Coccidioides immitis のマウス組織内における parasitic cycle

宮 治 誠 西 村 和 子

千葉大学生物活性研究所病原真菌研究部

寺 尾 清

同研究所毒性病理研究部

コクシジオイデス症(coccidioidomycosis)の原因菌である *Coccidioides immitis* (コクシジオイデス・イミチス) は自然界や普通の培地上では菌糸形を, 生体内や特殊な培養液中では内生孢子(endospore)で充された球状体(spherule 或は sporangium)を形成する¹⁻³⁾。本菌の二形性(dimorphism)に関して現在までに光学顕微鏡や透過型電子顕微鏡(TEM)を用いた研究が多数報告され⁴⁻¹⁹⁾, 中でも Huppert 等^{15-17,19)}はこの変換過程の詳細な研究を報告している。しかしこれらの手段による観察では本菌の分節型分生子(arthroconidium)から球状体への変換過程を立体的に理解する事は少々困難であった。Huppert 等^{17,19)}は上記手段の他に走査型電子顕微鏡(SEM)を用い立体的な解析も試みているが, 十分とはいえない。

今回本菌の寄生環(parasitic cycle)をSEMを用いて観察したところ, 光顕やTEMでは得難い情報が得られたので報告する。

実験材料と方法

使用菌株: *Coccidioides immitis* IFM 4935 株が実験に使用された。本菌は2年前(1982年)名古屋大学から同定の為当研究部に送られてきた菌株である。

実験動物: 先天的に胸腺の欠除しているヌードマウス(nu/nu mouse)とそのヘテロ接合同腹仔(nu/+ mouse) (BALB/c background, 共に雄性で18~21gの体重を有する)がそれぞれ7匹ずつ使用された。

分節型分生子懸濁液の調製: *C. immitis* IFM 4935 株を1% glucose 加 brain heart infusion 斜面寒天に接種し37℃で14日間培養後, 1/15 M pH 7.4 の磷酸緩衝生食水を同試験管内に斜面上の集落が完全に沈むまで静かに加えた。集落の表面をピペットの先で慎重にこすると分節型分生子と短菌糸が懸濁されてくる。この懸濁液を5枚のガーゼで濾過し短菌糸を除去, 3回同緩衝液で遠心洗浄後 Thoma の血球計算盤を用いて0.1 ml 中 3.3×10^5 個の分節型分生子を含む菌液を調製した。

感染実験: 各マウスには 3.3×10^5 個の分節型分生子が尾静脈から注入され, 両群より各2匹のマウスが

菌接種3日後に屠殺された。菌接種5日後には残り5匹のnu/nuマウスと1匹のmu/+マウスが, 6日後には残り4匹のmu/+マウスが死亡した。これらの犠牲死および病死したマウスは直ちに解剖され, 各臓器は2% glutaraldehyde 溶液中で20時間以上固定された。又各臓器の1部は10% formalin 溶液中でも固定された。固定された臓器は流水中で5時間水洗後液体窒素で凍結され, ミクロトームで切断された。切断された臓器は2% glutaraldehyde で再固定され, 続いて1% osmium tetroxide 中で17時間固定された。以後所定の手順で脱水し, 金パラジウムでコーティング後, 走査型電子顕微鏡(日立, HFS-2)を用いて観察した。

結果と考案

解離細胞(disjunct cell)と交互に配列し, 鎖状を成している多数の分節型分生子(平均 $3 \times 4 \mu\text{m}$)が37℃で14日間培養した集落中に産生されていた(Fig. 1)。これら分節型分生子がnu/nuおよびnu/+マウスに静注されると, 両群マウス共, 肝が最も強く続いて脾, 肺, 腎の順で侵されていた。静注された分節型分生子は膨化し丸くなり, 3日後には直径約7~33 μm の球状の細胞(若い球状体)が観察された(Fig. 2~6)。これらの球状体に対して多形核白血球より成る細胞反応が起っている場合と(Fig. 3), 全く細胞反応が起つ

