原 著

ルリコナゾールのヒト爪由来ケラチンに対する親和性

蓮 子 雅 之¹ 塩 見 涼¹ 高 橋 良 典¹ 元 場 一 彦¹
平 野 宏 文² 坪 井 良 治² 稲 垣 勝 裕¹

¹ 日本農薬株式会社

² 東京医科大学皮膚科学分野

要 旨

抗真菌薬ルリコナゾール（LLCZ）の爪白癬に対する治療効果を解析するために、LLCZの爪中薬物動態を左右する爪ケラチンとの親和性を、エフィナコナゾール（EFCZ）を対照に調べた。健康人および爪白癬患者の爪から調製したケラチン粉末40 mgに4 mlの緩衝液を加え、薬物（3濃度）を添加して振盪（37℃）することによって薬物の吸・脱着率を求めるとともに、試験条件による影響を避けるためフロインドリッヒの吸着等温式による理論的な解析を実施した。その結果、健康人および爪白癬患者のいずれの爪ケラチンでもLLCZはEFCZにくらべ高い吸着率および低い脱着率を示した。フロインドリッヒの吸着係数（ K^{ads}_F ）は5～7倍、脱着係数（ K^{des}_F ）は約2倍とLLCZがEFCZよりも高い値となり、LLCZはEFCZにくらべて爪ケラチンに吸着しやすく、脱着されにくいことが理論的に裏付けられ、LLCZは爪ケラチンに高い親和性を示すと考えられた。脱着操作を反復した際の脱着率の推移を加味すると、EFCZとは爪中での動態が異なり、LLCZは爪ケラチンへの高い親和性の特徴を活かして爪をリザーバーとして貯留され、感染局所で持続的に遊離して抗真菌活性を発揮すると考えられた。両薬物ともにケラチン吸・脱着性は健康人と爪白癬患者間で異なる傾向がみられており、爪白癬患者の爪での薬物動態を考察するうえでより詳細な検討が必要と考えられた。

Key words : luliconazole, efinaconazole, affinity to nail keratin, freundlich isotherm, healthy volunteers, tinea unguium patients

序 文

難治性の表在性真菌症である爪白癬の治療には、抗真菌薬の内服が第一選択とされてきたが、副作用や薬物相互作用の観点から内服による治療を選択できない患者も存在するため¹⁾、外用爪白癬治療薬の開発が望まれてきた。そのような中、わが国では新規外用爪白癬治療薬として、トリアゾール系抗真菌薬エフィナコナゾール（EFCZ）の10%含有製剤（CLENAFIN[®]）が2014年に上市され、続いてイミダゾール系抗真菌薬ルリコナゾール（LLCZ）の5%含有製剤（Luconac[®]）が2016年に上市されたことで、治療現場には外用爪白癬治療薬の選択肢が与えられた。

外用爪白癬治療薬の選択にあたり、病原真菌に対する有効成分の基本活性（*in vitro* 活性）と薬物動態に基づ

く作用機構を理解することが重要となる²⁾。特に薬物動態に関しては、製剤によってコントロールされる部分が大きい感染局所への有効成分の分配³⁾に加えて、病原真菌に対する直接的な抗菌作用を考察する意味で有効成分の局所での動態も重要となる。抗真菌薬の爪中感染局所での動態は、爪の主要構成成分であるケラチンと薬物の親和性²⁾により左右されると考えられる。先にわれわれは、ブタ蹄および健康人爪から調製したケラチン粉末を用いて、薬物の爪ケラチンとの親和性を評価する *in vitro* 試験系を構築した⁴⁾。この評価系において、LLCZはブタ蹄および健康人爪由来のケラチン粉末に対してそれぞれ90.4%および83.3%と高い吸着率を示し、ケラチン親和性が高いことが示唆された。LLCZがケラチンに対して高い親和性を示すことは、Matsudaら⁵⁾も健康人爪由来のケラチンを用いて報告しているが、彼らが報告したLLCZの吸着率は97.1%であり、われわれの結果と

別冊請求先：蓮子雅之

〒586-0094 大阪府河内長野市小山田町 345

日本農薬株式会社研究本部総合研究所

[受付：2017年5月12日，受理：2017年9月27日]

