

走査電子顕微鏡法によるイミダゾール系抗真菌剤 oxiconazole nitrate の白癬菌形態に及ぼす影響

山口英世・山田陽子*・平谷民雄

帝京大学医学部医真菌研究センター

山田直子

日本女子大学電子顕微鏡施設

大隅正子

日本女子大学生物学教室

(* 現所属：日本女子大学生物学教室)

(昭和59年8月30日受付)

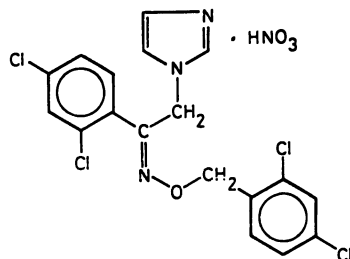
強力な抗真菌活性をもつ新しいイミダゾール誘導体 oxiconazole nitrate (OCZ) は完全発育阻止濃度以下に広い部分的発育阻止濃度域を有する。この濃度域において *Trichophyton mentagrophytes* 発育形態、とくに菌糸構造に本剤がどのような影響を及ぼすかを高分解能走査電子顕微鏡法により検討した。液体培地に接種した分生子からきわめて速やかな菌糸発育を示す菌株に対して、OCZ は 0.2 ng/ml に至る低濃度域において分生子の発芽ならびにそれに続く菌糸発育を明らかに阻止するとともに、発育菌糸を構成する細胞の変形、膨化、細胞壁表面の皺襞形成、一部剥離および顆粒状、線維状または不定形物質の堆積などの形態学的変化が認められた。OCZ の効果はその作用濃度に依存したが、いずれの濃度においても分生子接種 24 時間後には観察され、48 時間後に最も強く発現された。72 時間までの観察の結果では菌糸発育形態の異常は 6.4 ng/ml の薬剤濃度まで認められたが、12.5 ng/ml 以上の濃度ではほとんど分生子は発芽もしくは菌糸発育を示さなかった。以上の成績から、OCZ は MIC 以下に ≤ 0.2 ng/ml に至るきわめて広い sub-MICs 域をもち、低い薬剤濃度によって *T. mentagrophytes* 発育菌糸に対し特徴的な形態変化をもたらすことが示される。

Oxiconazole nitrate (以下 OCZ と略) の一般名をもつ 2', 4'-dichloro-2-imidazol-1-ylacetophenone (Z)-[O-(2,4-dichlorobenzyl) oxime] nitrate は、最近スイス Siegfried AG により合成され、抗真菌剤として開発研究途上にあるイミダゾール系化合物である¹⁾ (Fig. 1)。これまで幾種ものイミダゾール系抗真菌剤が実用化されているが、いずれもビスフェールイミダゾール誘導体またはフェネチルイミダゾール誘導体であり、OCZ のようなアセトフェノンオキシムイミダゾール誘導体に属する例はない²⁾。この理由から、OCZ は多数のイミダゾール系化合物のなかでも、その特異な化学構造と関連して特徴的な生物学的活性をもつ可能性が注目される。

OCZ は大部分の病原真菌に対して強力な *in vitro* 抗真菌活性を示すが、とくに感受性の高い真菌のなかに皮膚糸状菌が含まれること、また白癬の動物モデルにおいて本剤による局所療法が優れた治療効果を発揮することが

知られている³⁻⁶⁾。これに加えて、本剤の外用製剤はヒトの皮膚角質層や爪の層に良好に浸透するという薬理的成績が報告されている⁷⁾。これらの観点から、現在 OCZ 1% クリーム剤が表在性真菌症に対する局所的治療薬として開発研究されつつあり、予備的治療実験においても種々の病型の白癬、その他の皮膚真菌症症例に対

Fig. 1 Chemical structure of oxiconazole nitrate (OCZ)



して優れた治療成績をあげている⁸⁻¹⁰⁾。

OCZ の抗菌活性は、他の多くのイミダゾール剤と同様に、感受性真菌に対して MIC 以下に広い部分的発育阻止濃度すなわち sub-MICs¹¹⁾ 域をもつことを特徴とする⁹⁾。sub-MICs の下方限界値は、最小抗菌濃度 (minimum antibiotic concentration; MAC) とよばれ、微生物細胞の形態・構造または発育速度、またはその両者に阻害的影響を与える薬剤の最小濃度を表わすとする考えが提唱されてきた¹²⁾。細菌感染症の化学療法における sub-MICs または MAC の臨床的重要性は、多くの研究者によって指摘されているところであり、細菌については主として β -ラクタム抗生物質の MAC 効果が電子顕微鏡的に詳細に研究されている¹³⁾。他方、真菌および抗真菌剤に関してはこの面での基礎的または臨床的検討はほとんど報告をみない。

本報においては、OCZ の優れた抗真菌活性、とくに sub-MICs 域での抗真菌活性を説明する形態学的根拠を得ることを目的として、発育速度の高い *T. mentagrophytes* の分生子の発芽ならびにそれに引き続いて起こる菌糸発育の初期過程が、低濃度の本剤によってどのような影響を受けるかを高分解能走査型電子顕微鏡を用い

て検討した成績について述べる。

I. 実験材料と方法

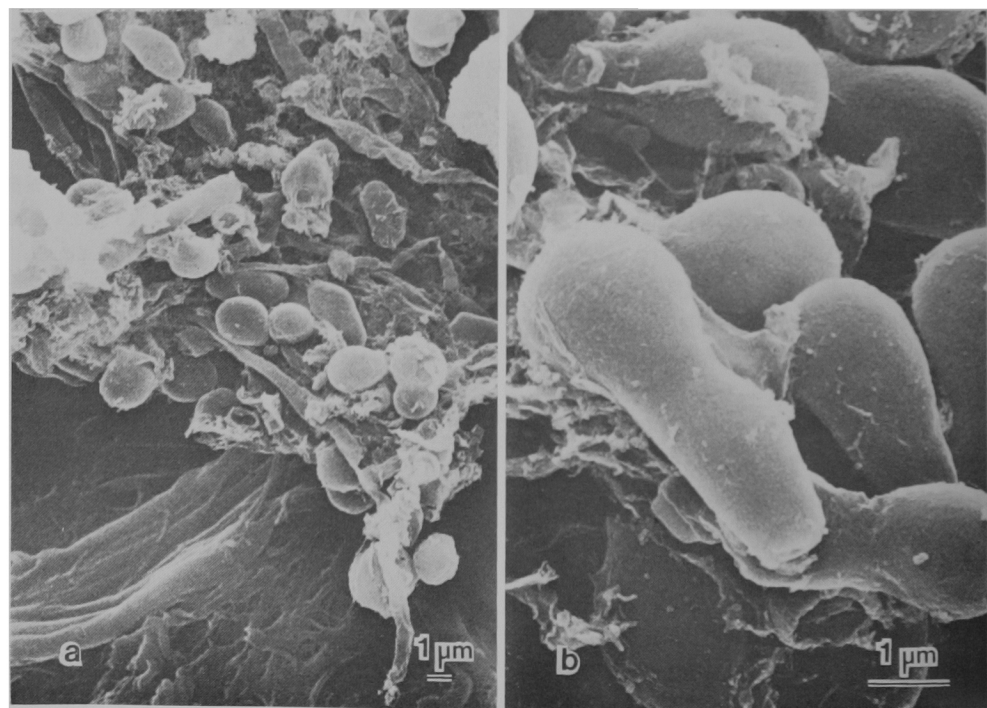
薬剤: Oxiconazole nitrate (lot no. 009488; 東京田辺製薬株式会社研究所より分与) の精製原末標品を試験薬剤として用いた。これを 100% ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、8 mg/ml の濃度に調整した溶液を薬剤原液として -20°C に凍結保存した。使用に先立って、凍結原液を加温融解し、薬剤が完全に溶解していることを確認した後、DMSO により適宜希釈し、実験に供した。

使用菌株: 先に OCZ 治療実験のための白癬動物モデル作製に使われた *T. mentagrophytes* 菌株と同一の TIMM 1189 株を今回の実験にも使用した⁶⁾。本菌株は分生子造生能が旺盛であり、通常の固形培地上および液体培地中で迅速な発育を示すという理由から試験菌として選んだ。Sabouraud dextrose agar 上での寒天希釈法⁹⁾ によって測定した本菌株に対する OCZ の MIC 値は $0.63 \mu\text{g/ml}$ であった。

接種用分生子浮遊液の調製および培養の薬剤処理: 前報⁶⁾と同様の方法により、0.1% (w/v) Tween 80 加減菌食塩水を用いて 1/10 Sabouraud dextrose agar 斜面

Fig. 2 Conidia seen immediately after inoculation. Oval microconidia aggregated to form small clusters.

