

【原著・臨床】

(1→3)- β -D-グルカンと抗真菌薬のヒト多形核白血球の化学発光におよぼす影響

加藤 淳子

帝京大学医学部内科学講座*

(平成10年11月5日受付・平成11年1月13日受理)

(1→3)- β -D-グルカン (β -グルカン) のヒトに対する病原性を明らかにするために、3種類の粒子状 (不溶性) β -グルカンと3種類の可溶性 β -グルカンの免疫学的活性をヒト好中球からの活性酸素の放出能を指標に *in vitro* で比較検討した。活性酸素の産生は、好中球浮遊液にルミノールを加えて、粒子状 β -グルカンである zymosan, zymocel, curdlan や可溶性 β -グルカンである CM-curdlan, laminarin, sonifilan を刺激物として chemiluminescence (CL) 法で測定した。この測定系は、可溶性 β -グルカンや lipopolysaccharide (LPS) の好中球の活性酸素産生に対する priming 効果を調べるのにも使用した。各種粒子状 β -グルカンで好中球を刺激すると、明らかな好中球 CL が容量依存的に誘導されたが、可溶性 β -グルカンや LPS には好中球に作用して直接的に活性酸素を放出させる作用はみられなかった。LPS と可溶性 β -グルカンの好中球 CL に対する priming 効果を比較するために、好中球を LPS や3種類の可溶性 β -グルカンで 37°C で 60 分間前処理した後で、phorbol myristate acetate (PMA) で刺激して 20 分間の CL を測定した。好中球を 100 ng/ml 以上の濃度の LPS で前処理した場合には、好中球 CL の増強がみられ、少量の血清存在下では、わずか 10 分間前処理した後においても同様の priming 効果を認めた。一方、CM-curdlan, laminarin, sonifilan などの可溶性 β -グルカンを種々の濃度 (1 ng~10 μ g/ml) で好中球と 10 分ないし 60 分間接触させた後に PMA で刺激した場合には、好中球 CL 反応に対する有意な priming 効果を認めなかった。逆に、これらの可溶性 β -グルカンの 10 μ g/ml 以上の濃度で好中球を 37°C で 60 分間接触させた後に、粒子状 β -グルカンである curdlan や zymocel で刺激すると、好中球の CL 活性が濃度依存的に抑制された。この抑制効果は *Candida albicans* を刺激物とした場合にも認められた。次に、ヒト好中球の活性酸素産生能におよぼす3種類の抗真菌薬、amphotericin B (AMPH-B), fluconazole (FLCZ), miconazole (MCZ) の影響について検討した。好中球を 1 μ g/ml 以上の濃度の AMPH-B で 60 分間前処理した後は、粒子状 β -グルカンである curdlan の食作用に付随する好中球の CL 反応が有意に増強し、FLCZ の 1 μ g/ml 以上の濃度では有意な抑制がみられた。MCZ の前処理は好中球の CL 反応に影響を与えなかった。これらの知見は、 β -グルカンや抗真菌薬がヒト好中球の酸素代謝を修飾することを示唆しているが、この免疫修飾作用のメカニズムの解析や臨床的意義を確立するためには、今後さらなる検討が必要と思われる。

Key words: (1→3)- β -D-glucan, polymorphonuclear leukocytes, chemiluminescence, antifungal agents

(1→3)- β -D-グルカン (β -グルカン) は、真菌一般の菌体表層に存在する多糖体であり、ヒト、動物に対し多彩な生物活性を示すことが知られている¹⁾。 β -グルカンが存在する部位は、細菌におけるエンドトキシン (lipopolysaccharide: LPS) に相当する部位であり、グラム陰性桿菌感染症においてエンドトキシンがヒトに病原性を発揮する先兵となっているように、真菌感染においては、 β -グルカンがその病原性の最前線を担っている可能性がある。現在、 β -グルカンのいくつかは、抗腫瘍活性を有する biological response modifier (BRM) として臨床使用され、感染に対する防御作用についても検討されている²⁾。一方、近年の compromised host

の増加に伴い *Candida spp.* を中心とした深在性真菌感染症の増加が臨床問題となっており³⁾、病原因子としての β -グルカンについての検討も重要な課題である。グラム陰性桿菌感染症においては、抗菌薬療法後にエンドトキシンの遊離が起こり病態を悪化させる可能性が指摘されていることから⁴⁾、真菌感染症においても、菌の分裂増殖時⁵⁾や抗真菌薬投与後に遊離すると考えられる β -グルカンの炎症反応への関与も十分に考えられる。今回 β -グルカンのヒトに対する病原性を明らかにするために、感染防御や炎症反応の中心的役割を果たす好中球に対する作用、特に炎症のメディエーターである好中球からの活性酸素の放出能におよぼす影響を、ル

*東京都板橋区加賀 2-11-1

ミノール依存性 chemiluminescence (CL) 法を用いて検討し、LPS の活性と比較した。さらに、 β -グルカン刺激により好中球から放出される活性酸素の産生に対して、治療に使用される抗真菌薬が影響を与えるかどうかについても検討した。

I. 材料と方法

1. 好中球の分離

好中球は、帝京大学医学部附属病院に勤務する健康成人 40 名 (男性 25 名, 女性 15 名), 年齢 21 歳~45 歳 (平均 32.4 歳) の末梢血よりヘパリン加 (ヘパリン 10 U/ml) 採血し, monopoly resolving medium を用いて分離し, Dulbecco 改変 minimum essential medium (MEM, 日水, 25 mMHEPES および L-glutamin 0.3 g/l 含有) に浮遊させ, 5×10^5 cells/ml となるように調整した。採血に際しては, ボランテアに対して研究の意義について説明し同意を得た上で行った。

2. 菌液の調整

当院において血液培養で分離された *Candida albicans* を 37°C で 18 時間培養後, 生理食塩水で 2 回洗浄し, 菌数を 5×10^7 cells/ml となるように MEM 中に浮遊させた。

