

# *Sporothrix schenckii* 酵母形細胞を用いてのチオカルバミン酸系 抗真菌剤 tolnaftate およびその関連化合物 naphthiomate-N の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 61 年 4 月 2 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抗真菌剤 tolnaftate (naphthiomate-T) およびその関連化合物である naphthiomate-N の抗菌活性を説明しうる一次的作用機序を検討し、次の成績を得た。

1) 試験菌に対して tolnaftate は静菌的ないしは軽度ながら殺菌的に、また naphthiomate-N は静菌的に作用した。

2) 本菌の主要な細胞構成成分の生合成に対して tolnaftate はさまざまな程度の阻害作用を示した。RNA 合成およびタンパク質合成は阻害されず、DNA 合成、細胞壁多糖合成および総脂質合成はいずれも阻害を受けた。特に脂質合成に対しては、0.16  $\mu\text{g/ml}$  の低濃度の薬剤でも有意な阻害を示した。一方、naphthiomate-N は tolnaftate よりも全体的に阻害度が弱いながらも同様の阻害パターンを示した。しかし、総脂質合成に対しては、tolnaftate と同程度の比較的強い阻害効果を示した。

3) 細胞膜および呼吸に対する両剤の阻害作用はまったく認められなかった。

4) 両剤は *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。

5) 両剤とも *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を強く阻害し、マンナン合成酵素反応をより軽度に阻害した。一方、 $\beta(1,3)$  グルカン合成酵素反応に対してはまったく阻害を示さなかった。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 tolnaftate で 180  $\mu\text{M}$ 、naphthiomate-N で 54  $\mu\text{M}$  と算出された。

6) エルゴステロール合成に対し、両剤とも強い阻害効果を示し、スクアレンの過剰蓄積が認められた。

以上の成績から、感受性真菌細胞において、tolnaftate および naphthiomate-N 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し、これが両剤の抗菌活性に最も直接的に関与する作用機序であると推論された。

Tolnaftate (naphthiomate-T) は、1962年日本曹達株式会社の開発になるチオカルバミン酸系抗真菌剤で、Fig. 1に示されるように 2-naphthyl N-methyl-N-(3-yl)thiocarbamate (分子量 307.43) の化学構造をつ。本剤は古くから外用抗白癬剤として使用され、現に常用されている。

Naphthiomate-N は、tolnaftate と同じく抗白癬菌活性をもつ関連化合物であり、2-naphthyl N-methyl-N-(3-yl)thiocarbamate (分子量 343.46) の化学構造をもつ。

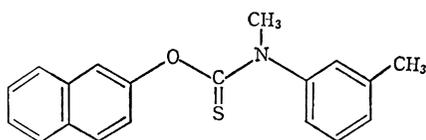
本剤は白癬菌に対してかなり強い抗菌力を有するが、

白癬菌以外の病原真菌、例えば、*Candida* などの酵母状真菌に対して発育阻止作用を示さない。また、両剤の抗白癬菌作用は、前者で殺菌的傾向が強いものに対して後者では静菌的傾向が強い点で幾分異なるものと考えられている<sup>1-4)</sup>。

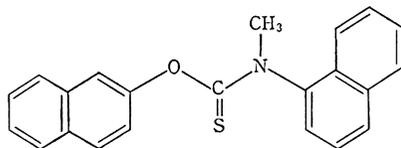
近年、新しいチオカルバミン酸系抗真菌剤として tolciclate が開発され、外用抗白癬剤としてすでに臨床的に使用されている<sup>5,7,8)</sup>。本剤は tolnaftate および naphthiomate-N と同様の抗菌スペクトルをもつ<sup>5,6,9)</sup>。

Tolnaftate は優れた外用抗白癬剤として古くから広く使用されてきたにもかかわらず、チオカルバミン酸系

Fig. 1 Chemical structures of tolnaftate and naphthiomate-N



Tolnaftate (naphthiomate-T)



Naphthiomate-N

抗真菌剤の作用機作に関する研究報告はほとんど見当たらない。本報においては両剤に比較的感受性の高い *Sporothrix schenckii* の酵母形細胞を主たる試験菌として用い、tolnaftate および naphthiomate-N の抗菌活性に一次的に関与する作用機作を検討することを試みた。

### I. 材料と方法

#### 薬剤溶液の調製

Tolnaftate, naphthiomate-N および miconazole nitrate はいずれも 100% ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、8 mg/ml(w/v) の濃度に調整した溶液を作製した。これを原液として  $-20^{\circ}\text{C}$  に保存し、必要に応じて融解した後、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) になるように調整した。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。

#### 菌株

前報<sup>10,11)</sup>で述べた tolcliate 高感受性 *S. schenckii* 菌株 TIMM 0960 は tolnaftate および naphthiomate-N に対しても比較的高い感受性を示したので、これを主な試験菌として選び、実験に用いた。

#### 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、 $37^{\circ}\text{C}$ 、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、荻谷<sup>12)</sup>の合成培地(pH を 6.8 に改変)で遠心洗浄した後、同じ合成培地に再浮遊し、細胞浮遊液を調製した。

