

イミダゾール系抗真菌剤 Tioconazole の抗菌作用メカニズム

平谷 民雄・永田 淳子・山口 英世

帝京大学医学部医真菌研究センター

(昭和 60 年 9 月 18 日受付)

最近わが国で外用抗真菌剤として実用化されたイミダゾール誘導体 tioconazole (TCZ) の抗菌作用メカニズムを究明することを企図し、比較的高いイミダゾール感受性をもつ *Candida albicans* TIMM 0144 を主たる試験菌として用い、ステロール合成阻害作用および直接的細胞膜障害作用を中心に、種々の細胞成分合成系に及ぼす影響も併せて検討した。TCZ は TIMM 0144 に対して次のような生化学的活性を示した。

(1) 発育期細胞におけるタンパク質、RNA、DNA、細胞壁多糖、総脂質といった主要細胞構成成分の合成は、TCZ の殺菌的濃度 ($\geq 40 \mu\text{g/ml}$) 添加直後から完全に停止した。それより低い濃度域すなわち静菌的または不完全発育阻止効果を示す薬剤濃度を添加した場合には、その濃度に依存して細胞成分の合成が様々な程度に阻害された。そのなかで最も低い薬剤濃度まで有意な阻害が認められたのは総脂質成分の合成であった。

(2) TCZ はその濃度に依存して静止期細胞からの K^+ および無機リン酸 (Pi) の放出を促進した。 K^+ および Pi の有意な量の放出は、それぞれ $\geq 5 \mu\text{g/ml}$ および $\geq 40 \mu\text{g/ml}$ の薬剤添加後 10 分以内ひき起こされ、 $80 \mu\text{g/ml}$ の薬剤存在下では、細胞内に存在するこれらの成分のほぼ全量が放出された。

(3) $\geq 5 \mu\text{g/ml}$ TCZ の存在下で、静止期細胞浮遊液の細胞外 pH は有意に上昇した。いずれの場合も pH 値の上昇は薬剤添加後極めて速やかに起こり、20, 40, $80 \mu\text{g/ml}$ の薬剤添加後 1 分以内の ΔpH は、それぞれ ≥ 0.1 , ≥ 0.5 , ≥ 1.0 の高値を示した。

(4) 種々の濃度の TCZ 存在下で培養した細胞から脂質を抽出し、ステロール組成の分析を行なった結果、正常細胞にあってはステロールの大部分を占める ergosterol がほとんど消失し、代わって 24-methylene-dihydrostanolol などの ergosterol 生合成の前駆体となるメチル化ステロールの大量蓄積が認められた。このパターンのステロール組成の変化は、 $< 0.08 \mu\text{g/ml}$ という極めて低濃度の薬剤でも顕著にひき起こされ、TCZ が真菌ステロール合成経路上の C-4, 14 脱メチル化過程を特異的にしかも極めて鋭敏に阻害することが知られた。

(5) TIMM 0144 を親株とし、これより誘導変異によって分離したステロール合成系に障害をもつ変異株を用い、親株との間で TCZ 感受性を比較した。変異株に対する TCZ の IC_{50} 値は親株のそれよりも数百倍上昇していたが、 IC_{100} (MIC) 値は 2~4 倍の上昇をみるに過ぎなかった。高濃度 ($\geq 40 \mu\text{g/ml}$) の薬剤による K^+ 放出促進効果ならびに殺菌の効果に対しては、変異株は親株と同等以上の高い感受性を示した。

以上の成績から、TCZ はその作用濃度に応じてステロール合成阻害および直接的細胞膜障害という二元的作用メカニズムを有し、低濃度域においてはステロール合成阻害によって不完全発育阻止効果を、中等度濃度域においてはこれに軽度の細胞膜障害が加わって完全発育阻止 (静菌的) 効果を、また高濃度域においては不可逆的な高度細胞膜障害による殺菌的效果を、それぞれ発揮するものと推察された。

英国ファイザー社研究所により合成された tioconazole (TCZ) は、1-[2,4-dichloro- β -(2-chloro-3-thienyl)oxy] phenethyl] imidazole の化学名に示されるようにフェネチルイミダゾール誘導体の一つである。この化

合物に関するこれまでの前臨床的研究から、優れた *in vitro* ならびに *in vivo* 抗真菌活性が知られ¹⁻⁶⁾、従来のイミダゾール系抗真菌剤と比較して殺菌的效果が著しい点特徴的とみなされている⁵⁻⁸⁾。TCZ の外用剤は白

癬、皮膚カンジダ症、癩風などすべての主要な表在性皮膚真菌症の症例に対して著効を示し⁹⁻¹⁵⁾、最近わが国でも上市され臨床的に賞用されている。

一般にイミダゾール剤は、少なくとも *Candida albicans* においては、(1) ステロール合成阻害および(2) 細胞膜の直接的(非代謝的)障害、という互いに独立した二つの異なる作用メカニズムをもつことが知られている^{16,17)}。

C. albicans から調製した無細胞系を用いて真菌ステロール合成に対する影響を検討した MARRIOTT¹⁸⁾ は、TCZ が econazole (nitrate), clotrimazole, ketoconazole, miconazole (nitrate), など他のイミダゾール剤と同様に、C-14 脱メチル化反応を低濃度 ($<10^{-7}$ M) で特異的に阻害することを明らかにした。また川崎ら⁹⁾ は、*C. albicans* プロトプラストにおいて殺菌的濃度 40 $\mu\text{g/ml}$ の TCZ がタンパク質、260 nm-吸収物質および K^+ を速やかに細胞外へ遊出させることを見出した。さらに、この TCZ の K^+ 遊出促進効果は、同じ重量濃度の miconazole nitrate や clotrimazole よりも顕著であり、TCZ の細胞膜障害作用の強力なことを示唆した⁹⁾。

われわれは強い殺菌的効果の特徴とする TCZ の抗真菌作用に関与するメカニズムを明らかにすることを目的として、*C. albicans* を試験菌として用い、種々の細胞機能に及ぼす影響を検討した。特に主要な作用メカニズムと想定されているステロール合成阻害作用および細胞膜に対する直接的障害がどのように TCZ の抗菌活性にかかわっているかという問題に焦点を合わせ、ステロール合成能を障害された変異株を用いてその解明を試みた。

I. 材料と方法

(1) 菌株：特に指定しない限り、すべての実験に *C. albicans* TIMM 0144 を使用した。この菌株は、TCZ その他のイミダゾール剤に対して比較的高い感受性を示す^{6,19)}。また、一部の実験には TIMM 0144 に加えて、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 vibunazole (BAY n 7133) 耐性変異株²⁰⁾を用いた。

