

Effect of in vitro Treatment with Clotrimazole on the Ultrastructure of *Alternaria alternata*

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7714

Alternaria alternata の微細構造に対する クロトリマゾールの作用に関する 実験的研究

金沢大学医学部皮膚科学教室 (主任：広根孝衛教授)

増 田 博 司

(昭和59年2月2日受付)

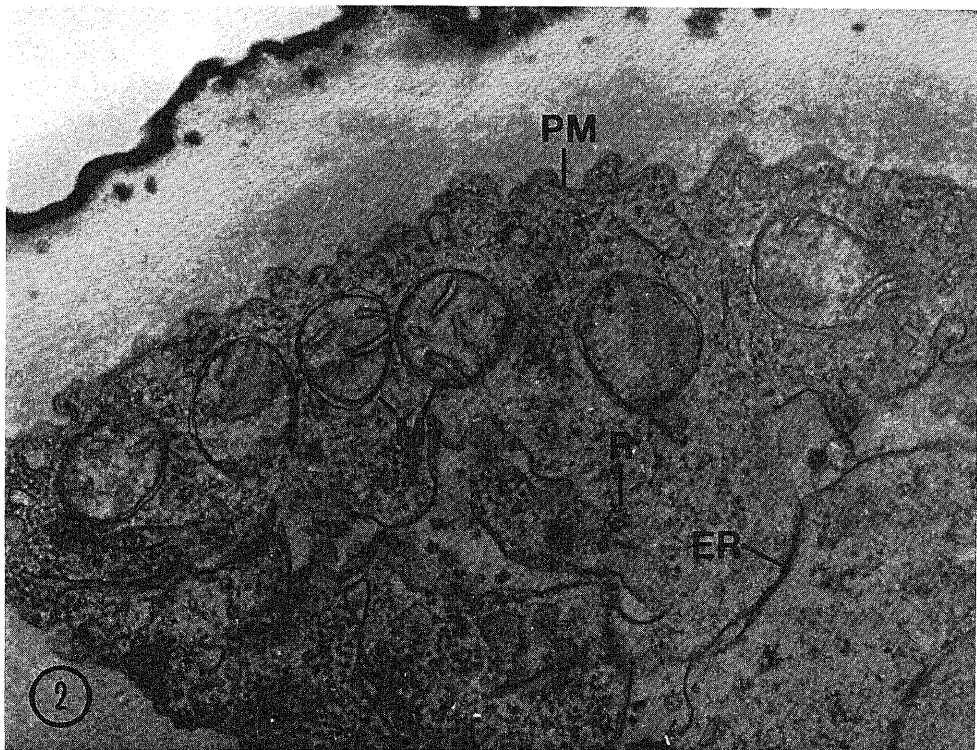
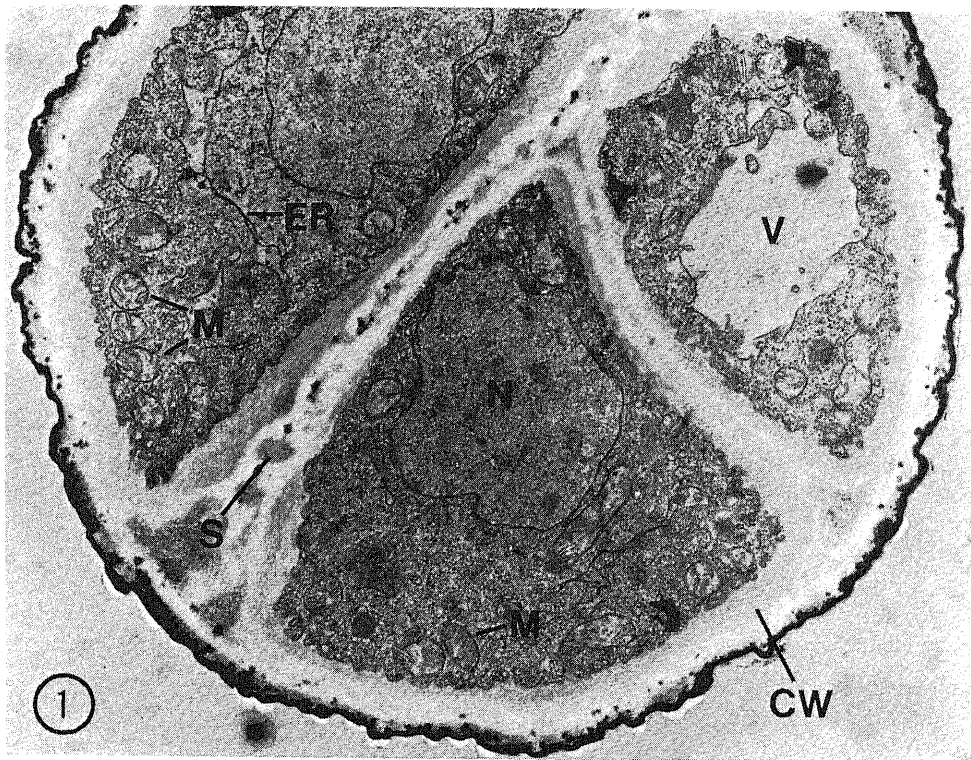
ヒトの皮膚アルテルナリア症は臨床的にイミダゾール誘導体で治療されているが、この疾患の病原菌に対するイミダゾール誘導体の作用に関する情報はまだ少ない。本研究はヒトの皮膚アルテルナリア症の病巣から分離された *Alternaria alternata* に対するクロトリマゾール (bis-phenyl-(2-chlorophenyl)-1-imidazolyl methane) の作用を電子顕微鏡学的に調べるために行った。*Alternaria alternata* (金沢大学医学部皮膚科学教室保存株, No. 1931) を Sabouraud ブドウ糖寒天および液体培地に 27°C で 3 日間培養後、これらの菌細胞の微細構造を検索した。また、クロトリマゾールの最小発育阻止濃度と最小殺菌濃度を標準法により測定し、各濃度の薬物で液体培地に培養された菌を 1-24 時間処理したのち、これらの菌細胞の微細構造を検討した。その結果、液体培地中で培養された菌糸細胞では細胞小器官が豊富に存在していたが、固形培地上で培養された菌糸細胞では細胞小器官の減少および脂質滴と空胞の増加がみられ、前者が薬物の作用により起こりうる変化を検討するのに適当であることが示された。次に、最小発育阻止濃度 (31.25 $\mu\text{g/ml}$) のクロトリマゾールで処理した場合には、6 ないし 24 時間後に多くの菌細胞においてミトコンドリアの種々の程度の膨化とクリスタの減少が認められた。最小殺菌濃度 (250 $\mu\text{g/ml}$) のクロトリマゾールで処理した場合には、1 ないし 6 時間後にすべての菌細胞においてミトコンドリアの著しい膨化とクリスタを含む内膜の完全または不完全な消失が起こり、しばしばミトコンドリアの空胞化が認められた。24 時間後にはすべての細胞が強い変化を示し、ミトコンドリアの空胞化、核の消失および形質膜の細胞壁からの剝離がみられた。変化の強い細胞では細胞質の種々の程度の融解も観察された。これらの所見から、クロトリマゾールは主に菌細胞の膜系に作用し、それによる障害は他の小器官が侵される前にミトコンドリアにおいて最も早く起こることが明らかにされた。

