

# *Candida albicans* のビルレンス に及ぼす抗リンパ球血清の影響

藤井 富美子

## Influence of Antilymphocyte Serum on virulence of *Candida albicans*

Fumiko FUJII

### I はじめに

微生物感染において現在免疫学的監視機構 (immunological surveillance) への関心が非常に高まりつつある。しかしこの免疫学的監視機構の解明はやとその緒についたばかりである。特に真菌感染においては細胞性免疫の占める位置の重要さが徐々に明確になりつつあるがその主役を示すリンパ球の種類、性格、機能などについては未解決の問題が少なくない。先に免疫抑制剤の1つ Azathioprine (Ap.) で処置したマウスにおいてその抵抗性の低下が病原性真菌 *Candida albicans* の感染を強めることについて検討し、免疫不全 (immunodeficiency) の果す役割の重要さを報告した。

今回は更なるしほり免疫反応において中心的役割をうけもつリンパ球に、投与された抗リンパ球血清がどのような影響を与えるか、更に真菌感染において如何なる細胞性免疫抑制効果があるかわれるか等の究明をこころみた。

すなわち、実験的マウスカンジダ症に主として抗リンパ球血清 (Antilymphocyte Serum ALS) を投与し、マウスの生残率、*Candida albicans* (以下 *C. alb.* とする) の臓器への侵襲性、脾細胞 (マクロファージを含む) の游走能力等に及ぼす影響を検討し抗リンパ球血清の主としてリンパ球への働きかけ、負方向への影響の重要性を知り得たので報告する。

### II 実験材料および実験方法

#### 1. 実験材料

(1) 実験動物：マウス SPF, ICR 1W~4W ♀を用いた。

(2) 菌株：*Candida albicans* I株 110 を使用した。

実験には3%サブロー寒天培地, 37°C, 24時間発育のものを使用した。

(3) 抗リンパ球血清

a) リンパ球の分離

抗リンパ球血清を得るためのリンパ球は次の方法で分離を行なった。

マウスを軽く麻酔した後、環流液 (組成  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_7$  0.027M, NaCl 0.014M, KCl 0.0005M,  $\text{NaHCO}_3$  0.00025M) で尾部静脈より環流を行ない主に赤血球、血液成分を除いた後、各リンパ節および腸間膜等のリンパ節を摘出した。摘出された各部リンパ節はスライドグラスで破碎し、次に局方ガーゼを重ね合わせてろ過を行なった。

ろ液を 1,000rpm, 10分間の遠沈を 2 回くり返して  $1 \times 10^8$ 個/ml の細胞浮遊液とした。

#### b) 抗リンパ球血清の作り方

分離調整したリンパ細胞浮遊液に等量の Freund アジュバントを加え、この浮遊液をウサギにそれぞれ  $10^8$ 個/ml 程度の細胞が入るように四肢足蹠皮下、大腿筋肉内において注射した。初回の注射 4 週後に追加免疫としてリンパ細胞浮遊液のみを  $10^8$ 個/ml 耳静脈から連続 3 日間注射し、その一週間後試験採血、凝集価を測定した。測定後耳動脈より連続 5 日間 1 回 20ml 採血を行なった後 1 週間後に全採血し血清を分離して、 $0 \sim 5^\circ\text{C}$  に保存適宜実験に使用した。

#### c) 凝集価の測定法

凝集価の測定にあたっては a) の方法でマウスのリンパ球の精製を行ない、次にウサギから得られた抗リンパ球血清を順次希釈し、各段階の血清中にリンパ球を浮遊させ、 $37^\circ\text{C}$ 、1 時間保温の後冷蔵庫内に一昼夜放置した。その後冷蔵庫から取り出し、ただちに  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間保温して寒冷凝集を除き、試験管を軽く回転させて浮遊した状態で顕微鏡を通して凝集の有無を確認した。

凝集価 256~512 に上昇した効果血清を使用した。

## 2. 実験方法

### (1) *C. alb.* 感染マウスの生残率よりみた ALS の影響

*C. alb.* I 株  $2 \times 10^8$ 個/ml を腹腔内接種したマウスにそれぞれ ALS (T=512×) を体重 0.02ml/g あたり皮下接種、尚同時に行なった AP. 投与はマウス体重 160r/g を腹腔内に接種し、接種菌による死亡状況を観察した。

