

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

稲葉 鋭

信州大学医学部第2病理学教室

(主任: 発地 雅夫教授)

Changes in Tissue Responses Against *Cryptococcus neoformans* Treated with Enzyme

Hayashi INABA

Department of Pathology, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Masao HOTCHI)

Tissue responses against *Cryptococcus neoformans* have been considered to depend on its capsular substances. In this paper, the influence of the capsular substances in tissue responses was investigated. A strain of *C. neoformans* S. Goki producing a thick capsule was treated with enzymes at an optimum condition to dissolve the capsule. After the treatment, the organisms were washed with sterile physiological saline, then the cell suspension was intra-tracheally inoculated into mice. The pulmonary lesions were examined with light and electron microscopes. In the animals inoculated with the treated cells, granulomatous lesions formed in the lungs 1 day after inoculation and the lesions became into cystoid 9 days after inoculation. On the other hand, in the animals inoculated with the untreated cells, granulomatous lesions formed in the lungs 1 day after inoculation, and the lesion became cystoid 5 to 7 days after inoculation. In any case, cystoid lesions formed in both groups. As a result, it is suggested that the enzymatic treatment of *C. neoformans* may produce a time lag in the tissue responses in the lung. *Shinshu Med. J.*, 40: 79-96, 1992

(Received for publication October 3, 1991)

Key words: *Cryptococcus neoformans*, enzyme treatment, cystoid lesion, granulomatous lesion
クリプトコックス症, 酵素処理, 嚢胞様病変, 肉芽腫性病変

I 緒 言

Cryptococcus neoformans は広く自然界に分布する真菌で, 特にハトの糞便中に多く存在する¹⁾ことが確認されている。通常酵母形で発育し, 菌体の直径は4~20 μ mで, 酸性ムコ多糖からなる5~10 μ mの厚さの莢膜を有する。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, おもに肺を初感染巣として急性および慢性の病変を形成する²⁾。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³⁾。ヒトの感染では, 年齢, 性別, 人種, 職業間に差異はない。*C. neoformans* は日光により容易に殺菌され, 正常健康人にはほとんど感染することはない, また感染しても通常は容易に治癒するが, まれに孤立性の肺病変を作ることがある⁴⁾。しかし, 何らかの重篤な疾患が背景にある患者の場合, クリプトコックス症は, 生命予後に重大な影響を及ぼし, アムフォテリシン B が開発される以前は, その致死率は80から90%にも達していた⁵⁾。

したがって、クリプトコックス症は日和見感染症のひとつとして理解され、抗生物質や副腎皮質ホルモン剤の多用、悪性腫瘍⁹⁾およびその治療のため使用する各種の抗腫瘍剤や免疫抑制剤、あるいは、様々な疾患の末期状態などに合併する深在性真菌症としてはカンジダ症、アスペルギルス症に次ぐものである¹⁰⁾。さらに最近では後天性免疫不全症候群 (AIDS)¹¹⁻¹²⁾や臓器移植に際しての免疫抑制状態における合併症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については十分に解明されていない。菌体の産出する莢膜多糖体成分は、マンノース、キシロース、グルクロン酸からなる骨格を持ち、5種類の血清型はこれらのモル比とO-アセチル化の比率の違いを示す。この多糖体が最も重要な抗原物質のひとつとして着目されてきた¹³⁾。莢膜の厚さは菌株によって異なり、また莢膜の厚さが病原性とは必ずしも相関しないことがわかってきた¹⁴⁾¹⁵⁾。しかし、厚い莢膜は好中球や貪食細胞による食作用に抵抗性で、菌体の病原性に關与していることは事実である。感染病巣も嚢胞様病変や肉芽腫性病変などと多様で、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¹⁶⁾。しかし、嚢胞様病変を形成する株でも、感染初期に肉芽腫性病変を形成することがある。そこで、著者は酵素によって厚い莢膜を剝離することにより、細胞壁を露出させ、そのような菌体が生体内でどのような病変を形成するかを検討した。

II 材料と方法

A 材 料

- 1 実験動物：5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。
- 2 使用菌株：Sabouraud寒天斜面培地（日本製薬）にて継代培養した *Cryptococcus neoformans*（血清A型）S. Goki株を使用した。この株は信州大学において、1979年に白血病患者剖検例（S-3952）から分離された。37°Cで増殖能があり、urease試験およびphenol oxidase試験陽性であることが確認されている。

B 方 法

- 1 菌液の調製：S. Goki株をSabouraud寒天平板培地にて、30°Cで約3日間培養し、滅菌生理食塩水（滅

菌生食水）で2回洗浄後、2,000回転・5分間遠沈して集菌した。滅菌生食水で 5×10^8 /mlの生菌浮遊液を調製した。

2 酵素液の調製

- a Lysing enzymes¹⁷⁾ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) in E buffer (50mM sodium citrate, 100mM sodium phosphate buffer, pH 6.0) 2.5mg/ml solution.
- b Zymolyase-100T (Kirin Brewery Co., Tokyo) in 0.07M phosphate buffer (pH 7.5) 0.012~0.024 mg/ml solution.
- c Lyticase in 0.07M phosphate buffer (pH 7.5) 0.43mg/ml solution.
- d Chymotrypsin (Worthington Biochemical Co., Freehold, New Jersey, USA) in 0.01M phosphate buffer (pH 8.0) 10.1mg/ml solution.
- e α -mannosidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) in 0.04M acetate buffer (pH 4.5) 8.3mg/ml solution.
- f Papain (Elastin Product Co., Owensville, MO, USA) in 0.01M phosphate buffer (pH 8.0) 3.2 μ l/ml solution.
- g β -N-acetylglucosaminidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) in 0.1M citrate buffer (pH 5.5) 23.1 μ l/ml solution.

3 菌体の酵素処理

各種酵素による菌体処理については様々な条件によって予備的に行った結果、以下の方法が最も良い効果を上げた。

a Lysing enzymes:

- (1) 菌液1.0mlを遠沈（2,000回転・5分間）して上清を捨てる。
- (2) 緩衝液（E buffer）で2回洗浄、遠沈（2,000回転・5分間）する。
- (3) Lysing enzymesの酵素液をミリポアフィルター（マイレクスGS0.22 μ m, 日本ミリポア工業）を通過させた後に菌体と混合する。
- (4) 37°C, 20分間、恒温槽内で60回/分で振盪させる。
- (5) 滅菌生食水で2回洗浄し、遠沈（2,000回転・5分間）する。
- (6) 最終的に滅菌生食水中で 5×10^8 /mlに調製して接種液とした。

b Zymolyase-100T, lyticase, chymotrypsin, α -

mannosidase, papain, β -N-acetylglucosaminidase:

- (1) 菌液7.5mlを遠沈(2,000回転・5分間)して上清を捨てる。
- (2) 各酵素に対応した緩衝液で2回洗浄, 遠沈(2,000回転・5分間)する。
- (3) 各酵素液をミリポアフィルター(マイレクスGS0.22 μ m, 日本ミリポア工業)を通過させた後に菌体と混合する。
- (4) 37°C, 60分間, 恒温槽内で60回/分で振盪させる。
- (5) 滅菌生食水で2回洗浄し, 遠沈(2,000回転・5分間)する。
- (6) 最終的に滅菌生食水中で 5×10^8 /mlに調製して接種液とした。

4 菌の接種

a マウスをエーテル麻酔後, 頸部皮膚を切開し気管を露出させ27Gの注射針を使用して各接種液を0.05ml気管内から緩徐に接種し, 接種後皮膚を直ちに縫合した。

b マウスの尾静脈から各接種液を0.1ml接種した。

5 病理組織学的検索: 接種後, 直後, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 15, 17, 21, 30日まで経時的に6匹ずつ屠殺し, 4%リン酸緩衝パラホルムアルデヒド液で右心室から灌流固定し, 肺は気管から注入固定し, 取り出した臓器は4%リン酸緩衝パラホルムアルデヒド液中で24時間固定した。パラフィン切片を作成し, hematoxylin-eosin (H.E.) 染色およびalcian blue (pH 2.5) - periodic acid Schiff (AB-PAS) 染色を行った。また, パラフィン切片を用いて酵素抗体間接法(*C. neoformans* CDC551株, 血清A型を感作原として家兎に免疫し, 抗体価が沈降反応で64倍以上の血清を分離し一次抗体として使用し, 二次抗体はDAKO社のhorseradish peroxidase 標識抗ウサギ抗体を使用)を行った¹⁸⁾。

6 菌体の観察: 酵素処理を行わない菌体と, 行った菌体を経時的に, 墨汁染色を行い光顕的に観察した。また, 2%カコジル酸緩衝(0.1M, pH 7.2)グルタルアルデヒド液にて2時間前固定し, 同緩衝液で洗浄した後1%カコジル酸緩衝(0.1M, pH 7.2)四酸化オスミウムで後固定した。型どおり脱水し, 低粘性エポキシ樹脂(スパー)に包埋し, 約0.1 μ mの超薄切片を作成し1%酢酸ウラニウム, 4%クエン酸鉛で重染色した後, 透過型電子顕微鏡(日立HS-9)にて観察した。