3. 試薬

粒子状 β -グルカンとしては, *Saccharomyces cerevisiae* に由来する zymosan A (Sigma Chemical 社) と zymocel (Sigma Chemical 社), *Alcaligenes faecalis* 由来の curdlan (和光純薬), 可溶性 β -グルカンは curdlan に化学修飾を加えて可溶性にした CM-curdlan (和光純薬), algae 由来の laminarin (Sigma Chemical 社), *Schizophyllum commune* 由来の sonifilan (科研製薬) を使用した。LPS は, *Escherichia coli* 0111: B4 株由来 LPS (Sigma Chemical 社) を注射用生理食塩水 (endotoxin free) に希釈して使用した。すべての β -グルカン試薬は, 注射用生理食塩水に希釈して使用したが, それぞれの溶液 1 mg/ml 中のエンドトキシンの濃度は 10 pg/ml 以下であった (エンドスペシー[®]で確認)。Phorbol myristate acetate (PMA, Sigma Chemical 社) は, dimethyl sulfoxide (DMSO) に 100 μ g/ml の濃度となるように溶解した。ルミノール (東京化成) 試薬は, 20 μ g/ml の濃度となるように phosphate buffered saline (PBS) に溶解した。

4. 抗真菌薬

Amphotericin B (AMPH-B, ブリストル・マイヤーズ スクイブ社), fluconazole (FLCZ, ファイザー製薬), miconazole (MCZ, 持田製薬) の原末を注射用滅菌生理食塩水に溶解し使用した。

5. Chemiluminescence (CL) の測定

CL の測定装置は Biolumat LB 9505 (Berthold 社) を使用した。

1) β -グルカンまたは *C. albicans* 刺激による CL

好中球 CL および全血 CL の測定は既述の方法にしたがった⁶⁾。すなわち, 好中球 CL の測定は, 好中球浮遊液 1 ml (5×10^5 cells) を試料とし, ルミノール溶液 20 μ l を加え, 10 分間 37°C で保温後, zymosan, zymocel, curdlan のそれぞれの懸濁液 20 μ l (100 μ g~5 mg), *C. albicans* 浮遊液は 40 μ l (2×10^5 cells) を刺激物として加えて 20 分間の CL を測定し, その積算値を求めた。全血 CL の測定は, 全血 0.1 ml に MEM を 0.1 ml 加えて 10 倍希釈した検体 1 ml を試料とし, 好中球 CL と同様の方法で測定した。粒子状 β -グルカンと同様に, 可溶性 β -グルカンである CM-curdlan や laminarin, sonifilan のそれぞれの溶解液 20 μ l (10 ng~1 mg) を刺激物とした好中球 CL や LPS を刺激物とした好中球 CL も測定した。

2) 可溶性 β -グルカンと LPS の priming 効果の検討
好中球浮遊液 (5×10^5 cells) に LPS 25 μ l (1 ng~10 μ g) または可溶性 β -グルカンである CM-curdlan, laminarin, sonifilan 25 μ l (1 ng~50 μ g) またはコントロールとして同容量の注射用生理食塩水に MEM を加えて総量 1 ml とした検体に, ルミノール 20 μ l を添加し, 60 分間 37°C で保温後, PMA 5 μ l や curdlan 20 μ l (500 μ g) または *C. albicans* 浮遊液 40 μ l (2×10^5 cells) を刺激として 20 分間の CL を測定した。20 分間の CL 積算値を求め, LPS または可溶性 β -グルカンで処理した場合の好中球 CL 活性とコントロール (注射用生理食塩水添加の場合) の CL 値を比較した。なお, 血清存在下における可溶性 β -グルカンや LPS の PMA 刺激による好中球 CL におよぼす影響を調べる場合や, *C. albicans* 刺激の場合は実験系に血清をそれぞれ 20 μ l, 5 μ l 添加した。

3) 抗真菌薬の好中球 CL におよぼす影響についての検討

好中球浮遊液 (5×10^5 cells) に種々の濃度の AMPH-B, FLCZ, MCZ 溶解液 20 μ l (最終的に 0.01~25 μ g/ml となるように調整) または同容量の注射用生理食塩水をコントロールとして添加し, MEM とルミノール 20 μ l を加えて総量 1 ml とした検体を, 10~60 分間 37°C で保温後, curdlan 20 μ l (500 μ g) を刺激物として 20 分間の CL を測定した。

6. 統計処理

Student's t-test を用い, $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

II. 結果

1. 粒子状 β -グルカンの好中球 CL, 全血 CL 産生能

Zymosan, zymocel, curdlan のそれぞれの刺激により産生される好中球 CL 活性を Table 1 に示した。それぞれの粒子状 β -グルカン 100 μ g, 500 μ g, 1,000 μ g により誘導される好中球 CL 活性は, zymosan, zymocel,

curdlan の順に強かった。これらの粒子状β-グルカンにより誘導される好中球のCL活性は容量依存的であった。種々の容量の curdlan により誘導されるCL活性を Fig. 1 に示した。

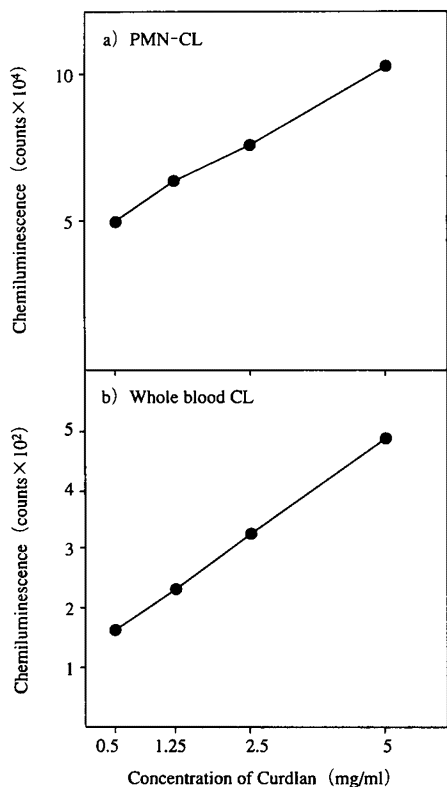


Fig. 1. CL values of polymorphonuclear leukocytes (PMN) and whole blood upon stimulation with curdlan.