### (2) *C. alb.* 感染マウスの各臓器への侵襲に及ぼす ALS の影響

*C. alb.* 感染のみの場合を対照とし、ALS を同時に投与した後 1 週~4 週にわたって各臓器の還元培養を行なった。AP. の影響も同時に観察した。

接種菌確認の還元培養には他の細菌類の発育を抑制する目的でテラマイシンを加えた生理食塩水にて、各臓器の懸濁液を調整し、サブロー培地に培養した。

### (3) *C. alb.* 感染個体の年齢差にみられる ALS の影響

生後 1 週齢および 4 週齢マウスの腹腔内に *C. alb.*  $1 \times 10^6$ 個を接種し、1 週後~4 週後還元培養を行ない、感受性の変動と年齢差の関係を観察した。

### (4) *C. alb.* 感染マウスにみられる ALS の投与時期とその影響

ALS 無処置のマウス群をコントロールとし、グループを 1~8 グループにわけ感染前に ALS を接種した場合、感染と同時の場合、感染後に ALS を接種した場合の影響を感染後 1 週間目の臓器還元培養により観察した。

投与の時期は Table. 1 の通りである。

この場合 *C. alb.* 接種菌量は  $1 \times 10^8$ 個を腹腔に、ALS は 0.02ml/g あたりを皮下に接種した。

### (5) *C. alb.* 感染における ALS の投与と脾臓肥大

*C. alb.* 感染実験において ALS を投与したマウスでは脾臓の肥大が特徴的に認められたので、特に ALS 投与時期から ALS の影響をみた実験群マウスにつき脾臓の重量比を求めた。

### (6) *C. alb.* 感染の脾細胞游走におよぼす ALS の影響

Table 1. Intraperitoneal inoculation and various dosages of ALS

	Cont.	G. 1	G. 2	G. 3	G. 4	G. 5	G. 6	G. 7	G. 8
3 days before dosage		ALS							
2 days before dosage			ALS						
1 day before dosage				ALS					
infection	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1 day after dosage						ALS			ALS
2 days after dosage							ALS		ALS
3 days after dosage								ALS	ALS
4 days after dosage									ALS
5 days after dosage									ALS
6 days after dosage									ALS

ALS 投与が脾臓内のマクロファージ，白血球等の機能に及ぼす影響を観察するためにこの実験を試みた。すなわち実験マウスを軽くエーテル麻酔したのち，脱血を行ない，脾臓を摘出した。この脾臓をうすくスライスして切片を作り，小形シャーレの中に円形カバーガラスをしき，そのうえにスライスした脾臓の切片を置く。さらに切片が浮遊しないよう円形カバーガラスをかぶせ，その中へ *C. alb.* 菌体蛋白抗原 (CKR-1) を添加した培養液 (HANKS液) またはその抗原非添加培養液を注入し，5% CO<sub>2</sub>，37°C 恒温器内で24~48時間培養し，顕微鏡下で脾細胞の游走状況からその影響を観察した。

### Ⅲ 実験成績および考察

#### 1. *C. alb.* 感染マウスの生残率よりみた ALS の影響

ALS 無処置の *C. alb.* 感染マウス対象群の場合は2週を過ぎて死亡がはじまり，4週後でも死亡率は40%であったが，ALS で同時に処理した場合，早期から死亡しはじめ，2週後で80%の死亡率を示した。AP. 処置群でも同様の死亡状況であった。(Fig. 1)

