

Tioconazole の *in vitro* ならびに *in vivo* 抗菌活性の特徴

山口英世・平谷民雄・永田淳子・内田勝久

帝京大学医学部医真菌研究センター

(昭和 60 年 9 月 18 日受付)

新規イミダゾール系抗真菌剤 tioconazole (TCZ) の外用剤は白癬その他の表在性皮膚真菌症に対して優れた治療効果を発揮することが知られている。この理由を説明するために、本剤の *in vitro* 抗菌活性、特に殺菌の効果ならびにモルモットの白癬モデルにおけるクリーム剤の治療効果について miconazole nitrate (MCZ) および clotrimazole (CTZ) と比較検討を行ない、以下の成績を得た。

(1) *Candida albicans* 2 株の増殖期培養に添加した場合、TCZ は 20 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で強力な殺菌効果を示し、その程度および発現の迅速さのいずれの点でも、MCZ および CTZ の効果を上回っていた。*Trichophyton mentagrophytes* 2 株の分生子に対しては発芽およびそれに続く菌糸発育を起こさない条件下で、TCZ は *C. albicans* における場合よりも低濃度で有意な殺菌的效果を示した。本菌においても TCZ は MCZ および CTZ に勝る強力な殺菌的效果を発現した。このような TCZ の *in vitro* 抗菌活性および殺菌的效果は、MCZ と比べて培地 pH による影響が軽微であった。

(2) モルモットの白癬モデルにおいて TCZ のクリーム剤は、局所病変度、培養陽性率、およびキチン含量のいずれを指標として判定した場合にも、明らかな治療効果を示した。この効果は TCZ 0.2% クリーム剤よりも 1% クリーム剤が有意に勝っていた。また TCZ 1% クリーム剤を同一基剤を用いて調製した MCZ および CTZ の対応する濃度のクリーム剤と比較すると、最終的な治療効果の点では 3 剤間で有意差は認められなかったが、治療効果が発現する迅速さの点では TCZ が最も優れていた。

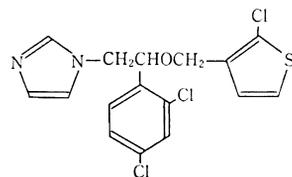
Tioconazole (TCZ) は、ファイザー社英国サンドイッチ研究所において開発された新しいイミダゾール系化合物であり、1-[2,4-dichloro- β [(2-chloro-3-thienyl)oxy]phenethyl]imidazole の化学式をもつ (Fig. 1)。TCZ の抗菌活性は顕著であり、ほとんどすべての病原真菌の試験管内発育を阻止するのみならず、動物モデルにおいて強力な抗白癬作用を示す¹⁻⁵⁾。加えて皮膚刺激性や毒性は、動物が局所適用に充分耐えられる程度に低い⁶⁻⁸⁾。

実際に、TCZ の 1% クリーム、その他の外用製剤が白癬、皮膚カンジタ症および癬風といった主要皮膚真菌症のあらゆる病型に対して著効を有することを証明する臨床的成績が多数得られ^{6,9-12)}、わが国でも最近上市されてこれらの疾患の治療に賞用されつつある。

TCZ の抗菌スペクトルならびに種々の真菌に対する発育阻止効果は他のイミダゾール剤と類似するが、本剤の高濃度存在下では高度な殺菌的作用が極めて迅速に発現することが異なる研究グループによって報告されてい

る^{6,13,14)}。本研究は、TCZ の抗真菌作用の基礎的評価という観点に立って、TCZ が他のイミダゾール剤をしのぐ殺菌的效果を有するという従来の報告を確認するとともに、その強力な *in vitro* 殺菌的效果が動物モデルにおける治療効果にどのように反映されるのかを究明することを目的として企図された。実験にはすでに実用化されているイミダゾール剤として clotrimazole (CTZ) および miconazole nitrate (MCZ) を対照薬剤として選り、TCZ とこれらの 2 剤との間で *in vitro* ならびに *in vivo* 抗菌活性を比較検討した。

Fig. 1 Chemical structure of tioconazole



I. 材料と方法

1. *in vitro* 実験

(1) 薬剤: TCZ (台糖ファイザー株式会社より分与), CTZ (バイエル薬品株式会社より分与) および MCZ (持田製薬株式会社より分与) の各精製原末標品を試験薬剤として使用した。いずれも 100% ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し, 8 mg/ml 濃度に調整したものを原液とし, これを -20°C に保存した。

(2) 試験菌株: 酵母状真菌 *Candida albicans* 2株 (TIMM 0144, TIMM 0163) および皮膚糸状菌 *Trichophyton mentagrophytes* 2株 (TIMM 1177, TIMM 1189) 計 4 株を使用した。 *T. mentagrophytes* TIMM 1189 のみはハムスター由来株であるが, 他の 3 株は患者材料からの分離株である。

(3) 抗菌活性の測定: *C. albicans* を試験菌とする場合には, これを Sabouraud dextrose broth (SDB) に接種し 37°C で一夜振盪培養を行ない, これを新鮮 SDB (pH 6.1~6.2 無修正) で希釈し, 当 5×10^5 細胞/ml の菌液を作製した。この菌液を 10 ml ずつ分注した L 型試験管に最終濃度 0.63~80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう薬剤溶液を添加し, 37°C で再び培養を行なった。培養開始後 1, 3, 6 および 24 時間目に各試験管から試料を採取し, 含まれる生菌数 (CFU) を常法に従って Sabouraud dextrose agar (SDA) 平板上で測定した¹⁵⁾。

T. mentagrophytes の場合には, 分生子を豊富に形成した 20~30 日培養の 1/10 SDA 斜面培地表面を 3~5 ml の 0.1% (w/v) Tween 80 添加滅菌生理食塩水で覆い, 試験管を手で激しく振動して分生子を生理食塩水中へ遊離させた。これを滅菌ピペットによって回収した後, 2 枚重ねの滅菌ガーゼを通して濾過し, 菌糸や寒天小片を除去した。得られた濾過液を SDB または生理食塩水で希釈して分生子濃度が 5×10^5 細胞/ml となるように調整した。これを試験菌液とし, *C. albicans* の場合と同様に L 型試験管に分注, 薬剤添加後, 30°C で振盪した。なお, 抗菌活性に及ぼす培地 pH の影響を検討する場合には, pH 無修正の SDB に代えて, 予め 1N-HCl または 1N-NaOH により初発 pH を所定の値すなわち 5.0, 7.0 または 8.0 に調整した SDB を試験培地として使用した。

2. *in vivo* 実験

(1) 動物: Hartley 系モルモット (雄性, 体重 450~600 g) を実験動物として使用した。購入後数週間予備飼育を行ない, 実験開始後は個別飼いとし, 固型試料および水の自由摂取の条件下で飼育した。

