

## *Candida albicans* 菌体由来多糖による マウス耳の炎症について

美禰弘子<sup>1)</sup> 津島弘文<sup>2)</sup> 星加和徳<sup>3)</sup>

川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科<sup>1)</sup>

川崎医科大学 衛生学教室<sup>2)</sup>

川崎医科大学 内科消化器部門 II<sup>3)</sup>

(平成4年10月21日受理)

## Inflammation in Mouse Ear Induced by *Candida albicans*-Polysaccharide

Hiroko MINE<sup>1)</sup>, Hirofumi TSUSHIMA<sup>2)</sup> and Kazunori HOSHIKA<sup>3)</sup>

*Department of Clinical Nutrition*

*Faculty of Medical Professions*

*Kawasaki University of Medical Welfare<sup>1)</sup>*

*Kurashiki, 701-01, Japan*

*Department of Hygiene*

*Kawasaki Medical School<sup>2)</sup>*

*Kurashiki, 701-01, Japan*

*The Second Division of Gastroenterology*

*Department of Internal Medicine*

*Kawasaki Medical School<sup>3)</sup>*

*Kurashiki, 701-01, Japan*

*(Accepted Oct. 21, 1992)*

**Key words :** *Candida albicans*, alkali-extracted-polysaccharide, inflammation, permeation of polymorphonuclear leucocytes

### Abstract

A method for the preparation of polysaccharide from a strain of *Candida albicans* has been described. Yeast type cells were treated with 10% KOH and crude glycoprotein, which was purified by a series of enzyme digestion, was extracted. Lectin-binding examination of the partially purified polysaccharide of *Candida albicans* (CaPS) indicated that a major constituent sugar was mannose. A small amount of N-acetyl-glucosamine was also found and its biological role was discussed.

CaPS produced inflammation in mice ears when injected intraperitoneally at their

tails. Degree of inflammation was determined quantitatively by measuring the thickness of the ears. Microscopical observation of the ear tissue showed a remarkable increase of polymorphonuclear leucocytes both in the vascular tract and in the extravascular space.

## 要 約

*Candida albicans* から多糖を調整する方法を記載した。酵母型細胞を10% KOH を用いて抽出すると、まず粗糖タンパク質が得られる。これを各種の酵素で処理することにより部分精製された *C. albicans* 多糖 (CaPS) を得た。レクチン結合試験により CaPS の構成単糖を調べたところ、主要な構成糖はマンノースであることが示された。また、少量の N-アセチルグルコサミンも含まれており、その炎症誘発作用が推測された。

CaPS をマウスの尾静脈から注射すると耳に炎症が発生した。炎症の程度は耳の厚みを測定することにより定量的に表すことができた。さらに、耳における炎症部位の組織切片像を光学顕微鏡で観察してみると、血管内外において多形核白血球が著しく増加していた。

## はじめに

*Candida albicans* はヒトの皮膚、粘膜、腸管などの常在真菌である。宿主が何らかの原因で弱体化すると、異常増殖してカンジダ症を引き起こす。カンジダ症の主な病理症状としては様々な種類の炎症があげられるが、これらの炎症の発生機構は不明な点が多い。

今回、我々は *C. albicans* から多糖を抽出し、これを用いてマウスの耳に肉眼および顕微鏡で明確な炎症を実験的に作成することができた。多糖の抽出方法、部分的な精製方法、マウスの耳に生じた炎症像等について報告する。

## 材料と方法

### A. *Candida albicans* からの多糖の精製

#### 1) 酵母型細胞の調整方法

用いた材料は *Candida albicans* IFO 1060 (serotype A) である。サブロー液体培地 (ペプトン10 g, グルコース30 g, yeast extract 5 g, 蒸留水1,000ml) で37℃, 24時間振とう培養した。5,000mlの培養液を遠心して約100 g (湿重量) の酵母型細胞を得、蒸留水で3回遠心洗浄して出発材料とした。

#### 2) アルカリ可溶物の抽出と収集

酵母型細胞100 gに10% KOH を1,000ml添加し、4℃, 12時間マグネチックスターラーで攪拌しながらアルカリ可溶物を抽出した。遠心に

より細胞残渣を除去した上清を蒸留水に対して透析した後に CaCl<sub>2</sub>を終濃度1%, エタノールを終濃度80%となるように添加して、4℃で12時間置き、白色の沈殿物を得た。

