

白癬菌の酵素組織化学的研究

〔I〕 培養形態の菌における酵素活性

金沢大学医学部皮膚科学講座(主任: 福代良一教授)

柳 下 邦 男

(昭和47年3月21日受付)

本論文の要旨は、第20回日本皮膚科学会中日本連合地方会および第15回日本医真菌学総会において発表した。

白癬菌を含めて病原性真菌のもっている酵素に関する研究はおもに、抗真菌剤の作用機序との関連において行なわれてきた。しかし、その成績にはまだ十分なものがなく、不明の点がいろいろある。著者はまず白癬菌の酵素を組織化学的に検索し、ついで酵素活性におよぼす抗白癬菌剤の影響を調べ、それによって抗白癬菌剤の作用機序の一端を解明しようと考えた。以下にその成績を述べる。

材料と方法

材料 被検菌種は石膏状小孢子菌 (*Microsporum gypseum*, 以下 *M. gyps.* と略) で、比較的新しくケルスス禿瘡から分離培養された菌株(保存No.1426)を使用した。この菌株の(Pleomorphism)を防ぎ、新鮮さを失わせないために、定期的にこれをモルモットの皮膚に接種し、病巣から逆培養した株を用いた。

方法

1) ガラス板培養 4%ブドウ糖寒天培地(Sabouraud)を用いて型の如くガラス板培養(22°C, 5~7日間)を行ない、載せガラスに生えた菌について実験した。

2) 固定 初めは無固定の新鮮な材料について酵素反応を行なったが、成績にバラツキが多いので止めた。以後は野口ら¹⁾の方法に倣い、冷アセトンで短時間(数10秒)固定した。

3) 水 洗

4) 酵素反応実施

5) 水 洗

6) グリセリン封入

7) 検鏡, 撮影: 標本作成後の反応生成物の拡散を

避けるため、なるべく早く撮影するようにした。

酵素の種類 検索の目標にした酵素は次の通りである。

I. 解糖系の酵素

1) 乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase, LDH)

2) nicotinamide adenine dinucleotide 依存性アルコール脱水素酵素 (NAD-linked alcohol dehydrogenase, NAD-ADH)

nicotinamide adenine dinucleotide phosphate 依存性アルコール脱水素酵素 (NADP-linked alcohol dehydrogenase, NADP-ADH)

3) グルコース 6 リン酸脱水素酵素 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-6-PDH)

II. TCA 回路系の酵素

4) NAD依存性イソクエン酸脱水素酵素 (NAD-linked isocitrate dehydrogenase, NAD-ICDH)

NADP依存性イソクエン酸脱水素酵素 (NADP-linked isocitrate dehydrogenase, NADP-ICDH)

5) こはく酸脱水素酵素 (succinate dehydrogenase, SDH)

6) NAD依存性りんご酸脱水素酵素 (NAD-linked malate dehydrogenase, NAD-MDH)

NADP依存性りんご酸脱水素酵素 (NADP-linked malate dehydrogenase, NADP-MDH)

III. 電子伝達系の酵素

7) dihydronicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase (NADH₂-DH)

dihydronicotinamide adenine dinucleotide phosphate dehydrogenase, (NADPH₂-DH)

In vitro studies on the enzyme activities in *Microsporum gypseum*. Kunio Yagishita, Department of Dermatology, (Director: Prof. R. Fukushima) School of Medicine, Kanazawa University.

- 8) チトクロム酸化酵素 (cytochrome oxidase, Cyt-ox)
 IV. 水解酵素 (Hydrolase)
 9) aminopeptidase (AP)
 10) アルカリ性フォスファターゼ (alkaline phosphatase, al-p-ase)
 11) 酸性フォスファターゼ (acid phosphatase, acid-p-ase)

酵素反応の実施法

1) LDH: Barka-Anderson 法²⁾ によった。反応液の処方は次のようである。この液に材料を60分間(37°C) 浸漬した。

i) sodiumDL-lactate, 0.1M	0.1ml
ii) NAD (6mg/ml)	0.1ml
iii) KCN, 0.1M	0.1ml
iv) MgCl ₂ , 0.05M	0.1ml
v) Phosphate buffer (PH7.4), 0.06M	0.25ml
vi) Nitro-BT (4mg/ml)	0.25ml
vii) distilled water	0.1ml

2) NAD- および NADP-ADH: Barka-Anderson²⁾ 法によった。反応液の処方は下記。浸漬時間と温度は1) に同じ。

ethanol 4.6%	0.1ml
NAD 或いは NADP (6mg/ml)	0.1ml
他は1) の iii)~vii) と同じ。	

3) G-6-PDH: a) Barka-Anderson²⁾ 法, または b) Rudolph-Klein³⁾ 法によった。反応液の処方下記。浸漬時間と温度は1) に同じ。

a) glucose-6-phosphate, disodium salt 1.0M	0.1ml
NADP (6mg/ml)	0.1ml
他は1) の iii)~vii) と同じ。	
b) glucose-6-phosphate, disodium salt	0.4mg
NADP	0.5mg
Tris-buffer (pH7.2), 0.1M	0.4ml
Nitro-BT (1mg/ml)	0.2ml
distilled water	0.4ml

