

〔原 著〕

*Candida albicans*の厚膜胞子の増殖能に関する研究

今村 光孝, 宮川 博史, 鈴木 裕子*, 鎌口 有秀, 馬場 久衛

北海道医療大学歯学部口腔細菌学講座
*北海道医療大学歯学部口腔解剖学第II講座

(主任: 馬場 久衛教授)
*(主任: 武田 正子教授)

Study on the proliferative ability of chlamydospores of
Candida albicans

Mitsutaka IMAMURA, Hiroshi MIYAKAWA, Yuko SUZUKI*),
Arihide KAMAGUCHI and Hisae BABA

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

*)Department of Oral Anatomy, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

(Chief: Prof. Hisae BABA)
*(Chief: Prof. Masako TAKEDA)

Abstract

Candida albicans is a dimorphic fungus proliferating by budding with oval yeast when cultured with Sabouraud agar medium at 37°C; when cultured with Corn meal agar medium at 25°C or room temperature, it forms pseudohyphae with many blastospores on the connections of each hyphae and chlamydospores on the ends.

Spores of fungi differentiating highly specialized cells generally proliferate for preservation of the species to germinate under optimal conditions. However, much fewer chlamydospores than blastospores are formed on the ends of pseudohyphae and the chlamydospores also have thick cell walls. As a result, chlamydospores are considered to be persistent. However, mature chlamydospores do not show nucleus and mitochondria and are nearly filled by vacuoles and spongoid vacuoles. Therefore it is not certain that chlamydospores possess the functions of spores that their name indicates.

This study compared chlamydospores and blastospores to examine whether chlamydospores possessed proliferative ability and persistence. Blastospores and chlamydospores formed by

受付: 平成10年3月13日

the *C. albicans* 2S2 strain were isolated and preserved in 0.3CMG medium at 6°C. The proliferative ability and persistence of the spores were examined with Sabouraud agar, BHI blood agar, Sabouraud liquid, and BHI liquid media. Further the ultrastructure of each spores was observed with transmission electron microscopy and the chromosomal DNA was analyzed by agarose gel electrophoresis.

The results were as follows:

1. Blastospores and chlamydo-spores were isolated by stir and shake methods from pseudohyphae so the spore functions were not damaged.
2. Blastospores maintained proliferative ability and germinated even after preservation in 0.3CMG medium at 6°C for 96 hours.
3. Some chlamydo-spores preserved for 24 hours germinated and proliferated, but after preservation for 48 hours or longer they did not proliferate and persistence was inferior to that of blastospores.
4. All blastospores formed within 24 hours had nucleus and organelles. However, a large number of chlamydo-spores had no nucleus.
5. There were mitochondria in chlamydo-spores after preservation for 24 hours, after 48 hours there were many spongoid vacuoles, after 72 hours there were only spongoid vacuoles, and after 96 hours there was separation of cell membrane from cell wall.
6. The chromosomal DNA of preserved chlamydo-spores showed more fragmentation of DNA than blastospores at all preservation times.

The results suggested that chlamydo-spores were dying off and had no proliferative ability and were not persistent.

Key words : *Candida albicans*, chlamydo-spore, blastospore, proliferative ability, persistence

緒 言

Candida albicans (以下 *C. albicans*) は、鰐口瘡やカンジダ膣炎や皮膚カンジダ症などを起こし、真菌の中でも病原性の強いもののひとつである¹⁾。また生体内常在真菌として健康人の口腔、咽頭、腸管粘膜、膣などに存在しており通常は無害である^{2,3)}。しかしながら、*C. albicans* は compromised host, いわゆる宿主の抵抗力が減弱した人などに発症する日和見感染症の代表的起因菌でもあり、また近年、白血病、悪性腫瘍などで抗腫瘍剤や免疫抑制剤の投与により生体内微生物叢が変化する時にも菌交代現

象として *Candida* 症は発症する⁴⁻⁸⁾。歯科領域においては、主に有床義歯装着患者に見られる義歯と接触する粘膜面の発赤、腫脹を主訴とする義歯性口内炎の原因菌としても考えられている⁹⁾。

通常、*C. albicans* は 2 形性の真菌で、サブロー寒天培地を用いて 37°C で培養すると、直径 4 ~ 6 μm の球状ないし卵形の酵母状となりその多くは、乳白色のクリーム様の集落を形成し分芽によって増殖する^{10,11)}。一方、コーンミール寒天培地を用いて 25°C ないし室温で培養すると、酵母細胞は発芽管が長く伸びて仮性菌糸を形成し、さらに各菌糸の接合部に多数の分芽胞子を

形成すると共に、菌糸の末端に厚膜胞子を形成するのが本菌の特徴である^{1,10-14)}。

一般に、真菌の胞子は種の保存のために分散し、適当な条件下で発芽して増殖するための高度に特殊な分化をした細胞である^{10,11,15)}。また、厚膜胞子は細菌における芽胞に相当する一種の耐久体ともみなされている^{11,15)}。しかし、*C. albicans*の厚膜胞子は前述のように仮性菌糸の末端に形成され、分芽胞子に比べてその数は少なくかつ厚い細胞壁に覆われており、形成直後の厚膜胞子においては核やミトコンドリアが認められるが、成熟した厚膜胞子においては核やミトコンドリアが見られず、ほとんどが空胞とスポンジ様構造物で満たされている^{1,16-19)}。

そこで本研究においては、*C. albicans*の厚膜胞子が胞子としての重要な機能である増殖能と耐久性を兼ね備えたものであるか否かについて分芽胞子と比較検討した。

材料と方法

1. 使用菌株と培養

使用菌株は当口腔細菌学教室保存の*C. albicans*2S2株を用い、分芽胞子と厚膜胞子形成用培地として0.3CMG液体培地を用いた²⁰⁾。まず、17gのコーンミール寒天培地(Difco)を500mlの純水に懸濁し、60°Cで1時間加温後、濾過し、濾液を8,000rpm、60分間遠心し、その上清を純水で1,000mlにしてCM液体培地を作製した。ついで、このCM液体培地を300ml、Tween80(和光純薬)を30g、N-アセチルグルコサミン(和光純薬)を2gおよび純水700mlを混合溶解し、0.1NのNaOHでpH8.0に調製後滅菌した培地を0.3CMG液体培地とした。

