

病原性酵母 *Candida albicans* の *in vitro* 生育に対する atovaquone とリチウムの併用効果

皆川信子,* 上原麻理子, 関 志織, 新田あゆみ, 古河原健人

Effects of Combined Addition of Atovaquone and Lithium on the *in Vitro* Cell Growth of Pathogenic Yeast *Candida albicans*

Nobuko MINAGAWA,* Mariko UEHARA, Shiori SEKI,
Ayumi NITTA, and Kento KOGAWARA

Department of Biochemistry, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences,
265-1 Higashijima, Akiha-ku, Niigata 956-8603, Japan

(Received May 25, 2009; Accepted October 5, 2009)

Atovaquone, an analog of ubiquinone, binds tightly to the ubiquinol oxidation site (Qo site) of parasite cytochrome bc_1 complex to inhibit electron transport at concentrations far lower than those at which the mammalian system is affected. The mode of action is thought similar to that of myxothiazol. To treat *Pneumocystis jirovecii* and *Plasmodium falciparum* infections, atovaquone has been used worldwide whereas it is unapproved in Japan. Since the pathogenic *Candida* species fungi seem resistant to atovaquone, this drug is not clinically available for candidosis, particularly deep mycosis. We examined the effects of atovaquone on cellular respiration and *in vitro* growth of *C. albicans* to explore a new therapeutic possibility for fungal infections. Atovaquone strongly inhibited glucose-dependent cellular respiration similarly to antimycin A, stigmatellin, and myxothiazol, specific bc_1 complex inhibitors. However, atovaquone suppressed glucose-dependent cell growth to a much lesser extent *versus* the comparator agents. When added alone, lithium exerted slight growth inhibition. The combined addition of lithium with atovaquone showed a significant increase in inhibition of growth. Although the way lithium acts synergistically with atovaquone remains to be elucidated, our results suggest a new therapeutic possibility of this combination for the treatment of candidosis.

Key words—atovaquone; *Candida albicans*; lithium

緒 言

ナフトキノン誘導体 atovaquone (Fig. 1) はユビキノンに類似した構造を有しており、マラリアの治療薬として開発された。¹⁾ 作用機序は極めて特異的であり、ミトコンドリア内膜の呼吸鎖電子伝達系のシトクロム bc_1 複合体の Qo 部位 (ユビキノール酸化部位) に結合して電子伝達を阻害する。^{2,3)} Qo 部位の阻害剤には stigmatellin や myxothiazol などが知られているが、atovaquone は myxothiazol に類似した阻害メカニズムを持つと考えられている。マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* の bc_1 複合体に対して特に強い阻害効果を示すが、真菌類にも作用し、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の bc_1 複合体との結合モデルが X 線結晶構造の解析により得られ

ている。⁴⁾ 現在 proguanil との合剤が抗マラリア薬として製造販売されているものの、日本では未認可である。哺乳動物の bc_1 複合体に対する阻害作用はマラリア原虫の bc_1 複合体に対する阻害作用に比べてはるかに弱いために選択性が高く、臨床使用における副作用の問題点はほとんどないとされている。ただし、atovaquone 耐性原虫の出現が複数報告されている。⁵⁾ Atovaquone 単独ではニューモシスチス肺炎やトキソプラズマ症に対する化学療法剤として

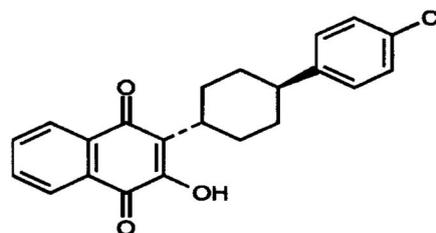


Fig. 1. Chemical Structure of Atovaquone

使用されるが、こちらも国内未認可であり、エイズ患者の場合に限り厚生労働省「エイズ治療薬研究班」より入手可能という現状である。*Pneumocystis jirovecii* (*P. carinii* と呼ばれていたが、菌名記載の規約により変更) が原因菌となるニューモシスチス肺炎は HIV 患者における代表的な日和見感染症の 1 つであり、そのほかにも免疫不全の様々な病態で発症し重篤になることが知られている。⁶⁾ わが国では先進国中唯一エイズ発症者が年々増加しているため、国内での認可が待望されている。

