薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
106 (2) 248-256 (1986)

皮膚真菌症の実験化学療法的研究 (第 10 報¹⁾) Propiolic Acid (β -Naphthyl)methyl Ester の抗真菌作用機序の検討

前田利男,^{*,a} 松井貞良,^a 林 真知子,^a 山添 寛,^b 林 栄一^b

静岡薬科大学,^a 静岡女子短期大学^b

Studies on the Experimental Chemotherapy for Dermatomycosis and Candidiasis. X.¹⁾ Mechanism of Antifungal Action of Propiolic Acid (β -Naphthyl)methyl Ester

TOSHIO MAEDA,^{*,a} SADAYOSHI MATUI,^a MACHIKO HAYASHI,^a
HIROSHI YAMAZOE^a and EIICHI HAYASHI^b

Shizuoka College of Pharmaceutical Sciences,^a 2-2-1 Oshika,
Shizuoka, 422, Japan, Shizuoka Women's College,^b 3-2-3
Nunohashi, Hamamatsu, 432, Japan

(Received September 14, 1985)

The mechanism by which propiolic acid (β -naphthyl) methyl ester (PNE) caused an antifungal action on *Candida albicans* was studied. PNE inhibited the growth of *C. albicans*, and minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration were 6.25 μ g/ml and 12.5 μ g/ml, respectively. PNE at concentrations causing an antifungal action strongly inhibited the endogenous respiration, the exogenous respiration utilizing glucose, succinate, citrate and pyruvate, the uptakes of [³H]leucine and [³H]adenine into cells, the incorporation of [³H]leucine into trichloroacetic acid-precipitated fraction and the incorporation of [³H]adenine into HClO₄-precipitated fractions. However, the inhibitory actions of PNE were not observed in cell free system. During the incubation of *C. albicans* with PNE (12.5—25 μ g/ml), 20—30% of intracellular K⁺ was leaked, but leakages of protein and 260 nm-absorbing materials were not observed. On the electromicroscopic observations, the surface of *C. albicans* was smooth and, 1 h after the treatment with PNE (12.5 μ g/ml), that was changed to be rough. After 24 h, big depressions were found in almost fungi. These results suggested that PNE caused a damage in cell membrane of *C. albicans* and that, as the results, the leakage of intracellular K⁺ and decrease in various metabolic functions of *C. albicans* occurred.

Keywords—propiolic acid (β -naphthyl)methyl ester; *Candida albicans*; antifungal action; membrane damage; K⁺ leakage; respiration; metabolic function

天然物から分離された acetylene 化合物の Capillin²⁾ や Cellocidin³⁾ が抗菌活性を示すことが報告されている。また、化学的に合成された acetylene 系化合物のうち Haloprogyn (2,4,5-trichlorophenyl 3-iodo-2-propynyl ether)⁴⁾ は人体の病原性真菌に対する治療薬として実用に供されている。著者らは、新たに acetylene 系化合物 40 種を合成し、これらの化合物の真菌類に対する抗菌試験を行った結果、propiolic acid (β -naphthyl) methyl ester (PNE) が皮膚糸状菌に対し強力な抗菌活性を示すことを認めた。⁵⁾ そこで、今回は PNE の抗真菌作用機序を *Candida albicans* を用いて検討した。

実 験 方 法

1) **試験物質** PNE は水に難溶なため、10 mg/ml の濃度で 70% ethanol に溶解したものを用時滅菌蒸留水あるいは培地で希釈して用いた。各実験系における ethanol 濃度は 0.35% 以下になるよう調整した。PNE の諸性質の詳細については前報に記した。⁶⁾

