クリプトコックス症の免疫学的研究

第1報 *Cryptococcus neoformans* 多糖体分割の抽出精製法と 実験的 *Cryptococcosis* についての本抗原による 免疫学的診断への応用に関する検討

梁 井 方 策

東京大学医学部細菌学教室 (指導 秋葉朝一郎教授)

[受付: 9月25日・1959年]

重要な真菌症の一つである *Cryptococcosis* については、古くより研究されているけれども、その免疫学的診断法については、いまだ信頼するに足る方法が確立されていない。これは本症においては一般に抗体価が著明には上昇しないという本質的な問題があるが、一方使用すべき抗原についても、その抽出精製法の検討によつて鋭敏性、特異性を高めうる余地は残されていると思われるのであつて、筆者はこのような見地から、動物実験で研究した後、更に臨床的応用の可否について検討することを企図して本研究に従事した。

もともと本症は、中枢神経系感染の場合や稀ではあるが皮膚感染の場合には、脳脊髄液または病巣より病原体を分離同定することによつて比較的簡単に診断することができるとも、感染の初期においては必ずしも病原体の分離は確実でなく、一方内臓諸臓器における感染の場合には本菌の分離同定が困難であることはいうまでもない。ここにおいて本症の診断には臨床所見の他、病原体の分離同定のみでなく、免疫学的に本症を追究することが当然重要な診断の一部として必要とされるゆえんである。

実験方法と結果

I. 多糖体分割の抽出精製と化学的性状

1. 抽出精製法

Palmer & Gerlough 法⁶⁾ による石炭酸抽出法に準じて多糖体分割を抽出精製した。その概要は第1表に示す如くである。

サブロー 4%ブドウ糖寒天斜面培地に37°C 5日間培養の *Cr. neoformans* No. 2617株 (本菌は Dr. Lewis, Memorial, Hospital Wisconsin, Virginia, U. S. A. によつて

Cryptococcosis 患者の脊髄より分離され、分与を受けた) の菌体をかきとり、これを蒸留水で3回、アセトンで3回洗滌後乾燥。

この乾燥菌体に約3倍量の90~95%石炭酸を加えて3日間、ときどき攪拌して浸出する。濾別した不溶物をエタノールで石炭酸がなくなるまで数回洗滌する。この沈渣に蒸留水を加え100°C 60分間加熱抽出する。これを遠心沈澱し、上清を流水中で2日間透析し、細菌濾過器で濾過し、減圧濃縮する。これに3倍量の無水エタノールを加えさらに1%醋酸ソーダを加えて氷室に放置し、生ずる沈澱をアセトンで洗滌後乾燥する。このようにしてえた灰白色粉末 (*Cr. F-I*) を蒸留水に再び溶解して、蒸留水中で透析し、濾過、減圧濃縮後3倍量のエタノールを加えて沈澱させ、沈渣をアセトンで洗滌後乾燥させる。このような精製操作を3回くり返すことによつて白色の粉末 (*Cr. F-II*) をうる。これをさらに蒸留水で溶解し、Sevag 法⁷⁾ により、クロロホルムとイソアミールアルコール中で振盪、除蛋白操作をおこない精製する (*Cr. F-III*)。

2. 本多糖体分割の化学的性状

かくしてえられた分割は白色の湿潤性粉末で水に易溶、耐熱性で、100°C 60分の加熱に対し安定である。

本物質の1000 mg/ml 溶液についての化学的定性反応

YANAI Hosaku: Immunological Studies on *Cryptococcosis*. I Studies on the extraction and purification of the polysaccharide fraction from *Cryptococcus neoformans* and on the application of the antigen for the immunological diagnosis of experimental *cryptococcosis*. Department of Bacteriology, School of Medicine, University of Tokyo. — Jap. J. of Bact. 15(4), 444-448, 1960.