(2) 薬剤溶液の調製：台糖ファイザー株式会社より分与された TCZ 精製原標品をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、8 mg/ml (w/v) の溶液を調製した。これを -20°C に保存し、実験に臨んで加温し、薬剤が完全に溶解していることを確認した後、原液として使用した。薬剤溶液を希釈する溶媒には DMSO を用い、反応液に添加する場合には総容量の 1/50 量すなわち有機溶媒の最終濃度が 2% (v/v) になるように調製した。また、薬剤無添加対照用の反応液には DMSO を同

量添加した。Amphotericin B methyl ester (日本スクイブ社より分与) も同様に DMSO に溶解して実験に供した。

(3) 培養生菌数を指標とする抗菌活性の測定：PYG ブロス (ポリペプトン 1%, 酵母エキス 0.5%, グルコース 2%, pH 無修正) に若い PYG 寒天培地斜面から採取した酵母細胞を接種し、 37°C で振盪培養を行った。18 時間培養後、これを新鮮な PYG ブロスで希釈し、血球計算板を用いて 10^6 細胞/ml の濃度に調整した後、10 ml ずつ L 型試験管に分注した。続いて薬剤溶液または DMSO のみを 0.2 ml 添加し、 37°C で再び振盪培養した。24 時間後、各試験管から試料を採取し、PYG ブロスで適宜希釈し、PYG 寒天培地平板に塗抹した。全平板を 37°C で 72 時間まで培養した後、発育コロニー数と希釈倍数からもとの培養中に含まれた生菌数を算定した²¹⁾。なお一部の試験においては、後述の放射性基質取り込み実験用の反応中で 60 分間インキュベートした後、生菌数測定を行なった。

(4) 培養濁度を指標とする抗菌活性の測定：上記と同様の方法によって PYG ブロス中 $2\sim 3 \times 10^5$ 細胞/ml の濃度になるように調整した細胞浮遊液を 10 ml ずつ L 型試験管に分注し、次いで 0.2 ml の薬剤溶液または溶媒のみを添加した。 37°C で 24 時間振盪培養した後、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。

(5) 各種放射性基質の取り込み：前報^{21,22)} に述べた *C. albicans* 細胞浮遊液調製法、反応系および試料分画法に従い、反応 0 時間に添加した種々の濃度の TCZ の存在下での細胞タンパク画分への [^3H]ロイシン、RNA および DNA 各画分への [^3H]アデニン、マンナン画分およびアルカリ不溶酸不溶画分への [^{14}C]グルコース、および総脂質画分への [^{14}C]酢酸のそれぞれの取り込みを 60 分間経時的に測定した。

(6) 脂質抽出およびガスクロマトグラフィー分析：基本的には RYDER *et al.*²³⁾ が記載した方法に準拠して *C. albicans* 細胞より非鹸化脂質を抽出し、ガスクロマトグラフィー分析を行なった。遠沈集菌した細胞をまず 15% KOH および 0.1% ピロガロールを含む 50% エタノール中で 2 時間還流を行ないながら鹼化した。2 容の水を添加した後、不鹸化脂質 (NSL) を石油エーテルで $40\sim 60^{\circ}\text{C}$ 、3 回抽出した。得られた石油エーテル抽出物を水で洗浄、無水硫酸ナトリウム上で乾燥、次いで濾過を行なった後、ロータリーエバポレーターにより乾固した。この NSL をエチルエーテルに溶解し、ガスクロマトグラフィーを行なった。これには 1% silicone OV-1 を充填したガラス製カラム (2 m \times 3 ϕ) を着装した日立

Table 1 Effect of tioconazole on synthesis of major cellular components by growing cells of *Candida albicans* TIMM 0144

Cellular components	Radioactive substrate incorporated	% Inhibition by tioconazole at levels of ($\mu\text{g/ml}$)							
		0.63	1.25	2.5	5	10	20	40	80
Protein	[T] leucine	0	0	6	17	29	88	100	100
RNA	[T] adenine	0	0	0	0	0	23	100	100
DNA	[T] adenine	0	0	12	35	39	82	100	100
Mannan	[C-14] glucose	0	0	0	19	44	100	100	100
β -Glucan + Chitin	[C-14] glucose	0	0	0	20	51	98	100	100
Total lipid	[C-14] acetate	20	22	30	34	41	91	100	100

Incubation was at 37°C for 40 minutes with aeration.

ガスクロマトグラフ 263-80 型を用いた。キャリアガスはヘリウム (23 ml/min) で、毎分 6°C、235~280°C の温度域にプログラムを設定した。

(7) K^+ および無機リン酸 (Pi) の放出量の測定: PYG ブロス中で 37°C、18 時間振盪培養して得られた細胞を遠心集菌し、3 回の遠心操作を繰り返しながら蒸留脱イオン水にて充分洗浄した後、蒸留脱イオン水に浮遊し、約 10^8 細胞/ml の濃度に調整した。この細胞浮遊液 10 ml ずつを L 型試験管に分注し、0.2 ml の薬剤溶液を添加した。直ちに 37°C で振盪を開始し、2.5 分から 15 分後までの間に経時的に各試料を採取した。採取試料は直ちにガラス繊維濾紙 (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、前報²³⁾に述べたとおり、 K^+ を蛍光測定法により、また Pi を比色法により定量した。細胞外放出量は、反応開始前の細胞浮遊液からの 5% 冷過塩素酸抽出物のなかの含量を 100% として算出した。

(8) 細胞外液 pH 値の連続測定: 上述の細胞浮遊液の一定量を所定の容器に移し、37°C の保温下で攪拌しながらその 1/50 容の薬剤溶液を添加し、pH メーター (日立-堀場 M-7 型、6028 型複合電極着装) により 10 分間以上 pH 値を連続的に測定、記録した。また、対照として最終濃度 80 $\mu\text{g/ml}$ の TCZ 溶液単独の pH 値も同様に測定した。

(9) 試薬: 次の放射性化合物はいずれも Radiochemical Center (英国) の製品である。[3, 4, 5- ^3H] L-ロイシン (120 Ci/mmol), [8- ^3H] アデニン (25 Ci/mmol), [U- ^{14}C] D-グルコース (240 mCi/mmol), [2- ^{14}C] 酢酸ナトリウム塩 (60 mCi/mmol), [1- ^3H] 2-デオキ-D-グルコース (240 Ci/mmol), その他の一般試薬は、東京化成工業または和光純薬社の製品を使用した。