2) **供試菌株** *C. albicans* IFO 1296 を試験菌として用いた。

- 3) 菌浮遊液の調製 抗菌力測定のための実験を除き、菌浮遊液を以下の方法で調製し、実験に供した。Sabouraud dextrose 寒天培地で培養 (30°C) 後一週間以内の菌 (新鮮培養菌) の 10 白金耳を Sabouraud dextrose broth 培地に接種し、37°C, 24 時間振盪培養した。遠心集菌し、脱イオン水で洗浄後 $1-4 \times 10^8$ 細胞/ml の濃度で 0.04 mM KH_2PO_4 に浮遊して菌浮遊液とした。
- 4) 静止菌の調製 新鮮培養菌の 10 白金耳を Sabouraud dextrose broth 培地 500 ml に接種し、37°C, 48 時間振盪培養した。遠心集菌し、脱イオン水で洗浄後、 10^8 細胞/ml の濃度で脱イオン水に懸濁し、30°C, 48 時間スターベーションした。遠心集菌、洗浄後、脱イオン水に $1-4 \times 10^8$ 細胞/ml の濃度で浮遊させ、静止菌として実験に供した。
- 5) 菌ホモジネートの調製 静止菌 (湿重量 10 g) を 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) 10 ml 及びガラスビーズ (0.45—0.50 i.d.) 20 g と Braun homogenizer で 30 秒間、4 回ホモジナイズ後さらに同 buffer を 30 ml 添加し、混和した。20 分間静置後、その上清を菌ホモジネートとして実験に供した。
- 6) ミトコンドリア分画の調製 菌ホモジネートを 1000 g で遠心分離し、その上清を 10000 g で遠心分離して得た沈殿を 0.1 M phosphate buffer に懸濁してミトコンドリア分画として実験に供した。
- 7) 抗菌活性の測定 新鮮培養菌の 5 白金耳を 2 ml の生理食塩水に懸濁し、約 20 個のガラスビーズ (約 2 mm i.d.) と激しく攪拌した。生理食塩水を 10 ml 添加し、20 分間静置した後、その上清 50 μl (2×10^4 細胞) をあらかじめ Sabouraud dextrose broth 培地で調製した薬物の 0.39 $\mu\text{g/ml}$ から 50 $\mu\text{g/ml}$ の 2 倍希釈系列 (各 2 ml) に添加した。30°C, 48 時間培養後、各菌液の 600 nm における透過率を分光光度計 (日立 100—20) により測定し、菌体数を算出した。
- 8) 生存率に及ぼす影響の検討 菌浮遊液 50 μl (2×10^6 細胞) を種々の濃度の薬物を含む生理食塩水 3 ml に添加し、37°C でインキュベートした。一定時間後、100 μl を生理食塩水で 100 倍に希釈した。ついで、その 100 μl を Sabouraud dextrose 寒天培地に塗布し、30°C, 48 時間培養後、生育したコロニー数から生菌数を算定した。
- 9) 呼吸測定法 Warburg 検圧法によった。検圧計容器内の主室に菌液、菌ホモジネートあるいはミトコンドリア分画 ($1-3 \times 10^8$ 細胞あるいは相当量) を 2 ml、副室に 20% KOH を 0.2 ml、側室に薬物、呼吸基質及び緩衝液を 0.5 ml 入れ、37°C, 10 分間の温度平衡後、毎分 105 回の振盪下で大気を気相として酸素消費量を測定した。
- 10) 放射性化合物の細胞内取込みの測定 菌浮遊液 (10^8 細胞) を 1 ml の 10 mM glucose, 0.4 mM KH_2PO_4 及び [^3H]adenine (5 mM, 1 $\mu\text{Ci/ml}$) あるいは [^3H]leucine (5 mM, 1 $\mu\text{Ci/ml}$) と一定時間インキュベート後、氷冷して反応を停止した。菌を遠心分離し、3 ml の生理食塩水で 3 回洗浄後、5 ml のシンチレーター (toluene 666 ml, Triton X-100 334 ml, DPO 2 g, POPOP 0.2 g) に懸濁、放射活性を液体シンチレーションカウンタ (Aloka 602) で測定した。
- 11) 放射性化合物の高分子化合物への取込みの測定 菌浮遊液あるいはホモジネートを 10) と同様にしてインキュベートし、反応を 1 ml の 20% HClO_4 ([^3H]adenine) あるいは 20% trichloroacetic acid ([^3H]leucine) で停止した。遠心分離して得た沈渣を同液で 2 回、精製水で 1 回洗浄後、その放射活性を 10) と同様にして測定した。
- 12) 細胞内成分漏出の検討 菌浮遊液 (10^8 細胞/ml) 1 ml に種々の濃度の薬物を添加し、37°C で一定時間インキュベートした。菌を遠心分離し、脱イオン水で 2 回洗浄後、 K^+ 、260 nm-吸収物質及びタンパクの細胞内残存量を下記のごとく測定した。
- K^+ の測定試料には等量の 4 N HCl を加えて 100°C, 10 分間抽出、ついで冷却後、遠心分離し、上清中の K^+ を atomic absorption spectrophotometer (Hitachi 518) により測定した。同一時間に採取した薬物無添加試料と薬物添加試料中の残存量の差を薬物による K^+ の漏出量とした。
- 260 nm-吸収物質及びタンパクの測定試料には 10% HClO_4 を加え、90°C, 10 分間抽出し、冷却後遠心分離した。上清は 260 nm における吸光度を測定した (260 nm-吸収物質)。沈渣は ethanol-ether 混液 (3:1, v/v) で 1 回洗浄後、1 ml の 1 N NaOH に溶解し、Lowry らの方法⁷⁾ でタンパク量を測定した。いずれの場合も、同一時間に採取した薬物無添加対照試料と薬物添加試料中の残存量の差を薬物による漏出量とした。

