

## 短報

# *in vitro*爪白癬モデルを用いたパルマローザ精油の 抗白癬活性に対する加温効果の検討

The effect of warming on anti-dermatophyte activity of  
palmarosa essential oil using *in vitro* tinea unguium model

丸 山 奈 保<sup>1), 2)</sup>、高 橋 美 貴<sup>1)</sup>、山 田 剛<sup>1)</sup>、西 山 彌 生<sup>1)</sup>、安 部 茂<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 帝京大学医真菌研究センター、<sup>2)</sup> 帝京平成大学健康メディカル学部健康栄養学科

## 要旨

爪白癬は足白癬に続発して発症することが多く、8人に1人が感染しているといわれるほど頻度が高い。植物精油は、*T. mentagrophytes*を接種した寒天ブロック法において、精油が加温により抗真菌効果が増強することが報告されていることから、爪白癬に対しても精油と温度を併用することで治療効果が期待できると考えた。そこで、我々が作製した*in vitro*爪白癬モデルを用い、パルマローザ油の抗白癬活性に対する加温効果について検討を行った。感染爪をパルマローザ油およびテルビナフィン塩酸塩希釈液中42℃で20分間処理することで、120時間後の白癬菌発育が27℃と比較し強く抑制された。各温度での最小殺菌濃度を比較すると、パルマローザ油では4倍以上の差が認められたのに対し、テルビナフィン塩酸塩は2倍となり、精油で加温効果が強いことが示された。今後、爪白癬治療に精油を用いる可能性をより高めるために、加温を併用した検討を進めていくことが必要であろうと考える。

## 1. 序文

白癬は、*Trichophyton rubrum*や*T. mentagrophytes*などの白癬菌が、皮膚の表皮角層、毛髪、爪などのケラチンを豊富に含む部位に定着・増殖することにより発症する皮膚糸状菌感染症である。その中で、足白癬（*tinea pedis*）は非常に身近な感染症であり、5人に1人が罹患していると推定されている。爪白癬（*tinea unguium*）は足白癬に続発して発症することが多く、8人に1人が感染しているといわれるほど頻度が高い。感染した菌糸の多くが爪のケラチン層に侵入し気層を形成するため、爪が白濁し、さらに、爪の下層では菌が増殖を続け、爪が厚く変形するのが特徴的である。爪甲内への薬剤浸透性の低さなどの問題から、外用薬のみによる爪白癬の治療は困難であり、主に経口抗真菌剤が使用される。しかしながら、経口剤には、患者が使用できないケースや副作用の問題がある。近年、エフィナコナゾール（クレナフィン）、ルリコナゾール（ルコナック）のような浸透性を高めた外用液剤が発売されているが、有効性の更なる改善が望まれており、新たな治療法の開発が期待される。

植物精油は古くから皮膚や粘膜での微生物感染のケアに用いられ、その経験的効果が報告されてきた。多くの精油で*in vitro*での抗菌・抗真菌作用が測定され、細菌よりも真菌、特に白癬菌に対する抗真菌効果が強いことが報告されている。爪白癬に対しては、Buck<sup>1)</sup>やSyed<sup>2)</sup>らが臨床研究を行い、ティートリー油単独あるいは既存薬剤との併用で治癒あるいは改善を示したことを報告している。皆川<sup>3)</sup>は、数種類の精油を含む軟膏により爪白癬が改善されたという症例を報告している。これらは、精油自身の浸透性の高さとともに、精油が薬剤の爪への吸収性を高めたことが効果の一因と考えられる。

白癬菌は温度感受性が比較的高いことが知られている。井上<sup>4)</sup>は、*Trichophyton mentagrophytes*を接種した寒天ブロックを用い、精油希釈液の温度を変化させることで、精油と加温による併用効果について報告した。さらに、足白癬患者を対象に、パルマローザ油希釈液による足浴（1日1回、4日間）によって症状の改善と高い除真菌率（high mycological eradication）が認められることを報告した<sup>5)</sup>。

以上のことから、抗白癬菌活性と爪への高い浸透

性が期待できる精油と温度を併用することで、爪白癬に対しても治療効果が期待できると考えた。しかしながら、井上らが実験に使用した白癬菌の寒天ブロックモデルは、爪白癬モデルとしては不十分と言える。そこで、我々が作製したin vitro爪白癬モデル<sup>6)</sup>を用い、パルマローザ油の抗白癬活性に対する加温効果について検討を行ったので報告する。

