信州医誌，42(1)：27～41，1994

実験的脳クリプトコックス症の病理組織学的，免疫組織化学的研究

——莢膜欠損株，莢膜保有株の組織反応の違い——

福　澤　正　男
信州大学医学部第2病理学教室
（主任：発地　雅夫教授）

Histological and Immunohistochemical Studies on Experimental Cerebral Cryptococcosis -Differences in Histological Reactions between Encapsulated and Nonencapsulated Strains-

Masao FUKUZAWA
Department of Pathology, Shinshu University School of Medicine
(Director : Prof. Masao HOTCHI)

To investigate the cerebral lesions caused by *Cryptococcus neoformans*, encapsulated and nonencapsulated (NC) *Cryptococcus* strains were intravenously injected into mice. Histologically, the NC strain induced only granulomatous lesions in the brain, then the lesions were absorbed. The encapsulated strain initially produced granulomatous lesions in the brain, and gradually these lesions changed to cystoid ones showing sparse inflammatory cell responses. The NC strain formed no capsule either *in vivo* or *in vitro*. In contrast to the NC strain, the encapsulated strain revealed a thicker capsule in cystoid lesions than in granulomatous lesions. Both strains also induced chronic meningitis. Immunohistochemically, granulomatous lesions consisted of macrophages and CD4 T cells in their centers while scattered CD8 T cells were present in their periphery. The results suggest that inflammatory cell responses to *C. neoformans* are identical to both strains, the differences in the lesions produced by the two strains depending on the presence or absence of the capsule. *Shinshu Med J 42 : 27—41, 1994*

(Received for publication October 4, 1993)

Key words : *Cryptococcus neoformans*, cystoid lesion, granulomatous lesion, meningoencephalitis, immunohistochemistry
クリプトコックス・ネオフォルマンス，嚢胞様病変，肉芽腫性病変，髄膜脳炎，免疫組織化学

I　緒　　言

Cryptococcus neoformans は，自然界に広く分布する酵母状真菌である。疫学的には腐生菌として鳩の排泄物などに多量に含まれ，重要な感染源となっている[1]。通常は，酵母形で発育し，菌体の直径は4～20 μmで，多くは酸性ムコ多糖からなる5～20μmの厚さの莢膜を有する[2][3]。本菌によって引き起こされるクリプトコックス症は，空気中に浮遊した菌体を吸引することにより，肺に初感染巣としての急性および慢性

別刷請求先：福澤　正男
〒390 松本市旭3－1－1　信州大学第2病理学教室

病変を形成する。ひとたび血中に移行すると，全身性クリプトコックス症となり，特に髄膜を中心とする中枢神経系に親和性がある。クリプトコックスは，健康人にはほとんど感染することはなく，また感染しても通常は容易に治癒し，まれに肺に孤立性病変を作る[4)5)]。しかし，何等かの免疫抑制状態に陥っている患者に感染が起きると，クリプトコックス症は生命に重大な影響を及ぼし，その致死率は80～90%に達する。本症は，以前，造血器悪性腫瘍，固形腫瘍の化学療法後，また副腎皮質ホルモンの使用に伴う免疫不全状態での日和見感染症として考えられていたが，近年は後天性免疫不全症候群[6)]，臓器移植後の免疫抑制状態などにおける合併症[7)]として注目されている。

C. neoformans の感染に対する宿主の感染防御機構は，十分には解明されていない。*C. neoformans* は株によって莢膜の厚さが異なり，感染病巣も，炎症性細胞浸潤のほとんどみられない嚢胞様病変と，マクロファージやリンパ球などからなる肉芽腫性病変がある[8)]。また臓器によっても形成される病変が異なることが知られている[9)]。そこで我々は，莢膜欠損株と莢膜保有株をマウスの尾静脈に注射し，髄膜を含めた脳内にどのような病変が形成されるか，また形成された病変に存在する浸潤マクロファージ，多形核白血球（PMN），T 細胞 subset, interleukin 2 receptor（IL2r）の出現を免疫組織化学的に検討した。

II 材料と方法

A 材料

1 使用動物：4 週齢の雄性 ICR マウス（日本チャールズ・リバー，厚木）を使用した。実験中は TAR-50型エアコンボックス内で飼育し，実験動物用固形飼料 MF（マウス・ラット・ハムスター，オリエンタル酵母工業）と水道水を自由に摂取させた。上記条件で1週間の予備飼育の後，下記実験に供した。

2 使用菌株：Sabouraud 寒天斜面培地（日水製薬）で継代培養した *Cryptococcus neoformans* 莢膜欠損株（血清型 D, ATCC 36556, 以下莢膜欠損株）と，*Cryptococcus neoformans* 莢膜保有株（血清型 D, ATCC 62072, 以下莢膜保有株）を使用した[10)]。

B 方法

1 培養条件：Sabouraud 寒天培地で30°C，約 4 日間培養した。

2 菌液の調製：上記条件で培養された *C. neoformans* の細胞を，それぞれ滅菌生食水に懸濁して菌液を作製した。この菌液を2,000rpm で10分間遠沈し，滅菌生食で 3 回洗浄し，Bürker-Türk 血球計算板で菌数を計算し，滅菌生食浮遊液とした。予備実験の結果，それぞれ莢膜欠損株は4.0×10^8/ml，莢膜保有株は2.0×10^8/ml に調製した。

3 接種と動物の屠殺：上記菌液をマウスの尾静脈から0.25ml ずつ注射した。マウス個体当たりの接種菌数は，莢膜欠損株は1.0×10^6個，莢膜保有株は5×10^7個である。接種後 3，5，10，15，20，25，30，35，40，45，50，55，60，65，70，75，80，85，90 日まで経時的に 5 匹ずつ屠殺した。

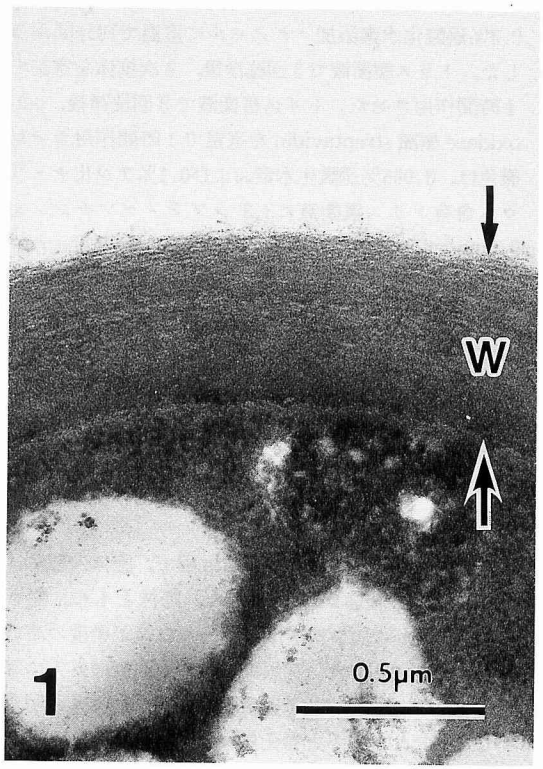
4 菌体の電子顕微鏡的観察：上記条件で平板培地で培養した 2 種の菌株を 2 %カコジル酸緩衝（0.1M, pH7.2）グルタールアルデヒドを用いて集菌し，そのまま 2 時間 4 °C で前固定した。その後上清を捨て，沈澱した菌体の pellet を約50°C の 1 %寒天（ナカライテスク）溶液に包埋し，冷えて固まった時点で 1 mm 角に細切し，同緩衝液で洗浄後，1 %カコジル酸緩衝四酸化オスミウムで 2 時間後固定した。型通り，脱水，置換し，エポキシ樹脂（TAAB 812）に包埋した。約0.1μm の超薄切片を作製し，1 %酢酸ウラニウム，クエン酸鉛で重染色を行った。切片は透過型電子顕微鏡（日立 HS-9）で観察した。