13) 走査電子顕微鏡による検討 菌浮遊液 (2×10^6 細胞) を一定濃度の薬物を含む Sabouraud dextrose broth 培地 3 ml 中で 1, 3 及び 24 時間インキュベートした後、遠心集菌し、脱イオン水で 2 回、0.1 M phosphate buffer で 1 回洗浄した。得られた菌を大隅らの方法により脱水、固定、乾燥した。⁸⁾ 乾燥した菌に Ion Sputter (JFC-1100, 日本電子) で金を蒸着した後、走査電子顕微鏡 (JSM-F15, 日本電子) で形態を観察した。

14) 使用薬物 Sabouraud dextrose broth 及び Sabouraud dextrose agar (DIFCO), [^3H]leucine 及び [^3H]adenine (New England Nuclear), Triton X-100 (半井化学), glucose, sodium citrate, sodium succinate, sodium pyruvate, trichloroacetic acid, HClO_4 , toluene, 2,5-diphenyloxazole, 1,4-bis-[2-(5-phenyloxazolyl)] benzene, osmic acid, glutaraldehyde, iso-amyl acetate 及びその他の試薬 (和光純薬)。

実験結果

C. albicans に対する抗菌活性

Fig. 1 に PNE 及び対照薬として用いた pentachlorophenol (PCP) の *C. albicans* に対する抗菌試験の結果を示した。PNE は $3.13 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で *C. albicans* の発育抑制作用を示し、最小発育阻止濃度 (MIC) は $6.25 \mu\text{g/ml}$ であった。一方、PCP は $1.56 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で *C. albicans* の発育を抑制し、MIC は $25 \mu\text{g/ml}$ であった。

Fig. 1. Fungistatic Effects of PNE and PCP on *C. albicans*

C. albicans was cultivated in Sabouraud dextrose broth containing PNE (○) and PCP (●) at 37°C for 48 h and numbers of cells were measured.

生菌数に及ぼす影響

C. albicans を被検薬物と一定時間インキュベートし、生菌数を測定した。 $6.25 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度の PNE と一時間インキュベートした場合、明らかな生菌数の減少がみられた。また、 $12.5 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度の PNE と 24 時間インキュベートした場合には生菌数は 1% 以下に減少した (Fig. 2)。一方、PCP の $12.5 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で生菌数の減少がみられ、24 時間インキュベートした場合、生菌数は 10% 以下に減少した (Fig. 2)。

呼吸に対する影響

被検薬物を作用させた静止菌の酸素消費量の経時の変化を Fig. 3 に、また被検薬物作用後 60 分間の酸素消費量を Table I に示した。静止菌においても

Fig. 2. Fungicidal Effects of PNE and PCP on *C. albicans*

C. albicans was incubated with (3.13 – $50 \mu\text{g/ml}$, ●) or without (○) PEN (left) and PCP (right) at 37°C for the indicated time and after dilution to 100 fold, an aliquot was cultivated on Sabouraud dextrose agar at 37°C for 24 h. Numbers of colonies on the agar were counted for the numbers of viable cells.

