

新規イミダゾール系抗真菌剤 710674-S の *Candida albicans* に対する作用機序

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 12 月 21 日受付)

新イミダゾール誘導体 710674-S の抗真菌活性の基盤として働く作用機序を明らかにすることを目的として、*Candida albicans* の主要な細胞機能に及ぼす影響を検討し、以下の成績を得た。

1. 本剤は 1.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度域で発育阻止作用を示した。その程度は薬剤濃度とともに高くなり、80 $\mu\text{g/ml}$ では軽度ながら殺菌的效果を生じた。

2. 本剤 40 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で、細胞呼吸は有意に阻害された。しかし、エネルギー代謝を異にする培養間で薬剤感受性を比較した結果、好氣的エネルギー代謝すなわち呼吸の阻害は本剤の抗菌作用と無関係であることが示された。

3. 主要細胞構成成分のうち、本剤によって有意に合成が阻害されたのは細胞壁多糖と脂質のみであり、40 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤濃度で 50% 以上の阻害が認められた。

4. 本剤は低濃度でステロール生合成経路の脱メチル化反応の段階に選択的に作用し、エルゴステロールの生成を強く阻害した。その阻害度は 1.25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 90% 以上に達した。

5. 本剤は 10 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で細胞内 K^+ および無機リン酸の迅速な放出および細胞外液 pH の上昇を促し、いずれの効果の強さも薬剤濃度に依存した。

6. エルゴステロール合成能を欠如した変異株は親株に比べて本剤に対する感受性が 1/2~1/4 に低下することから、比較的高濃度の薬剤の抗真菌作用は主として細胞膜障害によると考えられる。一方、それより低濃度域ではエルゴステロール合成阻害が抗真菌作用に主役を演じることが示唆された。

近年主として欧州の製薬企業研究所において多数のイミダゾール誘導体が合成され、抗真菌剤として開発研究がなされてきた。その幾つかはわが国にも導入されて基礎的ならびに臨床的検討が行なわれ、clotrimazole (CTZ), miconazole nitrate (MCZ), econazole nitrate (ECZ), isoconazole nitrate (ICZ) および tioconazole は、白癬などの表在性真菌症の局所的治療剤とすでに実用化されている。さらに若干の新しいイミダゾール剤も開発途上にある。

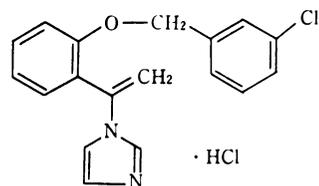
710674-S は、塩野義製薬研究所が最近開発した 1-[1-(*o*-*m*-chlorobenzoyloxy)phenyl]vinyl]-1*H*-imidazole hydrochloride の化学名をもつ新規イミダゾール誘導体である (Fig. 1)。

この化合物は、白癬菌を含む広範囲の病原真菌に対して強い *in vitro* 抗菌活性を示すとともに、白癬の動物モデルにおける局所的適用により優れた治療効果を発揮することが報告されている^{1,2)}。このような局所的抗真菌剤として満足すべき基礎的評価が得られたのに続き、710674-S の 1% クリーム剤およびゲル剤の表在性

皮膚真菌症に対する治療効果ならびに安全性に関する臨床試験が行なわれ、有用性を示す成績が得られている^{3,4)}。

化学構造 (Fig. 1) から明らかなように、710674-S は一種のフェニルビニルイミダゾール誘導体であり、ビスフェニルイミダゾール誘導体に属する CTZ およびフェニルエチルイミダゾール誘導体である MCZ, ECZ, ICZ など既存のイミダゾール剤と比べて化学構造上の特異性がみられる。本剤の生物学的活性についても他のイミダゾール剤と異なる特徴がみられる可能性を考慮しつつ、

Fig. 1 Chemical structure of 710674-S



作用機序に関する検討を行なうことを企図した。

本報では *Candida albicans* 野生株およびそれより人為的に誘導した変異株を試験菌として用い、710674-S の抗菌活性と直接的に関連する細胞内の生化学的過程を明らかにする目的で行なった実験成績について述べる。

I. 実験材料と方法

- 1) 使用菌株: *Candida albicans* TIMM 0144 を主な試験菌として使用し、一部の実験ではこの菌株から誘導したトリアゾール系抗真菌剤 BAY n 7133 耐性変異株⁵⁾を併用した。さらに、呼吸に関する実験には *C. albicans* MTU 12013 およびその呼吸欠損変異株⁶⁾を用いた。いずれの菌株も Sabouraud dextrose agar 斜面に継代保存した。
- 2) 薬剤溶液の調製: 塩野義製薬株式会社より分与された 710674-S 精製原末標品 (Lot 77) を 100% ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、8 mg/ml の濃度に調整した後、これを原液として -20°C に保存した。実験の前にこれを加温融解し、完全に薬剤が溶解していることを確認するとともに必要な濃度に希釈して使用した。希釈溶媒には DMSO を使用し、反応液にその 1/100 容量を添加した。また、実験ごとに 1% (v/v) DMSO のみを含む薬剤無添加対照反応系を設けて、薬剤の効果を比較検討した。Amphotericin B methyl ester (日本スライブ社より分与) および antimycin A (ICN NBC Laboratories, Inc.) はそれぞれ 100% DMSO および 100% エタノールに同様の方法で溶解、保存し、実験に供した。
- 3) 培養生菌数を指標とする抗菌活性の測定: Sabouraud dextrose broth (1% ポリペプトンおよび 2% グルコース含有, pH 無修正; 以下 SDB と略) に 1 週齢未満の若い斜面培養から採取した *C. albicans* 細胞を接種し、37°C で振盪した。この 18 時間培養を新鮮な SDB で希釈し、血球計算板を用いて 1 ml 当たり 10^6 細胞の濃度に調整した細胞浮遊液を作製した。この 10 ml ずつを段階的濃度の薬剤溶液 0.1 ml を含む各 L 型試験管に分注した後、37°C で振盪培養した。24 時間後にそれぞれの試験管から一定量の試料を採取、適宜希釈し、常法に従って Sabouraud dextrose agar 平板上に発育してくるコロニー数を数えることにより、もとの培養中の生菌数を測定した⁷⁾。
- 4) 培養濁度を指標とする抗菌活性の測定: 上記の生菌数測定におけるのと同様にして得られた SDB 培養を新鮮培地で約 2×10^5 細胞/ml の濃度に希

釈調整した後、種々の濃度の薬剤溶液 0.1 ml 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、分光光学的に 530 nm 波長における濁度を測定した。

