

〔原 著〕

Candida albicans の厚膜孢子形成培地の検討

鎌口 有秀, 馬場 久衛, 小松 始,
野崎 善弘, 越前 敏廣

東日本学園大学歯学部口腔細菌学講座
(主任: 馬場 久衛 教授)

A Medium for Reduction of Chlamyospore
Forming Time in *Candida albicans*

Arihide KAMAGUCHI, Hisae BABA, Hazime KOMATSU,
Yoshihiro NOSAKI, and Toshihiro ECHIZEN

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry,
HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY
(Chief : Prof. Hisae BABA)

Abstract

The composition of a medium and condition to reduce chlamyospore forming time in *Candida albicans* were examined. The most suitable composition of a medium and condition in reducing chlamyospore forming time were that the medium contained 30% of corn meal agar and 2 mg per ml of N-acetyl-D-glucosamine with an initial pH of 8.0, and incubation temperature was 25°C. This was designated 0.3CMG agar medium in this paper. On this medium all tested strains of *C. albicans* containing clinically isolated 190 strains formed chlamyospore at the incubation period of 24 hrs, and also germ tubes at 37°C for 3 hrs. This medium is superior to corn meal agar medium, and offers a reliable approach to rapid laboratory differentiation of *C. albicans*.

Key words : *Candida albicans*, chlamyospore, germ tube, initial pH, corn meal

緒 言

ヒトより分離される *Candida* 種は一般には *Candida (C.) albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* および *C. guilliermondii* の 7 種が知られている。なかでも病原性を有するものは *C. albicans* とされている¹⁾。*C. albicans* は表在性, 深在性カンジダ症, 口腔カンジダ症等の oportunistc fungus infection の原因菌であることは周知の事実であり²⁾, compromised host に対してその病原性を発揮することは現在においても大きな問題となっている^{3,4)}。感染症の早期の治療の為に病原体の迅速かつ信頼性のある同定方法が必要となるが, *C. albicans* を同定する際は, 本菌の性状の 1 つである厚膜孢子形成性と germ tube 形成性が重要な key となる¹⁾。厚膜孢子形成培地としては古くから種々の処方が報告されており, 一般的には corn meal 寒天培地⁵⁻²⁶⁾が使用されている。しかし, *C. albicans* における厚膜孢子形成性は菌株間において相違が見られ, corn meal 寒天培地を用いて短時間 (20-24 時間) の培養では厚膜孢子の形成が見られないか, あるいは非常に少ない菌株が存在する。そこで, このような菌株でも短時間の培養で厚膜孢子が形成されるような培地の処方について検討を加え, さらにこの培地での germ tube 形成性についても検討を加えた。

方 法

使用菌株と培養条件: *C. albicans* ATCC 1012, ATCC 1002, Basel A, Basel B, DUKE 1001, FIA 1001, FIA 1003, MTU 12013, 401, 1011, OKABE, OZAWA (計 12 株), skin candidiasis より分離した 86 株, oral candidiasis より分離した 3 株, ヒトの舌背より分離した 101 株, *C. stellatoidea* 1361, 1223, 1027, 427 (計 4 株), *C. tropicalis* ATCC 1003, 1113, 7397,

1112, 403 (計 5 株), *C. pseudotropicalis* 426, 1004, 7494, 1026 (計 4 株), *C. krusei* IFO 1012, 424, 1024 (計 3 株), *C. parapsilosis* 1015, 1025 (計 2 株), *C. guilliermondii* 582 OUT, 1007, 1023 (計 3 株) の計 223 株を使用した。各菌株は 10% スキンミルク溶液にて -80°C で凍結保存したものを融解後サブロー寒天培地 (日水製薬) を用いて 2 回継代後室温で保存した。これを実験実施時に同培地で 37°C で一夜 preculture し供試した。厚膜孢子形成培地と germ tube 形成培地の作製に際しては Table 1 に示した corn meal (CM) 寒天培地の組成を基本とした。この培地の corn meal 濃度を 100% とし, 70%, 30% および 10% に減じた培地, この培地に N-acetylglucosamine (GlcNAc) を 1, 2 および 3 mg/ml 添加した培地, あるいはこの培地の initial pH を 5, 6, 7 および 8 と変えた培地を作製し, 25°C で好氣的に培養しこれら 3 因子の影響を調べた。さらにこの 3 因子に加え培養温度を 22, 25, 28 および 31°C と変えてこれら 4 因子での最適条件を調べるためグレコラテン方格法を用いて 16 通りの培地を作製して検討した。

厚膜孢子, 分芽孢子, 仮性菌糸数の測定方法: Fig. 1 に示すように保存菌株をサブロー寒天培地で 37°C 一夜培養後, 生理食塩水に懸濁し 540 nm における吸光度が約 0.07 になるように調整した。この cell suspension を同一の 2 枚の厚膜孢子形成用培地に 0.05 ml ずつ滴下し, 一方は 37°C で 3 時間, 好気培養し, germ tube 形成細胞数を計測した。また他方は 25°C で 20-24 時間好気培養した。ついでこの寒天培地より菌を掻きとり生理食塩水に懸濁し 540 nm における吸光度が約 0.30 となるように調整した。haemocytometer にてこの cell suspension 中の厚膜孢子, 分芽孢子, および仮性菌糸の各細胞数を算出し, これらの 3 種の合計細胞数に対する % で示した。また, 寒天培地上の厚膜孢子

だけを直接検鏡する場合は25°Cで20-24時間好気培養後、集落上に0.05mlの0.5% methyl blueを滴下し200倍で観察し、5視野の平均値をFig. 1に示すように1+から10+の基準で示した。

Table 1 Composition of corn meal agar medium (CM)

corn meal agar (containing 88.2 % agar)	1.7 g
tween 80	0.3 ml
agar	0.5 g
H ₂ O	100 ml

