# Tolciclate の試験管内抗真菌作用に関する研究

# 西野武志・尾花芳樹・五十川葉子・古志智子・谷野輝雄 京都薬科大学 微生物学教室

## (昭和 56 年1月9日受付)

新しく開発された局所投与用皮膚真菌症治療薬 Tolciclate について、Tolnaftate, Clotrimazole を比較薬物として真菌学的研究を行った結果、次のような成績が得られた。

- 1) Tolciclate は子のう菌、不完全菌類に対して良好な抗菌力を示し、子のう菌類に対して、Tolnaftate よりも優れ、Clotrimazole とほぼ同等であった。また不完全菌類に対して Tolnaftate と同等であり、Clotrimazole より優れていた。
- 2) 臨床分離 T. mentagrophytes, T. interdigitale に対して、Tolciclate は他の2薬物よりも優れていたが、T. rubrum に対しては Tolnaftate より劣り、Clotrimazole より優れていた。また Tolnaftate との間に相関関係は認められたが、Clotrimazole との間に相関性は認められなかった。
- 3) 抗菌力に及ぼす諸因子の影響では、培地 pH, 馬血清添加,接種菌量により影響を受けたが、 培養時間では影響されなかった。
  - 4) 試験管内耐性獲得試験では、3薬物ともに耐性の上昇は認められなかった。
- 5) 生菌数に及ぼす影響では、3薬物ともに、A. niger, T. mentagrophytes に対して殺菌的に 作用した。
- 6) 抗菌作用機序の検討では、カリウムイオンの漏出を認めたが、直接的な細胞膜作用を有するものではなかった。
- 7) 形態変化については、作用濃度により、膨化胞子や異常分芽後、 菌糸体を伸ばしていく像が 観察できた。

Tolciclate は 1972 年イタリア Carlo Erba 社で開発された新しい局所投与用皮膚真菌症治療薬である $^{11}$ 。本物質は化学名をO-(1, 2, 3, 4-tetrahydro-1,4,-methanonaphthalen-6-yl) m, N-dimethylthiocarbanilate といい,分子式  $C_{20}H_{21}ONS$ ,分子量 323.46,水に不溶性の白色または淡黄色の結晶性粉末であり,既知物質 Tolnaftate と類似の構造を示す。その構造式はFig.1 に示すとおりである。また本物質は皮膚糸状菌に対して Tolnaftate と同程度の強い抗菌力を示すが,酵母状菌,細菌,原虫に対しては全く抗菌作用を示さないといわれている。

今回私どもは Tolciclate について, Tolnaftate<sup>2,8</sup>), Clotrimazole<sup>4,5,8,7,8)</sup>を比較薬物として種々の真 菌 学 的 検討を行い, 2, 3の知見を得たので報告する。

### I. 実験材料および実験方法

### 1. 使用薬物

薬物としては、Tolciclate、Tolnaftate、Clotrimazole のいずれも標準品を用いた。なおこれらの薬物はいずれも水に不溶のため、2 容の dimethylformamide(DMF)

で溶解後、 8 容の滅菌蒸留水を加えて、 $1,000 \mu g/ml$  溶液を作製し実験に供した。

Fig. 1 Structure of Tolciclate, Tolnaftate and Clotrimazole

## 2. 使用培地

Sabouraud-dextrose 培地 (組成: ブドウ糖 2 %, ポリペプトン1%, pH6.0) の液体培地および寒天培地を用時調製して用いた。

# 3. 胞子菌液の調製方法

Sabouraud-dextrose 寒天培地で、子のう菌類 (Aspergillus, Penicillium) は3~5日間、不完全菌類 (Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton) は10~14日間30℃で培養した菌を0.1% Tween 80 含 Sabouraud-dextrose 液体培地に懸濁し、減菌ガーゼを用いてろ過を行い、約105~106 cells/ml の胞子数 に調製後使用した。

## 4. 抗菌スペクトラム

試験菌として教室保存の皮膚糸状菌 10 種 (子のう菌類4種,不完全菌類6種)を用い、寒天平板希釈法で感受性を測定した。なお測定方法は日本化学療法学会感受性測定法を一部改変し,使用培地はSabouraud-dextrose培地,培養温度は 30℃,培養時間は、子のう菌類3日間,不完全菌類は10日間とした。

#### 5. 臨床分離株に対する感受性分布

1978年, 臨床材料より分離された新 鮮 分 離 の Trichophyton mentagrophytes 79 株, Trichophyton rubrum 114 株, Trichophyton interdigitale 43 株につ いて, 寒天平板希釈法で感受性を測定した。なお培養時 間は 10 日間とした。

## 6. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

抗菌力に及ぼす培地 pH, 馬血清添加, 接種菌量,培養時間の影響について, Aspergillus niger, Penicillium chrysogenium, T. mentagrophytes, Microsporum gypseum を試験菌として寒天平板希釈法により検討を行った。なお,以下の実験で用いた菌株は,全て,抗菌スペクトラムの項で用いたものと同一菌株である。

