

Candida albicans 菌体を固相とした RAST による 特異 IgE 抗体, ELISA による特異 IgG 抗体の測定

名古屋大学医学部小児科

宇理須厚雄 肥田康俊 鳥居新平

名古屋保健衛生大学小児科

近藤 久 宮田隆夫

名古屋大学医学部医真菌研究施設

近藤 譲

Key words: bronchial asthma — *Candida albicans* — specific IgE
antibody — specific IgG antibody

(受付: 2月24日, 1983)

はじめに

真菌の中で *Candida albicans* (以下, *C. albicans* と略す) は気管支喘息の原因物質として重要なものの一つである。しかし, まだその主要抗原が確定されていない現在, 免疫アレルギー学的検査の際, どの成分を抗原として用いたらよいか結論が出ていない。

最近, Edge¹⁾²⁾らは *Candida* 菌体そのものを固相として, クラス別の特異抗体を radioimmunoassay によって測定する方法を報告した。固相として菌体を用いれば, 表層に存在するすべての蛋白, 多糖体などの抗原を検索でき, さらに, 発作を誘発するアレルギー暴露の際, 生体が接触する抗原に最も近いものと考えられる³⁾。

今回, 我々は *Candida* 菌体を固相として用い, 特異 IgE 抗体を radioallergosorbent test (以下, RAST と略す) により, 特異 IgG 抗体を enzyme-linked immunosorbent assay (以下, ELISA と略す) によって測定することを試み, さらに, 50% inhibition test を行い, *Candida* 抗原に関する若干の知見を得たので報告する。

また, 特異 IgE 抗体の測定法の中で代表的なものの

一つに, 固相として paper disc を用いる方法があり, Akiyama ら⁴⁾は, 吸入誘発試験と眼反応に次いでよく関連したと述べており, 肥田ら⁵⁾も皮内テストと, 伊藤ら⁶⁾はプリックテストとよく一致したと報告している。そこで, paper disc 法と菌体を固相とした方法とで IgE 抗体を同時測定して比較検討したのであわせて報告する。

材料と方法

1. *Candida* 抗原の作製: *Candida* 抗原の作製は前報⁷⁾の方法に準じて行った。

① 菌株と培養: *C. albicans* NUM 26, 37, 110, 114, 683 (名古屋大学医学部医真菌研究施設保存株) 5 株を 3% glucose, 1% peptone 液体培地で 37°C, 24 時間振盪培養後, 1500G 10 分間遠心して菌体を採取し, 1/15M, PBS (pH 7.2) で 3 回洗浄後凍結乾燥した。なお, 菌株の血清型は, NUM 110, 114 は group A, NUM 26, 37, 683 は group B であった。

② *Candida* 菌体粗抗原 (以下, 粗抗原と略す) の調整: *C. albicans* NUM 37, 100g (湿潤重量) を 0.5N, KOH, 400ml に浮遊し, 4°C で 48 時間, スターラーで静かに攪拌した後, 直径 0.3mm のガラス・ビーズを加え, Vibrogen cell mill (Edmond buhler, Töbingen) で振盪破壊した。これを 11000G 30 分間遠心し, 得られた上清を蒸留水で 48 時間透析した後, さらに, これを 11000 G 30 分遠心し, その上清をミリポアフィルター (pore

Abbreviations: A.U. arbitrary units; *C. albicans* *Candida albicans*; CNBr cyanogen bromide; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay; NUM Institute of Medical Mycology, Nagaya University School of Medicine; RAST radioallergosorbent test

size 0.45 μ m) で濾過した後、凍結乾燥した。

③ 菌体多糖体分画の調整：粗抗原20g を蒸留水20 ml に溶解し、10% TCA 溶液を等量加えて除蛋白後、0.2M borate buffer (pH 7.2) で透析し、pronase を0.1% になるように加え、37°C 48時間反応させ蛋白成分を分解した。その後、コロジオンバッグで濃縮し、Sephadex G-75 column chromatography を用いて分解された peptide と pronase を除去し、さらに蒸留水で透析して凍結乾燥した。