第1表 Cr. neoformans 多糖体分割の抽出精製法

は、第2表に示す如く、糖反応としては、Molish 反応 (+), Carbazol 反応 (+), Orcinol-HCl 反応 (+), phloroglucin 反応 (-), Fehling 反応 (-), Benedict 反

応 (-), 蛋白反応として、Biuret, ninhydrin, Millon, Hopkins-Cole, Xanthoprotein, 硫化鉛の諸反応はすべて陰性で、坂口反応は凝陽性である。

Ⅱ 上記多糖体分割による *Cryptococcus* 感染ウサギについての血中抗体量の消長と皮膚反応の経過の追究

1. 使用菌株: Cr. neoformans No. 2617 株ならびに Cr. neoformans No. 2575 株。前者は既に述べた如く、抗原抽出に使用したと同一の菌株

表2 Cr. neoformans No. 2617 株
多糖体の化学的性状

糖 反 応	
Molish	+
Carbazol	+
Orcinol-Hcl	+
Phloroglucin	-
Fehling	-
Benedict	-
蛋 白 反 応	
Biuret	-
Ninhydrin	-
Millon	-
Hopkins-Cole	-
Xanthoprotein	-
硫 化 鉛	-
坂 口	±

註: 多糖体 1000 mcg/ml 溶液についておこなった。

であり、後者は Dr. Conant, Duke University School of medicine により *Cryptococcosis* 患者の肺より分離され、分与されたもの。両者とも莢膜の形成がよい菌株であつた。

2. 使用動物: ウサギ, 体重約 2 kg, 上記の菌株をそれぞれ 3% ブドウ糖サブロー寒天斜面に 37°C 48 時間培養の菌体を生理的食塩水に 1 mg/ml の割合に浮遊した菌液を 60°C 30 分間加熱殺菌し、これを 6 匹のウサギ (No. 6, 7, 8, 9, 10, 11) の耳静脈に 1 ml ずつ 1 週 3 回注射し、8 週間継続した。その後同量の生菌をウサギの耳静脈に数回接種した。その経過中に随時採血し、Cr. neof. No. 2617 株の菌体から抽出した前記多糖体を用いて、沈降反応により血中抗体価の消長ならびに皮膚反応出現の経過を検討した。

3. 皮膚反応と沈降反応

ウサギの腹部の毛を除去した部位に生理的食塩水に溶解した多糖体の各種濃度の溶液 0.1 ml をそれぞれ皮内に注射し、24時間後の発赤10 mm 以上および硬結が生じたものを陽性、5~9 mm を凝陽性、4 mm 以下を陰性

表 3 病理組織学的所見

	組織内菌数	所 見
大 脳	+++	髄膜炎 脈絡膜炎
小 脳	+++	+++ +
肺	++	限局性肺炎
肝	—	大単核細胞淋巴肉芽結節
腎	—	限局性腎炎
心 臓	—	間質性心筋炎
睪 丸	+++	
眼	+++	虹彩炎, 脈絡膜炎

図 1 *Cryptococcus neoformans* No. 2617 株感染ウサギ (No. 6) における抗体価の消長

図 2 *Cryptococcus neoformans* No. 2617 株感染ウサギ (No. 7) における抗体価の消長

図 3 *Cryptococcus neoformans* No. 2617 株感染ウサギ (No. 8) における抗体価の消長

図 4 *Cryptococcus neoformans* No. 2575 株感染ウサギ (No. 9) における抗体価の消長

図 5 *Cryptococcus neoformans* No. 2575 株感染ウサギ (No. 10) における抗体価の消長

図 6 *Cryptococcus neoformans* No. 2575
株感染ウサギ (No. 11) における抗体
価の消長

と判定した。沈降反応は抗原稀釈法により1000 mcg/ml 溶液を原血清に重層して試験した。

その結果は6匹のウサギがいずれも同様であつて、例えば図4, 5に示す如く、血中抗体の産生は比較的長く長期間の免疫を必要とすることを知った。皮膚反応においても同様であつた。そして沈降反応および皮膚反応はおおむね平行的に上昇あるいは下降する傾向を示した。なお中2匹 (No. 8, 10) はそれぞれ5, 7月後に感染死した。

