

Candida albicans マンナンによるアストロサイトからの炎症性因子の産生

山本 学, 柴田 信之, 大川 喜男*

Production of Proinflammatory Mediators from Astrocytes by *Candida albicans* Mannan

Manabu YAMAMOTO, Nobuyuki SHIBATA, and Yoshio OKAWA*

(Received November 20, 2010)

We made experiments to investigate the effect of *Candida albicans* mannan in the brain of mice with candidiasis and obtained the following results. The intracerebral injection of mannan induced fatal event(s) in mice. The mannan also stimulated the release of proinflammatory mediators, nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6), in the astrocytes. From these results, we speculate that the mannan in the brain induces the fatal event(s) to mice via the potent production of the proinflammatory mediators (NO, TNF- α , IL-1 β , and IL-6).

Key words — *Candida albicans*; mannan; astrocyte; inflammatory mediators

カンジダ感染症は免疫能の低下した宿主で特に問題になり、中枢神経系への感染は全身性カンジダ症の48–64%で認められている。^{1,2)} マウスへのカンジダ感染時には、カンジダ菌は肝臓や腎臓などの臓器だけでなく脳内でも増殖し、細胞壁多糖マンナンが遊離・放出されることが知られており、³⁾ 臨床的にもカンジダによる髄膜炎などの疾患で脳脊髄液中のマンナン濃度が上昇することが報告されている。^{4,5)} しかし、カンジダ感染によって引き起こされる脳内でのマンナン濃度の上昇が脳の機能へ与える影響についてはいまだ明らかにされていないのが現状である。

脳の代表的グリア細胞であるアストロサイトは、脳の自然免疫でのアクティブプレイヤーであり、種々の神経栄養因子、神経生存因子を産生し、また、アストロサイトには多くの神経伝達物質・調節物質に対する受容体の発現が見られる。⁶⁾ アストロサイトの機能変化(活性化)は脳機能障害の病態発現にも密接に関連していると考えられている。⁷⁾ *Candida albicans* の脳内感染で、脳内のサイトカイン: 腫瘍壊死因子 (TNF α)、インターロイキン-1 β (IL-1 β)、インターロイキン-6 (IL-6) が高いレベルで持続すること、⁸⁾ また、アストロサイトからのサイトカインと一酸化窒素 (NO) 産生⁹⁾ についても報告がある。我々は、マウス *C. albicans* 感染症における防御因子¹⁰⁾ や病原因子¹¹⁾ の検討を行ってきたが、脳内での検討は十分ではない。

そこで本研究では、*C. albicans* の脳内感染におけるマンナンの作用を明らかにする目的で、*C. albicans* マンナンのマウス脳内投与による致死活性、続いてマウス初代培養アストロサイトに *C. albicans* マンナンを添加、炎症性因子 (NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6) の遊離能を検討した。

材料および方法

1) 動物

日本エスエルシー株式会社より購入した5週齢 ddy 雄マウスおよび BALB/c 妊娠マウスを使用した。

2) マンナン

C. albicans NIH A-207 株のマンナンを用いた。¹²⁾ マンナン溶液は、マンナンを最終濃度それぞれ 0.001, 0.1, 10, 30, 50 mg/mL になるように PBS (-) にて調製し、オートクレーブで 121°C, 20 分間滅菌したものを使用した。

3) マウス脳室内投与方法

マウスをジエチルエーテルにて麻酔し、左手の親指と人さし指とで、頭部の両側をはさむようにして後頭部の皮膚をつかみ、右手で尾部を軽く引き、背を伸ばした状態で背部皮膚を中指と手のひらとの間にはさんだ。次に、頭部の毛をハサミで少し刈り、頭部をエタノールで消毒した。マウスの両耳を結ぶ線と両眼(前縁)を結ぶ線との中間で正中線を少しそれた部位の頭蓋に注射針を垂直

に刺し入れ、頭蓋から1 mmほどの深さに挿入したところまでとどめ、ゆっくりマンナン試料を30 μ L注入した。

4) マウスグリア細胞の初代混合系並びにアストロサイトの分離・調製

Yoshida らの方法¹³⁾ に準じて行った。

マウスグリア細胞の初代混合系の調製は、生後0~3日のBALB/c新生仔マウス的大脑を使用して次のように行った。マウス新生仔をハサミで断頭し、脳実質をPBS (+) が含まれるシャーレに移しとり、ハサミで塊が残らないように約10分間切り刻んだ。滅菌遠心チューブ (15 mL) に移し、PBS (+) で遠心分離 (1500 rpm, 3 min) を3回繰り返した後、上清を除き、10 mLの0.25%トリプシン溶液を加え、37°Cの恒温槽でゆっくり振とうしながら10分間保温した。遠心分離 (2000 rpm, 3 min) 後上清を除き、4 mLの10% FBS-DMEMを添加し、ピペティングして細胞をほぐし、遠心分離 (1500 rpm, 3 min) 後上清を除いた。細胞分散液を 2×10^6 個/mLの細胞密度になるように10% FBS-DMEMで希釈し、5% CO₂ インキュベーターで培養した。

