

医薬安全性からみた水溶性のプロドラッグ新規アゾール系
抗真菌薬に関する研究：静脈内持続投与方法による
安全性および有効性

2002

小 林 和 子

医薬安全性からみた水溶性のプロドラッグ新規アゾール系
抗真菌薬に関する研究：静脈内持続投与方法による
安全性および有効性

2002

小林 和子

目次

緒言	1
第1章 既存のアゾール系薬物 (FLUCONAZOLE, ITRACONAZOLE, KETOCONAZOLE) の毒性	5
第1節 実験材料および実験方法	6
第2節 結果	12
第3節 考察	18
第2章 新たな薬物療法を提案するための研究 –新規抗真菌薬 (WSA) の安全性, 有効性の検討	23
第1節 WSA の毒性評価	25
1. 実験材料および実験方法	25
2. 結果	34
3. 考察	53
第2節 薬物動態	56
1. 実験材料および実験方法	56
2. 結果	61
3. 考察	64
第3節 新たな薬物療法を提案するための薬効薬理学的研究	67
1. 静脈内持続投与による <i>candidiasis</i> 全身感染症の治療方法の検討	67
2. WSA を用いた静脈内持続投与による <i>candidiasis</i> および <i>aspergillosis</i> 全身感染症治療試験	70
3. 考察	72
第3章 総合考察 – 既存薬と新規抗真菌薬の毒性学的比較および考察 –	75
第4章 結論	79
謝辞	80
引用文献	81
図表	89
ABSTRACT	129

緒言

医学の進歩による臓器移植、骨髄移植およびこれに伴う免疫抑制薬やステロイド薬の使用、強力な広域スペクトラム抗菌薬、抗癌薬など新しく開発された治療薬は一方で、免疫低下を来す患者を生み出す原因となっている。さらに治療技術の進歩により本来救命のために使用される中心静脈栄養、人工呼吸器などが、感染抵抗性の低下した患者に感染の機会を増やしている。加えて、ヒト免疫不全ウイルス (HIV: human immunodeficiency virus)感染者の世界的な増加も免疫不全患者の増加につながっている。深在性真菌症の発生率は、このような免疫不全患者の増加に並行して増加の一途をたどっており、効果的で安全な深在性真菌症治療法の確立が急がれている[33,59,75]。深在性真菌症治療には全身投与が必須条件であり、重症患者においては経口服用が困難な場合も多く、治療薬の特性として静脈内投与できることが望ましい。しかし、ヒトを含む宿主である哺乳動物と真菌は同じ eukaryocyte (真核細胞) をもつ真核生物に属することから、細胞性基盤が互いに共通しており、真菌細胞への選択毒性を持たせることが難しい。それゆえ、深在性真菌症の治療薬開発は一般の細菌感染症と比べて抗菌活性および安全性の両面から著しく遅れている。

深在性真菌症を生じる病原真菌としては、*Aspergillus* 属、*Candida* 属、*Phycomycetes* 属 (*Cryptococcus neoformans*, *Mucor* など)、放線菌属などが日本では確認されており、中枢神経系(*Cryptococcus neoformans* によるものが主、*Candida* 属、*Aspergillus* 属によるものも少ないが存在する)、呼吸器系 (*Aspergillus* 属、*Candida* 属、*Mucor*, *Nocardia* によるものが主)、消化管 (*Candida* 属によるものが主)への作用、および尿路真菌症 (*Candida* 属、*Nocardia* によるものが主)、真菌血症、真菌性心内膜炎 (*Candida* 属によるものが主) などが知られているがいずれも治療においては抗真菌薬の全身投与が必要である[23, 75]。

従来、真菌症は表在性疾患として外用剤による局所治療が主に行われてきたが、1955年、Amphotericin B (AMPH-B)がポリエーテル系抗生物質として Gold らによって発見された。

AMPH-B は静脈内投与により種々の深在性真菌症に効果を示す抗真菌スペクトルの広い全身的治療が可能な薬物として使用されている[75]。しかし、この薬物は治療量と毒性量が近く種々の副作用は避け難い[12, 75, 78]。1957年に合成された核酸塩基アナログであるフルシトシンの抗真菌作用が1968年に臨床で認められ、経口投与可能で毒作用の少ない薬物として使用されたが抗真菌スペクトルが比較的狭く、耐性株が出現しやすいという欠点があった[13, 42, 75, 77]。1950年代後半にはベンツイミダゾール誘導体が抗真菌作用を持つことが明らかになり、その後多数のイミダゾール系抗真菌薬が発見されたが、いずれも脂溶性が高く、また毒性も強いため外用剤として用いられている。1979年には Ketoconazole(KCZ) が経口投与剤として開発された[56, 58, 75, 76]が、KCZはその毒作用のため、現在、日本においては発売中止に至っている[24,76]。1980年代にはいるとトリアゾール系薬物としてより安全性の高いといわれる Fluconazole(FCZ), Itraconazole(ICZ)が開発された。これらの薬物は、真菌のチトクローム P450(CYP)に作用して真菌細胞膜におけるラノステロールの蓄積を促進し、細胞膜機能維持に必要なエルゴステロールの生合成を選択的に阻害することから、哺乳類への影響は少ないとされている[53]。しかし、実際には、これらの薬物はヒトにおいても CYP, 特に CYP3A4により代謝され、これらに対して強い阻害作用を示す。さらにヒトにおいてはこの CYP3A4で代謝される薬物が多く、深在性真菌症の患者で併用される薬物の多くが相互作用を示し毒作用を増強する結果となっている[57, 61]。

現在用いられている抗真菌薬は、FCZを除いて脂溶性が高いためいずれも経口投与が中心であり、かつ肝臓、内分泌系臓器、造血系臓器などへの毒作用が依然として残されている。また、抗菌スペクトルも狭く、長期の使用により耐性を生じるなどの問題が多い[13, 46, 77]。経口的に用いられているフルオロシトシン(5FC)は、真菌の核酸合成を選択的に阻害し毒性が比較的低い耐性化しやすい[28, 30, 42, 43, 54, 75, 77]。深在性真菌症に対して現在もっとも多く使用されている薬物は、薬効を優先させた考え方なら AMPH-B であるが、その使用にあたっては毒作用の強さが指摘されている[15, 36]。一方、安全性を優先させた考え方からはアゾール系薬物が用いられているが、抗菌スペク

トルには制限があり耐性が生じる上に毒作用の問題も依然として残っている[43]。このアゾール系薬物の薬理作用に関連した毒性としては P450 の機能障害に続発した肝臓への影響(酵素誘導, 肝細胞肥大, 増殖など), 内分泌系への影響(副腎肥大, ステロイドホルモンの変化)などがあげられる。アゾール系薬物は, P450 の活性に影響を与え, 特に CYP3A4, CYP2C9 などへの併用薬との競合により併用された薬物の血中動態を変えることもある[16, 66-68]。アゾール系薬物の FCZ, ICZ などは, 現在使用されている抗真菌薬の中では安全性が高いとされ使用されているが, FCZ(静脈内投与可能)は抗真菌スペクトルが狭く, 特にアスペルギルスへの効果が低いためアスペルギルス症への治療には不適である。また, ICZ(脂溶性が高く経口適用)はアスペルギルスへの効果はみられるもの, 肝臓, 内分泌系臓器, 造血系臓器などへの毒性の問題は依然として残されており, 加えて長期の使用により耐性を生じることが知られている[77]。このように, 従来は, 深在性真菌症に対し効果を示す薬物の少ないことから, 効果が最優先され使用されてきたため安全性の問題は十分に検討されていない。また, 安全性の比較的高い薬物は効果が不十分で, 抗菌スペクトルが狭く, 有効な真菌が限られおり, かつ耐性菌が生じることなど多くの問題が残されている。

免疫不全などを伴ない, 全身状態が悪化した経口投与の難しい重症の入院患者が多い深在性真菌症治療においては, 静脈内投与の必要性はきわめて高い。しかし, 既に述べたように既存の治療薬は脂溶性の高い経口投与薬が主体であり, また静脈内投与できるものは毒作用が強いという問題をかかえている。このため, 抗菌スペクトルが広く, 毒作用が低く, かつ静脈内投与, 経口投与いずれも可能な安心して使用できる新薬の登場が待たれている。

以上のような背景をもとに, プロドラッグにすることで溶解性を高め, 静脈内投与を可能とした水溶性の新規アゾール系抗真菌薬である 4-[1-[(3-methylamino acetoxymethyl)pyridin-2-yl)-methyl-carbamoyloxy]-ethyl]-1-[(2R,3R)-3-[4-(4-cyano-phenyl)-thiazol-2-yl]-2-(2,5-difluoro-phenyl)-2-hydroxy-butyl]-1H-[1,2,4]triazol-4-ium chloride hydrochloride (以下 WSA と省略)について, この薬物の安全性, 有効性の観点から臨床における有用性を評

価した。

すなわち、WSA は、難溶性の活性体をプロドラッグとすることで水溶化を可能にしたため静脈内投与が可能となった。WSA は、静脈内投与された場合、まず血中でエステラーゼの作用によりエステル結合が加水分解され中間体となり、さらに化学的分解により脱アセトアルデヒド反応が生じて活性体である (1R,2R)-4-[2-[2-(2, 5-difluorophenyl)-2-hydroxy-1-methyl-3-[1,2,4] triazol-1-yl-propyl]-triazol-4-yl]-benzotrile (以下、活性体または active body と省略) と修飾部分である 1-Methyl-1,4-dihydro-pyrido[2,3-d][1,3]oxazin-2-one (以下、修飾部分または pro-moiety と省略) になる。このように、溶解性が改善されたため経口投与、静脈内投与の両投与が可能となり、そのスペクトラムは広く、また、既存の抗真菌薬に比較し真菌の P450 への選択性が高く、ヒトのチトクローム P450 へ影響を与える可能性は低くなることがわかった[31]。

そこで、この新規アゾール系抗真菌薬である WSA の有用性について、静脈内持続投与方法を用いることでより有効に、かつ経口投与と同様に安全でしかも効果的に使用できることを立証するため、毒性学および薬物動態学的アプローチと新しい薬効判定法の導入を加えた新たな視点から検討を行った。

また、本研究では、げっ歯類に加えてサルを用いた毒性試験を行ないその安全性について考究した。これは、プロドラッグである WSA の代謝過程における種差の可能性、および既存のアゾール系抗真菌薬における主要な毒性が肝臓・内分泌系であることを考慮し、ヒトに近い代謝機能を持つといわれるサルを用いることで、ヒトでの安全性をより正確に予測できると考えたためである。

本研究における動物実験は、すべて日本ロシュに設置する実験動物倫理委員会の承認を得て進められたものである。

第1章 既存のアゾール系薬物 (Fluconazole, Itraconazole, Ketoconazole) の毒性

アゾール系薬物は、真菌由来の P450 と特異的に結合しその効果を示すといわれている[78]が、哺乳類の P450 とも結合しその活性に影響を与え、特に CYP3A4 抑制効果を示すため深在性真菌症患者において併用される他の薬物の代謝にも影響を及ぼす可能性がある[9, 16, 25, 37, 51, 66-68]。

毒作用としては、薬理作用に関連した毒性として P450 の機能障害に続発した肝臓への影響(酵素誘導, 肝細胞肥大, 増殖など), 内分泌系への影響(副腎肥大, ステロイドホルモンの変化)などがあげられる。副腎, ホルモン系への影響は特に Ketoconazole (KCZ) で著明であり, テストステロン合成阻害による女性化が報告されている[76]。肝臓への影響はやはり KCZ において強く, 死亡例が認められたため日本では KCZ の全身投与は行われていない[24]。また, P450 の活性に影響を与えるため併用された薬物の代謝にも影響を与え CYP3A4 の競合により併用薬の血中動態を変えてしまうこともあると報告されている[56]。

本章では, WSA の毒性軽減化の評価指標を明確にするため, まず既存のアゾール系薬物の毒性について, SD-Slc 系ラットおよびカニクイザル(*Macaca fascicularis*)を用いた反復経口投与毒性試験を行い検討を加えた。比較薬としては, 既存のアゾール系薬物のうち代表的なものとしてあげられる Fluconazole (FCZ), KCZ, Itraconazole (ICZ)を用いた。FCZ については抗菌スペクトルは狭いものの経口および静脈内投与共に可能で汎用される薬物であるため選択し, SD-Slc 系ラットを用いて 2 週間および 4 週間試験を実施して毒性の確認を行い, さらにサルにおける毒性を明らかにするためカニクイザルを用いた 2 週間試験を行った。また, ICZ については脂溶性は高いものの経口投与で汎用されている薬物であるため選択し, カニクイザルを用いた 2 週間試験を実施してサルにおける毒性を明らかにした。KCZ については, 毒性が強いとされているため (日本での全身適用は認められていない)選択し, SD-Slc 系ラットを用いた 2 週間試験を行い毒性の確認を行った。

第1節 実験材料および実験方法

1. 被験物質

Itraconazole は化学名を (±)-1-*sec*-butyl-4-[p-[p-[[[(2R*, 4S*)-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazole-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]-1-piperazinyl]phenyl]- Δ^2 -1,2,4-triazolin-5-one と称し分子量 705.64, 水にほとんど不溶の白色粉末である。

Fluconazole は化学名を 2,4-difluoro- α, α -bis(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)benzyl alcohol と称し分子量 306.27 の白色～微黄色の水に難溶な結晶性粉末である。

Ketoconazole は化学名を *cis*-1-Acetyl-4-[4-[[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]-methoxy]phenyl]piperazine と称し分子量 531.44, 水に溶けにくい白色結晶性粉末である。

Itraconazole(Lot No.A08655-089-25), Fluconazole(Lot No. B)はそれぞれホフマン・ラ・ロシュ社 (スイス, バーゼル)より供給をうけ使用した。Ketoconazole (Lot No. 69F-0898) は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)より購入して使用した。

2. 試験動物および飼育条件

2-1. ラット

SD-Slc 系ラットを株式会社日本エスエルシー(静岡)より 4 週令で購入, 約 1 週間の検疫期間中に順調な発育を示し体重が雄で 110~160 g, 雌で 90~140 g に増加した健康な動物を試験に供した。検疫期間中を含めて動物は室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$ の飼育室で金属製ケージに 1 匹ずつ収容して飼育し, 日本チャールス・リバー社製固型飼料 CRF-1 と滅菌水道水を自由に摂取させた。動物の識別は番号の刻印されたステンレス製標識を用いた。本試験での使用動物は, 対照群, 投薬群ともに各群 5 匹とし, 全例に所定の投与期間, 反復経口投与を行った。投与期間終了時には全例を屠殺し毒作用の評価に供した。

2-2. サル

カニクイザル(*Macaca fascicularis*)(菌による推定年齢:雌雄約 4~6 才)を(株)SNBL サー

ビス(鹿児島)より購入後、2週間の検疫期間にて健康が確認された動物から健康な動物を選び、さらに試験開始前観察(馴化)期間を設定して一般状態および体重・摂餌状態の観察を行い、それぞれ2週間反復経口投与試験に供した。

動物は、検疫、馴化期間を含めて、室温 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、12 時間照明(7:00 ~19:00)の飼育室で1匹ずつ金属製ケージ(70(D) x 80(W) x 90(H) cm)に収容して飼育し、PMI Feeds 社製飼料 Primate diet #5048 (USA)(100g/day/body)と水道水(自由摂取)を与えた。これらの動物の識別には、動物識別カードおよび入れ墨(識別番号)を用いた。本試験での使用動物は、対照群、投薬群ともに雌雄各群1匹とし全例に2週間の反復経口投与を行い投与期間終了時に全例を屠殺し毒作用の評価に供した。

3. 用量の設定

既存のアゾール系薬物を用いた毒性試験の全容を Table 1-1 に示した。

3-1. Fluconazole

ラットを用いた2週間経口投与毒性試験では3試験(用量: 試験1: 0, 150, 450 mg/kg, 試験2: 0, 50, 150 mg/kg, 試験3: 0, 30, 100 mg/kg)を実施した。用量設定のための予試験として2週間試験を行い、その結果をもとに4週間経口投与毒性試験の用量を設定し、確実に毒作用が認められる用量として30 mg/kg、無毒性量または軽度な毒作用が認められる用量として10 mg/kgを設定した。

サルを用いた2週間経口投与毒性試験(投与用量: 0, 15, 100 mg/kg, 各群雌雄各1例)では、ラットの成績をもとに、確実に毒作用が認められる用量として100 mg/kgを、無毒性量または軽度な毒作用の予測される用量として15 mg/kgを設定した。

3-2. Itraconazole

サルを用いた2週間経口投与毒性試験(投与用量: 0, 15, 40, 100 mg/kg, 各群雌雄各1例)では、Fluconazoleと比較するために、低用量として15 mg/kg, 高用量として100 mg/kgを設定した。なお、30%HPCD-18%PEG 溶液(以下、30%HPCD/PEG 溶液と記載)を溶媒に用いて1 mL/kg 投与した。

3-3. Ketoconazole

ラットを用いた2週間経口投与毒性試験(投与用量: 50, 100, 200 mg/kg)を行った。投与用量は文献を参考に、確実に毒性が認められると考えられる用量である 200 mg/kg を高用量とし、無毒性量もしくは軽度に毒性が認められる用量として 50 mg/kg を低用量とした。中間用量は公比 2 で 100 mg/kg を設けた。

4. 被験物質の調製および投与方法

4-1. Fluconazole

被験物質は、0.5%CMC-Na 溶液に溶解または懸濁させた。なお、投与にはラットでは金属性の胃ゾンデを用い体重 100 g 当たり 1 mL を、サルでは経鼻ゾンデを用い体重 1 kg 当たり 1 mL を胃内へ、1 日 1 回ほぼ一定時刻に投与した。対照群には、0.5%CMC-Na 溶液を同様に投与した。

4-2. Itraconazole

被験物質は、30%HPCD/PEG 溶液に薬物を 20%の濃度に溶解させた。サルに経鼻ゾンデを用いて 1 日 1 回ほぼ一定時刻に投与した。投与容量は対照群および 100 mg/kg 群は 5 mL/kg, 40 mg/kg 群は 2.0 mL/kg, 15 mg/kg 群は 0.75 mL/kg とした。対照群には、溶媒として用いた 30%HPCD/PEG 溶液を同様に投与した。

4-3. Ketoconazole

被験物質は、0.5%CMC-Na 溶液に懸濁させた。なお、投与には金属性の胃ゾンデを用い、ラットに体重 100 g 当たり 1 mL を 1 日 1 回ほぼ一定時刻に投与した。対照群には、0.5%CMC-Na 溶液を同様に投与した。

5. 観察項目および検査方法

5-1. 一般状態

試験期間中、毎日一般状態を観察し、あわせて生死を確認記録した。

5-2. 体重変化および摂餌状態

体重および摂餌量は週 2 回測定記録した。

5-3. 臨床検査

1) 血液学的検査

ラットにおいては、最終投与日の翌日、採血前に 3 時間絶食させた後エーテル麻酔下で心臓より、サルにおいては、投与開始前、2 週間の投与終了時に大腿静脈から採血し、EDTA-2K にて抗凝固処理した後自動分析機 H-1 (テクニコン社, USA) にて、赤血球数 (RBC), 白血球数 (WBC), 血色素量 (Hb), ヘマトクリット (HCT), 血小板 (PLT), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球血色素量 (MCH), 平均赤血球血色素濃度 (MCHC), 白血球百分率を測定した。網赤血球数(Retic.)は Brecher 法で測定した。

骨髓有核細胞数 (BMC) の測定は、ラットでは大腿骨より、サルでは肋骨より採取した骨髓を用い Sysmex F-300(東亜医用電子, 東京)により計測した。

2) 血液生化学的検査

血液学的検査時にあわせて採取した血液から分離した血清を用いて以下の項目について測定した。

自動分析機 H7150(日立製作所, 東京)にてグルタミン酸・オキザロ酢酸トランスアミナーゼ活性(GOT), グルタミン酸・ピルビン酸トランスアミナーゼ活性(GPT), アルカリフォスファターゼ活性(ALP), コリンエステラーゼ活性(CHE), 総蛋白質量(TP), アルブミン量(ALB), 血糖(GLU), トリグリセライド量(TG), 総コレステロール量(T-CHO), 尿素窒素量(BUN), クレアチニン量(CRE), 総ビリルビン量(T-Bil), カルシウム量(Ca), 無機リン量(IP), ナトリウム量(Na), カリウム量(K), 塩素量(Cl)を測定し, アルブミン/グロブリン比(A/G)を算出した。

3) 尿検査

ラットでは最終投与日(投与前)に腹部圧迫により採尿, サルでは投与開始前の自然排尿, 投与期間終了時の自然排尿あるいは解剖時に膀胱より採取した尿を用いて以

下の検査を実施した。尿の色調を観察後、マルティスティックス（マイルス三共社製，東京）を用いて，pH，蛋白質，ブドウ糖，ケトン体，ビリルビン，潜血，ウロビリノーゲンを検査した。

また，上記の尿について尿沈渣検査（1500rpm，5min 遠心後の残渣を顕微鏡観察）を行なった。

4) 眼検査

最終投与日の投与終了後に，眼瞼の開閉状態，結膜の充血の有無，角膜混濁の有無，虹彩の状態および瞳孔反射，水晶体の混濁の有無などを指標とした外眼，前眼部の観察を行なった。外眼所見については毎日の投与時，症状観察時もしくは体重測定時においても確認を行った。

5) 病理解剖学的検査

投与期間終了時，ラットについては，エーテル麻酔下で腹大動脈より採血後，サルについてはキシラジン(セラクター®: Bayer 社製, 2%溶液, 0.1 mL/kg, 筋肉内投与)の麻酔前投与後，ケタミン(ケタラール®: PARKE-Davis 社製, 5%溶液, 0.3 mL/kg, 筋肉内投与)麻酔下にて腋窩動静脈切断し放血致死後，剖検した。脳，下垂体，甲状腺（含：副甲状腺），唾液腺（顎下腺，舌下腺），胸腺，肺（含：気管，気管支），心臓，肝臓，脾臓，副腎，腎臓，精巣，精巣上体，精囊，前立腺，卵巣，子宮（含：膈）の各臓器は重量を測定し，これらの臓器の相対重量（ラット：体重 100 g 当り，サル：体重 1 kg 当り）を求めた。上記秤量臓器に加えて脾臓，胃，十二指腸，空腸，回腸，結腸，直腸，脊髄，大動脈，食道，皮膚，乳腺，筋肉，膀胱，腸間膜リンパ節，胸骨，大腿骨（骨髄），坐骨神経，涙腺，眼球，舌および肉眼的異常部位について組織学的検査を行なった。

これら検査材料は，眼球を除きすべて 15%緩衝ホルマリン溶液（pH6.8）で固定し，H E 染色を行ない検査に供した。また，肝臓，腎臓については，脂肪染色標本の検査も行った。眼球は，グルタルアルデヒド・ホルマリン混液で固定後，15%緩衝ホルマリン溶液（pH 6.8）で再固定し，H E 染色標本を作製して組織学的検査に供した。

6) p-nitroanisole O-demethylase 活性

Fluconazole の 2 週間および 4 週間経口投与試験については、p-nitroanisole O-demethylase 活性を測定した。p-nitroanisole O-demethylation 活性は、Netter および Seidel 等の方法[46]および Esclade 等の変法[11]で測定した。

6. 統計学的解析

本試験で得られた結果は、Table 1-2 に示す方法を用いて、対照群を基準とした統計学的有意性の解析を行った。結果として数値が得られる検査項目については、各投与群の平均値および標準偏差を算出し、対照群に対する各投薬群の統計学的有意性を検定した。また、尿標準検査、病理組織学的検査結果など結果を数値として得られないものについては確立検定を行った。なお、有意水準はいずれも危険率 5% ($p \leq 0.05$) および 1% ($p \leq 0.01$) とした。

サルにおいては、一群の動物数が 1 例のため統計学的検定は実施せず、各個体の投与実施前の値、および背景データを考慮した上で評価を行った。

第2節 結果

1. Fluconazole (FCZ) の毒性

1-1. ラットを用いた2週間経口投与毒性試験 (Fig. 1-1, Table 1-3~1-5)

はじめに予試験として試験1を実施し(0, 150, 450 mg/kg), 毒性発現量を確認するため試験2: 0, 50, 150 mg/kg, 試験3: 30, 100 mg/kgを行った。結果は, いずれの投与群においても死亡例は認められなかったが, 30 mg/kg 以上群で肝臓に機能的および形態学的変化(肝臓重量増加, 小葉中心性肝細胞の肥大, 脂肪変性, P450 活性上昇)($p \leq 0.05$)が認められた。さらに, 450 mg/kg 群では著明なトリグリセライド量(TG)の減少($p \leq 0.05$)がみられた。また, 30 mg/kg 以上群では脾臓の重量増加($p \leq 0.05$), 髄外造血が, 100 mg/kg 以上群では副腎重量増加($p \leq 0.05$), 副腎皮質の脂肪滴増加などが認められた。

このようにFCZのラット肝毒性は30 mg/kg 以上の投与群で用量相関的に認められた。また副腎への影響は100 mg/kg 以上の投与群で軽度に認められた。

1-2. ラットを用いた4週間経口投与毒性試験 (0, 10, 30 mg/kg) (Table 1-6)

いずれの投与群においても, 死亡例は認められず, 肝臓に, 肝臓重量増加($p \leq 0.05$), 病理組織学的検査における肝細胞の肥大および脂肪変性, P450 活性上昇($p \leq 0.05$)がみられたが, 10 mg/kg 群ではこの変化はごく軽度であった。肝臓以外の変化としては, 30 mg/kg 群においてのみ副腎重量増加($p \leq 0.05$), 副腎皮質の脂肪滴増加などが認められた。

このようにFCZの4週間反復経口投与では, 肝毒性は低い用量(10 mg/kg)から発現し, その程度は用量相関的に認められた。なお, 副腎への影響は30 mg/kg 投与の雌1例で副腎皮質細胞肥大が軽度に確認されたが, いずれの投与群においても肝毒性と比較して軽度であった。

1-3. サルを用いた2週間経口投与毒性試験 (0, 15, 100 mg/kg) (Table 1-7)

いずれの群においても死亡例は認められなかったが, 100 mg/kg 群の雄において, 体重減少が認められた。なお, 摂餌量についてはいずれの投与群においても変化は認められなかった。血液学的検査では変化は認められなかったが, 血液生化学的検査において,

100 mg/kg 群の雌で TG の増加(投与前:35→投与 14 日目:112 mg/dL), アルブミン(ALB) (投与前:4.6→投与 14 日目:3.7g/dL), 15 mg/kg 群の雌雄では TG の増加(♂投与前:44→投与 14 日目:172 mg/dL, ♀投与前:16→投与 14 日目:112 mg/dL), 雌では ALB の軽度な減少(投与前:4.2→投与 14 日目:3.6 g/dL)が認められた (背景データ: TG ♂16-64♀20-80 mg/dL, ALB ♂3.5-4.7 ♀3.5-4.3 g/dL, GPT ♂63-101 ♀7-79IU/L, CRE ♂0.5-0.9 ♀0.4-0.8 mg/dL, IP ♂4.3-7.5 ♀2.8-6.8 mg/dL, TP ♂6.7-8.7 ♀6.7-8.7 g/dL)。

臓器重量では, 100 mg/kg 群の雌雄で 肝臓重量の増加が認められたほか, 100 mg/kg 群の雄で副腎重量の軽度増加, 雌では副腎重量の増加が, 雌雄の胸腺重量の減少が認められた。(背景データ: 相対重量:肝臓 ♂13.35-24.34, ♀16.0-27.2 g/kg, 副腎 ♂69.2-188.4, ♀97.4-247 mg/kg)

病理組織学的所見では, 100 mg/kg 群雌の肝臓に肝細胞の脂肪変性, 単細胞壊死, 小葉辺縁肝細胞の好酸性化, クッパー細胞内に褐色色素の沈着, 副腎には皮質の脂質滴の増加が, 雄では副腎皮質の束状帯細胞の肥大が認められた。重量減少の認められたこの群(雌雄)の胸腺では病理組織学的な変化はみられなかった。

このように FCZ によるサルの肝毒性は, 軽度に 15 mg/kg 群以上の用量で観察され, また副腎への影響は 100 mg/kg 群で認められた。

1-4. Fluconazole (FCZ) の毒性 : 考察

SD-Slc 系ラットを用いて 2 週間および 4 週間反復経口投与試験を行った。また, サルを用いて 2 週間反復経口投与試験を行った。

ラットにおける FCZ の 2 週間経口投与(最高用量 450 mg/kg)および 4 週間経口投与(最高用量 30 mg/kg)では, いずれも死亡例は認められず, 肝臓に変化(肝臓重量増加, 病理組織学的検査における肝細胞の肥大, 脂肪変性, P450 活性上昇)がみられた。ラットの 10 mg/kg 群(4 週間経口)ではこれらの変化はごく軽度であった。さらに, 2 週間試験においては 30 mg/kg 群以上の投与群で, 副腎重量増加, 副腎皮質の脂肪滴増加などが認められた。

このように, ラットでは, FCZ を用いた 30 mg/kg 以上の 2 週間経口投与および 10

mg/kg 以上の 4 週間経口投与において用量に依存した肝毒性の発現を確認した。また、サルでは FCZ 15 mg/kg 以上の 2 週間経口投与でラットの場合と質的に同様な肝毒性を確認した。一方、肝毒性に比べ軽度な変化ではあるが副腎への影響が FCZ 30 mg/kg の 4 週間経口投与ラットおよび 100 mg/kg の 2 週間経口投与サルで観察された。このことから副腎毒性の発現には肝毒性より長い期間もしくは高用量の曝露が必要と考えられる。

FCZ のラットにおける LD₅₀ は経口投与で雌 1,271 mg/kg(1,072-1,436 mg/kg), 雄 1,388 mg/kg (1,287-1,497 mg/kg), 静脈内投与では致死量 200 mg/kg 以上, ラットの 4 週間反復経口投与試験では 50 mg/kg 以上で肝臓細胞肥大・脂肪変性が, 100 mg/kg 以上で肝臓・腎臓・副腎重量の増加, GOT, GPT の増加, 総コレステロールおよびトリグリセライドの減少が報告されている[63]。

このように, FCZ の主な毒作用は, 肝毒性および内分泌系(主に副腎)に対するものであることを確認した。

2. Itraconazole(ICZ)の毒性

2-1. サルを用いた 2 週間経口投与毒性試験 (15, 40, 100 mg/kg) (Table 1-8)

100 mg/kg 群では, 雌雄で投与後ほぼ毎日嘔吐を認め, 雄 1 例は, 投与翌日から元気消失状態となった。100 mg/kg 群雄および 40 mg/kg 群雌では体重減少が認められた。また, 対照群(30 %HPCD-18%PEG 溶液)を含めすべての投与群で投与翌日より軟便が散見された。100 mg/kg 群雄 1 例は, 投与 11 日目から摂餌量が低下し 12 日目の投与後に嘔吐を認め, 嘔吐物の誤嚥による呼吸困難を来して死亡した(死後の病理解剖により確定)。

血液学的検査では, 投与前値と比較したところ, 100 mg/kg 群の雌において投与 7 日目および投与終了時に, 40 mg/kg 群の雌雄では投与終了時に, 15 mg/kg 群の雌では投与 7 日目に RBC, HCT, Hb の軽度減少が認められた。100 mg/kg 群の死亡した雄においては, 死亡直後の血液を用いた検査結果からは血液濃縮がうかがわれた。(背景データ: RBC ♂4.92-7.96 ♀4.96-7.69 10⁶/μL, HCT ♂38.9-50.9 ♀39.4-48.6 %, Hb ♂12.1-15.3 ♀

11.7-15.3 g/dL)。

血液生化学的検査では、100 mg/kg 群の雄において、投与7日目にTGの増加(投与前:32→投与7日目:111.0 mg/dL), 死亡直後の血液を用いた検査結果からはTGの著明な増加(599 mg/dL), ALB(投与前:4.9→3.6g/dL), 総コレステロール量(投与前:129→78 mg/dL)の減少が認められた他, CREの増加(投与前:1.2→2.0 mg/dL), IPの増加(投与前:5.1→9.1 mg/dL), TP(投与前:7.3→6.9 g/dL)もみられた。100 mg/kg 群の雌では投与7日目, 14日目にIPの減少(投与前:5.1→投与7日目および投与14日目:1.2, 1.4 mg/dL), 投与終了時にALBの減少(投与前:4.3→投与14日目:3.5g/dL)が認められた。また, 40 mg/kg 群の雌では投与7日目にGPTの増加(投与前:52→投与7日目:165IU/L)が認められた。15 mg/kg 群の雌では投与終了時にTGの増加(投与前:88→投与14日目:131 mg/dL)が認められた。(背景データ: TG ♂16-64 ♀20-80 mg/dL, ALB ♂3.5-4.7 ♀3.5-4.3 g/dL, GPT ♂63-101 ♀7-79 IU/L, CRE ♂0.5-0.9 ♀0.4-0.8 mg/dL, IP ♂4.3-7.5 ♀2.8-6.8 mg/dL, TP ♂6.7-8.7 ♀6.7-8.7 g/dL)。

尿検査, 眼検査では, 各群雌雄ともに対照群, 投与前, 背景値と比較して著変は認められなかった。

臓器重量では, 対照群の値および背景値と比較して100 mg/kg 群の雌雄で肝臓および副腎重量の軽度増加, 40 mg/kg 群の雌雄では副腎重量の軽度増加が認められた。

(背景データ: 相対重量: 肝臓 ♂13.35-24.34, ♀16.0-27.2 g/kg, 副腎 ♂69.2-188.4, ♀97.4-247 mg/kg)

肉眼的所見では, 100 mg/kg 群雄の死亡例において, 嘔吐物誤嚥に起因すると考えられる肺の浮腫・一部肝変様変化の他, 腎臓の白色病巣, 胸腺の縮小が認められた。

病理組織学的所見では, 100 mg/kg 群雄の死亡例においては, 副腎皮質における脂肪滴の増加, 雌では肝臓に小葉辺縁部肝細胞の肥大が認められた。40 mg/kg 群の雌では, 肝臓に小葉辺縁部肝細胞の肥大, 副腎皮質における脂質滴の増加が認められた。

2-2. Itraconazole (ICZ)の毒性: 考察

サルを用いて2週間経口投与試験(15, 40, 100 mg/kg)を実施した。ICZの主な毒作用

は肝臓 (重量増加, 肝細胞肥大: 軽度～中等度 100 mg/kg) および副腎 (重量増加, 皮質への脂肪滴増加: ごく軽度 40 mg/kg, 軽度 100 mg/kg) に特異的に認められた。なお, 100 mg/kg 群で嘔吐がみられ雄 1 例が吐物の誤嚥により死亡したことが病理所見で確認された。この動物は, 死亡直後の血液を用いた検査結果からは血液濃縮がうかがわれ, 衰弱のため水分摂取量が減少していたことが推察される。肝毒性は 100 mg/kg, 副腎毒性は 40 mg/kg の 2 週間連続投与で認められた。

ラットにおける LD₅₀ は経口投与で 320 mg/kg 以上, 静脈内投与では 46.4 mg/kg とされている。一方, 反復経口投与試験(3 ヶ月: 5, 20, 80 mg/kg)ではイヌ, ラットともに主に 20 mg/kg 以上で副腎への影響が報告され, 副腎腫大, 血中コレステロール, リン脂質の増加などが報告されている[17, 69, 70]。別の反復経口投与試験 (3 ヶ月: 10, 40, 160 mg/kg) では 160 mg/kg において死亡例が発現し, また 40 mg/kg 以上で副腎, 卵巣重量の増加が報告されている[71]。このように, いずれの報告でも ICZ の毒性は, 主に内分泌系に対するものである。

筆者の成績も, ICZ の主な毒作用は内分泌系(特に副腎)および肝臓を標的器官とするものであることを確認した。特に, サルでの肝毒性は 100 mg/kg 以上, 内分泌系への毒作用は 40 mg/kg 以上の 2 週間連続投与で確認されることをはじめて明らかにした。

このように, ICZ の肝臓に対する毒性は FCZ より弱く, 副腎に対する毒性は逆に ICZ でより強く確認された。

3. Ketoconazole(KCZ)の毒性

3-1. ラットを用いた 2 週間経口投与毒性試験 (0, 50, 100, 200 mg/kg) (Table 1-9)

いずれの投与群においても副腎の褪色および副腎重量増加がみられ, 100 mg/kg 以上の投与群ではこれらの変化が著明に認められた。また, 200 mg/kg 群では 1 例が死亡, 生存例においても自発運動減少が認められた他, 肝臓重量増加($p \leq 0.05$), 血中トリグリセライド減少($p \leq 0.05$)および一般状態の悪化に直接または間接的に関連したと考えられる変化(血中尿素窒素の減少, 白血球・骨髓有核細胞数減少など: $p \leq 0.05$)が認められ

た。肝臓については 100 mg/kg においても重量に軽度な増加がみられ有意($p \leq 0.05$)とされたが背景値からは、この値は必ずしも異常値とはいえず境界値と考えられた。200 mg/kg 群では、有意差は認められないものの精巣重量の減少がうかがわれた。

このように、KCZ の毒作用は、2 週間連続投与において副腎では 50 mg/kg 以上、肝臓では 200 mg/kg 以上で認められ、FCZ に比べ致死性が強く、副腎毒性はより強い毒性として確認された。KCZ の毒性は ICZ と同様に肝臓より副腎で顕著に認められた。

3-2. Ketoconazole の毒性 : 考察

200 mg/kg 群では死亡(1 例)が認められ、既存の代表的アゾール系薬物 FCZ, ICZ および KCZ の中では KCZ が最も致死性の強いことも明らかとなった。いずれの投薬群においても副腎重量の増加がみられ、肝臓重量増加および血中トリグリセライドの減少も確認された。死亡例の認められた 200 mg/kg 群では有意差は認められないものの精巣重量の減少がうかがわれた。

KCZ を用いた 100 mg/kg の 4 週間反復投与では 8/12 例が死亡し、肝臓(重量増加, 細胞肥大, 脂肪滴沈着), 腎臓(重量増加), 副腎(束状帯肥厚, 脂肪滴増加)の変化が顕著に発現したとの報告がある[63]。ラットにおける単回経口投与で、死亡例は雄では 410 mg/kg, 雌では 328 mg/kg から発現, LD_{50} は雄で 607 mg/kg, 雌で 374 mg/kg, 単回静脈内投与では LD_{50} は雄で 108 mg/kg, 雌で 111 mg/kg と報告されている[47]。また, 30 日間経口投与(6, 12, 25, 50, 100 mg/kg)では, 主に副腎重量の増加は 12 mg/kg 群から認められ, 50 mg/kg 以上の投与群では副腎, 肝臓の変化(重量増加, 肝細胞腫大・空胞化, 副腎皮質細胞空胞化 など)に加えて生殖器の変化(子宮壁ひ薄化, 卵巣黄体細胞脂肪沈着)が, 100 mg/kg 群ではさらに精囊重量減少, 精囊腺腔萎縮などが報告されている[47]。

このように, 筆者の確認した KCZ の致死毒性の強さからも, KCZ は既存のアゾール系薬物の中で最も毒性の強い物質として裏付けられる。また, KCZ の毒性は肝臓より内分泌系(副腎)臓器で顕著に認められ, 前述の 2 週間経口投与においても副腎への影響は 50 mg/kg 以上, 肝臓への影響は 200 mg/kg 以上で認められた。さらに, 精巣への影響が確認され, ステロイドホルモン合成系への影響が示唆される[2,8,73,76]。

第3節 考察

経口投与された既存のアゾール系薬物である Fluconazole (FCZ), Itraconazole (ICZ) および Ketoconazole (KCZ) は共に、ラットおよびサルに経口投与した場合、程度の差はあるものの、いずれも共通して質的に同様の毒性を主に肝臓および内分泌系(副腎)に認めた。FCZ 投与では、肝毒性は ICZ や KCZ よりも低い用量から発現し、ラットにおいては2週間で30 mg/kg, 4週間で10 mg/kg, サルでは2週間で15 mg/kg の用量からみられ、その毒性は用量相関的であった。また、副腎への影響は、ラットでは4週間投与した30 mg/kg 群でみられ2週間投与では高用量群でもごく軽度であり、サルでは2週間投与した100 mg/kg 群で確認された。

ICZ 投与では、副腎への影響が低い用量から発現し、サルを用いた本研究では、副腎への毒作用は40 mg/kg から、肝毒性は100 mg/kg から確認された。

KCZ 投与では、特に副腎で顕著な変化が認められ、ラット副腎への影響は50 mg/kg から、ラット肝臓への影響は200 mg/kg で認められている。さらに、200 mg/kg 群では精巣重量の減少も軽度ではあるがうかがわれた。

アゾール系薬物は一般に、真菌の細胞膜の主要構成成分であり細胞膜機能維持に必要なエルゴステロール合成においてチトクローム P450 (CYP) に作用しメバロン酸からエルゴステロールへの C14 位のデメチレーションを阻害して真菌細胞膜におけるエルゴステロールの生合成を妨げることで真菌の生育を選択的に阻止または抑制すると考えられている[29,42,46, 80]。このため、真菌への選択性があり、哺乳類への影響は少ないといわれているものの、同じ真核細胞をもつヒトでの細胞構成要素、代謝系に類似点は多く、哺乳類の CYP に対して非特異的な阻害剤として作用する可能性がある。それゆえ、CYP の機能障害による種々の影響は無視できない。一般にアゾール系薬物で問題とされる酵素誘導もこの影響の一つと考えられ、肝臓肥大などを誘発する可能性がある。その他、ステロール生合成を抑制することから、非特異的にヒトのコレステロール合成系、ホルモン合成系への影響も考えられる[2]。

