

担がんマウスの *Candida albicans* 感染防御におけるリゾチームの役割

大川 喜男*, 小林真紀子, 鈴木 益子

Role of Lysozyme on Protection of *Candida albicans* Infection in Tumor-bearing Mice

Yoshio OKAWA*, Makiko KOBAYASHI, and Masuko SUZUKI

(Received November 21, 2007)

In order to further demonstrate the protective mechanism of sarcoma 180 tumor-bearing mice against *Candida albicans* infection, we investigated the role of lysozyme. The lysozyme activity of serum and fixed number of polymorphonuclear leucocytes (PMN) from mice 1 week after sarcoma 180 tumor implantation exhibited a slight increase compared with that of PMN from the control mice. On the other hand, the activity of serum and PMN from mice 3 weeks after the tumor implantation increased about 2- and 4-fold higher than that of the cells from normal mice. When the yeast- and mycelial-form cells of *C. albicans* were treated with 50 μ g/ml of commercial lysozyme, the mycelial-form cells showed higher susceptibility in the candidacidal activity of the lysozyme than the yeast-form cells. From these results, it has been demonstrated that lysozyme plays an important role in the protection of tumor-bearing mice against *Candida albicans* infection together with the other protective factors.

Key words — Tumor-bearing mice; *Candida albicans*; Serum; Polymorphonuclear leucocytes (PMN); Lysozyme; Killing

がんは日本人の死因の第1位を占め、さらに現在増加傾向にある重要な疾患である。一般にがん患者は、担がん状態で産生される免疫抑制物質¹⁾や抑制性T細胞等²⁾により免疫機能が抑制されており、その結果、微生物感染に対する抵抗性が低下すると考えられている。また、免疫不全宿主 (Immunocompromised host) に発症する感染症は難治化、重症化しやすいことが知られている。白血病患者における真菌に対する易感染性には血中多形核白血球 (PMN) の減少および機能低下が関与していることがマウスを用いた実験により証明された。³⁾しかしながら、一方では担がんマウスでは真菌感染抵抗性は維持されているという報告もある。⁴⁾Asanoら⁵⁾は肺がん (OTUK-腫瘍) マウスの顆粒球形成促進が腫瘍細胞からの顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) によることを明らかにした。その後、肺がんや甲状腺がん、口腔がんなど⁶⁾にCSF活性をもつ腫瘍の存在が報告されている。大川ら

は1985年に、⁷⁾同種腫瘍 sarcoma 180 移植中期のマウスに *Candida albicans* を感染させたところ、担がんマウスでは *C. albicans* に対して防御能を持つこと、さらに腫瘍増殖に伴いPMNの数が増加し続け、殺菌能も増大していることを明らかにした。その後各種腫瘍細胞を用いて sarcoma 180 と類似の結果が得られること、またその防御にPMNが重要な役割を担っていることを報告してきた。⁷⁻¹²⁾

リゾチームは古くからムレイン構造をもつ細菌の感染に対する重要な防御因子として知られている。Kokoshisら¹³⁾は酵母グルカンがマウスの黄色ブドウ球菌感染に対して防御能のあること、その最も重要な因子としてマクロファージをあげ、マクロファージの分泌酵素であるリゾチームの活性が増大することを示した。しかしながら、真菌に対するリゾチームの作用については不明な点が多い。¹⁴⁾

そこで本論文では、担がんマウスの *C. albicans*

感染防御におけるリゾチームの関与について検討した。

材料および方法

1) 動物

ddY 系雄性マウス (静岡県実験動物農協) 5~8 週令を使用した。

2) 腫瘍

Sarcoma 180 腫瘍細胞は国立がんセンターより供与されたものを継代して使用した。

3) 菌株と培養条件

Candida albicans NIH A-207 株は明治薬科大学西川朱實教授より分与されたものをサブロー斜面寒天培地で継代保存した。サブロー液体培地で 27°C, 48 時間振とう培養したものを酵母形細胞として使用した。また, 菌糸形細胞は, 酵母形細胞 1×10^5 個/ml を合成液体培地 (1.5% 可溶性デンプン, 0.5% ショ糖, 0.25% リン酸水素二カリウム, 0.05% 硝酸ナトリウム, 0.1% L-メチオニン, 0.05% L-フェニルアラニン, 0.05% N-アセチル-D-グルコサミンおよび 0.5 ng/ml D-ビオチン)¹⁵⁾ に添加し, 37°C, 48 時間培養したものを使用した。

