

総 説

サイトカイン産生からみた皮膚真菌症の病態

加 納 壘

日本大学生物資源科学部獣医臨床病理学研究室

要 旨

皮膚は、直接外界と接し、多彩な免疫機構によって生体を防御している免疫臓器である。皮膚の免疫機構の中で食細胞はカンジダや皮膚糸状菌などの感染時に重要な働きをしているが、食細胞が表皮と真皮をとわず皮膚の病巣に集簇するためには、食細胞の活性化を誘導する炎症性サイトカインが深く関与しているものと考えられる。

そこで皮膚の真菌感染時におけるケラチノサイトから産生されるサイトカインを検討するため、培養ケラチノサイトにカンジダ、皮膚糸状菌、マラセチアを感作させ、ケラチノサイトから培養液中に放出された炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α) を ELISA 法を用いて測定した。その結果、カンジダでは IL-8、皮膚糸状菌では IL-8, TNF- α 、マラセチアでは IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α の産生が確認された。

以上の結果から、これら真菌の刺激が表皮に及ぶと、ケラチノサイトから炎症性サイトカインが分泌され、それによって白血球の遊走や、補体の活性化が惹起され炎症が進行し、感染真菌が排除されるものと思われる。したがって皮膚真菌症の病態解明や治療戦略にとって、ケラチノサイトにおける真菌によるサイトカインの誘導や発現を解明することは重要であると考えられる。

key word: サイトカイン (cytokine), ケラチノサイト (keratinocyte), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), カンジダ (*Candida*), マラセチア (*Malassezia*), 皮膚糸状菌 (tinea)

はじめに

皮膚は粘膜とともに直接外界と接する臓器である。ともすると単純な生体保護膜のように考えられるが、生体を防御している免疫臓器であり、その免疫機構は複雑である。皮膚の厚さは約 20 μ m であるが、角質は有害物質の浸透や微生物の侵入を物理的に防御している。また各種化学的物質を分泌して、微生物の増殖や侵入を防いでいる。しかしながら角層を通過した異物に対しては、表皮を構成するケラチノサイトから、多種のサイトカインが分泌され、それによって周辺の細胞からの抗菌物質の産生が増強する。また白血球の遊走や、血管透過性が亢進して液体成分や補体が浸出し、炎症が惹起され、さらに炎症部位周辺の細胞や、遊走した白血球からもサイトカインや抗菌物質などの炎症性物質が分泌され、炎症が進行することによって侵入物は速やかに排除される。

感染時にステロイド剤が投与されていると、微生物の存在を認識しても、抗菌物質やサイトカイン産生が抑制されるため、炎症が起りにくくなり易感染状態となつて感染が拡大する。

そこで皮膚の真菌感染時におけるケラチノサイトから産生されるサイトカインのうち炎症性サイトカインを検討するため、培養ケラチノサイトにカンジダ、皮膚糸状

菌、マラセチアを感作させ、ケラチノサイトから培養液中に放出された炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α) について ELISA 法を用いて測定した。

1) ケラチノサイトのサイトカイン産生に及ぼす *Candida albicans* の影響

皮膚カンジダ症の病理組織像において、好中球の著しい浸潤が認められるが、これには、ケラチノサイトから産生される炎症性サイトカインの関与が考えられる。そこでケラチノサイトのサイトカイン産生に対する *C. albicans* の影響について検討した。

ヒトケラチノサイトは、Clonetics 社 (BioWhittaker 社) の正常ヒト表皮細胞を NHEK 培養液中で 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養を行った。

使用菌株は *C. albicans* 血清型 A の 3 株 (TLD-0141, TLD-0142, TLD-0143) を用い、それぞれサブローブドウ糖液体培地で 37°C, 3 日間振盪培養後、菌を回収した。次に NHEK 培養液中で 1×10^3 個の菌数に調整し、 1×10^4 個のヒトケラチノサイトと同時に 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。培養液を経時的に回収し、培養液中の炎症性サイトカインを ELISA 法 (Cytoscreen Immunoassay kit; BioSource International 社) によって測定した。その結果、IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α は測定されなかったが、IL-8 は経時的に増加することが確認された (Fig. 1)。

