

原 著

## *Paracoccidioides brasiliensis*, Pb-18 株 における厚膜胞子の形成条件

佐野 文子 Marcello de Franco\* 竹尾 漢治

西村 和子 宮治 誠

千葉大学真核微生物研究センター 感染研究部門

\*Dept. Pathology, Fac. Medicine, São Paulo State University

〔受付6月10日, 1989年, 受理10月13日, 1989年〕

### 要 旨

*Paracoccidioides brasiliensis* は南米のパラコキシジオイデス症の原因菌で、温度依存性の二形性菌であり、室温では菌糸形、37℃では酵母形となる。また菌糸形から酵母形に変換する過程で厚膜胞子を形成する。本菌の厚膜胞子形成に及ぼす温度、栄養条件は一定の見解が得られていない。そこで厚膜胞子の形成条件を *P. brasiliensis* Pb-18 株を用いて調べた。シャーレで寒天培地と混積培養をしたところ、1. 培地は富栄養よりも貧栄養の方が厚膜胞子形成に都合がよかったが、無栄養 (water agar) では厚膜胞子形成は起こらなかった。2. 25℃以上、30℃までは、温度上昇に比例して厚膜胞子形成が進んだ。3. 菌濃度が  $10^6$  units/ml のときに厚膜胞子形成は最もよかった。4. 寒天濃度は 1.0% ないしは 2.0% で、最も厚膜胞子形成がみられた。本菌の厚膜胞子形成は、単に温度による影響だけでなく、培地、菌量、寒天濃度等の要因が複雑に関与していた。

**Key words:** *Paracoccidioides brasiliensis*, 厚膜胞子 (chlamyospore), 菌量 (cell population)

### 緒 言

*Paracoccidioides brasiliensis* は南米における重要な深在性真菌症、パラコキシジオイデス症の原因菌で、温度依存性の二形性菌であることは良く知られている。

なかでも本菌の厚膜胞子もしくは厚膜胞子様構造 (chlamyospore-like structures) は、菌糸形から酵母形への変換過程で出現することが Patiño<sup>1)</sup>, Salazar and Restrepo<sup>2)</sup>, Carbonell and Rodríguez<sup>3)</sup> らによって指摘されている。また Miyaji and Nishimura<sup>4)</sup> は寒天埋没法を用いて、本

菌の菌糸形から酵母形への変換は主に厚膜胞子を經由して起こると報告している。

厚膜胞子とは Alexopoulos and Mims<sup>5)</sup> によると、細胞壁の厚い thallic conidium (葉状胞子もしくは菌糸状胞子) で、一般に機能が休止状態にある胞子である。一方、Kendrick<sup>6)</sup> は厚膜胞子を細胞壁の厚い、末梢性もしくは介在性に菌糸から形成される胞子として定義し、特に機能については限定せず、広義に使用している。その他の成書<sup>7)</sup> によっても、菌糸の一部が腫大してほぼ球形になり厚い細胞壁をもつに至った菌要素を厚膜胞子としている点は共通している。

*P. brasiliensis* は条件によっては菌糸の一部が丸く膨らみ、厚い細胞壁をもつようになる<sup>1-4)</sup>。この菌要素は 37℃ においては、multiple budding を示すため、研究者によって表現が微妙に異なる

別刷請求先: 佐野文子

〒280 千葉市亥鼻1-8-1

千葉大学真核生物研究センター感染研究部門

が、形態学的には厚膜胞子であり、厚膜胞子と呼ばれることが多い。著者らも Kendrick の定義に従い、この菌要素を厚膜胞子と呼ぶことにした。このように *P. brasiliensis* の厚膜胞子は菌糸形から酵母形へ移行する中間構造物として重要な菌要素であり、厚膜胞子は感染に重要な役割を果たしていると思われる。

Mc-Ewen<sup>8)</sup>らは本菌の分節型分生子を吸収することによって感染が成立すると指摘しているが、Franco ら<sup>9)</sup>は厚膜胞子を吸入することによって肺感染を引き起こす可能性を示唆している。したがって本菌の厚膜胞子形成の下限温度を検討することはパラコクシジオイデス症の発症機序の解明に重要である。ブラジルからの逆移民が増加している日本の現状を考えると、輸入真菌症である本症の原因菌が日本の自然界に輸入され、生存する可能性も考えなくてはならない。

