

Sporothrix schenckii 酵母形細胞を用いた tolcliate 作用メカニズムの研究

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 21 日受付)

感受性真菌 *Sporothrix schenckii* 酵母形細胞を用いてチオカルバミン酸系の新しい抗真菌剤 tolcliate の抗菌活性に関与する作用機序を検討し、次の成績を得た。

1) Tolcliate は本菌に対し、培養濁度、乾燥重量、生菌数のいずれの測定法においても 1.25~80 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、静菌的ないしは軽度ながら殺菌的に作用した。

2) 本剤は本菌の主要な細胞構成成分すべての生合成に対して阻害効果を示したが、タンパク質や RNA の合成に比べて、DNA および 2 つの細胞壁多糖 (アルカリ不溶性多糖とラムノマンナン) の合成はより強く阻害された。また総脂質の合成阻害も同程度に強かった。

3) 細胞膜および呼吸に対する阻害は全く認められなかった。

4) 無細胞系において、本剤は *S. cerevisiae* から調製した DNA ポリメラーゼおよび RNA ポリメラーゼ各反応を阻害しなかった。*S. schenckii* より調製した細胞壁多糖合成酵素反応のうち、キチン合成酵素反応は最も強く阻害され、マンナン合成酵素反応は中程度の阻害を受け、 β (1,3)-グルカン合成酵素反応はまったく阻害されなかった。キチン合成酵素反応の阻害様式は競合的阻害であり、 K_i 値は 168 μM と算出された。

5) 本剤は脂質合成、特にエルゴステロール合成に対して強い阻害効果を示し、スクアレンの高度蓄積が認められた。

6) 以上の成績から、感受性真菌細胞において、tolcliate はスクアレン・エポキシ化反応の特異的阻害によりエルゴステロール合成阻害をひき起こすことが本剤の抗菌活性を説明する最も可能性の高い一次的作用機序であると推論される。

Tolcliate は、イタリアの Carlo Erba 社研究所で開発されたチオカルバミン酸系抗真菌剤で、Fig. 1 に示されるように *o*-(5,6,7,8-tetrahydro-5,8-methano-2-naphthyl) *N*-methyl-*N*-(*m*-methylphenyl) thiocarbamate (分子量 323.44) の化学構造をもつ。本物質は、白色結晶状粉末として得られ、水にはほとんど溶けないが種々の有機溶媒に可溶である¹⁾。関連するチオカルバミン酸系抗真菌剤としては、すでに 1962 年日本曹達社で合成され、外用抗白癬剤として繁用されている tol-naftate (tinactin) がある。Tolcliate は、*in vitro* で *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* 各属の皮膚糸状菌症 (白癬) 原因菌、*Aspergillus* 症原因菌に対して強い抗菌活性 (0.01~0.1 $\mu\text{g/ml}$) を示し、感受性菌に対して明らかな殺菌的効果を発現するが、*Candida* など酵母状真菌や細菌に対しては発育阻止作用を示さない^{2,3,4)}。このような tolcliate の *in vitro* 抗菌スペクトルおよび活性の強さは tol-naftate と極めて類似する。Tolcliate の強力な *in vitro* 抗白癬菌活性に対応して、白癬症例における本剤のクリーム剤およ

び液剤の局所投与の優れた治療効果に加えて高い忍容性を証明する臨床的成績が多数報告されている^{2,5,6)}。

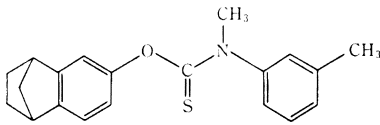
一方、tolcliate または連関抗真菌剤の作用機序に関する研究報告は極めて少ない。西野ら⁴⁾は、*Aspergillus niger* 分生子に対する本剤の生化学的影響を検討し、25 $\mu\text{g/ml}$ の薬剤濃度で 3 時間以上処理した場合に有意な細胞内 K^+ の放出を認めているが、これを本剤の一次的な抗菌作用機序とみなすことには彼ら自身が否定的である。

我々は、tolcliate に比較的感受性の高い *Sporothrix schenckii* 酵母形細胞を主たる試験菌として用い、tolcliate の抗菌活性に関与する一次的作用機序を詳細に検討した。ここにその成績を報告する。

I. 材料と方法

(1) 薬剤溶液の調製: Tolcliate (協和醸酵), miconazole nitrate (持田製薬) は、100% ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、8 mg/ml (w/v) の濃度に調製したものを原液とした。これを -20°C に保存し、必要に応じて融解の後、実験に供した。原液の希釈には必

Fig. 1 Chemical structure of tolciclate, $C_{20}H_{21}NOS$, Molecular weight 323.45



ず DMSO を使用し、すべての反応系において溶媒 (DMSO) の濃度が 1% (v/v) になるように調製した。また薬剤無添加対照の反応系には溶媒のみを最終濃度 1% になるように添加した。

(2) 菌株: 教室保存の *S. schenckii* 菌株のなかから、以下の方法により酵母形発育を誘導し易く、しかも本剤に感受性の高い菌株として TIMM 0960 を選び実験に用いた。

(3) 細胞浮遊液の調製: 菌接種後 1 か月以内の新鮮な Sabouraud グルコース寒天培地斜面培養から採取した *S. schenckii* を酵母エキス 0.5%, グルコース 1% を加えた BHI 液体培地に 1 白金耳接種後, 37°C, 数日間振盪培養し, 大部分が酵母形細胞からなる培養を得た。これをガーゼ濾過して酵母形細胞を集め, 宮治, 刈谷の合成培地⁷⁾ (pH を 6.8 に改変) で遠心洗浄の後, 同じ合成培地に再浮遊し, 細胞浮遊液を調製した。

