原 著

組織培養におけるクリプトコックス・ネオフォルマンスの
の発育とその促進要因について

日 高 治

東京大学伝染病研究所真菌研究室（指導 北本治教授）

1951年馬流産ウイルスを組織培養していた Randall は培養液中に偶々 *Histoplasma* の繁殖しているのを見出した。これにヒントを得た彼は積極的に *Histoplasma capsulatum* の組織培養を試みウマの胎盤組織・ニワトリの繊維芽細胞・Earl 系L細胞などを用いてその組織形を得ることに成功した¹⁾。

真菌の組織培養はウイルスにおけるが如く絶対不可欠のものではないが、病原性真菌特に二相性の発育を示すものがこれにより組織形を得ることは例えば菌の同定というような問題一つをとつてみてもかなり有意義であろう。Randall の最初の試みにひきつづいて幾多の研究がなされたが当研究所の上塚も HeLa 細胞を用いて *Candida albicans* の培養を行い、仮性菌糸が急速に伸長して細胞を貫通する様子を報告して居り、またこれにより抗真菌剤の抗菌力と細胞毒性を同時に判定し得ると述べている²⁾。

一方真菌症の感染及至発病の機構については未だ不明な点が多いが、いづれにしても生体と真菌との相関関係について追究されねばならないであろう³⁾。病原性真菌を用いた多くの動物感染実験がなされているが、この場合、生体全体と真菌との関係は極めて複雑であり、その解析もまた困難が多いであろう。そこで生体の最小単位たる細胞と真菌との関係について追究することは意義があると思う。勿論細胞と真菌との関係をそのまま直ちに生体と真菌との関係におし進めて考えるのは危険であるからその点については充分考慮されなければならない。

さて所謂内臓真菌症の増加が叫ばれて既に久しいが、

クリプトコックス症もまた、他のカンジダ症・アスペルギルス症などと共に近年増加しつつある疾患である⁴⁾⁵⁾。その特異な神経親和性と治療上の困難さにおいて極めて多くの臨床的興味をおぼえた *Cryptococcus neoformans* について私は上に述べたような見地から組織培養法を用いて実験を行つた。その結果について報告する。

1) *Cryptococcus neoformans* の発育に及ぼす副腎皮質ホルモンの影響

副腎皮質ホルモン（以下「副ホ」と略稱する。）の使用により真菌症の発症が促進されることは既にいくつかの報告があり⁶⁾⁷⁾¹⁰⁾、その原因としては抗体産生の低下⁷⁾、喰菌作用の低下、生体組織における炎症抑制作用⁸⁾などが挙げられている。これらは生体の網内系を通して起ると考えられるが、培養細胞に真菌を接種した場合、同時に「副ホ」を添加するとどのような影響がみられようか。「副ホ」は細胞自体に直接（網内系の介在なしに）はたらきかけるであろうか。この点について明かにすべく先づ次の実験を行つた。

（実験方法）

HeLa 細胞を Y L E 培地（Yeast extract-Lactoalbumin-Earle medium）にて培養し、細胞の充分発育した 3 及至 4 日目に *Cryptococcus neoformans* 吉田株（1958 年伝研附属病院において分離せる菌株）³⁴⁾（サブロー培地にて 48 時間培養せる菌を用いた。） 10^5 /cc を接種して菌の発育を観察し、一定時間後に、生菌数計算を行つた。またタンザク培養を同時に行い菌の発育とそれに伴う細胞の変性の状態などを顕微鏡的に観察した。尚 Y L E 培地の組成は次の如くである。

Osamu HIDAKA; GROWTH OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS IN TISSUE CULTURE. From the Department of Medical Mycology, Institute for Infections Disease of Tokyo University, Tokyo—Japan J. Med. Mycol., 5, 1964.

5 % Lactoalbumin 10
 1 % Yeast extract 10
 Earle 氏塩類溶液 (×10Conc.) 10
 牛 (又は馬) 血清10
 Aq, dest 60

又Contaminationを防ぐため Dihydro-SM. 1 gを5 ccの蒸留水に溶かしてその1 ccをY L E液1000ccに添加して使用した。培養温度は、すべて37°Cで行った⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽²⁰⁾。

(実験1)

菌の接種と同時に0～800 γ /cc に至る種々の濃度に「副ホ」を培養液に加え菌の発育を比較観察した。「副ホ」は Hydrocortisone hemisuccinate を用いたが濃度は勿論コーチゾンに換算したものである。3日後に培養液中及び細胞内の菌数計算を行った。細胞内の菌数とは培養液を完全にとり去り次に緩衝液で3回よく洗滌し、5000倍 EDTA液で細胞を管壁より剝離したものの中における菌数である。これについては後述する。菌数計算の方法は菌の発育せる培養液または細胞を生理食塩水で一定に稀釈しその1 ccをサブロー培地に移し、平板培養法によりコロニー数を算えたのである。かくして HeLa 細胞に接種せる *Cryptococcus neoformans* (以下単に *C. neof.* と記す。) の発育と添加せるコーチゾン濃度との関係は図1及び図2に示す通りである。培養液中の菌数は200 γ /cc の濃度において増加しており、一方細胞内菌数は200 γ /cc の濃度において、ピークを示し、それより上の濃度では次第に少くなる。これはコーチゾン

図1 HeLa 細胞組織培養液中の *C. neoformans* 生菌数

図2 HeLa 細胞内の *C. neoformans* 生菌数 (菌接種後3日目)

ン高濃度においては細胞の変性脱落が比較的早期におこるため、細胞内の菌が培養液中に移行するのであろうと思われる。この実験結果より「副ホ」は組織培養による *C. neof.* の発育を促進するように見えるが、これはコーチゾンが細胞にはたらくためであろうか、菌自体にもはたらくためかそれは次の実験が示す。

(実験2)

