

原 著

Candida albicans の家兎摘出食道粘膜への定着性状

美祢弘子¹⁾ 星加和徳²⁾

川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科¹⁾

川崎医科大学 内科消化器部門Ⅱ²⁾

(平成5年11月17日受理)

Adherence of *Candida albicans* to Resected Esophageal Epithelium of Rabbit

Hiroko MINE¹⁾ and Kazunori HOSHIKA²⁾

*Department of Clinical Nutrition
Faculty of Medical Professions
Kawasaki University of Medical Welfare¹⁾
Kurashiki, 701-01, Japan
The Second Division of Gastroenterology
Department of Internal Medicine
Kawasaki Medical School²⁾
Kurashiki, 701-01, Japan
(Accepted Nov. 17, 1993)*

Key words : *Candida albicans*, esophageal epithelium, adherence

Abstract

Resected rabbit esophagi were ligated at both their ends and were brought into contact with *Candida albicans* which were introduced into the lumen. Four forms of *Candida* cells were used in this experiment. They were living yeast form, living mycelial form, dead yeast form and dead mycelial form. Immutex DRS-02 beads were also challenged as a control.

After incubation(37°C, 1hr.) of those treated esophagi, they were cut open, rinsed, fixed and coated with gold palladium. The number of adhered *Candida* cells or beads were directly counted by scanning the whole area of the specimen under scanning electron microscope.

The following results were obtained. 1) Living yeast form adhered greater than living mycelial form. 2) Living yeast form adhered greater than dead yeast form. 3) Dead mycelial form adhered greater than living mycelial form. 4) Living yeast form adhered greater than beads.

要 約

家兎の摘出食道の両端を結紮し、その内腔に *Candida* を注入して食道粘膜と接触させた。本実験においては4種類の *Candida* 細胞：酵母型生菌、菌糸型生菌、酵母型死菌および菌糸型死菌とコントロールとして Immutex DRS-02ビーズを用いた。

処理食道は37℃で1時間インキュベートした後切り開いて洗浄し、固定して gold-palladium を蒸着した。定着した *Candida* 細胞数およびビーズ数を標本全体を走査型電子顕微鏡でスキャンすることにより直接数え、次の様な結果を得た。1) 酵母型生菌は菌糸型生菌よりもよく定着した。2) 酵母型生菌は酵母型死菌よりもよく定着した。3) 菌糸型死菌は菌糸型生菌よりもよく定着した。4) 酵母型生菌はビーズよりもよく定着した。

緒 言

従来より白血病や糖尿病などの患者に¹⁾、近年では後天性免疫不全症候群患者に²⁾消化器 *Candida* 症が認められるとの報告が多い。また消化器 *Candida* 症のなかで最も多くみられるのは食道 *Candida* 症である³⁾。しかしながら、*Candida* 症の発症の第一段階である *Candida* 細胞の食道粘膜への定着機序は明らかでない。これまで *Candida* 細胞の動物への定着実験が報告されているものはマウスの空腸⁴⁾、ブタの血管⁵⁾、ラットの消化管⁶⁾、ラットの皮膚⁷⁾などであり食道における定着実験はあまりおこなわれていない。著者等は食道の微細構造がヒトに類似している家兎⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾を実験動物に選び *Candida* 細胞の食道粘膜への定着性状を調べた。

家兎の食道粘膜への *Candida albicans* の定着様式は走査電子顕微鏡でくわしく観察し、付着、上皮細胞下付着、陥凹形成および侵入の4様式が存在する事をすでに報告している¹²⁾ので、本論文では摘出した家兎の食道に効率よく *Candida* 細胞を定着させる実験方法および投与する *Candida* 細胞が酵母型である場合と菌糸型である場合、またこれらが生菌である場合と死菌である場合の定着率の相違について報告する。

実験方法

生後8週齢の New Zealand White 系雄性家兎(体重1.0~1.6kg)を実験動物に使用した。2日間絶食後、pentobarbital を200mg/kgとなるように静注して屠殺し、ただちに開胸、開腹し

