

家兎内因性カンジダ眼内炎に対するフルコナゾールの抑制効果

磯部 裕, 秦野 寛

横浜市立大学医学部眼科学教室

要 約

内因性カンジダ眼内炎に対する新しい抗真菌剤フルコナゾールの有効性を確かめるため、家兎内因性カンジダ眼内炎で発症阻止実験と短期治療実験を行った。白色雌家兎(2.1~2.5kg)12匹の耳介静脈に、眼内炎患者の眼内より分離培養された *Candida albicans* (棟方株) 8×10^5 個を各々接種し、内因性カンジダ眼内炎を発症させた。家兎を6匹ずつに分け各実験を行った。実験1(発症阻止実験)では治療群3匹に菌接種30分後、1日後、2日後にフルコナゾール5mg/kgの静注を行った。3匹は非治療群とした。各群について、眼底病変を観察し菌接種後7日目に眼球を摘出し眼内生菌数を測定した。その結果、非治療群3匹6眼全ての眼底に滲出斑を認めたが、治療群では全く変化を認めなかった。培養結果では、非治療群すべての眼内よりカンジダが分離培養されたが、治療群では眼内よりカンジダは培養されなかった。実験2(短期治療実験)では、菌接種後3日目に眼底病変を認めた3匹を治療群として4日間連続でフルコナゾール5mg/kgの静注を行った。3匹は非治療群とした。その結果、治療群、非治療群とも菌接種後7日間に関するかぎり臨床像および眼内生菌数に差は認められなかった。以上よりフルコナゾールの静注は家兎内因性眼内炎の発症予防に著明な効果が認められたが、発症後の治療効果はみられなかった。(日眼会誌 74:1007-1011, 1990)

キーワード：フルコナゾール、カンジダ眼内炎、家兎、真菌

The Suppressive Effect of Intravenous Fluconazole against
Endogenous Candida Endophthalmitis in Rabbits

Yutaka Isobe and Hiroshi Hatano

Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine

Abstract

The therapeutic effect of intravenous fluconazole against endogenous candida endophthalmitis was investigated in rabbits. Twelve albino rabbits and a candida strain isolated from the human vitreous were used. Endogenous candida endophthalmitis was made by intravenous inoculation of 8×10^5 candida albicans spores in rabbits. In the first of two series of experiments, three rabbits out of six were injected intravenously with 5mg/kg.b.w. of fluconazole at 30 minutes, 1 day and 2 days after inoculation. Another three control rabbits received no medication. The clinical course of the eyes was observed for a week and the viable cell numbers of candida in the eye were counted at 7 days after inoculation. Three rabbits treated with fluconazole developed no ocular lesions and no candida spores whatsoever were isolated from the eyes. In contrast, three rabbits in the control group developed

別刷請求先：232 横浜市南区浦舟町3-46 横浜市立大学医学部眼科学教室 磯部 裕
(平成2年1月19日受付、平成2年3月16日改訂受理)

Reprint request to: Yutaka Isobe, M.D. Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine

3-46, Urafune-cho, Minami-ku, Yokohama 232, Japan

(Received January 19, 1990 and accepted in revised form March 16, 1990)

bilateral chorioretinitis and *candida albicans* was isolated from each of 6 eyes. In the second series, three out of six rabbits were injected intravenously of the same dose of fluconazole as described above for four days starting at 3 days after inoculation, when chorioretinitis was first observed. No medication was given to another three rabbits as a control. All six rabbits in this series developed chorioretinitis similarly and candida spores were isolated from all eyes at 7 days after inoculation. These results show that intravenous fluconazole is effective in the prevention of the endogenous candida endophthalmitis in rabbits but ineffective for these short term therapeutic applications after onset. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 1007-1011, 1990)

Key words: Fluconazole, Candida endophthalmitis, Fungus, Rabbit

I 緒 言

内因性真菌性眼内炎はしばしば高カロリー輸液 (IVH) に続発してみられ、近年増加傾向を示す眼感染症である。その原因菌のほとんどがカンジダであることは広く知られている¹⁾。

本症の治療にあたって従来よりある抗真菌剤、たとえばアンホテリシン B やフルシトシンはその副作用や耐性が問題で使用が困難であった。最近アゾール系の抗真菌剤が開発され、ミコナゾール、フルコナゾールが本邦でも一般に使用可能となった。特にフルコナゾールは副作用がほとんどなく、経口と静注が可能で、血中濃度半減期が30時間と長いので1日1回投与で治療が可能であるなど、臨床的に使用しやすい新しい抗真菌剤である。またカンジダに対しては、in vivo での強い抗菌活性が報告されている²⁾。

