2.4.6 マウスムーコル症モデルに対する作用

添付資料番号：［4.2.1.1-20］参

好中球減少を誘発したマウスに *Rhizopus oryzae* を感染させたマウスムーコル症モデルに対するイサブコナゾニウム硫酸塩および L-AMB の有効性を評価した。また、糖尿病性ケトアシドーシス (DKA) を誘発したマウスに *Rhizopus oryzae* を感染させたマウスムーコル症モデルに対するイサブコナゾニウム硫酸塩の有効性を評価した。

（方法）好中球減少は、シクロフォスファミドおよび酢酸コルチゾンを投与することにより誘発した。このマウスに *Rhizopus oryzae* を気管内感染させた後、感染 8 時間後からイサブコナゾニウム硫酸塩を 215 mg/kg 1 日 3 回経口投与または L-AMB を 15 mg/kg 1 日 1 回静脈内投与を計 5 日間投与した。対照群のマウスには *Rhizopus oryzae* を気管内感染させた後、イサブコナゾニウム硫酸塩の代わりに滅菌水を投与した。各薬剤の有効性は、各群のマウスの生存率、ならびに脳内および肺内生菌数を対照群と比較することにより評価した。

DKA は、ストレプトゾトシンと酢酸コルチゾンを投与することにより誘発した。このマウスに *Rhizopus oryzae* を気管内感染させた後、感染 8 時間後からイサブコナゾニウム硫酸塩を 80、110、または 215 mg/kg 1 日 3 回経口投与を計 5 日間投与した。対照群のマウスには *Rhizopus oryzae* を気管内感染させた後、イサブコナゾニウム硫酸塩の代わりに滅菌水を投与した。各薬剤の有効性は、各群のマウスの生存率を対照群と比較することにより評価した。

（結果）好中球減少マウスムーコル症モデルにおいて、イサブコナゾニウム硫酸塩投与群、L-AMB 投与群および対照群のマウスの感染 21 日後生存率はそれぞれ 65%、40%および 15%であった。また、イサブコナゾニウム硫酸塩投与群および L-AMB 投与群では、対照群と比較して肺内および脳内生菌数を減少させた（図 2-12）。DKA マウスムーコル症モデルにおいて、イサブコナゾニウム硫酸塩投与群と対照群の間で生存率の明らかな差は認められなかった。しかし、*Rhizopus oryzae* を気管内感染させていない DKA マウスでも明らかな生存率の低下が認められたことから、追加試験を実施した。その結果、DKA マウスムーコル症モデルにおいて、イサブコナゾニウム硫酸塩 110 mg/kg 投与群では対照群と比較して生存率を改善する傾向が認められた（図 2-13）。

（結論）イサブコナゾニウム硫酸塩は、好中球減少マウスムーコル症モデルの肺内および脳内生菌数を低下させ、生存率を改善した。同モデルにおけるイサブコナゾニウム硫酸塩の有効性は、L-AMB の有効性と同等であった。また、イサブコナゾニウム硫酸塩は、DKA マウスムーコル症モデルの生存率を改善する傾向を認めた。

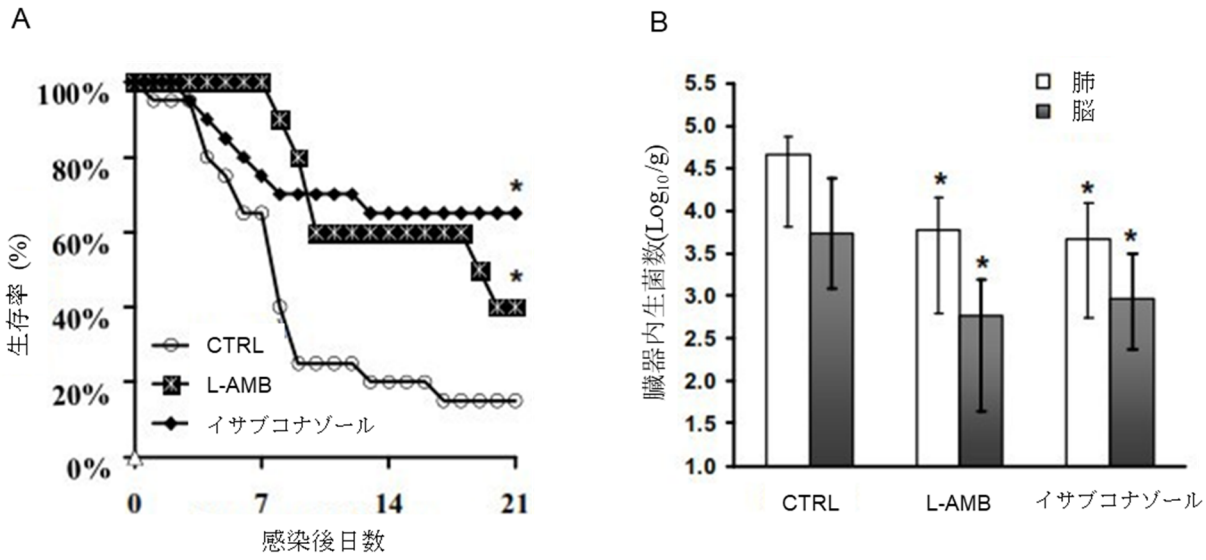


図 2-12 好中球減少マウスムーコル症モデルの生存率および臓器内生菌数に対するイサブコナゾニウム硫酸塩および L-AMB の作用

(A) 感染 21 日までの生存曲線。CTRL; 対照群 (n=20)、イサブコナゾニウム硫酸塩投与群 (n=20)、L-AMB 投与群 (n=10)、*p <0.05（対照群との比較、Log Rank 検定）。
(B) 感染 3 日後の肺内および脳内生菌数。各群 n=9、*p <0.05（対照群との比較、Wilcoxon 順位和検定）。

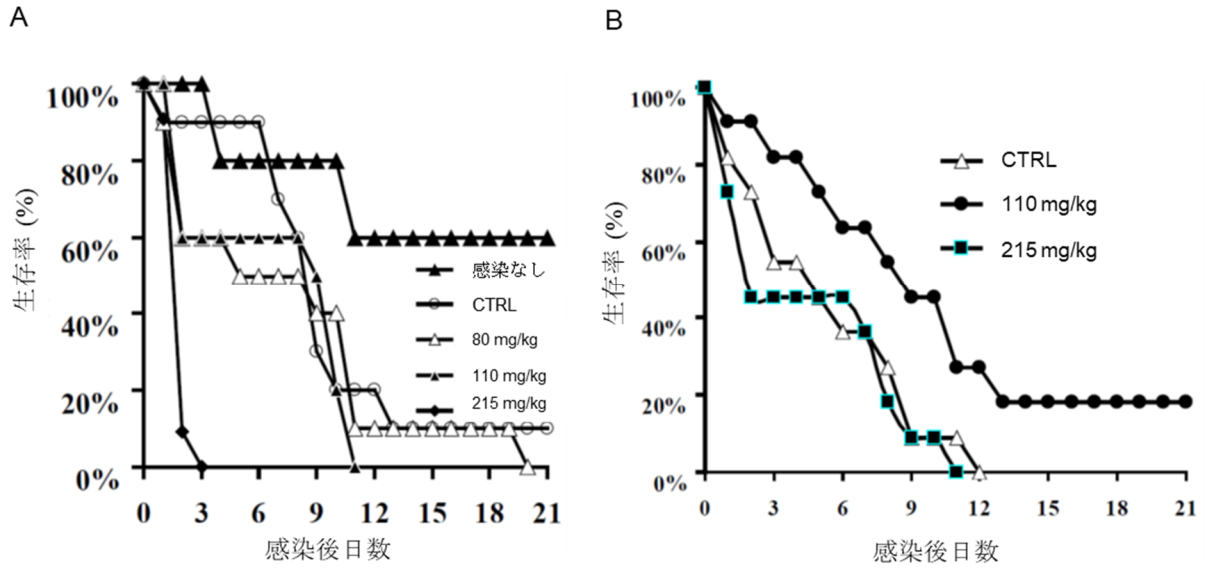


図 2-13 DKA マウスムーコル症モデルの生存率に対するイサブコナゾニウム硫酸塩の作用

(A) 初回試験の感染 21 日までの生存曲線。各群 n=10。(B) 追加試験の感染 21 日までの生存曲線。各群 n=11。CTRL; 対照群、各シンボルの横にイサブコナゾニウム硫酸塩の投与量を示す。

