

Sporothrix schenckiiの糖ペプチド複合体の研究: 菌の分化に伴う免疫化学的性状の変化

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8961

Sporothrix schenckii の糖ペプチド複合体の研究

菌の分化に伴う免疫化学的性状の変化

金沢大学医学部皮膚科学教室 (主任: 広根孝衛教授)

高 田 実

(昭和57年1月7日受付)

Sporothrix schenckii により産生される糖ペプチド複合体をその培養濾液から分離し、菌の形態と産生糖ペプチド複合体の化学組成との関係および糖ペプチド複合体の化学組成と免疫学的性質との関係について検討した。*Sporothrix schenckii* (ATCC 10268 株) を 0.5% ペプトン, 0.5% 酵母エキス, 2% ブドウ糖含有透析液体培地に 25°C で振盪培養し、培養後 2, 7 および 14 日目に菌の形態を観察し、また培養濾液から Con A-sepharose 4B カラムクロマトグラフィーにより Con A 結合性糖ペプチド複合体を分離、さらに DEAE-sephadex A50 カラムクロマトグラフィーにより Con A 非結合性糖ペプチド複合体を分離した。培養後の菌形態と糖ペプチド複合体の糖組成の比較検討により、培養 2 日目には菌のほとんどすべては分生子を持たない菌糸であり、その時期に分離された糖ペプチド複合体の糖部分はほとんどすべて mannose により構成されるが、7 および 14 日目には菌は分生子および胞子への分化を示すとともに糖ペプチド複合体の糖組成にかなり多量の rhamnose と少量の galactose が増加することが明らかにされた。免疫拡散法では、培養後 2 日目の濾液から分離された画分は抗 *S. schenckii* 抗血清に対して弱い反応を示し、* 抗 *Saccharomyces cerevisiae* 抗血清に対して強い交叉反応を示したが、培養後 7 日目および 14 日目の濾液から分離された画分はすべて抗 *S. schenckii* 抗血清に対して強い反応性を示し、また抗 *Klebsiella pneumoniae* K47 抗血清、抗 *Cladosporium werneckii* 抗血清および抗 *S. cerevisiae* 抗血清に対しても種々の程度の交叉反応性を示した。これらの免疫拡散法の結果より rhamnose のみでなく、galactose および mannose も抗原決定基として血清学的交叉反応に関与していることが示唆された。*S. schenckii* 感作モルモットによる皮内反応により、Con A 結合性糖ペプチド複合体は遅延型反応に対する抗原性を示すが、Con A 非結合性糖ペプチド複合体はそれを示さないことが明らかにされた。なお、そのような違いはこれらの糖ペプチド複合体のペプチド部分のアミノ酸組成の差異によることが示唆された。

Key words *Sporothrix schenckii*, Double immunodiffusion test, Skin test

スポロトリコーシス (sporotrichosis) の免疫学的診断法は 1910 年頃から始められ¹⁾²⁾、血清反応および皮内反応の抗原として、*Sporothrix schenckii* (*S. schenckii*) の菌体³⁾、培養濾液⁴⁾またはそれらからの粗製抽出物質⁵⁾ が用いられていたが、近年その抗原物質が問題となり、抗原性物質の精製とその免疫化学的性状が追究されてきた。この点に関して、*S. schenckii* の菌体および培養濾液から抽出された糖ペプチド複合体が強い即時型及び遅延型反応を示すこと、この複合体の多糖体は主に

rhamnose と mannose から成ることがこれまでに示されている^{6)~9)}。またこの多糖体は、 α -(1,→6) 結合した mannopyranose の主鎖に、 α -L-rhamnopyranosyl または、 α -L-rhamnopyranosyl-(1,→2) -L-rhamnopyranosyl 側鎖を持ち、これら L-rhamnose の非還元末端が血清学的な抗原決定基の重要な構成要素であると報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。L-rhamnose は細菌類には広く分布している糖であるが、真菌ではこれらを持つものは稀である¹²⁾。従って、L-rhamnose を有する *S.*

The Variation of Immunochemical Properties of Peptide-Polysaccharides Produced by *Sporothrix schenckii* During Differentiation. Minoru Takata, Department of Dermatology, (Director: Prof. T. Hirone), School of Medicine, Kanazawa University.

S. schenckii の多糖体は極めて特徴的で、血清学的特異性も L-rhamnose によると考えられてきた¹³⁾。

ところが最近、*S. schenckii* は rhamnomannan 以外の多糖体を産生することが示された。Mendonça ら¹⁴⁾ は、*S. schenckii* が二相性真菌であることに注目し、菌の形態の変化により産生される多糖体の組成と構造も変化するのではないかと考え、菌株、培地組成、培養温度および培養日数を変えることによって孢子のみまたは菌糸のみの培養を得た。そして孢子から monorhamnosyl rhamnomannan を、分生子を形成した菌糸から dirhamnosyl rhamnomannan を、分生子を持たない菌糸の菌体から galactomannan を、またその培養上清から mannan をそれぞれ抽出したと報告している。しかし、これらの galactomannan や mannan の生物学的活性はまだ全く知られていない。

本研究では、菌株、培地組成および培養温度を一定に設定した *S. schenckii* 培養の培養濾液から種々の時期に抽出された糖ペプチド複合体について、菌の形態と産生糖ペプチド複合体の化学組成との関係および糖ペプチド複合体の化学組成と免疫学的性質の関係を検討した。

材 料 と 方 法

I. 使用菌株と培養条件

菌株は Sabouraud ブドウ糖寒天斜面培地に保存中の *S. schenckii* (ATCC 10268) を用いた。これを 0.5% ペプトン、0.5% 酵母エキス、2% ブドウ糖含有透析液体培地に室温で 2 週間振盪培養した。その菌液 0.01 ml を同じ透析液体培地 250ml に加えて 25°C で振盪培養し、培養後 2, 7 または 14 日目に各培地にホルマリンを 2% の割合で加え、いずれも室温で一昼夜静置したのち、培地中の菌の生育形態を顕微鏡下で観察した。