#### 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  $530\ \mu\text{m}$  の濁度 ( $\text{OD}_{530}$ ) が 0.15 (約  $2 \times 10^7$  細胞/ml に相当) になる濃度に希釈して合成培地に再浮遊し、薬剤溶液を添加した後、 $37^{\circ}\text{C}$  で振盪培養を行った。一定時間間隔で試料を採取し、次の測定を行った。(1)  $\text{OD}_{530}$  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、 $27^{\circ}\text{C}$  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。

#### 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、 $\text{OD}_{530}$  が 1 になるような濃度 (約  $9\ \text{mg} \cdot \text{乾燥重量}/\text{ml}$  に相当) に調整した。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  $37^{\circ}\text{C}$  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  $0.4\ \mu\text{Ci}$  ( $0.1\ \mu\text{mol}$ ) 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、 $90^{\circ}\text{C}$  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。これを 5% TCA で洗浄し、乾燥した。

#### (2) アデノシン

反応液 1 ml 当り  $0.4\ \mu\text{Ci}$  ( $0.04\ \mu\text{mol}$ ) の  $[^3\text{H}]$ -7-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  $0^{\circ}\text{C}$  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、 $60^{\circ}\text{C}$ 、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  $0^{\circ}\text{C}$  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  $0.02\ \mu\text{Ci}$  ( $2\ \mu\text{mol}$ ) 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 & NICKERSON<sup>13)</sup>の方法に従ってマンナン画分および熱アルカリ不溶性グルカン画分を得、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/ml 当り [<sup>14</sup>C]-酢酸ナトリウム 0.04  $\mu$ Ci (0.1  $\mu$ mol) 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。

#### 細胞膜障害の測定

##### (1) 細胞外へ放出される K<sup>+</sup> 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、2~3 $\times$ 10<sup>7</sup> 細胞/ml の濃度になるように蒸留水に再浮遊し、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、細胞と濾液とに分離した。得られた濾液すなわち細胞外液について、K<sup>+</sup> 含量を蛍光光度計(日立 775 型)により、また Pi 含量を中村<sup>14)</sup>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 K<sup>+</sup> および Pi 放出量は、0 時間(薬剤処理前)の細胞を 5% 冷 TCA で抽出して得られるそれぞれの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形細胞浮遊液の一定量を測定用容器に取り、37°C で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。薬剤添加後、10 分間隔にわたって連続的に pH 値を記録した。

#### 呼吸活性の測定

*S. schenckii* 酵母形細胞を 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5) で 3 回洗浄した後、同溶液に浮遊し、内部呼吸を減させるために、30°C で 4 時間振盪して飢餓処理を行った。遠心により細胞を集め、OD<sub>530</sub> 値が 1.5 になるように 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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、外部基質として 10 mM グルコースを使用した。

#### 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、この実験系がすでに確立されている *Saccharomyces cerevisiae* 由来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 (OD<sub>530</sub>=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 CHANG<sup>15)</sup>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<sup>16,17)</sup>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<sup>18)</sup>の方法に準じて調製した。

##### (2) RNA ポリメラーゼ反応系

PONTA ら<sup>19)</sup>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。

#### 細胞膜標品を用いた細胞壁多糖合成酵素反応系

(1) *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<sub>2</sub> 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(大缶製作所製)を用いて 400 kg/cm<sup>2</sup> 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 $\times$ g、30 分遠心の上清をさらに 100,000 $\times$ 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。

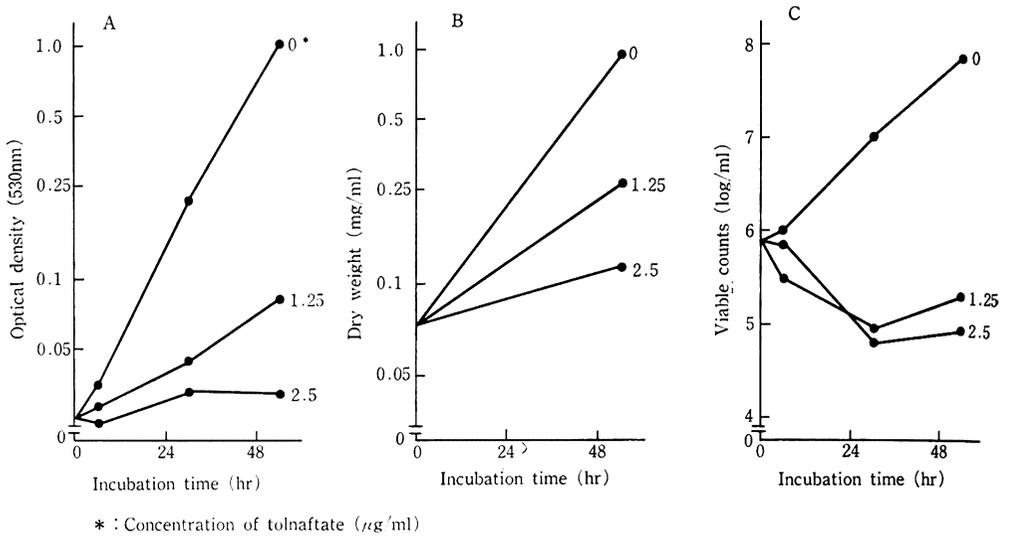
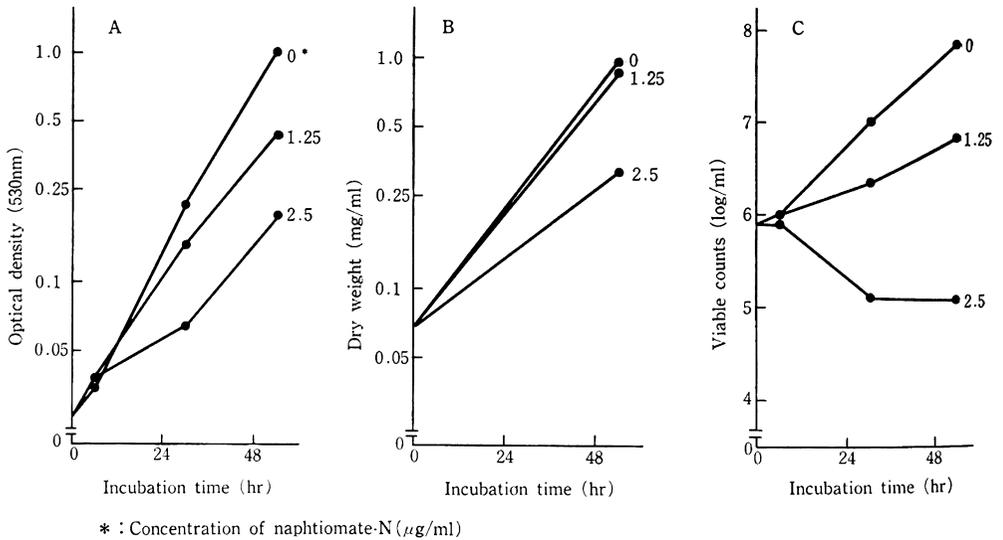
##### (2) 細胞壁多糖合成酵素反応系

