Candida robusta と Saccharomyces cerevisiae との 血清学的関係について

林 栄

順天堂大学医学部細菌学教室 (指導 土屋毅教授)

〔受付: 3月13日1957年〕

Fineman¹⁾, Heines²⁾ および Benham³⁾ は *Candida* が子嚢胞子を形成する酵母と交叉凝集反応を示すことを見, 特に Benham は *Candida* (*Monilia*), *Hansenula* (*Willia*) および *Saccharomyces* との間に共通抗原のあることを報告した。Almon and Stovall⁴⁾ は以上の3菌種にさらに1菌種を加え合計4菌種との間にも共通抗原のあることを報告した。Rawson and Norris⁵⁾ も吸収法を用いる定量的凝集反応の凝集価の差によつて *Candida albicans*, *Hansenula anomala* および *Saccharomyces cerevisiae* の3菌種間に共通抗原の存することを示した。また土屋等⁶⁾ も *Candida* (以下C. と略記する) 属の抗原分析を行つている際に抗C. 血清が *Hansenula* 属, *Saccharomyces* 属および *Torulopsis* 属の菌株を凝集するが, *Cryptococcus* 属や *Rhodotorula* 属の菌株を凝集しない事実を観察している。また川北⁷⁾ はC. 属8菌種の抗原分析を行い, *C. macedoniensis* と *C. pseudotropicalis* の抗原構造は全く同一であり, かつ *C. catenulata* と *C. krusei* の抗原構造も同一であつて, これらは同一菌属に属しそれぞれ独立した菌種であるにもかかわらず抗原構造が同一であることを報告した。

Diddens and Lodder⁸⁾ は *C. robusta* (以下C. rob. と略記する) と *Saccharomyces cerevisiae* (以下S. cerev. と略記する) との間には生物学的性状の類似性の存することを述べているが, 著者はこれら両菌種の抗原をC. 属の既知抗原との関連において実験を行い新知見を得たので報告する。

実験材料および実験方法

菌株: 抗原分析に使用した菌株はS. cerev. GRIF (A) およびC. rod. IBL₂₄₄₇ (A) である。抗原構造を明らかにした後で比較のために同じ2菌種の3菌株をも使用した。これら菌株は(B), (C), 株と名づけた。これら菌

株のほかになおC. 抗原の単因子血清作製のためには, 従来教室の深沢⁹⁾, 川北⁶⁾ の報告と同じ菌株を用いた。またこれら菌株はいずれも大阪の醗酵研究所より分与されたものである。

免疫用抗原の製法: 菌は2%葡萄糖, 1%ペプトン, 0.5% yeast extract (Difco) を含む寒天培地に27°Cで48時間培養した。加熱菌の抗原を作るには平板上のyeast phaseの菌を集め0.5%食塩水で2回洗滌後, 0.5%食塩水に20~30mg/ccの割合の菌浮游液を作り, これを100°C150分加熱後Glass grinderで磨砕し, 最後に菌を20mg/ccに補正した菌浮游液に, 防腐のため0.5%の割合になるようホルマリンを加えた。なお非加熱菌の抗原の作製は前法と同様であるが, 唯菌の加熱を行わない点だけが異つている。

免疫にはウサギを使用し, 菌浮游液の0.5 cc, 1.0 cc, 1.5 ccを連続3日間静注した。これを第1 seriesとし, 1日休んで第2 seriesには2.0 cc宛連続3日間静注した。かくて1日休んでから, 第2 seriesと同じように第3, 第4 seriesの注射を行つた。最後の注射から約1週間後に, 凝集価の検定を行い全採血した。もし凝集価が低かつたら所要の凝集価となるまで注射を繰り返した。またウサギの健康状態によつてはseriesとseriesの間で3~4日休んだこともあつた。

吸収法: まず凝集価がほぼ1:128になるように血清を稀釈した。すなわち凝集価が1:1280であつたら10倍に稀釈した。しかしこの凝集価の経過とともに低下するので, もちろん低下した程度にしたがつて稀釈倍数をかえた。次に稀釈血清1 ccに対して平板約2枚半分の加

HAYASHI Sakae: Serological relationship between *Candida robusta* and *Saccharomyces cerevisiae*. Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo. — Jap. J. of Bact., 12(4), 321-325, 1957.

