

細胞 ELISA を用いた *Candida* 属酵母表層抗原の検出

大川 喜男,* 山田 康代

Detection of the Specific Surface Antigens of *Candida* Species Strain Cells Using Cell-Enzyme Linked-Immunsorbent Assay (Cell-ELISA)

Yoshio OKAWA* and Yasuyo YAMADA

(Received November 20, 2009)

We conducted cell-enzyme linked-immunosorbent assay (Cell-ELISA) to detect the specific surface antigens of *Candida* species strain cells using factor sera from commercially available serum factor kit (Candida Check). The use of poly-L-lysine and glutaraldehyde in the Cell-ELISA was very useful to stick the yeast cells (antigens) to microtiterplate. The Cell-ELISA detected more clearly the surface antigens compared with the commercial slide agglutination test. We showed that the Cell-ELISA might detect qualitatively and/or quantitatively the mannan of the yeast surface by using antibodies with the mannan structure specificity.

Key words — Cell-ELISA; *Candida*; surface antigen; mannan; structure specificity

近年, 真菌症の臨床診断法は著しく進歩し, 特に *Candida* 症に対しては抗原 (マンナン) 検出を利用した診断試薬が開発されている. 医学的に重要な *Candida* 属酵母を迅速かつ正確に同定するために特異吸収抗血清が作製され, 因子血清, すなわち, ポリクローナル因子血清キット (カンジダ・チェック) を用いたスライド凝集反応が考案された.¹⁾ *Candida* 属酵母マンナン構造中の各抗原因子に相当する構造は, Fukazawa ら並びに Suzuki らの精力的な研究によってほぼ明らかにされている.²⁻⁴⁾ その抗原因子の同定の際, スライド凝集反応¹⁾に加え, マンナン ELISA⁵⁾ やマンナン ELISA 阻害試験⁶⁾ が有効な手段として用いられてきた. 8 種の医学的に重要な病原性 *Candida* 属酵母を, 10 種の因子血清を用いてスライド凝集反応によって同定するためのカンジダ・チェックの抗原パターンは次のように示されている.¹⁾

我々は各種 *Candida* 属酵母の表層抗原を迅速に検出することを目的として, 最初にカンジダチェックの因子血清を用いたスライド凝集反応を試みた. その結果, 本研究の中で示すように, そのスライド凝集反応は典型的な凝集パターンを示さないことが時々あることがわかった. また, マンナン ELISA は有効な手段であるが, 細胞壁からのマンナンの抽出・精製が必要で抗原解析に手間と時間を要する. そこで *Candida* 属酵母の表層抗原を迅速で正確に検出するために, カンジダチェックの因子血清を用いて, 動物細胞^{7b)} や細菌細胞⁹⁾ で検討されている細胞 ELISA を *Candida* 属酵母で行うための条件を検討した. 続いて, 各種 *Candida* 属酵母を用いて細胞 ELISA とスライド凝集反応のデータの比較を行った. さらに, 細胞 ELISA とマンナン ELISA の比較も試みた.

材料および方法

1) 使用菌株

使用した大部分の *Candida* 属酵母菌株は発酵研究所 (大阪) より購入した. *C. albicans* NIH A-207, NIH B-792 株は, 明治薬科大学免疫生物学教室, 西川朱實教授より分与された. *C. albicans* ATCC 1002 株は福岡歯科大学口腔微生物学教室, 故萩原義郷教授より分与された. *C. soyae* JCM 1644 株は理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室由来, また, *C. stellatoidea* TIMM 0310 株は帝京大

カンジダ・チェックの抗原パターン			
菌種または血清型	抗原因子		
<i>C. albicans</i> A 型	1	4 5 6	
<i>C. tropicalis</i>	1	4 5 6 ^{a)}	
<i>C. albicans</i> B 型	1	4 5	13b ^{a)}
<i>C. stellatoidea</i>	1	4 5	
<i>C. guilliermondii</i>	1	4	9 ^{a)}
<i>C. krusei</i>	1		11
<i>C. parapsilosis</i>	1		13 13b
<i>C. pseudotropicalis</i>	1	8	
<i>C. glabrata</i> (<i>T. glabrata</i>)	1	4 6	34

a) ときに欠如した株がある.

