

抗真菌薬アモロルフィンに見いだされた コリネバクテリウム増殖抑制効果

明治薬科大学 微生物学教室

倉 門 早 苗
張 音 実
杉 田 隆

要 旨

グラム陽性桿菌コリネバクテリウムは、主に腋窩や足底部に存在する皮膚常在細菌である。本菌は、汗や皮脂を前駆体として不快な臭い成分である揮発性脂肪酸やチオアルコール系の化合物を生成する。モルホリン系アモロルフィンは白癬菌に高い感受性を示す抗真菌薬であるが、本薬は *in vitro* でコリネバクテリウムの増殖を阻害した。その作用は濃度依存的であるが、特に本薬暴露初期（培養7時間後）に高い増殖抑制効果を有することが示された。抗コリネバクテリウム作用の機序は不明であるが、アモロルフィンは抗真菌作用以外にもユニークな作用を有する化合物であることが示された。

Key words : アモロルフィン, コリネバクテリウム, 抗真菌薬, 臭気

はじめに

モルホリン系抗真菌薬アモロルフィンは、真菌細胞膜主要構成成分であるエルゴステロールの生合成を阻害することにより抗真菌作用を示す¹⁾。エルゴステロールはスクワレンから生合成され、その各々の生合成過程を阻害する多種多様な抗真菌薬が存在する。アリルアミン系、ベンジルアミン系あるいはチオカルバメート系はスクアレンエポキシダーゼを、アゾール系はC14 α -ラノステロールデメチラーゼを阻害する。モルホリン系は Δ 14-ステロールレダクターゼおよび Δ 8-, Δ 7-ステロールイソメラーゼの2つの酵素を同時に阻害するユニークな抗真菌薬である。その効果は白癬菌、マラセチアとカンジダにおよぶ²⁾。

グラム陽性桿菌コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) はヒト皮膚の常在菌であり、特に腋窩や足底部に優位に存在する³⁾。これらの部

位は湿度が高いため本菌の増殖に適した環境となる。本菌が産生する酵素により汗や皮脂成分が代謝され、ヒトにとって不快な臭い成分である揮発性脂肪酸あるいはチオアルコール系の化合物などが生成される⁴⁾。

本研究では、モルホリン系抗真菌薬アモロルフィンが細菌コリネバクテリウムの増殖を *in vitro* で阻害する現象を見いだしたので報告する。また、コリネバクテリウムによる臭気生成に関する文献的考察も併せて行った。

コリネバクテリウムに対する アモロルフィンの増殖抑制効果

1. 材料および方法

1) 使用菌株

In vitro の増殖抑制作用の検討には以下の8株を用いた: *C. coyleae* JCM 10381, *C. glutamicum* JCM 1318, *C. minutissimum* JCM 9387, *C. mucifaciens*

