

新規イミダゾール誘導体 oxiconazole nitrate の *in vitro* 抗真菌活性に関する検討

平谷民雄・内田勝久・山口英世
 帝京大学医学部医真菌研究センター

(昭和 59 年 3 月 29 日受付)

新規イミダゾール誘導体 oxiconazole nitrate(OCZ) の *in vitro* 抗真菌活性を主として Sabouraud dextrose agar 上での希釈法により測定した。各種真菌に対する MIC 値は、培地の種類によって異なり、接種菌量の増大および判定までの培養時間の延長により上昇したが、その程度には菌種間および同一菌種内の菌株間でも相違が認められた。一方、培地 pH の影響は比較的軽微であった。これらの環境的要因を考慮して設定した条件下で広い範囲の医学的に重要な真菌に対する OCZ の抗菌活性を clotrimazole(CTZ) および miconazole nitrate(MCZ) を対照薬剤として測定した。

OCZ は広い抗真菌スペクトルを示し、試験したすべての真菌菌株の発育を 10 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で完全に阻止した。OCZ 感受性は、一部の *Candida* を除く酵母状真菌、黒色酵母、*S. schenckii* を除く二形性真菌が最も高く(平均 MIC 値 $< 0.1 \mu\text{g/ml}$)、次いで皮膚糸状菌および真菌性足菌腫原因菌(平均 MIC 値 $0.04 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$)、多くの *Candida* および *Aspergillus* など(平均 MIC 値 $0.1 \sim 4 \mu\text{g/ml}$) の順であり、*Absidia* を除く接合菌が最も低い感受性を示した(平均 MIC 値 $2.5 \sim 6.3 \mu\text{g/ml}$)。OCZ の抗菌活性は、すべておよび大部分の菌株について同一条件下で測定した MCZ および CTZ の抗菌活性をそれぞれ上回っていた。対照イミダゾール剤と比較して OCZ は特に *C. neoformans* に強い抗菌力を示した(平均 MIC $0.049 \mu\text{g/ml}$)。OCZ は種々のグラム陽性球菌および桿菌に対しても比較的強い抗菌活性を示し、*Bacteroides* 発育を阻止した。OCZ の抗菌作用は静菌の傾向が強かったが、20 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では緩慢な殺菌的効果を示した。本剤に対する自然耐性菌は試験した真菌菌株中には見出されず、人工的な耐性誘導も成功しなかった。

Oxiconazole nitrate は、スイス Siegfried AG で合成された Z[-2,4-dichloro-2-(imidazol-1-yl)acetophenone]-O-(2,4-dichlorobenzyl) oxime nitrate の化学式をもつ新しいイミダゾール誘導体である (Fig. 1)¹⁾。POLAK²⁾ はこの化合物の抗菌活性について精力的な検討を行なった結果、試験したすべての病原真菌ならびにアクチノマイセスに対し強い *in vitro* 発育阻止作用を示し、さらに動物における実験的白癬菌感染症および *Candida albicans* や *Histoplasma capsulatum* による全身の感染症に対し有意な治療効果を認めている。

われわれは oxiconazole nitrate が抗真菌剤として真菌症特に表在性真菌症の局所的治療に用いる可能性を期待し、POLAK の *in vitro* 成績を確認するのみならずさらに詳細な情報を得ることを目的として検討を行なった。

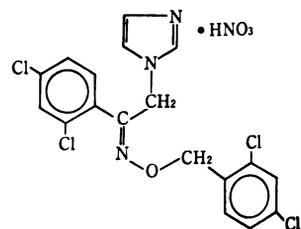
I. 実験材料と方法

薬剤: oxiconazole nitrate (lot no. 009488; 東京田辺製薬株式会社; 以下 OCZ と略), clotrimazole (バイエ

ル薬品株式会社; 以下 CTZ と略) および miconazole nitrate (持田製薬株式会社; 以下 MCZ と略) の各精製原末標品を試験薬剤として用いた。いずれも 100% ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、8 mg/ml に調整して原液として、 -20°C に保存した。

使用菌株: 抗真菌活性の測定には、保存菌株のなかから医学的に重要なものを中心に選んだ 26 属、48 菌種、194 株を使用した。また細菌に対する抗菌試験には、群馬大学医学部薬剤耐性実験施設井上松久博士より分与さ

Fig. 1 Chemical structure of oxiconazole nitrate



れた日本化学療法学会推奨の MIC 測定用標準菌株⁹⁾を含む好気性または通性嫌気性細菌 13 菌種、17 株および岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設上野一恵博士より分与された偏性嫌気性菌 7 菌種各 1 株ずつを使用した。

1) 真菌に対する薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

(i) 接種菌液の調製：酵母状真菌は Sabouraud dextrose broth (SDB) で 30°C, 48 時間振盪培養を行なった。これを同一培地で 20~100 倍希釈した後、さらに 6 時間振盪培養して対数増殖培養を得、特にことわりのない限り約 10^8 細胞/ml の濃度に調整し、接種菌液とした。糸状菌ならびに菌糸形発育を示す二形性真菌については、分生子が豊富に形成されている成熟期の Sabouraud dextrose agar (SDA) 斜面培養 (20~30 日培養) に 3~5 ml の 0.1% (w/v) Tween 80 を含む滅菌生理食塩水を加え、滅菌白金耳を用いて斜面部表面を擦って分生子を遊離させた。得られた分生子懸濁液を滅菌ビレットで回収した後、2 枚重ねの滅菌ガーゼを通して濾過することにより菌糸塊や寒天小片を除去した。濾過液は特にことわりのない限り 10^8 細胞/ml の濃度に調整し、接種菌液として用いた。なお接種菌量の影響を調べる実験においては、酵母状真菌および糸状菌とも 10^4 ~ 10^8 細胞/ml の範囲で種々の濃度の菌液を調製し、接種菌液として用いた。

(ii) 試験培地：抗真菌スペクトル測定その他の実験で特に指示されていない場合には、pH 無修正の SDA を試験培地として用いた。また、培地組成の影響を調べる実験には、SDA に加えて Kimmig agar, yeast morphology agar (Difco) および brain heart infusion agar の 3 種の固形培地を併用した。培地 pH の影響を検討する実験においては、SDA を N-NaOH で pH 4~8 の範囲に修正したものを使用した。

(iii) 試験実施法：われわれが従来から用いていた寒天平板希釈法に準拠して試験を行なった⁴⁾。SDA その他の試験培地に最終濃度 0.04~80 $\mu\text{g/ml}$ の範囲の O CZ または対照薬剤を含む 2 倍希釈系列の平板培地を作製した。薬剤溶液は寒天培地の 1/100 容を添加し、溶媒 (DMSO) の最終濃度が 1% (v/v) になるようにした。上記の方法で調製した接種菌液を標準白金耳により 1 白金耳量 (約 0.003 ml) とり、各平板培地に約 15 mm の長さに画線塗抹して菌接種を行なった。接種平板は直ちに 30°C のふらん器に移し、薬剤無添加の対照平板上でコロニー発育が肉眼的に明瞭に観察できるようになった時点で発育の有無に基づいて判定を行なった。すなわちコロニー発育が肉眼的にまったく認められない平板に含まれる薬剤濃度の最小のものを最小発育阻止濃度

(MIC) と判定した。

2) 細菌に対する薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

好気性ならびに通性嫌気性細菌については、前培養に Mueller-Hinton broth (Difco), 感受性測定用に Mueller-Hinton agar (Difco) をそれぞれ用い、日本化学療法学会による標準法⁹⁾に従って MIC 値を測定した。またこの場合に同一薬剤について 2 組ずつ希釈系列平板をつくり、その両者に菌を接種した後、1 組は通常の好気的条件下 37°C, 2 日間培養して判定を行なったが、他の 1 組については偏性嫌気性菌と条件を揃えるために Gas-Pak jar 内で 37°C, 3 日間嫌気培養を行なって MIC 値を判定した。偏性嫌気性細菌については、前培養に GAM 半流動高層培地 (日水) を、MIC 測定用に GAM agar (日水) および Mueller-Hinton agar (Difco) を用い、基本的には日本化学療法学会の定める方法⁹⁾に準拠して測定を行なった。各薬剤含有平板に前培養から調製した接種菌液 1 白金耳量画線して接種し、Gas-Pak jar 内で 37°C, 3 日間培養した後、MIC 値を判定した。

3) 殺菌作用の測定

Candida albicans TIMM 0144, TIMM 0163, *Torulopsis glabrata* TIMM 1062, TIMM 1064 および *Trichophyton mentagrophytes* TIMM 1177, TIMM 1189, 以上 6 株を試験菌として選んだ。酵母状真菌の 4 株はいずれも SDB 中 37°C で 1 夜振盪した後、これを新鮮培地で約 5×10^8 細胞/ml の濃度に調整した菌液をつくり、0.31, 1.25, 5, 20 および 80 $\mu\text{g/ml}$ になるように薬剤溶液を入れた 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。培養開始後 6 時間目と 24 時間目に各試験管から試料を採取し、常法に従って SDA 平板上で生菌数 (CFU) を測定した⁷⁾。皮膚糸状菌 *T. mentagrophytes* の 2 株については、MIC 測定法の項で述べた方法により採取した分生子を約 10^8 細胞/ml の濃度になるように 0.1% Tween 80 加 SDB に浮遊したものをそのまま (静止分生子)、または 48°C, 10 分間加熱処理した後 27°C, 5 時間インキュベートして発芽させたもの (発芽分生子) をそれぞれ試験菌液とし、薬剤添加後 27°C で振盪培養を行なった。培養開始後 6, 24 および 48 時間目に試料を採取し、酵母状真菌の場合と同様の方法により生菌数測定を行なった。ただし *T. mentagrophytes* の場合にはコロニー発育の観察を 2 週間後まで行なった。

