

Candida albicans における isoconazole の作用メカニズム

山口 英世・平谷 民雄・末柄 信夫

帝京大学医学部植物学・微生物学教室

岩 田 和 夫

明治薬科大学微生物学教室

(昭和 57 年 5 月 27 日受付)

イミダゾール系抗真菌剤 isoconazole の作用メカニズムの解明を目的として, *Candida albicans* 細胞の主要な生化学的活性に対する本剤の影響を検討した。その結果, isoconazole は用いた実験条件下で測定される静菌の濃度 (20 $\mu\text{g/ml}$) において次の効果を迅速かつ顕著に示した。(1) 各種放射性基質の取り込みを指標とするタンパク質, RNA, DNA, マンナンおよびグルカンの合成阻害, (2) 2-デオキシグルコースの influx 阻害と efflux 促進, (3) ソルボース細胞内保持能の低下, (4) 細胞内 K^+ , 260 nm-吸収物質およびタンパク質の遊出促進, (5) RNA, DNA, タンパク質の細胞内分解の促進。いずれの効果も本剤の殺菌的濃度 ($\geq 40 \mu\text{g/ml}$) 下ではさらに増強された。これらの効果に比べて, *C. albicans* 細胞の呼吸活性に対する影響は極めて軽度であったが, 内部呼吸よりもグルコースを基質とする外部呼吸に対する阻害効果のほうが強かった。また, エネルギー源や呼吸能を異にする *C. albicans* 培養について比較した結果, 細胞の本剤感受性は呼吸能にまったく依存しないことが認められた。

以上の成績から, isoconazole は真菌細胞膜に一次的に作用し, 基質の細胞内輸送の阻害と膜透過性亢進による細胞内成分保持能の低下をひき起こし, その結果, 高分子物質合成阻害, 細胞内高分子物質の分解, 呼吸能の低下を二次的に誘起することが本剤の抗真菌活性の生化学的基盤であると推論された。

Isoconazole (1-[2, 4-dichloro- β -(2, 6-dichlorobenzoy)-phenethyl]-imidazole nitrate) は GODEFROI et al.¹⁾ によって最初に合成され, 生物学的性状の記載が行なわれたイミダゾール系抗真菌剤の一つである。この化学式から明らかなように, 本剤は表在性および深在性真菌症の治療に有効な薬剤としてすでに臨床的に使用されている miconazole (1-[2, 4-dichloro- β -(2, 4-dichlorobenzoy)-phenethyl]-imidazole nitrate) のクロール置換基に関する異性体であり, したがってこれもすでに局所的抗真菌剤として実用化されている econazole (1-[2, 4-dichloro- β -(*p*-chlorobenzoy)-phenethyl]-imidazole nitrate) とも類似する化学構造をもつ。

Isoconazole は miconazole や econazole に匹敵する強力な抗微生物活性を有し, 試験管内で大部分の病原真菌のほかグラム陽性細菌やトリコモナスを含む広範囲の微生物種の発育を阻止し^{2,3,4)}, これらの微生物による実験的感染を受けた動物に対しても優れた治療効果を発揮する^{5,6)}。さらに, 皮膚真菌症患者に局所的に適用して良好な臨床的成績が得られている^{7,8)}。

Miconazole, econazole および clotrimazole の作用メカニズムについては, すでに多数の生化学的ならびに超微形態学的研究が報告され, これらのイミダゾール剤はいずれも共通して感受性真菌の細胞膜の機能, 構造を障害すること, 細胞膜上の標的分子はリン脂質と想定されること, また一方ではエルゴステロール合成阻害作用をもつことが明らかになっている^{9~13)}。化学構造と抗菌活性の類似性からみて, isoconazole も従来のイミダゾール剤と共通の作用メカニズムをもつ可能性は充分考えられるところであるが, 本剤を直接対象としたこの面での研究はいまだに報告がない。

本報では *Candida albicans* を試験菌として用い, 細胞膜機能を中心にこの菌の主要な細胞機能に及ぼす isoconazole の影響について生化学的検討を行ない, その一次的作用メカニズムの究明を試みた。

I. 材料と方法

菌株 すべての実験に *Candida albicans* MTU 12021 を使用した。加えて, 一部の実験には *C. albicans* MTU 12013 より誘導した呼吸欠損変異株 RD-4¹⁴⁾ を併

用した。

薬剤溶液の調製 日本シェーリング社より提供を受けた isoconazole (硝酸塩) の精製標品 (SH K 265) を 100% ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、8 mg/ml (w/v) の濃度に調整したものを原液として用いた。これを -20°C に保存し、必要に応じて融解の後、実験に供した。原液の希釈には必ず DMSO を使用し、すべての反応系において溶媒 (DMSO) の濃度が 1% (v/v) になるように調整した。また薬剤無添加対照の反応系には溶媒のみを最終濃度 1% になるように添加した。

培養濁度を指標とする発育の測定 PYG 培地 (1 l 当りポリペプトン 10g, 酵母エキス 5g, グルコース 20g, pH 無修正) に 30°C , 24 時間培養した *C. albicans* 細胞を約 10^6 細胞/ml の濃度に希釈して発育測定用培地 (1 l 当り KH_2PO_4 2g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, ポリペプトン 3.5g, 酵母エキス 4g, グルコースまたはグリセリン 20g, pH 無修正) に浮遊し、薬剤溶液を添加した後、 30°C で振盪培養を行なった。24 時間後に試料を採取し、530 nm 波長での濁度を測定した。

生菌数の測定 PYG 培地中で 37°C , 24 時間振盪培養して得られた培養を新鮮な同培地で $2 \sim 3 \times 10^7$ 細胞/ml の濃度に希釈した後、種々の濃度の薬剤溶液を含む L 型試験管に一定量ずつ分注し、薬剤の最終濃度範囲が 1.25 $\sim$ 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように調整して 37°C で振盪培養した。24 時間後に採取した試料を PYG 培地で適宜希釈した後、常法に従って PYG 寒天培地平板に一定量 (0.1 ml) を塗抹接種し、 37°C で培養した。48 時間後に生育してきたコロニー数を数え、試料中の生菌数を算定した。

