

1.表紙：

①表題:深在性真菌症に対する Liposomal Amphotericin B (L-AMB)の有効性及び安全性の検討

②ランニングタイトル:深在性真菌症患者を対象とした Liposomal Amphotericin B (L-AMB)の第Ⅱ相臨床試験

③著者名：

河野 茂¹⁾・小林宏行²⁾・正岡 徹³⁾・浦部晶夫⁴⁾・金丸昭久⁵⁾・二木芳人⁶⁾・森 健⁷⁾・原 耕平⁸⁾・池本秀雄⁹⁾・馬庭貴司¹⁰⁾・中條英司¹¹⁾・鈴木孝太¹²⁾・山口英世¹³⁾

④所属機関名：

1) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学講座(旧所属:長崎大学医学部・歯学部附属病院 第二内科)、2) 杏林大学名誉教授、3)地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立成人病センター 顧問、4) NTT 東日本関東病院 顧問(旧所属:NTT 東日本関東病院 血液内科)、5)近畿大学ライフサイエンス研究所(旧所属:近畿大学医学部附属病院 血液・腎臓・膠原病内科)、6)昭和大学医学部臨床感染症学(旧所属:川崎医科大学医学部 呼吸器内科)、7)順天堂大学医学部 血液内科、8)長崎大学名誉教授、9)順天堂大学名誉教授、10)大日本住友製薬株式会社、11)大日本住友製薬株式会社、12)大日本住友製薬株式会社、13)帝京大学名誉教授

⑤キーワード:invasive fungal infection, AmBisome, liposomal amphotericin B, clinical study

2. 要旨：

深在性真菌症を対象とした Liposomal amphotericin B (L-AMB) の多施設共同、非対照試験を実施した。対象は真菌感染症と確定診断された患者又は真菌感染症が疑われる患者とし、L-AMB の 1 日 1 回点滴静脈内投与における有効性、安全性及び薬物動態を検討した。投与量は初回を 2.5 mg/kg とし、5.0 mg/kg への増量又は 1.0 mg/kg への減量を可能とした。投与症例 88 例のうち安全性評価対象は 86 例、有効性評価対象は 66 例であった。

全体の有効性（主要評価項目：総合効果）は 63.6% (42/66) であり、原因真菌別の有効性ではカンジダ症 66.7% (8/12)、アスペルギルス症 51.4% (18/35)、クリプトコックス症 (1/1)、混合真菌症 (0/2) 及び真菌症疑い例 93.8% (15/16) であった。また、他の抗真菌薬無効例では 62.3% (33/53)、造血器悪性腫瘍合併症例では 70.5% (31/44) の有効率であった。

原因真菌が分離出来た 19 例の真菌の消失率は 63.2% (12/19) であり、内訳はカンジダ症 100% (7/7)、アスペルギルス症 41.7% (5/12) であった。また、臨床分離株に対する L-AMB の MIC はカンジダ属で 0.5~4 µg/mL、アスペルギルス属で ≤0.12~1 µg/mL であった。

因果関係が否定できない有害事象（副作用）は 86 例中 82 例 (95.3%)、664 件が認められた。発現率が 10% 以上であった主な副作用は悪心、発熱、血清中クレアチニン増加、BUN 増加、血清中カリウム減少などで、そのほとんどが軽度並びに中等度の副作用であった。

血清中のトラフ濃度を 78 例で測定し、8 例にトラフ濃度値の上昇が認められた。また、血漿中における Amphotericin B の存在形態としては 89.1% がリポソーム体であった。

以上より L-AMB の深在性真菌症患者における有効性と安全性および薬物動態が確認できた。これらの結果から、深在性真菌症治療に対する L-AMB の臨床的有用性が確認できたと考えられた。

3. 序文：

近年の造血器幹細胞移植，臓器移植などの高度医療の発展や化学療法の進歩により，易感染患者が増加し，真菌感染症の発症頻度は増加している¹⁾。また，深在性真菌症の多くは診断の困難さに加えて難治性であり，免疫不全状態の患者にとってはその基礎疾患以上に生命を脅かす存在である²⁾³⁾。

Amphotericin B (AMPH-B)は本邦でアムホテリシン B デオキシコール酸 (d-AMPH)として約 50 年前に上市された薬剤であるが，アスペルギルス属，カンジダ属及び，クリプトコックス属をはじめとする各種真菌に対して殺菌的に作用することから，これまで臨床の場で広く用いられてきた⁴⁾。一方で腎障害、低カリウム血症、投与時に発現する発熱，悪心・嘔吐，呼吸困難，関節痛などの急性症状（以下「投与時関連反応」）のため，使用が制限されるという問題がある。

Liposomal amphotericin B (L-AMB)は AMPH-B の毒性を軽減することを目的としてアムホテリシン B をリポソーム化した製剤であり，真菌に対する効果を維持したまま副作用を軽減することに成功した深在性真菌症治療薬である。

L-AMB は海外での d-AMPH との二重盲検比較試験では d-AMPH と同等の有効性を示すと共に，安全性では腎障害，低カリウム血症及び投与時関連反応の発現が有意に軽減されていることが確認されている⁵⁾。

本邦では，1998 年から 2001 年の間に実施された第 I / II 相試験で日本人における 5mg/kg/日までの忍容性が確認されたことから，国内での有効性及び安全性を検討するため 2002 年から 2003 年まで第 II 相臨床試験が実施された。その試験成績について報告する。

4. 対象及び方法：

1. 診断基準

登録前 4 週間以内の臨床症状，画像所見，真菌学的検査所見，血清学的検査所見等から，Table 1～4 に示す診断基準に基づき診断を行った。真菌学的所見(表中の「mycological findings」)及び臨床的所見(表中の「clinical findings」)を満たす患者を確定診断症例(proven mycosis patients)とし，臨床的所見を満たし(1,3)- β -D グルカンが陽性であった患者を疑い症例(probable mycosis patients)とした。

なお，疑い症例は，L-AMB の投与開始後も真菌学的検査及び血清学的検査を繰り返し行い，確定診断に努めた。

2. 選択基準

次の条件を全て満たす患者を対象とした。

- (1) 診断基準に基づき確定診断症例又は疑い症例と診断された患者（「1.診断基準」参照）
- (2) 同意取得時の年齢が 16 歳以上 80 歳未満の患者
- (3) 入院患者
- (4) 本人から文書による同意が得られた患者

3. 除外基準

- (1) 血清クレアチニン値*1 が実施医療機関の基準値上限の 2 倍を超える患者。
- (2) AST(GOT) *1 又は ALT(GPT) *1 が実施医療機関の基準値上限の 10 倍を超える患者。
- (3) 血清カリウム値*1 が 3.0 mEq/L 未満の患者。
- (4) 重篤な心疾患を合併している患者。
- (5) AMPH-B に対して過敏症又はアレルギーの既往のある患者。
- (6) 妊婦，妊娠している可能性のある患者，適切な避妊手段を講じず妊娠する可能性のある患者及び授乳中の患者。
- (7) 治験薬投与開始日前 4 週間以内に他の治験又は市販後臨床試験に参加していた患者。
- (8) 本治験以前に AmBisome®の投与を受けたことのある患者。
- (9) その他，治験責任医師又は治験分担医師が本治験の対象として不相当と判断した患者。

*1：登録前 2 週間以内で最新の検査値

4.同意

本試験の選択基準を満たし除外基準に抵触しない患者に対し文書での同意を得た。被験者が未成年の場合には被験者本人だけではなく代諾者にも同様の説明を行い、文書による同意を得た。

5.試験薬剤

1) 治験薬

治験用 L-AMB は注射用凍結乾燥製剤バイアル(1バイアルに AMPH-B を 50mg 含有)を使用した。なお、本稿における L-AMB の用量はすべて AMPH-B の量として示した。

2) 用量及び投与方法

初回投与量を 2.5 mg/kg/日とし、1.0 mg/kg/日への減量又は休薬を可能とした。また、真菌感染症の治療のため増量が望ましいと判断した場合は 5.0 mg/kg/日への増量を可能とした。ただし、初回投与から 3 日間は増量しないこととした。投与方法は 1 日 1 回、1~2 時間の点滴静注とした。

3) 投与期間

投与期間は原則として 3 週間とし、効果・症状により最長 12 週間まで可能とした。なお、1 週間を超えての休薬はその時点で試験中止とした。

6.併用禁止薬及び併用制限薬

他の治験薬又は製造販売後臨床試験薬、深在性真菌症治療を目的とした抗真菌薬および白血球輸注は併用禁止とした。また、G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor : 顆粒球コロニー刺激因子) 製剤及び M-CSF (macrophage-colony stimulating factor : マクロファージコロニー刺激因子) 製剤は原則併用禁止としたが、試験開始前から投与されている場合は併用を可能とした。ただし、その場合であっても増量は禁止とした。

7.調査・観察・検査スケジュール

Table 5 に示したスケジュールに従い有効性及び安全性に関する臨床症状、画像検査・内視鏡検査、真菌学的検査、血清学的検査、有害事象の観察、一般臨床検査及び血清中アムホテリシン B 濃度の測定を実施した。また、治療終了時や投与中止時には各種検査を調査し、調査終了後 1 ヶ月後に、副作用の転帰と真菌感染症の再発の有無について調査した。

8.有効性の評価方法

臨床症状、画像検査・内視鏡検査、真菌学的検査及び血清学的検査の結果の推移を基にそれぞれ臨床症状改善度、画像内視鏡検査所見の改善度、真菌学的効果及び血清学的効果の判定を行った。更に、これら4つの改善度を基に原則としてTable 6に示した判定基準に従い総合効果の判定を行った。

9.薬物動態の検討

1) 血清中 AMPH-B 濃度の測定

投与開始後3日目、投与7日目、投与3及び8週目の投与直前（原則として投与開始前2時間以内）、投与終了1日後（原則として最終投与の24時間後）また休薬を行った場合は休薬1日目（原則として最終投与の24時間後）にそれぞれ採血を行い、血清中 AMPH-B の総濃度の測定をおこなった。血液は各時間に静脈血 2 ml を採血した後、血清を分取し、測定に供するまで-20℃以下にて保存した。

血清中 AMPH-B の総濃度の測定は、株式会社三菱化学ビーシーエル中央総合ラボラトリーにおいて、高速液体クロマトグラフィー法（可視光）にて以前の報告¹²⁾と同様の方法で行った。本法においては、メタノール処理によりリポソームから AMPH-B を分離し、血清中 AMPH-B の総濃度を測定した。本法における定量限界は 0.05µg/mL であった。

2) 血漿中 AMPH-B フリー型濃度測定

投与1日目での投与前、投与開始1時間後（投与終了直後）、投与開始4時間後および8時間後の4ポイント、投与2日目、投与3日目、投与7日目、投与2週目、投与3週目、投与4週目の各日の投与直前及び投与終了日の翌日（最終投与開始時の22～26時間後）に1ポイントずつ採血を行った。血液は各時間に静脈血 5 ml を採血し、血漿を分取の後、一部を限外濾過により限外濾過液を得た。血漿及び限外濾過液のいずれのサンプルも測定に供するまで-20℃以下に保存した。