7 莢膜多糖体の分離精製¹⁹⁾⁻²¹⁾

a 培地と培養: glucose 40g/l, urea 1.29g/l, KH₂PO₄ 1.36g/l, MgSO₄·7H₂O 0.3g/l, yeast extract (Difco Lab., Detroit, MI, USA) 0.2g/l, thiamine·HCl 2×10^{-3} g/lを脱イオン水に溶解してpH 7.0とした。この培地に*C. neoformans* S. Goki株をSabouraud寒天平板培地にて, 30°Cで約3日間培養したものを植え, 約4日間, 35°C, 150回転/分にて振盪培養した。その後, Na ethylmercuri-thiosalicylate 0.01% W/Vを加え, 冷所にて24時間静置した。

b 莢膜多糖体の分離: 上記の振盪培養液を10,000回転/分にて20分間遠沈し, その上清を48時間脱イオン水にて透析し, 2倍量の純エタノールを加えた。10,000回転/分にて30分間遠沈し, 沈殿物を脱イオン水に溶解し, 再び48時間脱イオン水にて透析し, 2倍量の純エタノールを加えた。この操作を2, 3回繰り返した後, 沈殿物を脱イオン水に溶解し, 凍結乾燥して, 白色の綿状物として莢膜多糖体を精製した。

c 莢膜多糖体の調製: 凍結乾燥した莢膜多糖体を滅菌したリン酸緩衝食塩水(PBS)に溶解し, 糖濃度を2.0mg/mlに調製した。

8 莢膜多糖体の好中球遊走能への影響

a マウス好中球の分離²²⁾: マウスをエーテル麻酔後, 背部皮膚を切開し, 皮膚と皮下組織を剝離して囊状にした後, 滅菌したPBSを浸透させた1.0cm角の止血用ゼラチンスポンジ(スポンゼル, 山之内製薬)を4~5個同囊状部に留置し, 皮膚を縫合した。6時間後に, マウスをエーテル麻酔した後脱血し, 無菌的にゼラチンスポンジを回収し, 滅菌PBS中にて揉むようにして洗浄した。スポンジを絞った後除去し, 絞られた液を700回転5分間遠沈し, 沈渣に再びPBSを加え, 得られた好中球を 1×10^6 個/mlと 1×10^7 個/mlに調製した。

b Boyden chamber法²³⁾²⁴⁾: 滅菌したBoyden chamber(三基科学工芸)の下室には糖濃度2.0mg/ml; 1.0mg/ml; 0.2mg/mlの各莢膜多糖体PBS溶解液を入れ, コントロールにはPBSのみを入れた。上室には 1×10^4 個/mlから 1×10^7 個/mlまで各段階の濃度に調製した好中球を入れた。上室と下室は3 μ m孔の開いたポリカーボネートフィルターによって接している。45分間37°Cに保持した後, フィルターを取り出してPBSにて洗浄し, Giemsa染色を行った。400倍視野にて5視野の細胞数を数え, triplicateの平均値を算出しchemotactic index(CI)とした。

なお、莢膜多糖体 PBS 溶液は、高濃度では溶液自体の粘性が増し、好中球の移動の障害となる可能性があり、2.0mg/ml 以下の濃度で実験を行った。

9 肺 1 g 当たりの生菌数の測定：経時的に屠殺したマウスの肺を約0.1g無菌的に摘出して、滅菌生食水 5 ml を加えて硝子ホモジナイザーで粉碎し、その0.1ml ずつを 6 枚の Sabouraud 寒天平板培地で、30°C、約 3 日間培養した後、コロニー数を測定した。

10 酵素処理による菌の発育能の評価：酵素処理した菌と無処理の菌をそれぞれ 5×10^8 /ml の生菌浮遊液とし、その0.3ml ずつを 3 枚の Sabouraud 寒天平板培地にて30°Cで約 4 日間培養し、形成された集落の数と菌数を血球計算盤で経時的に測定した。

III 結 果

菌体の酵素処理によって、莢膜は溶解するものとしてないものがあつた。特に lysing enzymes は菌体の莢膜成分を溶解して細胞壁を露出させ、酵素の濃度が 2.5mg/ml 以上で30分以上作用させると、細胞壁も破壊して菌体を死滅させることがわかつた。また zymolyase-100T と lyticase は莢膜を菲薄化するには効果的であつたが、細胞壁を完全に露出させるには至らなかつた。他の酵素はほとんど効果はなく、作用させる濃度を高くすると、莢膜が菲薄化する前に溶菌して死滅した。以下は最も莢膜を菲薄化するのに有効であつた lysing enzymes による酵素処理の結果を示す。

1 酵素処理による菌の発育能

酵素処理をしない菌は、Sabouraud 寒天平板培地上で徐々に発育し、3 日目で約2.7倍の菌数となつた。Lysing enzymes にて処理した菌は、培地上でやはり徐々に発育し、3 日目で約 2 倍の菌数となつた (Fig. 1)。

2 菌体の酵素処理による変化

a 光頭的観察：

墨汁染色では、酵素処理をしない菌体は直径約 5 μ m で、莢膜は 5 μ m 前後であつた (Fig. 2a)。酵素処理により、菌体の直径は 5 μ m 前後であつたが、莢膜は菲薄化して 1 μ m 以下となり周辺には溶解して脱落した莢膜成分が認められた。酵素処理後 1 日目では、まだはっきりした莢膜は認められなかつたが (Fig. 2b)、3 日目には直径は7.5 μ m 前後で、莢膜は 5 μ m 前後となつた (Fig. 2c)。

b 電頭的観察：

超微形態学的には、酵素処理をしない菌体は直径

4.5~5.0 μ m で、300nm 前後のやや電子密度の高い莢膜を有し、その内側に70nm の電子密度の低い透明な層があり、これに接して200nm 前後の細胞壁があつた。核は1.8 μ m 前後で大小様々な液胞があり、細胞小器官は莢膜の存在により固定液が充分浸透しなかつたため、構造が不明瞭であつた (Fig. 3a)。酵素処理によって細胞壁の露出した菌体は、直径4.5 μ m 前後で約 50~100nm の細胞壁を有し、1.5 μ m 前後の核やミトコンドリア、0.7 μ m 前後の液胞、50nm 前後の電子密度の高いグリコーゲン顆粒が認められた (Fig. 3b)。

1 日目では細胞壁は約60nm でその外側に約60nm の透明層があり、この透明層から高さが80~160nm の莢膜成分が炎状に吹き出していた (Fig. 4)。2 日目では炎状の莢膜成分が癒合し始め (Fig. 5a)、3 日目では全周性に莢膜が癒合再生され、210nm 前後の細胞壁と70nm の透明層、その外側に210nm 前後の莢膜がみられ、酵素処理前と同様となつた (Fig. 5b)。すなわち、莢膜はほぼ 3 日で再生した。3 日目以降、菌は出芽する像が多数みられた。

3 肺 1 g 当たりの組織内生菌数

酵素処理をしない菌 (コントロール) は組織内では 5 日目まで減少を続け、以後急速に増加した。Lysing enzymes にて処理した菌は、3 日目までに著明に減少し、5 日目以降増加した (Fig. 6)。

4 病理組織学的変化

a 気管内接種：

酵素処理をしなかつた菌を接種した群 (コントロール群) では、接種後 1 日目で肺に0.5~1.5mm までの充実性の病巣を形成し、組織学的には菌体の直径は 5 μ m 前後で、莢膜の厚さは 5 μ m 前後であつた。好中球とマクロファージの浸出を中心とした小化膿性病変や小肉芽腫性病変が、肺胞囊領域を中心に菌体の周辺に形成された (Fig. 7a)。2 日目はほぼ同様の病巣で、3 日目には一部の菌が出芽し始め、肺胞中隔を巻き込んだ肉芽腫性病変を形成し、肉芽腫性病変から菌体の一部肺胞内へ遊離し、莢膜成分の産生も豊富で、周囲の好中球浸出が減少した (Fig. 7b)。5 日目では肺全葉に 1~2 mm の病巣を形成し、菌体の直径は10 μ m 前後となり、莢膜の厚さも7.5 μ m に達した。隣接する病変が癒合しはじめ、肉芽腫性病変から囊胞様病変へ移行し、やがて囊胞様病変主体の病巣へと変化し始めた (Fig. 7c)。7 日目から15日目では囊胞様病変が主体で、肺胞内に厚い莢膜を持つ菌体が著しく増加し、周囲にはほとんど炎症性細胞浸潤がみられなくなり、

細胞浸潤があっても菌体の周辺からやや離れた部位にみられた (Fig. 7d)。17日目頃から広く肺野に広がった囊胞様病変と周辺に新たに気管支肺炎が起こり、好中球やマクロファージの出現がみられ、マウスは死亡し始めた。21日目には病巣が拡大してほとんどのマウスが死亡した。この際、死亡時まで菌体は血中には移行せず、他の臓器には播種性の病巣を形成しなかった。