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、 $\beta$ -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<sup>20)</sup>の方法、LOPEZ-ROMERO ら<sup>21)</sup>の方法、DURAN ら<sup>22)</sup>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、薬剤濃度を変えて、基質濃度 2 mM、4 mM と一定にした時の反応速度を DIXON<sup>23)</sup>の方法に準じてプロットし、Ki 値を測定した。

#### ステロールの分析法

種々の薬剤濃度下で 37°C、24 時間振盪培養した後、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後、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、N<sub>2</sub> 流量 30 ml/min、カラム温度 235~280°C、昇温 6°C/min、水素炎イオン化検知器使用。

放射能の計測

Fig. 2 Effect of tolnaftate on the growth and viability of *S. schenckii*Fig. 3 Effect of naphthiomate-N on the growth and viability of *S. schenckii*

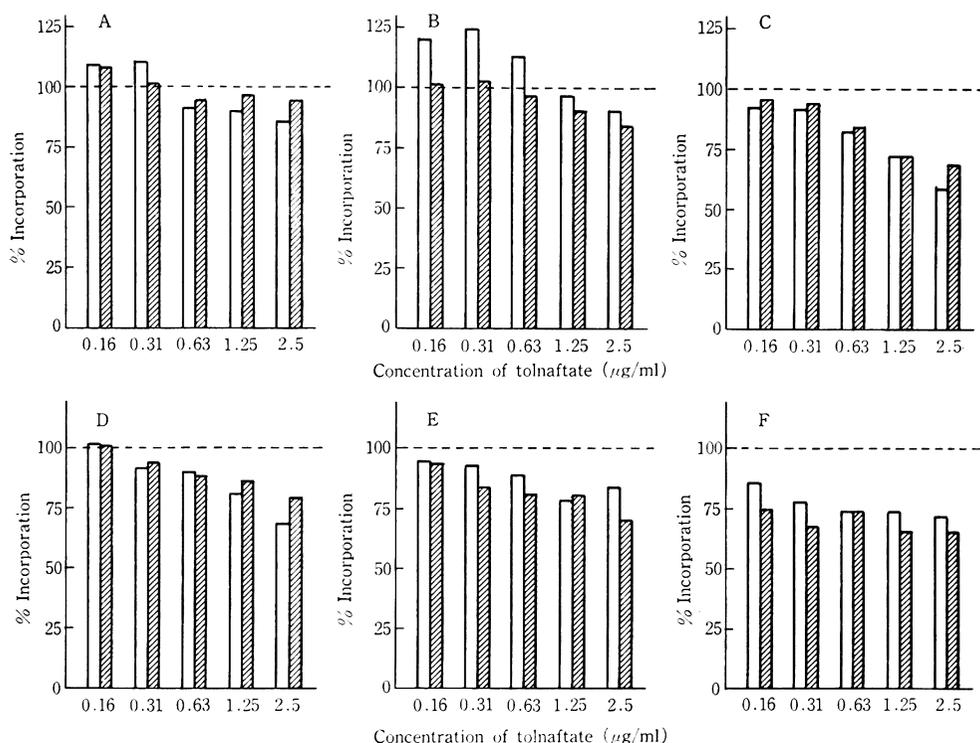
試料（細胞または細胞画分）をのせたガラス繊維濾紙を赤外線ランプ下で充分乾燥した後、計測用バイアルに移してトルエンシンチレーター（トルエン 11 中に DPO 5 g, ジメチル POPOP 0.3 g を含む）を加え、Aloka 液体シンチレーションシステム LSC-700 型を用いて放射能を計測した。