E-mail：hasuko-masayuki@nichino.co.jp

異なっている。このような吸着率に差が生じる原因は、試験条件の違いにあり、なかでも薬物量と基質（ケラチン）との量比が大きく影響すると考えられる。特に複数の物理化学的性質の異なる薬物を同じ試験内で比較する場合、薬物それぞれの吸着率に及ぼす試験条件の影響の大きさが異なることで適切な比較ができなくなる可能性があることに注意しなければならない。このような影響を回避する手法としてフロインドリッヒの理論（吸着等温式）⁶⁾ による客観的な解析が知られている。これは、化合物（薬物）と固相（基質）との吸着現象を物理化学的に解析するモデルとして広く汎用されている理論⁷⁾ であり、化学物質の環境安全性評価の標準法とされる OECD ガイドライン⁸⁾ にも採用されている。

そこで今回われわれは、LLCZ のケラチン親和性をより詳細に検討すべく、先に構築した *in vitro* 試験系⁴⁾ において上記ガイドラインに示されるフロインドリッヒの吸着等温式による解析を試み、EFCZ と比較した。白癬菌はプロテアーゼを分泌してケラチンを分解しながら栄養を摂取するといわれる⁹⁾ ことから爪白癬患者の爪ではケラチンが変性して薬物との親和性に変化が生じる可能性が考えられたので、本研究では健康人由来の爪ケラチンと爪白癬患者由来の爪ケラチンとの比較も検討した。

材料および方法

1. 試験薬物

日本農薬株式会社で合成および精製された LLCZ（純度 100%）および EFCZ（純度 96%）原末を使用した。

2. ケラチン親和性試験

(1) ケラチン粉末の調製

東京医科大学において 48 名の健康人および 32 名の爪白癬患者から採取された爪（医学研究倫理審査 2415 および 3125 号承認済み）を用いて、既報⁴⁾ にしたがってケラチン粉末を調製した。爪は、健康人および爪白癬患者のおのおのを 1 つにまとめ、超遠心粉砕機（IM200, ヴァーダー・サイエンティフィック株式会社、東京）で粉砕して粒径 0.5 mm 以下の粉末とした。これらをエチレンオキサイドガス滅菌したのち、0.1 M Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 緩衝液（pH7.0, 以下緩衝液）、蒸留水、エタノール / エーテル（1/1, v/v）、アセトンおよびメタノールを用いて順次洗浄・脱脂後、自然乾燥させたものを爪ケラチン粉末とした。

(2) ケラチン粉末への薬物親和性試験

健康人あるいは爪白癬患者由来の爪ケラチン粉末を 40 mg 入れたガラス遠心管に緩衝液を 4.0 ml 加えたのち、LLCZ もしくは EFCZ のメタノール溶液を 20 μl ずつ添加した。緩衝液中薬物濃度（計算値）が、各薬物の水溶解度（LLCZ : 0.62 μg/ml [未公表データ], EFCZ : 29 μg/ml¹⁰⁾）以下となる 0.05, 0.15 および 0.5 μg/ml に相当する量として、ケラチン粉末重量あたりの薬物添加量が 5, 15 および 50 μg/g keratin となる 3 試験区を設

定した。これらを 37℃ の温浴中で 4 時間振盪（130 回 / 分）させたのち、1,500 g で 5 分間遠心分離して得られた上清中薬物濃度（ケラチンに吸着しなかった薬物濃度）を HPLC で定量し、以下の式により吸着率を算出した。

$$\text{吸着率 (\%)} = (\text{薬物添加量} - \text{上清中薬物量}) / \text{薬物添加量} \times 100$$

上記操作で得られた沈渣画分（薬物を吸着したケラチン粉末）に 4.0 ml の緩衝液を加えて 37℃ の温浴中で再度 15 分間振盪（130 回 / 分）し、遠心分離（1,500 g, 5 分間）して得られた上清中薬物濃度を HPLC により定量して以下の式により脱着率を算出した。

$$\text{脱着率 (\%)} = \text{上清中薬物量} / \text{沈渣画分中薬物量}^{\#} \times 100$$

（[#]：上述の吸着率を求めた際の薬物添加量から上清中薬物量を引いた値）

試験は 3 連で行ったが、最高濃度区（50 μg/g keratin）については別途 4 連を設け、脱着操作（洗浄操作）を 5 回反復することによる脱着率の推移を調べた。

