総 説

皮膚由来の抗真菌物質の研究

高 橋 久

帝京大学医学部皮膚科学教室

要 旨

塩基性蛋白は侵入菌に対して生体が防御物質として活性を有する物質の一つであって、あるものは好中球やマクロファージの顆粒中であって運搬され、あるものは既に組織に備わっていて (tissue-bound), 組織の破壊と共に活性を現わすものと考えられる。われわれはモルモット表皮抽出物中にかかる抗真菌活性物質を見出し、研究中であるので、その現在に至る過程を述べ、同時に皮膚以外にも存在の報告されている類似物質の存在臓器について総説的に述べる。これらの物質は tissue-bound として、他の殺菌活性物質と共同で生体の防御に当たると考えられ、且つ下等動物に類似物質が存在することから、動物界において、極めて汎在的性格を有する防御物質と考えられる。

Key words: 表皮抽出物 (epidermal extract), 塩基性蛋白 (basic protein), magainin, defensin, 抗真菌物質 (fungicidal activity)

1. はじめに

われわれが熱剥離したモルモットの表皮の破砕物抽出液に殺カンジダ作用があることを報告¹⁾してから10年になる。その後何回かの報告²⁻⁴⁾を行い、最近ではその分画においてヒストンも関与⁵⁾している可能性も否定出来ないが、表皮蛋白も主要なる役割を演じていることは、電子顕微鏡所見からもほぼ間違いない。この機会にわれわれが辿ってきた諸研究を一括して御紹介したい。

2. 表皮抽出物の調整法

モルモットを剃毛し、エーテル麻酔下にその皮膚を採取、熱鉄板上にて、表皮と真皮を熱剥離し、表皮をクエン酸々性下にてホモジナイズしたものを粗抽出液とした。更にクエン酸緩衝液を用い、keratohyaline-granule-rich の分画を取り出し、ミリボアにて滅菌して粗抽出表皮 sample 液とし

た (Fig. 1)。

3. 表皮粗抽出液の殺カンジダ作用

表皮は極めて多数の物質の混合で構成されているであろうが、その分画精製には極めて困難が予想されるので、当面この粗抽出液を用いて諸種の殺菌試験を行った。その結果、粗抽出液ですら1時間に5 µg/ml の濃度で87% の殺カンジダ作用があることが *Candida albicans* を標的として実験を行った場合に証明出来た (trypan blue dye exclusion 法, Table 1)。

殺菌時間は20 µg/ml の抽出液で15分で94% の菌を殺すものと思われる (Table 2)。

この物質は熱に安定で90℃, 1時間の加熱で活性は70% に低下する。

4. 表皮抽出液の分画、精製

鹿島ら⁵⁾は粗抽出液を Mono S カラムで分画することによってその殺菌作用を0.4 µg/ml にまで精製することが出来たが、更に phenyl 5PW にかけるとその抗菌力は余り変化を見なかった。われ

別刷請求先: 高橋 久

〒173 東京都板橋区加賀 2-11-1
帝京大学医学部皮膚科学教室

われの粗抽出物は少なくとも表皮蛋白とヒストン H1 の2種の混合したものであり、殺菌作用にはこの双方が関わっていると思われる。一般にこのような塩基性ポリペプチドの分画には高度の技術を要するので、更に詳細な分析にはなお時間を要

Fig. 1. Process of crude epidermal extract preparation.

Table 1. Candidacidal activities of crude epidermal extracts

protein concentration ($\mu\text{g/ml}$)	candidacidal rate (%)
40	100
20	100
10	100
5	87
2.5	40.5
1.25	6.5
0.625	1
0.3125	0

(Trypan blue dye exclusion method, incubated for 1hr)

Table 2. Time course of candidacidal rate

time (min.)	candidacidal rate (%)
15	94
30	100
60	100
120	100

protein : 20 $\mu\text{g/ml}$
pH : 4.5

Fig. 2. *Candida albicans* treated with epidermal extract.