Ⅲ 免疫ウサギにおける病理学的所見

上記6匹中肺炎様症状を呈したものの3匹 (No. 6, 7, 8) 両側眼球に炎症をおこしたものの2匹 (No. 6, 8) 他のウサギ (No. 9, 10, 11) においては外観上、特に著しい変化は認められなかった。

死亡した4匹のウサギ (No. 6, 7, 8, 10) については、脳および硬脳膜に病変を認めたものの4匹 (No. 6, 7, 8, 10) 肺に所見のあるもの、即ち肺炎をおこしたものの3匹 (No. 6, 7, 8), 眼球、虹彩炎2匹 (No. 6, 8), 腎は硬度を増し糸球体に炎症をおこしたものの2匹 (No. 6, 8), 脾が縮小したものの3匹 (No. 7, 8, 10) 辜丸炎2匹 (No. 6, 7), 脊髓ならびに心臓に肉眼的所見を認めたものはなかった。

病理組織学的には大脳および小脳において細胞浸潤、菌体浸潤が著明で、髄膜炎および脈絡膜炎の症状を示した。肺において菌体の浸潤および栓塞性敗血症性限局性肺炎を呈し、肝においては、大単核細胞性淋巴肉芽腫結節を形成し、腎では栓塞性真菌性限局性腎炎を心臓では間質性心筋炎を、眼球では、虹彩炎、脈絡膜炎等の所見を認め全身感染の状態であつた。また脳、肺、眼および辜丸より *Cr. neoformans* を証明した。

考 察

真菌症においては、従来より種々の抗原による皮膚反応や血清反応がおこなわれているが、*Candidasis* 等の如き真菌症においては血中抗体価が一般的に上昇しない上に抗原の特異性、鋭敏性が劣ることがその価値を低くしており、*Cryptococcosis* も同じ難点を有している。*Candidasis*^{1,2,3,4,5)} の免疫学的診断法については、秋葉等が *Candida albicans* 多糖体分割を使用することによつて、診断用抗原として、使用可能性を示しており、筆者もその可能性を *Cryptococcosis* において検討することを企図した。

さて本症の免疫学的診断法として、従来凝集反応、沈降反応、補体結合反応等による血中抗体量の消長を測定する一方皮膚反応も試みられたが、上述の如き理由によつて現在一般に免疫学的検査はおこなわれてない。従来 *Cryptococcosis* 患者、或いは感染動物の血液には抗体産生が低い或いは殆んどないといわれ、免疫処置によつて、Rappoport and Kaplan⁸⁾ は40倍、Benhan⁹⁾ は160倍、Hoff¹⁰⁾ は280倍、Evans¹¹⁾ は320倍の凝集価をえた。Benhan⁹⁾ は *Cryptococcus* の莢膜を稀塩酸で処置することによつて高凝集価をえたと報告している。しかし凝集反応は一般に抗体価が低くて、正しい値を示さないため診断的価値はほとんどないものと考えられる。

皮膚反応については従来 Berghausen¹²⁾ は *Cr. neoformans* の加熱抽出水様液を、Kessel and Holzwardt¹³⁾ は加熱培養液を、また Dienst¹⁴⁾ は死菌ワクチン、それぞれ *Cryptococcosis* 患者に使用して、陽性反応をえた。Carton¹⁵⁾ は塩酸処理加熱死菌、Kligman¹⁶⁾ は莢膜多糖体 (crude state) が動物において強い反応を呈したと報告している。

沈降反応については既に Neill and coworkers¹⁷⁾, Hehre¹⁸⁾, Carlson¹⁹⁾, Hamilton¹⁹⁾ 等によつて *Cr. neoformans* の莢膜抽出多糖体の使用が報告され、またこのような方法によつて Evans and Kessel¹¹⁾ は A. B. C. の3型に区別することに試みた。Neill, Sugg, and McCauley²⁰⁾ は脳脊髄液、血液、患者の尿について沈降反応をおこなつた。