Lysing enzymes 処理群では、接種直後、菌体の直径は5 μm 前後であったが、莢膜はごく薄く、ほとんど好中球の出現をみなかった (Fig. 8a)。1日目の病巣は、コントロール群とほぼ同様で、肺胞囊領域に小化膿性病変や小肉芽腫性病変が形成され、多くの菌体はマクロファージに貪食されており、その細胞質は泡沫状にみえた。3日目まではほぼ同様の変化がみられ (Fig. 8b)、病巣内の菌体数はほとんど増加しなかった。接種後5日目では菌体の直径は7.5 μm 、莢膜の厚さは5 μm 前後となり、出芽している菌が出現し始めたが、病巣は肉芽腫性病変のまま、マクロファージが多数散見される (Fig. 8c)。7日目では出芽している菌体がさらに増加し、病巣内の菌体数が著明に増加し、肉芽腫性病変から囊胞様病変が主体となった (Fig. 8d)。9日目以降は囊胞様病変が主体であった (Fig. 8e)。

Zymolyase および lyticase 処理群では、接種後1日目では、菌体の直径は5 μm 前後とコントロールとほぼ同様であったが、莢膜は薄く、約1 μm 程度で、病巣は小肉芽腫性病変であった。3日目では菌体の直径は7.5 μm 、莢膜の厚さは5 μm 前後となったが、病巣は肉芽腫性病変のまま、囊胞様病変が主体となるのは9日目以降であった。

なお、chymotrypsin, α -mannosidase, papain, β -N-acetylglucosaminidase 処理群では、1日目に莢膜の明らかな菲薄化はみられず、菌体の直径も5 μm 前後で、コントロールからやや遅れるが7日目以降は囊胞様病変が主体となった。

b 静脈内接種:

コントロール群は、3日目に、主として脳に炎症性細胞浸潤を伴わない小囊胞様病変を毛細血管周囲の実質内に形成した。肝臓の類洞内には好中球の浸潤を主体とした小肉芽腫性病変を形成した。5日目以降、脳の囊胞様病変は増大し、10日目には肝臓の肉芽腫性病変も囊胞様病変へと変化した。20日目には、脳の病変は著しく進行し、マウスは運動失調の状態となりほとんどが死亡した。

Lysing enzymes 処理群では、5日目に明らかな小囊胞様病変を脳に形成した。肝臓には菌体成分を認めただが、炎症性細胞反応はなかった。

5 莢膜多糖体の好中球遊走能への影響

Chamber の上室にいいれる好中球のPBS浮遊液の濃度を一定にし (1×10^6 個/ml), 下室にコントロールとしてPBSのみをいれると、好中球は一部フィルターの膜孔を通過した ($CI=2.4 \pm 0.2$, $CI=\text{mean} \pm \text{SD}$)。莢膜多糖体0.2mg/mlを下室にいれると好中球は膜孔を通過 ($CI=1.6 \pm 0.2$) したが、濃度を増やし2.0mg/mlとしたとき、移動する好中球の数は減少 ($CI=1.0 \pm 0.2$) した (Fig. 9a)。またchamberの下室の莢膜多糖体の濃度を一定にし (1.0mg/ml), 上室にいいれる好中球の濃度を変化させると、 1×10^4 個/mlでは膜孔を通過する細胞数は少なく ($CI=0.2$), 濃度の増加とともに、移動する細胞数も増加し 2×10^6 個/mlでは $CI=1.8 \pm 0.2$ となった (Fig. 9b)。

IV 考 察

C. neoformans の形成する病変は、組織学的に肉芽

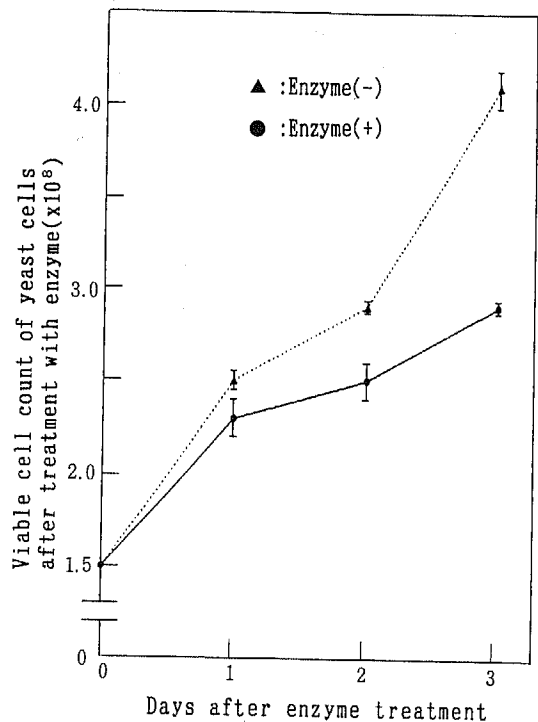


Fig. 1 Comparison of viability of yeast cell with or without enzymatic treatment.