アストロサイトの分離調製は、さらに、次のように行った。2日間静置培養した初代培養フラスコの上清を除去し、2 mLの0.25%トリプシン溶液を加え、インキュベーター内で5分間静置した。さらに、2 mLの10% FBS-DMEMを加え、Cell Scraper (Iwaki社製) を使用して付着している細胞をはがした。滅菌遠心チューブ (15 mL) に移し遠心分離 (1500 rpm, 3 min) 後上清を除去し、4 mLの10% FBS-DMEMを加えてピペティングして細胞をほぐし、遠心分離 (1500 rpm, 3 min) 後上清を除いた。細胞分散液を 2×10^6 個/mLの細胞密度になるように10% FBS-DMEMで希釈し、5% CO₂ インキュベーターで培養した。

5) アストロサイトへのマンナンの添加

十分に増殖したアストロサイトの培養液から浮遊細胞を含む上清を除き、それに2 mLの10% FBS-DMEMを加えて細胞表面を3回洗浄した。この操作により純度の高いアストロサイトが得られた。この培養フラスコに2 mLの0.25%トリプシン溶液を加え、インキュベーター内で5分間静置した。その後、2 mLの10% FBS-DMEMを加え、Cell Scraper (Iwaki社製) を使用して付着している細胞をはがし、さらに、ピペティングして付

着した細胞を浮遊させた。培養液を培養フラスコから滅菌遠心チューブ (15 mL) に移し、遠心分離 (1500 rpm, 3 min) 後、その沈殿に培養液を加え、 2×10^6 個/mLになるように調整したものを測定用細胞として用いた。この細胞液1 mLを12ウェルプレートに加えた。さらに、マンナン20 mg/mLを最終濃度が1, 10, 100, 1000 μ g/mLとなるようにDMEMで調製し、それぞれ1 mL添加して、全量を2 mLとした。また、マンナンの代わりに陽性コントロールとして *Escherichia coli* serotype 055 : B5由来 Lipopolysaccharide (LPS, Sigma) を最終濃度が0.01, 0.1, 0.5, 1 μ g/mLになるように添加した。これらを5% CO₂ インキュベーター中で37°C, 24時間培養した。その後、培養上清に含まれるNO, TNF- α , IL-1 β , IL-6の産生量の測定を行った。

6) 亜硝酸イオンの測定

Green ら¹⁴⁾ 並びに大川ら¹⁵⁾ の方法に準じて行った。すなわち、培養した測定用細胞液の上清100 μ Lと Griess 試薬 (純正化学社製) 100 μ Lを96ウェルプレート上で混合した。また、検量線作成用に亜硝酸ナトリウムを用い、0, 5, 10, 20, 50 μ Mをそれぞれ100 μ L調製し、測定細胞と同様に Griess 試薬100 μ Lを加えた。室温で10分間静置後、Micro Plate Readerで550 nmにおける吸光度を測定し、検量線から亜硝酸イオンの含有量を算出した。

7) TNF- α , IL-1 β , IL-6 産生能の測定

マウス TNF- α ELISA キット, マウス IL-1 β ELISA キット, マウス IL-6ELISA キット (いずれも R & D Systems) を使用した。

結果と考察

1) マウス脳室内へのマンナン投与の影響

全身性カンジダ症においては、カンジダ菌は脳内でも増殖し、脳内にマンナンを遊離することが知られている。³⁻⁵⁾ 酵母マンナンのマウス致死活性についてはいくつかの報告がみられるが、^{16,17)} 腹腔、皮下、経口投与ではその活性は認められず、静脈内投与でのみ活性が認められることが報告されている。しかしながら、マウス脳室内投与での検討はいまだなされていない。我々は今回、マウスカンジダ症における脳内でのマンナンの生理作用を検討するため、*C. albicans* マンナンをマウスの脳室内に投与し、まず致死活性の有無を検討し

