

## 北海道医療大学博士論文の内容および審査の結果要旨（平成9年度）

氏名・(本籍)	今村光孝(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲第52号
学位授与の日付	平成9年9月26日
学位授与の要旨	学位規則第5条第1項該当(課程博士)
学位論文題目	<b>Candida albicansの厚膜胞子の増殖能に関する研究</b>
論文審査委員	主査 教授 馬場久衛 副査 教授 松本仁人 副査 教授 小鷲悠典

## 論文内容の要旨

## 緒言

*Candida albicans* (以下, *C. albicans*) は、鵝口瘡やカンジダ膺炎や皮膚カンジダ症などを起こし、真菌の中で病原性の強いもののひとつである。また生体内常在真菌として、健康人の口腔、咽頭、腸管粘膜などに存在しており通常は無害である。しかしながら、宿主の抵抗性が減弱した compromised host などに発症する日和見感染症の代表的起因菌でもある。

*C. albicans* は2形成の真菌で、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、分芽によって増殖する。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分芽胞子を形成すると共に、仮性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。

一般に、真菌の胞子は種の生存、分散、増殖のために特殊な分化をした細胞であり、適当な条件下で発芽して増殖する。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。

しかし *C. albicans* の厚膜胞子は、分芽胞子に比べて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ほとんど核やミトコンドリアが見られず、空胞とスポンジ様構造物で満たされており、その名のように胞子としての機能を有するかどうかについてははなはだ疑問である。

そこで本研究では、*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、分芽胞子と比較して検討し、興味ある知見を得たのでここに報告する。

## 材料と方法

当口腔細菌学教室保存の *C. albicans* 2S2株を用い、これをサブロー寒天培地で37°C、24時間培養した。その1白金耳量の菌体を5 mlの0.3CMG液体培地(30%コーンミール, 3% Tween80, 0.2% -Nアセチルグルコサミン, pH8.0)に接種し、25°Cで20時間培養して分芽胞子および厚膜胞子を形成させた。遠沈により集菌し、ペレットを滅菌 phosphate buffered saline pH8.0 (以下PBS) 4 mlに懸濁した。次いでこれをLabo-Mixer (イウチ社製)で5分間攪拌したのち、さらに振盪培養器(Incubater BT-21, ヤマト科学KK製)で100rpm, 5分間振盪処理して分芽胞子と厚膜胞子を仮性菌糸より分離させた。ついでこれを、直径5 μmポアサイズの滅菌メンブレンフィルターにかけ、濾過されたものを分芽胞子として採取した。さらにフィルター上に残った菌体を50 mlの滅菌PBSに懸濁し、これをG3.5のグラスフィルター(孔径7~12 μm イワキKK製)で濾過し、フィルター上の菌体を1000 mlの滅菌生理食塩水にて2回洗浄した。これまでの過程でフィルター上の分芽胞子は、ほぼ完全に除去され厚膜胞子と仮性菌糸が残存した。グラスフィルター上の菌体を50 mlの滅菌生理食塩水に懸濁し、その2 mlを滅菌 Percol-saline濃度勾配に2度かけ、厚膜胞子のみを単離した。得

られた厚膜胞子をメチルブルーで染色後、400倍の顕微鏡下でHemocytometerを用いて染色性と大きさによりその単離の確認を行った。

ついで単離された分芽胞子と厚膜胞子をそれぞれ少量の0.3CMG液体培地に懸濁し、これを6°Cの冷所で24、48、72および96時間保存した。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となるように懸濁し、この0.1mlをサブローと血液寒天培地およびサブローとBHI液体培地に接種し、それぞれの増殖性を検討した。

また各時間保存の分芽胞子と厚膜胞子を2%グルタルアルデヒドで前固定し、5%過マンガン酸カリウムにて後固定した。次いでエタノールとプロピレンオキサイドを用いて脱水処理を行った後、これをエポン812に包埋した。ダイヤモンドナイフにて薄切後、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色して透過型電子顕微鏡(H-7110型日立製作所製)にてそれらの微細構造を観察した。さらに、分芽胞子および各時間保存の厚膜胞子からガラスビーズ法により染色体DNAを抽出し、これをアガロースゲル電気泳動にかけ、エチジウムブロマイド染色してDNA泳動パターンを観察した。

### 結果および考察

5分間の攪拌および振盪培養器で100rpm、5分間振盪して仮性菌糸より分芽胞子と厚膜胞子を分離し、さらに、フィルターによる濾過法とPercol-saline濃度勾配法により単離した分芽胞子と厚膜胞子を用いて、それぞれの増殖性と耐久性を検討した。

