原 著

ルリコナゾール爪外用液の *in vitro* 爪透過性試験およびスライス阻止円法による爪中薬物濃度分布および抗真菌活性評価

島 村 剛 宮 前 亜紀子 新 井 聖 和 嶺 村 彩
野 沢 暁 久保田 信 雄

株式会社ポーラファルマ医薬研究所

要 旨

外用爪白癬治療薬として創出したルリコナゾール爪外用液について、製剤特性を検証するため、爪中の薬物濃度分布測定および抗真菌活性評価を行った。 *In vitro* 爪薬物透過性試験では、薬剤塗布後の爪を爪甲表面から爪床側に向けて水平にスライスし、爪の深さごとに薬物濃度を測定し、製剤濃度依存性、爪の厚さへの影響および投与期間の関係を検証した。0.2, 1, 3, 5 および 7.5% ルリコナゾール爪外用液を用いた濃度依存性確認試験では、製剤濃度が高くなるにしたがって、爪全層で薬物濃度も高くなる傾向が認められた。また厚さの異なる爪に 5% ルリコナゾール爪外用液を塗布した結果、爪中薬物濃度分布は爪の厚さに影響を受けないことが確認された。さらに、5% ルリコナゾール爪外用液を単回、7, 14 および 21 日間投与した結果、投与期間に依存して薬物濃度が高くなることが確認された。つぎに、5% ルリコナゾール爪外用液と 8% シクロピロックスネイルラッカーを 14 日間投与後に、爪スライスを含菌培地にのせて阻止円の有無を指標に薬効比較を行った。その結果、8% シクロピロックスネイルラッカーとくらべ、5% ルリコナゾール爪外用液は爪深部まで阻止円が確認され、阻止円形成率は統計学的に有意な高値を示した。以上より、5% ルリコナゾール爪外用液は爪深部まで薬物が分布し薬効も認められたことから、外用爪白癬治療薬として治療効果が期待できるものと考えられた。

Key words : ルリコナゾール爪外用液, 爪白癬, 爪中薬物濃度分布, 阻止円

序 文

難治性の表在性真菌症として知られている爪白癬は、表在性真菌症のなかで最も多い病型との報告があり、さらに、罹患率の高い疾患としても認識されている¹⁻⁶⁾。爪白癬の治療は、抗真菌薬の経口投与による治療法が最も効果的⁷⁾と考えられるが、薬剤の肝機能低下患者への副作用および薬物相互作用などの理由で経口薬による治療が困難な場合がある⁸⁾。したがって、安全に使用可能かつ治療上有益な外用爪白癬治療薬に対する需要が高まっている。

一般に、爪と皮膚ではその組成や組織構造の違いから、薬物の透過を左右する因子が異なることが知られている。爪は、80~90 層の角化した細胞からなる組織であり、その構成成分はハードケラチンである⁹⁾。そのため、皮膚とくらべて爪のバリア機能は高く、治療に効果的

な薬物量を患部に到達させることがむずかしい¹⁰⁻¹²⁾。海外では外用爪白癬治療薬がいくつか上市されており、日本でも 2014 年にエフィナコナゾールが承認されたが、海外での報告によると、既存の外用爪白癬治療薬(エフィナコナゾール、シクロピロックス、テルピナフィン、アモロルフィン)による爪白癬治療の成功率は、経口剤によるものと比較して低いことが指摘されており¹³⁾、薬物を透過させる製剤技術のさらなる向上が必要と思われる。

ルリコナゾール {(-)-(E)-[(4R)-4-(2, 4-dichlorophenyl)-1, 3-dithiolan-2-ylidene] (1*H*-imidazol-1-yl)acetonitrile} は光学活性を有するイミダゾール系抗真菌薬であり、真菌細胞膜の構成成分であるエルゴステロール合成系のラノステロール-14 α -デメチラーゼ活性の阻害作用を有している¹⁴⁾。また、ルリコナゾールは上市されている抗真菌薬のなかで *Trichophyton* spp. に対する抗真菌活性が最も優れている¹⁵⁻¹⁷⁾。そこで、われ

