

Candida albicans の適応酵素形成に及ぼす抗生物質 及び抗カンジダ剤の影響

相 沢 春 海

大阪大学医学部第3内科学教室 (主任 堂野前教授)

(昭和 30 年 7 月 3 日受付)

本論文の要旨は昭和 30 年 4 月第 3 回日本化療法学会に於て報告した。

緒 言

最近 Moniliasis (Candidiasis) が臨床上注目される疾患として登場すると共に、その起炎菌たる *Candida albicans* の物質代謝に関する研究も僅か乍ら報告され始めている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。一方、抗カンジダ性物質に対する探究も進められ、Trichomycin¹¹⁾¹²⁾、Eurocidin、Candimycin、Toyokamycin 等の抗カンジダ性抗生物質、Dehydroacetic acid¹³⁾、p-Oxybenzoic acid の Alkyl ester¹⁴⁾等の抗カンジダ性化合物等が発見せられた。しかし乍ら此等諸物質の *Candida albicans* の物質代謝に及ぼす影響については未だに報告に接しない。ここに筆者は特に抗カンジダ性の強い物質を中心として此等の作用機序の一端を窺わんとして本実験を行つた。

*Mycobacterium*¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾、大腸菌¹⁸⁾、*Pseudomonas*¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾等の適応酵素形成に及ぼす抗生物質の影響に就いては Streptomycin その他の抗生物質が適応酵素の活性化を阻害し、一旦形成された適応酵素は此等物質の影響をうけない事が報告せられている。例えば、Streptomycin¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾ は *Mycobacterium* による安息香酸の適応的酸化を極めて微量で完全に阻害するが、一旦活性化された酵素に対しては何等の影響も及ぼさず、而も Streptomycin 耐性菌では、その耐性度に応じて阻害には大量の Streptomycin を必要とする事実が認められている。筆者は斯かる関係が *Candida albicans* と抗カンジダ性物質との間に存在するか否かを知らんとして、*Candida albicans* に於ける適応酵素を探求し、此に及ぼす各種物質の影響を検討した。

一方、抗生物質と Moniliasis との関係は、殊に本症の発症に関連して、重要な問題として取り上げられているが、美甘²²⁾は Penicillin が *Candida albicans* の呼吸を促進せしめ得る事を報告している。抗生物質に斯くの如き *Candida albicans* の物質代謝を直接促進せしめる作用が存するや否やを追求するのも本実験遂行の一つの目的である。

実験材料及び実験方法

酵素材料： *C. albicans* の F.D.A. No. 1001 株の 37.5°C 24 時間前後 SABOURAUD 寒天培地上に培養した菌体を集め、3 回遠心沈澱により洗菌、乾燥菌量 2.6 mg/cc 前後の菌浮遊液としたもの 1 cc を用いた。

阻害物質： 抗生物質その他の阻害物質の濃度は発育阻止濃度と比較し易い様に、夫々最終 1 及び 10 mcg/cc とした。

基質 各基質は 10 μ M を使用した。

緩衝液： pH 7.0 の磷酸緩衝液を最終 M/20~M/30 となる様に用いた。

斯くて法の如く WARBURG 検圧法により *C. albicans* の呼吸、基質を添加した際の酸素消費量及び炭酸ガス発生量を検した。

Galactose 適応菌の作成： *C. albicans* の菌浮遊液を Galactose と共に前実験と同じ濃度比にて 37.5°C 1~2 時間振盪後、充分洗滌した菌の浮遊液の同量を用いた。

各抗カンジダ剤による前処置は 10 mcg/cc の各溶液中に 2 時間 incubate した。

実験成績

I *C. albicans* に於ける適応酵素の探求

先づ最初 *C. albicans* により適応的酸化を受ける基質を探求すべく、各種基質の酸化状況を検した。その成績は第 1 表に示す如くである。

表に於て一、十、廿、卅は夫々酸素消費の程度を表わしたものであり、* は一定の潜伏期の後酸素消費を示すものである。即ち、DL- α -Alanine, L-Asparagine 酸, L-Glutamine 酸, L-Arginine, L-Proline 等の Amino 酸, Mannose, Galactose, 蔗糖等の糖類が適応的酸化の如き様相を呈するのを認めた。そこで此等基質の酸化が適応酵素によるものか否かの検討を試みた。第 1 図は Amino 酸を基質にした際の 1 例を示したものであるが、図示した如く *C. albicans* の菌液を磷酸緩衝液中で 37.5 °C に一定時間振盪する操作、即ち Starvation のみにて、酸素消費を示す迄の潜伏期は極端に短縮され、基質と共に振盪する Adaptation なる操作を加えても Starvation の場合と変わらない。即ち、*C. albicans* によ

