原	著
---	---

Candida albicans の厚膜胞子形成に 及ぼす前培養の影響

磯 田 輝 生 宮 路 圭 介
玉 村 富 正 古 良 夫

日本大学歯学部真菌研究室

Candida albicans の形態学的性状として重要な厚膜胞子形成は分離当初には認められても、継代保存中にこの性状の減退または消失が見られることは周知のとおりである。著者らはこのような保存株を適当な条件下で前培養することによって厚膜胞子形成の回復を試みたので、報告する。

材料および方法

1. 使用培地

1) 前培養培地

(1) Y系培地：0.3%酵母エキス・サブローブドウ糖寒天の処方のうち、ブドウ糖は、それぞれ2, 1, 0.5, 0%にし、寒天末は0.3%とした軟培地。

(2) S系培地：サブローブドウ糖寒天の処方のうち、糖と寒天末とを上記と同様にした培地。

(3) P系培地：20%ポテトグルコース寒天の処方のうち、糖と寒天末とを上記と同様にした培地。

2) 厚膜胞子形成用培地

(1) コーンミール寒天, Difco (以下, CMAと略す)

(2) 0.3%ポリソルベート80・コーンミール寒天 (以下, P・CMAと略す)

(3) 0.3%ポリソルベート80・ライス寒天 (以下, P・RAと略す) : 白米25gと水1,000mlとを水浴で100°C, 30分処理後の濾液に, ポリソルベート80および寒天を添加。

以上いずれの培地もpH修正は行なわない。

2. 供試菌株

Teruo ISODA, Keisuke MIYAJI, Tomi TAMAMURA and Yosio SCHÖBL: Effect of subculture on the chlamydospore formation of *Candida albicans*, from the Laboratory of Medical Mycology, School of Dentistry, Nihon University.

当研究室において0.3%酵母エキス・サブローブドウ糖寒天 (以下, Y S G Aと略す) の斜面で継代保存してきた*Candida albicans* のヒト病巣由来株から, 次のようにして8菌株を選んだ。すなわち, 同斜面で37°C, 48時間培養後, 上記3種の厚膜胞子 (以下, 胞子と略す) 形成用培地によるのせガラス培養法で, 胞子形成が3種の培地のいずれにもみられたものをA系株, P・CMAとP・RAとに見られたものをB系株, P・RAにのみ見られたものをC系株, 3種の培地のいずれにも見られなかったものをD系株として, 各系につき2株を選んだ。

3. 方法

1) 供試菌株を2組の前培養培地に穿刺し, 1組は37°Cで, 他の1組は25°Cで48時間培養し, 同条件でそれぞれを5代継代した。

2) 5代目の培養終了後, 3種の胞子形成用培地によるのせガラス培養を2組行なつた。ただし, 培地片は約10×10×3mmとし, その対角線上に極微量の菌を画線移植し, ふたガラスでおおい, 25°C湿室で5日間培養し, その間, 鏡検(10×10)を行なつた。

3) 供試菌株をY S G A斜面で37°C, 48時間培養したものについて同様に胞子形成を検して対照とした。

なお, 以上の実験を, 日をかけて3回行なつた。

成 績

成績として胞子形成の程度を表わすのに次のような判定基準を設けた。すなわち胞子が1視野に多数を卅および少数を卅, 総視野に少数を十および認められないをーとした。なお, 2組の標本のうち成績に差がある場合はよい方を採用した。また3回行なつた実験成績が一致しない場合にはよい方をとつて括弧で示した。

さて, 以上の判定基準で成績を要約すれば次のようになった。

表1 諸前培養を行なった *C. albicans* の厚膜胞子形成成績

厚膜胞子形成用培地	前ブドウ糖培養濃度(%)	A ₁ , A ₂ 株			対 照 (YSGA 斜面)
		37°, 25°C			37°C
		Y 系	S 系	P 系	A ₁ , A ₂ 株
CMA	2.0	+++	+++	+++	++
	1.0	+++	+++	+++	
	0.5	+++	+++	+++	
	0	+++	+++	+++	
P・CMA	2.0	+++	+++	+++	+++
	1.0	+++	+++	+++	
	0.5	+++	+++	+++	
	0	+++	+++	+++	
P・RA	2.0	+++	+++	+++	+++
	1.0	+++	+++	+++	
	0.5	+++	+++	+++	
	0	+++	+++	+++	

鏡検 (10×10)

厚膜胞子 1 視野に多数……+++

少数……++

総視野に少数……+

なし……—

培地略記は本文“使用培地”の項参照

1. A₁, A₂ 株 (表1)

2 株とも、いずれの前培養からいずれの胞子形成用培地によつても胞子形成は最良であつたが、対照ではCMAにおいて劣つていた。

2. B₁, B₂ 株 (表2)

1) B₁ 株の胞子形成: Y系およびP系前培養ではP・CMAおよびP・RAにおいて最良であつた。S系前培養ではP・CMAにおいて、低濃度の糖を含む同系前培養ではP・RAにおいて最良であつた。Y系およびP系前培養ではCMAにおいても胞子が少数見られた。

