

## イミダゾール系抗真菌剤 710674-S の抗白癬菌作用 に関する走査電子顕微鏡的研究

山口英世・平谷民雄・山田陽子\*

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 60 年 1 月 30 日受付)

新しいイミダゾール系抗真菌剤 710674-S が液体培地に分生子を接種した *Trichophyton mentagrophytes* 培養の発育に対してどのような形態学的影響を及ぼすかを培養開始後 72 時間目まで高分解能走査電子顕微鏡を用いて追跡検討した。薬剤無添加対照培養は、24 時間後にすでに旺盛な菌糸発育を示していたのに対して、1.6~100 ng/ml 薬剤添加培養においては 24 時間後でもほとんど分生子発芽または菌糸発育をみなかった。48 時間以後では、1.6~12.5 ng/ml 薬剤添加培養は菌糸発育を示したが、発育の程度は薬剤濃度に依存して阻害され、また菌糸表面の皺壁形成、線維状物質の付着、菌糸一部細胞の膨化、細胞壁表層の部分的剥離などの形態学的変化を生じた。25 ng/ml 以上の薬剤濃度で処理した培養においては、72 時間後まで菌糸発育はまったく認められず、分生子は変性、萎縮、崩壊した。これらの薬剤濃度依存性の二つのタイプの形態学的効果を、本剤の生化学的作用機序と抗菌作用との関連性の視点に立って考察した。

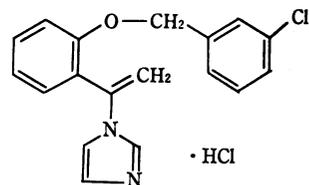
710674-S【(Fig. 1) は、塩野義製薬研究所により抗真菌剤として開発された新しいイミダゾール誘導体であり、1-[1-[*o*-(*m*-chlorobenzoyloxy) phenyl] vinyl]-1*H*-imidazole hydrochloride の化学名をもつ<sup>1)</sup>。この化合物の抗真菌スペクトルは広く、ほとんどすべての病原真菌に対して *in vitro* 抗菌活性を示し、とりわけ皮膚糸状菌の発育を低濃度で阻止する<sup>1,2)</sup>。これに対応して、710674-S の外用剤は、モルモットで作製した実験的白癬に対して優れた治療効果を示すことが見出され、臨床的有用性が期待される<sup>1)</sup>。実際に種々の病型の白癬、皮膚カンジダ症などの表在性真菌症の臨床症例に対して行なわれた最近の予備的治療実験は、本剤が高い薬効をもつことを証明している<sup>3,4)</sup>。

われわれは先に 710674-S の抗真菌作用機序を明らかにするために、*Candida albicans* 細胞を用いて生化学的検討を行なった結果、本剤は諸種の細胞機能に対して従来報告されている他のイミダゾール系抗真菌剤と同様に二元的作用機序を有し、比較的低濃度ではエルゴステロール合成阻害作用が、また高濃度では細胞膜に対する直接的障害作用がそれぞれ発育阻止の主要な機序として

働く可能性が強く示唆された<sup>5)</sup>。しかし、このような作用が真菌細胞にもたらす形態学的影響については不明である。

本報に示す研究は、710674-S の生化学的作用機序を支持する形態学的根拠を得ること、および本剤の抗真菌活性を形態学的に検討することを目的として企図された。試験菌として *C. albicans* よりも高い感受性と複雑な栄養形態をもち、しかも 710674-S の主要適応症である白癬の原因となる *Trichophyton mentagrophytes* を選び、その分生子を接種した培養の発育形態が種々の濃度の薬剤によってどのような影響を受けるかを高分解能走査電子顕微鏡法を用いて観察した。

Fig. 1 Chemical structure of 710674-S



## I. 実験材料と方法

1) 使用菌株：当施設に保存されている *T. mentagrophytes* TIMM 1189 株を試験菌として使用した。この菌株は、ハムスター病巣から分離されたもので、典型的な培養および形態学的性状をもち、モルモットにおいて良好な白癬の病態モデルをつくりうること<sup>9)</sup>、加えて、通常の培養条件下で小分生子を豊富に産生し、菌糸発育が速やかに起こることからこの実験に好適な菌株として選ばれた。

Sabouraud dextrose agar 上で標準的な寒天希釈法<sup>11)</sup>により測定した TIMM 1189 株に対する 710674-S の最小発育阻止濃度は 0.63  $\mu\text{g}$  (630 ng)/ml の値を示した。

2) 薬剤：塩野義製薬研究所より分与された 710674-S 精製原末標品 (Lot 77) を 100% ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、必要な濃度に調整して使用した。

3) 接種菌液の調製：継代培養斜面から白金線で採取した分生子を 1/10 Sabouraud dextrose agar (ポリペプトン 0.1%, グルコース 0.4%) 斜面培地に接種し、27°C で 2~3 週間培養を行なった。分生子が豊富に造生されたことを確認した後、0.1% (v/v) Tween 80 を

含む滅菌生理食塩水を注入して斜面部を覆い、白金耳でこすりながら分生子を遊離させた。この分生子浮遊液を 2~3 枚重ねの滅菌ガーゼに通して濾過し、寒天片や菌糸塊を除去した。得られた濾液中に含まれる分生子数を血球計算板で算定し、約  $3 \times 10^7$  細胞/ml の濃度に調整した後、接種用分生子浮遊液として実験に供した。

4) 培養および薬剤処理：1容の上記分生子浮遊液を 100 倍容量の Sabouraud dextrose broth で希釈し、フラスコに分注した。次いで各フラスコに最終薬剤濃度 0.16~100 ng/ml になるように調製した段階的濃度の 710674-S 溶液を 1容添加した。薬剤無添加対照培養のフラスコには同一容量の DMSO を添加した。充分混和した後、各フラスコを 27°C で回転振盪しながら 72 時間まで培養した。

5) 試料の調製および走査電子顕微鏡観察：所定の培養時間後に採取した培養を直ちに遠心し、分生子または(および)発育菌糸を沈渣として回収した。これを 1/10 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に再浮遊し、次いで遠心するという操作を 5 回くり返し、十分に洗浄した。最後に得られた沈渣を 1/10 M リン酸カリウム

Fig. 2 Conidia inoculated into growth medium before incubation. Oval microconidia aggregated to form small clusters.

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

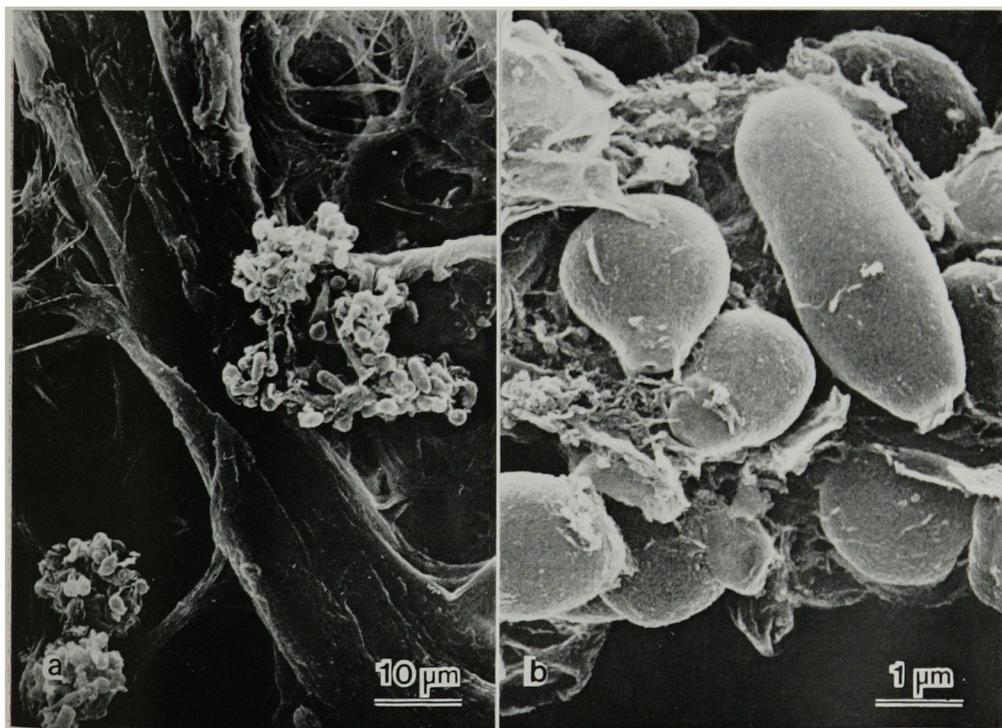


Fig. 3 Untreated control cultures grown for 24 hours. Well developed hyphae with smooth surface were seen.

