Cryptococcus neoformans の莢膜物質について

II. 莢膜形成の培養条件

玉 村 富, 正 古 良 夫

日本大学歯学部 真菌研究室

Cr. neoformans の莢膜が組織形と同程度に培養形でも形成されれば、とくに莢膜の形成機序などの研究にとつてきわめて有益であることはいうまでもない。現在のところ、Littman の莢膜培地が本菌の莢膜形成においてすぐれたものとして一般に認められていることは周知のとおりである。しかし、著者らが I 報¹⁾ で報告したように、莢膜形成に適した培地ほど培養中に莢膜形成のよりよい変異菌の増殖を促進するので、莢膜形成そのものの促進であるかいなかを明確にする必要があろう。従つて著者らはこの点に十分の注意を払つて、従来報告されている培養条件の再検討を試みたので報告する。

実 験

供試菌株：本邦で分離された病原株のうち、0.3%酵母エキス加サブローカンテン培地において莢膜がまつたく、またはほとんどみられない7菌株 Ma, TD, TT₂, TM₁, Th₂, As, Kt を供試した。

供試培地：

アミノ酸	X g
糖	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.05 g
KH ₂ PO ₄	0.05 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 g
Thiamine HCl	0.05 mg
カンテン末	1.5 g
精製水	至 100ml

アミノ酸は18種類(Glycine, DL-alanine, DL-valine, L-leucine, DL-isoleucine, DL-serine, DL-threonine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-lysine HCl, L-arginine HCl, L-histidine·HCl·H₂O, DL-phenylalanine, L-tyrosine, L-tryptophane, L-proline, L-cystine,

Tomi TAMAMURA & Yoshio SCHÖBL: The Capsular Substance of *Cryptococcus neoformans*, II. Cultural conditions of the capsule formation, From the Laboratory of Medical Mycology, Nihon University, School of Dentistry.

L-methionine) とし、添加量は Na-glutamate の 0.2% 添加量と L 型として同量素量となるようにした。ただし、水に難溶である tyrosine は 0.04% とし、cystine は微量の希塩酸にとかしてから添加した。糖は 5 種類 (D-xylose, D-glucose, D-fructose, Maltose, Sucrose) とし、2 種類混合の場合はそれぞれを半量とした。培地 pH としては供試培地の大部分において両リン酸塩を等量とすれば pH 5.6 ~ 5.8 となり、K₂HPO₄ のみ 0.1% にすれば pH 6.8 ~ 7.0 となるが、一部のものは両リン酸塩のいずれかを 0.1% に添加して、さらに HCl または NaOH の希水溶液で所定の pH とした。培地の滅菌として pH 5.6 ~ 5.8 の場合は 115°C に達すれば直ちに火を止め、圧の自然降下後取出して水で急冷したが、pH 6.8 ~ 7.0 の場合は、加熱による糖の変質または分解がみられるので、糖のみ 20% 溶液として別に滅菌後添加した。

なお、対照とした Littman の莢膜培地²⁾ の処方は原法に準じた。

方法：次の順序で行なつた。

1. 酵母エキス加サブロー平板に菌をまき、25°C, 5 日培養後、定型的集落 (*C. albicans* の S 形集落様で、莢膜をほとんど有しないことを確認) を滅菌水に微濁程度に懸濁し、強く 1 ~ 2 分振盪し、10 分間静置した上層部を菌液として用いた。

2. 供試培地に菌液の 1 滴をひろげ、所定温度で 5 日間培養して生じた集落について同様にさらに 2 回継代播種を行なつた。

3. 継代最後の供試培地平板に生じた集落のうち任意の 5 集落について墨汁標本をつくり、標本のセガラスを静かに十分圧してから鏡検し、100 個の細胞について莢膜の厚さを測定し、同時に酵母エキス加サブロー培地平板にまいて最初の集落と同一性状であるかを確かめた。