酵母型細胞100 gから約45 g (湿重量) のアルカリ可溶物が得られた。

#### 3) アルカリ可溶物の脱脂と粉末化

アルカリ可溶物40 gにアセトン400mlを添加して室温で30分間攪拌して脱脂した。遠心によりアセトンを除去した後、エーテルを200ml添加して室温で5分間攪拌し、大型シャーレに広げて室温で24時間放置して乾燥粉末約5 gを得た。

#### 4) 水溶性画分の凍結乾燥

アルカリ抽出物の乾燥粉末5 gに蒸留水200mlを加え、4℃で12時間、マグネチックスターラーで攪拌した。遠心により水不溶画分を除去した上清を蒸留水に対して48時間、4℃で透析した。透析内液を10万 g, 60分間遠心し、上清を凍結乾燥して白色粉末約1,500mgを得た。これを *Candida albicans* Alkali Extract (CaAE) とした。

透析には、分画分子量1~2万の Visking tube を使用した。

#### 5) CaAE の核酸除去

CaAE 1,000mg, RNase (Sigma, type I) 10mg, DNase (Sigma, type I) 10mgを10mM Tris HCl buffer, pH 7.4, 100mlに溶かしミリポアフィルターでろ過除菌後37℃, 24時間処理

した。

#### 6) 核酸除去 CaAE のタンパク質除去

核酸除去 CaAE 液100mlを10mM Tris HCl buffer に対して 4℃で12時間透析した。透析内液に protease (Sigma, type I) を終濃度0.1 mg/mlとなるように加え、ミリポアフィルターでろ過除菌し、37℃で24時間処理してタンパク質を除去した。

#### 7) 使用酵素の除去と精製

DNase, RNase および protease を除去する目的で TCA を終濃度 5% となるように加え 4℃で12時間放置した。生じた白色沈殿を遠心により除去した上清を蒸留水に対して 4℃, 96時間透析して TCA も除去した。透析内液を10万 g, 60分遠心して上清を凍結乾燥し、約500mgの白色粉末を得た。これを *Candida albicans* polysaccharide (CaPS) として実験に使用した。

### B. CaPS の性状検査

#### 1) タンパク質含有量検査

CaPS のタンパク質含有量は Bovine Serum Albumin をコントロールとして Folin 法<sup>1)</sup> で調べた。

#### 2) 糖含有量検査

CaPS の糖含有量はマンノースをコントロールとして Anthrone 法<sup>2)</sup> で調べた。

#### 3) 構成糖の検査

CaPS がどのような単糖類からできているかはレクチンに対する結合活性を ELISA 法<sup>3)</sup> で調べた。用いたレクチンは SBA, RCA, WGA, PNA, DBA, UEA および Con A の7種類<sup>4)</sup> である。

### C. マウスへの CaPS の投与方法

実験動物として ICR マウス、雌、4週齢、体重  $20 \pm 2$  g, 40匹を用いた。

CaPS を 1 mg/ml となるように生理食塩水に溶解し、これを 0.2ml ずつ 35匹のマウスの尾静脈より注入した。5匹のマウスにはコントロールとして生理食塩水に溶解したマンノースを同様に投与した。

### D. マウス耳の厚みの測定法

CaPS またはマンノース投与後 4 日目に、両耳の一定部分の厚みをシクネスゲージ (テクロクダイヤルゲージ SM 112型) を用いて測定

表1 CaPS のレクチン結合活性

ELISA 法により、CaPS に結合した標識レクチンの量を吸光度 (O. D. 450m $\mu$ ) であらわした。

レクチン	O. D. 450m $\mu$		考えられる結合糖
	+CaPS	-CaPS	
Con A	0.647	0.055	D-マンノース (D-グルコース)
WGA	0.082	0.055	D-N-アセチル- グルコサミン
SBA	0.050	0.064	D-ガラクトース D-N-アセチル- ガラクトサミン
RCA	0.050	0.052	D-ガラクトース
PNA	0.050	0.047	D-ガラクトース D-N-アセチル- ガラクトサミン
DBA	0.050	0.047	D-N-アセチル- ガラクトサミン
UEA	0.047	0.053	L-フコース