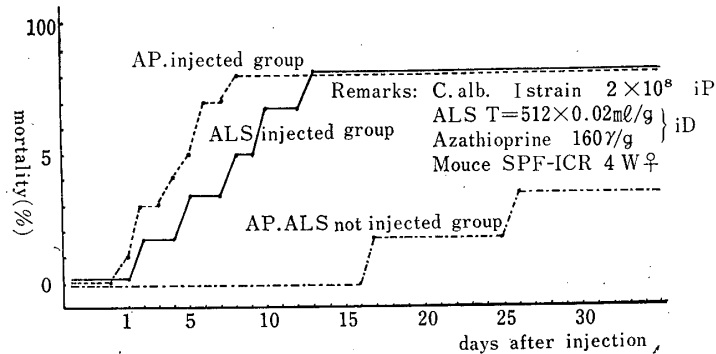


Fig. 1 Influence of ALS on *C. alb.* intraperitoneal inoculation

ALS を投与することにより *C. alb.* 感染マウスの防御能力は著明に低下することが認めら

れた。AP. も同様な影響を与えている。

## 2. *C. alb.* 感染マウスの各臓器への侵襲に及ぼす ALS の影響

*C. alb.* 感染のみの場合と ALS 処置を行なった場合接種菌の侵襲状況を1週～4週にわたって各臓器の還元培養を行なった。同時に行なったAP. の成績とともにその結果はTable. 2 に示した通りである。

Table 2. Influence of ALS on *C. alb.* intraperitoneal inoculation  
*C. alb.*

	Lung	Liver	Kidney	Spleen	Peritoneal Lymph nodes	Marrow	Heart's blood
1 W	++	+	##	###	###	###	—
2 W	##	++	##	###	###	###	—
3 W	—	—	+	+	+	+	—
4 W	—	—	—	+	+	—	—

### *C. alb.* + ALS

	Lung	Liver	Kidney	Spleen	Peritoneal Lymph nodes	Marrow	Heart's blood
1 W	+	±	++	###	###	++	—
2 W	+	+	++	+	+	+	—
3 W	+	+	+	+	+	+	—
4 W	—	—	++	+	++	—	—

### *C. alb.* + AP.

	Lung	Liver	Kidney	Spleen	Peritoneal Lymph nodes	Marrow	Heart's blood
1 W	++	++	###	###	###	##	—
2 W	+	+	+	+	##	+	—
3 W	—	+	+	+	++	—	—
4 W	+	++	+	+	++	+	—

この場合 *C. alb.* 感染のみ, *C. alb.* 感染+ALS, *C. alb.* +AP. 処置の三つのグループについて1週目ではそれほどの差異は認められなかったが, 3週～4週目になると ALS および AP. 処置グループでは *C. alb.* 接種菌の侵襲を助長するような影響が認められた。ALS 投与により個体の防御能の弱化を基盤とした *C. alb.* のビルレンスの増強が招来される。これは AP. でも同様である。

## 3. *C. alb.* 感染個体の年齢差にみられる ALS の影響

個体の免疫的監視機構は年齢により必ずしも一様ではないのみならず, この機構に加えられる外部からの働きかけに対する敏感性にも相異がある。

4週齢マウスにおいて ALS の影響が認められることは前にも述べたが, もっと幼弱な1週齢マウスでは4週齢マウスに比しALSの影響はどのようなものであろうかをみた結果はTable. 3

に示す通りである。

Table 3. Influence of ALS on Age difference for infected mice  
4 Weeks mouse

	Lung	Liver	Kidney	Spleen	Peritoneal Lymph nodes	Marrow	Heart's blood
Group of no ALS injection	—	—	—	+	+	—	—
Group of ALS injection		—	++	+	++	—	—

