

# Candida 分離株の酵素的性状

## 第 1 編

### グルコース代謝について

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

寺 坂 隆

〔昭和 39 年 4 月 15 日受稿〕

#### I 緒 言

*Candida* が鷲口瘡病原体として知られて以来臨床的、細菌学的に種々研究されているが、最近に至り抗生物質が各種細菌感染症の治療に盛んに用いられるにつれ交代菌症としての *Candida* 症が注目されるようになった<sup>1,12)</sup>。

*Candida* に関しては真菌学的研究、免疫学的検討についての報告は数多いが<sup>13-18)</sup> 酵素学的研究については少いようである<sup>19-26)</sup>。

当教室に於ては各種病原体の酵素的性状に関して種々検討を行つて居り、*Candida* についても標準株を用いた基礎的研究を報告している<sup>27)</sup> が、微生物の酵素的性状が環境に大きく支配されることは周知の通りであり、従つて *Candida* に於ても動物体 (患者) より分離直後の菌株と、人工培地に長期間継代を重ねた保存株とでは酵素的性状に何らかの差異があることは容易に予想される。

この分離株の人工培地に継代された菌株とは異つた代謝様式は、菌が動物体という環境にある際の自衛上最も適したものであると想像され、更に病原性ということ、直接関連をもつた代謝様式であるとも推定される。

筆者はこのような観点から *Candida* 症と診断された患者より分離した *C. albicans* 2 株を供試菌とし、標準株と対比しつつその酵素的性状、特にグルコースの酸化分解能について検討することとした。

本篇に於ては各菌株の好氣的、並びに嫌氣的条件下での発育に対する数種 C 源の影響及び発育途次の C 源の分解に於ける量的関係について検討した。

#### II 実験材料及び実験方法

供試菌株:

標準株: 当教室で継代保存している *C. albicans*

標準株を比較対照として使用した。

分離株: 下記症例のうち症例 1 の患者材料より分離した *C. albicans* を分離株 No. 1 とし、症例 2 よりのもを分離株 No. 2 とした。

症例 1 — 55 才の男子で胸部 X 線像に於て右肺上葉に非硬化多房空洞の結核性陰影があり、S. M. 1g 週 2 回、PAS 10g 連日、INH 0.4g 連日投与をつづけ、1 年後菌陰性化し、X 線像は硬化多房空洞に変化し、喀痰を Sabouraud 培地に培養して *Candida* 特有のコロニーを発見し、染色的、形態的、並びにグルコース、マルトースでのガス発生、サッカロース分解性などの点から *C. albicans* と同定した。又凝集反応も 200 倍以上を示した。

尚この患者は右肺上葉切除後血痰持続し、その喀痰中にも *C. albicans* を認めたが、トリコマイシン及び感光色素 NK91 の注射で血痰は去つた。

症例 2 — 32 才の女子で咽頭痛、発赤を認め感冒と診断して治療を行つていたが、関節痛、高熱、悪寒戦りつあり、多発性関節リウマチの疑いでコチゾン投与し、解熱したが尚関節痛はあつた。間もなく 39°C の発熱をみ、入院して精密検査の結果敗血症と診断し、TC., EM., CM. などを使用したが発熱せず。プレドニンを投与した所逆に発熱し、PC. 多量療法も反応しなかつた。そこで尿、喀痰、血液の検索を行い、何れからも *Candida* を分離し得たが、本実験に供したものは血液からのものであり、Sabouraud 培地で白色クリーム状に隆起したコロニーを呈し、形態、糖類分解能等より *C. albicans* と同定し、マウスの腹腔内接種によりその毒力を確認した。又本分離株は患者血清と 80 倍の凝集反応を示した。

液体培地に於ける発育の実験:

基礎培地: ペプトン

10g

食塩	5 g
第一磷酸カリ	0.5g
第二磷酸ソーダ	2.5g
水	1 l

PH 7.0 とする

上記基礎培地に C 源としてグルコース、クエン酸、サク酸、乳酸などを必要に応じて M/50 となるように加えた液体培地を用い、グルコースを M/50 となるように加えた普通寒天平板培地に培養した供試各菌株を、生理的食塩水に浮游したのから接種して 25°C で培養した。

