

Candida の赤血球凝集活性

美祢 弘子

グルタルアルデヒドで固定したヒト赤血球を用い、*Candida* の赤血球凝集活性を調べた。実験に用いた18種または株の *Candida* は GPY-broth 培地ではすべて酵母型となった。2種の *Candida* の酵母型細胞は赤血球凝集活性を示したが、他の16種または株の *Candida* の酵母型細胞は赤血球凝集活性を示さなかった。1/10 MEM-broth 培地では6株の *Candida albicans* と4種の *Candida* が仮性菌糸を形成した。これらの仮性菌糸は強い赤血球凝集活性を示した。2株の *C. albicans* と6種の *Candida* は1/10 MEM-broth 培地でも仮性菌糸を形成せず酵母型細胞のままであった。これらの酵母型細胞は赤血球凝集活性を示さなかった。病原性の強い *C. albicans* で仮性菌糸の形成傾向が強かったことから赤血球凝集活性と病原性の関連について考察をおこなった。

(昭和63年6月21日採用)

Hemagglutinability of *Candida*

Hiroko Mine

The hemagglutinability of *Candida* cells with glutaraldehyde-fixed human red blood cells was studied.

All of the 18 species or strains of *Candida* tested developed yeast type cells in GPY-broth medium. The yeast type cells of 2 species of *Candida* showed hemagglutination, but the other 16 species or strains of *Candida* did not show any hemagglutinability.

In 1/10 MEM-broth medium, 6 strains of *Candida albicans* and 4 species of *Candida* turned into pseudohyphae. These pseudohyphae hemagglutinated heavily. Two types of *C. albicans* and 6 species of *Candida* developed yeast type cells, but none of these cells hemagglutinated.

Pathogenic *C. albicans* showed a greater tendency to become pseudohyphae than non-pathogenic *Candida* species. Therefore, the relationship between hemagglutinability and pathogenicity was discussed. (Accepted on June 21, 1988) *Kawasaki Igakkaishi* 14(4): 525-529, 1988

Key Words ① *Candida albicans* ② Dimorphism ③ Hemagglutinability

はじめに

Candida の感染成立には宿主細胞に対する付着が不可欠であり、付着力の強さは病原性と相関性があると考えられる。*Candida* の付着力の測定はこれまでも様々な方法でおこなわれてきた。しかしながらこれらの測定法は培養細胞^{1),2)} や組織、あるいは fibrin-platelet-matrix^{3),4)} などに付着した *Candida* 細胞数を光学顕微鏡下で直接数えるものであり、繁雑である。

今回我々はある種の *Candida* がグルタールアルデヒドで固定した赤血球に付着し、これを凝集させることを見出した。このような赤血球凝集活性は *Candida* の宿主細胞に対する付着能と相関するものと考え、各種の *Candida* について赤血球凝集活性を測定比較した。さらに培養条件の変化によって得られた異なる細胞型によって赤血球凝集力がどのように変化するかについても調べた。

材料と方法

1) ***Candida* の培養:** 実験に用いた *Candida* は *C. albicans* 8株と *C. albicans* 以外の *Candida* 10種の計18種類であり、すべて発酵研究所 (IFO) より分譲を受けた。酵母型細胞を得るためには GPY-broth を用いた。GPY-broth の組成は glucose 3%, peptone 2%, yeast extract 0.5% で pH は 7.4 に調整した。仮性菌糸を得るためには Eagle の Minimum Essential Medium (栄研) を 1/10 濃度となるように希釈したもの (以下 1/10 MEM-broth と省略する) を用いた。pH は 7.4 に調整した。これらの培地に少量の種菌を移植し、37°C で 2日 静置培養した。遠心集菌して pH 7.4 の Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free phosphate buffer saline [以後 PBS (-) と略す] で 3回 遠心洗滌後 PBS (-) に約 2% 菌液となるように再浮遊したものを細胞液として実験に用いた。

2) **固定赤血球液の調整:** 新鮮なヒト赤血球 (予備実験の結果、血液型によるちがいはみられなかったので今回は A 型血球を用いた) を遠

心洗滌後 PBS (-) に溶かした 2% グルタールアルデヒドで 4°C, 12時間 固定した。固定後 PBS (-) で 3回 遠心洗滌し、最後に PBS (-) に 2% となるよう再浮遊したものを固定赤血球液として実験に用いた。