II. 実験結果

1. 主要細胞構成成分の生合成に及ぼす影響

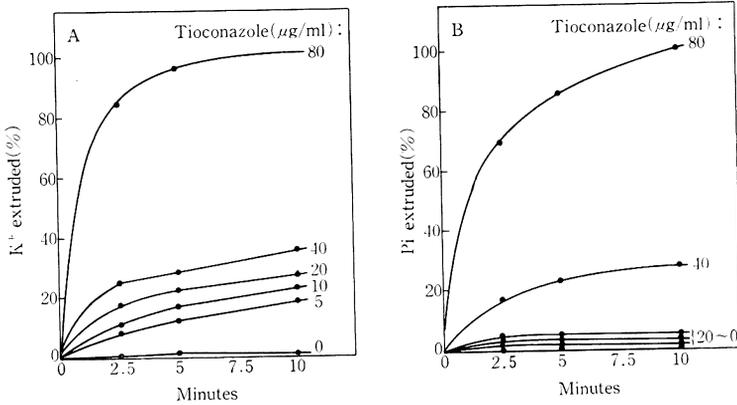
C. albicans 細胞を構成する生体高分子物質であるタンパク質、RNA および DNA、細胞壁多糖成分のマン

ナンおよび β -グルカン、ならびに脂質のいずれかの生合成機構に対して TCZ が一次的に作用する可能性の有無を検討するために、各成分への放射性基質の取り込みの初期速度が本剤によってどの程度阻害されるかを測定した。Table 1 は、反応開始から 40 分後の阻害度をまとめたものである。いずれの細胞成分における取り込みも、薬剤無添加の場合には直接的に進行した。なお、この反応系において、反応開始後 40 分目の時点で生菌数測定も併せて行なった。その結果、TCZ 0~20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲では、0 時間と比較して有意な生菌数の増減は認められなかったが、40 および 80 $\mu\text{g/ml}$ の TCZ を添加した反応液においては生菌数は 1/100 以下に減少することが観察された。

Table 1 に示されるように $\geq 40 \mu\text{g/ml}$ すなわち殺菌的濃度の TCZ を添加した場合には、すべての生合成は直ちに完全停止するにいたった。20 $\mu\text{g/ml}$ の TCZ 存在下では、タンパク質および DNA の合成は 80% 以上の阻害を、また、細胞壁多糖および脂質の合成は 90% 以上の阻害を受けた。一方、この濃度での RNA 合成阻害は約 20% と軽度であった。いずれの細胞成分の合成阻害度も薬剤濃度が低くなるにつれて減少し、2.5 $\mu\text{g/ml}$ の TCZ によっては生体高分子物質や細胞壁多糖の合成はほとんど影響を受けなかった。しかし、脂質合成のみは低濃度の TCZ の存在で、軽度ながら有意な阻害を受け、例えば 0.63 $\mu\text{g/ml}$ の TCZ は 20% の阻害度を示した。

これらの成績から、主要細胞構成成分の各合成系はいずれも薬剤濃度に依存して阻害を受けるが、脂質合成が最も低い薬剤で有意に阻害されること。また殺菌的效果を示す高濃度ではすべての細胞成分の合成がほぼ完全に停止することが認められた。後者の強力な非選択的阻害効果は細胞膜に対する直接的障害作用に起因する可能性が示唆されたので、次に TCZ により細胞膜障害が引き起こされるか否かについて、細胞内低分子物質 K^+ および無機リンの放出量ならびにこれに付随して起こる

Fig. 1 Release of K^+ (A) and inorganic phosphate (B) induced by tioconazole from cells of *Candida albicans* TIMM 0144



と予想される細胞外液 pH の変化を指標として検討を行なった。

2. 細胞内 K^+ および無機リン酸 (Pi) の放出促進効果

蒸留脱イオン水に浮遊した *C. albicans* 細胞に種々の濃度の TCZ を添加して 37°C でインキュベートし、外液中の K^+ および Pi の量を経時的に測定した成績を Fig. 1 に示す。薬剤無添加の場合には、10 分間の実験時間内では細胞内から外液中への K^+ または Pi の放出はほとんど認められなかった。この条件下において、 ≤ 5 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤を添加した場合には、添加直後から明らかな K^+ 放出促進が認められ、放出速度ならびに放出レベルは添加される薬剤の濃度とともに上昇した (Fig. 1 A)。TCZ $80 \mu\text{g/ml}$ の存在下では、10 分間以内に細胞内 K^+ はほぼ 100% 放出された。薬剤濃度が $40 \mu\text{g/ml}$ の場合には約 35% の K^+ が放出され、さらに $5 \mu\text{g/ml}$ に低下させた場合でも 20% 近くの放出が認められた。

一方、TCZ は Pi の細胞外放出も引き起こした (Fig. 1 B)。Pi 放出に対する効果は K^+ 放出におけるのと幾分異なっていた。 $\leq 20 \mu\text{g/ml}$ の薬剤濃度下では 10% 以下の放出しか認められなかったが、 $40 \mu\text{g/ml}$ では細胞内 Pi 含量の 50% 以上に相当する量が放出された。さらに、TCZ 濃度を $80 \mu\text{g/ml}$ に高めた場合には、細胞内含量を 2 倍も上回る Pi 量が外液中から回収され、この薬剤濃度では細胞内プールに存在する Pi のみならず、細胞内の有機リン酸化合物の一部が分解して生じた Pi も放出されると推察される。

3. 細胞外液 pH の変化

上述の成績に示されるように、細胞内成分特に K^+ などのカチオンが外液中へ放出されれば、それに対応して H^+ の細胞外から細胞内への移行が起こるために、外液

Fig. 2 pH changes produced by tioconazole in a cell suspension of *Candida albicans* TIMM 0144. The drug was added to the cell suspension at the time-point as indicated by an arrow to final concentrations of ($\mu\text{g/ml}$): A, 0 (solvent alone); B, 5; C, 10; D, 20; E, 40; and F, 80. In F, the cell suspension used in A~F was replaced by the same volume of deionized water and the drug was added to a final concentration of $80 \mu\text{g/ml}$.

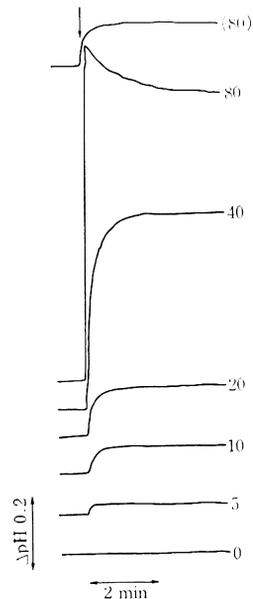
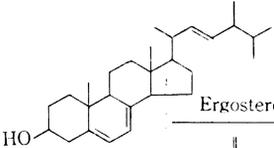
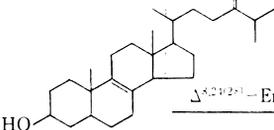
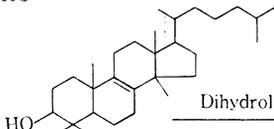
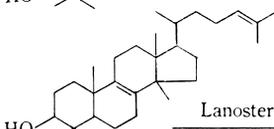
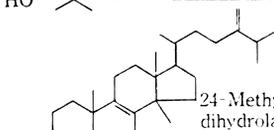