5 マウスに対する病原性：両菌株について（使用動物，使用菌株，培養条件に関しては前記と同様）4.0×10^8/ml の生食浮遊液を作製し，莢膜欠損株は20匹，莢膜保有株は17匹にそれぞれ尾静脈から0.25ml 静注し，感染死による経時的累積死亡数を算定した。その後剖検を行い，Hematoxylin-Eosin（HE）および Alcian blue（pH2.5）-periodic acid Schiff（AB-PAS）染色を行って検鏡した。

6 病理組織学的検索：

a 組織学的検索：上記日程で屠殺したマウス各 3 匹を左心室，右心室からそれぞれ 4 %燐酸緩衝パラホルムアルデヒド液で灌流固定し，肺は気管から注入固定し，取り出した臓器は24～48時間 4 %燐酸緩衝パラホルムアルデヒド液で固定した。脳，肺，肝および脾を中心に切り出してパラフィン切片を作製し，HE 染色および AB-PAS 染色を行った。

b 免疫組織化学的検索：上記日程で屠殺したマウス各 2 匹について取り出した脳を，ティシュー・テック，クリオモルド 2 号（Miles Inc., U. S. A.）に入れ，ティシュマウント（白井松器械）で包埋し，ドライアイスアセトンで凍結した。これらの材料から JUNG



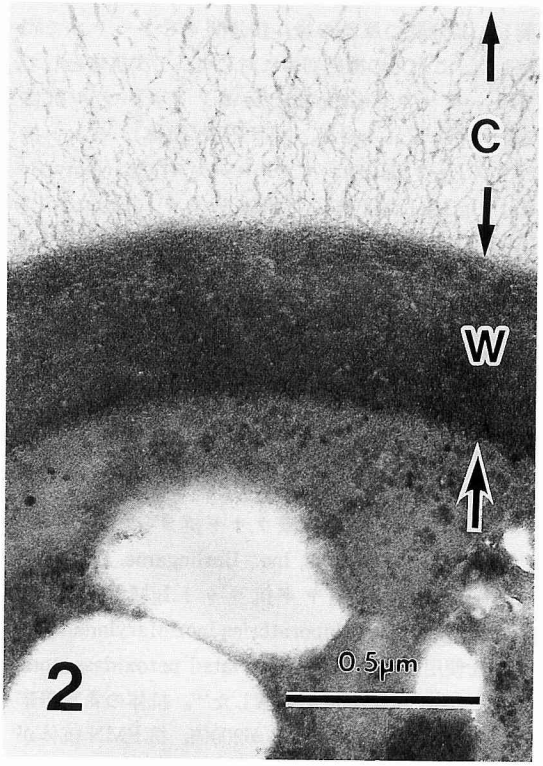


図1　莢膜欠損株の電顕像
図2　莢膜保有株の電顕像（C；莢膜，W；細胞壁）
図1の莢膜欠損株には莢膜は存在しない。

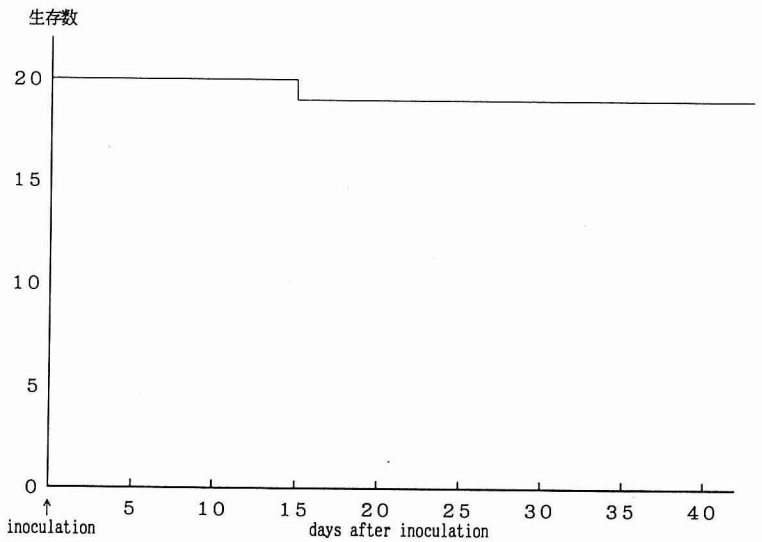


図3　莢膜欠損株接種におけるマウス生存数

CM3000 cryostatで，厚さ3～4μmの凍結切片を作製し，30分間の風乾の後，10分間4℃アセトンで固定した。これらの凍結切片に対して，1次抗体として，ラット抗マウスGranulocyteモノクローナル抗体（Isotype；Rat IgG2b，以下PMN抗体），ラット抗マウスLy-2（CD8a）モノクローナル抗体（Isotype；Rat IgG2a，以下抗CD8抗体），ラット抗マウスL3T4（CD4）モノクローナル抗体（Isotype；IgG2b，以下抗CD4抗体），ラット抗マウスIL-2receptor（interleukin-2 receptor antibody, CD25）モノクローナル抗体（Isotype；IgM，κ，以下IL2r抗体）（以上Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.），ラット抗マウスMacrophageモノクローナル抗体（Isotype；IgG2b, Caltag Laboratories Inc., South San Francisco, CA, U.S.A. 以下抗マクロファージ抗体），2次抗体として，ビオチン標識ウサギ抗ラットIgG抗体（Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, U.S.A.），ビオチン標識ヤギ抗ラットIgM抗体（Kirkegaard and Perry laboratories Inc., Maryland, U.S.A.）を使用してavidin-biotinylated peroxidase complex（ABC）methodで検索した[11]。抗体の希釈倍率は，抗マクロファージ抗体が200倍，抗PMN抗体が400倍，抗CD8抗体が400倍，抗CD4抗体が200倍，抗CD25抗体が400倍，2次抗体はいずれも50倍で，peroxidase標識streptavidin（Dakopatts, Kopenhagen, Denmark）は1,000倍で使用した。1次抗体を室温で1時間作用させ，0.05Mトリス塩酸緩衝液（pH7.6）で3回洗浄を行った。その後，内因性peroxidase除去のため，室温でメタノールに30分浸漬し，0.3%過酸化水素添加メタノールに室温で10分間浸漬した。トリス緩衝液で3回洗浄後，2次抗体を室温で1時間作用させた。トリス緩衝液で3回洗浄後，peroxidase標識streptavidinを室温で1時間作用させた。発色は，0.005%過酸化水素および0.1%アジ化ナトリウム含有トリス緩衝液に3,3'ジアミノベンチジンを0.2mg/mlの濃度で溶解し，室温で約10分間行った。核染は1%methyl greenを使用した。陽性コントロールとして，胸腺，脾臓を使い，陰性コントロールとして，前述のように作製した脳凍結切片に，正常兎血清（Dakopatts, Kopenhagen, Denmark）を1次抗体の代わりに使用した。

III 結　　果

A 菌体の電顕的観察（図1，2）

両株とも菌体直径は3～4 μm程で，胞体内部には，核，液胞，小胞体が観察された。両株ともに，厚さ0.3～0.5μmの層板状構造の明らかな電子密度の高い細胞壁が認められた。莢膜保有株は細胞壁の外方に厚さ1 μmほどのやや電子密度の低い樹枝状構造の明らかな莢膜に相当すると考えられる構造物が認められた。莢膜欠損株にはこの構造は存在しなかった。

B 両株の病原性

莢膜欠損株接種群では，経過観察期間は90日に及んだが観察中に死亡したものは1匹のみであり，死因は特定できなかった（図3）。莢膜保有株接種群では図4のように死亡し，剖検すると後に述べる実験群と同