発育度の測定は一定時間毎にその一部をとり光電比濁計により、比濁しあらかじめ作成した標準曲線に従って菌量を算出して行つた。

生菌浮游液の調製：グルコースを M/50 となるように加えた普通寒天を平板培地で 25°C, 20 時間培養した供試菌を集菌後 M/50 磷酸緩衝液 (0.85% NaCl 加, PH 7.0) を以て 2 回洗滌してから同一組成の緩衝液に湿菌量 15 mg/cc となるよう浮游した。

O<sub>2</sub> 消費量の測定：ワールブルグ検圧計を用いる常法<sup>23)</sup> に従つた。基質はすべて市販品を水に溶解し PH を修正してから使用した。

又容器内容は次の通りである。

主室……	}	菌液	2.0cc (湿菌量 30 mg/cup)
		緩衝液	0.7cc
側室……		基質 (M/10)	0.3cc
		計	3.0cc

グルコースの定量：3.5-ヂニトロサルチル酸を用いる比色法<sup>24)</sup> によつた。

焦性ブドウ酸の定量：2.4-ヂニトロフェニルヒドラゼンを用いる比色法<sup>25)</sup> によつた。

乳酸の定量：P-ヒドロキシヂフェニルを用いる比色法<sup>26)</sup> によつた。

サク酸の定量：試料溶液を硫酸々性として水蒸気蒸溜に付し、溜出液を 10<sup>-2</sup>M NaOH を以て滴定した。

エチルアルコールの定量：試料溶液に CO<sub>2</sub> ガスを通じアルコールを溜出せしめ、溜出液を重クロム酸硫酸混液中に導き、重クロム酸の還元を測定する方法<sup>27)</sup> によつた。

### III 実験成績

#### 1. 各種 C 源を添加した培地に於ける菌の発育度

供試菌 *C. albicans* 標準株、及び患者よりの分離株 No. 1, No. 2 の酵素的性状を比較するに当たり、その最初的手段として種々な条件下での発育度を比較することとした。

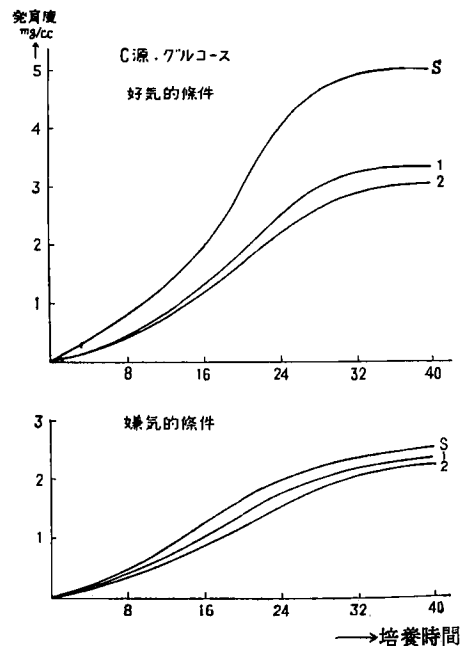
先づ実験方法の項に記した組成の基礎培地に C 源としてグルコースを M/50 の濃度となるように加えた液体培地を作り、これに各供試菌株の生理食塩水浮游液 (10mg/cc) を 2 白金耳づつ夫々に接種し、好氣的及び嫌氣的条件下で 25°C に静置して培養し、4 時間毎にその一部を取り出して菌の発育度を比濁計により測定して発育曲線を作成した。

好気培養では空気との接觸をよくするため、1 l 容コルベンに 200cc の培地を入れて培養し、嫌気培養では 200cc 容コルベンに 200cc の培地を入れ接種してから真空デシケーターに収め、気層を窒素で置換して培養した。

結果は第 1 図の如くであり、好氣的条件下では各菌共 8 時間目頃から発育曲線は立ち上つて log phase となり、28 時間目頃から stationary phase に入るものと見做される。而して標準株は分離株より発育は旺盛であり、分離株 No. 1, No. 2 間には有意の差異は存在しなかつた。

又嫌氣的条件下では一般に好氣的条件下に於けるより発育は不良となり 8~12 時間目頃より log phase に入るが、それ以後の発育も遅々として居り 32~36 時