Table 2 Sterol composition of cells of *Candida albicans* TIMM 0144 after incubation with tioconazole

Sterol (% total sterols)	Untreated control	Treated with tioconazole		
		0.08 $\mu\text{g/ml}$	1.25 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$
 Ergosterol	93.8	0.7	0.8	4.5
 $\Delta^{22(23)}$ -Ergostadien ⁻⁰¹⁽²⁾	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
 Dihydrolanosterol	1.9	0.8	1.8	76.6
 Lanosterol	2.0	7.3	12.2	3.2
 24-Methylene- dihydrolanosterol	2.3	91.2	85.2	15.8
% Growth*	100	34.5	19.8	3.6

* Expressed on the basis of cellular dry weight (mg/ml culture)

中の pH 値は上昇するはずである。したがって、この pH 変化もまた 細胞膜障害が生じたことを示唆する一つの指標として利用することができる。加えて、pH 測定は K^+ や Pi 定量と比べてはるかに容易に行なうことができ、しかも高感度で、反応開始時点から連続的な測定、記録が可能だという利点をもつ。そこで、*C. albicans* 細胞を蒸留脱イオン水に浮遊し、種々の濃度の TCZ を添加した後の外液中の pH 値を追跡した。

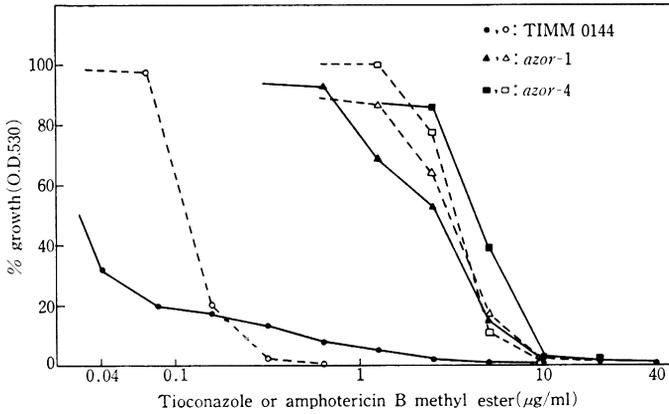
Fig. 2 に典型的な pH 変化のパターンを示す。薬剤無添加対照の細胞浮遊液においては、10 分間の測定時間内ではまったく外液 pH の変化を認めなかった (曲線 A)。一方、薬剤溶液はその濃度に依存して高い pH 値を示した。それはイミダゾール基を含む TCZ が塩基性物質であるためと考えられる。しかし、薬剤自体による pH 上昇の割合は、それほど顕著なものではなく、80 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度でも ΔpH は 0.1 程度にすぎなかった (曲線 G)。細胞浮遊液に TCZ を添加した場合には、その濃度に応じて外液 pH 値の上昇が起こった (曲線 B~

F)。pH 上昇の速度とレベルは完全に薬剤濃度に依存し、5~80 $\mu\text{g/ml}$ の範囲のいずれの濃度においても、 ΔpH は対応する濃度の薬剤単独添加における pH 上昇の程度を明らかに上回っていた。80 および 40 $\mu\text{g/ml}$ の TCZ を添加した場合には pH が急速に上昇して 1 分間以内に最高レベルに達し、それぞれの ΔpH は ≥ 1.0 および ≥ 0.5 の高値を示した。添加する薬剤濃度が低くなると、 ΔpH もそれに伴って低下したが、20 $\mu\text{g/ml}$ でも ≥ 0.1 の値が得られた。

4. ステロール組成に及ぼす影響

Table 1 に示される成績から、TCZ は低濃度においてもなお脂質合成に対して極めて強い阻害的効果を発揮することが知られる。したがって、本剤が *C. albicans* におけるステロール合成を選択的に阻害する可能性が想定されるため、これを確認する目的から TCZ 存在下で培養した *C. albicans* 細胞のステロール組成を分析した。Table 2 にその成績を示す。薬剤無添加対照細胞においては、細胞ステロールの大部分 (94%) を ergosterol が

Fig. 3 Effect of tioconazole (—) and amphotericin B methyl ester (·····) on growth of the wild-type strain (TIMM 0144) and two vibunazole-resistant mutant strains (*azor-1* and *azor-4*) of *Candida albicans* grown on PYG broth



占め、それ以外には ergosterol 生合成の前駆体として知られる 24-methylene-dihydrolanosterol, lanosterol および dihydrolanosterol がいずれも 2% 程度含まれているだけである。これに対して、部分的発育阻止効果を示す 0.08~1.25 µg/ml の濃度範囲の TCZ 存在下で培養した *C. albicans* 細胞においては、全ステロール中の ergosterol の割合は 1% 以下と極端に低下する。Ergosterol がほとんど存在しなくなったのに伴って 24-methylene-dihydrolanosterol の比率が 90~85% と増大して量的には最主要ステロールとなり、次いで lanosterol が 7~12% を占めるようになる。発育をほぼ完全に (95% 以上) 阻止する 20 µg/ml の濃度の TCZ を添加して培養した場合には、ergosterol に最も近い前駆体である 24-methylene-dihydrolanosterol やその前段階の lanosterol の比率は低濃度薬剤処理の場合よりもかえって減少し、代わって dihydrolanosterol の量比が著しく増大する。

以上の成績から、TCZ は部分的発育阻止効果しか示さない低濃度でも ergosterol 合成を強く阻害し、ergosterol をほとんど含まない細胞が生じることが示される。また、TCZ の作用点は、主としてステロール合成経路上の 24-methylene-dihydrolanosterol の脱メチル化反応の段階にあることが示唆される。

5. Vibunazole 耐性変異株に対する影響

Vibunazole (BAY n 7133) は、広い抗真菌スペクトルをもつトリアゾール系誘導体である²³⁾。*C. albicans* TIMM 0144 は vibunazole に対しても比較的高い感受性を示す一方、この菌株から N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 処理によって人為的に誘導された耐

性変異株のなかにはステロール合成系に障害をもち、ergosterol 量比が著しく低下した異常ステロール組成をもつものが見出される²⁰⁾。このタイプの変異株として *azor-1* および *azor-4* の 2 株を選び、感受性親株 (TIMM 0144) との間で TCZ に対する応答にどのような相違がみられるかを調べることによって、本剤の抗菌活性におけるステロール合成阻害の役割を明らかにすることを試みた。

