

Bifonazole の抗真菌作用機序に関する研究

平谷 民雄・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)

新規イミダゾール系抗真菌剤 bifonazole の抗菌作用機序を明らかにする目的で、本剤に比較的低感受性の *C. albicans* TIMM 0144(完全発育阻止濃度域, $\geq 10 \mu\text{g/ml}$) および高度感受性の *C. pseudotropicalis* TIMM 0301(完全発育阻止濃度域, $\geq 0.2 \mu\text{g/ml}$) を用いて脂質代謝および細胞膜機能に及ぼす影響を中心に検討を行なった。Bifonazole は *Candida* 細胞主要構成成分の合成系のなかで脂質合成に対して選択的阻害効果を示した。さらに bifonazole は $0.1 \mu\text{g/ml}$ 以下の低濃度でステロール合成経路の C14 脱メチル化反応を遮断し、エルゴステロール合成を阻害した。これらの薬剤効果は高度感受性株 TIMM 0301 でより強く発現された。一方, bifonazole は $10 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で両菌株細胞から K^+ や無機リン酸の放出を促進するとともに細胞外液中の pH を上昇させることから、本剤は比較的高濃度では細胞膜障害をひき起こすことが確認された。両菌株から人為的に誘導して得られたエルゴステロール合成能の低下した BAY n 7133 耐性変異株と対応する親株との間で bifonazole に対する感受性を比較した結果, TIMM 0144 では変異株と親株とがほぼ同等の感受性を示したのに対して TIMM 0301 では変異株の感受性は TIMM 0144 のレベルにまで著しく低下した。

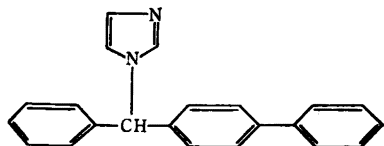
以上の成績から, bifonazole は二元的抗菌作用機序を有し, 低感受性株では細胞膜障害作用のみが, また高度感受性株においてはエルゴステロール合成阻害作用と細胞膜障害作用がそれぞれ低濃度域および高濃度域での抗菌作用に主として関与することが推論された。

Bifonazole(BAY h 4502) は, 西独 Bayer AG において抗真菌剤として研究開発された 1-[(4-biphenyl)-phenylmethyl]-1H-imidazole の化学式をもつ新規イミダゾール誘導体である (Fig. 1)¹⁾。従来知られているイミダゾール系抗真菌剤と化学構造を比較すると, bifonazole は biphenyl 構造をもつ点で clotrimazole と関連する物質であるが, 分子中にまったく Cl 元素を含まない点では clotrimazole を含めて他のいかなるイミダゾール剤とも異なる特徴を有している。Bifonazole の *in vitro* ならびに *in vivo* 抗菌活性の評価に関するこれまでの研究から, 本剤が広範囲の病原真菌に対して発育阻止作用を示し, 特に白癬の動物モデルにおいて局所的適用により優れた治療効果をあげることが報告されている²⁻⁸⁾。

Bifonazole の作用機序については, 最近, 幾つかの電子顕微鏡学的手法を用いた研究成績が発表されている。BARUG & DE GROOT⁹⁾ は *Candida albicans* および *Torulopsis glabrata* の超微形態に及ぼす bifonazole の影響を凍結切断電顕法を用いて検討し, 本剤が細胞膜微細構造を変化させることを示した。さらに, BARUG *et al.*¹⁰⁾ は, これらの酵母状真菌についての走査電顕法による観察から, bifonazole が細胞壁とくに隔壁の形成を阻害し, 細胞形態の変化をひき起こすことを報告している。また, OSUMI *et al.*¹⁰⁾ は, 極めて低濃度の bifonazole を作用させた *Trichophyton mentagrophytes* を走査電顕的に検討し, この菌の菌糸細胞壁形成の異常と崩壊がもたらされることを認めた。これらの形態学的研究の成績は, いずれも bifonazole が真菌の細胞膜に作用し, 細胞膜自体の構造の変化をもたらすと同時に細胞膜に局在する細胞壁多糖合成系の機能を阻害する可能性を強く示唆している。しかし, この推論を裏付ける直接的な生化学的証拠はまだ得られていない。

一方, clotrimazole など種々のイミダゾール剤の作用機序に関するこれまでの多くの生化学的研究の成績は, これらの薬剤が共通して複数の作用標的をもち, リン脂質との直接的相互作用¹²⁻¹⁴⁾ または脂質特にエルゴ

Fig.1 Chemical structure of bifonazole.



Empirical formula $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2$
Molecular weight 310.4

ステロールの合成阻害作用¹⁵⁻¹⁷⁾に基づいて細胞膜障害をひき起こすことを示唆している。しかしながら、これらの二つの作用のいずれが抗菌活性に直接的にかかわるかは、不明のままである。

本報においては、bifonazole 抗菌作用の一次的メカニズムを明らかにすることを目的とし、細胞膜に対する直接的作用ならびにエルゴステロール合成に及ぼす効果を中心に生化学的検討を行なった。Bifonazole 感受性の相違により一次的作用機序が異なる可能性を考慮し、全実験を通して低感受性 *C. albicans* 株と高度感受性 *C. pseudotropicalis* 株を併用し、対比させた。

I. 実験材料及方法

1) 使用菌株

すべての実験に *C. albicans* TIMM 0144 株および *C. pseudotropicalis* TIMM 0301 株を使用した。そのほか一部の実験には、これら両株からそれぞれ人為的に誘導されたトリアゾール系抗真菌剤 BAY n 7133¹⁸⁾ 耐性変異株 TIMM 0144 (azr-1), (azr-4) の2株および TIMM 0301 (azr-1), (azr-3) の2株¹⁹⁾を併用した。

2) 薬剤溶液の調製

バイエル薬品株式会社より分与された bifonazole 精製原末標品を 100% ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して 8 mg/ml の溶液を調製した。これを原液として -20°C で保存し、必要に応じ加熱融解し、完全に薬剤が溶解していることを確認した後、実験に使用した。原液の希釈溶媒には DMSO を用い、いずれの実験系においても溶媒の最終濃度が 2% (v/v) になるように調整した。

3) 培養生菌数を指標とする抗菌活性の測定

Sabouraud dextrose broth (11 当りポリペプトン 10 g, グルコース 20 g 含有, pH 無修正) (以下 SDB と略) に 1 週齢以内の若い斜面培養から採取した酵母細胞を接種し、37°C, 18 時間振盪培養を行なった。この培養を新鮮な SDB で希釈し、血球計算板を用いて 10⁶ 細胞/ml に調整した後、段階的濃度の薬剤を含む L 型試験管に 10 ml ずつ分注し、37°C で振盪培養した。24 時間後、各試験管から採取した試料を適宜希釈し、常法に従って Sabouraud dextrose agar 平板上で生菌数 (CFU) 測定を行なった²⁰⁾。

4) 培養濁度を指標とする抗菌活性の測定

生菌数測定の場合と同様にして得られた SDB 前培養を新鮮培地で約 2~3×10⁵ 細胞/ml の濃度に希釈調整した後、段階的濃度の bifonazole を含む L 型試験管に 10 ml ずつ分注し、37°C で振盪培養を行なった。24 時間後に各試験管から試料を採取し、分光光度計を用いて 530 nm 波長で濁度を測定した。