学医学部医真菌研究センター由来で, ATCC 11006, ATCC 20408 と ATCC 36232 株は American Type Culture Collection 由来である.

2) 菌株の培養

各菌株はまず酵母エキス加サブロー斜面寒天培地 (ペプトン 1%, グルコース 2%, 酵母エキス 0.5%, 寒天 1.5%) で培養した. このスラントから同液体培地 30 mL (100 mL 平底フラスコ) に移植し, 27°C, 48 時間振とう培養を行った.⁵⁾

3) マンナの調製

C. albicans NIH A-207 株細胞壁マンナの調製は, Kobayashi らの方法¹⁰⁾ により行った.

4) 菌体の *Candida* 因子血清との凝集反応

培養液 1~3 mL を取り, 生理食塩水 3~5 mL を加えて遠心 (2,500 rpm, 5 分間) 洗浄を 2 回行い, 生理食塩水を加えて希釈後顕微鏡下で菌数を測定, 1×10^6 個/0.2 mL または 1×10^7 個/0.2 mL の菌液を調製した. 各培養菌液を一滴凝集板に取り, これに *Candida* 各因子ポリクローナル抗体: ウサギ抗因子血清 (カンジダチェック, ヤトロン, 東京) を 1 滴滴下し, 30 分以内に凝集反応を観察した. 凝集が認められれば陽性 (+), 凝集しなければ陰性 (-) と判定した.¹¹⁾

5) 細胞 ELISA の測定方法

5-1. 菌液の調製

培養した菌を死菌体にするために, 加熱処理 (100°C, 30 分間) を行った. この菌体 1~3 mL を取り, 生理食塩水 3~5 mL を加えて遠心 (2,500 rpm, 5 分間) 洗浄を 2 回行い, PBS を加えて希釈し, 顕微鏡下で菌数を測定し, 1×10^7 個/mL の菌液を調製した.

5-2. 細胞 ELISA

Suzuki らの方法⁹⁾ に従って行った. すなわち, マイクロタイタープレート (Linbro/Titertek, Catalog no. 76-381-08) に PBS で $10 \mu\text{g/mL}$ に希釈したポリ-L-リジン $50 \mu\text{L/well}$ を入れて室温で 10 分間静置後, プレートの溶液を捨てリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄した. プレートに菌体を入れない陰性コントロールを 1 well 取り, 調製した *Candida* 属酵母菌液の 2 倍希釈系列を作り, それぞれ $50 \mu\text{L}$ ずつ well に入れ遠心分離 (1,500 rpm, 15 分間, 4°C) した. これに, PBS で希釈した 0.5% グルタルアルデヒド $50 \mu\text{L/well}$ を加え, 15 分間室温で放置, Tween 20 [終濃度 0.05% (v/v)] を含む PBS (PBST, pH 7.4) で 3 回洗浄後, 1% ウシ血清アルブミン (BSA) 含有 PBS に 100 mM グリシンを溶解させた液を $100 \mu\text{L/well}$ 加え, 30 分間静置後, PBST で 3 回洗浄

した. これに 20 倍希釈した因子血清 (1~34) を $50 \mu\text{L/well}$ 加え, 室温で 1.5 時間放置後, PBST で 3 回洗浄した. 次に PBST で 1,000 倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRPO) 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を $50 \mu\text{L/well}$ 加え, 室温で 1.5 時間静置後, PBST で 3 回洗浄した. さらに, HRPO の基質として 0.01% *o*-フェニレンジアミンおよび 0.006% H_2O_2 を含む 150 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) $100 \mu\text{L}$ 加え, 室温で約 5 分間放置した. 各 well に 2 M H_2SO_4 $50 \mu\text{L}$ ずつを加え 492 nm の吸光度を Micro Plate Reader A4 (Tosoh 社製) で測定した.

