

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*

ウサギ血清の抗体成分の分離精製

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)

文 献

諸種微生物およびそれらの菌体成分による免疫血清は一般に γ -グロブリンの著明な増量の特徴とし、ほかに特殊な場合としてT成分その他の分画が現われるけれども、おおむね同様の電気泳動図を示すことは周知のとおりであるが、真菌のそれに関してはほとんど全く知られていない。著者の1人岩田¹⁾は病原真菌として *Candida albicans* および *Aspergillus fumigatus* の各ウサギ免疫血清について TISELIUS 型の電気泳動によるパターンをしらべた結果、少数の実験ながら、菌種、菌株および動物の個体差によりアルブミン、 α -、 β -、 γ -各グロブリン画分の量的関係が著しく相違し、きわめて多様なパターンを示すことを認め、かくて真菌菌体成分の複雑多様性を示唆するものであることを報告した。

抗真菌血清に関するこのような興味ある事実から、著者らはそれらの γ -グロブリンを中心として抗血清を分画し、各パターンの特徴を追究するとともに、抗真菌血清の真菌症における治療効果ないしは真菌の実験的感染に対する防禦効果について従来替否両論があり、一定の結論がえられていないので、この点を明らかにする意味においても抗真菌血清からの精製 γ -グロブリン画分の実験的真菌感染における防禦効果を検討し、さらに抽出抗体諸成分の過敏性における責任の所在をもあわせ究明することを企図した。

本論文においては、2種の全く性状を異にする病原真菌である *A. fumigatus* ならびに *C. albicans* を対象とし、それらのウサギ免疫血清を分画してそれぞれよりクロマトグラフィーレベルで均一な抗体諸成分を抽出精製しえたので、それらの量的関係について報告する。

材料と方法

1. 使用菌株

Candida albicans C-a-13株(カンジダ性髄膜炎患者の髄液より分離) ならびに *Aspergillus fumigatus* As-f-6株

(アスペルギルス感染ペンギンの肺病巣より分離)の2菌株。

2. 使用動物

白色ウサギ(市販), 雄性, 体重約 2.5kgの健常と思われるもの各群5匹ずつを用いた。

3. 免疫方法

まず, *C. albicans* は SABOURAUD ブドウ糖寒天斜面に37°C48時間培養し, その酵母状細胞の生理食塩水浮遊液をつくり, 80°C10分間加熱滅菌し, 1ml の FREUND の incomplete adjuvant に water in oil 状として 1×10^8 個ずつを3回ウサギの腋下および鼠蹊部皮下に注射し, 以後 1×10^7 個ずつを4回, 5×10^7 個を1回, さらに 1×10^8 個の生菌を2回耳翼静脈内に接種し, 週2回の間隔で総計10回におよんだ。

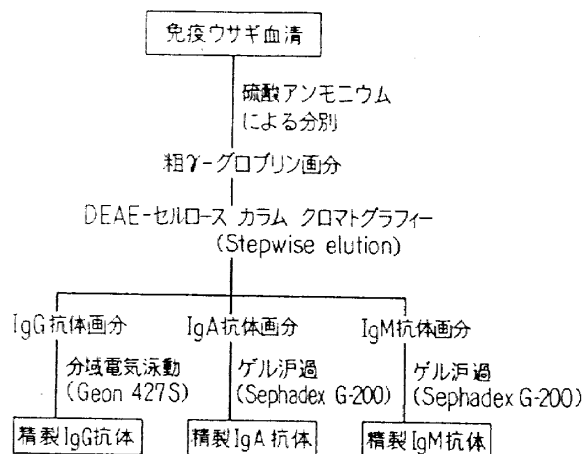
A. fumigatus の場合は, CZAPEK-DOX 寒天斜面に27°C2週間培養し, 0.1% Tween 80加生理食塩水にて均等な孢子浮遊液をつくり, *C. albicans* と同様の方法によりウサギを免疫した。

4. 抗体諸成分の分画精製法

各免疫血清は, 最終免疫処置1週後に, 各使用菌株からフェノール法で抽出した多糖体画分を抗原とする沈降反応(重層法)²⁾により10 μ g/ml以下の濃度で陽性を示すまで抗体価の上昇したことを確認してからブールして出発血清とした。

各出発血清からの抗体成分の分画精製法は, 図1に示すごとく, 常法³⁾により硫酸分画法で γ -グロブリンの粗画分をえ, DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより分画精製をおこなった。DEAE-セルロースは, 0.01M phosphate buffer (pH 7.8)で平衡にした後, 3時間脱気操作をおこない, 2 $\times$ 55cmのカラムをつくり, 同じ buffer で流出した。ついで, 0.02M phosphate buffer (pH 6.0), 0.05M NaH₂PO₄ (pH 4.7), さらに0.05M NaH₂PO₄+0.1M NaCl で stepwise elution をお

図1. 抗体画分の分画精製法.



