

氏名	なかもと さちこ 中本 幸子
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	乙第199号
学位授与年月日	平成16年 1月 7日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	<i>Candida albicans</i> の鑑別のための新しい厚膜胞子形成培地 (Canary 培地) の検討
学位論文審査委員	(主査) 田中吉紀 (副査) 飯野晃啓 日野茂男

学位論文の内容の要旨

近年、免疫機能の低下した易感染者や基礎疾患を持つ患者の増加によって *Candida albicans* の感染が増加している。*C. albicans* の検出には CHROM agar candida 培地のような分離 colony の色調により菌種を同定できる分離・鑑別培地が開発され、広く使用されている。*C. albicans* の鑑別基準の1つである厚膜胞子形成能を指標とした新しい培地基材を検索しているうちに、canary seed には *C. albicans* に対する特異的な colony の形成と厚膜胞子形成能があることが分かった。本研究では、canary seed から作製された Canary 培地における *C. albicans* の基本的増殖様態と厚膜胞子形成条件の検討を行い、新しい厚膜胞子形成培地として迅速な鑑別が可能であるか否かを検討した。

方法

C. albicans 標準株1株と保存株44株 (*C. albicans* 32株、その他の酵母様真菌12株)を使用した。Canary 培地は5% canary seed 熱抽出(121°C、15分)液を3,500rpm 1分間遠心し、その上清を濾紙で濾過した液に寒天粉末15gを加えて作製した。

平板培地に *C. albicans* を分離的手法により画線培養後、30°Cで好氣的に培養し、経時的に観察した。厚膜胞子の形成については、canary seed の濃度、Tween 80 添加効果および菌の接種方法による影響を検討した。さらに、新しい厚膜胞子形成培地 (改良 Canary 培地) を作製し、*C. albicans* の鑑別培地としての有用性を検討した。

結果

1. *C. albicans* は Canary 培地上で良好な発育が認められた。培養3日目頃より盛り上がった colony 周辺に白濁を生じ、次第に明瞭な二重のリング状に見える colony となった。この孤立 colony の盛り上がった部分は酵母様細胞として発育し、白濁部分は培地中に菌糸として発育したものであり、その菌糸周辺に厚膜胞子が認められた。一方、菌密集部位では培養17時間で短い仮性菌糸周辺に厚膜胞子が形成していた。このように、本 Canary 平板培地では、培養17時間で菌密集部位に、培養3日目以降孤立 colony の周辺部に、それぞれ厚膜胞子が検出された。

2. Canary 培地への Tween 80 添加は厚膜胞子形成を促進した。Canary seed の濃度を変えて厚膜胞子の形成能を検討したところ、至適濃度は 1.25% (canary seed の熱抽出液 4 倍希釈に相当) であった。Canary seed 熱抽出液の 4 倍希釈液に Tween 80 を 1% の割合に加えた培地 (改良 Canary 培地) は *C. albicans* の多くが一夜培養で厚膜胞子を形成し、使用した酵母様真菌 45 株のうち、96% を鑑別できたと同時に、*C. albicans* の確認を可能とした。

3. 菌の接種方法の検討においては、穿刺法では培地の中に豊富な菌糸を、培地表面に多くの厚膜胞子を認めた。一方、ジグザグ塗抹法では 17 時間培養で 100% の厚膜胞子検出率が得られた。

考 察

Canary 培地では *C. albicans* は中心部の酵母様細胞と、周辺部の白濁層 (培地中で菌糸が発育したもの) をもつユニークな二重のリング状に見える孤立 colony を形成し、さらに、この菌糸に厚膜胞子形成が認められた。菌密集部では仮性菌糸を形成するとともに、比較的早い時期に (17 時間) 厚膜胞子が見られた。厚膜胞子形成は培地の表層部で観察されたので、Canary 培地を用いると、好氣的培養でも厚膜胞子の検討が可能であることが分かった。

Canary 培地の canary seed 抽出液濃度を減少すると菌糸発育と厚膜胞子形成が促進され、酵母発育が抑制された。従って、canary seed 抽出液は本菌の形態発育に大きく影響することが分かった。Tween 80 は Corn meal 培地や Rice 培地の菌糸および厚膜胞子形成促進剤として使用されている。この Canary 培地においても同様な効果が認められた。これらの結果から、Canary 培地を 4 倍希釈し、1% の割合に Tween 80 を添加した改良 Canary 培地では、良好な厚膜胞子の形成が得られた。

厚膜胞子形成に常用されている Corn meal 培地が微嫌氣的培養に適している点で、そして、Staib らの niger seed を用いた培地では *C. dubliniensis* が厚膜胞子を形成するが、*C. albicans* はこれがないという点で、それぞれ Canary 培地の厚膜胞子形成能と違っていると考えられる。

結 論

Canary seed の熱抽出液中には *C. albicans* に厚膜胞子の形成を誘導する物質が含まれていることを示した。これに Tween 80 を加えた改良 Canary 培地は *C. albicans* の厚膜胞子形成の確認培地として有用であると考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、canary seed から熱抽出して作製された Canary 培地が、*C. albicans* の厚膜胞子の形成に有効であることを示したものである。本培地では *C. albicans* は酵母様細胞とともに菌糸と厚膜胞子の形成を示した。菌糸ならびに厚膜胞子の形成は canary seed を 1.25% (W/V) に調整し、Tween 80 を 1% の割合で加えた時に著明に認められた。本論文の内容は、厚膜胞子の形成を目指した新しい Canary 培地が *C. albicans* の確認培地として有用なものであることを示しており、明らかに学術水準を高めたものと認められる。