洗浄操作後の沈渣画分については、残存する薬物をメタノール、アセトニトリルおよび 0.1 N 塩酸含有メタノールで抽出して同様に定量し、試験系における薬物の総回収率は 90% 以上であることを確認した。

フロインドリッヒの解析では、以下の式にしたがって吸着係数（ K_F^{ads} ）および脱着係数（ K_F^{des} ）を算出した。

$$\text{フロインドリッヒの吸着係数 } (K_F^{ads}) : \text{Log } K_F^{ads} = \log (C_m) - 1/n \times \log (C_{aq})$$

$$\text{フロインドリッヒの脱着係数 } (K_F^{des}) : \text{Log } K_F^{des} = \log (C_m) - 1/n \times \log (C_{aq})$$

なお、 C_{aq} および C_m は、吸着率および洗浄 1 回目の脱着率を求めたおのおのの操作における上清中薬物濃度およびケラチン粉末中に残存した薬物濃度を示す。さらに、 C_{aq} の対数を横軸に C_m の対数を縦軸にプロットしたときに得られる直線（吸着等温線）の傾きを求め、吸脱着指数（1/n）とした。

(3) HPLC の分析条件

HPLC 分析は、Inertsil ODS-2 カラム（4.6 mm × 150 mm, 粒径 5 μm, ジーエルサイエンス株式会社、東京）を装着した Agilent 1260 システム（アジレント・テクノロジー株式会社、東京）を用いて Table 1 に示す条件で実施した。

3. 脱着操作で得られた上清中薬物の抗真菌活性検定

(1) 使用菌株

（独）製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター（東京）より購入した *Trichophyton rubrum*

Table 1. Parameters of HPLC analysis for LLCZ and EFCZ

Parameters	Drugs	
	LLCZ	EFCZ
Eluent (Acetonitrile/Distilled water (v/v))	1 / 1	64 / 36
Flow rate (ml / min)	1.2	1.0
Detector wavelength (nm)	295	205

Table 2. Affinity of LLCZ and EFCZ to nail keratin preparations from healthy volunteers and tinea unguium patients.

Nail origin	Drugs	Added drug concentration ($\mu\text{g/g}$ keratin)	Adsorption rate (%)	Desorption rate (%)
Healthy volunteers	LLCZ	5	79.7 $\pm$ 3.6 ***	16.3 $\pm$ 0.6
		15	80.6 $\pm$ 3.4 ***	15.4 $\pm$ 1.2
		50	82.3 $\pm$ 2.2 ***	13.6 $\pm$ 1.6 *
	EFCZ	5	49.0 $\pm$ 4.1	24.6 $\pm$ 5.5
		15	50.8 $\pm$ 4.4	24.9 $\pm$ 8.4
		50	49.6 $\pm$ 3.9	21.7 $\pm$ 3.3
Tinea unguium patients	LLCZ	5	86.3 $\pm$ 2.9 ***	10.6 $\pm$ 2.6 ***
		15	87.3 $\pm$ 0.7 ***	9.9 $\pm$ 0.2 **
		50	87.6 $\pm$ 0.5 ***	11.0 $\pm$ 0.5 ***
	EFCZ	5	55.4 $\pm$ 2.4	34.4 $\pm$ 2.5
		15	55.8 $\pm$ 3.9	29.2 $\pm$ 1.3
		50	55.6 $\pm$ 3.7	27.2 $\pm$ 3.0

Data shows mean $\pm$ standard deviation for 3 repetitions in each concentration.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs EFCZ (Tukey's multiple comparison test)

NBRC5808 株 (LLCZ の MIC = 0.00024 $\mu\text{g/ml}$, EFCZ の MIC = 0.002 $\mu\text{g/ml}$ ¹⁰⁾) の分生子を採取して 1×10^8 conidia/ml に調製したものを接種菌液とした。

(2) 抗真菌活性の検定

既報⁴⁾と同様にディスク拡散法で検定した。すなわち、ケラチン親和性試験の洗浄操作 1 回目で得られた上清 20 μl をペーパーディスク (Φ 8 mm, アドバンテック東洋株式会社, 東京) に染み込ませて菌を重層した寒天平板培地上 (中央) に置き, 27°C で 4 日間培養した。形成された阻止円を写真で記録するとともに, 阻止円の短径と長径をノギスで測定してその平均値を代表値とし, 各試験区 3 連の平均値を求めた。別途, LLCZ および EFCZ のアセトン溶液 (LLCZ : 0.015~5 $\mu\text{g/ml}$, EFCZ : 0.5~150 $\mu\text{g/ml}$) を用いて, 同様の方法で阻止円を形成させて検量線を作成した。この検量線を基に, 各試験区上清の生物学的力価を求めた。