表1　莢膜欠損株による病変の炎症細胞の推移

接種後日数	3	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90
肉芽腫性病変											
マクロファージ	＋	＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋＋	＋＋	＋	＋	＋＋	＋	＋
PMN	－	＋	＋	＋＋	＋	＋	－	－	＋	－	－
CD8 T細胞	－	＋	＋	＋＋	＋	＋	＋	＋	＋＋	＋	＋
CD4 T細胞	－	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－
IL2r(＋)細胞	－	－	－	－	＋	＋	－	－	＋	－	－
髄膜炎											
マクロファージ	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋
PMN	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－
CD8 T細胞	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－
CD4 T細胞	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋
IL2r(＋)細胞	－	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－

＋：少数，　＋＋：中等度，　＋＋＋：多数　（＋）レセプター陽性

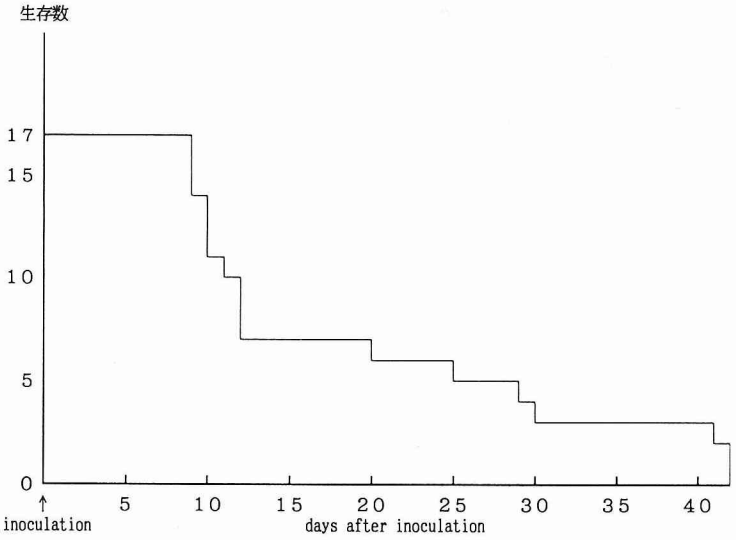
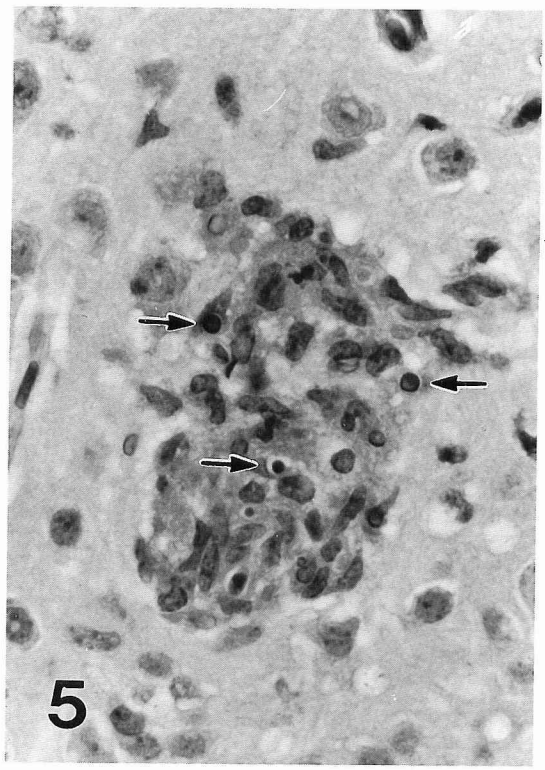


図4　莢膜保有株接種におけるマウス生存数



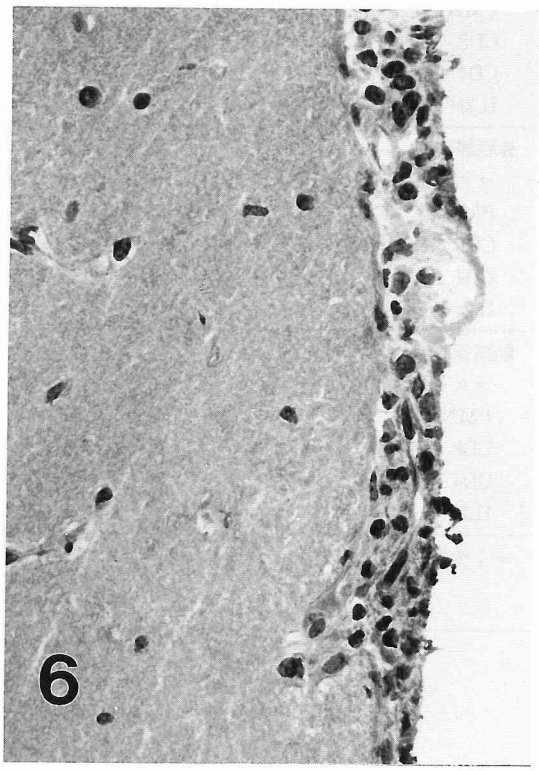


図5　接種後15日の莢膜欠損株による脳内肉芽腫性病変
マクロファージからなり内部には菌体（矢印）を認める。菌体に莢膜はみられない。(AB-PAS, ×670)

図6　接種後30日の莢膜欠損株による，慢性髄膜炎
浸潤炎症性細胞は，マクロファージ，リンパ球からなる。(HE, ×420)

様の病変を呈していた。

C　莢膜欠損株に対する脳の組織反応（表1）

接種後3日で脳内の毛細血管内から脳実質にかけて増殖する菌塊を認めた。菌塊の直径は20μm程であった。接種後10日位までこの菌塊内の菌数は増加し，菌塊数も増えた。この頃より菌塊の周辺にマクロファージの浸潤がみられる様になった。接種後15日程で肉芽腫の形成を認めた（図5）。これらの大きさは約150μm程までで，肉芽腫内に含まれる菌の数は減少していた。また，くも膜下腔にも菌体成分を認め，PMN，マクロファージの浸潤を軽度に認めた（図6）。接種後25日ほどで，髄膜腔ではリンパ球浸潤がみられた。以後，接種後30日までは，脳内の病変数，大きさは変化はないが，PMNは減少し，病変内部の菌数も減少した。接種後35から45日にかけて，脳内の肉芽腫性病変の数は著明な減少を示し，病変の大きさも直径60μm程と小型となった。また病変内の菌数も減少した。肉芽腫性病変内の構成細胞は，おもにマクロファージで，辺縁部に少数のリンパ球浸潤が観察された。髄膜炎も徐々に消退してゆき，少数のリンパ球，マクロファージが見られるのみであった。以後は，個体により違いはあるが，脳内の肉芽腫性病変と，髄膜炎は徐々に吸収され，注射後約80日ほどでほとんど吸収された。これらの肉芽腫性病変内，また吸収過程で菌体の

表2　莢膜保有株による病変の炎症細胞の推移

接種後日数	3	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90
肉芽腫性病変											
マクロファージ	−	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
PMN	−	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+
CD8 T細胞	+	++	++	+	+	+	++	+	++	++	++
CD4 T細胞	−	−	+	++	+++	++	+	++	++	++	++
IL2r(+)細胞	−	−	−	+	++	++	+	++	++	++	++
嚢胞様病変											
マクロファージ	−	−	−	++	++	+	+	+	+	+	+
PMN	−	−	−	+	+	+	−	−	−	+	−
CD8 T細胞	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+
CD4 T細胞	−	−	−	++	+	+	−	−	+	−	+
IL2r(+)細胞	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−
髄膜炎											
マクロファージ	−	−	++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++
PMN	−	−	++	++	++	++	++	++	++	++	++
CD8 T細胞	−	−	++	++	++	++	++	++	++	++	++
CD4 T細胞	−	−	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
IL2r(+)細胞	−	−	+	++	++	++	++	++	++	++	++