別冊請求先：島村 剛

〒244-0812 神奈川県横浜市戸塚区柏尾町 560

株式会社ポーラファルマ医薬研究所

[受付：2015 年 9 月 30 日, 受理：2016 年 1 月 5 日]

E-mail：t-shimamura@pola-pharma.co.jp

われは、ルリコナゾールを含有させた外用爪白癬製剤を創出し、爪白癬治療薬としての製剤特性を検証するため、爪中における薬物動態について検討した。

これまでの外用爪白癬治療薬の研究の多くは、フランツセルなどを用いて有効成分の爪への透過性を主眼にした実験が行われてきたが⁸⁾、爪中の薬物濃度分布を詳細に調べた報告はほとんどない。一方で、爪白癬の病型の違いにより、原因真菌の存在する部位は異なるため¹⁸⁾、詳細な薬物の爪中分布データを取得することは、治療上、有益な情報になり得ると考えられる。そこで、ルリコナゾール爪外用液の特性を明らかにするため、ヒト爪に製剤を塗布後、爪甲表面から爪床側に向けて爪の連続スライスを作製し、各爪スライスの薬物濃度測定を行った。また、同様に作製した爪スライスを含菌培地への、阻止円の観察を行うことで、爪の深さごとに爪中の抗真菌活性を評価した。

材料および方法

材料

ルリコナゾールは日本農薬株式会社より供給を受け、0.2, 1, 3, 5 および 7.5% ルリコナゾール爪外用液は株式会社ポーラファルマにて調製し、8% シクロピロックスネイルラッカーは、株式会社オズ・インターナショナル（東京、日本）を通じて入手した。

使用菌株

Trichophyton rubrum (NBRC9185) を独立行政法人製品評価技術基盤機構から入手し、*in vitro* ヒト爪スライス阻止円試験に使用した。ルリコナゾールの NBRC9185 株を含む *T. rubrum* 10 株を用いた MIC90 は、0.00049 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と報告されている¹⁹⁾。

菌液の調製

凍結乾燥して保管されていた *T. rubrum* を 0.05% (w/v) Tween 80 含有滅菌生理食塩水に懸濁し、Sabouraud's dextrose agar (SDA) 平板培地へ添加後、28°C にて 2 週間培養した。前培養後、白金耳で菌体をかきとり、0.05% (w/v) Tween 80 含有滅菌生理食塩水に懸濁させ、セルストレーナーでろ過後、Thoma 型血球計算盤を用いて、ろ液中の分生子数を計測し、含菌平板作製用の分生子液とした。

培地作製

Fluid Sabouraud Medium および Bacto agar は、Difco Laboratories (Detroit, MI) から、シクロヘキシミド、シソマイシンおよびクロラムフェニコールは、和光純薬工業株式会社（大阪、日本）から入手した。培養用培地として SDA 平板培地（1/中に Fluid Sabouraud Medium 6g, Bacto agar 15g）を作製した。また、SDA 平板培地に抗菌薬（1/中にシクロヘキシミド 500mg, クロラムフェニコール 50mg, シソマイシン 50mg）および分生子液を添加し、10cm シャーレを用いて含菌平板培地（培地中 *T. rubrum* 濃度： 2×10^4 conidia/ml）を作製した。

Fig. 1. Cross-sectional diagram of Franz diffusion cell for *in vitro* permeation study and zone of inhibition test.

ヒト爪サンプルの入手

2007 年 4 月から 9 月にかけて、社内ボランティア 58 人から 625 枚の爪の提供を受け、ヒト爪の遊離縁（ヒト爪サンプル）を入手した。すべてのヒト爪サンプルはシリアル番号が付与され、爪の由来（指の名称）、採取日を記録し、使用日までデシケーター内で保管した。なお、爪の収集および実験については、ポーラ研究倫理委員会（承認番号：倫 20060331）にて承認されている。

