

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及ぼす諸因子の影響

岩田 和夫・内田 勝久

明治薬科大学微生物学教室

(昭和 56 年 8 月 27 日受付)

Isoconazole の試験管内抗菌活性に及ぼす諸因子の影響を検討した。*Candida albicans* に対する本薬剤の最小発育阻止ならびに殺菌濃度は接種菌量ならびに培養時間に影響を受けるところが少なく、両濃度ともに培地 pH が酸性側よりもアルカリ側において小さく、血液成分添加の影響も比較的少なく、また *C. albicans* ならびに *Trichophyton mentagrophytes* の発育期ならびに休止期の細胞に対し、比較的低濃度において、特に発育期細胞に対しより強く殺菌的に作用することを認めた。

著者らは、前報¹⁾においてイミダゾール系抗真菌剤 Isoconazole (以下 IS と略) が *in vitro* において病原真菌に対し広域スペクトルの強力な抗菌活性を示すのみならず、一部細菌 (*Nocardia* 属諸菌種) にも強い発育阻止作用を発揮することを報告した。

本報においては、IS の試験管内抗真菌活性に及ぼす諸因子のうち、接種菌量、培養時間、培地 pH、血液成分添加の影響、さらに発育期の真菌細胞と休止期のそれとに対する IS の殺菌効果について検討した。

I. 材料と方法

薬剤: IS は日本シエリング(株)より分与された硝酸塩 (Isoconazole nitrate) の精製原末標品 (SHK 265 CB) を用いた。実験には 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°C に保存した。

菌株: *Candida albicans* MTU 12003 および *Trichophyton mentagrophytes* MTU 19031 の 2 株。

接種菌量の最小発育阻止濃度 (MIC) に及ぼす影響の実験: *C. albicans* MTU 12003 株を Sabouraud dextrose broth (SDB) (ブドウ糖 2%), pH 6.5 にて L 型試験管で 37°C 、18 時間培養後、SDB で適宜希釈し、血球計算盤により菌数を測定し、培地 1 ml 当り 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 個の菌浮遊液を調製した。液体培地希釈法による IS の MIC 値測定には、IS の SDB による $100\sim 0.18 \mu\text{g/ml}$ の 2 倍階段希釈系列各 1.8 ml に上記菌浮遊液 0.2 ml ずつを接種し、 37°C に 8 日間静置培養し、2 日、4 日および 8 日後の MIC 値を記録した。また Sabouraud dextrose agar (SDA) (ブドウ糖 2%), pH 6.5 を用いた寒天平板希釈法による IS の同一菌株に対する MIC 値の測定には、IS 2 倍階段希釈の平

板培地系列に上記菌浮遊液系列より 1 白金耳量 (約 10 μl) ずつを画線塗抹し、 37°C 、8 日間培養して、上記と同様、2 日、4 日、8 日後の MIC 値を測定した。

なお、2 日間培養後に MCC (最小殺菌濃度) を測定したが、SDA の場合には、菌塗抹部位 (肉眼的には菌発育を認めえない) を滅菌綿棒でぬぐい、薬剤を含まない SDA に画線塗抹し、 37°C 、7 日間培養後、菌集落形成の全く認められない最大希釈濃度をもって MCC 値とした。一方、SDB 使用の場合の MCC 値の測定には、同様に 2 日間培養後の菌発育が肉眼的に全く認められない各試験管より 0.1 ml ずつを取り、同じく薬剤非添加 SDA 平板に接種し、コンラージ体で平等に塗布し、以下同様に培養し、観察した。

培地 pH の MIC に及ぼす影響の実験: SDB を 5 N NaOH または 5 N HCl の水溶液により pH 3~9 に調整し、2 倍濃度の SDB に等量の 1/25 M Britton-Robinson 緩衝液 (クエン酸 0.84%, リン酸一カリウム 0.515%, ホウ酸 0.247%, ペロナール 0.737%, 濃塩酸 3.36 ml/l) を加え、10 N NaOH で所定の pH に調整した系 (以下緩衝 SDB) と、緩衝化していない系 (以下非緩衝 SDB) の 2 通りについて pH 値の変動による IS の MIC 値への影響を調べた。この場合の接種菌量は IS 希釈系列各 1.8 ml に $10^5/\text{ml}$ の菌浮遊液 0.2 ml ずつを接種し、上記 MIC 値測定と同一条件により MIC 値を測定した。また上記と同様に MCC 値も測定した。