Key words *Alternaria alternata*, clotrimazole

Alternaria 属の菌は不完全菌類に属し、腐生菌として自然界に広く分布し、梨の黒斑病の病原菌としてよく知られているが、またそれはヒトの気管支喘息の抗原になることもある。さらに近年、それに起因する皮膚病変が次々に報告され、皮膚真菌症の 1 つとして皮膚アルテルナリア症とよばれている。皮膚アルテルナリア症は菌要素が病巣の表皮にのみ存在する浅在型^{1)~4)}と菌要素が真皮内に存在する深在型^{2)5)~9)}に分類

される。浅在型アルテルナリア症の症例では病巣から分離された菌の病因性に疑問が持たれているが¹⁰⁾、深在型アルテルナリア症の症例では、病巣内菌要素の組織学的証明と反覆培養による検出、アルテルナリア・アレルゲンによる陽性皮内反応、および抗真菌剤投与による病変の改善に基き、この菌の病因性が肯定されている^{2)6)~8)}。従来、皮膚アルテルナリア症の症例は少なく、薬物療法はまだ確立されていないが³⁾、少数例に

Effect of in vitro Treatment with Clotrimazole on the Ultrastructure of *Alternaria alternata*. Hiroshi Masuda, Department of Dermatology (Director: Prof. T. Hirone), School of Medicine, Kanazawa University.



においてイミダゾール誘導体が有効であったとされている。しかし、イミダゾール誘導体の病原菌に対する作用を検討したものはまだ少ない。

本研究は、皮膚病巣から分離された *Alternaria alternata* (以下 *A. alternata* と略) に対するクロトリマゾール (clotrimazole, bis-phenyl-(2-chlorophenyl)-1-imidazolyl methane, 以下 CTZ と略) の作用を電子顕微鏡 (以下電顕と略) 法を用いて検討するために行った。

材料および方法

I. 材 料

使用菌株はヒトの皮膚病巣より分離、同定された *A. alternata* (金沢大学医学部皮膚科学教室保存株, No1931) である。CTZ は Bayer 社より提供された精製標品を用いた。

II. 方 法

1. 最小発育阻止濃度と最小殺菌濃度の測定

CTZ の *A. alternata* に対する最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration, 以下 MIC と略) と最小殺菌濃度 (minimal fungicidal concentration, 以下 MCC と略) を標準法¹⁾にしたがい液体培地希釈法により測定した。すなわち、*A. alternata* を 4% ブドウ糖寒天 (Sabouraud) 斜面培地に 27°C で 7 日間培養し、発育した菌苔を全部かき取り、これを 5 ml の滅菌生理食塩水中で十分に砕いて菌液を作った。菌液内の菌数 (分生子と菌糸の数) は $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ /ml とした。CTZ 20 mg/ml 含有アセトン溶液を用いて倍数希釈系列を作り、各濃度液 0.5 ml を 4% ブドウ糖液体培地 9.5 ml に添加し、最終薬物濃度の範囲を 1000~0.03 μ g/ml とした。対照として、薬剤無添加培地および溶媒 0.5 ml 添加培地を用いた。次に、各培地に駒込ピペット 1 滴量の菌液を移植、27°C で 10 日間培養した後、肉眼的に菌の増殖が認められない培地における薬物の最大希釈濃度を MIC と判定した。さらに、菌増殖の認められない試験管内容の沈渣を 4% ブドウ糖寒天斜面培地に再移植、27°C で 7 日間培養後、菌発育の認められない培地における薬剤の最大希釈濃度を MCC と判定した。

2. 電顕法

i) 4% ブドウ糖平面培地に 27°C で 3 日間培養後に採取した菌苔、ii) 4% ブドウ糖液体培地に 27°C で 3 日間振盪培養後に採取した菌塊、iii) 4% ブドウ糖液体培地に 27°C で 24 時間振盪培養後、さらに MIC または MCC の CTZ を添加した同液体培地で振盪培養し、1, 6 および 24 時間後に採取した菌塊、および iv) CTZ 液の代りに同量のアセトンを添加した液体培地

で振盪培養し、1, 6 および 24 時間後に採取した菌塊 (対照) を用いて、電顕用試料を作製した。試料はすべて 2% オスミウム酸に 4°C で 24 時間固定、アセトン系列で脱水、エポン 812 に包埋した。次いでダイヤモンドナイフを付けた LKB V 型超マイクロームで薄切片を作り、これを酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色し、日立 H-600 型および日本電子 JEM 100 B 型電顕で検索、写真撮影した。

成 績

I. 薬剤感受性

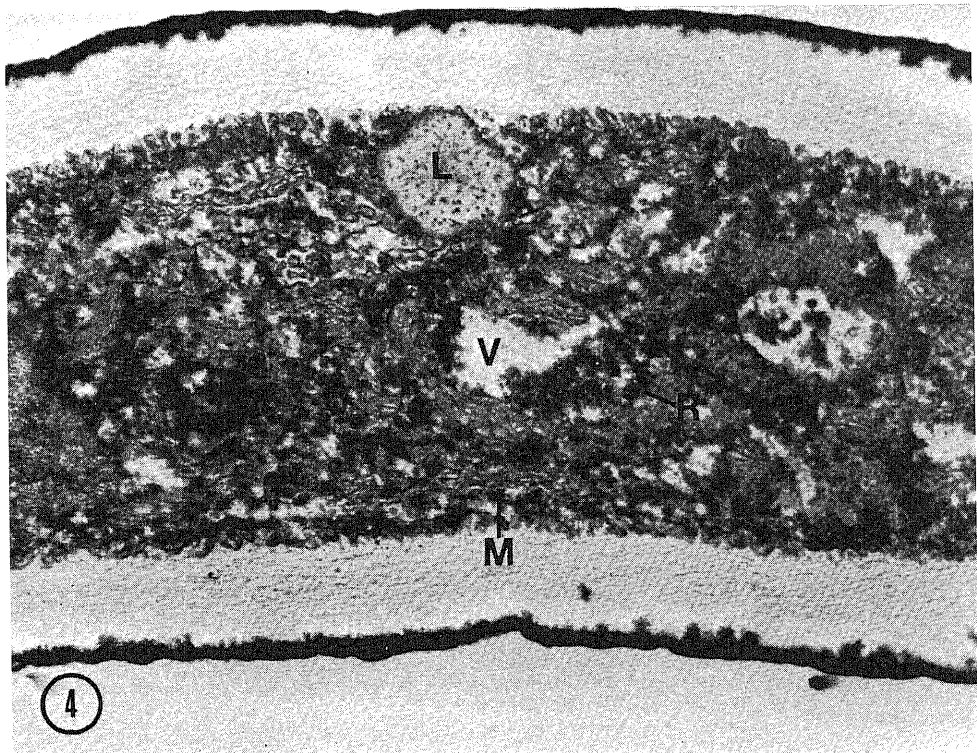
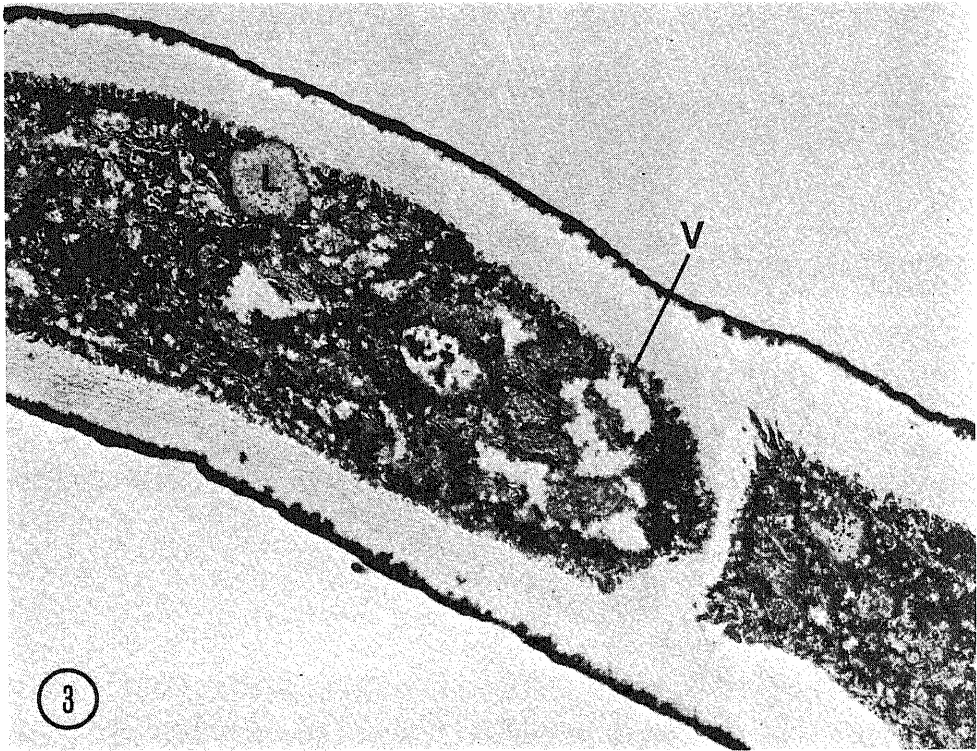
使用菌株に対する CTZ の MIC は 31.25 μ g/ml、MCC は 250 μ g/ml であった。

