原 著

モルモット皮膚抽出物の殺 *Candida* 作用について

高橋 久 近兼健一朗 奥田 賢 波多野真理
星野 学 金子 修 河 陽子

帝京大学医学部皮膚科学教室

〔受付：8月22日，1987年〕

要 旨

われわれはモルモット表皮抽出物に殺 *Candida* 作用があることを発見した。粗抽出物の殺 *Candida* 作用に関して濃度，殺菌時間，加熱および pH の影響について検討した。また，殺菌された *Candida* の細胞変化を電子顕微鏡により観察した。その結果この粗抽出物の殺菌活性は蛋白濃度 20 $\mu\text{g/ml}$ で *C. albicans* を 15 分で 94%，30 分以後は 100% 殺菌し，90℃，10 分間の加熱によって殺菌効力は 70% に低下した。濃度別 1 時間後の殺菌率は 10 $\mu\text{g/ml}$ 以上では 100%，5 $\mu\text{g/ml}$ では 87% に及んだ。また本物質はクエン酸緩衝液を用いた場合には pH 4.5 以下において活性を有することを確認した。電子顕微鏡的所見では本物質は electron dense であって標的 *Candida* の周囲を取り囲む像が観察された。

本抽出物を Sephadex G 50 カラムを使用して分画を行ったところ分子量約 20,000 と 10,000 以下の 2 カ所に殺 *Candida* 作用のピークを認めた。

Key words: 表皮蛋白，ケラトヒアリン顆粒，生体防御，tissue-bound immunity，
candidacidal activity

はじめに

真菌などの感染症に際しては宿主内に何等かの防御物質が存在しないし生成されて宿主の防御に当るものと思われる。かかる物質として多形核白血球については myeloperoxidase のほか，Spitznagel¹⁻⁵⁾，Lehrer^{6,7)} が抗菌性の塩基性の蛋白ないし polypeptide を抽出しており，Spitznagel はこの物質に cationic protein の名称を与えている。同様な物質は Hirsch^{8,9)}，Skarnes ら¹⁰⁾ によって 1950 年代よりすでに胸腺，脾臓，唾液腺などに見出されている。

浅在性真菌症である白癬，皮膚 *Candida* 症，癬風においては，菌要素が角層のみに存在して顆粒層以下に侵入することは先ず無いことは日常経験するところであるが，これらの真菌はケラチンを

含有しない培地にも良く生育するので，浅在性真菌症の成因を必ずしも菌のケラチン親和性に置くことは出来ない。われわれはモルモット表皮の粗抽出液を用いてその殺 *Candida* 作用を証明し予報的に報告した¹¹⁾。その後抽出液の殺 *Candia* 作用についてより詳細な観察を行うと同時に抽出液の分画をも行い，殺菌作用のピークと一致するピークを分画中に確認したので，電子顕微鏡による観察と共にその詳細について報告する。

材料と方法

モルモット表皮からの殺 *Candida* 物質の抽出

抽出法は Matoltsy ら¹²⁾ が表皮からケラトヒアリン顆粒を取り出すために用いた方法に従った。体重 300 g から 500 g のモルモットを剃毛したのち，エーテル麻酔後広域から皮膚を採取した。採取後の皮膚は表面を下方に向けて 60℃ の熱板上に数秒間置いて，ピンセットで表皮のみを剝離した。一匹のモルモットから得られた表皮量は湿潤

別刷請求先：高橋 久

〒173 板橋区加賀 2-11-1

帝京大学医学部皮膚科学教室

Fig. 1. Process of extraction of candidacidal sample solution from guinea pig epidermis.

量で約 1 g であった。剥離後、表皮は 0.34 M 蔗糖溶液 10 ml を添加して、ガラスホモジナイザーにて 15 ストローク均質化後 1 ml の 0.1 M クエン酸を添加して 1 時間静置、400×g、10 分間遠心分離を行った (Fig. 1)。Fig. 1 に示されるように抽出操作を繰返して、集められた上清を 8,700×g、15 分間遠心分離し、得られた沈渣を 0.25 M 蔗糖溶液中で 0.05% Triton X 存在下に凍結融解を 5 回繰返したのち遠心し、上清を 0.22 μm ミリポアフィルターで濾過滅菌して表皮抽出液とした。なお凍結融解に供した物質がケラトヒアリン顆粒に豊んだものであることを予め電子顕微鏡によって確認した。