サブロー液体培地にコーチゾン0～800 γ /cc と Trichomycin 又は Amphotericin B. 0～4 γ /cc を加えこれに *C. neof.* 10⁵/ccを接種し3～7日後の発育状態を比較観察したのが表1及び表2である。この場合菌数計算は行わなかったがコーチゾン濃度の差による菌の発育の差は見られなかった。即ちサブロー培地においてはコーチゾンは、800 γ /cc の濃度では *C. neof.* の発育に影響を与えないといえる。

(実験3)

HeLa 細胞に *C. neof.* 10⁵/cc接種と同時にコーチゾン200 γ /cc 及び0～1.0 γ /cc の Trichomycin を加え菌の発育を観察した。菌数計算は実験1と同様である。コーチゾン非添加群では Trichomycin 0.25 γ /cc で菌の発育は僅かに阻止され、0.5 γ /cc, 1.0 γ /cc では著明に阻止されるがコーチゾン添加群では Trichomycin の抗菌効果は殆ど認められない(図3及び図4)。

(実験4)

実験3と全く同じで、唯 Trichomycin の代りに Amphotericin B を用いた(図5及び図6)。本実験に

表1 Cortisone, Amphotericin B 添加サブロー液体培地に於ける *C. neoformans* の発育度

Cortisone γ /cc	培 日	養 数	Amphotericin B γ /cc							
			0	0.063	0.125	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0
0	3日		卅	卅	卅	+	—	—	—	—
	5日		卅	卅	卅	卅	+	—	—	—
	7日		卅	卅	卅	卅	+	—	—	—
12.5	3日		卅	卅	卅	+	—	—	—	—
	5日		卅	卅	卅	卅	+	—	—	—
	7日		卅	卅	卅	卅	+	—	—	—
25	3日		卅	卅	卅	+	—	—	—	—
	5日		卅	卅	卅	卅	+	—	—	—
	7日		卅	卅	卅	卅	+	—	—	—
50	3日		卅	卅	卅	+	—	—	—	—
	5日		卅	卅	卅	卅	+	—	—	—
	7日		卅	卅	卅	卅	+	—	—	—
100	3日		卅	卅	卅	卅	+	—	—	—
	5日		卅	卅	卅	卅	+	—	—	—
	7日		卅	卅	卅	卅	+	—	—	—
200	3日		卅	卅	卅	+	—	—	—	—
	5日		卅	卅	卅	卅	+	—	—	—
	7日		卅	卅	卅	卅	+	—	—	—
400	3日		卅	卅	卅	+	+	—	—	—
	5日		卅	卅	卅	卅	+	—	—	—
	7日		卅	卅	卅	卅	卅	—	—	—
800	3日		卅	卅	卅	+	+	—	—	—
	5日		卅	卅	卅	卅	+	—	—	—
	7日		卅	卅	卅	卅	卅	—	—	—

卅：菌の発育旺盛で管底に沈澱を認む 卅：卅と十の中間 十：菌の発育軽度で肉眼的混濁を微かに認める。

表2 Cortisone, Trichomycin 添加サブロー液体培地に於ける *C. neoformans* の発育度

Cortisone γ /cc	培 日	養 数	Trichomycin γ /cc							
			0	0.063	0.125	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0
0	3		卅	+	+	—	—	—	—	—
	5		卅	卅	卅	+	—	—	—	—
	7		卅	卅	卅	卅	—	—	—	—
12.5	3		卅	+	+	—	—	—	—	—
	5		卅	卅	卅	+	—	—	—	—
	7		卅	卅	卅	卅	—	—	—	—
25	3		卅	+	+	+	—	—	—	—
	5		卅	卅	卅	+	—	—	—	—
	7		卅	卅	卅	卅	—	—	—	—
50	3		卅	卅	+	—	—	—	—	—
	5		卅	卅	卅	+	—	—	—	—
	7		卅	卅	卅	卅	—	—	—	—

100	3	卅	卅	十	—	—	—	—	—
	5	卅	卅	卅	十	—	—	—	—
	7	卅	卅	卅	卅	—	—	—	—
200	3	卅	卅	十	十	—	—	—	—
	5	卅	卅	卅	十	十	—	—	—
	7	卅	卅	卅	卅	十	—	—	—
400	3	卅	卅	卅	十	—	—	—	—
	5	卅	卅	卅	卅	十	—	—	—
	7	卅	卅	卅	卅	十	—	—	—
800	3	卅	卅	卅	十	—	—	—	—
	5	卅	卅	卅	卅	十	—	—	—
	7	卅	卅	卅	卅	卅	十	—	—

図 3 HeLa 細胞培養液中の *C. neoformans* 生菌数 Trichomycin, Cortisone 添加の影響 (菌接種後 3 日目) (斜線は Cortisone 200 γ /cc 添加)

においてコーチゾンはやはり Amphotericin B の菌発育阻止効果を減少するが, Trichomycin に対する程つよくない。即ち Amphotericin B, 1.0 γ /cc の濃度においては, コーチゾン非添加群添加群共に菌の発育は完全に阻止された。然し Amphotericin B 0.5 γ /cc, 0.25 γ /cc の濃度においては明らかに, コーチゾンは Amphotericin B の菌発育阻止効果を弱める。

実験1, 3, 4 によつて, コーチゾンは組織培養における

図 4 HeLa 細胞内の *C. neoformans* 生菌数 Trichomycin, Cortisone 添加の影響 (菌接種後 3 日目) (斜線は Cortisone 200 γ /cc 添加)

C. neof. の発育に促進的に作用し, 抗真菌剤の効果を減少することが分るが, 更にこれらの関係をコーチゾン添加の時期を種々に変えることによつて追究した。

(実験 5)