2.4.7 マウス播種性カンジダ症モデルに対する作用

添付資料番号：［4.2.1.1-21］参

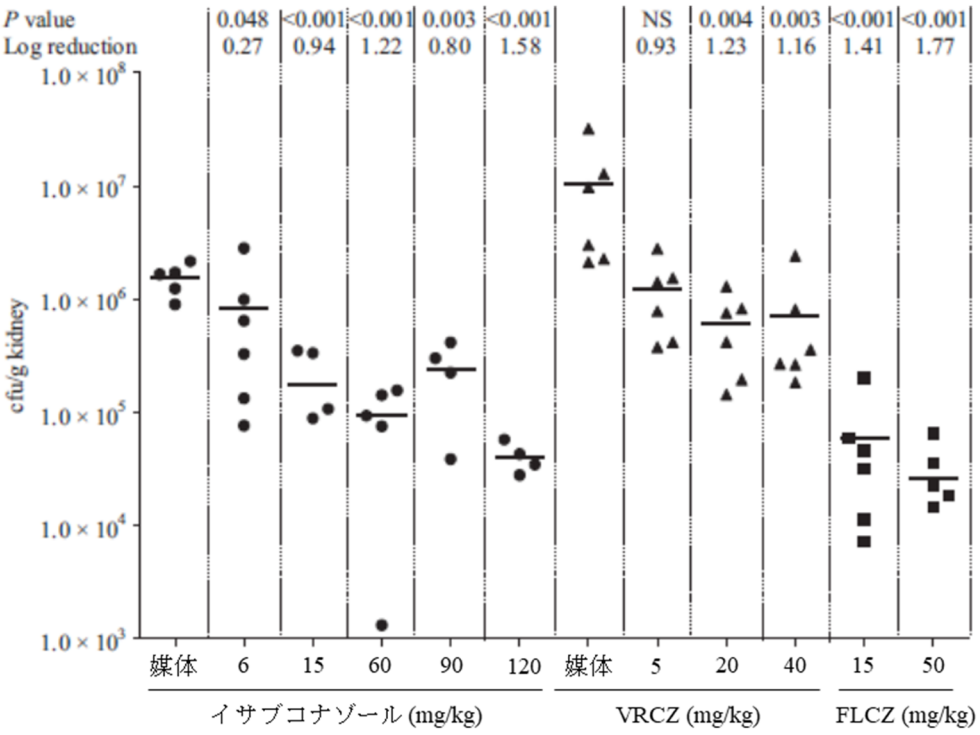
マウス播種性カンジダ症モデルにおけるイサブコナゾニウム硫酸塩、FLCZ および VRCZ の有効性を検討した。

（方法）雄性 CD-1 マウスにシクロフォスファミドを単回投与または 5 日毎に 2 回投与して TN または PN をそれぞれ誘発した。これらのマウスに *Candida tropicalis* または *Candida krusei* を静脈内投与して感染させ、播種性カンジダ症モデルを作製した。このモデルに対し、イサブコナゾニウム硫酸塩（6、15、30、60、90、または 120 mg/kg のイサブコナゾール相当量、経口投与)、VRCZ（5、20 または 40 mg/kg、静脈内投与）または FLCZ（15、50 または 150 mg/kg、経口投与）を感染 5 時間後から 1 日 2 回投与した。有効性は、感染 4 日後および 7 日後の腎臓または脳内生菌数により評価した。

（結果）*Candida tropicalis* によるマウス播種性カンジダ症モデルにおいて、イサブコナゾニウム硫酸塩は腎臓内生菌数を減少させた。TN + *Candida tropicalis* および PN + *Candida tropicalis* モデルにおけるイサブコナゾニウム硫酸塩の最大薬効は、VRCZ よりも強く、FLCZ と同程度であった（図 2-14）。また、*Candida krusei* によるマウス播種性カンジダ症モデルにおいても、イサブコナゾニウム硫酸塩は腎臓および脳内生菌数を減少させた。TN + *Candida krusei* モデルにおけるイサブコナゾニウム硫酸塩の腎臓内生菌数に対する最大薬効は、VRCZ および FLCZ と同等であった。一方、同モデルにおける脳内生菌数に対する最大薬効は、FLCZ よりも強く、VRCZ よりもやや弱かった（図 2-15）。