なお、本研究は、帝京大学倫理委員会の承認（承認番号12-175）およびボランティアからの承諾を得て実施した。

## 2. 材料および方法

### 2-1. 菌株および接種菌の調整

試験菌として*Trichophyton mentagrophytes* (TIMM2789) を使用した。Sabouraud dextrose agar (SDA) 培地 (BD Biosciences) を用いて、TIMM2789を28℃、3日間培養後、培地に0.05 % Tween80を含む滅菌生理食塩水を注入し、コンラージ棒で小分生子を採取した。セルストレイナー (40 μm; BD Biosciences) を用いてろ過した小分生子を遠心によって回収し、滅菌生理的食塩水を用いて洗浄後、 $1 \times 10^8$  cells/mlとなるように小分生子を滅菌生理的食塩水に懸濁した。

### 2-2. 抗真菌活性測定のための爪白癬モデルの作成

in vitro爪白癬モデルはNakashimaらの方法<sup>7)</sup>を改変して作成した。爪サンプルは、健康ボランティアより提供された手指爪の遊離縁を用いた。爪片は1x2 mm平方にカットし、5分間煮沸消毒後、70 %エタノール中で1時間振盪し、殺菌した。

小分生子懸濁液 ( $1 \times 10^8$  cells/ml) を0.2 %  $K_2HPO_4$ 、0.005 %  $CaCl_2$ 、0.005 %  $MgSO_4$ 、25 μg/ml chloramphenicol (Sigma-Aldrich)、500 μg/ml cycloheximide (Wako Pure Chemical Industries)、1 % Agarose I (同人化学) を含む無栄養寒天培地に最終濃度 $1 \times 10^6$  cells/mlになるように加えた。懸濁液12 mlを直径9 cmの滅菌シャーレに分注して平板培地を作製し、使用時まで4℃に保存した。爪切片は平板培地に爪甲面を上向きに載せ、28℃、3日間、さらに30℃、2日間培養した。

### 2-3. 精油および抗真菌剤

パルマローザ油（プラナロム社）は健草医学舎より提供を受け、テルビナフィン塩酸塩はSigma-Aldrich Japanより購入した。パルマローザ油およびテルビナフィン塩酸塩は、各1.28 g/ml、2 mg/mlとなるようDMSOに溶解した後、0.1 %寒天水溶液を用いて適当な濃度に希釈した。DMSO最高濃度は0.5 %である。コントロールには0.1 %

寒天水溶液に0.5 % DMSOを加えた。

### 2-4. 抗真菌活性測定

抗白癬活性は、井上らの方法<sup>4)</sup>を改変して行った。パルマローザ油およびテルビナフィン塩酸塩の各希釈液5 mlをガラスチューブに加え、27あるいは42℃の水浴に保持した。感染した爪切片は蒸留水で洗浄後、チューブに5切片ずつ入れ、各温度の水浴で20分間緩やかに振盪させた。爪切片は室温の蒸留水で洗浄後、濾紙の上に置いて過剰な水分を除いた。処置後の爪をchloramphenicolとcycloheximideを含むSDA培地の上に置き、28℃、120時間の培養後に形成されるコロニーの面積を、lenaraf220bソフトを用いて測定した。発育阻止活性はコロニーの面積で判断し、少なくとも半分のサンプルで菌糸発育を完全に抑制した最小濃度を最小殺菌濃度とした。

### 2-5. SEM試料作製

爪白癬モデルのSEM試料作製は西山らの方法<sup>6)</sup>を用いて行った。作製した試料は、電界放射型SEM (JSM-7500F、LEOL、Tokyo) を用いて加速電圧1kVで観察した。

## 3. 結果

予備試験として、本実験での爪白癬モデルに最適な小分生子の最終細胞密度の検討を行った。小分生子の最終細胞濃度が $1 \times 10^5$  cells/ml以下では、5日間の培養を経た後、爪上にコロニーの形成は認められなかった。細胞濃度 $1 \times 10^6$  cells/mlおよび $1 \times 10^7$  cells/mlでは、爪上に形成されたコロニーサイズに差が認められなかったため、本実験では西山らの方法<sup>6)</sup>と同様、最終分生子濃度を $1 \times 10^6$  cells/mlとした。28℃、3日間培養した時点での爪白癬モデルの走査電子顕微鏡像をFig.1に示した。菌糸が爪組織内に侵入している様子が認められた。