Fig. 3 は、親株および耐性変異株 2 株を PYG ブロスに培養した場合、濁度で表わされる発育を amphotericin B methyl ester (AMPH) および TCZ がどの程度阻害するかを示したものである。*azor-1* および *azor-4* いずれの変異株も AMPH に対しては IC₅₀ および IC₁₀₀ (MIC) とともに親株よりも 20~30 倍高い値を示した。次に、TCZ の IC₅₀ および IC₁₀₀ 値を親株と耐性変異株と比較すると、変異株に対する IC₅₀ 値は 0.02 µg/ml から >3 µg/ml へと 150 倍以上も上昇しているのに対し、IC₁₀₀ 値は 2.5 µg/ml から 10 µg/ml へと 4 倍程度上昇したに過ぎなかった。

TCZ に対する感受性を生菌数で比較したところ、静菌的または部分的発育阻止を示す濃度範囲すなわち ≤5 µg/ml においては Fig. 3 の成績に一致して変異株は 2 株とも親株よりも軽度の発育阻害しか受けないことが示された (Fig. 4)。しかし、殺菌的薬剤濃度すなわち *azor-1* および *azor-4* に対してそれぞれ ≥10, ≥20 µg/ml に相当する高濃度域においては、TCZ の殺菌的效果は親株よりも変異株でより高度に発現された。変異株が高濃度域の TCZ に対して親株以上に強い応答を示すことは、K⁺ 細胞外放出効果の点でも認められた。Fig. 5

Fig. 4 Effect of tioconazole on viable counts of cultures of the wild-type strain (TIMM 0144, □) and two vibunazole-resistant mutant strains (*azor-1*, ▨; and *azor-4*, ▩) of *Candida albicans* grown on PYG broth

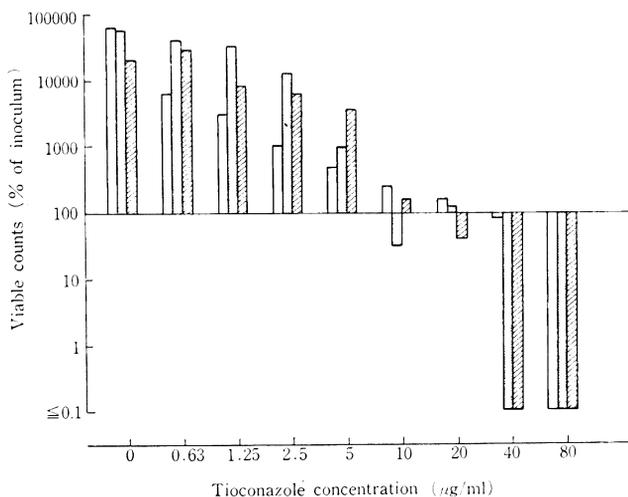
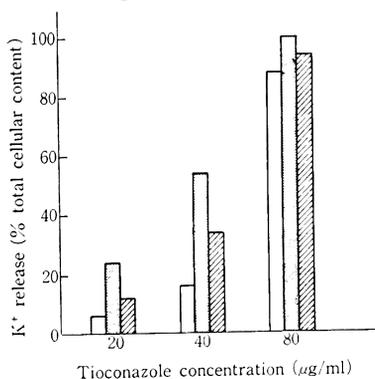


Fig. 5 Comparison between the wild-type strain (TIMM 0144, □) and two vibunazole-resistant mutant strains (*azor-1*, ▨; and *azor-4*, ▩) of *Candida albicans* of the response to K^+ -releasing activity of tioconazole



に示されるように、変異株においては $\geq 20 \mu\text{g/ml}$ の TCZ によって親株におけるのと同様またはそれ以上の K^+ 放出が惹起された。

III. 考 察

これまで clotrimazole, miconazole (nitrate), ketoconazole など多数のイミダゾール系抗真菌剤について、主として *C. albicans* を試験菌とする作用機序の研究がわれわれを含めて幾つかの研究グループにより行なわれてきた。それらの報告によれば、各イミダゾール剤は定性的には同一のメカニズムによって抗 *Candida* 活性を

発揮し、MIC 以上の比較的高い薬剤濃度は直接的な細胞膜障害効果を、それ以下の幅広い濃度域 (MIC の 1/1,000 以下に及ぶ) では顕著なステロール合成阻害効果をそれぞれ示す¹⁶⁻¹⁷⁾。

フェネチルイミダゾール誘導体である TCZ の作用機序もこれまで検討された多くのイミダゾール剤、特にフェネチルイミダゾール誘導体に属する miconazole (nitrate) などと類似する可能性は充分予想されるところである。しかし、実際に TCZ を対象とした作用機序の研究に関する報告は比較的少ない。川崎ら⁵⁾は *C. albicans* プロトプラストにおいて本剤 40 $\mu\text{g/ml}$ の添加後、大量の K^+ 260 nm-吸収物質およびタンパク質が速やかに細胞外へ放出されること。しかもこの K^+ 放出促進効果は同じ重量濃度の miconazole (nitrate) や clotrimazole よりも強いことを報告している。今回われわれはいずれのイミダゾール剤に対しても比較的高い感受性をもつ *C. albicans* TIMM 0144 の休止細胞を用いて同様の実験を行なった結果、TCZ 10 $\mu\text{g/ml}$ すなわち通常の測定条件下で得られる MIC に相当する濃度よりも 2~4 倍高い濃度の存在下で、細胞外へ有意な量の K^+ の放出に加えて、おそらくその結果によると考えられる細胞外液中の pH 上昇も観察された。これらの成績は、TCZ が他のイミダゾール剤と同様、比較的高濃度で添加された場合には、*C. albicans* 細胞膜に対して直接的な障害を与えることを示唆する。一方、同一 *C. albicans* 菌株に対して本剤の殺菌の効果が顕著に発現されるのは $\geq 40 \mu\text{g/}$

ml の濃度である。したがって、これ以下の静菌的濃度においてもなお TCZ が有意な細胞膜障害作用を示すことは注目に値する。つまり軽度の細胞膜障害は殺菌的に働かないことが示唆される。

われわれは種々のイミダゾール剤の細胞膜障害作用機序を分子レベルで究明するために、リボソーム人工膜モデルを用いて検討した結果、各薬剤とも膜リン脂質との直接的な相互作用によって膜流動性を高めることを見出した¹⁷⁾。イミダゾール剤が K⁺ などの細胞内成分を放出させるのはこのためと考えられる。また、膜リン脂質との親和性、膜透過性を亢進する作用は、miconazole (nitrate), econazole (nitrate), isoconazole (nitrate) などのフェネチルイミダゾール誘導体で特に強いことも示された¹⁷⁾。同じフェネチルイミダゾール系化合物に属する TCZ もおそらく同様の機序によって強い細胞膜障害をひき起こすものと推察される。

