

〔速報〕

Candida albicans が分泌する Acid Protease に対するアレルギー反応

- 1) 国立相模原病院臨床研究部
 2) 帝京大学医真菌センター
 3) 宝酒造株式会社バイオ研究所

秋山一男¹⁾ 安枝 浩¹⁾ 三田晴久¹⁾ 柳原行義¹⁾
 金子富志人¹⁾ 前田裕二¹⁾ 早川哲夫¹⁾ 長谷川真紀¹⁾
 信太隆夫¹⁾ 山本哲郎²⁾³⁾ 山口英世²⁾ 竹迫一任³⁾

Candida albicans (*C. albicans*) は人体皮膚粘膜の常在真菌でありアレルギー疾患の原因真菌として知られているが、その主要抗原成分については不明の点が多い。*C. albicans* が産生分泌する酵素である acid protease (CAAP) は、*C. albicans* が宿主皮膚、粘膜上にコロニー形成する時に分泌され IgA や secretory component を分解することにより *C. albicans* のヒト皮膚、粘膜への寄生を可能にする。本論文では、*Candida* 粗抗原による即時型皮内反応陽性の成人気管支喘息患者において CAAP に対する I 型アレルギー反応を検討した。68名に実施した眼反応 (CPT) では *Candida* 粗抗原に陽性の8名中6名 (75%) が CAAP に陽性であった。一方 *Candida* 粗抗原に陰性の60名中 CAAP に陽性であったのは1名 (1.7%) のみであった。個々の症例の検討では2例において CAAP に対する血中 IgE 抗体価 (RAST), CPT, 末梢血白血球ヒスタミン遊離反応 (HRT), さらに吸入誘発反応 (BPT) も陽性であった。CAAP は *C. albicans* による粘膜アレルギー反応において重要な抗原成分と考えられた。

Key words: acid protease — bronchial provocation test — *Candida albicans* — conjunctival provocation test — radioallergosorbent test

はじめに

Candida albicans (*C. albicans*) はヒトの皮膚、粘膜における常在真菌として知られている。*C. albicans* が分泌する acid protease (CAAP) は本菌に特異的な酵素であり¹⁾, IgA や secretory component を分解することにより本菌が粘膜上に常在菌叢として存在するのを可能にし²⁾, *C. albicans* が粘膜上に寄生し始める時に宿主が最初に会おう抗原のひとつと考えられる。我々は本酵素が *C. albicans* に対する即時型アレルギー反応の原因アレルゲンとして重要であると考えている³⁾。本稿では、*Candida* 粗抗原に対する即時型皮内

反応陽性者68例に実施した CAAP 眼結膜誘発反応の結果との中で種々アレルギー学的検査により CAAP に対する I 型アレルギー反応が明らかな4症例を報告する。本論文は CAAP が I 型アレルギー反応に関与することを明らかにした最初の報告である。

対 象

国立相模原病院アレルギー外来受診中の鳥居薬品製 *C. albicans* 抗原に対する即時型皮膚反応陽性の成人気管支喘息患者68症例。

方 法

Abbreviations: α -IgE affinity-purified goat antibody to human IgE; BPT bronchial provocation test; *C. albicans* *Candida albicans*; CAAP *Candida albicans* acid protease; CPT conjunctival provocation test; HRT peripheral leukocytes histamine releasing test; IAR immediate asthmatic response; LAR late asthmatic response; RAST radioallergosorbent test

1. *Candida albicans* acid protease (CAAP)

本研究に用いられた acid protease は、Yamamoto et al. により分離、精製された分子量44kD、糖鎖を含まない、等電点4.2、至適 pH 3.3の蛋白分解酵素であ

る¹⁾。CAAP は凍結乾燥末として -34°C に保存した。

2. *Candida* 粗抗原

皮内反応には鳥居薬品製の皮内反应用抗原液を使用した。そのほかのアレルギー学的検査には当院入院患者から採取した *C. albicans* を合成培地⁴⁾で4週間培養後遠心し、得られた培養上清を透析し、凍結乾燥末とした *Candida* 粗抗原を使用した。