5) 各種放射性化合物の取り込み実験

前報^{20,21)}に述べた細胞調製法、反応系ならびに試料分画法に準拠して、*Candida* 細胞におけるタンパク質画分への [³H] ロイシン, RNA および DNA 画分への [³H] アデニン, マンナンおよびアルカリ不溶グルカン画分への [¹⁴C] グルコースのそれぞれの取り込み²⁰⁾, および総脂質画分への [¹⁴C] 酢酸の取り込み²¹⁾とそれに及ぼす薬剤の効果を測定した。いずれの実験系においても薬剤添加を 0 時間に行なった。

6) ステロール合成実験

PYE & MARRIOTT²²⁾の方法に従い、酵母細胞に [2-¹⁴C] 酢酸 (ナトリウム塩) を取り込ませ、ステロールクラス別の放射能を測定した。SDB 前培養で得られた酵母細胞を遠心して集め、これを 1 mM 酢酸ナトリウム ([2-¹⁴C] 酢酸ナトリウム 50 μCi/ml を含む) 添加 Rowley-Huber medium (Oxoid) に浮遊し、2~3×10⁷ 細胞/ml の濃度に調製した。これを 50 ml ずつフラスコに分注し、段階的濃度の薬剤を添加した後、37°C で 3 時間振盪した。遠心集菌後、MARRIOTT²³⁾の方法に準拠して不飽和脂質画分を抽出し、薄層クロマトグラフィーを行なった。薄層板用スキャナーで放射性成分の所在を確認し、エルゴステロールおよびラノステロールの標準品の Rf 値に基づいて各ステロールクラスの位置を定めて取り取った後、それぞれの放射能を測定した。

7) 細胞外へ放出される K⁺ および無機リン酸 (Pi) の定量

SDB 中 37°C, 18 時間振盪培養を遠心して酵母細胞を集め、蒸留脱イオン水で 3 回洗浄した後、2~3×10⁷ 細胞/ml の濃度になるように蒸留脱イオン水に浮遊させた。この細胞浮遊液 10 ml を段階濃度の薬剤を含む L 型試験管に分注した後、振盪しながら 37°C でインキュベートし、15 分後まで経時的に各試験管から試料を採取した。これを直ちに減圧下でガラス線維濾紙 (GF/C, Whatmann 社製) を通して濾過し、細胞と濾液とに分離した。得られた濾液すなわち細胞外液について、K⁺ 含量を蛍光光度計 (日立 775 型) により、また Pi 含量を中村²⁴⁾の方法による比色定量法によりそれぞれ測定した。細胞外への放出量は、0 時間 (薬剤処理前) の細胞を 5% 冷 TCA で抽出して得られた細胞内含量に対する比率で表わした。

8) 細胞浮遊液 pH 値の連続測定

上記と同様に調製された酵母細胞浮遊液の一定量を測定用容器に取り、37°C に保温維持し、攪拌しながら薬剤溶液を添加し、インキュベーションを続けた。この間 10 分以上にわたって連続的に pH 値を追跡記録した。

9) 試薬

[3, 4, 5-³H] ロイシン (120 Ci/mmol), [8-³H] アデニン (25 Ci/mmol), [U-¹⁴C] グルコース (240 mCi/mmol), [2-¹⁴C] 酢酸 (60 mCi/mmol) および [U-¹⁴C] 酢酸ナトリウム (60 mCi/mmol), 以上使用したすべての放射性化合物は Radiochemical Centre (英国) から購入した。一般試薬は、東京化成工業 (株) 社または和光純薬 (株) 社の製品を用いた。

II. 実験成績

1) *C. albicans* TIMM 0144 および *C. pseudotropicalis* TIMM 0301 に対する抗菌力ならびに作用様式実験に用いた *Candida* 2 菌株のそれぞれに対する bifonazole の抗菌活性と生化学的作用の強さに関して対応関係を知るために、SDB 中での発育に及ぼす影響について生菌数を指標として検討することをまず行なった。

Fig. 2 に種々の濃度の bifonazole を添加して 24 時間培養した後の生菌数を図示した。この図から明らかなように、*C. albicans* TIMM 0144 株においては、1 $\mu\text{g/ml}$ 程度の薬剤濃度で部分的発育阻止が、10 $\mu\text{g/ml}$ 以上ではほぼ完全な阻止がそれぞれ認められたが、殺菌の効果は全くみられなかった。これに対して、*C. pseudotropicalis* TIMM 0301 株は、はるかに高い感受性を示し、0.2 $\mu\text{g/ml}$ 以下の薬剤濃度で発育が完全に阻止されるのみならず、軽度ながら殺菌の影響も受けことが認められた。また、1 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では接種菌数の 5% 程度までに生菌数は低下した。以上の成績から、TIMM 0144 株に比べて TIMM 0301 株は bifonazole 抗菌作用に対し、1,000 倍以上高い感受性をもつことが示された。

2) 主要細胞構成物質の合成に及ぼす影響

Bifonazole が *Candida* 細胞を構成する主要成分であるタンパク質、RNA、DNA、細胞壁多糖 (特にアルカリ不溶・酸不溶多糖とマンナン)、脂質のいずれかの合成系に対して直接的な阻害作用をもつか否かを検討する

ために、本剤を種々の濃度で加えた場合の反応液中の放射性基質の特定細胞成分への取り込みの初期速度を測定した。

Fig. 3, 4 にそれぞれ TIMM 0144 株および TIMM 0301 株について得られた各成分ごとの放射能取り込みの経時的パターンと薬剤濃度の影響を示す。TIMM 0144 株においては、3 種の情報高分子物質のうち、RNA の合成が最も顕著に阻害され、完全発育阻止を示す 20~40 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤濃度下で 50% 以上の阻害度が得られた (Fig. 3)。これと比較してタンパク質または DNA の合成は軽度の影響しか受けず、40 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤濃度による阻害度は 40% 以下に過ぎなかった。酵母細胞壁の主要構成多糖として知られるアルカリ不溶・酸不溶多糖 (主として β -グルカンと少量のキチンからなる) およびマンナンのいずれについても bifonazole による合成阻害効果が認められたが、阻害の程度はともに RNA 合成におけるよりも低かった。その反面、[¹⁴C] 酢酸の総脂質画分への取り込みを指標とする脂質合成は、bifonazole により際立って強い阻害を受け、反応開始から 40 分後では薬剤 2.5 $\mu\text{g/ml}$ により 50% 以上、20 $\mu\text{g/ml}$ により 80% 以上の阻害度に達した。

これと同様に、TIMM 0301 株においても脂質以外の細胞成分のなかでは RNA の合成が最も強く阻害される傾向が認められたが、全般的に発育阻止効果に比べて合成阻害効果は低く、5 $\mu\text{g/ml}$ すなわち完全発育阻止を示す薬剤濃度 0.2 $\mu\text{g/ml}$ の 25 倍高い濃度でようやく 50% を越す程度の RNA 合成阻害が認められるに過ぎなかった (Fig. 4)。これとは対照的に、反応開始 40 分後の成績でみる限り、脂質合成は 0.31 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤で 65% 以上の阻害度を示し、選択的に強い阻害を受けことが知られた。しかも反応開始後 20 分から 40 分の間では薬剤無添加対照反応系における取り込みがほぼ直線的に進行しているのに対し、薬剤を添加した反応系ではほぼ

Fig. 2 Viable counts of cultures of *C. albicans* TIMM 0144 (●) and *C. pseudotropicalis* TIMM 0301 (○) after 24 hours exposure to various concentrations of bifonazole.

