原	著
---	---

トランスフェリンの抗 *Candida* 作用の研究

白石 明郎 三上 襄 新井 正

千葉大学生物活性研究所抗生物質研究部

緒 言

血清中に非特異的な菌発育抑制因子が存在することは古くから知られている。トランスフェリン (Transferrin) の関与する系としては、*Candida albicans*¹⁾²⁾ *Escherichia coli*³⁾ *Pasteurella septica*³⁾ *Clodtridium welchii*⁴⁾ などを用いて研究されてきたが、いずれの菌についてもこの静菌作用は、トランスフェリンを鉄飽和することによって失なわれた。これらのことから鉄不飽和トランスフェリンが、菌の発育に必須の鉄イオンを奪うことによつて菌の発育を抑制すると考えられてきた⁵⁾。最近 King らは⁶⁾、人血清よりアフィニティークロマトグラフィーによつてトランスフェリンのみを特異的に除くことにより、この血清の *Trichophyton mentagrophytes* に対する静菌作用が消失すること、トランスフェリンの再添加によつてこの作用が回復すること、さらにこの作用が血清中の不飽和鉄結合能 (UIBC) と相関関係のあることを示し、トランスフェリンが *T. mentagrophytes* の発育抑制因子として働くことを証明した。一方 Esterly らは²⁾、トランスフェリン単独では *C. albicans* に対し静菌作用を示さなかつたと報告し、血清中に他の補助因子が存在すると予想している。また *P. septica* では³⁾⁷⁾、特異抗血清のみで静菌作用があり、56°C 30分間の熱処理で活性が失なわれることから、特異抗体と補体の関与が考えられている。*Cl. welchii* では⁸⁾、精製トランスフェリンと、 β_2 -グロブリン分画または γ -グロブリン分画に存在する因子との共同作用によると報告されている。*E. coli* については⁹⁾、Rogers によつてウマの特異抗血清より得られた IgG 分画と人トランスフェリンとの共同作用により、血清中と同様の静菌作用が得られたことが報告さ

れ、この IgG 分画が補助因子と考えられている。

我々は、*C. albicans* に対するトランスフェリンの静菌作用について、家兎血清について主に補助因子の存在を中心として検討を行つたので、得られた知見を報告する。

実験材料及び方法

(1) 使用菌株

被検菌としては、4% グルコース Sabouraud 培地に継代した教室保存の *Candida albicans* 7 N 株、*Trichophyton mentagrophytes* IFM 4072 株を用いた。

(2) 抗菌力測定法

King らの方法⁶⁾を改変して次のように行つた。1.5% の寒天 (Bacto Agar Noble) 溶液 10ml を基礎平板として固めた後、Trypticase Soy 寒天培地 (1.5% 寒天末、0.002% クロラムフェニコール、0.002% クロルテトラサイクリン、0.0025% シクロヘキサミドを含む) に、*C. albicans* の菌浮遊液 (OD 540nm 0.1) を 1% 接種したもの 5ml を重層し、試験平板とした。*T. mentagrophytes* を被検菌とした時には、Trypticase Soy 寒天培地の代りに、15% の仔牛血清寒天培地 (1.5% の寒天末を含む) を用いた。

この試験平板上に抗生物質検定用シリンダーカップを置き、中に被検液を満たす。37°C で 1 日培養後、得られる阻止円の大きさを測定した。

(3) 家兎の免疫法

4% グルコース Sabouraud 液体培地で、対数増殖期後期まで培養した *C. albicans* をホルマリン処理によつて殺菌後、20mg/ml (湿重量) になるように生理食塩水に懸濁液を土屋の方法¹⁰⁾に準じて、家兎耳静脈から、最初の 3 日間は 0.5ml、1.0ml、1.5ml の順で注射し、1 日休み、再び 2.0ml の注射を 3 日間続ける。再び 1 日おいて同じ処置をくり返す。最後の注射から 1 週間後に抗体価をチェックし、数百倍以上になつた時点で採血し

Akio SHIRAIISHI, Yuzuru MIKAMI and Tadashi ARAI: Anti-*Candida* activity of transferrin, from the Department of Antibiotics, Research Institute for Chemobodynamics, Chiba University.