- 5) 細胞呼吸活性の測定: SDB 中で 37°C 18 時間振盪培養して得られた *C. albicans* 細胞を集菌した後、0.4 mM KH_2PO_4 に浮遊し、遠沈するという操作を 3 回くり返すことにより洗浄を行なった。洗浄した細胞の浮遊液を 37°C で 4 時間振盪した。これを遠沈集菌して 0.4 mM KH_2PO_4 中に $1 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/ml の濃度になるように再浮遊した。この細胞浮遊液 2.0 ml を所定の容器にとり、外部基質依存性呼吸測定の場合にはさらにグルコース溶液を最終濃度 10 mM になるように加えた後、直ちに酸素電極 (Rank Brothers) を用いて 37°C 恒温下での酸素消費速度を測定した。数分後に薬剤溶液 20 μl を添加し、さらに測定を続け、薬剤添加前と添加後における酸素消費速度の比から薬剤による呼吸阻害度を算出した。
- 6) 各種放射性化合物の主要細胞成分への取り込み実験: 前報^{7,8)}に記した細胞浮遊液調製法、反応系および試料分画を用い、*C. albicans* 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 各画分への [³H] 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 [¹⁴C] グルコースの取り込み⁷⁾ならびに総脂質画分への [¹⁴C] 酢酸の取り込み⁸⁾を種々の濃度の薬剤存在下で測定した。いずれの反応系においても薬剤添加を 0 時間に行なった。
- 7) 各種ステロールへの放射性基質の取り込みと分画: PYE & MARRIOTT⁹⁾の方法に準拠し、*C. albicans* 細胞を [^{2-¹⁴C}] 酢酸 (ナトリウム塩) とともにインキュベートした後、ステロールをクラス別に分画し、それぞれの画分に取り込まれた放射能を測定した。まず SDB に培養した細胞を遠沈して集め、[^{2-¹⁴C}] 酢酸ナトリウム 50 $\mu\text{Ci/ml}$ を含む 1 mM 酢酸ナトリウムを添加した Rowley-Huber medium (Oxoid) に浮遊して $1 \sim 2 \times 10^6$ 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、種々の濃度の薬剤溶液を 1/100 容添加した後、37°C で 3 時間振盪した。遠沈集菌後、MARRIOTT¹⁰⁾の方法に従って不飽和脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーを行なった。薄層用スキャナーを用いて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

テロールの標準品を用いてそれぞれ C 4, 14-デスマチルステロールおよび前駆ステロールの位置を Rf 値に基づいて同定した後、各部分を切り取り、放射能を測定した。

- 8) K^+ および無機リン (Pi) 細胞外放出量の測定：基本的には前報¹¹⁾に述べたのと同じ方法を用いた。SDB 中に 37°C 、18 時間振盪培養して得られた *C. albicans* 細胞を遠沈集菌し、蒸留脱イオン水に再浮遊した後遠沈するという操作を 3 回くり返して充分に洗浄した。最後に蒸留脱イオン水に浮遊した細胞の濃度を $2\sim 3 \times 10^8$ 細胞/ml に調整し、この細胞浮遊液 10 ml ずつを、あらかじめ薬剤溶液 0.1 ml を添加しておいた L 型試験管に分注した。各試験管を 37°C で振盪しながらインキュベートし、反応開始 2.5 分から 10 分後まで経時的に試料を採取し、直ちにガラス線維濾紙 (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について、蛍光光度計 (日立 775 型) による K^+ 量の測定ならびに中村¹²⁾の方法による Pi 量の比色定量をそれぞれ行った。薬剤無添加対照細胞内の K^+ および Pi の全含量は、反応 0 時間の細胞を 5% 熱過塩素酸抽出して得られた画分についてのそれぞれの定量値から算出した。
- 9) 細胞外液 pH 値の連続測定：上記と同様の方法で調製した *C. albicans* 細胞浮遊液の一定量を容器にとり、 37°C 恒温層内で攪拌しながら薬剤溶液を添加し、pH メーター (日立-堀場 M-7 型, 6028 型複合電極装着) により 10 分間以上わたって pH 値を連続的に記録した。また、対照として薬剤溶液のみの pH 値も併せて測定した。
- 10) 試薬：[3, 4, 5- ^3H] L-leucine (120 Ci/mmol), [$^8\text{-}^3\text{H}$] adenine (25 Ci/mmol), [$^{\text{U-}}^{14}\text{C}$] D-glucose (240 mCi/mmol), [$^2\text{-}^{14}\text{C}$] acetic acid, sodium salt (60 mCi/mmol), 以上の放射性化合物はすべて Radiochemical Centre (英国) から購入した。特に記述のない一般試薬については、東京化成工業または和光純薬の製品を用いた。

II. 実験成績

1) *C. albicans* に対する抗菌力と作用様式

710674-S が本実験に使用されている主要試験菌である *C. albicans* TIMM 0144 株に対してどの程度の抗菌活性を示すか、また殺菌的效果を有するか否かを検討するため、本菌の一定細胞数を SDB に接種し、種々の濃度の薬剤存在下で 24 時間培養した後、それぞれの生菌数を測定した。

Fig. 2 Effect of 710674-S on growth of *C. albicans* as measured by viable counts. Cultures were grown at 37°C for 18 h with aeration. The inoculum size was approx. 10^8 cells per ml.

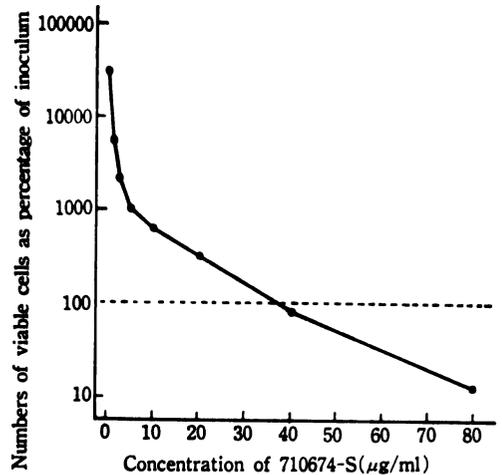


Fig. 3 Effect of 710674-S on respiration of *C. albicans* cells with and without glucose as an exogenous substrate.

