

## *Candida albicans* における oxiconazole nitrate の 抗真菌作用メカニズム

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8月27日受付)

新規イミダゾール剤 oxiconazole nitrate (OCZ) の強力な抗真菌活性に関与する作用機序を解明するために、*Candida albicans* を試験菌として用い、その主要な細胞機能に及ぼす影響ならびに幾つかの代謝変異株に対する抗菌活性について比較検討を行なった。

OCZ は酵母の発育阻止作用を示す 10~20 µg/ml 以上の濃度で、1) 呼吸、とくにグルコースを基質とする外部呼吸、および 2) 生体高分子物質、細胞壁多糖、脂質といった主要細胞成分のすべての合成、3) 2-デオキシグルコースの influx、をいずれも薬剤添加直後から有意に阻害した。呼吸欠損変異株が野生型親株を上回る本剤感受性を示したことから、この好氣的エネルギー代謝阻害は本剤の抗菌活性に直接関与しないことが推論された。

OCZ は 10 µg/ml 以上の濃度で、細胞内 K<sup>+</sup> および無機リン酸などの合成の放出、ならびに外液 pH 値の迅速な上昇をひき起こし、細胞膜障害作用をもつことが示された。細胞合成機能のなかで最も強く OCZ の阻害的効果を受けたのはステロール合成経路のなかの C4, 14-脱メチル化反応であり、1 µg/ml 以下の薬剤濃度によりエルゴステロール合成は 90% 以上阻害された。エルゴステロール合成能を欠如した変異株と親株との OCZ 感受性の比較から、エルゴステロール合成阻害は本剤の部分発育阻止作用のみにかかわるメカニズムであり、完全発育阻止作用は主として細胞膜障害に依存することが示唆された。

従来きわめて多数のイミダゾール誘導体が合成され、そのなかで clotrimazole, miconazole, econazole, isoconazole および tioconazole はすでにわが国においても局所的抗真菌剤として実用化されているほか、現在開発研究途上にある誘導体も少なくない。

Oxiconazole nitrate (以下 OCZ と略) は、スイス Siegfried AG により合成された 2', 4'-dichloro-2-imidazol-1-ylacetophenone(Z)-[O-(2, 4-dichlorobenzyl) oxime]nitrate の化学式をもつ新しいイミダゾール化合物である (Fig. 1)<sup>1)</sup>。これまで検討された OCZ の基礎的評価に関する成績から、本剤は広範囲の病原真菌に対して強い *in vitro* 抗菌活性を示すのみならず、動物での実験的白癬ならびに *Candida albicans* や *Histoplasma capsulatum* の系統感染モデルにおいても優れた治療効果を発揮することが知られている<sup>2-5)</sup>。さらに、本剤の 1% クリーム剤が白癬その他の皮膚真菌症症例の治療に用いられ、優れた薬効を証明する成績が得られている<sup>6-8)</sup>。

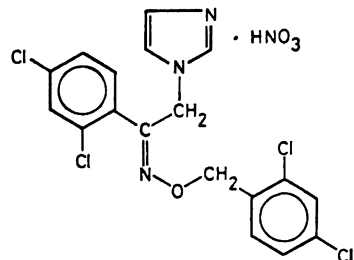
既存のイミダゾール系抗真菌剤がすべてビスフェニールイミダゾール体かまたはフェネチルイミダゾール体に

属するのに対して、アセトフェノンオキシムイミダゾール体である OCZ は化学構造の点で特異な性状をもつ。それと関連しているか否かは不明であるが、OCZ の *in vitro* 抗菌活性には、他のイミダゾール剤に比較して、ある種の特徴がみられる<sup>2-4)</sup>。一方、OCZ の強力な抗真菌作用を説明するメカニズムについてはまったく報告がなされていない。本報においては、*C. albicans* を試験菌として用い、主として生化学的方法論により細胞レベルでこの問題を検討した成績について述べる。

### I. 実験材料と方法

菌株：とくに指定しないかぎり、*Candida albicans*

Fig. 1 Chemical structure of oxiconazole nitrate



TIMM 0144 を主要試験菌として使用し、一部の実験にはこの菌株から人為的に誘導したトリアゾール系抗真菌剤 BAYn 7133 耐性変異株<sup>9)</sup>を組み合わせ用いた。そのほか、エネルギー代謝に関する実験では *C. albicans* MTU 12013 およびその呼吸欠損変異株<sup>10)</sup>が使用された。各菌株とも Sabouraud dextrose agar (SDA) 斜面に継代保存した。

薬剤溶液の調製：東京田辺製薬株式会社より分与された OCZ 精製原末 (lot no. 009488) をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、濃度 8 mg/ml (w/v) の溶液を調製した。これを -20°C に保存し、実験に臨んで融解し、完全に OCZ が溶解していることを確かめた後、適宜希釈して使用した。希釈用溶媒にはすべて DMSO を用い、反応液の 1/100 容量を添加した。また各実験系に 1% DMSO のみを含む対照を置いた。Amphotericin B methyl ester (日本スクイブ社より分与) および antimycin A (ICN NBC Laboratories, Inc.) は、それぞれ DMSO およびエタノールに溶解し、実験に供した。

培養生菌数を指標とする抗菌活性の測定：Sabouraud dextrose broth (pH 無修正；以下 SDB と略) に若い斜面培養から採取した菌を接種し、37°C で 18 時間振盪培養した。この培養を新鮮な SDB で希釈し、血球計算板を用いて  $10^8$  細胞/ml の濃度に調整し、細胞浮遊液を作製した。その 10 ml ずつを段階的濃度の薬剤を含む L 型試験管に分注し、37°C で振盪培養した。24 時間後、各試験管から試料を採取し、適宜希釈列を作り、常法に従って SDA 平板上に発育するコロニー数 (CFU) を測定した<sup>11)</sup>。

培養濁度を指標とする抗菌活性の測定：上記の生菌数測定の場合と同じ操作で得られた SDB 培養を新鮮培養地により約  $2 \times 10^8$  細胞/ml の濃度に希釈調整した後、これを予め段階的濃度の薬剤溶液 0.1 ml が添加された各 L 型試験管に 10 ml ずつ分注した。37°C、24 時間振盪培養を行なった後、各試験管から試料を採取し、分光測光法により 530 nm 波長における濁度を測定した。