(4) 試験薬剤の抗菌活性の測定: 生菌数, 濁度または乾燥重量を指標とした。酵母形細胞を 530 μm での濁度 (O. D. 530) が 0.15 (約 2×10^7 細胞/ml に相当) になる濃度に希釈して合成培地に浮遊し, 薬剤溶液を添加した後, 37°C で振盪培養を行なった。一定時間間隔で試料を採取し次の測定を行なった。(1) O. D. 530 の測定。(2) 生菌数測定。滅菌生理食塩水で適宜希釈した後, 常法に従って PYG 寒天培地平板 (11 当り酵母エキス 5g, ペプトン 10g, グルコース 20g, 寒天 15g, pH 無修正) に一定量 (0.1 ml) を塗抹接種し, 27°C で培養した。4 日後に発育してきたコロニー数を数え, 試料中の生菌数を算定した。(3) 乾燥菌重量の測定。一定量の試料をガラス繊維濾紙 (Whatman, GF/C) で濾過して菌体を濾紙上に集め, 蒸留水で数回洗浄した後, 乾燥し, 重量を測定した。

(5) 各種放射性基質の取り込み実験: 細胞を合成培地 ($[^{14}\text{C}]$ -グルコースの取り込みの場合のみはグルコースを除去した培地) に浮遊し, O. D. 530 が 1.5 になるような濃度 (約 9 mg・乾燥重量/ml に相当) に調製した。この合成培地細胞浮遊液に種々の濃度の薬剤溶液 1/100 容および $[^{14}\text{C}]$ または $[^3\text{H}]$ 標識化合物溶液 1/50 容を順次加え, 全量を 4~8 ml に合わせた。各反応液を含む L 型試験管を 37°C で振盪し, 一定の時間間隔で試

料を採取した。用いた標識化合物と試料の分画, 処理法は次のとおりである。

1) ロイシン: $[^3\text{H}]$ -ロイシンの熱トリクロール酢酸 (TCA) 不溶性画分への取り込みを指標としてタンパク質合成をモニターした。反応液には 1 ml 当り 0.4 μCi (0.1 μmol) の標識化合物を添加した。採取試料に等量の 10% (w/v) TCA を加えて反応を止め, 90°C で 15 分間加熱した後, 不溶性物質をガラス繊維濾紙 (Whatman, GF/A) 上に集めた。5% TCA で洗浄し, 乾燥した後, 放射能を測定した。

2) アデノシン: 反応液 1 ml 当り 0.4 μCi (0.04 μmol) の $[^3\text{H}]$ -アデノシンを添加した。採取試料を二分し, 一方には等量の氷冷 10% TCA を加えて 0°C に放置し, 生じた不溶性画分 (RNA+DNA) をガラス繊維濾紙上に集めた。他方の試料には等量の N-KOH を添加し, 60°C, 2 時間加水分解処理を行なった後に HCl で中和した。次に最終濃度 5% になるように氷冷 TCA を加え, 一夜 0°C に放置した。生じた不溶物 (DNA) をガラス繊維濾紙上に集めた。

3) グルコース: 1 ml 当り $[^{14}\text{C}]$ -グルコース 0.02 μCi (2 μmol) を含む反応液を調製した。採取試料に等量の氷冷 10% TCA を加えて反応を止めた後に, Chung & Nickerson⁸⁾ の方法に従ってマンナン画分を得, それぞれをガラス繊維濾紙上に集めた。

4) 酢酸ナトリウム: 反応液 1 ml 当り $[^{14}\text{C}]$ -酢酸ナトリウム 0.04 μCi (0.1 μmol) を含む反応液を調製した。採取試料に等量の氷冷 10% TCA を加えて反応を止めた後に, エタノール: エーテル (3:1, v/v) を加え, 55°C, 4 時間抽出を行ない, 抽出物 (総脂質) を直接放射能測定用バイアル中に集め, 乾固した。

(6) 細胞膜障害の測定

1) 細胞外へ放出される K^+ および無機リン酸 (Pi) の定量: 酵母形細胞誘導培地中, 37°C, 数日間振盪培養後, 遠心して酵母形細胞を集め, 蒸留水で 3 回洗浄した後, $2 \sim 3 \times 10^7$ 細胞/ml の濃度になるように蒸留水に浮遊させた。この細胞浮遊液 10 ml を段階濃度の薬剤を含む L 型試験管に分注した後, 振盪しながら 37°C でインキュベートし, 15 分後まで経時的に各試験管から試料を採取した。これを直ちに減圧下でガラス繊維濾紙 (Whatman GF/C) を通して濾過し, 細胞と濾液とを分離した。得られた濾液すなわち細胞外液について, K^+ 含量を蛍光光度計 (日立 775 型) により, また Pi 含量を中村⁹⁾ の方法に基づく比色定量法によりそれぞれ測定した。細胞外への放出量は, 0 時間 (薬剤処理前) の細胞を 5% 冷 TCA で抽出して得られた細胞内含量に対する比率で表わした。

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

(7) 呼吸活性の測定: *S. schenckii* 酵母形細胞を 0.4 mM KH_2PO_4 (pH 4.5) で 3 回洗浄した後、同溶液に浮遊し、内部呼吸を減少させるために、30°C で 4 時間振盪した。遠心により細胞を集め、O. D. 530 値が 1.5 になるように 0.4 mM KH_2PO_4 に再浮遊し、酸素電極 (Rank Brothers, Bottisham Cambridge, England) を用いて薬剤溶液添加前と添加後の酸素消費速度を 37°C で測定した。外部基質として 10 mM グルコースを使用した。

