

Candida albicans マンナンのマクロファージ傷害作用

大川 喜男*, 小島 美紀, 石橋 敏広, 中村 佳央, 松田 祐子, 亘理 陽子, 内藤 周一

Cytotoxicity of *Candida albicans* Mannan in Macrophages

Yoshio OKAWA *, Miki KOJIMA, Toshihiro ISHIZAKI, Yoshifumi NAKAMURA,
Yuko MATSUDA, Yoko WATARI, and Shuiti NAITO

(Received November 21, 2006)

Mannan of *Candida albicans* NIH A-207 strain induced cytotoxic activity in RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line, but not in U937 cells, a human monocyte cell line. The mannan greatly increased TNF- α production in RAW264.7 cells. Anti-TNF- α antibody completely inhibited both the TNF- α production from RAW264.7 cells and the cytotoxicity of the cells by mannan. Commercial recombinant TNF- α showed cytotoxic activity in RAW264.7 cells.

Key words — *Candida albicans*; mannan; macrophage; cytotoxicity; TNF- α

Candida 症は日和見感染による真菌疾患の中で最も発生頻度が高いことで知られており, その中でも *Candida albicans* は最も重要な原因菌である. 現在まで, *C. albicans* 細胞壁マンナンの生理作用については数多くの報告があり, その毒作用¹⁾ や免疫抑制作用,^{2,3)} 生体防御能の亢進作用⁴⁻⁷⁾ などさまざまな活性を示すことが知られている. *Candida* 感染において, マクロファージなどから産生されるサイトカインである Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) は生体の防御因子として働くという報告が多い.^{8,9)} また, *Candida* のマンナンによっても単球やマクロファージから TNF- α が産生されることもすでに報告されている.¹⁰⁻¹³⁾ しかしながら, マンナンの細胞傷害性とその傷害性への TNF- α の関与についての検討はほとんどなされていない.¹²⁾

我々は, 酵母マンナンの生理作用を検討している過程で, *C. albicans* マンナンがマクロファージ RAW264.7 細胞に対して傷害活性をもつことをみだした.¹⁴⁾ 本研究では, その傷害性のメカニズムとして, マンナンにより標的細胞から TNF- α が産生され, その TNF- α が細胞傷害性を示すこと

を明らかにしたので報告する。

材料及び方法

1) マンナン

Candida albicans NIH A-207 株の細胞壁マンナン¹⁵⁾ を用いた.

2) マクロファージ細胞株の培養

使用細胞は, American Type Culture Collection (ATCC) 貯蔵のものを大日本製薬株式会社を介して入手したマウス由来マクロファージ細胞株 RAW264.7 並びにヒト単芽球性白血病細胞 U937 を用いた. RAW264.7 細胞の培養は, 10% ウシ胎児血清 (Gibco), 100 U/ml ペニシリンと 100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む Dulbecco's modified Eagle medium (Dulbecco's MEM, Life Technologies) を用いた. U937 細胞の培養は, ウシ胎児血清, ペニシリンとストレプトマイシンを上記と同様に含む RPMI1640 medium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) を使用した. 生細胞は細胞懸濁液 10 μ l にトリパンブルー (Life Technologies) を 10 μ l 加えよく混和後, 細胞数を血球計算盤で計数した. 細

胞の継代は, 細胞数を 2×10^5 /mlに新たな培養液で調整し, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ インキュベーターにて培養することにより行った.

3) 細胞傷害性

Confluentに増殖したRAW264.7細胞(またはU937細胞) 2×10^5 /wellを96穴プレート(住友ベークライト株式会社)に各試料に対し3ウェルずつ入れる. それに培養液で調整したマンナンをそれぞれ0.1, 1および10 mg/mlとなるように加え, 全量 $200 \mu\text{l}$ とする. これを $5\% \text{CO}_2$ インキュベーターで 37°C , 4時間処理した. 細胞を懸濁させ, トリパンプルー法で細胞数をカウントし, 死細胞率を測定した. 実験はそれぞれ2回ずつ行い, 再現性を確認した.

4) TNF- α 産生能の測定

マウスTNF- α ELISAキット(Genzyme)を使用した.