II. 糖ペプチド複合体の精製 (図 1)

培養後 2, 7 および 14 日目のホルマリン添加菌液を遠心して培養濾液をとり、これらの濾液を流中水で 5 日間透析し、風乾により約 1/20 に濃縮した。濃縮液に 5 倍量の 99% エタノールを加えて生じた沈殿物をアセトンで脱水乾燥し、粗製抗原を得た。粗製抗原より糖ペプチド複合体を精製するために用いた方法は次のようである。

1. Concanavalin A (Con A) -sepharose 4B カラムクロマトグラフィー

粗製抗原を Con A-sepharose 4B カラム (1.5 × 45cm) に添加した。溶出には 20mM Tris-HCl · 0.5M NaCl 緩衝液 (pH 7.5) を用い 2.5ml/hr の速度で行なった。吸光度 280nm で測定して、Con A 非吸着画分 (F-1) が完全に溶出されたのち、さらに 0.1M methyl- α

-D-mannosid で Con A 吸着画分 (F-2) を溶出した。

2. DEAE-sephadex A50 カラムクロマトグラフィー

Con A-sepharose 4B カラムで再溶出した F-1 をさらに DEAE-sephadex A50 (1.5 × 30cm) に添加した。溶出には 0.5M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を用い、1.5ml/hr の速度で行なった。各チューブごとにアンスロン反応 (後述) を行ない、本反応陽性の画分 (F-1a) を分離した。得られた画分は、各々 4°C の蒸留水で 2 日間透析後、凍結乾燥した。

III. 精製糖ペプチド複合体の化学分析

1. 糖の定量

アンスロン法¹⁵⁾に従い、mannose を標準として行なった。1mg/ml の濃度に溶解した試料 0.3ml をアンスロン試薬 3.0ml を加え、沸騰水中に正確に 10 分静置し、水で急冷後発色を 620nm で測定した。

2. 蛋白の定量

Folin-Lowry 法¹⁶⁾に従って行なった。1mg/ml の濃度に溶解した試料 0.3ml を Folin の A 液 3.0ml に加え、室温に 10 分間静置したのち、蒸留水で 2 倍に希釈したフェノール試薬 0.3ml を加えてさらに 30 分静置した。これを吸光度 660nm で測定した。標準物質にはウシ血清アルブミンを用いた。

3. 単糖組成の分析

Sweeley らの方法¹⁷⁾に準じて行なった。試料を 5% 塩

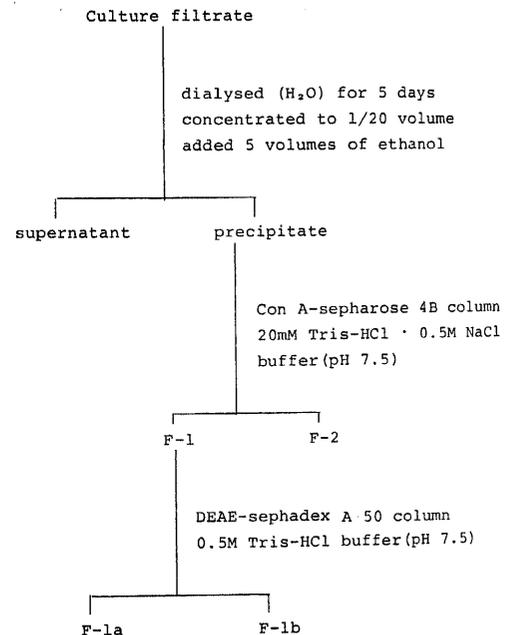


Fig. 1. Purification of peptide-polysaccharides from the culture filtrates of *S. schenckii*

酸メタノールにより 100°C で 5 時間処理後、ロータリーエバポレーターで乾固し、無水ピリジン 0.1ml に溶解した。これに hexamethyldisilazane 50 μ l および trimethylchlorosilane 30 μ l を加え、日立 163 型ガスクロマトグラフで測定した。カラムには 3 \times 200mm のガラスカラムを用い、80-100 メッシュのシリコンビーズに SE-30 を 5% にコーティングしたものを充填した。カラムの温度は 150°C、試料気化室の温度は 210°C とした。

4. アミノ酸組成の分析

試料 2mg を 6N HCl 1ml に溶解し、減圧下に封管したのち、110°C で 24 時間加水分解し、ロータリーエバポレーターで酸を除去後、クエン酸緩衝液 (pH 2.2) 2ml に溶解して、アトー MCL-703 型アミノ酸自動分析装置で測定した。

IV. 抗血清の作製

S. schenckii (ATCC 10268), *Cladosporium werneckii* (Duke University Medical Center 2785), *Saccharomyces cerevisiae* (明治薬科大学 J-6001) および *Klebsiella pneumoniae* K47 (国立予防衛生研究所 326) に対する抗血清を作製した。これらの菌をそれぞれ上述の液体培地に 35°C で 7 日間振盪培養し、遠沈により集められた菌を蒸留水で 3 回洗滌後アセトンで脱水乾燥した。これらの乾燥菌の生食懸濁液 (1mg/ml) 2ml を雄の白色家兎に週 2 回、2 週間静脈注射した。最終注射の 1 週後、心穿刺により採血して血清を分離し、抗血清を得た。

V. 免疫拡散法 (Immunodiffusion test)

Ouchterlony の方法¹⁹⁾ に準じて行なった。抗血清を center well に入れ生食水に 1mg/ml の濃度に溶解した各画分と 4°C で反応させ沈降線の形成を観察した。

VI. 皮内反応

上述の方法で得られた *S. schenckii* の乾燥菌より、ガーゼで濾して胞子を分離し、胞子の生食水懸濁液 (1mg/ml) 1ml を Freund's complete adjuvant 1ml と混合し、モルモットの皮下に 2 週間隔で合計 3 回注射した。最終注射の 2 週後に皮内反応を施行した。皮内反応には、各画分を 0.25% フェノール添加生食水に溶解した液を抗原液として用いた。感作モルモットの背に抗原液 0.1ml (100 μ g/ml) を皮内注射し、48 時間後に硬結を計測し、直径 5mm 以上の硬結を陽性と判定した。対照として、無処置のモルモットに同様の方法で皮内反応を行なった。