血液成分添加の MIC に及ぼす影響の実験: 材料としてヒト血液、ヒト血清およびウシ血液を用いた。ヒト血液は日本赤十字社の新鮮血液 100 ml に Alsever 氏液 (クエン酸ナトリウム 0.33g, クエン酸 0.12g, ブドウ糖 0.33g, 蒸留水 15 ml を含む—以下 Alsever-A 液と略) を

加えたもの、ヒト血清は健康人より採取したものをを用いた。ウシ血液は日本バイオテスト研究所の保存血で、これは新鮮ウシ血液 100 ml に Alsever 氏液 (クエン酸ナトリウム 0.80 g, クエン酸 0.055 g, フドウ糖 2.05 g, 塩化ナトリウム 0.12 g, 蒸留水 100 ml を含む) 以下 Alsever-B 液) を加えたものを使用した。MIC 値は寒天希釈法により測定した。SDA へのこれらの成分の添加量は各 10% とした。培養および観察日数については上記と同一の条件で MIC 値を測定した。

発育期と休止期の各真菌細胞に対する殺菌効果の実験: まず *C. albicans* MTU 12003 株を SDA 斜面に 37°C, 48 時間培養して得た酵母状細胞を Bacto yeast nitrogen base broth (Difco) (YNB と略) にフドウ糖 1%, L-アスパラギン 0.15% を加えた培地ならびに YNB に 10⁸ 個/ml ずつを接種して L 型試験管で 37°C, 3 時間振盪培養して得た発育期ならびに休止期の細胞に IS 原液の YNB 希釈液を終末濃度として 100~0.39 μg/ml になるように添加し、同一条件下に培養し、一定期間ごとに生菌数を SDA を用いて 37°C, 7 日間培養後の集落形成の有無から測定した。次に *T. mentagrophytes* MTU 19031 株については、SDA 斜面に 27°C, 2 週間培養し、その分生孢子を上記 2 種の培地に 10⁸ 個/ml ずつ接種して 27°C に振盪培養し、3 時間後 IS の希釈系列を加え、引き続き 27°C で振盪培養し、一定期間ごとに上記と同様生菌数を測定した。

II. 成績

1. IS の抗 *Candida* 作用に及ぼす接種菌量および培養時間の影響

Table 1 に示すように、*C. albicans* MTU 12003 株に対する IS の MIC 値は、当然のことながら SDA, SDB の両培地ともに接種菌量が小であるほど小であった。接種菌量の増加はある程度 MIC 値を上昇させた

が、顕著ではなかった。

培養時間の延長も MIC 値をほとんど上昇させなかった。

固形培地、液体培地ともに MCC 値についても接種菌量増加の影響は顕著でなく、かつ MIC 値に比較的よく接近しており、IS は静菌的のみならず、比較的低濃度で殺菌的に作用することを示唆した。

Table 2 Influence of pH values on *in vitro* anti-*Candida* activity of isoconazole

(a) In bufferized Sabouraud dextrose broth

Initial pH	MIC (MCC) μg/ml		
	2 d	4 d	8 d
3	50 (50)	50	50
4	50 (50)	50	50
5	25 (50)	25	25
6	12.5 (25)	12.5	12.5
7	6.25 (12.5)	6.25	6.25
8	6.25 (12.5)	6.25	6.25
9	6.25 (6.25)	6.25	6.25

(b) In unbufferized Sabouraud dextrose broth

Initial pH	MIC (MCC) μg/ml		
	2 d	4 d	8 d
3	50 (50)	50	50
4	50 (50)	50	50
5	25 (50)	25	25
6	12.5 (25)	12.5	12.5
7	12.5 (12.5)	12.5	12.5
8	6.25 (12.5)	6.25	6.25
9	6.25 (12.5)	6.25	6.25

Strain used: *C. albicans* MTU 12003.