各種放射性基質の取り込み実験 菌接種後 1 週以内の新鮮な Sabouraud グルコース寒天培地斜面培養から採取した *C. albicans* を casamino acid-無機塩培地¹⁵⁾ に接種し、 37°C で 18 時間振盪培養を行なった。遠心により細胞を集め、脱イオン水に浮遊して遠心洗浄した後、脱イオン水に再浮遊し、 30°C で振盪した。3 時間後に集菌し、0.04 mM KH_2PO_4 + 10 mM グルコース溶液 ($[^{14}\text{C}]$ グルコースの取り込みの場合のみはグルコースを含まない溶液) に浮遊し、約 1 mg 乾燥菌量 ($2 \sim 3 \times 10^7$ 細胞)/ml の濃度に調整した。この細胞浮遊液に種々の濃度の薬剤溶液 1/100 容および $[^{14}\text{C}]$ または $[^3\text{H}]$ 標識化合物溶液 1/50 容を順次加え、全量を 4 $\sim$ 8 ml に合わせた。各反応液を含む L 型試験管を 30°C で振盪し、一定の時間間隔で試料を採取した。用いた標識化合物と試料の分画、処理法は次のとおりである。

a) ロイシン $[^3\text{H}]$ ロイシンの熱トリクロール酢酸 (TCA) 不溶性画分への取り込みを指標としてタンパク

質合成をモニターした。反応液には 1 ml 当り 0.4 μCi (0.1 μmol) の標識化合物を添加した。採取試料に等量の 10% (w/v) TCA を加えて反応を止め、 90°C で 15 分間加熱した後、不溶性物質をガラス繊維濾紙 (Whatman, GF/A) 上に集めた。5% TCA で洗浄し、乾燥した後に、放射能を測定した。

b) アデニン 反応液 1 ml 当り 0.4 μCi (0.04 μmol) の $[^3\text{H}]$ アデニンを添加した。採取試料を二分し、一方には等量の氷冷 10% TCA を加えて 0°C に放置し、生じた不溶性画分 (RNA + DNA) をガラス繊維濾紙上に集めた。他方の試料には等量の N-KOH を添加し、 60°C , 2 時間加水分解処理を行なった後に HCl で中和した。次に最終濃度 5% になるように氷冷 TCA を加え、一夜 0°C に放置した。生じた不溶物 (DNA) をガラス繊維濾紙上に集めた。

c) グルコース 1 ml 当り $[^{14}\text{C}]$ グルコース 0.02 μCi (2 μmol) を含む反応液を調製した。採取試料に等量の氷冷 10% TCA を加えて反応を止めた後、CHENG & NICKERSON¹⁶⁾ の方法に従ってマンナン画分および熱アルカリ不溶性グルカン画分を得、それぞれをガラス繊維濾紙上に集めた。

2-デオキシンググルコース influx の測定 上述の方法で 0.04 mM KH_2PO_4 + 1 mM グルコース溶液を用いて調製した細胞浮遊液に所定の濃度の薬剤溶液 1/100 容と、 $[^3\text{H}]$ 2-デオキシンググルコースの 0.2 μCi (0.2 μmol)/ml を加え、 30°C で振盪した。一定時間経過後試料を採取し、直ちにガラス繊維濾紙 (Whatman, GF/C) 上に細胞を集め、氷冷脱イオン水で充分洗浄し、乾燥した後、放射能を測定した。

2-デオキシンググルコース efflux の測定 上述の反応液を薬剤無添加の条件下で 30°C , 30 分間振盪して細胞内に 2-デオキシンググルコースを取り込ませた。遠心により細胞を集め、氷冷脱イオン水で洗浄し、元の量の脱イオン水に再浮遊した後、1/100 容の薬剤溶液を含む L 型試験管に分注し、 30°C で再び振盪を行なった。経時的に試料を採取し、細胞をガラス繊維濾紙上に集め、氷冷脱イオン水で洗浄した後、放射能を測定した。

細胞内高分子物質の安定性の測定 前出の方法で、 $[^3\text{H}]$ ロイシンまたは $[^3\text{H}]$ アデニンを 30°C , 30 分間取り込ませた薬剤無添加反応液から遠心により細胞を集め、氷冷脱イオン水で充分洗浄した後、脱イオン水に再浮遊して薬剤を加え、 30°C で再び振盪した。90 分後に試料を採取し、 $[^3\text{H}]$ ロイシン標識細胞からタンパク質画分を、 $[^3\text{H}]$ アデニン標識細胞から RNA および DNA 画分をそれぞれ調製し、残存する放射能を測定した。

放射能の計測 試料 (細胞または細胞画分) をのせた

ガラス繊維濾紙を赤外線ランプ下で充分乾燥した後、計測用バイアルに移してトルエンシンチレーター（トルエン 1 l 中に DPO 5 g, ジメチル POPOP 0.2 g を含む）を加え、Aloka 液体シンチレーションシステム LSC-903 型を用いて放射能を計測した。

細胞成分遊出の測定 放射性基質取り込み実験に用いたものと同じ方法で調製した *C. albicans* 細胞浮遊液に 1/100 容の薬剤を加えた後、30°C で振盪し、経時的に試料を採取した。細胞からの K^+ , 260 nm-吸収物質およびタンパク質の遊出量は薬剤処理後の各成分の細胞内残存量を測定することにより算出した。採取試料を直ちに冷却し、遠心により細胞を回収し、これを氷冷脱イオン水で 1 回洗浄した後、元の量の脱イオン水に再浮遊した。これを二分し、一方には等量の 4N-HCl を加えて 100°C, 10 分間抽出を行ない、冷却後に遠心して上清を分離し、Unicam SP 90 型原子吸光計により K^+ 含量を測定した。薬剤処理試料中の K^+ 含量を同一時間に採取した薬剤無添加対照試料中の K^+ 含量から差し引いた値を遊出量と算定した。

採取した他方の試料には等量の 10% $HClO_4$ を加え、90°C で 10 分間加熱処理した。冷却後、遠心により上清と沈渣に分離した。上清については 260 nm-吸光度の測定により、260 nm-吸収物質の定量を行なった。沈渣はエタノール-エチルエーテル (3:1, v/v) で 1 回洗浄した後、適当量の N-NaOH を加えて 100°C, 30 分間加熱し、Lowry et al.¹⁷⁾ の方法によりタンパク質を定量した。いずれも K^+ の場合と同じ方法でそれぞれの遊出量を算出した。