## II. 実験成績

### 1. 発育および生菌数に及ぼす影響

Fig. 2 A および 3 A に示されるように、培養濃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 54 時間後まではほぼ対数関数的に上昇した。これに対して、tolnaftate 1.25 および 2.5  $\mu\text{g/ml}$  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、1.25  $\mu\text{g/ml}$  で約 80%、2.5  $\mu\text{g/ml}$  で約 97% まで減少した (Fig. 2 A)。また、これらの培養の 54 時間後の乾燥菌体重量は、1.25  $\mu\text{g/ml}$  で 75%、2.5  $\mu\text{g/ml}$  で

Fig. 4 Effect of tolnaftate on synthesis of major cellular constituents in *S. schenckii* cells as measured by incorporation of specific radioactive compounds for 2 hr (□) and 4 hr (▨). Incorporation of: A, [<sup>3</sup>H] leucine into protein; B, [<sup>3</sup>H] adenosine into RNA; C, [<sup>3</sup>H] adenosine into DNA; D, [<sup>14</sup>C] glucose into alkali-insoluble polysaccharides; E, [<sup>14</sup>C] glucose into alkali-soluble polysaccharides (rhamnomannan); and F, [<sup>14</sup>C] acetate into total lipids.



は95%近く減少した (Fig. 2B)。一方, naphthio-*N* 処理の場合, tolnaftate の場合よりも抗菌活性は弱く, O.D. 値は1.25 µg/ml で約50%, 2.5 µg/ml で約70%の低下を示し (Fig. 3A), この時の54時後の乾燥菌体重量は, 1.25 µg/ml では対照とほとんど変わらず, 2.5 µg/ml の濃度で約70%の減少を示し (Fig. 3B)。

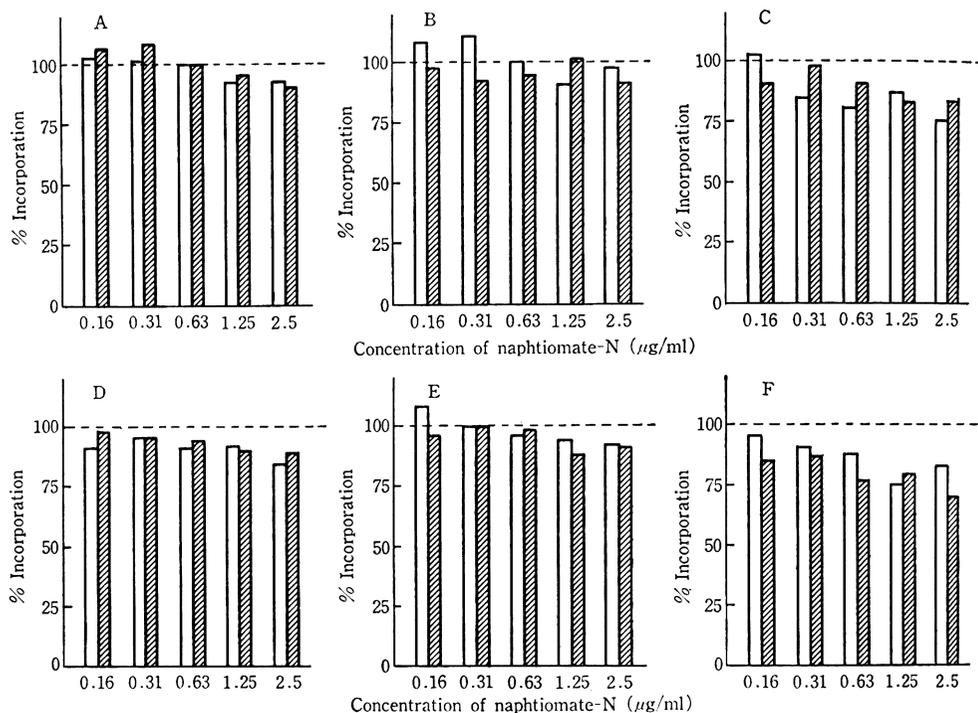
生菌数を指標とした発育は, 対照培養では, その値が間とともにほぼ対数的に上昇した (Fig. 2C, 3C)。これに対して, 1.25 および 2.5 µg/ml の tolnaftate を添加した培養においては, 添加後直ちに生菌数の低下が始まり, 54時間後では対照に比べ, 約99%以下の低値を示した (Fig. 2C)。一方, naphthio-*N* では, 2.5 µg/ml の濃度で tolnaftate と同様に添加後直ちに生菌数低下が始まり, 54時間後では対照に比べ, 約99%以下の低値を示したが, 1.25 µg/ml の濃度では対照に比約90%減少したのみであった (Fig. 3C)。

## 2. 主要細胞構成成分の生合成に及ぼす影響

Fig. 4 に示されるように, tolnaftate は *S. schenckii* 発育細胞における主要な細胞構成成分の合成のうち, RNA 合成およびタンパク質合成に対しては, 2.5 µg/ml の濃度で約10%の阻害を示したが, DNA 合成および細胞壁多糖 (アルカリ不溶性グルカン+ラムノマンナン) 合成, さらに総脂質合成に対しては, 2.5 µg/ml の濃度で約30%阻害した。特に, 顕著に阻害されたのは総脂質合成であり, 0.16~2.5 µg/ml の濃度範囲で約25~35%の阻害度に達した。