Fig. 3. Inhibitory Effect of PNE on O₂ Uptake of *C. albicans*

O₂ uptake by *C. albicans* in the absence (A) and presence (B) of 20 mM glucose was measured during an incubation with (1—40 μg/ml, ●) or without (○) PNE at 37°C for 60 min by Warburg apparatus as described in Method and Materials.

TABLE I. Inhibitory Effects of PNE and PCP on Respiration of *C. albicans*

Drugs (μg/ml)	O ₂ uptake (μl/mg protein/h)	
	Endogenous	+glucose
0	40.0±5.56	72.6±4.20
PNE 0.4	30.9±2.03 (22.7%)	64.8±1.68 (10.7%)
1.0	22.8±1.12 (42.9%)	60.3±2.54 (17.0%)
2.0	19.2±2.55 (51.9%)	44.4±4.10 (38.8%)
4.0	16.3±1.85 (59.3%)	26.8±4.07 (63.1%)
10.0	7.7±1.11 (88.8%)	15.8±2.34 (78.3%)
PCP 10	35.5±5.61 (11.2%)	68.8±6.65 (5.3%)
40	29.2±3.54 (27.1%)	47.4±1.10 (34.7%)

O₂ uptake by *C. albicans* starved for 48 h was measured during incubation with PNE and PCP for 60 min in the absence and presence of 20 mM glucose as described in Fig. 3. Each value represents mean±S.E.M. of O₂ uptake in five separate experiments and that in parentheses represents inhibition percent of O₂ uptake by the drugs.

呼吸基質の非存在下で呼吸（自家呼吸）が認められた。PNE は 0.4 μg/ml の濃度から濃度依存的に自家呼吸を抑制し、10 μg/ml の濃度では 90% の抑制率を示した。PCP の呼吸抑制作用は PNE と比較して弱く、高濃度においてのみ認められた。

一方、呼吸基質として 20 mM glucose を添加した場合、静止菌の呼吸（外呼吸）は自家呼吸と比較して約 80% 増加した。PNE の外呼吸に対する抑制作用は自家呼吸の場合と比較して低濃度（0.4—2.0 μg/ml）で若干低下する傾向にあったが、高濃度（4.0—10.0 μg/ml）ではほぼ同程度であった。PCP の外呼吸に対する抑制作用は弱かった。

また、呼吸基質として 20 mM pyruvate, citrate 及び succinate を添加した場合の酸素消費量はそれぞれ自家呼吸の 1.5 倍、1.6 倍及び 4 倍に増加した。PNE はこれらの呼吸を 73—84% とほぼ一率に抑制した (Table II)。

そこで静止菌を Braun's homogenizer で破碎し、そのホモジネート及びミトコンドリア分画の酸素消費に対する PNE の作用を検討した。PNE は *C. albicans* のホモジネート及びミトコンドリア分画の自家呼吸を抑制しなかった。また、PNE は呼吸基質として glucose, pyruvate, citrate 及び succinate を添加した場合の外呼吸に対しても抑制作用を示さなかった。

また、対数増殖期の菌に PNE を作用させたところ、PNE は静止菌と同程度に自家呼吸を抑制した。

放射性化合物の菌体内取込みに及ぼす影響

C. albicans を [³H]leucine 及び [³H]adenine と 1 時間インキュベートしたところ、[³H]leucine 及び [³H]adenine の菌体内への取込みは時間とともに増加した (Fig. 4B, 5B)。PNE はこれら化合物の取込みを 3.13—25.0