調整した抗原の蛋白濃度は、Bio Rad assay kit を用いてウシ血清アルブミンを標準物質として測定した。炭水化物濃度は、anthron 反応によってブドウ糖を標準物質として測定した。凍結乾燥重量に対する蛋白重量と炭水化物重量の百分率は、粗抗原では、それぞれ13.3%, 19.0%, 多糖体分画では、それぞれ0.6%, 70.0%であった。

2. *Candida* 菌体に対する特異 IgE 抗体の測定：Edge ら²⁾の方法に準じ、polystyrene tube (栄研 2 号) に *Candida* 菌体を2.5mg/ml (凍乾重量) の濃度で0.05% Tween 20と0.02% NaN₃を含んだ1/15M PBS (pH 7.2) (以下、PBS-Tween と略す) 0.5ml に浮遊し、そこへ患者血清0.1ml を加えて室温で3時間、30°の傾斜角度で回転させながら反応させた後、PBS-Tween で3回洗浄し、最後にペレットとした。次に、¹²⁵I-抗ヒト IgE 血清 (Pharmacia Diagnostics) 0.05ml を添加し菌体を浮遊させ、室温で一夜反応させ、5回 PBS-Tween で洗浄した後、gamma counter で計測した。各検体について¹²⁵I-抗ヒト IgE 血清0.05 ml のカウント数に対する百分率を下記の式で計算した。

$$100 \times \frac{(\text{検体のカウント数}) - (\text{PBS-Tween 添加のカウント数})}{(\text{総カウント数}) - (\text{PBS-Tween 添加のカウント数})}$$

Candida 菌体に対する特異 IgE 抗体高値の患者血清を原液から64倍まで倍々希釈し、この曲線を標準曲線として用い、各希釈倍数に64倍して、これを IgE RAST arbitrary units (以下 IgE RAST A.U. と略す) とした。つまり、1/64倍は1 IgE RAST A.U. 1/1倍 (原血清) は64 IgE RAST A.U. に相当する (Fig. 1)。

3. *Candida* 菌体に対する特異 IgG 抗体の測定：特異 IgG 抗体の測定は、alkaline phosphatase を酵素とした ELISA で行った⁸⁾。*Candida* 菌体を0.25mg/ml (凍乾重量) の濃度になるように PBS-Tween 0.5ml に浮遊し、そこへ100倍希釈した患者血清0.1ml を添加し

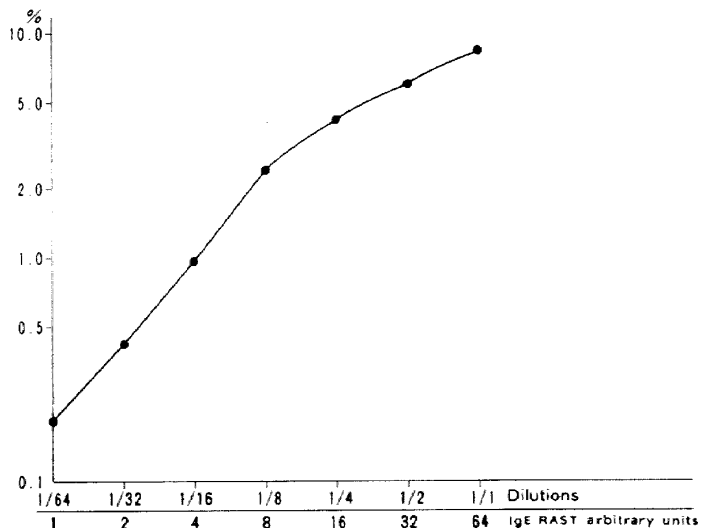


Fig. 1. Standard curve of IgE antibodies against yeast cells of *C. albicans* measured with RAST.

