Candida albicans 産生糖蛋白の生物活性

山 本 容 正 岩 田 和 夫

明治薬科大学微生物学教室

Candida albicans の強毒株より分離した糖蛋白（毒素）の有する種々の生物活性について検討した結果、本糖蛋白毒素には強いマウス致死活性、*Limulus amoebocyte lysate* ゲル化活性、発熱活性、血漿凝固促進活性、補体活性化能、ヒスタミン遊離活性等が見出された。さらにこのような活性の大部分は、糖蛋白毒素の多糖部分を占めるマンナンが担っていることが明らかとなり、糖蛋白毒素の蛋白部分はこれら活性の発現に相乗的な役割を担うものと考えられた。また、本糖蛋白毒素の推察される存在部位、その示す種々の生物活性および構成成分等より、細菌内毒素に対比しうる真菌内毒素として本糖蛋白毒素を位置づけてよいと思われる。

近年深在性真菌症の増加に伴い、これら真菌症に対する関心が高まると同時に、その感染機序を多面的にとらえようとする試みが多くなされてきた。真菌感染における宿主および菌側の免疫学的解析、あるいは菌側の因子としての菌体成分（毒素を含む）に関する研究が多くみられるようになってきたのも、このような背景にさらに生化学的、免疫学的研究法の近年における著しい進歩が加味された結果と思われる。とくに菌体成分に関する研究は、真に真菌高分子毒素（candidotoxin など）とみなしうる毒素が岩田ら^{1,2)}によつて初めて *C. albicans* より単離されて以来、物質レベルでの研究が盛んになつてきた。

著者らは、従来より *C. albicans* の強毒株に candidotoxin を含むいわゆる高分子毒素が広く分布するであろうことを推測して、これらを分離することを試みた結果、3種の糖蛋白としての毒性分画を新たに分離し得た^{3,4)}。ここでは、主にこれら毒素の生物活性を中心に本毒素に関連の深い *Candida* マンナンおよび従来から報告されている *C. albicans* 産生高分子生物活性物質について総括的に言及する。

Candida albicans の産生する高分子毒素 および毒性物質

深在性カンジダ症ならびに実験的カンジダ系統感染において、その侵襲組織における毒素ないし酵素などの産生を示唆する臨床症状あるいは病理学的所見は古

くから知られており⁵⁻⁸⁾、このような見地から多くの研究者が *C. albicans* より病原性を規定する一つの因子として高分子真菌毒素の存在を考え、その分離を試みてきた（Table 1）。

1951年 Salvin⁹⁾によつて *C. albicans* の菌体抽出液に溶血活性が存在することが指摘されて以来、種々の生物活性（主として毒素活性に関する）物質が *C. albicans* により産生されることが示唆されてきた。しかし、これら研究はいずれも活性物質の単離もしくは高度に精製された物質レベルでの研究ではなく、種々の生物活性が *Candida* 由来の物質に存在することを指摘したのにとどまつた。その中で Mankowski¹⁰⁾によつて *C. albicans* 培養液より分離された糖蛋白分画は蛋白部分が1.8%、糖部分は70.5%でその構成糖はグルコースとマンノースより成り、マウス静脈内投与による LD₅₀は750 mg/kgを示すものであつたが、部分精製の段階のものと思われ、致死活性以外にも新生児マウスの発育を抑制する活性や、本物質のマウス経口投与によつて pentylenetetrazole による強い刺激症状の誘発を促進することについて報告されたのに過ぎない。Nosál *et al.*¹¹⁾は *Candida* 細胞壁よりマンノース47.4%、グルコース38.3%、グルコサミン0.9%、蛋白12.7%、無機リン0.7%より成る糖蛋白を分離しており、この分画のマウス静脈内投与による LD₅₀は290 mg/kgで、とくにラット肥肝細胞より短時間でヒスタミンを遊離させる活性が認められ、その薬理学的活性は細菌内毒素に酷似していると報告している。Cutler *et al.*¹²⁾は *C. albicans* より種々の抽出法で得られた粗