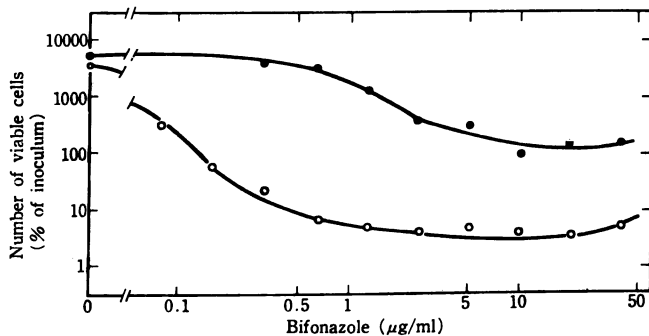
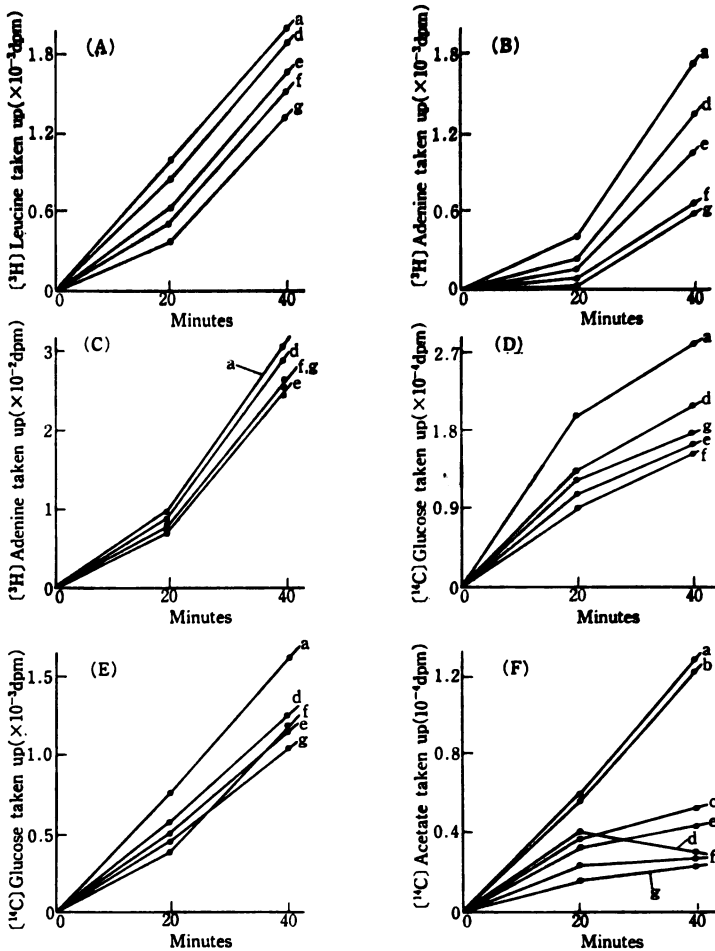


Fig. 3 Effect of bifonazole on synthesis of several major cellular constituents in *C. albicans* TIMM 0144 cells as measured by incorporation of specific radioactive compounds.

Incorporation of: A, [^3H] leucine into protein; B, [^3H] adenine into RNA; C, [^3H] adenine into DNA; D, [^{14}C] glucose into alkali-insoluble, acid-insoluble polysaccharides; E, [^{14}C] glucose into mannan; and F, [^{14}C] acetate into lipids.

Bifonazole was added to a final concentration of ($\mu\text{g/ml}$): a, 0; b, 1.25; c, 2.5; d, 5; e, 10; f, 20; and g, 40.



完全に停止することから、この阻害が時間とともに増強されることが示唆される。

以上の結果は、両菌株に共通して bifonazole は脂質合成を選択的に阻害する反面、他の主要な細胞構成成分の合成に対しては軽微な阻害効果しか示さないこと、また後者に関してはとくに TIMM 0301 株で薬剤感受性と間に大きな隔りがあることを示している。

3) エルゴステロール合成に及ぼす影響

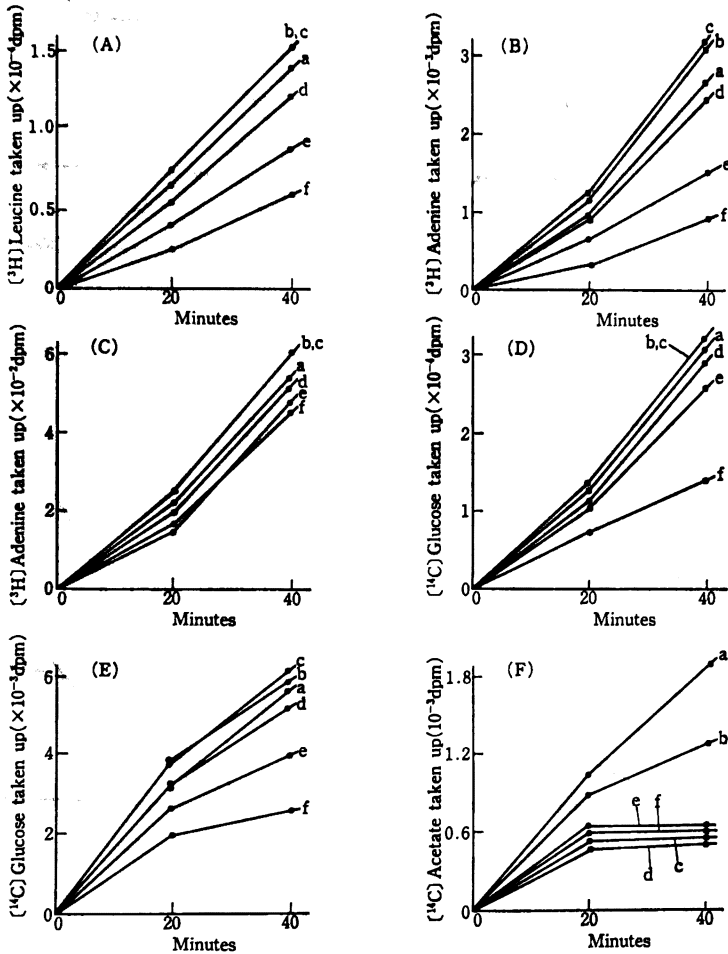
Candida 細胞におけるステロール合成に bifonazole がどのように作用するかを検討するために、種々の薬剤濃度下で細胞に [$2\text{-}^{14}\text{C}$] 酢酸を取り込ませた後、ステロ

ール合成経路の最終生産物であるデスマチルステロール画分（酵母では大部分がエルゴステロールからなる）およびその代謝的前駆物質であるジメチルステロールとトリメチルステロールの各画分を薄層クロマトグラフィーにより分離し、それぞれの放射能を測定した。Fig. 5 は、各画分の放射能を百分率で表わしたものとそれに対する bifonazole 濃度の影響を示したものである。図から明らかなように、bifonazole は TIMM 0144 株および TIMM 0301 株のいずれにおいても低濃度でデスマチルステロールすなわちエルゴステロールの合成を顕著に阻害した。一方、他の 2 つの前駆体画分の放射能比は減少

Fig. 4 Effect of bifonazole on synthesis of several major cellular constituents in *C. pseudotropicalis* TIMM 0301 cells as measured by incorporation of specific radioactive compounds.

Incorporation of : A, [^3H] leucine into protein ; B, [^3H] adenine into RNA ; C, [^3H] adenine into DNA ; D, [^{14}C] glucose into alkali-insoluble, acid-insoluble polysaccharides ; E, [^{14}C] glucose into mannan ; and F, [$^2\text{-}^{14}\text{C}$] acetate into lipids.