Table 1 の成績に示されるように、生体高分子物質および細胞壁多糖成分の生合成は、殺菌的濃度に相当する $\geq 40 \mu\text{g/ml}$ の TCZ によって完全に停止し、静菌的濃度 (5~20 $\mu\text{g/ml}$) の薬剤によっても添加直後から有意に阻害される。TCZ 濃度に依存する各種主要細胞成分の初期合成速度の低下は、阻害効果発現の速さからみて、後述のステロール合成阻害に由来する二次的効果とは考え難く、むしろ上述の直接的な細胞膜障害に起因すると解釈すべきであろう。おそらく殺菌的濃度の TCZ は、極めて速やかに真菌細胞膜に不可逆的な障害を与え、その結果、すべての細胞生合成系を完全に阻止するのみならず、K⁺ 放出に共役する H⁺ 流入などによる細胞内環境の劣化も加わって細胞死を招くと推察される。一方、静菌的濃度の TCZ による細胞膜障害は可逆的な程度にとどまり、各細胞成分の生合成はある程度の阻害を受けるものの、細胞死には至らず、単に発育停止または発育速度の低下をひき起こすに過ぎないと考えられる。しかし、この軽度の細胞膜障害のみで完全に発育が停止するかは疑問である。

この点で注目しなければならないのは、種々の細胞成分の生合成がいずれも TCZ によって阻害されるといっても、それぞれの阻害度は著しく異なっていることである。最も顕著な阻害を受けたのは脂質合成であり、直接的細胞膜障害効果をまったく示さない $\leq 0.63 \mu\text{g/ml}$ という低濃度の TCZ によって明らかに阻害された。脂質のなかでもステロールの生合成が特異的に阻害されることは、TCZ 存在下で培養した *C. albicans* 細胞にみられるステロール組成の分析結果から明白である。部分的発育阻止効果しか示さない低濃度の TCZ を添加した場合でも、細胞膜構成ステロールの大部分を占めるべき

ergosterol はほぼ完全に消失し、これに代わって 24-methylene-dihydrolanosterol などの前駆体が大量に蓄積されるという異常なステロール組成が認められる。この成績は、TCZ が他の幾つかのイミダゾール剤で証明されたと同様に、真菌ステロール合成経路上の ergosterol の前駆体である dimethylsterols または trimethylsterols の C-4, 14-脱メチル化過程を阻害することを強く示唆する。この推論は、MARRIOTT¹⁸⁾ が *C. albicans* の無細胞系を用いて行なった実験成績から導いた結論と完全に一致する。

真菌、特に酵母においては、ergosterol は好气的条件下で培養された細胞の主要ステロールであり^{24,25)}、主として細胞膜に存在し^{26,27)}、発育ならびに膜の構造と機能の維持に重要な役割を演じている²⁸⁾。

一方、*C. albicans* のポリエン抗生物質耐性株のように、ergosterol 合成能に欠陥があるためにこのステロールをほとんど含有しないにもかかわらず、充分な発育・生存能をもつ変異株も見出されている²⁹⁾。しかし、野生株についていえば、ergosterol を失った酵母細胞は発育不能になることが報告されている³⁰⁾。加えて、人工膜モデルを用いた実験から、ergosterol が膜の硬さを増す働きをしていること³¹⁻³²⁾、そして種々のステロールの挿入または置換によって各種陽イオン、陰イオンまたは非電解質の膜透過性が著しく変化すること³³⁻³⁵⁾が見出されている。これらの成績を考慮するならば、TCZ が直接的膜障害作用とはまったく別に、より低濃度域においてステロール合成阻害効果のみで明らかな抗菌活性を発現することはほとんど疑いないところであり、今回のわれわれの実験成績からもこの推論は強く支持される。おそらく本来の真菌細胞膜の主要ステロールである ergosterol の欠乏と非平面的配位をとる ergosterol 合成の前駆体となるステロールの蓄積とが相まって膜におけるリン脂質-ステロール間の相互作用を極度に変化させ、その結果、相転移が促進されて膜流動性が高まると考えられる。この可能性は、リン脂質とステロールから成る膜モデルを用いて定量的に証明されている³⁶⁾。このように TCZ は高濃度での直接的非代謝的細胞膜障害作用に加えて、より低濃度でのステロール合成阻害を介して二次的な細胞膜障害作用をもつことが示される。

この二つの異なる機序によって発現する細胞膜障害が TCZ の抗菌作用、すなわち高濃度における殺菌的作用、それより低濃度での静菌的作用、および sub-MIC 域での不完全発育阻止作用のそれぞれにどのように関与しているのだろうか。高濃度の TCZ が示す迅速な殺菌的效果が、何らの代謝系を介することなく細胞膜に対する直接的な作用によってひき起こされることは、前報⁶⁾ の

成績からも明らかである。問題となるのは、本剤の非殺菌的な発育阻止効果に主役を演じる作用機序である。この点は従来から他の幾つものイミダゾール剤について議論されてきた。SUD & FEINGOLD³⁷⁾ は、通性嫌気性酵母である *Saccharomyces cerevisiae* の ketoconazole 感受性を嫌気的および好氣的培養条件下すなわち ergosterol 合成が起こる場合と起こらない場合とで比較し、前者で明らかに感受性が低下することを見出した。この成績から彼らはイミダゾール剤の低濃度域における発育阻止効果が ergosterol 合成阻害に基づく結論した。しかしながら、嫌氣的培養においては、(1) 膜リン脂質の脂肪酸残基の組成が変化し、よりイミダゾール剤親和性の低い飽和型の比率が高まること^{38,39)}、(2) 発育に不飽和脂肪酸を要求するためこれを培地に添加しているが、不飽和脂肪酸はイミダゾール剤に対して強い拮抗作用を示すこと⁴⁰⁾、などの点を考慮すると、彼らの導いた結論は必ずしも妥当なものとはいえない。

一般的にいて、複数の抗菌作用機序が想定されている場合、そのいずれが抗菌活性に一次的に関与しているかを知るためには、感受性親株から耐性変異株を誘導し、両株の細胞間で代謝機能や構造上の相違を比較検討する方法論がしばしば有用である。RYLEY *et al.*⁴¹⁾ は、慢性粘膜炎皮膚カンジダ症患者から ketoconazole 耐性の *C. albicans* を 2 株分離した。これらの株は細胞レベルでの ergosterol 合成阻害に対しては耐性であったが、無細胞系では耐性を示さず、またアミノ酸取り込み阻害に対しても耐性である一方、薬剤分子取り込み能を欠いていたという⁴¹⁾。したがって、この耐性は、細胞内酵素、特にステロール合成系の酵素、の変化によるのではなく、細胞膜輸送にかかわる性質の変化によると考えられる。われわれは以前より *C. albicans* から各種イミダゾール剤に対して耐性を示す変異株を人為的に誘導することを試みてきたが、耐性度が充分高くしかも安定な変異株は得られなかった。ところが、直接的な細胞膜障害作用を欠きステロール合成阻害作用のみをもつトリアゾール剤 vibunazole に対する耐性変異株を分離する試みのみは成功した。得られた変異株のなかに、ステロール合成系が障害され、ergosterol 含量が著しく低いものが幾つか見出された²⁰⁾。こうして選び出された vibunazole 耐性変異株が、ステロール合成能に異常をもつことは、これらの株が ergosterol と特異的に相互作用を営む amphotericin B に対しても顕著に耐性化していることから明らかである (Fig. 3)。野生型親株と耐性変異株 2 株を用いて TCZ に対する感受性の比較検討を行なった結果、次のような極めて興味深い成績を得ることができた。(1) 培養濁度を指標として測定した耐性変異株に