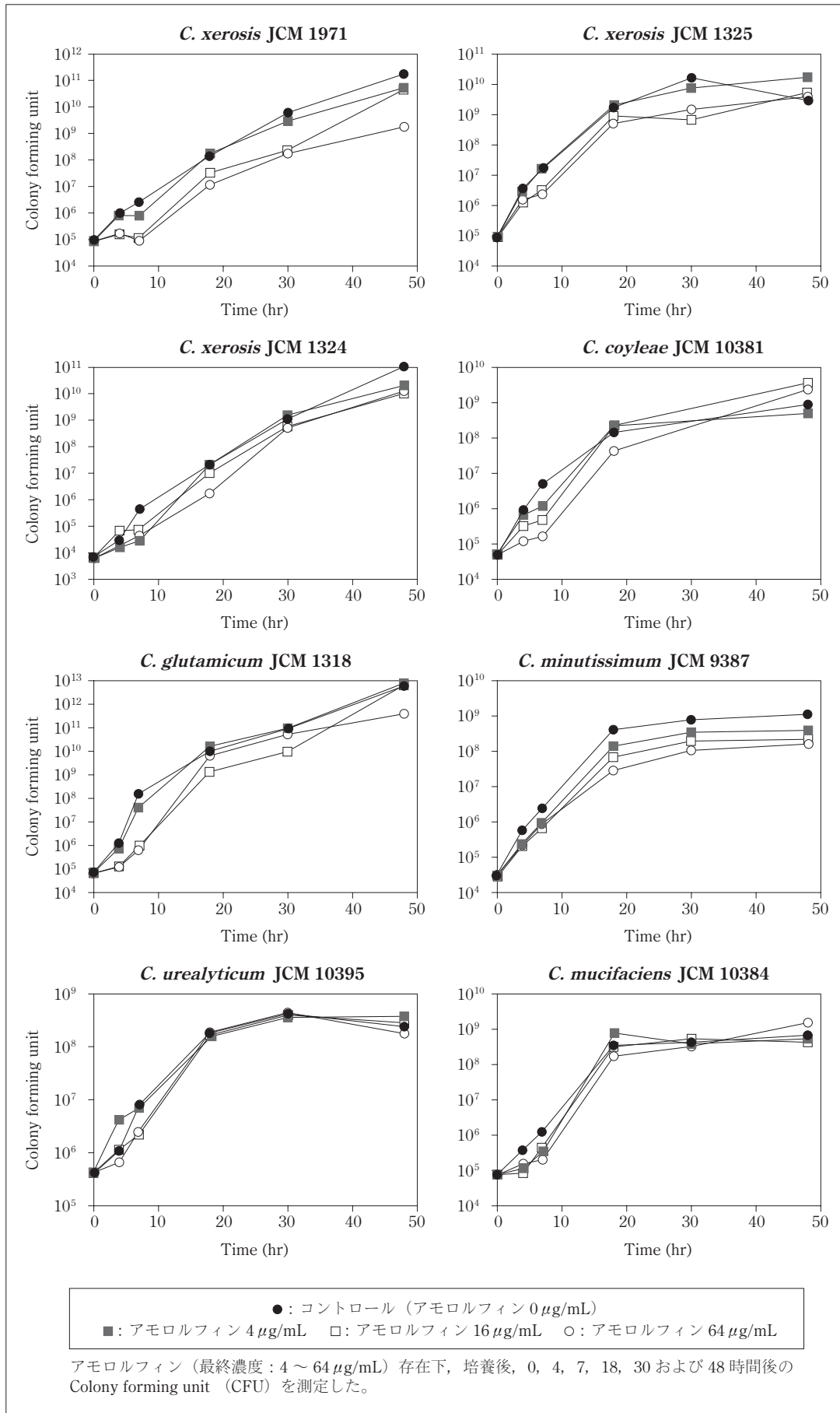


図 1 コリネバクテリウムに対するアモロルフィンの増殖に及ぼす影響

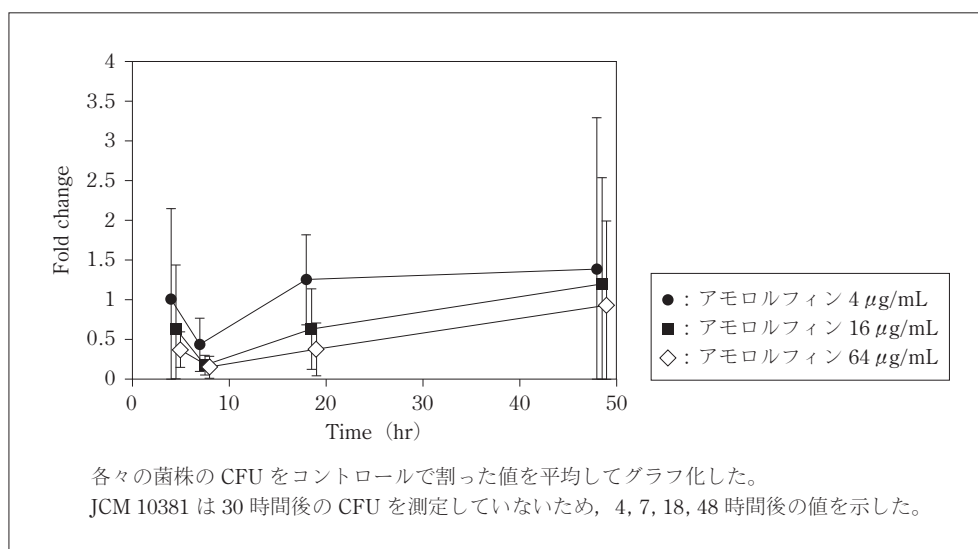


図2 コントロールに対する CFU の比率の平均

JCM 10384, *C. urealyticum* JCM 10395, *C. xerosis* JCM 1324, *C. xerosis* JCM 1325, *C. xerosis* JCM 1971

すべての菌株は理化学研究所バイオリソースセンター (JCM, <http://jcm.brc.riken.jp>) より入手した。

2) 増殖抑制効果

微量液体希釈法により評価した。アモロルフィン は 和 光 純 薬 (<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/>) より購入し, DMSO を用いて 10 mg/mL 濃度に調整した。前培養した被験菌株は約 10^5 /mL 濃度に調製し, アモロルフィン (最終濃度: 4 ~ 64 μ g/mL) とともにヘモサプリ/Tween 80 含ミューラーヒントンブイヨン培地 (栄研化学) に加えて 37°C で培養した⁵⁾。

2. 結果および考察

図1にコリネバクテリウムに対するアモロルフィンの増殖抑制作用を Colony forming unit (CFU) として示した。株差がみられるが, おおむね濃度依存的にコントロールに比べて増殖が抑制された。特に, 培養7時間後の増殖抑制が顕著であった。コントロールに対する CFU の比率の平均値を図2に示した。アモロルフィン 4, 16, 64 μ g/mL 存在下での培養7時間後の CFU はコントロールに比べてそれぞれ 43.1, 17.5, 14.8%まで低下した。その後は培養時間とともに比率は上昇した。