(8) 情報高分子物質合成無細胞系を用いた実験: 技術的な制約から、実験系がすでに確立されている *Saccharomyces cerevisiae* の酵素を調製して使用した。

37°C で発育良好な *S. cerevisiae* TIMM 0942 を PYG 液体培地に 1 白金耳量接種後、37°C で振盪培養し、対数期培養 (O. D. 530=0.1~0.2) から細胞を集め、以下の方法により調製した反応系に対する薬剤の影響を調べた。

1) DNA ポリメラーゼ反応系: *S. cerevisiae* 細胞より CHANG¹⁰⁾ の方法に準じて、DNA ポリメラーゼの精製および活性測定を行なった。なお比較実験として、動物細胞 (エールリッヒ腹水ガン細胞) 由来の DNA ポリメラーゼを、MATSUKAGE ら^{11,12)} の方法により、精製し、同様に活性測定を行なった。鋳型として用いた activated DNA は、SCHLABACH ら¹³⁾ の方法に準じて調製した。

2) RNA ポリメラーゼ反応系: PONTA ら¹⁴⁾ の方法に準じて *S. cerevisiae* 細胞より RNA ポリメラーゼを調製し、活性測定を行なった。

(9) 細胞膜標品を用いた細胞壁多糖合成反応系

1) 細胞膜の分離精製: *S. schenckii* 酵母形細胞の対数増殖期初期の細胞を集め、生理食塩水で洗浄後、5 mM MgCl_2 と 1 mM EDTA を含む 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) に再浮遊した。次に、フレンチプレス (大丘製作所製) を用いて、400 kg/cm² の条件で細胞を破壊した。これを 3,000 rpm、10 分間遠心し、未破壊細胞および細胞壁成分の沈渣を除いた。得られた上清液は、超遠心分画に付した。10,000×g、30 分遠心の上清をさらに 100,000×g、30 分遠心して、沈渣を集め、得られた細胞膜標品を、細胞壁多糖合成酵素源として以下の実験に供した。

2) 細胞壁多糖合成反応系: 上記の方法により得た精製細胞膜標品を酵素源としてマンナン合成酵素反応、 β

(1,3)-グルカン合成酵素反応およびキチン合成酵素反応をそれぞれ BEHRENS ら¹⁵⁾ の方法、LOPEZ-ROMERO ら¹⁶⁾ の方法、DURÁN ら¹⁷⁾ の方法に準じて行ない、各反応系における薬剤の阻害効果を調べた。また、基質濃度を 2 mM と 4 mM に固定し薬剤濃度を変えた時の反応速度を DIXON¹⁵⁾ の方法に準じてプロットし K_i 値を測定した。

(10) ステロールの分析法: 種々の薬剤濃度下で 37°C、24 時間振盪した後、細胞を集め、15% KOH と 0.1% ピロガロールを含む 50% エタノール中で還流しながら 2 時間ケン化処理を行なった。これに 2 容の水を加え、ケン化脂質を石油エーテルで 3 回抽出した。この抽出物を洗浄、乾固した後、エチルエーテルに溶解し、日立ガスクロマトグラフィー (日立 263-80) を使用して以下の条件で分析を行なった。カラムの長さ 200×0.3 cm、1% OV-1 silicone、 N_2 流量 30 ml/分、カラム温度 235~280°C、昇温 6°C/分、水素炎イオン化検知器使用。

(11) 放射能の計測: 試料 (細胞または細胞画分) をのせたガラス繊維濾紙を赤外線ランプ下で充分乾燥した後、計測用バイアルに移してトルエンシンチレーター (トルエン 11 中に DPO 5g, ジメチル POPOP 0.3g を含む) を加え、Aloka 液体シンチレーションシステム LSC-700 型を用いて放射能を計測した。

II. 実験成績

1. 発育および生菌数に及ぼす影響

Fig. 2 に示されるように培養濁度を指標とした場合には、薬剤無添加対照培養の O. D. 値は、48 時間後までほぼ対数関数的に上昇したのに対して、 $\geq 1.25 \mu\text{g/ml}$ の tolcliate を添加した培養においては、その直後から O. D. 値の上昇速度は著しく低下した。これらの培養の 48 時間後の乾燥菌体重量は、培養開始前とほとんど変わらなかった。

一方、生菌数を指標とした場合には、対照培養では初期の遅滞期を終えた後、その値がほぼ対数的に上昇した。これに対して $1.25\sim 80 \mu\text{g/ml}$ の tolcliate を添加した培養においては添加後、直ちに生菌数の低下が始まり、48 時間後では接種時の 1% 以下の低値を示した。

2. 主要細胞構成成分の生合成に及ぼす影響

Fig. 3, 4 に示されるように、タンパク質や、RNA の合成に比べて、DNA および 2 つの細胞壁多糖画分の合成は tolcliate によってより強く阻害され、 $\geq 20 \mu\text{g/ml}$ の薬剤濃度における阻害度は 50% 近くに達した。総脂質の合成に対する阻害効果は特に顕著であり、 $10 \mu\text{g/ml}$ までの薬剤濃度では濃度とともに阻害度も上昇し、約 70% の値に達したが、それ以上の濃度ではかえって阻害度が低下した。

