シンポジウム

—真菌剤の基礎と臨床—その現況と展望—

膜系に作用点をもつ抗真菌剤, とくに Clotrimazole の作用機序および相互の併用効果

山口 英世 神田 弥生 岩田 和夫

東京大学医学部細菌学教室

1. 緒言

Clotrimazole (以下CTZと略) はBay b 5097とも略称され, 西独バイエル社が開発したトリチルイミダゾール誘導体で, 2,4-bisphenyl-[2-chlorophenyl]-1-imidazolyl methaneの化学式をもつ合成抗真菌剤である¹⁾²⁾ (図1). 本剤は広い抗真菌スペクトルを示し^{3)~5)}, しかも毒性が低い⁶⁾ため, amphotericin B や 5-fluorocytosine とならんで深在性真菌症の治療に使用し得る数少ない薬剤と

図1 Clotrimazole の化学構造

して注目されている。事実, Oberste-Lehn ら⁶⁾および Marget & Adam⁸⁾ によりその臨床成績が報告されて以来, 内服による諸種の深在性真菌症や表在性真菌症 (白癬など) に対するすぐれた治療効果が内外の多くの基礎的ならびに臨床的研究により確認されつつある。

われわれは数年前より主としてCTZの作用機序に関して研究した結果^{8)~13)}, 本剤の一次作用点が真菌細胞の膜系構造, とくに細胞膜 (cell membrane) にあることを明らかにした。化学療法剤や殺菌剤のなかでとくに強い抗真菌活性を有する薬剤には膜に作用するものが少ないが, すでにわかっている範囲でもそれら薬剤の作用

機序は多様であり, 膜の構造ならびに機能の複雑さを示している。本論文ではCTZの抗菌活性および作用機序の特徴を理解するために, まず膜障害作用 (膜活性) をもつ諸種の薬剤とその作用機序に関する従来の知見を整理し, ついでCTZについて得られた成績を報告することとした。

細胞膜や細胞壁などの細胞表層構造に障害を与える薬剤はしばしば他の薬剤の細胞内透化を亢進し, その結果両薬剤間に抗菌力のうえで顕著な相乗効果 (synergism) が発現する例が従来より知られている。すぐれた抗真菌剤を欠く真菌症化学療法の不満足な現状を考えると, この相乗効果を利用した併用療法の開発, 導入はとくに望まれよう。われわれはCTZ作用機序究明の一環として本剤が真菌細胞の生存, 生理学的活性ならびに微細構造におよぼす影響が他の薬剤の存在下でどのような修飾を受けるかを検討したが, その過程である種の界面活性剤とCTZとの間に特徴的な相互作用が認められた。その成績は相乗効果発現機序に関して示唆に富むと考えられるので, 抗真菌剤の併用効果を扱った従来の報告と併せて本論文の第二の主題としてその概略を述べたい。

2. 膜に障害作用を有する薬剤の作用機序

(1) 生体膜の基本構造と特異的作用点

生物細胞の膜を極く単純に模式化すると, それは二葉の蛋白質層が脂質層をはさんでできたリポ蛋白複合体であり, 電顕的には「単位膜」構造として観察される。脂質層の主要構成成分は中性脂質とリン脂質であるが, 真性核生物細胞の膜はその他にステロール (動物細胞ではコレステロール, 真菌細胞ではエルゴステロールが主要ステロール) を含み, ステロール—リン脂質—リポ蛋白複合体のサブユニット¹⁴⁾を構成する。Saccharomyces cerevisiaeでの成績によると, 菌体乾量の10%が膜で, 膜 (乾量) の50%は蛋白, 40%は脂質で占められる。中性脂質

Hideyo YAMAGUCHI, Yayoi KANDA and Kazuo IWATA: Studies on action mechanism of clotrimazole as compared with other membrane-active agents and their combinations effective in synergism or antagonism, from the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Tokyo.