分画した分芽胞子と厚膜胞子の培養にはサプロ液体培地(サプロ寒天培地[日水製薬]より寒天を除去した培地)とBrain Heart Infusion(以下BHI, Difco)液体培地、およびサプロ寒天培地と5%羊脱繊維血液(日本バイオ

テスト研究所)加BHI寒天培地(以下、血液寒天培地)の4種類の培地に接種し、37°Cで48時間好気培養した。*C. albicans*の継代培養には、サプロ寒天培地を用い、37°C、24時間好気培養し、6°Cで保存した。

2. 分芽胞子と厚膜胞子の分画方法

1) 分芽胞子の分画方法

2S2株をサプロ寒天培地で37°Cで24時間前培養し、その1白金耳量を5mlの0.3CMG液体培地に接種し、さらに25°Cで20時間培養した。これを4,000rpmで15分間遠心分離して集菌し、滅菌phosphate buffered saline pH8.0(以下PBS)4mlに懸濁した。ついで、Labo-Mixer(井内盛栄堂)で5分間攪拌した後、さらに振盪培養器(タイテック)で100rpm、5分間振盪し、分芽胞子と厚膜胞子を仮性菌糸より分離した。次に、孔径5 μ mの滅菌メンブレンフィルター(東洋濾紙)で濾過し、さらに300mlの滅菌生理食塩水で3回洗浄した。これまでの過程で濾液中には分芽胞子のみが存在したので、濾液を4,000rpm、15分間遠心分離して分芽胞子を採取した。

2) 厚膜胞子の分画方法

上記のメンブレンフィルター上に残存している厚膜胞子、仮性菌糸および残りの分芽胞子を50mlのPBSに懸濁した後、G3.5のガラスフィルター(孔径7~12 μ m, 岩城硝子)で濾過した。フィルター上の菌体をさらに1,000mlの滅菌生理食塩水で2回洗浄し分芽胞子をほぼ完全に除去した。残存している厚膜胞子と仮性菌糸を50mlの滅菌生理食塩水に再度懸濁し、その2mlを滅菌percol-saline濃度勾配(50, 70, 75, 85および90%)にのせ600rpm、10分間遠心して厚膜胞子層を集め、さらにもう一度同様な操作をして厚膜胞子のみを単離した。

得られた分芽胞子、厚膜胞子の単離の確認は、0.5%メチルブルー/3%酢酸水溶液(以下メチルブルー染色液)で染色し、400倍の顕微鏡下で

hemocytometerを用いて染色性と大きさにより行った。

3) 分芽胞子と厚膜胞子の液体培地と寒天培地での増殖能

単離された分芽胞子と厚膜胞子は、それぞれ0.3CMG液体培地に懸濁し、これを6°Cの冷所で0, 24, 48, 72および96時間保存した。両胞子の増殖能を調べるために、各時間保存した厚膜胞子と分芽胞子をそれぞれ0.3CMG液体培地を用いて400~500個/mlとなるように希釈し、その0.1mlをサブロー液体培地とBHI液体培地およびサブロー寒天培地と血液寒天培地の4種類の培地に接種し、37°Cで48時間好気培養した。各培地における増殖実験を8回行い、液体培地は肉眼で確認し菌の増殖の有無を陽性(+)か陰性(-)で表し、寒天培地は発育した集落数を計測し、平均値と標準偏差で示し、それぞれの発芽による増殖能を調べた。

3. 電子顕微鏡試料の作製と観察

単離した分芽胞子と6°Cの冷所で各時間保存した厚膜胞子の微細構造を、透過型電子顕微鏡(H-7110型、日立)により観察した²¹⁻²³。試料の作製は、分芽胞子および厚膜胞子の懸濁液5mlを遠心して集菌後、蒸留水10mlにて2回洗浄し、これに2%グルタルアルデヒドリン酸緩衝液5ml(pH7.2)を加えて24時間の前固定を行った。固定後、集菌し10mlのリン酸緩衝液(pH7.2)で3回洗浄を行ったのち、これに5%過マンガン酸カリウムリン酸緩衝液(pH7.2)10mlを加えて48時間の後固定を行った。ついで10mlの蒸留水で3回水洗を行い遠心分離した上清が無色になったことを確認し、この沈渣を50, 70, 80, 90, 95および100%濃度のエタノールで各1回15分間ずつの脱水処理を行った。さらに、エタノールとプロピレンオキサイド1:1混合液で15分間、プロピレンオキサイドのみで30分間2回脱水処理を行ったのち、エポン812に包埋し24時間室温に放置して固化した後オープンで

60°C, 48時間加熱処理して試料を作製した。

作製した試料は、ダイヤモンドナイフを用いてULTRATOME(LKB)により薄切後、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色し、微細構造を観察した²⁴。

4. 染色体DNAのアガロースゲル電気泳動

1) 染色体DNAの調製

分芽胞子と24, 48, 72および96時間保存した厚膜胞子を4,000rpm, 15分間遠心して集菌後、それぞれ2白金耳量を直径2mmの滅菌ガラスビーズ2g入りの試験管に移した。次に、この試験管をLabo-Mixerに60秒かけた後、saline-EDTA・Na(0.15N NaCl, 0.01M EDTA・2Naの当量混合液を0.1N NaOHにてpH8.0に調整)とフェノール混合液(フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール, 25:24:1混合液)を各々500 μ lずつ加えた後60秒間Labo-Mixerで混合した。3,000rpmで5分間遠心分離を行い上清をependorf tubeに移し、2倍量のエタノールを加え、室温に5分間放置した後、15,000rpmで3分間遠心分離を行った。その上清を捨て200 μ lのwashing buffer(0.25M NaCl, 50mM Tris-HCl pH8.0)を加えLabo-Mixerにて混合した。さらに500 μ lのエタノールを加え5分間室温においた後、15,000rpmで5分間遠心分離し上清を捨て、沈渣に400 μ lの70%エタノールを加え混合した後、再度15,000rpmで3分間遠心分離し、上清を捨て沈殿を乾燥させて染色体DNAを得た^{25,26}。

2) アガロースゲル電気泳動

得られた染色体DNAは、50~100 μ lの滅菌水に溶解し、その一部を1/10容の0.25%プロモフェノールブルーを含む5%グリセロール試料用色素液と混合し、アガロースゲル電気泳動用試料とした。分子量マーカーとしてはlambda phage DNA/HindIII digest(ニッポンジーン)を使用した。アガロースゲル電気泳動による染色体DNAの解析は、ミューピッド2(コスモバ