pH was adjusted to 6.0 with ammonium water

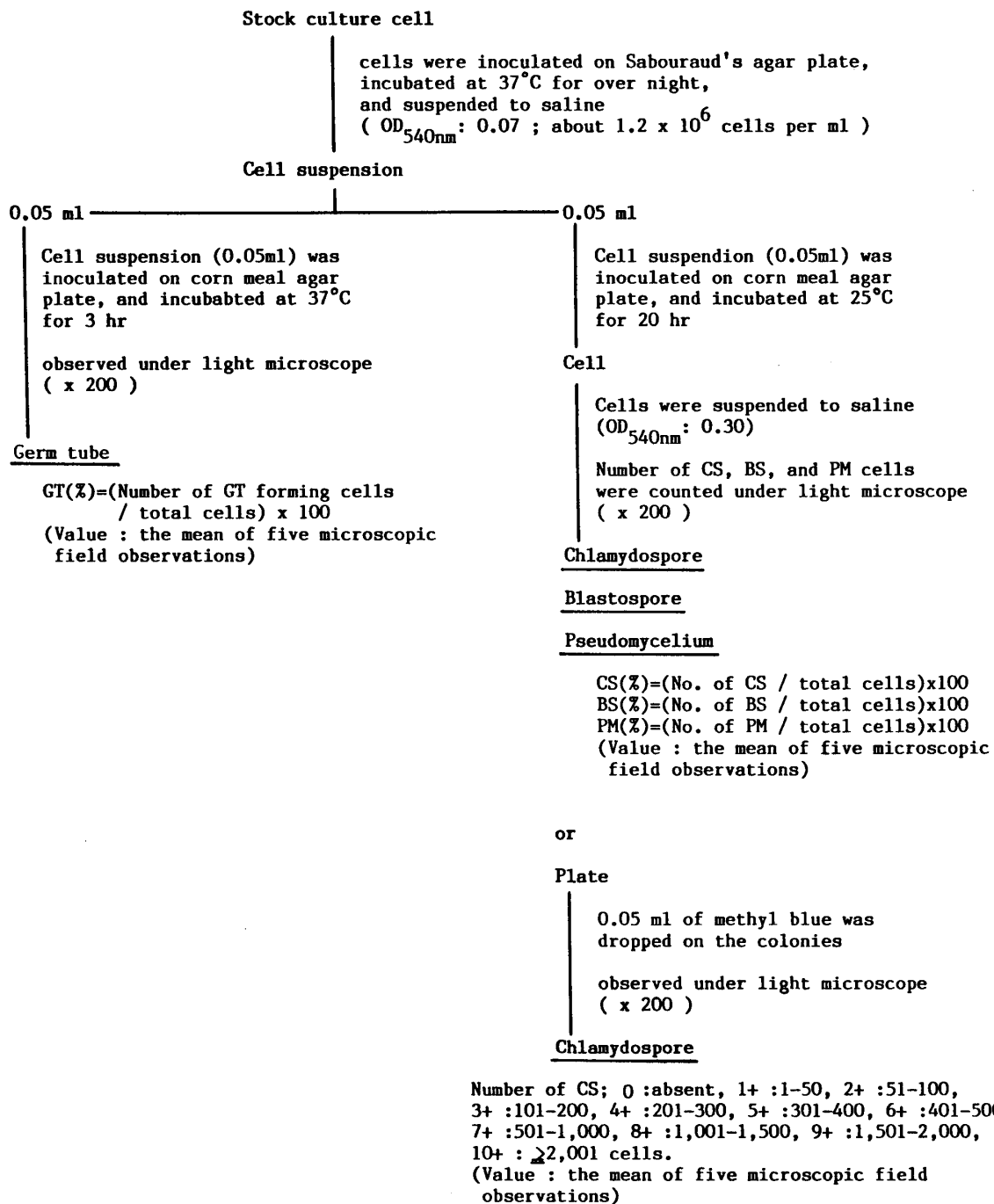


Fig. 1 Procedure for productivity of chlamyospore (CS), blastospore (BS), pseudomycelium (PM), and germ tube (GT) of various Candida species

結 果

1. Initial pH の影響

C. albicans FIA 1001, Basel A, ATCC 1012 および 12S1 を用いて corn meal 寒天培地 (Table 1) の initial pH が *C. albicans* の各細胞形成にどのように影響するかを検討した。厚膜胞子形成性は Basel A, ATCC 1012, 12S1 株では pH を 5 から 6, 7, 8 と上げるにつれて増加し, pH 8 ではこれら 3 株のそれぞれ 3, 15, 30% を示した。FIA 1001 株においては initial pH を上げて厚膜胞子形成は見られなかった。また, initial pH を上げるにしたがい 4 株とも分芽胞子が減少し, 仮性菌糸が増加する傾向が見られた (Fig. 2)。

2. Corn meal 濃度の影響

Corn meal 寒天培地の corn meal 濃度を低くして上記 4 種の *C. albicans* の各細胞形成に

対する影響を調べた。ATCC 1012 と 12S1 の 2 株において corn meal 濃度を 100% から 70%, 30%, および 10% と低下させるにしたがい厚膜胞子形成が上昇する傾向が見られた。しかし, FIA 1001, Basel A においては corn meal 濃度の低下により厚膜胞子の形成は見られなかった。また, corn meal 濃度の低下に従い供試した 4 株ともに分芽胞子は減少し仮性菌糸が増加する傾向が見られた。特に FIA 1001 株において仮性菌糸の著しい増加が見られたがその先端に形成される厚膜胞子の形成は全く見られなかった (Fig. 3)。

3. GlcNAc 添加による影響

Corn meal 寒天培地に GlcNAc を 1, 2, 3 mg/ml 添加し各細胞の形成性を検討した。ATCC 1012, 12S1 株においては GlcNAc の添加量の増加にしたがい厚膜胞子は増加した。しかし FIA 1001 と Basel A の 2 株では GlcNAc

