Candida albicans に対する protease inhibitor の 抗真菌作用について

坪井 良治 栗田 依幸 松田 和子
根木 信 小川 秀興

順天堂大学医学部皮膚科学教室

〔受付：8月22日，1984〕

Candida albicans を人皮膚角質を窒素源として添加した液体培地で培養すると、角質溶解性タンパク分解酵素（keratinolytic proteinase：KPase）が産生されるが、Sabouraud 培地内では KPase は産生されない。今回は、この人皮膚角質片を窒素源とした液体培地を用いて *C. albicans* を培養し、その菌増殖に及ぼす培地内 pH 及び各種 protease inhibitor の影響を比較検討した。その結果、*C. albicans* は弱酸性の液体培地で増殖が認められ、特に KPase の至適 pH である pH 4.0 で最も強い増殖能を示した。また各種 protease inhibitor を添加した実験では KPase（carboxyl protease）の阻害剤である pepstatin だけが *C. albicans* の増殖を強力に抑制した。以上のことより pepstatin の抗カンジダ作用は、*C. albicans* が人角質に侵入する際産生する KPase を阻害することによる 2 次的（間接的）作用に基づくものであることが想定された。さらにこの pepstatin と既知の抗真菌剤である clotrimazole を同じ条件下の培養系に添加し、抗菌作用を比較したところ、前者の方が遙かに強力な抗菌作用を示した。従って今回の実験結果は、*C. albicans* の人表皮角層内増殖に際し、KPase が不可欠な働きをしていることを裏付けると共に、protease inhibitor である pepstatin が新しい作用機序の抗真菌剤となりうる可能性をも示唆した。

C. albicans が皮膚角層内に侵入し増殖していくためには、自ら何らかのタンパク分解酵素を発動させ不溶性の角質タンパクを分解し、それを栄養源として増殖していくことが必要と考えられる。しかし *C. albicans* は従来より真菌の分離培養に汎用されている Sabouraud 培地では何らタンパク分解酵素を産生しない。最近、松田ら¹⁾は人足蹠角層 Human stratum corneum の不溶性分画（HSC）以外には極端に窒素源を制限した液体培地を用いて *C. albicans* を培養したところ、培養濾液中に角質溶解性タンパク分解酵素が産生されることを見出し、その一部性状について報告した。即ち、本酵素の産生は人皮膚角層添加培地では誘導されるが、人毛髪添加培地では誘導されないこと、carboxyl protease に属する可能性等が示唆され

た。次いで Hattori ら²⁾は本酵素を部分精製し、これが不溶性角質成分のみならず、これより精製した不溶性タンパクであるケラチン線維分画をも強力に分解することを明らかにし、本酵素を keratinolytic proteinase（KPase）と命名した。さらに Negi ら³⁾は、この KPase を分離精製し、本酵素が分子量約 42,000、至適 pH 4.0 を示し、pepstatin によつて著明に活性阻害される carboxyl protease の一種であることを報告した。以上の如き一連の研究から、我々は、*C. albicans* は KPase を産生することにより角層を分解し栄養源として増殖しているものと仮定し、もしそうであるならば、この KPase 活性を阻害すれば間接的に *C. albicans* の角層内増殖を抑制することができるのではないかと考えた。そこで HSC を添加した液体培地で *C. albicans* を培養し、まず 1) 菌増殖能と培地内 pH との関係を検討し、菌増殖の至適 pH が KPase の至適 pH である pH 4.0 に近似するか否かを検索し、次いで

別刷請求先：坪井 良治

〒113 文京区本郷 2-1-1

順天堂大学医学部皮膚科学教室

2) 菌増殖能が KPase の阻害剤である pepstatin によって抑制されるか否かを各種 protease inhibitor 及び既知の抗カンジダ剤である clotrimazole との対比のもとに検討した。

