

*Candida albicans*の鑑別のための新しい厚膜孢子形成培地  
(Canary培地)の検討

鳥取大学医学部保健学科病態検査学講座

中本幸子

Studies on a new medium, Canary medium, for chlamyospore  
formation for the differentiation of *Candida albicans*

Sachiko NAKAMOTO

*Department of Pathobiological Science and Technology, School of Health Science,  
Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago 683-8504, Japan*

**ABSTRACT**

The purpose of this study was to clarify the effect of a new base, Canary seed medium, on the promotion of chlamyospore formation of *C. albicans*. Canary medium was made from the heat-extracted solution of canary seeds. On Canary medium, *C. albicans* were both introduced into yeast-form growth and mycelial growth with chlamyospore formation, followed by unique two-floor structure. The mycelial growth with chlamyospore were promoted by decreasing of canary seed concentration, by the addition of Tween 80 or increasing of fungi density. However, high fungi density was inhibited along with the extension of the mycelia. When 45 strains of yeast-form fungi were incubated on improved Canary medium which was diluted four-fold and added Tween 80, 97% of the differentiation was confirmed in overnight culture. These results indicated that the Canary medium is useful for more rapid differentiation of *C. albicans*. (Accepted on 22 September, 2003)

**Key words :** *Candida albicans*, Chlamyospore, Canary medium

はじめに

*Candida albicans* (*C. albicans*) は日和見感染の原因菌の1つであり、免疫機能低下、基礎疾患を持つ患者や易感染者の増加により本菌の検出は増加している。形態学的には環境条件により酵母形と菌糸形に変換することができる二形性真菌で、特に厚膜孢子と発芽管形成能は酵母様真菌の中で

本菌に見られる特性であった。しかし、最近、新種の *C. dubliniensis* も同じ性質を持つことが報告された<sup>1-3)</sup>。この特徴的形態形成<sup>4-7)</sup>は *C. albicans* の診断の基準となっている。これらは判定時間に大きな差が見られ、数時間で判定できる発芽管形成試験に対して、厚膜孢子形成は数日を要する。日常的検査ではもっぱら前者が利用されているが、菌種の鑑別・同定には後者が欠かせない検査項目

の1つである。

微生物検査は検体中の菌を分離し、単離したcolonyを獲得するいわゆる分離培養が最初のステップで、そのcolonyを用いて菌の鑑別・同定や薬剤感受性検査を行うのが第二あるいは第三のステップである。各ステップでは、菌の活発な代謝活性が必要であり、そのためには一定時間の培養は不可欠である。従って、第一と第二ステップを同時に行える方法は真菌検査の迅速化につながる。真菌の培地にはSabouraud培地やPotato dextrose寒天培地といった分離培地の他に、最近CHROMagar candida培地やAlbicans ID2培地などの培地が報告されている<sup>8-10)</sup>。これらの培地は分離培養で形成したcolony性状によって菌種を推定出来る鑑別・分離培地であり、検査の迅速化に果たす役割は大きい。

真菌の培地基材としてpotatoの他にもcorn meal, riceやcarrotなどが用いられている。Staib<sup>3)</sup>らは、niger seedより作製した培地が*Cryptococcus neoformans*の鑑別診断に有用であり、さらに、この培地で*C. dubliniensis*のみが厚膜胞子形成することを報告した。この報告は*C. albicans*の厚膜胞子形成を検討する上で、他の種子に対する非常に大きな興味を引き起こさせた。また、niger seedは小鳥の餌としてペットショップで市販されており、安価で、入手も容易であった。そこで、*C. albicans*の高い菌糸形成と厚膜胞子形成を促す培地基材を検索する目的でcanary seedについて検討を行ったところ、canary seedより作製したCanary培地で*C. albicans*は良好に増殖し、特有なcolony形成と早期に厚膜胞子形成することが確認された。Canary培地における*C. albicans*の増殖様態と迅速診断への応用のために検討を行ったので報告する。

## 材料および方法

### 1 菌株

*C. albicans* IFO 1385株1株（協和発酵より購入）は標準株として使用した。さらに、臨床材料より分離、同定し、保健学科に保存している酵母様真菌44株（*C. albicans* 32株、その他の酵母様真菌12株）を使用した。これらの菌の生化学的性状はApiCオクサノグラム（アスカ製薬）、形態学的性状はcorn meal培地による厚膜胞子形成試験および血清によるgerm tube形成試験を実施して、

総合的に菌を同定した。実験にはSabouraud培地で1晩培養した新鮮菌を使用した。

### 2 Canary培地

Canary培地は次のように調整した。皮付きのCanary seeds 50 gに1 Lの純水を加えて（5%）、熱抽出（121°C, 15分）を行った。これを遠心分離（3,500 rpm, 10分）し、その上清をさらに濾紙（東洋濾紙no. 2）で濾過した。この濾液に寒天粉末を1.5%に加えて、オートクレーブ滅菌後シャーレに分注し、Canary平板培地を作製した。