溶液の蛋白量は Lowry 法によって測定した。

殺 *Candida* 作用の測定

使用菌株は *Candida albicans* ATCC 16261, *C. tropicalis* 臨床新鮮分離自己施設同定株についても行った。各菌は 10 分の 1 サブロー液体培地 (ペプトン (Difco) 0.1%, ブドウ糖 0.2% および酵母エキス 0.05%) 中で 30℃ で振盪培養を行った。6 時間後菌が対数増殖期にある時点でこれを採取、滅菌蒸留水にて洗滌後、採血用小型スピッツ管に

菌液 0.1 ml (菌数 2.5×10^5)、クエン酸緩衝液 0.8 ml および各種濃度の表皮抽出液 0.1 ml を添加し、37℃、1 時間水浴中にて静かに振盪したのち trypan blue dye exclusion 法によって生菌数を測定し、殺菌率は全菌数 100 コに対する死菌数の割合によって表示した。コントロールとして表皮抽出物を除いた溶液について同様に殺菌率を計測した。

表皮抽出液の分画法

前記表皮抽出液は Sephadex G 50 (Pharmacia, 2.6×80 cm) カラムを使用して、検体の流出は約 200 ml の 0.01% citrate-phosphate 緩衝液 (pH 4.7) flow rate は 2 ml/min を以て行った。

電子顕微鏡による観察

電子顕微鏡標本の作製には第 1 の方法として Karnovsky 固定液によって固定後、1% OsO₄ で固定を行い、ウラニウム・鉛の二重染色を行った後、日本電子 JEM 100-S で観察および撮影を行った。

一方、より詳細な内部構造の観察のための第 2 の方法として Karnovsky 固定、1% 過マンガン酸カリにて 1 時間固定後、更にアルカリピスマス染色を行う方法も併用した。

結 果

表皮抽出液の *C. albicans*, *C. tropicalis* に対する殺菌作用

クエン酸緩衝液を用いて行った *C. albicans* に対する本抽出液 10 μg/ml (蛋白濃度) の殺菌活性は pH 4.5、1 時間後において 72% を示した。一方、*C. tropicalis* では同条件において 98% 殺菌率を示したが、pH 4.5 においてはこの菌は緩衝液のみで 16% の殺菌率を示したので、結果は両菌種に対する本抽出液の影響の差とは結論を下し得ない (Table 1)。

表皮抽出液の蛋白濃度と殺 *Candida* 活性の関係

本抽出液は、pH 4.5 のクエン酸緩衝液を使用した場合、10 μg/ml 以上の蛋白濃度で *C. albicans* に対して 1 時間以内に 100% の殺 *Candida* 活性を発揮した (Table 2)。1.25 μg/ml の濃度においては 6.5% と高度に殺菌力の低下を見た。

Fig. 2. Candidacidal activities of fractionated sample solution.

Table 1. Fungicidal rates of sample solution on *C. albicans* and *C. tropicalis*. Sample solution 10 μg/ml, citric acid buffer pH 4.5, 37°C 1 hr

	fungicidal rate	control
<i>C. albicans</i>	72%	1%
<i>C. tropicalis</i>	98%	16%

Table 2. Influence of concentrations of sample solution on the candidacidal rates. Citric acid buffer pH 4.5

protein concentration (μg/ml)	candidacidal rate (%)
40	100
20	100
10	100
5	87
2.5	40.5
1.25	6.5
0.625	1
0.3125	0

殺 *Candida* 作用の時間的経過と本抽出液の耐熱性

20 μg/ml の本抽出液は pH 4.5 のクエン酸緩衝液中において *C. albicans* に対して 15 分後に

Fig. 3. Electron microscopic findings of killed *C. albicans*.

はすでに 94%, 30 分以後は 100% の殺 *Candida* 活性を示した。この抽出液は相当耐熱性であって、90°C、10 分間の加熱によって殺菌率は 70% に低下したのみであった。

表皮抽出液の分画と殺 *Candida* 作用の関係

Sephadex G 50 を用いた表皮抽出液の分画では Lowry 法により 3 カ所に蛋白のピークを認め、そのうち 2 カ所のピークに殺 *Candida* 活性が確認された (Fig. 2)。各分画はそれぞれ分子量約 20,000 と 10,000 以下の両部位に該当した。

殺 *Candida* 作用の電顕的観察

本抽出物は electron dense な物質であって、こ

Fig. 4. Subcellular electron microscopic findings of killed *C. albicans*. (left) in comparison to intact cell (right).