Bifonazole was added to a final concentration of ($\mu\text{g/ml}$) : a, 0 ; b, 0.08 ; c, 0.31 ; d, 1.25 ; e, 5 ; and f, 20.



しないかまたはかえって増加しているところから、この阻害効果は C 14 脱メチル化反応の遮断に起因することが示唆される。

TIMM 0144 株におけるエルゴステロール合成は、5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の薬剤濃度ではほぼ完全に阻害され、0.08 $\mu\text{g/ml}$ という低濃度でもなお 50% 程度の阻害が認められた (Fig. 5A)。TIMM 0301 株に対する阻害効果はさらに高く、1.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の薬剤濃度ではほぼ 100%、0.02 $\mu\text{g/ml}$ でも約 65% の阻害度を示した (Fig. 5B)。

したがって、この阻害効果を抗菌活性と比較した場合、TIMM 0301 株においては両者間にほぼ対応関係がみられたが、TIMM 0144 株では発育阻止をほとんど示さない濃度でもエルゴステロール合成を強く阻害することが知られた。

4) 細胞内 K^+ および無機リン酸 (Pi) の放出促進効果

Candida 両試験菌株に対する bifonazole の細胞膜障害作用について、薬剤添加後直ちに細胞外へ放出される

Fig. 5 Effect of bifonazole on incorporation of [$2\text{-}^{14}\text{C}$] acetate into three sterol classes in cells of *C. albicans* TIMM 0144 (A) and *C. pseudotropicalis* TIMM 0301 (B).
 ○, C 4, 4', 14-trimethyl sterols; ●, C 4, 14-dimethyl sterols; △, C 4, 14-desmethyl sterols.

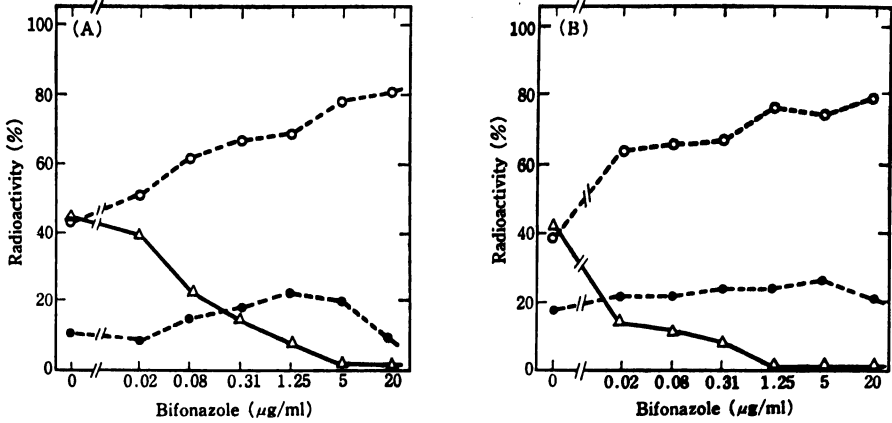
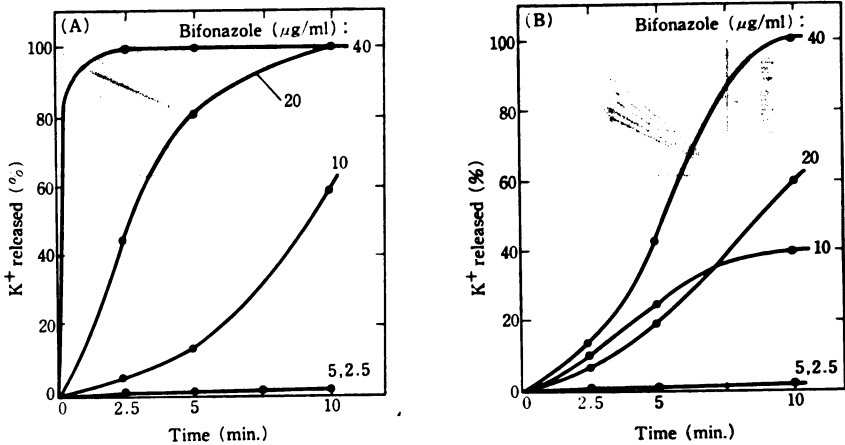


Fig. 6 Effect of bifonazole on K^+ release from cells of *C. albicans* TIMM 0144 (A) and *C. pseudotropicalis* TIMM 0301 (B).



K^+ および P_i の量を指標に検討を行なった。

Fig. 6A に示されるように、 K^+ 放出は TIMM 0144 株においては 10 µg/ml 以上の濃度の bifonazole 添加により有意に促進され、20 µg/ml の濃度では添加後 10 分以内に細胞内 K^+ のほぼ全量が外部へ放出された。 K^+ 放出の程度、速度とも薬剤濃度に依存し、40 µg/ml では添加後 2.5 分以内に K^+ 全量が放出された。これに比べて TIMM 0301 株における bifonazole の K^+ 放出促進効果は、放出の程度、速度のいずれの点でも弱い傾向が認められた (Fig. 6B)。10 µg/ml 以上の薬剤添加で K^+ 放出が認められたものの、10 分後の時点における 20 µg/ml の bifonazole による放出量は 60% 程度であり、40 µg/ml の高濃度でようやく 100% に達した。

細胞内 P_i に対しても bifonazole は両菌株において K^+ の場合と同程度かむしろそれより強い放出促進効果を示した (Fig. 7A, 7B)。

TIMM 0144, TIMM 0301 のいずれにおいても 5 µg/ml 以上の濃度の添加により 10 分以内に有意な P_i 放出が認められた。しかし、 K^+ 放出の場合と同様、前者の株における放出促進効果が後者のそれよりも顕著であり、20 および 40 µg/ml の添加ではそれぞれ 2.5 分、5 分以内に細胞内 P_i のほぼ全量が放出された。これに対して、TIMM 0301 株では 40 µg/ml の添加で 10 分後によく放出量が 100% に達した。

以上の成績から、本剤は両菌株に対して同程度の薬剤濃度 (10 µg/ml 以上) で有意な細胞内 K^+ および P_i 放

Fig. 7 Effect of bifonazole on release of inorganic phosphate (Pi) from cells of *C. albicans* TIMM 0144 (A) and *C. pseudotropicalis* TIMM 0301 (B).

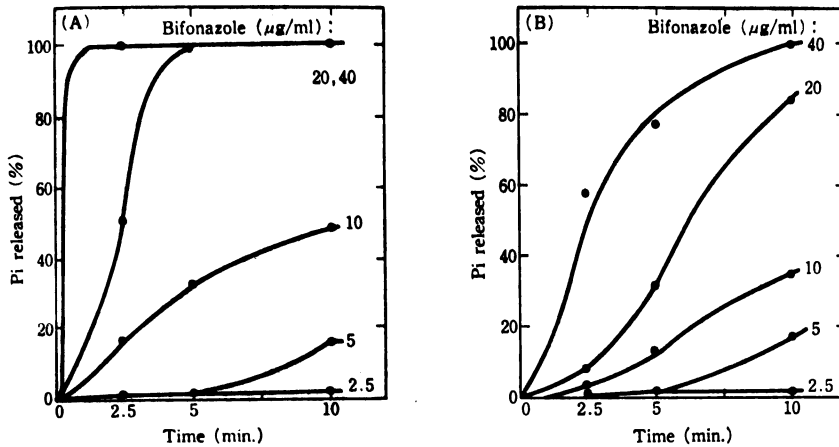
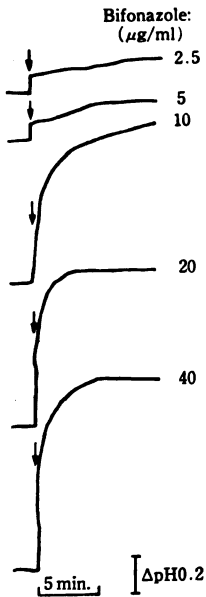


Fig. 8 Bifonazole-induced pH changes in a *C. albicans* TIMM 0144 cell suspension.