別刷請求先: 宮治 誠

〒280 千葉市友鼻1-8-1

千葉大学生物活性研究所病原真菌研究部

てこない場合 (Fig. 2) とがあつた。菌接種後3日目には細胞質の分割 (cleavage 或は segmentation) が始まっている球状体も観察された (Fig. 4)。感染後5日目になると観察される球状体の多くは成熟し、その半分以上は内生孢子を組織内に放出していた (Fig. 17)。

初期の球状体の内部は2層で構成されていた。内層は凝乳状物質によつて充され (Fig. 4)、外層は細胞質で本法による観察では特別な構造物は見られなかつた。Breslau 等¹¹⁾や Miyaji と Nishimura¹⁸⁾の報告で

は、この凝乳状物質は PAS 染色陽性で多糖体である。しかしこの凝乳状物質はほとんどの初期の (若い) 球状体では消失しており (生理的か或は固定水洗の段階で消失するのか不明)、その為ほとんどの球状体の内層は空の状態であつた (Fig. 2, 5, 6)。これらの球状体の内面は月面のクレーターの様に見えた (Fig. 5)。次に細胞膜 (細胞壁に密着している) は数カ所より細胞壁の内層と共に細胞質内に陥入し始め、細胞質を大きく分割していった (Fig. 7, 8)。この分割壁 (cleavage

Explanation of Figures

- Fig. 1. Arthroconidia (arrows) and disjunct cells (arrow heads) on a brain heart infusion dextrose (2%) agar slant incubated at 37 C for 14 days. $\times 2,000$.
- Fig. 2. Young spherule (arrow) in the liver of a nu/nu mouse 3 days after inoculation. There were no cellular responses against it. $\times 2,000$.
- Fig. 3. Microabscess with a young spherule (arrows) in the liver of a nu/nu mouse 3 days after inoculation. $\times 2,000$.
- Fig. 4. Young spherule in the liver of a nu/nu mouse 3 days after inoculation. A dense curd-like substance is observed in an inner zone. $\times 1,000$.
- Fig. 5. Section of a young spherule in the liver of a nu/nu mouse 3 days after inoculation. The central zone is vacuous. The concave inner surface is pockmarked with irregularly shaped concave craters. $\times 2,000$.
- Fig. 6. Young spherule in the liver of a nu/+ mouse 3 days after inoculation. The arrow indicates a cell wall. $\times 2,000$.
- Fig. 7, 8. Young spherules in the liver of a nu/+ mouse 5 days after inoculation. The cytoplasm is divided into large compartments by relatively thick cleavage walls. The arrows indicate the cell wall. $\times 5,000$.
- Fig. 9, 10. Spherules in the liver of a nu/nu mouse 5 days after inoculation. The cytoplasm is divided into smaller segments by cleavage walls. Fig. 9: $\times 10,000$. Fig. 10: $\times 10,000$.
- Fig. 11. Spherule packed with sacs in the liver of a nu/nu mouse 5 days after inoculation. $\times 2,000$.
- Fig. 12. Section of sacs (arrows). Two endospores (arrow heads) emerge from the sac on the bottom. $\times 5,000$.
- Fig. 13. Endospores in sacs. $\times 5,000$.
- Fig. 14. Endospores (TEM). $\times 9,000$.
- Fig. 15. Inner face of the cell wall (arrow) of a mature spherule. $\times 2,000$.
- Fig. 16. Mature and immature spherules. $\times 1,000$.
- Fig. 17. Released endospores. $\times 1,000$.
- Fig. 18. Lesion consisting of macrophages in the liver of a nu/nu mouse 5 days after inoculation. $\times 2,000$.
- Fig. 19. Lesion in the liver of a nu/nu mouse 5 days after inoculation. $\times 5,000$.