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

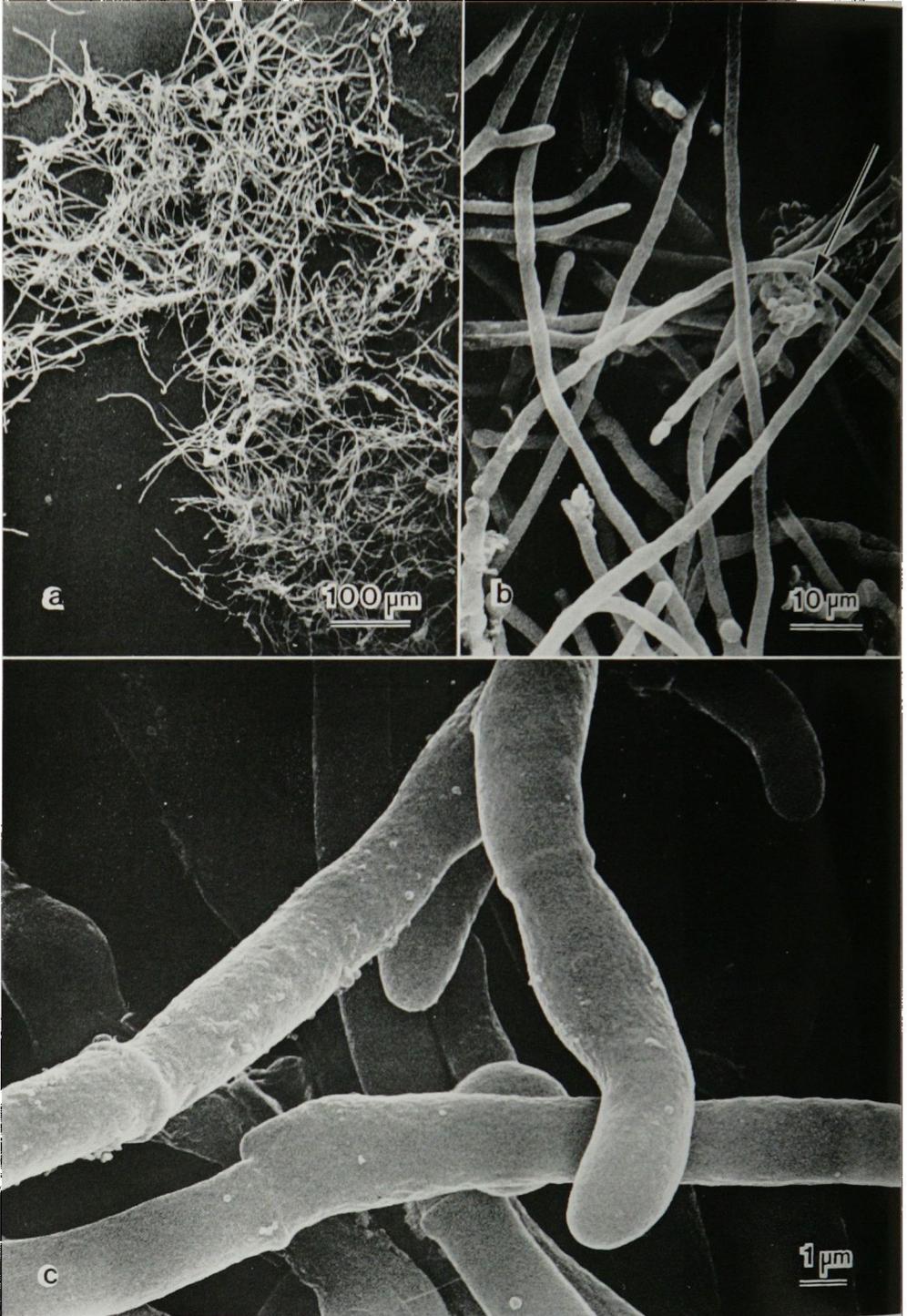


Fig. 4 Untreated control cultures grown for 48 hours showing heavily developed hyphae.  
(a)  $\times 120$ ; (b)  $\times 1,200$ ; (c)  $\times 3,600$

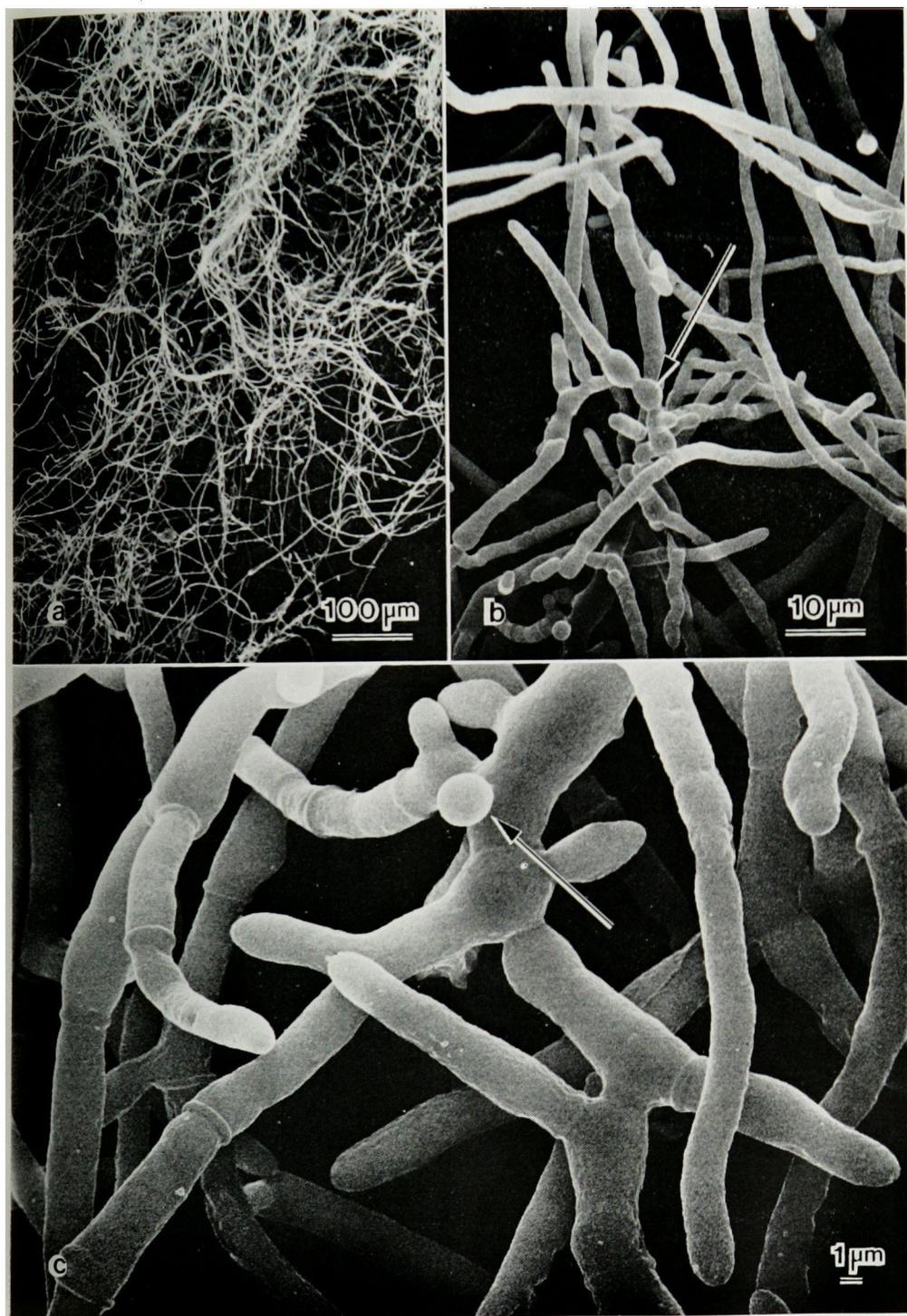
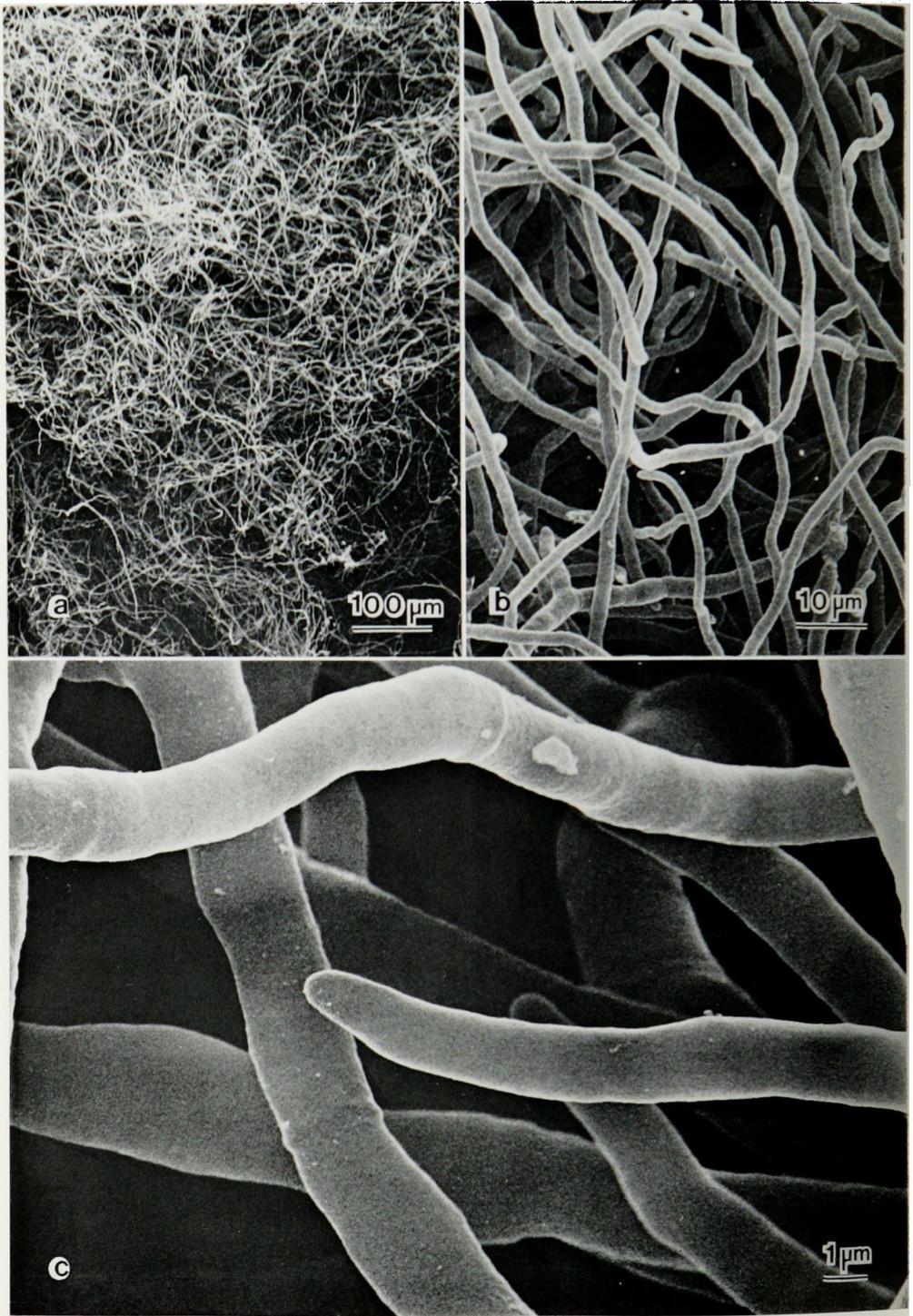