また、ヒトにおいては CYP 特に CYP3A4 で代謝される薬物が多く、深在性真菌症の

患者では他の薬物を併用することが多いため、これらの併用薬に対して薬物代謝に影響を与え CYP3A4 の競合により併用薬の血中動態を変えてしまうこともある。この場合、結果として薬物のもつ毒作用を増強するリスクは高くなる[1, 2, 7, 9, 16, 26, 35, 57, 64, 66-68, 85]。さらに、これらの抗真菌作用は耐性化が生じることが知られており、このメカニズムとしては真菌細胞膜の薬剤透過性の変化による薬剤取り込みの変化あるいは薬剤排出の亢進と CYP の質的・量的変化によるものと考えられている。従って、アゾール系薬物の長期間投与が必要な場合、薬効が期待できなくなる可能性がある。

上記のように、主な毒作用として本試験で認められた肝臓への影響(肝細胞肥大, 増殖など), 内分泌系への影響(副腎肥大)は、既存のアゾール系薬物と同様にチトクローム P450(CYP)の機能障害に続発した薬理作用に関連した変化と考えられ、肝臓への影響(酵素誘導, 肝細胞肥大, 増殖など), 内分泌系への影響(副腎肥大, ステロイドホルモンの変化)などが既に報告されている[17,47,63,69-71]。副腎, ホルモン系への影響は特に KCZ ではっきりと認められ、臨床では、テストステロン合成阻害による女性化が報告されている[76]。肝臓への影響はやはり KCZ において強いと報告され、肝障害の要因として直接的な膜ステロール合成阻害, 過酸化水素分解酵素抑制による過酸化水素の蓄積などが上げられている[5]。さらに、副腎への影響に続発した二次的变化として催奇形性が報告されている[6,48]。また FCZ の場合、注射剤と経口剤があるがバイオアベイラビリティはほぼ等しく組織移行性も既存の抗真菌薬に比較して良いため、両投与方法による毒作用に差は少ないと考えられる。一方、ICZ の場合は脂溶性が高く、酸の存在で吸収がよくなるため食事の影響を受ける[18]。また、尿細管における p-糖蛋白を介した輸送を阻害するため、他剤との併用が必要な場合は注意が必要である。この ICZ では長期投与後血中コレステロールの増加が認められているが、種差が大きく毒性用量での二次的变化と考えられ、ヒトでは確認されていない[8, 55, 71]。

耐性は FCZ より疎水性の強い KCZ, ICZ に強くみられ、膜の物理学的および生化学的变化がアゾール系薬物の取り込みおよび efflux に影響する可能性がある[3,19]。耐性化の原因としては、薬剤の膜透過性低下, 14α -デメチラーゼの過剰発現, 14α -デイ

メチラーゼの変異によるアゾール親和性低下などの関与が考えられている[20]。

このように、今日の深在性真菌症の薬物療法においては最も毒性が少ないとされ、使用されている既存のアゾール系薬物の持つ主な毒性は肝臓と内分泌系臓器(副腎)に発現するといえる。

1. 肝臓

アゾール系薬物は、CYP に影響し、結果として酵素誘導が起こり、これらの酵素群は甲状腺からのホルモン(T3, T4)の排泄を亢進することが考えられる。この場合、排泄の亢進に対してネガティブフィードバックがおきた場合、下垂体から甲状腺刺激ホルモンの分泌が亢進し、T3, T4 などの合成が亢進、これに伴って甲状腺、肝臓において hypertrophy, hyperplasia, peroxisome proliferation などが懸念される[40]。従って、肝臓、甲状腺の臓器重量、病理組織変化、CYP 活性への影響、甲状腺ホルモンへの影響などを確認する必要があると考えられる。

既存の抗真菌薬において肝臓毒性を示す薬物は多く KCZ, FCZ を用いた *in vitro* 試験では KCZ の cytotoxicity は FCZ より強いと報告されている[55]。臨床においては、肝臓における代謝への影響が強い場合は、CYP3A4 などに関与した併用薬による毒性を誘発する可能性も考えられる。

2. 内分泌系臓器

アゾール系薬物の作用機序が、真菌のステロイド合成抑制ということから、哺乳類においてもコレステロール生合成への関与は懸念される。肝臓でステロイドホルモンの合成阻害が生じた場合は、ネガティブフィードバックがおきると考えられ、増加した下垂体を介する ACTH, LH, FSH などの刺激により副腎の肥厚が生じると考えられる。また、コレステロール自体は肝臓で生合成されるが、副腎ではラットの場合はコルチコステロンが、サルの場合はコルチゾールが合成される。コルチコステロンが増加した場合、胸腺の未熟な細胞とバインディングし胸腺の若い細胞である T-cell が抑えられ胸腺

萎縮の生じる可能性も否定はできない。また、テストステロンの生合成に影響を受けた場合、生殖系臓器への影響も考えられる。従って、毒性の指標として、副腎の他、胸腺、生殖器などへの影響も確認する必要がある。副腎、ホルモン系臓器への影響は、KCZにおいて強く認められるが、KCZでは臨床において女性化が報告されている[76]。しかし、副腎、ホルモン系臓器への影響はFCZ、ICZでは改善されていると報告されている[8,71,73]。一般に、アゾール系薬物では、毒性用量を投与した場合、過剰のコルチコイドホルモンを遊離させる場合があり、その結果として胎児毒性が現れるといわれている。また、KCZは高用量で妊娠ラットにおいて催奇形性を起こすとの報告もある[10, 18, 50, 53, 65, 72, 73]。この催奇形性は副腎の働きを介していると考えられ、副腎へ影響の少ない薬物は、催奇形性誘発の可能性も軽減化すると考えられる。

このように抗真菌薬全般と比較した場合、アゾール系薬物の毒性は軽減化されている。しかし、抗菌スペクトルは必ずしも広くはなく、また静菌的作用が中心であり、抗真菌効果を期待した場合、効果に比較してその毒作用はまだ無視することはできない。

この今日の状況が、深在性真菌症の治療において、抗菌スペクトルが広く、より高い効果をもち、かつ毒作用が低い新規薬物の出現が期待される所以である。

3. 小 括

既存のアゾール系薬物を用いた反復経口投与毒性試験を行い、アゾール系薬物の持つ毒性を確認し以下の結果を得た。

1. Fluconazole では、ラット肝臓毒性は2週間投与で30 mg/kg、4週間投与では10 mg/kg以上で、ラット副腎毒性は4週間投与の30 mg/kgで認められた。また、サルにおける2週間投与では肝毒性が⁵15 mg/kg以上、副腎毒性が⁵100 mg/kgで認められた。
2. Itraconazole のサル2週間投与では副腎毒性が⁵40 mg/kg以上で、肝毒性が⁵100 mg/kgで認められた。
3. Ketoconazole のラット2週間投与では、肝毒性が⁵200 mg/kg、副腎毒性が⁵50 mg/kg

以上で認められた。

以上のように、既存のアゾール系薬物の主な毒作用は共通的であり、肝臓 (重量増加, 細胞肥大, 脂肪変性)・副腎(重量増加, 皮質脂肪滴増加など)に認められた。また, Fluconazole では肝毒性, Itraconazole, Ketoconazole では副腎毒性の発現しやすいことを確認した。さらに、ラットとサルにおける毒性は本質的には同じであるが、毒性発現用量に差のあることが示唆された。

第2章 新たな薬物療法を提案するための研究 –新規抗真菌薬 (WSA) の安全性, 有効性の検討

現在のアゾール系薬物は, AMPH-B に比べ毒性が軽減されているものの薬効は弱く, なおかつ経口投与が中心で肝臓, 内分泌系臓器, 造血系臓器などへの毒作用の問題が依然として残されている。また, 抗菌スペクトルは狭く, 長期の使用により耐性を生じるものが多いことが問題となっており, 新しい抗真菌薬の出現がまたれている[75]。

プロドラック化することにより溶解性が改善された新規抗真菌薬 WSA は, 経口投与, 静脈内投与の両投与が可能である。さらに, その抗菌スペクトラムは広く, また, 既存の抗真菌薬に比較し真菌の P450 への選択性が高いため, ヒトのチトクローム P450 へ影響を与える可能性は低くなった。そこで, 本章ではこの新規アゾール系抗真菌薬である WSA を用いて, ラットおよびサルに経口投与, 静脈内 (bolus および infusion) 投与を行い, その安全性, 有効性について検討を行った。また, ヒトの安全性をより正確に評価するため薬物血中動態検索も併せて実施し, トキシコキネティックスの検討をも加えた。

本章, 第1節では, 本化合物 WSA, (4-[1-[(3-methylaminoacetoxymethyl-pyridin-2-yl)-methyl-carbamoyloxy]-ethyl]-1-[(2R,3R)-3-[4-(4-cyano-phenyl)-thiazol-2-yl]-2-(2,5-difluoro-phenyl)-2-hydroxy-butyl]-1H-[1,2,4]triazol-4-ium chloride hydrochloride) を, 静脈内投与および経口投与を行い, WSA そのものの毒性について検討した。また, WSA は, 血中で活性体(active body)に変換されることから, 活性体についても検討を加えた。第2節では, ヒトでの安全性をより正確に評価するため WSA およびその活性体のトキシコキネティックス解析を行った。また, *in vitro* による肝細胞での活性体への変換率についても検討を行った。さらに, 第3節では, 抗真菌薬のより安全で有効な投与方法を確立するため, 感染動物モデルを用いた新たな評価法を作成し, その方法を用いて WSA の安全性ならびに有効性を検討した。比較薬には, 現在, 毒性は強いものの最も有効性が高い静脈内

投与薬である非アゾール系薬物 amphotericin B (AMPH-B)を用いた。抗真菌剤として、その効果から長く使用されている AMPH-B はポリエーテル系抗真菌剤であり、真菌細胞膜のエルゴステロールに直接結合し、細胞膜のバリア機構に障害を与え K イオンなどの電解質の細胞内外の均衡に影響を及ぼし(K^+ の細胞外放出と同時に、プロトンの細胞内移入を促す)膜透過作用を亢進することで静菌的に作用する[29, 30, 36, 75]と考えられている。また、一方では、真菌細胞膜の酸化的障害作用を示すことから、殺菌的作用を持つことも報告されている[12, 38]。この薬物は、効果が高いが毒作用も強いことが知られており、腎機能障害をきたしやすく[27, 34]、また低 K 血症、悪心嘔吐、悪寒、戦慄、発熱なども報告されており汎用されているものの使用に注意が必要な薬物とされている[15, 53]。

第1節 WSAの毒性評価

SD-Slc系ラットおよびカニクイザルを用いてWSAの毒性試験を以下のように実施し、その毒性を既存のアゾールの持つ毒性と比較検討した。WSAの毒性試験の全容は、Table 2-1に示した。

1. 実験材料および実験方法

1-1. 被験物質

本薬物 WSA(Lot No. MTS2111 および MTS2113)は、化学名を 4-[1-[(3-methylaminoacetoxymethyl-pyridin-2-yl)-methyl-carbamoyloxy]-ethyl]-1-[(2R,3R)-3-[4-(4-cyano-phenyl)-thiazol-2-yl]-2-(2,5-difluoro-phenyl)-2-hydroxy-butyl]-1H-[1,2,4]triazol-4-ium chloride hydrochloride と称し、分子式 $C_{35}H_{35}F_2N_8O_5S \cdot 1:1HCl \cdot 1:1Cl$ 、分子量 789.695 で水に極めて溶けやすい(蒸留水に 1 g/mL 以上溶解: 25°C) 白色粉末である。また、ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルフォキシド (DMSO)、メタノール(MeOH)、エタノール (EtOH)にはやや溶けにくく (>10 mg/mL)、エチルアセテート、エーテルにはほとんど溶けない。被験物質 WSAの化学構造式を Fig. 2-1 に示した。

本薬物、WSA は Prodrug であり、静脈内投与された場合、まず血中で酵素(エステラーゼ)の作用により加水分解を受け、中間体を経て修飾部分 (pro-moiety) と活性体 (active body)に変換される (Fig. 2-1)。修飾部分の化学名は 1-Methyl-1,4-dihydro-pyrido[2,3-d][1,3]oxazin-2-one、分子量は 437.474、活性体の化学名は(1R,2R)-4-[2-[2-(2,5-Difluoro-phenyl)-2-hydroxy-1-methyl-3-[1,2,4]triazol-1-yl-propyl]-thiazol-4-yl]-benzotrile、分子量は 164.165 である。修飾部分および活性体の構造式、および WSAの代謝の過程を Fig. 2-2 に示した。

WSAの溶解性 (Table 2-2): WSA は Prodrug となったことで水溶性は極めて改善され、1 mL の水に 1,000 mg 溶解させることが可能となり、生理食塩水を用いた静脈内投与が可能となった。主なアゾール系薬物の水に対する溶解性は Table 2-2 に示したように、WSA (prodrug)は 1,000 mg/mL、WSA の活性体および Itraconazole は 0.001 mg/mL 以下、

Fluconazole は 10~20 mg/mL, Ketoconazole は 0.01 mg/mL 以下であった。従って、今までもっとも水溶性が高いとされていた FCZ (10~20 mg/mL) と比較すると 50~100 倍、抗真菌スペクトルの広いといわれる ICZ と比較した場合は百万倍となる。

1-2. 動物および飼育条件

1) ラット

SD-Slc 系ラットを日本エスエルシー(株)より購入した。経口投与および静脈内ボラス投与試験には 4 週齢で購入し、約 1 週間の検疫期間中に順調な発育を示した健康な動物を 5 週齢より試験に供した。静脈内持続投与試験に用いた動物は 5 週齢で購入し、検疫終了後に静脈内カテーテル留置手術を施し、その 2 週間後、動物の一般状態やカテーテル留置後の生理的食塩液(Saline)の通液状態が良好な動物を試験に供した。検疫期間中を含めて動物は室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$ の飼育室で金属製ケージに 1 匹ずつ収容して飼育し、日本チャールスリバー社製固型飼料 CRF-1 と滅菌水道水を自由に摂取させた。動物の識別は番号の刻印されたステンレス製耳標識を用いた。

静脈内カテーテル留置手術 [14, 22, 41]

動物はペントバルビタール溶液 (15~25 mg/kg) の腹腔内投与により麻酔した。消毒した後肢皮膚の大腿静脈上の皮膚を切開した。周囲の脂肪組織などをピンセットで剥離して大腿静脈を露出し、カテーテル (Clear Vinyl Tube, 外径 0.9 mm, 内径 0.5 mm) を大腿静脈より後大静脈へ挿入した。挿入したカテーテルを周囲の皮下組織に固定し、カテーテルのもう一端を皮下組織を通して背側頸部より導出し、切開部を縫合した。動物にジャケットを装着し、カテーテルをテーサーに通してシーベルに接続し、シリンジポンプ (KD Scientific Inc., USA) に接続した。また、感染防御のため Penicillin G 溶液 (2,5000 unit/mL; 明治製菓) を術野に滴下 (0.2 mL) し、大腿筋肉内に投与 (0.5 mL) した。また、留置カテーテルを維持するため、生理的食塩液 0.4 mL/hr/body を 24 時間静脈内持続投与した。

2) サル

カニクイザル(*Macaca fascicularis*)(歯による推定年齢:雌雄約 4~6 才)を(株)SNBL サービスより購入後、検疫期間中(約 1 ヶ月間)に健康状態に問題のないことを確認し、試験に供した。また、静脈内持続投与に使用する動物には、後述するカテーテル挿入手術を実施した後、投与開始までに約 2 週間の観察(馴化)期間を設け健康な動物(試験開始時体重:雄 3~5 kg, 雌 2~4 kg)を選定し、それぞれ単回投与(雄 6 頭), 2 週間(32 頭)または 4 週間(32 頭)の反復投与試験に供した。動物は、検疫期間、試験期間を通して室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、12 時間照明(7:00 ~19:00)の飼育室で 1 匹ずつ金属製ケージ(70(D) x 80(W) x 90(H) cm)に収容し、PMI Feeds 社製飼料 Primate diet #5048 (USA) (100g/day/body)と水道水(自由摂取)を与えて飼育した。これらの動物の識別には入れ墨(識別番号)を用いた。

静脈内カテーテル挿入手術 [39,74]

投薬開始約 2 間前に、キシラジン(セラクター®: Bayer 社製, 2 %溶液, 0.1 mL/kg, 筋肉内投与)の麻酔前投与後、ケタミン(ケタラール®: PARKE-Davis 社製, 5 %溶液, 0.3 mL/kg, 筋肉内投与)麻酔下にて、大腿静脈から腹部大静脈へのカテーテル(シリコン製カテーテル, 内径 1 mm, 外径 2 mm)挿入留置手術を行なった。挿入部以外のカテーテルは、皮下を通して腹側部に導出した。動物にはテーサーを取り付けたジャケットを着せ、術後 3 日間、アンピシリン (ビクシリン®溶液: 明治製菓社製, 12 mg 力価/mL)を 1 mL/hr/body にて 24 時間持続静脈内投与した。留置カテーテルを維持するため、生理的食塩液 0.4 mL/hr/body を 24 時間静脈内持続投与した。静脈内持続投与にはシリンジポンプ KDS 220 (KD Scientific Inc.社製. USA)を 1 頭あたり 1 台使用した。

1-3. 試験方法

1) 単回投与毒性試験における投与用量と投与方法

(1) 経口投与

ラット: 投与用量は物理的 maximum 投与用量と考えられる 2,000 mg/kg を高用量とし、以下公比 2 で 1,000 mg/kg, 500 mg/kg とした。薬液は、蒸留水を溶媒として 100 mg/mL

濃度に溶解させ 2,000 mg/kg 投与用薬液とし、さらにこの薬液を溶媒で希釈してそれぞれ 1,000 mg/kg 投与 (50 mg/mL), 10 mg/kg 投与 (25 mg/mL)用の投与薬液とし、体重 100 g 当たり 2 mL を投与した。また、対照群には溶媒を投与した。動物数は 1 群雌雄各 5 匹を用いた。投与溶液は高用量群の薬液の pH にあわせ、対照群も含めていずれも pH 3.5 ± 0.1 で使用した。

サル: 投与用量は、物理的¹最大投与用量である 2,000 mg/kg を高用量とし、以下公比 2 で 1,000 mg/kg, 500 mg/kg とした。薬液は、蒸留水を溶媒として 200 mg/mL 濃度に溶解させ、それぞれ 2.5 mL/kg(500 mg/kg), 5 mL/kg (1,000 mg/kg), 10 mL/kg (2,000 mg/kg)の容量で投与を行った。動物数は雄 2 頭を用い、低用量から漸増投与を行った。各用量の投与間隔は 1~2 週間を設け、投与の影響が回復していることを確認してから次の投与を行った。投与溶液は高用量群の薬液の pH にあわせ、対照群も含めていずれも pH 3.5 ± 0.1 で使用した。

(2) 静脈内投与

ラット: 2 種類の投与速度を用い、投与用量は 1 mL/body/min の速度で 5, 10, 20 mg/kg, 0.1 mL/body/min.の速度で 10, 20, 40 mg/kg を適用した。薬液は生理的食塩水を溶媒として 8 mg/mL の濃度に溶解させ 40 mg/kg 投与用の薬液とし、さらにこの薬液を溶媒で希釈して、それぞれ 20 mg/kg 群 (4 mg/mL), 10 mg/kg 群 (2 mg/mL), 5 mg/kg 群 (1 mg/mL)用の投与薬液とし、体重 100 g 当たり 0.5 mL を投与した。また、対照群には溶媒のみを投与した。投与溶液は高用量群の薬液の pH にあわせ、対照群も含めていずれも pH 3.5 ± 0.1 で使用した。動物数は、いずれの投与速度の試験も、1 群雌雄各 5 匹を用いた。

サル: 2 種類の投与速度で試験を行った。投与用量は静脈内ボラス投与(投与速度: 0.25~0.5 mL/sec.)では 4, 8, 16, 32, 64 mg/kg を、静脈内持続投与(6.25 mL/kg/hr, 2 時間投与)では 90, 120 mg/kg を適用した。投与溶液は高用量群の薬液の pH にあわせ、対照群も含めていずれも pH 3.5 ± 0.1 で使用した。

静脈内ボラス投与では、予備試験で一般症状に変化がみられた 16 mg/kg を最

高用量とし、以下公比 2 で 8, 4 mg/kg を設定したが、症状に大きな変化がみられなかったため 32 および 64 mg/kg を追加した。薬液は生理的食塩水を溶媒として 4 mg/mL 濃度で溶解させ、それぞれ、1 mL/kg(4 mg/kg), 2 mL/kg(8 mg/kg), 4 mL/kg(16 mg/kg), 8 mL/kg(32 mg/kg)の容量を投与した。また、64 mg/kg 投与には 7.2 mg/mL の薬液を 8.89 mL/kg 投与した。

静脈内持続投与の用量は、予試験で軽度な一般症状の変化が認められた 90 mg/kg を最低用量とし、高用量として 120 mg/kg を設けた。薬液は生理的食塩水を溶媒として 7.2 mg/mL 濃度とし、それぞれ、6.25 mL/kg/hr (90 mg/kg), 8.33 mL/kg/hr(120 mg/kg)の容量を 2 時間投与した。

動物数は、いずれの投与速度の試験にも雄各 2 頭を用い、低用量から漸増投与を行った。各用量の投与間隔は 1~2 週間を設け、投与の影響が回復していることを確認してから次の投与を行った。

2) 反復投与毒性試験における投与用量と投与方法

(1) 経口投与

ラット:予試験の結果から、何等かの毒作用が発現する用量 90 mg/kg を高用量とし、無毒性用量と推定される 10 mg/kg を低用量に、さらに公比 3 で 30 mg/kg を中間用量として設定した。WSA は蒸留水を溶媒として溶解させ、それぞれ 90 mg/kg 投与 (9 mg/mL), 30 mg/kg 投与 (3 mg/mL), 10 mg/kg 投与 (1 mg/mL)用の投与薬液とした。また、対照群には溶媒のみを投与した。投与は、毎日ほぼ一定時刻に体重 100 g 当たり 1 mL を投与した。投与溶液は高用量群の薬液の pH にあわせ、対照群も含めていずれも pH 3.5 ± 0.1 で使用した。

動物数は 1 群雌雄各 16 匹を用い、雌雄各 10 匹は 4 週間の投与期間終了後に屠殺、さらに雌雄各 6 匹は 4 週間の回復期間終了後に屠殺し、以下に示す臨床検査並びに剖検に供した。

サル:予備試験の結果から、何等かの毒作用が発現すると考えられる 90 mg/kg を高用量とし、無毒性用量と推定される 10 mg/kg を低用量に、さらに公比 3 で 30 mg/kg

を中間用量に設定した。薬液は蒸留水を溶媒とし、それぞれ 90 mg/kg 投与 (45 mg/mL), 30 mg/kg 投与 (15 mg/mL), 10 mg/kg 投与 (5 mg/mL)用の投与薬液とした。なお、対照群では溶媒のみを投与した。投与は、毎日ほぼ一定時刻に体重 1 kg 当たり 2 mL を投与した。投与溶液は、高用量群の薬液の pH にあわせ、対照群も含めていずれも pH 3.5 ± 0.1 に調製した。

動物数は 1 群雌雄各 4 匹を用い、雌雄各 3 頭は 2 または 4 週間の投与期間終了後に、残りの雌雄各 1 例は 4 週間の回復期間後に屠殺し、以下に示す臨床検査並びに剖検に供した。

(2) 静脈内持続投与

ラット:予備試験の結果から、何等かの毒作用が発現する用量 60 mg/kg を高用量とし、無毒性用量と推定される 10 mg/kg を低用量に、中間用量として 30 mg/kg を設定した。なお、対照群では溶媒のみを投与した。薬液は生理的食塩水に 2.4 mg/mL 濃度で溶解させ 60 mg/kg 投与用の薬液とし、さらにこの薬液を溶媒で希釈して、それぞれ 30 mg/kg 群 (1.2 mg/mL), 10 mg/kg 群 (0.4 mg/mL)用の投与薬液とした。薬液投与は、毎日ほぼ一定時刻に 12.5 mL/kg/hr の流速で 2 時間行った。

動物数は 1 群雌雄各 10 匹を用い、4 週間の投与期間終了後に屠殺し以下に示す臨床検査並びに剖検に供した。

サル:予備試験の結果から、何等かの毒作用が発現すると考えられる用量 60 mg/kg を高用量とし、無毒性用量と推定される 10 mg/kg を低用量に、中間用量として 30 mg/kg を設定した。なお、対照群では溶媒のみを投与した。薬液は生理的食塩水に 4.8 mg/mL 濃度で溶解させ 60 mg/kg 投与用の薬液とし、さらにこの薬液を溶媒で希釈して、それぞれ 30 mg/kg 群 (2.4 mg/mL), 10 mg/kg 群 (0.8 mg/mL)用の投与薬液とした。薬液投与は、毎日ほぼ一定時刻に 6.25 mL/kg/hr の流速で 2 時間行った。投与溶液は、高用量群の薬液の pH にあわせ、対照群も含めていずれも pH 3.5 ± 0.1 に調製した。

動物数は 1 群雌雄各 4 匹を用い、雌雄各 3 頭は 2 週間の投与期間終了後に、残

りの雌雄各 1 例は 4 週間の回復期間後に屠殺し、以下に示す臨床検査並びに剖検に供した。

1-4. 単回投与毒性試験の観察項目および検査方法

1) ラット

(1) 一般状態

すべての動物は投与前 3 時間の絶食を実施した。一般状態は、投与時、投与後 15, 30 分および 1, 2, 4, 6 時間後に観察し、投与翌日より 2 週間、毎日観察を行った。あわせて生死についても確認記録した。

(2) 体重および摂餌量

体重および摂餌量は投与翌日および投与 2, 3, 7, 10, 14 日目に測定した。

(3) 剖検所見

死亡例については、死亡後なるべく速やかに剖検を実施した。生存例については、2 週間の観察期間終了時、エーテル麻酔後に剖検を行った。

(4) 統計学的解析

体重および摂餌量は、Pitman test および Jonckheere test を用いて統計検定を行った。50%致死量 (LD₅₀ 値) は、投与後 14 日間の致死率から Probit 法(最尤法)[82]を用いて算出した。

2) サル

(1) 一般状態

すべての動物は投与後 8 時間、および投与翌日より 2 週間は毎日、一般状態を観察し、あわせて生死を確認記録した。死亡例については発見後直ちに剖検を実施した。

(2) 体重および摂餌量

体重は、投与初日の投与前および投与 1, 2, 3, 7, 14 日目に、摂餌量は 2 週間の間毎日測定した。

(3) 臨床検査

投与開始前(Table には Pre と記載) および投与 3, 6, 13 日目に大腿静脈から採血し, EDTA-2K で抗凝固処理した血液を用い, 血液学的検査, 血液生化学的検査を行った。測定方法, 測定項目については, 第 1 章, 第 1 節, 5-3 の 1)および 2)に記載した。

(4) 統計学的解析

一群の動物数が 3 匹のため統計学的検定は実施せず, 投与実施前の値, および背景データを考慮した上で比較し評価を行なった。

1-5. 反復投与毒性試験の観察項目および検査方法

1) 一般状態

試験期間中, 毎日一般状態を観察し, あわせて生死を確認記録した。

2) 体重変化および摂餌状態

体重および摂餌量を, 週 2 回測定記録した。

3) 臨床検査

(1) 血液学的検査

ラットにおいては, 最終投与日の翌日および回復期間終了時, 採血前に 3 時間絶食させた後エーテル麻酔下で腹部大動脈より採血, サルにおいては, 投与開始前(Table では Pre と表示), 2 週間または 4 週間の投与終了時 (Table ではそれぞれ Day 14 または Day 27 と表示)および回復期間終了時 (Table では ERC と表示) に全例の大腿静脈から採血し, EDTA-2K にて抗凝固処理した後検査に供した。測定方法, 測定項目については, 第 1 章, 第 1 節, 5-3 の 1)に記載した。

(2) 血液生化学的検査

血液学的検査時にあわせて採取した血液から分離した血清を用いて測定した。

測定方法, 測定項目については, 第 1 章, 第 1 節, 5-3 の 2)に記載した。

(3) 尿検査

ラットでは最終投与日の投与前および回復期間終了時に腹部圧迫により採尿, サルでは投与開始前・投与期間終了時および回復期間終了時の自然排尿, および解剖時の膀胱より採取した尿を用いて以下の検査を実施した。尿の色調を観察後, マルティステックス (マイルス三共社製, 東京) を用いて, pH, 蛋白質, ブドウ糖, ケトン体, ビリルビン, 潜血, ウロビリノーゲンを検査した。また, 上記の尿について尿沈渣検査 (1500rpm, 5min 遠心後の残渣を顕微鏡観察) を行った。

(4) 外眼所見

最終投与日の投与終了後および回復期間終了時に, 眼瞼の開閉状態, 結膜の充血の有無, 角膜混濁の有無, 虹彩の状態および瞳孔反射, 水晶体の混濁の有無などを指標とした外眼, 前眼部の観察を行なった。なお, 外眼所見については毎日の投与時, 一般状態の観察時もしくは体重測定時においても観察し記録した。

(5) 病理解剖学的検査

投与期間終了時および回復期間終了時に, ラット, サルともに第1章, 第1節, 5-3の5)に記載した方法で行った。

4) 統計学的解析

本試験で得られた結果は, Table 1-2 に示す方法を用いて, 対照群を基準とした統計学的有意性の解析を行った。結果として数値が得られる検査項目については, 各投与群の平均値および標準偏差を算出し, 対照群に対する各投薬群の統計学的有意性を検定した。また, 尿標準検査, 病理組織学的検査結果など結果を数値として得られないものについては確立検定を行った。なお, 有意水準はいずれも危険率5% ($p \leq 0.05$) および1% ($p \leq 0.01$)とした。

なお, サルについては1群の動物数が4例以上の場合のみ, 各投与群の平均値および標準偏差を算出し, Table 1-2 に示す方法を用いて, 各検査項目毎に対照群に対する各投薬群の有意差を検定した。しかし, 使用動物匹数および個体差を考慮し, いずれの場合も各個体の投与前値, および背景データを併せて考慮し評価を行った。

2. 結果

2-1. 単回投与試験

ラットとサルを用い、経口投与、静脈内ボース投与、静脈内持続点滴投与での単回投与時における急性毒性の観察を行い以下の結果を得た。

1)ラットにおける単回経口投与における急性毒性および剖検所見 (Table 2-3)

雄雌共に、1,000 mg/kg 以上の投与で死亡例が認められ、2,000 mg/kg 群では全例死亡した。

2,000 mg/kg 投与は物理的に投与可能な最大量である。この 2,000 mg/kg 群では投与日あるいは投与後早い時期に死亡する例（雄：投与 1 日目に 3 例、投与 2 日目および投与 4 日目に各 1 例、雌：投与 1 日目に 4 例、投与 3 日目に 1 例）が多かったが、1,000 mg/kg 群ではやや遅れて（雄：投与 2 および 4 日目に各 1 例、雌：投与 1 日目に 1 例、投与 2 日目および投与 3 日目に各 2 例）認められた。しかし、いずれの死亡も投与 4 日目までに観察された。LD₅₀ 値は、雄では 1024 mg/kg、雌では 708 mg/kg であった。

投与後 15 分以内に、雄雌共にすべての WSA 投与群では自発運動の低下および腹臥が認められ、2,000 mg/kg 群（雄 3 例、雌 4 例）および 1,000 mg/kg 群（雌 1 例）の死亡例では、さらによろめき歩行、跳躍、呼吸不整およびチアノーゼを示し死亡に至った。投与日の死亡例は、いずれも投与約 15 分以内の早い時期に観察された。投与日に死の転帰をとらなかったラットでは、投与 6 時間目までの観察期間中、自発運動の低下や腹臥は持続し、発現の頻度および持続時間はともに用量に相関して認められた。さらに、投薬群では黄白色便、軟便、流涎および流涙も散見されたが、これらの徴候は、発現の頻度および発現・持続時間に、用量相関性はみられなかった。1,000 mg/kg 以上群で投与後 24 時間から投与 4 日目までに死亡したラットは、自発運動の低下、腹臥および流涙に加えて体温低下も観察され死亡に至った。生存したラットでは、いずれも投与 4 日目以降は特記すべき変化は認められなかった。体重は、投与翌日 (Day 1) には、すべての WSA 投与群において、雄雌共に増加抑制($p \leq 0.05$)が認め

られた。500 mg/kg 群では投与 2 日目以降は摂餌量が回復し、体重増加量についても対照群とほぼ同様の推移を示すまでに回復した。1,000 mg/kg 以上の群では投与 3 日目まで有意な増加抑制または体重減少が認められたが、生存例については投与 7 日目以降は摂餌量、体重増加の回復が認められた。

投与日の投与後 15 分以内の死亡例では、胃内に透明な水様物、小腸に黄白色内容物および肺の充うっ血が認められた。投与後 24 時間から 4 日目までの死亡例においては、胃内に黄色液・出血、小腸に黒褐色部・出血および肺の充うっ血が認められた。14 日間の観察期間後における生存例の剖検所見では特記すべき変化は認められなかった。

2) ラット単回静脈内ボラス投与における急性毒性および剖検所見 (Table 2-4)

静脈内投与：投与速度：約 1 mL/min

観察期間中の死亡例については、雄雌共に、10 mg/kg 以上群において死亡例が認められ、20 mg/kg 群では全例死亡した (10 mg/kg：雄 2/5, 雌 3/5 例死亡, 20 mg/kg：雄雌共に 5/5 例死亡)。いずれの死亡も投与終了後約 15 分以内に認められた。

LD₅₀ 値は、雄； 10.2 mg/kg, 雌； 9.8 mg/kg であった。

観察期間中の症状については、10 および 20 mg/kg 群の死亡例については、投与直後より腹臥、よろめき歩行、振戦、および呼吸不整を示し、投与終了後約 15 分以内に死亡した。5 および 10 mg/kg 群の生存例では、上記の症状に加えて、自発運動の低下も認められたが、投与終了後 30 分後には回復し、以後、14 日間の観察期間を通じて著変は認められなかった。

体重および摂餌量共に、対照群との間に統計学的に有意な変化($p \leq 0.05$)は認められなかった。

死亡例および生存例の剖検所見について死亡例および生存例共に異常は認められなかった。

静脈内投与：投与速度：約 0.1 mL/min

観察期間中の死亡例については、40 mg/kg 群の雄 1 例のみに、死亡が投薬中に認

められた。観察期間中の症状については、40 mg/kg 群の死亡例については、投与開始後 2 分頃より振戦、呼吸不整、自発運動低下、および腹臥などを示し投与開始後約 7 分に死亡した。40 mg/kg 群の生存例では死亡例と同様に、投与中に自発運動低下、腹臥、振戦、呼吸不整、跳躍、およびよろめき歩行を示したが、投与終了後 15 分には回復が認められた。以後、14 日間の観察において、投与部位（尾）の変化以外は著変は認められなかった。10 および 20 mg/kg 群については、投与中および以後の観察においても対照群との間に差は認められなかった。

体重および摂餌量共に、対照群との間に統計学的に有意な変化($p \leq 0.05$)は認められなかった。

剖検所見については、40 mg/kg 群の死亡例においては変化は認められなかった。40 mg/kg 群の生存例については、投与部位の変化（痂皮形成、黒色化、尾先端脱落）以外、著変は認められなかった。10 および 20 mg/kg 群については、異常は認められなかった。

3) サルにおける単回経口投与における急性毒性および剖検所見(Pyramiding-dose)

(1) 概略の致死量

経口投与において、500 mg/kg および 1,000 mg/kg の投与では死亡例は認められず、2,000 mg/kg で 2 例中 1 例が死亡した。従って、 LD_{50} は求められないものの、経口投与での 2,000 mg/kg は致死量と推定される。

(2) 一般状態

500 mg/kg 経口投与では、2 例ともに投与 45~132 分後までに 2 回の嘔吐(白色泡沫状)がみられた。しかし、投与翌日からは次の投与までの 7 日間の観察期間中、特に大きな変化は認められなかった。

1,000 mg/kg 経口投与では、2 例ともに投与 23~240 分後までに 3 回の嘔吐と嘔吐跡がみられ、1 例では投与 10~70, 144~184 分後に流涎も認められた。投与翌日からは次の投与までの 14 日間の観察期間中は特に大きな変化は認められなかった。

2,000 mg/kg 投与では、1 例は投与直後から流涎、5 分から顔面の紅潮、8 分後から脱

力状態、腹臥、13分後から呼吸困難を呈し、15分後に死亡した。他の1例は投与直後~480分に流涎、15~60分に脱力状態、15分後に腹臥、15~120分後に半眼状態、60分後から座位、閉眼、180、240分後に嘔吐(白色、薬物様)がみられ、投与翌日にも元気のない状態が観察された。しかし、投与2日後から14日後までの観察期間中は、投与前の一般状態との間に特に差異は認められなかった。WSAのサルを用いた一般薬理試験[32]では、本薬物22.5 mg/kgを静脈内持続投与(30分間、投与速度6.25 mL/kg/hr)した際に、軽度ではあるが一過性に血圧の低下、心拍数の増加がみられた。従って、上記の2,000 mg/kg投与でみられた症状は、被験物質による末梢血管拡張によると考えられる血圧降下に起因した変化と推定された。

(3) 体重変化および摂餌状態

① 体重変化

いずれの動物にも投与前と比較して体重にほとんど変化はみられなかった。

② 摂餌状態

経口投与では500 mg/kg、1,000 mg/kgの投与群において投与翌日、2,000 mg/kgの投与において投与翌々日まで摂餌量の抑制が認められたが、その他の日には摂餌量の変化は認められなかった。

(4) 臨床検査

① 血液学的検査

2,000 mg/kg投与で死亡した1例の死亡時に採取した血液の検査で、赤血球数(RBC)、血色素量(Hb)、血球容積(HCT)の高値を認めた。しかし、死亡時の変化は、その薬物の持つ特異的作用によるものとは考えがたく、この変化の示す意義は小さいと判断される。その他のサルにおいては、いずれも大きな変化は認められなかった。

② 血液生化学的検査

血液学的所見と同様、2,000 mg/kg投与で死亡した1例の死亡時検査でのみ、GOT、GLU、Na、Clに高値がみられた。しかし、死亡時の変化は、その薬物の持つ特異的作用によるものとは考えがたく、この変化の示す意義は小さいと判断される。その他

のサルにおいては、いずれも大きな変化は認められなかった。

(5) 死亡例の剖検所見

死亡例において、臓器重量には異常値は認められず、肉眼的異常所見も認められなかった。

4) サルにおける単回静脈内 bolus および静脈内持続投与 (pyramiding-dose)

(1) 概略の致死量

静脈内ボラス投与では 64 mg/kg 群で 2 例、静脈内持続投与では 120 mg/kg 群で 1 例、それぞれ死亡した。この結果から、LD₅₀ は求められないものの、概略の致死量は、静脈内ボラスで 64 mg/kg、静脈内持続投与で 120 mg/kg と推定される。

(2) 一般状態

静脈内ボラス投与では、4 mg/kg 投与で半眼状態が投与直後から 10 分以内に、8 mg/kg 投与で顔面紅潮、脱力状態、腹臥が投与直後から 15 分以内にみられた。16 mg/kg および 32 mg/kg の投与では、顔面紅潮、脱力状態、腹臥/横臥、呼吸困難、呼吸停止、半眼状態、自発運動の減少、座位が投与直後から認められた。その後全ての徴候は 2 時間以内に回復した。64 mg/kg 投与では 2 例ともに投与直後から顔面紅潮、脱力状態、横臥、呼吸停止に陥り、5 分後に死亡した。

静脈内持続投与では、90 mg/kg 投与で半眼状態、自発運動の減少が投与 60~150 分後にみられたが、それ以外の一般状態に変化は認められなかった。120 mg/kg 投与では半眼状態、自発運動の減少、腹臥、脱力状態、嘔吐がいずれも 1 時間以降にみられ、2 例中 1 例が死亡した。生存例では 4 時間以降、これらの徴候は消失した。

(3) 体重変化および摂餌状態

① 体重変化

生存したいずれの動物にも体重の変化は認められなかった。

② 摂餌状態

静脈内ボラス投与では、生存例には投薬に起因したと思われる変化は認められなかった。静脈内持続投与では、90 mg/kg 群の 1 例に投与翌日、また、120mg/kg 群(生

存した 1 例)に投与翌日および翌々日に摂餌量の低下が認められた。その後は、摂餌量は投与前と同様に回復し、給餌された 100 g をすべて摂取した。

(4) 臨床検査

① 血液学的検査

静脈内ボラス投与、静脈内持続投与共に、死亡例の死亡時検査のみに異常な値が得られた。すなわち、静脈内ボラス投与では、64 mg/kg の投与により死亡した 2 例の死亡時検査において、好中球百分比(NEUT)の低値、リンパ球百分比 (LYMP) の高値が認められた。また、静脈内持続投与では、120 mg/kg の投与により死亡した 1 例の死亡時検査において、白血球数(WBC)の高値、RBC, Hb, HCT の低値が認められた。しかし、これらの異常値は死亡例の死亡時の変化として得られたものであることから、WSA の特異的な毒性を示すものと断定はできない。