4. 統計学的解析

統計解析ソフト The SAS[®] System (SAS institute Inc., NC, USA) を用いて解析した。ケラチン親和性試験における吸着率および脱着率の群間比較は, Tukey の多重比較検定法を用いて実施した。有意水準は 5% と

した。

結 果

1. ケラチン親和性

ケラチン親和性試験における吸着率および脱着率の測定結果を Table 2 に示す。LLCZ および EFCZ は各 3 濃度で試験を行ったが, 両薬物とも健常人および爪白癬患者のいずれの爪ケラチンにおいても吸着率と脱着率に試験濃度による差はみられなかった。LLCZ および EFCZ の吸着率は, 健常人由来爪ケラチンでそれぞれ 79.7~82.3% および 49.0~50.8%, また爪白癬患者由来爪ケラチンでそれぞれ 86.3~87.6% および 55.4~55.8% となり, LLCZ は EFCZ と比較して有意に高い値を示した。いずれの薬物も吸着率は爪白癬患者における値が健常人のそれらより高い傾向にあった。

LLCZ および EFCZ の脱着率は, 健常人由来爪ケラチンでそれぞれ 13.6~16.3% および 21.7~24.9%, 爪白癬患者由来爪ケラチンでそれぞれ 9.9~11.0% および 27.2~34.4% となり, LLCZ の爪ケラチンからの脱着率は EFCZ と比較して健常人で明らかに低い傾向 (50 $\mu\text{g/g}$ keratin 区では有意) を示し, また爪白癬患者では有意

Table 3. The Freundlich analysis for adsorption and desorption coefficient of LLCZ and EFCZ to nail keratin preparations from healthy volunteers and tinea unguium patients

Nail origin	Drugs	Adsorption		Desorption	
		K_F^{ads}	1/n	K_F^{des}	1/n
Healthy volunteers	LLCZ	479	0.969	822	0.993
	EFCZ	94	0.979	354	0.922
Tinea unguium patients	LLCZ	723	0.983	732	0.981
	EFCZ	118	0.986	407	0.988

Fig. 1. Change of desorption rates of LLCZ and EFCZ during repeated washings of keratin samples with buffer.

Data shows mean $\pm$ standard deviation for 4 repetitions.* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs EFCZ (Tukey's multiple comparison test)

に低かった。脱着率を健常人と爪白癬患者で比較すると、LLCZ は健常人よりも爪白癬患者由来の爪ケラチンでやや低い傾向、一方、EFCZ は健常人よりも爪白癬患者でやや高い傾向にあった。フロインドリックの解析による吸着係数 (K_F^{ads})、脱着係数 (K_F^{des}) および吸脱着指数 (1/n) を Table 3 に示す。健常人および爪白癬患者由来の爪ケラチンに対する K_F^{ads} は、LLCZ でそれぞれ 479 および 723、EFCZ で 94 および 118 となり、いずれも LLCZ が EFCZ より明らかに高かった。また、両薬物ともに健常人より爪白癬患者由来の爪ケラチンで高い値がみられた。吸着における 1/n は、LLCZ で 0.969 および 0.983、EFCZ で 0.979 および 0.986 となり、いずれも 1.0 に近似した。健常人および爪白癬患者由来の爪ケラチンに対する K_F^{des} は、それぞれ LLCZ で 822 および 732、EFCZ で 354 および 407 となり、LLCZ は EFCZ より高い値を示した。爪ケラチンの由来による K_F^{des} についても、LLCZ は健常人でやや高い傾向、一方、EFCZ は爪白癬患者でやや高い傾向にあった。脱着における 1/n は LLCZ で 0.993 および 0.981、EFCZ で 0.922 および 0.988 となり、脱着においても 1.0 に近似する値が観察された。