図2 膜障害作用を示す薬剤の作用点模式図

とリン脂質の含量はほぼ等しく、ステロール量は膜全重量の約6%に当る¹⁵⁾。膜サブユニットは疎水性結合および二価陽イオン (Mg^{2+} , Ca^{2+} など) の metal bridge を介して相互につながり、連続した生体膜構造をつくり上げる¹⁶⁾。

膜に活性を示す薬剤の作用機序をこのような膜の化学的構成ならびに細胞学的構築と対応して考えた場合、図2に示されるように現在のところ少くとも5つの作用点にわけられる。第1の作用点は Mg^{2+} (または Ca^{2+})-bridge で、昇汞その他の水銀化合物による膜障害作用は Mg^{2+} に比して Hg^{2+} のサイズが大きいためこの bridge が異常に長くなるためと推定されている¹⁷⁾。sodium-N-methyl-dithiocarbamate¹⁸⁾ や EDTA¹⁹⁾ など金属をキレートする薬剤はさらに強い作用を有する。第2の作用点は疎水性結合で、一般に陽イオン性の界面活性作用をもつ薬剤はこの結合を切つて膜に空隙を作る結果、膜の選択的透過性機能が障害されるという。代表的な薬剤としては、環状デカペプチド抗生物質 (tyrocidine, gramicidin など)²¹⁾²²⁾、 C_{60} の分枝脂肪酸残基を側鎖にもつ polymyxin 群ポリペプチド抗生物質²¹⁾、塩化アルキルアンモニウム²³⁾ および農薬の dodine (dodecyl guanidine acetate)²⁴⁾²⁵⁾、glydine (2-heptadecyl imidazoline acetate)²⁶⁾ が挙げられ、いずれも菌体成分や電解質を遊出させる効果をもつ。

膜の主要構成成分である蛋白、ステロール、およびリン脂質部分のそれぞれに特異的に作用する薬剤が知られている。前述のキレート剤をはじめ、アミノ基や—SH基と反応する薬剤、アルキル化剤などはいずれも膜の蛋白部分に作用してその高次構造を変える。しかしながら、これら薬剤による影響は細胞質内の蛋白や核酸に対してよく強く発現されるために、膜障害作用が一次作用として認められることは稀である。第4および第5の作用点はステロールおよびリン脂質部分である。ampho-

tericin B, nystatin, trichomycin, pimarininなどのポリエン抗生物質がステロールと特異的に結合して膜障害作用を示すことは、よく知られているところであるが、詳細については野沢氏の論文(本誌)²⁷⁾を参照されたい。一方、リン脂質に対しては polymyxin 群抗生物質が特異的親和性を有する²⁸⁾。

これら膜活性を有する薬剤の影響はふつう細胞膜の透過性機能に最も顕著に現われ、選択的透過性障壁が破壊される結果、菌体成分の遊出および電解質の選択的ないしは非選択的透過異常が起り、さらには菌体内部環境の変化(pHの低下など)により自己溶解過程が進行して菌は死滅する。詳細な作用機序は不明であるが、フェノール系殺菌剤 hexachlorophene²⁸⁾、および呼吸鎖に1次作用点を有するといわれる pyrrolnitrin²⁹⁾ や azalomycin F³⁰⁾ などの抗真菌性抗生物質についても同様の透過性障害作用が認められている。

(ii) Clotrimazole の作用機序とその特徴

C T Zに比較的高い感受性を示す *Candida albicans* の株(最小発育阻止濃度2~5 $\mu g/ml$, 最小殺菌濃度20~40 $\mu g/ml$)を主たる試験菌として本剤作用機序を検討し、つぎに述べるような特徴が明らかになった。

本剤は殺菌の濃度でも *C. albicans* 細胞および単離ミトコンドリアの呼吸を阻害せず、また浸透圧抵抗性の減弱やプロトプラスト形成をおこさないことから、好気的エネルギー代謝系および細胞壁に対する直接的作用は否定的であつた。これに対して、菌体乾燥重量の減少、核酸および低分子260m μ -吸収物質含量の著しい低下と菌体外遊出および K^{+} の遊出促進などをきたす影響からみて、本剤が細胞透過性を変化せしめる作用を有することが証明された。さらにこの菌のプロトプラストをburstさせること、動物赤血球に対して溶血作用を示すこと、^{3H}-標識C T Zを菌体にとりこませると大部分が細胞膜その他の膜画分に局在すること、電顕的に細胞膜の異常増殖像が観察されることなどの結果が得られた。これらの成績を総合して考えると、本剤が細胞膜と結合してその構造および透過性機能を障害することは明らかである。