Table 1. High molecular weight toxins produced by *C. albicans*¹⁶⁾

Toxin or toxic material	Toxic action	Reference
Cytoplasmic extract	Lethal, hemolytic	Salvin, 1951
Cytoplasmic extract	Lethal	Salvin, 1952
Cytoplasmic extract	Lethal	Dobias, 1957
Cytoplasmic extract	Lethal	Mankowski, 1957
Cytoplasmic extract	Lethal	Roth & Murphy, Jr., 1957
Cytoplasmic extract	Lethal	Mourad & Friedman, 1961
Glycoprotein	Lethal	Mankowski, 1962, 1968
Cytoplasmic extract	Lethal	Hasenclever & Mitchell, 1963
Polysaccharide-protein complex	Lethal, dermonecrotic	Isenberg <i>et al.</i> , 1963
Protein (Candidotoxin)	Lethal, cytotoxic	Iwata <i>et al.</i> , 1967 Iwata & Uchida, 1967 Iwata, 1977
Glycoprotein	Allergic, release of histamine from rat mast cell	Sikl <i>et al.</i> , 1969 Svec, 1974 Nosál <i>et al.</i> , 1974
Cytoplasmic extract	Lethal, granuloma-inducing	Cutler <i>et al.</i> , 1972
Cytoplasmic extract	Decrease in blood platelets	Holder & Nathan, 1973
Glucan	Granuloma-inducing	Meister <i>et al.</i> , 1977
Glycoproteins	Lethal	Iwata & Yamamoto, 1977

分画中に発熱活性、マウス致死活性、肉芽腫形成能等を認めており、さらに Holder と Nathan¹³⁾によつて 1973年 *C. albicans* 抽出液中に血小板減少及び血液凝固促進活性が存在することが報告された。しかし、これらの報告はいずれも粗抽出液かもしくは部分精製と思われる分画を用いた実験であり、活性本態となる物質の単離は行われていなかったが、*C. albicans* 由来の物質に上記種々の生物活性が存在することは、多くの研究者の認めるところであつた。このような研究の流れの中にあつて、1967年岩田らによつて前記のように candidotoxin¹⁾が *C. albicans* より単離され、その本態が明らかにされた。本毒素は分子量約75,000の酸性単純蛋白質で2分子のカルボキシペプチダーゼ (α)、1分子のアルカリホスファターゼ (β) および未同定高分子物質 (γ) の3要素から成る複合体であり、これらの要素が $\alpha_2\beta\gamma$ のかたちで1つに結合したときにのみ毒素活性が発現される最小単位であることが明らかにされた¹⁴⁾。本毒素の有する生物活性は多岐にわたり、その代表的なものとしてマウス静脈内投与による強い急性致死活性、モルモット摘出小腸に対する収縮作用やガマ摘出心臓に対する顕著な筋収縮力増強作用、マウス脾臓リンパ球、とくにT細胞に対する障害作用¹⁵⁾等があげられ、その物理化学的性状等より細菌外毒素の諸属性をそなえており、「真菌外毒素」と唱えうるもの¹⁷⁾である。しかし、candidotoxinは前述してきた *C. albicans* 由来の物質が示す種々の生物活性を必ずしもすべて示すものではなく、従来報告されてきた活性の

本態はそれ以外にも存在するであろうことが推測された。

一方、*Candida* 菌体成分、とくに細胞壁成分に種々の生物活性が存在するとみなされ、菌が宿主と直接かわりあう最初の段階において、まず、その表層が、とくに病原微生物においては、その最外層が大なり小なり感染の成立になんらかの役割を演ずるものと考えられる。現に細菌類においては内毒素を初めとして細胞壁由来の生物活性物質が多々知られている。真菌類において、とくに酵母においては1969年岡¹⁸⁾および1972年 Kind *et al.*¹⁹⁾によつて報告された酵母マンナンのマウスに対する急性致死活性や、Meister *et al.*²⁰⁾による細胞壁グルカンの肉芽腫形成能等の報告は、これら酵母細胞壁成分の生物活性を示したものであり、*Candida* 細胞壁にも同様にこのような活性成分が存在するものと考えられるのは当然であろう。