4) NAD- および NADP-ICDH: Barka-Anderson²⁾ 法によった。反応液の処方下記。浸漬時間と温度は1) に同じ。

DL-isocitrate, sodium salt, 1.0M	0.1ml
NAD 或いは NADP (6mg/ml)	0.1ml
他は1) の iii)~vii) と同じ。	

5) SDH: a) Barka-Anderson²⁾ 法, または b)

Nachlas⁴⁾ 法によった。反応液の処方は下記。浸漬時間と温度は1) に同じ。

a) sodium succinate, 0.06M	1.0ml
Nitro-BT, 0.2%	2.5ml
phosphate buffer (pH 7.4), 0.2M	1.0ml
Ringer solution	0.5ml
b) sodium succinate, 0.2M	5ml
phosphate buffer (pH 7.6), 0.2M	5ml
Nitro-BT (1mg/ml)	10ml

6) NAD- および NADP-MDH: Barka-Anderson²⁾ 法によった。反応液の処方は下記。浸漬時間と温度は1) に同じ。

sodium malate, 0.1M	0.1ml
NAD 或いは NADP (6mg/ml)	0.1ml
他は1) の iii)~vii) と同じ。	

7) NADH₂- および NADPH₂-DH: Barka-Anderson²⁾ 法によった。反応液の処方は下記。浸漬時間は60分間 (22°C)。

NADH 或いは NADPH (2~3mg/ml)	0.7ml
Nitro-BT, 0.2%	2.5ml
phosphate buffer (pH7.2~7.4), 0.2M	1.0ml
Ringer solution	0.8ml

8) Cyt-ox: Burstone⁵⁾ 法によった。反応液の処方は下記。浸漬時間は90分間 (22°C)。あと10%酢酸第一コバルト・ホルマリソ (10%) 溶液に約1時間浸漬した。

p-aminodiphenylamine coupler (8-amino-1,2,3,4-tetrahydroquinoline)	10~15mg
ethanol	0.5ml
distilled water	35ml
Tris buffer (pH7.4), 0.2M	15ml

9) AP: Monis⁶⁾ 法によった。反応液の処方は下記。浸漬時間は60分間(37°C)。あと硫酸銅 (0.1M) に30分間浸漬した。

L-leucyl-4-methoxy-β-naphthylamide HCL (10mg/ml)	0.25ml
saline, 0.86%	2.0ml
Fast Blue B	5mg
KCN, 2×10 ⁻² M	0.25ml
phosphate buffer (pH7.4), 0.1M	2.5ml

10) al-p-ase: Gomori 法⁷⁾によった。反応液の処方
は下記の通りで、これに水を加えて総量 50ml とす
る。浸漬時間は60分間 (37°C)。あと、硝酸コバルト
(2%)に5分間、さらに稀硫酸アンモニウムに5分間
浸漬した。

- sodium β-glycerophosphate, 3%
5~10ml
- CaCl₂, 2% 20~25ml
- MgSO₄, 10% 約10滴
- barbital natrium 0.5~1.0g

11) acid-p-ase: Barka-Anderson 法⁸⁾によった。
反応液の処方
は下記の通り。これに 20ml の硝酸鉛
(0.2%)を滴下。浸漬時間は120分間 (37°C)。

- sodium β-glycerophosphate, 1.25%
10ml
- (あらかじめ塩酸で pH 5 にしておく)
- Tris-maleate buffer (pH5), 0.1M
10ml
- distilled water 10ml

対照 al-p-ase および acid-p-ase では熱処理 (90°C, 5分間)したもので、他では各基質を除去したものについて同様に反応させた。

実験成績

被検菌株において LDH, NAD および NADP-ADH, G-6-PDH, NAD および NADP-ICDH, SDH, NAD および NADP-MDH, NADH₂ および NADPH₂-DH, Cyt-ox; AP, al-p-ase および acid-p-ase, 以上15種類の酵素活性がすべて陽性であった。これらの酵素活性は酵素の種類により、菌の器官により、また実験条件によってかなりの変動を示した。酵素の種類別にまた菌の各器官別に酵素活性の大体の傾向を示すと次のようであった (表1)。

1) lactate dehydrogenase

大分子子、小分子子および菌糸のすべてに活性を認めた。しかし、菌糸において活性は一般に他の場合よりも弱かった。大分子子では隔壁の近くに活性が一般に強かった (図1)。

2) alcohol dehydrogenase

NAD-ADH および NADP-ADH とも大分子子、小分子子および菌糸に活性を認めた。菌糸における活性は一般に弱かったが、所々に強い活性を示す部位もあった (図2, 3)。

3) glucose-6-phosphate dehydrogenase

大分子子と小分子子に強い活性が見られたほか、菌糸にも比較的強い活性が認められた (図4, 5)。

表1 M. gypseum の各器官における酵素活性

酵 器 官	大 分 子	小 分 子	菌 糸
NAD-ADH	+	+	±~+
NADP-ADH	+	+	+
G-6-PDH	+	+	±~+
NAD-ICDH	+	+	+
NADP-ICDH	+	+	+
SDH	+	±~+	+
NAD-MDH	±~+	+	±
NADP-MDH	±~+	+	±
NADPH ₂ -DH	+	+	±~+
NADPH ₂ -DH	+	+	±~+
Cyt-ox	+	+	±~+
AP	±~+	+	+
al-p-ase	+	+	+
acid-p-ase	+	+	-

注: 半反応生成物 (色素顆粒)

密, や粗, 散在, 僅かに存在, なし.

