

## 胃潰瘍と真菌に関する研究

## 第 III 編

## 螢光抗体法による胃潰瘍組織内真菌の同定に関する研究

岡山大学医学部 第一内科教室 (主任: 小坂淳夫教授)

岡山済生会総合病院 内科 (院長: 大和人士博士)

北 昭 一

〔昭和42年12月25日受稿〕

## 緒 言

慢性胃潰瘍の病因については現在なお多くの議論があり, その因子の決定は非常に困難である。

慢性胃潰瘍の病因の一因子としての胃潰瘍内の真菌の繁殖については1877年 J. Parrot<sup>1)</sup> が胃潰瘍壁に Soor が存在することを発見して以来, Heller<sup>2)</sup> をはじめ多くの研究者<sup>3)4)5)</sup> によつて主に剖検例に就いて提唱された。その後慢性胃潰瘍の起因菌として Askanazy<sup>6)</sup> は真菌説を主張し, さらに Kirch u. Stahnke<sup>7)</sup> は真菌説を否定し, この問題に関して多くの議論が続出している<sup>8)9)10)</sup>。

然し胃潰瘍組織内に真菌の存在する例があることは, 慢性胃潰瘍の起因菌となるか否かはさておくとしても明らかな事実である。この胃潰瘍組織内の真菌の菌種については Askanazy は *Oidium albicans* と記載しているが, その同定法はおそらく組織内の真菌の形態のみによつて行われたものと思われる。又他の報告では組織内侵入真菌の菌種についての記載はみられない。

爾来真菌の同定法には感染組織内の真菌についての形態学的方法と培養に移して分離した真菌についての生物学的方法がとられてきた。前者については通常 PAS 染色, Gridley 染色, Gomori 染色等の組織化学反応が応用されているが Genus まで詳細に鑑別することは容易でない。

近年 Coons<sup>11)</sup> らによつて開発された fluorescent antibody 法 (以下 FA 法と略称する。) は周知の如く抗原抗体反応を螢光顕微鏡下で観察する免疫学的方法で, 抗原蛋白の特異性の決定に極めて鋭敏である。FA 法の真菌への応用は Eveland<sup>12)</sup>, Gordon<sup>13)</sup>, Kase<sup>14)</sup>, 上塚<sup>15)</sup> らにより, その実用性が報告され

ている。著者は FA 法を応用して胃潰瘍底組織内の真菌同定を試みた。

## 実験材料並びに実験方法

## I 被検材料

手術切除によるヒトの胃潰瘍及びウイスター系ラットの実験胃潰瘍の組織を使用した。

## 1) ヒトの胃潰瘍

胃潰瘍の手術摘出胃をフォルマリン固定し, 潰瘍部組織をパラフィン包埋したものを材料とし, 予じめ PAS 染色, Gridley 染色, Gomori 染色等で潰瘍底組織内に真菌増生を認めたものを選んだ。

## 2) 実験的胃潰瘍

田林<sup>16)</sup> の提唱した Clamping-Cortisone 法で作製した実験的胃潰瘍の組織をヒトの胃潰瘍の場合と同様の方法で固定, 包埋し, 潰瘍底組織内に真菌増生を認めたものを材料に選んだ。

## II 免疫原と抗血清の作製

## 1) 免疫原

*Candida albicans* IFO, 0583株を使用。

## 2) 免疫方法

深沢<sup>17)</sup> らの Thermostable antigens 法に従い, 標準株を Sabouraud east extract 加寒天培地に 25°C, 48時間培養後, 集菌洗浄した。その約10~20mg/ml の菌浮遊液0.5%の食塩水で作り, Koch の蒸気釜で100°C, 2½時間加熱後, 上塚<sup>15)</sup> 方法により, 血球計算盤で5×10<sup>7</sup>/ml の菌液として用いた。