4) 耐性誘導実験

C. albicans TIMM 0144, TIMM 0163 および *T. glabrata* TIMM 1062, TIMM 1064, 以上 4 株の酵母状

真菌株を試験菌として用いた。各料の SDB 培養 (10⁷ 細胞/ml) の 1 白金耳量を OCZ 0.01~80 µg/ml を含有する SDA 平板に接種し、7 日間、27°C で培養を行なった。発育をみた最大濃度薬剤平板から菌を採取し、約 10⁷ 細胞/ml の菌液をつくり、同じ薬剤濃度系列の SDA 平板に接種、培養した。この継代培養を約 15 代行なった。

II. 実験結果

1. Oxiconazole nitrate の *in vitro* 抗菌活性測定値に影響を及ぼす諸要因の検討

一般にイミダゾール剤の *in vitro* 抗菌作用は、試験菌の生理学的要因に加えて、環境的要因に大きく左右され、MIC 値の確定が困難だとされている^{8,9)}。これらの要因のなかで特に培地組成、培地 pH、接種菌量および判定までの培養時間が各種真菌に対する OCZ の MIC 値にどのような影響を及ぼすかを検討した。

Table 1 は、*C. albicans*, *T. glabrata* および *T. men-*

tagrophytes 各 2 株に対する OCZ の発育阻止作用を寒天希釈法によって測定した場合に、4 種の異なる固形培地が MIC 値に及ぼす影響を検討した実験の成績である。“実験材料と方法”で述べたように、まったくコロニー発育を認めない最小薬剤濃度を MIC 値と判定した値が表の数値であるが、*C. albicans* および *T. mentagrophytes* の菌株においては、表示 MIC 値の 1/4~1/16 低い濃度域まで部分的な発育阻止がみられた。各菌株の発育速度は、培地の種類によって異なっていたが、いずれにおいても培地日数とともに発育が進むにつれて各 MIC 値は上昇する傾向を示した。また、培地が異なれば、一定培養時点の特定株に対する MIC 値ならびに培養時期に依存する MIC 値の上昇の程度はいずれも異なってくるが、この相違は同一菌種の株間にも認められる。試験した 4 種の培地の間で大部分の株についてはさほど大きな MIC 値の相違はみられなかったが、*T. glabrata* の 1 株 (TIMM 1064) で Kimmig agar (KA) と

Table 1 The inhibitory activity of oxiconazole nitrate determined on several different solid media after incubation for different periods of time.

Strain	Period of incubation(day)	Minimum inhibitory concentration(µg/ml) determined on:			
		SDA	KA	YMA	BHIA**
<i>Candida albicans</i> TIMM 0144	1	0.04	0.08	0.04	0.08
	2	0.63	5	5	2.5
	5	2.5	5	10	10
	10	5	5	20	10
<i>Candida albicans</i> TIMM 0163	1	2.5	0.16	5	0.08
	2	5	20	10	10
	5	10	40	20	10
	10	20	80	20	40
<i>Torulopsis glabrata</i> TIMM 1062	1	0.04	—*	0.04	—
	2	0.04	0.08	0.04	0.04
	5	0.04	0.08	0.04	0.04
	10	0.04	0.08	0.04	0.04
<i>Torulopsis glabrata</i> TIMM 1064	1	0.04	5	0.04	0.04
	2	0.04	80<	0.08	40
	5	0.16	80<	0.16	40
	10	0.16	80<	0.31	80<
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> TIMM 1177	3	0.04	0.04	—	—
	5	0.63	1.25	0.16	0.16
	7	0.63	2.5	0.63	0.63
	10	1.25	2.5	1.25	1.25
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> TIMM 1189	3	0.04	0.04	—	—
	5	0.63	0.63	0.04	0.08
	7	0.63	2.5	0.31	0.31
	10	1.25	2.5	0.63	0.63

* No visible growth on drug-free control plates.

** SDA, Sabouraud dextrose agar; KA, Kimmig agar; YMA, yeast morphology agar; and BHIA, brain heart infusion agar.

Table 2 The inhibitory activity of oxiconazole nitrate determined on Sabouraud dextrose agar with different pH values.

Strain	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)* on the medium adjusted to a pH value of:				
	4	5	6	7	8
<i>Candida albicans</i> TIMM 0144	1.25	1.25	0.63	0.63	2.5
<i>Candida albicans</i> TIMM 0163	2.5	5	5	10	10
<i>Torulopsis glabrata</i> TIMM 1062	0.16	0.04	0.04	0.04	0.04
<i>Torulopsis glabrata</i> TIMM 1064	0.31	0.16	0.16	0.16	0.16
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> TIMM 1177	0.63	0.63	0.63	1.25	2.5
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> TIMM 1189	0.63	0.63	0.63	1.25	1.25

* MIC values were read after 2 days (for *Candida* and *Torulopsis*) or 5 days (for *Trichophyton*).

Table 3 The inhibitory activity of oxiconazole nitrate determined on Sabouraud dextrose agar by an agar dilution method employing different inoculum sizes and periods of incubation.

Strain	Period of incubation (day)	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$) determined with an inoculum size (no. of organisms/ml) of:				
		10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
<i>Candida albicans</i> TIMM 0144	1	0.04	0.04	0.63	10	80<
	2	0.31	0.63	1.25	10	80<
	5	2.5	2.5	2.5	10	80<
	10	5	5	5	20	80<
<i>Candida albicans</i> TIMM 0163	1	1.25	2.5	10	10	80<
	2	5	5	10	20	80<
	5	10	10	40	80	80<
	10	10	20	40	80	80<
<i>Torulopsis glabrata</i> TIMM 1062	1	—*	0.04	0.04	0.04	0.04
	2	—	0.04	0.04	0.04	0.04
	5	0.04	0.04	0.04	0.04	0.16
	10	0.04	0.04	0.04	0.04	0.16
<i>Torulopsis glabrata</i> TIMM 1064	1	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
	2	0.04	0.04	0.04	0.08	0.08
	5	0.08	0.16	0.16	0.16	0.31
	10	0.08	0.16	0.16	0.31	0.63
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> TIMM 1177	3	—	0.04	0.04	0.16	0.31
	5	0.31	0.63	0.63	0.63	1.25
	7	0.63	0.63	1.25	1.25	1.25
	10	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> TIMM 1189	3	—	—	0.04	0.08	0.31
	5	0.16	0.31	0.63	1.25	1.25
	7	0.16	1.25	1.25	1.25	2.5
	10	0.16	1.25	1.25	1.25	2.5

* No visible growth on drug-free control plates.

Table 4 Antifungal activities of oxiconazole nitrate, miconazole nitrate and clotrimazole against medically important yeasts as determined by agar dilution

Organism	Number of strain tested	Antifungal	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₅₀ ^{a)} ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₉₀ ^{b)} ($\mu\text{g/ml}$)	Geometric mean MIC ^{c)} ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Candida albicans</i>	14	OCZ	<0.04~10	1.25	10	0.725
		MCZ	<0.04~5	1.25	5	0.762
		CTZ	<0.04~5	0.63	2.5	0.539
<i>C. tropicalis</i>	6	OCZ	0.63~10	2.5	10	3.150
		MCZ	1.25~5	2.5	5	2.806
		CTZ	0.31~2.5	1.25	2.5	1.250
<i>C. pseudotropicalis</i>	5	OCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		MCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		CTZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
<i>C. krusei</i>	4	OCZ	0.08~0.31	0.16	0.31	0.186
		MCZ	0.31~1.25	0.63	1.25	0.743
		CTZ	0.08~0.31	0.16	0.31	0.186
<i>C. parapsilosis</i>	3	OCZ	0.16~0.63	0.31	0.63	0.313
		MCZ	0.63~1.25	1.25	1.25	0.992
		CTZ	<0.04~0.16	0.16	0.16	0.098
<i>C. stellatoidea</i>	2	OCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		MCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		CTZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
<i>C. guilliermondii</i>	3	OCZ	0.08~0.31	0.08	0.31	0.124
		MCZ	0.16~1.25	0.16	1.25	0.317
		CTZ	<0.04~0.63	0.08	0.63	0.124
<i>Torulopsis glabrata</i>	8	OCZ	<0.04~0.16	0.16	0.16	0.110
		MCZ	<0.04~0.63	0.31	0.63	0.313
		CTZ	<0.04~5	2.5	5	2.102
<i>Cryptococcus neoformans</i>	12	OCZ	<0.04~0.16	<0.04	0.08	0.049
		MCZ	<0.04~1.25	0.31	0.63	0.331
		CTZ	<0.04~10	1.25	5	1.250
<i>Trichosporon capitatum</i>	2	OCZ	<0.04~0.08	<0.04	0.08	0.055
		MCZ	0.31	0.31	0.31	0.313
		CTZ	<0.04~0.08	<0.04	0.08	0.055
<i>T. cutaneum</i>	2	OCZ	<0.04~0.08	<0.04	0.08	0.055
		MCZ	<0.04~0.08	<0.04	0.08	0.055
		CTZ	<0.04~0.08	<0.04	0.08	0.055
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	OCZ	\leq 0.04	<0.04	<0.04	0.039
		MCZ	0.08~0.16	0.16	0.16	0.124
		CTZ	0.08~1.25	0.16	1.25	0.248
<i>Rhodotorula rubra</i>	2	OCZ	\leq 0.04	<0.04	<0.04	0.039
		MCZ	\leq 0.04	<0.04	<0.04	0.039
		CTZ	\leq 0.04	<0.04	<0.04	0.039

MIC values for *Candida* except *C. pseudotropicalis* were read after 2 days and those for other yeasts after 4 days.