注: 半反応生成物 (色素顆粒)

注: 半反応生成物 (色素顆粒)

4) isocitrate dehydrogenase

NAD-ICDH および NADP-ICDH ともに大分生子, 小分生子 および 菌糸に活性を認めた. 菌糸における活性は一般に分生子よりも弱かった (図 6, 7, 8).

5) succinate dehydrogenase

大分生子, 小分生子, 菌糸ともに活性を認めた. 菌糸においても活性が比較的強かった (図 9, 10).

6) malate dehydrogenase

NAD-MDH および NADP-MDH ともに大分生子, 小分生子, 菌糸に活性を認めた. しかし, この酵素反応は他の酵素活性に比べて反応が一般に弱く, 特に菌糸ではごく弱い活性しか認められなかった (図 11, 12).

7) NADH₂-dehydrogenase および NADPH₂-dehydrogenase

二つの酵素とも大分生子, 小分生子および菌糸に活性を認めた. 菌糸における活性も比較的強かった (図 13, 14).

8) cytochrome oxidase

大分生子, 小分生子に強い活性が見られ, 菌糸にも比較的強い活性が認められた (図 15, 16).

9) aminopeptidase

大分生子, 小分生子および菌糸ともにほぼ同程度の活性が見られた. しかし, 全体として活性は弱かった (図 17).

10) alkaline phosphatase

大分生子, 小分生子および菌糸ともにほぼ同程度の活性が認められ, それらは非常に強かった (図 18).

11) acid phosphatase

この酵素活性は一般に非常に弱く, 菌糸ではほとんど活性が見られなかった. 分生子においても, 活性の強いものもすこしあったが, 全体として弱かった (図 19).

なお, すべての酵素反応が対照標本では陰性であった.

小 括

被検菌株において検索した15種類の酵素反応のすべてが陽性であった. これらの酵素反応のうち, alkaline phosphatase の活性が最も強く, malate dehydrogenase および acid phosphatase の活性が最も弱かった. acid phosphatase では菌糸に活性がほとんど認められなかった. 各酵素とも一般に大分生子の方に活性が強く, 小分生子→菌糸の順に活性が弱くなる傾向が見られた. 大分生子では一般に細胞壁や隔壁

の近くに活性が強かった. 隔壁のない大分生子では活性がほぼ均等に分布し, 隔壁のあるものよりもやや強い傾向を示した. 細胞壁や隔壁のものには活性は認められなかった. 大分生子の若干では, 細胞壁の外側にも活性の存在を示す所見が得られた. 菌糸では, 菌糸先端部に活性の強い所見もあった.

考 按

真菌細胞における酵素の存在を組織化学的に証明したのは Bayliss ら⁹⁾ が初めてである. alkaline phosphatase, acid phosphatase, lipase を証明. Polemann ら¹⁰⁾ は *M. gypseum* において alkaline phosphatase と acid phosphatase を証明した. Jung ら¹¹⁾ は同じく *M. gypseum* において培地に triphenyltetrazoliumchloride を添加することにより還元酵素の存在を見出した. Kim ら¹²⁾ および Montes ら¹³⁾ は *C. albicans* において leucine aminopeptidase を Mizuno ら¹⁴⁾ は同じく *C. albicans* において succinate dehydrogenase, NADH₂-dehydrogenase, NADPH₂-dehydrogenase を証明した. Meinhof ら¹⁵⁾ は12種の白癬菌について, Meinhof¹⁶⁾⁻¹⁹⁾ は29種の白癬菌と4種の Saprophyten において解糖系, TCA 回路系, 電子伝達系, 水解酵素系の活性を証明した. Male ら²⁰⁾ は *T. rubrum* など6種の白癬菌において alkaline phosphatase, acid phosphatase, aminopeptidase, NADH₂-dehydrogenase, succinate dehydrogenase の活性を見出した.

わが国ではこの方面の研究は少ない. 樋口ら²¹⁾ が *M. gypseum* において培地に kaliumtellurit および triphenyltetrazoliumchloride を添加することによって還元酵素の存在を, Hasegawa²²⁾ が *C. albicans* において succinate dehydrogenase を野口ら¹⁾ が *C. albicans*, *M. gypseum* および *T. rubrum* において isocitrate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, malate dehydrogenase, NADH₂-dehydrogenase, NADPH₂-dehydrogenase, cytochrome oxidase, ubiquinone の活性を証明, 石原²³⁾ が *M. gypseum* において NAD-isocitrate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, ubiquinone, cytochrome oxidase, NADH₂-dehydrogenase を証明しているだけである.