(a) $\times 3,600$; (b) $\times 12,000$



から採取した分生子を 3×10^7 細胞/ml の濃度になるように調整した浮遊液をつくった。この1容を99容の Sabouraud dextrose broth に接種し、所定の濃度の薬剤溶液を含む各フラスコに一定量ずつ分注した。薬剤の最終濃度は 0.2~25 ng/ml の範囲とし、溶媒 (DMSO) の最終濃度はすべて 1% (w/v) になるように段階的濃度の薬剤溶液を添加した。薬剤無添加対照培養のフラスコには DMSO のみを添加した。次いで、各フラスコを回転式振盪機にのせ、27°C で振盪培養し、24、48 および 72 時間後に培養液を採取した。

走査型電子顕微鏡観察：採取した培養試料を遠心して集菌し、沈渣として回収された菌体（菌糸塊または分生子）を 1/10 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 中で同じく遠心操作により充分洗浄した。この菌体を 1/10 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 2% (w/v) グルタルアルデヒド溶液に懸濁し、4°C に 2 時間放置した。前固定終了後、同じ緩衝液で 3 回遠心洗浄を行ない、次いで 1/10 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 2% (w/v) オスミウム酸溶液中で 4°C、1.5 時間固定した。固定を終えた試料をアルコール系列を通して脱水し、酢酸イソアミルを浸透させた後、液化二酸化炭素中で臨界点乾燥処理を行

なった。菌量の少ない試料すなわち菌糸発育の不十分な試料については、固定した試料を濾紙上に直接回収し、その小片を臨界点乾燥処理した。乾燥を終えた試料の適当量を支持台にのせ、電導性ペイントにより固着し、アースした。次に Technics Hummer II のなかに移し、真空度 1.3 Pa の減圧下でイオンスパッター法により厚さ 6.0 nm になるように金-パラジウム合金 (60:40) を蒸着した¹⁹⁾。高分解能走査電子顕微鏡 (日立 HFS-2 RS 型) を用い、20 kV の加速電圧により各試料の観察ならびに写真撮影を行なった。

II. 実験成績

Fig. 2 は接種用として調製した *T. mentagrophytes* 分生子の走査電顕像を示す。濾紙上の上っているため、背後に濾紙線維がみえるが、ところどころに直径 1.5~2.0 μm の大きさの球形ないし楕円体形の細胞が小さな集簇をつくっている。その大きさと形態からこれらの細胞はすべて小分生子であることが分かる。接種直前に分生子浮遊液の全細胞数を血球計算板により、また生細胞数 (CFU) を通常のコロニーカウント法によりそれぞれ測定した結果、全分生子の 95% 以上がコロニー形成すなわち菌糸発育を行なうことが示された。したがって、

Fig. 3 Untreated control cultures grown for 24 hours. Most conidia germinated and subsequently developed into hyphae, although fewer conidia remained ungerminating.
(a) $\times 600$; (b) $\times 3,600$

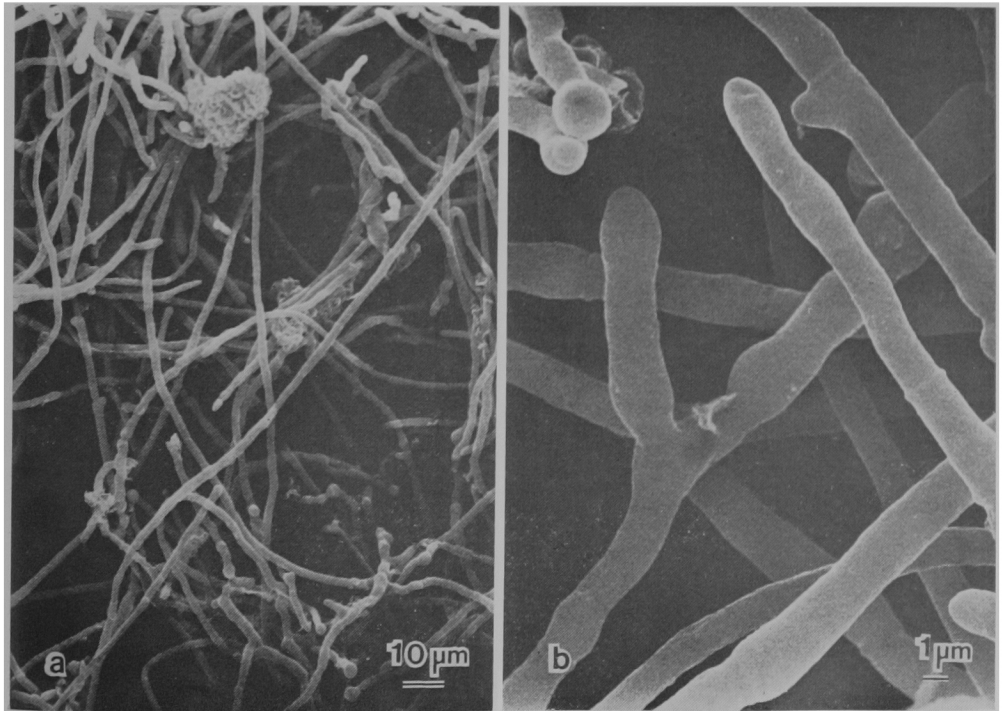


Fig. 2 にみられる分生子のほとんどまたはすべては、発芽能およびそれに続く菌糸発育能を有することが確認された。

T. mentagrophytes 分生子を薬剤無添加培地に接種し、経時的に発育形態を観察した。24 時間後では、まだ発芽しない分生子が少数残っていたが、大部分は発芽して菌糸発育を示し、小さな菌糸塊を形成した (Fig. 3)。菌糸発育の程度は、時間とともに高まり、48 時間後には、未発芽分生子は最早認められず、ほぼまっすぐに伸長した菌糸が密にからみ合っより大きな菌糸塊に成長した (Fig. 4)。72 時間を経過すると、菌糸の長さおよび分枝度はさらに著しくなり、肉眼で充分観察可能な大きな菌糸塊にまで発達した (Fig. 5)。菌糸の伸長度が増すにつれて、菌糸を構成する各細胞の長さすなわち菌糸隔壁間の距離もそれに見合って増大した。しかし、菌糸の長さまたは培養時間とは無関係に、菌糸の幅は 1.5~2.3 μm の範囲ではば一定の値を示した。またすべての菌糸は表面平滑であり、特別な構造や付着物は認められなかった (Fig. 2~5)。

このように極めて速やかな菌糸発育を示す本菌培養に種々の濃度の OCZ を添加した場合には、薬剤濃度と培

養時間に依存して様々な形態学的影響がみられる。24 時間後の培養においては、0.2 ng/ml OCZ 添加により分生子発芽率は明らかに低下し、一部の分生子のみが菌糸発育に至った (Fig. 6)。生じた菌糸も伸長を阻害され、菌糸の途中または先端部の細胞は不整形化、膨化などの異常形態を示し、そのために菌糸全体は著しい変形像を呈した (Fig. 6 b, c)。一部の菌糸表面には皺状の模様認められ、不定形構造物の付着が観察された (Fig. 6 b, c, d, \leftarrow)。薬剤濃度が高くなった場合も、基本的には同様の菌糸形態の変化がみられたが、薬剤濃度とともに分生子の発芽率は次第に低下し、6.4 ng/ml の濃度では未発芽分生子のみで、菌糸発育はほとんど観察されなかった (Fig. 7 a, b)。

48 時間薬剤とともに培養した場合には、いずれの薬剤濃度によっても発育菌糸の形態はより顕著な変化を受けた。0.2 ng/ml OCZ 処理培養においては、24 時間後と比べて発育菌糸の伸長度は有意に増していたが、発芽しないままの分生子もかなりの割合で残っていた (Fig. 8 a, b)。とくに注目される変化として、一部の菌糸で細胞壁表層部分の剝離像および線維状物質の付着が観察された (Fig. 8 c)。菌糸の亜先端部分の表面は皺状を呈した

Fig. 4 Untreated control cultures grown for 48 hours. Development of straightly elongated hyphae with smooth surfaces is noted.
(a) $\times 600$; (b) $\times 3,600$

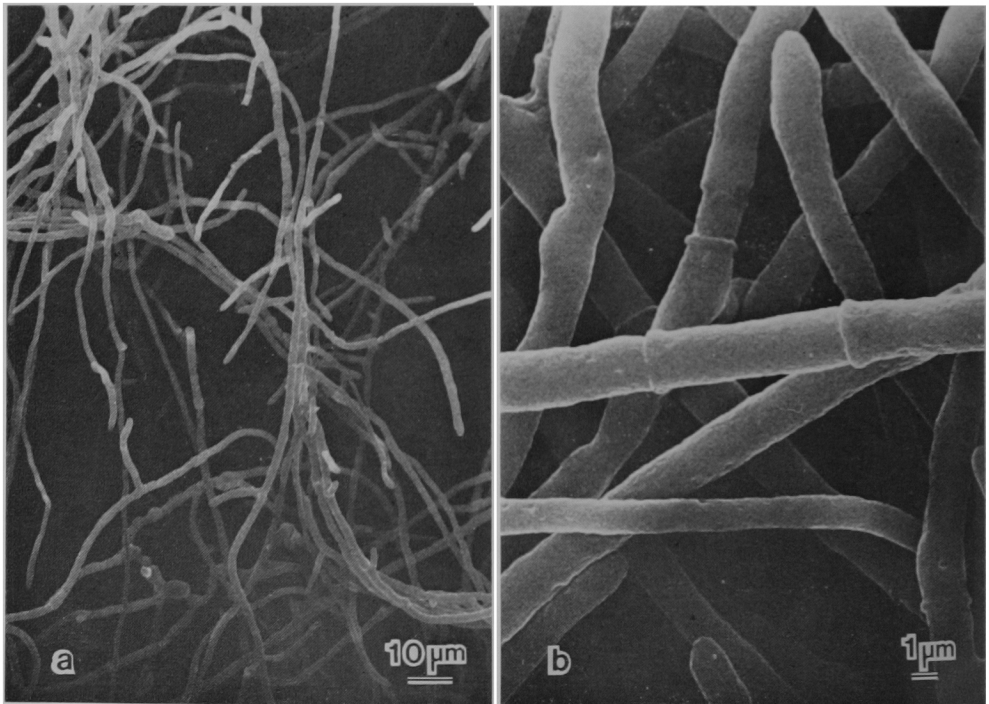


Fig. 5 Untreated control cultures grown for 72 hours showing hyphae developing to a higher extent in terms of frequency of branching and hyphal length.
(a) $\times 120$; (b) $\times 600$; (c) $\times 12,000$