Antifungal: OCZ, oxiconazole nitrate; MCZ, miconazole nitrate; and CTZ, clotrimazole.

^{a)} MIC ($\mu\text{g/ml}$) required to inhibit 50% of strains tested.

^{b)} MIC ($\mu\text{g/ml}$) required to inhibit 90% of strains tested.

^{c)} Values of <0.04 treated as 0.04.

brain heart infusion agar (BHIA) では他の 2 つの培地すなわち Sabouraud dextrose agar (SDA) と yeast morphology agar (YMA) に比べて極端に高い値を示した。また SDA と YMA を比較すると、YMA の方が幾分低い MIC 値を与える傾向がみられるものの、この培地上では全般的に真菌発育が不十分であり、なかにはほ

とんど発育しない皮膚糸状菌株もかなりの頻度で見出された。以上の点を考慮した結果、広範囲の真菌に対する OCZ の *in vitro* 抗菌活性を評価する上で SDA が適切であると判断された。

pH 無修正の SDA は約 5.6 の pH 値を示すが、次に真菌発育が充分起こる 4~8 の pH 域内で pH の変動

Table 5 Antifungal activities of oxiconazole nitrate, miconazole nitrate and clotrimazole against opportunistic fungal pathogens as determined by agar dilution

Organism	Number of strain tested	Antifungal	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₅₀ ^{a)} ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₉₀ ^{b)} ($\mu\text{g/ml}$)	Geometric mean MIC ^{c)} ($\mu\text{g/ml}$)
Aspergilli and penicillia:						
<i>Aspergillus fumigatus</i>	7	OCZ	2.5~5	5	5	4.102
		MCZ	2.5~5	5	5	4.102
		CTZ	1.25	1.25	1.25	1.250
<i>A. flavus</i>	3	OCZ	1.25~5	1.25	5	1.984
		MCZ	1.25~5	1.25	5	1.984
		CTZ	0.63~1.25	0.63	1.25	0.787
<i>A. niger</i>	3	OCZ	0.63~1.25	1.25	1.25	0.992
		MCZ	1.25	1.25	1.25	1.250
		CTZ	1.25	1.25	1.25	1.250
<i>A. nidulans</i>	2	OCZ	0.31	0.31	0.31	0.313
		MCZ	1.25~5	1.25	5	2.500
		CTZ	0.16~0.63	0.16	0.63	0.313
<i>Penicillium notatum</i>	2	OCZ	0.63	0.63	0.63	0.625
		MCZ	0.63~1.25	0.63	1.25	0.884
		CTZ	1.25~2.5	1.25	2.5	1.768
Zygomycetes:						
<i>Mucor</i> spp.	3	OCZ	5~10	5	10	6.300
		MCZ	5~10	10	10	7.937
		CTZ	0.31~0.63	0.63	0.63	0.496
<i>Rhizopus oryzae</i>	1	OCZ	5	5	5	5
		MCZ	10	10	10	10
		CTZ	10	10	10	10
<i>R. nigricans</i>	1	OCZ	2.5	2.5	2.5	2.5
		MCZ	10	10	10	10
		CTZ	10	10	10	10
<i>R. equinus</i>	2	OCZ	2.5~5	2.5	5	3.535
		MCZ	10	10	10	10
		CTZ	10	10	10	10
<i>Absidia lichtheimi</i>	2	OCZ	<0.04~0.63	0.04	0.63	0.156
		MCZ	5~10	5	10	7.071
		CTZ	0.16~0.31	0.16	0.31	0.221

All MIC values were read after 3 days.

Antifungal: OCZ, oxiconazole nitrate, MCZ, miconazole nitrate; and CTZ, clotrimazole.

^{a)} MIC($\mu\text{g/ml}$) required to inhibit 50% of strains tested.

^{b)} MIC($\mu\text{g/ml}$) required to inhibit 90% of strains tested.

^{c)} Values of <0.04 treated as 0.04.

により MIC 値がどのような影響を受けるかを検討した。Table 2 の成績から明らかのように、その影響は比較的軽微であり、菌種または株間でも若干異なっていたが、全般的には 5~7 の範囲で比較的低い MIC 値が得られた。したがって OCZ に関しては、pH 無修正の SDA が充分使用に耐えることが知られた。

Table 3 は接種菌量および判定までの培養日数が MIC 値に及ぼす影響を示している。接種菌量 $10^8 \sim 10^9$ 細胞/ml の範囲で、*T. mentagrophytes* に対する MIC 値は比較的安定しているのに対し、*C. albicans* においては 10^8 細胞/ml から 10^7 細胞/ml に接種菌量が増大すると明らかに MIC 値の上昇が認められ、 10^8 細胞/ml になるとこの傾向はさらに顕著となった。*C. albicans* の場合よりも軽度ながら *T. glabrata* においても同様の接種菌量効果が認められた。また、発育が不十分な期間、すなわち *C. albicans* や *T. glabrata* では接種後 2 日以内、*T. mentagrophytes* では 7 日以内の時期には培養日数とともに MIC 値の上昇が認められたのは当然としても、特に *C. albicans* においてはその後も依然として MIC 値の上昇傾向が続き、しかも上昇の程度は接種菌量が小さいほど顕著であった。以上の成績から OCZ に関して、他のイミダゾール剤と同様に、過大にならない程度の接種菌量でしかも充分な発育が認められる最小培養期間内で判定を行なう場合に、低い MIC 値が得られることが知られた。

2. Oxiconazole nitrate の抗真菌スペクトル

上述の成績を考慮して設定した実験条件に基づき、広範囲の医学的に重要な真菌菌種に対する OCZ の抗菌活性について、既存のイミダゾール系抗真菌剤 clotrimazole (CTZ) および miconazole nitrate (MCZ) を対照薬として比較測定した。

表在性真菌症ならびに深在性真菌症の主要原因菌を含む酵母状真菌 6 属 13 菌種 66 株に対する各薬剤の MIC 値を Table 4 に示す。*Candida* 7 菌種のなかで最も広い感受性分布を示したのは *C. albicans* であり、OCZ に対しては $\leq 0.04 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ 、CTZ と MCZ に対しては $\leq 0.04 \sim 5 \mu\text{g/ml}$ の範囲に分散した。平均 MIC 値で比較すると、最も高い OCZ 感受性を示したのは *C. pseudotropicalis* と *C. stellatoidea* であり ($0.039 \mu\text{g/ml}$)、これに対して *C. tropicalis* は最も低い感受性 ($3.150 \mu\text{g/ml}$) を示した。他の 2 剤についても OCZ と同様の感受性パターンが認められた。*C. albicans* に対する OCZ の平均 MIC 値は $0.725 \mu\text{g/ml}$ であり、CTZ および MCZ もこれとほぼ同等の値を示した。全般的にみて、*Candida* 菌種に対する OCZ の抗菌活性は CTZ とほぼ同等かまたは幾分低く、MCZ よりは高いことが

知られた。*C. albicans*、*C. tropicalis* などの比較的感受性の低い菌株においては、各薬剤とも MIC 値の $1/2 \sim 1/16$ の濃度範囲で部分的な発育阻止効果を示した。

Candida 以外の酵母状真菌活性について薬剤間で比較すると、MCZ は CTZ よりも高かったが、OCZ はそれ以上に優れており、*T. glabrata*、*C. neoformans*、*Trichosporon* などその他の菌種に対する平均 MIC 値は、それぞれ $0.110 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.049 \mu\text{g/ml}$ および $0.039 \sim 0.055 \mu\text{g/ml}$ と著しく低く、特に前二者の値は対応する CTZ の値の $1/10$ 以下であった。

Table 5 は、通性感染症の落下的原因菌である糸状菌 10 菌種 26 株の薬剤感受性を示す。*Aspergillus* および *Penicillium* に属する菌種に対する OCZ の MIC 値は $0.31 \sim 5 \mu\text{g/ml}$ という比較的狭い範囲にまとまり、他の 2 剤と比べて大差ない抗菌活性を示した。一方、接合菌に属する菌種の OCZ 感受性は低値 ($0.156 \mu\text{g/ml}$) を示す *Absidia* 菌種を除いてすべて $2.5 \sim 6.3 \mu\text{g/ml}$ の範囲であり、試験した全真菌群中で最も高い平均 MIC 値であった。この OCZ の抗菌活性は接合菌全菌について MCZ のそれよりも高く、*Mucor* を除けば CTZ よりも勝っていた。これらの多くの菌株では MIC 値の $1/2 \sim 1/8$ の範囲で明らかな部分的発育阻止が認められた。