(2) 感染法: *in vitro* 実験に使用した *T. mentagrophytes* TIMM 1189 株の分生子生理食塩水浮遊液を同様

の方法で調整し, 動物接種に用いた。動物背部の毛を電気バリカンで短く刈り取り, 適当な間隔部位に設定した 4 か所のそれぞれに約 2 cm 角片のガムテープを貼りつけては勢いよくはがすという操作を 3~4 回繰り返した。この操作によって局所部位全面が抜毛されると同時に表皮角質層上部が剥離される。毛が残存する場合には, さらに毛抜きを用いて完全に抜去した。この処理を終えた各局所部位に約 2×10^7 細胞/ml の濃度の摂取菌液 0.05 ml (細胞数約 10^6 個) を滴下し, 滅菌へらを用いて皮膚へ擦り込むように接種した。

(3) 治療用薬剤: 市販の TCZ クリームと同一基剤を用いて調整した TCZ, CTZ および MCZ の各 0.2% および 1% クリーム製剤ならびに単独基剤を使用した。

(4) 治療実施法: 感染局所部位に軽度の病変(発赤)が現われ始める時期である感染後 3 日目に治療を開始した。各クリーム剤または基剤を 1 日 1 回 (毎朝), 300 mg 用量を滅菌へらにより局所全面に塗り広げた。この治療を 14 日間連日行なった。

(5) 薬効判定法: 次の 3 つの指標を用いて薬剤の治療効果を判定した。

1) 病変スコア: 感染局所の病変度を接種翌日から実験終了日まで連日, 薬剤塗布前に肉眼的観察を行なった。病変度は, 前報¹⁶⁻¹⁸⁾に述べたのと同じ基準によるスコア方式に従って記載した。すなわち, 局所病変がまったくみられない状態を 0 とし, 明らかな病変をみとめる場合には, その程度に応じて下記のように +1 から +4 まで 4 段階のスコアで表わした。

+1: 少数個の小紅斑または紅斑性小丘疹が島状に点在する状態, または病変が改善に向かって新しい体毛の発育がみられる状態。

+2: 紅斑性病変が局所全面に広がり, 表皮剥離を伴っている状態。

+3: 局所の少なくとも一部に強い発赤, 腫脹などの炎症症状がみられ, 豊富な鱗屑形成を伴う状態。

+4: 肥厚した痂皮によって局所全面が覆われている状態。

2) 皮膚片内キチン含有量: LEHMAN & WHITE¹⁹⁾ がマウス腎内の *Aspergillus fumigatus* 菌糸量を測定するために考案した方法を皮膚組織内の皮膚糸状菌の量を測定するのに適したように改変した²⁰⁾。その実施法の詳細を Table 1 に示す。各実験群の動物を, 感染後経時的にエーテル麻酔下で屠殺し, 局所全体の皮膚組織を円形に切り取った。この円形皮膚片を均等に二分し, 一方を上記の方法に従ってキチン含量測定に付した。

3) 皮膚片培養試験: 残りのもう一つの皮膚片をほぼ同じ大きさの 10 個の小片に分割し, 各小片を cyclo-

Table 1 Assay procedures for chitin content in murine dermal tissues infected with *T. mentagrophytes*

Dermal tissues from infected sites (10×10 mm)	
Cut into 2×2 mm-sized blocks and suspend in	saline (10 ml)
Homogenate in a Ultradisperser (Janke & Kunkel, LK-12) for 30 sec., repeating 3 times	
Centrifuge (1,500×g, 5 min)	
Pellet	
Add 4 ml of 3% (w/v) sodium lauryl sulfate and heat	(100°C, 15 min)
Centrifuge (1,500×g, 5 min)	
Pellet	
Wash once with aq. dist.	
Add 3 ml of 12% (w/v) KOH and heat (130°C, 60 min)	
Cool, add 8 ml of 75% (v/v) ice-cold ethanol and keep	in an ice-bath (15 min)
Add 0.3 ml of 10% Celite 545	
Centrifuge (1,500×g, 5 min)	
Pellet	
Wash once with ice-cold 40% (v/v) ethanol and then twice with ice-cold aq. dist.	
CHITOSAN	
Suspend in 0.4 ml of aq. dist., add 0.5 ml of NaNO ₂ (5%, w/v) and 0.5 ml of KHSO ₅ (5%, w/v), and gently mix three times during 15 min	
Centrifuge (1,500×g, 15 min)	
Supernatant	
Take 1.2 ml, add 0.4 ml of 12.5% (w/v) ammonium sulfonate and mix vigorously for 5 min	
Add 0.4 ml of freshly prepared 3-methylbenzo-2-thiazolone hydrazone HCl monohydrate (50 mg/10 ml) and heat (100°C, 3 min)	
Cool, add 0.4 ml of 0.83% (w/v) FeCl ₃ ·6H ₂ O and keep at room temp. (25 min)	
Measure OD 650 nm (for determination of glucosamine)	

heximide 500 µg/ml, mezlocillin 50 µg/ml および sisomicin 50 µg/ml 含有 SDA 平板上に置き, 30°C で培養した。14 日後, 皮膚小片から, *T. mentagrophytes* 特有のコロニーが 1 個でも発育してきた場合には, 培養陽性と判定した。培養陽性率は, 皮膚小片総数に対する培養陽性皮膚小片数の百分率で表わした。

(6) データの推計学的処理: 培養試験の成績については, χ^2 検定法を用いて実験群間の有意差を検定した。

II. 成績

1. *In vitro* 抗菌活性

Fig. 2 は, *C. albicans* の増殖期培養に TCZ ならびに对照薬剤 MCZ または CTZ を種々の濃度で添加した場合の生菌数の時間的推移を示す。各種イミダゾール剤に対して平均的感受性をもつ *C. albicans* 株である TIMM 0163 の培養に対して TCZ は使用薬剤濃度の下限 0.63 µg/ml という低濃度でも培養 6 時間後には発育を有意に阻止し, 5~10 µg/ml の濃度ではほぼ完全な発育阻止効果を示した。同様の発育阻止効果は MCZ および CTZ にも認められたが, 重量濃度で比較した場合には, 3 剤のなかで CTZ の効果が最も強力であった。

TCZ は 20 µg/ml の濃度では明らかな殺菌の効果を示し, 生菌数の低下は薬剤添加直後から徐々に起こり, 6 時間後には 0 時間 (接種時) の 1/10 程度に, また 24 時間後にはその 1/100 程度にまで低下した。TCZ 40 および 80 µg/ml の高濃度下においては, 薬剤添加後 1 時間以内に生菌数は 0 時間の 1/10,000 以下に急激に低下し, 極めて強力, かつ迅速な殺菌の効果を発揮することが知られた。これに対して, MCZ は, 20 µg/ml の濃度では

Fig. 2(a) Time-course of viable counts in growing cultures of *C. albicans* TIMM 0163 after exposure to various concentrations of tioconazole, miconazole nitrate and clotrimazole

