

## Isoconazole の抗真菌作用に関する研究 (第1報)

## —試験管内抗菌活性—

岩田和夫・内田勝久

明治薬科大学微生物学教室

(昭和56年2月26日受付)

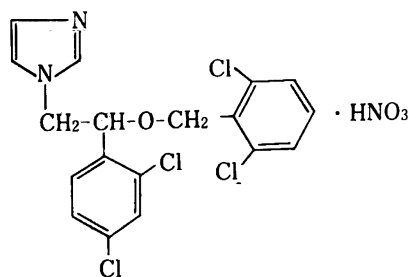
イミダゾール系抗真菌剤として新しく開発された Isoconazole の抗真菌作用を基礎的に研究する一環として、まず本剤の試験管内抗菌活性を検討した。寒天平板希釈法により本剤は *Candida*, *Cryptococcus* などの酵母状真菌, *Histoplasma* などの二形性真菌, *Trichophyton* などの皮膚糸状菌, *Fonsecaea*, *Phialophora* などの黒色糸状菌, *Aspergillus*, *Penicillium* などの子囊菌類に対し、さらに細菌としての *Nocardia* 属諸菌種に対しても強い発育阻止作用を有すること、すなわち広域抗菌スペクトルを示す強力な抗真菌剤であることを認め、また、相当に強い殺菌作用のあることも明らかにした。Isoconazole のこれらの病原真菌に対する最小発育阻止濃度と最小殺菌濃度を他のイミダゾール系抗真菌剤である Miconazole, Clotrimazole と比較するとき、ほぼ同等であり、優るとも決して劣らないことを認めた。

諸種の真菌症が近年世界的に増加しており、一般に難治療性であるがため各種抗真菌剤の相次ぐ発見にもかかわらず、真菌症、とくに深在性の通性(日和見)真菌感染症を制圧すべき化学療法はまだ確立されていない現状である。イミダゾール系抗真菌剤は Clotrimazole (以下 CT と略す) をはじめとしてこのような背景のもとに開発されてきたが、その誘導体の1つである Isoconazole (以下 IS と略す) は、ベルギーの Janssen 社で開発された新抗真菌剤で、E. F. GODEFROI *et al.*<sup>1)</sup> により合成され、生物活性に関する最初の報告がなされた(1969年)。

IS は一般名: Isoconazole nitrate, 化学名: 1-[2,4-dichloro-β-(2,6-dichlorobenzoyloxy)-phenethyl]-imidazole nitrate, 分子式:  $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O \cdot HNO_3$ , 分子量: 479.15 である。その構造式は Fig. 1 に示す。

IS の外観は白色の結晶性粉末である。溶解性はメタ

Fig. 1 Chemical structure of isoconazole nitrate



ノールに易溶、アセトン、エタノールにやや易溶、クロロホルム、イソプロパノール、プロピレングリコールに難溶、水にはきわめて難溶である。融点は約 180°C (分解) である。

IS の抗真菌作用については、すでに基礎的<sup>2-5)</sup>ならびに臨床的<sup>6,7)</sup>に研究されており、試験管内ならびに生体内(実験動物における *Candida*, *Trichophyton*, *Aspergillus* などの実験的表在性ならびに深在性感染、ヒトの皮膚真菌症に対して)で他のイミダゾール系抗真菌剤と比較して優るとも劣らない抗菌作用を発揮し、かつ副作用は軽度であることが報告されている。

筆者らは IS の試験管内ならびに生体的抗菌作用を多面的に研究することにより、この新抗真菌剤の臨床的適応のための基礎資料を得ることを目的として一連の研究を行なったが、本報では、まず諸種病原真菌と一部病原細菌に対する試験管内抗菌活性を調べた。