表 3 に示す如く, HeLa 細胞へのコーチゾンの添加時期を次の 4 通りに変えた。

- A : 菌 (*C. neof.*) 接種24時間前にコーチゾンを加える。
- B : 菌接種と同時にコーチゾンを加える。
- C : 菌接種24時間後にコーチゾンを加える。
- D : 菌接種24時間前にコーチゾンを加えるが菌接種直前に培養液を捨て, コーチゾンを加えてない新しい Y L E 液と交換する。これらに
- E : 対照群 (コーチゾンを全く加えない。) を併せ 5

図5 HeLa 細胞培養液中の *C. neoformans* 生菌数 Amphotericin B, Cortisone 添加の影響 菌接種後3日目 (斜線は Cortisone 200 γ /cc 添加)

図6 HeLa 細胞内 *C. neoformans* 生菌数 Amphotericin B, Cortisone 添加の影響 (3日目) 斜線は Cortisone 200 γ /cc 添加

つの実験群を作り、更にこれらの各群に Trichomycin 0 ~ 1.0 γ /cc を加えて菌の発育を比較観察した。菌数計算は前と同じである。表4は、コーチゾン 200 γ /cc 接種菌数10⁵/cc の場合であり、表5はコーチゾン 300 γ /cc 接種菌数 1.5 $\times$ 10⁵/ccの場合である。この表からコーチゾンの添加時期が早くコーチゾンの作用時間が長いほど菌の発育がよい傾向がみられる。例えばコーチゾン 300 γ /cc, Trichomycin 0.5 γ /cc の群で比較してみると、図7に示すように菌の発育は略 A,B,C,D,E の順になりコーチゾンの細胞に対する作用時間の長短の順と一

表3 実験5における Cortisone 添加時期の差による5つの実験群 斜線は Cortisone の存在を表す。

図7 Cortisone 添加時期の差による *C. neoformans* の発育度 Trichomycin 0.5 γ /cc Cortisone 300 γ /cc

表4 Trichomycin 各種濃度における *C. neoformans* の発育に及ぼす Cortisone 添加時期の差による影響

Trichomycin γ /cc		0	0.25	0.5	1.0
生菌数					
(A)	培養液中	850×10^4	250×10^4	50×10^4	7×10^4
	細胞内	435	380	328	6
(B)	培養液中	560×10^4	284×10^4	31×10^4	0
	細胞内	477	368	131	2
(C)	培養液中	440×10^4	344×10^4	40×10^4	0
	細胞内	400	658	139	0
(D)	培養液中	334×10^4	136×10^4	1×10^4	0
	細胞内	600	404	120	0
(E)	培養液中	365×10^4	140×10^4	0	0
	細胞内	365	20	0	0

Cortisone 200 γ /cc 接種菌数 10^5 /cc 4日目

表5 Trichomycin 各種濃度における *C. neoformans* の発育に及ぼす Cortisone 添加時期の差による影響

Trichomycin γ /cc		0	0.25	0.5	1.0
生菌数					
(A)	培養液中	755×10^5	496×10^5	338×10^5	6×10^5
	細胞内	165×10^2	143×10^2	149×10^2	10×10^2
(B)	培養液中	578×10^5	462×10^5	402×10^5	4×10^5
	細胞内	156×10^2	81×10^2	87×10^2	8×10^2
(C)	培養液中	296×10^5	208×10^5	148×10^5	2×10^5
	細胞内	140×10^2	56×10^2	44×10^2	4×10^2
(D)	培養液中	300×10^5	176×10^5	126×10^5	2×10^5
	細胞内	106×10^2	50×10^2	44×10^2	3×10^2
(E)	培養液中	201×10^5	138×10^5	97×10^5	2×10^5
	細胞内	96×10^2	24×10^2	40×10^2	0

Cortisone 300 γ /cc 接種菌数 1.5×10^5 /cc 4日目

致する。これはコーチゾンの作用が細胞に及ぶためである事を示唆するように思われる。

附. タンザク培養による観察

小型角ビンにタンザク（0.7cm×2.5cm大の薄いガラス片）を入れ、この上に HeLa 細胞を培養して、コーチゾン及び抗真菌剤を添加し *C. neof.* を接種する。一定時間後に培養液を捨て去り、緩衝液でよく洗い適当な固定液で固定し、更に適当な染色を行い、中のタンザクをとり出して鏡検するわけである。

先ずコーチゾンも抗真菌剤も添加しないで菌を接種した場合の菌接種後1及至5日後の標本が写真1から写真5までである。（PAS染色）菌は3日後の標本に最も

多く見られるが4日5日と経つと少くなる。これは菌が発育すると細胞の変性脱落がおこり菌は細胞と共に培養液中に落ちるためと思われる。写真6はコーチゾン 400 γ /cc を添加した場合の菌接種後3日目の標本でギムザ染色である。カプセルの肥厚が明らかである。写真7はコーチゾン 500 γ /cc Amphotericin B 0.5 γ /cc を添加した場合で菌接種後4日目同じくギムザ染色である。菌の脱落したあとを思わせる空胞が多い。写真8はコーチゾン 800 γ /cc を添加し、菌接種後3日目の標本である。

さて以上に挙げた短冊標本にも見られるように *C. neof.* は HeLa 細胞の単に表面に附着しているだけか細胞質の中に入っているのかという問題がある。このこと

写真1 培養 HeLa 細胞に接種した *C. neoformans*. 1 日後 (PAS 染色)

写真4 同 4 日後

写真2 同 2 日後

写真5 同 5 日後

写真3 同 3 日後

写真6 コーチゾン (400 γ /cc) 添加, 菌接種後 3 日目 (ギムザ染色).

写真7 コーチゾン (500 γ /cc), Amphotericin B (0.5 γ /cc) 添加, 菌接種後4日目 (ギムザ染色)

写真8 コーチゾン (800 γ /cc) 添加, 菌接種後3日目. (ギムザ染色)

写真9 *C. neoformans* 接種 HeLa の細胞の薄切片標本.