した。厚みの測定部位は図1に示した。

### E. 耳における細胞レベルの炎症像の検査

厚み測定後の耳を 8 mm<sup>2</sup>程度麻酔して切り取り、ホルマリン固定し、常法通りヘマトキシリン-エオシン染色標本を作成して顕微鏡観察をおこなった。

## 結 果

### A. CaPS の性状

CaPS は糖の含有量が99%以上であることが Anthrone 法により、タンパク質の含有量が1%以下であることが Folin 法により確認された。精製前の CaAE には約16%のタンパク質が含まれていた。また、CaAEの糖含有量は約75%であった。

このように、ほぼ純粋に糖のみからなる CaPS の構成糖の性状を ELISA 法によるレクチン結合活性を比較して調べた。

表1に示すように、CaPS は Con A と強く、WGA と弱く結合し、他の5種類のレクチンとは結合しなかった。この結果は、CaPS が多量の D-マンノースと少量の D-N-アセチルグルコサミンからなる多糖であることを示している。Con A と結合する糖にはマンノースのほかに D

-グルコースも考えられるが、今回我々が抽出、部分精製した多糖は水溶性であることからこの可能性は除外された (*Candida* 由来のグルカンは水に不溶性であることが知られている)。以上の結果をまとめると、今回得られた *Candida* 菌体由来の CaPS は、分子量 2 万以上の水溶性多糖であり、その構成単糖は大部分がマンノースであり、少量の N-アセチルグルコサミンであるといえる。

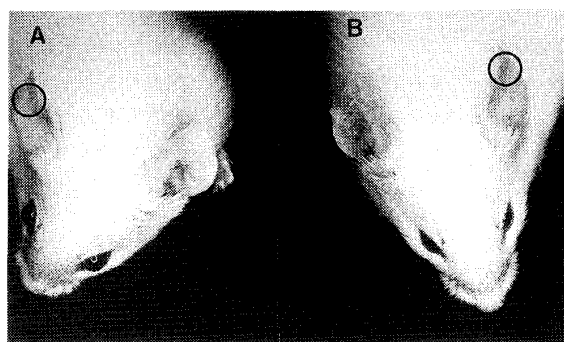


図1 CaPS 投与によるマウス耳の炎症  
CaPS 投与 4 日目のマウス耳 (B) はコントロール (A) に比較して発赤し、肥厚化している。○印の部分の厚みを左右測定した。

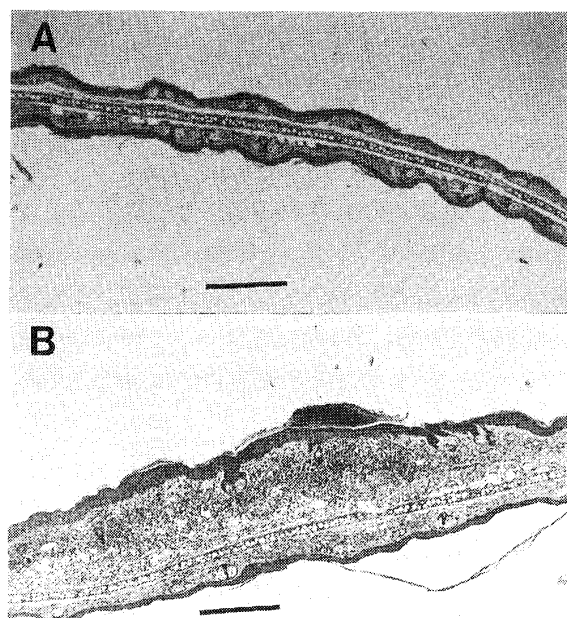


図2 CaPS 投与マウス耳の光学顕微鏡像 (低倍率)  
CaPS 投与 4 日目のマウス耳の組織切片像 (B) は、コントロール (A) に比較して厚みが増し、細胞の浸潤や排除が著しい。図中の——は  $200\mu\text{m}$  である。

## B. CaPS によるマウス耳の肥厚化

CaPS をマウスの尾静脈より注射して 24 時間ほど経過すると、左右の耳が赤くなり、肥厚化しはじめる。このような炎症像は約 2 ~ 3 日で最大となり、数日間持続する。炎症の発生が遅れる個体も存在するので、肥厚の測定等は 4 日目におこなった。