ソルボース保持能の測定 CIRILLO et al.¹⁸⁾ が記述している方法に準拠して、あらかじめ細胞に取り込ませたソルボースの細胞内含量を定量した。放射性基質取り込み実験で用いた方法に従って一夜培養菌を遠心集菌し、0.06 M-NaCl を含む 0.03 M-トリス-コハク酸緩衝液 (pH 7.5) で 1 回洗浄した後、同緩衝液を用いて約 1 mg 乾燥菌量/ml の濃度の細胞浮遊液を調製した。これを L 型試験管に分注し、薬剤とソルボース（最終濃度 100 mg/ml）を添加した後、30°C で 60 分間振盪した。遠心により細胞を集め、一定量の氷冷 0.15 M-NaCl で 3 回遠心洗浄した後、100°C, 30 分間加熱し、細胞内に保留されているソルボースを抽出した。冷却後に遠心して上清を分離し、DISCHE & DEVI¹⁹⁾ の方法によりソルボースの定量を行なった。

呼吸活性の測定 一夜培養した *C. albicans* 細胞を 0.4 mM- KH_2PO_4 で 3 回洗浄した後、同溶液に浮遊し、内部呼吸を減少させるために 30°C で 4 時間振盪した。遠心により細胞を集め、約 1 mg 乾燥菌量/ml の濃度に

なるように 0.4 mM- KH_2PO_4 に再浮遊し、Clark 型酸素電極（柳本製作所）を用いて 30°C で酸素消費速度を測定した。外部基質として 10 mM グルコースを使用した。

試薬 $[3,4,5-^3H]$ ロイシン (120 Ci/m mol), $[8-^3H]$ アデニン (25 Ci/m mol), 2,2,6,6-テトラメチル- $[1-^3H]$ グルコース (17.5 Ci/m mol), $[U-^{14}C]$ グルコース (210 mCi/m mol) は Radiochemical Centre (英国) の製品を用いた。

II. 成績

C. albicans に対する抗菌作用の様式

後述の生化学的実験は $2 \sim 3 \times 10^7$ 細胞 (約 1 mg 乾燥菌量)/ml の濃度の *C. albicans* 細胞浮遊液を用いて行なわれているので、この条件下で isoconazole が細胞の発育または生存にどの程度の影響を示すかを先ず検討することにした。発育を良好に支持する PYG 培地に細胞を浮遊し、種々の濃度の薬剤を添加して 30°C, 24 時間培養を行なった後に生菌数を測定した。Fig. 1 に示されるように、isoconazole 20 μ g/ml 以内で完全に発育（生菌数増加）が阻止され、40 μ g/ml 以上では濃度に依存して生菌数の減少が認められた。しかしその程度はさほど顕著ではなく、80 μ g/ml の濃度でも 0 時間の 5% 以上の生存率は維持された。

生体高分子物質の合成に及ぼす影響

$[^3H]$ ロイシンのタンパク質への取り込みおよび $[^3H]$ アデニンの RNA と DNA への取り込みを指標として、これらの高分子物質の合成に及ぼす isoconazole の影響

Fig. 1 Viable counts of *C. albicans* cultures exposed to varying concentrations of isoconazole for 24 hours

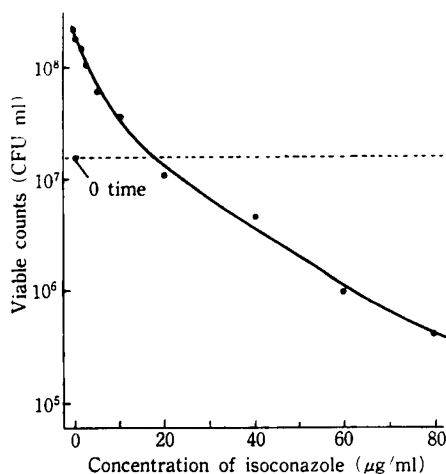


Fig. 2 Effect of isoconazole on syntheses of protein, RNA and DNA as measured by incorporation of [^3H] leucine (for protein) and [^3H] adenine (for RNA and DNA) in *C. albicans* cells

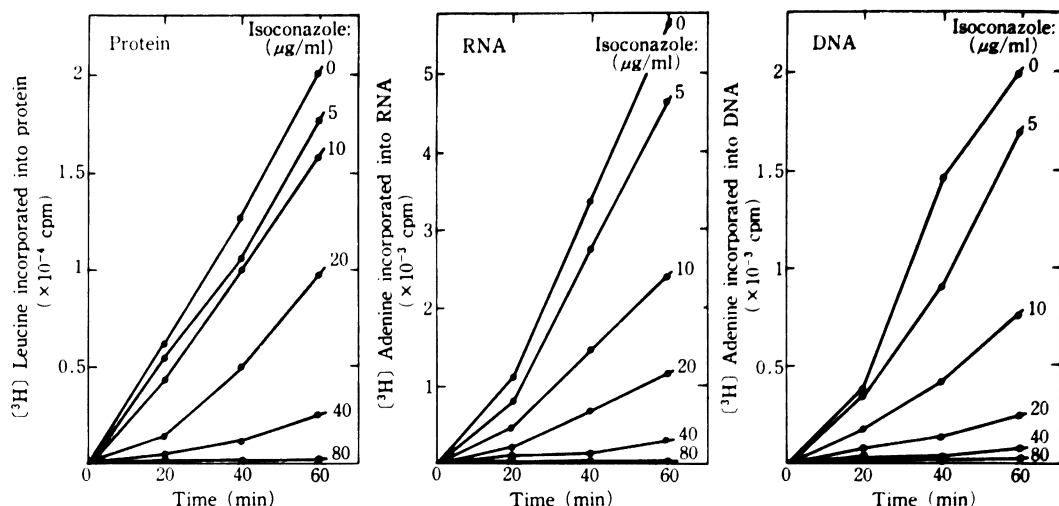
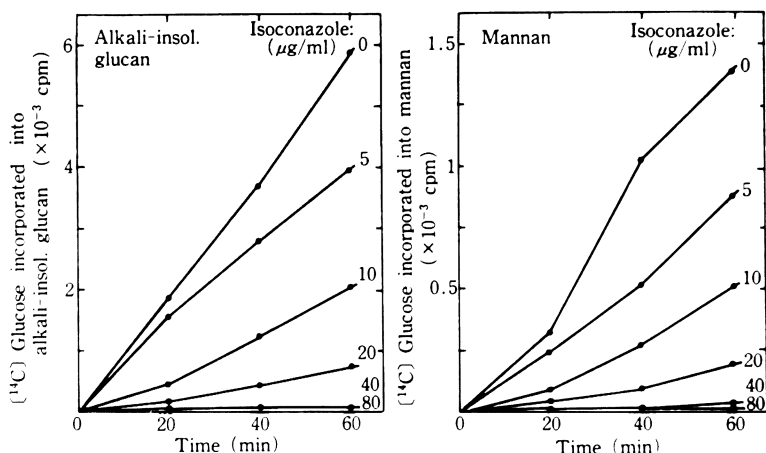