4) 血清と血中多形核白血球の分離

Sarcoma 180 腫瘍細胞 1×10^6 個をマウスそ径部皮下に移植後, 経日的 (1, 3, 5 週目) に心臓穿刺により採血, 血清は遠心分離により得た。PMN は同様に採血, デキストラン沈殿により白血球を分離し, リンホライト M (和光純薬) 上に重層, 遠心, 低張処理を行い分離した。¹⁶⁾ なお, 腫瘍細胞移植 10 日以降より死亡するマウスが出現し, 3 週での生存率は 60%, 5 週では 30% で, 生存マウスの平均腫瘍重量は, 1 週で 0.3 g, 3 週で 5 g, 5 週で 7 g であった。

5) リゾチーム活性

Parry らの方法¹⁷⁾ に従い, 最終濃度 25% の *Micrococcus lysodeikticus* (Miles Laboratories Inc., Kankakee, U.S.A.) の懸濁液を基質として測定した。活性は卵白リゾチーム (Merck, Darmstadt, Germany) の活性を基準に求め, 相対活性で表示した。

6) 市販リゾチームの殺菌活性

卵白リゾチーム (Merck) は, 1/15M リン酸緩衝液 (pH 6.2) に懸濁し, 5-50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に調整した。96 穴マイクロタイタープレートにそれぞれの酵素液 90 μl , *C. albicans* 酵母形細胞 2×10^5 個/10 μl , *C. albicans* 菌糸形細胞の場合 5×10^4 個を加え 37°C, 3 時間 CO₂ インキュベーターで培養した。この混液を Hank's balanced salt solution (HBSS, pH 7.2) で希釈し, サブロー寒天培地中に入れ, 27°C, 48 時間培養後生じたコロニー数を算定し, 殺菌活性は下式より Killing (%) として示した。なお, A は培養前の菌数, B はリゾチームと 3 時間培養後の菌数である。

$$\text{Killing (\%)} = \{(A-B)/A\} \times 100$$

7) リゾチーム処理 *C. albicans* 菌糸形細胞より N-アセチルグルコサミンの遊離

C. albicans 菌糸形細胞を 1/15M リン酸緩衝液に 1×10^6 個/ml の濃度に懸濁し, リゾチームを 50 $\mu\text{g/ml}$ 添加した。37°C で 15 時間培養を行い, 経時的に培養液を 1 ml 採取し, 培養上清中の N-アセチルグルコサミン量を Ito らの方法¹⁸⁾ により測定した。

8) 統計処理

有意差検定は Student *t*-test により行った。P < 0.05 を有意差ありとした。

実験結果

1) 担がんマウス血清と PMN のリゾチーム活性

担がんマウスの血清と PMN から産生されるリゾチーム量を測定した (Table 1)。その結果, 血清リゾチーム活性は担がん 3 週目で正常マウスの約 2 倍に増加した。PMN のリゾチーム活性は, 正常マウスの PMN 1×10^5 個当たりの値 0.5 μg と比較して担がん 1 週目では 1.8 倍しか増加していないのに対し, 3 週目になると約 4 倍にも増大していた。また, これをマウス当たり換算すると担がん 1 週目では正常マウスとあまり差異がみられないが, 担がん 3 および 5 週目では PMN 数が顕著に増加するので,^{7-9,12)} 急激なトータル活性の上昇が認められ, 腫瘍増

Table 1. Lysozyme Activity of Serum and Peripheral Blood Polymorphonuclear Leucocytes (PMN) from Sarcoma 180 Tumor-bearing Mice^{a)}

Mice	Weeks after the tumor inoculation	Lysozyme activity (Relative activity)		
		Serum	PMN	
			1 × 10 ⁵ cells	total cells
Normal		100 ± 20	100 ± 30	100
Tumor-bearing	1	135 ± 15	180 ± 50	210
Tumor-bearing	3	200 ± 45 ^{b)}	400 ± 20 ^{c)}	7300
Tumor-bearing	5	160 ± 20 ^{b)}	200 ± 30 ^{b)}	4200

a) One, 3, and 5 weeks after sarcoma 180 tumor cell subcutaneous transplantation (1 × 10⁶ cells/mouse), lysozyme activity of the serum and the peripheral blood polymorphonuclear leucocytes (PMN) was measured. The results were expressed as the mean ± S.D.

b) *p* < 0.05 compared with normal mice group.

c) *p* < 0.01 compared with normal mice group.

