シンポジウム

抗真菌性物質の作用機序に関する研究

岩田 和夫 横田 健 松田 明
吉川昌之介 若林 清重

東京大学医学部細菌学教室

真菌症、とくに深在性真菌症の治療は、従来対症療法に甘んずるほかなかつたが、その長い暗黒時代を経て、ようやく1951年Hansen and Brownにより抗生物質ny-statinが発見されたのに始まり、その後2, 3のすぐれた抗真菌剤が登場し、一方これまた難治の皮膚真菌症に対しても、画期的な内服治療剤である griseofulvinの著効が確認されるにいたつて、ここに真菌症の化学療法は飛躍的進展をとげた。

しかし、真菌症の治療は、これら抗真菌剤の出現にもかかわらず、一方において、広域抗菌スペクトルの抗菌剤の繁用その他の原因によるとみなされる真菌症例の増加と相俟つて、多くの未解決の問題を含んでおり、むしろその化学療法の確立は、今後のよりすぐれた薬剤の出現に俟たねばならないといえるであろう。

さて、現在広く用いられている若干の抗真菌剤の作用機序はどのようなものであろうか。その究明は、基礎医学上重要な意義を有するのみでなく、上述の意味において、すなわち、新抗菌剤の探索や、ひいては広く真菌症の治療上にも重要な知見を提供することになろう。しかし、病原真菌そのものの生理学的・生化学的分野が、現在未だ極めて不明の段階にある以上、抗真菌剤の作用機序に関する研究が抗細菌剤のそれに比して著るしく立ちおくれているのもやむをえないけれども、最近ようやくこの方面の研究報告が散見されるようになった。

著者は抗真菌性物質の作用機序を形態学的ならびに生理生化学的面から究明することを企図し、つぎの諸点より検討して、若干の知見をえたので報告する。

- 1) 諸種抗真菌性物質の抗真菌作用と形態学的影響との関連性について
- 2) 病原真菌の諸種抗真菌性物質に対する薬剤耐性に

ついて

- 3) 病原真菌の代謝活性におよぼす抗真菌性物質の影響について

本報告において、抗真菌性物質または抗真菌剤などの表現を用いているが、前者の場合は、抗生物質たると化学療法剤たるとを問わず、また現在臨床の実際に適応されていると実験的段階にあるとを問わず、抗真菌作用を有する物質を総称した意味での表現であり、後者は現在市販され、臨床上使用されている薬剤に限定した意味で、著者の便宜上の区別にすぎないが、それが故にかえつてその使い分けが煩わしく、また必ずしも適切でない場合もありうることをお断りしておきたい。

I. 諸種抗真菌性物質の抗真菌作用と形態学的影響との関連性について

一般に細菌のように形態学的に比較的単純なものにおいては、その発育条件の変化、すなわち栄養素、pH、発育阻害剤の添加の影響などによつて形態に変化をきたすことが多くの菌について知られている¹⁾。このような変化は、いわゆる teratological growth form または impressed variation などと呼ばれているが、上のような外的因子が除去されれば、直ちに復帰することが多い。外的因子の影響が強い場合には、菌の生活力、増殖力が減少ないし消失し、退行性変化を示し、その結果として死滅ないしはそれに近い状態になる場合もある。

細菌に比して構造の複雑な真菌についても、古くからこれらの点について報告²⁾があつたが、特定の化学物質の抗真菌作用の1表現として、これをとらえたものは少なく、わずかに griseofulvin³⁾が注目されていたに過ぎない。

Kazuo IWATA, Takeshi YOKOTA, Akira MATSUDA, Masanosuke YOSHIKAWA and Kiyoshige WAKABAYASHI: Studies on the mode of action of antifungal agents. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Tokyo.-Japan. J. Med. Mycol., 4 (3), 1962,

著者らはさきに抗真菌性物質の効力評価およびスクリーニングを実施するに当つて、構造活性相関の方法論に基づいておこなうことの合理的であるゆえんを示したが、今回はさらに抗真菌性物質の抗真菌作用と病原真菌に与える形態学的変化との関連性を検討するために、抗真菌作用のない物質をも含めて、化学構造上多種多様の化合物について系統的に追求した。

実 験

1. 薬剤：表1—6に示すような抗生物質、合成薬品など36種類で、抗真菌作用を殆んどあるいは全く示さない薬剤をも比較の意味で含めた。

2. 使用菌株：*Trichophyton mentagrophytes* T-1株、*Trichophyton rubrum* T-53株、*Hormodendrum pedrosoi* Ho-1株、*Sporotrichum schenku* Sp-1株、*Aspergillus fumigatus* As-f-2株、*Aspergillus niger* ATCC 6275株、*Candida albicans* C-a-1株、*Candida albicans* 3147株、*Cryptococcus neoformans* 2617株および *Botrytis cinerea* B-c-1株の計10株。いずれも当教室保存株である。

3. 実験方法：抗菌力の測定と形態学的影響の観察とを同時にかつ経時的におこなうために、寒天平板画線法によつた。すなわち各薬剤の溶液をつくるに当つて、水溶性薬剤は滅菌蒸留水に、大部分の検体は ethylalcohol

に、ethylalcohol 難溶性の検体は dimethylformamide にそれぞれ一定量を溶解した後、あらかじめ加熱溶解して約50°Cに保つた Sabouraud 寒天平板培地（ブドウ糖 3%）にその一定量を加えて平板とした。薬剤の濃度は 1,000 γ /ml より10 $\times$ 稀釈で 0.1 γ /ml まで用いた。

被検菌を Sabouraud寒天斜面（*Aspergillus niger* および *Botrytis cinerea* のみは potato-sucrose 寒天斜面）に27°C 7～10日間培養し、その1白金耳量（白金耳直径4mm）を生理的食塩水1mlに均等に浮游させ、その1白金耳量を各平板に塗布接種して27°Cに培養し、3日、5日および7日後に観察し、5日後の最小発育阻止濃度および形態学的変化を記録した（ただし発育のおそい菌については7日後の成績をもつてした）。

被検菌の形態変化は対照無処置菌と対比しつつ培地上に発育した集落および発育の阻止された場合はその接種部位について実体顕微鏡ならびに普通顕微鏡の弱拡大によつて観察し、併せて顕微鏡写真撮影した。

形態学的変化の記載²⁾には、molds については菌糸の屈曲（curling）、生長阻害（stunting）、異状分岐（excessive branching）、畸形（gross hyphal distortion）、yeasts については楕円形化、偽菌糸、原膜胞子の形成などを目標とした。

成 績

表1. [第1群] 最小発育阻止濃度の附近でも真菌に形態変化を与え、高濃度においては溶菌を示す化合物群

菌 株 \ 薬 剤	<i>T. ment.</i> T-1	<i>T. rub.</i> T-53	<i>H. ped.</i> Ho-1	<i>S. sch.</i> Sp-1	<i>A. fum.</i> As-f-2	<i>A. nig.</i> ATCC 6275	<i>C. alb.</i> C-a-1	<i>B. cin.</i> B-c-1
Merzonin	0.1 C, G 1.0	0.1 C, G 1.0	<1.0	0.1 G <1.0	1.0 C, G 1.0	1.0	1.0	0.1 C, G 1.0
Phenylmercuric acetate	0.01 E 0.1	0.01 C 0.1	0.1	0.1	0.01—0.1 C 1.0	1.0	1.0	0.10—0.1 C 1.0
α -Brom-cinnamaldehyde	0.1—1.0 C, G 1.0	0.1—1.0 C, G 1.0	10 G 10	10 G 10	10 G 10	10 G 10	10	10 G 10
4-Nitro- β -methyl- β -nitrostyrene	0.1—1.0 C, G 1.0	0.1—1.0 C, G 1.0	1.0	0.1—10 C, G 1.0	1.0 C 10	100	10	1.0 C 10
Pentachlorophenol	0.1—1.0 C 10	0.1—1.0 C 10	100	10 S 100	10 G 100	10 G 100	100	10 G, E 100
Malachite green	0.01—1.0 C, G 1.0	0.01—1.0 C, G 1.0	1.0	1.0	1.0 G 1.0	1.0	1.0	0.1 C 1.0

註：表中下段は形態変化を示す濃度 γ /ml, 中段の略字は形態変化の種類, 下段は最小発育阻止濃度。

C=curling, S=stunting, E=excessive branching, G=gross hyphal distortion, Lp=long elliptical change, Ph=formation of pseudohyphae, Cl=formation of chlamydospores, Ac=acapsular change, Sw=swelling. 以下の表2—6もこれに準ずる。