別刷請求先: 加納 壘

〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野1866

日本大学生物資源科学部獣医臨床病理学研究室

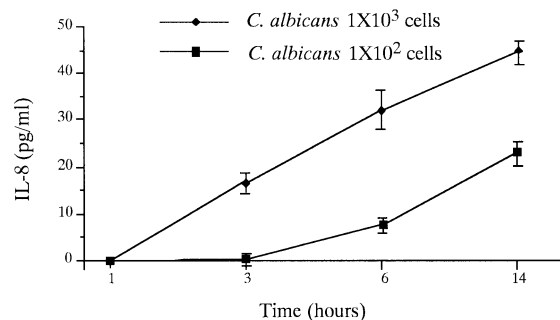


Fig. 1a

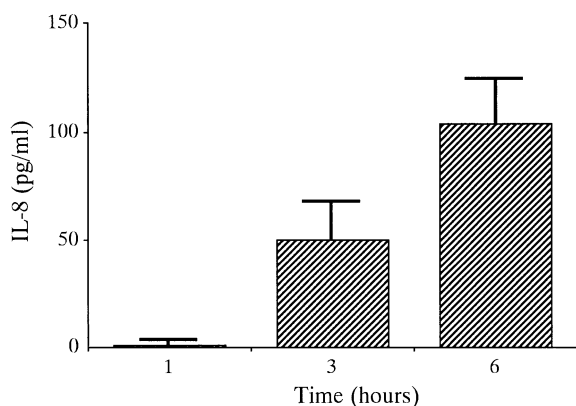


Fig. 1b

Fig. 1. Effect of live, killed and cultured supernatant of *C. albicans* on cytokine production by human keratinocytes.

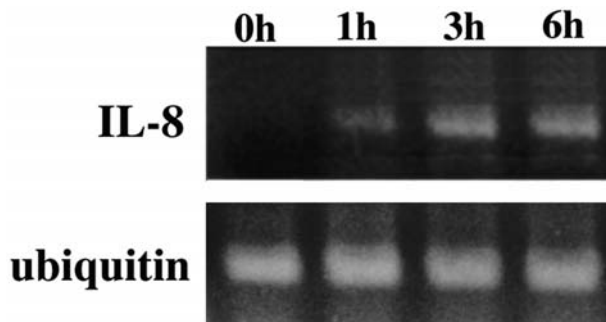
1a, Keratinocytes (1×10^4 cells per well) were co-cultured with the live *C. albicans* (1×10^3 or 1×10^4 cells per well). After 1 h, 3 h, 6 h, and 14 h, the IL-8 levels in the supernatants were measured by the ELISA method.

1b, Keratinocytes (1×10^4 cells) were cultured with the supernatant of the *C. albicans* (1×10^7 per ml). After 1 h, 3 h, and 6 h, the IL-8 levels in the supernatants were measured by the ELISA method. Results shown are representative of five experiments.

次に 1×10^7 個の *C. albicans* (TLD-0141) を 10 ml の NHEK 培養液中に 37°C で一晚培養し、その培養液を濾過した。これをヒトケラチノサイトに加えて培養し、 1×10^4 個のヒトケラチノサイトに加えて、 37°C 、5% CO_2 の条件下で培養した。培養液を経時的に回収し、サイトカインを ELISA 法によって同様に測定した。その結果、IL-8 産生は濾液のみによっても促進されることが認められた (Fig. 1)。

さらにカンジダと共培養することでケラチノサイトから IL-8 mRNA の発現が誘導されることを確認するために、reverse transcription-PCR (RT-PCR) による IL-8 mRNA の発現を検討した。

まず 5×10^5 個のヒトケラチノサイトと 5×10^5 個の *C. albicans* (TLD-0141) を同時に 37°C 、5% CO_2 の条件下で培養し、培養 1, 3, 6 時間後に細胞を回収した。回収した細胞から、RNeasy total RNA kit (QIAGEN 社)

Fig. 2. IL-8 mRNA production in human keratinocytes co-cultured with *C. albicans*.

