

審査報告書

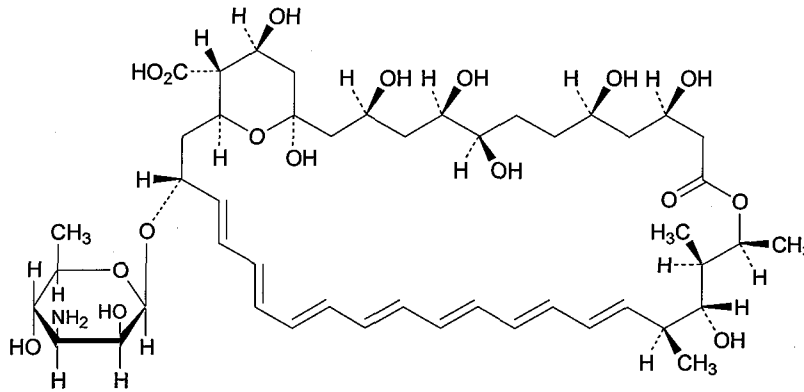
平成 18 年 2 月 7 日

独立行政法人医薬品医療機器総合機構

承認申請のあった下記の医薬品にかかる医薬品医療機器総合機構での審査結果は、以下のとおりである。

記

- [販売名] アムビゾーム点滴静注用 50mg
[一般名] アムホテリシン B
[申請者名] 住友製薬株式会社（現：大日本住友製薬株式会社）
[申請年月日] 平成 16 年 5 月 31 日
[剤型・含量] 1 バイアル中にアムホテリシン B 50mg（力価）を含有する注射用凍結乾燥製剤
[申請区分] 医療用医薬品（5）新剤型医薬品、（6）新用量医薬品
[化学構造]



分子式：C₄₇H₇₃NO₁₇

分子量：924.08

化学名：

(日本名) (1R, 3S, 5R, 6R, 9R, 11R, 15S, 16R, 17R, 18S, 19E, 21E, 23E, 25E, 27E, 29E, 31E, 33R, 35S, 36S, 37S) - 33 - (3 - アミノ - 3, 6 - ジデオキシ - β - D - マンノピラノシルオキシ) - 1, 3, 5, 6, 9, 11, 17, 37 - オクタヒドロキシ - 15, 16, 18 - トリメチル - 13 - オキシ - 14, 39 - ジオキサビシクロ[33.3.1]ノナトリアコンタ - 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 - ヘプタエン - 36 - カルボン酸

(英名) (1R, 3S, 5R, 6R, 9R, 11R, 15S, 16R, 17R, 18S, 19E, 21E, 23E, 25E, 27E, 29E, 31E, 33R, 35S, 36S, 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

[特記事項] なし

[審査担当部] 新薬審査第一部

審査結果

平成 18 年 2 月 7 日作成

- [販売名] アムビゾーム点滴静注用 50mg
[一般名] アムホテリシン B
[申請者] 住友製薬株式会社（現：大日本住友製薬株式会社）
[申請年月日] 平成 16 年 5 月 31 日
[審査結果] (1) 提出された資料より、本剤の安全性・有効性は確認できたと機構は判断した。
(2) 本剤は既存のアムホテリシン B 静脈内投与時に比べ、腎機能障害や発熱等の副作用発現率は低下したという結果が得られているものの、投与時関連反応（血管拡張、背部痛、胸痛）など、既存のアムホテリシン B 静脈内投与時と同程度ないしは発現頻度が高い副作用も認められていることから、安全性については過信せずに注意を払いながら使用することが重要であると考ええる。
(3) 今般申請された適応菌種は、既存のアムホテリシン B 製剤が有する適応菌種のうち、アスペルギルス属、カンジダ属、クリプトコッカス属に限定されていたが、既存のアムホテリシン B 製剤が有するムコール等の適応菌種についても取得することが望ましいと判断されたことから、速やかに開発を進めるよう機構は申請者に指示をした。
(4) 申請時の本剤の名称「アンビゾーム」については、医薬品名称検索システムによる検索の結果、変更する必要があると判断されたことから、「アムビゾーム」に変更することとされた。

以上、医薬品医療機器総合機構の審査の結果、下記の効能・効果、用法・用量で承認して差し支えないと判断した。

- [効能・効果] 1. 真菌感染症
アスペルギルス属、カンジダ属及びクリプトコッカス属による下記感染症
真菌血症、呼吸器真菌症、真菌髄膜炎、播種性真菌症
2. 真菌感染が疑われる発熱性好中球減少症

- [用法・用量] 1. 真菌感染症
体重 1kg 当たりアムホテリシン B2.5mg（力価）を 1 日 1 回、1～2 時間以上かけて点滴静注する。
患者の症状に応じて適宜増減できるが、1 日総投与量は体重 1kg 当たり 5mg（力価）までとする。但し、クリプトコッカス髄膜炎では、1 日総投与量は体重 1kg 当たり 6mg（力価）まで投与できる。

2. 真菌感染が疑われる発熱性好中球減少症

体重 1kg 当たりアムホテリシン B2.5mg (力価) を 1 日 1 回、1~2 時間以上かけて点滴静注する。

審査報告（1）

平成 18 年 1 月 19 日

I. 申請品目

- [販売名] アンビゾーム点滴静注用 50mg
- [一般名] アムホテリシン B
- [申請者] 住友製薬株式会社（現：大日本住友製薬株式会社）
- [申請年月日] 平成 16 年 5 月 31 日
- [剤型・含量] 1 バイアル中にアムホテリシン B 50mg（力価）を含有する注射用凍結乾燥製剤
- [申請時効能・効果] アスペルギルス属、カンジダ属及びクリプトコッカス属による下記感染症
真菌血症、呼吸器真菌症、真菌髄膜炎、播種性真菌症
- [申請時用法・用量] 体重 1kg 当たりアムホテリシン B 2.5mg（力価）を 1 日 1 回、1～2 時間以上かけて点滴静注する。
患者の症状に応じて適宜増減できるが、1 日総投与量は体重 1kg 当たり 5mg（力価）までとする。

II. 提出された資料の概略及び医薬品医療機器総合機構（以下、機構）における審査の概要

1. 起原又は発見の経緯及び外国における使用状況等

本剤は抗真菌薬アムホテリシン B（AMPH-B）を毒性軽減の目的から、リポソームと呼ばれる脂質小胞の脂質二分子膜中に封入した注射用凍結乾燥製剤である。本剤の開発は、米国 Vestar 社（後の NeXstar Pharmaceuticals 社、現在の Gilead Sciences 社）によって行われた。本邦においては、NeXstar Pharmaceuticals 社と業務提携を結んだ住友製薬株式会社（現：大日本住友製薬株式会社）により、19 年より国内臨床試験が開始されている。