Fig. 5 Untreated control cultures grown for 72 hours. Hyphae developed to a greater extent.  
(a)  $\times 120$ ; (b)  $\times 1,200$ ; (c)  $\times 7,200$



緩衝液 (pH 7.4) で調製した 2% (w/v) グルタルアルデヒド溶液に懸濁して 2 時間 4°C で前固定を行なった。この緩衝液で 3 回遠心洗浄した後、1/10 M リン酸カリウム緩衝 (pH 7.4) 2% オスミウム酸溶液中に 4°C、1.5 時間浸漬して後固定を行なった。固定試料はアルコール系列で脱水し、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。また、試料中の菌量が少ないものについては、直接濾紙上に固定試料を回収し、臨界点乾燥した。各乾燥試料を支持台にのせ、電導性ペイントを用いて支持台に固着し、アースした。これを Technics Hammer II に入れ、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 mm の金-パラジウム合金 (60:40) 膜を蒸着した<sup>9)</sup>。各試料の観察、および写真撮影は、高分解能走査電子顕微鏡 (日立 HFS-2RS 型) により 20 KV の加速電圧を用いて行なった。

## II. 実験成績

1) 薬剤無添加対照培養: Fig. 2 は、接種菌液の電子顕微鏡写真である。濾紙の線維を背景にして *T. menta-*

*grophyles* の小分生子と見なされる直径 1.5~2.0  $\mu\text{m}$  の大きさの球形ないし楕円体形を呈する細胞の集塊が観察される。細胞外および細胞表面に不定形構造物がみられるが、これが培地成分由来か菌体由来かは不明である。観察した限り、破壊または著しく変形した分生子はなく、また菌糸も認められなかった。

薬剤無添加で培養すると 24 時間後にはすでに大部分の分生子は発芽、伸長し、菌糸塊を形成したが (Fig. 3), 一部の分生子は発芽しない状態に留まっていた (Fig. 3 b,  $\cdot$ )。発育菌糸のなかにはかなりの長さに伸長したのもみられたが、分枝は乏しかった。すべての菌糸は表面平滑であった。48 時間後には、菌糸発育はさらに著しくなり、酵母様細胞はまったく観察されず、ほとんどすべての分生子が発芽、伸長したことをうかがわせた (Fig. 4)。多くの菌糸は一定の幅をもち、分枝しながらフィラメント状に発育していたが、一部の菌糸においては細胞が幾分膨化し、厚膜孢子状または発芽孢子状の形態を示した (Fig. 4 b,  $\leftarrow$ )。この菌株の菌糸発育は極めて速やかかつ旺盛であり、72 時間後には肉眼的

Fig. 6 24-Hours cultures grown with 1.6 ng/ml (a) and 3.2 ng/ml (b) of 710674-S, mostly consisting of conidia without germination or hyphal growth.

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

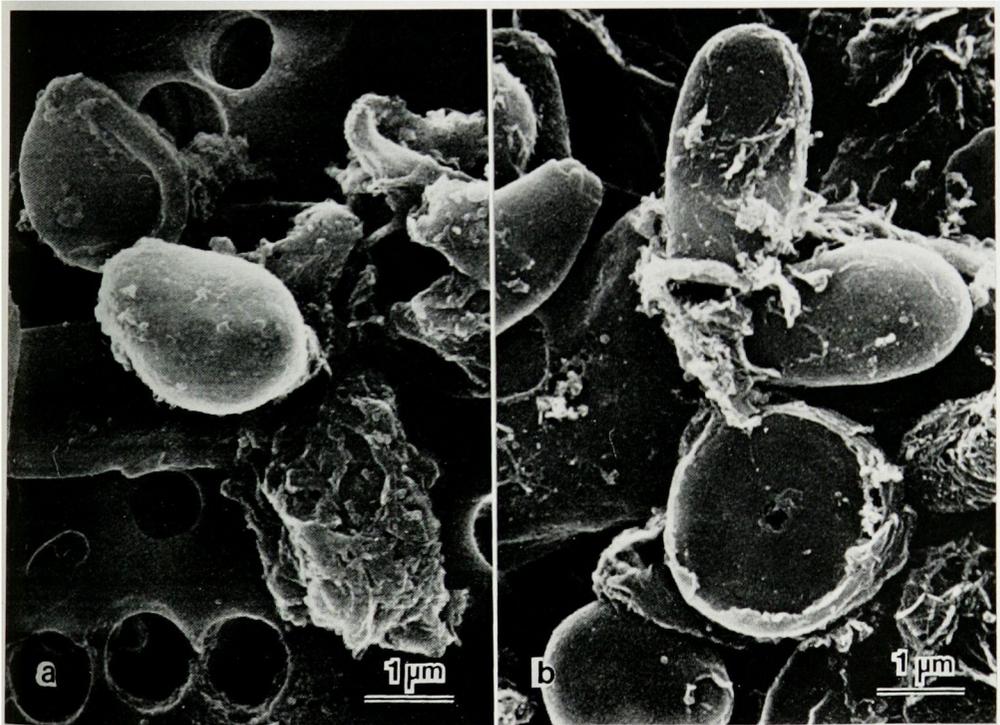


Fig. 7 48-Hours cultures grown with 1.6 ng/ml of 710874-S showing short hyphae with slight deformation in contour. In some hyphae granular or amorphous materials attached to the surface (b,  $\leftarrow$ ) and in others small parts of the surface were exfoliated (c,  $\leftarrow$ ).

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

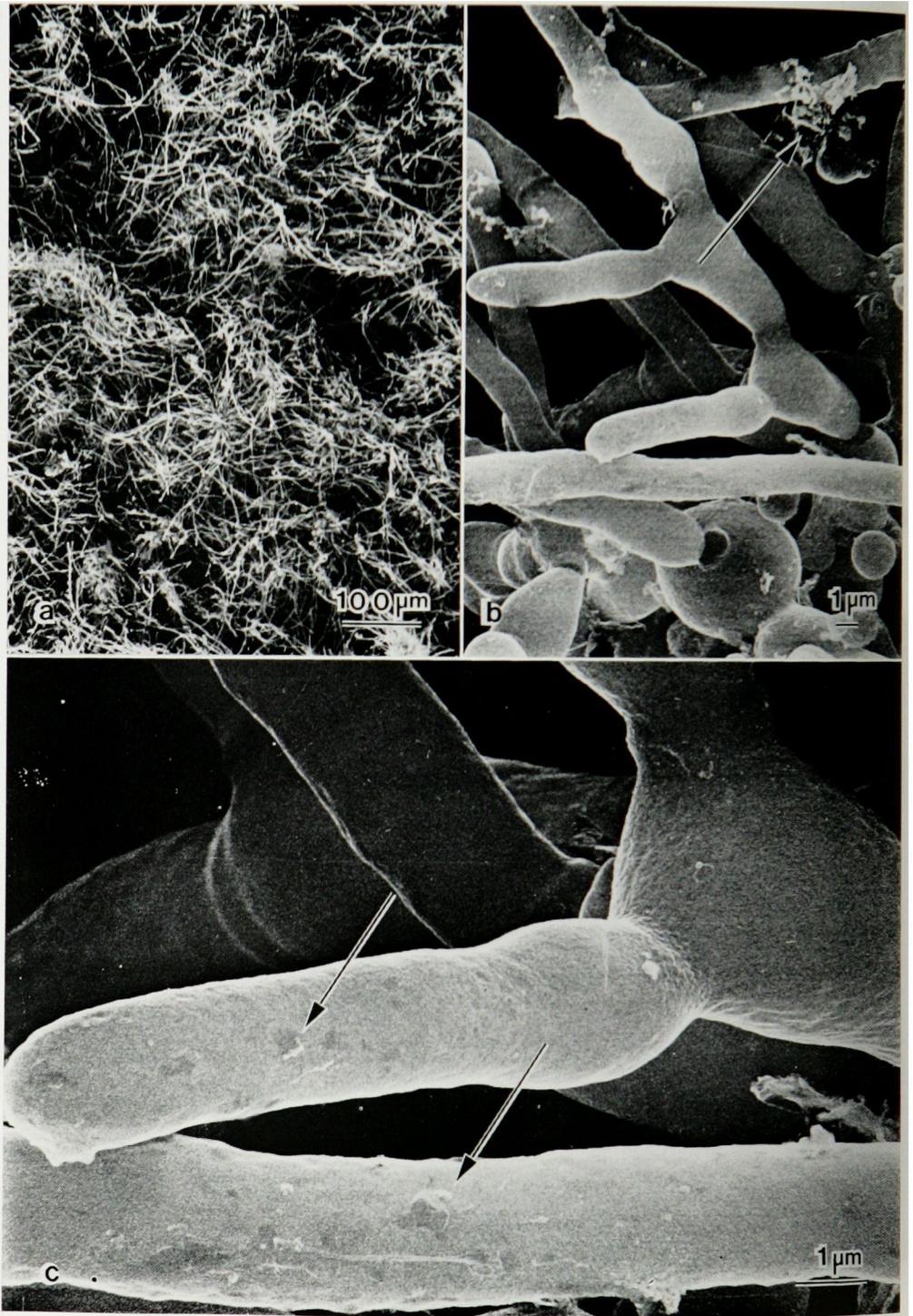


Fig. 8 48-Hours cultures grown with 3.2 ng/ml of 710674-S showing short hyphae (a). They were characterized by accumulation of granular materials on the surface (b,  $\cdot$ ) and heavily wrinkled surfaces especially at the apical region (c,  $\leftarrow$ ).