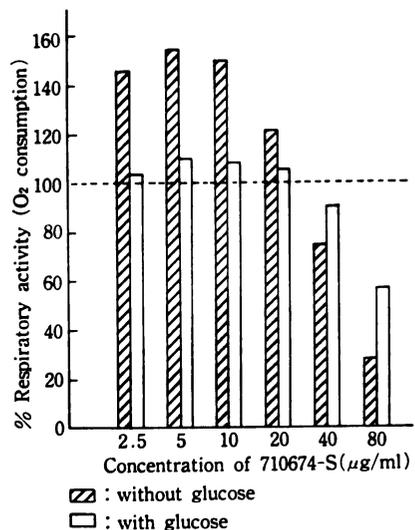
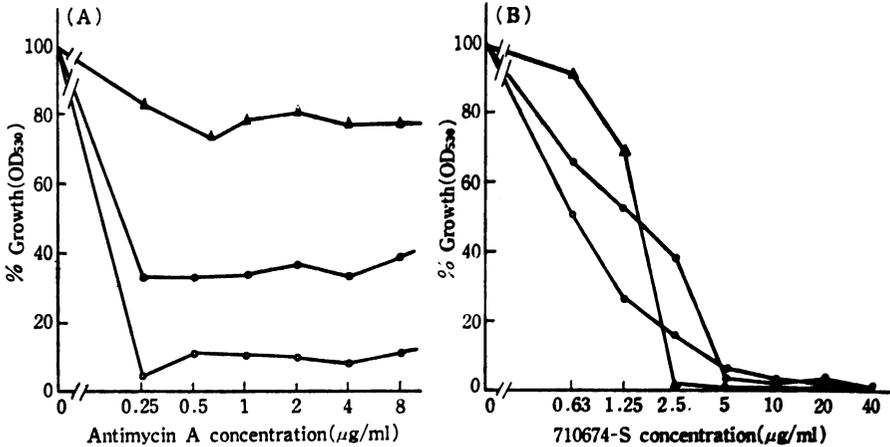


Fig. 2 に示されるように、薬剤無添加対照培養の生菌数と比較すると、 $1.25 \mu\text{g/ml}$ 以上の薬剤濃度で有意な発育阻止が認められ、 $20\sim 40 \mu\text{g/ml}$ ではほぼ完全に阻止され、生菌数は菌接種時と同じレベルに留まった。さらに $80 \mu\text{g/ml}$ に濃度を上げた場合には、菌接種時 (0 時間) に比べて生菌数は $1/10$ 以下に低下し、軽度ながら殺菌的效果が認められた。

Fig. 4 Effect of antimycin A (A) and 710674-S (B) on growth of wild type strain (MTU 12013) and respiratory-deficient mutant strain (MTU 12013 RD-4) of *C. albicans* in media containing 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.



2) 細胞呼吸に及ぼす影響

脱イオン水のなかで 37°C, 4時間 飢餓処理することによって細胞内基質をかなり消費させた *C. albicans* TIMM 0144 株細胞の自家呼吸能すなわち残存内部基質を利用する呼吸能およびこれに外部基質としてグルコースを与えた場合の呼吸能のそれぞれに対して 710674-S がどのような影響を及ぼすかを検討した。この実験条件下では、自家呼吸に比べて外部基質依存性呼吸は 2.5~3.0 倍高い Q_{O_2} 値 (mg タンパク量当り) を示した。

Fig. 3 に図示される実験成績から明らかなように、自家呼吸は 2.5~20 µg/ml すなわち部分的発育阻止効果をもつ薬剤濃度範囲で促進される傾向があり、5 µg/ml では薬剤無添加対照に比べて 55% も高い値を示した。しかし、20 µg/ml 以上に薬剤濃度を高めた場合には次第に強く呼吸は阻害され、40 および 80 µg/ml では Q_{O_2} 値は、それぞれ対照の 75%, <30% に低下した。一方、外部基質依存性呼吸は、どのような薬剤濃度でもまったく促進されることはなかった。40 および 80 µg/ml の薬剤存在下では明らかに阻害されたが、その阻害度は自家呼吸よりも低かった。

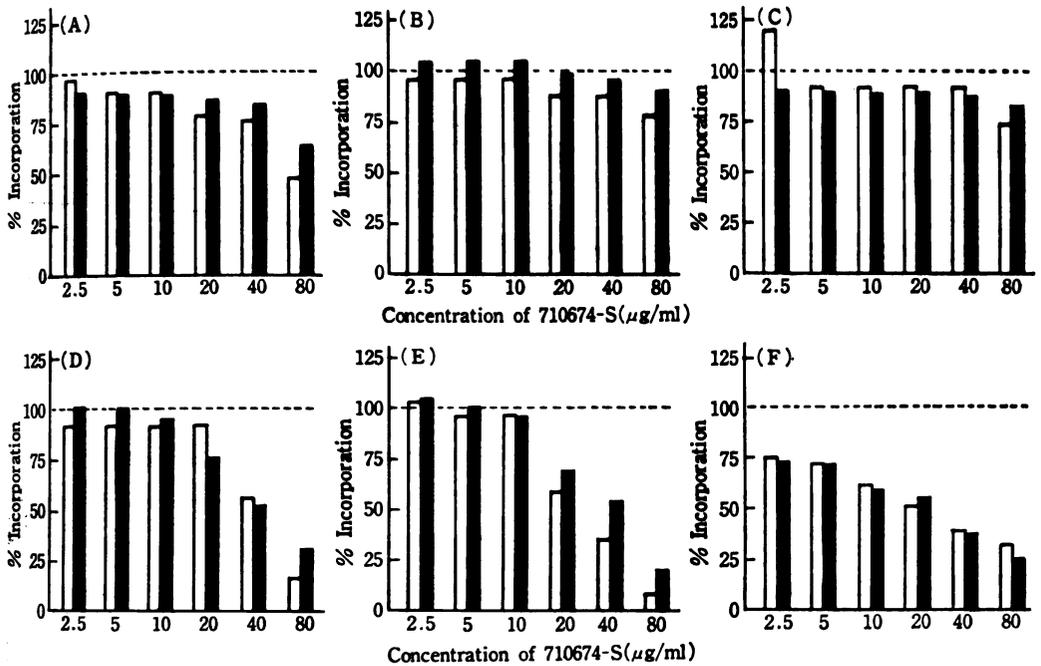
3) エネルギー代謝様式の異なる培養の発育に及ぼす影響

C. albicans など大部分の酵母状真菌は通性嫌気性であり、通常の好氣的培養条件下でグルコースのような発酵性基質が炭素源として与えられた場合には、必要なエネルギーの大部分を好氣的呼吸によって、また一部を発酵

によって獲得する。一方、同じく好氣的条件下でグリセリンなどの非発酵性基質が供給される唯一の炭素源である場合には、これはすべて好氣的呼吸によるのみ代謝され、エネルギーが産生されることになる。こうした野生型の親株から誘導される呼吸欠損変異株は、好氣的条件下においても非発酵性基質をまったく利用できず¹⁴⁾、したがって、発酵性基質の発酵によるのみエネルギーを獲得するはずである。そこでこのような通性嫌気性酵母における基質の相違および野生型株と呼吸欠損変異株との間のエネルギー代謝様式の相違を利用して、710674-S の抗真菌活性が好氣的エネルギー代謝すなわち呼吸と関連するか否かを検討した。そのために *C. albicans* MTU 12013 株 (野生型株) とそれに由来する呼吸欠損変異株 MTU 12013 RD-4 株⁹⁾ を用い、それぞれの培養の本剤に対する感受性を比較検討した。