第 1 図 各菌の発育曲線



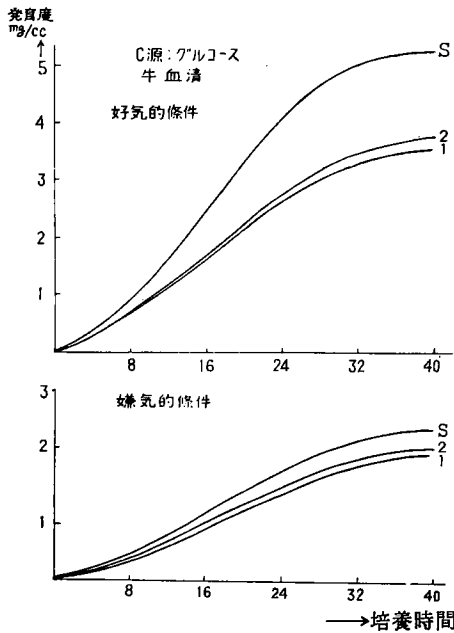
S: 標準株, 1: 分離株 No. 1, 2: 分離株 No. 2

間頃より stationary phase に入るものと見做される、而して嫌氣的にすることによる發育の低下は標準株に於て最も著しく、分離株では影響はやや少い傾向が認められた、

各菌の好氣的、嫌氣的条件に於ける發育度の差異は以上の如くであるが、次にこれらの菌の發育に特に影響を及ぼすような因子があるか否か、又これらの菌株間に發育促進因子に差異があるか否かについて検討した。即ち培地への添加物質として牛血清、牛肝臓エキス、酵母エキスの3種を選び、これらを加えた培地について上と同様にして好氣的、及び嫌氣的条件に於ける發育曲線を作成した、

先づ基礎培地にグルコースを M/50 となるように加え、更に牛血清を3%となるように加えた培地を用いた結果は第2図の如くであり、好氣的、嫌氣的条件下共に各菌の發育は血清無添加の場合(第1図)と有意の差異はなかつた、

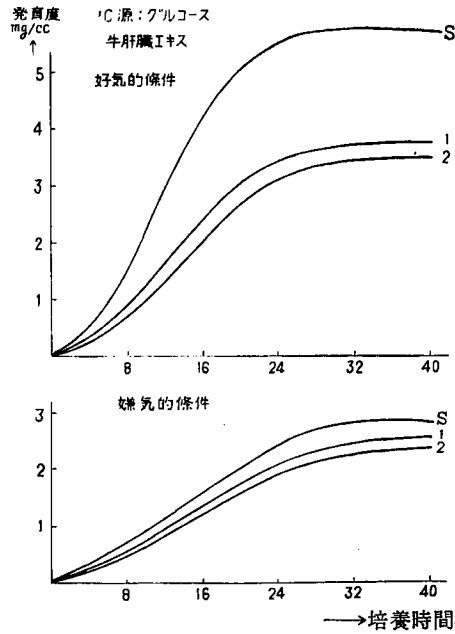
第2図 各菌の發育曲線



S: 標準株, 1: 分離株No. 1, 2: 分離株No. 2

次に牛肝臓エキス添加培地について見た。即ちグルコース添加培地 100cc に対して牛肝臓 10g 分のエキスを加えた培地に菌を接種し上と同様にして發育曲線を作つた。結果は第3図の通りであり、各菌共一様に發育は促進され發育曲線の立ち上りは牛肝臓エキス無添加の場合より早くなる傾向が認められたが各供試菌間にはその影響の差異は見られなかつた、

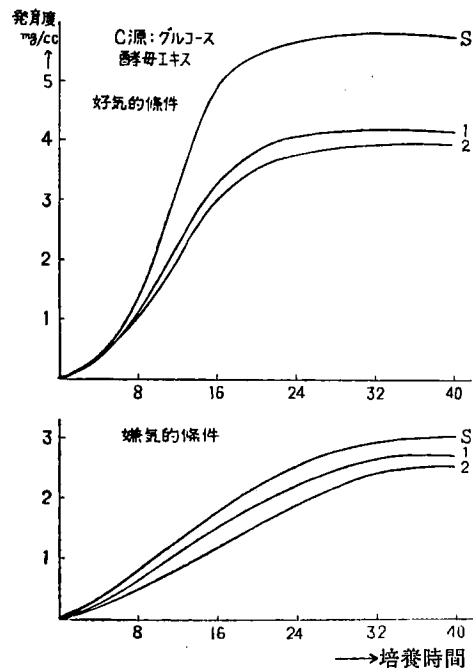
第3図 各菌株の發育曲線



S: 標準株, 1: 分離株No. 1, 2: 分離株No. 2

又酵母エキスを 1mg/cc の割合で添加した培地に於ては第4図の通りであり、牛肝臓エキス添加培地の場合と同様、各菌共發育は促進されたが、その影響は各菌間に差異は認められなかつた、