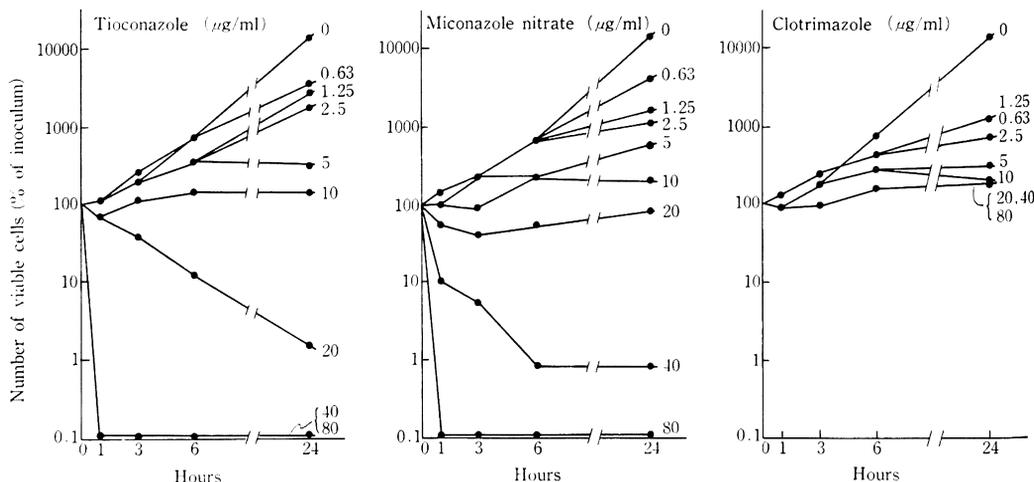
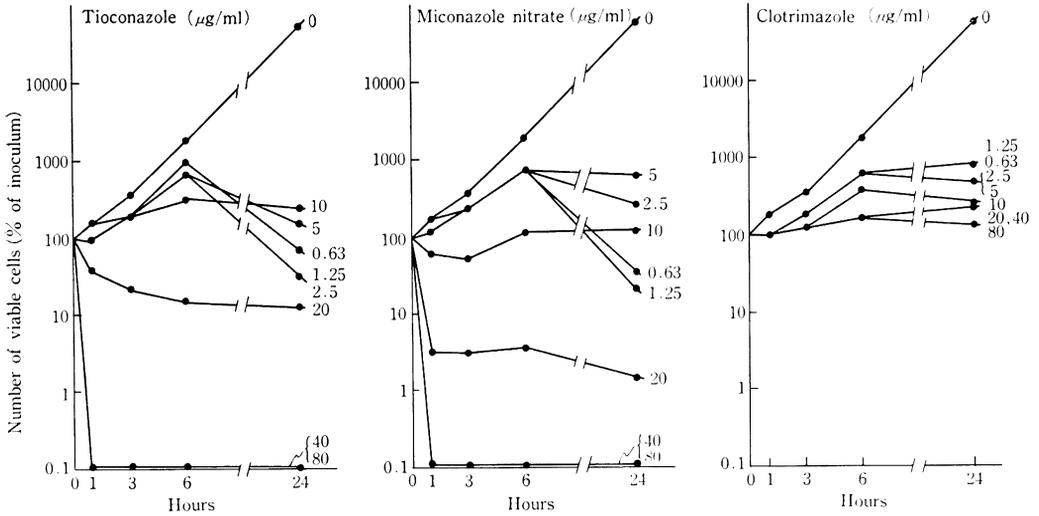


Fig. 2(b) Time-course of viable counts in growing cultures of *C. albicans* TIMM 0144 after exposure to various concentrations of tioconazole, miconazole nitrate and clotrimazole



明らかな殺菌的效果を示さず、40 µg/ml の濃度でようやく 6 時間後に生菌数は 1/100 程度まで低下したが、それ以上の生菌数の減少は 24 時間後も認められなかった。MCZ の濃度を 80 µg/ml に高めた場合にはじめて、TCZ 40~80 µg/ml と同程度の顕著な殺菌的效果が現われた。CTZ は、これら 2 剤のいずれとも異なり、80 µg/ml までほとんど静菌的にのみ働き、有意な殺菌的效果を示さなかった。

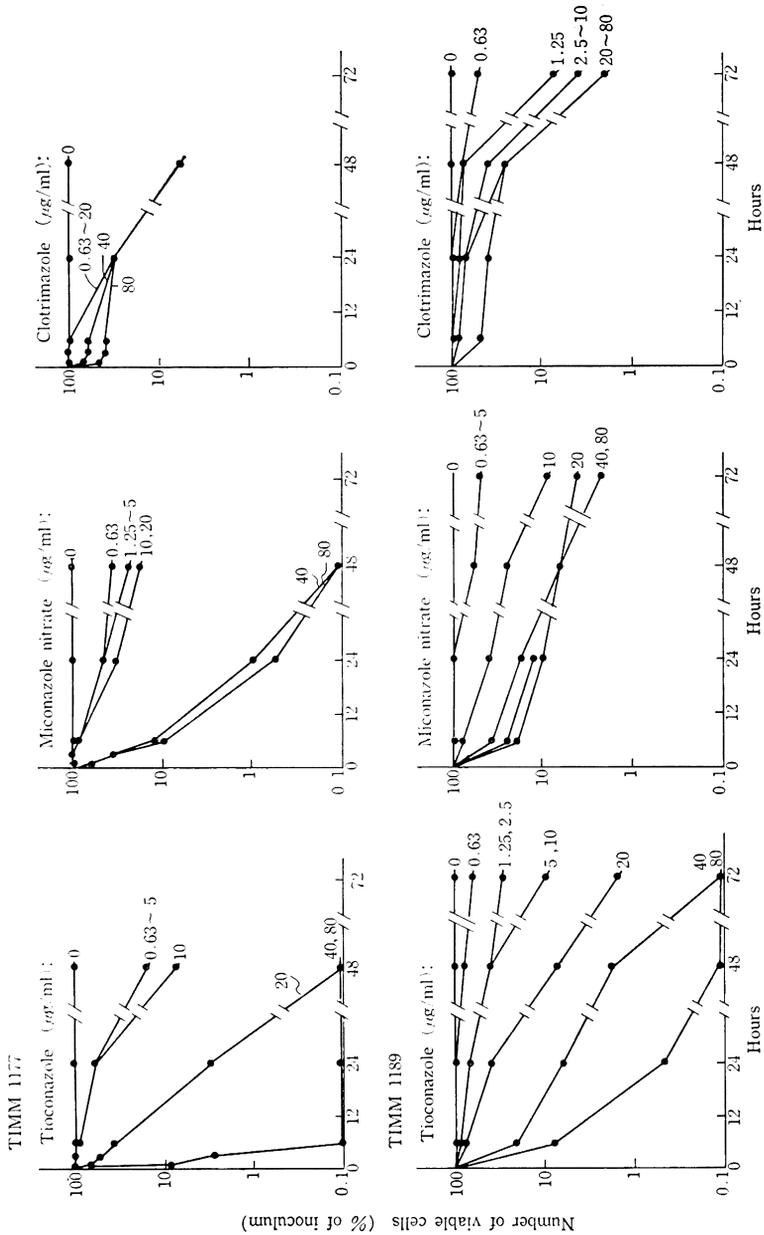
TIMM 0144 株は、種々のイミダゾール剤に対して比較的高い感受性をもつ *C. albicans* 株である²¹⁾。この菌株の SDB 培養は、本実験条件下において TCZ に対し特徴的な二元的応答を示した。すなわち、10 µg/ml 程度の濃度では発育は初期からほぼ完全に阻止された。一方、それより低濃度域 0.63~5 µg/ml においては、薬剤無添加対照培養よりもやや遅い速度ながら発育を続けたが、6 時間以後の時点で生菌数は減少に転じ、24 時間後には 0 時間のレベル以下の値を示した。20 µg/ml 以上の TCZ 濃度下では、生菌数ははじめから徐々に低下に向かい、6 時間以後では 0 時間の 1/10 程度に留まった。40 および 80 µg/ml では添加直後から生菌数は急激に低下し、1 時間後の値は 0 時間の 1/10,000 以下とほぼ完全に死滅した。TIMM 0144 株は MCZ に対しても TCZ とほぼ同様の二元的応答を示したが、20 µg/ml での殺菌的效果は MCZ のほうがやや強いようであった。これらの 2 剤とは対照的に、CTZ はこの感受性株においても静菌的效果しか示さず、しかもその強さは終始薬剤濃度とともに上昇した。*C. albicans* 試験菌 2 株のいずれにお