In vitro ヒト爪薬物透過性試験

48 穴プレートに爪と滅菌水を入れ、室温で 1 時間浸漬後、綿棒で爪表面の汚れを取り、縦に 2 分割したものを爪試験サンプルとした。爪試験サンプルを、直径 2mm の孔を有するテフロン板により甲側床側を保持し、フランツセルにセットした (Fig. 1)。爪床側の穴を塞ぐように約 40°C のアガロースゲル（1.5% Bacto agar, 0.9% 塩化ナトリウム）を流し込み、室温で静置しゲルを固化させたあとにシールで密封した。実験期間中は、28°C、湿度 50% に設定した恒温恒湿槽内に静置した。0.2, 1, 3, 5 および 7.5% ルリコナゾール爪外用液の投与は、各爪試験サンプルのテフロン板の穴から 0.5 μl ずつ爪甲表面に塗布し、約 24 時間後に蒸留水でふき取りを行った。投与期間中は、この投与操作を繰り返し行った。各投与期間終了後に、投与部位を 2mm 径のバイオブシーパンチにて爪を打ち抜き、爪ディスクを作製した。つぎに、クライオスタットを用いて、爪ディスクを 10 μm の厚さで連続的に薄切し、爪スライスを作製した。得られた爪スライスは 5 枚ずつ試験管に採取して測定用試料とし、LC-MS/MS にて薬物濃度を測定した。

In vitro ヒト爪スライス阻止円試験

爪を 70% (v/v) エタノール水溶液に約 1.5 時間浸漬後、綿棒で付着物を目視で確認できなくなるまで除去し、縦に 2 分割したものを爪試験サンプルとした。*in vitro* ヒト爪薬物透過性試験と同様の方法で、フランツセルにセットし、5% ルリコナゾール爪外用液または 8% シクロピロックスネイルラッカーを 1 日 1 回 14 日間投与し、爪ディスクの作製を行った。つぎに、クライオスタット

Fig. 2. Concentration of luliconazole in nail plate after 14-day treatment with different concentrations of luliconazole nail solution. Data represent mean values ($n = 8-10$) and error bars represent SD.

を用いて、爪ディスクを $25\mu\text{m}$ の厚さで連続的に薄切し、爪スライスを作製した。得られた爪スライスは1枚ずつ含菌培地のシャーレ中心部に置き、 4°C にて72時間の静置後に、 28°C にて3日間の培養を行った。

培養後に各シャーレについて、爪スライスを中心に阻止円が観察されたものを+と規定し、阻止円の有無(+/-)を確認した。爪全層のうち、抗真菌活性を有する薬物濃度を示す爪の層の割合を算出するために、投与薬剤ごとに平均阻止円形成率(%)を算出した。

統計学的解析

平均阻止円形成率について、統計学的解析はExcel 2010 (マイクロソフト社)を使用し、Studentの t 検定で、 $p < 0.05$ を有意と判定した。

結 果

In vitro ヒト爪薬物透過性試験

1) 濃度依存性の確認

0.2, 1, 3, 5 および 7.5% ルリコナゾール爪外用液を濃度ごとに5群 ($n = 8-10$) 設定し、14日間投与したときの爪中薬物濃度を Fig. 2 に示す。爪中薬物濃度は、ルリコナゾール爪外用液の濃度が高くなるにしたがって、爪全層において薬物濃度も高くなる傾向が認められた。

2) 爪の厚さへの影響試験

爪を厚さごとに第1指爪 (厚さ: $0.535 \pm 0.070\text{ mm}$)、第2から4指爪 (厚さ: $0.436 \pm 0.051\text{ mm}$)、第5指爪 (厚さ: $0.327 \pm 0.050\text{ mm}$)、第1趾爪 (厚さ: $0.749 \pm 0.104\text{ mm}$) と4群 ($n = 7-10$) を設定し、5% ルリコナゾール爪外用液を14日間投与したときの爪中薬物濃度を Fig. 3 に示す。どの厚さの爪を用いても爪中薬物濃度分布に違

いは認められず、厚い爪でも深部まで薬物が分布した。

3) 塗布期間の検討

5% ルリコナゾール爪外用液を単回、7日、14日および21日間投与したときの爪中薬物濃度 ($n = 10$) を Fig. 4 に示す。爪中薬物濃度は、投与期間が長くなるにつれて、爪中薬物濃度が高くなる傾向が認められた。特に、14日および21日間投与では単回投与と比較し、爪全層において高い薬物濃度を認めた。