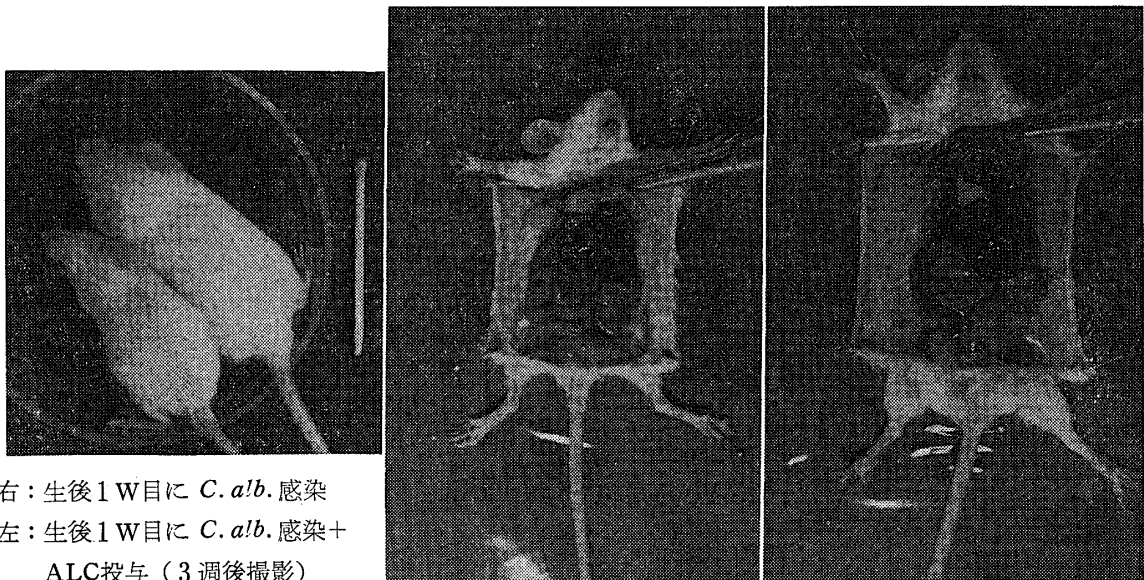
1 Week mouse

	Lung	Liver	Kidney	Spleen	Peritoneal Lymph nodes	Marrow	Heart's blood
Group of no ALS injection	—	—	—	—	+	—	—
Group of ALS injection	+	+++	+	++	++	+	—

1週齢マウスの場合は4週齢マウスに比し接種した *C. alb.* の侵襲性、菌量共に強く認められた。すなわち感染に対する抵抗力に及ぼす ALS の影響は若齢の方が強くうけることがわかった。おそらく immunological surveillance の ALS に対する敏感さが若い場合より著しいといえる。

なお ALS を1週齢マウスに投与し、同時に *C. alb.* を感染させ、3週後に剖検したが成長が非常に悪いのに脾臓だけが著しく肥大しているのが特徴的である。

Fig. 2



右：生後1W目に *C. alb.* 感染  
左：生後1W目に *C. alb.* 感染+  
ALC投与（3週後撮影）

#### 4. *C. alb.* 感染マウスにみられる ALS の投与時期とその影響

*C. alb.* 感染マウスに対して ALS の影響をみるのに投与する時期を変えて行なった。対照の *C. alb.* 感染のみの場合および ALS 処置グループ1～8までの結果は Table. 4 に示す通りである。

ALS の投与時期の如何をとわず *C. alb.* の侵襲は増強される。感染前に ALS 処置を行なった場合、また感染後に ALS 処置を行なった場合のいずれも3日の範囲内において抵抗力を

Table 4 Influence of several ALS dosages on *C. alb.* inoculation

	Lung	Liver	Kidney	Spleen	Peritoneal Lymph nodes	Marrow	Heart's blood
Cont	—	—	+	+	++	—	—
G.1	++	++	++	###	++	—	—
G.2	++	###	###	###	###	—	—
G.3	—	++	++	###	###	—	—
G.4	+	++	++	###	###	++	—
G.5	—	+	###	###	###	—	—
G.6	—	—	++	++	###	—	—
G.7	+	+	++	++	###	—	—
G.8	+	+	###	###	###	—	—