C. albicans 糖蛋白毒素

著者らは、前述の背景のもとに *C. albicans* の強毒株 (candidotoxin 産生株以外の強毒株) より再度 candidotoxin を含む高分子毒素の分離を試みた。分離方法は、candidotoxin の分離法に準拠して、なるべく温和に、native なかたちで菌由来の物質を単離するよう試みた (Fig. 1)。すなわち、菌体破壊抽出液を DEAE cellulose, Sephadex G-200 等のカラムクロマトグラフィー及びゾーン電気泳動等とを組み合わせて致死活性物質の単離を試みた結果、最終的に3種の致死活性成分 (Fr I-1, I-2, II-2) が得られ、超遠心分析において

Table 3. Physicochemical properties of purified toxins⁴⁾

		Fr I-1	Fr I-2	Fr II-2
S _{20w} value		8.4	5.5	3.2
Elementary analysis (%)		—	—	N : 2.10 C : 39.51 H : 6.26
Chemical composition	Protein (%)	7	10	13
	Carbohydrate (%)	92	89	86
Carbohydrate composition		D-mannose	D-mannose	D-mannose

Protein and sugar contents were assayed by the Lowry method and the Anthron method on mannose expression.

Table 4. Comparison of biological activities of glycoprotein toxin and mannan isolated from same *Candida albicans* strain

Biological activities	Glycoprotein toxin	Mannan
Immunogenicity	+	hapten
Lethality for mice (MLD:mg/mouse)	0.063—0.28	1.2—4.6
Hemolytic activity	—	—
<i>Limulus</i> amoebocyte lysate gelling activity (μg/ml)	2.5	0.5
Pyrogenicity	+	—
Plasma coagulation promoting activity	+	+
Platelet aggregation activity	—	—
Complement activation	+	+
Histamine releasing activity	+	+
Inhibition of peripheral lymphocyte transformation	+	—

強力であるがマンナンにも致死活性が存在することを認めた。このように熱水抽出等の drastic な抽出・分離を行つて得たマンナン単独よりも、極めて温和な方法で分離・精製した毒素は、菌体成分としてもより native なかたちとしてのマンナン蛋白構造が維持されているものと思われ、このような毒素により強い活性が認められたのは興味深い。

***Limulus* amoebocyte lysate (LAL) ゲル化活性²¹⁾**
著者らは、本毒素の多糖部分がマンナンであるところより、恐らくこれら毒素が *Candida* 細胞壁に存在するであろうことを推察し、さらに、熱および蛋白分解酵素等の処理に対して、その致死活性が安定であるところより、本毒素が *Candida* においてその存在部位、生物活性等の点で細菌内毒素と対比しうる毒素ではないかと想定した。そこで、細菌内毒素の微量検出法として近年多用されている LAL 試験を本毒素に適用することによって本毒素の LAL ゲル化活性を調べた。そ

の結果、本毒素にも LAL ゲル化活性が存在し、その比活性は2.5 μg/ml であることを認めた。しかし、LPS (lipopolysaccharide) と比較すると、その比活性は極めて弱いものであつた。

一方、*C. albicans* 及び *Saccharomyces cerevisiae* より抽出したマンナンにも同様の LAL ゲル化活性が認められ、さらに高度に精製したマンナン、とくに酸性マンナン (CM-2, SM-2) により強い LAL ゲル化活性 (0.5 μg/ml) が認められた。しかも本活性はマンナーゼによる酵素消化で失活することよりマンナン自身に活性が存在することが確認され、本毒素 LAL ゲル化活性も、そのマンナン部分に由来するものと考えられた。

LAL 試験におけるゲル化反応は、高等動物にみられる血液凝固反応と多くの共通点があり、哺乳動物を含む脊椎動物一般の凝固型の原始型といわれている²²⁾。Ray *et al.*²³⁾は *C. albicans* 抽出液、マンナン等の LAL ゲル化活性を、Holder と Nathan¹³⁾は *C. albicans* 生菌接種マウスにおける血液凝固異常と、菌体抽出液投与による同様の凝固異常を観察しており、また、カンジダ症患者血清での LAL 試験陽性の報告²⁴⁾等より、*C. albicans* 自体もしくはその産生物に LAL ゲル化活性および血液凝固異常をおこす活性が存在するであろうことが指摘されていた。マンナン (マンナン蛋白である毒素も含め) に前記のような明らかな LAL ゲル化活性が存在することは、血液凝固系への関与等の可能性も考えられ、興味深い知見と思われる。

