パネルディスカッション

真菌感染と宿主抵抗性

真菌感染と Phagocytosis

深沢 義村 加賀谷けい子 篠田 孝子

明治薬科大学微生物学教室

病原性酵母の感染防御における食作用 (Phagocytosis) の役割を明らかにするために、末梢血白血球 (PBL, 主として PMN) と腹腔マクロファージ (PMP) の *Candida albicans* に対する食菌能および殺菌能の差, 食細胞の種による機能の相違, 体液性成分の食菌におよぼす影響および *Cryptococcus neoformans* の莢膜と食作用の関係を検討した。

C. albicans に対しては、モルモットとマウスの PBL と PMP は同じ食菌能を示したが、PBL の殺菌能はモルモットが最も高く、次いでヒト、マウスの順であつた。モルモットとマウスの PMP の殺菌能は PBL に比較して低かつたが、リンフォカインで培養したマウスの PMP では殺菌能が増強された。PBL と PMP において補体は食菌率を増加させたが、この系に抗体を加えても食作用に変化はみられなかつた。EGTA と Mg^{2+} を用いた実験により *C. albicans* に対する正常オプソニンはプロペルジンであることが示唆された。

C. neoformans に対するモルモットの食作用においては、PBL は補体の存在下で薄い莢膜株に対しては高い食菌および殺菌率を示したが、厚い莢膜株に対する食作用は明らかな低下を示した。PMP の食作用は *C. albicans* の場合と同様に PBL のそれよりも低く、また免疫血清には食作用増強効果はみられなかつた。

真菌感染における抵抗性の機序については、感染初期にはプロペルジン系と PMN が重要な役割を演じていることが示唆されたが、また感作リンパ球出現後には活性化された MP も関与するものと考えられる。

最近深在性真菌症と宿主の防御機構との関係が論議され、真菌免疫における細胞性免疫の重要性が指摘^{1,2)}されている。一方、食作用 (Phagocytosis) が微生物感染に対する宿主の正常および特異的免疫機構の中で重要な役割を演じていることはよく知られているが、病原性酵母に対する食作用に関しては系統的研究が少なく不明の

点が多い。そこでわれわれはヒト、モルモット、マウスの末梢血白血球およびモルモットとマウスの腹腔マクロファージについて、*C. albicans* および *C. neoformans* に対する食菌能、細胞内殺菌能、オプソニンの役割について検討し、正常および免疫食作用の真菌感染に対する抵抗性の意義を明らかにすることを試みた。

実験材料と方法

1) 使用菌株および培養：菌株としては当教室保存株の *C. albicans* J-1012, type A, *C. neoformans* Duke, *C. neoformans* A J-4290 を用い, 0.5% イーストエキストラクト (Difco) を含む 2% ブドウ糖サブロー液体培地で 27°C, 3~5 日間振盪培養を行つた後, 生理食塩水で洗浄して用いた。

2) 食細胞：ヒト, Hartley 系モルモットおよび ICR 系マウスの末梢白血球 (PBL) とモルモットおよび ICR または C57BL/6 系マウスの腹腔 マクロファージ (PMP) を用いた。PBL の分離には Boyum の方法³⁾ を用い, 混入した赤血球を 0.2% NaCl で処理⁴⁾ して溶血させた後に Hanks balanced salt solution (HBSS) で 2 回洗浄して用いた。この PBL 中の PMN と単球の比は約 9 : 1 であつた。

3) オプソニン：同系動物の新鮮血清および抗 *C. albicans* J-1012 ウサギ血清 (凝集素価 1 : 1280) または抗 *C. neoformans* AJ-4290 ウサギ血清 (凝集素価 1 : 1280) を用いた。

4) 食菌率の測定：*C. albicans* に対する食菌率の測定は小試験管法で行つた。すなわち, シリコン処理した小試験管に食細胞と *C. albicans* をそれぞれ 2×10^6 入れ, 新鮮血清 0.1ml, 抗血清 0.1ml を加え, HBSS で全量を 1ml とし, 37°C の恒温水槽中で 20rpm で回転させ, 一定時間後にその 1 滴を血算板にとり, 食細胞外の菌数を測定して食菌率を求めた。