以上の方法で成績を勘案しながら次の順序に従つて実験を進め、またこれらの実験は 2 回反復実施した。

表 2

培地 pH 5.6~5.8, 好気, 37°C

糖	菌 株	Ma					TD					Th ₂					Kt					TT ₂					TM ₁					As																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
		* フミ ノ酸					A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	F	G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
		A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	F	G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
Xylose	Prol.	10						10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	

* A, B...G : 本文の成績の項参照
 数 字 : 細胞数の割合 (本文の成績の項参照)

1) 好氣的条件下で、pH 5.6～5.8の供試培地についての25°Cおよび37°Cにおける培養

2) 好氣的条件下で、pH 5.8～7.0の供試培地についての37°Cにおける培養

3) ロウソク法で、pH 5.6～5.8の培地についての37°Cにおける培養

成績

成績の記載は、全実験における莢膜の厚さの分布を検討して妥当と思われた次のような区分によつた。

A：莢膜をまったくまたはほとんど認めないもの。

B：0～1.5 μ の間に連続的に分布するもの

C：約1.5 μ あるもの。

D：1.5～3 μ の間に連続的に分布するもの。

E：約3 μ あるもの。

F：3～4.5 μ の間に連続的に分布するもの。

G：4.5～6 μ の間にあるもの。

なお、細胞100個のうち、各区分にある細胞数を10で除し、小数点下を四捨五入した値を各区分の割合とした（ただし、4個以下すなわち0.4以下の区分では切上げて1とし、割合の最も大きいものから1を減じた）。これによれば同一株の同一平板における5集落の間はもとより、3回の反復実験を通じて成績はよく一致した。

さて、以上の基準によつて成績をまとめた結果は次のようになった。

1. 好氣的条件下で、pH 5.6～5.8の供試培地についての25°Cおよび37°Cにおける培養の成績は表に示したようになった。

まず、菌株および培地組成によつて異なるにしても、37°Cで莢膜形成がみられる培養に対応する25°Cのものでは莢膜がほとんどみられないか、またはみられても莢膜の厚さによる細胞数の割合が薄い方に偏していた。従つて37°Cが25°Cよりも莢膜形成には適していた。

さらに、これら37°Cにおいて莢膜形成がみられた培地について比較すれば菌株差はあるにしても糖としては白糖および麦芽糖が最も適し、次いでブドウ糖および果糖であり、白糖と麦芽糖との混合およびブドウ糖と果糖との混合ではそれぞれ単独の糖の場合と同程度であつた。なお、キシロースは比較的よい成績を示したが、増殖の点では他の糖よりもはるかに劣つていた。アミノ酸としてはグルタミン酸およびアスパラギン酸が最も適し、次いでグリシン、アラニンおよびプロリンであり、上記以外のアミノ酸は莢膜形成または増殖の点ではほとんど問題とするに至らなかつた。

対照としたLittmanの莢膜培地は上記の最も適した糖とアミノ酸とを組合せた培地と莢膜形成についてほとんど同程度であつた。

2. 好氣的条件下で、pH 6.8～7.0の供試培地についての37°Cにおける培養の成績は前項の37°Cにおける培養とまったく同様であつた。

3. ロウソク法で、pH 5.6～5.8の培地についての37°Cにおける培養の成績も1項の37°Cにおける培養とまったく同様であつた。

考察

1. 実験について

1) 供試菌株として酵母エキスカサブロー培地で莢膜形成がまったくまたはほとんど認められない菌株を選んだのは、供試培地における莢膜形成の判定が容易であり、またそれを逆に培養することによつてその莢膜形成が変異菌の混在によるものであるか否かの判別が容易であるからである。

2) 培地組成としては莢膜形成にすぐれたものとされているLittmanの莢膜培地を対照とし、またその組成を参照し、とくに糖とアミノ酸について検討する目的でその他の組成はできるだけ簡略にした。培地pHとしては一般に真菌の増殖に好適である5.6～5.8と対照培地に指定されているpHとして6.8～7.0とを選んだ。