て室温で3時間回転させながら反応させた後、PBS-Tween で5回洗浄してからペレットとした。alkaline phosphatase を結合させた抗ヒト IgG (γ 鎖) の原液を PBS-Tween で100倍希釈した溶液を0.5ml 加え、さらに室温で一夜回転させながら反応させた。なお、alkaline phosphatase の抗ヒト IgG への結合は、Engvall⁹⁾の方法に従った。つまり、alkaline phosphatase (type VII, Sigma Chemical) を、抗ヒト IgG 血清 (Behring Institute) から塩析法によって得られた γ -グロブリン分画に glutaraldehyde によって結合させた。反応終了後、PBS-Tween で5回洗浄し、基質として p-nitrophenyl phosphate を1mg/ml の濃度で含む0.05M sodium carbonate 緩衝液 (pH 9.8, 10⁻³M MgCl₂ 含) 1.0ml の中へ再浮遊させ、15から30分間反応させ、1N の NaOH 0.1ml を添加して反応を停止させた後、吸光度計を用いて405nm の波長でその上清の吸光度を測定した。*Candida* 菌体に対する特異 IgG 抗体高値の患者プール血清を標準血清として用いた。血清を40倍から2560倍まで倍々希釈し、その希釈倍数に2560倍した値を IgG ELISA arbitrary units (以下 IgG ELISA A.U. と略す) とした (Fig. 2)。

4. *Candida* 菌体による50% absorption test：菌株間に抗原活性の差異があるかどうかをみるため、50% absorption test を行った。IgE 高値プール血清と、IgG 高値プール血清に菌株 (NUM 26, 37, 114, 683) を凍乾重量で最終濃度が25mg/ml, 2.5mg/ml, 0.25mg/ml となるように添加し、室温で1時間、その後、4°C で

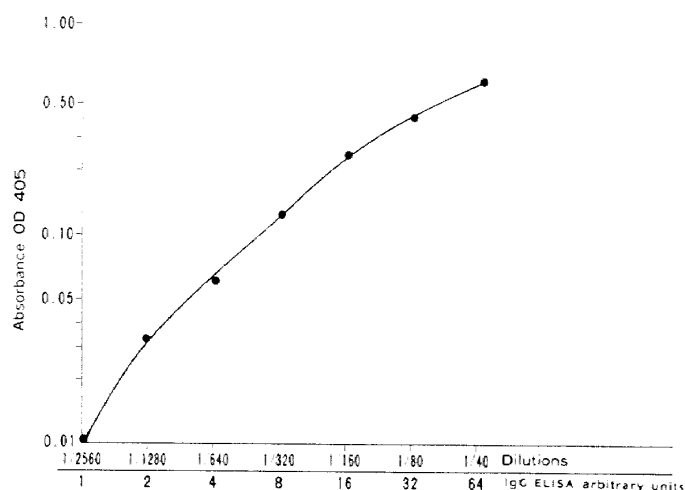


Fig. 2. Standard curve of IgG antibodies against yeast cells of *C. albicans* measured with ELISA.

一夜反応させた後, 11000G 4℃, 30分遠心して菌体を除去し, その上清の特異 IgE 抗体, 特異 IgG 抗体を測定した。なお, 固相としては NUM 110を用いた。結果は50% absorption に匹敵する菌体の凍乾重量で表現した。

5. 粗抗原と多糖体分画による 50% inhibition test : 50% inhibition test は Gleich ら⁹⁾の方法に準拠して行った。粗抗原と多糖体分画を各患者血清に, 凍乾重量で最終濃度が7.5mg/ml, 0.75mg/ml, 0.075mg/ml となるように添加し, 室温で1時間反応させた後, 4℃で一夜反応させ, その検体の特異 IgE 抗体, 特異 IgG 抗体を NUM 110を固相として用いて測定した。結果は50% inhibition に相当する凍乾重量で表した。

6. Pharmacia 製 IgE *Candida* allergen disc と菌体を固相とした IgE RAST との比較 : 同一血清について, Pharmacia 製 *Candida* allergen disc と菌体 (NUM 110)を固相とした RAST によって同時測定して両者の方法を比較した。

結 果

1. 菌株の検討 : 気管支喘息患者 6 人の血清の特異 IgE 抗体を各菌株を固相として測定した値を Fig. 3 に示した。さらに, 各菌株間の相関係数と危険率を示したのが, Table 1 である。NUM 110は NUM 26と危険率10%以下で正の相関の傾向を示した以外, 他の菌株とは有意に正の相関関係があった。特異 IgG 抗体に

Table 1 Comparison of IgE antibodies against yeast cells among the varying strains of *C. albicans*

NUM NUM	26	37	110	114	683
26		N S	$p < 0.1$	$p < 0.01$	N S
37	$\gamma = 0.557$		$p < 0.02$	N S	$p < 0.01$
110	$\gamma = 0.785$	$\gamma = 0.910$		$p < 0.02$	$p < 0.05$
114	$\gamma = 0.968$	$\gamma = 0.729$	$\gamma = 0.907$		N S
683	$\gamma = 0.364$	$\gamma = 0.945$	$\gamma = 0.852$	$\gamma = 0.579$	

N S : not significant.