The drug was added at the point indicated by an arrow.



出促進効果を示すこと、その効果は bifonazole 感受性の低い TIMM 0144 株により強く発現されることが明らかになった。

5) 細胞外液の pH 上昇効果

Fig. 6, 7 に示される実験成績から明らかのように、bifonazole は細胞内から K^+ などの陽イオンおよび PO_4^{3-} などの陰イオンの放出を促進する結果、それに付随して細胞外液の pH 値が変動することが予測される。したがって、この現象もまた細胞膜障害とその程度を示

す指標として用いられるところから、*Candida* 細胞浮遊液に種々の濃度の bifonazole を添加し、pH 値を連続的に測定、記録した。

Fig. 8 に示すように、TIMM 0144 株の細胞浮遊液に薬剤を添加した場合には、その直後から急激な、しかし徐々に減速する pH の上昇が認められた。pH 上昇のレベルは薬剤濃度に依存し、2.5 または 5 µg/ml では軽度の上昇しかみられなかったが、10 µg/ml 以上の濃度ではそれが極めて顕著となり、特に 20 µg/ml 以上では 5 分以内に ΔpH 0.8 以上のレベルで平衡に達した。

一方、TIMM 0301 株においても、Fig. 9 に示されるように、2.5 µg/ml 以上の薬剤濃度で有意な pH 上昇が認められ、上昇のレベルは薬剤濃度とともに高くなった。しかし、TIMM 0144 株に比べて上昇速度が著しく遅いことが特徴的であり、上昇レベルもやや低い傾向にあった。

Bifonazole 添加による細胞外液 pH の上昇は、陰イオンに比べて圧倒的大量の陽イオンが放出された結果と考えられ、事実各両菌株、各薬剤濃度ごとの pH 上昇曲線によく対応することが示される。

6) BAY n 7133 耐性変異株の bifonazole 感受性

広範囲の抗真菌スペクトルをもつトリアゾール系誘導体 BAY n 7133 は、*Candida* 菌種の大部分の菌株に対して強い抗菌力を有する^{18,24)}。*C. albicans* TIMM 0144 株および *C. pseudotropicalis* TIMM 0301 株をニトロソグアニジン処理することにより、前者からは 50% 発育阻止濃度 (IC_{50}) が 20 倍以上、後者からは 200 倍以上、それぞれ上昇した BAY n 7133 耐性変異株を数株ずつ分離することに成功した。これらの変異株は、いずれも共通して細胞エルゴステロール含量が低く、エルゴス

テロールおよび不飽和脂肪酸に対し部分的要求性を示し、しかも amphotericin B などのポリエン抗生物質に耐性であった¹⁹⁾。したがってエルゴステロール合成系に欠陥のある変異株と考えられたので、これらの変異株と対応する親株の間で bifonazole に対する感受性を比較することにより、本剤の抗菌効果とエルゴステロール合成阻害効果との相関性について検討することを試みた。

Fig. 10 にその実験成績を示す。TIMM 0144 株においては、親株と変異株 2 株との間に bifonazole 抗菌活性に対する大きな感受性の差は認められず、いずれの菌株も 5 $\mu\text{g/ml}$ ではほぼ 50% 発育阻止、20 $\mu\text{g/ml}$ で完全発育阻止を来した。これに対して、TIMM 0301 株の親株は 0.08 $\mu\text{g/ml}$ の bifonazole により完全に阻止されたが、

Fig. 9 Bifonazole-induced pH change in a *C. pseudotropicalis* TIMM 0301 cell suspension.

The drug was added at the point indicated by an arrow.

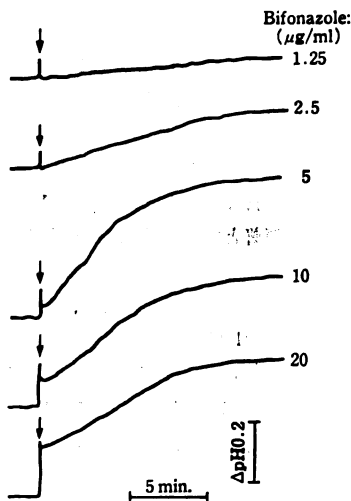
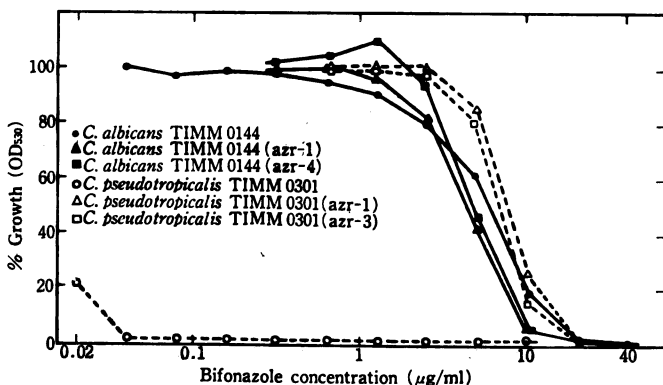


Fig. 10 Effect of bifonazole on growth of wild type and BAY n 7133-resistant mutants of *C. albicans* TIMM 0144 and *C. pseudotropicalis* TIMM 0301.



変異株では 2 株とも完全に発育阻止するのに 20 $\mu\text{g/ml}$ を要し、約 250 倍の感受性低下を示した。また、両親株間には bifonazole 感受性に 250 倍もの差がありながら、それぞれの変異菌の間には全くこの点で相違がみられない点が注目された。

以上の成績から TIMM 0144 株に対する bifonazole の抗菌活性は、エルゴステロール合成阻害と無関係であるのに対し、TIMM 0301 株においてはエルゴステロール合成阻害に強く依存する可能性が示唆された。

III. 考 察

これまで知られている種々のイミダゾールは、構造的にはかなり多様であるが、いずれも感受性細胞の生化学的経路に共通した複数の作用点をもつと考えられる^{22,23)}。現在イミダゾール剤の作用機序として想定されているものには、(i) 酸化的リン酸化の脱共役²⁷⁾、(ii) 呼吸酵素系阻害^{22,23)}、(iii) 酸化酵素ならびに過酸化酵素の合成阻害^{20,21)}、(iv) 細胞膜障害^{21,22)}および(v) エルゴステロール合成阻害¹⁵⁻¹⁷⁾があり、とくに(iv)と(v)については抗菌活性との関連性を含めて詳細な検討がなされている。

比較的高い薬剤濃度で *C. albicans* などの感受性細胞から K^+ 、リン酸化合物、タンパクなどの細胞内成分を放出させる細胞膜障害作用は、clotrimazole²¹⁾をはじめ miconazole^{22,24)}、econazole²⁰⁾、isoconazole^{22,23)}、sulconazole²⁷⁾ など調べられたあらゆるイミダゾール剤で、程度の差はあるにせよ、例外なく認められている。さらにこうした細胞膜障害を示唆する生化学的成績を支持する電子顕微鏡所見も種々のイミダゾール剤について報告されているが、とりわけ econazole による細胞膜超微構造の変化を凍結断電顕法により検討した成績が PREUSSER *et al.*²⁰⁾ および YAMAGUCHI *et al.*²³⁾ により提示されている。Bifonazole についても BARUG & DE GROOT⁹⁾ は同じ

