

【短報】

真菌に対するトリクロサンと尿素の併用効果に関する検討

高岡 洋五

滋賀県薬剤師会*

(平成14年9月26日受付・平成14年12月16日受理)

In vitro においてトリクロサン (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxy diphenyl ether) は、供試真菌株すべてに発育阻止効果が観察された。またトリクロサンに尿素と微量の硫酸を併用した場合の発育阻止効果は、トリクロサン単剤に比べ明らかに優れていた。この結果、静菌的トリクロサンが尿素との相乗効果により抗真菌作用の増強を示すことが明らかになった。

Key words: 相乗効果, 2,4,4'-トリクロロ-2'-ヒドロキシジフェニルエーテル, 尿素, 抗真菌薬, 硫酸

水虫は、白癬菌が頭部、股部、手掌、趾間などの皮膚角質層、有棘層、真皮、皮下組織などで発育して病変を生じる皮膚領域の疾患である。白癬菌は、生体内で多くのブドウ糖をエネルギー源とし、好氣的条件下で発育に必要なエネルギーを獲得しながら¹⁾、発芽、増殖、芽胞形成という生活環で生息している。環境が生育に不適な状態になると細胞内に芽胞という耐久構造を形成し、物理的、化学的条件に対して抵抗性が強くなる。この芽胞は抗真菌薬に対して抵抗性を示す²⁾。近年、新規の抗真菌薬が開発され、優れた臨床効果が報告されている^{3,4)}。それにもかかわらず水虫は完治し難い皮膚病であり、治療後も菌は表皮角質層の深部に潜伏寄生するが多い。真菌細胞が動物細胞と生物学的に類似していることが選択性の高い抗真菌薬の開発を困難にしている⁵⁾。そこで1980年ごろから抗真菌薬の抗真菌作用を増強する助剤の検討に取り組み、これまでにこの研究から2種類の改良抗真菌薬⁶⁾を開発した。さらに、真菌に対し静菌作用を有する消毒薬に尿素を添加し、基礎的併用効果⁷⁻¹¹⁾についても検討した。本稿では、真菌に対するトリクロサンと角質溶解剥離剤としての尿素との併用効果について、安定剤として硫酸を添加して基礎的検討をしたのでその成績を述べる。

1. 使用菌株

Microsporum gypseum ATCC 8138, ATCC 11658, *Trichophyton rubrum* ATCC 10218, ATCC 18753, *Epidermophyton floccosum* ATCC 15693, ATCC 44685, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 13396, ATCC 18748, ATCC 18613, *Candida albicans* ATCC 18804, ATCC 20032 を用いた。

2. 培地

真菌用サブロー寒天 (栄研化学) を用いた。

3. 使用抗真菌薬

トリクロサン (2,4,4'-トリクロロ-2'-ヒドロキシジフェニルエーテル) を用いた¹²⁾。トリクロサンは、実際使用する上で生体への毒性が低く、皮膚刺激も少なく、主に手指の殺菌消毒薬 (グリンズ[®]丸石製薬) として使用されている。対照薬として、エンペシド (バイエル薬品): Agent A, パラベール (大塚製薬): Agent B, シツカニン (三共): Agent C, バドラフェン (アベンティスファーマ): Agent D, デルマシド (科研製薬): Agent E, ハイベラン (エスエス製薬): Agent F, エフゲン (太源製薬): Agent G, ハイベチック (佐藤製薬): Agent H, コザック S (全薬工業): Agent I 原薬を用いて調整した。

4. 試薬

角質溶解剥離剤として尿素 (試薬特級: ナカライテス

Table 1.

	20% urea aqueous solution (mL)	2% Triclosan ethanol solution (mL)	Concentrated sulfuric acid (mL)	50% ethanol aqueous solution (mL)	Caustic soda (mL)	50% ethanol aqueous solution (mL)
a	1	1	0.05	—	—	0.5
b	1	1	—	0.05	—	0.5
c	1	1	—	—	0.5	0.05

Stability of urea and triclosan after the addition of concentrated sulfuric acid or sodium hydroxide under sealed conditions

ク)を用いた。尿素とトリクロサンの分解を抑制するための安定剤として濃硫酸(試薬特級:ナカライテスク)を用いた。

5. 調整抗真菌薬

トリクロサン 0.25% (w/v), トリクロサン 0.5% (w/v), トリクロサン 1.0% (w/v), トリクロサン 1.0% (w/v)

Table 2.