### 3 検討方法

平板培地に*C. albicans*を分離的手法により画線塗抹し、30°Cで好氣的に培養した。培養17時間目、2日目、3日目と5日目に肉眼で孤立colony性状を観察した。同時に、平板培地の裏より弱拡大顕微鏡で菌の形態と厚膜胞子形成を観察した。菌を画線塗抹する開始部位の菌密集部位、孤立colonyの散在する終了部位の2ヶ所で観察した。菌密集部位では弱拡大顕微鏡（100倍）10視野中、孤立colonyは10ヶを観察し、その範囲内の厚膜胞子形成の有無を判定し、厚膜胞子の検出率（%）を算出した。

### 4 Canary 培地の改良

5% canary seed抽出液を純水で希釈して、2.5%（2倍希釈）、1.25%（4倍希釈）と0.5%（10倍希釈）の各濃度の寒天平板培地を作製し、Canary seedの濃度による厚膜胞子形成効果を検討した。さらに、Canary寒天培地にTween 80を1%に添加したCanary Tween 80（Canary T80）寒天培地を作製して、Tween 80添加効果を検討した。これらの結果をもとにCanary seed濃度を1.25%（4倍希釈）に希釈し、1% Tween 80を添加して改良した新しいCanary培地（改良Canary培地）を作製した。

### 5 厚膜胞子の迅速同定方法の検討

シャーレの裏よりマジックで区画した改良Canary培地上に純培養菌を画線塗抹し培養後、厚膜胞子の検出率を比較した。塗抹方法として1本線を引いた上をさらにジグザグに線を引くジグザグ塗抹と穿刺法の2つの方法で比較した。さらに、改良Canary培地で*C. albicans* 33株、その他の酵

表1 Colony形成の経時変化

培地	培養時間 (hr)	直径(mm)	肉眼観察所見		直接顕微鏡観察所見	
			形・辺縁	その他の性状	中央部	周辺部
Sabouraud	17	0.5	単円・S型	白色・凸・光沢	Y	Y
	44	1.2	単円・S型	白色・凸・光沢	Y	Y
	72	3.5	単円・S型	白色・凸・光沢	Y	Y
	120	5	単円・S型	白色・凸・光沢	Y	Y
Canary	17	0.3	単円・S型	白色・凸・光沢	Y	CS <sup>+</sup> 短菌糸
	44	1	単円・S型	白色・凸・光沢	Y	Y
	72	1.5	周囲に白濁	白色・凸・光沢	Y	CS <sup>+</sup> /-形成菌糸
	120	2	二重円・S/R型	白色・凸・光沢	Y	CS <sup>+</sup> /-形成菌糸

S/R型：Smooth type or Rough type colony；CS：Chlamydospore（厚膜胞子）；Y：Yeast form cell（酵母様細胞）

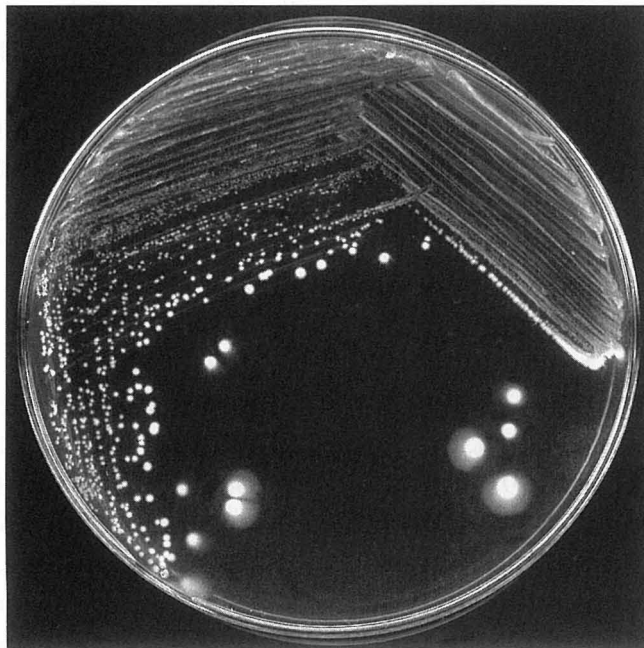


図1 Canary培養平板

Canary培地に*C. albicans*を画線塗抹し，30°Cで5日間培養した。

母様真菌12株の合計45菌株を培養し，厚膜胞子形成による*C. albicans*の鑑別を行った。

## 結 果

### 1 Canary培地による*C. albicans*の培養性状の観察

*C. albicans*をCanary培地とSabouraud培地に分離的手法により画線塗抹し，孤立colony形成の経時変化を表1に示した。Canary培地上で菌は一晚

培養すると盛り上がった微小colonyを形成し，連続的に成長した。このcolonyの大きさはSabouraud培地上のものと比較すると約半分程度であった。しかし，培養3日目頃よりその周辺に白濁を生じ，培養5日目には明瞭な二重のリング状に見えるcolonyとなった。白濁層を含む直径はSabouraud培地上のcolonyと同等かそれ以上であった（データ省略）。Canary培地の5日間培養平板の中央から下位部に見られる孤立したcolonyが