パルマローザ油の抗真菌効果を検討した。上記のように爪内に白癬菌を侵入させた切片を、27℃または42℃のパルマローザ油希釈液で処理し、培養120時間後の白癬菌の増殖の様子を解析した。Fig.2に示すように、コントロール液では、42℃で処理した爪における白癬菌の発育面積は、27℃処理に比べ20 %に抑制された。パルマローザ油希釈液はいずれの温度でも濃度依存的に白癬菌の発育を抑制した (Fig.3 (A))。27℃および42℃における最小殺菌濃度は3.2 mg/ml以上と0.4 mg/mlで (Table 1)、温度による差は4倍以上であった。パルマローザ油希釈液は3.2 mg/mlより高濃度になると分離してしまい、均一な懸濁状態を保つことが

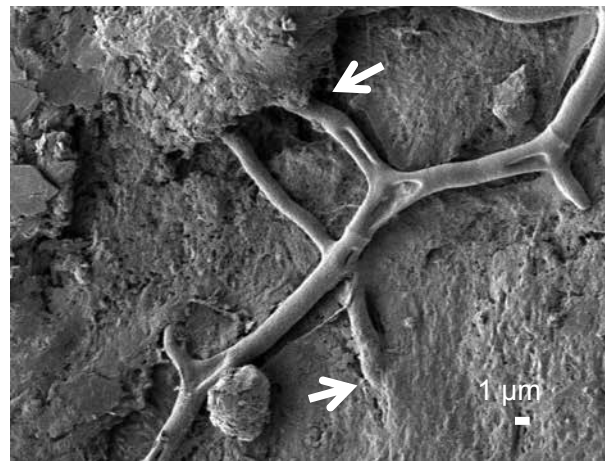


Fig.1 爪組織内への白癬菌菌糸侵入像

爪甲表面でみられる爪組織内への菌糸侵入像（矢印）

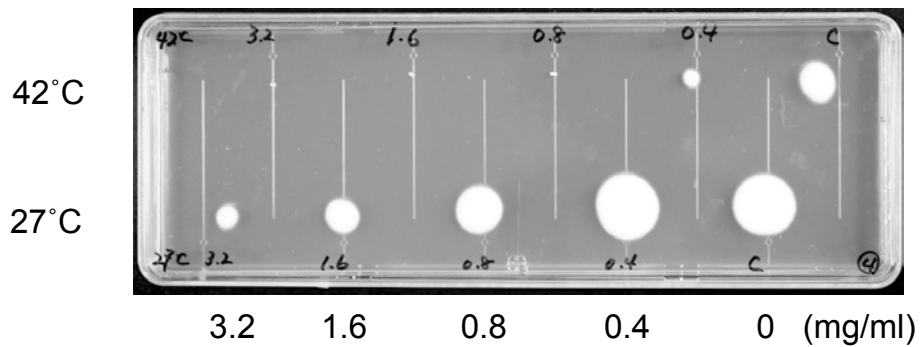


Fig.2 27°Cあるいは42°Cのパルマローザ油希釈液で処理した爪白癬モデルの白癬菌発育の変化

爪内に白癬菌を侵入させた切片を、27°Cまたは42°Cのパルマローザ油希釈液で処理した後、寒天培地上で28°C、120時間培養した状態を観察した。

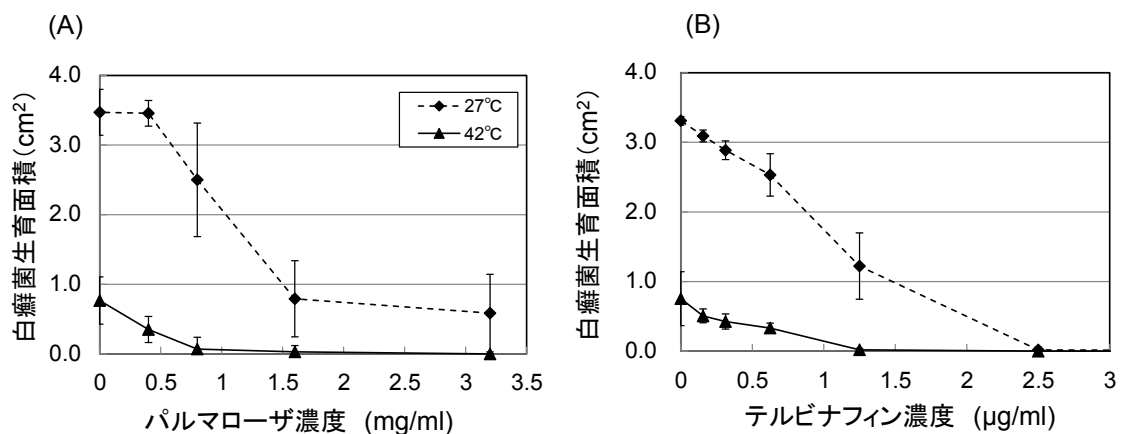


Fig.3 パルマローザ油およびテルビナフィン塩酸塩希釈液で処理した爪白癬モデルの発育面積に対する希釈液温度の影響

爪内に白癬菌を侵入させた切片を、27°Cまたは42°Cのパルマローザ油およびテルビナフィン塩酸塩希釈液で処理した後、寒天培地上で28°C、120時間培養した時の発育面積を測定した