本研究では50年以上も前に分離されたにもかかわらず、いまだに感染能力を維持しており<sup>10)</sup>、形態学的研究<sup>11)</sup>、感染実験<sup>12-16)</sup>、抗原作製<sup>17,18)</sup>などにおいて、使用頻度の高い Pb-18 株を用いて、種々の温度での厚膜胞子の形成を検討した。さらに市販の培地や Sabouraud's dextrose agar, peptone と dextrose 含量が非常に少ない培地、および培養に用いる菌量や寒天濃度が厚膜胞子形成に及ぼす影響についても検討した。

## 材料と方法

### 1. 使用菌株

ブラジルの患者分離株 Pb-18 で、Burger 博士 (Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil) より譲渡された菌株である。

### 2. 培地

2% dextrose (和光純薬) を含む Sabouraud's dextrose agar (SDA と略母), 0.1% dextrose, 0.1% peptone (和光純薬) を含む 0.1% Sabouraud's dextrose agar (0.1% SDA と略), 1% dextrose 添加 brain heart infusion agar (Difco, BHIA と略), potato dextrose agar (Difco, PDA と略), water agar (agar は Difco, WA と略)<sup>19)</sup> を使用した。この実験に関しての寒天濃度は、全て 2.0% に調製した。温度、菌量に関する実験には、0.1% SDA のみを用いた。寒天濃度に関して

は、dextrose と peptone を 0.1% SDA と同様の組成にし、寒天濃度を 0 (液体培地), 0.5, 1.0, 2.0, 4.0% に調製した。

### 3. 菌液の調製及び培養方法

菌液の調製には、37°C, BHIA 斜面培地で保存されている酵母形を用い、これをさらに 37°C, BHIA 斜面培地で1週間培養して用いた。この斜面培地に滅菌した 1/15M phosphate buffered saline を駒込ピペットで注ぎ、数回ピペッティングをして酵母様細胞を採集した。この酵母様細胞浮遊液は、6枚の滅菌ガーゼを通過させた後、2,000 rpm 5分間の遠沈操作を行い、上清を捨て、再び 1/15M phosphate buffered saline に懸濁、浮遊させた。菌数は Thoma の血球計算盤を用いて数えた。菌数の計算に際し、本菌は酵母様細胞に multiple budding がみられることから、Kashino ら<sup>10,11)</sup>、Zacharias ら<sup>13)</sup>、Hoyos ら<sup>20)</sup>の方法に準じて、複数細胞の小集団 (multiple budding の細胞) も single cell も 1 unit として数え、所定の濃度 ( $10^4 \sim 10^7$  units/ml) に調製した。培地、温度、寒天濃度に関する実験には、 $10^6$  units/ml を用いた。

培養方法は所定濃度の菌液 1 ml に各培地 25 ml を加え、直径 90 mm, 厚さ 20 mm のプラスチックシャーレ内で混釈し、各温度 (15, 25, 28, 30, 35°C) で培養した。観察期間は、接種後 20 日間とした。但し、培地、菌量、寒天濃度に関する実験は、25°C で行った。

これらの実験に使用した菌の生菌数の算定は、 $10^6$  units/ml の菌液 1 ml と 0.1% SDA 25 ml とを混釈したシャーレを 25°C で培養し、培養 3 日目、5 日目に小片を取り、300 units 中の菌糸形発育の認められる units 数を数えた。培養 3 日目に菌糸を発育させている units は 239/300 (79.3%)、培養 5 日目では 249/300 (83.0%) であった。

### 4. 厚膜胞子の分類

San-Blas<sup>21)</sup>の観察方法に準じ、0.1% SDA において 25°C で 3 日間培養したときにみられるような厚膜胞子未形成の菌糸を - (Fig. 1a), 同様条件で 5 日間培養したときにみられるような菌糸の一部が膨らんだ形成過程にある厚膜胞子を ± (Fig. 1b), 同様条件で 7 日間培養したときにみられる球形に発達し、細胞壁が厚い、成熟した厚膜胞