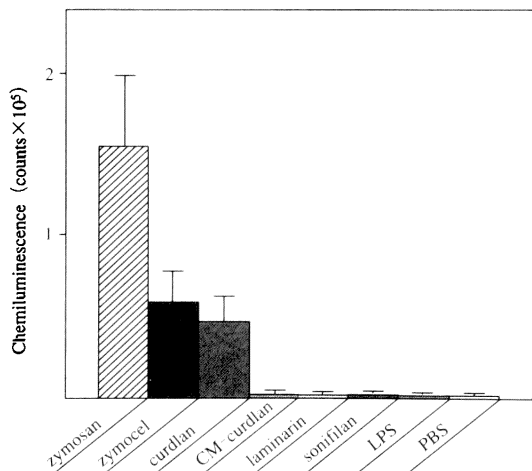


Fig. 2. CL values of polymorphonuclear leukocytes (PMN) upon stimulation with various β-glucans and lipopolysaccharide (LPS). PMN-CL was measured upon stimulation with 500 μg of various β-glucans and 10 μg of LPS. Data are shown as 20-min integrated CL counts with means and SDs (n=10).

2. 可溶性β-グルカンとLPSの好中球CL産生能

可溶性β-グルカンであるCM-curdlan, laminarin, sonifilan の種々の濃度 (10 ng~1 mg) で好中球を直接刺激した場合は、コントロール (PBS) と比較して好中球CLの増強がみられず、可溶性β-グルカンには好中球に作用して直接的に活性酸素を放出させる作用はみられなかった。同様に種々の容量のLPS (100 pg~10 μg) で好中球を直接刺激した場合にも好中球CL活性の増強はみられなかった。各種β-グルカン500 μgおよびLPS 10 μg刺激により誘導される好中球CL活性を Fig. 2 に示す。

Table 1. CL values of polymorphonuclear leukocytes (PMN) induced by particulate β-glucans

Dose (μg)	100	500	1,000	
zymosan	7.98 ± 2.12	15.10 ± 4.38	21.9 ± 6.22	(counts × 10 ⁴)
zymocel	3.36 ± 1.09	6.08 ± 2.10	7.61 ± 2.91	(counts × 10 ⁴)
curdlan	2.68 ± 0.89	5.01 ± 1.77	7.23 ± 2.84	(counts × 10 ⁴)

Data are shown as 20-min integrated CL counts with means and SDs (n=8).

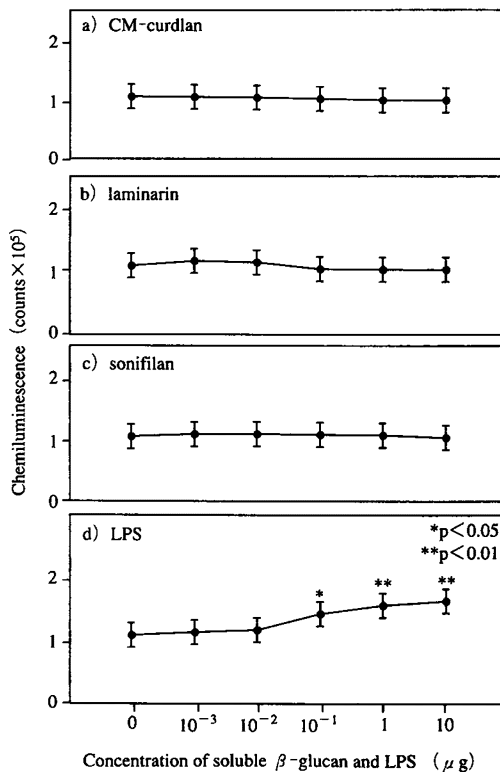


Fig. 3. Priming effect of water-soluble β-glucans and lipopolysaccharide (LPS) on the CL response of polymorphonuclear leukocytes (PMN) upon stimulation with PMA.

PMN-CL was measured upon stimulation with PMA after 60 min incubation with a) CM-curdlan, b) laminarin, c) sonifilan and d) LPS. Data are shown as means and SDs (n=10). Significant differences (*p<0.05, **p<0.01) from controls without LPS.

3. PMA 刺激時の好中球 CL に対する可溶性 β-グルカンと LPS の priming 効果

可溶性 β-グルカンである CM-curdlan や laminarin, sonifilan の 10^{-3} ~ $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度で好中球と 60 分間接触させた後に PMA で刺激した場合には, 好中球の CL 活性に有意な変化を認めなかったが, LPS で好中球を 60 分間前処理した後で PMA で刺激した場合には, LPS 100 ng/ml 以上の濃度から有意な好中球 CL の増強がみられた (Fig. 3)。さらに, LPS $1 \mu\text{g/ml}$ の濃度において血清が存在しない場合は, 10 分間の好中球との接触時間では CL 反応に対する有意な priming 効果が見られないが, 血清存在下においては LPS の priming 効果が 10 分の接触で認められた。これに対して, 可溶性 β-グルカンは血清存在下においても, PMA 刺激による好中球の CL 活性に有意な影響を与えなかった (Fig. 4)。

4. 粒子状 β-グルカン刺激時の好中球 CL に及ぼす可溶性 β-グルカンと LPS の効果

種々の濃度の CM-curdlan を好中球と 60 分間接触させた後に, 粒子状 β-グルカンである curdlan で刺激すると, 好中球の CL 活性の有意な抑制が $10 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度の CM-curdlan で前処理することにより認められた (Fig. 5-a)。一方, LPS を好中球と 60 分間接触させた後に, curdlan で刺激すると好中球の CL 活性の有意な増強が 100 ng/ml 以上の濃度で認められた (Fig. 5-b)。可溶性 β-グルカンである CM-curdlan による好中球 CL の抑制効果は, zymocel や *C. albicans* を刺

激物とした場合にも同様に認められた (Fig. 6-a, b)。他の可溶性 β-グルカンである laminarin や sonifilan の $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度で好中球を前処理した場合においても, curdlan の食作用に付随する好中球の CL 活性は, コントロールと比較して, それぞれ 26.5%, 23.5% 抑制した ($P < 0.05$)。