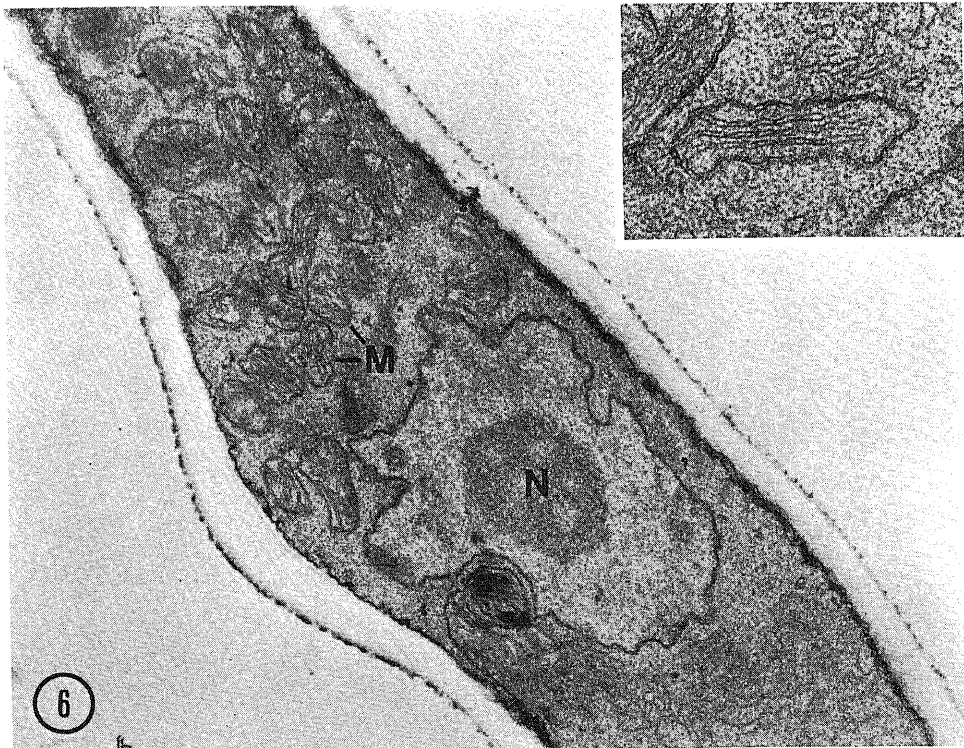
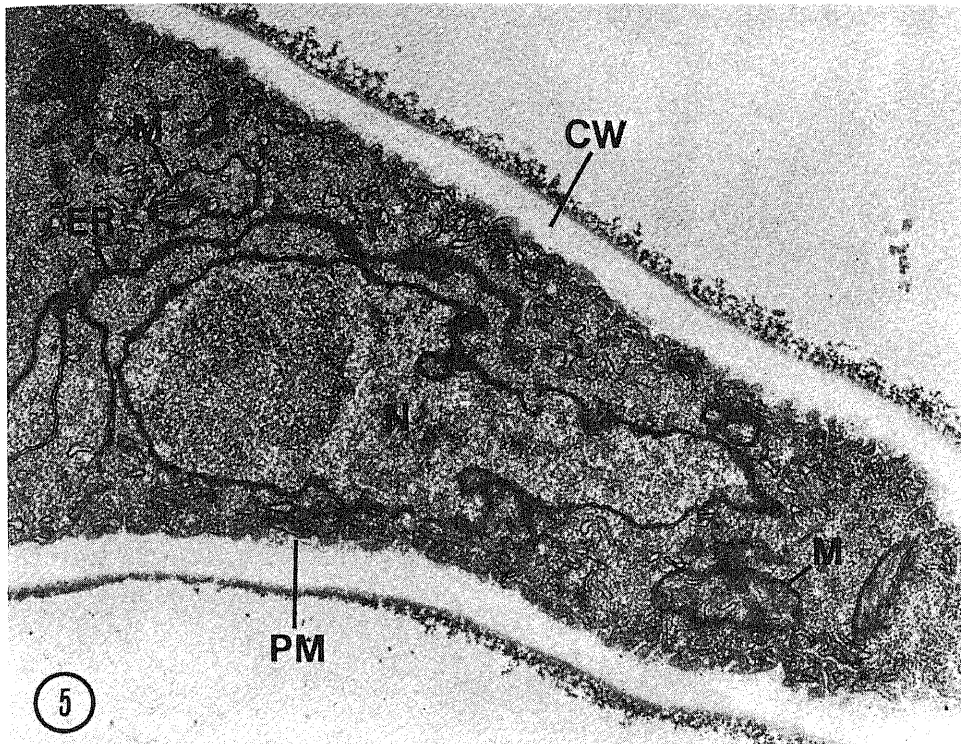
II. 電顕的観察