## I. 材料と方法

薬剤: IS は日本シエーリング(株)から分与された硝酸塩(Isoconazole nitrate)の精製原末標品(SHK 265)を用いた。

菌株: 教室保存の主として病原真菌 211 株と病原細菌 15 株、計 226 株を用いた。内訳は *Candida* 属 48 株, *Cryptococcus* 属 11 株, *Torulopsis* 属 6 株, *Geotrichum* 属 3 株, *Histoplasma* 属 14 株, *Blastomyces* 属 5 株, *Paracoccidioides* 属 4 株, *Sporothrix* 属 6 株, *Trichophyton* 属 34 株, *Microsporum* 属 15 株, *Epi-*

dermophyton 属 5 株, *Fonsecaea* 属を含む黒色真菌 34 株, *Aspergillus* 属 20 株, *Penicillium* 属 6 株および *Nocardia* 属 15 株である。

抗真菌活性の測定法: Sabouraud dextrose agar (SDA) (ブドウ糖 2%) を用いる寒天平板希釈法によった。

IS を dimethylsulfoxide に 10 mg/ml の割合に溶解し, それを原液として暗所に  $-20^{\circ}\text{C}$  に保存した。

接種菌液の調製の方法は, 次のとおりである。SDA (ブドウ糖 2%) 斜面に  $37^{\circ}\text{C}$  または  $27^{\circ}\text{C}$  で 4 日ないし 3 週間培養して充分発育させたのち (菌種で培養条件は異なる), 酵母状真菌は白金耳で釣菌して適当量の生理食塩水に浮遊させ, 糸状菌の場合は, Tween 80 を 0.1 % v/v に含む生理食塩水のそれぞれ適当量を培養に加えて白金耳で表面をこすり, 胞子を浮遊させた。後者は室温に約 30 分間静置して大小の菌糸・胞子の集塊を沈降させたのち, 駒込ピペットで上層の胞子浮遊液を滅菌試験管に移した。このようにして得られた各菌株の浮遊液は光電光度計を用い, O. D. <sub>530</sub> 値が 0.01 になるように生理食塩水で調整した。かくして得られた接種菌液は, 菌数にして約  $10^6/\text{ml}$  であった。

薬剤の 2 倍階段希釈を含有する SDA (ブドウ糖 2%) の各系列の各平板に上記接種菌液の 0.01 ml ずつ ( $10^4$  個の細胞) をコンラージ棒で画線塗抹し, 酵母状真菌は  $37^{\circ}\text{C}$  に, 糸状菌は  $27^{\circ}\text{C}$  にインキュベートし, 前者は, 24, 48, 72, 96 時間後に, 後者は 2, 3 週間後に, それぞれ集落形成の有無を観察した。薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) は, *Candida* 属は 48 時間後, その他の酵母類は 72 時間後, *Aspergillus* 属, *Penicillium* 属, *Nocardia* 属は 7 日後, 二形性真菌, 黒色糸状菌, 皮膚糸状菌は 2 週間後に集落形成が認められなかった平板の最小薬剤濃度をもってした。最小殺菌濃度 (MCC) の測定は, MIC 測定終了直後, 各希釈系列で集落形成の認められなかった平板培地の菌塗抹部分をぬぐい取るようにし, 薬剤無添加の SDA 平板 (ブドウ糖 2%) に画線塗抹し, MIC 値測定の場合と同じ条件で培養し, それぞれ同じ判定時間での集落形成を認めなかった平板の最小薬剤濃度をもってした。

## II. 成績

### 1. *Candida* 属に対する抗菌作用

Table 1 にみるように, IS は *Candida* 属諸菌種に強い発育阻止作用を有し, 菌種菌株により若干の差異はあ

Table 1 *In vitro* antifungal activity of isaconazole against *Candida*

Organism	Strains tested	MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	MCC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
<i>C. albicans</i>	16	0.20~3.13	1.56~25
<i>C. tropicalis</i>	7	0.78~3.13	3.13~12.5
<i>C. pseudotropicalis</i>	5	0.10~0.39	1.56~3.13
<i>C. krusei</i>	5	0.10	0.78~3.13
<i>C. parapsilosis</i>	5	0.78~1.56	1.56~6.25
<i>C. stellatoidea</i>	5	0.10~0.20	1.56~3.13
<i>C. guilliermondii</i>	5	0.78~1.56	3.13~12.5