6) 細胞 ELISA とマンナン ELISA の比較

培養した *C. albicans* NIH A-207 菌体を加熱処理し, 1×10^7 個/mL に調製した菌液と因子血清 6 を用いて細胞 ELISA を行った. 一方, 同菌よりオートクレーブ抽出後フェーリング処理して精製したマンナン¹⁰⁾ を PBS にて $100 \mu\text{g/mL}$ とし, これを抗原として同様にマンナン ELISA⁵⁾ を行い, 細胞 ELISA と反応性を比較した. また, 両 ELISA でのポリ-L-リジンの影響を検討した.

実験結果

1) 細胞 ELISA の条件検討

Candida 属酵母を使用した細胞 ELISA を確立するために, ポリ-L-リジンとグルタルアルデヒドの影響を検討した (Fig. 1). ポリ-L-リジンはマイクロタ

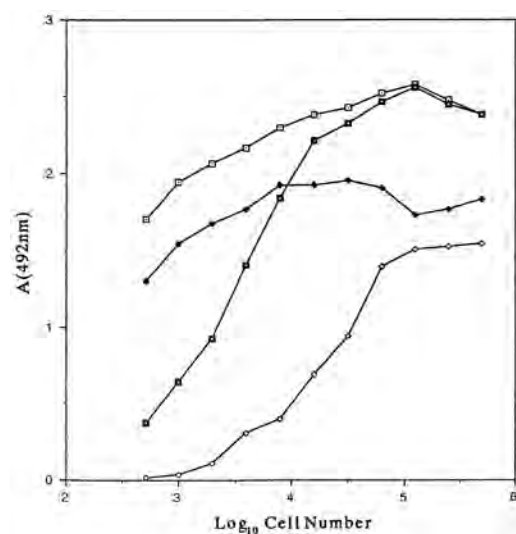


Fig. 1. Effect of Poly-L-lysine and Glutaraldehyde on Reactivity by Cell-ELISA of Factor Serum 6 with *Candida albicans* NIH A-207 Heat-killed Cells

□, Poly-L-lysine + Glutaraldehyde; ◆, Poly-L-lysine only; ■, Glutaraldehyde only; ◇, None.

Table 1. Slide Agglutination Assay of Factor Sera with *Candida* species Strain Cells

Strain	Agglutination with factor sera ^{a)}									
	1	4	5	6	8	9	11	13b	13	34
<i>Candida albicans</i> NIH A-207	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> J-1012*	±	++	±	++	±	±	±	±	±	±
<i>C. albicans</i> NIH B-792	+++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 1002	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i> IFO 0622	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i> IFO 0566	++	++	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>C. kefyr</i> IFO 0616	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i> IFO 0584	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. lambica</i> IFO 1146	++	-	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>C. lipolytica</i> IFO 1548*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. macedoniensis</i> IFO 0706	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. norvegenesis</i> IFO 1020	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> IFO 0585*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. pseudotropicalis</i> IFO 0586	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. soyae</i> JCM 1644	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. stellatoidea</i> ATCC 11006	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. stellatoidea</i> ATCC 20408	++	+	+	++	-	-	-	-	-	-
<i>C. stellatoidea</i> ATCC 36232	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. stellatoidea</i> IFO 1397	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. stellatoidea</i> TIMM 0310	+++	±	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> IFO 0587	+++	++	-	++	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> IFO 0589	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> IFO 0199	++	++	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> IFO 1647	++	++	-	±	-	-	-	-	-	-

^{a)} Agglutination was scored from high (+++) to low (+), and no agglutination (-). * It was impossible to judge.