いても CTZ は殺菌的效果を示さない反面、その静菌的效果はむしろ他の 2 剤よりも強力であり、しかもこの効果の強さは薬剤濃度が低下してもそれほど変わらない点が注目される。

次に皮膚糸状菌に対する TCZ ならびに対照薬剤の殺菌的效果を比較検討した。実験に際しては、生菌数測定の便宜上、栄養細胞すなわち菌糸ではなく分生子を用い、しかも菌糸発育が起こらないように発育用培地の代わりに生理食塩水に浮遊して薬剤処理を行なった。試験菌株として用いた *T. mentagrophytes* TIMM 1177 および TIMM 1189 の両株は、SDA 平板上での通常の寒天希釈法による感受性試験の結果によれば、TCZ、MCZ および CTZ のいずれによっても 0.31~0.63 µg/ml の濃度で完全に発育を阻止される。いずれの株の分生子も、薬剤を加えないでインキュベートした場合には、48~72 時間の実験期間中まったく生菌数の低下を示さなかったが、薬剤添加の場合には、薬剤の種類および濃度に依存して生菌数は低下した (Fig. 3)。

TIMM 1177 株においては、生菌数は 0.63~10 µg/ml の濃度範囲の TCZ 48 時間処理後では 0 時間の 10% 程度に、また 20 µg/ml の濃度では <0.1% にそれぞれ低下した。さらに、40~80 µg/ml TCZ 処理の場合には、*C. albicans* 発育培養におけるのと同様、分生子は迅速に殺菌され、生菌数は 6 時間以内に <0.1% に激減した。一方、TIMM 1189 株は、これよりも幾分感受性は低いようであったが、それでも TCZ 20 µg/ml の存在下では 72 時間後で約 0.1% に 40 および 80 µg/ml の濃度下では

Fig. 3 Time-course of viable counts of conidia from two strains (TIMM 1177 and TIMM 1189) of *T. mentagrophytes* suspended in saline after exposure to various concentrations of tioconazole, miconazole nitrate and clotrimazole

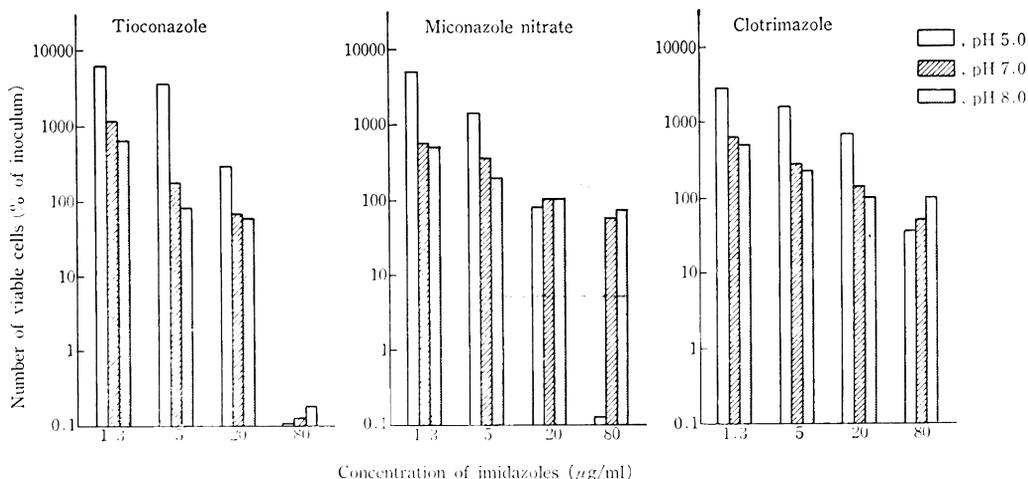


それぞれ 72 および 48 時間後に <0.1% に減少し、この株に対しても TCZ はかなり強い殺菌的効果を示した。

TCZ に比べて MCZ の殺菌的効果はより軽度であった。TIMM 1177 株においては、MCZ 20 μg/ml までの濃度下では 48 時間後に接種分生子の 10% 以上はコロニー形成能を保持していた。しかし、MCZ 濃度を 40

μg/ml 以上に高めると、生菌数の急速な低下がみられ、48 時間後には 0.1% 以下の低値を示した。TIMM 1189 株は MCZ に対してもより低感受性であり、80 μg/ml の高濃度で 72 時間処理した場合でも、1% 以上のレベルの生菌数が得られた。CTZ は、*C. albicans* におけるのとは異なり、*T. mentagrophytes* 分生子に対しては軽度ながら殺菌的効果を示した。TIMM 1177 株において

Fig. 4 Effect of pH value of the growth medium on viable counts in growing cultures of *C. albicans* TIMM 0144 with various concentrations of tioconazole, miconazole nitrate and clotrimazole



は、0.63~80 µg/ml の範囲のいずれの濃度の CTZ によっても 48 時間後の生菌数は 10% 以下に低下し、TIMM 1189 株においては、1.25 µg/ml 以上の濃度で 72 時間後の生菌数は 10~1% のレベルに低下した。CTZ は、他の 2 剤よりも *T. mentagrophytes* 分生子に対する殺菌的効果が軽度であり、しかも遅く発現する傾向を示したが、その反面、低濃度でも高濃度とそれほど遜色ない効果がみられる点では特徴的であった。