Fig. 2 Effect of tolcliate on the growth and viability of *S. schenckii*

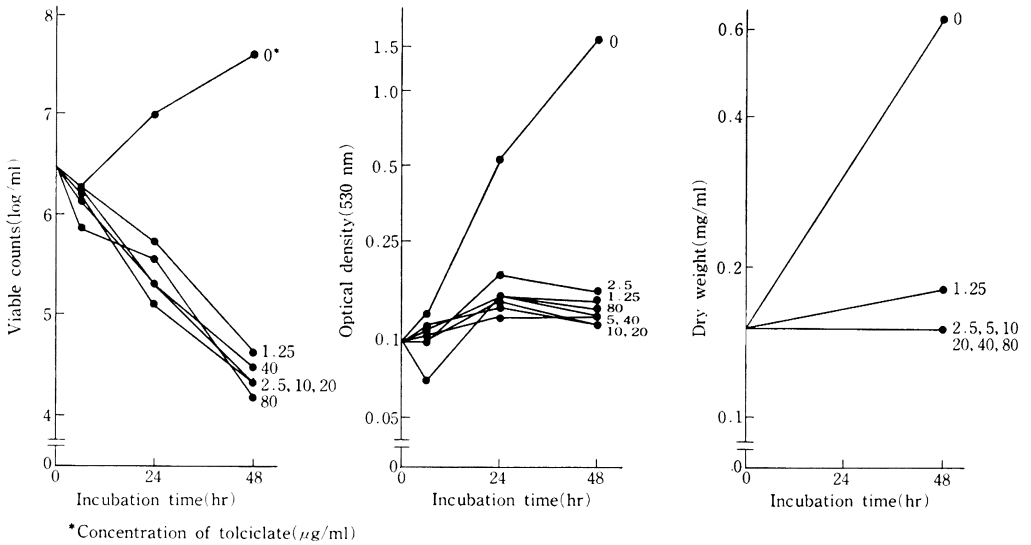
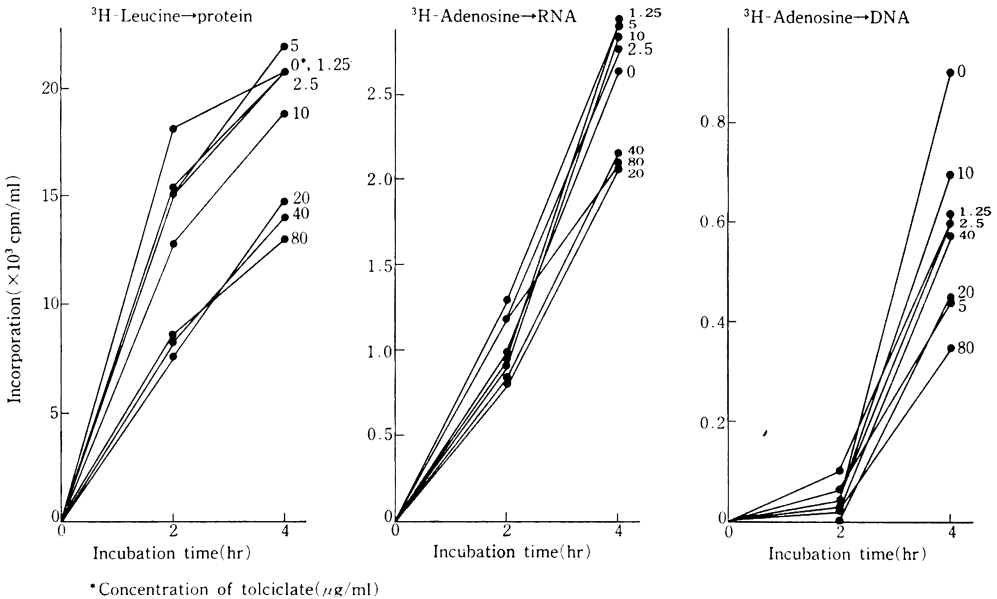


Fig. 3 Effect of tolcliate on the incorporation of ^3H -leucine into protein and of ^3H -adenosine into RNA and DNA in *S. schenckii* cells



3. 呼吸活性に及ぼす影響

Tolcliate を 80 $\mu\text{g/ml}$ にいたる高濃度で添加しても呼吸活性に対する阻害効果はまったく認められなかった(データ省略)。

4. 細胞膜に及ぼす影響

細胞膜障害作用をもつ対照薬剤として用いた miconazole nitrate (80 $\mu\text{g/ml}$) は、添加後 10 分以内に細胞内 K^+ および P_i をほぼ 100% 放出させたのに対して、tolcliate は 80 $\mu\text{g/ml}$ までのすべての濃度で有意な K^+ または P_i 放出促進効果を示さなかった。また、miconazole nitrate (80 $\mu\text{g/ml}$) を添加した場合には、その直後から急速な pH 上昇 ($\Delta \text{pH} > 0.3$) が認められた。これ

zole nitrate (80 $\mu\text{g/ml}$) は、添加後 10 分以内に細胞内 K^+ および P_i をほぼ 100% 放出させたのに対して、tolcliate は 80 $\mu\text{g/ml}$ までのすべての濃度で有意な K^+ または P_i 放出促進効果を示さなかった。また、miconazole nitrate (80 $\mu\text{g/ml}$) を添加した場合には、その直後から急速な pH 上昇 ($\Delta \text{pH} > 0.3$) が認められた。これ

Fig. 4 Effect of tolcliate on the incorporation of ^{14}C -glucose into alkali-soluble and -insoluble polysaccharides and of ^{14}C -acetate into lipids in *S. schenckii* cells