表2.〔第2群〕最小発育阻止濃度および高濃度にわたり真菌に形態変化を与える化合物群

菌 株 薬 剤	<i>T. ment.</i> T-1	<i>H. ped.</i> Ho-1	<i>A. fum.</i> As-f-2	<i>A. nig.</i> ATCC 6275	<i>C. alb.</i> C-a-1	<i>C. alb.</i> 3147	<i>Cr. neo.</i> 2617
Amphotericin B	1.56		50		1.56 Lp 3.12	1.56 Ph 3.12	0.8 Ac 1.56
Nystatin	6.25		25		1.56 Ph 6.25	6.25	3.12
Trichomycin	6.25		> 100		0.4	0.4 Ph 0.8	0.1
Variotin	1.56	100 G 10	0.8	100 G, S 1000	> 100	> 100	6.25
Cerulenin	0.1—10 C, Cl 100	100 G 100	0.1—1.0 C, E 100		10		
Dimethylformamide	1—2 C 4	4	4 S > 4	4 G, E > 4	> 4		

註：Dimethylformamide のみは%で示した。

表3.〔第3群〕最小発育阻止濃度以下および高濃度にわたり真菌に形態変化を与える化合物群

菌 株 薬 剤	<i>T. ment.</i> T-1	<i>T. rub.</i> T-53	<i>H. ped.</i> Ho-1	<i>S. sch.</i> Sp-1	<i>A. fum.</i> As-f-2	<i>A. nig.</i> ATCC 6257	<i>C. alb.</i> C-a-1	<i>B. cm.</i> B-c-1
Griseofulvin	0.1—1.0 C, E 10	0.1—1.0 C, E 10	100 C 1000	10 C 1000	>100 C, S >1000	>100 S >1000	>1000	0.1—1.0 C 100
Actidione	0.1—1.0 C >1000	0.1—1000 C >1000	>1000	>1000	100 C, G 1000	1000	>1000	0.0—100 C 1000
Halogenated salicylanilide	0.1 C 1.0	0.1 C 1.0	10	10	1.0 E >1000	1.0—10 C, E 100	>1000	0.1 G <0.1
o-Phenylphenol	0.1—1.0 C 100	0.1—10 C 100	100	100	10 C, E 100	10 G 100	1000	100
Thymol	1.0 C 100	1.0 C 100	100	100	100 C, S 1000	100 S 1000	1000	100 G 1000
846(4,4,5,6,6, penta- chloro-3-methoxycy- clohexa-2-ex-1-one)	0.1—1.0 C 10	0.1 C 100	10	10	10 C 100	10 C, G, S 100	100	0.1 C 100
847 (4,4,5,6, tetra- chloro-3-methoxycy- clohexa-2-5, dien-1- one)	0.1—1.0 C 10	0.1—1.0 C, E 10	10	0.1—1.0 C 10	0.1—1.0 C 100	0.1—1.0 E 100	100	0.1—1.0 C 100

註：最小発育阻止濃度は一般に第2群より大きい。

成績は表1—6および写真1—8に示した。

各種の化合物の発育阻止濃度と形態に与える影響との間には一定の関連が認められたので、その結果に基づいて化合物を便宜上6群に分けることを試みた。各群はそ

れぞれ互に重複している部分を含んでおり、必ずしも明確ではないが、おおよその傾向は示しているものと考えられる。

第1群は、表1に示すように、最小発育阻止濃度附近

表4.〔第4群〕発育阻止力弱く、真菌形態への影響も弱い化合物群

菌 株 薬 物	<i>T. ment.</i> T-1	<i>T. rub.</i> T-53	<i>H. ped.</i> Ho-1	<i>S. sch.</i> Sp-1	<i>A. fum.</i> As-f-2	<i>A. nig.</i> ATCC 6275	<i>C. alb.</i> C-a-1	<i>B. cin.</i> B-c-1
Phenol	1000	1000 G 1000	1000	1000	1000 G 1000	1000 G 1000	>1000	100
o-Cresol	1000 G 1000	1000 G 1000	1000 G 1000	1000	1000	1000	1000	1000
Salicylic acid	1000 G 1000	1000	1000	1000	1000 S >1000	1000 S >1000	>1000	100
Buthyl-p-hydroxy- benzoate	10 C 10	10 C 10	100	100	1000	100	100	10 C, G 1000
Methyl-p-hydroxy- benzoate	100 C 100	100 C 100	1000	1000	1000	1000	1000	100 C 100
Campher	100 C 1000	1000	1000	>1000	1000 C >1000	>1000	>1000	>1000
Cyclohexanol	100—1000 C 1000	100—1000 C 1000	100	1000	1000 C >1000	>1000	>1000	1000
α -Naphtol	10 C 100	100	100	100	10 C 100	100	100	100
α -Naphthylamine	100 C 100	100	100	100	100 G 1000	100 G 1000	1000	10 C 100

表5.〔第5群〕発育阻止力なく真菌形態への影響も弱い化合物群

菌 株 薬 剤	<i>T. ment.</i> T-1	<i>T. rub.</i> T-53	<i>H. ped.</i> Ho-1	<i>S. sch.</i> Sp-1	<i>A. fum.</i> As-f-2	<i>A. nig.</i> ATCC 6275	<i>C. alb.</i> C-a-1	<i>B. cin.</i> B-c-1
Penicillin	1000 C >1000	1000 C >1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	100 Sw >1000
Streptomycin	1000 C >1000	1000 C >1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	100 Sw >1000
Chloramphenicol	1000 C >1000	1000 C >1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Tetracycline	1000 C, G >1000	1000 C, G >1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
2,4, D. (2,4, dichloro- phenoxy-acetic acid)	10—100 C >1000	>1000	>1000	>1000	10 E >1000	>1000	>1000	>1000
Potassium thiocyanate	10 C >1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	100 C >1000

でも真菌に形態変化を与え、高濃度においては溶菌を示す化合物群であつて、このなかには merzonin, α -brom-cinnam-aldehyde など6種の化合物を含み、いずれも

強力な抗菌力を示し、選択性の比較的に少ない抗菌スペクトルを有しており、作用態度の殺菌的なものが多い。

第2群は、表2に示すように、最小発育阻止濃度およ

表6.〔第6群〕発育阻止力なく、真菌形態への影響も認められない化合物群

菌 株 薬 剤	<i>T. ment.</i> T-1	<i>T. rub.</i> T-53	<i>H. ped.</i> Ho-1	<i>S. sch.</i> Sp-1	<i>A. fum.</i> As-f-2	<i>A. nig.</i> ATCC 6275	<i>C. alb.</i> C-a-1	<i>B. cin.</i> B-c-1
p-Dichlorobenzene	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Ethylcarbamate	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

が高濃度にわたり真菌に形態変化を与える化合物群であつて、このなかには amphotericin B, nystatin など6種を含み、いずれも第1群と同程度ないしはやや低い抗菌力を示し、比較的選択性のある抗菌スペクトルを有し、作用態度が制菌的なものが多い。この群には例外として溶媒として用いられる dimethylformamide が含まれ、4%以上で制菌力、形態変化を発現するので、かかる物質を溶媒として用いて抗真菌剤の抗菌力、形態変化などを検討する場合は注意を要する。

第3群は、表3に示すように、最小発育阻止濃度以下および高濃度にわたり真菌に形態変化を与える化合物であつて、このなかには griseofulvin, actidion など7種の化合物を含み、いずれも第2群と同等ないしはやや低い抗菌力を示し、比較的選択性のある抗菌スペクトルを有し、作用態度の制菌的なものが多く、一般に第1、第2群に比して不完全発育阻止濃度の幅が広い。

第4群は、表4に示すように、発育阻止力弱く真菌形態への影響も弱い化合物群であつて、このなかには phenol, salicylic acid など9種があり、古くから用いられている2、3の殺菌剤を含んでいるが、いずれもその抗菌力は第1～3群に比較すると弱い。

第5群は、表5に示すように、発育阻止力なく、真菌形態への影響も弱い群であつて、penicillin, streptomycin のごとき抗細菌性物質、2,4-D, (2,4, dichlorophenoxy-acetic acid) のごとき除草剤などの6種を含んでいる。

第6群は、表6に示すように、発育阻止力なく真菌形態への影響も認められない群で、p-dichloro-benzene と ethylcarbamate がこれにあたる。

考 察

抗真菌剤の真菌形態におよぼす影響については、griseofulvinの著るしい作用が知られて以来、近年にわかに注目されてきた。著者らはこのような真菌の形態に変化をおこす物質の作用を抗真菌性との関連において検討した。抗細菌剤、抗真菌剤その他の有機ならびに無機化合物について調べた結果、両作用の間にはかなり密接な関

