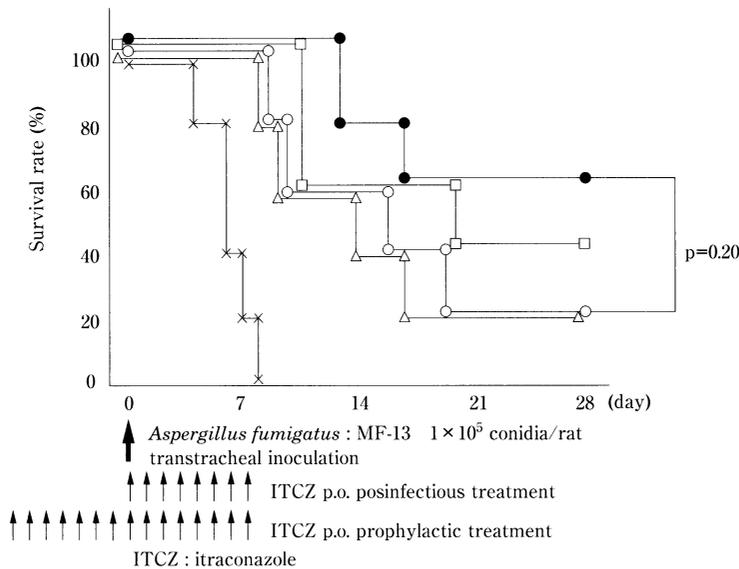


Fig. 2. Survival rates of rats with IPA, in comparison to no treatment control (×-×) and oral itraconazole postinfectious treatment with 40 mg/kg/day (△-△), and 80 mg/kg/day (○-○), prophylactic treatment with 20 mg/kg/day (□-□), and with 40 mg/kg/day (●-●).

とも 20 %であるが、予防投与群では、20 mg/kg/日群で 40 %、40 mg/kg/日群で 60 %であった。その後感染後 3 か月目まで新たな死亡個体はなく、80 mg/kg/日感染後投与群と 40 mg/kg/日予防投与群との間には、後者の方により生存期間の延長傾向があったが、統計学的有意差は認めなかった ($p = 0.20$)。

3. 血中ならびに肺組織内 ITCZ 濃度の検討

40 mg/kg 連日投与時の ITCZ の血中および肺組織中濃度の経時的变化を 80 mg/kg 単回投与後 24 時間の結果と比較して Fig. 3 に示す。いずれの時点においても、ITCZ は血中よりも肺組織中で約 2 倍程高い濃度を示しており、ITCZ は肺組織移行が優れた薬剤であることが示唆された。ITCZ 肺組織内濃度は 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 前後を維持していた。また、経時的な ITCZ の蓄積については血中、肺組織中とも著明ではなく、40 mg/kg 投与群のいずれの時点においても、80 mg/kg 単回投与 24 時間後の濃度よりも血中、肺組織とも 1/2 ~ 1/4 の低い濃度を示した。

4. 肺内生菌数の比較検討

各群の接種 24 時間後と感染 5 日目における肺内生菌数を Fig. 4 に示す。接種 24 時間後の肺内生菌数を比較すると、平均値でコントロール群が $4.18 \pm 0.27 \log_{10}$ CFU/g であったのに対し 40, 80 mg/kg/日感染後投与群では各々 4.10 ± 0.37 , $4.52 \pm 0.07 \log_{10}$ CFU/g と、3 群間に差は認めなかったが、40 mg/kg/日予防投与群では $2.64 \pm 0.23 \log_{10}$ CFU/g と、他の 3 群に比べ有意に肺内生菌量が低値であった ($p < 0.02$)。感染 5 日目において、コントロール群が $5.57 \pm 0.38 \log_{10}$ CFU/g と

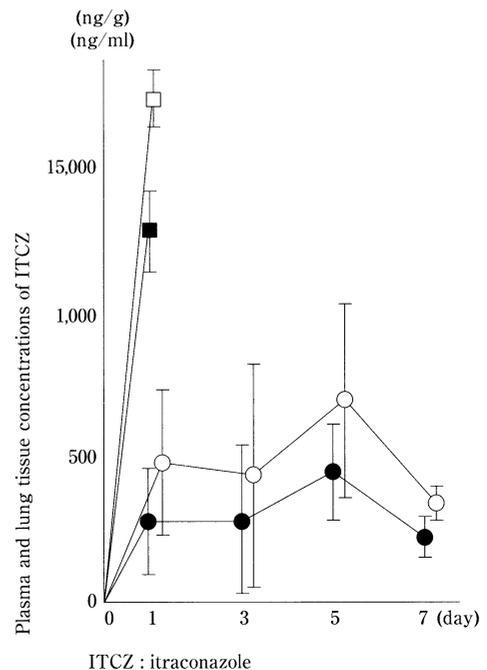


Fig. 3. Concentration of ITCZ in plasma and lung tissue of immunosuppressed rats to which oral itraconazole had been administered at of 40 mg/kg/day (plasma: ●-●, lung: ○-○), or at 80 mg/kg/day (plasma: ■-■, lung: □-□).