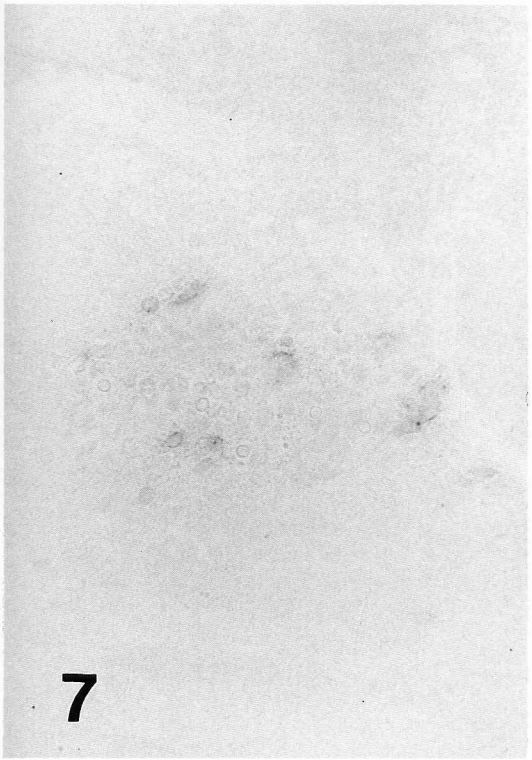
＋：少数，　＋＋：中等度，　＋＋＋：多数　（＋）レセプター陽性

図7　接種後20日の莢膜欠損株による肉芽腫性病変における抗CD4抗体陽性像（ABC法，×790）

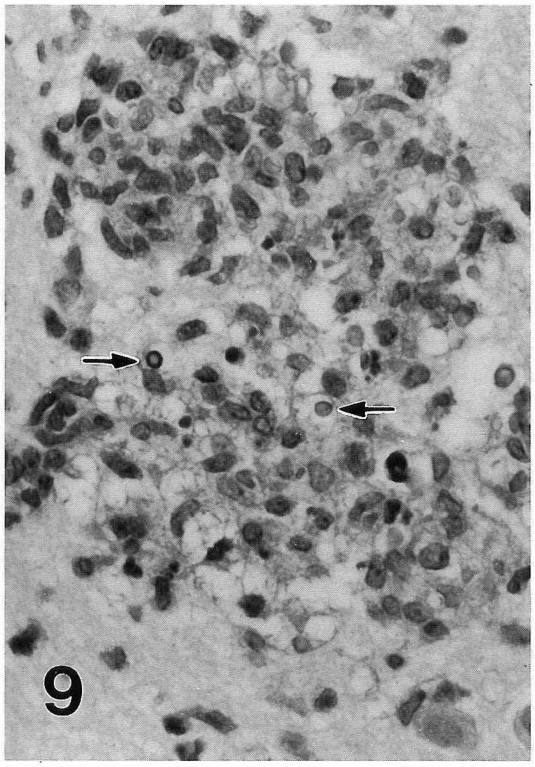
図8　接種後20日の莢膜欠損株による肉芽腫性病変における抗CD8抗体陽性像（ABC法，×440）

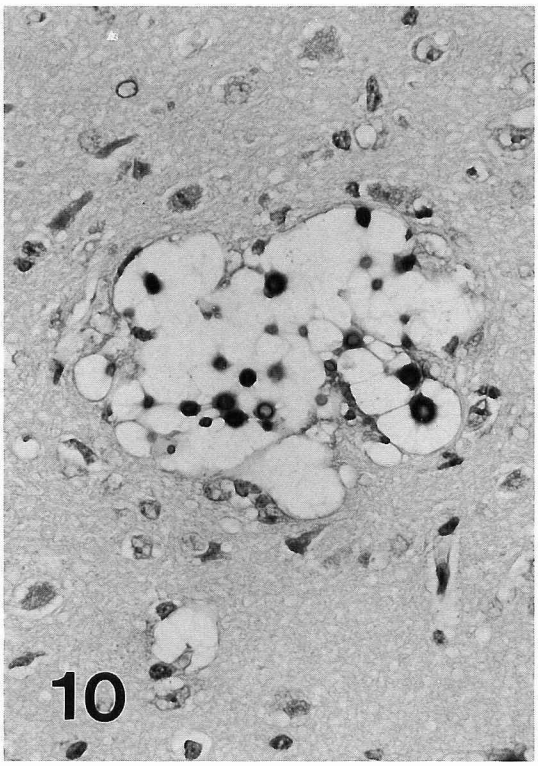
図9　接種後30日の莢膜保有株による脳内の肉芽腫性病変
菌体（矢印）には薄い莢膜がみられる。（AB-PAS，×590）

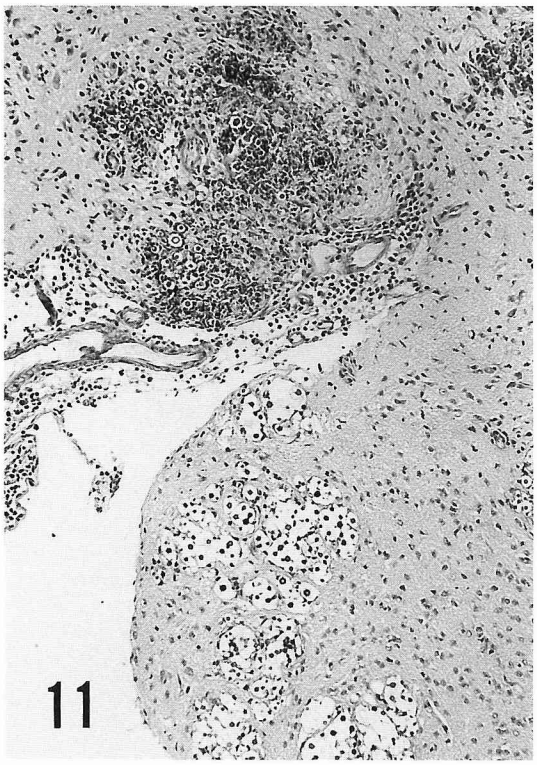
図10　接種後50日の莢膜保有株にみられる嚢胞様病変
菌体には厚い莢膜がみられ，炎症性細胞浸潤はほとんど観察されない。
（AB-PAS，×610）