イオ)を用いて行った。実効電圧は50V, 泳動時間70分で泳動を行い, 泳動終了後ただちにエチジウムブロマイド液にゲルを浸し, 15~20分間静止状態で放置した後にUVトランスイルミネーター(フナコシ)にて観察した^{27,28)}。

結 果

1. 分芽孢子と厚膜孢子の単離の確認

分離した分芽孢子と厚膜孢子のメチルブルー染色液での染色結果をFig.1に示す。分芽孢子では明確な染色性は見られず, 直径約2~2.5 μm の大きさであった(Fig.1a)。一方, 厚膜孢子はメチルブルー染色液で青色に染色され, 直径約5~12 μm の大きさであり(Fig.1b), それぞれ単離されていることが確認された。

2. 分芽孢子と厚膜孢子の増殖能

単離した分芽孢子と厚膜孢子の増殖能をTable1, Figs.2-6に示す。

分芽孢子はTable1およびFigs.2a-6aに示すように, サブロー寒天培地では0から96時間保存の孢子まで明らかに増殖した。血液寒天培地でも0から96時間保存の孢子まで明らかに増殖

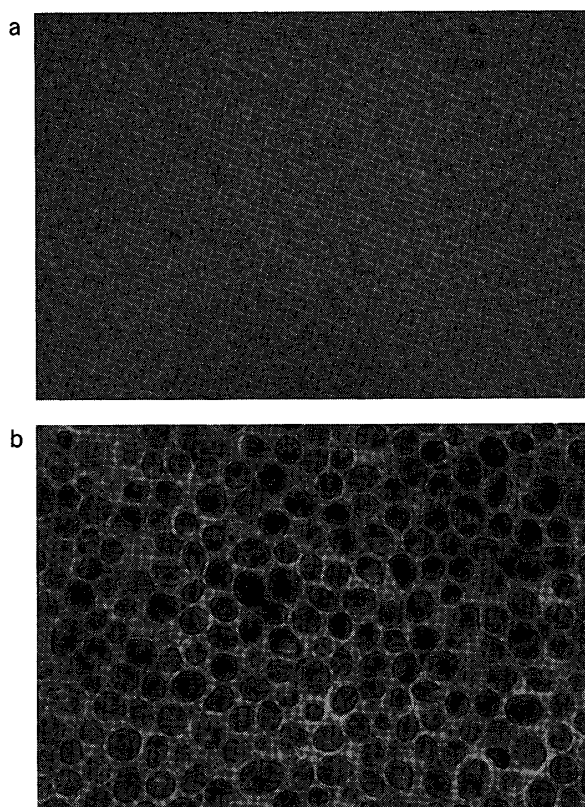


Fig. 1 Light micrographs of blastospores(a) and chlamydospores(b) of *C. albicans* 2S2 isolated from culture fluid (0.3CMG medium). The cells were treated with methyl blue. Blastospores do not stained, while chlamydospores do. $\times 1000$

Table1 Growth of blastospore and chlamydospore

spores	preservation time(h)	agar plate medium(CFU)		liquid medium(+,-)	
		Sabouraud	Blood	Sabouraud	BHI
blastospore	0	47 \pm 4.2	42 \pm 1.4	+	+
	24	53 \pm 2.8	47 \pm 2.4	+	+
	48	53 \pm 3.1	49 \pm 2.4	+	+
	72	49 \pm 2.5	54 \pm 2.1	+	+
	96	57 \pm 2.9	52 \pm 1.6	+	+
chlamydospore	0	22 \pm 0.7	18 \pm 0.7	+	+
	24	19 \pm 1.2	16 \pm 1.9	+	+
	48	N. D.	N. D.	-	-
	72	N. D.	N. D.	-	-
	96	N. D.	N. D.	-	-

n=8

mean \pm standard deviation

CFU: colony forming units; +: growth, -: no growth

BHI: brain heart infusion

N. D.: not detected

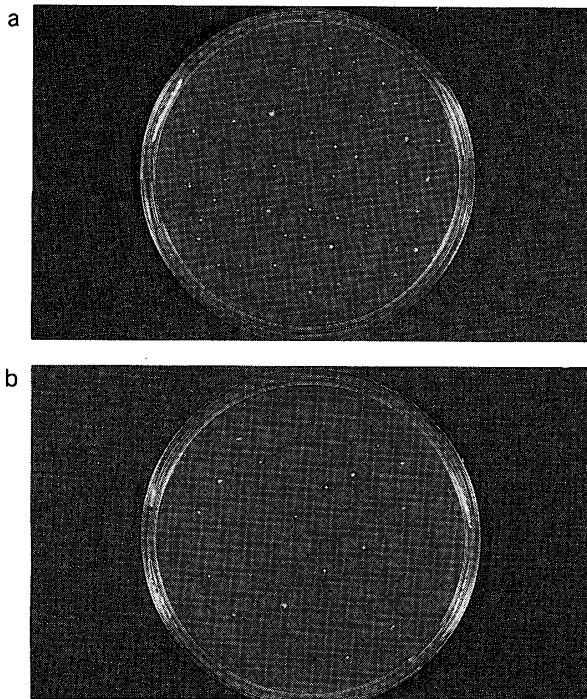


Fig. 2 Multiplication of blastospores(a) and chlamydospores(b) of *C. albicans* 2S2 immediately after isolation from culture fluid(0.3 CMG medium). These cells were incubated on Sabouraud agar medium at 37°C for 48 hours.

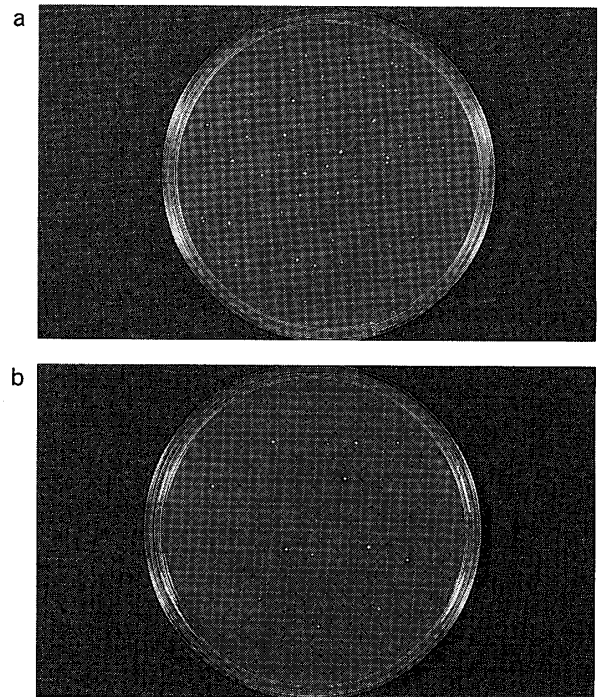


Fig. 3 Multiplication of blastospores(a) and chlamydospores(b) of *C. albicans* 2S2 after preservation at 6°C for 24 hours. These cells were incubated on Sabouraud agar medium at 37°C for 48 hours.