免疫動物には *Candida albicans* と類属凝集を示さない 2.5kg 前後の家兎を使用した。

免疫方法は thermostable antigens の 0.5ml, 1.0ml, 1.5ml を連続3日間静注して, これを第1 Series とし, その後1日菌接種を中止し, 第2 Series を始め

た。第2 Series 以後は 2.0ml づつ連続3日間静注を続けたのち、試験採血を行い、凝集価1280倍以上に達した時に全採血を行った。

### Ⅲ 螢光標識抗体の作製

川村<sup>18)</sup>の方法に従い、概略は図1に示した。

図1 Purification of fluorescent labelled protein

Globulin (Dialyse with 0.005 M P. B. S. (pH 7.2))  
 |  
 Labelled with Fluorescein isothiocyanate: Protein  
 fluorescent dye (1:80) Protein 1%, pH 9.5,  
 | 4°C, 6hr. conjugation (carbonate-  
 bicarbonate buffer)  
 |  
 Sephadex G-25 column-Elute with pH 7.2, 0.01M  
 | P. B. S. solution  
 |  
 DEAE cellulose collum  
 |  
 Fluorescent staining

#### 1) $\gamma$ -globulin の精製 (塩析法)

飽和硫酸アンモニウムの作製: 硫酸 1000g (キシダ特級) に 1200ml の加温水を加え、20分間攪

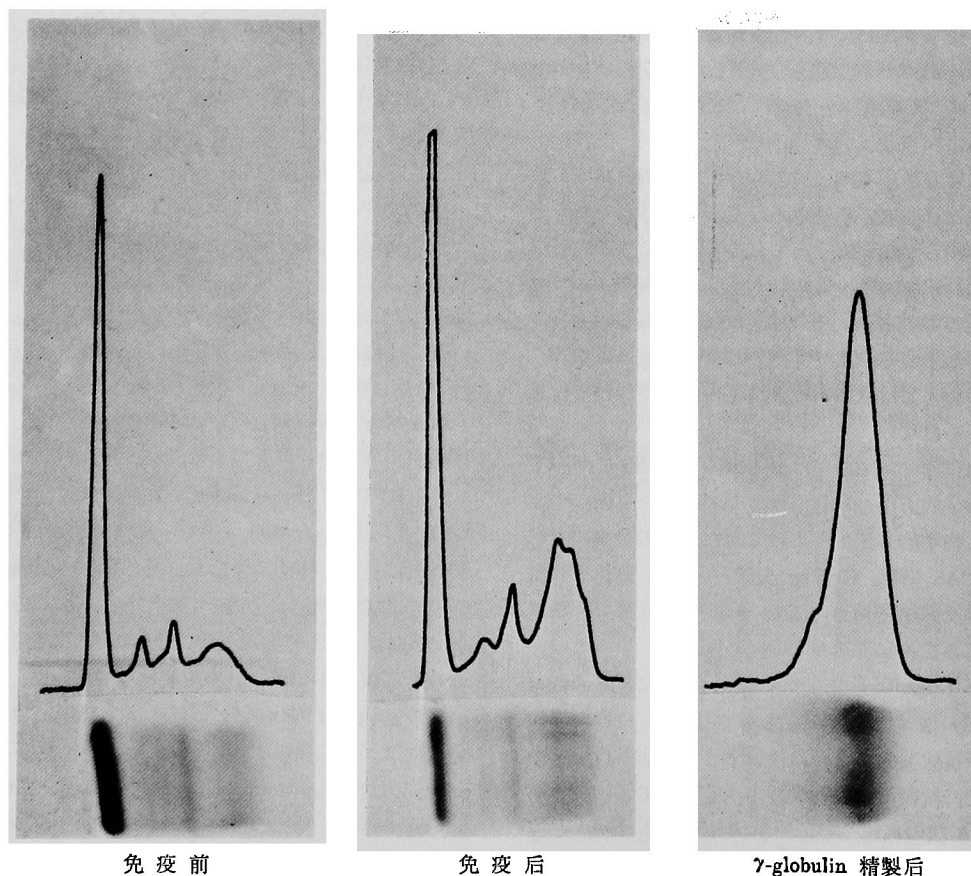
拌後 25°C に冷却し、pH 5.5, 比重1.245 に調整した。

抗血清を 4°C 中、 $1/2$  飽和硫酸アンモニウムで30分間静置後 9500r. p. m, 15分遠心沈澱を行い、沈澱を生理食塩水で、もとの2倍稀釈量にし、再び  $1/3$  飽和硫酸アンモニウムで沈澱、30分以上静置後、遠心沈澱する。 $1/3$  飽和硫酸アンモニウムの操作を3回繰返した後、0.005 M. phosphate buffered saline (P. B. S), pH 7.2 で外液に硫酸アンモニウムがみられなくなるまで透析を行った。なお外液の硫酸アンモニウムのチェックに 0.5M 塩化バリウムを使用した。図2はセルロースアセテート電気泳動法による抗体の推移で、 $\gamma$ -globulin の精製を示した。