成 績

I. 培養菌細胞の形態

液体培地で培養後 2 日目には、*S. schenckii* の菌糸の

みがみられ、分生子や胞子は認められなかった (図 2a)。培養後 7 日目には、菌糸とともに分生子および胞子も多数みられた (図 2b)。培養後 14 日目にも、菌糸、分生子、胞子がいずれも多数みられた。

II. 糖ペプチド複合体の化学組成

Con A-sepharose 4B カラムクロマトグラフィーにより、培養後 2, 7 および 14 日目の培養濾液のエタノール沈殿物はいずれも F-1 (Con A 非吸着画分) と F-2 (Con A 吸着画分) に分けられた (図 3)。さらに DEAE-sephadex A50 カラムクロマトグラフィーにより、F-1 は F-1a と F-1b に分けられた (図 4)。F-1a はアンスロン反応陽性の多糖体を主成分とする画分、F-1b は 280nm で高い吸光度を示す蛋白画分であった。これら 2 段階のカラムクロマトグラフィーにより、糖ペプチド画分として培養後 2 日目の培養濾液からの F-1a、F-2

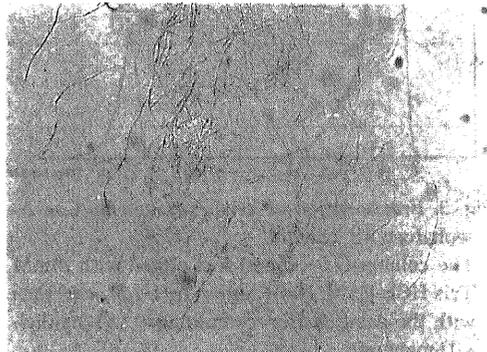


Fig. 2a. Growth morphology of *S. schenckii* on the 2nd day of incubation.

All of the fungal cells are unsporulated mycelia ($\times 200$).

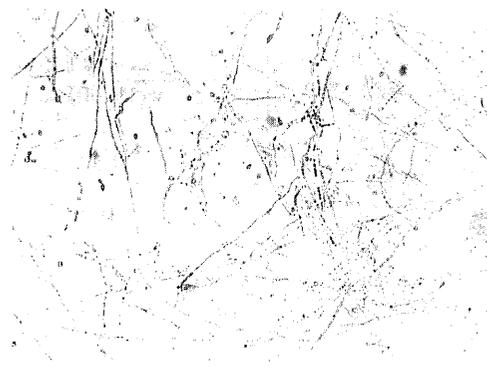


Fig. 2b. Growth morphology of *S. schenckii* on the 7th day of incubation.

Many conidia and yeast-like cells are formed ($\times 200$).

(2-F-1a, 2-F-2), 培養7日目の培養濾液からのF-1a, F-2 (7-F-1a, 7-F-2), 培養後14日目の濾液からのF-1a, F-2 (14-F-1a, 14-F-2) が分離された。これらの糖ペプチド複合体の化学組成は次のようであった。

1. F-1a と F-2 の収量比

表1のように、収量比は2-F-1a: 2-F-2は1: 22.9, 7-F-1a: 7-F-2は1: 11.4, 14-F-1a: 14-F-2は1: 7.2であった。なおF-1aの収量はいずれも少ないが、培養日数の延長に伴ないやや増加する傾向がみられた。

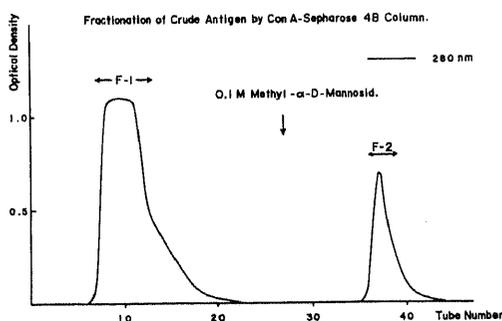


Fig. 3. Fractionation of crude antigen by Con A-sepharose 4B column.

The column (1.5×45cm) was eluted with 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl buffer (pH 7.5), and then with the same buffer containing 0.1M methyl- α -D-mannosid.

Fractions (3ml each) were collected at a flow rate of 3ml per hour.

2. 糖および蛋白の量

各画分の糖および蛋白の含有量は表1のようであり、これらの画分はいずれも糖ペプチド複合体であるが、それらの組成は培養日数により軽度の差異を示した。すなわち、2-F-1a および 2-F-2 はいずれも糖含有量が約60%、蛋白含有量はそれぞれ約5%および約15%であるが、7-F-1a, 7-F-2, 14-F-1a および 14-F-2 はいずれも糖含有量が80~90%、蛋白含有量が約10%であった。

3. 糖組成

表2のように各画分の単糖分析はこれらの画分に含まれる糖が rhamnose, mannose および galactose か

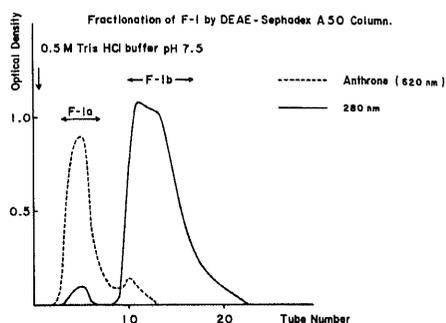


Fig. 4. Fractionation of F-1 by DEAE-sephadex A 50 column.

The column (1.5×30cm) was eluted with 0.5M Tris-HCl buffer (pH 7.5) at a flow rate of 1.3ml per hour in 1.5ml fractions.

Table 1. Chemical composition of each peptide-peplysaccharide fraction from *S. schenckii* culture filtrate.