C T Zは人工リン脂質小球(lipid spherule, liposome)³¹⁾に対してポリエン抗生物質と同様に、とりこまれた標識化合物の遊出を促進する作用を示したが、ポリエンとは異なり³²⁾、ステロールの存在による感受性増強は認められなかつた。このモデル実験の成績から、C T Zは膜の脂質部分に作用点を有すること、しかもそれは

ステロール以外の部分、即ちリン脂質であると推定された。*C. albicans* の発育に対するCTZの作用がエルゴステロールで拮抗されず、レシチンによつて強い拮抗を受ける事実もこの仮説を支持する。

蛋白、RNA、DNA、脂質、細胞壁多糖体などの真菌々体構成主要成分の合成に対するCTZの影響は*C. albicans* 増殖期細胞による放射性基質のとりこみ実験を行なつて検討した。いずれのとりこみも殺菌的濃度のCTZにより強い阻害を受けたが、とくにRNAおよび蛋白合成阻害は顕著であつた。しかしながら、リボソーム系を用いた実験ではペプチド鎖伸長反応の阻害は認められず、また見掛け上のRNA合成阻害も *de novo* の合成阻害というよりもRNA崩壊と菌体外遊出に帰因することがわかつた。

上述の成績から明かなように少なくともCTZがその殺菌的濃度で膜障害作用を示することは間違いないが、反面その作用を抗菌力と対比してみると、ポリエン抗生物質や polymyxin B にくらべて著しく軽度である。従つてCTZの抗菌活性機序を菌体成分の遊出とそれに続く菌体内の autolytic な過程のみで説明し得るかは疑問である。寧ろ、細胞レベルで比較強い生体高分子合成反応阻害を示す点、電顕的観察では細胞質内オルガネラ構造の崩壊よりは膜異常増殖像が目立つ点、増殖期細胞のみに作用する点、静菌的濃度域が広い点などいずれの点からもCTZの抗菌活性、とくに静菌的活性には菌体の主要な anabolic metabolism の異常が大きく関与している可能性を考えざるを得ない。目下、各種アミノ酸、リン酸、糖の能動輸送に対するCTZの作用を検討中である。なお、*C. albicans* に対するCTZの最小殺菌濃度は最小発音阻止濃度のほぼ10倍に当たり⁴¹⁾⁵⁾⁸⁾¹¹⁾、従つて実際的には本剤は静菌的抗真菌剤 (fungistatic) とみなされる。

3. 細胞透過性障壁に作用する薬剤との併用による抗菌力の増強

培地に加えた抗菌剤や殺菌剤が菌体に吸着し、ついで菌体内の特異的作用部位に移行する際に細胞壁、細胞膜などの菌体表層構造が障壁として働くことが知られている。従つて本来菌体内に入りにくい性質をもつために充分な抗菌力が発揮されないもその透薬剤で過性に対する障壁 (permeability barrier) を破壊するような薬剤と併用すれば菌体内へのとりこみが促進されて抗菌力増強がみられるはずである。penicillin と streptomycin の併用が腸球菌その他のD群レンサ球菌に対して相乗的抗菌作

用を示すことが以前より知られ、細菌性心内膜炎などの感染症の治療に応用されているが、Moellering, Jr. ら³³⁾ はその相乗効果の機序に関して検討を行ない、streptomycin などアミノ酸糖体抗生物質 (蛋白合成阻害剤) に対する主たる透過性障壁となつている細胞壁の構築が penicillin その他の壁 (ペプチドグリカン) 合成阻害剤により障害される結果であると報告している。また、Levie³⁴⁻³⁶⁾ は actinomycin D に抵抗性を示す大腸菌が EDTA 処理により著しく感受性が増強することを認め、それが actinomycin D の透過に対し障壁となつている細胞壁のリボ多糖体が EDTA により遊出されるためであると結論した。同じグラム陰性桿菌のチフス菌でも同様の現象が観察されている³⁷⁾。