1. 正常菌細胞

固形培地から採取された菌苔は菌糸と分生子から成っていた。いずれの菌細胞もその細胞壁は電子密度の高い外層と電子密度の低い内層から成り、内層は時に線維状構造を示した (図 1, 3)。菌糸ではこれを横断する隔壁が、分生子では横断する隔壁だけでなく縦断する隔壁もみられた。細胞壁および隔壁の内面は波状の小凹凸を示し、それに密接して走る形質膜がみられた。細胞小器官は少数の分生子細胞において明瞭にみられたが、大多数の分生子細胞と菌糸細胞では不明瞭で、高電子密度の細胞質基質に包埋されていた。前者の分生子細胞では (図 1, 2)、核は通常菌細胞の中央に位置し、所々に核孔のある核膜により境されていた。核質は微粒子とこれを包埋する基質から成り、微粒子は不規則に分布していた。核小体は微粒子の密な集まりとして認められた。細胞質内にはかなり多数のミトコンドリアが存在していた。ミトコンドリアは一般に軽度の凹凸のある卵円形または紡錘形を呈し、クリスタ (櫛) は微絨毛状で、比較的少なく、不規則に突出していた。小胞体は滑面型のみ存在し、多くは細管状であったが、時に扁平な囊状のものもみられた。これらの小器官の間にはリボゾームが豊富に存在していた。他方、細胞質が暗い菌糸細胞や分生子細胞では (図 3, 4)、リボゾームの不規則な凝集およびミトコンドリア外面への付着のためにミトコンドリアや小胞体が不明瞭であった。また、種々の数の脂質滴や空胞が存在し、それらが多い細胞ではミトコンドリアは著しく減少していた。

液体培地から採取された菌塊では菌糸のみが認められた (図 5)。これらの菌細胞では、細胞壁は平面培地で培養された菌細胞のそれと同様であったが、外層はやや不明瞭であった。細胞小器官は豊富に存在し、その構造は平面培地で培養された分生子細胞におけると





同様であった。なお、脂質滴は時にみられたが、空胞は全く認められなかった。

アセトン添加液体培地から採取された菌塊でも菌糸のみが認められた(図6)。菌細胞の微細構造は1~24時間の培養時間内では差異は示さず、いずれもアセトン無添加液体培地で培養された菌細胞におけると同様であり、アセトンによる微細構造の変化は全く認められなかった。

2. CTZ 処理後の菌細胞

1) MIC の CTZ による処理後

CTZ 添加液体培地から採取された菌塊では常に菌糸のみが認められた。1時間後では、大多数の菌細胞は対照の菌細胞と同様の微細構造を示した。しかし、ごく少数の菌細胞においてミトコンドリアの軽度の変形がみられた。

6時間後には、多くの菌細胞においてミトコンドリアの変化が認められた(図7)。すなわち、ミトコンドリアは腫大するとともに軽度に変形し、クリスタの配列は乱れ、内腔の基質は部分的にやや澄明化していた。

24時間後には、すべての菌細胞においてミトコンドリアの変化が認められた。変化の顕著な菌細胞では(図8)、ミトコンドリアは腫大するとともに著しく変形し、クリスタは種々の程度に減少し、基質の大部分が澄明化していた。クリスタがほとんどすべて消失して空胞様にみえるものもあったが、そのようなミトコンドリアでも内膜と外膜はいずれも比較的よく保存されていた。なお、少数の脂質滴がみられた。その他の細胞成分に顕著な変化は認められなかった。

2) MCC の CTZ による処理後

1時間後にすでに大多数の菌細胞においてミトコンドリアの顕著な変化がみられた(図9)。すなわち、ミトコンドリアは腫大するとともに著しく変形し、クリスタの配列の乱れと種々程度の減少が認められた。また基質の部分的な澄明化もみられた。なお、少数の脂質滴も認められた。

6時間後には、すべての菌細胞においてミトコンドリアのより著しい変化がみられた(図10)。すなわち、ミトコンドリアは著しく腫大、変形し、クリスタは著しく減少し、残存するクリスタはしばしば環状を呈し、内腔内に遊離の状態で存するようみえた。また、多くのミトコンドリアにおいて基質は完全に澄明化していた。さらに、少数ではあるが、ミトコンドリアがほとんど認められない菌細胞が観察された(図11)。このような菌細胞では、1層の膜で境された空胞が多数存在していた。また、細胞質性微粒子は数個ずつ凝集していた。

24時間後には、すべての菌細胞においてミトコンド

リアだけでなく他の小器官にも顕著な変化がみられた(図12)。すなわち、形質膜は細胞壁の内面から部分的に剝離し、多数の空胞、数個ずつ凝集した細胞質性微粒子、および時に複雑な形態の膜構造がみられたが、核もミトコンドリアも認められなかった。なお、不規則に凝集した膜成分の断片のみ残存する菌細胞も時にみられた(図13)。このような菌細胞でも、しかし、細胞壁はよく保存されていた。