て約5cmの食道を摘出した。摘出食道を phosphate buffer saline, pH7.4 (以後 PBS と省略する)で洗った後、PBSに5%の割合に溶かした trypsin (Difco, 1:250)で室温で75分間前処理した。この5% trypsin 液には100 μ g/mlとなるように kanamycin を添加して実験中の細菌の汚染を防いだ。前処理を終えた摘出食道を PBSでよく洗浄して trypsin を除去し、一端を結紮して準備調整した菌液を注入した後他端を結紮した。注入する菌液の量は食道全長を実験に用いる場合には約1ml、食道の半長ずつを用いる場合には約0.5mlとした。このようにふくまりました袋状の食道の中に *Candida* 細胞液が満ちた状態で食道粘膜と *Candida* 細胞の接触をおこなわせた。結紮した食道は、これが十分浸る量の arginine-saline-kanamycin 液 (arginine 培地¹²⁾に0.75%となるように NaCl を加え、さらに kanamycin を100 μ g/mlとなるように添加したもの、以後 arginine-saline と省略する)につけて37℃で1時間静置して *Candida* 細胞と接触させた。

Candida 細胞としては *Candida albicans* IFO 1060, serotype A を用いた。Sabouraud 液体培地で培養して得られた細胞を遠心洗浄し、arginine saline に10⁸/となるように浮遊させたものを酵母型生菌液とした。酵母型細胞を arginine 培地中で37℃で約48時間培養し、伸びた菌糸の長さが酵母型の母細胞の4~5倍に達したものを遠心集菌し、同様の濃度で arginine saline に浮遊させたものを菌糸型生菌液とした。酵母型細胞および菌糸型細胞を10% formalin saline 液

で48時間、室温で処理して得られた死菌を遠心洗浄した後 arginine saline に 10^8 /ml となるように浮遊させたものをそれぞれ酵母型死菌液および菌糸型死菌液とした。これら細胞浮遊液のほかに直径 $4.72\mu\text{m}$ の Immutex, DRS-02 (日本合成ゴム株式会社) を 10^8 /ml となるように arginine saline に浮遊させてビーズ液として実験に用いた。

Candida 細胞との接触が終了した食道は結紮を解除し、切開してシート状にしてから arginine-saline で十分洗浄して未定着の *Candida* 細胞を除去して標本とした。標本はさらに3分割し、2.5% glutaraldehyde と1% osmium tetroxide の二重固定後 ethanol 系列で脱水し、isoamyl succinate に置換後 gold palladium を蒸着した。

すべての標本全域を日立 S-570 走査電子顕微鏡によりくまなくスキャンして定着菌数を計測した。スキャンした標本の面積は高速ハイグレード画像解析装置: interactive image analysis system (IBAS2000, CARLZEISS) を用いて計測した。

実験結果

1. 酵母型生菌の定着率

家兎7羽の摘出食道を2分割して袋状にして酵母型生菌の定着率を調べた結果を表1に示した。定着率は実験毎に、また各分割部域毎に大きく異なった。1家兎の食道 1mm^2 あたりの定着率は 552.21 (平均値) ± 607.52 (標準偏差: SD) であった。

酵母型生菌の食道粘膜への代表的な定着像を図1に示した。

表1 酵母型生菌の摘出食道粘膜への定着率(/ mm^2)

家兎	部域1	部域2	部域3	全食道
1	145.63	146.86	19.22	311.71
2	161.49	68.86	160.05	390.40
3	859.47	61.49	400.39	1321.35
4	36.53	33.66	36.07	106.26
5	65.38	58.36	29.86	153.60
6	607.11	26.87	886.36	1520.34
7	27.75	20.00	14.06	61.81

552.21 (平均値) ± 607.52 (標準偏差: SD)

2. 菌糸型生菌の定着率

家兎3羽の摘出食道を2分割して袋状にして菌糸型生菌の定着率を調べた結果を表2に示した。酵母型生菌の場合と同様に定着菌数のばらつきは大きい。菌糸型生菌の1家兎の食道 1mm^2 あたりの定着率が 451.65 (平均値) ± 437.98 (SD) であり、前項に示した酵母型生菌の定着率に比較すると低い傾向がみられた。ばらつきが大きいので有意差の検定は行わなかった。