第4図 各菌株の發育曲線



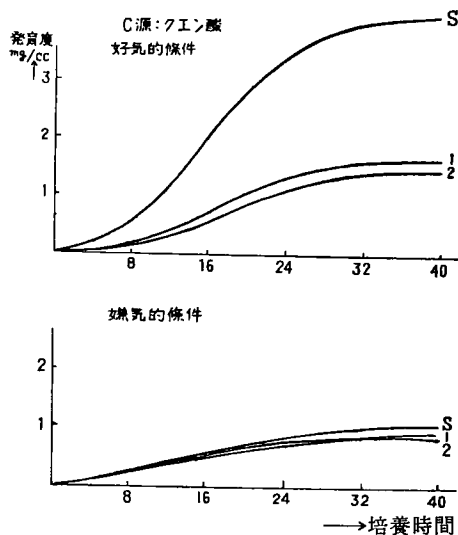
S: 標準株, 1: 分離株No. 1, 2: 分離株No. 2

以上の如く肝臓エキス、酵母エキス中には供試菌の発育を促進する因子が存在することを知ったが、この促進作用は各菌に共通であり、菌株間の酵素的性状の差異を知る手掛りとはならなかつた。従つて今後の実験ではこれらを添加することはしなかつた。

次に前記基礎培地にC源としてグルコースの代わりにクエン酸を M/50 となるように加えた培地を作成し前実験と全く同様にして発育曲線を記録した。

結果は第5図に示す如くであり、好氣的条件に於てはグルコースをC源とした場合(第1図)に比較すると一般に発育は不良であるが、これら供試菌のうちでは標準株が最も発育良好であり、分離株 No. 1, No. 2 ではこれに比しはるかに不良であつた。

第5図 各菌株の発育曲線



S: 標準株, 1: 分離株No. 1, 2: 分離株No. 2

又嫌氣的条件に於ては各菌株共発育は極めて不良であつた。

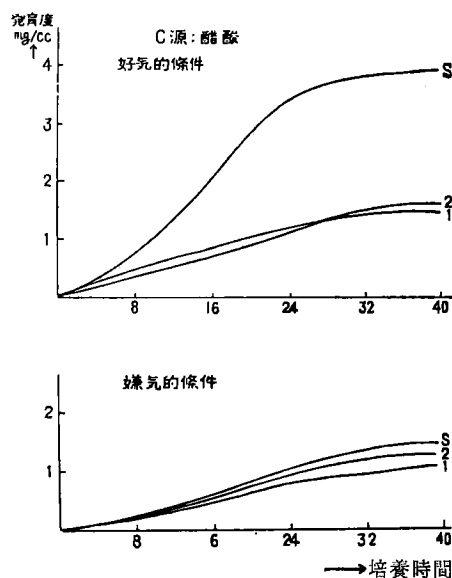
サク酸をC源とした培地に於ては第6図の如くであり、上述のクエン酸をC源とした場合とほぼ同様であり、好氣的条件下ではグルコース添加培地に比すると発育は一般に不良であり、特に分離株は No. 1, No. 2 共に標準株に比して不良であつた。而して嫌氣的条件に於ては標準株分離株共に極めて不良であつた。

又乳酸をC源とした培地では第7図の如く、上述の各培地に比するとやや発育は悪く、特に嫌氣的条件下では不良であつた。

## 2. 発育途次のC源の分解産物

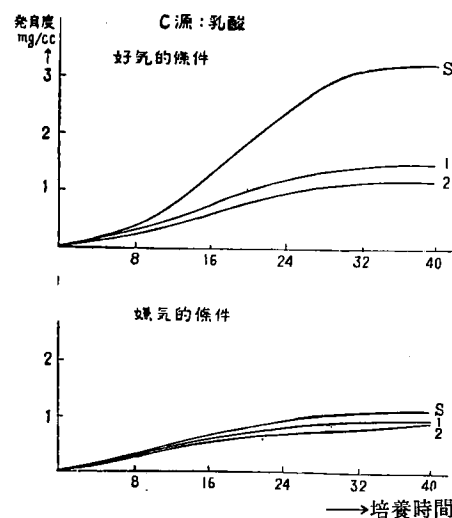
次に上記基礎培地にグルコース、クエン酸、サク

第6図 各菌株の発育曲線



S: 標準株, 1: 分離株No. 1, 2: 分離株No. 2

第7図 各菌株の発育曲線



S: 標準株, 1: 分離株No. 1, 2: 分離株No. 2

酸、或は乳酸を夫々C源として加えた培地を作成し、これらに各菌株を培養した時の培地C源分解、並びに分解産物の生成を量的に比較検討した。C源の初濃度は何れも M/50 である。