連性が認められ、それらの量的、質的な多様性を6つの範疇に整理し、化合物を6群に分類してみた。第1群から第3群には抗菌作用の主なる対象が真菌であるか、または非選択的に作用するような殺菌剤が属し、またいわゆる抗真菌剤と呼ばれるものもこれらの群のいずれかに属する。作用態度ならびに抗菌力については、第1群は殺菌的ないし溶菌的で最も強力、第2群は制菌的で強力、第3群も制菌的でかなり強力（第2群より劣る）である。第4群以下には非選択的殺菌剤（または食品防腐剤）か抗細菌性抗生物質その他が含まれ、抗真菌作用の低下と形態変化に与える影響の低下とが並行的であつた。第3群に属させた halogenated salicylanilide, 846 (4,4,5,6,6, pentachloro-3-methoxycyclohexa-2-en-1-one), 847 (4,4,5,6, tetrachloro-3-methoxycyclohexa-2-5, dien-1-one) などが griseofulvin と同様の範疇にはいる形態変化を真菌に与えることを見出し、かかる属性がひとり griseofulvin にとどまらないことが明らかになつた。なかでも846と847はともにその化学構造中に griseofulvin 類似の構造 $\text{CH}_3\text{O}-\text{C}=\text{CH}-\text{C}=\text{O}$ を有し、かつ抗菌スペクトルも griseofulvin と類似するかないしはやや拡張していることは興味深い。なお最近見出された抗生物質のなかにも cerulenin^{6,7)}, ascomycin⁸⁾ などのように抗真菌力とともに真菌に形態変化を示すもののあることが報告されている。

以上示したような成績から、抗真菌作用はさほど強力でなくとも、真菌形態に著るしい影響を与えるような薬剤は、一応抗真菌剤としての可能性を考慮にいれてもよさそうに思われ、したがって新たに抗真菌剤をスクリーニングする際に、その第一段階としては、試験管内抗菌力の測定にとどまらず、形態学的影響の検査をも併せておこなうことは意義なしとしないであろう。なお今回しらべた化合物のなかには、真菌の有糸分裂に影響を与えるとの記載のある化合物、例えば、camphor⁹⁾, streptomycin¹⁰⁾ などもあるが、これらも含めて今後抗真菌性物質による形態学的変化という現象の背景に存在するものの理解が深まるようになれば、抗真菌性物質の作用

機序の解明が一層推進されるものと考えられる。

小 括

諸種化合物36検体について *Trichophyton*, *Candida*, *Aspergillus* など9種10株の病原真菌の形態に与える影響を検討し、つぎのような成績をえた。

1) 各種化合物を真菌に対する抗菌作用を形態に与える影響との量的検討から両作用の間にはかなり密接な一定の関連性の存在することが認められた。

2) その結果として、それら諸種の化合物が6群の範疇に分けられることを示した。

3) それらのうち、数種の化合物においては、病原真菌に対して *griseofulvin* と同様の形態変化を与えることを見出した。

4) 化合物の抗真菌作用をしらべるに当つて、抗真菌力の測定とともに、形態学的影響をも検討することの必要性を示した。

II. 病原真菌の諸種抗真菌性物質に対する薬剤耐性について

真菌症の治療に種々の抗真菌剤が用いられるようになると、一般細菌の場合と同様に、真菌の薬剤耐性化が当然問題とされねばならない。著者ら^{10,11)}はさきに *griseofulvin* その他の抗真菌剤に対する皮膚真菌の試験管内耐性について報告したが、今回はさらに *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus fumigatus* および *Aspergillus niger* の4菌種の各種抗真菌剤に対する薬剤耐性について、つぎの諸点より検討した。

- 1) 新鮮分離株の薬剤感受性
- 2) 増量継代培養法による薬剤耐性の獲得
- 3) 同一菌株における耐性細胞の分布

実 験

1. 薬剤: nystatin (3,030 u/mg), amphotericin B (850 γ /mg), trichomycin (4,200 u/mg), variotin (160 u/mg) および merzonin (比較の意味で) の5種。

2. 使用菌株: *Trichophyton mentagrophytes* 12株, *Trichophyton rubrum* 12株, *Aspergillus fumigatus* 5株および *Aspergillus niger* 1株の以上4菌種、計30株。

3. 実験方法

a. *Trichophyton* ならびに *Aspergillus* の新鮮分離株の薬剤感性試験: 寒天平板画線法によつた。*T. mentagrophytes* と *T. rubrum* には Sabouraud ブドウ糖寒天 (ブドウ糖3%) を、*A. fumigatus* には Czapek 寒

天を用い、各薬剤の2×階段稀釈液を一定量ずつ混入して平板とした後、あらかじめ被検菌を所定の斜面培地に27°C10日間培養し、その1白金耳量 (白金耳直径4mm) を生理食塩水1mlに均等に浮遊し、その1白金耳量を各平板に塗抹して27°Cに培養し、3日、5日および7日後に観察し、7日後の最小発育阻止濃度をもつて被検菌の感受性を示した。

b. *Aspergillus* の各種抗真菌剤に対する増量継代培養法による耐性獲得試験: 薬剤増量継代法によつて *Aspergillus* の各種抗真菌剤に対する耐性獲得の度合をしらべた。

A. fumigatus の As-f-1株, As-f-2株, As-f-4株, 久保山株および As-10-1株、対照としての *A. niger* Δ TCC 6275株の計6株を用い、前実験と同様に、あらかじめ Czapek 寒天斜面に27°C10日間培養し、その1白金耳量 (白金耳直径4mm) を1mlの生理食塩水に浮遊して孢子浮遊液をつくり、その1白金耳量を各薬剤加 Czapek 寒天平板の2×階段稀釈系列に接種し、27°C5日間培養し、以後5日間隔で継代した。2代以後はより高濃度の薬剤を含有する培地上に十分発育してきた集落より1白金耳量を取り、1mlの生理食塩水に浮遊したものの1白金耳量を次代の薬剤加培地に継代し、同様に30代におよんだ。

c. 同一株における薬剤耐性細胞の分布および薬剤耐性の安定性についての実験: *A. fumigatus* の As-f-1株ならびに As-f-2株、*T. rubrum* の森田株ならびに名取株の計4株を用い、replica plating 法によつて耐性細胞の分布をしらべた。

1) *A. fumigatus* の場合: 白米を一昼夜水に浸し、ガーゼ上にひろげて水を切り、その12gを容量100mlの三角コルベンに入れ、15ポンド10分滅菌し、これに各菌株の Czapek 寒天斜面27°C7日間培養の1白金耳量を接種し、よく振つて米粒に孢子を十分混合する。27°Cに培養し、毎日1回振り、米粒をほぐし、7日後孢子が十分着生したものをを用いた。

被検菌の米粒培養10個に tween 80 0.05%加生理食塩水10mlを加え、よく振つて、十分に孢子を米粒より離し、その浮遊液を 10^{-4} , 10^{-5} および 10^{-6} に稀釈し、各稀釈液について各3枚、計9枚の Czapek寒天平板に各0.5mlずつを接種し、十分均等ひろげた後、27°C5日間培養する。発生集落数が20個前後の平板を選んで replica plating の原平板とした。

2) *T. rubrum* の場合: 被検菌は米粒培養によつて

写真 1

写真 2

写真 3

写真 4

写真 5

写真 6

写 真 7

写 真 8

写 真 の 説 明

- 写真1 : merzonin 0.1 γ /ml 作用下の *Trichophyton rubrum*.
 写真2 : griseofulvin 1.5 γ /ml 作用下の *Trichophyton mentagrophytes*.
 写真3 : halogenated salicylanilide 0.1 γ /ml 作用下の *Trichophyton mentagrophytes*.
 写真4 : 847 1 γ /ml 作用下の *Aspergillus fumigatus*.
 写真5 : 2,4,D. 10 γ /ml 作用下の *Aspergillus fumigatus*.
 写真6 : cerulenin 10 γ /ml 作用下の *Trichophyton mentagrophytes*.
 写真7 : amphotericin B 0.5 γ /ml 作用下の *Candida albicans*.
 写真8 : nystatin 1.5 γ /ml 作用下の *Candida albicans*.