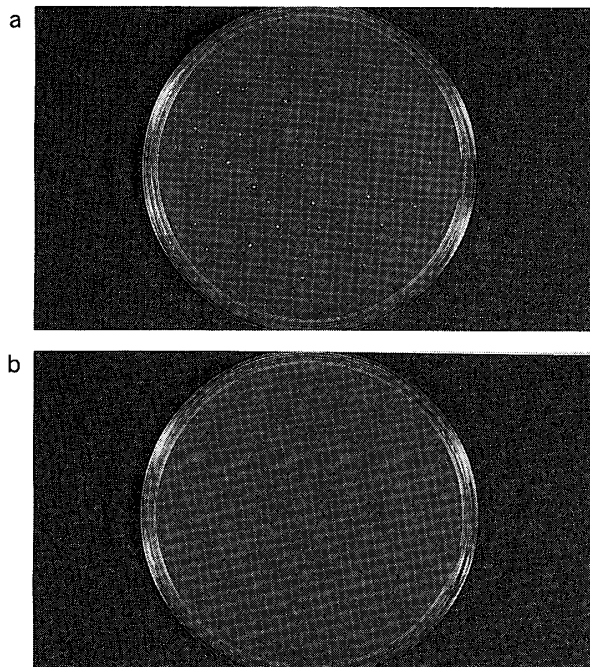


Fig. 4 Multiplication of blastospores(a) and chlamydospores(b) of *C. albicans* 2S2 after preservation at 6°C for 48 hours. These cells were incubated on Sabouraud agar medium at 37°C for 48 hours.

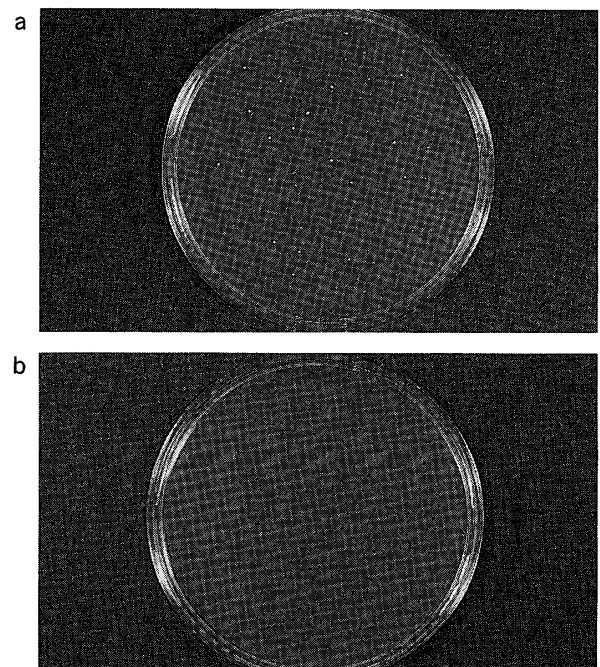


Fig. 5 Multiplication of blastospores(a) and chlamydospores(b) of *C. albicans* 2S2 after preservation at 6°C for 72 hours. These cells were incubated on Sabouraud agar medium at 37°C for 48 hours.

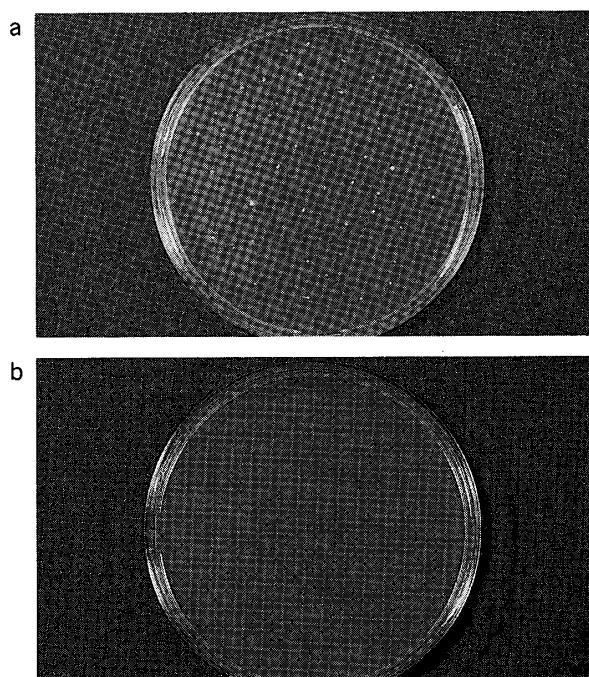


Fig. 6 Multiplication of blastospores(a) and chlamydospores(b) of *C. albicans* 2S2 after preservation at 6°C for 96 hours. These cells were incubated on Sabouraud agar medium at 37°C for 48 hours.