血漿中 AMPH-B 濃度及びフリー型濃度の測定は、メタノール処理によりリポソームから AMPH-B を抽出し、血漿中 AMPH-B の総濃度を測定した（定量限界：0.05µg/mL）。また、同時に限外濾液中の AMPH-B 濃度を測定した（定量限界：2ng/mL）。

10.安全性の評価方法

投与期間中から投与終了1ヶ月以内に発生した有害事象（投与期間中に発現し

たあらゆる好ましくない、あるいは意図しない徴候、症状、疾患で、臨床検査値の異常変動を含む)を検討した。有害事象について治験薬との因果関係の判定を行い、因果関係が否定できない有害事象を副作用とした。

また、治験薬の点滴前、点滴中及び点滴直後のバイタルサイン（体温、血圧及び脈拍）を測定し、投与時関連反応を調査した。

臨床検査値の異常変動の判定は、日本化学療法学会の臨床検査値異常の判定基準⁶⁾を基に評価した。

11. 継続投与試験

倫理的な配慮から継続投与を行うための試験を計画（以下「継続投与試験」と記載）した。即ち、12週間の投与が完了した時点で、本剤の投与が更に必要と医師が判断した被験者の同意取得後、継続投与試験に移行し、引き続き本剤の投与を行った。投与量、投与方法及び併用禁止薬は先行試験と同様に設定したが、投与期間は治療上必要な最小限の期間とし、G-CSF（granulocyte-colony stimulating factor：顆粒球コロニー刺激因子）製剤及びM-CSF（macrophage-colony stimulating factor：マクロファージコロニー刺激因子）製剤の併用制限は行わなかった。

Table 7 に示したスケジュールに従い有効性及び安全性に関する臨床症状、画像検査・内視鏡検査、真菌学的検査、血清学的検査、有害事象の観察、一般臨床検査及び血清中 AMPH-B 濃度の測定を先行試験に準じて実施した。

また、有効性の評価及び安全性の評価とも先行試験の方法に順じて実施した。

12. 倫理

本治験は現行のヘルシンキ宣言に基づき「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」及び関連通知（GCP）ならびに治験実施計画書を遵守して実施した。

5. 結果：

1. 症例の内訳

有効性及び安全性の解析対象集団の内訳を Fig.1 に示した。登録された 90 例中、88 例に L-AMB が投与されたが、88 例のうち実施計画書からの重大な逸脱のあった 2 例（AmBisome® を投与した症例が 1 例、アムホテリシン B 既存製を投与した症例が 1 例）を除く 86 例を安全性解析対象とした。更に、除外基準に抵触せずかつ所定用量で 7 日間以上投与され、判定不能を除いた 66 例を有効性の評価対象とした。

安全性解析対象とした 86 例のうち、78 例にて血清中 AMPH-B トラフ濃度値を測定した。また、点滴注射後の L-AMB の存在形態を検討する目的で、8 例にて限外濾過による血漿中 AMPH-B フリー型濃度を測定した。

2.被験者背景

安全性解析対象 86 例及び有効性解析対象 66 例における被験者背景を Table 8 に示した。安全性解析対象集団のうち被験者の性別は男性 59 例，女性 27 例と男性の割合が高かった。年齢の範囲は 16～79 歳に分布し，平均年齢は 51.9 ± 16.5 歳（平均値±標準偏差）であった。基礎疾患又は合併症は 86 例全例が有していた。好中球減少症は 22 例，白血病などの血液腫瘍は 63 例であった。また，骨髄移植が施行されていた症例は 28 例であった。

有効性解析対象集団のうち、原因菌別ではカンジダ症 12 例，アスペルギルス症 35 例，クリプトコックス症 1 例及びその他の真菌症 18 例であった。また，確定診断例が 50 例に対し疑い例は 16 例であった。抗真菌薬の前治療があった症例は 53 例であり，fluconazole (FLCZ)治療例が最も多く 31 例，次いで d-AMPH 治療例が 22 例であった。micafungin (MCFG)治療例は少なく 9 例であった。

L-AMB の投与日数は 21 日以下が 86 例中 35 例，22 日以上が 86 例中 51 例で平均投与日数は 36 ± 27 （平均値±標準偏差）日、中央値は 26.5 日であった。実施計画書に規定された最長投与日数である 84 日間の投与が行われた症例は 86 例中 14 例であった。14 例中 11 例は継続投与試験に移行し，さらに投与が継続された。また，d-AMPH では累積投与量が 5g を超えると不可逆的な腎障害が発現するといわれているが⁷⁾、本試験で 5g を超えた症例は 86 例中 31 例，更に 10g 以上であった症例は 12 例であった。累積投与量の平均は 5.25g、中央値は 3.7 g、最大は 22.1 g であったが、不可逆的な腎障害を発現した症例はいなかった。

3.有効性評価

1) 総合効果

有効性解析対象集団での有効率を Table 9 に示した。全体の有効率は 63.6% (42/66) であった。原因菌別ではカンジダ症 66.7% (8/12)，アスペルギルス症 51.4% (18/35)，クリプトコックス症 100% (1/1)，混合真菌症 (0/2)及び真菌症疑い例 93.8% (15/16)であった。

また，感染部位別にみた場合も真菌血症 60.0% (6/10)，呼吸器真菌症 51.5% (17/33) であった。

前抗真菌治療薬または合併症の有無別にみた総合効果を Table 10 に示した。前抗真菌治療薬の有無による有効率に大きな違いはなく，d-AMPH が前投与された症例における有効率が 68.2% (15/22)，d-AMPH が前投与されていなかった症

例では 61.4% (27/44) であった。また、合併症の有無による有効率の違いも大きな差はなく、特に好中球減少症を合併した症例での有効率は 55.6% (10/18) であり、免疫が極度に低下したこの集団でも有効率が特に低い結果ではなかった。

2) 真菌学的効果

有効性解析対象集団 66 例のうち真菌学的効果が判定できた症例は 19 例であった。18 例における真菌学的効果を Table 11. に示した。19 例の内訳はカンジダ症 7 例、アスペルギルス症 12 例であり、カンジダ症の症例では 7 例全てに菌消失が認められたが、アスペルギルス症では 41.7% (5/12) であった。

臨床分離株 19 株に対する L-AMB, d-AMPH 及び AMPH-B に対する MIC の範囲を Table 12. に示した。カンジダ属に対する MIC は d-AMPH 及び AMPH-B がそれぞれ 0.5~1 μ g/mL 及び 0.5~2 μ g/mL であったのに対し、L-AMB では 0.5~4 μ g/mL であった。一方、アスペルギルス属に対する MIC は d-AMPH 及び AMPH-B がそれぞれ 0.25~0.5 μ g/mL 及び \leq 0.12~1 μ g/mL であったのに対し、L-AMB では \leq 0.12~1 μ g/mL であり、両菌種とも L-AMB は d-AMPH および AMPH-B に対して、*C.krusei* では最大で 3 管の差があり、その他の菌種では 1、2 管の差が見られたものの、大きな違いはなかった。

4.薬物動態の検討

1) AMPH-B トラフ濃度値

安全性解析集団 86 例のうちトラフ濃度の測定が可能であった 78 例での AMPH-B トラフ濃度値の推移を Fig.2 に示した。多くの被験者ではトラフ濃度値は一定の値を推移したが、一部の被験者で投与日数の増加に従ってトラフ濃度値が上昇する傾向が見られた。第 I / II 相試験で 2.5mg/kg/日の初回投与後の Cmax (平均値 \pm 標準偏差) が 16.19 \pm 7.41 μ g/ml であったことからトラフ濃度値が 20 μ g/mL を越える場合をトラフ濃度値上昇とした場合、該当する症例は 8 例であり、発現率は 10.3% (8/78) であった。

2) AMPH-B の存在形態の検討

L-AMB を静脈内投与した際の体内での AMPH-B の存在形態としては以下の 3 つが考えられる (Fig.3)。

- ①リポソーム型：リポソームのまま脂質に保持されている形態
 - ②血漿蛋白結合型：リポソームから遊離した後、本剤が血漿蛋白に結合した形態
 - ③フリー型：リポソームから遊離後血漿蛋白に結合しないフリー形態
- 血漿中 AMPH-B 総濃度(①+②+③)及び限外濾液後の AMPH-B 濃度 (③) を

測定し、限外ろ過で得られた濃度に対応する AMPH-B の血漿蛋白結合率から血漿蛋白結合型濃度 (②) を算出し、さらに血漿中 AMPH-B 総濃度から②及び③を差し引くことにより、①を算出した。

安全性解析集団 86 例のうち、限外濾過の実施が可能であった 8 例の血清中 AMPH-B の存在形態を Fig.3 に示した。最高血中濃度を反映していると考えられる投与終了直後を含め、測定対象とした 8 例全ての採血時期における遊離型の濃度は 6.97~40.19 ng/mL の範囲を推移した。それに対し AMPH-B 総濃度は 273.99~28,549.09 ng/mL の範囲にあった。遊離型 AMPH-B 濃度は同時点で測定した AMPH-B 総濃度ほど変動せず、投与直後から次投与の投与直前まで 1%未満で推移した。存在形態別の血漿中 AMPH-B の構成比率の平均値(標準偏差)はリポソーム型が 89.1%(15.1)、蛋白結合型が 10.1%(13.9)、フリー型が 0.8%(1.1)であった。

5.安全性評価

本稿における有害事象名及び副作用名は医師の報告用語から ICH 国際医薬品用語集日本語版 (MedDRA/J) バージョン 6.0 の基本語 (PT : Preferred terms) に読み替えた上で使用した。また各表中の用語は英語版 (MedDRA) バージョン 6.0 の PT を用いた。

5%以上の症例で発現した副作用を Table 13.に示した。何らかの副作用が認められた症例は、82/86 例(95.3%)で 664 件認められた。発現率が高かった副作用は腎障害に関連した臨床検査値の異常変動であり、血清クレアチニン増加 37/86 (43.0%)、血中カリウム減少及び低カリウム血症 30/86 (34.9%) (血中カリウム減少:23/86,26.7%, 低カリウム血症:7/86,8.1%), 血中尿素増加 25/86 (29.1%), 血清中 β 2 ミクログロブリン増加 18/81 (22.2%) などであった。また、その他症状として現れた副作用としては、悪心 16/86 (18.6%)、発熱 14/86 (16.3%) 及び嘔吐 9/86 (10.5%) などであった。

副作用のうち医師により投与時関連反応と判断された有害事象は 86 例中 22 例に発生した。その内訳を Table 14.に示した。発現率が高かったものは背部痛 5/86 (5.8%)、発熱 4/86 (4.7%) 及び血圧上昇 4/86 (4.7%) などであった。