3) **赤血球凝集反応:** *Candida* 細胞液 200 μ l と固定赤血球液 200 μ l を凝集板のホール中に入れて混合し、室温で 30 分間反応させた後ゆり動かして凝集の有無を肉眼で判定した。固定赤血球と *Candida* 細胞が大きな凝集塊を形成しているものを凝集+, 凝集塊が小さいものは凝集土, 全く凝集していないものは凝集-とした。*Candida* 細胞液のかわりに PBS (-) 200 μ l と固定赤血球液 200 μ l を加えて同様に反応させたものを凝集-のコントロールとした。

4) **表面抗原構造の判定:** *Candida* 細胞の表面抗原構造を因子抗体 (カンジダチェック, ヤトロン社) を用いて調べた。⁵⁾ 用いた因子抗体は No. 4, No. 5, No. 6, No. 13_b の 4 種類である。酵母型細胞の場合は細胞液 100 μ l と因子抗体 100 μ l を凝集板中で混合し、室温で 5 分間反応させて凝集の有無を肉眼で判定した。因子抗体のかわりに PBS (-) 100 μ l を細胞液と混合したものを非凝集のコントロールとした。仮性菌糸の場合には自己凝集をおこすため上記の方法を用いずに蛍光抗体間接法によって表面抗原構造を決定した。仮性菌糸液 100 μ l に因子抗体 100 μ l を遠心管中で混合し、37°C で 30 分間反応させた。PBS (-) で 3回 遠心洗滌後、PBS (-) で 4 倍に希釈した FITC ラベル抗ウサギ IgG 血清 (カッペル社) を 100 μ l 添加し 37°C で 30 分間反応させ、PBS (-) で 2回 遠心洗滌して細胞表面の蛍光染色の有無を調べた。因子抗体のかわりに PBS (-) 100 μ l を加えて同様に処理したものを蛍光染色の非染色コントロールとした。

結 果

1) GPY-broth で培養した *Candida* 細胞の赤血球凝集活性の比較: 実験に用いた 18 種または株の *Candida* はすべて GPY-broth で酵

母型を示した。これら酵母型細胞の赤血球凝集活性を調べたところ、凝集が+であったのは *C. glabrata* と *C. sake* の2種のみであり他はすべて凝集-であった (Table 1)。この2種の *Candida* はどのような培地で培養しても常に酵母型を示すことが知られており、培地により一般に二型性を示す他の *Candida* と異なっている。

2) 1/10 MEM-broth で培養した *Candida* 細胞の赤血球凝集活性の比較: *Candida* を 1/10 MEM-broth で培養すると *C. albicans* 8株中6株は仮性菌糸型となったが *C. tropicalis*, *C. zeylanoides*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* の4種は仮性菌糸と酵母が混在しており、*C. albicans* 2株と他の *Candida* 6種は酵母型を示した。培養条件を変えればこれらの *Candida* のうちでも仮性菌糸を形成すると思われるが今回は 1/10 MEM-broth で得られた細胞を用いて細胞形態と赤血球凝集活性の関係を調べた。この結果、仮性菌糸型を示す6株の *C. albicans* は凝集+であり、仮性菌糸と酵母の混在型である4種の *Candida* は凝集±であった。酵母型を示す2株の *C. albicans* と4種の *Candida* の凝集は-であった。GPY-broth で得られた酵母型細胞が赤血球凝集活性を示した *C. glabrata* と *C. sake* の2種は 1/10 MEM-broth でも酵母型を示しやはり凝集は+であった (Table 2)。

3) *Candida* 細胞の表面抗原構造: 18種類の *Candida* について GPY-broth と 1/10 MEM-broth の両培地で得られた細胞の表面抗原構造を調べた。同一菌種または菌株に