菌糸型生菌の食道粘膜への代表的な定着像を図2に示した。

3. 酵母型生菌と酵母型死菌の定着率の比較

1羽の家兎の摘出食道を上下に2分割し、一方に酵母型生菌液を、他方に酵母型死菌液を注入して両者の定着率を比較した(表3)。4羽の家兎のうち、1羽では両者の定着率はほぼ同じであったが、3羽では酵母型生菌の定着率のほうが酵母型死菌の定着率よりも2.7倍~5.6倍高かった。個体差が大きいので定着率の平均値をも

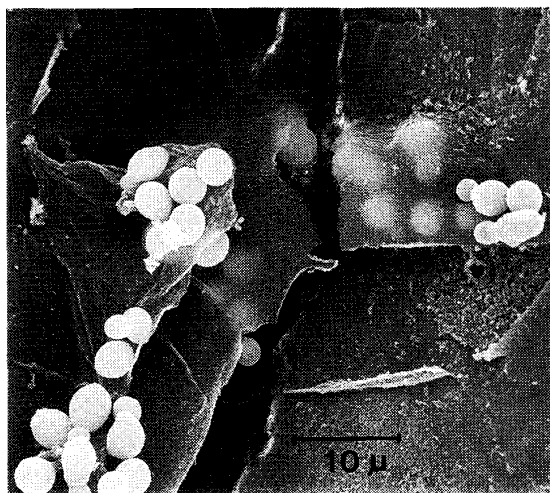


図1 家兎食道粘膜に定着した *Candida albicans* の酵母型生菌の走査電子顕微鏡像

表2 菌糸型生菌の摘出食道粘膜への定着率(/ mm^2)

家兎	部域1	部域2	部域3	全食道
1	125.64	464.44	259.90	849.98
2	6.23	5.46	16.20	27.89
3	120.93	84.85	32.76	238.54

451.65 (平均値) ± 437.98 (標準偏差: SD)



図2 家兎食道粘膜に定着した *Candida albicans* の菌糸型生菌の走査電子顕微鏡像

表3 酵母型生菌と酵母型死菌の定着率の比較

家兎	酵母型生菌定着率 (/mm ²)	酵母型死菌定着率 (/mm ²)
1	105.82	39.58
2	125.57	28.72
3	363.02	64.31
4	35.46	40.33

とめての比較は行わなかった。

4. 菌糸型生菌と菌糸型死菌の定着率の比較

1羽の家兎の摘出食道を上下に2分割し、一方に菌糸型生菌液を、他方に菌糸型死菌液を注入して両者の定着率を比較した(表4)。2羽の家兎を用いた実験の結果、菌糸型死菌の定着率は菌糸型生菌の定着率よりも2倍および9.5倍高かった。

5. 酵母型生菌とビーズの定着率

1羽の家兎の摘出食道を上下に2分割し、一方に酵母型生菌液を、他方にビーズを注入して両者の定着率を比較した(表5)。2羽の家兎を用いた実験の結果、いずれにおいても酵母型生菌の定着率のほうが13.3倍および142.1倍と圧倒的に高かった。

考 察

摘出食道に対する *Candida* 細胞の定着数を調べたところ、実験毎の値のばらつきが大きく統計的に有意な差があるかどうかを検定する事が

表4 菌糸型生菌と菌糸型死菌の定着率の比較

家兎	菌糸型生菌定着率 (/mm ²)	菌糸型死菌定着率 (/mm ²)
1	9.70	92.10
2	76.36	155.95

表3 酵母型生菌とビーズの定着率の比較

家兎	酵母型生菌定着率 (/mm ²)	ビーズ定着率 (/mm ²)
1	50.49	3.81
2	500.09	3.52

できなかった。ばらつきの原因は不明であるので、家兎の種類、使用菌株、摘出食道の前処理方法、投与菌量、投与時間、投与方法などの再検討が必要であると思われる。

未処理の摘出食道あるいはHCl処理した摘出食道にたいする *Candida* 細胞の定着率は非常に低く、trypsin処理により比較的定着率が高まった。今後はさらに定着率が安定して高くなる前処理方法を検討したい。