胞子の着生が不良であつたので、Sabouraud 寒天平板面に tween 80 0.05%加生理食塩水を適量加え、軽くこすつて胞子液をつくり、以後の操作は、*Aspergillus* の場合に準じた。

3) replica plating の方法：種々の濃度に薬剤を含んだ平板培地を調製しておき、直径約8 cmの瓶の底に滅菌した純毛ジャージをまき、これを用いてあらかじめ調製しておいたスタンプ用原平板に均等に力を加えてスタンプする。それを薬剤加寒天平板にスタンプし、27℃ 5日間培養し、発生してきた集落の数、位置、薬剤の濃度から生じてきた集落の数、位置、薬剤の濃度から耐性細胞の分布をしらべた。

4) 薬剤耐性の安定性実験：replica plating 法によつて分離した単一細胞より生育した集落を10個選び、それよりえた菌株を10代 Czapek 寒天に継代し、分離時および一定期間継代後の薬剤感受性を寒天平板画線法によつて測定し、耐性の安定性をしらべた。

成 績

1. *Trichophyton* ならびに *Aspergillus* の新鮮分離株の薬剤感受性

表7に示すように *T. mentagrophytes* の各菌株は、nystatin, amphotericin B, trichomycin, variotin の各抗真菌剤に対して比較的均一な感受性を示した。

T. rubrum においても、表8に示すように、*T. mentagrophytes* の場合とほぼ同様であつた。ただし amphotericin Bにみられるように、菌株間の感受性に8×の開きがある場合もあつた。

A. fumigatus においては、表9にみるように、皮膚

表7. *Trichophyton mentagrophytes* の各種抗真菌剤に対する感受性

薬剤 菌株	Nystatin	Ampho- tericin B	Tricho- mycin	Variotin
A 2468	25	6.25	50	6.25
JR 158	12.5	12.5	100	6.25
" 258	25	3.12	100	6.25
" 358	12.5	6.25	100	6.25
" 458	25	6.25	50	6.25
" 558	12.5	6.25	50	3.12
KI 1	25	12.5	50	3.12
" 2	25	12.5	100	3.12
" 3	12.5	6.25	50	3.12
" 4	25	12.5	50	3.12
" 5	12.5	6.25	50	3.12
Th 59	25	12.5	50	3.12

註：表中の数値は Sabouraud 寒天平板における27℃ 7日間培養後の最小発育阻止濃度 (γ /ml) を示す。

表 8. *Trichophyton rubrum* の各種抗真菌剤に対する感受性

菌株 \ 薬剤	Nystatin	Amphotericin B	Trichomycin	Variotin
G 2424	12.5	6.25	50	0.8
JR 158	12.5	6.25	25	1.56
" 258	6.25	6.25	50	0.8
" 558	6.25	6.25	25	0.8
KR 2	6.25	12.5	50	0.8
" 5	3.12	3.12	25	3.12
" 9	25	25	100	1.56
Th 591	12.5	6.25	50	1.56
" 592	6.25	3.12	50	1.56
" 593	6.25	12.5	50	1.56
" 594	25	25	50	1.56
" 595	12.5	25	50	1.56

註：表 7 の註に準ずる。

表 9. *Aspergillus fumigatus* の薬剤抗菌剤に対する感受性

菌株 \ 薬剤	Nystatin	Amphotericin B	Trichomycin	Variotin
As-f-1 株	6.25	12.5	25	3.12
As-f-2 株	12.5	> 500	200	3.12
As-f-4 株	25	> 500	> 500	> 500
As-10-1 株	25	> 500	> 500	> 500
久保山株	12.5	100	100	3.12

註：表中の数値は Czapek 寒天平板における 27°C 7 日間培養後の最小発育阻止濃度 (γ /ml) を示す。

真菌により著しく異なり, amphotericin B に対してその高低の間に 32 $\times$ 以上, trichomycin に対して 16 $\times$ 以上, variotin に対しては 128 $\times$ 以上, nystatin に対しては 4 $\times$ の開きが認められた。

2. *Aspergillus* の各種抗真菌剤に対する耐性獲得

Aspergillus 各菌株の増量継代培養法による各抗菌剤に対する耐性獲得の程度は図 1 に示した。なお、図中の各曲線は各継代の際、各薬剤の稀釈系列において発育の十分に認められた試験管のうちの最大濃度のもの（対照の薬剤無含有試験管の発育と同程度ないしそれよりいくぶん劣る程度の発育を示す）から次代に移植していった経過を示すもので、発育は認められてもその貧弱な試験管から継代することはさけた。したがって菌発育許容最大濃度と表現したのは、発育の比較的十分に認められた限りでの最大濃度という意味である。

図 1. *Aspergillus fumigatus* の増量継代培養法による抗真菌剤耐性の獲得

amphotericin B に対しては、久保山株にみられるように、5 代ないし 10 代の継代によつて耐性がやや上昇し、10 代以後やや下降の傾向を示し、30 代にいたつても継代開始時に比して薬剤感受性に認むべき変動がなかつた。他の菌株もほぼ同様であつた。As-f-1 株、*A. niger* ATCC 6275 株にみられるように、継代が進むにつれ、かえつて感受性が増大する傾向を示すものもあつた。

nystatin に対しては、6 株ともに継代によつて感受性が殆んど変動せず、耐性上昇の傾向はなかつた。

trichomycin に対しては継代ごとに感受性の変動が著るしかつたが、30 代通過後においても、結局耐性の上昇は認められなかつた。この場合も *A. fumigatus* As-f-1 株、*A. niger* ATCC 6275 株は amphotericin と同様に継代により、かえつて感受性が増大した。

表10. Replica plating 法による *Aspergillus fumigatus* の各抗真菌剤耐性細胞の分布

菌株	薬剤	薬剤濃度 γ/ml					
		1,000	100	10	1	0.1	0
As-f-1 株	Nystatin		0	0	20	20	20
	Amphotericin B		0	16	20	20	20
	Trichomycin	0	0	19	20		20
	Variotin		0	0	0	18	20
	Merzonin			0	0	20	20
As-f-2 株	Nystatin		0	0	8	11	12
	Amphotericin B		0	7	9	10	12
	Trichomycin	0	2	9	10		12
	Variotin		0	0	0	6	12
	Merzonin			0	0	7	12
As-f-4 株	Nystatin		0	16	18	18	18
	Amphotericin B		10	18	18	18	18
	Trichomycin	0	7	18	18		18
	Variotin		2	18	18	18	18
	Merzonin			0	5	17	18

註：表中の数値は Czapek 寒天平板上に生じた集落の数を示す (27°C 5 日間培養)。

表11. Replica plating 法による *Trichophyton rubrum* の各種真菌剤耐性細胞の分布

菌株	薬剤	薬剤濃度 γ/ml					
		1,000	100	10	1	0.1	0
KR 2 株	Nystatin		0	0	36	36	36
	Amphotericin B		0	0	36	36	36
	Trichomycin	0	0	13	36		36
	Variotin		0	0	0	35	36
	Merzonin			0	0	35	36
KR 5 株	Nystatin		0	0	0	8	13
	Amphotericin B		0	4	7	12	13
	Trichomycin	0	0	13	13		13
	Variotin		0	0	0	8	13
	Merzonin			0	0	12	13

註：表中の数値は Sabouraud 寒天平板上に生じた集落の数を示す (27°C 5 日間培養)。

variotin に対しては、継代前の感受性に著しい差があつたが、30代によつても耐性は上昇しなかつた。

merzonin に対しては、継代前の感受性は各菌株同様であつたが、As-f-1 株は継代が進むにつれ、やや感受性が增大したが、変動は少なかつた。

3. *Aspergillus* の同一菌株における薬剤耐性細胞の分布

表10に示すように、*A. fumigatus* は一般に amphotericin B, trichomycin に対して高度耐性の細胞が多く見出されたが、これに比して、nystatin, variotin, merzonin においては高度耐性の細胞は少なく、一般に感受

性が均等であつた。

variotin に感受性の低い As-f-4 株は高度耐性の細胞が大部分を占めた。

T. rubrum は表11にみるように、amphotericin B, trichomycin に対して一部高度耐性細胞を認めた以外は、大多数の細胞はほぼ均一の感受性分布を示した。

4. *Aspergillus* における薬剤耐性の安定性

上のごとく replica plating 法によつて単一細胞よりえた集落10個よりの10菌株の各薬剤に対する耐性度（または感受性度）は、図2に示すように、少なくとも10代の継代に関する限り、*A. fumigatus* の2菌株ともに、