3. アレルギー学的諸検査

① *Candida* 粗抗原及び CAAP に対する特異的 IgE 抗体は、RAST 法⁵⁾で測定した。その他の抗原に対する特異的 IgE 抗体は Pharmacia RAST kit で測定。②末梢血白血球ヒスタミン遊離反応 (HRT) は三田らの方法⁶⁾に則り刺激物質としてヒト IgE に対する affinity-purified goat antibody (α -IgE) (Kirkegaard & Perry Lab. Inc., USA), *Candida* 粗抗原並びに CAAP を用いて実施した。③眼結膜誘発試験 (CPT) には 1:400 *Candida* 粗抗原液 (凍結乾燥末 10mg を生食 4ml に溶解) 並びに 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CAAP 液 (蛋白量として) を使用した。④吸入誘発試験 (BPT) は日本アレルギー学会標準法に則った当院でのルーチン法⁷⁾で行い、1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CAAP 液を用いた。

結 果

1. スクリーニング検査の結果

スクリーニング検査として過去に当院で皮膚テストを受けた成人気管支喘息患者の内、鳥居社製 *Candida* 粗抗原に対して即時型強陽性反応を示した患者 16 例の血清を用いて CAAP に対する血中 IgE 抗体を測定した。測定した 16 例中 6 例が陽性 (12.3, 1.1, 1.0, 1.0, 0.47, 0.42PRU) であり、あとの 10 例が 0.35PRU 未満で陰性であった。そこで陽性例、陰性例につき皮内反応での相違を検討したが、鳥居社製 *Candida* 粗抗原に対する皮内反応閾値は両群とも $10^{-4} \sim 10^{-7}$ で差はなく、他の真菌抗原に対する陽性反応も CAAP RAST 陽性群で、*Aspergillus* 3/6, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Trichophyton*, *Cephalosporium* 各 1/6 であり、一方 CAAP RAST 陰性群では、*Aspergillus*, *Penicillium*, *Cephalosporium* 各 3/10, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Trichophyton* 各 2/10 であった。すなわち CAAP RAST 陽性群が他の真菌抗原との交叉反応によるとは考えにくかった。両群間で明かな相違が認められたのは *Candida* 粗抗原に対する CPT であっ

Table 1 Conjunctival provocation test

		Crude <i>Candida</i> extract		Total
		+	-	
<i>Candida</i> acid protease	+	6*	1**	7
	-	2	59	61
Total		8	60	68

*Six of the 8 (75%) patients with positive CPT to crude *Candida* ext. show positive CPT to CAAP.

**Only 1 of the 60 (1.7%) patients with negative CPT to crude *Candida* ext. show positive CPT to CAAP.

た。CAAP RAST 陽性群では 6 例中 5 例が陽性であり、一方 CAAP RAST 陰性群では 10 例中 2 例のみが CPT 陽性であった。

2. *Candida* 粗抗原, CAAP による眼結膜誘発反応

スクリーニング検査で *Candida* 粗抗原による CPT 陽性と CAAP RAST 陽性とが関連していること、すなわち CAAP が粘膜アレルギーのアレルゲンとして重要である可能性が考えられたので鳥居社製 *Candida* 粗抗原に対する皮内反応陽性成人気管支喘息患者に対して *Candida* 粗抗原と CAAP を用いて CPT を実施した。Table 1 に示すように検討した 68 例の内、*Candida* 粗抗原に対して CPT 陽性を示した 8 例中 6 例 (75%) が CAAP に対しても CPT 陽性を示した。一方、*Candida* 粗抗原に対して CPT 陰性の 60 例中には CAAP 陽性例は 1 例 (1.7%) しかみられなかった。

3. 症例 1 (Fig. 1A)

58 歳女性で 40 歳発症の気管支喘息患者。血中総 IgE 値は 730IU/ml。即時型皮内反応では *Candida*, ダニ, HD, スギ陽性。Pharmacia RAST では *Candida* 3, ダニ 3, HD 2, スギ 2。今回の検討では、血中 IgE 抗体価 (% total counts: normal control=1.0) は *Candida* 粗抗原 RAST 26.5, CAAP RAST 7.5 であり、CPT は両抗原で陽性、HRT は α -IgE, *Candida* 粗抗原, CAAP で共に陽性。CAAP による BPT は 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の CAAP で IAR 陽性, LAR 陰性。

4. 症例 2 (Fig. 1B)

49 歳女性で 23 歳発症の気管支喘息患者。血中総 IgE 値は 1324IU/ml。即時型皮内反応では *Candida*, ダニ, HD の他, スギ, カモガヤなど複数の花粉抗原に陽性。Pharmacia RAST では ダニ 4, HD 3, *Candida* 2, スギ 1。今回の検討では、血中 IgE 抗体価は *Candida*