薬剤透過性障壁として細胞壁以上に重要な役割を演じているのが細胞膜であり、従つて膜活性薬剤との併用によつても抗菌力増強が期待される。Medoff ら^{38)~41)} は *C. albicans* などの酵母状真菌に対して低濃度の amphotericin B もしくは polymyxin B (いずれも膜活性剤) と併用することにより、rifampicin, 5-fluorocytosine, actinomycin D (以上RNA合成阻害剤), mycophenolic acid (プリン合成阻害剤), tetracycline (蛋白合成阻害剤) の抗菌活性ならびに代謝阻害活性が著しく増強されることを認めた。これらはいずれも細胞表層、とくに細胞膜の透過性障壁を破壊する薬剤と細胞質内の代謝系に作用する薬剤との組み合わせで、前者が後者の菌体内とりこみを促進するために相乗効果が現れるものと考えられる。一方、細胞表層に作用する薬剤間で相乗効果が発現する例も知られている。非イオン界面活性剤 polysorbate 80 (tween 80) は種々の細菌の脂質性状を変え⁴²⁾、透過性を亢進することが知られているが⁴³⁾、chlorhexidine, benzalkonium, polymyxin B などの陽イオン界面活性物質 (膜活性剤) との間に殺菌作用のうえて強い相乗効果を発揮することが報告されている⁴⁴⁾。ただし polysorbate 80 は polymyxin B ととりこみをまつたく促進せず⁴⁵⁾、その相乗作用の機序は不明である。

CTZ は amphotericin B などと同様に膜活性を有する抗真菌剤であり、われわれはCTZによる他の抗真菌剤の活性増強、および諸種界面活性剤との併用によるCTZ活性増強、の2つの可能性について検討を行なつた^{46)~49)}。ここではその後者に関する成績を中心に述べたい。試験菌には *C. albicans* (接種菌量 10^7 cells/ml)、培地は 0.5% 酵母エキス加サブロー・グルコース培地を主に用い、併用薬剤は0時間に同時に加えて37°C振盪培

図3 Clotrimazole および諸種界面活性剤の単独ならびに併用による *C. albicans* 生菌数におよぼす影響

養を行なった。生菌数は *Candida* GS 寒天平板に通常の方法でプレーティングを行なつて測定した。

(i) CTZ の抗菌活性に及ぼす諸種界面活性剤の影響

Benzethonium chloride (BC), sodium laurylsulfate (SLS), dioctyl sodium sulfosuccinate (DSS), deoxycholic acid (DOC), triton X-100, tween 80 の 6 種の界面活性剤を用い、それぞれ単独ではほとんど抗菌活性を示さない濃度と CTZ の不完全発育阻止濃度 (0.5~5 μ g/ml) と組み合わせた場合に、CTZ の抗菌力がどのように増強されるかを期待してしらべた。

図3に示されるように、CTZ の抗菌作用に対し陰イオン界面活性剤 DSS が最も強力な増強効果を示し、CTZ 単独の場合にくらべて生菌数は 1/10,000 以下に激減した。同じく DOC は DSS について相乗的殺菌効果を示し、また SLS も軽度ながら静菌的併用効果を示した。一方、非イオン界面活性剤である triton X-100 と tween 80 は、ともに CTZ に対して逆に拮抗作用を示し、CTZ 単独にくらべて生菌数は約 10 倍多く、CTZ 無添加の対照培養とほぼ同じ値を示した。これら陰イ

オン、および非イオン界面活性剤はいずれもそれ自身の抗菌活性は弱い。他方、BC などの陽イオン界面活性剤は極めて強力な殺菌作用をもつ (殺菌剤もしくは抗真菌剤として外用される) が、CTZ とはなんらの相互作用も示さなかつた。

このように、界面活性剤はその種類により CTZ 抗菌活性に及ぼす影響が多様であり、しかもそれら相互作用と化学的性状との間に対応関係が認められ、一般に陰イオン剤は相乗的に、非イオン剤は拮抗的に作用し、一方陽イオン剤はいずれの作用も示さないという傾向がうかがわれる。

つぎに、CTZ 抗菌活性に対する各種界面活性剤の影響が予期したごとく菌体にとりこまれる CTZ 量の変化によるか否かを検討した。

表1 ^3H -Clotrimazole の *C. albicans* 菌体へのとりこみにおよぼす各種界面活性剤の影響

添加界面活性剤	^3H -Clotrimazole とりこみ量 (cpm/ml)		
	30-分	60-分	240-分
なし	102	156	210
陰イオン性			
DSS (0.1%)	0	5	107
SLS (")	45	97	449
DOC (")	1,275	1,035	582
非イオン性 (中性)			
Triton X-100 (0.1%)	12	15	46
Tween 80 (")	0	0	32
陽イオン性			
BC (0.00013%)	124	189	240