こなつた。

さらに IgG 抗体画分については、Geon 427S を支持体として電極槽に 0.2M phosphate buffer (pH 7.5), 泳動槽に 0.1M veronal buffer (pH 8.6) を用い、4°C で 1.2mA/cm² の電流を20時間通じて分域電気泳動をおこない、IgG 抗体を精製した。また、IgA 抗体画分ならびに IgM 抗体画分の分離精製は、0.1M Tris-HCl + 0.1M NaCl buffer (pH 8.2) で平衡にした Sephadex G-200 でゲル濾過によつた。

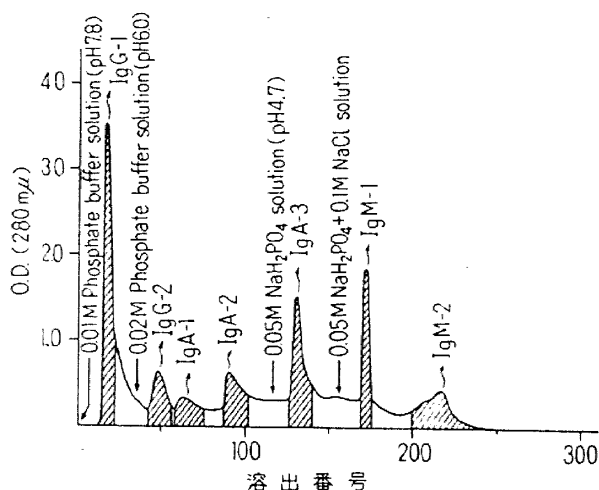
なお、抗体蛋白量は、PERKIN-ELMER 型 (日立製 139型) 光電光度計にて 280mμ の吸収で測定した。

成 績

C. albicans C-a-13株および *A. fumigatus* As-f-6 株の各多糖体画分を抗原とする沈降反応において、10μg/ml 以下の濃度で陽性を示した両ウサギ免疫血清から硫酸分画後 DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによつて分画された両血清のパターンは、図2および図3に示すとおりである。

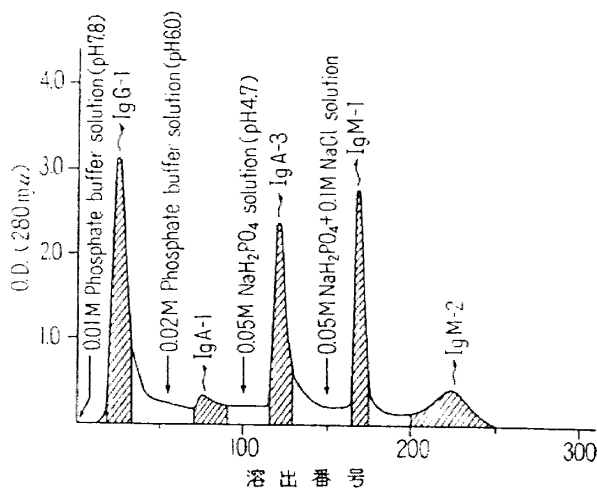
抗 *C. albicans* 血清の γ-グロブリンのクロマトグラムは IgG, IgA および IgM に相当する大小7つのピークを示す。これらの画分をピークの順に便宜上 IgG-1, IgG-2, IgA-1, IgA-2, IgA-3, IgM-1 および IgM-2 とよぶことにすると、IgG-1 画分の量が最も多く、ついで IgM-1, IgA-3 の2画分が少ない。

抗 *A. fumigatus* 血清のそれは、5個のピークを示し、これを抗 *C. albicans* 血清のそれに準じて IgG-1, IgA-1, IgA-3, IgM-1, IgM-2 とよぶならば、前者の IgG-2 と IgA-2 に相当するピークが認められない点が注目される。また、抗 *A. fumigatus* 血清の γ-グロブリンでは、IgG-1画分の量が最も多いのは同様であるが、IgA-

図2. 抗 *Candida albicans* ウサギ血清の粗 γ-グロブリン画分の DEAE-セルロースカラムクロマトグラム.