After 0 h, 1 h, 3 h, and 6 h of co-culture of keratinocytes with live *C. albicans*, the IL-8 mRNA levels in the keratinocytes were determined by RT-PCR. Reaction products were run on 2% agarose gels. Although IL-8 mRNA in keratinocytes is undetectable at 0 h of co-culture, IL-8 mRNA was detected in the keratinocytes after 1 - 6 h of co-culture. Ubiquitin was the positive transcription control.

を用いて RNA を抽出し、これから OmniscriptTM Reverse Transcriptase kit (QIAGEN) によって cDNA を合成した。これを鋳型として IL-8 に特異的なプライマーを作成し PCR を行い、IL-8 の mRNA 発現を検出した。

ヒト IL-8 遺伝子に特異的なプライマーは Gene Bank に登録されているヒトの IL-8 の遺伝子情報から設計した¹⁾。プライマーの塩基配列は下記に示した。

5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGT-3' (primer IL-8 1S; nt. 102-122 in Human mRNA for MDNCF in the Gene Bank accession nos.-Y00787)

5'-TCCTTGGCAAACTGCACCT-3' (primer IL-8 1R; nt. 164-183).

PCR の反応条件は 94°C 1 分、 55°C 1 分、 72°C 2 分を 1 サイクルとして 30 サイクル反応を行い、目的の遺伝子断片を増幅した。

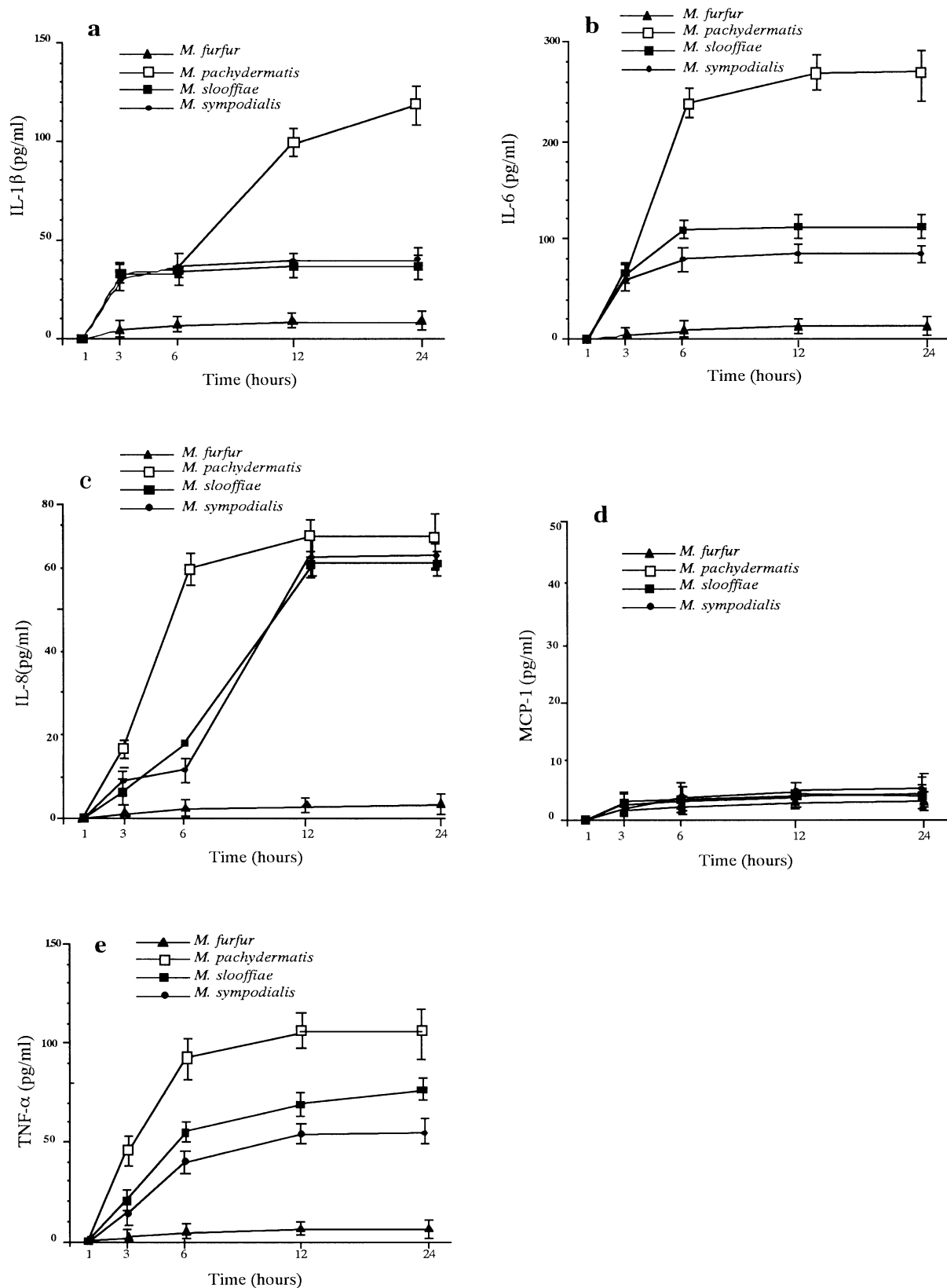
PCR で増幅した IL-8 の遺伝子断片は、2% アガロースゲル上で泳動後、臭化エチジウムで染色後、紫外線照射下で確認した。