細菌細胞膜にエルゴステロールは存在しないため, アモロルフィンが細胞膜生合成経路を阻害する

ことにより, コリネバクテリウムの増殖を阻害することは理論上考えがたい。類似の作用が細菌 *Propionibacterium acnes* について報告されている⁶⁾。アゾール系抗真菌薬は *P. acnes* の増殖を *in vitro* で濃度依存的に抑制した。しかもこの作用には構造活性相関がみられた。すなわち, ミコナゾール, イトラコナゾールやケトコナゾールは当該菌種の増殖を阻害したが, フルコナゾールやボリコナゾールはその作用を示さなかった。現時点でアモロルフィンが示すコリネバクテリウムの増殖抑制作用の機序は全く不明であるが, 本化合物は抗真菌作用以外にも潜在的に抗細菌効果を示す可能性があると考えられた。

ヒト常在細菌による臭気発生に関する 文献的考察

ヒト皮膚には多種多様な細菌が常在しているが, 中でも臭気発生に関する細菌は腋窩や足底部に優位に存在する。細菌叢は部位にかかわらず個人の多様性が高いが, 優位な菌種は腋窩で Proteobacteria, Bacteroides に Corynebacteriaceae が続く。足の踵部は Staphylococcaceae と Proteobacteria であり, Corynebacteriaceae はほとんど検出されない。足趾部は Corynebacteriaceae が最も優位であり, これに Micrococcaceae と Staphylococcaceae が続く³⁾。腋窩と足底部の共通環境は他の部位に比べて湿度が高いことである。