本邦においては、AMPH-B を有効成分とし、デソキシコール酸を添加剤として加えた注射用 AMPH-B（販売名：A*）が 1962 年に承認されており、重症の深在性真菌症患者を中心に主要な抗真菌薬の 1 つとして現在も使用されている。しかしながら、A*においては不可逆的な腎機能障害が報告されており、そのため、A*での治療はリスク・ベネフィットの観点から、添付文書上、「毒性が非常に強いため深在性の重篤な疾患にのみ適用すること」との注意喚起がなされている。

本剤は、リポソーム化技術の応用により、AMPH-B の副作用標的臓器である腎臓への分布量を減少させ、腎毒性等の有害事象の発現あるいは懸念から従来の AMPH-B 製剤が使用できない患者に対しても治療が可能となり得る製剤であると期待されている。

本剤は 1990 年にアイルランドで承認されたのをはじめとして、1991 年に英国、1997 年に米国で承認・市販されており、2006 年 1 月時点で、これらの国に加えてドイツ、スペイン、ロシア、フランス、イタリア等の海外 45 カ国で承認・市販されている。

2. 物理的・化学的性質並びに規格及び試験方法に関する資料

<提出された資料の概略>

(1) 製剤設計について

本剤は AMPH-B のリポソーム製剤であり、注射用水で用時溶解後、5%ブドウ糖注射液で希釈して用いる注射用凍結乾燥製剤である。リポソーム構成成分として水素添加大豆リン脂質 (HSPC)、ジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG)、コレステロール及びトコフェロールを含む。また、これらリポソーム構成成分以外の賦形剤として精製白糖を含み、緩衝剤であるコハク酸二ナトリウム六水和物と共にリポソームの緩衝液の構成成分となる。また、pH 調節剤として、塩酸及び水酸化ナトリウムが用いられている。

リポソームはリン脂質を主成分とする二分子膜よりなる微小な閉鎖小胞であり、使用する脂質成分及び調製方法の違いにより、膜構成、大きさ及び形態が様々に異なるリポソームが得られる。したがって、本剤の処方検討に際して Vestar 社は、製造工程において濾過滅菌 (0.2 μ m) が可能で、かつ静脈内投与後の細網内皮系組織による急速な取り込みが回避され、比較的高い血中濃度が期待できる平均粒子径 100nm 以下のリポソームを作成することとし、また、リポソームへの AMPH-B 封入率 (回収率) 及びマウス急性毒性の結果を総合的に評価した上で、最適なりポソームの構成成分を選択することとした。

リポソームの主な構成成分であるリン脂質に関しては、DSPG を AMPH-B とモル比 2 : 1 で配合した場合にマウスに対する急性毒性が最も低くなった。また、脂肪酸側鎖の短いリン脂質であるジラウリルホスファチジルグリセロール (DLPG) を用いると毒性が高くなった。よって、リン脂質については、DSPG を選択し、これと AMPH-B とモル比 2 : 1 で配合することとされた。

コレステロールに関しては、全脂質成分に対するモル比で 25%以上配合することでマウスにおける急性毒性が低減されることが示されたことから、最終処方におけるコレステロール含量は全脂質に対するモル比 26% (全リポソーム成分に対しては 24%) とされた。

最終的には、HSPC : コレステロール : DSPG : AMPH-B をモル比 2 : 1 : 0.8 : 0.4 で配合した処方において、平均粒子径が小さく (47nm)、毒性が低く (マウス LD₅₀ > 35mg/kg)、かつ AMPH-B の回収率の高い (85%) リポソームが得られたことから、リポソーム構成成分については本処方を最適と判断されている。また、開発初期の製剤には

現在の製剤処方を

配合されている。

本剤の剤型は、保存安定性を高めるために、凍結乾燥製剤とされた。使用時に注射用水で溶解することで、凍結乾燥前と同じ安定なりポソーム分散液を再調製できるよう、リポソームが緩衝液中に分散した状態の薬液を凍結乾燥することとされた。本品の含量は「1 バイアルあたり AMPH-B として 50mg (力価)」であるが、使用時に生じる薬液損失及び溶解後の実際の薬

液濃度を考慮し、充填量は表示量に対して ■%増しとされている。なお、リポソーム製造工程における過量仕込みは行っていない。一方、本剤は用時溶解型の凍結乾燥製剤であり、使用時には注射用水を加えて直ちに激しく振盪して製剤を溶解するが、溶解後の薬液はリポソームの分散した黄色い半透明の液となることから、不適切な溶解操作により製剤中に固形物が生じた場合を考慮し、海外では、溶解後の薬液を濾過するための孔径 5 μ m のシリンジフィルターが添付されている。したがって、本邦においても海外で添付されているものと同じ孔径 5 μ m のシリンジフィルターを添付することとされた。

(2) 製剤

規格及び試験方法として、性状（外観）、確認試験（紫外可視吸光度測定法 (UV/VIS)）、pH、純度試験（類縁物質 (HPLC 法)）、水分（電量滴定法）、質量偏差試験、発熱性物質試験、無菌試験（メンブレンフィルター法）、B*量、■、粒子径■及び定量法（HPLC 法）が設定されている。

なお、B*量試験とは、本剤と■をインキュベートし、■B*の量を測定することにより、本剤の■を評価するために設定された試験であり、■を設定している。

安定性については、長期保存試験（5 \pm 3 $^{\circ}$ C/暗所/無色透明ガラスバイアル及びゴム栓（密封容器）・倒立/36 カ月）、加速試験（25 \pm 2 $^{\circ}$ C/暗所/無色透明ガラスバイアル及びゴム栓（密封容器）・倒立/36 カ月）及び苛酷試験（温度に対して：■ $^{\circ}$ C/暗所/無色透明ガラスバイアル及びゴム栓（密封容器）・倒立/■カ月、光に対して：25 \pm 2 $^{\circ}$ C/総照度 120 万 lux \cdot hr 以上、総近紫外放射エネルギー200W \cdot h/m² 以上/無色透明ガラスバイアル及びゴム栓（密封容器）・倒立/■日間（白色蛍光ランプ）、■時間（近紫外蛍光ランプ））が実施された。