5. 抗真菌薬の粒子状 β-グルカン刺激時の好中球 CL におよぼす影響

3 種類の注射用抗真菌薬である AMPH-B, FLCZ, MCZ の好中球の活性酸素産生能におよぼす影響を調べるために, 上記薬剤と好中球を 10~60 分間接触させた後で, curdlan で刺激して食作用に付随する好中球の活性酸素産生能を測定した。60 分間の接触では, MCZ は好中球の CL 反応に有意な影響を与えなかったが, AMPH-B は $1 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で有意な増強効果を示し, FLCZ は $1 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度において有意な抑制効果を示した (Fig. 7)。10 分間の接触では 0.1 ~ $25 \mu\text{g/ml}$ のいずれの濃度においても AMPH-B と MCZ は有

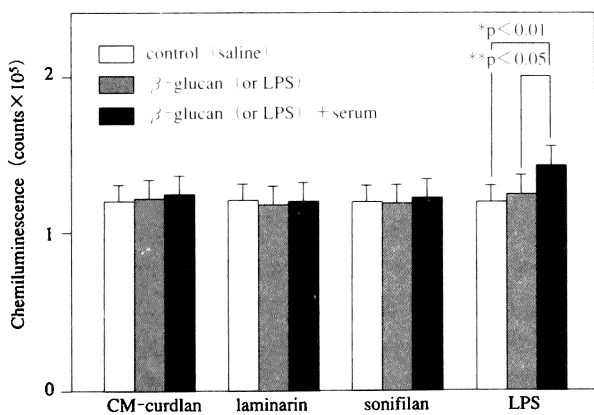


Fig. 4. Priming effect of water-soluble β-glucans and lipopolysaccharide (LPS) on the Phorbol myristate acetate (PMA)-induced CL response of polymorphonuclear leukocytes (PMN) in the presence of serum.

In the presence of $20 \mu\text{l}$ of serum, PMN-CL was measured upon stimulation with PMA after 10 min incubation with a) CM-curdlan, b) laminarin, c) sonifilan and d) LPS. Data are shown as means and SDs ($n=5$). Significant differences ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$) from controls without LPS.

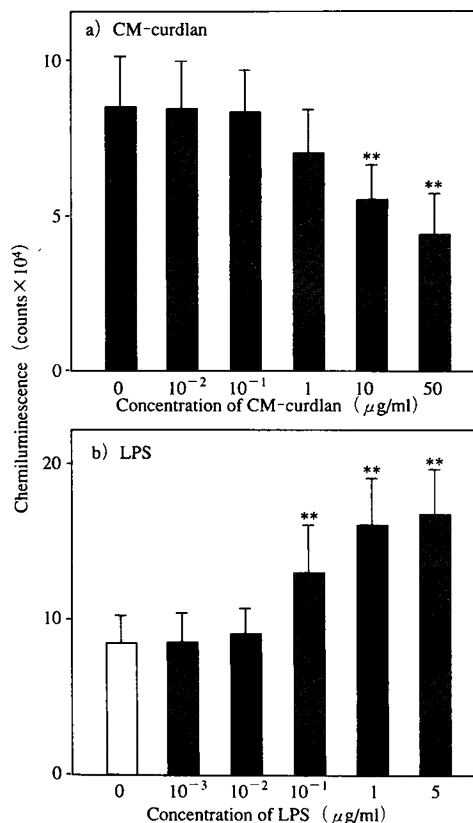


Fig. 5. Effect of CM-curdlan and lipopolysaccharide (LPS) on the CL response of polymorphonuclear leukocytes (PMN) upon stimulation with curdlan. PMN-CL was measured upon stimulation with curdlan after 60 min incubation with a) CM-curdlan and b) LPS. Data are shown as means and SDs ($n=8$). Significant differences ($**p < 0.01$) from controls without CM-curdlan or LPS.

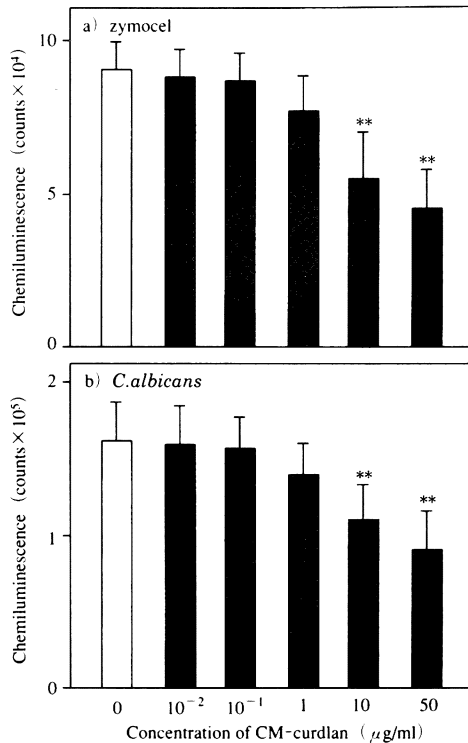


Fig. 6. Inhibitory effect of CM-curdlan on the CL response of polymorphonuclear leukocytes (PMN) upon stimulation with zymocel and *Candida albicans*.

PMN-CL was measured upon stimulation with a) zymocel and b) *C. albicans* after 60 min incubation with CM-curdlan. Data are shown as means and SDs (n=8). Significant differences (**p<0.01) from controls without CM-curdlan.