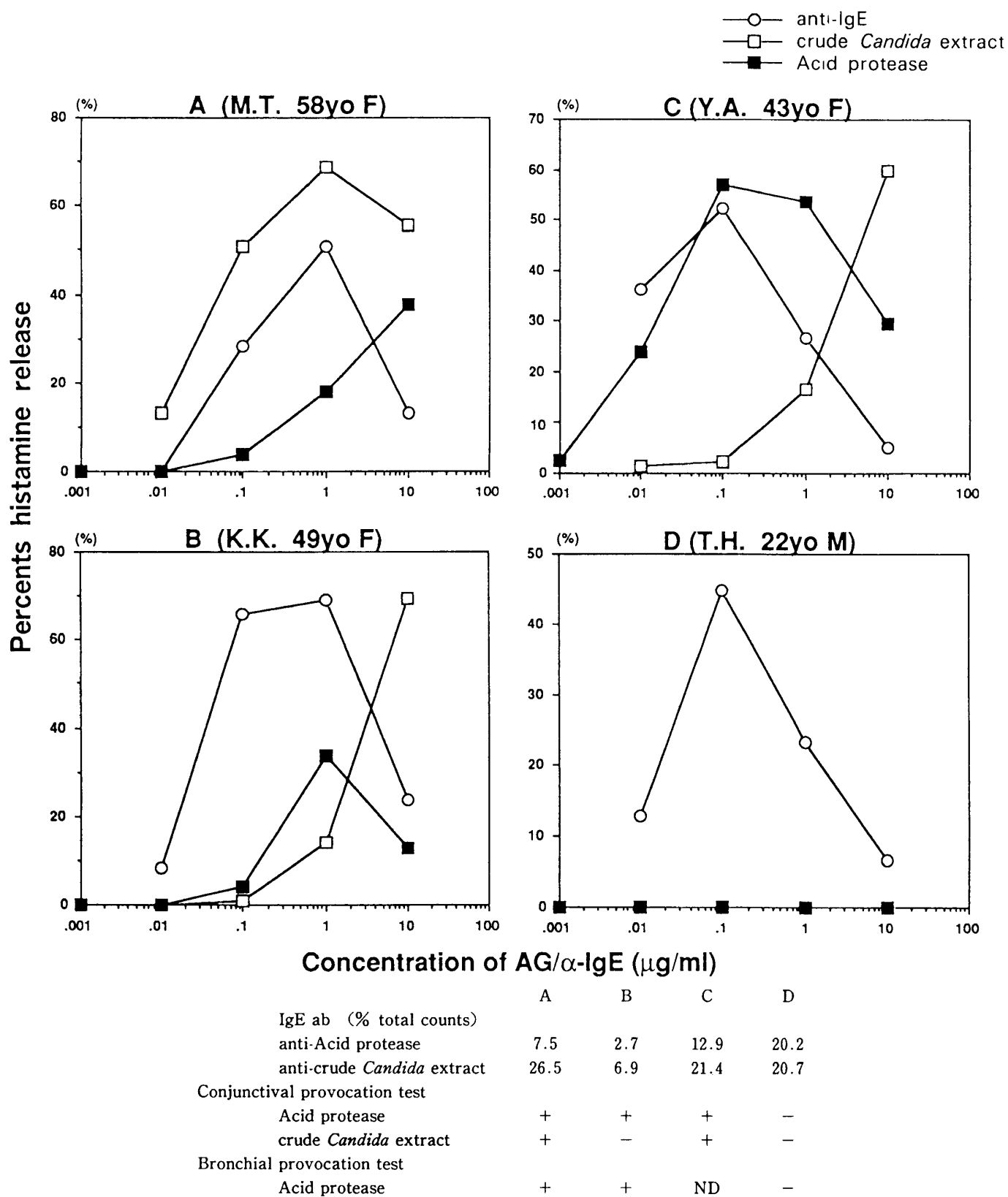


Fig. 1. Allergy profiles in 4 cases.