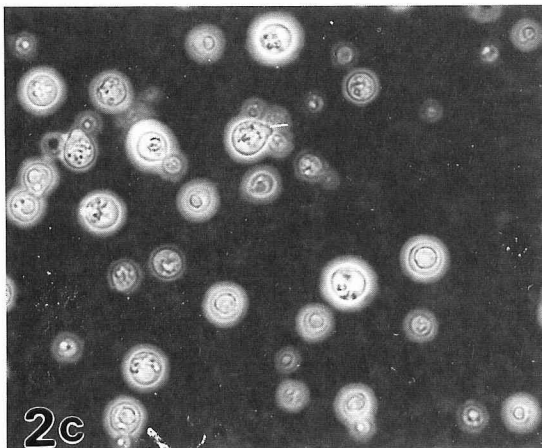
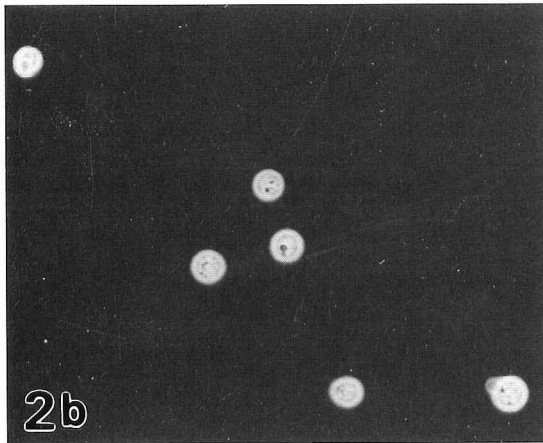
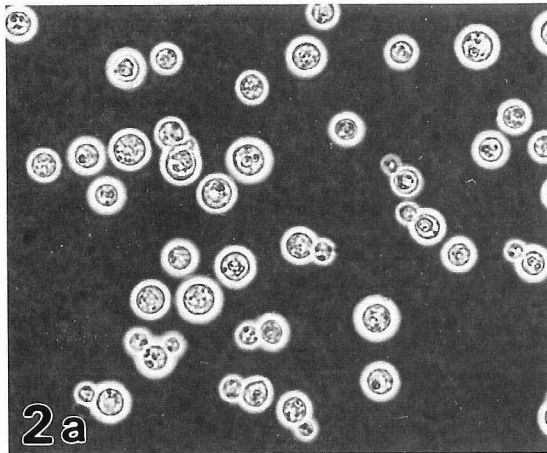
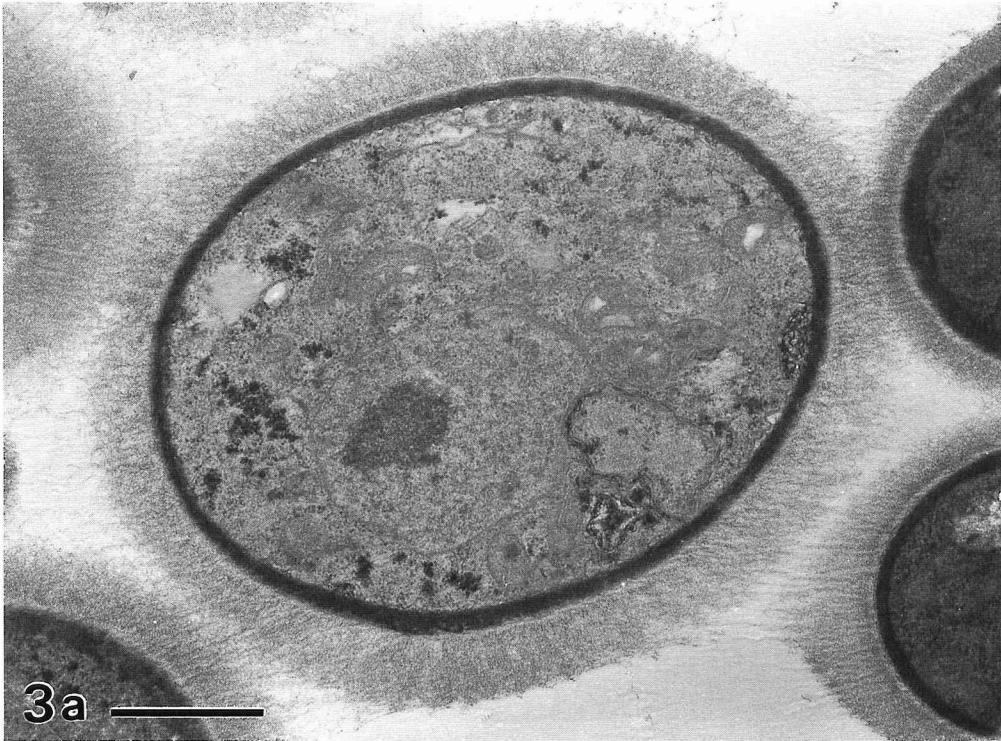
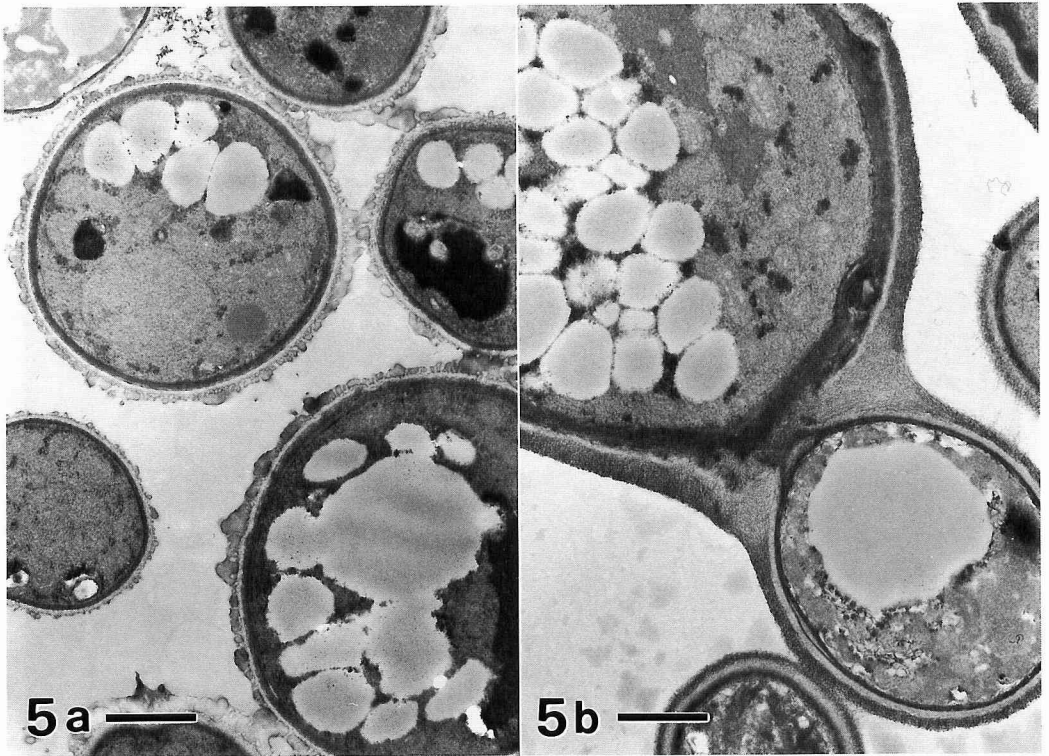
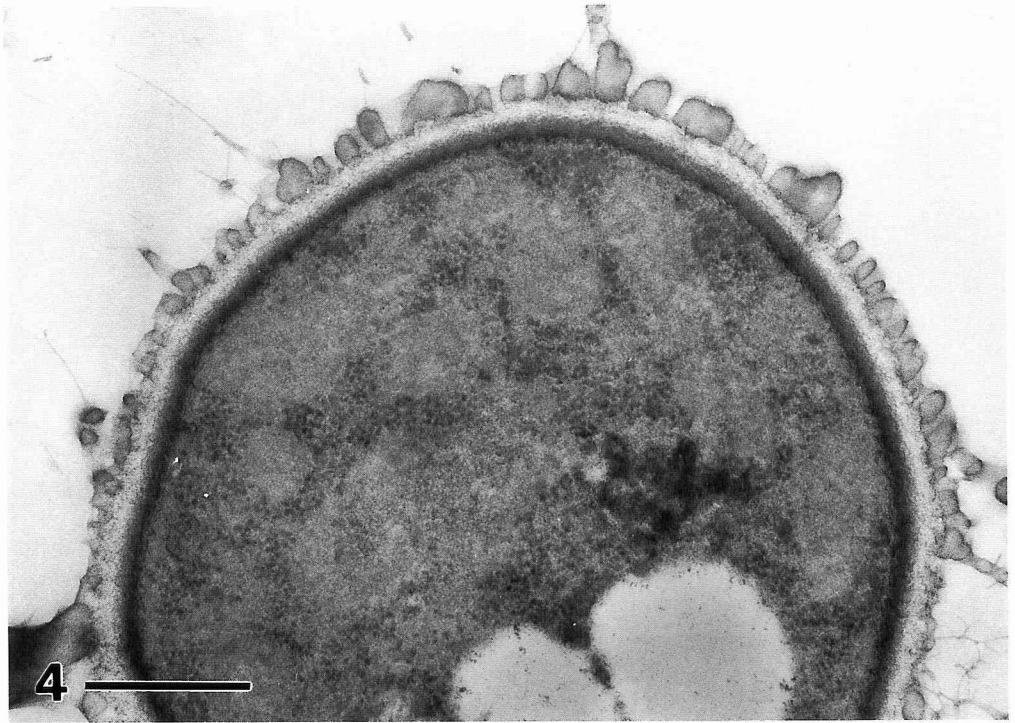


Fig. 2 *C. neoformans* SG strain,
a) 3 days culture without enzymatic treatment,
b) 1 day after enzymatic treatment,
c) 3 days after enzymatic treatment.
India ink method, $\times 132$

Fig. 3 Electron microscopic findings of yeast cells,
a) with thick capsule, before enzymatic treatment,
b) dissolved the thick capsule by lysing enzymes.
Bars indicate $1 \mu\text{m}$.





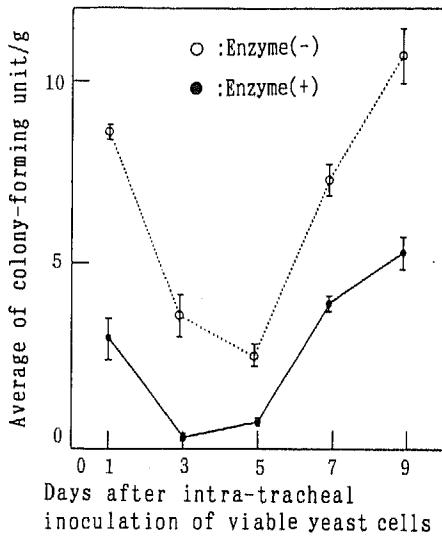


Fig. 6 Average of colony-forming unit.

腫性病変と嚢胞様病変が主体であり、感染組織や菌の莢膜の厚さによって病変が異なることが知られている。莢膜を有する親株から発生した莢膜のない突然変異株では肉芽腫性病変を形成するが、親株は嚢胞様病変を形成する²⁵⁾。嚢胞様病変は、菌の増殖速度が早く、莢膜形成能が高い菌株に多くみられる²⁶⁾。これらのことから莢膜の薄い株や莢膜を持たない株は肉芽腫性病変を主として形成し、一方莢膜の厚い株は組織反応の少ない嚢胞様病変を形成すると考えられてきた。

しかし、詳細に感染組織を観察すると、このような単純な型分け¹⁶⁾²⁷⁾に加えて多様な組織像が認められる²⁸⁾。この病変形成に大きな影響を与える要因は、主として原因となる菌株が有する生物学的特徴である。クリプトコックス症における病変形成の解析のために多くの実験モデルが作られ、異なる菌株間の比較や²⁹⁾³⁰⁾、同一株内での突然変異株との比較²⁵⁾などが今までに報告されてきた。しかし、人工的に一時的に莢膜のない状態にした菌体を用いた報告はない。そこで、