今回我々は、この新しい抗真菌剤フルコナゾールの有効性について家兎内因性カンジダ眼内炎モデルを使用して短期投与による発症阻止実験と治療実験を行い検討した。

II 材料と方法

1. 実験動物：2.1~2.5kg の白色雌家兎12匹を用いた。

2. カンジダ：内因性カンジダ眼内炎患者の硝子体より分離された *Candida albicans* (棟方株) を使用した。継代はサブロー液体培地を用いて行った。(なお、この株のフルコナゾールに対する IC₉₉ (99% inhibition concentration) は0.39μg/ml であった。)

3. 接種菌液の調整：*Candida albicans* (棟方株) をサブロー液体培地中にて37℃にて24時間振蕩培養を行った。菌液を1,500rpm にて10分間遠沈し、上清をのぞき生理食塩水にて希釈を行った。菌体数の測定は血

球計算板を用いて行った。菌体数は、培養された原液で1.6×10⁸個/ml であった。

4. 菌の接種：カンジダの接種には、培養後遠沈し生理食塩水にて再浮遊させた原液を100倍に希釈したものを用いた。この菌液を各家兎の左耳介静脈より0.5 ml 静注した。投与した菌体数は家兎1匹あたり8×10⁶個であった。この投与量は事前に予備実験を行い、接種した各家兎に確実に眼内炎が発症し、1週間以上の生存が得られるカンジダの菌量をもとめ決定した。

5. 抗真菌剤の投与：実験は、1. 眼内炎発症阻止実験および、2. 眼内炎治療実験の2つに分けて行った。フルコナゾール (ジフルカン®) は、臨床的に使用されている静注用のものを用いた。実験1の発症阻止実験では、6匹のうち3匹の家兎を薬物投与群としてカンジダ接種30分後に右耳介静脈よりフルコナゾール5 mg/kg 静注し、さらに1日後、2日後に投与した。実験2の短期治療実験では6匹のうち3匹を薬物投与群とし接種3日目に眼底に白色の滲出斑を確認してからフルコナゾール5mg/kg の静注を開始しその後6日目まで4日間同じ治療を続けた。両実験とも家兎3匹ずつを対照群として、菌の接種のみとした。

6. 臨床的観察：散瞳後、検眼鏡にて眼底の観察を行い眼底の滲出斑の数を測定した。臨床効果の判定は両実験とも接種後7日目におこなった。

7. 眼内生菌数の測定：菌接種後7日目に、眼球摘出を行い眼内生菌数の測定を行った。摘出した眼球より硝子体と網脈絡膜を採取しガラスパウダー入りの乳鉢にて十分にホモジェナイズを行いその上清を培養した。培養はサブロー寒天培地に上清0.1ml をコンラージ棒を用いてのぼし37℃にて24時間、以後室温にて6日間培養を行った。培養されたカンジダの同定はコロニーの形態で行った。合計7日間培養した後、コロニーの数を測定しこれを硝子体の容積で換算して (コロ

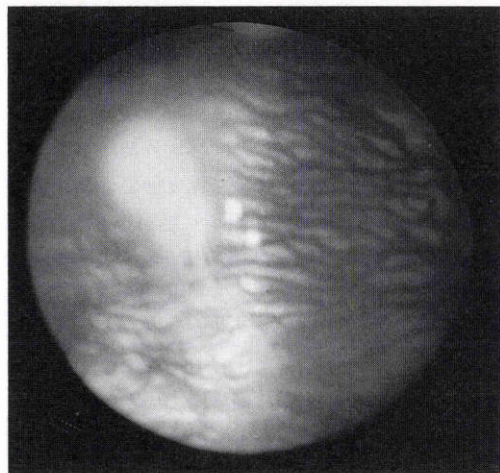


図 1 家兎内因性眼内炎の眼底写真。カンジダ静注後 6 日目、眼底後極に白色の滲出斑がみられる。

ニ一数 $\times(1.5\div0.1)$ 眼内の生菌数とした。

III 結 果

実験 1 (発症阻止実験)

1. 臨床所見：カンジダ接種後 7 日目、フルコナゾール投与群 3 匹 6 眼には全く眼底の滲出斑が認められなかった。非投与群では、3 匹 6 眼の眼底全てに最少 1 個から最多 14 個の白色の滲出斑を認め平均 8.0 ± 5.4 個(mean $\pm$ SD)であった(図 1)。