写真10 同 上

図8 *C. neoformans* 接種 HeLa 細胞培養液のpHの変化

は実験1の所で細胞内菌数という言葉を使つたときに後述するとしておいた。こゝで次のようなことを試みた。

HeLa 細胞に *C. neoformans* を接種し、3～4日後に培養液を捨て5000倍 EDTA 液で処理しこれを遠沈して細胞沈渣を集めこれにエタノール固定を施し、更に血清を加えて水浴中にて熱し血清を凝固せしめる。この凝固物をパラフィン包埋し病理組織標本の如く1～2 μ の切片に切り標本作製した。然しこの方法では細胞の形がくずれてよい標本を得ることが出来なかつた。そこで固定法を種々検討しオスミウム酸を用いたのが比較的細胞の原形を保っているように思われた。写真9及び10に示す。矢印の部分は細胞質内の菌と思われる。

II) 組織培養 *C. neoformans* の発育に及ぼす pH その他の影響について

真菌の発育において一般に酸性培地が好まれることは周知である²⁸⁾阿多らによれば、クリプトコックスは合成培地(処方:文献参照)においてpH 4.0よりpH 8.0までの範囲において観察せる所、pH 5.0よりpH 6.0の間で最

もよく発育し、以下pH 4.5, 6.5, 7.0, 4.0の順に次第に発育がわるくなる¹⁷⁾。組織培養によつてクリプトコックスの発育を観察する際、菌接種時には培養液を新しいYLE液と交換するから、そのときpHはYLE液のpHと同じである。(厳密にいうとYLE液に10%牛血清を加えたものであるが実際に測定してみるとやはり略7.6である)。培養液のpHは細胞の代謝により次第に低下し、48時間後は略7.0である(図8)。すなわち組織培養によれば *C. neof.* の発育は比較的高いpHにおいても可能であるといえよう。これは、細胞の存在が菌の発育に有利なためであらう。

細胞の存在しない組織培養液に *Candida albicans* と *C. neof.* が発育することは、1956年 H.W. Larsh が既に報告している¹⁸⁾。この事実は真菌類の栄養要求が低い点から考えてむしろ当然ともいえよう。Larsh の報告では、培養液のpHには触れていない。もし培養液のpHを一層酸性にしたり、又一度細胞を培養した培養濾液を用いれば菌の発育は、更によいように思われる。この点を明らかにすべく次の諸実験を行った。そして HeLa 細胞培養濾液には単なるYLE液におけるよりも *C. neof.* の発育がよいことを確かめたので、その原因につき、若干の考察と実験を行った。

尚これらの実験におけるpHの測定はいずれも、日立pHメーター (EHM-2) を用い菌の発育度の比較はサブロー平板培養により生菌数計算を行った。

(実験1)

YLE液のpHを塩酸によつて修飾し、いくつかの異つたpHを有する培養液を作つた。これらに *C. neof.* 吉田

図9 YLE液における *C. neoformans* の発育に及ぼすpHの影響

図10 YLE液における *C. neoformans* の発育に及ぼすpHの影響

株 10^5 /cc を接種して菌の発育状態と培養液のpHの変化を観察した。菌接種後5日目に菌数計算を行った結果をpHの変化と一緒に図示すれば図9及び図10となる。(図10はpH 7.0前後を細かく行つたものである)。図からわかるように、菌接種後培養液のpHはいつでもやや低下している。また初めに、培養液のpHを7.0以下に下げて菌を接種した場合はかなり菌の発育がよい。

(実験2)

HeLa 細胞に *C. neof.* を接種する際にはYLE液に10%牛血清を加えて用いる。そこで実験1と全く同じことを10%牛血清を加えたYLE液について行つた。すな

図11 YLE液(+10%牛血清)における *C. neoformans* の発育に及ぼすpHの影響

わち10%牛血清を加えたY L E液を塩酸でpHを修飾し種々のpHをもつ培養液をつくり、これに*C. neof.* 10⁵/cc接種して各々のpHの変化と菌の発育を比較観察した。図11に示すようにやはり時間と共にpHは低下し、又始めにpH 7.0以下に修飾された群では菌の発育がよい。更に実験1と比べて、血清の有無により菌の発育には殆ど差がみられない。菌の発育に及ぼす血清の影響はこの程度の濃度では存在しないように思われる。血清が真菌の発育を抑えるという報告もあるが¹⁹⁾、このY L E液における場合は、血清を加えることにより、液の物理化学的性状が変り、菌の発育に有利にはたらく面と相殺されてこのような結果が出たのであろう。血清の影響に関しては後に再びふれる。

(実験 3)

HeLa 細胞にコーチゾン 0, 200γ/cc, 1000γ/cc を添加し、これに *C. neof.* 10⁵/cc を接種して培養液のpHの変化と菌の発育度を観察した。2日後及び4日後に培養液のpHの測定と生菌数計算を行った結果が図12である。pH は、48時間後かなり低下するが、次の48時間後には、それより僅かに低下する。コーチゾン添加量と菌の発育度とは平行しコーチゾン添加量が多い程pHの低下も

図12 Cortisone の HeLa 細胞培養液中 *C. neoformans* 生菌数に及ぼす影響及び培養液の pH の変化

つよいようである。

(実験 4)

Y L E液にコーチゾン 0, 200γ/cc, 1000γ/cc を添加し、これに *C. neof.* 10⁵/cc を接種し培養液のpHの変化と菌の発育度とを観察したのが図13である。実験3と異なる点は HeLa 細胞の存在しない点である。コーチゾン添加量の差による菌の発育度の差は殆ど見られず、いずれもあまり良好でない。また培養液のpHの変化も著明ではなかった。