皮下真菌症原因菌に対する 3 剤の抗菌活性を Table 6 にまとめる。OCZ 感受性は *S. schenckii* が最も低く、9 株の平均 MIC 値は $0.729 \mu\text{g/ml}$ であった。しかし、この値は MCZ および CTZ の対応する値のそれぞれ $1/3$ および $1/30$ に過ぎず、従来よりイミダゾール剤に感受性が比較的低いといわれた本菌に対して OCZ は優れた抗菌力を示した。クロモミコーンスの原因となる黒色酵母 6 菌種 (25 株) に対する OCZ の平均 MIC 値はすべて $0.1 \mu\text{g/ml}$ 以下であり極めて強い阻止活性を示した。この OCZ の活性は MCZ、CTZ のいずれよりも強いものであった。真菌性足菌腫の原因菌 5 菌種 (13 株) に対する抗菌活性も 3 剤のなかで OCZ が最も強く、平均 MIC 値は $0.039 \sim 0.496 \mu\text{g/ml}$ の範囲に入った。

Table 7 に示されるように、深在性真菌症の原因となる二形性真菌 5 菌種 (17 株) はいずれも OCZ に対し高度感受性であり、平均 MIC 値の分布範囲は $0.039 \sim 0.156 \mu\text{g/ml}$ と低値を示した。OCZ に比べて、MCZ および CTZ に対する感受性は幾分低かった。

Table 8 は、主要な皮膚糸状菌症原因菌である *Trichophyton* 4 菌種 (20 株)、*Microsporium* 3 菌種 (13 株) および *Epidermophyton* 1 菌種 (5 株) に対する OCZ と対照 2 剤の抗菌活性を示す。いずれの菌種も 3 剤に対し高い感受性を示し、平均 MIC 値はすべて $0.039 \sim 0.625 \mu\text{g/ml}$ の範囲内であった。さらに詳細に比

Table 6 Antifungal activities of oxiconazole nitrate, miconazole nitrate and clotrimazole against fungal pathogens causing subcutaneous mycoses as determined by agar dilution

Organism	Number of strain tested	Antifungal	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₅₀ ^{a)} ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₉₀ ^{b)} ($\mu\text{g/ml}$)	Geometric mean MIC ^{c)} ($\mu\text{g/ml}$)
Dimorphic fungus:						
<i>Sporothrix schenckii</i>	9	OCZ	0.16~1.25	0.63	1.25	0.729
		MCZ	1.25~2.5	2.5	2.5	2.315
		CTZ	10~>80	10	80	21.602
Dematiaceous fungi:						
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	6	OCZ	<0.04~0.08	<0.04	0.08	0.044
		MCZ	0.08~0.31	0.16	0.31	0.175
		CTZ	<0.04~0.63	0.63	0.63	0.278
<i>F. compactum</i>	3	OCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		MCZ	<0.04~0.31	0.31	0.31	0.156
		CTZ	<0.04~0.31	0.31	0.31	0.156
<i>Phialophora verrucosa</i>	6	OCZ	<0.04~0.16	<0.04	0.16	0.062
		MCZ	<0.04~1.25	0.16	1.25	0.197
		CTZ	<0.04~2.5	0.63	2.5	0.351
<i>P. dermatitidis</i>	6	OCZ	<0.04~0.16	0.08	0.16	0.088
		MCZ	<0.04~0.63	0.31	0.63	0.278
		CTZ	<0.04~2.5	1.25	2.5	0.992
<i>Cladosporium bantianum</i>	2	OCZ	0.08	0.08	0.08	0.078
		MCZ	0.63	0.63	0.63	0.625
		CTZ	0.08~0.16	0.08	0.16	0.110
<i>C. carrionii</i>	2	OCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		MCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		CTZ	0.16	0.16	0.16	0.156
Mycetoma-causing fungi:						
<i>Madurella grisea</i>	2	OCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		MCZ	0.16	0.16	0.16	0.156
		CTZ	0.31~0.63	0.31	0.63	0.552
<i>M. mycetomatis</i>	2	OCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		MCZ	0.08~0.16	0.08	0.16	0.110
		CTZ	0.63	0.63	0.63	0.625
<i>Petriellidium boydii</i>	4	OCZ	0.16~2.5	0.16	2.5	0.372
		MCZ	0.16~10	0.31	10	0.743
		CTZ	0.16~2.5	0.31	2.5	0.526
<i>Microsporium apiospermum</i>	3	OCZ	0.16~1.25	0.63	1.25	0.496
		MCZ	0.31~1.25	0.63	1.25	0.625
		CTZ	0.63~2.5	1.25	2.5	1.250
<i>Phialophora jeanselmei</i>	2	OCZ	\leq 0.04~0.08	\leq 0.04	0.08	0.055
		MCZ	0.16	0.16	0.16	0.156
		CTZ	0.63~1.25	0.63	1.25	0.884

MIC values were read after 3 days (for *S. schenckii*), 4 days (for mycetoma-causing fungi except *P. jeanselmei*), or 7 days (for other fungi).

Antifungal: OCZ, oxiconazole nitrate; MCZ, miconazole nitrate; and CTZ, clotrimazole.

^{a)} MIC ($\mu\text{g/ml}$) required to inhibit 50% of strains tested.

^{b)} MIC ($\mu\text{g/ml}$) required to inhibit 90% of strains tested.

^{c)} Values of <0.04 treated as 0.04.

Table 7 Antifungal activities of oxiconazole nitrate, miconazole nitrate and clotrimazole against dimorphic fungal pathogens causing deep-seated mycoses as determined by agar dilution

Organism	Number of strain tested	Antifungal	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₅₀ ^{a)} ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₉₀ ^{b)} ($\mu\text{g/ml}$)	Geometric mean MIC ^{c)} ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Histoplasma capsulatum</i>	6	OCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		MCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		CTZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
<i>H. duboisii</i>	2	OCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		MCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		CTZ	0.08	0.08	0.08	0.078
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	4	OCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		MCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		CTZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	2	OCZ	0.08~0.16	0.08	0.16	0.110
		MCZ	2.5~10	2.5	10	5.000
		CTZ	0.31	0.31	0.31	0.313
<i>Geotrichum candidum</i>	3	OCZ	<0.04~0.31	0.31	0.31	0.159
		MCZ	0.63~1.25	0.63	1.25	0.787
		CTZ	0.31~2.5	2.5	2.5	1.250

All MIC values were read after 7 days.

Antifungal: OCZ, oxiconazole nitrate; MCZ, miconazole nitrate; and CTZ, clotrimazole.

^{a)} MIC ($\mu\text{g/ml}$) required to inhibit 50% of strains tested.

^{b)} MIC ($\mu\text{g/ml}$) required to inhibit 90% of strains tested.

^{c)} Values of <0.04 treated as 0.04.

較すると、OCZ の抗菌活性は MCZ よりは僅かながら強く、CTZ と同等または幾分弱い傾向がみられたが、有意な差とは確定できなかった。比較的感受性の低い菌株の大部分は各薬剤に対して MIC 値の 1/2~1/16 低い濃度まで部分的に発育が抑制された。

3. Oxiconazole nitrate の抗細菌作用

Table 9 は、好気性または通性嫌気性の標準的細菌菌種に対するイミダゾール系薬剤 3 剤の抗菌活性を寒天希釈法により測定した成績を示す。いずれの薬剤に対しても球菌、桿菌の別なくグラム陽性菌のみが感受性を示し、グラム陰性菌はすべて非感受性であった。グラム陽性菌に対する OCZ の MIC 値は、0.20 $\mu\text{g/ml}$ という高度感受性の *M. luteus* を除けばすべて 3.13~6.25 $\mu\text{g/ml}$ の狭い範囲に集中した。薬剤間の抗菌力の強さは MCZ>OCZ>CTZ の順であった。また、通性嫌気性菌については嫌気的条件下でも測定を行なったが、好気的条件下と基本的に変らない MIC 値が得られ、酸素分圧による影響を受けないことが示唆された。

Table 10 に示されるように、*Bacteroides*, *Peptococcus*, *Clostridium* 各属の偏性嫌気性菌は、いずれもイミダゾール剤感受性であった。OCZ の MIC 値は、接種菌量 10^6 細胞/ml を用いて GAM 培地上で測定した場合には 3.13~50 $\mu\text{g/ml}$ の範囲であり、さほど強いもので

はなかった。明らかな接種菌量効果が認められ、接種菌量を 10^8 細胞/ml へ増量すると、MIC 値は 2~16 倍上昇した。GAM 培地に比べて発育支持力の弱い M-H 培地を使用した場合には MIC 値は 1/8 以下に低下した。偏性嫌気性菌に対する抗菌活性は 3 剤のなかで MCZ が最も強く、OCZ は CTZ よりもさらに弱いようであった。

4. Oxiconazole nitrate の殺菌作用

上述の成績から OCZ が広範囲の病原真菌に対して強い抗菌活性を示すことが明らかになった。この抗菌活性が主として静菌作用に基づくものかそれとも殺菌作用によるものかを検討するために、液体培養の生菌数が時間とともに薬剤によってどのように変動するかを追跡した。