50 $\mu\text{g/g}$ keratin 添加区において、洗浄操作を 5 回反

復した時の脱着率の推移を Fig. 1 に示す。脱着率の推移は健常人と爪白癬患者由来の爪ケラチンで同様の傾向にあった。すなわち、いずれの薬物においても脱着率は洗浄回数に伴い低下したが、その程度は LLCZ より EFCZ で顕著であった。洗浄操作 1 回目における脱着率は、EFCZ が LLCZ より約 2 倍高かったが、洗浄操作 3 回目以降、両薬物の脱着率は逆転した。洗浄操作 5 回目の健常人由来および爪白癬患者由来ケラチンにおける脱着率は、LLCZ でそれぞれ 4.9% および 5.3%、EFCZ でそれぞれ 2.8% および 2.7% と、LLCZ では EFCZ より有意に高かった (約 2 倍)。

2. 生物学的力価

洗浄操作 1 回目の上清を用いて実施したディスク拡散法において観察された阻止円の代表例を Fig. 2 に示す。阻止円は、LLCZ においてのみ観察され、その平均阻止円径は健常人由来で 22.7 mm、爪白癬患者由来で 21.8 mm であった。阻止円径から求めた LLCZ の生物学的力価はそれぞれ 0.017 $\mu\text{g/ml}$ および 0.016 $\mu\text{g/ml}$ であった。

Fig. 2. Inhibition zones observed in disk diffusion assay. Zone inhibition was observed in the samples treated with LLCZ, but not in those treated with EFCZ. Mesh size in background is 1 cm.

考 察

健康人由来の爪ケラチンに対する LLCZ の吸着率および脱着率は、薬物添加濃度にかかわらずそれぞれ 79.7～82.3% および 13.6～16.3% の範囲となり、既報の結果⁴⁾と一致する値が再現された。一方、EFCZ は LLCZ と比較して吸着率は低く (49.0～50.8%)、逆に脱着率は高い (21.7～24.9%) ことが確認された。

フロインドリッヒの解析⁶⁾において、吸着あるいは脱着の濃度依存性を表す係数である吸脱着指数 (1/n) は LLCZ および EFCZ とともに 1.0 に近似した。吸脱着指数は 1.0 に近いほど薬物のケラチンに対する吸・脱着は薬物添加量に依存しないことを示しており⁶⁾、両薬物ともに爪ケラチンに対する吸着は可逆的であることが分かる。爪ケラチンに対する吸着性の指標である K_F^{ads} は、健康人および白癬患者のいずれの由来においても、LLCZ が EFCZ より高く、脱着性の指標である K_F^{des} においても同様であった。 K_F^{ads} は高いほど吸着性が強く、 K_F^{des} は高いほど脱着性が弱い、すなわち遊離しにくいとされることから、LLCZ は EFCZ とくらべて爪ケラチンに対して吸着しやすく、脱着されにくいことが理論的に裏付けられた。この吸・脱着性から考えて、LLCZ は EFCZ よりケラチン親和性が高いと判断される。

爪白癬患者の爪ではケラチンが変性して⁹⁾ 薬物との親和性に変化が生じる可能性が考えられたので、今回は健康人由来の爪ケラチンと爪白癬患者由来の爪ケラチンとで比較を試みた。その結果、患者由来の爪ケラチンにおける吸着率は、健康人由来のそれと比較して LLCZ および EFCZ のいずれも高い傾向にあり、フロインドリッヒの K_F^{ads} も同様の傾向がみられた。脱着率は、LLCZ で

健康人よりも爪白癬患者由来の爪ケラチンでやや低く、一方、EFCZ は健康人よりも爪白癬患者由来の爪ケラチンでやや高い傾向にあり、フロインドリッヒの K_F^{des} においても弱いながら同様の傾向にあった。健康人と爪白癬患者とで薬物の親和性に違いがあるのかもしれない。今回は試験規模も限られていたので、本点を明確にするには今後さらにサンプル数を増して詳細に検証することが必要と考えられる。脱着率は、感染局所の爪ケラチンに吸着した薬物がどの程度遊離して病原菌に作用するかをみる指標となる。そこで今回は洗浄操作を反復して薬物の遊離の持続性を調べた。洗浄操作を 5 回反復した時、EFCZ は 1 回目の洗浄では LLCZ よりも有意に高い脱着率が観察されたが、その後洗浄を繰り返すと脱着率は顕著に低下した。一方、LLCZ は EFCZ にくらべ最初の洗浄による脱着率は高くないものの、その後洗浄を繰り返しても脱着率の低下は緩慢であり、洗浄 3 回目以降は EFCZ よりも有意に高い脱着率を示した。爪ケラチンに吸着した LLCZ は、EFCZ よりも持続的にかつ安定した濃度で遊離すると考えられる。

