

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	有本 翔
論文審査担当者	主査 大野 京子 副査 鈴木 敏彦、玉村 啓和
論文題目	Antifungal Efficacy of Luliconazole in an Experimental Rabbit Model of Fungal Keratitis Caused by <i>Fusarium Solani</i>
(論文内容の要旨) <要旨> 真菌性角膜炎は主に <i>Fusarium</i> 属等の糸状菌によって角膜に起きる真菌感染症であり、失明にもつながるが、有効な治療薬はナタマイシンなどに限られる。本研究ではイミダゾール系抗真菌薬であるルリコナゾールの <i>Fusarium solani</i> 感染モデルにおける治療効果を評価した。<i>Fusarium solani</i> をウサギの角膜に接種後、薬剤投与群には3日目からルリコナゾールまたはナタマイシンを一日4回点眼投与し、症状を菌接種から14日間観察した。感染対照群のピーク時の症状スコアと比較すると薬剤投与群では症状スコアの有意な改善が認められた。本研究によりルリコナゾールは真菌性角膜炎の新規治療薬となる可能性が示された。 <緒言> 感染性角膜炎は、細菌、真菌、ウイルス、寄生虫によって引き起こされる角膜感染症である。感染性角膜炎は重度の視力障害を引き起こし、最終的には失明に至ることが知られている。アジアで実施された前向き観察研究では、外傷とコンタクトレンズ装用が感染性角膜炎の主な危険因子であることが明らかにされ、真菌性角膜炎の発生率（原因と診断された症例の割合）は32.7%で、細菌性角膜炎の38.0%に次ぐことが報告されている。さらに、この研究で最も頻繁に検出された菌はフザリウム属(18.3%)であり、次いで緑膿菌(10.7%)、アスペルギルス・フラバス(8.3%)であった。日本で実施された前向き観察研究によると、分離された真菌94種のうち52種(55.3%)が糸状菌であり、フザリウム属が最も頻繁に検出される菌種(23種)であった。これらの結果は、フザリウム属がアジアにおける真菌性角膜炎の主要な原因菌であることを示している。薬物療法に関しては、ナタマイシン(NAT)5%点眼薬が、世界保健機関(WHO)の必須医薬品リストに掲載されている唯一の食品医薬品局(FDA)認可薬であるが、角膜間質層への浸透が悪いため、その治療効果は限定的である。現在、真菌性角膜炎に対する治療の選択肢は、細菌性角膜炎に比べて限られている。したがって、新しい薬剤の開発が待ち望まれている。 ルリコナゾール(LLCZ)は、真菌細胞壁の主要成分であるエルゴステロールの合成を阻害する新しいイミダゾール系抗真菌薬である。ルリコナゾールは1%外用製剤が足白癬等に、5%製剤は爪真菌症の治療に使用されている。しかし、ルリコナゾールは真菌性角膜炎には使用されてい	

い。報告されているように、ルリコナゾールはアスペルギルス属やフザリウム属に対しても抗真菌活性を示す。しかし、真菌性角膜炎の感染モデルにおいてルリコナゾールの有効性を評価した研究はない。そこで本研究ではルリコナゾールがフザリウム属による真菌性角膜炎に対して治療効果を示すとの仮説を立て、ルリコナゾールの抗真菌活性および治療効果を、ウサギを用いた感染モデル (*Fusarium solani* を感染) で評価した。

<方法>

Slc:JW/CSK 系の 9 週齢のウサギを 1)感染対照群、2)ルリコナゾール 1%投与群および 3)ナタマイシン 5%投与群に分け (各群 n=6)、菌接種の 5 日前及び当日に免疫抑制のためデキサメタゾンを投与した。菌接種当日はウサギの右眼の角膜に注射針でポケット状の傷をつけ、該当箇所には *Fusarium solani* の分生子 (1×10^5) を接種した。ルリコナゾール 1%液またはナタマイシン 5%液は菌接種後 3 日目から 1 日 4 回、1 回約 $50 \mu\text{L}$ を点眼投与した。1 日 1 回スリットランプを用いて眼を観察し、従前の報告に倣って症状スコアを記録した (菌接種 14 日目まで)。最終日にはウサギを安楽死させた後、菌接種した眼を取り出しホルマリン固定、PAS 染色し、組織学的検査を行った。症状スコアの比較にはノンパラメトリック法の 1 種であるスティールの多重比較検定を行った。