著者は、人工的に莢膜を剥離した状態の生菌を作り、それがどのように回復するか、また、そのような菌による感染巣がいかなる組織学的変化をするかを検討した。

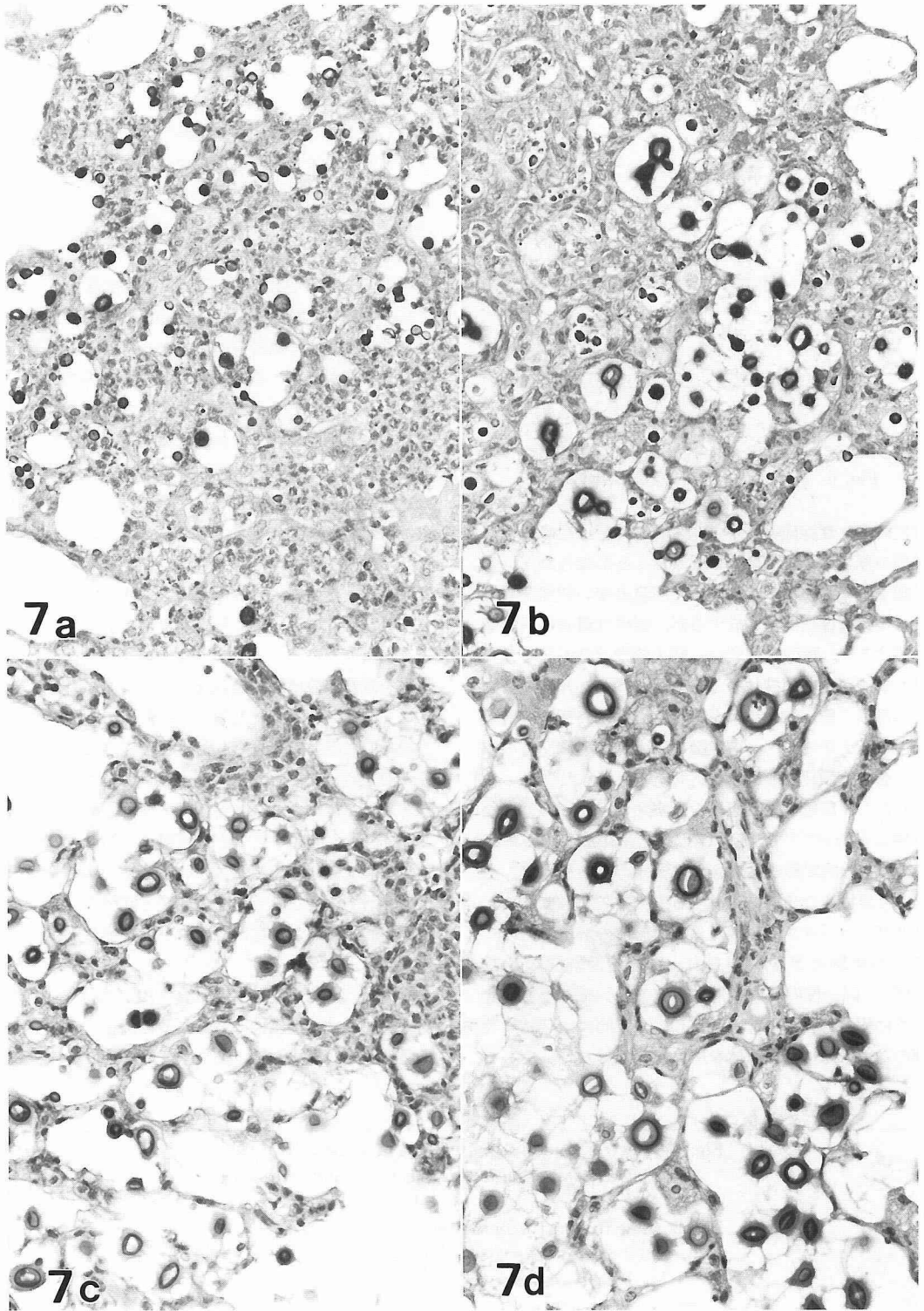
肺に侵入した菌体は、非特異的の反応として肺胞マクロファージによる貪食作用を受ける。莢膜の存在により一部の貪食細胞に認識されない菌体は、alternate pathway を介して活性化された補体によるオプソニン化³¹⁾によって好中球や単球系細胞が認識し貪食する^{32)–36)}。菌体の生食浮遊液を気管内接種することにより引き起こる初期の反応は、非特異的組織反応であり、滅菌生食水を気管内に接種するだけでも気管内の細菌や異物が肺胞へ流入して同様の非特異的の反応が惹起される。しかし、これらの気管内の常在細菌や異物は容易に肺胞から除去され、炎症反応が遷延化しない。このことは、高濃度の lysing enzymes で死菌となった菌体成分を気管内に接種した際にはほぼ1日目で肺胞内から除去されてしまうことから確認された。

この感染初期のマクロファージや好中球による貪食反応は、菌全体の大きさや莢膜の厚さなどにより大きく影響を受ける³⁷⁾。特に莢膜を持たない突然変異株は容易にマクロファージに貪食される³⁸⁾³⁹⁾。コントロール群を気管内接種した場合、3日目までの時期にマクロファージに貪食された菌体が多数認められたが、一方組織内に厚い莢膜を有したまま貪食されない菌体成分も散見された。Lysing enzymes 処理をした菌体はほとんどが貪食され、3日目頃までは組織内で遊離した菌体成分を確認することが困難であった。これは、莢膜無形成株が感染組織において確認が困難で、そのため診断困難となるという報告⁴⁰⁾と同様の所見である。組織学的所見は、急性炎症像や小肉芽腫性病変であった。

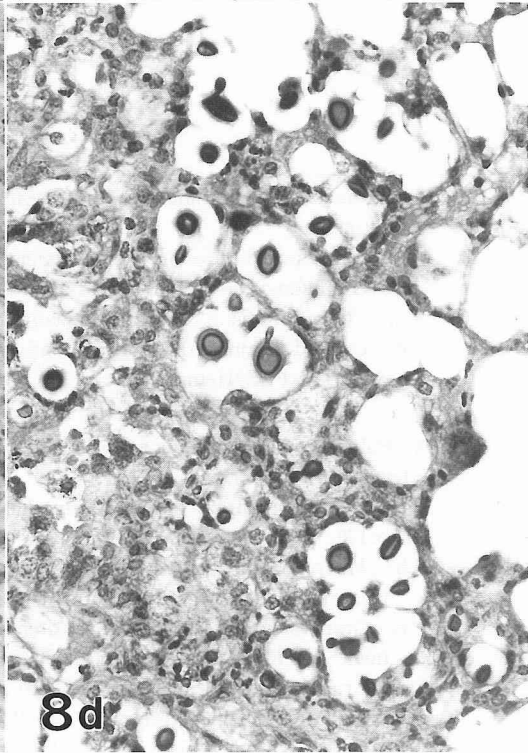
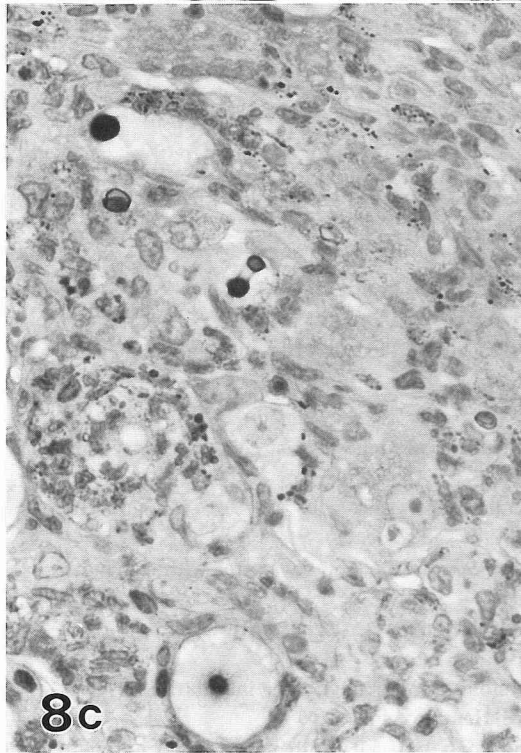
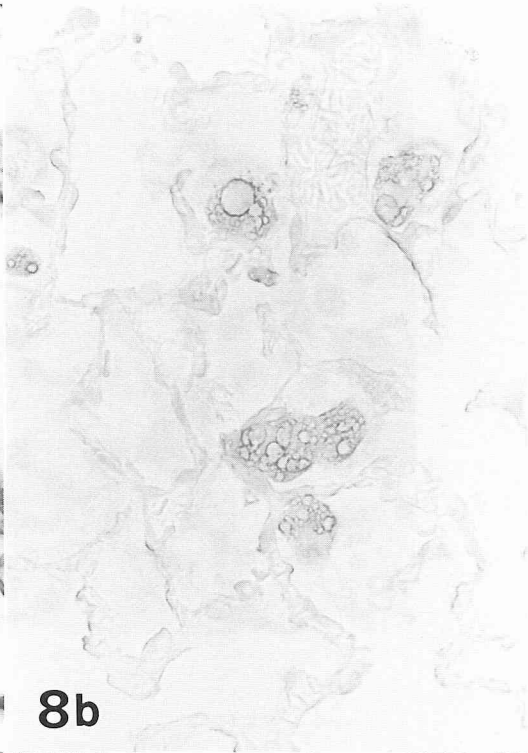
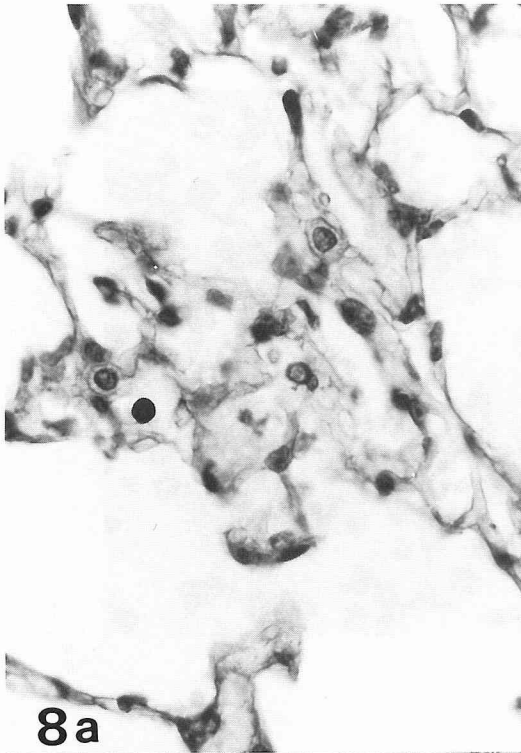
オプソニン化を受けても貪食作用に抵抗性の株³⁵⁾や、物理的に貪食に抵抗性である大型の菌体や、莢膜が厚い菌体³¹⁾³³⁾³⁷⁾は組織内で成長を続ける。また、マクロ

Fig. 4 Electron microscopic findings of yeast cells, 1 day after enzymatic treatment. Bar indicates 0.5 μ m.