Fraction*	yields of F-2 yields of F-1a	Carbohydrate** (%)	Peptide*** (%)
2-F-1a	22.9	56.6	5.3
2-F-2		63.3	15.5
7-F-1a	11.4	89.0	8.0
7-F-2		85.0	13.0
14-F-1a	7.2	83.3	9.0
14-F-2		87.7	8.5

* 2-, 7-, and 14- represent culture duration
F-1a represents fraction 1a (non-con A binding fraction)

F-2 represents fraction 2 (con A-binding fraction)

** measured by the anthrone test

*** measured by Folin-Lowry method

ら構成されること、また単糖類の構成比率は培養日数により異なることを示した。2-F-1a および 2-F-2 に含まれる糖の大部分は mannose であり、その他の単糖類は極めて少量であった。7-F-1a および 7-F-2 では、糖の主成分が mannose であることは 2-F-1a および 2-F-2 と同じであるが、これらに比べて rhamnose が増加し、特に 7-F-2 において顕著な増加がみられた。14-F-1a では rhamnose の増加とともに galactose の軽度の増加もみられた。14-F-2 の糖組成は 7-F-2 のそれと同じであった。

4. アミノ酸組成

表3のように各画分のアミノ酸分析はこれらの画分

にオキシアミノ酸であるセリンとスレオニン、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸ならびに中性アミノ酸であるアラニンとグリシンが比較的多く含まれるが、含硫アミノ酸であるメチオニンとシステチンはほとんどまたは全く含まれないことを示した。各画分のアミノ酸組成は培養日数による差異をほとんど示さず、むしろ分離方法の違いによる差異が認められた。すなわち、2-, 7-, 14-F-2 はいずれもスレオニンを最も多く含み、次いでセリン、アラニンを比較的多く含むが、他方 2-, 7-, 14-F-1a はいずれも酸性アミノ酸であるグルタミン酸、アスパラギン酸を比較的多く含み、セリンも多く含むが、スレオニンを余り多く

Table 2. Monosaccharide composition of peptide-polysaccharide fractions from *S. schenckii* culture filtrate

Fraction	molecular ratio of			
	Rhamnose	Mannose	Galactose	Glucose
2-F-1a	0.09	1	0.05	0.06
2-F-2	trace	1	trace	0
7-F-1a	0.16	1	0.06	0
7-F-2	0.60	1	0.07	0
14-F-1a	0.23	1	0.29	0
14-F-2	0.60	1	0.07	0

Table 3. Amino acid analysis of peptides in peptide-polysaccharide fractions from *S. schenckii* culture filtrate (%)

Amino acid	2-F-1a	2-F-2	7-F-1a	7-F-2	14-F-1a	14-F-2
Asp	12.2	11.1	10.1	8.1	16.6	6.7
Thr	6.9	21.4	9.7	18.5	9.2	19.9
Ser	13.6	16.0	15.5	12.8	15.5	15.0
Glu	19.1	9.5	12.1	6.7	10.4	5.8
Pro	7.1	2.1	4.9	7.4	9.2	5.7
Gly	7.0	4.6	10.1	7.5	9.4	7.7
Ala	6.4	10.2	11.7	11.8	7.0	11.7
Cys	0	0	0	0	0	0
Val	4.7	5.6	3.9	11.8	5.6	6.7
Met	1.4	1.1	0	trace	0	trace
Ile	6.4	3.2	3.4	2.6	9.5	2.6
Leu	4.0	3.2	3.4	3.3	4.6	3.9
Tyr	2.1	3.4	1.5	1.5	trace	1.5
Phe	1.7	2.1	2.4	1.8	trace	1.7
Lys	4.1	3.3	4.4	3.0	trace	4.5
His	1.6	2.2	4.9	1.7	1.7	4.5
Arg	1.4	1.1	1.9	trace	1.5	1.3

含んでいなかった。糖組成が同じであった7-F-2と14-F-2はアミノ酸組成の面でも極めて類似していた。

III. 糖ペプチド複合体の免疫学的性質

1. 免疫拡散法

1) 家兎抗 *S. schenckii* 抗血清に対する反応(図5) : 家兎抗 *S. schenckii* 抗血清に対して2-F-1aは1本の鮮明な沈降線と2本の弱い沈降線を形成したが、2-F-2

は微弱な沈降線を1本形成しただけであった。7-F-1aは少なくとも3本の太い沈降線を、7-F-2は少なくとも4本の太い沈降線をそれぞれ形成した。また、14-F-1aは4本の太い沈降線を、14-F-2は少なくとも4本のより太い沈降線をそれぞれ形成した。

2) 家兎抗 *K. pneumoniae* K47 抗血清に対する反応(図6) : 家兎抗 *K. pneumoniae* K47 抗血清に対し

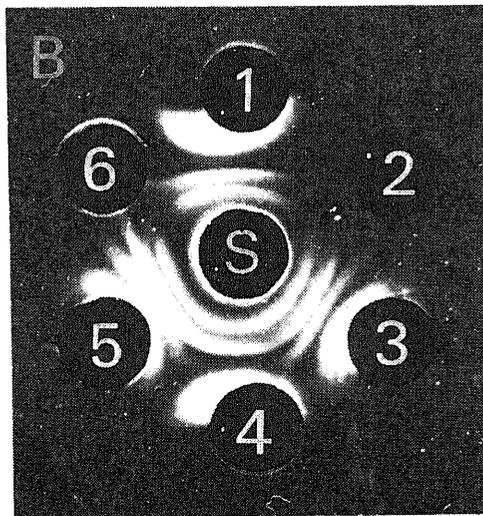
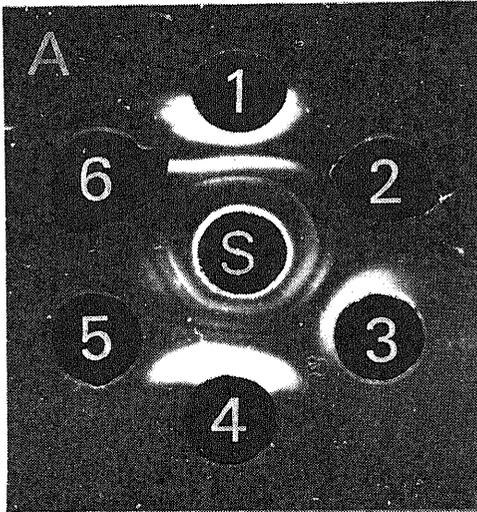


Fig. 5. Immunodiffusion test of each fraction against *S. schenckii* antiserum.