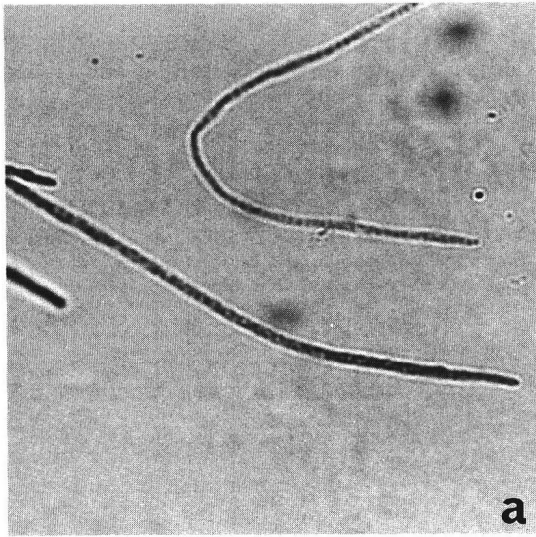


Fig. 1a. Hyphae with no chlamydospores in 0.1% SDA at 25°C on day 3. Score-. ×400.

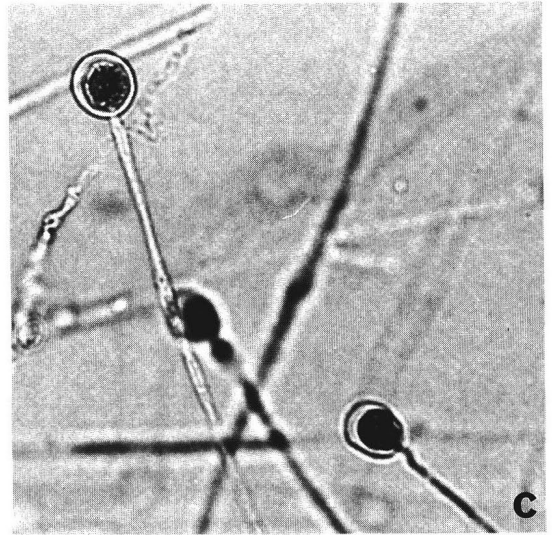


Fig. 1c. Hyphae with mature chlamydospores in 0.1% SDA at 25°C on day 7. Score+. Note the thickness of the cell wall. ×400.

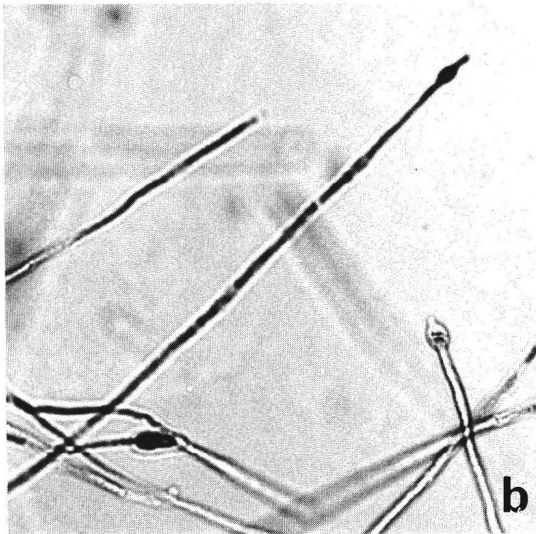


Fig. 1b. Hyphae with immature chlamydospores in 0.1% SDA at 25°C on day 5. Score±. ×400.