Fig. 5 Electron microscopic findings of yeast cells, a) 2 days after enzymatic treatment, b) 3 days after enzymatic treatment. Bars indicate 1 μ m.



クリプトコックス菌体の酵素処理



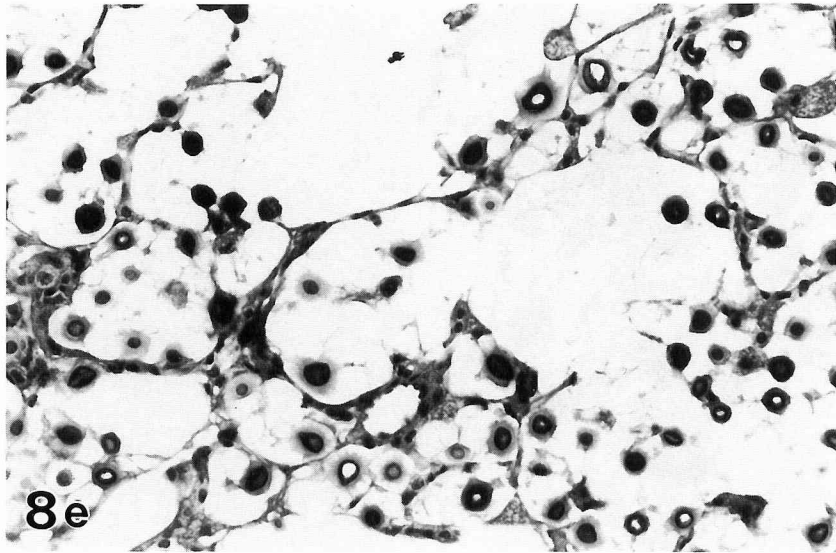


Fig. 7 Pulmonary lesions induced by intra-tracheal inoculation of yeast cells without enzymatic treatment.

- a) Acute purulent lesion, 1 day after inoculation of yeast cells.
- b) Granulomatous lesion, 3 days after inoculation of yeast cells.
- c) Cystoid lesion, 5 days after inoculation of yeast cells.
- d) Cystoid lesion without inflammatory responses, 15 days after inoculation of yeast cells. AB-PAS-Hematoxylin, $\times 100$

Fig. 8 Pulmonary lesions induced by intra-tracheal inoculation of yeast cells with enzymatic treatment.

- a) No inflammatory reaction, after inoculation of yeast cells. AB-PAS-Hematoxylin, $\times 100$
- b) Macrophages positive for anti-*C. neoformans* antibody, 3 days after with enzymatic treatment.
- c) Granulomatous lesion, 5 days after inoculation of yeast cells with enzymatic treatment. AB-PAS-Hematoxylin, $\times 100$
- d) Granulomatous lesion changed into cystoid lesion, 7 days after inoculation of yeast cells with enzymatic treatment. AB-PAS-Hematoxylin, $\times 100$
- e) Cystoid lesion, 9 days after inoculation of yeast cells with enzymatic treatment. AB-PAS-Hematoxylin, $\times 100$

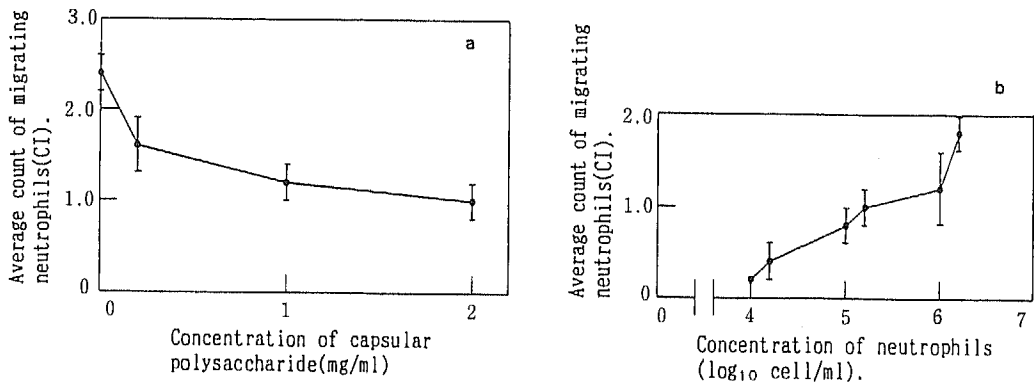


Fig. 9 Average count of migrating pMNs,
 a) upper chamber containing neutrophils, concentration = 1×10^6 cell/ml.
 b) lower chamber containing capsular polysaccharide, concentration = 1mg/ml.

ファージや好中球に貪食された菌体は、細胞内で活性酸素・リゾチーム・塩基性蛋白などの作用によって殺菌されるが、好中球は寿命が短く、菌体を充分処理できないうちに好中球自体が変性や壊死に陥り、菌体の存続を許してしまう可能性がある。殺菌作用に抵抗した菌体は、寿命の長いマクロファージの場合細胞内で生存を続ける。このようにして、貪食作用・殺菌作用に抵抗性のある菌株は初期の段階で宿主の防御機構を容易にくぐり抜ける。

コントロール群の生菌を接種した動物には、マクロファージや好中球による肺胞内清掃や化膿性病変の時期を経て、3日目前後から肉芽腫性病変を形成し5日目前後まで続いた。酵素処理によって莢膜を消化した菌体の場合には、マクロファージの反応が3日目前後まで続き、5日目からは肉芽腫性病変を示して9日目前後まで続いた。ここにコントロールとの間に3日前後の時相のずれが生じた。これは、厚い莢膜を有する菌体の場合には、貪食作用だけでは菌体を排除できないので、さらにその周囲をマクロファージが被包することによって病巣の拡大を防ごうとする。その結果、病変は肉芽腫性病変へと移行する。しかし、莢膜が消化剝離されていると、貪食細胞が容易に反応することが可能になり、莢膜が完全に再生するのに要する日数だけより長く貪食作用を受ける結果となったと考えられる。これは *in vitro* において、莢膜を消化した菌体を培地へ戻すと発育を続け、約3日間かけて莢膜を再生することから推測される。コントロールの無処置の菌体は、すでに3日間培養して成熟し始めた菌体のため、再び培地へ戻すと出芽が始まる。莢膜を消化され

た菌体は、おそらく莢膜を再生するために細胞内のエネルギーを消費し出芽が遅れるものと思われる。莢膜が再生してくるとこれらの菌体も盛んに出芽を始めるようになる。莢膜を消化された菌体は感染の初期には肺マクロファージや好中球に容易に貪食される³⁹⁾⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾ため、組織内生菌数はコントロールに比較して著減するが、莢膜が完成する3日目以後は出芽による増殖が始まり、組織内生菌数が増加し始めた。また莢膜が完全に消化された状態においても、やはりマクロファージと好中球の貪食殺菌作用のみでは菌体の完全な除去は不可能であった。これは、莢膜を持たない突然変異株のクリプトコックス菌体が感染した場合と同様の結果である³⁸⁾⁽⁴³⁾⁻⁽⁴⁵⁾。

ここまでの経過中に組織内で観察された肉芽腫性病変は、いずれも組織球性肉芽腫の像であった。真菌感染において形成される肉芽腫性病変は、発地⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁷⁾により化膿性肉芽腫、組織球性肉芽腫、類結核肉芽腫、サルコイド様肉芽腫、異物肉芽腫に分類された。この分類における組織球性肉芽腫は、マクロファージの比較的単純な集合からなる成熟性肉芽腫とも言われるもので、多くの肉芽腫の初期像と考えられている。コントロール群の菌体を接種した場合も、また莢膜を消化した菌体を接種した場合も、ともに感染初期の段階で形成された肉芽腫はこの組織球性肉芽腫であった。莢膜無形成株によるヒトの感染についての報告³⁸⁾⁽⁴³⁾では、感染初期は化膿性病変や組織球性肉芽腫と考えられる病変で、時間が経過すると類上皮細胞の出現を認める肉芽腫へと変化したとされている。このような違いは、T細胞機能を含む今後の検討が必要である。本実験で