Fig. 4 は、TCZ、MCZ および CTZ のそれぞれの抗菌活性の pH 依存性を検討した実験成績を示す。*C. albicans* TIMM 0144 株を試験菌として用い、この一定菌数を予め pH を 5.0、7.0 および 8.0 に調整した SDB に接種し、各薬剤の生菌数に及ぼす効果を pH 間および薬剤間で比較した。いずれの薬剤も 20 µg/ml 以下の濃度すなわち部分的発育阻止または完全発育阻止を示す静菌的濃度の範囲においては、酸性 pH よりも中性から弱アルカリ性 pH 域でより強い抗菌作用を示す傾向がみられたが、殺菌的に働く高濃度域ではこの傾向が逆転し、酸性側でより強い殺菌的効果を発現した。この pH の影響は MCZ に対して特に顕著であり、pH 7~8 では 80 µg/ml の高濃度でもほとんど殺菌的效果を示さなかった。これに比べて TCZ および CTZ が受ける影響は軽度であり、アルカリ側においても明らかな殺菌的效果が認められた。

2. In vivo 抗菌活性

典型的な感染の成立した無処置群での感染局所の病変は、Fig. 5 にも示されるように、ほぼ次の経過を辿った。*T. mentagrophytes* 分生子接種後 3~4 日目に症状が

現われ、病変は日数とともに徐々に増悪した。すなわち、感染後 4~5 日目にスコア +1、6~7 日目にスコア +2、9~10 日目にスコア +3 と進行し、12 日目以後にスコア +4 の最高のレベルの病変度に達した。この状態は 16 日目頃まで続き、それ以後次第に消退した。このような無処置対照群における病変度の経過に比べて、基剤による治療を行なった場合には(基剤対照群)、病変度は 7 日目以後若干軽く経過する傾向はうかがえるものの、有意な相違は認められなかった。

0.2% TCZ 剤治療群においては、治療薬剤の種類を問わず、感染後 6 日目(治療開始後 3 日目)まで病変度は無処置対照群とほとんど変わらず、病変スコア +2 のレベルすなわち局所全面に紅斑を生じる状態にまで進行したが、それ以上増悪することはなかった。しかしながら、いずれの薬剤で治療した場合でも、実験終了日すなわち感染 17 日目まで平均スコアは +1 以下にはならなかった。0.2% MCZ 剤の治療効果は、同じ濃度の TCZ 剤より優れ、感染 14 日目には平均スコアは +1 以下に低下した。0.2% CTZ 剤の治療効果は両剤の中間であった。1% クリーム剤で処置した場合には、その治療効果は、開始早期には対応する薬剤の 0.2% クリーム剤の効果と大差なかった。しかし、その後は病変スコアの低下が徐々に顕著となり、感染 14 日目には 3 剤いずれの治療群においても平均スコアは +1 以下になった。また、3 剤の 1% クリーム剤間には各薬剤の 0.2% クリーム剤の間にみられるほどの治療効果の差は見出されなかった。

Table 2 には、感染経過ならびに薬剤治療効果の推移

Fig. 5 The therapeutic efficacy of 0.2% and 1% cream preparations of tioconazole (TCZ), miconazole nitrate (MCZ) and clotrimazole (CTZ) in the topical treatment of guinea-pigs experimentally infected with *T. mentagrophytes*: assessment based on the average daily lesion score

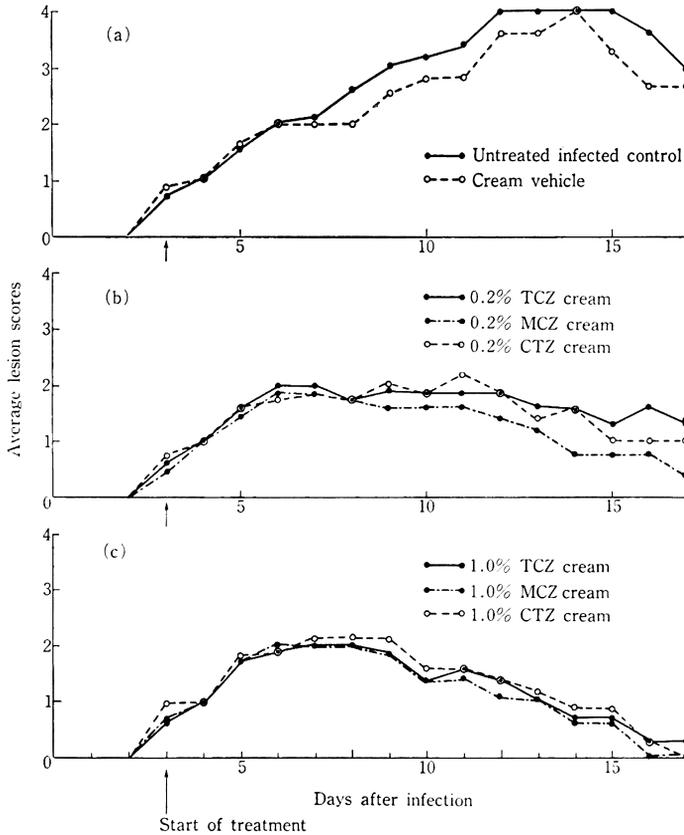


Table 2 The therapeutic efficacy of 0.2% and 1% cream preparations of tioconazole (TCZ), miconazole nitrate (MCZ) and clotrimazole (CTZ) in the topical treatment of guinea-pigs experimentally infected with *T. mentagrophytes*: assessment based on chitin content

Days postinfection Treatment with	Chitin (as μg of glucosamine)			
	6 d	9 d	13 d	17 d
None	8.0 ± 1.8	16.9 ± 3.2	13.7 ± 3.2	8.8 ± 1.9
Cream vehicle	7.2 ± 1.5	14.5 ± 2.2	11.7 ± 2.0	8.1 ± 2.4
0.2% TCZ	5.7 ± 1.6	6.7 ± 1.2	5.8 ± 1.5	2.0 ± 1.0
0.2% MCZ	6.1 ± 2.9	8.8 ± 1.5	4.6 ± 1.7	2.5 ± 0.6
0.2% CTZ	6.7 ± 2.5	12.3 ± 2.0	7.0 ± 3.5	5.8 ± 1.5
1.0% TCZ	5.3 ± 1.7	4.9 ± 1.8	2.2 ± 0.9	$< 1.0 \pm 0.0$
1.0% MCZ	6.7 ± 2.2	6.9 ± 1.7	2.3 ± 1.4	1.6 ± 0.6
1.0% CTZ	5.3 ± 2.8	9.4 ± 2.4	3.4 ± 1.5	1.9 ± 0.9

を感染局所皮膚組織内のキチン含量を指標として追跡した成績を示す。無処置対照群の感染局所におけるキチン

含量は、感染後9日目頃まではほぼ直線的に上昇した後、徐々に下降し、17日目にはほぼ6日目のレベルにまで低下する。クリーム基剤処置群におけるキチン含量も、無処置対照群にみられるのとほぼ同様な経過を辿った。各薬剤の0.2%および1%のクリーム剤で処置した場合には、キチン含量の低下は感染後6日目(治療開始後3日目)でもある程度認められたが、この効果は感染後9日目(治療開始後6日目)で特に顕著化した。このキチン含量を低下させる薬剤効果は、治療日数とともに著しくなること、同一薬剤間の比較では0.2%クリーム剤よりも1%クリーム剤のほうが優れていること、3剤のなかではTCZ>MCZ>CTZの順であることが認められた。特に1%TCZ剤処置群においては、感染17日目にはもはやキチンは感染局所から検出することができなかった。

