

- ・ sulforhodamine 存在下で *C. albicans* を 24 時間培養したところ、色素の赤色蛍光は視野全体に認められたが、細胞質では蛍光は認められなかった。sulforhodamine を封入した AMPH-B を含まない空リポソーム及び sulforhodamine を封入した本剤の存在下で培養した場合、赤色蛍光は *C. albicans* に局在していた。非標識の本剤と sulforhodamine の存在下で培養した場合には赤色蛍光は *C. albicans* に認められるとともに、蛍光は視野全体にも広がっていた。
- ・ L-Rho-PE で標識した本剤の存在下で *A. fumigatus*、*C. albicans* あるいは *C. glabrata* を培養したところ、いずれの真菌においても培養開始直後より真菌に赤色蛍光シグナルが観察された。*A. fumigatus* 及び *C. albicans* では、培養後に死滅した真菌の発する黄色の自家蛍光も観察されたが、*C. glabrata* では黄色の自家蛍光は僅かであった。L-Rho-PE で標識した AMPH-B を含まない空リポソームの存在下では、赤色蛍光シグナルが観察されたが、培養後も黄色の自家蛍光は殆ど認められなかった。
- ・ NBD-PE/ L-Rho-PE で標識した本剤の存在下で *C. albicans* を培養したところ、培養 1 時間では赤橙色の蛍光が真菌に局在し、培養 5.5 時間以降より真菌に黄色や黄緑色の蛍光が認められるとともに、培養 5.5 時間での真菌の生存率は 24%であった。一方、NBD-PE/L-Rho-PE で標識した AMPH-B を含まない空リポソームの存在下では、培養 21 時間まで赤橙色の蛍光が真菌に局在し、その時の真菌の生存率は 91%であった。*C. glabrata* を NBD-PE/L-Rho-PE で標識した本剤の存在下で培養すると、培養 5 時間で真菌表層に黄色の蛍光が認められ、真菌の生存率は 35%であった。また、培養 24 時間では黄緑色の蛍光が認められるとともに、一部赤橙色の蛍光が真菌に認められ、真菌の生存率は 33%であった。NBD-PE/ L-Rho-PE で標識した本剤を含まない空リポソームの存在下では培養 5 時間で蛍光は認められなかったが、24 時間で黄色の蛍光が認められ、この時の真菌生存率は 99%であった。
- ・ 金粒子で標識した本剤存在下で、*C. albicans*、*C. glabrata* 及び *A. fumigatus* を培養したところ、培養 3~4 時間では金粒子は真菌の外側細胞壁に確認され、培養 14~24 時間では表層、細胞膜及び細胞質に金粒子が認められた。金粒子で標識した AMPH-B を含まない空リポソームの存在下では、培養 14~24 時間でも金粒子は真菌の外側細胞壁にあり、細胞膜及び細胞質には認められなかった。

以上より、本剤が真菌表層に結合後、リポソームから AMPH-B が遊離し、真菌細胞膜の構成成分であるエルゴステロールと結合することにより、既存の AMPH-B 製剤と同様に真菌細胞膜の透過性を高め、その結果、抗真菌活性を発現すると考察されている。本剤が真菌表層に結合し、そこでリポソームが崩壊する機序は現時点では不明であるが、AMPH-B を含まない空リポソームでは、真菌表層との結合は生じるもののリポソームの崩壊は認められないことから、真菌表層への結合にはリポソームと真菌との相互作用が、またリポソームの崩壊には本剤中の AMPH-B が重要な役割を果たしていると推測されている。

(2) 一般薬理試験

マウスの一般症状、行動に対して、本剤 0.3、1、3、10、及び 30mg/kg 静脈内投与は、3mg/kg 以上で排尿回数を増加させたものの、他に特記すべき事項は認められなかった。マウスの自発運動量、チオペンタール誘発睡眠、ペンチレンテトラゾール誘発痙攣、電撃痙攣及び侵害受容反応、若しくはウサギ体温に対して、本剤 3 及び 10mg/kg 静脈内投与の影響は認められなかった。

本剤の呼吸及び循環器系（呼吸、血圧、心拍数、大腿動脈血流量及び心電図）に対する影響は、麻酔下のイヌで検討された。

静脈内 bolus 投与（投与容量 2.5mL/kg、投与速度 5mL/分）

0.1mg/kg 投与（n=4）では、投与中（投与開始後 3 分）において、心拍数（投与前：142±10 拍/分；平均値±標準誤差、以下同）は 171±14 拍/分に増加したが、投与終了後 15 分に回復（145±12 拍/分）した。他の測定パラメータについては投与中及び投与後のいずれも、特記すべき影響は認められなかった。

0.3mg/kg 投与（n=4）では、投与中（投与開始後 3 分）において、収縮期血圧（投与前：159±2mmHg）は 132±11mmHg、拡張期血圧（投与前：102±2mmHg）は 89±6mmHg、心拍数（投与前：147±6 拍/分）は 196±16 拍/分、血流量（投与前：144±12mL/分）は 112±21mL/分に変化した。これらの変化は投与終了後 15 分までに回復した。また、呼吸数（投与前：9±2 回/分）は投与終了直後に 15±5 回/分となったが、その 10 分後に回復（9±2 回/分）した。心電図は投与中及び投与後のいずれにおいても影響は認められなかった。

1mg/kg 投与（n=4）では、投与中（投与開始後 3 分）において、収縮期血圧（投与前：154±4mmHg）及び拡張期血圧（投与前：100±2mmHg）はそれぞれ 69±20 及び 41±13mmHg、心拍数（投与前：131±12 拍/分）は 153±11 拍/分、呼吸数（投与前：7±0 回/分）は 21±1 回/分、血流量（投与前：122±15mL/分）は 49±25mL/分となった。血圧、心拍数及び血流の変化は投与終了後 30 分までに、また呼吸数の変化は投与終了後 15 分に回復した。心電図は投与中及び投与後のいずれにおいても影響は認められなかった。