Table 1 Influence of inoculum size on *in vitro* anti-*Candida* activity of isoconazole

Strain	Inoculum size*	Sabouraud dextrose agar			Sabouraud dextrose broth		
		MIC (MCC) μg/ml			MIC (MCC) μg/ml		
		2 d	4 d	8 d	2 d	4 d	8 d
<i>C. albicans</i> MTU 12003	10 ²	N D	N D	N D	0.39 (3.13)	1.56	1.55
	10 ³	1.56 (6.25)	1.56	1.56	0.78 (12.5)	1.56	3.13
	10 ⁴	3.13 (12.5)	3.13	3.13	3.13 (25)	3.13	3.13
	10 ⁵	12.5 (25)	12.5	12.5	6.25 (25)	12.5	25
	10 ⁶	25 (25)	25	25	25 (25)	25	25
	10 ⁷	I D	I D	I D	I D (>100)	I D	I D

I D: Impossible to determine the MIC values due to the initial heavy turbidity.

N D: Not done.

* Indicates final number of organisms per ml of culture medium or per plate.

なお、接種菌量と培養時間の IS の MIC 値ならびに MCC 値に及ぼす影響に関する固形培地と液体培地による差はほとんど全く認められなかった。

2. IS の抗 *Candida* 作用に及ぼす培地 pH の影響
緩衝 SDB と非緩衝 SDB における pH の *C. albicans* MTU 12003 株に対する IS の発育阻止作用に及ぼす影響については、Table 2 に示すとおりで、総体的にいえば、IS はアルカリ側においてより有効に作用し、酸性側においては抗菌活性が若干低下する傾向が認められた。pH 6 以下においては両培地ともに MIC 値、MCC 値ともに差異がなく、pH 7 および 9 において非緩衝 SDB において MIC 値がわずかに上昇を示したのにとどまり、全体的にみれば、両種培地において pH の変動はほとんど影響せず、本薬剤の pH 値の変動に対する安定性を示唆した。

なお、培養時間の延長は本実験においても IS の抗 *Candida* 作用に影響するところはなく、本薬剤の培地中における安定性を示唆した。

3. IS の抗 *Candida* 作用に及ぼす血液ならびに血清添加の影響

血液または血清の無添加対照では、*C. albicans* MTU 12003 株の SDB、pH 6.5、37°C、48 時間静置培養に対する MIC 値と MCC 値は、それぞれ 6.25 $\mu\text{g/ml}$ および 25 $\mu\text{g/ml}$ であったのに対し、ヒト血液、ヒト血清またはウシ血液を同培地に各 10% の割合に加えたときは、いずれも MIC 値と MCC 値はそれぞれ 12.5 $\mu\text{g/ml}$ および 50 $\mu\text{g/ml}$ で、若干の上昇をみた。一方、Alsever-A 液ならびに同 B 液の 10% 添加は、MIC 値、MCC 値をともに 3.13 $\mu\text{g/ml}$ および 12.5 $\mu\text{g/ml}$ と低下させた。両液による抗菌活性の相対的増強は、両液に

含まれているクエン酸ナトリウムおよびクエン酸の軽度の抗菌作用によるものとみなされる。

4. 発育期ならびに休止期の *Candida* 細胞、または *Trichophyton* 細胞に対する IS の殺菌効果の比較

L-アスパラギンとブドウ糖を添加した YNB 培地とそれらを添加しない YNB 培地で *C. albicans* MTU12003 株または *T. mentagrophytes* MTU 19031 株をそれぞれ培養して得た発育期および休止期の細胞に 2 倍階段希釈の IS 溶液を添加して生菌数の消長を経時的に測定した結果は、Fig. 1 および Fig. 2 に示すように、2 菌種に対し IS は休止期の細胞よりも発育期の細胞により強く殺菌効果を発揮した。