子を+ (Fig. 1c)とした。判定は厚膜胞子を形成した部位が末梢性の場合も、介在性の場合も、上記の基準に従った。

### 5. 寒天濃度

0.1% SDA に対する寒天濃度を 0.5, 1.0, 2.0,

及び 4.0% とした。各寒天濃度の培地と  $10^6$  units/ml の菌液 1 ml を混釈し、25°C で培養した。また、寒天を全く含まない培地として、0.1% dextrose, 0.1% peptone を含む Sabouraud's dextrose broth 100ml に  $10^6$  units/ml の菌液 4 ml を加え、25°C で 14 日間静置した。さらに同様のフラスコをバイオシェーカー (BR-30L : 太洋工業) にかかけ、120rpm, 25°C で 14 日間培養した。

### 6. 観察方法

寒天小片または培養液をラクトフェノール・コックトンプルーで固定染色し、カバーガラスで圧べい、鏡検した。

## 結 果

### 1. 培地による影響

酵母様細胞  $10^6$  units を SDA, 0.1% SDA, BHIA, PDA, WA にて 25°C で培養すると、いずれの培地においても酵母様細胞は発芽し、菌糸が発育してきた。しかし、厚膜胞子の形成は培地により形成時期と部位に差異が生じた。

SDA における厚膜胞子は、培養 7 日目に形成が始まり、培養 10 日目以後に細胞壁が厚く、丸く成熟した厚膜胞子となり、その形成部位は主に、介在性で、連珠状であった (Fig. 2)。

一方、0.1% SDA における厚膜胞子は、培養 5

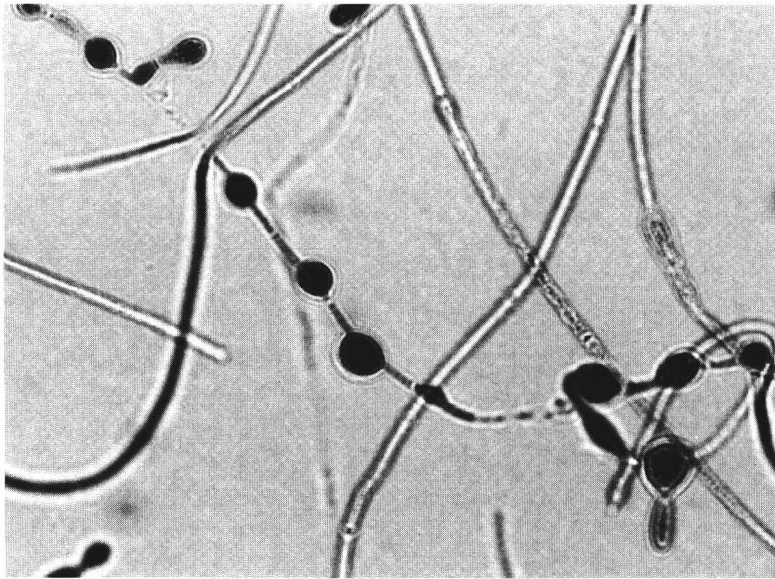


Fig. 2. Intercalary chlamydospores in Sabouraud's dextrose agar at 25°C on day 10.  $\times 400$ .

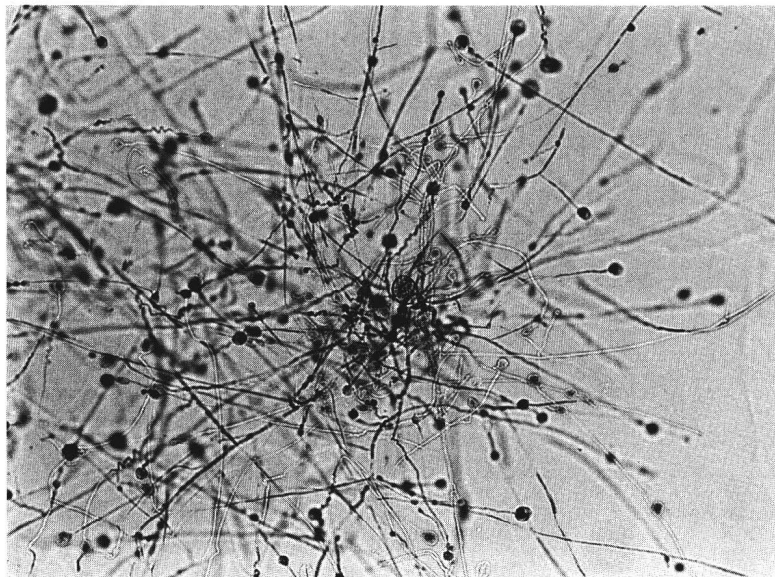


Fig. 3. Terminal chlamydospores in 0.1% SDA at 25°C on day 7.  $\times 100$ .