3mg/kg 投与（n=2）では、投与中（投与開始後 3 分）において、収縮期血圧（投与前：179mmHg）及び拡張期血圧（投与前：112mmHg）はそれぞれ 71 及び 42mmHg、呼吸数（投与前：11 回/分）は 30 回/分、血流量（投与前：144mL/分）は 29mL/分となった。血圧及び呼吸数の変化は投与終了後 30 分までに回復し、血流量の変化は投与終了後 120 分後に回復した。心拍数（投与前：149 拍/分）は、投与終了後 5 分で 168 拍/分となったのを除き、特記すべき変化は認められず、また心電図は投与中及び投与後のいずれにおいても影響は認められなかった。

10mg/kg 投与（n=2）では、投与中（投与開始後 3 分）において、収縮期血圧（投与前：181mmHg）及び拡張期血圧（投与前：116mmHg）はそれぞれ 41 及び 25mmHg、心拍数（投与前：196 拍/分）は 157 拍/分、呼吸数（投与前：8 回/分）は 29 回/分、血流量（投与前：134mL/分）は 32mL/分となった。血圧、心拍数、呼吸数及び血流量の変化は、それぞれは投与終了後 30 分、30 分、120 分及び 30 分に回復した。心電図は 1/2 例に QRS 時間の延長傾向が認められた。

静脈内 infusion 投与（投与容量 2 又は 2.5mL、投与速度 0.04mL/kg/分）

0.3mg/kg 持続投与（n=4）では、投与中及び投与終了後において、いずれの測定パラメータ

にも影響は認められなかった。

1mg/kg 持続投与 (n=4) では、投与中 (投与開始後 3 分) において、収縮期血圧 (投与前: 150±8mmHg) は 136±13mmHg、拡張期血圧 (投与前: 95±8mmHg) は 86±13mmHg、心拍数 (投与前: 146±11 拍/分) は 173±18 拍/分、血流量 (投与前: 81±13mL/分) は 70±13mL/分となったが、他のパラメータに特記すべき影響は認められなかった。

3mg/kg 持続投与 (n=4) では、心拍数 (投与前: 148±6 拍/分) は投与中 (投与開始後 3 分) に 188±13 拍/分へと有意に増加したが、この変化は投与終了直後に回復した。また、投与中 (投与開始後 3 分) に、収縮期血圧 (投与前: 148±8mmHg) は 118±14mmHg、拡張期血圧 (投与前: 99±5mmHg) は 83±13mmHg、投与中 (投与開始後 5 分) に血流量 (投与前: 85±5mL/分) は 58±13mL/分、投与中 (投与開始後 10 分) に呼吸数 (投与前: 10±1 回/分) は 14±1 回/分となったが、これらの変化も投与中 (投与開始後 30 分) あるいは投与終了直後までに回復した。心電図は投与中及び投与後のいずれにおいても影響は認められなかった。

10mg/kg 持続投与 (n=4) では、投与中 (投与開始後 3 分) において、収縮期血圧 (投与前: 162±7mmHg) は 99±20mmHg、拡張期血圧 (投与前: 110±6mmHg) は 58±14mmHg、心拍数 (投与前: 174±17 拍/分) は 223±24 拍/分、呼吸数 (投与前: 12±3 回/分) は 23±10 回/分、血流量 (投与前: 78±10mL/分) は 35±17mL/分となった。血圧及び呼吸数は投与中 (投与開始 30 分まで) に、心拍数及び血流量は投与終了直後に回復した。心電図は投与中及び投与後のいずれにおいても影響は認められなかった。

ラット摘出血管に対して、本剤 1×10^{-5} 、 3×10^{-5} 及び 1×10^{-4} g/mL 添加の影響は認められず、また塩化カリウムあるいはノルアドレナリンによる収縮に対しても本剤の影響は認められなかった。モルモット摘出回腸に対して、本剤 1×10^{-5} 、 3×10^{-5} 及び 1×10^{-4} g/mL 添加の影響は認められず、またアセチルコリン、ヒスタミンあるいは塩化バリウムによる収縮に対しても本剤の影響は認められなかった。

マウス胃腸管輸送能及びラット胆汁分泌に対して、本剤 1 (マウスのみ)、3 及び 10mg/kg 静脈内投与は、影響を与えなかった。

生理食塩液負荷ラットにおいて、本剤 1mg/kg 静脈内投与の影響は認められなかった。3mg/kg 静脈内投与では尿中 K^+ 排泄の増加、さらに 10mg/kg 静脈内投与では尿量増加、尿中 Na^+ 排泄の増加傾向、尿中 K^+ 及び Cl^- 排泄の増加を示した。本剤投与によるいずれの影響も溶媒対照と比較して 22~33%の変化であった。

麻酔下のイヌを用いて本剤及び AMPH-B の腎血流量、糸球体ろ過量、糸球体ろ過率、尿量及び尿中電解質排泄に対する影響が検討された。本剤 3 及び 10mg/kg 静脈内投与はいずれのパラメータも影響は認められなかったが、AMPH-B 3mg/kg 静脈内投与により腎血流量、糸球体ろ過量及びろ過率は減少し、また尿量は減少後に増加傾向となり、さらに尿中電解質排泄は増加あるいは増加傾向となった。

ウサギ血漿のカルシウム再加時間 (塩化カルシウムを添加後のフィブリン塊析出までの時

間)、活性化部分トロンボプラスチン時間、プロトロンビン時間、トロンビン時間に対して、本剤 3 及び 10mg/kg 静脈内投与の影響は認められなかった。ウサギ血小板の ADP 又はコラーゲンによる凝集に対して、本剤 10^{-5} 及び 3×10^{-5} g/mL 添加の影響は認められなかった。ラット洗浄赤血球に対して、本剤 10^{-5} 、 3×10^{-5} 及び 10^{-4} g/mL 添加により溶血は認められなかった。

一般薬理試験では、中枢神経系、自律神経系、平滑筋、消化器系及び血液系に対して本剤の影響は認められなかった。本剤 3mg/kg 静脈内投与で心拍数の増加、10mg/kg 静脈内投与で心拍数増加に加えて血圧下降、血流量の減少等が認められたが、摘出血管及び摘出心房の試験結果から本剤の循環器系への直接作用によるものではなく、またいずれも一過性の変化であることから重篤な副作用を予測させる変化ではないと考察されている。