細胞呼吸活性の測定：SDB 中での 37°C、18 時間振盪培養から *C. albicans* 細胞を遠心集菌し、0.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液に懸濁しては遠心するという操作を 3 回くり返して十分に洗浄した後、最後に得られた細胞浮遊液を 37°C で振盪した。4 時間後に遠心集菌し、0.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液中に約  $10^8$  細胞/ml の濃度になるように再浮遊した。内部呼吸測定の場合には、細胞浮遊液 2.0 ml を所定の容器に移し、直ちに酸素消費量の測定を開始した。また、外部呼吸測定の場合には細胞浮遊液のほかに 200 mM グルコース溶液 0.1 ml を添加した。測定は酸素電極 (Rank Brothers) を用いて行なわれ、37°C

恒温下における酸素消費速度を記録した。この速度が一定になった時期に薬剤溶液 20  $\mu\text{l}$  を添加し、さらに記録を続けた。薬剤添加前とその後における酸素消費速度の比に基づいて、薬剤による呼吸阻害度を算出した。

各種放射性基質の細胞主要成分への取り込み：前報<sup>11,12)</sup>に記した細胞浮遊液調製法、反応系および試料分画法を用い、*C. albicans* 細胞におけるタンパク質画分への [<sup>3</sup>H] ロイシン、RNA および DNA 各画分への [<sup>3</sup>H] アデニン、マンナンおよびアルカリ不溶酸不溶多糖各画分への [<sup>14</sup>C] グルコースのそれぞれの取り込み<sup>13)</sup>、総脂質画分への [<sup>14</sup>C] 酢酸の取り込み<sup>12)</sup>を種々の段階的濃度の OCZ 存在下で経時的に測定した。また [<sup>3</sup>H] デオキシグルコースの influx も前報<sup>11)</sup>に準拠して測定を行なった。いずれの反応系においても薬剤を反応開始直前に添加した。

各ステロールクラスへの放射性基質の取り込みと成分画：PYE & MARRIOTT<sup>14)</sup>の記載に従い、*C. albicans* 細胞を各種濃度の OCZ 存在下で [<sup>14</sup>C] 酢酸を含む反応液中でインキュベートし、経時的に採取した各試料についてステロールのクラス別分画を行なった後、各画分から回収される放射能を測定した。SDB 培養から遠心集菌した細胞を [<sup>14</sup>C] 酢酸含有 Rowley-Huber medium (Oxoid) に浮遊し、約  $10^8$  細胞/ml の濃度に調整した。この細胞浮遊液を 50 ml ずつフラスコに分注し、所定の濃度の薬剤溶液 9.5 ml を添加した後、37°C、3 時間振盪保温した。遠心集菌した細胞から MARRIOTT の方法<sup>14)</sup>に従って不飽和脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィー展開を行なった。放射能の所在を薄層スキャナーを用いて確認した後、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、C, 4, 14-デスマテルステロール画分およびその前駆ステロール画分の位置をそれぞれ特定した後、その部分を切り取って放射能を測定した。

K<sup>+</sup> および無機リン (Pi) の細胞外放出量の測定：前報<sup>15)</sup>に述べたのと基本的には同一の方法を用いて、薬剤処理細胞から外液中へ放出される K<sup>+</sup> および Pi を定量した。SDB 中での 37°C、18 時間振盪培養から遠心集菌した *C. albicans* 細胞を 3 回の遠心操作により蒸留脱イオン水で十分に洗浄した。最後に得られた沈渣を蒸留脱イオン水に再浮遊し、約  $10^8$  細胞/ml の濃度の細胞浮遊液を調製した。この 10 ml ずつをあらかじめ薬剤溶液 0.1 ml が添加された L 型試験管に分注し、直ちに 37°C で振盪した。反応開始 2.5 分後から 10 分後まで経時的に各試験管から試料を採取し、速やかにガラス線維濾紙 (GF/C, Whatmann) を通して減圧濾過した。得られた濾液すなわち細胞外液の一部をとり、炎光度計 (日立

775 型) による  $K^+$  量測定および比色法<sup>10)</sup> による  $P_i$  量測定をそれぞれ行なった。薬剤無添加対照細胞における  $K^+$  および  $P_i$  の細胞内含量は、反応開始前の細胞から 5% 熱過塩素酸により抽出される画分について得られた測定値に基づいて算出した。

細胞外液 pH 値の連続測定: 上記の方法を用いて調製した *C. albicans* 細胞浮遊液の一定量を所定の容器に移し、37°C 恒温槽内で攪拌しながら 1/100 容量の薬剤を添加し、pH メーター (日立一堀場 M-7 型, 6028 型複合電極装着) により 10 分間以上にわたって連続的に pH 値を測定、記録した。また、対照として薬剤溶液単独の pH 値も併せて測定した<sup>11)</sup>。

試薬: [3, 4, 5-<sup>3</sup>H] L-leucine (120 Ci/mmol), [8-<sup>3</sup>H] adenine (25 Ci/mmol), [U-<sup>14</sup>C] D-glucose (240 mCi

/mmol), [2-<sup>14</sup>C] acetic acid, sodium salt (60 mCi/mmol), [1-<sup>3</sup>H] 2-deoxy-D-glucose (240 Ci/mmol), 以上すべての放射性化合物は Radiochemical Centre (英国) 製品を使用した。とくに記述のない一般試薬は、いずれも東京化成工業社または和光純薬社の製品である。

## II. 実験成績

### 1) *C. albicans* に対する抗菌作用

本実験に主として使用されている *C. albicans* TIMM 0144 の発育が OCZ 濃度によってどの程度阻害されるか、また殺菌的影響を受けるか否かを検討した。種々の濃度の OCZ を含む SDB 中で 24 時間培養した後に測定した生菌数を Fig. 2 に示す。薬剤無添加対照培養に比べて、1.25  $\mu\text{g/ml}$  以上の OCZ 存在下においては生菌数は 1 オーダー低く、20  $\mu\text{g/ml}$  以上の薬剤濃度では生菌数増加がほぼ完全に阻害された。一方、使用した最大薬

Fig. 2 Effect of oxiconazole nitrate on growth of *C. albicans* as measured by viable counts. Cultures were grown at 37°C for 18 hours with aeration. The inoculum size was approx.  $10^6$  cells per ml.