Fig. 4 に対照薬剤として用いた酵母の特有的呼吸阻害剤 antimycin A¹⁴⁾ および 710674-S に対する 3 種類の *C. albicans* 培養すなわち (i) 野生型株のグルコース培養、(ii) 野生型株のグリセリン培養、および (iii) 呼吸欠損変異株のグルコース培養、それぞれの発育の感受性を示す。Antimycin A は、予期したとおり、好氣的エネルギー代謝すなわち呼吸のみを営む (ii) に対して最も強い抗菌活性を示し、発育阻害度は 90% に達した (Fig. 4 A)。一方、嫌氣的エネルギー代謝のみを営む (iii) は最も感受性が低く 20% 程度の発育阻害を受けるに過ぎなかった。好氣的ならびに嫌氣的エネルギー代謝

Fig. 5 Effect of 710674-S on synthesis of major cellular constituents in *C. albicans* cells as measured by incorporation of specific radioactive compounds for 20 min. (□), and 40 min. (■). Incorporation of: A, [³H] leucine into protein; B, [³H] adenine into RNA; C, [³H] adenine into NDA; D, [¹⁴C] glucose into alkali-insoluble polysaccharides; E, [¹⁴C] glucose into mannan; and F, [¹⁴C] acetate into total lipids.



の双方を営む (i) の antimycin A 感受性は (ii) と (iii) の中間に位置し、60~70% の阻害が認められた。次に、(i)、(ii)、(iii) のそれぞれの発育に対する 710674-S の抗菌活性を同様に測定したが、この薬剤に対する感受性は三者の間で有意な差異が認められず、(i)、(ii) は 5 µg/ml 以上、(iii) は 2.5 µg/ml 以上の薬剤濃度ではほぼ完全に発育を阻止された (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各合成系に対する 710674-S の作用の有無と強さを知るために、それぞれの細胞成分へ取り込まれる特異的基質の放射能を指標として薬剤の効果を比較検討した。Fig. 5 は反応時間 20 および 40 分における成績をまとめたものである。

この図から明らかなように、タンパク質、RNA および DNA のいずれの合成も 80 µg/ml に至るまで用いた 710674-S のすべての濃度範囲でほとんど影響を受けなかった。一方、主として β-グルカンからなると考えら

れる酸不溶アルカリ不溶多糖画分およびマンナンの高主要細胞壁多糖の合成速度は、40 および 80 µg/ml の薬剤存在下でそれぞれ 50, 80% 程度に低下し、情報高分子物質の合成よりも強く阻害されることが認められた。しかし、10 µg/ml 以下の低濃度薬剤は細胞壁多糖の合成に対してもほとんど阻害効果を示さなかった。脂質合成に対する本剤の阻害効果は、40~80 µg/ml の高濃度では細胞壁多糖合成に対するそれと同程度であったが、10 µg/ml 以下の濃度でも有意な阻害を受けた。

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して 710674-S がどのような影響を与えるかを知るために、種々の薬剤濃度下で標識酢酸を取り込ませた細胞から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、およびその代謝的前駆体であるジメチルステロールならびにトリメチルステロールの 3 画分をそれぞれ分離し、含まれる放射能を指標として各画分の合成量比を調べた。

Fig. 6 Effect of 710674-S on synthesis of ergosterol in *C. albicans* cells as measured by incorporation of [$2\text{-}^{14}\text{C}$] acetate into three sterol classes. Incorporation into: ○, C 4, 4', 14-trimethyl sterols; ●, C 4, 14-dimethyl sterol; and △, C 4, 14-desmethyl sterols.

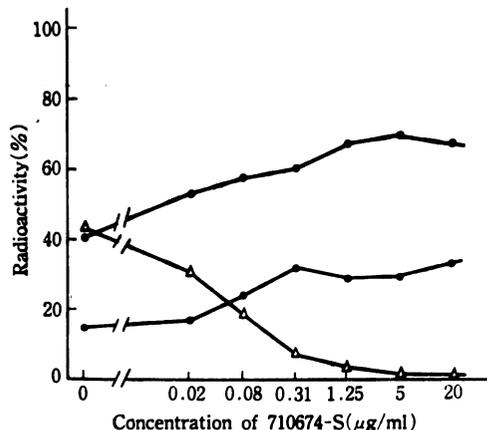


Fig. 6 に示されるように、デスメチルステロールの合成は $0.08 \mu\text{g/ml}$ という低濃度の薬剤により 50% 以上阻害され、 $1.25 \mu\text{g/ml}$ での阻害度は 90% 以上に達した。これに対して、他の 2 つの前駆ステロールクラスの合成は、この濃度範囲の薬剤ではまったく阻害されないばかりか、薬剤濃度が高くなるにつれて合成は促進される傾向を示した。これらの成績から、本剤は極めて低濃度でステロール合成経路を C 4, 14 脱メチル化反応の段階で遮断し、デスメチルステロールの生成を特異的に阻害することが判明した。

6) 細胞内カリウムイオンおよび無機リンの放出促進効果

細胞内カリウムイオン (K^+) および無機リン (Pi) の放出量を指標として 710674-S が細胞膜障害を引き起こすか否かを検討した。蒸留脱イオン水に浮遊した *C. albicans* 細胞からは、10 分間の測定時間内に細胞内部から外液中への K^+ または Pi の放出はほとんど認められなかった。この条件下で細胞浮遊液に $10 \mu\text{g/ml}$ 以上の薬剤をあらかじめ添加しておいた場合には、有意な量の K^+ および Pi の放出が反応開始後 2.5 分以内から観察され、時間とともに増強された (Fig. 7, 8)。 K^+ , Pi とも放出速度ならびに放出量は薬剤濃度に依存して増大した。その結果、 $80 \mu\text{g/ml}$ の薬剤存在下では、細胞内 K^+ 含量はほぼ匹敵する量の K^+ が、また Pi にいたっては細胞内 Pi 含量の約 2 倍に相当する量がいずれも反応開始後 10 分以内に細胞外液中へ放出された。後者の成績から、高濃度薬剤処理細胞においては、細胞内プ

Fig. 7 Release of K^+ induced by 710674-S from *C. albicans* cells

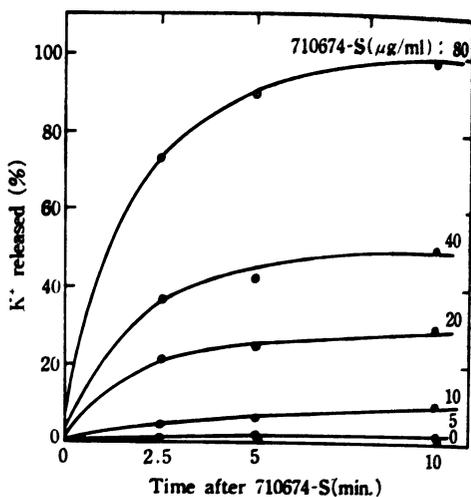
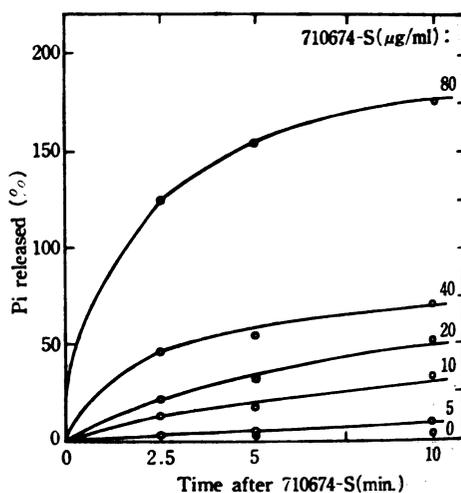


