

局所的イミダゾール系抗真菌剤 Bifonazole の実験的白癬菌 感染症に対する治療効果

内田 勝久・山下 悟・山口 英世

帝京大学医学部医真菌研究センター

(昭和 59 年 4 月 27 日)

イミダゾール系新規誘導体 bifonazole (BFZ) の *in vivo* 抗真菌活性を検討する目的で、モルモットの *Trichophyton mentagrophytes* 感染モデルを使用し、局所的適用 (塗布) による治療効果を対照薬剤として用いた clotrimazole (CTZ) のそれと比べ、以下の成績を得た。

(1) BFZ 1% クリーム剤, 1% 液剤および 1% polyethylene glycol 液剤を感染 3 日後または 5 日後から局所当り 1 日量 0.3 g を連続 14 日または 21 日間塗布療法を行なった場合、治療開始 6~10 日後から有意な症状改善または治癒効果が認められた。治療終了後に行なった局所皮膚組織片の培養試験でも、感染部位組織内の菌の陰性化または有意な菌数減少が認められた。

(2) BFZ の各製剤とも 14 日間治療よりも 21 日間治療の方が優れた成績を示した。

(3) BFZ の各製剤を対応する CTZ 製剤と比較した場合、両薬剤間に有意な薬効の差は認められなかった。

今日、新しい抗真菌剤の出現に対する要望は益々高まっている。最も大きな関心と開発研究が集中しているのは、イミダゾール系化合物であり、近年 clotrimazole, miconazole, econazole, isoconazole などが外用抗真菌化学療法剤として相次いで実用化された。

Bifonazole (BAY h 4502) は、西独バイエル社で開発された新規イミダゾール誘導体であり、1-[(4-biphenyl)-phenylmethyl]-1H-imidazole の構造をもつ (Fig. 1)。

SHADOMY *et al.*^{1,2)}, PLEMPER *et al.*^{3,4)}, IWATA & YAMAMOTO⁵⁾ および YAMAGUCHI *et al.*⁶⁾ は、本剤の *in vitro* 抗菌活性を検討し、他のイミダゾール剤と同様、広範囲の病原真菌に対し発育阻止作用を示すこと、白癬菌その他の皮膚糸状菌は特に感受性が高いことを報告している。さらに前二者の研究グループは、モルモットの実験的白癬においても bifonazole のクリーム剤および液剤が顕著な *in vivo* 抗菌活性をもつことを予備的実

験成績から示している。一方、これらの bifonazole 製剤を局所的に投与した場合、経皮的に吸収される比率が低い反面、表皮内に高い濃度で残留し、しかも局所刺激作用を示さないという薬理学的にも優れた性質が認められ^{7,8)}、本剤の臨床的適用が検討されている⁹⁾。

本報では、局所的抗真菌剤としての bifonazole の *in vivo* 活性の評価を行なうことを目的とし、1% クリーム剤および液剤を用いてモルモットの実験的白癬菌感染症に対する治療効果を検討した。すべての実験で bifonazole と同じく bisphenyl imidazole 構造をもつ関連物質である clotrimazole を対照薬剤として用い、比較検討した。

I. 実験材料と方法

1. 実験動物

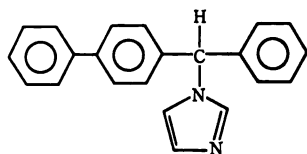
Hartley 系モルモット雄性および雌性 (体重 450~600 g) を 1~2 週間予備飼育した後、実験に使用した。飼育は 1 ケージ 1 匹ずつとし、固型飼料および水を自由に摂取させた。

2. 使用菌株

接種菌には当センターに保存されている *Trichophyton mentagrophytes* TIMM 1189 株 (東京大学農学部長谷川篤彦博士より分与されたハムスター病巣分離株) を使用した。この菌株に対する bifonazole および clotrimazole の標準的な寒天平板希釈法¹⁰⁾による MIC 値は、それぞれ 1.25 および 0.31 $\mu\text{g/ml}$ であった。

3. 接種菌液の調製

Fig. 1 Chemical structure of bifonazole



$\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2$, M. W. 310.4

上記菌株を 1/10 Sabouraud glucose (ポリペプトン 0.1%, デルコース 0.4%) agar 斜面培地に 27°C, 4 週間培養した後, 斜面部を 0.1% (w/v) Tween 80 添加滅菌生理食塩水で覆い, 振盪により分生子を遊離させた。これを滅菌ガーゼで濾過して菌糸塊を除去した。得られた分生子浮遊液中の分生子数を血球計算板で算定し, 2×10^7 分生子/ml の濃度に調整した後, 接種菌液として用いた。

4. 感染方法

Sakai *et al.*¹⁰⁾ および Noguchi *et al.*¹¹⁾ の方法を若干改変した感染方法を用いた。モルモット背部の毛を電気バリカンで刈り取った後, 適当な間隔の部位 4 か所を選び, そこに約 2 cm 角のガムテープを貼りつけては勢いよく剥がすという操作を 3~4 回繰り返した。これにより局所部位の抜毛を行なうと同時に皮膚角質層上部を剝離させた。残った毛は毛抜きを用いて完全に抜去した。これらの抜毛部位に接種菌液を各部位当り 0.05 ml ずつ塗布接種した。