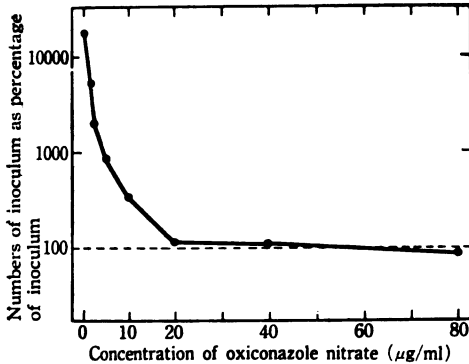


Fig. 3 Effect of oxiconazole nitrate on respiratory activity of *C. albicans* cells with and without glucose as an exogenous substrate

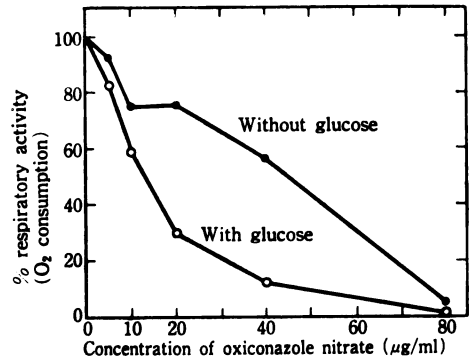
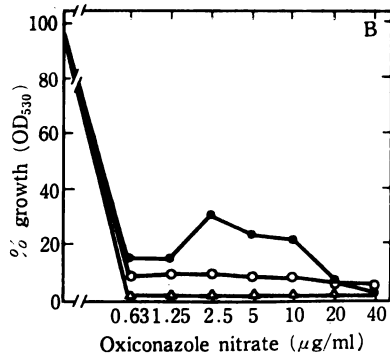
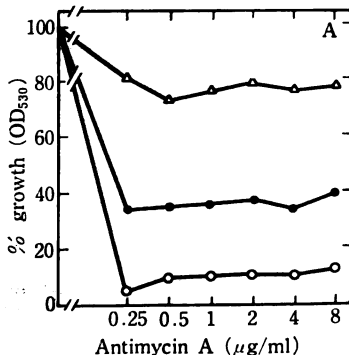


Fig. 4 Effect of antimycin A (A) and oxiconazole nitrate (B) on growth of wild type strain (MTU 12013) and respiratory-deficient mutant strain (MTU 12013 RD-4) of *C. albicans* in media supplemented with glucose or glycerol as a sole carbon source. Cultures were: ●, MTU 12013 grown on glucose; ○, MTU 12013 grown on glycerol; and ▲, MTU 12013 RD-4 grown on glucose.





受性を示し、0.63  $\mu\text{g/ml}$  以上の薬剤濃度下ではほぼ完全に発育が阻止された (Fig. 4 B)。

#### 4) 主要細胞構成成分の合成に及ぼす影響

*C. albicans* 細胞を構成する主要成分である各種生体高分子物質、細胞壁多糖および脂質のそれぞれの初期合成速度が OCZ によってどのような影響を受けるかを、各成分へ取り込まれる特異的基質の放射能を指標として比較検討した。反応開始 20 分および 40 分後の成績を Fig. 5 にまとめた。

この図から明らかなように、生体高分子物質のなかでは DNA 合成が最も強く阻害され、薬剤濃度 10, 40  $\mu\text{g/ml}$  でそれぞれ 50, 80% 以上、80  $\mu\text{g/ml}$  ではほぼ 100% 阻害を示した。一方、タンパク質および RNA の合成に対しては、20, 80  $\mu\text{g/ml}$  でそれぞれ 50, 90% 以上の阻害度が得られた。*C. albicans* 細胞壁主要構成多糖であるアルカリ不溶解不溶多糖およびマンナンの合成に対しても OCZ は有意な阻害効果を示し、とくにマンナン合成は DNA 合成に匹敵する強い阻害を受けた。脂質合成もまたこれらの高分子物質と同程度またはそれ以上に OCZ によって阻害された。このように細胞成分の種類によって OCZ 阻害効果は若干程度を異にする傾向がみられたが、いずれの成分においても 50% 合成阻害が達成される薬剤濃度は 10~20  $\mu\text{g/ml}$  の範囲に限定された。

#### 5) ステロール合成に及ぼす影響

*C. albicans* 細胞におけるステロール合成系に対する OCZ の作用を検討するために、種々の薬剤濃度下で [ $^{14}\text{C}$ ] 標識酢酸を取り込ませた細胞から本菌ステロール合成経路の最終生産物であるデスメチルステロール画分、およびその前駆代謝産物であるジメチルステロール画分ならびにトリメチルステロール画分をそれぞれ分離し、含まれる放射能の強さに基づいて各画分の合成量比を測定した。

Fig. 6 の実験成績に示されるように、OCZ はデスメチルステロール合成を低濃度で強力に阻害し、0.16 および 0.63  $\mu\text{g/ml}$  での阻害度はそれぞれ 50% 以上、90% 以上に達した。これとは対照的に、他の 2 つの前駆ステロールクラスの合成はいずれもこれらの低薬剤濃度域ではほとんど阻害されず、薬剤濃度をさらに高めた場合にはかえって合成が促進される傾向を示した。これらの成績から、本剤はステロール合成経路の最終段階であるジメチルステロールからデスメチルステロールが産生される反応すなわち C 4, 14-脱メチル化反応を特異的に阻害することが示唆された。

#### 6) 2-デオキシグルコースの influx に及ぼす影響

酵母状真菌において、グルコースと同様に ATP 依存

Fig. 6 Effect of oxiconazole nitrate on synthesis of ergosterol in *C. albicans* cells as measured by incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ] acetate into three sterol classes. Incorporation into: ○, C 4, 4', 14-trimethyl sterols; ●, C 4, 14-dimethyl sterols; and △, C 4, 14-desmethyl sterols