イタープレート表面でアミノ基を露出し菌体の付着を促進させるために添加し、グルタルアルデヒドは加えた菌体を固定するために添加した。その結果、ポリ-L-リジンとグルタルアルデヒドの両者を添加しない方法では菌体の固定が十分行われず、洗浄の際に菌体が離脱し低い反応性しか得られなかったが、両者が入った方法では高い反応性が検出された。よって、ポリ-L-リジンとグルタルアルデヒドは細胞 ELISA には不可欠であると考えられる。

2) *Candida* 属酵母菌体の因子血清とのスライド凝集反応

Table 1 は 8 種の主要病原性 *Candida* 属酵母, さらに *C. kefyr*, *C. lambica*, *C. lipolytica*, *C. macedoniensis*, *C. norvegenesis*, *C. soyae* の全菌体を用いてスライド凝集反応を行った結果である。その結果, 8 種の主要病原性 *Candida* 属酵母については Shinoda らの報告¹⁾ と類似しているところもあるが, その典型的な凝集パターンと比べ, 異なった凝集パターンを示

す場合もみられた。特に, *C. albicans* J-1012, *C. lipolytica* IFO 1548, *C. parapsilosis* IFO 0585 では反応性の判定は困難であった。また, 典型的な凝集パターンを示すはずの, *C. albicans* ATCC 1002 では因子血清 5, *C. glabrata* IFO 0622 では因子血清 6 と 34, *C. krusei* IFO 0584 では因子血清 11, *C. pseudotropicalis* IFO 0586 では因子血清 8, *C. stellatoidea* と *C. tropicalis* では因子血清 5 との反応性が確認できず, スライド凝集反応のみから菌種を同定することは困難であった。

3) *Candida* 属酵母菌体の細胞 ELISA

Candida 属酵母の熱処理死菌について細胞 ELISA による反応性の検討を行った (Fig. 2)。その結果, Table 1 に示したスライド凝集反応では菌体が凝集塊を形成し判定が不可能な菌株や, 陰性か陽性か判定しがたい菌株があったが, 細胞 ELISA では明瞭に反応性を確認することができた。すなわち, ほとんどすべての細胞 ELISA のパターンは, 主