(A)パルマローザ処理 (B)テルビナフィン塩酸塩処理

できなかったため、より高濃度での検討はできなかった。このため、27℃での最小殺菌濃度はさらに大きくなる可能性がある。

抗真菌剤であるテルビナフィン塩酸塩の効果を比較検討した。テルビナフィン塩酸塩による水浴処理も、パルマローザ油の場合と同様、いずれの温度でも白癬菌の発育を濃度依存的に抑制した (Fig.3 (B))。27℃と42℃におけるテルビナフィンの最小殺菌濃度は5 µg/mlおよび2.5 µg/mlで、温度による差は約2倍であった (Table 1)。

#### 4. 考察

今回、感染爪をパルマローザ油およびテルビナフィン塩酸塩希釈液中で42℃、20分間処理することにより、27℃と比較して *Trichophyton mentagrophytes* の発育を強く抑制することが明らかになった。井上ら<sup>4)</sup> は、白癬菌を接種した寒天ブロックモデルを用い、精油と加温を併用すると、単独の場合に比べ白癬菌の発育抑制効果が増強されることを報告している。さらに、精油希釈液を利用した足浴が足白癬患者に治療効果を示すことが報告されている<sup>5)</sup>。今回、爪白癬モデルを用いて得られた結果から、爪白癬においても、精油と温度を組み合わせることで、白癬菌の発育を抑制できる可能性が示された。

皮膚糸状菌は常在真菌ではないため、菌の発育抑制ではなく、殺菌が重要である。この点から、我々

は、水浴処理後、5日間の培養を経た段階で白癬の発育が認められない最低濃度を最小殺菌濃度として比較を行った。抗真菌剤であるテルビナフィン塩酸塩では、加温による最小殺菌濃度の差が2倍だったのに対し、パルマローザ油では4倍以上となったことから、精油と加温の併用は爪白癬の治療に向けた新たな可能性を示している。

この精油や抗真菌剤と温度の併用（組合せ）効果に、精油などの抗真菌効果の増強が関与しているのと推察している。井上らは、27℃と42℃で処理した *T.mentagrophytes* の微細構造を観察したところ、42℃で部分的に細胞表面の粗面化が認められたことを報告している<sup>4)</sup>。今回、井上らの寒天モデルと同様に、精油と加温の併用による殺菌効果の上昇が見られたことから、爪を用いた場合も、温度の上昇によって白癬菌の細胞膜構造が変化し、精油の細胞内への侵入がより容易になった可能性が考えられる。

さらに、温度により精油や抗真菌剤の爪への浸透性の増加が関与する可能性がある。Kobayashiら<sup>8)</sup> は、脂溶性薬物の分子量と爪甲への透過性には相関関係があり、分子量が増加すると透過係数が低下することを報告している。分子量327.89のテルビナフィン塩酸塩に比べ、パルマローザ油の主成分であるゲラニオール<sup>9)</sup>の分子量 (154.24) が小さいことから、パルマローザ油の浸透性の高さが推察される。さらに、脂溶性薬剤の皮膚浸透性は皮膚表面温度や湿度の上昇と共に増加することが報告されている<sup>9)</sup>。

Table 1. パルマローザ油およびテルビナフィン塩酸塩の最小殺菌濃度に及ぼす温度の影響

最小殺菌濃度**		
	パルマローザ	テルビナフィン
27℃	>3.2 mg/ml	5 µg/ml
	↓	↓
42℃	0.8 mg/ml	2.5 µg/ml

\*\*最小殺菌濃度：少なくとも半分のサンプルで菌糸発育を完全に抑制した最小濃度

爪内に白癬菌を侵入させた切片を、27℃または42℃のパルマローザ油およびテルビナフィン塩酸塩希釈液で処理した後、寒天培地上で28℃、120時間培養し、少なくとも半分のサンプルで菌糸発育を完全に抑制した最小濃度を最小殺菌濃度とした。

10) ことから、加温によって爪甲内の浸透性が増加することが予想される。したがって、27℃と42℃におけるパルマローザ油の最小殺菌濃度の差がテルビナフィン塩酸塩のそれに比べ大きかった理由の一つに、加温による浸透性上昇に差があった可能性がある。