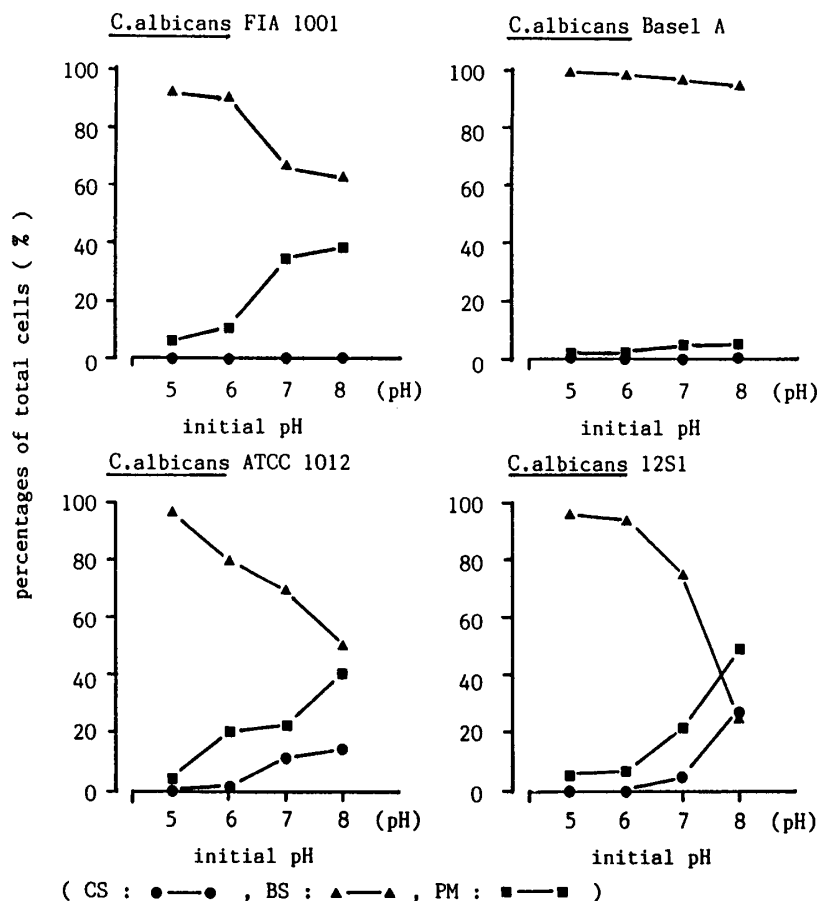


Fig. 2 Effect of initial pH on chlamydospore formation

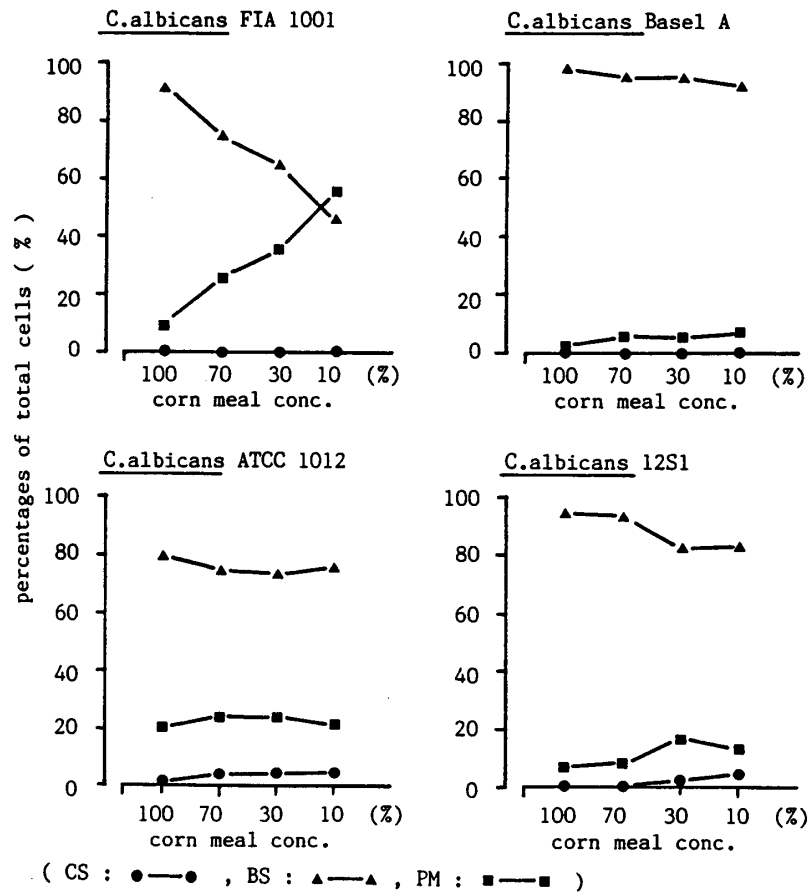


Fig. 3 Effect of the concentration of corn meal on chlamyospore formation

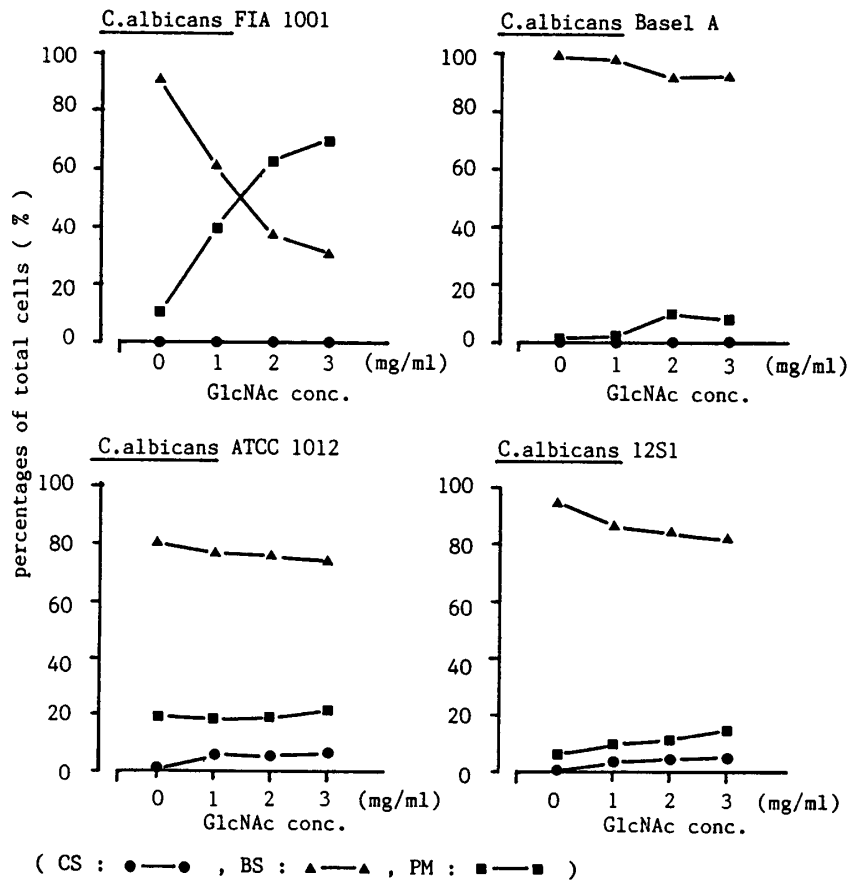


Fig. 4 Effect of the concentration of N-acetylglucosamine on chlamyospore formation

の添加量を増加しても厚膜胞子の形成は見られなかった。また分芽胞子は減少し仮性菌糸が増加傾向を示した (Fig. 4)。

4. Initial pH, corn meal 濃度, GlcNAc, 培養温度の厚膜胞子形成に及ぼす影響

Initial pH, corn meal 濃度, GlcNAc, 培養

Table 2 Effect of N-acetylglucosamine, initial pH, corn meal, and incubation temperature on chlamyospore formation of several *C. albicans* strains

(4^2 Graeco-Latin square)

factor column No	GlcNAc pH corn meal temperature				strain										
	A	B	C	D	FIA 1001	Basel A	ATCC 1012	C12	E						
									E1	E22	12S1	27S1	28S2	112S3	
1	1	1	1	1	1+	0	3+	3+	4+	0	2+	1+	1+	2+	
2	1	2	2	3	1+	0	6+	3+	1+	1+	1+	2+	3+	1+	
3	1	3	3	4	0	0	7+	7+	1+	7+	2+	6+	1+	1+	
4	1	4	4	2	1+	2+	6+	6+	2+	6+	4+	6+	4+	6+	
5	2	1	2	2	1+	1+	7+	4+	6+	5+	6+	7+	6+	6+	
6	2	2	1	4	1+	1+	6+	6+	1+	4+	6+	0	5+	6+	
7	2	3	4	3	1+	1+	7+	6+	2+	6+	6+	8+	6+	8+	
8	2	4	3	1	2+	6+	7+	7+	1+	2+	7+	8+	3+	6+	
9	3	1	3	3	0	0	3+	1+	2+	3+	6+	6+	2+	3+	
10	3	2	4	1	0	2+	3+	1+	2+	6+	5+	6+	4+	6+	
11	3	3	1	2	2+	6+	6+	6+	7+	6+	8+	8+	6+	7+	
12	3	4	2	4	1+	3+	7+	6+	0	6+	5+	6+	6+	7+	
13	4	1	4	4	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	0	
14	4	2	3	2	0	1+	7+	2+	2+	4+	6+	7+	7+	7+	
15	4	3	2	1	1+	3+	6+	6+	6+	3+	10+	10+	8+	10+	
16	4	4	1	3	1+	2+	6+	6+	3+	4+	7+	7+	4+	6+	

