

氏名(本籍)	小林和子(神奈川県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第396号
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 赤堀文昭 (副査) 福安嗣昭 木内明男

論文内容の要旨

近年、深在性真菌症は増加傾向にあり、感染抵抗力の低下した患者においては致命的な重症感染症となっているが、その治療薬開発は抗菌活性および安全性の両面から最近感染症と比べて遅れている。特に、静脈内投与の必要な重症患者が多いにもかかわらず、脂溶性が高いため経口投与が中心でかつ毒性の強いものが多いことから、今日、安全で有効性が高い静脈内投与可能な薬物が必要とされている。

そこで筆者は、難溶性薬物をプロドラッグ化して水溶性物質とすることを提案し、合成された新規アゾール系抗真菌薬、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と記載)を用い、安全かつ効果的な使用法としてWSAの静脈内持続投与方法について検討した。

本研究は、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その有用性について究明したものである。

この研究は、日本ロシュに設置する動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

第1章では、既存のアゾール系薬物を用いた毒性試験をSD-Slc系ラット(以下ラット)、カニクイザル(*Macaca fascicularis*, 以下サル)を用いて行い、その毒性の強さと特徴を明らかにした。既存薬物のうち、抗菌スペクトルは狭いが毒性は比較的lowく、経口および静脈内投与の可能なFluconazole(ラット2週間・4週間試験、サル2週間試験)、難溶性のため経口投与で使用されるItraconazole(サル2週間試験)および毒性が強いKetoconazole(ラット2週間試験)をとりあげた。その結果、Fluconazoleではラット肝臓毒性は2週間投与で30mg/kg、4週間投与では10mg/kg以上で、ラット副

腎毒性は4週間投与の30mg/kgで認められた。また、サル2週間投与では肝毒性が15mg/kg以上、副腎毒性が100mg/kgで認められた。また、Itraconazoleのサル2週間投与では副腎毒性が40mg/kg以上で、肝毒性が100mg/kg（トリグリセライドの上昇は15mg/kg以上）で認められた。Ketoconazoleのラット2週間投与では、肝毒性が200mg/kg、副腎毒性が50mg/kg以上で認められた。

既存のアゾール系薬物の主な毒性作用は共通的であり、肝臓（重量増加、肝細胞肥大、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立証した。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を確認した。

第2章では、サルおよびラットを用いてWSAの安全性ならびに有効性の検討から新たな薬物療法の提案を試みた。

第1節では単回投与（経口投与：ラット・サル共に500、1,000、2,000mg/kg、静脈内ボラス投与：ラット10、20、40mg/kg、サル4、16、32、64mg/kg、静脈内持続投与：サル90、120mg/kg）、反復投与毒性試験（経口投与：サル10、30、90mg/kg：2週間（活性体）、ラット・サル共に10、30、90mg/kg：4週間、静脈内持続投与：ラット・サル共に10、30、60mg/kg：2週間）を行ってWSAの毒性を明らかにした。

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とその活性体のトキシコキネティクス解析を行った。また、*in vitro*による血漿中での活性体への変換率も検討した。

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、従来の薬効判定基準である生存日数に加え、予め感染時の標的臓器（腎臓、肝臓）を明らかにし、その標的臓器における病理組織学的変化も評価に加えるという薬効・毒性を同時に判定する方法を新に確立し、その方法を用いて静脈内持続投与方法について検討した。また、WSAの安全性・有効性については非アゾール系だが効果が最も強いAmphotericin Bと比較検討した。なお、試験法の検討では全身性カンジタ症マウスモデルを用い、難溶性のItraconazole（7.2、14.4、24mg/kg/day）を2週間投与した。また、有効性比較試験には全身性カンジタ症および全身性アスペルギルス症ラットモデルを用い、WSA（カンジタおよびアスペルギルス症：3、10、30mg/kg/day）およびAmphotericin B（カンジタ症：0.3、1.5、6mg/kg/day、アスペルギルス症：2、8mg/kg/day）を7日間、1日24時間の定常静脈内持続投与を行ない薬効・毒性を比較した。

その結果、第1節：WSAの単回投与における致死量（ラット：経口投与1,000mg/kg、静脈内ボラス投与40mg/kg、サル：経口投与2,000mg/kg以上、静脈内ボラス投与64mg/kg、静脈内持続投与120mg/kg）は、大きな用量である（毒性の低い）ことが確認された。ラットの反復投与では、経口（最高用量90mg/kg）、静脈内持続（最高用量60mg/kg）投与のいずれにおいても死亡例は認められず、無毒性量は4週間経口投与では30mg/kg、2週間静脈内持続投与では10mg/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90mg/kgで肝毒性（臓器重量増加）が認められ、無毒性量は30mg/kgと推定された。4週間経口投与では90mg/kgで死亡例が発現、30mg/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30mg/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10mg/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10mg/kg、副腎毒性30mg/kg：4週間経口投与）と比較してWSAの毒性発現用量（肝毒性90mg/kg：4週間経口投与）は大きく、毒作用が軽度であることが確認された。副腎への毒作用はFluconazoleと同様に肝毒性よりも大きい用量・長期間投与で確認された。サルでもFluconazoleおよびItraconazoleは2週間経口投与試験で15mg/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の2週間経口投与では90mg/kgでのみ、また、4週間経口投与、2週間静脈内持続投与においても30mg/kg以上でのみ毒性が認められ、WSAの低毒性が確認された。

