

Bifonazole の *in vitro* 抗菌活性

内田 勝久・山下 悟・山口 英世

帝京大学医学部医真菌研究センター

(昭和 59 年 4 月 27 日受付)

イミダゾール系抗真菌剤 bifonazole の嫌気性菌ならびに好気性菌に対する抗菌活性を clotrimazole のそれと比較検討し、以下の成績を得た。

(1) 本剤は球菌、桿菌を問わずグラム陽性の嫌気性および非嫌気性菌に対し、clotrimazole と同程度の比較的強い抗菌活性を有する。

(2) 本剤は通性嫌気性または好気性グラム陰性菌には抗菌作用を示さないが、偏性嫌気性菌の *Bacteroides* に対し中等度の抗菌活性を有する。

(3) 本剤の非嫌気性菌に対する抗菌活性は好気的および嫌氣的培養条件の差による影響をほとんど受けない。

著者らは別報において、最近開発されたイミダゾール系化合物である bifonazole は *in vitro* においてほとんどすべての主要病原真菌に対して抗菌作用を示し、特に皮膚糸状菌に対して強力な抗菌活性を有することを報告した¹⁾。また、臨床的にも白癬、皮膚カンジダ症および癬癩に対して優れた成績を示すことが報告されている²⁻⁴⁾。

皮膚、口腔、陰などの表在性真菌感染症には、細菌による混合感染または何らかの病因的関与が推定されているものがある。口角口唇炎はその典型的な例であり、患部からは *Candida albicans* に加えて *Staphylococcus aureus* および β -溶血性レンサ球菌が高率に分離される⁵⁾。また、白癬などの皮膚糸状菌症に続発して *Staphylococcus* または *Streptococcus* などに起因する二次感染症が起こることも知られている⁶⁾。したがって、局所的抗真菌剤の評価にあたっては、抗真菌活性のみならず抗細菌活性についても検討する必要があると考えられる。

今回われわれは、すでに局所的抗真菌剤として実用化されている関連物質 clotrimazole を対照薬剤として用い、bifonazole の各種細菌に対する抗菌活性を *in vitro* で検討した。

I. 実験材料と方法

薬剤：Bifonazole および clotrimazole はバイエル薬品株式会社より分与された原末標品を用いた。使用に先立ち、dimethyl sulfoxide (DMSO) にて 10 mg/ml の溶液を作って原液とし、 -20°C に保存した。

菌株：好気性および通性嫌気性細菌は教室保存の ATCC 標準株 6 菌株と群馬大学医学部薬剤耐性菌実験

施設より分与された標準株 9 菌種 11 菌株を用いた。また、偏性嫌気性細菌としては岐阜大学医学部嫌気性菌実験施設より分与された標準株 6 菌種 7 菌株を用いた。

抗菌活性の測定法：寒天平板希釈法による最小発育阻止濃度（以下 MIC）測定は、日本化学療法学会標準法⁷⁾ および日本化学療法学会嫌気性菌 MIC 測定法委員会法⁸⁾ に準じて行なった。

1. 好気性および通性嫌気性菌の MIC 測定法

増菌用培地としては Mueller-Hinton 液体培地 (Difco) を用い、中試験管にて 37°C 、20 時間静置培養した後、あらかじめ同一条件の菌数を測定しておいた結果に基づき、菌液を 10^6 cells/ml に調整し接種菌液とした。感受性測定には Mueller-Hinton 寒天培地 (Difco) を使用した。薬剤の濃度段階は bifonazole および clotrimazole 原液より 2 倍希釈系列を作り、上記培地に添加して薬剤最終濃度範囲を $100 \sim 0.025 \mu\text{g/ml}$ 、DM-SO 終末濃度を 1% とした。薬剤添加平板は一薬剤濃度について各 2 枚ずつ作製し、各平板に被検菌液を内径 1 mm の標準白金耳にて約 2 cm 画線塗抹した後、一方は好気的培養に、他方はガスバック法 (BBL) による嫌氣的培養に付した。好気的、嫌氣的培養ともに 37°C 、20 時間培養した後、肉眼で明らかに発育が阻止された最低濃度をもって MIC を表わした。

2. 嫌気性菌の MIC 測定法

増菌培地には GAM 半流動高層培地 (日水製薬) を用い、 37°C 、24~48 時間培養し、あらかじめ同一条件で培養した菌液の生菌数を測定しておきそれに基づき、増菌培養液を同増菌培地で 10^8 cells/ml 菌液およびその 100 倍希釈液 (10^6 cells/ml 菌液) を調製した。感受性測定培

