

病原真菌の抗体成分と免疫学的活性

第3報 抗 *Candida albicans* および抗 *Aspergillus fumigatus*

ウサギ血清の抗体諸成分の受け身皮膚アナフィラキシー活性

東京大学医学部細菌学教室

岩 田 和 夫 長 井 辰 男

(受付: 3月12日, 1968)

真菌では免疫抗体諸成分についての系統的な研究はほとんどなく、その過敏性に関する意義についてもほとんど全く知られていない。真菌の感染成立機序には過敏性と免疫性（いいかえれば、感染防禦）という矛盾した過程が密接な関連を有することは、臨床的諸事実がこれを示唆しているし、著者ら¹⁾はさきに動物実験によつてもこの点がある程度明らかにするところがあつた。また前報¹⁾²⁾において *Candida albicans* および *Aspergillus fumigatus* による免疫ウサギ血清から抗体諸成分を分離し、それらのパターンが他の微生物細胞またはその菌体諸成分によるそれらとはかなり様相を異にして特徴的であること、さらにそれらの精製した抗体諸成分、とくに IgG-1 画分が相応する菌株によるマウスの感染に対して著明な防禦効果を有することを明らかにした。

そこで本論文においては、これら抗体諸成分がこれら病原真菌の過敏性に関していかなる活性を有するかについてウサギを用いる受け身皮膚アナフィラキシー（以下 PCA）実験から検討した成績について報告する。

材料と方法

1. 使用動物

モルモット, HARTLEY 系, 雄性, 6週令, 体重約 250g の健常と思われるものを各群 2匹ずつ使用した。

2. 使用抗体成分

前報³⁾記載の抗 *C. albicans* C-a-13 株ウサギ血清から分離精製された IgG-1, IgG-2, IgA-1, IgA-2, IgA-3, IgM-1, IgM-2 の 7 画分および抗 *A. fumigatus* As-f-6 株ウサギ血清から分離精製された IgG-1, IgA-1, IgA-3, IgM-1, IgM-2 の 5 画分を用いた。

3. 使用抗原

C. albicans の場合は, C-a-13 株を SABOURAUD ブドウ糖寒天斜面における 37°C48 時間培養の 1 白金耳量ずつを数個の SABOURAUD ブドウ糖液状培地 200ml

(500ml の坂口振盪コルペンを使用) に接種し, 37°C48 時間振盪培養 (1 分間 120 往復) した後, 6,000r.p.m. 30 分の遠心により集菌し, 生理食塩水で 3 回洗浄後, 0.05M phosphate buffer solution (pH 7.5) を 3 倍量加え, French pressure cell を 400kg/cm² の条件下で 1 回通すことにより菌体を破壊し, 8,000r.p.m. 20 分の遠心上清をえ, すなわちこの無細胞抽出液をもつて抗原とした。

つぎに *A. fumigatus* では, As-f-7 株を CZAPEK-DOX 寒天斜面に 27°C10 日間培養し, 分生子の 1 白金耳量ずつを上と同様に 200ml の CZAPEK-DOX 液状培地数個に植えて 27°C72 時間, 上と同じ条件で振盪培養し, 菌体をガーゼ濾過で集菌し, 生理食塩水で 3 回洗浄後, 0.05 M phosphate buffer solution (pH 7.5) を 3 倍量に加えて 4,000r.p.m. 15 分間組織用 ホモジナイザーで破碎し, 以下 *C. albicans* の場合と同じ条件で French press による菌体破壊を経て, 抗原を調製した。

4. PCA 試験

上記抗体諸成分を micro Kjeldahl 法で定量し, おのおの 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001μg N をモルモットの背部内に一定間隔で注射し, 2 時間後上記兩種抗原に 1% Evans blue saline を等量加えたもの 1ml をモルモットの頸静脈内に接種した。なお, 抗体の対照として, 生理食塩水および分画前のブールした出発血清を用いた。

各々蛋白量として 10μg N の抗原を注射して 3 時間放置後にモルモットの皮膚を広く剥離し, 成績を判定した。判定基準は, 抗体注射局所の発色した部分の大きさが 10×10mm 以上を陽性 (+), それ以下わずかでも発色のみられるものを弱陽性 (±), 全く認められないものを陰性 (−) と表現した。

表1. *C. albicans* ウサギ血清の抗体諸画分のPAC活性の比較

抗体画分 使用	IgG-1	IgG-2	IgA-1	IgA-2	IgA-3	IgM-1	IgM-2
10.0 μ gN	+	+	+	+	+	+	+
1.0	+	+	±	±	±	±	±
0.1	+	+	—	—	—	—	—
0.01	+	—	—	—	—	—	—
0.001	—	—	—	—	—	—	—
対 照 1 *	—	—	—	—	—	—	—
対 照 2 **	+	+	+	+	+	+	+

注. *および**はそれぞれ生理食塩水および出発血清を 0.1ml ずつ使用した.