7

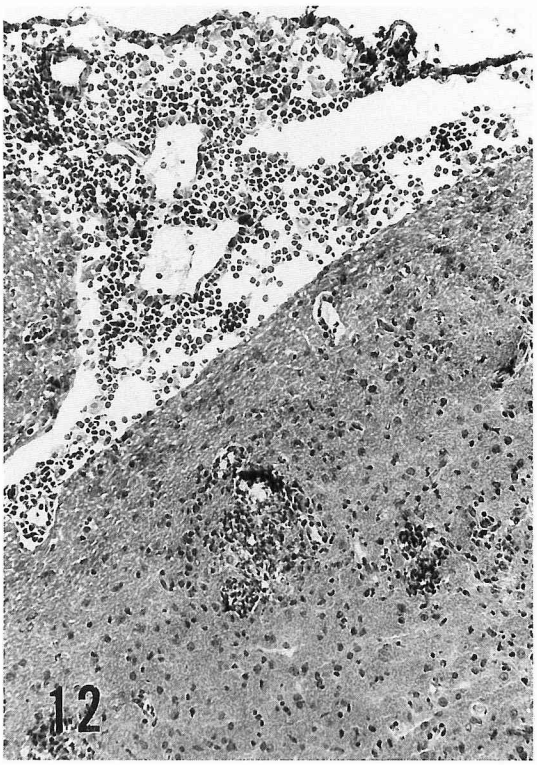

8


9

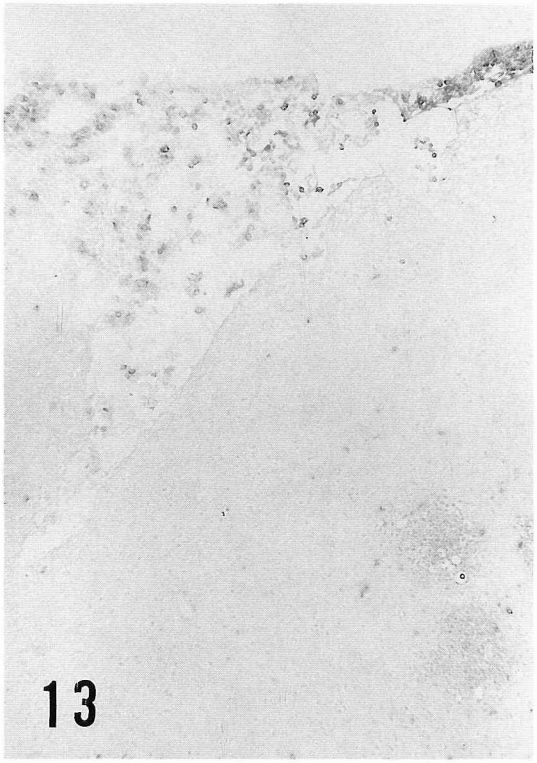

10



11



12



13



14

PAS染色性は徐々に低下した。組織中の菌体成分は通常の莢膜保有株にみられるAB染色陽性の莢膜は存在しなかった。全経過を通じて嚢胞様病変は形成されなかった。

免疫組織化学的にはPMNとマクロファージについては前述の結果と同様の所見であった。接種後15日程で，脳実質では菌を取り囲むようにしてCD4陽性T細胞が浸潤し，接種後20日頃に最も多くみられ（図7），以後は徐々に減少し，接種後40日頃でほとんど観察されなくなった。しかし肉芽腫性病変が長く存在した動物では，この後も，CD4陽性T細胞浸潤が認められた。脳内の肉芽腫性病変にCD4陽性T細胞が出現する時期とほぼ同じ時期に，くも膜下腔でもCD4陽性T細胞が散見され，接種後90日まで観察された。CD4陽性T細胞の浸潤がみられる時期にほぼ一致して，CD8陽性T細胞が肉芽腫を取り囲むように出現した（図8）。肉芽腫数が増加すると，病変内に観察されるCD8陽性T細胞は増加し，病変数の減少とともに減るが，完全に消失することはなく，接種後80日で肉芽腫性病変が消失した後でも，CD8陽性T細胞は散見された。髄膜でも，CD8陽性T細胞の浸潤時期は脳実質内のそれとほぼ一致し，接種後90日まで観察された。接種後20日ほどすると，肉芽腫内で表面にIL2rを発現するリンパ球が散見され，接種後40日頃まで観察された。髄膜でもほぼ同時に観察され，接種後75日頃まで認められた。

D　莢膜欠損株に対する他臓器のおもな組織反応

1　肺：接種後3日頃から間質に肉芽腫性病変が形成され，以後増加した。接種後15～25日がピークで，接種後35日までに吸収された。

2　肝：接種後3日ほどで肉芽腫性病変が形成され，以後数は増加し，注射後15～20日でピークに達した。以後徐々に減少し，接種後90日まで少数の肉芽腫性病変が存在した。

3　脾：注射後10～15日で少数の肉芽腫性病変が形成され，注射後20日で吸収された。

E　莢膜保有株に対する脳の組織反応（表2）

注射後3日で，脳実質内に直径約40μmほどの菌塊が形成された。病変は，以後時間とともに数，大きさを増した。注射後10日ほどで，菌の増殖巣の大きさは最大300μmほどとなり，辺縁に単核細胞浸潤と一部ではPMNの浸潤を認め，少数ではあるが，径約40μmの小型の肉芽腫性病変が形成された。くも膜下腔にも菌体成分が確認された。注射後15日まで嚢胞様病変の数は増加するが，併せてマクロファージの浸潤も多くみられ，肉芽腫の形成が著明となった（図9）。注射後20日ほどで髄膜にもPMN，マクロファージからなる炎症性細胞浸潤がみられた。注射後25日ほどで，肉芽腫性病変と，嚢胞様病変の数はほぼ半々となった（図10，11）。髄膜炎も著明となり，上記炎症細胞に加えて，リンパ球の浸潤が明らかとなった。また個体によっては，肉芽腫性病変の方が多いものもみられた。注射後30日から35日でふたたび嚢胞様病変が増加し，直径700μm程に大型化した。接種後40日までに形成された嚢胞様病変の内部や，辺縁部にはマクロファージの浸潤が少数ではあるが認められたが，以後はこれらの細胞は減少していった。脳実質には肉芽腫性病変が吸収された跡と考えられる，中心部に変性した菌体を少数含み，辺縁にgliosisを伴う病変が散見された。以後90日まで，嚢胞様病変，肉芽腫性病変が交互に出現する像がみられたが，徐々に嚢胞様病変の占める面積が大きくなっていった。髄膜炎は，注射後25日ほどから常に観察され，注射後40日ほどで，マクロファージ，リンパ球が中心となった。なお経過中，肉芽腫性病変内の菌体はAB陽性の莢膜は厚さ1 μm以下と薄く，それに対して，嚢胞様病変では厚さ3 μm以上であった。肉芽腫性病変の中央部に位置する菌体は，莢膜が乏しく，菌体自身のPAS染色性も低下していた。

図11　接種後25日の莢膜保有株による脳内病変
肉芽腫性病変と嚢胞様病変が同時に観察される。（AB-PAS，×100）

図12　接種後25日の莢膜保有株による髄膜脳炎
髄膜腔にリンパ球とマクロファージの著しい浸潤を認め，脳内には肉芽腫性病変がみられる。（HE，×120）

図13　接種後25日の莢膜保有株による髄膜脳炎
抗CD4抗体に陽性のリンパ球が多数髄膜腔に浸潤する。（ABC法，×120）

図14　接種後25日の莢膜保有株による髄膜脳炎
抗CD8抗体に陽性のリンパ球が髄膜腔に散見される。（ABC法，×120）

全経過を通じて，莢膜保有株は，脳実質に病変が形成され，炎症細胞の反応は髄膜より速いが，一旦髄膜炎が形成されると，髄膜腔の方が炎症性細胞反応は著しかった。

免疫組織化学的には，PMNとマクロファージは，脳の組織反応に述べた通りであった。接種後15日ほどで，菌塊を取り巻くようにCD4陽性T細胞が肉芽腫性病変内で増加し，接種後25日程まで増加した。以後，接種後90日まで個体差はあるが持続した。髄膜では，CD4陽性T細胞は接種後10日頃からみられ，髄膜炎の進展に合わせて，数は増加した。髄膜炎を形成するリンパ球の大半は，CD4陽性T細胞であった（図12，13)。これと前後して病変の辺縁部にCD8陽性T細胞が散見され，接種後90日まで観察された（図12，14)。IL2rは肉芽腫性病変では，接種後15日ほどからリンパ球に発現し，以後接種後90日まで持続した。

F 莢膜保有株に対する他臓器のおもな組織反応

1 肺：接種後3日から菌集塊を認め，少数の肉芽腫性病変の形成を認めた。接種後10～20日で嚢胞様病変が最大となり，一部の動物はこの段階で死亡した。以後嚢胞様病変は肉芽腫性病変へと変化し徐々に病変数は減少した。