TABLE II. Inhibitory Effect of PNE on Respiration of *C. albicans* in the Presence of Various Substrates

Substrate	O ₂ uptake (μ l/mg protein/h)		Inhibition (%)
	Control	PNE (25 μ g/ml)	
None	38.8 $\pm$ 2.55	8.1 $\pm$ 0.93	79
Glucose	67.9 $\pm$ 3.99	14.9 $\pm$ 0.90	78
Pyruvate	59.3 $\pm$ 6.35	16.0 $\pm$ 1.20	73
Citrate	62.2 $\pm$ 7.35	10.0 $\pm$ 0.80	84
Succinate	155 $\pm$ 13.3	32.6 $\pm$ 2.28	79

O₂ uptake by *C. albicans* starved for 48 h was measured in the presence of PNE (25 μ g/ml) and various substrate for 60 min. Each value represents mean $\pm$ s.e.m. of three separate experiments.

μ g/ml の濃度で濃度依存的に抑制した (Fig. 4B, 5B). 一方, PCP は PNE と比較して若干弱い, PNE と同様の抑制作用を示した (Fig. 4D, 5D).

タンパク合成に及ぼす影響

C. albicans を [³H]leucine と 1 時間インキュベートし, *C. albicans* の trichloroacetic acid-不溶性物質への取

Fig. 4. Inhibitory Effects of PNE and PCP on Uptake of [³H]Leucine into Cells and Trichloroacetic Acid-Precipitated Fraction

C. albicans was incubated with PNE (3.13–25 μ g/ml, A and B) or PCP (3.13–25 μ g/ml, C and D) in phosphate buffer containing 5 mM [³H]leucine (1 μ Ci/ml) for 60 min. After washing the fungi, radioactivity in cells (B and D) and trichloroacetic acid-precipitated fraction (A and C) were measured as described in Methods and Materials.

Fig. 5. Inhibitory Effects of PNE and PCP on Uptake of [^3H]Adenine into Cells and HClO_4 -Precipitated Fraction

C. albicans was incubated with PNE (3.13–25 $\mu\text{g/ml}$, A and B) or PCP (3.13–25 $\mu\text{g/ml}$, C and D) in phosphate buffer containing 5 mM [^3H]adenine (1 $\mu\text{Ci/ml}$) for 60 min. After washing the fungi, radioactivity in cells (B and D) and HClO_4 -precipitated fraction (A and C) were measured as described in Methods and Materials.

込みを指標としてタンパク合成に及ぼす影響を検討した。*C. albicans* により菌体内に取込まれた [^3H]leucine の約 40% がタンパク分画で検出され、この取込み (タンパク合成) は時間とともに増加した。PNE はタンパク合成を 3.13–25.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で濃度依存的に抑制した (Fig. 4A)。一方、PCP は PNE と比較して弱い抑制作用を示した (Fig. 4C)。

次に、*C. albicans* のホモジネートを用い PNE のタンパク合成に対する影響を同様の実験で検討した。菌ホモジネートによる [^3H]leucine の trichloroacetic acid-不溶性物質への取込みは 30 分後 2604 dpm, 60 分後 8931 dpm であった。PNE はこのタンパク合成には何ら影響を及ぼさなかった。

核酸合成に及ぼす影響

C. albicans を [^3H]adenine と 1 時間インキュベートし、[^3H]adenine の HClO_4 -不溶性分画への取込みを指標として核酸合成に及ぼす被検薬物の影響を検討した。*C. albicans* により菌体内に取込まれた [^3H]adenine の約 1% が核酸分画で検出され、この取込み (核酸合成) は時間とともに増加した。PNE は核酸合成を 3.13–25.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で濃度依存的に抑制した (Fig. 5A)。一方、PCP は PNE と同程度の抑制作用を示した (Fig. 5C)。

次に、*C. albicans* のホモジネートを用い PNE の核酸合成に対する影響を同様の実験で検討した。菌ホモジネートによる [^3H]adenine の HClO_4 -不溶性分画への取込みは、30 分後 1535 dpm, 60 分後 4481 dpm であった。

Fig. 6. Effect of PNE on Leakage of K⁺ in *C. albicans*

C. albicans was incubated with (●, 12.5 and 25 $\mu\text{g/ml}$) and without (○) PNE for the indicated time. After washing, cells were heated in 4N HCl. K⁺ in the supernatant was measured by atom absorbing spectrophotometer.