C. albicans 株 1 mg 乾燥菌量 (2×10^7 細胞) / ml の培養液に ^3H -Clotrimazole 10 μ g/ml および所定濃度の界面活性剤を加え、37°C 振盪培養。

表1に示されるように、培地に加えた ^3H -CTZ の菌体へのとりこみに対して DOC は高度の促進、SLS は一過性の抑制に続く促進、triton X-100 と tween 80 はともに抑制、BC は無影響というように、いずれも抗菌力の変化とよく対応する成績が得られた。しかしながら、DSS のみは例外で、CTZ との間で最も強い相乗効果を発現するにもかかわらず、CTZ とりこみを強く阻害した。このように DSS による併用効果は DOC や SLS の場合と異なり単なる CTZ 透過亢進以外の機序を考える必要があり、さらに詳細な検討を行なった。

(ii) CTZ と DSS 間にみられる相乗効果の特徴

C. albicans の培養に CTZ 5 μ g/ml, DSS 0.1% の濃度で加え、24 時間後に生菌数を測定すると、CTZ、

図4 Clotrimazole およびDSSの単独ならびに併用時の Clotrimazole 生菌数の時間的推移

DSS おおの単独ではまったく生菌数の減少がみられないのに反し、両者の併用ではほぼ完全な殺菌効果の発現が認められた (図3)。図4はこの殺菌効果を経時的に追跡した結果を表わしたものである。CTZ 単独では或る程度の発育速度の低下がみられるに過ぎなかったが、DSS との併用では培養開始 (薬剤添加) 後3時間から生菌数の急速な減少が始まり、14時間で生菌はほぼ完全に消失した。また、DSS 単独処置の場合、24時間培養の判定では無処置対照培養と同程度の生菌数増加を示すにもかかわらず、培養初期 (0~10時間) に強い発育阻害がみられる点は注目に値する。この培養条件下で明らかな相乗的殺菌効果が発現される薬剤濃度限界は、CTZ 0.1μg/ml, DSS 0.0125%であった。CTZ とDSS の併用による生菌数の減少が対数増殖期にはば一致して開始することは、この殺菌的作用の発現に菌の分裂増殖過程が必要条件である可能性を示唆する。しかし、その理由については未だ明らかでない。

CTZ とDSS の間の相乗的殺菌効果は、滲透圧安定剤 (IM—マンニットなど) を含む培地を用いることにより部分的に拮抗され、この成績から殺菌作用発現機構

に細胞滲透圧抵抗性の減弱、即ち細胞壁構造の障害が関与することが考えられる。

DSS 処理菌体の化学組成は対照菌体にくらべてRNAおよびリン脂質含量の著しい減少が特徴的で、この傾向はCTZとの併用で増大された。一方、CTZ 単独ではほとんど影響はみられなかった。

電顕的観察では、併用2剤処理菌において細胞壁膨化と菌体内外での異常膜様構造体の形成が認められ、前者は壁リン脂質の遊出の結果であり、また後者は菌体蛋白とDSS との複合体であることが知られた。

以上の成績から、CTZ とDSS の間の相乗的殺菌作用には、(1) 細胞壁リン脂質の遊出に伴う滲透圧抵抗性の減弱、(2) 菌体成分、とくにRNAおよび膜リン脂質の遊出、(3) 細胞質内における菌体構成蛋白とDSS との不溶性複合体形成が主要な過程として含まれることが示唆される。しかもこれらの過程に直接関与するのはCTZ ではなくDSS であり、CTZ は恐らくDSS に対してその作用点 (リン脂質) への到達を容易にするか、或はリン脂質と結合してDSS による可溶性を受け易い状態にしていると推定される。

4. 考察とまとめ

以上述べてきた実験成績から、CTZ の作用機序には細胞膜その他の膜系構造に障害を与えて菌体成分の遊出を起すことが関与し、またCTZ は膜構造のなかでとくにリン脂質部分に親和性を有することがわかった。このようなCTZ の作用機序の特徴は従来から知られている種々の膜活性剤のうち、polymyxin B に最も類似しているように思われる。しかしながら、中性で疎水性の強いCTZ の化学的性状は陽イオン性で親水基も有して界面活性作用の強い polymyxin B のそれとは著しく異なり、この点からも両剤の作用機序の細部には明らかな相違があると考えられる。