第2節：第1節の毒性試験の血漿試料を用いWSAおよびその活性体の血中最高濃度（ C_{max} ）、血中濃度曲線下面積（AUC）、半減期（ $t_{1/2}$ ）を測定し、トキシコキネティック解析を行った。その結果、いずれの動物および投与方法においてもWSAは投与後速やかに消失していることが確認された。また、活性体は最高血中濃度（ C_{max} ）、血中濃度曲線下面積（AUC）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。活性体の血中濃度持続時間は、ラット（ $t_{1/2}$ ：経口投与3.5時間、静脈内持続投与5.1時間）に比べサルでは比較的長く（ $t_{1/2}$ ：経口投与12.8時間、静脈内持続投与9.8時間）、サルのデータから、ヒトへの臨床応用において1日1回の投与でその効果が期待された。また、経口投与でのバイオアベイラビリティは極めて良好で、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ことが立証され、経口投与による治療も効果的に行えることが確認された。また、*in vitro*における肝細胞での活性本体への変換率は、ラットでは変換時間が短いヒトとサルは近い値（WSAの $t_{1/2}$ ：ヒト0.75、サル0.85、ラット0.25時間）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。

第3節：マウスを用いた試験では、Itraconazoleの24mg/kg/day投与（血中濃度約0.3 μ g/mLを維持）で、薬効を示す従来の指標とされる平均生存日数に延長が確認された（平均生存日数：対照群1.85日、24mg/kg/day群7.42日）。また、病理学的評価により菌の増殖抑制を示唆する変化（観察視野内の菌体数減少、菌糸出現頻度の減少、菌塊周囲の炎症性細胞浸潤の軽減化など）が肝臓、腎臓で14.4mg/kg/day以上の用量から用量依存性の変化として確認され、この病理学的評価は感度の高い指標であることが立証された。しかし、Itraconazoleの薬効用量24mg/kg/dayは、50%致死量（LD50）[LD50：iv ♂46mg/kg、♀40mg/kg（H.V.Cauteren et al., 1991）]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用量であるが、血中濃度を有効濃度（約0.3 μ g/mL）に保つことでこの投与法の採用は毒性を低減させ、かつ効果を強化して薬効評価の行えることを立証した。

一方、カンジタ症およびアスペルギルス症ラットモデルにおいて、WSAは10mg/kg以上の投与で死

亡例は認められず、腎臓、肝臓における真菌病巣は消失し感染症治癒が確認された。また、腎臓、肝臓には薬物に起因したと考えられる変化も認められなかった。Amphotericin Bは、全身性カンジタ症ラットに6mg/kg、全身性アスペルギルス症ラットに8mg/kgの投与（いずれも最高用量）でのみ、肝臓、腎臓に真菌病巣は確認されず薬効も確認されたが、薬効量と毒性量が同一であることが立証された。

WSAの活性体血中濃度は、薬効の認められた10mg/kg投与では投与期間（7日間）を通し0.05 μ g/mL以上が維持され最小有効濃度と推察された。3mg/kg投与では、初めの3日間の血中濃度が0.02 μ g/mLと有効濃度に達しなかったため効果不十分であったと考えられる。

このように難溶性薬物も含めて安全性と有効性を同時に比較評価するため24時間定常静脈内持続投与方法を採用し、被験薬の血中有効濃度および標的臓器の病理学的所見により抗真菌作用および毒性を評価する新しい組み合わせの評価法を確立し、この方法を用いてWSAの有用性比較試験を行い、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。また、この投与方法は薬物の血中濃度を毒性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。

第3章では、第1章、第2章の結果をもとにWSAの安全性についてヒトへの外挿性も含めて考察し、ヒトでは1日1回0.6-1mg/kgを投与することで十分な効果が期待できると推察された。また、最小有効血中濃度（0.05 μ g/mL）、無毒性量（サル静脈内持続投与10mg/kg）における C_{max} （2.93 μ g/mL）を考慮するとWSAは安全域の広い薬物であることが示された。本薬物は、既存のアゾール系薬物に比較して低い投与量で薬効を発揮し、かつ薬効は低い血中濃度で認められ、さらに毒性はより高い用量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提示された。

本研究の結論は、以下のように要約される。

1. 水溶性プロドラッグとすることで可能となった静脈内持続投与方法を用い、薬効が認められ、かつ毒作用の認められていない血中濃度を維持することが可能となった。これにより、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、安全域を拡大できることを立証した。
2. 安全性と有効性を同時に評価するため、新しい評価試験法を確立した。すなわち、低濃度薬液の静脈内持続投与（24時間持続投与方法）、有効血中濃度の確認、評価指標として病理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。
3. 静脈内持続投与方法と経口投与を組み合わせたより効果的な使用方法も可能であることを立証した。