図13 Cortisone の Y L E液中 *C. neoformans* 生菌数に及ぼす影響と Y L E液の pH の変化

A : Cortisone	0
B : "	200 γ/cc
C : "	1000 γ/cc

尚実験3及び実験4でコーチゾンは Hydrocortisone hemisuccinate を使用したが、1000γ/ccの添加によつてY L E液のpHは変らなかつた。

(実験 5)

前に述べたように Larsh は組織培養液で細胞なしに *C. neof.* が発育するといつて居るが、実験1及び実験2で示した如く、pHが 7.0を越えている場合は菌の発育は極めてわるい。

確かに僅かに発育するがそれも細胞の存在する場合に比してはるかにおそい。それでは一度 HeLa 細胞を培養した組織培養液(培養濾液)ではどうであろうか。HeLa 細胞を培養すると培養液のpHが低下することは図8に示した通りである。従つて菌の発育は新しいY L E液におけるよりもよいであろうことが予想される。そこでpHの修正をして比較する必要がある。

HeLa 細胞を3日間培養した培養濾液(細胞が十分に増殖した培養液を採りこれを遠沈して細胞成分を除いたもの)に NaHCO₃ を適当量加えてpHを修正し、これに *C. neof.* 10⁵/ccを接種しpHの変化と菌の発育を観察し

図14 HeLa 細胞培養濾液における *C. neoformans* の発育に及ぼすpHの影響

た。(尚、NaHCO₃はYLE液の構成成分である)。
図14に示す通りpH 7.5附近でもかなりよく菌の発育することが分る。このことはHeLa細胞培養濾液で*C. neof.*の発育が新しい組織培養液に比してよいのは、単にpHの低下だけによるものではないことを推定させる。
しかし細胞の存在する場合に比べればやはりかなり劣ることは当然であろう。

(実験6)

HeLa細胞培養濾液について実験を進める前に組織培養液中の二つの物質について考えてみたい。一つは培養液のpH指示薬であるPhenol redであり一つは牛血清である。Phenol redは、0.02g/lの濃度で加えてあるが、この程度の濃度では細胞に対する毒性はないといわれている²⁰⁾。菌に対する影響も、先ず考えなくてよいと思われるが、一応次のような実験を行った。

表6 サブロー液体培地における *C. neoformans* の発育に及ぼすPhenol redの影響

接種菌数	0	10 ³ /cc	10 ⁴ /cc	10 ⁵ /cc
Phenolred				
400γ/cc	—	+	++	++
40 "	—	+	++	++
20 "	—	+	++	++
10 "	—	+	++	++
5 "	—	+	++	++
0 "	—	+	++	++

サブロー液体培地にPhenol red 5γ/cc, 10γ/cc, 20γ/cc, 40γ/cc, 400γ/ccを夫々加え(20γ/cc=0.02g/l)これに*C. neof.* 10³/cc, 10⁴/cc, 10⁵/ccを接種した。3日後の状態を表6に示すように菌の発育には全く差を認められない。

また血清については実験2において既に述べた如く菌の発育を抑えるという報告があるが、組織培養液におけるものではない¹⁹⁾。

HeLa細胞の培養には牛血清5~20%, また細胞の維持には同じく2.5%程度を培養液に加える。*C. neof.*を接種する場合は10%を加えて実験を行ってきた。そこでこれらの組織培養液における血清が*C. neof.*の発育に影響を及ぼすか否かを見るため次の実験を行った。

表7 YLE液における *C. neoformans* の発育に及ぼす血清の影響

接種菌数	0	10 ³ /cc	10 ⁴ /cc	10 ⁵ /cc
血清				
20%	—	+	+	+
10%	—	—	±	±
5%	—	—	—	+
2.5%	—	—	—	±
0%	—	—	—	+

YLE液に牛血清2.5%, 5%, 10%, 20%を加えてこれに*C. neof.* 10³/cc, 10⁴/cc, 10⁵/ccを接種して観察した。この場合菌接種時のpHはいずれも7.6であり、菌の発育はいずれもよくないが、各実験群について有意の差は認め難かつた。表7に示す。

(実験7)

実験5においてHeLa細胞培養液における*C. neof.*の発育がYLE液におけるよりもよいことを示した。そしてその差異が単にpHの変化だけによるとは考えられないと述べたが、次のような実験も行った。

HeLa細胞(湿重量325mg)をYLE液5ccに浮遊させて音波(15000CS, 60分)により菌体を破壊し、その上清を採取した。この上清をYLE液に(10%, 20%, 30%, 40%)を加えてpHはいずれも7.25にした。これらのYLE液に*C. neof.* 10⁵/ccを接種して5日後の菌の発育を菌数計算により比較したのが図15である。対照(YLE液のみ)に比していずれも菌の発育はよい。但し細胞破壊上清の添加量が多い程菌の発育がよいという傾向はみられず、10%添加群でも40%添加群でも殆ど同じ発育を示している。

図15 YLE液における *C. neoformans* の発育に及ぼす HeLa 細胞音波破壊上清の影響
接種菌数 $10^5/cc$ 生菌数計算 5日後

さてこれまでの実験によつて HeLa 細胞培養濾液及至 HeLa 細胞破壊上清の中に *C. neoformans* の発育を促進する物質の存在する可能性が考えられる。そこで *C. neoformans* の栄養要求について考えてみると一般に言われているように、それは極めて低いのである¹⁶⁾¹⁷⁾。然しエネルギー源として糖を要求し、例えばブドウ糖について言えば1~2%のブドウ糖でよく発育し、0.1%でもかなり発育する (YLE液中のブドウ糖は0.45%)。HeLa 細胞を YLE液で培養した場合、培養液中の糖量是如何なる変動を示すであろうか。細胞の増殖にエネルギー源として、糖が消費されるから当然減少することが予想されるが、培養濾液に菌がよく発育することから尚かなりの糖が残つていると考えねばならない。この点を明らかにするべく次の実験を行った。