一般に有用抗真菌剤には疎水性が強いために水に難溶性を示すものが多く、そのような薬剤は、臨床的使用に際してしばしば界面活性剤ミセル中に可溶化して内用もしくは外用されている。それにもかかわらず、併用される抗真菌剤と界面活性剤との間に抗菌力のうえてどのような相互作用があるかという重大な問題点については従来ほとんど検討がなされなかった。今回のわれわれの実験成績から、共通して細胞表層に作用して透過性障壁を破壊する作用を有するといわれる界面活性剤もその種類 (主として化学的性状に依存する) によってはある抗真菌剤の抗菌活性を著しく増強するものがある反面、逆に

拮抗的に働くものもあることが知られた。これは抗真菌製剤として臨床的に使用する場合に、抗真菌剤と組合せる界面活性剤の選択には充分な考慮を払う必要があることを強く示唆するものである。CTZに関する限り、陰イオン界面活性剤が相乗的殺菌効果を発現する点で最も好ましいという成績が得られ、一方非イオン剤は拮抗作用を示すゆえにその併用は厳に避けなければならない。陰イオン剤がCTZの場合と同様に他の抗真菌剤に対しても相乗的な併用効果を発揮するかは目下検討中である。このような併用効果は薬剤の作用機序、透過性機序の解明に役立つばかりでなく、臨床的にも応用し得る可能性が期待されよう。

(Clotrimazole を分与されたバイエル薬品株式会社に深甚の謝意を表す。)

本論文の要旨は第17回日本医真菌学会総会(昭和48年9月岐阜市)のシンポジウム「抗真菌剤の基礎と臨床—その現況と展望—」において発表した。

文 献

- 1) Plempel, M., Bartmann, K., Büchel, H. & Regel, E.: Experimentelle Befunde über ein neues, oral wirksames Antimykotikum mit breiten Wirkungsspektrum, Deutsch. med. Wochenschr., **94**, 1356-1364, 1969.
- 2) Plempel, M., Bartmann, K., Büchel, H. & Regel, E.: Bay b 5097, a new orally applicable antifungal substance with broad-spectrum activity, Antimicrob. Ag. Chemother.-1969, p. 271-274, 1970.
- 3) Shadomy, S.: *In vitro* studies with Bay b 5097. Antimicrob. Ag. Chemother.-1970, p. 169-174, 1971.
- 4) Shadomy, S.: *In vitro* antifungal activity of clotrimazole (Bay b 5097), Inf. Immun., **4**, 143-148, 1971.
- 5) Waitz, J.A., Moss, E.L. & Weinstein, M.J.: Chemotherapeutic evaluation of clotrimazole [Bay b 5097, (o-chloro- α -2-diphenylbenzyl) imidazole], Appl. Microbiol., **22**, 891-898, 1971.
- 6) Oberste-Lehn, H., Baggesen, I. & Plempel, M.: Erste klinische Erfahrungen bei System-Mykosen mit einem oralen Antimykotikum, Deutsch. med. Wochenschr., **94**, 1365-1367, 1969.
- 7) Marget, W. & Adam, D.: Erste Erfahrungen mit dem Breitband-Antimykotikum Bay b 5097, Med. Klin., **64**, 1235-1238, 1969.
- 8) Yamaguchi, H., Kanda, Y., Iwata, K. & Osumi, M.: Electronmicroscopical studies on the fungitoxicity of bisphenyl-[2-chlorophenyl]-1-imidazolyl methane (Bay b 5097): Preferential effect on the nuclear envelope in *Candida albicans* cells, J. Electron Microscopy., **22**, 167-172, 1973.
- 9) Iwata, K., Yamaguchi, H. & Hiratani, T.: Mode of action of clotrimazole, Sabouraudia, **11**, 158-166, 1973.
- 10) Iwata, K., Kanada, Y., Yamaguchi, H. & Osumi, M.: Electron microscopic studies on the mechanism of action of clotrimazole on *Candida albicans*, Sabouraudia, **11**, 205-209, 1973.
- 11) Iwata, K., Yamaguchi, H., Hiratani, T., Kanda, Y. & Osumi, M.: Mechanism of action of Bay b 5097, Proc. 2nd Int. Specialized Symp. Yeasts (1972, Tokyo) (in press).
- 12) Iwata, K., Yamaguchi, H., Kanda, Y. & Osumi, M.: Mechanism of action of Bay b 5097 on *Candida albicans*: An electron microscopic study, Proc. 2nd Int. Specialized Symp. Yeasts (1972, Tokyo) (in press).
- 13) 岩田和夫, 山口英世: Clotrimazole 作用機序 I. *Candida albicans* に対する一次作用点の検討, 日本細菌学雑誌, **28**, 513-521, 1973.
- 14) Salton, M.R.J.: Structure and function of bacterial cell membranes, Ann. Rev. Microbiol., **21**, 417-442, 1967.
- 15) Hunter, K. & Rose, A.H.: Yeast lipids and membranes, In The Yeasts, vol. **2**, (ed. by A.H. Rose & J.S. Harrison), p. 211-270, Academic Press, New York, 1971.
- 16) Razin, S., Morowitz, M.J. & Terry, T.M.: Membrane subunits of *Mycoplasma laidlawii* and their assembly to membrane structure, U.S. Nat. Acad. Sci., **54**, 219-225, 1965.
- 17) Passow, H. & Rothstein, A.: The binding of mercury by the yeast cell in relation to changes in permeability, J. Gen. Physiol., **43**, 621-633, 1960.
- 18) Wedding, R.T. & Kendrick, J.B., Jr.: Toxicity of N-methyl dithiocarbamate and methyl isothiocyanate to *Rhizoctonia solani*, Phytopathol., **49**, 557-561, 1959.
- 19) Neu, H.C. & Heppel, L.A.: On the surface localization of enzymes in *Escherichia coli*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **14**, 215-219, 1964.
- 20) Mach, B. & Slayman, C.W.: Mode of action of tyrocidine on *Neurospora*, Biochim. Biophys. Acta, **124**, 351-361, 1966.
- 21) Hunter, F.E., Jr. & Schwartz, L.S.: Tyrocidines and gramicidin S (J_1 , J_2), In Anti-