重篤な副作用は 6 例 (7.0%) において 21 件発現し、その内訳は血中ビリルビン増加 2 例 (2.3%) のほか胃腸出血、口の感覚鈍麻、肺炎、敗血症性ショック、静脈閉塞性肝疾患、胆汁うっ滞、硝子体浮遊物、播種性血管内凝固、潮紅、呼吸困難、急性腎不全、多臓器不全、代謝性アシドーシス NOS (not otherwise specified)、低カリウム血症、蕁麻疹 NOS、アナフィラキシー反応、急性リンパ性白血病、腫瘍崩壊症候群、血中アルカリホスファターゼ増加が各 1 例 (1.2%)

であった。

本治験で治験薬投与期間中及び治験薬投与終了1ヵ月後までに死亡した症例は27例であった。死亡例27例のうち、24例は造血器悪性腫瘍を合併している症例であり、残りの3例は肺がん、間質性肺炎、嚥下性肺炎を合併した症例であった。死亡に至った重篤な有害事象とL-AMBとの因果関係を否定できなかった症例は2例で、他の25例はいずれも合併症と真菌を含む感染症の悪化が死因と判断された。また、因果関係の否定できなかった2例も急性リンパ性白血病など合併症の悪化を伴うものであったが、投与中に発現した事象であることから因果関係は否定されなかった。

AMPH-Bトラフ濃度値上昇例8例のうち、2例以上に発現した副作用の発現例数及び発現割合をAMPH-Bトラフ濃度値非上昇例70例とともにTable 15.に示した。AMPH-Bトラフ濃度値上昇例で発現率が高かった副作用は脂質NOS増加6例、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ増加5例、血中クレアチニン増加、血中トリグリセリド増加及び血中カリウム減少がそれぞれ4例であった。

臨床検査値のうち、血清中クレアチニン、血清中カリウム、AST(GOT)及びALT(GPT)の「投与開始前」、「投与期間中」、「投与終了時」及び「最終観察時」での値をFig.4a)-d)に示した。「投与期間中」は血清中クレアチニン、AST(GOT)及びALT(GPT)は各症例の最大値、血清中カリウムは各症例の最小値とし、「投与開始前」の値から以下の①～④の基準により2群に分け、各群での推移をFig.4a)-d)に示した。

①血清中クレアチニン：1.2mg/dl \leq 及び<1.2mg/dl

②血清中カリウム：3.5mEq/l \leq 及び<3.5mEq/l

③AST(GOT)：40IU/l<及び \leq 40IU/l

④ALT(GPT)：40IU/l<及び \leq 40IU/l

その結果、血清中クレアチニン、AST(GOT)及びALT(GPT)は「投与開始前」の値に関わらず、投与期間中大きな変化はなかったが、血清中カリウムは投与期間中、全体的に減少傾向にあった。

また、血清中クレアチニン及び血清中カリウムの平均値の推移をTable16a)-b)に示した。

6.継続投与試験

継続投与試験に移行した被験者は11例であり(Table 17)，No.6の1例を除いた残り全ては有効性解析対象症例であった。

診断名別の内訳としてはカンジダ症5例、アスペルギルス症4例及び真菌疑い例2例であった。カンジダ症5例の内訳はカンジダ血症2例(No.1,2)及び播種

性カンジダ症 3 例 (No.5,3,4) であり、播種型カンジダ症の 3 例は感染部位がいずれも肝臓及び脾臓であるいわゆる肝脾膿瘍であった。アスペルギルス症 4 例の内訳は侵襲性肺アスペルギルス症 2 例 (No.7,8) , 鼻脳型アスペルギルス症 1 例 (No.6) 及び感染部位が特定できなかつた 1 例 (No.9) であった。

11 例中 10 例で造血器悪性腫瘍の合併症を有していた。先行試験の投与期間と継続投与試験の投与期間を合わせた総投与日数は 94~303 日間であり 200 日以上投与された症例が 4 例あった。累積投与量は 11.0~53.7g で 20g 以上投与されたのは 9 例, 30g 以上は 4 例であった。

9 例は 84 日間の先行試験の投与終了時で有効性は認められていたものの、更なる効果を期待され投与継続となった。そのうち 5 例では更に副次的評価項目の臨床症状または血清学的効果のいずれかの判定が「消失」若しくは「陰性化」に改善した。また、1 例は画像所見が「改善」となった。2 例は評価項目の判定に変更はなかつたが、悪化することなく「有効」が維持された。残る 1 例は原疾患の悪化のため臨床症状に対する効果が判定できなくなり、「有効」から「判定不能」となった。一方、84 日間の投与で有効と判断されなかつた 2 例のうちの 1 例 (No.6) は致死的な鼻脳型アスペルギルス症であり、臨床症状の悪化を防いでいるとして継続投与試験に移行した。本症例は真菌学的効果と臨床症状の改善が認められたが、その後に臨床症状が悪化したため無効となった。残る 1 例 (No.5) は播種性カンジダの他剤無効例であり、他に治療薬がなくまた画像と一部の臨床症状の改善も認められて継続投与試験に移行したが、原疾患である悪性リンパ腫の悪化により死亡した。

先行試験開始時から継続投与試験終了時までの全期間における結果として副作用は、11 例中 11 例 (100%) に 203 件発現した。副作用のうち発現率が 20% 以上であったものについて時期別の発生状況を Table 18. に示した。重度の副作用は「血中 ALP 増加」の 1 例 (最大値: 2633 IU/L) であり、その他は何れも軽度又は中等度であった。

6. 考察:

L-AMB は d-AMPH の副作用軽減を目的として開発された薬剤であり、その最初の臨床試験は d-AMPH が無効であった患者や腎障害のために d-AMPH の使用が制限される患者を対象とした救命救急的試験として 1988 年に実施された。1990 年に世界で始めてアイルランドにて承認され、以降欧米を中心に現在では世界 40 カ国以上で販売されている。

本邦では深在性真菌症患者を対象として薬物動態および安全性を検討する目的で第 I/II 相試験を実施し、日本人での 5mg/kg/日までの忍容性を確認した。こ

の結果を踏まえ、実臨床に即した投与方法にて本剤の有効性、安全性及び薬物動態を検討する目的で本試験を実施した。

有効率は総合効果が全体で 63.6% (42/66) で、原因菌別に見るとカンジダ症 66.7% (8/12), アスペルギルス症 51.4% (18/35), クリプトコックス症 100% (1/1), 混合真菌症 (0/2)及び真菌症疑い例 93.8% (15/16)であった。

カンジダ症のうち、播種性カンジダが 3 例登録されたが、いずれも肝脾膿瘍が認められ難治性であったため、84 日の投与終了後も継続投与試験に移行した。3 例のうち 1 例は原疾患である悪性リンパ腫の増悪により死亡したが、画像所見では 3 例全てに改善が認められ、残る 2 例は有効となった。L-AMB は脂質製剤であるため肝臓や脾臓などの網内系に取り込まれやすいことから長期間投与により改善したものと考えられる。このように難治性の症例を含むカンジダ症に対しても本試験では有効性が認められた。海外でもカンジダ症の重症・難治例に対する L-AMB の治療成績として APACHE II スコアが 20 より大きい患者に対しても 33/37 (89.2%) の有効率が得られていることから⁸⁾、本試験の結果を支持する結果であった。

アスペルギルス症での有効率は、疾患別に慢性壊死性肺アスペルギルス症 66.7% (6/9)、侵襲性肺アスペルギルス症 57.1% (8/14) であるのに対し、アスペルギローマでは 6 例中 1 例のみ有効であった。アスペルギローマは長期間に渡って徐々に進行し、根治療法としては外科的切除が選択されるため、有効性が現れにくいことが示唆されている⁹⁾。また、アスペルギローマに対する抗真菌剤の全身投与の有用性は明らかなエビデンスは得られていないことから本試験でも有効性が低かったと考えられる¹⁰⁾。アスペルギローマ以外での慢性壊死性肺アスペルギルス症及び侵襲性肺アスペルギルス症の有効率は約 60%であったが、海外で実施された侵襲性糸状菌感染症を対象とした L-AMB の無作為化二重盲検比較試験での報告¹¹⁾とほぼ同じ有効率であった。

クリプトコックス症は肺クリプトコックス症の 1 例のみであったが、画像所見の改善がみられ有効であった。海外では HIV 陽性患者におけるクリプトコックス髄膜炎に対する多施設無作為二重盲検試験が行われており、有効率は AMPH-B の 0.7mg/kg/日で 75.5%であったのに対し、本剤 3mg/kg/日で 67.5%, 6mg/kg/日で 73.7%であり、本剤はクリプトコックス症に対しても d-AMPH と同等の結果が示されている¹²⁾。

本試験では培養、直接鏡検等により真菌が確認できなかったとしても、臨床症状又は特徴的な画像所見を有し、(1,3)- β -D グルカンが陽性であった被験者を疑い症例として登録した。疑い症例での総合効果は 93.8% (15/16) であり、真菌感染が確定した症例に比べ高い有効率であった。一般的に真菌感染を疑う段階で

抗真菌薬による早期の治療開始は、より高い治療効果が得られると言われており、Denning¹³⁾や Herbrecht¹⁴⁾らの報告でも同様の結果が示されている。本試験でも L-AMB を早期に投与開始することの有用性が示されたものと考えられる。

本試験では前治療薬として抗真菌剤の投与を受けていた患者は 80.3% (53/66) で、前治療薬から本剤に切り替えられた患者での総合効果は 62.3% (33/53) であった。このうち d-AMPH からの切換え例では 68.2% (15/22)、MCFG からの切換え例では 44.4% (4/9) であった。VRCZ は試験遂行時、上市前であったため、VRCZ からの切り替え例はなかった。これらの結果から L-AMB は一次治療のみならず、他剤が無効であった症例や d-AMPH で有害事象により投与が継続できなかった症例に対しても治療薬として有用性が示された。なお前治療なしの症例での総合効果は 69.2% (9/13) であり、本剤は他剤からの切り替え例のみならず一次治療においても有用であることが示された。

本試験では造血器悪性腫瘍の合併が 66.7% と最も多く、合併症が起因と考えられる死亡や重篤な有害事象が認められた。造血器悪性腫瘍を合併した症例での総合効果は 70.5% (31/44) であり、造血器幹細胞移植の実施症例でも 70.0% (14/20) であった。造血器悪性腫瘍や造血器幹細胞移植の合併は、一般的に基礎疾患の状態が悪く、強度の免疫抑制により、易感染状態であるため、強い抗真菌剤での治療が必要との考えから本剤の投与が選択され、治療が継続されたものと考えられるが、本剤はこのような患者層に対しても治療薬として有用であることが示された。