5) TNF- α 産生並びに細胞傷害性に及ぼす抗TNF- α 抗体の影響

2×10^5 /wellのRAW264.7細胞に, polyclonal rabbit anti-mouse TNF- α (neutralizing) (Genzyme)

を最終濃度が1並びに5%になるように加え, 5分後にマンナンを10 mg/mlになるように加えて, 37°C , 4時間処理培養後, TNF- α 産生量と細胞傷害性を調べた.

6) TNF- α による細胞傷害性

Genzyme社のrecombinant mouse TNF- α を用いて直接細胞傷害性を調べた.

RAW264.7細胞 1×10^5 /wellをとり, TNF- α の濃度が1.75, 3.5, 17.5および35 ng/mlになるように各wellに加え, 全量 $150 \mu\text{l}$ とする. それぞれ 37°C , 2並びに4時間処理後, 細胞傷害性を調べた.

実験結果

1) マンナンの細胞傷害性

マンナンは, RAW264.7細胞に対してほぼ濃度依存的に細胞傷害性(コントロールに対し, マンナン0.1 mg/mlで1.08倍, 1 mg/mlで1.97倍, 10 mg/mlで2.2倍)を示した(Fig. 1)が, U939細胞に対してはほとんど傷害性を示さなかった.

2) マンナンによるTNF- α 産生並びに細胞傷害性

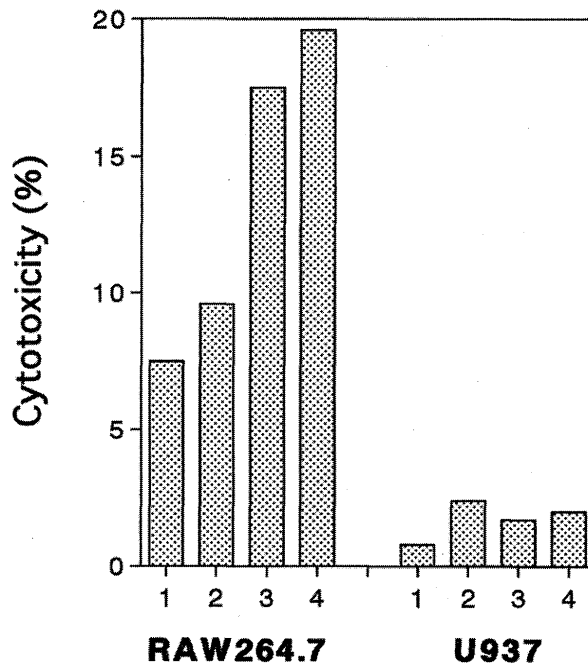


Fig. 1. Cytotoxicity of RAW264.7 Cells by *C. albicans* Mannan

RAW264.7 and U937 cells (2×10^5 /well) were incubated for 4 h with mannan. 1, Control; 2, mannan 0.1 mg/ml; 3, mannan 1 mg/ml; 4, mannan 10 mg/ml. Values are the mean cytotoxicity (%) from triplicate cultures. Standard deviations in the cultures were $<20\%$.

に及ぼす抗TNF- α 抗体の影響

マンナン10 mg/mlをRAW264.7細胞に作用させたところ、顕著にTNF- α 産生を増強することが明らかになった (Fig. 2-A). データには示さないが、マンナン1 mg/mlでも10 mg/mlの70~80%の産生がみられた。また、抗TNF- α 抗体存在下で、RAW264.7細胞からのTNF- α の産生が完全に抑制された。次に、抗TNF- α 抗体によりマンナン10 mg/mlの細胞傷害性が抑制されるかどうか検討した (Fig. 2-B). その結果、抗体1%で細胞傷害性は68%抑制され、抗体5%で完全に抑制された。

3) TNF- α の細胞傷害性

Fig. 2の結果から、TNF- α にRAW264.7細胞に対し直接細胞傷害性のあることが考えられたので、市販のTNF- α を用いて傷害性を検討した (Fig. 3). その結果、TNF- α は濃度依存的に細胞傷害性を示すことが明らかになった。

考 察

我々はすでに、酵母マンナンがマウス腹腔マクロファージや血中多形核白血球の各種酵素活性を上昇させ、そのことにより抗菌、抗腫瘍活性を示

すことを報告した.^{4,7)} 今回は、*C. albicans* マンナンを用いてさらなる生理活性を研究している過程で、マンナンがマクロファージRAW264.7細胞に対しネクロシス様細胞死を起こすことをみだしたので、¹⁴⁾ その原因をさぐるべく検討を加えた。