- biotics I. Mechanism of Action (ed. by D. Gottlieb & P.D. Shaw), p. 636-641, Springer-Verlag, New York, 1967.
- 22) Sebek, O.K.: Polymyxins and circulin. In Antibiotics I, Mechanism of Action (ed. by D. Gottlieb & P.D. Shaw), p. 142-152, Springer-Verlag, New York, 1967.
 - 23) Salton, M.R.J.: The absorption of cetyltrimethylammonium bromide by bacteria, its action in releasing cellular constituents and its bactericidal effects, J. Gen. Microbiol., **5**, 391-404, 1951.
 - 24) Brown, I.F. & Sisler, H.D.: Mechanisms of fungitoxic action of n-dodecyl guanidine acetate Phytopathol., **50**, 830-839, 1960.
 - 25) Somers, E. & Pring, R.J.: Uptake and binding of dodine acetate by fungal spores, Ann. Appl. Biol., **58**, 457-466, 1966.
 - 26) Kottke, M. & Sisler, H.D.: Effect of fungicides in permeability of yeast cells to the pyruvate ion, Phytopathol., **52**, 959-961, 1962.
 - 27) 野沢義則：生体膜レベルから見た polyene 系抗生物質の作用機序，本誌，**15**，11-17，1974.
 - 28) Joswick, H.L., Corner, T.R., Silvernale, J.L. & Gerhardt, P.: Antimicrobial actions of hexachlorophene: Release of cytoplasmic materials, J. Bacteriol., **108**, 492-500, 1971.
 - 29) Nose, M. & Arima, K.: On the mode of a new antifungal antibiotic, pyrrolnitrin, J. Antibiotics., **22A**, 135-143, 1969.
 - 30) Sugawara, S.: Mode of action of azalomycin F. Effect of azalomycin F on *Candida albicans*, J. Antibiotics, **20A**, 93-108, 1967.
 - 31) Weissmann, G., Sessa, G. & Weissmann, S.: The action of steroids and triton X-100 upon phospholipid/cholesterol structures, Biochem. Pharmacol., **15**, 1537-1551, 1966.
 - 32) Kinsky, S.C., Haxby, J., Kinsky, C.B., Demel, R.A. & Van Deenen, L.L.M.: Effect of cholesterol incorporation on the sensitivity of liposomes to the polyene antibiotic, filipin. Biochim. Biophys. Acta, **152**, 174-185, 1968.
 - 33) Moellering, R.C., Jr., Wennersten, C. & Weinberg, A.N.: Studies on antibiotic synergism against enterococci I, Bacteriologic studies. J. Lab. Clin. Med., **77**, 821-828, 1971.
 - 34) Levie, L.: Actinomycin sensitivity in *Escherichia coli* produced by EDTA, Biochem. Biophys. Res. Comm., **18**, 13-17, 1965.
 - 35) Levie, L.: A nonspecific increase in permeability in *Escherichia coli* produced by EDTA, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **53**, 745-750, 1965.