5. 使用薬剤

バイエル薬品株式会社より分与された bifonazole (BFZ) および clotrimazole (CTZ) のクリーム剤, アルコール系液剤およびポリエチレングリコール (P. G. 400) 液剤を実験に使用した。いずれも薬剤 1% を含有する製剤であり, 以下それぞれをクリーム, 液, および P. G. 液と呼ぶ。さらに対照として各製剤の単独基剤を用いた。

6. 治療実験実施法

感染部位に軽度の発赤が現われる直前 (接種後 3 日目) または発赤が明らかに認められるようになった時点 (接種後 5 日目) に治療を開始し, 14 日間または 21 日間連日投与した。BFZ クリーム, CTZ クリームおよびクリーム基剤は 1 か所当り 1 日用量 0.3 g を特にことわりのない限り 1 日 1 回, ヘラを用いて局所に塗布した。BFZ 液, CTZ 液, 液基剤または BFZ P. G. 液, CTZ P. G. 液, P. G. 液基剤は, いずれも 1 回用量 0.15 ml を 1 日 2 回朝と晩に局所に塗布した。この方法により行なった 3 回の実験の条件と内容は次のとおりである。

実験-1

動物 15 匹を使用した。このうち 10 匹については, 各 4 か所ずつつくった感染部位の 1 か所を感染対照としてまったく処置を行わず, 残り 3 か所に BFZ クリーム, CTZ クリームおよびクリーム基剤をそれぞれ塗布した。治療を感染 5 日目に開始し, 14 日間続けた。残りの 5 匹については, 4 か所とも BFZ クリームまたは CTZ クリームによる処置を施した。

実験-2

動物 20 匹 (1 匹当り 4 か所の感染部位) を使用した。無処置感染対照のほかに, BFZ クリーム, CTZ クリーム, クリーム基剤ならびに BFZ 液, CTZ 液, 液基剤のそれぞれによる処置を行なった。治療開始は感染 3 日目で, 治療期間は 14 日とした。

実験-3

動物 20 匹 (1 匹当り 4 か所の感染部位) を使用した。この実験では各薬剤のクリーム, 液およびクリーム基剤, 液基剤に加えて BFZ と CTZ の P. G. 液ならびに P. G. 基剤による処置も行なった。また, クリーム剤は, いずれも 1 日量 0.3 g を 2 回に分けて 0.15 g ずつ塗布した。感染後 3 日目に治療を開始し, 一部の動物では 14 日間, 残りは 21 日間投与した。

7. 病変度の判定

感染部位病変度の肉眼的判定を菌接種翌日から実験終了日まで連日, 薬剤塗布前に行なった。1 日 2 回塗布の場合には, 1 回目塗布の前に判定した。病変度の判定基準は, Weinstein *et al.*¹²⁾ や Gordee *et al.*¹³⁾ による方式を一部改変し, 次のように定めた。すなわち, 局所病変がまったく認められない状態を 0 とし, 病変を生じた場合にはその程度に応じて +1 から +4 まで 4 段階のスコアで表わした。

+1: 少数個の小さな紅斑または紅斑性丘疹が島状に散在して認められる状態または病変が軽快し新しい体毛が発育してきた状態。

+2: 紅斑が感染部位全面に広がり, 表皮の剝離を伴う状態。

+3: 部分的に強い発赤, 腫脹などの炎症症状がみられ, 豊富に鱗屑が生じる状態。

+4: 肥厚した痂皮の形成がみられる状態。

なお, 大部分の動物では, 病変の最盛期に入っても, 出血, びらん, 潰瘍などの症状を呈するには至らなかった。

8. 培養試験

最終治療日の 2 日後に, すべての実験動物をエーテル麻酔下で屠殺後, 各感染部位の皮膚をそのまま円形に切りとり, ほぼ均等な大きさの 10 個の小片を刻んだ。各小片を cycloheximide 500 μ g/ml, mezlocillin 50 μ g/ml, sisomicin 50 μ g/ml を含む Sabouraud glucose agar 平板上に置き, 27°C, 14 日間培養した。皮膚小片の周囲に *T. mentagrophytes* のコロニーが 1 個でも発育したものを培養陽性と判定した。培養成績は, 各実験群について培養陽性皮膚小片を 1 個以上含む感染部位の数および各群の皮膚小片総数に対する培養陽性小片数とその比率によって表わした。

9. 推計学的処理

実験ごとに得られたデータについては次の方法による推計学的解析を行ない、各実験群間の有意差を検定した。すなわち、病変のスコアについては経時的に取ったデータの t 検定ならびに WILCOXON の順位和検定を行なった。解析したすべてのデータについて両者はほぼ一致した成績を示したので、論文中には前者の成績のみを掲げた。また、培養試験の成績のうち、感染部位の陽性率については FISHER 直接確率計算法を、組織小片の陽性率については χ^2 検定法をそれぞれ用いて解析した。