手法を用いて同様の所見を観察し、従来のイミダゾール剤と共通した細胞膜障害作用をもつと推論している。

今回われわれの実験成績から、5~10 µg/ml 以上の bifonazole が高度感受性および低感受性の *Candida* 細胞から K⁺ および 無機リン酸を迅速に遊離させること、また細胞外液 pH を急激に上昇させることが示され、いずれも上述の電顯的所見に対応して本剤が細胞膜障害作用をもつことを明らかにした。Bifonazole による細胞外液 pH 上昇の経時的パターンは、薬剤濃度や菌株の差に関して対応する細胞浮遊液における K⁺ 放出の経時的パターンに近似する。細胞外液の pH 上昇が、K⁺ を主とする細胞内陽イオンの放出に共役して起こる外液中 H⁺ の細胞内移入に起因することを考えるならば、これらの二つの現象の間に有意な相関性がみられるのはむしろ当然というべきであろう。H⁺ の細胞内蓄積は、内部環境を酸性化し、その結果、タンパク分解酵素や核酸分解酵素などの自己融解酵素の活性化を促して細胞内の多くの重要な代謝活性特に生合成反応を阻害することになる。Bifonazole 添加直後から生じる情報高分子物質や細胞壁多糖の合成がある程度阻害された原因は、合成基質の細胞外放出に加えて、細胞内環境の劣化にあることが推察される。

Bifonazole を 10 µg/ml 以上の濃度で添加した直後から大量の K⁺ その他の細胞内成分が放出され、それに付随する細胞外液の pH 上昇が観察されたことは、この効果がエルゴステロール合成経路その他の何らかの細胞代謝経路に対する阻害作用を経由した二次的効果ではなく、細胞膜に対する薬剤の直接的作用に基づくことを強く示唆する。すでに他の種々のイミダゾール剤についてリボソーム人工膜モデルを用いて解析した成績が示すように、bifonazole もまた膜リン脂質と直接的相互作用を営んで膜流動性を高め¹⁴⁾、その結果、膜透過性を亢進すること^{18,40)}、に本剤膜障害作用に分子的基盤を求めることができよう。

Bifonazole の直接膜障害作用は、低感受性の *C. albicans* TIMM 0144 株においては発育阻止濃度にほぼ一致する 10 µg/ml 以上の濃度域で発現された。一方、この作用は、本剤の抗菌活性に対して 50 倍以上も高い感受性をもつ *C. pseudotropicalis* TIMM 0301 株においてもほぼ同じ薬剤濃度ではじめて発現された。したがって、TIMM 0144 株に対する bifonazole 抗菌作用の生化学的機序は、直接的膜障害作用で十分説明される反面、TIMM 0301 株については 0.2~10 µg/ml という低薬剤濃度域での抗菌作用は他のメカニズムに由来すると考えざるを得ない。この点に関連して、bifonazole が両菌株の細胞における主要構成成分のなかで脂質の合成を選択

的に阻害する成績、さらにステロール合成経路の C 14 脱メチル化反応を遮断して 0.02 µg/ml 以下という極めて低い濃度でエルゴステロール合成阻害をひき起こす成績が得られたことは示唆的である。Bifonazole でのこれらの成績は、VAN DEN BOSSCHE *et al.*^{15,17)}、MARRIOTT¹⁶⁾、PYE & MARRIOTT²²⁾、SUD & FEINGOLD⁴¹⁾らの研究者による他の種々のイミダゾール剤についての報告とよく対応するとともに、bifonazole 高度感受性菌にみられる低薬剤濃度での発育阻止がエルゴステロール合成阻害に起因する可能性を支持する。一般にイミダゾール剤が極めて低濃度で真菌細胞のエルゴステロール合成を阻害することは、最早疑問の余地はないが、この合成阻害作用が抗菌作用に一次的にかかわっていることを示す直接的な証拠はまだ得られていない。それに加えて、*C. albicans* ポリエン耐性変異株のなかには C 14 脱メチル化を欠き、したがってエルゴステロールを細胞内にほとんどもたないにもかかわらず、充分な発育・増殖能を示す株が見出されており⁴²⁾、この事実はエルゴステロール合成阻害効果の抗菌的意義に対しむしろ否定的な立場を強化している。SUD & FEINGOLD⁴¹⁾ は、嫌気的条件下で *S. cerevisiae* などの酵母がエルゴステロールを合成しないことを利用し、この酵母を嫌気的に培養した場合には好氣的培養でみられたイミダゾール剤低濃度による静菌的作用が消失するという成績を得、これを根拠に、低濃度域ではエルゴステロール合成阻害が一次的抗菌作用機序として働くことを証明したと述べている。しかしながら、彼らの実験に用いられた設定条件には幾つかの疑問点があり、特に嫌気的条件下での発育に必ず要求される不飽和脂肪酸源を培地に添加したことは、不飽和脂肪酸がイミダゾール剤に対して強い拮抗的效果をもつ¹²⁾ことを考慮するならば、彼らが導いた結論は妥当性を欠くものと判断せざるを得ない。

この点で今回われわれが行なった BAY n 7133 感受性親株と耐性変異株との間の bifonazole 感受性の比較検討は、エルゴステロール合成阻害の役割についてより明確な解答に迫るアプローチといえよう。実験の結果、bifonazole に対して比較的感受性の *C. albicans* TIMM 0144 株由来の変異株は親株と同程度の bifonazole 感受性を示す一方、高度感受性の *C. pseudotropicalis* TIMM 0301 株由来の変異株は、TIMM 0144 株と同程度までに数百倍も感受性が低下した。これらの変異株がいずれもエルゴステロール合成能の低下したおそらく PIERCE *et al.*⁴²⁾ の記載したポリエン耐性株と類似の代謝特性をもつ株であることを考慮に入れるならば、今回の実験成績を総合して次の推論が導かれる。(i) bifonazole 低感受性株においては本剤がエルゴステロール合成を強く阻害

するにもかかわらず、この阻害効果はまったく抗菌作用には反映されず、抗菌作用は膜障害のみに起因する。(ii)高度感受性株においては、低薬剤濃度域すなわち10 µg/ml以下でのbifonazoleの抗菌作用は主としてエルゴステロール合成阻害に起因し、それ以上の濃度では膜障害が主因となる。

生物学的活性の類似性からみて、おそらくこの二元的抗菌作用機序はそのまま他のイミダゾール剤についても適用されると考えられる。しかし、低感受性株でも、エルゴステロール合成が強く阻害され、しかもそれが抗菌活性と結びつかなかった理由は、不明であり、今後の検討を待たねばならない。菌種または菌株によってポリエン耐性変異株などのエルゴステロール合成能欠損株の誘導分離率が著しく異なることなどの点からは、異なる菌種または菌株間で膜成分としてのエルゴステロールの必要度に相違がある可能性も否定できない。

エルゴステロールは好氣的条件下で培養された酵母細胞の主要ステロールであり^{48,49}、主として細胞膜に存在し^{45,46}、発育ならびに膜の構造・機能の維持に重要な役割を果たしており⁴⁷、エルゴステロールを失った通常の真菌細胞は発育不能となる⁴⁸。さらに、人工膜モデル系を用いた実験から、ステロールが膜の硬さを増す働きをしており^{49,50}、種々の陽イオン、陰イオンまたは非電解質の膜透過性がステロールの挿入または置換により著しく変化することが示されている⁵¹⁻⁵³。これらの成績に基づいて推論するならば、bifonazoleなどのイミダゾール剤によってエルゴステロール合成が阻害された細胞においては、細胞膜のエルゴステロール欠損によっても膜透過性の異常亢進すなわち膜障害がひき起こされる可能性が考えられよう。