地としては GAM 寒天培地 (GAM 半流動高層培地に寒天を増量して最終寒天濃度を 1.5% とした) および Mueller-Hinton 寒天培地 (Difco) を用いた。薬剤添加平板に上記被検菌液を標準白金耳にて約 2 cm 画線塗抹し、直ちにガスバク法 (BBL) により嫌氣的に 37°C, 24 時間培養した後、肉眼で明らかに発育が阻止された最低濃度をもって MIC を表わした。

II. 実験結果

1. 通性嫌気性菌および好気性菌の bifonazole 感受性

Table 1 に非嫌気性の各菌株に対する bifonazole および clotrimazole の MIC 値を示す。好気的および嫌氣的培養条件下での両剤の MIC 値には、いずれの菌株においても 1 希釈段階程度の差しかみられず、酸素分圧による影響はみられなかった。Bifonazole はグラム陽性球菌に対し比較的強い抗菌活性を示し、*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* および *Streptococcus pyogenes* の菌株に対する MIC 値の範囲は 6.25~12.5 µg/ml であった。また、*Micrococcus luteus* はさらに高い感受性を示した。グラム陽性桿菌 *Bacillus subtilis* に対しても球菌と変わらない抗菌活性を有した。なお、いずれの菌株も対照薬の clotrimazole に対して bifonazole と同程度の感受性を示した。

一方、グラム陰性桿菌の試験菌株はすべて bifonazole および clotrimazole 両剤に非感受性であり、100 µg/ml 以上の濃度でも発育を阻止されなかった。

2. 嫌気性菌の bifonazole 感受性

Table 2 に嫌気性菌各菌株に対する bifonazole および clotrimazole の MIC 値を示す。グラム陽性球菌の *Peptococcus asaccharolyticus* および *P. magnus* ならびにグラム陽性桿菌の *Clostridium perfringens* は、bifonazole に対し比較的高い感受性を示し、GAM 寒天培地を用いた場合の MIC 値は 10^6 cells/ml の接種時でそれぞれ 12.5 µg/ml, 6.25 µg/ml および 12.5 µg/ml であった。なお、これら菌株に対する clotrimazole の MIC 値はそれらより 1~2 希釈段階低い値であった。また、 10^6 cells/ml 接種では、*P. asaccharolyticus* および *C. perfringens* に対する bifonazole の MIC 値は 10^6 cells/ml 接種時に比べ著しく上昇したが、clotrimazole の MIC ではそのような傾向はみられなかった。

グラム陰性菌の *Bacteroides* 属菌株に対しては、bifonazole は中等度の抗菌活性を示し、GAM 寒天培地での 10^6 cells/ml 接種時の各菌株に対する MIC 値は 25 µg/ml と一定した値を示した。また、clotrimazole も bifonazole と同程度の抗菌活性を示し、両薬剤とも高接

Table 1 Antibacterial activity of bifonazole and clotrimazole against aerobes and facultative anaerobes as measured under aerobic and anaerobic conditions on Mueller-Hinton medium

Strain tested		MIC (µg/ml)			
		Bifonazole		Clotrimazole	
		Aerob.*	Anaerob.**	Aerob.*	Anaerob.**
<i>Staphylococcus aureus</i>	209P	12.5	3.13	6.25	3.13
<i>S. aureus</i>	Terajima	6.25	6.25	6.25	3.13
<i>S. aureus</i>	MS 253	12.5	6.25	6.25	3.13
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	6.25	6.25	6.25	3.13
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12226	12.5	6.25	6.25	3.13
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Cook	6.25	6.25	6.25	3.13
<i>S. pyogenes</i>	ATCC 19615	6.25	6.25	6.25	3.13
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	0.39	(-)	0.39	(-)
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	3.13	(-)	6.25	(-)
<i>Escherichia coli</i>	NIHJ JC-2	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IFO 3445	>100	(-)	>100	(-)
<i>Proteus vulgaris</i>	OX-19	>100	>100	>100	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PCI 602	>100	NT	>100	NT
<i>Salmonella typhimurium</i>	IID 971	>100	NT	>100	NT
<i>S. typhi</i>	901	>100	NT	>100	NT
<i>Serratia marcescens</i>	IAM 1184	>100	NT	>100	NT
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	>100	NT	>100	NT

(-): Indicates no visible growth on drug-free control plate.