意な影響を与えなかったが、FLCZはコントロールと比較して5 µg/ml以上の濃度において有意な抑制効果を示し、5, 10, 25 µg/mlの濃度でそれぞれ33.8%, 72.0%, 90.4%程好中球のCL活性を抑制した(P<0.01)。

III. 考 察

本研究において、粒子状β-グルカン、ヒトの好中球に直接作用して活性酸素を放出させる作用があることが明らかになった。一方、可溶性β-グルカンには直接的な活性酸素誘導能は見られなかった。粒子状β-グルカンの中でも、活性酸素誘導能の強さはzymosanがもっとも強く、続いてzymocelとcurdlanの順であった。β-グルカンの食細胞の活性酸素放出能に関する報告では、マウスのマクロファージやヒトの単球、単球系培養細胞に対して粒子状のβ-グルカンが活性酸素放出能を有することが報告されている⁷⁻¹¹⁾。一方、今回の研究と同様に可溶性β-グルカンには食細胞に作用して直接的に活性酸素誘導能は認められないとする報告が多いが^{17,8)}、ヒトの好中球を用いた検討は数少ない。今回、入手可能な製剤であるzymosan, zymocel, curdlanの3種類の粒子状β-グルカンでその作用を比較したが、同

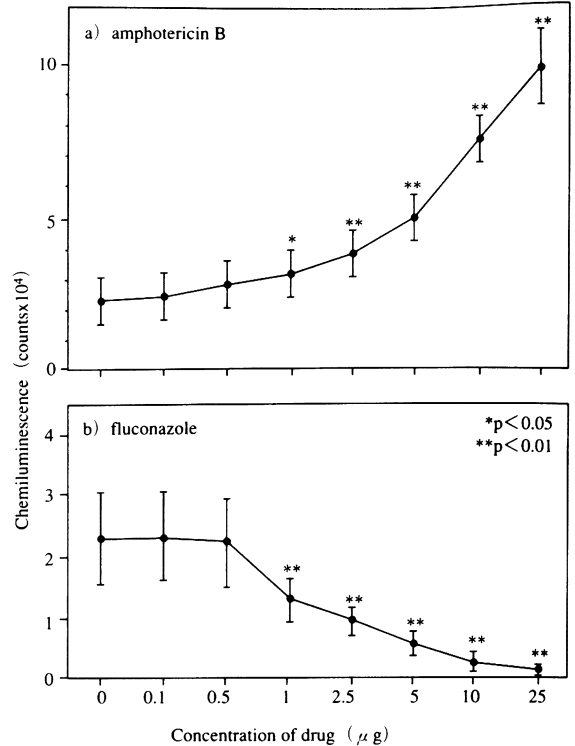


Fig. 7. Effect of antifungal agents on the CL response of polymorphonuclear leukocytes (PMN) upon stimulation with curdlan.

PMN-CL was measured by stimulation with curdlan after 60 min incubation with a) amphotericin B and b) fluconazole. Data are shown as means and SDs (n=8). Significant differences (*p<0.05, **p<0.01) from controls without drugs.

じ *Saccharomyces cerevisiae* に由来するzymosanとzymocelで比較した場合にはzymosanの方が強い活性酸素誘導能を有していた。その理由は不明であるが、zymocel粒子を構成する主成分がβ-グルカンであるのに対して、zymosanにはβ-グルカン以外にマンナン蛋白などが含まれており¹⁾、β-グルカンとこのような蛋白との結合物の方が食細胞への刺激性が強いのかも知れない。*Alcaligenes faecalis*由来の粒子状β-グルカンであるcurdlanにおいてもzymocelとほぼ同様の活性酸素誘導能を示し、zymosanよりも弱かった。一方、今回検討した3種類の可溶性β-グルカンであるCM-curdlan, laminarin, sonifilanのいずれにおいても、好中球に直接作用して活性酸素を誘導する作用はみられなかった。後に示すように可溶性β-グルカンがβ-グルカンのレセプターであるCR3レセプター¹²⁻¹⁴⁾を介して好中球膜に結合しても、それが刺激となって活性酸素の放出には至らないものと考えられる。このような作用はLPSがCD14レセプターに結合しても活性酸素の直接的な放出が起らないのと同様であった。好中球をLPSで前処理し、その後でPMA, zymosan, 細菌など

を系に加えて刺激すると、未処理の好中球に比較して活性酸素の産生が有意に増強すること (priming 効果) は良く知られているが¹⁵⁾、可溶性 β -グルカンで前処理し、PMA で刺激しても好中球の活性酸素産生能の増強はみられなかった。逆に、LPS とは異なり、真菌や粒子状 β -グルカンの貪食に付随する好中球の活性酸素産生能が、可溶性 β -グルカンで前処理しておくことで抑制されることが明らかになった。すでに、Czop らにより可溶性 β -グルカンでマクロファージや単球を前処理しておく、引き続き粒子状 β -グルカンの貪食が抑制されることが報告されており、これは β -グルカンレセプターに可溶性 β -グルカンが付着することで、粒子状 β -グルカンの貪食が抑制されることによる^{14,16,17)}。活性酸素産生能の抑制もこれと同じ機序によると思われる。さらに、*C. albicans* の食作用に付随する活性酸素の産生も抑制がかかることから、*C. albicans* の貪食も β -グルカンレセプターを介して行われることが推測される。

β -グルカンの走化能や貪食能、殺菌能など他の好中球機能におよぼす影響については種々の報告があるが、対象や測定方法により必ずしも一定の成績が得られていない¹²⁾。走化能に関しては zymosan は血清存在下で強力な走化性因子となることはよく知られており、これは補体の alternative pathway を介した補体の活性化が関与するとされている^{18,19)}。これまでの報告では、zymosan や zymocel などの粒子状 β -グルカンは補体の活性化作用や走化性因子としての作用が強いが、可溶性 β -グルカンの作用は弱いとされており^{19,20)}、今回の活性酸素産生能の成績と合わせても好中球への作用は粒子状 β -グルカンの方が強く、炎症反応への関与は β -グルカンが粒子状の場合に強く起こることが示唆される。*In vivo* においてモルモットの気道に LPS を投与した後の肺胞洗浄液中には、好中球やマクロファージ、好酸球などの炎症細胞の浸潤がみられるが、curdlan との併用で浸潤する細胞の数が增加することが報告されている²¹⁾。同じ系において、curdlan 単独ではマクロファージや好酸球の浸潤がみられることが報告されている。真菌やその菌体成分である β -グルカンの吸入により発症すると考えられている Sick building syndrome などの気道の過敏性反応の亢進には、これら炎症細胞の浸潤と、炎症細胞から放出されるロイコトリエン B₄、血小板活性化因子、ヒスタミンなどのケミカルメディエーターが重要な役割を果たすが、活性酸素の関与も指摘されている²²⁻²⁵⁾。気道過敏性は、物理的・化学的な刺激に対し、気道平滑筋の収縮反応が亢進した状態であり、好中球やマクロファージ、好酸球から放出される活性酸素やキサンチンキサンチンオキシダーゼ系で産生される活性酸素が、気道の攣縮と、これに引き続き気道の反応性の亢進を引き起こすことが明らかにされている^{24,25)}。今回の研究で、粒子状 β -グルカンが好中球に作用して活性酸素を放出