一方, Fig. 5 にみられるように, naphthio-*N* もまたさまざまな程度の阻害効果を示した。RNA 合成およびタンパク質合成に対しては2.5 µg/ml の濃度で約10%の阻害, DNA 合成および細胞壁多糖合成に対して, 約10~30%の阻害を示し, tolnaftate に比べて阻害度は弱いと同様の阻害パターンがみられた。しかし, DNA 合成, 細胞壁多糖合成および総脂質合成のなかで最も顕著

Fig. 5 Effect of naphthiomate-N on synthesis of major cellular constituents in *S. schenckii* cells as measured by incorporation of specific radioactive compounds for 2 hr (□) and 4 hr (▨). Incorporation of: A, [<sup>3</sup>H] leucine into protein; B, [<sup>3</sup>H] adenosine into RNA; C, [<sup>3</sup>H] adenosine into DNA; D, [<sup>14</sup>C] glucose into alkali-insoluble polysaccharides; E, [<sup>14</sup>C] glucose into alkali-soluble polysaccharides (rhamnomannan); and F, [<sup>14</sup>C] acetate into total lipids.



に阻害されたのは総脂質合成であり、0.16~2.5 µg/ml の薬剤濃度範囲で tolnaftate と同程度の約 15~30% の阻害を示した。

### 3. 呼吸活性性及び影響

Tolnaftate および naphthiomate-N は ~20 µg/ml の濃度範囲においても、外部呼吸基質添加の有無にかかわらず、*S. schenckii* 酵母形細胞の呼吸活性をまったく阻害しなかった (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 µg/ml) は、*S. schenckii* 酵母形細胞培養において、添加後 10 分以内に細胞内 K<sup>+</sup> および Pi をほぼ 100% 放出させた。これに対して、tolnaftate および naphthiomate-N は 2.5~20 µg/ml の範囲のすべての濃度で有意な放出促進効果を示さなかった。また、miconazole nitrate (80 µg/ml) 添加直後から急速な pH 上昇 (ΔpH, >0.3) が認められた。これに反して、チオカルバミン酸系 2 剤は、2.5~20 µg/ml の濃度範囲でま

たく pH 変化をひき起こさなかった (データ省略)。

### 5. 核酸合成酵素反応に及ぼす影響

*S. schenckii* 発育細胞において、tolnaftate および naphthiomate-N は比較的強い DNA 合成阻害効果を示したので (Fig. 2, 3), 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、すでに実験系の確立している *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。両剤は 20 µg/ml の濃度においてもこれらの 2 つの *in vitro* 反応をまったく阻害しなかった (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

Tolnaftate および naphthiomate-N が *S. schenckii* 発育細胞において示した各種細胞壁多糖合成阻害効果が発成系自体に対する一次的作用か否かを知るために、この細胞から調製した無細胞合成系を用いて検討した。

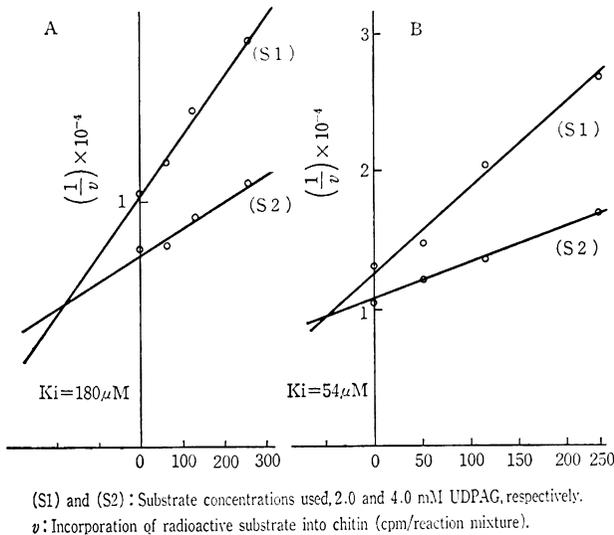
Table 1 から明らかなように、tolnaftate は β(1,3)-グルカン合成酵素反応をまったく阻害せず、マンノ

Table 1 Effects of tolinaftate and naphthiomate-N on some cell wall synthetases from *Sporothrix schenckii*

Drugs	Enzymes	% Inhibition by drugs at levels of ( $\mu\text{g/ml}$ ):				
		20	40	80	160	320
Tolnaftate	$\beta$ -Glucan synthetase	0	0	0	0	0
	Mannan synthetase	—	—	10	—	16
	Chitin synthetase	13	28	43	47	51
Naphthiomate-N	$\beta$ -Glucan synthetase	0	0	0	—	—
	Mannan synthetase	—	—	12	—	—
	Chitin synthetase	23	31	43	—	—

— : Not done.