考 察

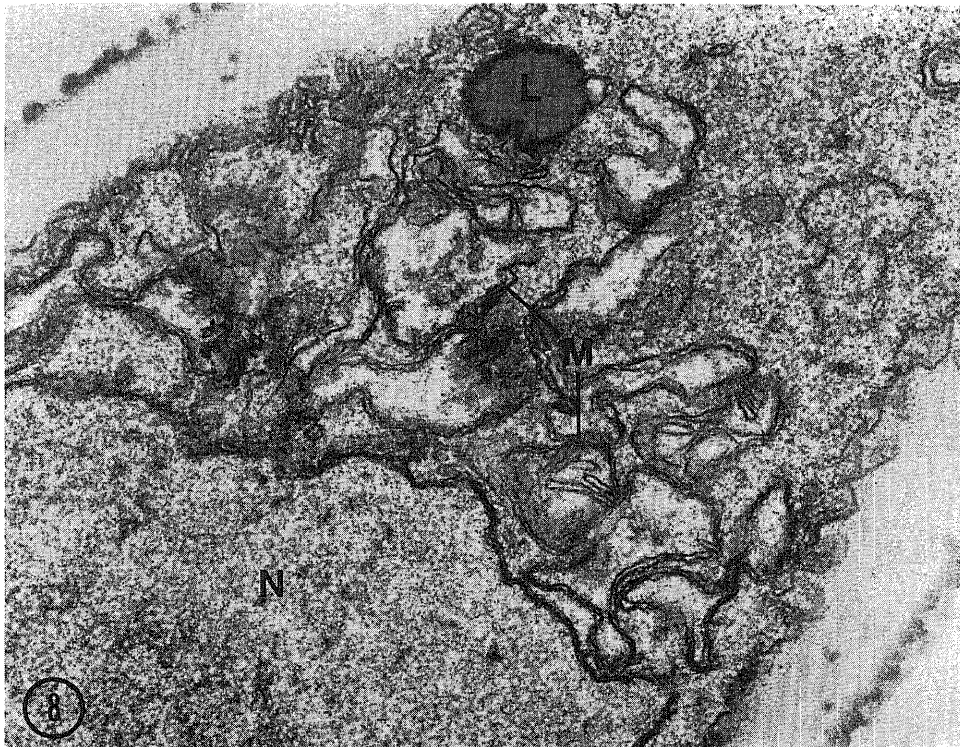
I. 薬剤感受性について

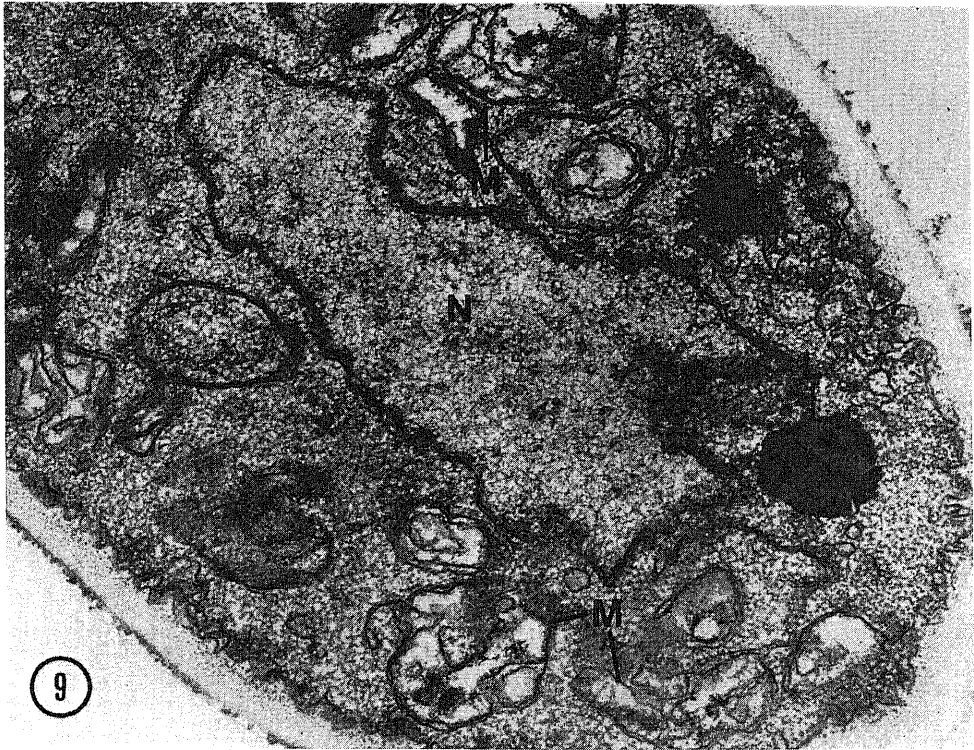
Alternaria 属の菌に対する各種抗真菌剤の MIC 値は従来次のように記載されている。すなわち、CTZ 20 $\mu\text{g/ml}$ ⁶⁾ または 25 $\mu\text{g/ml}$ ⁹⁾、ミコナゾール 10 $\mu\text{g/ml}$ ¹²⁾、アンホテリシン B 1.6~3.2 $\mu\text{g/ml}$ ²⁾、ナイスタチン 8~32 $\mu\text{g/ml}$ ²⁾、ピマリシン 2.5 $\mu\text{g/ml}$ ¹³⁾、トリコマイシン 4.5 $\mu\text{g/ml}$ ¹⁴⁾、グリセオフルビン 10 $\mu\text{g/ml}$ ²⁾、5-フルオロオサイトシン 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上⁹⁾、トルナフテート 1000 $\mu\text{g/ml}$ ⁴⁾ とされている。著者の成績では、CTZ の MIC は 31.25 $\mu\text{g/ml}$ であった。用いられた菌種および菌株と測定法が異なるため、上述の薬物の MIC 値を同一の基準で比較することはできないが、これらの MIC 値から概してイミダゾール系 (CTZ, ミコナゾール) およびポリエン系 (アンホテリシン B, ナイスタチン, ピマリシン, トリコマイシン) の薬物が *Alternaria* 属の菌に有効であるように思われる。実際、臨床的に CTZ⁶⁾、ミコナゾール⁹⁾ およびアンホテリシン B⁹⁾ は深在性アルテルナリア症に有用であったと報告されている。ただしナイスタチンは無効⁹⁾ とされている。

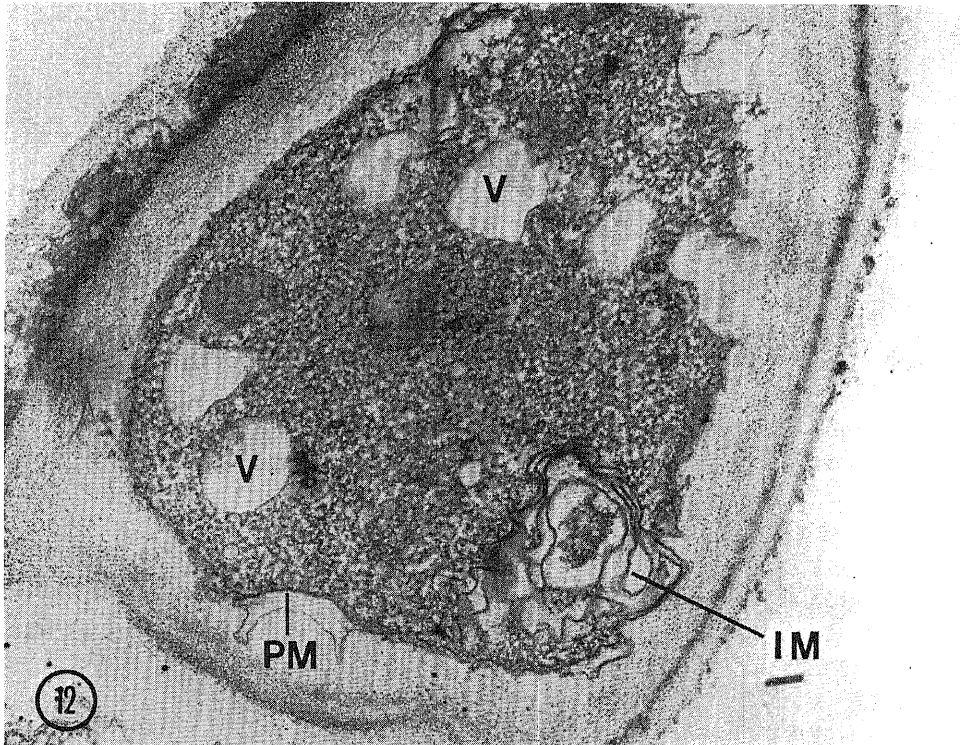
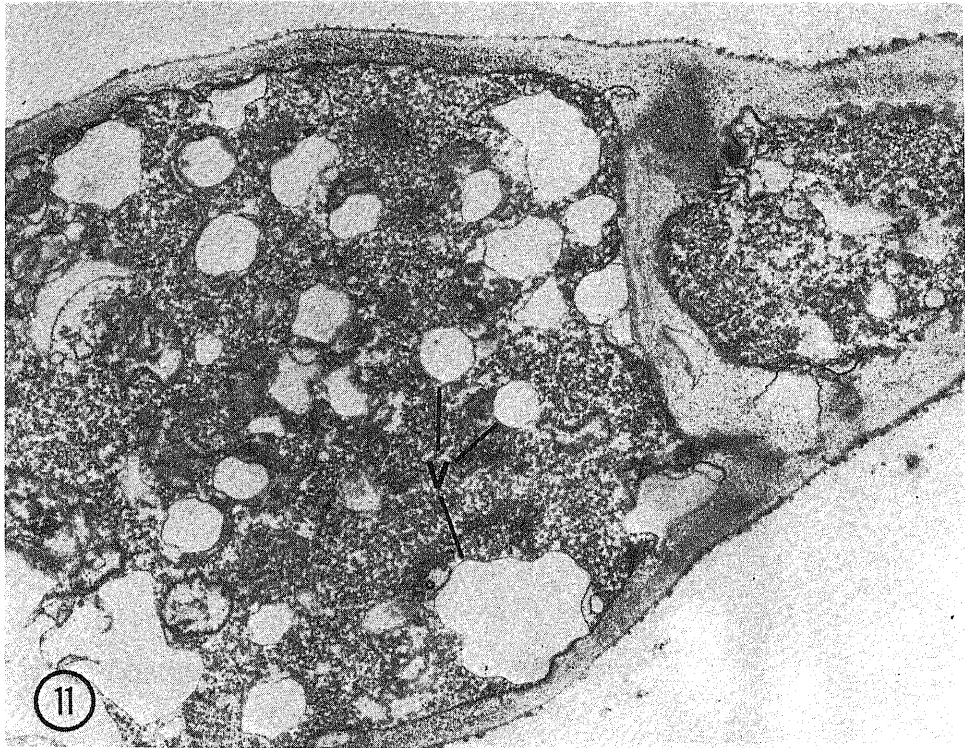
II. 正常微細構造について