Fig. 3 Effect of isoconazole on syntheses of alkali-insoluble glucan and mannan as measured by incorporation of [^{14}C] glucose in *C. albicans* cells



を検討した。Fig. 2 に図示されるように、いずれの合成もある濃度以上の薬剤では添加直後から明瞭な阻害効果が認められ、タンパク質合成は 20 µg/ml の薬剤濃度で約 50%，40 µg/ml で 85%，80 µg/ml ではほぼ 100% の阻害率であった。RNA 合成および DNA 合成に対する isoconazole の阻害率はさらに高く、10 µg/ml および 20 µg/ml でそれぞれ 50% 以上、80% 以上の値に達した。

細胞壁多糖の合成に及ぼす影響

C. albicans その他の酵母の細胞壁の特徴的かつ主要構成成分であるグルカン（特にアルカリ不溶性グルカン）とマンナンの合成に及ぼす isoconazole の影響をそ

れぞれの多糖画分に対する [^{14}C] グルコースの放射能の取り込みを指標として検討した。Fig. 3 に示される実験結果から明らかなように、両多糖画分への取り込みは、前述の RNA または DNA への [^3H] アデニンの取り込みと同程度かそれ以上強く阻害され、20 µg/ml の薬剤濃度で 90%， ≥ 40 µg/ml の濃度ではほぼ 100% 阻害された。

2-デオキングルコースの influx に及ぼす影響

以上の成績から、isoconazole は *C. albicans* 細胞の主要高分子物質のすべての合成を非選択的に阻害する傾向が認められる。これは isoconazole がそれぞれの合成機構自体に対して直接的に作用するというよりも、これ

Fig. 4 Effect of isoconazole on influx of [3 H] 2-deoxyglucose into *C. albicans* cells

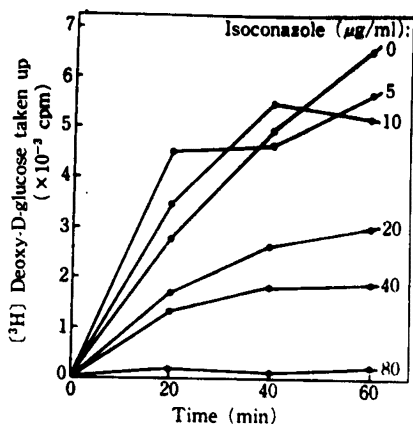
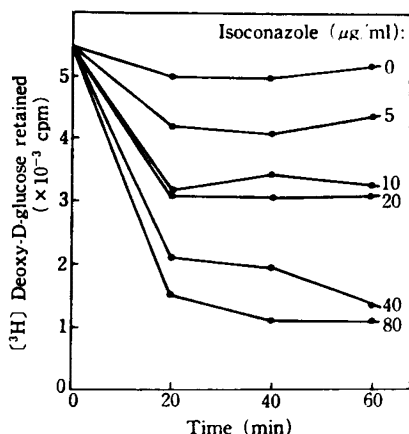


Fig. 5 Effect of isoconazole on efflux of [3 H] 2-deoxyglucose from preloaded *C. albicans* cells

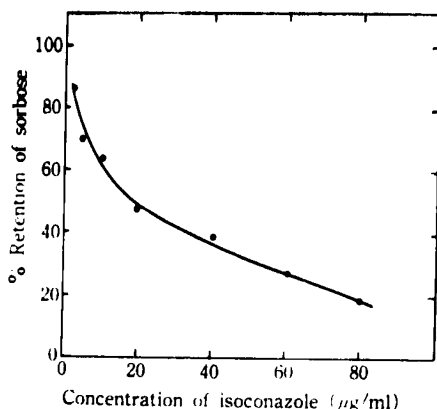


らの異なる合成系が特異的に利用する様々な基質の細胞外から内部への輸送過程を阻害する可能性が想定される。この可能性を確かめるために、酵母細胞においてエネルギー依存性で比較的大量に細胞内に輸送され、しかも細胞内で代謝を受けない基質として [3 H] 標識の 2-デオキシグルコースを選び、外液に加えたこの放射性基質の influx に対する isoconazole の影響を検討した。Fig. 4 に示されるように、isoconazole を 0 時間に添加した場合、20, 40 および 80 μ g/ml の濃度でこの基質の influx をそれぞれ 50, 70, >95% 阻害した。

2-デオキシグルコースの efflux に及ぼす影響

Isoconazole は 2-デオキシグルコースの influx のみならず、efflux に対しても強い促進作用を有することが Fig. 5 から示される。あらかじめ細胞内に取り込まれた

Fig. 6 Effect of isoconazole on intracellular retention of sorbose in *C. albicans* cells



この放射性基質は、無処理正常細胞ではほぼ安定したレベルで保持されているが、isoconazole を添加すると急速に細胞外へ放出される。その程度は薬剤濃度に依存し、10~20 μ g/ml では初め細胞内に保持されていた量の約 40% が、40 μ g/ml では 80% 以上が放出される。

ソルボースの細胞内保留に対する影響

レ-ソルボースは促進拡散によって酵母細胞膜を通過して細胞内へ輸送される単糖類である²⁰⁾。酵母細胞をソルボース溶液中に浮遊すると、ソルボースは速やかに細胞内へ取り込まれ、遂には細胞内濃度は外液の濃度と平衡に達する。この細胞を氷冷生理食塩水でくり返し洗浄しても、細胞内のソルボースはほとんど遊出することはない。しかし、nystatin や filipin のような細胞膜の透過性障壁機能を障害する薬剤を加えてやると、この保留能が失われ、生理食塩水によって洗浄を行なう間に細胞内のソルボースは次第に失われていくことが知られている¹⁸⁾。そこで isoconazole の細胞膜に対する障害作用を調べる目的で、*C. albicans* 細胞のソルボース保留能にいかなる影響を及ぼすかを検討した。Fig. 6 に示されるように、isoconazole は細胞内ソルボースの遊出を強く促進し、遊出率は薬剤濃度 20 μ g/ml で約 50%、80 μ g/ml で約 80% に達した。