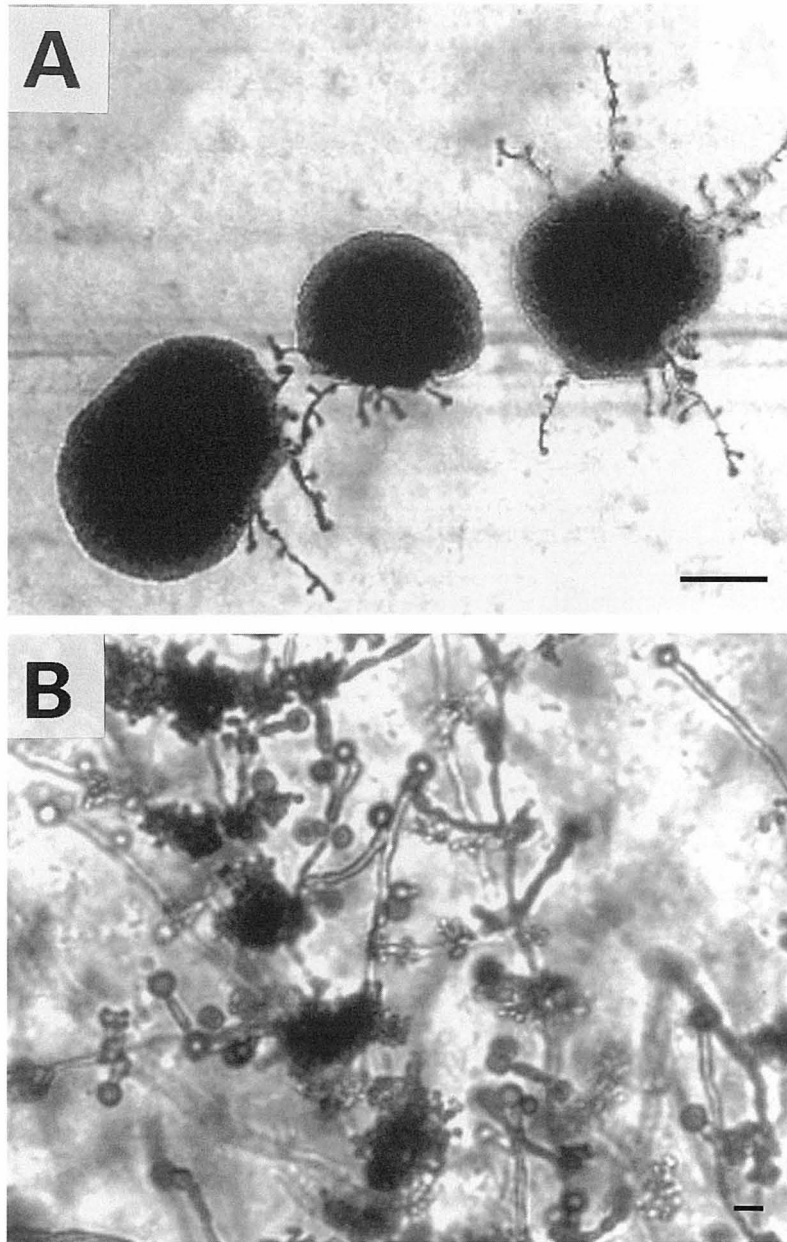


図 2 孤立colonyの*C. albicans*の形態

Canary培地で30°C培養した.

A : 24時間培養した針頭状のcolony, bar = 100 $\mu$ m

B : 5日間培養した二重のリング状に見えるcolonyの白濁部, bar = 10 $\mu$ m

二重のリング状に見えるcolonyである (図 1). この孤立colonyの盛り上がった部分は酵母様細胞からなっており, その周辺で培養初期に厚膜胞子を伴った短い仮性菌糸が見られた (図 2A). 2日目頃には厚膜胞子が消失する傾向が見られるが, 3日目頃より再び厚膜胞子を伴う菌糸が見られた. 培養5日目の白濁層は良好な厚膜胞子形成菌糸が見られた (図 2B). しかし, 白濁層の周辺ほど

菌糸の伸長と分岐が目立ち, 厚膜胞子未形成傾向が強かった. 一方, 菌密集部位では培養17時間で既に厚膜胞子形成した短く分化の少ない仮性菌糸が形成していた (図 3A). 2日目には酵母様細胞の増殖が目立ち, 菌糸は減少していた. しかし, 厚膜胞子が酵母様細胞の菌塊の中や縁に認められた (図 3B).