2. 眼内生菌数：フルコナゾール投与群の眼内からは、全例でカンジダは培養されなかった。しかし非投与群の全ての 3 匹 6 眼より、接種した *Candida albicans* が培養された。その数は最少 No. 5 の右； 1.5×10 ，最多 No. 6 の左； 1.4×10^4 であり、平均 $5.6\times10^3\pm5.9\times10^3$ (mean $\pm$ SD)であった(表 1)。

実験 2 (短期治療実験)

1. 臨床所見：カンジダ接種後 1 日目の眼底には全く変化は認められなかった。2 日目の眼底には 3 眼にごく小さな滲出斑様の变化を認めた。3 日目には 6 匹 12 眼のすべての眼底にはっきりとした滲出斑が 1 から 6 個認められた。この時点より、治療群の No. 7, 8, 9 の 3 匹の家兎にフルコナゾール 5mg/kg の投与を開始した。5 日目になると病巣部を中心とした硝子体混濁が非治療群の 6 眼と治療群の 3 眼にみられた。以後この硝子体混濁はしだいに減少し、カンジダ接種後 7 日目には非治療群で 2 眼、治療群で 1 眼に減少した。眼底の滲出斑の数は治療群、非治療群とも発症を確認

表 1 家兎内因性カンジダ眼内炎に対するフルコナゾール静注の効果(菌接種後 30 分後より 3 日間連続, one shot)

	家兎 No.	左右	眼底滲出斑数	眼内生菌数
治療群	No. 1	R	0	0
		L	0	0
	No. 2	R	0	0
		L	0	0
	No. 3	R	0	0
		L	0	0
非治療群	No. 4	R	14	3.9×10^3
		L	6	4.0×10^3
	No. 5	R	3	1.5×10
		L	1	9.0×10
	No. 6	R	12	1.2×10^4
		L	12	1.4×10^4

表 2 家兎内因性カンジダ眼内炎に対するフルコナゾール静注の効果(菌接種後 3 日目、眼底病変確認より 4 日間連続, one shot)

	家兎 No.	左右	眼底滲出斑数	眼内生菌数
治療群	No. 7	R	6	1.5×10^2
		L	5	4.8×10^2
	No. 8	R	1	4.5×10
		L	0	7.5×10
	No. 9	R	4	2.0×10^2
		L	7	2.0×10^2
非治療群	No. 10	R	6	3.6×10^3
		L	5	1.5×10^3
	No. 11	R	5	1.2×10^2
		L	2	1.4×10^2
	No. 12	R	5	1.5×10^2
		L	4	3.6×10^2

した 3 日目の数とほぼ同数で経過し、カンジダ接種後 7 日目では治療群が 0 から 7 個で平均 3.8 ± 2.8 ，非治療群が 2 から 6 個平均 4.5 ± 1.4 であった(表 2)。両群の間に有意差は認められなかった($p<0.05$)。個々の滲出斑の大きさは両群とも 3 日目以後 5 日目まで拡大傾向を示したがそれ以後変化は認めなかった。

2. 眼内生菌数：カンジダ接種後 7 日目の眼内生菌数は、非治療群が最少 No. 11 の右； 1.2×10^2 ，最多

No. 10の左; 1.5×10^3 で平均 $4.4 \times 10^2 \pm 5.4 \times 10^2$ であった。一方、接種後3日目より6日目まで3回フルコナゾールを投与した治療群では最少No. 8の右; 4.5×10 , 最多No. 7の左; 4.8×10^2 で平均 $1.9 \times 10^2 \pm 1.5 \times 10^2$ であり、統計学的には有意差は認められなかった ($p < 0.05$) (表2)。

IV 考 按

内因性真菌性眼内炎は視力予後の悪い重篤な眼感染症であるが、そのほとんどの原因菌はカンジダによるものである¹⁾。内因性カンジダ眼内炎は、内科や外科領域の抗ガン剤、抗生物質、免疫抑制剤、高カロリー輸液 (IVH) などの治療の進歩と共に増加の傾向にある¹⁾³⁾。特に IVH は、経口摂取不可能な手術後の患者や重症患者に非常に有用な治療法であるが、内因性カンジダ眼内炎をしばしば合併することが知られている³⁾⁴⁾。事実、外科手術の患者で IVH を行くとその経過中かなりの確率 (25%) でカンジダ血症をおこし、また全身性のカンジダ症 (10%) を起こしたという報告⁵⁾や、カンジダ眼内炎患者の病理解剖結果で78%の患者に全身性多臓器のカンジダ症が起きていたとの報告³⁾がある。実験的にも、家兎内因性カンジダ眼内炎において網脈絡膜から菌が検出された個体の95%から腎臓などの他臓器よりカンジダが検出されたとの報告がある⁶⁾。これらの報告はカンジダ眼内炎の直接の原因が IVH 治療中に起きるカンジダの血行播種であることを強く示唆するものである。このことは実験的に静脈内にカンジダを注入することにより眼内炎を発症出来るという今回の結果からも裏付けらよう。