の物質が標的 *Candida* の周囲を取り囲む像が第1の方法による電顕像で認められ (Fig. 3), 第2の方法を用いた所見ではミトコンドリアの膨化, 核膜の破壊像が内部構造の変化として観察された (Fig. 4).

考 察

近來の免疫学の飛躍的発達にもかかわらず, 防御機構として現在までに知られている食細胞による食作用やリンパ球の産生する諸物質以外に未だ充分に解明されていない物質の存在が予測される。今回われわれが抽出した物質もまたかかる物質に属するものと考えられる。

このような物質の研究にはリンパ系の未発達な動物を使用することが適当であると考えられる。菊地¹³⁾はカイコの体液中に, ワクチンを注射することによって数種の抗菌性物質を誘導することに成功し, その物質は MIC 1.0~16 μg/ml で各種侵入菌に殺菌的に作用することを報告している。和合¹⁴⁾や大西¹⁵⁾は前記動物や下等脊椎動物の生体防御機構について報告しており, ことに前者には自己, 非自己の鑑別, 異物認識と移植片に対する拒絶反応が認められるという。哺乳類における生体防御機構については Buchner のヒトの血清の抗菌力に関する論文^{16,17)}が嚆矢をなすものである

う。彼はすでにその中で分芽菌に対する血清の殺菌作用について触れている。相沢¹⁸⁾の綜説によれば血清中には易熱性殺菌系と耐熱性殺菌系があり, 前者はアレキシンとも呼ばれる現在の補体に相当するものと考えてよいが, 後者は β-リジンと呼ばれて, その後 Donaldson¹⁹⁾が血小板由来の同物質を報告した以外大きな発展を見ない。血液以外に由来する抗菌活性を有する生理的物質としては Bloom ら^{20,21)}が動物の胸腺, 脾, 盲腸から殺炭疽菌物質を抽出し, それがリジン, アルギニンに富む塩基性物質である点で Hirsch と Dubos⁸⁾が1954年に牛の胸腺から分離した物質に類似している。そのものは1 μg/ml で各種細菌を殺し得るといわれる。Hirsch⁹⁾は2年後に多形核白血球から類似の殺菌性物質を取り出したが, その後これらの研究は少数の研究者によって引き継がれて現在に及んでいる。即ち Spitznagel の系統的な研究^{1~5)}と Lehrer らのものであり, ことに Lehrer らの研究は^{6,7,22,23)}殺菌作用の assay に *Candida* を使用して, このものが myeloperoxidase と異なる non-oxidative fungicidal mechanism であり⁶⁾抗菌活性が pH 5 で強い点でわれわれの抽出物の特性と類似している。

かかる tissue-bound の生理活性殺菌物質に関

する報告としては胸腺¹⁰⁾、耳下腺²⁴⁾、睪丸²⁵⁾、および精液²⁶⁾や肺胞マクロファージ²²⁾由来のものの報告が発表されている。また最近これら物質の殺菌作用の機序について Sahl^{27,28)}の報告もある。

以上の非免疫学的な tissue-bound の生体防御物質の沿革に基づいて今回われわれが表皮から抽出した殺 *Candida* 作用を有する物質の生体内での存在意義を検討すると、この物質は表皮ケラトヒアリン顆粒に富む分画から採取したものであるが、同顆粒はヒスチジンに富む物質を含有するとされ²⁹⁾、その物質は角層へも移行して stratum corneum basic protein となる³⁰⁾とされている。この物質は in vitro で亜鉛と親和性を有する傾向を有し³¹⁾、電顕所見で electron dense に認められた菌体周囲の附着物は亜鉛含有物質である可能性が強く、生体の亜鉛欠乏に際して発症する acrodermatitis enteropathica において *Candida* の増殖を見るのもこれらの事実と関連があるのかも知れない。

表在性真菌症で菌要素が角層内に留まってそこから深部に侵入しない理由として、1) 深部に血清由来の抗菌性物質が存在するとの説³²⁻³⁷⁾、2) 血清中のトランスフェリンに抗菌作用があるとの説^{38,39)}、3) 真菌の産生する keratinolytic proteinase (keratinase) の阻害物質が表皮内に存在するとの報告^{40,41)}もあるが、著者らが表皮から抽出した物質も表在性真菌症成立の 1 つの根拠として考慮されても良いであろう。ただ著者らの抽出物が酸性領域でのみ活性を発揮する問題については今後更に検討を必要とするであろう。