Canary培地の菌密集部位と孤立colonyの散在

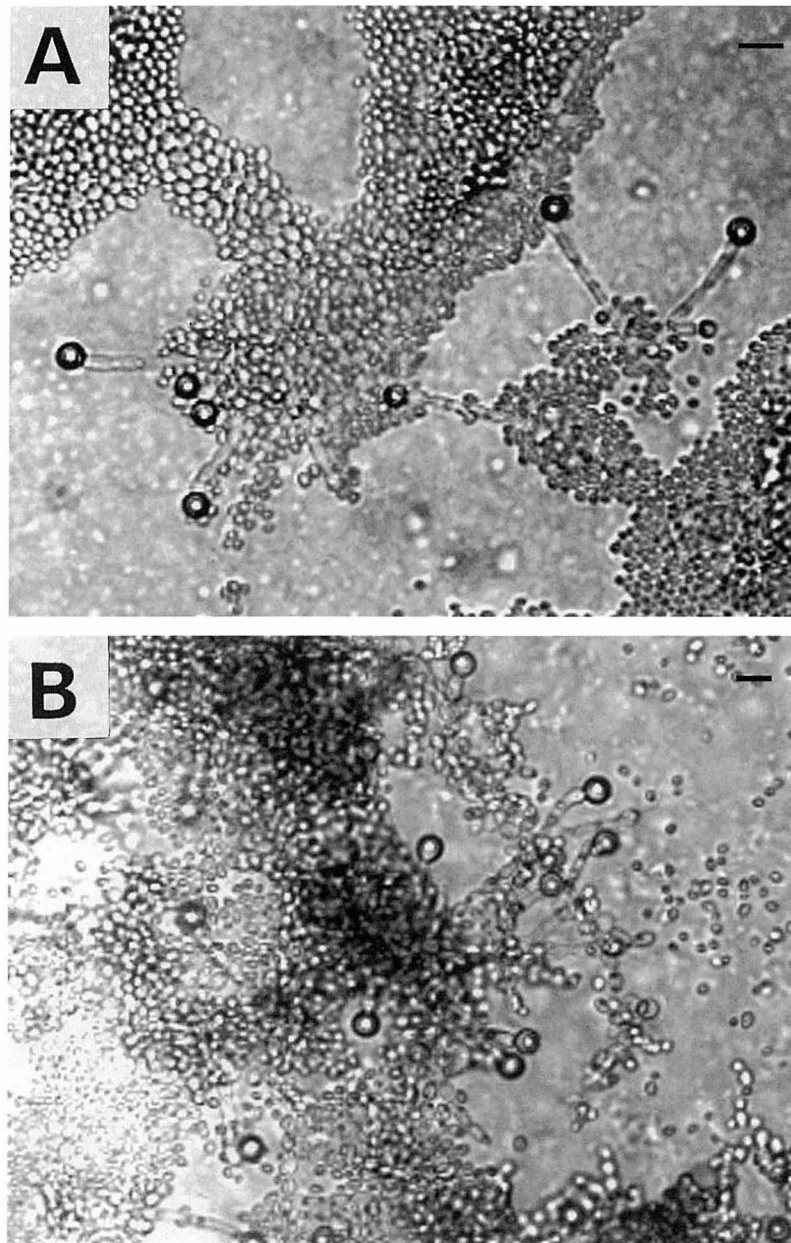


図3 培養平板培地の菌密集部位における *C. albicans* の形態

A : Canary培地の17時間培養, bar = 10 $\mu$ m

B : Canary培地の2日間培養, bar = 10 $\mu$ m

する部位で厚膜胞子の検出率を比較した (図 4). 菌密集部位が培養17時間で100%と高い検出率が得られた. 培養2日目から検出率は低下をはじめ, 培養5日目にはさらに低下した. 一方, 孤立 colonyの散在する部位では菌密集部位と逆に, 厚膜胞子の検出率は培養初期に低いが培養後期に上昇した.

## 2 Tween 80添加効果

Canary培地とCanary T80培地の菌密集部位と孤立 colonyの散在する部位で厚膜胞子の検出率を比較すると, いずれの部位でもTween 80を添加すると上昇し, Canary T80培地の菌密集部位では培養時間に関わらず100%に検出できた (図 5). 顕微鏡観察では厚膜胞子を形成した菌糸の形成量の増加が見られた.

