

Sporothrix schenckii tolcliate 耐性変異株の分離と性状

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10月8日受付)

新しいチオカルバミン酸系抗真菌剤 tolcliate に比較的感受性の高い *Sporothrix schenckii* の野生株から本剤に対する耐性変異株を9株誘導分離し、その性状を検討し、以下の成績を得た。

(1) すべての変異株は、tolnaftate および naftifine に対して交差耐性を示し、ketoconazole には感受性であった。

(2) 得られたすべての変異株は amphotericin B (AMPH) に耐性を示す群および親株と同程度の AMPH 感受性をもつ群とに分けられた。AMPH 耐性の変異株においては親株よりもエルゴステロール含量が低下し、スクアレノ含量が増加していた。一方、AMPH 感受性の変異株は親株と変わらないステロールパターンを示した。

(3) この両群のそれぞれから任意に選んだ菌株の細胞膜標品を用いた *in vitro* キチン合成酵素反応はいずれも tolcliate によって親株と同程度またはそれより強く阻害された。

以上の成績から、感受性真菌細胞において、チオカルバミン酸系抗真菌剤は、スクアレノ・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を阻害すること、また、これが本剤の抗菌活性を説明する一次的作用機序であるとの従来の推論が支持された。

われわれは、チオカルバミン酸系抗真菌剤 tolcliate の抗菌作用機序を明らかにするために比較的高い感受性を示す *Sporothrix schenckii* 酵母形細胞を主たる試験菌として用い、検討を行ってきた。その結果、本菌細胞の種々の機能、代謝活性のなかでキチン合成およびステロール合成が本剤の一次的阻害作用を受けることが認められ、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ステロール合成阻害作用のほうが本剤の抗菌活性により大きく関与する可能性が示唆された。この推論の妥当性を検討するために、本報においては、tolcliate 耐性変異株を分離し、本剤と化学構造および(または)作用機序の点で関連性をもつものを含む幾つかの主要抗真菌剤との交差耐性ならびに本剤作用機序と関連する幾つかの生化学的性状について解析した成績を述べる。

I. 材料と方法

1. 薬剤溶液の調製

Tolcliate (協和醸酵), tolnaftate (naphtiomate-T) (日本曹達), naftifine (サンド), amphotericin B methyl ester (日本スクイブ), および ketoconazole (協和醸酵) は、100% ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、8 mg/ml (w/v) の濃度に調整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、しかもチオカルバミン酸系抗真菌剤に比較的に感受性の高い菌株として TIMM 0960 を選び実験に用いた。

3. 培養

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のみを集めた。

4. Tolcliate 耐性変異株の分離

S. schenckii TIMM 0960 を親株として用い、これを 37°C で4~5日間培養したものを 10^6 細胞/mlの濃度になるように新鮮培地に接種し、 37°C で3時間振盪培養した。この培養に変異誘発剤として N'-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン を最終濃度 250~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、 37°C で30分~1時間振盪した。処理終了後、直ちに遠心集菌し、洗浄した細胞を 80 $\mu\text{g}/$

ml の tolciclate を含む平板培地に塗抹し、室温で1週間培養を続け、発育してきたコロニーを分離し、薬剤含有培地を数回通過させて耐性変異株を得た。

5. 抗菌活性の測定

抗菌活性は乾燥重量を指標として測定した。酵母エキス 0.5%, グルコース 1% を加えた BHI 液体培地で、24~48 時間培養した試験菌を 530 μ m での濁度 (OD₅₃₀) が 0.15 (約 2×10^7 細胞/ml に相当) になる濃度に希釈して同じ培地に浮遊し、薬剤溶液を添加した後、37°C で振盪培養を行なった。24 および 48 時間後、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。

6. ステロールの分析法

試験菌を 37°C, 24~48 時間振盪した後、細胞を集め、15% KOH と 0.1% ビロガロールを含む 50% エタノール中で還流下に 2 時間ケン化処理を行なった。これに 2 容の水を加え、不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 \times 0.3 cm, 1% OV-1 silicone, N₂ 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。

7. 無細胞キチン合成系に対する影響

S. schenckii 野生型株および耐性変異株の対数増殖期初期の細胞を集め、生理食塩水で洗浄した後、5 mM MgCl₂ 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、フレンチプレス (大缶製作