た。

(4) 鉄の定量法

和光純薬の Fe-Test を用いて Ramsay 法¹¹⁾で行った。

(5) 蛋白質の定量法

Layne の方法¹²⁾に従つて、260nm と 280nm の吸光度を測定することによつて求めた。

実験結果

(1) 各種血清の *C. albicans* 及び *T. mentagrophytes* に対する静菌作用

カップ法で血清の静菌作用を調べると Fig. 1 のよう

Fig. 1 Serum inhibition of *C. albicans*

な阻止円が検出される。この方法で、正常人血清、牛血清、正常家兎血清、*C. albicans* 免疫家兎血清の *C. albicans* 及び *T. mentagrophytes* に対する静菌作用を調べたのが、Table 1 である。人血清、牛血清、免疫家兎血清では、*C. albicans* に対し静菌作用を示すが、正常家兎血清ではこの作用は認められない。一方 *T. mentagrophytes* に対しては、血清、正常家兎血清、免疫家兎血

清いずれにも静菌作用が認められた。この時、正常家兎血清は UIBC 100r/dl を有していた。一方人血清、牛血清では鉄溶液を加えて UIBC 100r/dl 程度にしたものでも、*C. albicans* に対し、明瞭な静菌作用が認められた。すべての血清の静菌作用は、56°C 30分間の熱処理で影響を受けなかったが、鉄溶液を加えて、UIBC を零にすることによつて失なわれた。この中では牛血清だけは、UIBC が零となつても静菌作用を若干残していた。すべてを通じ、*T. mentagrophytes* に対する静菌作用は *C. albicans* に対するものより強かつた。

(2) 免疫家兎血清からの促進因子の分画

免疫家兎血清から硫酸50—70%飽和分画をとり、0.015 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.3) に一晚透析する。これを DEAE セルロースのカラム [(0.015M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.3) で平衡化)] に添着し、同緩衝液で洗浄後、0.1M KCl を含む同緩衝液で溶出した。得られた溶出分画をコロジオンバックで濃縮後、セフアデックスG—200のカラムで生理食塩水を溶出液としてゲル濾過を行つた。この溶出曲線を Fig. 2 に示すが、大きく3つの蛋白分画に分かれ、第3のピークが鉄結合能を有し、ここにトランスフェリンが存在する事が示された。しかしこの分画だけは、*C. albicans* に対し明瞭な静菌作用を示さず、第1のピークの分画を添加する事によつて両者単独では得られなかつた静菌作用が回復した。またこの第1のピークの分画には、*C. albicans* に対する凝集反応は認められなかつた。

(3) 促進因子とトランスフェリンの共同作用による静菌作用

促進因子 (第1のピークの分画) に含まれる蛋白量と促進作用の関係を示したのが、Table 2である。UIBC 90 r/dl のトランスフェリンに対し、促進因子分画蛋白125

Table 1 Serum inhibition of *C. albicans* and *T. mentagrophytes*.

Serum	Zone of inhibition (mm)	
	<i>C. albicans</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
Human serum	11.0	18.0
Human serum saturated with Fe*	0	0
Bovine serum	11.8	—
Bovine serum saturated with Fe*	8.0	—
Normal rabbit serum	0	13.8
Normal rabbit serum saturated with Fe*	0	0
Immunized rabbit serum	12.0	15.0
Immunized rabbit serum saturated with Fe*	0	0

Fig. 2 Elution pattern of stimulation factor and transferrin from Sephadex G-200.

Table 2 Effect of stimulation factor on the anti-candida activity of rabbit transferrin (UIBC 90 γ /dl)

Stimulation factor (protein γ /ml)	Stimulation effect
500	+
250	+
125	+
50	—
25	—
0	—

Table 3 Anti-candida activity of rabbit transferrin with stimulation factor (250 γ /ml) titrated to UIBC's

UIBC (γ /dl)	Zone of inhibition (mm)
200	11.1
100	10.6
50	9.9
0	0

r/ml の添加で静菌活性が認められた。さらに促進因子分画蛋白量を500 γ /dlに増すと、やや阻止円が明瞭になった。この促進因子の作用は阻止円を増大するものではなく、明瞭にする効果として観察された。

一方トランスフェリン分画に鉄溶液を添加して、各々の UIBC を 50 γ /dl, 100 γ /dl, 200 γ /dl にしたものに、促進因子分画蛋白量250 γ /ml 添加した時の静菌作用を Table 3に示した。阻止円の大きさと UIBC の間に、明らかな相関関係が観察された。

考 察

人、家兎、牛の血清中に含まれる抗 *Candida* 因子は、鉄溶液を添加することによってその作用が失なわれたため、King らが述べている⁶⁾ようにトランスフェリンが主役を演じていると考えられる。この中で牛血清は鉄飽和する事によって完全に作用を消失できなかったが、他に抗 *Candida* 因子が存在するかどうかは現在のところ明らかでない。これらの静菌作用は、*C. albicans* より *T. mentagrophytes* に対して強かつた。正常家兎血清では、家兎のロットにより、*C. albicans* に対し静菌作用を示すものと示さないものがあり、免疫家兎血清ではすべてが、*C. albicans* に対し静菌作用を示した。*T. mentagrophytes* に対してはどちらの血清もすべて静菌作用を示した。このことから *C. albicans* に対しては、*T. mentagrophytes* に対する時より多くの因子が必要とされることが考えられる。この作用は56℃ 30分間の熱処理に対し安定であつたので、補体の関与は考えにくい。我々は、トランスフェリン分画とは別の分画に、この静菌作用を高める作用がある事を見出した。両者の共同作用もまた UIBC と相関関係のあることから、作用の主役は鉄不飽和トランスフェリンと考えられた。一方補助因子の本体については、この分画が *C. albicans* に対し凝集反応を示さないこと、免疫血清から硫酸33—40%飽和分画をとって精製した IgG 分画には、促進作用が認められなかつたことより、*E. coli* に対しての場合のように IgG 分画が関与することは考えにくい。本実験結果から、*C. albicans* への家兎トランスフェリンの静菌作用においても、補助因子の存在の必要性が示唆されたが、今後この補助因子の実体および静菌作用のメカニズムの解明などが重要な研究課題と考えられ現在研究中である。