wall)は比較的厚い。TEMによるO'HernとHenry⁹⁾およびBreslau等¹¹⁾の観察によると、この分割壁は細胞膜より形成されているといわれ、一方Huppert等¹⁷⁾によると細胞膜が細胞壁の最内層の2層と共に折れ込む様に細胞質内に陥入し、その結果4層からなる分割壁を形成するという。この壁は分枝しながら球状体の中心部に向って伸び続け、細胞質をより小さな区画へと分けていった(Fig. 9, 10)。この分割壁は分枝する毎にその厚さは薄くなっていた。以後ある程度小さく分割された細胞質は壁の陥入の初期から中期にかけて形成された比較的厚い分割壁の所で分離し、比較的大きなかたまりに分れた(Fig. 11)。この囊状のかたまりの表面には縦横の浅い溝が観察され、これは分割壁によって分けられている内部の細胞質の小塊間の境界を示していた(Fig. 11, 12)。この囊状のかたまりを割断すると、薄い分割壁によって仕切られた細胞質の小塊が詰っていた(Fig. 12)。続いてこれら囊状物内の分割壁は分枝し続け、細胞質をさらに細かく分割していった。一般的にはこの過程により最終的に個々の内生孢子になつていくといわれている。この時期になると囊

状物の表面を形成している壁および内部の分割壁は溶け始め、内生孢子が球状体内に現われてきた(Fig. 13)。Fig. 14はこの時期の内生孢子のTEMの写真である。各内生孢子は1個の核を持つている。SunとHuppert¹⁵⁾によると成熟した球状体が内生孢子を放出する直前に人工的に割られると、透明な膜で包まれた内生孢子の集団が多数観察されるという。また、球状体の壁内面には囊状物の剥離した跡と思われるscarが認められた(Fig. 15)。更に微細な平行した畝状のものが認められたが(矢印)、由来は不明であつた。最後に球状体の壁が破れ、内生孢子が組織内に放出された(Fig. 17)。

病理組織学的には5日および6日後に死亡した両群マウスの間に有意義な差を認めなかつた。半数以上の病巣で球状体や放出された内生孢子に対して細胞反応は認められなかつた(Fig. 17)。一方細胞反応の起つた病巣においてはその浸潤細胞は両群共に主に単核性細胞であつた(Fig. 18)。又肝において興味ある所見が少数認められた。Fig. 19に示される様に肝細胞は融解し、肝細胞の残渣および細網繊維のみ残存していた。