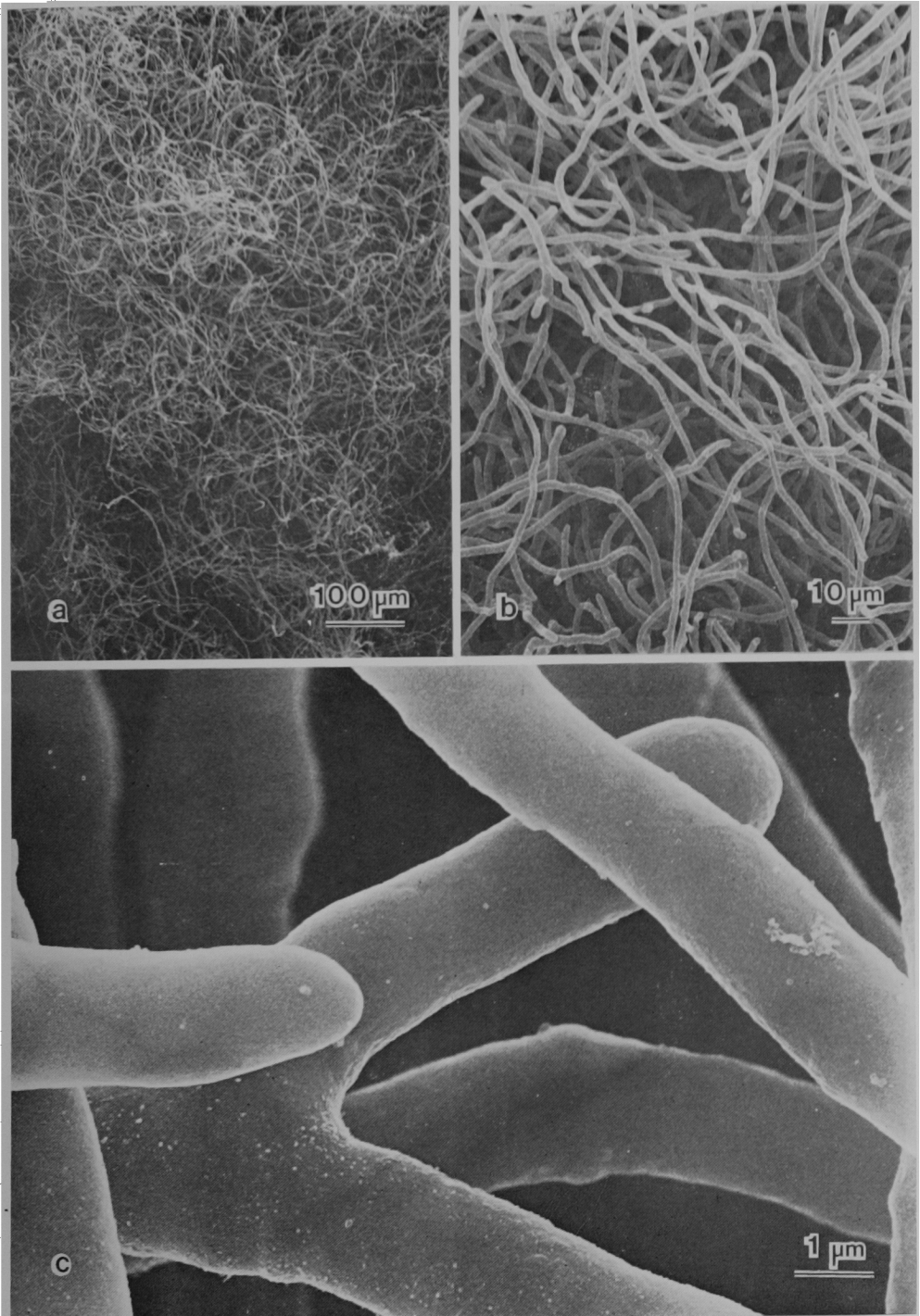


Fig. 6 24-Hours cultures grown with 0.2 ng/ml of OCZ. Only a small proportion of inoculated conidia germinated and developed into those hyphae which were short in length and irregular in shape. Swollen or deformed cells frequently occurred in hyphae and amorphous materials attached to some parts of the hyphal surface. Wrinkled hyphae are also seen. (a) $\times 600$; (b) $\times 3,600$; (c) $\times 3,600$; (d) $\times 12,000$

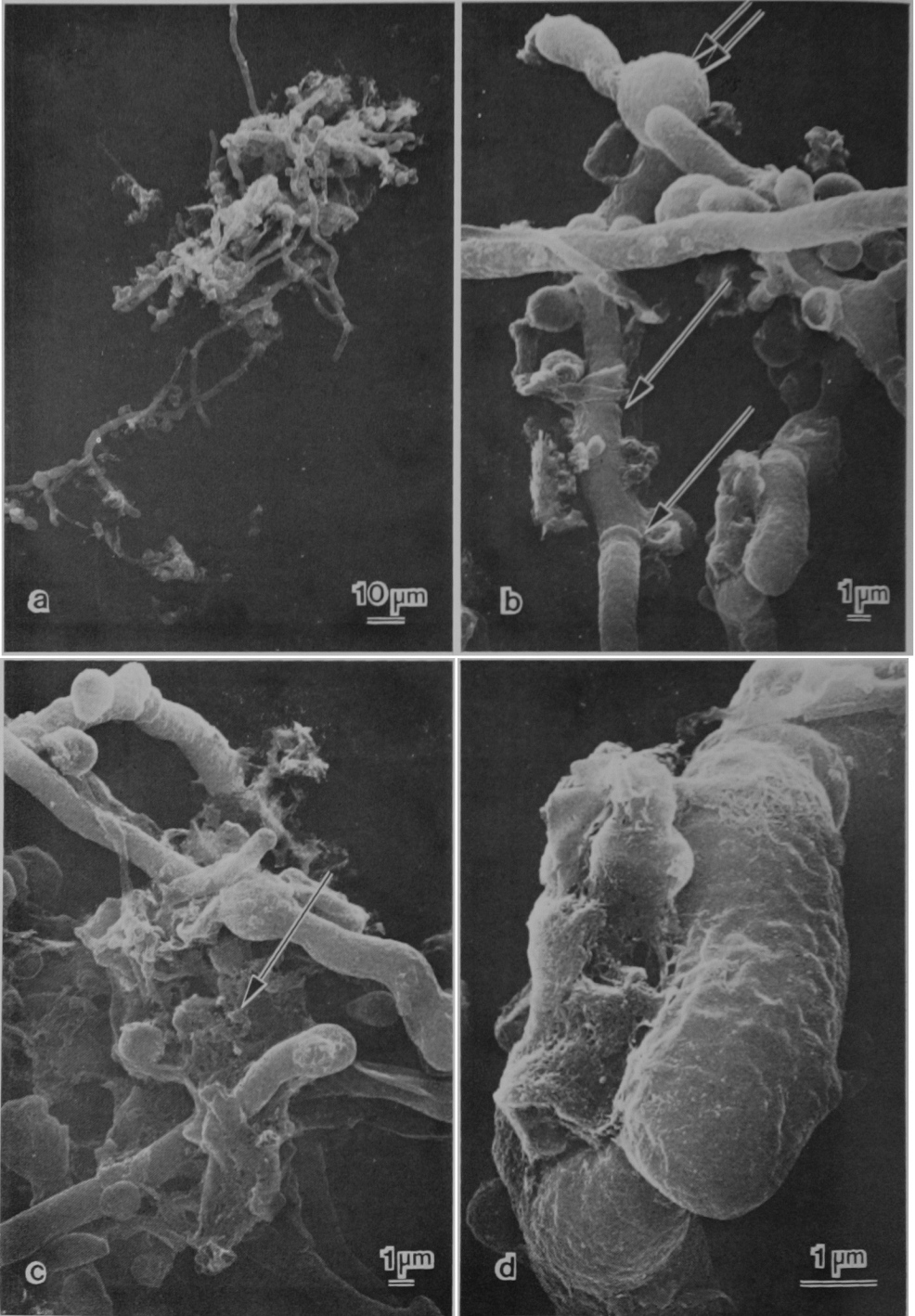
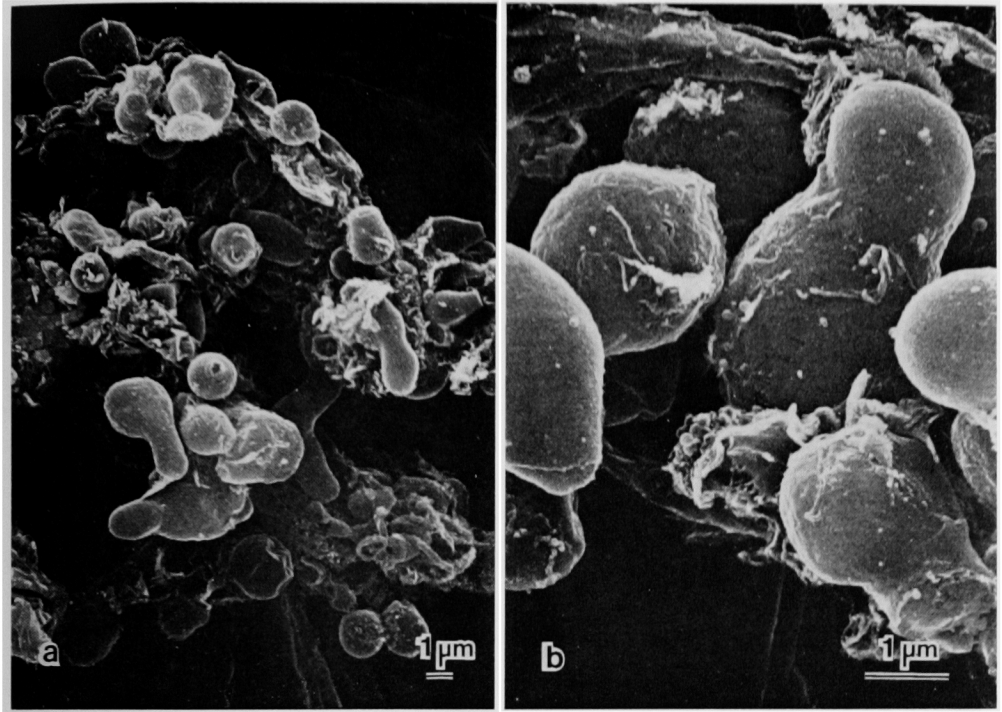


Fig. 7 24-Hours cultures grown with 6.4 ng/ml of OCZ. Most conidia remained ungerminated without any hyphal growth.