また、造血器悪性腫瘍や造血器幹細胞移植の合併は、移植後の生着不全などで好中球減少が長期に続く場合もあり、一旦、真菌感染症が発症すると致死的な状況に陥ることも少なくない。投与期間が 84 日を超える継続投与試験に移行した症例のほとんどがこの場合に当たった。内訳は移植直後の患者、治験中に移植をした患者（いずれも侵襲性肺アスペルギルス症）及び鼻脳型アスペルギルス症が各 1 例、肝脾膿瘍が 5 例（播種性カンジダ 3、疑い症例 2）、その他が 3 例であった。致死性の高い鼻脳型アスペルギルス症の患者は最終的には有効には至らなかったが、臨床症状の一時的な改善を認め、悪化を防いでいることに意義があるとの考えから 110 日間の投与が行われた。この症例はその後も健在であった。肝脾膿瘍の 5 例はいずれも画像所見の改善が認められ 4 例で有効となった。このように各種の難治性の真菌感染例に対しても本剤の継続投与により一定の有効性が確認された。このような十分量での長期治療が実施可能であった点からも、d-AMPH に比べた場合の本剤の安全性の高さが臨床的に有用であることが示された。

本剤の副作用は d-AMPH でもよく知られている投与時関連反応、腎機能低下、

及びカリウム値の低下が主たるもので、そのほとんどが軽度及び中等度の副作用で投与の中断あるいは中止により軽快、回復した。本剤特有の副作用として脂質増加があったが、これは本剤の脂質成分に由来するものと考えられ、発現は一過性であり、全て軽度又は中等度の事象であった。L-AMBの安全性は発熱性好中球減少症を対象とした d-AMPH との大規模比較試験をはじめとする幾つかの臨床試験において投与時関連反応、腎障害、低カリウム血症など、AMPH-Bの投与継続が困難となる副作用の発現を有意に抑制することが示されている⁵⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。本試験での安全性成績はこれら海外で実施された臨床試験における L-AMB の成績を踏襲する結果であり、安全性の側面において日本人と外国人に大きな違いはないものと考えられる。

発熱、悪寒といった d-AMPH の点滴静注の際に発現する投与時関連反応が発現する要因として Toll-like receptor (TLR) との結合を介した炎症性サイトカインの産生誘導によることが明らかとなっているが、L-AMB ではフリーの AMPH-B の漏出が抑えられている上に、リポソーム化により TLR との反応性が低下していることが報告されているため、これが本剤の投与時関連反応の低減に寄与しているものと考えられている¹⁷⁾。

投与開始前に既に血清中クレアチニン、AST (GOT) 及び ALT (GPT) 値が悪化していた被験者及びカリウムの値が既に低下していた被験者に対しても本試験では L-AMB が投与された。カリウムの中央値は投与期間中、減少したものの、投与終了時には回復傾向にあった。クレアチニン、AST (GOT) 及び ALT (GPT) 値は一部の症例で変動はあったが、全体的に投与前値に関わらず、大きな変動はなかった。Table 16a)でクレアチニン値の推移を示した。投与 7 日目に最大値として 4.1mg/dl まで上昇した症例は原疾患により悪化したもので L-AMB との因果関係は否定されている。

d-AMPH の添付文書によると、累積投与量が 5g を超えると不可逆的な腎障害が現れることがあるとされている⁷⁾。本試験で L-AMB の累積投与量が 5g を超えて投与が行われた症例は 86 例中 31 例であり、更に継続投与試験に移行した 11 例では 11.0～53.7g であったが、重篤又は不可逆的な腎障害にいたった症例はなかった。この結果より、L-AMB には累積用量に制限がなく長期投与における忍容性が示されたといえる。

第 I/II 相試験にてトラフ濃度が上昇する傾向が 31 例中 4 例 (12.9%) で認められたため、本治験でもトラフ濃度値の測定を行った。本試験でのトラフ濃度値の上昇は 10.3% (8/78) であり第 I/II 相試験とほぼ同程度であった。なお、累積投与量の推移や投与日数とトラフ濃度値推移については明らかな関連性は確認できな

かった。トラフ濃度値上昇例と非上昇例での副作用の比較でも被験者背景に大きな違いはなく、現在のところトラフの上昇が治験薬の安全性に重大な問題を与えている結果ではないと考えられた。

限外濾過法による本剤の血中のフリー型 AMPH-B 濃度は投与直後の C_{max} を含め 6.97~40.19ng/mL の範囲を推移した。Alak らは、健常人を用いて本剤 2mg/kg の単回投与に対して限外濾過法を用いた類似の方法でフリー型濃度測定を実施し、投与後 2.25~24 時間におけるフリー型の割合は 0.1~0.2%と報告している¹⁸⁾。今回得られた結果を 24 時間迄で比較すると、1 例は 24 時間値が 3.2%を示したが、他の 7 例では 0.1~1.2%で推移し、Alak らの報告結果と同様に、本剤投与 24 時間後も約 90%がリポソームに封入された状態で存在することが示唆された。一方、d-AMPH では、約 0.5mg/kg の投与時の平均最高血漿中濃度が 500~2,000ng/mL で推移することが知られており¹⁹⁾、血中でのフリー型の濃度は d-AMPH に比べ L-AMB は著しく少ないことが本試験でも確認された。

また、L-AMB のリポソーム粒子径は平均 100nm であるが、これは正常組織への毛細血管壁からの漏出が出来ない大きさであり²⁰⁾、正常組織に対する影響は少ないものと考えられる。一方、炎症反応を伴った感染部位においては組織への移行性が亢進しているため、本剤はリポソームのまま容易に感染組織に到達し、抗真菌効果を発現できるものと考えられている。このように本剤が血中においてリポソーム体として安定に存在することとリポソーム粒子の大きさが正常組織と感染組織の移行による差異（選択性）に寄与しているものと考えられている²¹⁾。

以上のように L-AMB は、深在性真菌症の治療薬として、有効性及び安全性のいずれもリポソーム化によって得られた利点を有する有用な薬剤であると考えられた。本邦では AMPH-B 製剤として、d-AMPH が深在性真菌症の治療薬として長く臨床使用されてきたが、安全性面での問題から他剤無効例の場合に限って使用されることが少なくなかった。既報および本試験で示された L-AMB の有効性と安全性は、AMPH-B 製剤の更なる可能性を示唆するものであり、特に他系統の治療薬では予後不良が懸念される重症例や難治例の治療では、リスク&ベネフィットの観点から L-AMB による初期治療を考慮する価値があるものと考えられた。

利益相反について

著者 河野茂は大日本住友製薬株式会社より資金援助を受けている。

著者 二木芳人は大日本住友製薬株式会社より資金援助を受けている。

著者 馬庭貴司、中條英司、鈴木孝太は大日本住友製薬株式会社の社員である。

8. 引用文献：

- 1) 龍橋克紀, 大原元, 山田英恵, 栗島浩一, 近藤匡, 宮崎邦彦, 他:リポソーマルアムホテリシン B (L-AMB) の臨床的有用性に関する検討。化学療法の領域 2011;27(7):125-131
- 2) 河野 茂:Compromised host における深在性真菌症。Jpn J Med Mycol 2000;41:71~76
- 3) Beck-Sague CM, Jarvis WR:The National Nosocomial Infections Surveillance System:Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States. J Infect Dis 1993;167:1247~1251
- 4) Ampel N M: Emerging disease issues and fungal pathogens associated with HIV infection. Emerg Infect Dis 1996;2:109~116
- 5) Walsh TJ, Finberg RW, Arndt C, Hiemenz J, Schwartz C, Bodensteiner D et al. :Liposomal Amphotericin B for Empirical therapy in Patients with persistent Fever and Neutropenia. N Engl J Med 1999;340 :764-771
- 6) 国井乙彦:抗菌薬による治験症例における副作用, 臨床検査値異常の判定基準。Chemotherapy 1991;39:687~689
- 7) 添付文書「ファンギゾン注射用 50mg」2010年8月改訂(第13版)
- 8) Ernst-Rüdiger Kuse, Ploenchan Chetchotisakd, Clovis Arns da Cunha, Markus Ruhnke, Carlos Barrios, Digumarti Raghunadharao, et al : Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial.Lancet 2007;369: 1519-1527
- 9) 伊藤章編:真菌症のすべて。医薬ジャーナル,医薬ジャーナル社,大阪,1997
- 10) 宮崎義継, 河野 茂:治療学,ライフサイエンス出版,東京,2003;37:242-244

- 11) Leenders AC, Daenen S, Jansen RL, Hop WC, Lowenberg B, Wijermans PW, et al: Liposomal amphotericin B compared with amphotericin B deoxycholate in the treatment of documented and suspected neutropenia associated invasive fungal infections. *Br J Haematol* 1998;103:205-12
- 12) Leenders Alexander CAP, Reiss Peter, Portegies Peter, Clezy, Kate, Hop Wim CJ, et al: Liposomal amphotericin B (AmBisome) compared with amphotericin B both followed by oral fluconazole in the treatment of AIDS-associated cryptococcal meningitis. *AIDS* 1997;11:1463-1471
- 13) David W Denning, Patricia Ribaud, Noel Milpied, Denis Caillot, Raoul Herbrecht, Eckhard Thiel et al: Efficacy and Safety of Voriconazole in the Treatment of Acute Invasive Aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2002;34:563-571
- 14) Raoul Herbrecht, David W Denning, Thomas F Patterson, John E Bennett, Reginald E Greene, Jörg-W Oestmann et al: Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002;347:408-415
- 15) Leenders AC, Daenen S, Jansen RL, Hop WC, Lowenberg B, Wijermans PW et al: Liposomal amphotericin B compared with amphotericin B deoxycholate in the treatment of documented and suspected neutropenia-associated invasive fungal infections. *Br J Haematol* 1998;103(1):205-212
- 16) Prentice HG, Hann IM, Herbrecht R, Aoun M, Kvaloy S, Catovsky D et al: A randomized comparison of liposomal versus conventional amphotericin B for the treatment of pyrexia of unknown origin in neutropenic patients. *Br J Haematol*. 1997;98(3):711-718
- 17) Sau K, Mambula SS, Latz E, Henneke P, Golenbock DT, Levitz SM: The antifungal drug amphotericin B promotes inflammatory cytokine release by a Toll-like Receptor- and CD14-dependent mechanism. *J. Biological Chemistry*. 2003;278(39):37561~37568
- 18) Alak A, Moys S, Bekersky I: A high-performance liquid chromatographic assay for the determination of amphotericin B serum concentrations after the administration of AmBisome, a liposomal amphotericin B formulation.