た (Table 1). 5 匹のマウスへの脳室内投与で、マンナン 0.03 μg , 3 μg 投与時では、特に異常な行動は見られなかった。しかし、マンナン 300 μg 投与では約 5 分経過するとマウスは動かなくなり、苦しそうにジャンプするものも見られ明らかに異常行動を起こしていると思われた。1 時間以内に死亡したマウスは 2 匹であった。マンナン 900 μg 投

与マウスは投与後 5 分ほどくるくる動き回ることが多かったが、10 分経過したころから動きが鈍く、このマウスも見られた。マンナン 900 μg 投与マウスは 1 時間以内に 4 匹死亡した。マンナン 1,500 μg 投与マウスは 1 時間以内に 5 匹とも死亡した。以上のことから、マンナン (300 μg 以上) はマウス脳室内投与によって致死活性をもつことが明らかになった。

Table 1. Lethal Activity of *C. albicans* Mannan by Intracerebral Injection in Mice^{a)}

Mannan ($\mu\text{g}/30 \mu\text{L}$)	Mortality	
	death/total	%
0	0/5	0
0.03	0/5	0
3	0/5	0
300	2/5	20
900	4/5	80
1,500	5/5	100

^{a)} Mice were injected intracerebrally with 30 μL of *C. albicans* mannan solutions.

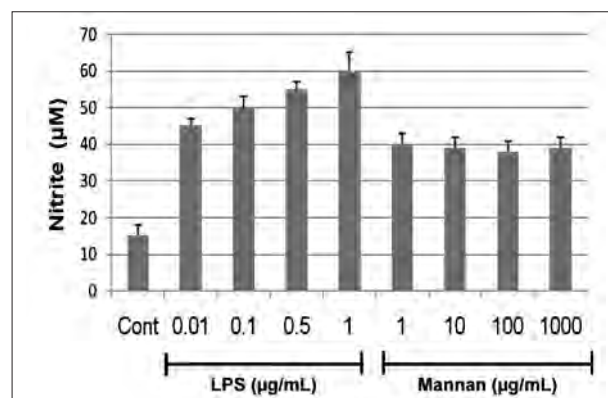


Fig. 1. Stimulation of nitrite production by mannan-treatment of astrocytes. Astrocytes were treated with mannan and LPS. After incubation for 24 h, the culture supernatants were collected for nitrite determination using Griess reagent.