した。さらに、サブローおよびBHI液体培地でも0から96時間保存の胞子は明らかに増殖した。一方、厚膜胞子はTable1およびFigs.2b-6bに示すように、サブロー寒天培地で0および24時間保存の胞子までは明らかに増殖したが、48、72および96時間保存後の厚膜胞子ではFigs.4b-6bに示すように全く増殖しなかった。血液寒天培地でも、0および24時間保存後の胞子までは明らかに増殖したが、48、72および96時間保存後の厚膜胞子では、サブロー寒天培地と同様に全く増殖しなかった。さらに、サブロー液体培地でも0および24時間保存までの厚膜胞子では増殖したが、48、72および96時間保存後の厚膜胞子では、全く増殖しなかった。また、BHI液体培地でもサブロー液体培地と同様に、0および24時間保存までの厚膜胞子では増殖したが、48、72および96時間保存後の厚膜胞子では、全く増殖しなかった。

以上の結果をまとめると、分芽胞子では0、24、48、72および96時間、6°Cに保存しても増殖能は存続したのに対し、厚膜胞子の一部では24時間保存までは増殖したものの、48、72および96時間保存では全く増殖しなかった。

3. 透過型電子顕微鏡による分芽胞子と厚膜胞子の微細構造

分芽胞子と形成24時間以内の厚膜胞子（0時間保存）および24、48、72、96時間保存後の厚膜胞子の微細構造をFigs.7、8に示す。分芽胞子は厚膜胞子より小さく、核やミトコンドリアなどの細胞内小器官が明確に観察された（Fig.7a）。これに対し、形成24時間以内の厚膜胞子（0時間保存）では、少数のもので核やミトコンドリアや空胞が観察されたが（Fig.7c）、ほとんどのものでは明確な核は見られず、ミトコンドリアや空胞が観察された（Fig.7b）。24時間保存後の厚膜胞子では、ミトコンドリアやその他の細胞内小器官が見られたが（Fig.8a）、核が明確に観察されたものは無かった。48時間保存後の厚膜胞子では核やミトコンドリアは全く見られず、スポンジ様構造物と空胞が多く観察された（Fig.8b）。72時間保存後の厚膜胞子では、48時間保存の厚膜胞子同様に核やミトコンドリアなどは観察されず、やはりスポンジ様構造物が多く観察された（Fig.8c）。保存96時間に至ると厚膜胞子には空胞が多く見られ、さらに細胞膜が細胞壁から分離した像が観察された（Fig.8d）。

4. 分芽胞子と厚膜胞子の染色体DNAのアガロースゲル電気泳動像

分芽胞子および24、48、72、96時間保存の厚膜胞子の染色体DNAのアガロースゲル電気泳動像をFig.9に示す。

分芽胞子では、分子量23130bp以上のDNAが最も多く、9416bpのものも多少存在した。一方、24時間保存後の厚膜胞子では、分芽胞子のそれより小さい分子量のDNAになっているものの、23130bp以上のものが多く、それ以下で6557bp

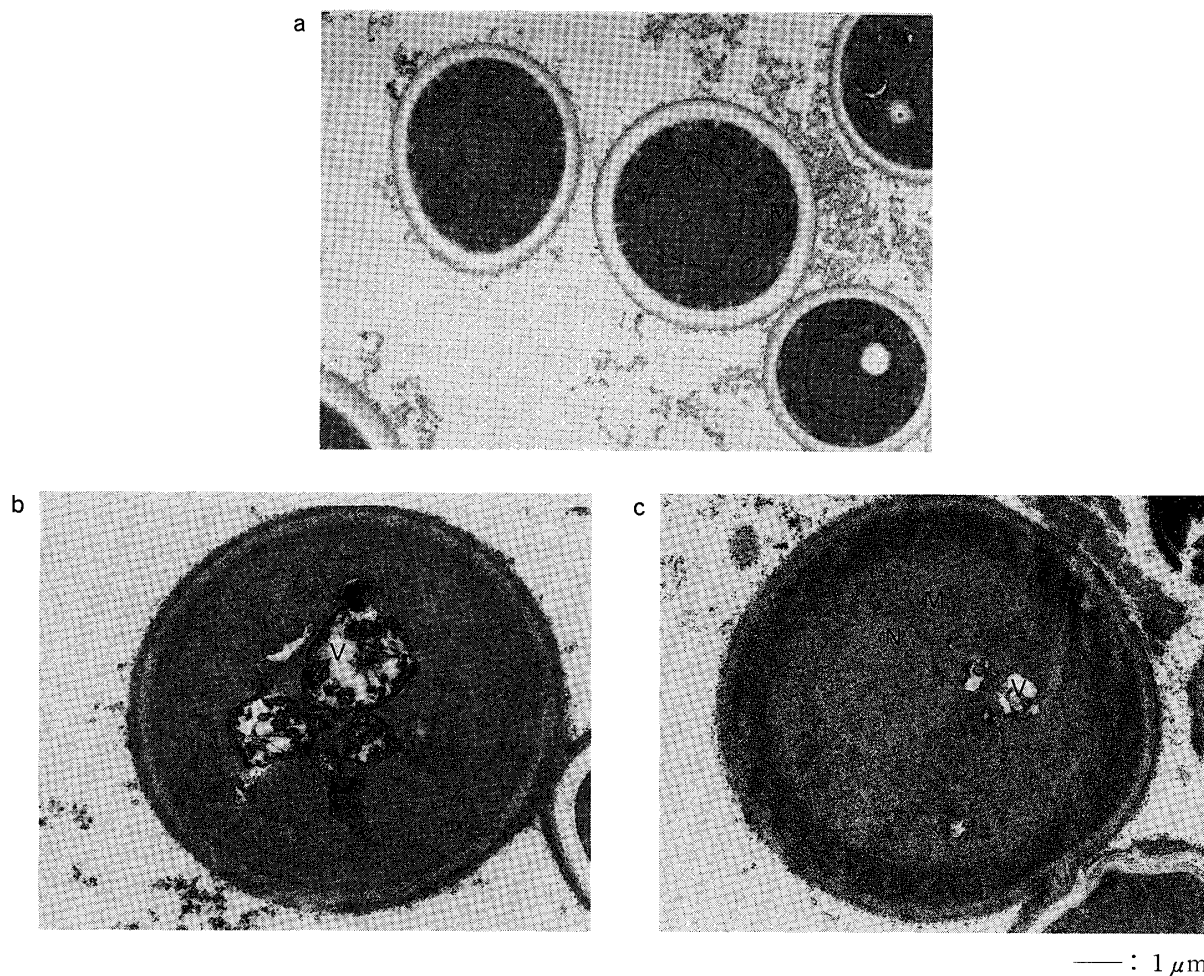
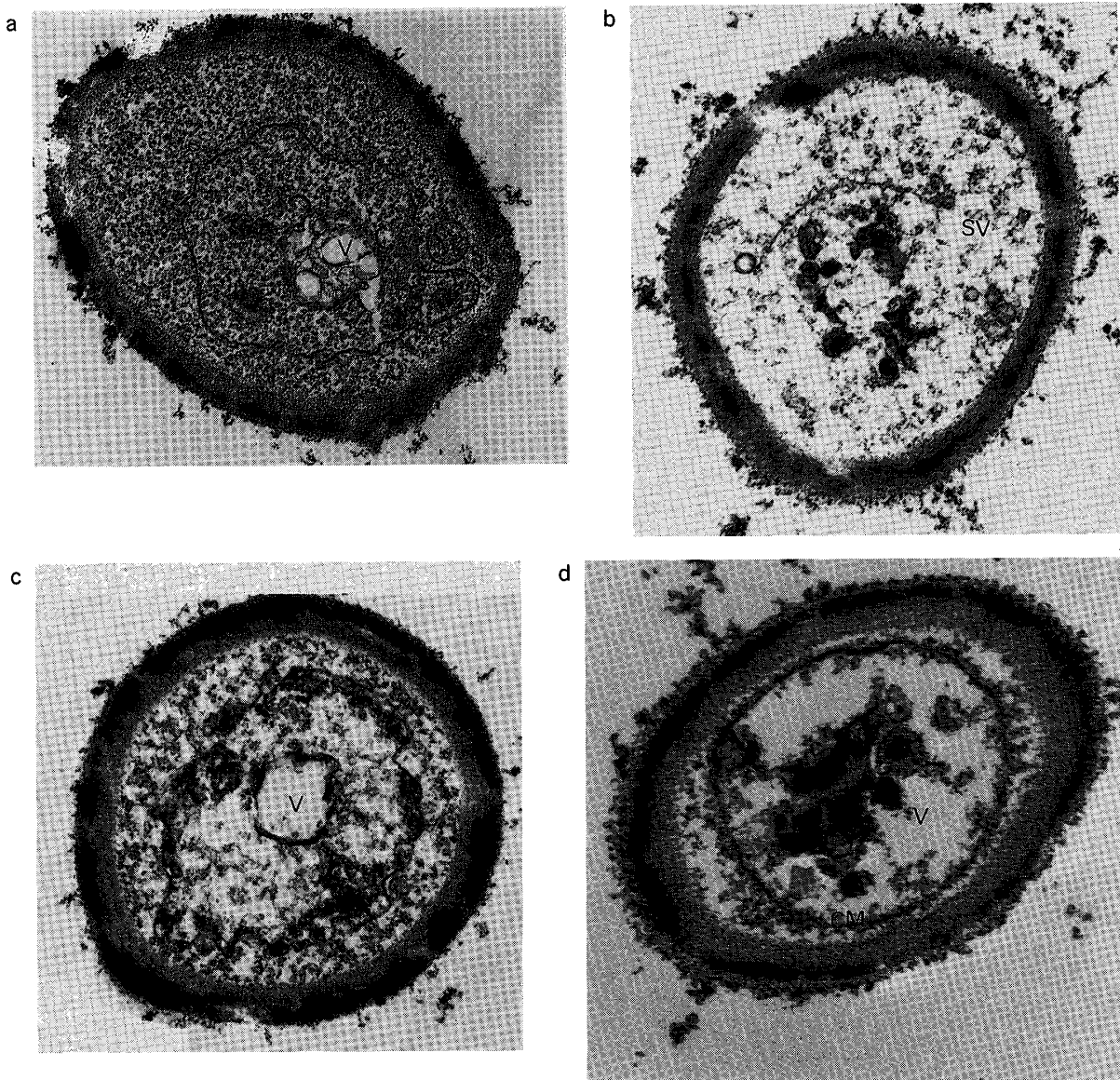