所製) を用いて、400 kg/cm² の条件下で細胞を破壊した。3,000 rpm, 10 分間の遠心により未破壊細胞および細胞壁成分を含む沈渣を除いた後、得られた上清液の超遠心分画を行なった。10,000 \times g, 30 分間遠心後の上清をさらに 100,000 \times g, 30 分遠心し、細胞膜標品を沈渣として得た。これを酵素源とし、[¹⁴C]-UDP-N-acetyl glucosamine を基質として用い、キチン合成酵素反応を DURAN ら²⁾の方法に準じて行ない、薬剤の阻害効果を調べた。反応後の試料をガラス繊維濾紙上に集め、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

最終的に 9 株の tolciclate 耐性変異株を分離した。まずはじめに、これらの耐性変異株について、tolciclate ならびに他の 4 種の抗真菌剤に対する感受性を液体希釈法により測定した。Table 1 に、各菌株に対するこれらの薬剤の IC₅₀ 値 (μ g/ml) すなわち 50% 発育阻止濃度を示す。いずれの変異株も関連構造をもつ tolnaftate と完全な交差耐性を示した。加えて、アリルアミン系抗真菌剤 naftifine に対しても交差耐性が認められた。他方、ketoconazole などのイミダゾール系抗真菌剤に対する感受性は、親株と tolciclate 耐性変異株との間で有意に違わなかった。Amphotericin B (AMPH) に対する応答は、変異株間で異なり、これに基づいて 9 株の変異株は次のとおり 2 群に分かれた。第 1 群は、AMPH 耐性を示すグループで、tcr-1 から tcr-5 までの 5 株が該当し

Table 1 Sensitivity of various antifungal agents against wild-type and tolciclate-resistant mutant strains of *S. schenckii* and squalene/ergosterol ratios in lipids from these strains

Strains	IC ₅₀ * (μ g/ml)					S/E ratios**
	Tolciclate	Tolnaftate	Naftifine	Ketoconazole	Amphotericin B methyl ester	
Wild-type (TIMM 0960)	≤ 0.3	1.25	0.3	< 0.3	0.3	0.047
tcr-1	> 20	> 20	5	< 0.3	10	16.9
tcr-2	> 20	> 20	10	< 0.3	2.5	7.1
tcr-3	> 20	> 20	2.5	0.3	2.5	8.2
tcr-4	> 20	> 20	10	0.6	2.5	6.0
tcr-5	> 20	> 20	5	≤ 0.3	1.3	2.1
tcr-6	> 20	> 20	10	≤ 0.3	0.6	0.047
tcr-7	> 20	> 20	> 20	≤ 0.3	0.6	0.071
tcr-8	> 20	> 20	> 20	≤ 0.3	0.6	0.059
tcr-9	> 20	> 20	> 20	≤ 0.3	0.6	0.048

* Concentration of drug which gives a 50% reduction in growth.

** Squalene/ergosterol ratios.

Table 2 Effect of tolclolate on chitin synthetase from wild-type and tolclolate-resistant mutant strains of *S. schenckii*

Strains	Radioactivity (% of control)					
	Tolclolate conc. in assay mixture ($\mu\text{g/ml}$)					
	0	20	40	80	160	320
Wild-type (TIMM 0966)	100	83.4	79.1	59.2	54.3	45.8
Tolclolate-resistant mutants						
tcr-1	100	ND*	ND	ND	41.9	36.7
tcr-6	100	ND	ND	ND	27.1	17.4

* ND, Not done.

た。tcr-6 から tcr-9 までの 4 株を含む第 2 群は、これと対照的に AMPH に対して親株と同程度に感受性であった。さらに AMPH 感受性の差に対応して、両群間には細胞内のスクアレン対エルゴステロールの含量比に大きな相違がみられた (Table 1)。第 1 群の変異株においてはこの含量比が著しく高かったのに対し、第 2 群の変異株は親株と変わらない低値を示した。

次に、第 1 群と第 2 群の変異株のなかから tcr-1 と tcr-6 をそれぞれ任意に選び、無細胞系におけるキチン合成酵素活性の tolclolate 感受性を親株のそれと比較した。