Atovaquone は、真菌症の半分以上を占めるカンジダ症には顕著な効果を示さないとされてきた。⁷⁾ 真菌症特に深在性 (内臓真菌症) は、免疫能の低下した患者に多発する日和見感染症であり、わが国における高度医療の普及と人口高齢化に伴い急激に深刻化している。治療の選択肢は狭く、現在国内で頻用されている抗真菌薬は 7 種 9 剤である。エルゴステロールと特異的に結合して細胞膜機能を破壊する amphotericin B, エルゴステロールの生合成経路の阻害などで静菌的に作用するアゾール系薬剤、細胞壁の構成多糖を合成する β -glucan synthase を阻害するキャンディン系抗真菌薬、核酸アナログであるフルシトシン^{8,9)} とは全く異なる標的に対して高い特異性を持つ atovaquone の臨床利用の可能性に、われわれは注目した。Atovaquone が真菌症治療の選択肢に加われば、相乗効果や薬剤耐性出現の抑制が期待できるものと思われる。Atovaquone によって真菌の好氣的エネルギー産生が阻害されると、嫌氣的過程すなわち解糖系におけるエネルギー産生が中心的な役割を果たすようになると予想される。Atovaquone と解糖系を抑制する薬剤を同時に投与すれば増殖阻害効果が増強できると考えた。そこで、既に臨床使用されている医薬品の中からリチウムの併用を検討することにした。リチウムは「炭酸リチウム」という医薬品として 1950 年代より躁鬱病の治療に臨床使用されている。^{10,11)} 生体に対するリチウムの作用メカニズムの解明に関しては多くの報告¹²⁾があるが、解糖系を中心とするエネルギー代謝に影響を与えると報告されている。¹³⁻¹⁵⁾ さらに、*Candida albicans* において、高濃度のリチウムが増殖を阻害し、病原性を弱めると報告されている。¹⁶⁾ 臨床使用されている 2 種の薬剤が真菌の好氣的及び嫌氣的エネルギー代謝を阻害して顕著な増殖阻害に

至るのではないかと考え、実験に着手した。

この論文では、カンジダ症の主要な原因菌である *C. albicans* を用いて、atovaquone の呼吸阻害と *in vitro* 生育に対するリチウムとの併用効果を検討し、真菌症の化学療法の新たな可能性を示唆すると思われる知見を得たので報告する。

材料と実験方法

1. 試料 Atovaquone は GlaxoSmithKline 社から供与頂いた。Antimycin A, myxothiazol, amphotericin B, miconazole, clotrimazole, ketoconazole, fluconazole はシグマアルドリッチ¹⁷⁾より購入した。Stigmatellin は Fluka Biochemica より購入した。塩化リチウムは和光純薬工業¹⁸⁾より購入した。そのほかの試薬は市販されているもののうち、最も純度の高いものを購入した。

2. 培養方法 *Candida albicans* K 株¹⁷⁾は口腔カンジダ症の患者から単離されたもので、日本歯科大学新潟歯学部青木茂治博士 (現名誉教授) より供与頂き、報告に従って保存した。¹⁷⁾ われわれが以前に報告した液体培地 (pH 5.2 を NaOH で pH 7.2 に調節)¹⁸⁾ 2 ml を入れた試験管を用いて、好気条件又は窒素気流下の嫌気条件で 30°C, 15 時間振とう培養を行った。Table 2 の実験以外は、111 mM グルコースを唯一の炭素源として用いた。酵母形菌の生育は 600 nm の吸光度測定により追跡した。Table 2 から Table 5 に示した値は同一条件における 3 サンプルの平均値であり、標準偏差は 0.002 から 0.101 の範囲であった。

3. 呼吸活性の測定方法 われわれが酵母 *Hansenula anomala* に関して報告した通り,¹⁹⁾ 静止期初期の培養液を遠心して集菌し、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) に懸濁 ($A_{600}=25$) して、呼吸活性測定用の試料とした。50 mM グルコースを基質とする酸素吸収活性はクラーク型酸素電極モデル 5331 (Yellow Spring Instrument Co., Inc., Ohio) を用いて 30°C で行った。²⁰⁾ シアン感受性呼吸活性及びシアン耐性呼吸活性は文献に従って測定した。²¹⁾