C. albicans 細胞内成分の遊出促進

C. albicans 細胞浮遊液に 40 μ g/ml の isoconazole を添加すると、その直後から細胞内の K^+ 、260 nm-吸収物質およびタンパク質の遊出が認められた (Fig. 7)。これらの細胞成分のなかで遊出速度ならびに遊出率が最大値を示すのは K^+ であり、次が 260 nm-吸収物質で、タンパク質の遊出は最も軽度であった。いずれの遊出も添加される薬剤の濃度に強く依存し、60 分間処理後の K^+ 、

Fig. 7 Time-course of release of K^+ (●), 260 nm-absorbing materials (○) and proteins (▲) from *C. albicans* cells after exposure to 40 μ g/ml of isoconazole

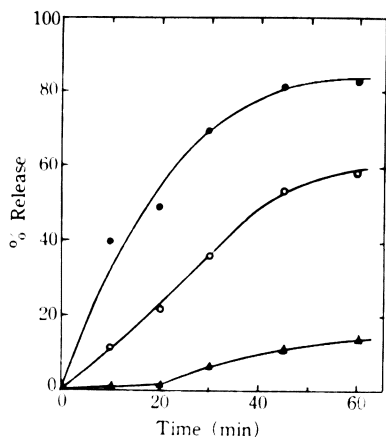
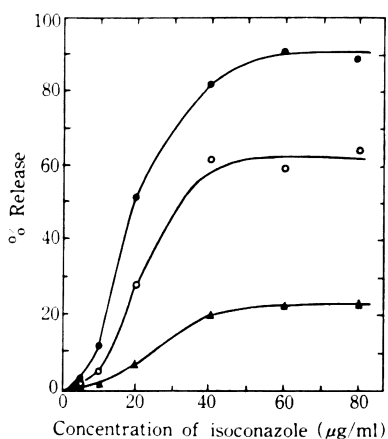


Fig. 8 Effect of isoconazole on release of K^+ (●), 260 nm-absorbing materials (○) and proteins (▲) from *C. albicans* cells after exposure for 60 minutes

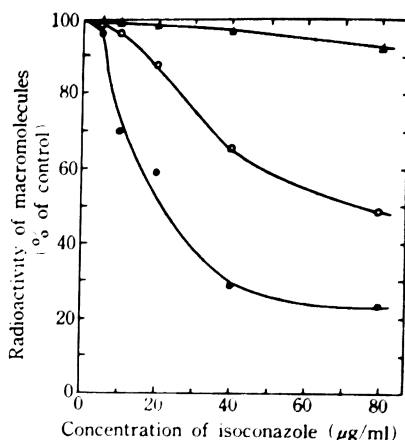


260 nm-吸収物質およびタンパク質の遊出率を比較すると、20 μ g/ml ではそれぞれ約 50, 30, 10%, 40 μ g/ml ではそれぞれ約 90, 60, 20% であった (Fig. 8)。

細胞内高分子物質の分解に及ぼす影響

上述の実験成績にみられるような isoconazole による細胞成分の顕著な遊出に細胞内高分子物質の分解が関与しているか否かを検討するために、あらかじめ [3 H] ロイシンまたは [3 H] アデニンで *C. albicans* 細胞を標識しておき、これに種々の濃度の isoconazole を加えて

Fig. 9 Effect of isoconazole on degradation of cellular macromolecules, viz. RNA (●), DNA (○) and proteins (▲), in *C. albicans* cells after exposure for 60 minutes.



90 分間処理した後、細胞を分画してタンパク質、RNA および DNA の各画分から回収される放射能の値を処理前の細胞の対応する値と比較した。Fig. 9 に示される成績から明かなように、薬剤処理後の放射能の低下は RNA 画分 ($[^3\text{H}]$ アデニン標識) で最も著しく、DNA 画分 ($[^3\text{H}]$ アデニン標識) がこれに次ぎ、タンパク質画分 ($[^3\text{H}]$ ロイシン標識) が最も軽度であった。タンパク質の分解率はこの実験で使用した最高薬剤濃度 80 μ g/ml でも 10% を超えなかったのに対し、RNA の分解率は薬剤 20 および 40 μ g/ml でそれぞれ 40%, 70% に達した。

呼吸に対する影響

内部呼吸能を部分的に低下させた *C. albicans* 細胞の内部呼吸およびグルコースを基質とする外部呼吸のそれぞれに対する isoconazole の影響を検討した。代表的な実験成績を Table 1 にまとめる。ここに示されるように、内部呼吸およびグルコースの呼吸の両者とも 80 μ g/ml までのいかなる薬剤濃度でも僅かな影響を受けるに過ぎなかった。特に内部呼吸は感受性が低く、80 μ g/ml の薬剤濃度での阻害は 10% 程度にとどまった。一方、グルコースを基質とする外部呼吸はこれよりも高い感受性を示したが、それでも阻害度は 50% を超すことはなかった。

エネルギー代謝をこににする *C. albicans* 細胞の発育に及ぼす影響

C. albicans は他の多くの酵母と同様、通性嫌気性菌であり、したがってグルコースなどの発酵性基質をエネ

Table 1 Effect of isoconazole on respiration of *C. albicans* cells

Isoconazole concentration (μg/ml)	Respiratory activity	
	without glucose (endogenous)	with glucose
0 (control)	47.5*(100)**	102.2*(100)**
5	48.5 (102)	97.1 (95)
10	49.9 (105)	94.0 (92)
20	45.6 (96)	65.4 (64)
40	42.8 (90)	62.3 (61)
80	42.3 (89)	55.2 (54)

* Q_{O2} (μl O₂/hr/mg protein)
** Percent of control

ルギー源とする場合には呼吸による好氣的エネルギー代謝と発酵による嫌氣的エネルギー代謝のいずれをも営むことができるが、一方、グリセリンなどの非発酵性基質の場合には完全に呼吸によってのみエネルギーが産生される。これに対して、非発酵性基質を利用できない変異菌、すなわち呼吸欠損菌では、発酵性基質の嫌氣的代謝によってのみエネルギーを獲得する。したがって、もし isoconazole が *C. albicans* 細胞の呼吸に対して阻害的效果を示し、しかもそれがこの薬剤の抗菌活性の基盤となる主要な作用機序であるならば、好氣的エネルギー代謝への依存度に応じて細胞の薬剤感受性が異なるはずである。