C源をグルコースとした培地での好気培養では、培養12, 24, 48時間目の夫々のグルコース消費量、乳酸、焦性ブドウ酸、サク酸、アルコール(エチルアルコール)の生成量の定量値は第1表の如くであつた。尚発育曲線は前記第1図の通りである。

標準株では一般に分解産物の蓄積は少く、培養時

第1表 発育途次のグルコースの分解に於ける量的関係, 好气的条件

培養	定量 $\mu\text{M}/\text{cc}$	グルコース消費	乳酸生成	焦性ブドウ酸生成	サク酸生成	アルコール生成
標準株	12時間培養	10.5	1.0	1.5	1.0	1.5
	24 "	15.0	2.0	1.0	3.0	2.5
	48 "	18.0	2.0	1.5	3.5	2.0
分離株 No. 1	12 "	8.5	1.5	1.0	2.0	4.5
	24 "	10.0	1.0	0.5	2.5	6.0
	48 "	14.0	1.0	1.0	3.5	9.0
分離株 No. 2	12 "	9.0	2.0	0.5	1.0	3.5
	24 "	13.5	1.5	1.0	2.0	5.0
	48 "	15.0	1.5	1.0	3.0	8.0

間が長くなっても何れも余り増量せず, サク酸の生成が僅かに大であるにすぎなかつた。

これに対し分離株では No. 1, No. 2 共にアルコール生成が大である点が標準株と異つて居り, No. 1 では培養 12, 24, 48時間目で夫々 4.5, 6.0, 9.0  $\mu\text{M}/\text{cc}$  で漸次増大して行つた。而して他の分解産物の蓄積はアルコールに比し少量であり, 培養時間が大となつても余り増大しなかつた。

分離株 No. 2 に於ても同様の傾向が認められ, グルコース分解産物としてはアルコールが量的に最大であり, 且つ培養時間と共に漸次増大して行くのが認められた。

又嫌気培養に於ては培養48時間後の定量値のみを示すと第2表の如くであり, 前述の如く各菌共に発育は不良となるため, グルコース消費量も比較的小さく, 標準株では 8.0  $\mu\text{M}/\text{cc}$  で大体同程度であるがアルコール生成は好气的条件下に匹敵する量が認められた, アルコール以外の分解産物蓄積量は比較的小であつた。

ここで各菌株につき, 好气的並びに嫌气的培養に於ける培養48時間後のグルコース消費量に対するア

第2表 発育途次のグルコースの分解に於ける量的関係, 嫌气的条件

菌株	定量値 $\mu\text{M}/\text{cc}$	グルコース消費	乳酸生成	焦性ブドウ酸生成	サク酸生成	アルコール生成
標準株	8.0	1.5	1.5	2.0	4.0	
分離株 No. 1	8.5	1.5	1.0	2.5	7.0	
分離株 No. 2	8.0	1.0	1.5	2.5	7.0	

培養時間: 48時間

第3表 発育途次のアルコール生成比

菌株	アルコール生成		グルコース消費	
	好気培養	嫌気培養	好気培養	嫌気培養
標準株	0.11		0.50	
分離株 No. 1	0.64		0.82	
分離株 No. 2	0.53		0.88	

培養48時間

アルコール生成量の比を算出するに第3表の如くなつた。

好気培養に於けるアルコール生成量/グルコース消費量の比は標準株の 0.11 に対し, 分離株では No. 1, No. 2 で夫々 0.64, 0.53 でかなり大であり, 分離株では標準株に比しアルコール醗酵が旺盛であることがうかがわれる。

而して培養条件が嫌气的となると標準株ではこの比は 0.50 となつて好気培養に於けるより著しく大となり, 又分離株では夫々 0.82, 0.88 となつて好気培養に於ける値より勿論大とはなるが標準株に於ける程著しくはなく, 従つて標準株と分離株の数值は接近する結果となつた。