II. 実験結果

1. *T. mentagrophytes* TIMM 1189 株による感染経過

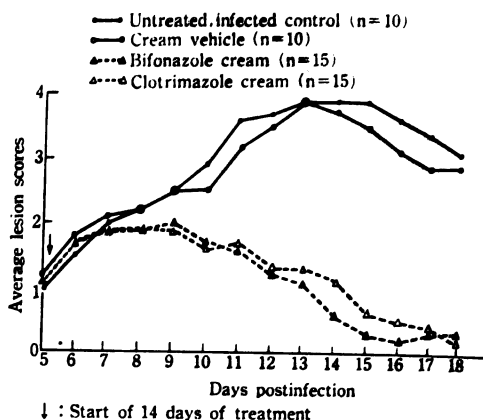
T. mentagrophytes TIMM 1189 株の分生子浮遊液を実験動物に 1 部位当り 1×10^6 分生子 (0.87×10^6 CFU) 接種した場合、典型的には各感染部位の病変は次のような経過を辿った。接種後 3~4 日目より、少数の小さな紅斑性の丘疹が生じ (スコア, +1), 5~7 日目に紅斑は次第に顕著となり、接種部位全面に広がった (スコア, +2)。接種 10 日目頃から紅斑は益々強度を増し、明らかな炎症性皮膚反応を呈するとともに、豊富な鱗屑を生じた (スコア, +3)。さらに皮膚反応は強くなり、14 日目頃には痂皮が厚く形成され、まれに出血性びらんを生じた (スコア, +4)。接種後 20 日目頃より症状は自然に軽快の方向へ進み、約 1 か月後に発赤はほぼ完全に消退し、新しい体毛が発育してきて部分的に接種部位を覆うようになった。時によってこの経過と多少異なり、スコア +1 の状態が比較的長く持続する例もみられたが、こうした場合でも遅れた経過でスコア +3, +4 の状態へ進展した。また、出血性びらんを生じない動物ほど、厚い痂皮の形成がより長期にわたって持続する傾向を示した。おそらく出血性病変は、自然治癒を促進するものと思われる。同一実験においては、動物個体間または感染部位間で病変の強さや経過に大きな差異を認めなかった。

2. 治療実験-1 病変度および培養成績を指標とするクリーム剤の薬効試験

T. mentagrophytes 接種 5 日後、すべての感染部位に明らかな紅斑性丘疹が認められた。この日から 1 日 1 回 BFZ クリーム, CTZ クリームおよびクリーム基剤の塗布を 14 日間行ない、それぞれの治療効果を比較検討した。

Fig. 2 に示される病変スコアの経時的推移から明らかに、無処置感染対照群においては、感染 7 日後には紅斑性丘疹が局所全面に広がり、次第に強度を増してゆき、10 日後には豊富な鱗屑の形成がみられた。病変は 12~16 日目にかけて最盛となり、厚い痂皮を形成する

Fig. 2 The therapeutic activities of bifonazole cream and clotrimazole cream in the topical treatment of guinea-pigs experimentally infected with *T. mentagrophytes* (average daily lesion score)—Experimental 1



という典型的な経過を示した。その後、局所症状は徐々に軽減したが、観察期間終了後の 20 日目においてもなお感染部位の一部に痂皮や鱗屑が残り、体毛の再生はほとんどみられなかった。一方、接種 5 日後からクリーム基剤を塗布した場合には、はじめ上記感染対照群におけるのと同様の経過を辿ったが、感染の進行が盛んになる 10 日後頃から、病変は抑制される傾向を示し、極期にある期間も短くなった。

BFZ クリームおよび CTZ クリーム塗布群においては、第 2 治療日までは感染対照群または基剤塗布群と同様に、病変は増強された。しかし、その後スコア +2 の状態が持続し、それ以上悪化することなく感染 10 日目 (第 6 治療日) 頃、肉眼的にも明らかな病変の改善が認められた (Fig. 2)。6, 10, 14, 18 日目 (それぞれ第 2, 6, 10, 14 治療日) に各群の平均病変スコアを t 検定した結果を Table 1 に示す。第 6 治療日以後、BFZ, CTZ 治療群ともに感染対照群および基剤塗布群のいずれと比較した場合でも、有意な病変改善効果が認められた。この間の両治療群における改善の速度は速やかであり、最終 (第 14) 治療日には、両群のすべての感染部位から症状は完全に消失した。

最終治療日の 2 日後に行なった培養試験の成績 (Table 2) に示されるように、両群とも約半数の感染局所において菌が陰性化し、有意な菌学的治療効果が認められた (Table 3)。また、局所皮膚小片総数中で培養陽性のものは 15% 程度に過ぎず、この値を感染対照群 (78%) および基剤塗布群 (66%) と比較した場合、有意

Table 1 Statistical evaluation based on the average lesion score of the therapeutic activities of bifonazole cream and clotrimazole cream—Experiment 1

On the 2nd day following start of treatment				On the 6th day following start of treatment			
			Infected control				Infected control
		Cream vehicle	*			Cream vehicle	*
	Bifonazole cream	*	*		Bifonazole cream	$P < 0.01$	$P < 0.001$
Clotrimazole cream	*	*	*	Clotrimazole cream	*	$P < 0.001$	$P < 0.001$

On the 10th day following start of treatment				On the 14th day following start of treatment			
			Infected control				Infected control
		Cream vehicle	*			Cream vehicle	$P < 0.05$
	Bifonazole cream	$P < 0.001$	$P < 0.001$		Bifonazole cream	$P < 0.001$	$P < 0.001$
Clotrimazole cream	*	$P < 0.001$	$P < 0.001$	Clotrimazole cream	*	$P < 0.001$	$P < 0.001$

Statistical significance was evaluated according to the t-test.