S: *S. schenckii* antiserum

A, B-1, 4: *S. schenckii* crude antigen

A, B-6: no antigen

A-2: 2-F-1a

B-2: 2-F-2

A-3: 7-F-1a

B-3: 7-F-2

A-5: 14-F-1a

B-5: 14-F-2

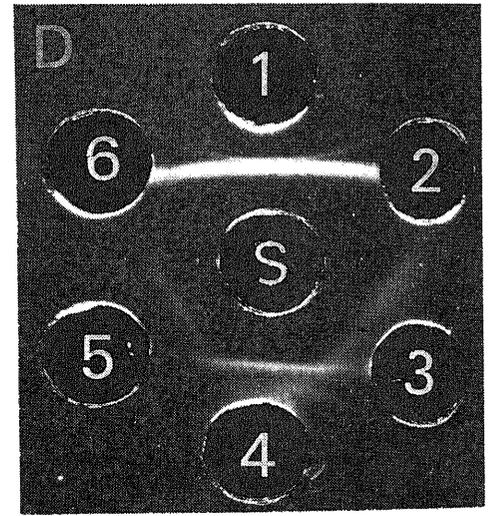
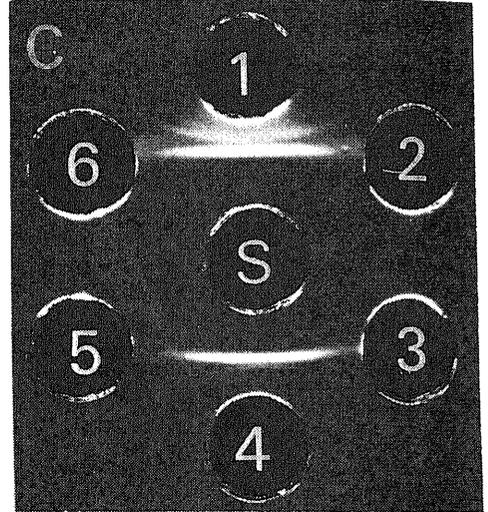


Fig. 6. Immunodiffusion test of each fraction against *K. pneumoniae* K47 antiserum.

S: *K. pneumoniae* K47 antiserum.

C, D-1, 4: *K. pneumoniae* K47 crude antigen

C, D-6: no antigen

C-2: 2-F-1a

D-2: 2-F-2

C-3: 7-F-1a

D-3: 7-F-2

C-5: 14-F-1a

D-5: 14-F-2

て、7-F-1a, 7-F-2, 14-F-1a, 14-F-2 はいずれも1本の沈降線を形成したが、2-F-1a および 2-F-2 は沈降線を形成しなかった。

3) 家兎抗 *C. werneckii* 抗血清に対する反応 (図7): 家兎抗 *C. werneckii* 抗血清に対して 2-F-1a は2本の沈降線を形成し、これらの沈降線は 7-F-1a が形成したやや太い沈降線と融合した。14-F-1a は1本の鮮明な沈降線を形成した。2-, 7-, 14-F-2 はいずれも1

本の沈降線を形成した。2-F-2 が形成した沈降線は弱く、7-F-2 が形成した沈降線と棘形成した。

4) 家兎抗 *S. cerevisiae* 抗血清に対する反応 (図8): 家兎抗 *S. cerevisiae* 抗血清に対して、2-F-1a および 2-F-2 は非常に太い1本とより細く鮮明な1~2本の沈降線を形成した。7-F-1a および 14-F-1a はそれぞれ2本の弱い沈降線を形成した。7-F-2 および 14-F-2 はそれぞれ1本の沈降線を形成し、それらは 2-F-2 が形

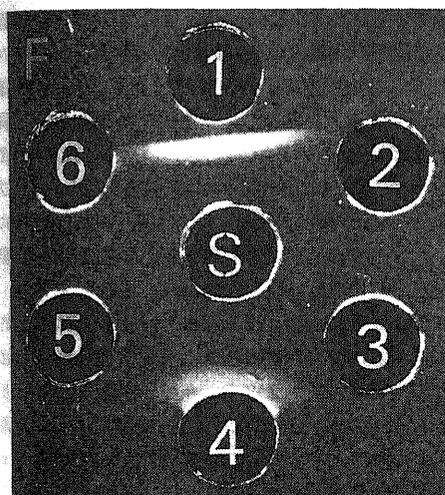
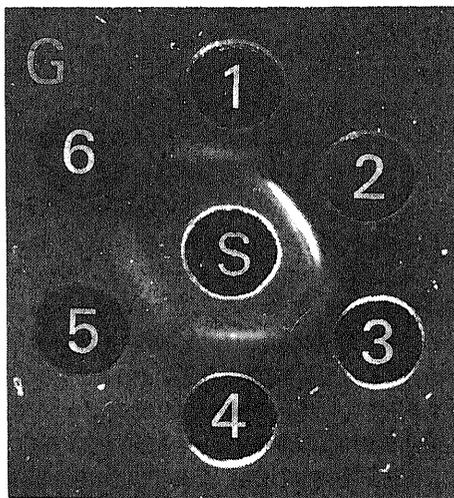
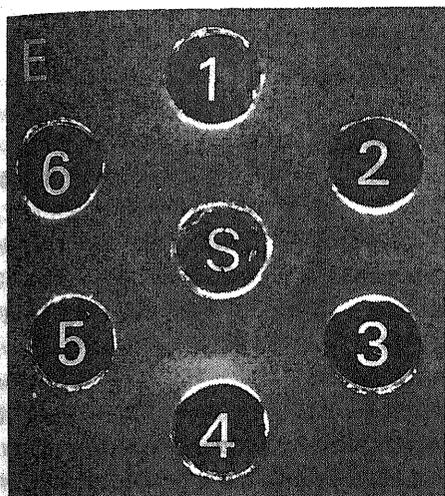


Fig. 7. Immunodiffusion test of each fraction against *C. werneckii* antiserum.

S: *C. werneckii* antiserum

E, F-1, 4: *C. werneckii* crude antigen

E, F-6: no antigen

E-2: 2-F-1a

F-2: 2-F-2

E-3: 7-F-1a

F-3: 7-F-2

E-5: 14-F-1a

F-5: 14-F-2

Fig. 8. Immunodiffusion test of each fraction against *S. cerevisiae* antiserum.