第1表 *Candida albicans* による各種基質の酸化

A) Amino 酸酸化

基 質	酸素消費	基 質	酸素消費
Glycine	+	L-Lysine-HCl	—
DL- α -Alanine	++*	DL-phenylaniline	+
L- β -Alanine	++*	DL-Tyrosine	+
DL-Serine	+	L-Histidine-HCl	+
DL-Valine	—	DL-Tryptophane	—
L-Leucine-HCl	+	L-Asparagine	++*
L-Asparagin 酸	++*	DL-Methionine	—
L-Glutamin 酸ソーダ	++*	L-Proline	++*
L-Arginine-HCl	++*	DL-Isoleucine	—
Pyrocatechin	±	葡 萄 糖	++
Anthranil 酸	—	Mannose	++*
安 息 香 酸	—	Galactose	++*
林 檜 酸	—	果 糖	++*
ク エ ン 酸	±	乳 糖	—
サ リ チ ル 酸	—	蔗 糖	++*
琥 珀 酸	—		

* 一定の潜伏期後、酸素消費を示すもの
る Amino 酸の酸化は適応的酸化ではなく、菌膜の透過性の関係上斯かる酸素消費曲線を描くものと考えられる。

此に対し Mannose, Galactose 等の单糖類の場合は根本的に異り、第2図 A) 及び B) に示した如く、Starvation のみにては Starvation 前の菌による場合と変化なく、夫々の基質に Adapt せしめた *C. albicans* では潜伏期なしに酸素吸收を示すのを認めた。即ち *C. albicans* による此等糖類の酸化は適応酵素によるものと

考え、以下、両基質の酸化に対する各種物質の影響について実験を行つた。

一方、SHEFFNER²³⁾²⁴⁾²⁵⁾は *Saccharomyces* を用いて Galactose につき適応的酸化のみならず、一定の濃度関係に於ては適応的酵素も同時に行われる事を報告しているので、筆者も *C. albicans* による Mannose 及び Galactose の酸化と酵素との関係を検したが、第2表に示した如く、少くとも 2 時間迄は R.Q. は略々 1 であり、筆者の行つた実験条件では酸化のみが起つている事を認

第2表 *Candida albicans* による糖の酸化と酵素の関係

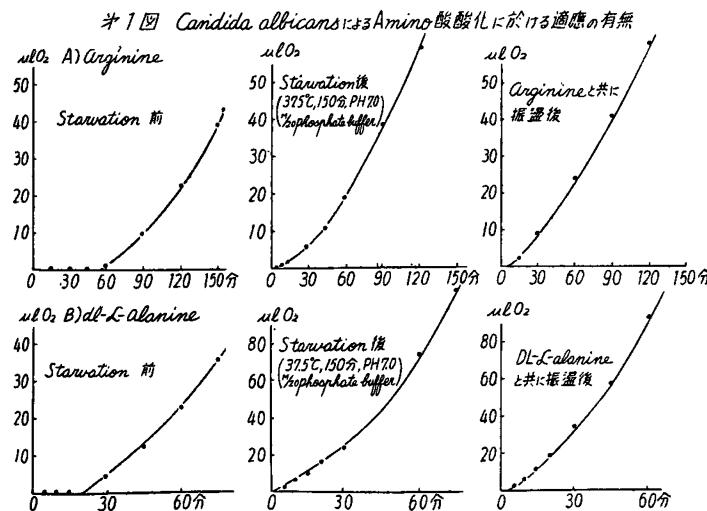
1) pH 7.0

		酸素消費	CO ₂ 放出	R. Q.
1 時間	菌	44	48	1.09
	菌 + Mannose	93	98	1.04
2 時間	菌	84	83	0.99
	菌 + Galactose	195	204	1.04

