

# 学位論文

Candida albicans の二形性とその脂質構成  
並びに脂質代謝に関する研究

貞森紳丞

広島大学歯学部歯科補綴学第二講座

(主任：浜田泰三教授)

1986年

## 謝 辞

本研究に際し、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った広島大学歯学部歯科補綴学第二講座浜田泰三教授に深厚なる謝意を表します。また、本研究を進めるに際し、終始御指導、御校閲を頂いた本学口腔生化学講座奥田九一郎教授に深謝致します。同時に御助言、御校閲を頂いた本学口腔細菌学講座杉中秀壽教授に謝意を表します。

尚、本研究を行うに当り、御協力を頂いた、能城光秀博士、荻島正博士、林慎一先生、大山義彦先生をはじめとする本学口腔生化学講座の諸氏、並びに広島県環境センターの白根義治先生に感謝致します。同時に、重頭直文講師、玉本光弘博士をはじめとする本学歯科補綴学第二講座の方々に感謝致します。

## 論文内容要旨

### 主論文題名

Candida albicans の二形性とその脂質構成並びに脂質代謝に関する研究

学位申請者 貞森紳丞

義歯性口内炎患者のデンチャープラーク中には、多数の真菌が認められることから、これら真菌が本症の原因菌の一つとされている。このようなデンチャープラーク中の真菌には、Candida 属が高頻度に検出され、中でも Candida albicans の検出率が著しく高いことが知られている。本真菌は、酵母（Y）型並びにフィラメント（F）型の二つの形態をとる二形性真菌であり、種々の因子によりその形態が変化することが、古くから知られている。しかし、その詳細な機構については未だ不明な点が多い。著者は、C. albicans が培地中のビオチン濃度により形態変化を受ける事実に着目し、本菌の二形性と脂質代謝との間に、なんらかの関連性があるのではないかとの作業仮設のもとに、以下の実験を行った。

本研究は、Candida albicans A 1F0 1385 株を用いて行った。使用培地は、サブローグルコース培地（2% グルコース、1% ペプトン、0.5% イーストエキス）（medium A）並びにメチオニン含有合成培地（medium B）である。培養温度は、それぞれ Y 型菌並びに F 型菌を得るために、25℃並びに 37℃にて行い、各条件において対数増殖期後期に達した菌体を集菌して試料とした。集菌した菌体は、Zymolyase-60000 にて細胞壁を溶解した後、Bligh & Dyer の方法に準じて脂質を抽出し、総脂質画分とした。

脂質分析は、リン脂質、不ケン化脂質並びに脂肪酸について行った。リン脂質は、Fiske & Subbarow の方法に従い、総脂質の総無機リン量として求めた。

不ケン化脂質は、総脂質を強アルカリにてケン化後抽出し、ガスクロマ

トグラフ (GLC) にて定性並びに定量分析を行った。脂肪酸は、三フッ化ホウ素メタノール溶液にて直接メチル基転移を行い、GLC にて定性並びに定量分析を行った。尚、含量は、DNA 当りで算出した。更に、放射性酢酸のステロール並びに脂肪酸への取り込みを経時的に追跡し、これらの実験より以下の結果を得た。

- 1) DNA 当りのリン脂質、エルゴステロール及び各脂肪酸含量は、F 型菌の方が Y 型菌より多かった。
- 2) エルゴステロール生合成の中間体であるスクアレンは、Y 型菌と比較して F 型菌において著しく多く含まれていた。
- 3) 各脂肪酸の構成比率は両型において異なり、Y 型菌と比較して F 型菌では、パルミチン酸並びにパルミトレイン酸のような炭素鎖の短い脂肪酸の構成比が高かった。
- 4) ステロール代謝を検討したところ、培養初期では、相互に分離しない中間体が多くみられ、時間の経過とともにエルゴステロールが増加していくことが認められ、両型菌の間には著しい相違は見られなかった。
- 5) 脂肪酸代謝に関して、両型菌とも時間の経過とともにパルミチン酸からオレイン酸への伸長が認められたが、F 型菌では Y 型菌に比し炭素鎖の短い脂肪酸への取り込みが高かった。

以上の結果より、C.albicans の F 型菌は、Y 型菌に比して脂質がより多く含まれるのみならず、C16:0 並びに C16:1 のような脂肪酸合成系の最初の産物、あるいはそれに近い脂肪酸が、圧倒的に多く含まれていることがわかった。これらの事実は、F 型菌において脂肪酸需要が高いため、これらの脂肪酸が供給にまわされ、Y 型菌のように十分な伸長が行われなことを示唆するものと考えられ、放射性酢酸の脂肪酸への取り込み実験からも確認された。以上、C.albicans の F 型菌と Y 型菌との間には、その脂質代謝に顕著な差があり、F 型菌においては脂質合成が著しく亢進していることが明らかとなった。

# 目 次

第 I 章 緒 論	1
第 II 章 <u>Candida albicans</u> の二形性	
第 1 節 概要	3
第 2 節 F 型菌の誘導因子	4
第 3 節 F 型菌及び Y 型菌の誘導	8
第 1 項 菌数測定	8
第 2 項 F 型菌の培養	8
第 3 項 Y 型菌の培養	11
第 4 節 考察	11
第 III 章 脂質分析	
第 1 節 概要	13
第 2 節 脂質の抽出	15
第 3 節 脂質分析	15
第 1 項 DNA の抽出及び定量	16
第 2 項 リン脂質	18
第 3 項 ステロール	18
第 4 項 脂肪酸	20
第 IV 章 放射性酢酸のステロール並びに 脂肪酸への取り込み	
第 1 節 概要	27
第 2 節 脂質の抽出	27
第 3 節 脂質分析	30
第 1 項 ステロール	30
第 2 項 脂肪酸	31
第 V 章 結果の要約	36
第 VI 章 考 察	37
試薬	41
参考文献	42

本論文において次の略号を用いた

Y型：酵母型 ( yeast form )

F型：フィラメント型 ( filamentous form )

DNA：デオキシリボ核酸

TCA：トリクロロ酢酸

DTT：dithiothreitol

MIC：最小発育阻止濃度

GLC：ガスクロマトグラフ

OV-1：methyl silicone gum

OV-17：phenyl methyl silicone

EGSS-X：organo silicone polymer

GC-MS：ガスクロマトグラフ付質量分析器

エルゴステロール Ergosterol : 5,7,22-ergostatrien-3 $\beta$ -ol

ラノステロール Lanosterol : 8,24-lanostadien-3 $\beta$ -ol

ザイモステロール Zymosterol : 8,24-cholestadien-3 $\beta$ -ol

## 第 I 章 結 論

義歯性口内炎は、総義歯、部分床義歯、床矯正装置などの可撤性床装置の床下粘膜の一種の炎症である<sup>1)</sup>。義歯性口内炎患者のデンチャープラーク中には、多数の Candida albicans が存在することが明らかにされており<sup>2), 3)</sup>、本症の有力な原因菌の一つとされている。

義歯性口内炎患者のデンチャープラークの塗沫標本を観察すると、酵母状並びに菌糸状の二つの形態の真菌が多数認められる (図1)。C.albicans は酵母 (Y) 型菌並びにフィラメント (F) 型菌の二つの形態をとる二形性真菌であることが、古くから知られている。Budtz-Jørgensen は、義歯性口内炎炎症部位から、菌糸状菌が多く検出されたと報告<sup>4)</sup>しており、本症の発症と菌糸状菌との間に何らかの関連性があることが推測される。

C.albicans の形態的变化に影響を及ぼす因子としては、種々の物質並びに条件が報告されている (表1参照)。培養液中のビオチンの濃度はそのような因子の一つである<sup>5)</sup>。ビオチンは、酵母等の発育に必須のビタミンであり、生体内においてホスホエノールカルボキシキナーゼ、アセチル-CoA カルボキシラーゼ等の補酵素として働き、糖新生や脂肪酸合成に関与していることが知られている。

真菌の二形性誘導機構と脂質代謝との関連については、従来多くの研究が行われてきている。すなわち Gordon ら<sup>6)</sup>は、Mucor genevensisを用いて実験を行い、二形性と脂質構成との間には、直接的な関連はないと報告している。しかし、Manocha<sup>7)</sup> は、最近、Paracoccidioides brasiliensis においては、二形性の誘導と菌体

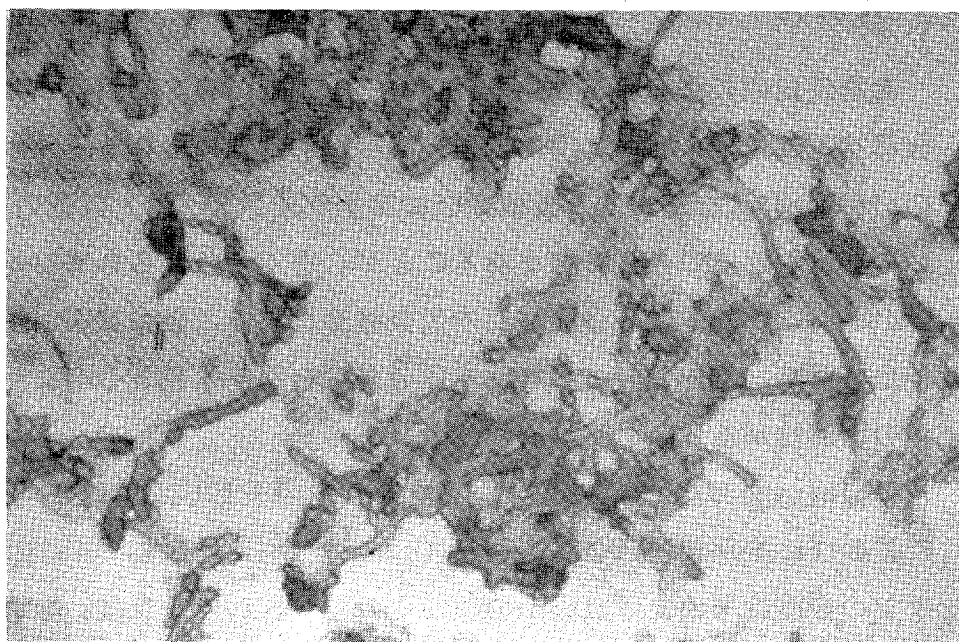


図1 義歯性口内炎患者のデンチャープラークからの塗沫標本  
(直接倍率, ×400 ) .



の脂質構成の間には密接な関連があることを示唆した。

C.albicans の二形性と脂質代謝に関しても、二つの形態の細胞膜の脂質構成の差異に関して、いくつかの報告がなされている<sup>8), 9)</sup>が、細胞自体の脂質代謝に関する比較検討は行われていない。また、従来行われてきた細胞膜の脂質構成の比較にしても、異なる培地で培養して得た菌体について研究がなされているため、見出された脂質構成の差異が形態の違いに基づくものか、あるいは培養条件の相違に由来するものか判然としない。

著者は、C.albicans の Y 型菌並びに F 型菌の脂質代謝を比較検討するために、まず両型の菌体を同一の培地で培養する条件を確立し、このようにして得られた両型の菌体についてその脂質構成並びに代謝を検討した。

## 第 II 章 Candida albicans の 二形性

### 第 1 節 概要

真菌の多くは、酵母（及び酵母状真菌）または糸状菌のいずれかの形態をとる。しかし、少数ではあるが、酵母型と菌糸型の双方を可逆的にとりうる真菌菌種が存在する。このような特定の栄養的または物理的因子によって容易に酵母型、菌糸型変換が起こる現象を二形性（dimorphism）と呼ぶ<sup>10)</sup>。

C.albicans は、人の口腔、気道などの常在微生物叢の一員であるが、このような部位で、この菌が優勢となると病的状態を起こすことがある。更に、消耗性疾患があると、全身性進行性疾病を起こ

す。このような病原性を示すことから、本真菌は医学的に重要であり、また、二形性を示す酵母状真菌として、二形性の研究対象としても重要視されている。第 I 章で既に述べたように、義歯性口内炎においても、C.albicans が本症の発症に係わっていることは確実であり、Budtz-Jørgensen の報告<sup>4)</sup>からも、本症に対する F 型菌の重要性が伺われる。

C.albicans のフィラメント化を促進する因子としては、古くから種々の物質並びに培養条件が報告されている。このように二形性は、多種多様の因子で支配されるため、研究者が異なると同一の因子に関して相反する結果が得られる事例も知られている<sup>11), 12)</sup>。種々の因子の中には、偶然に発見されたものも多く、その機構はほとんどわかっていない。また、これらの因子の相互関係に至っては、いまのところ全く不明といえる。

## 第 2 節 F 型菌の誘導因子

本研究には、C.albicans A IF0 1385 株を用いた。

C.albicans の形態変化に影響を及ぼす因子を、表 1 に示す。

本研究では、培養温度、初期接種菌濃度、振盪速度及びビオチン濃度を F 型菌発育に適した条件にすることとし、Tani<sup>ら</sup><sup>23)</sup>、坂野<sup>ら</sup><sup>8)</sup>、Yano<sup>ら</sup><sup>24)</sup>の合成培地を参考にして、合成培地を作成した。表 2 に合成培地の組成を示す。

培養温度は、種々の報告<sup>11), 13), 14)</sup>から高温の方が F 型菌発育の促進因子と考えられること、また人の体温が 37℃であることから、37℃で培養することとした。