使用菌株: C-a-13 株

抗 原: 同菌株よりえた無細胞抽出液

動 物: モルモット

表2. 抗 *A. fumigatus* ウサギ血清の抗体諸画分のPAC活性の比較

抗体画分 使用量	IgG-1	IgA-1	IgA-2	IgM-1	IgM-2
10.0 μ gN	+	+	+	+	+
1.0	+	±	±	±	±
0.1	+	—	—	—	—
0.01	+	—	—	—	—
0.001	—	—	—	—	—
対照 1 *	—	—	—	—	—
対照 2 **	+	+	+	+	+

注. *および**はそれぞれ生理食塩水および出発血清を 0.1ml ずつ使用した.

使用菌株: As-f-6 株

抗 原: 同菌種よりえた無細胞抽出液

動 物: モルモット

成 績

まず, 抗 *C. albicans* C-a-13株 ウサギ血清からえた抗体諸成分と同菌株の抗原とによるモルモットにおけるPAC試験の結果は表1に示すとおりである.

表は2匹のモルモットにおいて全く同一の結果がえられたもので, IgG-1画分の活性が最も強く, 0.01 μ g Nの微量でも陽性反応を呈し, 同じIgG抗体でもIgG-2画分は活性が弱く, 1 μ g Nで陽性であり, 他の諸画分, すなわち, IgA-1, IgA-2, IgA-3, IgM-1, IgM-2はいずれもさらに活性が弱く, 1 μ g Nで弱陽性, 10 μ g Nでようやく陽性であつた. なお, 抗体の対照に用いた出発血清は明らかに陽性反応を, また生理食塩水は陰性反応を示した.

つぎに, 抗 *A. fumigatus* As-f-6株ウサギ血清からえた抗体諸画分と同一菌株の抗原とによるPAC試験の成績は表2に示した.

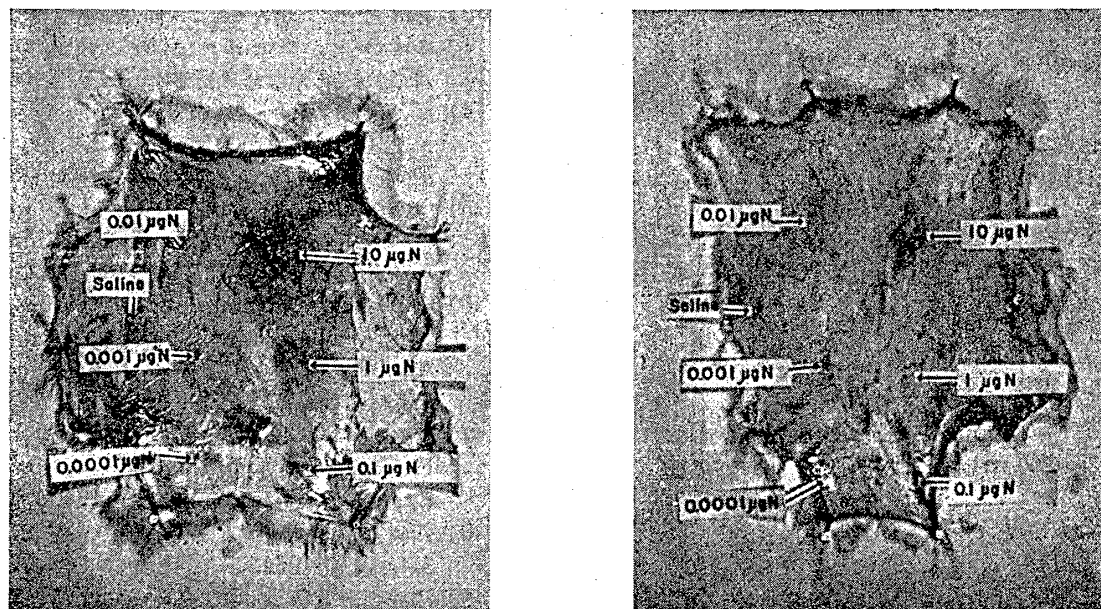
ここでも使用した2匹のモルモットにおいて同一の結果がえられ, IgG-1画分が活性最も強く, ただし, 抗 *C. albicans* 血清のそれよりやや弱く, 0.01 μ g Nで弱陽性, 0.1 μ g Nで陽性であり, 他の画分, IgA-1, IgA-3, IgM-1, IgM-2は抗 *C. albicans* 血清の場合と同様に1 μ g Nで弱陽性で, 10 μ g Nにいたつてようやく陽性を呈した.