Fig. 2 は、*C. albicans* および *T. glabrata* 各 2 株の栄養形細胞を種々の OCZ 濃度下で SDB に浮遊し、振盪培養開始後、6 時間目と 24 時間目に採取した培養の生菌数の増減を示す。*C. albicans* では 2 株とも 80 $\mu\text{g/ml}$ までまったく殺菌的效果は認められなかった。これに対して、*T. glabrata* においては 20 $\mu\text{g/ml}$ 以上の OCZ 存在下で 6 時間目から、また 0.31~1.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の薬剤濃度下では 24 時間目に生菌数の減少が認められた。この殺菌作用は薬剤濃度および培養時間とともに顕著と

Table 8 Antifungal activities of oxiconazole nitrate, miconazole nitrate and clotrimazole against dermatophytic fungi as determined by agar dilution

Organism	Number of strain tested	Antifungal	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₅₀ ^{a)} ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₉₀ ^{b)} ($\mu\text{g/ml}$)	Geometric mean MIC ^{c)} ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	10	OCZ	0.08~0.31	0.31	0.31	0.237
		MCZ	0.16~1.25	0.31	1.25	0.442
		CTZ	<0.04~0.31	0.16	0.31	0.118
<i>T. rubrum</i>	6	OCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		MCZ	<0.04~0.16	0.16	0.16	0.098
		CTZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
<i>T. tonsurans</i>	2	OCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		MCZ	<0.04~0.08	<0.04	0.08	0.055
		CTZ	0.08~0.16	0.08	0.16	0.110
<i>T. violaceum</i>	2	OCZ	0.31~0.63	0.31	0.63	0.442
		MCZ	0.63	0.63	0.63	0.625
		CTZ	0.31~0.63	0.31	0.63	0.442
<i>Microsporum audouinii</i>	3	OCZ	0.08~0.63	0.08	0.63	0.156
		MCZ	<0.04~1.25	0.08	1.25	0.156
		CTZ	<0.04~0.16	0.08	0.16	0.078
<i>M. gypsum</i>	6	OCZ	0.16~0.63	0.63	0.63	0.496
		MCZ	0.63	0.63	0.63	0.625
		CTZ	0.16	0.16	0.16	0.156
<i>M. canis</i>	4	OCZ	<0.04~0.31	<0.04	0.31	0.066
		MCZ	<0.04~0.63	<0.04	0.63	0.078
		CTZ	<0.04~0.16	<0.04	0.16	0.055
<i>Epidermophyton floccosum</i>	5	OCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		MCZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039
		CTZ	<0.04	<0.04	<0.04	0.039

All MIC values were read after 4 days.

Antifungal: OCZ, oxiconazole nitrate; MCZ, miconazole nitrate; and CTZ, clotrimazole.

^{a)} MIC($\mu\text{g/ml}$) required to inhibit 50% of strains tested.

^{b)} MIC($\mu\text{g/ml}$) required to inhibit 90% of strains tested.

^{c)} Values of <0.04 treated as 0.04.

なり、80 $\mu\text{g/ml}$ の OCZ は 24 時間後に接種細胞の 99% 以上を殺菌した。

Fig. 3A は、*T. mentagrophytes* 2 株についてそれぞれの分生子を種々の濃度で OCZ を含有する SDB に懸濁して培養し、6、24 および 48 時間後に生菌数がどのように変動するかを示したものである。2 株の間で多少の相違はみられるものの、0.31 $\mu\text{g/ml}$ でも 24 時間以後生菌数の減少傾向がみられ、20 $\mu\text{g/ml}$ 以上の薬剤濃度下では 6~48 時間以後 95~99% 以上の細胞が殺菌された。一方、発芽させた分生子を用いて同様の実験を行なったが、OCZ の殺菌の効力に大きな相違は認められなかった (Fig. 3B)。

5. Oxiconazole nitrate 耐性の誘導

C. albicans および *T. glabrata* 各 2 株を用い、種々の

濃度の OCZ を含む SDA 斜面に継代培養をくり返し、多段階的に OCZ 耐性を誘導し、耐性菌の選択分離を試みた。しかし、いずれの株においても 15 代継代培養した後の MIC 値は初代培養開始前のそれとほとんど変わらず、まれに分離される 4~8 倍 MIC 値の上昇したコロニーも、その耐性が維持できず、次の継代培養後はもとの低い MIC 値に戻っていた。

III. 考 察

従来、開発されたすべてのイミダゾール剤の *in vitro* 抗菌活性は、感受性試験の方法論に依存して大きく変わることが多くの研究者によって報告されてきた。MCZ などのイミダゾール剤について詳細に検討を加えた HOEPRICH および彼の共同研究者は、複合培地に比べて合成培地のほうで抗菌活性がより強く発現されることを

Table 9 Antibacterial activities of oxiconazole nitrate, clotrimazole and miconazole nitrate against aerobic and facultative anaerobic bacteria as measured by agar dilution on Mueller-Hinton agar

Strain tested	M I C ($\mu\text{g/ml}$)					
	OCZ		CTZ		MCZ	
	Aerob*	Anaerob*	Aerob*	Anaerob*	Aerob*	Anaerob*
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	3.13	3.13	6.25	3.13	1.56	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> TIRAJIMA	3.13	3.13	6.25	3.13	1.56	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> MS 353	3.13	1.56	6.25	3.13	1.56	1.56
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6.25	3.13	6.25	3.13	3.13	1.56
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12226	6.25	6.25	6.25	3.13	1.56	3.13
<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	3.13	6.25	6.25	3.13	1.56	3.13
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	6.25	6.25	6.25	3.13	1.59	3.13
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0.20	(-)	0.39	(-)	0.39	(-)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	3.13	(-)	6.25	(-)	1.56	(-)
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445	>100	(-)	>100	(-)	>100	(-)
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI 602	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Salmonella typhimurium</i> IID 971	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>S. typhi</i> 901	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Serratia marcescens</i> IAM 1184	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	>100	>100	>100	>100	>100	>100

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

*: Aerob., tested under aerobic conditions; Anaerob., tested under anaerobic conditions.

Antifungal: OCZ, oxiconazole nitrate; MCZ, miconazole nitrate; and CTZ, clotrimazole.

Table 10 Antibacterial activities of oxiconazole nitrate, clotrimazole and miconazole nitrate against anaerobic bacteria as measured by agar dilution on GAM agar and Mueller-Hinton(M-H) agar

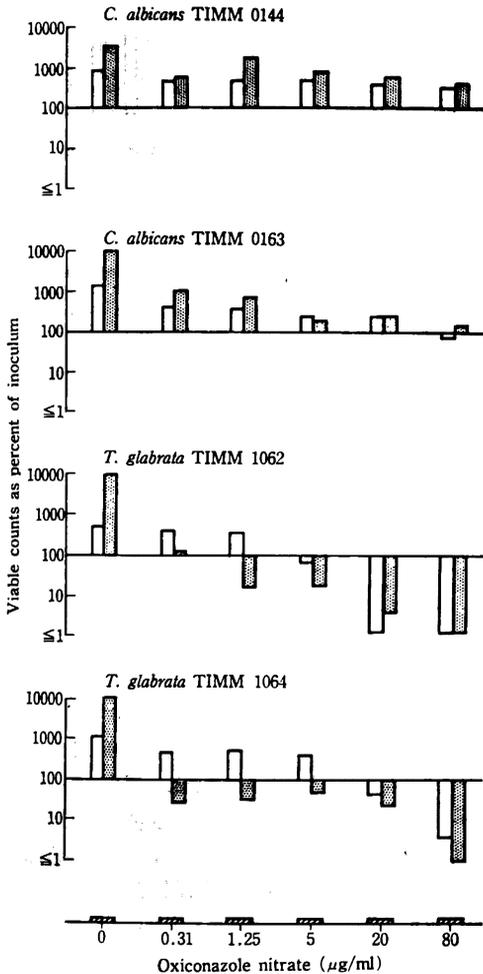
Strain tested	Inoculum size*	M I C ($\mu\text{g/ml}$)					
		OCZ		CTZ		MCZ	
		GAM	M-H	GAM	M-H	GA	M-H
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	10 ⁶	50	(-)	12.5	(-)	12.5	(-)
	10 ⁸	50	6.25	12.5	3.13	12.5	3.13
<i>B. vulgatus</i> GAI-0672	10 ⁶	25	(-)	12.5	(-)	12.5	(-)
	10 ⁸	50	6.25	12.5	1.56	25	3.13
<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI-0560	10 ⁶	25	(-)	25	(-)	12.5	(-)
	10 ⁸	25	6.25	25	3.13	25	3.13
<i>B. thetaiotaomicron</i> GAI-0661	10 ⁶	25	(-)	25	(-)	12.5	(-)
	10 ⁸	50	6.25	25	3.13	25	3.13
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i> GAI-6651	10 ⁶	12.5	(-)	3.13	(-)	1.56	(-)
	10 ⁸	50	1.56	6.25	1.56	3.13	0.39
<i>P. magnus</i> ATCC 29328	10 ⁶	3.13	(-)	3.13	(-)	1.56	(-)
	10 ⁸	12.5	0.78	6.25	1.56	3.13	0.78
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13123	10 ⁶	6.25	(-)	3.13	(-)	1.56	(-)
	10 ⁸	100	0.78	12.5	1.56	6.13	0.39

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

*: Number of organisms/ml

Antifungal: OCZ, oxiconazole nitrate; MCZ, miconazole nitrate; and CTZ, clotrimazole.