<機構における審査の概略>

(1) AMPH-B の抗真菌活性に及ぼすリポソーム化の影響について

機構は、AMPH-B のリポソーム化に伴う MIC の上昇率が標準株間で大きく異なる理由について説明を求めた。

申請者は、以下のように回答した。

本剤の抗真菌作用は、リポソームと真菌表層が接着した後に、リポソームが崩壊して AMPH-B を遊離して真菌を傷害すると想定しており、*in vitro* では、真菌表層の構造、電荷あるいは疎水性の真菌株間の違いが本剤の真菌表層への接着に影響を及ぼしている可能性が考えられる。また、真菌表層に接着後、本剤から AMPH-B を遊離する際に関与する真菌側の因子に株間で量的あるいは質的な違いが生じている可能性も考えられる。しかしながら、これまでにその詳細は明らかになっていない。しかし、MIC が 1 μ g/mL からリポソーム化によって 64 μ g/mL に上昇した *Aspergillus flavus* IFO5839 を用いたマウス全身感染モデルの検討において、A*1mg/kg 群、本剤 3 及び 10mg/kg 群の生存日数中央値はいずれも溶媒対照に比して有意に延長しており、AMPH-B のリポソーム化に伴う抗真菌活性の変化の程度は *in vitro* と *in vivo* で一致するものではない。

機構は、上記の回答に対して以下の通り考える。

Aspergillus flavus IFO5839 を用いたマウス全身感染モデルの検討結果から、本剤の *in vitro* と *in vivo* の成績は一致するものではないと述べるのであれば、各々の用量投与時の血中濃度を明示した上で、その濃度と MIC 値の関係について考察すべきであると考え。この点について、機構は申請者に再度照会中である。

Aspergillus terreus 等、いくつかの菌種において、リポソーム化に伴い、MIC 値の上昇が認められている。提出されているデータにおいては、*in vivo* 及び *in vitro* の両検討がなされている菌種・菌株数は限られていることから、これらのデータのみを以って *in vivo* と *in vitro* から得られる本剤の抗真菌活性の関係は相関しないと判断することは困難であると考え。よって、この点については、更なる情報収集が必要であると考え。また、リポソームから AMPH-B が遊離される過程は本剤の抗真菌活性の発現に重要であることから、これに影響を及ぼす真菌側の因子を探索していく必要があると考え（「(ii) 薬物動態試験成績の概要」の項

参照)。

次に、機構は、A*投与後の AMPH-B の脳への分布は他の臓器に比較して低いことがラットで示されているが（「(ii) 薬物動態試験成績の概要」の項参照）、薬剤の中枢への移行性はリポソーム化によって変動する可能性もあることから、脳室内接種した *Cryptococcus. neoformans* に対する *in vivo* 薬理試験結果について、薬物動態学的観点から考察するように求めた。

申請者は、以下のように回答した。

C.neoformans を脳室内に接種したマウスを用いて本剤及びA*の脳内移行性を追加検討した結果、本剤 10mg/kg 及び A*1mg/kg 静脈内投与 24 時間後の脳内 AMPH-B 濃度の平均値±標準偏差は、各々 0.294 ± 0.104 及び $0.344 \pm 0.053 \mu\text{g/g}$ であった。非接種マウスでは、本剤 10mg/kg 及び A*1mg/kg 投与後 24 時間の脳内 AMPH-B 濃度は各々 0.111 ± 0.006 及び $0.083 \pm 0.007 \mu\text{g/g}$ であり、クリプトコッカス髄膜炎の発症により、詳細なメカニズムは不明であるが、傷害によって両剤の脳内移行性が亢進することが確認された。

機構は、① *in vivo* の試験結果より、本剤と A*の間では、MIC が異なる場合もあること、② 脳内に残存する血液中の被験薬の影響を少なくするため、静脈内投与 24 時間後には血中濃度が投与 5 分後の 1/50 以下にまで低下するという本剤の血中濃度推移を考慮し、脳の摘出時期を投与 24 時間後と設定しているものの、灌流操作等により摘出時に脳内に残存する血液を除去した後に測定された値ではないことから、脳の血液中に残存する薬剤濃度（クリプトコッカス髄膜炎マウスに本剤 10mg/kg 及び A*1mg/kg 静脈内投与 24 時間後の血清中 AMPH-B 濃度の平均値±標準偏差は、各々 1.862 ± 1.173 及び $0.160 \pm 0.028 \mu\text{g/mL}$ ）が脳内薬剤濃度の一部に含まれている可能性は否定できず、脳実質内濃度は上記の値を下回ると考えられること等の理由から、薬物動態の観点からは、本結果のみでは髄膜炎等の中枢系感染症に対する本剤の有効性の判断は困難であると考えられるものの、本剤 10mg/kg 及び A*1mg/kg 投与後の脳内の薬剤濃度はほぼ同程度であると考えた。

(2) 薬力学的相互作用について

アゾール系抗真菌薬やミカファンギン（MCFG）と作用機序が異なることから、臨床における併用（特に MCFG との併用）が臨床効果の増強に繋がると考えると申請者は述べているにもかかわらず（「4. 臨床に関する資料、(ii) 有効性及び安全性試験成績の概要」の項参照）、本剤と MCFG の薬力学的相互作用に関する成績は申請時に提出されていないため、機構は両剤の併用効果を示すデータを提示するよう求めた。

申請者は、以下のように回答した。

Graybill らは、*A.fumigatus* 全身感染モデルを用い、本剤 0.15mg/kg と MCFG 1mg/kg を併用した場合、単剤投与群と比較して有意差は認められないものの併用により生存日数が延長する傾向があること、脾臓、肺内の菌数減少に相加的な併用効果が認められたことを報告している（*J Antimicrob Chemother* 52: 656-662, 2003）。また、二木らは、AMPH-B と MCFG との併用効果について *in vitro* 及び *in vivo* で検討を行い、相加的又は相乗的な作用が認められることを報告している（*化療学会誌* 2002; 50(S-1): 58-67, 2002）。臨床効果については、併用効果の比較試験における検討成績は報告されていないものの、骨髄移植患者のアスペルギルス症における AMPH-B 製剤と MCFG の併用に関する米国での検討では、併用効果を示唆する結果が報告されている（*Blood* 100(11, Part 1): Abst 2472, 2002）。