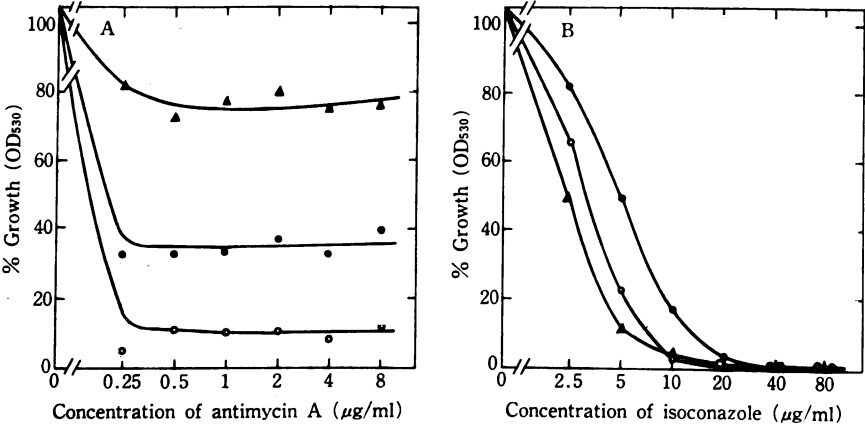
そこでエネルギー代謝をことにする 3 種の培養、すなわち (i) *C. albicans* (野生型株) に唯一の炭素源としてグルコースを加えた培地に発育させる培養、(ii) 同

株のグリセリン培地培養、(iii) *C. albicans* の呼吸欠損変異株のグルコース培地培養、の間で isoconazole の発育阻止作用の強さを比較し⁷⁾。Fig. 10A に示されるように、特異的呼吸阻害剤として知られる antimycin A に対する感受性は(ii)>(i)>(iii)の順で低くなり、好氣的エネルギー代謝活性が高い培養ほど antimycin A 感受性も高いという期待通りの結果が得られた。一方、isoconazole に対する感受性については三者間で有意な差異は認められなかった (Fig. 10B)。

III. 考 察

一般にイミダゾール系抗真菌剤の抗菌活性は接種菌量または試験菌濃度によって著しく大きな影響を受ける¹¹⁾。これはおそらくイミダゾール剤のレセプターと想定されているリン脂質分子が細胞膜その他の膜系に豊富に存在するために、薬剤と細胞とが接触する際に細胞数に対応して培地から大量の薬剤が細胞内へ移行すること起因すると考えられる。事実、isoconazole に関しても諸種の真菌に対する最小発育阻止濃度または最小殺菌濃度が接種菌濃度の増加に伴って著しく上昇することが報告されている¹²⁾。今回行なった *C. albicans* の種々の代謝機能に及ぼす isoconazole の影響を検討する実験では、2~3×10⁷ 細胞/ml という比較的高い濃度の菌液が使用されている。したがって細胞代謝機能に対する薬剤の阻害的效果と抗菌活性とを対応させるために、本研究においては生化学的実験に先立って、これらの実験系で使用する細胞浮遊液と同じ濃度になるように菌接種を行なった培養について isoconazole の抗菌活性を測定した。その結果、本剤は約 20 μg/ml で菌の増殖を完全に

Fig. 10 Effect of antimycin A (A) and isoconazole (B) on growth of wild-type and mutant strains of *C. albicans* in media containing glucose or glycerol as sole carbon source.
Cultures were: ●, *C. albicans* MTU 12021 (wild-type) grown on glucose; ○, *C. albicans* MTU 12021 grown on glycerol; and ▲, *C. albicans* MTU 12013 RD 4 (respiratory-deficient mutant) grown on glucose.



阻止した。また、40 $\mu\text{g/ml}$ またはそれ以上の濃度では殺菌的效果を示したが、その効果はさほど顕著なものではなかった。

このような抗菌活性が示される条件下で、調べたすべての細胞内高分子物質、すなわちタンパク質、RNA、DNA および細胞壁主要多糖であるグルカン、マンナン各合成は静菌的濃度またはそれ以上の薬剤濃度の isoconazole を添加した直後から著しい阻害を受け、しかもそれぞれの阻害度はタンパク質合成が幾分低いことを除けば、いずれもほぼ同程度である。これらの阻害度と抗菌効果との対応関係からみて、すべての高分子物質の合成阻害が isoconazole の抗菌作用に寄与していることは疑いない。しかし異なる高分子物質合成系の間で isoconazole 感受性に明白な選択性がみられないことは、いずれの場合も本剤が合成系自体に対して直接的に作用するのではなく、合成過程の予備段階として共通に要求される生化学的過程として、各合成系に必要な基質の細胞内輸送機構に対して一次的に作用する可能性がより強く示唆される。この想定は、培地中に加えた非代謝性糖 2-デオキシグルコースの細胞内輸送（能動輸送）が isoconazole の存在下で高度に阻害されるという実験成績から支持される。おそらく *C. albicans* が利用可能な天然基質の細胞内移入も同様に阻害される結果、二次的に高分子物質の合成阻害がひき起こされると推察される。

正常な *C. albicans* 細胞においては、細胞内へ取り込まれた 2-デオキシグルコースは、何ら代謝されることなく、安定に保持されることはすでに報告したところである¹⁴⁾。このような細胞に静菌的または殺菌的濃度の isoconazole を添加すると、細胞内の 2-デオキシグルコースは速やかに培地中に遊出される。促進拡散の機構によって酵母細胞内へ取り込まれる非代謝性糖ソルボースの保持能が isoconazole によって失われるのも同様の薬剤効果に由来すると解釈される。さらに、isoconazole はこれらの人工的に取り込ませた指標化合物のみならず、 K^+ 、260 nm-吸収物質（核酸、スクレオチド、スクレオンドなど）、タンパク質などの本来の *C. albicans* 細胞内主要成分の遊出をも明らかに促進する。

以上のすべての成績から、isoconazole は感受性真菌細胞において外部基質の細胞内輸送および細胞内成分の保持という細胞膜の2つの主要な機能の双方とも顕著に障害することが示される。いずれの障害も静菌的濃度の薬剤で明瞭に観察され、殺菌的薬剤濃度では特に高度であることから、細胞膜機能に対する障害が本剤の抗真菌作用の一次的メカニズムとして働いている可能性が強く示唆される。