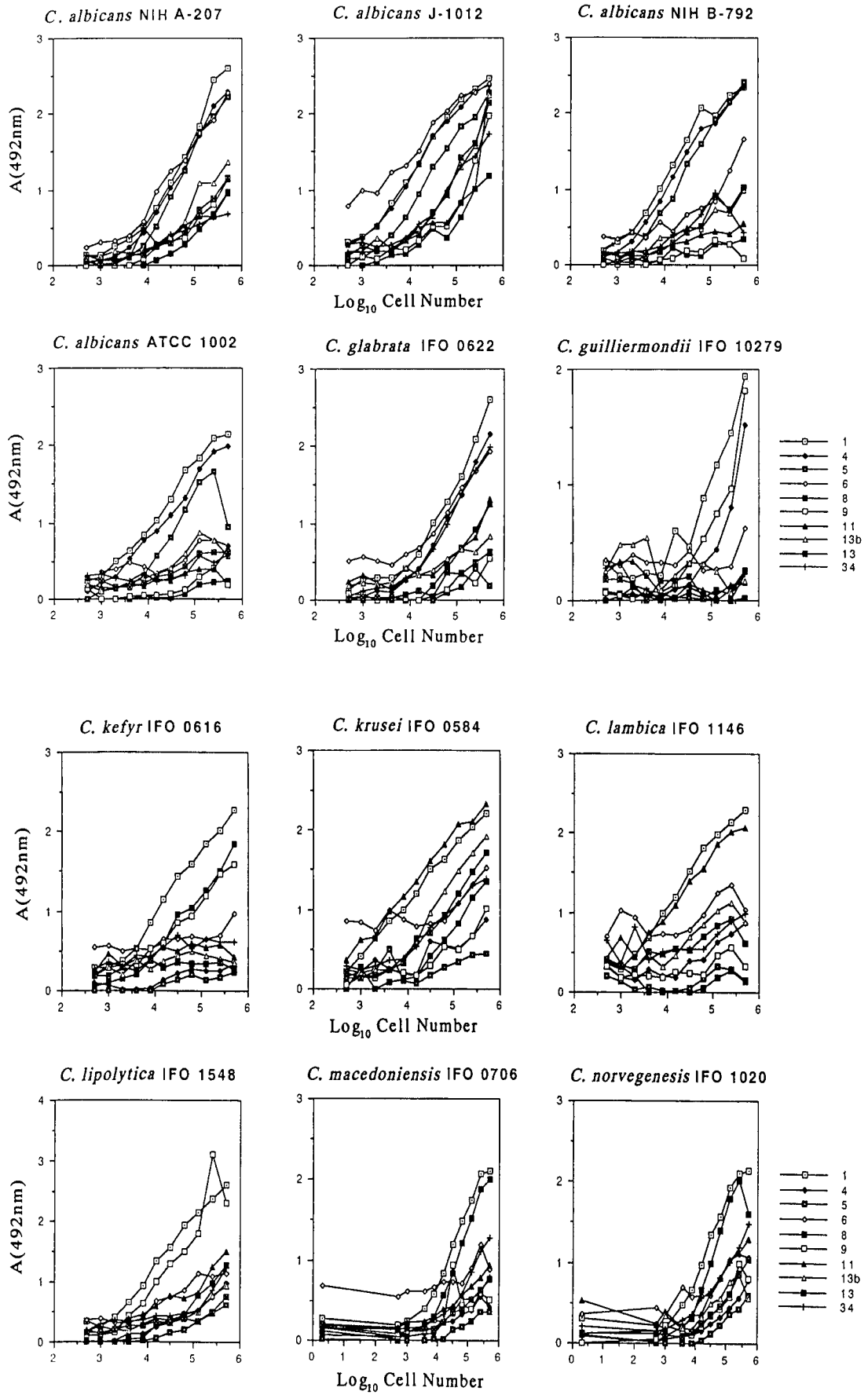


Fig. 2-1. Cell-ELISA for *Candida* Species Strain Cells with Factor Sera

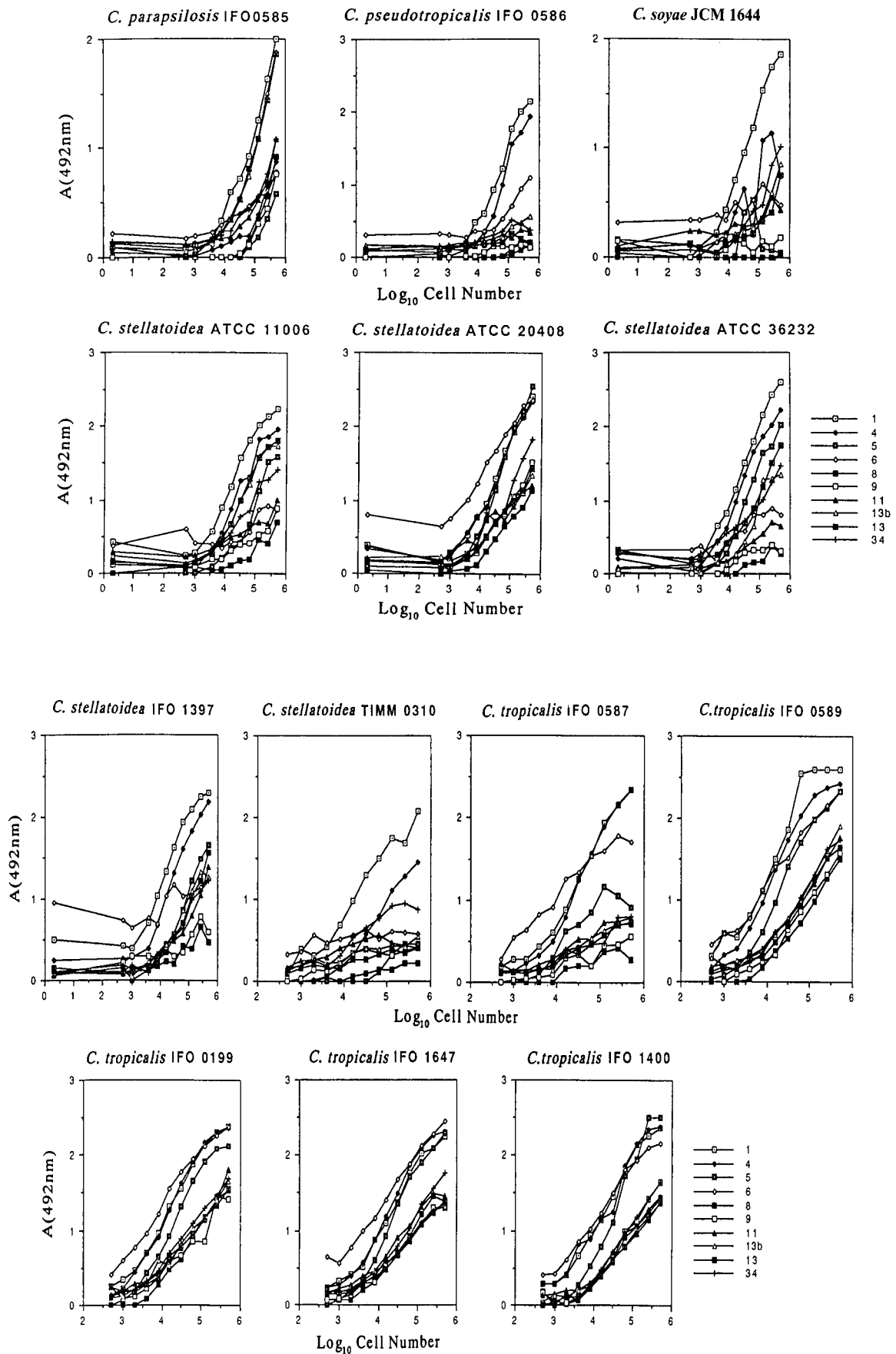


Fig. 2-2. Cell-ELISA for *Candida* Species Strain Cells with Factor Sera

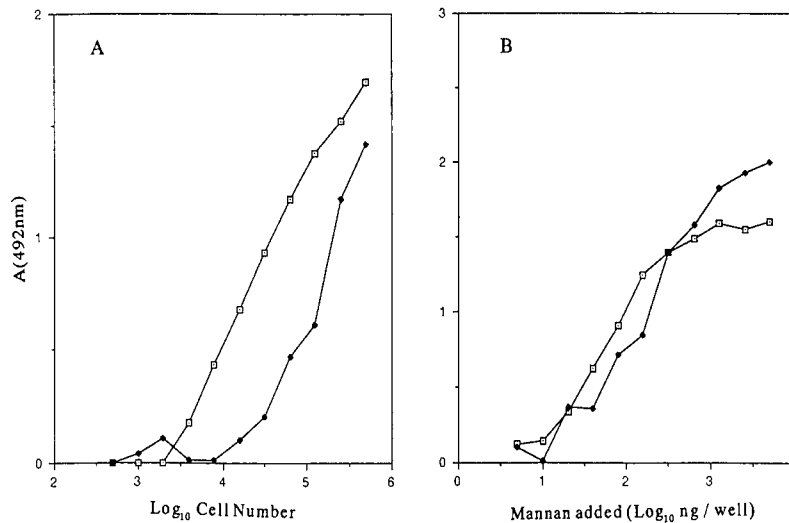


Fig. 3. Comparison of Cell-ELISA (A) and Mannan-ELISA (B) on the Reactivity of *Candida albicans* NIH A-207 Strain with Factor Serum 6

□, Poly-L-lysine; ◆, None.

要病原性 *Candida* 属酵母については典型的なスライド凝集反応パターン¹⁾と基本的に類似しているが、本 ELISA は凝集反応よりも表層抗原を明瞭に検出することができている例もある。例えば、興味深いことに *C. albicans* NIH B-792 株は因子血清 6 と弱い反応性を示すことが示された。また、*C. pseudotropicalis* IFO 0586 は因子血清 1, 4, そしてわずかに 6 との反応性が認められた。また、酵母菌の量を増やしたための非特異的な反応性の上昇とは別と考えられる各菌の特異血清以外の因子血清との反応性が上昇しているものが、*C. albicans* J-1012, *C. krusei* IFO 0584, *C. norvegensis* IFO 0585, *C. stellatoidea* ATCC 11006, 20408, 36232 そして *C. tropicalis* IFO 0589, 0199, 1647, 1400 株などでみられた。今回新たに、*C. kefyr* IFO 0616 は因子血清 1, 8, 9 と、*C. lambica* IFO 1146 は 1, 11 と、*C. lipolytica* IFO 1548 は 1, 9 と、*C. macedoniensis* IFO 0706 と *C. norvegensis* IFO 1020 は 1, 8 と、*C. soyae* は 1, 4 と反応性があることが細胞 ELISA により明らかになった。*C. parapsilosis* IFO 0585 と *C. lipolytica* IFO 1548 はスライド凝集反応ではすべての因子血清と反応性を示さなかった (Table 1) が、細胞 ELISA によって表層抗原を検出することができた。