（結論）イサブコナゾニウム硫酸塩は、TN および PN を伴うマウス播種性カンジダ症モデルの腎臓または脳内生菌数を低下させた。

A



B

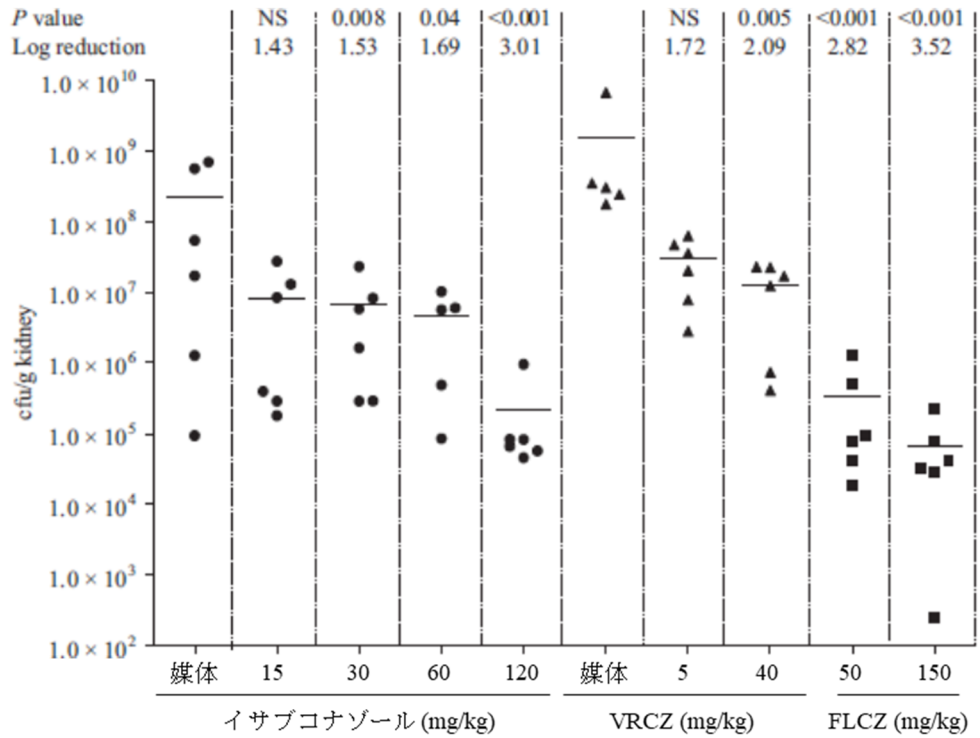


図 2-14 *Candida tropicalis* によるマウス播種性カンジダ症モデルの腎臓内生菌数に対するイサブコナゾニウム硫酸塩および対照薬の作用

(A) 感染 7 日後の TN マウスの腎臓内生菌数、(B) 感染 7 日後の PN マウスにおける腎臓内生菌数。

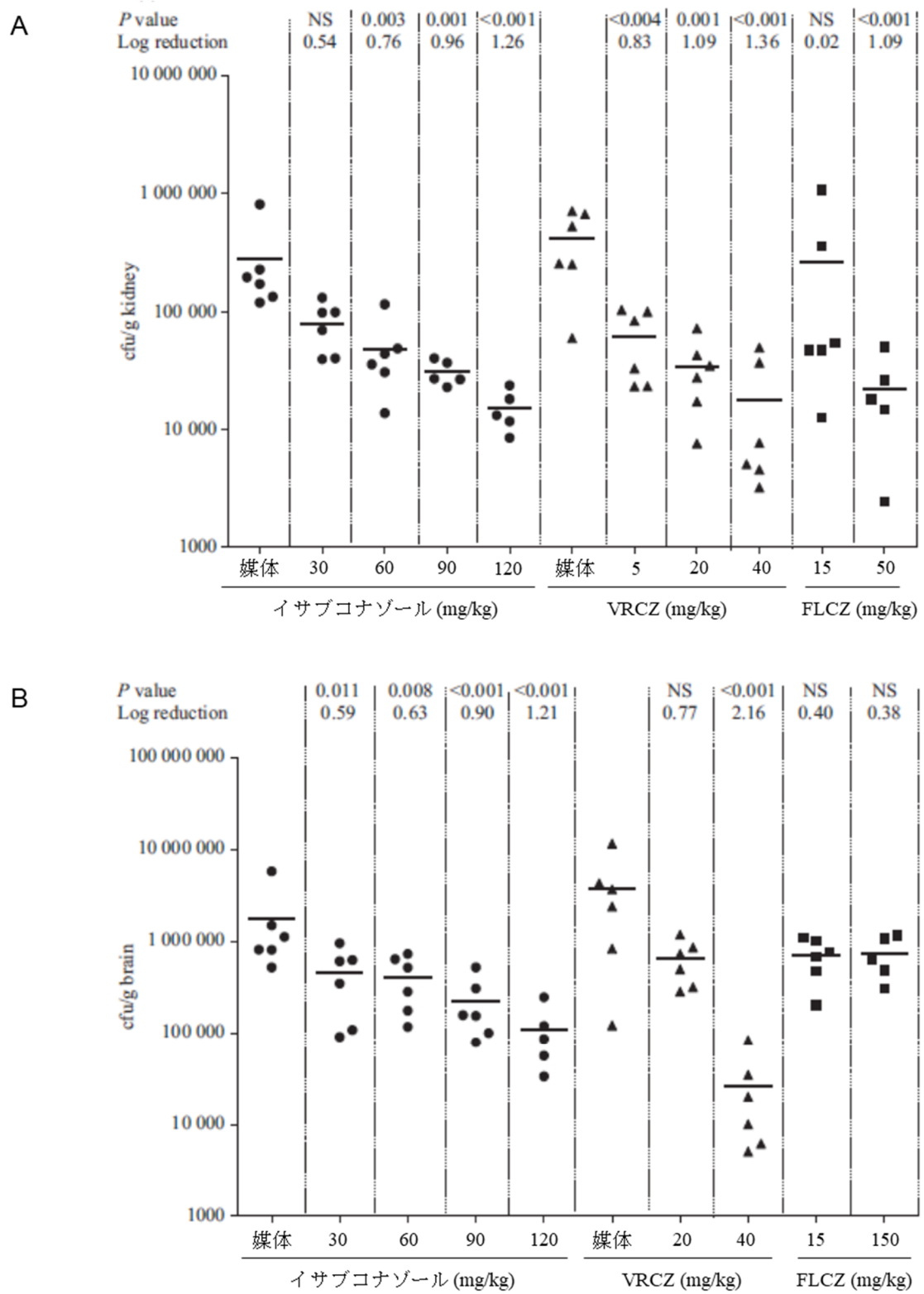


図 2-15 *Candida krusei* によるマウス播種性カンジダ症モデルの腎臓および脳内生菌数に対するイサブコナゾニウム硫酸塩および対照薬の作用

(A) 感染 4 日後の TN マウスの腎臓内生菌数、(B) 感染 4 日後の TN マウスにおける脳内生菌数。

2.4.8 マウス播種性カンジダ症モデルにおける PK/PD 試験

添付資料番号：［4.2.1.1-22］参

マウス播種性カンジダ症モデルを用いて、イサブコナゾールの PK/PD 試験を実施した。

（方法）雄性 CD-1 マウスにシクロフォスファミドを腹腔内投与して好中球減少を誘発した。このマウスに *Candida albicans* FA/6862 を静脈内投与して感染させ、播種性カンジダ症モデルを作製した。このモデルに対し、イサブコナゾニウム硫酸塩（1.6～28 mg/kg のイサブコナゾール相当量）を感染 5 時間後に皮下投与し、その 24 時間後に腎臓内生菌数を評価した。得られた結果から用量反応曲線を作成し、シグモイド E_{max} モデルによる回帰分析を行い、回帰式のパラメータを算出した。また、同モデルにイサブコナゾール相当量として 3.3、5.4、8.1 および 13.5 mg/kg を 1 日総投与量として設定し、イサブコナゾニウム硫酸塩を 1 日総投与量ごとに 1 日 1 回、2 回または 4 回に分割投与し、投与開始 24 時間後に腎臓内の生菌数を評価した。腎臓内生菌数と各パラメータ（AUC/MIC、C_{max}/MIC および血漿中薬物濃度が MIC を上回る時間の割合）の関連をシグモイド E_{max} モデルに当てはめて解析した。

（結果）対照群における投与開始時の腎臓内生菌数は 2.44±0.16 $\log_{10}$ CFU/g であり、試験終了時には 5.5～6 $\log_{10}$ CFU/g に増加した。イサブコナゾニウム硫酸塩投与群では、このモデルにおける腎臓内生菌数の増加が用量依存的に抑制された。用量反応曲線から、イサブコナゾール相当量として 15 mg/kg 以上投与すると、当該モデルの腎臓内生菌数の減少作用が最大になった（図 2-16）。分割投与試験における各パラメータと腎臓内生菌数の PK/PD 解析結果を図 2-17 に示した。イサブコナゾニウム硫酸塩の有効性に最も関連する PK/PD パラメータは AUC/MIC であった。

（結論）イサブコナゾニウム硫酸塩は、用量依存的にマウス播種性カンジダ症モデルの腎臓内生菌数を低下させた。このイサブコナゾニウム硫酸塩の有効性は、イサブコナゾールの AUC/MIC と最も関連していた。