(a) $\times 3,600$; (b) $\times 12,000$



(Fig. 8 d, ←). 0.4 ng/ml OCZ 処理培養では、菌糸の変形はさらに顕著となり、皺襞模様のついた菌糸表面には、顆粒状または不定形の物質が豊富に付着していた (Fig. 9, ←)。OCZ 濃度 1.6 ng/ml で処理した場合には、多数の未発芽分生子とともに発育菌糸も認められた (Fig. 10)。しかし、菌糸の変形ならびに表面形態の変化が著しく、深い皺襞形成 (←)、表層剝離および線維状物質の付着を認めた (Fig. 10 b, c)。この変化は 3.2 ng/ml OCZ 処理培養でさらに顕著に生じた (Fig. 11)。薬剤濃度を 6.4 ng/ml に高めると、大部分の分生子は未発芽状態にとどまった (Fig. 12 a, b, ←)。一方、発芽した少数の分生子は太く短い菌糸を形成したが、著しく膨化し、皺状変化を示すその表面および細胞外には線維状、顆粒状または不定形の多量の物質が付着または堆積する像が観察された (Fig. 12 c, d, ←, 二)。

薬剤処理を 72 時間まで続けた後に観察した結果から、0.2~6.4 ng/ml の薬剤濃度ではいずれもかなりの程度の菌糸発育が起こっていることが知られた。また、それぞれの培養で発育した菌糸は、薬剤濃度に依存してある程度特徴的な形態学的変化を示したが、対応する 48 時間培養のそれと比べるとむしろ軽度であった。12.5

ng/ml 以上の薬剤濃度下ではこの時点でも菌糸発育はほとんど認められなかった。Fig. 13, 14, 15 にそれぞれ薬剤 0.2, 1.6, 6.4 ng/ml 処理培養にみられる菌糸の発育形態を示す。全体的に旺盛な菌糸発育がみられ、分生子はほとんど見当らなかった (Fig. 13 a)。しかし、一部の菌糸の先端部は、短い細胞が分節孢子様に連鎖をつくり、また軽度の膨隆を示す菌糸も認められ (Fig. 13 b, c ←)、菌糸の伸長発育はなお阻害されていることがうかがわれた。一部を除いて菌糸表面はおおむね平滑な像を呈した (Fig. 13 c)。Fig. 14 に示されるように、1.6 ng/ml 薬剤処理培養においては、菌糸は比較的良好に伸長発育し、全体的に波状屈曲が目立ち、菌糸先端部ならびに中間部でところどころ著しい不整形形態を示した (Fig. 14 b, c)。菌糸表面は、大部分が平滑な像を呈したが、変形の著しい部分などでは皺襞がみられた (Fig. 14 c)。また、分枝がとくに強く阻害されるらしく、分枝部は側方に向った短い突起として観察された (Fig. 14 c, ←)。薬剤濃度 6.4 ng/ml においても 72 時間後にはかなり旺盛な菌糸発育がみられた (Fig. 15)。菌糸は伸長しているものの波状またはカール状屈曲変形は 1.6 ng/ml 処理の場合よりもさらに顕著となり、高倍率写真から、

Fig. 8 48-Hours cultures grown with 0.2 ng/ml of OCZ. Morphological and structural alterations of growing hyphae were characterized by exfoliation of surface layers and occurrence of wrinkled surfaces (←) especially frequent at the subterminal hyphal region. Occasional attachment of fibrillar materials to the hyphal surface is also seen.

(a) $\times 120$; (b) $\times 1,200$; (c) $\times 8,600$; (d) $\times 12,000$

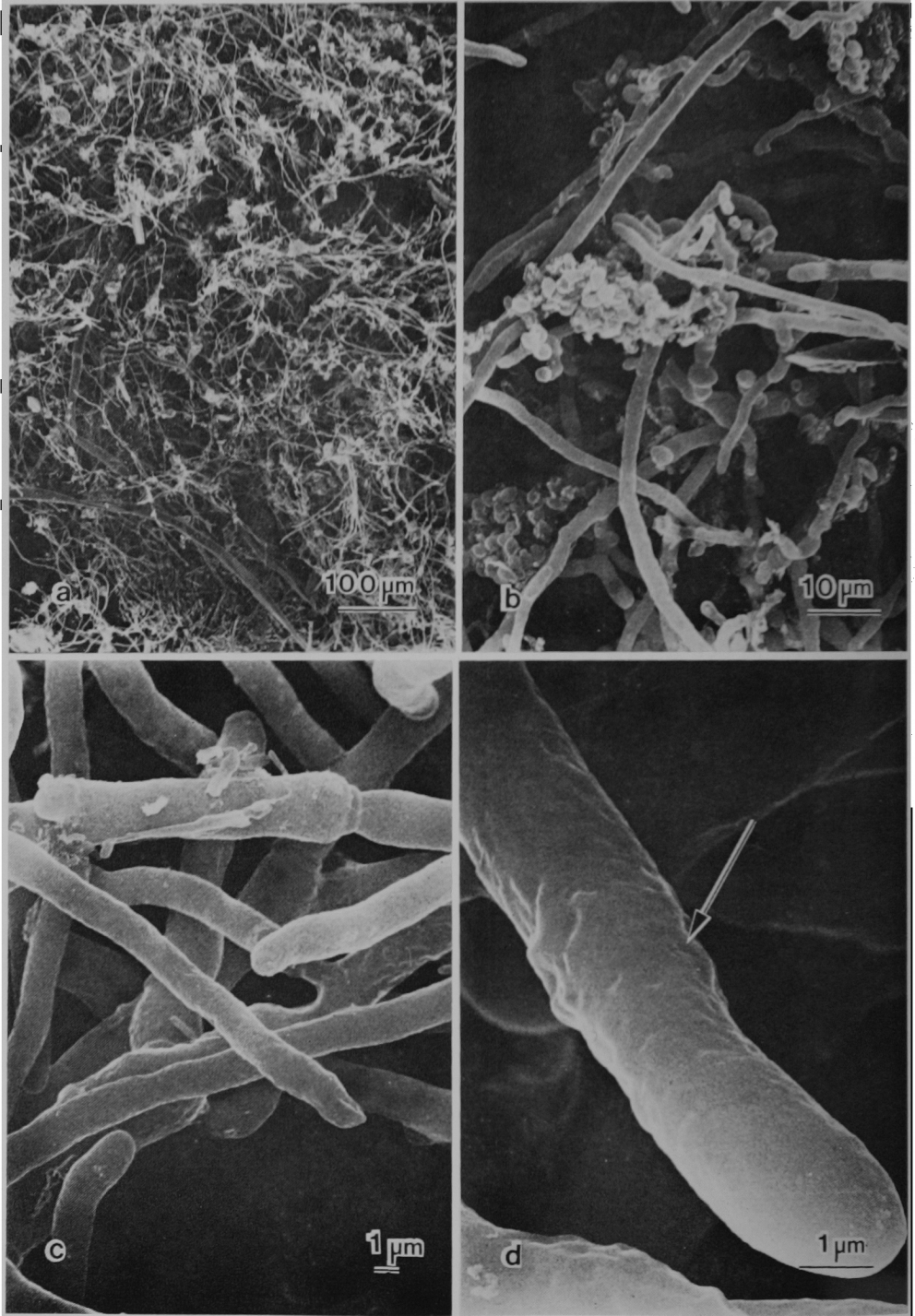


Fig. 9 48-Hours cultures grown with 0.4 ng/ml of OCZ, showing more marked morphological distortion of growing hyphae. Granular materials (\leftrightarrow) were massively attached the surface of wrinkled hyphae.