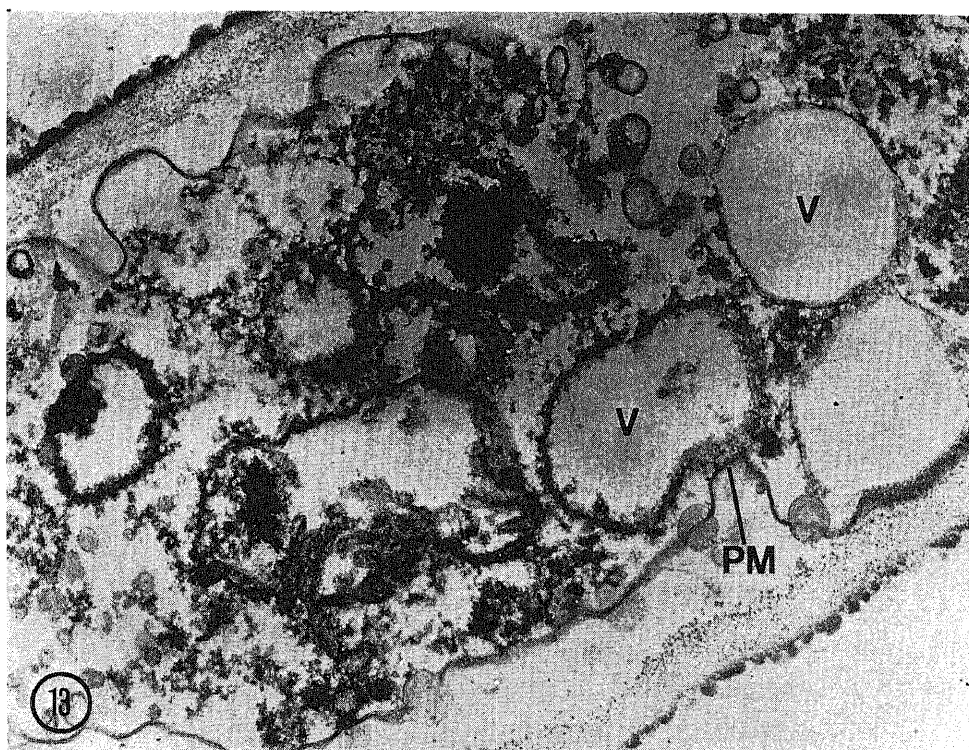
各種の真菌の微細構造はすでに多数報告されているが、*Alternaria* 属の菌に関する報告はまだほとんどない。Campbell¹⁵⁾¹⁶⁾ は、potato dextrose agar に培養された *A. brassicicola* において、高電子密度の外層と低電子密度の内層から成る細胞壁、細胞壁の内面に密接した形質膜、核膜により細胞質から境されている1~2個の核、細胞質内のミトコンドリア、小胞体および遊離リボソームを観察している。

著者の観察は、固形培地から得られた菌苔の分生子の一部と液体培地から得られた菌塊の菌糸はいずれも微細構造が *A. brassicicola* のそれとほぼ同様であり、細胞質内に多数のミトコンドリアを有することを示した。これらのミトコンドリアは比較的小さく、卵円形または紡錘形であり、そのクリスタは比較的少数で微絨毛状であった。なお、従来他の若干の真菌ではミトコンドリアに類似の構造物である mesosome の存在が報告されているが、そのような構造物は *A. alter-*









nata では認められなかった。

従来、培地の種類および培養条件の変化により真菌細胞の微細構造も変化することはよく知られている。福代ら¹⁷⁾は、猩紅色白癬菌を4%ブドウ糖寒天培地に7日間培養して得られた集落の菌塊と4%ブドウ糖液体培地に3日間振盪培養して得られた菌球を電顕的に観察し、前者では細胞質は凝集していて小器官を見分け難く、かつ多数の空胞が存在していたが、後者では菌細胞内に豊富な細胞小器官が明瞭にみられたと述べ、また薬物の作用で起こりうる変化をみるための材料として後者のほうがより適当であると述べている。

Campbell¹⁵⁾¹⁶⁾は、*A. brassicicola* の菌細胞において加齢とともにミトコンドリア、小胞体およびリボゾームは減少し、脂質滴と空胞が増加すると述べている。

すでに述べたように、*A. alternata* の場合にも、固形培地に培養後3日目の集落では、ほとんどすべての菌糸細胞と分生子細胞が細胞質基質の暗調化、リボゾームの不規則な凝集、種々の程度のミトコンドリアの減少、および空胞や脂質滴の出現を示した。しかし、液体培地に培養後3日目の菌塊ではそのような変化を示す菌細胞は全く認められなかった。これらの所見から、この菌は固形培地上の培養では比較的短期間に細胞活性が低下し、発育が停止することが推測された。

実際、固形培地に培養すると、約1週後には培地全面に発育し、以後発育は緩慢となり、数カ月で枯死するものもあり、短期間での継代培養が必要であった。他方、液体培地における培養では少なくとも3日目までに菌細胞の活性が低下することはなく、したがって、この期間中ならば菌の微細構造の変化によってこの菌に対する薬剤の作用を検討することが可能であると判断された。

III. CTZ の作用について

従来、菌に対するCTZの作用は生化学的ならびに形態学的に検討されてきたが、いずれも報告は少ない。*Candida albicans* (以下 *C. albicans* と略) を用いた生化学的研究では、CTZは菌細胞の形質膜と結合してその透過性を高め、二次的に細胞内の低分子リン酸化合物、アミノ酸、電解質などの細胞外遊出を惹起させること¹⁸⁾、そのような遊出効果はCTZの殺菌的濃度(20-30 $\mu\text{g/ml}$)で速やかに起こるが、静菌的濃度(2.5-10 $\mu\text{g/ml}$)では起こらないことが示されている¹⁹⁾。また、CTZは形質膜成分のうちの磷脂質およびトリグリセリドに対して親和性を有し、この点でステロールと結合して形質膜の機能を障害するポリエン系抗真菌剤と異なることが明らかにされている²⁰⁾。なお、CTZは殺菌的濃度で蛋白、RNA、DNA、脂質および