<結果>

① スコア比較

プラセボ対照群では、菌接種 1 日目から角膜混濁が認められ、点眼開始日 (菌接種 3 日目) には 5 例に角膜混濁が認められた。その後、角膜混濁は悪化し、潰瘍、突出、前房膿瘍、虹彩炎が観察された。ルリコナゾール 1%投与群では、投与開始 (菌接種 3 日目) 後、プラセボ対照群と同様の徴候が認められた。菌接種 7 日目では、ルリコナゾール 1%投与群のすべてで角膜混濁が観察された。1 例でのみ症状スコアが 2 認められたが、他は全てスコア 1 と低値であった。菌接種 14 日目ではほぼ全例で角膜混濁は軽度 (スコア 1) であったが、1 例はプラセボ対照群と同様の症状を呈した。ルリコナゾール 1%投与群の菌接種 7~12 日目における症状スコアの平均値はプラセボ対照群に比べ有意に低かった ($P<0.05$)。ナタマイシン 5%投与群では、菌接種 7 日目ですべての動物に角膜混濁が観察され、1 例はスコア 3 を示した。菌接種 14 日目では、潰瘍を伴う重度の角膜混濁を認めた 1 例を除き、ほぼすべての動物で角膜混濁の程度は軽度 (スコアは 1) であった。ナタマイシン 5%投与群の菌接種 10~14 日目の症状スコアの平均値はプラセボ対照群より有意に低かった ($P<0.05$)。

② 病理組織学的検査

摘出した眼球の病理組織学的検査 (PAS 染色) により、角膜の間質層の真菌感染が明らかになった。これらの眼では、角膜炎、角膜上皮の潰瘍化とびらん、角膜間質層の溶解壊死、瘢痕形成、角膜内皮欠損が観察された。プラセボ対照群では 3 匹から真菌が検出され、ルリコナゾール 1%投与群とナタマイシン 5%投与群ではともに 1 匹から真菌が検出された。いずれの群においても、真菌が検出された群では検出されなかった群よりも症状スコアが重篤であった。真菌が検出され

たルリコナゾール 1%投与群およびナタマイシン 5%投与群の各 1 例の眼では、プラセボ対照群と同様の病変が認められた。

<考察>

抗真菌薬の効果を評価するために、さまざまな真菌性角膜炎のモデルが開発され、報告されている。本研究で用いたモデルでもヒトの臨床像に酷似した病変が観察されている。

ポリエン系抗生物質であるナタマイシンは、真菌性角膜炎の外用治療薬として FDA に認可された唯一の薬剤であり、多くの国で真菌性角膜炎の治療に使用されている。その有効性はウサギのフザリウム角膜炎モデルで実証されている。本研究でも、動物に過度のストレスを与えないよう、1 日 4 回（3 時間間隔）の点眼を行い、ナタマイシンの有効性を検出することに成功した。ナタマイシンの投与はプラセボ対照群と比較して真菌性角膜炎の発症を遅延させ、症状スコアを有意に減少させた。したがって、本モデルは *Fusarium solani* による真菌性角膜炎に対するナタマイシンの有効性を他の薬剤と比較評価するのに適している。

ナタマイシンはフザリウム属に有効であるが、角膜間質への移行性が悪く、治療効果に限界があることが知られている。一方、ルリコナゾールは、日本で開発された新規のイミダゾール系抗真菌薬であり、真菌性角膜炎の原因菌であるフザリウム属やアスペルギルス属を含む様々な糸状菌に対して強い抗真菌活性を示すことが特徴である。ルリコナゾールの *in vitro* での抗真菌活性は、NAT やボリコナゾールよりも強く、臨床においても高い治療効果が期待される。本試験においてルリコナゾールの投与は観察期間中の症状スコアを有意に減少させ、治療効果を示した。