接種菌濃度としては、 $10^6$  cells/ml 付近が F 型菌発育促進因子と考えられている<sup>14), 17), 20)</sup>が、実験の結果  $4.65 \times 10^4$  cells/ml

表1 C.albicans の形態変化に影響を及ぼす因子とその報告者

temperature

Skinner, C.E. ( 1947 )<sup>11)</sup>

McClary, D.O. ( 1952 )<sup>12)</sup>

Chattaway, F.W., Holmes, M.R. & Barlow, A.J.E. ( 1968 )<sup>13)</sup>

Mardon, D.N., Hurst, S.K. & Balish, E. ( 1971 )<sup>14)</sup>

pH

Skinner, C.E. ( 1947 )<sup>11)</sup>

McClary, D.O. ( 1952 )<sup>12)</sup>

Johnson, S.A.M., Guzman, M.G. & Aguilera, C.T. ( 1954 )<sup>15)</sup>

De Palma, P.A. ( 1966 )<sup>16)</sup>

Mardon, D.N., Hurst, S.K. & Balish, E. (1971 )<sup>14)</sup>

initial blastospore concentration of about  $10^6$  cells/ml

Mackenzie, D.W.R. ( 1962 )<sup>17)</sup>

Bernander, S. & Edebo, L. ( 1969 )<sup>18)</sup>

Mardon, D.N., Hurst, S.K. & Balish, E. ( 1971 )<sup>14)</sup>

nitrogen source

Mardon, D.N., Balish, E. & Phillips, A.W. ( 1969 )<sup>19)</sup>

polysaccharides

Nickerson, W.J. & Mankowski, Z.T. ( 1953 )<sup>20)</sup>

biotin

Yamaguchi, E. ( 1974 )<sup>5)</sup>

serum

Mackenzie, D.W.R. ( 1962 )<sup>17)</sup>

serum albumin

Reynolds, R. & Braude, A. ( 1956 )<sup>21)</sup>

inorganic phosphate

McClary, D.O. ( 1952 )<sup>12)</sup>

Widra, A. ( 1964 )<sup>22)</sup>

reduced oxygen tension

Skinner, C.E. ( 1947 )<sup>11)</sup>

Johnson, S.A.M., Guzman, M.G. & Aguilera, C.T. ( 1954 )<sup>15)</sup>

controlled CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> ratio in the atmosphere of incubation

Mardon, D.N., Balish, E. & Phillips, A.W. ( 1969 )<sup>19)</sup>

starvation conditions

Skinner, C.E. ( 1947 )<sup>11)</sup>

Johnson, S.A.M., Guzman, M.G. & Aguilera, C.T. ( 1954 )<sup>15)</sup>

表2 本研究に使用した培地

A (Sabouraud glucose medium)		B (Synthetic medium)	
Glucose	20g	Glucose	16.5g
Peptone	10g	L-methionine	1.0g
Yeast extract	5g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7g
		MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.13g
		KCl	0.43g
		FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2.5mg
		MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	2.5mg
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.5g
		Biotin	0.1 μg

Total volume 1 liter

付近の方がF型変換率が高かった。尚、菌数測定は、後に述べる方法により行った。また、Lingappa ら<sup>25)</sup>は、C.albicans は菌体からF型菌発育抑制因子（フェニルエチルアルコール、トリプトフォル）を産出すると報告している。その他にもフィラメント化に関連のある発芽管（germ tube）形成を抑制する C.albicans 代謝産物—autoregulatory substance—が未同定ながら分離<sup>26)</sup>されている。そこで、合成培地に接種する菌体は、前培養後、集菌し、精製水で2回洗浄して、合成培地に接種することとした。前培養には、C.albicans の培養によく用いられるサブローグルコース培地（medium A）（2% グルコース、1% ペプトン、0.5% イーストエキス）を用いることとした。

酸素分圧がF型発育に影響を及ぼし、低酸素分圧で、F型菌が誘導されることが報告<sup>11), 15)</sup>されている。従って、静置培養、または非常にゆるやかに振盪培養することが、F型菌の発育を促進すると考えられるので、50 osc/min の速度で培養することとした（150 osc/min の速度で培養するとY型菌の比率が増加していた）。

次に、本合成培地においてF型菌発育に最適なビオチン濃度を求めるために、種々のビオチン濃度に調整した合成培地を作製しF型変換を観察した。すなわち、medium A にて前培養した対数増殖期後期の菌体を、精製水にて2回洗浄した後に、合成培地に菌濃度が  $4.65 \times 10^4$  cells/ml になるように接種した。合成培地におけるビオチン濃度は、それぞれ 0、0.001、0.1 及び 10.0 ng/ml に調整した。300 ml の三角フラスコに 100 ml の合成培地を入れ、37°C、50 osc/min の条件で振盪培養した。2 時間後に光学顕微鏡にてF型変換率を計算した。F型変換率は、両型の合計数に対するF型菌

の百分比率として求めた。両型の合計数は、100個以上計測して求めた。その結果、0.1 ng/ml の濃度において最高の F 型変換率を示した（表 3）。尚、F 型菌の菌数を数える場合、F 型菌は、1 菌体を 1 細胞として計算したが、F 型菌は複数の細胞からなるため細胞の比率は、ここに得られた値よりもかなり大きい値になると考えられた。従って、以後の実験においては、0.1 ng/ml のビオチン濃度の合成培地を用いて行った（以下 medium B）。

### 第 3 節 F 型菌及び Y 型菌の誘導

#### 第 1 項 菌数測定

菌数は全菌数を測定することとし、血球計算板を用いて、白血球計算に準じて行った。すなわち、被験菌浮遊液を、1% NaCl 溶液で希釈し、よく振盪混和し、計算板にとり約 30 分間静置した。鏡検して、4 区画を数え、その平均値をとった。この値に希釈倍数をかけて、もとの全菌数を算出した。

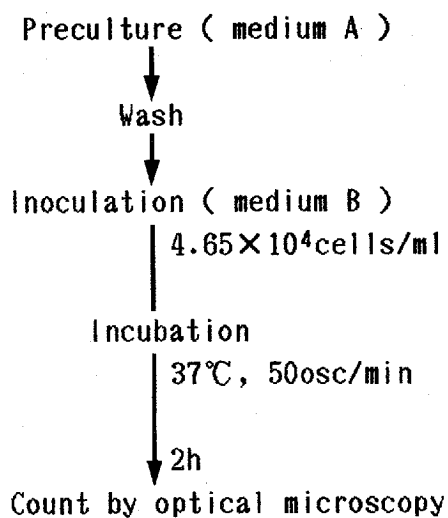
#### 第 2 項 F 型菌の培養

F 型菌の培養方法は、次の通りである。Medium A にて前培養した対数増殖期後期の菌体を、精製水にて 2 回洗浄した。その後、medium B に菌濃度が  $4.65 \times 10^4$  cells/ml になるように接種し、37°C、50 osc/min の条件で振盪培養した。

F 型菌の経時的成長の観察は、3、6、9 及び 12 時間後のものについて行った（図 2）。9 時間から 12 時間の培養時間において、F 型菌は最高の伸長を示した。12 時間においては、Y 型菌が多くなってきていることが認められた。しかし、形態は、やや細長くなっていた（図 2）。

次に、F 型菌の増殖測定を行った。まず、培養液の濁度を、分光

表3 種々のビオチン濃度でのF型変換率



Biotin conc. ( ng/ml )	Ratio ( % )	F/F+Y
0	66.7	
0.001	61.8	
0.1	75.8	
10.0	45.7	

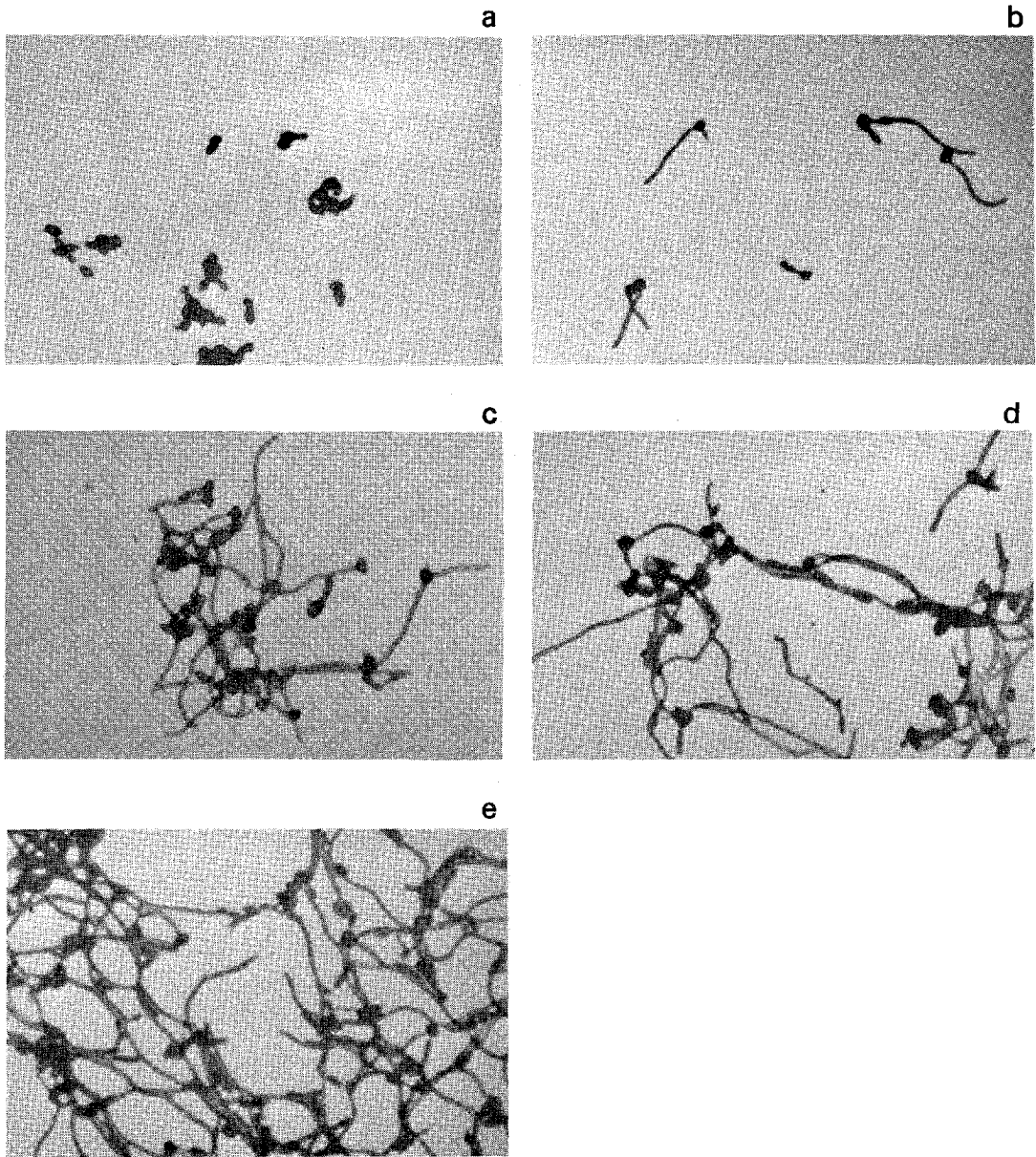


図2 F型菌の経時的成長を示す光学顕微鏡像（直接倍率， $\times 400$ ）。

a：接種直後， b：3 時間後， c：6 時間後， d：9 時間後， e：12時間後。



光度計を用いて測定する方法を試みたが困難であった。なぜならば、F型菌は成長に伴いF型菌同志がからみあい菌塊を作り、成長が正確に濁度に反映しにくかったためである。そこで、後に述べる方法により DNA 量を定量して、F型菌の増殖測定を行うこととした。図3 B は、F型菌の発育曲線を示している。その結果、約10時間で対数増殖期後期に達していることがわかり、DNA の doubling time は約 2 時間と計算された。

### 第3項 Y型菌の培養

第2項の結果より、F型菌の培養条件は決定したが、次に培養条件をあまり変えることなく同一の培地でY型菌のみを培養することを試みた。なぜならば、培養条件が変化すれば、その変化の影響により菌の代謝が変化することが考えられるからである。

まず、ビオチン濃度を高くしたがF型菌がかなり混在していた。更に、初期接種菌濃度、振盪速度をそれぞれ変化させたが同様であった。各々を組み合わせても、同様の結果であった。

次に、培養温度を下げることを試みた。37℃以外に、よく用いられる培養温度25℃で培養を行った。その結果Y型菌のみが培養されることがわかった。培養条件は、培養温度が異なるのみで、その他はF型菌の培養条件と同じである。Y型菌の増殖は、培養液の濁度 (optical density,  $\phi$  12 mm, 660 nm) を、分光光度計 (100-10形、日立製作所、東京) を用いて測定した。尚、全菌数と全 DNA 量とは、比例関係にあった。図3 A にY型菌の発育曲線を示しているが、約36時間で対数増殖期後期に達し、doubling time は約 6 時間と計算された。

### 第4節 考察

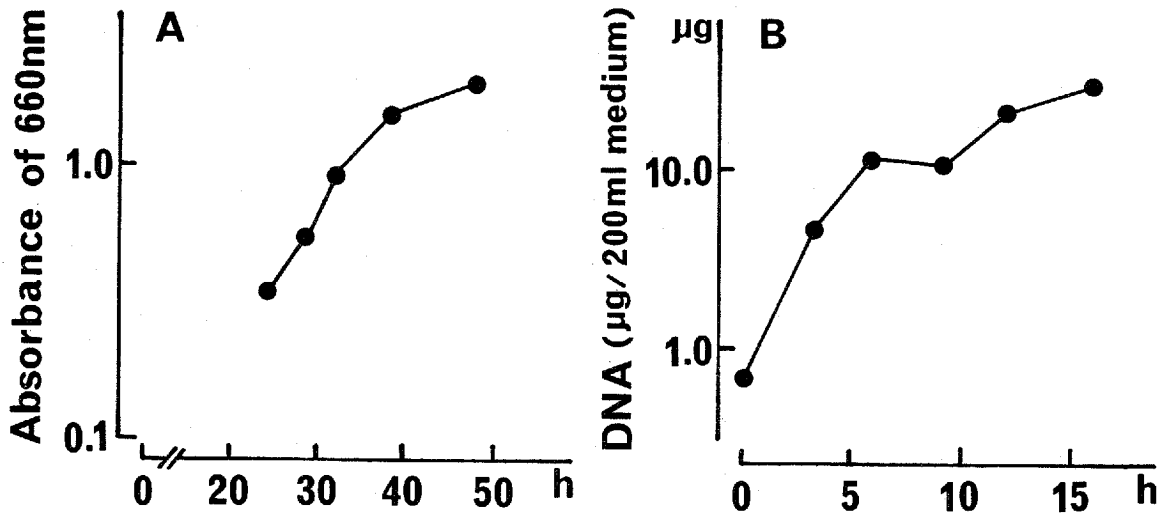


図3 Y型菌 (A) 並びに F 型菌 (B) の発育曲線.