* : Not significant ($P > 0.05$)

Table 2 The therapeutic activities of bifonazole cream and clotrimazole cream in the topical treatment of guinea-pigs experimentally infected with *T. mentagrophytes* (culture studies)—Experiment 1

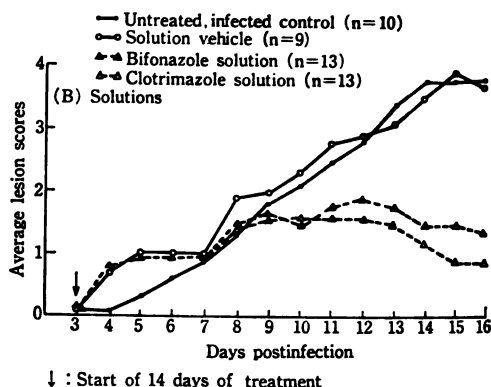
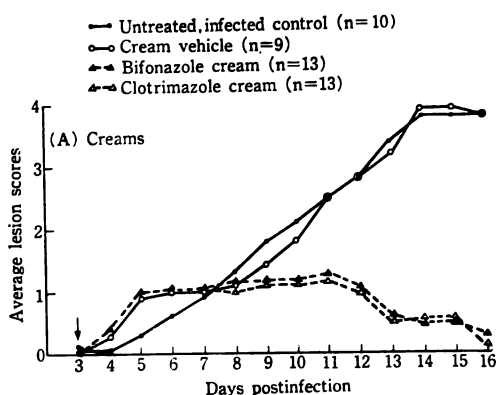
Treatment with	Total number of infected loci on the skin	Infected loci with positive cultures	No. of skin blocks with positive cultures/total No. of skin blocks from infected locus (%)
None	10	10	78/100 (78.0)
Cream vehicle	10	9	66/100 (66.0)
Bifonazole cream	15	8	27/150 (18.0)
Clotrimazole cream	15	6	22/150 (14.6)

Table 3 Statistical evaluation based on the culture studies data of the therapeutic activities of bifonazole cream and clotrimazole cream—Experiment 1

(A) On the level of infected locus on the skin				(B) On the level of skin block			
			Infected control				Infected control
		Cream vehicle	*			Cream vehicle	*
	Bifonazole cream	*	P<0.05		Bifonazole cream	P<0.001	P<0.001
Clotrimazole cream	*	P<0.05	P<0.01	Clotrimazole cream	*	P<0.001	P<0.001

Statistical significance was evaluated according to the FISHER's exact test in (A) and the χ^2 -test in (B).

* : Not significant ($P>0.05$)

Fig. 3 The therapeutic activities of bifonazole and clotrimazole preparation in the topical treatment of guinea-pigs experimentally infected with *T. mentagrophytes* (average daily lesion score)—Experimental 2

な感染局所組織内の生菌数減少が示された (Table 2, 3)。基剤塗布群においても第 14 治療日以後では、感染対照群に比べて有意な病変改善が認められ (Table 1), これは培養試験からも確かめられた (Table 2)。また, BFZ クリームと CTZ クリームの間で病変スコアおよび培養陽性率のいずれの指標を用いて比較しても、有意な薬効の差は認められなかった (Table 1, 3)。

3. 治療実験-2 病変度を指標とするクリーム剤および液剤の薬効試験

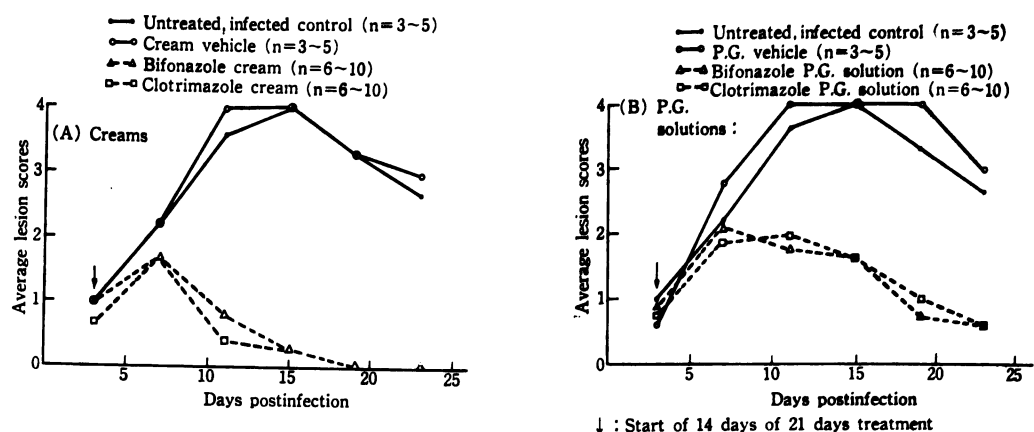
この実験では BFZ および CTZ のクリーム剤ならびに液剤を用い、さらに治療開始を感染 3 日後に早めて、それぞれの治療効果 (病変度のみを指標) を検討した。各実験群の病変スコアの経日的推移を Fig. 3 に、また幾つかの時点での推計学的解析の結果を Table 4 にそれぞれ示す。

Fig. 3 から明らかなように、感染対照群の局所病変は、実験-1 におけるよりもゆるやかに進行した。接種後 13 日目に至ってようやくスコア +4 に到達したが、実

Table 4 Statistical evaluation based on the average lesion score of the therapeutic activities of creams (A) and solutions (B) of bifonazole and clotrimazole—Experiment 2

A. On the 5th day following start of treatment	Infected control	*	*	*
			*	*
	Cream vehicle			
		Bifonazole cream		
			Clotrimazole cream	