PNEはこの核酸合成には何ら影響を及ぼさなかった。

菌体内成分の漏出に及ぼす影響

C. albicans を被検薬物とインキュベートし、一定時間後菌体内のタンパク、260 nm-吸収物質及び K⁺ 残存量を測定することにより菌体内成分の漏出量を測定した。PNE 処理した菌においてタンパク及び 260 nm-吸収物質の残存量の減少、すなわち漏出は認められなかった。一方、K⁺ は PNE の 12.5—25.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で漏出がみられ、60 分後の漏出量は 18% (12.5 $\mu\text{g/ml}$) 及び 30% (25.0 $\mu\text{g/ml}$) であった (Fig. 6)。PCP による細胞内成分の漏出は認められなかった。

PNE 処理菌の走査電子顕微鏡による観察

C. albicans を PNE と 1—24 時間インキュベートし、菌体の形態の変化を観察した。薬物非処理菌では表面がなめらかな球状であったが (Fig. 7A), PNE 処理 1 時間後には多数の菌の表面で凹凸が認められた (Fig. 7B), また、24 時間後では細胞壁が大きく陥没した菌が多数認められた (Fig. 7C, D)。

Fig. 7. Scanning Electron Microphotographs of *C. albicans*

A, Control; B, treated with PNE (12.5 $\mu\text{g/ml}$) for 3 h; C and D, treated with PNE (12.5 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h.

考 察

Acetylene 化合物が抗菌作用を示すことが知られている。そこで acetylene 化合物を各種合成し、抗菌活性を検討したところ、PNE が最も強い活性を示した。PNE は特に真菌類に対する作用が強く、モルモットにおける実験的真菌症に対しても有効であった。本研究では *C. albicans* を対象として抗菌作用機序を検討した。

PNE は 1.56 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では *C. albicans* の発育を全く抑制しなかったが、3.13 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で *C. albicans* の発育を抑制しはじめ、6.25 $\mu\text{g/ml}$ で完全に発育を抑制した。一方、対照薬として用いた PCP は 1.56 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で *C. albicans* の発育抑制作用を示しはじめ、25 $\mu\text{g/ml}$ で完全な発育抑制作用を示した。このように、PCP の発育抑制作用は比較的低濃度からはじまり、濃度依存的に徐々に強くなったのに対し、PNE の場合濃度の上昇とともに急激な作用の増強がみられた。PNE と PCP の作用の違いは殺菌作用でもみられた。PCP の殺菌作用は発育抑制作用を示す低濃度 (1.56—6.25 $\mu\text{g/ml}$) では認められず、高濃度 (25 $\mu\text{g/ml}$) でのみ認められたことから PCP の発育抑制作用は静菌作用によるものと考えられる。これに対し、PNE は発育抑制作用を示す濃度で既に殺菌作用を示した。したがって、PNE の発育抑制作用は静菌作用というより殺菌作用によるものと考えられる。

同じ acetylene 化合物である Haloprogin の *C. albicans* に対する作用は Harrison & Zygmunt により検討され、⁹⁾ その抗菌作用は本研究で認められた PNE の作用と同程度であった。彼らの報告によれば、Haloprogin は *C. albicans* に対し強い呼吸阻害作用及び K^+ 漏出促進作用を示し、一方、uridine の ribonucleic acid への取込み及び leucine のタンパクへの取込みに対する阻害作用は軽度であったことから、Haloprogin の *C. albicans* に対する抑制作用は呼吸阻害及び (もしくは) 細胞膜障害に起因すると推察された。