機構は、本剤と MCFG の併用が臨床効果の増強に繋がることの申請者の説明は、臨床において検証されたものではなく、各薬剤の作用機序をもとにした推測の域であると考え。したがって、本剤と他の抗真菌薬との薬力学的相互作用について非臨床で検討するとともに、臨床においても本剤と他の抗真菌薬との併用時の有効性及び安全性について情報収集していく必要があると機構は考える。

(3) 呼吸・循環器系への影響について

機構は、本剤の一般薬理試験では A*や AMPH-B を対照として設定されていないことから、本剤投与の影響が認められた呼吸及び循環器系について A*等と比較するように求めた。

申請者は、以下のように回答した。

本剤は麻酔イヌへの静脈内投与で、呼吸回数の増加、心拍数の増加傾向又は減少、血圧下降、大腿動脈血流量の減少、心電図 QRS 幅の延長傾向が認められている。また、静脈内持続投与でも呼吸回数の増加傾向、心拍数増加、大腿動脈血流量の減少、血圧下降が見られているが、心電図への影響は見られていない。一方、AMPH-B 2.5mg/kg の麻酔イヌへの静脈内投与では、心拍数に変化は見られなかったが、全身血管抵抗の増加、平均血圧の上昇、心拍出量の減少、不整脈や心電図変化、肺動脈抵抗の増加が報告されている (J Infect Dis 140: 564-575, 1979)。また、同じく麻酔イヌでの検討で、AMPH-B 静脈内投与は 1.5mg/kg より血圧上昇及び徐脈を示し、心電図に対して 3mg/kg より T波の異常が報告されている (Science 179: 584-585, 1973)。更に、麻酔イヌを用いた別の報告では、静脈内投与 5mg/kg 以上で心拍数の減少、血圧上昇、T波上昇、PR 間隔延長、QT 間隔短縮、ST 分節上昇、心室性不整脈の発現が認められている (Proc Soc Exp Bio Med 116: 857-863, 1964)。以上、本剤は循環器系に対し、心拍数の増加及び血圧下降などを示したが、AMPH-B でも心拍数の減少及び血圧上昇が報告されている。本剤はリポソーム化に起因すると思われる循環器系の変化を示したが、AMPH-B で報告されているような不整脈等の重篤な作用は認められていない。

機構は、呼吸及び循環器系に対する本剤の一般薬理試験で用いられた最高用量は、体重変化及び腎・肝機能を指標としたマウスに対する静脈内投与における無影響量が用いられていたが、公表論文から引用された AMPH-B の呼吸及び循環器系に対する検討結果は、申請者から提出された体重変化及び腎・肝機能を指標とした A*の無影響量 1mg/kg を超える投与量の結果であることを踏まえると、本剤についても 10mg/kg を超える用量をイヌに投与した場合には、A*と同様の心電図等への影響が発現する可能性があると考え。したがって、本剤の臨床使用においては、A*と同様、循環器系の副作用の発現について注意喚起する必要があると機構は考える。さらに、本剤では A*で認められていない血圧低下が投与開始初期に認められており、またこの作用は infusion 投与よりも bolus 投与で強く発現する傾向があることから、血圧低下が発現する可能性に加えて、本剤の投与速度についても注意喚起する必要があると考える。なお、麻酔イヌを用いた一般薬理試験で、本剤 10 及び 1mg/kg を 0.1mL/kg/min の速度で投与した際に認められたとされている血圧の低下、心拍数の顕著な上昇等を示すデータ (機構注：現時点で未提出) の提示、並びに麻酔イヌに本剤を投与した際に認められた血圧低下の機序については、申請者に照会中である。

(ii) 薬物動態試験成績の概要

<提出された資料の概略>

以下の記載においては、本剤の用量は有効成分のアムホテリシン B (AMPH-B) 相当量を示し、また特に断りのある場合を除き、生体試料中の AMPH-B 濃度はリポソーム型と非リポソーム型をあわせた総 AMPH-B 濃度として記載する。なお、生体試料中の AMPH-B 濃度はバリデーションされた HPLC 法により測定された。

(1) 吸収

1) 単回投与試験

雄性マウスに本剤及び A* を静脈内投与し、投与後 0.083~48 時間の血清中 AMPH-B 濃度を測定した結果、各薬物動態パラメータは、以下のとおりであった。

薬剤名	本 剤			A*
	1	3	10	
投与量 (mg/kg)	1	3	10	1
C _{5min} (µg/mL)	22.3	76.7	303	3.51
AUC ₀₋₄₈ (µg·h/mL)	82.0	285	1839	12.4
t _{1/2α} (h)	2.19	2.74	0.03	0.45
t _{1/2β} (h)	101	18.4	4.66	17.8
V _c (L/kg)	0.051	0.047	0.017	0.30
V _{dss} (L/kg)	0.35	0.058	0.041	1.4
CL (mL/min/kg)	0.23	0.19	0.10	1.02

雄性ラットに本剤及び A* を静脈内投与し、投与 0.5~168 時間後の血漿中 AMPH-B 濃度を測定した結果、各薬物動態パラメータは、以下のとおりであった。

薬剤名	本 剤		A*
	1	9	
投与量 (mg/kg)	1	9	1
C ₀ (µg/mL)	17.530	204.588	0.586
AUC _{0-∞} (µg·h/mL)	46.605	1062.178	7.228
t _{1/2} (h)	7.0	11.5	19.4
V _c (mL/kg)	41.0	45.7	1305.9
V _{dss} (mL/kg)	154.4	86.9	3874.3
CL (mL/h/kg)	21.5	8.5	138.3

2) 反復投与試験

毒性試験において、ラットに本剤 1~20mg/kg を 1 日 1 回 30 日間静脈内投与し、初回及び最終投与日に投与後 0.5~24 時間の血漿中 AMPH-B 濃度を測定した結果の各薬物動態パラメータは、以下のとおりであった。なお、最終投与日に認められた CL の低下は、クッパー細胞等の非実質細胞の取り込みクリアランスが反復投与により飽和した結果と考察されている。