Fig. 2 Effect of oxiconazole nitrate on growth of cultures in Sabouraud dextrose broth inoculated with approximately 5×10^5 CFU per ml of cells of *C. albicans* or *T. glabrata* as measured by viable counts. Cultures were incubated with the indicated concentration of oxiconazole nitrate at 37°C aerobically. Samples were taken from each tube at 6 th (□) and 24 th (▨) hours after the onset of incubation for viable count.



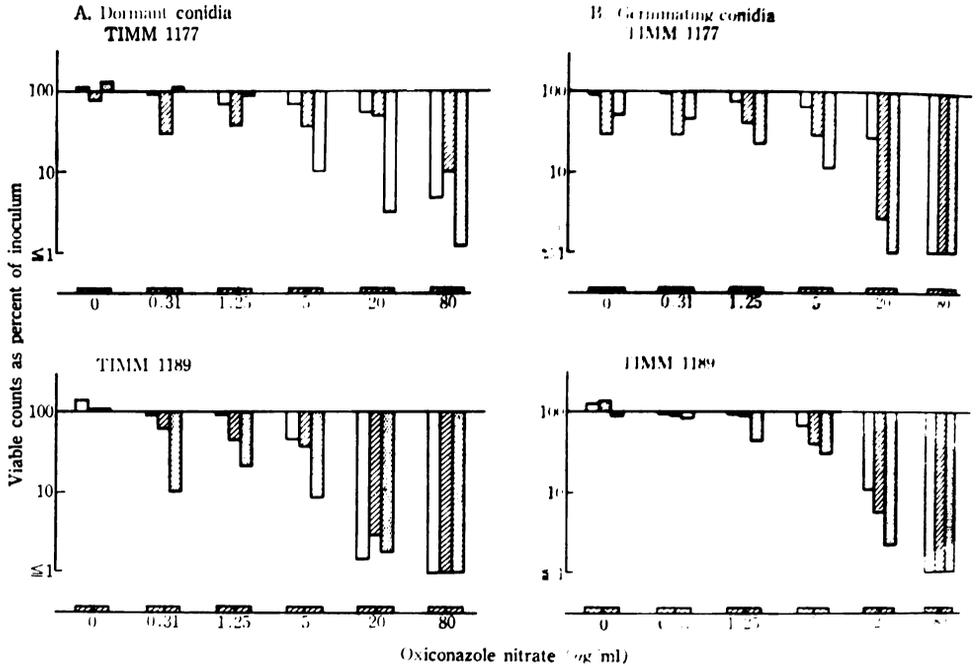
認め、この差は複合培地中に存在する拮抗物質によるものと推論している^{10,11)}。われわれは不飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸残基を含む脂質、またはリポタンパク質がMCZ, CTZなどのイミダゾール剤の抗*Candida*活性を阻害することを見出しており^{12,13)}、こうした拮抗物質を多量に含む培地はイミダゾール剤感受性試験には不適といえよう。HOEPRICHらの成績とは対照的に、SWAMY *et*

*al.*¹⁴⁾はMCZの抗菌活性が合成培地などの栄養的に不足した培地では比較的弱くしか発現されないと報告している。一般に誘導期または対数増殖期にある真菌細胞は静止期細胞に比べてより高いイミダゾール剤感受性を示すことが知られており¹⁵⁻¹⁹⁾、したがって極端に発育を遅らせるような栄養欠乏培地においては感受性が低いままにとどまると考えられる。事実、VAN DEN BOSSCHE *et al.*¹⁵⁾は、臓器または酵母抽出物などの複合栄養素を加えて強化した培地上でMCZの抗*C. albicans*活性が増強されることを認め、真菌発育速度と抗菌作用との間には正の関係が成立すると結論している。また、HOEPRICHらが使用した合成培地は脂質やリポタンパク質などの拮抗物質を含んではいないが、 Mg^{2+} および Ca^{2+} 含量が比較的高い。これらの2価陽イオンがイミダゾール剤の発育阻止作用ならびに殺菌的作用を阻止することはCOPPE²⁰⁾によって示されている。

Mg^{2+} などの陽イオンがMCZの抗菌作用から*C. albicans*細胞を保護する効果をもつことは、陰性荷電をもつ細胞表面成分との結合に関してイミダゾール剤との間で競合が起きる可能性が考えられる。イミダゾール基のpKa値は約6.5であり、中性から弱酸性すなわち真菌発育をゆるすpH域ではイミダゾール剤は正の荷電をもつからである²¹⁾。われわれはリポソーム人工膜モデルを用いた実験成績から、同じ脂質組成でも負の荷電をもつリポソームの方が正に荷電したリポソームよりも有意にイミダゾール剤感受性が高いことを認めている²²⁾。これはイミダゾール分子が正に荷電していることがその抗菌活性に重要な役割を果している可能性を示唆する。

これまでにCTZ, MCZおよびeconazole (ECZ)について得られた成績によれば、培地pH3~8の範囲でこれらの薬剤の感受性真菌に対するMIC値はほとんど変動しない^{8,23,24)}。一方、ketoconazole (KCZ), isoconazole (ICZ), bifonazole (BFZ)などについては中性より高いpH域で抗菌活性が強まることが報告されている²⁵⁻²⁷⁾。COPPE²⁸⁾は*C. albicans*細胞による³H-標識MCZの取り込みを検討し、細胞内へ取り込まれる薬剤量がpH3以上の反応液中ではpHが高くなるほど増加し、pH6ではほぼ飽和されること、また、薬剤と細胞との結合は完全に可逆的であり、これらの細胞を非標識MCZ含有反応液中で再びインキュベートすると、先に取り込まれた³H]MCZはほぼ100%、液中へ放出されることを観察した。彼はこの成績から、MCZが非解離型(中性)のまま細胞壁および細胞膜上の成分と結合すること、しかもこの結合は配位結合やイオン結合ではなく、おそらく壁や膜を構成する脂質との疎水結合であることを推定している。これとよく対応する成績はICZ

Fig. 8 Effect of oxiconazole nitrate on viability of suspensions dormant conidia (A) and germinating conidia (B) prepared from two strains of *T. mentagrophytes*. The suspension from each strain was incubated with the indicated concentration of oxiconazole nitrate at 27°C aerobically. Samples were taken at 6th (□), 24th (▨) and 48th (▩) hours after the onset of incubation for viable count.



についても得られている。西木ら²⁹⁾は、 $[^3\text{H}]$ ICZ の *C. albicans* 細胞への取り込み量が反応液 pH 5~8 の範囲で pH 値の上昇とともに増加することを見出し、これはこの脂溶性弱塩基性化合物が非解離型でより強く親脂性となる結果、細胞膜脂質領域に溶解して膜を透過しやすくなることによるものと推論している。さらに皆川ら²⁵⁾も、培地 pH の上昇に伴う KCZ 抗菌活性の増強が分子内のピペラジン基のプロトン化率の低下と密接に関連することを指摘している。

OCZ に関していえば、CTZ, MCZ, ECZ などと同様に、少なくとも培地 pH が 5~7 の範囲では試験したいずれの菌に対する MIC 値もほとんど変わらず、その限りでは無修正で 5.6 の pH 値をもつ SDA を使用することに特に問題はないと考えられる。しかし、生体組織内の生理学的条件および pH 依存度の高いイミダゾール剤が存在することを考慮するならば、広くイミダゾール剤すべてに適用できる試験法としては pH を中性に修正した培地のほうが好適かもしれない。OCZ の抗菌活性は pH 8 の SDA で若干低下する傾向が認められ、MCZ についても同様の現象が観察されている¹⁹⁾。しか

し、この pH 値は真菌にとって発育可能 pH 域の上限であり、したがって非生理学的条件による影響を受けると考えられる。このように培地 pH がイミダゾール剤の抗菌活性に及ぼす影響は、メカニズムの点でも単純ではなく、また薬剤の化学構造によっても異なることがうかがわれる。しかし、この問題は薬剤の作用機序とも密接に関係するので、今後さらに詳細な検討が望まれる。

OCZ の抗菌活性により強く影響する要因としては、接種菌量および培養時間があげられる。今回の実験成績から、接種菌量の増大および培養時間の延長がすべての菌種で MIC 値をおし上げる方向に働き、この効果は特に *C. albicans* や *T. mentagrophytes* など感受性が中等度またはそれ以下の菌種で顕著であった。同様の効果は、これまで調べられたすべてのイミダゾール剤 CTZ, MCZ, ECZ, KCZ, ICZ, BFZ および tioconazole (TCZ) について報告されている^{10,15,17,24,26,30-33)}。イミダゾール剤が真菌細胞によって代謝されるという証拠はなく、MCZ についての実験成績によれば、細胞内に取り込まれた薬剤はまったく化学的变化を受けることなく細胞外へ放出される¹⁵⁾。一方、培地中に添加した MCZ が生理

学的条件下で *C. albicans* 細胞により大量に取り込まれることが報告されている²⁸⁾。これらの成績から、OCZ を含めて一般にイミダゾール剤が例外なく強い接種菌量効果を受けるのは、接種菌量に反比例して細胞当たり取り込まれる薬剤分子数が低下し、有効な細胞内レベルに達しなくなることに起因すると推論される。