図2. *Aspergillus fumigatus* の抗真菌剤耐性の安定性

註：各薬剤につき，上段は原株，下段は replica plating 法によつて原株よりえた分離株の感受性（菌発育許容最大濃度 γ/ml 一ただし，検査した濃度の範囲内において）を示す。
 □：初回の感受性試験における感受性（分離株については replica plating 法による分離時の感受性）。
 ▨：10代の継代後の感受性。
 各下段横軸の下の数値は replica plating 法による耐性細胞の分離における分離濃度 γ/ml の示す（集落を生じた各平板より任意に抽出）。

replica plating 法による分離時に比して変動が少なく、したがって、分離細胞の耐性は安定性を有することが認められた。

考 察

病原真菌の薬剤耐性については、幸いにして現在のところ、臨床医学上の問題とはなっていないが、しかし真菌症の化学療法が今後普及するにともない、病原真菌の耐性化は予想せざるをえないし、事実抗真菌剤のなかには、臨床的に無効の症例が多くなっており、菌学的にも薬剤投与によって菌の陰性化が予期に反してみられないことがしばしば経験されている。このような機運にあつて、病原真菌の薬剤耐性獲得について研究報告がみられるようになってきた。皮膚真菌の griseofulvin に対する薬剤耐性獲得については、Rosenthal and Wise¹²⁾, Aytoun *et al.*¹³⁾, Robinson *et al.*¹⁴⁾ その他は試験管内増量継代培養法によって耐性の上昇を認めているが、臨床材料からの明らかな耐性株は見出していない。

Aspergillus については、福島¹⁵⁾らの報告があり、amphotericin B に対して試験管内恒量および増量継代培養によって10代継代後に初代の感受性の 100×に耐性が上昇したといい、またアスペルギルス症患者に amphotericin B を用いた結果、分離株の耐性は使用前の約 80×上昇したと述べている。

著者らの実験によれば、新鮮分離株の薬剤感受性は、皮膚真菌では菌株による変動が少なく、比較的均一であったが、*A. fumigatus* においては菌株数が少ない憾みはあるが、菌株による変動が著しく、この点は後述する耐性細胞の分布の実験によっても確認された。

増量継代培養法による *A. fumigatus* の耐性上昇化を 30代にわたってしらべ、10代前後において一過性に耐性が上昇する傾向を示したのも 2, 3 認められたが、福島らの示したような著しい耐性化は認められず、かえって感受性の増加（これはむしろ薬剤の影響による菌の代謝活性の低下に基づく発育の減弱化とみなすべきであるが）を認める場合すらあつた。

このような諸報告にみられる実験成績の差異については、実験方法、使用菌株などの相異による要因が考えられるが、今後検討を要する問題である。*A. fumigatus* が菌株によって著しく薬剤感受性を異にすることはすでに述べたが、その要因を明らかにするために同一菌株における耐性細胞の量的分布について replica plating 法により検討した結果は、一般に *A. fumigatus* は amphotericin B や trichomycin に対して比較的耐性の高い細胞が多

く、これに比較すると nystatin, variotin, merzonin に対しては、かかる細胞は少なかつた。この結果はさきに示した薬剤感受性測定の結果とほぼ一致しているが、*A. fumigatus* As-f-2 株の amphotericin B に対するように、異なる場合もあつた。この点についてはさらに実験法^{16,17)}に考慮し検討を加えたい。

なおわれわれは replica plating 法によつてえた種々の程度の耐性細胞（自然耐性細胞）の耐性度の安定性を薬剤無添加培地に継代してかなり安定であることを認めた。

これらの諸点から真菌は細菌とは異なり、抗真菌剤に対して耐性を獲得しがたいかにみえるし、また今日臨床材料から高度耐性の真菌が分離されたとの報告もないようであるから、少なくとも現段階では真菌耐性化について、にわかに重要問題化することはないと考えられるけれども、一面 *A. fumigatus* にみられるように、菌株によつてはかなり高度の自然耐性細胞を含んでいる事実は、これらの薬剤使用による選択の結果とも十分考えられ、さらに変異による耐性化の点を考慮するとき、真菌の場合にも、おこりうる耐性化に対しては十分考慮をほらう必要があろう。

小 括

1) 病原真菌の新鮮分離株の薬剤感受性を nystatin, amphotericin B, trichomycin, variotin および merzonin の各抗真菌剤について検討した。*T. mentagrophytes*, *T. rubrum* はともに菌株による薬剤感受性が比較的均一であつたが、*A. fumigatus* は菌株間の差異が著しくあつた。

2) *A. fumigatus* について増量継代培養法によつて薬剤耐性の獲得を 80代にわたってしらべたが、上昇は認められなかつた。

3) *A. fumigatus* について、replica plating 法により同一菌株における耐性細胞の分布とその耐性の安定性を検討した結果、amphotericin B と trichomycin とに対して比較的高度の耐性を示す細胞が多く、nystatin, variotin および merzonin に対してはかかる細胞は少なかつた。これらの耐性細胞は薬剤無添加培地における 10 代の継代によつては、安定であつた。

III. 病原真菌の代謝活性におよぼす抗真菌性物質の影響について

すでに述べたように、抗真菌性物質の作用機序の研究は、最近その緒についたといつてよく、内外の文献をみ

るに, Lampen *et al.*^{18,19)}, Bradley *et al.*^{20—23)}, Osteux *et al.*²⁴⁾, 塚原^{25—27)}, Drouhet *et al.*^{28,29)} などの研究が散見するにすぎない。Drouhet *et al.*²⁹⁾ によれば polyene 系薬剤は O_2 uptake の上昇および蛋白, RNA, carbohydrate, polyphosphate reserves の合成阻害などかなり広範囲の代謝阻害をおこすものと報告しているが, かれら自身指摘しているように, このような広範囲の代謝阻害は必ずしも polyene 系薬剤の一次的作用点とは考えられず, むしろそれに随伴しておこってくる二次的作用の場として生ずるものと考えるべきで, 薬剤の作用機序を知るためには, この一次的作用点を解明しなければならない。

かかる見地から, われわれは一方で病原真菌の生理学的生化学的研究を進めるとともに, 抗真菌性物質の作用機序を解明する目的で生理学的生化学的方法により, 研究をおこなってきた。いまだ一次的作用点の解明にはいたらないが, 若干の興味ある知見をえたので報告する。

実 験

1. 薬剤: 目的に応じて, つぎの各種抗真菌剤のいくつかを選んで用いた。nystatin, amphotericin B, trichomycin, pentachlorophenol (PCP) および aureothricin の5種類。

なお対照としての抗細菌剤には chloramphenicol を用いた。

2. 使用菌株: つぎの2株を用いた。

Candida albicans C-a-6株: 肺カンジダ症患者の喀痰より分離。

Candida pseudotropicalis C-pt-1株: (Duke University 保存株, #1780)。

3. 実験方法: つぎの諸方法によった。

a. 内部呼吸およびブドウ糖利用能におよぼす抗真菌剤の影響の検討: *C. albicans* を Sabouraud 培地に35°C48時間培養し, その菌体を集め, $1/10$ M phosphate buffer (pH 7.0) により3回洗菌し, 最後に同一 buffer に適当な濁度に浮遊したものを菌液として用いた。

内部呼吸をみる場合は, これに薬剤を加え, ブドウ糖利用をみる場合には薬剤とブドウ糖を加えて, 型のごとく Warburg's manometer により O_2 uptake を計量した。なお反応の前後における生菌数を知るため, それぞれのサンプルを十分に洗菌してから適宜稀釈して Sabouraud 寒天平板で菌数を数えた。

b. リン酸代謝におよぼす抗真菌剤の影響の検討: 増殖過程ならびに非増殖過程における50%増殖阻止濃度の

図3. P分画法

薬剤存在下でのリン酸代謝の検討は, ^{32}P -phosphate を incorporate させ, 全菌体および各種の分画に取り込まれた ^{32}P の count を計測する方法によった。その概略は図3に示した。すなわち, 増殖過程としては, 培地 (半合成培地) (脚註*) に50%増殖阻止濃度の薬剤ならびに ^{32}P を約 0.1mc/l の割合で加え, あらかじめ Sabouraud 培地中で, 35°C36時間培養した *Candida* 細胞を $1 \times 10^6/\text{ml}$ 接種し, 35°C48時間振盪培養した。菌液は遠沈により集め, 上清に count および Biuret 反応性物質のなくなるまで洗菌してから sonic oscillator によつて菌体をこわし, その cell-free extract をとり, Schmidt and Thannhauser の変法によつて酸溶性-P, lipid-P, RNA-P, DNA-P, protein-P に分画し, 各分画の ^{32}P の取り込みを Geiger-Mueller counter により測定した。Schmidt and Thannhauser の方法³⁰⁾はいろいろな点で欠点が多く, とくに ^{32}P 取り込み実験には多くの難点のあることは周知の事実であるが, 方法がき

*脚註: 培地

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0 g
Na_2HPO_4	2.0 g
KH_2PO_4	0.35 g
NaCl	1.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
glucose	25.0 g
casein hydrolysate	10.0 g
aq. dest.	1,000 ml