投与量 (mg/kg)	1		3		9		20	
性	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
初回投与								
C _{0.5h} (µg/mL)	7.9	6.8	32.6	28.0	109	189	143	300
AUC ₀₋₂₄ (µg·h/mL)	53.1	52.4	242	436	872	1228	1015	1878
Vd _β (mL/kg)	242	177	135	64	137	54	206	197
CL (mL/h/kg)	13.9	18.1	10.4	6.5	9.1	7.0	17.0	8.2
最終投与								
C _{1h} (µg/mL)	9.3	8.8	43.2	29.4	148	110	500	380
AUC ₀₋₂₄ (µg·h/mL)	135	80.5	474	321	1791	1766	5357	3744
Vd (mL/kg)	88	142	75	108	82	50	47	56
CL (mL/h/kg)	6.8	11.2	5.4	8.0	2.9	4.8	3.0	4.5

* : 血漿中濃度の各測定時点 (n=2~3) の平均値の推移曲線を用いて算出

ラットに本剤 0.1~9mg/kg を 1 日 1 回 30 日間静脈内投与し、初回及び最終投与日に投与後 0.5、3 及び 24 時間の血漿中 AMPH-B 濃度を測定した結果は以下のとおりであり、雌雄差が認められた。なお、AUC_{0-t} は各動物で血漿中濃度が検出された時間までの AUC より算出されている。

投与量 (mg/kg)	0.1		0.3		1		9	
性	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
初回投与								
C _{0.5h} (µg/mL)	0.36 (0.06)	0.26 (0.03)	1.18 (0.43)	0.82 (0.25)	5.08 (0.76)	4.09 (0.83)	123.88 (4.28)	101.96 (8.75)
AUC _{0-t} (µg·h/mL)	0.8# (0.2)	0.6# (0.1)	2.6# (1.1)	1.8# (0.6)	32.6 (4.2)	23.6 (1.9)	665.6 (118.4)	485.4 (87.0)
最終投与								
C _{0.5h} (µg/mL)	0.61 (0.14)	0.25 (0.09)	1.84 (0.31)	1.32 (0.40)	8.70 (0.45)	7.64 (1.31)	229.81 (49.94)	136.37 (23.55)
AUC _{0-t} (µg·h/mL)	1.4# (0.3)	0.6# (0.2)	11.6 (1.0)	8.4## (5.6)	50.5 (2.1)	44.8 (12.6)	2170.7 (763.9)	1086 (255.3)

* : 数値は 3 例の平均値、() 内は標準偏差

: AUC_{0-3hr}、## : 3 例中 1 例が AUC_{0-3hr}

毒性試験において、ラットに本剤 0.03、0.3 及び 3mg/kg を 1 日 1 回 182 日間静脈内投与し、初回、第 30 日、第 90 日及び最終投与日に投与後 0.5、3 及び 24 時間の血漿中 AMPH-B 濃度が測定された結果、0.03mg 群では初回投与日以降に繰返し投与による曝露量の上昇は認められなかったが、0.3mg/kg 群では第 90 日目まで、3mg 群では最終投与日まで曝露量の上昇が認められ、曝露量の上昇の程度は雌性ラットより雄性ラットで顕著であった。

毒性試験において、イヌに本剤 0.25~16mg/kg を 1 日 1 回 30 日間静脈内投与し、投与後 0.5~24 時間の血漿中 AMPH-B 濃度が測定された結果は、以下のとおりであった。なお、AUC は血漿中濃度が検出された時間 t までのデータを用いて算出されている。

投与量 (mg/kg)	0.25		1		4		8		16	
性	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
初回投与日										
AUC _{0-t} (μg·h/mL)	—	1.76	10.6	8.5	136	149	586	963	2119	1835
Vdβ (mL/kg)	—	1024	1119	1093	311	294	151	137	110	100
CL (mL/h/kg)	—	118	91.8	106	27.0	25.8	11.8	7.6	5.7	7.4
第 14 投与日										
AUC _{0-t} (μg·h/mL)	2.7	2.9	55.0	50.1	740	717	3060	2486	7830	6054
Vdβ (mL/kg)	579	288	194	335	57.8	72.0	51.1	52.2	34.0	43.5
CL (mL/h/kg)	71.1	83.2	23.0	25.4	4.93	5.51	2.26	2.55	1.16	1.79
最終投与日										
AUC _{0-t} (μg·h/mL)	4.89	5.05	117.8	99.6	1640	1218	—	—	—*	—*
Vdβ (mL/kg)	184	135	77.3	77.3	26.0	45.6	—	—	—*	—*
CL (mL/h/kg)	42.4	51.3	9.6	9.8	1.11	2.62	—	—	—*	—*

— 各群 5 例中で評価可能パラメータの得られた個体が 2 例以下のため平均値を算出せず (* は全例死亡)

イヌに本剤 0.03、0.3 及び 1.5mg/kg を 1 日 1 回 273 日間静脈内投与し、初回、第 91、第 182 及び最終投与日に投与後 0.5、3 及び 24 時間の血漿中 AMPH-B 濃度が測定された結果、いずれの用量群においても、第 182 投与日まで投与回数の増加に伴う曝露量の上昇が認められたが、その後は投与を繰り返しても曝露量の上昇は認められなかった。

(2) 分布

1) 単回投与試験

ラットに本剤 1 及び 9mg/kg を静脈内投与し、投与後 3~168 時間における臓器・組織（血液、血漿、脳、肺、肝臓、腎臓及び脾臓）中の AMPH-B 濃度が測定された。その結果、本剤投与後 3 時間の AMPH-B 濃度は肝臓>脾臓>血漿>血液>肺≒腎臓>脳の順で、肝臓及び脾臓で特に高く、またこれらの臓器からの AMPH-B の消失は他の臓器に比して緩やかな傾向が認められた。投与 24 時間後までの血漿中の AMPH-B 濃度は血液より高く推移していることから、AMPH-B の脾臓への移行に関して血球に移行後に脾臓に移行する経路の寄与は小さいと考察されている。なお、臓器中 AMPH-B 濃度に明確な性差は認められていない。A* 1mg/kg 静脈内投与後の分布と比較すると、投与後 3 及び 24 時間の肝臓、血液及び血漿中の薬物濃度は本剤投与時の方が高く、腎臓及び肺では A* 投与時の方が高かった。脾臓の AMPH-B 濃度は本剤投与時と A* 投与時で同程度であった。