爪ケラチンに吸着している抗真菌薬は、遊離して活性化されることで抗真菌活性を発揮すると考えられている^{1, 4, 5, 11)}。そこで緩衝液中に遊離した薬物の抗真菌活性をディスク拡散法で検証したところ、LLCZ は健康人および患者のいずれにおいても明らかな阻止円の形成を認め、ケラチンから脱着した遊離薬物が抗真菌活性を発揮することを確認できた。一方、EFCZ では阻止円は形成されず、抗真菌活性を捉えることができなかった。ディスク拡散法は検出感度が低い抗真菌活性が LLCZ より弱い EFCZ¹⁰⁾では活性を検出できなかったものと推察される。

以上より、LLCZ はその高いケラチン親和性によって

爪ケラチンをリザーバーとして爪中に貯留されるとともに、貯留した薬物が持続的かつ安定した濃度で感染局所に遊離し、治療効果を発揮すると考えられる。一方、EFCZは、LLCZとは異なる薬物動態により効果を発揮していると考えられる。

LLCZとEFCZの臨床効果に関しては、5% LLCZ含有製剤の第Ⅲ相臨床試験では、48週後の完全治癒率が14.9%（プラセボ5.1%）と報告されている¹²⁾。一方、10%EFCZ含有製剤は米国で2種（試験Ⅰおよび試験Ⅱ）の第Ⅲ相臨床試験が実施され、52週後（薬剤塗布は48週間）の完全治癒率は試験Ⅰで17.8%（プラセボ3.3%）、試験Ⅱで15.2%（プラセボ5.5%）と報告されている¹³⁾。プラセボを差し引いた実質的な完全治癒率は、5% LLCZ含有製剤で9.8%、一方10% EFCZ含有製剤で9.7~14.5%と大きな差はみられず、さらに製剤中の有効成分含量（EFCZはLLCZの2倍）、製剤の基剤組成、治療期間等が違っているので正確には比較できないが、有効成分であるLLCZとEFCZ自体の治療効果は類似していると推察される。つまり、病原菌に対する基本活性（*in vitro* 活性）がLLCZより低い¹⁰⁾ EFCZがこのような治療効果を示す理由としては、EFCZのケラチン親和性の低さが逆に爪中で抗真菌活性を示すことに繋がっている可能性が推察される。すなわち、投薬直後に感染局所に分布した薬物³⁾は、LLCZでは多くがケラチンに吸着していったん貯留されるのに対して、EFCZはケラチンに吸着されずに一時的に高濃度で存在することで病原菌に作用し、治療効果を発揮していると推察される。このような感染局所での両薬物の薬物動態の違いから考えると、LLCZではケラチンにいったん貯留された薬物が徐々に脱着して病原菌に対する抗真菌活性が長期に持続し得る¹⁴⁾ことから、爪白癬の再発や再感染の予防に繋がる可能性も示唆される。今後、治療現場で長期にわたり使用されることで、LLCZおよびEFCZそれぞれの薬剤の特徴が明らかになると期待したい。