OCZ の *in vitro* 抗菌活性の測定に際して注目されるのは、*C. albicans* その他の *Candida* 菌種、*Aspergillus* 菌種、接合菌、皮膚糸状菌などを含む多数の菌において、MIC 値すなわち完全発育阻止濃度よりも 1/2~1/16 低い濃度の間で不完全または部分的な発育阻止がみられた点である。POLAK²⁾ も同様に OCZ が酵母状真菌に対し液体培地中で MIC 値の 1/3~1/20 の低濃度で 50% 発育阻止を示すことを報告している。このように MIC 値の下に比較的幅広い亜発育阻止濃度 (sub-inhibitory concentration) 域が存在することは、すでに CTZ, MCZ, ECZ, KCZ, TCZ, BFZ において見出されており^{2,21,27,34-38)}、OCZ に限ったことではなくイミダゾール剤抗菌活性の共通の特徴と見なすことができる。

JEVONS *et al.*³⁰⁾ は、固形培地上での TCZ の部分的発育阻止効果をより定量的に測定した結果、MIC 値 6.6 $\mu\text{g/ml}$ で 99.9% 発育阻止される *C. albicans* に対して 0.2 $\mu\text{g/ml}$ すなわち 1/30 低い薬剤濃度で 70% 発育阻止したことを報告している。こうした部分的発育阻止効果は、OCZ その他のイミダゾール剤の MIC 値が培養時間が長くなるにつれて上昇する現象をよく説明する。つまり、培養早期には細胞集団の大きさが小さいため部分的発育阻止効果でも培養陰性と判定されるが、培養日数が経つにつれて遅ればせながら発育は可視的となるからである。この推論は、OCZ に対して比較的幅広い部分的発育阻止濃度域を示した *C. albicans* や *T. mentagrophytes* などで培養時間とともに特に著しい MIC 値の上昇がみられたことから支持されよう。

以上述べた OCZ および他のイミダゾール剤の抗菌作用の特徴ならびにそれに及ぼす諸因子の影響に関する解析は、これらの薬剤の *in vitro* 抗菌活性を評価する際に考慮すべき点を指摘してくれる。*In vitro* 試験で得られる MIC 値は、*in vivo* での治療効果と充分な対応関係をもつものではない限り、ほとんど無意味であろう。したがって、両者間にできるだけ相関性をもたせるように感受性試験法を標準化することが重要であり、そのためにはまず *in vitro* 抗菌活性測定に用いられる環境的条件を感染組織または生体内のそれに近いものにする必要がある。この観点に立てば、培地 pH は中性付近とし、接種菌量は試験成績の再現性の点で支障のない範囲で小さくすべきであろう³¹⁾。また、ROLIN-

BON³¹⁾ は、感染症によっては単に病原菌の発育速度を低下させるだけで治療効果が充分挙げられ、したがって投与される抗菌物質は部分的発育阻止濃度でも目的が達せられる可能性を指摘している。この点にも留意するならば、*in vitro* 試験においては部分的発育阻止効果が残っている培養の比較的早期に判定を行なうのがより適切と考えられる。

これらの条件はいずれもイミダゾール剤にとっては MIC 値を低下させる方向に働く要因ばかりである。局所的治療法における組織(表皮)内薬剤濃度と治療効果との相関性については充分なデータが得られていないが、系統的抗真菌剤として使用される KCZ および MCZ に関しては *in vitro* 抗菌活性が低いにもかかわらず高い治療成績が得られるという矛盾がみられる^{40,41)}。このことは従来の *in vitro* 試験によって測定された抗菌活性が不当に低く評価され、したがって *in vivo* での抗菌活性を充分反映していなかったと見なさざるを得ない。

これらの問題点をできるだけ考慮に入れて設定した *in vitro* 試験法を用い、今回医学的に重要な多数の菌種を対象に OCZ の抗菌活性を測定した。さらに得られる成績の評価の客観性を高めるために、既存の有力なイミダゾール剤である CTZ および MCZ を対象薬剤として並べて測定を行なった。本剤は期待した通り、広い抗真菌スペクトルを示し、すべての試験菌株の発育を 10 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で完全に阻止した。感受性分布レベルから大きく 4 つの真菌群に分けられた。すなわち感受性の高い順から (i) 一部の *Candida* (例、*C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea*)、*Candida* 以外の酵母状真菌、黒色酵母および *S. schenckii* 以外の(すなわち深在性真菌症の原因となる)二形性菌、(ii) 皮膚糸状菌および真菌性足菌腫原因菌、(iii) 多くの *Candida* および *Aspergillus* など、(iv) *Absidia* を除く接合菌であり、それぞれに属する菌株の平均 MIC 値は、 $<0.1 \mu\text{g/ml}$, 0.04~0.5 $\mu\text{g/ml}$, 0.1~4 $\mu\text{g/ml}$ および 2.5~6.3 $\mu\text{g/ml}$ の分布を示した。

POLAK^{2,42)} は Casitone 液体培地および寒天培地を用い、希釈法により OCZ の抗菌活性を測定している。その平均 MIC 値をわれわれの成績と比較すると、*C. albicans*, *C. tropicalis* および *T. glabrata* の 3 菌種で 10~30 倍高い値を示し、その他の菌種でも 2~4 倍程度高めているものの、全体的には極めてよく似た感受性パターンが得られている。したがって、上述の各真菌群の感受性の順位と程度は有意なものと判断される。さらに、われわれの実験成績から OCZ の抗菌活性を MCZ および CTZ のそれと比較した結果、OCZ の活性

はすべての菌種で MCZ よりも、また大部分の菌種で CTZ よりも上回るかまたは同等であった。OCZ より CTZ に対してより高い感受性を示した菌種は、*C. albicans* など一部の *Candida*、*A. fumigatus* など一部の *Aspergillus*、*Mucor* など一部の接合菌、*M. gypseum* など一部の皮膚糸状菌に限られていた。また、OCZ は MCZ のいずれよりも同一菌種内の菌株間での感受性分布域が狭く、比較的感受性が揃っている傾向がみられる。

OCZ の抗菌活性の特徴として注目されるのは、*C. tropicalis* の低感受性と *C. neoformans* の高度感受性である。それぞれの菌種に対する平均 MIC 値は、*C. albicans* に対する MIC 値を基準として比較した場合、われわれの成績では 4 および < 0.05 倍、POLAK^{2,42)} の成績では 9 および 0.002 倍である。*C. neoformans* に対する OCZ の抗菌活性は MCZ の 6 倍以上、CTZ の 25 倍以上に達する高いものであり、イミダゾール剤間でも抗菌活性にはそれぞれ特徴があり、必ずしも 1 薬剤群のメンバーとして同一視しえないことを示唆する。

POLAK^{2,42)} の成績によれば、OCZ は *C. albicans* および *A. fumigatus* に対して 10 µg/ml 以上の濃度で、*C. neoformans* および *T. mentagrophytes* に対しては 1 µg/ml 以上の濃度でいずれも殺菌的に作用するが、*C. neoformans* を除けば 99% 以上の殺菌効果が発現するのに 48 時間以上の接触を必要とする。本報に示したわれわれの成績では、薬剤接触 24 時間までは *C. albicans* に対して 80 µg/ml の濃度でもまったく殺菌の効果は認められず、一方高度感受性菌である *T. glabrata* に対しては 20~80 µg/ml すなわち MIC 値の 500 倍程度高い濃度でようやく有意な殺菌的作用がみられた。また、*T. mentagrophytes* 分生子に対してはより殺菌的に働く傾向が認められ、20 µg/ml すなわち MIC 値の 32 倍の濃度で 48 時間後に 99% 以上の殺菌率が得られた。これらの成績からみて、OCZ は比較的高濃度では殺菌的に働くものの、殺菌効果は緩慢であり、いずれかといえば静菌的傾向の強い薬剤と見なされよう。しかし、本剤の殺菌的濃度と静菌的濃度との関係は菌種によって一様ではなく、ことに *T. mentagrophytes* において比較的強い殺菌的作用が認められたことは本剤の皮膚真菌症への適用に有利な判断材料とならう。

OCZ は広範囲の真菌に対する活性に加えて、好気性、嫌気性の別なく試験したすべてのグラム陽性球菌ならびに桿菌に対しても比較的強い抗菌活性を示し、弱いながらグラム陰性嫌気性桿菌 *Bacteroides* をも阻止した。この抗菌スペクトルは基本的には他のイミダゾール剤のそれと同一であり、イミダゾール剤としての共通の生物学

的特徴と考えられる。

いずれのイミダゾール剤についても、2つの報告例^{16,44)}を除いて自然界から真菌の耐性株が分離されたという報告はなく、*in vitro* で実験的に耐性株を誘導する試みもすべて失敗に終わっている^{20,45,46)}。OCZ についても試験真菌株のなかには耐性株がまったく認められず、また人工的な耐性の誘導も成功しなかった。これは OCZ が他のイミダゾール剤と同様、長く臨床的有用性を保持しうる可能性を示唆するものである。