2) pH 5.0

		酸素消費	CO ₂ 放出	R. Q.
1 時間	菌	58	57	0.99
	菌 + Galactose ($5 \times 10^{-5} M$)	91	89	0.98
	菌 + Galactose ($10^{-5} M$)	75	75	1.00
2 時間	菌	104	93	0.94
	菌 + Glactose ($5 \times 10^{-5} M$)	203	204	1.00
	菌 + Galactose ($10^{-5} M$)	180	178	0.99

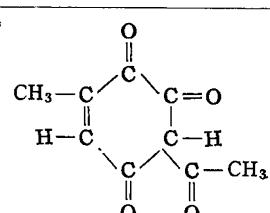
O₂, CO₂ の数字は μl

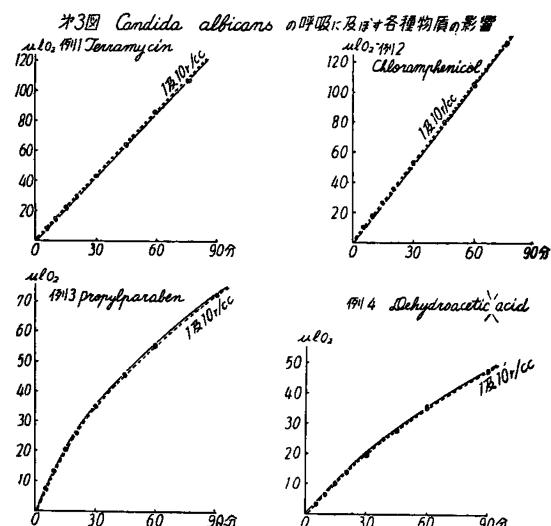
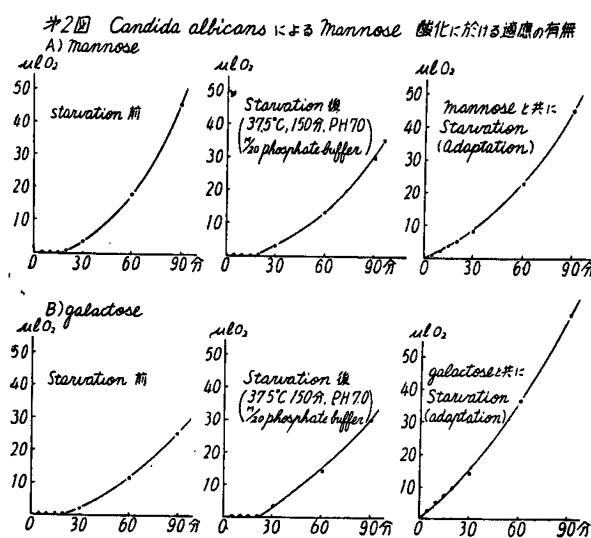


めた。そこで以下の実験に於ては酸素消費量のみに就て追求した。

II *C. albicans* の呼吸に及ぼす各種物質の影響

Penicillin G, Aureomycin, Terramycin, Chloramphenicol, Dihydrostreptomycin 等の抗生素質及び Propylparaben, Dehydroacetic acid*, Natrium azide 等は夫々 1 及び 10 mcg/cc の濃





度にて *C. albicans* の呼吸に対し全く影響を与えたなかつ

た。第3図はその中の数例を示したものである。

此れに対し 8-Hydroxyquinoline, Merzonin, Vitamin K₃, 2-Methyl-3-mercaptop-1:4-Naphthoquinone, Aureothricin, Candimycin, Eurocidin, Trichomycin (1,900 u/mg) は 1 及び 10 mcg/cc の濃度で第4図 A)～H) に示す如く夫々ある程度の影響を認めた。即ち、8-Hydroxyquinoline は 1 及び 10 mcg/cc にて中等度の阻害を、Merzonin は 1 mcg/cc では僅かに、10 mcg/cc では著明な阻害を、Vitamin K₃ は 10 mcg/cc にて軽度の阻害を 2-Methyl-3-Mercapto-1:4-Naphthoquinone は 1 mcg/cc にて中等度、10 mcg/cc にて著明な阻害を、以下図示した如く阻害作用を示すのを認めた。