Table 2 の成績に示されるように、いずれの変異株から調製した酵素標品による反応も親株由来のものと同程度またはそれ以上に tolclolate によって強く阻害された。

III. 考 察

チオカルバミン酸系抗真菌剤の白黴菌に対する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ほとんど見当らない。その大きな理由は、白黴菌の栄養形発育形態が菌糸であるためと考えられる。われわれは好適な試験菌を求めて検討を行なった結果、二形菌 *S. schenckii* がチオカルバミン酸系抗真菌剤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用い、主要な細胞機能や代謝に及ぼす tolclolate の影響を検討した。その結果、感受性真菌細胞の種々の機能、代謝のなかでこれらの薬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

は後者の作用がこれらの薬剤の抗菌活性により大きく関与していることが示唆された¹⁾。

この推論の妥当性を検討するために、本報においては、*S. schenckii* から tolclolate に耐性化した変異株を分離し、その耐性機序と関連すると考えられる生化学的性状を調べた。その結果、いずれの変異株も関連化合物の tolnaftate と完全な交差耐性を示し、アリルアミン系抗真菌剤 naftifine に対する交差耐性も認められた。

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^{3,4)}の研究グループによって明らかにされている。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今回の成績からさらに強く支持されたわけである。

他方、ketoconazole などのイミダゾール系抗真菌剤に対する感受性については、親株と tolclolate 耐性変異株との間で有意な違いはみられなかった。AMPH に対する応答が変異株間で異なり、これに基づいて 9 株の変異株は 2 群に分かれた。一つは AMPH 耐性を示すグループで、第 2 のグループはこれと対照的に AMPH に対して親株と同程度の感受性を示した。これらの変異株は AMPH 感受性の差に対応して両群間には細胞内のスクアレン対エルゴステロール含量の比に大きな相違がみられた。第 1 群の変異株においては、この含量比が著しく高いのに対し、第 2 群変異株は親株と変わらない低値を示した。第 1 群変異株ではおそらくスクアレン・エポキシダーゼ活性に欠陥をもつためにスクアレンの蓄積とエルゴステロール生成阻害が起こっているであろう。そのため、標的分子おそらくスクアレン・エポキシダーゼが欠除したかまたは修飾されて tolclolate 親和性が低下し、本剤に耐性を示すようになったと考えられる。AMPH などのポリエーテル抗生物質は、真菌細胞において膜内のエルゴステロール分子と特異的に相互作用を営み、細胞膜を障害することは周知のとおりである。したがって第 1 群の変異株のようにエルゴステロール生成が阻害されている細胞にあっては、AMPH の作用標的となるエルゴステロールの膜内含量 (分子数に比例する) が低下したために細胞膜は AMPH の膜作用を受けにくくなり、耐性を示すに至ったと考えられる。この推論は従来報告された *S. cerevisiae* や *C. albicans* の AMPH 耐性株でエルゴステロール含量の低下が証明された例がある⁵⁻¹²⁾ ことから支持されよう。一方、第 2 群の tolclolate 耐性変異株においては、エルゴステロール含量の低下もスクアレンの蓄積も起こらず、ステロール合成

系は正常に機能していると考えられる。親株と同様に高い AMPH 感受性を示すのはそのためであろう。また第1群と第2群の変異株のなかからそれぞれ1株ずつを任意に選び、無細胞系におけるキチン合成酵素活性の tolclate 感受性を親株のそれと比較した結果からは、いずれの変異株から調製した酵素標品も親株由来のものと同程度またはそれ以上に tolclate 感受性を示した。この成績から耐性タイプのかんにかかわらず、キチン合成酵素自体の耐性化は認められなかった。したがって、第2群の変異株が tolnaftate および naftifine に対して交差耐性をもつ理由は、tolclate およびこれらの薬剤に対する透過性の低下にあると考えるのが妥当であろう。薬剤の細胞内移入は主として細胞膜によって支配されるところから、これらの変異株は細胞膜変異株と推定される。また、これらの成績は、チオカルバミン酸系薬剤がアリルアミン系薬剤と作用点を共有するばかりでなく、両系薬剤間は細胞透過性の点でも共通性がみられることを示唆している。化学的に異なる系統に属する薬剤であることを考えると、これは奇異なことがらのようにもみえる。しかし、分子中にナフタレン環や N-メチル基をもつなどの点では両系薬剤の化学構造にある程度の類似点があると見なすこともできるので、この問題は構造・活性相関の観点からさらに検討を加える必要がある。