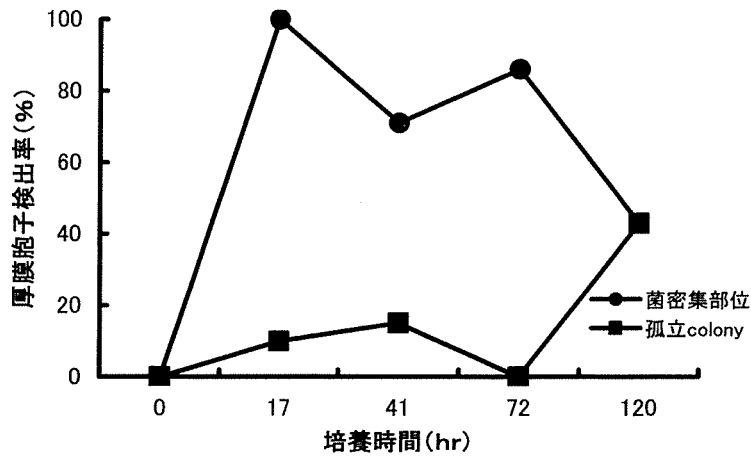


図 4 Canary培地における厚膜胞子検出部位

C. albicans 7株をCanary培地に分離し、30°Cで5日間培養した。菌糸形態や厚膜胞子形成の観察は培養17時間目、2日目、3日目と5日目にそれぞれの部位で行った。

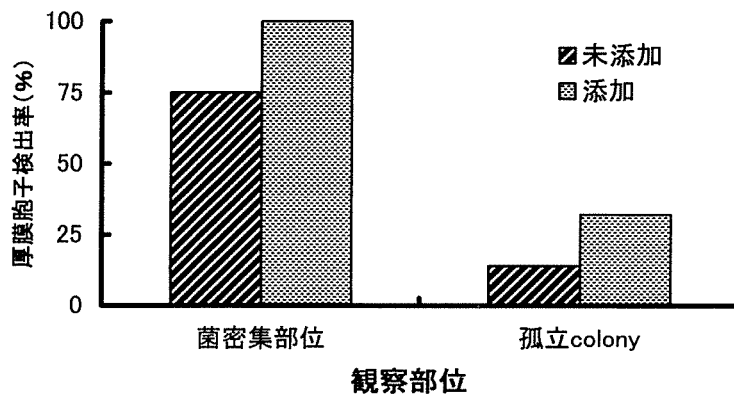


図 5 Tween 80添加効果

C. albicans 2株をCanary培地とCanary T80培地に分離培養した。菌糸形態や厚膜胞子形成の観察は培養17時間、2日目、3日目と5日目に各部位で行った。菌密集部位と孤立colonyの厚膜胞子検出率は各培養時間に得られた検出率を平均して求めた。

### 3 Canary seed濃度による厚膜胞子形成効果

Canary seed濃度の異なる培地における厚膜胞子検出率を図 6に示した。canary seedの濃度を減少すると菌密集部位と孤立colonyの散在する部位のいずれも検出率は上昇した。菌密集部位ではcanary seed濃度0.5%から2.5%の間で100%と高い検出ができた。しかし、0.5%では形態的に菌糸や厚膜胞子が細く小さくなっていた。従って、安定した形態形成と高い厚膜胞子検出率が得られるCanary seed濃度は1.25% (4倍稀釈) であった。

### 4 塗抹方法による厚膜胞子形成効果

改良Canary培地にジグザグ塗抹法と穿刺法の2つの塗抹方法により菌を塗抹し、培養後にそれぞれの厚膜胞子検出率を比較した(図 7)。ジグザグ塗抹法は培養中を通して高率な結果が得られた。穿刺法では培養17時間でジグザグ法に比べて25%低率であった。菌形態はジグザグ塗抹法ではいわゆる菌密集部位で見られる特有の短い菌糸が発育していたが、穿刺法では培養初期より旺盛な菌糸発育を示すものの(図 8)、厚膜胞子の出現は培養を続けると次第に増加した。

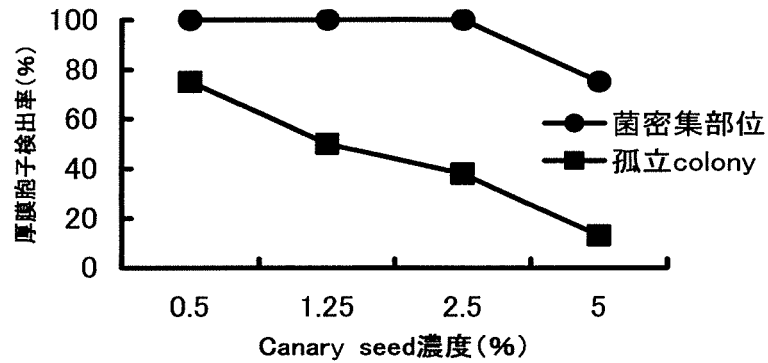


図 6 Canary seed濃度と厚膜胞子形成

*C. albicans* 2株を4種類のcanary seed濃度培地に培養した。菌糸形態や厚膜胞子形成の観察は培養17時間目、2日目、3日目と5日目に各部位で行った。各濃度の厚膜胞子検出率は各培養時間に得られた検出率を平均して求めた。

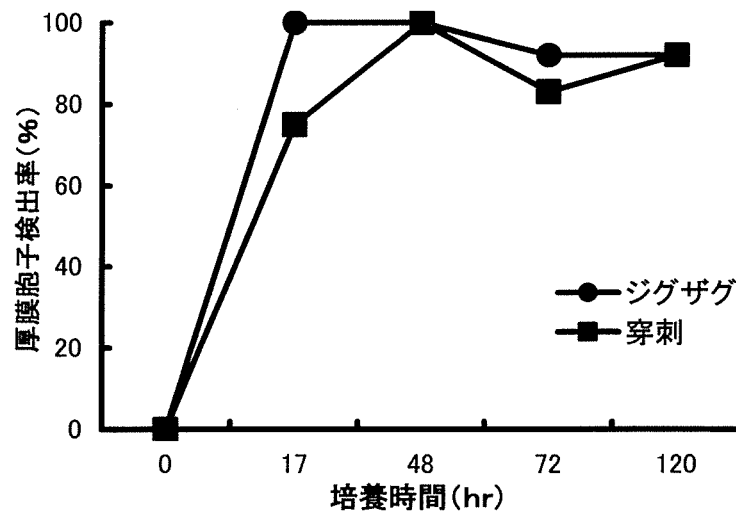


図 7 菌塗抹方法と厚膜胞子形成

*C. albicans* 12株を2種類の菌の塗抹方法で塗抹後培養した。菌糸形態や厚膜胞子形成の観察は培養17時間目、2日目、3日目と5日目に行った。

## 5 改良Canary培地の評価

改良Canary培地に菌を分離的手法により画線塗抹して、17時間培養した菌密集部位の菌の形態を示した(図9)。colonyが密集したその周辺や酵母様細胞の増殖により形成した菌塊の隙間に、厚膜胞子を形成した短い菌糸が明らかに増加したことが分かった。また、改良Canary培地で*C. albicans* 33株は一晚培養で97%、2日間培養で*C. albicans*を100%に診断できた。一方、その他の酵