この内因性カンジダ眼内炎に対し、従来全身投与で使用可能な抗真菌剤はアンホテリシン B (ファンギゾン®) とフルシトシン (アンコチル®) だけであった。アンホテリシン B は真菌性眼内炎に対する有効性が評価されているが⁷⁾、実際に患者に使用する場合毒性が強く安全域が狭いため使用が難しい薬剤である。フルシトシンは耐性菌の出現頻度が高く、単独使用では問題がある。最近、副作用が少ないアゾール系抗菌剤が開発され、ミコナゾール (フロリード F®)、フルコナゾール (ジフルカン®) が全身性の真菌性に対して一般に使用されるようになった。ミコナゾールは真菌性眼内炎にたいする有効性が評価され臨床的に使用されている⁸⁾。しかし眼科的に使用する場合、経口投与が不可能なため外来通院時に使用困難であるため長期投与が行いにくいことや、軽度ではあるが副作用が問題に

なっている⁴⁾。ミコナゾールとともにフルコナゾールが一般に使用可能になったことは、真菌性眼内炎に対する薬物療法を選択の幅をもたせることになり非常に有意義なことであると考ええる。

フルコナゾールは1978年に開発されたトリアゾール系の新しい抗真菌剤で、真菌の膜成分であるエルゴステロールの合成を選択的に阻害し抗菌作用を示す⁹⁾。この抗菌作用は *in vitro* に比べ *in vivo* で高く評価されており、カンジダ、クリプトコッカス、アスペルギルスなどの深在性真菌症に有効である²⁾。体内のすべての組織への移行性も非常に良く¹⁰⁾、毎日投与した場合には血清中の濃度とほぼ同濃度まで眼内の硝子体や脈絡膜に炎症、非炎症時とも移行することが確かめられている⁶⁾¹⁰⁾。また副作用の報告はほとんどなく、経口、静注投与が可能で血中の薬物濃度半減期が30時間と長いので1日1回の投与で治療可能な臨床的に使用しやすい優れた抗真菌剤である²⁾。そこで我々はフルコナゾールの *in vivo* の有効性を確かめるため、家兎内因性カンジダ眼内炎モデルを使用して実験を行った。

従来の家兎内因性カンジダ眼内炎モデル⁶⁾¹¹⁾¹²⁾は発症が確実ではなく、薬効の評価には不相当と考え、まず確実に各個体に眼内炎が発症しかつ1週間以上安定して家兎が生存し経過観察の行えるモデル作成のため予備実験を行った。様々な量のカンジダを家兎に投与した結果、各個体に 8×10^6 個の菌体を静注すると個体では100% (5匹/5匹)、眼数では90% (9眼/10眼) に白色の滲出斑が認められ、生存期間はすべて1週間以上であった。さらに眼内組織の培養により接種したもの同一のカンジダが検出され、眼内炎の原因が接種したカンジダによるものであることが確認された。今回、この家兎内因性カンジダ眼内炎モデルを使用しフルコナゾール静注の効果を検討した。

発症阻止実験では、治療群には家兎にカンジダを静注後30分、1日、2日後にフルコナゾールを5mg/kg 静注した。非治療群では全ての眼に眼内炎の発症を認め眼内よりカンジダが培養されたが、治療群では全ての眼に病変を認めず眼内よりカンジダは培養されなかった。短期治療実験では、眼底に臨床的にはっきりと病変が現れた後、フルコナゾールによる4日間の短期治療を行い、眼底病変の経過と眼内生菌数を調べ効果を検討した。眼底病変の経過では、硝子体混濁が若干早く消退する傾向がみられたが両群の間で滲出斑の数や臨床経過に差は認められなかった。また両群のすべて