細胞壁の多糖体の合成を種々の程度に阻害することも示されている¹⁸⁾。他方, Iwata ら²¹⁾は, 静菌的濃度 ($3 \times 10^{-5}M$) および殺菌的濃度 ($1.5 \times 10^{-4}M$) の CTZ で 1-4 時間処理された *C. albicans* を電顕的に検討し, 静菌的濃度による処理ではミトコンドリアの腫大以外に微細構造上の変化は認められないが, 殺菌的濃度による処理では形質膜の過剰産生とそれに伴う細胞質内膜複合体 (intracytoplasmic membrane complex) や lomasome の形成および核膜やミトコンドリアの内膜の崩壊が起こり, 障害の強い菌細胞では細胞質の融解もみられたと述べている。これに対して, Nollin & Borgers²²⁾は 10^{-7} - $10^{-4}M$ の CTZ で 7-24 時間処理された *C. albicans* を電顕的に検討し, この濃度の CTZ の作用は静菌的であるが殺菌的でないこと, また CTZ 処理後の菌細胞では形質膜の細胞壁からの剝離と形質膜断片の細胞壁下空隙内蓄積が生じるが, 核やミトコンドリアに変化は起こらないことを強調している。なお, 細胞壁下空隙における形質膜断片の蓄積は, 変性した形質膜の排除または部分的に融解した細胞質を含む形質膜の分離の結果であろうと推測している。*Trichophyton mentagrophytes*, *C. albicans* および *Aspergillus fumigatus* を用いた in vivo 実験では²³⁾, 上述のような形質膜の変化とともに細胞質内における空胞形成が観察されている。

A. alternata を用いた著者の観察では, MIC 処理 24 時間後の菌細胞においてミトコンドリアの腫大および変形とクリスタの崩壊が認められた。また, MCC 処理の場合には, 6 時間後にミトコンドリアのクリスタの消失と基質の澄明化および形質膜の部分的剝離がみられ, 24 時間後には核の消失, 多数のミトコンドリア由来空胞, および形質膜の不規則な剝離がみられた。また, 細胞質の融解性変化も時にみられた。これらの所見から, MIC ならびに MCC の CTZ が比較的短時間の作用で菌細胞のミトコンドリア, 特にクリスタを含む内膜に強い障害を与えること, また MCC の CTZ は作用時間の延長とともにミトコンドリアだけでなく核膜, 形質膜, およびおそらく小胞体膜にも種々の程度の障害を与えることが明らかにされた。核の消失は核膜の崩壊により, 形質膜の不規則な剝離はその部分的崩壊により起こりうると推測される。細胞質の融解は薬物の一次的作用および膜系の障害に続発した二次的变化のいずれか, または両者により起こされたように思われる。このような推測は, CTZ が分離された形質膜の磷脂質およびトリグリセリドに親和性を示すという生化学的成績²⁰⁾からも妥当のように思われる。著者の成績は, CTZ 処理後形質膜の変化に先行してミトコンドリアの障害が起こることを示した点で Noll-

in & Borgers²²⁾の成績と異なり, またミトコンドリアの障害が CTZ の殺菌的濃度だけでなく静菌的濃度でも起こることを示した点で Iwata ら²¹⁾の成績と異なるものである。

結 論

ヒトの皮膚アルテルナリア症より分離された *A. alternata* の微細構造とそれに及ぼす CTZ の影響を電顕的に観察し, この菌に対する CTZ の作用を検討した。得られた成績は次のようである。

1. 液体培地中の振盪培養により得られた菌塊は菌糸のみから成り, これらの菌糸細胞では 2 層構造を示す細胞壁, 細胞壁の内面に密接する形質膜, 核膜で境された核, かなり多数のミトコンドリアおよび豊富なリボゾームがみられた。

2. 固形培地上の培養により得られた菌苔は菌糸と分生子から成り, 少数の分生子細胞を除くほとんどすべての菌細胞は細胞質の暗調化, 種々の程度の細胞小器官の減少および脂質滴と空胞の増加を示した。

3. MIC ($31.25 \mu g/ml$) の CTZ で処理された菌細胞では, ミトコンドリアのクリスタの減少ないし消失が認められた。MCC ($250 \mu g/ml$) の CTZ で処理された菌細胞では, ミトコンドリアのクリスタの消失と基質の澄明化から始まる空胞化が認められた。さらに, 変化の強い菌細胞では核の消失, 形質膜の細胞壁からの剝離および細胞質の融解像が観察された。これらの所見から, CTZ は主に菌細胞の膜系に作用し, それによる障害はミトコンドリアにおいてより早く, また強く起こると考えられた。

謝 辞

稿を終るに当り, 御指導いただきました福代良一名誉教授, 直接御指導いただきました広根孝衛教授に深甚の謝意を表します。本論文の要旨は第 23 回日本医真菌学会総会 (昭和 54 年 10 月 27・28 日, 於東京), 第 80 回日本皮膚科学会学術大会 (昭和 56 年 4 月 3~5 日, 於名古屋) において発表した。

文 献

- 1) 東 禹彦・島津 隆・朝田康夫: アルテルナリア・カンジダ混合感染症の 1 例. 臨皮, 27, 329-334 (1973).
- 2) Pedersen, N. B., March, P. A. & Jonsson, N.: Cutaneous alternariosis. Br. J. Dermatol., 94, 201-209 (1976).
- 3) 西本勝太郎: 皮膚アルテルナリア症の 1 例. 真菌誌, 20, 148-152 (1979).
- 4) 猿田隆夫・大隈貞夫・中溝慶生: 浅在型皮膚アル

- テルナリア症. 皮膚臨床, 23, 1695-1701 (1981).
- 5) 川崎平和・赤木正志・西村長志: 皮膚アルテルナリア感染症の1例. 真菌誌, 11, 218 (1970).
- 6) 福士 堯・亀田忠孝・花田勝美・野口 允: 皮膚アルテルナリア症(深在型)の1例. 皮膚臨床, 19, 227-232 (1977).
- 7) 福代良一・金原武司・井上久美子・藤田幸雄・伊予 進: 皮膚アルテルナリア症. 真菌誌, 17, 246 (1977).
- 8) 御子柴 甫・大久保正己・若松勝雄・二条貞子: 皮膚アルテルナリア症. 西日皮膚, 39, 691-695 (1977).
- 9) de Moragas, J. M., Prats, G. & Verger, G.: Cutaneous alternariosis treated with miconazole. Arch. Dermatol., 117, 292-294 (1981).
- 10) 渡辺昌平: 最近特に注目される皮膚真菌症の基礎と臨床. 真菌誌, 18, 374-386 (1977).
- 11) 福代良一: 抗真菌剤療法. 皮膚科治療学, 91-101頁, 金原出版, 東京, 1959.
- 12) Van Cutsem, J. M. & Thienpont, D.: Miconazole, a broad-spectrum antimycotic agent with antibacterial activity. Chemotherapy, 17, 392-404 (1972).
- 13) Struyk, A. P., Hoette, I., Drost, G., Waisvisz, J. M., Van Eek, T. & Hoogerheide, J. C.: Pimaricin, a new antifungal antibiotic. Antibiot. Ann., 1957/1958, 878-885 (1958).
- 14) Ohashi, Y.: On a rare disease due to *Alternaria tenuis* Nees (Alternariosis). Tohoku J. Exp. Med., 72, 78-82 (1960).
- 15) Campbell, R.: An electron microscope study of spore structure and development in *Alternaria brassicicola*. J. Gen. Microbiol., 54, 381-392 (1969).
- 16) Campbell, R.: An electron microscope study of exogenously dormant spores, spore germination, hyphae and conidiophores of *Alternaria brassicicola*. New Phytol., 69, 287-293 (1970).
- 17) 福代良一・広根孝衛・北村清隆・小西喜朗: 抗白癬菌剤の作用機序に関する電子顕微鏡的研究. 真菌誌, 9, 80-88 (1968).
- 18) 岩田和夫・山口英世: Clotrimazole の作用機作 I. *Candida albicans* に対する一次作用点の検討. 日細誌, 28, 513-521 (1973).
- 19) 山口英世・岩田和夫: Clotrimazole の作用機作 II. *Candida albicans* 細胞の膜系に対する作用. 日細誌, 29, 379-385 (1974).
- 20) Yamaguchi, H.: Antagonistic action of lipid components of membranes from *Candida albicans*

