Candida 細胞破壊桿菌の破壊機序について

秋葉 朝一郎 岩田 和夫 望月 友子

東京大学医学部微生物学教室

〔受付：6月12日 1954年〕

は し が き

筆者等¹⁾²⁾³⁾は汎発性カンジダ症患者の喀痰その他の材料より、Candida 属を分離中、偶々 Sabouraud 寒天培地上に分離された多数の Candida albicans (以下適宜 C.a. と略す)の乳白色集落が室温に放置中にほとんどすべてが赤発してしまつた事実に着目し、この現象を追究した結果、グラム陰性の赤色々素産生桿菌の汚染によること、この菌によつて Candida 細胞は著しく破壊されていること、純培養したこの菌を Candida の純培養に混ぜると、後者の細胞を強力に攻撃し、その細胞内に侵入増殖して、これを破壊後離散し、phage の溶菌現象といわば相似的な破壊現象を呈することを顕微鏡下に確認した。そして本菌株は、分類学的研究の結果、新菌株であることを確認し、Bacterium candidodestruens Akiba et Iwata (以下適宜 B.c. と略す)と命名するに至つた所以を報告した。

本文においては、この Candida 細胞破壊桿菌が、試験管内で Candida 細胞を破壊死滅せしめて行く経過を諸種の観点から定量的に追究し、かつその破壊機序の解明を試みて現在迄にえられた知見を報告する。

実 験

まず Candida 細胞浮游液に B. candidodestruens を加えて混合培養し、後者の前者に対する破壊の結果、Candida 細胞数の減少する度合を集落計算により測定した。

即ち1%ブドウ糖ブイヨン (pH 6.5) に 37°C 24 時間培養せる菌液をそのまま或は希釈したもの 0.5 ml ずつを、同じ組成の培地 5 ml の 10 数本の試験管に加え (毎日1本ずつ菌液を採取するため)、直ちに 37°C 18 時間ブイヨン (pH 6.5) に培養せる攻撃菌を 0.1 ml ずつ添加して、37°C に培養し、直後及び 24 時間毎に 1 ml ずつとり出し、0.5% の食塩水で適当に希釈し、或はほとんど死滅に近いと思われるときには、希釈せずその 1 ml をシャーレ内で、Sabouraud 液状培地で溶解した dihydrostreptomycin 硫酸塩 10,000 r/ml の溶液

1 ml と混合して、約 30 分間放置後、Sabouraud 寒天培地 8 ml を加えて、37°C 48 時間培養後に Candida に対する集落計算を行う方法を一般にとつた。streptomycin 添加により攻撃菌はほとんど 100% 死滅せしめられるが、Candida の方はほとんど全く影響をうけない。これについては、対照たる Candida 単独の培養液を菌数計算する際、混合培養の場合と同様に streptomycin を加えたが、これを加えないで行つた場合の集落数もほとんど全く同様であつた。

1. B. candidodestruens の混合培養による C. albicans の破壊—Proteus vulgaris 及び赤色桿菌伊 1025 株との比較

上述の如く、C. albicans No. 3 株 (B.c. と同時にカンジダ症患者の胆汁より分離) に B.c. を混合し、37°C に培養して Candida 数の消長を追究する一方、対照として、群馬大学の山本教授より分与された赤色々素産生桿菌で、本菌と諸性状のよく類似し、かつ同様に Candida 細胞内に侵入増殖してこれを破壊する伊-1025 株 (下痢患者の糞便より分離されたという) 及びかかる破壊作用を有せぬけれども、酸素呼吸が旺盛で共存すれば何らかの影響を及ぼすと思われる Proteus vulgaris、東大株とを Candida にそれぞれ混合して、破壊の度合を比較した。その結果は図 1 に示す。縦軸は Candida の 1 ml 当りの細胞数の対数を示し、横軸は培養日数を示す。Candida は 4~5 日頃迄は相対的には余り増殖もせず減少もしないが、6~7 日頃より急激に減少して行き、ほとんど完全に死滅してしまう。ある時期がきて急激に Candida 細胞の死滅が一勢に起ることが特徴的である。これは顕微鏡観察により、Candida 細胞が“burst”

AKIBA Tomoichiro, IWATA Kazuo and MOCHIZUKI Tomoko: On the Mechanism of Destruction of Candida albicans by Bacterium candidodestruens. Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, University of Tokyo. — Jap. J. of Bact., 9(10), 895-899, 1954.