雄性イヌに本剤 1mg/kg 及び A* 1mg/kg を静脈内投与し、投与後 3、24 及び 168 時間における臓器・組織（血漿、脳、肺、肝臓、腎臓及び脾臓）中の AMPH-B 濃度が測定された結果、本剤投与後 3 時間の AMPH-B 濃度は肝臓>脾臓>肺>血漿>腎臓>脳の順で、肝臓及び脾臓で特に高く、またこれらの臓器からの AMPH-B の消失は他の臓器に比して緩やかな傾向が認められた。A* 投与 3 時間後の AMPH-B 濃度は肝臓>脾臓>腎臓>肺>血漿>脳の順であった。投与後 3 時間において、肝臓、脾臓、肺及び血漿の AMPH-B 濃度は本剤の方が A* より高く、腎臓は A* が高値であった。

ラットに本剤のリポソームを構成するコレステロールを ^{14}C で標識した本剤 3mg/kg (AMPH-B 3mg/kg、コレステロール 2.8mg/kg (27.54 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$)) を静脈内投与し、投与後 3、8、12、24、48、72、96 及び 168 時間の臓器・組織中の総放射能が測定された結果、投与 3 時間後の組織重量あたりの放射能は、血漿>脾臓 \approx 肝臓>肺>心臓>腎臓>小腸の順で、脂肪、眼、筋肉、皮膚の放射能は僅かであった。血漿中放射能の半減期は雄で 81.42h、雌で 77.53h であった。肝臓、脾臓、肺、心臓からの放射能の消失は血漿と比較して緩やかであった。小腸の放射能は投与後 72 時間まで増加し、その後緩やかに減少した。小腸における放射能の増加については、肝臓内に取り込まれた ^{14}C -コレステロール由来成分が胆汁排泄されたためと考察されている。また、筋肉及び皮膚中放射能の増加については、遊離した ^{14}C -コレステロール由来成分が再分布したものと考察されている。

2) 反復投与試験

雄性ラットに本剤 1mg/kg を 1 日 1 回 21 日間静脈内投与し、最終投与後 3、24、72 及び 168 時間における血液、血漿、脳、肺、肝臓、腎臓及び脾臓の AMPH-B 濃度が測定された。

単回投与と同様、AMPH-B 濃度は肝臓及び脾臓で高く、これらの臓器からの AMPH-B の消失は他の臓器に比して緩やかな傾向であった。最終投与後 3 時間の AMPH-B 濃度は、本剤 1mg/kg 単回投与時と比べると肝臓及び脾臓で約 5 倍、腎臓及び肺で約 2 倍に上昇した。

3) 投与後の血漿中存在形態

雌性ラットに本剤 20mg/kg を静脈内投与し、投与後 0.5、1、2、4、8 及び 24 時間における血漿中総 AMPH-B 濃度と血漿を限外ろ過したろ液中の非リポソーム型 AMPH-B 濃度が測定された。なお、非リポソーム型 AMPH-B のうち蛋白結合していない遊離型 AMPH-B 濃度は *in vitro* で得られた AMPH-B の蛋白結合率 (AMPH-B 10 及び 30mg/mL 添加後の蛋白結合率の平均値 1.9%) を用いて算出された。

本剤投与後の血漿中総 AMPH-B 濃度に対する非リポソーム型の割合 (平均値 \pm 標準偏差) は、0.08 \pm 0.03 \sim 0.25 \pm 0.06% (投与後 24 時間は $<$ 0.20%) であり、血漿中総 AMPH-B の 99.75%以上はリポソーム型として存在していた。また、血漿中総 AMPH-B のうち遊離型は 0.0016 \pm 0.0005 \sim 0.0047 \pm 0.0011% (投与後 24 時間は $<$ 0.0039%) であった。

4) 肝臓内分布

ラットに本剤 1 及び 9mg/kg を静脈内投与し、投与後 3 時間の肝臓中 AMPH-B 濃度が測定された。また、肝臓をコラゲナーゼ灌流及び遠心分離し、肝実質細胞画分を調製し、同画分中の AMPH-B 濃度が測定された。

雄性ラットにおける 1 及び 9mg/kg 投与後の肝臓中 AMPH-B 濃度の平均値は各々 15.5 及び 49.4 $\mu\text{g}/\text{g}$ で、このうちの約 20%は実質細胞に存在していた。雌性ラットにおける 1 及び 9mg/kg 投与後の肝臓中 AMPH-B 濃度の平均値は各々 10.0 及び 68.4 $\mu\text{g}/\text{g}$ で、このうちの 1mg/kg では 14.9%、9mg/kg では 17.9%が実質細胞に存在していた。AMPH-B が実質細胞に分布した原因として、本剤が粒子径 100nm 以下であり、肝臓の類洞壁を通過して実質細胞へ取り込まれる可能性、あるいはリポソームとして非実質細胞に取り込まれた後に、リポソームから遊離した AMPH-B が実質細胞に再分布した可能性が推測されている。

5) 蛋白結合 (*in vitro*)

In vitro において、A*をラット及びヒトプール血清に添加し、血清中及び限外ろ過後のろ液中の AMPH-B 濃度より AMPH-B の蛋白結合率が算出された結果、添加した AMPH-B 10 及び 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ における蛋白結合率の各平均値は、ラットでは 97.5 及び 98.7%、ヒトでは 95.9 及び 96.9%であった。

In vitro 試験で AMPH-B をヒトプール血漿に添加し、血漿中及び限外ろ過後のろ液中の AMPH-B 濃度より蛋白結合率が算出された結果、AMPH-B 0.618~65.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ における蛋白結合率は、95.31 (AMPH-B の添加量 0.618 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ~99.1% (AMPH-B の添加量 65.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) であった。また、ヒト血清アルブミン及びヒト α 1 酸性糖蛋白に対する AMPH-B の結合率がそれぞれ検討された結果、ヒト血清アルブミンには 93.4~95.5%及びヒト α 1 酸性糖蛋白には 90~92.2%結合し、両蛋白はヒト血漿中で AMPH-B の担体として機能していると考察されている。

6) 胎児移行性

妊娠 13 及び 19 日のラットに本剤 3mg/kg を静脈内投与し、投与後 1、4 及び 24 時間の母動物の血漿中、胎盤中、羊水及び胎児の AMPH-B 濃度が測定された結果、母動物の血漿中 AMPH-B 濃度に比べて胎盤中濃度は低く、妊娠 13 日目の胎児 (全身) 及び羊水、19 日目の胎児 (全身)、羊水、胎児の肝臓、腎臓、肺及び脳では、いずれの時点においても定量限界未満であった。