筆者はこれらの業績を参考として、*Cr. neoformans* の1株より多糖体分割の抽出精製法を検討することによつて、鋭敏性、特異性のよりすぐれている抗原をうることにつとめた。

そして沈降反応と皮膚反応とを併行することにより、*Cryptococcosis* の免疫学的診断法のより確実な成績をえられることと期待した。現在までの動物実験の結果では、ある程度満足しうる成績をえたように思われる。

Cr. neof. No. 2617 株よりえた本多糖体は同一菌株のみでなく, No. 2575 株による免疫ウサギについても同様の成績を示したので, この程度で結論的なことはいえないが, Cr. neof. の他の菌株にも共通的に使用しうるのではないかとの示唆をえた。

総 括

Cr. neof. 感染症に対する免疫学的診断法として, Cr. neof. No. 2617 株菌体より多糖体分割を抽出精製し, これを抗原として免疫ウサギについて皮膚反応および沈降反応により免疫の過程を追究することによつて, 両者がおおむね平行的に上昇下降の消長を示すことを認め, 従つてこれを人体に診断用抗原として適用しうる可能性を示唆すると思われる。

終りに, 懇切な御指導と御校閲を賜つた主任秋葉朝一郎教授並びに岩田和夫助教授に深甚の謝意を表します。また病理組織学的検査について奥平雅彦博士に謝意を表する。

文 献

- 1) 秋葉朝一郎, 岩田和夫, 井上捨巳: 臨床病理: 2: 191, 1954.
- 2) 秋葉朝一郎, 岩田和夫: 臨床と研究, 31: 7, 1954.
- 3) 秋葉朝一郎, 岩田和夫, 井上捨巳: 総合医学, 12: 17, 1955.
- 4) T. Akiba, K. Iwata, and S. Inouye: Jap Jour. Microbiol, 1: 11, 1957.
- 5) T. Akiba, K. Iwata, and Workers: Jour. Antib. 9: 84, 1958.
- 6) Palmer, J. W. & Gerlough, J. D. L.: Science. 42, 155, 1940.
- 7) Sevag, M. G. Lackman, J. B. and Smolens, J. Biol. Chem. 154, 323, 1944.
- 8) Rappoport, B. Z. and Kaplan, B.: Arch. Path. 1: 720, 1926.
- 9) Benham, R. W.: J. Infect. Dis. 57: 255, 1935.
- 10) Hoff, C. L.: J. Lab. & Clin. Med. 27: 751, 1945.
- 11) Evans, E. E. and Kessel, J. F.: J. Immunol. 67: 109, 1951.
- 12) Berghausen, O.: Ann. Int. Med. 1: 235, 1927.
- 13) Kessel, J. F. and Holtzworth, F.: Am. J. Trop. Med. 15, 467, 1935.
- 14) Dieust, R. B.: Arch. Dermat. & Syph. 37: 461, 1938.
- 15) Carton, C. A.: Ann. Int. Med. 37: 123, 1952.
- 16) Kligman, A. M.: J. Immunol. 57: 395, 1947.
- 17) Neill, J. M. Abraham, I. and Kapros, C. E.: J. Bact. 59: 263, 1950.
- 18) Neill, J. M. Castillo, C. G., Smith, R. H. and Kapros, C. E.: J. Exper. Med. 89: 93, 1949.
- 19) Hehre, E. J. Carlson, A. S. and Hamilton, D. M.: J. Biochem. 177, 289, 1949.
- 20) Neill, J. M. Sugg, J. Y. and McCauley, D. M.: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 77: 775, 1951.
- 21) Littman, M. D. and Zimmerman, M. D.: Cryptococcosis, New York and London. 1956.