Fig. 7 Electron micrographs of blastospores(a) and chlamydo spores(b,c) of *C. albicans* 2S2 immediately after isolation from culture fluid (0.3 CMG medium). Blastospores(a) contain nucleus(N) and mitochondria(M). Many chlamydo spores(b) contain vacuole(V), and no nucleus. Nucleus(N), mitochondria(M) and vacuole(V) are observed in a few chlamydo spores(c).

以上のものも多少存在した。また、48時間保存後では9416bpから2027bpのものが多く、72時間保存後では564bpの小さな分子量のものも存在し、さらに96時間保存後では125bpという小さ

なもの存在するようになり、保存時間の経過と共にDNA電気泳動像は断片化し、低分子化する傾向が見られた。



— : 1 μm

Fig. 8 Electron micrographs of chlamydospore of *C. albicans* 2S2 after presevation at 6°C. Preservation for 24 hours(a). Mitochondria(M) and vacuole(V) are seen. Preservation for 48 hours(b). There are spongoid vacuoles(SV). Preservation for 72 hours(c). There are vacuoles. Preservation for 96 hours(d). There are vacuoles(V) and separation of cytoplasmic membrane(CM) from the cell wall.

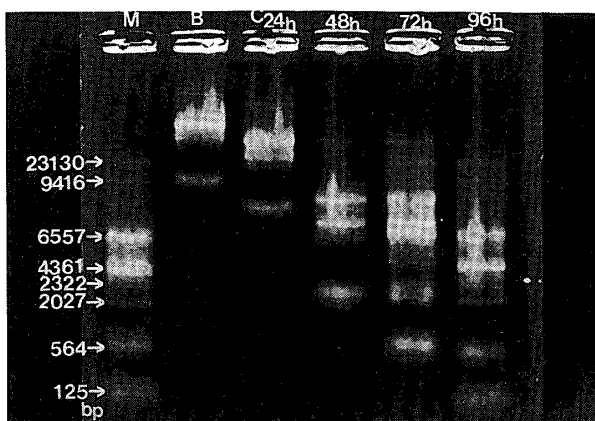


Fig. 9 Agarose gel electrophoresis pattern of DNA of blastospore and chlamydospore. Lane M is the molecular weight marker (Lambda phage DNA/HindIII digest). Lane B is chromosomal DNA prepared from blastospores. Lane C24h, 48h, 72h and 96h are chromosomal DNA prepared from chlamydospores after preservation at 6°C for 24, 48, 72, and 96 hours, respectively.