Fig. 4 The therapeutic activities of bifonazole and clotrimazole preparation in the topical treatment of guinea-pigs experimentally infected with *T. mentagrophytes* (average daily lesion score)—Experimental 3



験終了時（接種後 16 日目においてもなお重度の病変を呈し、すべての感染部位に厚い痂皮の形成がみられた。クリーム基剤塗布群における病変の経過はこれとほぼ同様であったが、治療初期特に第 2～4 治療日に基剤の刺激作用によると思われる皮膚局所の発赤がみられる点で異なっていた。同様の皮膚反応は BFZ クリーム、CTZ クリーム各治療群においても観察された。

各薬剤クリームで治療した感染部位では、部分的な紅斑がみられる状態が感染後 11 日目（第 9 治療日）まで続き、その後症状は徐々に消失した。いずれの薬剤治療群も 12 日目（第 10 治療日）より感染対照群、基剤塗布群の双方に比べて有意な病変スコアの改善を示した（Table 4）。

他方、液剤を用いた治療の場合にも、クリーム剤におけるのと同様、基剤による刺激作用が治療初期に観察された（Fig. 3）。BFZ、CTZ 両薬剤の液剤による局所病変の改善効果は、クリーム剤の場合に比べて、ゆるやかに発現された。しかし推計学的解析の結果、この効果は感染後 12 日目（第 10 治療日）、16 日目（最終治療日）ともに、感染対照および基剤単独のそれぞれに対し有意差をもつことが知られた（Table 4）。

4. 治療実験-3 病変度および培養成績を指標とするクリーム剤、液剤および P.G. 剤の薬効試験

この実験では、BFZ、CTZ それぞれの 3 種の製剤すなわちクリーム剤、液剤および P.G. 液剤について治療効果を検討した。いずれの場合も感染後 3 日目より治療を開始し、一部の動物は 2 週間、残りの動物については 3 週間にわたり連日 1 日 2 回の塗布を行なった。Fig. 4 に病変スコアを指標とする各実験群の症状の経過を示す。

感染対照群にみられる病変度の推移は実験-1 のそれに近似しているが、より長期にわたって観察が続けられている。

クリーム剤による治療を行なった場合には、BFZ、CTZ 群とも感染 7 日目（第 5 治療日）を境に病変は軽減へ向った（Fig. 4）。感染 15 日目（第 13 治療日）には、感染対照群および基剤塗布群の感染部位はすべてスコア +4 の強い病変を示したが、BFZ および CTZ 治療群においては約 70% の部位でまったく症状が消失した。液剤のかたちで適用した場合にも、BFZ、CTZ はいずれも対応するクリーム剤にほぼ匹敵する症状改善を示した。病変スコアの有意差検定を行なった結果、両薬剤治療群とも感染対照群および基剤塗布群に対し、クリーム剤の場合には第 9 治療日から、液剤の場合には第 5 治療日から明らかな有効性が認められた（Table 5）。

クリーム剤または液剤による 14 日間治療後に培養試験を行なった結果、Table 6 に示されるように、感染局所レベルでは BFZ クリーム、液治療群とも菌が完全に消失した例はみられなかったのに対し、CTZ 治療の場合には約半数の感染部位が培養陰性化した。しかし、例数が少ないため有意差は得られなかった。一方、皮膚組織小片レベルで培養成績を比較検討した結果、BFZ クリームまたは液治療群では培養陽性率はいずれも 20%、CTZ クリーム、液治療群ではそれぞれ 10%、15% の値を示し（Table 6）、85～100% の高い培養陽性率が得られた感染対照、基剤塗布群のいずれに対しても有意差を認めた（Table 7）。これに対し、BFZ と CTZ との間ではクリーム剤、液剤とも有意な治療効果の差異は認められなかった。

Table 5. Statistical evaluation based on the average lesion score of the therapeutic of creams (A), solutions (B) and P.G. solutions (C) of bifonazole and clotrimazole—Experiment 3

A. On the 5th day following start of treatment			On the 9th day following start of treatment			On the 13th day following start of treatment			On the 17th day following start of treatment		
Infected control	Cream vehicle	*	Infected control	Cream vehicle	*	Infected control	Cream vehicle	*	Infected control	Cream vehicle	*
	Bifonazole cream	*		Bifonazole cream	$P < 0.001$		Bifonazole cream	$P < 0.001$		Bifonazole cream	$P < 0.01$
	Clotrimazole cream	*		Clotrimazole cream	$P < 0.001$		Clotrimazole cream	$P < 0.001$		Clotrimazole cream	$P < 0.01$
B. On the 5th day following start of treatment			On the 9th day following start of treatment			On the 13th day following start of treatment			On the 17th day following start of treatment		
Infected control	Solution vehicle	*	Infected control	Solution vehicle	*	Infected control	Solution vehicle	*	Infected control	Solution vehicle	*
	Bifonazole solution	$P < 0.05$		Bifonazole solution	$P < 0.001$		Bifonazole solution	$P < 0.001$		Bifonazole solution	$P < 0.05$
	Clotrimazole solution	$P < 0.05$		Clotrimazole solution	$P < 0.001$		Clotrimazole solution	$P < 0.001$		Clotrimazole solution	$P < 0.05$
C. On the 5th day following start of treatment			On the 9th day following start of treatment			On the 13th day following start of treatment			On the 17th day following start of treatment		
Infected control	P.G. vehicle	*	Infected control	P.G. vehicle	*	Infected control	P.G. vehicle	*	Infected control	P.G. vehicle	*
	Bifonazole P.G.	*		Bifonazole P.G.	$P < 0.01$		Bifonazole P.G.	$P < 0.001$		Bifonazole P.G.	$P < 0.01$
	Clotrimazole P.G.	$P < 0.05$		Clotrimazole P.G.	$P < 0.01$		Clotrimazole P.G.	$P < 0.001$		Clotrimazole P.G.	$P < 0.01$

Statistical significance was evaluated according to the t test.