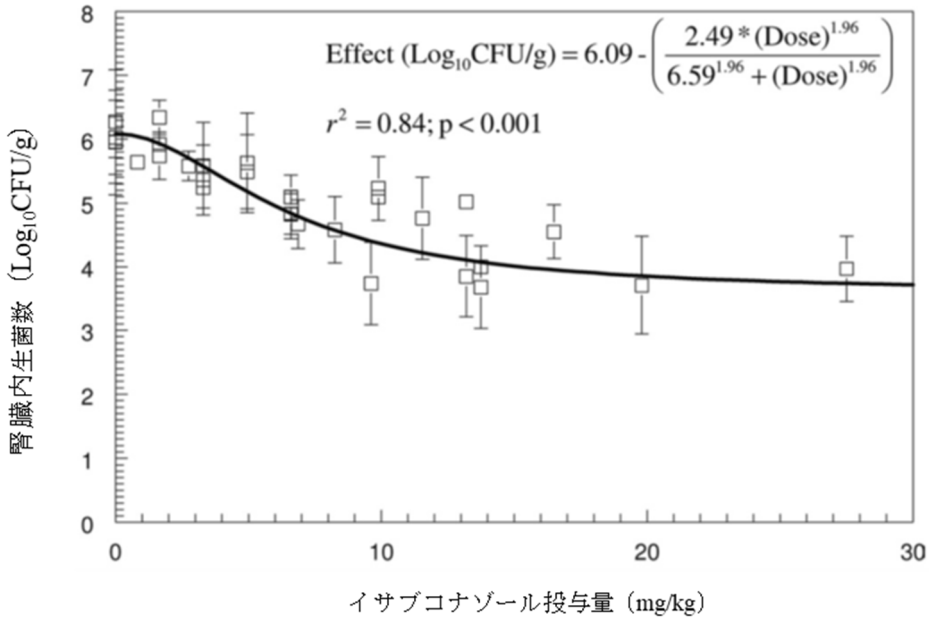


図 2-16 マウス播種性カンジダ症モデルにおけるイサブコナゾニウム硫酸塩の用量反応回帰分析

各群の腎臓内生菌数をそれぞれ平均値±標準偏差で示した（n=3～4）。また、シグモイド E_{max} モデルによる回帰分析結果を凡例に、近似曲線を実線で示した。

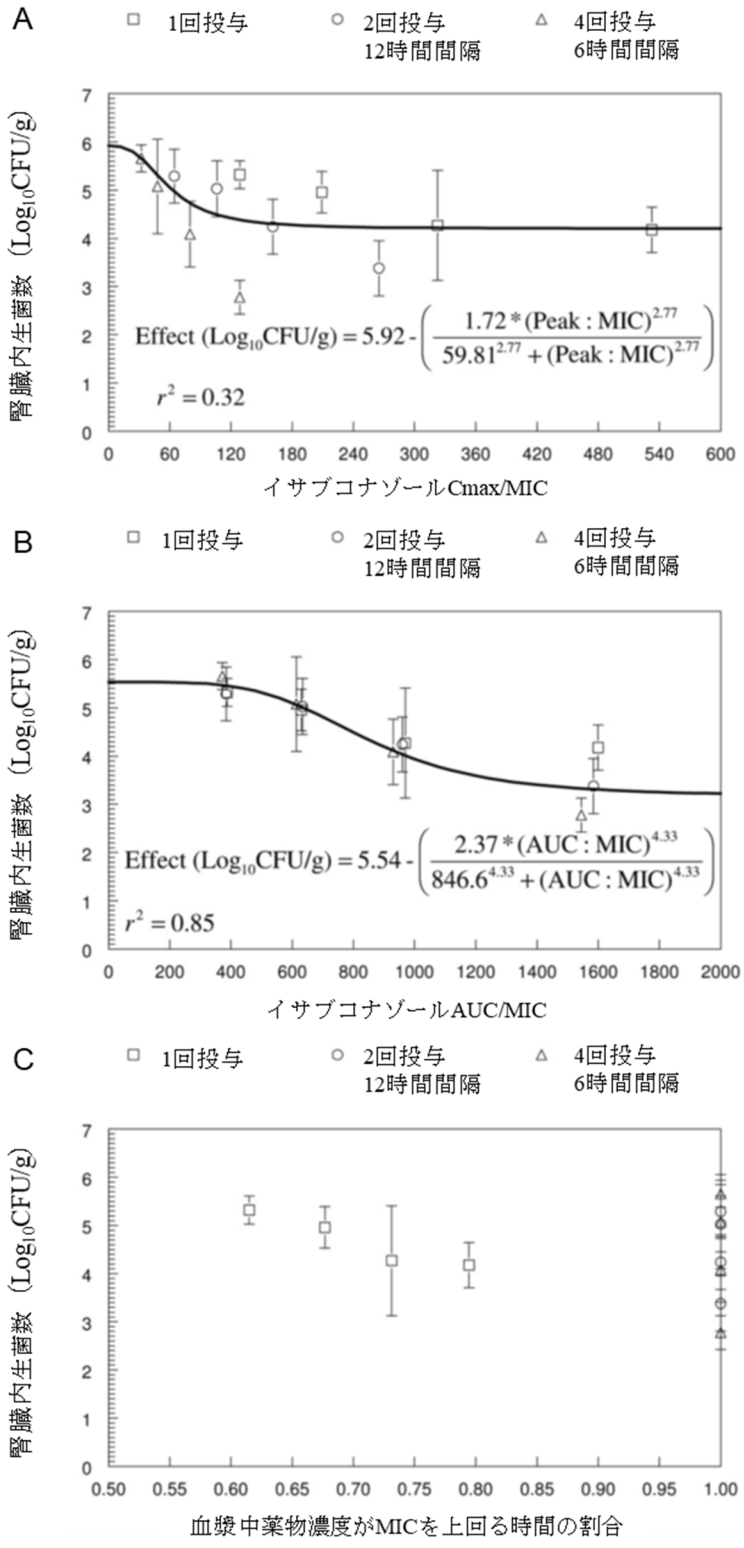


図 2-17 マウス播種性カンジダ症モデルにおける各パラメータと腎臓内生菌数の関係

(A)イサブコナゾール C_{max}/MIC、(B) イサブコナゾール AUC/MIC、(C) 血漿中薬物濃度が MIC を上回る時間の割合。各データは平均値±標準偏差で示した (n=6)。(A) および (B) ではシグモイド E_{max} モデルによる回帰分析結果を凡例に、近似曲線を実線で示した。

2.4.9 マウス播種性カンジダ症モデルにおける分割投与および PK/PD 試験

添付資料番号：［4.2.1.1-23］参

マウス播種性カンジダ症モデルを用いて、イサブコナゾニウム硫酸塩の分割投与による有効性への影響を評価した。また、PK/PD 解析を行い、イサブコナゾニウム硫酸塩の有効性と関連する PK/PD パラメータを探索した。

（方法）雌性 ICR マウスにシクロフォスファミドを感染 4 日前および感染 1 日前に腹腔内投与して好中球減少を誘発した。このマウスに臨床分離された *Candida albicans*（5 株、イサブコナゾール MIC: 0.004～0.03 μg/mL）を静脈内投与して感染させ、それぞれ播種性カンジダ症モデルを作製した。*Candida albicans* K1 を感染させたモデルに対し、1 日の総投与量としてイサブコナゾニウム硫酸塩 40、80、160、320 または 640 mg/kg を 1 日 1 回、2 回、3 回または 4 回（それぞれ、24 時間、12 時間、8 時間または 6 時間間隔）で感染 2 時間後から経口投与し、その 24 時間後に腎臓内の生菌数を評価した。腎臓内生菌数と各パラメータ（AUC/MIC、C_{max}/MIC および血漿中薬物濃度が MIC を上回る時間の割合）の関連をシグモイド用量反応モデルに当てはめて解析した。

（結果）イサブコナゾニウム硫酸塩は、マウス播種性カンジダ症モデルにおける腎臓内生菌数を用量依存的に低下させた。1 日総投与量が同じで分割投与した群間において、イサブコナゾニウム硫酸塩の有効性に明らかな差は認められなかった（図 2-18）。PK/PD 解析の結果、検討した PK/PD パラメータのうち、AUC/MIC が最も R^2 が高値となった（図 2-19）。

（結論）イサブコナゾニウム硫酸塩は、マウス播種性カンジダ症モデルの腎臓内生菌数の増加を用量依存的に抑制した。当該モデルにおけるイサブコナゾニウム硫酸塩の有効性は 1 日総投与量と相関があり、分割投与による影響を受けなかった。また、イサブコナゾニウム硫酸塩の有効性に最も関連する PK/PD パラメータは AUC/MIC であった。