についても, NUM 110は, NUM 114に次いで, 他の菌株との間により相関を示していた (Fig. 4, Table 2)。これらの結果から, 以下の実験では, NUM 110を固相として用いることにした。なお, NUM 110について使用直前に, 位相差顕微鏡下で形態を観察したところ, 100%が yeast form であり, Sabouraud 寒天培地を用いた混濁培養を行ったところ生菌は存在しなかった。

2. 菌体による50% absorption test : NUM 26, 37, 114, 683それぞれの菌株による50% absorption の値は, IgE 抗体が6.8mg/ml, 13.0mg/ml, 25mg/ml 以上, 24.5mg/ml, IgG 抗体は NUM 26が1.85mg/ml, 他の菌株は0.25mg/ml 以下であった (Table 3)。IgE 抗体に対する抗原力価も, IgG 抗体に対する抗原力価も菌株によって差があった。興味あることには, NUM 26は, IgE 抗体に対する抗原力価は4株中最大であるにもかかわらず, IgG 抗体に対する抗原力価は最低で

Table 2 Comparison of IgG antibodies against yeast cells among the varying strains of *C. albicans*

NUM NUM	26	37	110	114	683
26		N S	$p < 0.1$	$p < 0.05$	$p < 0.1$
37	$\gamma = 0.707$		$p < 0.01$	$p < 0.005$	$p < 0.005$
110	$\gamma = 0.780$	$\gamma = 0.925$		$p < 0.005$	$p < 0.005$
114	$\gamma = 0.825$	$\gamma = 0.967$	$\gamma = 0.976$		$p < 0.005$
683	$\gamma = 0.801$	$\gamma = 0.945$	$\gamma = 0.995$	$\gamma = 0.992$	

N S : not significant.

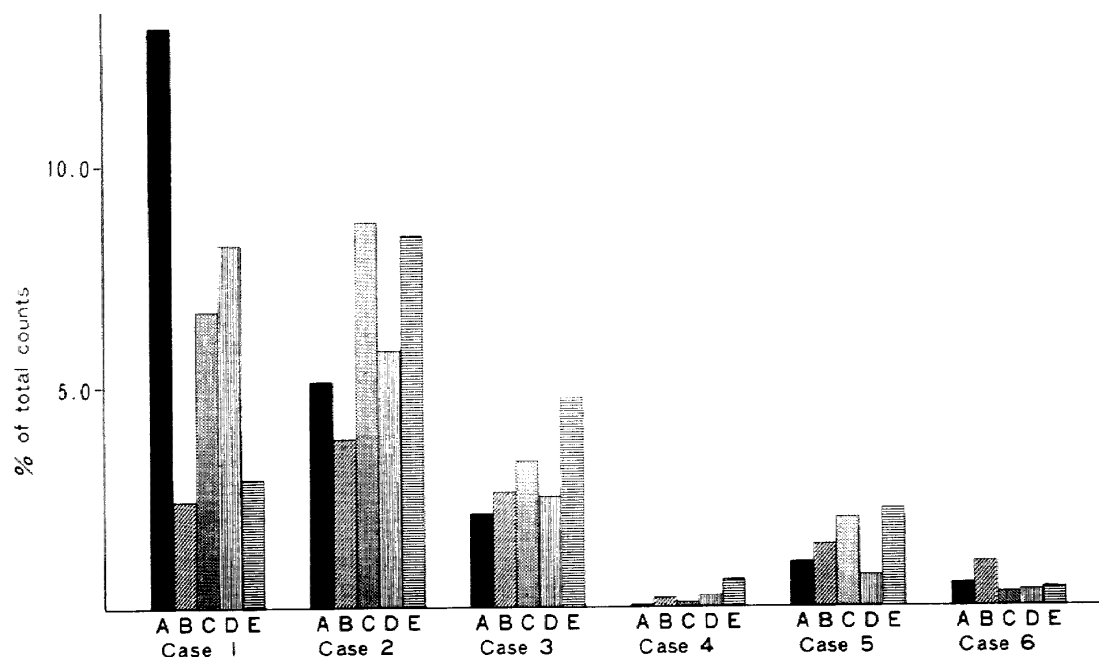


Fig. 3. Comparison of IgE antibodies against yeast cells among the varying strains of *C. albicans*.