### 7. 試験管内耐性獲得試験

継代的増量法により耐性獲得状況を A. niger を試験 菌として試験管内寒天希釈法により検討を行った。

#### 8. 生菌数に及ぼす影響

A. niger, T. mentagrophytes の胞子菌を Sabouraud-dextrose 液体培地に浮遊させ, 所定の濃度になるように薬物を添加し, 30℃ で培養を行い, 以後 経時的に生菌数を測定した。

# 9. 抗菌作用機序の検討

# 1) 細胞膜透過性に及ぼす影響

A. niger の胞子菌を生理的食塩水に浮遊させ、所定の濃度になるように薬物を添加し、30℃ で培養 した。 以後経時的に菌液を採取し、millipore filter で除菌後、 漏出菌体成分のうち、260 nm および 280 nm 吸収物質量 を紫外部吸収で、カリウムイオン量をtetraphenylboron による比濁法<sup>9</sup>で検討した。

### 2) 漫透圧抵抗性について

A. niger の胞子菌を 10% マンニット含 Sabouraud-dextrose 液体培地に浮遊させ、所定の濃度になるように薬物を添加し、30℃ で培養した。以後 経時的に菌液を採取し、10% マンニットを含んだ培地(stabilized)と含まない培地(shocked)で希釈系列を行い、10% マンニット含 Sabouraud-dextrose 寒天培地を使用して生菌数を測定した。

### 3) 細菌細胞質膜に対する作用

Escherichia coli NIHJJC-2 を EDTA- lysozyme 処理により spheroplast 細胞を作製し $^{10}$ , 10% ショ糖 含リン酸緩衝液 (M/15, pH7.2) に浮遊させた。この 細胞浮遊液に薬物を添加し、経時的に濁度の変化を測定し、溶菌作用について検討を行った。

## 4) 赤血球膜に対する溶血作用

マウス腋下動脈より血液を採取し、低速遠心後、沈渣を ACD 溶液 (acid-citrate-dextrose 溶液: クエン酸ナトリウム・ $2\,H_2O$  0.255%、クエン酸・ $H_2O$  0.08%、ブドウ糖 0.12%)に懸濁させた。この懸濁液に薬物を添加し、経時的に濁度の変化を測定した。

### 5) 細胞主要構成成分に及ぼす影響

薬物を作用させた A. niger 胞子菌を遠心集菌し、冷 5% TCA 抽出後、熱 5% TCA 抽出を行った。 沈渣は 1 N-NaOH で溶解した。

これらの操作で得られた酸可溶性分画を BROWN 法<sup>11)</sup> およびBURTON 法<sup>12)</sup>で RNA, DNA 含量を測定した。 また酸不溶性分画は LOWRY 法<sup>13)</sup>で蛋白量を測定した。

## 10. 形態変化について

A. niger 胞子菌を用い、スライド培養法で形態変化を観察した。すなわち薬物を含んだ Sabouraud-dextrose 寒天培地をスライドガラス上にフィルム状に引き、その寒天上に胞子菌を接種し、この試料を水蒸気を飽和させた滅菌シャーレの中に移して 30℃ で培養した。以後経時的にスライドガラスを取り出し、カバーガラスを施して、光学顕微鏡観察(倍率 100~400 倍)を行った。

## II. 実 験 結 果

# 1. 抗菌スペクトラム

教室保存の皮膚糸状菌 10 種に対する抗菌力について検討した結果を Table 1 に示した。子のう菌 4 種に対して,Tolciclate は Clotrimazole とほぼ同等の抗菌力を示し,その最小発育阻止濃度 (MIC) は  $1.56\sim3.12\,\mu g/m$ l であった。また今回使用した菌株に対して本実験条件下では,Tolciclate は Tolnaftate と比較すると良好な成績であった。不完全菌 6 種に対して,Tolciclate は

Organisms	Tolciclate	Tolnaftate	Clotrimazole
Aspergillus niger	3. 12	100	6. 25
Aspergillus oryzae	3. 12	>100	3. 12
Aspergillus terreus	1.56	1. 56	3. 12
Penicillium chrysogenium	3. 12	25	3. 12
Trichophyton mentagrophytes	0. 19	0. 19	0.78
Trichophyton rubrum	0.09	0. 39	0.78
Trichophyton violaceum	0. 39	0.39	3. 12
Microsporum canis	0. 39	0. 19	0.78
Microsporum gypseum	0. 39	0.39	1.56
Epidermophyton floccosum	0. 39	0. 39	1. 56

Table 1 Antifungal spectrum of Tolciclate, Tolnaftate and Clotrimazole

MIC (µg/ml)

Tolnaftate とほぼ同等の抗菌力を示し、その MIC は  $0.09\sim0.39\,\mu\mathrm{g/ml}$  であり、Clotrimazole より  $2\sim8$  倍優れていた。このように Tolciclate は子のう菌、不完全菌の両菌種にも優れた抗菌力を示すことが 認 め ら れた。