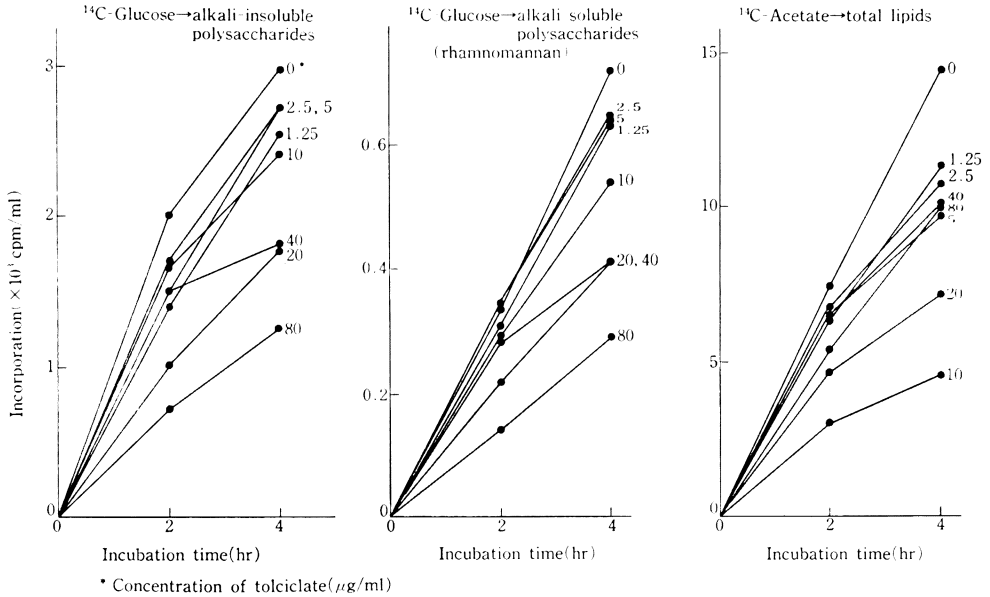


Table 1 Effect of tolcliate on some cell wall synthetases from *S. schenckii*

Enzymes	% Inhibition by tolcliate at levels of ($\mu\text{g/ml}$):				
	20	40	80	160	320
$\beta(1,3)$ -Glucan synthetase	0	0	0	0	0
Mannan synthetase	—	—	17	—	20
Chitin synthetase	22	39	52	58	69

—: Not done.

に反して, tolcliate ($\sim 80 \mu\text{g/ml}$) はまったく pH 変化を引き起こさなかった (データ省略)。

5. 核酸合成酵素反応に及ぼす影響

Tolcliate が比較的強い DNA 合成阻害効果を示したので, これが核酸合成機構自体に対する一次的作用か否かを知るために *S. cerevisiae* から調製した無細胞系を用いて DNA ポリメラーゼ反応および RNA ポリメラーゼ反応に対する影響を調べた。その結果, 本剤は $320 \mu\text{g/ml}$ の高濃度までいずれの反応もまったく阻害しないことが認められた (データ省略)。

6. 主要細胞壁多糖合成酵素反応に及ぼす影響

Table 1 から明らかなように, tolcliate は, $\beta(1,3)$ -グルカン合成酵素反応をまったく阻害せず, (ラムノ)マンナン合成酵素反応に対しては最大 20% 程度の弱い阻害作用を示した。Tolcliate が最も強く阻害したのは, キチン合成酵素反応であり, 最大阻害度はこの条件下で 50% 以上に達した。

Tolcliate によるキチン合成酵素反応の阻害様式をさ

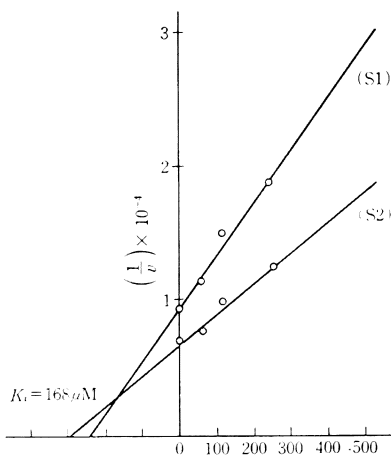
らに詳細に解析した結果, Fig. 5 に示されるように, 本剤の阻害効果は反応基質すなわち UDP-N-アセチルグルコサミンの濃度に依存し, この濃度が高くなるにつれて阻害度が低下するという競合的阻害パターンが得られ, この場合の K_i 値は $168 \mu\text{M}$ と算出された。

7. ステロール合成系に及ぼす影響

Fig. 4 の成績に示されるように, 総脂質画分への [^{14}C]酢酸の取り込みは tolcliate によって高度でしかも特徴的な阻害を受けたことから, 脂質合成, 特にステロール合成に対して本剤がどのように作用するかをより詳細に検討した。

Table 2 に示されるように, 無処置対照培養細胞の不ケン化脂質の主要成分はエルゴステロールであったが, tolcliate 添加培養においては, 薬剤濃度が増して発育阻害を強く受けるようになるとともにエルゴステロール含量は低下した。それと同時に, 正常細胞からはほとんど検出されないスクアレンの含量が著増した。その結果, スクアレン/エルゴステロール比は, 約 50% 発育阻

Fig. 5 Kinetics of inhibition by tolclolate of activity of chitin synthetase from *S. schenckii*



(S1) and (S2) : Substrate concentrations used, 2.0 and 4.0mM UDPAG respectively.
 v : Incorporation of substrate into chitin (cpm/reaction mixture)

Table 2 Squalene/ergosterol ratios in lipids from *S. schenckii* TIMM 0960 cells treated for 24 hours with tolclolate

Tolclolate ($\mu\text{g/ml}$)	Growth (mg dry weight/ml)	Squalene/ergosterol ratio
0	8.45	0.047
0.01	4.89	3.31
0.04	2.55	9.80
0.16	0.20	14.45
2.50	0.01	43.19

止濃度でも 70 倍、発育を完全に阻止する 2.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では 900 倍も対照より高い値を示した。

