

表在性 真菌의 Thiocarbanilide (L-1) 處理效果에 對한 電子顯微鏡的 觀察

延世大學校 醫科大學 微生物學教室

高 春 明 · 金 泰 元 · 柳 駿

—Abstract—

Electron Microscopic Observations of the Effects of Thiocarbanilides (L-1) on Dermatophytes

Choon-Myung Koh, Tai-Won Kim and Joon Lew

Dept. of Microbiology, College of Medicine, Yonsei University

The present study is of ultra-fine structures of *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* and *Epidermophyton floccosum* by means of electron microscopy and reveals the following.

1. In contrast to the bacteria, the normal fungus contains nuclear membrane, mitochondria, endoplasmic reticulum, distinct cell wall and cell membrane and secretory granules as observed in the higher plants and animals.
2. Thickening of the cell wall, inapparent cell wall, inapparent cell membrane with the appearance of electron thin area (ETA) and increase of inclusions were observed in the L-1 treated groups.
3. Thickening of cell wall and increase of ETA were more apparent in the *Epidermophyton floccosum* than the other groups.
4. Increase of electron thin area was thought to be associated with autolysis.

I. 緒 論

真菌類의 細胞構造에 對하여는 오래전부터 光學顯微鏡을 利用 연구 발표되어 온 바 있다. 그러나 1931年 Knoll 및 Ruska에 의하여 電子顯微鏡이 考案되고 1940年以後 實際로 利用하게 되면서부터 自然科學의 여러 分野에 使用하게 되었으며 現在는 醫學 生物學 分野는 물론 이 이외의 여러 分野에 널리 利用되고 있는 實情이다.

電子顯微鏡을 利用하여 細胞構造의 觀察 특히 微生物

에 對한 研究는 細菌에 對한 研究가 真菌에 對한 研究보다 빠른 시기에 이루어졌으며 真菌의 電子顯微鏡을 통한 觀察은 比較的 近來에 와서부터 活潑하여 졌다고 할 수 있다.

電子顯微鏡을 통한 真菌類의 微細構造에 對한 研究는 非病原性 真菌들에 對한 報告들이 (William等, 1956; Hilda 및 Douglas, 1957; Tanaka等, 1963; Tanaka, 1966) 病原性 真菌들에 對한 研究報告보다 많다고 할 수 있으며 특히 表在性 真菌類에 對한 實驗報告는 他報告에 比하여 매우 적은 量이 있다.

Laden 및 Erickson(1958), Werner(1964)들은 Epidermophyton屬, Sagami(1959), Talpin 및 Blank(1961), Ishihara 및 Noguchi(1963), Ikeda(1964), Tsukahara 등(1964) 그리고 Yuki(1967)들은 Trichophyton屬의 數種을 對象으로 微細構造를 觀察하였으며 Microsporum屬에 對한 觀察역시 Werner等(1966; 1967; 1968)에 依하여 觀察되어 正常的인 Eucaryotic cell의 細胞構造를 볼 수 있었다고 發表하고 細胞壁는 Electron dense thin outer area와 Electron lucid inner area로 細胞膜은 Trilaminar의 構造로서 되어 있음을 報告하였다.

또한 深在性 真菌에 對한 觀察역시 Edward等(1959)은 Histoplasma屬, Tsukahara(1963), Edward等(1967)은 Cryptococcus neoformans, Kitamura(1965)는 Sporotrichum schenckii, O'Hern 및 Henry(1959)는 Coccidioides immitis, Tokunaga等(1969-a; 1969-b; 1969-c)은 Candida屬等을 利用하여 電子顯微鏡에 依한 細胞의 微細構造를 관찰하여 Yeast phase의 真菌들은 酵母의 細胞構造와 大同小異하고 Mycelial phase의 真菌은 他 表在性 真菌의 微細構造와 비슷하다고 主張하였다.

한편 藥劑를 處理한 真菌의 電子顯微鏡 觀察로서는 Adams等(1963)은 Sodium caprylate로서 Candida albicans를 處理, Gale(1963)은 Benzalkonium chloride와 Amphotercin B로서, 李等(1969) 역시 數種의 抗生劑와 染料로서 Candida albicans를 處理하여 微細構造를 觀察하고 細胞壁의 顯著한 肥厚와 細胞質의 變化로 ETA(Electron thin area)의 增加 및 Organells의 正確한 觀察이 不可能하였다고 報告하였다.