走査電顕法による観察からは、bifonazoleが低濃度で真菌細胞壁の構築に対しても障害的影響を与えることが示されている^{10,11}。これを説明する生化学的機序としては、(i)細胞膜の変化によってそこに局在する壁多糖合成酵素の活性が低下する、(ii)多糖合成反応に必要な脂質担体が欠乏する、(iii)細胞壁の構成脂質が欠除する、などの可能性があげられる。ことに(iii)については、細胞壁乾量の4~8%を脂質が占め^{54,55}、その大部分はアシルグリセリドおよびステロールエステルからなり⁵⁶、細胞を脱脂乾燥すると扁平化することなどからみて脂質が細胞壁に硬さを与えていると推論されている⁵⁷。したがって、bifonazoleがステロール合成系に対する効果を介して細胞壁を脆弱化する可能性は十分検討に値しよう。

Bifonazole 精製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) PLEMPPEL, M.; K. H. BÜCHEL & E. REGEL: Recent developments in antifungal azole compounds. In Proceedings of the 8th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (BAXTER, M. ed.), Massey University, New Zealand, pp. 305~309, 1983
- 2) SHADOMY, S.; D. M. DIXON & R. MAY: A comparison of bifonazole (Bay h 4502) with clotrimazole *in vitro*. *Sabouraudia* 20: 313~323, 1982
- 3) IWATA, K. & Y. YAMAMOTO: *In-Vitro* antifungal activity of bifonazole: a preliminary report. In Proceedings for International Antifungal Symposium: Bifonazole (URABE, H., ZAIAS, N. and STETTENDORF, S. ed.), *Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton*, pp. 2~17, 1982
- 4) SHADOMY, S.; D. M. DIXON, R. MAY & B. L. SHADOMY: *In-vitro* and *in-vivo* activity of bifonazole. In Proceedings for International Antifungal Symposium: Bifonazole (URABE, H., ZAIAS, N. and STETTENDORF, S. ed.), *Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton*, pp. 18~28, 1982
- 5) PLEMPPEL, M. & E. REGEL: Antimycotic properties of the topical azole bifonazole *in vitro* and *in vivo*. In Proceedings for International Antifungal Symposium: Bifonazole (URABE, H., ZAIAS, N. and STETTENDORF, S. ed.), *Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton*, pp. 29~36, 1982
- 6) PLEMPPEL, M.; E. REGEL & K. H. BÜCHEL: Antimycotic efficacy of bifonazole *in vitro* and *in vivo*. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 33(I): 517~524, 1983
- 7) YAMAGUCHI, H.; T. HIRATANI & M. PLEMPPEL: *In vitro* studies of a new imidazole antimycotic, bifonazole, in comparison with clotrimazole and miconazole. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 33(I): 546~551, 1983
- 8) 内田勝久, 山下 悟, 山口英世: 局所的イミダゾール系抗真菌剤 bifonazole の実験的白黴菌感染症に対する治療効果. *Chemotherapy* 32: 89~101, 1984
- 9) BARUG, D. & C. DE GROOT: Microscopic studies of *Candida albicans* and *Torulopsis glabrata* after *in vitro* treatment with bifonazole. Freeze fracture electron microscopy. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 33(I): 538~545, 1983
- 10) BARUG, D.; R. A. SAMSON & A. KERKENAAR: Microscopic studies of *Candida albicans* and