III. 考 察

チオカルバミン酸系抗真菌剤の白癬菌に対する抗菌活性は、これまで開発されたあらゆる薬剤のなかで最も強力と見なされている。それにもかかわらず、tolclolate はおろか治療薬として 20 年もの歴史をもつ tolnaftate についてさえも作用機序に関する研究報告はこれまでごく少数に限られている⁴⁾。一般に糸状菌は、部位によって著しく代謝活性をこととする菌糸を発育形態とするため、定量的な取り扱いが困難であるのみならず、代謝的にも均一なマスとして取り扱うことができない。したがって、抗真菌剤の生化学的作用機序研究には単細胞性の酵母状真菌を試験菌として用いるのが原則となっている。われわれは好適な試験菌を求めて検討を行なった結果、

スポロトリコーシスの原因菌である二形菌 *S. schenckii* が tolclolate に対して比較的高い感受性をもつことを見出した。そこでこの菌の酵母形細胞を試験菌として選んだ。事実、今回の実験に使用した *S. schenckii* TIMM 0960 の酵母形細胞に対して tolclolate は $\geq 1.25 \mu\text{g/ml}$ の濃度で明らかな静菌的または殺菌的作用を示した。このように比較的高い tolclolate 感受性をもつ本菌酵母形細胞による主要細胞構成成分の生合成はいずれも発育阻止濃度の tolclolate によって有意に阻害されたが、タンパク質や RNA の合成阻害度に比べて、DNA および 2 つの細胞壁多糖（アルカリ不溶性グルカンおよびラムノマンナン）の合成に対する阻害度はより大きいことが知られた。さらに注目されるのは、総脂質の合成に対する阻害効果が特徴的なパターンを示すことであり、10 $\mu\text{g/ml}$ までの薬剤濃度では濃度とともに阻害度も上昇し、約 70% まで達したがそれ以上の濃度ではかえって阻害度が低下するという二相性の応答が認められた。おそらくこれは、総脂質画分中に含まれる様々な脂質の合成系が相互に関連しているために薬剤の一次的阻害効果が複雑な二次的影響をひき起こしたものと推察される。Tolclolate は、*S. schenckii* 細胞による DNA および細胞壁多糖の生合成を比較強く阻害したが、真菌無細胞合成系を用いた実験成績からは、本剤が *S. cerevisiae* や動物細胞由来の DNA ポリメラーゼ反応をまったく阻害しないこと、また *S. schenckii* 細胞壁を構成する 3 種の主要多糖キチン、 β -グルカンおよびラムノマンナンそれぞれの合成酵素反応のうち、有意に強い阻害作用を呈したのはキチン合成酵素反応だけであることが示された。したがって、tolclolate によって有意な一次的阻害を受ける生体高分子合成系はキチン合成系だけであると見なすことができよう。真菌におけるキチン合成を選択的かつ強力に阻害する抗真菌性物質として、polyoxin 群および nikkomycin 群抗生物質が知られている。両群の抗生物質は UDP-N-アセチルグルコサミンと関連する化学構造を有し、各種真菌から調製されたキチン合成酵素反応を競合的に阻害し、しかもその K_i 値は 0.5~3.5 μM という極めて低い値を示すことが報告されている¹⁹⁻²³⁾。一方、tolclolate もまた真菌キチン合成酵素反応に対して競合的阻害作用を示すことが今回のわれわれの実験から明らかにされたものの、その K_i 値は 160 μM 以上であり、上述の糖スクレオチド抗生物質に比べて酵素親和性は著しく低い。したがって、tolclolate は確かにキチン合成酵素反応に作用して真菌のキチン合成を一次的に阻害するが、その阻害効果は本剤の抗菌活性を充分説明するほど強いものとは認めがたい。

そこで tolclolate の作用標的として最も注目されるの

は脂質合成系である。予備の実験から本剤が *S. schenckii* 細胞における脂肪酸合成には顕著な阻害作用を示さなかったのも、もっぱらステロール合成系を中心に本剤の効果を検討したところ、僅かな発育阻止作用しか示さない低濃度でも有意なエルゴステロール含量の低下とスクアレンの過剰蓄積が観察された。スクアレンはエルゴステロールを合成するための代謝的前駆体であり、これが高度に蓄積することは、ステロール合成経路におけるスクアレンの次の代謝段階であるスクアレンからスクアレン・エポキシドへの変換される段階が特異的に阻害される可能性を強く示唆する。その結果として、究極的にはエルゴステロール生成の阻害を招くことになる。この推定作用点を確認するために現在、*S. schenckii* 酵母形細胞から調製したスクアレン・エポキシダーゼ反応に対する tolclolate の阻害効果について検討中である。

これまで述べてきた tolclolate の作用機序に関するすべての実験成績を総合的に解釈するならば、感受性真菌細胞の種々の機能、代謝のなかで本剤の一次的作用を受ける確証が得られたのはキチン合成系とステロール合成系であり、それぞれの合成系に対して有効に働く薬剤濃度と阻害度との関係からは後者の作用が本剤の抗菌活性により大きく関与している可能性が示唆される。真菌ステロール生合成経路における本剤の作用点は *in vitro* でのスクアレン・エポキシダーゼ反応に対する影響を直接検討した成績がまだ得られていないものの、MIC 以下の低濃度の tolclolate 存在下で顕著なスクアレンの蓄積と最終産物であるエルゴステロールのみならずその前駆体であるラノステロールを含めてあらゆるステロールの欠乏が生じたことから、阻害はスクアレンからスクアレン・エポキシドが生成される段階すなわちスクアレン・エポキシダーゼ反応の過程で起こることはほとんど疑いない。

これまですでにアリルアミン系抗真菌剤 naftifine や SF 86-327 が種々の真菌においてスクアレン・エポキシ化反応を特異的に阻止してエルゴステロール生成を阻害することが Sandoz 社の RYDER ら^{24,25)}の研究グループによって確立されている。したがって、チオカルバミン酸系薬剤はアリルアミン系薬剤と真菌ステロール生合成経路上で同一の作用点をもつ可能性が強く示唆されたわけである。