Fig. 6 Kinetics of inhibition by tolinaftate(A) and naphthiomate-N(B) of the activity of chitin synthetase from *S. schenckii*



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

またはラムノマンナン) 合成酵素反応を最大 10% 程度に阻害した。Tolnaftate によって最も強く阻害されるのはキチン合成酵素反応であり、用いた条件下での最大阻害度は 50% 以上に達した。

Naphthiomate-N の阻害効果も tolinaftate のそれと同様の傾向を示した。 $\beta(1,3)$ -グルカン合成酵素反応をまったく阻害せず、マンナン (またはラムノマンナン) 合成酵素反応を最大約 10% 程度軽度阻害し、キチン合成酵素反応を最大約 40% 阻害した (Table 1)。

両剤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. 6 に示されるように、両剤の阻害効果は、反応基質すなわち、UDP-N-アセチルグルコ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を示し、 $K_i$  値は tolinaftate で 180  $\mu\text{M}$ 、naphthiomate-N で 54  $\mu\text{M}$  と算出された。

7. ステロール合成系に及ぼす影響

Fig. 4, 5 の成績に示されるように、総脂質画分への  $[^{14}\text{C}]$  酢酸の取り込みは 0.16  $\mu\text{g/ml}$  という極めて低い濃度の tolinaftate および naphthiomate-N によっても有意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これらの両剤がどのように作用するかをより詳細に検討した。

Table 2 に示すように、無処置対照培養 *S. schenckii* 酵母母形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、各薬剤を添加して培養した細胞において

Table 2 Squalene/ergosterol ratios in lipids from *Sporothrix schenckii* cells treated for 24 hours with tolinaftate or naphthiomate-N

Drugs	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Growth (mg dry weight/ml)	Squalene/ergosterol ratio
None	0	8.5	0.047
Tolnaftate	0.16	3.1	16.2
	0.63	3.0	16.4
	2.50	2.3	25.2
	10.0	1.0	25.7
Naphthiomate-N	0.16	7.8	10.5
	0.63	7.4	13.5
	2.50	4.2	14.7
	10.0	4.1	17.9

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、tolinaftate 存在下では、スクアレン/エルゴステロール比は、約 50% 発育阻止濃度 ( $\leq 0.16 \mu\text{g/ml}$ ) でも 300 倍、約 90% 発育阻止する  $10 \mu\text{g/ml}$  の濃度では約 500 倍それぞれ対照より高い値を示した。一方、naphthiomate-N 処理培養においては、約 50% 発育阻止濃度 ( $2.5\sim 10.0 \mu\text{g/ml}$ ) 存在下で、対照培養より約 300 倍高いスクアレン/エルゴステロール比が得られた。

### III. 考 察

一般に糸状菌は部位によって著しく代謝活性をことに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見なすことができない。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。

チオカルバミン酸系抗真菌剤の白癬菌に対する *in vitro* 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、治療薬として 20 年もの歴史をもつ tolinaftate について作用機序に関する報告はこれまでほとんどみあたらなかったのは、これらの薬剤がいかなる酵母状真菌に対しても抗菌活性を示さなかったことに大きな原因があると考えられる。

われわれは、前回報告したチオカルバミン酸系抗真菌剤である tolinaftate の作用メカニズムの検討に際し、スポロトリコーシスの原因菌となる二形菌 *S. schenckii* が tolinaftate をはじめとしてチオカルバミン酸系抗真菌剤である tolinaftate および naphthiomate-N に対しても比較的高い感受性をもつことを見出した<sup>10,11)</sup>。そこで今回は、tolinaftate および naphthiomate-N について、この菌

の酵母形細胞を試験菌として選び、主要な細胞機能や代謝に及ぼす影響を検討し、チオカルバミン酸系抗真菌剤のもつ共通の作用メカニズムの解析を行なった。

Tolnaftate は試験菌に対し、 $2.5 \mu\text{g/ml}$  以上の濃度で完全に発育をおさえ、静菌的ないしは軽度ながら殺菌的に作用することが認められた。一方、naphthiomate-N は tolinaftate より抗菌活性は弱く静菌的にのみ作用することが認められた。これらの成績は本菌株が両剤の作用メカニズムの生化学的解析を可能にするだけの感受性をもつことを示すものである。

この試験菌の発育細胞において、tolinaftate はタンパク質合成または RNA 合成に対してはほとんど影響を与えず、DNA 合成および細胞壁多糖合成をより強く阻害した。総脂質合成に対し強い阻害効果を示した。最も注目されるのは総脂質合成に対する阻害作用である。Tolnaftate は  $0.16 \mu\text{g/ml}$  という低濃度でも有意に阻害し、しかもその阻害度は薬剤濃度にあまり依存しないという特徴的な効果を示した。関連化合物の naphthiomate-N は tolinaftate よりも全体的に阻害効果が低いものの、これと同様の阻害パターンを示し、特に脂質合成については tolinaftate と類似の特徴的な阻害効果をもつことが知られる。

細胞レベルにおいて阻害を受けた各種主要細胞構成成分の合成系のうち、DNA 合成系はおそらく tolinaftate および naphthiomate-N の二次的阻害作用を受けたものと考えられる。*S. cerevisiae* から調製された DNA ポリメラーゼおよび RNA ポリメラーゼ活性がほとんど本菌の影響を受けないからである。

*S. schenckii* の細胞壁を構成する主要多糖は、 $\beta$ -グルカン、キチンおよびラムノマンナンである<sup>20)</sup>。これらの多糖を合成する特異的酵素反応のうち、tolinaftate および naphthiomate-N によって有意な阻害を受けたのはキ