熱菌を加えた。この加熱菌は免疫用抗原作製の場合と同じように0.5%食塩水で2回洗滌してから、この混合した浮游液を37℃の恒温槽に3時間保ち、その後冷蔵庫に一夜保存した。翌日この菌浮游液を遠心沈澱しその上清について slide 凝集反応を行った。吸収菌と陽性反応を示す限りなお新鮮抗原で吸収を繰り返したのであるが、数回吸収を行って陽性凝集反応を示さなくなっても念のためさらにもう1回吸収することにした。この吸収血清を用いて各菌種の加熱又は非加熱菌と Slide 凝集反応を行った。

生物学的性状検査はほぼ Lodder¹⁰⁾、宮崎¹¹⁾の方法に準じて行った。すなわち Sabouraud 寒天、Sabouraud ブイヨン等の各種培地における培養性状を検し、また醗酵作用検査には指示薬として B. T. B. を加え、酸産生の有無は B. T. B. の変色によって判定し、またガス発生の有無は Durham 管を用いた。同化作用検査には (NH₄)₂SO₄、KH₂PO₄、MgSO₄・7H₂O に寒天を加えた基礎培地に多量の菌浮游液を混和し、培地が固ってから

微量の糖を穿刺して、その部に菌が発育するかどうかによって判定した。使用した糖は葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖であった。また KNO₃ の同化作用の検査は糖同化作用と同じ方法を用いた。仮性菌糸および硬膜胞子形成の検査は Cornmeal (Difco) 寒天を用いる slide 培養を行って仮性菌糸の形成の有無、形態および硬膜胞子形成の有無を検査した。子嚢胞子形成には人参培地または Gorodkova 培地を使用し、子嚢胞子の形成の有無を約4週間検査した。以上の検査は唯1回の検査だけでなく必要に応じて何回も繰り返した。

実験成績

A) C. 属の耐熱性抗原の因子血清を用い S. cerev. と C. rob. の加熱菌との slide 凝集反応を行った (第1表)。S. cerev. は耐熱性抗原 2, 3, 10, 14, 18 に対応する因子血清または吸収血清と slide 凝集反応が陽性であったが、他の抗原に対応する因子血清とは陰性であった。C. rob. についても同じ結果が観察された。従って

第1表 耐熱性抗原の因子血清による Slide 凝集反応 (実験 A, C)

因 子 血 清	抗 加 熱 菌 血 清	吸 收 菌 (加 熱 處 理)	抗 原 (加熱處理)					因 子 血 清	抗 加 熱 菌 血 清	吸 收 菌 (加 熱 處 理)	抗 原 (加熱處理)					
			(A)		(B)						(A)		(B)			
			S. cer.	C. rob. (A)	S. cer.	S. cer. (C)	C. rob. (B)				S. cer.	C. rob. (A)	S. cer. (B)	S. cer. (C)	C. rob. (B)	
2	C. alb.	C. pt.	+	+	+	+	+	+	11	C. cat.	C. alb.	-	-	-	-	-
3	C. pk.	C. kr.	+	+	+	+	+	+	12	C. myc.	C. kr.	-	-	-	-	-
4	C. st.	C. pk.	-	-	-	-	-	-	13	C. pul.	{ C. alb. C. pel.	-	-	-	-	-
5	C. st.	C. glm.	-	-	-	-	-	-	14	C. pul.	C. alb.	+	+	+	+	+
6	C. tr.	C. st.	-	-	-	-	-	-	15	C. pel.	C. ut.	-	-	-	-	-
7	C. alb.	C. tr.	-	-	-	-	-	-	16	C. pel.	C. pk.	-	-	-	-	-
8	C. mac.	C. sct.	-	-	-	-	-	-	17	C. ut.	C. pel.	-	-	-	-	-
9	C. glm.	C. tr.	-	-	-	-	-	-	18	C. rob.	{ G. alb. C. pk. C. pt.	+	+	+	+	+
10	C. sct.	C. alb.	+	+	+	+	+	+	19	C. rug.	{ C. alb. C. cat.	-	-	-	-	-