 臨床分離株に対する感受性分布および感受性相関 1978年, 臨床材料より分離された新鮮分離のT.
 Fig. 2 Sensitivity distribution of clinical isolates (T. mentagrophytes 79 strains)

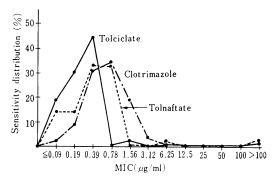


Fig. 3 Cumulative sensitivity distribution of clinical isolates (T. mentagrophytes 79 strains)

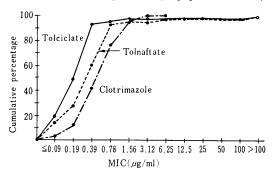


Fig. 4 Cross sensitivity of Tolciclate and Tolnaftate (T. mentagrophytes 79 strains)

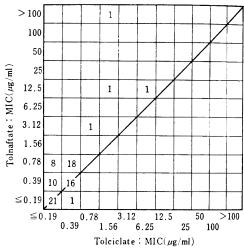
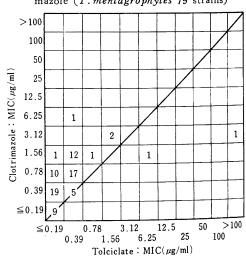


Fig. 5 Cross sensitivity of Tolciclate and Clotrimazole (T. mentagrophytes 79 strains)



mentagrophytes 79 株, T. rubrum 114 株, T. interdigitale 43 株について感受性分布, 累積分布および Tolnaftate, Clotrimazole との相関関係について検討を行った結果を, Fig. 2~13 に示した。

# (a) T. mentagrophytes の場合

感受性分布では Fig. 2、3 に示す ように Tolciclate の感受性 ピークは  $0.39~\mu g/ml$  であり、 $\leq 0.09\sim 0.39~\mu g/ml$  に供試菌の 90% 以上が分布しており、非常に良好な感受性を示したが、 $>100~\mu g/ml$  の耐性菌が 1 株存在していた。 Tolnaftate の感受性ピークは  $0.39\sim 0.78~\mu g/ml$ , Clotrimazole では  $0.78~\mu g/ml$  であり、 Tolciclate の抗菌力は他剤に比べ  $2\sim 4$  倍程度優れていた。また感受性相関では、Fig. 4、5 に示す ように Tolnaftate との間には交差性が認められたが、Clotrimazole との間にはあまり交差性が認められなかった。

### (b) T.rubrum の場合

感受性ピークは、Fig. 6、7 に示すように Tolciclate では  $0.19~\mu g/ml$  であり、 $\leq 0.09 \sim 0.39~\mu g/ml$  に 90%以上の株が分布していたが、 $>100~\mu g/ml$  の耐性菌も存在していた。Tolnaftate では  $\leq 0.09~\mu g/ml$ 、Clotri-

Fig. 6 Sensitivity distribution of clinical isolates (T. rubrum 114 strains)

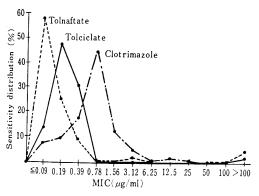
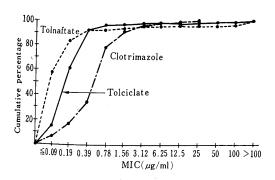


Fig. 7 Cumulative sensitivity distribution of clinical isolates (*T. rubrum* 114 strains)



mazole では  $0.78 \mu g/ml$  にそれぞれピークを有し、Tolciclate は Tolnaftate に比べ 2 倍程度劣っていたが、Clotrimazole よりも 4 倍程度優れているという結果であった。感受性相関では Fig. 8, 9 に示すように、Tolnaftate との間には交差性が認められたが、Clotrimazole との間にはあまり交差性が認められなかった。

### (c) T.interdigitale の場合

感受性ピークは Fig. 10, 11 に示すように Tolciclate では  $0.19\sim0.39~\mu g/ml$  であり、全ての株が  $1.56~\mu g/ml$  以下に存在 していた。 Tolnaftate では  $0.78~\mu g/ml$ , Clotrimazole では  $0.78~\mu g/ml$  にそれぞれピークを 有

Fig. 8 Cross sensitivity of Tolciclate and Tolnaftate (T. rubrum 114 strains)

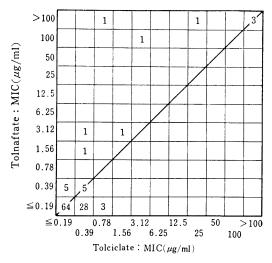


Fig. 9 Cross sensitivity of Tolciclate and Clotrimazole (T. rubrum 114 strains)