粗抗原 RAST 6.9, CAAP RAST 2.7であり, CPT では *Candida* 粗抗原では陰性, CAAP では陽性であった。HRT は 3 抗原とも陽性, BPT では 10 μg/ml の

CAAP で IAR 陽性, LAR 陰性であった。

5. 症例 3 (Fig. 1C)

43歳女性で3歳発症のアトピー性皮膚炎を伴う気管

支喘息患者。血中総 IgE 値は11000IU/ml。即時型皮内反応ではダニ、HD の他、*Candida* を含めた多数の真菌抗原、花粉抗原に陽性。Pharmacia RAST では *Candida* 4, ダニ 3, HD 3, *Aspergillus* 3, 他多数の真菌抗原で score 2。今回の検討では、血中 IgE 抗体価は *Candida* 粗抗原 RAST 21.4, CAAP RAST 12.9であり、CPT では両抗原で陽性であった。HRT では3抗原とも陽性であったが特に CAAP に対する反応が強かった。本症例では BPT は実施できなかった。

6. 症例 4 (Fig. 1D)

22歳男性で3歳発症のアトピー性皮膚炎を伴う気管支喘息患者。血中総 IgE 値は4800IU/ml。即時型皮内反応ではダニ、HD の他、*Candida* を含めた多数の真菌抗原、花粉抗原に陽性。Pharmacia RAST ではダニ > 4, HD > 4, *Candida* 3, *Penicillium* 2, 他複数の真菌抗原で score 2。今回の検討では、血中 IgE 抗体価は *Candida* 粗抗原 RAST 20.7, CAAP RAST 20.2であった。しかし、CPT は両抗原とも陰性であり、また HRT も α -IgE には反応したが、*Candida* 粗抗原、CAAP では陰性であった。本症例に実施した BPT では100 μ g/ml の CAAP 吸入によっても IAR, LAR とも陰性であった。

考 察

Candida albicans は成人気管支喘息患者の皮膚テスト実施時にはダニ、HD、スギに次いで即時型反応の陽性頻度が高い抗原である。しかも他のアトピー性抗原とは異なり加齢によっても陽性頻度は減少せず、ほぼ40~50%程度で一定している⁸⁾。しかしながら即時型皮膚反応陽性例の中で血中 *Candida* 特異的 IgE 抗体を有する者はその30%程度であり、その内で BPT 陽性例は更に少ない⁹⁾。我々は以前から CPT を日常臨床において BPT に代わり得る検査法として頻用しているが、特に HD と真菌抗原においては皮内反応、RAST, CPT が全て陽性の場合には、BPT 陽性頻度が95%以上であるため BPT を割愛できると考えている¹⁰⁾¹¹⁾。CAAP は *C. albicans* が産生する誘導酵素であり医真菌学、皮膚科学の分野で日和見感染、皮膚寄生菌の観点から研究されている¹²⁾。Yamamoto らが検索した140株の *C. albicans* 全てが本酵素を分泌した。他には、*C. tropicalis* 18株中13株、*C. parapsilosis* 18株中11株が本酵素を分泌したが、他の *Candida* 属、

Cryptococcus neoformans, *Tricosporon cutaneum* は分泌しなかった¹⁾。CAAP は宿主皮膚、粘膜への寄生、感染のさいに最初に分泌される酵素であり、宿主の側からみれば *C. albicans* 侵入の際に最初に出会う *C. albicans* 関連の物質のひとつであろう。従ってアトピーを一種の防御反応と考えれば CAAP に対して IgE 抗体を産生し、I 型アレルギー反応を惹起することは充分考えられる。*Candida* 粗抗原による即時型皮膚反応陽性と他のアレルギー学的諸検査との解離の原因はいまだ不明であるが、真菌抗原の複雑さが一つの原因と考えられる。現在までに *Candida* 細胞壁構成成分である mannan のアレルギー反応における役割が広く研究されているが、今回細胞壁構成成分ではない分泌酵素である CAAP が *Candida* 粗抗原と眼反応での一致率が高く、また個々の症例における検討で RAST 値、HRT, CPT, BPT の一致が認められたことは *C. albicans* が分泌する酵素である CAAP が I 型アレルギーの原因抗原として重要であることを示している。現在、*Candida* 粗抗原中における CAAP と mannan との関係を検討中である。以上から感染あるいは寄生物としての側面と、異物として抗原、アレルゲンとしての側面とを合わせ持っているという点で、他の微生物アレルゲンである他の真菌、細菌においても、*C. albicans* における CAAP と同様に分泌酵素が生物学的な意義と同時にアレルゲンとしての意義をも持つというこのような機序はあてはまると考えられる。

本研究の一部は、XIV International Congress of Allergy and Clinical Immunology および第32回日本胸部疾患学会総会で発表した。