Fig. 8 Release of inorganic phosphorus induced by 710674-S from *C. albicans* cells

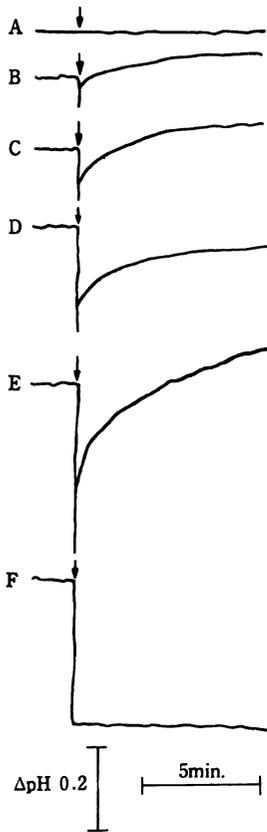


ールにある Pi のみならず、各種ヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸などの有機リン酸化合物の分解が促進され、その結果生じた Pi もまた大量に放出されると推定される。

7) 細胞外液 pH に及ぼす影響

上述の成績に示されるように、細胞内 K^+ が大量に外液中に放出されるならば、当然これは外液の pH 値の上昇をひき起こす結果となることが予想され、この pH の変化もまた細胞膜障害を示唆する一つの指標とみなしうると考えられる。しかも細胞外液の pH 値測定は、

Fig. 9 pH changes produced by 710674-S 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 $\mu\text{g/ml}$.



K^+ や P_i の定量と比べてはるかに容易で、感度が高く、しかも反応開始時から連続的に記録できるという利点がある。このような理由から *C. albicans* 細胞浮遊液に種々の濃度で 710674-S を添加し、外液中の pH 値の変化を追跡した。

Fig. 9 に代表的な実験データを示す。薬剤無添加対照の細胞浮遊液においては、10 分間の測定時間内ではまったく pH の変化を示さなかった。一方、細胞浮遊液に薬剤を添加した場合には、その濃度にかかわらず、瞬間的に pH 値が低下した。これは本剤が弱塩基性物質の塩酸塩¹⁾ であるために、その水溶液が呈する強酸性におそらく由来するものと考えられる。pH 低下の程度

は、当然のことながら薬剤濃度に依存し、80 $\mu\text{g/ml}$ では ΔpH 0.4 の低下をみた。しかし、いったん低下した pH 値は再び速やかな上昇を示し、その速度と程度とは薬剤濃度とともに増大した。2.5 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤濃度ですでに有意な pH 上昇が認められ、80 $\mu\text{g/ml}$ では 10 分後に ΔpH 0.5 に達した。

8) BAY n 7133 感受性野生型株と耐性変異株との間での 710674-S 感受性の比較

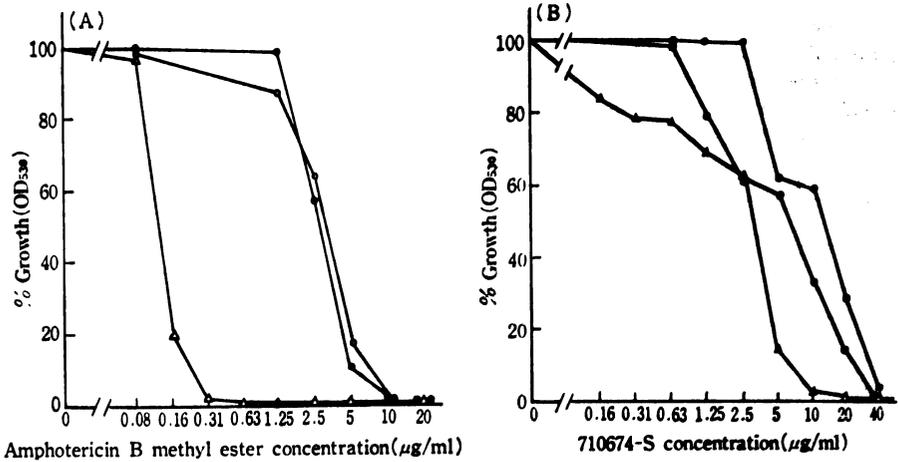
トリアゾール誘導体の一つ BAY n 7133 (vibunazole) は *C. albicans* その他の *Candida* に対して比較的強い *in vitro* 抗菌活性をもつ¹⁵⁾。 *C. albicans* TIMM 0144 株もまたこの薬剤に感受性であるが、それから誘導された MIC 値が 20~40 倍上昇した耐性変異株はいずれもエルゴステロール含量が低く、発育にエルゴステロールと不飽和脂肪酸を部分的に要求し、しかも、amphotericin B などのポリエン抗生物質に対しても耐性化していることが見出された⁵⁾。したがって、これらの耐性株は、エルゴステロール合成過程に欠損をもつ変異株と推定されたので、親株(野生型株)との間で 710674-S に対する感受性を比較することにより、本剤の抗菌活性がエルゴステロール合成阻害に基づいて発現されるのか否かを検討した。

Fig. 10 に示されるように、*azr-1* および *azr-2* の二つの BAY n 7133 耐性変異株は、親株に比べて、amphotericin B に対する耐性度は IC_{50} , MIC (IC_{100}) 値のいずれの点からみても 30 倍もの上昇を示しているのが認められた (Fig. 10 A)。これに対して、710674-S に対する変異株の感受性を親株のそれと比較すると、MIC 値が親株の 20 $\mu\text{g/ml}$ から変異株の 40 $\mu\text{g/ml}$ へと 2 倍の上昇を、また IC_{50} 値は 3 $\mu\text{g/ml}$ から 6~12 $\mu\text{g/ml}$ と 2~4 倍の上昇をそれぞれ示したに過ぎなかった。一方、両変異株の細胞浮遊液に薬剤を添加した場合の外液中の pH 上昇パターンは親株で得られた成績 (Fig. 9) と基本的に一致することが認められた (データ省略)。