2 肝：接種後3～5日で菌集塊が出現し，接種後10～15日ですべて肉芽腫性病変となり，同時に病変数も最大となった。以後徐々に吸収された。

3 脾：接種後5～25日間に少数の肉芽腫性病変が観察された。

Ⅳ 考 察

クリプトコックス症の頻度は，深在性真菌症のうち，カンジダ症，アスペルギルス症に次いで，3番目に位置づけられている[12]。*C. neoformans*は，菌体を厚い莢膜が被うことが特徴である[2)3)]。この莢膜は，菌株により様々な厚さがあり，食細胞の貪食に抵抗を示すといわれる[13)-15)]。まれに莢膜欠損株が存在し，莢膜保有株との違いが論議されている[3)10)16)-22)]。

人肺クリプトコックス症の組織学的検索によると，健常人に発症した場合は，異物型の巨細胞を伴った肉芽腫の形成が著明で，一部には乾酪壊死を伴い，遅延型アレルギー反応の関与が推定される例もある[23)24)]。これらの現象には，肉芽腫の形成とともにT細胞による細胞性免疫の関与が考えられ，*in vitro*での細胞性免疫の成立を示唆する報告もある[25)]。近年は，臓器移植患者における免疫抑制状態[7)]，AIDSなどでの本症の発症が増加している。アメリカのAIDS患者の5～10%にクリプトコックス症があり，その85%が，髄膜炎であるという[6)]。

脳におけるクリプトコックス感染病巣は，髄膜炎，髄膜脳炎，cryptococcomaの3種類に分類されている[5)]。マウスを使用した実験的脳クリプトコックス症では，莢膜を有する株は嚢胞様病変を形成し，莢膜欠損株は肉芽腫性病変を形成することが明らかにされている[8)26)]。これらの報告では，脳実質で形成される病変の形態学的な違いに関して検討されており，髄膜に形成される病変に関しては，詳細な記述は乏しい。

*C. neoformans*に対する免疫応答は未だ十分には解明されておらず，感染防御機構における液性免疫の役割にも一定の見解は得られていない[27)28)]。クリプトコックス感染には，細胞性免疫の果たす役割が大きいとの報告が多い[4)25)27)-30)]。過去の*in vivo, in vitro*での研究によると，natural killer細胞[31)]，antigen-induced suppressor T細胞[32)]，活性化マクロファージ[33)]などがクリプトコックス感染の防御に関与していると言われている。またヌードマウスを使用した実験によると[34)]，宿主の*C. neoformans*に対する免疫応答では，初期のT細胞反応が重要であることが明らかにされている。しかし，脳クリプトコックス症におけるリンパ球subsetおよび肉芽腫の形成，髄膜炎に関する検索は行われていない。本実験で使用した2種の株は，髄膜脳炎を形成し，病変の再現性が高く，炎症性細胞浸潤の検討に適していると考えられる。一般的に，クリプトコックスの侵入経路は，経気道的であり，その後血液を介して，脳に病変を作るものと考えられている[4)]。本実験では，血行性脳病変の検索を目的としたため，菌体の静注による経路を選んだ。また本菌を用いた感染実験の多くは，菌の病原性に主眼がおかれたものが多い。ここでは，人クリプトコックス性脳髄膜炎に類似した実験的病変に免疫組織化学的検討を加えて，脳における肉芽腫形成とT細胞のsubsetを明らかにすることとした。

今回の実験で使用した莢膜欠損株では，初期にはPMNとマクロファージの浸潤がみられたが，肉芽腫形成が著明になるとPMNは認められなくなり，肉芽腫は，リンパ球とマクロファージから形成された。免疫組織化学的には，肉芽腫形成期にみられるリンパ球は，病変中央部はCD4陽性T細胞であり，肉芽腫の辺縁部にCD8陽性T細胞が散見された。病変数が減少するにしたがって，マクロファージ，CD4陽性T

細胞も減少した。実験的なマウスの真菌症において，免疫組織化学的な検討が加えられているものにcoccidioidomycosisがある[35]。それによると，coccidioidomycosisでは諸臓器に肉芽腫が形成され，その中心に菌体を取り囲むようにマクロファージとCD4陽性T細胞があり，その周囲にCD8陽性T細胞が散見され，人coccidioidomycosisに見られるものと同様であるとのことである。健常人に発症した，肺クリプトコックス症の組織学的，免疫組織化学的検討によると，肺の肉芽腫では，菌体を取り囲むようにCD4陽性T細胞が散在し，その周囲にCD8陽性T細胞が少数散見され，病変内部のCD4対CD8は約2対1であったという[36]。また，渋谷ら[37]は，マウス肺のクリプトコックス症について免疫組織化学的な検討を加えており，肉芽腫形成の時期では，major histocompatibility (MHC)，class IIであるIa抗原を発現したマクロファージが多く観察され，その間にCD4陽性T細胞が位置したという。MHC class IIに拘束されたCD4，CD8およびマクロファージによる細胞間の相互作用が，肉芽腫の形成と菌体の処理に重要な役割を演じているとしている。マウス肺のクリプトコックス初感染巣では，菌の拡散防止は，CD8陽性T細胞より，CD4陽性T細胞の果たす役割が大きいといわれる[38]。しかし，マウス肺初感染巣における検討によると，CD8陽性T細胞は*C. neoformans*を貪食したマクロファージを溶解し，感染病巣にマクロファージを動員する役割を果たし，CD4陽性T細胞はCD8陽性T細胞よりcytokine分泌が盛んであり，食細胞の活性化を促すことにより*C. neoformans*に対する感染を防御するという[30]。ヌードマウス（nu/nu）の脳のクリプトコックス感染病巣では，BALB/c（nu/+）マウスに比して，髄膜，脳実質ともに炎症性細胞浸潤が乏しく，ヌードマウスでは肉芽腫の形成にいたらなかったとの報告もある[9][39]。一方，nu/nuマウスでは，異物肉芽腫の形成はみられるといわれている[40]。この事実は，脳内のクリプトコックス感染病巣における肉芽腫の形成およびその維持にT細胞が必要であり，本実験結果でみられた肉芽腫性病変の中心にCD4陽性T細胞が位置することは，病変の拡大を防止する意味での脳内肉芽腫形成にT細胞が深くかかわっていると考えられる。

人の肉芽腫を形成する代表的疾患に結核がある。結核性肉芽腫ではしばしば周囲にfibrosisがみられ，病変の修復過程であると考えられている[41]。クリプトコックス症でも肉芽腫周囲の線維化が起きてもよいが，莢膜欠損株は，線維化の形成以前に病変が吸収され，莢膜保有株では，線維化を惹起させるマクロファージなどが嚢胞様病変ではほとんど存在しないため形成されないと考えられる。

MiyajiとNishimura[9]の報告によると，クリプトコックス感染時に，クリプトコックス菌体に対する肉芽腫の形成は病変の拡大を防止する点で重要であり，マウスのクリプトコックス症における病変形成は，組織固定マクロファージの数に依存し，肺，脾，肝のようにマクロファージの多い臓器では肉芽腫性病変が形成され，脳のようにマクロファージの少ない臓器では嚢胞様病変が形成されるという。しかし，本実験で明らかなように，本菌の感染における病変の質は，組織固定マクロファージの数ではなく，菌株，特に莢膜の性格に依存するといえる。

渋谷らは，対象臓器として肺を用い，本実験では，脳を用いたため単純な比較は不可能であるが，浸潤リンパ球のsubsetはほぼ同様である。したがって，脳内病変形成，および感染防御機構に関しては，肺と同様のメカニズムに基づいていると推定される。本実験で使用したマウスはICRマウスであり，現在までにこの系のマウスの，MHC class II抗原を認識する抗体は開発されていないために検討を加えることができなかった。しかし，本実験ではIL2rがリンパ球に発現した。IL2は，T cell growth factorであり，T，B細胞に作用し，T，B細胞の増殖を促進させる[42]。すなわち，肉芽腫内部や，髄膜炎病変部ではT細胞間におけるサイトカインを介したinteractionの存在が考えられる。