註

C. alb.	C. albicans	C. rob.	C. robusta	S. cer.	Sacch. cerevisiae
C. kr.	C. krusei	C. cat.	C. catenulata	C. glm.	C. guilliermondi
C. pk.	C. parakrusei	C. mac.	C. macedoniensis	C. myc.	C. mycoderma
C. pul.	C. pulcherrima	C. pel.	C. pelliculosa	C. pt.	C. psuedotropicalis
C. sct.	C. scottii	C. rk.	C. reukaufii	C. rug.	C. rugosa
C. ut.	C. utilis	C. st.	C. stellatoidea	C. tr.	C. tropicalis
		C. zey.	C. zeylanoides		

第2表 順次吸収した抗 *S. cerevisiae* 加熱菌血清の Slide 凝集反応 (実験 B)

実験 番号	抗 加 熱 菌 血 清	吸 收 菌 (加熱処理)				抗 原 (加熱処理)								吸す 収る 後 残 存 体
		第1 次 吸 收	第2 次 吸 收	第3 次 吸 收	第4 次 吸 收	S. cer. C. rob.	O. alb. C. pt.	C. kr. C. pk.	C. glm. C. ut.					
1	S. cer.	C. alb.				+	+	-	+	-	-	10, 14, 18 14, 18 18		
2	S. cer.	C. alb.	C. pt.			+	+	-	-	-	+		-	-
3	S. cer.	C. alb.	C. pt.	C. pel.		+	+	-	-	-	-		-	-
4	S. cer.	C. alb.	C. pt.	C. pel.	C. rob.	-	-	-	-	-	-		-	-
5	S. cer.	C. rob.				-	-	-	-	-	-			
6	C. rob.	S. cer.				-	-	-	-	-	-			

C属の既知の抗原に関する限りではこの両菌種は耐熱性抗原 2, 3, 10, 14, 18を有していることとなる。

B) C属の既知の抗原以外の新耐熱性抗原の有無を検するため、次の実験を行った。実験1 (第2表) において抗 *S. cerev.* 加熱菌血清を *C. albicans* の加熱菌で吸収した血清に *S. cerev.* および15種のCの加熱菌を混じて Slide 凝集反応を行った。これによれば吸収血清は *S. cerev.*, *C. rob.*, *C. pseudotropicalis*, *C. parakrusei* の加熱菌と陽性凝集反応を示した。第2表において凝集反応の抗原としては *S. cerev.* および *C. rob.* のほかは6群にわたるCの代表菌種だけの凝集反応の成績を示したが、Cの菌種は全部で15菌種を用い、その抗原の分布から抗原を推定し吸収菌種を選択した。実験A (第1表) によつてこの陽性反応はこの吸収血清が抗原 10, 14, 18に対応する抗体を有するためあらわれたものと考えられる。次に実験2においてこの吸収血清から抗原 10を有する *C. pseudotropicalis* の加熱菌で吸収すると、この再吸収血清は *S. cerev.*, *C. rob.* および *C. parakrusei* の3菌種に対してのみ陽性反応を示した。さらに実験3において抗原14を有する *C. pelliculosa* の加熱菌で吸収すると、吸収後の血清とは *S. cerev.* と *C. rob.* の2菌種に対してのみ陽性反応を示した。これは両者の共通抗原18に対応する抗体の反応と考えることができる。かくて3菌種によつて3回吸収された血清からさらに抗原18を有する *C. rob.* の加熱菌で吸収すると、この吸収血清は各菌種に対してすべて陰性であった。それ故 *S. cerev.* は *C. rob.* の抗原18を有することとなる。実験5および6において *S. cerev.* と *C. rob.* の加熱菌の抗血清から相互に両菌種の加熱菌で吸収した吸収血清は、すべての菌種に対して Slide 凝集反応は陰

性であった。

以上の実験の結果から *S. cerev.* は耐熱性抗原, 2, 3, 10, 14, 18を有するが、それ以外の新耐熱性抗原は有しないことが判った。尚吸収しない抗血清は互に相对应する菌種とはもちろん他のC属の菌種とも陽性凝集反応を示した。このことから両菌種は抗原 1を有するものとする。

C) *S. cerev.* の抗原構造が判つたので同一菌種の他の菌株も、抗原分析に使用した標準株の抗原構造と一致するかどうかを検査した。第1表にB, Cと記した菌株はそれぞれ *S. cerev.*, または *C. rob.* と同一菌種であつて共に由来の正しい菌株である。これら菌株の抗原を因子血清によつて Slide 凝集反応を行った結果は予期

第3表 易熱性抗原の因子血清による Slide 凝集反応 (実験D)