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

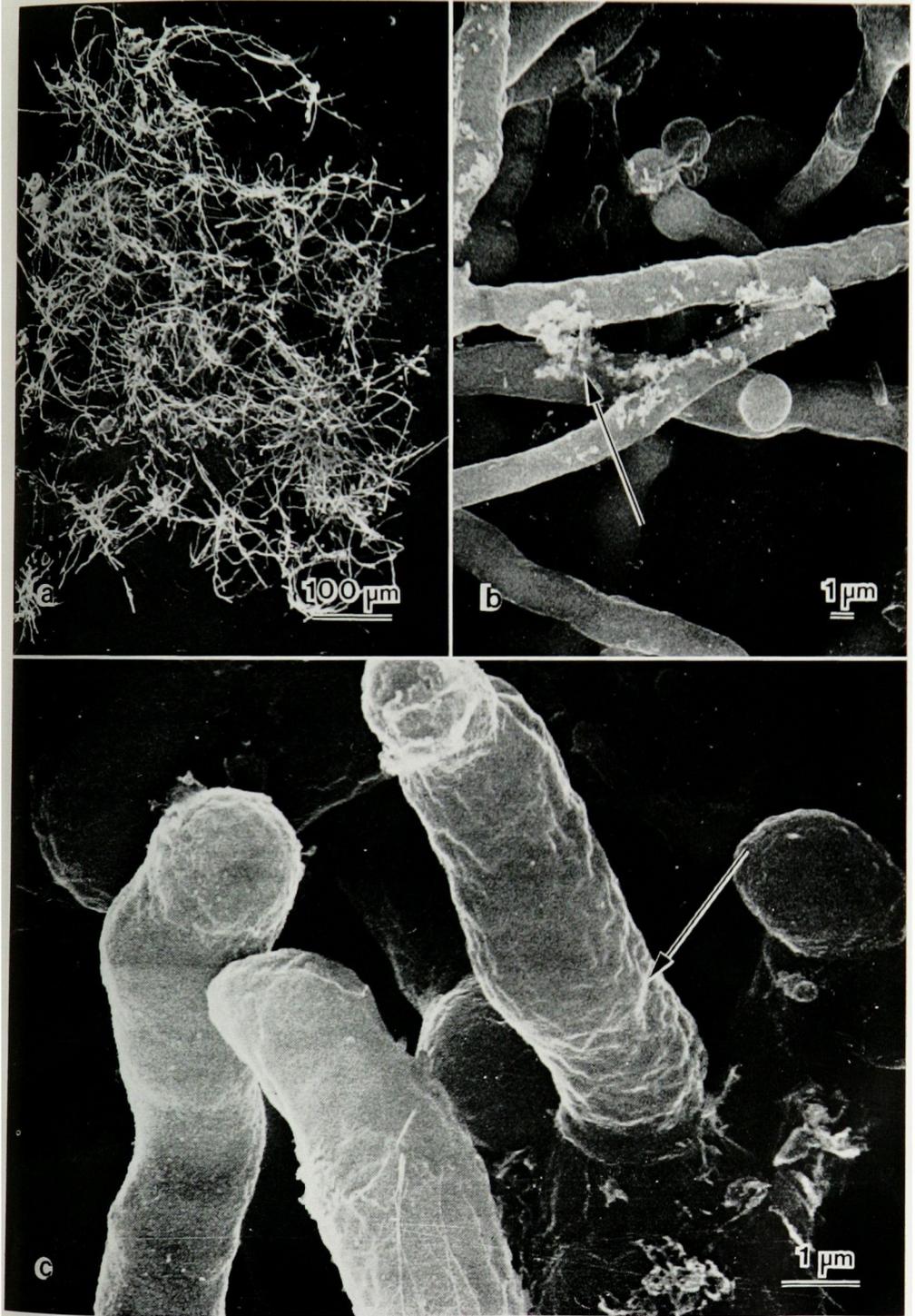
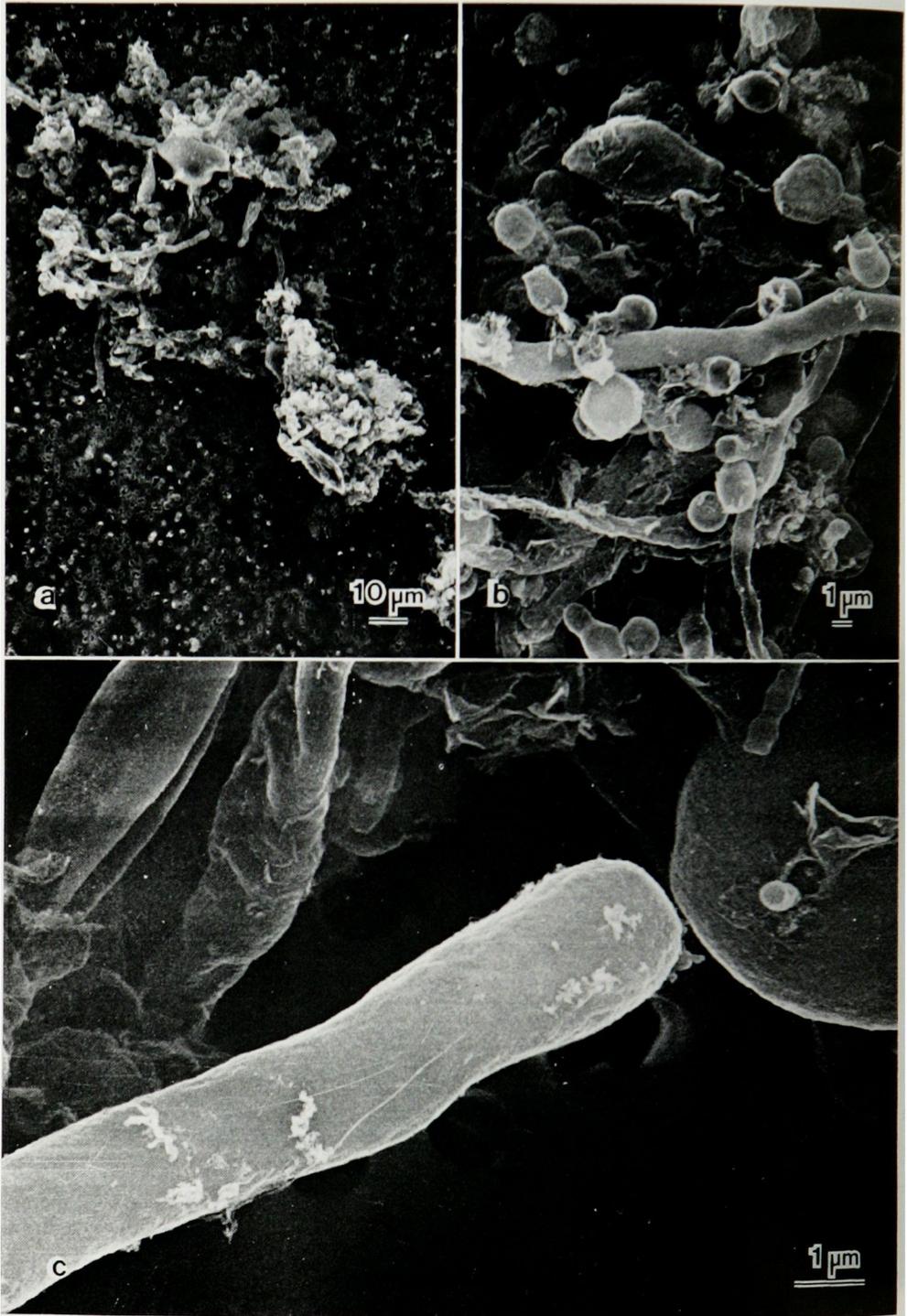


Fig. 9 48-Hours cultures grown with 12.5 ng/ml of 710674-S consisting of a large number of conidia (a) and fewer hyphae with morphological alterations such as deformation and atrophy in contour (b). Accumulation of granular materials was also seen on some hyphae (c).  
(a)  $\times 600$  ; (b)  $\times 3,600$  ; (c)  $\times 12,000$



に観察可能な菌糸塊を形成した。これに対して走査電顕法により、典型的によく発達した菌糸が高い密度が互いにかみあった像が観察された (Fig. 5)。菌糸の伸長度に一致して、菌糸構成細胞の長さすなわち隔壁から隔壁までの距離も増大したが、菌糸幅は培養時間にかかわらず、ほぼ一定していた。菌糸表面も全体が常に平滑であり、付着物はほとんど認められなかった。また、細胞外にも何ら構造物は存在しなかった。

2) 薬剤処理培養: 1.6~100 ng/ml の濃度範囲の薬剤で処理した培養においては、24 時間後分生子の発芽または菌糸発育はほとんど観察されなかった (Fig. 6)。