材料と方法

使用菌株、培地及び培養方法

Candida albicans (*C. albicans*) NIH A-207 (山梨医大微生物学教室、深沢義村教授より御恵与) を使用した。*C. albicans* は、あらかじめ Sabouraud 液体培地中で 27℃、3 日間前培養を行つたものを実験に供した。培地及び培養方法については、すでに報告したが³⁾ 以下簡単に述べる。培養に用いた液体培地は 1 l あたり yeast carbon base (Difco 社製) 12 g, inositol 0.05 g, thiamine 0.01 g, pyridoxine 0.01 g を含むものでこれを濾過滅菌して使用した。窒素源は健康人の足跡より角質片を薄切摂取し、さらに 0.5 mm³ 以下の小角質片に調整後、これを蒸留水で繰り返し抽出し、可溶性成分 (主としてタンパク質分画) を O.D. 280 nm で測定し、その吸光度が 0.01 以下になるまで続けた。このようにして可溶性タンパクを反復抽出した残りの沈渣を角質不溶性分画 (HSC) とした。この HSC は凍結乾燥後エチレン・オキサイド・ガスにて滅菌し、それぞれ液体培地に乾燥重量 5 mg/ml になるように添加し、これを *C. albicans* 培養のための窒素源とした。*C. albicans* は培養液中の菌数が 10⁶ 個/ml になるように調整し、接種した。培養は 27℃ 下、振盪培養器で行い、10 日間にわたり菌数の経時的な変化を観察した。実験中の菌数の算定は、すべて血球計算盤を使用して行つた。

菌増殖に及ぼす培地内 pH の影響

HSC を窒素源として *C. albicans* を培養する際、この培地の pH を種々変動させ、pH の菌増殖に与える影響を検討した。pH 3-7 は 0.1 M クエン酸-リン酸緩衝液、pH 8 は、0.1 M マレイン酸-トリス緩衝液を用いてそれぞれ調整し、その各々に同菌数の *C. albicans* を接種し、経日的な菌数の変化を測定した。

菌増殖に及ぼす pepstatin 及び各種タンパク分解酵素阻害剤の影響について

上記至適 pH 同定実験より *C. albicans* は HSC 培地内では、pH 4.0 の条件下で最も菌数の増加を示すことから、本実験では pH を 4.0 を設定し、それに carboxyl 系 protease inhibitor を加えて *C. albicans* の増殖に及ぼす阻害効果を各々比較検討した。添加した阻害剤は、carboxyl protease の阻害剤である pep-

statin (タンパク質研究奨励会製)、thiol protease の阻害剤である N-ethylmaleimide (NEM)、metallo protease の阻害剤である ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)、serine protease の阻害剤である soy bean trypsin inhibitor (SBTI) である。それぞれ培地内での最終濃度を NEM, SBTI, pepstatin については 10 µg/ml とし、EDTA については 10 mM/ml となるよう調整し、それらに *C. albicans* を接種後その菌数増加に及ぼす阻害効果を比較検討した。更に pepstatin については、最終濃度 1 µg, 0.1 µg, 0.01 µg/ml の低濃度での阻害実験を追加した。

菌増殖に及ぼす clotrimazole の阻害効果

pepstatin の抗菌作用と比較する目的で、市販されている imidazole 系の抗真菌剤である clotrimazole を選び、HSC を窒素源とした培養系に添加し、抗菌作用を検討した。添加した clotrimazole の濃度は 1 µg, 10 µg/ml, 100 µg/ml であつた。

結 果

菌増殖に及ぼす培地内 pH の影響 Table 1 に示す如く、*C. albicans* は *in vivo* に近い HSC を窒素源とした場合、pH 3, 4, 5 という弱酸性の培地で経日的な菌数の増殖が認められ、特に pH 4.0 で最も強い増殖能を示した。しかし、pH 6.0 以上では菌の増殖は認められなかつた。

菌増殖に及ぼす pepstatin 及び各種阻害剤の影響 Table 2 に示す如く、NEM, EDTA, SBTI を添加した系では control に比べ、まったく増殖抑制効果は認められなかつたが、10 µg/ml の pepstatin を添加した系では 10 日間、完全に菌の増殖抑制効果が認められた。さらに低濃度の pepstatin を添加した場合には Table 3 の如く最終濃度 1 µg, 0.1 µg/ml でも 8 日間にわたつて強い抗菌作用を示し、0.01 µg/ml という非

Table 1. Influence of culture medium pH on the growth of *C. albicans*

Culture medium pH	×10 ⁶ Cells/ml			
	Incubation time(days)			
	2	4	6	8
3.0	4.4	27	92	160
4.0	8.7	150	130	230
5.0	3.6	8.7	16	30
6.0	2.2	1.1	2.0	1.4
7.0	2.1	0.9	1.1	1.4
8.0	1.5	1.1	0.8	1.7

Inoculum size: 1.0×10⁶ cells/ml

Table 2. Inhibitory effect of various kinds of protease inhibitors on the growth of *C. albicans*