C. neoformans に対する食菌率の測定は monolayer 法で行つた。すなわち, 食細胞の 2×10^6 /ml の懸濁液を 24×12 mm のカバーガラス上に 0.25ml ずつ載せ, 炭酸ガス培養器中に 1 時間放置した後 Medium-199 で洗浄して非附着細胞を除去して monolayer を作製し, シャーレ (Falcon, No. 3002) に新鮮血清 0.375ml, 抗血清 0.25ml, *C. neoformans* 2×10^6 を入れ, Medium-199 で全量を 2.5ml とした中に monolayer 4 枚を入れ, 炭酸ガス培養器中で 20rpm の回転下で食菌させた。一定時間後にカバーガラスを細胞附着面を下にしてスライドガラスに固定し, 鏡検して菌を取りこんでいる細胞の全細胞に対する割合を測定し, 食菌率とした。

正常オプソニンを検討するためには 10mM の EGTA と 10mM の $MgCl_2$ を Mg^{2+} と Ca^{2+} を除いた HBSS に加える系⁷⁾を用いた。

5) 細胞内殺菌能の測定：上記の monolayer 法により菌を取り込ませ, 一定時間後に 2×10^{-3} M のメチレン

青を加えて冷所に置き, 15 分後に鏡検して細胞内の菌の生死をメチレン青の排除試験⁸⁾により判定した。

6) 粗リンフォカイン：C57BL/6 系マウスの脾細胞およびリンパ節細胞を Eagle MEM 培地 (Flow Laboratories) に 1×10^7 /ml の割合で懸濁し, Concanavalin A (Con A, Sigma Chemicals Co.) 10 μ g/ml と共に 24 時間培養し, この上清を Sephadex G-15, 10mg/ml と共に 30 分間攪拌して Con A を除去し, PBS で透析後濃縮したものを粗リンフォカインとした⁹⁾。また Con A を加えずにリンパ球を培養した上清を対照とした。リンフォカインは毛細管法¹⁰⁾によりマクロファージ遊走阻止試験を行い, 60% の遊走率を示す濃度で使用した。

7) 活性化マクロファージ：C57BL/6 系マウスの PMP をリンフォカインと共に 3 日間培養し, *C. albicans* に対する細胞内殺菌能および食菌に伴う chemiluminescence を測定した。Chemiluminescence は Allen らの方法¹¹⁾にしたがい, ルミノール飽和 FCS の存在下でザイモサンを取り込ませ, 液体シンチレーションカウンタを用いて室温で測定した。

実験結果

C. albicans に対する食菌におよぼすオプソニンの効果

モルモットの PBL を *C. albicans* と共に小試験管中で回転させた場合に, HBSS のみでは食菌はおこらず, また抗血清を加えた場合にも HBSS と比べて取り込みの増強はおこらなかった。これに対して新鮮血清を加えた場合には 30 分で約 95% の菌が取り込まれた。また新鮮血清に抗血清を加えた場合にも食菌の増強効果は特にみら

Fig. 1. Effect of serum factor on phagocytosis of *C. albicans* by normal guinea pig peripheral blood leukocytes

Fig. 2. Effect of EGTA and Mg²⁺ on phagocytosis of *C. albicans* by normal guinea pig peripheral blood leukocytes

れなかつた (Fig. 1). この結果は, *C. albicans* の食菌は正常オプソニンで十分におこり, 特に免疫オプソニンを必要としないことを示している.

C. albicans に対する正常オプソニンの検討

新鮮血清中に含まれる正常オプソニンを検討するために, 新鮮血清に EGTA と MgCl₂ を加えた系を用いてモルモットの PBL による食菌実験を行った. Fig. 2 に示すように, 新鮮血清に 10mM の EGTA を加えて Mg²⁺ と Ca²⁺ を除去し補体活性化の正経路 (classical pathway) と別経路 (alternative pathway) の両者を遮断した系では食菌はわずかしおこらなかつたが, EGTA と MgCl₂ を加えて Ca²⁺ のみを除去し別経路のみが働くようにした系では新鮮血清と同様の食菌がみられた. これらの結果より *C. albicans* に対する正常オプソニンは補体のプロパージン系であることが示された.

食細胞の種類による *C. albicans* に対する食菌能の比較

モルモットおよびマウスの PBL と PMP を用いて食細胞の種類および動物種による食菌能の比較を行った. マウスの PBL, モルモットおよびマウスの PMP はすべて Fig. 1 に示すモルモットの PBL と同様の食菌率のパターンを示し, PBL と PMP の差およびモルモットとマウスの差はみられなかつた.