References

- 1) Emmons, C.W., Binford, C.H., Utz, J.P. and Kwon-Chung, K.J.: Coccidioidomycosis. In Medical Mycology (3rd edition), p. 230—253, Lea & Febiger, Philadelphia, 1977.
- 2) Drutz, D.J. and Catanzaro, A.: Coccidioidomycosis. Part I. Am. Rev. Respir. Dis., 117 : 559—585, 1978.
- 3) Chandler, F.W., Kaplan, W. and Ajello, L.: Coccidioidomycosis. In A Colour Atlas and Textbook of the Histopathology of Mycotic Diseases, p. 50—53, Wolfe Medical Publication Ltd., London, 1980.
- 4) Moore, M.: The chorioallantoic membrane of the developing chick as a medium for the cultivation and histopathologic study of pathogenic fungi. Am. J. Pathol., 17 : 103—120, 1941.
- 5) Baker, E.E., Mrak, E.M. and Smith, C.E.: The morphology, taxonomy, and distribution of *Coccidioides immitis* Rixford and Gilchrist 1896. Farlowia, 1 : 199—244, 1943.
- 6) Brueck, J.W. and Buddingh, G.J.: Propagation of pathogenic fungi in the yolk sac of embryonated eggs. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 76 : 332—335, 1951.
- 7) Tarbet, J.E., Wright, E.T. and Newcomer, V. D.: Experimental coccidioidal granuloma. Developmental stages of sporangia in mice. Am. J. Pathol., 28 : 901—917, 1952.
- 8) Converse, J.L.: Growth of spherules of *Coccidioides immitis* in a chemically defined liquid medium. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 90 : 709—711, 1955.
- 9) O'Hern, E.M. and Henry, B.S.: A cytological study of *Coccidioides immitis* by electron microscopy. J. Bacteriol., 72 : 632—645, 1956.
- 10) Lones, G.W. and Peacock, C.L.: Role of carbon dioxide in the dimorphism of *Coccidioides immitis*. J. Bacteriol., 79 : 308—309, 1960.
- 11) Breslau, A.M., Hensley, T.J. and Erickson, J.O.: Electron microscopy of cultured spherules of *Coccidioides immitis*. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9 : 627—637, 1961.
- 12) Bartels, P.A. Wagoner, N. and Larsh, H.W.: Conversion of *Coccidioides immitis* in tissue culture. Mycopathol. Mycol. Applic., 35 : 37—41, 1968.
- 13) Cutler, J.E. and Erke, K.H.: Ultrastructural characteristics of *Coccidioides immitis*, a morphological variant of *Cryptococcus neoformans* and *Podosypha ravenelii*. J. Bacteriol., 105 : 438—444, 1971.
- 14) Donneoly, W.H. and Yunis, E.J.: The ultrastructure of *Coccidioides immitis*. Study of a human infection. Arch. pathol., 98 : 227—232, 1974.
- 15) Sun, S.H. and Huppert, M.: A cytological study of morphogenesis in *Coccidioides immitis*. Sabouraudia, 14 : 185—198, 1976.
- 16) Sun, S.H., Sekhon, S.S. and Huppert, M.: Electron microscopic studies of saprobic and parasitic forms of *Coccidioides immitis*. Sabouraudia, 17 : 265—273, 1979.
- 17) Huppert, M., Sun, S.H. and Harrison, J.L.: Morphogenesis throughout saprobic and parasitic cycles of *Coccidioides immitis*. Mycopathologia, 78 : 107—122, 1982.
- 18) Miyaji, M. and Nishimura, K.: Murine coccidioidomycosis—Reproductive cycle of spherule and tissue responses. Jpn. J. Med. Mycol., 23 : 287—296, 1982.
- 19) Drutz, D.J. and Huppert, M.: Coccidioidomycosis: Factors affecting the host-parasite interaction. J. Infect. Dis., 147 : 372—390, 1983.

The Parasitic Cycle of *Coccidioides immitis* in Murine Coccidioidomycosis

Makoto Miyaji and Kazuko Nishimura

Department of Pathogenic Fungi, Research Institute for Chemobiodynamics, Chiba University,
1-8-1 Inohana, Chiba 280, Japan

Kiyoshi Terao

Department of Toxicology and Experimental Pathology, Research Institute for Chemobiodynamics,
Chiba University

The parasitic cycle of *Coccidioides immitis* in murine coccidioidomycosis was investigated using a scanning electron microscope. An arthroconidium suspension containing 3.3×10^5 arthroconidia in 0.1 ml phosphate buffered saline was prepared from a culture of *C. immitis* IFM 4935 incubated at 37°C for 14 days. As experimental animals, 7 congenitally athymic nude mice and 7 of their heterozygous littermates were used. Each mouse was inoculated intravenously with 0.1 ml of the arthroconidium suspension and dessected 3, 5, and 6 days after inoculation.

The liver was severely affected by the fungus, followed by the spleen and lungs in that order. The inoculated arthroconidia swelled and became spherical. Many young spherules with or without cellular responses were observed in the liver of both groups of mice 3 days after inoculation. On that day a few spherules reached the midpoint stae of their parasitic cycle. All the developmental stages, from spherule initials to released endospores, were found in each specimen prepared from the tissue of both groups of mice on the 5th and 6th day after inoculation. These developmental stages were clearly demonstrated by scanning electron microscopy.