第1図 *B. candidodestruens* その他の菌の
C. albicans 破壊作用

する時期と大凡一致している。一方 *Candida* のみの対照は増殖し続け、4～5日で maximum growth に達し、以後10数日間同様の水準を維持する。

伊-1025 株は *B.c.* よりもやゝ破壊の仕方が遅いけれども大体同様の傾向を示す。かゝる *Candida* 破壊作用を有する菌、筆者等の称える“*Candida* destroying organisms”は今後も見出されるであろうことが期待される。他方 *P. vulgaris* は、最初は *Candida* の増殖を抑制しているが、遂には抑え切れなくなり、対照と同様に *Candida* の増殖を許すようになる。

II. *B. candidodestruens* の混合培養による *C. parakrusei* の破壊、

B.c. が *C. albicans* 以外の *Candida* 属各菌株の酵母細胞或は *Saccharomyces* 属の細胞を破壊することは、既に前報²⁾で述べたが、顕微鏡的に破壊状態を追究してみると、菌株によつて破壊の程度或は時間的關係はかなりの相異があることがわかつた。*C. parakrusei*, Duke University 株は、*C. albicans*, No.3 株よりも幾分破壊の程度が著しい傾向が認められたので、両者の破壊の度合を比較してみた。実験条件は上のそれと全く同じである。

図2に示す如く、やはり *C. parakrusei* の方が破壊が早く、顕微鏡的所見と大凡一致している。

III. 攻撃菌の多寡と *Candida* 細胞破壊の程度

以上実験においては、攻撃菌は一樣にブイヨン (pH 6.5) 37°C 18時間培養 0.1 ml が 5.5 ml の *Candida* 浮游液に接種され、即ち *B.c.* の場合、1 ml 当り 2×10^5 個の菌数であつた。攻撃菌の多寡、いゝかえれば

第2図 *B. candidodestruens* の *C. albicans*
並に *C. parakrusei* に対する破壊の比較

Candida 細胞に対する攻撃菌の相対的菌数の多寡が破壊にいかなる差異を生ずるかを検討してみた。即ち両者の組合せを次のようにした。

- 1) *C.a.* (No.3 株) 4.0×10^3 /ml + *B.c.* 2.0×10^3 /ml
- 2) *C.a.* 4.0×10^3 /ml + *B.c.* 2.0×10^5 /ml
- 3) *C.a.* 4.0×10^5 /ml + *B.c.* 2.0×10^5 /ml

その結果は図3に示す如く、攻撃菌の数が大である方が、当然破壊が速に行われた。即ち 1), 2) の如く、*Candida* の数が一定で攻撃菌の数に大小のある場合も、攻撃菌の数が一定で *Candida* 数に大小のある 2), 3) の場合も、或は両方とも菌数が異なるけれども、相対的に

第3図 *B. candidodestruens* 接種の多寡による
C. albicans 破壊の状態

差のある 1), 3) の場合も, いずれにせよ *Candida* 細胞に対する攻撃菌の数の大なる程, 破壊が著しい傾向が認められる。

IV. 培養温度の破壊に及ぼす影響

以上の諸実験はすべて 37°C の孵卵器内で培養された結果であるが, 最初この破壊現象が見出されたのが分離培地を室温に放置していたときであり 25°C でも B.c. の発育は極めてよく, 色素産生も低温の方が良好なので, 低温培養の方がむしろ破壊がより速に行われるのではなからうかとの予想のもとに, 37°C 培養と 25°C 培養とで比較実験した。接種菌量は C.a. 3.5×10^3 /ml, B.c. 2.0×10^7 /ml である。