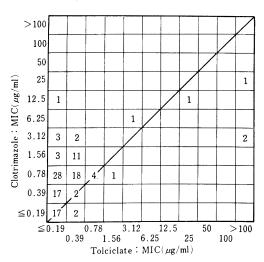


Fig. 10 Sensitivity distribution of clinical isolates (T. interdigitale 43 strains)

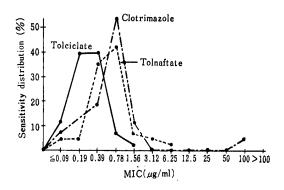
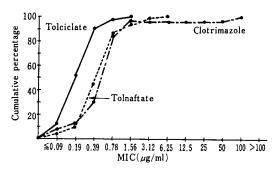


Fig. 11 Cumulative sensitivity distribution of clinical isolates (T. interdigitale 43 strains)



し, Tolciclate は Tolnaftate, Clotrimazole に比べ2 倍程度優れていた。また感受性相関では Fig. 12, 13 に 示すように Tolnaftate および Clotrimazole との間に わずかな相関性が認められた。

### 3. 抗菌力に及ぼす諸因子の影響

A.niger, P.chrysogenium, T.mentagrophytes, M.gypseum を用いて, 抗菌力に及ぼす培地 pH, 馬血清添加, 接種菌量, 培養時間の影響について検討した結果を  $Fig.14\sim17$  に示した。培地 pH の影響では, いずれの菌を用いた場合も酸性側で抗菌力が良くなる傾向にあったが, 特に A.niger および P.chrysogenium において顕著であった。馬血清添加の影響では, 添加量が増加するにつれて, 抗菌力が低下する傾向にあった。接種菌量の影響では, T.mentagrophytes の場合, 菌量による抗菌力の変動はあまり認められなかった。また培養時間の影響では, 培養が長くなっても抗菌力はほとんど変動しなかった。これらの諸因子による影響は、3薬物ともに同様な傾向であり, 薬物間の差は認められなかった。

#### 試験管内耐性獲得試験

Fig. 12 Cross sensitivity of Tolciclate and Tolnaftate (T. interdigitale 43 strains)

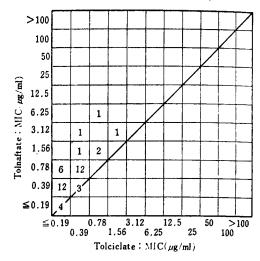
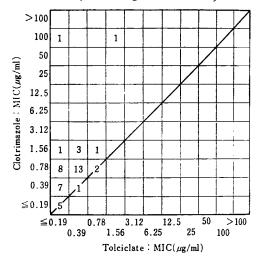


Fig. 13 Cross sensitivity of Tolciclate and Clotrimazole (T. interdigitale 43 strains)

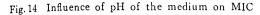


A. niger を供試菌として、耐性獲得状況を検討した結果を Fig. 18 に示した。 3 薬物ともにほとんど耐性の上昇は認められなかった。

## 5. 生菌数に及ぼす影響

### (a) A. niger について

 $A.\,niger$  に対する殺菌効果について検討した結果を Fig. 19 に示した。 Tolciclate の殺菌効果は他の薬物よりも優れており、 $1.56\,\mu g/ml$  作用でも強い殺菌性が認められた。 Tolnaftate, Clotrimazole でも殺菌効果が認められたが、 $1.56\sim6.25\,\mu g/ml$  作用では Toliclate に比べて殺菌性が弱かったり、あるいは作用発現が遅い



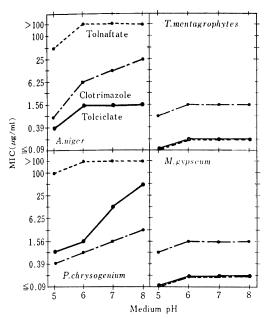
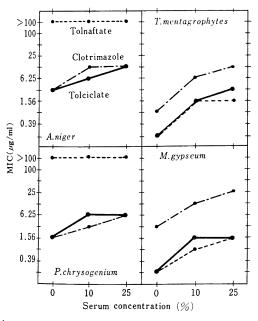


Fig. 15 Influence of horse serum on MIC



# という結果であった。

# (b) T. mentagrophytes について

T.mentagrophytes に対する殺菌効果について 検 討した結果を、Fig. 20 に示した。 Tolciclate は Tolnaftate とほぼ同様の殺菌効果を示し、 強い殺菌作用を有していた。また Clotrimazole も殺菌作用を有するが、

Fig. 16 Influence of inoculum size on MIC

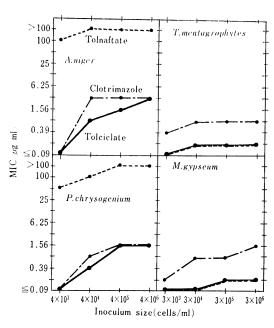
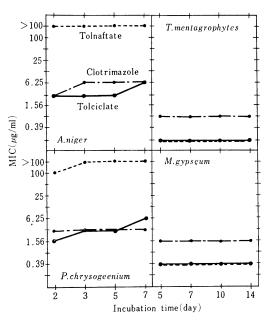