Ther. Drug Monit.1996;18:604-609

- 19) Sau K, Mambula SS, Latz E, Henneke P, Golenbock DT, Levitz SM: The Antifungal Drug Amphotericin B Promotes Inflammatory Cytokine Release by a Toll-like Receptor- and CD14-dependent Mechanism. *J Biol Chem.*2003;278:37561-37568
- 20) 山本寛, アムホテリシン B 脂質製剤-その作用機序と特徴-, 最新医学, 最新医学社, 大阪, 2003;58(6):1121-1127
- 21) Maniwa T, Yamamoto Y: Antifungal activity and clinical efficacy of liposomal amphotericin B (AmBisome). *Folia Pharmacologica Japonica* 2007;129:129-34

Table 1. Diagnostic criterion for deep-seated mycosis (Candidiasis)

	“Mycological findings” ^{*1} (Patients with one of findings below)	“Clinical findings” ^{*1} (Patients with one of these findings below)
Candidemia, Disseminated Candidiasis	<ul style="list-style-type: none"> · Culture of Blood^{*2} is positive. · Candida antigen is positive on blood. · Fungus gene is detected by PCR. 	<ul style="list-style-type: none"> · Antibiotic resistant fever continues more than three days (after catheter removal). · Clinical findings of candidemia is observed.
Esophageal Candidiasis	<ul style="list-style-type: none"> · Culture of specimen from lesion is positive. · Yeast-like fungus is observed by direct microscopy or histological examination. · Candida antigen is positive on blood. · Fungus gene is detected by serum PCR. 	<ul style="list-style-type: none"> · Tongue fur, pseudo-membrane or ulcer is observed on esophageal mucosa. · Clinical findings (ex: swallowing pain or difficulty, heartburn) is observed.
Other candidiasis (ex: endocarditis, liver or spleen, endophthalmitis)	<ul style="list-style-type: none"> · Culture of specimen or sampled puncture fluid is positive. · Yeast-like fungus is observed by direct microscopy or histological examination. · Candida antigen is positive on blood. · Fungus gene is detected by serum PCR. 	<ul style="list-style-type: none"> · Fungal infection is suspected according to patient’s clinical findings or imaging test findings.^{*3}

*1 Proven mycosis patients are with both “Mycological Aspects” and “Clinical Aspects”. Probable mycosis patients are who satisfies “Clinical Aspects” and has positive 1.3-β-D Glucan.

*2 Including indwelling vascular catheter smear

*3 Ophthalmologists diagnosis is necessary on Candida endophthalmitis.

Table 2. Diagnostic criterion for deep-seated mycosis (Aspergillosis)

	“Mycological findings” *1 (Patients with one of findings below)	“Clinical findings” *1 (Patients with all findings below)
Aspergilloma	<ul style="list-style-type: none"> • Culture of sputum*2 or BALF is positive. • Fungus thread is observed by direct microscopy, or histological examination. • Aspergillus antigen or antibody is positive. • Fungus gene is detected by PCR. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fungus ball or thickened cavity wall is observed on chest CT or radiographic image. • Fungal infection is suspected according to clinical findings.
Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis	<ul style="list-style-type: none"> • Culture of sputum*2 or BALF is positive. • Fungus thread is observed by direct microscopy, or histological examination. • Aspergillus antigen or antibody is positive. • Fungus gene is detected by PCR. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cavity lesion is observed on chest CT or radiographic image and infiltrated shadow was changed on several week or month. • Chronic symptom is observed, fungal infection is suspected according to clinical findings. • Positive CRP
Invasive pulmonary aspergillosis	<ul style="list-style-type: none"> • Culture of sputum*2 or BALF is positive. • Fungus thread is observed by direct microscopy, or histological examination. • Aspergillus antigen or is positive. • Fungus gene is detected by PCR 	<ul style="list-style-type: none"> • Characteristic finding is observed on the chest CT or radiographic image, or fungal infection is suspected according to clinical findings.
Other aspergillosis (ex: disseminated aspergillosis)	<ul style="list-style-type: none"> • Culture of blood or specimen is positive. • Fungus thread is observed by direct microscopy. • Aspergillus antigen is positive. • Fungus gene is detected by PCR. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fungal infection is suspected according to patient’s clinical findings or imaging test findings.

*1 Proven mycosis patients are with both “Mycological Aspects” and “Clinical Aspects”. Probable mycosis patients are who satisfies “Clinical Aspects” and has positive 1.3-β-D Glucan.

*2 Including transtracheally sampled sputum

*3 BALF: bronchoalveolar lavage fluid

Table 3. Diagnostic criterion for deep-seated mycosis (Cryptococcosis)

	“Mycological findings” *1 (Patients with one of these findings below)	“Clinical findings” *1 (Patients with one of findings below)
Pulmonary cryptococcosis	<ul style="list-style-type: none"> • Culture of sputum*2 or BALF is positive. • Fungus body is observed in biopsy by histological examination. • Cryptococcus antigen is positive on blood. 	<ul style="list-style-type: none"> • Abnormal image is observed on chest CT or radiographic image. • Fungal infection is suspected according to clinical findings.
Cryptococcus meningitis	<ul style="list-style-type: none"> • Positive cerebrospinal fluid (CSF) culture • Fungus body is observed in India ink stained CSF. • Cryptococcus antigen is positive on CSF. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fungal infection is suspected according to patient’s clinical findings.
Other cryptococcosis	<ul style="list-style-type: none"> • Culture of specimen is positive. • Fungus filaments is observed in specimen by direct microscopy. • Cryptococcus antigen is positive on blood. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fungal infection is suspected according to patient’s clinical findings or imaging test findings.

*1 Proven mycosis patients are with both “Mycological Aspects” and “Clinical Aspects”.

*2 Including transtracheally sampled sputum

Table 4. Diagnostic criterion for deep-seated mycosis (Other Mycosis)

	“Mycological findings” *1 (Patients with one of these findings below)	“Clinical findings” *1 (Patients with the findings below)
Other mycosis	<ul style="list-style-type: none"> • Culture of specimen from lesion is positive. • Fungus filaments is observed in specimen from lesion by direct microscopy. • Fungus gene is detected by PCR. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fungal infection is suspected according to patient’s clinical findings or imaging test findings.

*1 Proven mycosis patients are with both “Mycological Aspects” and “Clinical Aspects”. Probable mycosis patients are who satisfies “Clinical Aspects” and has positive 1.3-β-D Glucan.

Table 5. Schedule of the trial

	Pre Treatment	During treatment														End of Treatment	In case of Drug Seccession	Follow-Up*1	
		D 1	D 3	D 7	W 2	W 3	W 4	W 5	W 6	W 7	W 8	W 9	W 10	W 11	W 12				
Informed consent	●																		
Baseline characteristics	●																		
Clinical symptom	●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		
Imaging test or endoscopy	●			● *2	● *2								○			●	●		
Mycological test	●		● *3	● *3	● *3	● *3							○			●	●		
Serological test	●			●	●	●							○			●	●		
Plasma drug concentration			●	●	●	●						●				●	●		
Vital sign			← ● →																
Adverse events									●							●	●	●	
Laboratory tests		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		
Recurrence																		●	

●: Necessary, ○: If possible, D1-D7: Day 1-Day 7, W2-W12: Week 1-Week 12

*1: One month after treatment

*2: Endoscopy is not necessary if invasive.

*3: Mycological test is not necessary if sampling is invasive.

Table 6. Overall response evaluation criteria

(For aspergilloma)

Clinical response	Mycological response	Imaging test or endoscopy	Overall response
Success or improved	Eradicated	Success	Success
		Improved	Success
		Unchanged	Success
		Worsened	Failure
		Unable to evaluate	Success
	Not Eradicated	Success	Success
		Improved	Success
		Unchanged	Success
		Worsened	Failure
		Unable to evaluate	Failure
	Unable to evaluate	Success	Success
		Improved	Success
		Unchanged	Unable to evaluate
		Worsened	Failure
Unable to evaluate		Unable to evaluate	
Unchanged or worsened	In case of any evaluation		Failure
Unable to evaluate	In case of any evaluation		Unable to evaluate

(For patients with poor clinical symptom)

Clinical response	Mycological response	Serological response	Imaging test or endoscopy	Overall response	
Worsened	In case of any evaluation			Failure	
Unable to evaluate	Eradicated	In case of any evaluation	Success	Success	
			Improved	Success	
			Unchanged	Success	
			Worsened	Failure	
			Unable to evaluate	Success	
	Not eradicated	In case of any evaluation	Success	Success	
			Improved	Success	
			Unchanged	Failure	
			Worsened	Failure	
			Unable to evaluate	Failure	
	Unable to evaluate	Unable to evaluate	Success or improved	Success	Success
				Improved	Success
				Unchanged	Success
				Worsened	Failure
Unable to evaluate		Unchanged, worsened	Success	Success	
			Improved	Success	
			Unchanged	Success	

Clinical response	Mycological response	Serological response	Imaging test or endoscopy	Overall response
		or unable to evaluate	Unchanged	Failure
			Worsened	Failure
			Unable to evaluate	Unable to Evaluate

(For other mycosis patients)

Clinical response	Mycological response	Serological response	Imaging test or endoscopy	Overall response
Success or improved	Eradicated	In case of any evaluation	Success	Success
			Improved	Success
			Unchanged	Success
			Worsened	Failure
			Unable to evaluate	Success
	Not eradicated	In case of any evaluation	Success	Success
			Improved	Success
			Unchanged	Failure
			Worsened	Failure
			Unable to evaluate	Failure
	Unable to evaluate	Success or improved	Success	Success
			Improved	Success
			Unchanged	Success
			Worsened	Failure
			Unable to evaluate	Success
		Unchanged, worsened or unable to evaluate	Success	Success
Improved			Success	
Unchanged			Failure	
Worsened			Failure	
Unable to evaluate			Unable to evaluate	
Unchanged or worsened	In case of any evaluation			Failure
Unable to evaluate	In case of any evaluation			Unable to evaluate

Table 7. Schedule of the trial for extended administration period

	Pre treatment	During treatment	End treatment	of
Informed consent	●			
Clinical symptom		● (once per week)	●	
Imaging test or endoscopy		○	○	
Mycological test		○	○	
Serological test		○	○	
Plasma drug concentration		○	○	
Adverse events		← ● →	●	
Laboratory tests		● (once per week)	●	

● : Necessary

○ : If possible

Table 8. Characteristics of patients

Evaluation items		Safety analysis set (N=86)	Efficacy analysis set (N=66)	
Gender	male	59	46	
	female	27	20	
Age (year)	16-19	3	3	
	20-39	17	15	
	40-64	44	29	
	65-74	17	14	
	75-79	5	5	
	mean(\pm S.D.)	51.9 (16.5)	52.0 (16.4)	
Weight (kg)	30-39	10	10	
	40-49	31	26	
	50-59	24	17	
	60-69	17	11	
	70-79	2	0	
	80-	2	2	
	mean(\pm S.D.)	51.9 (10.7)	51.8 (10.8)	
Diagnosis (classified by causative fungi)	Candidiasis	Candidemia	12	9
		Disseminated candidiasis	3	3
		Candida pneumonia	1	0
		Total number of candidiasis	16	12
	Aspergillosis	Aspergilloma	6	6
		Chronic necrotic pulmonary aspergillosis	9	9
		Invasive pulmonary aspergillosis	19	14
		Other pulmonary aspergillosis	1	1
		Other aspergillosis	8	5
		Total number of aspergillosis	43	35
	Cryptococcosis	Pulmonary cryptococcosis	1	1
Others* ¹		26	18	
Diagnosis (classified by Infection site)	Proven mycosis	Fungemia	13	10
		Pulmonary mycosis	39	33
		Disseminated mycosis	6	4
		Nasal or sinuses mycosis	2	1
		Other	3	2
	Total number of "proven mycosis"	63	50	
	Probable mycosis		22	16
Other		1	0	

infection			
Previous antifungal agent	Yes	71	53
	No	15	13
Amphotericin-B	Yes	29	22
	No	57	44
Itraconazole	Yes	24	18
	No	62	48
Fluconazole	Yes	42	31
	No	44	35
Miconazole	Yes	1	0
	No	85	66
Micafungin	Yes	13	9
	No	73	57
Other agent	Yes	2	2
	No	84	64
Severity of mycosis	Mild	14	11
	Moderate	34	27
	Severe	38	28
Concurrent abnormality	Yes	86	66
	No	0	0
Neutropenia	Yes	22	18
	No	64	48
Leukemia or other hematopoietic tumor	Yes	63	44
	No	23	22
Experience of bone marrow transplantation	Yes	28	20
	No	58	46
Residual pulmonary tuberculosis	Yes	4	4
	No	82	62