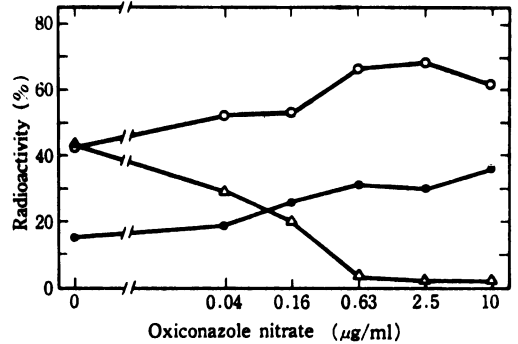
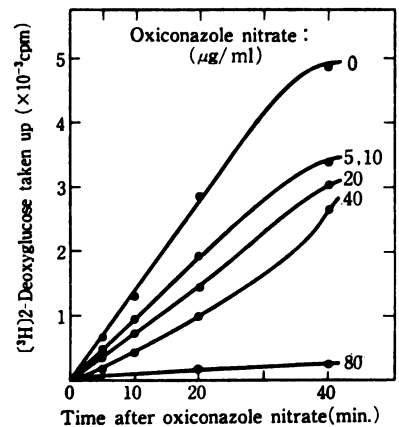


Fig. 7 Effect of oxiconazole nitrate on influx of [ $^3\text{H}$ ] 2-deoxyglucose into *C. albicans* cells



性輸送機構によって細胞内へ移入される一方、グルコースと異なり細胞内で代謝されないグルコースアナログ体である 2-デオキシグルコースの [ $^3\text{H}$ ] 標識化合物を基質として用い、外液から *C. albicans* 細胞内への influx が OCZ によってどのように影響されるかを検討した。

Fig. 7 に示されるように、2-デオキシグルコースの細胞内移入速度は OCZ 80  $\mu\text{g/ml}$  の存在下で、薬剤添加直後から顕著に阻害された。一方、5~40  $\mu\text{g/ml}$  の濃度範囲の OCZ による阻害度は、濃度に依存する傾向はみられるものの、いずれの場合も 50% 以下と比較的軽微であった。

#### 7) 細胞内カリウムイオンおよび無機リン酸 (Pi) の放出促進効果

Fig. 8 Release of  $K^+$  induced by oxiconazole nitrate from *C. albicans* cells

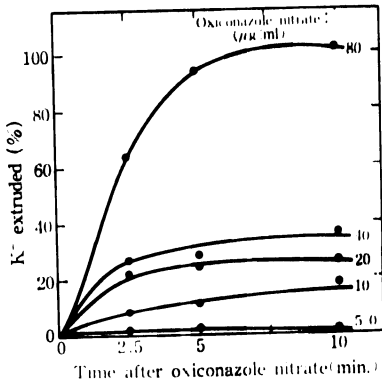
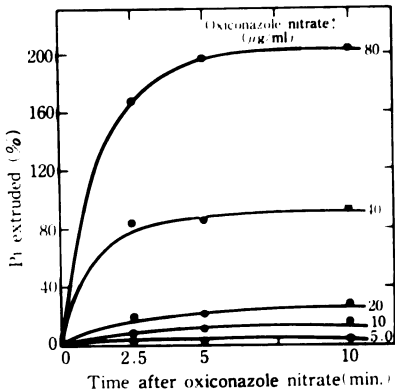


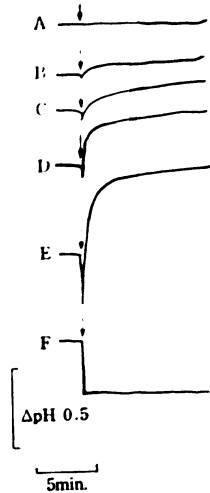
Fig. 9 Release of inorganic phosphate induced by oxiconazole nitrate from *C. albicans* cells



蒸留脱イオン水に浮遊した *C. albicans* 細胞を  $37^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした場合、10 分間の測定時間内では細胞内から外液中への  $K^+$  または  $P_i$  の放出は測定されなかった。これに対して、 $10\ \mu\text{g/ml}$  以上の濃度の OCZ をあらかじめ細胞浮遊液に添加しておいた時には、反応開始直後から有意な量の  $K^+$  および  $P_i$  の細胞外への放出が観察された (Fig. 8, 9)。 $K^+$ 、 $P_i$  いずれの放出初期速度および放出量も添加された薬剤濃度に対応して増大した。ことに  $80\ \mu\text{g/ml}$  の薬剤濃度下においては、10 分後までに細胞内  $K^+$  のほぼ全量が放出された。それ以下の薬剤濃度では放出量が著しく低くなり、 $40\ \mu\text{g/ml}$  OCZ による 10 分後までの放出率は 20% 以下に過ぎなかった (Fig. 8)。

$K^+$  の場合に比べて、OCZ の細胞内  $P_i$  促進効果はさらに強く、 $40\ \mu\text{g/ml}$  の濃度下では反応開始 10 分後までに細胞内  $P_i$  のほぼ全量が、また  $80\ \mu\text{g/ml}$  ではその 2

Fig. 10 pH changes produced by oxiconazole nitrate in a *C. albicans* cell suspension. The drug was added to the cell suspension prepared in deionized water at the point as indicated by an arrow to a final concentration of ( $\mu\text{g/ml}$ ): A, 0 (solvent alone); B, 10; C, 20; D, 40; and E, 80. In F, the cell suspension used in A~E was replaced by the same volume of deionized water and the drug was added to a final concentration of  $80\ \mu\text{g/ml}$ .



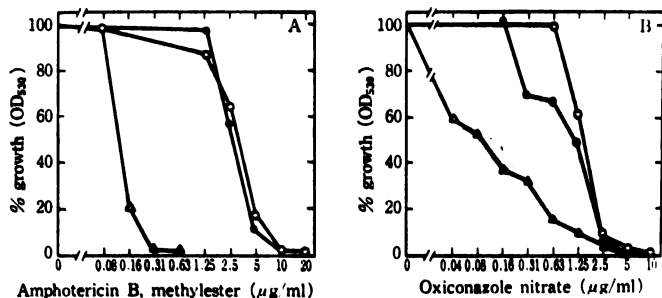
倍に相当する量がそれぞれ外液中へ放出された (Fig. 9)。これは、細胞内プールに存在する  $P_i$  のみならず、各種スクレオチド、核酸などの有機リン化合物に由来する  $P_i$  もまた  $40\ \mu\text{g/ml}$  以上の高濃度の OCZ によって放出されることを示唆する。