C. albicans は休止期の細胞が IS 6.25 $\mu\text{g/ml}$ の存在下ではほとんど全く影響を受けなかったのに対し、発育期の細胞は同濃度において 75 時間後に大多数が死滅し、25 $\mu\text{g/ml}$ ではともに 50 時間後に死滅したが、発育期の細胞はより急速に死滅し、10 時間後に大多数が死滅した。100 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度ではともに急速に死滅し、完全な死滅に休止期細胞が 7 時間を要したのに対し、発育期細胞は 5 時間を要した。

他方、*T. mentagrophytes* は *C. albicans* に比べて発育が遅いために IS の殺菌に要する時間はより長時間を必要としたが、発育期細胞が休止期細胞よりも同様に感受性が強かった。完全殺菌に要した IS 濃度と日数は発育期細胞に対し 25 $\mu\text{g/ml}$ および 50 $\mu\text{g/ml}$ で 1 日、休止期細胞に対し 25 $\mu\text{g/ml}$ で 2 日、50 $\mu\text{g/ml}$ で 2 日であった。

III. 考 察

IS の試験管内抗真菌活性に及ぼす諸因子の影響について KESSLER²⁾は、同じイミダゾール系抗真菌剤である

Fig. 1 Decrease in viability of *T. mentagrophytes* MTU 19031 exposed to isoconazole

Culture medium: (A) Yeast nitrogen base with L-asparagine (0.15%) and glucose (1%), (B) Yeast nitrogen base. Arrows indicate the time of addition of isoconazole.

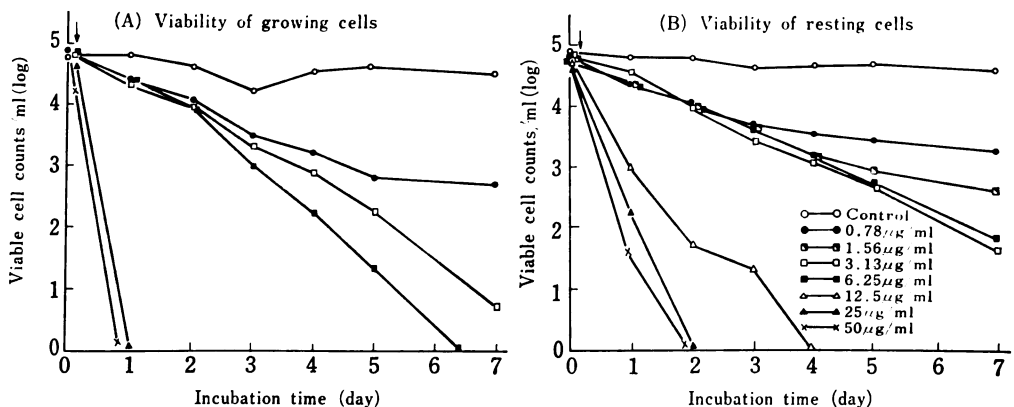
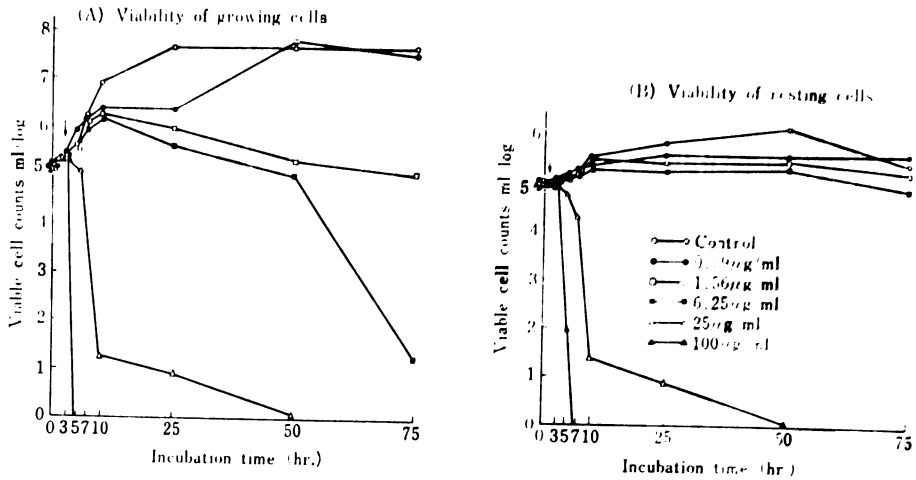