(3) 代謝

1) *In vitro*

ラット、イヌ及びヒトの肝 S9 分画 2mg protein/mL に基質として AMPH-B (最終濃度 5 ~7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加し、補酵素として NADH 3mmol/L 及び NADPH 3mmol/L、NAD 3mmol/L 及び NADP 3mmol/L、NADPH 3mmol/L、UDPGA 4mmol/L、PAPS 380 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 及び MgCl_2 6mmol/L の存在下で各々 2 及び 24 時間 37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートした際の基質の残存率が検討された。

ラット及びイヌの肝 S9 では、補酵素非添加系及びいずれの補酵素添加系においても熱処理 S9 に比して明確な基質の減少は認められなかった。ヒト肝 S9 では、補酵素を添加しない反応条件で基質の減少が認められたが、ヒト肝 S9 を用いた他の補酵素添加系は熱処理 S9 と同様に基質の減少は認められず、また補酵素非添加条件の反応液を分析した HPLC クロマトグラムに基質減少分に対応する AMPH-B 以外の代謝物ピークも認められなかったことより、ラット、イヌ及びヒトの肝 S9 では、AMPH-B の代謝反応は進行しにくいと考察されている。

2) 薬物代謝酵素への影響

雌性ラットに本剤 1 及び 9mg/kg を 1 日 1 回 14 日間静脈内投与し、最終投与後 24 及び 168 時間に摘出した肝臓を用い、相対肝重量、ミクロソーム蛋白量、P450 量、Cytochrome b₅ 量、NADPH cytochrome c reductase 活性、7-ethoxyresorfin O-deethylase (CYP1A) 活

性、testosterone 2 α -hydroxylase (CYP2C11) 活性、testosterone 6 β -hydroxylase (CYP3A) 活性、testosterone 16 α -hydroxylase (CYP2C11、CYP2B1) 活性、testosterone 16 β -hydroxylase (CYP2B1) 活性及び chlorzoxazone 6-hydroxylase (CYP2E1) 活性が測定された。

本剤 1mg/kg 投与群では、すべての測定項目において対照群（媒体投与群）との間に有意な差は認められなかった。本剤 9mg/kg 群では最終投与後 24 時間において Cytochrome P450 含量と NADPH cytochrome c reductase 活性に有意な低下が認められたが、低下の程度は約 20% であり、また最終投与後 168 時間では有意差は認められなかった。以上より、ラットに本剤を静脈内投与した時の肝薬物代謝酵素系への影響は小さいと考察されている。

(4) 排泄

1) 尿中及び糞中排泄

雄性ラットに本剤 5mg/kg を静脈内投与し、投与 168 時間後までの尿中及び糞中 AMPH-B 濃度が測定された結果、本剤投与後、AMPH-B は尿及び糞中に徐々に排泄され、投与量に対する投与 96 時間後までの累積排泄率の平均値は、尿中 5.43%、糞中 7.60%、また投与後 168 時間までは、尿中 6.55%、糞中 8.47% であった。なお、投与後 168 時間における AMPH-B の総回収率（屍体を含む）の平均値は投与量の 61.87% であった。

ラットに本剤のリポソームを構成するコレステロールを ¹⁴C で標識した本剤 3mg/kg (AMPH-B 3mg、コレステロール 2.8mg/kg) を静脈内投与し、投与後 96 時間までの尿中及び糞中総放射能が測定された結果、本剤投与後、放射能は尿及び糞中に徐々に排泄され、投与量に対する投与後 96 時間までの累積排泄率の平均値は、尿中 0.47% (雄) 及び 2.27% (雌)、糞中 31.58% (雄)、35.06% (雌) であった。なお、投与後 96 時間における放射能の総回収率（屍体を含む）の平均値は投与量の 111.04% (雄) 及び 108.34% (雌) であった。

2) 胆汁中排泄

胆管カニューレ手術を施行した雄性ラットに本剤 3mg/kg を静脈内投与し、投与 72 時間後までの胆汁中及び尿中の AMPH-B 濃度が測定された結果、本剤投与後、AMPH-B は胆汁中に徐々に排泄され、投与量に対する投与後 72 時間までの累積排泄率の平均値は、5.9% であった。また、投与量に対する投与後 72 時間までの尿中への累積排泄率の平均値は、4.3% であった。

3) 乳汁移行性

分娩後 11 日のラットに本剤 3mg/kg を静脈内投与し、投与後 0.25、0.5、1、2、4、8 及び 24 時間の乳汁中及び血漿中の AMPH-B 濃度が測定された結果、乳汁中 AMPH-B の t_{max} は 4~8h、C_{max} 及び台形法による AUC₀₋₂₄ の平均値は各々 0.106 μ g/mL 及び 1.27 μ g \cdot h/mL であり、血漿中 AMPH-B の AUC₀₋₂₄ に対する乳汁中の AMPH-B の AUC₀₋₂₄ は 0.009 倍であった。

(5) 薬物動態学的薬物相互作用

雌性ラットにシスプラチン 6mg/kg (Day 1)、塩酸ドキシソルビシン 2mg/kg (Day 1~3) 及びコハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム 20mg/kg (Day 1~21) をそれぞれ静脈内投与し、本剤 5mg/kg を 1 日 1 回 21 日間静脈内投与時の血漿中 AMPH-B 濃度推移に及ぼす併用薬剤の影響が検討された。その結果、Day1 における本剤単独投与群の投与 0.5 時間後の血漿中 AMPH-B 濃度及び AUC₀₋₂₄ の平均値に対し、シスプラチン併用群は各々 1.10 倍及び 0.99 倍、塩酸ドキシソルビシン併用群は 1.01 倍及び 0.96 倍、コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム併用群は 0.84 倍及び 0.90 倍であった。また、Day 21 における本剤単独投与群の投与後 0.5 時間の血漿中 AMPH-B 濃度及び AUC₀₋₂₄ 平均値に対して、塩酸ドキシソルビシン併用群は各々 1.88 倍及び 2.00 倍、コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム併用群は 1.15 倍及び 1.25 倍であった。なお、シスプラチン併用群は途中死亡のため、Day 3 以降のデータは得られなかった。