謝辞：稿を終るに当り、抽出液の分画を御指導下さった本学第 1 生化学教室（主任：植田伸夫教授）鈴木範男助教に深甚な謝意を表します。

文 献

- 1) Spitzangel, J.K.: The effects of mammalian and other cationic polypeptides on the cytochemical character of bacterial cells. J. Exp. Med., 114 : 1063—1078, 1961.
- 2) Spitzangel, J.K. and Chi, H.Y.: Cationic proteins and antibacterial properties of infected tissues and leucocytes. Am. J. Pathol., 43 : 697—711, 1967.
- 3) Zeya, H.I. and Spitzangel, J.K.: Characteriza-

- tion of cationic protein-bearing granules of polymorphonuclear leucocytes. Lab. Invest., 24 : 229—236, 1971.
- 4) Spitzangel, J.K., Dalldorf, F.G., Leffer, M.S., Folds, J.D., Welsh, I.R.H., Cooney, M.H. and Martin, B.S.: Character of azurphil and specific granules purified from polymorphonuclear leucocytes. Lab. Invest., 30 : 774—785, 1974.
- 5) Zeya, H.I. and Spitzangel, J.K.: Antibacterial and enzymatic basic proteins from leucocyte lysosomes: Separation and identification. Science, 142 : 1085—1087, 1963.
- 6) Lehrer, R.I.: Functional aspects of a second mechanism of candidacidal activity by human neutrophils. J. Clin. Invest., 51 : 2566—2572, 1972.
- 7) Lehrer, R.I. and Cline, M.J.: Interaction of *Candida albicans* with human leucocytes and serum. J. Bacteriol., 98 : 996—1004, 1969.
- 8) Hirsch, J.G. and Dubos, R.J.: Chemical studies on a basic peptide preparation derived from calf thymus. J. Exp. med., 99 : 65—78, 1954.
- 9) Hirsh, J.G.: Phagocytin: A bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. J. Exp. Med., 103 : 589—611, 1956.
- 10) Skarnes, R.C. and Watson, D.W.: Characterization of an antibacterial peptide from calf thymus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 93 : 207—269, 1956.
- 11) Takahashi, H.L., Kaneko, O., Chikakane, K., Kosumi, N., Kawa, Y. and Abe, T.: Candidacidal activities of guinea pig skin extracts. Proc. Jap. Soc. Invest. Dermatol., 6 : 141—142, 1981.
- 12) Matoltsy, A.G. and Matoltsy, M.N.: The chemical nature of keratohyalin granules of the epidermis. J. Cell. Biol., 47 : 593—603, 1970.
- 13) 菊地幹雄：カイコ体液中の抗菌活性。生体防御の機構（水野伝一ほか編）p. 19—39, 東京大学出版, 1980.
- 14) 和合治久：前口動物の生体防御システム。生体防御, 2 : 291—305, 1985.
- 15) 大西耕二：下等脊椎動物の免疫グロブリンの特徴とその起源。Ibid, 2 : 237—245, 1985.
- 16) Buchner, H.: Ueber die bakterientötende Wirkung des zellfreien Blutserums. Zentralblatt für Bakteriologie. U. Parasitenkunde, 5 : 817—823, 1889.
- 17) Buchner, H.: Ueber die nähere Nature der bakterientödtenden Substanz im Blutserum.