24 時間後よりも菌数が増加していたのに対し、80 mg/kg/日感染後投与群では $3.33 \pm 0.45 \log_{10}$ CFU/g と 24 時間後よりも減少していた。40 mg/kg/日の感染後投与群と予防投与群では、いずれも 24 時間後に比べ肺内生菌数が増加していたが、感染後投与群では 5.02 ± 0.24

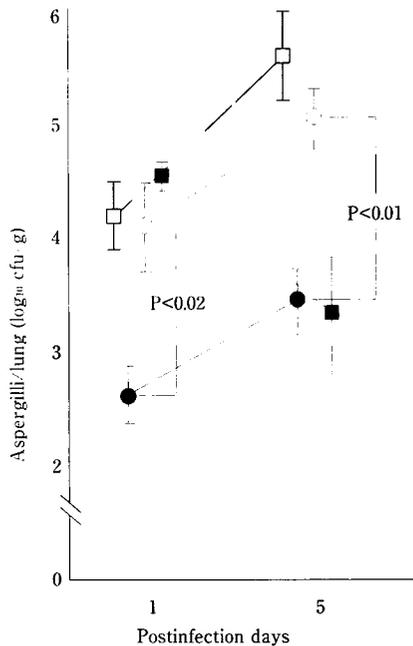


Fig. 4. Quantitative counts of aspergilli in rat lungs with IPA, in comparison to no treatment control (□-□), oral itraconazole postinfectious treatment with 40mg/kg/day (○-○), 80 mg/kg/day (■-■), and prophylactic treatment with 40 mg/kg/day (●-●).

\log_{10} CFU/g, 予防投与群では $3.46 \pm 0.27 \log_{10}$ CFU/g と、感染後投与群よりも予防投与群が有意に肺内菌数が少なかった ($p < 0.01$).

5. 肺組織の比較検討

40 mg/kg/日感染後投与 5 日目のラット肺の PAS 染色組織像では、Fig. 5 に示すごとく、気管支内腔および周囲肺実質に炎症細胞の集積を認め、*A. fumigatus* 菌糸の著明な増生も認めた。一方、同一時点における、40 mg/kg/日予防投与群ラット肺では、Fig. 6 のごとく気管支周囲の炎症所見はごく軽微であり、*A. fumigatus* 菌糸もほとんど認めなかった。

III. 考 案

ラットの IPA モデルを用いて、ITCZ 予防内服投与による IPA の発症予防効果について検討した。生存率の検討では、感染後投与群に比べ半分の投与量の予防投与群が、有意差はなかったものの生存率が高かった。このことより、治療に必要とされる投与量の半量の ITCZ 予防内服投与により、IPA の発症が抑制されたことが示唆された。

前述の IPA 発症抑制効果の根拠として、連投による ITCZ 組織濃度の累積的な上昇が関与するのではないかと思われたが、今回の検討では、ITCZ は血中ならびに肺組織への累積的蓄積性は認められず、初回投与時から長期間一定の血中ならびに肺組織濃度が保たれることが推定された。一方、抗腫瘍化学療法中の患者に 6 週間以上の ITCZ 連続投与を行ったところ、徐々に ITCZ の血

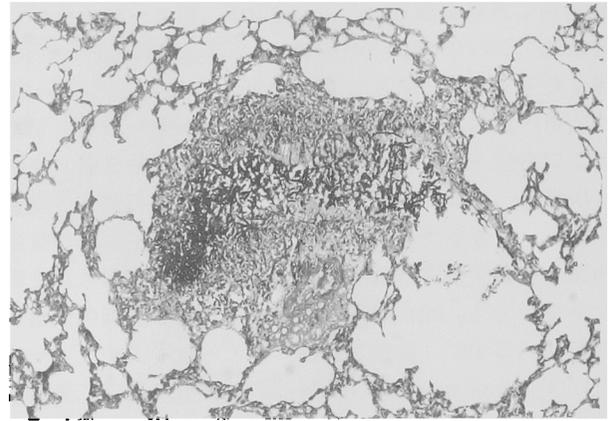


Fig. 5. Lung pathology, in rats treated postinfectiously with 40 mg/kg/day of oral itraconazole, postinfection at day 5. PAS stain. Magnification $\times 200$.