マンナンはRAW264.7細胞に対しては傷害性を示すが、U937細胞に対してはほとんど傷害性を示さなかった (Fig. 1). この原因としてマンナン結合たんぱく質の量が両細胞で異なることが予想された (データは示さない).^{14, 16)} 次にまず、マンナンの細胞傷害性の本体としてTNF- α の関与について検討した。その結果、マンナン添加により多量のTNF- α が産生されることが明らかになった (Fig. 2). また、抗TNF- α 抗体によりTNF- α 産生とRAW264.7細胞傷害性が完全に抑制されたこと、また、リコンビナントTNF- α によりRAW264.7細胞傷害性がみられたことにより、TNF- α はマンナンのRAW264.7細胞に対する傷害性の主要な因子であると結論することができる。すなわち、マンナンによりRAW264.7細胞より産生されたTNF- α がオートクリンまたはパラクリン的に働いてRAW264.7細胞を傷害しているものと考えられる。我々は、他の*Candida*属酵母マンナン並び

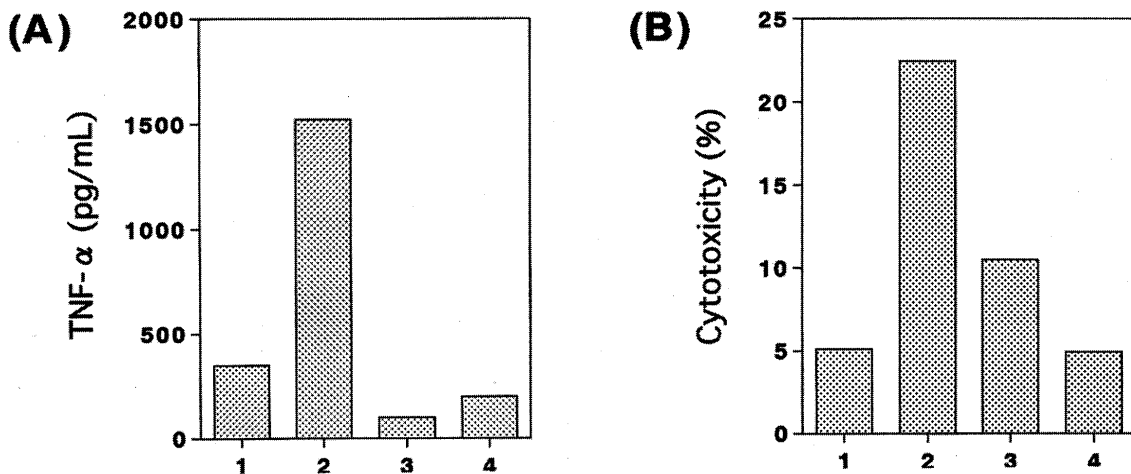


Fig. 2. Production of TNF- α from RAW264.7 Cells by *C. albicans* Mannan (A) and Effect of Anti-TNF- α Antibody on Cytotoxicity of RAW264.7 Cells by *C. albicans* Mannan (B)

RAW264.7 cells (2×10^5 /well) were incubated for 4 h with mannan and mannan+ anti-TNF- α antibody. 1, Control; 2, mannan 10 mg/ml; 3, mannan 10 mg/ml + anti-TNF- α antibody (1%); 4, mannan 10 mg/ml + anti-TNF- α antibody (5%).

Values are the mean TNF- α (pg/ml) (A) and the mean cytotoxicity (%) (B) from triplicate cultures. Standard deviations in the cultures were <20%.