(実験8)

HeLa 細胞を YLE液で培養し、培養液中の糖量を連日7日間にわたつて測定した。測定は Anthrone 法によつた²¹⁾²²⁾ (培養液中には最初 Earle 氏液中の糖、血清中の糖、Yeast extract に含まれる糖が存在する)。

結果は図16に実線で示す通りである。最初4800γ/cc含まれている糖は、次第に減少して2日後には約3150γ/ccになるがそれからは減少の勾配はゆるやかになり、7日後で約2060γ/cc存在する。この減少曲線は細胞の増殖と考え合わせると興味深い。すなわち細胞の増殖は3~4日でピークになり、それ以後は培養液を交換しないでよくと細胞の増殖は不活発になる。従つて細胞の増殖の最も旺盛な時期に糖の消費も大きいと考えられる。次に

図16 HeLa 細胞培養液中の糖量の *C. neoformans* 接種による影響

HeLa 細胞に *C. neoformans* $10^5/cc$ を接種した場合の培養液中の糖量の変化は同図の点線で示した如くである。1日後に略 $\frac{1}{2}$ に減少し、以下次第に減少して、7日後には約1200γ/ccになる。菌を接種しない場合に比して糖の減少が一層著しいのは当然と云えよう。

(実験9)

HeLa 細胞が増殖するにつれて培養液中の糖は減少し、培養液中の pH は低下することが、以上で明らかであるが、当然培養液中に酸が生ずることが考えられる。そこでその一つとして乳酸の定量を行つてみた。HeLa 細胞が腫瘍起源の細胞であり、Warburg が述べた腫瘍組織においては、正常組織に比して酸素分圧が低く乳酸の含量が多いという所説と考え合わせたわけである²³⁾。

HeLa 細胞を YLE液で培養し、培養液中の乳酸量を連日7日間にわたつて測定した。測定は、Barker らの比色法によつた²²⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾。(即ちトリクロール酢酸で除蛋白水酸化カリウムで除糖した検液に濃硫酸を作用

図17 HeLa 細胞培養液中の乳酸量の *C. neoformans* 接種による影響

させ検液中の乳酸をアセトアルデヒドに変えしめ、これを P-oxy-diphenyl のアルカリ溶液で発色させ比色定量する。）

結果は図17に実線で示す通りである。培養液中の乳酸量は急激に増加し略々3日で最高に達し、それ以後はゆるやかに僅かに減少する。これも細胞の増殖状態と比較して考えると興味が深い。次に HeLa 細胞に *C. neoformans* 10⁵/ccを接種した場合の培養液中の乳酸量は同図の点線が示す如くやはり増加するが *C. neoformans* を接種しない場合に及ばない。即ち菌の接種により糖の消費は高まるが乳酸の生成はむしろ低下するといえる、これは *C. neoformans* が好気性であることが一つの要因であろうとも思われる。

(実験10)

実験8及び実験9によつて HeLa 細胞培養濾液中の糖量は減少し、乳酸量が増加していることを示したが勿論糖は減少しているといつても尚2000γ/cc以上存在して居り、*C. neoformans* の発育に全く不足な量ではない。

HeLa 細胞培養濾液に新しいYLE液におけるよりも *C. neoformans* の発育がよいのは培養液の単なる物理化学的性状の変化(例えばpH、滲透圧、粘性など)だけでなく、細胞の代謝産物中に *C. neoformans* の発育を促進する物質があつて、それが培養液中に増加する事にもよるといふ可能性は前にも述べたが、それが果してどのような物質であるかを追究する前に、培養液中に増加している乳酸について考えてみたい。乳酸の増加がpHの低下という点で、確かに *C. neoformans* の発育に有利であるがそれ以外に有利な点があるであろうか。細胞に *C. neoformans* を接種した方が乳酸の生成が少いということは、恰も *C. neoformans* が生じた乳酸を利用するような印象を与える。そこで、糖利用試験培地(Difco, BACTO, Yeast Nitrogen Base)を用いてブドウ糖の代りに乳酸を加え、これに *C. neoformans* 10⁵/ccを接種してみた。結果はブドウ糖を加え

たものは発育するが乳酸を加えたものは全く発育しない。図18に示す。

(実験11)

乳酸以外に細胞の代謝産物或は細胞の構成成分の中で *C. neoformans* の発育を促進する物質があるとすれば、低分子のものかそれとも高分子のものを、先ず分ける必要がある。そこで透析膜としてセルロースを使用し、HeLa 細胞培養濾液を同量のYLE液で低温(5℃)透析し(24時間)その内液及び外液について *C. neoformans* 10⁵/ccを接種し、菌の発育度を比較観察した。同時に透析前の培養濾液及びYLE液についても同じように菌を接種して比べた。pHはいずれも7.4である。結果は図19に示すように、内液、外液及び透析前の培養濾液共に菌の発育

図19 HeLa 細胞培養濾液透析液の *C. neoformans* の発育に及ぼす影響
接種菌数10⁵/cc 菌数計算4日目

はよく、その間に有意の差は認め難い。(但し外液は内液に比して菌の発育はより良好である)。外液は透析前はYLE液そのものであるから、それが透析後においてYLE液よりも格段に菌がよく発育するということは内液から発育促進物質が外液に移つたものと想定したい。然らば、それは低分子の物質ということになる。

(実験12)

低分子の物質が酸性であることは、培養液のpHが次第に低下することから予想される。そこで実験11によつて得た透析外液を陰イオン交換樹脂(Amberlite IRA 400)²⁷⁾に通して外液中の酸性物質を吸着せしめ、これを1規定蟻酸にて溶離した。これを更に回転蒸留器によつ