本研究の成果は、水溶性アゾール系抗真菌薬の有用性について、WSAを静脈内持続投与することで、より有効に、また経口投与と同様に安全かつ効果的に本薬物を使用できることを、薬物動態学的アプローチと新しい薬効判定法を加えて毒性学的研究から明らかにしたことにある。

論文審査の結果の要旨

今日、深在性真菌症（内蔵真菌症）は増加の傾向にあり、日和見感染として致命的な重症感染症発症の原因一つとなっている。一般に重症感染症患者では、薬物経口投与の困難なことが多く、静脈内投与の必要性はきわめて高い。それゆえ、深在性真菌症に対しては経口投与および静脈内投与の両方が可能で、しかもいずれの投与方法においても安全性の高い、有効な薬物の開発が強く望まれている。

著者は、これまでに開発され使用されている薬物の中では大きな課題を残しながらも、比較的安全性が高く効果も高いとされているアゾール系薬物を取り上げ、より安全性・有効性の高い薬物の開発とその臨床応用でのより効果的な療法について検討した。すなわち、脂溶性の高い物質を水溶性物質のプロドラックすることをトキシコロジストの立場から提案し、その結果として、経口および静脈内投与の可能な薬物、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と略す）が開発された。さらに、この薬物のより安全な適用と有効性を高める方法として、静脈内点滴投与（静脈内持続投与）による療法についても検討した。

その成績の概要は次のとおりである。

第1章では、既存アゾール系薬物（フルコナゾール、イトラコナゾール、ケトコナゾール）のSDラットおよびカニクイザルにおける毒性を検討した。既存のアゾール系薬物の主な毒作用は肝臓（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）にみられ、フルコナゾールでは肝毒性、イトラコナゾールおよびケトコナゾールでは副腎毒性の発現しやすいことを確認した。

第2章では、新たな薬物療法を提案するための研究としてWSAの安全性、有効性についてサルおよびラットを用いて検討した。第1節ではWSAの毒性を明らかにし、第2節ではヒトでの安全性をより正確に評価するためにWSAおよびその活性本体の血中濃度を測定して、トキシコキネティックス解析を行った。

第1節、第2節の結果から、WSAの毒作用は従来の抗真菌薬と同様、肝臓、副腎に認められ既存の静脈内投与による抗真菌薬と比較し、WSAの静脈内持続投与は経口投与と同様、安全に投与できることを確認した。

毒性の低減化を期待する場合、無毒性用量以下での血中濃度を維持し、特にC_{max}は有効濃度以上であれば低いほうがよい。すなわち、毒性を少なくしかつ高い抗真菌作用を期待するには、C_{max}は有効濃度以上で、なるべく低く、かつ、その持続時間を長くするためにAUCの大きくなることが望ましいとされている。このことを本章第1節で実証した。また、本薬物の静脈内持続投与方法は有用な方法であることを立証した。

第3節では難溶性の多い抗真菌薬の薬効評価を行うに際し、静脈内持続投与方法を応用し、毒性評価においては従来の生死による判定だけではなく標的臓器の組織学的判定をも併せた（毒作用検出感度を高めた）、いわゆる「安全性と有効性を同時点で評価する」試験法（1日24時間、低濃度薬液を持続

的に定速投与、血中濃度を持続)の有用性を証明した。次いで、毒作用検出感度を高めたこの試験法と新たに確立した静脈内持続投与法を用いてWSAの安全性と有効性をアンホテリシンBと比較検討した。その結果、WSAはカンジダ症およびアスペルギルス症のいずれの感染症においてもアンホテリシンBより安全性および有効性において優れていることを明らかにした。

本研究の成果は、

- 1) 既存の薬物の毒性を明確にし、次いでその毒作用の発現しない用量と用法を動物実験を通して究明した。
- 2) トキシコロジストからプロドラッグとすることを提案し、水溶性アゾール系薬物を開発させ、静脈内持続投与を用い、薬物動態学的アプローチと新しい薬効判定法を導入して、新規薬物の有用性(有効性と安全性)を立証した。

このように、本論文の新規性は、これまでの薬物の開発はその有効性が強調され、副作用や毒性は次の課題とされてきたが、まず既存の薬物の毒性を明確にし、次いでその毒作用(副作用)の発現しない用量と用法を、動物実験を通して究明したことにある。このことにより、この種の新規薬物の開発の方向性(安全性と有効性)を示唆したことの意義は大きい。

本研究はトキシコロジーの領域から新規薬物の開発の方向性(有効性と安全性)を示唆し、さらに、トキシコロジーおよび獣医薬理学の立場から社会に対し大きく貢献するものであり、博士(獣医学)の学位を授与するに相応しいものと判定する。