著者は *M. gypseum* を材料とし, 培養状態の菌について解糖系, TCA 回路系, 電子伝達系および水解酵素系に属するそれぞれ数種の酵素の活性を検索し, 15種の酵素のすべてに反応陽性の結果を得た. なお各

酵素とも大分生子に活性がより強く、小分生子→菌子の順に活性が弱くなる傾向が見られた。Meinhof ら¹⁵⁾、Meinhof¹⁶⁾¹⁸⁾、野口ら¹⁾も大分生子に活性が最も強い傾向のあることを述べている。また Meinhof¹⁶⁾¹⁸⁾ は若い分生子と菌糸先端に活性の強いことを、Bayliss ら⁹⁾ や Male ら²⁰⁾ は培養日数の古い菌ほど活性が弱い傾向のあったことを指摘している。著者の検索でも、隔壁の認められない大分生子（恐らく年令が若い）において隔壁のある大分生子よりも活性がやや強い傾向が見られ、また菌糸では先端部に活性が強かった。野口ら¹⁾、Mizuno ら¹⁴⁾ は細胞壁や隔壁の近くに活性が強いという傾向をあげているが、著者の場合も大分生子においてその傾向が見られた。Jung ら¹¹⁾、Meinhof¹⁶⁾、Male ら²⁰⁾ は活性の不均等な分布を指摘しているが、著者の場合も細胞によってはそれが見られた。Jung ら¹¹⁾ は反応生成物が菌糸外側にも見られることを示し、それが菌糸壁の破壊によるものか菌糸壁外側に独立して存在するものか、はっきりしないと述べている。著者も大分生子においてしばしば細胞壁の外側に反応生成物のまだらな存在を認めたが、その場合、細胞壁の破壊を思わす所見はなかった。次に、各酵素の間に活性の強弱があるかどうかの問題であるが、著者の場合、phosphatase については alkaline phosphatase の活性は強く、acid phosphatase の活性は著しく弱かった。Meinhof ら¹⁵⁾ も多くの真菌で alkaline phosphatase の活性は強く、acid phosphatase の方は活性が見られなかったといっている。しかし Polemann ら¹⁰⁾ は *M. gypseum* において acid phosphatase の活性をも証明している。

抗真菌剤の酵素活性におよぼす影響

前項の15種の酵素のうち数種の酵素について抗真菌剤のおよぼす影響を検索した。

材料と方法

1) 材料 前項の実験と同じ菌株 (*M. gyps.*) を材料とし、振盪培養3日目の小菌塊を使用した。

2) 抗真菌剤 グリセオフルビン (griseofulvin, GF) ナフチオメート-T (naphthiomate-T, NT) およびチメロサル (thimerosal, M) の3種。各薬剤の濃度は10万倍水溶液、作用時間は10, 30, 60および90分間とした。

3) 酵素の種類 検索した酵素反応は G-6-PDH, SDH, Cyt-ox の3種とした。方法は前項と同じ。ただし、G-6-PDH は Rudolph-Klein 法³⁾ のみによ

った。

4) 実験 次の順序で行なった。

i) 菌塊作成: 4%ブドウ糖液体培地(Sabouraud)振盪培養(25°C)3日目には直径2~3mmの球状の菌塊が出来る。これを使用した。

ii) 水洗: 培地除去のため、十分に水洗。

iii) 抗真菌剤水溶液に浸漬。

iv) 水洗: 薬剤除去のため、十分に水洗。

v) 酵素反応液に浸漬。

vi) 水洗。

vii) グリセリン封入。

5) 対照 基質液を除去した場合、および薬剤処理なしの菌塊を対照とした。

成績

1. グリセオフルビンの影響

1) G-6-PDH: 10~90分薬剤浸漬後の各菌塊について反応抑制効果は認められなかった(図21)。

2) SDH: 10~60分薬剤浸漬後の場合は、反応抑制効果は認められなかった。90分薬剤処理の菌塊では軽度の反応抑制効果が認められた(図25)。

3) Cyt-ox: 10~30分の薬剤処理の菌塊には影響はなかった。60分間薬剤処理の場合は反応抑制効果が見られ、90分処理では色素顆粒が全体に粗となり、抑制効果はより強かった(図29)。

2. ナフチオメート-Tの影響

1) G-6-PDH: 10~90分処理の各菌塊について反応抑制は認められなかった(図22)。

2) SDH: 10~60分薬剤処理の菌塊には反応抑制効果は認められなかった。90分処理の菌塊ではごく僅かに反応抑制効果が認められた(図26)。

3) Cyt-ox: 10~30分薬剤処理では反応抑制は見られなかった。60分処理の菌塊では反応抑制を認め、90分処理の菌塊では活性が処々残存する程度になり、かなりの抑制効果が見られた(図30)。

3. チメロサールの影響

1) G-6-PDH: 10~30分薬剤処理では影響はなかった。60分処理の菌塊では軽度の反応抑制効果が見られ、90分処理では色素顆粒がさらに粗になり、明らかな抑制効果が認められた(図23)。