*1: Other mycosis (N=1), multiple fungal infection (N=2), probable mycosis (N=22) and causative fungi was unknown(N=1) on “Safety analysis set”

Table 9. Overall response

	Success	Failure	Total	“Success” rate (%)
All patients	42	24	66	63.6
Candidiasis	8	4	12	66.7
Candidemia	6	3	9	66.7
Disseminated candidiasis	2	1	3	66.7
Aspergillosis	18	17	35	51.4
Aspergilloma	1	5	6	16.7
Chronic necrotic pulmonary aspergillosis	6	3	9	66.7
Invasive pulmonary aspergillosis	8	6	14	57.1
Other pulmonary aspergillosis	1	0	1	100
Other aspergillosis	2	3	5	40.0
Cryptococcosis	1	0	1	100
Pulmonary cryptococcosis	1	0	1	100
Others* ¹	15	3	18	83.3
Proven mycosis	27	23	50	54.0
Fungemia	6	4	10	60.0
Pulmonary mycosis	17	16	33	51.5
Disseminated mycosis	2	2	4	50.0
Sinuses mycosis	1	0	1	100
Other proven mycosis	1	1	2	50.0
Probable mycosis	15	1	16	93.8

*1: Multiple fungal infection :0/2 and probable mycosis :93.8%(15/16)

Table 10. Overall response classified by characteristics of patients

		Success	Failure	total	“Success” rate (%)
Previous antifungal agent	Yes	33	20	53	62.3
	No	9	4	13	69.2
Amphotericin-B	Yes	15	7	22	68.2
	No	27	17	44	61.4
Itraconazole	Yes	8	10	18	44.4
	No	34	14	48	70.8
Fluconazole	Yes	21	10	31	67.7
	No	21	14	35	60.0
Miconazole	Yes	0	0	0	
	No	42	24	66	63.6
Micafungin	Yes	4	5	9	44.4
	No	38	19	57	66.7
Other agent	Yes	2	0	2	100
	No	40	24	64	62.5
Concurrent abnormality	Yes	42	24	66	63.6
	No	0	0	0	
Neutropenia* ¹	Yes	10	8	18	55.6
	No	32	16	48	66.7
Leukemia or other hematopoietic tumor	Yes	31	13	44	70.5
	No	11	11	22	50.0
Experience of bone marrow transplantation	Yes	14	6	20	70.0
	No	28	18	46	60.9
Residual pulmonary tuberculosis	Yes	2	2	4	50.0
	No	40	22	62	64.5

*1: Neutrophil cell count was below 1000/mm³ at entry of the trial.

Table 11. Mycological response

	Eradicated	Not eradicated	Total	“Success” rate (%)
All patients	12	7	19	63.2
Candidiasis	7	0	7	100
Aspergillosis	5	7	12	41.7
Fungemia	6	0	6	100
Pulmonary mycosis	4	6	10	40.0
Disseminated mycosis	1	0	1	100
Sinuses mycosis	1	0	1	100

Table 12. MIC range of isolated fungus*

Isolated fungus	Number of strains	MIC range ($\mu\text{g/mL}$)		
		L-AMB	d-AMPH	AMPH-B
<i>C.albicans</i>	2	0.5 - 1	0.5 - 1	0.5 - 1
<i>C.tropicalis</i>	3	1	0.5 - 1	0.5 - 1
<i>C.parapsilosis</i>	2	2	0.5 - 1	0.5 - 1
<i>C.glabrata</i>	1	2	1	2
<i>C.krusei</i>	2	4	0.5 - 1	0.5 - 2
<i>A.fumigatus</i>	7	≤ 0.12 - 1	0.25 - 0.5	≤ 0.12 - 1
<i>A.neiger</i>	1	0.25	0.25	0.25
<i>A.terreus</i>	1	1	0.5	1

*:Broth microdilution method

Table 13. Adverse drug reactions occurred no less than five percent

System Organ Class	Preferred Term	Number of patients (%)	N
Total number of patients		82 (95.3%)	86
Gastrointestinal disorders	Nausea	16 (18.6%)	86
	Vomiting	9 (10.5%)	86
	Diarrhoea	6 (7.0%)	86
	Abdominal pain upper	6 (7.0%)	86
Musculoskeletal and connective tissue disorders	Back pain	5 (5.8%)	86
Nervous system disorders	Headache	5 (5.8%)	86
General disorders and administration site conditions	Fever	14 (16.3%)	86
Metabolism and nutrition disorders	Hypomagnesaemia	8 (9.4%)	85
	Hypokalaemia	7 (8.1%)	86
Skin and subcutaneous tissue disorders	Rash	5 (5.8%)	86
Investigations	Blood creatinine increased	37 (43.0%)	86
	Blood urea increased	25 (29.1%)	86
	Blood potassium decreased	23 (26.7%)	86
	Beta 2 microglobulin increased	18 (22.2%)	81
	Aspartate aminotransferase increased	17 (19.8%)	86
	Lipids increased	17 (20.7%)	82
	Gamma-glutamyltransferase increased	16 (18.6%)	86
	Alanine aminotransferase increased	14 (16.3%)	86
	Blood cholesterol increased	14 (16.5%)	85
	Blood uric acid increased	13 (15.1%)	86
	Blood triglycerides increased	13 (15.7%)	83
	Blood alkaline phosphatase increased	12 (14.3%)	84
	Blood bilirubin increased	12 (14.0%)	86
	Blood magnesium decreased	10 (11.8%)	85
	Blood lactate dehydrogenase increased	9 (10.5%)	86
	Thrombocytopenia	8 (9.3%)	86
	Occult bleeding test positive	8 (9.8%)	82
	Blood potassium increased	7 (8.1%)	86
	Urinary casts	6 (7.6%)	79
	Blood pressure increased	6 (7.0%)	86
	C-reactive protein increased	5 (5.8%)	86
	Monocyte percentage increased	5 (6.6%)	76
	Red blood cells urine positive	5 (6.3%)	80
Lymphocyte percentage decreased	4 (5.3%)	76	
Neutrophil percentage decreased	4 (5.3%)	76	
Urine WBC positive	4 (5.1%)	79	

Table 14. Infection related reactions

Preferred term	Number of patients (%)	N
Total number of patients	22 (25.6%)	86
Back pain	5 (5.8%)	86
Fever	4 (4.7%)	86
Blood pressure increased	4 (4.7%)	86
Vomiting	3 (3.5%)	86
Flashing	3 (3.5%)	86
Vascular disorder	2 (2.3%)	86
Blood pressure decreased	2 (2.3%)	86
Temperature elevation	2 (2.3%)	86
Mouth hypesthesia	1 (1.2%)	86
Urinary casts	1 (1.2%)	86
Arthralgia	1 (1.2%)	86
Pain of extremities	1 (1.2%)	86
Vasculitis	1 (1.2%)	86
Dyspnea	1 (1.2%)	86
Heart pounding	1 (1.2%)	86
Bradycardia	1 (1.2%)	86
Headache	1 (1.2%)	86
Rigors	1 (1.2%)	86
Coldness	1 (1.2%)	86
Feeling of warmth	1 (1.2%)	86
Urticaria	1 (1.2%)	86
Anaphylactic reaction	1 (1.2%)	86
Heart rate increased	1 (1.2%)	86

Table 15. Adverse drug reactions occurred in patients whose plasma AMPH-B trough concentration was increased*¹

Plasma AMPH-B trough concentration Preferred Term	$\geq 20\mu\text{g/mL}$		$< 20\mu\text{g/mL}$	
	Number of patients (%)	N	Number of patients (%)	N
Total number of patients	8 (100%)	8	66 (94.3%)	70
Lipids increased	6 (75.0%)	8	10 (15.2%)	66
Gamma-glutamyltransferase increased	5 (62.5%)	8	9 (12.9%)	70
Blood creatinine increased	4 (50.0%)	8	31 (44.3%)	70
Blood triglycerides increased	4 (50.0%)	8	7 (10.4%)	67
Blood potassium decreased	4 (50.0%)	8	17 (24.3%)	70
Blood cholesterol increased	3 (37.5%)	8	9 (13.0%)	69
Blood urea increased	2 (25.0%)	8	20 (28.6%)	70
Beta 2 microglobulin increased	2 (25.0%)	8	15 (23.1%)	65
Nausea	2 (25.0%)	8	14 (20.0%)	70
Aspartate aminotransferase increased	3 (37.5%)	8	14 (20.0%)	70
Fever	2 (25.0%)	8	11 (15.7%)	70
Alanine aminotransferase increased	3 (37.5%)	8	10 (14.3%)	70
Blood alkaline phosphatase increased	2 (25.0%)	8	9 (13.0%)	69
Diarrhoea	2 (25.0%)	8	4 (5.7%)	70
Vomiting	2 (25.0%)	8	7 (10.0%)	70
Blood lactate dehydrogenase increased	2 (25.0%)	8	6 (8.6%)	70
Hypomagnesaemia	2 (25.0%)	8	6 (8.7%)	69
Blood potassium increased	2 (25.0%)	8	5 (7.1%)	70

*1: Adverse drug reactions occurred more than two patients in trough concentration increased group ($\geq 20\mu\text{g/mL}$) were listed.