NT: Not tested.

*: Measured under aerobic condition.

**: Measured under anaerobic condition.

Table 2 Antibacterial activity of bifonazole and clotrimazole against anaerobes as measured on GAM agar and Mueller-Hinton medium

Strain tested			MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
			Bifonazole		Clotrimazole	
			GAM	M-H*	GAM	M-H
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25286	10^6	10^8	25	(-)	12.5	(-)
			25	6.25	12.5	3.13
<i>B. vulgatus</i> GAI-0672	10^6	10^8	25	(-)	12.5	(-)
			25	0.78	12.5	1.56
<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI-0560	10^6	10^8	25	(-)	25	(-)
			25	3.13	25	3.13
<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI-0661	10^6	10^8	25	(-)	25	(-)
			25	6.25	25	3.13
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i> GAI-6651	10^6	10^8	12.5	(-)	3.13	(-)
			50	1.56	6.25	1.56
<i>P. magnus</i> ATCC 29328	10^6	10^8	6.25	(-)	3.13	(-)
			12.5	3.13	6.25	1.56
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13123	10^6	10^8	12.5	(-)	3.13	(-)
			100	3.13	12.5	1.56

(-): Indicates no visible growth on drug-free control plate.

*: Mueller-Hinton medium.

種菌量時でも MIC の変動は認められなかった。

上記菌株に対する両薬剤の MIC 値を Mueller-Hinton 培地でも測定したが、GAM 寒天培地を使用した場合に比べかなり低い MIC 値が得られた。

III. 考 察

本実験で得られた bifonazole の抗細菌スペクトルは極めて特徴的であり、好気性、嫌気性の別なくグラム陽性菌に対して比較的強い抗菌力を有するが、グラム陰性菌に対して全く抗菌力を示さない。ただし、嫌気性グラム陰性桿菌の *Bacteroides* は例外的に比較的感受性が高いという点で注目される。Clotrimazole の抗細菌活性についてはすでにいくつかの報告がなされている。WAITZ *et al.*⁹⁾ は、グラム陽性球菌の *S. aureus*, *S. pyogenes* のみならず *Proteus* spp. および *Salmonella* spp. といったグラム陰性桿菌に対しても本剤は $3 \mu\text{g/ml}$ 以下の MIC 値をもつと報告している。一方、HOLT & NEWMAN¹⁰⁾ は、*Staphylococcus* についてはこれと対応する成績を得たものの、clotrimazole が *Streptococcus* やグラム陰性桿菌に対してはまったく活性を示さなかったと述べており、KESSLER¹¹⁾ も同様の成績を発表している。今回われわれが clotrimazole について得た成績は、これらのいずれの報告とも異なり、グラム陽性菌は例外なく感受性であり、グラム陰性菌は *Bacteroides* を除いてすべて非感受性であることを提示した。Bifonazole の抗細菌

スペクトルも clotrimazole のそれと基本的に一致する。同じパターンの抗細菌スペクトルは miconazole¹²⁻¹⁴⁾, econazole^{15,16)}, isoconazole¹¹⁾, butoconazole¹⁷⁾, ketoconazole¹⁸⁾ などについても報告されているので、これはイミダゾール系化合物に共通する生物学的活性と考えられる。

嫌気性菌は咽頭、口腔、腸管、腔などの体腔に多く常在し、これらの部位に感染病巣をつくる場合が多い。Bifonazole は現在、抗真菌剤として局所適用が行なわれているが、皮膚、口腔、腔などの真菌症の治療に際して嫌気性菌やグラム陽性細菌による混合感染あるいは二次感染に対しても治療的または予防的効果を単独使用であげうる可能性を示唆するものである。

Bifonazole ならびに clotrimazole 原末標品を提供して頂いたバイエル薬品株式会社に深謝いたします。

文 献

- 1) YAMAGUCHI, H.; T. HIRATANI & M. PLEMPER: *In vitro* studies of a new imidazole antimycotic, bifonazole, in comparison with clotrimazole and miconazole. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 33(I): 546~551, 1983
- 2) STETTENDORF, S.: Tolerability and efficacy of bifonazole in dermatomycoses. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 33 (I): 750~754, 1983
- 3) WATANABE, S.: Clinical evaluation of bifona-