Table 2. Candidacidal Activity of Lysozyme *In Vitro*^{a)}

Morphology of <i>C. albicans</i> cells	Killing (%)		
	Lysozyme concentration (μg/ml)		
	5	25	50
Yeast-form	8.9 ± 8.1	37.3 ± 11.5	47.0 ± 0.4
Mycelial-form	27.0 ± 5.0 ^{b)}	67.7 ± 5.0 ^{b)}	82.7 ± 6.6 ^{b)}

a) Yeast- and mycelial-form cells (1 × 10⁶ cells/ml) of *C. albicans* were treated with lysozyme (egg white), 5-50 μg/ml, at 37°C in 1/15M phosphate buffer (pH 6.2). After 3-h incubation, the number of viable *C. albicans* cells were measured by diluting with HBSS and plating on a Sabouraud agar plate. The results were expressed as the mean ± S.D.

b) *p* < 0.05 compared with yeast-form cells group.

殖に伴い担がんマウスの PMN から多量のリゾチームが産生されることが明らかになった。

2) 市販リゾチームの *C. albicans* 殺菌効果

市販リゾチームの *C. albicans* 殺菌効果を検討した (Table 2)。酵母形 *C. albicans* 細胞に対し、リゾチーム 5, 25, 50 μg を添加し培養したところ、殺菌効果は添加リゾチーム濃度に従ってそれぞれ 9, 37, 47% と増加した。菌糸形 *C. albicans* 細胞に対する殺菌効果は、酵母形 *C. albicans* 細胞に対するものより強く、27, 68, 83% であった。

3) リゾチーム処理 *C. albicans* 菌糸形細胞より *N*-アセチルグルコサミンの遊離

リゾチーム添加による *C. albicans* の損傷の程度を知るため、*C. albicans* 菌糸形細胞より *N*-アセチルグルコサミンの遊離を測定した。培養 15 時間で *N*-アセチルグルコサミンの遊離量はリゾチーム未添加と比べ有意に増大した (Table 3)。

考 察

担がん生体の免疫応答は一般に抑制されており、この免疫抑制は、直接腫瘍細胞から分泌される免疫抑制因子を介して、¹⁾ あるいは間接的に抑制性 T 細胞の誘導を介して²⁾ 起こることが知られている。がん患者に併発する深在性真菌症の発症の原因を解明するため、動物モデルとして白血病マウスなどを用いた実験的カンジダ症の研究がなされている。³⁾ 我々は、がんの種類によっては担がんマウスがカンジダ感染抵抗性を示すことを報告してきた。^{3,7-12)} その作用機作についても種々検討し、腫瘍細胞が顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) を産生すること、¹⁰⁾ さらに、担がんマウスはマクロファージや単球の数にはさしたる影響を与えないが、血中 PMN 数を顕著に増加させ、活性

Table 3. Release of *N*-acetyl-glucosamine from *C. albicans* Cells by Lysozyme^{a)}

Treatment of mycelial-form <i>C. albicans</i> cells	<i>N</i> -acetyl glucosamine (μ g) released
None	14 \pm 1.4
Lysozyme	25 \pm 1.2 ^{b)}

a) Mycelial form cells of *C. albicans* (1×10^6 cells/ml) were treated at 37°C by lysozyme (50 μ g/ml). After 15 h incubation, the amount of *N*-acetyl-glucosamine released from *C. albicans* cells was measured. The results were expressed as the mean \pm S.D.

b) $p < 0.05$ compared with None group.