Table16-a) Serum creatinine level in patients receiving L-AMB

Day	Baseline	Day3	Day7	Day14	Day21	Day28	Day35	
N	86	84	79	73	63	49	33	
Mean±SD	0.82±0.35	0.83±0.35	0.94±0.51	0.93±0.36	0.96±0.41	0.97±0.37	1.00±0.43	
Maximum	1.90	1.81	4.10	1.81	2.50	2.10	2.10	
Median	0.730	0.800	0.860	0.900	0.870	0.980	0.930	
Minimum	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.20	
Number of patients (%) ^{a)}	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (6.3)	3 (4.1)	7 (11.1)	6 (12.2)	8 (24.2)	
Day	Day42	Day49	Day56	Day63	Dat70	Day77	Dat84	End
N	30	25	22	18	18	15	14	72
Mean±SD	0.98±0.43	0.99±0.38	0.99±0.33	0.95±0.32	0.99±0.36	0.99±0.37	1.02±0.44	1.13±0.60
Maximum	2.50	2.10	1.80	1.60	1.62	1.65	1.87	4.20
Median	1.000	1.000	0.985	1.000	1.000	1.000	0.900	1.000
Minimum	0.30	0.30	0.30	0.20	0.30	0.30	0.30	0.30
Number of patients (%) ^{a)}	5 (16.7)	3 (12.0)	2 (9.1)	0 (0.0)	2 (11.1)	1 (6.7)	1 (7.1)	14 (19.4)

a): Creatinine level \geq Baseline \times 1.5mg/dL or \geq 1.2 mg/dL

Table16-b) Serum potassium level in patients receiving L-AMB

Day	Baseline	Day3	Day7	Day14	Day21	Day28	Day35	
N	86	84	79	73	63	49	33	
Mean±SD	4.0±0.6	3.9±0.6	3.8±0.6	3.8±0.6	3.8±0.7	3.8±0.7	3.7±0.5	
Maximum	6.0	5.4	5.2	4.9	5.0	5.3	4.5	
Median	4.10	3.95	3.80	3.70	3.90	3.70	3.80	
Minimum	2.4	2.5	2.6	2.5	2.1	2.2	2.9	
Number of patients (%) ^{a)}	5 (5.8)	6 (7.1)	6 (7.6)	7 (9.6)	9 (14.3)	5 (10.2)	2 (6.1)	
Day	Day42	Day49	Day56	Day63	Dat70	Day77	Dat84	End
N	30	25	22	18	18	15	14	73
Mean±SD	4.0±0.5	3.9±0.8	3.9±0.6	3.9±0.4	4.1±0.6	4.0±0.6	3.9±0.6	3.9±0.9
Maximum	4.8	5.8	5.3	4.6	5.1	5.4	5.0	6.6
Median	4.05	4.10	3.80	3.80	3.95	3.80	4.00	3.90
Minimum	3.0	2.2	3.0	3.3	3.2	3.2	3.0	2.1
Number of patients (%) ^{a)}	0 (0.0)	3 (12.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	14 (19.2)

a) Potassium level \leq 3.0 mEq/L

Table 17. List of patients enrolled in the extended administration period

No	Age (y)	Weight (kg)	Concomitant diseases	Diagnosis	Causative fungi	Number of days administered* ⁴	Cumulative dose(g) * ⁴	Overall response		Mycological response	
								Routine period	Extended period	Routine period	Extended period
1	36	63	AML	Candidemia	<i>C. krusei</i>	303	45.41	success	success	eradicated	eradicated
2	18	46	ALL	Candidemia	<i>C. tropicalis</i>	175	20.12	success	UTE* ²	eradicated	eradicated
3	45	48	ALL	Disseminated candidiasis	<i>C. tropicalis</i>	157	35.76	success	success	eradicated	eradicated
4	53	42	ALL	Disseminated candidiasis	<i>Candida</i> spp. * ¹	203	20.87	success	success	UTE* ²	UTE* ²
5	42	43	Malignant lymphoma	Disseminated candidiasis	<i>Candida</i> spp.* ¹	94	12.15	failure	failure	UTE* ²	UTE* ²
6	55	54	Iron-deficiency anemia	Rhinocerebral aspergillosis	<i>A. fumigatus</i>	110	25.85	UTE* ²	failure	not eradicated	eradicated
7	22	40	AML	Invasive Pulmonary aspergillosis	<i>Aspergillus</i> spp. * ¹	113	10.99	success	success	UTE* ²	UTE* ²
8	47	49	MDS, anaplastic anemia	Invasive pulmonary aspergillosis	<i>Aspergillus</i> spp. * ¹	292	31.21	success	success	UTE* ²	UTE* ²
9	41	59	AML	Aspergillosis* ³	<i>Aspergillus</i> spp. * ¹	134	26.42	success	success	UTE* ²	UTE* ²
10	20	57	AML	Disseminated aspergillosis (probable)	Unknown	216	53.72	success	success	UTE* ²	UTE* ²
11	79	52	AML	Liver and spleen abscess (probable)	Unknown	142	20.6	success	success	UTE* ²	UTE* ²

*1: Identified by serological test

*2: Unable to evaluate

*3: This patient had symptom of sputum expectoration and fever (38.1°C). 1,3-β-D Glucan was 45.5 pg/mL and Aspergillus antigen was detected by serological test. But infection focus could not be specified.

*4: Total number of days or dose on routine and extended period

Table 18. Adverse drug reactions which occurred no less than twenty percent on “Total period”

Preferred term	Routine period (N=11)	Extended period (N=11)	Total period (N=11)
Diarrhoea	1	2	3
Abdominal pain upper	3	0	3
Oedema	2	1	3
Blood creatinine increased	8	4	9
Beta 2 microglobulin increased	6	1	6
Blood uric acid increased	4	4	6
Blood urea increased	3	4	6
Blood potassium decreased	6	4	7
Blood cholesterol increased	5	2	5
Blood triglycerides increased	5	0	5
Lipids increased	5	2	5
Aspartate aminotransferase increased	3	1	4
Alanine aminotransferase increased	3	0	3
Gamma-glutamyltransferase increased	3	1	3
Blood alkaline phosphatase increased	3	0	3

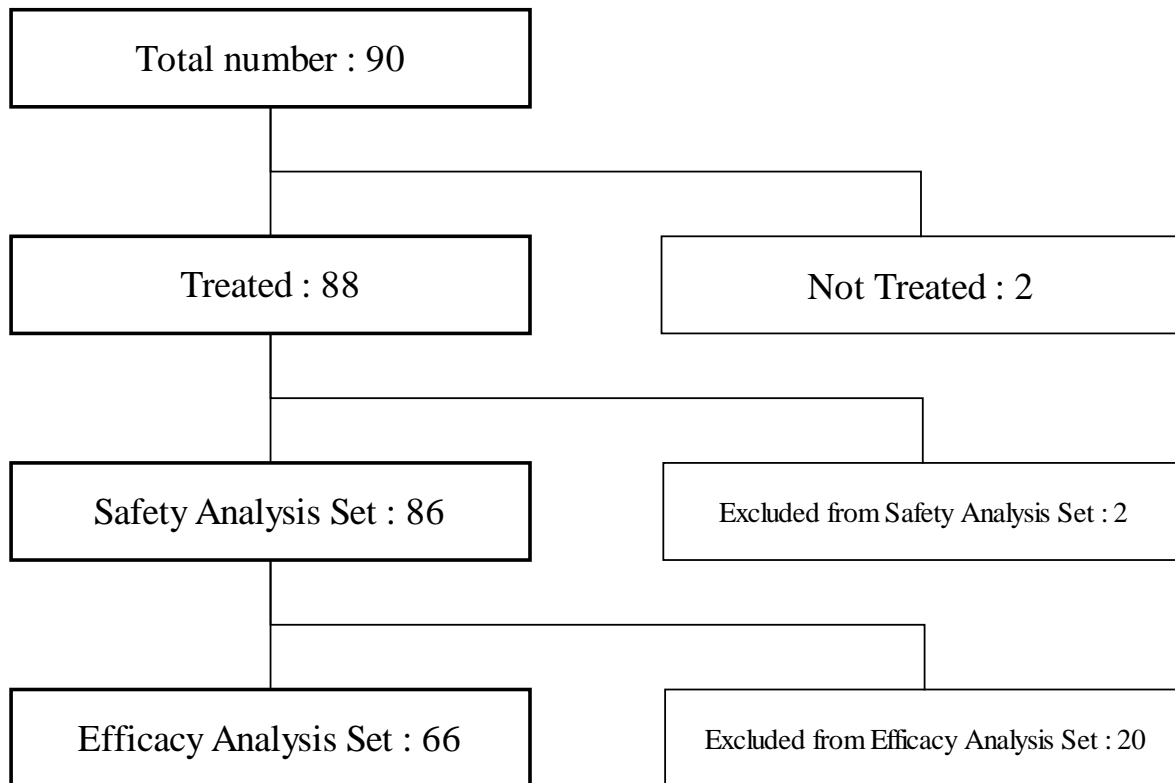


Fig.1. Analyzed Population

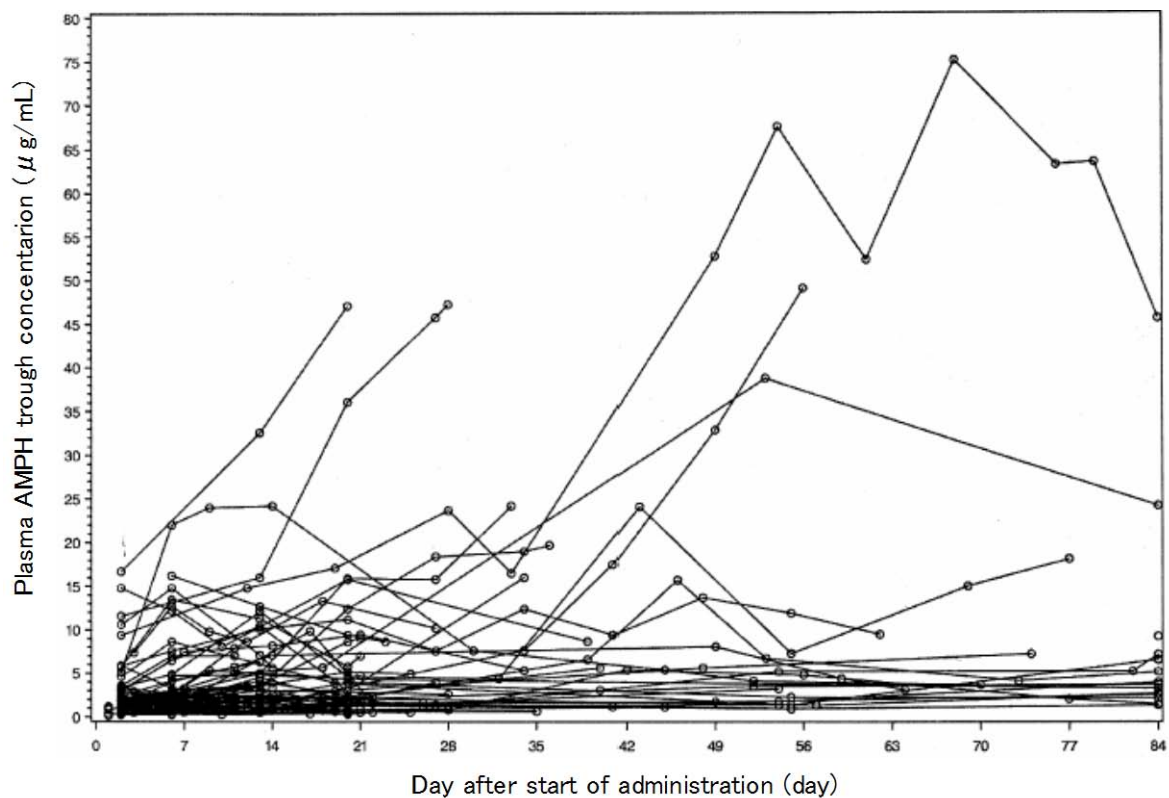
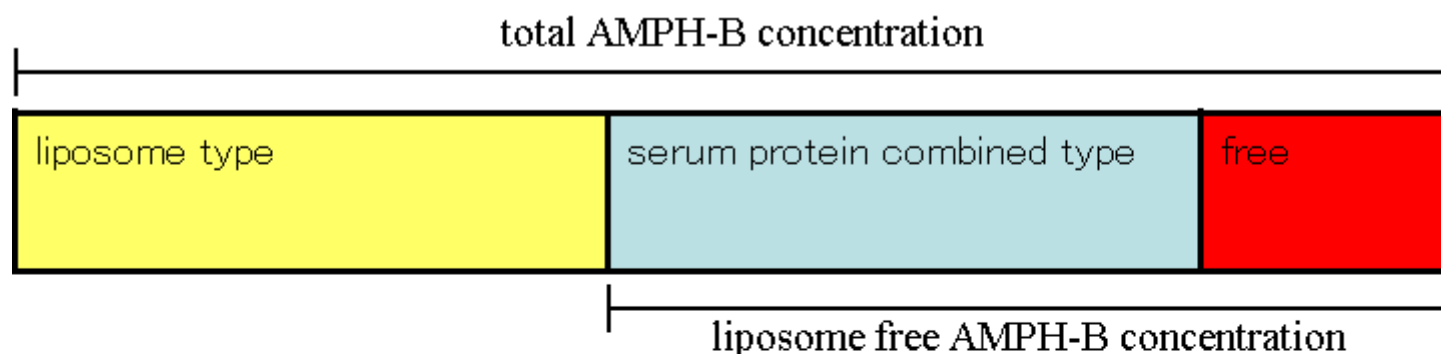