此等物質の *C. albicans* に対する試験管内発育阻止濃度は第3表に示した如くであるが、呼吸阻害の程度との間には一定の関係を認める事は出来なかつた。

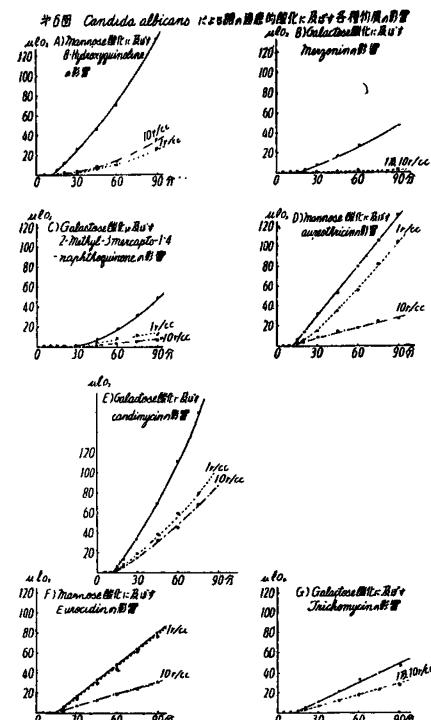
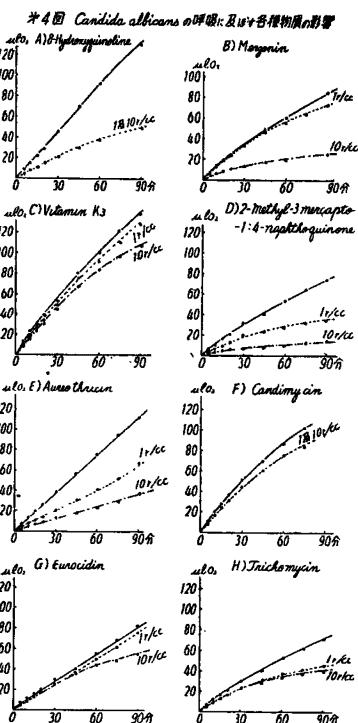
III. *C. albicans* による糖の適応的酸化に及ぼす各種物質の影響

Penicillin G, Chlortetracycline, Oxytetracycline, Chloramphenicol, Dihydrostreptomycin, Dehydroacetic acid, Propylparaben, Natrium azide, Vitamin K₃ は *C. albicans* による Mannose 及び Galactose の適応的酸化に対し 1 及び 10 mcg/cc の濃度では全く影響を及ぼさない。第5図は Mannose 及び Galactose 酸化に於ける実験例各々 2 例を示したものである。

一方、8-Hydroxyquinoline, Merzonin, 2-Methyl-3-Mercapto-1:4-Naphthoquinone, Aureothricin, Candimycin, Eurocidin, Trichomycin (1900 u/mg) は夫々 1 及び 10 mcg/cc の濃度に於て第6図 A)～G) に示す如く Mannose 及び Galactose の適応的酸化に対し阻害作用を示した。此の際 Mannose を基質とするも、Galactose を基質とするも、此れに対する各種薬剤の阻害度には本質的差異を認めなかつたので、図に於ては Mannose 或いは Galactose の何れかを基質とした際の

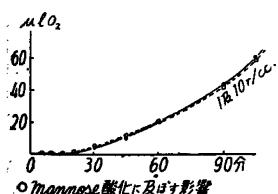
第3表 各種抗生素質及び抗カンジダ剤の試験管内最小発育阻止濃度

薬 剤 名	試験管内最小発育阻止濃度	薬 剤 名	試験管内最小発育阻止濃度
Penicillin	>5,000 mcg/cc	Trichomycin	0.15 mcg/cc
Chlortetracycline	>5,000 mcg/cc	8-Hydroxyquinoline	6.25 mcg/cc
Oxytetracycline	>5,000 mcg/cc	Merzonin	0.078 mcg/cc
Chloramphenicol	>5,000 mcg/cc	Vitamin K ₃	250 mcg/cc
Dihydrostreptomycin	>5,000 mcg/cc	2-Methyl-3-Mercapto-1:4-Naphthoquinone	250 mcg/cc
Aureothricin	15.0 mcg/cc	Dehydroacetic acid	20 mcg/cc
Candimycin	3.12 mcg/cc	Propylparaben	62.5 mcg/cc
Eurocidin	1.5 mcg/cc		