するものとする。粗抽出物を作用したカンジダの電子顕微鏡標本では菌の表面に電子密度の高い付着物を認める (Fig. 2) が、これは表皮蛋白がヒスチジンに富んで、Zn と親和性がこの黒い帯状沈着物となったものと推定される。

5. 好中球抽出物と表皮抽出物との対比

われわれがこのような表皮抽出物に殺菌力があると着想したのは次の理由による。すなわち好中球の顆粒中の殺菌物質には myeloperoxidase と cationic protein と lysozyme があり、そのうち第 1 番目のものについては Klebanoff ら⁶⁾により十分に解明されているが、第 2 の cationic protein については Spitznagel ら^{7,8)}が塩基性蛋白を Fast green 染色で組織学的に証明したのに対し、皮膚を同じ作用の色素である Luxol-fast blue で染めると表皮から角層にかけて、特に顆粒層が濃く染まることを発見し、浅在性皮膚真菌症では、菌要素は白癬菌もカンジダも癬菌も顆粒層から奥へは侵入することがないことを日常経験しているからである。好中球の cationic protein については Spitznagel のほかに Lehrer ら⁹⁾の研究もあり、未だ余り注目を引いていないが、表皮にも同じ染色態度を示す物質があることから、この物質が諸臓器における生体防御に大きな役割を演じているものと推測し、これを tissue-bound immunity として報告²⁾した、われわれがモルモットの表皮から抽出した粗抽出物と、類似の方法で oyster のグリコーゲンをモルモット腹腔中に注入後採取して得た好中球から取り出した粗抽出物の双方の殺菌作用を併記すると表のごとくなる (Table 3)。これから推測すると tissue-bound immunity の効力

にはその強度において両者間に大きな差を見ないものと推測される。

6. 殺菌性塩基性ポリペプチドの作用機序

本物質の作用機序については未だ確定した理論は確立されていないが、Sahl^{10,11)}の一連の報告によれば、この物質は微生物の表面をとり囲んでその浸透性を変化させることによって殺菌を行うもののである。

7. 殺菌性塩基性ポリペプチドの存在臓器

皮膚：われわれの報告したモルモットの表皮以外に鹿島¹²⁾はラット皮表のスコッチテープ剥離物の抗カンジダ作用について報告しており、近年 Zasloff¹³⁾はアフリカ爪ガエルの皮膚から magainin を抽出して抗菌力を検討している。

好中球：好中球には顆粒中に本物質が存在し、たとえ myeloperoxidase が欠損しても動物は必ずしも感染症を起こさないと Lehrer ら⁹⁾は報告し、その物質を更に検討して近年 defencin¹⁴⁾と名付けた。一方 Spitznagel らは本物質に cationic protein¹⁵⁾の名を与えている。好中球の殺菌物質についての研究は主として myeloperoxidase で行われているが、この塩基性物質も大きな意義を有する。たとえばスポロトリコーシスの場合の星芒体も、その周囲を好中球の microabscess が囲むことが多く、酸性染料のエオジンで染まるところは、それがこの塩基性蛋白である率が高い。

マクロファージ：本細胞にも塩基性ポリペプチドが存在し、貪食菌の殺菌を行っていることが Lehrer 一門¹⁶⁾から報告され、その殺菌力はカンジダに対して 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 20 分間で 90% に達している。

好酸球：好酸球のエオジンで陽性に染まる顆粒は塩基性の物質の存在を思わせるが、その殺菌力は弱い。これは本物質が不活性のまま存在するためかも知れない。

血小板：本物質と関連する研究としては、Donaldson¹⁷⁾によれば platelet beta-lysin は *Bacillus subtilis* を 2 分以内に 80% 殺菌することが報告されている。糖尿病患者の血小板機能は落ちており、同病患者がカンジダ症や Zygomycoses に罹患し易いのも何らかの関係があるかもしれない¹⁸⁾。

胸腺：胸腺由来物質が諸種の起炎菌を 1-10 μg

Table 3. Killing activities of crud PMN and epidermal extracts on *C. albicans* and *C. tropicalis*. (Trypan blue dye exclusion method, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of each crude extract protein concentration, 1hr)

	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
PMN extract	96.5 %	98.0 %
Control	2.0 %	3.5 %
Skin extract	72.0 %	98.0 %
Control	1.0 %	16.0 %