* : Not significant ($P > 0.05$)

Table 6 The therapeutic activities of creams, solutions and P.G. solutions of bifonazole and clotrimazole in the topical treatment of guinea-pigs experimentally infected with *T. mentagrophytes* (culture studies)—Experiment 3

Treatment with	Duration of treatment (days)	Total number of infected loci on the skin	Infected loci with positive cultures	No. of skin blocks with positive cultures/total No. of skin blocks from infected locus (%)
None	—	2	2	20/20 (100.0)
Cream vehicle	14	2	2	20/20 (100.0)
Bifonazole cream	14	4	4	8/40 (20.0)
Clotrimazole cream	14	4	2	4/40 (10.0)
Solution vehicle	14	2	2	17/20 (85.0)
Bifonazole solution	14	4	4	8/40 (20.0)
Clotrimazole solution	14	4	3	6/40 (15.0)
P.G. vehicle	14	2	2	20/20 (100.0)
Bifonazole P.G.	14	4	4	21/40 (52.5)
Clotrimazole P.G.	14	4	4	16/40 (40.0)
None	—	3	3	25/30 (83.3)
Cream vehicle	21	3	3	20/30 (66.6)
Bifonazole cream	21	6	1	1/60 (1.6)
Clotrimazole cream	21	6	1	1/60 (1.6)
Solution vehicle	21	3	3	16/30 (53.3)
Bifonazole solution	21	6	3	9/60 (15.0)
Clotrimazole solution	21	6	2	3/60 (5.0)
P.G. vehicle	21	3	3	21/30 (70.0)
Bifonazole P.G.	21	6	3	9/60 (15.0)
Clotrimazole P.G.	21	6	2	7/60 (11.6)

さらに治療を1週間延長して21日間行なった場合には、両薬剤ともより良好な治療効果を示した。BFZ, CTZ 各クリーム治療群においては、すべての感染部位から症状は完全に消失した (Fig. 4)。培養試験もこれに対応する成績を示し、両薬剤治療群とも5/6の感染部位で完全な菌の消失が認められ、組織小片レベルでの培養陽性率ともに1.5%に過ぎず、ほぼ完全な治癒が得られたことが示唆された。BFZ および CTZ 各液剤の治療効果は、対応するクリーム剤の効果に比べていずれも若干劣るようであった (Table 6)。しかし、クリーム剤と同様、液剤においても両薬剤の治療効果は感染対照、基剤単独のいずれに対しても有意なレベルであったのに対し、両薬剤間では有意差を認めなかった (Table 7)。

Fig. 4 に示されるように、BFZ, CTZ の P.G. 剤による病変改善効果は、対応するクリーム剤および液剤に比べて緩慢に発現し、14日間治療よりも21日間治療で明らかに優れた治療効果を示し、この効果はいずれの場合も推計学的に有意であった (Table 5)。培養試験においてもこれに対応する菌陰性化率が認められた (Table 6, 7)。

III. 考 察

抗菌物質の *in vivo* 活性を正當に評価するためには、適切につくられた感染動物モデルを使用することが先決である。従来より局所的抗真菌剤の治療実験にはほとんどすべての場合、モルモットにおける *T. mentagrophytes* 実験的皮膚感染症が賞用されてきた。しかし、これまで報告された実験的 *T. mentagrophytes* 感染症の多くは、通常のヒト白癬と比べて、出血、びらん、潰瘍などにいたる一過性の激しい局所症状を呈する反面、比較的短い期間で自然治癒に向かうために、白癬の病態モデルとしてもまた治療実験の目的からも必ずしも満足すべきものとは言い難かった。われわれは、今回の治療実験を実施するのに先立って、できるだけ適切な感染動物モデルの作製を企図し、ヒトまたは動物由来の種々の *T. mentagrophytes* 菌株を用いて感染実験を行ない、比較検討した。その結果、ハムスター病巣から分離された TIMM 1189 株がヒトや動物の白癬に最もよく対応する局所病変をつくり、しかも感染が比較的長い期間持続することが判明したので、これを治療実験系として選んだ。

この菌株が白癬の優れた病態モデルをつくることは高橋ら¹⁴⁾も確認している。従来より MTU 12031 の菌株名

で江川ら¹⁵⁾、山崎ら¹⁶⁾および岩田ら¹⁷⁾によって治療実験用の動物感染モデルの作製に使用されてきた菌株も TIMM 1189 株と同一由来をもつ保存株である。しかし、これらの各研究者は、MTU 12031 株による感染が局所の出血、びらんなどの激しい症状をひき起こすことを報告している。この起病力の相違は、分離以来長年にわたって異なった条件下で継代保存され、したがって異なる選択圧を受けてきたことによって両株間に生じた生理学的性状の相違に基づくものと推察され、現在その比較検討を行なっている。さらに、TIMM 1189 株が比較的穏和な病変をつくることを考慮し、従来の多くの研究者が基準とした病変度スコアを改変したものを設定して使用した。