図 1 は CaPS 投与後 4 日におけるマウスの耳である。左右の耳の○印の部分の厚みを測定した結果を表 2 に示した。コントロールの 5 匹のマウスの左右の耳の厚みの平均値  $0.246 \pm 0.020 \text{ mm}$  に対して CaPS 投与マウス 35 匹の左右の耳の厚みの平均値は  $0.304 \pm 0.056 \text{ mm}$  と著しい肥厚化が定量的に示された。

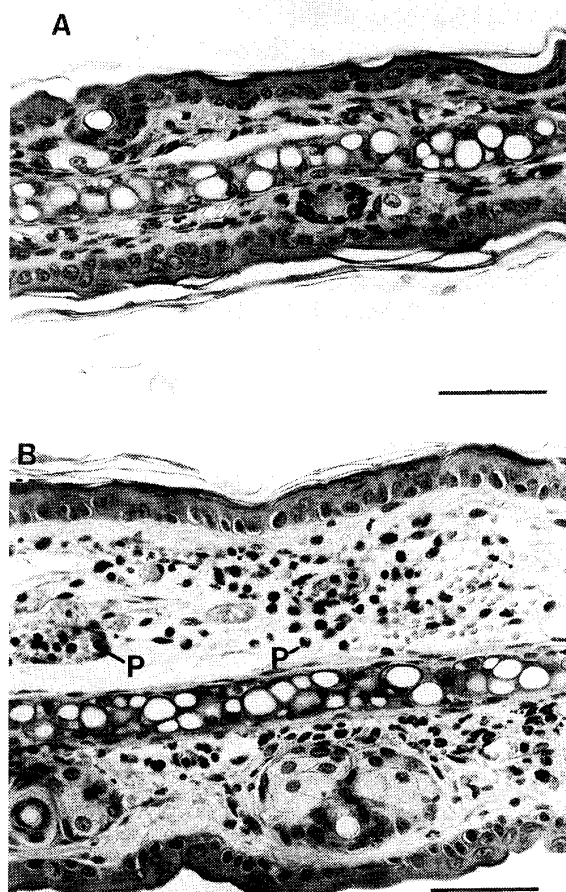


図3 CaPS 投与マウス耳の光学顕微鏡像 (高倍率)  
CaPS を投与したマウス耳 (B) において、コントロール (A) ではみられない多形核白血球 (P) が血管内外に数多くみられる。図中の——は  $100\mu\text{m}$  である。

表2 CaPS 投与によるマウス耳の肥厚化

マウスNo.1～35には CaPS を、C-1～C-5にはコントロールとしてマンノースを200  $\mu$ g ずつ投与した。耳の厚みは投与後4日で測定した。厚みの単位はmm。

マウス No.	耳の厚み		マウス No.	耳の厚み	
	右	左		右	左
1	0.32	0.36	21	0.26	0.26
2	0.32	0.30	22	0.26	0.24
3	0.50	0.26	23	0.28	0.28
4	0.28	0.28	24	0.32	0.28
5	0.28	0.28	25	0.32	0.42
6	0.32	0.32	26	0.24	0.26
7	0.52	0.38	27	0.32	0.40
8	0.28	0.30	28	0.30	0.28
9	0.28	0.26	29	0.46	0.42
10	0.26	0.26	30	0.26	0.30
11	0.28	0.28	31	0.28	0.28
12	0.24	0.26	32	0.24	0.26
13	0.24	0.26	33	0.26	0.24
14	0.36	0.28	34	0.28	0.26
15	0.34	0.35	35	0.30	0.32
16	0.30	0.30	C-1	0.26	0.26
17	0.38	0.30	C-2	0.26	0.26
18	0.28	0.28	C-3	0.26	0.26
19	0.36	0.30	C-4	0.22	0.22
20	0.26	0.42	C-5	0.24	0.22

### C. マウス耳における組織学的炎症像

CaPS 投与マウスの耳の切片を顕微鏡観察すると、コントロールに比較して、全体的に肥厚化が著しく(図2)、拡大してみると、表皮および真皮の細胞層が増加しており、皮下組織において血管の周囲を中心として多形核白血球の浸潤が著しかった(図3)。血管内においても、多