A 1: GlcNAc 0 mg/100 ml,
A 2: GlcNAc 200 mg/100 ml,
A 3: GlcNAc 400 mg/100 ml,
A 4: GlcNAc 600 mg/100 ml,

B 1: initial pH 6.0,
B 2: initial pH 7.0,
B 3: initial pH 8.0,
B 4: initial pH 9.0,

C 1: CM 10 %,
C 2: CM 30 %,
C 3: CM 70 %,
C 4: CM 100 %,

D 1: 22°C
D 2: 25°C
D 3: 28°C
D 4: 31°C

Table 3 Analysis of variance

Source	Sum of squares	df	Mean square	F rate	ρ (%)
GlcNAc (A)	68.2	3	22.73	7.54**	4.94
Initial pH (B)	205.2	3	68.40	22.70**	16.37
Corn meal (C)	29.4	3	9.80	3.25*	1.70
Temperature (D)	98.0	3	22.67	10.84**	7.42
Strain (E)	381.8	9	42.42	14.08**	29.60
A x E	94.2	27	3.49		
B x E	94.7	27	3.51		
C x E	63.0	27	2.33		
D x E	85.4	27	3.16		
e	78.5	30	2.62		
T	1198.4	159			
e'[(A-D)xE+e]	415.8	138	3.01		

* : significant at 5 % level
** : significant at 1 % level
 ρ : contribution rate

温度のこれら 4 因子を4²グレコラテン方格法に組みその最適条件を検討した。各々の因子は Table 2 に示したような水準をとり、また欄外には *C. albicans* の菌株を配置した。これらの菌株は corn meal 寒天培地では厚膜胞子を形成しないかまたは非常に形成が悪い10株を選んだ。Table 2 に示したデータは各々の組み合わせの条件における厚膜胞子の形成度合いを 0 から10+の値で示したものである。Table 3 は実験結果の分散分析表である。これより GlcNAc, initial pH, 培養温度, strain の各因子は 1% の危険率で有意であるという結果が得られた。また, 菌株因子を除いた 4 因子の中では initial

pH の寄与率が16.4%と高かった。Fig. 5 は各々の因子の区間推定グラフで, 各菌株間で厚膜胞子の形成性は大きな差異が見られるものの, これより GlcNAc は 2 mg/ml, initial pH は 8.0, corn meal 濃度は30%, 培養温度は25°Cが厚膜胞子形成には最適であることがわかった。これらの結果を基に厚膜胞子形成の最適培地を

Table 4 Composition of 0.3 CMG agar medium (optimum medium)

Corn meal agar	0.5 g
Tween 80	0.3 ml
GlcNAc	200 mg
agar	1.6 g
H ₂ O	100 ml

pH was adjusted to 8.0 with ammonium water

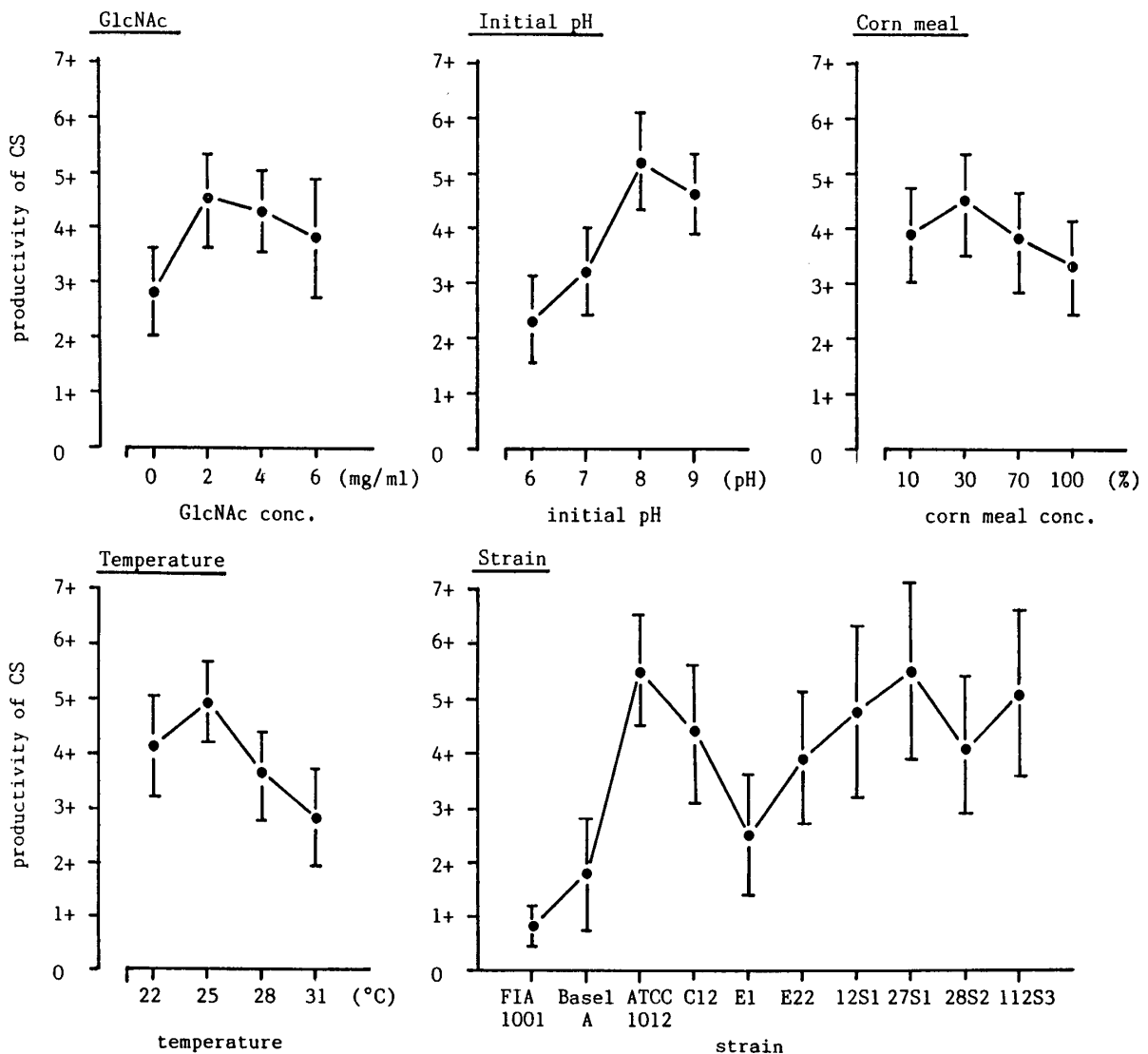


Fig. 5 Interval estimation graphs

試作し0.3CMG寒天培地とし、その組成をTable 4に示した。

5. Corn meal 寒天培地と0.3CMG寒天培地による厚膜孢子形成性とgerm tube形成性の比較

Table 5-1,-2,-3に示したように従来の

Table 5-1 Chlamyospore production and germ tube formation on CM and 0.3 CMG agar plates of various *Candida* species