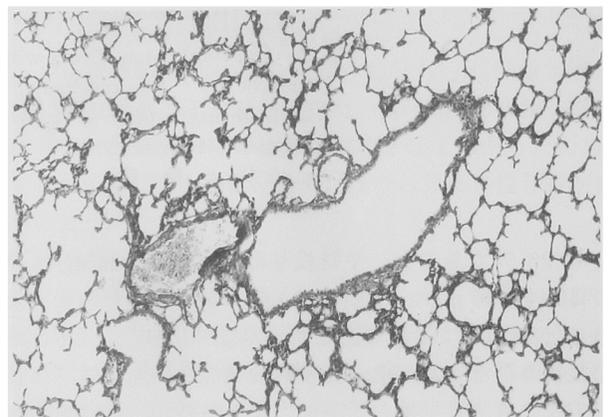


Fig. 6. Lung pathology, in rats treated prophylactically with 40 mg/kg/day of oral itraconazole, postinfection at day 5. PAS stain. Magnification $\times 100$.

中濃度が累積的上昇傾向を示している報告¹⁰⁾もあり、ITCZ の蓄積性についてはより長期的な検討も必要と思われた。

今回使用した菌株 (MF-13) の ITCZ に対する MIC は 0.25 mg/ml であり、ITCZ 血中濃度が time above MIC を 24 時間持続できる ITCZ の投与量は、ラットにおいては最低 40 mg/kg/日程度であることが本実験により示唆された。文献的にも、抗腫瘍化学療法中の患者に ITCZ を予防投与した際に、血中濃度が 0.25 mg/ml を 2 週間以上維持できた群では、そうでなかった群に比べアスペルギルス症の発症頻度が低かったとの報告がある¹⁰⁾。

感染 24 時間後の肺内アスペルギルス生菌数においては、感染後投与群 2 群がコントロール群とほぼ同量なのに対して、予防投与群では他の群の 1/100 程度の菌量になっていた。このことは、前述の結果より推察すると、ITCZ 予防投与によって time above MIC が維持されている肺内において、下気道へ侵入した直後のアスペルギルスの増殖が初期の段階で抑制されていることを示

唆していると思われた。感染 5 日目においては、40 mg/kg/日の予防投与および感染後投与群とも肺内菌数の増加を認めた。しかし、組織学的には前者は後者に比べ、著明に気管支および肺実質の炎症性変化が抑制されていた。一方、肺内菌数測定を施行したラットのうち、80 mg/kg/日感染後投与群では唯一経時的な肺内菌数の減少を認めた。しかし、生存率の問題をあわせて考えると、必ずしも肺内菌数の減少がそのまま治療効果に反映されるものではないと思われた。本実験から、IPA の発症予防にはアスペルギルスが下気道に侵入し肺内に定着する初期の段階からの増殖抑制が重要であることが示唆され、ITCZ の予防内服投与は、上記の目的を達成するのに優れた方法の一つであることが示唆された。

今回の我々の検討より、ITCZ の IPA に対する発症予防投与は実験的にも効果が期待できると考えられた。ITCZ の臨床応用が本邦より早かった欧米においては、ITCZ 予防投与の有効性を認める臨床試験結果も散見されている¹¹⁻¹³⁾。また、ITCZ 長期投与における容認性については、文献的にはおおむね良好であり、副作用も少ないとの報告が多く^{11, 12)}、ITCZ は予防投与薬としても有用かつ安全な薬剤と考えられる。今後本邦においても IPA に対する ITCZ の予防内服投与の臨床的検討が期待される。