F型変換誘導因子としては種々の物質並びに条件が報告されているが、本研究ではF型菌発育のために、培養温度、初期接種菌濃度、振盪速度（酸素分圧）、ビオチン濃度をF型菌発育に適した状態にして行った（medium B）。そして、可能な限り同じ条件でY型菌を培養することを試みた。なぜならば、条件が変化すれば脂質構成が変化することが推察され、脂質構成変化が、形態によるものかそれとも培養条件によるものか判別できないからである。初期接種菌濃度、振盪速度、ビオチン濃度を変化させてもY型菌のみを培養することは困難であった。これは、medium B中のメチオニンの効果によるものかもしれない<sup>19)</sup>。次に、培養温度を37℃から25℃に下げるとmedium BにおいてY型菌のみが培養できた。このことから、二形性には、温度が重要な因子になっていることが明らかである。

### 第III章 脂質分析

#### 第1節 概要

脂質はいくつかの重要な生物機能をもっており、1) 膜の構成成分として、2) 代謝燃料の貯蔵・輸送形として、3) 多くの生物の表面での保護層として、4) 細胞認識・種特異性・組織免疫に関与する細胞表面成分として、それぞれ役立っている。

一方、二形性の誘導機構を知るために従来より、主に細胞壁の構成成分の比較検討が行われてきた。その結果、細胞壁の化学構成が、Y、F型菌間でかなり異なっていることが明らかとなった<sup>13), 27)</sup>が、膜の脂質分析を詳細に行った報告はほとんど見られない。また、わずかに見られる報告<sup>8), 9)</sup>も、前章で述べたように同一の条件で

両型を培養することの困難さのためか、それぞれ別の培地で培養して得た Y、F 型菌を比較検討しているに過ぎず、それぞれ相反する結果もみられる。培養条件が異なれば、それにより脂質構成が変化する可能性も十分に考えられるから、報告された両型の脂質構成の異同が直ちに形態の差に基づくものであるとは言えない。従って、可能な限り同一の条件で培養して得た Y、F 型菌について分析を行うことが大切であると考えられる。

脂質は、細胞膜に多く含まれていることが知られており、その成分が変化することにより、膜の流動性が変化することが明らかにされた<sup>28)</sup>。膜結合酵素は、膜の脂質により種々の動力的影響を受けることが知られている<sup>29)</sup>。また、細胞膜には細胞壁合成に関与する種々の重要な酵素が含まれており、このような膜結合酵素の一つとして、細胞壁の一つの主成分であるキチンを合成する酵素が知られているが、第 I 章で述べたようにこの酵素は細胞膜に局在していることが報告<sup>30)</sup>されており、また可溶化部分精製された酵素の活性調節に、脂質が関与していることが明らか<sup>31)</sup>にされた。

また、真菌は、特徴として不ケン化脂質にエルゴステロールを多く含んでいることが知られている。エルゴステロールは、細胞膜に多く含まれておりカンジダ症などにおいてポリエーテル系の抗真菌剤（例えば、アンホテリシン B、ナイスタチンなど）の作用点<sup>32)</sup>としても注目されている。

以上の事実から、二形性と脂質との間には、密接な関係があることが推察され、カンジダ症の治療の方面からも脂質を調べることは重要と思われる。そこで、著者は、*C. albicans* の Y 型菌並びに F 型菌を前章で述べた条件、すなわち medium B を用いて、25°C で Y

型菌、37℃でF型菌を培養後集菌し、両型から脂質を抽出し、エルゴステロール等の脂質分析を行い両型の脂質構成の相違を詳細に検討した。また、培養温度による脂質構成の相違を確かめるために、同様の条件で medium A にて、培養し脂質の分析を行った。尚、medium A においては、両温度培養菌体とも形態は、Y型であった。

## 第2節 脂質の抽出

脂質を抽出する場合、真菌においてはまず細胞壁を取り除くことが必要であった。そこで、細胞壁の溶解は、 $\beta$ -1,3-glucanase 活性を有する真菌細胞壁溶解酵素 Zymolyase を用いて行った。すなわち、対数増殖期後期に達した菌体を、集菌した後、精製水で洗浄し、0.6 mg/ml Zymolyase-60000、80 mM Tris-HCl (pH7.4)、10 mM DTT の条件にて、37℃で1時間振盪し、細胞壁を溶解した。細胞壁の溶解の確認は、光学顕微鏡にて行った。

菌体からの脂質の抽出は、Bligh & Dyer の方法<sup>33), 34)</sup>に準じて行った。尚、一部分は DNA の定量に用いた。すなわち、細胞壁を溶解した菌体試料 1 ml に、2.5 ml のメタノールと 1.25 ml のクロロホルムを順次加え、4 分間激しく Voltex mixer にて攪拌後、10分間静置した。そして、再び 1.25 ml のクロロホルムを加え、30秒間激しく攪拌し、1.25 ml の精製水を加え、30秒間激しく攪拌した。次に、遠心分離 (3000 rpm、5 分間) すると、上層、中層、下層の三層に分離するので、下層のクロロホルム層を分取した。回収率を上げるために、再び、1 ml のクロロホルムを加え、再び 30 秒間激しく攪拌し、遠心分離 (同上) 後、クロロホルム層を分取し、先のクロロホルム層と合わせて、総脂質画分とした。

## 第3節 脂質分析

Thin layer chromatography にて総脂質画分を分析したが、Y、F 型菌とも、中性脂質は痕跡程度しか認めなかった。このことは、Taylor らの *Saccharomyces cerevisiae* を用いて得られた知見<sup>35)</sup> と一致し、集菌を対数増殖期に行ったためと考えられた。従って、今回分析した脂肪酸は、ほとんどリン脂質およびステロールエステル由来の脂肪酸と考えられた。

また、脂質含量を計算する場合、菌体量が少ないため、よく用いられる湿菌体重量、乾燥菌体重量では、正確な含量を算出しにくいため DNA 当りで計算することとした。

#### 第 1 項 DNA の抽出及び定量

細胞壁を溶解した菌体からの DNA の抽出は、Schneider 法<sup>36)</sup> に準じて行った。すなわち、細胞壁を溶解した菌体試料 1 ml を遠心管中に取り、氷冷 10% TCA、2 ml を加えて Voltex mixer にて攪拌後、遠心分離 (3000 rpm、10 分間) した。沈澱にもう一度同量の氷冷 10% TCA を加えて攪拌し遠心分離 (同上) した。沈澱にエタノール 3 ml を加え攪拌後、5 分間静置し、再び遠心 (同上) した。沈澱に 3 ml エタノール : エーテル (3:1) を加え攪拌後 5 分間静置し遠心 (同上) した。沈澱に 5% TCA を加え、100℃ で 15 分間加熱し、DNA を加水分解、可溶化後冷却し遠心 (同上) した。上清を 0.5 ml 分取し、DNA の定量に用いるまで 4℃ で保存した。

DNA の定量は、Schneider 法に準じて行った。すなわち、上記で得られた DNA 抽出液 0.5 ml にジフェニルアミン試薬 0.1 ml (ジフェニルアミン 1.0 g, 酢酸 100 ml, 濃硫酸 2.75 ml) を加え、100℃ で 10 分間加熱し、冷却後 600 nm にて吸光度を測定し定量した。図 4 に DNA の検量曲線を示す。

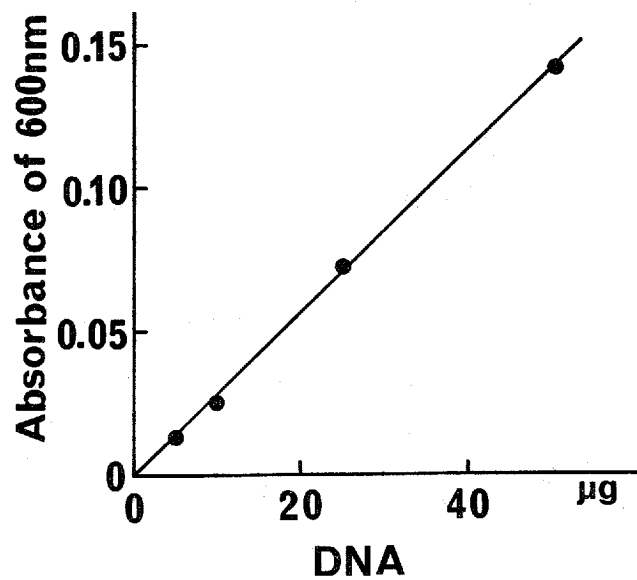


図4 DNA の検量曲線.

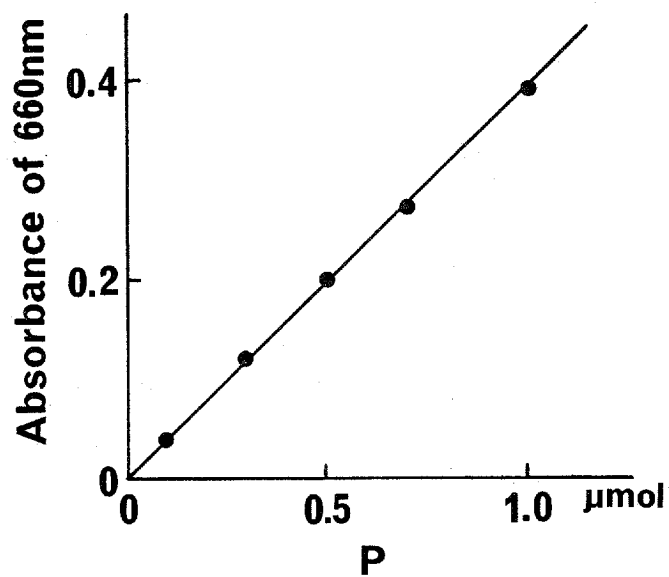


図5 無機リンの検量曲線.