させる作用があることから、 β -グルカンの吸入や抗真菌薬投与後に真菌から遊離される β -グルカンが粒子状の場合には、食細胞に作用して活性酸素を放出させて気道の過敏性を亢進させる可能性がある。さらに、粒子状 β -グルカンは単球やマクロファージに作用して、好中球の活性化を促す tumor necrosis factor (TNF)- α や interleukin (IL)-1, interferon- γ などの炎症性サイトカインの産生を引き起こし^{2,26)}、炎症反応を増長させる可能性がある。これに対して、可溶性 β -グルカンには直接的な好中球からの活性酸素産生を引き起こす作用はないものの、*C. albicans* や粒子状 β -グルカンの貪食に付随する活性酸素産生能を抑制することが明らかになった。*Candida* の食作用に付随する活性酸素産生の抑制は、*Candida* 感染症において可溶性 β -グルカンが存在すると好中球の貪食殺菌が円滑に進まなくなる可能性があることを示唆している。臨床で長期にわたり気管内挿管されている患者の気道分泌物からは、*Candida* 属を中心とした酵母様真菌が検出される頻度が極めて高く、当教室では全分離菌の約 25% を占めている。これらは通常コロニゼーションとして考えられ、病原性についてはあまり検討されていない。しかし、今回の検討より明らかな感染症状がなくても、好中球などの炎症細胞に作用して気道の過敏性や炎症反応に関与する可能性があり、特に抗真菌薬投与後には β -グルカンの遊離が起こり、患者の病態を修飾する可能性があるため注意が必要と思われる。カリニ肺炎を例にとると、*Pneumocystis carinii* は分類学上は真菌に属し、細胞膜に β -グルカンを有している。筆者らの検討でも、カリニ肺炎患者の血清 β -グルカン濃度は高値を示し、化学療法後も数週間にわたり陽性を示すデータが得られている (未発表データ)。AIDS 患者に発症した重症のカリニ肺炎に対しては、sulfamethoxazole-trimethoprim 合剤などの抗真菌薬に副腎皮質ステロイドを併用することが推奨されている^{27,28)}。治療後には、病原体の破壊に伴う β -グルカンなどの遊離が起こり、感染局所においては好中球やマクロファージなどの免疫担当細胞からの活性酸素や炎症性サイトカインなどのメディエーターの過剰産生が起こる可能性がある。種々の β -グルカン自体も、血管透過性亢進を起こすので²⁹⁾、肺水腫から低酸素血症をきたして病態がさらに悪化させることが推測される。ステロイドは、このような組織傷害を防ぐことを期待して使用されている^{27,28)}。今後は、病巣が広範囲におよぶ重症の真菌感染症においても、治療後の β -グルカンの遊離と免疫系の活性化に関する検討が必要と思われる。

さらに、真菌感染症の治療に使用される抗真菌薬が、好中球などの免疫担当細胞の機能に影響をおよぼすかどうかについての検討も重要である。近年、抗真菌薬の免疫担当細胞におよぼす効果が注目されているが、抗真菌薬に関してはまだ十分に研究されたとはいえない^{30,31)}。今

回、ヒト好中球の粒子状 β -グルカン刺激による活性酸素産生能におよぼす AMPH-B, MCZ, FLCZ の効果について検討したところ、AMPH-B は増強効果を示し、FLCZ は抑制効果、MCZ は特に影響を与えなかった。これまで食細胞機能におよぼす抗真菌薬の研究は AMPH-B について多く検討されており、対象とする動物や食細胞の種類、実験方法によってその成績は相反している³⁰⁻⁴³。一般に AMPH-B は、好中球の走化能、貪食能、殺菌能に対して抑制的に働くと考えられている³²⁻³⁸、活性酸素産生能に関しては血中濃度レベルで抑制するという報告³⁸、不変とする報告^{31,39}、高濃度で増強させるという報告がある³⁵。このような成績の違いは抗菌薬と食細胞の接触時間、刺激物質の種類、測定方法の違いによるものと思われる。AMPH-B の好中球におよぼす効果は、AMPH-B が好中球のステロール膜に結合しその機能を修飾することによるとされており、マクロファージに対しても TNF- α などのサイトカイン産生能を増強すること⁴⁰、マウスの *C. albicans* や黄色ブドウ球菌感染症の防御効果などの免疫増強効果があることも報告されている³⁹⁻⁴¹。これに対して、FLCZ の好中球の活性酸素産生に対して抑制作用を示す機序は不明である。Abruzzo ら⁴²も FLCZ が CL 反応を抑制すると報告しているが、治療域濃度では好中球機能に影響を与えないとする報告もある^{39,42}。MCZ は今回の成績と同様に影響を与えないと報告されている^{31,32}。しかし、今回のような curdlan や zymocel などの β -グルカンに対するヒト好中球の活性酸素産生能におよぼす抗真菌薬の検討はまだなされておらず、検討した3種類の薬剤で差がみられたことは興味ある知見である。今回の成績から、粒子状 β -グルカンによる好中球の活性酸素産生を抑制することで臓器障害を防ぐという観点からは FLCZ の使用が勧められるし、免疫賦活という点からは AMPH-B の使用がよいのかもしれないが、*in vivo* での治療後の β -グルカンの遊離を含めたさらなる検討が必要と思われる。いずれにせよ AMPH-B や FLCZ は、粒子状 β -グルカンにより誘導される好中球の活性酸素産生能を血中濃度レベルで修飾することが判明したので、抗真菌薬の使用に際しては、抗菌力、体内動態だけでなく、宿主の免疫系に及ぼす薬剤の影響も考慮に入れた薬剤の選択が必要と思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御助言、御校閲を賜りました帝京大学内科 佐藤友英教授、山中正己主任教授、ならびに直接御指導頂きました同内科 斧 康雄講師、感染化療研究の皆様に深謝いたします。