- Zentralblatt für Bakteriologie. U. Parasitenkunde, 6 : 561—565, 1889.
- 18) 相沢 憲 : 液性抵抗に関する最近の知見. 日大医学誌, 17 : 847—858, 1958.
 - 19) Donaldson, D.M. and Ters, J.G. : Beta-lysin of platelet origin. *Bacteriol. Rev.*, 41 : 501—513, 1977.
 - 20) Bloom, W.L. and Blake, F.G. : Studies on an anthracocidal substance from various animal tissues. *J. Infect. Dis.*, 80 : 41—52, 1947.
 - 21) Bloom, W.L. and Balke, F.G. : Studies on an antibacterial polypeptide extracted from normal tissues. *J. Infect. Dis.*, 83 : 116—123, 1948.
 - 22) Patterson-Delafeld, J., Szklarek, D., Martinez, R.J. and Lehrer, R.I. : Microbiocidal cationic proteins of rabbit alveolar macrophages : Amino acid composition and functional attributes. *Inf. Immunol.*, 31 : 723—731, 1981.
 - 23) Selsted, M.E., Brown, D.M., DeLange, R.J. and Lehrer, R.I. : Primary structure of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *J. Biol. Chem.*, 258 : 14485—14489, 1983.
 - 24) Pollock, J.J., Denepitiya, L., McKay, B.J. and Ianco, V.J. : Fungistatic and fungicidal activity of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Candida albicans*. *Inf. Immun.*, 44 : 702—707, 1984.
 - 25) Kistler, W.S., Noyes, C., Hsu, R. and Heinkikson, R.L. : The amino acid sequence of testis specific basic protein that is associated with spermatogenesis. *J. Biol. Chem.*, 250 : 1847—1853, 1975.
 - 26) Reddy, E.S.P. and Bhargava, P.M. : Seminal plasmin—an antimicrobial protein from bovine seminal plasma which acts in *E. coli* by specific inhibition of RNA synthesis. *Nature*, 279 : 725—729, 1979.
 - 27) Sahl, H.-G. : Influence of staphylococcal like Pep 5 on membrane potential of bacterial cell and cytoplasmic membrane vesicles. *J. Bacteriol.*, 162 : 833—836, 1985.
 - 28) Ruhr, K. and Sahl, H.-G. : Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cell and cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27 : 841—845, 1985.
 - 29) Tezuka, T. and Freedberg, I.M. : Epidermal structural proteins, 1, Isolation and purification of keratohyalin granules of the newborn rat. *Biochem. Biophys. Acta*, 261 : 402—417, 1972.
 - 30) Horii, I., Kawasaki, K., Koyama, J., Nakayama, Y., Nakajima, K., Okazaki, K. and Seiji, M. : Histidine-rich protein as a possible origin of free amino acids of stratum corneum. *J. Dermatol.*, 10 : 25—33, 1983.
 - 31) Ito, Y., Horie, N. and Fukuyama, K. : Enzymatic activities of metal binding proteins (MBP) in rat epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, 80 : 353, 1983.
 - 32) Esterly, N., Brammer, S.R. and Crouse, R.G. : *In vitro* inhibition of candidal growth by human serum. *J. Invest. Dermatol.*, 49 : 246—250, 1967.
 - 33) Hendry, A.T. and Bakerspiegel, A. : Factors affecting serum inhibited growth of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia*, 7 : 219—229, 1970.
 - 34) Carlisle, D.H., Inouye, J.C., King, R.D. and Jones, H.E. : Significance of serum fungal inhibitory factor in dermatophytosis. *J. Invest. Dermatol.*, 63 : 239—241, 1974.
 - 35) Louria, D.B. and Brayton, R.G. : A substance in blood lethal for *Candida albicans*. *Nature*, 201 : 309, 1964.
 - 36) Lorincz, A.L., Priestley, J.O. and Jacob, P.H. : Evidence for a humoral mechanism which prevents growth of dermatophytes. *J. Invest. Dermatol.*, 31 : 15, 1958.
 - 37) Roth, F.J., Boyd, C.C., Segami, S. and Blank, H. : An evaluation of the fungistatic activity of serum. *J. Invest. Dermatol.*, 32 : 549—555, 1959.
 - 38) Martin, C.M., Jandl, J.H. and Finland, M. : Enhancement of acute bacterial infection in rat and mice by iron and their inhibition by human transferrin. *J. Inf. Dis.*, 112 : 158—163, 1963.
 - 39) Shiraishi, A. and Arai, T. : Antifungal activity of transferrin. *Sabouraudia*, 17 : 79—83, 1979.
 - 40) 脇元敦彦, 佐川弥生, 樋口道生, 滝内石夫 : 人表皮より抽出した extra cellular な keratinase に対する低分子 inhibitor について. 真菌誌, 24 : 128—132, 1983.
 - 41) Yu, R.J., Grappel, S.F. and Black, F. : Inhibition of keratinase by α_2 -macroglobulin, *Experimentia*, 38 : 886, 1972.

Candidacidal Activities of Guinea Pig Epidermal Extract

Hisashi Takahashi, Kenichiro Chikakane, Masaru Okuda, Mariko Hatano,
Manabu Hoshino, Osamu Kaneko and Yoko Kawa

Department of Dermatology, Teikyo University School of Medicine, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan

Proteins and polypeptides extracted from guinea pig epidermis revealed candidacidal activity. In the present paper, we introduced the way of extraction and measurement of candidacidal assay. The substance was heat stable, and active in acidic pH against *Candida*.