図 4 に示すように, 37°C 培養に比して 25°C 培養では破壊に要する日数は約 2 倍で, しかも破壊の経過は極めて緩慢であつた。

第 4 図 *B. candidodestruens* の *C. albicans* の破壊に及ぼす培養温度の影響

V. *Candida* 細胞破壊機作の諸要因

上述の諸実験を通して *Candida* 細胞破壊の経過を定量的に証明したのであるが, その破壊現象をもたらす本質的の諸因子について究明を試みることにした。前報²⁾に記載せる如く, B.c. の培養濾液には抗 *Candida* 作用が認められず, 従つてこの現象は一次的には侵入増殖による機械的破壊によると考え, かつ菌体内に産生される色素は, その抽出せられた粗製粉末に相当の抗 *Candida* 作用の認められるところから, 侵入後に *Candida* に対して何程かの破壊作用にあずかるものと推察した。同論文の Fig. 16 にみられるように, B.c. は Ca. の集落の周囲をとりまくと同時に接触した部分より覆つて行き, ついには C.a. 集落全体を完全に包囲してしまう。その状態は V-factor 的の要因によると考える場合もあるが, 若干趣の異なる場合もある。そこでとにかくお互の菌

の影響をしらべるために, B.c. の培養濾液が *Candida* の増殖に及ぼす影響を集落計算により (前回は濁濁度の肉眼的判定によつた) 定量的に検討する一方, *Candida* 培養濾液或はその菌体成分が, B.c. の発育に促進的であるかどうかを同じく集落計算によりしらべてみた。

1) *B. candidodestruens* 培養濾液の *C. albicans* の発育に及ぼす影響

まず 37°C 8 日間ブイヨン (pH 6.5) に培養せる B.c. の Seitz-filter 濾液を Sabouraud 培地 (ブドウ糖 1% pH 6.5) で $5 \times$, $10 \times$, $100 \times$, $1,000 \times$ と希釈し, C.a. No. 3 株を接種後, 37°C に培養して, 8 時間後, 24 時間後の菌数を計算してみると, 表 1 に示す如く, 発育抑制作用は全くなく, むしろ $100 \times$ 位迄は幾分促進的の傾向さえみえる。同様の実験を B.c. の比較的若い培養 (48 時間) について行つてみたが, 結果はほとんど全く同様であつた。

第 1 表 *B. candidodestruens* 培養濾液の *C. albicans* の発育に及ぼす影響

培養時間	$5 \times$	$10 \times$	$100 \times$	$1,000 \times$	対 照
直 後	4.0×10^3	"	"	"	"
6 時間	4.3×10^3	9.6×10^3	7.8×10^3	7.0×10^3	6.1×10^3
24 時間	5.8×10^7	5.3×10^7	6.1×10^7	4.1×10^6	4.6×10^6

註 表中の数値は 1 ml 当りの *C. albicans*, No. 3 株の細胞数。濾液はブイヨン 37°C 8 日間培養

2) *C. albicans* 培養濾液の *B. candidodestruens* の発育に及ぼす影響

Sabouraud 培地 (ブドウ糖 1%) に 37°C 7 日間培養の *C. albicans* No. 3 株濾液を合成培地 ((NH_4)₂ HPO_4 2.0g, KH_2PO_4 1.5g, NaCl 5.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, ブドウ糖 2.0g, 蒸留水 1,000 ml, pH 6.5) で希釈し, 上記と同様に B.c. の増殖に及ぼす影響をみると, 表 2 に示す如く, 対照に比して 8 時間値で $100 \times$ 迄かなり著明な発育促進作用が認められ, $1,000 \times$ でも僅かにその作用があり, 24 時間値でもなおその傾向が認められた。

3) *C. albicans* 菌体浸出液の *B. candidodestruens* の発育に及ぼす影響

次に Sabouraud 寒天培地 (ブドウ糖 3%) に 37°C 3 日間培養せる菌体 2.6 g (wet wt.) を生理食塩水で 3 回洗滌後, 蒸留水 10 ml を加え, 100°C 1 時間加熱浸出し, その Seitz-filter 濾液を上記の合成培地で希釈し, B.c. の発育に及ぼす影響をみると, 表 3 にみる如く, 培養濾液と同様の発育促進性が認められ, かつ培地を加