Table 2 *In vitro* antifungal activity of isaconazole against *Cryptococcus*, *Torulopsis* and *Geotrichum*

Organism	Strains tested	MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	MCC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
<i>Cryptococcus neoformans</i>	11	<0.025~1.56	1.56~12.5
<i>Torulopsis glabrata</i>	6	1.56~6.25	6.25~12.5
<i>Geotrichum candidum</i>	3	0.39~1.56	0.78~3.13

Table 3 *In vitro* antifungal activity of isaconazole against dimorphic fungi

Organism	Strains tested	MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	MCC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
<i>Histoplasma capsulatum</i>	10	0.025	0.05~1.56
<i>Histoplasma duboisii</i>	4	0.025	0.025~0.78
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	5	0.05~0.20	0.39~1.56
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	4	0.39~0.78	1.56~12.5
<i>Sporothrix schenckii</i>	6	0.78~1.56	0.78~3.13

Table 4 *In vitro* antifungal activity of isoconazole against dermatophytes

Organism	Strains tested	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MCC ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	15	0.10~3.13	0.10~3.13
<i>Trichophyton rubrum</i>	6	0.10~0.39	0.20~3.13
<i>Trichophyton tonsurans</i>	4	0.78~1.56	1.56~3.13
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	4	0.20~0.39	0.39~1.56
<i>Trichophyton violaceum</i>	5	0.78~3.13	0.78~3.13
<i>Microsporum canis</i>	5	0.10~3.13	0.10~6.25
<i>Microsporum gypsum</i>	5	0.78~3.13	1.56~6.25
<i>Microsporum audouinii</i>	5	0.78~3.13	1.56~6.25
<i>Epidermophyton floccosum</i>	5	0.10~0.20	0.20~1.56

Table 5 *In vitro* antifungal activity of isoconazole against dermatiaceae fungi

Organism	Strains tested	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MCC ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Fonsecaea pedrosi</i>	3	0.05~ 3.13	1.56~12.5
<i>Fonsecaea compactum</i>	3	0.20~ 1.56	6.25~12.5
<i>Phialophora verrucosa</i>	3	0.10~ 6.25	1.56~12.5
<i>Phialophora dermatitidis</i>	5	1.56~ 6.25	1.56~12.5
<i>Phialophora gougerotii</i>	5	0.10~ 3.13	1.56~ 3.13
<i>Phialophora jeanselmei</i>	3	3.13	6.25
<i>Cladosporium trichoides</i>	5	6.25~12.5	12.5 ~25
<i>Cladosporium carrionii</i>	5	3.13~12.5	25
<i>Cladosporium werneckii</i>	2	1.56	1.56

Table 6 *In vitro* antifungal activity of isoconazole against *Aspergillus* and *Penicillium*

Organism	Strains tested	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MCC ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Aspergillus fumigatus</i>	8	1.56~6.25	3.13~12.5
<i>Aspergillus flavus</i>	4	1.56~3.13	3.13~12.5
<i>Aspergillus niger</i>	4	0.78~1.56	3.13~12.5
<i>Aspergillus nidulans</i>	4	0.78~1.56	1.56~ 6.25
<i>Penicillium notatum</i>	3	3.13~6.25	3.13~12.5
<i>Penicillium chrysogenum</i>	3	0.78~1.56	1.56~ 6.25

Table 7 *In vitro* antifungal activity of isoconazole against *Nocardia*

Organism	Strains tested	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MCC ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>N. asteroides</i>	5	0.78~1.56	1.56
<i>N. brasiliensis</i>	4	0.78~1.56	1.56~3.13
<i>N. caviae</i>	4	0.78~1.56	1.56
<i>N. farcinica</i>	2	0.39	1.56