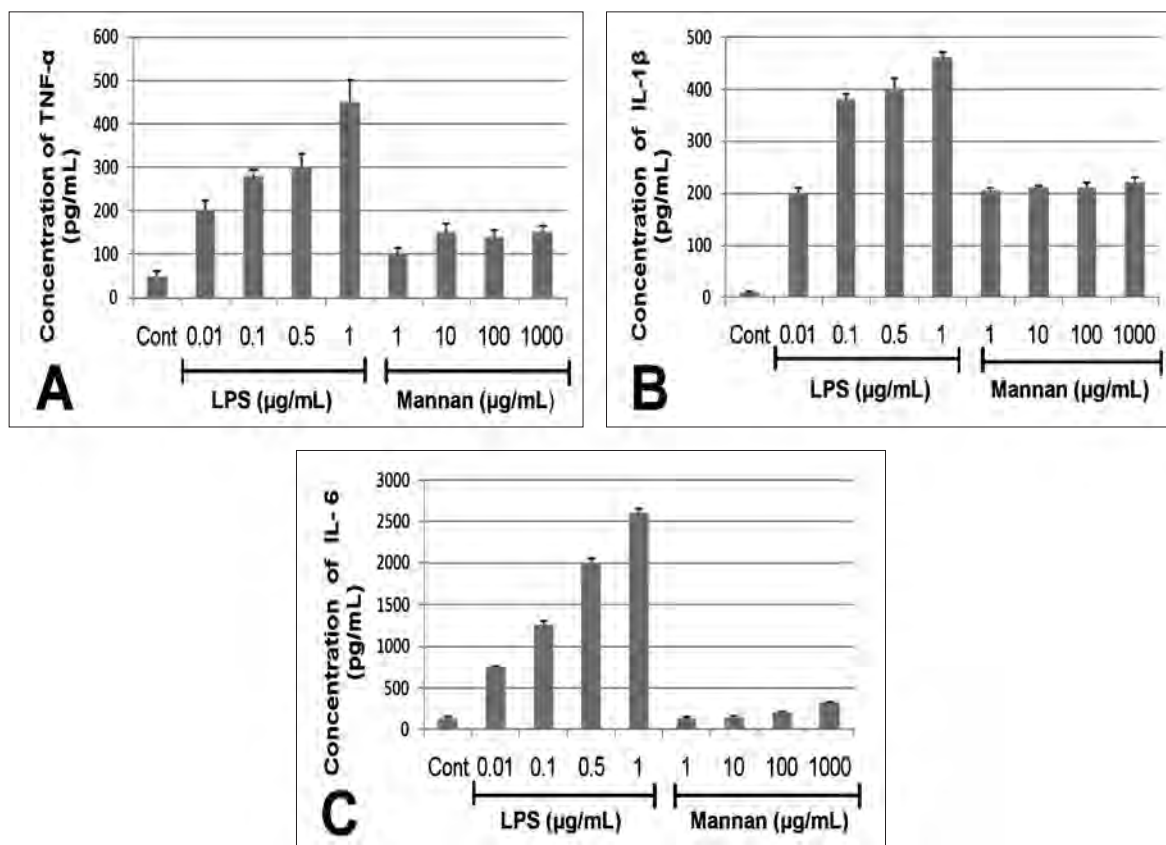


Fig. 2. Stimulation of TNF- α (A), IL-1 β (B), and IL-6 (C) products by mannan-treatment of astrocytes. Astrocytes were treated with mannan and LPS. After incubation for 24 h, the culture supernatants were collected and assayed for TNF- α , IL-1 β and IL-6.

2) *C. albicans* マンナン処理マウスアストロサイトからの炎症性因子の産生

ミクログリアやアストロサイトから、炎症性因子として NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 が産生されており、^{18,19)} LPS 刺激によってその産生が増強されることが知られている。^{9,20)} そこで、アストロサイトへの *C. albicans* マンナン添加によって、NO, TNF- α , IL-1 β , IL-6 産生量が増強するか否かを検討した。LPS は陽性コントロールとして用いた。その結果 (Fig. 1 と 2), コントロール (マンナン未添加) と比較すると、マンナン添加において (LPS と比べて多量を用いたが) NO, TNF- α , IL-1 β 産生量の増強が認められた。マンナン添加によるこれら炎症性因子の産生は用いた濃度 (1~1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で濃度依存性はみられなかったが、これは濃度依存性がないほどの高用量であった可能性がある。マンナン添加により IL-6 産生量の増強も多少みられたが、NO, TNF- α , IL-1 β 産生量に比べ顕著ではなかった。本実験の結果から、マウスアストロサイトへの *C. albicans* マンナン添加により NO やサイトカイン (TNF- α , IL-1 β , IL-6) などの炎症性因子の産生量の増強が明らかになった。今回データには示さないが、*C. albicans* マンナン中に内毒素 (LPS) のコンタミがないことを確認するため、マンナンのアルカリ処理 (LPS 除去処理)²¹⁾ を行った。その結果、アルカリ処理画分で今回調べた活性の低下はなく、活性はマンナン自身によることが確認された。

アストロサイトにおける NO 産生の増強は神経細胞死に寄与することが知られている。²²⁾ アストロサイトより産生されるサイトカインのうち TNF- α は神経突起の増殖を阻害すること、²³⁾ また、TNF- α と IL-1 β は共同で強力な神経毒性を引き起こすことが知られている。²⁴⁾ アストロサイトにより産生された TNF- α , IL-1 β , IL-6 は血液脳関門の透過性を増大させる。²⁵⁾ また、IL-1 β が脳内炎症に寄与していることも報告されている。²⁶⁾ このように、脳内で産生された炎症性因子はアストロサイトを含む脳組織に対して強い毒性を示すものと考えられる。我々はマウス真菌感染症において、マウスに対する致死活性 (病原性) は血中への炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β) の産生能と相関することをすでに報告し、炎症性サイトカインの重要性を示した。²⁷⁾ さらに、*C. albicans* マンナンによりマクロファージから産生された TNF- α は、マクロ

ファージを傷害することを報告した。²⁸⁾ 今回、マンナンの脳室内投与 (300 μg 以上) でマウスは死亡したが (Table 1), これはマンナン投与によってマウス脳内でアストロサイトなどから TNF- α をはじめとする炎症性因子が大量に産生され (Fig. 1 と 2), それによって脳の細胞や組織が傷害されたことによるものと考えられる。

以上より、カンジダ症において、脳内で増殖した *C. albicans* が遊離したマンナンは、アストロサイトをはじめとした脳細胞から多量の炎症性物質の産生を誘導し、脳内におけるカンジダ症の増悪、進展に関与しているものと推測される。アストロサイトには、Toll-like receptor (TLR) をはじめ多くのレセプターがあるが、⁶⁾ カンジダマンナンがどのレセプターと結合し、どのような経路を介して炎症性因子を産生するのか今後明らかにしていくことが必要である。