(a) $\times 120$; (b) $\times 1,200$; (c) $\times 7,200$

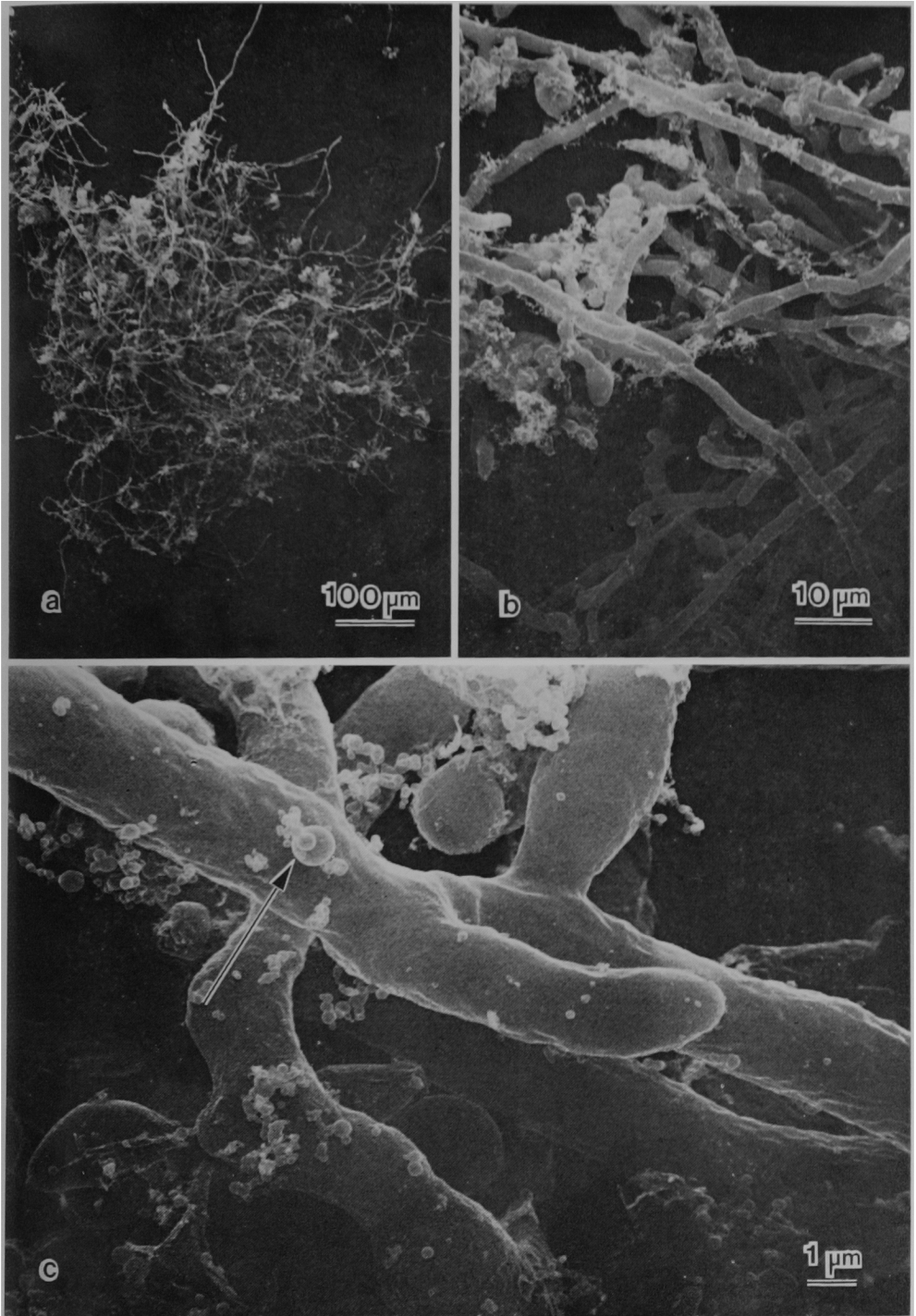


Fig. 10 48-Hours culture grown with 1.6 ng/ml of OCZ. Deep wrinkles (\leftarrow) occurred on the surface of markedly deformed hyphae, to which fibrillar materials were occasionally attached.

(a) $\times 120$; (b) $\times 3,600$; (c) $\times 12,000$

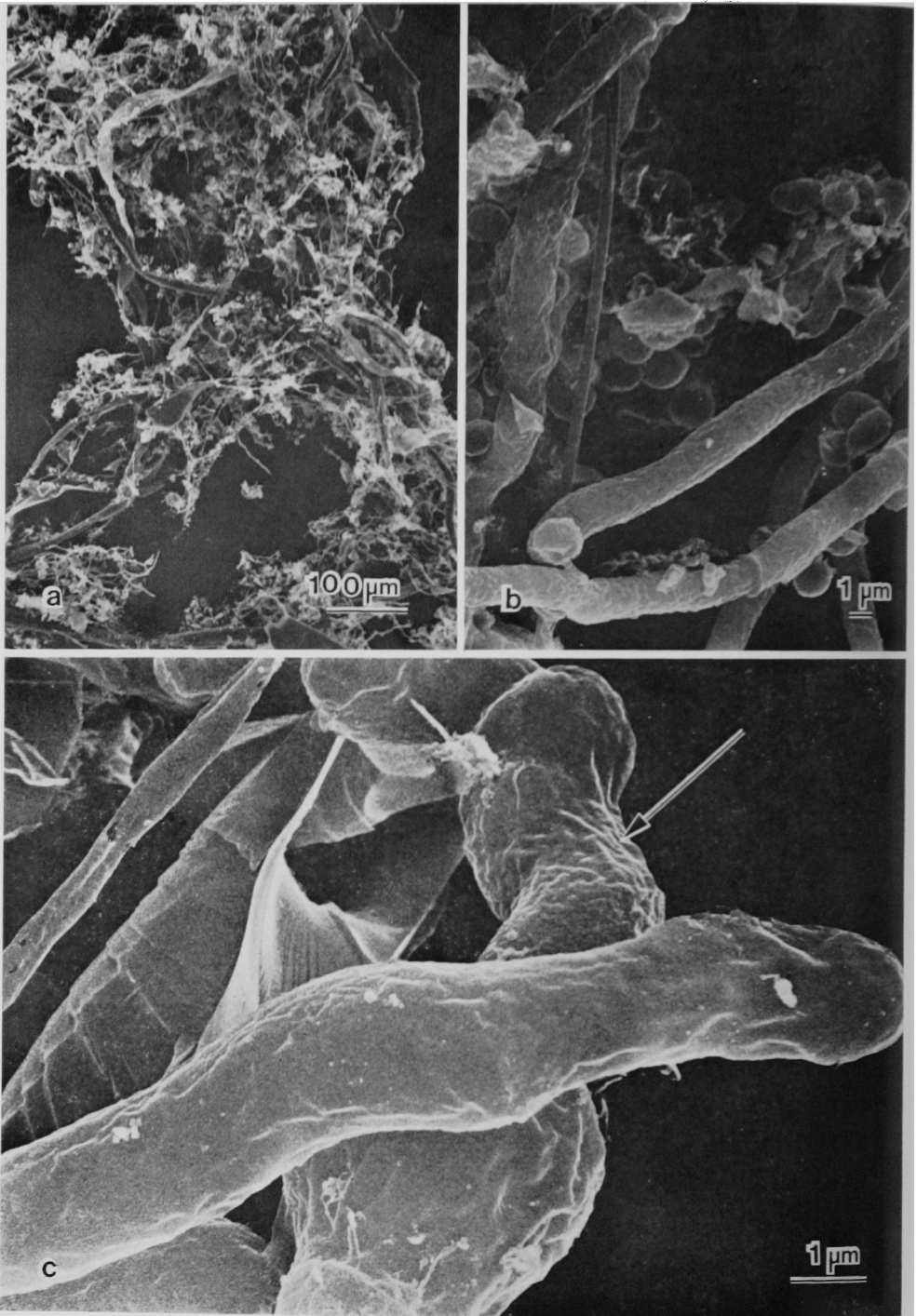


Fig. 11 48-Hours cultures grown with 9.2 ng/ml of OCZ. More profound alterations of the hyphal morphology are noted.