2) SDH: 10~30分薬剤処理では影響はなかった。60分処理では反応抑制効果が見られ、90分処理では明らかな抑制効果を認めた(図27)。

3) Cyt-ox: 10~60分薬剤処理では影響なく、90分処理の菌塊でも僅かに抑制効果を認めたに過ぎなかった(図31)。

小 括 (表2)

グリセオフルビンとナフチオメート-TにおいてはSDH および Cyt-ox に対して反応抑制効果があり、それは Cyt-ox の方でより 顕著に見られた。G-6-PDH に対しては影響は見られなかった。チメロサルにおいては G-6-PDH, SDH および Cyt-ox の3種の酵素反応のいずれに対しても反応抑制効果があり、その程度は $SDH > G-6-PDH > Cyt-ox$ の順に弱くなり、Cyt-ox の反応抑制は僅かであった。

酵素反応の側から見ると、G-6-PDH の反応についてはチメロサールの影響が他の二つの薬剤よりも強く ($M > GF = NT$)、SDH の反応についてもほぼ同様 ($M > GF \geq NT$)、Cyt-ox の反応については逆に $NT \geq GF > M$ の順に抑制効果は減った。

表2 薬剤と白癬菌の酵素活性との関係

酵 素 \ 薬 剤	グリセオフルビン	ナフチオメート-T	チメロサル
G-6-PDH	-	-	+
SDH	+	+	+
Cyt-ox	+	+	+

註: +は抑制効果あり, -は同なしの意味。

考 按

実験に用いた3種の薬剤の被検菌株 (*M. gyps.*) に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を測定したところ、グリセオフルビンでは $51.4 \times 10^4 \sim 128 \times 10^4$ 倍、ナフチオメート-Tでは $204.8 \times 10^4 \sim 256 \times 10^4$ 倍、チメロサルでは $102.4 \times 10^4 \sim 128 \times 10^4$ 倍であった。今回の実験では薬剤の濃度として、真菌細胞に確実に影響をおよぼすと考えられるような、MIC よりもはるかに高い濃度 (10万倍) を選んだ。なお、グリセオフルビンとナフチオメート-T は水に難溶で、メタノールその他の有機溶媒には溶ける。そこで、これら二つの薬剤では、まずそれぞれの 0.1%メタノール溶液を作り、次いでそれぞれを蒸留水で100倍に希釈して10万倍水溶液を作った。グリセオフルビン水溶液は透明で混濁していなかったが、ナフチオメート-T水溶液では僅かに白濁していた。しかし、沈殿物は生じなかった。また、このような少量のメタノールを含んだ溶媒について酵素活性抑制の有無を調べたが、抑制は見

られなかった。薬剤処理時間を決めるに当っては、あらかじめ菌塊を蒸留水にそれぞれ90分、2時間、3時間、5時間ずつ浸漬、あと酵素反応を試みた。その結果、90分および2時間浸漬の菌塊では反応抑制は認められなかったが、3時間と5時間浸漬の菌塊では活性の抑制が見られた (蒸留水の影響)。そこで薬剤処理時間を90分までとした。

グリセオフルビンの作用について

グリセオフルビンの白癬菌におよぼす作用についての研究はかなり多数あるが、多くは菌細胞の形態学的変化²⁴⁾²⁵⁾に関するものである。生化学的に検索したものの多くは白癬菌の呼吸²⁶⁾⁻³⁴⁾ に対するグリセオフルビンの影響を検圧計を用いて検索したもので、抑制効果ありという成績と無いという成績がある。また、白癬菌の酵素活性に対するグリセオフルビンの影響を組織化学的に検索した成績²¹⁾³⁵⁾⁻³⁸⁾ が若干あり、還元酵素系への抑制効果が見出されている。著者もかなりの高濃度のグリセオフルビンの白癬菌 (*M. gyps.*) の酵素活性におよぼす影響を組織化学的に検索し、グリセオフルビンが菌細胞の呼吸に関係した脱水素酵素である SDH の活性および呼吸系酵素である Cyt-ox の活性に対する抑制効果をもつことを認めた。

次に菌細胞の核酸代謝に対するグリセオフルビンの影響については研究が少なく、わずかに McNall³⁹⁾ がグリセオフルビンは直接に核酸合成を阻害するのであろうと推論し、また EL-Nakeeb ら⁴⁰⁾ も ³H-グリセオフルビンを用いてこの種の研究を行なっている。著者は核酸代謝に直接に関係した酵素については検索しなかったが、核酸合成に利用されるD-リボースの生成において重要な一過程をなしている glucose-6-phosphate → 6-phosphogluconolactone の反応を触媒する G-6-PDH の活性について検索し、それに対するグリセオフルビンの影響をほとんど認めなかった。