48 時間後の各培養においては薬剤の効果が濃度に依存して顕著に発現された。1.6 ng/ml 薬剤処理培養の走査電顕像を Fig. 7 に示す。大部分の分生子は発芽し、明らかに菌糸発育を示したが、菌糸全体の長さおよび菌糸構成細胞の長さは、いずれも同時間の対照培養 (Fig. 4) に比べて有意に短く、しかも不規則に膨化したり、不整形を呈するものがみられた。また一部の菌糸では表面に顆粒状または不定形物質の付着物が認められ (Fig. 7 b, ←), さらに部位によっては細胞壁表層の小部分が剝離

した像も観察された (Fig. 7 b, ←)。

3.2 ng/ml の薬剤濃度で 48 時間処理した場合には、大部分の接種分生子の発芽ならびに菌糸発育は認められたものの、菌糸はかなり短く、明らかな伸長阻害が示された (Fig. 8 a)。さらに高倍率で観察すると、菌糸細胞はかなり不整形を呈し、菌糸のところどころに顆粒状物質の沈着が認められた (Fig. 8 b, ←)。また、菌糸先端にはしばしば深い皺襞が形成された (Fig. 8 c, ←)。

6.4 ng/ml の薬剤濃度で処理した培養においてもこれとほぼ同様の形態学的変化が認められた (写真省略)。これに対して、12.5 ng/ml の薬剤濃度下では、ごく一部の分生子のみが菌糸発育を示し、大部分の分生子は発芽しないままに留まった (Fig. 9 a)。僅かにみられる発育菌糸でも、その多くは強度の萎縮、扁平化などの変性像を呈し (Fig. 9 b, c), 外形が比較的よく保たれた菌糸の表面には顆粒状および不定形の付着物が認められた (Fig. 9 c)。710674-S 100 ng/ml で 48 時間処理した場合には、菌糸発育はまったく認められず、0 時間の場合と同様に分生子のみが観察された (Fig. 10)。

72 時間培養においては、各濃度の薬剤の形態学的効

Fig.10 48-Hours cultures grown with 100 ng/ml of 710674-S mostly consisting of ungerminating conidia with relatively well preserved contour.

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

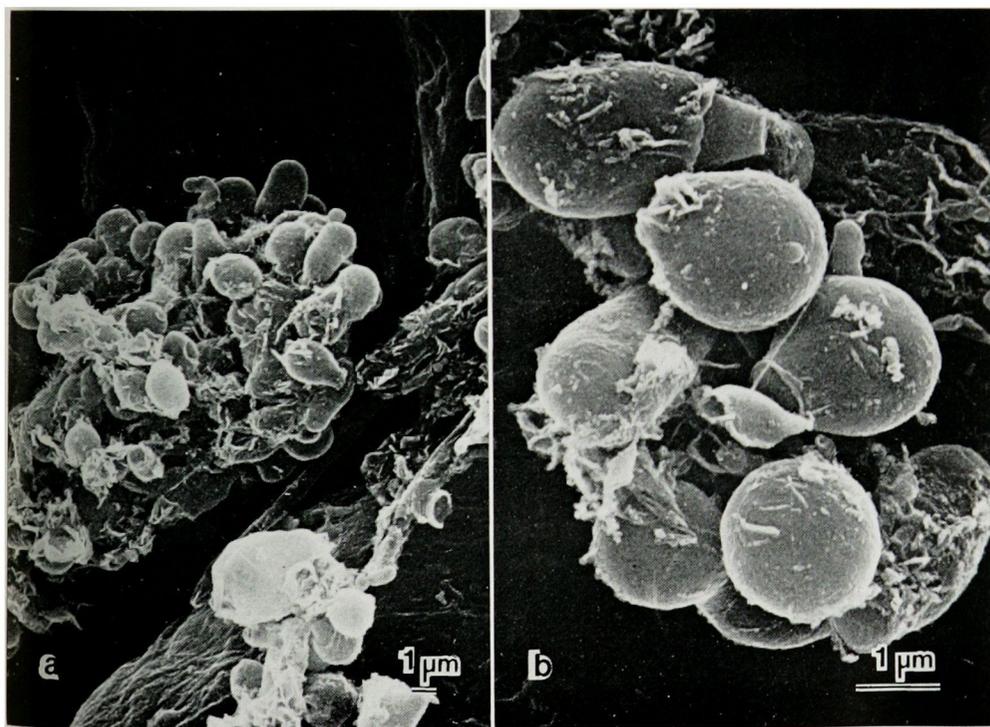


Fig. 11 72-Hours cultures grown with 1.6 ng/ml of 710674-S. Some hyphae were septated at a high frequency to give arthrospore-like appearance (c). Most hyphae were smooth in surface but some were wrinkled (d).

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

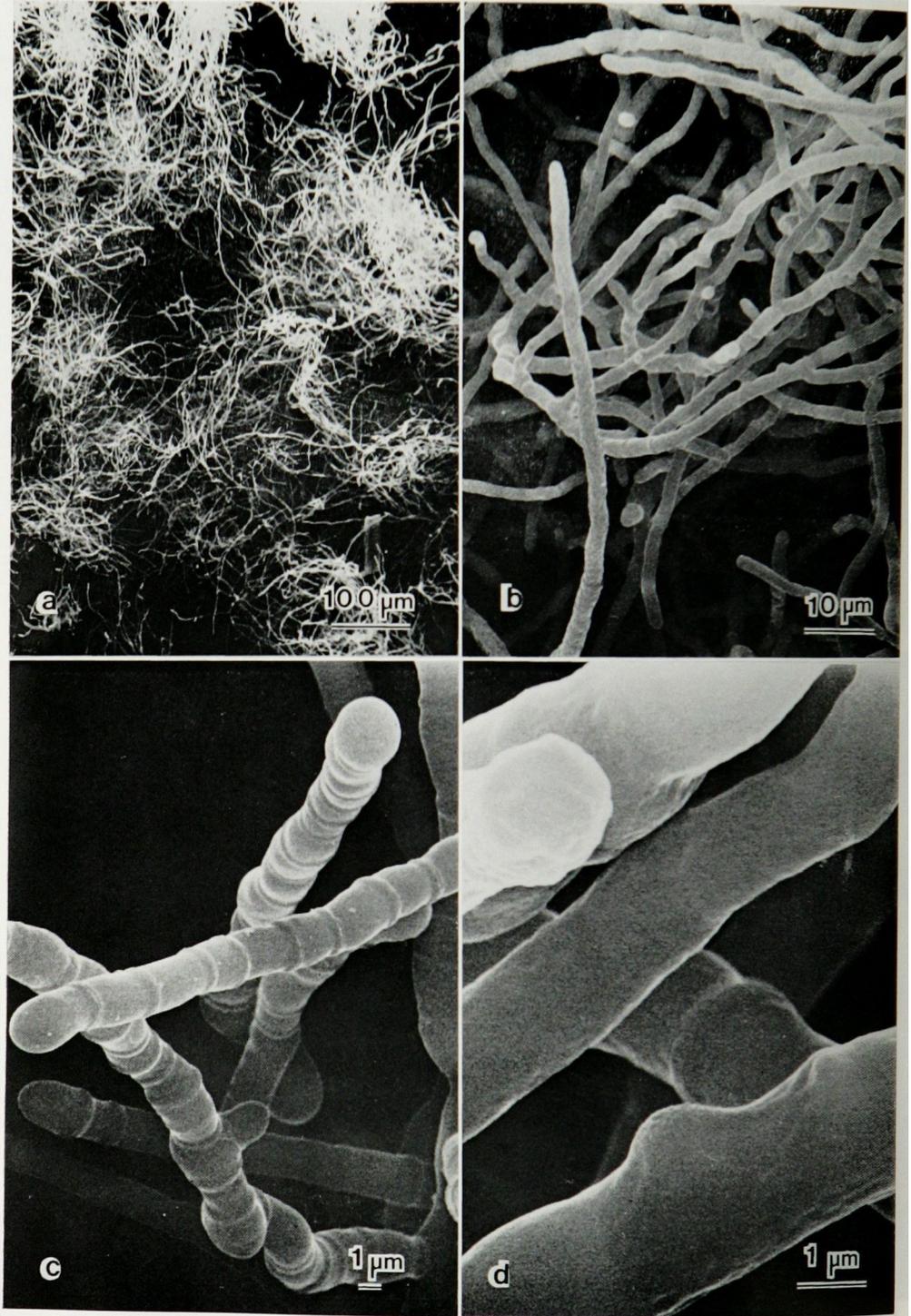


Fig. 12 72-Hours cultures grown with 3.2 ng/ml of 710874-S showing growing hyphae shorter in length and slightly wavy in contour (a). Most hyphae were more deeply wrinkled (b, c) and some were characterized by exfoliation of the surface layer or accumulation of fibrillar materials over the wide surface area (c, d). (a)  $\times 120$ ; (b)  $\times 3,600$ ; (c)  $\times 3,600$ ; (d)  $\times 12,000$