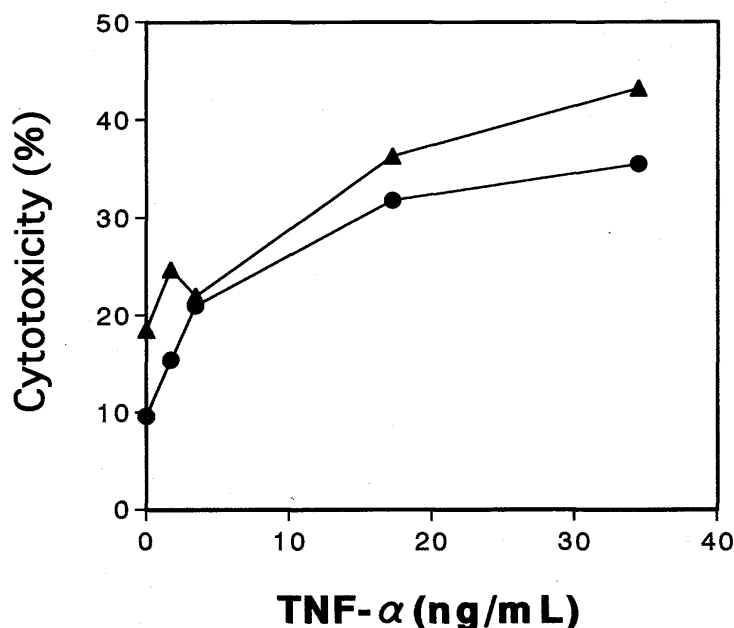


Fig. 3. Cytotoxicity of RAW264.7 Cells by TNF- α

RAW264.7 cells (1×10^5 /well) were incubated for 2 h (●) and 4 h (▲) with TNF- α (1.75, 3.5, 17.5, and 35 ng/ml). Values are the mean cytotoxicity (%) from triplicate cultures. Standard deviations in the cultures were <20%.

にパン酵母マンナンでも今回と同じ結果が得られることをすでに確認している(データは示さない)。

現在まで, 病原性 *Candida* 属酵母の細胞壁マンナンはその酵母の抗原性を担っている¹⁷⁾ばかりでなく *Candida* 症における生体調節因子として多様な生理活性を示しているものと推定される。今回報告したように, マンナンは, *C. albicans* の全身感染時に血中に多量に放出され, マクロファージをはじめとする生体内の細胞に傷害を与え, 病原因子の1つとして *Candida* 症の増悪化に重要な役割を担っているものと考えられる。

REFERENCES

- Iwata K., *Mycopathologia*, **65**, 141-154 (1978).
- Carrow E. W., Domer J. E., *Infect. Immun.*, **49**, 172-181 (1985).
- Wright C. D., Herron M. J., Gray R., *Infect. Immun.*, **32**, 731-738 (1981).
- Suzuki S., Suzuki M., Matsumoto T., Okawa Y., *Gann*, **62**, 343-352 (1971).
- Okawa Y., Okura Y., Hashimoto K., Matsumoto T., Suzuki S., Suzuki M., *Carbohydr. Res.*, **108**, 328-334 (1982).
- Okawa Y., Suzuki K., Kobayashi M., Asagi M., Sakai S., Suzuki S., Suzuki M., *Microbiol. Immunol.*, **30**, 957-967 (1986).
- Okawa Y., Howard C. R., Steward M. W., *J. Immunol. Methods*, **149**, 127-131 (1992).
- Ferrante A., *Infect. Immun.*, **57**, 2115-2122 (1989).
- Louie A., Baltch A. L., Smith R. P., Franke M. A., Ritz W. J., Singh J. K., Gordon M. A., *Infect. Immun.*, **62**, 2761-2772 (1994).
- Vecchiarelli A., Puliti M., Torosantucci A., Cassone A., Bistoni F., *Cell. Immunol.*, **134**, 65-76 (1991).
- Ausiello C. M., Urbani F., Gessani S., Spagnoli G. C., Gomez M. J., Cassone A., *Infect. Immun.*, **61**, 4105-4111 (1993).
- Garner R. E., Rubanowice K., Sawyer R. T., Hudson J. A., *J. Leukoc. Biol.*, **55**, 161-168 (1994).
- Garner R. E., Hudson J. A., *Infect. Immun.*, **64**, 4561-4566 (1996).

-
- 14) Okawa Y., Kojima M., Nakamura Y., Ishizaki T., XVth International Symposium on Glycoconjugates, Abstract, 1999, p. S147.
- 15) Okawa Y., Takahata T., Kawamata M., Miyauchi M., Shibata N., Suzuki A., Kobayashi H., Suzuki S., *FEBS Lett.*, **345**, 167-171 (1994).
- 16) Shepherd V. L., Lane K. B., Abdolrasulnia R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **344**, 350-356 (1997).
- 17) Suzuki S., *Curr. Top. Med. Mycol.*, **8**, 57-70 (1997).