In vitro ヒト爪スライス阻止円試験

5% ルリコナゾール爪外用液および8% シクロピロックスネイルラッカーを14日間投与したときの、爪スライスごとの阻止円を観察した (Fig. 5a, b)。各薬剤の阻止円形成率は、5% ルリコナゾール爪外用液および8% シクロピロックスネイルラッカーで、それぞれ67.5%および7.6%を示し、両薬剤の比較において統計学的有意差が認められた (Fig. 5c)。

考 察

外用爪白癬治療薬は、海外で古くから使用されているが、一般に、外用剤治療では十分な効果が得られないことが指摘されている。その原因の一つとして、有効成分が原因真菌の存在する部位まで到達できていないことが考えられる⁷⁾。外用爪白癬製剤の評価として、爪中薬物濃度や薬物透過性の評価が行われているが、爪白癬は病型の違いにより、原因真菌の存在する部位が異なる¹⁷⁾と報告されており、詳細な薬物の爪中分布が明らかになれば、治療効果を予測するうえで重要な手がかりとなり得ると考えられる。

われわれは、既存の抗真菌薬のなかで、*T. rubrum* お

Fig. 3. Concentration of luliconazole in nail plate after 14-day treatment with 5% luliconazole nail solution when using nails of different thickness. Data represent mean values ($n = 7-10$) and error bars represent SD.

Fig. 4. Concentration of luliconazole in nail plate after four different durations of treatment with 5% luliconazole nail solution. Data represent mean values ($n = 10$) and error bars represent SD.

および *T. mentagrophytes* に対して、最も強い抗真菌活性を有するルリコナゾールを用いて、爪への高い透過性を有する可能性のある製剤を創出し、この製剤の有効性評価のために、爪中の薬物濃度分布について検討した。

ルリコナゾール爪外用液 (0.2, 1, 3, 5 および 7.5%) を 14 日間塗布した試験では、いずれの濃度においても、爪甲表面から爪深部にかけて濃度勾配を伴いながら爪全層で分布するとともに、*T. rubrum* および *T. mentagrophytes*

臨床新鮮分離株に対するルリコナゾールの MIC 90 ($0.0010 \mu\text{g/ml}$)¹⁶⁾ を大きく上回ることが確認された。また、ルリコナゾールのヒト血漿たん白結合率は、99.9%と高いため、MIC 90 の 1,000 倍 ($1 \mu\text{g/ml}$) を、爪白癬治療薬として効果を示す爪中薬物濃度と想定した場合、3%以上の製剤では、全層において $1 \mu\text{g/ml}$ をこえる結果となった。

薬物の透過性における爪側の影響因子の一つとして、

Fig. 5. Fungal growth inhibition after 14-day treatment of 5% luliconazole nail solution and 8% ciclopirox nail lacquer.

(a) Judgement criteria of inhibition zone. + means that there is inhibition zone, and - means that there is no inhibition zone. (b) Photo of representative examples of zone of inhibition test. (c) Zone of inhibition rate (%) = (number of nail slices which confirmed zone of inhibition / number of all nail slices) × 100. Data represent mean values (n = 8) and error bars represent SE. **P < 0.01

爪の厚さが挙げられる⁷⁾。そこで、5%ルリコナゾール爪外用液塗布後の爪中薬物濃度への爪の厚さによる影響を確認するため、第1指爪、第2から4指爪、第5指爪、第1趾爪を用いて、14日間投与したときの爪中薬物濃度を測定した。その結果、5%ルリコナゾール爪外用液は、どの厚さの爪においても、全層にわたり、MIC 90の1,000倍(1μg/ml)をこえる濃度を示した。これらの結果から、爪の厚さは5%ルリコナゾール爪外用液の爪中薬物濃度分布に影響を与えない因子と考えられるため、ヒト爪のなかで最も厚いとされる第1趾爪においても、治療効果を示す可能性が示唆された。