苛酷試験の結果、温度に対しては、経時的な変化は認められず、本剤は■ $^{\circ}$ Cで■カ月間安定であった。しかしながら、熱分析法（■）の結果では、■ $^{\circ}$ Cから脂質膜の相転移による変化が認められていることから、本剤は■ $^{\circ}$ Cにおいては安定であるが、■ $^{\circ}$ C付近からリポソームの脂質膜構造の融解等が生じ、物理的・化学的性質が変化する可能性が示唆された。光に対して品質に影響を及ぼす経時的な変化は認められず安定であった。加速試験及び長期保存試験の結果、品質に影響を及ぼす経時的な変化は認められず、安定であった。

以上より、無色透明ガラスバイアル及びゴム栓（密封容器）で 5 $^{\circ}$ C（2 \sim 8 $^{\circ}$ C）で保存した場合、有効期間は 3 年とされ、機構はこの設定は妥当であると判断した。

また、本剤の用法に従って調製した薬液及び薬液を 5%ブドウ糖注射液で希釈した液についても安定性が検討された。

本剤（■ $^{\circ}$ C、■カ月保存品）1 バイアル中に注射用水 12mL を加えた薬液については、■ $^{\circ}$ C、暗所、無色透明ガラスバイアル及びゴム栓（密封容器）・倒立、■日間の条件で検討された。その結果、■日間の保存で脂質成分の分解物である C*体■が僅かに増加する傾向（0 日目に比べ ■mg/mL 程度）が認められたが、■日間では安定であった。また、薬液を 5%ブドウ糖注射液で 2 倍及び 20 倍に希釈した液（各々

2mg (力価) /mL、0.2mg (力価) /mL) については、 \blacksquare °C、白色蛍光ランプ (\blacksquare lux)、輸液バック、 \blacksquare 時間の条件で検討された。その結果、2倍希釈液では、 \blacksquare 時間の保存により C*体 \blacksquare が僅かに増加する傾向(0時間時に比べ \blacksquare mg/mL程度)が認められ、 \blacksquare 時間の保存では最大で \blacksquare mg/mLであった。20倍希釈液に関しては、 \blacksquare 時間の保存で最大で \blacksquare mg/mLであった。なお、本試験結果は、 \blacksquare の製剤を用いて調製した薬液及び希釈液の安定性の結果と同等であった。

<機構における審査の概略>

申請者は、本剤溶解後の薬液はリポソームの分散した黄色い半透明の液となり、不適切な溶解操作により製剤中に固形物が生じた場合にその固形物を見落とすケースを考慮して、孔径 $5\mu\text{m}$ のシリンジフィルターを添付すると述べているが、①不適切な操作により固形物が生じたというデータが実際にあるのか否か、また、②シリンジフィルターの孔径を $5\mu\text{m}$ とした妥当性について、機構は申請者に尋ねた。申請者は以下の通り、回答した。

①「不適切な溶解操作」とは、薬液の調製操作において、振盪操作が不十分で残った固形物の存在を目視によって見落とす場合を想定しているが、実際の再溶解時に固形物が残存したというデータはない。また、実験的に不十分な振盪操作による影響を定量的に検証する手法がない。しかしながら、本剤の開発当初から考慮されたこのようなリスクを、完全に否定できなかったことから、海外のすべての承認国においては、薬液を調製する際に添付される孔径 $5\mu\text{m}$ のシリンジフィルターにより、濾過することとしている。

②第14改正日本薬局方の製剤総則「17.注射剤」の項には、「(4)懸濁性注射液中の粒子は、通例、 $150\mu\text{m}$ 以下とし、乳濁性注射液中の粒子は、通例、 $7\mu\text{m}$ 以下とする」との記載がある。また、通常国内で市販されている医療用シリンジフィルターの孔径としては、 0.22 、 0.45 、 $0.8\mu\text{m}$ 等があり、医療現場では無菌性確保の観点から、孔径 $0.22\mu\text{m}$ 及び $0.45\mu\text{m}$ のシリンジフィルターが主に使用されている。しかしながら、 $0.22\mu\text{m}$ 及び $0.45\mu\text{m}$ の孔径のシリンジフィルターを本剤に用いた場合、濾過抵抗が大きく使用できなかった。また、孔径 $0.8\mu\text{m}$ では、薬液は濾過可能ではあったが、孔径 $5\mu\text{m}$ のシリンジフィルターと比較して、濾過の操作性は劣っていた。よって、海外の使用実績が豊富な孔径 $5\mu\text{m}$ のシリンジフィルターを添付することが妥当であると判断した。

機構は、本剤溶解液は黄色い半透明液であり、固形物が生じた場合においても目視で確認することが困難であることを踏まえると、溶解操作後の固形物に対するリスクを回避するために海外と同様に孔径 $5\mu\text{m}$ のシリンジフィルターを添付することは妥当であると判断した。

申請者は、本剤を溶解した際にはリポソームが均一に分散した薬液が得られると述べているが、その評価方法の詳細について、機構は申請者に説明を求めた。申請者は以下の通り回答した。

本剤に注射用水を加えて直ちに激しく振り混ぜた場合、凍結乾燥ケーキは分散して均一な黄色の半透明な液となることは、性状を観察することで確認できる。また、この時に調製された薬液中のリポソームの粒子径及び分散性は、本剤の規格及び試験方法における「粒子径」及び「 \blacksquare 」としてそれぞれ同一の溶解操作で評価が行われている。また、本剤のリポソーム分散液は、小さな単層リポソームより構成されており、このような単層リポソームは、水溶液中においてはブラウン運動で支配されていることから不均一の原因となる沈降は示さない特性がある。こ

のような特性は、製造工程中のバリデーション結果からも確認している。以上のことから、注射用水で再溶解して得たリポソーム分散液も沈降等は起こらず、バイアル内においても均一に分散した状態を保持しているものとする。なお、[REDACTED]の分析法バリデーションにおいてもリポソームの分散性に変動がないことを示す結果が得られている。

機構は、リポソーム封入率は本剤の有効性及び安全性に影響する品質特性であるが、封入率の恒常性をどのように保証するのか、また本リポソーム製剤ではバースト(リポソームが破壊され、封入された薬剤が急激に放出される現象)は生じないのか、申請者に説明を求めた。申請者は以下の通り回答した。