その結果、分芽胞子は0.3CMG培地で6°C96時間保存しても増殖性は存続した。一方、厚膜胞子は24時間保存までは増殖するものが存在するが、48時間保存以後は増殖しなかった。さらに分芽胞子と各時間保存の厚膜胞子の微細構造を透過型電子顕微鏡で観察した。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オルガネラが明確に観察された。これに対し、形成24時間以内の厚膜胞子(0時間保存)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、ほとんどのものでは明確な核は観察されず、ミトコンドリアや空胞が観察された。24時間保存の厚膜胞子ではミトコンドリアやその他の細胞質内オルガネラ様のものが観察された。しかし、48時間後の厚膜胞子では、スポンジ様構造物が多く、72時間保存後のものでも、スポンジ様構造物が多く観察された。また、96時間保存の厚膜胞子では空胞が多くみられ、さらに原形質膜が分離された像が観察された。分芽胞子と各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でも、24時間保存の厚膜胞子は分芽

胞子のDNAより小さなDNA断片が存在することを示し、48、72および96時間保存のDNA像は、時間の経過と共にDNAの切断がさらに細くなることが示された。

以上のことから考えて、厚膜胞子は増殖や耐久のための細胞でなく、死に向かっている細胞である可能性が高いことが推測された。

### 結 論

*Candida albicans*の分芽胞子と厚膜胞子に関して、胞子としての増殖能と耐久性を調べるために、まず、仮性菌糸から分芽胞子と厚膜胞子をそれぞれ分離する条件を検討した。次いで単離した両胞子を6°Cに一定時間保存すると共に、サブローと血液寒天培地およびサブローとBHI液体培地を用いて単離した両胞子の増殖性を調べた。さらに透過型電子顕微鏡にて、分芽胞子および0時間、24時間、48時間、72時間、96時間保存した厚膜胞子の微細構造も観察し、同時にDNAの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、さらに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することに成功した。
2. 分芽胞子は、0.3CMG液体培地で6°C、96時間保存しても増殖性は存続した。
3. 厚膜胞子は、6°Cに24時間の保存までは増殖するものが存在するが、48時間保存以後は増殖せず、分芽胞子より耐久性が劣った。
4. 形成24時間以内の分芽胞子はすべて核や細胞内オルガネラが存在した。しかし、厚膜胞子ではほとんど明確な核は存在せず、空胞などが存在していたが少数のもので、核やミトコンドリアや空胞が共存するものが存在していた。
5. 24時間保存の厚膜胞子では、ミトコンドリアやその他の細胞質内オルガネラ様のものが観察されたが、48時間保存後はスポンジ様構造物と空胞が多く、72時間保存のものではスポンジ様構造物のみで、さらに96時間保存のものでは原形質膜が分離された像が観察された。
6. 24、48、72および96時間保存の厚膜胞子の染色体DNA像は、分芽胞子と比較して保存時間の経過と共にDNAの切断が多くなる像を示した。

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なく、死に向かっている細胞である可能性が高いことが推測された。

## 学位論文審査の要旨

*Candida albicans*は、2形成の真菌でサブロー寒天培地を用いて37°Cで培養すると、卵形の酵母状となり分芽によって増殖する。一方、コールミール寒天培地を用いて25°Cないし室温で培養すると、仮性菌糸を形成し各菌糸の接合部に多数の分芽胞子を形成すると共に、仮性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。一般に真菌の胞子は種の保存のために分散して増殖するためのもので、高度に特殊な分化をした細胞であり、適当な条件下で発芽して増殖する。しかし厚膜胞子は、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いる。このことから厚膜胞子は、耐性機能を有するものともいわれている。しかしながら、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。したがってこの厚膜胞子は、胞子として名が付けられているが、胞子としての機能を有するかどうかについては、はなはだ疑問である。そこで、本研究では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持つものであるかどうかについて、分芽胞子と比較して検討を加えた。*C. albicans* 2S2株により形成された分芽胞子と厚膜胞子とを単離しそれぞれ6°Cの0.3CMG液体培地に保存し、サブローと血液寒天培地およびサブローとBHI液体培地を用いて、各々の増殖性と耐久性を検討するとともに、透過型電子顕微鏡による微細構造およびDNAアガロースゲル電気泳動による染色体DNAの解析を行い以下の結果を得た。

(1) 攪拌・振盪法により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、それぞれを単離した。

(2) 単離された分芽胞子は、0.3CMG液体培地で6°C、96時間保存しても発芽し増殖性は存続した。

(3) 厚膜胞子は、24時間の保存までは発芽し増殖するものが存在するが、48時間保存以後は増殖せず分芽胞子より耐久性が劣った。

(4) 形成24時間以内の分芽胞子はすべて核や細胞内オルガネラが存在した。しかし厚膜胞子ではほとんどが核は存在せず、空胞等が形成されていたが、少数のものでは核と空胞が共存するものが存在した。

(5) 24時間保存の厚膜胞子では、ミトコンドリアが観察されたが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時間後では原形質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の切断が多くなる像を示した。

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。

以上の結果から、本論文は歯科医学の進歩発展に寄与するところが大きく、審査の結果、学位授与に値すると判定した。