第 2 表 C. albicans 培養濾液の Bacterium candidodestruens の發育に及ぼす影響

培養時間	原 液	5 ×	10 ×	100 ×	1,000 ×	対 照
直 後	5.8×10^3	"	"	"	"	"
8 時間 後	3.5×10^7	8.5×10^8	5.8×10^8	2.0×10^8	5.8×10^7	2.3×10^6
24 時間 後	4.8×10^8	1.8×10^9	1.5×10^9	1.1×10^9	9.4×10^8	8.7×10^8

註 表中の数値は 1 ml 当りの B. candidodestruens の菌数。

原液は Sabouraud (ブドウ糖 1%) 培地 37°C 7 日間培養濾液。

第 3 表 C. albicans 加熱浸出液の B. candidodestruens の發育に及ぼす影響

培養時間	原 液	5 ×	10 ×	100 ×	1,000 ×	10,000 ×	対 照
直 後	6.1×10^3	"	"	"	"	"	"
8 時 間	3.8×10^7	1.3×10^8	7.5×10^7	4.0×10^7	5.4×10^6	2.9×10^5	2.2×10^5
24 時 間	6.4×10^8	7.3×10^8	8.0×10^8	5.2×10^8	2.9×10^8	3.0×10^8	3.1×10^8

註 表中の数値は 1 ml 当りの B. candidodestruens の菌数。

原液は C. albicans 2.6 g + aq. dest. 10 ml の 100°C 1 時間浸出濾液。

えない原液そのままでも、対照より發育のよいことがわかつた。

かゝる加熱浸出液によらずに、同量の Candida 浮游液を homogenizer で冷却しつゝ完全に菌体を破壊したものの遠心上清液を Seitz-filter で濾過したものについても、加熱浸出液とほとんど同等の發育促進性を示した。従つてそれらの發育促進因子は大部分耐熱性のものと思われる。

これらの実験を通して、B.c. は Candida 細胞内に侵入後、その菌体成分を好適の medium として利用しうることがわかる。

考 察

筆者等はさきに顕微鏡下に追究した Bacterium candidodestruens の Candida 細胞破壊の現象を streptomycin 添加によつて攻撃菌を処理することにより、Candida 細胞を集落計算して、その死滅経過を定量的に実証することによつて裏付けた。

既に Candida 細胞内に侵入しているときでも、実際の Candida の死滅はかなり遅れて起るということが、この方法によつてわかつたのであるが、恐らく Candida 細胞は極めて抵抗力が強く、侵入菌が多数増殖して burst することにより完全な破壊がもたらされるようになってはじめて急激な死滅が起つてくるようである。攻撃菌の接種量が大きである程、完全破壊にいたる時間が短くなるが、その際 Candida 細胞 1 個に対し何個の攻撃菌

が侵襲すればよいかというような関係は認められない。攻撃菌の侵襲状態は極めて不規則であるから。たゞいふことは、攻撃の初期に比較的大量の菌をもつてした方が効果的だということである。B.c. の發育は極めて旺盛で、少量接種した場合も 24 時間以内に大量接種したときと同様に maximum growth に達するのに、どうしてこのような相異が生ずるかはよくわからない。

37°C 培養の方が 25°C 培養よりも破壊が早くかつ著しいということに関しては、培養温度によつて攻撃菌、被攻撃菌の双方或は一方の増殖に影響するのではないかと考へのもとに、それぞれ単独の増殖度合をしらべてみたが、攻撃菌は 37°C と 25°C とで増殖の度合にほとんど差異がなく、被攻撃菌でも 37°C の方が培養初期に 25°C 培養よりも幾分まさっている程度で 24 時間後ではほとんど差異がなく、従つて 37°C 培養の方が相対的に攻撃菌の数が多いということには決してならないし、攻撃菌の運動が 25°C になると特に低下するということもないので、37°C の方が侵襲の activity が強いのか或は侵襲される側の細胞の状態に相異があるのかも しい。

攻撃菌の培養濾液は Candida に対して發育阻止的ではなく、むしろ促進的でさえあり、一方 Candida の菌体内成分並びに菌体外産生物質は攻撃菌の増殖に極めて好適な medium を提供しているわけであるから、さきに述べた如く、攻撃菌の侵入増殖による機械的の破壊とい