Strain	Chlamyospore		Germ tube(%)		Strain	Chlamyospore		Germ tube(%)	
	CM	0.3 CMG	CM	0.3 CMG		CM	0.3 CMG	CM	0.3 CMG
(standard strains)					(skin candidiasis)				
<u>C.albicans</u>					<u>C.albicans</u>				
ATCC 1002	0	1+	89.1	87.1	E17	2+	8+	48.7	95.5
ATCC 1012	1+	6+	30.0	96.2	E19	0	2+	33.1	99.1
Basel A	0	6+	45.1	94.4	E20	0	2+	39.5	40.5
Basel B	0	2+	17.4	77.9	E21	7+	10+	30.4	100
Duke 1001	0	1+	0	43.6	E22	2+	8+	13.5	97.0
FIA 1001	0	1+	14.3	96.0	E23	0	8+	13.4	92.6
FIA 1003	0	1+	20.8	36.2	E24	0	9+	32.8	100
MTU 12013	0	1+	1.3	63.3	E25	1+	8+	6.4	97.8
401	1+	1+	0	54.6	E26	0	9+	0	99.0
1011	0	1+	0	21.6	E27	0	9+	1.2	98.8
OKABE	0	7+	74.8	77.8	E30	0	2+	68.0	89.8
OZAWA	7+	9+	7.3	88.3	E31	1+	8+	77.5	92.5
(skin candidiasis)					E32				
<u>C.albicans</u>					E33				
C1	0	4+	16.1	92.8	E36	0	3+	77.2	85.7
C2	0	1+	54.8	87.0	E37	0	7+	71.2	86.8
C3	0	4+	5.9	28.6	E38	0	6+	89.1	93.2
C4	0	3+	2.6	52.9	E39	0	1+	83.8	71.4
C5	0	2+	35.6	89.7	E40	1+	9+	96.4	96.1
C6	0	1+	4.1	75.0	E41	1+	8+	95.3	95.3
C7	0	5+	96.1	96.0	E42	1+	7+	85.7	95.6
C10	0	1+	85.6	86.9	E43	0	8+	65.7	88.2
C11	0	2+	9.2	40.0	E44	0	10+	13.3	98.3
C12	0	7+	55.0	85.8	E47	0	3+	73.8	97.7
C14	0	2+	7.5	56.2	E49	0	7+	25.3	98.6
C15	0	6+	0	86.3	E50	0	2+	24.1	53.6
C16	0	1+	48.1	91.4	E51	1+	4+	3.4	61.3
C17	0	2+	0	85.1	E53	0	2+	67.4	95.7
C25	0	1+	0	53.2	E54	0	4+	87.0	96.0
C26	0	5+	0	56.6	E56	0	4+	90.7	98.3
C27	0	1+	38.4	72.4	E57	1+	6+	33.7	72.0
C28	0	1+	90.8	94.1	E58	2+	7+	12.9	87.8
C29	0	2+	10.9	82.7	E59	3+	8+	22.0	93.2
C30	0	2+	97.3	96.5	E60	1+	8+	77.2	97.1
E1	3+	8+	0	97.2	E61	0	10+	78.0	98.2
E2	1+	8+	62.5	83.8	E62	0	5+	91.4	99.0
E3	2+	7+	0	98.8	E63	5+	9+	83.7	99.6
E8	0	7+	10.7	97.9	E66	3+	8+	58.1	99.2
E9	0	4+	0	85.7	E67	0	5+	84.4	100
E10	2+	8+	24.0	93.7	E69	5+	10+	5.8	97.8
E13	7+	8+	56.3	95.0	E70	0	7+	99.6	100
E14	0	10+	33.3	99.4	E71	2+	10+	59.6	99.7
E15	1+	9+	2.2	98.8	E72	1+	9+	99.4	99.7
E16	9+	9+	0	98.7	E73	3+	10+	73.0	100

*:Number of CS; -:absent, 1+:1-50, 2+:51-100, 3+:101-200, 4+:201-300, 5+:301-400, 6+:401-500, 7+:501-1,000, 8+:1,001-1,500, 9+:1,501-2,000, 10+: \geq 2,001.

** :GT(%)=(Number of GT forming cells / total cells) x 100
(Value was the mean of five microscopic field observations)

corn meal 寒天培地においては培養20時間の培養では厚膜胞子が形成されないか厚膜胞子が形成されても形成度合いは少ない *C. albicans* の菌株が多く見られた。これに対して0.3CMG 寒天培地においては程度の差はあれ供試した202

株の全株において良好な厚膜胞子形成が見られた。また, corn meal 寒天培地と0.3CMG 寒天培地における厚膜胞子形成度合いの平均値は前者においては1.3+であるのに対して後者は6.5+と約5倍0.3CMGの方が優れていた。各

Table 5 - 2 Chlamyospore production and germ tube formation on CM and 0.3 CMG agar plates of various *Candida* species

Strain	Chlamyospore		Germ tube(%)		Strain	Chlamyospore		Germ tube(%)	
	CM	0.3 CMG	CM	0.3 CMG		CM	0.3 CMG	CM	0.3 CMG
(skin candidiasis)					(dorsum lingual)				
<u><i>C. albicans</i></u>					<u><i>C. albicans</i></u>				
E74	0	5+	98.7	98.6	33S1	9+	9+	0	27.1
E75	0	6+	62.7	95.6	33S2	0	2+	35.7	54.1
E76	0	6+	31.9	83.9	33S3	9+	9+	0	90.0
E77	1+	8+	87.7	92.0	36S1	2+	9+	87.2	90.8
E78	2+	7+	0	96.6	36S4	0	6+	72.1	76.0
E79	1+	7+	87.6	90.0	49S1	0	2+	90.2	90.0
E81	5+	6+	92.2	97.4	49S2	0	9+	43.2	98.6
E84	0	5+	88.3	96.4	49S3	0	9+	0	93.3
E85	2+	9+	92.9	96.3	49S4	0	8+	57.6	94.7
E90	0	1+	83.7	78.2	49S5	0	5+	68.3	69.2
E91	2+	9+	94.7	94.9	49S6	0	9+	0	98.0
E93	1+	6+	92.7	87.4	57S1	4+	9+	1.4	88.1
(oral candidiasis)					(dorsum lingual)				
<u><i>C. albicans</i></u>					<u><i>C. albicans</i></u>				
KC98	1+	3+	18.6	80.8	57S2	1+	9+	1.3	78.7
E92	2+	5+	67.7	96.9	58S1	0	7+	18.3	99.2
E106	2+	7+	61.9	89.7	58S2	0	8+	55.8	97.2
2S1	1+	6+	0	97.9	62S3	2+	7+	39.4	98.2
2S2	1+	7+	0	94.4	62S4	1+	4+	14.8	54.2
2S3	0	6+	57.6	88.2	69S1	0	9+	33.3	95.7
2S4	0	6+	16.7	86.5	69S2	0	10+	0	92.1
5S1	1+	4+	16.5	57.8	69S3	0	9+	91.2	95.3
5S2	1+	9+	0	81.6	69S4	0	10+	16.7	98.7
5S3	1+	7+	12.1	93.0	71S1	6+	7+	2.3	95.4
5S4	0	7+	4.2	91.8	71S2	7+	8+	19.8	99.0
12S1	1+	8+	20.0	68.2	71S3	6+	9+	10.8	93.9
12S2	2+	8+	0	97.4	71S4	1+	3+	0	97.1
20S1	0	7+	4.2	40.7	77S1	1+	9+	89.3	93.7
20S2	0	6+	4.7	30.7	77S2	1+	8+	0.5	92.6
20S3	1+	7+	0	70.1	77S3	0	3+	47.6	73.0
20S4	0	6+	14.8	52.4	77S4	1+	7+	83.1	94.4
21S1	0	9+	23.9	98.7	80S1	1+	5+	64.7	85.7
25S1	1+	9+	0	88.9	80S2	0	9+	0.3	100
25S2	4+	10+	0	97.6	80S3	0	7+	22.5	93.6
25S3	0	8+	89.1	97.6	80S4	0	7+	1.2	93.6
27S1	3+	8+	91.5	95.5	88S1	2+	8+	93.9	93.8
27S2	5+	9+	96.7	100	88S2	1+	7+	23.1	97.9
27S3	2+	6+	82.2	93.2	88S3	1+	7+	1.3	84.9
28S1	1+	4+	39.3	96.6	88S4	1+	4+	81.2	90.6
28S2	0	6+	0	44.9	90S1	1+	10+	73.9	96.9
28S3	0	5+	0	95.9	90S2	0	4+	83.9	93.0
28S4	0	4+	83.3	83.3	90S3	1+	10+	0	96.4
					90S4	0	7+	78.0	86.0
					97S1	0	10+	6.1	83.3
					97S21	1+	9+	3.6	91.8
					98S1	1+	9+	4.0	73.3
					98S2	2+	6+	90.1	95.6