日目に形成が始まり (Fig. 1b), 培養7日目から10日目にかけては, 成熟した形態を示し, 主に末梢性に存在した (Fig. 1c, 3). しかし, 培養14日目には厚膜孢子及び菌糸のコットンブルーによる細胞質の染色性が消失し, 細胞壁の輪郭を認めう

るのみとなった. 一方, 菌糸を発芽しないで酵母形のまま残存していた一部の細胞は, 細胞質の染色性を維持していた.

BHIA, PDAにおける厚膜孢子の形成はSDAの場合とほぼ同様に, 培養7日目に出現し, 培養

Table 1. Medium and chlamyospore formation

Medium	Days					
	3	5	7	10	14	20
SDA	-	-	±	+	+	+
0.1% SDA	-	±	+	+	ND	ND
BHIA	-	-	±	+	+	+
PDA	-	-	±	+	+	+
WA	-	-	-	-	-	-

Temperature : 25°C  
 Cell population : 10<sup>6</sup> units/25ml of medium  
 ND : Not detected

Table 2. Temperature and chlamyospore formation

Temperature (°C)	Days					
	3	5	7	10	14	20
15	-	-	-	±	±	±
25	-	±	+	+	ND	ND
28	-	+	ND	ND	ND	ND
30	-	+	ND	ND	ND	ND
35	YG	YG	YG	YG	YG	YG

Medium : 0.1% SDA, 25 ml  
 Cell population : 10<sup>6</sup> units/25ml of medium  
 ND : Not detected  
 YG : Yeast-like growth

Table 3. Cell population and chlamyospore formation

Unit /ml	Days					
	3	5	7	10	14	20
10 <sup>4</sup>	-	-	-	±	+	+
10 <sup>5</sup>	-	-	±	+	+	+
5×10 <sup>5</sup>	-	-	±	+	ND	ND
10 <sup>6</sup>	-	±	+	+	ND	ND
10 <sup>7</sup>	-	-	-	ND	ND	ND

Medium : 0.1% SDA, 25ml  
 Temperature : 25°C  
 ND : Not detected

10日目に成熟した形態となり、形成部位は介在性であった。WAでは菌糸の発育は起こるが、厚膜胞子の形成は起こらず、培養5日目より菌糸の染色性が消失し始め、培養10日目ではほとんどの菌

Table 4. Agar solidity and chlamyospore formation

Agar (%)	Days					
	3	5	7	10	14	20
0 *	-	-	-	-	-	...
0.5	-	-	+	+	ND	ND
1.0	-	±	+	ND	ND	ND
2.0	-	±	+	+	ND	ND
4.0	-	-	±	±	ND	ND

Medium : 0.1% SDA, 25 ml  
 Temperature : 25°C  
 ND : Not detected  
 \* : 0.1% Sabouraud's dextrose broth  
 ... : Not observed

糸が輪郭のみとなった (Table 1).

### 2. 温度による影響

0.1% SDA に 10<sup>6</sup> units/ml の菌液 1ml を混釈して 15°C, 25°C, 28°C, 30°C, 35°C で培養すると、35°C で酵母形発育を示し、これ以外の温度では菌糸形発育を示した。

厚膜胞子の形成は、15°C では 10日目に菌糸の末梢部分で始まった。25°C で 7日目、28°C, 30°C では 5日目に成熟した厚膜胞子が形成された。しかし、これらの厚膜胞子は multiple budding には至らなかった。28°C, 30°C では培養 7日目に厚膜胞子及び菌糸の染色性が消失した (Table 2)。