謝辞 本研究において、マウスアストロサイトの分離・調製法についてご教示いただいた本学学生体膜情報学教室講師・三苦純也先生に深謝いたします。

REFERENCES

- 1) Lipton S. A., Hickey W. F., Morris J. H., Loscalzo J., *Am. J. Med.*, **76**, 101-108 (1984).
- 2) Faix R. G., *J. Pediatr.*, **105**, 616-622 (1984).
- 3) Pike I. H., Evans E. G. V., Carney J. A., *J. Med. Vet. Mycol.*, **29**, 83-91 (1991).
- 4) Ikeda K., Yamashita J., Fujisawa H., Fujita S.-i., *Neurosurgery*, **26**, 860-863 (1990).
- 5) Lunel F. M. V., Voss A., Kuijper E. J., Gelinck L. B. S., Hoogerbrugge P. M., Liem K. L., Kullberg B. J., Verweij P. E., *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 867-870 (2004).
- 6) Farina C., Aloisi F., Meinel E., *Trends Immunol.*, **28**, 138-145 (2007).
- 7) Montgomery D. L., *Vet. Pathol.*, **31**, 145-167 (1994).
- 8) Blasi E., Bartoli A., Barluzzi R., Mazzolla R., Bistoni F., *J. Neuroimmunol.*, **52**, 205-213 (1994).
- 9) Pahan K., Sheikh F. G., Namboodiri A. M. S., Singh I., *J. Clin. Invest.*, **100**, 2671-2679 (1997).
- 10) Okawa Y., Suzuki K., Kobayashi M., Asagi M., Sakai K., Suzuki S., Suzuki M., *Microbiol. Immunol.*, **30**, 957-967 (1986).

- 11) Okawa Y., Miyauchi M., Takahashi S., Kobayashi H., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1870–1873 (2007).
- 12) Okawa Y., Takahata T., Kawamata M., Miyauchi M., Shibata N., Suzuki A., Kobayashi H., Suzuki S., *FEBS Lett.*, **345**, 167–171 (1994).
- 13) Yoshida K., Kohsaka S., Nii S., Idei T., Otani M., Toya S., Tsukada Y., *Neurosci. Lett.*, **70**, 34–39 (1986).
- 14) Green S. J., Meltzer M. S., Hibbs J. B., Jr., Nacy C. A., *J. Immunol.*, **144**, 278–283 (1990).
- 15) Okawa Y., Fujiwara T., Seki F., Kawamata Y., Shiraogawa K., Kato Y., *J. Tohoku Pharmaceutical University*, **52**, 79–83 (2005).
- 16) Kind L. S., Kaushal P. K., Drury P., *Infect. Immun.*, **5**, 180–182 (1972).
- 17) Yamamoto Y., Iwata K., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **24**, 76–82 (1983).
- 18) Lee S. C., Liu W., Dickson D. W., Brosnan C. F., Berman J. W., *J. Immunol.*, **150**, 2659–2667 (1993).
- 19) Wilms H., Sievers J., Rickert U., Rostami-Yazdi M., Mrowietz U., Lucius R., *J. Neuroinflamm.*, **7**, 1–8 (2010).
- 20) Lin S.-T., Wang Y., Xue Y., Feng D.-C., Xu Y., Xu L.-Y., *Mol. Cell Biochem.*, **315**, 41–49 (2008).
- 21) Kobayashi M., Yamamoto M., *Yakugaku Zasshi*, **94**, 293–297 (1974).
- 22) Heals S. J. R., Bolaños J. P., Stewart V. C., Brookes P. S., Land J. M., Clark J. B., *Biochim. Biophys. Acta*, **1410**, 215–228 (1999).
- 23) Neumann H., Schweigreiter R., Yamashita T., Rosenkranz K., Wekerle H., Barde Y.-A., *J. Neurosci.*, **22**, 854–862 (2002).
- 24) Chao C. C., Hu S., Ehrlich L., Peterson P. K., *Brain Behav. Immun.*, **9**, 355–365 (1995).
- 25) Abbott N. J., *J. Anat.*, **200**, 629–638 (2002).
- 26) Moynagh P. N., *J. Anat.*, **207**, 265–269 (2005).
- 27) Okawa Y., Yamada Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 940–942 (2002).
- 28) Okawa Y., Kojima M., Ishizaki T., Nakamura Y., Matsuda Y., Watari Y., Naito S., *J. Tohoku Pharmaceutical University*, **53**, 57–61 (2006).