② 血液生化学的検査

静脈内ボラス投与では、64 mg/kg の投与で死亡した 1 例の死亡時検査では TP, ALB, T-CHO の低値が、また、死亡した他の 1 例の死亡時検査では GOT, CRE, IP, K の高値、TP, ALB, Ca の低値が認められ、死亡した 2 例に共通した所見は TP および ALB の低値のみであった。死亡のみられなかった 32 mg/kg 群において 1 例に投与 2 日後の検査値で GOT, GPT の高値、および投与 6 日後の GOT, GPT の高値、TP の低値が認められた。しかし、投与 13 日目の検査では異常は認められなかった。これらのことから、WSA も大量を速い速度で投与した場合には、一過性ではあるが肝機能に対して影響を示すことがうかがわれた。これは、WSA の投与方法においてボラス投与は持続投与に比較して毒性を強める可能性を示唆していると推察される。

静脈内持続投与では、120 mg/kg の投与で死亡した 1 例の死亡時検査では、GLU, IP の高値、TP, ALB, T-CHO, Ca の低値が認められたが、血液学的検査同様に死亡時の変化として得られたものであることから、WSA の特異的な毒性を示すものと断定はできない。死の転帰をとらなかった他の動物では、特に異常な所見は認められなかった。

(5) 死亡例の病理検査

全ての死亡例において、臓器重量に異常値は認められず、肉眼的異常所見も認められなかった。

5) 小括

死亡例発現用量は、経口投与においては、ラット(500, 1,000, 2,000 mg/kg)では 1,000 mg/kg 以上、サル(500, 1,000, 2,000 mg/kg)では 2,000 mg/kg と極めて高用量であり高い安全性が確認された。静脈内投与試験においては、投与速度を遅くすることで死亡例の発現は減少し、ラットにおける死亡例は、投与速度が 1 mL/min.(5, 10, 20 mg/kg, concentration: 1, 2, 4 mg/mL, carrier: saline, pH3.5)では 10 mg/kg 以上、0.1 mL/min.(10, 20, 40 mg/kg, concentration: 2, 4, 8 mg/mL, carrier: saline, pH3.5)では 40 mg/kg 以上で認められた。またサルでは、ボラス投与(0.25~0.5mL/sec: 4, 8, 16, 32, 64 mg/kg)では 64 mg/kg, 持続投与(6.25~8.33 mL/kg/hr: 90, 120 mg/kg)では 120 mg/kg で死亡例が認められた。

急性症状として、サルでは顔面紅潮、脱力状態、腹臥などが認められた。これは、サルを用いた WSA の一般薬理試験[32]で、22.5 mg/kg を静脈内持続投与(30 分間、投与速度 6.25 mL/kg/hr)した際に、軽度ではあるが一過性の血圧低下、心拍数の増加がみられていることから、WSA を大量投与したことにより末梢血管拡張により血圧降下を来たし上記の症状を呈したものと考えられる。大量の WSA を静脈内投与した際に発現するこれらの急性毒性は、投与速度を遅くすることで軽減化が認められた。これは、一時的に急上昇する薬物濃度を抑えることができたためと考えられる。ラットにおいては、静脈内投与で 40 mg/kg 投与の投与部位に炎症が認められ、高い濃度の薬液(8 mg/mL)は、ラットにおいては刺激性を示すものと考えられる。

2-2. 反復投与試験

ラットおよびサルを用いて WSA の 4 週間経口投与 (0, 10, 30, 90 mg/kg)および 2 週間静脈内持続投与(0, 10, 30, 60 mg/kg)を行った。また、サルを用いて WSA の活性体の 2 週間経口投与 (0, 10, 30, 90 mg/kg)も行った。

1) ラットにおける4週間経口投与毒性試験 (0, 10, 30, 90 mg/kg) (Table 2-5)

(1) 一般状態および途中死亡例

いずれの投与群においても、薬物投与に起因すると考えられる異常な徴候は認められなかった。

対照群雌1例が投与過誤(肺への誤投与: 投与後、鼻より血液の混入した薬液の漏出を認めた。また、剖検所見では気管に薬液を認め肺全体に出血が認められた)により死亡した。その他の動物では死亡例は認められなかった。

(2) 体重変化および摂餌状態

いずれの投薬群においても対照群と比較して有意な差($p \leq 0.05$)は認められなかった。

(3) 臨床検査

① 血液学的検査

投与終了時、統計学的に有意な減少($p \leq 0.05$)が90 mg/kg 群雄の PLT, RBC, HCT, Hb に認められた。しかし、その値はいずれも生理的変動範囲内の変化であり、生物学的に有意な差とは考えられなかった。

② 血液生化学的検査

投与終了時、統計学的に有意な減少($p \leq 0.05$)が、10 mg/kg 以上群雄および90 mg/kg 群雌の GOT, 90 mg/kg 群雌の GPT, 30 mg/kg 以上群雌の A/G に、統計学的に有意な増加($p \leq 0.05$)が、10 mg/kg および90 mg/kg 群雄の CHE, 10 および30 mg/kg 群雄の TG, 90 mg/kg 群雄の総蛋白質量に認められたが、その値はいずれも生理的変動範囲内の変化であり、生物学的に有意な差とは考えられなかった。

③ 尿検査 (マルティスティックス, 尿沈渣, 尿量および尿比重)

投与終了時、10 mg/kg および30 mg/kg 群雄において pH の低値、10 mg/kg 群雌の尿量減少に統計学的に有意な変化($p \leq 0.05$)が認められたが、いずれの変化も生理的変動範囲内、または用量相関性のない変化であり、生物学的に有意な差とは考えられなかった。

④ 眼検査

薬物の影響と考えられる異常な変化は認められなかった。

(4) 臓器重量

投与終了時には、90 mg/kg 群の雄雌で肝臓および甲状腺重量の増加に対照群に比べ有意な差($p \leq 0.05$)が認められた。回復期間終了時点ではいずれの群も対照群に比べ有意な差($p \leq 0.05$)は認められなかった。

(5) 病理解剖学的所見

① 主要肉眼的所見

投与終了時および回復期間終了時の検査において、薬物投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

② 病理組織学的所見

投与終了時には、90 mg/kg 群の雄 2 例、雌 4 例に甲状腺に軽度な小型濾胞の増加が認められた。このうち雄 1 例雌 2 例には肝臓に軽度な小葉中心性肝細胞の肥大が認められた。これらの変化は回復期間終了時の検査では全て回復していた。

(6) 小括

臓器重量において、90 mg/kg 群の雄雌で肝臓および甲状腺重量の増加が認められたが、いずれも回復期間終了時の検査では対照群との間に差は認められなかった。

投与終了時、90 mg/kg 群の雄 2 例、雌 4 例に甲状腺小型濾胞の軽度な増加が認められ、しかし、これらの変化は回復期間終了時の検査では認められなかった。

これらの成績から、WSA の無毒性量は、30 mg/kg と考えられる。

2) サルにおける 4 週間経口投与毒性試験 (0, 10, 30, 90 mg/kg) (Table 2-6)

(1) 一般状態

死亡例

投与期間中、90 mg/kg 群の雌 4 例中 2 例が死亡した。1 例は、投与 4 日目より軽度な流涎が投与直後にみられることがあり、削瘦が投与 7 日目から認められ投与 16

日目の朝死亡した。他の1例では、嘔吐が投与8日目から、削瘦が投与14日目から、軽度流涎が投与16, 23, 24日目に、下痢が投与21~23日目に、座位を伴った自発運動減少が投与24日目にみられ、投与25日目の朝死亡が確認された。

生存例

90 mg/kg 群: 投与期間中、軟便、下痢が雄4例と雌2例中1例でみられた。また、軽度から中等度の流涎が雄4例と雌2例の全例で投与直後に認められた。嘔吐は1~2週目に散発的に(1-4回)雄3例、雌1例で認められた。3週目より削瘦が雄3例、雌2例で軽度から中等度に認められた。自発運動の減少は雄2例で認められた。この雄2例のうち極めて状態が悪化した1例では投与7日目に軽度、投与8日から13日目には中等度となった。さらに、この雄における自発運動減少は次第に重等度となり投与13日目より座位を呈した。投与16日目には眼の周囲に目脂の付着が認められ投与21日目より腹臥姿勢に起因する尿による下腹部の汚れがみられた。

他の雄1例では自発運動の軽度減少が投与12~23日目に認められ、その後中等度を示して経過した。

30 mg/kg 群: 軟便、下痢が雄4例中2例で投与開始日および投与1日目(投与翌日)にみられた。また、軽度流涎が投与2~4週目に雄3例で認められた。

回復期間

90 mg/kg 群: 投与期間中に認められた前述の徴候は徐々に回復した。すなわち自発運動減少、座位、軟便、目の周囲の粘液、下腹部の尿による汚れなどは休薬3日目までに消失した。しかし、雌雄各1例の軽度な削瘦は回復期間終了まで続いた。10および30 mg/kg 群では、症状において回復期間中も対照群との間に特記すべき差異は認められなかった。

(2) 体重変化および摂餌状態

90 mg/kg 群では死亡した雌2例においては、体重および摂餌量の減少が認められ、いずれも死亡の1週間前よりほとんど摂餌は認められなくなった。生存した雌2例および雄4例中3例に摂餌量減少が投与期間を通して認められた。摂餌量の減少は

いずれも投与終了後4日目以降は認められず投与前の摂餌量に回復した。

一方、30 mg/kg 群および10 mg/kg 群ではいずれの動物においても著変はみられなかった。

(3) 臨床検査

① 血液学的検査

生存例において、軽度なRBC減少、Hb濃度およびHCT値の低下が、90 mg/kg 群では、投与13日目に雌1例で、投与27日目に雌雄各1例で、30 mg/kg 群では投与13日および27日目に雌雄各1例で認められた。

生存した90 mg/kg 群雌も含め、回復期間終了時にはいずれの動物にも投与前値や背景値を超える変化は認められなかった。

(背景値: RBC ♂462-795.6 ♀440.5-768.9 $10^4/\text{mm}^3$, Hb ♂10.93-15.13 ♀10.45-14.57 g/dL, HCT ♂37.26-50.62 ♀35.7-48.7 %)

② 血液生化学的検査

90 mg/kg 群のうち投与16日目に死亡した雌1例の投与13日目の検査で、投与前値と比較して特にBUN(21.9→86.4 mg/dL), CRE(0.9→1.19 mg/dL), K(4.5→7.4 mEq/L)が高値を、T-CHO(162→71 mg/dL), GLU(75→20 mg/dL), Cl(111→90 mEq/L)が低値を示していた。また、投与25日目で死亡した雌1例の投与13日目の検査では投与前値と比較して特に異常は認められなかった。投与終了時の検査で、生存した雌2例および雄4例中3例にT-CHO(92-162→41-71 mg/dL)の低値が認められた。この雄3例のうち1例にはTP(7.4→6.2 g/dL), ALB(57.4→44.0 g/dL), A/G比(1.35→0.79)の低値も認められた。なお、雄4例全例でTGが高値を示していた。TGの平均値は投与13日目の雌、投与27日目の雌雄で統計学的に有意な高値($p \leq 0.05$)を示していた。

30 mg/kg 群以下の群については、対照群との統計学的な有意差は、投与前の値も含めていくつかの項目に認められたが、いずれも投与前値との比較あるいは背景データからみて投薬に起因した変化とは考えがたいものであった。

回復期間終了時の検査では、異常値を示した90 mg/kg 群の生存例も含め、いずれ

のサルも異常な値は認められず、投薬終了時の変化は可逆性であり、回復したものと考えられた。

(背景データ: BUN ♀12.21-33.97 mg/dL, CRE ♀0.604-1.144 mg/dL, TG ♂2.4-76.4 ♀3.5-87.9 mg/dL, ALB ♂4.18-5.66 g/dL, IP ♂4.3-7.5 ♀2.8-6.8 mg/dL, TP ♂6.83-9.63 ♀6.7-8.7 g/dL, T-CHO ♂71.8-177.8 ♀78.9-190.9 mg/dL)。

③ 尿検査

投与期間終了時 90 mg/kg 群において雄 1 例で総蛋白量の高値が認められた。

回復期間終了時の検査では、いずれのサルにおいても対照群と比較して著しい変化は認められなかった。

④ 眼検査

投与期間終了時および回復期間終了時の検査では、いずれのサルにおいても対照群と比較して著しい変化は認められなかった。

(4) 臓器重量

投与終了時の検査において、統計学的有意差($p \leq 0.05$)が、雄の 30 mg/kg 群および 90 mg/kg 群の副腎の絶対重量ならびに相対重量の増加、雌の 30 mg/kg 群の肝臓の絶対重量ならびに相対重量増加に認められた。また、統計学的な有意差は認められないものの個体別に背景値と比較すると、90 mg/kg 群の死亡した雌 2 例、90 mg/kg 群雄全例、90 mg/kg 群雌の生存例 2 例中 1 例で肝臓および副腎の絶対重量ならびに相対重量の増加がうかがわれた。(背景データ: 相対重量: 肝臓 ♂13.35-24.34, ♀16.0-27.2 g/kg, 副腎 ♂69.2-188.4, ♀97.4-247 mg/kg)

回復期間終了時の検査でも、背景値と比較して副腎の絶対重量および相対重量の増加は 30 mg/kg および 90 mg/kg 群でうかがわれた。

10 mg/kg 群では、雌雄いずれにおいても各臓器重量の増加は認められなかった。

(5) 病理検査

① 病理解剖学的所見

90 mg/kg 群においては、途中死亡例の雌 2 例で、副腎の腫大、肝小葉明瞭、肺と

気管の部分的癒着が認められた。結腸、直腸粘膜の赤色病巣散在が1例で認められた。

投与終了時の検査では、雄4例中2例、雌2例中1例で肝小葉明瞭、肝腫大が認められた。副腎腫大は雌1例で認められた。回復期間終了時には著しい変化は認められなかった。

10 mg/kg 群および 30 mg/kg 群では、投与期間終了時および回復期間終了時のいずれの検査においても著しい変化は認められなかった。

② 病理組織学的所見

90 mg/kg 群の雌2例の途中死亡例では、肉眼的変化の見られた肝臓に小葉中心性または辺縁肝細胞の軽度な脂肪変性、肉眼的変化のみられなかった腎臓に軽度から中等度の近位尿細管上皮空胞化、軽度の尿細管好酸性顆粒増加などが認められた。また、副腎に皮質束状帯の肥厚が軽度から中等度にみられ、皮質におけるごく軽度の出血巣が1例でみられた。さらに、これらの死亡例では、胸腺、脾臓のリンパ濾胞、腸間膜リンパ節、顎下リンパ節、膵臓の腺房細胞、顎下腺などの萎縮がみられた。なお、死亡例2例のうち1例では、結腸の粘膜固有層上皮細胞に軽度壊死と軽度出血、食道粘膜壊死が認められた。これらの消化管の変化は、サルで摂餌量低下が続いた場合に一般的に認められる変化と同様であり直接 WSA に起因した変化とは考えがたい。

投与終了時検査において、90 mg/kg 群の雄4例全例と雌2例中1例に肝臓で肝細胞肥大が、また、この雌雄各1例に小葉中心性肝細胞の脂肪変性も認められた。さらに、副腎皮質束状帯の軽度な肥厚が雄2例、雌1例に認められた。30 mg/kg 群においては、ごく軽度から軽度の肝細胞肥大が雄全4例と雌4例中2例で認められた。10 mg/kg 群では著しい変化は認められなかった。

回復期間終了時においては、臓器重量に増加がうかがわれた例も含めて著しい変化は認められなかった。

(6) 小括

WSA の毒性として、肝細胞の肥大が 30 mg/kg および 90 mg/kg 群で認められた。90 mg/kg 投与では死亡例がみられ、致死量であった。無毒性量は 10 mg/kg と評価された。死亡例はいずれも死亡する 1 週間以上前から摂餌がほとんど認められなかったため、衰弱が加速されたものと考えられる。生存例においては、投与期間中認められた摂餌量減少は投与終了により速やかに回復した。

3) サルにおける 2 週間経口投与毒性試験 (活性体: 0, 10, 30, 90 mg/kg) (Table 2-7)

(1) 一般状態

投与期間中、90 mg/kg 群の雄では投与 3 日目に軟便、投与 4 日目以降は便量の減少が観察された。また、嘔吐が投与 8 日目および 10 日目に認められた。雌では投与 6~7 日目に便量の減少、投与 8~14 日目に軟便が観察された。

10 mg/kg および 30 mg/kg 群では、投与期間を通して投与前および対照群との間に差はみられなかった。

(2) 体重変化および摂餌状態

90 mg/kg 群では投与 3 日目以降摂餌量が減少したため補食(リンゴ、バナナ、サツマイモ)を与えたが、雄は摂餌量の回復は認められず、投与 10 日目以降、投与前と比較してごく軽度な体重減少が認められた。90 mg/kg 群の雌では投与 7 日目以降、摂餌量は回復した。30 mg/kg および 10 mg/kg 群雌雄ではいずれの動物においても投与前および対照群と比較して大きな差はみられなかった。

(3) 臨床検査

① 血液学的検査

投与期間終了時の検査において、投与前および対照群と比較して大きな差はみられなかった。

② 血液生化学的検査

投与期間終了時の検査で、投薬に起因したと思われる以下の変化が認められた。

90 mg/kg 群の雄で T-CHO の低値(140→59 mg/dL), TG の高値(34→119 mg/dL)が認められた。

(背景データ: TG ♂2.4-76.4 ♀3.5-87.9 mg/dL, T-CHO ♂71.8-177.8 ♀78.9-190.9 mg/dL)

③ 尿検査

投与期間終了時, 90 mg/kg 群において総蛋白量の高値が雄 1 例で認められた。回復期間終了時の検査においては, 各群雌雄ともに投薬に起因したと思われる変化は認められなかった。

(4) 病理検査

① 臓器重量

90 mg/kg 群において, 背景値と比較し, 肝臓の増加(♂:絶対重量ならびに相対重量, ♀:相対重量) がうかがわれた。(背景データ: 相対重量: 肝臓 ♂13.35-24.34, ♀16.0-27.2 g/kg)

② 病理解剖学的所見

90 mg/kg 群では, 雌雄の肝臓の腫大, 肝小葉明瞭化が認められた。10 および 30 mg/kg 群では, 投薬に起因すると考えられる変化は認められなかった。

③ 病理組織学的所見

90 mg/kg 群で, 雄の肝細胞腫大が認められた。

(5) 小括

90 mg/kg 群では, 軟便, 摂餌量の減少, 肝臓重量の増加, 肝細胞の肥大が認められ, 無毒性量は 30 mg/kg と評価された。

4) ラットにおける 2 週間静脈内持続投与毒性試験 (0, 10, 30, 60 mg/kg) (Table 2-8)

(1) 一般状態

死亡例は認められず, 異常な徴候も認められなかった。

(2) 体重変化および摂餌状態

投与期間中, 各群雌雄共に対照群と比べ有意($p \leq 0.05$)な差は認められなかった。

(3) 臨床検査

実験方法の臨床検査項目にあげた投与終了時のいずれの血液学的検査, 血液生化学的検査, 尿検査および眼検査などの検査においても, 投薬に起因すると考えられる変化は認められなかった。

(4) 臓器重量

30 mg/kg および 60 mg/kg 群雌の肝臓の絶対重量および相対重量に増加($p \leq 0.05$)が, また 60 mg/kg 群雄の肝臓相対重量に有意($p \leq 0.05$)な増加が認められた。

(背景データ: 相対重量: 肝臓♂13.35-24.34, ♀16.0-27.2 g/kg)

(5) 病理検査

① 病理解剖学的所見

30 mg/kg (雌 2 例) および 60 mg/kg 群 (雌 4 例)に軽度の肝臓の腫大が認められた。それ以外の変化として投与部位のカテーテル挿入先端部位の血管 (後大静脈) に硬結部(肉芽腫)を形成していた動物が, 雄の対照群, 30 mg/kg および 60 mg/kg 群に各々, 1, 3, 2 例(いずれも軽度)に認められたが, 用量との関連性はみられずカテーテル先端部の機械的刺激による偶発的な変化であると考えられた。

② 病理組織学的所見

病理組織学的検査の結果, いずれの投薬群にも被験物質投与に起因した変化は認められなかった。投与部位のカテーテル挿入先端部位の血管 (後大静脈) およびその周囲組織 (infusion site) において, 血管内に血栓, 血管周囲の浮腫, 炎症性細胞の浸潤, 肉芽腫, 線維化がみられたが, いずれも対照群でも認められた変化であり, 被験薬物による変化とは考えられなかった。

(6) 小括

投与期間を通じて被験物質投与に起因した徴候および死亡動物はみられなかった。被験物質投与に起因したと思われる変化は, 30 mg/kg および 60 mg/kg 群雌に認められた肝臓の腫大と肝臓絶対重量および相対重量の増加, 60 mg/kg 群雄の肝臓相対重量の増加であった。しかし, これらの変化は病理組織学的変化および血液生化学的検査パラメ

一夕に変化が認められないことから、被験物質投与に対する軽度な適応性の反応（代謝酵素誘導など）が捕らえられたものと考えられた。なお、他の検査項目（体重、摂餌状態、臨床検査、病理組織学的所見）および上記以外の動物には、被験物質投与に起因したと思われる変化は認められなかった。

以上の結果、本試験条件下における WSA の無毒性量は 10 mg/kg であると推定された。

5) サルにおける 2 週間静脈内持続投与毒性試験 (0, 10, 30, 60 mg/kg) (Table 2-9)

(1) 一般状態

試験期間中、いずれの群にも死亡あるいは切迫屠殺した動物はいなかった。

投与期間中、60 mg/kg 群の雄の全 4 例、雌 4 例中 1 例で投与 1~6 日目のほぼ毎日、投与中および投与終了後 2 時間位まで嘔吐、半眼状態が認められた。そのうち雌雄各 1 例では投与 8~13 日目に、軟便あるいは下痢が認められた。さらに、この雄 1 例は投与 7~13 日目に、別の雄 1 例では投与 13 日目に軽度な自発運動減少が認められた。これらの徴候は回復期間には消失した。30 mg/kg 群、10 mg/kg 群および対照群では、投与期間中、一般状態に特記すべき変化は認められなかった。

(2) 体重変化および摂餌状態

60 mg/kg 群の雄において、軽度な体重減少が投与終了日に認められた。その他の群では投与前値との間に著変は認められなかった。

摂餌状態については、60 mg/kg 群の雌雄それぞれ全 4 例において投与 2 日目以降減少がみられたが、これらのうち雄 2 例、雌 3 例では投与 7 日目以降は投与前の摂餌量に回復した。投与 7 日目に回復の認められなかった雄 2 例、雌 1 例については、投与 7 日目以降補食としてリンゴ、サツマイモを与えた。その他の群では給餌したほぼ全量 (100 g) の摂餌が認められ対照群との間に差はみられなかった。

回復期間では、各群雌雄ともに給餌したほぼ全量 (100 g) の摂餌が認められ対照群との間に差はみられなかった。

(3) 臨床検査

① 血液学的検査

投与期間終了時、回復期間終了時のいずれの検査においても、有意な変化($p \leq 0.05$)は認められなかった。

② 血液生化学的検査

投与期間終了時の検査では、統計学的に有意な変化($p \leq 0.05$)として、雄の 60 mg/kg 群で TG の増加、雌の 30 mg/kg および 60 mg/kg 群で T-CHO の減少が認められた。また、統計学的な有意差は認められないものの、投与前値、対照群の値あるいは背景値と比較すると、60 mg/kg 群の雄で T-CHO の低値、30 mg/kg 群の雄で TG の高値が認められた。また、60 mg/kg 群の雄 1 例で BUN, CRE, K の高値、Na の低値が認められた。10 mg/kg 群では有意な変化($p \leq 0.05$)は認められず薬物の影響と考えられる変化はみられなかった。

回復期間終了時点では、いずれの群においても投与前値、対照群の値および背景値と比較して著変は認められなかった。

(背景データ: BUN ♀ 12.21-33.97 mg/dL, CRE ♂ 0.5-0.9 mg/dL, TG ♂ 2.4-76.4 ♀ 3.5-87.9 mg/dL, ALB ♂ 4.18-5.66 g/dL, IP ♂ 4.3-7.5 ♀ 2.8-6.8 mg/dL, TP ♂ 6.83-9.63 ♀ 6.7-8.7 g/dL, T-CHO ♂ 71.8-177.8 ♀ 78.9-190.9 mg/dL)

③ 尿検査, 眼検査, 心電図検査

投与期間終了時および回復期間終了時の検査において、投与前値、対照群の値、背景値と比較して著変は認められなかった。

(4) 病理検査

① 臓器重量

投与期間終了時の検査では、有意な差($p \leq 0.05$)は認められなかった。しかし、対照群および背景値と比較して、60 mg/kg 群の雌雄で肝臓絶対重量ならびに相対重量の高値、左右副腎絶対重量ならびに相対重量の高値、胸腺絶対重量ならびに相対重量の低値がうかがわれた。また、上記に加え、60 mg/kg 群の雄 1 例で左右腎臓絶対重量ならびに相

対重量の高値, 30 mg/kg 群の雄 1 例で肝臓絶対重量ならびに相対重量の高値, 30 mg/kg 群の雌 1 例で左副腎絶対重量ならびに相対重量の高値がうかがわれた。10 mg/kg 群では臓器重量の変化は認められなかった。なお, 10 mg/kg 群の雌 1 例では, 肝臓絶対重量ならびに相対重量の高値を示したが, 肝臓に結節状に寄生虫の浸襲がみられており, これにより肝臓重量が増加したもので投薬に起因した変化ではないと判断した。回復期間終了時の検査では, 各群雌雄ともに, いずれの重量にも異常値は認められなかった。(背景データ: 相対重量: 肝臓 ♂13.35-24.36, ♀16.0-27.2 g/kg, 副腎 ♂69.2-188.4, ♀97.4-247 mg/kg)

② 病理解剖学的所見

投与期間終了時の検査では, 60 mg/kg 群の雄全 4 例, 雌 4 例中 2 例で肝臓の腫大, 雄 1 例で肝小葉明瞭, 副腎の腫大, 30 mg/kg 群の雄 1 例で肝臓の腫大が認められた。10 mg/kg 群雌 1 例の肝臓腫大例において肝臓に結節状に寄生虫の浸襲がみられたため, 投薬に起因した変化ではないと判断した。

回復期間終了時の検査では, 各群雌雄ともに, いずれの臓器にも異常所見は認められず, 投与期間終了時の変化は回復したと考えられた。

③ 病理組織学的所見

投与期間終了時の検査では, 60 mg/kg 群の雌雄各 1 例で軽度な肝細胞の腫大が認められ, そのうち雄 1 例では小葉中心性肝細胞の脂肪変性を伴っていた。また, 60 mg/kg 群の雌雄各 1 例では副腎皮質の束状帯細胞における脂質滴の増加が軽度に認められた。さらに, 60 mg/kg 群の雄 1 例, 雌 2 例では胸腺の萎縮が認められた。胸腺の萎縮は, 投薬に関連したストレスに起因した変化の可能性が考えられた。30 mg/kg 群および 10 mg/kg 群では対照群と比較して著変は認められなかった。なお, BUN, CRE, K の高値, Na の低値, 腎臓重量の高値が認められた 60 mg/kg 群の雄 1 例の腎臓では病理組織学的変化は認められなかった。

回復期間終了時の検査では, 各群雌雄ともに, 対照群との間に著変は認められなかった。

なお、静脈内持続投与用カニューレ先端の到達部位である腹部大静脈およびその周囲組織の病理組織学的検索では、投与期間終了時に静脈周囲への出血、炎症性細胞の浸潤、褐色色素の沈着、肉芽腫が、回復期間終了時に炎症性細胞の浸潤、褐色色素の沈着、線維化、肉芽腫が認められたが、これらの変化には対照群も含めて観察されており、投与用量に依存した出現頻度、程度の悪化などは認められなかった。

(5) 小括

WSA の 2 週間静脈内持続投与により、60 mg/kg 群では一過性の血圧降下に起因すると思われる症状の発現と共に、肝臓に対する毒作用(血清脂質の変化、肝臓重量の増加、肝細胞の腫大、脂肪変性)および副腎に対する毒作用(副腎重量の増加、副腎束状帯細胞における脂質滴の増加)が認められ、腎臓に対する軽度な毒作用も示唆された。また、胸腺では、投薬によるストレスに起因したと思われる萎縮性の変化が散見された。30 mg/kg 群では、ごく軽度な肝臓、副腎に対する毒作用が認められたが、可逆性の変化であった。10 mg/kg 群では投薬に起因したと思われる変化は認められなかった。

これらの成績から、本試験条件下では、WSA の無毒性量は 10 mg/kg と推定される。

3. 考察

水溶性プロドラッグである新規アゾール系薬物 WSA の毒性試験を、ラット、サルを用いて実施し WSA の毒性を明らかにした。

単回投与毒性試験は、経口投与(ラット、サルとも 500, 1,000, 2,000 mg/kg)、静脈内ボラス投与 (ラット 10, 20, 40 mg/kg, サル 4, 8, 16, 32, 64 mg/kg)、静脈内持続投与 (サル 90, 120 mg/kg)を、反復投与毒性試験は経口投与 (サル 10, 30, 90 mg/kg: 2 週間(活性体)、ラット、サルともに 10, 30, 90 mg/kg: 4 週間)、静脈内持続投与 (ラット、サルともに 10, 30, 60 mg/kg: 2 週間) を行った。

単回投与における致死量は、経口投与ではラットは 1,000 mg/kg、サルは 2,000 mg/kg と極めて高い用量であることが確認された。また、サルの静脈内ボラス投与では 64 mg/kg、静脈内持続投与では 120 mg/kg であった。静脈内投与においては、投与速度が

遅いほど投与可能な用量は高くなり安全域は広がり、致死量は、サルを用いた場合、静脈内持続投与ではボーラス投与の約2倍であった。WSAのサルを用いた一般薬理試験[32]では、WSAの22.5 mg/kg(溶液濃度: 7.2 mg/mL, 投与速度: 6.25 mL/kg/hr.)を30分で静脈内持続投与した際に、一過性に血圧の低下、心拍数の増加がみられた。従って、WSAの高用量投与で認められた症状は、一過性に生じた末梢血管拡張による血圧低下に起因した変化と推定される。静脈内持続投与は、投与速度を遅くすることでWSAの最高血中濃度を静脈内ボーラス投与より低く抑えて投与することが可能となり、結果として、毒作用を軽減し高い用量を投与できたと考えられる。

反復投与においては、ラットの経口投与(最高用量 90 mg/kg)、静脈内持続投与(最高用量 60 mg/kg)のいずれにおいても死亡例は認められなかった。ラットにおける無毒性量は、4週間経口投与では30 mg/kg、2週間静脈内持続投与では10 mg/kgと推定された。一方、サルの反復投与においては、2週間経口投与(活性体)では90 mg/kgで肝毒性(臓器重量増加)が認められ、無毒性量は30 mg/kgと推定された。4週間経口投与では90 mg/kgで死亡例が発現、30 mg/kgでは肝毒性(臓器重量増加および肝細胞肥大)が軽度に認められた。2週間静脈内持続投与では30 mg/kg以上で肝毒性が軽度に認められた。このことから経口投与(4週間)、静脈内持続投与(2週間)いずれの試験においても無毒性量は10 mg/kgと推定された。

上記の結果から、ラットでは、副腎、肝臓毒性ともにFluconazole(毒性発現量 肝毒性10 mg/kg, 副腎毒性30 mg/kg: 4週間経口投与)と比較してWSAの毒作用発現用量(肝毒性90 mg/kg: 4週間経口投与)が大きく、毒作用が軽度であることが確認された。また、副腎への毒作用はFluconazoleと同様に肝毒性よりも大きい用量・長期間投与でのみ確認された。サルにおいても、FluconazoleおよびItraconazoleは両薬物共に2週間経口投与試験で15 mg/kgからトリグリセライドの上昇が認められ肝への影響が示唆されたが、WSAでは同様の変化は2週間経口投与では90 mg/kgでのみ、4週間経口投与、2週間静脈内持続投与においても30 mg/kg以上でのみ認められておりWSAの低毒性が確認された。

結論として、既存の抗真菌薬に比較してWSAの毒作用は低く、かつ静脈内持続投与により有効かつ毒作用の認められない血中濃度を保つことにより、毒性を軽減しつつ有効性を維持できることが確認され、安全域の拡大が示された。また、臨床においても静脈内持続投与することでより効果的な治療ができるものと考えられる。

第2節 薬物動態

第2節では本章、第1節で実施した毒性試験における薬物動態を把握するため、これらの毒性試験における WSA および活性体の血中濃度を明らかにした。

1. 実験材料および実験方法

1-1. 被験物質

本章、第1節に述べた毒性試験と同様に WSA, WSA の活性体およびその修飾部分を用いた。WSA の構造式は、Fig. 2-1 に、WSA の修飾部分および活性体の構造式は Fig. 2-2 に示した。化学名は本章、第1節、1, 1-1 の被験物質の項に述べた。

1-2. 実験方法

1) トキシコキネティクス

(1) 薬液の調製

WSA を静脈内投与には生理的食塩水、経口投与には蒸留水を用いて溶液とし投与に用いた。

(2) 動物および飼育条件

① 単回投与試験

ラット: SD-Slc 系雄ラットを日本エスエルシー(株)より6週令で購入、約1週間の検疫期間中に順調な発育を示し体重が220~230 gに増加した動物18匹を試験に供した。動物は、検疫期間中を含めて室温 22±2℃、湿度 55±10%の飼育室で金属製ケージに1匹ずつ収容して飼育し、日本チャールス・リバー社製固型飼料 CRF-1 と滅菌水道水を自由に摂取させた。

サル: カニクイザル(*Macaca fascicularis*)(歯による推定年齢: 雌雄約4~6才)を(株)SNBL サービスより購入後、検疫期間中(約1ヶ月間)に健康状態に問題のないことを確認した3匹(体重: 2.5~3.5 kg)を試験に供した。動物は、検疫期間、試験期間を通して室温 25±2℃、湿度 55±10%、12時間照明(7:00~19:00)の飼育室で1匹ずつ金属製ケージ(70(D) x 80(W) x 90(H) cm)に収容し、PMI Feeds 社製飼料 Primate diet #5048 (USA)

(100g/day/body)と水道水(自由摂取)を与えて飼育した。

② 反復投与試験

本章，第1節に述べた毒性試験に供した動物を用いた。

(3) 血漿試料のサンプリング

① 単回投与試験

本章，第1節で述べた毒性試験と同様の方法で単回投与後に採血を行ない試料とした。
ラット：投与用量は，静脈内ボラス投与は5 mg/kg (2.5 mL/kg)，経口投与は10 mg/kg (5 mL/kg) を用い，以下のようなスケジュールにてエーテル麻酔下で，眼窩静脈叢より約0.5 mLの採血を行った。各群3例とし，いずれの採血時間においても各動物から採血を行った。

静脈内ボラス投与： 5, 10, 15, 30分, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24時間

経口投与： 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 時間

サル：投与用量は静脈内投与，経口投与いずれも3 mg/kg (活性体として1.66 mg/kg) とし，経口投与は摂餌確認後30分および16時間の絶食後の2種類の試験を行なった。

各群3例を使用し，各投与の間隔は1週間以上のウォッシュアウト期間を設けた。

全ての動物から以下のスケジュールにて，約0.5 mLの採血を行った。

静脈内ボラス投与： 投与開始前, 5, 15, 30分, 1, 2, 4, 7, 24, 31, 48, 72時間

経口投与： 投与開始前, 30分, 1, 2, 4, 7, 24, 31, 48, 72時間

② 反復投与試験

本章，第1節で述べた毒性試験に供した動物から以下のように採血を行ない試料とした。

ラット：以下のスケジュールにてエーテル麻酔下で，眼窩静脈叢より約0.5 mLの採血を行った。各群3例とし，いずれの採血時間においても各動物から採血を行った。

初回投与日： 投与開始後1, 2, 4, 7, 24時間

投与7日目(2週間試験), 15日目(4週間試験)

：投与前および投与開始後2時間

最終投与日 : 投与前, 投与開始後 1, 2, 4, 7, 24 時間

サル: 全ての動物から以下のスケジュールにて, 大腿静脈から約 0.5 mL の採血を行った。

2 週間投与

初回投与日 : 投与前開始前, 投与開始後 1, 2, 4, 7, 24 時間

投与 7 日目 : 投与前開始前, 投与開始後 2 時間(静脈内投与), 4 時間(経口投与)

最終投与日 : 投与前開始前, 投与開始後 1, 2, 4, 7, 24 時間

4 週間投与

初回投与日 : 投与後 1, 2, 4, 7, 24 時間

投与 13 日目 : 投与前および投与後 4 時間

最終投与日 : 投与前, 投与後 1, 2, 4, 7, 24 時間

(4) 血漿試料の調製

抗凝固剤 (ヘパリンナトリウム)で処理したキャピラリー(ラット)またはシリンジ(サル)を用いて採取した血液には, エステラーゼ阻害剤としてパラオキソン(最終濃度 1 mM) (Sigma-Adrich 社, USA),安定化剤として pH 調節用にクエン酸(最終濃度 25 mM)を添加後遠心(2,500 回転, 15 分)し, その上清(血漿)を分析まで-80°Cに保存した。

測定時, 血漿サンプル(50 μ L)は, (1R,2S)-4-[2-[2-Hydroxy-1-methyl-3-[1,2,4]triazol-1-yl-2-(4-trifluoromethyl-phenyl)-propyl]-1-thiazol-4-yl]-benzoxazole (0.25 μ g/mL)を内部標準物質として含んだアセトニトリル溶液(acetonitrile:water:formic acid =80:20:0.1, v/v/v) 150 μ L で蛋白質を沈殿させ, 遠心ろ過 (MultiScreen@ filtration plate, 96-well format)後, 分析に用いた。

(5) 測定方法

WSA, WSAの活性体および修飾部分の測定は, 液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS; API 300, PE SCIEX API, Applied Biosystems, CA, US)を用いた中野らの方法 [44]により行った。検出限界 (WSA: 0.043 μ g/mL, 活性体: 0.0043 μ g/mL, 修飾部分: 0.043 μ g/mL) 以下の値はBLQとして示した。得られたデータはSample Control

およびMacQuan (Perkin-Elmer Sciex Instruments; Toronto, Canada)を用いて収集, 測定値から最高血中濃度 (C_{max}), 投与後2時間目の血中濃度(C_{2h}), 最高血中濃度到達時間 (T_{max}), 半減期 ($T_{1/2}$)などを求めた。測定値はDMLIMS+によりノンコンパートメントモデル解析法で処理した。血中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-24h} ; $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) は, linear trapezoidal ruleに基づいて計算された。標準液として, サルの血漿にWSA(0.05~45.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 活性体(0.005~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 修飾部分 (0.05~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を添加したものをを用いた。

2) WSA の代謝

(1) 血漿の調製

SD-Slc 系雄ラット 3 匹, カニクイザル 3 匹, 健常人の男性ボランティア 3 人から採取後, 抗凝固剤 EDTA で処理した血漿を用いた。血漿は使用まで -40°C で保存された。

(2) 試料の調製

WSA は DMSO(1 mM)に, 活性体, 修飾部分はメタノール(1 mg/mL)に溶解させた。

(3) 測定方法

ラット, サルおよびヒト血漿を 37°C で 5 分間インキュベートした後, WSA (prodrug) を 10 μM (final volume :500 μL)の濃度となるように加え, 37°C でさらにインキュベートした。次に, それぞれ 15, 30 秒, 1, 2, 5 分の時点でアセトニトリル溶液を加えて反応を止め, WSA, 活性体, 修飾部分の濃度を液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS; API 300, PE SCIEX API, Applied Biosystems, CA, US)を用いた中野等の方法 [44]により測定を行なった。

3) WSA の薬物相互作用 - 酵素誘導

(1) 試料の調製

本章, 第1節に示した毒性試験において投与期間終了時に剖検された動物から摘出された肝臓約 5 g を液体窒素で凍結し -80°C で保存し検査に供した。検体は, 1.15%KCl, 20 mM Tris-HClおよび 1 mM EDTA (pH 7.4)を含んだ3倍量の緩衝液でホモジネートし 9,000 x g で 20 分間遠心, その上清をさらに1時間, 105,000 x g で遠心した。その沈殿したミクロゾーム分画を20 mM Tris-HCl および20% glycerol (pH 7.4)を含む緩衝液で懸

濁させた。マイクロゾーム分画は液体窒素で凍結し-80°Cで測定まで保存した。

蛋白濃度は、プロテインアッセイキット (Bradford 法[4], Bio-rad Laboratories, Richmond, CA)を用いて牛血清アルブミンを標準物質として測定した。

なお、陽性対照としては、3-methylcholanthrene (3-MC), Phenobarbital (PB), dexamethasone (DEX)およびコーン油を投与したラットの肝マイクロゾームを購入 (Xenotech LCC, USA)して用いた。

(2) 測定方法

① Cytochrome P450 の測定

肝マイクロゾームP450量は、大村よび佐藤の変法[49]で測定した。

マイクロゾーム液は20 mM Tris-HCl および 20% glycerol (pH 7.4)を含む緩衝液で0.5 mg/mL 蛋白を含むように希釈した。分光光度計(V-530, JASCO Co., Japan)で400~490 nmの間のベースラインを測定した。測定用のマイクロゾーム液は一酸化炭素ガスで1分間飽和され、450 nmおよび490 nmでの吸収の差を測定しP450量を計算した。

② p-Nitroanisole O-demethylation 活性

p-Nitroanisole O-demethylation 活性は、NetterおよびSeidelら[46]の方法およびEscladeらの変法[11]で測定した。反応液は、マイクロゾームを蛋白量として0.5 mg/mL含むように、5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 2 mM NADPHを含む50 mMリン酸緩衝液(pH7.4)で調製した。p-Nitroanisole (和光純薬, 大阪) はメタノールで希釈し、1 mMの濃度になるように反応液に加えた後、37°Cで10分間インキュベートした。代謝物であるp-Nitrophenol はメタノールで抽出し高速液体クロマトグラフ(島津製作所, 東京)で測定した。