次にC源をクエン酸, サク酸, 又は乳酸とした場合について見る。この実験はこれらのC源では嫌気培養での発育が不良のため, 好気培養についてのみ行い, 又培養時間は48時間の場合のみ行うこととした。C源分解産物としての乳酸, 焦性ブドウ酸, サク酸, アルコールの生成量を測定した結果は第4表に一括して示した。尚これらに於ける発育曲線は前

第4表 発育途次の各種C源の分解に於ける量的関係, 好气的条件

菌株	C源	定量値 $\mu\text{M}/\text{cc}$			
		乳酸生成	焦性ブドウ酸生成	サク酸生成	アルコール生成
標準株	クエン酸	1.0	1.5	1.0	1.0
	サク酸	1.0	1.0	—	1.0
	乳酸	—	1.5	1.0	1.0
分離株 No. 1	クエン酸	0.5	1.5	1.0	2.0
	サク酸	1.0	1.5	—	2.0
	乳酸	—	0.5	1.0	1.5
分離株 No. 2	クエン酸	2.0	1.0	1.5	2.5
	サク酸	1.0	0.5	—	2.0
	乳酸	—	0.5	0.5	1.5

培養時間: 48時間

掲第5～7図の通りである。

第4表に見られる如く標準株ではこれらC源の培地に於ても、やはりアルコール生成は極めて小であり、又分離株では No. 1, No. 2 共発育が不良であるということにもよろうが、分解産物の蓄積は一般に少く、アルコール生成量もグルコースをC源とした培地の場合に比しかなり少であり、例えば No. 1 ではクエン酸、サク酸、乳酸培地で夫々 2.0, 2.0, 1.5  $\mu\text{M}/\text{cc}$  であつた、即ちこれらC源はアルコール醗酵の基質とはなり難いものと考えられる。

### 3. 各菌のアルコール酸化能

前述の如くグルコースをC源とした培地に好気培養した場合、分離株ではアルコール生成が大であり、標準株ではこれが小であるという差異が得られたので、次に各菌株の静止菌体を用いてアルコールの酸化能を比較して見た。即ち実験方法の項に記した如くして静止菌浮游液を調製し、ワールブルグ検圧計を用いてアルコールを M/100 となるように添加し、25°C で1時間振盪して O<sub>2</sub> 消費量を測定した後、菌体を遠沈により除去し、上清について、アルコールの消費量、乳酸、焦性ブドウ酸、サク酸の生成量を夫々定量した。

結果は第5表に示した如くであり、標準株では O<sub>2</sub> 消費 12.7  $\mu\text{M}/3\text{cc}$ 、アルコール消費 10.5  $\mu\text{M}/3\text{cc}$  で著明なアルコールの酸化が認められるのに対し、分離株では No. 1, No. 2 共にアルコール酸化は極めて僅かにしか起らなかつた。

第5表 静止菌によるアルコールの酸化

菌株	定量値 $\mu\text{M}/\text{cc}$	アルコール消費	乳酸生成	焦性ブドウ酸生成	サク酸生成
	O <sub>2</sub> 消費				
標準株	12.7	10.5	0	0.5	2.0
分離株 No. 1	2.8	2.0	0	0.5	1.5
分離株 No. 2	2.4	2.0	0	0.5	1.0

而して標準株に於けるアルコールの分解産物の蓄積は少く、サク酸 2.0  $\mu\text{M}/3\text{cc}$  を認めるにすぎず、この菌株ではアルコールは殆んど完全に酸化されるものと見做される。

## IV 総括及び考案

Candida 症と診断された患者の喀痰及び血液中より分離し、形態的観察、培養上の所見、糖分解能などから C. albicans と同定された分離株 2 株、及び比較のため教室保存の標準株を供試菌として上記実験を行った。

標準株は長年月人工培地に継代を重ねたものであり、患者よりの分離株は動物から動物へと通過された毒力株であり、両者の性状には何らかの差異が期待されるはずである。

先づペプトンをN源とした基礎培地に種々のC源を M/50 となるように添加した液体培地を作り、各菌株を接種して好氣的及び嫌氣的に培養した際の発育度を比較したところ、グルコースをC源とした培地に於ては、好気培養では各菌株共に発育は良好であり、特に標準株は分離株より更に良好である。