母様真菌12株では、この改良Canary培地で菌糸形成を示す株もあったが、厚膜胞子形成は全く見られなかった(表2)。

## 考 察

Staub<sup>3)</sup>らが作製したniger seedを用いた培地は、現在、バードシード培地として市販されている。著者はこの実験の中でcanary seedを培地基材として初めて使用し、新しい培地、Canary培地を作製した。このcanary seedは小鳥の餌として市



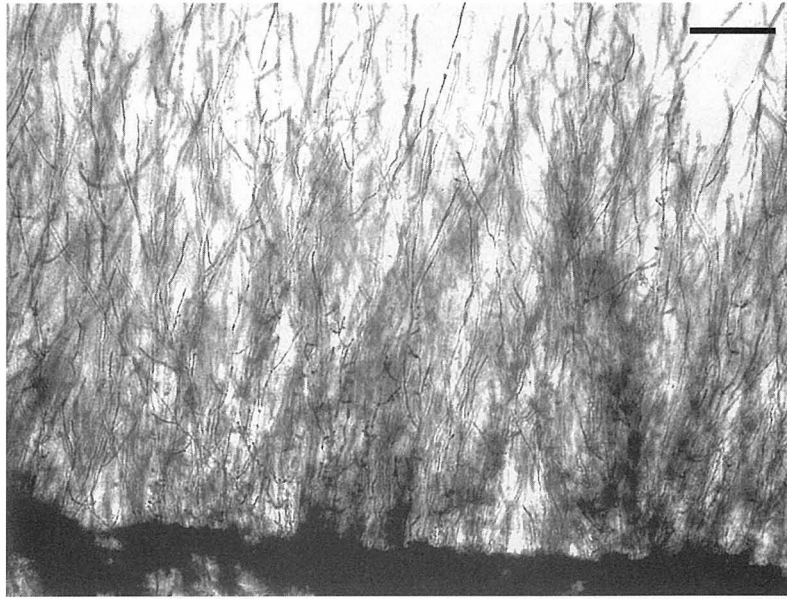


図 8 穿刺培養での*C. albicans*の形態

改良Canary培地に、穿刺的に菌を接種し30°Cで17時間培養した。  
Bar=100 $\mu$ m

販されたもので、カナリア諸島が原産地として知られるイネ科の植物の種子である。Canary培地は種子のままを熱抽出して得られた抽出液に寒天を加えた簡単な作製方法であり、安価であることが利点と考えられる。特に、*C. albicans*の厚膜孢子形成のために使用される培地として、種子に関するものは現在のところ知られておらず、今回検討したcanary seedが初めての報告である。

Canary培地で*C. albicans*を分離的手法により画線塗抹して、好氣的に培養すると、その培養平板上でユニークなcolony形成と厚膜孢子を伴った仮性菌糸発育が認められた。まず1つには、Sabouraud培地では見られないユニークな二重のリング状に見える孤立colony形成であり(図1)、このcolonyを顕微鏡で観察すると培地上に盛り上がった部分は酵母様細胞で出来ていたが、その外側の白濁層は厚膜孢子を伴った仮性菌糸で形成されていた(図2B)。しかし、この厚膜孢子を伴った仮性菌糸は、colony形成過程の早期の段階に、colony周辺で認められることから(図2A)、菌の発育方向は培養を開始してから非常に早期に決定されることを示している。発育方向が決定されると、酵母様細胞は培地上で盛り上がるように増殖し、菌糸発育菌は嫌氣的環境を好むことから<sup>5,11)</sup> Canary培地表面に画線塗抹された菌は培

地中に向かって根を生やすように伸長発育する。明瞭に形成された白濁層を顕微鏡で観察すると、比較的内側で厚膜孢子を伴う菌糸が分布し、一方、より外側は穿刺培養時に見られる伸長した菌糸が分布していた。これはこの白濁層の外側の菌糸はさらに周辺に向かって伸長発育していると考えられた。また、この菌糸の伸長発育と厚膜孢子形成は培地中の嫌氣度(図8)やcanary seedの濃度(図6)と関係していると考えられる。これは培地中のより深い部位やより外側に存在する菌糸に伸長発育が著しいが、厚膜孢子形成は伸長発育が緩和する環境的条件下で多く認められることから推定できる。このようにCanary培地は*C. albicans*を培地の上と中で同時に2つの形態形成を誘導出来ることが、二重のリング状に見える孤立colony形成につながっている。2つ目は、菌密集部で見られる厚膜孢子を形成した短いツクシ様の仮性菌糸(図3A)で、この菌糸は培養初期にすでに成長を止めた、いわゆる増殖を停止した様な成熟菌糸の体をなし、培養を継続しても菌糸の伸長が見られないが、その菌糸は培養一晩で、すでに厚膜孢子を形成している点に特徴があった(図3B)。いずれの部位においても、厚膜孢子形成が認められることは、これまででない初めての報告である。さらに、この培地上の2カ所は厚膜孢子形成の有