酸素に依存した殺菌因子を顕著に増加させることなどを明らかにしてきた。^{7-9,12)} 現在まで、真菌に対するリゾチームの作用については、*C. albicans* に細胞毒性を示すという報告がある。¹⁴⁾ また、リゾチームは単球ばかりでなく、顆粒球からも産生されることが報告されている。¹⁹⁾ そこで本論文では、活性酸素非依存性の殺菌因子としてリゾチーム活性について検討した。その結果、腫瘍増殖に伴い担がんマウスの血清と血中 PMN のリゾチーム量の増加が認められた (Table 1)。次に、リゾチームの *C. albicans* に対する直接的な影響を調べたところ、リゾチームの添加濃度に依存して殺菌が認められ、また、酵母形に比べ菌糸形に対してより強い殺菌効果が認められた (Table 2 と 3)。このことは、*C. albicans* は感染組織内でキチン含量の多い菌糸形に形態変化することにより、リゾチームに対してより殺菌されやすくなるものと考えられる。以上より、担がんマウスの *C. albicans* 感染抵抗性の機作のひとつとしてリゾチームの関与が明らかになった。データには示さないが、市販のキチナーゼ (*Streptomyces griseus* 由来: Sigma) でもリゾチームと類似の結果が得られたこともこのことを裏付けている。我々は、担がんマウスの *C. albicans* 感染に対する防御因子として活性酸素産生能やミエロペルオキシダーゼ活性などを報告してきたが、⁷⁻¹²⁾ 今回、これに担がんマウスのリゾチーム活性の亢進も感染防御因子のひとつとして加えることができた。

我々は今まで、マウスに腫瘍細胞を移植する単純な担がんマウスの系で一連の実験を展開し、がんの種類により微生物感染に対する応答性が異なることを証明してきた。これらの実験は、がん患者の治療という観点からがんの種類

やその特徴を知ることの重要性を指摘するものである。実際臨床に即してこれらの現象を考えた場合、がん患者は何らかの治療 (化学療法、放射線療法、さらには外科療法など) を受けていることになる。今後はより臨床に近い担がんマウスモデルを作製し、担がん生体の動態とがん治療の全貌を明らかにしていく必要がある。

REFERENCES

- 1) Yamazaki H., Nitta K., Umezawa H., *Gann*, **64**, 83-92 (1973).
- 2) Tada T., Sano H., Sato S., Shima J., Fujiwara H., Hamaoka T., *J. Leukoc. Biol.*, **47**, 149-157 (1990).
- 3) Johnson J. A., Lau B. H., Nutter R. L., Slater J. M., Winter C. E., *Infect. Immun.*, **19**, 146-151 (1978).
- 4) Robinette E. H., Mardon D. N., *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**, 731-733 (1975).
- 5) Asano S., Urabe A., Okabe T., Sato N., Kondo Y., *Blood*, **49**, 845-852 (1977).
- 6) Okabe T., Sato N., Kondo Y., Asano S., Ohsawa N., Kosaka K., Ueyama Y., *Cancer Res.*, **38**, 3910-3917 (1978).
- 7) Okawa Y., Kobayashi M., Sakai K., Suzuki K., Suzuki M., *Jpn. J. Bacteriol.*, **40**, 908 (1985).
- 8) Kobayashi M., Okawa Y., Suzuki K., Tokoro A., Sakai K., Suzuki M., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **28**, 333-337 (1987).
- 9) Okawa Y., Murata Y., Kobayashi M., Suzuki M., Suzuki S., *Microbiol. Immunol.*, **36**, 517-521 (1992).
- 10) Murata Y., Okawa Y., Shibata N., Suzuki M., Suzuki S., *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo*, **41**, 179-184 (1994).
- 11) Okawa Y., Murata Y., Suzuki M., Ito M., Hotchi M.,

- Suzuki S., *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **34**, 113-117 (2002).
- 12) Okawa Y., Kobayashi M., Sakai K., Suzuki M., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 674-678 (2004).
- 13) Kokoshis P. L., Williams D. L., Cook J. A., Di Luzio N. R., *Science*, **199**, 1340-1342 (1978).
- 14) Marquis G., Montplaisir S., Garzon S., Strykowski H., Auger P., *Lab. Invest.*, **46**, 627-636 (1982).
- 15) Shibata N., Kobayashi H., Tojo M., Suzuki S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **251**, 697-708 (1986).
- 16) Suzuki K., Okawa Y., Hashimoto K., Suzuki S., Suzuki M., *Microbiol. Immunol.*, **28**, 903-912 (1984).
- 17) Parry R. M., Chandan R. C., Shahani K. M., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **119**, 384-386 (1965).
- 18) Imoto T., Moriyama S., Yagishita K., *J. Biochem.*, **80**, 1319-1325 (1976).
- 19) Takamori K., Yamashita T., *Infect. Immun.*, **29**, 395-400 (1980).