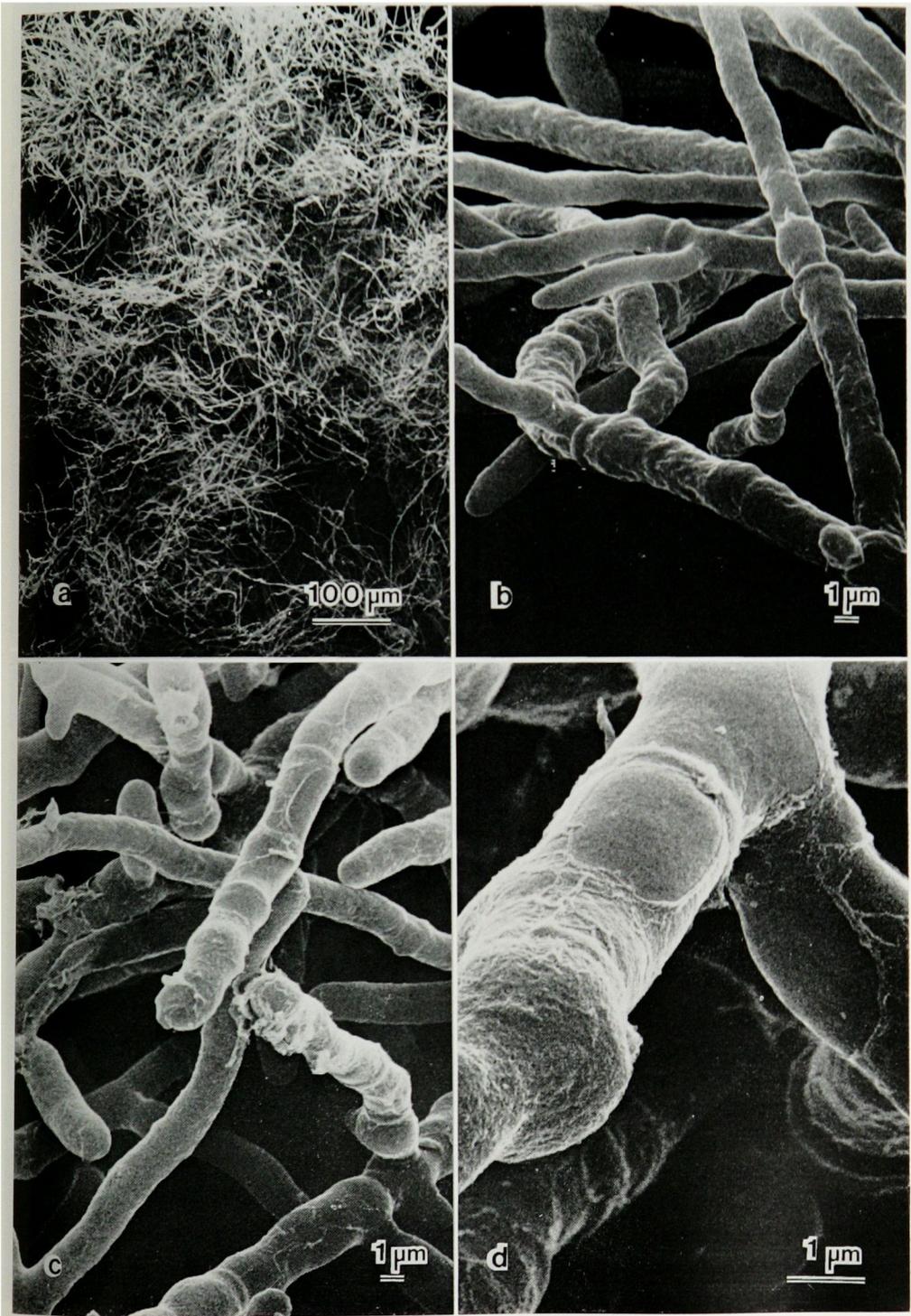


Fig. 13 72-Hours cultures grown with 12.5 ng/ml of 710874-S showing very short hyphae and swollen cells, some of which arranged in chain.

(a)  $\times 1,200$ ; (b)  $\times 9,600$ ; (c)  $\times 12,000$

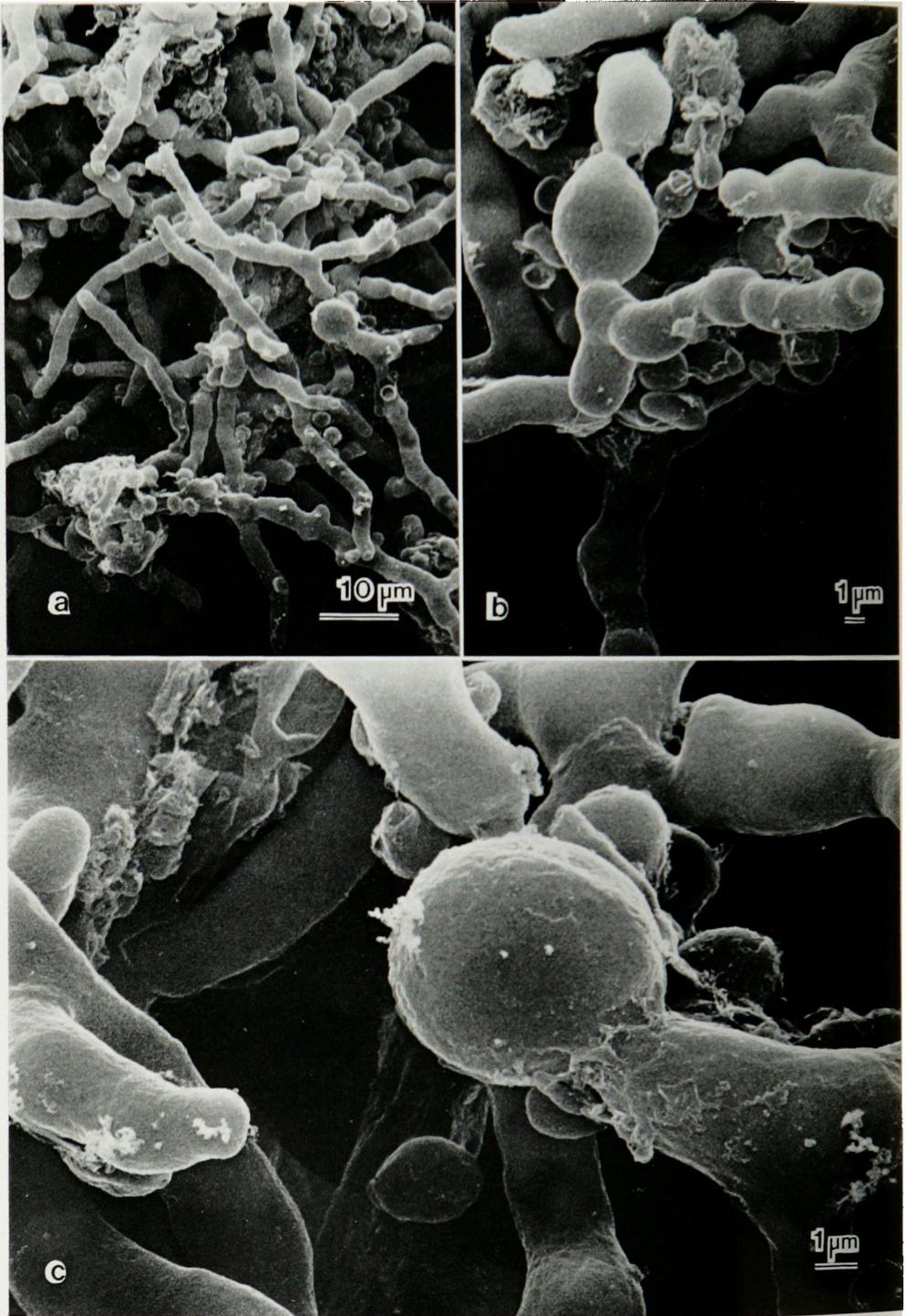


Fig.14 72-Hours cultures grown with 25 ng/ml of 710674-S characterized by shrunken, collapsed or broken conidia without germination.