莢膜保有株では，初期には肉芽腫性病変が形成され，以後徐々に嚢胞様病変が優位となっていった。莢膜欠損株に比して，個々の肉芽腫は大きいが，浸潤リンパ球のsubsetは莢膜欠損株とほぼ同様であった。莢膜の乏しい株は，非特異的オプソニン化を受けて，PMN，マクロファージに貪食されるとの報告がある[43]。莢膜保有株は，嚢胞様病変形成前には莢膜はやや薄いが，嚢胞様病変が形成される時期になると，厚くなり，これらの病変には炎症性細胞浸潤が乏しくなる。興味のあることに，嚢胞様病変と肉芽腫性病変が混在する時期がみられた。この時期の肉芽腫性病変のリンパ球subsetは，莢膜欠損株の肉芽腫とほぼ同様であった。すなわち，同一の個体で，免疫応答が完成した炎症性細胞浸潤がみられる病変もあれば，同一の

病原体に対して，ほとんど炎症性細胞浸潤がみられない病変も存在することになる。

また，マウスに対する病原性に関して，同じ血清型の株同士でも著しい差があることが知られている[44]。本実験で使用した菌株はいずれも血清型Dの共通抗原性を示す。しかしこれらの株は，*in vivo, in vitro* での莢膜形成能，菌体の大きさで，著しい差を認めた。電顕的に，莢膜保有株は，細胞壁から伸びた電子密度の高い樹枝状構造物を認め[45][46]，莢膜欠損株では，このような構造物はみられなかった。また，脳内病変でもAB染色陽性の莢膜は，莢膜欠損株には観察されなかった。マクロファージの貪食は，莢膜のサイズに反比例するといわれている[47]。莢膜 polysaccharide は，リンパ球の反応を抑制するとの報告もあり[48]-[50]，この莢膜の有無が，組織反応の違いの1つの原因として考えられる。また，他の理由としては，厚い莢膜がマクロファージの貪食に抵抗し，抗原提示細胞としての働きが達成されないとか，菌体の抗原物質が莢膜によって隠されてしまうという仮説がある[13]-[15]。莢膜保有株では，一旦嚢胞様病変が形成されると，大きさ，数を増して，さらに病変同士の融合傾向がみられ，接種後90日では大きいもので700μm ほどのものが認められた。多量のクリプトコックス莢膜 glucuronoxylomannan の存在は宿主のクリプトコックスに対する免疫学的寛容を成立させるとの報告[29]や，クリプトコックス抗原物質は遅延型過敏反応を抑制するといった報告もある[32]。

莢膜欠損株に対する組織反応と，莢膜が薄い時期での莢膜保有株に対する反応はいずれも肉芽腫性病変形成という同一の反応であった。これらの事からクリプトコックスの抗原はおもに細胞壁にあることが推定される。前述の莢膜の性格からすると莢膜が厚くなるにしたがって嚢胞様病変が優位になることは理解しやすい。すなわち，嚢胞様病変が一旦形成され，数が増加し，大型化すると，ますますリンパ球，マクロファージの反応が起きにくくなることが推定される。本実験の莢膜保有株使用時の末期に観察されたような大型の嚢胞様病変が形成されると，宿主の免疫機能だけで排除されるとは考え難く，事実，一度形成された嚢胞様病変は，肉芽腫性病変に転換し得ないとの報告もある[8]。莢膜保有株の病原性の検索では，注射後42日で全動物が死亡した。病原性の検索において投与した菌数は，免疫組織化学的な検討を行った系の2倍量である。

本実験では，莢膜産生能のある株とない株を使用して脳内病変の免疫組織化学的検討を加えた。基本的な炎症性細胞反応は，初期には，非特異的な急性炎症細胞浸潤であるが，徐々にCD4，CD8陽性T細胞およびマクロファージが中心となっていく。莢膜保有株は，生体内での莢膜産生により，宿主の免疫機構から逃れるように増殖し，最終的には，嚢胞様病変の形成に至る。本実験で，脳内クリプトコックス感染病巣における病変形成にT細胞とマクロファージが強く関与していることが明らかとなり，他方莢膜の有無で病変の性格が変わることも明示された。

V 結　　語

C. neoformans による脳の病変がその莢膜の有無によって，いかに異なるかを明らかにする目的で，マウスを用いて実験を行った。すなわち，*C. neoformans* の同じ血清型(D)を有する莢膜欠損株と莢膜保有株をマウスに静注し，形成された脳の病変を経時的に検索して，以下の結論を得た。

1　莢膜欠損株は莢膜保有株に比べて病原性が著しく弱かった。

2　莢膜欠損株は *in vitro* でも *in vivo* でも莢膜を形成しないことが確認された。一方莢膜保有株は *in vitro* でも *in vivo* でも莢膜が形成された。

3　両株とも，マウスに脳髄膜炎を惹起し，病変初期の炎症性細胞反応は，PMNとマクロファージの浸潤であり，やがて肉芽腫が形成され，菌を取り囲むようにマクロファージとCD4陽性T細胞が集まり，その周囲にCD8陽性T細胞が散見された。髄膜炎の構成細胞も肉芽腫構成細胞と同様であった。IL2rはリンパ球に発現した。

4　莢膜欠損株では，この肉芽腫性病変が時間とともに吸収された。それに対して，莢膜保有株では肉芽腫性病変から炎症性細胞反応のない嚢胞様病変へと変化し，その病変数が増加し，かつ大型化した。

5　これらの結果から，*C. neoformans* に対する炎症性細胞反応は，莢膜の有無に関係なく原則として共通であるが，莢膜保有株では，組織内菌増殖に伴って炎症性細胞反応のない特異な嚢胞様病変を形成することが明らかにされた。

本論文の要旨は，第81回日本病理学会総会（1992年5月，仙台），第36回日本医真菌学会総会（1992年10月，福岡），第82回日本病理学会総会（1993年4月，

東京）において発表した。

稿を終えるにあたり，終始懇篤なるご指導ご校閲を賜りました恩師発地雅夫教授に深甚なる謝意を表します。同時に本研究に際し，直接ご指導ご助力下さいました故阿部章彦助教授，伊藤　誠博士，馬場　健博士をはじめとする第2病理学教室の諸先生，ならびに本論文作製にご協力頂いた市川寿恵嬢に深く感謝致します。さらに，標本作製にご協力頂いた羽山正義技官を始めとする技官の皆様方に心から感謝致します。