#### 2) 標識法

抗体蛋白に結合させる螢光色素は Riggs<sup>19)</sup> が合成した Fluorescein isothiocyanate (FITC) (Baltimore Biological Laboratories, U. S. A, Lot. 201634) を使用した。蛋白量の測定はビュレット法によった。

図2 セルロースアセテート電気泳動法による抗体の推移



$\gamma$ -globulin は 15 mg/ml で総蛋白量は  $\gamma$ -globulin 蛋白量 (15 mg/ml)  $\times$   $\gamma$ -globulin 溶液 (31 ml) = 総蛋白量 (465 mg) の式より 465 mg であった。

使用した 1% 抗体蛋白生食溶液に対して 9:1 の 0.5 M Carbonate bicarbonate buffer (pH 9.5) で総蛋白量の 1/80 (5.82 mg) の FITC 結晶粉末を溶解後、蛋白変性に留意しながら両者を混合し、4°C で静かに攪拌を行い、標識抗体を得た。

### 3) 遊離色素及び非特異螢光物質の除去

0.005 M, P. B. S (pH 7.2) を用いて Sephadex G-25 で濾過して遊離色素を除き、DEAE-cellulose により非特異螢光物質の除去を行った。

### 4) 螢光標識抗体の性状のチェック

被検材料の実験的胃潰瘍の動物はウイスター系雄ラットを使用した。大和<sup>20)</sup>がこの種の実験動物の胃内正常真菌叢とした *Torulopsis famata* は *Candida albicans* と共通抗原を有する為、吸収試験を行い、定量凝集反応及び寒天ゲル内沈降反応により抗 *Candida albicans* 螢光標識抗体が抗原と単一反応を示すことを確認した。

### IV 固定及び染色法

フォルマリン固定、パラフィン包埋した人及びラットの胃潰瘍組織を使用し、非螢光スライドガラスにグリセリンを薄く塗り、薄切切片を載せ、伸展乾燥した後、キシロロールで脱パラフィン、アルコールで脱キシロロールを行い、次いで 0.005 M P. B. S (pH 7.2) 溶液で洗い、さらに標識抗体をかけて湿度 100%, 37°C の状態で 30 分間反応させ、再び 0.005 M P. B. S (pH 7.2) で 3 乃至 4 回洗浄し、乾燥後エルパノールで包埋し、ニコン SUR-F 型の螢光顕微鏡で鏡検した。

## 成 績

### I 共通抗原に対する検討

抗 *Candida albicans* 標識抗体 ( $\gamma$ -globulin 15 mg/ml) に対してラット胃内正常真菌叢 *Torulopsis famata* と、供試 *Candida albicans* thermostable antigen に於ける力価の測定及び特異性の検討を行った。図 3 に示すように定量凝集反応の結果、この 2 つの Genus は同一の凝集価 (160 倍) が得られた。