III. 考 察

種々のイミダゾール誘導体についてのこれまでの研究から、*C. albicans* などの感受性真菌においては次のような幾つかの異なる作用メカニズムが働くことが報告されている。(i) 酸化酵素および過酸化酵素の合成阻害^{16,17)}、(ii) 呼吸酵素系阻害^{18,19)}、(iii) エルゴステロール合成阻害^{10,20,21)}、(iv) 細胞膜障害^{8,22)}。それぞれの作用機序は必ずしもすべてのイミダゾール剤について見出されたわけではない。しかし、これまで開発され、検討されてきたイミダゾール剤にみられる化学的ならびに生物学的性状の共通性を考慮すると、上記の各作用機序は、たとえ程度の差はあるにせよ、基本的にはすべてのイミダゾ

Fig. 10 Effect of amphotericin B methyl ester (A) and 710674-S (B) on growth of wild type strain (TIMM 0144, Δ) 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



ール剤に普遍的に備わっていると理解してよからう。

わが国で開発された初めてのイミダゾール系抗真菌剤である 710674-S の作用機序の究明を企図するに当たって、これまで想定されている上記 (i)~(iv) の作用機序のうち、比較的多数のイミダゾール剤について証明されている後三者を中心に本剤作用の特徴を生化学的に検討した。

C. albicans 細胞および単離ミトコンドリアにおける呼吸酵素阻害作用を ketoconazole (KCZ) が示すことは、UNO *et al.*¹⁸⁾、SHIGEMATSU *et al.*¹⁹⁾ の同一研究グループにより報告されたが、それ以外に CTZ, MCZ, ECZ, ICZ, sulconazole (SCZ) などこれまで調べられたイミダゾール剤はいずれも多少とも *C. albicans* 細胞の呼吸を阻害することが知られている^{8,11,23-25)}。この作用機序に関して 710674-S で検討した結果、Fig. 3 に示されるように、40 μg/ml すなわち完全発育阻止濃度で *C. albicans* 細胞の呼吸、とくに自家呼吸を有意に阻害することが認められた。しかし、本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、グルコースなど発酵性基質が供給される限り、発育に必要なエネルギーのかなりの部分は発酵のみで産生できるはずである。したがって、今回の実験の場合のように、大量のグルコースを含む SDB などの発育培地を使用するならば、ある薬剤が呼吸を強く阻害したとしても、それは発育阻止効果としては発現してこないと考えられる。この推論は Fig. 4 に示される実験成績から支持された。すなわち、真菌における特異的呼吸阻害剤として知られる antimy-

cin A は、非発酵性基質グリセリンに依存する *C. albicans* 培養の発育を 90% 阻害したのに比べて、グルコース培地での発育に対する阻害度は 60~70% 止りであり、おそらくこの阻害効果の低下は発酵によって獲得されるエネルギーで支えられる発育に基づくものと見なすことができよう。一方、710674-S は、いずれの培養に対しても、また大部分のエネルギー産生を発酵のみによって行なう呼吸欠損変異株の培養に対してもほぼ同程度の発育阻害を示し、しかも 10 μg/ml 以上の薬剤濃度による阻害度はほぼ 100% に達した。この成績は、本剤の作用機序が antimycin A のそれとは明らかに異なること、また本剤による呼吸阻害は発育阻止作用の少なくとも一次的メカニズムとはなりえないことを示唆するものである。本剤が他の幾つかのイミダゾール剤と同様に、偏性嫌気性菌に対して *C. albicans* と同程度の抗菌活性を示す成績²⁾からもこの推論は支持されよう。

ステロール合成系は、後述の細胞膜とならんでイミダゾール剤の主要な作用標的と想定されているものであり、この作用機序は VAN DEN BOSSCHE *et al.*²⁰⁾ により最初に確認された。彼らは MCZ が *C. albicans* 細胞における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の C-14 位メチル基の脱メチル化反応を選択的に阻止することによりエルゴステロール合成阻害をひき起こすこと、またこの阻害効果は本菌に対する MCZ の MIC の 1/1,000 以下の低濃度でも有意に認められるほど強いことを明らかにした。エルゴステロールは、好氣的な通常の条件下で培養された酵母細胞の主要ステロ-

ルであり^{30,37)}、主として細胞膜に存在し^{20,38)}、細胞の発育ならびに膜の機能と構造の維持に重要な役割を演じていると考えられる³⁰⁾。そのためエルゴステロールを喪失した通常の酵母細胞は発育不能に陥ることが知られている³¹⁾。同様のメカニズムによる強力でしかも特異的なエルゴステロール合成阻害作用は、他の種々のイミダゾール剤について細胞レベルでは無論のこと無細胞系においても確認されている^{9,10,30)}。このような知見を背景に、現在イミダゾール剤全般を通じてその一次的作用機序がエルゴステロール合成阻害にあるとする説は極めて有力になっている。

今回得られた 710674-S についての実験成績は、本剤が *C. albicans* 細胞においてジメチルステロールまたはトリメチルステロールからデスメチルステロールに変換される過程に選択的に作用することを示した (Fig. 6)。*Candida* などの酵母にあっては、デスメチルステロールは主としてエルゴステロールから成ることが知られており、したがって、本剤は従来の他のイミダゾール剤について報告されたと同様、エルゴステロールの合成を前駆ステロールの脱メチル化反応の段階で阻害すると見なすことができよう。加えて、この阻害効果は極めて強く、1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ すなわち完全発育阻止濃度である 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ よりもはるかに低い濃度でエルゴステロール合成はほぼ完全に停止した。したがって、定量的にみても本剤のエルゴステロール合成阻害作用は、他のイミダゾールのそれに匹敵するといえることができる。

著者らが CTZ での研究に基づいてイミダゾール剤の主要作用機序として最初に提唱した細胞膜障害作用は、MCZ, ECZ, ICZ, SCZ などその後検討されたすべてのイミダゾール剤で例外なく見出されており、しかも殺菌的濃度もしくは少なくとも MIC 値以上の比較的高い濃度ではじめて顕著に現われる点が特徴である^{9,11,22-25,32)}。今回の実験成績から、710674-S が 5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で検出可能な量の細胞内 K^+ および無機リン酸化合物を迅速に放出させること、細胞外液 pH も同様の速さで上昇させること、しかもこれらの二つの効果の強さはともに薬剤濃度に依存することが認められた (Fig. 7~9)。 K^+ をはじめとする細胞内陽イオンが放出されればそれに共役して外液中の H^+ の細胞内移行が起こり、これが外液の pH を上昇させる結果となる。したがって、細胞内 K^+ の放出と外液 pH の上昇という二つの指標は、細胞膜障害によってもたらされる一つの現象の異なる表現にすぎないと理解することができる。事実、それぞれの指標で表わされる生化学的変化の時間的経過や程度は、互いに極めてよく対応している。こうした効果が細胞膜の構造的・機能的障害を反映していることは、細胞

膜障害作用をもつポリエン抗生物質そのほかの抗真菌剤の作用機序に関する研究から明らかである³³⁾。710674-S は、比較的高い濃度で細胞膜障害をひき起こす点でも従来のイミダゾールと共通の作用機序をもつことが強く示唆される。