真菌細胞や動物細胞に対する細胞膜障害作用の程度とその結果として遊出される細胞内成分の種類や量との間に一定の相関関係が成立することは、すでにポリエン系抗生物質についての詳細な研究から指摘されているところである。それによると、膜障害が軽度の場合には K^+ をはじめとする低分子物質やイオンのみが遊出され、しかもこの透過性の変化は可逆的である。しかし、膜障害の程度が重くなるにつれて、より大きな分子量の細胞成分の遊出が起こり、さらに膜障害が不可逆的なレベルまで進むと、タンパク質などの高分子物質が顕著になり、細胞の死滅にいたるという経過をたどることが報告されている²⁰⁻²³⁾。*C. albicans* 細胞に isoconazole を作用させた場合にも同様に K^+ >260 nm-吸収物質>タンパク質の順で強い細胞外遊出が認められ、ことに前二者の遊出率は殺菌的薬剤濃度 ($\geq 40 \mu\text{g/ml}$) 下でもとの細胞内含量のそれぞれ 80, 60% に達するところから、この遊出促進効果は本剤の抗菌作用、特に殺菌作用を充分説明しうるものと考えられる。一方、殺菌的薬剤濃度で処理された細胞では、RNA、DNA を主体として高分子物質の分解が促進される。これは K^+ の遊出に伴って細胞内部環境が酸性側に傾き、RNAse、DNAse などの高分子物質水解酵素が活性化され、その結果自己分解反応が進行するためであろう。前述の高分子物質合成に対する isoconazole の阻害的效果は、単に外部基質の細胞内移入の阻害によるばかりでなく、移入された基質が合成反応に利用される前に再び細胞外へ遊出されることに加えて、高分子物質自体の分解が促進されることによって、見掛け上さらに高められると考えられる。また、薬剤による細胞内成分の遊出や分解がたとえ殺菌的效果を発現するまでにいたらないとしても、高分子物質合成阻害はその程度に応じて細胞の発育阻害をもたらす結果になることは当然である。

Isoconazole の呼吸阻害作用は、膜障害作用やその結果として二次的に誘起されると考えられる高分子合成阻害作用に比べて、著しく軽度である。しかも *C. albicans* 細胞の内部呼吸に対する阻害度よりも、グルコースを基質とする外部呼吸の阻害度が高いという成績は、本剤のミトコンドリアに対する直接的障害作用というよりも細胞膜障害による外部基質の細胞内輸送の阻害に基づく二次的效果の発現をより強く示唆する。すでに SWAMY et al.²⁴⁾ は *C. albicans* 細胞に対する miconazole の作用の研究から同様の推論を導いている。加えて、呼吸によってのみエネルギー産生を行なう *C. albicans* 野生型菌のグリセリン培養に比べて、発酵によってのみエネルギーを獲得する *C. albicans* 呼吸欠損菌のグルコース培養が同等またはより高い isoconazole 感受性を示す成績

は、本剤抗菌活性機序に好氣的呼吸代謝が少なくとも一次的には関与しないことを強く示唆する。

Isoconazole を含めて一般にイミダゾール剤は、真菌のエルゴステロール合成経路のなかで脱メチル化反応の段階を阻止し、真菌細胞の主要ステロールであるエルゴステロールの合成を特異的に阻害することが報告されている^{25,26)}。この阻害効果が本剤の抗真菌活性にどのようににかかわっているかは不明であるが、エルゴステロールが真菌細胞膜に不可欠な構成成分であり、膜流動性の制御に主要な役割を演じていることを考慮するならば、エルゴステロール合成阻害が二次的に細胞膜障害をひき起こす可能性は否定できない。しかしながら、細胞膜障害が本剤添加直後から現われ、しかも迅速に進行するという本報の実験成績をみる限り、isoconazole の膜障害作用はエルゴステロール合成阻害作用を介するというよりは細胞膜上の標的分子（おそらくリン脂質）に対する直接的な物理化学的作用に基づくと考えるのが妥当であろう。

以上のすべての点を総合して、isoconazole の抗真菌作用は次のような一連の生化学的過程に基づいて発現されるものと推論される。すなわち、本剤は真菌細胞膜に直接作用してその基質輸送機能ならびに細胞内成分保持機能を障害し、細胞内高分子物質の分解が加わってすべての高分子物質の強い合成阻害をひき起こされる結果、細胞は発育停止または死滅にいたる。

このような isoconazole の作用メカニズムは、clotrimazole, miconazole および econazole などの他のイミダゾール剤について想定されている作用メカニズムと基本的に同一であり⁷⁻¹¹⁾、特にわれわれが econazole について報告した成績^{14,27)}とは共通する面が多い。これらのすべてのイミダゾール剤の生物学的活性の間には、たとえ定量的な相違はあるとしても、定性的な相違はないと考えてよからう。最近われわれは isoconazole その他のイミダゾール剤による膜障害作用の分子的基盤を明らかにする目的で人工膜モデルとして種々の脂質組成をもつリポソームならびに真菌細胞から単離した生体膜標品を材料として用い、膜の物性が薬剤によっていかなる影響を受けるかを検討した。その結果、予備的な成績ながら、isoconazole は miconazole や econazole と同様、膜リン脂質の相転移温度を著しく低下させるとともに、転移エントロピーも減少させることが示された²⁸⁾。このことから isoconazole の膜障害作用は膜の流動性が著しく高められることに起因すると推論される。