Solution	Ammonia production %	Triclosan decomposition %
a	0.051	2.9
b	0.052	22.9
c	0.051	24.8

Stability was slightly reduced after the addition of sodium hydroxide. When a solution containing urea and triclosan was mixed with a small volume of sulfuric acid, the two ingredients were markedly less degraded, showing good stability and prolonged actions

+尿素 5% (w/v), トリクロサン 1.0% (w/v) +尿素 10% (w/v) を 50% エタノール水溶液で調整し, また, Econazole nitrate (インファ・イタリア) 1%: Agent B, Exalamide (エスエス製薬) 5%: Agent F は 99.8% メタノール (試薬特級: 片山化学) で調製, Clotrimazole (金剛化学) 1%: Agent A, Siccanin (三共) 1%: Agent C, Ciclopirox olamine (アベンティスファーマ) 1%: Agent D, Phenylundecylenoate (科研製薬) 0.5%: Agent E, Undecylenic acid (ナカライテスク) 3%–Salicylic acid (ナカライテスク) 4%: Agent G, Konstazole (佐藤製薬) 0.2%–Undecylenic acid (ナカライテスク) 12%: Agent H, Tolnaftate (ハマリ産業) 2%: Agent I を 99.5% エタノール (試薬特級: 片山化学) で調整し, 各液 10 μ L 浸漬させた直径 6 mm 濾紙を乾燥させる。

真菌の薬剤感受性測定法¹³⁾は拡散間接測定高岡変法にて実施した。11 種類の真菌株について純培養後, 培地

Table 3.

Agents	Number of samples	Effectiveness (%)	Mean inhibitory width (mm)
Triclosan (1.0%)	11	100	3.50 (\pm 0.14)
Triclosan (0.5%)	11	100	3.26 (\pm 0.21)
Triclosan (0.25%)	11	100	2.16 (\pm 0.15)
Triclosan (1.0%) + Urea (5%)	11	100	7.00 (\pm 0.23)
Triclosan (1.0%) + Urea (10%)	11	97.7	5.20 (\pm 0.37)
Agent A Clotrimazole (1%)	11	79.4	4.58 (\pm 0.25)
Agent B Econazole nitrate (1%)	11	83.3	6.00 (\pm 0.05)
Agent C Siccanin (1%)	11	66.6	1.76 (\pm 0.15)
Agent D Ciclopirox olamine (1%)	11	35.3	0.86 (\pm 0.08)
Agent E Phenylundecylenoate (0.5%)	11	57.6	2.50 (\pm 0.15)
Agent F Exalamide (5%)	11	66.6	3.00 (\pm 0.26)
Agent G Undecylenic acid (3%) Salicylic acid (4%)	11	73.3	2.40 (\pm 0.25)
Agent H Konstazole (0.2%) Undecylenic acid (12%)	11	85.7	2.58 (\pm 0.30)
Agent I Tolnaftate (2%)	11	33.3	0.84 (\pm 0.06)

The total antifungal activity of individual agents against 11 kinds of fungus (n = 32)

上に手動の試験管ホモジナイザーに5%ブドウ糖2 mLと真菌約0.5 gを入れ、ゆるやかに攪拌混和して均等にそれぞれ接種する。その表面にディスクを置き、無菌室・室温において測定しやすくするため10日間培養する。この発育阻止帯の幅(mm)を計測し評価した。

トリクロサンおよび尿素の併用における安定剤の効果についても検討した。Table 1に示すように調製溶液2.55 mLを密封容器で37.0°Cで72時間放置した後、尿素の分解量を $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2$ の反応により、生成するアンモニアは藤井、奥田法の変法により測定した。トリクロサンについてはフェノール系化合物はメタ過ヨウ素酸ナトリウムの存在下で4-アミノアンチピリンと縮合反応を起こし、キノン型色素を生成するのでその吸光度500 nmで測定することによってトリクロサンの定量分析を行った(Table 2)。