BFZ の剤形、投与開始時期、投与期間などの条件を変えて 3 回の治療実験を行なったが、無処置感染対照群にみられる感染部位の病変度の推移が実験毎に多少異なるため、全実験成績を一率に比較することには問題がある。しかし、感染局所病変度および局所組織培養成績のいずれを指標とした場合でも、すべての実験成績は BFZ 1% クリーム、1% 液および 1% P.G. 液の 1 日量 0.3g の連続 14 日または 21 日の局所投与がモルモットの実験的 *T. mentagrophytes* 感染症に対して有意な治療効果をもつことを示している。同様の感染動物モデルを使用して、PLEMPEL *et al.*^{3,4)} は 0.05~1% BFZ クリーム剤および液剤の 1 日量 0.5g の 1~3 日間投与により、また SHADOMY *et al.*²⁾ は 0.1% および 1% クリーム剤および液剤の 1 日 0.1g、5 日間連続投与により、いずれも有効性を示唆する予備の実験成績を報告している。より詳細な *in vivo* 効果を検討したわれわれの成績は、彼らの結論を明確に裏付けるものである。

SHADOMY *et al.*²⁾ はまた、BFZ 1% クリーム剤に比べて 1% 液剤の局所症状改善効果が劣ることを指摘した。まったく同じ製剤を使用したわれわれの実験成績からは治療効果の点で目立った差異は認められず、おそらくこれは 1 日当りの用量が多い上に 2 回に分けて投与したこと、治療期間が長かったことなどの理由で、液剤についても十分な効果が発揮されたためと考えられる。液剤の局所適用にあたっては、1 回に塗布する量が制限されるため、1 日用量が大きい場合には分割して投与する必要がある、しかもそうした投与方法自体が治療効果を高める上で有効に働く可能性が推察される。

実験的白癬動物において抗真菌薬法の開始時期が早いほど治療効果が速やかに発現されるという成績が、siccanin¹⁸⁾、Hoe 296 (ciclopiroxolamine)¹⁹⁾ に加えてイミダゾール系抗真菌剤 miconazole²⁰⁾ についても報告されている。しかし、今回の BFZ による治療実験に関し

ては、治療開始が感染後 5 日目と 3 日目との間に特に相違はみられず、有意な局所病変改善効果が観察されたのは、治療開始から 5~10 日後であった。しかし、感染初期には基剤の刺激作用による局所症状の増強がみられることが多く、これが病変スコアを押し上げる結果となる。したがって、実際の BFZ の治療効果は、より早期に発現している可能性がある。

一方、実験-3 の成績から明かなように、治療期間が長くなれば、治療効果はそれだけ増す。したがって、BFZ の効果を十分に発揮させるためには、14 日間以上の治療期間が必要と考えられる。このことは、また感染がそれ以上長期間にわたって持続するような動物モデル使用の必要性をあらためて強調するものである。

今回の *in vivo* 試験に使用した TIMM 1189 株について *in vitro* 感受性試験を行なった成績では、BFZ の MIC は CTZ に比べて 4 倍程度高かった。しかしながら、治療実験の成績は、両剤間で治療効果に有意差は認められず、全体的な評価としては BFZ は CTZ とほぼ同等の薬効をもつと判断される。したがって、PLEMPEL *et al.*^{3,4)} が指摘しているように、BFZ は、CTZ その他のイミダゾールと比較して *in vitro* 抗菌活性が低いわりには *in vivo* 活性の高い誘導体と見なすことができる。*T. mentagrophytes* をはじめ主要な皮膚糸状菌菌種ならびに広範囲の病原真菌を含む多数の菌株に対する BFZ の *in vitro* 抗菌活性を測定した結果、大部分の菌株に対する MIC 値は 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下であり²¹⁾、TIMM 1189 株と同程度かまたはそれより高い感受性をもつことが推察される。加えて、BFZ は MIC 値の 1/100 の濃度でも *T. mentagrophytes* の発育を有意に阻止することを証する電子顕微鏡学的成績が得られている²¹⁾。PLEMPEL *et al.*⁴⁾ が 0.05% という低濃度のクリーム剤または液剤で治療効果を認めることができたのも、BFZ 極低濃度での抗菌活性に由来するのかもしれない。

今回の *in vivo* 実験成績に加えて、従来の *in vitro* 実験成績ならびに薬理学的実験成績を考慮するならば、BFZ は皮膚糸状菌症のみならず他の表在性真菌症に対しても有用な局所的抗真菌剤として期待される。

Bifonazole ならびに clotrimazole の各種製剤および基剤を提供して頂いたバイエル薬品株式会社に感謝いたします。

文 献

- 1) SHADOMY, S.; D. M. DIXON & R. MAY: A comparison of bifonazole (Bay h 4502) with clotrimazole *in vitro*. Sabouraudia. 20: 313~323, 1982
- 2) SHADOMY, S.; D. M. DIXON, R. MAY & B. L. SHADOMY: *In-vitro* and *in-vivo* activity of