るが、低い MIC 値を示した。

MCC 値も低く、殺菌力も強いことを表わしている。

ただし、菌株により大小の差異があった。

2. *Cryptococcus* 属, *Torulopsis* 属および *Geotrichum* 属に対する抗菌作用

これらの酵母状真菌については各1菌株に対する IS

の抗菌活性を Table 2 に示した。*Candida* 属と同様に、発育阻止作用ならびに殺菌作用が強いことが認められた。

3. 二形性真菌に対する抗菌作用

*Candida* 属以外の二形性真菌5菌株に対する IS の抗菌活性は、Table 3 にみるように極めて強く、発育阻止

作用だけでなく殺菌作用も顕著であることを示している。

#### 4. 皮膚糸状菌に対する抗菌作用

*Trichophyton* 属 5 菌種, *Microsporum* 属 3 菌種および *Epidermophyton* 属 1 菌種について調べた結果, IS はすべての菌種菌株に対して強力な発育阻止ならびに殺菌作用を示し, 菌株間の感受性の差異も比較的小さいことが認められた (Table 4)。

#### 5. 黒色糸状菌に対する抗菌作用

*Fonsecaea* 属 2 菌種, *Phialophora* 属 4 菌種および *Cladosporium* 属 3 菌種に対する IS の抗菌活性は, Table 5 に示すように, 皮膚糸状菌とはほぼ同様の強い抗菌活性を有するが, 殺菌効果では黒色糸状菌がやや抵抗性の強いことが認められた。

#### 6. *Aspergillus* 属ならびに *Penicillium* 属に対する抗菌作用

*Aspergillus* 属 4 菌種および *Penicillium* 属 2 菌種に対しても IS は同様に強い抗菌活性を示した (Table 6)。

#### 7. *Nocardia* 属に対する抗菌作用

*Nocardia* 属 4 菌種にも IS は強く発育阻止的に作用するだけでなく, 低濃度でも殺菌的に作用することが認められた (Table 7)。

### III. 考 察

イミダゾール系抗真菌剤の *in vitro* の抗真菌活性についてはすでに多くの研究発表が行なわれているが<sup>8-10)</sup>, 新しく開発された IS についての報告はまだ少ない<sup>11-12)</sup>。IS および他のイミダゾール系抗真菌剤について筆者らや他の研究者により報告されたデータと, 今回筆者らが行った実験の成績とを比較するとき, 総体的には極めてよく類似しているといえる。今回も一部は Miconazole (MC) を対照として比較実験を行なったが, 既報<sup>11,12)</sup>の成績とほとんど全く合致した。

これらの成績を分析してみると, 発育阻止作用に関しては, いいかえれば MIC 値ではイミダゾール系薬剤は上述のように酷似するが, 殺菌作用については若干の相違がみられ, IS は MC とほぼ同様で, CT よりも強く, いいかえれば MCC 値が若干 CT よりも小さい傾向が認められた。

IS は他のイミダゾール系抗真菌剤と同様に広域スペクトルの抗真菌活性を病原真菌に対して示すだけでなく, *Penicillium* 属のような非病原真菌に対しても強い抗菌活性を有することを確認しただけでなく, 医真菌学分野で取り扱われる細菌である *Nocardia* 属に対しても MC<sup>12)</sup>, Econazole (EC)<sup>13)</sup> などと同様に強い抗菌作用を発揮する点が注目された。実験に用いた菌種につ

いて, とくに皮膚糸状菌, 二形性真菌, さらに *Candida* を含む酵母状真菌に強い活性を有する点は, 本剤の臨床適用との関連で重要な特徴と考えられる。

MIC 値, MCC 値の測定方法に関しては, 一部 Sabouraud dextrose broth を用いる液体培地希釈法との比較実験を行ない, ほぼ同様の成績が得られたところから, 簡便な寒天平板希釈法を全実験を通じて用いた。また, 後者で, 接種菌量は 1 平板当たり  $10^6$  個を用いて検討した結果, 当然 MIC 値, MCC 値はともに若干上昇し, とくに MCC 値の上昇がある程度顕著になり 20~80  $\mu\text{g/ml}$  を示す菌株も一部にみられた。しかし, 皮膚糸状菌や二形性真菌に関しては, このような傾向は軽度であった点が注目される。培養時間を延長した場合にも, これらと同様の所見が被検菌株に総体的に認められた。