- Torulopsis glabrata* after *in vitro* treatment with bifonazole. Light and scanning electron microscopy. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 33(I): 528~537, 1983
- 11) OSUMI, M.; N. YAMADA, J. OKADA, H. YAMAGUCHI, T. HIRATANI & M. PLEMPER: The effect of bifonazole on the structure of *Trichophyton*. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 33 (II): 1484~1491, 1983
 - 12) YAMAGUCHI, H.: Antagonistic action of lipid components of membranes from *Candida albicans* and various other lipids on two imidazole antimycotics, clotrimazole and miconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 16~25, 1977
 - 13) YAMAGUCHI, H. & K. IWATA: Effect of fatty acyl group and sterol composition on sensitivity of lecithin liposomes to imidazole antimycotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15: 706~711, 1979
 - 14) YAMAGUCHI, H.; Y. YAMAMOTO & T. FUJITA: Molecular basis of the membrane-active property of imidazole antimycotics. In *Proceedings of the 8th Congress of International Society for Human and Animal Mycology* (BAXTER, M. ed.), Massey University, New Zealand, pp.294~297, 1983
 - 15) 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
 - 16) MARRIOTT, M. S.: Inhibition of sterol biosynthesis in *Candida albicans* by imidazole-containing antifungals. *J. Gen. Microbiol.* 117: 253~255, 1980
 - 17) VAN DEN BOSSCHE, H.; G. WILLEMSSENS, W. COOLS, F. CORNELISSEN, W. F. LAUWERS & J. M. DAN CUTSEM: Effects of the antimycotic drug ketoconazole on sterol synthesis. An *in vitro* and *in vivo* study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 922~928, 1980
 - 18) YAMAGUCHI, H.; T. HIRATANI & M. PLEMPER: *In-vitro* studies of a new oral azole antimycotic, BAY n 7133. *J. Antimicrob. Chemother.* 11: 135~149, 1983
 - 19) HIRATANI, T. & H. YAMAGUCHI: Isolation and characterization of a triazole antimycotic Bay n7133-resistant mutants of *Candida albicans* and *C. pseudotropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (submitted).
 - 20) 山口英世, 平谷民雄, 末柄信夫, 岩田和夫: *Candida albicans* における isoconazole の作用メカニズム。 *Chemotherapy* 30: 1439~1449, 1982
 - 21) IWATA, K.; H. YAMAGUCHI & T. HIRATANI: Mode of action of clotrimazole. *Sabouraudia* 11: 158~166, 1973
 - 22) PYE, G. W. & M. S. MARRIOTT: Inhibition of sterol C14 demethylation by imidazole-containing antifungals. *Sabouraudia* 20: 325~329, 1982
 - 23) 中村道徳: 燐酸の比色定量法。 *農化誌* 34: 1~5, 1959
 - 24) FROMTLING, R. A.; H.-P. YU & S. SHADOMY: *In-vitro* inhibitory activities of 2 new orally absorbable imidazole derivatives: BAY n 7133 and BAY 1 9139. *Sabouraudia* 21: 179~184, 1983
 - 25) BEGGS, W. H.; F. A. ANDREWS & G. A. SAROSI: Action of imidazole-containing antifungal drugs. *Life Science* 28: 111~118, 1981
 - 26) YAMAGUCHI, H.: Advances in research of mechanism of imidazole-antimycotics action. In *Proceedings of the 1st International Symposium on Chemobiodynamics: Filamentous Microorganisms—Current Topics of Infection, Toxicosis and Control* (ARAI, T. ed.), (in press).
 - 27) DICKINSON, D. P.: The effects of miconazole on rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 26: 541~542, 1977
 - 28) UNO, J.; M. L. SHIGEMATSU & T. ARAI: Primary site of action of ketoconazole on *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 912~918, 1982
 - 29) SHIGEMATSU, M. L.; J. UNO & T. ARAI: Effect of ketoconazole on isolated mitochondria from *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 919~924, 1982
 - 30) DE NOLLIN, S.; H. VAN BELLE, F. GOOSSENS, F. THONE & M. BORGERS: Cytochemical and biochemical studies of yeast after *in vitro* exposure to miconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 500~513, 1977
 - 31) BORGERS, M.: Mechanism of action of antifungal drugs, with special reference to the imidazole derivatives. *Rev. Infect. Dis.* 2: 520~534, 1980
 - 32) 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
 - 33) 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
 - 34) COPE, J. E.: Mode of action of miconazole on *Candida albicans*: effects on growth, viability and K⁺ release. *J. Gen. Microbiol.* 19: 245~251, 1980
 - 35) 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* の諸種細胞機能に及ぼす影響。真菌誌 20 : 31~39, 1979
- 36) 西本克信, 工藤大悟, 押野 臨: Isoconazole の抗真菌作用に関する研究—*Candida* 酵母に対する殺菌機序。真菌誌 23 : 227~239, 1982
- 37) 山口英世, 平谷民雄, 岩田和夫: 新イミダゾール系抗真菌剤 sulconazole の作用機序に関する研究。真菌誌 24 : 253~262, 1983
- 38) PREUSSER, H.-J. & H. ROSTEK: Freeze-fracture studies on the plasmalemma of *Candida albicans* after treatment with econazole-nitrate. Sabouraudia 17 : 389~398, 1979
- 39) YAMAGUCHI, H.; K. IWATA, M. NAGANO & M. OSUMI: Ultrastructure of *Saccharomyces cerevisiae* treated with econazole. J. Electron Microsc. 30 : 305~314, 1981
- 40) SUD, I. J.; D. -L. CHOU & D. S. FEINGOLD: Effect of free fatty acids on liposomes susceptibility to imidazole antifungals. Antimicrob. Agents Chemother. 16 : 660~663, 1979
- 41) SUD, I. J. & D. S. FEINGOLD: Mechanisms of action of antimycotic imidazoles. J. Invest. Dermatol. 76 : 438~441, 1981
- 42) PIERCE, A. M.; H. D. PIERCE, A. M. UNRAU & C. OEHLISCHLAGER: Lipid composition and polyene antibiotic resistance of *Candida albicans* mutants. Canad. J. Biochem. 56 : 135~142, 1978
- 43) GREENSPAN, M. D. & J. I. GERMERSHAUSEN: Effect of halofenate and clofibrate on growth and lipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 113 : 847~855, 1973
- 44) PENMAN, C. S. & J. H. DUFFUS: Ergosterol is the only sterol in *Kluyveromyces fragilis*. Antonie van Leeuwenhoek. 40 : 529~531, 1974
- 45) LONGLEY, R. P.; A. H. ROSE & B. A. KNIGHTS: Composition of the protoplast membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J. 108 : 401~412, 1968
- 46) Marriott, M. S.: Isolation and chemical characterization of plasma membranes from the yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. J. Gen. Microbiol. 86 : 115~132, 1975
- 47) LEES, N. D.; M. BARD, M. D. KEMPLE, R. A. HAAK & F. W. KLEINHAUS: ESR determination of membrane order parameter in yeast sterol mutants. Biochim. Biophys. Acta 553 : 469~475, 1979
- 48) NES, W. R.; B. C. SEKULA, W. D. NES & J. H. ADLER: The functional importance of structural features of ergosterol in yeast. J. Biol. Chem. 253 : 6218~6225, 1978
- 49) MORPURGO, G.; G. SERLUPI-CRESCENZI, G. TECCE, F. VALENTE & D. VENETTACCI: Influence of ergosterol on the physiology and the ultra-structure of *Saccharomyces cerevisiae*. Nature 201 : 897~899, 1964
- 50) BUTLER, K. W.; I. C. P. SMITH & H. SCHNEIDER: Sterol structure and ordering effects in spin-labelled phospholipid multibilayer structures. Biochim. Biophys. Acta 219 : 514~517, 1970
- 51) CHILD, J. J.; G. DÉFAGO & R. H. HASKINS: The effect of cholesterol and polyene antibiotics on the permeability of the protoplasmic membrane of *Pythium PRL 2142*. Canad. J. Microbiol. 15 : 599~603, 1969
- 52) GRUNZE, M. & B. DEUTICKE: Changes of membrane permeability due to extensive cholesterol depletion in mammalian erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta 356 : 125~130, 1974
- 53) GRAHAM, J. M. & C. GREEN: The properties of mitochondria enriched *in vitro* with cholesterol. Eur. J. Biochem. 12 : 58~66, 1970
- 54) NORTHCOOTE, D. H. & R. W. HORNE: The chemical composition of the yeast cell wall. Biochem. J. 51 : 232~236, 1952
- 55) 山口英世, 岩田和夫: 真菌細胞の二形性と壁の構造。蛋白質・核酸・酵素 17 : 588~603, 1972
- 56) PHAFF, H. J.: Structure and biosynthesis of the yeast cell envelope. In Yeast vol. 2 (ROSE, A. H. and HARRISON, J. S. ed.), Academic Press, London, pp. 135~210, 1971
- 57) BARTNICKI-GARCIA, S. & I. MCMURROUGH: Biochemistry of morphogenesis in yeasts. In Yeasts vol. 2 (ROSE, A. H. and HARRISON, J. S. ed.), Academic Press, London, pp. 441~491, 1971

STUDIES ON THE MODE OF ANTIFUNGAL ACTION OF BIFONAZOLE

HIDEYO YAMAGUCHI and TAMIO HIRATANI

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

To clarify the mode of antifungal action of bifonazole, a new imidazole antimycotic, the effects of this drug on lipid metabolism, cell membrane function, etc. were examined using relatively low sensitive *Candida albicans* TIMM 0144 (minimum inhibitory concentration 10 $\mu\text{g/ml}$) and highly sensitive *C. pseudotropicalis* TIMM 0301 (minimum inhibitory concentration 0.2 $\mu\text{g/ml}$) as the test organisms.

Bifonazole caused a selective inhibition of synthesis of lipid among several major cellular constituents, and it potently inhibited ergosterol synthesis by blocking C 14-demethylation in the pathway of sterol synthesis at drug concentrations as low as 0.1 $\mu\text{g/ml}$ in cells of each strain. In addition, bifonazole induced release of K^+ and inorganic phosphate from cells of each strain, and elevation of pH value in a cell suspension of each strain at concentrations of $\geq 10 \mu\text{g/ml}$, suggesting that the drug damages the cell membrane function at relatively high concentrations.

BAY n 7133-resistant mutants, which had a reduced ability to synthesize ergosterol, were obtained artificially from both strains of *Candida*, and the sensitivity of mutants and the corresponding wild type to bifonazole were comparatively tested. TIMM 0144 mutants showed almost the same sensitivity as that of the wild type, while the sensitivity of TIMM 0301 mutants was much lower than that of the comparable wild type and the sensitivity level was almost equal to the level of TIMM 0144 wild type.

On the basis of all these results, it is suggested that bifonazole has dualistic modes of antifungal action. That is to say, bifonazole exerts the antifungal activity against low-sensitive strains by mainly damaging the cell membrane. Against highly sensitive strains, on the other hand, bifonazole exerts the antifungal activity by primarily inhibiting ergosterol synthesis at the low drug concentration range, although it may exert the antifungal activity by damaging the cell membrane at the high concentration range.

The extent of inhibition by bifonazole of synthesis of bulk lipids and ergosterol in cells of TIMM 0301 was greater than that in cells of TIMM 0144.