チン合成酵素反応のみであり、他の2種の多糖合成酵素反応はまったくまたは軽度にしかに阻害されなかった。さらに、両剤によるキチン合成酵素反応の阻害様式は競合的阻害であることも知られ、両剤が真菌のキチン合成酵素反応に直接作用して細胞壁合成を阻害することはまず疑いない。しかし、(1) tolnaftate は naphthiomate-N より抗菌活性が強いにもかかわらず、前者の  $K_i$  値が後者のそれよりも大きいこと、および(2) 酵母状真菌のキチン合成酵素反応特異的阻害剤として知られている polyoxin A や B、または nikkomycin X や Z などの報告されている  $K_i$  値<sup>25-29)</sup> と比べてこれらのチオカルバミン酸剤のそれが数百倍も高いこと、などの点を考慮すると、tolnaftate や naphthiomate-N のキチン合成阻害作用のみでそれらの抗菌活性を説明することは困難である。また、チオカルバミン酸剤のキチン合成酵素反応に対する作用様式は、この酵素の基質である UDP-N-アセチルグルコサミンのアナログである polyoxin 群または nikkomycin 群抗生物質とは異なることが示唆される。

チオカルバミン酸剤の抗菌活性を説明する一次的作用機序としてキチン合成阻害作用の役割が低いとすれば、最も注目されるのは脂質合成に対する作用である。予備的実験から各クラスの脂質のなかで最も強い影響を受けるのがステロール合成系であることが推定されたので、この合成系に対する効果を中心に検討した。実験の結果、最小発育阻止濃度よりもはるかに低い濃度の tolnaftate または naphthiomate-N の添加によっても細胞内のエルゴステロール含量は著しく低下し、代って正常細胞からほとんど検出されないスクアレンの含量が著増し、この傾向は薬剤濃度とともに強まることを見出されたのである。

このように真菌細胞膜の構造と機能を維持する上で不可欠なエルゴステロールの生合成を tolnaftate や naphthiomate-N が MIC より低い濃度で顕著に阻害するという成績は、これがチオカルバミン酸剤の一次的抗菌作用メカニズムである可能性を強く示唆する。

さらにこの場合、チオカルバミン酸剤存在下でスクアレンの過剰蓄積およびエルゴステロールの欠乏のみならず、ラノステロールを含めてあらゆる前駆ステロールの欠乏が生じたことから、作用点が真菌ステロール合成経路上の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にあることはほとんど疑いない。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両剤の阻害効果についてさらに詳細な検討を行なっている。

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<sup>30)</sup>。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さまざまに影響され、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ことである。

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はこれまでに多数報告され、真菌合成経路上の2つの異なる段階のいずれかに作用点をもつことが知られている。

第1の作用点はスクアレン・エポキシ化反応段階であり、アリルアミン系抗真菌剤である naftifine や SF 86-327 が特異的にこの過程を阻害する<sup>32)</sup>。第2の作用点はこれより後の  $\alpha$ -メチルステロールの C-14 脱メチル化反応の段階であり、この反応にはチトクローム P-450 が必須である。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化合物はこの過程を阻害する<sup>33-35)</sup>。アゾール系化合物は真菌のチトクローム P-450 に特異的に親和性をもつことが知られており、おそらくこのヘムタンパクと結合して C-14 脱メチル化反応触媒機能を阻害すると考えられる<sup>36,37)</sup>。

本報で述べた実験成績から tolnaftate および naphthiomate-N はアリルアミン系抗真菌剤と同じく第1のタイプの作用点を持ち、スクアレン・エポキシ化反応段階に作用してエルゴステロール合成を阻害することはまず疑いない。

われわれはすでに、チオカルバミン酸系抗真菌剤の一つである tolcliate の作用機序を検討し、本剤が *S. schenckii* 酵母形細胞におけるエルゴステロール含量を低下させ、スクアレンを過剰に蓄積すること、すなわち、基本的には tolnaftate や naphthiomate-N とまったく同一の作用を有することを認めている<sup>10)</sup>。加えて、この感受性真菌から誘導分離した tolcliate 耐性変異株の生化学的性状を解析した結果、これらの株は親株よりスクアレン/エルゴステロール比が 50~350 倍高いこと、tolnaftate や naftifine と交差耐性を示すことを見出した<sup>11)</sup>。この成績と今回の tolnaftate および naphthiomate-N の作用点の解析の成績とを考えあわせるならば、チオカルバミン酸系抗真菌剤に共通して真菌ステロール生合成経路上のスクアレン・エポキシ化反応の段階

がすべてのチオカルバミン酸系抗真菌剤のみならずアルファミン系抗真菌剤にも共通した作用点であり、この阻害効果がこれらの薬剤の抗菌活性を一次的に説明しうるものと考えられる。