それでは、真菌ステロール生合成経路上のスクアレン・エポキシ化反応阻害は、どのような過程を経て真菌細胞に阻止的に働くのであろうか。最も考えやすいのは、この代謝経路の最終産物エルゴステロールの欠乏による細胞膜の障害である。エルゴステロールは、真菌細胞膜の主要ステロールであり、膜内で2分子層を形成

しているリン脂質と相互作用し、細胞膜の流動性を調節している。したがって、もし何らかの理由でエルゴステロールの欠乏が起こるならば、その程度に応じて細胞膜の構造、機能が障害され、細胞は発育阻止ないし致死的影响を受けることになる²⁶⁾。細胞膜の機能は物質輸送にあずかることや透過性障壁として働くこと以外に、種々の細胞壁多糖合成酵素がここに局在して細胞壁形成に中心的な役割を果たすことにある。膜流動性の変化によって細胞壁合成酵素活性も様々に影響され、細胞壁の正常な形成が行なわれなくなる可能性は充分予想されるところである。

真菌細胞におけるエルゴステロール生合成を特異的に阻害する抗真菌剤としてよく知られているのは、すべてのイミダゾール剤およびトリアゾール剤を含むアゾール系薬剤である。しかし、アゾール系薬剤のステロール生合成経路上の作用点は、チオカルバミン酸系薬剤やアリルアミン系薬剤のそれとはまったく異なり、より後の過程である α -メチルステロールの C₁₄-脱メチル化反応の段階にある^{27,28,29)}。この反応にはチトクローム P-450 が必須であり、アゾール剤はこのヘムタンパク質に結合してその機能を阻害すると考えられている^{30,31)}。

ステロール生合成阻害作用とは別に tolclolate が一次的なキチン合成阻害作用をもつことは確かである。しかし阻害度の低さから、この作用機序が tolclolate の抗菌活性に主要な役割を果たすという可能性は小さくおそらく副次的な役割しかもたないのではないかと推察される。

<謝辞> Tolclolate および miconazole nitrate 精製原末標品を提供して頂いた協和酸酵(株)および持田製薬(株)に深謝いたします。

文 献

- 1) MELLONI, P.; R. METELLI, V. VECCHIETTI, W. LOGEMANN, S. CASTELLINO, G. MONTI & I. DE CARNERI: New antifungal agents. Eur. J. Med. Chem.-Chimica Therapeutica 9: 26~31, 1974
- 2) DE CARNERI, I.; G. MONTI, A. CASTELLINO, G. MEINARDI & V. MANDELLI: Tolclolate against dermatophytes. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 26: 769~772, 1976
- 3) BIANCHI, A.; G. MONTI & I. DE CARNERI: Tolclolate: Further antimycotic studies. Antimicrob. Agents Chemother. 12: 429~430, 1977
- 4) 西野武志, 尾花芳樹, 五十川葉子, 古志智子, 谷野輝雄: tolclolate の抗真菌作用に関する研究. Chemotherapy 29: 1304~1317, 1981
- 5) 高橋伸也: 抗白癬剤 Tolclolate の臨床的評価—二重盲検法試験における疾患別治療日数に関する考察. 西日本皮膚 42: 98, 1980