### 謝 辞

Isoconazole の原末標品を分与された日本シーリング株式会社のご厚意に感謝する。

### 文 献

- 1) GODEFROI, E. F.; J. HERRES, J. VAN CUSTEM & P. JANSSEN: The preparation and antimycotic properties of derivatives of 1-phenetyl imidazole. *J. Med. Chem.* 12: 784~791, 1969
- 2) KESSLER, von H.-J.: Mikrobiologische Untersuchungen mit Isoconazolnitrat, einem Breitspektrum-Antimykotikums aus der Gruppe der Imidazol-Derivativ. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 29: 1344~1351, 1979.
- 3) KESSLER, von H.-J.; D. HAUDE & C. SCHÖBEL: Tierexperimentelle Prüfung des neuen Breitspektrum-Antimykotikums Isoconazolnitrat. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 29: 1352~1357, 1979
- 4) TÄUBER, T.: Perkutane Resorption von Isoconazol beim Menschen. *Mykosen* 22: 223~232, 1979
- 5) WENDT, VON H. & J. KESSLER: Antimikrobielle Wirksamkeit des Breitspektrum-Antimykotikums Isoconazolnitrat im Humanversuch. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 29: 846~848, 1979
- 6) TÄUBER, U. & M. RZADKIEWIEZ: Bioverfügbarkeit von Isoconazol in der Haut. *Mykosen* 22: 201~216, 1979
- 7) 渡辺昌平, 野村 宏, 宗 義朗, 土井 顕, 朝田 康夫, 浦上敏三, 富士枝 繁: Isoconazole の皮膚真菌症に対する臨床効果と試験管内抗菌価実験。皮膚科紀要 73: 209~214, 1978
- 8) PLEMPPEL, M. & K. BARTMAN: Experimental studies on the antimycotic action of clotrimazole *in vitro* and after local application *in vivo*. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 22:

- 1280~1289, 1972
- 9) VAN CUSTEM, J. M. & D. THIENPONT: Miconazole a broad spectrum antimycotic agent with antibacterial activity. *Chemotherapy* 17: 392~404, 1972
- 10) THIENPONT, D.; J. VAN CUSTEM, S. J. M. VAN NUETEN, C. J. E. NIEMEGERES & R. MARSBOOM: Biological and toxicological properties of econazole, a broad-spectrum antimycotic. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 25: 224~230, 1975
- 11) 江川朝生, 山口英世, 内田勝久, 平谷民雄, 山本容正, 岩田和夫: Miconazole の *in vitro* 抗菌活性。真菌誌 18: 65~72, 1977
- 12) 江川朝生, 山口英世, 内田勝久, 平谷民雄, 山本容正, 岩田和夫: Miconazole の嫌気性並びに好気性細菌に対する抗菌活性。真菌誌 19: 298~302, 1978
- 13) 山崎良治, 内田勝久, 山口英世, 平谷民雄, 山本容正, 岩田和夫: Econazole の抗真菌活性に関する研究 第1報 試験管内抗菌活性。真菌誌 18: 216~224, 1977

## STUDIES ON THE ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF ISOCONAZOLE I. IN VITRO ANTIMICROBIAL ACTIVITY

KAZUO IWATA and KATSUHISA UCHIDA

Department of Microbiology, Meiji College of Pharmacy

Of a series of studies on the antifungal activities of isoconazole, a newly developed imidazole antimycotic, this paper deals with its *in vitro* antifungal and antibacterial activity against a variety of pathogenic and non-pathogenic fungi as well as a pathogenic bacteria.

The minimum inhibitory and cidal concentrations of the antimycotic were determined by means of agar dilution method. As a result, it was demonstrated that isoconazole possessed a strong growth-inhibitory activity and a relatively marked cidal effect on these groups of fungi and bacteria; in other words this new drug is one of the broad antifungal spectrum antimycotics with a strong antibacterial activity.