### 3. 菌量による影響

濃度 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 5×10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> units/ml の菌液 1ml と 0.1% SDA 25ml と混釈して 25°C で培養したところ、10<sup>4</sup> units/ml では培養 10日目に介在性の厚膜胞子が形成され始め、14日目には成熟した。10<sup>5</sup>, 5×10<sup>5</sup> units/ml では培養 7日目より厚膜胞子の形成を認め、それぞれ 10日目には成熟した。10<sup>5</sup> units/ml では介在性に厚膜胞子を形成し、5×10<sup>5</sup> units/ml では末梢性に形成した。しかし、5×10<sup>5</sup> units/ml では培養 14日目に菌糸の染色性が消失した。10<sup>6</sup> units/ml では培養 5日目より厚膜胞子の形成が始まり、7日目に末梢性に成熟した厚膜胞子の形成を認め、14日目には厚膜胞子及び菌糸の染色性が消失した。一方、10<sup>7</sup> units/ml では菌糸形発育はするが、厚膜胞子の形成はほとんど認めず、培養 10日目に菌糸の染色性が消失した (Table 3)。

#### 4. 寒天濃度による影響

寒天濃度が0.5%の場合、培養後7日目と10日目に介在性の厚膜胞子を形成した。寒天濃度が1.0%の場合は、2.0%とほぼ同様で末梢性の成熟した厚膜胞子を形成したが、1.0%の場合10日目には菌糸の染色性が消失した。さらに寒天濃度が4.0%の場合は、菌糸伸長も遅く、10日目のscoreを土としたのち14日目には菌糸の染色性が消失した。いずれの寒天濃度においても、培養後10日ないし14日目に菌糸および厚膜胞子の染色性は消失した。

一方、液体培地における厚膜胞子の形成は、静置、振とういずれの培養方法においても、みられなかった (Table 4)。

#### 考 察

*Paracoccidioides brasiliensis* の厚膜胞子形成は温度上昇とともに促進すると Patiño ら<sup>1)</sup> が報告している。今回、我々の実験でも同様に 28℃、30℃ において厚膜胞子の形成促進を認めた。一方、菌糸形は soil extracts を用いて 15℃ で培養した場合、菌糸形発育を促すが、酵母形を同様に培養した場合の発育は起こらなかったと Restrepo ら<sup>2)</sup> は報告している。我々の実験では 15℃ で酵母形から菌糸形への変換、および形成過程にある厚膜胞子を認めた。Restrepo ら<sup>2)</sup> によれば本症の分布は雨の多い、年間平均気温が 10–28℃ の地方と言われており、上記の結果とあわせると日本に移入された場合には、気象条件の面からは自然界で生き延びる可能性もある。

*P. brasiliensis* の厚膜胞子は、培養日数が少なく、培地の栄養が豊富で、菌糸が成長している時にも形成されると述べられている<sup>2)</sup>。我々の実験でも、SDA、0.1% SDA、PDA、BHIA のいずれの培地においても 10<sup>8</sup> units/ml の菌液 1 ml と 25 ml の各培地を混釈し 25℃ で培養した場合、20 日以内に厚膜胞子を形成したことから、前報を<sup>9)</sup> 再確認するとともにこの見解に賛成したい。

しかしながら、SDA と 0.1% SDA とでは、0.1% SDA の方が厚膜胞子形成が早期に起こること、0.03% SDA (dextrose, peptone とともに 0.03%、寒天濃度は 2.0%。未発表) や、胞子形成がよく、我々の示す厚膜胞子と類似の bulging arthroconidium を形成したと Bustamante-Simon が報告した WA<sup>24)</sup> においては厚膜胞子は形成されなかった

こと、0.1% SDA 中でも接種菌量に影響を受けることから、接種菌 1 unit あたりの栄養源の絶対量が厚膜胞子形成に影響していると推測された。今回の実験からは、栄養源の質の差と厚膜胞子形成との関係は明らかではなく、今後の課題としたい。

また WA において厚膜胞子形成が起こらなかった理由として、スライドカルチャー法と混釈培養法との違いが挙げられる。本菌は環境が厳しいときや形態変換のときに、多量の菌がある場合には菌体に別の菌体が入り込んで生きながらえていく性質がある<sup>25, 26)</sup>。スライドカルチャー法では、ある程度まとまった菌塊として培養されるので 1 unit 当りの菌数が多く、隣接した菌体より栄養分を取入れることも可能である。このように本菌は接種菌量によっても厚膜胞子形成が左右されている。Kashino ら<sup>11)</sup>、Goihman-Yahr ら<sup>27)</sup>、Paris ら<sup>28)</sup> などによると、本菌は、ある一定の実験系には適する菌量があると述べている。今回の実験では、菌量により厚膜胞子の形成部位や、形成時期も異なった。今後、本菌の厚膜胞子形成や二形性を研究する場合には、菌量も重要な鍵となろう。