또한 Blank等(1960)은 表在性 真菌症의 治療劑로 알려진 Griseofulvin을 表在性 真菌의 一種인 Trichophyton rubrum에 處理하여 微細構造를 觀察하고 菌絲의 Swelling 및 Ballooning되고 細胞壁의 肥厚와 Weakness 現象等을 主張하였다.

이에 著者들은 本 教室에서 새로 合成하여 金 및 柳(1967)에 依하여 試驗管内 抗真菌作用이 우수하다고 알려졌으며 金 및 柳(1969)에 依하여 臨床實驗 結果 역시 우수한 效果가 있다고 發表된 Thiocarbanilide系統의 一種인 L-1*을 使用하여 藥劑含有培地에 계속 繼代 培養한 후에 電子顯微鏡을 通하여 微細構造의 변화유무를 觀察하여 보았던 바 意義있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

A. 實驗材料

* L-1: N-(p-ethoxyphenyl)-N'-(thiocyano-phenyl) thiocarbanilide.

1. 實驗에 使用된 菌株

實驗에 使用된 菌株로서는 患者의 病巢에서 分離 同定후 純粹繼代 培養中인 Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes, Microsporum canis, 및 Epidermophyton floccosum 各 一株씩을 使用하였다.

2. 實驗에 使用한 藥劑

實驗에 使用된 藥劑로서는 表在性 真菌에 對하여 試驗管内 및 臨床實驗에서 우수한 效果가 있다고 報告된 Thiocarbanilide系統의 一種인 L-1을 使用하였다.

B. 實驗方法

1. 菌株의 藥劑接觸 方法

Thiocarbanilide(L-1)을 有機溶媒의 一種인 Polyethylene glycol 400에 一定한 比率로 희석시킨후 이를 다시 Sabouraud's 糖 固體培地上에 含有시키어 每 1ml當 10r, 20r, 40r, 80r, 100r, 200r, 400r, 800r 및 1,000r의 濃度가 되도록 분주하였다. 各 濃度로 分注된 培地를 斜面培地로 만든후 이 培地上에 液體培地上에서 培養된 各 菌株를 研(Mortar and pestle)로서 연마한 뒤 이들의 一白全耳를 各種 濃度의 藥劑가 含有된 培地中央에 接種한 뒤 室溫에서 2時間 放置한 후 부란기에 옮겨 25°C에서 培養하였다. 菌 發育 最高 濃度의 培地上에 發育된 菌株는 上記의 같은 方法을 되풀이 하므로써 藥劑를 接觸시켰으며 이와 같은 處理를 10代간 계속하였으며 이 菌株를 本 實驗에 使用하였다.

2. 電子顯微鏡的 觀察方法

Thiocarbanilide(L-1)含有培地에서 10代를 繼代 培養한 各種實驗菌株들을 集菌하여 이를 0.1 mol Sucrose에 磷酸緩衝液으로 희석한 2퍼센트 Osmium tetroxide 加溶液을 使用하여 2時間 0°C~4°C 냉장고에 靜置하여 試料를 固定한 후 60%, 70%, 80%, 90%, 99.5% 및 100%의 알콜과 Propylene oxide를 使用하여 段階的으로 脫水하였다. 完全 脫水된 試料는 Epon 812로 包埋하여 MT-2 ultramicrotome으로 Glass knife를 使用하여 400Å~800Å으로 절단하고 이를 다시 Uranyl acetate와 Lead citrate로서 二重染色한 후 Hitachi HU-11 E-1型 電子顯微鏡을 利用 75 KV下에서 細胞를 관찰하였다.

III. 實驗成績

A. 藥劑接觸에 依한 實驗成績

Thiocarbanilide(L-1)의 藥劑 接觸에 對한 實驗成績을 보면 各 屬種間에 特別한 差異를 볼 수 없었으며 10代를 繼代培養하는 동안 Trichophyton 및 Microsporum屬은 7代에서 菌發育 抑制最高 濃度(100r~200r)를 나타내었으며 Epidermophyton屬은 4代에서 400r/ml로서 菌發育 抑制 最高濃度를 나타내었다(第1, 2, 3, 및 4表).

第1表

L-1處理에 의한 *Tr. rubrum*의 發育抑制 實驗成績

Table 1.

Development by *Tr. rubrum* of in vitro resistance to L-1

Previous contact with L-1(r/ml)	0	10	20	40	80	100	200	400	800	1000
1 Generation	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2 "	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3 "	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4 "	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
5 "	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
6 "	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
7 "	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
8 "	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
9 "	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10 "	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

+: Indicate fungi growth.