(a) $\times 120$; (b) $\times 1,200$; (c) $\times 3,600$; (d) $\times 12,000$

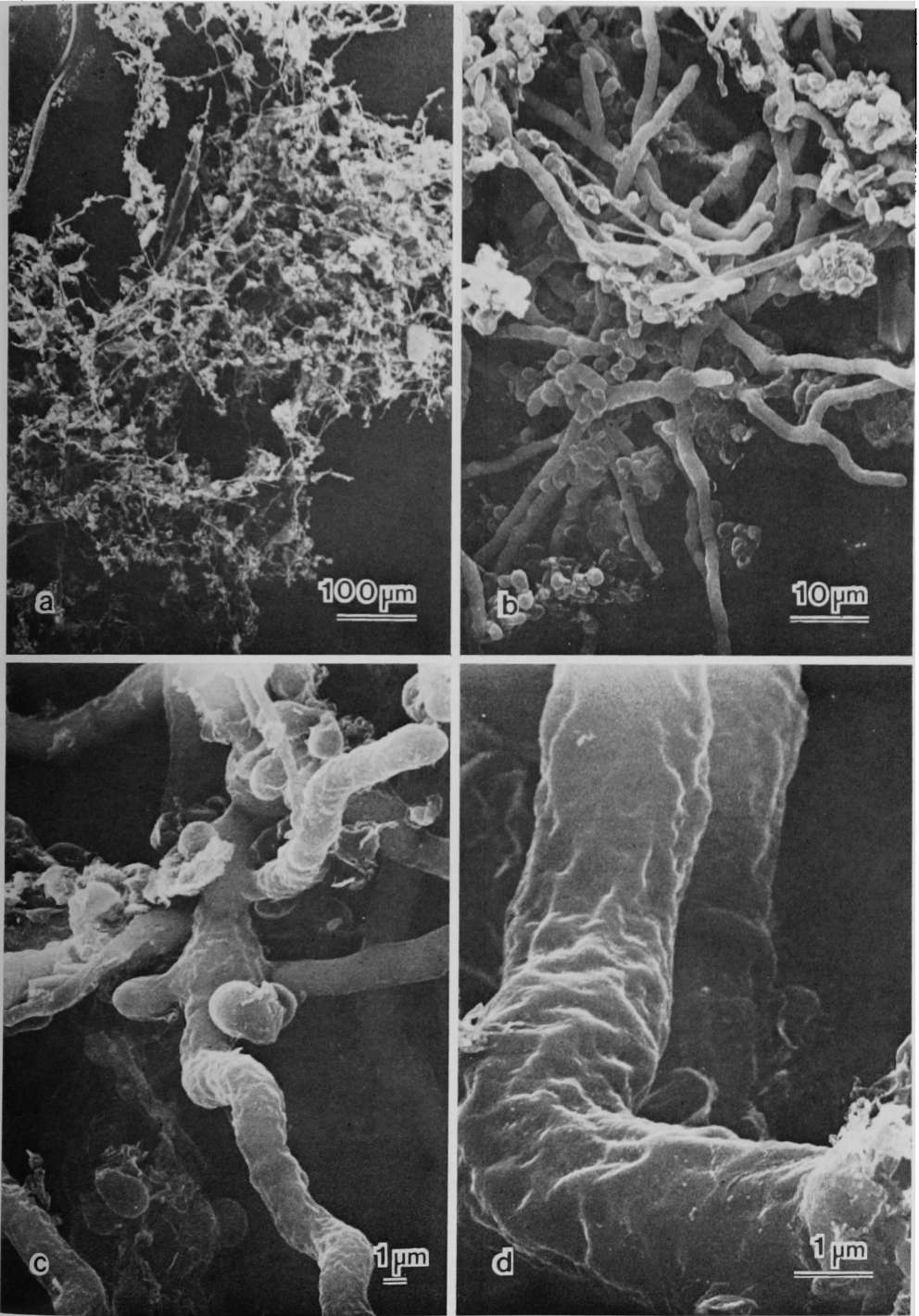


Fig. 12 48-Hours cultures grown with 6.4 ng/ml of OCZ. Most conidia remained ungerminating with development of small numbers of growing hyphae which were markedly deformed by intercalary occurrence of swollen or distorted cells. Fibrillar, granular or amorphous materials accumulated massively on the hyphal surface or extracellularly.

(a) $\times 1,200$; (b) $\times 3,600$; (c) $\times 12,000$; (d) $\times 12,000$

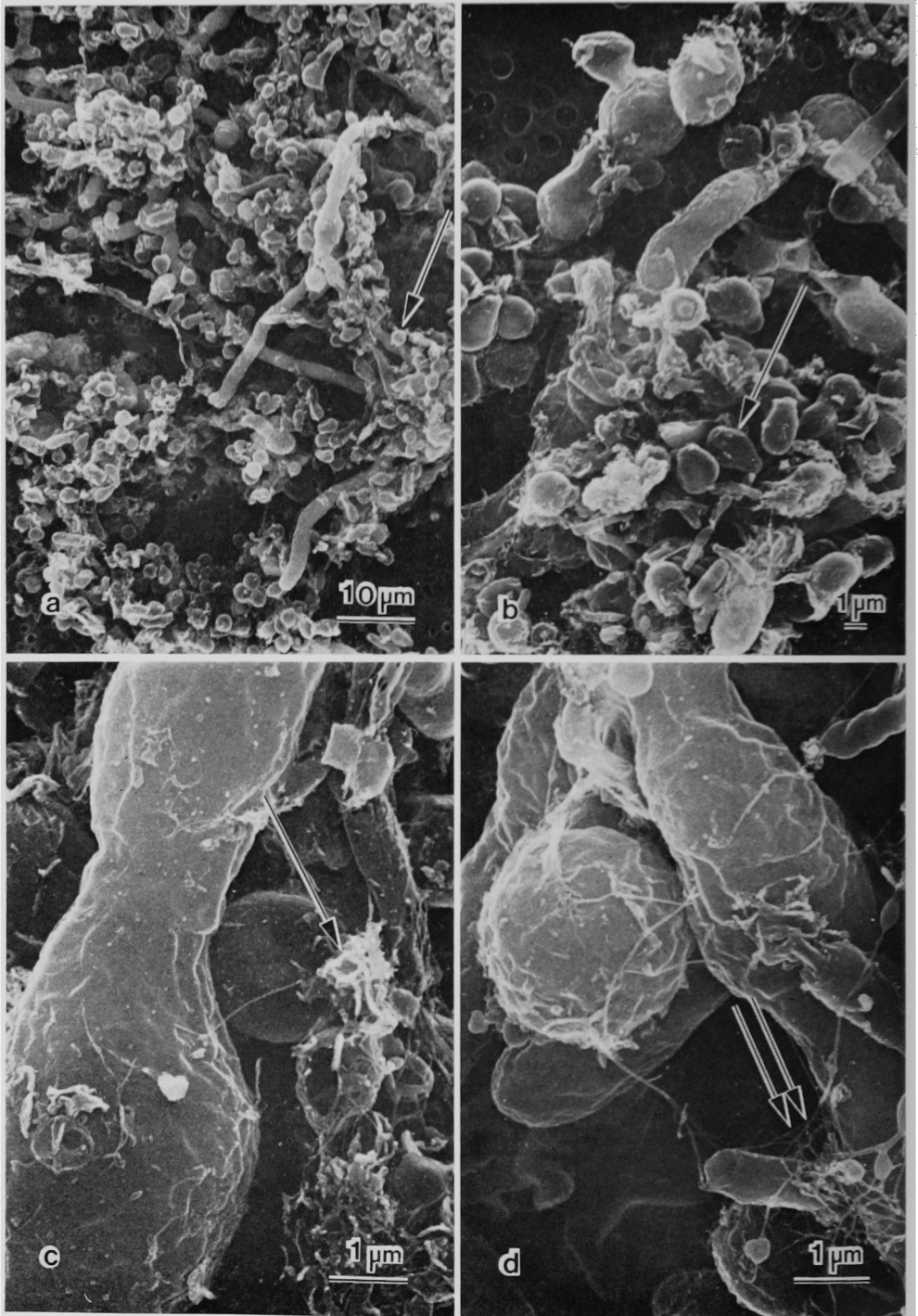


Fig. 13 72-Hours cultures grown with 0.2 ng/ml of OCZ showing relatively well developed hyphae. At the terminal region of some hyphae, spherical cells arranging in chain (\leftarrow) are seen.

(a) $\times 600$; (b) $\times 3,600$; (c) $\times 7,200$

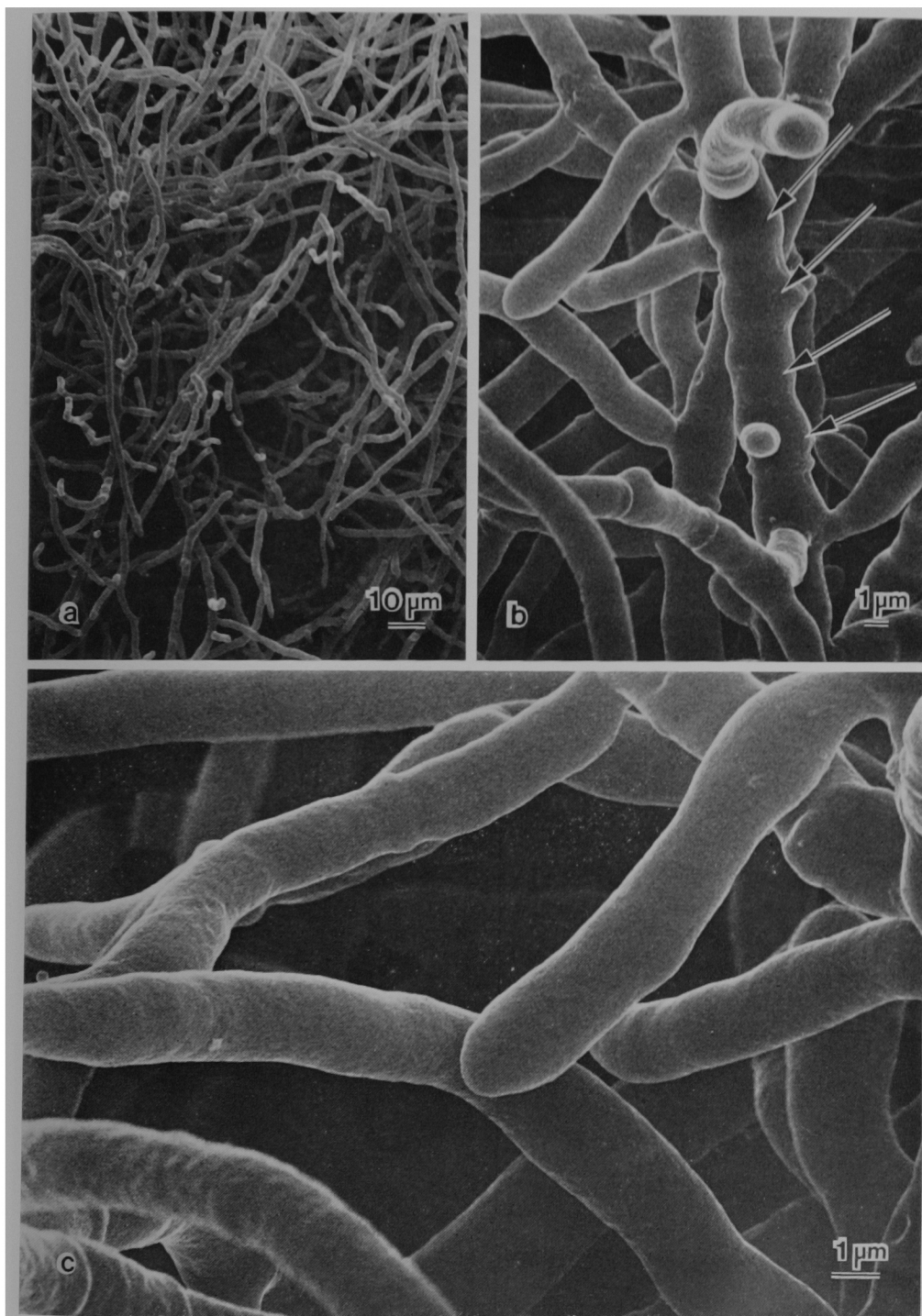


Fig. 14 72-Hours cultures grown with 1.6 ng/ml of OCZ distinguished by development of wavy hyphae. Deformation of the hyphae became more prominent by occurrence of short processes (\leftarrow).