- sole cream applied once daily in the treatment of dermatomycoses. In Proceedings for International Antifungal Symposium: Bifonazole (URABE, H., ZAIAS, N. and STETTENDORF, S. ed.), Excerpta Medica, pp.141~151, 1982
- 4) URABE, H.; M. ASAHI, M. KURAKUZU, O. MATSUZAKI, T. NAKAMA, N. MAKINO, T. YAHATA, K. FUCHI & M. YASUDA: Clinical results with bifonazole in the treatment of cutaneous candidiasis. In Proceedings for International Antifungal Symposium: Bifonazole (URABE, H., ZAIAS, N. and STETTENDORF, S. ed.), Excerpta Medica, pp.88~93, 1982
 - 5) MACFARLANE, T. W. & S. J. HELENARSKA: The microbiology of angular cheilitis. Brit. Dent. J. 140: 403~406, 1976
 - 6) STOUGHTON, R. B.: Dermatophytosis. Medical Microbiology and Infectious Diseases (BRAUDE, A. I., ed.), W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp.1568~1573, 1981
 - 7) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について. Chemotherapy 29: 76~79, 1981
 - 8) 日本化学療法学会嫌気性菌 MIC 測定法検討委員会: 嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法. Chemotherapy 27: 559~560, 1979
 - 9) WAITZ, J. A.; E. C. MOSS & M. J. WEINSTEIN: Chemotherapeutic evaluation of clotrimazole. Appl. Microbiol. 22: 891~894, 1971
 - 10) HOLT, R. J. & R. L. NEWMAN: Laboratory assessment of the antimycotic drug clotrimazole. J. Clin. Pathol. 25: 1089~1097, 1972
 - 11) VON KESSLER, H.-J.: Mikrobiologische Untersuchungen mit Isoconazolnitrat, einem Breit-spektrum-Antimykotikum aus der Gruppe der Imidazole-Derivate. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 29: 1344~1351, 1979
 - 12) HOLT, R. J.: Laboratory and clinical studies on antifungal drugs of the imidazole series. Adv. Antimicrob. Antineoplast. Chemother. 1: 243~247, 1972
 - 13) SCHÄR, G.; F. H. KAYSER & M. C. DUPONT: Antimicrobial activity of econazole and miconazole *in vitro* and in experimental candidiasis and aspergillosis. Chemotherapy 22: 211~220, 1976
 - 14) 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
 - 15) THIENPONT, D.; J. VAN CUTSEM, J. M. VAN NUETEU, C. J. E. NIEMEGEERS & R. MARSBOOM: Biological and toxicological properties of econazole, a broad-spectrum antimycotic. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 25: 224~230, 1975
 - 16) 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 の抗菌活性. 真菌誌 18: 216~224, 1977
 - 17) WALKER, K. A. M.; A. C. BRAEMER, S. HITT, R. E. JONES & T. R. MATTHEWS: 1-[4-(4-Chlorophenyl)-2-(2,6-dichlorophenylthio)-n-butyl]-1H-imidazole nitrate, a new potent antifungal agent. J. Med. Chem. 21: 840~843, 1978
 - 18) 皆川治重, 北浦皓三, 峯浦和幸, 丸茂博大: Ketoconazole (KW-1414) の抗菌活性に関する研究 第1報 試験管内抗菌活性. 真菌誌 22: 171~180, 1982

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF BIFONAZOLE AGAINST AEROBIC AND ANAEROBIC BACTERIA

KATSUHIISA UCHIDA, SATORU YAMASHITA and HIDEYO YAMAGUCHI

Research Center for Medical Mycology, Teikyo University,
School of Medicine, Tokyo, Japan

The antibacterial activity of bifonazole, a novel imidazole antimycotic, against aerobic and anaerobic bacteria was examined in comparison with that of clotrimazole and the following results were obtained.

(1) Bifonazole showed a relatively strong antibacterial activity similar to that of clotrimazole against aerobic and anaerobic gram-positive bacteria, irrespective of cocci or rods.

(2) Bifonazole exhibited no antibacterial activity against aerobic and facultative anaerobic gram-negative bacteria, but it had a moderate antibacterial activity against *Bacteroides*, obligatory anaerobes.

(3) No difference in the antibacterial activity of bifonazole against aerobic and facultative anaerobic bacteria was observed between aerobic and anaerobic culture conditions.