一方この両者の菌株からそれぞれの加熱可溶性抗原を用いて抗 *Candida albicans* 標識抗体と寒天ゲル内沈降反応 (double diffusion 法) を行つたが共通抗原の存在が考察される沈降帯がみられた。

図 3 定量凝集反応による抗 *Candida albicans* 標識抗体凝集価

(抗 *Candida albicans* 標識抗体  $\gamma$ -globulin 量: 2.5 mg/ml)

#### ●吸収前

抗原	抗体価	5	10	20	40	80	160	320	640
<i>Candida albicans</i>							160×		
<i>Torulopsis famata</i>							160×		

#### ●吸収後

抗原	抗体価	5	10	20	40	80	160	320	640
<i>Candida albicans</i>		5×							
<i>Torulopsis famata</i>									

### II 螢光標識抗体の性状

成績 I で得られた標識抗体は *Torulopsis famata* と共通抗原が存在する為、吸収試験を行い、出来た標識抗体の特異性をさらにチェックした。

#### 1) 吸収試験

抗 *Candida albicans* 標識抗体 1 ml に対して 100 mg の *Torulopsis famata* (約 10~20 mg/ml の菌浮遊液にて 100°C, 2 1/2 時間加熱後、2~3 回洗浄を行つたもの) を加え、37°C, 2 時間恒温槽で incubate 後、4°C で一夜放置し、3000 r. p. m. 2 分遠心沈澱し、吸収操作を行つた。この操作を 3 回繰り返す。共通抗原の完全な吸収をスライド凝集反応でチェックした。即ち吸収操作を繰返した抗 *Candida albicans* 標識抗体をスライドガラスに 1 滴とり、その対照として正常家兎血清、生理食塩水を用いた。上記 thermostable antigen の供試 *Candida albicans* 及び *Torulopsis famata* 菌株を使用してスライド凝集反応を試み、*Candida albicans* への凝集のみ凝集がみられ、対照の正常家兎血清及び生理食塩水には何ら凝集反応はみられず、*Torulopsis famata* 抗原においても類属凝集反応は生じなかつた。

#### 2) 標識抗体の特異性

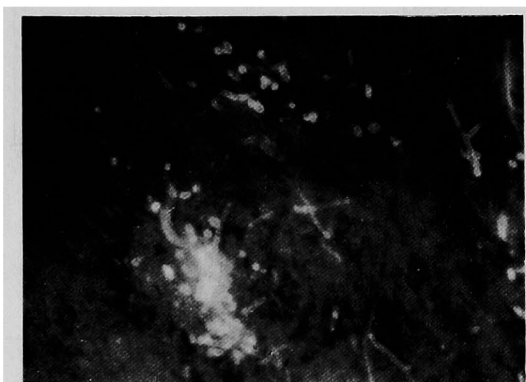
スライド凝集反応でチェックした抗 *Candida albicans* 標識抗体の定量凝集反応を行つた結果は図 3 に示す通りである。共通抗原の完全な吸収と強い凝集価減少を伴つたが、特異抗体が得られた。又、同時に寒天ゲル内沈降反応 (double diffusion 法) を行つたが、*Candida albicans* の thermostable antigen に対して単一の反応を示す沈降帯が認めら

れた。

次いで *Candida albicans* 及び *Torulopsis famata* の両菌の塗抹標本作製、型の如く固定した後吸収操作を行つた抗 *Candida albicans* 標識抗体で染色、螢光顕微鏡で検鏡を行つたところ、*Candida albicans* のみ特異的に螢光を発することを確認した。

さらに胃潰瘍における螢光抗体組織標本の結果は写真1（ヒト胃潰瘍）、写真2（実験胃潰瘍）に示す如く良好なものであつた。

写 真 1



写 真 2



### 総括並びに考案

近年螢光抗体法の技術の進歩と共に、この方法が真菌の同定にも次第に利用されるようになり、従来同属間の形態学的鑑別が困難であつた組織切片材料についての菌種同定法に応用されるに至っている。（Kasel<sup>14</sup>、Metzger<sup>21</sup>、上塚<sup>15</sup>）