因子の個別の影響を調べた際にほとんど厚膜孢子を形成しなかった Basel A や FIA 1001株も 0.3CMG 寒天培地では各々 6+ と 1+ の程度の厚膜孢子形成を示した。その他の *Candida* 種における両培地における厚膜孢子的形成性を見たところ (Table 5-3), *C. stellatoidea* 1027 と 427 の 2 株が 0.3CMG 寒天培地において厚膜孢子を形成したが, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* および *C. guilliermondii* の各菌株においては

厚膜孢子的形成は 0.3CMG 寒天培地においても見られなかった。一方, 両培地における germ tube 形成性を比較したところ, corn meal 寒天培地においては平均 39.3% であるのに対して, 0.3CMG 寒天培地では平均 87.1% と germ tube 形成性においても 0.3CMG の方が約 2 倍強優れていた。その他の *Candida* 種における両培地における germ tube 形成性は *C. stellatoidea* 1361, 1027 および 427 において 0.3CMG で見られた以外, *C. tropicalis*, *C.*

Table 5-3 Chlamydospore production and germ tube formation on CM and 0.3 CMG agar plates of various *Candida* species

Strain	Chlamydospore		Germ tube (%)		Strain	Chlamydospore		Germ tube	
	CM	0.3 CMG	CM	0.3 CMG		CM	0.3 CMG	CM	0.3 CMG
(dorsum lingual)					(standard strains)				
<i>C. albicans</i>					<i>C. stellatoidea</i>				
98S3	1+	7+	85.0	98.7	1361	0	0	0	68.2
98S4	1+	10+	35.6	93.2	1223	0	0	0	0
102S1	4+	8+	0	100	1027	0	2+	14.3	95.8
102S2	2+	8+	47.7	98.4	427	0	7+	87.4	97.4
102S3	6+	8+	20.3	100	<i>C. tropicalis</i>				
104S4	0	7+	47.5	98.3	ATCC 1003	0	0	0	0
104S3	1+	9+	43.6	90.3	1113	0	0	0	0
106S1	2+	7+	77.6	87.3	7397	0	0	0	0
106S2	0	7+	63.8	94.3	1112	0	0	0	0
106S4	0	7+	86.5	83.9	403	0	0	0	0
106S4	3+	6+	62.9	97.0	<i>C. pseudotropicalis</i>				
108S1	2+	9+	0	85.5	426	0	0	0	0
108S2	1+	9+	8.7	99.1	1004	0	0	0	0
108S3	6+	9+	0	97.4	7494	0	0	0	0
108S4	5+	9+	0	97.7	1026	0	0	0	0
109S1	0	9+	32.0	80.5	<i>C. krusei</i>				
110S1	1+	7+	0	96.7	IFO 1012	0	0	0	0
110S2	9+	9+	8.6	91.3	424	0	0	0	0
110S3	1+	7+	0	98.0	1024	0	0	0	0
110S4	2+	8+	0	92.3	<i>C. parapsilosis</i>				
112S1	1+	10+	61.2	99.3	1015	0	0	0	0
112S2	1+	9+	48.8	100	1025	0	0	0	0
112S3	1+	8+	42.5	97.3	<i>C. guilliermondii</i>				
113S1	2+	7+	42.9	88.2	582 OUT	0	0	0	0
113S2	3+	8+	0	93.6	1007	0	0	0	0
116S1	9+	10+	81.6	99.0	1023	0	0	0	0
116S2	6+	9+	92.8	97.2					
116S3	6+	8+	97.2	90.9					
125S2	0	9+	46.3	97.3					
125S3	0	9+	8.7	99.1					
125S4	1+	7+	2.6	91.3					
Mean	1.3	6.5	39.3	87.1					
± S.D.	±2.1	±2.7	±35.3	±16.2					
	P < 0.01		P < 0.01						

Total 202 strains

pseudotropicalis, *C. krusei*, *C. parapsilosis* および *C. guilliermondii* の各菌株においては見られなかった。Fig. 6, 7 は *C. albicans* 12S1 株のそれぞれ corn meal 寒天培地と 0.3CMG 寒天培地における厚膜孢子形成性を示したもので



Fig. 6 Chlamydospore (CS) of *C. albicans* 12S1 on CM agar plate. ($\times 200$)
(Chlamydospores were stained with 0.5% methyl blue.)

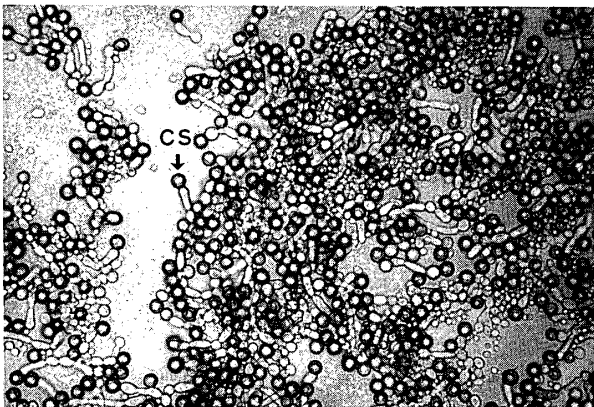


Fig. 7 Chlamydospore (CS) of *C. albicans* 12S1 on 0.3 CMG agar plate. ($\times 200$)
(Chlamydospores were stained with 0.5% methyl blue.)