発熱活性²¹⁾ 毒素および *C. albicans* 精製マンナンのウサギに対する発熱活性は、毒素 50 μg/kg 投与群において明らかな一峰性の発熱傾向がみられ、本毒素に発熱活性が存在することが認められた。これに反して *C. albicans* マンナンにはこのような発熱活性は認められなかつた。

真菌、とくに *C. albicans* の発熱活性については

Kobayashi と Friedmans²⁵⁾, Cutler *et al.*¹²⁾によつて弱いながらも存在することが指摘されていたが, *C. albicans* より発熱物質を単離した報告は今日まで知られていない。著者らが分離した毒素は, 比活性は弱いながらも明らかな発熱活性を有し, 対照に用いたマンナンにはこのような活性が認められないところより, 本毒素の蛋白部分が発熱活性に重要な役割を演じているであろうことが示唆された。これら知見はマンナン単独よりも蛋白の結合したより native なかたちが種々の活性を発現し, マンナン蛋白を真菌内毒素として位置づける根拠ともなるものと考ええる。

補体活性化能²⁶⁾ 毒素は正常モルモットもしくはヒト血清と *in vitro* において反応させると, これら血清中の補体を著明に活性化させる作用を有しており, この毒素による補体活性化能は, キレート剤を用いた実験および血清中の C3 プロアクチベーターから C3 アクチベーターへの変換実験から古典経路の活性化によることが明らかとなつた。また, このような補体の活性化は *in vivo* においても認められ, 本毒素の致死活性に血清中の補体が関与している可能性が示唆された。

真菌菌体成分による補体活性化に関しては, ザイモサンによる補体活性化の機序が詳細に研究されているが, *C. albicans* に関しては, Ray と Wuepper²⁷⁾の全菌体による C3 変換, Ray *et al.*²³⁾による菌体抽出液での補体の活性化が知られており, *C. albicans* が補体を活性化させることはこれらの研究者のすでに指摘するところであつた。しかし, いずれの報告も物質レベルでの追求が不充分であり, また, 活性化経路がいわゆる別経路によつて起きているとする点, 著者らの結果と大きく相違するが, 恐らくその原因はこれら研究者の使用している分画が未精製であること等の理由によるものと思われる。

肥胖細胞からのヒスタミン遊離活性²⁸⁾ ラット腹腔肥胖細胞からのヒスタミン遊離に關与する多糖はいくつか知られているが, 酵母マンナンにも強いヒスタミン遊離活性が存在することは, Waki と Kimura²⁹⁾によつて指摘されている。著者らは *C. albicans* 糖蛋白毒素がマンナン蛋白であるところより, 本毒素にもそのような活性が存在するであろうことを推測し, *C. albicans* 精製マンナンと併せ検討した結果, その ED₅₀ (肥胖細胞より50%のヒスタミンを遊離させるに必要な量) は毒素で1.42 $\mu\text{g/ml}$, *C. albicans* 中性マンナン0.56 $\mu\text{g/ml}$, 酸性マンナンで1.42 $\mu\text{g/ml}$ の活性を示