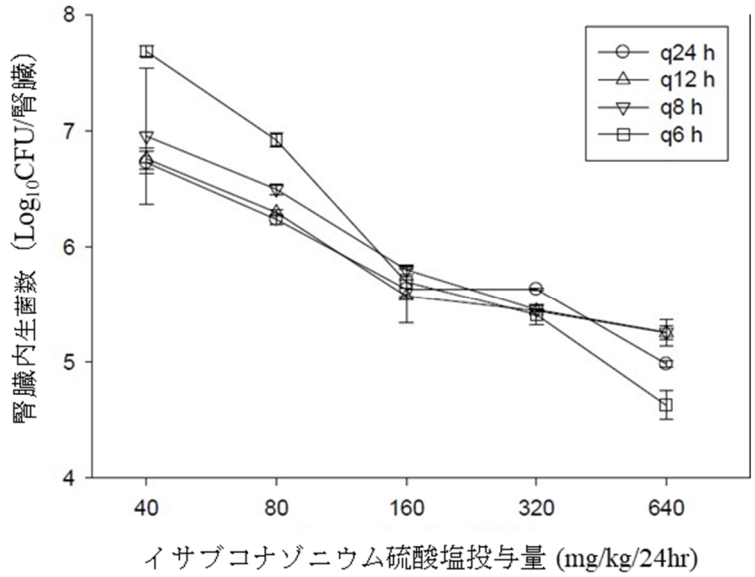


図 2-18 マウス播種性カンジダ症モデルにイサブコナゾニウム硫酸塩を分割投与したときの投与量と腎臓内生菌数の関係

各データは平均値±標準偏差で示した (n=3)。凡例は投与間隔を表す。

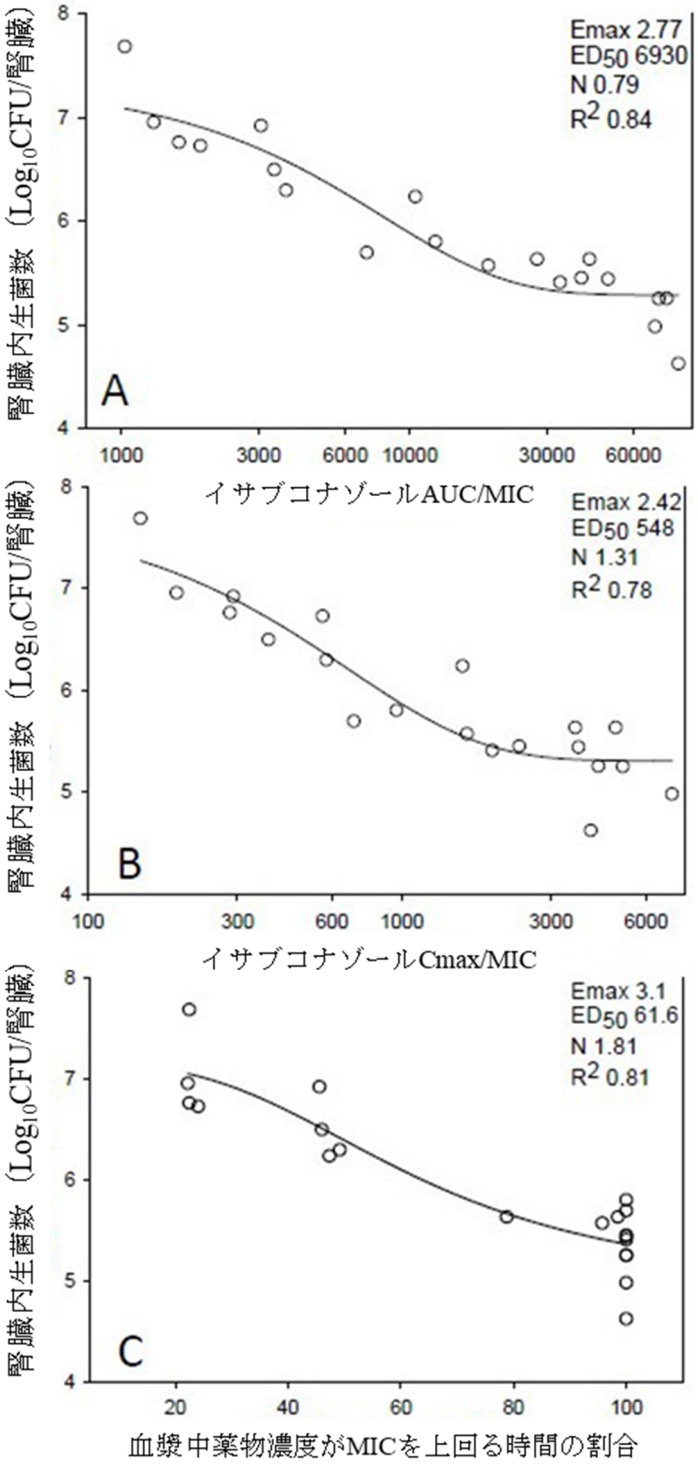


図 2-19 マウス播種性カンジダ症モデルにおける各パラメータと腎臓内生菌数の関係

(A) イサブコナゾール AUC/MIC、(B)イサブコナゾール C_{max}/MIC、(C) 血漿中薬物濃度が MIC を上回る時間の割合。各プロットは腎臓内生菌数の平均値を表す (n=3)。また、シグモイド用量反応モデルによる回帰分析結果を凡例に、近似曲線を実線で示した。

3. 副次的薬理試験

3.1 放射性リガンド結合アッセイ

添付資料番号：［4.2.1.2-1］参

44 種類の受容体、イオンチャネル、トランスポーターおよび酵素に対するイサブコナゾールの作用を評価した（試験番号：100019651）。

（方法）イサブコナゾールの適用濃度は 20 μmol/L とした。アデノシン受容体 (A_{2A})、ノルアドレナリン受容体（α_{1A}、α_{2A}、β_1、β_2）、ベンゾジアゼピン受容体、カンナビノイド受容体（CB_1、CB_2）、コレシストキニン受容体 (CCK_1)、ドパミン受容体（D_1、D_{2S}）、エンドセリン受容体 (ET_A)、グルタミン酸受容体 (NMDA)、ヒスタミン受容体（H_1、H_2）、モノアミン酸化酵素 (MAO-A)、アセチルコリン受容体（M_1、M_2、M_3、α4β2）、オピオイド受容体（μ、δ_2、κ）、セロトニン受容体（5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、5-HT_{2A}、5-HT_{2B}、5-HT_3）、グルココルチコイド受容体、アンドロゲン受容体、バソプレシン受容体 (V_{1a})、L 型 Ca イオンチャネル (dihydropyridine site)、hERG、Kv チャネル、Na チャネル (site2)、ノルエピネフリントランスポーター、ドパミントランスポーター、セロトニントランスポーター、シクロオキシゲナーゼ（COX_1、COX_2）、ホスホジエステラーゼ（PDE3A、$PDE4D_2$）、Lck キナーゼ、アセチルコリンエステラーゼについて、それぞれの放射性同位体リガンドの結合に対するイサブコナゾールの結合阻害活性を評価した。

（結果）20 μmol/L で 50%以上の結合阻害活性を示したのは、L 型 Ca イオンチャネル (52.8%)、Na イオンチャネル (77.9%)、アンドロゲン受容体 (54.3%)であった。

（結論）L 型 Ca イオンチャネル、Na イオンチャネル、アンドロゲン受容体への結合阻害活性が 20 μmol/L の濃度で認められた。これはヒトにイサブコナゾニウム硫酸塩の臨床維持用量（イサブコナゾールとして 200 mg）を投与した際のイサブコナゾール（非結合型）の C_{max}｛以下、臨床曝露量 (C_{max})｝の 167 倍であった（表 3-1）。

表 3-1 結合阻害活性を調べたイサブコナゾールの濃度と臨床曝露量 (C_{max}) の比

結合阻害活性を調べたイサブコナゾールの濃度	臨床曝露量 (C_{max}) [a)]	曝露量比 [b)]
20 μmol/L (8.75 μg/mL)	0.0525 μg/mL	167 倍

a) 9766-CL-0017 試験における定常状態（13 日目）の C_{max} は 7499 ng/mL であった（2.7.2.2.5.2）；ヒトにおけるイサブコナゾールの血漿蛋白非結合型分率を 0.7%［2.4：表 4-5］として算出

b) 結合阻害活性を調べたイサブコナゾールの濃度／臨床曝露量 (C_{max})

4. 安全性薬理試験

「新医薬品の製造（輸入）承認申請に必要な一般薬理試験のガイドラインについて」（平成3年1月29日薬新薬第4号厚生省薬務局新医薬品課長通知）に準じてイサブコナゾニウムの一般薬理試験を19[redacted]年に実施した。また、「安全性薬理試験ガイドラインについて」（平成13年6月21日医薬審発第902号厚生労働省医薬局審査管理課長通知）の発出後、イサブコナゾールのhERG試験を20[redacted]年にGLPを遵守して実施した。さらに、臨床試験（9766-CL-0004試験）でQTcのわずかな短縮がみられたため、イサブコナゾールの各種心臓イオンチャネルに及ぼす影響をGLP非適用下にて検討した。

4.1 イサブコナゾールのHEK293細胞を用いたhERGチャネル阻害試験

添付資料番号：［4.2.1.3-1］

hERG導入HEK293細胞のカリウム電流に対するイサブコナゾールの作用を、マニュアルパッチクランプ法により評価した。比較対照薬として、KCZ、VRCZおよびFLCZを用いた（試験番号：9766-PT-0001）。

（方法）イサブコナゾールおよびKCZの適用濃度は1、3、10および30 µmol/Lの4濃度、VRCZおよびFLCZの適用濃度は3、10、30および100 µmol/Lの4濃度とした。溶媒対照にはDMSO、陽性対照にはE-4031を、それぞれ用いた。1濃度当たり少なくとも3例の細胞を用いてhERG電流を測定し、阻害率を算出した。

（結果）イサブコナゾールでは濃度依存的なhERG電流阻害作用が認められ、IC_{50}は5.82 µmol/Lであった。KCZのIC_{50}は5.46 µmol/Lであった。VRCZおよびFLCZではhERG電流阻害作用は認められなかった。

（結論）イサブコナゾールとKCZのhERG電流阻害作用は同程度（IC_{50}は、それぞれ5.82および5.46 µmol/L）であった。イサブコナゾールのIC_{50}は、臨床曝露量（C_{max}）の49倍であった（表 4-1）。