ナフチオメート-Tの作用について

ナフチオメートの白癬菌におよぼす影響については研究²¹⁾³²⁾³⁴⁾ が少ない。師井³³⁾ の成績では *T. mentagrophytes* の呼吸に対してナフチオメート-Nは無影響、岩田³⁴⁾ の成績では *T. rubrum* において呼吸抑制・MDH 亢進・その他は無影響、*T. mentagrophytes* においてはすべてに無影響であった。樋口ら²¹⁾ はナフチオメート-Tによる還元酵素活性の抑制を認めた。著者の検索では、TCA 回路系の酵素で呼吸に関係のある SDH の活性 および呼吸系酵素である

Cyt-ox の活性に対するナフチオメートーTの抑制効果を認めた。しかし、ナフチオメートーTの G-6-PDH の活性に対する影響は見られなかった。

チメロサールの作用について

白癬菌におよぼすチメロサールの影響については若干¹⁾²¹⁾³⁰⁾⁻³²⁾³⁴⁾の研究がある。高橋³⁰⁾は *T.asteroides* で、樋口ら²¹⁾³¹⁾は *M. gypseum*, *T. rubrum* および *T. mentagrophytes* において、師井³²⁾は *T. mentagrophytes* においてチメロサールの呼吸抑制効果を認めた。岩田³⁴⁾は *T. mentagrophytes* と *T. rubrum* で TCA 回路系の酵素 (SDH, MDH, ICDH, α -KG など) に対してチメロサールの抑制効果を見出した。野口ら¹⁾は *M. gypseum* と *T. rubrum* において ICDH, SDH, MDH, など TCA 回路系の酵素に対するチメロサールの抑制効果を観察した。著者の検索においても、SDH および Cyt-ox の活性はチメロサルによって抑制された。しかし Cyt-ox は軽度であった。また、G-6-PDH の活性もまた抑制され、この点はグリセオフルビンやナフチオメートーTの場合と異なっていた。

総 括

M. gypseum の培養形態の菌細胞について、その酵素活性を組織化学的に検索し、さらに3種の薬剤の酵素活性におよぼす影響を調べた。成績を要約すると次のようである。

1. *M. gypseum* において解糖系の酵素 (lactate dehydrogenase, NAD ならびに NADP-linked alcohol dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase), TCA 回路系の酵素 (NAD ならびに NADP-linked isocitrate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, NAD ならびに NADP-linked malate dehydrogenase), 電子伝達系の酵素 (NADH₂ ならびに NADPH₂-linked malate dehydrogenase, cytochrome oxidase, および 水解酵素 (aminopeptidase, alkaline phosphatase, acid phosphatase) の活性が認められた。ただし、acid phosphatase 活性のみは菌糸において認められなかった。

2. 上述のほとんどすべての酵素活性は大分子子において最も強く、小分子子→菌糸の順に活性が低下する傾向が見られた。

3. 上述の酵素活性は一般に大分子子では細胞壁と隔壁の近くに、菌糸では先端部に活性の強い傾向を示した。

4. グリセオフルビンとナフチオメートーTは succinate dehydrogenase および cytochrome oxidase の活性に対して抑制効果を示した。しかし、両薬剤とも glucose-6-phosphate dehydrogenase の活性に対しては無影響であった。

5. チメロサルは succinate dehydrogenase, cytochrome oxidase, glucose-6-phosphate dehydrogenase の3者のいずれの活性に対しても抑制効果を示した。

文 献

- 1) 野口義園・関建次郎・石原和之・中島 弘・下田 祥由・片倉仁志・高梨雄蔵・河村英子：真菌誌，7，3-13 (昭41)。
- 2) Barka, T. & Anderson, P. J. : Histochemistry, Theory, Practice and Bibliography, p. 312-314, New York, Hoeber Medical Division, Harper and Row Publisher, 1963.
- 3) Rudolph, G. & Klein, H. J. : Histochemie, 4, 238-251 (1964)。
- 4) Nachlas, M. M., Tsou, K. C., Souza, E. DE., Chang, C. S. & Seligman, A. M. : J. Histochem. Cytochem., 5, 420 (1957)。
- 5) Burstone, M. S. : J. Histochem. Cytochem., 8, 63 (1960)。
- 6) Monis, B., Nachlas, M. M. & Seligman, A. M. : Cancer, 12, 601 (1959)。
- 7) Gomori, G. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 42, 23 (1939)。
- 8) Barka, T. & Anderson, P. J. : Histochemistry, Theory, Practice, and Bibliography, p. 240, New York, Hoeber Medical Division, Harper and Row Publisher, 1963.
- 9) Bayliss, M., Glick, D. & Siem, R. A. : J. Bact., 55, 307-316 (1948)。
- 10) Polemann, G. & Jansen, N. : Mykosen, 1, 63-70 (1957)。
- 11) Jung, H. D. & Gerhardt, H. : Derm. Woch., 27, 16-19 (1963)。
- 12) Kim, Y. P., Adachi, K. & Chow, D. : J. Invest. Derm., 38, 115-116 (1962)。
- 13) Montes, L. F. & Constantine, V. S. : J. Invest. Derm., 51, 1-3 (1968)。
- 14) Mizuno, N. & Montes, L. F. : Sabouraudia, 5, 46-51 (1966)。
- 15) Meinhof, W., Braun-Falco, O. & Thianprasit, M. : Arch. klin. exp. Derm., 226, 48-63 (1966)。
- 16) Meinhof, W. : Mykosen, 10, 335-366 (1967)。
- 17) Meinhof, W. : Mykosen, 11, 727-744