わめて簡単であるので、欠点とされている諸点に改良を加えることにより本実験の目的には十分に使用しうることを確認できたのでこの方法によつた。図3の方法がそれで、図のごとく抽出の不十分なためにおこる分画の移行は、数回抽出を反復し、少なくとも抽出時の最終上清に ^{32}P が移行しないように check されている。非増殖過程における取り込みは上記半合成培地（脚註）と同一組成のものから casein hydrolysate およびブドウ糖を除いたものを用い、それに50%増殖阻止濃度の薬剤と ^{32}P -phosphate を加え、その中に Sabouraud 培地で35°C36時間培養した菌を適当な濁度に浮遊し、35°Cで2—3時間振盪し、 ^{32}P を取り込ませる方法によつた。分画の方法は増殖過程の場合と同じである。

c. アミノ酸の菌体内取り込みに対する抗真菌剤の影響の検討：この目的の実験は、50%増殖阻止濃度の薬剤存在下における ^{14}C -アミノ酸混合物の菌体内取り込み量によつて測定した。すなわち、pH 6.9の tris buffer に casein hydrolysate 0.5%, Mg acetate 4 mc moles/ml, MnCl_2 2 mc moles/ml, 50%増殖阻止量の薬剤、 ^{14}C -アミノ酸混合物 (algal protein hydrolysate, Radiochemical Center) 約0.01 mc c/ml を加えた反応液に、Sabouraud 培地で35°C、72時間培養後遠沈により洗菌した菌体を浮遊し、37°C 2時間反応させた。反応後十分に洗菌して上清にもはや ^{14}C -アミノ酸を含まないことを確認した上、菌体を適宜稀釈して gas flow counter によりその ^{14}C -count を計測した。本法はほぼ非増殖過程における全菌体による ^{14}C -アミノ酸の取り込み量を示

すものと考えられる。

成 績

1. 各種抗真菌剤の *Candida* に対する増殖阻止作用
nystatin, amphotericin B および PCP の *C. albicans* C-a-5 株と *C. pseudotropicalis* C-pt-1 株に対する50%増殖阻止濃度 (35°C24時間培養後の) は表12に示した。すなわち, amphotericin B が最も強く増殖を阻止した。*C. albicans* に対しては、ついで nystatin で、PCP は最も弱く、*C. pseudotropicalis* に対しては逆に PCP の方が nystatin よりやや強く増殖を阻止した。ただし、*C. pseudotropicalis* の方は3薬剤に対して感受性の差異が軽度であつた。

表12 抗真菌剤の *Candida albicans* ならびに *Candida pseudotropicalis* に対する50%増殖阻止濃度

薬剤 \ 菌株	<i>C. albicans</i> C-a-6 株	<i>C. pseudotropicalis</i> C-pt-1 株
Nystatin	0.95	1.4
Amphotericin B	0.20	1.0
Pentachlorophenol	1.1	1.2

註：表中の数値は35°C24時間培養後の50%増殖阻止濃度(γ/m)を示す。

2. *Candida* の呼吸におよぼす抗真菌剤の影響

nystatin, amphotericin B およびPCPの内部呼吸（外部から基質を加えない状態における O_2 uptake として表現）におよぼす影響を図4に示した。いずれも観察した120分間の範囲で50%増殖阻止濃度前後の薬剤の存

図4. *Candida albicans* の内部呼吸に対する Nystatin, Amphotericin B および Pentachlorophenol の影響

図5. *Candida albicans* の外部呼吸に対する Nystatin, Amphotericin B および Pentachlorophenol の影響

在によつてはなんら内部呼吸の阻害は認められず、薬剤濃度を50%増殖阻止濃度よりさらに高くしたときのみ軽度の増殖阻止が認められたにすぎない。

つぎに反応液に基質としてブドウ糖を加えた場合における O_2 uptake の量は図5に示すとおりである。50%増殖阻止濃度附近ではこの場合も殆んど影響がなく、nystatin, amphotericin B ではかなり高濃度でもさほど著るしい阻害を与えなかつた。PCP はやや趣きが異なり、高濃度ではかなりの阻害を示した。

以上の実験において反応の前後における生菌数を数えてみると、50%増殖阻止量ではいずれの場合も生菌数の減少はみられず、この点からみる限り、高濃度のPCPによる呼吸阻害は菌数減少によるものでなく、真の生菌あたりの呼吸阻害であり、また nystatin および amphotericin B によつては、生菌あたりの呼吸の促進はおこらないものと考えて差支えないものと思われる。

3. *Candida* のリン酸代謝におよぼす抗真菌剤の影響

非増殖過程における *C. pseudotropicalis* の全菌体による ^{32}P -phosphate の取り込みにおよぼす抗真菌剤の影響は表13に示した。表から明らかなごとく、polyene系薬剤(nystatin および trichomycin)では、50%増殖阻止濃度前後で単位重量の乾燥菌体あたりの ^{32}P -phosphate の取り込みの量が著るしく低下し、 ^{32}P -phosphate の菌体内への transport またはその後におけるリン酸代謝に著るしい阻害があるものと推測された。aureothricin および PCP では ^{32}P -phosphate の取り込みはほとんど影響がないかやや抑制的という程度で、この成績から

表13. 非増殖過程における *Candida pseudotropicalis* の ^{32}P 取り込みに対する抗真菌剤の影響

(1) 全菌体への ^{32}P 取り込み

反 応 系	取り込まれた ^{32}P の cpm/ml	乾燥菌体 mg/ml	菌 体 cpm/mg
対 照	6545	2.29	2860
+Nystatin 1 γ /ml	2119	"	924
+Trichomycin 2 γ /ml	1577	"	689
+Aureothricin 2 γ /ml	5191	"	2261
+Pentachlorophenol 1 γ /ml	5402	"	2361
+Chloramphenicol 50 γ /ml	7506	"	3281

表14. 非増殖過程における *Candida pseudotropicalis* のリン酸代謝におよぼす抗真菌剤の影響

(2) 酸溶性-P, Lipid-P, RNA-P, DNA-P および Protein-P への ^{32}P 取り込み

反応系	取り込まれた ^{32}P の cpm/mg dry cells			
分画	対 照	+Nystatin 2 γ /ml	+Pentachlorophenol 1 γ /ml	+Aureothricin 2 γ /ml
酸溶性-P	2538	959	1990	1175
Lipid-P	237	46	162	130
RNA-P	251	51	190	297
DNA-P	3	14	7	19
Protein-P	5	19	8	22
全菌体	2860	924	2361	2261

表15. 増殖過程における *Candida albicans* のリン酸代謝 (^{32}P 取り込み) に対する Nystatin Pentachlorophenol の影響

反応系 分画	取り込まれた ^{32}P の cpm/mg (dry cells)		
	対 照	+Pentachlorophenol 0.6 γ /ml	+Nystatin 0.6 γ /ml
全 菌 体	13158	5387	8921
酸溶性-P	6463	632	1181
Lipid-P	944	253	299
RNA-P	5998	3575	5865
DNA-P	288	451	779
Protein-P	428	455	776

はリン酸代謝の阻害の有無を云々することはできない。抗細菌剤 chloramphenicol は代表的な蛋白合成阻害剤として知られているが、*C. pseudotropicalis* の全菌体による ^{32}P -phosphate の取り込みには50 γ /ml の高濃度でもなら影響がみられなかった。

以上の結果から抗真菌剤、とくに polyene 系のそれらは ^{32}P -phosphate の取り込みを阻害するものと推測されたので、取り込まれた ^{32}P -phosphate の運命、すなわち、酸溶性-P, lipid-P, RNA-P, DNA-P および protein-P への取り込みの有無を検討してみた。

その結果は表14および表15のとおりで、それぞれ *C. pseudotropicalis* の非増殖過程、*C. albicans* の増殖過程についての結果である。いずれの例においても、nystatin においてとくに顕著な酸溶性-P 取り込み抑制がみられた。

一方非増殖過程における PCP においては軽度な低下しかみられないが、増殖過程において著明な減少を示しているので、やはり PCP にも酸溶性-P の減少をおこさせる作用があるものと推測される。酸溶性-P の他に lipid-P や RNA-P にも軽度の低下が認められるようであるが、分画法としての Schmidt and Thannhauser 法の欠点や、全菌体取り込みの絶対量の低下を考慮に入れるとき、少なくとも薬剤の一次的作用の場としての阻害という観点からは、とくに強調すべきものではないと考えられる。このことは他方これら高分子物質の合成に high energy の供給源として、またその構成要素として酸溶性-P 分画に属する各種の有機リン酸化合物が必要であることを考慮すれば、この程度の阻害を一次作用点として云々することは危険であろう。