本剤の主薬 AMPH-B はリポソームの脂質二重膜内に封入(保持)されている製剤である。本剤中の AMPH-B がリポソームに封入されていることを示す試験方法として、当初、[REDACTED]を用いて、[REDACTED] AMPH-B を [REDACTED] 定量する「リポソーム封入率」を検討した。しかしながら、この方法では [REDACTED] の AMPH-B 量の評価は可能であったが、[REDACTED] の [REDACTED] を十分に評価することはできず、安全性の指標となるリポソームへの封入量を正確に評価する方法ではないと考えた。そこで、[REDACTED] 製剤の安全性を総合的に評価する試験方法として、B*量試験を開発した。B*量試験では、製剤より調製した試料溶液に [REDACTED] を加えてインキュベートし、[REDACTED] を評価する。B*量の規格値は、B*量により求めた [REDACTED] を利用し、[REDACTED] を設定し、[REDACTED] しなくてもリポソームへの封入率の恒常性を保証することが可能である。

また、リポソームのバーストとは、リポソームの脂質二重膜の内側と外側の浸透圧バランスが崩れ、リポソームの内側が外側に対して高張となった場合に、リポソーム内へ水が流入することによって、リポソームが膨張し、浸透圧に耐えきれなくなったときに起こる浸透圧崩壊である。本剤の場合、AMPH-B はリポソームの脂質二重膜の更に内側に存在しているのではなく、脂質二重膜内に封入(保持)されており、かつリポソームの脂質二重膜内で細孔を形成し、膜の透過性を亢進していると推測できることから、リポソームの内側と外側で大きな浸透圧差が生じることはない。以上のことから、本剤の場合、浸透圧崩壊であるバーストが生じる可能性は極めて低いと考える。

機構は、本剤の AMPH-B の放出(脂質二重膜からの遊離)機序が未だ確定されていない状況において、本製剤のバーストが生じる可能性が極めて低いとの回答に対しては、了承しかねるものの、海外での臨床使用において、製剤上、大きな問題が認められていないことも考慮し、B*量により、リポソーム封入率を保証することは現段階では妥当であると考え。なお、AMPH-B の放出機序を含め、本剤の製剤特性について更なる基礎的な検討は引き続き必要であると考え。

機構は、本剤の溶解操作の違いによって、B*量に変化が認められている点について、申請者にその理由について考察を求めた。申請者は以下の通り回答した。

本剤は、注射用水を添加後は直ちにバイアルを激しく振盪し、内容物を溶解させ、均一な黄色の半透明な液として使用する。注射用水を添加後、直ちに振盪せずに放置した場合、注射用水により局部的に溶解した箇所が生じてしまうことになり、このような溶解操作を行った場合、下記

に示したように B*量に変化が見られる。

溶解操作					
通常の操作（注射用水添加直後に激しく振盪）					
緩やかな振盪（約 1/4 の速さ）					
円を描くように振盪					
10 分放置後、通常の（激しい）振盪					
注射用水を 1 滴滴下し 10 分放置後注射用水を添加、直後に激しく振盪					
30 秒放置後、通常の（激しい）振盪					
5 分放置後、通常の（激しい）振盪					

以上の実験結果は、通常の溶解操作法に比較して意図的に規定外の溶解操作を行ったときには、B*量に変化が起こる可能性があることを示している。ただし、注射用水添加後から振盪までの時間を長くしても、必ずしも時間経過に応じた B*量の変化がない結果も得ており、溶解操作と B*量における明確な相関関係を本実験から見出すことはできなかった。これは、このような局部的かつ不均一に溶解した状態を正確かつ定量的に再現することが困難であるという要因が考えられる。また、リポソーム膜における構造上の変化を正確に測定することが現状の技術では困難であり、溶解操作の違いによって B*量が増加する詳細な機構については不明である。したがって、本剤の調製方法については、注射用水を添加後は「直ちに」そして「激しく」振盪し、内容物を溶解させるように規定した。

機構は、溶解操作の違いによるリポソームの構造上の変化を正確に検出し、その原因を追究することが技術的に困難である点については、今後、引き続き検討していく必要があると考えるものの、本剤を使用する上では、本剤に注射用水を添加後は「直ちに」そして「激しく」振盪し、内容物を溶解させることが重要であり、この点については添付文書での情報提供をはじめとし、医療従事者に溶解方法を徹底していくことが必要であると考えられる。

新規添加物について

本製剤には、リポソーム構成成分として新添加物の水素添加大豆リン脂質、ジステアロイルホスファチジルグリセロールナトリウム、コレステロール及びトコフェロールが含有されている。

本添加物の規格については、日局等を参考に再設定させた（XXXXXXXXXX及びXXXXXXXXXXはそれぞれ薬添規及び日局に適合しなかったが、問題はないものと判断した）。安定性については、特に問題ないものと判断した。

安全性については、本添加物投与により、血中コレステロール及びリン脂質の上昇が認められていることから、注意喚起の必要性を申請者に尋ねたところ、申請者より、添付文書の「その他の注意」として動物で認められたコレステロール及びリン脂質の上昇の結果を記載し、注意喚起を図るとの回答を得た。

機構は、本添加物の安全性試験が混合物で実施されており、各添加物単体での静脈内投与時の安全性が担保できないことから、これらの添加物については本製剤に限った承認とすべきであると考え、使用前例としては取り扱わないとすることが妥当であると判断した。

3. 非臨床に関する資料

(i) 薬理試験成績

本剤の薬理作用に関する資料として、効力を裏付ける試験及び平成 13 年 6 月 21 日医薬審発 902 号「安全性薬理試験ガイドラインについて」の通知以前に実施された一般薬理試験成績（非 GLP）が提出された。

以下の記載においては、特に断りのある場合を除き、本剤及びアムホテリシン B（AMPH-B）をデソキシコール酸で可溶化した既存の注射用製剤（販売名：A*）の用量はともに有効成分である AMPH-B 相当量として記載する。

<提出された資料の概略>

(1) 効力を裏付ける試験

1) *In vitro* 抗真菌活性：標準株 (1)

日本医真菌学会の抗真菌剤感受性試験法に準じて、*Candida* 属、*Cryptococcus neoformans*、*Aspergillus* 属等計 35 株（A*に対する最小発育阻止濃度（MIC）はいずれも 1 μ g/mL 以下）に対する本剤の抗真菌活性が検討された（接種菌種量：1~5 \times 10³ cfu (conidia) /mL）。