これまでに, 臭気に関与する常在細菌の探索が行

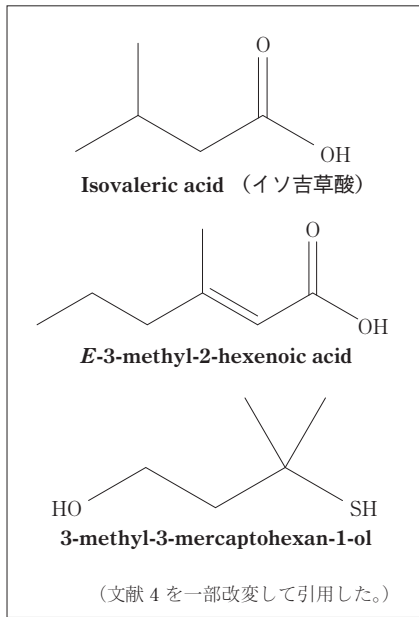


図 3 皮膚細菌により生成される代表的な臭気物質

なわれている。36名の健常人の腋窩臭を臭気評価者により5段階に評価し、同時に菌量(CFU)を測定した⁷⁾。この臭気スコアと菌量に有意な相関を示したのはコリネバクテリウム ($p < 0.0001$) とマイクロコッカス ($p = 0.0235$) のみであり、その他のブドウ球菌やプロピオニバクテリウムとは有意な相関を示さなかった。性差は菌叢に影響する可能性もある。別の実験では、男女53名の健常人腋窩の細菌叢を非培養法で分析したところ、ブドウ球菌クラスターとコリネバクテリウムクラスターに大別された。後者に含まれる健常人の大部分は男性であった⁸⁾。臭気産生菌として *C. xerosis* が候補になっている⁹⁾。

臭気成分はその化学構造から揮発性脂肪酸やチオアルコール系の化合物に分類される。これらの臭気化合物は常在細菌が直接産生するのではなく、ヒト生体成分であるアミノ酸あるいは脂肪酸が前駆体となる。つまり、前駆体は汗腺から皮膚に分泌される、あるいは皮脂が皮膚常在微生物によりグリセリンや脂肪酸に分解されたものに由来する。これが、さらにコリネバクテリウムなどの常在細菌の代謝酵素により産生されるいわば二次代謝産物である。

1. 揮発性脂肪酸

短鎖脂肪酸 (C2-C5) あるいは中鎖脂肪酸 (C6-C10) で構成される。プロピオニバクテリウムあるいはブドウ球菌は自身のリパーゼで皮脂をトリアシ

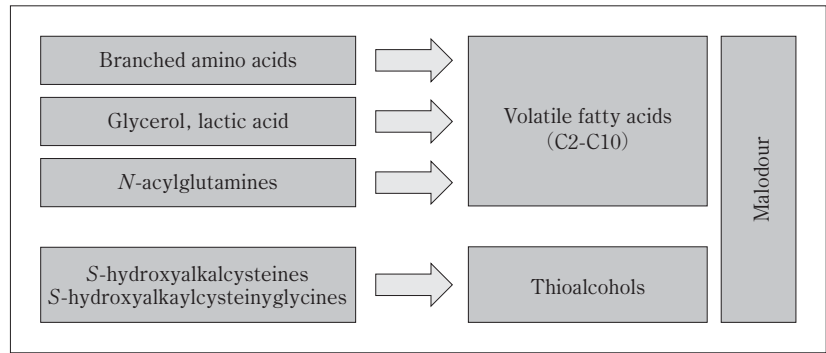


図 4 臭気物質産生経路

ルグリセロールへと分解し、これからさらにグリセリンへと分解される。乳酸やプロピオン酸も皮膚に豊富に存在し、これらの化合物が短鎖脂肪酸へと生物変換される。ブドウ球菌は、ロイシンなどの分岐鎖アミノ酸をメチル鎖揮発性脂肪酸 (C4-C5) へと変換することができる。代表例がイソ吉草酸 (Isovaleric acid) である (図 3)。これは悪臭防止法の規制対象にもなるほどの不快な化合物である。白癬菌はケラチナーゼによりタンパクを分解、あるいは皮膚細菌が産生するプロテアーゼによりタンパク質がさらにアミノ酸へと分解されるので、これが揮発性脂肪酸の前駆物質となると考えられる。一方で、コリネバクテリウムの産生酵素によりメチル分岐鎖長鎖脂肪酸が β 酸化により短鎖あるいは中鎖脂肪酸へと変換するとの説もある⁴⁾。これには、酵素 *N-acylglutamine aminoacylase* が関与する。臭気脂肪酸である *E-3-methyl-2-hexenoic acid* (図 3) や *N-3-hydroxyl-3-methylhexanoic acid* は、それぞれ *N-E-3-methyl-2-hexenoyl-L-glutamine* と *N-3-hydroxyl-3-methylhexanoyl-L-glutamine* から *N-acylglutamine aminoacylase* により生成される。