③ Testosterone hydroxylase 活性

Testosterone hydroxylase活性は、Van Der HoevenおよびSonderfanの変法[62]を用いて測定した。0.5 mg/mLの蛋白を含むマイクロゾーム反応液(225 μL)は、5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, Testosterone (Steraloids, Inc., NH) 250 μM を含む50 mMリン酸緩衝液で調製した。酵素反応は2 mM NADPH(25 μL)を添加して37°Cで10分間インキュベートした。Testosteroneからの代謝物は酢酸エチル(1 mL)で抽出し高速液体クロマトグラフ(島津製

作所，東京)で測定した。

(3) 統計学的解析

まず，ANOVA の片側検定を用いて検定し，同一群であることが否定された場合には，ダネットの多重検定を用いて対照群と投薬群の間の有意差を検定した[81]。

2. 結果

2-1. トキシコキネティクス

1) WSA の単回投与における血中濃度 (Fig. 2-3～2-5, Table 2-10)

(1) WSA の静脈内投与における血中濃度

WSA への代謝は早く $T_{1/2}$ はラットで 7.4 分，サルで 8.0 分であった。このため，活性体，修飾部分の血中への発現は速やかで T_{max} はラット，サルともに 5 分であった。この結果は WSA が活性体に速やかに変換されることを示している。しかし，活性体の代謝速度は， $T_{1/2}$ がラットで 5.1 時間，サルで 9.8 時間とゆっくりである。また，WSA から活性体への代謝過程で生じる修飾部分の $T_{1/2}$ はラットで 28 分，サルで 24 分であり，活性体に比較して早く体内より排泄される。活性体を静脈内投与 (溶媒: DMSO, HPCD) したサルにおける活性体の $T_{1/2}$ は 11.7 時間と長く，組織分布は広範囲にわたった (V_{ss} : 3.0 L/kg)。

WSA の静脈内投与後における活性体の AUC からみると，WSA から活性体への変換率は 84% と高い値を示した。

(2) WSA の経口投与における血中濃度

経口投与では，ラット，サルともに WSA は血中で検出されなかった。これは，腸管および/または初回通過効果によって速やかに変換されていることを示す。

活性体の T_{max} はラットにおいて 2.0 時間，サルにおいて 3.3 時間， $T_{1/2}$ はラットで 3.5 時間，サルで 12.8 時間であった。経口バイオアベイラビリティはラットで 62%，サルで 87% であり経口吸収も良好であることを示している。

サルでの経口投与時の摂餌による影響は、活性体は AUC からみると軽度ではあるが減少(19%)した。摂餌により T_{max} は 3.3 時間から 5.0 時間へ遅れ、 C_{max} は 51%減少した。

2) WSA の反復投与における血中濃度 (Table 2-11~2-13)

(1) ラット

2 週間静脈内持続投与および 4 週間経口投与試験の血中動態を確認した。結果の詳細は、Table 2-11~2-13 に示した。以下のように要約される。

静脈内持続投与後、WSA は速やかに血中から消失され、WSA の血中濃度は低くなった。また、その AUC は投与用量に相関して増加した。経口投与後は、血中に WSA はみられなかった。活性体の血中濃度は高く、特に雄において投与用量に相関して増加した。これは、すべての投薬群での WSA の良好な吸収と変換を示している。修飾部分は活性体に比較して消失が早く血中濃度は低い。そして、その増加量は用量に相関するより多い。活性体の血中濃度は、雄より雌において高い傾向がうかがわれた。しかし、WSA と修飾部分の血中濃度は雌雄に差はみられなかった。WSA、活性体、修飾部分の血中濃度に蓄積はみられなかった。活性体の血中濃度は雌の反復投与後、高用量においてやや低めであったが、これは雌の CYP 3A サブファミリーの酵素誘導能に起因していると考えられる。

(2) サル

2 週間静脈内持続投与および 4 週間経口投与試験の血中動態を確認した。結果の詳細は、Table 2-11~2-13 に示した。以下のように要約される。

WSA の静脈内持続投与後 WSA は速やかに変換されるため全身暴露量は低いですが、サルにおいて C_{max} はラットより高い。AUC は投与用量に相関して増加した。

活性体の全身暴露量は、いずれの投与方法においても投与期間中高い値を示した。AUC はほぼ投与用量に相関して増加した。また、活性体の血中濃度の推移から見て吸収と変換は良好と考えられる。修飾部分の排泄は早く、全身暴露量は低い値を示した。血中濃度の推移は投与用量にほぼ相関して増加した。WSA、活性体、および修飾部分

の血中濃度に性差はみられなかった。WSA の反復投与で WSA, 活性体, および修飾部分の血中濃度に蓄積は認められなかった。

2-2. WSA の代謝: 血中での変換 Plasma conversion (*in vitro* 試験) (Fig. 2-6~2-8, Table 2-14)

WSA は血漿中で中間体を経て速やかに活性体に変換された。すべての検査時間における血漿中の WSA, 中間体, 活性体の総濃度は反応開始時の WSA の濃度にほぼ等しかった。WSA の中間体への変換には, 種差が認められた ($T_{1/2}$: 0.25, 0.85, 0.75 分; ラット, サル, ヒト)。この結果は, 中間体への加水分解率においてヒトはラットよりサルに近いことを示している。この変換は, 血漿中にエステラーゼ抑制剤 (1 mM paraoxon) を加えることで強く抑制され, WSA の中間体への加水分解にエステラーゼが強く関与していることを示す。WSA から活性体への総合的な変換率は T50% (50%の WSA が活性体に変換される時間)で評価され, 三つの動物種でほぼ等しい(1.41, 1.75, 1.60 分, ラット, サル, ヒト) ことが確認された。従って, WSA から活性体への最終的な変換には種差はみられなかった。代謝で生成した修飾部分は, LC/MS/MS で検出され, それぞれの検査時点で活性体と同率であることが確認された。

2-3. 薬物相互作用 — 酵素誘導

アゾール系薬物は, 一般にチトクローム P450 の酵素誘導があることが知られている。このことは, P450 isozymes によって代謝される複数の薬剤を併用して投与する際に問題となる。

1) 酵素誘導 (Table 2-15, 2-16)

薬物代謝酵素系に誘導を起こす可能性が WSA を 2 週間静脈内持続投与を行ったラット, サル (投与用量: 10, 30 および 60 mg/kg) の肝臓を用いて検討された。サルについては, 4 週間の回復期間終了後についても検討を実施した。

雌ラットでは, testosterone 2 β -hydroxylase と 6 β -hydroxylase 活性が 30, 60 mg/kg で

誘導された。この誘導は、CYP 3A subfamily への誘導の可能性を示している。さらに CYP 2B subfamily への誘導の可能性を示す testosterone 16 β -hydroxylase activity が 60 mg/kg で誘導された。一方、雄においては、いずれの投与用量においても testosterone hydroxylase activities は一切誘導されなかった。

サルにおいて、testosterone 16 β -hydroxylase 活性と p-nitroanisole O-demethylase 活性は 10 から 60 mg/kg で誘導された。これは、CYP 2B subfamily の誘導の可能性を示唆している。回復期間終了時、上記で観察された誘導はほぼ回復した。サルにおいて CYP 2C 又は CYP 3A subfamilies の誘導を示唆する testosterone 2 α -, 2 β -, 6 β -hydroxylase 活性の増加はみられなかった。また、性差はうかがわれなかった。

3. 考察

本章、第2節では、第1節で行った毒性試験における血中の WSA および活性体の濃度を測定し、血中最高濃度(C_{max})、血中濃度-時間曲線下面積(AUC)、半減期($T_{1/2}$)を算出しトキシコキネティックス的解析を行った。その結果、いずれの動物、投与方法においても WSA は投与後速やかに消失している事が確認された。また、活性体の濃度は C_{max} , AUC とともに用量相関性のある増加を示し、WSA 投与後のプロドラッグから活性体への変換は、速やかにかつ有効になされていることが確認された。

また、活性体の体内への保留は、ラット($T_{1/2}$:経口投与 3.5 時間, 持続静脈内投与 5.1 時間)に比べサルでは比較的長く($T_{1/2}$:サル経口投与 12.8 時間, 持続静脈内投与 9.8 時間), 1日1回の投与で充分効果が期待されることが推察される。また経口投与でのバイオアベイラビリティ(BA)は極めて良好でラットでは 62%, サルでは 87%であり、特にサルでは経口投与によっても静脈内投与の場合の約 90%近い血中濃度が得られる事が示され、経口投与による治療も効果的に行なえることが確認された。既存のアゾール系薬物の中で静脈投与が可能な FCZ と比較しても同等以上の BA である[15]。

以上のサルを用いた試験の結果から、WSA の投与により、活性体はヒトでの臨床において1日1回投与で静脈内投与, 経口投与ともに十分な治療効果を得られる濃度推移を示すことが示された。既存のアゾール系薬物で抗菌スペクトルの比較的広い ICZ は、

脂溶性が高いため静脈内投与はできないこと、静脈内投与が可能で BA も比較的良好²⁾とされる FCZ は抗菌スペクトルが狭く特に、アスペルギルス症に効果がないことなどを考慮すると、この意義は大きい。

サルを用いた経口投与試験および静脈内持続投与試験について、血中濃度とその毒作用を Table 2-17 および Table 3-2 に示した。経口投与では 30 mg/kg 群では 2 週目にはほとんど毒作用は認められないが、4 週目には肝臓、副腎に毒作用が軽度ではあるが認められた。この時の血中濃度は、 C_{max} が 4~6 $\mu\text{g/mL}$ 、AUC が 55~75 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$ であった。また、2 週間の静脈内持続投与では、軽度ではあるが 30 mg/kg で毒性が認められている。この時の血中濃度は、 C_{max} が 8~11 $\mu\text{g/mL}$ 、AUC が 85~127 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$ と経口投与時より高い曝露量を示している。従って、2 週間投与の場合、 C_{max} が 8~11 $\mu\text{g/mL}$ 、AUC が 85~127 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$ 前後の血中濃度を越えると毒作用が発現し、4 週間投与よりも高い濃度での曝露が必要と推定された。また、経口投与の 90 mg/kg 群(C_{max} : 6.2~25 $\mu\text{g/mL}$ および AUC: 103~281 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$)は、静脈内投与の 60 mg/kg 群(C_{max} : 13~30 $\mu\text{g/mL}$ および AUC: 190~480 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$)と同様に高い曝露を示しており、2 週目より毒作用が認められた。このように、4 週間経口投与の 90 mg/kg 群、2 週間静脈内投与の 60 mg/kg 群は確実に毒性を示す用量であり、その C_{max} 、AUC は類似した曝露量を示し、毒作用の強さもこの曝露量と相関を示している。

また、*in vitro* における血漿中での WAS から中間体への変換率は、ラットでは変換時間が短いが生人とサルは近い値(WSA の $T_{1/2}$: ヒト 0.75 分、サル 0.85 分、ラット 0.25 分)が示されたことから、薬物動態プロファイルは、ヒトへの外挿性の点ではサルが比較的近いものであることが推察された。しかし、WSA から活性体への総合的な変換率は動物種による差はみられなかった。また、肝細胞とマイクロゾームにおける WSA の活性体を用いた代謝的安定性試験の結果から、活性体からの代謝においてサルはヒトに近いパターンを示し、P450 酵素は重要な役割を示していないことが報告されている[21]。このように、活性体は代謝的安定性が高く、WSA は 1 日 1 回投与で効果を示すことが可能であり臨床において患者に有利な投与方法と考えられた。

酵素活性への影響は、*in vitro* における 酵素阻害試験では、活性体の CYP 3A4 抑制活性 (IC50: 1.4 μ M)は、Itraconazole (0.46 μ M)より弱く、活性体の薬物相互作用は Itraconazole より弱いこと[31, 60]、および CYP3A4 に対する作用は 50%抑制量と臨床での有効濃度を併せて評価した場合、Ketoconazole, Itraconazole, Fluconazole に比較して 1/5~1/115 (50%抑制量 Ketoconazole: 0.04 μ M, Itraconazole: 0.46 μ M, Fluconazole: 17.3 μ M, WSA: 1.4 μ M, 臨床有効濃度/50%抑制量比 Ketoconazole : Itraconazole : Fluconazole : WSA = 94.2 : 3.08 : 3.78 : 0.82)となる[2, 59, 68]。従って、既存の抗真菌薬に比較して WSA の併用薬物への相互作用の可能性は低くなっている。CYP3A4 への抑制作用は、臨床において他に薬物を併用している患者が多いこと、および併用される薬物には CYP3A4 で代謝される薬物が多いため、大きな問題となっている。従って、この意義は高いと考える。

薬物代謝酵素系に誘導を起こす可能性は、雄ラットにおいては、いずれの投与用量においても示唆されなかったが、雌ラットでは、30, 60 mg/kg で CYP 3A subfamily への誘導の可能性が、また、60 mg/kg で CYP 2B subfamily への誘導の可能性が示唆された。サルにおいては、CYP 2B subfamily の誘導の可能性を示唆されたが、回復期間終了時には回復した。サルにおいて CYP 2C 又は CYP 3A subfamilies の誘導を示唆する変化はみられず、性差もうかがわれなかった。この結果から、酵素誘導には種差のある事が示された。WSA と臨床で併用される可能性の高い薬物は、CYP 2C 又は CYP 3A subfamilies の誘導をうけるといわれているものが多いことから、臨床適用時に患者への負担の軽減につながると考えられる。また、p-nitroanisole O-demethylase 活性について比較すると、ラットを用いた FCZ 投与において 2 週間経口投与 (Table 1-5) では 30 mg/kg 群で 162%、4 週間投与 (Table 1-6) では 10 mg/kg 群で 138%の増加が見られているが、WSA については 2 週間静脈内持続投与において最高用量の 60 mg/kg 群においても著変は認められていない。FCZ は、既存の抗真菌薬の中では安全性の高い薬物として知られているが、WSA は FCZ より酵素への影響は少ないと考えられる。また、酵素誘導に関連する変化としてあげられる安全性薬理試験における pentobarbital-induced sleeping time の延長については、WSA において FCZ や KCZ より軽度であると報告されており[32]、この結果を裏付けている。

第3節 新たな薬物療法を提案するための薬効薬理学的研究

WSA と既存抗真菌薬の薬効を正しく比較評価するに際し、まず既存の溶解性の低い薬物の静脈内投与による効果を確認し、さらに薬効が認められる血中濃度を明らかにするため「静脈内持続投与による全身感染症の治療方法」をマウス感染モデルを用いて検討し、あわせて安全性を確認することを試みた。

次に、ラット感染モデルを用い新たに確立された方法である静脈内持続投与方法によって WSA と AMPH-B の有効性および安全性について比較評価を行い、あわせて薬物の有効血中濃度も確認した。

1. 静脈内持続投与による *candidiasis* 全身感染症の治療方法の検討

一般に、既存の抗真菌薬には、水溶性に乏しい、半減期が短い、毒性が強い、などの理由で動物治療モデルで十分な効果を引きだすことが困難なものが多い。これらの問題をコントロールすることは、臨床においては点滴静脈内注射を行うことなどである程度可能であるが、動物実験においては非常に難しいとされてきた。そこで、このような化合物による動物モデルでの治療を可能にし、薬物の評価を効率よく行ない、かつ安全性も有効性と同時に確認するため、静脈内持続投与治療モデルの開発を行った。

1-1. 実験材料および方法

1) 被験薬物

Itraconazole は化学名を (±)-1-*sec*-butyl-4-[p-[p-[[[(2R*, 4S*)-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazole-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]-1-piperazinyl]phenyl] - Δ^2 -1,2,4-triazolin-5-one と称し、分子量 705.64、水にほとんど不溶の白色粉末である。

2) 試験動物および飼育条件

ICR マウス(日本チャールスリバー社)を4週令で購入した。検疫終了後、静脈内カテーテル留置手術を施し、ほぼ1週間の観察期間中に、動物の一般状態やカテーテル留置後の生理的食塩液の通液状態が良好な動物(体重 20~25 g)を試験に供した。検疫期間中

を含めて動物は室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ の飼育室でポリカーボネート製ケージに 1 匹ずつ収容して飼育し、日本クレア社製固型飼料 CE-2 と滅菌水道水(Gentamycin sulfate: $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 含む)を自由に摂取させた。

3) 静脈内カテーテル留置手術 [14,22,41]

2.5%トリプロモエタノール溶液 (約 $0.2 \sim 0.3 \text{ mL}$) の腹腔内投与により麻酔し、消毒後、外頸静脈にカテーテル (塩化ビニル製チューブ, 外径 0.9 mm , 内径 0.5 mm , SV35, Dural Plastics & Eng. Pty. Ltd.) を挿入した。挿入したカテーテルを周囲の皮下組織に固定し、カテーテルの一端を皮下組織を通して背側頸部より導出し切開部を縫合した。動物にジャケットを装着し、カテーテルをテーパーに通してシーベルに接続し、シリンジポンプ (Model KDS220, KD Scientific Inc. USA) に接続し 0.1 mL/hr で送液した。

4) 投与方法

対照群, $0.3, 0.6$ および 1 mg/kg/h の 4 群を設け 1 群 5 匹とした。溶媒として 5%DMSO, 5%PEG300, 10%HPCD の混液を使用し 0.22 mg/mL (1 mg/kg/hr) の薬液を調製し、さらに溶媒で希釈して使用した。薬液は 2 週間を通して 0.1 mL/hr の流速で 1 日 24 時間シリンジポンプ Model 220(KDS 社製)を用いてカテーテルを通して静脈内へ注入した。

5) 感染および評価方法

感染には、*C. albicans* CY1002 株を用い、その孢子懸濁液を $6.8 \times 10^6/\text{mouse}$ を尾静脈より投与した。治療には難溶性として知られている Itraconazole (ICZ) を溶媒 (5%DMSO, 5%PEG300, 10%HPCD の混液) で 0.22 mg/mL とし 24 mg/kg (1.0 mg/kg/hr) 用溶液とした。さらに希釈して 14.4 mg/kg (0.6 mg/kg/hr) および 7.2 mg/kg (0.3 mg/kg/hr) 用溶液を調製した。治療効果の判定には生存日数、死亡時の腎臓、肝臓の病理組織学的検索(指標: 標的臓器における *C. albicans* の形態, *C. albicans* の侵襲の状態, Kupffer cells による貧食像, 炎症性細胞の浸潤)を用いた。

6) 病理組織学的検索方法

死亡動物は発見後速やかに剖検すると共に、肝臓、腎臓を摘出し 15%緩衝ホルマリン溶液 (pH 6.8) で固定後、HE 染色および PAS 染色を行ない、組織学的検査に供した。

7) 血漿中濃度の測定

未感染のマウス 15 匹を用いて 24 mg/kg/day (1 mg/kg/hr) の投与を 72 時間連続して行い、これらの動物から 30 分, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 53, 60, 72, 74, 76, 80 時間の各時点で採取した検体 (3 匹/point, 同一動物で複数回採取) を用いて、液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS; API 300, PE SCIEX API, Applied Biosystems, CA, US) により行った。

1-2. 結果 (Table 2-18, Fig.2-9, 2-10, 2-11)

ICZ の投与用量は 0, 7.2 mg/kg/day, 14.4 mg/kg/day, 24 mg/kg/day (0, 0.3, 0.6, 1 mg/kg/hr) で行った。薬効を示す従来の指標である平均生存日数は Table 2-18 に示したように延長が確認された ($p \leq 0.05$)。また、感染に関連した変化として、腎臓では菌の組織内への侵襲が特に対照群で顕著に腎実質全体にわたって認められ、病巣も大きく、構成している菌体は主に菌糸状で、菌塊状を形成していた。また、菌の出現部位の周辺には炎症性細胞の浸潤が認められた。これらの変化の出現部位は、投与用量の増加に相関して腎実質全体から髓質、腎乳頭へと限局されていき、かつ酵母状を呈するようになり、7.2 mg/kg/day 群では菌糸状と酵母状の菌が混在していたが、24 mg/kg/day 投与においては酵母状のものがわずかに尿細管の管腔内にまれに認められるのみであり、腎皮質には認められなかった。肝臓における菌の侵襲およびこれに起因した炎症性細胞の浸潤は主に対照群で認められた。この他、全投与群で近位尿細管上皮の空胞化が認められ溶媒に起因した変化と考えられた。

対照群などの早期死亡が認められた動物は、菌により腎全体が傷害を受け、致命的な腎不全状態を呈していたが、ICZ 投与群では投与用量に相関してこれらの変化が軽減化されており、これが延命に結びついたものと考えられる。

一般にアゾール系薬物で認められる肝臓における肝細胞の腫大、脂肪変性などは認められなかった。血中濃度は、24 mg/kg/day (1 mg/kg/hr) 投与において静脈内持続開始後 8 時間以降から 72 時間まで $0.302 \pm 0.081 \mu\text{g/mL}$ の濃度で定常状態を維持した。

上記の結果から、カンジダ症マウスモデルに対し ICZ の 24 mg/kg/day の 24 時間静脈内持続投与により十分な治療効果が確認された。またこの方法は、低濃度の薬液を持続的に定速で投与し薬物の血中濃度を薬効濃度に維持することにより、結果として溶解性の低い化合物の薬効を確認することを可能とした。この方法は、難溶性でかつ半減期の短い薬物を開発する際の *in vivo* での評価系として極めて有効な治療試験方法と考えられる。

2. WSA を用いた静脈内持続投与による *candidiasis* および *aspergillosis* 全身感染症治療試験

2-1. 実験材料および実験方法

1) 被験薬物

WSA, WSA の活性体, WSA の修飾部分, および Amphotericin B を用いた。WSA, WSA の活性体および WSA の修飾部分の化学名は本章, 第 1 節, 1, 1-1 の被験物質の項に述べた。WSA とその活性体の構造式は, Fig. 2-1 に示した。WSA の修飾部分の構造式は Fig. 2-2 に示した。Amphotericin B は化学名を (1R,3S,5R,6R,9R,11R,15S,16R,17R,18S,19E,21E,23E,25E,27E,29E,31E,33R,35S,36R,37S)-33-(3-amino-3,6-dideoxy- β -D-mannopyranosyloxy)-1,3,5,6,9,11,17,37-octahydroxy-15,16,18-trimethyl-13-oxo-14,39-dioxabicyclo[33.3.1]nonatriaconta-19,21,23,25,27,29,31-heptaene-36-carboxylic acid と称し, 分子量 924.09 の水にはほとんど溶けない黄色～黄褐色の粉末である。Amphotericin B (Lot No. FZV1270)は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)より購入して使用した。

2) 試験動物および飼育条件

雄の F344 fisher ラット(体重: 50～60 g, 日本チャールスリバー社)を 5 週令で購入した。検疫終了後, 静脈内カテーテル留置手術を施し, ほぼ 1 週間の観察期間中に, 動物の一般状態やカテーテル留置後の生理的食塩液の通液状態が良好な動物を試験に供した。検疫期間中を含めて動物は室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$ の飼育室で金属製ケージに 1 匹ずつ収容して飼育し, 日本チャールス・リバー社製固型飼料 CRF-1 と滅菌水道水

(Gentamycin sulfate: 25 µg/mL 含む)を自由に摂取させた。動物の識別は番号の刻印されたステンレス製標識を用いた。本試験での使用動物は、対照群、投薬群ともに各群 5 匹とした。

3) 静脈内カテーテル留置手術 [14,22,41]

ペントバルビタール溶液 (15~25 mg/kg) の腹腔内投与による麻酔後、外頸静脈にカテーテル (塩化ビニル製チューブ, 外径 0.9 mm, 内径 0.5 mm, SV35, Dural Plastics & Eng. Pty. Ltd.) を挿入した。挿入したカテーテルを周囲の皮下組織に固定し、カテーテルのもう一端を皮下組織を通して背側頸部より導出し切開部を縫合した。動物にジャケットを装着し、カテーテルをテーサーに通してシーベルに接続し、シリンジポンプ (Model KDS220, KD Scientific Inc. USA) に接続し 0.3 mL/hr で 1 日 24 時間、7 日間送液した。

4) 投与方法

WSA は、両感染モデルともに 3, 10, 30 mg/kg/day, AMPH-B はカンジダ症モデルには 0.3, 1.5, 6 mg/kg/day, アスペルギルス症モデルには 2, 8 mg/kg/day 投与群を設け、1 群 5 匹とした。溶媒として 5%DMSO, 5%PEG300, 10%HPCD の混液を使用し 0.22 mg/mL (1 mg/kg/hr) の薬液を調製し、*さらに溶媒で希釈して使用した。薬液は 2 週間を通して 0.1 mL/hr の流速で 1 日 24 時間、計 7 日間の間シリンジポンプ Model 220 (KDS 社製) を用いてカテーテルを通して静脈内へ連続して注入した。血中濃度測定用には 1 群 3 匹を別途用意し、同一条件で WSA の投与を実施した。

5) 感染および評価方法

感染には、*C. albicans* CY1002 (孢子懸濁液濃度 4×10^6 /rat), *A. fumigatus* (孢子懸濁液濃度 1×10^7 /rat) を尾静脈より投与した。治療には WSA (*C. albicans*: 3, 10, 30 mg/kg/day, *A. fumigatus*: 3, 10 mg/kg/day), Amphotericin B (*C. albicans*: 0.3, 1.5 mg/kg/day, *A. fumigatus*: 2, 8 mg/kg/day) を溶媒に溶解させて用いた。治療効果の判定には生存日数および病理所見を用いた。また、50%有効濃度(ED₅₀)を Probit 法(最尤法) [82]により算出した。

6) 血漿中濃度の測定

WSA の投与当日(day 0), 投与 4 日目(day 3), 7 日目(day 6)に採血した検体を用いて、

液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS; API 300, PE SCIEX API, Applied Biosystems, CA, US)により行った。

2-2. 結果 (Table 2-19, Fig. 2-12, 2-13)

WSA 投与では、10 mg/kg/day (0.083 mg/mL 溶液)以上の投与では7日間の観察期間に死亡する動物は認められず、0.05 µg/mL以上の血中濃度を示した。また、投与期間終了時の剖検では腎臓、肝臓に菌巢の存在は認められなかった。3 mg/kg/day(0.028 mg/mL 溶液)では投与終了までにカンジダ症モデルでは全例、アスペルギルス症モデルでは4/5匹の動物が死亡した。この時の血中濃度は、投与開始後4日目より0.05 µg/mLに達してほぼ定常状態となったものの、初めの3日間の血中濃度はほぼ0.02 µg/mLであった。

AMPH-B の投与においては、いずれの感染モデルにおいても全投与用量で死亡する動物が認められた。最高用量における死亡動物は、腎臓、肝臓に菌の存在は認められず薬効が確認されたものの、腹水、肝臓、腎臓の褪色など AMPH-B の毒性を示す所見が確認され、薬効量は毒性量でもあることが確認された。

以上のように、WSA 投与では、用量相関的に生存日数の延長が確認され *C.albicans* に対する ED₅₀ 値はほぼ 5.5 mg/kg, *A.fumigatus* に対する ED₅₀ 値はほぼ 3.41 mg/kg であり、活性体の最小有効濃度(MEC)はカンジダ症、アスペルギローシス症ともにおよそ 0.05 µg/mL 程度と推定された。AMPH-B では ED₅₀ 値は求められなかった。

3. 考察

抗真菌薬のより安全で有効な投与方法を確立するため、静脈内持続投与を応用し、従来の薬効判定基準である生存日数だけではなく、予め明らかにされた感染時における標的臓器(腎臓、肝臓)における病理組織学的変化を評価に加えたところ、死亡が認められる以前に菌の侵襲状態の変化が観察され、検出感度のよい方法であることが明らかとなった。また、標的臓器における薬物に起因する変化も合わせて観察することで、病理所見を評価の指標とすることで、安全性と有効性を同時に評価することが可能となった。ま

た、低濃度の薬液を使用し24時間定常静脈内持続投与を行うことで、薬物の血中濃度を一定状態に保つことが可能となり、難溶性または半減期の短い薬物などを開発する際の *in vivo* 評価系としても極めて有用であることを立証した。

Itraconazole の投与用量 24 mg/kg は、50%致死量(LD₅₀) (LD₅₀: iv ♂46 mg/kg, ♀40 mg/kg)[69]の約 1/2 用量で1日当たりの投与用量としては極めて高い用量だが、低濃度薬液を用いて24時間持続して定速で静脈内持続投与を行なうことで薬物の血中濃度を有効濃度以上かつ毒性用量以下に維持できる(約 0.3 µg/mL 維持)ことが確認され、結果として毒作用も軽減されることが示され、静脈内持続投与法は毒性を低減させかつ薬効を強化し、さらに難溶性薬物についても静脈内投与による薬効・安全性を評価できる方法であることを立証した。

なお、この方法は、少量の薬物で試験を行わざるを得ない薬物の開発初期のスクリーニングとしても使用することを考慮に入れ、薬物使用量の少ないマウスを用いて検討を行った。

次に、確立された新評価法である24時間定常静脈内持続投与方法を用いて、一般的に薬効評価に使用されるラット感染モデルにおける薬物の効果を比較し、あわせて薬物の血中濃度を確認した。

WSA はカンジタおよびアスペルギルス全身感染症ラットモデルにおいて、10, 30 mg/kg 投与では死亡例は認められず、標的臓器である腎臓、肝臓に菌巢は認められなかった。また、毒作用を示す変化も認められていない。従って、有効な用量は安全量でもある。しかし、AMPH-B では、薬効の示唆された用量で毒性による死亡が確認され、薬効用量と毒性用量が等しいことが確認された。以上の結果から、WSA の静脈内投与、経口投与ともに毒性の認められない用量で強い効果が確認され、AMPH-B と比較して十分な薬効を認めた。WSA のカンジタおよびアスペルギルス全身感染症における血漿中最小有効用量は 0.05 µg/mL と推定された。また、感染初期の薬物濃度が有効濃度に達しない場合は、十分な薬効が認められず、感染初期の血中濃度が抗真菌作用を示す上で重要であることが確認された。

また、山崎ら[79]は、WSAの抗菌活性について *in vitro* において WSAの活性体は広い抗真菌スペクトラムを持ち、主要な日和見感染原因菌である *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* の他、強い病原性を持つ *Histoplasma capsulatum*, および *Blastomyces dermatitidis* にも効果を示し(MIC: 0.001 μ g), その効果は Itraconazole と同等で Fluconazole より強いこと、および WSAの活性体は *C. albicans* の FCZ 耐性菌および *Zygomycetes*; *Absidia*, *Rhizopus*, *Rhizomucor spp.* に対し優れた効果を示し、WSAは全身性カンジダ症において経口、静脈内投与ともにほぼ等しい ED₅₀ を示すことを報告している。これは経口投与および静脈内投与における良好なバイオアベイラビリティの結果と考えられる。また、現在適切な治療薬がないに等しいアスペルギルス症、全身性クリプトコッカス症においても他剤に比較して優れた効果が報告されている。

結論は、以下のように要約される。

安全性と有効性を同時に評価するため、新しい評価試験法、すなわち低濃度薬液の静脈内持続投与(24時間持続投与法)、有効血中濃度の確認、評価指標として病理学組織学的所見を用いる新しい組み合わせの評価法を確立し、難溶性かつ半減期の短い薬物を開発する際の *in vivo* 評価系としても極めて有用であることを立証した。また、この新しい方法を用いて WSAの有効性比較試験を行ない、WSAは Amphotericin B に比較して安全性が高く有効な抗真菌薬であることを立証した。さらに、この投与方法は薬物の血中濃度を毒性発現用量以下に保ち長時間投与できるため毒作用の軽減が可能であること、感染初期の血中濃度が重要であることも確認された。

WSAの安全性について

WSAの生体内変換については、経口投与および静脈内投与のいずれの投与方法においても、WSAは速やかに活性体に変換され、この活性体は比較的長く体内にとどまった。またバイオアベイラビリティ(BA)は極めて良好であった。WSAから活性体への総合的な変換率はT50%(50%のWSAが活性体に変換される時間)で評価したところ、三つの動物種でほぼ等しい(1.41, 1.75, 1.60分, ラット, サル, ヒト)結果が得られ、WSAから活性体への最終的な変換には種差はないことが確認された。

毒性の特徴と強さについて、既存の代表的なアゾール系薬物3種、Fluconazole (FCZ), Ketoconazole (KCZ), Itraconazole(ICZ)の反復経口投与毒性試験を行いアゾール系薬物の持つ毒性の特徴と強さを再確認した。ラットでは、FCZの肝臓毒性は2週間投与で30 mg/kg, 4週間投与では10 mg/kg以上で、副腎毒性は4週間投与の30 mg/kgで認められた。また、サルでは、FCZ 2週間投与では肝毒性が15 mg/kg以上、副腎毒性が100 mg/kgで認められた。一方、ICZのサル2週間投与では副腎毒性が40 mg/kg以上で、肝毒性が100 mg/kgで認められた。KCZのラット2週間投与では、肝毒性が200 mg/kg, 副腎毒性が50 mg/kg以上で認められた(Table 3-1)。この結果から、既存のアゾール系薬物の主な毒作用は共通的であり、肝臓(重量増加, 細胞肥大, 脂肪変性)・副腎(重量増加, 皮質脂肪滴増加など)に認められ、FCZでは肝毒性, ICZ, KCZでは副腎毒性の発現しやすいことを立証した。ステロイドホルモン合成系への影響がKCZにおいてFCZ, ICZより強く認められることは既に報告されている[8,71,73]。また、ラットとサルにおける毒性は本質的には同じであるが、毒性発現用量に差のあることが確認された。

WSAの毒作用を検討するために、反復投与毒性試験を、静脈内持続投与および経口投与の2経路で実施した。その結果、WSAの毒性は既存のアゾール系薬物と異なった種類の毒作用はみられなかった。FCZおよびICZと同様WSAでも、主に肝臓と副腎

に毒作用が認められた(Table 3-2)。サルを用いた2週間経口投与試験における毒性を比較すると(Table 3-3), FCZ, ICZは15 mg/kg投与からトリグリセライドの上昇が認められ肝臓への影響が示唆されたが, WSAでは肝臓への影響は90 mg/kg投与でのみ確認され, 4週間経口投与, 2週間静脈内投与試験においてもその毒性は30 mg/kg以上の投与でのみ認められた。また, いずれの投与経路においても肝臓, 副腎およびこれらの変化に起因する二次的な変化以外はWSAによる著変はみられなかった。また, FCZやICZと比較して副腎をはじめとした内分泌系への影響は軽度であった。

新たな薬物療法を提案するための薬効薬理学的研究

抗真菌薬のより安全で有効な投与法を確立するため, 静脈内持続投与を応用し, 従来の薬効判定基準である生存日数だけではなく, 予め明らかにされた感染時における標的臓器(腎臓, 肝臓)における病理組織学的変化を評価に加えたところ, 死亡が認められる以前に菌の侵襲状態の変化が観察され, 検出感度のよい方法であることが明らかとなった。また, 標的臓器における薬物に起因する変化も合わせて観察することで, 病理所見を評価の指標とすることで, 安全性と有効性を同時に評価することが可能となった。

低濃度の薬液を使用し24時間定常静脈内持続投与を行うことで, 薬物の血中濃度を一定状態に保つことが可能となり, 難溶性または半減期の短い薬物などを開発する際の*in vivo*評価系としても極めて有用であることを立証した。この方法は, 血中濃度を毒性発現用量以下, 有効量以上に保つことができ, 低用量の薬液で十分な曝露を与えることが可能になったため, 少量の薬物で試験を行わざるを得ない薬物の多い開発初期のスクリーニングとしても有用である。さらに静脈内持続投与により, 「薬効が認められかつ毒作用の認められない血中濃度」を保つことが可能となり, 毒性を軽減した状態で有効性を維持できることが確認されたため安全域の拡大を立証した。

確立された新評価法を用いて, 一般的に薬効評価に使用されるラット感染モデルにおける薬物の効果を比較し, あわせて薬物の血中濃度を確認した結果, WSAはAMPH-Bと比較して十分な薬効を認め, WSAのカンジタおよびアスペルギルス全身感染症にお

ける血漿中最小有効用量は 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と推定された。また、感染初期の薬物濃度が有効濃度に達しない場合は、十分な薬効が認められず、感染初期の血中濃度が抗真菌作用を示す上で重要であることが確認された。静脈内投与、経口投与でいずれの投与方法においても良好な血中濃度を示すことから、初めに静脈内持続投与方法を用いて、速やかに血中濃度を高め、その後は経口投与で血中濃度を維持していくという、より効果的な使用法も可能であることが確認された。

ヒトへの外挿を考慮した安全域の検討

WSA の安全域を以下のように考究した。

低濃度の薬液を 24 時間静脈内持続投与することにより曝露量を維持して投与を行った薬効薬理試験から、活性体の最小有効血中濃度は約 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された (Fig. 2-13)。毒性発現用量以下での濃度を持続し、 C_{max} を有効濃度以上ではあるが低く維持して投与を行った結果、50%致死量(LD_{50} 値)に近い高い用量の投与が可能となることが確認された。このことから、ヒトにおいても抗真菌薬の効果を期待する場合、有効濃度以上かつ毒性発現用量以下での濃度を持続し C_{max} を低い状態に保つことが望ましいと考えられた。

ヒトにおける安全性を予測する上で、サルにおける反復投与毒性試験の結果を活性体の血中濃度とあわせて精査するため、活性体の C_{max} および AUC と無毒性量、毒性量との関係を以下のように確認した (Table 3-4)。WSA の 2 週間静脈内持続投与での無毒性量は 10 mg/kg (C_{max} : 2.93 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AUC: 26.1 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)、毒性発現の境界値は 30 mg/kg (C_{max} : 9.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AUC: 113.4 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)、WSA の活性体の 2 週間経口投与では、無毒性量は 30 mg/kg (C_{max} : 1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AUC: 28.5 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)、毒性発現量は 90 mg/kg (C_{max} : 9.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AUC: 148.8 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)、WSA の 4 週間経口投与では、無毒性量は 10 mg/kg (C_{max} : 1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AUC: 19.5 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)、毒性発現量は 30 mg/kg (C_{max} : 5.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AUC: 65.8 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)であった。このサルにおける反復投与毒性試験の薬物動態から、毒性発現の境界値における WSA の活性体の C_{max} は、2 週間投与では約 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、特に AUC が 100 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ を越え

た場合、また4週間投与では C_{max} が約 $6 \mu\text{g/mL}$ 、AUC が $65 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ を超えた場合に毒性が発現することが判明した。

肝臓細胞におけるWSAの活性体の代謝率は、サルとヒトの比率が $1 : 0.34$ であった[21]。従って、ヒトではサルの約3倍排泄が遅くなると仮定できる。この結果およびサルを用いたWSAの2週間静脈内持続投与における無毒性量(10 mg/kg)投与時の血中活性体濃度推移をもとにヒトでの投与用量およびその血中濃度を算出する(Fig. 3-1)と、 C_{max} は $0.14 \mu\text{g/mL}$ 、AUCは $2.1 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ と考えられた。従って、有効濃度の $0.05 \mu\text{g/mL}$ を24時間維持するためには、2時間の静脈内持続投与の場合、ヒトでは 0.6 mg/kg/day 程度の投与で十分と考えられる。最も曝露量が高いため、他の投与経路に比較して低い用量から毒性が発現すると考えられる2週間静脈内持続投与におけるWSAの無毒性量 (10 mg/kg)を用いてその安全域の広さを比較したところ、その用量での C_{max} は $2.93 \mu\text{g/mL}$ であり、有効濃度($0.05 \mu\text{g/mL}$)と比較すると約60倍の値を示した。また、サルを用いた2週間経口投与試験においてWSAより低い用量で毒作用を認めた他のアゾール系薬物の臨床における有効濃度はKCZ: $2 (1.7\sim 3.6) \mu\text{g/mL}$ 、ICZ: $1\sim 2 \mu\text{g/mL}$ 、FCZ: $20 (17\sim 51) \mu\text{g/mL}$ であり、ICZ、FCZの臨床投与用量は $100\sim 200 \text{ mg/body}$ 、場合によっては効果を求めるため 400 mg/body 程度まで使用されている(KCZは日本での臨床適用は認められていない)[2, 31, 59]。しかし、WSAは、上記のように $0.05 \mu\text{g/mL}$ の活性体濃度で十分に効果が期待でき、ヒトでは、1日あたりのWSA投与用量は 0.6 mg/kg/day 、すなわち、 $30\sim 50 \text{ mg/body}$ 程度と予測される。従って、本薬物は、既存のアゾールに比較して低い投与量で薬効を発揮し(臨床用量で比較した場合: WSAは他の薬物の $1/3\sim 1/15$ 程度)、かつ薬効は低い血中濃度で認められ(有効濃度で比較した場合: $1/20\sim 1/1000$)、さらに毒性はより高い用量(サルの2週間経口投与試験の毒性発現用量で比較した場合: 6倍程度)でのみ確認されるという極めて安全域の広い薬物であることが示された。

第4章 結論

水溶性プロドラッグである新規アゾール系薬物，WSA の静脈内持続投与方法による安全性と有効性について検討した結果，以下に示す結果が得られ有用性が立証された。

1. 既存のアゾール系薬物 (Ketoconazole, Itraconazole, Flucanazole など) と質的には同様の毒性，すなわち肝臓および内分泌系を中心とした毒作用が WSA でも認められたものの，既存の薬物に比較しその毒作用は極めて軽度であり，結果としてホルモン系への影響も軽減化され，より広い安全域が認められた。いずれの投与経路においても肝臓，内分泌系(主に副腎)の変化，およびこれらの変化に起因する二次的な変化以外には著変は認められず，新たな毒作用は認められなかった。
2. WSA は経口，静脈内いずれの投与においても速やかに活性体に変換され，活性体の半減期も長く，また両経路とも良好な薬効を示すことが立証された。それ故，経口，静脈内，いずれの適用も可能で，しかも 1 日 1 回の投与で十分な効果が期待できる事を立証した。さらに，静脈内投与および経口投与を組み合わせたより効果的な使用法も可能であることを立証した。
3. 静脈内持続投与により，毒作用血中濃度域と薬効血中濃度域が明確に分別できることが確認できた。この結果，静脈内持続投与は，薬効が認められかつ毒作用の認められない血中濃度を保つための有用な適用方法であることを証明した。また，WSA の静脈内持続投与は，既存の抗真菌薬と比較してより低い用量レベルで有効性を維持し，さらに毒性を軽減でき，安全域の拡大が示唆された。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、終始御指導、御鞭撻を賜りました麻布大学獣医学部薬理学研究室の赤堀文昭教授、麻布大学獣医学部衛生学第2研究室の福安嗣昭教授、麻布大学獣医学部微生物学第2研究室の木内明男教授、日本ロシユ研究所前臨床科学研究部前部長の堀井郁夫博士に謹んで感謝の意を表します。また、さまざまな協力をいただいた日本ロシユ研究所主幹研究員の市原茂泰博士、主任研究員の川島明氏、山崎敏和氏、中野康之亮氏、主席研究員の滝沢節子博士、研究員の猪又晃氏および日本ロシユ研究所前臨床科学研究部の皆様に御礼申し上げます。

引用文献

- 1 Awouters, F., Niemegeers, C.J.E. and Janssen, P.A.J.: Interference of antimycotics and other drugs with methohexital hypnosis in rats. *Drug Dev. Res.*, 16, 85-91, 1989.
- 2 Bodey, G.P.: Azole antifungal agents. *Clin. Infect. Dis.*, 14 (Suppl 1), S161-169, 1992.
- 3 Bossche, H.V., Marichal, P., Gorrens, J., et al.: Mutation in cytochrome P-450-dependent 14 α -demethylase results in decreased affinity for azole antifungals. *Biochem. Soc. Trans.*, 18, 56-59, 1990.
- 4 Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
- 5 Buchi, K.N., Gray, P.D. and Tolman, K.G.: Ketoconazole hepatotoxicity: an in vitro model. *Biochem. Pharmacol.*, 35, 2845-2847, 1986.
- 6 Cummings, A.M., Hedge, J.L. and Laskey, J.: Ketoconazole impairs early pregnancy and the decidual cell response via alterations in ovarian function. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 40, 238-246, 1997.
- 7 Damanhour, Z., Gumbleton, M., et al. : *In-vivo* effects of itraconazole on hepatic mixed-function oxidase. *J. Antimicrobial. Chem.*, 21, 187-194, 1988.
- 8 Davey, P.G.: New antiviral and antifungal drugs. *BMJ*, 300, 793-798, 1990.
- 9 De Beule, K. and Van Gestel, J: Pharmacology of Itraconazole. *Drugs*, 61 (Suppl.1), 27-37, 2001.
- 10 De Coster, R., Beerens, D., et al.: Effects of itraconazole on the pituitary-testicular – adrenal axis; an overview of preclinical and clinical studies. In *Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents* (Fromtling, R. A., ed.), pp251-261, J.R. Prous Science Publisher, S.A., Barcelona, 1987.
- 11 Esclade, L., Guillochon, D. and Thomas, D.: Determination of metabolites of cytochrome P-450 model systems using high-performance liquid chromatography. *J.*

- Chromatogr., 341, 373-382, 1985.
- 12 Gallis, H.A., Drew, R.H. and Pickard, W.W.: Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Reviews of infectious diseases*, 12, 308-329, 1990.
 - 13 Ghannoum, M.A. and Rice, L.B.: Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 501-517, 1999.
 - 14 Green, P.G. and Patten, D.: Femoral cannulation using the jacket/harness model in the rat. In *Handbook of preclinical continuous intravenous infusion* (Healing, G. and Smith, D., eds.), pp7-19, Taylor & Francis, London and New York, 2000.
 - 15 浜本恒男：新しい抗菌薬の特徴と使用上の留意点－抗真菌薬. *Prog. Med.*, 15, 575 - 579, 1995.
 - 16 Hansten, P.D., 菅家甫子：臨床で重要な薬物相互作用. *月刊薬事*, 43, 1249-1254, 2001
 - 17 Heykants, J., Michiels, M., Meuldermans, W., et al.: The pharmacokinetics of itraconazole in animals and man; an overview. In *Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents* (Fromtling, R.A., ed.), 223-249, J.R. Prous Science Publ., S.A., Barcelona, 1987.
 - 18 Heykants, J., Van Peer, A., Van de Velde, V., et al.: The clinical pharmacokinetics of itraconazole : An overview. *Mycoses*, 32 (Suppl 1), 67-87, 1989
 - 19 Hitchcock, C.A., Pye, G.W., Troke P.F., et al.: Fluconazole resistance in candida glabrata. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, 1962-1965, 1993.
 - 20 Hitchcock, C.A., Barrett-Bee, K.J. and Russell, N.J.: Inhibition of 14 α -sterol demethylase activity in candida albicans. *Sabouraudia, J. Med. Vet. Mycol.*, 22, 53-63, 1984.
 - 21 Horii, I, Ogawa, K., and Ichihara, S.: In vitro metabolism of Ro 09-4815 using cryopreserved hepatocytes and liver microsomes of rats, monkey and human. Roche Research Report, J-0146998, 2000.