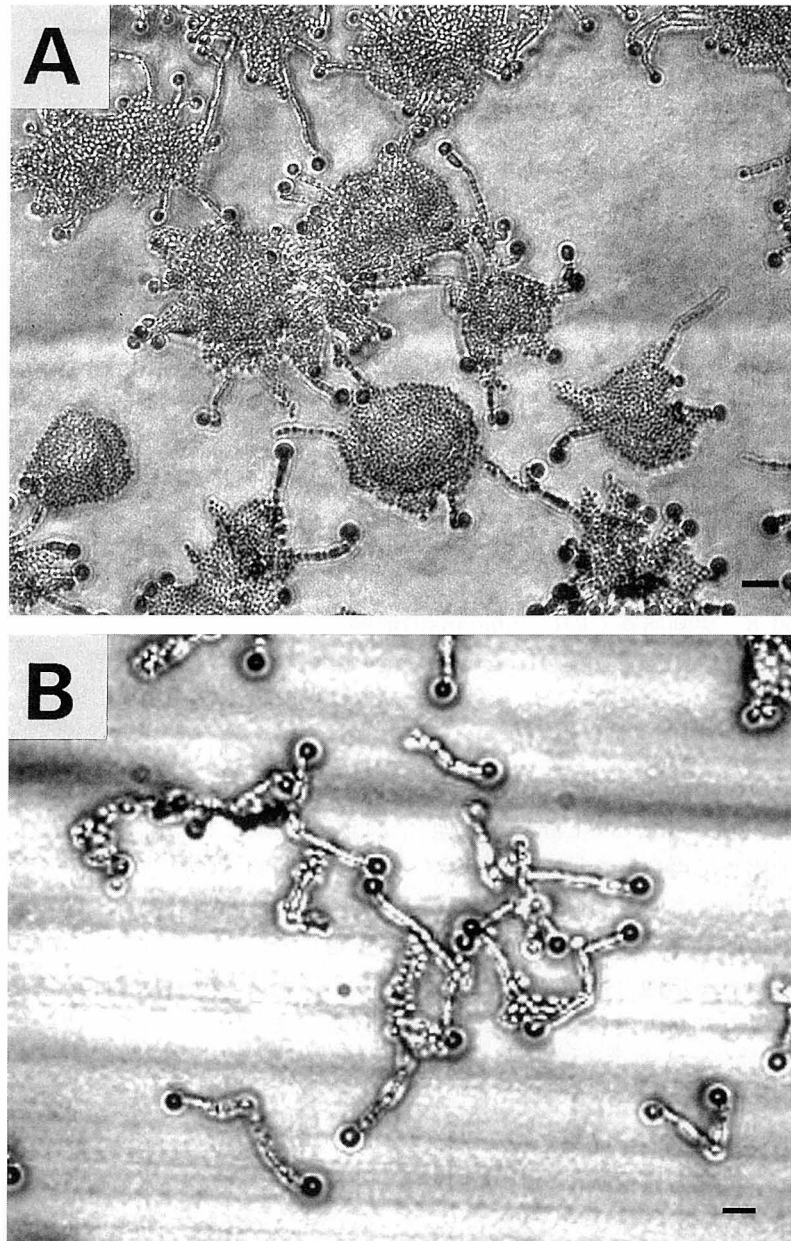


図 9 改良Canary培地の*C. albicans*の形態  
改良Canary培地に17時間培養した菌密集部位。  
A : colonyが密集した部位, bar = 20 $\mu$ m  
B : 菌塊の隙間, bar = 20 $\mu$ m

表 2 改良Canary培地による厚膜孢子形成

培養時間 (h)	<i>C. albicans</i> 33株	他の酵母様真菌 12株
17	31	0
41	33	0
72	31	0
120	30	0

無を検出する最適時期が異なっており(図4), 厚膜胞子形成の迅速性や安定性を考慮した方法の検討につながった(図4, 7).

厚膜胞子形成試験では, corn meal Tween 80培地やrice Tween 80培地を用いて, 培地表面に菌を画線塗抹後, その面をcover glassで覆って培養するslide culture法がおこなわれている<sup>5, 11)</sup>. まず, Tween 80は菌糸形成促進のために用いられる界面活性剤<sup>12, 13)</sup>である. このTween 80を培地に添加したり(図5), 菌の密集性(図7)は今回の実験においても厚膜胞子の検出をより高率で, 安定にする大きな効果があった. しかし, Canary培地での厚膜胞子形成は好氣的培養が適していること, あるいは, Staibらの培地で*C. albicans*はこれを形成しないと述べた点はCanary培地の厚膜胞子形成能がこれらのものとは多少異なっていると考えられた.