K^+ などの細胞内成分の放出は、細胞膜透過性が異常に亢進することに起因すると考えられる。生体膜および人工膜モデル系を用いた実験成績によれば、ステロールには膜に硬さを与える働きがあり^{34,35)}、種々の陽イオン、陰イオンまたは非電解質の膜透過性はステロールの挿入または置換によって著しく変化する³⁶⁻³⁸⁾。したがって、*C. albicans* などの酵母においてエルゴステロール合成が阻害された場合には、細胞膜のエルゴステロール欠乏による膜透過性の異常亢進すなわち細胞膜障害がもたらされる可能性が考えられる。しかしながら、5~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の比較的高い濃度の 710674-S を添加したときには、その直後から細胞内成分の放出ならびに外液中 H^+ の細胞内移行が開始した。この反応の迅速さから判断して、細胞膜障害はエルゴステロール合成阻害に由来する間接的な薬剤の効果に起因するのではなく、薬剤と細胞膜成分との直接的相互作用に基づくと考えざるをえない。すでに、種々のイミダゾール剤については、膜リン脂質との物理化学的反応の結果、膜流動性が高まり、膜透過性の亢進が起こることが確かめられている^{22,30)}。おそらく、710674-S も同様のリン脂質親和性を有し、これと直接的に反応することによって細胞膜障害を引き起こすと推測される。

710674-S は、エルゴステロールをはじめとする脂質以外にも、酸不溶アルカリ不溶性多糖およびマンナンなどの多糖画分の合成をかなり強く阻害した (Fig. 5)。前者の画分は主として β -グルカンからなり、マンナン-タンパク複合体と合わせて、*C. albicans* における最も主要な細胞壁構成多糖である⁴⁰⁾。いずれの合成系も細胞膜に結合して存在しており⁴¹⁾、したがって、細胞膜の化学組成や物性が変化を受ければ、これらの合成酵素活性に影響が及ぶ可能性は当然予測されることである。また、われわれの予備的成績から、本剤は *C. albicans* および *Saccharomyces cerevisiae* のプロトプラスト膜から調製した β -1,3-グルカンおよびマンナン-タンパク複合体の各無細胞合成系の酵素反応をほとんど阻害しないことが認められており、したがって、本剤はこれらの細胞壁多糖の合成系に対して酵素レベルでの直接作用をもたないと推測される。これらの成績から、細胞レベルで観察された本剤の細胞壁多糖合成阻害効果は、細胞膜作用を介しての二次的作用と見なすのが妥当であろう。

以上述べた 710674-S の想定作用機序に関するすべて

の実験成績を総合的に考慮するならば、*C. albicans* に対する本剤の抗菌活性にはエルゴステロール合成阻害および細胞膜障害のいずれか一方または両者が一次的に関与する可能性が示唆される。この二つの作用機序を比較すると、本剤が他のイミダゾール剤と同様、細胞膜障害を引き起こす濃度よりもはるかに低い濃度でエルゴステロール合成を有意に阻害するという成績は、後者に主要作用機序を求める根拠を提示していると解釈することができるかも知れない。しかし、本剤のエルゴステロール合成阻害濃度が *C. albicans* 発育阻止濃度に比べてあまりにも低いことは、むしろこのエルゴステロール合成阻害作用が抗菌作用に直接関与していない可能性をより強く示唆していると解釈することもできる。この推論は次の二つの知見によっても支持されよう。(1) 本来ステロールをまったく合成せずまた含有もしない細菌の中でグラム陽性菌の多くは *C. albicans* と同程度に本剤によって発育阻止される³⁾。(2) *C. albicans* ポリエン耐性株のように、エルゴステロールを合成できないためにこれをほとんど含有しないにもかかわらず、十分な発育能と生存能をもつ変異株が見出されている⁴⁾。SUN & FEINGOLD⁴⁾ は、*S. cerevisiae* などの通性嫌気性酵母の KCZ 感受性を嫌気的条件下と好気的条件下とで比較検討した実験で、エルゴステロール合成の起こらない前者の条件下のほうで感受性が低下することから、このイミダゾール剤低濃度域での静菌的作用はエルゴステロール合成阻害に基づく結論した。しかしながら、嫌気的条件下での培養においては、イミダゾール剤親和性の低い飽和型リン脂質⁴⁾の細胞膜含量が増すこと⁴⁾やイミダゾール剤に対して強い拮抗作用をもつ不飽和脂肪酸⁴⁾が培地に添加されていることを考慮するならば、彼らが設定した実験条件下での成績からの結論の導き方には疑問があり、したがってエルゴステロール合成阻害と細胞膜障害のいずれが本剤ならびに他のイミダゾール剤の抗真菌作用メカニズムとして主役を演じているかは依然として不明であると言わざるをえない。

今回われわれはこの問題のより明確な解答を得るためのアプローチとして、酵母におけるエルゴステロール合成を特異的に阻害するが細胞膜障害作用をもたないことが見出された BAY n 7133 に対する *C. albicans* 感受性親株と耐性変異株との間で 710674-S に対する感受性を比較検討した。この耐性変異株にエルゴステロール合成能が欠けていることは、細胞膜エルゴステロールを作用標的とする amphotericin B³⁾ に対しても顕著な耐性を示すことから明らかである (Fig. 10 A)。他方、710674-S に対するこの耐性変異株の感受性は、1/2~1/4 程度低下しているに過ぎなかった (Fig. 10 B)。これ

と耐性変異株が親株と同程度に本剤による細胞膜障害を受けることを考え合わせると、本剤の抗 *Candida* 作用の基盤として働くメカニズムについて次の推論が導かれよう。(1) MIC の 2~4 倍高い濃度、とくに殺菌的濃度では細胞膜障害が主要メカニズムである。(2) それ以下の濃度域における抗菌作用すなわち静菌の完全発育阻止作用および部分的発育阻止作用はエルゴステロール合成阻害に基づく。これまでの予備的成績から、いずれのイミダゾール剤においても細胞膜障害作用に基づく抗菌作用は、被験菌の感受性とは無関係に 10~20 µg/ml 以上で発現されることが見出されている。したがって、今回実験に使用した *C. albicans* 株のように比較的感受性の低い菌種もしくは菌株においてはエルゴステロール合成阻害作用のみによってもたらされる完全発育阻止の濃度域は極めて狭いが、高度感受性菌においてはこれが広い濃度域にわたる可能性が考えられる。