は、莢膜を消化された菌体は肉芽腫性病変内で処理されず、成長を続けて、莢膜は一層厚くなり、被包する組織を徐々に圧排し、最終的には肺胞内へ菌体成分が遊離して周囲に豊富な粘液状の莢膜を伴い嚢胞様病変へと変化した。

嚢胞様病変は、コントロールの菌体では7日目以降、莢膜を消化された菌体では9日目以降であった。

以後、感染したマウスはコントロールおよび酵素処理群ともに、病変は嚢胞様病変が持続して治癒することなく、気管内接種後約20日前後で死亡した。このようにクリプトコックス症では感染が成立し、菌体の増殖が可能になると自然治癒は起こらない。

莢膜多糖体の基本的な性質は、マクロファージの貪食に対する物理的な抵抗であるのみならず、好中球の貪食能も抑制することが知られている³⁷⁾。本実験に使用した株の莢膜多糖体を精製し、好中球に与える影響を検討したところ莢膜多糖体の濃度に反比例して遊走する好中球の数が減少することが確認された⁴⁸⁾。

これらの莢膜の性質は、各クリプトコックス菌株固有の性格であり、本実験に使用した株は、中等度から厚い莢膜を形成し、好中球は正の走化性を示さないことがわかった。

莢膜を持たない株に、他の株から分離した莢膜多糖体を加えると30分で付着し、2時間で完全に周囲を被い、貪食作用に抵抗性となると報告されている^{49)~51)}。またこの莢膜は他種の真菌とは結合しないことが確認されている⁵²⁾。さらに、菌体の毒性とこの莢膜の厚さとは直接関連しないとされている¹⁴⁾²⁸⁾。

本実験でも、莢膜を消化した菌体はよく貪食され、組織内生菌数が著減するが、莢膜の再生とともに貪食殺菌能に抵抗性となり、莢膜の再生に要した日数だけコントロール実験と時相がずれて、コントロールと同様、肉芽腫性病変からこの株本来の嚢胞様病変へと変化していった。

菌体の経静脈的接種では、他の臓器に明らかな病巣を形成しない初期から中枢神経系に病巣を形成した。中枢神経系の病変は細胞反応をほとんど伴わない嚢胞様病変で、コントロールでは3日目から、莢膜の消化された菌体では5日目頃から形成された。

クリプトコックス症における病変の組織学的分類についての試みは、ヒトの感染ではBakerとHaugen¹⁶⁾が、マウスの実験的クリプトコックス症ではFazekasとSchwarz²⁷⁾が行った。これらによると肉芽腫性病変と嚢胞様病変に大別して分類されていた。本実験では、

感染する臓器や、感染の時間経過とともに形成される病変がこれらの分類に加えて様々に変化することが観察された⁵³⁾⁵⁴⁾。また、ヒトの皮膚クリプトコックス症における病変が、本実験とは逆に嚢胞様病変から化膿性病変や肉芽腫性病変に変化したという報告がされている⁵⁵⁾。さらにAIDS患者の肺クリプトコックス症では、感染初期にマクロファージの出現がみられるが、その後形成する病変は、毛細血管内や間質に広く菌体がみられ、ほとんど肉芽腫性病変を形成しなかったと報告されている⁵⁶⁾。

近年、菌株側の特徴として、臨床で分離されるクリプトコックス菌体がヒト好中球やマクロファージの貪食殺菌作用に対してより抵抗性であるという報告がある⁵⁷⁾。また、宿主側の防御機構において、特に肺と肺門リンパ節由来のT細胞が脾臓由来などの他のT細胞と比較して最も強力に作用することが報告されている⁵⁸⁾。

C. neoformans 以外の菌種の細胞壁を剥離して菌体の微細構造を観察する研究は報告されているが¹⁷⁾、本実験のように、*C. neoformans* の莢膜を剥離消化することによって寄生体側の条件を変化させ、宿主側の防御反応の変化を誘導し、病理組織学的に検討した研究報告はなされていない。クリプトコックス症の感染機序において重要な役割を果たすと考えられる菌体表面の厚い莢膜に注目し、感染初期における組織応答を観察したが、病変が変化しながら形成される機序については細胞性免疫の関与が重要と考えられ、さらに今後の検討が必要であろう。

V 結 語

Cryptococcus neoformans の感染初期における組織反応の変化を検討する目的で、莢膜の存在に着目し、同一菌株において莢膜の有無により形成される病変の違いを観察した。そのために厚い莢膜を酵素的に消化し、マウスの気管内に接種し、病理組織学的に検討した。その結果、以下の結論を得た。

- 1 *In vitro* で lysing enzymes を作用させると、莢膜は完全に消化され、細胞壁が露出した生菌を得ることが初めて可能となった。
- 2 莢膜の再生には、*in vitro* および *in vivo* とともに約3日間を要することがわかった。莢膜再生初期の超微形態が初めて観察された。
- 3 莢膜の消化された菌体は、肺胞マクロファージや好中球の貪食殺菌作用に抵抗しながら莢膜を再生し

た。莢膜を再生している間の感染病巣は、肉芽腫性病変のままで、接種後から7日目頃まで続いた。

4 接種後9日目頃から、莢膜の再生が完成するとともに病変は嚢胞様病変へと移行した。肉芽腫性病変から嚢胞様病変に移行するのに要する日数は、コントロール菌体と莢膜を消化した菌体では3日間のずれが生じた。この日数は莢膜を再生するのに要する日数とほぼ一致する。

5 菌体から精製された莢膜多糖体に対して、好中球は正の走化性を示さなかった。

以上のことから、*C. neoformans* の感染によって形成される組織病変は同一株においてさえも莢膜の産出とその厚さの違いにより修飾されることが示された。

本論文の要旨は、第34回日本医真菌学会総会（1990年9月、大磯）、第80回日本病理学会総会（1991年4月、大阪）および第11回国際医真菌学会（1991年6月、モントリオール、カナダ）において発表した。

稿を終えるにあたり、終始懇篤なる御指導御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、直接御指導御助力下さいました故阿部章彦助教授、伊藤 誠博士、馬場 健博士を始めとする病理学教室の諸先生、ならびに本論文作成にご協力いただいた市川寿恵氏に深く感謝致します。さらに、標本作成に御協力いただいた羽山正義技官、総合研究室亀谷清和技官に心から感謝致します。

文 献

- 1) Emmons, C.W.: Saprophytic source of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am J Hyg*, 62: 227-232, 1955
- 2) Campbell, G.D.: Primary pulmonary cryptococcosis. *Am Rev Respir Dis*, 94: 236-243, 1966
- 3) Rippon, J. W.: *Medical Mycology*. 3rd ed., pp. 582-609, Saunders Co., Philadelphia, 1988
- 4) Haugen, R. K. and Baker, R. D.: The pulmonary lesions in cryptococcosis with special reference to subpleural nodules. *Am J Clin Pathol*, 24: 1381-1390, 1954
- 5) Zimmerman, L. E. and Rappaport, H.: Occurrence of cryptococcosis in patients with malignant disease of reticuloendothelial system. *Am J Clin Pathol*, 24: 1050-1072, 1954
- 6) 金子健彦, 加藤匡志, 崔 進, 阿部章彦, 発地雅夫: 最近の剖検例からみた深在性真菌症とその組織病変について. *真菌誌*, 28: 241-249, 1987
- 7) Hotchi, M., Okada, M. and 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
- 8) Kovacs, J. A., Kovacs, A. A., Polis, M., Wright, W. C., Gill, V. J., Tuazon, C. U., Gelmann, E. P., Lane, H. C., Longfield, R., Overturf, G., Macher, A. M., Fauci, A. S., Parrillo, J. E., Bennett, J. E. and Masur, H.: Cryptococcosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med*, 103: 533-538, 1985
- 9) Marchevsky, A., Rosen, M. J., Chrystal, G. and Kleinerman, J.: Pulmonary complications of the acquired immunodeficiency syndrome: a clinicopathologic study of 70 cases. *Hum Pathol*, 16: 659-670, 1985
- 10) Swinne, D., Deppner, M., Maniratunga, S., Laroche, R., Floch, J. J. and Kadende, P.: AIDS-associated cryptococcosis in Bujumbura, Burundi: an epidemiological study. *J Med Vet Mycol*, 29: 25-30, 1991
- 11) Suger, A. M.: Overview: cryptococcosis in the patient with AIDS. *Mycopathologia*, 114: 153-157, 1991
- 12) Chechani, V. and Kamholz, S. L.: Pulmonary manifestations of disseminated cryptococcosis in patients with AIDS. *Chest*, 98: 1060-1066, 1990
- 13) Kozel, T. R.: Antigenic structure of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharides. In: Kurstak, E., Marquis, G., Auger, P., Repentigny, L. and Montplaisir, S. (eds.), *Immunology of fungal diseases*, pp. 63-86, Marcel Dekker, INC., New York, 1989
- 14) Hasenclever, H. F. and Mitchell, W. O.: Virulence and growth rates of *Cryptococcus neoformans* in mice. *Ann NY Acad Sci*, 89: 156-162, 1960