対する TCZ の IC₅₀ 値は、親株に比べて数百倍も上昇し、TCZ を vibunazole との間に明らかに交叉耐性が成立することを示した。しかし、IC₁₀₀ (MIC) 値で比較すると、耐性度の上昇は 2~4 倍程度に過ぎず、TCZ に対する耐性変異株の応答の仕方が異なることを示唆している。(2) 耐性変異株は高濃度の TCZ による細胞膜障害ならびに殺菌的作用に対しては親株と同等かまたはそれ以上に高い感受性を示した。これはステロール組成の変化した耐性変異株の細胞膜が親株のそれに比べて TCZ の影響をより一層受けやすくなっていることを示唆するものである。PESTI *et al.*⁴²⁾ は *C. albicans* の ergosterol 欠損変異株を 20 µg/ml の miconazole で処理した場合、親株よりも著しい形態変化を受けることを報告している。(2) の成績からは、TCZ 高濃度域における直接的細胞膜障害と殺菌的效果が密接な因果関係をもつことがあらためて支持される。

以上の点から TCZ の抗菌活性と作用機序の対応関係について考えるならば、*C. albicans* TIMM 0144 においては、高濃度域 (≥40 µg/ml) での殺菌的效果は高度の直接的細胞膜障害のみに、中等濃度域 (5~10 µg/ml ~ <40 µg/ml) での静菌的效果すなわち完全発育阻止効果は軽度の直接的細胞膜障害とステロール合成阻害双方に、またそれより低濃度域での不完全発育阻止効果はステロール合成阻害のみに、それぞれ起因すると解釈するのが妥当であろう。一般にイミダゾール剤は、ポリエーテル抗生物質などとは対照的に、極めて幅広い不完全発育阻止濃度域すなわち sub-MIC 域をもつことが知られている⁴³⁾。これはイミダゾール剤が著しく低濃度でもステロール合成を強く阻害する作用をもつ事実によって説明されよう。

今回 TCZ で示された二元的作用メカニズムは、定性的には bifonazole⁴⁴⁾、oxiconazole (nitrate)⁴⁵⁾、710674-S⁴⁶⁾ など他のイミダゾール剤でも認められている。しかし、TCZ の場合には、これらの薬剤に比べて直接的細胞膜障害が特に顕著であり、おそらくこの特徴が本剤の強い殺菌的效果の基礎となっているのであろう。

文 献

- 1) JEVONS, S.; G. E. GYMER, K. W. BRAMMER, D. A. COX & M. R. G. LEEMING: Antifungal activity of tioconazole (UK-20,249), a new imidazole derivative. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15: 597~602, 1979
- 2) 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
- 3) BERGAN, T. & M. VANGDAL: *In vitro* activity of antifungal agents against yeast species.

- Chemotherapy (Basel) 29: 104~110, 1983
- 4) MARRIOTT, M. S.; J. R. C. BAIRD, K. W. BRAMMER, J. K. FAULKNER, G. HALLIWELL, S. JEVONS & M. H. TARBIT: Tioconazole, a new imidazole-antifungal agent for the treatment of dermatomycoses. Antifungal and pharmacologic properties. *Dermatologica* 166 (suppl. 1): 1~7, 1983
 - 5) 川崎賢二, 新美博仕, 沖 俊一: Tioconazole の抗真菌活性。薬理と治療 10: 3863~3887, 1982
 - 6) 山口英世, 平谷民雄, 永田淳子, 内田勝久: Tioconazole の *in vitro* ならびに *in vivo* 抗真菌活性の特徴。Chemotherapy 34: 146~156, 1986
 - 7) BEGGS, W. H.: The effect antifungal imidazoles on resting cells of *Candida parapsilosis*. *IRCS Med. Sci.* 11: 677, 1983
 - 8) LEFLER, E. & D. A. STEVENS: Inhibition and killing of *Candida albicans in vitro* by five imidazoles in clinical use. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25: 450~454, 1984
 - 9) GRIGORIU, D. & A. GRIGORIU: Double-blind comparison of the efficacy, toleration and safety of tioconazole base 1% and econazole nitrate 1% creams in the treatment of patients with fungal infections of the skin or erythrasma. *Dermatologica* 166 (suppl. 1): 8~13, 1983
 - 10) FREDRIKSSON, T.: Treatment of dermatomycoses with topical tioconazole and miconazole. *Dermatologica* 166 (suppl. 1): 14~19, 1983
 - 11) O'NEILL, E. M.; J. T. HENDERSON & S. JEVONS: Tioconazole in the treatment of fungal infections of the skin. An international clinical research program. *Dermatologica* 166 (suppl. 1): 20~33, 1983
 - 12) 西本勝太郎: チオコナゾールクリーム of 局所刺激性および経皮吸収試験報告。医学と薬学 7: 435~446, 1982
 - 13) 野口晏弘, 橋 正克, 菜畑博司, 飯島護丈, 堀本政夫, 山河静子, 石河醇一, 大槻勲夫: Tioconazole の毒性, 生殖および一般薬理試験。薬理と治療 10: 3849~3861, 1982
 - 14) チオコナゾール研究班: 二重盲検法によるチオコナゾールの皮膚真菌症に対する有用性の検討。西日本皮膚 44: 425~443, 1982
 - 15) チオコナゾール研究班: 二重盲検法によるチオコナゾールクリームの皮膚カンジダ症に対する有用性の検討。西日本皮膚 44: 444~451, 1982
 - 16) BEGGS, W. H.; F. A. ANDREWS & G. A. SAROSI: Action of imidazole-containing antifungal drugs. *Life Sciences* 28: 111~118, 1981
 - 17) YAMAGUCHI, H.: Advances in research of mechanism of imidazole antimycotics action. *In* (T. ARAI ed.) *Filamentous microorganisms*, pp. 355~365, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1984
 - 18) MARRIOTT, M. S.: Inhibition of sterol biosynthesis in *Candida albicans* by imidazole-containing antifungals. *J. Gen. Microbiol.* 117: 253~255, 1980
 - 19) 平谷民雄, 内田勝久, 山口英世: 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。Chemotherapy 32: 568~584, 1984
 - 20) 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).
 - 21) 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
 - 22) IWATA, K.; H. YAMAGUCHI & T. HIRATANI: Mode of action of clotrimazole. *Sabouraudia* 11: 158~166, 1973
 - 23) RYDER, N. S.; S. SEIDL & P. F. TROKE: Effect of the antimycotic naftifine on growth of and sterol biosynthesis in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25: 483~487, 1984
 - 24) 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
 - 25) PENMAN, C. S. & J. H. DUFFUS: Ergosterol is the only sterol in *Kluyveromyces fragilis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 40: 529~531, 1974
 - 26) LONGLEY, R. P.; A. H. ROSE & B. A. KNIGHT: Comparison of the protoplast membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 108: 401~412, 1968
 - 27) 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
 - 28) 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
 - 29) PIERCE, A. M.; H. D. PIERCE, A. M. UNRAU & C. OEHLISCHLAGER: Lipid composition and polyene antibiotic resistance of *Candida albicans* mutants. *Can. J. Biochem.* 56: 135~142, 1978
 - 30) 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
 - 31) MORPURGO, G.; G. SERLUPI-CRESCENZI, G. TECCE, F. VALENTE & D. VENETTACCI: Influence