以上の実験のうち, 抗 *C. albicans* 血清からのIgG-1およびIgM-1の各抗体画分のPAC試験の成績を写真に例示した.

考 察

さきに述べたように, 真菌の感染成立に過敏性が前提となつていられる臨床的基礎的事実が少なくないという視点において, 真菌免疫血清の抗体諸画分が過敏性を含む諸種免疫反応にそれぞれどのような責任と活性を有するかについては, 他の微生物による抗体諸画分のそれらが漸次明らかにされてきたのに対して, 抗体成分の分画そのものの研究が最近深沢⁴⁾および著者²⁾³⁾らによつて緒についたばかりであり, 深沢は凝集反応における活性について, 著者らは前報³⁾において感染防禦効果に関する活性について報告したにすぎない.

本論文において著者らは抗 *C. albicans* および抗 *A. fumigatus* ウサギ血清から分画した抗体諸成分のPACを一応指標とする過敏性反応における活性の所在とその量的関係を知ることを企図して上述のような成績をえたの

図. 抗 *C. albicans* ウサギ血清の IgG-1 ならびに IgM-1 抗体による PCA 反応.

注. 左: IgG-1 抗体による, 右: IgM-1 抗体による.

使用菌株: C-a-13株, 抗原: 同菌株よりえた無細胞抽出液, 動物: モルモット.

であるが, 両種抗血清ともに IgG の活性が最も顕著であり, IgA, IgM はそれにくらべれば著しく活性が弱いという共通の傾向が認められたので, そこに真菌抗体についての普遍性が推測される.

同じく IgG 抗体といつても, *C. albicans* の場合は, 2 種のうち IgG-1 画分が $0.01\mu\text{g N}$ で PCA 反応が陽性であり, IgG-2 画分になると, 他の抗体画分と同様に活性が低下し, 一方 *A. fumigatus* の場合は, IgG 抗体は 1 種しか分離されなかつたが, それは *C. albicans* のより強い画分, すなわち, IgG-1 よりも活性が 1 けた劣るという結果であり, このような量的差違は菌種の差違によるか, 菌株としてのそれか, または免疫方法, 免疫の時期, 分画方法などの条件にも関係するのか, 今後の検討にまたねばならない. 他の微生物に関しては, 一般には, 免疫性グロブリンのうちで, IgA がアレルギー性疾患における皮膚感作抗体, または IgM の一部がこれに関与するといわれ, なお, 最近 IgE とレアギンとの関係が問題とされている. これらの点で真菌の免疫性グロブリンの PCA 反応に関与する抗体として IgG が主要な役割を演じていることは興味深い.

Ovary⁵⁾⁶⁾ の研究に始まる PCA 反応は, アレルギー現象のモデル実験の一つとして, きわめて感度の高い生体内抗原抗体反応として知られているが, この反応が過敏性の直接的な表示であるとする見解には批判も生まれ

ている.

Ovary *et al*⁷⁾ はモルモットにおける PCA 反応は補体結合能のない抗原抗体系でもおこりうるとしているが, 西岡⁸⁾, 橘・真弓⁹⁾ は抗体の補体結合能が PCA 活性に関連していると述べているし, また Robbins *et al*¹⁰⁾ も補体の関与する殺菌作用, オプソニン作用などの免疫活性が IgM 抗体において IgG 抗体よりも著しく強いことを報告しており, このような実験的諸事実は, 著者らの前報³⁾ および本報における真菌の感染防禦と過敏性に関する抗体成分, とくに, それら現象論的に相反する免疫現象における主要な担い手としての IgG 抗体の役割を考慮するとき, これと補体結合性との関連は今後究明すべき重要な問題点と考えられる.

以上のごとく, 前報と今回の成績とを結合的にみると, 抗 *C. albicans* 血清の場合もまた抗 *A. fumigatus* 血清の場合も, IgG 抗体が感染防禦効果においても, また PCA 活性においても, IgA, IgM よりも活性が著しく強く, いいかえれば, 少なくとも著者らの実験系においては, 真菌の場合における免疫学的活性の主要な担い手は IgG 抗体であることを示唆するものである.