Fig. 17 Influence of incubation time on MIC



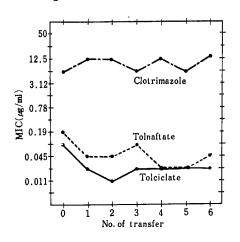
作用発現が遅いという結果であった。

## 6. 抗菌作用機序の検討

# 1) 細胞膜透過性に及ぼす影響

A. niger を供試菌とし、細胞膜透過性に及ぼす 影響 について検討した結果を Fig. 21~23 に 示 した。 漏出 260nm 吸収物質量の測定結果では、 Tolciclate, Clotri-

Fig. 18 Pattern of development of resistance of A. niger



mazole 作用では、ほとんど漏出を認めることができず、また Tolnaftate 作用では顕著な 260 nm 値の低下が認められた。漏出 280 nm 吸収物質量の測定結果でも、260 nm 吸収物質量測定結果と同様の成績であった。漏出カリウムイオン量の測定結果では、3 薬物ともに漏出作用が認められ、特に Tolciclate, Clotrimazole 作用では顕著であった。

## 2) 浸透圧抵抗性について

 $A.\,niger$  を供試菌として薬物処理細胞の浸透圧抵抗性について検討した結果 を、 $Fig.\,24$  に示した。3 薬物ともに stabilized と shocked の間に生菌数の差は、ほとんど認められないことから、浸透圧に不安定な細胞形成は起こっていないことが判った。

# 3) 細菌細胞質膜に対する作用

E. coli NIHJJC-2 を用いて作製した spheroplast 細

Fig. 19 Effect of Tolciclate, Tolnaftate and Clotrimazole on the viability of A. niger

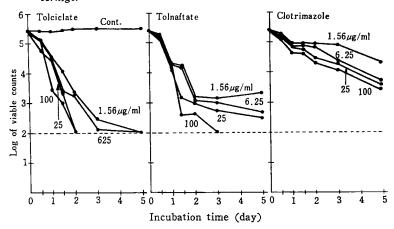
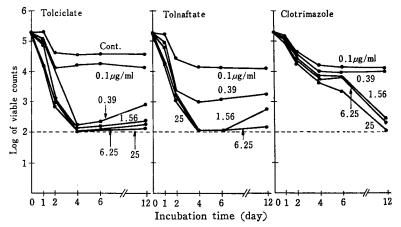
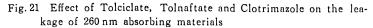


Fig. 20 Effect of Tolciclate, Tolnaftate and Clotrimazole on the viability of T. mentagrophytes





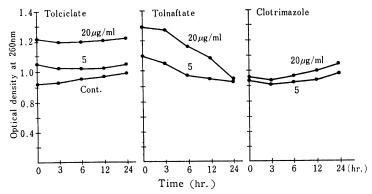


Fig. 22 Effect of Tolciclate, Tolnaftate and Clotrimazole on the leakage of 280nm absorbing materials

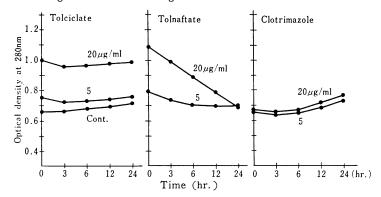
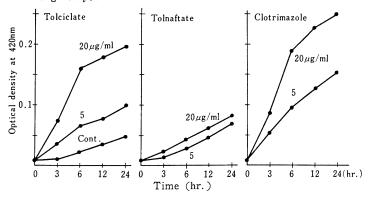


Fig. 23 Effect of Toiciclate Tolnaftate and Clotrimazole on the leakage of potassiumion

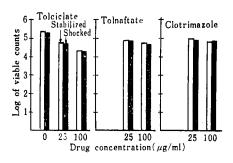


胞に対する影響について検討した結果を、Fig. 25 に示した。3薬物とも spheroplast 細胞に対する溶菌作用がほとんど認められなかった。なお比較薬物として用いた Polymyxin B (PL) 作用では顕著な溶菌作用が認められた。

4) 赤血球膜に対する溶血作用

マウス赤血球膜に対する溶血作用について検討した結果を Fig. 26 に示した。Tolciclate, Tolnaftate 作用では、あまり強くはないが溶血作用が認められた。しかしながら Clotrimazole 作用では非常に顕著な濁度の減少が認められ、強い溶血作用を有していることが判った。

Fig. 24 Comparison of the viable counts of stabilized and osmotically schoked culture of A. niger exposed to Tolciclate, Tolna ftate and Clotrimazole for 4 hours



## 5) 細胞主要構成成分に及ぼす影響

細胞主要構成成分合成に及ぼす影響について検討した 結果を Fig. 27~29 に示した。 3 薬物ともに蛋白合成, DNA 合成にあまり影響を及ぼさなかったが, 高濃度作 用では, わずかながら RNA 合成に影響を及ぼすという 結果が得られた。またそれぞれの合成に及ぼす 阻害 度 は、あまり dose response のあるものではなかった。 7. 形態変化について