弱める ALS の影響が認められた。

特に ALS を感染と同時に投与した場合および感染後連日 6 日間 ALS を投与したときの抵抗性低下には骨髄その他の臓器への侵襲増加で明瞭に観察される。

#### 5. *C. alb.* 感染における ALS の投与と脾臓肥大

これまでの感染実験で、脾臓が特徴的であったので脾臓の体重に対する重量比を求め、その実体を明確にした。結果は Fig. 3 に示した。

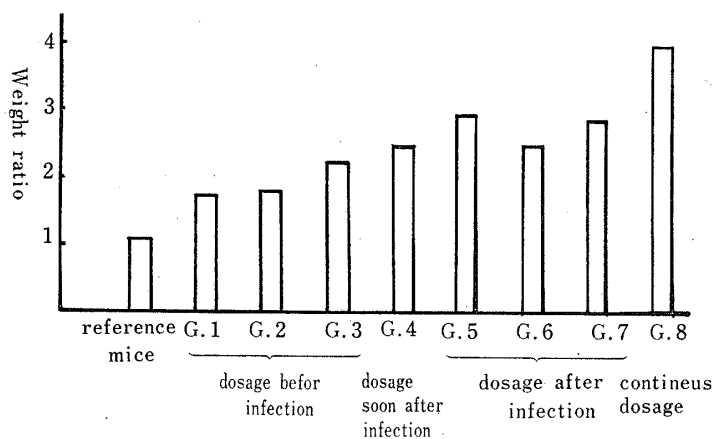


Fig. 3 Weight ratio of spleen at a week after dosage of ALS for *C. alb.* infection mice

コントロールの場合の重量比を 1 とすると感染前、感染後いずれにおいても ALS 処置を行なったものはその値が大きく、脾臓肥大の著しいことが明確にうかがえる。なかでも感染後 ALS を与えた方が脾臓の肥大が顕著であるのはおそらく *C. alb.* の感染刺激とこれに ALS の影響が加わり脾臓機能の増進から肥大へと進展したものと思われる。

また感染後 ALS を投与したものは脾臓の周囲組織とのゆ着が著しかった。連続 ALS 投与の場合はこのゆ着現象は、はなはだしく減弱しているのが認められた。この脾臓の肥大や、ゆ着といった症状は AP. 処置を行なった場合は全くみられなかった現象である。

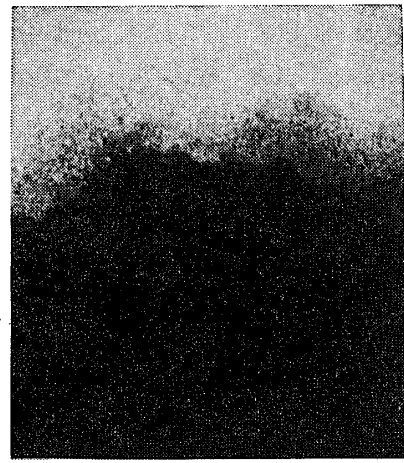
#### 6. *C. alb.* 感染マウスの脾細胞游走におよぼす ALS の影響

ALS の抵抗力低下への影響が著しいことからおそらくリンパ球さらにマクロファージ、仔血球の機能にも障害を与えている可能性が考えられる。そこで実験をこころみたが、*C. alb.* 感染脾細胞に *C. alb.* 菌体蛋白抗原 (CKR-1) を添加しなかったとき示したこれら細胞の游走は抗原添加によりかなり減弱することが明らかになった。

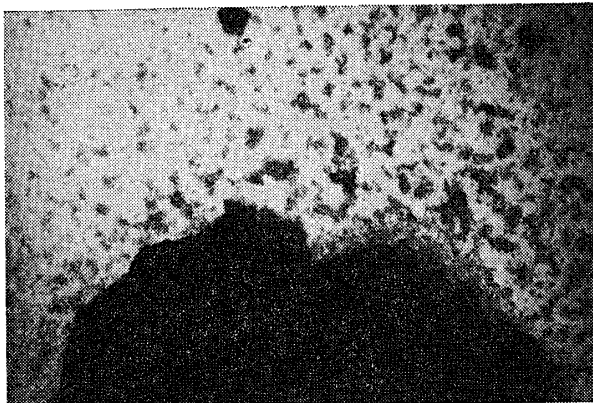
Fig. 4



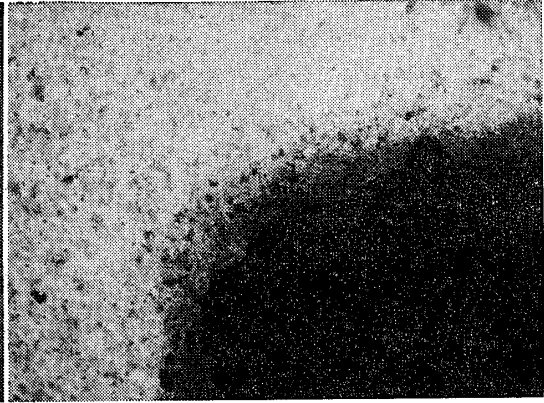
*C. alb.* 感染脾細胞 + Antigen (-)