図18 Bacto Nitrogen Base における *C. neoformans* の糖及び乳酸利用試験

	5日後			
	Glucose	乳酸	発育度	全菌数
<i>C. neoformans</i> 10 ⁵ /cc接種	5%	0	卅	310×10 ⁴ /cc
	1%	0	卅	235×10 ⁴ /cc
培地 Bacto Nitrogen Base	0	5%	—	10 ⁴ /cc以下
	0	1%	—	10 ⁴ /cc以下
	0	0	—	10 ⁴ /cc以下

図20 HeLa 細胞培養濾液中酸性物質の *C. neoformans* 発育に及ぼす影響

A : 酸性物質 2% 添加
B : " 0.2% "
C : " 0.02% "

接種菌数 10^5 /cc 菌数計算 3 日目

て減圧濃縮した。かくして HeLa 細胞培養濾液 80cc から酸性物質約 0.7cc を得た。この酸性物質 0.2cc を Y L E 液 (10cc, 100cc, 1000cc) に溶かし、これに *C. neoformans* 10^5 /cc を接種して菌の発育度を観察した。同時に乳酸を Y L E 液に加えたもの (0.01%, 0.0%, 1%) 及び乳酸カルシウムを Y L E 液に加えたもの (0.01%, 0.1%, 1%) を作りこれにも同様に菌を接種して比較した。図20に各々の菌数計算の結果を示す。適当な濃度の所ではいずれも菌の発育は良好であるが透析して得た酸性物質を加えた群で最もよい。濃度が、濃すぎると逆に菌の発育が悪いが、これは pH 4.0 以下になりあまり酸性に過ぎるためであろう。

以上で、HeLa 細胞培養濾液から透析及びイオン交換法によつて得た低分子酸性物質が菌の発育にとつて有利にはたらくことは間違いないと思われる。酸性物質としては乳酸以外にも多くの有機酸があり、それらの中に発育促進物質の存在する可能性が充分考えられる。

考 案

C. neoformans を HeLa 細胞を用いて組織培養し、その発育状態を観察し、主として①コーチゾンの影響。②培養液の pH の変化と、それによる菌の発育度の差異。③培養液中の糖及び乳酸の増減等についての実験成績を報告した。以下に、その結果をまとめて見れば

①コーチゾンは組織培養における *C. neoformans* の発育に促進的に作用する。その場合コーチゾンの細胞に対する作用時間が長い程菌の発育が良い傾向がある。コーチゾンと抗真菌剤とを同時に加えると、コーチゾンは抗真菌剤の効果を減少する。コーチゾンはサブロー培地においては、*C. neoformans* の発育に促進的作用を示さない。

②短冊培養による観察によれば組織培養を行うことにより *C. neoformans* のカプセルは肥厚する。又細胞内に菌の発育が見られる。コーチゾンは細胞の変性を早め菌の脱落せるあとを思わせる空胞が多く見られる。

③組織培養液の pH は *C. neoformans* の発育に極めて重要な影響を与える³²⁾。*C. neoformans* は HeLa 細胞なしの Y L E 液では極めて発育が悪いが Y L E 液の pH を下げればかなりよく発育する。pH 7.0 以下の場合 pH 7.0 以上の場合に比してかなり発育がよい。しかし細胞の存在した場合には及ばない。

④HeLa 細胞培養濾液には Y L E 液におけるよりも菌の発育が良い。しかしこれも細胞に接種した場合には及ばない。HeLa 細胞培養濾液は Y L E 液よりも pH が低い pH を Y L E 液と同じに修正してもやはり菌の発育は Y L E 液におけるより良い。

⑤HeLa 細胞培養液中の糖は次第に減少する。HeLa 細胞に *C. neoformans* を接種すると、培養液中の糖の減少は更に著しい。

HeLa 細胞培養液中の乳酸は増加する。HeLa 細胞に *C. neoformans* を接種すると培養液中の乳酸は増加するが非接種時の増加より少い。

⑥HeLa 細胞音波破壊上清、HeLa 細胞培養濾液より透析及びイオン交換法を行つて得た低分子酸性物質には *C. neoformans* 発育促進効果が認められる。

⑦通常組織培養に使用する程度の濃度においては、Phenol red は *C. neoformans* の発育に影響を及ぼさない。又、通常組織培養に用いる濃度の血清も Y L E 液における菌の発育に影響を及ぼさない。

さて真菌の組織培養を行う意義に関しては前がきで触れたが *C. neoformans* の場合 *Candida albicans* と異り二相性発育を示さないけれども、組織培養を行うことによりカプセルが大きくなる事は興味がある。また HeLa 細胞自体に及ぼすコーチゾンの作用に関しては Bass D.B. & Snell C.C. の報告があるが形態学的・生化学的に変化がおこると述べて居る¹⁴⁾¹⁵⁾。即ち形態学的には細胞の増大、核の増大、細胞数の減少、Mitose の減少、生化学的には Protein, RNA (per cell) の増加、また種々の酵素にも影

響がある。*C. neoformans* を HeLa 細胞に接種した際コーチゾンが菌の発育を促進するのもコーチゾンの細胞に対するそのような作用によるものであろう。それはコーチゾンがサブロー培地では菌の発育を促進しないこと、またコーチゾンの細胞に対する作用時間の長いほど菌の発育が促進される点からも裏書されよう、これらの成績が臨床的にも副腎皮質ホルモン療法後にクリプトコックス症が増加する⁹⁾ という報告とよく一致するように思う。

次に細胞なしの組織培養液に *C. neoformans* が発育することは既に Larsh の報告にあるが細胞を培養した濾液において菌の発育が一層良いことは興味深い。クリプトコックス症が血液病や悪性腫瘍の患者に合併する例が報告されているが^{29) 30) 31)} HeLa 細胞培養濾液に *C. neoformans* の発育を促進する物質がありはしないか。HeLa 細胞培養濾液を透析、イオン交換、減圧濃縮して得た低分子酸性物質には *C. neoformans* 発育促進効果が認められた。このものの本態については後日に譲る。乳酸は培養濾液中に増加しているが乳酸以外にも多種の酸が存在するであろう。