摘出食道を結紮し腹腔に菌液を注入したが、注入液量約0.5mlと菌液の濃度(10⁸/ml)はこれ以上増量する事はむづかしいので、*Candida* 細胞を浮遊させる溶液の粘度をあげる事などの工夫をして定着率を高めれば、定着数のばらつきも減少すると考えられる。

統計的な検定はできないが表3、4、5から明らかなように1羽の家兎の摘出食道を2分割してそれぞれに異なる性状の菌液を注入して定着率を比較してみると両者の違いは明白であった。酵母型生菌は酵母型死菌よりもよく定着したが、菌糸型細胞の場合には死菌の方が生菌よりもよく定着した。菌糸型で死菌の方が定着率が高い事の理由は不明である。formalin以外の方法で死菌化した *Candida* 細胞も使用して比較する事が必要である。

ビーズの定着率は安定して低いので、ばらつきはあるものの *Candida* 細胞の食道への定着には単純な物理的接触によるものではなく、細胞表面の様々な性状が関与していると思われる。

文 献

- 1) 小池道明, 石山泰二郎, 阿部総太郎, 堀江誠一, 管谷直樹, 杉本正邦, 橋本真生, 住吉順子, 斎藤 潔, 大沢秀樹, 若林芳久, 広瀬俊一 (1990) 深在性真菌症の合併が認められた白血病剖検症例に関する臨床的検討. 日本医真菌学会誌, **31**(3), 237—242.
- 2) Odds FC, Schmid J and Soll DR (1990) Epidemiology of *Candida* infections in AIDS. In : Bossche HV, Mackenzie DWR, Cauwenberg G, Cutsem JV, Drouhet E, Dupon B, eds. Mycosis in AIDS patients. Plenum Press, New York, pp 67—74.
- 3) Eras P, Goldstein MJ and Shevloc KP (1991) *Candida* infection of the gastrointestinal tract. *Medicine*, **51**, 367—369.
- 4) Cole GT, Seshan KR, Pope LM and Yancey RJ (1988) Morphological aspects of gastrointestinal tract invasion by *Candida albicans* in the infant mouse. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, **26**, 173—185.
- 5) Klotz SA, Drutz DJ, Harrison JL and Huppert M (1983) Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida* yeasts. *Infection and Immunity*, **42**(1), 374—384.
- 6) DeMaria A, Buckley H and von Lichtenberg F (1976) Gastrointestinal Candidiasis in rats treated with antibiotics, cortisone and azathioprine. *Infection and Immunity*, **13**(6), 1761—1770.
- 7) Ray TL and Payne CD (1988) Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis : a role for *Candida* acid proteinase. *Infection and Immunity*, **56**(8), 1942—1949.
- 8) 星加和徳 (1980) 食道・胃粘膜接合部の微細構造に関する研究 I. 人における接合様式の検討. 日本臨床電子顕微鏡学会誌, **13**, 315—330.
- 9) 星加和徳 (1981) 食道・胃粘膜接合部の微細構造に関する研究 II. 人における接合様式の検討. 日本臨床電子顕微鏡学会誌, **14**, 121—133.
- 10) 星加和徳 (1981) 食道・胃粘膜接合部の微細構造に関する研究 III. 哺乳動物以外の脊椎動物における接合様式の検討. 日本臨床電子顕微鏡学会誌, **14**, 135—150.
- 11) Hoshika K and Kihara T (1980) The fine structure of the esophago-gastric junction. *Journal of Clinical Electron Microscopy*, **13**, 5—6.
- 12) 美祢弘子, 津島弘文, 星加和徳 (1993) *Candida albicans* の二形性変換に及ぼすアミノ酸の影響. 川崎医療福祉学会誌, **3**(1), 183—188.