被験真菌に対する本剤の MIC range は 0.125~>64 μ g/mL であった。AMPH-B のリポソーム化に伴い A* より MIC が 1~2 倍となった真菌は 15 株、4~8 倍に上昇したものは 16 株、また MIC が 16~>64 倍に上昇したものは 3 株（*Candida krusei* MTU12041、*Aspergillus flavus* IFO5839 及び *A. terreus* IFO7078）であった。なお、1 株は A* 及び本剤の MIC は各々 \leq 0.125 μ g/mL 及び 0.25 μ g/mL のため MIC の上昇率は算出不能であった。

2) *In vitro* 抗真菌活性：臨床分離株

日本医真菌学会の抗真菌剤感受性試験法に準じて、申請者が保有する国内で臨床分離された *Candida* 属、*Cryptococcus* 属及び *Aspergillus* 属に対する本剤の抗真菌活性が検討された（接種菌種量：1~5 \times 10⁴ cfu (conidia) /mL）。MIC 測定後、培養液から 10² cfu (conidia) の接種真菌を分取し、これを SD 培地に添加して、最小殺真菌濃度（MFC）についても検討された。

使用菌株 (n)	薬剤	MIC (μ g/mL)		MFC (μ g/mL)	
		Range	MIC ₉₀	Range	MFC ₉₀
<i>Candida albicans</i> (20)	本 剤	1~4	2	4~>16	>16
	A*	0.5~1	0.5	0.5~2	1
<i>C. glabrata</i> (3) + <i>C. parapsilosis</i> (1) + <i>C. tropicalis</i> (3)	本 剤	2		2~>16	
	A*	0.5~1		0.5~2	
<i>Cryptococcus neoformans</i> (8)	本 剤	0.5~2		2~4	
	A*	0.25~0.5		0.5~1	
<i>Aspergillus fumigatus</i> (13)	本 剤	0.5~2	2	1~32	16
	A*	0.5	0.5	0.5~4	1
<i>A. flavus</i> (5)	本 剤	4~32		4~32	
	A*	0.5		0.5	
<i>A. niger</i> (6)	本 剤	0.5~1		0.5~1	
	A*	0.25~0.5		0.25~0.5	

3) *In vitro* 抗真菌活性に及ぼす諸因子の影響

C.albicans ATCC90028、同 ATCC90029、*C.glabrata* ATCC90030、同 TIMM1064 及び *A.fumigatus* IFO5840、同 IFO7080 を用いて、本剤の抗真菌活性に対する接種菌量、培地の pH や種類、及び血清添加の影響について微量液体希釈法により検討された。その結果、本剤及び A* の MIC は、接種菌量 ($1\sim 5\times 10^2\sim 10^5$ cfu (conidia) /mL) と一定の傾向は認められなかったが、培地の pH については、pH が低くなるに従って上昇する傾向が認められた。また、本剤及び A* の MIC は、培地の種類により変化するが、影響を受ける培地の種類及び活性に与える影響は本剤と A* で異なっていた。培地にヒト血清を 10~50% 添加した場合、血清非存在下と比較して本剤の MIC の変動範囲は 4 倍以内であったが、A* の MIC は一部の株で 4 倍を超える変動が認められ、本剤の *in vitro* における抗真菌活性は A* より血清添加の影響を受け難いと考察されている。

4) *In vitro* 殺真菌活性

C.albicans ATCC90029 (MIC : 本剤 4 μ g/mL、A* 0.5 μ g/mL) を、本剤 1~256 μ g/mL (1/4~64 MIC) 又は A* 0.125~32 μ g/mL (1/4~64 MIC) を添加した培地中で培養し、24 時間後まで経時的に菌液がサンプリングされた。これをサブロー寒天培地に接種し、培養後のコロニー数から生菌数が算出された。

本剤及び A* は、各々 1MIC 以上の濃度で添加した場合、生菌数は 1/1000 以下にまで減少した。また、いずれの被験薬も、薬剤添加時から 99.9% 殺真菌作用を示すまでの時間は、作用濃度が高くなるに従って短縮した。

5) *In vivo* : *Candida* 属の全身感染における検討 (1)

マウスに *C.albicans* KB-8 8.9×10^6 cfu を静脈内接種し、接種 4 時間後に本剤又は A* を静脈内投与した結果、本剤 0.03、0.1、0.3、1、3 及び 10mg/kg 群の生存期間中央値は、それぞれ 0、0.5、0、0、>31 及び >31 日であり、接種後 31 日の生存率から求めた ED₅₀ は 2.80 (95%信頼区間 (以下、C.I) ; [1.64, 4.88]) mg/kg であった。A* 0.03、0.1、0.3 及び 1mg/kg 群の生存期間中央値は、それぞれ 0、0、3.5 及び 14.5 日であり、いずれの投与量においても接種後 31 日の生存率は 0% であった。

6) *In vivo* : *Candida* 属の全身感染における検討 (2)

シクロホスファミド前投与により白血球数が低下したマウスに *C.albicans* ATCC90029 4.14×10^5 cfu を静脈内接種し、接種 4 時間後に本剤又は A* が静脈内投与された結果、本剤 0.03、0.1、0.3、1、3 及び 10mg/kg 群の生存期間中央値は、それぞれ 1、1、2.5、5、>30 及び >30 日で、感染後 30 日の生存率から求めた ED₅₀ は 1.39 (95% C.I ; [0.86, 2.19]) mg/kg であった。A* 0.03、0.1、0.3 及び 1mg/kg 群の生存期間中央値は、それぞれ 1、2、3 及び 19.5 日で、いずれの投与量においても接種後 30 日の生存率は 0% であった。

7) *In vivo* : *Candida* 属の全身感染における検討 (3)

シクロホスファミド前投与により白血球数が低下したマウスに *C.albicans* ATTC90029 4.94×10^5 cfu を静脈内接種、接種 4 時間後に本剤 10mg/kg 又は A*1mg/kg が静脈内投与された。真菌接種 1 及び 7 日後に腎臓が摘出され、これをサブロー寒天培地に接種して、培養後のコロニー数から生菌数が算出された。

本剤群及び A*群の接種 1 日後における腎臓の平均生菌数は、各々 2.71 及び 2.84 log cfu/kidney と同程度で、いずれも溶媒対照群に比べて 4 log 以上減少した。接種 7 日後の本剤群の平均生菌数は 3.16 log cfu/kidney であり、A*群の 5.77 log cfu/kidney に比して 2.5 log 以上低値であった。また、接種後 30 日の本剤群では 8/10 例で腎臓の真菌は陰性であった。