形核白血球が増加していた。

### 考 察

*Candida albicans* に由来する毒性高分子物質については、これまでも数多くの研究がなされている。主なものとして、カンジトキシンと呼ばれるタンパク質<sup>5)6)</sup>、糖タンパク<sup>7)8)</sup>、アルカリ抽出多糖<sup>9)10)11)</sup>、酸性プロテアーゼ<sup>12)13)</sup>などがあげられる。これら *Candida albicans* により産生されるか、または *Candida albicans* 細胞より抽出された高分子物質が実験動物に様々な病的状態を引き起こすことが報告されている。しかしながら、これらの実験結果については再現性の無いものが少なくなく、安定した毒性物質を得ることはなかなかむづかしい。この原因として、毒性物質の産生菌株が臨床分離株であることがあげられる。そこで、我々は毒性多糖を抽出する材料として、安定な標準株である IFO 1060株を選んだ。また、抽出した物質の毒性を簡便で定量的に測定できる実験系としてマウスの耳における炎症を選んだ。

マウスの耳に炎症を引き起こすことが知られている物質としては *Streptococcus pneumoniae* R36A 由来の C-多糖<sup>14)15)</sup> があげられる。C-多糖と CaPS の共通性状としてはアミノ糖の存在があげられる。C-多糖には50%以上ものアミノ糖が含まれており強い炎症活性を有する。CaPS にもわずかではあるが N-アセチル-D-グルコサミンが含まれている。今後は CaPS をさらに精製して糖組成を明確にするとともに、アミノ糖の種類や量に注目して、炎症活性との関連を調べる予定である。

### 文 献

- 1) Lowry OH, Rosenbrough T, Fan AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265—275.
- 2) Roe JH (1955) The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **212**, 335—343.
- 3) 遠藤玉夫 (1990) 糖鎖の検出：レクチンまたは抗体を用いる方法。日本生化学会編、新生化学実験講座3、東京化学同人、東京、pp 157—161.
- 4) 山本一夫、大沢利昭 (1990) レクチンカラムを用いた糖タンパク質の精製。日本生化学会編、新生化学実験

講座 3, 東京化学同人, 東京, pp 10—18.

- 5) 岩田和夫, 内田勝久, 遠藤博子 (1967) *Candida albicans* の新毒性物質 "Candidotoxin" 7. 菌株と毒力の関係および毒性物質産生条件. 医学と生物学, **74**, 346—350.
- 6) 岩田和夫, 内田勝久 (1967) *Candida albicans* の新毒性物質 "Candidotoxin" 2. 毒性物質の分離, 精製と毒性. 医学と生物学, **74**, 351—355.
- 7) 山本容正, 岩田和夫 (1980) *Candida albicans* の産生する糖蛋白毒素に関する研究. 第1報 分離精製と物理化学的性状. *Japanese Journal of Medical Mycology*, **21**, 264—273.
- 8) 山本容正, 岩田和夫 (1980) *Candida albicans* の産生する糖蛋白毒素に関する研究. 第2報 毒素および菌体マンナンの *Limulus amoebocyte lysate* (LAL) のゲル化活性. *Japanese Journal of Medical Mycology*, **21**, 274—285.
- 9) 村田久雄, 飯島 肇, 直江史郎 (1979) カンジダの菌体抽出物によるマウスの実験的冠状動脈炎に関する研究. 第1報. *Japanese Journal of Medical Mycology*, **20**, 214—219.
- 10) 村田久雄, 飯島 肇, 直江史郎, 増田弘毅 (1980) カンジダの菌体抽出物によるマウスの実験的冠状動脈炎に関する研究. 第2報. *Japanese Journal of Medical Mycology*, **21**, 131—136.
- 11) Murata H (1979) Experimental *Candida*-induced arteritis in mice. *Microbiology and Immunology*, **23**, 825—831.
- 12) Negi M, Tsuboi R, Matsui T and Ogawa H (1984) Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*. *Journal of Investigative Dermatology*, **83**, 32—36.
- 13) 小川秀興, 吉池高志 (1990) 各種真菌の産生するプロテアーゼの病態的意義について. *Japanese Journal of Medical Mycology*, **31**, 297—304.
- 14) Liu TY and Gotschlich EC (1963) The chemical composition of pneumococcal C-polysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry*, **238**, 1928—1934.
- 15) Chetty C and Kreger A (1980) Characterization of pneumococcal purpura-producing principle. *Infection and Immunity*, **29**, 158—164.