<謝辞> Tolnaftate, naphthiomate-N および miconazole nitrate 精製原末標品を提供して頂いた日本曹達(株)および持田製薬(株)に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) NOGUCHI, T.; A. KAJI, Y. IGARASHI, A. SHIGEMATSU & K. TANIGUCHI: Antitrichophyton activity of naphthiomates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2: 259~267, 1962
- 2) WEINSTEIN, M. J.; E. M. ODEN & E. MOSS: Antifungal properties of tolnaftate *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4: 595~601, 1964
- 3) ROBINSON, H. M.; J. RASKIN: Tolnaftate, a potent topical antifungal agent. *Arch. Dermatol.* 91, 4: 372~376, 1965
- 4) JASKOKI, B. J.; M. B. THOMPSON: *In vitro* activity of tolnaftate. *J. Am. Podiatry Assoc.* 57, 6: 273~274, 1967
- 5) DE CARNERI, I.; G. MONTI, A. CASTELLINO, G. MEINARDI & V. MANDELLI: Tolciclate against dermatophytes. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 26: 769~772, 1976
- 6) BIANCHI, A.; G. MONTI & I. DE CARNERI: Tolciclate: Further antimycotic studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 429~430, 1977
- 7) 高橋伸也: 抗白癬剤 tolclate 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
- 8) 香川三郎, ほか: 皮膚真菌症に対する tolclate 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
- 9) 西野武志, 尾花芳樹, 五十川葉子, 古志智子, 谷野輝雄: Tolciclate の抗真菌作用に関する研究。Chemotherapy 29: 1304~1317, 1981
- 10) 平谷民雄, 永田淳子, 山口英世: *Sporothrix schenckii* 酵母形細胞を用いた tolclate 作用メカニズムの研究。Chemotherapy 34: 137~145, 1986
- 11) 平谷民雄, 永田淳子, 山口英世: *Sporothrix schenckii* tolclate 耐性菌の分離と性状。Chemotherapy 34: 227~231, 1986
- 12) 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
- 13) CHUNG, C. W.; W. J. NICKERSON: Polysaccharide synthesis in growing yeasts. *J. Biol. Chem.* 208: 395~406, 1954
- 14) 中村道徳: 燐酸の比色定量法。農化誌 34: 1~5, 1959
- 15) CHANG, L. M. S.: DNA polymerases from baker's yeast. *J. Biol. Chem.* 256: 1873~1880, 1977
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) BEHRENS, N. H.; E. CABIB: The biosynthesis of mannan in *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Biol. Chem.* 243: 502~509, 1968
- 21) LOPEZ-ROMERO, E.; J. RUIZ-HERRENA: Biosynthesis of  $\beta$ -glucans by cell-free extracts from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 500: 372~384, 1977
- 22) 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
- 23) DIXON, M.: The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochemical J.* 55: 170~171, 1953
- 24) BLANK, F.: On the cell walls of dimorphic fungi causing systemic infections. *Can. J. Microbiol.* 1: 1~5, 1954
- 25) ENDO, A.; T. MISATO: Polyoxin D, a competitive inhibitor of UDP-N-acetylglucosamine: chitin N-acetylglucosaminyltransferase in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37: 718~722, 1969
- 26) ENDO, A.; K. KAKIKI & T. MISATO: Mechanism of action of the antifungal agent polyoxin D. *J. Bact.* 104: 189~196, 1970
- 27) KELLER, F. A.; E. CABIB: Chitin and budding, properties of chitin synthetase from *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Biol. Chem.* 246: 160~166, 1971
- 28) 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

- cin Z, nikkomycin X, and polyoxin A : A comparison. Arch. Microbiol. 130 : 195~197, 1981
- 29) HORI, M.; J. EGUCHI, K. KAKIKI & Y. 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
- 30) KERRIDGE, D.; W. L. WHELAN : The polyene macrolide antibiotics and 5-fluorocytosine ; molecular actions and interactions. In : Mode of action of antifungal agents (A. P. J. TRINCI & J. F. RELEY, eds.), pp. 321~341, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1984
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 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
- 35) 山口英世 : 今日の抗生物質。南山堂, 1984
- 36) 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
- 37) 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 TWO  
THIOCARBAMATE ANTIMYCOTICS TOLNAFTATE AND  
NAPHTIOMATE-N WITH YEAST-PHASE CELLS OF  
A SENSITIVE DIMORPHIC FUNGUS  
*SPOROTHRIX SCHENCKII*

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 a thiocarbamate antimycotic tolnaftate and a related compound naphthiomate-N was studied using yeast-phase cells of a relatively sensitive fungus *S. schenckii* as the test organism. The results are summarized as follow :

(1) As monitored by optical density, dry weight and viable counts of fungal cultures, the extent of growth inhibition by tolnaftate and naphthiomate-N increased with increasing drug concentrations. At appreciably high drug levels, tolnaftate showed a slight fungicidal activity, while the activity of naphthiomate-N was only fungistatic.

(2) Tolnaftate and naphthiomate-N inhibited synthesis of DNA, cell wall polysaccharides and lipids to greater extents than synthesis of other cellular components in growing fungal cultures. The greatest was the inhibition by the two compounds of lipid synthesis, the extent of which appeared to be comparable to that of their growth-inhibitory activity.

(3) No evidence was obtained which showed that both compounds had any effect on the cell membrane function or the respiratory activity of *S. schenckii* cells.

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

(5) Both compounds differently affected *in vitro* synthesis of three major classes of cell wall polysaccharides, namely chitin, mannan and  $\beta(1,3)$ -glucan, by cell-free preparations from *S. schenckii* yeast-phase cells. The high concentrations of each compound 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 tolnaftate and naphthiomate-N of the chitin synthetase was of competitive type, and exhibited  $K_i$  values of 180  $\mu\text{M}$  and 54  $\mu\text{M}$ , respectively.

(6) Ergosterol synthesis in *S. schenckii* cells was potently inhibited by tolnaftate and naphthiomate-N even at concentrations lower than MIC. These compounds induced significant reduction in ergosterol content and accumulation of squalene, a biosynthetic precursor of sterol.

(7) All these results led us to the suggestion that inhibition by tolnaftate and related compound naphthiomate-N 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 two thiocarbamate compounds.