考 察

C. albicans は日和見感染の代表的なものであり, AIDS患者の約50%でカンジダ性口腔咽頭炎や食道咽頭炎として見られることが報告されている^{7,8)}。一般に, コーンミール寒天培地で25°Cあるいは室温で培養すると, 酵母細胞は発芽し, 細胞が長く伸びてつながり仮性菌糸を形成する。ついで, 各菌糸の接合部に多数の分芽胞子を形成し, ボール状の集団となる。この時, さらに仮性菌糸の末端に厚膜胞子を形成することは古くから知られており, これが*C. albicans*の鑑別の基礎となっている¹⁾。

一般に, 厚膜胞子は厚い細胞壁をもつため, これまで物理化学的因子に抵抗性が強く細菌の芽胞に相当する一種の耐久体とみなされてきた^{11,15)}。しかしながら, *C. albicans*の厚膜胞子は秋貞ら¹⁾が述べているように, 形成直後の厚膜胞子では, 核やミトコンドリアが認められるが, 形成後7日目の成熟した厚膜胞子では, 核やミトコンドリアが見られず, ほとんどが空胞とスポンジ様構造物で満たされている。

そこで本研究では, 厚膜胞子とその名が示すような胞子としての増殖能と耐久性を兼ね備えているかについて, 分芽胞子と対比して種々検討を行った。そのためにまず, 厚膜胞子と分芽胞子を仮性菌糸から分離させ, それぞれを単離する条件を検討した。その結果, Labo-Mixerによる5分間の攪拌と振盪培養器を用いた100 rpm, 5分間の振盪という穏やかな条件で分芽胞子と厚膜胞子とその胞子の機能が損れることなく仮性菌糸から分離されることを見出した。そこで, この攪拌・振盪法により分芽胞子と厚膜胞子を仮性菌糸より分離し, それぞれの胞子の大きさの違いから孔径5 μm の滅菌メンブレンフィルターを用いることにより分芽胞子のみを単離した(Fig.1a)。次に, 仮性菌糸と厚膜胞子の分画は, 比重の違いを利用して,

percol-salineの濃度勾配に2度かけることにより厚膜胞子のみを単離する事ができた(Fig.1 b)。また, 分離した分芽胞子はメチルブルーで染色されなかったが, 厚膜胞子は染色された。この染色性の違いは, 植村²⁹⁾や秋貞ら³⁰⁾が述べているように, 分芽胞子と比較して厚膜胞子はviabilityの低下した細胞である可能性を示唆するものであった。

4種類の培地を用いた増殖能の実験から, 分芽胞子は6°Cで96時間保存してもほぼ完全に発芽・増殖し, その名の通り胞子としての機能である増殖能と耐久性を十分に持つことが示された。一方, 厚膜胞子では, 24時間保存後まではその一部で発芽・増殖が見られた。Jansonsら³¹⁾や徳永ら³²⁾は, 若い(成熟していない)厚膜胞子では発芽が認められるとしており, 24時間保存以内の厚膜胞子の一部では増殖能を維持していると考えられた。また, 電子顕微鏡観察から, 分芽胞子には核や細胞内小器官が明確に存在していたのに対し, 形成24時間以内(0時間保存)の厚膜胞子の一部では, 核の存在が確認されたものの, 24時間保存したものでは, ミトコンドリアやその他の細胞内小器官は見られたが, 核は観察されなかった。このことから, 厚膜胞子は胞子としての増殖能と耐久性の機能が失われつつあることが示唆された。さらに, 48時間保存以後では発芽・増殖する厚膜胞子は全く存在しなかった。電子顕微鏡観察でも, 48時間保存後の厚膜胞子では, 核やミトコンドリアは全く観察されず, ほとんどがスポンジ様構造物と空胞のみで, 72時間保存後でもスポンジ様構造物が多く, 秋貞ら¹⁾の知見と一致した。また, 96時間保存後では空胞が多くみられ, さらに細胞膜が細胞壁から分離した像が観察された。このように24から96時間保存の厚膜胞子の電子顕微鏡像では, まったく核の存在が確認できず, このことは秋貞ら¹⁷⁾やMillerら³³⁾が述べているように, 成熟した厚膜胞子は生存能力が低下した

細胞であるという考えとも一致している。

染色体DNAのアガロースゲル電気泳動像でも、24時間保存後の厚膜胞子は分芽胞子の染色体DNAより低分子化しており、このことと増殖能との関係についてはさらに検討する必要があると考える。さらに、48、72および96時間と保存時間の経過と共にDNAの断片化が進行した。このような*C. albicans*厚膜胞子の染色体DNAの断片化についても、今後さらに検討する必要があると考える。

以上のことから考えて、真核細胞である*C. albicans*の厚膜胞子が胞子の機能である増殖や耐久のための細胞ではなく、死に向かっている細胞であると考えられるが、なぜ、*C. albicans*がそのような細胞を形成するのか、今後さらに詳細な検討を加える必要があると考える。

結 論

*Candida albicans*の厚膜胞子について、胞子としての増殖能と耐久性を調べるために、サブロー寒天培地と血液寒天培地およびサブローとBHI液体培地を用いてその増殖能を分芽胞子と比較検討した。さらに透過型電子顕微鏡にて分芽胞子および0、24、48、72および96時間保存した厚膜胞子の微細構造も観察し、同時にDNAアガロースゲル電気泳動を用いて染色体DNAの解析を行い、以下の結果を得た。

1. 攪拌・振盪法を用いて分芽胞子と厚膜胞子を胞子としての機能を損なうことなく仮性菌糸より分離し、メンブレンフィルターとpercol-saline濃度勾配法を用いてそれぞれを単離した。
2. 分芽胞子は、0.3CMG液体培地で6°C、96時間保存しても発芽し、増殖能は存続した。
3. 厚膜胞子の一部は、24時間保存までは発芽し、増殖したが、48時間保存以後は増殖しなかった。
4. 形成24時間以内の分芽胞子では、全てに核

や細胞内小器官が存在した。しかし、ほとんどの厚膜胞子では核は観察されず、空胞などが見られたが、その一部では核とミトコンドリアと空胞が共存していた。

5. 24時間保存後の厚膜胞子では、ミトコンドリアなどが観察され、48時間保存後はスポンジ様構造物が多く、72時間保存後ではスポンジ様構造物のみで、さらに96時間保存後では細胞膜の分離像が観察された。