#### 8) 細胞外液 pH に及ぼす影響

前述の実験成績から示されるように、細胞内  $K^+$  が外液中に放出されれば、その結果として外液 pH 値が上昇するはずであり、したがってこれを指標としても細胞膜障害の程度を知ることができると考えられるところから、*C. albicans* 細胞浮遊液に種々の濃度の OCZ を添加し、外液の pH 値を連続的に測定、記録した。Fig. 10 にその実験成績をまとめる。

薬剤無添加対照の細胞浮遊液の pH は 10 分間の測定時間内ではまったく変化を示さなかった。これに対して、細胞浮遊液に薬剤を添加した場合には、薬剤濃度に対応するレベルまで、しかしいずれの場合も瞬間的に pH 値が低下した。これは、本剤が弱塩基物質の硝酸塩<sup>1)</sup>であるために、その水溶液が強酸性を呈すること起因すると思われる。最終濃度  $80\ \mu\text{g/ml}$  になるように OCZ を添加した場合には、 $\Delta\text{pH}$  約 0.3 の低下を示

Fig. 11 Effect of amphotericin B methyl ester (A) and oxiconazole nitrate (B) on growth of wild type strain (TIMM 0144,  $\Delta$ ) and BAY n 7133-resistant mutant strains (TIMM 0144 *azr-1*,  $\circ$ ; and TIMM 0144 *azr-2*,  $\bullet$ ) of *C. albicans* in Sabouraud dextrose broth



した。しかし、一旦低下した pH は直ちに上昇に転じ、その速度と程度とは薬剤濃度とともに増大した。少なくとも最終薬剤濃度 10  $\mu\text{g/ml}$  までは、薬剤添加前を超すレベルにまで pH 値は上昇し、80  $\mu\text{g/ml}$  の薬剤添加後の pH 上昇は、 $\Delta\text{pH} > 0.8$  に達した。

#### 9) BAY n 7133 耐性変異株にみられる OCZ 感受性低下

トリアゾール誘導体 BAY n 7133 (vibunazole) は、広い抗真菌スペクトルを有し、*C. albicans* に対しても強い *in vitro* 抗菌活性を示す<sup>18,19</sup>。われわれは先に BAY n 7133 感受性である *C. albicans* TIMM 0144 を親株として、これより MIC 値が 20~40 倍高い耐性変異株を得た。いずれの株も共通してエルゴステロールの細胞含量が低く、発育にはエルゴステロールと不飽和脂肪酸の部分的要求性がみられ、加えて amphotericin B、その他のポリエン抗生物質に耐性であった<sup>9</sup>。これらの性状から、得られた BAY n 7133 耐性変異株は、エルゴステロール合成過程に欠損を生じた変異株であると推定された。そこで、これらの変異株のなかから TIMM 0144 *azr-1* および *azr-2* の 2 株を選び、感受性親株との間で OCZ 感受性を比較することにより、本剤の抗 *Candida* 作用に対するエルゴステロール合成系の関与の有無を検討した。

Fig. 11 A に示されるように、変異株は 2 株とも親株と比べて amphotericin B (methyl ester) に対する感受性が、IC<sub>50</sub> または IC<sub>100</sub> (MIC) のいずれを基準として評価した場合でも、1/30 以下に低下していた。これに対して、OCZ に対する感受性を比較すると、IC<sub>100</sub> 値はいずれも 10  $\mu\text{g/ml}$  でほとんど変わらず、IC<sub>50</sub> 値のみが親株の 0.08  $\mu\text{g/ml}$  から変異株の 1.25  $\mu\text{g/ml}$  へと約 16 倍上昇を示した (Fig. 11 B)。

### III. 考 察

種々のイミダゾール誘導体についてこれまでなされた研究から、それらの抗真菌作用に関する想定メカニズムとして報告されているものは、次のとおり多様である。(i) 酸化酵素および過酸化酵素の合成阻害<sup>20,21</sup>、(ii) 酸化的リン酸化の脱共役<sup>22</sup>、(iii) 呼吸酵素系阻害<sup>23,24</sup>、(iv) エルゴステロール合成阻害<sup>14,25,26</sup>、および (v) 細胞膜障害<sup>12,27</sup>。現在開発研究途中にあるものを含めてこれまで検討されてきたイミダゾール系抗真菌剤に属する化合物は、化学構造的にはかなり多彩であり、抗菌活性の上でも化合物による特徴がみられることもあるが、少なくとも定性的には上記の作用機序のなかの複数のものが共通に働いていると考えられている<sup>28-30</sup>。

OCZ は化学構造的には特異なイミダゾール化合物であるが、物理化学的性状や抗菌活性などの生物学的性状からみれば、基本的には従来のイミダゾール剤と類似の作用機序をもつ可能性が想定される。本報では、イミダゾール剤抗真菌作用の主要なメカニズムと目されて比較的研究の進んでいる上記の (iii)、(iv)、および (v) を中心に、OCZ 作用機序の検討を進めた。

イミダゾール剤が *C. albicans* などの感受性真菌細胞の呼吸活性を阻害することは、clotrimazole, miconazole, econazole, isoconazole, sulconazole, ketoconazole というこれまで調べられたすべての薬剤で証明されている<sup>11,12,15,23,24,27,31-33</sup>。しかし、薬剤によって阻害の強さは異なり、抗菌活性を基準として比較すると、ketoconazole が最も強力な呼吸阻害作用を示すようである。この点に関して OCZ を対象に検討した本報の成績は、外部基質のグルコースに依存する呼吸が、本剤によって高度に阻害されることを示している (Fig. 3)。この阻害度は、種々の細胞成分のいずれの合成に対する阻害度よりも高く、さらに 2-デオキシグルコース influx の

それをも上回るものであった。一方、内部呼吸は OCZ によってそれほど強く阻害されず、したがって呼吸系自体の障害に加えてミトコンドリア内への外来性基質の輸送ならびに利用の阻害もまたひき起こされることが示唆される。