食細胞の種類および動物種による *C. albicans* に対する細胞内殺菌能の比較

ヒト, モルモットおよびマウスの PBL とモルモットおよびマウスの PMP の *C. albicans* に対する細胞内殺菌能を比較した. PBL の殺菌能については Fig. 3 に示

Fig. 3. Intracellular killing of *C. albicans* by normal peripheral blood leukocytes

すように, モルモットの PBL が最も高い殺菌率を示し, 次いでヒト, マウスの順であつた. また PMP の場合にも, モルモットの PMP は食菌開始 3 時間後に約 10% の殺菌率を示したが, マウスの PMP は 3% を殺菌したのみであり, PBL および PMP の殺菌能には動物種によつて差があることが示された.

PBL と PMP の細胞内殺菌能を比較した場合には, モルモットでは PBL の殺菌率 60% に対して PMP は 10% の殺菌率しか示さず, マウスの場合も PBL の 10% に対して PMP は 3% の殺菌率を示したのみで, いずれも PMP は PBL と比較して低い殺菌能を示した. また PMP 中では germ tube の形成は活発で細胞を破壊したが, PBL 中では germ tube の形成は抑制された.

活性化マクロファージの *C. albicans* に対する殺菌能

正常マウスの PMP をリンフォカインと共に 3 日間培養した後 *C. albicans* に対する殺菌能を測定した. その結果, Fig. 4 に示すように Medium-199 で培養した場合の殺菌率は 3% であり, 対照上清で培養した場合の殺菌率は 22% を示したが, リンフォカインと共に培養した場合には殺菌率は 50% と著明に増加した.

リンフォカインにより活性化されたマクロファージの殺菌能の増加を知るために, ゼイモサンを取り込ませた場合の chemiluminescence を測定した. その結果, リンフォカインと共に 3 日間培養した PMP は対照上清と共に培養した PMP の 3.6 倍の chemiluminescence を示し, singlet oxygen の産生が増加していることが示された.

Fig. 4. Effect of lymphokine on intracellular killing of *C. albicans* by mouse peritoneal macrophages

以上の結果より、細胞性免疫の成立した動物ではリンフォカインによりマクロファージが活性化され、singlet oxygen の産生が増加して *C. albicans* に対する殺菌能が増強されることが示唆された。

C. neoformans に対するモルモットの食作用

C. neoformans の薄い莢膜株 (AJ-4290) と厚い莢膜株 (Duke) に対するモルモットの PBL と PMP の食菌能を検討した。その結果 Fig. 5 に示すように、新鮮血清

Fig. 5. Effect of capsule on phagocytosis of *C. neoformans* by normal guinea pig peripheral blood leukocytes and peritoneal macrophages

の存在下で PBL でも PMP でも Duke 株に対する食菌率は AJ-4290 株に対する食菌率よりも明らかに低く、莢膜は食菌に対する阻害効果をもつことが示された。

次に AJ-4290 株に対するモルモットの PBL と PMP の食菌に必要なオプソニンを検討した。

PBL と PMP のいずれの場合にも Medium-199 または抗血清のみでは食菌はおこらなかったが、新鮮血清の

存在下では食菌 1 時間後に PBL では 42%、PMP では 22% の食菌率を示し、この系に抗血清を加えた場合にも食菌率の増加はみられなかった。また EGTA と Mg^{2+} を用いた実験により AJ-4290 株に対する正常オプソニンも *C. albicans* と同様にプロパージン系であることが示された。

PBL と PMP の AJ-4290 株に対する細胞内殺菌能を測定した結果、食菌 3 時間後の殺菌率は PBL では 41% であったが、PMP では 29% であり、この場合も PBL の方が高い殺菌率を示した。

以上の結果より、*C. neoformans* の食作用においては莢膜が食菌に対する抵抗性を示し、莢膜の薄い株においては正常オプソニンはプロパージン系であり、食菌後は PBL の方が PMP よりも高い殺菌能をもつことが示された。

考 察

深在性真菌症の多くは opportunistic infection として知られているが、その発症機序については多形核白血球の機能不全¹⁰⁾や細胞性免疫不全¹²⁾などが考えられている。

正常防御機構としては食作用が重要な役割を演じているが、*C. albicans* の食作用における PMN と MP の役割を考えた場合に、食菌の段階においては PMN と MP の機能に差はみられなかった。しかし、細胞内殺菌の段階においては PMN は MP よりも明らかに強い殺菌能を示した。慢性肉芽腫症やミクロベロオキシダーゼ欠損など PMN の殺菌系に障害のある人にカンジダ症が多くみられることが知られており、*C. albicans* に対する正常防御機構においては PMN が重要な役割を演じると考えられる。