Fig.2. Plasma AMPH-B trough concentration

Blood was sampled at:

- i) 3rd day and 7th day of treatment
- ii) Arbitrary day at 3rd and 8th week of treatment
- iii) Next day of final administration at the end of treatment and the temporally interruption

Sampling was work out just before each administration at i) or ii) and 24 hour after the last administration at iii).



configuration	concentration range (ng/mL)	component percentae (%)
total AMPH-B concentration	273.99~28,549.09	-
liposome type	66.06~28,109.39	89.1±15.1
serum protein combined type	83.17~503.52	10.1±13.9
free type	6.97~40.19	0.8±1.1

Fig.3. Plasma AMPH-B configuration

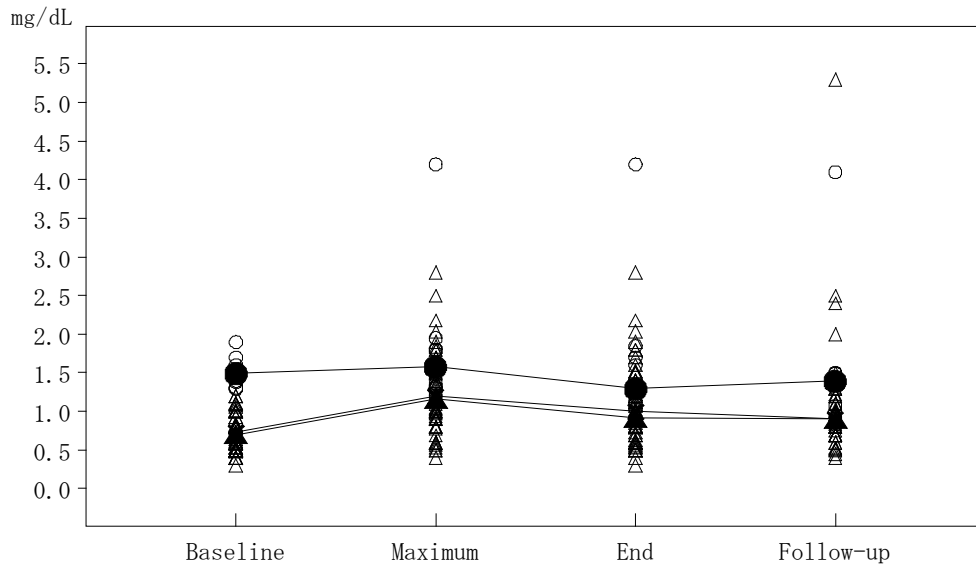


Fig.4-a) Serum creatinine level in patients receiving L-AMB.

○: $1.2\text{mg/dl} \leq$ Baseline of serum creatinine (●:median)

△: $1.2\text{mg/dl} >$ Baseline of serum creatinine (▲:median)

×: Serum creatinine level (median) in all patients

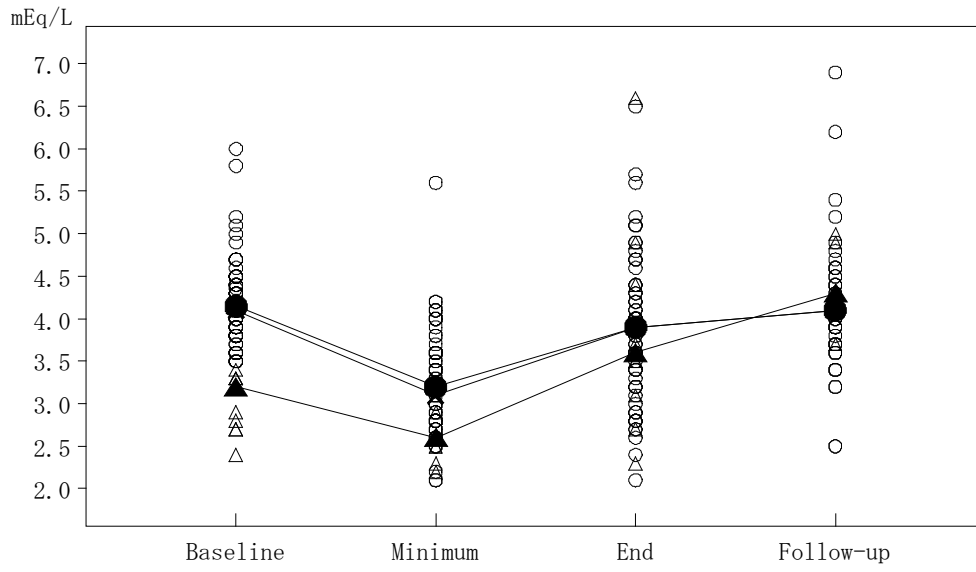


Fig.4-b) Serum potassium level in patients receiving L-AMB

○: $3.5\text{mEq/L} \leq$ Baseline of serum potassium (●:median)

△: $3.5\text{mEq/L} >$ Baseline of serum potassium (▲:median)

×: Serum potassium level (median) in all patients

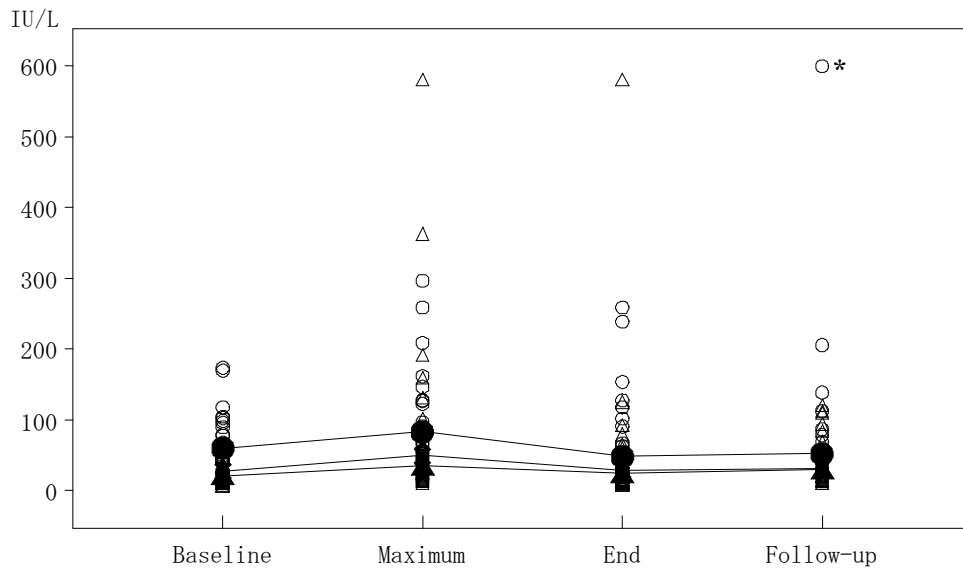


Fig.4-c) AST (GOT) level in patients receiving L-AMB.

○: 40IU/L < Baseline of AST (GOT) (●:median)

△: 40IU/L ≥ Baseline of AST (GOT) (▲:median)

×: AST (GOT) level (median) in all patients

○*:3741.5IU/L

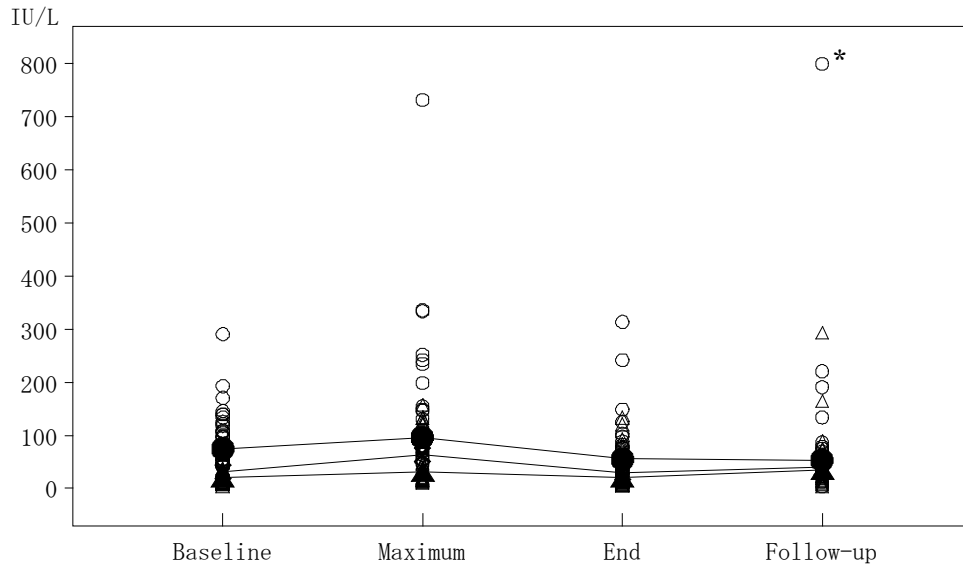


Fig.4-d) ALT (GPT) level in patients receiving L-AMB.

○: $40\text{IU/L} < \text{Baseline of ALT (GPT)}$ (●:median)

△: $40\text{IU/L} \geq \text{Baseline of ALT (GPT)}$ (▲:median)

×: ALT (GPT) level (median) in all patients

○*: 3153 IU/L