S: *S. cerevisiae* antiserum

G, H-1, 4: *S. cerevisiae* crude antigen

G, H-6: no antigen

G-2: 2-F-1a

H-2: 2-F-2

G-3: 7-F-1a

H-3: 7-F-2

G-5: 14-F-1a

H-5: 14-F-2

Table 4. Mean values of delayed hypersensitivity cutaneous reaction to each fraction in ten *S. schenckii* sensitized guinea pigs and five non-sensitized controls (diameter of induration in millimeters)

Fraction	animals	
	sensitized	control
2-F-1a	0	0
2-F-2	7×6	0
7-F-1a	1×1	0
7-F-2	12×10	0
14-F-1a	0	0
14-F-2	14×14	0

成した沈降線と棘形成した。

2. 皮内反応

S. schenckii 感作モルモット (10匹) における皮内反応の結果は表4のようである。2-, 7-, 14-F-2はいずれも陽性反応を示し、また2-F-2よりも7-F-2ならびに14-F-2がより強い反応を示した。2-, 7-, 14-F-1aはいずれも陽性反応を示さなかった。対照(5匹)における皮内反応は、すべての画分が陽性反応を示さなかった。

考 察

本研究では、25°Cで振盪培養された *S. schenckii* の菌形態の経時的変化と、培養濾液から分離された糖ペプチド複合体の化学的組成の経時的変化が検討された。培養後2日目に菌はすべて分生子を持たない菌糸であり、その時期に培養濾液から分離された糖ペプチド複合体(2-F-1a, 2-F-2)の糖成分はほとんど全部 mannose であったが、7日目および14日目には菌糸に加えて分生子および胞子が増加し、この時期に分離された糖ペプチド複合体(7-F-1a, 7-F-2, 14-F-1a, 14-F-2)の糖成分には主体をなす mannose に加えてかなり多量の rhamnose と少量の galactose も含まれていることが明らかにされた。この成績は、分生子および胞子の増加に伴ない、培地中には糖成分に rhamnose を含有する多糖体が出現することを示し、菌の形態学的分化とともに産生される多糖体の糖組成が変わることを示唆した Mendonça ら¹⁴⁾の意見を支持するものである。

次に、免疫拡散法を用いて糖ペプチド複合体に含まれる rhamnose の血清学的反応性を検討した。家兎抗 *S. schenckii* 抗血清に対して、糖成分がほとんど全部 mannose から成る 2-F-2 は弱い反応を示し、1本の弱

い沈降線を形成しただけであったが、rhamnose をより多く含有する 7-F-1a, 7-F-2, 14-F-1a および 14-F-2 はいずれも強い反応を示した。なお、抗原決定基として rhamnose を有する *K. pneumoniae* K47 に対する抗血清を用いた免疫拡散法では、rhamnose 含有量の多い 7-F-1a, 7-F-2, 14-F-1a および 14-F-2 はいずれも交叉反応を示したが、rhamnose をほとんど含まない 2-F-1a および 2-F-2 は沈降線を形成しなかった。これらの結果から、rhamnose の抗原決定基を有する糖ペプチド複合体が、培養日数の延長に伴ない培養濾液に増加することが明らかにされたわけである。

ごく最近 Ishizaki ら²⁰⁾および Kurata²¹⁾は11種の *Sporothrix* 属の免疫化学的性質を調べ、抗 *S. schenckii* 抗血清が抗原に rhamnose を持たない *Sporothrix* 属の菌とも交叉反応することを報告した。また、他の真菌の培養濾液から得られた galactomannan 含有抗原と、抗 *S. schenckii* 抗血清とを用いた免疫拡散法の結果から、Ishizaki ら²²⁾は交叉反応に関与する抗原決定基が D-galactose である可能性を示唆した。本研究では、抗原決定基に galactose が関与する *C. werneckii*²³⁾ に対する抗血清と、mannose が抗原決定基である *S. cerevisiae*²⁴⁾ に対する抗血清を作製し、これらの抗血清と F-1a および F-2 を用いて免疫拡散法を行なった。その結果、抗 *C. werneckii* 抗血清に対して 2-F-2 を除くすべての画分は1~2本の太い沈降線を形成し、これらの画分はいずれも構成糖に galactose を有することが確認された。なお 2-F-2 は1本の弱い沈降線を形成した。また抗 *S. cerevisiae* 抗血清に対しては 2-F-1a と 2-F-2 が強い沈降反応を示し、その他の画分はいずれも弱い反応を示した。これらの交叉反応の成績は、*S. schenckii* の糖ペプチド複合体には D-galactose および D-mannose が抗原決定基として存在することを明確に示したものである。なお、交叉反応の成績は各画分の糖組成とも合致している。

このように、*S. schenckii* 産生糖ペプチドの血清学的抗原決定基には、従来知られていた L-rhamnose のほかに D-galactose および D-mannose も関与することが示された。このことは、*S. schenckii* 抗原が他の真菌や細菌と幅広く血清学的に交叉反応しうることを、従って血清反応のみでスポロトリコーシスの診断を下すことの危険性を示唆している。他方、*S. schenckii* と共通抗原を有する細菌や真菌類に対する抗体が正常人の血清中に存在し、これが *S. schenckii* 感染に際して宿主の防御機構の一端を担うという可能性²⁵⁾²⁶⁾を示唆する所見として、それは興味深いものである。

次に、F-1a と F-2 を感作モルモットの皮内に注射し、これらの糖ペプチド複合体の皮内反応における抗原性

を検討した結果、Con A 結合性画分(2-, 7-, 14-F-2)はすべて反応陽性、Con A 非結合性画分(2-, 7-, 14-F-1a)はすべて同反応陰性であり、抗原性は各画分の抽出時期(培養日数)と関係ないことが明らかにされた。また糖ペプチド複合体のアミノ酸組成も Con A 結合性画分と Con A 非結合性画分の間には差異がみられたが、各画分の抽出時期による差異は認められなかった。また、Con A 結合性画分のアミノ酸組成は、Shimonaka²⁰⁾が *S. schenckii* から分離した遅延型反応陽性画分のそれと類似していた。これらの成績は、*S. schenckii* 産生糖ペプチド複合体の多糖体部分が即時型反応に、ペプチド部分が遅延型反応に関与するという Shimonaka²⁰⁾の知見を支持するものである。なお、糖組成に rhamnose を欠き、抗 *S. schenckii* 抗血清に対する反応性が最も弱い画分である 2-F-2 が、皮内反応陽性であるという結果が得られた。これは、Kurata²¹⁾の観察成績と同様に、遅延型皮内反応の成績が抗原の糖組成や血清学的反応性と必ずしも一致しないことを示すものであり、今後の研究を要する問題である。