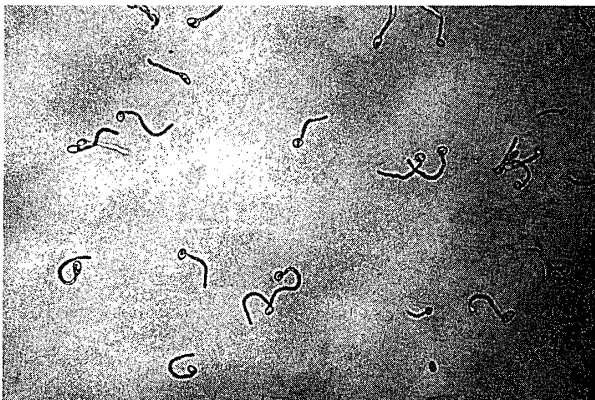


Fig. 8 Germ tube of *C. albicans* 12S1 on 0.3 CMG agar plate. ($\times 200$)

ある。Fig. 6 の corn meal 寒天培地においては、分芽孢子が殆どで、その中にほんの少しの丸いボール状の厚膜孢子が観察されるにすぎないが、Fig. 7 の 0.3CMG 寒天培地においては分芽孢子はほとんど無く多数の厚膜孢子が形成されている。Fig. 8 は同菌株の 0.3CMG 寒天培地における germ tube 形成性を見たものである。ほとんどの細胞より germ tube が伸びているのが観察される。

考 察

Candida 種の同定には主に生化学的性状、血清学的性状および形態学的性状検査とが行われている。生化学的性状検査は主に糖の利用と発酵であるが、*Candida* 種の代謝系は複雑であり、糖発酵などの諸性状は安定を欠くことがある²⁷⁾。また、因子血清による凝集反応においても自発凝集する場合もあり、判定に苦慮する場合が多々ある²⁸⁾。形態学的性状としては厚膜孢子形成性と germ tube 形成性が *C. albicans* と他の *Candida* 種との鑑別に用いられている。厚膜孢子形成性は *C. albicans* の他に *C. stellatoidea* の一部に見られ²²⁾、本研究においても 0.3CMG 寒天培地において 1027 と 427 株とにみられた。しかしながら *C. stellatoidea* が病巣から検出されるのは極めてまれであり、またこの菌株はショ糖からの酸産生性等において容易に鑑別出来る^{29,30)}。したがって厚膜孢子形成を証明できれば、臨床分離株ではほぼ *C. albicans* と推定がつけられる。厚膜孢子を形成させるためには古くから多くの培地や条件が報告されてきた⁵⁻²⁶⁾。しかし、厚膜孢子形成には一般的には比較的長い培養日数 (3-4 日) が必要である。そこで著者らはこれを培養 1 日以内に短縮できるような条件の検討を行った。現在厚膜孢子形成用培地として一般的に使用されている corn meal 寒天培地に tween80 を添加したものを basal medium とした (Table 1)。この basal

medium の initial pH と厚膜胞子形成の関係は pH を上げるに従い仮性菌糸が増加する傾向を示し、それと平行して厚膜胞子形成も増加する傾向が見られた。これは *C. albicans* が pH4.5 以下では酵母形で増殖し、pH6.5 以上では菌糸形になるとの報告とも合致する³¹⁻³³⁾。また、厚膜胞子形成培地としては低栄養の方が良いとの報告があり、本実験においても 100, 70, 30, 10% と corn meal 濃度が低下するほど厚膜胞子の形成性は増加した。Strippoli と Simonetti²⁰⁾ は germ tube 形成血清培地に GlcNAc を添加したところ厚膜胞子形成性にも適したことを報告している。本実験でもこの corn meal 寒天培地に添加したところ添加量の増加とともに厚膜胞子の形成が増加する傾向が見られた。しかしながら、これら initial pH, corn meal 濃度, GlcNAc の 3 因子は各々単独では供試した 4 株のうち ATCC 1012 と 12S1 の 2 株の厚膜胞子形成には非常に効果的であるが、残りの FIA 1001 と Basel A の 2 株には殆ど効果がなかった。そこでこれら 3 因子にさらに培養温度を加えた 4 因子の組み合わせにより培養 20-24 時間で後者の 2 菌株にも厚膜胞子が形成されるような最適条件をグレコラテン方格を用いて検討した。因子の組み合わせ実験の結果において、initial pH が 8 のときが最適であり、寄与率が 4 因子中最大であることを考えると培地の initial pH は厚膜胞子形成にとって重要な因子と思われる。

Jansons と Nickerson³⁴⁾ は厚膜胞子が endogenous な代謝により形成されるので栄養成分は不必要であると報告している。しかし、4 因子の影響を考慮した本実験の結果、より多数の厚膜胞子形成を得るためには 10% よりも 30% の corn meal 添加培地の方が良好であった。このことは、単に endogenous な代謝のみで厚膜胞子が形成されるのではないこと、また他の因子が関連した場合ある程度の栄養を必要とすることを示唆しているものと考えられる。

GlcNAc の添加においては 3 mg/ml より 2 mg/ml の方が厚膜胞子形成性が良好であった。*C. albicans* の germ tube 形成の誘導、つまり酵母形細胞より発芽管を形成し菌形変化の開始点における GlcNAc の役割について最近種々の報告³⁵⁻³⁸⁾がなされているが、その詳細なメカニズムについては明らかにはされていない。しかし、GlcNAc 添加によりアミノ酸代謝の変化、つまり細胞内のアミノ酸量の低下が起こり、このことが菌形変化の開始と何らかの関係があることが示唆されている³⁵⁻³⁸⁾。

培養温度も厚膜胞子形成に大きく関与しており経験的に室温が良いとされている¹⁷⁾。本実験の結果においても 25°C が最適であった。温度も 2 形性の因子であり³⁹⁾、*B. dermatitidis* においては、酵母形形成にあずかる酵素系と菌糸形形成にあずかる酵素系との間で共通基質に対する酵素親和性が温度により調節されていると報告されている³⁹⁾。*B. dermatitidis* は栄養因子とは無関係で温度のみに依存するが³⁹⁾、*C. albicans* をサブロー寒天培地上で 25°C で培養しても仮性菌糸は形成されない。したがって *Candida* 種の場合、温度因子単独ではなく他の因子が関連しているものと思われる。

4 因子を組み合わせで検討した結果より作製した 0.3CMG 寒天培地は、従来の corn meal 寒天培地において 20-24 時間では厚膜胞子がみられない菌株においても良好に厚膜胞子の形成が観察され、本培地は従来の培地に比し厚膜胞子形成にとってより良好な培地であることが統計的にも明かとなった。また、本培地は厚膜胞子形成性を主目的として検討を重ねてきたが、corn meal 寒天培地との比較実験において germ tube 形成培地としても適していることがわかり、*C. albicans* 同定におけるなお一層の有用性が示唆された。