第2表

L-1處理에 의한 *Tr. mentagrophytes*의 發育抑制 實驗成績

Table 2.

Development by *Tr. mentagrophytes* of in vitro resistance to L-1

Previous contact with L-1(r/ml)	0	10	20	40	80	100	200	400	800	1000
1 Generation	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2 "	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3 "	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4 "	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
5 "	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
6 "	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
7 "	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
8 "	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
9 "	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10 "	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

+: Indicate fungi growth.

第3表

L-1處理에 의한 *M. canis*의 發育抑制 實驗成績

Table 3.

Development by *M. canis* of in vitro resistance to L-1

Previous contact with L-1(r/ml)	0	10	20	40	80	100	200	400	800	1000
1 Generation	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2 "	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3 "	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4 "	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
5 "	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
6 "	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
7 "	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
8 "	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
6 "	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10 "	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

+: Indicate fungi growth.

第4表

L-1處理에 의한 *E. floccosum*의 發育抑制 實驗成績

Table 4.

Development by *E. floccosum* of in vitro resistance to L-1

Previous contact with L-1(r/ml)	0	10	20	40	80	100	200	400	800	1000
1 Generation	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2 "	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3 "	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4 "	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
5 "	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
6 "	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
7 "	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
8 "	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
9 "	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10 "	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

+: Indicate fungi growth.

B. 電子顯微鏡에 의한 觀察成績

1. Trichophyton 屬의 觀察成績

正常的인 對照群의 細胞에서는 正確한 核, 核膜, Mitochondria, 細胞壁, 細胞膜, Endoplasmic reticulum, Vacuole, 및 granular like dense body 등을 正常的인 細胞構造를 볼 수 있었으나 藥劑 處理 實驗群에서는 顯著한 細胞壁의 肥厚, Granular like dense body의 增加 및 細胞膜 등의 變化를 招來하는 것을 觀察할 수 있었으며 또한 Cytoplasmic matrix의 變化로 Organelles의 관찰이 힘들었다(第1, 2, 3 및 4圖).

2. Microsporium의 觀察成績

對照群에서는 Trichophyton 屬과 같이 正常的인 細胞構造를 볼 수 있었으며 實驗群에서는 역시 細胞壁의 肥厚, granular like dense body의 增加와 細胞基質의 變化를 招來하였으며 細胞膜의 變化로 正確한 構造를 관찰하기 힘들었고 아울러 Electron dense outer coat 등의 出現을 볼 수 있었다(第5, 6圖).

3. Epidermophyton 屬의 觀察成績

Epidermophyton 屬의 觀察成績을 보면 他屬과 別다른 差異를 볼 수 없었으나 本實驗群에는 他屬의 實驗群보다 특히 細胞壁의 肥厚現象이 顯著하였으며 아울러 Electron thin area 部分의 增加와 細胞基質의 變化로 因하여 Cytoplasm 內의 organelles의 관찰이 下可能하였다(第7, 8圖).

IV. 考 按

微生物의 微細構造는 1931年 Knoll 및 Ruska에 依하여 電子顯微鏡이 考案되고 1940年 以後 各分野 특히 生物學, 醫學分野에서 電子顯微鏡의 利用度가 높아짐에 따라 많은 研究者들에 依하여 各種 微生物의 微細構造가 研究 報告되었다.

即 Schreiff(1964), Young 및 Fitts-James(1959) 그리고 Fuhs(1965)들은 核과 DNA에 關하여, Iterson(1965), Boatman(1964), Chapman 및 Hillier(1953), Edward 및 Stevens(1963), 그리고 Weibull(1953)들은 細胞質의 微細構造를 觀察 高等 動物과 細菌사이의 差異點을 지적하고 細菌의 細胞構造는 動物의 細胞構造보다 原始的이라 主張하였다.

그러나 真菌類의 微細構造에 對하여서는 여러 學者들(Hilda 및 Douglas, 1965; William 등, 1956; Tanaka 등, 1963; Tanaka, 1966)에 依하여 數種 真菌類의 細胞에 對한 微細構造를 觀察하고 細菌과는 달리 高等 生物의 構造와 비슷하다고 報告하였다.

한편 病原性 表在性 真菌類에 對한 研究 역시 Laden 및 Erickson(1958), Werner 등(1964), Sagami(1959),

Talpin 및 Blank(1961), Ishihara 및 Noguchi(1963), Ikeda(1964), Tsukahara 등(1964) 그리고 Yuki 등(1967)에 依하여 觀察 報告되 바 있다.