Con A 結合性糖ペプチド複合体の所在については既に Travassos²²⁾の観察があり、FITC 標識 Con A 結合後の蛍光の強さや、Con A-horseradish peroxidase-diaminobenzidine 反応後の反応物質の沈着部位から、Con A 結合性糖ペプチド複合体は菌の細胞壁外層に局在すること、また細胞壁外層は内層との結合がゆるいためしばしば培地中に剝離分泌されることが示されている。本実験では、培養後 7 日および 14 日目には菌糸とともに胞子と分生子も多数みられること、またそれらの時期には培養濾液から抽出された Con A 結合性糖ペプチド複合体(7-F-2, 14-F-2)は糖組成比が同じであり、アミノ酸組成も類似しているの、これらの Con A 結合性複合体は主に胞子および分生子の細胞壁外層に由来するものと推測された。

本研究の成績は、*S. schenckii* の培養濾液から精製された糖ペプチド複合体の化学的性状と抗原性が培地中の菌の形態および糖ペプチド複合体の精製法と密接に関連すること、従って今後スポロトリギン反作用抗原の作製には、培養日数、培養温度、培地中の菌の形態などの諸条件に充分留意すべきことを示している。

結 論

培養後 2, 7 および 14 日目に、透析液体培地中に 25°C で振盪培養された *S. schenckii* の培養濾液から Con A-sepharose 4B カラムクロマトグラフィーにより Con A 結合性画分(2-, 7-, 14-F-2)が分離され、さらに DEAE-sephadex A50 カラムクロマトグラフィーにより Con A 非結合性画分(2-, 7-, 14-F-1a)が分離さ

れた。これらの画分の免疫化学的検索の成績は次のようである。

1. Con A 結合性画分および Con A 非結合性画分はいずれも糖ペプチド複合体であった。

2. 培養後の菌形態と産生糖ペプチド複合体の糖組成の比較検討により、分生子および胞子の形成に伴ない糖組成にかなり多量の rhamnose と少量の galactose が増加することが示され、菌の形態学的分化に伴ない産生糖ペプチド複合体の糖組成は変化することが明らかにされた。

3. 抗 *S. schenckii* 抗血清、抗 *Klebsiella pneumoniae* K47 抗血清、抗 *Cladosporium werneckii* 抗血清および抗 *Saccharomyces cerevisiae* 抗血清に対する免疫拡散法により、*S. schenckii* 産生糖ペプチド複合体はいずれも血清学的に抗原性を有することが示され、さらに従来知られていた rhamnose および galactose とともに mannose も抗原決定基に関与していることが明らかにされた。なお、これらの糖の抗原決定基への関与のため、*S. schenckii* 産生糖ペプチド複合体は、*S. schenckii* 以外の真菌および細菌に対する抗血清と幅広い交叉反応を起しうることが示された。

4. *S. schenckii* 感作モルモットにおける皮内反応では、Con A 結合性糖ペプチド複合体が陽性反応を、Con A 非結合性糖ペプチド複合体は陰性反応を示した。そういう違いはこれらの糖ペプチド複合体のペプチド部分のアミノ酸組成の差異によることが示唆された。

稿を終るにあたり、御校閲いただきました広根孝衛教授ならびに御助言いただきました石崎 宏講師に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) Bloch, B.: Die Sporotricose. Beih. Med. Klin., 5, 179-202(1909).
- 2) Widal, F., Abrami, P., Joltrain, E., Brissand, E. et Weill, A.: Serodiagnostic mycosique. Applications au diagnostic de la Sporotrichose et de l'Actinomycose.-Les coagglutinations et cofixations mycosiques. Ann. Inst. Pasteur 24, 1-33(1910).
- 3) Connant, N.F., Smith, D.T., Baker, R. D., & Callaway, J.L.: Manual of clinical mycology, 3rd ed., p417-457, W.B. Sanders Co., Philadelphia, (1971).
- 4) Schneidau Jr., J.D., Lamar, L.M. & Hairston, M.A.: Cutaneous hypersensitivity to sporotrichin in Louisiana. J.A.M.A. 188, 371-373 (1964).
- 5) Nielsen Jr., H.S.: Biologic properties of skin test antigens of yeast form *Sporotrichum schenckii*.