## 第2項 リン脂質

総リン脂質含量は、総無機リンとして算出することとした。まず、総脂質に、60%過塩素酸を加えて加熱して酸化し、有機リンを無機リンに変換した<sup>37)</sup>。しかる後に、Fiske & Subbarowの方法<sup>38)</sup>に準じて無機リン量を測定した。すなわち、酸化後の試料に精製水を加えて約6 mlにして、5%の ammonium molybdate 溶液を0.5 ml 加え攪拌した。更に、還元試薬 ( NaHSO<sub>3</sub> 30 g, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 6.0 g, 1,2,4-aminonaphthol sulfonic acid 0.5 g を精製水 250 ml に溶かした溶液 ) を0.4 ml 加えた後に、精製水を加え全量を10ml にし攪拌した。室温に20分間静置したあと、660 nm にて吸光度を測定し定量した。図5 に無機リンの検量曲線を示す。

Medium A で培養した場合、菌の形態はいずれもY型であり、25℃培養菌体 ( Y型菌 ) に比して37℃培養菌体 ( Y型菌 ) の方が DNA 当りのリン脂質含量が多いことが認められた ( 図6 A )。Medium B においても同様な現象が認められたが、その差は更に顕著であった ( 図6 B )。

## 第3項 ステロール

不ケン化脂質の抽出は、Nagai らの方法<sup>39)</sup>に従った。すなわち、総脂質画分の一部を、ねじ付き試験管に移し、20%メタノール性苛性カリで、85℃、2.5時間窒素気流下にて加熱しケン化を行った。ケン化終了後、石油エーテルで不ケン化脂質の抽出を行った。抽出後、石油エーテルを気化し十分乾固の後、酢酸エチルに溶解し試料とした。

分析は、水素イオン化検出器付ガスクロマトグラフ ( 島津K.K., GC-6A型 ) にて行った。カラムは、1% OV-1 ( ガラスカラム 3.0



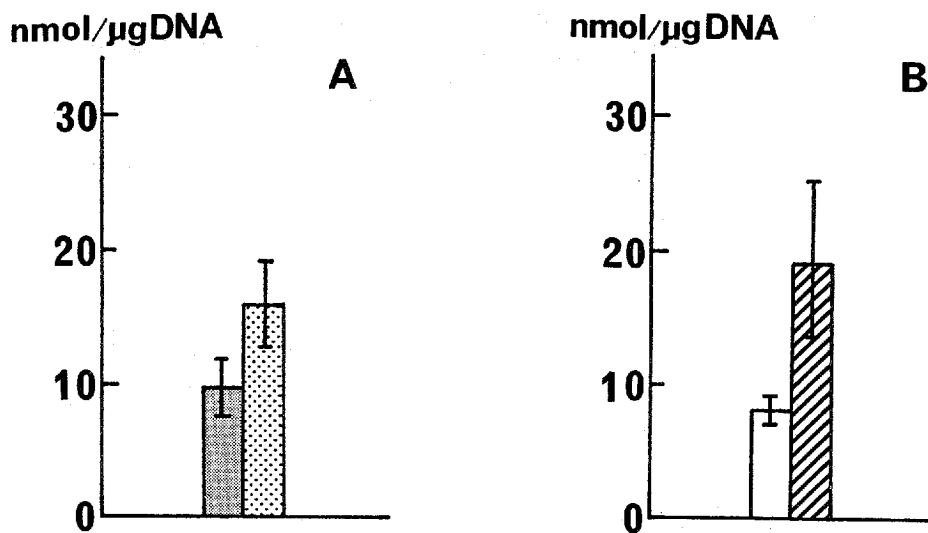


図6 各培養菌体における DNA  $\mu$ g 当りのリン脂質含量。  
 A : 25°C (■) 及び 37°C (●) の培養菌体におけるリン脂質含量,  
 B : Y型 (□) 及び F型 (▨) の菌体におけるリン脂質含量。

mm×1.0 m ) と 1.5% OV-17 ( ガラスカラム 3.0 mm×1.0 m ) を使用し、carrier gas (N<sub>2</sub>) の流速は 1.3 Kg/cm<sup>2</sup> (100 ml/min)、カラム温度は 225℃、試料注入部温度は 245℃に保った。記録計には、クロマトパック C-R 1 B ( 島津K.K.) を使用した。各物質の同定は、OV-1、OV-17 の異なる 2 本のカラムで標準物質の保持時間と比較して行った。各物質の含量は、算出された面積より外部標準法を用いて求めた。図 7 にエルゴステロールの検量曲線を示す。

Y 型菌並びに F 型菌の不ケン化脂質の GLC のプロフィールを 図 8 に示す。a のピークはスクアレン、b のピークはザイモステロール、c のピークはエルゴステロール、d のピークはラノステロールであった。両型菌のプロフィールには明らかな相違が見られた。すなわち、Y 型菌に比べて F 型菌において、エルゴステロールに対するスクアレンの含量比が多いということがわかった。Medium A を用いて 25℃並びに 37℃にて培養した菌体 (両者とも Y 型菌) 間では、プロフィールの相違は認められなかった。

Y 型菌並びに F 型菌における DNA 当りのスクアレン並びにエルゴステロールの含量を 図 9 に示す。その結果、Y 型菌に比べて F 型菌の方が、スクアレン並びにエルゴステロール含量がはるかに高かった。特に、スクアレン含量において差が大きかった。Medium A にて、25℃並びに 37℃にて培養した菌体 (両者とも Y 型菌) においては、スクアレン並びにエルゴステロールの含量は両者の間で有意な差を示さなかった ( 図 9 A )。

#### 第 4 項 脂肪酸

脂肪酸分析は、総脂質画分のままでは分析不可能なため、脂肪酸メチルエステルの形に変換して行った。この場合、一度ケン化し、

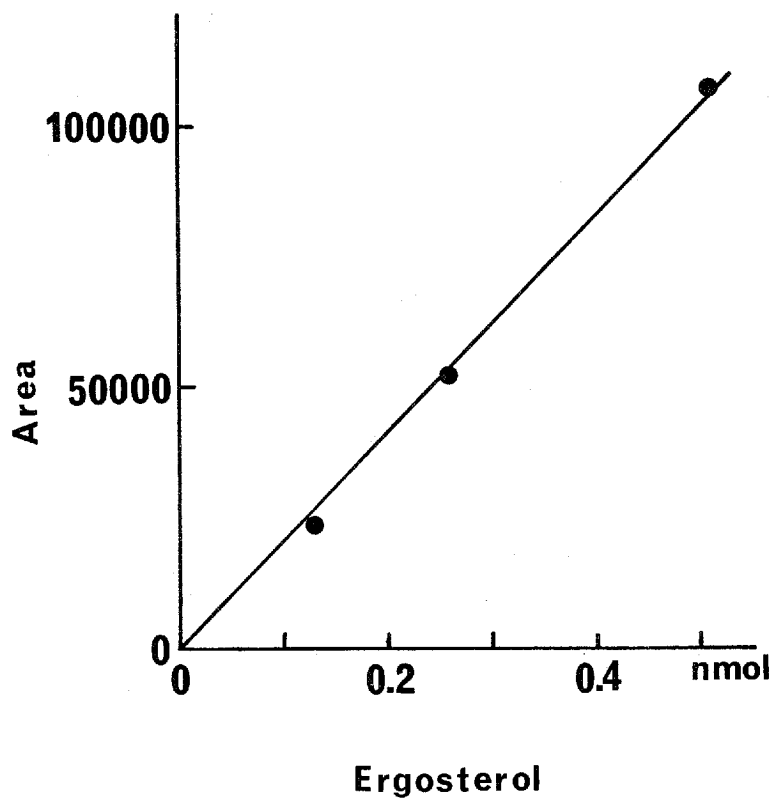


図7 エルゴステロールの検量曲線.

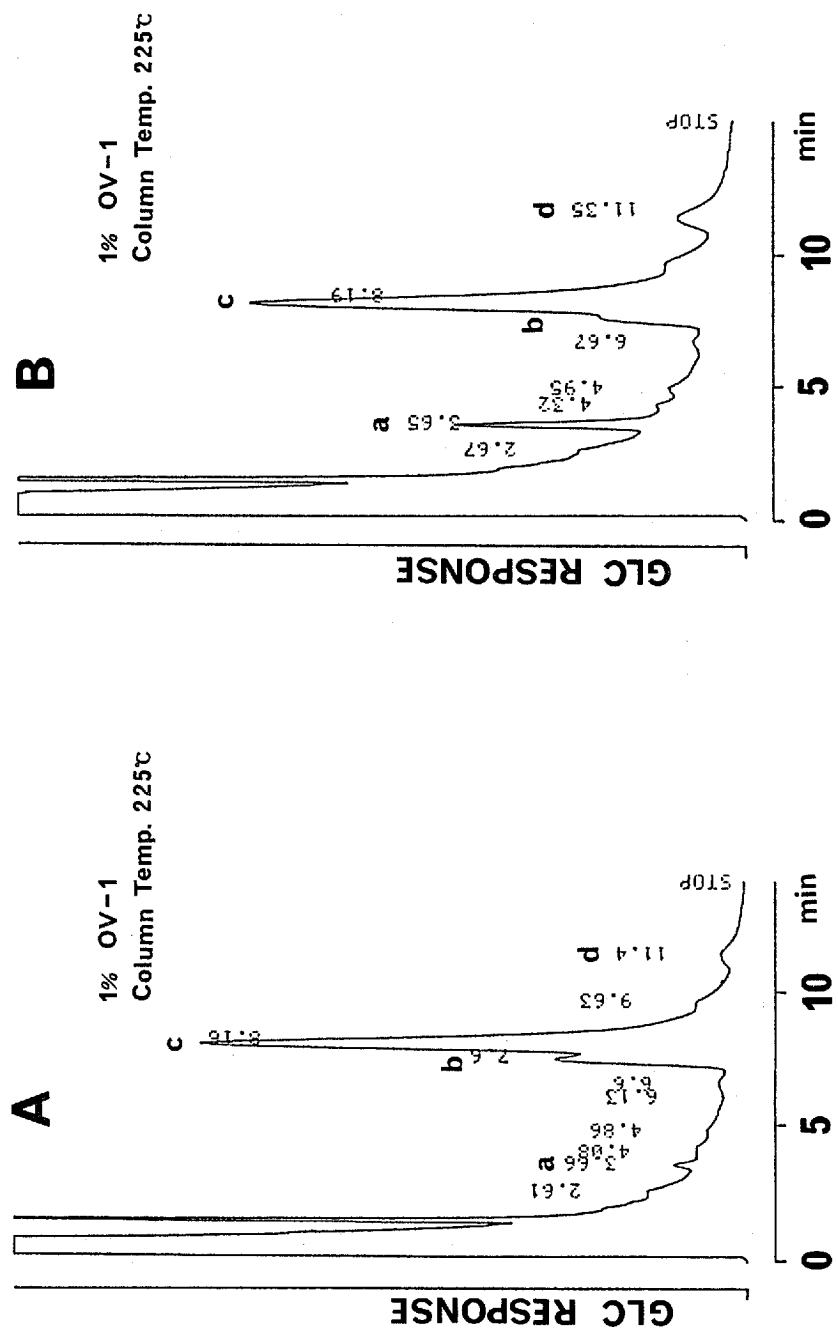


図8 Y型菌(A)及びF型菌(B)の不ケン化脂質のガスクロマトグラム.

a: スクアレン, b: ザイモステロール, c: エルゴステロール,

d: ラノステロール, カラム: 1% OV-1.

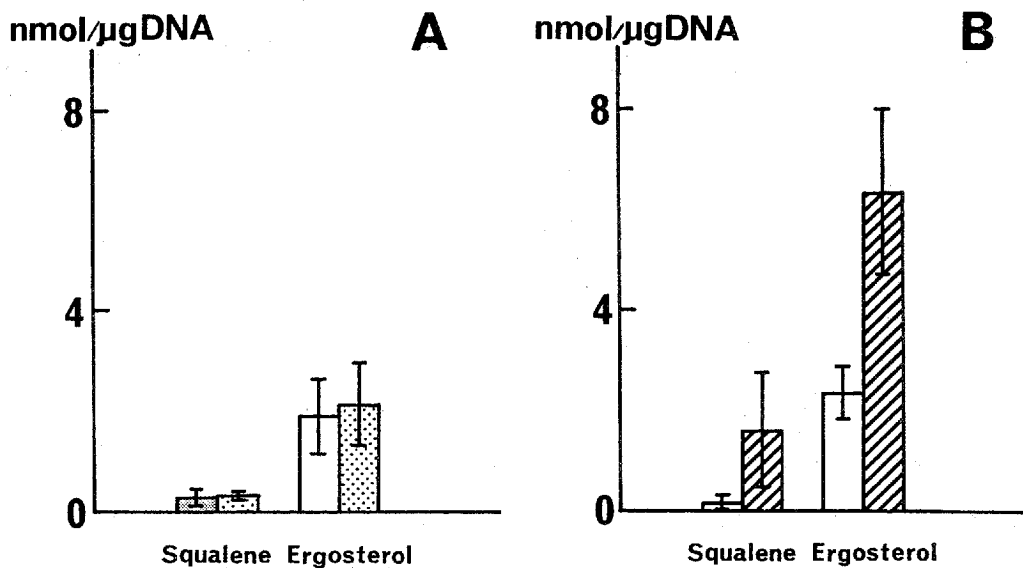


図9 各培養菌体における DNA  $\mu$ g 当りのスクアレン並びにエルゴステロール含量。  
 A : 25°C (▨) 及び 37°C (▩) の培養菌体における DNA  $\mu$ g 当りのスクアレン並びにエルゴステロール含量,  
 B : Y型 (□) 及び F型 (▧) の菌体における DNA  $\mu$ g 当りのスクアレン並びにエルゴステロール含量.