- of ergosterol on the physiology and the ultrastructure of *Saccharomyces cerevisiae*. Nature 201 : 897~899, 1964
- 32) 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
- 33) 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
- 34) GRUNZE, M. & B. DEUTICKE : Changes of membrane permeability due to extensive cholesterol depletion in mammalian erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta 356 : 125~130, 1974
- 35) GRAHAM, J. M. & C. GREEN : The properties of mitochondria enriched *in vitro* with cholesterol. Eur. J. Biochem. 12 : 58~66, 1970
- 36) DAHL, C. E.; J. S. DAHL & K. BLAK : Effects of cycloartenol and lanosterol on artificial and natural membranes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 92 : 221~228, 1980
- 37) SUD, I. J. & D. S. FEINGOLD : Mechanisms of action of antimycotic imidazoles. J. Invest. Dermatol. 76 : 438~441, 1981
- 38) 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
- 39) 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
- 40) 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
- 41) RYLEY, J. F.; R. G. WILSON & K. J. BARRETT-BEE : Azole resistance in *Candida albicans*. Sabouraudia 22 : 53~63, 1984
- 42) PESTI, M.; D. BECHER & G. BARTSCH : The effect of miconazole on ergosterol-less mutant of *Candida albicans*. Acta Microbiol. Hungarica 30 : 25~29, 1983
- 43) 山口英世 : 新規抗真菌剤の基礎的検討。真菌誌 26 : 116~125, 1985
- 44) 平谷民雄, 山口英世 : Bifonazole の抗真菌作用機序に関する研究。Chemotherapy 32 : 829~841, 1984
- 45) 平谷民雄, 山口英世 : *Candida albicans* における Oxiconazole nitrate の抗真菌作用メカニズム。Chemotherapy 33 : 215~226, 1985
- 46) 平谷民雄, 山口英世 : 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。Chemotherapy 33 : 579~591, 1985

MECHANISM OF ANTIFUNGAL ACTION OF TIOCONAZOLE

TAMIO HIRATANI, JUNKO NAGATA and HIDEYO YAMAGUCHI

Research Center for Medical Mycology, Teikyo University

School of Medicine

To explore the action mechanism of tioconazole (TCZ), a novel topical imidazole-antimycotic, by which it inhibits the growth of or kills fungi, the biochemical effect of the drug on a sensitive parent strain of *Candida albicans* (TIMM 0144), as well as resistant mutant strains induced therefrom, was studied. The results are summarized as follows:

(1) All the syntheses of protein, RNA, DNA, cell wall homopolymers and total lipids that proceeded linearly in growing cells of *C. albicans* TIMM 0144 were instantly and completely arrested after exposure to fungicidal concentrations (40 and 80 $\mu\text{g/ml}$) of TCZ. When the cells were treated with lower levels of the drug, the initial rate of biosynthesis was decreased to different extents from one cellular component to another. Biosynthesis of total lipids appeared to be most susceptible to the relatively low concentrations of TCZ and was significantly inhibited by 1.25 $\mu\text{g/ml}$ of the drug at which it scarcely affected biosynthesis of any other cellular components.

(2) TCZ markedly enhanced release of K^+ and inorganic phosphate from cells of *C. albicans* TIMM 0144 into the ambient medium. The rate and extent of release of these intracellular materials was dependent on the drug concentrations in the medium; significant amounts of K^+ and inorganic phosphate were released in the presence of $\geq 5 \mu\text{g/ml}$ and 40 $\mu\text{g/ml}$, respectively, of TCZ within 10 min after addition of the drug and an almost complete release of the materials was induced by 80 $\mu\text{g/ml}$ of the drug.

(3) When $\geq 5 \mu\text{g/ml}$ of TCZ was added to *C. albicans* TIMM 0144 cell suspensions in deionized water, the pH value of the medium was rapidly increased. pH values of ≥ 0.1 , ≥ 0.5 and ≥ 1.0 were attained within 1 min after addition of 20, 40 and 80 $\mu\text{g/ml}$, respectively, of TCZ.

(4) Cellular lipids were extracted from cells of *C. albicans* TIMM 0144 grown with graded concentrations of TCZ for chromatographic analyses of sterol composition. Non-saponifiable lipids from cells treated with 0.08 $\mu\text{g/ml}$ or higher concentrations of TCZ were characterized by a marked decrease in the content of ergosterol, the major sterol of this fungus, and an excessive amount of α -methylated sterols as compared with those from untreated cells.

(5) Two mutant strains resistant to TCZ were induced by mutagenesis from *C. albicans* TIMM 0144 and their microbiological and biochemical responses to the drug were compared with those of the parent strain. Whereas IC_{100} (MIC) values of TCZ for both mutant strains increased only by 2- to 4-fold, IC_{50} values of TCZ for the strains increased by 100-fold or above, as compared with comparable values for the parent strain. However, the extent of K^+ release induced by relatively high levels (40 and 80 $\mu\text{g/ml}$) of TCZ from cells of the mutant strains was equal to or greater than that from cells of the parent strain. Both of the two mutant strains were shown to be defective in ergosterol biosynthesis.

(6) All the results lead us to the postulation that TCZ may have a dual mechanism of antifungal action; TCZ appear to cause inhibition of sterol biosynthesis without effect on the fungal cell membrane at sub-inhibitory drug levels, both inhibition of sterol biosynthesis and reversible membrane damage at fungistatic levels, and irreversible membrane damage at fungicidal levels.