- 22 Horii, I.: Jugular cannulation and efficacy studies in the mouse. In Handbook of preclinical continuous intravenous infusion (Healing, G. and Smith, D., eds.), pp81-91, Taylor & Francis, London and New York, 2000.
- 23 伊藤 章：抗真菌剤選択と中止変更の指標. 医学のあゆみ, 154, 349-354, 1990.
- 24 伊藤 章：特集 抗菌薬と耐性菌 - 抗真菌薬. 月刊薬事, 41, 1831-1835, 1999
- 25 Karanam, B.V., Vincent, S.H. and Lee Chiu, S.H.: FK506 Metabolism in human liver microsomes: Investigation of the involvement of cytochrome P450 isozymes other than CYP3A4. Drug Metab. Dispos., 22, 811-814, 1994
- 26 Kaufmann, I., Junginger, H., et al.: Less inhibition of liver and cutaneous P-450 activity by itraconazole than by ketoconazole and clotrimazole - I. Clin. Exper. Dermatol., 12, 151, 1987.
- 27 Keim, JR. G.R., Sibley, P.L., Yoon, Y.H., et al.: Comparative toxicological studies of amphotericin B methyl ester and amphotericin B in mice, rats, and dogs. Antimicrob. Agents and Chemother., 10, 687-690, 1976.
- 28 Kerridge, D., Fasoli, M. and Wayman, F.J.: Drug resistance in *candida albicans* and *candida glabrata*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 544, 245-259, 1988.
- 29 Kerridge, D.: Polyene macrolide antibiotics. In Aspergillus and Aspergillosis (Vanden Bossche, H., et al., eds.), 147-160, Plenum Press, New York, 1988.
- 30 北島康雄：病原性真菌の構造構築と生化学的特性：細胞壁，脂質と二形成，抗真菌剤の作用点. Jpn. J. Med. Mycol., 41, 211-217, 2000.
- 31 Kobayashi, K., Horii, I, Arisawa M., et al.: Investigator's brochure - Ro 09-8557, Roche Internal Report, 2001.
- 32 Kobayashi, K., Kamenoso, T., Horii, I., et al.: General Pharmacology of Ro 09-8557, Roche Research Report, J-146965, 2001.
- 33 河野茂：Compromised host における深在性真菌症. Jpn. J. Med. Mycol., 41, 71-76, 2000.

- 34 Langston, J.D., Wasan, K.M., Lopez-Berestein, G., et al.: Evaluation of Amphotericin B-cyclosporine interaction in the rat, *Transplantation*, 50, 506-510, 1990.
- 35 Lavrijsen, K., Van Houdt, J., Thijs, D., et al.: Interaction of miconazole, ketoconazole and itraconazole with rat-liver microsomes. *Xenobiotica*, 17, 45-57, 1987.
- 36 前崎繁文, Mohammad Ashraf Hossain, 佐々木英祐 他: 全身性抗真菌薬の展望—非アゾール系抗真菌薬. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 40, 157-161, 1999.
- 37 McLachlan, A.J. and Tett, S.E: Effect of metabolic inhibitors on cyclosporine pharmacokinetics using a population approach. *Ther. Drug Monit.*, 20, 390-395, 1998.
- 38 Medoff, G.: The mechanism of action of amphotericin. In *Aspergillus and aspergillosis* (Vanden Bossche, H., et al. Eds.), pp161-164, Plenum Press, New York, 1998.
- 39 Mendenhall, V., Cornell, S. and Scalero, A.M.: Surgical preparation and infusion of the large primate. In *Handbook of pre-clinical continuous intravenous infusion* (Healing, G. and Smith, D., eds.), pp 163-180, Taylor & Francis, London and New York, 2000.
- 40 Meschter, C.L., Mico, B.A., Mortillo, M., et al.: A 13-week toxicologic and pathologic evaluation of prolonged cytochromes P450 inhibition by 1-aminobenzotriazole in male rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 22, 369-381, 1994.
- 41 Miedel, S. E.: Tethering and the implanted button model in the rat. In *Handbook of preclinical continuous intravenous infusion* (Healing, G. and Smith, D.), pp26-30, Taylor & Francis, London and New York, 2000.
- 42 森田達也, 野澤義則: 抗真菌剤の作用機序. *臨床検査*, 35, 828-834, 1991.
- 43 中島茂: 作用機序から眺めた抗真菌薬の現状と展望. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 40, 119-123, 1999.
- 44 Nakano, K., Onodera, H., Shindoh, H., et al.: Validation of the assay for the

- quantitative determination of Ro 09-8557 (prodrug), Ro 09-4815 (active metabolite) and Ro 09-8728 (pro-moiety) in rat and monkey plasma by ion spray LC/MS/MS. Roche Research Report J-1 46' 977, 2000.
- 45 Netter, K.N. and Seidel, G.: An adaptively stimulated O-demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 146, 61-65, 1964.
- 46 二木芳人, 中島正光, 松島敏春: 全身用抗真菌薬の展望 —アゾール系抗真菌薬—. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 40, 163-168, 1999.
- 47 西川智, 原卓司, 宮崎英治 他: KW-1414 の安全性に関する研究 (第 1 報) マウス, ラットにおける急性毒性試験およびラット経口投与における亜急性, 慢性毒性試験. *基礎と臨床*, 18, 1401-1425, 1984.
- 48 西川智, 原卓司, 宮崎英治 他: KW-1414 の安全性に関する研究 (第 3 報) 生殖に及ぼす影響に関する試験. *基礎と臨床*, 18, 1433-1448, 1984.
- 49 Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes II. Solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 239, 2379-2385, 1964.
- 50 Patricia E Bayer, Neil Chernoff: The induction of Supernumerary ribs in rodents, Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 6, 419-429, 1986
- 51 Pichard, L., Fabre, I., Fabre, G., et al.: Cyclosporin A drug interactions - Screening for inducers and inhibitors of cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) in primary cultures of human hepatocytes and in liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, 18, 595-606, 1990
- 52 Piddington, R., Herold, R. and Goldman, S. A.: Further evidence for a role of arachidonic acid in glucocorticoid teratogenic action in the palate (41745), *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 174, 336-342, 1983.
- 53 Polak, A.: Mode of action studies. In *Chemotherapy of fungal diseases* (Ryley, J.F.

- ed.), pp153-182, Springer-Verlag, Berlin, 1990.
- 54 Polak, A. and Hartman, P.G. : Antifungal chemotherapy - Are we winning?. *Prog. Drug Res.*, 37, 181-269, 1991.
- 55 Rodriguez, R. J. and Acosta, D. : Comparison of ketoconazole- and fluconazole-induced hepatotoxicity in a primary culture system of rat hepatocytes. *Toxicology*, 96, 83-92, 1995.
- 56 Saag, M.S. and Dismukes, W.E.: Azole antifungal agents: Emphasis on new triazoles. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32, 1-8, 1988.
- 57 柴田敏之, 奥村勝彦: アゾール系抗真菌薬と他剤との相互作用. *薬局*, 50, 2155-2158, 1999.
- 58 Sawyer, P.R., Brogden, R.N., Pinder, R.M., et al.: Miconazole: A review of its antifungal activity and therapeutic efficacy. *Drugs*, 9, 406-423, 1975.
- 59 Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A. and Sibley, C.M.: Current and emerging azole antifungal agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 40-79, 1999.
- 60 Shindoh, H., Ichihara, S. and Horii, I.: CYP inhibition study of Ro 09-4815 and Ro 09-8728 against Human CYP isoforms using HT-SPE-LC/MS/MS method. Roche Research Report, J-0146972, 2000.
- 61 Smith, D.A., Ackland, M.J. and Jones, B.C.: Properties of cytochrome P450 isoenzymes and their substrates Part 2: properties of cytochrome P450 substrates. *DDT*, 2, 479-486, 1997.
- 62 Sonderfan, A.J., Arlotto, M.P., Dutton, D.R., et al.: Regulation of testosterone hydroxylation by rat liver microsomal cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.*, 255, 27-41, 1987.
- 63 Tachibana, M., Noguchi, Y. and Monroe, A.M.: Toxicology of fluconazole in experimental animals. In *Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents* (Fromtling, R.A., ed.), pp93-101, J.R. Prous Science Publishers, S.A., Barcelona, 1987.

- 64 Tassaneeyakul, W., Birkett, D.J. and Miners, J.O.: Inhibition of human hepatic cytochrome P4502E1 by azole antifungals, CNS-active drugs and non-steroidal anti-inflammatory agents. *Xenobiotica*, 28, 293-301, 1998.
- 65 Tzortzatou, G.G., et al.: Evidence for a role of arachidonic acid in glucocorticoid - induced cleft palate in rats. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 166, 321-324, 1982.
- 66 上野和行:薬物の体内動態 7 薬物の代謝; CYP の特徴と考え方. 月刊薬事, 42, 2883-2912, 2000.
- 67 上野和行:薬物の体内動態 10 薬物代謝に関する相互作用の考え方. 月刊薬事, 43, 113-120, 2001.
- 68 上野和行:薬物の体内動態 11 薬物代謝に関する相互作用の考え方 - その2. 月刊薬事, 43, 311-319, 2001.
- 69 Van Cauteren, H., Lampo, A, 小山薫 他: 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.
- 70 Van Cauteren, H., Heykants, J., DeCoster, R., et al: Itraconazole: Pharmacologic studies in animals and humans. *Reviews of infectious disease*, 9 (Suppl. 1), S43-46, 1987.
- 71 Van Cauteren, H., Coussement, W., Vandenberghe, J., et al.: The toxicological properties of itraconazole. In *Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents* (Fromtling, R.A., ed.), pp263-271, J.R. Prous Science Publishers, S.A., Barcelona, 1987.
- 72 Van Cauteren, H., Lampo, A., Vandenberghe, J., et al.: Toxicological profile and safety evaluation of antifungal azole derivatives. *Mycoses*, 32 (Suppl. 1), 60-66, 1989.
- 73 Van Cauteren, H., Lampo, A., Vandenberghe, J., et al.: Safety aspects of oral antifungal agents. *Br. J. Clin. Pract. Suppl.*, 71, 47-49, 1990.
- 74 Walker, D. M.: Multidose infusion toxicity studies in the large primate. In *Handbook*

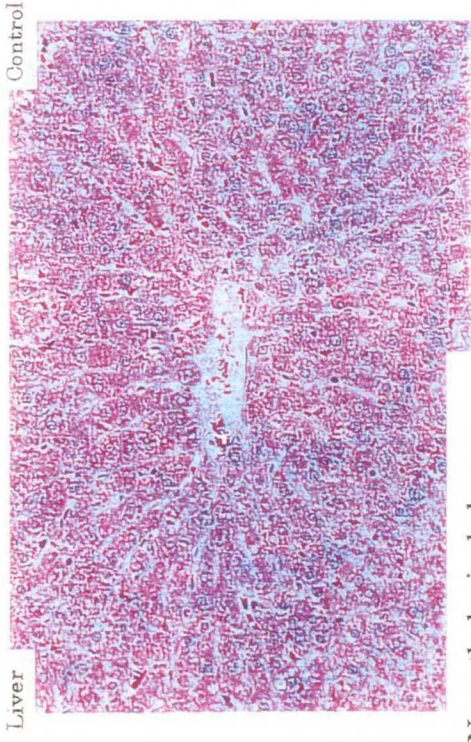
of preclinical continuous intravenous infusion (Healing, G. and Smith, D., eds.), pp182-209, Tylor & Francis, London and New York, 2000.

- 75 山口英世 他：真菌症の化学療法. 病原真菌学 (山口英世, 宮地誠, 西村和子 編), pp 319-354, 南山堂, 東京, 1987.
- 76 山口英世：抗真菌剤—開発の現況と今後の動向—. 医学のあゆみ, 154, 304-308, 1990.
- 77 山口英世：抗真菌薬の耐性機構. 臨床と微生物, 22, 575-581, 1995.
- 78 山口英世：深在性真菌症治療の新たな展開. Jpn. J. Med. Mycol., 41, 221-228, 2000.
- 79 Yamazaki, T., Tsukaguchi, M., Arisawa M., et al.: In vitro activity of Ro 09-8557, a new water-soluble triazole, against clinical important fungi and its efficacy in animal models. Roche Research Report, J-0147002, 2000.
- 80 吉田雄三：アゾール系抗真菌剤の標的としてのチトクロム P-450. 薬物動態, 2, 563-571, 1987.
- 81 吉村功, 大橋靖雄, 滝沢毅 他：多重比較法. 毒性試験データの統計解析 (吉村功, 大橋靖雄 編) pp95-112, 地人書館, 東京, 1992.
- 82 吉村功, 大橋靖雄, 滝沢毅 他：LD₅₀などの推定. 毒性試験データの統計解析 (吉村功, 大橋靖雄 編) pp135-145, 地人書館, 東京, 1992.

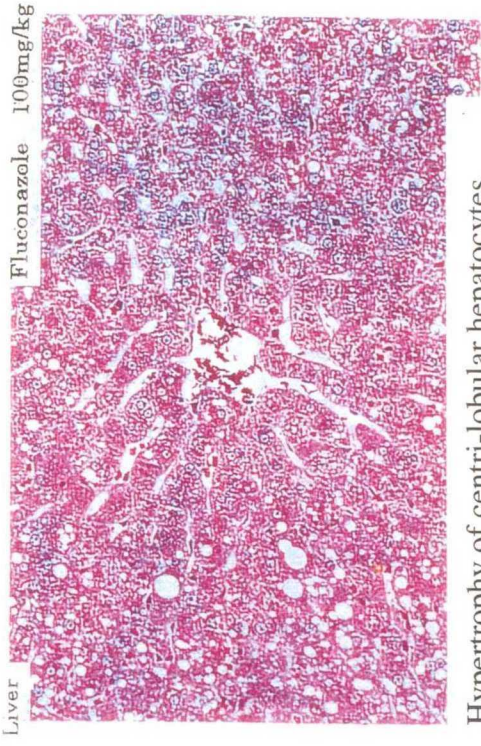
FIGURES

FIG. 1-1:	HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN 2-WEEK ORAL TOXICITY STUDY OF FLUCONAZOLE IN RATS	89
FIG. 2-1:	CHEMICAL STRUCTURES OF WSA AND THE ACTIVE BODY OF WSA	90
FIG. 2-2:	METABOLIC PATHWAY OF WSA IN THE PLASMA	90
FIG. 2-3:	PLASMA LEVEL PROFILE OF ACTIVE BODY AFTER ORAL (WITH FOOD) ADMINISTRATION OF WSA TO MONKEYS AT A DOSE OF 3 MG/KG	91
FIG. 2-4:	PLASMA LEVEL PROFILES OF WSA, ACTIVE BODY AND PRO-MOIETY AFTER ADMINISTRATION OF WSA TO RATS	92
FIG. 2-5:	PLASMA LEVEL PROFILES OF WSA, ACTIVE BODY AND PRO-MOIETY AFTER ADMINISTRATION OF WSA TO MONKEYS AT A DOSE OF 3 MG/KG	92
FIG. 2-6:	SUGGESTED METABOLIC PATHWAY OF WSA IN THE PLASMA OF RAT, MONKEY AND HUMAN	93
FIG. 2-7:	IN VITRO PLASMA CONVERSION OF WSA TO ACTIVE BODY IN RATS, MONKEYS AND HUMAN	94
FIG. 2-8:	IN VITRO PLASMA CONVERSION OF WSA TO ACTIVE BODY AND PRO-MOIETY IN HUMAN	94
FIG. 2-9:	PLASMA LEVEL PROFILE OF CONTINUOUS INTRAVENOUS INFUSION (24 HOURS/DAY)	95

FIG. 2-10:	HISTOPATOLOGICAL CHANGES IN SYSTEMIC CANDIDIASIS USING A MOUSE CONTINUOUS INTRAVENOUS INFUSION MODEL	96
FIG. 2-11:	HISTOPATOLOGICAL CHANGES IN SYSTEMIC CANDIDIASIS USING A MOUSE CONTINUOUS INTRAVENOUS INFUSION MODEL	97
FIG. 2-12:	EFFICACY OF WSA AGAINST RAT SYSTEMIC CANDIDIASIS AND ASPERGILLOSIS BY USING I.V. INFUSION MODEL	98
FIG. 2-13:	ACTIVE BODY LEVEL IN PLASMA DURING CONSTANT INFUSION OF WSA IN SYSTEMIC CANDIDIASIS RATS OR ASPERGILLOSIS RATS	98
FIG. 3-1:	ESTIMATION OF SAFETY INDEX	99



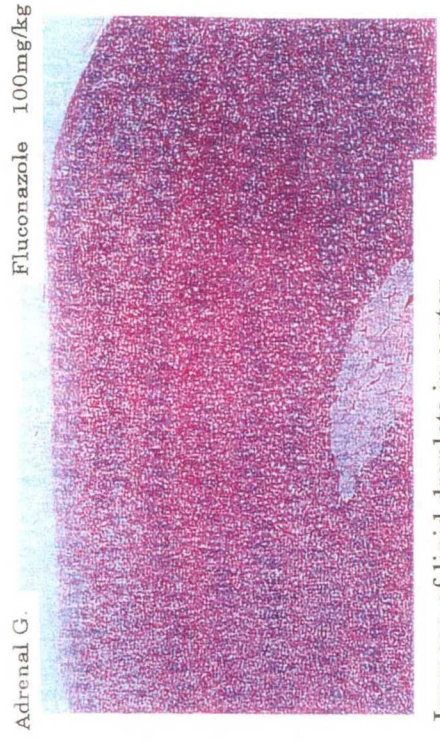
No pathological change



Hypertrophy of centri-lobular hepatocytes
Fatty change of mid-lobular hepatocytes



No pathological change



Increase of lipid droplets in cortex

Fig. 1-1. Histopathological changes in 2-week oral toxicity study of fluconazole in rats

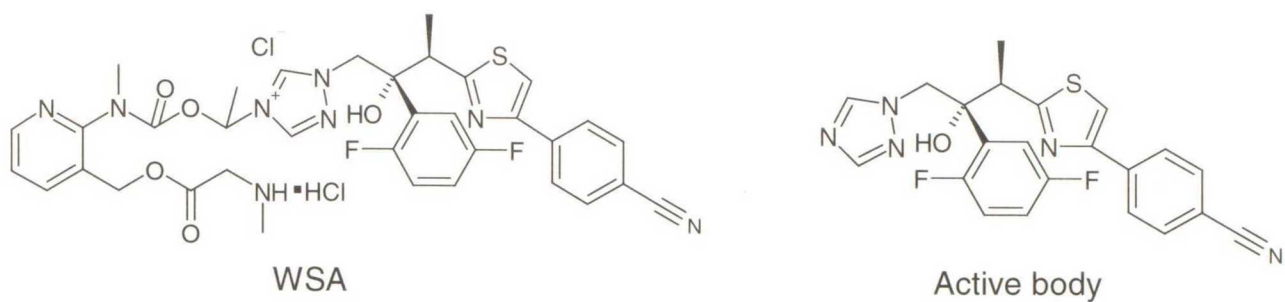


Fig 2-1: Chemical structures of WSA and the active body of WSA

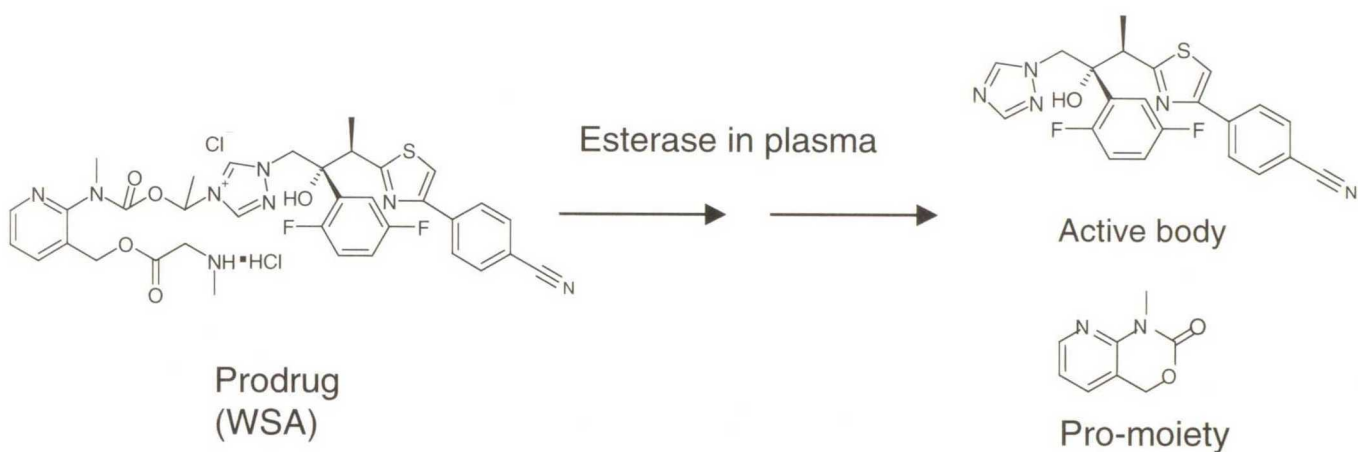


Fig 2-2: Metabolic pathway of WSA in the plasma

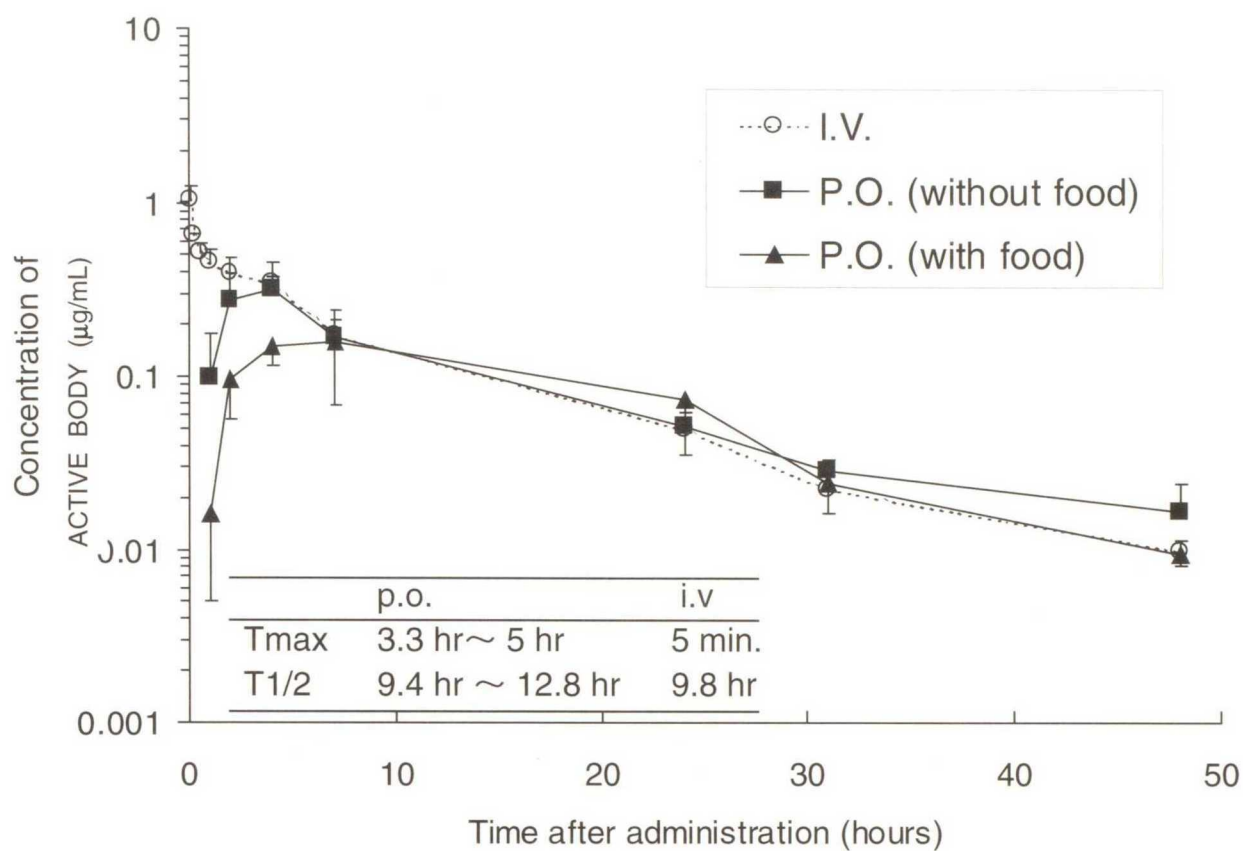


Fig. 2-3: Plasma level profile of active body after oral (with food) administration of WSA to monkeys at a dose of 3 mg/kg

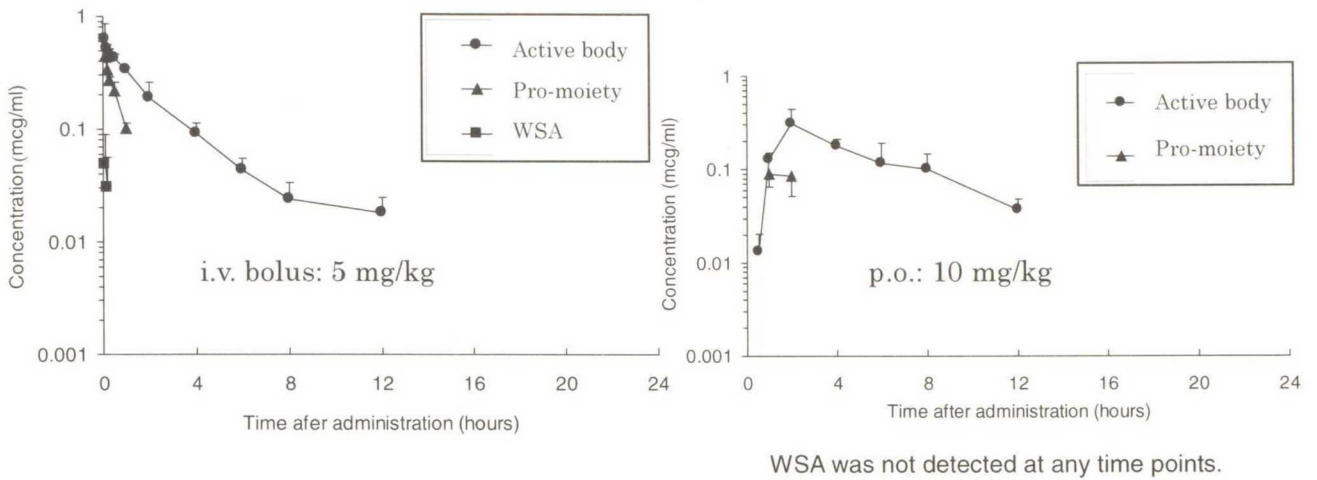


Fig.2-4: Plasma level profiles of WSA, active body and pro-moiety after administration of WSA to rats

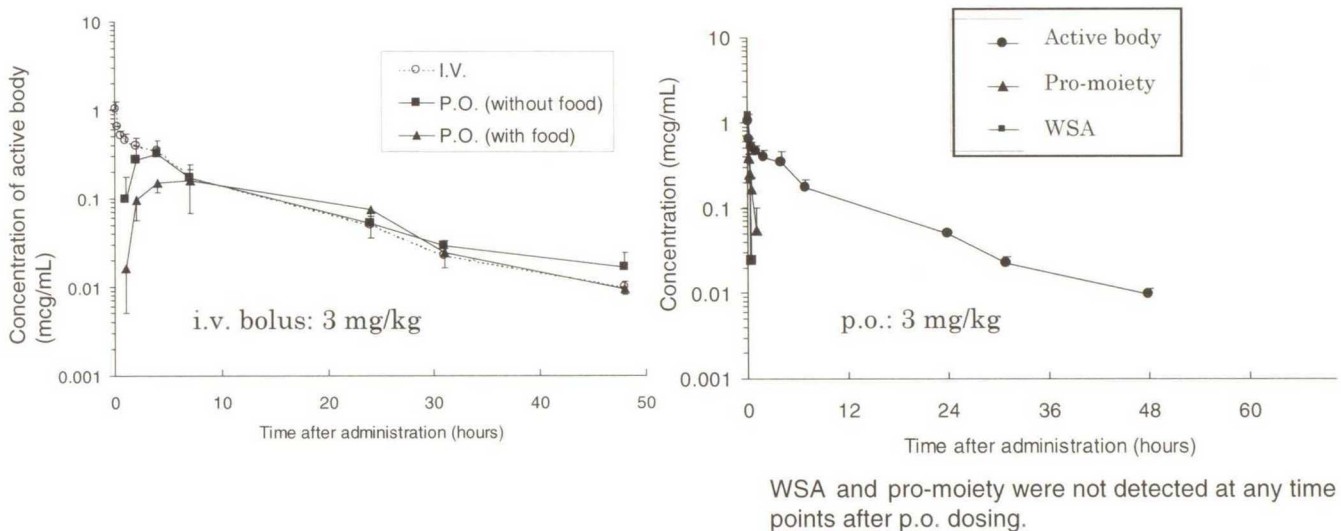


Fig.2-5: Plasma level profiles of WSA, active body and pro-moiety after administration of WSA to monkeys at a dose of 3 mg/kg

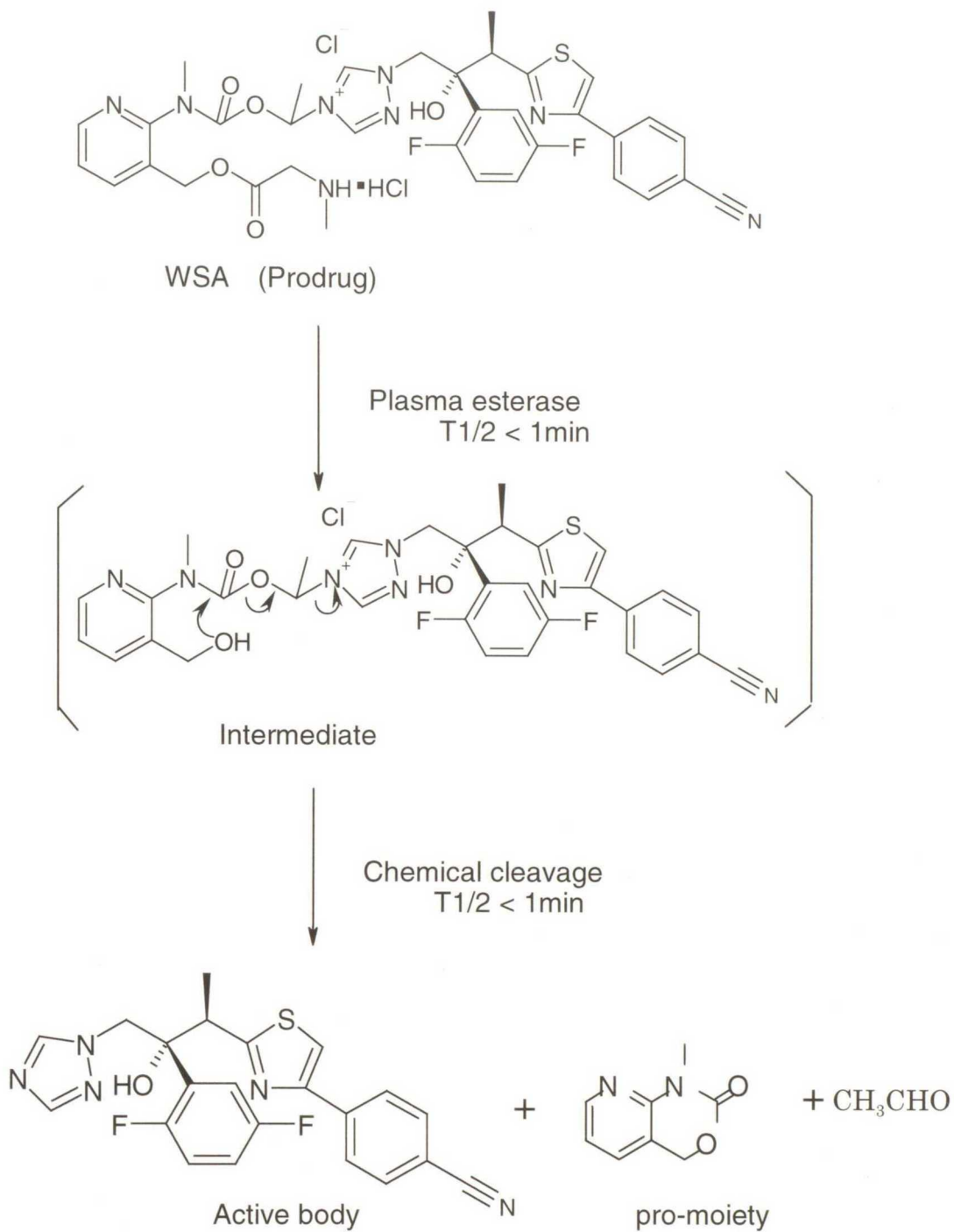


Fig. 2-6: Suggested metabolic pathway of WSA in the plasma of rat, monkey and human.