 - 36) Levie, L.: Release of lipopolysaccharide in EDTA treatment of *E. coli*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **21**, 290-296, 1965.
 - 37) Muschel, L.H. & Gustafson, L.: Antibiotic detergent, and complement sensitivity of *Salmonella typhi* after ethylenediaminetetraacetic acid treatment, J. Bacteriol., **95**, 2010-2013, 1968.
 - 38) Medoff, G., Comfort, M. & Kobayashi, G.S.: Synergistic action of amphotericin B and 5-fluorocytosine against yeast-like organisms, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **138**, 571-574, 1971.
 - 39) Medoff, G., Kobayashi, G.S., Kwan, C.N., Schlessinger, D. & Venkov, P.: Potentiation of rifampicin and 5-fluorocytosine as antifungal antibiotics by amphotericin B. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **69**, 196-199, 1972.
 - 40) Kwan, C.N., Medoff, G., Kobayashi, G.S., Schlessinger, D. & Raskas, H.J.: Potentiation of the antifungal effects of antibiotics by amphotericin B, Antimicrob. Ag. Chemother., **2**, 61-65, 1972.
 - 41) Schwartz, S.N., Medoff, G., Kobayashi, G.S., Kwan, C.N. & Schlessinger, D.: Antifungal properties of polymyxin B and its potentiation of tetracycline as an antifungal agent, Antimicrob. Ag. Chemother., **2**, 36-40, 1972.
 - 42) Godson, C.N. & Sinsheimer, R.L.: Lysis of *Escherichia coli* with a neutral detergent. Biochim Biophys. Acta, **149**, 476-488, 1967.
 - 43) Reese, E.T. & Maguire, A.: Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms, Appl. Microbiol., **17**, 242-245, 1969.
 - 44) Brown, M.R.W. & Richards, R.M.E.: The effect of Tween 80 on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to chemical inactivation, J. Pharm. Pharmacol., **16**, 51-55, 1964.
 - 45) Brown, M.R.W. & Winsley, B.E.: Synergism between polymyxin and polysorbate 80 against *Pseudomonas aeruginosa*, J. Gen. Microbiol., **68**, 367-373, 1971.
 - 46) 岩田和夫，山口英世：抗真菌剤 BAY b 5097 の真菌々体へのとりこみにおよぼす各種化合物の影響，第27回日本細菌学会関東支部総会（昭47，7月）口頭発表，日細誌，**27**，834，1972.
 - 47) 岩田和夫，山口英世：BAY b 5097 の作用機作に関する研究IV. 各種表面活性剤および他の抗真菌剤との相互作用. 第16回日本医真菌学会総

- 会（昭47. 9月），口頭発表．本誌，**13**， 138—139，1972.
- 48) 岩田和夫, 山口英世, 神田弥生：抗真菌剤BAY b 5097の作用機作に関する研究V．陰イオン表面活性剤との相乗作用について．第46回日本細菌学会総会（昭48, 4月）口頭発表，日細誌，**28**， 132，1973.
- 49) 岩田和夫, 山口英世, 神田弥生：抗真菌剤 *clotrimazole* と陰イオン性表面活性剤 *dioctyl sodium sulfosuccinate* との相乗作用に関する電顕的研究，日本電子顕微鏡学会第29回学術講演会（昭48年5月）口頭発表．
(昭和49年1月5日受付)
-