うことが本破壊現象の最も主要な要因であると思われる。

攻撃菌の産生する色素は、抗 *Candida* 作用を有するから、破壊に何程かの役割を演ずるかもしれないが（色素産生性を失った菌でもよく侵入増殖し、そこで再び色素を産生しうることがある）、二次的のものにすぎないと考えられる。

培養が古くなると、アルカリ性に傾いてくるが、その pH の変動は *Candida* の発育を阻害する程度ではなく *P. vulgaris* の場合にしても、同様の pH の変化が認められるけれども、上述の如く *Candida* は増殖し続けるので、pH の影響も問題にはならないであろう。

混合培養によつて、特に攻撃菌の発育が旺盛であるために、*Candida* の栄養素の不足をきたすのではないかということは当然考えられるけれども、*P. vulgaris* の如く、極めて旺盛に発育してそれがために一時的に *Candida* の発育を阻止しえても結局は阻止しきれないし、*B.c.* の場合も大体同様であろうから、栄養素の欠乏は特に大きな要因にはならないと思う。ただ *B.c.* の増殖によつて *C.a.* の必須代謝物質、選択的の欠乏が起りうることを考慮して、それらの混合培養濾液（2週間培養）に *Candida* を接種してみたが、相当良好な発育を示した。

B.c. は極めて wild の菌であり、普通の培地に極めてよく増殖し、*Candida*-dependent でないから *Candida* の菌体成分が自らの発育に好適であるとはいへ、何故に特に侵入増殖して行かねばならぬか（すべての菌が侵入するのではないが）、その本質は未だ解明しえない。*Candida* に対して極めて強い親和性を有することは、最初この菌を分離したときがそうであり、一度純培養したつものの *C.a.* No. 3 株がその後再三、斜面培地全体が本菌の汚染によつて赤変した事実に徴してもうなずけるが、その攻撃の活潑なしかし不規則な状態からみて、いわゆる taxis としては説明し難い。

今一つ問題となる事柄は、上述のように本菌の汚染によつて全く包囲されてしまった *Candida* 集落が、鏡検してみると個々の細胞は大多数著しい破壊をうけていな

がらも、一応その外形を保っている場合が多いけれども時折集落の溶解が起つて、その白色の集落が消失し、淡紅色粘稠の半流動状の状態に変化することがある。この際 *Candida* 細胞は無数の *B.c.* によつてほとんど完全に破壊されて残骸となり或は“ghost cells”の状態になつている。かかる状態にもたらずのには、更に別個の強力な因子が加わっていることが考えられるが、現在のところ、かかる集落の溶解を確実にもたらす条件を見出していない。

結 論

著者等は *Candida* 細胞破壊桿菌 *Bacterium Candido-destruens Akiba et Iwata* による *Candida* 細胞破壊の経過を、両者の混合培養液より逐次一定量を採取して、これに streptomycin を加えることにより感受性の攻撃菌を処理し、これに不感性の *Candida* を集落計算する方法によつて、定量的に追究証明した。そしてその際、両菌の多寡や培養温度の差が、破壊にどのような差異を生ずるかを示した。

それとともにこの破壊現象の最も大きな要因が、攻撃菌の侵入増殖による直接的な機械的破壊作用であること、そしてこれは *Candida* 細胞の菌体内成分或は菌体外産生物質が好適な環境を提供することによつて可能であることを示した。攻撃菌の菌体内に産生する赤色々素は抗 *Candida* 性を有するので、*Candida* 細胞内でも何程かの二次的な役割を演ずることも考えられるが、混合培養による pH の変動、栄養素の不足等は、少なくとも直接的の破壊因子ではないと思われる。

Candida 細胞破壊作用を有する 1 菌株伊-1025 株を分與された群馬大学の山本郁夫教授に感謝する。

本研究は糸状菌症研究班の文部省科学研究費の援助のもとに行われたことを附記して謝意を表する。

文 献

- 1) 岩田和夫：日本細菌学雑誌 8, 499~500, 1953.
- 2) 秋葉朝一郎, 岩田和夫：日本細菌学雑誌, 8, 951~960, 1953.
- 3) 秋葉朝一郎, 岩田和夫：日本細菌学雑誌, 9, 1~4, 1954.