A: NUM 26, B: NUM 37, C: NUM 110, D: NUM 114, E: NUM 683.

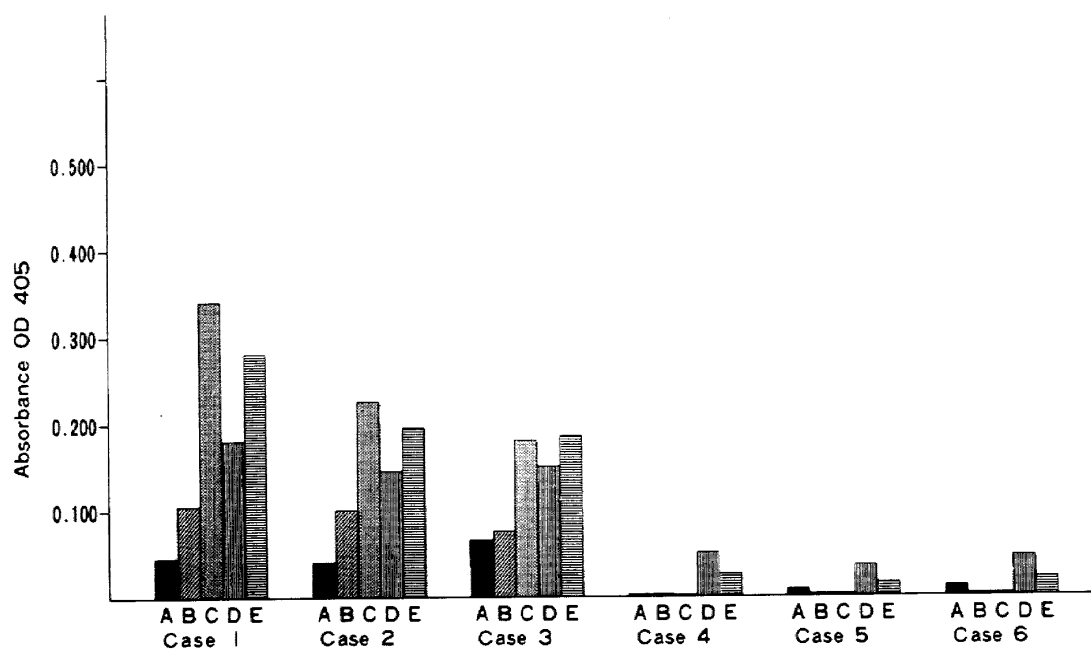


Fig. 4. Comparison of IgG antibodies against yeast cells among the varying strains of *C. albicans*.

A: NUM 26, B: NUM 37, C: NUM 110, D: NUM 114, E: NUM 683.

あった。

3. 粗抗原と多糖体分画による 50% inhibition test: 対象とした10人の気管支喘息患者のうち7人は鳥居薬品 K.K. 製 *Candida* 凍乾末を用いた吸入誘発試験陽性であり, 1人は陰性, 2人は未施行者である。

症例5, 6, 7の血清は, IgE 抗体に対する50% inhibition 値が, 多糖体分画よりも粗抗原の方が低値であった。すなわち, これらの血清中の IgE 抗体に対する主要抗原は, 多糖体分画よりもむしろ粗抗原に存在していた。つまり粗抗原から多糖体分画を差し引いた分画

Table 3 50% RAST & ELISA absorption by varying strains of *C. albicans*

	<i>C. albicans</i> NUM #1			
	26 (mg/ml)	37 (mg/ml)	114 (mg/ml)	683 (mg/ml)
IgE	6.8	13.0	>25.0	24.5
IgG	1.85	<0.25	<0.25	<0.25