その結果、IL-8 の mRNA は培養 1 時間後から発現することが確認された (Fig. 2)。

以上の結果から、*C. albicans* はヒトケラチノサイト IL-8 の産生を誘導することが示唆された。一般に皮膚カンジダ症では、著明な好中球浸潤が認められる²⁾。今回得られた結果から、皮膚カンジダ症においては、ケラチノサイトから IL-8 が産生され、それによって好中球浸潤が起きていることが示唆された。今後皮膚カンジダ症の病態解明のためには、IL-8 の産生誘導因子の解析が重要であると考えられる³⁾。

2) ケラチノサイトのサイトカイン産生に及ぼすマラセチアの影響

Malassezia 属の 4 菌種 (Table 1) をカンジダと同様

Fig. 3. Effect of *Malassezia* species on cytokine protein release.

Keratinocytes were co-cultured with *Malassezia* species. After 1 hr, 3 hr, 6 hr, 12 hr and 24 hr, the supernatants were collected and cytokine releases were analyzed by the ELISA method. (a) IL-1 β , (b) IL-6, (c) IL-8, (d) MCP-1 and (e) TNF- α .

Table 1. Species and strains used in this study

Species	Strain	
<i>M. furfur</i>	VUT-98021	(CBS 1878)
<i>M. furfur</i>	VUT-98022	(CBS 7019)
<i>M. furfur</i>	VUT-98023	(CBS 6000)
<i>M. pachydermatis</i>	VUT-98028	(CBS 1879)
<i>M. pachydermatis</i>	VUT-98010	(Clinical isolate of cat)
<i>M. slooffiae</i>	VUT-98030	(CBS 7875)
<i>M. slooffiae</i>	VUT-98031	(CBS 7956)
<i>M. sympodialis</i>	VUT-98032	(CBS 7222)
<i>M. sympodialis</i>	VUT-98033	(CBS 7977)