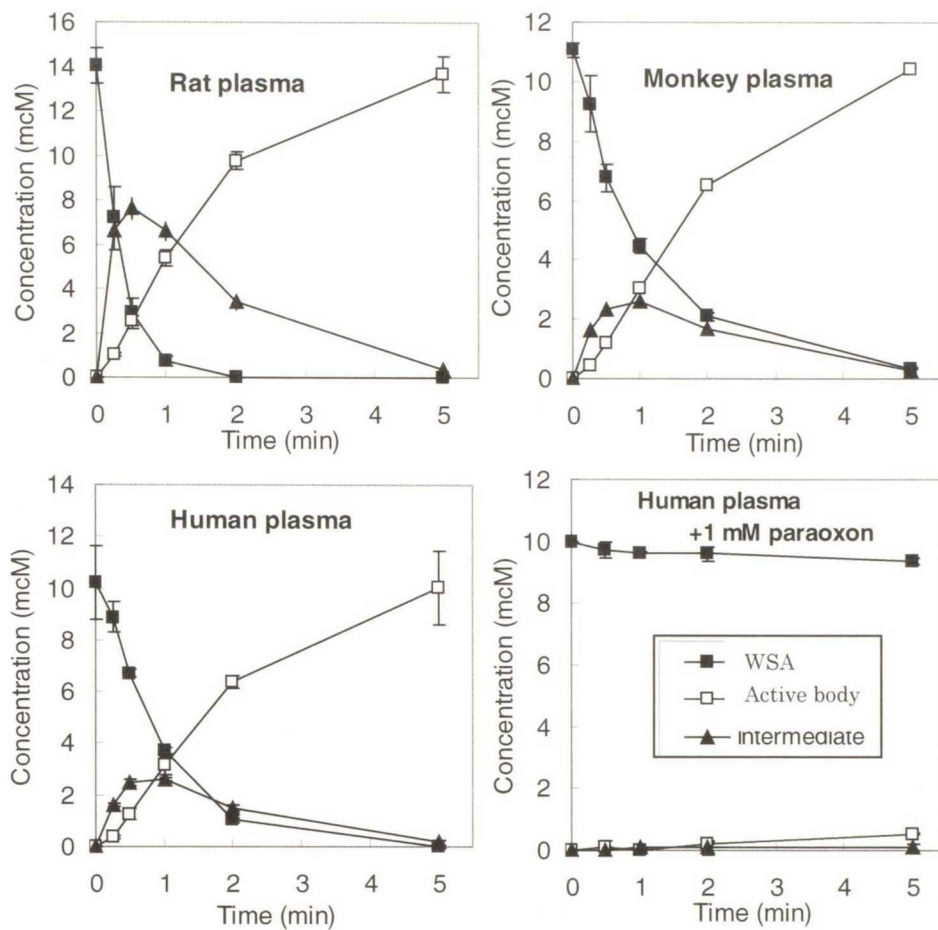


Fig. 2-7: *In vitro* plasma conversion of WSA to active body in rats, monkeys and human

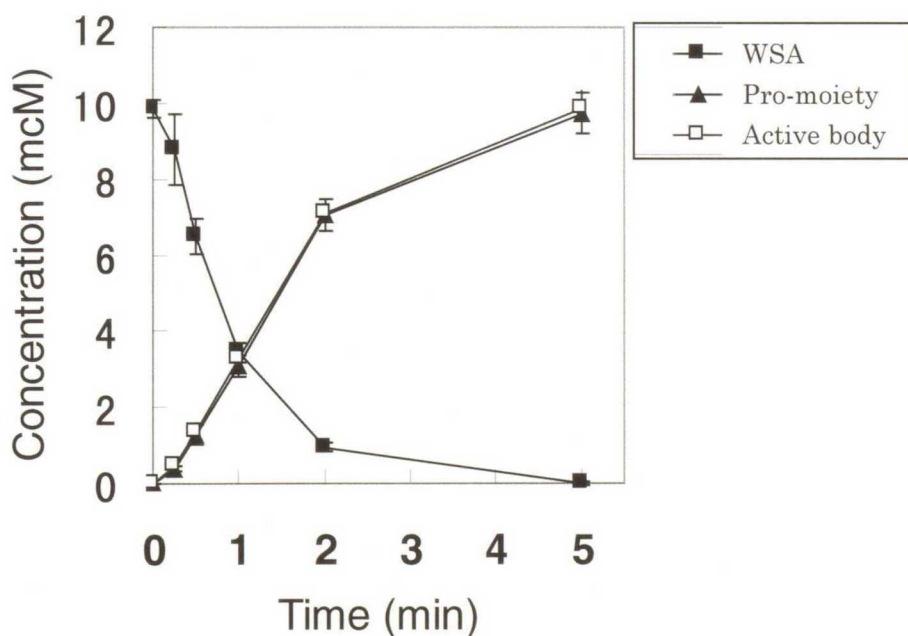
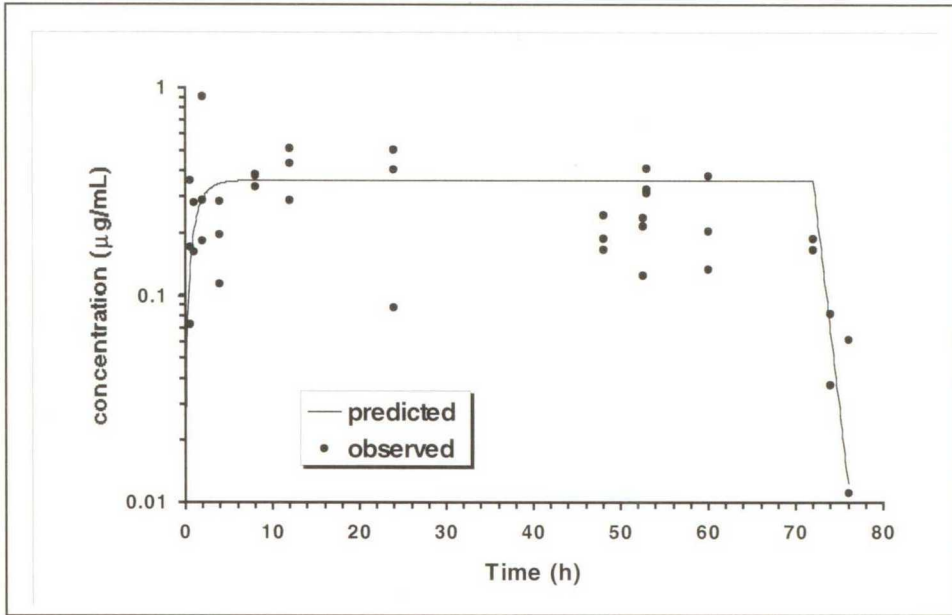
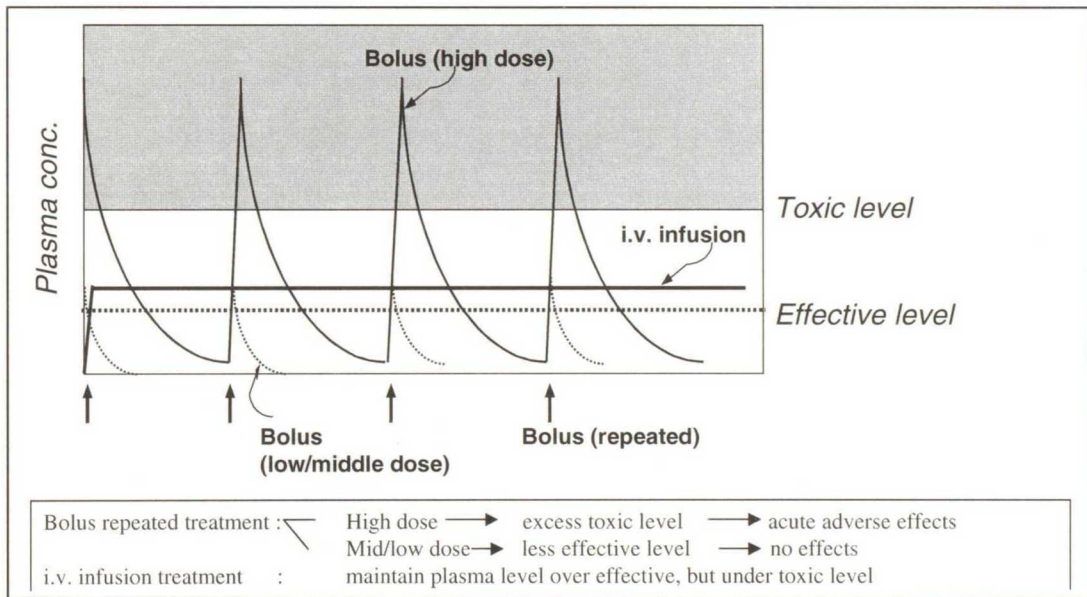


Fig.2-8: *In vitro* plasma conversion of WSA to active body and pro-moiety in human



A: Plasma level profile of itraconazole during continuous intravenous infusion (24 mg/kg/day) in male mice



B: Maintenance of effective plasma level with continuous intravenous infusion in disease animal model

Fig.2-9: Plasma level profile of continuous intravenous infusion (24 hours/day)

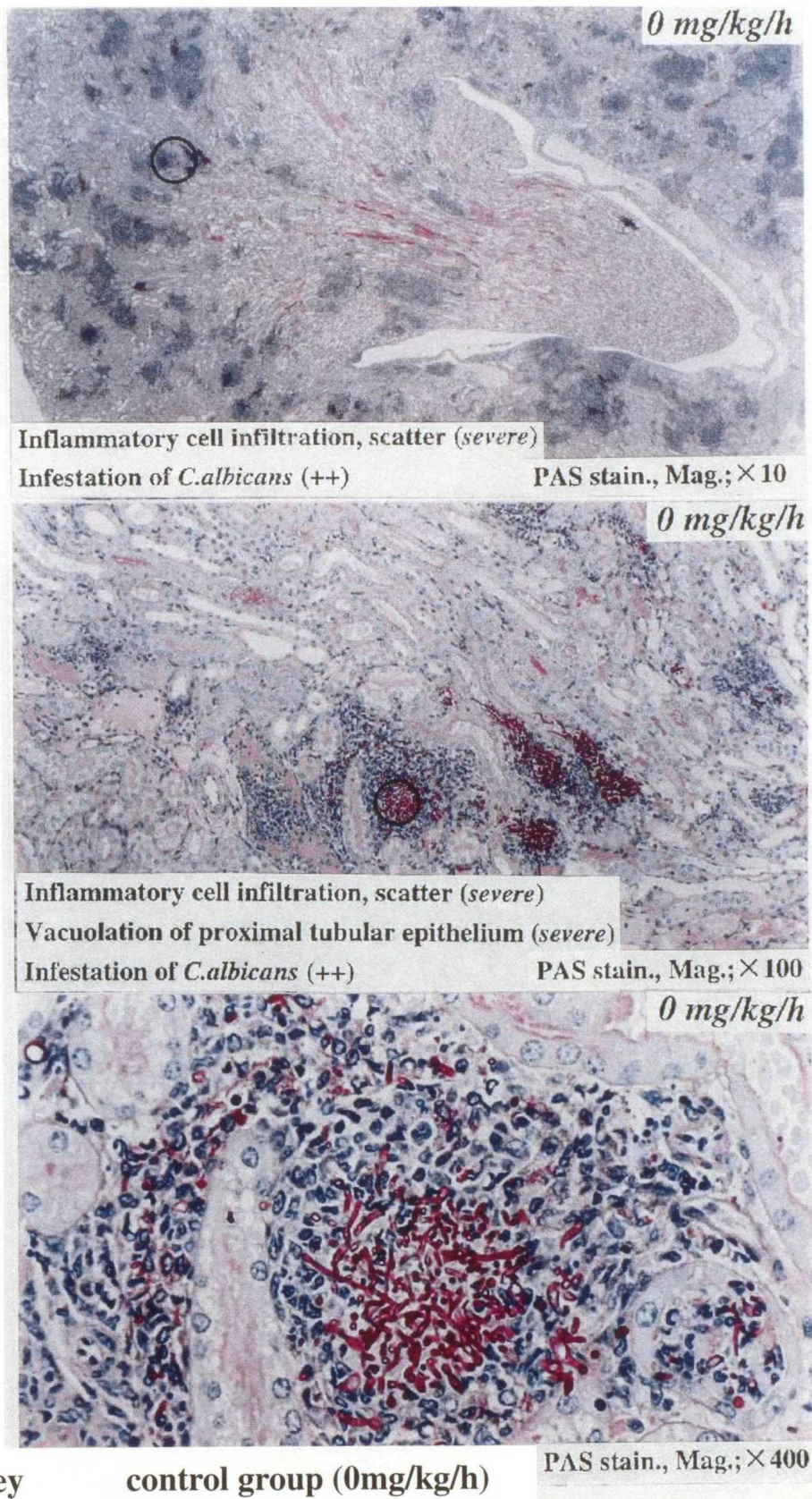
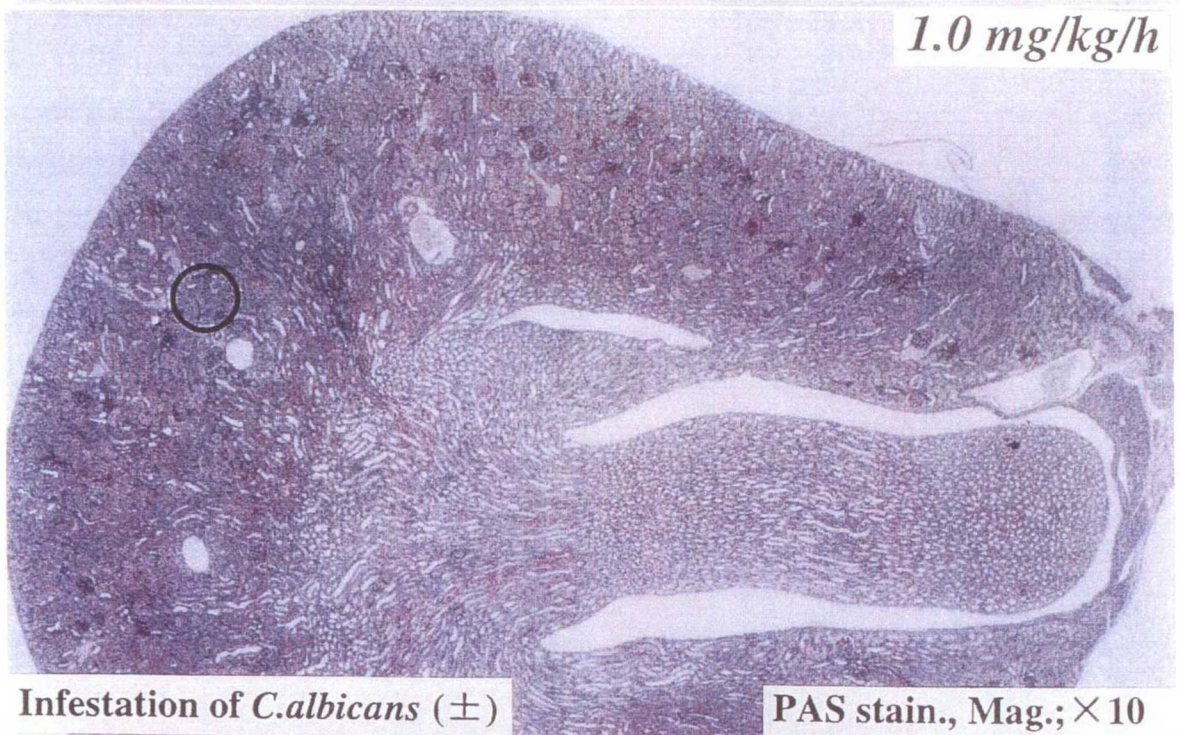
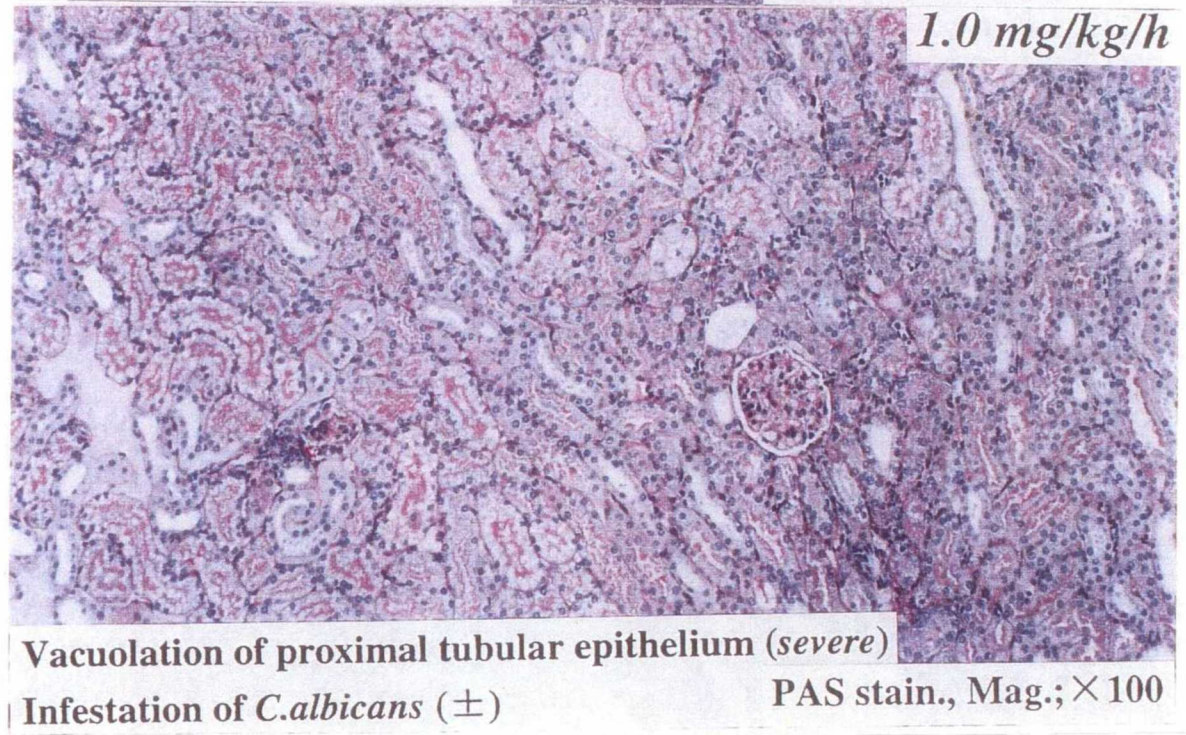


Fig. 2-10: Histopathological changes in systemic candidiasis using a mouse continuous intravenous infusion model



Infestation of *C.albicans* (\pm)

PAS stain., Mag.; $\times 10$



1.0 mg/kg/h

Vacuolation of proximal tubular epithelium (*severe*)

Infestation of *C.albicans* (\pm)

PAS stain., Mag.; $\times 100$

Kidney

Itraconazole 24 mg/kg/day group (1 mg/kg/h)

Fig. 2-11: Histopathological changes in systemic candidiasis using a mouse continuous intravenous infusion model

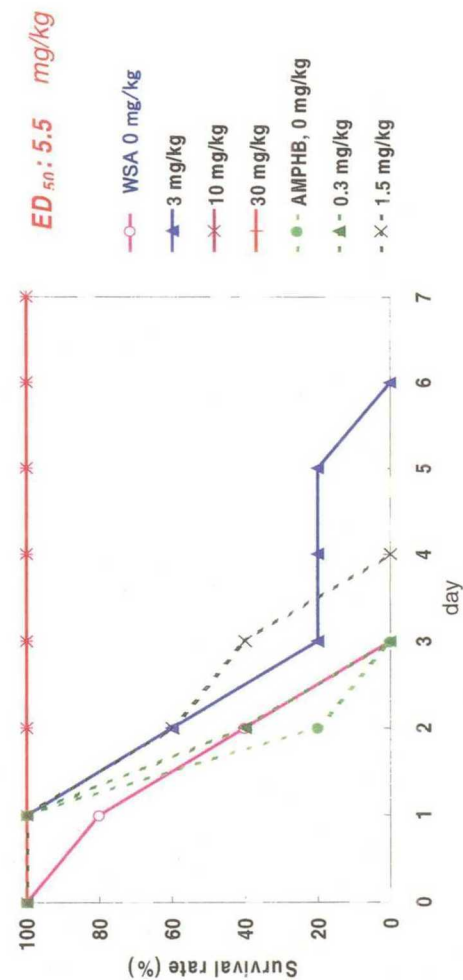


Fig.2-12: Efficacy of WSA against rat systemic candidiasis and aspergillosis by using i.v. infusion model

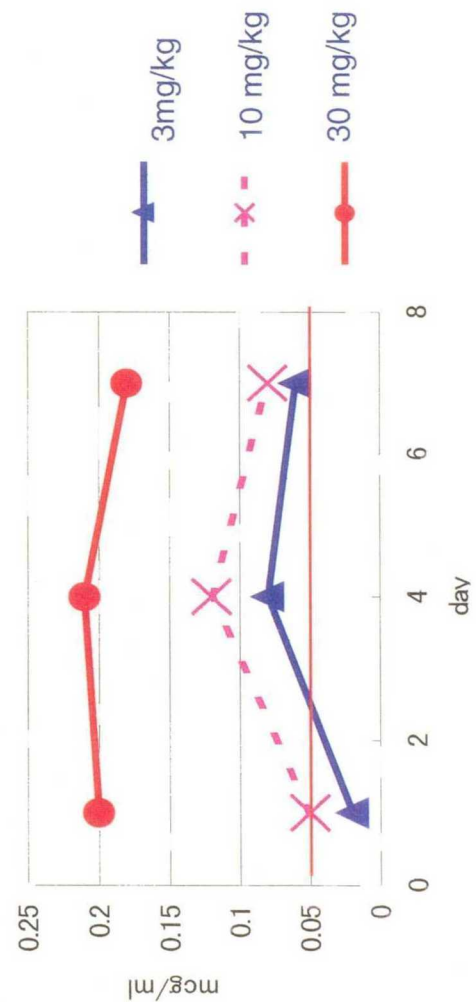
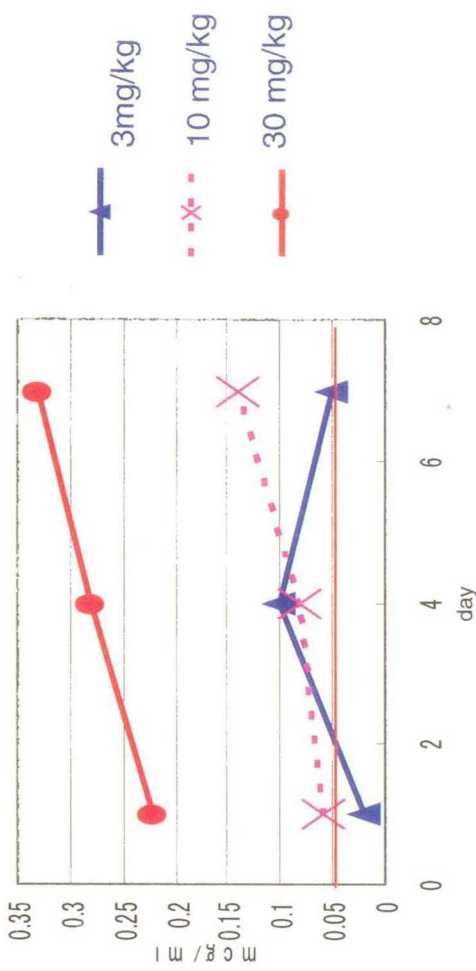
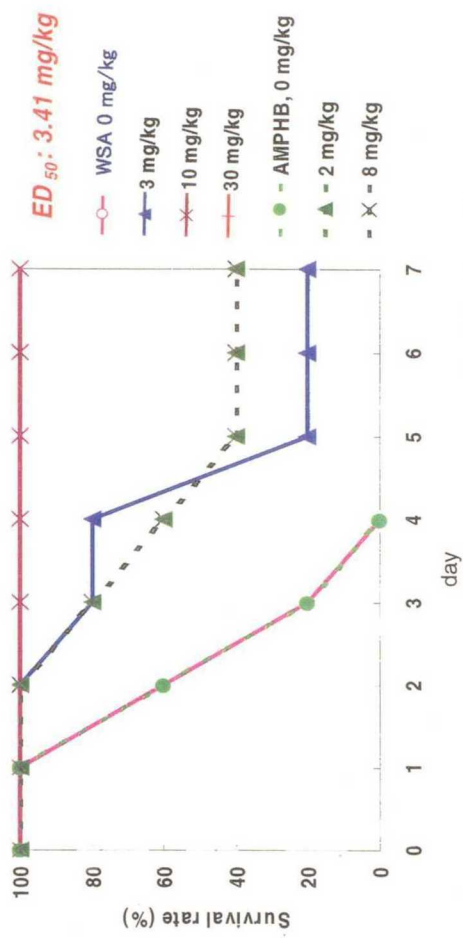
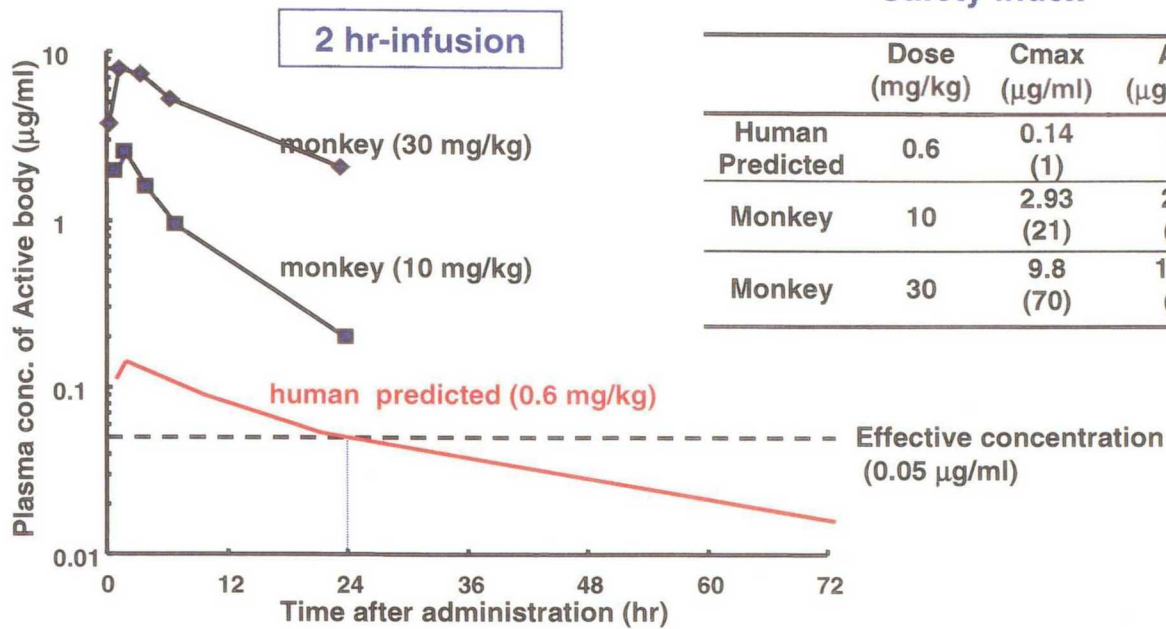


Fig.2-13: Active body level in plasma during constant infusion of WSA in systemic candidiasis rats or aspergillosis rats





Plasma concentration of active body after intravenous infusion of WSA

Fig. 3-1: Estimation of safety index

TABLES

TABLE 1-1:	OVERVIEW OF TOXICITY STUDIES OF EXISTING ANTIFUNGAL DRUGS	100
TABLE 1-2:	STATISTICAL METHODS	101
TABLE 1-3:	TWO-WEEK ORAL TOXICITY STUDY OF FLUCONAZOLE IN RATS (TEST 1)	102
TABLE 1-4:	TWO-WEEK ORAL TOXICITY STUDY OF FLUCONAZOLE IN RATS (TEST 2)	103
TABLE 1-5:	TWO-WEEK ORAL TOXICITY STUDY OF FLUCONAZOLE IN RATS (TEST 3)	104
TABLE 1-6:	FOUR-WEEK ORAL TOXICITY STUDY OF FLUCONAZOLE IN RATS	105
TABLE 1-7:	TWO-WEEK ORAL TOXICITY STUDY OF FLUCONAZOLE IN MONKEYS	106
TABLE 1-8:	TWO-WEEK ORAL TOXICITY STUDY OF ITRACONAZOLE IN MONKEYS	107
TABLE 1-9:	TWO-WEEK ORAL TOXICITY STUDY OF KETOCONAZOLE IN RATS	108
TABLE 2-1:	OVERVIEW OF TOXICITY STUDIES OF WSA	109
TABLE 2-2:	SOLUBILITY OF COMPOUNDS	110
TABLE 2-3:	SINGLE ORAL ADMINISTRATION TOXICITY STUDY OF WSA IN RTAS	111
TABLE 2-4:	SINGLE INTRAVENOUS ADMINISTRATION TOXICITY STUDY OF WSA IN RTAS	111

TABLE 2-5:	FOUR-WEEK ORAL TOXICITY STUDY OF WSA IN RATS	112
TABLE 2-6:	FOUR-WEEK ORAL TOXICITY STUDY OF WSA IN MONKEYS	113
TABLE 2-7:	TWO-WEEK ORAL TOXICITY STUDY OF ACTIVE BODY IN MONKEYS	114
TABLE 2-8:	TWO-WEEK INTRAVENOUS INFUSION TOXICITY STUDY OF WSA IN RATS	115
TABLE 2-9:	TWO-WEEK INTRAVENOUS INFUSION TOXICITY STUDY OF WSA IN MONKEYS	116
TABLE 2-10:	MEAN PHARMACOKINETIC PARAMETERS OF WSA, ACTIVE BODY, PRO-MOIETY FOLLOWING A SINGLE INTRAVENOUS AND ORAL ADMINISTRATION OF WSA TO RATS AND MONKEYS AND FOLLOWING A SINGLE INTRAVENOUS ADMINISTRATION OF ACTIVE BODY TO MONKEYS	117
TABLE 2-11:	TOXICOKINETICS OF WSA AFTER 2-HOUR I.V. INFUSION AND P.O. ADMINISTRATION OF WSA TO RATS AND CYNOMOLGUS MONKEYS	118
TABLE 2-12:	TOXICOKINETICS OF ACTIVE BODY AFTER 2-HOUR I.V. INFUSION AND P.O. ADMINISTRATION OF WSA TO RATS AND CYNOMOLGUS MONKEYS	119
TABLE 2-13:	TOXICOKINETICS OF PRO-MOIETY AFTER 2-HOUR I.V. INFUSION AND P.O. ADMINISTRATION OF WSA TO RATS AND CYNOMOLGUS MONKEYS	120

TABLE 2-14: KINETIC PARAMETERS OF CONVERSION OF WSA TO ACTIVE BODY VIA THE INTERMEDIATE IN RAT, MONKEY AND HUMAN PLASMA	121
TABLE 2-15: THE EFFECT OF WSA ON THE HEPATIC METABOLIZING ENZYME SYSTEMS IN RATS	122
TABLE 2-16: THE EFFECT OF WSA ON THE HEPATIC METABOLIZING ENZYME SYSTEMS IN MONKEYS [2 WEEK INFUSION TOXICITY STUDY OF WSA IN MONKEYS WITH RECOVERY PERIOD (1 MONTH AFTER THE FINAL ADMINISTRATION)]	123
TABLE 2-17: SUMMARY OF THE PRIMARY SITES AND PARAMETERS INDICATING TOXICITY DUE TO WSA ADMINISTRATION (TWO- AND FOUR-WEEK STUDIES)	124
TABLE 2-18: ITRACONAZOLE の 24 時間静脈内持続投与による平均生存日数	125
TABLE 2-19: ラット感染モデルにおける効果	125
TABLE 3-1: SUMMARY OF TOXICITY (FLUCONAZOLE, KETOCONAZOLE, ITRACONAZOLE)	126
TABLE 3-2: SUMMARY OF TOXICITY (WSA)	126
TABLE 3-3: SUMMARY OF TOXICITY IN 2-WEEK ORAL TOXICITY STUDY IN MONKEYS (WSA, ITRACONAZOLE, FLUCONAZOLE)	127
TABLE 3-4: TOXICITY IN CYNOMOLGUS MONKEYS WITH PK PROFILE	128

Table 1-1: Overview of toxicity studies of existing antifungal drugs

Study Type	Treatment duration	Species/Test system	Animals/group/sex	Dose/Concentration
<u>Comparative tox. studies</u>				
Fluconazole	2-week	rat (M)	5	150, 450 mg/kg/day
	2-week	rat (M&F)	5	50, 150 mg/kg/day
	2-week	rat (M)	5	30, 100 mg/kg/day
	4-week	rat (M&F)	5	10, 30 mg/kg/day
	2-week	monkey (M&F)	1	15, 100 mg/kg/day
Itraconazole	2-week	monkey (M&F)	1	15, 40, 100 mg/kg/day
Ketoconazole	2-week	rat (M)	5	50, 100, 200 mg/kg/day

M: Male, F: Female

Table 1-2: Statistical methods

Item	Treatment-Control difference test					Dose response test			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Randomization	O								
Clinical signs				O*	O*			O*	O*
Body Weight & gain	O!	O!!							O
Food Consumption & Efficiency	O!	O!!							O
Hematology (H*1 items except for Baso, Mono)	O!	O!!							O
Hemogram (Baso, Mono)						O			O
Hematology (BMC)	O!	O!!							O
Hematology (Myelogram)	O!	O!!							O
Blood chemistry (H7150 items)	O!	O!!							O
Urinalysis (Standard urinalysis)				O*	O*			O*	O*
Urinalysis (pH)						O			O
Urinalysis (Sediment)				O*	O*			O*	O*
Organ weights (Absolute & Relative)	O!	O!!							O
Adjusted organ weight							O		
Gross autopsy findings				O*	O*			O*	O*
Histopathology				O*	O*			O*	O*

*for dichotomous response, ** for graded response,

! for $n < 7$, !! $n \geq 7$

All programs for statistical analysis are comprised in Tox-DP System documents in NRRC.

The following statistical methods are to be employed.

A. Randomization :

For small animals: Sontage J.M., Page N.P., and Saffiotti U.: Guidelines for carcinogen bioassay in small rodents, NCI, 1975.

For large animals: Japanese Industry Standards (JIS), Z9031, 1956.

B. Pitman test: Lehman E.L. : Rank tests for comparing two treatments, In Nonparametrics. (Lehmann E.L. and D'Albrera H.J.M., eds.), p1-53, McGraw-Hill and Holden-day Inc., SanFrancisco, 1975.

C. The t-test with F-test for homogeneity of variance

JIS : Significance test of difference between the two population means (standard deviations unknown, two-sided). Japanese Industry Standards, Z9049, 1965.

D. Fisher-Irwin test

Fisher RA : Statistical Method for Research Workers (5th Ed). Oliver & Boyed, Edinburgh, 1934

E. Exact rank sum test for $2 \times k$ table : Lehman EL : op. cit. p21

F. Pitman test using exact generalization of Fisher-Irwin test $2 \times k$ table

Cox DR : The regression analysis of binary sequences, J. R. Stat. Soc. [B] 20, 215-242, 1958.

G. Analysis of covariance

Takizawa T. : An unbiased comparison of organ weights when an inequality in body weight exists. Toxicology, 9, 353-360, 1978.

H. Exact trend test: Cox DR : op. cit.

I. Dose response test (Jonckheere)

Jonckheere AR : A distribution-free κ -sample test against ordered alternatives. Biometrika, 41, 133-145, 1954.

Table 1-3: Two-week oral toxicity study of fluconazole in rats (Test 1)

Animal: SD-Slc rat (Male), 5 weeks old, Carrier: 0.5%CMC-Na solution				
Dose (mg/kg)		0	150	450
Items	Animal numbers	5	5	5
		-	-	BW, FC ↓
		-	-	RBC, Hb ↓
Blood chemistry				
TG (mg/dL)		71.6±29.3	52.0±8.7	18.4±8.6** ↓ ↓
GOT (IU/L)		97.2±10.2	102.2±16.7	103.4±12.5
GPT (IU/L)		46.0±7.3	44.0±3.4	40.8±5.4
ALB (g/dL)		3.96±0.11	3.70±0.35	3.62±0.24*
Organ weight				
Liver		9.838±1.507	12.920±1.016*	6.372±0.557
Absolute (g)		10.94±1.075	13.056±0.819*	17.196±2.452**
Relative (g/100gBW)		4.91±0.269	6.214±0.308**	8.388±0.649**
Adrenal		-	-	(↑)
Absolute (mg)-R		24.60±3.76	23.48±3.00	28.66±4.21
Absolute (mg)-L		25.4±3.62	26.0±5.32	30.72±4.64
Relative (mg/100gBW) -R		11.06±1.62	11.12±1.13	14.18±2.96
Relative (mg/100gBW) -L		11.38±1.23	12.30±1.96	15.20±3.20*
Prostate		-	↓	↓
Absolute (mg)		137±29.5	112.0±26.5	113.4±25.1
Relative (mg/100gBW)		62.0±16.0	52.8±9.0	56.2±15.1
Histopathology				
Liver				
Enlargement of hepatocellular		0	0	G1:4*
Fatty change of mid-lobular		0	G1:2, G2:2 *	G2:1, G3:4 **
Hypertrophy of centrilobular		0	G1:2	G1:4, G2:1 **
Adrenal				
Increase of lipid droplets in zonal		0	0	G1:1
Spleen				
Increase of extramedullary		0	0	G1:2

Values represent the mean±SD, Statistical significance of treatment-control difference : * P≤0.05, ** P≤0.01

G: Evaluation grade for individual animal R: Right, L: Left

Numeral: animal numbers, G1:Slight, G2:Moderate, G3:Severe

(↑): very slight increase, ↑: slight increase, ↑↑: moderate increase

(↓): very slight decrease, ↓: slight decrease, ↓↓: moderate decrease

Table 1-4 : Two-week oral toxicity study of fluconazole in rats (Test 2)

Animal: SD-Slc rat, 5 weeks old, Carrier: 0.5%CMC-Na solution							
Fluconazole		Male			Female		
Dose (mg/kg)		Control	50	150	Control	50	150
Item (Unit)	No. of animals	5	5	5	5	5	5
Blood chemistry							
CHE (IU/L)		94.6±20.6	106.6±43.4	105.0±18.0	453.6±177.1	283.4±30.9**	297.2±57.7*
TP (g/dL)		6.12±0.13	5.82±0.31	5.88±0.13*	5.98±0.22	5.74±0.11	5.72±0.24
ALB (g/dL)		4.24±0.11	3.86±0.21*	3.82±0.19**	4.28±0.15	4.00±0.14*	4.04±0.23
TG (mg/dL)		63.4±16.8	62.0±21.0	26.8±13.2*	29.6±8.2	25.0±5.5	36.8±22.4
T-CHO (mg/dL)		82.6±16.0	84.6±15.2	70.0±8.6	82.2±8.5	88.0±6.7	103.2±6.4**
IP (mg/dL)		10.24±0.75	10.78±0.30	10.82±1.13	9.48±0.45	10.46±0.66*	9.98±0.75
Na (mEq/L)		144.16±1.52	144.40±1.77	144.46±1.69	143.22±0.76	142.88±0.63	144.38±1.69
K (mEq/L)		4.82±0.44	4.94±0.15	4.98±0.55	4.14±0.13	4.78±0.30**	4.78±0.63
Cl (mEq/L)		96.98±1.31	98.52±1.01	97.04±0.82	100.26±0.76	98.66±0.99*	98.66±1.26
A/G		2.258±0.123	1.986±0.204*	1.884±0.289*	2.530±0.213	2.302±0.137	2.414±0.226
Relative organ weight							
Thyroid -R (mg/100gBW)		2.56±0.64	2.52±0.42	3.00±0.36	2.98±0.41	3.64±0.47*	3.56±1.12
Thyroid -L (mg/100gBW)		2.46±0.39	2.18±0.45	2.88±0.36	2.64±0.18	3.04±0.55	3.34±0.74
Lung (mg/100gBW)		456.4±19.7	470.4±12.6	485.6±31.9*	510.6±22.6	566.4±33.1**	519.4±42.7
Liver (g/100gBW)		4.692±0.291	5.186±0.234*	6.270±0.282**	4.010±0.180	4.424±0.193*	4.834±0.248**
Spleen (mg/100gBW)		215.2±24.4	224.4±10.0	253.6±44.0	203.2±23.0	228.4±27.0	259.2±91.6
Kidney -R (mg/100gBW)		383.0±22.6	394.0±37.5	426.2±42.6	396.8±28.4	404.0±10.5	425.0±18.6
Kidney -L (mg/100gBW)		388.2±31.6	401.6±45.8	416.0±37.4	398.2±27.9	397.8±18.8	419.0±17.6
Adrenal -R (mg/100gBW)		10.12±1.62	10.02±1.23	10.80±0.83	16.82±1.19	18.18±1.87	19.92±3.69
Adrenal -L (mg/100gBW)		11.72±2.02	10.64±1.14	12.04±1.08	17.60±1.26	19.10±1.68	20.84±1.89**
Seminal v. (mg/100gBW)		105.2±28.0	102.6±35.0	69.6±13.9*			
Uterus (mg/100gBW)					203.6±48.0	169.2±27.3	155.2±17.6*
Histopathology							
Liver							
Focal necrosis of hepatocytes		0	0	0	0	0	G1:1
Enlargement of nuclei of hepatocytes		0	0	G1:1	0	0	0
Fatty change of mid-lobular		0	G1:1	G1:1,G2:3,G3:1 **	0	0	G1:3
Hypertrophy of centri-lobular		0	G1:1	G1:4, G2: 1 **	0	0	G1:1

Values represent the mean±SD, Statistical significance of treatment-control difference : * P≤0.05, ** P≤0.01

G: Evaluation grade for individual animal, Numeral: animal numbers, G1:Slight, G2:Moderate, G3:Severe

R: Right, L: Left

Table 1-5 : Two-week oral toxicity study of fluconazole in rats (Test 3)

Animals: SD-Slc male rat, 5 weeks old		Carrier: 0.5% CMC-Na solution		
Dose (mg/kg/day)		0	30	100
Number of animals/group		5	5	5
Clinical signs (salivation)		No notable change		
Body weight gain, Food consumption		-	-	-
Hematology		-	±	±
Hb (g/dL)		14.44±0.43	13.44±0.36*	13.58±0.40*
Blood chemistry		-	-	-
TG (mg/dL)		81.2±33.6	64.8±26.0	59.8±17.5
T-CHO (mg/dL)		79.4±6.9	90.0±21.7	79.0±5.9
Urinalysis		Grade	-	-
Protein		+	5	4
		++	0	1
Relative Organ weight				
Liver (g/100gBW)		4.672±0.116	5.110±0.182**	5.438±0.196**
Adrenal -R (mg/100gBW)		8.32±1.01	8.18±0.74	10.02±1.93
Adrenal -L (mg/100gBW)		8.82±1.14	9.20±0.86	11.14±1.56*
Heart (mg/100gBW)		336.0±15.6	334.0±6.6	348.8±6.3
Spleen (mg/100gBW)		214.2±19.4	253.4±19.5*	268.4±53.0
Kidney - R (mg/100gBW)		357.8±17.1	369.2±22.5	391.2±23.7*
Kidney - L (mg/100gBW)		362.2±11.6	359.8±17.8	399.8±14.0**
Histopathology				
Liver				
·Fatty change of mid-lobular hepatocytes		-	± G1:1	++ G1:3, G2:2 **
·Hypertrophy of hepatocytes (cent./peri lob.)		-	+ G1:2	+~++ G1:1, G2:2
·Degeneration of centri-lobular hepatocytes		-	-	± G1:1
·Enlargement of nuclei / hepatocytes		-	-	± G1:1
·Enlargement of nucleoli of hepatocytes		-	-	± G1:1
Adrenal				
·Increase of lipid droplets in cortex		-	-	± G1:1
Spleen				
·Increase of extramedullary hematopoiesis		-	+ G1:2	-
P450 specific activity #				
Relative activity (%)		100	142	198
(U/mg protein)		114±11	162±16*	226±46*

Values represent the mean±SD, Statistical significance of treatment-control difference : * P≤0.05, ** P≤0.01

-; No change, ±; Very slight, +; Slight, ++; Moderate, +++; Severe (Evaluation for group)

G: Evaluation grade for individual animal, Numeral: animal numbers, G1:Slight, G2:Moderate