C. albicans に対する食菌は新鮮血清の存在下ではほぼ完全に行われた。*C. albicans* に対しては自然抗体が多くの人や動物に見出されるため、正常動物の新鮮血清中のオプソニンとしては、自然抗体を介する補体の正経路 (classical pathway) の活性化と、ザイモサンのような細胞壁多糖類による補体のプロパージン系の活性化の 2 つの経路が考えられる。今回の実験で、EGTA と Mg^{2+} を用いて Ca^{2+} のみをキレートし補体の正経路を遮断した系でも対照の新鮮血清と同様の食菌がおこることから、新鮮血清中の正常オプソニンはプロパージン系であることが示された。

C. albicans に対する体液性抗体がマウスにおいて感染防御に有効である^{14,15)}ことが報告されており、われわれ

の以前の実験においてもマウスにおいて体液性抗体が感染防御に関与している結果¹⁶⁾が得られている。しかし、この度の実験から特異抗体は *in vitro* において食作用を増強しないことが明らかにされた。したがって体液性抗体はおそらく candidotoxin の中和によつて感染防御に関与していると考えられる。

動物種による食細胞の機能の差を検討した結果、食菌能には差はみられなかつたが、モルモットの PBL と PMP は共にマウスの場合よりも高い殺菌能を示し、またヒトの PBL はモルモットより低いがマウスよりも高い殺菌能を示した。モルモットはヒトと同様に *C. albicans* の感染に対してマウスよりも抵抗性である¹⁷⁾との報告があるが、細胞内殺菌能の差はこの結果とよく一致すると思われる。

C. albicans は軽度の細胞内寄生性をもち、結核菌やリステリア菌と同様にリンフォカインによるマクロファージの活性化¹⁸⁾が感染防御に重要であると考えられる。今回の実験ではリンフォカインはマクロファージの *C. albicans* に対する殺菌能を著明に増強し、この活性化の機構としては singlet oxygen の産生増加が示唆された。マクロファージはミエロペルオキシダーゼを欠く¹⁹⁾ために通常は singlet oxygen を spontaneous に産生するのみであるが、活性化されるとミエロペルオキシダーゼが産生されるかあるいは spontaneous の系の活性化がおこり、singlet oxygen が産生されると考えられ、*C. albicans* の感染防御に細胞性免疫がマクロファージの活性化を通して関与していることが示唆された。

C. neoformans の食作用実験において、厚い莢膜株は薄い莢膜株よりも明らかに食菌に抵抗し、莢膜の抗食作用性²⁰⁾が証明された。薄い莢膜株はプロパージン系の活性化によりオプソニン化されるが、人工培地や土壌中で薄い莢膜しかもたない株でも組織培養中では厚い莢膜をもつようになるとの報告²¹⁾もあり、*C. neoformans* の感染防御には抗莢膜抗体が重要な役割を演じると考えられる。今回使用した抗血清は食菌を増強しなかつたが、これは薄い莢膜株で作製したものであり、今後厚い莢膜株で作製した抗莢膜抗体を用いて *C. neoformans* の感染防御における特異抗体の役割を検討する必要があると考える。

文 献

- 1) Kirkpatrick, C.H., Rich, R.R. & Bennet, J.E.: Chronic mucocutaneous candidiasis: Model-building in cellular immunity. *Ann. Intern. Med.*, **74**, 955—978, 1971.