Table 1. Hemagglutination and morphology of *Candida* grown in GPY-broth

Species and Strains		Hemagglutination	Morphology
<i>Candida albicans</i>	IFO 1060	-	Y
<i>Candida albicans</i>	IFO 1594	-	Y
<i>Candida albicans</i>	IFO 1270	-	Y
<i>Candida albicans</i>	IFO 1385	-	Y
<i>Candida albicans</i>	IFO 0579	-	Y
<i>Candida albicans</i>	IFO 0583	-	Y
<i>Candida albicans</i>	IFO 1269	-	Y
<i>Candida albicans</i>	IFO 1386	-	Y
<i>Candida tropicalis</i>	IFO 1400	-	Y
<i>Candida glabrata</i>	IFO 0622	+	Y
<i>Candida sake</i>	IFO 0435	+	Y
<i>Candida zeylanoides</i>	IFO 1092	-	Y
<i>Candida parapsilosis</i>	IFO 1396	-	Y
<i>Candida guilliermondii</i>	IFO 0566	-	Y
<i>Candida krusei</i>	IFO 0584	-	Y
<i>Candida kefyr</i>	IFO 0586	-	Y
<i>Candida utilis</i>	IFO 0626	-	Y
<i>Candida lipolytica</i>	IFO 1548	-	Y

Y=yeast type cell

Table 2. Hemagglutination and morphology of *Candida* grown in 1/10 MEM-broth

Species and Strains		Hemagglutination	Morphology
<i>Candida albicans</i>	IFO 1060	+	PH
<i>Candida albicans</i>	IFO 1594	+	PH
<i>Candida albicans</i>	IFO 1270	+	PH
<i>Candida albicans</i>	IFO 1385	+	PH
<i>Candida albicans</i>	IFO 0579	+	PH
<i>Candida albicans</i>	IFO 0583	+	PH
<i>Candida albicans</i>	IFO 1269	-	Y
<i>Candida albicans</i>	IFO 1386	-	Y
<i>Candida tropicalis</i>	IFO 1400	±	Y+PH
<i>Candida glabrata</i>	IFO 0622	+	Y
<i>Candida sake</i>	IFO 0435	+	Y
<i>Candida zeylanoides</i>	IFO 1092	±	Y+PH
<i>Candida parapsilosis</i>	IFO 1396	±	Y+PH
<i>Candida guilliermondii</i>	IFO 0566	±	Y+PH
<i>Candida krusei</i>	IFO 0584	-	Y
<i>Candida kefyr</i>	IFO 0586	-	Y
<i>Candida utilis</i>	IFO 0626	-	Y
<i>Candida lipolytica</i>	IFO 1548	-	Y

PH=pseudohyphae Y=yeast type cell

Table 3. Surface antigens of *Candida* cells grown in 1/10 MEM-broth

Species and Strains		Surface antigens			
		4	5	6	13b
<i>Candida albicans</i>	IFO 1060	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	IFO 1594	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	IFO 1270	+	+	+	-
<i>Candida albicans</i>	IFO 1385	+	+	+	-
<i>Candida albicans</i>	IFO 0579	+	+	-	+
<i>Candida albicans</i>	IFO 0583	+	+	-	+
<i>Candida albicans</i>	IFO 1269	+	+	-	-
<i>Candida albicans</i>	IFO 1386	+	+	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	IFO 1400	+	+	+	+
<i>Candida glabrata</i>	IFO 0622	+	+	+	-
<i>Candida sake</i>	IFO 0435	+	+	+	-
<i>Candida zeylanoides</i>	IFO 1092	+	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	IFO 1396	-	+	-	+
<i>Candida guilliermondii</i>	IFO 0566	+	-	-	-
<i>Candida krusei</i>	IFO 0584	-	+	-	-
<i>Candida kefyr</i>	IFO 0586	-	-	-	-
<i>Candida utilis</i>	IFO 0626	-	-	-	-
<i>Candida lipolytica</i>	IFO 1548	-	-	-	-