- (1968). 18) Meinhof, W. : Arch. klin. exp. Derm., 232, 260-278 (1968). 19) Meinhof, W. : Arch. klin. exp. Derm., 232, 279-294 (1968). 20) Male, O. & Holubar, K. : Arch. klin. exp. Derm., 227, 962-972 (1967). 21) 樋口謙太郎・矢幡敬・北村公一 : 真菌誌, 5, 250 (昭39). 22) Hasegawa, T. : J. J. Derm., 75, 165-167 (1965). 23) 石原和之 : 日皮会誌, 78, 1027-1053 (1968). 24) Hildick-Smith, G., Blank, H. & Sarkany, I. : Fungus diseases and their treatment, p. 427-431, London, Published in Great Britain by J. & A. Churchill Ltd., 1964. 25) 野口義園・岩田和夫・小堀辰治 : 真菌誌, 1, 116-119 (昭35). 26) Brian, P. W. : Ann. Bot. (N.S.), 13, 59 (1949). 27) Roth, F. J., Sallman, B. & Blank, H. : J. Invest. Derm., 33, 403-418 (1959). 28) Tickner, A. : Exc. med. Derm. Venerol., 14, 420 (2279) (1960). 29) Meyer-Rohn, J. : Chemotherapia, 4, 563-572 (1962). 30) 高橋 久 : 真菌誌, 1, 380, (昭35). 31) 樋口謙太郎・植松一男・師井庸夫・吉住和子・矢幡 敬・原宜之 : 真菌誌, 3, 3-15 (昭37). 32) 師井庸夫 : 皮と泌, 25, 221-232 (昭38). 33) Larsen, W. G. & Demis, D. J. : J. Invest. Derm., 41, 335-342 (1963). 34) 岩田美恵子 : 真菌誌, 6, 206-222 (昭40). 35) Jung, H. D. & Gerhardt, H. : Derm. Woch., 36, 257-264 (1963). 36) Jung, H. D. & Gerhardt, H. : Derm. Woch., 38, 310-318 (1963). 37) Jung, H. D. : Mykosen, 10, 91-102 (1967). 38) Male, O. & Holubar, K. : Arch. klin. exp. Derm., 227, 973-984 (1967). 39) McNall, E. G. : Arch. Derm., 81, 657-661 (1960). 40) El-Nakeeb, M. A. & Lampen, J. O. : Microbiol., 39, 285-293 (1965).

図の説明

図1. LDH 反応. ガラス培養板6日目. 大, 小分子に活性を認める. 大分子では隔壁の近くに活性が強い. $\times 1000$.

図2. NAD-ADH 反応. ガラス板培養6日目. 大分子に活性を認め, それは細胞壁や隔壁の近くに活性が強い. $\times 1000$.

図3. NADP-ADH 反応. ガラス板培養6日目. 大分子に強い活性を認め, それは全体に均等な強さを示す. $\times 1000$.

図4. G-6-PDH 反応. ガラス板培養6日目. 大分子に均等な強い活性を認める. $\times 800$.

図5. G-6-PDH 反応. ガラス板培養6日目. 菌糸に比較的強い活性が見られる. 細胞壁や隔壁のものには活性を認めない. $\times 800$.

図6. NAD-ICDH 反応. ガラス板培養7日目. 大, 小分子に活性を認める. 隔壁のある大分子では, 細胞壁や隔壁の近くに活性が強い. 隔壁のない大分子では, 活性がほぼ均等に認められ, それが隔壁のあるもよりもやや強い傾向が見られる. $\times 504$.

図7. NADP-ICDH 反応. ガラス板培養6日目. 大分子に活性を認める. 細胞壁の外側にも所々に活性を示す色素顆粒の沈着を認める. $\times 800$.

図8. NADP-ICDH 反応. ガラス板培養7日目. 菌糸に活性を認める. 活性は菌糸の先端の方にやや強い傾向が見られる. $\times 800$.

図9. SDH 反応. ガラス板培養5日目. 隔壁のない大分子にほぼ均等な活性を認める. $\times 504$.

図10. SDH 反応. ガラス板培養7日目. 菌糸と小分子に活性を認めるが, 菌糸の方で活性がより弱い. $\times 800$.

図11. NAD-MDH 反応. ガラス板培養5日目. 大分子に活性を認めるが, 全体として活性は弱い. 細胞壁や隔壁の近くに活性がより強く, また細胞壁の外側にも色素顆粒の沈着を認める. $\times 800$.

図12. NADP-MDH 反応. ガラス板培養5日目. かなり強い活性のある大分子を示す. $\times 504$.

図13. NADH₂-DH 反応. ガラス板培養7日目. 大分子と菌糸に活性を認める. 菌糸の活性は一般に弱い. $\times 504$.