文 献

1. S. Conant and C. Baker : Candidiasis. Manual of clinical mycology third ed., 325-364, W. B. Saunders company, Philadelphia, 1971.
2. A. S. Klainer, and W. R. Beisel : Opportunistic infection. A review, Am. J. Med. Sci., 258 ; 431-456, 1969.
3. 池本秀雄 : Opportunistic infection : 日本臨床, 524 ; 102-106, 1985.
4. 螺良英郎 : Immunocompromised host : 日本臨床, 524 ; 107-112, 1985.
5. R. W. Benham : Certain monilias parasiticon man, J. Infect. Dis., 49 (3) ; 183-215, 1931.
6. D. S. Martin, C. P. Jones and L. E. Lee : A practical classification of the monilias, J. Bacteriol., 34 ; 99-129, 1946.
7. E. A. Jhonson : An improved slide culture technique for the study and identification of pathogenic fungi. J. Bacteriol., 51 ; 689-694, 1946.
8. W. J. Nickerson and Z. Mankowski : A polysaccharide medium of known composition favoring chlamyospore formation in *Candida albicans*, J. Infect. Dis., 92 ; 20-25, 1953.
9. J. D. Reid, M. M. Jones and E. B. Carter : A simple, clear medium for demonstration of chlamyospores of *Candida albicans*, Am. J. Clin. Pathol., 23 ; 938-941, 1953.
10. P. Liu and A. Newton : Rapid chlamyospore formation by *Candida albicans* in a buffered alkaline medium, Am. J. Clin. Pathol., 25 ; 93-97, 1954.
11. 真鍋三郎 : *Candida* に関する研究 1. 厚膜胞子形成のための培地ならびに培養条件に関する研究, 九州歯科学会誌, 12(1) ; 1-10, 1958.
12. 土屋 毅, 佐藤一郎, 志村芳雄 : 厚膜胞子による *Candida albicans* の簡易同定法, 日本医事新報, 1854 ; 11-14, 1954.
13. J. P. Kelly and F. Funigiello : *Candida albicans* ; A study of media designed to promote chlamyospore production, J. Lab. Clin. Med., 53 ; 807-809, 1959.
14. 秋貞泰輔, 徳永純一, 小林美智子, 清水和房 : 平板培地塗抹法による *Candida albicans* の厚膜胞子形成に関する研究, 広島医学, 8(12) ; 7-12, 1960.
15. W. E. Rimington : An investigation into factors affecting chlamyospore production by *Candida albicans*, J. Med. Lab. Technol., 26 ; 382-386, 1969.
16. L. Kapicak, A. Clifford and M. Noik : Room temperature incubation for chlamyospore production by *Candida albicans*, Mycopathol. Mycol. Appl., 37(4) ; 338-344, 1969.
17. K. Halmy : Vergleichende untersuchung der chlamyosporenbildung der *Candida albicans*, Mycol. Appl., 37(4) ; 331-337, 1969.
18. F. Beheshti, A. G. Smith and G. W. Krause : Germ tube and chlamyospore formation by *Candida albicans* on a new medium, J. Clin. Microbiol., 2(4) ; 345-348, 1975.
19. V. Strippoli and N. Simonetti : Specific induction of chlamyospore formation in *Candida albicans* by N-acetyl-D-glucosamine, Experientia, 31(11) ; 130-131, 1975.
20. M. Gunasekaran and W. F. Hughes : A simple medium for isolation and identification of *Candida albicans* directly from clinical specimens, Mycopathologia, 61(3) ; 151-157, 1977.
21. D. C. T. Yong, C. Smitaka, A. Prytula and J. Kane : The comparison of two agar media for germ tube and chlamyospore production by *Candida albicans*, Health. Lab. Sci., 15(4) ; 197-200, 1978.
22. M. Gunasekaran and W. T. Hughes : A simple liquid medium for chlamyospore formation in *Candida albicans*, Mycopathologia, 64(3) ; 143-146, 1978.
23. L. Dujardin, S. Walbaum and J. Biguet : Chlamyosporulation in *Candida albicans* : Influence of sowing density and glucose, nitrogen, biotin and mineral salts concentration in rice-cream decoction. Ann. Microbiol., 129b ; 183-193, 1978.
24. H. L. Muller : Testing of germ tube formation and other cell morphological criteriae of yeasts on a chemical defined medium by Wicherham, Mykosen, 23(11) ; 609-618, 1980.
25. M. Casal and M. J. Linares : The comparison of six media for chlamyospore production by *Candida albicans*. Mycopathologia, 76 ; 125-128, 1981.
26. 土屋 毅, 深沢義村 : *Candida* 属の血清学的分類,

- 臨床病理, 特集7: 1-9, 1959.
28. 猿田隆夫, 仙頭郁子, 伊藤味子: 皮膚カンジダ症から分離されたカンジダ同定と血清学的同定法の比較, 真菌誌, 20: 220-226, 1979.
 29. T. Kamaya: Simple rapid identification of *Candida albicans* with emphasis on the differentiation between *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*, Mycopathol. Mycol. Appl., 35: 107-112, 1967.
 30. H. Saez and S. Andrieu: Mycological comparative study of *Candida stellatoidea* and *C. albicans*, Ann. Parasitol., 54(5): 555-565, 1979.
 31. M. Brummel and D. R. Soll: The temporal regulation of protein synthesis during synchronous bud or mycelium formation in the dimorphic yeast *Candida albicans*, Dev. Biol., 89: 211-224, 1982.
 32. J. Buffo, M. A. Herman and D. R. Soll: A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. Mycopathologia, 85: 21-30, 1984.
 33. R. Finny, C. J. Langtimm and D. R. Soll: The programs of protein synthesis accompanying the establishment of alternative phenotypes in *Candida albicans*, Mycopathologia, 91: 3-15, 1985.
 34. V. K. Jansons and W. J. Nickerson: Induction, Morphogenesis and germination of chlamydospore of *Candida albicans*, J. Bacteriol., 104(2): 910-921, 1970.
 35. A. Torosantucci, L. Angiolella, C. Filesi and A. Cassone: Protein synthesis amino acid pool during yeast-mycelial transition induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*. J. Gen. Microbiol., 130: 3285-3293, 1984.
 36. P. Gopal, P. A. Sullivan and M. G. Shepherd: Enzymes of N-acetyl-D-glucosamine metabolism during germ tube formation in *Candida albicans*, J. Gen. Microbiol. 128: 2319-2326, 1984.
 37. M. G. Shepherd, H. M. Ghazali and P. A. Sullivan: N-Acetyl-D-glucosamine kinase and germ tube formation in *Candida albicans*, Exp. Mycol., 4: 147-159, 1980.
 38. M. G. Sheperd, Y. Y. Chiew, S. P. Ram and P. A. Sullivan: Germ tube induction in *Candida albicans*, Can. J. Microbiol., 26: 21-26, 1980.
 39. 山口英世, 岩田和夫: 真菌細胞の二形性と壁の構造, 蛋白質核酸酵素, 17(8): 588-603, 1972.