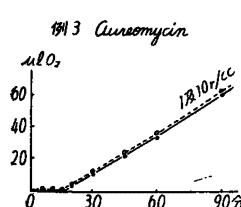


オウ図 *Candida albicans* による糖の適応的酸化に及ぼす各種物質の影響

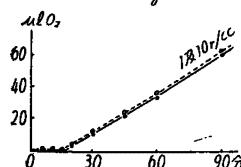
○Galactose 酸化に及ぼす影響
例1 Chloramphenicol



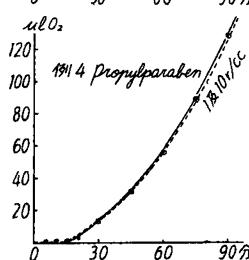
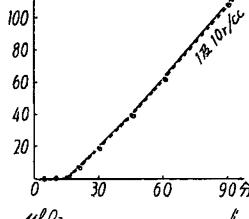
○Mannose 酸化に及ぼす影響



例3 Aureomycin



例2 Dihydroacetic acid



例4 Propylparaben

には、呼吸に対する影響の場合と同様、一定の関係を認める事は出来なかつた。

IV Galactose 適応菌の Galactose 酸化に及ぼす抗カシジダ剤の影響

Galactose に適応せしめた *C. albicans* は第7図の各図に示す如く潜伏期なしに直ちに Galactose を酸化し得る。前記糖の適応的酸化を阻害する物質の適応菌による酸化に対する影響をみた成績が第7図 A)~G) に示した如くである。此の実験は同時培養の *C. albicans* を以て適応前の菌に対する影響と適応菌に於けるものとに就て行つたものであるが、図に於ては適応菌による成績のみを記した。図に於て、8-Hydroxyquinoline, Merzonin, 2-Methyl-3-Mercapto-1:4-Naphthoquinone, Aureothricin, Candimycin は適応菌による Galactose 酸化は適応前の菌を使用した場合と同様に阻害する。此れに対し Eurocidin, Trichomycin (1900 u/mg) は適応菌の Galactose 酸化を全く阻害せず、却つて促進する如き觀を呈する。即ち、前者の各物質は形成された酵素による酸化を阻害するものであり、後者は適応酵素の形成を阻害し、一旦形成された酵素による酸化は全く阻害を受けないものである事を認めた。

1例づつを示した。図示せる如く 1 及び 10 mcg/cc の濃度に於て Merzonin では完全阻害を、8-Hydroxyquinoline, 2-Methyl-3-Mercapto-1:4-Naphthoquinone では著明な阻害を、又 10 mcg/cc の濃度に於て Aureothricin では著明な阻害を、Candimycin, Eurocidin, Trichomycin (1900 u/mg) では中等度の阻害を認めた。此等の阻害の強さと試験管内発育阻止濃度との間

V 抗カンジダ剤にて前処置せる *C. albicans* の適応並びに酸化能力

実験方法の項に記した如く前処理せる *C. albicans* の菌体を数回遠心沈殿により充分洗滌した菌体を同様の菌浮遊液として実験に供した。第8図 A~G) に示した如く、 8-Hydroxyquinoline, Merzonin, 2-Methyl-3-Mercapto-1:4-Naphthoquinone, Aureothricin, Candimycin, Eurocidin, Trichomycin (1900 u/mg) の各 10 mcg/cc により前処置した際には菌呼吸の減少と共に Glucose 及び Galactose の酸化能力は共に前処置なき場合に比し著しく減弱する。又 Eurocidin, Trichomy-

cin の場合には Galactose に適応する時間が著明に延長せられ、殊に Merzonin の場合には呼吸、酸化能力、適応能力は殆んど消失してしまうのが認められた。斯かる現象が特に試験管内発育阻止力の強い薬剤に認められ、抗菌力の強さと比較的の割合する如く見られるのは興味深く思われ、此等薬剤の抗カンジダ作用の一面を示唆するものの如く考えられる。