の眼内よりカンジダが培養され、その平均値では治療群が非治療群に比べ少ない傾向がみられたが有意差は認めなかった。以上のようにフルコナゾールがカンジダ静注直後より投与を行った場合眼内炎の発症は完全に阻止されたが、臨床的にははっきりと眼内炎が発症した後の4日間という短期治療と短期観察では効果は認められなかった。しかし、临床上問題となる病変確立後のカンジダ眼内炎の治療に対するフルコナゾールの有効性については、臨床的に内因性カンジダ眼内炎に使用して有効だったとの報告もあり²⁾¹³⁾¹⁴⁾、さらに薬剤の投与方法(硝子体内投与など)、投与期間(1カ月以上の長期投与など)を検討し、慎重に評価する必要があると考えられる。

外因性の家兎カンジダ眼内炎モデルにおいてアンホテリシンBの1回の硝子体内投与による治療実験で早期治療は非常に有効であったという報告がある⁷⁾。各種抗真菌剤の効果を家兎内因性カンジダ眼内炎で調べた報告では、検討されたどの薬剤も短期投与では完全に病原菌を消失させていない⁶⁾。またその中で菌接種1週間後よりフルコナゾール80mg/kgを毎日投与し1週間治療を行っているが有意な治療効果を示していない。今回の実験結果もカンジダ眼内炎の早期治療の大切さと病変確立後の治療の困難な一面を示す事実である。

早期投与により家兎内因性カンジダ眼内炎の発症は完全に阻止されたことは、フルコナゾールがカンジダ眼内炎患者の予防に対し確実に有効であることを示唆するものである。一方、眼底病変出現後の短期の治療では効果がみられなかった点については、今後さらに薬剤投与量、薬剤投与期間などを検討しながら実験を進めていく必要がある。内因性カンジダ眼内炎は発症すると治療が困難で視力予後不良な疾患であり、しかもその発症原因の大半がIVHに続発する一種の医原性疾患と言えるものである。今回の実験結果から、今後本症に対しては予防的な抗真菌剤の投与も検討する必要があると考えられる。

稿を終えるにあたり、ご校閲を賜りました大野重昭教授に深謝いたします。なお、本論文要旨は、第9回日本眼薬理学会(1989, 東京)にて発表した。

文 献

1) 石橋康久, 本村幸子, 渡辺亮子: 本邦における内因

- 性真菌性眼内炎—1986年末までの報告例の集計一, 日眼会誌 92: 952—958, 1988.
- 2) 池本秀雄, 渡辺一功, 森 健, 他: Fluconazoleの深在性真菌症に対する臨床試験成績. Jpn J Antibiot 17: 63—116, 1989.
- 3) Edwards JE, Foos RY, Montgomerie JZ, et al: Ocular manifestations of candida septicemia: Review of seventy-six cases of hematogenous candida endophthalmitis. Medicine (Baltimore) 53: 47—75, 1974.
- 4) 五十嵐勢津子, 鈴木一作, 高橋茂樹: 内因性カンジダ性眼内炎の1例. 眼紀 40: 702—708, 1989.
- 5) Ashcraft KW, Leape LL: Candida sepsis complicating parenteral feeding. JAMA 212: 454—456, 1970.
- 6) Savani DV, Perfect JR, Cobo LM, et al: Penetration of new azole compounds into the eye and efficacy in experimental candida endophthalmitis. Antimicrob Agents Chemother 31: 6—10, 1987.
- 7) Axelrod AJ, Peyman GA: Intravitreal amphotericin B treatment of experimental fungal endophthalmitis. Am J Ophthalmol 76: 584—588, 1973.
- 8) 石橋康久, 本村幸子: 眼科における抗真菌剤の使い方. 眼科 30: 251—258, 1988.
- 9) 山口英世: 抗真菌剤の種類と特徴, 上田 泰, 清水喜八郎 編. 深在性真菌症の診断と治療. 東京, メディカル・ジャーナル社, 61—78, 1989.
- 10) Waldh TJ, Foulds G, Pizzo PA: Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in rabbits. Antimicrob Agents Chemother 33: 467—469, 1989.
- 11) Edwards JE, Montgomerie JZ, Foos RY, et al: Experimental hematogenous endophthalmitis caused by candida albicans. J Infect Dis 131: 649—657, 1975.
- 12) 平野洋子: Candida albicansによる実験的脈絡網膜炎. 日眼会誌 93: 109—117, 1989.
- 13) 黒川真理, 小林康彦, 加藤和男, 他: 硝子体手術を行った分娩後真菌性眼内炎の1例. 眼臨 82: 1111—1115, 1988.
- 14) 谷口定路, 秦野 寛, 磯部 裕, 他: ミコナゾールの硝子体注入とフルコナゾールの内服で治癒した内因性カンジダ眼内炎の2症例. 眼臨 84: 1530—1532, 1990.