文 献

- 1) Yamamoto, T., Nohara, K., Uchida, K., and Yamaguchi, H.: Purification and characterization of secretory proteinase of *Candida albicans*. *Microbiol. Immunol.* 36, 637-641, 1992.
- 2) Ruchel, R., Tegeler, R. and Trost, M.: A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20, 233-244, 1982.
- 3) 秋山一男, 田部一秋, 大友 守, 金子富志人, 前田裕二, 他: *Candida* acid protease に対するアト

- ビー性喘息—常在菌アレルギーのモデルとして。
日胸疾会誌 30, 263(抄録), 1992.
- 4) Schaffer, N., Molomut, N. and Center, J.G.: Studies on allergenic extracts. I. A new method for the preparation of mold extracts using a synthetic medium. *Ann. Allergy* 17, 380-384, 1959.
 - 5) Yasueda, H., Mita, H., Yui, Y. and Shida, T.: Isolation and characterization of two allergens from *Dermatophagoides farinae*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 81, 214-223, 1986
 - 6) Mita, H., Yui, Y., Yasueda, H., Kajita, T., Saito, H. and Shida, T.: Allergen induced histamine release and immunoreactive-leukotriene C₄ generation from leukocytes in mite sensitive asthmatic patients. *Prostaglandins* 31, 869-886, 1986.
 - 7) 牧野荘平, 小林節雄, 宮本昭正, 信太隆夫, 高橋昭三, 他: 気管支喘息および過敏性肺臓炎における吸入試験の標準法. アレルギー 31, 1074-1076, 1982.
 - 8) 秋山一男, 前田裕二, 信太隆夫: 高齢者のアレルギー(1)アレルギー反応の特徴. 1. アレルギー反応. アレルギー 40, 332(抄録), 1991.
 - 9) 秋山一男: 真菌アレルギー反応の多様性. アレルギー 39, 203(抄録), 1990.
 - 10) 秋山一男, 油井泰雄, 信太隆夫: 真菌喘息の研究. 皮内反応, *radioallergosorbent test*, 眼反応, 吸入誘発反応間の相関の検討. アレルギー 29, 74-84, 1980.
 - 11) 油井泰雄: アレルゲン吸入誘発試験. アレルギーの臨床 20, 49-53, 1983.
 - 12) 小川秀典: *host-parasite relationship*. —真菌, 特に *C.albicans* の産生する角質溶解性酵素(KPase)について. 皮膚病診療 6, 582-586, 1984.

THE ALLERGIC REACTION TO ACID PROTEASE RELEASED BY *CANDIDA ALBICANS*

Kazuo Akiyama¹⁾, Hiroshi Yasueda¹⁾, Haruhisa Mita¹⁾, Yuki Yoshi Yanagihara¹⁾, Fushito Kaneko¹⁾,
Yuuji Maeda¹⁾, Tetsuo Hayakawa¹⁾, Maki Hesegawa¹⁾, Takao Shida¹⁾,
Tetsuro Yamamoto²⁾³⁾, Hideyo Yamaguchi²⁾ and Kazuto Takesako³⁾

¹⁾Research Center for Rheumo-Allergology, National Sagamihara Hospital

²⁾Research Center for Medical Mycology, Teikyo University School of Medicine

³⁾Biotechnology Research Laboratories, Takara Shuzo Co., Ltd.

The species of *Candida albicans* (*C. albicans*) are known to colonize mucocutaneous regions as part of the endogenous flora. *C. albicans* is also known as an important allergen in human allergic diseases. However, the major allergen of *C. albicans* has not been identified yet. Acid protease released from *C. albicans* (CAAP) cleaves IgA or the secretory component to enable *C. albicans* to colonize on the mucous membrane.

In this study, using CAAP and crude *Candida* antigen as challenging antigens, we carried out conjunctival provocation tests (CPT) on 68 adult bronchial asthmatic patients who showed immediate positive skin reactions to crude *Candida* antigen. In several patients we performed serum IgE antibody (RAST), histamine release from peripheral leukocytes (HRT) and bronchial provocation tests (BPT) to CAAP. Six of the 8 patients who showed positive CPT to crude *Candida* antigen (75%) showed positive CPT responses to CAAP. On the other hand, only 1 of the 59 patients who showed negative CPT to crude *Candida* antigen (1.7%) showed positive CPT reactions to CAAP.

Two female patients showed positive RAST and HRT to both crude *Candida* and CAAP. They also showed positive CPT and BPT. One patient had positive RAST results but negative HRT, CPT and BPT results.

These results show that CAAP is an important allergen for atopic patients allergic to *C. albicans*.