- and various other lipids on two imidazole antimycotics, clotrimazole and miconazole. Antimicrob. Agents Chemother., 12, 16-25, (1977).
- 21) Iwata, K., Kanda, Y., Yamaguchi, H. & Osumi, M.: Electron microscopic studies on the mechanism of action of clotrimazole on *Candida albicans*. Sabouraudia, 11, 205-209 (1973).
- 22) Nollin, S. D. & Borgers, M.: An ultrastructural and cytochemical study of *Candida albicans* after in vitro treatment with imidazoles. Mykosen, 19, 317-328 (1976).
- 23) Voigt, W. H.: Clotrimazole (Canesten)-Electron microscope studies on the action on the ultrastructure of pathogenic fungi, p.12-19. In R. Alstaedter (ed.), Broad-Spectrum Antimycotic Canesten Experience and Outlook, Bayer AG, Leverkusen (FRG), 1975.

Figure legends

- Fig. 1. Electron micrograph of the conidium of *A. alternata* cultured on Sabouraud's glucose agar for 3 days at 27°C. The conidial cells are separated by thick septa (S) one another, containing many mitochondria (M) within the cytoplasm. N, nucleus; ER, endoplasmic reticulum; V, vacuole; CW, cell wall. ×12,000.
- Fig. 2. Enlargement of a portion of Fig. 1, showing oval mitochondria (M) with villiform cristae. ER, endoplasmic reticulum; R, ribosome; PM, plasma membrane. ×37,500.
- Fig. 3. Electron micrograph of the mycelium of *A. alternata* cultured on Sabouraud's glucose agar for 3 days at 27°C. The mycelial cells contain a number of lipid droplets (L) and vacuoles (V) within the altered cytoplasm. ×17,500.
- Fig. 4. Enlargement of a portion of Fig. 3, showing shrinking mitochondria (M) and irregularly aggregated ribosomes (R) within the cytoplasm. L, lipid droplet; V, vacuole. ×28,000.
- Fig. 5. Electron micrograph of the mycelial cell of *A. alternata* cultured in Sabouraud's glucose liquid medium for 3 days at 27°C. The cell has a large nucleus (N) with a prominent nucleolus and contains a number of mitochondria (M) within the cytoplasm. ER, endoplasmic reticulum; PM, plasma membrane; CW, cell wall. ×25,500.

Fig. 6. Electron micrograph of the mycelial cell of *A. alternata* cultured in acetone-added liquid medium for 24 hr at 27°C (control). The cell shows the same structure as in Fig. 5. No significant changes due to acetone are seen. N, nucleus; M, mitochondria. $\times 15,000$. Inset shows mitochondria with villiform cristae. $\times 35,000$.

Fig. 7. Electron micrograph of the mycelial cell of *A. alternata* exposed to a minimal inhibitory concentration (31.25 $\mu\text{g/ml}$) of clotrimazole for 6 hr at 27°C. Slightly swollen mitochondria (M) with irregularly arranged cristae are seen. N, nucleus. $\times 45,000$.

Fig. 8. Electron micrograph of the mycelial cell of *A. alternata* exposed to the minimal inhibitory concentration of clotrimazole for 24 hr at 27°C. Mitochondria (M) are seen to be vacuolated in varying degrees and the cristae are decreased in number. N, nucleus; L, Lipid droplet. $\times 37,500$.

Fig. 9. Electron micrograph of the cell of *A. alternata* exposed to a minimal fungicidal concentration (250 $\mu\text{g/ml}$) of clotrimazole for 1 hr at

27°C. Markedly swollen mitochondria (M) with a few cristae are seen. N, nucleus; L, lipid droplet. $\times 30,000$.

Fig. 10. Electron micrograph of the cell of *A. alternata* exposed to the minimal fungicidal concentration of clotrimazole for 6 hr at 27°C. Mitochondria (M) are markedly swollen and vacuolated. $\times 37,500$.

Fig. 11. Electron micrograph of the cell of *A. alternata* treated with the same procedure as in Fig. 10. A number of membrane-limited vacuoles (V) are seen. $\times 15,000$.

Fig. 12. Electron micrograph of the cell of *A. alternata* exposed to the minimal fungicidal concentration of clotrimazole for 24 hr at 27°C. Membrane-limited vacuoles (V), intracytoplasmic membrane complex (IM) and separation of the plasma membrane (PM) from the cell wall can be seen. $\times 25,000$.

Fig. 13. Electron micrograph of the cell of *A. alternata* treated with the same procedure as in Fig. 12. Degradation of cell organelles and separation of the plasma membrane (PM) from the cell wall are seen. V, vacuole. $\times 45,000$.

Effect of *in Vitro* Treatment with Clotrimazole on the Ultrastructure of *Alternaria alternata*
 Hiroshi Masuda, Department of Dermatology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Juzen Med. Soc., **93**, 197—210 (1984)

Key words: *Alternaria alternata*, Clotrimazole

Abstract

Although human cutaneous alternariosis is clinically treated with imidazole derivatives, there has been little information concerning the effect of the drugs on pathogenic fungi of the disease. The aim of this study was to investigate, by electron microscopy, the *in vitro* mode of action of clotrimazole, bis-phenyl-(2-chlorophenyl)-1-imidazolyl methane, on *Alternaria alternata* isolated from the lesion of human cutaneous alternariosis. After cultivation in the Sabouraud's glucose liquid medium for 24 hr at 27°C, cultures of fungal cells were exposed to a minimal inhibitory (31.25 $\mu\text{g/ml}$) or a minimal fungicidal (250 $\mu\text{g/ml}$) concentration of clotrimazole and examined the drug effects 1, 6 and 24 hr later, respectively. Other cultures, to which an equal amount of solvent (0.5% acetone) was added, served as controls. In Many of the cells after exposure to the minimal inhibitory concentration of the drug for 6 to 24 hr, mitochondria showed varying degrees of swelling and incomplete loss of cuistae. In all the cells after exposure to the minimal fungicidal concentration for 1 to 6 hr, mitochondria exhibited marked swelling and complete or incomplete loss of the inner membrane systems including cristae, often forming electron-lucent

vacuoles. After a 24-hr exposure, all the cells showed severe alterations of all cell organelles. Vacuolation of mitochondria, disappearance of nuclei and partial separation of the plasma membrane from the cell wall were commonly observed. Some of the cells displayed varying degrees of lytic changes of the cytoplasmic matrix. These findings indicate that clotrimazole exerts its primary effect on the membrane systems of the cells, and that the earliest alterations occur at the mitochondria before any other organelles are involved.