また、これまでの外用爪白癬治療薬に関する報告のなかで、連続投与による爪中の薬物動態を調べた報告はない。そこで、5%ルリコナゾール爪外用液を単回、7日、14日および21日投与したときの爪中薬物濃度の違いについて検討を行った。その結果、5%ルリコナゾール爪

外用液は、投与期間が長くなるにつれて、爪中薬物濃度が高くなる傾向が認められた。したがって、5%ルリコナゾール爪外用液は、塗布し続けることで、高い薬物濃度が維持される製剤であると考えられた。

つぎに、5%ルリコナゾール爪外用液および8%シクロピロックスネイルラッカーを14日間投与後、得られた爪スライスを含菌培地に置き、培地中に放出された爪中の薬物が抗真菌活性を有するか否かを検討した。その結果、対照群として設定した8%シクロピロックスネイルラッカーにくらべ、5%ルリコナゾール爪外用液は爪の深部まで抗真菌活性を示した。一方で、爪中薬物濃度分布試験では、爪中でルリコナゾールが抗真菌活性を示す濃度は1μg/mlと仮定して爪中薬物濃度分布試験を実施してきたが、5%ルリコナゾール爪外用液においても、全層にわたる抗真菌活性は認められなかった。その理由として、スライス阻止円試験での検出感度が考えられる。

濃度依存性試験における 5% ルリコナゾール爪外用液の爪中分布における最下層濃度は $5.4 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ であり、爪 1 枚あたりのルリコナゾール量を換算すると 0.43 ng と算出される。一方で、スライス阻止円試験において、阻止円が認められるルリコナゾール量の下限は、既知濃度によるパルプディスクでの阻止円形成の濃度から 3.7 ng (未発表データ) と算出される。つまり、スライス阻止円試験は、有効成分の培地中での拡散による実質的な希釈作用により、検出感度が低いものと考えられる。しかし、これらのことを考慮しても、5% ルリコナゾール爪外用液は、8% シクロピロックスネイルラッカーよりも、爪中に抗真菌活性を示すだけの十分な薬物濃度が入っていることが証明されたものと考えられる。

以上から、5% ルリコナゾール爪外用液は、爪深部まで MIC 90 の 1,000 倍以上の薬物濃度を維持するとともに、爪中のルリコナゾールが抗真菌活性を示すことが確認された。よって本製剤は、爪への高い透過性を有し、爪の深部まで薬物を到達させることが可能な製剤であると考えられる。