結 果

1. *C. albicans* 生菌の呼吸に対する種々の薬剤の効果 Table 1 は、グルコースを基質とする *C.*

Table 1. Effects of Respiratory Inhibitors and Antifungals on the Cellular Respiration of *C. albicans*

| Chemicals | IC ₅₀ (μM) | |
|----------------|-----------------------|-------------------|
| | Cyanide-sensitive | Cyanide-resistant |
| Antimycin A | 0.240 | >1000 |
| Stigmatellin | 0.265 | >1000 |
| Myxothiazol | 0.260 | >1000 |
| Atovaquone | 0.295 | >1000 |
| Amphotericin B | >1000 | >1000 |
| Miconazole | 200 | 23.0 |
| Clotrimazole | 600 | 130 |
| Ketoconazole | 500 | 130 |
| Fluconazole | >1000 | >1000 |

albicans 生菌の呼吸に対するシトクロム *bc*₁ 複合体の特異的阻害剤及び臨床使用されている抗真菌剤の効果を示している。*C. albicans* のミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系はユビキノールの酸化反応から枝分かれしており、シトクロム酸化酵素を末端酸化酵素とするシアン感受性呼吸とシアン非感受性ユビキノール酸化酵素である alternative oxidase が触媒するシアン耐性呼吸の 2 種類がある。²²⁾ Antimycin A は *bc*₁ 複合体の Qi 部位の阻害剤であり、stigmatellin と myxothiazol は Qo 部位をそれぞれ異なる作用機序で阻害する。^{2,3)} Atovaquone は、これら 3 種の呼吸阻害剤と全く同様に *C. albicans* 生菌のシアン感受性呼吸を阻害した。データには示していないが、*C. albicans* から単離した無傷のミトコンドリアを用いてコハク酸を基質として測定した酸素吸収活性においても、atovaquone は 3 種の呼吸阻害剤と同等の阻害作用を示した。Amphotericin B, miconazole, clotrimazol, ketoconazole, fluconazol は、わが国において臨床的に頻用されている抗真菌剤である。⁸⁾ Amphotericin B と fluconazole には呼吸阻害作用が認められなかった。Miconazole, clotrimazole, ketoconazole には、若干のシアン感受性呼吸阻害とそれよりもやや強いシアン耐性呼吸阻害効果がみられたが、特異的かつ強力な作用ではなかった。

2. *C. albicans* の生育に対するリチウムの効果

生体に対するリチウムの作用メカニズムに関しては現時点ではいまだ不明であるが、解糖系の phosphofructokinase や phosphoglucomutase を阻害し、エネルギー産生を抑制するという報告が出てい

Table 2. Effects of Lithium Chloride on Aerobic Growth of *C. albicans*

| Concentration (mM) | Absorbance at 600 nm | | | |
|--------------------|-------------------------|------|-------|-------|
| | LiCl Concentration (mM) | | | |
| | 0 | 2 | 5 | 10 |
| Glucose | | | | |
| 111 | 3.32 | 2.93 | 2.28 | 1.66 |
| 50 | 3.90 | 3.20 | 2.52 | 1.80 |
| 20 | 3.25 | 3.09 | 2.45 | 1.65 |
| 10 | 1.45 | 1.46 | 1.43 | 1.35 |
| 5 | 1.10 | 1.10 | 1.06 | 1.04 |
| Galactose | | | | |
| 111 | 3.40 | 3.12 | 2.40 | 1.52 |
| 50 | 3.72 | 3.25 | 2.59 | 1.61 |
| 20 | 3.51 | 2.95 | 2.66 | 1.62 |
| 10 | 1.44 | 1.44 | 1.40 | 1.18 |
| 5 | 1.04 | 1.02 | 0.990 | 0.872 |

る。¹³⁻¹⁵⁾ Table 2 は、唯一の炭素源の濃度を変えて、*C. albicans* の好氣的生育に対する塩化リチウムの効果を調べた結果である。グルコース濃度が高いほどリチウムの生育阻害が強くあらわれており、5 mM のグルコース培地では、リチウムの効果はほとんど認められなかった。グルコース濃度が高まると菌体のエネルギー代謝は解糖系により強く依存するようになると予想されるため、リチウムの作用点は解糖系のいずれかの部位である可能性が示唆された。データには示していないが、硫酸リチウムを用いた場合も全く同様の結果が得られた。唯一の炭素源をグルコースからガラクトースに換えてもリチウムの効果はほぼ同様であった。これは、*S. cerevisiae* における報告²³⁾とは異なる結果である。

3. *C. albicans* の生育に対する atovaquone のリチウムとの併用効果 Table 3 は、*C. albicans* の好氣的生育に対する塩化リチウムと atovaquone の併用効果を調べたものである。100 μM の atovaquone は、20%程度の生育阻害しか示さなかったが、10 mM のリチウムと同時添加すると、生育阻害効果が顕著に増強した。しかし 10 μM では atovaquone による生育阻害は認められなかった。Table 2 の結果から、リチウムは解糖系に作用する可能性が示唆されたため、ミトコンドリアにおける酸素呼吸を特異的に阻害することが確立している atovaquone²⁻⁴⁾ との併用効果を嫌気条件と好気条件の生育で比較してみた (Table 4)。窒素気流下の嫌