それから脂肪酸エステルにする方法もあるが、迅速に分析を行うために、直接メチル基転移を行うこととした<sup>40)</sup>。すなわち、総脂質画分に、15%三フッ化ホウ素メタノール溶液を加え、80℃で20分間加熱し直接メチル基転移を行った。処理後、炭酸水素ナトリウム飽和溶液にて酸を中和したあと、酢酸エチルにて抽出した。抽出後、酢酸エチルを気化し十分乾固の後、酢酸エチルに溶解し試料とした。脂肪酸の分析は、水素炎イオン化検出器付きガスクロマトグラフ（島津K.K., GC-9A型）にて行った。カラムは、10% EGSS-X（ガラスカラム 3.0 mm × 3.0 m）を使用し、carrier gas (N<sub>2</sub>)の流速は 35 ml/min、カラム温度は185℃、試料注入部温度は210℃に保った。記録計には、クロマトパック C-R 1 B（島津K.K.）を使用した。各脂肪酸の同定は、各標準物質の保持時間と比較して行い、一部は質量分析により確認した（図10）。各脂肪酸含量は、算出された面積より外部標準法を用いて求めた。図11 にその代表的な例として、ステアリン酸メチルの検量曲線を示す。

Y型菌並びにF型菌の脂肪酸のGLCのプロフィールを 図12 に示す。aのピークはミリスチン酸（C14:0）、bのピークはパルミチン酸（C16:0）、cのピークはパルミトレイン酸（C16:1）、dのピークはステアリン酸（C18:0）、eのピークはオレイン酸（C18:1）、fのピークはリノール酸（C18:2）、gのピークはリノレイン酸（C18:3）であった。Y、F型菌において、プロフィールの相違がみられた。F型菌においてパルミチン酸（C16:0）のピークが他のピークに比し大きいことがわかった。Medium Aを用いて25℃並びに37℃にて培養した菌体（両者ともY型菌）間では、プロフィールの相違は認められなかった。

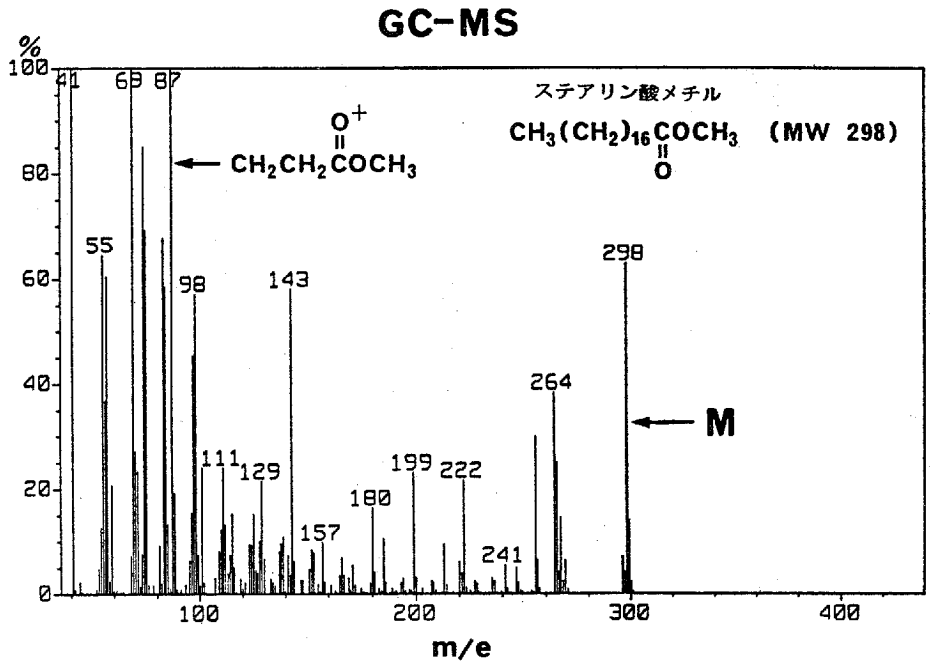


図10 ステアリン酸メチルに相当するピークのガスマススペクトラム。  
M：分子イオンピーク。

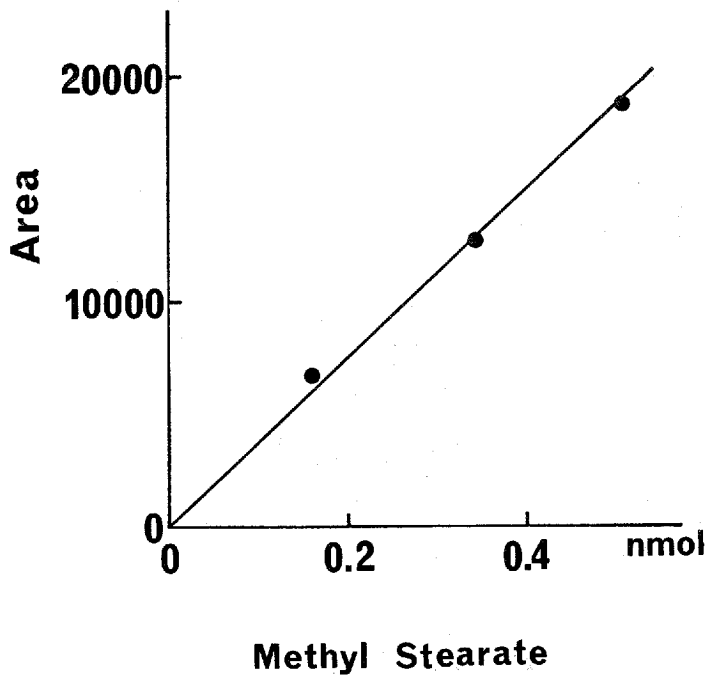


図11 ステアリン酸メチルの検量曲線。

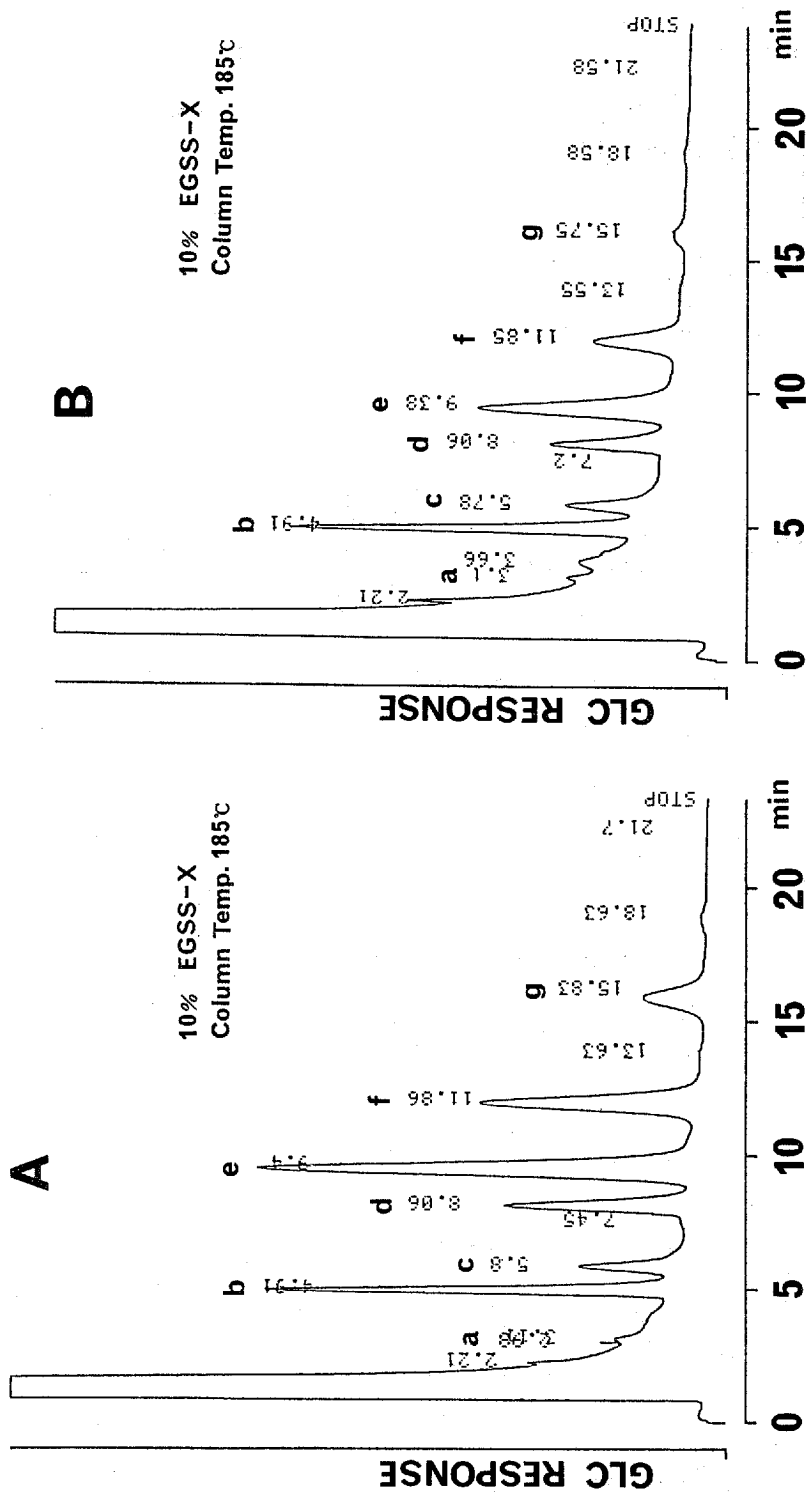


図12 Y型菌 (A) 及びF型菌 (B) の脂肪酸のガスクロマトグラム。

a : ミリスチン酸 ( C14:0 ), b : パルミチン酸 ( C16:0 ), c : パルミトレイン酸 ( C16:1 ), d : ステアリン酸 ( C18:0 ), e : オレイン酸 ( C18:1 ), f : リノール酸 ( C18:2 ), g : リノレイン酸 ( C18:3 ), カラム : 10% EGSS-X.



各脂肪酸含量を、図13 に示す。クロマトグラフのプロフィールからも明らかなように、C14:0 の脂肪酸は比率が少なかったのを除いて算出した。いずれの脂肪酸においてもF型菌の方が、DNA 当りの含量はるかに多いということがわかった（図 13 A）。

しかし、medium A を用いて25℃並びに37℃で培養した菌体間では、パルミチン酸を除いて有意な差はなかった（図13 B）。

次に、脂肪酸の構成比率を 図14 に示す。同様に、C14:0 の脂肪酸は比率が少なかったのを除いて計算した。その結果、Y型菌と比べてF型菌の脂肪酸構成比は、C16:0 並びに C16:1 のような炭素鎖の短い脂肪酸が、有意に多いことがわかった（図14 A）。Medium A を用いて25℃並びに37℃にて培養した菌体（両者ともY型菌）間では、それぞれの脂肪酸構成比は 5%で有意な差は認められなかった（図14 B）。

## 第IV章 放射性酢酸のステロール並びに脂肪酸への取り込み

### 第1節 概要

第III章から、脂質構成がY、F両型菌で異なっていることが、明らかとなった。これらのことは、両型菌において脂質代謝に相違があることを示唆するものと考えられる。そこで、両型菌に $[^{14}\text{C}]$ でラベルした放射性酢酸を取り込ませ、ステロール並びに脂肪酸の代謝能を検討することとした。

### 第2節 脂質の抽出

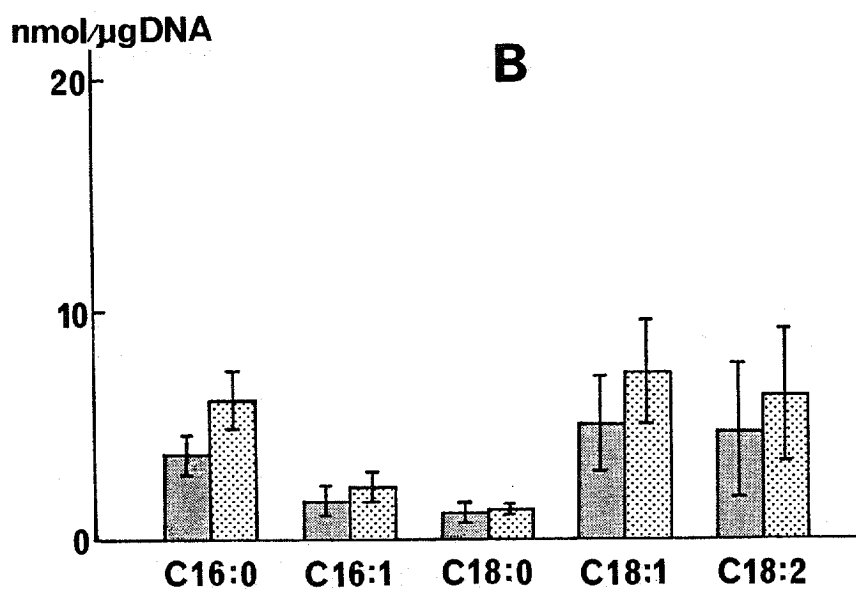
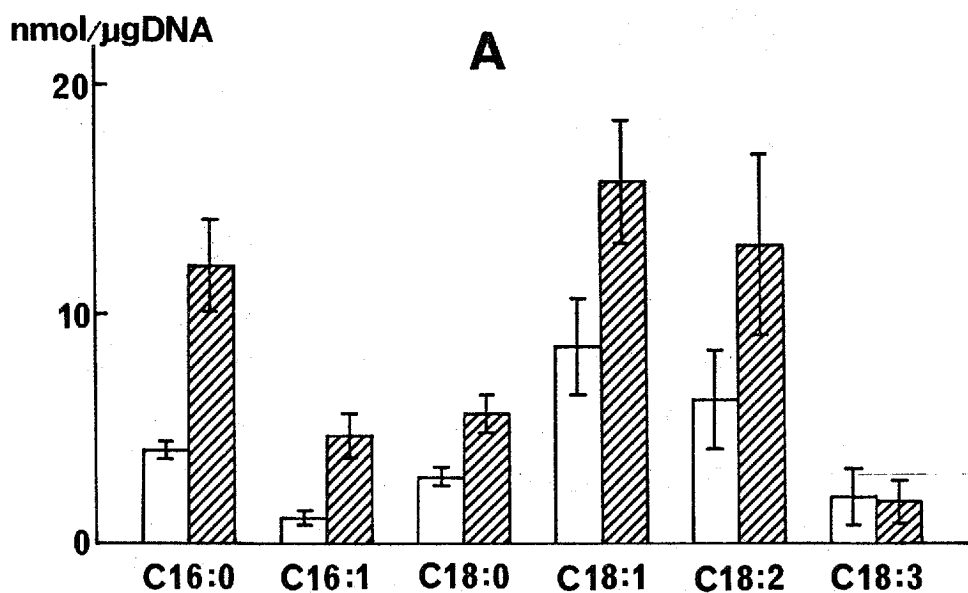


図13 各培養菌体における DNA  $\mu$ g 当りの各脂肪酸の含量.