文 献

- 1) Pires CAA, Cruz NF, Lobato AM, Sousa PO, Carneiro FR, Mendes AM: Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. *An Bras Dermatol* **89**: 259-264, 2014.
- 2) Panackal AA, Halpern EF, Watson AJ: Cutaneous fungal infections in the United States: Analysis of the National Ambulatory Medical Care Survey (NAMCS) and National Hospital Ambulatory Medical Care Survey (NHAMCS), 1995-2004. *Int J Dermatol* **48**: 704-712, 2009.
- 3) Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R, Konnikov N, Gupta AK, Summerbell R, Sullivan S, Daniel R, Krusinski P, Fleckman P, Rich P, Odom R, Aly R, Pariser D, Zaiac M, Rebell G, Leshner J, Gerlach B, Ponce-De-Leon GF, Ghannoum A, Warner J, Isham N, Elewski B: A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *J Am Acad Dermatol* **43**: 641-648, 2000.
- 4) Ogasawara Y: Prevalence and patient's consciousness of tinea pedis and onychomycosis. *Jpn J Med Mycol* **44**: 253-260, 2003.
- 5) Haneke E, Roseeuw D: The scope of onychomycosis: epidemiology and clinical features. *Int J Dermatol* **38** (Suppl 2): 7-12, 1999.
- 6) 仲 弥, 宮川俊一, 服部尚子, 畑康樹: 足白癬・爪白癬の実態と潜在罹患率の大規模疫学調査 (Foot Check 2007). *日本臨床皮膚科医会雑誌* **26**: 27-36, 2009.
- 7) Daniel RC: Onychomycosis: burden of disease and the role of topical antifungal treatment. *J Drugs Dermatol* **12**: 1263-1266, 2013.
- 8) Elewski B, Tavakkol A: Safety and tolerability of oral antifungal agents in the treatment of fungal nail disease: a proven reality. *Ther Clin Risk Manag* **1**: 299-306, 2005.
- 9) Saner MV, Kulkarni AD, Pardeshi CV: Insights into drug delivery across the nail plate barrier. *J Drug Target* **22**: 769-789, 2014.
- 10) Khengar RH, Jones SA, Turner RB, Forbes B, Brown MB: Nail swelling as a pre-formulation screen for the selection and optimisation of ungual penetration enhancers. *Pharm Res* **24**: 2207-2212, 2007.
- 11) Elewski BE: Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin Microbiol Rev* **11**: 415-429, 1998.
- 12) E. J. van Hoogdale, W. E. van den Hoven, I. J. Terpstra, J. van Zijtveld, J. S. C. Verschoor, J. N. Visser: Nail penetration of the antifungal agent oxiconazole after repeated topical application in healthy volunteers, and the effect of acetylcysteine. *Eur J Pharm Sci* **5**: 119-127, 1997.
- 13) Gupta AK, Daigle D, Paquet M: Therapies for onychomycosis: a systematic review and network meta-analysis of mycological cure. *J Am Podiatr Med Assoc* **105**: 357-366, 2015.
- 14) Gupta AK, Cvetković D, Abramovits W, Vincent KD: LUZU (luliconazole) 1% cream. *Skinmed* **12**: 90-93, 2014.
- 15) Uchida K, Nishiyama Y, Yamaguchi H: *In vitro* antifungal activity of luliconazole (NND-502), a novel imidazole antifungal agent. *J Infect Chemother* **10**: 216-219, 2004.
- 16) Koga H, Tsuji Y, Inoue K, Kanai K, Majima T, Kasai T, Uchida K, Yamaguchi H: *In vitro* antifungal activity of luliconazole against clinical isolates from patients with dermatomycoses. *J Infect Chemother* **12**: 163-165, 2006.
- 17) Koga H, Nanjoh Y, Makimura K, Tsuboi R: *In vitro* antifungal activities of luliconazole, a new topical imidazole. *Med Mycol* **47**: 640-647, 2009.
- 18) Roderick J Hay, Robert Baran: Fungal (Onychomycosis) and other infections involving the nail apparatus. *In* Baran and Dawber's Diseases of the Nails and their Management 4th ed (Baran R, de Berker DAR, Holzberg M, Thomas L ed), chapter 5, pp.211-255, A John Wiley and Son's, Ltd., Chichester, 2012.
- 19) 南條育子, 古賀裕康, 坪井良治: 各種外用抗真菌薬の *in vitro* 抗真菌活性の測定. *日皮会誌* **117**: 149-152, 2007.

Distribution of Luliconazole in Nail Plate by *In Vitro* Permeation and Efficacy by Zone of Inhibition Test after Treatment of Luliconazole Nail Solution

Tsuyoshi Shimamura, Akiko Miyamae, Masakazu Arai,
Aya Minemura, Akira Nozawa, Nobuo Kubota
R&D Laboratories, POLA PHARMA INC.

To clarify the character of luliconazole nail solution we have developed, we investigated luliconazole distribution and antifungal activity in nail plate. An *in vitro* permeation study which measured luliconazole concentration of sliced nail in the transverse direction after treatment of luliconazole nail solution was conducted to investigate for concentration dependency and the influences of nail thickness and treatment duration. When 0.2, 1, 3, 5, and 7.5% luliconazole nail solutions were used, luliconazole was detected in the all the layers of nail and there was a concentration gradient from the dorsal side to deep nail layers. The luliconazole concentration was almost same after 14-day treatment with 5% luliconazole nail solution when using nails of different thicknesses. And we confirmed that concentration of luliconazole into the nail was increased depending on the treatment duration. In zone of inhibition test after 14-day treatment, 5% luliconazole nail solution showed statistically high formation rate of zones of inhibition compared to 8% ciclopirox nail lacquer. Above all, these data suggested that 5% luliconazole nail solution has the potential to show high therapeutic effect for onychomycosis.