Table 3 は、各実験群動物の感染局所皮膚片を経時的

Table 3 The therapeutic efficacy of 0.2% and 1% cream preparations of tioconazole (TCZ), miconazole nitrate(MCZ) and clotrimazole(CTZ) in the topical treatment of guinea-pigs experimentally infected with *T. mentagrophytes*: assessment based on culture study

Treatment with	Days post-infection			
	No. of skin blocks with positive cultures/total No. of skin blocks from infected locus (%)			
	6 d	9 d	13 d	17 d
None	10/10(100)	15/15(100)	15/15(100)	15/15(100)
Cream vehicle	10/10(100)	15/15(100)	15/15(100)	14/15(93)
0.2% TCZ	10/10(100)	15/15(100)	12/15(80)	11/15(73)
0.2% MCZ	10/10(100)	15/15(100)	11/15(73)	10/15(66)
0.2% CTZ	10/10(100)	15/15(100)	13/15(86)	13/15(86)
1.0% TCZ	7/10(70)	5/15(33)	1/15(6)	0/15(0)
1.0% MCZ	8/10(80)	5/15(33)	3/15(20)	1/15(6)
1.0% CTZ	8/10(80)	7/15(46)	8/15(53)	0/15(0)

に採取し、培養した成績を示す。無処置対照群における培養陽性率は、感染後6日目から17日目まで100%で終始した。クリーム基剤処置群もこれと同様に高い陽性率のまま経過した。各薬剤の0.2%クリーム剤処置群においては、いずれの薬剤でも感染9日目では有意な培養陽性率の低下は認められず、MCZ剤では13日目以後、またTCZは17日目によりやく培養陽性率は無処置対照群のそれと比べて有意な低下を示した。それでもいずれの治療群においても培養陽性率が70%以下に低下することはなかった。

一方、1%クリーム剤処置を行なった場合には、各薬剤とも感染後6日目である程度の培養陽性率の低下をきたしたが、9日目以後はこの値はさらに急速に低下し、17日目以後にはほとんど陰性化した。いずれの薬剤の1%クリーム剤処置も9日目以後無処置対照および基剤処置に比べて有意に優れた治療効果を示したが($P < 0.01$)、薬剤間での有意差は認められなかった。しかし、培養陽性率の低下は、1%TCZ剤処置群で最も速く、1%CTZ剤処置群で最も遅い傾向がみられた。

III. 考 察

川崎ら⁹⁾は、*C. albicans* 発育期培養に対する殺菌的効果をTCZ、MCZおよびCTZの3種のイミダゾール間で比較検討した結果、TCZは静菌的効果の点では他の2剤と同等かまたは劣っているにもかかわらず、高濃度域(20~80 $\mu\text{g/ml}$)における殺菌的効果はTCZで最も速やかに高度に発揮されることを報告した。これに対応する成績は、LEFLER & STEVENS¹⁴⁾によっても報告されている。彼らによれば、TCZ、MCZ、CTZを含む5種のイミダゾール剤の*C. albicans* 10数株に対する最小発育阻止濃度および最小殺菌濃度を比較した場合、いずれの

値もTCZで最も低く、加えて殺菌的効果が最も迅速に発現された。

TCZの*in vitro* 抗菌活性は、他の多くのイミダゾール剤と同様、測定条件などによって強く影響することが知られている^{2,5)}。イミダゾール剤のなかでも高い脂質親和性(脂溶性)をもつフェニルエチルイミダゾール誘導体群に包含されるMCZ、econazole(nitrate)、isoconazole(nitrate)、sulconazole(nitrate)などが一般に強い殺菌的効果を示すこと、これに対して、脂溶性ながらビスフェニルイミダゾール(トリフェニルメチルイミダゾール)誘導体群に属するCTZならびに水溶性の高いKCZなどの殺菌的効果は著しく弱いことが、主として*C. albicans* を試験菌とした実験成績からうかがわれる²¹⁾。脂溶性イミダゾール剤に共通する比較的強い殺菌的効果は、これらの薬剤分子が、一般に高い膜リン脂質親和性をもつことと関連するようである。これとは対照的に、CTZやKCZにMCZ以上の強い殺菌作用を認めたという報告もある¹⁴⁾。この対立した成績は、使用した菌株や測定条件の相違に由来するものであろう。測定条件のなかで特に注目すべきは培地pHである。一般にイミダゾール剤の*in vitro* 抗菌活性が培地pHによって強く影響されることは、多くの研究者によって指摘されているところである²¹⁾。イミダゾール剤の静菌的作用ならびに殺菌的作用に及ぼす培地pHの影響について、今回*C. albicans* を試験菌として用いて検討を行なった結果、TCZ、MCZ、およびCTZの3剤のなかではMCZの抗菌活性特に殺菌的作用が最も強い影響を受け、酸性側(pH5)では中性~弱アルカリ性側に比べて活性の上昇が認められた。一方、TCZの殺菌的作用はpH依存性がはるかに低かった。これらの成績は、イミダゾール剤の*in vitro* 抗菌活性を検討する際には培地pHを十分に考慮する必要があること、また薬剤間でpHの影響を受ける度合に大きな差があることを示唆するものである。

C. albicans 中等度感受性株(TIMM 0163)および高感受性(TIMM 0144)を試験菌として用いた実験から、高濃度域においてはTCZはMCZと同様に殺菌的効果を発揮したが、この効果の程度はTCZのほうがより顕著であった。この成績は、これまで他の幾つかの研究グループによって発表された成績^{5,13,14)}と基本的に一致する。菌株の差や培養条件の差を超えてTCZが強い殺菌的作用を示すことはTCZの特徴といえよう。一方、CTZは80 $\mu\text{g/ml}$ までまったく殺菌的作用を示さなかったが、その反面、低濃度域(0.63~5 $\mu\text{g/ml}$)における静菌的作用はTCZやMCZを上回っており、CTZの抗菌活性が比較的低い薬剤濃度依存性をもつことが示され

た。この原因の一つは CTZ の低い水溶性にあると考えられる。すなわち薬剤濃度が計算上高くなるはずであっても、実際に菌液中に溶け込んでいる有効濃度はそれほど高くないのであろう。

TCZ の *C. albicans* 2 株のいずれに対する抗菌活性も完全な濃度依存性を示し、低濃度では静菌的に働き、より高濃度では殺菌的に作用した。特に注目されるのは高度感受性株である TIMM 0144 が比較的 low 濃度の TCZ に対して示すユニークな応答である。すなわち、薬剤添加後、暫くの間は増殖が進行し、その後生菌数の低下が起こるとする二相性のパターンを示す。このことは、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の比較的高濃度域で発現される迅速な殺菌的作用に加えて、低濃度域においては合成的代謝系を介して働く殺菌的作用機序が存在する可能性を示唆する。前者は非代謝的な直接的細胞膜障害に由来し、後者はステロール合成阻害に由来すると推定される。