文 献

1) Stone B A, Clarke A E: (1 \rightarrow 3)- β -glucans and animal defence mechanisms. *Chemistry and biology of (1 \rightarrow 3)- β -glucans* (Stone B A, Clarke A E)

P 525~564, La Trobe University Press, Australia, 1992

- 2) Yadomae T, Ohno N: Structure-activity relationship of immunomodulating (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans. *Recent Res. Devel. in Chem. & Pharm. Sciences.* 1: 23~34, 1996
- 3) Beck-Sague C M, Jarvis W R: National Nosocomial Infections Surveillance System: Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in United States, 1980~1990. *J. Infect. Dis.* 167: 1247~1251, 1993
- 4) Hurley J C: Antibiotic-induced release of endotoxin: A reappraisal. *Clin. Infect. Dis.* 15: 840~854, 1992
- 5) Mitsuya M, Wada K, Yamaguchi H: *In vitro* studies on the release of a G test-positive (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans from various fungal pathogens. Third glucan Inhalation toxicity workshop. Committee on Organic Dusts, ICOH, Report: 29~37, 1994
- 6) Ono Y, Kunii O, Kobayashi K, et al.: Evaluation of opsonophagocytic dysfunctions in severely burned patients by luminol-dependent chemiluminescence. *Microbiol. Immunol.* 37: 567~571, 1993
- 7) Adachi Y, Okazaki M, Ohno N et al.: Leukocyte activation by (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans. *Mediators of Inflammation.* 6: 251~256, 1997
- 8) Chiba N, Ohno N, Terui T et al.: Effect of highly branched (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan, OL-2, on zymosan-mediated hydrogen peroxide production by murine peritoneal macrophages. *Pharm Pharmacol. Lett.* 6.1: 12~15, 1996
- 9) Adachi Y, Ohno N, Yadomae T: Inhibitory effect of β -glucans on zymosan-mediated hydrogen peroxide production by murine peritoneal macrophages *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.* 16: 462~467, 1993
- 10) Jorgensen J B, Robertsen B: Yeast β -glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 19: 43~57, 1995
- 11) Okazaki M, Chiba N, Adachi Y, et al.: Signal transduction pathway on β -glucans-triggered hydrogen peroxide production by murine peritoneal macrophages *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.* 19: 18~23, 1996
- 12) Czop J K, Austen F: A β -glucan inhibitable receptor on human monocytes: its identity with phagocytic receptor for particulate activator of the alternative complement pathway. *J. Immunol.* 134: 2588~2593, 1985
- 13) Czop J K, Puglisi A V, Miorandi D Z et al.: Perturbation of β -glucan receptor on human neutrophils initiates phagocytosis and leukotriene B₄ production. *J. Immunol.* 141: 3170~3176, 1988
- 14) Czop J K, Kay J: Isolation and characterization of β -glucan receptors on human mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 173: 1511~1520, 1991
- 15) Ono Y: Chemiluminescence response of human phagocytes in septic patients: Priming effects of lipopolysaccharide and inflammatory cytokines. *Chemotherapy (Tokyo)* 42: 580~591, 1994