表 4-1 hERG試験のIC_{50}と臨床曝露量（C_{max}）の比

イサブコナゾールのIC_{50}	臨床曝露量（C_{max}）[a)]	曝露量比[b)]
5.82 µmol/L (2.55 µg/mL)	0.0525 µg/mL	49倍

a) 9766-CL-0017試験における定常状態（13日目）のC_{max}は7499 ng/mLであった（2.7.2.2.5.2）；ヒトにおけるイサブコナゾールの血漿蛋白非結合型分率を0.7%［2.4：表4-5］として算出
b) イサブコナゾールのIC_{50}／臨床曝露量（C_{max}）

4.2 イサブコナゾールの心臓イオンチャネルに及ぼす影響

添付資料番号：［4.2.1.3-2］参

心臓イオンチャネルに対するイサブコナゾールの作用をオートパッチクランプ法により評価した（試験番号：9766-PT-0003）。

（方法）CHO細胞またはHEK293細胞にhCav1.2、hERG、hKir2.1、hKir3.1/hKir3.4、Kir6.2/SUR2A、hKv1.5、hKv4.3/KChiP2.2、hKvLQT1/hminKおよびhNav1.5の各チャネルを発現させ、イサブコナゾールの各チャネルへの作用をオートパッチクランプシステム（QPatch HT®、Sophion Bioscience A/S）により検討した。イサブコナゾールの濃度は1、3、10および

30 µmol/L の 4 濃度とし、1 濃度当たり少なくとも 3 例の細胞を用いて各チャネル電流を測定し阻害率を算出した。

（結果）hCav1.2、hERG、hKvLQT1/hminK、hNav1.5 (Tonic phase) および hNav1.5 (Phasic phase) に対する IC_{50} はそれぞれ、6.57、19.44、24.03、20.36 および 14.87 µmol/L であった。その他のチャネル電流に対してはいずれも IC_{50} > 30 µmol/L であった。

（結論）各種心臓イオンチャネルに対する IC_{50} は、臨床曝露量 (C_{max}) の 55 倍以上であった。

4.3 イサブコナゾニウムの一般薬理試験

添付資料番号：［4.2.1.3-3］

イサブコナゾニウムの一般症状および行動、中枢神経系、自律神経系および平滑筋、呼吸・循環器系、消化器系ならびに腎・泌尿器系に及ぼす影響を検討した（試験番号：9766-PT-0002）。

4.3.1 一般症状および行動に及ぼす影響

4.3.1.1 マウスの一般症状および行動に及ぼす影響

（方法）1 群 6 匹の雄性 CD-1 マウス（6 週齢）を使用し、一般症状および行動に対するイサブコナゾニウムの作用を Irwin 変法により検討した。イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩の 0（溶媒）、10、30 および 90 mg/kg（イサブコナゾールとして 5.5、17 および 50 mg/kg）を単回経口投与し、投与前ならびに投与後 1、2、4、6 および 8 時間に一般症状を観察した。

（結果）イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩は 90 mg/kg（イサブコナゾールとして 50 mg/kg）までの用量において、マウスの一般症状および行動に対して特記すべき作用を示さなかった。

4.3.2 中枢神経系に及ぼす影響

4.3.2.1 自発運動量に及ぼす影響

（方法）1 群 6 匹の雄性 CD-1 マウス（6 週齢）を使用し、自発運動量に対するイサブコナゾニウムの作用を運動量測定装置（Super Mex®、室町機械株式会社）により検討した。イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩の 0（溶媒）、10、30 および 90 mg/kg（イサブコナゾールとして 5.5、17 および 50 mg/kg）を単回経口投与し、投与後 8 時間までの自発運動量を 30 分毎に測定した。

（結果）イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩は 90 mg/kg（イサブコナゾールとして 50 mg/kg）までの用量において、マウスの自発運動量に対して特記すべき作用を示さなかった。

4.3.2.2 痙攣誘発処置との協力および拮抗作用

（方法）1 群 6 匹の雄性 CD-1 マウス（6 週齢）を使用し、イサブコナゾニウムの抗痙攣および痙攣協力作用を検討した。(1) イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩の 0（溶媒）、10、30 および 90 mg/kg（イサブコナゾールとして 5.5、17 および 50 mg/kg）を単回経口投与し、投与後 4 時間に電撃刺激（50 mA、0.2 秒）によって誘発される強直性伸展性痙攣および死亡に対する拮抗作用の有無を検討した。 (2) イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩の 0（溶媒）、10、30 および 90 mg/kg（イサブコナゾールとして 5.5、17 および 50 mg/kg）を単回経口投与し、投与後 4 時間にペンチレンテトラゾールの 150 mg/kg を腹腔内投与し、誘発される強直性痙攣および死亡に対する拮抗作用の有無を検討した。 (3) イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩の 0（溶媒）、10、

30 および 90 mg/kg（イサブコナゾールとして 5.5、17 および 50 mg/kg）を単回経口投与し、投与後 4 時間にペンチレンテトラゾールの 50 mg/kg を腹腔内投与し、誘発される強直性あるいは間代性痙攣に対する協力作用の有無を検討した。

（結果）イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩は 90 mg/kg（イサブコナゾールとして 50 mg/kg）までの用量において、電撃刺激あるいはペンチレンテトラゾール投与による痙攣に対して特記すべき作用を示さなかった。

4.3.2.3 麻酔に対する作用

（方法）1 群 6 匹の雄性 CD-1 マウス（6 週齢）を使用し、ペントバルビタール麻酔に対するイサブコナゾニウムの作用を検討した。イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩の 0（溶媒）、10、30 および 90 mg/kg（イサブコナゾールとして 5.5、17 および 50 mg/kg）を単回経口投与し、投与後 4 時間にペントバルビタールの 55 mg/kg を腹腔内投与し、睡眠時間（正向反射消失から回復するまでの時間）を測定した。

（結果）イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩の 10 mg/kg（イサブコナゾールとして 5.5 mg/kg）群では、ペントバルビタール麻酔に対して特記すべき作用は認められなかった。30 mg/kg（イサブコナゾールとして 17 mg/kg）以上の群では睡眠時間の延長が認められた。この作用は、イサブコナゾールの CYP 阻害作用［2.7.2.2.1.5.1］によりペントバルビタールの代謝が阻害されたことに起因すると考えられた。

4.3.2.4 痛覚に及ぼす影響

（方法）1 群 6 匹の雄性 CD-1 マウス（6 週齢）を使用し、痛覚に対するイサブコナゾニウムの作用を酢酸ライジング法により検討した。イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩の 0（溶媒）、10、30 および 90 mg/kg（イサブコナゾールとして 5.5、17 および 50 mg/kg）を単回経口投与し、投与後 4 時間に 0.6%酢酸を 10 mL/kg の容量で腹腔内投与し、投与後 10 分間のライジング回数を測定した。

（結果）イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩は 90 mg/kg（イサブコナゾールとして 50 mg/kg）までの用量において、痛覚に対して特記すべき作用を示さなかった。

4.3.2.5 体温に及ぼす影響

（方法）1 群 6 匹の雄性 SD ラット（8 週齢）を使用し、体温に対するイサブコナゾニウムの作用を検討した。イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩の 0（溶媒）、10、30 および 90 mg/kg（イサブコナゾールとして 5.5、17 および 50 mg/kg）を単回経口投与し、投与前ならびに投与後 1、2、4、6 および 8 時間に直腸温を測定した。

（結果）イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩は 90 mg/kg（イサブコナゾールとして 50 mg/kg）までの用量において、体温に対して特記すべき作用を示さなかった。

4.3.3 呼吸・循環器系に及ぼす影響

4.3.3.1 呼吸数、血圧、心拍数、大腿動脈血流量および心電図に対する作用

（方法）3 匹の雄性カニクイザル（5 歳齢）を使用し、ペントバルビタール麻酔下での呼吸数、血圧、心拍数、大腿動脈血流量および心電図に及ぼすイサブコナゾニウムの作用を検討した。イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩の 0（溶媒）、2.5、7.5 および 22.5 mg/kg（イサブコナゾールとして、1.4、4.2 および 12 mg/kg）を漸増投与した。各投与液は 30 分かけて静脈内に持続投与し、投与前～投与終了後 30 分（22.5 mg/kg 群は投与終了後 60 分）まで呼吸数、血圧、心拍数および大腿動脈血流を測定した。また、投与前、投与開始後 5、10、15、20 および 25 分、投与終了直後ならびに投与終了後 5、10、15 および 30 分に心電図を測定した（22.5 mg/kg 群は投与終了後 45 および 60 分も測定）。