注. 使用菌株: C-a-13

斜線で囲んだ部分は、分域電気泳動および Sephadex G-200による精製に供した区分を示す。

図3. 抗 *Aspergillus fumigatus* ウサギ血清の粗 γ-グロブリン画分の DEAE-セルロースカラムクロマトグラム

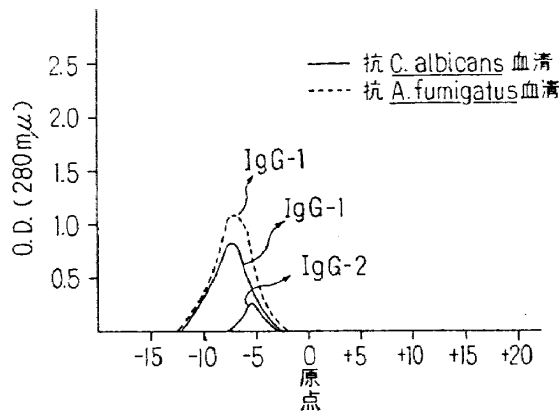
注. 使用菌株: As-f-6

斜線で囲んだ部分は、分域電気泳動および Sephadex G-200による精製に供した区分を示す。

3, IgM-1 の両画分の量が前者のそれらよりも顕著である点が目立っており、他の画分が少ないことは前者と同様である。

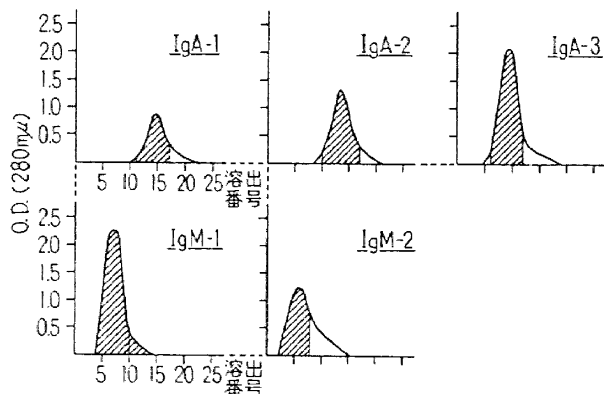
つぎに、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーでえられた兩種 γ-グロブリンの各画分について、それぞれ図2, 3の斜線で囲んだ区分をとり出して、Geon

図4. 抗 *Candida albicans* および抗 *Aspergillus fumigatus* ウサギ血清の粗 γ -グロブリン画分の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーレベルにおける IgG 抗体画分の分域電気泳動による各精製抗体のパターン.



注. 使用菌株: *C. albicans* C-a-13, *A. fumigatus* As-f-6
Buffer: 0.1M veronal buffer (pH 8.6)
支持体: Geon 427 S, 40×3×1 cm
電 流: 1.2mA/cm²
通電時間: 20時間

図5. 抗 *Candida albicans* ウサギ血清の粗 γ -グロブリン画分の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーレベルにおける IgA および IgM 抗体画分の Sephadex G-200ゲル濾過による各精製抗体のパターン

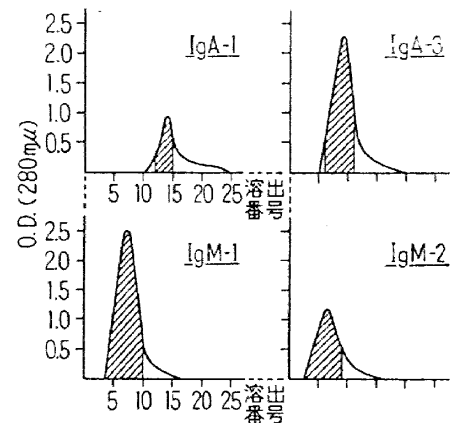


注. 使用菌株: C-a-13
Buffer: 0.1M Tris-HCl buffer+0.1M NaCl (pH 8.2)

427 S による分域電気泳動および Sephadex G-200ゲル濾過をおこなつて精製した IgG 抗体および IgA ならびに IgM 抗体のパターンを図4および図5ならびに図6に示した.

図4にみるように, 精製 IgG 抗体は, いずれも単一峰を示し, 左右対称性であつて, おおむね精製された

図6. 抗 *Aspergillus fumigatus* ウサギ血清の粗 γ -グロブリン画分の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーレベルにおける IgA および IgM 抗体画分の Sephadex G-200ゲル濾過による各精製抗体のパターン.