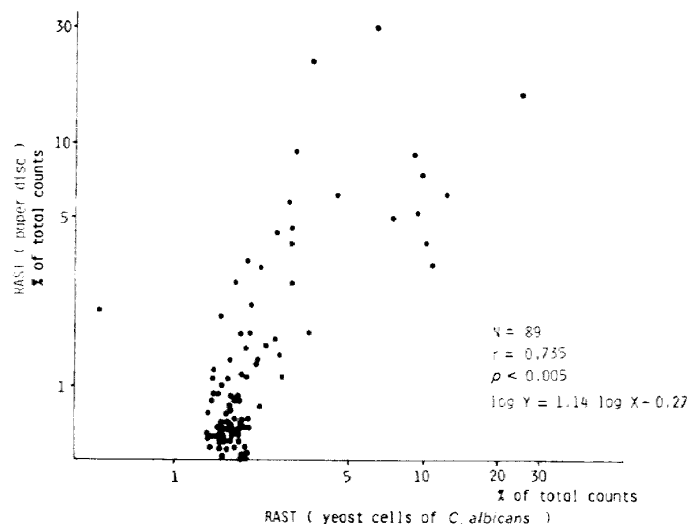
*1 Nagoya University, Institute of Medical Mycology.

にその主要抗原が存在していることになる。他の症例では、粗抗原、多糖体分画いずれも7.5mg/ml以上であった。IgG抗体に関しては、症例1と症例4とで、粗抗原の方が多糖体分画よりも50% inhibition値が低値であったが、他の症例では、いずれの分画でも0.075 mg/ml以下であった(Table 4)。また、同一症例でも、IgE抗体に対する主要抗原とIgG抗体に対する主要抗原とが異なる分画に存在していた(症例1から6)。

4. Pharmacia製IgE *Candida* allergen discと菌体を固相としたIgE RASTとの比較: 両者によるIgE抗体価の間には $r=0.735$, $p<0.005$ で有意の相関が認められた(Fig. 5)。

考 察

*C. albicans*の種々の菌株を固相として喘息患者血清について検討してみると、IgE抗体、IgG抗体どちら

Fig. 5. Relationship between the two methods of IgE *Candida* RAST using paper disc and yeast cells of *C. albicans* as solid phase.

の場合でも、高い値を示す血清はどの菌株でも高く、逆に、低い値を示す血清はどの菌株でも低値であった。しかし統計処理をしてみると、どの菌株の間にも正の相関があるわけではなく、このことは、菌体の表層抗原が菌株によって異なっているところもあることが分った。今回検討した菌株の中で、NUM 110はIgE抗体に関しては他のどの菌株とも良く相関しており、他の菌株よりも多種類の抗原を備えていると推測された。IgG抗体に関しては、NUM 114に次いで優れていた。よって、我々の実験では、NUM 110を固相として用いることが妥当であると考えられた。

Table 4 50% RAST & ELISA inhibition with crude extracts and polysaccharide rich fraction of *C. albicans*

	50% inhibition					
	IgE		IgG		IgE RAST (AU/ml)	IgG ELISA (AU/ml)
	Crude *1 (mg/ml)	PS *2 (mg/ml)	Crude (mg/ml)	PS (mg/ml)		
1. ♂	>7.5	>7.5	<0.075	1.25	22.5	18.5
2. ♂	>7.5	>7.5	<0.075	<0.075	10.8	10.5
3. ♀	>7.5	>7.5	<0.075	<0.075	70.7	13.2
4. ♂	>7.5	>7.5	0.45	>7.5	23.5	8.2
5. ♂	1.25	>7.5	<0.075	<0.075	43.0	10.5
6. ♀	0.155	3.1	<0.075	<0.075	38.0	10.0
7. ♂	0.062	>7.5	ND	ND	25.5	1.4
8. ♀	ND *3	ND	<0.075	<0.075	0.6	56.5
9. ♂	ND	ND	<0.075	<0.075	UD *4	58.0
10. ♀	ND	ND	<0.075	<0.075	5.5	38.0

*1 Crude: crude extracts of *C. albicans*.*2 PS: polysaccharide rich fraction of *C. albicans*.