文　献

1) Emmons CW: Saprophytic source of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon *(Columba livia)*. Am J Hyg 62: 227-232, 1955
2) 稲葉　鋭：クリプトコックス菌体の酵素処理による組織病変の変化について．信州医誌　40：79-96，1992
3) Farhi F, Bulmer GS, Tacker JR: *Cryptococcus neoformans*. IV. The not-so-encapsulated yeast. Infect Immun 1: 526-531, 1970
4) Kozel TR: Cryptococcosis. In: Murphy JW, Friedman H, Bendinelli M (eds), Fungal infections and immune responses, pp 277-302, Plenum Press, New York, 1993
5) Rippon JW: Medical Mycology. 3rd ed, pp 582-609, WA Saunders Co, Philadelphia, 1988
6) Chuck SL, Sande MA: Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 321: 794-799, 1989
7) 長尾　桓，杉本久之，内田久則：臓器移植と真菌症．Jpn J Med Mycol 34：303-309，1993
8) Watabe T, Miyaji M, Nishimura K: Studies on relationship between cysts and granulomas in murine cryptcoccosis. Mycopathologia 86: 113-120, 1984
9) Miyaji M, Nishimura K: Defensive role of granuloma against fungal infections. In: Arai T (ed), Filamentous Microorganisms, pp 263-277, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1985
10) Kozel TR, Cazin JJr: Nonencapsulated variant of *Cryptococcus neoformans*. I. Virulence studies and characterization of soluble polysaccharide. Infect Immun 3: 287-294, 1971
11) 渡辺慶一，中根一穂：酵素抗体法．改訂三版，一巻，pp 49-98，学際企画，東京，1993
12) Hotchi M, Okada M, Nasu T: Present state of fungal infections in autopsy cases in Japan. A statistical survey of all autopsy cases during the ten-year period from 1966-1975. Am J Clin Pathol 74: 410-416, 1980
13) Kozel TR: Non-encapsulated variant of *Cryptococcus neoformans*. II. Surface receptors for cryptococcal polysaccharide and their role in inhibition of phagocytosis by polysaccharide. Infect Immun 16: 99-106, 1977
14) Kozel TR, Gotschlich EC: The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. J Immunol 129: 1675-1680, 1982
15) Bulmer GS, Sans MD: *Cryptococcus neoformans*. III. Inhibition of phagocytosis. J Bacteriol 95: 5-8, 1968
16) Kozel TR, Wilson MA, Welch WH: Kinetic analysis of the amplification phase for activation and binding of C3 to encapsulated and nonencapsulated *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 60: 3122-3127, 1992
17) Wilson MA, Kozel TR: Contribution of antibody in normal human serum to early deposition of C3 onto encapsulated and nonencapsulated *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 60: 754-761, 1992
18) Laxalt KA, Kozel TR: Chemotaxigenesis and activation of the alternative complement pathway by encapsulated and non-encapsulated *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 26: 435-440, 1979
19) Jacobson ES, Ayers DJ, Harrell AC, Nicholas CC: Genetic and phenotypic characterization of capsule mutants of *Cryptococcus neoformans*. J Bacteriol 150: 1292-1296, 1982
20) Kozel TR: Dissociation of a hydrophobic surface from phagocytosis of encapsulated and non-encapsulated *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 39: 1214-1219, 1983

21) Small JM, Mitchell TG : Binding of purified and radioiodinated capsular polysaccharides for *Cryptococcus neoformans* serotype A strains to capsule-free mutants. Infect Immun 54 : 742-750, 1986
22) Richardson MD, White LJ, McKay IC, Shankland GS : Differential binding of acapsulate and encapsulated strains of *Cryptococcus neoformans* to human neutrophils. J Med Veter Mycol 31 : 189-199, 1993
23) Bulmer GS, Sans MD, Gunn CM : *Cryptococcus neoformans*. I. Nonencapsulated mutants. J Bacteriol 94 : 1475-1479, 1967
24) Graybill JR, Alford RH : Cell-mediated immunity in cryptococcosis. Cell Immunol 14 : 12-21, 1974
25) Hoy JF, Murphy WJ, Miller GG : T cell response to soluble cryptococcal antigens after recovery from cryptococcal infection. J Infect Dis 159 : 116-119, 1989
26) Farmer SG, Komorowski RA : Histologic response to capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. Arch Pathol 96 : 383-387, 1973
27) Levitz SM, Farrell TP : Growth inhibition of *Cryptococcus neoformans* by cultured human monocytes : role of the capsule, opsonins, the culture surface, and cytokines. Infect Immun 58 : 1201-1209, 1990
28) Sanford JE, Lupan DM, Schlageter AM, Kozel TR : Passive immunization against *Cryptococcus neoformans* with an isotype-switch family of monoclonal antibodies reactive with cryptococcal polysaccharide. Infect Immun 58 : 1919-1923, 1990
29) Sundstrom JB, Cherniak R : T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of tolerance to glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* serotype A. Infect Immun 61 : 1340-1345, 1993
30) Huffnagle GB, Yates JL, Lipscomb MF : Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4+ and CD8+ T cells. J Exp Med 173 : 793-800, 1991
31) Murphy JW, McDaniel DO : *In vitro* reactivity of natural killer (NK) cells against *Cryptococcus neoformans*. J Immunol : 1577-1583, 1982
32) Murphy JW, Moorhead JW : Regulation of cell-mediated immunity in cryptococcosis. I. Induction of specific afferent T suppressor cells by cryptococcal antigen. J Immunol 128 : 276-283, 1982
33) Gentry LO, Remington JS : Resistance against *Cryptococcus* conferred by intracellular bacteria and protozoa. J Infect Dis 123 : 22-31, 1971
34) Cauley LK, Murphy JW : Response of congenitally athymic (nude) and phenotypically normal mice to *Cryptococcus neoformans* infection. Infect Immun 23 : 644-651, 1979
35) Modlin RL, Segal GP, Hofman FM, Walley MS, Johnson RH, Taylor CR, Rea TH : In situ localization of T lymphocytes in disseminated coccidioidomycosis. J Infect Dis 151 : 314-319, 1985
36) 宮崎英士，津田富康，鬼塚 徹：原発性肺クリプトコッカス症における肺肉芽腫病巣の免疫組織化学的研究．日胸疾会誌 29：444-451，1991
37) 渋谷和俊，若山 恵，直江史郎，内田勝久，山口英世：病原酵母を用いた実験的肺肉芽腫に関する免疫組織化学的研究．炎症 10：361-366，1990
38) Hill JO : CD4+T cells cause multinucleated giant cells to form around *Cryptococcus neoformans* and confine the yeast within the primary site of infection in the respiratory tract. J Exp Med 175 : 1685-1695, 1992
39) Salkowski CA, Balish E : Cryptococcosis in beige mice : the effect of congenital defects in innate immunity on susceptibility. Can J Microbiol 37 : 128-135, 1991
40) 小林和夫，吉田 彪：肉芽腫炎症の発症および制御機序．炎症 11：421-427，1991
41) Turk JL : Granulomatous diseases. In : McGee JO'D, Isaacson PG, Wright NA (eds), Oxford textbook of pathology, pp 394-401, Oxford University Press, Oxford, 1992
42) Loughnan MS, Takatsu K, Harada N, Nossal G : T-cell-replacing factor (interleukin-5) induces expression of interleukin 2 receptors on murine splenic B cells. Proc Natl Acad Sci USA 84, 5399-5403, 1987

43) Diamond RD, May JE, Kane M, Frank MM, Bennett JE: The role of late complement components and the alternate complement pathway in experimental cryptococcosis. Proc Soc Exp Biol Med 144: 312-315, 1973

44) Kagaya K, Yamada T, Miyakawa Y, Fukazawa Y, Saito S: Characterization of pathogenic constituents of *Cryptococcus neoformans* strains. Microbiol Immunol 29: 517-532, 1985

45) Edwards MR, Gordon MA, Lapa EW, Ghiorse WC: Micromorphology of *Cryptococcus neoformans*. J Bacteriol 94: 766-777, 1967

46) Harding SA, Scheld WM, Feldman PS, Sande MA: Case report. Pulmonary infection with capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 382: 113-118, 1979

47) Mitchell TG, Friedman L: In vitro phagocytosis and intracellular fate of variously encapsulated strains of *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 5: 491-498, 1972

48) Breen JF, Lee IC, Vogel FR, Friedman H: Cryptococcal capsular polysaccharide-induced modulation of murine immune responses. Infect Immun 36: 47-51, 1982

49) Lee I, Vogel F, Breen J, Friedman H: Altered responsiveness of murine lymphoid cells treated with cryptococcal capsular polysaccharide (41370). Proc Soc Exp Biol Med 169: 427-431, 1982

50) Murphy JW, Cozad GC: Immunological unresponsiveness induced by cryptococcal capsular polysaccharide assayed by the hemolytic plaque technique. Infect Immun 5: 896-901, 1972

(5. 10. 4 受稿)