今回の実験で得られた結果をもとに作製した改良Canary培地は, 菌密集部位で, 培養初期に厚膜胞子を伴う菌糸を明らかに増加させることが確認された(図9). これは厚膜胞子検出の精度を非常に安定させることにつながった. この改良Canary培地で厚膜胞子形成による*C. albicans*の鑑別を行ったところ, 培養17時間で97%, 培養41時間で100%に鑑別できた(表2). 培養17時間で厚膜胞子が検出できなかった2株については, 厚膜胞子遅形成株か, あるいは, 逆に形成が早すぎる株のいずれかであると考えられた. 後者を想定すると, 菌の高密度塗抹では, 特に伸長が抑制された菌糸形成があり, 培地上の酵母様細胞の増殖との関係から生じる, 検出の低下があると考えられる. 従って, この改良Canary培地で厚膜胞子の検出は培養のより早い時期が望ましいと考えられる. これらの結果より, 著者はCanary seedを用いて作製した改良Canary培地は, 厚膜胞子形成による*C. albicans*の鑑別をより安定して, 高精度に検出できる優れた培地であることを明らかにした. 今後, この培地は*C. albicans*のより迅速な鑑別診断に有用であると考えられる.

## 結 語

*C. albicans*の厚膜胞子形成を促す培地基材の検索を目的として, 新しい基材であるcanary seedの検討を行った. canary seedsの熱抽出液よりCanary培地を作製した. この培地上で*C. albicans*

は酵母様細胞の増殖と厚膜胞子形成を伴う菌糸発育が同時に誘起され, 2階建てのユニークなcolonyを形成した. この厚膜胞子を伴う菌糸発育はcanary seedsの減少, Tween 80添加, あるいわ, 菌密集性の上昇により促進された. しかし, 菌の高密度化は菌糸の伸長に対して抑制的に作用した. これらを基に作製した改良Canary培地(Canary培地を4倍稀釈して, Tween 80を添加)で酵母様真菌45株(*C. albicans* 33株, その他の酵母菌12株)を鑑別すると, 一晚培養で97%の鑑別ができた. このようにcanary seedは*C. albicans*の酵母様細胞の増殖と菌糸および厚膜胞子形成を誘導できることが分かった. さらに, 改良Canary培地は厚膜胞子形成による*C. albicans*の鑑別培地として優れていることが分かった. 今後, この培地は*C. albicans*のより迅速な鑑別診断に有用であると考えられる.

稿を終わるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました機能形態統御学ゲノム形態学講座飯野晃啓教授, 並びに, 基盤病態医学感染制御学講座田中吉紀教授に深謝いたします. さらに, 御指導, 御助言頂きました保健学科病態検査学講座高山壽雄教授に感謝いたします.

## 文 献

- 1) 宮地 誠. (2002) わだいの真菌症の原因菌—同定のポイント. *Med Tech*; 30, 1150-1153.
- 2) Sullivan, D. and Coleman, D. (1998) *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol* 36, 329-334.
- 3) Staib, F. and Arasteh, K. (2001) Chlamydospore formation on Staib agar. Observations made before *Candida dubliniensis* was described. *Mycoses* 44, 23-27.
- 4) Joshi, K. R., Solanki, A., Prakash, P. (1993) Morphological identification of *Candida* species on glucose agar, rice extract agar and corn meal agar with and without Tween-80. *Indian J Pathol Microbiol* 36, 48-52.
- 5) Odds, F. C. (1988) *Candida and Candidosis; A Review and Bibliography*. 2th ed, Chapter 5. morphogenesis in *Candida*, with special reference to *C. albicans*, pp. 42-59. Bailliere

- Tindall.
- 6) Odds, F. C. (1988) *Candida* and Candidosis; A Review and Bibliography. 2th ed, Chapter 6. isolation, identification and other laboratory aspects of *Candida*, pp. 60-67. Bailliere Tindall.
  - 7) Kim, D., Shin, W. S., Lee, K. H., Kim, K., Park, J. Y., and Koh, C. M. (2002) Rapid differentiation of *Candida albicans* from other *Candida* species using its unique germ tube formation at 39°C. *Yeast* 19, 957-962.
  - 8) Odds, F. C. and Davidson, A. (2000) "Room temperature" use of CHROMagar *Candida*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 38, 147-150.
  - 9) Campbell, C. K., Holmes, A. D., Davey, K. G., Szekely, A., Warnock, D. W. (1998) Comparison of a new chromogenic agar with the germ tube for presumptive of *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17, 367-368.
  - 10) Cardenes, C. D., Carrillo, A. J., Arias, A., Rodriguez-Alvares, C., Torres-Lana, A., Sierra, A., et al. (2002) Comparison of *Albicans* ID2 agar plate with the germ tube for presumptive identification of *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 42, 181-185.
  - 11) Odds, F. C., Rinaldi, M. G., Cooper, C. R., Fothergill, A., Jr., Pasarell, L., McGinns, M. R. (1997) *Candida* and *Torulopsis*; a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol* 35, 313-316.
  - 12) Gunasekaran, M. and Hughes, W. T. (1977) A simple medium for isolation and identification of *Candida albicans* directly from-clinical specimens. *Mycopathologia* 61, 151-157.
  - 13) Gunasekaran, M. and Hughes, W. T. (1978) A simple liquid medium for chlamyospore formation in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 64, 143-146.