においては細胞形態が異なっても表面抗原構造に変化はみられなかった。ここでは1/10 MEM-brothで培養した細胞を用いての結果を示す(Table 3)。この結果1/10 MEM-brothで仮性菌糸を形成し、その仮性菌糸が赤血球凝集活性を示す6株の*C. albicans*の表面抗原構造と酵母型細胞でありながら赤血球凝集活性を示す*C. sake*と*C. glabrata*の2種の*Candida*の表面抗原構造がよく似ていた。これに対して1/10 MEM-brothでも仮性菌糸を形成せず、赤血球凝集活性のない2株の*C. albicans*は仮性菌糸を形成し赤血球凝集活性を示す6株の*C. albicans*とは表面抗原構造が異なっていた。例外はあるものの4種類の表面抗原の保育率が高いほど赤血球凝集力が高いという相関関係が示された。ただしこれらの表面抗原そのものは凝集素ではなく、*C. albicans*の標準株(IFO 1060)との表層の類似性を示しているものと考えられる。

考 察

生の赤血球とは凝集しない*Candida*がグルタルアルデヒドで固定した赤血球とは凝集することの原因は今のところ不明である。今回はグルタルアルデヒドで固定した赤血球との凝集反応を利用して*Candida*の付着力を比較検討した。この方法は他の付着力測定法と比較すると非常に簡便であり数多くの臨床分離株を用いての実験などに適している。

多くの*Candida*の中で*C. albicans*は特に培養条件の変化に伴い形態が変化しやすいことが知られている。⁶⁾ 今回の実験でもこの傾向ははっきり示された。すなわち1/10 MEM-brothにおける仮性菌糸形成率は*C. albicans*は6/8で75%で

あったのに対し、*C. albicans*以外の*Candida*では2/10で20%であった。

*Candida*の酵母型細胞で赤血球凝集活性を示したのは2/18で11%であったが仮性菌糸は100%赤血球凝集活性を示した。この事実は酵母型細胞から仮性菌糸への変換に伴って仮性菌糸表層に赤血球凝集素が形成されたことを示している。

*C. albicans*の仮性菌糸表層に酵母型細胞にはみられなかった新しいタンパク質が出現するという報告^{7)~9)}はすでにあるが、これがどのような役割をはたしているかは不明である。我々が今回見いだした赤血球凝集因子がこれらと同一のものであるかどうかは今後検討したい。

病原性が強いことが知らされている*C. albicans*は1/10 MEM-brothにおける仮性菌糸形成率は75%(8株中6株)であり、病原性が低いとされている他の*Candida*の仮性菌糸形成率が20%(10種中5種の仮性菌糸形成を示すものが4種であった)であった。このことは

仮性菌糸の形成により宿主細胞への付着が
起こり感染が成立する可能性が高いことを示して
いる。¹⁰⁾

今後は仮性菌糸表層の赤血球凝集素を単離し
その性状を調べるとともに病原性との関連を明
らかにする予定である。

文 献

- 1) Kimura, L. H. and Pearsall, N. N.: Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* 21: 64—68, 1978
- 2) King, R. D., Lee, J. C. and Morris, A. L.: Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. *Infect. Immun.* 27: 667—674, 1980
- 3) Maisch, P. A. and Calderone, R. A.: Adherence of *Candida albicans* to a fibrin-platelet matrix formed *in vitro*. *Infect. Immun.* 27: 650—656, 1980
- 4) Maisch, P. A. and Calderone, R. A.: Role of surface mannan in the adherence of *Candida albicans* to fibrin-platelet clots formed *in vitro*. *Infect. Immun.* 32: 92—97, 1981
- 5) 深沢義村：*Candida albicans* の血清型。真菌誌 10: 132—138, 1969
- 6) 山口英世, 岩田和夫：真菌細胞の二形性と壁の構造。蛋・核・酵 17: 588—604, 1972
- 7) Sundstrom, P. M. and Kenny, G. E.: Characterization of antigens specific to the surface of germ tubes of *Candida albicans* by immunofluorescence. *Infect. Immun.* 43: 850—855, 1984
- 8) Smail, E. H. and Jones, J. M.: Demonstration and solubilization of antigens expressed primarily on the surfaces of *Candida albicans* germ tubes. *Infect. Immun.* 45: 74—81, 1984
- 9) Sundstrom, P. M., Nichols, E. J. and Kenny, G. E.: Antigenic differences between mannoproteins of germ tubes and blastospores of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 55: 616—620, 1987
- 10) McCourtie, J. and Douglas, J.: Relationship between cell surface composition, adherence, and virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 45: 6—12, 1984