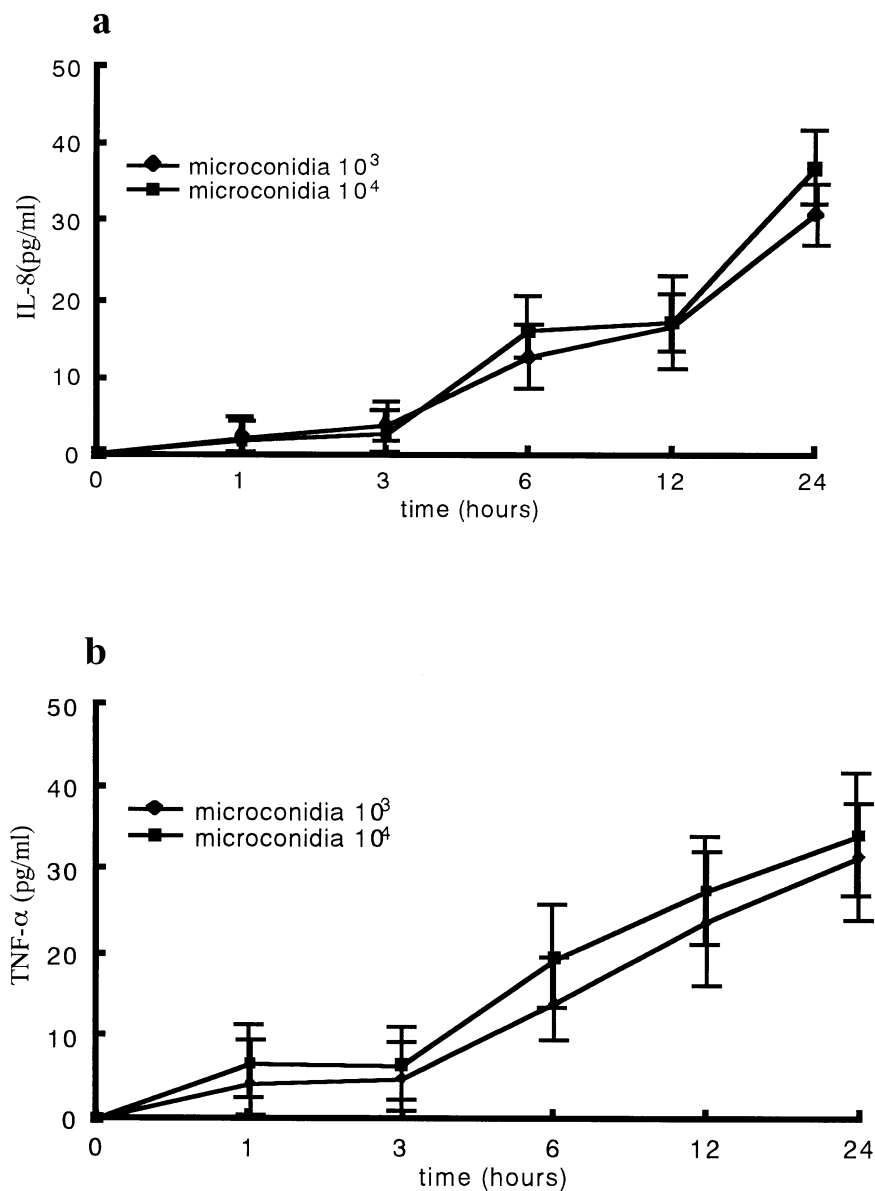
VUT : School of Veterinary Medicine, University of Tokyo

CBS : Centraalbureau voor Schimmelcultures

の条件で、ヒトケラチノサイトと培養し、経時的に培養液のサイトカイン量をELISA法によって測定した。その結果、MCP-1は産生されなかったが、3菌種でIL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α が産生され、感作に用いた菌種によってサイトカイン活性が異なっていた (Fig. 3)。このことから *Malassezia* 属の菌種により細胞浸潤や炎症反応の度合いが異なり、それにとまって皮膚病変が異なることが示唆された⁴⁾。

3) ケラチノサイトのサイトカイン産生に及ぼす *Trichophyton mentagrophytes* の影響

T. mentagrophytes の6株を1/10サブローブドウ糖寒天培地上で25°C、14日間培養後、菌体を回収した。次に菌体を滅菌水中に懸濁後、40 μ mのフィルターを通して、

Fig. 4. Effect of *T. mentagrophytes* on cytokine protein release.

Keratinocytes were co-cultured with *T. mentagrophytes*. After 1 hr, 3 hr, 6 hr, 12 hr and 24 hr, the supernatants were collected and cytokine releases were analyzed by the ELISA method. (a) IL-8, (b) TNF- α .