図14. NADPH₂-DH 反応. ガラス板培養5日目. 大分子と菌糸に活性を認める. 菌糸の活性は一般に弱い. 大分子では, 隔壁のない方において活性が均等に見られ. やや強い傾向を示す. $\times 504$.

図15. Cyt-ox 反応. ガラス板培養6日目. 強い活

性を示す大分子。×504。

図16. Cyt-ox 反応。ガラス板培養6日目。菌糸と小分子に活性を認める。小分子では大分子(図15)よりも活性弱く、菌糸ではさらに弱い。×800。

図17. AP 反応。ガラス板培養5日目。大分子に僅かに活性が見られる。隔壁近くに反応陽性で、細胞壁の外側にも色素顆粒の沈着を認める。×504。

図18. al-p-ase 反応。ガラス板培養7日目。大分子と菌糸に強い活性を認める。×504。

図19. acid-p-ase 反応。ガラス板培養6日目。大分子では比較的強い活性のもものと、ほとんど活性のないものがある。この酵素の活性は検索した15種の酵素の中で最も弱い。×800。

図20. G-6-PDH 反応。振盪培養3日目。薬剤処理なし(対照)。菌糸に均等な強い活性を認める。×1000。

図21. G-6-PDH 反応。振盪培養3日目。10万倍グリセオフルビン溶液に90分間浸漬。図20と比較して活性の強さはほとんど変わらない。×1000。

図22. G-6-PDH 反応。振盪培養3日目。10万倍ナフチオメート-T溶液に90分間浸漬。図20と比較して活性の強さはほとんど変わらない。×1000。

図23. G-6-PDH 反応。振盪培養3日目。10万倍チメロサル溶液に90分間浸漬。図20と比較して色素顆粒が粗で、活性の低下を認める。×1000。

図24. SDH 反応。振盪培養3日目。薬剤処理なし

(対照)。所々に活性の弱い部分もあるが、全体としてかなり強い活性を認める。×1000。

図25. SDH 反応。振盪培養3日目。10万倍グリセオフルビン溶液に90分間浸漬。図24と比較して色素顆粒が粗で、活性の低下を認める。×1000。

図26. SDH 反応。振盪培養3日目。10万倍ナフチオメート-T溶液に90分間浸漬。図24と比較して色素顆粒が僅かに粗で、軽い活性の低下を認める。×1000。

図27. SDH 反応。振盪培養3日目。10万倍チメロサル溶液に90分間浸漬。図24と比較して色素顆粒が非常に粗で、かなり強い活性の低下を認める。×1000。

図28. Cyt-ox 反応。振盪培養3日目。薬剤処理なし(対照)。菌糸全体に強い活性を認める。×1000。

図29. Cyt-ox 反応。振盪培養3日目。10万倍グリセオフルビン溶液に90分間浸漬。図28と比較して色素顆粒が明らかに粗で、活性の低下を認める。×1000。

図30. Cyt-ox 反応。振盪培養3日目。10万倍ナフチオメート-T溶液に90分間浸漬。色素顆粒は所々に沈着しているのみで、図28と比較して活性の低下が明らかである。それは図29よりもより顕著である。×1000。

図31. Cyt-ox 反応。振盪培養3日目。10万倍チメロサル溶液に90分間浸漬。図28と比較して色素顆粒がやや粗で、活性の軽度抑制を認める。×1000。

Abstract

Enzyme-histochemical methods were employed in order to demonstrate the enzyme activities in *M. gypseum* and to evaluate the effects of some antifungal agents on the activities.

Experiment I. A subculture of the stock strain (No. 1426) of *M. gypseum* was used. The fungal cells were inoculated into Sabouraud's media for 5-7 days at the room temperature (22°C) by slide culture technique. The specimens were fixed in cold acetone within one minute and then immersed in the incubation media for the enzyme reactions. Enzyme activities for glycolysis, tricarboxylic acid cycle and respiration chain as well as phosphatase and aminopeptidase activities were examined.

Results.—Each of the enzyme activities was found to be present in the cells of *M. gypseum*. The positive reactions for the enzyme activities, in general, were intenser in macroconidia than in the hyphal cells of the fungus. Furthermore, strongly positive reactions were seen in the vicinity of the cell wall and septum of macroconidia. The hyphal cells often showed intenser reactions in their tip than in other parts of the cells.

Experiment II. Small fungal pellets of *M. gypseum* grown in Sabouraud's glucose broth for three days at 25°C on the shaker were used. The specimens were immersed for 10, 30, 60, and 90 minutes respectively in the solution containing 0.001% of the

following antifungal agents respectively: griseofulvin, naphthiomate-T and thimerosal. And then, enzyme activities for glucose-6-phosphate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, and cytochrome oxidase were examined.

Results.—In the specimens treated with griseofulvin and naphthiomate-T, enzyme reactions for succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase were reduced in degree, while there were no reductions in the reaction of glucose-6-phosphate dehydrogenase. In the specimens treated with thimerosal, each of the enzyme reactions was decreased in degree.