2) B₂ 株の胞子形成: 37°CにおけるY系前培養ではP・CMAおよびP・RAにおいて、また同温におけるP系前培養ではP・RAにおいて最良であつた。なお、P系前培養ではCMAにおいても胞子が少数見られた。

対照では、両株とも胞子はCMAでは見られず、P・CMAおよびP・RAにおいて少数見られた。

3. C₁, C₂ 株 (表2)

1) C₁ 株の胞子形成: 37°CにおけるY系前培養ではP・CMAおよびP・RAにおいて最良であつた。な

お、S系およびP系前培養ではP・CMAにおいて比較的良好であり、Y系および25°CにおけるP系前培養ではCMAにおいて胞子が少数見られた。

2) C₂ 株の胞子形成: Y系および25°CにおけるP系前培養ではP・CMAおよびP・RAにおいて最良であつた。次いでS系前培養の場合がよく、25°CにおけるP系前培養ではCMAにおいて胞子が少数見られた。

対照では両株とも胞子はCMAおよびP・CMAでは見られず、P・RAにおいて少数見られた。

4. D₁, D₂ 株

2 株とも、いずれの前培養からいずれの胞子形成培地によつても胞子形成は対照と同様に見られなかつた。

考 察

1. 供試菌株について

当研究室では、*C. albicans* の菌株保存法として斜面培地に隔月移植継代し、室温で保存する方法をとつてきた。また、分離または分与当初に、一般性状として集落および液状培地における発育、糖 (glucose, maltose, saccharose, lactose) に対する発酵および同化、胞子形成について検査を行なつてきた。

さて、*C. albicans* の15保存株について、胞子形成以外の一般性状には分離または分与当初と現在との間で差違は認められなかつた。胞子形成については、分離または分与当初はいずれもA系であつたものが、現在ではA系のものは8株、B系のものは3株、C系およびD系のものはそれぞれ2株であつた。ところで、Rimington¹⁾は *C. albicans* の胞子形成について41新鮮株ではすべて見られ、61保存株では7株に見られなかつたと報告しているが、著者らの場合とほぼ一致している。

供試菌株としては、上記A系およびB系の株からはそれぞれ保存年数の最長のものと最短のものを選んで各系とも2株とした。8供試菌株の保存年数は B₂, A₂, D₁ 株はそれぞれ9, 5, 4年で残り5株は15年前後である。

2. 前培養法について

前培養培地としては、継代保存に用いてきたYSGAおよび一般に用いられているSGAと、仮性菌糸や胞子の形成を促進する傾向があるポテト寒天との処方参考とした。また、周知のように胞子形成にはブドウ糖などの含有培地は不適であり、室温培養で酸素の不十分な条件が好適であるとされているので、これが前培養においても影響するかを検討するために、糖含量や培養温度をかえ、また穿刺培養を行なつた。なお、前培養で安定し

表2 (前表のつづき)

厚膜孢子形成用培地			CMA				P・CMA				P・RA			
前培養培地ブドウ糖濃度 (%)			2.0	1.0	0.5	0	2.0	1.0	0.5	0	2.0	1.0	0.5	0
B ₁ 株	37°C	Y 系	+	+	+	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		S 系	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		P 系	卅	卅	卅	(卅)	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	25°C	Y 系	—	+	+	(+)	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		S 系	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		P 系	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
B ₂ 株	37°C	Y 系	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		S 系	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
		P 系	+	+	+	—	+	+	+	(+)	卅	卅	卅	卅
	25°C	Y 系	—	—	—	—	卅	卅	+	+	卅	卅	+	(+)
		S 系	—	—	—	—	+	+	+	(+)	+	+	+	(+)
		P 系	+	+	(+)	—	+	+	+	—	+	+	+	—
C ₁ 株	37°C	Y 系	+	+	+	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		S 系	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		P 系	—	—	—	—	+	+	+	(+)	卅	卅	卅	(+)
	25°C	Y 系	—	(+)	(+)	(+)	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		S 系	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		P 系	—	—	—	(+)	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	(+)
C ₂ 株	37°C	Y 系	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		S 系	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	(+)
		P 系	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
	25°C	Y 系	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
		S 系	—	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+
		P 系	—	—	(+)	(+)	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
対 照 (YSGA 斜面)	37°C	B ₁ 株	—				+				+			
		B ₂ 株	—											
		C ₁ 株	—				—				+			
		C ₂ 株	—											