注. 使用菌株: As-f-6
Buffer: 0.1M Tris-HCl buffer+0.1M NaCl (pH 8.2)

ものであることを示している. *C. albicans* の IgG-1 と *A. fumigatus* のそれとは, 分域電気泳動の移動度が等しく, すなわち, 電気的性質が類似し, また, 上述のように, DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーでの溶出位置が同じであることが認められ, かくて, 異なる2菌種の間に共通性をもつた抗体主成分が存在することを示唆している. しかし, *C. albicans* の IgG-2 抗体は, これらの2点において, 同じ菌株の IgG-1 抗体と明らかに差違が認められ, むしろ, その移動度は IgA, IgM の各抗体の示す移動度に近い.

精製 IgA, IgM 各抗体のパターンは, 図4, 5にみられるように, いずれも単一峰で, 左右対称性であり, IgG 抗体と同様におおむね精製された物質であることを示している.

C. albicans の各抗体と *A. fumigatus* の相応するそれらとは, DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーおよび Sephadex G-200によるゲル濾過の溶出位置が同一で, 共通性をもつことをここでも示唆している.

なお, 続報において感染防禦および受け皮膚アナフィラキシーの実験に用いた各精製抗体画分は, 図4に示した原点より陰極へ移動した画分および図5, 6において斜線で囲んだ区分である.

考 察

さきに述べたように, 著者の1人岩田¹⁾は, 病原真菌

として同じく *C. albicans* (ただし使用菌株は C-a-7 株) および *A. fumigatus* (ただし As-f-4 株) の 2 菌種について同様な免疫方法による ウサギ抗血清の TISELIUS 型の電気泳動によるパターンをしらべた結果、細菌その他の微生物およびそれらの菌体成分による免疫血清と比較して著しく様相を異にすること、すなわち、 γ -グロブリンの増量するのは同様であるとしても (しかし、ある例ではかえって免疫処置後に減量さえした)、すべての例において α -および β -グロブリンが大なり小なり明らかな増量をみせ、またグロブリンの増量はアルブミンの犠牲によるとみなされること、また、そのような量的関係は動物の個体によっても異なることを見出し、真菌免疫血清の多様性を指摘したが、今回も使用菌株こそ異なるが、抗 *C. albicans* ウサギ血清および抗 *A. fumigatus* ウサギ血清について、硫酸分画後の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによる γ -グロブリンの諸成分に関しても、他の微生物のそれとは質的ならびに量的関係において、かなり著しい相違がみられるようであつて、今日知られている免疫性グロブリンの IgG, IgA, IgD, IgM, IgE などの諸抗体と著者らのそれとの諸性状における比較は今後の検討にまきたい。

深沢⁴⁾は抗 *C. albicans* ウサギ血清について蛍光抗体法のための血清抗体蛋白の分画を Sephadex G-200 ゲル濾過でおこなない、280m μ の吸収に関し 3 つのピークをえ、また硫酸沈殿後の蛋白に fluorescein isothiocyanate を結合させ、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより分画して 4 画分をえて、凝集反応上の抗体活性の所在とその特異性を示し、さらに Sephadex G-200 ゲル濾過によりえた試料を上記蛍光色素で染色後、同様に DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーをおこなない、2 種の buffer で stepwise elution をおこない、2 つの画分をえている。

このような著者らの成績との不一致は、分画精製法の若干の相違や同じ *C. albicans* でも菌株の相違にもよるものであろうが、免疫方法の違いもあるいは大きく関与しているかもしれない。すなわち、深沢の免疫方法は抗原として終始加熱死菌を用いているのに対し、著者らは加熱死菌のほかに中途から生菌に切り替えていることで、これは、後報に述べるように、抗 *C. albicans* 血清、抗 *A. fumigatus* 血清より抽出精製した抗体画分による感染防禦実験において牛場⁵⁾およびその一門の報告した腸炎菌の場合における死菌免疫にまさる生菌免疫の感

染防禦効果にかんがみ、真菌の場合にも同様の効果を期待した意図による。ただし、細菌の場合と異なり、弱毒生菌、強毒生菌の区別をもつて免疫するような毒力の著明な差違を示す菌株がえられず、死菌で最初免疫処置した後に生菌を接種する必要があると考えたのである。

抗 *A. fumigatus* 血清とその抗体画分については、著者らは文献にその例を見出していないから、ここに比較検討することはできないが、著者らの抗 *C. albicans* 血清と比較して抗体画分としてピークが 2 個少ないこと、その他の画分の量的関係も若干の相違が認められる点などが注目されるが、これらは菌種の相違か、もしくは *C. albicans* における酵母細胞と *A. fumigatus* の胞子による免疫の相違による影響とも考えうる。