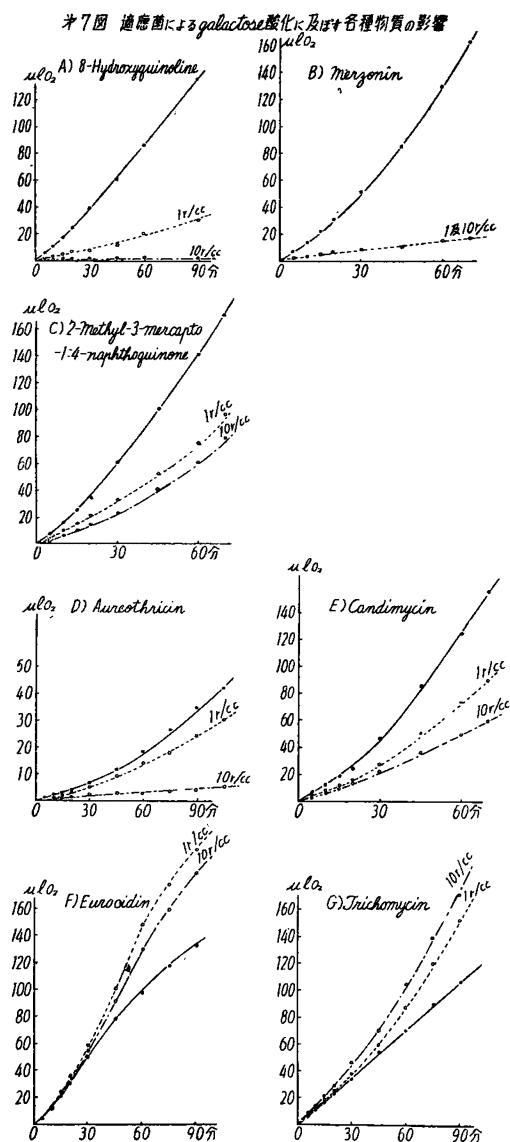
総括並びに考按

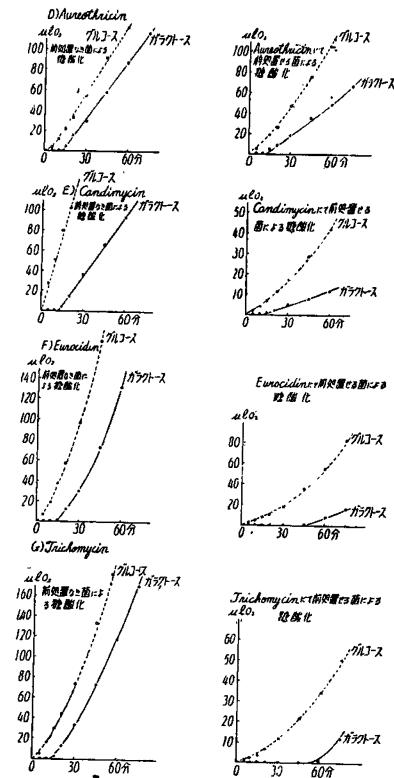
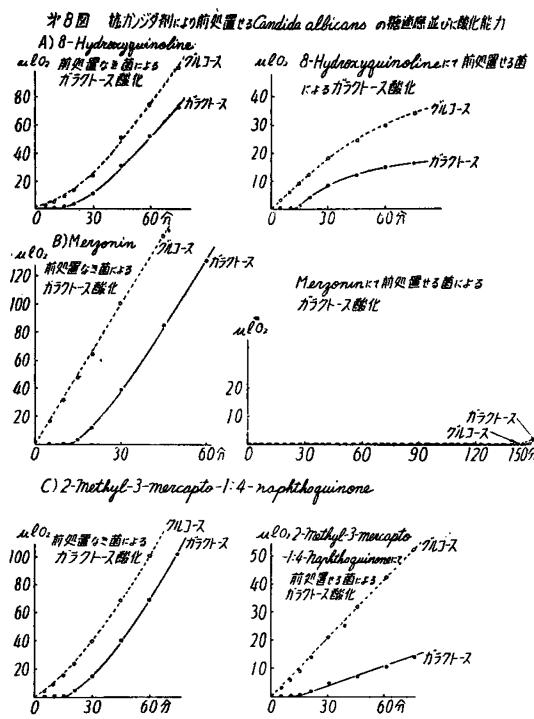
実験成績の項に記した如く、 Amino 酸を基質とした場合には屢々適応的酸化の如く、一定の潜伏期後酸素消費を示すのであるが、此の潜伏期は菌を Starvation するのみにて、極端に短縮乃至は消失せしめられる。即ち *Candida albicans* による Amino 酸の酸化は適応酵素によるものではなく、菌膜の透過性の関係上、斯かる様相を呈するものと考えられる。此れに対し糖の場合は適応酵素により酸化せられるものとの結論を得た。此の際筆者の行つた実験条件では酵素が関与していない事は前述の如くである。