- 2) Rothschild, H., Wilson, M., Lopez, M., Salvaggio, J. & Bice, D.: An immunological investigation of a family with chronic mucocutaneous candidiasis. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, **52**, 291—296, 1976.
- 3) Boyum, A.: Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **21**, Suppl. 97—, 1968.
- 4) Johnston, R.B. Jr., Misra, H.P., Lehmeyer, J.E., Webb, L.S., Baehner, R.L. & Rajagopalan, K.V.: The role of superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity. *J. Clin. Invest.*, **55**, 1357—1372, 1975.
- 5) Leijh, P.C., van den Barselaar, M.T. & van Furth, R.: Kinetic of phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by human granulocytes and monocytes. *Infect. Immun.*, **17**, 313—318, 1977.
- 6) Baughn, R.E. & Bonventre, P.F.: Cell-mediated immune phenomena induced by lymphokines from splenic lymphocytes of mice with chronic staphylococcal infection. *Infect. Immun.*, **11**, 313—319, 1975.
- 7) Forsgren, A. & Quie, P.G.: Opsonic activity in human serum chelated with ethylene glycoltetra-acetic acid. *Immunology*, **26**, 1251—1255, 1974.
- 8) Schmid, L. & Brune, K.: Assessment of phagocytic and antimicrobial activity of human granulocytes. *Infect. Immun.*, **10**, 1120—1126, 1974.
- 9) Gately, M.K., Gately, C.L., Henney, C.S. & Mayer, M.M.: Studies on lymphokines: The production of antibody to guinea pig lymphotoxin from migration inhibitory factor and mitogenic factor. *J. Immunol.*, **115**, 817—826, 1975.
- 10) George, M. & Vaughan, J.H.: *In vitro* cell migration as a model for delayed hypersensitivity. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **111**, 514—521, 1962.
- 11) Allen, R.C. & Loose, L.D.: Phagocytic activation of a luminol dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 245—252, 1976.
- 12) Lehrer, R.I. & Cline, M.J.: Interaction of *Candida albicans* with human leukocytes and serum. *J. Bacteriol.*, **98**, 996—1004, 1969.
- 13) Lehrer, R.I. & Cline, M.J.: Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: The role of myeloperoxidase in resistance to candida infection. *J. Clin. Invest.*, **48**, 1478—1488, 1969.

- 14) Mourad, S. & Friedman, L.: Passive immunization of mice against *Candida albicans*. Sabouraudia, **6**, 103—105, 1968.
- 15) Pearsall, N.N., Adams, B.L. & Bunni, R.: Immunologic responses to *Candida albicans*. III. Effects of passive transfer of lymphoid cells or serum on murine candidiasis. J. Immunol., **120**, 1176—1180, 1938.
- 16) 深沢義村, 篠田孝子, 加賀谷けい子, 西川朱実: カンジダ症の免疫機序に関する実験的研究. 真菌誌, **17**: 64—68, 1976.
- 17) Hurley, D.L. & Fauci, A.S.: Experimental disseminated candidiasis. I. An experimental model in the guinea pig. J. Infect. Dis., **131**, 516—521, 1975.
- 18) Nathan, C.F., Karvanovsky, M.L. & David, J.R.: Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. J. Exp. Med., **137**, 275—290, 1973.
- 19) van Furth, R., Hirsch, J.G. & Fedorko, M.E.: Morphology and peroxidase cytochemistry of mouse promonocytes, monocytes, and macrophages. J. Exp. Med., **132**, 794—805, 1970.
- 20) Bulmer, G.S. & Sans, M.D.: *Cryptococcus neoformans*. II. Phagocytosis by human leukocytes. J. Bacteriol., **94**, 1480—1483, 1967.
- 21) Farhi, F., Bulmer, G.S. & Tacker, J.R.: *Cryptococcus neoformans*. IV. The not-so encapsulated yeast. Infect. Immun., **1**, 526—531, 1970.

Phagocytosis in Fungus Infection

Yoshimura Fukazawa, Keiko Kagaya and Takako Shinoda

Department of Microbiology, Meiji College of Pharmacy, 35—23, Nozawa-1,
Setagaya-ku, Tokyo 154, Japan

The study of phagocytosis of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* by human, guinea pig and mouse peripheral blood leukocytes (PBL) and guinea pig and mouse peritoneal macrophages (PMP) *in vitro* has been performed to elucidate the role of phagocytosis in host defense mechanism against systemic mycoses. Although *C. albicans* was ingested by guinea pig and mouse PBL and PMP in the same rates in the presense of fresh serum, the killing rates of intracellular *C. albicans* in these phagocytes were not the same showing a high ability of guinea pig and a low of mouse phagocytes. The human PBL showed an intermediate killing ability between them. Moreover, intracellular killing abilities of guinea pig and mouse PMP were lower than those of PBL. The killing capacity of mouse PMP increased remarkably when the PMP had been cultured previously with lymphokines for 3 days. The PBL and PMP ingested *C. albicans* almost completely in the presense of fresh serum alone, and no more enhancement of ingestion was shown when specific antibody was added to this system. The results of phagocytosis *in vitro* using EGTA and Mg²⁺ indicate that normal opsonin for *C. albicans* is factors of properdin system in fresh serum. Guinea pig PBL and PMP ingested encapsulated strain of *C. neoformans* more effectively than nonencapsulated strain, and specific antibody did not enhance ingestion of both strains of *C. neoformans*. It might be suggested that properdin system and PMP play an important role at the primary stage of *Candida* or *Cryptococcal* infections and that activated macrophages participate in the host defense mechanism after induction of sensitized lymphocytes.