*3 ND: not done. *4 UD: undetectable.

菌体の表層抗原が菌株によって異なっていることは、菌体による50% absorption test でも証明された。また NUM 23は、IgE 抗体に対する抗原力価が検討した5株中最大であり、一方、IgG 抗体に対する抗原力価は最小であった。この事実は、NUM 23ではIgE 抗体に対する主要抗原と、IgG 抗体に対する主要抗原とが異なっていることを示している。

次に、患者血清を用いた50% inhibition test の結果から、IgE 抗体に対応する主要抗原が今回使用した粗抗原から多糖体分画を差し引いた残りの分画に存在する場合と、どの分画にも存在しない場合とがあった。つまり、IgE 抗体に対応する主要抗原が症例によって異なる分画に存在していることが明らかにされた。一方、IgG 抗体に対する主要抗原は多くの血清で粗抗原だけでなく、多糖体分画にも存在していたが、中には、多糖体分画以外の分画に存在する血清も2検体みつけた(症例1と4)。また、IgG 抗体に対する主要抗原も症例によって異なる場合があることがわかった。*Candida* 抗原も、ダニ¹⁰⁾、*Cladosporium*¹¹⁾と同様、IgE 抗体、IgG 抗体それぞれに対する主要抗原は複数存在し、症例によって異なった抗原と反応していることが示唆された。

さらに、症例によってはIgE 抗体に対する主要抗原が存在する分画と、IgG 抗体に対する主要抗原が存在する分画が異なっていた。つまり、IgE 抗体とは反応するがIgG 抗体とは反応しない抗原や、その反対の抗原が存在することが推測された。このことを解明していくためには、今後抗原成分を単一物質としてとらえていくことが必要と考えられた。

菌体を固相としたRASTと*Candida* allergen disc によるRASTとの間に強い相関関係がみられた。CNBrによって*Candida*抗原を結合させているpaper disc には、第一級アミノ基を成分に含んだ物質が結合している。このことから、IgE 抗体に対する主要抗原として、第一級アミノ基を含んだ物質、たとえば、蛋白、糖蛋白、あるいは糖ペプチドのようなものが重要であることが示唆された。

抗原分析を行うためには、固相上にできるだけ広範囲の抗原が備わっており、さらに主要抗原がもれなく存在していることが望ましい。その意味で、菌体を固相として用いることは、より優れた方法と考えられる。しかも、Pepys がいうように、喘息発作を誘発するアレルギー暴露に近い状態の抗原について検索できるので、臨床上有意義な方法といえるかもしれない。しか

し、この方法では菌体内の抗原に関しては検索できない。Longbottom ら¹²⁾は、細胞質蛋白にもIgE 抗体に対する主要抗原が存在すると述べており、*Candida* の主要抗原の検索にはこの点も考慮する必要がある。

結 語

1. *C. albicans* の菌株によって、IgE 抗体、IgG 抗体のいずれについても、その表層抗原に違いが認められたが、今回検討した5株の中では、NUM 110がその表層に最も多種類の抗原を配列していた。よってIgE 抗体、IgG 抗体を測定する際 NUM 110を固相として用いることが妥当と考えられた。

2. *C. albicans* のIgE 抗体に対する主要抗原は複数であり、症例によって反応している抗原の属する分画が異なっていた。これはIgG 抗体に対する主要抗原についても同様であった。また、IgE 抗体に対する抗原が属する分画と、IgG 抗体に対する抗原が属する分画とが異なっている症例も存在した。

稿を終えるにあたり、御校閲頂いた名古屋大学医学部小児科学教室 鈴木榮教授ならびに、研究をすすめるにあたり御指導頂いた名古屋大学医学部医真菌研究施設 田中健治教授に深謝いたします。

本論文の要旨は、第32回日本アレルギー学会総会(岡山)において発表した。

文 献

- 1) Edge, G., Longbottom, J.L., Tee, R.D. and Pepys J.: Immunological investigations of *Candida albicans* in respiratory disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 4, 303-312, 1977.
- 2) Edge, G. and Pepys, J.: Antibodies in different immunoglobulin classes to *Candida albicans* in allergic respiratory disease. *Clin. Allergy* 10, 47-58, 1980.
- 3) Pepys, J.: "Allergy in Immunological Aspects of Infectious Diseases" (Ed. by G. Dick), MTP Press Limited Falcon House Lancaster, England, pp. 215-268, 1979.
- 4) Akiyama, K., Yui, Y., Shida, T. and Miyamoto, T.: Relationship between the results of skin, conjunctival and bronchial tests and RAST with *Candida albicans* in patients with asthma.