- bifonazole. In Proceedings for International Antifungal Symposium: Bifonazole (URABE, H., ZAIAS, N. and STETTENDORF, S. ed.), Excerpta Medica, pp.18~28, 1982
- 3) PLEMPER, M. & E. REGEL.: Antimycotic properties of the topical azole bifonazole *in vitro* and *in vivo*. In Proceedings for International Antifungal Symposium: Bifonazole (URABE, H., ZAIAS, N. and STETTENDORF, S. ed.), Excerpta Medica, pp.29~36, 1982
- 4) PLEMPER, M.; E. REGEL & K. H. BÜCHEL: Antimycotic efficacy of Bifonazole *in vitro* and *in vivo*. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 33 (I): 517~524, 1983
- 5) IWATA, K. & Y. YAMAMOTO: *In-vitro* antifungal activity of bifonazole: a preliminary report. In Proceedings for International Antifungal Symposium: Bifonazole (URABE, H., ZAIAS, N. and STETTENDORF, S. ed.), Excerpta Medica, pp.2~17, 1982
- 6) YAMAGUCHI, H.; T. HIRATANI & M. PLEMPER: *In vitro* studies of a new imidazole antimycotic, bifonazole, in comparison with clotrimazole and miconazole. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 33 (I): 546~551, 1983
- 7) SCHLÜTTER, G.: The toxicology of bifonazole. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 33 (I): 739~745, 1983
- 8) PATZSCHKE, K.; W. RITTER, H. M. SIEFERT, H. WEBER & L. A. WEGNER: Pharmacokinetic studies following systemic and topical administration of [^{14}C] bifonazole in man. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 33(I): 745~750, 1983
- 9) STETTENDORF, S.: Tolerability and efficacy of bifonazole in dermatomycoses. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 33 (I): 750~754, 1983
- 10) SAKAI, S.; T. KADA, G. SAITO, N. MURAOKA & Y. TAKAHASHI: Studies on chemotherapy of *Trichophyton* infections. 1. Antifungal properties of halogen phenol esters. *J. Sci. Res. Inst.* 46: 113~117, 1952
- 11) NOGUCHI, T.; A. KAJI, Y. IGARASHI, A. SHIGEMATSU & K. TANIGUCHI: Antitrichophyton activity of naphthiomates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1962: 259~267, 1963
- 12) WEINSTEIN, M. J.; E. M. ODEN & E. MOSS.: Antifungal properties of tolnaftate *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1964: 595~601, 1965
- 13) GORDEE, R. S. & T. R. MATTHEWS.: Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of pyrrolnitrin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1967: 378~387, 1968
- 14) 高橋 久: *In vivo* 系による外用抗真菌剤評価法の研究. *真菌誌* 24: 230~233, 1983
- 15) 江川朝生, 岩田和夫: モルモットの実験的白癬に対する Miconazole の治療効果. *真菌誌* 20: 10~19, 1979
- 16) 山崎良治, 内田勝久, 岩田和夫: Econazole の抗真菌活性に関する研究 第3報 実験的白癬菌感染に対する治療効果. *真菌誌* 19: 332~343, 1978
- 17) 岩田和夫, 内田勝久: Isoconazole の抗真菌作用に関する研究 第3報 実験的真菌感染に対する治療効果. *Chemotherapy* 30: 1216~1221, 1982
- 18) SUGAWARA, S.: Siccamin, a new antifungal antibiotic. II. *In vivo* studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1969: 253~256, 1970
- 19) 桜井京子, 坂口 孝, 山口英世, 岩田和夫: 新合成抗真菌剤 Hoe 296 の抗菌作用 第1報 試験管内抗菌作用と実験的白癬菌感染に対する治療効果. *真菌誌* 16: 35~40, 1975
- 20) VAN CUTSEM, J. M. & D. THIENPONT: Miconazole, a broadspectrum antimycotic agent with antibacterial activity. *Chemotherapy (Basel)* 17: 392~404, 1972
- 21) OSUMI, M.; N. YAMADA, J. OKADA, H. YAMAGUCHI, T. HIRATANI, & M. PLEMPER: The effect of bifonazole on the structure of *Trichophyton*. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 33 (II): 1484~1491, 1983

THERAPEUTIC EFFECT OF BIFONAZOLE, A TOPICAL IMIDAZOLE ANTIMYCOTIC AGENT, ON EXPERIMENTAL *TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES* INFECTION

KATSURISA UCHIDA, SATORU YAMASHITA and HIDEYO YAMAGUCHI

Research Center for Medical Mycology, Teikyo University,
School of Medicine, Tokyo, Japan

To investigate the *in vivo* antimycotic activity of bifonazole (BFZ), a new imidazole antimycotic agent, the therapeutic effectiveness of the drug in the topical treatment of experimental *T. mentagrophytes* infection in guinea-pigs was compared with that of clotrimazole (CTZ), a reference drug.

(1) 1% cream, 1% solution or 1% polyethylene glycol solution of BFZ was applied topically at a dose of 0.3 g/day for 14 or 21 consecutive days, starting on the 3rd or 5th day after infection. The treatment resulted in a significant improvement in symptoms and a complete heal as early as 6 to 10 days after initiation of application. After completion of the treatment course, local skin cultures revealed either an elimination of the fungus or a significant decrease in the fungal count.

(2) The therapeutic effectiveness of BFZ in the 21-day treatment course was superior to that in the 14-day course, irrespective of the type of drug preparation used.

(3) Comparison of each BFZ preparation with the corresponding CTZ preparation showed no significant difference in efficacy between the two drugs.