



Title	Candida albicansに対するナスタチンの作用機序に関する形態学的研究
Author(s)	神木, 照雄
Citation	大阪大学, 1961, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/28428">https://hdl.handle.net/11094/28428</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【 2 】

氏名・(本籍)	神 木 照 雄 <small>かみ き てる お</small>
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 244 号
学位授与の日付	昭 和 36 年 12 月 26 日
学位授与の要件	医学研究科 病理系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	<b>Candida albicans に対するナスタチンの作用機序に関する形態学的研究</b>
論文審査委員	(主 査) 藤野恒三郎 (副 査) 教授 小浜 基次 教授 天野 恒久

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

ナスタチンは, Hazen and Brown (1951) によって発見された polyene 系の抗カビ抗生物質の一つであり, その真菌に対する抗菌作用はかなり広い範囲にわたっている。

1956年および1957年に, Lampen らによって, endogenous metabolic activity の阻害および種々な基質の利用阻害が報告された。その後, 加熱死菌においても, ナスタチンの吸収がおこることを Lampen は認めている。しかしながら現在まで, ナスタチンの作用機序に関しては全く不明である。そこでこの物質の細胞形態におよぼす影響を光学顕微鏡および電子顕微鏡を使用して観察し, ナスタチンの作用機序の一端を解明するために以下の実験を行なった。

〔方法並びに成績〕

使用菌は阪大微研保存株 *Candida albicans* FIA 1048 であり, この菌のナスタチン, トリコマイシンおよびアンホテリシンBに対する感受性は, 下表の如くである。

薬 剤	ナスタチン	トリコマイシン	アンホテリシンB
発育阻止最少濃度 (u/ml)	8	1	2.5 (r)
	1.6	2.	3.5 (r)

*Candida albicans* をサブローブドウ糖液体培地 35°C 18 時間培養したものを遠心沈澱集菌して洗滌し, 35°C 3 時間振盪してナスタチンを作用させた。この場合薬剤最終濃度は 75.4 u/ml, 最終菌濃度は  $9.6 \times 10^8$ /ml であった。この試料について, Bartholomew によるグラム染色, R. B. Webb による細胞壁染色, Feulgen 反応を行なった。またカーボンレプリカ法および超薄切片法による電子顕微鏡的観察を行なった。あらかじめ薬剤処理を受けた細胞より音波処理 (10 KC) によって細胞壁を単離したのも, 正常細胞

より単離した細胞壁にナイスタチンを処理したものについても電子顕微鏡的に観察した。

グラム染色法にあっては 80°C 30 分間温浴槽で加熱処理した *Candida albicans* ではグラム染色性に変化はなかったが、35°C 3 時間ナイスタチン処理した菌体は、90 % 以上グラム陰性となった。同様の方法でトリコマイシンあるいはアンテホリシン B によって 3 時間処理された菌体のグラム染色性には、変化はみられなかった。加熱死菌、トリコマイシンおよびアンホテリシン B によって処理された菌体はいずれもその細胞壁は濃染し明確に認められたが、ナイスタチン処理菌体の細胞壁と細胞質は一樣に濃染され、区別することができなかった。

**Feulgen** 反応を行なった場合、対照にあっては酵母様菌体の一端に一つの核部分が認められ、メチレンブルーなどによって後染色された標本にあってはかなり明瞭に円形、楕円形に認められる。しかしナイスタチンで処理を受けた菌体では、核部分は不明瞭に認められるもの、殆んど認め難いもの、また菌体全体が僅かに赤紫色に染まっているものがあり、かなり核部分の破壊を思わせる所見を認めた。次いでカーボンレプリカ法を用いて菌体の表面を観察したが、無処理の菌体においては菌体表面は比較的規則的な皺があり、菌体の厚みがみとめられる。一方ナイスタチン 3 時間処理を受けたものでは表面は滑らかとなり、細胞の厚味がなくなり扁平な観を呈する。また 6 時間処理を受けたものでは、細胞壁の表面が粗になり、細胞は扁平となり、膨化の観を呈する。超薄切片の電子顕微鏡的観察の結果、対照にあっては核部分、ミトコンドリア様構造、脂肪顆粒、小胞体、網様構造が認められたが、ナイスタチン処理をうけた菌体では、細胞質は粗になり、細胞壁もその対照に比して薄く、電子線透過度に変化をきたし一部に破壊欠損部が認められる。核質にあってはその電子線透過性が増し核質自身が外部へ游出したように特に粗となり、核膜は全く消失して高度の破壊像を呈しているものが多い。音波処理によって菌体を破壊した後にトリプシン処理を行なって得た細胞壁は、一部に破壊を受けた袋状のものである。一方ナイスタチン処理を受けたものの細胞壁は、このような完全な袋状を呈するものは殆んどなく、大部分の細胞壁は薬剤の影響を受けて破壊されていた。また正常細胞より単離された細胞壁のみにナイスタチンを作用させても同様な破壊像を認め得た。ナイスタチン処理を行った際に 6000 rpm 20 分間 2 回の遠心沈澱後の上清を  $\frac{1}{40}$  に濃縮 (減圧蒸溜 10 mmHg) したものについて DNA, RNA, 蛋白質を定量したところ、DNA において、有意義の差をみとめ得た。