雌性ラットにフロセミド 2mg/kg (Day 1~7)、タクロリムス 0.1mg/kg (Day 1~21) 及びシクロスポリン 6mg/kg (Day 1~21) をそれぞれ静脈内投与し、本剤 5mg/kg を 1 日 1 回 21 日間静脈内投与時の血漿中 AMPH-B 濃度推移に及ぼす併用薬剤の影響が検討された。Day 1 における本剤単独投与群の投与後 0.5 時間の血漿中 AMPH-B 濃度及び AUC₀₋₂₄ の平均値に対し、フロセミド併用群は各々 1.09 倍及び 1.02 倍、タクロリムス併用群は 1.05 倍及び 0.96 倍、シクロスポリン併用群は 1.29 倍及び 1.25 倍であった。また、Day 21 における本剤単独投与群の投与後 0.5 時間の血漿中 AMPH-B 濃度及び AUC₀₋₂₄ の平均値に対し、フロセミド併用群は各々 0.77 倍及び 0.87 倍、タクロリムス併用群は 0.92 倍及び 0.85 倍、シクロスポリン併用群は 1.21 倍及び 0.97 倍であった。

(6) その他の薬物動態試験

1) 肝機能障害モデル

本剤投与 24 時間前に四塩化炭素を経口投与して作成した肝機能障害モデルラットに、本剤 3mg/kg を静脈内投与し、投与後 0.5、1、2、4、8 及び 24 時間の血漿中 AMPH-B 濃度が測定された。また、本剤投与後 1、24、72 及び 168 時間の臓器中 AMPH-B 濃度が測定された。

肝機能障害モデルの AUC_{0-∞}、Vdss 及び CL の平均値は、各々 946µg·h/mL、30.9mL/kg 及び 3.19mL/h/kg であり、投与後 1、24、72 及び 168 時間の肝臓中 AMPH-B 濃度の平均値は 29.6、43.4、19.6 及び 12.7µg/g であった。一方、四塩化炭素を投与していない対照ラットにおける AUC_{0-∞}、Vdss 及び CL の平均値は各々 219µg·h/mL、233mL/kg 及び 13.9mL/h/kg、投与後 1、24、72 及び 168 時間の肝臓中 AMPH-B 濃度の平均値は 44.9、47.8、34.5 及び 12.2µg/g であった。以上から、ラットにおける本剤の血漿クリアランスは、主として肝臓への取り込みが関与していると考察されている。

2) 腎機能障害モデル

左腎 2/3 と右腎の摘出手術を施行した腎機能障害モデルラットに、本剤 3mg/kg を静脈内投与し、投与後 0.5、1、2、4、8 及び 24 時間の血漿中 AMPH-B 濃度を測定、薬物動態パラメータが算出された結果、腎障害モデルラットの AUC_{0-∞}、Vdss 及び CL の平均値 (各々

157 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 、173 mL/kg 及び 20.1 $\text{mL}/\text{h}/\text{kg}$) は、疑手術ラット (各々 196 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 、140 mL/kg 及び 15.6 $\text{mL}/\text{h}/\text{kg}$) と有意な差はなく、本剤のクリアランスへの腎臓の関与は小さいと考察されている。

<機構における審査の概略>

(1) リポソームからの AMPH-B の遊離について

機構は、本剤の抗真菌活性の発現過程について、リポソームの構造及び薬物動態の観点から説明するよう求めた。

申請者は、以下のように回答した。

ーリポソームの構造の観点からー

再溶解した本剤を電子顕微鏡下で観察し、単層リポソームを形成していることを確認している。本剤のリポソームの分子構造は、AMPH-B が水に難溶であり、会合体を形成すると考えられること、脂質膜への添加により膜透過性が亢進されることから (Biochemistry 36: 4959-4968, 1997)、AMPH-B はリポソーム内に可溶化して存在するのではなく、リポソームの脂質二分子膜内に細孔を形成して埋め込まれているものと推定されている (Biochemistry 36: 4959-4968, 1997) (「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、本剤をヒト血漿中で 72 時間インキュベートした後も AMPH-B の 95% がリポソーム画分に存在すること (J Liposome Res 3: 429-450, 1993)、またラットでは本剤静脈内投与後 24 時間までの血漿中総 AMPH-B のうち非リポソーム型として存在する割合は、0.3% 未満であり、本剤の分布容積は血漿容積と細胞外液容積の和より小さかったことより、本剤はラット血漿中においてリポソーム型として安定に存在し、培養液中 (*in vitro*) あるいは投与後に単に経時変化、あるいは代謝によってリポソームから AMPH-B が遊離することはない。

ーリポソームの薬物動態の観点からー

本剤は平均粒子径が 100nm 程度であるため、不連続内皮を持つ肝臓、脾臓、骨髄等ではリポソーム製剤は毛細血管より漏出するが、生体内に広く分布する連続内皮を有する毛細血管からは漏出することはない。一方、感染部位においては炎症により血管透過性が亢進し、直径 100nm 以下の粒子であれば、血管より漏出することが可能であるとされているため (医薬品の開発 第 13 巻薬物伝達法 216-231、廣川書店、1989)、本剤はリポソーム構造のまま毛細血管より漏出し、感染部位周辺に局在化すると考える。

真菌にはエルゴステロールが存在する細胞膜の外側に、キチンや β -グルカンで構成される緻密な網目構造を有する細胞壁が存在するため、平均粒子径が 100nm 程度である本剤はリポソーム構造を維持したまま細胞壁を通過し、真菌細胞膜上のエルゴステロールに結合することはできないと考えられる。本剤が真菌表層に結合後にリポソーム構造が崩壊することが *in vitro* で示されており (「(i) 薬理試験成績」の項参照)、本剤の抗真菌作用は、真菌表層に結合したリポソームの崩壊により遊離した AMPH-B が細胞壁を透過し、細胞膜に移行することにより発揮されるものと考えられる。また、リポソーム製剤はマクロファージ等の細網内皮系細胞に取り込まれやすく、真菌を貪食したマクロファージに取り込まれた本剤はマクロファージ内でリポソーム構造が崩壊した後においても殺真菌作用を示す。

なお、AMPH-B を含まない本剤と同一の構成成分からなる空リポソームは本剤と同様に真菌