A : Y型 (□) 及び F型 (▨) の菌体における DNA  $\mu$ g 当りの各脂肪酸の含量,

B : 25°C (■) 及び 37°C (▤) の培養菌体における DNA  $\mu$ g 当りの各脂肪酸の含量.

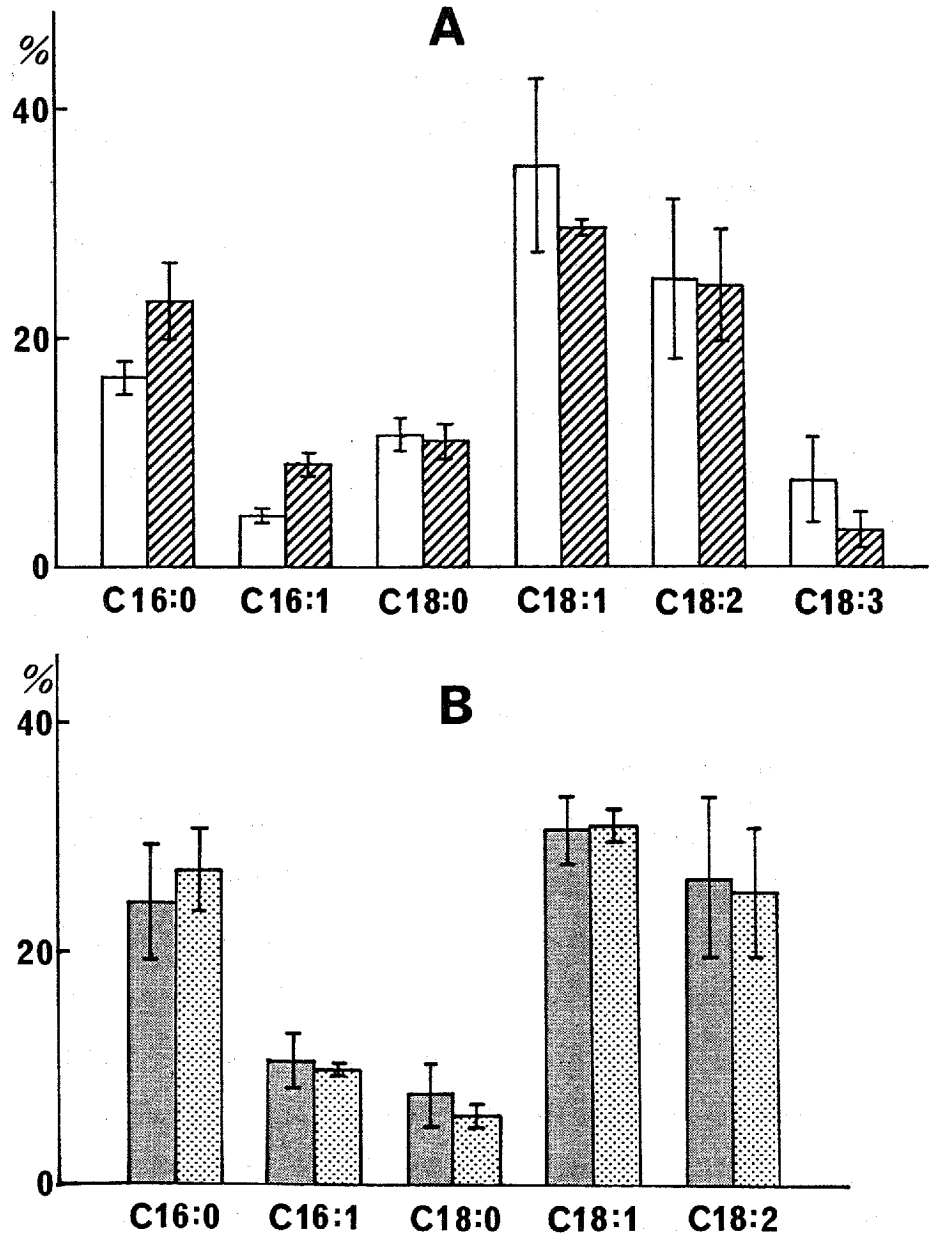


図14 各培養菌体における DNA  $\mu\text{g}$  当りの各脂肪酸の構成比率.

A : Y型 (□) 及び F型 (▨) の菌体における DNA  $\mu\text{g}$  当りの各脂肪酸の構成比率,

B : 25°C (■) 及び 37°C (▤) の培養菌体における DNA  $\mu\text{g}$  当りの各脂肪酸の構成比率.

前章と同様に medium A にて前培養した C.albicans を洗淨後 medium B に  $4.65 \times 10^4$  cells/ml の濃度になるように接種した。尚、medium B 中には、 $[2-^{14}\text{C}]$ acetate を最終濃度  $2 \mu\text{Ci/ml}$  になるように加えた。発育曲線から Y、F 型菌のそれぞれの doubling time は、6 時間、2 時間と計算されたので、Y 型菌は、9、18、27 時間、F 型菌は、3、6、9 時間それぞれ振盪培養し集菌した。

反応終了後、最終濃度が 5% になるように TCA を加えて反応を停止させ、よく洗淨し集菌<sup>34)</sup>した。その後、前章と同様にして細胞壁を溶解し脂質を抽出した。

### 第 3 節 脂質分析

#### 第 1 項 ステロール

抽出した脂質試料の一部は、前章で用いた方法に従ってケン化後、不ケン化脂質の抽出を行った。

抽出した試料は、水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ（島津 K.K., GC-6A 型）に直結したラジオデテクター（柳本 K.K., RD-1 型）にかけ、放射性ステロールの分析を行った。放射性ステロールの分析は、カラムに 1.5% OV-17（ガラスカラム 3.0 mm  $\times$  1.0 m）を使用し、カラム温度は  $245^\circ\text{C}$ 、試料注入部温度は  $265^\circ\text{C}$ 、carrier gas（He）の流速は  $1.5 \text{ kg/cm}^2$ （80 ml/min）に保った。RD-1 型における酸化は高温酸化銅炉上  $700^\circ\text{C}$  で行い、scavenge gas（He）の流速は 80 ml/min に、Q ガス（He + 1% iso-butane）の流速は 70 ml/min に保ち分析を行った。記録は、2 ペンレコーダー（島津 k.k., R-112M）にて行った。分析時内部標準物質として、ステロール分析時に、スクアレン、エルゴステロール、ラノステロールを用いた。

図15,16 にその結果を示す。Y ( 図15 )、F ( 図16 ) 型菌のパターンには明瞭な相違は認められなかった。両型菌とも時間の経過とともに、最終生成物であるエルゴステロールが増加していていることが認められた。しかし、F型菌の9時間培養菌体のラジオガスクロマトグラムでは、スクアレンに相当する小さなピークが認められた。

## 第2項 脂肪酸

抽出した脂質試料の一部を用いて、前章と同様の方法に従って、直接メチル基転移を行い、脂肪酸を脂肪酸メチルエステルにし抽出した。

抽出した試料は、第1項と同様に水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフ ( 島津K.K., GC-6A型 ) に直結したラジオデテクター ( 柳本K.K., RD-1型 ) にかけて、放射性脂肪酸の分析を行った。放射性脂肪酸の分析条件は、カラムに 10% EGSS-X ( ガラスカラム 3.0 mm × 3.0 m ) を使用し、カラム温度は185℃、試料注入部温度は210℃、carrier gas ( He ) の流速は 1.5 kg/cm<sup>2</sup> ( 80 ml/min ) に保った。また、RD-1型における酸化は高温酸化銅炉上700℃で行い、scavenge gas ( He ) の流速は 80 ml/min に、Qガス ( He + 1% iso-butane ) の流速は 70 ml/min に保ち分析を行った。記録は、2ペンレコーダー ( 島津k.k., R-112M ) にて行った。分析時内部標準物質として、パルミチン酸 ( C16:0 )、パルミトレイン酸 ( C16:1)、ステアリン酸 ( C18:0 )、オレイン酸 ( C18:1 )、リノール酸 ( C18:2 ) を用いた。

図17,18 にその結果を示す。両型菌とも時間の経過とともに、C16 から C18 に代謝されていていることが認められた。しかし、

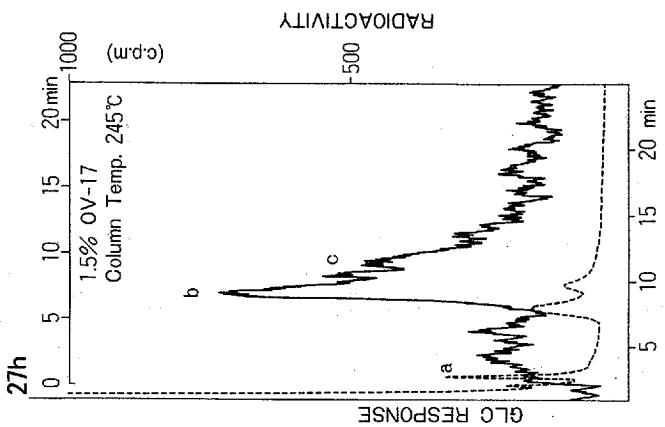
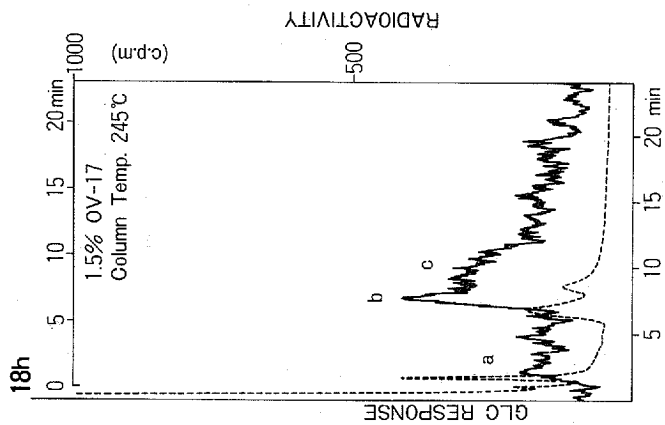
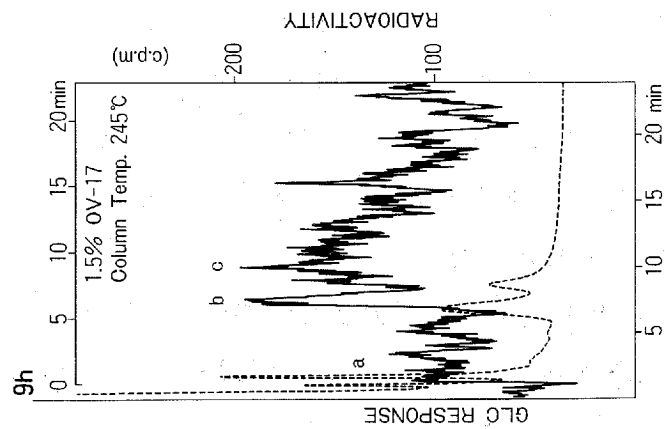


図15 Y型菌の各培養時間における [2-<sup>14</sup>C]acetate の不ケン化脂質画分への取り込みを

示すラジオガスクロマトグラム。

a : スクアレン, b : エルゴステロール, c : ラノステロール, カラム 1.5% OV-17.

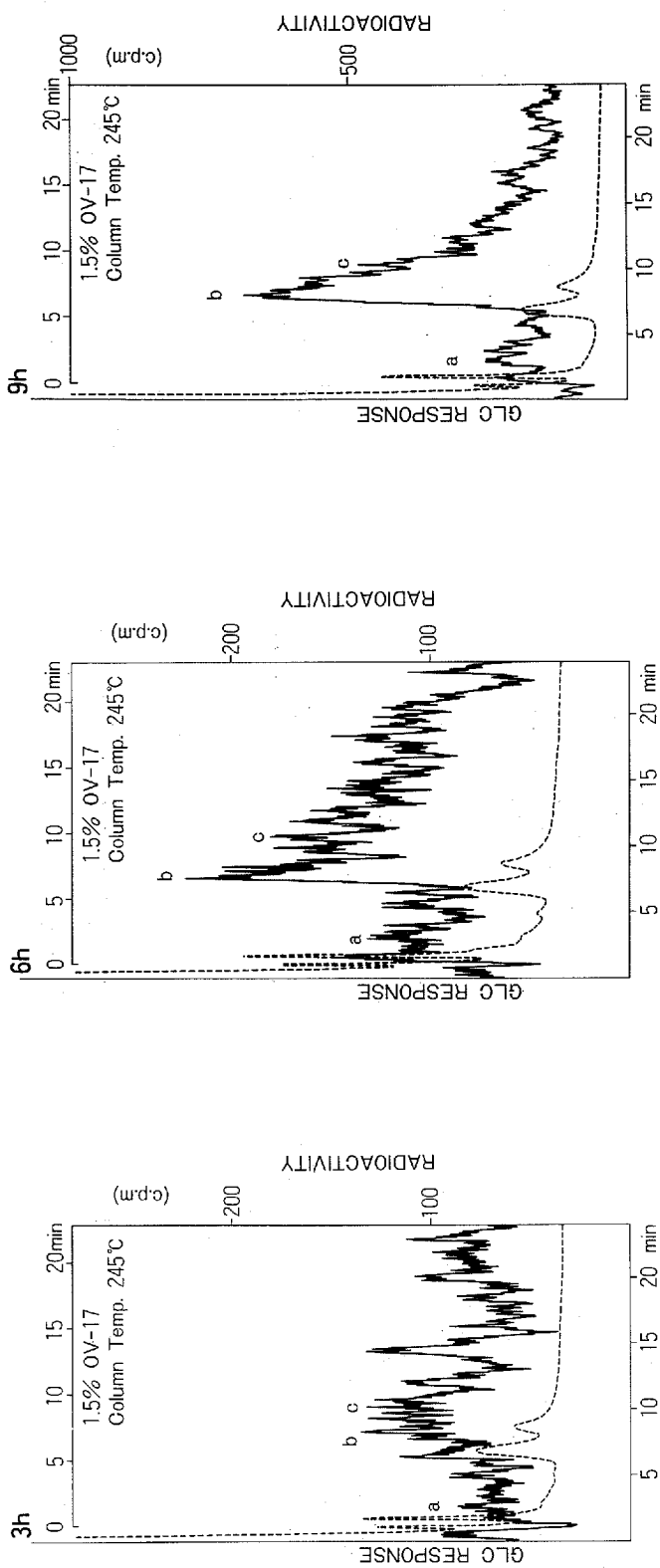


図16 F型菌の各培養時間における $[2-^{14}C]$ acetateの不ケン化脂質画分への取り込みを示すラジオガスクロマトグラム。

a: スクアレン, b: エルゴステロール, c: ラノステロール, カラム 1.5% OV-17.