温度との併用には別の面からの利点も考えられる。爪白癬の罹患率は、加齢により上昇し、末梢の血行が低下している場合にリスクが上昇することが報告されている<sup>11, 12)</sup>。血行低下は爪の伸長速度の低下につながり、白癬菌が定着する可能性を増加させると考えられる。このことから、足を加温することによる末梢血行の改善は爪の発育を促進し、予防効果として真菌の定着を抑制することが期待される。さらに、爪白癬の場合、感染した爪が排除され、爪全体が無感染状態の爪に置き換わって初めて完全な治癒といえる。加温によって爪の発育速度が増せば、治療期間の短縮につながるかもしれない。

本研究では、精油や抗真菌剤と温度を組み合わせることで、白癬菌感染爪に対する殺真菌効果が増強することを示した。今後、爪白癬治療に対する精油の可能性をより高めるためにも、加温を併用した検討を進めていくことが必要であろうと考える。

#### 引用文献

- 1) Buck DS, Nidorf DM, Addino JG.: Comparison of two topical preparations for the treatment of onychomycosis: Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and clotrimazole. J Fam Pract, **38**: 601-605, 1994.
- 2) Syed TA, Qureshi ZA, Ali SM, Ahmad S, Ahmad SA.: Treatment of toenail onychomycosis with 2 % butenafine and 5 % Melaleuca alternifolia (tea tree) oil in cream. Trop Med Int Health, **4**: 284-287, 1999.
- 3) 皆川一男, 藤井健, 芦田礼子, 熊西敏郎, 竹内幸美: アロマセラピーによる高齢者の爪白癬治療の取り組み. 総合ケア, **14**: 37-40, 2004.
- 4) Inouye S, Uchida K, Nishiyama Y, Hasumi Y, Yamaguchi H, Abe S.: Combined effect of heat, essential oils and salt on fungicidal activity against Trichophyton mentagrophytes in a foot bath. Jpn. J. Med. Mycol. **48**: 27-36, 2007.
- 5) 服部尚子, 井上重治, 高橋 美貴, 安部茂ほか: パルマローザ精油と塩酸テルビナフィンを用いた足浴による足白癬治療の試み. アロマセラピー学術雑誌, **10**: 17-24, 2010
- 6) 西山彌生, 高橋美貴, 丸山奈保, 山田剛, 安部茂: *in vitro*爪白癬モデルを用いた白癬菌の発育および爪組織内への侵入過程に関する走査電子顕微鏡解析. Medical Mycology Research. **7**: 3-10, 2016
- 7) Nakashima T, Nozawa A, Ito T, Majima T.: Experimental tinea unguium model to assess topical antifungal agents using the infected human nail with dermatophyte in vitro. J Infect Chemother, **8**: 331-335, 2002
- 8) Kobayashi Y, Komatsu T, Sumi M, Numajiri S, Miyamoto M, Kobayashi D, Sugibayashi K, Morimoto Y.: In vitro permeation of several drugs through the human nail plate: relationship between physicochemical properties and nail permeability of drugs. Eur J Pharm Sci, **21**: 471-477, 2004
- 9) Tominaga K, Tojo K: Effect of environmental temperature on transdermal drug penetration. Biol Pharm Bull, **33**: 1983-1987, 2010.
- 10) Momii S., Hatakeyama N., Tojo K.: Effect of temperature on skin permeation of nitroglycerin. Drug Delivery System, **10**: 55-59, 1995.
- 11) Scher RK, Rich P, Pariser D, Elewski B: The epidemiology, etiology, and pathophysiology of onychomycosis. Semin Cutan Med Surg, **32(2 Suppl 1)**: S2-4, 2013
- 12) Elewski BE: Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. Clin Microbiol Rev, **11**: 415-429, 1998.

### 英文要旨

Onychomycosis (tinea unguium) is often secondary to tinea pedis and is so frequent that one in eight people is said to be infected. As the anti-dermatophyte effect of essential oils for agar block inoculated with *T. mentagrophytes* has been reported to be increased in combination with warming, the combined effect is expected for tinea unguium. The warming effect on the anti-dermatophyte activity of palmarosa oil was investigated using the *in vitro* tinea unguium model. Treatment of infected nails in palmarosa oil and terbinafine hydrochloride diluent at 42°C for 20 minutes strongly suppressed the fungal growth after 120 hours compared to 27°C. Comparing the minimum fungicidal concentrations at 42 and 27°C, palmarosa oil showed a difference of 4 times or more, while terbinafine hydrochloride doubled. To increase the possibility of essential oils for the treatment of tinea unguium, it will be necessary to evaluate the combined effect of essential oils and warming.