8) *In vivo* : *Candida* 属の全身感染における検討 (4)

マウスに *C.albicans* #39 3×10^6 cfu を静脈内に接種、接種 3 日後に本剤 2.5、5.0 及び 10mg/kg 又は AMPH-B 0.75mg/kg が静脈内投与された。接種 19 日後 (切迫殺) ~21 日に腎臓が摘出され、これをサブロー寒天培地に接種、培養後のコロニー数から生菌数が算出された。

接種 21 日後における溶媒対照群及び AMPH-B 群の生存数は、各々 4/8 例及び 7/8 例で、本剤群はいずれの投与量においても生存数は 8/8 例であった。腎臓の平均生菌数は対照群及び AMPH-B 群では各々 28301 及び 22757 cfu/mg kidney、本剤 2.5、5.0 及び 10mg/kg 群では各々 202、51 及び 8 cfu/mg kidney であった。

9) *In vivo* : *Candida* 属の全身感染における検討 (5)

マウスに *C.albicans* #39 を 4×10^6 cfu 静脈内に接種、接種 3 日後から本剤 2.5、5.0 及び 10mg/kg 又は AMPH-B 0.75mg/kg が 1 日 1 回、5 日間静脈内投与された。また、接種 22 日後に一部のマウスの腎臓が摘出され、これをサブロー寒天培地に接種、培養後のコロニー数から生菌数が算出された。

接種 41 日後の生存数は溶媒対照群及び AMPH-B 群では、各々 0/5 例及び 2/5 例、本剤 2.5、5 及び 10mg/kg 群では 5/5 例、4/5 例及び 5/5 例であった。また、接種 22 日後の腎臓の平均生菌数は、溶媒対照群、AMPH-B 0.75mg/kg 群、本剤 2.5mg/kg 群、本剤 5mg/kg 群及び本剤 10mg/kg 群では各々 5075、1018、68、16 及び 9 cfu/mg kidney で、溶媒対照群に対していずれの被験薬群も有意な減少が認められ、また本剤の各投与量群と AMPH-B 群との生菌数の差も有意であった。

10) *In vivo* : *Aspergillus* 属の全身感染における検討 (1)

マウスにアスペルギルス属真菌 3×10^7 conidia を静脈内に接種し、単回投与試験では接種 4 時間後に、2 回投与試験では接種 4 及び 8 時間後に被験薬が静脈内投与された結果、各群の生存期間中央値 (日) と接種 30 日後の生存率 (%、下表の括弧内) 及びこの生存率から算出した ED₅₀ (mg/kg) は以下のとおりであった。

単回投与

用量 : mg/kg	0.03	0.1	0.3	1	3	10	ED ₅₀ [95% C.I.]
<i>A. fumigatus</i> IFO 9733							
本 剤	2.5 (0)	3.5 (0)	4 (0)	4.5 (20)	>30 (50)	>30 (100)	2.38 [1.45, 4.15]
A*	2 (0)	2 (0)	3 (0)	7.5 (30)			—
<i>A. fumigatus</i> IFO 8868							
本 剤	2 (0)	3 (0)	4 (0)	6 (20)	>30 (50)	>30 (100)	2.38 [1.45, 4.15]
A*	1 (0)	3 (0)	3 (0)	23 (40)			—
<i>A. fumigatus</i> H11-20							
本 剤	2 (0)	6.5 (0)	6.5 (0)	7 (20)	>30 (80)	>30 (100)	1.73 [1.08, 2.79]
A*	1 (0)	2 (0)	4.5 (10)	15 (30)			—

2回投与

用量 : mg/kg	0.03	0.1	0.3	1	3	10	ED ₅₀ [95% C.I.]
<i>A. fumigatus</i> IFO 9733							
本 剤	3 (0)	5 (0)	5.5 (0)	17 (40)	>30 (70)	>30 (90)	1.80 [1.00, 3.28]
A*	2 (0)	4.5 (0)	10 (20)	>30 (80)			0.55 [0.34, 0.99]
<i>A. fumigatus</i> IFO 8868							
本 剤	3 (10)	4.5 (10)	14.5(10)	>30 (90)	>30 (100)	>30 (90)	0.48 [0.24, 0.95]
A*	2.5 (0)	8 (0)	8 (20)	>30 (80)			0.55 [0.34, 0.99]
<i>A. fumigatus</i> H11-20							
本 剤	2.5 (0)	5.5 (0)	15.5(20)	>30 (70)	>30 (80)	>30 (100)	0.80 [0.44, 1.40]
A*	2.5 (0)	5 (10)	19 (20)	>30 (100)			0.36 [0.23, 0.65]

11) *In vivo* : *Aspergillus* 属の全身感染における検討 (2)

シクロホスファミド前投与により白血球数を低下させたマウスに *A.fumigatus* H11-20 5×10^5 conidia を静脈内に接種、接種 4 時間後に本剤又は A* が静脈内投与された結果、本剤 0.03、0.1、0.3、1、3 及び 10mg/kg 群の生存期間中央値は、各々 3、4、4、6、>30 及び >30 日であり、接種後 30 日の生存率から求めた ED₅₀ は 3.18 (95% C.I ; [1.91, 5.19]) mg/kg であった。A*0.03、0.1、0.3 及び 1mg/kg 群の生存期間中央値は、各々 3、3、4 及び 15.5 日であり、接種後 30 日の生存率は 1mg/kg 群の 30%を除き、いずれも 0%であった。

12) *In vivo* : *Aspergillus* 属の全身感染における検討 (3)

マウスに *Aspergillus* 属真菌 2×10^6 、 5×10^6 あるいは 3×10^7 conidia を静脈内に接種し、本剤又は A* が接種 4 時間後に静脈内投与された結果、各投与量における生存期間中央値(日)と接種後 30 日の生存率 (%、下表の括弧内) 及びこの生存率から求めた ED₅₀ (mg/kg) は以下のとおりである。