つぎに増殖過程において、PCP, nystatin とともに DNA がやや増加しているようであり、これを全菌体取り込み

量に対する ratio としてみると、かなりの増加になるであろう。DNA 合成にも他の高分子物質の合成と同様に酸溶性-P に属する有機リン酸化合物が必要であり、その意味では合成阻害が認められてもよい筈であるという点を考慮すると、DNA 合成の促進があるようである。この点についてはさらに検討を加える予定である。

4. *Candida* のアミノ酸取り込みにおよぼす抗真菌剤の影響

^{14}C -アミノ酸混合物を用いて *C. pseudotropicalis* によって取り込まれる ^{14}C -アミノ酸の量に抗真菌剤がいかなる作用を示すかについては、表16に示した。表から明らかのように、単位重量の乾燥菌体あたりの ^{14}C -アミノ酸の取り込みは polyene 系薬剤 (nystatin, trichomycin) においては著明に、また aureothricin においては軽度に抑制された。しかし、PCP および chloramphenicol (50 γ /ml) では阻害がみられなかった。

表16. 非増殖過程における *Candida pseudotropicalis* の ^{14}C -アミノ酸取り込みに対する抗真菌剤の影響

反 応 系	取り込まれた ^{14}C cpm/ml	乾燥菌体 mg/ml	菌 体 cpm/mg
対 照	5984	2.29	2611
+Nystatin 1 γ /ml	2951	"	1289
+Trichomycin 2 γ /ml	1584	"	794
+Aureothricin 2 γ /ml	4704	"	2068
+Pentachlorophenol 1 γ /ml	6272	"	2738
+Chloramphenicol 50 γ /ml	6446	"	2808

考 察

抗真菌剤の作用機序の研究は近々数年にすぎず、Lampen *et al.* ^{18,19)} の研究に始まるといつて過言ではない。かれらは nystatin を用い、内部呼吸およびブドウ糖の利用をしらべ、これらが nystatin によって阻害されることを報告した。同時にかれらは濃度によつては O_2 消費が添加初期において促進されるが、ある時間が経過すると代謝がとまってしまうと述べている。その後の諸家の研究¹⁸⁻²⁵⁾ も主としてこの方面の研究が中心となつてゐるが、糖利用による外呼吸に関するかぎり、促進するという報告^{27,28)} と阻害するという報告¹⁸⁻²¹⁾ とがあり、一定

していない。Drouhet *et al.*²⁹⁾によれば、*C. albicans* に amphotericin B を作用させると O_2 uptake の促進がおこるが、呼吸の阻害は細胞の死滅による最終結果としておこるにすぎないという。しかるに、われわれのおこなった実験では、反応前後において生菌数の減少することのない濃度（50%増殖阻止量に近い濃度）で対照群と比較してみると、内部呼吸、ブドウ糖利用ともに阻害も促進も示していない。

このような各研究者による成績のくいちがいは、いかなる要因によるものであろうか。Drouhet *et al.* は上述の論文においてpHの影響を強調しているが、著者らのおこなった実験は、かれらのいう促進のおこる pH 範囲においてであることを考えると、pHのみで説明してしまうことはできないであろう。かれらの薬剤濃度がわれわれのそれに比してかなり高いことは注目に値するが、かれらの使った fungicidal effect の出現する量は実際の薬剤使用の場合の組織内濃度からみても、また正常の代謝系路の阻害された結果をわれわれが実験的に測定しているにすぎないという意味から考えても、適当な量であるとは考えられない。後述のごとく、これら薬剤の一次的作用点が酸溶性-Pの生成阻害にあると考えられるので、その二次的結果として現われてくる現象は微妙な実験条件の相異のために、正負逆転することも十分に考えられる。このことが研究者間のくいちがいの原因の一つともなっているであろう。

Drouhet *et al.* はその後リン酸代謝の研究から amphotericin B はリン酸塩の細胞内への transport を阻止するとし、さらに蛋白、RNA、carbohydrate および polyphosphate reserves の合成阻害もみられるが、これをむしろ呼吸の促進（そしておそらくはその奥にある ATP の ADP への分解促進）と結びつけて考えるべきだとしている。われわれはこれら高分子物質の合成阻害を一次的作用点の阻害に随伴しておこる二次的阻害であるとする考え方はきわめて妥当なものとするが、他方、われわれの polyene 系薬剤についての実験成績をみると、酸溶性-Pへの著明な ^{32}P 取り込み阻害と、RNA や lipid への軽度の取り込み阻害が認められる。このような酸溶性-Pへの ^{32}P の取り込みの阻害は phosphate transport の阻害も影響してくるとしても、果して ATP の分解促進と phosphate transport の阻害のみで説明してしまえるものが疑問なしとしない。呼吸の促進の有無についての各研究者の報告のくいちがいを考慮するとき、Drouhet *et al.* のいうように、呼吸促進に

一次的作用点を求め、ATP が分解して ADP になる結果、他の高分子物質の合成が阻害されるを考えるよりも、著者らは ATP も含めて酸溶性-P 分画に属するなにか有機リン酸化合物の生成が阻害される反応系に一次作用点を求め、二次的結果として高分子物質の合成が阻害されてくると考えることもできるのではないかと思う。著者らは抗真菌剤の存在によつてアミノ酸の取り込み阻害もおこることを知つたが、これも蛋白合成の阻害と結びつけて考えるべきものではなく、むしろアミノ酸の菌体内取り入れ (transport system) や高分子物質としての蛋白の合成に必要な high energy bond を提供すべき物質の生成阻害による二次的なものと考えた方が妥当であろう。

ともあれ、問題の焦点が酸溶性-Pに属する物質にあることについては、Drouhet *et al.* の結果と一致するところであり、問題はその一次的作用点がどこにあり、しかもそれが分解促進のためか生成阻害のためかということを決する点にあると考える。高分子物質の合成のわずかな阻害をもつて作用点を云々することは、代謝系路が入り乱れて、相互に feed back control がおこなわれている反応の場に代謝阻害物質たる抗真菌剤の作用が加わり代謝攪乱がおこる結果の一部をみている限り、きわめて危険であることはいふまでもなく、その意味で最終的な一次的作用点ということを目指して追求することが必要であると痛感し、目下とくに酸溶性-Pについて研究をつづけているが、詳細は追つて報告することにしたい。

小 括

抗真菌剤、とくに polyene 系の薬剤の抗真菌作用の作用点を知るため、生理学的生化学的方法を用いて 2, 3 検討をおこなった。

1) 内部呼吸およびブドウ糖の利用には50%増殖阻止濃度で、かつ反応前後に生菌数の低下のない条件では、ほとんど促進も抑制もうけなかった。

2) リン酸代謝を ^{32}P -phosphate の取り込みによつてしらべた結果では、polyene 系薬剤には全菌体への ^{32}P -phosphate の取り込み阻害が著るしく、分画した各画分の取り込み値からみると、酸溶性-Pへの高度の取り込み阻害と lipid-P や RNA-P への軽度の取り込み阻害が認められた。しかし、lipid-P や RNA-P への取り込みの低下は、全菌体および酸溶性-Pへの取り込み阻害の二次的影響によるものと考えられた。

3) ^{14}C -アミノ酸の全菌体内取り込みもまた抗真菌剤、なかんづく、polyene 系のそれらによつて阻害をうけ

た、これも酸溶性P代謝阻害の二次的結果と考えられる。

以上の結果を通じ、抗真菌剤の作用点は（少なくとも polyene 系では）リン酸塩の菌体内への transport および酸溶性-Pへの取り込みであり、他の現象、とくに高分子物質の合成阻害は、その二次的作用の結果であろうと推論された。

総 括

抗生物質、化学療法剤を含めた諸種の抗真菌性物質の作用機序を系統的に究明する研究の一環として、それらの物質の諸種病原真菌に対する抗真菌作用と形態学的影响との関連性、薬剤耐性および真菌の代謝活性におよぼす影響の観点より検討した。

抗真菌性物質のみならず、諸種の抗菌剤、消毒剤など多種の化合物について、病原真菌に対する抗菌作用と形態学的影响とを量的質的にしらべた結果、両作用の間には、かなり密接な一定の関連性が存在することを見出し、このことから諸種化合物を6群の範疇に分類しうることを示した。

griseofulvin の真菌形態に与える影響の著しいことは、周知の事実であるが、他の諸種化合物のなかにも大なり小なり、かかる作用を有するもののあることを明らかにした。