（結果）イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩の 22.5 mg/kg（イサブコナゾールとして 12 mg/kg）群において収縮期および拡張期血圧の低下ならびに心拍数増加が認められたが、投与終了後 30 分でほぼ回復した。これは、反射性の心拍数増加を伴う血管拡張による低血圧と考えられた。イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩は、サルの呼吸数、大腿動脈血流量および心電図に対しては 22.5 mg/kg（イサブコナゾールとして 12 mg/kg）までの用量において特記すべき作用を示さなかった。

4.3.4 自律神経系および平滑筋に及ぼす影響

4.3.4.1 摘出回腸に対する作用

（方法）雄性 Hartley モルモット（5 週齢）より摘出した回腸を用いてマグヌス法 (n=4) により検討した。約 20 時間絶食後、モルモットから回腸を摘出し、その約 1.5 cm を 95%酸素、5%炭酸ガスの混合ガスを通気した Tyrode 溶液中に懸垂し、収縮運動を記録した。イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩を添加した際の単独作用ならびにアセチルコリン、ヒスタミンおよび塩化バリウム誘発収縮に及ぼすイサブコナゾニウムの影響を検討した。

（結果）イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩は検討した最高濃度 (10 μmol/L) でモルモット摘出回腸の自発運動に対する抑制作用が認められたが、1 μmol/L までの濃度では摘出回腸に対して単独で何ら作用を示さなかった。また、10 μmol/L までの濃度においてアセチルコリン、ヒスタミンおよび塩化バリウムによる収縮反応に対して特記すべき作用を示さなかった。

4.3.5 水および電解質代謝に及ぼす影響

4.3.5.1 尿量および電解質排泄に対する作用

（方法）1 群 6 匹の雄性 SD ラット（8 週齢）を使用し、尿量および電解質排泄に対するイサブコナゾニウムの作用を検討した。25 mL/kg の生理食塩液を経口投与した 30 分後にイサブコナゾニウム塩化物塩酸塩の 0（溶媒）、10、30 および 90 mg/kg（イサブコナゾールとして 5.5、17 および 50 mg/kg）を単回経口投与した。その直後に、ラットを代謝ケージに入れて 5 時間尿を採取し、尿量および尿中の電解質（Na^+、K^+および Cl^-）濃度を測定した。

（結果）イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩は 90 mg/kg（イサブコナゾールとして 50 mg/kg）までの用量において、ラットの尿量および電解質排泄能に対して特記すべき作用を示さなかった。

4.3.6 消化器系に及ぼす影響

4.3.6.1 腸管輸送能に対する作用

（方法）1 群 6 匹の雄性 CD-1 マウス（6 週齢）を使用し、腸管輸送能に対するイサブコナゾニウムの作用を炭末法にて検討した。約 18 時間絶食したマウスに、イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩の 0（溶媒）、10、30 および 90 mg/kg（イサブコナゾールとして 5.5、17 および 50 mg/kg）を単回経口投与した。その 4 時間後に、5%アラビアゴム溶液に 7.5%の濃度となるように懸濁した炭末液を 0.1 mL の容量で単回経口投与した。30 分後にマウスを安楽殺して全腸を摘出し、炭末の移行率を算出した。

（結果）イサブコナゾニウム塩化物塩酸塩は 90 mg/kg（イサブコナゾールとして 50 mg/kg）までの用量において、マウスの腸管炭末輸送能に対して特記すべき作用を示さなかった。

5. 薬力学的薬物相互作用

該当試験なし。

6. 考察および結論

6.1 国内外で分離された臨床分離株における感受性の比較

国内および海外で臨床分離された真菌におけるイサブコナゾールの抗真菌作用の評価結果を表 6-1 にまとめ、両者の成績を比較した。イサブコナゾールの国内臨床分離株に対する MIC は、海外臨床分離株の試験成績と比較して同程度またはやや低値であった。したがって、表 6-1 に示した真菌に対するイサブコナゾールの抗真菌作用は、国内と海外で明らかな差はないと考えられた。

表 6-1 国内および海外で臨床分離された真菌に対するイサブコナゾールの MIC 比較

菌種	国内 a)			海外		
	株数	MIC_{50} / MIC_{90} (μg/mL)	MIC 範囲 (μg/mL)	株数	MIC_{50} / MIC_{90} (μg/mL)	MIC 範囲 (μg/mL)
Aspergillus 属						
A. fumigatus	50	0.5 / 0.5	0.25 – 0.5	302	0.5 / 2	0.12 – >8
A. niger	20	1 / 2	0.5 – 2	46	2 / 4	0.12 – 8
A. flavus	20	0.5 / 1	0.5 – 1	48	0.5 / 1	0.12 – 2
A. terreus	10	0.25 / 0.5	0.25 – 0.5	20	0.5 / 0.5	0.06 – 1
ムーコル目						
Mucor 属	10	16 / 16	4 – 16	77	4 / 16	≤0.015 – >128
Rhizopus 属	7	–	1 – 4	139	1 / 4	0.12 – 32
Cunninghamella 属	20	8 / 16	4 – >16	18	2 / 16	0.12 – 16
Candida 属						
C. albicans	33	0.0007 / 0.0013	≤0.0004 – 0.0026	621	0.015 / 0.03	≤0.008 – >8
C. glabrata	25	0.0039 / 0.02	0.0011 – 0.64	235	0.5 / 2	0.03 – 8
C. guilliermondii	15	0.051 / 0.11	0.0069 – 0.18	15	0.5 / 8	0.12 – >8
C. krusei	10	0.0041 / 0.011	0.0032 – 0.015	37	0.5 / 1	0.12 – 4
C. parapsilosis	17	0.0015 / 0.011	≤0.0004 – 0.017	197	0.06 / 0.12	≤0.008 – 1
C. tropicalis	24	0.0046 / 0.008	≤0.0004 – 0.0094	110	0.06 / 0.25	0.015 – 4
C. lusitaniae	17	0.00059 / 0.0024	≤0.0004 – 0.0025	33	0.03 / 0.06	≤0.008 – 0.12
Cryptococcus 属						
C. neoformans	15	≤0.03 / ≤0.03	≤0.03 – 0.06	69	0.06 / 0.12	≤0.008 – 0.5

a) 株数が 10 株未満の菌種に対しては、MIC 範囲のみを示した

6.2 同効薬との比較

他のアゾール系抗真菌薬と比較して、イサブコナゾールの *Aspergillus* 属における *in vitro* 抗真菌作用濃度は同等またはやや高値であった。ムーコル目におけるイサブコナゾールの作用濃度は ITCZ および PSCZ と比較して同等またはやや高値、VRCZ と比較して低値であった。*Candida* 属および *Cryptococcus* 属におけるイサブコナゾールの作用濃度は、他のアゾール系抗真菌薬と比較して同等またはやや低値であった。また、マウス播種性アスペルギルス症モデルにおいて、イサブコナゾニウム硫酸塩は VRCZ および ITCZ と比較してやや高い生存率の改善作用が認められた。*Candida tropicalis* によるマウス播種性カンジダ症モデルにおけるイサブコナゾニウム硫酸塩の最大薬効は、VRCZ よりも強く、FLCZ と同程度であった。一方、*Candida krusei* によるマウス播種性カンジダ症モデルの腎臓内生菌数に対するイサブコナゾニウム硫酸塩の最大薬効は FLCZ および VRCZ と同程度であり、脳内生菌数に対する最大薬効は FLCZ よりも強く、VRCZ よりもやや弱かった。

以上の結果から、イサブコナゾニウム硫酸塩は *Aspergillus* 属、ムーコル目、*Cryptococcus* 属および *Candida* 属による深在性真菌症に対し、他のアゾール系抗真菌薬と同等またはやや強い抗真菌作用を発揮することが期待された。

また、イサブコナゾニウム硫酸塩は、好中球減少マウスムーコル症モデルの肺内および脳内生菌数を低下させ、生存率を改善した。同モデルにおけるイサブコナゾニウム硫酸塩の有効性は、L-AMB の有効性と同等であった。この結果から、イサブコナゾニウム硫酸塩はムーコル症に対して L-AMB と同等の有効性を発揮することが期待された。