用量 : mg/kg	0.03	0.1	0.3	1	3	10	ED ₅₀ [95 % C.I.]
<i>A. niger</i> SP-20087							
本剤	4 (10)	9 (10)	7 (0)	22 (20)	>30 (70)	>30 (100)	1.50 [0.74, 3.73]
A*	3 (0)	9 (0)	6 (0)	17.5 (10)			算出不能
<i>A. niger</i> SP-20091							
本剤	0 (0)	0 (0)	0 (10)	2 (0)	>30 (50)	>30 (100)	2.59 [1.53, 4.93]
A*	0 (0)	2 (10)	2 (10)	>30 (70)			0.68 [0.37, 2.52]
<i>A. flavus</i> SP-20082							
本剤	4.5 (0)	3.5 (0)	4 (0)	8.5 (0)	14 (0)	>30 (50)	10.0 [算出不能]
A*	4 (0)	3 (0)	4.5 (0)	8 (0)			算出不能
<i>A. flavus</i> IFO 5839							
本剤	3 (0)	3 (0)	3 (0)	3.5 (0)	5.5 (0)	10 (10)	算出不能
A*	3.5 (0)	3.5 (0)	4 (0)	6 (0)			算出不能

13) *In vitro* 抗真菌活性 : *Aspergillus* 全身感染に使用した株

微量液体希釈法によりアスペルギルス属に対する本剤及び A* の抗真菌活性が測定された (接種菌量 : 1×10^4 conidia/mL)。MIC の測定後、MIC 以上のウェルから菌液を分取し、サブロー寒天培地に添加し、最小殺真菌濃度 (MFC) が検討された。

使用菌株	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		MFC ($\mu\text{g/mL}$)	
	本 剤	A*	本 剤	A*
<i>A. niger</i> SP-20087	0.5	0.5	1	0.5
<i>A. niger</i> SP-20091	0.5	0.25	1	0.25
<i>A. fumigatus</i> IFO 8868	4	1	8	1
<i>A. fumigatus</i> IFO 9733	4	1	512	1
<i>A. fumigatus</i> H11-20	4	1	16	1
<i>A. flavus</i> SP-20082	8	1	8	1
<i>A. flavus</i> IFO 5839	128	1	128	1

Aspergillus 属に対する *in vitro* 抗真菌活性の評価において、A* の MIC は MFC と一致していたが、本剤の MIC は MFC と乖離が認められる菌株が存在していた。その理由は不明であるが、*in vivo* 抗真菌活性の評価においては、これら菌株についても他の乖離の認められていない菌株と同様に本剤の有効性が確認されていることから、本剤の場合には *in vitro* で観察された MIC と MFC の乖離は、生体内での抗真菌活性発現には大きく影響しないと考察されている。

14) *In vivo* : *Aspergillus* 属の肺感染における検討 (1)

シクロホスファミド前投与により白血球数を低下させたマウスに *A. fumigatus* H11-20 2×10^7 conidia を気管内に接種し、接種 4 時間後に本剤 1、3 及び 10mg/kg 又は A* 1mg/kg が静脈内投与された結果、本剤 1、3 及び 10mg/kg 群の生存期間中央値は、各々 3.5、>30 及び >30 日で、接種後 30 日の生存率から求めた ED₅₀ は 4.16 (95% C.I. ; [1.85, 14.5]) mg/kg であった。A* 群の生存期間中央値は 3 日であった。

15) *In vivo* : *Aspergillus* 属の肺感染における検討 (2)

シクロホスファミド前投与により白血球数を低下させたマウスに *A.fumigatus* H11-20 1.85×10^7 conidia を気管内に接種し、接種 4 時間後に本剤 10mg/kg 又は A*1mg/kg が静脈内投与された。接種 1 日後に肺を摘出、これをサブロー寒天培地に接種し、培養後のコロニー数から生菌数が算出された。

溶媒対照群の肺内の平均生菌数は 1.49×10^6 cfu/lung であった。A*群は溶媒対照群と有意差は認められなかったが、本剤群はそれぞれ溶媒対照群及び A*群に対して有意に生菌数が低下していた。

16) *In vivo* : *Cryptococcus* 属の髄膜感染における検討 (1)

マウスに *C. neoformans* SP-20159 を 9.90×10^2 cfu 脳室内に接種し、接種 4 時間後に本剤 1、3 及び 10mg/kg 又は A*1mg/kg を静脈内投与した結果、本剤 1、3 及び 10mg/kg 群の生存期間中央値は各々 12.5、19 及び 25.5 日であり、接種後 30 日の生存率は各々 0%、10% 及び 10% であった。A*群の生存期間中央値は 16.5 日で、接種後 30 日の生存率は 0% であった。

17) *In vivo* : *Cryptococcus* 属の髄膜感染における検討 (2)

マウスに *C. neoformans* SP-20159 を 1.25×10^3 cfu 脳室内に接種し、接種 5 日後に本剤 1、3 及び 10mg/kg 又は A*1mg/kg が静脈内投与された結果、本剤 1、3 及び 10mg/kg 群の生存期間中央値は各々 19.5、>30 及び >30 日であり、接種 30 日後の生存率から求めた ED₅₀ は 5.69mg/kg であった。A*群の生存期間中央値は 23.5 日であった。

18) *In vivo* : *Cryptococcus* 属の髄膜感染における検討 (3)

マウスに *C. neoformans* SP-20159 を 1.11×10^3 cfu 脳室内に接種し、接種 5 日後に本剤 10mg/kg 又は A*1mg/kg が静脈内投与された。接種 8 日後に脳が摘出され、これを YM 寒天培地に接種、培養後のコロニー数より生菌数が算出された。

溶媒対照群、本剤群及び A*群の脳内平均生菌数は、それぞれ 7.45、6.15 及び 6.42 log cfu/brain であり、本剤群及び A*群は溶媒対照群に比して有意に生菌数が低かった。

19) *In vivo* の投与量の設定について

マウスにおいて、本剤及び A*の静脈内投与での生死を指標とした最大耐量は各々 60mg/kg 及び 2mg/kg、体重変化及び腎・肝機能を指標とした無影響量は各々 10mg/kg 及び 1mg/kg であったことから、本剤 10mg/kg 及び A*1mg/kg を *in vivo* 抗真菌活性の検討で用いる最高投与量とし、主な試験では A*は 1mg/kg、本剤は 1~10mg/kg で実施された。なお、投与量の設定について申請者は以下の旨を説明した。

- ・ ラット及びヒトにおいては、本剤投与後の血清中 AMPH-B は、ほとんどがリポソーム型として存在すること
- ・ 感染組織においては血管透過性が亢進しており、感染組織の細胞外液に存在する真菌に本剤はリポソーム型の状態で到達した後に、抗真菌活性を発揮すると考えられること