ルリコナゾール 1%投与群では、真菌は 6 匹中 1 匹からしか検出されなかったが、プラセボ対照群では 6 匹中 3 匹から検出された。この違いはルリコナゾール投与の影響と考えられる。真菌が検出された動物では、他の動物よりも症状の重症度が高かったことから、真菌の量（または存在）と症状の重症度には相関関係がある可能性が示唆された。今後、真菌の定量を含め、薬剤投与と症状抑制の関係を検討する必要がある。今回の研究では、ルリコナゾール 1%液の投与は、ナタマイシン 5%液の投与より優れているとは認められなかった。これは、ルリコナゾールの水溶解度が $0.62 \mu\text{g/L}$ と、水に極めて溶けにくいことが要因と考えられる。ナタマイシンの水への溶解度も十分に低い ($52 \mu\text{g/L}$) が、ルリコナゾールはナタマイシンの 100 倍以上水への溶解度が低い。今回はルリコナゾールを水性溶媒に懸濁して点眼したため、薬剤が感染部位である角膜に十分に移行せず、抗真菌活性が十分に発現しなかった可能性も考えられる。近年、NAT の新規水溶性製剤が検討され、通常の懸濁液と比較して眼内濃度が 2.5 倍以上に維持されることが報告されている。したがって、今後ルリコナゾールの臨床的優位性を評価するためには、点眼に適した製剤の調製や投与方法の工夫が求められる。

<結論>

これは *Fusarium solani* による真菌性角膜炎の治療に LLCZ が有用であることを示した最初の報告である。抗真菌薬ルリコナゾールは本モデルにおいて真菌性角膜炎に対して有意な治療効果を示した。今後、ルリコナゾールの点眼製剤化が進めば、真菌性角膜炎に対する有望な抗真菌薬となることが期待される。より高濃度のルリコナゾールを溶解できる新規製剤の真菌性角膜炎治療

への応用が待たれる。

論文審査の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第 6858 号	有 本 翔
論文審査担当者	主 査 大野 京子 副 査 鈴木 敏彦、玉村 啓和、	
【論文審査の要旨】 1. 論文内容 本論文は、ウサギ角膜真菌感染症モデルに対し、イミダゾール系抗真菌薬であるルリコナゾールの治療効果を評価したものである。 2. 論文審査 1) 研究目的の先駆性・独創性 角膜感染症の原因として、真菌性は細菌性に次いで高い。特に、フザリウム属が頻繁に検出され、アジアでの主要な原因菌であることが示唆されている。治療においては、ナタマイシンがFDA認可薬であるが、角膜への浸透が制限されており、治療効果が制約されているため、新しい薬剤の開発が求められてきた。ルリコナゾールはエルゴステロールの合成を阻害する抗真菌薬であり、爪真菌症などで使用されている。そこで本研究では、ルリコナゾールがフザリウム属による真菌性角膜炎に対して治療効果を示す可能性を検証した新規の知見を得るための研究である。 2) 社会的意義 1. 真菌性角膜炎の治療選択肢の拡充：新しい抗真菌薬であるルリコナゾールが <i>Fusarium solani</i> による真菌性角膜炎に対する有効性を示すことにより、従来の治療薬に比べて新しい選択肢の提供につながる。 2. 点眼製剤の開発への期待： 現行の点眼法ではルリコナゾールの効果が水溶性の問題から、やや制約されている可能性が示唆された。将来的な研究で、より効果的な点眼製剤が開発されることが期待される。総じて、この研究は真菌性角膜炎治療の進展に寄与し、患者の視力を守るための新しい治療法の可能性を開拓するものである。 3) 研究方法・倫理観 今回の研究は、動物実験は試験施設（日本バイオリサーチ株式会社）の動物実験委員会によって承認され、日本バイオリサーチ株式会社の実験動物の管理と福祉に関する規定に従って実施されており（承認調査番号 39020）、倫理上の問題はない。 4) 考察・今後の発展性 研究では、ナタマイシンによる治療の有効性が確認され、真菌性角膜炎に対し、ルリコナゾールも新たな治療薬として有望であることが示唆された。しかし、ルリコナゾールの水溶解度の低さや点眼における効果に関する課題も新たにわかり、今後、ルリコナゾールの点眼製剤の改善や新規製剤の開発により、真菌性角膜炎治療における有用性が向上する可能性が期待される。		

3. その他

特記すべき事項はない。

4. 審査結果

以上より、本論文による成果は博士（医学）の申請に値する水準にあるものと認められた。