このような成績から、抗真菌性物質の属性として真菌形態に与える影響の重要性を強調し、さらに、抗真菌剤探索に際して、抗真菌作用のほかに形態への影響をしらべることの必要性を示した。

諸種病原真菌は試験管内増量継代培養法によつては、諸種抗真菌性物質に対して耐性を獲得しにくいということ、菌株によつてそれら諸種抗真菌性物質に対する感受性に著しい相異があり、かなり高い耐性を示すものがあること、また replica plating 法により同一菌株内に高度耐性の細胞がかなり高頻度に存在するということを認めた。かかる成績から、最近臨床的にみて諸種真菌症の諸種抗真菌剤に対する反応性が低下しているがごとき傾向のみられることと相俟つて、真菌の耐性化も楽観しえない問題であることを示唆した。

抗真菌性物質、とくに polyene 系薬剤の抗真菌作用の作用点を知るために、生理学的生化学的方法により検討をおこなつた。真菌の内部ならびに外部呼吸に対しては、50%増殖阻止濃度付近では促進的にも抑制的にも作用しなかつた。

真菌のリン酸代謝およびアミノ酸代謝におよぼす影響を、それぞれ ^{32}P -phosphate および ^{14}C -アミノ酸取り

込みについてしらべた結果では、少なくとも polyene 系抗菌剤の作用点は、リン酸塩の菌体内への transport および酸溶性-Pへの取り込み阻害にあり、他の現象、とくに高分子物質の合成阻害は、その二次的作用の結果であろうとの論に達した。

附記：本報告は昭和36年10月6日仙台市で開催された、第5回日本医真菌学会総会のシンポジウムにおいて発表したものである。その一部はすでに本誌1巻4号に発表したもので、本文からは除外したことをお断りしておく。

本研究に御指導を頂いた主任秋葉朝一郎教授に深甚の謝意を表す。また貴重な薬剤や菌株を分与された各位に衷心より謝意を表す。

文 献

- 1) Huges, W.H.: *Bacterial Anatomy*, p. 341, 1956.
- 2) 板垣史郎, 古川 稔, 木下祝郎: 細胞の増殖, 応用微生物研究所シンポジウム 第I集, p. 146, 1960.
- 3) Horsfall, J.G.: *Principles of Fungicidal Action*, p. 91, 1956.
- 4) Aytoun, R.S.C.: *Annals of Botany*, 20, 297, 1956.
- 5) 岩田和夫, 松田 明, 一色義人, 米倉幸夫: 真菌と真菌症, 1, 264, 1960.
- 6) 秦 藤樹, 松前昭広, 梁 慶雲: 第34回日本細菌学会総会口頭発表, 1961.
- 7) 松田 明, 蜂屋 昇, 川村良夫, 山中国夫: 第5回日本医真菌学会総会口頭発表, 1961.
- 8) Bauch, R.: *Naturwsschr.*, 29, 503, 1941.
- 9) Berliner, M.D. Olive, L.S.: *Science*, 117, 652, 1953.
- 10) 岩田和夫, 松田 明, 一色義人, 米倉幸夫: 真菌と真菌症, 1, 319, 1960.
- 11) 松田 明: *Chemoth.*, 8, 261, 1960.
- 12) Rosenthal, S.A. and Wise, R.S.: *A.M.A. Arch. Dermat.*, 81, 684, 1960.
- 13) Aytoun, R.S.C., Campbell, A.H., Napier, E. J. and Seiler, D.A.L.: *A.M.A. Arch. Dermat.*, 81, 650, 1960.
- 14) Robinson, R.C.V., Ferciot, T.N. and Robinson, H.M.: *A.M.A. Arch. Dermat.*, 81, 681, 1960.
- 15) 福島孝吉: 真菌と真菌症, 2, 3, 1960.
- 16) Roberts, C.F.: *J. Gen. Microbiol.*, 20, 540, 1959.
- 17) 安部英一: 皮膚と泌尿, 20, 724, 1958.
- 18) Lampen, J.O., Morgan, E.R. and Slocum, A. C.: *Federation Proc.*, 15, 295, 1956.

- 19) Lampen, J.O., Morgan, E.R. and Slocum, A. C.: J. Bact., 74, 297, 1957.
- 20) Bradley, S.G.: Antibiot. and Chemoth., 8, 282, 1958.
- 21) Bradley, S.G.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 98, 786, 1958.
- 22) Bradley, S.G.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 102, 82, 1959.
- 23) Bradley, S.G. and Jones, L.A.: Ann. New York Acad. Sci., 89, 122, 1960.
- 24) Osteux, R., Tran-Van-ky and Biguet, J.: Compt. rend. acad. Sci., 247, 2475, 1958.
- 25) 塚原 徹: J. Antibiot., ser. B., 10, 243, 1957.
- 26) 塚原 徹: J. Antibiot., ser. B., 11, 169, 1958.
- 27) 塚原 徹: J. Antibiot., ser. B., 11, 287, 1958.
- 28) Drouhet, E., Hirth, L. and Lebeurier, G.: Compt. rend. acad. Sci., 247, 2416, 1958.
- 29) Drouhet, E., Hirth, L. and Lebeurier, G.: Ann. New York Acad. Sci., 89, 134, 1960.
- 30) Schmidt, G. and Thannhauser, S.J.: J. Biol. Chem., 161, 83, 1945.

Summary

A study was conducted to determine the mode of action of antifungal agents in respect to the relationships between the antifungal activities and morphological effects, drug resistance and their effects on the metabolism of pathogenic fungi. The results obtained were as follows:

The antifungal activities and morphological effects of 36 compounds were tested against 8 different strains of pathogenic fungi, such as *Trichophyton*, *Aspergillus*, *Candida*, etc. by the agar plate-streaking method. These compounds can be classified into 6 groups in terms of the relationships between the antifungal activities and morphological effects. Several compounds which showed strong antifungal activity exhibited a griseofulvin-like action on the fungi, a morphologic change. In view of such results obtained, the examination of an in vitro antifungal activity of drugs should be tested in addition to observing any morphologic changes which occur.

The newly isolated strains of fungi were first examined for their susceptibility to nystatin, amphotericin B, trichomycin, variotin and merzonin; *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* and *Aspergillus fumigatus* showed, more or less, differences in susceptibilities to these drugs. The differences in susceptibilities observed may have depended upon the strains employed; *A. fumigatus* was especially conspicuous in this sense. All of the test drugs employed did not produce a significant degree of increase to resistance in all strains of *A. fumigatus* tested. The population of the resistant cells of *A. fumigatus* was determined by the replica plating method. Cells which were highly resistant to amphotericin B or trichomycin were much more numerous than those resistant to nystatin, variotin or merzonin, and the drug resistance of these isolated cells were stable as demonstrated by ten successive transfers on drug-free agar media. Thus, it might be concluded that the pathogenic fungi have a difficulty in acquiring drug resistance to antifungal agents; however, the existence of highly resistant strains and cells may demonstrate the acquisition of an increase in drug resistance, similar to bacteria and other microorganisms, if such drugs were to be used extensively.

The effects of antifungal agents, especially polyene antibiotics, such as nystatin, trichomycin and amphotericin B, and, also, for comparison, pentachlorophenol, a synthetic drug, on the metabolism of *Candida albicans* or *Candida pseudotropicalis* were investigated in preliminary experiments in order to determine the primary action of these antifungal agents. The endogenous respiration, the O₂ uptake by the utilization of glucose, the ³²P-phosphate incorporation into the cells and into several kinds of metabolites, and the incorporation of ¹⁴C-amino acids mixture into the cells were examined in the presence of antifungal agents of concentration which inhibited the growth of 50% or more cells. Neither stimulation nor inhibition was observed in the endogenous respiration and the O₂ uptake by the oxidation of glucose in the presence of the employed drugs. The incorporation of ³²P-phosphate into the cells was markedly suppressed by these drugs, especially by the polyene antibiotics. Marked suppression of the incorporation of ³²P-phosphate into the TCA-soluble fraction and a slight inhibition of it into the phospholipid and RNA fractions were demonstrated. The incorporation of ¹⁴C-amino acids into the cells was also inhibited.

From these results, the primary action of the polyene antibiotics may be ascribed to inhibiting

the transport of phosphate into the cells and the formation of some organic phosphate substances belonging to the TCA-soluble fraction. The inhibitions of phosphate incorporation into high molecular metabolites and of the amino acids incorporation into the cells may be regarded as the secondary effects arising from these antifungal agents. These inhibitions would appear through the primary actions of the phosphate transport and the metabolism of organic phosphate substances belonging to the TCA-soluble fraction.