Table 3. Effects of Lithium Chloride and Atovaquone on Aerobic Cell Growth of *C. albicans*

| Additions | Absorbance at 600 nm | |
|-------------------------|----------------------|-------------|
| | None | +10 mM LiCl |
| None | 3.42 | |
| 100 μ M Atovaquone | 2.74 | |
| 10 mM LiCl | 1.20 | |
| +100 μ M Atovaquone | 0.392 | |
| +50 μ M Atovaquone | 0.646 | |
| +20 μ M Atovaquone | 0.838 | |
| +10 μ M Atovaquone | 1.22 | |

Table 4. Effects of Atovaquone and Lithium on the Aerobic and Anaerobic Growth of *C. albicans*

| Growth Conditions | Absorbance at 600 nm | |
|----------------------------------|----------------------|-------------|
| | None | +10 mM LiCl |
| Shaken under Air | 3.20 | 1.70 |
| +100 μ M Atovaquone | 2.74 | 0.480 |
| Shaken under Nitrogen Atmosphere | 0.681 | 0.456 |
| +100 μ M Atovaquone | 0.602 | 0.305 |

Table 5. Effects of Lithium Chloride and Respiratory Inhibitors on Aerobic Cell Growth of *C. albicans*

| Additions | Absorbance at 600 nm | | |
|-------------------------|-------------------------|-------|-------|
| | LiCl Concentration (mM) | | |
| | 0 | 10 | 20 |
| None | 3.52 | 1.23 | 0.660 |
| 10 μ M Antimycin A | 0.780 | 0.230 | 0.170 |
| 10 μ M Stigmatellin | 0.952 | 0.350 | 0.250 |
| 10 μ M Myxothiazol | 1.07 | 0.342 | 0.255 |
| 100 μ M Atovaquone | 2.30 | 0.320 | 0.188 |

気条件では、atovaquone の添加による生育阻害は弱まっていた。Table 1 で示したほかの呼吸阻害剤を用いてリチウムとの併用による生育阻害を検討した (Table 5)。生菌の呼吸阻害作用は同等であったにもかかわらず、100 μ M の atovaquone は 1/10 の濃度で添加したほかの呼吸阻害剤と比べて生育阻害効果がはるかに弱かった。リチウムの同時添加により、100 μ M の atovaquone は 10 μ M のほかの呼吸阻害剤と同程度の生育阻害を示した。

考 察

C. albicans はカンジダ症の主要な原因菌であり、ヒトに対する親和性が高く、粘膜や皮膚表面に常在菌として定着している。内因性感染による発症

を引き起こし易いため、有効な抗真菌剤による早期の治療が必要である。現在国内で臨床使用されている抗真菌薬は、ポリエーテル系、アゾール系、カンデイン系、フルシトシン等である。^{8,9)} フルコナゾールをはじめとするアゾール系薬剤が第一選択薬として使用されることが多いが、薬剤耐性菌の出現が問題となりつつある。⁸⁾ ミトコンドリアの電子伝達系を極めて特異的に阻害する atovaquone は、わが国における新規の標的を持つ抗真菌薬として、治療の新たな選択肢に加わる可能性が期待される。

Table 1 に示したように、atovaquone は *C. albicans* に対しても *S. cerevisiae* の場合と同様にミトコンドリア内膜の bc_1 複合体に結合し、電子伝達を阻害していると推定される。この強力な呼吸阻害作用にもかかわらず、Table 5 からわかるように、atovaquone の生育阻害作用はほかの呼吸阻害剤に比べてはるかに弱い。この理由としてまず挙げられるのは、天然の抗生物質である antimycin A, stigmatellin, myxothiazol に比べて atovaquone は単純な構造であるため、速やかに代謝されて効果を失う可能性である。また、呼吸活性測定に用いた菌体が静止期初期のものであるため、対数増殖期の菌体とは細胞壁の状態や細胞膜の透過性が異なっていると考えられる。天然の抗生物質である 3 種の呼吸阻害剤とは異なり、人工の有機合成品として開発された atovaquone は対数増殖期の菌体内に取り込まれ難いか又は排出され易いのかもしれない。リチウムは長らく躁病に限らず双極性感情障害などの治療に用いられているものの、その詳細な作用機序はいまだ明確ではない。¹²⁾ リチウムが解糖系の酵素を阻害してエネルギー代謝に影響を与えるという考え方は以前から根強く続いており、Table 2 から解糖系が作用点である可能性が示唆された。*S. cerevisiae* において、phosphoglucomutase 反応の補因子であるマグネシウムに対してリチウムが競合的に阻害すると報告されたが、²³⁾ Table 2 に示したようにガラクトースを唯一の炭素源としてもグルコースと全く同様の生育結果が得られたので、酵母形の *C. albicans* におけるリチウムの作用点は少なくとも phosphoglucomutase ではないと推定される。菌糸形の *C. albicans* においてリチウムが菌糸形成を阻害するものの、やはり phosphoglucomutase の阻害に起因するものではないと報告されている。²⁴⁾ 解糖系に