*C. alb.* 感染脾細胞 + Antigen (+)



*C. alb.* 感染 + ALS 連続 7 日投与脾細胞 + Antigen (-)



*C. alb.* 感染 + ALS 連続 7 日投与脾細胞 + Antigen (+)

特に *C. alb.* 感染後 ALS を連続 7 日間投与した細胞は抗原非添加においては特徴的な游走がみられたが、抗原を加えても游走細胞の抑制はこの成績からは弱かった。

頻回の ALS 処置により特にリンパ球の T-Cell に量的に、質的に悪影響を与えるためにリンフォカインの産生に抑制効果を与えていることが考えられる。

#### IV おわりに

*C. alb.* 感染マウスに抗リンパ球血清 (ALS) を投与した場合 *C. alb.* のビルレンスは上昇する。

1. 対照群に比べて早期から死亡が始まり、死亡率も高くなる。
2. 臓器内侵襲は著明で *C. alb.* ビルレンスの上昇を招来する。
3. ALS の免疫学的監視機構に与える悪影響は成熟マウスより幼若マウスにおいて顕著である。

4. 感染3日前でも、また3日後でも ALS の抵抗性低下の効果が認められ、連続投与の場合は強力な悪影響がみられる。

5. 剖検によると ALS 投与マウスの脾の腫大が著しい。特に ALS 連続投与マウスの脾臓は異常に肥大し、激しいゆ着が認められた。

6. ALS 処置感染脾細胞の游走は感染脾細胞にみられない特徴的な像を示すが、抗原を加えても游走細胞の抑制は弱い。感作リンパ球を用いた MIT において ALS が抑制的影響を与えることから感染脾細胞の游走においても感作リンパ球に関する現象も含まれているものと考えられる。

真菌感染は *Opportunistic infection* とよばれる。真菌の病原因子は必ずしも明確ではない。原発的感染がみられるが病原性の低い微生物である。こういった弱毒真菌による感染症は白血病、再生不良性貧血、がんや臓器移植をした患者に末期感染としてみられることが多く、抗がん剤ステロイド使用による宿主の細胞性ならびに体液性抵抗の減弱、抗生物質使用による生体内 *microflora* の攪乱、延命による感染機会の増大などが発症因子とされている。

特に現在これらの基盤と考えられるのは免疫学的監視機構のうちでリンパ球、特に T-cell から感作リンパ球への移行その能力、感受性などの部分であろう。

ALS を使用して *C. alb.* 感染への影響を観察して得られた数々の成績は真菌感染に対する宿主生体の免疫学的監視機構の解明にいささか役立ち、かつ細胞性免疫の重要性を認識させられる知見であると考えられる。

最後にこの実験を行なうにあたり終始御指導下さいました名古屋大学医学部教授阿多実茂博士に深く感謝いたしますとともに実験に御協力いただいた名古屋大学医学部助手近藤譲氏、神戸俊夫氏に厚くお礼を申し上げます。

## V 主な参考文献

- Gray. J.G. et al : J. Immun. 96, 217 (1966)  
R. N. Taub, E. M. Lance : Immunology, 15, 633-642 (1968)  
野本亀久 : 最新医学 Vol. 24, 7, 1494-1499 (1969)  
花岡正男 : 最新医学 Vol. 24, 7, 1358-1371 (1969)  
Hinuma Yorio : American Society for Microbiology Vol. 3, 2, 304 (1970)  
H. P. R. Seeriger : Zbl. Bakt. Hyg., A 220, 174-185 (1972)  
木下喜博 : 臨床病理 Vol. 21, 34~38 (1973)  
福岡良男, 安藤清平 : 臨床検査講座 7 259-268 (1973)  
John R. Graybill, Robert H. Alford : Cellular Immunology 14, 12-21 (1974)