710674-S の精製原末標本を提供して頂いた塩野製薬株式会社研究所に深謝いたします。

文 献

- OGATA, M.; H. MATSUMOTO, Y. HAMADA, M. TAKEHARA & K. TAWARA: 1-(1-(2-((3-chlorobenzyl)oxy)phenyl)vinyl)-1*H*-imidazole hydrochloride, a new potent antifungal agent. *J. Med. Chem.* 26: 768~770, 1983
- 飯 勝也, 砂川剛雄, 竹間盛夫: 710674-S の抗真菌作用に関する研究 第 1 報 *In vitro* 抗真菌活性。真菌誌 (投稿中)
- 東 禹彦, 渡辺昌平, 宗 義朗, 土井 顕: 710674-S の表在性真菌症に対する治療効果。皮膚 25: 729~739, 1983
- 710674-S 研究班: 抗真菌外用剤 710674-S クリームおよびゲルの皮膚真菌症に対する多施設共同研究による臨床効果の検討。皮膚 (印刷中)
- HIRATANI, T. & H. YAMAGUCHI: Isolation and characterization of a triazole antimycotic BAY n 7133-resistant mutants of *Candida albicans* and *C. pseudopedropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (submitted)
- 山口英世, 平谷民雄, 大隈正子, 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
- 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: 1439~1499, 1982
- IWATA, K.; H. YAMAGUCHI & T. HIRATANI: Mode of action of clotrimazole. *Sabouraudia* 11: 158~166, 1973
- PYE, G. W. & M. S. MARRIOTT: Inhibition of C 14-demethylation by imidazole-containing antifungals. *Sabouraudia* 20: 325~329, 1982
- MARRIOTT, M. S.: Inhibition of sterol bio-

- synthesis in *Candida albicans* by imidazole-containing antifungals. *J. Gen. Microbiol.* 117: 253~255, 1980
- 11) 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
 - 12) 中村道徳: 硝酸の比色定量法. 農化誌 34: 1~5, 1959
 - 13) 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
 - 14) RIESKE, L. S.: Antimycin A. *In* Antibiotics. vol.1 Mechanism of action (GOTTLIEB, D & P. D. SHAW ed.), pp.542~584, Springer-Verlag, New York, 1967
 - 15) 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
 - 16) DE NOLLIN, S.; H. VAN BELLE, F. GOOSENS, F. THONE & M. BORGERS: Cytochemical and biochemical studies of yeast after *in vitro* exposure to miconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 500~513, 1977
 - 17) BORGERS, M.: Mechanism of action of antifungal drugs, with special reference to the imidazole derivatives. *Rev. Infect. Dis.* 2: 520~534, 1980
 - 18) UNO, J.; M. L. SHIGEMATSU & T. ARAI: Primary site of action of ketoconazole on *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 912~918, 1982
 - 19) SHIGEMATSU, M. L.; J. UNO & T. ARAI: Effect of ketoconazole on isolated mitochondria from *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 919~924, 1982
 - 20) 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
 - 21) VAN DEN BOSSCHE, H.; G. WILLEMSSENS, W. COOLS, F. CORNELISSEN, W. F. J. 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
 - 22) 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
 - 23) 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
 - 24) 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
 - 25) 西木克信, 工藤大悟, 押野 隆: Isoconazole の抗真菌作用に関する研究—*Candida* 酵母にたいする殺菌機序. 真菌誌 23: 227~239, 1982
 - 26) 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
 - 27) PENMAN, C. S. & J. H. DUFFUS: Ergosterol is the only sterol in *Kluyveromyces fragilis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 40: 529~531, 1974
 - 28) LONGLEY, R. P.; A. H. ROSE & B. A. KNIGHTS: Composition of the protoplast membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 108: 401~412, 1968
 - 29) 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
 - 30) 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
 - 31) 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
 - 32) 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
 - 33) 山口英世: 抗真菌剤の作用機序. 真菌誌 18: 342~358, 1977
 - 34) 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
 - 35) 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
 - 36) CHILD, J. J.; G. DEFAGO & E. 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
 - 37) GRUNZE, M. & B. DEUTICKE: Changes of membrane permeability due to extensive chole-

- sterol depletion in mammalian erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 356 : 125~130, 1974
- 38) GRAHAM, J. M. & C. GREEN : The properties of mitochondria enriched *in vitro* with cholesterol. *Eur. J. Biochem.* 12 : 58~66, 1970
- 39) YAMAGUCHI, H.; Y. YAMAMOTO & T. FUJITA : Molecular basis of the membrane-active property of imidazole antimycotics. In *Proceedings of the 8th Congr. ISHAM (BAXTER, M. ed.)*, pp.294~297, Massey University, New Zealand, 1983
- 40) ODDS, F. C.: Structure, physiology and biochemistry of *Candida*. In *Candida and candidosis*, pp.16~28, University Park Press, 1979
- 41) FARKAS, V.: Biosynthesis of cell wall of fungi. *Microbiol. Rev.* 43 : 117~144, 1979
- 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) SUD, I. J. : & D. S. FEINGLOLD : Mechanisms of action of antimycotic imidazoles. *J. Invest. Dermatol.* 76 : 438~441, 1981
- 44) 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
- 45) JOLLOW, D.; 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
- 46) 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

STUDIES ON THE MECHANISM OF ACTION OF A NEW IMIDAZOLE ANTIMYCOTIC 710674-S

TAMIO HIRATANI and HIDEYO YAMAGUCHI

Research Center for Medical Mycology, Teikyo University
School of Medicine, Hachioji, Tokyo 192-03, Japan

With an attempt for clarifying the action mechanism of a newly developed imidazole derivative 710674-S, on which its antifungal activity is based, the effect of this drug on various major cellular functions of *Candida albicans* cells was studied. The results are summarized as follows :

(1) 710674-S inhibited growth of the yeast at drug concentrations higher than 1.25 $\mu\text{g/ml}$. The extent of growth inhibition increased with increasing drug concentrations and a slight fungicidal activity was exerted by 80 $\mu\text{g/ml}$ of the drug.

(2) Cell respiration was significantly inhibited by 710674-S at a concentration of 40 $\mu\text{g/ml}$ or above. However, the results of experiments in which drug susceptibility was compared among cultures different in energy metabolism suggested irrelativeness of the antifungal activity of 710674-S to its inhibitory effect on aerobic energy-yielding metabolism or respiration.

(3) Synthesis of wall polysaccharides and lipids but that of any other major cellular constituents were profoundly inhibited by 710674-S ; more than 50% inhibition was attained at a drug level of 40 $\mu\text{g/ml}$.

(4) Lower concentrations of 710674-S selectively blocked C4,14-demethylation in the sterol biosynthesizing pathway in *C. albicans*. The extent of inhibition was more than 90% at 1.25 $\mu\text{g/ml}$ of the drug.

(5) 710674-S at concentrations higher than 10 $\mu\text{g/ml}$ induced rapid release of intracellular K^+ and inorganic phosphate from the yeast cells and comparably rapid elevation of pH in a medium.

(6) A mutant strain of *C. albicans* was 1/2 to 1/4 lesser susceptible to 710674-S than the wild-type strain. It suggests that this drug exerts the antifungal action mainly through damaging the cell membrane in the relatively high drug concentration range but through inhibition of ergosterol biosynthesis at lower drug concentrations.