また、家兎血清のトランスフェリンと人血清のそれとは質的な差も考えられ、この点についても現在研究中である。

結 論

カップ法を用いて、血清の抗 *Candida* 作用について検討した。正常家兎血清ではその作用は認められなかつたが、免疫家兎血清、人血清、牛血清ではその作用が認められた。この作用は、血清中のトランスフェリンを鉄飽和することによって失なわれた。免疫家兎血清から硫酸塩析、DEAE セルロース、セファデックス G-200によって精製されたトランスフェリン分画は、セファデックス G-200によって分離された促進因子分画の添加を作用

発現に必要とした。この共同作用の強さは UIBC と相関関係のあることが観察された。

文 献

- 1) Caroline, L., Taschdjian, C.L., Kozinn, P.J. & Schade, A.L.: Reversal of serum fungistasis by addition of iron. *J. Invest. Dermatol.*, **42**: 415—419, 1964.
- 2) Esterly, N.B., Brammer, S.R. & Crounse, R.G.: Relationship of transferrin and iron to serum inhibition of *Candida albicans*. *J. Invest. Dermatol.*, **49**: 437—442, 1967.
- 3) Bullen, J.J. & Rogers, H.J.: Bacterial iron metabolism and immunity to *Pasteurella septica* and *Escherichia coli*. *Nature*, **224**: 380—382, 1969.
- 4) Rogers, H.J.: Bacteriostatic effects of horse sera and serum fractions on *Clostridium welchii* type A and the abolition of bacteriostasis by iron salts. *Immunology*, **12**: 285—301, 1967.
- 5) Bullen, J.J., Rogers, H.J. & Griffiths, E.: Iron binding proteins and infection. *Br. J. Haematol.*, **23**: 389—392, 1972.
- 6) King, R.D., Khan, H.A., Foye, J.C., Greenberg, J.H. & Jones, H.E.: Transferrin, iron and dermatophytes. I. Serum dermatophyte inhibitory component definitively identified as unsaturated transferrin. *J. Lab. Clin. Med.*, **86**: 204—212, 1975.
- 7) Bullen, J.J., Rogers, H.J. & Lewin, J.E.: The bacteriostatic effect of serum on *Pasteurella septica* and its abolition by iron compounds. *Immunology*, **20**: 391—406, 1971.
- 8) Rogers, H.J., Bullen, J.J. & Cushrie, G.H.: Iron compounds and resistance to infection. *Immunology*, **19**: 521—538, 1970.
- 9) Rogers, H.J.: Ferric iron and the antibacterial effects of horse 7S antibodies to *Escherichia coli* OIII. *Immunology*, **30**: 425—433, 1976.
- 10) 土屋 毅: 酵母の血清学的研究. *日本細菌学雑誌*, **19**: 253—267, 1964.
- 11) Ramsay, W.N.M.: The determination of the total iron binding capacity of serum. *Clin. Chim. Acta.*, **2**: 221—226, 1957.
- 12) Layne, E.: Protein estimation by ultraviolet absorption. *In: Methods in Enzymology*, Vol. 3 p. 451—454 Academic Press, 1957.

(昭和51年12月20日受付)

Anti-*Candida* activity of transferrin

Akio SHIRAISHI, Yuzuru MIKAMI and Tadashi ARAI

From the Department of Antibiotics, Research Institute for Chemobiodynamics, Chiba University

Employing cylinder-plate assay system, studies were undertaken to examine inhibitory effects of various sera against *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. Human serum and immunized rabbit serum showed inhibitory effects against *C. albicans*, but normal rabbit serum did not. All these three sera showed inhibitory effects against *T. mentagrophytes*. These activities were abolished by the addition of iron.

Transferrin which was partially purified from immunized rabbit serum did not show any inhibitory effects. However, when the stimulation factor, which was also purified from immunized rabbit serum, was added to the transferrin, the activities were restored. It was found that the activities were correlated with unsaturated iron binding capacity (UIBC).