3) 培養法としては変異菌の混在を極力避けるため集落継代法によつた。なお、前培養による影響を除くために供試培地に3代継代すれば十分であることは予備実験で確認しておいた。培養温度として本菌の増殖に好適な25°Cと莢膜形成に好適といわれている37°Cとを選び、また大塚³⁾によれば莢膜形成に好影響があるとされているロウソク法をも試みた。

2. 成績について

実験条件のうち、供試培地の組成として糖は白糖または麦芽糖、アミノ酸はグルタミン酸またはアスパラギン酸とし、培養温度は37°Cとした場合が莢膜形成に最も適し、Littmanの莢膜培地と同程度の成績を示した。培地pHとしてはいずれも差はなかつたが、pH 5.6～5.8が培地の加熱滅菌における糖の変質分解に対してはるかに安定である点では実際には便であらう。またロウソク法は本実験では莢膜形成に関してまったく好氣的条件下のものと同程度であり、従つて少なくとも本実験法では好氣的条件で十分であらう。

さて、培地組成のうち、上記の糖とアミノ酸の組合わせが莢膜形成に適している点については明らかでない。

おそらくこれらの二糖類ではまず構成単糖に分解されてから利用されるのであろうが、その構成単糖単独または混合によつてはこれら二糖類と同等の成績は得られなかつた。上記の両アミノ酸においても単に増殖によいというだけではないようにも思われる。というのは他のアミノ酸にも同等の増殖を示すものがあり、さらに、この両アミノ酸は容易に菌体内で利用できる窒素源から生成されるはずだからである。ところで、Littman の莢膜培地²⁾の組成では硫酸アンモニウムがグルタミン酸とともに添加され、さらに微量の諸金属塩も添加されているが、われわれの上記供試培地と莢膜形成においてまったく同等であつたことはとくに硫酸アンモニウムの添加を必要としないし、またその他の諸金属塩は必要であるとしても、実際には培地材料中に痕跡的に含まれているのでとくに添加の要がないのであろう。

いずれにしても上記の糖とアミノ酸との組合せがとくに莢膜形成の過程で何らかの役割を果していることは確かであろう。しかしながら、この条件においても、なお菌株差があり、とくに Ma 株のようにほとんど莢膜を形成しない菌株もマウス感染組織では容易に著明な莢膜形成を示すことは莢膜形成になお未知の要因があることを思わせる。この要因が生体または感染した生体においてのみ存在するものであるかは明らかでなく、これらに関しては今後追求したい。

結 論

Cryptococcus neoformans の莢膜形成に関する培養条件について、とくに培養中みられる莢膜形成変異菌の増殖

を極力避けることに意を用い、なお、従来の報告をも参照して実験を行ない次の結論を得た。

1. 培地組成としてはとくに糖として白糖または麦芽糖が、窒素源としてはグルタミン酸またはアスパラギン酸が莢膜形成に最もよかつた。
2. 培養温度としては37°Cが莢膜形成には好適であつた。
3. 培地pHとしては培地の加熱滅菌の便をも考慮すればpH 5.6～5.8が莢膜形成にも適当であろう。
4. ローソク培養法は通常の好気培養法よりも莢膜形成にすぐれているとは認め難かつた。
5. 検討した条件のうち最も莢膜形成によいと思われる条件においても菌株によつては組織形と同等の莢膜形成が認められなかつた。従つて莢膜形成にはさらに未知の要素があるように思われる。

本論文要旨は第10回医真菌学会総会(1966年)に発表した。

文 献

- 1) 正古良夫・玉村富：*Cryptococcus neoformans* の莢膜物質について、1. 莢膜物質産生における変異と性状；真菌と真菌症，7 (1)：36～41, 1966.
- 2) Littman M.L.: Capsule synthesis by *Cryptococcus neoformans*; Trans. New York Acad. Sc., 20：623～648, 1958.
- 3) 大塚恭生：本邦分離 *Cryptococcus neoformans* の性状，特に莢膜について；真菌と真菌症，2 (3) 186～197, 昭36 (1961).

(昭和42年1月12日受付)