著者は胃潰瘍底組織内の真菌を組織標本を材料にし、螢光抗体法によつて *Candida albicans* 同定することが出来たが、その実験方法、実験成績につい

て考察を行つてみる。

爾来  $\gamma$ -globulin の精製は硫酸ナトリウムを用いる塩析法が一般に賞用されている。著者も同様に  $\gamma$ -globulin の精製は硫酸ナトリウムを用いて塩析法により、得られた  $\gamma$ -globulin をセルロースアセテート膜電気泳動（ペロナール・ペロナール緩衝液、pH 8.6, 0.06~0.07 M, 0.8 mA/cm）にチェックした結果  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  の易動部位に少量の globulin を認め、完全に精製することは不可能であつた。又、深沢<sup>22</sup> は  $\gamma$ -globulin を Sephadex G-200 を用いて Ig M と Ig G に濾別し、*Candida* 属に対する標識抗体に Ig G を用いた方が良好な結果を得たとの報告があるが、 $\gamma$ -globulin 精製法と共に今後 Ig G, Ig M 等の分画の真菌に対する特異性はさらに検討すべき問題と考えられる。又、透折時における精製  $\gamma$ -globulin に変性蛋白を認めることはよく経験することであるが、川村<sup>20</sup> の報告による Sephadex-G 25~50 を用い、1~2% の蛋白濃度にして Marshall の方法に準じて色素を加え、出来るだけ変性を少くする方法も検討し、利用することが望まれる。

Conjugation 時に用いられる 0.5 M Carbonate bicarbonate buffer の pH は諸家により種々の報告がある。即ち浜島<sup>23</sup> は pH 9.1, 深沢<sup>22</sup>, 山瀬<sup>24</sup> は pH 9.0, 川村<sup>18</sup>, 辻<sup>25</sup> は pH 9.5 を用いている Carbonate bicarbonate buffer の緩衝力<sup>27</sup> をみると浜島<sup>23</sup> の用いた pH 域では緩衝作用が弱い。従つて著者は川村<sup>18</sup> の pH 9.5 を用い、その結果は良好であつた。又深沢<sup>22</sup> は FITC 結晶粉末を直接  $\gamma$ -globulin 溶液中に混合し、conjugate を行つているが、著者は前述の buffer に FITC 結晶粉末を溶解後滴下を行つた。両者を比較した結果、後者の方が Conjugation が容易であつた。色素対蛋白比は総蛋白量の 1/80 FITC 結晶粉末で攪拌時間 6 時間、温度 0~4 °C により良い染色結果を得た。

この様にして得た標識抗体の特異性の問題であるが、先に述べた実験成績でこの標識抗体はラットの胃内正常真菌叢である *Torulosis famata* と強い交叉反応を示した。

土屋<sup>26</sup> は thermostable antigen の抗原分析を行うと共に yeast 型真菌の異つた Genus 間に共通抗原のみならず同一の抗原を有するものがあることを指摘し、因子血清利用による新し分類を提唱している。この抗原分析をみると *Candida albicans* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 の抗原構造を有し、*Toruopsis famata* は 1, 2, 3, 4, (9), (14) を有し、両者間には比較的

多い共通抗原 1, 2, 3, 4 が介在する。従つてここで吸収試験を行つたが、吸収操作は抗血清作製時に行う場合と、標識後に行う方法があるが、前者は多量の多くの吸収回数を必要とし、後者の方法で完全に共通抗原を吸収し得た。著者が行つた試験では吸収前の  $\gamma$ -globulin 量が 2.5 mg/ml に対し、吸収後は 0.9 mg/ml と著しい減少をみせたことによつても前記共通抗原 1, 2, 3, 4 が多量に存在することを意味するものであろう。又、使用家兎の免疫前の血清と *Candida albicans* との凝集反応での抗体価のチェックは吸収試験において重要な問題を有し、予め本菌に対する抗体価のある家兎血清は頻回に吸収操作を行つても類属凝集を取除き得ない。