또한 藥劑 處理에 依한 真菌類의 微細構造의 變化에 對한 研究는 Adams(1963), Gale(1963), 李等(1969)은 數種 抗生劑와 染料 및 化學藥品을 使用하여 Candida 屬을 處理 變化를 觀察하였으며 이 結果顯著한 細胞壁의 肥厚, 細胞質의 變化, Electron thin area의 增加를 나타낸다고 하였으며 Blank 등(1960)은 表在性 真菌症의 治療劑의 一種인 Griseofulvin을 處理 관찰하여 上記와 비슷한 現象을 나타낸다고 主張하였다. 本實驗成績에서도 細胞壁의 肥厚, 細胞膜의 變化, Granular like dense body의 增加 및 Electron thin area의 많은 出現을 볼 수 있었는데 이는 上記 報告者들의 報告와 一致하는 點들이라고 할 수 있다.

表在性 真菌類의 電子顯微鏡에 依한 微細構造에 對한 觀察은 우리나라에서는 처음 實施한 結果라고 생각되며 계속적인 研究가 實施되어야 한다고 보며 아울러 細胞 遺傳學的인 研究가 必要하다고 본다.

또한 他 藥劑에 處理된 表在性 真菌의 微細構造의 變化 有無의 觀察이나 處理 時間의 差에 依한 變化에 對한 研究 역시 앞으로 계속적인 研究가 必要하다고 하겠다.

V. 結 論

表在性 真菌症 患者로부터 分離 同定한 Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum, Microsporium canis 및 Epidermophyton floccosum 各 一株씩을 Thiocarbanilide 系統의 L-1에 계속 접촉시킨후 이를 電子顯微鏡을 通하여 微細構造를 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 正常的인 對照群에서는 細菌과는 달리 高等 動物에서 觀察 가능한 Eucaryotic cell의 構造를 觀察할 수 있었다.

2. Thiocarbanilide의 L-1으로 處理한 實驗群에서는 各種 菌株 共히 細胞壁의 肥厚, 細胞基質의 變化, 많은 數의 封入體의 增加 및 Electron thin area의 增加現象을 나타내었다.

3. 특히 Epidermophyton 屬에서는 他 實驗群에서 보다 심한 變化를 나타내었다.

4. Electron thin area의 增加는 自家溶解와 關係 있는 것으로 思慮된다.

參 考 文 獻

Adams, J.N., Painter, B.G. and Payne, W.J.:

- Effects of sodium caprylate on Candida albicans I. Influence on concentration ultrastructure, J. Bact., 86: 548, 1963.*
- Blank, H., Taplin, D. and Rothe F.J.: *Electron microscopic observations of the effects of griseofulvin on dermatophytes, Arch. Dermat., 81: 667, 1960.*
- Boatman, E.S.: *Observations of the fine structure of spheroplasts of Rhodospirillum rubrum, J. Cell Biol., 29: 297, 1964.*
- Chapman, G.B. and Hillier, J.: *Electron microscopy of ultrathin sections of the bacteria I. Cellular division in Bacillus cereus, J. Bact., 66: 362, 1963.*
- Edwards, M.R. and Stevens, R.W.: *Fine structure of Listeria monocytogenes, J. Bact., 86: 414, 1963.*
- Edwards, M.R., Hazen, E.L. and Edwards, G.A.: *The fine structure of the yeast-like cells of Histoplasma in culture, J. Gen. Microbiol., 20: 496, 1959.*
- Edwards, M.R., Gordon, M.A., Lapa, E.W. and Ghiorse, W.C.: *Micromorphology of Cryptococcus neoformans, J. Bact., 94: 766, 1967.*
- Fuhs, G.W.: *Symposium on the fine structure and replication of bacteria and their part, Bact. Rev., 29: 277, 1965.*
- Gale, G.R.: *Cytology of Candida albicans as influenced by drugs acting on the cytoplasmic membrane, J. Bact., 86: 151, 1963.*
- Hilda, D.A. and Douglas, H.C.: *Studies on the cytological structure of yeast; electron microscopy of thin sections J. Bact., 73: 365, 1957.*
- Ikbda, H.: *An electron microscopic study of Trichophyton rubrum, Jap. J. Derm., 74: 269, 1964.*
- Ishihara, K. and Noguchi, Y.: *An electron microscopic study on Trichophyton rubrum (In Japanese), Dermat. Urol., 17: 729, 1963.*
- Iterson, W.: *Symposium on the fine structure and replication of bacteria and their parts, Bact. Rev., 29: 299, 1965.*
- Kitamura, K.: *Fine structure of Sporotrichum schoenckii, Jap. J. Derm., 75: 285, 1965.*
- Laden, E.L. and Erickson, J.O.: *Electron microscopic study of Epidermophyton floccosum, J. Invest. Dermat., 31: 55, 1958.*
- O'Hern, E.M. and Henry, B.S.: *A cytological study of Coccidioides immitis by electron microscopy, J. Bact., 72: 632, 1952.*
- Sagami, S.: *Studies on the cytological structures of Trichophyton rubrum (In Japanese), Skin Res., 1: 84, 1959.*
- Schreill, W.H.: *Studies on the fixation of artificial and bacterial DNA plasma for the electron microscopy of thin section, J. Cell Biol., 22: 1, 1964.*
- Tanaka, K.: *Change in ultrastructure of Aspergillus oryzae conidia during germination, J. Gen. Appl. Microbiol., 12: 239, 1966.*
- Tanaka, K. and Yanagita, T.: *Electron microscopy on ultrathin sections of Aspergillus niger, J. Gen. Appl. Microbiol., 9: 189, 1963.*
- Talpin, D. and Blank, H.: *Microscopic morphology of Trichophyton rubrum, J. Invest. Derm., 37: 523, 1961.*
- Tokunaga, J., Tokunaga, M., Egashira, T. and Harada, K.: *Electron microscopical studies on growing fungal cells, II. Cell wall formation in budding and germinating blastospores of genus Candida, Jap. J. Bact., 24: 679, 1969.*
- Tokunaga, T., Tokunaga, M. and Egashira, T.: *Electron microscopical studies on growing fungal cells, III. Germination ability of chlamydospores of Candida stellatoidea and Candida albicans and their fine structures during germination, Jap. J. Bact., 24: 666, 1969.*
- Tsukahara, T., Sato, A. and Okada, R.: *Electron microscopic studies on the cytological structure of Trichophyton mentagrophytes, Jap. J. Microbiol., 8: 83, 1964.*
- Warner, J.H., Jolly, H.W. and Lee, J.H.: *Electron microscopic observation of Epidermophyton floccosum, J. Invest. Derm., 43: 139, 1964.*
- Warner, J.H., Jolly, H.W. and Carpenter, C.L.: *Observations of the fine structure of Microsporum audouini, J. Invest. Derm., 50: 276, 1968.*
- Warner, H.J., Jolly, H.W., Catsulis, C. and Carpenter, C.L.: *Electron microscope observation of the fine structure of Microsporum gypseum, J. Invest. Derm., 48: 481, 1967.*
- Weibull, C.: *Characterization of the protoplasmic*

- constituents of Bacillus megaterium* *J. Bact.*, 66: 696, 1953.
- Williams, M.A., Lindegren, C.C., Yoasa, A., Ephrussi, B., Slonimski, P. and Yotsuyanagi, Y.: *Cytoplasmic structure in yeast*, *Nature*, 177: 1041, 1956.
- Young, I.E. and Fitz-James, P.C.: *Pattern of synthesis of deoxyribonucleic acid in Bacillus subtilis growing synchronously out of spores*, *Nature*, 183: 372, 1959.
-



第1圖 정상적인 Eucaryotic cell의 구조인 세포형태를 볼 수 있다.

Nm: Nuclear membrane

N: Nucleus

Cw: Cell wall

Cm: Cell membrane

第2圖 현저한 세포벽의 비후, 불확실한 세포막과 Dense body의 증가를 볼 수 있다.

ETA: Electron thin area.

第3圖 正常的인 세포구조의 Vacuole(V), Mitochondria(M), Endoplasmic reticulum(Er), Granular-like dense body(Gr)을 볼 수 있다.

第4圖 세포벽의 비후와 아울러 많은 Granule의 증가를 볼 수 있다.

第5圖 정상적인 세포구조를 정확히 볼 수 있다.

第6圖 세포질의 변화와 아울러 많은 수의 Graular-like dense body(G₂)을 볼 수 있다.

第7圖 E. floccosus의 정상미세구조를 볼 수 있다.

第8圖 세포벽의 편저한 비후 및 많은 ETA가 관찰된다.