OCZ がこのように *C. albicans* 細胞の外部呼吸を強く阻害するにもかかわらず、これが本剤の抗 *Candida* 活性に直接関与している可能性については問題がある。本来 *C. albicans* など多くの酵母状真菌は通性嫌気性であり、たとえ呼吸をまったく行なわなくとも、グルコースその他の発酵性基質が利用できる限り、発酵によって必要なエネルギーを獲得できると考えられるからである。Fig. 4 に示される実験成績は、この想定を支持するものと解釈される。すなわち、特異的呼吸阻害剤として知られる antimycin A が *C. albicans* 呼吸欠損変異株の発育を軽度にししか阻止しなかったのは当然予想されたところであるが、本菌野生型親株の非発酵性基質グリセリンに依存する発育を 90% のレベルまで阻害したのに対して、発酵性基質グルコースを含む培地における発育阻害は 70% 以下に留まった。後者の培養で antimycin A 感受性が低かったのは、おそらく発酵によって支持される発育があったためであろう。このことは、呼吸阻害のみではグルコース培地における通性嫌気性菌の発育の完全阻止が達成されないことを示している。Antimycin A の場合とは対照的に、OCZ に対しては呼吸欠損変異株培養が野生型株培養と同程度もしくはそれより高い感受性を示し、その抗菌活性が培養の好氣的エネルギー代謝への依存度と無関係であることが認められた。したがって、OCZ は強い呼吸阻害作用を示すにせよ、これは本剤の抗菌作用の原因機序となるものではなく、他の細胞機能の障害に続発する二次的效果と見なすべきであろう。本剤に対する *C. albicans* の好気培養と嫌気培養の感受性がほぼ同等であるという前報<sup>41</sup>の成績もこの推論を支持する。これに加えて、内部呼吸が比較的影響を受けにくいことを考慮するならば、OCZ の呼吸阻害作用に直接的に関与する生化学的過程として二次的に惹起されるミトコンドリア内部環境の劣化および呼吸基質移入阻害を第一に想定すべきであろう。

呼吸阻害のみならず、10~20  $\mu\text{g/ml}$  という対応する濃度で OCZ がすべての主要細胞成分の合成をもほぼ同程度にしかも薬剤添加直後から迅速に阻害したことから、これらのすべての OCZ 作用を一元的に説明するには細胞膜および内膜系の機能障害を一次的機序として考えざるを得ない。事実、他の実験成績は、10  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度の OCZ が細胞内  $\text{K}^+$  および無機リンを迅速に放出させること (Fig. 8, 9)、また同様の速やかさで細胞外液

pH を上昇させること (Fig. 10) が観察された。両者はそれぞれの薬剤濃度依存性や経時的パターンからみても互いに関連する過程であることが示される。これは外液 pH の上昇が  $\text{K}^+$  細胞外放出に共役して起こる外液中  $\text{H}^+$  の細胞内移入促進によってもたらされることを考えれば、細胞膜障害に基づく同一の過程を異なる指標で表わしたものに過ぎないと理解することができよう。 $\text{H}^+$  の細胞内蓄積は、内部環境を酸性化する結果、タンパク質や核酸の分解酵素の活性化により自己融解過程を促進し、細胞内の種々の重要な代謝とくに生合成反応の阻害を招く。2-デオキシグルコース influx の阻害度に比べて、生体高分子物質、細胞壁多糖および脂質などの主要細胞膜構成成分の合成阻害がより強いことは、合成基質の細胞内輸送能の低下に加えて、 $\text{K}^+$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$  などの放出と  $\text{H}^+$  の移入による細胞内環境の劣化が大きく関与していることを示唆する。

一般に細胞内成分の放出は、細胞膜透過性の異常亢進にともなひき起こされることが知られている<sup>40</sup>。生体膜および人工膜モデルについての研究から、ステロールは膜に硬さを与える作用をもつこと<sup>25,40</sup>、ステロールの挿入または置換によって種々の陽イオン、陰イオン、非電解質の膜透過性に著しい変化を生じること<sup>27-30</sup>が見出されている。*C. albicans* などの感受性真菌細胞から  $\text{K}^+$  などのイオンや細胞成分を放出させる作用は、clotrimazole, miconazole, econazole, isoconazole, sulconazole など従来調べられたすべてのイミダゾール剤に認められ、いずれの場合も MIC 値以上の比較的高い薬剤濃度でなければ顕著に現われないことが共通した特徴として指摘される<sup>40</sup>。これらのイミダゾール剤は、膜リン脂質との親和性が強く<sup>40,41</sup>、物理化学的相互作用の結果として膜流動性を高めることがリポソームモデル膜を用いた実験成績から確かめられている<sup>42</sup>。*C. albicans* 細胞に 10  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度の OCZ を作用させた場合にみられる迅速な細胞膜透過性亢進は、他のイミダゾール剤と同様の分子レベルでのメカニズムに基づいて発現されることが推定される。

こうした細胞膜障害作用を明瞭に発揮する薬剤濃度よりはるかに低濃度で本剤は *C. albicans* 細胞におけるエルゴステロール合成を有意に阻害した (Fig. 6)。エルゴステロールは、好氣的条件下で培養した場合の酵母細胞の主要ステロールであり<sup>43,44</sup>、その大部分は細胞膜に存在する<sup>45,46</sup>。細胞の発育ならびに膜の機能・構造の維持に果すエルゴステロールの役割の重要性<sup>47</sup>は、通常の酵母がこのステロールを失うと発育不能になる<sup>48</sup>ことから充分うかがい知られる。Fig. 6 に示される成績は、OCZ によるエルゴステロール合成阻害がその前駆体か



らの C4,14-脱メチル化反応の段階で起こることを示している。この作用機序はすでに他の幾つかのイミダゾール剤に関して特異的な生物学的活性として知られているところであり<sup>28-30)</sup>、阻害的薬剤濃度や作用点の共通性から判断して、エルゴステロール合成系に対しても OCZ は従来のイミダゾール剤と同様の作用機序を営むと見なすことができよう。

以上述べたことから、OCZ の作用機序は、基本的には従来のイミダゾール剤のそれと同様であり、主として直接的細胞膜障害およびエルゴステロール合成阻害にあると推論される。前者が本剤の抗 *Candida* 活性、とくに高濃度域におけるそれに関与していることに異論はないと思われるが、一方、後者の作用が極めて低濃度の薬剤によって発揮されるものの、抗 *Candida* 活性との関連性を明確に示す証拠は得られていない。*C. albicans* ポリエン耐性変異株のなかにはステロール合成経路上の C4,14-脱メチル化能(したがってエルゴステロール合成能)を欠き、エルゴステロールを細胞内にほとんど含有しないにもかかわらず、十分な発育・増殖を行なうものが見出されており<sup>40)</sup>、これはエルゴステロール合成阻害の抗菌作用における意義をむしろ否定するものと解釈することができよう。