(a) $\times 600$; (b) $\times 3,600$; (c) $\times 12,000$

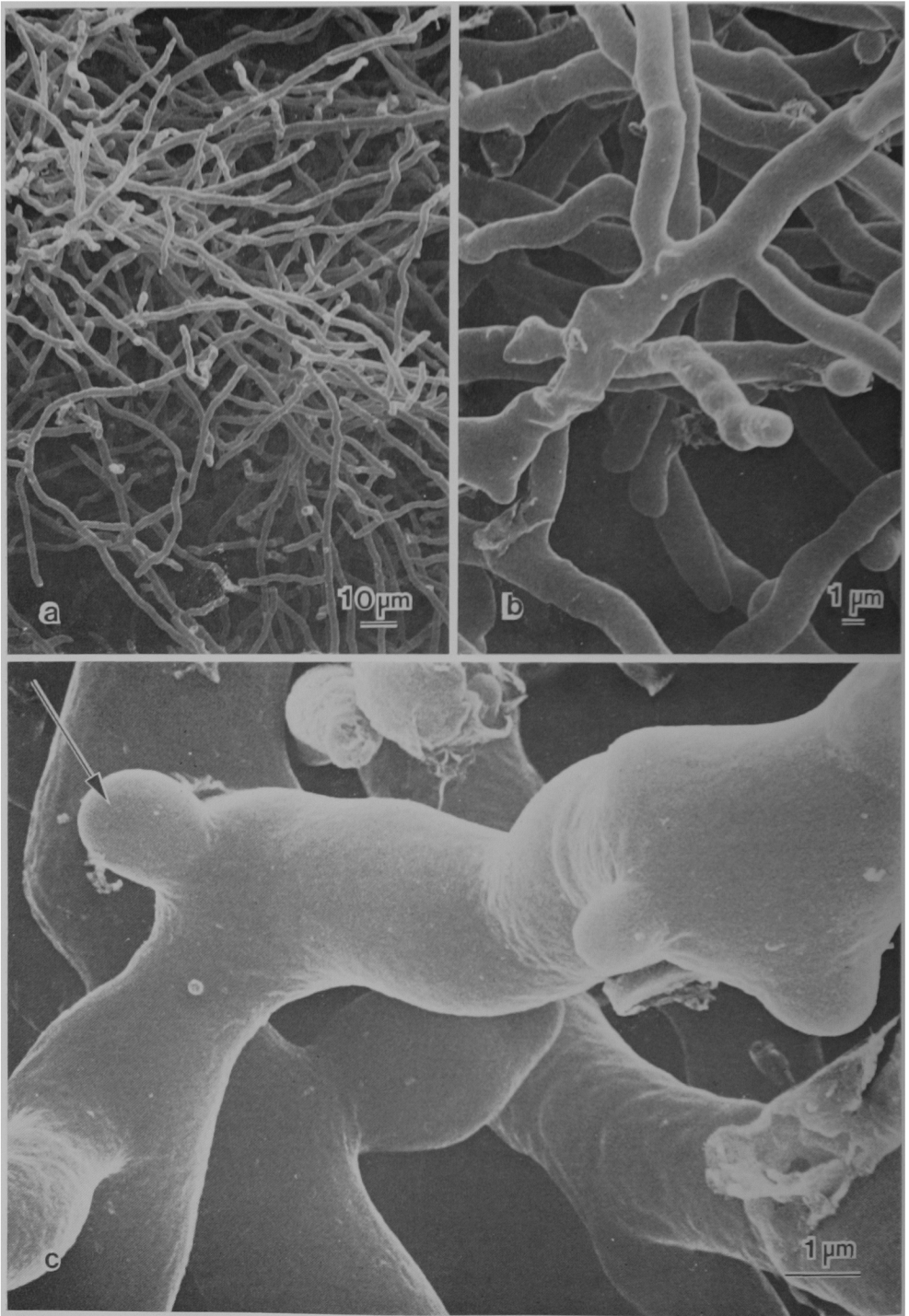
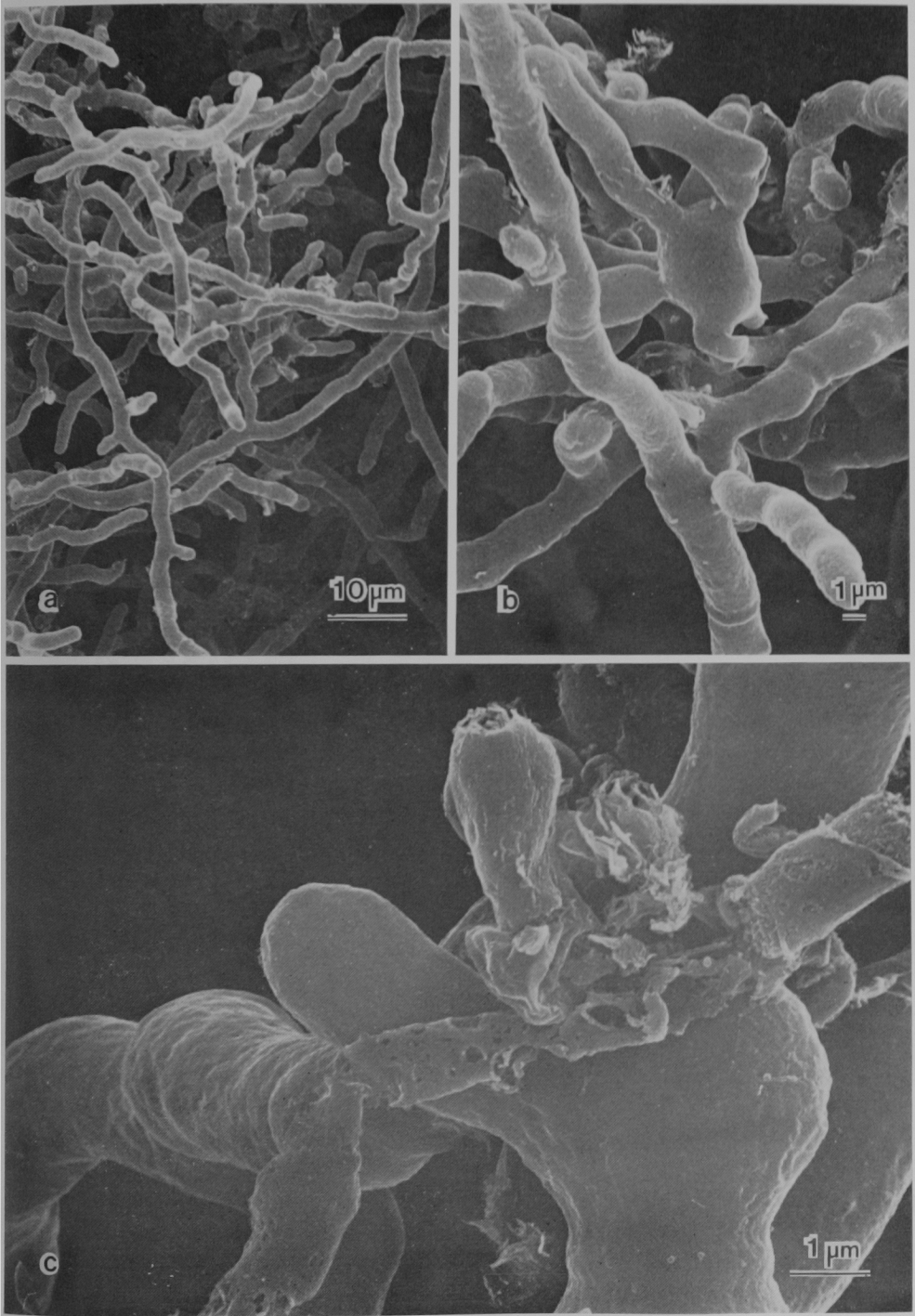


Fig. 15 72-Hours cultures grown with 6.4 ng/ml of OCZ. Alterations of hyphal morphology and surface structures as were seen in Fig. 14 became more marked in extent and frequency.

(a) $\times 1,200$; (b) $\times 3,600$; (c) $\times 12,000$



菌糸細胞の不整形化、膨化、表面皺状変化、および線維状ないし不定形物質の付着が認められた (Fig. 15 b, c)。

III. 考 察

今回、試験菌として使用した *T. mentagrophytes* TIMM 1189 株は、液体培地に分生子を接種して振盪培養した場合、発育速度から予想されたとおりに極めて速やかな菌糸発育を行なうこと、しかも発育菌糸は 72 時間までの観察期間中はすべてが平滑な表面をもつ均一な幅のまっすぐな形態を示し、従来報告された白黴菌の若い培養の発育形態^{14,15}によく対応することが走査電子顕微鏡法により確認された。一方、OCZ を添加した培養においては、薬剤濃度と作用時間に応じて幾つの特徴的な形態学的効果が認められた。これらの効果は、二つに大別される。一つは、接種された分生子の発芽およびそれに続く菌糸伸長発育の阻害であり、他は菌糸発育形態の異常である。前者の効果は、当然のことながら、培養時間が短いほど顕著に発現された。低濃度の薬剤存在下では分生子発芽や菌糸発育は一時的に抑制されても、不可逆的な阻害を受けているわけではないので、一定時間遅れて開始するからである。これに対して、発育菌糸に対する形態学的効果は、48 時間培養すなわち発芽後の菌糸発育が開始された早期に最も顕著に現われた。菌糸にみられる特徴的な変化としては、菌糸細胞の不整歪曲変形、膨化、表面の皺状形成および表層の剥離があげられ、その結果、菌糸全体は伸長を阻害されるばかりでなく、波状またはカール状に屈曲した変形像を示すようになる。これらの形態学的変化は、いずれも直接的には菌糸細胞壁構築の局所的または全体的異常に起因すると考えられ、ことに膨化は細胞壁剛性の低下を示唆するものであろう。菌糸自体の形態学的変化に加えて、菌糸表面および外部に顆粒状、小胞状、線維状その他不定形構造をもつ物質の付着、堆積が認められた。これらの物質は、対照培養ではまったく観察されず、また培養の特定の時期に多く認められるところから、細胞外に遊出された細胞成分を主体としてつくられたと考えるのが妥当であり、したがって、細胞膜障害が引き起こされた結果と解釈される。*Candida albicans* 細胞を用いた OCZ 作用機序に関する研究から、本剤の抗菌活性に主としてかわる生化学的過程は、比較的高濃度では直接的細胞膜障害、低濃度ではエルゴステロール合成阻害であることを推論した¹⁷⁾。細胞学的類似性ならびに OCZ 感受性の点からみて、*T. mentagrophytes* などの皮膚糸状菌においても基本的には同一の作用機序が働くと推察される。したがって、*C. albicans* 細胞でみられたのと同様、*T. mentagrophytes* に対する sub-MICs 域の OCZ の抗菌作用は、主としてエルゴステロール合成阻害に基