4) 細胞 ELISA とマンナン ELISA の比較

サブロー液体培地で培養し、加熱処理した *C. albicans* NIH A-207 株菌体と同菌より抽出・精製したマンナンを抗原として、因子血清 6 を用いて、細

胞 ELISA とマンナン ELISA を比較した。また、ポリ-L-リジンの影響についても併せて検討した (Fig. 3)。その結果、菌体と因子血清との反応性は菌数の増加に伴い上昇した (Fig. 3-A)。また、マンナン量の増加でも反応性が上昇した (Fig. 3-B)。このことにより、因子血清 6 との反応性は菌体表層の因子血清 6 が認識するマンナン量¹²⁾と相関し、菌体表層のマンナン抗原の量を直接細胞 ELISA によって測定できることがわかった。この際、細胞 ELISA でのポリ-L-リジンの使用は、Fig. 1 でも示したように有効で、菌数の増加に伴い反応性は直線的に上昇した (Fig. 3-A)。しかし、マンナン ELISA の場合 (Fig. 3-B) はポリ-L-リジンを使用してもしなくても反応性に違いはなかった。

考 察

細胞 ELISA は各種動物細胞表層抗原に対するモノクローナル抗体^{7,8)}や *Pseudomonas aeruginosa* に対するモノクローナル抗体⁹⁾の検出のために用いられてきた。この細胞 ELISA では、すでにポリ-L-リジンとグルタルアルデヒドが使用され、良好な結果が得られている。しかしながら、酵母菌体を用いた系統的な細胞 ELISA の報告は見当たらない。今回の我々の結果は、接着酵母細胞の特異表層抗原量とその細胞の数をポリ-L-リジンとグルタルアルデヒドを用いた細胞 ELISA によって測定できることを

示した (Fig. 1). また, 本方法は, 酵母細胞表層抗原に対する抗体を検出する迅速で正確なスクリーニングのためにも有用であり, さらに, 酵母の培養経過中や生体内での免疫反応時や病的状態の時, さらに変異剤を用いた細胞表層構造変異の研究など, 酵母細胞の特異的な表現型の変化を正確に検出することが可能である.

因子血清と酵母細胞とのスライド凝集反応は病原性 *Candida* 株を迅速に同定するために確立された方法である.¹⁾ しかしながら, Table 1 に示したように, 典型的な凝集パターンを示さない時があり, 正確性に問題がある. *C. albicans* 細胞表層抗原と因子血清との相互作用はフローサイトメトリー¹³⁾や免疫電子顕微鏡¹⁴⁾によっても研究されているが, 本報告は細胞 ELISA に因子血清を用いた最初の報告である (Fig. 2). *Candia* 属酵母の菌種・菌株によって相違はみられるが, それぞれ菌種特異的因子血清とは強く反応したが, それ以外の因子血清とも反応する菌株のあることが示された. このような場合の考察として, 細胞 ELISA の感度が優れているためにそれらの菌に微量ながら存在している各抗原因子特異構造を認識できているか, 因子血清の特異性が低いため, 抗原因子特異構造以外の構造とも反応性を示している可能性が考えられる.¹⁵⁾ いずれにしても現在は *Candida* の各因子の構造が明らかになっているので,⁴⁾ 細胞 ELISA は基本的に各因子構造の量を菌体を用いて直接測定できることを示している.