2. チオアルコール系化合物

コリネバクテリウムの産生する酵素 *cysteine-S-conjugate beta-lyase* により *S-[1-(2-Hydroxyethyl)-1-methylbutyl]-(L)-cysteinylglycine* (前駆体) から *3-methyl-3-mercaptohexan-1-ol* (図 3) が生成される。

酵素 *N-acylglutamine aminoacylase* や *cysteine-S-conjugate beta-lyase* はコリネバクテリウムが産生するが、その産生には株差が認められる。前者は 30% (8/27 株)、後者は 68% (19/28 株) の株が産生する。これが臭気発生の個人差に起因する原因とな

るかもしれない。臭気発生と皮膚常在細菌との関係を図4に示した。

3. 抗真菌作用と抗コリネバクテリウム作用を同時に有することの微生物学的意義

臭気物質は、ヒト生体成分を前駆物質として皮膚細菌が産生する酵素 (*N*-acylglutamine aminoacylase や cysteine-S-conjugate beta-lyase) により生物変換される。しかも、前駆物質も皮膚細菌あるいは皮膚真菌により生成される。アミノ酸は白癬菌のケラチナーゼや皮膚細菌のプロテアーゼから、グリセリンや脂肪酸は皮膚細菌あるいは皮膚真菌マラセチアのプロテアーゼから生成される。例えば、足白癬患者は強い足臭が生じるが、その臭気発生は白癬菌と皮膚細菌が産生する分泌酵素の複合的反応の結果と推定される。したがって、白癬菌と *N*-acylglutamine aminoacylase / cysteine-S-conjugate beta-lyase 産生菌であるコリネバクテリウムの両者の増殖を同時に阻害することは、臭気発生の抑制が期待できると考えられる。

利益相反

あり。本研究に要した費用はガルデルマ株式会社が負担した。

文献

1) 山口英世：病原真菌と真菌症 改訂4版。南山堂，東

京，2007。

- 2) ペキロン[®]クリーム0.5%：インタビューフォーム，ガルデルマ株式会社，2013年2月（改訂第7版）
- 3) Grice EA, Segre JA: The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*: **9**: 244-253, 2011.
- 4) James AG, Austin CJ, Cox DS, et al: Microbiological and biochemical origins of human axillary odour. *FEMS Microbiol Ecol* **83**: 527-540, 2013.
- 5) 大塚喜人，戸口明宏，北蘭英隆，他： *Corynebacterium* 属菌と *Erysipelothrix rhusiopathiae* の抗菌薬感受性検査法. *日本臨床微生物学雑誌* **22**: 120-125, 2012.
- 6) Sugita T, Miyamoto M, Tsuboi R, et al: *In vitro* activities of azole antifungal agents against *Propionibacterium acnes* isolated from patients with acne vulgaris. *Biol Pharm Bull* **33**: 125-127, 2010.
- 7) Taylor D, Daulby A, Grimshaw S, et al: Characterization of the microflora of the human axilla. *Int J Cosmet Sci* **25**: 137-145, 2003.
- 8) Callewaert C, Kerckhof FM, Granitsiotis MS, et al: Characterization of *Staphylococcus* and *Corynebacterium* clusters in the human axillary region. *PLOS One* **8**: e70538, 2013.
- 9) Rennie PJ, Gower DB, Holland KT, et al: The skin microflora and the formation of human axillary odour. *Int J Cosmet Sci* **12**: 197-207, 1990.