づくものと考えられる。エルゴステロールは真菌細胞の主要ステロールであり、細胞膜および細胞壁の必須構成成分としてそれぞれの機能および構造に重要な役割を演じている^{18,19)}。したがって OCZ 処理培養で観察された形態学的変化が、いずれもエルゴステロール合成阻害に由来する可能性は充分考えられるところであり、今後検討すべき問題であろう。

18 時間作用で顕著にみられた OCZ による *T. mentagrophytes* 培養の形態学的変化は、72 時間作用後には、むしろ軽減する傾向がみられた。一般にイミダゾール誘導体は、リン脂質および真菌細胞表層に存在する脂質成分と親和性が強く²⁾、そのためか培地中に添加すると菌量に比例して極めて大量に細胞へ取り込まれるのが特徴的であり、このことは miconazole について詳細に検討されている²⁰⁾。OCZ を用いたわれわれの予備実験から、本剤も同様の性質をもつことが示されている。したがって、OCZ 処理した培養においては、真菌発育が完全に阻止されない限り、菌量の経時的増加とともに菌体へ取り込まれる薬剤の割合が高くなり、培地中の有効薬剤濃度は徐々に低下することが予想される。この可能性は、前報に示した OCZ の MIC 値が判定日数の延長にともなって上昇すること³⁾、および本報での OCZ 効果の漸減を説明する一つの根拠となる。また、このことは本剤の sub-MICs を測定するのに、早期培養での形態学的観察の必要性を示唆している。

走査電子顕微鏡法を用いて抗真菌剤の白黴菌その他の真菌の発育形態に及ぼす影響を検討した研究の報告は少ないが、われわれの知る限り、OCZ の形態学的効果は、定性的には bifonazole のそれに酷似している¹⁸⁾。これは両剤が同様の作用機序をもつことを反映するものであろう。

sub-MICs の下方限界値すなわち MAC は、光学顕微鏡または電子顕微鏡によって観察される形態・構造上の変化を起こしうる最小薬剤濃度として、または対照に比べて菌数を 1 桁低下させる最小薬剤濃度として測定される¹²⁾。白黴菌その他の糸状菌のように、菌数または菌量の正確な測定が困難なものについては、形態学的変化をパラメーターとして測定する方法がより適切であり、とくに走査電子顕微鏡法は比較的簡便で迅速に細胞の形態学的変化の詳細をとらえることができる点で優れている。この方法による観察から、OCZ は *T. mentagrophytes* 試験菌に対して $\leq 0.2 \text{ ng/ml}$ という極めて低い MAC をもつことが見出された。この値は通常の方法で測定された MIC の 1/3,000 以下の濃度に相当し、余りにも低過ぎるようにも思われる。しかし、*T. mentagrophytes* に対して OCZ とほぼ同程度の MIC をもつ bi-

fonazole が本菌の菌糸発育を 1 ng/ml で明らかに阻止した成績¹⁰⁾を考慮するならば、決して驚くにはあたらず、イミダゾール誘導体に共通する特性と理解することができよう。化学療法における抗菌剤の sub-MICs の臨床的意義¹¹⁾からみて、OCZ が MIC 以下に広い範囲の sub-MICs をもつことは、本剤の優れた臨床効果をよく説明するものであろう。

文 献

- 1) MIXICH, G. & K. THIELE: Ein Beitrag zur Stereospezifischen Synthese von antimykotisch wirksamen Imidazolyloximäthern. Oxiconazol-nitrat (Sgd 301-76), ein neues Breitbandantimykotikum. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 29 (II): 1510~1513, 1979
- 2) ARAI, T.: Filamentous microorganisms-biochemical aspects. Japan Scientific Societies Press, Advances in research of mechanism of imidazole-antimycotics action (YAMAGUCHI, H.) (in press).
- 3) POLAK, A.: Oxiconazole, a new imidazole derivative. Evaluation of antifungal activity *in vitro* and *in vivo*. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 32 (I): 17~24, 1982
- 4) POLAK, A.: Antifungal activity *in vitro*, a phenylpropylmorpholine. *Sabouraudia* 21: 205~213, 1983
- 5) 平谷民雄, 内田勝久, 山口英世: 新規イミダゾール誘導体 oxiconazole nitrate の *in vitro* 抗真菌活性に関する検討。 *Chemotherapy* 32: 568~584, 1984
- 6) 内田勝久, 山口英世: モルモットの白癬モデルに対する新規イミダゾール誘導体 oxiconazole nitrate クリーム剤の治療効果。 *Chemotherapy* 32: 585~601, 1984
- 7) STÜTTGEN, G. & E. BAUER: Bioavailability, skin- and nailpenetration of topically applied antimycotics. *Mykosen* 25: 74~80, 1981
- 8) KONZELMANN, M. & W. GRABER: Untersuchung über Wirkung und Verträglichkeit von Oxiconazol-creme an 100 Mykosepatienten. *Acta Therapeutica* 8: 361~365, 1982
- 9) BEIERDORFFER, H.; K. PICOLIN & D. HERBOLD: Oxiconazol, ein neues topisches Antimykotikum bei der Behandlung von Dermatomykosen. *Acta Therapeutica* 9: 147~155, 1983
- 10) WEITHASSER, H.: Erfahrungen über ein neues lokal wirksames Antimykotikum "Oxiconazol-Nitrat". *Praktischer Arzt.* 37: 302~309, 1983
- 11) ROLINSON, G. N.: Subinhibitory concentrations of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 3: 111~113, 1977
- 12) LORIAN, V.: Antibiotics in laboratory medicine, Williams & Wilkins, 12. Effects of subminimum inhibitory concentrations of antibiotics on bacteria (LORIAN, V.) pp.342~408, 1980
- 13) OSUMI, M. & S. TORIGATA: Surface structure of microbodies isolated from yeast cells. *Scanning Electron Microsc.* 1977 II, pp.617~622, 1977
- 14) ITO, Y.; Y. NOZAWA, H. SUZUKI & T. SETOGUCHI: Surface structure of dermatophytes as seen by the scanning electron microscope. *Sabouraudia* 7: 270~272, 1970
- 15) ELMROS, Th. & B. WINBLAD: Scanning electron microscopic study of dermatophyte colonies on agar surface. *Mykosen* 24: 181~186, 1981
- 16) OSUMI, M.; N. YAMADA, J. OKADA, H. YAMAGUCHI, T. HIRATANI & M. PLEMPER: The effect of bifonazole on the structure of Trichophyton. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 33 (II): 1484~1491, 1983
- 17) 平谷民雄, 山口英世: Oxiconazole nitrate の抗真菌作用機序に関する研究。 *Chemotherapy* (投稿中)
- 18) WASSER, M. K.: Fungal lipids. *Advances in Lipid Research* 15: 47~179, 1978
- 19) BRENNAN, P. J. & D. M. LOSEL: Physiology of fungal lipids: selected topics. *Advances in microbial Physiology* 17: 47~179, 1978
- 20) COPE, J. E.: The interaction of [³H] miconazole with *Candida albicans*. *Sabouraudia* 18: 211~228, 1980

EFFECT OF OXICONAZOLE NITRATE ON THE MORPHOLOGY
OF *TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES* AS OBSERVED
BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

HIDEYO YAMAGUCHI, YOKO YAMADA* and TAMIO HIRATANI

Research Center for Medical Mycology, Teikyo University School of Medicine

NAOKO YAMADA

Laboratory of Electron Microscopy, Japan Women's University

MASAKO OSUMI

Department of Biology, Japan Women's University

* Present institution : Department of Biology, Japan Women's University

The effect of sub-minimum growth-inhibitory concentrations (sub-MICs) of a new imidazole antimycotic oxiconazole nitrate on the morphology of growing hyphae of *Trichophyton mentagrophytes* in a liquid medium was studied by high-resolution scanning electron microscopy. With this drug at decreasing concentrations up to 0.2 ng/ml, germination of inoculated conidia and subsequent hyphal growth were significantly inhibited and several morphological changes were produced in developing hyphae. They were characterized by deformation or swelling of hypha-constituting cells, occurrence of wrinkles on the hyphal surface, exfoliation of hyphal surface layers and accumulation of granular, fibrillar and/or amorphous materials on the hyphal surface or in the medium. These morphological changes increased in extent with increasing drug concentrations and became most prominently after 48 hours of exposure to the drug.