Candida 属酵母マンナン構造と病原性との関連性の研究は重要なテーマである.¹⁶⁻¹⁹⁾ また, *Candida* 症の血清学的診断や予後の判定において, そのマンナン抗原の検出は, 新しい血清学的反応, 例えば ELISA, ELISA 阻止反応やラテックス粒子凝集反応など²⁰⁻²³⁾ を用いることにより感受性や特異性の点で格段に進歩している.

REFERENCES

- 1) Shinoda T., Kaufman L., Padhye A. A., *J. Clin. Microbiol.*, **13**, 513-518 (1981).
- 2) Nishikawa A., Shinoda T., Fukazawa Y., *Mol. Immunol.*, **19**, 367-373 (1982).
- 3) Funayama M., Nishikawa A., Shinoda T., Suzuki M., Nishikawa A., Fukazawa Y., *Microbiol. Immunol.*, **28**, 1359-1371 (1984).
- 4) Suzuki S., *Curr. Top. Med. Mycol.*, **8**, 57-70 (1997).
- 5) Okawa Y., Takahata T., Kawamata M., Miyauchi M., Shibata N., Suzuki A., Kobayashi H., Suzuki S., *FEBS Lett.*, **345**, 167-171 (1994).
- 6) Okawa Y., Goto K., Nemoto S., Akashi M., Sugawara C., Hanzawa M., Kawamata M., Takahata T., Shibata N., Kobayashi H., Suzuki S., *Clin. Dian. Lab. Immunol.*, **3**, 331-336 (1996).
- 7) Lansdorp P. M., Astaldi G. C. B., Oosterhof F., Janssen M. C., Zeijlemaker W. P., *J. Immunol. Methods*, **39**, 393-405 (1980).
- 8) Suter L., Brüggen J., Sorg C., *J. Immunol. Methods*, **39**, 407-411 (1980).
- 9) Suzuki H., Okubo Y., Moriyama M., Sasaki M., Matsumoto Y., Hozumi T., *Microbiol. Immunol.*, **31**, 959-966 (1987).
- 10) Kobayashi H., Shibata N., Mitobe H., Ohkubo Y., Suzuki S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **272**, 364-375 (1989).
- 11) Miyakawa Y., Kagaya K., Fukazawa Y., Soe G., *J. Clin. Microbiol.*, **23**, 881-886 (1986).
- 12) Kobayashi H., Shibata N., Suzuki S., *Infect. Immun.*, **60**, 2106-2109 (1992).
- 13) Chaffin W. L., Ringler L., Larsen H. S., *Infect. Immun.*, **56**, 3294-3296 (1988).
- 14) Marquis G., Garzon S., Strykowski H., Auger P., *Infect. Immun.*, **59**, 1312-1318 (1991).
- 15) Okawa Y., Monma K., Shibata N., Kobayashi H., Yamada Y., *Carbohydr. Res.*, **338**, 1175-1182 (2003).
- 16) Kind L. S., Kaushal P. K., Drury P., *Infect. Immun.*, **5**, 180-182 (1972).
- 17) Cuff C. F., Taub D. D., Rogers T. J., *Cell. Immunol.*, **122**, 71-82 (1989).
- 18) Okawa Y., Miyauchi M., Takahashi S., Kobayashi H., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1870-1873 (2007).
- 19) Okawa Y., Miyauchi M., Kobayashi H., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1507-1510 (2008).
- 20) Lew M. A., Siber G. R., Donahue D. M., Maiorca F., *J. Infect. Dis.*, **145**, 45-56 (1982).
- 21) Faille C., Michalski J. C., Strecker G., Mackenzie D. W. R., Camus D., Poulain D., *Infect. Immun.*, **58**, 3537-3544 (1990).
- 22) Domer J. E., Stashak P. W., Elkins K., Prescott B., Caldes G., Baker P. J., *Cell. Immunol.*, **101**, 403-414 (1986).
- 23) Garcia-de-Lomas J., Morales C., Grau M. A., Mir A., *Mycopathologia*, **102**, 175-178 (1988).