#### 〔総括〕

ナイスタチンが *Candida albicans* におよぼす影響として致死的に作用することは既に知られた事実であるが、その形態にも大きな変化を与える事実がここにはじめて明らかにされた。これは同じような Polyene 系の抗カビ抗生物質であるトリコマイシンやアンホテリシン B などでは認められないものであって、ナイスタチンに特有のものと思われる。すなわち、ナイスタチンの *Candida albicans* に対する特異作用として、細胞壁へのかなりの影響とともに核質の変化を証明できた。

#### 論文の審査結果の要旨

ナイスタチンは、polyene 系の抗カビ抗生物質の一つであり、その真菌に対する抗菌作用はかなり広い範囲にわたっている。Lampen らによって endogenous metabolic activity の阻害および種々な基質の利用

阻害の報告がなされ、その後、加熱死菌においても、ナイスタチンの吸収がおこることを認めている。しかしながら現在まで、ナイスタチンの作用機序に関しては全く不明である。そこでこの物質の細胞形態におよぼす影響を形態学的に研究し、ナイスタチンの作用機序の一部なりとも解明しようとして、著者は以下の実験を行なった。

ナイスタチンに対し発育阻止最少濃度が16u/mlの *Candida albicans* をサブローブドウ糖液体培地 35°C 18時間培養したものを遠心沈澱集菌して洗滌し、35°C 3時間振盪してナイスタチンを作用させた。この場合薬剤最終濃度は75.4 u/ml、最終菌濃度は  $9.6 \times 10^8$  /ml であった。この試料についてグラム染色、細胞壁染色、Feulgen 反応、カーボンレプリカ法および超薄切片法による電子顕微鏡的観察を行なった。またあらかじめ薬剤処理を受けた細胞より音波処理 (10 KC) によって細胞壁を単離したのも、正常細胞より単離した細胞壁にナイスタチンを処理したものについても電子顕微鏡的に観察した。

80°C 30分間温浴槽で加熱処理した *C. albicans* ではグラム染色性に変化はなく、またトリコマイシンあるいはアンホテリシンBによって3時間処理菌体でもグラム陽性のままであった。しかしながら3時間ナイスタチン処理した菌体にあつては、90%以上グラム陰性となった。

加熱死菌、トリコマイシンおよびアンホテリシンBによって3時間処理された菌体はいずれもその細胞壁は濃染し明確に認められたが、ナイスタチン処理菌体の細胞壁と細胞質は一樣に濃染され、区別することができなかった。

Feulgen 反応を行なった場合、対照にあつてはかなり明瞭に円形・楕円形に核部分が認められる。しかしナイスタチン処理を受けた菌体では、核部分は不明瞭となり、全く認められない細胞もあり、かなり核部分の破壊を思わせる所見を認めた。

カーボンレプリカ法では、無処置の菌体においては菌体表面には皺があり菌体の厚みがみとめられる。一方ナイスタチン3時間処理をうけたものの表面は滑らかとなり、細胞の厚みがなくなり扁平な観を呈する。超薄切片の電顕像においては、対照にあつては核部分、脂肪顆粒、ミトコンドリア様構造、小胞体などが認められたが、ナイスタチン処理をうけた菌体では、細胞質は粗になり、細胞壁もその対照に比してうすく、一部に破壊欠損部が認められた。核質にあつては、その電子線透過性を増し核質自身が外部へ游出したように特に粗となり、核膜は全く消失して高度の破壊像を呈しているものが多い。音波処理によって得られた正常細胞壁は大部分袋状のものであったが、ナイスタチン処理菌体より得られた細胞壁は完全な袋状を呈するものは少く破壊されていた。また正常細胞壁にナイスタチンを作用させた場合にも破壊像が認められた。ナイスタチン処理を行った際に遠心沈澱 (6000 rpm 20分間2回) 後の上清を  $\frac{1}{40}$  に濃縮 (減圧蒸溜 10 mmHg) したのもについて、DNA, RNA, 蛋白を定量したところ、DNA において有意義の差を認めた。以上のことより、ナイスタチンが *C. albicans* におよぼす影響として致死的に作用することは既に知られた事実であるが、その形態・内構造にも大きな変化を与えることが、ここにはじめて明らかにされた。これは同じような polyene 系の抗カビ抗生物質であるトリコマイシンやアンホテリシンBなどには認められないものであつて、ナイスタチンに特有のものであることを明らかにした。

以上のように、著者は、ナイスタチン処理菌体に見られる光学顕微鏡的所見を電子顕微鏡的に解析して、その実態を明らかにしたが、病原微生物と抗生物質の相互関係についての新事実をとらえた意義は高く評価してよいものと信ずる。