HeLa 細胞に *C. neoformans* を接種すると糖の消費は高まるが乳酸の生成は却つて低下するのも興味がある結果であった。

組織培養法による実験によつて *C. neoformans* の発育促進要因の若干について研究し、予後不良のクリプトコックス症の分析の一端とした。

結 論

① コーチゾンは組織培養における *C. neoformans* の発育に促進的に作用する。その場合コーチゾンの細胞に対する作用時間が長い程菌の発育が良い傾向がある。コーチゾンと抗真菌剤とを同時に加えると、コーチゾンは抗真菌剤の効果を減少する。コーチゾンはサブロー培地においては *C. neoformans* の発育に促進的作用を示さない。

② 短期培養による観察によれば組織培養を行うことにより *C. neoformans* のカプセルは肥厚する。又細胞内に菌の発育が見られる。コーチゾンは細胞の変性を早め、菌の脱落せるあとを思わせる空胞が多く見られる。

③ *C. neoformans* は HeLa 細胞なしの YLE 液では極めて発育が悪いが、YLE 液の pH を下げればかなり良く発育する。pH 7.0 以下の場合には pH 7.0 以上の場合に比してかなり発育がよい。しかし細胞の存在した場合には及ばない。

④ HeLa 細胞培養濾液には YLE 液におけるよりも菌の発育が良い。しかしこれも細胞に接種した場合には及ばない。HeLa 細胞培養濾液は YLE 液よりも pH が低

いが pH を YLE 液と同じに修正してもやはり菌の発育は YLE 液におけるより良い。

⑤ HeLa 細胞培養液中の糖は次第に減少する。HeLa 細胞に *C. neoformans* を接種すると培養液中の糖の減少は更に著しい。

HeLa 細胞培養液中の乳酸は増加する。HeLa 細胞に *C. neoformans* を接種すると培養液中の乳酸は増加するが非接種時の増加より少い。

⑥ HeLa 細胞音波破壊上清、HeLa 細胞培養濾液より透析及びイオン交換法を行つて得た低分子酸性物質には *C. neoformans* 発育促進効果が認められる。

⑦ 通常組織培養に使用する程度の濃度においては Phenol red は *C. neoformans* の発育に影響を及ぼさない。又通常組織培養に用いる濃度の血清も、YLE 液における、菌の発育に影響を及ぼさない。

文 献

- 1) Randall, C.C. & McVicker, D.L.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 77, 150—153, 1951.
- 2) 上塚昭: 日本伝染病学会雑誌, 33, 336—363, 1959.
- 3) 阿多夷茂: 真菌症の感染学, 真菌誌, 1 (3), 197—206, 1960.
- 4) 美甘義夫: 日本臨床, 18 (5), 1—6, 1960.
- 5) Littman, M.L. & Zimmermann, L.E.: Cryptococcosis, New York, Grand & Stratton, Inc., 1956.
- 6) 岩田和夫: 新薬と治療, 42: 1—3, 1958.
- 7) 岩田和夫: 第12回日本細菌学会関東例会演説, 1959.
- 8) 第32回日本細菌学会総会, シンポジウム: ホルモンと感染の関連性に関する諸問題, 1959.
- 9) Goldstein, E. Rambo, O.N.: Ann. Int. Med., 56, 114—120, 1962.
- 10) Sidransky, H. et al.: Dis. Chest. 39, 1961.
- 11) 勝田甫: 組織培養法, 納谷書店, 1955.
- 12) Paul, J.: Cell and Tissue culture, E. & S. Livingstone Ltd. Edinburgh and London, 1959.
- 13) Grossfeld, H.: Endocrinology 65, 777—784, 1959.
- 14) Wellington, J.S. & Moon, H.D.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 107, 556—559, 1961.
- 15) Bass, A.D. & SNell, C.C.: J. Phar. Exp. Ther., 134, 38, 1961.
- 16) 新井潔: 日本細菌学会雑誌, 12 (8), 681—685, 1957.
- 17) 阿多夷茂, 中野安二: 真菌誌, 1 (3), 237—240, 1960.

- 18) Larsh, H.W., Hinton, A., Silbery, S.L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 93, 612—615, 1956.
 - 19) Gerald, L. Baum & Dorothy Artis: Amer. J. Med. Sci., 242, 761—770, 1961.
 - 20) 堀田進, 大山昭夫: 組織培養の基本と実際, 永井書店, 1962.
 - 21) Morris, D.L.: Science, 107, 254, 1948.
 - 22) 藤井暢三: 生化学実験法(定量篇) 南山堂11版, 1958.
 - 23) Warburg, O.: The Metabolism of tumors London, Constable & CO., Ltd., 1930.
 - 24) Barker-Summerson: J. Biol. Chemi. 138, 535, 1941.
 - 25) Koenmann, R.H.: J. Biol. Chemi. 135, 105, 1940.
 - 26) Miller-Muntz: J. Biol. Chemi. 126, 413, 1938.
 - 27) 化学実験研究会篇: 化学実験操作書4版, 広川書店, 1962.
 - 28) Mosberg, W.H. & Alvarez de Choudens, J. A.: Lancet 260, 1259, 1951.
 - 29) Fitchett, M.S. & Weidmann, F.S.: Arch. Path., 18, 225, 1934.
 - 30) Gendal, B.R., Ende, M., Norman, S.L.: Amer. J. Med., 9, 343, 1949.
 - 31) Zimmerman, L.E. & Rappaport, H.: Am. J. Clin. Path., 24, 1050, 1954.
 - 32) Howard, D.H.: J. Bact., 82, 430—435, 1961.
 - 33) 北本治, 上塚昭, 松官恒夫ら: 内科, 3, 570—575, 1958.
-