謝 辞

ITCZ 原末を供与いただいた JANSSEN RESEARCH FOUNDATION、およびヤンセン協和株式会社に深謝する。

なお本論文の要旨は、第 43 回日本化学療法学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Beyer J, Schwartz S, Heinemann V, Siegert W: Strategies in prevention of invasive pulmonary aspergillosis in immunosuppressed or neutropenic patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 911~917, 1994
- 2) Rousey S R, Russler S, Gottlieb M, Ash R C: Low-dose amphotericin B prophylaxis against invasive aspergillus infection in allogenic BMT. *Am. J. Med.* 91: 484~492, 1991
- 3) Beyer J, Barzen G, Risse G, Weyer C, Miksits K, Dullenkopk K, Huhn D, Siegert W: Aerosol amphotericin B for prevention of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 37: 1367~1369, 1993
- 4) Karp J E, Burch P A, Merz W: An approach to intensive anti-leukemia therapy in patients with previous invasive aspergillosis. *Am. J. Med.* 85: 203~206, 1988
- 5) Perfect J, Klotman M E, Gilbert C C, Crawford D D, Rosner G L, Wright K A, Peters W P: Prophylactic intravenous amphotericin B in neutropenic autologous bone marrow transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 165: 891~897, 1992
- 6) Heykants J, Michiels M, Meuldermans W, Moubaliu J, Lavrijns K, Van Peer A, Levron J C, Woestenborghs R, Cauwenbergh G: The pharmacokinetics of itraconazole in animals and man: an overview. "Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents" (Fromtling R A ed.), p233~249, J. R. Prous Science Publ. S. A., Barcelona, 1987
- 7) Itraconazole 内科領域研究班: 新経口抗真菌剤 Itraconazole の深在性真菌症に対する臨床試験成績。基礎と臨床 25: 585~616, 1991
- 8) Niki Y, Bernard E M, Edwards F F, Schmitt H J, Yu B, Armstrong D: Model of recurrent pulmonary aspergillosis in rats. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1317~1322, 1991
- 9) Van Cauteren H, Lampo A, Vanderberghe J, Vanparys P, Coussement W, Niemegeers C J E, Megens A, Marsboom R, 小山 薫: 新トリアゾール系抗真菌剤イトラコナゾールの毒性研究。基礎と臨床 25: 381~386, 1991
- 10) Boogaerts M A, Verhoef G E, Zachee P, Demuynck H, Verbist L, De Beule K: Antifungal prophylaxis with itraconazole in prolonged neutropenia: correlation with plasma levels. *Mycoses* 32: 103~108, 1989
- 11) Mouy R, Veber F, Blanche S, Donadieu J, Brauner R, Levron J C, Griscelli C, Fisher A: Long-term itraconazole prophylaxis against *Aspergillus* infection in thirty-two patients with chronic granulomatous disease. *J. Pediatr.* 125: 999~1003, 1994
- 12) Thunnissen P L M, Sizoo W, Hendriks W D H: Safety and efficacy of itraconazole in prevention of fungal infections in neutropenic patients. *Neth. J. Med.* 39: 84~91, 1991
- 13) Cowie F, Meller S T, Cushing P, Pinkerton R: Chemoprophylaxis for pulmonary aspergillosis during intensive chemotherapy. *Arch. Dis. Child.* 70: 136~138, 1994

Prophylaxis against experimental invasive pulmonary aspergillosis in rats with oral itraconazole

Takakazu Otsubo, Shigeru Kohno, Sumio Kawamura, Yoshihiro Yamamoto,
Hiroshi Kakeya, Yoichi Hirakata, Kazunori Tomono, Hironobu Koga,
Takayoshi Tashiro and Kohei Hara

The Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine 1-7-1 Sakamoto,
Nagasaki 852, Japan

The efficacy of prophylactic oral administration of itraconazole (ITCZ) was studied in a rat model of invasive pulmonary aspergillosis (IPA). Immunosuppressed rats were infected by intratracheal inoculation of *Aspergillus fumigatus* conidia. Oral administration of various doses of ITCZ was started 7 days before infection (prophylactic treatment), or immediately after infection (postinfectious treatment), and both were continued for 7 days after infection. Prophylactic treatment with 40 mg/kg/day of oral ITCZ (survival rate: 60% in 28 days) was more effective at prolonging survival than postinfectious treatment with 80 mg/kg/day of oral ITCZ (survival rate: 20% in 28 days). Quantitative counts of aspergilli in the rat lung at 24 h after infection with 40 mg/kg/day, 80 mg/kg/day postinfectious treatment of oral ITCZ and no treatment controls exceeded $4.00 \log_{10}\text{CFU/g}$, but the number of aspergilli in the rat lung with 40 mg/kg/day prophylactic treatment was $2.64 \pm 0.23 \log_{10}\text{CFU/g}$ ($p < 0.02$). Pathology of the lungs, in rats were treated prophylactically with 40 mg/kg/day of oral ITCZ, at post-infection day 5, showed no invasive growth of aspergillus hyphae. However the lungs of rats treated post-infectiously with 40 mg/kg/day of oral ITCZ, at the same time, showed invasive growth of aspergillus hyphae. Prophylactic treatment with oral ITCZ is useful for preventing IPA, because it inhibits aspergilli in the early phase of infection of the lower respiratory tract.