これらに加えて、寒天濃度も厚膜胞子形成の一要因となっていることも明らかになった。0.1% SDA における末梢性の厚膜胞子形成には、1.0 ないし 2.0% の寒天濃度が適していた。0.5% や 4.0% の場合には、厚膜胞子形成は不良で、液体培養では全く形成されなかった事から、厚膜胞子形成には適当な硬度の支持体が必要と推測された。

Alexopoulos and Mims<sup>29)</sup> によると、厚膜胞子は菌糸がストレス状態に置かれた時や、有害な要因が加わった時に形成される一種の耐久形とみなされている。しかし、*P. brasiliensis*、Pb-18 株の厚膜胞子の形成は、栄養状態が良く、室温でも起こり、単なる耐久形と考えられない。またこれらの実験で形成された Pb-18 株の厚膜胞子は 35℃ に置くと 24 時間で multiple budding をして酵母形に変ることから<sup>9)</sup>、病原性発現に重要な発育形態と推測される。

Pb-18 株の厚膜胞子形成は、単に温度によるストレスだけでなく、培地、菌量、寒天濃度などの要因が複雑に絡み合って関与していた。

#### 文 献

- 1) Patiño MM, Burgos LC and Restrepo A :

- Effect of temperature on the mycelium to yeast transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* **22** : 509–511, 1984.
- 2) Salazar ME and Restrepo A : Morphogenesis of the mycelium to yeast transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* **23** : 7–11, 1985.
  - 3) Carbonell LM and Rodríguez J : Transformation of mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in cultures and in experimental inoculations. *J Bacteriol* **90** : 504–519, 1965.
  - 4) Miyaji M and Nishimura K : Experimental fungal infections. *In Animal models in medical mycology*. (Miyaji, M. ed.), p.12–15, CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, 1986.
  - 5) Alexopoulos CJ and Mims CW : Glossary. *In Introductory Mycology*. Third edition, p.591, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1979.
  - 6) Kendrick B. : Conclusions and recommendations. *In Taxonomy of fungi imperfecti*. p.258, University of Toronto Press., Tronto and Buffalo, 1971.
  - 7) 山口英世, 宮治 誠, 西村和子共著 : 病原真菌学. p.378, 南山堂, 1987.
  - 8) McEwen JG, Bedoya V, Patiño MM, Salazar ME and Restrepo AM : Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol* **25** : 165–175, 1987.
  - 9) Franco M, Sano A, Kera K, Nishimura K, Takeo K and Miyaji M : Chlamyospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *Rev Inst Med Trop São Paulo* **31** : 151–157, 1989.
  - 10) Kashino SS, Calich VLC, Burger E and Singer-Vermes, L. M. : *In vivo* and *in vitro* characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Mycopathologia* **92** : 173–178, 1985.
  - 11) Kashino SS, Calich VLC, Singer-Vermes, LM, Abrahamsohn PA and Burger E: Growth curves, morphology and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Mycopathologia* **99** : 119–128, 1987.
  - 12) Tani EM, Franco M, Paraçoli MTS and Montenegro MR : Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology and correlation of lesions with the immune response. *J Med Vet Mycol* **25** : 291–300, 1987.
  - 13) Zacharias D, Ueda A, Moscardi-Bacchi M, Franco M and San-Blas G : A comparative histopathological, immunological and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *J Med Vet Mycol* **24** : 445–454, 1986.
  - 14) Mota NGS, Viero RM, Rezkallah-Iwasso MT, Paraçoli MTS, Soares AMVC and Montenegro MR : The effect of ketoconazole on experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster : immunological and histopathological study. *Mycopathologia* **88** : 141–144, 1984.
  - 15) Defaveri J, Rezkallah-Iwasso MT and Franco M : Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis in mice: Morphology and correlation of lesions with humoral and cellular immune response. *Mycopathologia* **77** : 3–11, 1982.
  - 16) Paraçoli MTS, Mota NGS and Montenegro MR : Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster : Morphology and correlation of lesions with humoral and cell-mediated immunity. *Mycopathologia* **79** : 7–17, 1982.
  - 17) Rezkallah-Iwasso MT, Mota NGS, Gomes, MCG and Montenegro MR : Effect of levamisole experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster : Immunologic and histopathologic correlation. *Mycopathologia*, **84** : 171–180, 1984.
  - 18) Kamegasawa A, Viero RM, Rezkallah-Iwasso MT and Franco MF : Protective effect of prior immunization on ocular paracoccidioidomycosis in guinea pigs. *Mycopathologia* **103** : 35–42, 1988.
  - 19) Ellis JJ and Ajello L : An unusual source for *Apophysomyces elegans* and a method for stimulating sporulation of *Saksenaeva vasiformis*. *Mycologia* **74** : 144–145, 1982.
  - 20) Hoyos GL, McEwen JG, Brummer E, Castañeda E, Restrepo A and Stevens DA : Chronic murine paracoccidioidomycosis : effect of ketoconazole on clearance of *Paracoccidioides brasiliensis* and immune response. *Sabouraudia* **22** : 419–426, 1984.
  - 21) San-Blas F : Ultrastructure of spore formation in *Paracoccidioides brasiliensis*.