- Clin. Allergy* 11, 343-351, 1981.
- 5) 肥田康俊, 宇理須厚雄, 鳥居新平, 上田雅乃, 吉田政己, 山田政功, 近藤 譲: RAST 法を用いたカンジダ特異的 IgE 抗体の測定について. アレルギーの臨床 11, 58-63, 1982.
 - 6) 伊藤幸治, 佐野靖之, 奥平博一, 森田 寛, 中川武正, 坂本芳雄, 宮本昭正: スギ花粉, カンジダディスクによる RAST 価と皮膚反応との関係に関する研究. アレルギーの臨床 17, 59-64, 1982.
 - 7) 阿多実茂, 近藤 譲, 神戸俊夫, 藤井富美子, 高橋高明, 後藤幸夫: *Candida albicans* 菌体成分の細胞性免疫学的活性に関する研究. 真菌と真菌症 18, 40-47, 1977.
 - 8) Engvall, E. and Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.* 109, 129-135, 1972.
 - 9) Gleich, G.J., Larson, J.B., Jones, R.T. and Baer, H.: Measurement of the potency of allergy extracts by their inhibitory capacities in the radioallergosorbent test. *J. Allergy Clin. Immunol.* 53, 158-169, 1974.
 - 10) 灰田美知子, 長谷川真紀, 山内信和, 荻田忠厚, 奥平博一, 宮本昭正, 北郷 修: mite アレルゲンの多様性に関する研究 — radioimmuno-electrophoresis を用いた mite アレルゲンの同定について. アレルギー 30, 301-307, 1981.
 - 11) Aukrust, L.: Crossed radioimmuno-electrophoretic studies of distinct allergens in two extracts of *Cladosporium herbarum*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 58, 375-390, 1979.
 - 12) Longbottom, J.L., Brighton, W.D., Edge, G. and Pepys, J.: Antibodies mediating type 2 skin reactions of *Candida albicans*. *Clin. Allergy* 6, 41-49, 1976.

MEASUREMENT OF IgE AND IgG ANTIBODIES AGAINST
CANDIDA ALBICANS BY RAST AND ELISA,
 RESPECTIVELY, USING YEAST CELL
 AS SOLID PHASE

Atsuo Urisu, Yasutoshi Hida and Shimpei Torii

Department of Pediatrics, Nagoya University School of Medicine

Hisashi Kondo and Takao Miyata

Department of Pediatrics, Fujita Gakuen University

Yuzuru Kondo

Institute of Medical Mycology, Nagoya University School of Medicine

Candida-specific IgE and IgG antibodies were measured by means of RAST and ELISA, respectively, using yeast cells of *Candida albicans* as solid phase. The following results were obtained.

These were some differences in surface antigenic determinants against IgG antibody as well as IgE antibody among the five strains used. NUM 110 had the greatest variety in antigenic determinants against IgE and IgG antibodies on the surface among the strains we used in this experiments. Accordingly, we used the NUM 110 strain as solid phase in our subsequent experiments.

The results from 50% RAST and ELISA inhibition test with *Candida* crude extracts and polysaccharide-rich fraction showed that major antigens of *C. albicans* against not only IgE but also IgG antibody were contained in the different fractions from case to case. These results show that there may be more than one major antigen against IgE antibody as well as IgG antibody and that the major antigens are varied from patient to patient. In most cases, the major antigens against IgE and IgG antibodies were found in separate fractions.

There was a close correlation ($r=0.735$, $p<0.005$) between the two methods of *Candida* IgE RAST, that using paper disc and that using yeast cells as solid phase. It is speculated from this result that components such as protein, glucoprotein or glucopeptide, including first class amino acid residue, are important as major antigen (s) against IgE antibody, because first class amino acid residue is essential for the binding to paper disc by cyanogen bromide.