今回得られたすべての実験成績は、OCZ が従来のイミダゾール剤と比べても優れた抗真菌活性を有する新しい薬剤として、その臨床的効果に期待を抱かせるものである。

Oxiconazole nitrate 標品を提供して頂いた東京田辺製薬株式会社に感謝いたします。

文 献

- MIXICH, G. & K. THIELE: Ein Beitrag zur stereospezifischen Synthese von antimykotisch wirksamen Imidazolyloximathen. Oxiconazole-nitrat (Sgd 301-76), ein neues Breitband-antimykotikum. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 29(II): 1510~1513, 1979
- POLAK, A.: Oxiconazole, a new imidazole derivative. Evaluation of antifungal activity *in vitro* and *in vivo*. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 32(I): 17~24, 1982.
- 三橋 進, 井上松久: MIC 測定用標準菌株. *Chemotherapy* 27: 561, 1979
- 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
- 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法. *Chemotherapy* 23: 1~2, 1975
- 嫌気性菌 MIC 測定法委員会: 嫌気性菌の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法. *Chemotherapy* 27: 559~560, 1979
- 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
- BEGGS, W. H.; F. A. ANDREWS & G. A. SAROSI: Action of imidazole-containing antifungal drugs. *Life Science* 28: 111~118, 1981
- PLEMPER, M.; K. H. BÜCHEL & E. REGER: Recent developments in antifungal azole agents. *Proc. 8th Congr. ISHAM (M. BAXTER, ed.)*, pp. 305~309, Massey University, Palmerston North New Zealand, 1983
- HOEPRICH, P. D. & P. D. FINN: Obfuscation of the activity of antifungal antimicrobics by culture media. *J. Infect. Dis.* 126: 353~361,

- 1972
- 11) HOEPRICH, P. D. & A. C. HUSTON: Effect of culture media on the antifungal activity of miconazole and amphotericin B methyl ester. *J. Infect. Dis.* 134: 336~341, 1976
 - 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) 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
 - 14) 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
 - 15) VAN den BOSSCHE, H.; G. WILLEMSSENS & J. M. VAN CUTSEM: The action of miconazole on the growth of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 13: 63~73, 1975
 - 16) BEGGS, W. H.; G. A. SAROSI & N. M. STEELE: Inhibition of potentially pathogenic yeastlike fungi by clotrimazole in combination with 5-fluorocytosine or amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9: 863~865, 1976
 - 17) BEGGS, W. H.; G. A. SAROSI & N. M. STEELE: Synergistic action of clotrimazole and sulfamethoxazole on *Candida albicans* and related species. *Curr. Ther. Res.* 20: 623~629, 1976
 - 18) GALGANI, J. N. & D. A. STEVENS: Turbidimetric studies of growth inhibition of yeasts with three drugs: inquiry into inoculum-dependent susceptibility testing, time of onset of drug effect, and implications for current and newer methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 249~254, 1978
 - 19) 江川朝生, 山口英世, 岩田和夫: Miconazole の *in vitro* 抗菌活性 第3報 抗真菌作用に関する研究補遺。真菌誌 20: 20~30, 1979
 - 20) COPE, J. E.: Mode of action of miconazole on *Candida albicans*: effect on growth, viability and K⁺ release. *J. Gen. Microbiol.* 119: 245~251, 1980
 - 21) PLEMPPEL, M.; K. BARTMANN, K. H. BUCHEL & E. REGEL: Bay b 5097, a new orally applicable antifungal substance with broadspectrum activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*-1969, 271~274, 1970
 - 22) 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
 - 23) HOLT, R. J.: Laboratory tests of antifungal drugs. *J. Clin. Pathol.* 28: 767~774, 1975
 - 24) 山崎良治, 岩田和夫: Econazole の抗真菌活性に及ぼす諸因子の影響。真菌誌 19: 316~331, 1978
 - 25) 皆川治重, 北浦皓三, 峯浦和幸, 丸茂博夫: 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
 - 26) 岩田和夫, 内田勝久: Isoconazole の抗真菌作用に関する研究 第2報 試験管内抗真菌活性に及ぼす諸因子の影響。Chemotherapy 30: 409~413, 1982
 - 27) 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: 546~551, 1983
 - 28) COPE, J. E.: The interaction of ³H miconazole with *Candida albicans*. *Sabouraudia* 18: 211~228, 1980
 - 29) 西木克侑, 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
 - 30) WAITZ, J. A.; A. C. MOSS & M. J. WEINSTEIN: Chemotherapeutic evaluation of clotrimazole. *Appl. Microbiol.* 22: 891~894, 1971
 - 31) SHADOMY, S.: *In vitro* antifungal activity of clotrimazole. *Infect. Immun.* 4: 143~148, 1971
 - 32) BRASS, C.; J. Z. SHAINHOUSE & D. A. STEVENS: Variability of agar dilution-replicator method of yeast susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15: 763~768, 1979
 - 33) ODDS, F. C.: Laboratory evaluation of antifungal agents: a comparative study of five imidazole derivatives of clinical importance. *J. Antimicrob. Chemother.* 6: 749~761, 1980
 - 34) VAN CUTSEM, J. M. & D. THIENPONT: Miconazole a broad-spectrum antimycotic agent with antibacterial activity. *Chemotherapy (Basel)* 17: 392~404, 1972
 - 35) HALLER, I.: Zum Wirkungstyp von Imidazol-Antimykotika: Konsequenzen für die Empfindlichkeitsbestimmung. *Mykosen* 22: 423~430, 1979
 - 36) JEVONS, S.; G. E. GYMER, K. W. BRAMMER, D. A. COX & M. R. G. LEEMING: Antifungal activity of tioconazole (UK-20,349), a new imidazole derivative. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15: 597~602, 1979
 - 37) GALGANI, J. N. & D. A. STEVENS: Antimicro-

- bial susceptibility testing of yeasts: a turbidimetric technique independent of inoculum size. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10: 721~726, 1976
- 38) ODDS, F. C.: Problems in the laboratory assessment of antifungal activity. *Postgrad. Med. J.* 55: 677~680, 1979
- 39) ROLINSON, G.: Subinhibitory concentrations of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 3: 11~13, 1977
- 40) HEEL, R. C.; R. N. BROGDEN, A. CARMINE, P. A. MORLEY, T. M. SPEIGHT & G. S. AVERY: Ketoconazole: a review of its therapeutic efficacy in superficial and systemic fungal infections. *Drugs* 23: 1~36, 1982
- 41) 内田勝久, 山口英世: マウス実験的カンジダ症における miconazole 注射剤の治療効果。Chemo-therapy 32: 547~554, 1984
- 42) POLAK, A.: Antifungal activity *in vitro* of Ro 14-4767/002, a phenylprophyl-morpholine. *Sabouraudia* 21: 205~213, 1983
- 43) HOLT, R. J. & A. AZMI: Miconazole-resistant *Candida*. *Lancet* i: 50, 1978
- 44) RYLEY, J. E.; R. G. WILSON, & K. J. BARRETT-BEE: Azole resistance in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 22: 53~63, 1984
- 45) HOLT, R. J. & R. L. NEWMAN: Laboratory assessment of the antimycotic drug clotrimazole. *J. Clin. Pathol.* 25: 1089~1097, 1972
- 46) PLEMPER, M. & K. BARTMANN: Experimental studies on the antimycotic action of clotrimazole (Canesten) *in vitro* and after local application *in vivo*. *Drugs made in Germany* 15: 103~120, 1972

OXICONAZOLE NITRATE, A NEW IMIDAZOLE-ANTIMYCOTIC : EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY *IN VITRO*

TAMIO HIRATANI, KATSUHISA UCHIDA and HIDEYO YAMAGUCHI

Research Center for Medical Mycology, Teikyo University School of Medicine

Oxiconazole nitrate (OCZ) is a recently synthesized imidazole derivative. Its antifungal properties were studied *in vitro* mainly using an agar dilution procedure on Sabouraud dextrose agar. In general, the MIC values to several fungal strains were altered by composition of assay medium, and increased with an increase of inoculum size and prolongation of incubation period before reading. However, the extent of these factors varied between different species and from strain to strain within the same species. On the other hand, pH of assay medium only slightly influenced the OCZ activity.

Taking into consideration of all these factors, the assay conditions for the susceptibility testing was established, with which the OCZ activity against a range of medically important fungi was directly compared with that of clotrimazole (CTZ) and miconazole nitrate (MCZ). OCZ was found to have a broad spectrum of antifungal activity and to inhibit all fungal strains tested at concentrations less than 10 $\mu\text{g/ml}$. The most susceptible were many yeastlike fungi (except for most *Candida*), black yeasts and dimorphic fungi (except for *Sporothrix schenckii*) (mean MIC, 0.1 $\mu\text{g/ml}$). They were followed by dermatophytes and mycetoma-associated fungi (mean MIC, 0.04~0.5 $\mu\text{g/ml}$), and next by most of *Candida* and aspergilli (mean MIC, 0.1~4 $\mu\text{g/ml}$). Zygomycetous fungi except for *Abidia* were the least susceptible (mean MIC, 2.5~6.3 $\mu\text{g/ml}$). OCZ was superior to CTZ and MCZ in activity against most of the fungal pathogens and especially, it was highly active against *Cryptococcus neoformans* (means MIC 0.049 $\mu\text{g/ml}$) in comparison with the other two reference imidazoles. Moreover, OCZ had a relatively high activity against various Gram-positive bacteria and, to a lesser extent, *Bacteroides*.

The type of antifungal action of OCZ principally appeared to be fungistatic, but this imidazole showed a fungistatic action toward susceptible fungi at concentrations higher than 20 $\mu\text{g/ml}$. No fungal strains with natural resistance to OCZ was found among a large number of species and strains tested and no *in vitro* development of OCZ resistance was demonstrated.