Inhibitors	×10 ⁶ Cells/ml(relative% growth compared with control)				
	Incubation time(days)				
	2	4	6	8	10
Control	16	105	400	500	370
(no inhibitor)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
NEM	11	/	310	270	500
(10 μg/ml)	(69%)		(78%)	(54%)	(135%)
EDTA	12	87	520	480	450
(10 mM/ml)	(75%)	(83%)	(130%)	(96%)	(122%)
SBTI	10	/	480	350	400
(10 μg/ml)	(63%)		(120%)	(70%)	(93%)
Pepstatin	6.8	7.0	7.2	7.0	6.9
(10 μg/ml)	(43%)	(6.7%)	(1.8%)	(1.4%)	(1.8%)

Inoculum size: 1.0×10⁶ cells/ml

/ : not examined

Table 3. Antifungal effect of various concentrations of pepstatin and clotrimazole

Concentrations	×10 ⁶ Cells/ml(relative % growth compared with control)			
	Incubation time(days)			
	2	4	6	8
Control	16	105	400	500
(no inhibitor)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
Pepstatin				
0.01 μg/ml	9.0	6.4	6.6	45
	(56%)	(6.1%)	(1.7%)	(9.0%)
0.1 μg/ml	6.5	9.4	6.0	6.0
	(41%)	(9.0%)	(1.5%)	(1.2%)
1.0 μg/ml	5.8	12	6.6	6.6
	(36%)	(11%)	(1.7%)	(1.3%)
Clotrimazole				
1.0 μg/ml	7.5	18	27	190
	(47%)	(17%)	(6.8%)	(38%)
10 μg/ml	10	12	25	130
	(63%)	(11%)	(6.3%)	(26%)
100 μg/ml	13	20	37	50
	(81%)	(19%)	(9.3%)	(10%)

Inoculum size: 1.0×10⁶ cells/ml

μg, 100 μg/ml という、かなりの量の添加でも菌の増殖が認められた。

考 察

HSC を窒素源とした場合、*C. albicans* の増殖は pH 4.0 で最も盛んで、pH 3.0, 5.0 がこれに次いだ。一方 pH 6.0 以上では全くといつてよい程認められなかつた。この結果は KPase の至適 pH が 4.0 であることとよく一致しており、*in vivo* では *C. albicans* は、少なくとも microlocal condition としては弱酸性下で KPase を産生し、角層を分解していることが想定された。一方、各種 protease inhibitor を培養系に添加した実験では carboxyl protease の阻害剤である pepstatin だけが、他系統の protease inhibitor に比し特異的に *C. albicans* の発育を阻害した。この結果は精製した KPase の活性が pepstatin によつて著しく阻害されること³⁾とよく一致しており、本実験系では pepstatin は KPase を阻害することによつて間接的に *C. albicans* の増殖を抑制していることが示唆された。*C. albicans* に対する pepstatin の作用は殺菌的ではないが、0.01 μg/ml という非常に低濃度でも菌の増殖を抑制したため、すでに市販されている imidazole 系の抗真菌剤である clotrimazole を選び、同じ条件下の培養系に加えて、その効果を比較検討した。その結果 pepstatin の方が、はるかに強い抗菌作用を示した。従来の報告⁴⁾に比べ clotrimazole の MIC が高いのは窒素源として *in vivo* に近い HSC を窒素源として用いたこと、培地の pH が弱酸性であつたこと等が関係しているものと思われる。かかる意味から、この比較実験は clotrimazole にとつては苛酷なものと考えられ、あくまで pH 4.0 の HSC 培地での比較結果であることは言うまでもない。しかしながら、Sabouraud 培地より HSC 培地の方がより *in vivo* に近いと思われること、また正常の皮膚 pH は弱酸性を示すことから、もし clotrimazole と pepstatin の臨床効果を比較すれば後者の方が有効である可能性は十分に考えられよう。いずれにしても pepstatin は、かかる条件下で低濃度でも抗菌作用を示したことは明らかであり、その原因は先に述べた如く KPase を阻害しての間接的効果であろうことが強く示唆された。

さて、本実験で強力な抗菌作用を示した pepstatin は 1970 年梅沢ら⁵⁾によつて放線菌の培養濾液中から発見された pepsin の拮抗阻害剤である。現在は carboxyl protease の低分子阻害剤として研究室で *in vitro* 実験用に広く使用されている。*in vivo* では、か