以上、両血清の抗体画分の質的量的関係は、使用菌株、使用動物、免疫方法、採血時期、分画精製条件、動物の個体差などによつてかなりの差違が生ずるであろうことは当然推測されるところで、これらの点についての検討は、今後にまきたい。

なお、両抗血清よりえた IgG, IgA, IgM の各抗体画分の免疫学的活性については、続報に記述する。

総 括

Candida albicans C-a-13 株または *Aspergillus fumigatus* As-f-6 株によるウサギ免疫血清から硫酸分画で γ -グロブリンの粗画分をえ、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより分画し、その IgG 抗体相当の区分よりさらに分域電気泳動により IgG 抗体を、一方、IgA および IgM 抗体相当の区分より Sephadex G-200 ゲル濾過をおこなない、IgA および IgM 抗体をそれぞれ精製した。

上記の抗 *C. albicans* 血清および抗 *A. fumigatus* 血清からの γ -グロブリンの DEAE-セルロースカラムクロマトグラムは、それぞれ、7 つのピーク、すなわち、IgG-1, IgG-2, IgA-1, IgA-2, IgA-3, IgM-1, IgM-2 および 5 つのピーク, IgG-1, IgA-1, IgA-3, IgM-1, IgM-2 (仮称) の各成分が認められた。ともに IgG-1 (従来知られている免疫性グロブリンの IgG 抗体に相当する) が主成分をなすが、後者では、そのほかに IgA-3 および IgM-1 抗体の増量が前者のそれらよりも顕著であつた。

各精製抗体画分のパターンは、いずれも左右対称性の単一峰を示し、おおむねよく精製しえたものとみなされる。

以上のごとく、真菌性免疫グロブリンは、質的にも量的にも多様性に富む特徴的な抗体成分より構成されていることが認められる。

(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に関する研究，とくに感染と免疫に関連して，真菌と真菌症，

3(4), 157~179, 1963.

- 2) Akiba, T., K. Iwata and S. Inoue: Studies the Serologic Diagnosis of the Deep-Seated Candidiasis, Japan. Jour. of Microbiol., (1), 11~19, 1957.
- 3) 山村雄一，石坂公成編集：免疫化学，469~523, 1963, 朝倉書店，東京.
- 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) 牛場大蔵：感染と免疫，139~156, 1965, 中外医学社，東京.

Studies on the infectious allergy of staphylococcus

Report 2. Experimental renal lesions caused by the sensitization with

hemolytic Staphylococcus

Takao Sakamoto

The First Department of Internal Medicine (Director: Prof. Yasuo Kawakami)

School of Medicine, Showa University, Tokyo, Japan

Rabbits were sensitized with cells of staphylococcus or its α -hemolysin, principal pathological findings were as follows.

The kidney of rabbits presented the changes of glomerulitis. That were enlargement of capillary tufts, adhesion of the tufts with Bowman's capsules, and mild grade of thickening of the basement membrane of the tufts.

These changes were enhanced by combined treatment of staphylococcus sensitization with small quantities of the nephrotoxic serum, and the changes similar to chronic glomerulonephritis was also produced.

Some of the α -hemolysin sensitized animals showed a marked proliferation of epitheloid or fibroblastic cells which protruded in alveoli and occupied its lumens (Masson body like masses).

Studies on Antibodies Formed by Pathogenic Fungi and Their Immunologic Activities

1. Fractionation and Purification of Antibodies from Anti-Candida albicans and Anti-Aspergillus fumigatus Rabbit Sera

Kazuo Iwata and Tatsuo Nagai

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

In an attempt to clarify antibodies produced by pathogenic fungi and their immunologic activities, several experiments were made.

This paper deals with fractionation and purification procedures of the immunoglobulins from anti-*Candida albicans* and anti-*Aspergillus fumigatus* rabbit sera and their electrophoretic patterns.

In the DEAE-cellulose column chromatogram of the crude gammaglobulins obtained from the anti-*C. albicans* and anti-*A. fumigatus* sera by ammonium sulfate fractionation were seen seven peaks, IgG-1, IgG-2, IgA-1, IgA-2, IgA-3, IgM-1 and IgM-2 fractions and five peaks, IgG-1, IgA-1, IgA-3, IgM-1 and IgM-2 fractions, respectively, which were temporarily designated for convenience.

The main component was the IgG-1 fraction appropriate to so-called IgG antibody, a main component of any immunoglobulins, either, and the IgA-3 and IgM-1 fractions were also recognized to exist in considerable amount, especially, in case of *Aspergillus* globulin.

Thus it is to be noted that the immunoglobulins from anti-fungus sera are characteristic in quality and quantity, compared with those of any other origin.