SUD & FEINGOLD<sup>50)</sup> は、通性嫌気性酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が嫌気的条件下でエルゴステロールを合成しないことを利用し、本菌の好氣的培養に対して示された低濃度イミダゾール剤の静菌的作用が嫌氣的培養ではみられなくなることを観察し、これを根拠に、低濃度イミダゾール剤の抗菌作用がエルゴステロール合成阻害に基づくことを証明したと述べている。しかし、ここで設定された実験条件には幾つかの問題点があり、とくに嫌気培養においてはイミダゾール剤親和性の低い飽和型リン脂質の相対含量が増すこと<sup>40,51)</sup>、およびイミダゾール剤作用を強く拮抗する不飽和脂肪酸<sup>52)</sup>を培地に添加したことを考慮するならば、彼らの結論は必ずしも妥当なものとは言い難い。

この問題をより明確に検討するための手段として、われわれは *C. albicans* などの酵母におけるエルゴステロール合成を阻害する一方、細胞膜障害作用をほとんど示さないことが予備的に見出されているトリアゾール系抗真菌剤 BAY n7133 に着目し、本剤感受性の野生型親株とそれから人為的に誘導した耐性変異株との間で OCZ に対する感受性を比較した。この耐性変異株がエルゴステロールを欠如していることは、膜エルゴステロールを作用標的とする amphotericin B に対して著しく耐性化している成績 (Fig. 11 A) からも示される。実験の結果、OCZ の完全発育阻止濃度に関しては、変異株

も親株とほとんど変わらないが、親株に対する OCZ の IC<sub>50</sub> 値に比べて耐性株に対する値は明らかに上昇していることが認められた (Fig. 11 B)。これは、*C. albicans* において OCZ によるエルゴステロール合成阻害が本剤の完全発育阻止効果には関与せず、部分的発育阻止効果に対してのみ主要な役割を果たす可能性を示唆する。おそらく完全発育阻止濃度域すなわち MIC 値より高い濃度においては細胞膜障害作用が主役を演じるものと推定される。低濃度域ではエルゴステロール合成阻害が、また高濃度域では細胞膜障害がそれぞれ抗菌作用により大きく関与するという傾向は、細胞生理学的類似性から判断して、他種の感受性菌でも同様にみられると考えられる。しかし、その場合にこれらの二つの作用機序が占める役割の比重は菌種によって異なる可能性は否定できない。まったくエルゴステロール合成能を欠く種々のグラム陽性細菌に対して OCZ は *C. albicans* と同程度の強い抗菌活性を有する<sup>4)</sup>。われわれは *Torulopsis glabrata*, *Trichophyton mentagrophytes* など OCZ に対しより高い感受性をもつ菌種を用い、この問題をさらに詳細に検討しつつある。

Oxiconazole nitrate 精製原末標品の提供を仰いだ東京田辺製薬株式会社研究所に対し深謝いたします。

#### 文 献

- 1) MIXICH, G. & K. THIELE: Ein Beitrag zur stereospezifischen Synthese von antimykotisch wirksamen Imidazoloximäthern. Oxiconazol-nitrat (Sgd 301-76), ein neues Breitbandantimykotikum. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 29 (II): 1510~1513, 1979
- 2) 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
- 3) POLAK, A.: Antifungal activity *in vitro*, a phenylpropylmorpholine. *Sabouraudia* 21: 205~213, 1983
- 4) 平谷民雄, 内田勝久, 山口英世: Oxiconazole nitrate の *in vitro* 抗真菌活性に関する検討. *Chemotherapy* 32: 568~584, 1984
- 5) 内田勝久, 山口英世: モルモットの白癬モデルに対する新規イミダゾール誘導体 oxiconazole nitrate クリーム剤の治療効果. *Chemotherapy* 32: 585~601, 1984
- 6) KONZELMANN, M. & W. GRABER: Untersuchung über Wirkung und Verträglichkeit von Oxiconazol-creme an 100 Mykosepatienten. *Acta Therapeutica* 8: 361~365, 1982
- 7) BEIERDORFFER, H.; K. PICONIN & D. HERBOLD: Oxiconazol, ein neues topisches Antimykotikum bei der Behandlung von Dermatomykosen. *Acta Therapeutica* 9: 147~155, 1983