た増殖を得るため5代継代することにした。

3. 成績について

1) 前培養における温度および培地成分

(1) Y系およびS系前培養の場合

孢子形成成績から、Y系またはS系前培養における37°Cと25°Cとの場合の比較では、37°Cの場合が全体としてよかつた。次に37°Cにおける両系前培養間の比較ではY系前培養が全体としてよかつた。これらのことは、*C. albicans* の増殖にとって37°Cが好適であり、また酵母エキスが増殖に促進的であることに関連があると考えられる。すなわち、増殖旺盛な状態にある *C. albicans* を孢子形成に好適な環境——一般に増殖には不適当であるが—

に移すことが孢子形成を促進すると一般にいわれていることに相当しよう。Nickerson²⁾ はこのことを栄養の変換による代謝の変化が孢子形成の要因であろうと述べている。

次に、37°CにおけるY系前培養について糖含量を検討すると、ブドウ糖が2%の場合には成績が一部において劣っていたが、1.0～0%の間ではほとんど影響が見られなかつた。したがって、ブドウ糖を増殖のために添加するのであれば、1.0～0.5%が適当であろう。Nickerson³⁾ が粘含量の少ない培地が *C.a.* の仮性菌糸や孢子の形成に好ましいと述べたことは、前培養においてもいえる。

(2) P系前培養の場合

P系前培養の場合にはどの観点から検討してみても全体として成績にまとまりがなく、予想に反した結果になった。また予備実験で胞子形成用培地として最もよかつたP・RAを軟培地として前培養に用いてみたが、P系前培養の場合よりも成績は劣り、またポリソルベート80をY系培地に添加した場合もY系前培養よりもよい成績は得られなかつた。

2) 前培養における酸素要求

この点に関しては糖2%のY系前培地と対照とを比較すれば、培地成分は同一であるが、前者の場合に胞子形成が明らかによかつたことから、穿刺培養によつて酸素の供給が不十分であることに関係があらう。

4. 胞子形成の大別と変化

今まで述べたことから、Y系培地(糖1%以下)に穿刺し、37°Cで数回継代した後、P・RAまたはP・CMAを用いて胞子形成を検する方法が最もよいことになる。しかし、胞子形成の程度によつて大別するにはCMAをも併せ用いる必要がある。すなわち胞子形成がCMAにおいても顕著に見られるものは胞子形成能完全株、P・RAまたはP・CMAにおいてまったく見られないものは胞子形成能消失株であり、CMAにおいてわずかにまたはまったく見られないが、P・RAまたはP・CMAにおいて見られるものは胞子形成能不全株と大別できよう。

胞子形成能の完全なものから不完全なものまたは消失したものに変化することは明らかであるが、不完全なものから消失するものへと変化するか否かは本実験では明らかではない。したがつて数年後再検討して明らかにしたい。ただし、A₁株は15年間の保存によつても胞子形成能を完全に保持し、D₁株は4年の保存で消失していることから菌株によつて変化の速さの違いがあることは明らかであらう。

最後に、保存用培地の種類が異なつても上記のY系前培養法が適当であるかという疑問が生じる。しかし、保存用培地の種類は胞子形成能の変化に関係するとして

も、ある時点における胞子形成能の程度を示すことはできるであらう。

結 論

Candida albicans の厚膜胞子形成が継代保存によつて低下または消失するという周知の事実から0.3%酵母エキス・サブローブドウ糖寒天斜面が多年にわたつて継代保存した株について、胞子形成試験に先立つて、酵母エキス・サブローブドウ糖寒天、サブローブドウ糖寒天、ポテトグルコース寒天を半流動培地としたものに穿刺培養する方法で5代継代前培養を行なつてからコーンミール寒天、ポリソルベート80・コーンミール寒天、ポリソルベート80・ライス寒天を用いたのセガラス法で厚膜胞子形成を検した。

その結果、次のような結論を得た。

1. 前培養としては糖含量1.0~0%の酵母エキス・サブローブドウ糖半流動培地を用いて37°Cで前培養後、ポリソルベート80・コーンミール寒天および同ライス寒天を用いた厚膜胞子形成成績が全体として最もよかつた。

2. 前項の前培養について上記の2種の厚膜胞子形成用培地のいずれかとコーンミール寒天とで検した厚膜胞子形成成績から、*C. albicans* の厚膜胞子形成能は完全、不完全、消失に3大別された。すなわち、厚膜胞子形成がいずれにも顕著なもの、ポリソルベート80・コーンミール寒天またはポリソルベート80・ライス寒天で顕著なもの、いずれにも見られないものに大別された。

文 献

- 1) Rimington, W.E.: An investigation into factors affecting Chlamydospore production by *Candida albicans*. J. Med. Lab. Technol. 26(4): 382~386, 1969.
- 2) Nicherson, W.J.: Experimental control of morphogenesis in micro-organisms Ann. N.Y. Acad. Sci., 60: 50~57, 1954.
- 3) Nicherson, W.J. & Mankowski, Z.: Role of nutrition in the maintenance of the yeast-shape in *Candida* Am. J. Botany 40: 584~592, 1953. J. Infectious Diseases 92: 20~25, 1953.