水酸化ナトリウム添加時の安定性は若干劣るが、尿素とトリクロサンは硫酸添加時に安定である成績を得た。11の菌種に対する各種薬剤の抗真菌活性をTable 3に示す。トリクロサンはいずれの濃度においても、全菌株に対して抗真菌活性を示した。抗真菌性薬剤として有効成分1%トリクロサンと5%尿素との併用による抗真菌活性は市販薬含有成分と比較してももっとも強かった。

白癬菌などによる真菌症を治癒させるためには、これらの原因真菌を100%死滅させることが理想的である。その際、抗真菌薬の有効性を決定する大きな要因は、①抗真菌活性の強弱、②細胞膜障害能、③宿主の免疫賦活化作用、④感染部位への抗真菌薬の移行能、⑤薬物の体内での安定性などが考えられる。今回、トリクロサンは真菌細胞膜リン脂質と直接特異的に結合して、膜透過性を亢進することにより細胞膜障害を起こし、栄養となるアミノ酸、糖、核酸塩基の取り込みなどの細胞代謝経路に対する阻害作用により、細胞の増殖停止や膜変位が進み菌糸細胞の破壊が起こり死滅に至ると考えられる。尿

素はきわめて多くの酸、有機化合物と複塩・付加物をつくることが知られている¹⁴⁾。H₂SO₄存在下、尿素併用により、複塩・付加物を作り、トリクロサンの抗真菌活性が高まると考えられた。

稿を終えるにあたり、福地製薬株式会社施設ご提供に際し、中島 忍先生のご尽力に深謝いたします。

文 献

- 1) 高岡洋五: 糖尿病と水虫。プラクティス 1, 2, 56~57, 1991
- 2) 後藤 稠編集: 芽胞(孢子)医学大辞典。第2版, p.277, 1999
- 3) 山口英世: 抗真菌剤。医薬ジャーナル 32 (S-1): 126, 1996
- 4) 吉田耕一郎, 二木芳人: 抗真菌薬。医薬ジャーナル 38 (S-1): 231, 2002
- 5) 田部和久, 韓 秀妃: 抗真菌剤。医薬ジャーナル 31 (S-1): 149~158, 1995
- 6) 高岡洋五: 助剤添加による抗真菌剤の相乗効果。基礎と臨床 Vol.24 (15): 529~532, 1990
- 7) 高岡洋五: 水虫外用薬。日本国特許庁, A 61 K 31/085, 1984
- 8) Takaoka Y: Au β erlich anwendbares Medikament gegen Fu β pilz. DEUTSCHES PATENTAMT, 12, 06, 1984, JP 59-121586
- 9) Takaoka Y: Improvements in or relating to the treatment of athlete's foot. UK Patent, 11 June 1985
- 10) Takaoka Y: EXTERNAL APPLICATION MEDICINE FOR ATHLETE'S FOOT. US Patent, May 20, 1985
- 11) Takaoka Y: Medicament ad uso esterno Per il piede d' atleta. Switzerland Patent, June 5, 1985, No 2387/85
- 12) 新谷洋三, 高谷悦子, 中村美寿子: 特殊製剤について。薬局 28: 43~47, 1977
- 13) 金井正光, 金井 泉, 薬剤耐性感受性試験。臨床検査法提要, p.121, 1996
- 14) 南修正男 編: 尿素。化学大辞典 6, p.823, 1978

Examination about the combined use effect of trichlosan and urea to fungus

Yogo Takaoka

Medicine and Pharmacy Labor Division Support Center, Shiga Prefectural Pharmaceutical Association,
4-6-18 Moriyama, Moriyama, Shiga, Japan

Trichlosan (2, 4, 4'-trichloro-2'-hydroxy diphenyl ether) inhibited growth in all test fungus strains *in vitro*. Furthermore, the inhibitory effects of a combination therapy, consisting of trichlosan, urea and only a small amount of sulfate, were markedly more potent than those of trichlosan alone. These results suggest that bacteriostatic trichlosan enhances antifungal actions via its synergistic effects with urea.