本研究において PNE は *C. albicans* の発育抑制作用を示す濃度で自家呼吸及び種々の基質を利用した外呼吸を抑制した。この PNE の呼吸抑制作用は不可逆的で、PNE 作用後の菌を洗浄しても呼吸は回復しなかった。しかしながら、PNE の呼吸抑制作用は無細胞系のホモジネート及びミトコンドリア分画では認められなかった。抗真菌剤である siccanin¹⁰⁾ や pyrrolnitrin¹¹⁾ は菌の呼吸系を直接抑制することにより抗真菌作用を示すことが知られているが、これらの薬物は無細胞系においても呼吸抑制作用を示す。したがって、PNE による *C. albicans* の呼吸能の低下は呼吸系及び糖質代謝系に対する直接の抑制作用によるものではなく、PNE の作用に基づく二次的結果であると推察される。

また、PNE は *C. albicans* の発育抑制作用を示す濃度で [^3H]leucine のタンパク分画への取込み及び [^3H]adenine の核酸分画への取り込みを抑制した。しかし、この PNE の抑制作用は無細胞系では認められなかった。PNE のタンパク合成及び核酸合成に対する抑制作用は各々の基質の菌体内への取込み抑制作用とパラレルであり、したがって、PNE の作用は合成系に対する直接的抑制によるものではなく、基質の菌体内への取込み抑制に起因すると思われる。

一方、PNE を作用させた菌ではタンパク及び 260 nm-吸収物質の菌体外への漏出は認められなかったが、 K^+ の漏出が認められた。このことは PNE が *C. albicans* の細胞膜障害作用を有することを示唆している。ところで、polyene 系抗生物質の抗真菌剤も真菌の細胞膜障害作用を示し、菌体内成分の漏出を惹起することはよく知られている。^{12,13)} その細胞膜障害作用と薬物の構造との関係については詳細に検討され、小さな分子の polyene 化合物 (filipine) により種々の菌体内物質 (K^+ 、アミノ酸、糖、リン酸、有機酸、ヌクレオチド等) の漏出がみられるが、大きな分子の polyene 化合物 (succinylperimycin) では K^+ の漏出のみがみられることが明らかにされた。¹²⁾ 一方、clotrimazole 等の imidazole 化合物を真菌類に作用させると菌体内のタンパク、260 nm-吸収物質及び K^+ の著明な菌体外への漏出が認められる。¹⁴⁾ このように、細胞膜の障害の程度により漏出される菌体内物質は異なり、障害が強いほど大きな分子の漏出がみられる。PNE の場合、タンパクや 260 nm-吸収物質といった大きい分子の漏出は認められないことから、その細胞膜障害作用は大きな分子の polyene 化合物と類似した K^+ の漏出のみが生ずる小さな “pore” を形成するためと推察される。

PNE を作用させた *C. albicans* の電子顕微鏡による観察でも初め菌体表面の凹凸がみられ、ついで大きな陥没が認められた。この所見は PNE が *C. albicans* の細胞膜に何らかの作用をしていることを示唆している。Clotrimazole や econazole を作用した菌でも同様な菌体表面の変化が報告されている。¹⁵⁾ したがって、*C. albicans*

の形態の観察においても PNE は imidazole 化合物と類似した細胞膜障害作用を示すことが示唆された。

Polyene 化合物の抗真菌作用は細胞膜障害による菌体内成分の漏出に起因するが、特に K^+ の漏出により細胞内部環境の酸性化とそれに起因する細胞水解酵素の活性化が生じ、その結果、種々の機能の低下が生ずることが示唆されている。¹²⁾ PNE は *C. albicans* の呼吸、糖質代謝、タンパク合成、核酸合成及び基質の取込み等の機能を抑制したが、PNE の作用は無細胞系では認められなかったことから、これらの作用は細胞膜障害の結果生ずる二次的なものと推察される。結局、PNE は *C. albicans* の細胞膜に作用し、 K^+ のような小分子のみの漏出が生ずる膜構造の変化を惹起することにより抗菌作用を示すと考えられる。Polyene 化合物の細胞膜障害作用は膜ステロールとの相互作用による“pore”の形成に起因することが示されているが、¹⁶⁾ PNE の分子レベルでの膜に対する作用はさらに詳細な検討がなされなければならない。