従来の TCZ 殺菌の効果に関する研究は、いずれも *C. albicans* を試験菌としたものばかりであり、糸状菌ごとに本剤の主要適応症となる白癬の原因菌として知られる皮膚糸状菌を対照とした研究成績は発表をみない。われわれはすでに oxiconazole (nitrate) の殺菌の効果に対して *C. albicans* と *T. mentagrophytes* が異なる応答を示すことを報告した²²⁾。そこで今回の実験においては、*in vivo* 実験における白癬モデルの作製に使用した株を含めて 2 株の *T. mentagrophytes* の分生子に対して TCZ がどの程度の殺菌的效果を発揮するかを検討した。一般に糸状菌においては、菌糸がある程度伸長発育すると、生菌数すなわちコロニー形成単位 (CFU) の正確な測定は技術的に不可能となる。そこで今回の実験に際しては、菌糸発育を進まなくするために分生子を生理食塩水中で薬剤とともにインキュベートした。したがって、この条件下で薬剤が CFU を低下させるならば、それは代謝を介さない直接的な細胞障害に基づく殺菌的效果が発現されたことを示す。実験の結果、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度の TCZ は、*C. albicans* の場合と比べて、迅速さでは幾分劣っているように見えるものの、CFU 低下のレベルの点ではほぼ同程度の効果を示した。この TCZ の殺菌的效果は、対照薬剤として用いた MCZ および CTZ のいずれよりも明らかに強力である。以上の成績から、TCZ は *C. albicans* などの酵母状真菌のみならず、皮膚糸状菌を含む糸状菌に対しても、おそらく同様の作用機序すなわち直接的細胞障害により、強力な殺菌的效果を有することが示唆されよう。

このように TCZ が高濃度域において他のイミダゾール剤をしのぐ強力な *in vitro* 殺菌的作用を示すことは疑いないが、問題となるのは、この *in vitro* 効果が生体

内での治療効果と対応関係をもつか否かという点である。これを究明するために、TCZ および対照薬剤 MCZ と CTZ の各 0.2% および 1% クリーム剤を同一基剤を用いて調製し、上記の *in vitro* 実験に用いた *T. mentagrophytes* の 1 株である TIMM 1189 の分生子を接種して作製したモルモットの実験的白癬に対する治療効果を薬剤間で比較検討した。白癬の動物モデルにおける感染の度合や治療による改善の度合を判定するパラメーターとしては、従来からスコア方式による局所病変度および局所皮膚片の培養成績が用いられてきた。局所症状に基づく臨床的治療効果または臨床的治療よりも培養試験の成績に基づく真菌学的治療効果のほうが薬効評価基準としてより一層信頼性に富むことはいままでのない。しかし、後者の評価法にも、実際には大きな難点がある。それは定量性が全く欠けていることである。感染局所から切除した皮膚片をそのまま平板培地上に載せてインキュベートし、培養陽性かまたは陰性かを判定するという従来の方法では、CFU がまったく存在しない状態すなわち菌学的完全治癒が得られない限り、有効と判定することはできない。そこでわれわれはこの真菌学的指標により高い定量性を与え、たとえ完全治癒に至らなくとも治療効果の有無を判定できるようにする目的で、局所皮膚を 10 ブロックに分割し、各ブロックごとに培養成績 (陽性かまたは陰性か) を判定し、それを総計したものを局所の培養陽性率として算出するという半定量的方法を採用してきた^{16-18, 23)}。しかし、この方法でも定量性は充分とはいえず、また精度にも問題がある。第 1 の理由は局所皮膚を刻んでブロックにする場合、労力の点から作りうるブロック数に限度があることで、第 2 は皮膚糸状菌は皮膚組織内で菌糸状発育を行なうために菌量と CFU との間に必ずしも良好な対応関係が成立しないと予想されることである。そこでわれわれは、先に考案した感染局所皮膚のキチン含量を測定し、これをもって皮膚組織内に存在する皮膚糸状菌の菌量を表わすという原理に基づいた評価法を併せて採用した。キチンは真菌特の子嚢菌および子嚢菌類縁菌の細胞壁の必須構成成分として知られる多糖であるが、他方、動物組織にはまったく存在しない。したがって、組織内のキチン含量は、そこに存在する真菌の量を正確に反映することになるので、菌量を CFU として測定することの困難な糸状菌については、この値は CFU より一層正確に菌量と対応するパラメーターとして利用できるはずである。この生化学的方法の欠点は、組織内に存在する菌が死菌であっても、細胞壁が崩壊していない限り、測定値に含まれるという問題があることである。しかしながら、少なくとも白癬菌の主要な存在部位となる表皮角質層は常に速やかに剥

脱しており白癬菌の死菌もおそらくそれと歩調をあわせて脱落するために、死菌が測定値に及ぼす影響はそれほど大きくないと考えられる。事実皮膚のキチン含量は、その培養成績と良好な対応関係をもつことが、CTZ および bifonazole の治療実験の際に見出されている²⁰⁾。今回の TCZ, MCZ および CTZ の3剤を用いた治療実験からもこの対応関係の成立があらためて確認され、感染度のパラメーターとしての有用性は最早疑いないものといえよう。

局所病変スコアに基づいて症状の点から薬効評価を行なった場合、3剤のなかでは MCZ が最も優れていたが、キチン含量または培養成績を指標としたより客観的な微生物学的評価を行なった場合には、TCZ のほうが対照薬剤よりも優れているという結果が得られ、基本的には川崎ら⁹⁾の成績に一致した。TCZ の動物モデルにおける薬効は、その発現が迅速であるという点で特徴がある。これに対して、CTZ の場合には、最終的には、TCZ など他の薬剤と同程度の優れた治療効果を示すものの、効果が発現するのが遅いという傾向が認められる。また MCZ の薬効発現時間は両者の中間であった。これらの成績から、イミダゾール剤の *in vitro* 殺菌の効果は、*in vivo* での最終的な治療成績よりも有意な治療効果が現われるまでの時間の短さにより良好に対応する可能性が示唆される。

真菌症の動物モデルにおける治療効果と実際の真菌症患者における治療効果との間に有意な相関関係が成立することは、すでに多数の抗真菌剤について証明されているところである。これまでの TCZ クリーム剤の局所療法に関する臨床的成績は、本剤が多くのイミダゾール剤のなかでも優れた薬効を示し、とりわけ症状改善や菌消失効果が速やかにしかも再発率が低いことを示している^{11,12)}。これは、TCZ の *in vitro* での強力な殺菌効果ならびに動物モデルにおいて認められる迅速な治療効果と対応するものであろう。