### 結 論

螢光抗体法によつてヒト及びラットの胃潰瘍底組織内の真菌を同定した。

1. 成熟家兎に *Candida albicans* IFO 0583 株を使用して thermostable antigens 法で免疫し、凝集価 1280 倍以上の抗血清を得た。
2. 定量凝集反応を行つたところ、上記免疫血清から作製した螢光標識抗体はラット正常胃内真菌叢 *Torulopsis famata* 及び供試 *Candida albicans* に対して両菌とも 160 倍の凝集価を得、又両菌と螢光

標識抗体との間で寒天ゲル内沈降反応を行い、共通抗原の存在が確認された。

3. 特異的螢光標識抗体を得る為に上記抗 *Candida albicans* 標識抗体に吸収試験を行い、供試 *Candida albicans* にのみ定量凝集反応で 5 倍の凝集価を得た。同時に寒天ゲル内沈降反応で *Candida albicans* にのみ定量凝集反応で 5 倍の凝集価を得た。同時に寒天ゲル内沈降反応で *Candida albicans* にのみ単一の反応を示す沈降帯を認め、0.9 mg/ml の  $\gamma$ -globulin 濃度の特異的な抗 *Candida albicans* 螢光標識抗体を得た。

4. 吸収試験を行つた螢光標識抗体を使用して *Candida albicans* 及び *Torulopsis famata* の塗抹標本を螢光顕微鏡下で鏡検し、*Candida albicans* にのみ特異的に螢光を発することを認めた。同時にこの標識抗体で組織を染め、菌体に特異的な陽性螢光を認め、胃潰瘍底組織内真菌は *Candida albicans* であると同定した。

(本論文の要旨は第64回日本内科学会総会にて発表した。)

(終りに臨み、御指導、御校閲を戴いた岡大小川病理学教室の小川教授並びに援助教授に深く感謝致します。)

### 文

- 1) Parrot: Cliniques des Nouveaux-nés, 1877.
- 2) Heller: Beiträge zur Lehre vom Soor, Dtsch. Arch. f. klin. Med. 55, 125. 1895.
- 3) Nauwerck: Mykotisch-peptisches Magengeschwür, Münch. med. Wochenschr. 1895, Nr. 38/39,
- 4) Pick: Arterienarrosion durch Soorpilze mit tödlicher Blutung, ein Beitrag zur Kenntnis der Oidiomykosen, Berl. Klin. Wochenschr. Nr. 34, S. 798.
- 5) Maresch: Zur Kenntnis der Soormykose des Magens, Zeitschr. f. Heilk. 1907.
- 6) Askanazy: Über Bau und Entstehung des chron. Magengeschwürs, sowie Soorpilzbefunde in ihm, Virchow's Arch. Bd. 234, S. 111, 1921.
- 7) Kirch u. Stahnke: Pathologisch-anatomische, klinische und tiereexperimentelle Untersuchungen über die Bedeutung des Soorpilzes für das chronische Magengeschwür, Mitt. a. d. Grenzgeb.

### 献

- d. Med. u. Chir. Bd. 167, S. 145. 1921.
- 8) Nicolaysen: Pathologisch-anatomische und experimentelle Studien über die Pathogenese des chronischen Magengeschwürs, Deutsche Zeitschrift für Chirurgie, Bd. 167, S. 145, 1921.
- 9) Hartwich: Über das Vorkommen vom Soor im chronischen Magengeschwür, in hämorrhagischen Erosionen und Magencarcinomen, Archiv. f. patho. Anat. Bd. 241, S. 116, 1923.
- 10) Frank: Über die Beziehungen des Soorpilzes zu dem runden Magengeschwür, Wien. Archiv. f. inn. Med. Bd. 5, S. 39, 1923.
- 11) Coons: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. (N. Y.), 47, 200-202, 1941.
- 12) Eveland: Amer. J. Pathol. 33, 616, 1957.
- 13) Gordon: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 67, 694, 1958.
- 14) Kase: Amer. J. Clin. Path. 34, 52, 1960.