謝辞 *C. albicans* の走査電子顕微鏡用標本の作製及び観察に関し御指導、御助言いただきました静岡薬科大学微生物学教室 柳原保武教授に深謝致します。 K^+ の測定に御協力いただきました静岡薬科大学産業衛生学教室 山口正義助手に感謝致します。

引用文献

- 1) 第9報：松井貞良，山添 寛，渡辺一幹，林 栄一，紺屋一美，薬誌，**104**，1198 (1984)。
- 2) 今井統雄，薬誌，**76**，405 (1956)；今井統雄，池田信一，田中喜一郎，菅原真一，*ibid.*，**76**，397 (1956)；今井統雄，池田信一，田中喜一郎，菅原真一，*ibid.*，**76**，400 (1956)。
- 3) S. Suzuki, K. Okuma, *J. Antibiot.* (Tokyo), *Ser. A*, **11**, 84 (1958)。
- 4) S. Seki, B. Nomiya, K. Nishihata, T. Koeda, K. Umemura, M. Oda, H. Ogawa, *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **1963**, 569 (1964)；S. Seki, K. Nishihata, T. Nakayama, H. Ogawa, *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 150 (1963)。
- 5) 第7報：山添 寛，林 真知子，林 栄一，松井貞良，紺屋一美，薬誌，**102**，278 (1982)。
- 6) 第8報：山添 寛，松井貞良，岡田忠彦，林 真知子，林 栄一，薬誌，**103**，455 (1983)。
- 7) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randal, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1980)。
- 8) 大隅正子，“図説走査電子顕微鏡，”永谷 隆，田中敬一 編，朝倉書店，1980，p. 266。
- 9) E. F. Harrison, P. Zwadyk, Jr., R. J. Bequette, E. E. Hamlow, P. A. Tavormina, W. A. Zygmunt, *Appl. Microbiol.*, **19**, 746 (1970)；E. F. Harrison, W. A. Zygmunt, *Can. J. Microbiol.*, **20**, 1241 (1974)。
- 10) K. Ishibashi, *J. Antibiotics*, **15A**, 161 (1962)；K. Nose and A. Endo, *J. Bacteriol.*, **105**, 176 (1971)。
- 11) M. Nishida, T. Matubara, N. Watanabe, *J. Antibiotics*, **18A**, 211 (1969)；R. K. Tripathi and Gottlieb, *J. Bacteriol.*, **100**, 310 (1969)。
- 12) 山口英世，真菌誌，**18**，342 (1977)；J. O. Lampen, *Am. J. Clin. Pathol.*, **52**, 138 (1960)；S. C. Kinsky, “Polyene antibiotics,” Vol. 1, ed. D. Gottlieb, P. D. Shaw, Springer-Verlag, New York, 1960, p. 122。
- 13) 新井真澄，薬局，**32**，41 (1981)。
- 14) K. Iwata, H. Yamaguchi, T. Hiratani, *Sabouraudia*, **11**, 158 (1973)；岩田和夫，山口英世，日細誌，**28**，513 (1973)；山口英世，岩田和夫，*ibid.*，**29**，379 (1974)。
- 15) S. DeNollin, M. Borgers, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **7**, 704 (1975)；K. Iwata, Y. Kanda, M. Osumi, *Sabouraudia*, **11**, 205 (1973)；K. Iwata, H. Yamaguchi, Y. Kanda, M. Osumi, “Proceedings of the 2nd International Specialized Symposium in Yeast,” ed. K. Ito, Univ. of Tokyo Press, Tokyo, 1972, p. 335。
- 16) T. E. Andreoli, V. W. Dennis, A. M. Weigl, *J. Gen. Physiol.*, **53**, 133 (1969)；J. O. Lampen, P. M. Arnow, R. S. Safferman, *J. Bacteriol.*, **80**, 200 (1960)。