- 16) Janusz M J, Austen K F, Czop J K: Isolation of a yeast heptagluco-side that inhibits monocyte phagocytosis of zymosan particles. *J. Immunol.* 142: 959~965, 1989
- 17) Nemoto J, Ohno N, Saito K, et al.: Expression of interleukin 1 family mRNAs by a highly branched (1→3)- β -D-glucans, OL-2. *Biol. Pharm. Bull.* 16: 1046~1050, 1993
- 18) Ohno N, Saito K, Nemoto J, K et al.: Immunopharmacological characterization of a highly branched (1→3)- β -D-glucans. OL-2, isolated from *Omphalia lapidescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 16: 414~419, 1993
- 19) Suzuki T, Ohno N, Saito K, et al.: Activation of the complement system by (1→3)- β -D-glucans having different degrees of branching and different ultrastructures. *J. Pharmacobio-Dyn.* 15: 277~285, 1992
- 20) Suzuki T, Ohno N, Adachi Y, et al.: Preparation and biological activities of derivatives of (1→3)- β -D-glucan, *J. Pharmacobio-Dyn.* 14: 256~266, 1991
- 21) Birgitta F, Margareta S, Ragnar R: Pulmonary inflammation induction by repeated inhalation of β (1→3)-D-glucan and endotoxin. *Int. J. Exp. Path.* 75: 85~90, 1994
- 22) Rylander R, Persson K, Goto H, et al.: Airborne β -1,3-glucan may be related to symptoms in sick buildings. *Indoor Environ.* 1: 263~267, 1992
- 23) Murphy K R, Wilson M C, Irvin C G et al.: The requirement for polymorphonuclear leukocytes in the late asthmatic response and heightened airway reactivity in an animal model. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134: 62~68, 1986
- 24) Katsumata U, Miura M, Ichinose M, et al.: Oxygen radicals produce airway constriction and hyperresponsiveness in anesthetized cats. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 1158~1161, 1990
- 25) Chanez P, Yukawa T, Dent G, et al.: Generation of oxygen free radicals from blood eosinophils from asthma patients after stimulation with platelet-activating factor and phorbol ester. *Eur. Resp. J.* 3: 1002~1007, 1990
- 26) Sakurai T, Ohno N, Yadomae T: Effects of fungal β -glucan and interferon- γ on the secretory functions of murine alveolar macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 60: 118~124, 1996
- 27) McGowan J E, Chesney P J, Crossley K B, et al.: Guidelines for the use of systemic glucocorticosteroids in the management of selected infections. *J. Infect. Dis.* 165: 1~13, 1991
- 28) Bozzette S A, Sattler F R, Chiu J, et al.: A controlled trial of early adjunctive treatment with corticosteroids for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 323: 1451~1457, 1990
- 29) Ohno N, Miura T, Miura N N, et al.: Effect of various β -D-glucans on vascular permeability in mice. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 6: 115~118, 1996
- 30) Van Vlem B, Vanholder P R, De Paepe, et al.: Immunomodulating effects of antibiotics: Literature Review. *Infection.* 24: 275~291, 1996
- 31) Ono Y, Kunii O: Influence of forty-two antimicrobial agents on the chemiluminescence response of human phagocytic cells. *Chemotherapy (Tokyo).* 37: 583~590, 1989
- 32) Abruzzo G K, Giltinan D M, Capizzi T P, et al.: Influence of six antifungal agents on the chemiluminescence response of mouse spleen cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 602~607, 1986
- 33) Bjorksten B, Ray C, Quite P G: Inhibition of human neutrophil chemotaxis and chemiluminescence by amphotericin B. *Infect. Immun.* 14: 315~317, 1976
- 34) Marmer D J, Fields B T Jr, France G L, et al.: Ketoconazole, amphotericin B, and amphotericin B methyl ester: comparative *in vitro* and *in vivo* toxicological effects on neutrophil function. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 660~665, 1981
- 35) Supapitayakul S R, Kizlatis L R, Andersen B R: Stimulation of human and canine neutrophil metabolism by amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19: 284~289, 1981
- 36) Chan C K, Balish E: Inhibition of granulocyte phagocytosis of *Candida albicans* by amphotericin B. *Can. J. Microbiol.* 24: 363~364, 1978
- 37) Johnson E M, Warnock D W, Richardson M D, et al.: *In vitro* effect of itraconazole, ketoconazole and amphotericin B on the phagocytic and candidacidal function of human neutrophils. *J. Antimicrob. Chemother.* 18: 83~91, 1986
- 38) Yasui K, Masuda M, Matsuoka T, et al.: Miconazole and amphotericin B alter polymorphonuclear leukocyte functions and membrane fluidity in similar fashions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1864~1868, 1988
- 39) Emmanuel R, Tomas J W, Marc R, et al.: Effects of antifungal agents on the function of human neutrophils *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 196~201, 1990
- 40) Tokuda Y, Tsuji M, Yamazaki M, et al.: Augmentation of murine tumor necrosis factor production by amphotericin B *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2228~2230, 1993
- 41) Bistoni F, Vecchiarelli A, Mazzola R, et al.: Immunoadjuvant activity of amphotericin B as displayed in mice infected with *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 625~631, 1985
- 42) Abruzzo G K, Fromtling R A, Turnbull T A, et al.: Effects of bifonazole, fluconazole, itraconazole, and terbinafine on the chemiluminescence response of immune cells. *J. Antimicrob. Chemother.* 20: 61~68, 1987
- 43) Senior D S, Shaw J T B: *In vitro* effects of fluconazole (UK-49, 858) and ketoconazole on mouse lymphocyte proliferation and on *Candida* blastospore destruction by human polymorphonuclear leukocytes. *Int. J. Immunopharmacol.* 10: 169~173, 1988

Influence of (1-3)- β -D-glucans and antifungal agents on the chemiluminescence response of human polymorphonuclear leukocytes

Junko Kato

Department of Internal Medicine, Teikyo University School of Medicine,
Kaga 2-11-1, Itabashi-ku, Tokyo 173-8606, Japan

To clarify the pathogenicity of (1-3)- β -D-glucan (β -glucan), the immunomodulatory activity of three types of particulate (water-insoluble) β -glucan and three water-soluble β -glucans, were compared in respect to the production of reactive oxygen species (ROS) by human polymorphonuclear leukocytes (PMN) *in vitro*. The production of ROS was measured by a chemiluminescence (CL) assay in which luminol was added to the samples and the PMN were subsequently stimulated with a particulate β -glucan (curdlan, zymosan or zymocel) and a water-soluble β -glucan (CM-curdlan, laminarin or sonifilan). This assay was also used to test the ability of each of the three water-soluble β -glucans and lipopolysacchhalide (LPS) to augment the priming effects on the production of ROS from PMN. Each particulate β -glucan induced the apparent CL of PMN in a dose-dependent manner, while water-soluble β -glucans and LPS could not at any concentrations tested. PMN were incubated for 60 min at 37°C with LPS and three types of water-soluble β -glucan, and the integrated CL response induced by phorbol myristate acetate (PMA) was measured for 20 min, which permitted comparisons of the priming effects of LPS in combination with each water-soluble β -glucans. Preincubation with LPS resulted in an increase in the CL response of PMN at concentrations of more than 100 ng/ml. Similar results were obtained in the PMN sample, which included a small amount of serum after only 10 min incubation with LPS. However, no significant priming effect was observed when PMN were incubated for 10 and 60 min with various concentrations (1 ng-10 μ g/ml) of CM-curdlan, laminarin or sonifilan. PMN-CL induced by particulate β -glucans such as curdlan or zymocel and *Candida albicans* was significantly prevented when PMN was preincubated with more than 10 μ g/ml of the water-soluble β -glucans for 60 min at 37°C and then exposed to particulate β -glucan and *C. albicans*. These inhibitory effects were dose-dependent. Also, the effect of three antifungal agents, amphotericin-B (AMPH-B), fluconazole (FLCZ) and miconazole (MCZ) on the CL response of PMN were studied *in vitro*. After 60 min incubation with more than 1 μ g/ml of AMPH-B, CL values of PMN during phagocytosis of curdlan were significantly enhanced, whereas these values were suppressed with FLCZ at the concentration of more than 1 μ g/ml. There was no significant effect on the CL response of PMN in treatment with MCZ. These findings indicate that these β -glucans and antifungal agents modulate the oxygen metabolism of human PMN, however, further studies are required to elucidate the mechanisms responsible for this immunomodulatory effect and to establish its clinical relevance.