文 献

- JEVONS, S.; G. E. GYMER, K. W. BRAMMER, D. A. COX & M. R. G. LEEMING: Antifungal activity of tioconazole (UK-20,349), a new imidazole derivative. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15: 597~602, 1979
- ODDS, R. C.: Laboratory evaluation of antifungal agents: a comparative study of five imidazole derivatives of clinical importance. *J. Antimicrob. Chemother.* 6: 749~761, 1980
- BERGAN, T. & M. VANGDAL: *In vitro* activity of antifungal agents against yeast species. *Chemotherapy* 29: 104~110, 1983
- Marriott, M. S.; J. R. C. BAIRD, K. W. BRAMMER, J. K. FAULKNER, G. HALLIWELL, S. JEVONS & M. H. TARBIT: Tioconazole, a new imidazole-antifungal agent for the treatment of dermatomycoses. Antifungal and pharmacologic properties. *Dermatologica* 166 (suppl. 1): 1~7, 1983
- 川崎賢二, 新美博仕, 沖 俊一: Tioconazole の抗真菌活性。薬理と治療 10: 3863~3887, 1982
- GRIGORIU, D. & A. GRIGORIU: Double-blind comparison of the efficacy, toleration and safety of tioconazole base 1% and econazole nitrate 1% creams in the treatment of the skin or erythrasma. *Dermatologica* 166 (suppl. 1): 8~13, 1983
- 西本勝太郎: チオコナゾールクリーム の局所刺激性および経皮吸収試験報告。医学と薬学 7: 435~446, 1982
- 野口晏弘, 橋 正克, 菜畑博司, 飯島護夫, 堀本政夫, 山河静子, 石河醇一, 大槻勲夫: Tioconazole の毒性, 生殖および一般薬理試験。薬理と治療 10: 3849~3861, 1982
- FREDRIKSSON, T.: Treatment of dermatomycoses with topical Tioconazole and miconazole. *Dermatologica* 166 (suppl. 1): 14~19, 1983
- O'NEILL EAST, M.; J. T. HENDERSOM & S. JEVONS: Tioconazole in the treatment of fungal infections of the skin. An international clinical research program. *Dermatologica* 166 (suppl. 1): 20~33, 1983
- チオコナゾール研究班: 二重盲検法によるチオコナゾールクリームの皮膚真菌症に対する有用性の検討。西日本皮膚 44: 425~443, 1982
- チオコナゾール研究班: 二重盲検法によるチオコナゾールクリームの皮膚カンジダ症に対する有用性の検討。西日本皮膚 44: 444~451, 1982
- BEGGS, W. H.: The effect of antifungal imidazoles on resting cells of *Candida parapsilosis*. *IRCS Med. Sci.* 11: 677, 1983
- LEFLER, E. & D. A. STEVENS: Inhibition and killing of *Candida albicans in vitro* by five imidazoles in clinical use. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25: 450~454, 1984
- 山口英世, 平谷民雄, 末柄信夫, 岩田和夫: *Candida albicans* における isoconazole の作用メカニズム。Chemotherapy 32: 585~601, 1984
- 内田勝久, 山口英世: モルモットの白癬モデルに対する新規イミダゾール誘導体 oxiconazole nitrate クリーム剤の治療効果。Chemotherapy 32: 585~601, 1984
- 内田勝久, 山下 悟, 山口英世: 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。Chemotherapy 32: 842~854, 1984
- YAMAGUCHI, H. & K. UCHIDA: *In vivo* activity of bifonazole in guinea-pigs: its characteristic features and comparison with clotrimazole-

- le. *Dermatologica* 169 (suppl. 1) : 33~46, 1984
- 19) LEHRMANN, P. F. & L. O. WHITE : Chitin assay used to demonstrate renal localization and cortisone-enhanced growth of *Aspergillus fumigatus* mycelium in mice. *Infect. Immun.* 12 : 987~992, 1975
- 20) UCHIDA, K. & H. YAMAGUCHI : Assessment of *in vivo* activity of bifonazole against dermatophytic infections in guinea-pigs on the basis of the amount of a specific fungal cell wall component chitin in the infected skin. *Dermatologica* 119 (suppl. 1) : 47~50, 1984
- 21) BEGGS, W. H.; F. A. ANDREWS & G. A. SAROSI : Action of imidazole containing antifungal drugs. *Life Sciences* 28 : 111~118, 1981
- 22) 平谷民雄, 内田勝久, 山口英世 : 新規イミダゾール誘導体 oxiconazole nitrate の *in vitro* 抗真菌活性に関する検討。 *Chemotherapy* 32 : 568~584, 1984
- 23) 内田勝久, 山口英世 : モルモットの実験的白癬に対する硝酸ミコナゾール液剤の治療効果—クリーム剤との比較—。 *Chemotherapy* 33 : 207~214, 1985

IN VITRO AND IN VIVO ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF TIOCONAZOLE IN COMPARISON WITH OTHER IMIDAZOLE-ANTIMYCOTICS

HIDEYO YAMAGUCHI, TAMIO HIRATANI, JUNKO NAGATA and KATSUHISA UCHIDA
Research Center for Medical Mycology, Teikyo University
School of Medicine

In an attempt to obtain preclinical data which can explain the excellent therapeutic effectiveness of tioconazole (TCZ) for the topical treatment of dermatophytosis and other superficial mycoses, studies on the *in vitro* activity of this drug were carried out, mainly focussing on its fungicidal action toward several strains of pathogenic fungi, in comparison with miconazole nitrate (MCZ) and clotrimazole (CTZ) as reference drugs. They were followed by *in vivo* studies in which the topical effectiveness of cream preparations of TCZ, as well as the two reference drugs, in experimental *Trichophyton mentagrophytes* infection in guinea-pigs was tested. The estimation of efficacy of treatment with active formulations was made on the basis of the score of skin lesion, the rate of positive skin cultures and dermal contents of fungal chitin.

The results are summarized as follows :

(1) In growing cultures of *Candida albicans* strains, TCZ exerted a potent killing action at drug concentrations of 20 µg/ml or above. The extent and rapidity of this fungicidal effect of TCZ was greater than that of MCZ or CTZ if compared on the weight basis.

(2) When *T. mentagrophytes* conidia suspension was exposed to TCZ under the condition where no germination or subsequent outgrowth occurred, the imidazole significantly reduced viable counts recovered from the suspension at drug levels lower than those which were required for attaining a similar extent of lethal effect on growing cells of *C. albicans*. The fungicidal activity of TCZ toward *T. mentagrophytes* conidia was again superior to that of MCZ or CTZ.

(3) The *in vitro* antibiotic and cidal activity of TCZ against these susceptible fungi was only slightly affected by the pH value of testing media.

(4) The three parameters employed in the present *in vivo* studies denoting the severity of dermal infections were virtually comparable to each other.

(5) Both 0.2 and 1% creams of TCZ showed good therapeutic efficacy, although the former was less effective than the latter.

(6) Although no significant difference was observed in the therapeutic efficacy among the comparable cream preparations of TCZ, MCZ and CTZ when estimation was made at the end of 17-day experimental period of time, treatment with 1% cream of TCZ appeared to render the skin lesions to heal more rapidly than did treatment with comparable creams of MCZ or CTZ.