#: p-nitroanisole O-demethylation

R: Right, L: Left

Table 1-6 : Four-week oral toxicity study of fluconazole in rats

		Animals: SD-Slc rat, 5 weeks old			Carrier: 0.5% CMC-Na solution		
		Male			Female		
Dose (mg/kg)		Control	10	30	Control	10	30
Item (Unit)	No. of animals	10	5	5	10	5	5
Blood chem.							
GOT (IU/L)		92.2±19.3	108.6±18.3	102.6±10.0	91.7±16.4	81.2±8.7	101.2±11.6
GPT (IU/L)		42.0±7.7	41.2±8.5	41.8±3.1	38.1±5.6	35.6±4.7	38.4±11.6
ALP (IU/L)		323.0±43.1	395.6±70.6*	352.0±57.6	222.1±51.6	180.8±20.2	284.2±40.0*
TP (g/dL)		6.10±0.16	5.94±0.15	5.68±0.15**	6.04±0.22	6.10±0.20	5.92±0.18
ALB (g/dL)		4.21±0.11	4.16±0.11	3.96±0.18*	4.31±0.20	4.34±0.23	4.12±0.16
TG (mg/dL)		99.5±35.6	85.0±29.8	88.4±33.2	39.4±18.1	48.2±30.0	50.4±5.7
T-CHO (mg/dL)		72.2±7.6	61.8±13.8	56.4±9.3**	82.5±7.3	90.8±16.4	81.2±4.8
CRE(mg/dL)		0.51±0.06	0.70±0.00**	0.66±0.05**	0.57±0.05	0.68±0.04**	0.66±0.05*
Urinalysis							
	Grade						
Protein	-	0	0**	0**	3	0	0**
	±	6	0	0	6	2	1
	+	4	2	1	1	3	4
	++	0	3	4	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0	0
	++++	0	0	0	0	0	0
Relative organ weight							
Thyroid -R (mg/100gBW)		2.75±0.49	2.66±0.22	2.92±0.52	2.96±0.67	3.26±0.47	2.94±0.15
Thyroid -L (mg/100gBW)		2.39±0.46	2.70±0.23	2.40±0.34	2.97±0.52	3.46±0.32	2.94±0.55
Salivary gland (mg/100gBW)		178.0±12.2	170.8±12.6	161.4±4.6**	193.6±8.7	207.2±11.2*	203.0±13.1
Thymus (mg/100gBW)		154.4±22.6	169.6±30.8	164.6±26.7	192.9±18.0	200.6±21.3	191.6±17.0
Liver (g/100gBW)		4.073±0.306	4.104±0.221	4.236±0.351	3.627±0.193	3.856±0.131*	4.122±0.139**
Spleen (mg/100gBW)		180.3±7.6	180.2±19.5	172.0±15.6	199.1±18.0	205.8±17.5	194.6±17.2
Adrenal -R (mg/100gBW)		7.56±1.40	7.64±0.48	7.74±2.03	14.92±1.22	15.90±1.97	18.08±1.20**
Adrenal -L (mg/100gBW)		7.85±1.03	8.10±1.20	9.04±0.57*	16.19±1.36	16.62±1.85	19.02±2.09*
Histopathology							
Liver							
	Grade						
Fatty change of mid-lobular hepatocytes	1	0	0	1	0	0	1
	2	0	0	1	0	0	0
	3	0	0	1	0	0	0
Hypertrophy of centrilobular hepatocytes	1	0	0	2	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
Microgranuloma, scatter	1	0	1	1	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
Pituitary							
Increase of mitosis in anterior	1	0	0	0	0	1	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
Cyst in anterior lobe	1	0	1	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
Thyroid							
Increase of large follicles	1	0	0	0	1	2	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
Adrenal gland							
Hypertrophy of cortical cells	1	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
P450 specific activity#							
	(U/mg protein)	161	222	290**	83	96	124
	(%)	100	138	180	100	116	149

Values represent the mean±SD, Statistical significance of treatment-control difference : * P≤0.05, ** P≤0.01

G: Evaluation grade for individual animal, Numeral: animal numbers, G1:Slight, G2:Moderate, G3:Severe

#: p-nitroanisole O-demethylation

Table 1-7: Two-week oral toxicity study of fluconazole in monkeys

Animal: Cynomolgus monkey (Male and Female), Carrier: 0.5%CMC-Na solution							
		Male			Female		
Dose (mg/kg)		0	15	100	0	15	100
Animal numbers	Day	1	1	1	1	1	1
Body weight				-300g			-200g
Blood chemistry							
TG (mg/dL)	Pre	20	44	49	30	16	35
	14	49	172	23	33	112	102
ALB (g/dL)	Pre	4.2	4.3	4.5	4	4.2	4.6
	14	4.5	4.4	3.9	5	3.6	3.7
Organ weight							
Liver							
Absolute (g)		79.3	78.3	95.4	65.1	63.9	72.2
Relative (g/kgBW)		18	23	31.8	20.3	21.3	26.7
Adrenal weight							
Absolute R/L (mg)		372/354	185/244	280/363	191/247	251/318	337/476
Relative R/L (mg/kgBW)		85/80	54/72	93/121	60/77	84/106	125/176
Thymus weight							
Absolute (g)		2.66	2.14	1.29	4.92	2.11	1.21
Relative (g/kgBW)		0.6	0.63	0.43	1.54	0.77	0.45
Histopathology							
Liver							
Single cell necrosis of hepatocytes		-	-	-	-	-	+
Degeneration of perilobular		-	-	-	-	+	-
Eosinophilic change of perilobular							
hepatocytes		-	-	-	-	-	++
Fatty change of mid-lobular		-	-	-	-	-	+++
Brown pigment deposition in kupffer		-	-	-	-	-	+
Imflammatory cell infiltration in							
Glisson's sheath		-	-	-	-	-	+++
Adrenal							
Hypertrophy of cortical cells in zona							
fasciculata		-	-	+	-	-	-
Increase of lipid droplets in cortex		-	-	-	-	-	+

-; No change, ±; Very slight, +; Slight, ++; Moderate, +++; Severe

Table 1-8: Two-week oral toxicity study of itraconazole in monkeys

Animal: Cynomolgus monkey (Male and Female), Carrier : 30%HPCD/18%PEG 300									
Dose (mg/kg)	Male				Female				
	0	15	40	100	0	15	40	100	
Animal numbers	1	1	1	1	1	1	1	1	
Mortality					Day12 Death aspiration of vomit				
Body weight					-500 g			* -300 g	-200g
Hematology									
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	0	6.22	10.70	9.59	6.66	7.05	6.11	6.61	6.25
	7	6.17	8.69	10.50	6.31	7.22	4.84	6.22	5.39
	14	6.40	10.95	12.42	7.42	6.97	5.31	5.48	5.31
HCT (%)	0	39.3	35.4	43.6	43.1	41.5	43.5	41.6	40.6
	7	39.2	35.6	37.4	38.4	40.3	33.4	35.2	33.4
	14	40.8	35.5	33.4	50.1	38.3	38.1	31.0	31.6
Hb (g/dL)	0	12.5	10.9	13.8	13.8	13.0	13.3	11.8	12.5
	7	11.9	11.1	12.2	13.0	12.8	10.2	10.9	10.5
	14	12.4	11.0	10.9	15.3	12.5	11.4	9.7	10.3
Blood chem.									
GPT (IU/L)	0	59.0	37.0	25.0	14.0	144.0	95.0	52.0	33.0
	7	58.0	36.0	44.0	14.0	37.0	47.0	165.0	49.0
	14	56.0	29.0	32.0	43.0	25.0	45.0	62.0	49.0
TG (mg/dL)	0	32.0	53.0	60.0	32.0	45.0	88.0	28.0	46.0
	7	21.0	30.0	39.0	111.0	93.0	73.0	23.0	34.0
	14	40.0	35.0	41.0	599.0	112.0	131.0	34.0	58.0
T-CHO (mg/dL)	0	107.0	114.0	166.0	129.0	261.0	214.0	218.0	149.0
	7	102.0	132.0	119.0	94.0	112.0	176.0	142.0	100.0
	14	108.0	130.0	128.0	78.0	129.0	171.0	117.0	97.0
ALB (g/dL)	0	4.5	4.7	5.0	4.9	4.2	5.0	4.9	4.3
	7	4.3	4.7	4.7	4.7	4.3	4.4	4.8	4.1
	14	4.4	4.7	4.2	3.6	4.4	4.5	4.2	3.5
IP (mg/dL)	0	6.1	4.8	7.7	5.1	3.2	4.5	4.1	5.1
	7	3.4	5.9	3.6	4.0	2.9	3.6	2.8	1.2
	14	4.5	6.1	4.3	9.1	4.5	3.3	3.0	1.4
Organ weight									
Liver weight									
Absolute (g)		77.5	72.8	69.5	97.6	53.4	71.3	53.9	62.4
Relative (g/kgBW)		19.9	17.8	22.4	27.1	25.4	22.3	23.4	26.0
Adrenal weight									
Absolute (mg)		223/257	356/290	345/418	384/517	228/250	287/298	303/492	349/438
Relative (mg/kgBW)		57/66	87/71	111/135	107/144	109/119	90/93	132/214	145/183
Histopathology									
Liver									
Hypertrophy of perilobular		-	-	-	NE	-	-	+	++
Adrenal									
Hypertrophy of cortical cells in zona		-	-	+	-	-	-	-	++
Inflammatory cell infiltration in cortex		-	-	-	-	-	-	-	+
Increase of lipid droplets in cortex		-	-	-	++	-	-	+	-

-; No change, ±; Very slight, +; Slight, ++; Moderate, +++; Severe

N.E.: Not estimated (autolysis)

Table 1-9: Two-week oral toxicity study of ketoconazole in rats

Animals: SD-Slc male rat, 5 weeks old, Carrier: 0.5% CMC-Na solution				
Dose (mg/kg/day)	0	50	100	200
Number of animals/group	5	5	5	5
Mortality	0	0	0	1/5 (day 5)
Clinical signs	-	-	-	Decrease of spontaneous activity
Body weight gain, Food consumption	-	-	-	↓
Hematology	-	-	-	↓
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	8.566±1.589	7.224±1.360	7.050±0.826	4.133±2.516*
BMC ($10^{10}/\text{L}$)	307.6±9.9	322.2±15.4	311.0±11.2	274.3±16.4*
Blood chemistry	-	-	-	
TG (mg/dL)	51.8±9.2	43.2±8.2	36.8±17.1	17.8±6.8*
BUN (mg/dL)	18.2±1.1	17.2±2.7	17.8±1.8	13.5±1.3*
Na (mEq/L)	142.02±0.50	142.80±1.13	143.40±0.83*	146.20±1.43*
Urinalysis	-	-	-	-
Relative Organ weight				
Liver (g/100g)	4.608±0.261	4.602±0.235	5.056±0.199*	5.960±0.643*
Adrenal -R (mg/100gBW)	9.8±2.58	12.72±2.37	17.28±2.41*	40.00±13.78*
Adrenal -L (mg/100gBW)	9.92±1.96	13.48±1.69*	18.26±2.39**	40.58±13.82*
Kidney -R (mg/100gBW)	400.8±16.7	388.4±16.1	408.8±27.7	455.0±28.6*
Kidney -L (mg/100gBW)	390.8±10.8	386.8±18.3	409.2±31.8	454.0±26.8*
Testis -R (mg/100gBW)	496.2±41.9	505.8±54.4	499.4±15.7	443.3±116.0
Testis -L (mg/100gBW)	513.2±37.4	515.8±52.3	516.2±15.4	445.3±100.8
Gross autopsy findings				
Adrenal (color deterioration)	-	+	+	+
Adrenal (adrenomegaly)	-	-	+	++
Histopathology			No exam.	No exam.

Values represent the mean±SD

Statistical significance of treatment-control difference : * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$

-; No change, ±; Very slight, +; Slight, ++; Moderate, +++; Severe

(↓); Very slight decrease, ↓; Slight decrease, ↓↓; Moderate decrease

(↑); Very slight increase, ↑; Slight increase, ↑↑; Moderate increase

R: Right, L: Left

Table 2-1: Overview of Toxicity studies of WSA

Study Type	Treatment duration	Species/Test system	Animals/group/sex	Dose/(Concentration)
Single dose				
<u>WSA (Prodrug)</u>				
Single dose (iv, bolus)	single	rat (M&F)	5	5, 10, 20 mg/kg (1, 2, 4 mg/mL sol.)
Test 1: injection speed: approx. 1 mL/body/min				10, 20, 40 mg/kg (2, 4, 8 mg/mL sol.)
Test 2: injection speed: approx. 0.1 mL/body/min				
Single dose (po)	single	rat (M&F)	5	500, 1,000, 2,000 mg/kg
Pyramiding (iv, bolus)		monkey (M)	2	4, 8, 16, 32, 64 mg/kg (4 or 7.2 mg/mL)
injection speed: approx. 0.25 or 0.5 mL/body/sec				
Pyramiding (iv, infusion)		monkey (M)	2	90, 120 mg/kg (7.2 mg/mL)
injection speed: approx. 6.25, 8.33 mL/kg/hr				
Pyramiding (po)		monkey (M)	2	500, 1,000, 2,000 mg/kg
<hr/>				
Study Type	Treatment duration	Species/Test system	Animals/group/sex	Dose/Concentration
Repeated dose				
<u>WSA (Prodrug)</u>				
Short-term infusion, 2hr/day (6.25 mL/kg/hr x 2hr)	2-week	monkey (M&F)	4	10, 30, 60 mg/kg/day (0.8, 2.4, 4.8 mg/mL)
Short-term infusion, 2hr/day (12.5 mL/kg/hr x 2hr)	2-week	rat (M&F)	10	10, 30, 60 mg/kg/day (0.4, 1.2, 2.4 mg/mL)
Subchronic (po)	4-week	rat (M&F)	16	10, 30, 90 mg/kg/day
Subchronic (po)	4-week	monkey (M&F)	4 6: recovery 1: recovery	10, 30, 90 mg/kg/day
<u>Active body (Active metabolite)</u>				
Pilot (po)	2-week	monkey (M&F)	1	10, 30, 90 mg/kg/day
Safety pharmacology				
Cardiovascular and respiratory system (infusion)		male monkey	3	2.5, 7.5, 22.5 mg/kg (0.8, 2.4 and 7.2 mg/mL, 6.25mL/kg x 30 min.)
General behavior, central nervous system (p.o.)		male mouse	6	
		male rat	6	10, 30, 90 mg/kg

M: Male, F: Female

Table 2-2 Solubility of compounds

Compound name	Compound/water (mg/mL)
WSA (prodrug)	1,000 mg/mL
Active body of WSA	< 0.001 mg/mL
Itraconazole	< 0.001 mg/mL
Voriconazole	2 mg/mL
Fluconazole	10-20 mg/mL
Ketoconazole	< 0.01 mg/mL

Table 2-3: Single oral administration toxicity study of WSA in rats

p.o. Dose	Mortality (Lethal No./Total No.)	
	Male	Female
0 mg/kg	0/5	0/5
500 mg/kg	0/5	0/5
1,000 mg/kg	2/5	5/5
2,000 mg/kg	5/5	5/5

Table 2-4: Single intravenous administration toxicity study of WSA in rats

i.v. Dose	Mortality (Lethal No./Total No.)			
	injection speed			
	1mL/min.		0.1mL/min.	
	Male	Female	Male	Female
0 mg/kg	0/5	0/5	0/5	0/5
5 mg/kg	0/5	0/5	-	-
10 mg/kg	2/5	3/5	0/5	0/5
20 mg/kg	5/5	5/5	0/5	0/5
40 mg/kg	-	-	1/5	0/5

Table 2-5: Four-week oral toxicity study of WSA in rats

Animals: SD-Slc rats, 5-weeks old. Carrier : Water (pH 3.5)								
Sex	Male				Female			
Dose (mg/kg)	0	10	30	90	0	10	30	90
Item (Unit)	No. of animals	10	10	10	10	10	10	10
Hematology								
Hb (g/dL)	15.53±0.41	15.11±0.48	15.15±0.44	15.05±0.38*	15.43±0.52	15.32±0.61	15.23±0.43	15.32±0.29
PLT (10E3/ μ L)	1122.7±105.1	1042.3±88.9	1016.5±144.0	1009.1±118.5*	1117.0±72.0	1067.8±131.3	1104.3±176.9	1126.1±103.5
RBC (10E6/ μ L)	8.221±0.327	7.896±0.406	8.010±0.406	7.962±0.151*	7.881±0.326	7.843±0.377	7.834±0.295	7.869±0.211
HCT (%)								
Blood Chemistry								
GOT (IU/L)	44.39±1.20	43.33±1.07	43.41±1.19	43.08±0.93*	42.74±1.64	43.05±1.68	42.47±1.16	42.50±0.94
GPT (IU/L)	103.3±12.3	88.3±14.3*	86.9±15.5*	87.0±13.1**	98.3±16.3	97.7±25.5	100.1±11.8	84.0±12.7*
CHE (IU/L)	50.1±5.3	46.1±8.4	45.8±5.3	51.9±9.4	46.6±13.9	57.4±38.7	40.3±6.0	35.8±4.1*
TP (g/dL)	65.9±9.0	82.4±15.0**	77.3±24.2	92.6±21.3**	519.6±163.0	595.2±177.3	610.1±120.5	570.6±131.5
TP (g/dL)	6.32±0.19	6.29±0.29	6.34±0.22	6.49±0.16*	6.47±0.14	6.45±0.18	6.43±0.27	6.55±0.23
TG (mg/dL)	86.5±18.8	135.8±43.0**	121.7±39.5*	102.7±20.8	41.1±20.5	43.1±14.4	43.5±14.8	41.1±11.9
A/G	2.684±0.204	2.547±0.190	2.536±0.216	2.617±0.179	2.812±0.150	2.758±0.178	2.563±0.147**	2.594±0.265*
Liver weight								
Absolute (g)	11.909±1.381	14.104±2.080*	13.703±1.560*	14.189±1.423**	7.535±0.632	7.728±0.670	8.156±0.859	8.402±0.706**
Relative (g/100gBW)	3.911±0.242	4.302±	4.201±0.217*	4.646±0.203**	3.727±0.145	3.879±	3.976±0.234*	4.371±0.209**
Adrenal weight								
Absolute (mg)	R 24.73±3.18	23.52±4.32	22.89±3.37	24.2±2.41	28.67±4.52	29.21±4.46	27.83±2.06	30.08±3.28
	L 27.04±3.61	24.49±3.56	24.68±3.32	26.66±2.18	28.89±6.99	32.43±5.69	30.34±3.01	31.27±2.58
Relative	R 8.16±1.03	7.20±1.19	7.05±1.00*	7.98±0.81	14.22±2.06	14.70±2.21	13.64±1.44	15.71±2.05
(mg/100gBW)	L 8.93±1.14	7.53±1.08*	7.61±1.00*	8.79±0.89	14.28±3.05	16.35±2.93	14.90±2.19	16.33±1.56
Thyroid weight								
Absolute (mg)	R 8.77±0.81	8.67±1.48	9.84±2.31	10.41±1.64*	5.80±1.24	7.06±0.91*	6.54±1.08	8.28±1.09**
	L 7.34±0.95	8.14±1.04	7.72±1.10	9.20±1.69**	5.50±0.56	6.78±1.46*	5.97±1.06	6.80±1.24*
Relative	R 2.90±0.28	2.62±0.24*	3.01±0.57	3.42±0.49**	2.87±0.51	3.57±0.40**	3.20±0.50	4.32±0.65**
(mg/100gBW)	L 2.40±0.21	2.51±0.23	2.38±0.36	3.00±0.49**	2.74±0.22	3.39±0.72*	2.93±0.60	3.53±0.53**
Histopathology								
Liver								
Hypertrophy of centri-lobular hepatocytes								
	0	0	0	+(G1:1)	0	0	0	+(G1:2)
Thyroid								
Increase of small follicles								
	0	0	0	+(G1:2)	0	0	0	+(G1:4)

Values represent the mean±SD, Statistical significance of treatment-control difference : * P≤0.05, ** P≤0.01

-; No change, ±; Very slight, +; Slight, ++; Moderate, +++; Severe

G: Evaluation grade for individual animal, Numeral: animal numbers, G1:Slight, G2:Moderate

R: Right, L: Left

Table 2-6: Four-week oral toxicity study of WSA in monkeys

Animal: Cynomolgus monkey (Male and Female), Carrier : 0.5% CMC-Na solution Stage : Day 0-27 (N=4), Recovery (ERC: 4 weeks); N=1										
Male					Female					
Dose (mg/kg)	Control	10	30	90	Control	10	30	90		
No. of animals	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
Item (Unit)	Day									
Clinical sign										
salivation, soft stool		-	+ : Day 0&1	+	-	-	-	-	+	
vomiting	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
decrease of spontaneous activity			-	+	-	-	-	-	+	
BW & FC	-	-	-	↓	-	-	-	-	↓	
TG	Pre	26.5±11.4	39.8±23.6	36.0±18.9	37.0±13.0	33.3±5.5	28.8±4.5	44.0±12.2	33.8±12.0	
(mg/dL)	14	44.3±14.2	61.3±24.5	57.8±22.2	71.5±32.8	32.8±5.0	37.8±8.2	63.0±8.8**	63.0±12.7**	
	27	32.0±10.7	54.0±13.6	61.0±17.2	172.5±63.3**	30.0±6.6	40.8±4.9	67.0±15.4*	82.0**	
	ERC	63.0	54.0	34.0	43.0	31.0	24.0	39.0	30.0	
T-CHO	Pre	90.5±7.5	121.8±24.3	96.8±11.3	118.8±23.4	97.3±3.6	106.5±9.1	153.0±13.9**	133.5±32.9*	
(mg/dL)	14	104.3±12.4	126.8±33.5	80.5±11.0	65.8±18.7	100.8±7.3	112.3±4.6	125.3±21.7	81.5±22.1	
	27	100.3±13.5	124.0±20.3	78.0±6.4	81.0±11.6	96.8±4.0	110.5±3.4	123.0±35.0	59.5	
	ERC	106.0	154.0	105.0	121.0	91.0	106.0	169.0	144.0	
BUN	Pre	24.18±1.98	24.65±4.37	23.83±3.57	22.53±4.36	20.5±1.55	26.73±4.88**	20.78±1.05	20.10±2.45	
(mg/dL)	14	24.70±1.35	24.75±2.96	22.63±3.94	31.58±12.14	21.88±4.33	22.68±3.85	21.75±2.08	36.50±33.42	
	27	20.83±1.29	25.65±1.02	22.40±5.79	19.07±6.75	19.45±1.16	24.90±3.06**	20.63±0.88	14.65*	
	ERC	22.6	24.4	21.9	17.4	22.6	27.9	19.3	18.5	
Item : Organ Weight Summary										
Adrenal (mg)										
	R	27	237±23	190±10	310±26*	307±40*	217±40	267±29	287±67	420
	L	27	283±15	227±6	353±50	430±62**	297±61	330±20	370±50	570
	R	ERC	230.0	230.0	200.0	320.0	200.0	190.0	410.0	320.0
	L	ERC	310.0	290.0	270.0	430.0	230.0	240.0	520.0	460.0
Thymus	27	1.87±0.55	1.87±0.86	1.10±0.52	1.17±0.50	1.50±0.40	1.30±0.26	1.40±0.61	0.8	
(g)	ERC	2.1	3	3.5	1.5	2	4.7	2.4	5.1	
Liver (g)	27	81.97±13.38	92.13±6.93	114.17±11.05	138.63±31.19	64.73±4.34	72.03±3.34	80.13±5.69*	132.4	
	ERC	76.1	74.3	70.1	76.4	76.1	58.3	65.0	68.0	
End of drug administration period										
Male					Female					
Dose (mg/kg)	Control	10	30	90	Control	10	30	90		
No. of animals	3	3	3	3	3	3	3	3		
Histopathology										
Liver	-	-	-	+	-	-	±	+	2: dead	
Fatty change of centrilobular hepatocytes	0	0	0	G1: 1	0	0	0	±: 1	±: 1	
Hypertrophy of hepatocytes	0	0	±:2, G1:1	±: 3	0	0	±: 2	G1: 1		
Kidney	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Changes in tubules	0	0	0	0	0	0	0	0	±: 1 ~ G2: 1	
Adrenal	-	-	-	++	-	-	-	+	++	
Thickening of zona fascicula	0	0	0	G2: 2	0	0	0	G1: 1	G2: 2	

Values represent the mean±SD, Statistical significance of treatment-control difference : * P≤0.05, ** P≤0.01

Total evaluation : -, No change, ±: Very slight, +: Slight, ++: Moderate, +++: Severe

G: Evaluation grade for individual animal, Numeral: animal numbers, G1:Slight, G2:Moderate, G3:Severe

(↑): very slight increase, ↑: slight increase, ↑↑: moderate increase; (↓): very slight decrease, ↓: slight decrease, ↓↓: moderate decrease

R: Right, L: Left

Table 2-7: Two-week oral toxicity study of active body of WSA in monkeys

Sex	Male				Female				
Oral active metabolite dose (mg/kg)	Control	10	30	90	Control	10	30	90	
Item (Unit)	No. of animals	1	1	1	1	1	1	1	
Blood chemistry	Day								
GOT (IU/L)	Pre	31	30	25	33	26	20	37	34
	14	22	20	22	25	40	24	17	23
GPT (IU/L)	Pre	22	43	18	23	59	21	76	29
	14	26	50	29	27	91	28	21	52
TG (mg/dL)	Pre	11	32	24	34	33	51	35	51
	14	18	45	46	119	20	57	34	86
T-CHO (mg/dL)	Pre	143	155	136	140	173	119	146	152
	14	144	113	84	59	180	113	132	111
Liver weight	14								
Absolute weight (g)		75.8	110.5	105.5	138.4	56.3	67.3	72.6	86.2
Relative weight (g/kg BW)		17.6	22.6	23.4	30.8	17.6	21.0	20.7	30.8
Adrenal weight	14								
Absolute weight (mg)	Right	242	391	266	444	257	293	262	336
	Left	279	368	393	567	310	351	371	473
Relative weight (mg/kg BW)	Right	56.0	79.8	59.0	99.0	80.0	92.0	75.0	120.0
	Left	65.0	75.1	87.0	126.0	97.0	110.0	106.0	169.0
Histopathology of liver	Grade								
Vacuolation of Ito cells	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Eosinophilic change of perilobular hepatocytes	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Fatty change of centrilobular hepatocytes	1	1	0	0	0	1	0	1	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	1
Hypertrophy of hepatocytes	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Histopathology of adrenals	Grade								
Increase of lipid droplets in cortical cells in zona fasciculata	1	0	0	0	1	0	0	1	0

Grade 1: very slight, Grade 2: slight

Table 2-8: Two-week intravenous infusion toxicity study in rats

Animal Method	SD-Slc, 7 weeks old, BW: M200-250g, F150-200g, 13 rats/dose/sex (EDA: 10 rats, TK: 3 rats) Infusion, Flow rate 12.5 ml/kg/hr (2hr/day), Carrier : saline, 2-week							
	Male				Female			
Dose (mg/kg)	0	10	30	60	0	10	30	60
Animal numbers	10	10	10	10	10	10	10	10
Blood chem.								
TG (mg/dL)	36.6±12.6	33.3±14.5	27.3±7.8	29.6±8.9	23.8±4.4	25.3±9.8	28.1±11.3	32.5±10.2*
GOT (IU/L)	135.5±26.3	121.1±24.3	123.4±27.4	139.4±43.8	147.2±31.2	135.6±28.0	116.1±12.0*	121.5±15.8*
GPT (IU/L)	51.9±9.7	53.5±10.8	41.7±6.0	55.0±11.5	48.0±9.1	41.2±10.1	46.1±7.8	41.1±10.7
Organ weight								
Liver weight								
Absolute (g)	11.491±1.184	12.004±1.238	10.937±1.162	12.017±0.616	8.048±0.608	7.998±0.869	9.056±0.811**	9.530±1.096**
Relative (g/100gBW)	3.752±0.158	3.942±0.302	3.838±0.139	4.047±0.233**	3.970±0.143	4.183±0.285	4.584±0.406**	4.756±0.517**
Adrenal								
Absolute (mg)	28.05±3.90	29.06±4.18	30.48±3.47	30.59±4.15	33.81±3.82	32.95±5.13	32.21±4.58	37.23±5.33
	30.79±3.90	31.23±5.52	32.24±4.85	32.41±4.34	36.2±2.63	35.63±4.94	35.72±4.09	39.61±5.98
Relative (mg/100gBW)	9.23±1.55	9.58±1.49	10.83±2.03	10.30±1.44	16.66±1.33	17.24±2.32	16.23±1.69	18.61±2.63
	10.10±1.53	10.28±1.93	11.46±2.41	10.92±1.57	17.86±0.72	18.64±2.05	18.00±1.06	19.79±2.94
Histopathology								
	-	-	-	-	-	-	-	-

Significance of treatment-control difference : * : $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

- : No change

Table 2-9: Two-week intravenous infusion toxicity study of WSA in monkeys

Animal: Cynomolgus monkey (Male and Female), Carrier : 0.5% CMC-Na solution									
End of administration period (Day 14; N=4), End of recovery period (ERC; N=1)									
		Male				Female			
Dose (mg/kg)		Control	10	30	60	Control	10	30	60
Item (Unit)	No. of animals	4	4	4	4	4	4	4	4
Body weight	Day	-	-	-	-280g	-	-	-	-150g
Blood Chemistry									
GOT	Pre	32.5±3.3	33.3±2.5	30.3±5.4	29.5±7.5	36.3±2.2	32.3±2.9	41.5±13.0	31.0±6.1
	(IU/L) 14	31.8±10.1	35.5±9.7	28.3±2.6	29.8±5.7	29.8±2.2	31.0±5.5	29.5±5.8	26.8±6.2
	ERC	203	65	106	96	55	53	180	66
GPT	Pre	50.3±19.6	31.8±10.5	29.8±7.7	23.5±6.5	56.5±12.1	41.5±22.7	39.8±19.5	46.5±22.2
	(IU/L) 14	45.8±26.2	22.8±5.8	30.5±7.3	23.3±5.1	27.8±4.9	35.8±14.4	32.3±29.4	33.0±10.4
	ERC	68	35	37	33	64	40	71	40
TG	Pre	40.3±23.9	27.8±18.5	26.0±13.6	26.5±8.2	67.3±61.3	71.3±46.7	53.8±41.1	55.5±22.2
	(mg/dL) 14	51.8±17.9	54.8±22.8	102.0±30.3	181.5±78.0*	52.3±17.2	48.3±14.9	62.5±16.4	87.3±33.4
	ERC	52.0	34.0	89.0	26.0	29.0	36.0	41.0	59.0
T-CHO	Pre	145.8±17.5	139.0±18.5	131.0±39.1	109.5±35.0	152.5±32.2	138.5±14.2	102.8±11.4	138.0±23.1
	(mg/dL) 14	151.0±41.9	132.3±11.2	107.8±14.2	81.3±16.4	139.5±18.4	140.3±25.6	94.3±8.4*	98.5±15.5*
	42	153.0	176.0	128.0	134.0	149.0	116.0	114.0	183.0
BUN	Pre	29.5±4.8	29.0±3.6	25.0±4.2	22.8±4.3	26.5±5.8	25.3±5.4	26.5±5.9	25.5±4.4
	(mg/dL) 14	30.8±2.4	32.3±5.7	35.3±3.8	39.0±17.7	30.5±4.0	24.5±5.0	34.0±5.0	26.8±8.7
	ERC	39.0	44.0	37.0	25.0	29.0	29.0	43.0	31.0
Organ weight									
Adrenal	(mg)								
	R 14	250.0±75.3	258.3±11.2	300.7±23.3	535.0±156.6	237.3±37.9	303.3±99.8	273.3±64.0	367.0±19.9
	L 14	327.3±60.2	319.7±25.6	349.3±34.4	624.7±129.2	342.0±78.3	325.0±76.7	393.3±109.5	413.0±47.7
	R ERC	302.0	217.0	396.0	280.0	191.0	224.0	283.0	260.0
Thymus	14	2.233±0.547	1.350±0.156	1.377±0.362	0.713±0.086	1.290±0.167	0.933±0.249	1.327±0.263	0.727±0.261
	(g) ERC	2.08	2.14	1.37	2.74	4.13	2.06	1.18	1.88
Liver (g)	14	91.27±12.61	88.37±13.91	105.60±12.08	134.33±22.08	63.50±4.62	84.83±16.14	83.37±3.96	86.53±12.94
	ERC	78.8	76.1	100.7	91.2	72.1	77.7	51.0	74.4
No. of animals (End of drug administration)									
Histopathology		3	3	3	3	3	3	3	3
Liver									
Vacuolation of Ito cells		0	0	0	0	0	0	G1:1	0
Eosinophilic change of perilobular hepatocytes		0	0	0	0	G2:1	0	0	0
Fatty change of centrilobular hepatocytes		0	0	0	0	0	0	G1:1	0
Hypertrophy of hepatocytes		0	0	0	G1:1	0	0	0	G1:1
Inflammatory cell infiltration in sinusoid		0	0	G1:1	0	0	0	0	0
Thymus									
Atrophy		0	0	0	G1:1	0	0	0	G1:2
Kidney									
Dilatation of tubules		0	0	0	G1:1	0	0	0	0
Thickening of capsule (focal)		0	0	0	G1:1	0	0	0	0
Adrenal									
Increase of lipid droplets in cortical cells in zona fasciculata		0	0	0	G1:1	0	0	0	G1:1
Injection site									
Hemorrhage around vein		0	G2:1	G1:1	G1:1	G1:1	0	0	0
Brown pigment deposits around vein		G1:1	0	0	0	0	0	0	0
Inflammatory cell infiltration around vein		G1:2	G2:1	G2:1	G3:1	G1:2	G1:1	G1:1	G1:1, G2:1
Granuloma around vein		G1:1, G2:1	G2:3	G1:1, G2:1	G1:1, G2:1, G3	G1:2, G2:1	G1:1, G2:2	G1:2, G2:1	G1:2, G2:1

Values represent the mean±SD, Statistical significance of treatment-control difference : * P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01

-; No change, ±; Very slight, +; Slight, ++; Moderate, +++; Severe

G: Evaluation grade for individual animal, Numeral: animal numbers, G1:Slight, G2:Moderate, G3:Severe

R: Right, L: Left

Table 2-10: Mean pharmacokinetic parameters of WSA, active body, pro-moiety following a single intravenous and oral administration of WSA¹⁾ to rats and monkeys and following a single intravenous administration of active body²⁾ to monkeys

N=3

Species		Rat		Monkey			
Compound		WSA	WSA	WSA	WSA	WSA	Active body
Route		I.V.	P.O.	I.V.	P.O. without food	P.O. with food	I.V.
Dose (mg/kg)		5	10	3	3	3	1
PK parameters for WSA³⁾							
	Units						
Dose as WSA	(mg/kg)	4.54	9.09	2.73	2.73	2.73	
Cmax	(mcg/ml)	-		-			
Co	(mcg/ml)	0.0768		3.06			
Tmax	(hr)	-		-			
T1/2	(min)	7.37		7.98			
AUC _{0-inf}	(mcg.hr/ml)	0.0138	N.M.	0.343	N.M.	N.M.	N.S.
CL	(ml/min/kg)	5500		202			
CL/F	(ml/min/kg)	-		-			
Vss	(L/kg)	56.8		1.01			
Vz/F	(L/kg)	-		-			
PK parameters for Active body⁴⁾							
	Units						
Dose as Active body	(mg/kg)	2.77	5.54	1.66	1.66	1.66	1
Cmax	(mcg/ml)	0.624	0.307	1.03	0.360	0.175	-
Co	(mcg/ml)	-	-	-	-	-	0.525 *
Tmax	(hr)	0.083	2.00	0.083	3.33	5.00	-
T1/2	(hr)	5.07	3.47	9.84	12.8	9.40	11.7
AUC _{0-inf}	(mcg.hr/ml)	1.39	1.72	5.08	4.39	3.54	3.66
In vivo conversion ratio	(%)	-	-	84.2	-	-	(100)
Oral bioavailability	(%)	-	61.9	-	86.9	67.9	-
CL	(ml/min/kg)	-	-	-	-	-	4.64
CL/F	(ml/min/kg)	33.3	53.6	5.54	6.43	8.71	-
Vss	(L/kg)	-	-	-	-	-	3.01
Vz/F	(L/kg)	14.6	16.1	4.74	7.28	7.42	-
PK parameters for Pro-moiety⁵⁾							
	Units						
Dose as Pro-moiety	(mg/kg)	1.04	2.08	0.624	0.624	0.624	
Cmax	(mcg/ml)	0.443	0.089	0.388			
Tmax	(hr)	0.083	1.00	0.083			
T1/2	(min)	27.5	-	23.7			
AUC _{0-inf}	(mcg.hr/ml)	0.287	0.196 ⁶⁾	0.218	N.M.	N.M.	N.S.
CL/F	(ml/min/kg)	60.5	177	50.5			
Vz/F	(L/kg)	2.40	-	1.74			

- 1) : WSA was dosed as HCl salt (M.W. = 789.7)
 2) : Active body was dosed as free form (M.W. = 437.5)
 3) : M.W. of WSA is 717.8 as free form.
 4) : M.W. of Active body is 437.5.
 5) : M.W. of Pro-moiety is 164.2.
 6) : AUC_{0-4h}
 - : Not calculated
 N.M. : Not measurable
 N.S. : No sample

C0 : Estimated plasma concentration at time zero
 In vivo conversion ratio : ratio of the AUCs of Active body after i.v. administration of WSA vs. Active body
 Oral bioavailability : $[\text{AUC}(0\text{-inf})\text{p.o.} * \text{Dose i.v.}] / [\text{AUC}(0\text{-inf})\text{i.v.} * \text{Dose p.o.}] * 100$
 * : C0 = C 5 min

Table 2-11: Toxicokinetics of WSA after 2-hour i.v. infusion and p.o. administration of WSA to rats and cynomolgus monkeys

Study duration	Species	Route	Dose (mg/kg/day)	Sampling day	Cmax in male/female ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	AUC _{0-inf} in male/female ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)
2 weeks	rat	i.v. infusion for 2 h	10	1	0.123 / 0.152	0.275 / 0.336
				8	BLQ ¹⁾ / BLQ ¹⁾	-
				14	0.192 / 0.181	0.192 / 0.204
2 weeks	rat	i.v. infusion for 2 h	30	1	0.466 / 0.782	1.09 / 1.33
				8	0.515 ¹⁾ / BLQ ¹⁾	-
				14	1.11 / 1.11	1.52 / 1.19
2 weeks	rat	i.v. infusion for 2 h	60	1	1.35 / 1.52	2.88 / 3.55
				8	0.059 ¹⁾ / 0.033 ¹⁾	-
				14	1.68 / 1.61	3.21 / 2.63
4 weeks	rat	p.o.	10	1	N.M.	N.M.
				16	N.M.	N.M.
				28	N.M.	N.M.
4 weeks	rat	p.o.	30	1	N.M.	N.M.
				16	N.M.	N.M.
				28	N.M.	N.M.
4 weeks	rat	p.o.	90	1	N.M.	N.M.
				16	N.M.	N.M.
				28	N.M.	N.M.
2 weeks	monkey	i.v. infusion for 2 h	10	1	1.38 / 1.48	3.04 / 2.62
				8	0.674 ¹⁾ / 0.577 ¹⁾	-
				14	1.34 / 0.648	2.52 / 1.49
2 weeks	monkey	i.v. infusion for 2 h	30	1	4.02 / 3.87	9.34 / 7.76
				8	2.27 ¹⁾ / 2.48 ¹⁾	-
				14	5.11 / 4.31	12.0 / 10.1
2 weeks	monkey	i.v. infusion for 2 h	60	1	6.03 / 7.88	10.1 / 17.9
				8	2.01 ¹⁾ / 1.68 ¹⁾	-
				14	6.44 / 8.32 ²⁾	15.2 / 16.1 ²⁾
4 weeks	monkey	p.o.	10	1	N.S.	N.S.
				14	N.S.	N.S.
				28	N.S.	N.S.
4 weeks	monkey	p.o.	30	1	N.S.	N.S.
				14	N.S.	N.S.
				28	N.S.	N.S.
4 weeks	monkey	p.o.	90	1	N.S.	N.S.
				14	N.S.	N.S.
				28	N.S.	N.S.

1) : Concentrations at 2 hours .