- 15) 上塚 昭：深在性真菌症の基礎的研究，真菌と真菌症，第6巻，第3号，1965.
- 16) 田林忠綱：Clamping-Cortisone 法によるラットの慢性胃潰瘍の作製とその組織，日本消器病学会雑誌，Vol. 62. No. 12. 1965.
- 17) 深沢義村：Candida 属の分類に関する研究，日本細菌雑誌 11 (3)，1956.
- 18) 川村明義：蛍光抗体法，日本衛生検査技師会雑誌，Vol. 14, No. 5, 1965.
- 19) Riggs: Amer. J. Pathol. 34, 1081, 1959.
- 20) 大和人士：実験胃潰瘍と真菌，真菌と真菌症，第7巻，第4号，1966.
- 21) Metzger: Identification of pathogenic fungi in surgical and autopsy specimens by immunofluorescence, Mycopathol. & Mycol. Appl. X VII (4), 1962.
- 22) 深沢義村：真菌に対する診断的意義，真菌と真菌症，第6巻，第3号，1965.
- 23) 浜島義博：蛍光抗体法（医学書院），1963.
- 24) 山瀬 裕：真菌における蛍光抗体法に関する基礎的研究，真菌と真菌症，第7巻，第3号，1966.
- 25) 辻 孝夫：ミオシンの抗原性と蛍光抗体法による光輝細胞の組織由来に関する研究，細胞核病理学雑誌，巻10，号1，1965.
- 26) 土屋 毅：酵母の血清学的研究，日本細菌学雑誌，第19巻，第9号，1964.
- 27) Sidney P. Goldwick and Nathan O. Kaplan: Methods in Enzymology, Vol. 1, 1955.
- 28) 川村明義：蛍光抗体法と非特異反応，特にその除去の試みについて，最新医学，第17巻，第11号，昭和37年.

## Studies on the Relationship between Gastric Ulcers and Fungi

### Part 3. Studies on the Identification of Fungi in the Bottom of the Gastric Ulcers by a Fluorescent Antibody Technique

By

Schoichi KITA

The 1st Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. Kiyowo Kosaka)

Department of Internal Medicine, Okayama Saiseikai General Hospital

(Director: Hitoshi Yamato)

1. The rabbits of a commercial stock were immunized by the technique of thermostable antigen with *Candida albicans* of IFO 0583 strain. The agglutination titer of the immune serum was 1:5120 against the homologous organism.

2. The antiserum of rabbits was labeled with the fluorescein isothiocyanate. The agglutination titer of the labeled antiserum was 1:160 against *Candida albicans* (the homologous organism) as well as *Torulopsis famata* of normal flora in the rat-stomach. The common determinants of the two strains were also identified by the precipitation reaction.

3. The monospecific antiserum was obtained by absorbing the above mentioned labeled serum with *Torulopsis famata*. The thus absorbed labeled antiserum showed the agglutination-titer 1:5 against *Candida albicans* and no titer against *Torulopsis famata*, whereas the band of precipitate in the Ouchterlony method was found against only *Candida albicans*. The gamma globulin concentration of the fluorescein isothiocyanate-labeled, absorbed and monospecific antiserum solution was 0.9 mg/ml.

4. Fungi in the gastric ulcers of human and rats could be identified as *Candida albicans* by its specific fluorescence when stained with the fluorescein isothiocyanate-labeled, absorbed and monospecific antiserum.