(a)  $\times 3,600$ ; (b)  $\times 12,000$ ; (c)  $\times 24,000$

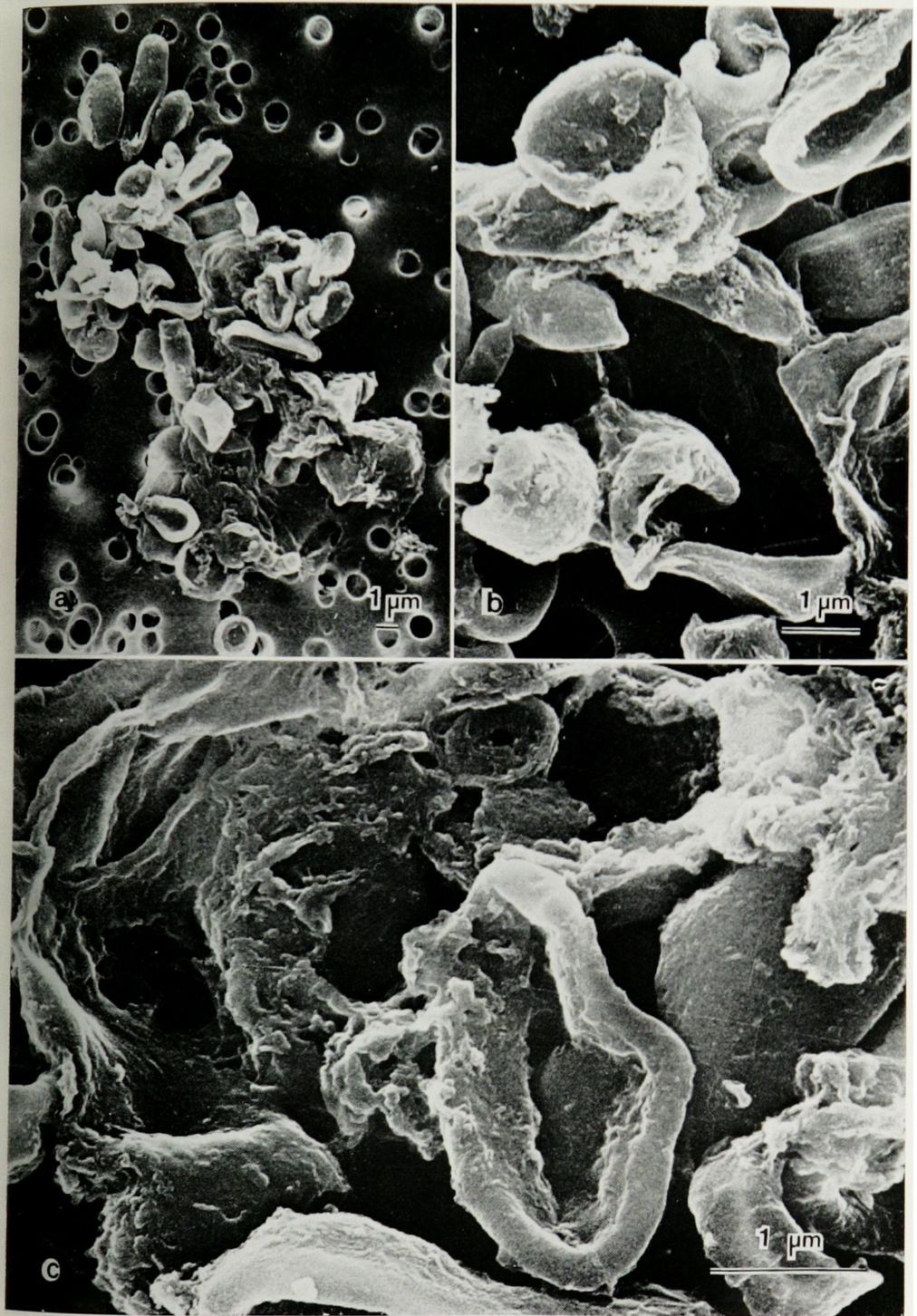
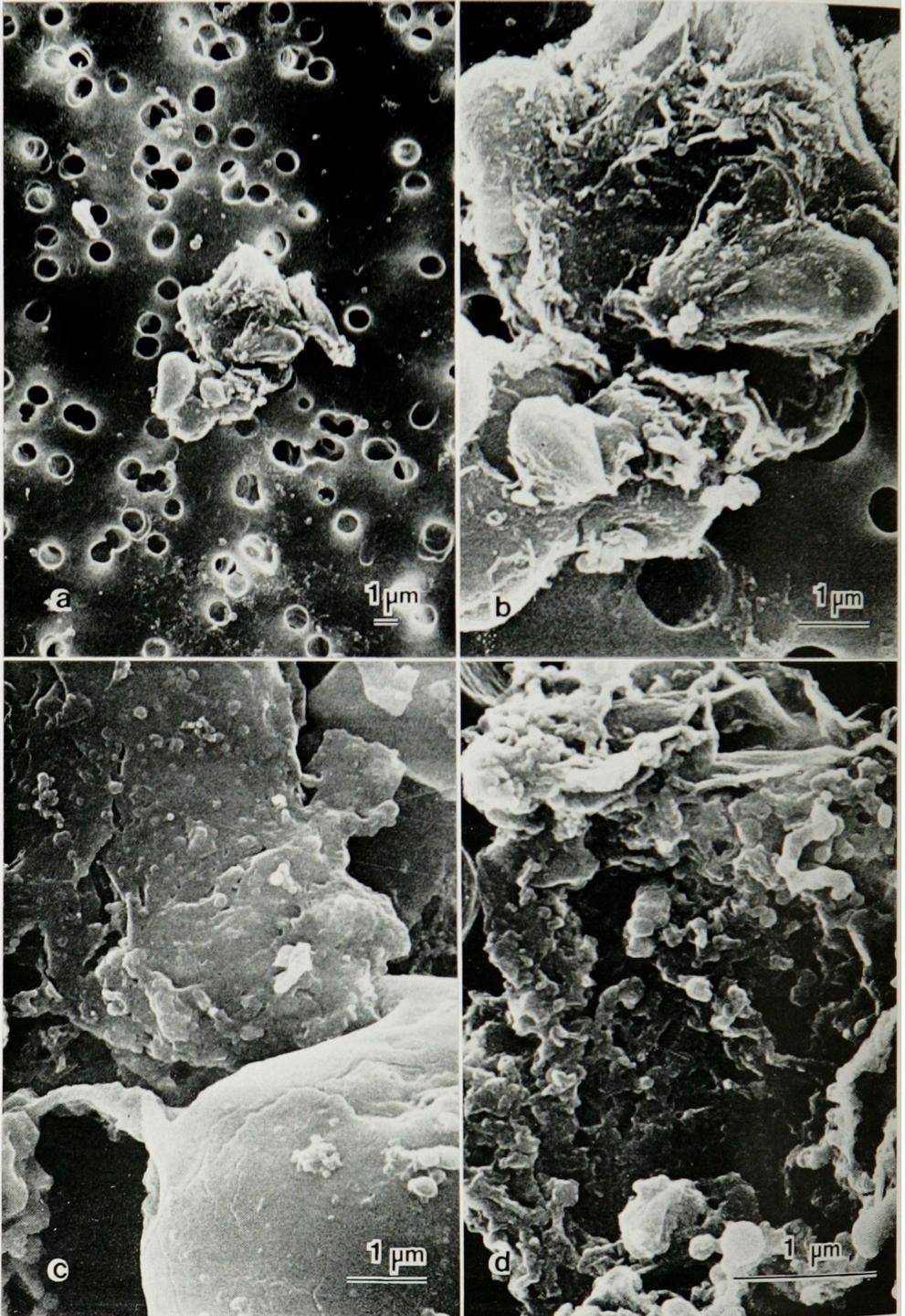


Fig. 15 72-Hours cultures grown with 50 ng/ml of 710674-S showing ungerminating conidia which were heavily degenerated and broken down and occurrence of massive amorphous materials.  
(a)  $\times 3,600$ ; (b)  $\times 12,000$ ; (c)  $\times 12,000$ ; (d)  $\times 24,000$



果はさらに顕著に発現された。1.6 ng/ml の薬剤濃度で処理した場合、発育菌糸の長さは同じ薬剤濃度での 48 時間処理に比べて明らかにまざっていたが、薬剤無添加対照の 72 時間培養に比べれば、劣っていた (Fig. 11 a, b)。菌糸細胞の長さは、かなり短く、一部の菌糸は分節孢子形成時に似た外観を呈した (Fig. 11 c)。さらに強拡大した写真からは、皺壁をつかった菌糸も認められたが、大部分の菌糸においては表面平滑であることが観察された (Fig. 11 d)。

3.2 ng/ml の薬剤濃度で処理した場合にも、低倍率の写真においては、1.6 ng/ml 処理の場合と同様に、かなり旺盛な菌糸発育が認められた (Fig. 12 a)。多くの菌糸では皺壁がさらに顕著に認められた (Fig. 12 b, c)。これに加えて、一部の菌糸の表面は、細胞壁最外層の剝離または線維状物質の沈着を思わせる像を呈した (Fig. 12 c, d)。6.4 ng/ml 薬剤処理培養においてもほぼ同様の形態学的変化が認められた (写真省略)。12.5 ng/ml の薬剤存在下においては、菌糸発育は一応認められるものの、菌糸全体の長さおよび菌糸構成細胞の長さはいずれも短く、不整形を呈し、とくに菌糸途中の膨化した大きな細胞が目立った (Fig. 13)。

25 ng/ml 以上の薬剤濃度で処理した場合には、72 時間後でもまったく接種分生子の発芽もしくは菌糸発育が起ころなかった。加えて、25 ng/ml 処理培養においても分生子の著しい変形、萎縮、扁平化、陥没、崩壊などの像が観察され、正常な分生子形態を示すものはまったく認められなかった (Fig. 14)。さらに、変性した分生子の表面または菌体外には内部から遊出されたと見なされる大量の不定形構造物の堆積がみられた。この変化は、薬剤 50 ng/ml 以上ではより顕著となり、大部分の分生子は原型をとどめないほど破壊され、試料全体が不定形構造物で占められるに至った (Fig. 15)。

### III. 考 察

本研究を行なうにあたって、発育速度の大きな *T. mentagrophytes* 菌株を試験菌として選んだのは、同一培養内における個々の発育菌糸間での aging による形態学的ならびに生理学的ばらつきができるだけ少なくなるように、若い培養で短期間に実験を終えるためである。実際に、液体培地中で振盪培養した場合には、この菌株は分生子接種 24 時間後にすでにかなりの程度の菌糸発育を示し、72 時間後には良好に発育した典型的な菌糸が観察され、予期した通り、分生子の発芽ならびにそれに続く菌糸発育は極めて速やかに起こることがあらためて確認された。*T. mentagrophytes* の菌糸が古くなるにつれて、幅が広くなり、表面が疣状の外観を呈することは、前報<sup>9)</sup>で報告した通りである。一方、本実験にお

いては、培養時間にかかわらず、72 時間まで菌糸は終始幅 1.5~2.0  $\mu\text{m}$  と比較的細く、しかも多くはまっすぐに伸びて表面平滑であった。