文 献

- 1) GODEFROI, E. F.; J. HEERES, J. VAN CUTSEM & P. A. J. JANSSEN: The preparation and antimycotic properties of derivatives of 1-phenethylimidazole. *J. Med. Pharmacol. Chem.* 12: 784~791, 1969
- 2) KESSLER, H.-J.: Mikrobiologische Untersuchungen mit Isoconazolnitrat, einem Breitspektrum-Antimykotikum und der Gruppe der Imidazol-Derivative. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, 29-II: 1344~1351, 1979
- 3) 岩田和夫, 内田勝久: Isoconazole の抗真菌作用に関する研究 (第1報) —試験管内抗菌活性—。 *Chemotherapy* 29: 1149~1153, 1981
- 4) 岩田和夫, 内田勝久: Isoconazole の抗真菌作用に関する研究 (第2報) 試験管内抗菌活性におよぼす諸因子の影響。 *Chemotherapy* 30: 409~413, 1982
- 5) KESSLER, H.-J. & C. SCHOBEL: Tierexperimentelle Prüfung des neuen Breitspektrum-Antimykotikums Isoconazolnitrat. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, 29-II: 1352~1357, 1979
- 6) 岩田和夫, 内田勝久: Isoconazole の抗真菌作用に関する研究 (第3報) 実験的真菌感染に対する治療効果。 *Chemotherapy* 30: 1216~1221, 1982
- 7) WENDT, H. & H.-J. KESSLER: Antimikrobielle Wirksamkeit des Breitspektrum-Antimykotikums Isoconazolnitrat im Humanversuch. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, 29-I: 846~848, 1979
- 8) 渡辺昌平, 野村 宏, 宗 義朗, 土井 顕, 朝田康夫, 浦上紘三, 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
- 9) 山口英世: 抗真菌剤の作用機序。 *真菌誌* 18: 342~358, 1977
- 10) 山口英世: 最近開発された抗真菌剤と作用機点, 抗生物質の研究—あすの化学療法をめざして— (梅沢浜夫, 田中信男編)。p. 123~138, 学会出版センター, 東京, 1980
- 11) BEGGS, W. H.; F. A. ANDREWS & G. A. SAROSI: Action of imidazole-containing antifungal drugs. *Life Science* 28: 111~118, 1980
- 12) 山口英世: Clotrimazole—抗真菌作用とそのメカニズム。 *バイエル薬品*, 大阪, 1982
- 13) 山口英世: イミダゾール系抗真菌剤 Econazole の作用機序。 *真菌誌* 22: 279~294, 1981
- 14) 山口英世, 岩田和夫: Econazole の作用機作に関する研究 第1報 *Candida albicans* の諸細胞機能に及ぼす影響。 *真菌誌* 20: 31~39, 1979
- 15) 山口英世, 平谷民雄, 大隅正子, 岩田和夫: *Candida albicans* の変異について。 *真菌誌* (印刷中)
- 16) CHUNG, C. W. & W. J. NICKERSON: Polysaccharide synthesis in growing yeasts. *J.*

- Biol. Chem. 208 : 395~406, 1954
- 17) LOWRY, O. H.; N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265~275, 1951
- 18) CIRILLO, V. P.; M. HARSH & J. O. LAMPEN: Action of the polyene antibiotics filipin, nystatin, and *n*-acetylcandidicin on the yeast cell membrane. J. Gen. Microbiol. 35 : 249~259, 1964
- 19) DISCHE, Z. & A. DOVI: A new colorimetric method for the determination of ketohexoses in the presence of aldoses, ketoheptoses and ketopentoses. Biochim. Biophys. Acta. 39 : 140~144, 1960
- 20) LAMPEN, J. O.: Interference by polyene antifungal antibiotics (especially nystatin and filipin) with special membrane functions. Symposium of the Society for General Microbiology, 16 : 111~130, 1966
- 21) BOROWSKI, E. & B. CYBULSKA: Potassiumless death of *Saccharomyces cerevisiae* cells treated with N-succinyl perimycin and the reversal of fungicidal action by potassium ions. Nature (Lond.), 213 : 1034~1035, 1967
- 22) ROSSOMANDO, E. G.; G. CREME, B. MALDONADO, M. A. HESLA & E. E. BOLUB: Effect of amphotericin B on growth and membrane permeability in *Distoystelium discoidium*. Antimicrob. Agents Chemother. 9 : 618~624, 1976
- 23) KOTLER-BRAITBURG, J.; G. MEDOFF, D. SCHLESINGER & G. S. KOBAYASHI: Amphotericin B and filipin effects on L and Hela cells: dose-response. Antimicrob. Agents Chemother. 11 : 803~808, 1977
- 24) SWAMY, K. H. S.; M. SIRSI & G. R. RAO: Studies on the mechanism of action of miconazole: effect of miconazole on respiration and cell permeability of *Candida albicans*. Antimicrob. Agents Chemother. 5 : 420~425, 1974
- 25) VAN den BOSSCHE, H.; G. WILLEMSSENS, W. COOLS, W. F. J. LAUWERS & L. LE JEUNE: Biochemical effects of miconazole on fungi. II. Inhibition of ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. Chem. Biol. Interactions 21 : 59~78, 1978
- 26) MARRIOTT, M. S.: Inhibition of sterol biosynthesis in *Candida albicans* by imidazole-containing antifungals. J. Gen. Microbiol. 117 : 253~255, 1980
- 27) 山口英世, 岩田和夫: Econazole の作用機作に関する研究 第2報 生体膜におよぼす影響。真菌誌 20 : 201~208, 1979
- 28) YAMAGUCHI, H.; Y. YAMAMOTO & T. FUJITA: Molecular basis of the membrane-active property of imidazole antimycotics. In Proceedings of the 8th Congr. ISHAM Perma-ston North 1982 (in press)

STUDIES ON THE MECHANISM OF ANTIFUNGAL ACTION OF ISOCONAZOLE ON *CANDIDA ALBICANS*

HIDEYO YAMAGUCHI, TAMIO HIRATANI and NOBUO SUEGARA

Department of Botany and Microbiology, Teikyo University School of Medicine

KAZUO IWATA

Department of Microbiology, Meiji College of Pharmacy

A new imidazole-containing antimycotic isoconazole showed following biological activities toward *C. albicans* cells when it was applied at a fungistatic level (20 $\mu\text{g/ml}$) or fungicidal levels (≥ 40 $\mu\text{g/ml}$): (1) inhibition of syntheses of proteins, RNA, DNA, mannans and alkali-insoluble glucans as measured by incorporation of appropriate radiolabeled substrates; (2) suppression of influx and stimulation of efflux of 2-deoxyglucose; (3) inhibition of intracellular retention of sorbose; (4) release of intracellular K^+ , 260 nm-absorbing materials and proteins; and (5) degradation of cellular macromolecules such as RNA, DNA and proteins. On the other hand, the respiratory activity of *C. albicans* cells was affected by the drug to much lesser extents, although the respiration with exogenous glucose was more profoundly impaired than the endogenous respiration. The results of experiments which were conducted to seek any relationship between the respiratory activity and isoconazole-sensitivity of *C. albicans* cells revealed that they were apparently irrelevant.

On the basis of all these data, it is reasonably suggested that isoconazole may primarily interact with fungal cell membranes, causing inhibition of transmembrane transport of exogenous substrates and damage of permeability barrier, with resultant inhibition of syntheses of macromolecules and degradation of macromolecules, as well as suppression of respiration with exogenous substrates. This may be considered as the biochemical basis of the antifungal action of isoconazole.