2) : n = 3

- : Not calculated

N.S. : No sample

N.M. : Not measurable

Table 2-12: Toxicokinetics of active body after 2-hour i.v. infusion and p.o. administration of WSA to rats and cynomolgus monkeys

Study duration	Species	Route	Dose (mg/kg/day)	Sampling day	Cmax in male/female ($\mu\text{g/mL}$)	AUC ⁵⁾ in male/female ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)
2 weeks	rat	i.v. infusion for 2 h	10	1	0.795 / 0.994	3.07 / 8.87
				8	0.599 ¹⁾ / 0.870 ¹⁾	-
				14	0.685 / 0.863	4.34 / 9.06
			30	1	3.16 / 3.20	22.3 / 32.3
				8	3.00 ¹⁾ / 2.88 ¹⁾	-
				14	2.84 / 2.96	24.8 / 28.6
60	1	7.66 / 8.17	66.6 / 92.5			
	8	4.43 ¹⁾ / 6.22 ¹⁾	-			
	14	5.84 / 5.77	43.4 / 51.7			
4 weeks	rat	p.o.	10	1	0.259 / 0.422	1.20 / 4.50
				16	0.252 ¹⁾ / 0.633 ¹⁾	-
				28	0.274 / 0.850	1.87 / 8.02
			30	1	1.28 / 1.55	7.64 / 15.9
				16	1.31 ¹⁾ / 1.89 ¹⁾	-
				28	1.36 / 1.92	10.7 / 20.1
90	1	3.86 / 4.74	36.8 / 62.3			
	16	3.03 ¹⁾ / 5.49 ¹⁾	-			
	28	3.88 / 4.60	35.7 / 48.2			
2 weeks	monkey	i.v. infusion for 2 h	10	1	2.96 / 3.25	31.0 / 34.1
				8	3.68 ¹⁾ / 2.74 ¹⁾	-
				14	3.49 / 2.37	30.8 / 21.4
			30	1	8.88 / 8.07	100 / 85.0
				8	11.7 ¹⁾ / 8.65 ¹⁾	-
				14	10.8 / 8.80	127 / 99.7
60	1	13.3 / 17.1	190 / 230			
	8	34.2 ¹⁾ / 26.6 ¹⁾	-			
	14	29.8 / 19.7 ³⁾	479 / 253 ³⁾			
4 weeks	monkey	p.o.	10	1	1.92 / 1.60	18.1 / 18.7
				14	1.76 ²⁾ / 1.63 ²⁾	-
				28	1.69 / 1.91	19.3 / 19.7
			30	1	3.98 / 4.06	55.5 / 55.6
				14	6.04 ²⁾ / 5.45 ²⁾	-
				28	5.32 / 4.68	74.3 / 57.2
90	1	15.0 / 6.21	241 / 103			
	14	25.0 ²⁾ / 18.5 ²⁾	-			
	28	18.2 / 12.2 ⁴⁾	283 / 212 ⁴⁾			

1) : Concentrations at 2 hours.

2) : Concentrations at 4 hours

3) : n = 3

4) : n = 2

5) : AUC_{0-inf} in rats, AUC₀₋₂₄ in monkeys

- : Not calculated

Table 2-13: Toxicokinetics of pro-moiety after 2-hour i.v. infusion and p.o. administration of WSA to rats and cynomolgus monkeys

Study duration	Species	Route	Dose (mg/kg/day)	Sampling day	Cmax ¹⁾ in male/female (μ g/mL)	AUC _{0-inf} in male/female (μ g•h/mL)
2 weeks	rat	i.v. infusion for 2 h	10	1	0.335 / 0.342	0.728 / 0.760
				8	0.197 / 0.166	-
				14	0.301 / 0.335	0.667 / 0.895
			30	1	1.25 / 1.09	2.80 / 2.77
				8	0.963 / 0.687	-
				14	1.27 / 1.32	3.43 / 3.32
60	1	3.18 / 3.47	7.33 / 8.91			
	8	1.55 / 1.04	-			
	14	3.21 / 2.56	7.56 / 6.23			
4 weeks	rat	p.o.	10	1	0.0910 / 0.0883	0.189 / 0.225
				16	0.081 / 0.066	-
				28	0.153 / 0.200	0.326 / 0.300
			30	1	0.359 / 0.425	0.858 / 1.02
				16	0.306 / 0.208	-
				28	0.448 / 0.550	1.21 / 1.26
			90	1	2.13 / 1.86	5.21 / 5.15
				16	1.41 / 0.880	-
				28	1.82 / 1.25	5.68 / 4.22
2 weeks	monkey	i.v. infusion for 2 h	10	1	0.322 / 0.220	0.749 / 0.518
				8	0.468 / 0.304	-
				14	0.489 / 0.245	1.12 / 0.545
			30	1	1.24 / 0.840	2.85 / 2.05
				8	1.49 / 0.968	-
				14	1.75 / 1.09	4.28 / 2.52
60	1	2.38 / 2.25	5.71 / 5.14			
	8	2.11 / 1.92	-			
	14	3.55 / 2.53 ²⁾	9.06 / 6.18 ²⁾			
4 weeks	monkey	p.o.	10	1	N.S.	N.S.
				14	N.S.	N.S.
				28	N.S.	N.S.
			30	1	N.S.	N.S.
				14	N.S.	N.S.
				28	N.S.	N.S.
90	1	N.S.	N.S.			
	14	N.S.	N.S.			
	28	N.S.	N.S.			

1) : Cmax on study day 8 or 16 was the concentration at 2 hours.

2) : n = 3

- : Not calculated

N.S. : No sample

Table 2-14: Kinetic parameters of conversion of WSA to active body via the intermediate in rat, monkey and human plasma

Parameter	Time (min)					
	Rat		Monkey		Human	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
T1/2(WSA)	0.25	0.03	0.85	0.05	0.75	0.03
T1/2(intermediate)	0.80	0.00	0.47	0.02	0.46	0.03
T50%	1.41	0.04	1.75	0.05	1.60	0.08

T50%: WSA から中間体を経て 50%の活性本体が生成する時間。各々の値は、測定されたこの値の「mean±SD」を示している。WSA とその中間体の T1/2 は以下の代謝モデルを用いて計算された。T50%は、観察された値から計算された。

WSA の血漿中での変換モデル

k1	k2
WSA (A) ----> intermediate (B) ----> active body (C)	
dA/dt = -A*k1	
dB/dt = A*k1-B*k2	
dC/dt = B*k2	

k1 とk2は WSA から中間体へおよび中間体から活性本体への変換率 (min⁻¹) を示している。A、B、Cは WSA、中間体、活性本体の濃度 (mcM)をそれぞれ示している。

Table 2-15: The effect of WSA on the hepatic metabolizing enzyme systems in rats (2-week infusion toxicity study of WSA in rats)

< Male rats, n=6>

() : % of control

Dose (mg/kg)	Cytochrome P-450 concentration (nmol/mg pro.)	p-Nitroanisole O-demethylase activity (nmol/min/mg pro.)	testosterone hydroxylase activity (nmol/min/mg protein)				
			2 α	2 β	6 β	7 α	16 β
0	0.44 ± 0.11 (100)	0.65 ± 0.18 (100)	1.42 ± 0.59 (100)	0.19 ± 0.06 (100)	1.83 ± 0.66 (100)	0.31 ± 0.06 (100)	0.12 ± 0.03 (100)
10	0.44 ± 0.11 (100)	0.65 ± 0.21 (100)	1.57 ± 0.84 (111)	0.16 ± 0.02 (84)	1.41 ± 0.29 (77)	0.27 ± 0.04 (87)	0.10 ± 0.03 (83)
30	0.37 ± 0.08 (85)	0.38 ± 0.05 (58)	0.40 ± 0.20 * (28)	0.16 ± 0.01 (84)	1.37 ± 0.21 (75)	0.33 ± 0.06 (106)	0.06 ± 0.02 (50)
60	0.48 ± 0.15 (109)	0.60 ± 0.25 (92)	1.29 ± 0.78 (91)	0.22 ± 0.08 (116)	2.04 ± 0.72 (111)	0.32 ± 0.07 (103)	0.12 ± 0.06 (100)

< Female rats, n=6>

Dose (mg/kg)	Cytochrome P-450 concentration (nmol/mg pro.)	p-Nitroanisole O-demethylase activity (nmol/min/mg pro.)	testosterone hydroxylase activity (nmol/min/mg protein)				
			2 α	2 β	6 β	7 α	16 β
0	0.39 ± 0.06 (100)	0.47 ± 0.11 (100)	n.d.	0.06 ± 0.02 (100)	0.22 ± 0.06 (100)	0.64 ± 0.18 (100)	0.08 ± 0.03 (100)
10	0.29 ± 0.05 (75)	0.34 ± 0.07 (72)	n.d.	0.06 ± 0.01 (100)	0.21 ± 0.04 (95)	0.46 ± 0.09 (72)	0.07 ± 0.01 (88)
30	0.41 ± 0.06 (103)	0.41 ± 0.12 (87)	n.d.	0.15 ± 0.04 ** (250)	0.41 ± 0.09 * (186)	0.67 ± 0.19 (105)	0.09 ± 0.03 (113)
60	0.44 ± 0.15 (113)	0.51 ± 0.22 (109)	n.d.	0.23 ± 0.08 ** (383)	0.55 ± 0.17 ** (250)	0.59 ± 0.22 (92)	0.14 ± 0.06 * (175)

Statistically significant difference from control indicated as *(p<0.05) and **(p<0.01) by oneway ANOVA and Dunnett's multiple comparison test. n.d. : not detected

< Positive controls of rat liver microsomes induced by known inducers, which were purchased from Xenotech>

Dose (mg/kg)	Cytochrome P-450 concentration (nmol/mg pro.)	p-Nitroanisole O-demethylase activity (nmol/min/mg pro.)	testosterone hydroxylase activity (nmol/min/mg protein)				
			2 α	2 β	6 β	7 α	16 β
Corn oil (x 4days)	1.26 (100)	0.96 (100)	2.51 (100)	0.31 (100)	2.96 (100)	0.39 (100)	0.13 (100)
3-MC (54 x 4days)	2.42 (192)	5.93 (619)	1.47 (58)	0.37 (120)	3.85 (130)	0.93 (236)	0.08 (61)
PB (80 x 4days)	3.08 (2.44)	3.42 (357)	1.28 (51)	0.75 (245)	8.77 (296)	0.72 (183)	2.97 (2216)
DEX (50 x 4days)	2.375 (188)	0.58 (60)	0.12 (5)	1.73 (567)	10.74 (363)	0.30 (76)	0.16 (119)

P-450 concentration : data are from Xenotech

3-MC : 3-methylcholanthrene

PB : phenobarbital

DEX : dexamethasone

Corn oil : vehicle control

Table 2-16: The effect of WSA on the hepatic metabolizing enzyme systems in monkeys [2 week infusion toxicity study of WSA in monkeys with recovery period (1 month after the final administration)]

< Male monkeys, n=3>

() : % of control

Dose (mg/kg/day)	Cytochrome P-450 concentration (nmol/mg protein)	p-Nitroanisole O-demethylase activity (nmol/min/mg protein)	Testosterone hydroxylase activity (nmol/min/mg protein)				
			2 α	2 β	6 β	7 α	16 β
0	0.80 \pm 0.03 (100)	4.29 \pm 0.55 (100)	0.042 \pm 0.009 (100)	0.54 \pm 0.17 (100)	3.76 \pm 1.46 (100)	n.d.	0.69 \pm 0.03 (100)
10	1.42 \pm 0.23 (178)	6.99 \pm 1.21 (163)	0.048 \pm 0.009 (114)	0.68 \pm 0.06 (126)	4.43 \pm 0.38 (118)	n.d.	1.59 \pm 0.24 (230)
30	1.57 \pm 0.23 * (196)	12.05 \pm 2.40 ** (281)	0.045 \pm 0.003 (107)	0.53 \pm 0.09 (98)	3.03 \pm 0.68 (81)	n.d.	1.79 \pm 0.27 * (259)
60	2.23 \pm 0.46 ** (279)	12.71 \pm 3.24 ** (296)	0.037 \pm 0.020 (88)	0.52 \pm 0.24 (96)	2.85 \pm 1.52 (76)	n.d.	1.92 \pm 0.85 * (278)

< Female monkeys, n=3>

Dose (mg/kg/day)	Cytochrome P-450 concentration (nmol/mg protein)	p-Nitroanisole O-demethylase activity (nmol/min/mg protein)	Testosterone hydroxylase activity (nmol/min/mg protein)				
			2 α	2 β	6 β	7 α	16 β
0	1.00 \pm 0.13 (100)	5.32 \pm 1.37 (100)	0.048 \pm 0.011 (100)	0.65 \pm 0.10 (100)	4.62 \pm 0.73 (100)	n.d.	0.66 \pm 0.12 (100)
10	1.00 \pm 0.09 (100)	5.51 \pm 1.63 (104)	0.055 \pm 0.008 (115)	0.68 \pm 0.07 (105)	4.62 \pm 0.53 (100)	n.d.	0.95 \pm 0.29 (144)
30	1.78 \pm 0.17 (178)	10.75 \pm 0.39 (202)	0.051 \pm 0.009 (106)	0.67 \pm 0.05 (103)	4.15 \pm 0.22 (90)	n.d.	2.14 \pm 0.44 * (324)
60	1.78 \pm 0.66 (178)	10.84 \pm 4.60 (204)	0.059 \pm 0.010 (123)	0.75 \pm 0.09 (115)	5.01 \pm 0.55 (108)	n.d.	1.95 \pm 0.81 * (295)

Statistically significant difference from control indicated as *p<0.05 and ** p<0.01 by oneway ANOVA and Dunnett's multiple comparison test
n.d. : not detected

< Male monkeys, at the end of recovery period, n=1 >

Dose (mg/kg/day)	Cytochrome P-450 concentration (nmol/mg protein)	p-Nitroanisole O-demethylase activity (nmol/min/mg protein)	Testosterone hydroxylase activity (nmol/min/mg protein)				
			2 α	2 β	6 β	7 α	16 β
0	0.87 (100)	3.42 (100)	0.058 (100)	0.79 (100)	5.92 (100)	n.d.	0.59 (100)
10	0.77 (88)	4.64 (136)	0.056 (97)	0.80 (101)	6.18 (104)	n.d.	0.59 (100)
30	0.73 (85)	5.29 (154)	0.060 (103)	0.78 (98)	6.04 (102)	n.d.	0.40 (69)
60	0.87 (100)	4.48 (131)	0.038 (66)	0.53 (67)	4.29 (72)	n.d.	0.68 (116)

n.d. : not detected

< Female monkeys, at the end of recovery period, n=1 >

Dose (mg/kg/day)	Cytochrome P-450 concentration (nmol/mg protein)	p-Nitroanisole O-demethylase activity (nmol/min/mg protein)	testosterone hydroxylase activity (nmol/min/mg protein)				
			2 α	2 β	6 β	7 α	16 β
0	0.93 (100)	4.09 (100)	0.036 (100)	0.55 (100)	4.29 (100)	n.d.	0.40 (100)
10	0.87 (93)	4.12 (101)	0.046 (128)	0.57 (103)	4.43 (103)	n.d.	0.47 (116)
30	1.27 (136)	6.07 (149)	0.050 (139)	0.67 (122)	5.14 (120)	n.d.	0.66 (164)
60	0.87 (93)	5.05 (124)	0.050 (139)	0.75 (137)	5.45 (127)	n.d.	0.56 (138)

Table 2-17: Summary of the primary sites and parameters indicating toxicity due to WSA administration (Two- and four-week studies)

Study type	Dose level (mg/kg)	Sex	As active metabolite			Intensity						
			Day	C _{max} (mcg/ml)	AUC (mcg.hr/ml)	Day	Liver toxicity	Endocrinological tox. (adrenals)	Other toxicity			
4-week p.o.	10	Male	0	1.92	18.1	TG	T-CHO	OW	Histo. ¹⁾	OW	Histo. ²⁾	Anemia
			13 *	1.76	n.d.	-	-	-	-	-	-	-
			27	1.69	19.3	-	-	-	-	-	-	-
	Female	0	1.60	19.1	-	-	-	-	-	-	-	-
		13 *	1.63	n.d.	-	-	-	-	-	-	-	-
		27	1.91	19.7	-	-	-	-	-	-	-	-
30	Male	0	3.98	55.5	-	-	-	-	-	-	-	
		13 *	6.04	n.d.	-	-	-	-	-	-	-	
		27	5.32	74.3	-	-	(↑)	(±a)	(↑)	-	-	
	Female	0	4.06	55.6	-	-	-	-	-	-	-	-
		13 *	5.45	n.d.	-	-	-	-	-	-	±#	-
		27	4.68	57.2	-	-	(↑)	±a	-	-	-	-
90	Male	0	15.00	241.0	(↑)	(↓)	(↑)	±a	#	(↑)#	±#	-
		13 *	24.98	n.d.	↑↑	(↓)	(↓)	↑	↑	↑	±	-
		27	18.20	281.0	-	-	-	-	-	-	-	-
	Female	0	6.21	103.0	-	(↓)	(↓)	↑#	±b	#	(↑)#	-
		13 *	18.55	n.d.	↑	↓	↓	↑	±	±	±	±
		27	12.20	212.0	-	-	-	-	-	-	-	-
2-week i.v. infusion	10	Male	0	2.96	31.0	-	-	-	-	-	-	-
			13	3.49	30.8	-	-	-	-	-	-	-
			13	3.25	34.1	-	-	-	-	-	-	-
	Female	0	3.25	34.1	-	-	-	-	-	-	-	-
		13	2.37	21.4	-	-	-	-	-	-	-	-
		13	10.80	127.0	↑	-	(↑) ³⁾	-	-	-	-	-
60	Male	0	8.88	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-
		13	8.80	99.7	-	-	-	-	-	(↑) ³⁾	±	-
		13	13.30	190.0	↑↑	(↓)	(↓)	↑	±	↑	±	-
	Female	0	29.80	479.0	↑	(↓)	(↓)	↑	±a	↑	±	±
		13	17.10	230.0	↑	(↓)	(↓)	↑	±a	↑	-	±
		13	19.70	253.0	-	-	-	-	-	-	-	-

(↑): very slight increase, ↑: slight increase, ↑↑: moderate increase; (↓): very slight decrease, ↓: slight decrease, ↓↓: moderate decrease

1) ±a: Hypertrophy in hepatocytes, ±b: Fatty change in hepatocytes or vacuolation of Ito cells, ±: Hypertrophy in hepatocytes and eosinophilic changes in hepatocytes

2) Thickening of zona fasciculata (including an increase of lipid droplets): ± very slight, + slight, ++ moderate

3) One animal exhibited an increase in organ weight.

#: The results from the 2-week oral toxicity study of the active metabolite of WSA; *: C4h; n.d.: not done

Table 2-18: Itraconazole の 24 時間静脈内持続投与による平均生存日数

1 日当たりの投与用量	投与速度	動物数	平均生存日数 (日)
0 mg/kg/day	1.0 mg/kg/h	5	1.85±0.16
7.2 mg/kg/day	0.3 mg/kg/h	5	3.40±0.72 **
14.4 mg/kg/day	0.6 mg/kg/h	5	3.28±0.57 **
24.0 mg/kg/day	1.0 mg/kg/h	5	7.42±3.2 **

Values represent the mean±SD

Statistical significance of treatment-control difference : * P≤0.05, ** P≤0.01

Table 2-19: ラット感染モデルにおける効果

投与方法: 24 時間静脈内持続投与 x 7 日間

薬物名		WSA		薬物名		Amphotericin B	
感染モデル	C.albicans	死亡例数	肝、腎所見(菌巢数)	感染モデル	A.fumigatus	死亡例数	肝、腎所見(菌巢数)
対照群	5/5	5/5	++	対照群	5/5	5/5	+
用 3 mg/kg/day	5/5	5/5	++	3 mg/kg/day	5/5	3/5	+
10 mg/kg/day	0/5	5/5	-	10 mg/kg/day	0/5	8 mg/kg/day	-
量 30 mg/kg/day	0/5	5/5	-	30 mg/kg/day	0/5	6 mg/kg/day	-
ED ₅₀		5.5 mg/kg		ED ₅₀		3.41 mg/kg	

薬物名		Amphotericin B		薬物名		Amphotericin B	
感染モデル	C.albicans	死亡例数	肝、腎所見(菌巢数)	感染モデル	A.fumigatus	死亡例数	肝、腎所見(菌巢数)
対照群	5/5	5/5	++	対照群	5/5	5/5	+
用 0.3 mg/kg/day	5/5	5/5	++	2 mg/kg/day	3/5	2 mg/kg/day	+
量 1.5 mg/kg/day	5/5	5/5	++	8 mg/kg/day	3/5	8 mg/kg/day	-
6 mg/kg/day	2/5	5/5	-				
ED ₅₀		効果認められるが毒性による死亡も発現し計算できず		ED ₅₀		効果認められるが毒性による死亡も発現し計算できず	

死亡例数: 7 日目における死亡例数

Table 3-1: Summary of toxicity (Fluconazole, Ketoconazole, Itraconazole)

Species	Rat (p.o.)			Monkey (p.o.)	
	Fluconazole	Ketoconazole	Fluconazole	Itraconazole	
Study	2W	4W	2W	2W	2W
Dose (mg/kg)	30,100,150	10, 30	50, 100, 200	15, 100	15, 40, 100
No Toxic dose (mg/kg)	< 30	< 10	< 50	< 15	15
Lethal dose (mg/kg)	-	-	200	-	(100)*
Toxic dose (mg/kg)					
BW & FC	-	-	200	100	40
Liver	30	10	200	15	100
TG/T-CHO	TG150 ↓	T-CHO30 ↓	TG200 ↓ ↓	TG15 ↑	TG100 ↑
Increased weight	30	30	200	30	100
Hypertrophy of hepatocyte	30	30	ND	-	40
Microgranuloma/Degeneration	-	10	ND	15	
Adrenal	-	30	50	100	40
Increased weight		30	50	100	40
Increase of lipid droplets in cortex		-	ND	100	40
Thickening of zonal fascicula		30	ND	100	40

*: Aspiration of vomit ND: not done

Table 3-2: Summary of toxicity (WSA)

Species	Rat		Monkey		
	2W i.v. inf.	4W p.o.	2W i.v. inf.	2W p.o.	4W p.o.
Study					
Dose (mg/kg)	10, 30, 60	10, 30, 90	10, 30, 60	10, 30, 90	10, 30, 90
No Toxic dose (mg/kg)	10	30	10	30	10
Lethal dose (mg/kg)	-	-	-	-	90
Toxic dose (mg/kg)					
BW & FC	-	-	60	90	90
Liver					
TG, T-CHO ↑	-	-	30	90	90
Increased weight	30	90	60	90	30 (slight)
Hypertrophy of hepatocyte	-	90	60	90	30 (slight)
Adrenal					
Increased weight	-	-	60	-	90
Increase of lipid droplets in cortex			60	-	-
Thickening of zonal fascicula			-	-	90
Cmax in marginal toxic dose	(30mg/kg)	(90mg/kg)	(30mg/kg)	(90mg/kg)	(30mg/kg)
Active body (μg/mL)	2.9	4.24	9.8	9.1	5.0

M: Male, F: Female Active body

**Table 3-3: Summary of toxicity in 2-week oral toxicity study in monkeys
(WSA, Itraconazole, Fluconazole)**

A: Grade of toxicity

Animals	Cynomolgus monkey, 1 monkey/dose/sex								
Dose levels	WSA: 0, 10, 30, 90 mg/kg/day,			Carrier: Distilled water					
				Itraconazole: 0, 15, 40, 100 mg/kg/day,			Carrier (35 % HPCD/PG; Hydroxypropyl cyclodextrin/Propyleneglycol)		
				Fluconazole: 0, 15, 100 mg/kg/day,			Carrier (0.5 % CMC-Na sol.)		
Administration term	2-week								
Test article	WSA			Itraconazole			Fluconazole		
Dosage (mg/kg/day)	10	30	90	15	40	100	15	100	
Mortality	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Day12 Death aspiration of vomit								
Organ weight (Liver)	-	-	↑	-	-	↑	-	↑↑	
(Adrenal)	-	-	-	-	↑	↑	-	↑	
Blood Chemistry									
TG	-	-	↑	(↑)	-	↑↑↑	↑	↑	
T-CHO	-	-	↓	-	-	↓	-	-	
Histopathology (Liver)									
-Hypertrophy of hepatocytes	-	-	+	-	+	++	-	-	
-Fatty change of hepatocytes	-	-	-	-	-	-	-	+++	
-Eosinophilic change of perilobular hepatocytes	-	-	-	-	-	-	-	++	
-Single cell necrosis	-	-	-	-	-	-	-	+	
-Brown pigment deposition of kupffer cells	-	-	-	-	-	-	-	+	
-Degeneration of perilobular hepatocytes	-	-	-	-	-	-	+	-	
(Adrenal)									
-Increase of lipid droplets in cortex & Thickening of cortex	-	-	-	-	+	++	-	+	

↓; Slight decrease, ↓↓; Moderate decrease, ↓↓↓; Severe decrease
(↑); Very slight increase, ↑; Slight increase, ↑↑↑; Severe increase
-; No change, ±; Very slight, +; Slight, ++; Moderate, +++; Severe

B: Toxic dose

Animals	Cynomolgus monkey, 1 monkey/dose/sex								
Test article	WSA			Itraconazole			Fluconazole		
Dose (mg/kg/day)	10	30	90	15	40	100	15	100	
Carrier	Distilled water			35 % HPCD/PG#			0.5 % CMC-Na sol.		
No Toxic dose (mg/kg)	30			< 15			< 15		
Toxic dose (mg/kg)									
Liver	90			15			15		
Organ weight ↑	90			100			100		
Blood Chemistry									
TG ↑ / T-CHO ↓	90			15			15		
Histopathology									
-Hypertrophy of hepatocytes	90			40			-		
-Fatty change of hepatocytes	-			-			100		
-Single cell necrosis	-			-			100		
-Eosinophilic change of perilobular hepatocytes	-			-			100		
-Brown pigment deposition of kupffer cells	-			-			100		
-Degeneration of perilobular hepatocytes	-			-			15		
Adrenal	-			40			100		
Organ weight	-			40			100		
Histopathology	-			40			100		
-Increase of lipid droplets in cortex & Thickening of cortex	-			40			100		

-; No change, ±; Very slight, +; Slight, ++; Moderate, +++; Severe
#: Hydroxypropyl cyclodextrin/Propyleneglycol

Table 3-4: Toxicity in Cynomolgus Monkeys with PK Profile

Dose (mg/kg/ day)	2W - i.v. infusion			2W - p.o.		
	Toxicity	Active body		Toxicity	Active body	
		Cmax (µg/ml)	AUC (µg.h/ml)		Cmax (µg/ml)	AUC (µg.h/ml)
10	Non-toxic:	2.93	26.1	Non-toxic:	1.2	14.9
30	Marginal-tox: Liver weight (very slight) ↑	9.8	113.4	Non-toxic:	1.7	28.5
60	Toxic: Vomiting BW & FC ↓ Liver weight ↑ Lipid droplets in adrenal	24.8	366	-	-	-
90				Toxic: Vomiting BW & FC ↓ Liver weight ↑ Hypertrophy of hepatocytes	9.1	148.8

The Development of New Water-soluble Azole Antifungal Agents from the Safety Aspect: Toxicology and Efficacy of WSA administered via Continuous Intravenous Infusion

[Abstract]

The incidence of deep-seated mycosis has been on the increase recently. This type of mycosis often causes serious or fatal infection in patients with a weakened or compromised immune system. For patients who are suffering from deep-seated mycosis, their general health has often deteriorated prior to the development of their fungal infection. Therefore, the drugs used to treat their mycosis need to be effective via intravenous administration and should also have a low toxicity. It is, however, very difficult to produce a drug that possesses a selective toxicity targeted against fungi as both mammals (the human host) and fungi are both eukaryotes. Compared with anti-bacterial drugs, the development of drugs for the treatment of deep-seated mycosis lags far behind with regard to both efficacy and safety. At the present time, most of the anti-fungal drug treatments are applied orally and treatments are usually performed in the health clinic setting. The relatively safe drugs cover only a narrow anti-fungal spectrum and often induce drug resistance. The antifungal drugs that are considered to be relatively effective in general have the dual disadvantage of having a narrow safety margin and are usually quite difficult to dispense via i.v. infusion due to their lipophilic, water-insoluble characteristics.

Taking the above issues into consideration, a water-soluble azole derivative, 4-[1-[(3-methylaminoacetoxymethyl-pyridin-2-yl)-methyl-carbamoyloxy]-ethyl]-1-[(2R,3R)-3-[4-(4-cyanophenyl)-thiazol-2-yl]-2-(2,5-difluoro-phenyl)-2-hydroxy-butyl]-1H-[1,2,4]triazol-4-ium chloride hydrochloride (hereinafter referred to WSA) has recently been developed. The active form of this compound was not water soluble, but it was modified with the addition of quaternary ammonium salt to produce a soluble prodrug, which is both injectable and applicable orally. Following administration, this drug is quickly hydrolyzed enzymatically into its active metabolite.

This study examined the safety of the continuous intravenous infusion of this drug as well as its oral administration. Also discussed are the bioavailability of WSA using new toxicological and pharmacokinetic approaches and the introduction of a new method of drug efficacy

evaluation.

This examination also includes a toxicological investigation of WSA in monkeys as well as in rodents. To compensate for the possible species difference in the metabolic pathways for this drug (prodrug), and also considering the toxic potential of the liver and secretory system (as is encountered with existing azole analogues), monkeys were employed with the expectation of a more accurate prediction of WSA safety, since the metabolic system of monkeys is very similar to humans. As one of the objectives of this study was to examine the bioavailability and safety of WSA continuous i.v. infusion in humans, it was considered reasonable and pertinent to conduct this study utilizing the monkey. The monkey is the species that is the closest approximation to humans from the viewpoint of both physiology and toxicology.

This study was conducted with the consent of the ethical committee for animal experiments in Nippon Roche K.K.

In the first chapter, the evaluation of repeated oral dose toxicities on the existing azole analogues, fluconazole, itraconazole and ketoconazole was performed.

Although fluconazole possesses a narrow spectrum, it is the most frequently used drug for both oral and intravenous treatment. The study on fluconazole was performed as 2-week and 4-week toxicity studies in SD-Slc rats and a 2-week toxicity study with cynomolgus monkeys.

For itraconazole, a highly lipophilic compound that is frequently utilized for oral treatment, a 2-week toxicity study was undertaken using cynomolgus monkeys.

Using ketoconazole, a drug that has not yet been approved in Japan for human treatment (except for external application) because of its severe toxicity, a 2-week toxicity study was conducted in SD-Slc rats.

The drug dosage utilized in the toxicity studies were as follows:

Fluconazole:	Rat, 2-week study	30, 100, 150, 450 mg/kg/day
	Rat, 4-week study	10, 30 mg/kg/day
	Monkey, 2-week study	15, 100 mg/kg/day
Itraconazole:	Monkey, 2-week study	15, 40, 100 mg/kg/day
Ketoconazole:	Rat, 2-week study	50, 100, 200 mg/kg/day

Statistical analysis (Pitman test: Lehman, E.L., 1974) was applied to the measured data collected in this chapter from hematology values, blood chemistry results and organ weight values only when the treatment group consisted of 3 or more animals (Statistical significance: $p \leq 0.05$).

The data obtained in this chapter indicates that these azole analogues adversely affect primarily the liver (increased weight, hypertrophy of hepatocytes, fatty changes) and the adrenal (increased weight, increase of lipid droplets in the cortex, etc.). In addition, the affects of fluconazole treatment were focused mainly on the liver, but itraconazole and ketoconazole tend to affect the adrenal more severely. The comparison between the rats and the monkeys, as the experimental subjects indicated that the toxic characteristics were very similar in both species. The primary differences observed between the two species was the toxicity exhibited in the fluconazole group occurred at much lower drug concentrations in monkeys.

More detailed results that were obtained from chapter one are as follows.

Fluconazole: In the rat study, liver toxicity was detected at 30 mg/kg/day and higher for the 2-week administration group and at 10 mg/kg/day and higher for the 4-week administration group. In the high dosage group (30 mg/kg/day) of the 4-week rat treatment group, adrenal toxicity was also uncovered. In the 2-week monkey treatment group, liver toxicity was observed in both dosage groups (15 and 100 mg/kg), and adrenal toxicity was found only in the highest (100 mg/kg/day) group.

Itraconazole: In the 2-week monkey treatment group, toxic changes were detected in the adrenal (40 mg/kg/day and higher) and in the liver for the 100 mg/kg/day group (increased triglyceride: 15 mg/kg and higher).

Ketoconazole: In the 2-week rat study, liver toxicity was observed in the 200 mg/kg/day group, and adrenal toxicity was observed in all dosage groups (50 mg/kg/day and higher).

In the second chapter, the efficacy, bioavailability and safety of WSA, utilizing monkeys, rats and mice as the experimental models was investigated.

In the first section, the results of both single dose and repeated WSA treatment toxicity studies are examined. In the second section of this chapter, the blood concentration levels

of the active WSA metabolite are determined and subjected to toxicokinetic analysis. In the third section, a new evaluation method was introduced to facilitate comparisons between WSA and the other effective, but insoluble antifungal drugs, focusing on their efficacy and toxicity when the administration is intravenous.

The first section of the second chapter discussed the results obtained from the toxicity studies on WSA treatment in rats and monkeys. The treatment protocol was as follows:

Single oral treatment:	rat, monkey	500, 1,000, 2,000 mg/kg
Single i.v. dosing (0.1 mL/body/min.):	rat	10, 20, 40 mg/kg
Single i.v. infusion (6.25 or 8.33 mL/kg/h):	monkey	90, 120 mg/kg
2-week repeated i.v. Infusion: (6.25 or 12.5 mL/kg/h, 2 h/day)	rat, monkey	10, 30, 60 mg/kg/day
4-week repeated oral treatment:	rat, monkey	10, 30, 90 mg/kg/day

The results obtained from this section are discussed as follows:

Rats: From the data collected, the lethal dosages in the single treatment study were very high, specifically 40 mg/kg (i.v.) and 1,000 mg/kg (oral). In the repeated WSA administration studies, no animal expired from either the oral treatment group (highest dose: 90 mg/kg/day) or in the i.v. infusion group (highest dose: 60 mg/kg). In the 2-week repeated infusion study, the non-toxic level was estimated to be 10 mg/kg/day. An increase in the liver weight values was observed in the 30 and 60 mg/kg/day groups, but accompanying histopathological changes were not detected. In the 4-week repeated oral treatment study, no significant changes were observed in either the liver or adrenal for the 30 mg/kg/day group. Therefore, the non-toxic dosage level was set at 30 mg/kg/day. For the 90 mg/kg/day group, hepatotoxicity (increased liver weight and hypertrophy of hepatocytes) was detected.

Monkeys: The WSA lethal dosages determined for in the single treatment studies were 64 mg/kg (i.v. bolus), 120 mg/kg (i.v. infusion) and 2,000 mg/kg (oral). In the 4-week repeated oral treatment study, expiration of a few of the monkey animal models occurred in the 90 mg/kg/day group, and a slight liver toxicity (increased liver weight and hypertrophy of the hepatocytes) was observed in the 30 mg/kg/day animal group. In the 2-week repeated i.v. infusion study, toxic effects were encountered in the examination of the liver and adrenal from both the 30 and 60 mg/kg/day groups. The non-toxic WSA dosage was estimated to be 10 mg/kg/day for both the oral (4 weeks) and the i.v. (2 weeks) studies.

When compared with fluconazole, the results of these rat studies indicate that WSA has significantly weaker and less toxic effects on both the liver and adrenal. WSA's minimum toxic level was higher than for fluconazole. The adverse effects induced by WSA on the adrenal were present only in the long-term administration groups and within dosage level group where hepatotoxicity was demonstrated. The toxic properties and effects of WSA are very similar to fluconazole.

In the monkeys treated with fluconazole and itraconazole over a 2-week period (oral), an increase in the serum triglyceride values was detected. This parameter indicates that these drugs were having a toxic effect on the liver of these animals and the effect was observed in the 15 mg/kg/day and higher dosage groups. In the 4-week oral WSA toxicity study, a similar effect was uncovered, but only in the 30 mg/kg/day group and higher, which supports the claim of a lower toxicity for the WSA treatment.

In the second section of this chapter, a toxicokinetic analysis was performed utilizing the data collected the studies described in the first section. In these studies, the blood concentrations of WSA and its active metabolite were assayed and recorded. The C_{max} , AUC and $T_{1/2}$ values were then calculated. The results obtained demonstrated that WSA was rapidly eliminated for the animal species that were evaluated in this experiment, for both oral and i.v. infusion. The C_{max} and AUC values for the active metabolite exhibited dose-dependent increases. This indicates that the conversion of the prodrug into the active metabolite was rapid. The active metabolite also remained bioavailable for a longer period of time in the monkeys than in the rats.

Rat $T_{1/2}$: 3.5 h (oral) and 5.1 h (infusion)

Monkey $T_{1/2}$: 12.8 h (oral) and 9.8 h (infusion).

These results suggest that a once-a-day treatment protocol with WSA should be both adequate and effective for use in clinical practice. The oral bioavailability of WSA was very good; measured at 62% in the rat groups and 87% in the monkey groups. The fact that the oral administration can achieve nearly 90% of the blood WSA concentration levels reached by i.v. infusion suggests the feasibility of effective oral treatment in clinical use.

The evaluation of the WSA conversion rate from WSA (prodrug) to the intermediate in plasma (*in vitro*) indicated that the $T_{1/2}$ of in humans was similar to the results from the monkey group, and much higher than for the rat group ($T_{1/2}$: humans 0.75 min., monkeys 0.85 min., rat 0.25 min.). These results support the application of monkey pharmacokinetic

data as valid predictor for WSA performance in humans. However, the total conversion rate from WSA to the active body of WSA in plasma (*in vitro*) showed that the $T_{1/2}$ of in humans was similar to that in monkeys and rats ($T_{1/2}$: humans 1.6 min., monkeys: 1.75 min., rat: 1.41 min.).

In summary, the studies utilizing the monkey groups demonstrated that a protocol of once-a-day administration of WSA (prodrug) was effective in establishing the concentration of the active metabolite to be high enough for both effective and safe treatment of deep-seated mycosis in humans.

The first and second sections of the second chapter have substantiated the following points:

1. WSA administration adversely affects both the liver and adrenals, as was the case with the existing azole analogues. These negative effects were slight, however, when compared to the existing azole.
2. The i.v. infusion treatment using WSA was very safe, even when the affects were compared with the oral administration. The i.v. administration of the existing anti-fungal drugs had induced severe toxicity, but WSA did not cause sever toxic changes.

In the third section of this chapter, a new method for the evaluation of the efficacy of nearly insoluble compounds, which are difficult to administer intravenously at high enough concentration to both be effective and safe, was introduced. Employing continuous i.v. infusion, sufficient data was collected to evaluate the efficacy of these compounds, despite the low concentration of these solutions. To increase the accuracy of this efficacy evaluation, referrals to the histological findings of renal lesions, damage to the target organs, and the incorporation of histological criteria were included in the evaluation. The results of of this new method of efficacy, evaluation as applied to WSA treatment are also discussed in this section.

To establish this efficacy evaluation method, itraconazole and the ICR mouse model of systemic candidiasis were studied over a 14-day treatment. For the efficacy comparison evaluation, WSA or Amphotericin B were i.v. infused into a F344 fischer rat model representing systemic candidiasis or systemic aspergillosis for a period of 7 days. For both of these experiments, the animals were administered one of the test compounds, continuously via i.v., at a low concentration. The infusion was maintained at a fixed rate using a catheter inserted into the external jugular vein. During the treatment period, the

blood concentration of each compound was measured and recorded.

Itraconazole, a nearly insoluble drug, was infused into the mouse models at a dosage level of 24 mg/kg/day over a period of 3 days. The blood concentration of this drug was maintained at ca. 0.3 μ g/mL. The average survival time was significantly prolonged (1.85 days for the control group, 7.42 days for the itraconazole group). In the treatment group, a decrease with renal bacteria count was confirmed, and the signs indicative of infection were ameliorated. In the efficacy comparison study, no death were encountered during the drug administration period among the F344 fischer rats treated with 10 mg/kg/day of WSA. Within the kidney of these animals, no signs of infection were detected the end of the 7-day treatment period. The blood levels of the active drug metabolite were maintained above 0.05 μ g/mL throughout this infusion period. The ED₅₀ value (during dosage level with a 50% survival rate) for WSA was estimated to be 5.5 mg/kg for systemic candidiasis and 3.41 mg/kg for systemic aspergillosis. The minimal effective concentration was estimated to be ca. 0.05 μ g/mL. With amphotericin B, some rats expired during the 7-day administration period (candidiasis group at 6 mg/kg/day and aspergillosis group at 8 mg/kg/day). The dead rats, exhibited characteristics of toxicity attributable to amphotericin B in their kidneys and livers. However, the signs of infection were not found in the kidney of these animals.

In the ICR-mouse model attempting to establish a new efficacy evaluation method, we also introduced a new method to evaluate both the safety and effectiveness of treatment drugs at the same time. Specifically, we set up evaluation criteria of the effective blood concentration of the drug and focused on the histopathological findings that were observed in the target organs. This comparative efficacy study of WSA and amphotericin B using the rats models was then subjected to this new safety evaluation method.

In the third section, it was confirmed that the administration via i.v. infusion was helpful for evaluating the efficacy of nearly insoluble compounds, that also have a short half-life. By administering a low concentration solution of a drug, at a constant rate for 24 hours a day, the blood level of the drug can be maintained within a relatively narrow concentration range. Using this type of infusion, the efficacy of nearly insoluble drugs can be better evaluated.

The conclusions reached in this paper can be summarized as follows:

1. It was confirmed that the existing azole analogues (fluconazole, itraconazole and ketoconazole) adversely and severely affected both the liver and adrenals. The target

organs for azole toxicity were verified and index of toxicity was established for these drugs which was later used as a reference for the new azole drug, WSA.

2. Confirmation that WSA, which has been modified to a water-soluble prodrug, possessed a potency with higher safety and sufficient efficacy for the treatment of systemic mycosis.
3. New experimental methods for both safety and efficacy evaluation of anti-fungal drugs were demonstrated. This involved a combination of procedures for infusion administration, toxicokinetic and pharmacokinetic aspects, and histopathological assessment of the target organs for both toxicity and efficacy.
4. Based upon the results obtained from the above described approaches, it was demonstrated that the new WSA was safer and sufficiently more effective compared to be the existing anti-fungal drugs.
5. Clinical application using intravenous continuous infusion would be an effective first intensive treatment, followed by oral administration.

The cumulative opinion that we believe is supported by data from this report was that the development of a new water-soluble azole, WSA, which would be administered orally, via bolus injection and by continuous i.v. infusion possesses sufficient efficacy and is safer than its azole precursors.