- 8) WEIHHASSE, H.: Erfahrungen über ein neues lokalwirksames Antimykotikum "Oxiconazol-Nitrat". *Praktischer Arzt.* 37: 302~309, 1983
- 9) HIRATANI, T. & H. YAMAGUCHI: Isolation and characterization of a triazole antimycotic BAY n 7133-resistant mutants of *Candida albicans* and *C. pseudotropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (Submitted).
- 10) 山口英世, 平谷民雄, 大隅正子, 岩田和夫: *Candida albicans* の変異株について—呼吸欠損変異株を中心に—. *真菌誌* 23: 132~142, 1982
- 11) 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・カニズム. *Chemotherapy* 30: 1439~1449, 1982
- 12) IWATA, K.; H. YAMAGUCHI & T. HIRATANI: Mode of action of clotrimazole. *Sabouraudia* 11: 158~166, 1973
- 13) PYE, G. W. & M. S. MARRIOTT: Inhibition of C 14 demethylation by imidazole-containing antifungals. *Sabouraudia* 20: 325~329, 1982
- 14) MARRIOTT, M. S.: Inhibition of sterol biosynthesis in *Candida albicans* by imidazole-containing antifungals. *J. Gen. Microbiol.* 117: 253~255, 1980
- 15) 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
- 16) NAGAI, S.; N. YANAGISHIMA & H. NAGAI: Advances in the study of respiratory-deficient (RD) mutations in yeast and other microorganisms. *Bacteriol. Rev.* 25: 404~426, 1961
- 17) GOTTLIEB, D. & P. D. SHAW: Antibiotics vol. 1 Mechanism of action, Springer-Verlag. *Antimycin A* (RIESKE, J. S.) pp. 542~584, 1967
- 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) FROMTHING, R. A.; H.-P. YU & S. SHADOMY: *In-vitro* inhibitory activities of 2 new orally absorbable imidazole derivatives: BAY n 7133 and BAYl 9136. *Sabouraudia* 21: 179~184, 1983
- 20) 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
- 21) BORGERS, M.: Mechanism of action of antifungal drugs, with special reference to the imidazole derivatives. *Rev. Infect. Dis.* 2: 520~534, 1980
- 22) DICKINSON, D. P.: The effects of miconazole on rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 26: 541~542, 1977
- 23) UNO, J.; M. L. SHIGEMATSU & T. ARAI: Primary site of action ketoconazole on *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 912~918, 1982
- 24) SHIGEMATSU, M. L.; J. UNO & T. ARAI: Effect of ketoconazole on isolated mitochondria from *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 919~924, 1982
- 25) VAN den BOSSCHE, H.; G. WILLEMSSENS, W. COOLS, W. F. J. LAUWERS & L. LE JEUNE: Biochemical effects of miconazole on fungi. II. Inhibition of ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *Chem. Biol. Interactions* 21: 59~78, 1978
- 26) VAN den BOSSCHE, H.; G. WILLEMSSENS, W. COOLS, F. CORNELISSEN, W. F. LAUWERS & J. M. VAN CUTSEM: Effects of the antimycotic drug ketoconazole on sterol synthesis. An *in vitro* and *in vivo* study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17: 922~928, 1980
- 27) 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
- 28) 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
- 29) BEGGS, W. H.; F. A. ANDREWS & G. A. SAROSI: Action of imidazole-containing antifungal drugs. *Life Science* 28: 111~118, 1981
- 30) ARAI, T.: Filamentous microorganisms—current topics of infection, toxicosis and control. *Proceedings of the 1st International Symposium on Chemobiodynamics, Advances in research of mechanism of imidazole-antimycotics action* (YAMAGUCHI, H.) (in Press).
- 31) 山口英世, 岩田和夫: Econazole の作用機序に関する研究 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
- 32) COPE, J. E.: Mode of action of miconazole on *Candida albicans*: effects on growth, viability and K<sup>+</sup> release. *J. Gen. Microbiol.* 19: 245~251, 1980
- 33) 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
- 34) 山口英世: 抗真菌剤の作用機序. *真菌誌* 18: 342~358, 1977
- 35) 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

- 36) BUTLER, K. W.; I. C. P. SMITH & H. SCHNEIDER : Sterol structure and ordering effects in spin-labelled phospholipid multilayer structures. *Biochim. Biophys. Acta* 219 : 514~517, 1970
- 37) CHILD, J. J.; G. DEFAGO & 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
- 38) GRUNZE, M. & B. DEUTICKE : Changes of membrane permeability due to extensive cholesterol depletion in mammalian erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 356 : 125~130, 1974
- 39) GRAHAM, J. M. & C. GREEN : The properties of mitochondria enriched *in vitro* with cholesterol. *Eur. J. Biochem.* 12 : 58~66, 1970
- 40) 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
- 41) 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
- 42) BAXTER, M. : Proceedings of the 8th Congress of International Society for Human and Animal Mycology, Molecular basis of the membrane-active property of imidazole antimycotics (YAMAGUCHI, H., Y. YAMAMOTO & T. FUJITA), pp. 294~297, Massey University, 1983
- 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 and 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) PIERCE, A. M.; H. D. PIERCE, A. M. UNRAU & C. OEHLISCHLGER : Lipid composition and polyene antibiotic resistance of *Candida albicans* mutants. *Canad. J. Biochem.* 56 : 135~142, 1978
- 50) SUD, I. J. & D. S. FEINGOLD : Mechanism of action antimycotic imidazoles. *J. Invest. Dermatol.* 76 : 438~441, 1981
- 51) JOLLOW, P.; G. M. KELLERMAN & A. W. LINNANE : The biogenesis of mitochondria. III. The lipid composition of aerobically and anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae* as related to the membrane system of the cells. *J. Cell. Biol.* 37 : 221~230, 1968
- 52) 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

## MODE OF ANTIFUNGAL ACTION OF OXICONAZOLE NITRATE TOWARD *CANDIDA ALBICANS*

TAMIO HIRATANI and HIDEYO YAMAGUCHI

Research Center for Medical Mycology, Teikyo University School of Medicine

To clarify the biochemical bases on which the potent antifungal action of oxiconazole nitrate, a new imidazole antimycotic, is exerted, the effects of this drug on major cellular metabolisms and functions of *Candida albicans* cells and on growth of several metabolic mutant strains of this yeast in comparison with that of their parent wild-type strain were studied. Oxiconazole nitrate at fungistatic levels ranging from 10 to 20  $\mu\text{g/ml}$  or above significantly and rapidly caused (i) inhibition of cellular respiration, especially oxidation of glucose as an exogenous substrate, (ii) inhibition of biosynthesis of all major cellular constituents including proteins, nucleic acids, wall polysaccharides and lipids, and (iii) suppression of influx of 2-deoxyglucose from the medium into the cells. Moreover, a respiratory-deficient mutant strain of *C. albicans* was shown to be more susceptible to oxiconazole nitrate than the comparable wild-type strain. It looks, therefore, likely that the oxidative energy metabolism may not be directly involved in the antifungal action of this drug. When oxiconazole nitrate was added to a *C. albicans* cell suspension at a final drug concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$  or above, acceleration of release of  $\text{K}^+$  and inorganic phosphate from the cells, as well as elevation of pH in an ambient medium, was rapidly induced. It suggests that this imidazole is membrane-active. Of all the fungal cell metabolisms tested C 4,14-demethylation in the pathway of ergosterol biosynthesis was most profoundly inhibited by oxiconazole nitrate. Based on the experimental data obtained by studies in which susceptibility to this drug was compared between the wild-type strain and a mutant strain lacking in ergosterol-synthesizing capability, we are led to the assumptive conclusion that the inhibitory effect of the drug on ergosterol synthesis is only responsible for its partial fungistasis and that the complete fungistatic or fungicidal action of the drug is more highly dependent on its membrane-active property.