6. 24、48、72および96時間保存の厚膜胞子の染色体DNAは、分芽胞子と比較して保存時間の経過と共にDNAの断片化が生じた。

これらのことから考えて、厚膜胞子は増殖や耐久のための細胞ではなく、死に向かっている細胞ではないかと推測された。

謝 辞

稿を終えるに当たり、電子顕微鏡試料作製ならびに観察に関して丁重な御指導をいただきました。新日鉄八幡記念病院原田薫先生に深く感謝致します。

文 献

1. 秋貞泰輔：カンジダ症，口腔細菌学談話会編，歯学微生物学第3版，医歯薬出版，東京，1981，408-413。
2. 山口英世，宮治 誠，西村和子：カンジダ症，病原真菌学，南山堂，東京，1987，235-240。
3. 深沢義村：カンジダ症およびクリプトコックス症における生体防御，宮治 誠，高橋 久，高橋伸也編，真菌症と生体防御機構，協和企画通信，東京，1988，81-92。
4. 発地雅夫：カンジダ，螺良英郎，占部治邦編，真菌の今日的意味，医薬ジャーナル社，大阪，1988，71-77。
5. Crislip, M. A. and Edwards, J. E. Jr.: Candidiasis., *Infect. Dis. Clin. North Amer.*, 3 : 103-133, 1989.
6. Greenfield, R. A.: Host defense system interactions with *Candida*., *J. Med. Vet. Mycol.*, 30 : 89-104, 1992.
7. 奥平雅彦：カンジダ症，奥平雅彦，発地雅夫編，真菌症カラーアトラス，文光堂，東京，1994，76-97。

8. 山口英世：カンジダ症—その病原性, 宿主抵抗性, 易感染因子, 螺良英郎監修, CANDIDIASIS, 協和企画通信, 東京, 1995, 20-26.
9. 松田 登, 藤林孝司：口角糜爛症, 口腔粘膜疾患の診断と治療, 書林, 東京, 1983, 154-155.
10. 中山宏明, 荻原義郷：真菌学総論, 各論, 天児和暢, 南嶋洋一編, 戸田新細菌学第31版, 南山堂, 東京, 1997, 906-922.
11. 鈴木益子, 小熊恵二：真菌学総論, 各論, 東 匡伸, 小熊恵二編, シンプル微生物学第2版, 南江堂, 東京, 1993, 309-336.
12. 原田 薫, 秋貞泰輔：Candida albicansの菌糸型発育に厚膜胞子の発芽様式について, 歯基礎誌, 17：476, 1975.
13. 秋貞泰輔, 原田 薫：Candida albicansの仮性菌糸の厚膜胞子化について, 歯基礎誌, 19：370, 1977.
14. Akisada, T., Harada, K., Niimi, M. and Kamaguchi, A.: Production of contiguously arranged chlamydo spores in *Candida albicans*., *J. Gen. Microbiol.*, 129：2327-2330, 1983.
15. 岩田和夫：真菌, 岩田和夫編, 病原微生物学, 南山堂, 東京, 1982, 493-529.
16. 秋貞泰輔, 原田 薫, 馬場久衛, 鎌口有秀, 衛藤馨：Candida albicans仮性菌糸の厚膜胞子化, 真菌誌, 25：303-311, 1984.
17. 秋貞泰輔, 徳永純一, 小林美知子：酵母様真菌細胞微細構造の電子顕微鏡的研究, 1. *Candida albicans*, *Candida stellatoidea*のchlamydo sporeの微細構造について, 日細菌誌, 21：1-12, 1966.
18. 徳永純一, 徳永美知子, 江頭 威, 原田 薫：真菌細胞の発育過程における微細構造の変化, I. *Candida*属の核分裂とその他の膜系の変化, 日細菌誌, 24：671-675, 1969.
19. 徳永純一, 徳永美知子, 江頭 威：真菌細胞の発育過程における微細構造の変化, II. 細胞壁構築過程における微細構造 (*Candida albicans*および*Candida stellatoidea*について), 日細菌誌, 24：676-682, 1969.
20. Kamaguchi, A., Imamura, M., Miyakawa, H. and Baba, H.: Purification of *Candida albicans* chlamydo spores., *Jpn. J. Oral. Biol.*, 36：676-679, 1994.
21. 徳永純一, 原田 薫, 松本英嗣：走査電子顕微鏡の真菌学への応用, 特に試料調製法について, 真菌誌, 11：49-60, 1970.
22. 徳永純一, 徳永美知子, 江頭 威：真菌類発芽胞子の微細構造, 真菌誌, 11：83-89, 1970.
23. 徳永美知子：真菌細胞壁の微細構造, *Candida albicans*の細胞壁最外層構造を中心に, 電子顕微鏡, 25：167-173, 1990.
24. 永野俊雄, 外山芳郎, 龍岡穂積：薄切法, ポジティブ染色, 永野俊雄監訳, 透過電子顕微鏡生物試料作製ハンドブック, 丸善, 東京, 1990, 103-189.
25. 溝口順三, 堀内義史：遺伝子検出法, 堀尾武一監修, 分子細胞生物学基礎実験法, 南江堂, 東京, 1994, 413-423.
26. 中山広樹, 西方敬人：分子生物学の基本操作, バイオ実験イラストレイテッド, 1. 分子生物実験の基礎, 秀潤社, 東京, 1995, 113-122.
27. 宮沢弥栄子, 小池千加：電気泳動, 田村隆明編, 遺伝子工学実験ノート (上) DNA取扱の基本とサブクローニング, 羊土社, 東京, 1997, 128-145.
28. 大山ハルミ, 下川卓志：アポトーシスの検査法, 判別法, 1. DNAの電気泳動(ラダー検出法), 辻本賀英, 刀祢重信, 山田 武編, 最新アポトーシス実験法, 羊土社, 東京, 1995, 61-67.
29. 植村敏雄：生体染色による*Candida albicans*の生死の判断に関する研究, 阪大医誌, 11：3829-3838, 1959.
30. 秋貞泰輔, 徳永純一, 小林美知子：Candida albicans厚膜胞子の成熟過程における変化性について, 日細菌誌, 19：274-275, 1964.
31. Jansons, V. K. and Nickerson, W. J.: Induction, morphogenesis, and germination of the chlamydo spore of *Candida albicans*., *J. Bacteriol.*, 104：910-921, 1970.
32. 徳永純一, 徳永美知子, 江頭 威：真菌細胞の発育過程における微細構造の変化, III. *Candida stellatoidea*, *Candida albicans*厚膜胞子の発芽能とその微細構造, 日細菌誌, 24：683-389, 1969.
33. Miller, S. E. and Finnerty, W. R.: Age-related physiological studies comparing *Candida albicans* chlamydo spores to yeasts., *Can. J. Microbiol.*, 25：765-772, 1979.