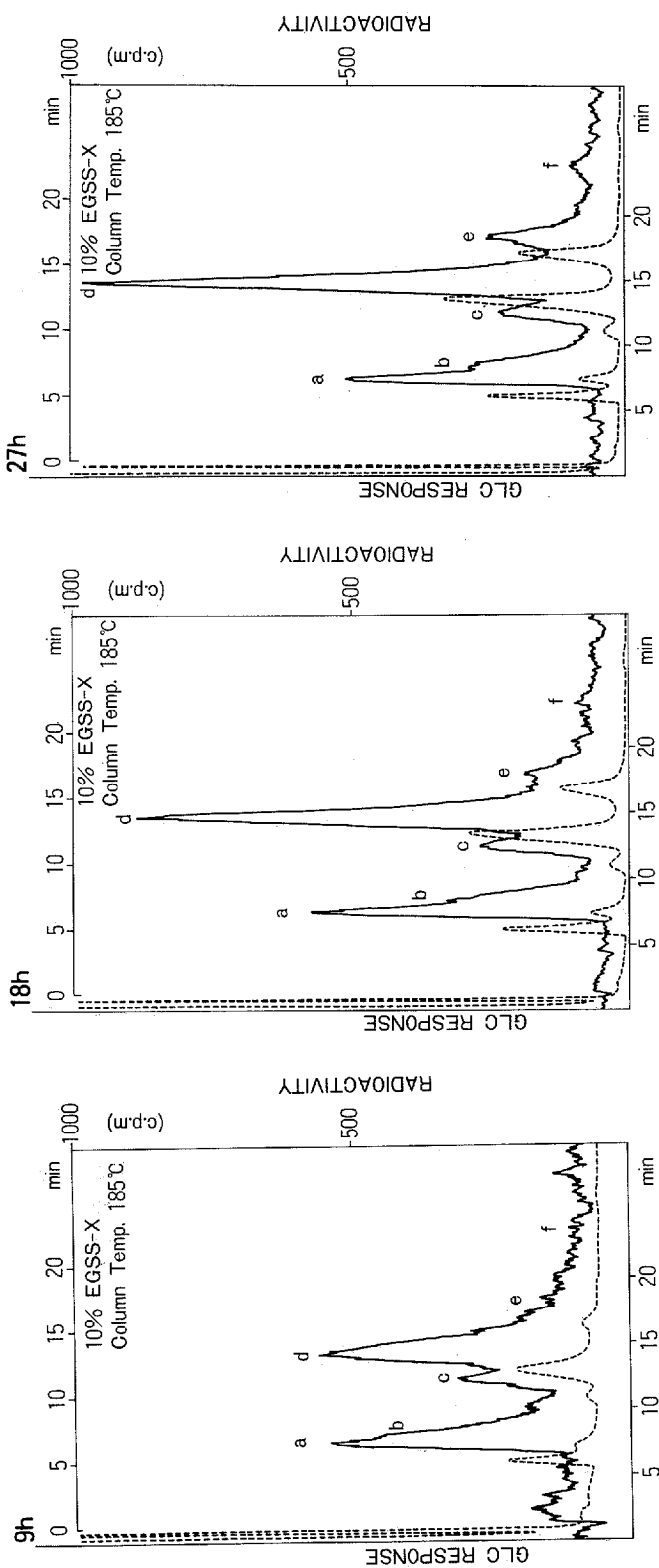


図17 Y型菌の各培養時間における[2-<sup>14</sup>C]acetateの脂肪酸画分への取り込みを示す  
ラジオガスクロマトグラム.

a : パルミチン酸 (C16:0), b : パルミトレイン酸 (C16:1), c : ステアリン酸 (C18:0), d : オレイン酸 (C18:1), e : リノール酸 (C18:2), f : リノレイン酸 (C18:3), カラム : 10% EGSS-X.



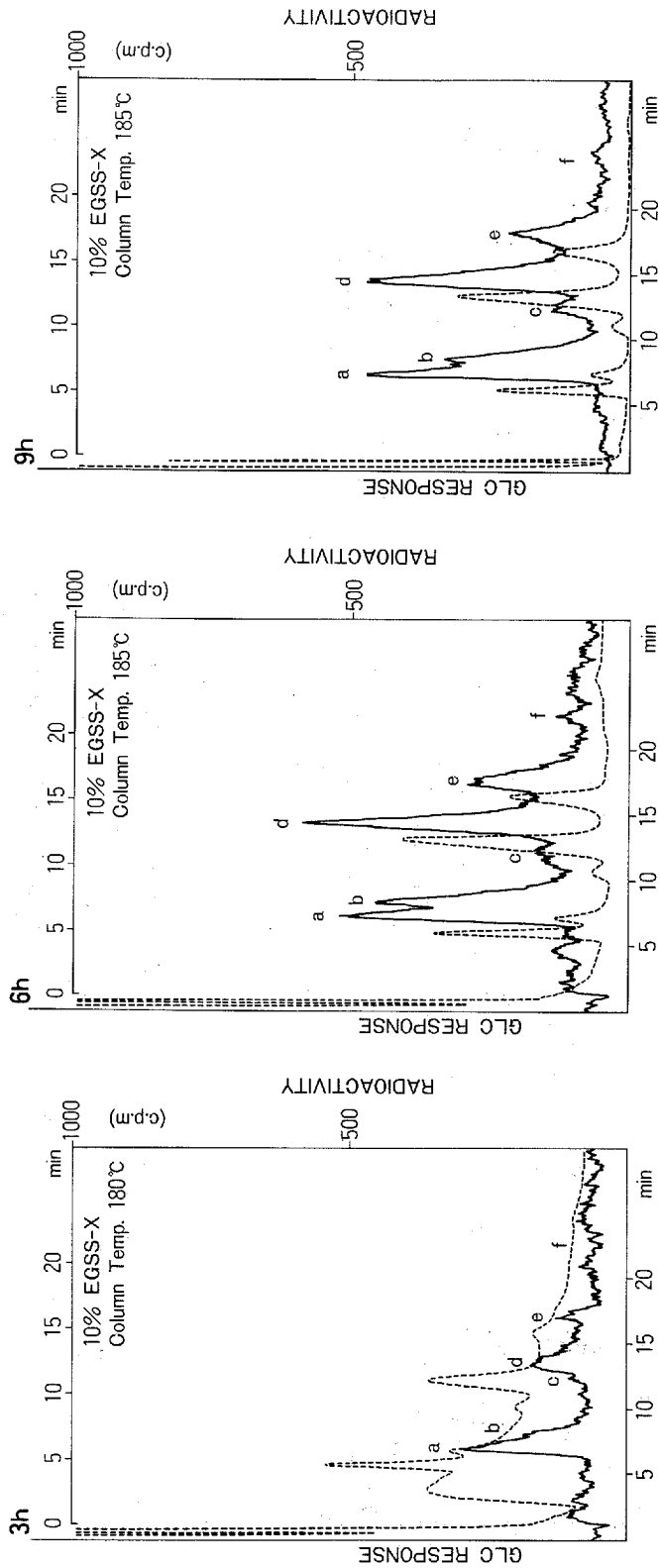


図18 F型菌の各培養時間における $[2-^{14}\text{C}]$ acetateの脂肪酸画分への取り込みを示すラジオガスクロマトグラム。

a : パルミチン酸 ( C16:0 ), b : パルミトレイン酸 ( C16:1 ), c : ステアリン酸 ( C18:0 ), d : オレイン酸 ( C18:1 ), e : リノール酸 ( C18:2 ), f : リノレイン酸 ( C18:3 ), カラム : 10% EGSS-X.

両型菌において明らかな相違が認められた。すなわちF型菌において、パルミチン酸の比率が著しく高かった。

## 第V章 結果の要約

- 1) DNA 当りのリン脂質、エルゴステロール及び各脂肪酸含量は、F型菌の方がY型菌より多く、F型菌が脂質に富んだ細胞であることがわかった。
- 2) エルゴステロール生合成の中間体であるスクアレンは、Y型菌と比較してF型菌において著しく多く含まれていた。
- 3) 各脂肪酸の構成比率が、両型菌において異なり、Y型菌と比較してF型菌では、パルミチン酸並びにパルミトレイン酸のような炭素鎖の短い脂肪酸の構成比が高かった。
- 4) ステロール代謝を検討したところ、培養初期では、相互に分離しない中間体が多くみられ、時間の経過とともにエルゴステロールが増加していくことが認められ、両型菌の間には著しい相違は見られなかった。
- 5) 脂肪酸代謝では、両型菌とも時間の経過とともにパルミチン酸からオレイン酸への伸長が認められたが、F型菌ではY型菌に比し、炭素鎖の短い脂肪酸への取り込みが高かった。
- 6) F型菌においては、脂質合成が著しく亢進し、脂肪酸需要が高いため、脂肪酸合成系の最初の産物あるいはそれに近い脂肪酸が供給にまわされ、脂肪酸の十分な伸長が行われないことが示唆された。

以上のことから、*C. albicans* の二形性と脂質との間に密接な関

連のあることが、強く示唆された。

## 第VI章 考 察

本研究の目的は、*C.albicans* のY型菌並びにF両型菌を培養し、得られた両型菌から脂質を抽出し、両型菌の脂質構成の異同並びにトレーサーとして投与した $[^{14}\text{C}]$ 酢酸の両型菌における代謝を詳細に検討することである。

従来、Y、F型菌の比較を行った研究は、両型菌をそれぞれ異なった培地で培養したものが多かった。しかし、培養条件が変化すれば脂質構成が変化することが推察され、脂質構成変化が、形態によるものかそれとも条件によるものか判別できないと考えられる。そこで、第II章で述べたようにF型変換誘導因子としては種々の物質並びに条件が報告されているが、本研究ではF型発育のために、培養温度、初期接種菌濃度、振盪速度、ビオチン濃度をF型発育に適した状態にして行った。そして、可能な限り同じ条件でY型菌を培養することを試みた。その結果、培養温度を $37^{\circ}\text{C}$ から $25^{\circ}\text{C}$ に下げることによりY型菌が培養できることがわかった。

F型菌並びにY型菌を採取し、その脂質含量を比較すると、Y型菌に比較してF型菌の方が、DNA 当りのリン脂質、エルゴステロール及び各脂肪酸含量が多いということがわかった。このことより、F型菌はY型菌に比較して脂質に富んだ細胞であることがわかるとともに、F型菌においては脂質合成が亢進していることが推察された。更に、エルゴステロール生合成の中間体であるスクアレンがF型菌において多いこと、また脂肪酸合成の最初の産物であるパルミ

チン酸が多いことから、F型菌において脂質代謝が亢進していることが考えられた。

酵母における脂肪酸合成は、酢酸から脂肪酸合成複合酵素系によってパルミチン酸並びにステアリン酸まで合成され<sup>41)</sup>、このパルミチン酸とステアリン酸との比率は、acetyl-CoA/malonyl-CoA の比率に依存していることが明らかにされた。このことから、ステアリン酸のある部分は、パルミチン酸から脂肪酸伸長機構によって伸長されることが考えられる。従ってステアリン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸及びリノレイン酸は、パルミチン酸の“ further metabolite ” であると考えられる。Y型菌において C18:0、C18:1 及び C18:3 の脂肪酸構成比がF型菌に比較して高いこと、一方F型菌において C16:0 及び C16:1 の構成比が高いことから、F型菌に比較してY型菌においては、“ mature ” な脂肪酸が多いと考えられる。これらの結果は、F型菌における脂肪酸の含量が、Y型菌の含量よりはるかに多いことを考えると、F型菌はY型菌と比較して、脂質代謝が亢進していると考えられる。このことは、[2-<sup>14</sup>C]acetate を medium 中に加えた実験からも明らかである。