MIC データベースを用いて、臨床検体からの検出頻度が低いまれな真菌に対するイサブコナゾールおよび対照薬の *in vitro* 抗真菌作用を評価した。その結果、イサブコナゾールおよび対照薬はこれらの真菌に対して幅広く抗真菌作用を示した。したがって、他のアゾール系抗真菌薬と同様に、イサブコナゾールは検出頻度が低いまれな真菌に対しても幅広く抗真菌作用を示すと考えられた。

6.3 ムーコル症に対する有効性

イサブコナゾニウム硫酸塩は、好中球減少マウスムーコル症モデルの肺内および脳内生菌数を低下させ、生存率を改善した。また、イサブコナゾニウム硫酸塩は DKA マウスムーコル症モデルの生存率を改善する傾向が認められた。ただし、DKA マウスムーコル症モデルでは、計 2 回の試験のうち 1 試験ではイサブコナゾニウム硫酸塩による生存率の改善は認められなかった。当該試験では、非感染動物でも生存率の低下が認められたことから、感染に起因しない死亡の影響によりイサブコナゾニウム硫酸塩の明確な薬効が得られなかったと考えられた。したがって、イサブコナゾニウム硫酸塩は DKA マウスムーコル症モデルに対しても有効性を発揮すると考えられた。

ムーコル目におけるイサブコナゾールの感受性試験成績および2種類のマウスムーコル症モデルにおけるイサブコナゾニウム硫酸塩の薬効試験成績は、イサブコナゾニウム硫酸塩のムーコル症患者における有効性を裏付けるものであると考えられた。

6.4 作用機序

アゾール系抗真菌薬は、$P450_{14DM}$ に結合し、その活性を阻害することによりエルゴステロール産生を阻害する。そこで、新規アゾール系抗真菌薬であるイサブコナゾールの $P450_{14DM}$ に対

する阻害作用を評価した。イサブコナゾールは、他のアゾール系抗真菌薬と同様に、*Candida albicans* から抽出した反応液における 4,4-デスメチルステロール生成を阻害した。また、イサブコナゾールの *Candida albicans* 抽出液を含む反応液における IC_{50} は、ラット肝臓抽出液を含む反応液における IC_{50} と比較して低値であった。これらの結果から、イサブコナゾールは他のアゾール系抗真菌薬と同様に $P450_{14DM}$ に結合し、その活性を阻害することによりエルゴステロール産生を阻害すると考えられた。また、その阻害作用は哺乳類のコレステロール合成と比較して真菌のエルゴステロール合成選択的であることが示唆された。

6.5 薬剤耐性

イサブコナゾールに対する耐性を示す真菌の機序を調べるため、実験的にイサブコナゾール MIC が 4～>16 μg/mL のイサブコナゾール耐性 *Aspergillus fumigatus* 変異株を取得した。これらの変異株では、アゾール耐性の獲得に関与する既知の *CYP51A* または *CYP51B* 遺伝子変異、ならびに薬剤排出トランスポーター (*MDR1～4*) の過剰発現は認められなかった。また、各変異株における ITCZ および VRCZ の MIC はいずれも 2 μg/mL 以上であり、野生株における各 MIC と比較して高値であった。一方、各変異株における AMPH-B の MIC は、野生株における MIC と比較して明らかな差は認めなかった。これらの結果から、これらの変異株がイサブコナゾール耐性を獲得した明確な機序は明らかにすることができなかったものの、アゾール交叉耐性が認められたことからアゾール系抗真菌薬共通の耐性機構が関与している可能性が考えられた。なお、これらの変異株および背景株をマウスに感染させ、その生存率を比較検討したところ、変異株と背景株の間に明らかな差は認められなかった (Masumoto S. 2014)。したがって、イサブコナゾールの長期暴露によって生じるイサブコナゾール耐性 *Aspergillus fumigatus* 変異株は、野生株と比較して病原性が高まる可能性は低いと考えられた。

CYP51 遺伝子変異を持つ *Aspergillus fumigatus*（以下、CYP51 変異株）は、アゾール系抗真菌薬に対する感受性が低下することが知られている。そこで、各種 CYP51 変異株に対するイサブコナゾールおよび対照薬の抗真菌作用を評価した。他のアゾール系抗真菌薬と同様に、CYP51 変異株におけるイサブコナゾールの MIC は、野生株における MIC と比較して上昇する傾向が認められた。CYP51 の変異部位ごとにその影響を評価したところ、L98H、G138C、Y431C、G434C および G448S 株では、野生株と比較してイサブコナゾールを含むアゾール系抗真菌薬の MIC が上昇した。一方、G54 変異株では野生株と比較して ITCZ および PSCZ の MIC は上昇したのに対し、イサブコナゾールおよび VRCZ の MIC に明らかな上昇は認められなかった。M220 変異株では、ITCZ および PSCZ の明らかな MIC 上昇が認められたのに対し、イサブコナゾールおよび VRCZ の MIC は上昇傾向が認められたもののその程度は小さかった。したがって、イサブコナゾールは ITCZ や PSCZ に低感受性の CYP51A 変異を有する一部の *Aspergillus fumigatus* に対しても強い抗真菌作用を発揮することが期待される。

また、FLCZ 耐性 *Candida* 属に対するイサブコナゾールおよび対照薬の抗真菌作用を評価した結果、多くの株でイサブコナゾール、VRCZ および PSCZ の MIC 上昇が確認された。したがって、FLCZ 耐性 *Candida* 属に対するアゾール系抗真菌薬の作用は、薬剤の種類により大きな差はない可能性が示唆された。

各種 CYP51 変異株を感染させたマウス播種性アスペルギルス症モデルにおいて、感染させた菌株におけるイサブコナゾール MIC と有効性を示すために必要なイサブコナゾニウム硫酸塩の投与量の間に相関があることを確認した。これらの結果から、*in vitro* でイサブコナゾール

に対する感受性が低い真菌に生体が感染した場合、イサブコナゾニウム硫酸塩が生体内で抗真菌作用を示すためにはより高い用量の薬剤投与が必要になることが示唆された。

6.6 用法用量

マウス播種性アスペルギルス症モデルおよびマウス播種性カンジダ症モデルにおけるイサブコナゾニウム硫酸塩の同じ 1 日総投与量を 1 日 1 回から複数回に分けて投与し、その有効性を比較する分割投与試験を実施した。その結果、いずれのモデルにおいても 1 日 1 回投与と 1 日複数回投与を比較してその有効性に明らかな差は認められなかった。したがって、これらのモデルにおけるイサブコナゾニウム硫酸塩の有効性は 1 日総投与量に依存しており、分割投与が有効性に及ぼす影響はない、または極めて小さいと考えられた。

また、マウス播種性アスペルギルス症モデルおよびマウス播種性カンジダ症モデルに対し、イサブコナゾニウム硫酸塩は用量依存的に有効性を発揮した。両モデルにおける PK/PD 解析の結果、イサブコナゾニウム硫酸塩の有効性に最も関連のある PK/PD パラメータは AUC/MIC であった。したがって、曝露と MIC の両方がイサブコナゾニウム硫酸塩の有効性に影響する因子であると考えられた。

6.7 副次的薬理および安全性薬理

臨床試験（9766-CL-0017 試験）では QTcF 間隔の短縮が報告されている。QT 間隔は hERG チャネルを介する外向き K^+電流の阻害による延長のみならず、Cav1.2 チャネルを介する内向き Ca^{2+}電流の阻害による短縮を起こすことが知られており、特に Ca^{2+}電流への影響を強く反映することが報告されている (Zemzemi N et al, 2015)。イサブコナゾールは hERG チャネルのみならず hCav1.2 阻害作用を有することから、QT 間隔を短縮させた可能性が考えられた。

上記以外の点について、イサブコナゾールの安全性薬理学的プロファイルは他のアゾール系抗真菌薬と同様であった。安全性薬理試験の結果から、臨床推奨用法・用量の範囲内で、イサブコナゾニウム硫酸塩が問題となる作用を惹起する可能性は低いと考えられた。

7. 参考文献

Matsumoto S. Virulence study of isavuconazole-resistant Aspergillus fumigatus in mouse disseminated aspergillosis. Internal report 2014; Study No. 9766-PH-0123.

Zemzemi N, Rodriguez B. Effects of L-type calcium channel and human ether-a-go-go related gene blockers on the electrical activity of the human heart: a simulation study. Europace. 2015;17(2):326-33.