小分子と分節分生子を回収した。この懸濁液中の菌体数計算後、カンジダと同様の条件でヒトケラチノサイトと培養し、経時的に培養液のサイトカイン量をELISA法によって測定した。その結果、MCP-1 IL-1 β , IL-6, は産生されなかったが、IL-8, TNF- α が産生された (Fig. 4)。このことから白癬菌によってもケラチノサイトからサイトカインが誘導されることが確認された。また、白癬の場合も好中球を主体とした炎症細胞浸潤が認められることから、白癬菌が角質下の生きているケラチノサイトと接触することによって炎症が惹起されることが示唆された⁵⁾。

ま と め

以上の結果から、これら真菌の刺激が表皮に及ぶと、ケラチノサイトから炎症性サイトカインが分泌され、それによって白血球の遊走や、補体の活性化が惹起され炎症が進行し、感染真菌が排除されるものと思われる。

生体の細胞が侵入してきた微生物をどのように認識しているかについては、近年侵入微生物の細胞壁や遺伝子を感知する細胞膜レセプター (Toll-like receptor) が発見され、その機能について注目されている。このレセプターはヒトやマウスの貪食細胞、粘膜細胞、表皮細胞などにも存在し、上記の微生物由来物を認識することで、炎症性サイトカインの分泌が誘導されることが確認されている^{6, 7)}。

このように皮膚真菌症の病態解明や治療戦略にとって、ケラチノサイトにおける真菌によるサイトカインの誘導や発現を解明することは重要であると考えられる。

文 献

- 1) Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, Appella E, Kung HF, Leonard EJ, Oppenheim JJ: Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* **167**: 1883-1893, 1988.
- 2) Longley BJ: Fungal disease. *In* Lever's Histopathology of the skin (Elder D ed). 8th ed. 517-551.p. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997.
- 3) Kano R, Watanabe S, Sato H, Nakamura Y, Hasegawa A: *Candida albicans* induced interleukin 8 production by human keratinocytes. *J Dermatol Sci* **31**: 233-235, 2003.
- 4) Nakamura Y, Kano R, Hasegawa A, Watanabe S: IL-8 and TNF α production from human epidermal keratinocytes induced by *Trichophyton mentagrophytes*. *Clin Diag Laboratory Immun* **9**: 935-937, 2002.
- 5) Watanabe S, Kano R, Sato H, Nakamura Y, Hasegawa A: The effect of *Malassezia* yeasts on cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **116**: 769-773, 2001.
- 6) Kawai K, Shimura H, Minagawa M, Ito A, Tomiyama K, Ito M: Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* **30**: 185-194, 2002.
- 7) Pivarsci A, Bodai L, Rethi B, Kenderessy-Szabo A, Koreck A, Szell M, Beer Z, Bata-Csorgoo Z, Magocsi M, Rajnavolgyi E, Dobozsy A, Kemeny L: Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol* **15**: 721-730, 2003.

Cytokine Production and Dermatophytosis

Rui Kano

Department of Pathobiology, Nihon University School of Veterinary Medicine,
1866 Kmeino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan

The characteristic pathological feature of dermatomycosis is numerous neutrophilic infiltrates within the epidermis. However, the precise mechanism of this infiltration remains unknown. In this study, interleukins 1 β , 6, and 8, monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), and tumor necrosis factor (TNF)- α levels in the medium where keratinocytes were co-cultured with *Candida albicans*, *Malassezia* and *Trichophyton mentagrophytes*, were determined by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) in order to estimate the effect of these fungi on the cytokine production from human keratinocytes.

The IL-8 level in the supernatants increased with 1 to 14 hours of co-culture in response to live *C. albicans*, but the other cytokines were undetectable. Furthermore, the mRNA of IL-8 in keratinocytes was also confirmed to increased. This data suggested that *C. albicans* directly induce interleukin 8 production from human keratinocytes without activated macrophages.

The IL-6, IL-8, and TNF- α levels in the culture supernatants increased with 1 to 24 hours of co-culture with keratinocytes and *Malassezia* species but the MCP-1 level was undetectable.

The IL-8 and TNF- α levels in the culture supernatants increased with 1 to 24 hours of co-culture with keratinocytes and *Trichophyton mentagrophytes* but the other cytokine levels were undetectable.

The ELISA analysis of cytokine production by human keratinocytes will provide useful information in understanding the pathogenesis of dermatomycosis.

この論文は、第47回日本医真菌学会総会の“シンポジウム 1: 皮膚科領域における抗真菌剤治療のトピックス
—皮膚真菌症の病態と抗真菌薬の新展開—”において発表されたものです。