- ・ 本剤の有効性に関しては血清中の総 AMPH-B 濃度に支配されると考えられ、*in vivo* 抗真菌活性評価で用いた投与量は臨床における有用性を予見するために適切であると考えること
- ・ 本剤の予想される臨床用量は A* の臨床用量 (0.25~1mg/kg) の 1~20 倍であることから、今回の *in vivo* 抗真菌活性の検討で用いた本剤の投与量は適切であると考えること

なお、本剤 1~10mg/kg をマウスに静脈内投与した際の血清中 AMPH-B 濃度の AUC は 82~1839 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 、予想される本剤の臨床用量である 1、2.5 あるいは 5 mg/kg をヒトに投与した際の AUC はそれぞれ 65、175 あるいは 443 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ であった。

20) ヒト赤血球に対する傷害性

本剤 3、30 及び 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は A*1、3 及び 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 存在下でヒト赤血球をインキュベートし、溶血した赤血球の割合を吸光度法により測定した結果、本剤 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の存在下で 2 時間に溶血した赤血球の割合は 6%であったが、A*1、3 及び 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の存在下で 2 時間に溶血した赤血球の割合は、いずれも 90%以上であった。

21) 動物細胞に対する傷害性

ヒト、マウス、ラット由来樹立細胞を本剤又は A* 存在下で培養し、その後各細胞の ^3H -Thymidine の取り込み量を測定した結果、HUVEC、Hs27、293、RPTEC、Chang Liver、BRL3A、H2-35、AML12 及び J774 の ^3H -Thymidine の取り込みに対する本剤の 50%阻害濃度 (IC_{50}) は、各々 172.9、97.5、309.2、54.0、633.3、579.0、算出不能、28.2 及び 127.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、A* は各々 9.1、2.3、39.2、1.8、16.8、5.1、22.7、0.5 及び 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

AMPH-B をリポソーム化することにより、非リポソーム型で存在する AMPH-B と比較して、動物細胞に対する傷害性が減弱されたと考察されている。

22) 組織分布

マウスに *C.albicans* を 2×10^6 cfu を静脈内接種し、接種 23 及び 30 時間後に蛍光色素である sulforhodamine をリポソーム内部に封入した本剤 25mg/kg 又は蛍光色素を内部に封入した AMPH-B を含まない空リポソーム (蛍光色素封入空リポソーム) を計 2 回静脈内投与し、2 回目の投与 17 時間後に腎臓が摘出された。同様の投与スケジュールで蛍光色素を封入した本剤 25mg/kg に含まれる蛍光色素が静脈内投与され、2 回目の投与 7 時間後に腎臓が摘出された。

Gomori methenamine silver 染色後の明視野での顕微鏡像と染色せずに蛍光顕微鏡観察した結果が比較されたところ、色素を封入した本剤及び蛍光色素封入空リポソーム投与では赤色蛍光は Gomori methenamine silver に染色された真菌感染部近傍に局在していたのに対して、色素単独投与では Gomori methenamine silver 染色の有無に関わりなく腎臓の全細胞の外側に赤色蛍光が認められた。

23) 組織中薬物濃度

シクロホスファミド前投与マウスに *A.fumigatus* が 2×10^7 conidia 気管内接種され、接種 2 日後に本剤 1 及び 10mg/kg 又は A*1mg/kg が静脈内投与された。被験薬投与 4 時間後に肺が摘出され、臓器内のリポソーム型を含む総 AMPH-B 濃度を HPLC 法により測定された。また同モデルに蛍光色素を封入した本剤 40mg/kg が静脈内投与され、投与 4 時間後に摘出された肺の組織切片が蛍光顕微鏡により観察された。

本剤 1mg/kg 群と A*1mg/kg 群において、肺内総 AMPH-B 濃度の平均値は各々 1.68 及び 2.29 μ g/g lung であり、有意差は認められなかった。本剤 10mg/kg 群の平均値は 13.97 μ g/g lung であり、A*1mg/kg 群に対して有意に高かった。

蛍光色素を封入した本剤を投与した場合、periodic acid-Schiff 染色陽性の真菌感染部位近傍にローダミン由来の蛍光シグナルが観察され、本剤が肺内の感染部位近傍に局在していることが示唆されたと考察されている。

24) マクロファージ内の真菌に対する殺真菌活性

C.glabrata を貪食させたマウス腹腔マクロファージが、7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl phosphatidylethanolamine (NBD-PE) /N-lissamine rhodamine B sulfonyl phosphatidylethanolamine (L-Rho-PE) 標識した本剤 25 及び 40 μ g/mL あるいは AMPH-B を含まない空リポソームの存在下で培養された。その後、マクロファージ内の真菌の生存率の検討、蛍光顕微鏡を用い蛍光共鳴エネルギー転移 (RET) 法による蛍光シグナルの変化を指標としたリポソームの状態が観察された。

空リポソームの存在下で 5 時間培養したマクロファージ内の *C.glabrata* の生存率は 91% であったが、本剤 25 及び 40 μ g/mL の存在下では各々 51 及び 29% に低下した。

蛍光顕微鏡を用いてマクロファージ内のリポソーム構造の変化が観察された結果、本剤添加 1.5 時間後には赤橙色の蛍光シグナルが認められ、5 時間後には黄緑色のシグナルが認められたことから、本剤はマクロファージに取り込まれた後、細胞内で本剤のリポソーム構造が崩壊していると推察されている。

25) 抗真菌活性の発現メカニズム

本剤はリポソームとして溶媒中で安定であり（「2. 物理的・化学的性質並びに規格及び試験方法に関する資料」の項参照）、また生体に投与された本剤は血漿中ではリポソームとして安定に存在しているため（「3. 非臨床に関する資料、(ii) 薬物動態試験成績の概要」及び、「4. 臨床に関する資料、(i) 臨床薬物動態及び臨床薬力学試験成績の概要」の項参照）、平均粒子径が 100nm 程度のリポソーム構造を維持したまま緻密な網目構造を有する細胞壁を通過して直接標的である真菌細胞膜のエルゴステロールに結合できないと考えられている。そのため、本剤が真菌に対して作用を発揮するには、本剤が真菌表層に結合後、リポソームから AMPH-B が遊離される必要がある。本剤の真菌に対する作用メカニズムを検討するために、sulforhodamine 色素を封入した本剤、蛍光標識した脂質成分あるいは金標識脂質成分により調製された本剤を用いて、*in vitro* で真菌に対する作用が蛍光顕微鏡あるいは電子顕微鏡を用いて観察された。