各薬物作用時の形態変化について 検 討 した 結果を Fig. 30~46 に示した。Fig. 30~32 は薬物無添加(control) の形態を示したものであり、 胞子は培養時間の経 過とともに分芽し、菌糸を伸ばしていく様子が観察でき た。Fig. 33~36 は Tolciclate 作用による形態変化を示 したものであり、低濃度では、大きな形態変化を示さ ず、高濃度では稀に膨化する胞子やあるいは異常分芽 は Tolnaftate 作用のものであり、低濃度では変化を起 こさないが、高濃度では膨化胞子や異常分芽後菌糸を伸 ばしていく像が 観察 できた。 Fig. 42~46 は Clotrimazole 作用のものであり、高濃度では、やはり膨化胞 子や異常分芽後, 菌糸を伸ばしていく像が, 低濃度では 正常に発育していく像が観察できた。以上のように3薬 物の作用による形態変化はよく類似していたが、濃度的 なもので若干の差異が認められた。

Fig. 25 Effect of Tolciclate, Tolnaftate and Clotrimazole on the lysis of spheroplasts of E. coli NIHJJC-2

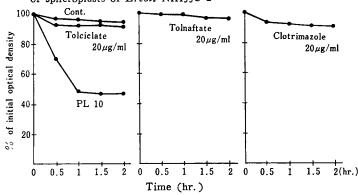


Fig. 26 Effect of Tolciclate, Tolnaftate and Clotrimazole on the lysis of red blood cells from mouse

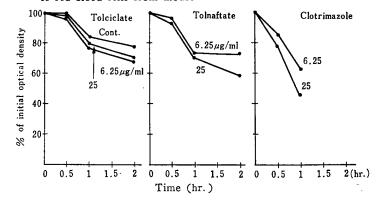


Fig. 27 Effect of Tolciclate on the synthesis of macromolecules

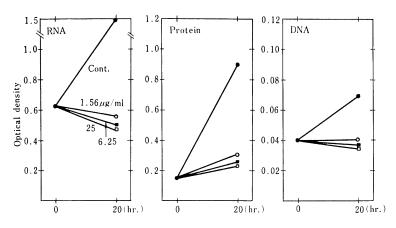


Fig. 28 Effect of Tolnaftate on the synthesis of macromolecules

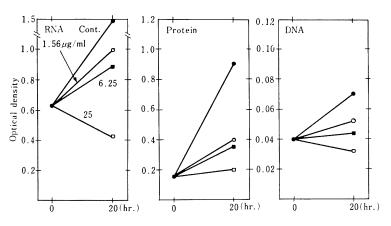


Fig. 29 Effect of Clotrimazole on the synthesis of macromolecules

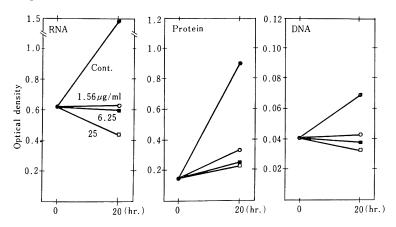


Fig. 30 Spore of A. niger (Ohr.)

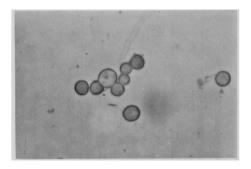


Fig. 31 Untreated A. niger cells observed after 9hrs. of incubation

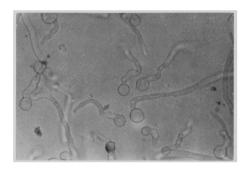


Fig. 32 Untreated cells after 18 hrs

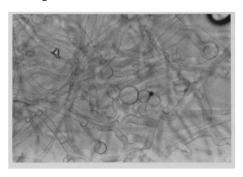


Fig. 33 Cells after 36hrs. of exposure to Tolciclate (0.2  $\mu$ g/ml)

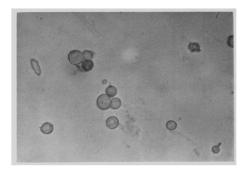


Fig. 34 Cells after 36hrs. of exposure to Tolciclate (0.04  $\mu$ g/ml)

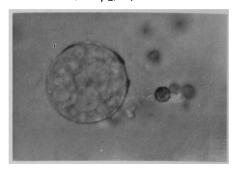


Fig. 35 Cells after 18 hrs. of exposure to Tolciclate (0.008 µg/ml)

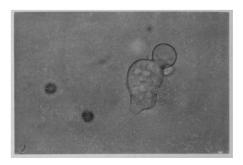


Fig. 36 Cells after 36hrs. of exposure to Tolciclate (0.008  $\mu$ g/ml)

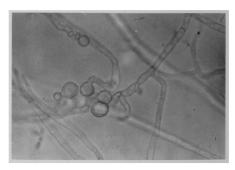


Fig. 37 Cells after 24 hrs. of exposure to Tolnaftate (0.  $2 \mu g/ml$ )