- J. Infect. Dis. 118, 173-180 (1968).
- 6) **Ishizaki, H.**: Some antigenic substances from culture filtrate of *Sporotrichum schenckii*. Jap. J. Dermatol., Series B. 80, 16-23, (1970).
- 7) **Lloyd, K. O. & Bitoon, M. A.**: Isolation and purification of a peptido-rhamnomannan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immunological studies. J. Immunol., 107, 663-671 (1971).
- 8) **野口享秀**: スポロトリクム (*Sporotrichum schenckii*) の免疫化学的研究 (I) 免疫活性物質の抽出と化学組成, 岐阜医紀, 20, 335-343 (1972).
- 9) **野口享秀**: スポロトリクム (*Sporotrichum schenckii*) の免疫化学的研究 (II) フェノール抽出抗原の免疫学的性状, 岐阜医紀, 20, 344-351 (1972).
- 10) **Travassos, L. R., Gorin, P. A. J. & Lloyd, K. O.**: Comparison of the rhamnomannan from the human pathogen *Sporothrix schenckii* with those from the *Ceratomyces* species. Infect. Immun., 8, 685-693 (1973).
- 11) **Lloyd, K. O. & Travassos L. R.**: Immunochemical studies on L-rhamno-D-mannans of *Sporothrix schenckii* and related fungi by use of rabbit and human antisera. Carbohydr. Res., 40, 89-97 (1975).
- 12) **Bartnicki-Garcia, S.**: Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. Ann. Rev. Microbiol., 22, 87-108 (1968).
- 13) **Ishizaki, H., Wheat, R. W., Kiel, R. W. & Conant, N. F.**: Serological cross-reactivity among *Sporothrix schenckii*, *Ceratomyces*, *Europhium*, and *Graphium* species. Infect. Immun., 21, 585-593 (1978).
- 14) **Mendonça, L., Gorin, P. A. J., Lloyd, K. O. & Travassos, L. R.**: Polymorphism of *Sporothrix schenckii* surface polysaccharides as a function of morphological differentiation. Biochemistry, 15, 2423-2431 (1976).
- 15) **Trevelyan, W. E. & Harrison J. S.**: Studies on yeast metabolism. 1. Fractionation and micro-determination of cell carbohydrates. Biochem. J., 50, 298-302 (1952).
- 16) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.**: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951).
- 17) **Sweeley, C. C., Bentley, R., Mikita, M. & Wells, W. W.**: Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. J. Am. Chem. Soc., 85, 2497-2507 (1963).
- 18) **Ouchterlony, O.**: Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Michigan (1968).
- 19) **Bjorndal, H., Lindberg, B., Lonngren, J., Rossel, K. G. & Nimmich, W.**: Structural studies of the *Klebsiella* type 47 capsular polysaccharide. Carbohydr. Res., 27, 373-378 (1973).
- 20) **Ishizaki, H., Nakamura, Y. & Wheat, R. W.**: Comparative immunochemical studies on *Sporothrix* species. J. Dermatol. (Tokyo), 6, 317-320 (1979).
- 21) **Kurata, Y.**: Chemical composition and immunological properties of glycoproteins of *Sporothrix* species. Mycopathologia, 76, 45-53 (1981).
- 22) **Ishizaki, H., Nakamura, Y. & Wheat, R. W.**: Serological cross-reactivity between *Sporothrix schenckii* and various unrelated fungi. Mycopathologia, 73, 65-68 (1981).
- 23) **Suzuki, S. & Takeda, N.**: Serological cross-reactivity of the D-galacto-D-mannans isolated from several pathogenic fungi against anti-*Hormodendrum pedrosoi* serum. Carbohydr. Res., 40, 193-197 (1975).
- 24) **Sakaguchi, O., Suzuki, S. & Suzuki, O.**: Biochemical and immunochemical studies of fungi. Immunochemical studies of mannans of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. Jpn. J. Microbiol., 11, 119-128 (1967).
- 25) **Nakamura, Y., Ishizaki, H. & Wheat, R. W.**: Serological cross-reactivity between group B streptococcus and *Sporothrix schenckii*, *Ceratomyces* species, and *Graphium* species. Infect. Immun., 16, 547-549 (1977).
- 26) **Ishizaki, H., Kurata, Y., Nakamura, Y. & Wheat, R. W.**: Serological cross-reactivity among *Klebsiella pneumoniae* K47, *Ceratomyces*, *Europhium* and *Graphium* species. J. Dermatol. (Tokyo), 7, 401-404 (1980).
- 27) **Shimonaka, H., Noguchi, T., Kawai, Hasegawa, I., Nozawa, Y. & Ito, Y.**: Immunochemical studies on the human pathogen *Sporothrix schenckii*: Effects of chemical and enzymatic modification of the antigenic compounds upon immediate and delayed reactions. Infect. Immun., 11, 1187-1194 (1975).

28) Travassos, L. R., de Sousa, W., Mendonça
-previato, L. & Lloyd, K. O.: Location and
biochemical nature of surface components reacting

with Concanavalin A in different cell types of
Sporothrix schenckii. Exp. Mycol., **1**, 293-305 (1977).

The Variation of Immunochemical Properties of Peptide-polysaccharides Produced by *Sporothrix schenckii* during Differentiation Minoru Takata, Department of Dermatology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. J. Med. Soc., 91, 91—102 (1982)

Key words: *Sporothrix schenckii*, double immunodiffusion test, skin test

Abstract

The chemical composition and immunological properties of peptide-polysaccharides isolated from the culture filtrates of *Sporothrix schenckii* in different days of incubation were investigated. *Sporothrix schenckii* cells (ATCC 10268) were incubated in liquid dialysate medium at 25°C by continuous shaking. Light microscopy showed that all of the fungal cells were unsporulated mycelia in 2 days of cultures while they formed many conidia and yeast-like cells in 7 and 14 days of cultures. From the culture filtrates in 2, 7 and 14 days after incubation, Con A-binding peptide-polysaccharides (2-, 7- and 14-F-2) were fractionated by Con A-sepharose 4B column chromatography, and then non-Con A-binding peptide-polysaccharide fractions (2-, 7- and 14-F-1a) were obtained by DEAE-sephadex A50 column chromatography. Sugar analyses showed that the fractions 2-F-1a and 2-F-2 were mostly composed of mannose, and that all of the fractions 7-F-1a, 7-F-2, 14-F-1a and 14-F-2 contained a considerable amount of rhamnose and a little galactose in addition to mannose. These results indicated that both rhamnose and galactose were increased as the fungal cells differentiated into conidia and yeast-like cells with prolonged cultivation.

In the double immunodiffusion test, fractions 2-F-1a and 2-F-2 showed a weakly positive reaction with anti-*Sporothrix schenckii* antiserum and a strongly positive cross-reaction with anti-*Saccharomyces cerevisiae* antiserum. On the other hand, fractions 7-F-1a, 7-F-2, 14-F-1a and 14-F-2 showed a strongly positive reaction with rabbit anti-*Sporothrix schenckii* antiserum. In addition, they showed varying degrees of cross-reaction with anti-*Klebsiella pneumoniae* K47 antiserum and anti-*Cladosporium werneckii* antiserum as well as anti-*Saccharomyces cerevisiae* antiserum. The results from the double immunodiffusion test and those from sugar analyses made it possible to strongly suggest that not only rhamnose but also mannose and galactose participated in the serological cross-reactions as the antigenic determinants.

In addition, skin tests with the fractions in guinea pigs sensitized by *Sporothrix schenckii* suggested that the reactivity to the test might depend upon the amino acid composition of peptide moiety of peptide-polysaccharides.