- J Med Vet Mycol **24** : 203–210, 1986.
- 22) Restrepo A, Moncada LH and Quintero M : Effect of hydrogen ion concentration and of temperature in the growth of *P. brasiliensis* in soil extracts. *Sabouraudia* **7** : 207–215, 1969.
- 23) Restrepo AM : The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* **23** : 323–334, 1985.
- 24) Bustamante-Simon B, McEwen JG, Tabares AM, Arango M and Restrepo-Moreno, A : Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* **23** : 407–414, 1985.
- 25) Bedout C, Cano LE, Tabares AM, Van de Ven M and Restrepo A : Water as a substrate for the development of *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *Mycopathologia* **96** : 123–130, 1986.
- 26) Carbonell LM : Ultrastructure of dimorphic transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **100** : 1076–1082, 1969.
- 27) Goiman-Yahr M, Pine L, Albornoz MC, Yarzabal L, De Gomez MH San Martin B, Ocanto A, Molina T and Convit J : Studies on plating efficiency and estimation of viability of suspensions of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Mycopathologia*, **71** : 73–83, 1980.
- 28) Paris S, Duran-Gonzalez S and Mariat, F : Nutritional studies on *Paracoccidioides brasiliensis* : the role of organic sulfur in dimorphism. *Sabouraudia*, **23** : 85–92, 1985.
- 29) Alexopoulos CJ and Mims CW : Chapter 27. Subdivision Deuteromycotina. In *Introductory Mycology*, Third edition, p. 548, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1979.

### Chlamydospore formation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain Pb-18

Ayako Sano, Marcello de Franco\*, Kanji Takeo, Kazuko Nishimura and Makoto Miyaji  
 Department of Fungal Infection, Research Center for Pathogenic Fungi and  
 Microbial Toxicoses, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chiba, 280, Japan  
 \*Department Pathology, Faculty of Medicine, São Paulo State University,  
 18, 610 Botucatu, São Paulo, Brazil

*Paracoccidioides brasiliensis* is the causative agent of paracoccidioidomycosis and is known as a temperature-dependent dimorphic fungus.

Even though several routes of transformation from a mycelial to yeast forms have been reported, the route *via* chlamydospore is the most important.

At this time, conditions of temperature, nutrients, population of yeast cells and concentration of agar which influence chlamydospore formation are examined.

*P. brasiliensis* strain Pb-18 was used in this experiment. Its yeast cells were mixed with agar media, and were cultured at various temperatures. The results were as follows:

1. At 25°C, more chlamydospores were formed in poor media than in rich ones.
2. At over 25°C, the number of chlamydospores increased in proportion to the increase in temperature.
3. Chlamydospores were most frequently formed when 10<sup>6</sup> yeast cell units were mixed with 25ml of medium.
4. One and 2.0% agars were the most adequate concentrations for chlamydospore formation.