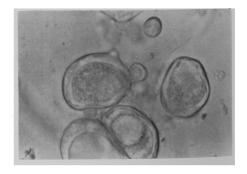


Fig. 38 Cells after 36 hrs. of exposure to Tolnaftate (0.2  $\mu$ g/ml)

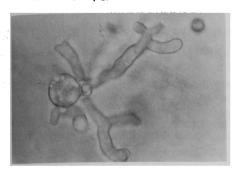


Fig. 39 Cells after 18hrs. of exposure to Tolnaftate (0.04 µg/ml)

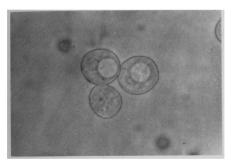


Fig. 40 Cells after 36hrs. of exposure to Tolnaftate  $(0.04 \mu g/ml)$ 

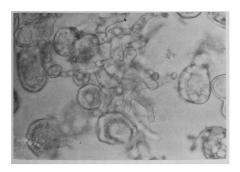


Fig. 41 Cells after 36 hrs. of exposure to Tolnaftate (0.008  $\mu g/ml$ )



Fig. 42 Cells after 9hrs. of exposure to Coltrimazole (1  $\mu g/ml$ )

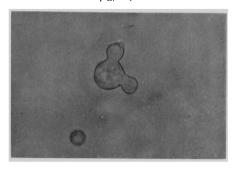


Fig. 43 Cells after 24hrs. of exposure to Clotrimazole (1  $\mu$ g/ml)

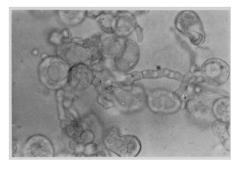


Fig. 44 Cells after 9hrs. of exposure to Clotrimazole 0.2  $\mu g/ml$ )



Fig. 45 Cells after 24hrs. of exposure to Clotrimazole (0.2  $\mu$ g/ml)

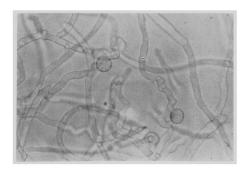
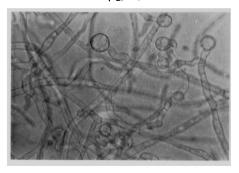


Fig. 46 Cells after 24hrs. of exposure to Clotrimazole 0.04 µg/ml)



III. 総括および考察

イタリア Carlo Erba 社で開発された新しい局所投与 用皮膚真菌症治療薬 Tolciclate に関する真菌学的研究 を既知物質 Tolnaftate および Clotrimazole を比較薬 物として検討を行った。その結果、Tolciclate は子のう 菌、不完全菌類に対して良好な抗菌力を示し、子のう菌 類に対して、Tolnaftate よりも優れ、Clotrimazole と ほぼ同等であった。 また不完全菌類に対して、 Tolnaftate とほぼ同等であり、Clotrimazole より優れてい た。

臨床分離白癬菌に対する感受性分布について検討した結果, T. mentagrophytes, T. interdigitale に対して, Tolciclate は他の2薬物よりも2~4倍優れていたが, T. rubrum については, Tolnaftate より2倍程度劣っており, Clotrimazole よりは優れていた。また Tolciclate と Tolnaftate との間には相関関係が認められたが, Clotrimazole との間には相関関係は認められなかった。

抗菌力に及ぼす諸因子の影響では、培地 pH, 馬血清添加,接種菌量により抗菌力は変動する傾向にあったが、培養時間にはほとんど影響されなかった。試験管内耐性獲得試験では、3薬物ともに耐性の上昇は認められなかった。

生菌数に及ぼす影響では、A. niger あるいは Tmentagrophytes を用いた場合、3薬物ともに殺菌作用が認められたが、Tolciclate の効果が最も強力であった。抗菌作用機序の検討では、細胞膜透過性に及ぼす影響については、顕著なカリウムイオンの漏 出が Tolciclate および Clotrimazole 作用で認められたが、260 nm あるいは 280 nm 吸収物質の漏出はほとんど認められなかった。

浸透圧抵抗性については、浸透圧に不安定な細胞形成 は認められなかった。細菌細胞質膜に対する溶菌作用は 3 薬物ともに認められず、赤血球膜に対する溶血作用は、 Tolciclate, Tolnaftate ではわずかに認められたにすぎなかったが、Clotrimazole では強い溶血作用が認められた。

細胞上要構成成分合成に及ぼす影響については、3薬物ともに蛋白合成、DNA 合成にはほとんど影響せず、RNA 合成に若干の影響が認められた。形態変化では、薬物作用により、膨化胞子や異常分芽後、菌糸を伸ばしていく像が観察できたが、濃度的には、Tolciclateによる抗菌作用が最も強いことが認められた。