そこで *Candida albicans* の呼吸並びに糖の適応的酸化に対する各種物質の影響を検したのであるが、 Penicillin G, Chlortetracycline, Chloramphenicol, Streptomycin 等の抗生素は全く影響なく、美甘²²⁾の報告している如き促進的効果は認められなかつた。

一方、 8-Hydroxyquinoline, Merzonin, Vitamin K₃, 2-Methyl-3-Mercapto-1:4-Naphthoquinone, Aureothricin, Candimycin, Eurocidin, Trichomycin は夫々 1~10 mcg/cc にてある程度の呼吸阻害を呈した。此等の物質は Vitamin K₃ を除き、 *Candida albicans* による糖の適応的酸化に対しても同様に阻害した。此の中 Eurocidin 及び Trichomycin は Galactose 適応菌による Galactose 酸化に対しては全く阻害作用を示さない点より、適応酵素の形成を阻害するものと考えられる。此れに対し他の物質は形成された酵素の作用をも同様に阻害し得る。又此等の薬剤で前処置する事により、特に Eurocidin, Trichomycin 等にあつては適応迄の時間が著明に延長せられる。此等の事実は Eurocidin, Trichomycin 等の抗カンジダ性抗生素は適応酵素活性化に伴う蛋白合成機転に対し阻害効果を及ぼすものと考えられる。

化学療法剤の作用機序については、現在迄殆ど無数の研究が報告されているが、本質的問題をつき得たと考えられる研究は未だ見当らない。即ち、これこそが化学療法剤の作用機序であると断言するからには、いくつかの条件が必要であるが、此等の全部を満す実験は成功していない。第一に各種の菌に於ける特異的な且つ本質的な





代謝経路も発見されていないし、又多くの実験では反応阻害に高濃度の薬剤を必要としている。此の中には試験管内発育阻止濃度に近い濃度で阻害される反応は、適応酵素の活性化阻害、GALE²⁶⁾一派による蛋白合成阻害の如き蛋白合成の関与している反応に限られている様に思われる。筆者も今回抗カンジダ剤の作用機序研究に当り、少くとも試験管内発育阻止濃度に近い濃度で阻害される反応を目標としたので、*Candida albicans* に於ける適応酵素を実験対象とし、阻害物質の濃度も 1 及び 10 mcg/cc に於て検した。

その結果、前述の如く Eurocidin, Trichomycin 等の抗カンジダ性抗生物質は *Candida albicans* に於ける蛋白合成機転を阻害し得るという結論を得た。しかし尚此の現象が此等物質の作用機序に於て、どの程度の役割を果しているかは未だ確言の域には達し得ないが、重要な部分を占めているものといつて差支えないと考える。