謝 辞

実験にご協力頂いた松葉敬子氏および本稿をご高覧頂いた梅哲夫博士（いずれも日本農薬株式会社）に御礼申し上げます。

COI 自己申告

蓮子雅之、塩見涼、高橋良典、元場一彦、稲垣勝裕は日本農薬株式会社の社員である。

文 献

- 1) 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.
- 2) 内田勝久, 山口英世: Terbinafine のケラチン親和性に関する検討. *真菌誌* **34**: 207-212, 1993.
- 3) 島村 剛, 宮前亜紀子, 今井絢美, 平柳こず恵, 岩永知幸, 久保田信雄, 澁谷和俊: 外用爪白癬治療薬の特性比較. *Med Mycol J* **57**: J141-J147, 2016.
- 4) 蓮子雅之, 梅 哲夫, 恒光俊哉, 松本貴裕, 古賀裕康, 平野宏文, 坪井良治: ルリコナゾールの健常人爪およびブタ蹄由来ケラチンに対する親和性. *Med Mycol J* **57**: J7-J12, 2016.
- 5) Matsuda Y, Sugiura K, Hashimoto T, Ueda A, Konno Y, Tatsumi Y: Efficacy coefficients determined using nail permeability and antifungal activity in keratin-containing media are useful for predicting clinical efficacies of topical drugs for onychomycosis. *PLoS One* **11**: e0159661, 2016.
- 6) Masel RI: *In The Freundlich Adsorption Isotherm. Principles of Adsorption and Reaction on Solid Surfaces*. pp.247. Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Inc., NY, USA, 1996.
- 7) 安部郁夫: 吸着の化学. *オレオサイエンス* **2**: 275-281, 2002.
- 8) OECD Guideline for the testing of chemicals, "Adsorption - Desorption Using a Batch Equilibrium Method" 106, Adopted: 21st January 2000.
- 9) 山口英世: 真菌の病原因子, 病原真菌と真菌症. pp. 64-65, 南山堂, 東京, 2007.
- 10) 前田 潤, 南條育子, 古賀裕康, 梅 哲夫, 榎村浩一, 坪井良治: ルリコナゾールの白癬菌に対する *in vitro* 抗真菌活性 - MIC および MFC の同時測定による既存外用抗真菌薬との比較試験 -. *Med Mycol J* **57**: J1-J6, 2016.
- 11) 島村 剛, 宮前亜紀子, 新井聖和, 嶺村 彩, 野沢 暁, 久保田信雄: 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. *Med Mycol J* **57**: J19-J25, 2016.
- 12) Watanabe S, Kishida H, Okubo A: Efficacy and safety of luliconazole 5% nail solution for the treatment of onychomycosis: A multicenter, double-blind, randomized phase III study. *J Dermatol* **44**: 753-759, 2017.
- 13) Gupta AK, Paquet M: Efinaconazole 10% nail solution: a new topical treatment with broad antifungal activity for onychomycosis monotherapy. *J Cutan Med Surg* **18**: 151-155, 2014.
- 14) Koga H, Nanjoh Y, Toga T, Pillai R, Jo W, Tsuboi R: Luliconazole Retention in Stratum Corneum and Prevention of Fungal Infection in a Guinea Pig Tinea Pedis Model. *J Drugs Dermatol* **15**: 611-615, 2016.

Affinity of Luliconazole for Human Nail Derived Keratin

Masayuki Hasuko¹, Ryo Shiomi¹, Yoshinori Takahashi¹, Kazuhiko Motoba¹, Hirofumi Hirano², Ryoji Tsuboi² and Katsuhiro Inagaki¹

¹Nihon Nohyaku Co., Ltd.

²Department of Dermatology, Tokyo Medical University

Affinity of Luliconazole (LLCZ), an antifungal drug used for topical treatment of onychomycosis in Japan, to nail keratin was demonstrated. Efinaconazole (EFCZ) was used as a reference drug. Drugs at fixed concentrations were added to 4 ml of buffer solution containing 40 mg of nail keratin powder prepared from healthy volunteers or from tinea unguium patients. The mixtures were shaken at 37°C, and adsorption and desorption rates of the drug in nail keratin were measured. Theoretical analysis using the Freundlich adsorption isotherm was applied to eliminate effects of testing conditions on the results. Results showed that compared with EFCZ, LLCZ exhibited high adsorption rates and low desorption rates in nail keratins. These results were verified by Freundlich analysis, in which adsorption coefficient (K^{ads}_F) and desorption coefficient (K^{des}_F) of LLCZ were 5–7 times and about 2 times higher than EFCZ, respectively. In addition, antifungal activity against *Trichophyton rubrum* of the desorbed LLCZ samples was determined using disk diffusion assay. In conclusion, LLCZ is considered to possess high affinity to nail keratin. LLCZ, therefore, can be retained in the nail as a reservoir and continuously desorbed at the infection site to exhibit antifungal activity against pathogenic fungi. The pharmacokinetics of LLCZ in the nail is believed to differ from that of EFCZ. As adsorption and desorption rates of the two drugs in nail keratin tended to be different between healthy volunteers and patients, further detailed study is needed.