抗真菌薬の感受性測定は抗菌薬のように、学会等で定められた測定方法が確立されておらず、各研究機関で、独自の方法で実施されているのが現状であるが、実験データの信頼性などの点を考慮すると、測定方法を規定する必要性があると思われる。

次に生菌数に及ぼす影響については、本実験では液体 培地を用いて検討したが、長時間培養を行うと、菌糸体 がからみ合い、正確な希釈等ができないため、0.1%、 Tween 80 あるいはガラス珠などを使用して懸濁を行っ た。このため薬物無添加 (control) でも生菌数の減少が 生じる結果となった。これについても実験方法の検討が 必要であり、例えば薬物を含有した寒天表面上に菌を塗 抹することにより薬物作用を行い、経時的に薬物無含有 寒天上にレブリカするなどの方法を考案して、測定方法 の mannual を確立する必要性があると思われる。

最後に抗菌作用機序の検討であるが、カリウムイオンの漏出などの結果より、Tolciclate の作用は真菌菌体表層(主に細胞膜)に在るものと考えられる。また今回得られた結果からは、260 nm あるいは 280 nm 吸収物質の漏出はほとんど認められなかったが、これらは薬物自体の吸収が影響しているものと考えられ、さらに違った測定方法を用いる必要性があると思われる。また細胞主要構成成分合成への影響では若干の RNA 合成阻害が認められたが、さらに放射性物質の取り込みなどで検討していく必要があると考えている。

### 文 献

 BIANCHI, A., G. MONTI & I. DE CARNERI: Tolciclate: Further Antimycotic Studies. Antimicr. Agents & Chemoth. 12(3): 429~430, 1977

- WEINSTEIN, M. J.; E. M. ODEN & E. Moss.: Antifungal properties of tolnaftate. In vitro and in vivo. Antimicr. Agents & Chemoth. -1964: 595~601, 1965
- ROBINSON, H. M. & J. RASKIN.: Tolnaftate therapy of mycotic infections. J. Invest. Dermatol. 42:185~187, 1964
- 4) PLEMPEL, M.; K. BARTMANN, K. H. BÜCHEL & E. REGEL: Bay b 5097, a new orally applicable antifungal substance with broadspectrum activity. Antimicr. Agents & Chemoth. 1969: 271~274, 1970
- 5) SHADOMY, S.: In vivo studies with Bay b 5097. Antimicr. Agents & Chemoth. -1970: 169~174, 1971
- 6) 岩田和夫, 山口英世: Clotrimazole の作用 機 作 I. Candida albicans に対する一次作用点の検討。 日本細菌学雑誌。28:513~521, 1973
- 7) 山口英世,神田弥生,岩田和夫:膜系に作用点を もつ抗真菌剤, とくに clotrimazole の作用機序 および相互の併用効果。真菌誌。15:18~24,

#### 1974

- 8) 山口英世, 岩田和夫: Clotrimazole の作用 機作 II. Candida albicans 細胞の膜系に対する作用。 日本細菌学雑誌。29:379~385, 1974
- 9) 金井 泉,金井正光:臨床檢查法提要,WII-18,金原出版
- 松本建介,三和秀明,中沢昭三:ペプタイド系抗 生物質 Enramycin の作用機序に関する研究。 Chemotherapy. 23(8):2552~2557, 1975
- BROWN, A. H.: Determination of pentose in the presence of large quantities of glucose. Arch. Biochem. 11: 269~278, 1946
- 12) BURTON, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62: 315~321, 1956
- 13) LOWRY, O. H.: N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265~275, 1951

## ANTIMYCOTIC STUDIES ON TOLCICLATE

Takeshi Nishino, Yoshiki Obana, Yohko Isogawa, Tomoko Koshi and Teruo Tanino Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy

The *in vitro* antifungal activity of tolciclate was compared with that of tolnaftate and clotrimazole. The following results were obtained.

- 1) The antifungal activity of tolciclate against Ascomycetes was superior to those of tolnaftate and similar to those of clotrimazole, and against Fungi imperfecti was similar to those of tolnaftate and superior to those of clotrimazole.
- 2) The in vitro antifungal activity of tolciclate against clinical isolates of Trichophyton mentagrophytes and Trichophyton interdigitale was superior to those of tolnaftate and clotrimazole, but was
  inferior to tolnaftate against Trichophyton rubrum.
- 3) Influence of medium pH, the addition of horse serum, inoculum size and incubation time on in vitro antifungal activity of tolciclate showed the same tendency with tolnaftate and clotrimazole.
- 4) Development of resistance of Aspergillus niger to tolciclate, tolnaftate and clotrimazole in vitro was not observed.
- 5) Antifungal action of tolciclate against Aspergillus niger and Trichophyton mentagrophytes was similar to that of tolnaftate and clotrimazole.
  - 6) Tolciclate and clotrimazole released cellular potassium ion.
- 7) With a light microscopy, exposure of Aspergillus niger to tolciclate, tolnaftate and clotrimazole resulted in the swelling of spore and the extention of hypae following abnormal budding.