しかし、温度により脂質構成がどのように変化するか調べなければ、上述の脂質構成変化が形態によるものであるとは断言できない。そこで、medium A において、25℃並びに37℃にてそれぞれ培養した菌体を用いて検討した。両温度で培養した菌体は、いずれもY型を示した。両者において、脂質構成の比較を行うと、リン脂質が、37℃培養菌体においてやや多いという点を除いて、不ケン化脂質、脂肪酸含量及び脂肪酸構成比のいずれも、両者間に有意な差は

認められなかった。また、Okuyama ら<sup>42)</sup>は、*Escherichia coli* のような細菌では、培養温度を変化させると不飽和脂肪酸の比率が低温培養菌体において増加すると報告している。また、酵母を用いた研究では、低温度培養菌体では、炭素鎖の短い脂肪酸が、増加していることが示された<sup>43)</sup>。これらの結果は、本研究において medium B を用い両温度で培養して得られた菌体の脂質構成の差異とは明らかに異なっている。従って、上において述べた相違は、培養温度による相違をほとんど含まず形態の相違によるものを反映していると考えることができる。

脂肪酸の構成比から、飽和脂肪酸に対する不飽和脂肪酸の比率を計算してみると、F型菌に比べて、Y型菌では、不飽和脂肪酸の比率が高かった。Chattaway ら<sup>13)</sup>は、Y、F型菌の細胞壁成分を分析し、F型菌はY型菌に比し約3倍量のキチンを含有していることを認めている。一方、Duran ら<sup>31)</sup>は、部分精製したキチンシンターゼを用いた実験から、この酵素の活性は飽和脂肪酸の添加によっては変化を受けないが、不飽和脂肪酸の添加により著しい阻害を受けることを報告している。本実験において見出した、Y型菌における不飽和脂肪酸の高比率が、遊離脂肪酸においても反映されていると考え、Chattaway らによって見出されたF型菌ではY型菌よりキチンが多いという事実は、不飽和脂肪酸によるキチン合成の阻害によると思われることができるが、上記の仮定が成り立つかどうか等、尚、今後検討を要する問題が多い。

中性脂質は、Y、F型菌において痕跡程度しか認められなかった。このことは、Taylor らの *Saccharomyces cerevisiae* を用いて得られた知見<sup>35)</sup>、すなわち、トリアシルグリセロールは、対数増殖

期後期から増加し始め、静止期に入るに従い著しく増加した現象、と一致するものと考えられる。この事実は、トリアシルグリセロールは貯蔵脂肪として使われるため、対数増殖期にあるときは少ないと推察された。従って、本研究で分析した脂肪酸は、ほとんどリン脂質及びステロールエステルの構成成分と考えられた。

臨床的見地からは第 I 章で既に述べたように、ポリエン系の抗真菌剤は、エルゴステロールに作用することが知られている。エルゴステロール含量の異なる変異株を用いて、ナイスタチンの最小発育阻止濃度 (MIC) を調べた Hamilton の結果<sup>44)</sup>からは、エルゴステロール含量の多い菌体のほうが、MIC が大きいというものであった。Hamilton の結果から考えると、Y、F 両型菌においては、このような抗真菌剤に対する耐性の相違があると考えられた。

以上述べてきたように、Y、F 型菌において脂質構成並びに脂質代謝の相違が明らかになり、新しい所見が得られた。しかし、まだ解決していない問題も多く、二形性の複雑な機構等興味あるところである。

## 試薬

実験に用いた試薬は次に記載した会社や研究室より購入または供与された。

- エルゴステロール (Sigma Chemical Co.)
- ラノステロール、スクアレン (東京化成k.k.)
- ザイモステロール (京都大学理学部、香月教授)
- ミリスチン酸メチル、パルミチン酸メチル、パルミトレイン酸メチル、ステアリン酸メチル、オレイン酸メチル、リノール酸メチル (Sigma Chemical Co.)
- イーストエキス (DIFCO)
- ポリペプトン (大五栄養化学k.k.)
- [2-<sup>14</sup>C]acetate (58mCi/mmol) (Radiochemical center、England)
- Zymolyase-60000 (生化学工業k.k.)

ガスクロマトグラフに用いた担体は、全て 100/120 mesh に調整して使用した。

その他の試薬は片山化学工業k.k.、半井化学薬品k.k.より購入した。

## 参考文献

- 1) 浜田泰三 ( 1983 ) : デンチャープラークコントロール. 永末書店, 京都, 1-19, 昭和58.
- 2) Olsen, I. ( 1974 ) : Denture stomatitis. Occurrence and distribution of fungi. Acta Odontol. Scand. 32, 329-333.
- 3) 玉本光弘 ( 1984 ) : デンチャープラークのカンジダに関する研究. (第1報) デンチャープラークのカンジダ叢と義歯性口内炎との関係. 広大歯誌 16, 242-249, 昭和59.
- 4) Budtz-Jørgensen, E. ( 1974 ) : The significance of Candida albicans in denture stomatitis. Scand. J. Dent. Res. 82, 151-190.
- 5) Yamaguchi, H. ( 1974 ) : Mycelial development and chemical alteration of Candida albicans from biotin insufficiency. Sabouraudia 12, 320-328.
- 6) Gordon, P.A., Stewart, P.R. and Clark-Walker, G.D. ( 1971 ) : Fatty acid and sterol composition of Mucor genevensis in relation to dimorphism and anaerobic growth. J. Bacteriol. 107, 114-120.
- 7) Manocha, M.S. ( 1980 ) : Lipid composition of Paracoccidioides brasiliensis: Comparison between the yeast and mycelial forms. Sabouraudia 18, 281-286.
- 8) 坂野喜子, 矢野 高, 関谷 孝, 山田富保, 渡辺隆司, 野沢義則 ( 1981 ) : 二形性真菌 Candida albicans の形質膜の脂質構成とキチン合成酵素. 真菌誌 22, 243-250, 昭和56.
- 9) Marriott, M.S. ( 1975 ) : Isolation and chemical characterization of plasma membranes from the yeast and mycelial forms of Candida albicans. J. Gen. Microbiol. 86, 115-132.
- 10) 柳島直彦, 大嶋泰治, 大隅正子 ( 1982 ) : 酵母の解剖. 講談社, 東京, 109-



114, 昭和57.

- 11) Skinner, C.E. ( 1947 ) : The yeast like fungi : Candida and Brettanomyces. Bacteriol. Rev. 11, 227-274.
- 12) McClary, D.O. ( 1952 ) : Factors affecting the morphology of Candida albicans. Ann. Mo. Bot. Gard. 39, 137-164.
- 13) Chattaway, F. W., Holmes, M. R. and Barlow, A. J. E. ( 1968 ) : Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of Candida albicans. J. Gen. Microbiol. 51, 367-376.
- 14) Mardon, D.N., Hurst, S.K. and Balish, E. ( 1971 ) : Germ tube production by Candida albicans in minimal liquid culture media. Can. J. Microbiol. 17, 851-856.
- 15) Johnson, S.A.M., Guzman, M.G. and Aguilera, C.T. ( 1954 ) : Candida ( Monilia ) albicans. Effect of amino acids, glucose, pH, chlortetracycline ( aureomycin ), dibasic sodium and calcium phosphates, and anaerobic and aerobic conditions on its growth. Arch. Dermatol. 70, 49-60.
- 16) De Palma, P.A. ( 1966 ) : Biochemical and structural variations in the cell wall of Candida albicans under conditions of controlled morphogenesis. Thesis, Department of Botany, Boston University, Boston, Mass. : from Chattaway, F.W., Odds, F.C. and Barlow, A.J.E. ( 1971 ) : An examination of the production of hydrolytic enzymes and toxins by pathogenic strains of Candida albicans. J. Gen. Microbiol. 67, 255-263.
- 17) Mackenzie, D.W.R. ( 1962 ) : Germ tube identification of Candida albicans. J. Clin. Pathol. 15, 563-565.
- 18) Bernander, S. and Edebo, L. ( 1969 ) : Growth and phase conversion of Candida albicans in Dubos medium. Sabouraudia 7, 116-155.

- 19) Mardon, D., Balish, E. and Phillips, A.W. ( 1969 ) : Control of dimorphism in a biochemical variant of Candida albicans. J. Bacteriol. 100, 701-707.
- 20) Nickerson, W.J. and Mankowski, Z.T. ( 1953 ) : Role of nutrition in the maintenance of yeast-shape in Candida. Am. J. Bot. 40, 584-592.
- 21) Reynolds, R. and Braude, A. ( 1956 ) : The filament-inducing property of blood for C.albicans : Its nature and significance. Clin. Res. Pro. 4, 40. : from Bernander, S. and Edebo, L. ( 1969 ) : Growth and phase conversion of Candida albicans in Dubos medium. Sabouraudia 7, 116-155.
- 22) Widra, A. ( 1964 ) : Phosphate-directed Y-M variation in Candida albicans. Mycopathol. Mycol. Appl. 23, 197-202.
- 23) Tani, Y., Yamada, Y. and Kamihara, T. ( 1979 ) : Morphological change in Candida tropicalis pk 233 caused by ethanol and its prevention by myo-inositol. Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 351-355.
- 24) Yano, K., Yamada, T., Banno, Y., Sekiya, T. and Nozawa, Y. ( 1982 ) : Modification of lipid composition in a dimorphic fungus, Candida albicans during the yeast cell to hypha transformation. Jap. J. Med. Mycol. 23, 159-165.
- 25) Lingappa, B.T., Prasad, M., Lingappa, Y., Hunt, D.F. and Bieman, K. ( 1969 ) : Penethyl alcohol and tryptophol autoantibiotics produced by the fungus Candida albicans. Science 163, 192-194.
- 26) Hazen, K.C. and Cutler, J.E. ( 1979 ) : Autoregulation of germ tube formation by Candida albicans. Infect. Immun. 24, 661-666.
- 27) 山口英世, 岩田和夫 ( 1972 ) : 真菌細胞の二形性と壁の構造. 蛋白質 核酸 酵素 17, 588-603, 昭和47.
- 28) 野沢義則 ( 1975 ) : 生体膜の流動性と機能. 生化学 47, 52-82, 昭和50.

- 29) Morrisett, J.D., Pownall, H.J., Plumlee, R.T., Smith, L.C., Zehner, Z. E., Esfahani, M. and Wakil, S. ( 1975 ) : Multiple thermotropic phase transitions in Escherichia coli membranes and membrane lipids. J. Biol. Chem. 250, 6969-6976.
- 30) Braun, P.C. and Calderone, R.A. ( 1978 ) : Chitin synthesis in Candida albicans : Comparison of yeast and hyphal forms. J. Bacteriol. 135, 1472-1477.
- 31) Duran, A. and Cabib, E. ( 1978 ) : Solubilization and partial purification of yeast chitin synthetase. J. Biol. Chem. 253, 4419-4425.
- 32) 野沢義則 ( 1974 ) : 生体膜レベルから見た Polyene 系抗生物質の作用機序. 真菌誌 15, 11-17, 昭和49.
- 33) Bligh, E.G. and Dyer, W.J. ( 1959 ) : A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.
- 34) 渋谷 勲, 赤松 穰, 土井 修, 鬼頭 誠 ( 1972 ) : 微生物膜脂質研究法. 化学と生物 10, 672-681, 昭和49.
- 35) Taylor, F.R. and Parks, L.W. ( 1979 ) : Triacylglycerol metabolism in Saccharomyces cerevisiae relation to phospholipid synthesis. Biochim. Biophys. Acta 575, 204-214.
- 36) Schneider, W.C. ( 1945 ) : Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. J. Biol. Chem. 161, 293-303.
- 37) Dittmer, J.C. and Wells, M.A. ( 1969 ) : Quantitative and qualitative analysis of lipids and lipid components. Methods Enzymol. 14, 482-530.
- 38) Fiske, C.H. and Subbarow, Y. ( 1925 ) : The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66, 375-400.
- 39) Nagai, J., Katsuki, H., Nishikawa, Y., Nakamura, I., Kamihara, T. and

- Fukui, S. ( 1974 ) : Effects of thiamine and pyridoxine on the content and composition of sterols in Saccharomyces carlsbergensis 4228. Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 555-560.
- 40) Ackman, R.G. ( 1969 ) : Gas-liquid chromatography of fatty acids and esters. Methods Enzymol. 14, 330-381.
- 41) Sumper, M., Oesterhelt, D., Riepertinger, C. und Lynen, F. ( 1969 ) : Die Synthese verschiedener Carbonsäuren durch den Multienzymkomplex der Fettsäuresynthese aus Hefe und die Erklärung ihrer Bildung. Eur. J. Biochem. 10, 377-387.
- 42) Okuyama, H., Yamada, K., Kameyama, Y., Ikezawa, H., Akamatsu, Y. and Nojima, S. ( 1977 ) : Regulation of membrane lipid synthesis in Escherichia coli after shifts in temperature. Biochemistry 16, 2668-2673.
- 43) Okuyama, H., Saito, M., Joshi, V.C., Gunsberg, S. and Wakil, S.J. ( 1979 ) : Regulation by temperature of the chain length of fatty acids in yeast. J. Biol. Chem. 254, 12281-12284.
- 44) Hamilton-Miller, J. M. T. ( 1972 ) : Sterols from polyene-resistant mutants of Candida albicans. J. Gen. Microbiol. 73, 201-203.