(謝辞): Tolclate と ketoconazole, tolnaftate, naftifine および amphotericin B methyl ester 精製原末標品を提供して頂いたそれぞれ協和醸酵、日本曹達、サンドおよび日本スクイブのご厚意に深謝いたします。

文 献

- 1) 平谷民雄, 永田淳子, 山口英世: *Sporothrix schenckii* 酵母形細胞を用いての tolclate の作用メカニズム. *Chemotherapy* 34: 137~145, 1986.
- 2) DURÁN, A. & E. CABIB: Solubilization and partial purification yeast chitin synthetase. Confirmation of the zymogenic nature of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 253: 4419~4425, 1978
- 3) 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
- 4) 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
- 5) WOODS, R. A.: Nystatin-resistant mutants of yeast: alterations in sterol content. *J. Bacteriol.* 108: 69~73, 1971
- 6) BARD, M.: Biochemical and genetic aspects of nystatin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 111: 649~657, 1972
- 7) HAMILTON-MILLER, J. M. T. . Sterols from polyene-resistant mutants of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 73: 201~203, 1972
- 8) MORZAHN, S. W. & R. A. WOODS: Polyene resistance and the isolation of sterol mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 72: 339~348, 1972
- 9) PARKS, L. W.; F. T. BOND, E. D. THOMPSON & P. R. STARR: $\Delta^8(9),22$ -Ergostadien-3 β -ol, an ergosterol precursor accumulated in wild type and mutants of yeast. *J. Lipid Res.* 13: 311~316, 1972
- 10) BARTON, D. H. R.; J. E. T. CORRIE, D. A. WIDDOWSON, M. BARD & R. A. WOODS: Biosynthetic implications of the sterol content of ergosterol-deficient mutants of yeast. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 30~31, 1974
- 11) FRYBERG, M.; A. C. OEHLISCHLAGER & A. M. UNRAU: Sterol biosynthesis in antibiotic-resistant yeast: nystatin. *Arch. Biochem. Biophys.* 160: 83~89, 1974
- 12) WOODS, R. A.; M. BARD, I. E. JACKSON & D. J. DRUTZ: Resistance to polyene antibiotics and correlated sterol changes in two isolates of *Candida albicans* from a patient with an amphotericin B-resistant funguria. *J. Infect. Dis.* 129: 53~58, 1974

DRUG SENSITIVITY PATTERNS AND SOME BIOCHEMICAL
PROPERTIES OF TOLCICLATE-RESISTANT MUTANT
STRAINS DERIVED FROM A SUSCEPTIBLE
DIMORPHIC *SPOROTHRIX SCHENCKII*

TAMIO HIRATANI, JUNKO NAGATA and HIDEYO YAMAGUCHI

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

Nine mutants resistant to a new thiocarbamate antimycotic tolclate were isolated from yeast-phase cells of a sensitive fungus *Sporothrix schenckii* and some of their biochemical properties possibly related to this resistance were examined. The results are summarized as follows :

(1) All these mutant strains were cross-resistant to tolnaftate and naftifine, but sensitive to ketoconazole.

(2) Tolclate-resistant mutant strains were divided into two groups. On the basis of sensitivity to amphotericin B methyl ester.

The members of the first group were also resistant to amphotericin B methyl ester, although the level of resistance varied widely ; the IC_{50} values of amphotericin B methyl ester for these mutant strains were 2 to 16 times higher than the comparable value for the wild-type strain. Moreover, they were biochemically characterized by a significant reduction in ergosterol content and heavy accumulation of squalene, a biosynthetic precursor of sterol. On the other hand, in the second group of mutant strains, which are sensitive to amphotericin B methyl ester, ergosterol was the major sterol as is the case in the wild-type strain.

(3) The *in vitro* activity of chitin synthetase prepared from each group of the mutant strains was inhibited to almost equal or higher extent than that from the parent strain.

(4) All these results strongly support the possibility that inhibition by tolclate 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.