- 6) 香川三郎, ほか: 皮膚真菌症に対する Tolciclate クリームの臨床評価—二重盲検法による検討。西日本皮膚 43 : 141, 1981
- 7) 宮治 誠, 荻谷英郎: *sporothrix schenckii* の二相性 (II), 酵母型, 菌糸型のビタミン要求性。真菌誌 12 : 61~66, 1971
- 8) CHUNG, C. W.; W. J. NICKERSON: Polysaccharide synthesis in growing yeasts. J. Biol. Chem. 208 : 395~406, 1954
- 9) 中村道徳: 燐酸の比色定量法。農化誌 34 : 1~5, 1959
- 10) CHANG, L. M. S.: DNA polymerases from baker's yeast. J. Biol. Chem. 256 : 1873~1880, 1977
- 11) MATSUKAGE, A.; E. W. BOHN & S. H. WILSON: On the DNA polymerase III of mouse myeloma: partial purification and characterization. Biochemistry 14 : 1006~1020, 1975
- 12) MATSUKAGE, A.; M. SIRARAJAN & S. H. WILSON: Studies on DNA polymerase of mouse myeloma: partial purification and comparison of three molecular forms of enzyme. Biochemistry 15 : 5305~5314, 1976
- 13) SCHLABACH, A.; B. FRIDLANDER, A. BOLDEN & A. WEISSBACH: DNA-dependent polymerases from HeLa cell nuclei. II. Template and substrate utilization. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44 : 879~885, 1971
- 14) PONTA, H.; U. PONTA & E. WINTERSBERGER: DNA-dependent RNA polymerases from yeast. Partial characterization of three nuclear enzyme activities. Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 18 : 204~208, 1971
- 15) BEHRENS, N. H.; E. CABIB: The biosynthesis of mannan in *Saccharomyces carlsbergensis*. J. Biol. Chem. 243 : 502~509, 1968
- 16) LOPEZ-ROMERO, E.; J. RUIZ-HERRENA: Biosynthesis of β -glucans by cell-free extracts from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta. 500 : 372~384, 1977
- 17) DURÁN, A.; E. CABIB: Solubilization and partial purification of yeast chitin synthetase. Confirmation of the zymogenic nature of the enzyme. J. Biol. Chem. 253 : 4419~4425, 1978
- 18) DIXON, M.: The determination of enzyme inhibitor constants. Biochemical J. 55 : 170~171, 1953
- 19) ENDO, A.; T. MISATO: Polyoxin D, a competitive inhibitor of UDP-N-acetylglucosamine: chitin N-acetyl-glucosaminyltransferase in *Neurospora crassa*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37 : 718~722, 1969
- 20) ENDO, A.; K. KAKIKI & T. MISATO: Mechanism of action of the antifungal agent polyoxin D. J. Bact. 104 : 189~196, 1970
- 21) KELLER, F. A.; E. CABIB: Chitin and budding. Properties of chitin synthetase from *Saccharomyces carlsbergensis*. J. Biol. Chem. 246 : 160~166, 1971
- 22) MÜLLER, H.; R. FURTER, H. ZÄHNER & D. M. RAST: Metabolic products of microorganisms 203. Inhibition of chitosomal chitin synthetase and growth of *Mucor rouxii* by nikkomycin Z, nikkomycin X, and polyoxin A: A comparison. Arch. Microbiol. 130 : 195~197, 1981
- 23) HORI, M.; J. EGUCHI, K. KAKIKI & T. MISATO: Studies on the mode of action of polyoxins. VI Effect of polyoxin B on chitin synthesis in polyoxin-sensitive and resistant strains of *Alternaria kikuchiana*. J. Antibiotics 27 : 260~266, 1974
- 24) RYDER, N. S.: Selective inhibition of squalene epoxidation by allylamine antimycotic agents. In Microbial cell wall synthesis and autolysis (NOMBELA, G. ed.), pp. 313~321, Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, 1984
- 25) RYDER, N. S.: Specific inhibition of fungal sterol biosynthesis by SF 86-327, a new allylamine antimycotic agent. Antimicrob. Agents Chemother. 27 : 252~256, 1985
- 26) KERRIDGE, D.; W. L. WHELAN: The polyene macrolide antibiotics and 5-fluorocytosine; molecular actions and interactions. In mode of action of antifungal agents (TRINCI, A. P. J. & RELEY, J. F. eds.), pp. 321~341, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1984
- 27) SISLER, H. D.; N. N. RAGSDALE: Biochemical and cellular aspects of the antifungal action of ergosterol biosynthesis inhibitors. In mode of action of antifungal agents (TRINCI, A. P. J. & RELEY, J. F. eds.), pp. 257~282, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1984
- 28) 山口英世: 新しい抗真菌剤とその特徴, ケミカルテクノロジーシンポジウム—抗生物質の開発と課題。pp. 2-3-1~11, 日本能率協会, 1984
- 29) 山口英世: 今日の抗生物質, 南山堂, 1984
- 30) VANDEN BOSSCHE, H.; G. WILLEMSSENS & P. MARICHAL: Cytochrome P-450 inhibitors at the origin of deteriorated fungal membranes. A summary. In Microbial cell wall synthesis and autolysis (NOMBELA, G. ed.), pp. 307~312, Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, 1984
- 31) VANDEN BOSSCHE, H.; G. WILLEMSSENS, P. MARICHAL, W. COOLS & W. LAUWERS: The molecular basis for the antifungal activities of N-substituted azole derivatives. Focus on R 51211. In Mode of action of antifungal agents (TRINCI, A. P. J. & RELEY, J. F. eds.), pp. 321~341, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1984

STUDIES ON THE MECHANISM OF ACTION OF A NEW
THIOCARBAMATE ANTIMYCOTIC TOLCICLATE WITH
YEAST-PHASE CELLS OF A SENSITIVE FUNGUS
SPOROTHRIX SCHENCKII AS
TEST ORGANISM

TAMIO HIRATANI, JUNKO NAGATA and HIDEYO YAMAGUCHI
Research Center for Medical Mycology, Teikyo University,
School of Medicine, Hachioji, Tokyo 192-03, Japan

The mode of antifungal action of tolclolate, a new thiocarbamate antimycotic was studied using yeast-phase cells of a relatively sensitive fungus *S. schenckii* as the test organism. The results are summarized as follows :

(1) As monitored by optical density, dry weight and viable counts of fungal cultures, the extent of growth inhibition by tolclolate increased with increasing drug concentrations and a fungistatic or slight fungicidal activity was exerted by 1.25 to 80 $\mu\text{g/ml}$ of the drug.

(2) Tolclolate inhibited synthesis of cell wall polysaccharides as well as lipids to greater extents than synthesis of the other cellular components in growing fungal cultures. (The extent of inhibition by the drug appeared to be comparable to this antifungal activity.)

(3) Tolclolate had no effect on the cell membrane function or the respiratory activity of *S. schenckii* cells.

(4) Tolclolate caused no significant inhibition of *in vitro* activities of DNA polymerases and RNA polymerases, both of which were prepared from *S. cerevisiae*.

(5) The *in vitro* activities of synthetases of three major cell wall polysaccharides prepared from *S. schenckii* were affected by tolclolate in a different fashion from synthetase to synthetase. The high concentrations of tolclolate substantially inhibited the chitin synthetase activity and, to a lesser extent, the mannan synthetase activity, but they were without effect on the $\beta(1,3)$ -glucan synthetase activity. The inhibition by tolclolate of the chitin synthetase was of competitive type and exhibited K_i value of 168 μM .

(6) Ergosterol synthesis in *S. schenckii* cells was potently inhibited by tolclolate even at concentrations lower than MIC. They induced significant reduction in ergosterol content and heavy accumulation of squalene, a biosynthetic precursor of sterol.

(7) All these results led us to the suggestion that inhibition by tolclolate of sterol synthesis through blocking the step of squalene epoxidation in a fungal sterol biosynthetic pathway may be primarily involved in the antifungal action of the drug.