このように速やかに良好な菌糸発育を行ないうる培養に 710674-S を種々の濃度で作用させた場合には、用いた最小薬剤濃度である 1.6 ng/ml によっても培養 24 時間から有意な形態学的変化が観察された。しかし、薬剤の形態学的影響の程度は、薬剤濃度に依存する一方、培養時間が進むにつれて増強され、72 時間培養において最も特徴的な形態変化が認められた。薬剤処理培養全体を通して、生じた形態学的変化は、発育菌糸に関するものと分生子自体に関するものとの二つに分けられる。すなわち、1.6~12.5 ng/ml の薬剤濃度範囲では、接種された分生子が 24 時間でもほとんど発芽ならびに菌糸発育を示さず、同じ時期の対照培養にあっては大部分の分生子が発芽してかなりの長さの菌糸にまで発育しているのと比べて、明瞭な発育阻害効果が認められた。しかし、48 時間後には、遅ればせながら薬剤濃度に応じてさまざまな程度に菌糸が発達したが、菌糸表面の皺壁形成、薄膜状物質の付着、菌糸細胞の膨化などの菌糸形態の異常像が観察された。一方、25~100 ng/ml の濃度の 710674-S 処理を受けた培養においては、72 時間後に至ってもなお分生子はほとんど発育せず、したがって、菌糸発育もみられなかった。加えて、発芽しないままに留まった分生子は、72 時間後には著しい萎縮や崩壊像を呈し、細胞内細胞に由来すると思われる不定形構造物が分生子の表面または外部に大量に蓄積される結果となったのである。

以上述べた 710674-S の *T. mentagrophytes* 培養に対する形態学的影響のうち、比較的低い薬剤濃度域でみられた発育菌糸の形態変化は、おそらく最終的には細胞壁構築の異常によるものと推測されよう。しかしながら、本剤の真菌細胞壁多糖、とくに  $\beta$ -グルカンやキチンの合成に対する本剤の直接的阻害作用はいまだ証明されておらず、細胞壁形態形成に及ぼす本剤の効果は、他の代謝系を介しての二次的作用である可能性も考えられる。われわれはすでに、ビスフェールイミダゾール誘導体 bifonazole が 1~200 ng/ml の濃度範囲で *T. mentagrophytes* 発育菌糸に対して種々の形態学的変化をひき起こすことを報告した<sup>9)</sup>。今回観察された 710674-S による形態変化と比べ、bifonazole によるものと共通する点がみられたものの、菌糸の波状またはカール状の屈曲変形や細胞壁層の剝離が顕著にみられることなどの点で菌糸細胞壁に及ぼす影響は bifonazole のほうが 710674-S よりもさらに強いように見受けられる。一方、bifonazole は使用薬剤濃度範囲では分生子の発芽または

菌糸発育を完全に阻止することがなかったのに対して、710674-S 25 ng/ml 以上の濃度では接種された分生子の発芽およびそれに続く菌糸発育はほぼ完全に停止し、しかも不発芽分生子の大部分は変性崩壊した。培養条件や使用菌株の相違から、これら2剤の形態学的影響をそのまま単純に比較して論じることはできない。しかし、710674-S は、25 ng/ml 以上の薬剤濃度では *T. mentagrophytes* 分生子に対して極めて強力な殺菌的效果を発揮することは疑いないといえよう。

最近われわれが行なった *Candida albicans* 細胞における作用機序に関する生化学的研究から、本剤の抗真菌作用は比較的高い薬剤濃度域においては細胞膜に対する直接的障害効果に、また低濃度域においてはエルゴステロール合成阻害効果にそれぞれ主に起因することが示唆された<sup>9)</sup>。この作用機序に従って今回の *T. mentagrophytes* に対する本剤の発育阻止作用の生化学的基盤を類推するならば、25 ng/ml 以上の濃度域でみられた完全発育阻止と分生子の崩壊を直接的な細胞膜障害に起因する出来事と見なすことは、この障害が細胞内  $K^+$  の放出を介して細胞内部を急速に酸性化して自己融解過程を促進する<sup>9)</sup> 点からも妥当性をもつものであろう。一方、低濃度域の 710674-S によってひき起こされた菌糸発育の部分的阻止作用と菌糸形態異常に対して本剤のエルゴステロール合成阻害作用はどのように関与するのであろうか。従来の研究から、*T. mentagrophytes* その他の糸状菌における主要ステロールは、酵母におけるのと同様、エルゴステロールであることが示されている<sup>10-13)</sup>。エルゴステロールは真菌細胞の細胞膜と細胞壁の必須構成成分であり、細胞膜においてはその物性を調整する役割を果たしているため、もしエルゴステロール合成が阻害されている細胞膜内の含量が低下するならば、細胞膜に結合している細胞壁多糖合成酵素活性が影響を受け、細胞壁合成が阻害される可能性がある。*T. mentagrophytes* では直接証明されていないが、酵母においてはエルゴステロールおよびアシルグリセリドなどからなる中性脂質は、細胞壁構成脂質の大部分を占め<sup>14)</sup>、細胞が脱脂乾燥により扁平化することからみて、これらの脂質は真菌細胞壁の剛性を保持する上で不可欠であると考えられる<sup>15)</sup>。以上の知見は 710674-S 1.6~12.5 ng/ml の濃度域における菌糸形態変化がエルゴステロール合成阻害による細胞膜および（または）細胞壁の機能・構造の異常に基づく可能性を強く示唆するものであり、*Trichophyton* などの皮膚糸状菌を対象とした本剤抗真菌作用機序の生化学的検討が待たれている。

本報告において 710674-S が、従来の標準的な *in vitro* 抗菌試験から得られている *T. mentagrophytes* に

対する平均的 MIC 値よりも数十分の一低い濃度で殺菌的效果を示したことは、こうした抗菌試験法の妥当性に再考を促すとともに、本剤が白癬の動物感染モデルおよび臨床症例において極めて優れた治療効果を発揮する事実をよく説明するものであろう。

## 文 献

- OGATA, M.; H. MATSUMOTO, Y. HAMADA, M. TAKEHARA & K. TAWARA: 1-(1-(2-(3-chlorobenzyl) oxy) phenyl) vinyl)-1H-imidazole hydrochloride, a new potent antifungal agent. *J. Med. Chem.* 26: 768~770, 1983
- 俵 勝也, 砂川則雄, 竹間盛夫: 710674-S の抗真菌作用に関する研究 第1報 *In vitro* 抗菌活性. *真菌誌* 25: 281~289, 1984
- 東 勇彦, 渡辺昌平, 宗 義朗, 土井 頤: 710674-S の表在性真菌症に対する治療効果. *皮膚* 25: 729~739, 1983
- 710674-S 研究班: 抗真菌外用剤 710674-S クリームおよびゲルの皮膚真菌症に対する多施設共同研究による臨床効果の検討. *皮膚* 26: 445~457, 1984
- 平谷民雄, 山口英世: 新規イミダゾール系抗真菌剤 710674-S の *Candida albicans* に対する作用機序. *Chemotherapy* 33: 579~591, 1985
- 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
- YAMAGUCHI, H.; T. HIRATANI & M. PLEMPER: *In vitro* studies of a new imidazole antimycotic, bifonazole, in comparison with clotrimazole and miconazole. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 33(I): 546~551, 1983
- OSUMI, M. & S. TORIGATA: Surface structure of microbodies isolated from yeast cells. *Scanning electron microscopy/1977 II*, pp. 617~622, 1977
- 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
- AUDETTE, R. C. S.; R. M. BAXTER & G. C. WALKER: A study of the lipid content of *Trichophyton mentagrophytes*. *Canad. J. Microbiol.* 7: 282~283, 1961
- WASSER, M. K.: Fungal lipids. *Advances in lipid research* 15: 47~179, 1978
- BRENNAN, P. J. & D. M. LOSEL: Physiology of fungal lipids: selected topics. *Advances in microbial physiology* 17: 47~179, 1978
- KHULIER, G. K.: Lipids of *Microsporum gypsum*. *Experientia* 34: 432, 1978
- PHAFF, H. J.: *Yeasts*, vol. 2, Academic Press, Structures and biosynthesis of the yeast cell

- envelope (ROSE, A. H. & J. S. HARRISON) pp.  
135~210, 1971  
15) BARTNICKI-GARCIA, S. & I. MCMURROUGH :

Yeasts, vol. 2, Academic Press, Biochemistry  
of morphogenesis in yeasts (ROSE, A. H. &  
J. S. HARRISON) pp. 441~491, 1971

SCANNING ELECTRON MICROSCOPICAL STUDY  
OF THE EFFECT OF A NEW IMIDAZOLE  
ANTIMYCOTIC 710674-S ON *TRICHOPHYTON*  
*MENTAGROPHYTES*

HIDEYO YAMAGUCHI, TAMIO HIRATANI, YOKO YAMADA<sup>†</sup>  
NAOKO YAMADA\* and MASAKO OSUMI\*\*

Research Center for Medical Mycology, Teikyo University  
School of Medicine, 359 Otsuka, Hachioji, Tokyo 192-03  
and \*Laboratory of Electron Microscopy and \*\*Department  
of Biology, Japan Women's University, 2-8-1 Mejirodai,  
Bunkyo-ku, Tokyo 112

<sup>†</sup> Present address : Department of Biology, Japan Women's University

Using high-resolution scanning electron microscopy, the morphological effect of a new imidazole-containing antimycotic 710674-S on cultures of *Trichophyton mentagrophytes* in a liquid medium which had been inoculated with microconidia of this organism was examined over 72 hours of the experimental period of time. Untreated control cultures grown for 24 hours consisted of highly developing hyphae. By contrast, when cultures were grown with 710674-S in the concentration range between 1.6 and 100 ng/ml, germination of inoculated conidia or hyphal growth was scarcely observed. Although hyphal growth was recognized in cultures grown with 710674-S at concentrations from 1.6 to 12.5 ng/ml after 48 hours of incubation, the extent of growth decreased with increasing drug concentrations and several morphological changes of growing hyphae such as occurrence of wrinkled hyphae, attachment of fibrillar materials to the hyphal surface, swelling of hypha-constituting cells and exfoliation of surface layers of hyphae. In cultures grown with 710674-S at concentrations of 25 ng/ml or above, no hyphal growth was observed by the end of 72 hours of the experimental period and all of the inoculated conidia were degenerated, collapsed or lysed.