ところが嫌気培養では各菌株共発育は不良となり、標準株と分離株との間に発育度に著しい差異は見られなくなる。従つて嫌氣的条件にすることによる発育の抑制度は分離株に於けるより標準株の方がはるかに大であることになる。

又このグルコースをC源とした培地に於ける発育途次のグルコースの分解、並びに分解産物蓄積の状態を比較すると、好気培養では各菌株共分解産物としては乳酸、焦性ブドウ酸、サク酸は一般に少く、分離株では No. 1, No. 2 共にアルコールの蓄積が顕著であり、これは Candida の一般的性状と一致するものであるが、標準株では発育は極めて良好であり、又グルコースの消費も大であるに拘らずアルコール蓄積は少いという差異が認められた。

而して嫌気培養では発育度は前述の如く標準株と分離株間に著差はなくなるが、同時にグルコース消費量も大差なく、更にアルコール蓄積のグルコース消費に対する割合も好気培養の場合よりは著しく縮小され、何れの菌株もアルコール醗酵の形式をとることが認められる。

これらの事から分離株は標準株に比し酵素的性状がやや嫌気性に傾いていることがうかがわれる。

而して分離株と標準株とについてアルコールの酸化能を比較してみると標準株は旺盛なアルコール酸化能を有するのに対し、分離株は殆んどアルコールを酸化せず、従つて標準株はグルコースを酸化分解して一旦はアルコール乃至その前駆物質を生成するが、好氣的条件下ではこれらは直ちに酸化されて消失してしまうものと推定される。

次にクエン酸、サク酸、又は乳酸をC源とした培地について見ると、標準株は好気培養ではかなりの発育を示すが嫌気培養では発育は不良となる。即ちこの菌株は好氣的条件ではクエン酸、サク酸、乳酸等を酸化してエネルギー源、C源として充分利用する酵素活性を有するが、嫌氣的条件ではアルコー

ル酸酵の基質とはなし得ないものと考えられる。

又分離株ではこれらの基質の酸化能が低いため嫌気的条件下では勿論好気的条件下に於ても発育は極めて不良となるものと考えられる。このような分離株の特徴は菌が動物を通過することにより常に得られるものか否かについては次に検討することとする。

(参考文献は第2編の末尾に掲載)

## V 結 語

Candida 症患者より分離した *C. albicans* 2株、及び教室保存の標準株を供試菌として、グルコース、クエン酸、サク酸、或は乳酸をC源とした培地に於ける好氣的、並びに嫌氣的条件下の発育度、及びこれらC源の分解について比較検討して次の結果を得た。

- 1 グルコースをC源とした培地に於て、好気培

養では各菌共発育は良好であり特に標準株の発育は良好である。又この際のアアルコール生成は分離株では大であり、標準株では極めて小である。

嫌気培養では各菌共発育は不良となり、特に標準株の発育低下は著しい。

- 2 クエン酸、サク酸、乳酸をC源とした培地に於ては好気培養では標準株の発育は良好であるが、分離株は不良であり、嫌気培養ではすべての菌株は発育不良である。

- 3 分離株は標準株に比しやや嫌気性に傾いているものと考えられる。

終りに臨み終始御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師村上教授、並びに微生物学教室松浦慶之博士に深尋の謝意を表します。

## Enzymic Properties of Isolated Strains of Candida

### Part 1. Glucose metabolism

by

Takashi Terasaka

Department of Microbiology Okayama University Medical School

(Director: Prof. Sakae Murakami)

#### Author's Abstract

Two strains of *Candida albicans* isolated from the patient with candidiasis and the standard strain preserved in our laboratory served as the materials. By cultivating these strains both under aerobic and anaerobic conditions in the medium containing glucose, citrate, succinate or lactate as C sources, a comparative study was conducted as to the growth rate and the decomposition of these C sources. The results are presented in the following.

1. In the medium containing glucose as C source, the growth of all the bacteria is good under aerobic condition, especially so with the standard strain. In this instance, the alcohol formation is especially marked with the isolated strains but extremely small with the standard strain.

Under anaerobic condition the growth rate of every strain becomes poorer, especially marked is the decrease in the growth of standard strain.

2. In the medium containing succinate, citrate, or lactate and cultured under aerobic condition, the growth of the standard strain is good whereas it is poor with the isolated strains. Under anaerobic condition the growth of every strain is poor.

3. It seems that the isolated strains somewhat tend to be aerobic as compared with the standard strain.