結 論

1. Mannose 及び Galactose は *Candida albicans* により適応的に酸化される。
2. 従来の各種抗生物質は *Candida albicans* の呼吸及び糖の適応的酸化に全く影響を及ぼさない。

3. 抗カンジダ剤の中 Eurocidin 及び Trichomycin の如き抗カンジダ性抗生物質は適応酵素の形成を阻害する。

稿を終るに臨み、終始御懇切な御指導御校閲を賜つた堂野前教授及び河盛助教授に深く感謝し、直接御指導を賜つた伊藤文雄博士に深謝する。

文 献

- 1) NICKERSON, W. J. & A. H. ROMANO : Science, 115, 676, 1952.
- 2) NICKERSON, W. J. : J. Infect. Dis., 93, 43, 1953.
- 3) NICKERSON, W. J. : J. Gen. Physiol., 37, 483, 1954.
- 4) 吾孫子 : 南大阪病院医学, 2, 70, 1954.
- 5) 吾孫子 : Chemotherapy, 2, 80, 1954.
- 6) 吾孫子 : 第 7 回日本細菌学会関西支部総会, 1954.
- 7) 阿多, 他 : 日本細菌学雑誌, 9, 607, 1954.
- 8) 久保, 二宮, 他 : Chemotherapy, 2, 81, 1954.
- 9) 水間, 他 : 日本細菌学雑誌, 9, 609, 1954.
- 10) 蝶良, 伊藤 : Chemotherapy, 2, 63, 1954.
- 11) 細谷, 他 : 臨床, 6, 182, 298, 1953.
- 12) 細谷 : 診療, 7, 522, 1954.

- 13) 相磯：千大腐研報告, 1946.
- 14) SPIEGEL, M. : Antibiotics and Chemotherapy, 3, 478, 1953.
- 15) FITZGERALD, R. J. & F. BERNHEIM : J. Bact., 54, 671, 1947.
- 16) FITZGERALD, R. J. ; F. BERNHEIM & D. B. FITZGERALD : J. Biol. Chem., 175, 195, 1948.
- 17) 山村：酵素化学の進歩, 第2集, 1950.
- 18) HAHN F. E. & C. L. WISSEMAN : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 76, 533, 1951.
- 19) SUDA, M. ; O. HAYASHI & Y. ODA : Med. J. Osaka Univ., 2, 21, 1950.
- 20) BERNHEIM, F. & W. E. DETURK : J. Bact., 65, 65, 1953.
- 21) BERNHEIM, F. : J. Pharm. Exp. Therap., 110, 115, 1954.
- 22) 美甘 日本臨床, 10, 1059, 1952.
- 23) SHEFFNER, A. L. & C. C. LINDERGREN : J. Bact., 64, 423, 1952.
- 24) SHEFFNER, A. L. : Arch. Biochem. & Biophys., 52, 74, 1954.
- 25) SHEFFNER, A. L. : Nature, 171, 1073, 1953.
- 26) GALE, E. F. : Advances in protein chemistry, 8, 285, 1953.

The Influences of Various Antibiotics and Antifungal Drugs upon Adaptive Enzyme Formation of *Candida Albicans*

HARUMI AIZAWA

Third Dept. of Internal Medicine, Osaka University School of Medicine
(Prof. IMASATO DONOMAE)

In order to study the influences of various antibiotics and antifungal drugs upon the metabolism of *C. albicans*, I have investigated their influences

upon the adaptive enzymes of the cells.

Using a living cell suspension of *C. alb.* (F. D. A. No. 1001) as an enzymic preparation which cultured on Sabouraud-glucose agar media at 37.5 °C for about 24 hours, I have studied the influences of various drugs (final concentration 1~10 mcg/cc) upon adaptive oxidation of substrates by using manometric technique of WARBURG.

1. Mannose and galactose are adaptively oxidized by *C. alb.*
2. Both the respiration and the adaptive oxidation of mannose and galactose are inhibited by 8-hydroxyquinoline, merzonin, 2-methyl-3-mercaptop-1:4-naphthoquinone, aureothricin, candimycin, eurocidin and trichomycin, but not affected by penicillin G, chlortetracycline, oxytetracycline, chloramphenicol, dihydrostreptomycin, propylparaben, so called "Dehydroacetic acid" * and sodium azide.
3. In the case of using mannose or galactose adapted cells, the oxidation of mannose or galactose is inhibited by 8-hydroxyquinoline, merzonin, 2-methyl-3-mercaptop-1:4-naphthoquinone, aureothricin and candimycin, but not affected by eurocidin and trichomycin. Namely eurocidin and trichomycin inhibit the formation of the adaptive enzymes.