常に低濃度でも 6 日目までは強い抗菌作用が認められた。pepstatin の作用は濃度を上げて殺菌的でないが、菌数を一定以下に抑制する作用は強力であつた。

菌増殖に及ぼす clotrimazole の阻害効果 HSC を窒素源とした培養系での clotrimazole の抗菌作用は Table 3 に示す如く pepstatin に比べると不十分で 10

つて消化性潰瘍の治験用として検討されたこともあり、消化管からの吸収は良好でないが、副作用の著しく少ない物質であることが知られているので、将来これが抗カンジダ薬として皮膚、粘膜用として転用される可能性も十分考えられよう。従来、*C. albicans* に対する抗真菌剤が種々開発されてきたが⁶⁾、酵素に対する阻害剤を抗真菌剤として使用した例はかつてなく、pepstatin は、その強力な抗菌作用と副作用のない点から、将来新しい作用機序の抗真菌剤として使用される可能性が考えられる。

今回、我々は、*C. albicans* の培養にあたって、HSC を窒素源とした液体培地を使用し、まずその有する host 侵襲因子 (KPase) の性状とその阻害機構について検討し、次いでその阻害因子の抗菌作用を明らかにしたが、かかる方向性は将来他菌種での検討にも広く応用されるべきであろう。すなわち、真菌の病態観察や抗真菌剤の検定には、従来、Sabouraud 培地など栄養源を種々工夫した培地が汎用されてきたが、これらの培地は *in vivo* に比べると、あまりに過保護的な培地であり、必ずしも *in vivo* の実態を忠実に反映しているものとは云えないと考えられる。我々の例でも、HSC を窒素源に用いることで、初めて KPase の存在と重要性を明らかにすることができた。従つて今後、菌側因子の解明や抗真菌剤の検定等に当たっては、できるだけ *in vivo* の条件に近い培地 (biological

medium) を用いて実験を行うことも重要な方向性の 1 つであろうと考えられる。

文 献

- 1) 松田和子, 服部道廣, 鈴木佳子, 佐藤壮彦, 小川秀興: *Candida albicans* の産生する角質溶解性タンパク分解酵素の 2, 3 の生化学的性状について, 日皮会誌, 93: 463—466, 1983.
- 2) Hattori, M., Yoshiura, K., Negi, M. and Ogawa, H.: Keratinolytic proteinase produced by *Candida albicans*. Sabouraudia, 22: 175—183, 1984.
- 3) Negi, M., Tsuboi, R., Matsui, T. and Ogawa, H.: Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*—Substrate specificity-. J. Invest. Dermatol., 83: 32—36, 1984.
- 4) Plempel, M. and Bartmann, K.: Experimental studies on the antimycotic action of clotrimazole *in vitro* and after local application *in vivo*. Arzneimittel-Forsch., 22: 1280—1289, 1972.
- 5) Umezawa, H., Aoyagi, T., Morishima, H., Matsuzaki, M., Hamada, M. and Takeuchi, T.: Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes. J. Antibiotics, 23: 259—262, 1970.
- 6) Odds, F.C.: Antifungal agents and their use. In *Candida* and Candidosis, p. 228—244, Leicester University Press, London, 1979.

Antifungal Effect of a Protease Inhibitor against *Candida albicans*

Ryoji Tsuboi, Yoriyuki Kurita, Kazuko Matsuda, Makoto Negi
and Hideoki Ogawa

Department of Dermatology, Juntendo University SCHOOL OF Medicine, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

C. albicans produced a keratinolytic proteinase (KPase) when cultivated in medium containing human stratum corneum (HSC) as the nitrogen source, but was unable to do so when cultivated in Sabouraud dextrose broth. The authors investigated the influence of culture medium pH and various kinds of protease inhibitors on the growth of *C. albicans* when cultivated in liquid medium containing HSC as the nitrogen source. Rapid growth of *C. albicans* was observed with weakly acidic media, particularly at pH 4.0. From amongst the various kinds of protease inhibitors added to the media at pH 4.0, pepstatin, a carboxyl protease inhibitor, most strongly inhibited the growth of *C. albicans* dependent upon its concentration. Pepstatin showed a strong antifungal effect indirectly, probably through KPase inhibition. This inhibitory effect of pepstatin was considerably stronger than that of the well-known antifungal agent, clotrimazole. Our results suggest that KPase may play an important role in the growth of *C. albicans* and that pepstatin has a possibility of being used as a new type of antifungal agent.