- 15) Hasenclever, H. F. and Emmons, C. W. : The prevalence and mouse virulence of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from urban areas. *Am J Hyg*, 78 : 227-231, 1963
- 16) Baker, R. D. and Haugen, R. K. : Tissue changes and tissue diagnosis in cryptococcosis. A study of 26 cases. *Am J Clin Pathol*, 25 : 14-24, 1955
- 17) Osumi, M., Yamada, M., Kobori, H., Taki, A., Naito, N., Baba, M. and Nagatani, T. : Cell wall formation in regenerating protoplasts of *Schizosaccharomyces pombe* : Study by high resolution, low voltage scanning electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 38 : 457-468, 1989
- 18) Kobayashi, K., Hayama, M. and Hotchi, M. : The application of immunoperoxidase staining for the detection of causative fungi in tissue specimens of mycosis I. *Mycopathologia*, 102 : 107-113, 1988
- 19) Bhattacharjee, A. K., Kwon-Chung, K. J. and Glaudemans, C. P. J. : On the structure of the capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype C. *Immunochemistry*, 15 : 673-679, 1978
- 20) Bhattacharjee, A. K., Kwon-Chung, K. J. and Glaudemans, C. P. J. : On the structure of the capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype C-II. *Mol Immunol*, 16 : 531-532, 1979
- 21) Cherniak, R., Reiss, E., Slodki, M.E., Plattner, R. D. and Blumer, S. O. : Structure and antigenic activity of the capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Mol Immunol*, 17 : 1025-1032, 1980
- 22) Middleton, M. M. and Campbell, P. A. : Functions of purified mouse neutrophils isolated from gelatin sponges. *J Leu Biol*, 46 : 461-466, 1989
- 23) Boyden, S. : The chemotactic effect of mixture of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*, 115 : 453-466, 1962
- 24) 鳥巢要道, 園崎秀吉 : Chemotactic factor 原理と測定法. 免疫実験操作法 A, 第四版, pp,660-665, 日本免疫学会 (編), 金沢, 1973
- 25) Bulmer, G. S., Sans, D. and Gunn, C. M. : *Cryptococcus neoformans* I. Nonencapsulated mutants. *J Bacteriol*, 94 : 1475-1479, 1967
- 26) Kagaya, K., Yamada, T., Miyakawa, Y., Fukazawa, Y. and Saito, S. : Characterization of pathogenic constituents of *Cryptococcus neoformans* strains. *Microbiol Immunol*, 29 : 517-532, 1985
- 27) Fazekas, G. and Schwarz, J. : Histology of experimental murine cryptococcosis. *Am J Pathol*, 34 : 517-529, 1958
- 28) 伊藤 誠, 発地雅夫 : クリプトコックス症の病理. 病理と臨床, 9 : 1288-1295, 1991
- 29) 伊藤 誠 : 気管内接種法によるマウスの実験的肺クリプトコックス症の病理組織学的研究. 信州医誌, 34 : 586-604, 1986
- 30) 渋谷和俊, 浅地 聡, 直江史朗, 内田勝久, 山口英世 : マウスによるクリプトコックス症発症機序の解析に関する研究. 真菌誌, 28 : 349-359, 1987
- 31) Kozel, T. R. and Gotschlich, E. C. : The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. *J Immunol*, 129 : 1675-1680, 1982
- 32) Schlageter, A. M. and Kozel, T. R. : Opsonization of *Cryptococcus neoformans* by a family of isotype-switch variant antibodies specific for the capsular polysaccharide. *Infect Immun*, 58 : 1914-1918, 1990
- 33) Levitz, S. M. and Farrell, T. P. : 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
- 34) Hobbs, M. M., Perfect, J. R., Granger, D. L. and Durack, D. T. : Opsonic activity of cerebrospinal fluid in experimental cryptococcal meningitis. *Infect Immun*, 58 : 2115-2119, 1990
- 35) Kozel, T. R., Wilson, M. A., Pfrommer, G. S. T. and Schlageter, A. M. : Activation and binding of opsonic fragments of C3 on encapsulated *Cryptococcus neoformans* by using an alternative complement pathway

- reconstituted from six isolated proteins. *Infect Immun*, 57 : 1922-1927, 1989
- 36) Kozel, T. R., Pfrommer, G. S. T., Guerlain, A. S., Highison, B. A. and Highison, G. J. : Strain variation in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* : Dissociation of susceptibility to phagocytosis from activation and binding of opsonic fragments of C3. *Infect Immun*, 56 : 2794-2880, 1988
- 37) Bulmer, G. S. and Sans, M. D. : *Cryptococcus neoformans* II. Phagocytosis by human leukocytes. *J Bacteriol*, 94 : 1480-1483, 1967
- 38) Farmer, S. G. and Komorowski, R. A. : Histologic response to capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. *Arch Pathol*, 96 : 383-387, 1973
- 39) Bulmer, G. S. : Twenty-five years with *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, 109 : 111-122, 1990
- 40) Ro, J. Y., Lee, S. S. and Ayala, A. G. : Advantage of fontana-masson stain in capsule-deficient cryptococcal infection. *Arch Pathol Lab Med*, 111 : 53-57, 1987
- 41) Levitz, S. M. and Tabuni, A. : Binding of *Cryptococcus neoformans* by human cultured macrophages. Requirement for multiple complement receptors and actin. *J Clin Invest*, 87 : 528-535, 1991
- 42) Bulmer, G. S. and Sans, M. D. : *Cryptococcus neoformans* III. Inhibition of phagocytosis. *J Bacteriol*, 95 : 5-8, 1968
- 43) Harding, S. A., Scheld, W. M., Feldman, P. S. and Sande, M. A. : Pulmonary infection with capsule-deficient *Cryptococcus neoformans*. *Virchows Arch [Pathol Anat]*, 382 : 113-118, 1979
- 44) Milchgrub, S., Visconti, E. and Avellini, J. : Granulomatous prostatitis induced by capsule-deficient cryptococcal infection. *J Urol*, 143 : 365-366, 1990
- 45) 迎 寛, 岩本雅典, 木下明敏, 高瀬登美子, 森理比古, 石野 徹, 河野 茂, 山口恵三, 廣田正毅, 原耕平 : SIADH を伴った莢膜欠損クリプトコックス敗血症・髄膜炎の1例. *感染症学雑誌*, 63 : 1206-1211, 1989
- 46) 発地雅夫 : 真菌感染における病変形成. 宮治 誠, 高橋 久, 高橋伸也 (編), *真菌症と生体防御機構*, 第一版, pp. 93-106, 協和企画通信, 東京, 1988
- 47) 発地雅夫 : マクロファージと肉芽腫. *日本炎症学会雑誌*, 11 : 203-209, 1991
- 48) Diamond, R. D. and Erickson III, N. F. : Chemotaxis of human neutrophils and monocytes induced by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 38 : 380-382, 1982
- 49) Small, J. M. and Mitchell, T. G. : Strain variation in antiphagocytic activity of capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* serotype A. *Infect Immun*, 57 : 3751-3756, 1989
- 50) Kozel, T. R. and Hermerath, C. A. : Binding of cryptococcal polysaccharide to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 43 : 879-886, 1984
- 51) Small, J. M. and Mitchell, T. G. : Binding of purified and radioiodinated capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* serotype A strains to capsule-free mutants. *Infect Immun*, 54 : 742-750, 1986
- 52) Kozel, T. R. : 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
- 53) Schwarz, J. : The diagnosis of deep mycoses by morphologic methods. *Hum Pathol*, 13 : 519-533, 1982
- 54) McDonnell, J. M. and Hutchins, G. M. : Pulmonary cryptococcosis. *Hum Pathol*, 16 : 121-128, 1985
- 55) Narisawa, Y., Kojima, T., Iriki, A., Masaki, J. and Kohda, H. : Tissue changes in cryptococcosis : histologic alteration from gelatinous to suppurative granulomatous tissue response with asteroid body. *Mycopathologia*, 106 : 113-119, 1989
- 56) Gal, A. A., Koss, M. N., Hawkins, J., Evans, S. and Einstein, H. : The pathology of pulmonary cryptococcal infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med*, 110 : 502-507, 1986
- 57) Miller, M. F. and Mitchell, T. G. : Killing of *Cryptococcus neoformans* strains by human neutrophils and

- monocytes. Infect Immun, 59 : 24-28, 1991
- 58) Huffnagle, G. B., Yates, J. L. and Lipscomb, M.F. : T cell-mediated immunity in the lung : a *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection model using SCID and athymic nude mice. Infect Immun, 59 : 1423-1433, 1991

(3. 10. 3 受稿)