Fig. 2 Growth inhibition and decrease in viability of *Candida albicans* MTU 12003 cells exposed to isoconazole

Culture medium: (A) Yeast nitrogen base with L-asparagine (0.15%) and glucose (1%), (B) Yeast nitrogen base. Arrows indicate the time of addition of isoconazole.



Miconazole (MZ) との比較において検討した。まず、接種菌量については、培地 1ml 当り 10^3 , 10^4 , 10^5 個の *C. albicans* 細胞を SDB に接種し、 10^3 , 10^4 個では両薬剤とも MIC 値は 23°C, 4 日後, 3.1 µg/ml, 37°C, 1 日後で 6.3 µg/ml, 10^5 では 23°C で 6.3 µg/ml, 37°C で 25 µg/ml であったものが 10^5 個では両温度において 50~>200 µg/ml であった。著者らの成績では 10^6 の接種菌量でも 25 µg/ml であったし、また江川・山口・岩田⁸⁾の *T. mentagrophytes* に対する MZ に関する同様の実験においても接種菌量の増大は KESSLER のそのように飛躍的に高い MIC 値の上昇は認められなかった。

培養時間の延長は、著者らの実験では *C. albicans* に対し MIC 値, MCC 値ともに認むべき上昇はなく, IS は培地中で安定に維持されて発育阻止ないし殺菌的に作用することを示唆する成績であった。これは江川らによる上述の論文における MZ の *C. albicans*, *T. mentagrophytes* に対する実験成績とも符合するものであった。

培地 pH の変化については、江川らの MZ の両種の真菌に対する緩衝ならびに非緩衝 SDB における MZ の抗真菌活性について、*C. albicans* の緩衝 SDB では MIC 値, MCC 値ともに pH の変化が影響せず、非緩衝 SDB では、むしろアルカリ側において MIC 値が上昇しており、著者らの実験とある程度異なった成績となっている。これらの差異については、今後の検討に待ちたい。

血液、血清、さらに Alsever 氏液添加の抗菌活性に及

ぼす影響についても江川らの MZ に関する成績と若干の相違はあるが、本質的には同様の傾向にあることを IS についても認めた。

発育期の微生物細胞が休止期のものよりも抗微生物薬に対して一般に感受性が高いことは周知のとおりであるが、今回の著者らの *C. albicans* と *T. mentagrophytes* に対する IS の殺菌活性についても同様に証明された。このことは、本薬剤の臨床的適応に対して意義のある知見と思われる。

〈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御厚意に感謝する。

文 献

- 1) 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
- 2) KESSLER, von H.-J.: Mikrobiologische Untersuchungen mit Isoconazolnitrat, einem Breitspektrum-Antimykotikum aus der Gruppe der Imidazol-Derivate. *Arzneim. Forsch./Drug Res.*, 29: 1344~1351, 1979
- 3) 江川朝生, 山口英世, 岩田和夫: Miconazole の *In vitro* 抗菌活性, 第 2 報: MIC 値ならびに MCC 値におよぼす諸因子の影響. *真菌誌* 19: 303~315, 1978

STUDIES OF THE ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF ISOCONAZOLE

II. INFLUENCES OF VARIOUS FACTORS ON THE ANTIFUNGAL ACTIVITY

KAZUO IWATA and KATSUHISA UCHIDA

Department of Microbiology, Meiji College of Pharmacy

The *in vitro* anti-*Candida albicans* activity of isoconazole was affected to a slight degree by changes of inoculum size, incubation time, and pH values in sabouraud dextrose agar or broth. The growing cells of *C. albicans* or *Trichophyton mentagrophytes* were considerably more susceptible to the killing activity of this imidazole antimycotic than the resting cells.