し, 他の多糖によつておこされる遊離活性よりもはるかに強く, その機序は免疫学的機序によるヒスタミン遊離と類似していることが判明した。

考 察

著者らの分離した糖蛋白毒素は, 上述のように多糖部分がマンナンより成るマンナン蛋白であり, 本毒素の示す種々の生物活性の大部分をこのマンナン部分が担つていると考えられる。それは, マンナンのみでも比活性は弱い毒素の示す大部分の生物活性を発現する点より明らかである。*C. albicans* 細胞壁の主要構成成分であるマンナンにこのような種々の生物活性が存在することは感染における菌側因子を考える上で極めて興味深い知見といえる。従来この種の研究は, 記述のように物質レベルでの追求が充分でないため, *Candida* 菌体成分もしくは産生物に種々の生物活性が存在するであろうことが指摘されていたが, その本態は不明のままであつた。しかし, すでに指摘されてきたこれら生物活性のうち, いくつかの活性の本態はマンナンに起因するであろうことが, 著者らの研究で明らかになつたものと思われる。一方, 菌体マンナンは, その存在形態としては, 蛋白質等を結合した状態がいわゆる native なかたちと思われる。また, このような native な状態で抽出, 精製された糖蛋白毒素は, その比活性においても, また, マンナン単独では認められない活性(発熱活性がその代表的なものであるが)の発現や, 免疫学的活性の相違, すなわちマンナンはいわゆるハプテンであるのに対し, マンナン蛋白である毒素は完全抗原としての性格を有する⁴⁾等, この両者には化学的, 生物活性的性状において著しい差異が認められた。このように現在まで得られてきた知見から考察するに, 毒素の蛋白部分は恐らくその活性発現等において相乗的な役割を担つているものと考えられる。

著者らが分離した糖蛋白(マンナン蛋白)毒素を「真菌内毒素」と位置づけるのは, その推察される存在部位および, その示す上記種々の生物活性において, いわゆる細菌内毒素と対比しうる毒素とみなしうるからである。いずれにしても, *C. albicans* 細胞壁にこのような種々の生物活性を有する物質が存在することは, 菌側因子としての毒素もしくは菌体成分を感染との関連において考える上で興味深い。

文 献

- 1) 岩田和夫, 内田勝久, 遠藤博子: *Candida albicans* の新毒性物質“Canditoxin”. 1. 菌株と毒力の関係および毒性物質産生条件. 医学と生物学, 74:

- 346—350, 1967.
- 2) 岩田和夫, 内田勝久: *Candida albicans* の新毒性物質“Candidotoxin”. 2. 毒性物質の分離・精製と毒性. 医学と生物学, 74: 351—355, 1967.
 - 3) Iwata, K. and Yamamoto, Y.: Glycoprotein toxins produced by *Candida albicans*. In The Black and White Yeasts (Proc. 4th Intl. Conference on the Mycoses, 1977, Brasilia), pp. 246—257, PAHO, Scientific Publication No. 356, Washington, 1978.
 - 4) 山本容正, 岩田和夫: *Candida albicans* の産生する糖蛋白毒素に関する研究. 第1報 分離・精製と物理化学的性状. 真菌誌, 21: 264—273, 1980.
 - 5) Adrano, S.M. and Schwarz, J.: Experimental moniliasis in mice. Amer. J. Pathol., 31: 859—874, 1955.
 - 6) Henrichi, A.T.: Characteristics of fungus disease. J. Bact., 39: 113—138, 1940.
 - 7) Mourad, S. and Friedman, L.: Pathogenicity of *Candida*. J. Bact., 81: 550—572, 1961.
 - 8) Salvin, S.B., Cory, J.C. and Berg, M.K.: The enhancement of the virulence of *Candida albicans* in mice. J. Infect. Dis., 90: 177—182, 1952.
 - 9) Salvin, S.B.: Hemolysin from the yeast-like phase of some pathogenic fungi. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 76: 852—854, 1951.
 - 10) Mankowski, Z.T.: Production of glycoprotein by *Candida albicans* in a synthetic medium its influence on the growth of new born mice. Mycopath. Mycol. Appl., 54: 113—118, 1968.
 - 11) Nosál, R., Novotony, J. and Sikl, D.: The effect of glycoprotein from *Candida albicans* on isolated rat mast cells. Toxicon, 12: 103—108, 1974.
 - 12) Cutler, J.E., Friedman, L. and Milner, K.C.: Biological and chemical characterization of toxic substances from *Candida albicans*. Infect. Immun., 6: 616—627, 1972.
 - 13) Holder, J.H. and Nathan, P.: Effect in mice of viable *Candida albicans* and a cell-free extract on circulating platelets. Infect. Immun., 7: 468—472, 1973.
 - 14) 内田勝久, 岩田和夫: Candidotoxin の毒素蛋白の subunit への解離. 医学と生物学, 83: 291—296, 1971.
 - 15) Iwata, K. and Uchida, K.: Cellular immunity in experimental fungus infections in mice: the influence of infections and treatment with a *Candida* toxin on spleen lymphoid cells. Mykosen, Suppl. 1: 72—81, 1978.
 - 16) Iwata, K.: Fungal toxins as a parasitic factor responsible for the establishment of fungal infections. Mycopathologia, 65: 141—154, 1978.
 - 17) 岩田和夫: 真菌毒素とその病因学的意義. 真菌誌, 18: 279—298, 1977.
 - 18) 岡 捨己: 植物多糖体の分画とその抗腫瘍性に関する研究. 日本臨床, 27: 1749—1752, 1969.
 - 19) Kind, L.S., Kaushal, P.K. and Drury, P.: Fatal anaphylaxis-like reaction induced by yeast mannans in non-sensitized mice. Infect. Immun., 5: 180—182, 1972.
 - 20) Meister, H., Heymer, B., Schäffer, H. and Haferkamp, O.: Role of *Candida albicans* in granulomatous tissue reactions. I. *In vitro* degradation of *C. albicans* and immunospecificity of split products. J. Inf. dis., 135: 224—234, 1977.
 - 21) 山本容正, 岩田和夫: *Candida albicans* の産生する糖蛋白毒素に関する研究. 第2報 毒素および菌体マンナンの *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) のゲル化活性. 真菌誌, 21: 274—285, 1980.
 - 22) 中村 伸, 岩永貞昭: カプトガニの血液凝固系, 内毒素によるゲル形成機構を中心に, 蛋白質・核酸・酵素, 23: 2770—2790, 1978.
 - 23) Ray, T.L., Hanson, A.B.S., Ray, L.F. and Wuepper, K.D.: Purification of a mannan from *Candida albicans* which activates serum complement. J. Invest. Dermatol., 73: 269—274, 1979.
 - 24) Levin, J., Poore, T.E., Zauber, N.P. and Oser, R. S.: Detection of endotoxin in the blood of patients with sepsis due to gram-negative bacteria. N. Engl. J. Med., 283: 1313—1316, 1970.
 - 25) Kobayashi, G.S. and Friedman, L.: Characterization of the pyrogenicity of *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans*. J. Bact., 88: 660—666, 1964.
 - 26) 山本容正, 岩田和夫: *Candida albicans* の産生する糖蛋白毒素に関する研究. 第3報 補体および末梢血白血球に及ぼす影響. 真菌誌, 22: 223—233, 1981.
 - 27) Ray, T.L. and Wuepper, K.D.: Activation of the alternative (properdin) pathway of complement by *Candida albicans* and related species. J. Invest. Dermatol., 67: 700—703, 1976.
 - 28) 山本容正, 岩田和夫: *Candida* 属菌体マンナンによるラット腹腔肥胖細胞からのヒスタミン遊離について. 日細誌, 37: 364, 1982.
 - 29) Waki, I. and Kimura, M.: Possible role of IgE-constituent carbohydrate in the mediation of histamine release. Japan. J. Pharmacol., 28: 739—745, 1978.

Biological Activities of Glycoproteins Produced by *Candida albicans*

Yoshimasa Yamamoto and Kazuo Iwata

Department of Microbiology, Meiji College of Pharmacy, Setagaya-ku, Tokyo 154, Japan

Three toxin fractions of glycoprotein nature, which were physicochemically, biologically and immunologically different but closely related with each other, were isolated from a virulent strain of *Candida albicans* MTU 12024. This paper deals with biological activities of these glycoprotein toxins. All of the three toxins possessed various biological activities, i.e. lethality for mice, *Limulus* amoebocyte lysate gelling activity, pyrogenicity, plasma coagulation promoting activity, complement activation both *in vitro* and *in vivo*, histamine releasing activity, and peripheral lymphocyte transformation inhibition activity. It was found out that these biological activities of the toxins was also provoked by the cellular mannan isolated from the same strain of *C. albicans*, suggesting a possible synergistic action of the sugar moiety of the toxins.

In view of these results as well as of the most plausible location of the toxins, *viz.* the cell wall, the toxins may be classified into a category of fungal endotoxins.