対するリチウムの作用機序，さらにリチウムが atovaquone の効果を増強するメカニズムに関しては，今後のさらなる検討が必要である。既に医薬品として臨床使用されているリチウムと標的への特異性が高い atovaquone との併用は，カンジダ症他真菌症の治療に新たな方向性を示唆するものと思われる。

REFERENCES

- 1) Hudson A. T., *Parasitol. Today*, **9**, 66–68 (1993).
- 2) Srivastava I. K., Morrisey J. M., Darrouzet E., Daldal F., Vaidya A. B., *Mol. Microbiol.*, **33**, 704–711 (1999).
- 3) Kessl J. J., Moskalev N. V., Gribble G. W., Nasr M., Meshnick S. R., Trumpower B. L., *Biochem. Biophys. Acta*, **1767**, 319–326 (2007).
- 4) Kessl J. J., Lange B. B., Merbitz-Zahradnik T., Zwicker K., Hill P., Meunier B., Pálsdóttir H., Hunte C., Meshnick S., Trumpower B. L., *J. Biol. Chem.*, **278**, 31312–31318 (2003).
- 5) Henry M., Diallo I., Bordes J., Ka S., Pradines B., Diatta B., M'Baye P. S., Sane M., Thiam M., Gueye P. M., Wade B., Touze J. E., Debonne J. M., Rougier C., Fusai T., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **75**, 146–151 (2006).
- 6) Krajicek B. J., Thomas C. F. Jr., Limper A. H., *Clin. Chest Med.*, **30**, 265–278 (2009).
- 7) Spencer C. M., Goa K. L., *Drugs*, **50**, 176–196 (1995).
- 8) Yamaguchi H., “Byougen-seishinkin to Shin-kinsho”, 3rd ed., Nanzando, Tokyo, 2005.
- 9) Sable C. A., Strohmaier K. M., Chodakewitz J. A., *Annu. Rev. Med.*, **59**, 361–379 (2008).
- 10) Vestergaard P., Licht R. W., *World J. Biol. Psychiatry*, **2**, 18–26 (2001).
- 11) Howland R. H., *J. Psychosoc. Nurs. Ment. Health Serv.*, **45**, 13–17 (2007).
- 12) Bielecka A. M., Obuchowicz E., *Pharmacol. Rep.*, **60**, 771–782 (2008).
- 13) Kajda, P. K., Birch, N. J., *J. Inorg. Biochem.*, **14**, 275–278 (1981).
- 14) Nordenberg J., Kaplansky M., Beery E., Klein S., Beitner R., *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 1025–1031 (1982).
- 15) Rodriguez-Gil, J. E., Fernández-Novell J. M., Barberá A., Guinovart J. J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **375**, 377–384 (2000).
- 16) Herman P., Forgács K., Gál E., Lenkey B., Nagy G., Rozgonyi F., *Folia Microbiol.*, **48**, 173–176 (2003).
- 17) Aoki S., Ito-Kuwa S., *Microbiol. Immunol.*, **28**, 393–406 (1984).
- 18) Minagawa N., Yoshimoto A., *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 125–127 (1983).
- 19) Minagawa N., Yoshimoto A., *J. Biochem.*, **101**, 1141–1146 (1987).
- 20) Aoki S., Ito-Kuwa S., *Plant Cell Physiol.*, **23**, 721–726 (1982).
- 21) Henry M. F., Nyns E. J., *Sub-Cell. Biochem.*, **4**, 1–65 (1975).
- 22) Huh W. K., Kang S. O., *Biochem. J.*, **356**, 595–604 (2001).
- 23) Masuda C. A., Xavier M. A., Mattos K. A., Galina A., Montero-Lomeli M., *J. Biol. Chem.*, **276**, 37794–37801 (2001).
- 24) Martins L. F., Montero-Lomeli M., Masuda C. A., Fortes F. S., Previato J. O., Mendonça-Previato L., *FEMS Yeast Res.*, **8**, 615–621 (2008).