因子血清	抗血清 マル リン 処理 菌	吸 收 菌 (加 熱 処 理)	吸 收 菌 (非 加 熱 処 理)	抗原 (非加熱処理)			
				(A) S. cer. C. rob.	(A) S. cer. C. rob.	(B) S. cer. C. rob.	(B) S. cer. C. rob.
a	C. pt.	C. pt.		+	+	+	+
b	C. kr.	C. kr.		-	-	-	-
c	C. ut.	C. ut.		-	-	-	-
d	C. pul.	C. pul.		-	-	-	-
e	C. rob.	C. rob.	C. pt.	+	+	+	+
f	C. rk.	C. rk.	C. kr.	-	-	-	-
g	C. rug.	C. rug.		-	-	-	-
h	C. zey.	C. zey.	C. pk. C. rob.	-	-	-	-

第4表 順次吸収した抗 *S. cerevisiae* 非加熱菌血清の Slide 凝集反応 (実験 E)

実験番号	抗理菌血清ホルマリン処理	加る第1次熱処理菌に吸収よ	吸収菌 (非加熱処理)		抗 原 (非加熱処理)								吸抗体後残存する
			第2次吸収	第3次吸収	S. cer.	C. rob.	C. alb.	C. pt.	C. kr.	C. pk.	C. glm.	C. ut.	
7	S. cer.	S. cer.			+	+	-	+	-	-	-	-	a, e e
8	S. cer.	S. cer.	C. pt.		+	+	-	-	-	-	-	-	
9	S. cer.	S. cer.	C. pt.	C. rob.	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	S. cer.	S. cer.	C. rob.		-	-	-	-	-	-	-	-	
11	C. rob.	C. rob.	S. cer.		-	-	-	-	-	-	-	-	

の如く *S. cerev.* の2菌株および *C. rob.* の1菌株の抗原は、今までの実験から所有すると考えられた耐熱性抗原は全部有しており、また所有しておらないはずの抗原はもっていないかつた、それ故菌株数こそは少ないが、標準株以外の菌株の抗原構造もその種の標準株の抗原構造と同一であると結論することができた。

D) 易熱性抗原については耐熱性抗原の場合と同様に a から h までの抗原に対応する8種の因子血清を作り、この吸収血清と非加熱菌との間で Slide 凝集反応を行った。*S. cerev.* の非加熱菌は *C. rob.* と同じように易熱性抗原 a および e に対応する因子血清と陽性反応を示した (第3表)。すなわち *S. cerev.* は易熱性抗原 a および e を有することが判った。

E) 次に *S. cerev.* は抗原 a および e 以外の易熱性抗原を所有するかどうかを耐熱性抗原の抗原分析の場合と同様にして行つた (第4表)。すなわち実験7によれば *S. cerev.* の加熱菌で吸収した同じ菌の抗ホルマリン処理菌血清は *S. cerev.* *C. rob.* および *C. pseudotropicalis* の非加熱菌と凝集した。次に実験8においてこの吸収血清を抗原 a を有する *C. pseudotropicalis* の非加熱菌で吸収し、この吸収血清に各菌種の非加熱菌を加えて Slide 凝集反応を行つた。このように吸収や凝集反応検査を繰り返したのであるが、その反応が陽性的場合も陰性的場合にも、それぞれの結果は吸収後残存する抗体によつて合理的に説明することができた。そこで *S. cerev.* は *C. rob.* と同じく易熱性抗原 a および e を有しているが、他の易熱性抗原を有してないこととなる。なお標準株以外の *S. cerev.* と *C. rob.* の3菌株 (B, C株) も標準株と同一の易熱性抗原を有することがわかつた (第3表)。