総括

前報²⁾記載の抗 *C. albicans* C-a-13ウサギ血清および抗 *A. fumigatus* As-f-6 株ウサギ血清から分画精製された IgG, IgA および IgM の各抗体画分を用い, これ

らの菌株の無細胞抽出液を抗原として、モルモットによるPCA試験をおこなった結果、ともにIgG抗体の活性が最も顕著であり、IgA, IgM抗体諸成分はある量以上で陽性反応を呈するが、IgG抗体よりも活性が著しく低いということを明らかにした。

なお、上述の実験系において、抗*C. albicans*血清のIgG抗体の方が抗*A. fumigatus*血清のIgG抗体よりも活性が強く、前者のうちでも、かかる顕著な活性を示すのはIgG-1画分の方で、IgG-2画分は、IgA, IgMの諸画分なみに活性が弱い。

(本論文の要旨は第17回日本医学会総会、総会講演、1967年4月2日、名古屋市および第22回日本細菌学会関東支部総会、1967年11月17日、東京都において発表した。)

文 献

- 1) 岩田和夫：病原真菌の菌体成分と感染及び免疫上の意義に関する研究，東京医学雑誌，72 (2)，85～104，1964.
- 2) 岩田和夫，長井辰男：病原真菌の抗体成分と免疫学的活性，第1報，抗*Candida albicans*および抗*Aspergillus fumigatus* ウサギ血清の抗体諸

成分の分離精製，本誌，印刷中。

- 3) 岩田和夫，長井辰男：同第2報，抗*Candida albicans*および抗*Aspergillus fumigatus* ウサギ血清の抗体成分の感染防禦効果，本誌，印刷中。
- 4) 深沢義村：第8回日本医真菌学会総会，シンポジウム「真菌の蛍光抗体法」真菌に対する診断的意義，真菌と真菌症，6 (3)，178～185，1965.
- 5) Ovary, Z.: Quantitative Studie in Passive Cutaneous Anaphylaxis of the Guinea Pig, Int. Arch. Allergy, 3 (3), 162～174, 1952.
- 6) Ovary, Z.: Immediate Reactions in the Skin of Experimental Animals Provoked by Antibody-Antigen Interaction, Progress in Allergy, 5, 459～508, 1958.
- 7) Ovary, Z., Benaceraff, B., and Bloch, K.J.: Properties of Guinea-pig γ Antibodies: J. Exp. Med., 117 (6), 951～964, 1963.
- 8) 西岡久寿彌：補体とその結合，科学，34 (6)，314～320，1964.
- 9) 橘武彦，真弓忠：補体結合反応，診療，18 (6)，803～811，1965.
- 10) Robbins, J.B., Kenny, K., and Sutyr, E.: The Isolation and Bio-logical Activities of Rabbit γ M-anti- γ G-Salmonella typhimurium.

Studies on Antibodies Formed by Pathogenic Fungi and Their Immunologic Activities

2. Infection-Preventing Effects of the Antibodies of the Anti-*Candida albicans* and Anti-*Aspergillus fumigatus* Rabbit Sera

Kazuo Iwata and Tatsuo Nagai

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

In view of the present status that preventive and curative effects of anti-fungus sera and their antibody components have not been clarified yet, the authors attempted to investigate such effects of the IgG-1, IgA-3 and IgM-1 components from the anti-*Candida albicans* and anti-*Aspergillus fumigatus* rabbit sera described in the preceding paper* against the experimental infections of mice with organisms of their respective strains.

One mg of the antibody components was intraperitoneally administered to each mouse of DD strain each once before and after the intravenous challenge with 1×10^6 yeast cells of *C. albicans* C-a-13 strain and also with the same number of conidia of *A. fumigatus* As-f-6 strain.

In the both infections, all the treated groups of mice were significantly smaller in mortality than the non-treated control ones; the IgG-1 fraction exhibited the most conspicuous preventive effect, the IgM-1 came next and the IgA-3 showed only a slight degree of activity.

* It is in press in this journal.

Studies on Antibodies Formed by Pathogenic Fungi and Their Immunologic Activities

3. Passive Cutaneous Anaphylaxis Activities of the Antibodies of the Anti-*Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* Rabbit Sera

Kazuo Iwata and Tatsuo Nagai

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

In an attempt to investigate the responsibility of antibodies of anti-fungus sera for hypersensitivity in mycotic infections, were performed experiments by means of passive cutaneous anaphylaxis technique.

As antibodies were used the IgG, IgA and IgM components from the anti-*Candida albicans* C-a-13 strain and anti-*Aspergillus fumigatus* As-f-6 strain rabbit sera described in the previous paper* in various contents and as antigens the cell-free extracts in 10 μ g N obtained from the cultures of the respective strains employed in immunization mixed with Evans blue. Test animals were guinea pigs. The results obtained were as follows.

In the both homologous antigen-antibody systems, the IgG-1 antibody proved the most active in PCA reaction, whereas the IgA and IgM antibodies were not so active as to all their fractions, positive in 1-10 μ g N.

Thus it might be concluded that IgG antibody is mainly responsible for hypersensitivity in terms of PCA reaction in pathogenic fungi and IgA and IgM antibodies do not play an important role in this property, as far as the test strains of *C. albicans* and *A. fumigatus* are concerned at least.

* It is in press in this journal.