F) *S. cerev.* と *C. rob.* の形態学的並びに生物学的性状の比較

S. cerev. の抗原分析に用いた菌株 (A) の細胞は yeast extract 寒天の若い培養の菌では円形、短卵円形または卵円形であつた。葡萄糖、麦芽糖、蔗糖を分解して酸とガスをつくるが乳糖を醗酵しなかつた。Auxanographic 法で葡萄糖、麦芽糖、蔗糖の同化作用は陽性であつたが、乳糖は陰性であつた。cornmeal 寒天上で4日間培養すると仮性菌系をつくつたが硬膜胞子は認められなかつた。子嚢胞子形成は人参培地または Gorodkova 寒天を使用した、胞子は円形乃至稍々卵円形であつて子嚢中に1~4個の胞子を認めた。他の2株 (B, C株) の性状も同一であつた。*C. rob.* (A株) の細胞は短卵円形乃至長卵円形であつて、醗酵作用と同化作用の検査では麦芽糖の醗酵作用以外は *S. cerev.* の各作用と同一であつた。仮性菌糸は形成したがもちろん子嚢胞子の形成は認められなかつた。他の *C. rob.* (B株) はこの菌種の標準的記載と同一であつた。それ故抗原分析に使用したA菌株は生物学的性状からいえば軽度の変異株と考えられる。

考 案

Diddens & Lodder⁶⁾ は形態学的並びに生物学的性状を基礎にして *C. rob.* を新種として発表し、*C. rob.* は *S. cerev.* と子嚢胞子形成以外は同一性状であるので *S. cerev.* の imperfect stage と考えた。著者の検査したこの2菌種、5菌株についても形態学的並びに生物学的性状は子嚢胞子形成以外はほとんど同一であつたから、この2菌種の間には生物学的類縁関係があることは容易に考えることができるが、しかし、たとえ両菌種のかかる性状が同一であつたとしても、1菌種の抗原構造が他の菌種と同一であるとは必ずしも云えない。なお *Saccharomyces hutensis* および *Saccharomyces awamori* と命名して送附された *C. rob.* の2菌株を

Lodder¹⁰⁾ は記載している。それら菌株の由来は1種の酒であった事は、*C. rob.* もまた *S. cerev.* と同様、その由来が酒であることの少くないことを示している。

一方上述の実験結果から *yeast phase* の *S. cerev.* の抗原構造は耐熱性抗原 1, 2, 3, 10, 14, および 18, 易熱性抗原 a および e であつて *C. rob.* と同一であつた。しかしこの両菌種は子嚢胞子形成の有無によつて子嚢胞子形成酵母すなわち *Endomycetaceae* 科と無胞子酵母すなわち *Cryptococcaceae* 科に明らかに区分されている。また一方この両菌種が *yeast phase* には抗原的に同一であることも事実である。故に *S. cerev.* と *C. rob.* とは同一菌種でそのいずれかの菌種は抹殺されるべきものであるが少なくとも現在 *C. rob.* は *C. cerevisiae* と称する方が無難であるまいかと考える。以上の実験成績から土屋等と同じく著者もまた今後 *yeastlike fungi* を分類する場合その菌株の抗原性を確かめる必要があるものと考ええる。

結 論

S. cerev. と *C. rob.* の抗原を *C.* 属の抗原との関連において抗原分析を行つた。この2菌種は子嚢胞子形成の有無という明瞭な相違があるにも拘らず、両者の抗原構造は同一であることが分つた。著者は *yeastlike*

fungi の分類には *Salmonella* 菌属の場合と同様に生物学的性状と共に抗原にもとづく分類がなされなければならないものと考ええる。

本研究を行うにあたり懇篤なる指導と校閲を戴いた恩師土屋順大教授に心から深謝する。なお一方ならぬ援助を戴いた深沢講師および菌株を分与された醸酵研究所長谷川農学士の厚意に深く感謝する。

文 献

- 1) Fineman, B. C.: J. Infect. Dis., 28, 185, 1921.
- 2) Heines, L. E.: J. Infect. Dis., 34, 529, 1924.
- 3) Benham, R. W.: J. Infect. Dis., 49, 183, 1931.
- 4) Almon, L., & Stovall, W. D.: J. Infect. Dis., 55, 12, 1934.
- 5) Rawson, A. J., & Norris, R. F.: Am. J. Clin. path., 17, 807, 1947.
- 6) 土屋: J. Microbiol., 1, 2, 1957.
- 7) 川北: 日本細菌学雑誌, 12, Nr. 2, 1957.
- 8) Diddens, H. A., & Lodder, J.: Die anakosporogenen Hefen. Zeite Hälfte, 1942.
- 9) 深沢: 日本細菌学雑誌, 11, 245, 1956.
- 10) Lodder, J., & Kreger-Van Rij, N. J. W.: The yeaste. A Taxonomic study. 1952.
- 11) 宮崎: 日本細菌学雑誌, 11, 206, 1956.