/mlで殺すとの報告¹⁹⁾もあるが古い文献であり、更に研究を要する。

精液：塩基性蛋白による殺菌の報告がBroch²⁰⁾によってなされている。

以上のほかカイコの幼虫などの殺菌力も類似物質によるものと推測され、この塩基性蛋白は動物界全体の大きな防御物質である可能性も強い。

8. おわりに

現在の医学の発達段階では未知な現象が多く、この塩基性ポリペプチドないし蛋白もその意味では今後研究が進むに従って、より広い存在意義が発見されると思われる。

終りに、ここに至るまでの研究に従事した共同研究者の名を挙げて感謝の意を表し度い。

金子	修	星	野	学
小澄	法夫	近	兼健一朗	
奥田	賢	波多野	真理	
佐藤	ひろ子	鹿島	真人	
河	陽子	高梨	真一	
竹中	輝仁	中村	遊香	

文 献

- 1) Takahashi H, Chikakane K, Kaneko O, Kawa Y: Candidacidal activities of guinea pig skin extracts. *Proc Jap Soc Invest Dermatol* **6**: 141-142, 1981.
- 2) Takahashi H, Chikakane K, Okuda M, Hatano M, Hoshino M, Kaneko O, Kawa Y: Tissue-bound immunity. In *Current Topics in Medical Mycology* (McGinnis MR and Borgers M ed), vol. 3, p. 50-63, Springer, New York, Heidelberg, 1989.
- 3) Takahashi H, Chikakane K, Hanawa S, Okuda M, Hatano M, Kikuchi K, Kawa Y, Hasegawa A: Host tissue responses to pathogenic and non-pathogenic fungi, including aspergilli. In *Aspergillus and Aspergillosis* (Vanden Bossche H, Mackenzie DWR and Cauwenbergh G ed), p. 121-128, Plenum, New York, 1988.
- 4) Takahashi H, Chikakane K, Kashima M: Pathogenesis and host defense in humans and animals. In *Handbook of Applied Mycology* vol. 2 (Arora DK, Ajello L and Mukerji KG ed), p. 243-288, Marcel Dekker,

- New York, 1991.
- 5) Kashima M: H 1 histones contribute to candidacidal activities of human epidermal extract. *J Dermatol* **18**: 695-706, 1991.
- 6) Klebanoff SJ, Clem WH, Luebke RG: The peroxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide antimicrobial system. *Biochim Biophys Acta* **117**: 63-72, 1966.
- 7) Zeya HI, Spitznagel JK: Antibacterial and enzymic basic proteins from leukocyte lysosomes: Separation and identification. *Science* **142**: 1085-1087, 1963.
- 8) Zeya HI, Spitznagel JK: Antimicrobial specificity of leukocyte lysosomal proteins. *Science* **154**: 1049-1051, 1966.
- 9) Lehrer RI, Ladra KM, Hake RB: Nonoxidative fungicidal mechanisms of mammalian granulocytes. *Infect Immun* **11**: 1226-1234, 1975.
- 10) Sahl H-G: Bactericidal cationic peptides involved in bacterial antagonism and host defense. *Microbiol Sci* **2**: 212-217, 1985.
- 11) Sahl H-G: Influence of staphylococcin-like peptide Pep 5 on membrane potential of bacterial cells and cytoplasmic membrane vesicles. *J Bacteriol* **162**: 833-836, 1985.
- 12) Kashima M, Takahashi H, Shimosuma M, Epstein WL, Fukuyama K: Candidacidal activities of protein partially purified from rat epidermis. *Infect Immun* **57**: 186-190, 1989.
- 13) Zasloff M: Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 5449-5453, 1987.
- 14) Ganz T, Selsted ME, Szkark D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI: Defensins, natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* **76**: 1427-1435, 1985.
- 15) Spitznagel JK, Chi HY: Cationic proteins and antibacterial properties of infected tissues and leukocytes. *Am J Pathol* **43**: 697-711, 1963.
- 16) Patterson-Delafield J, Martinez RJ, Lehrer RI: Microbiocidal cationic proteins in rabbit alveolar macrophages. *Infect Immun* **30**: 180-192, 1980.
- 17) Donaldson DM, Tew JG: Beta-lysin of platelet origin. *Bacteriol Rev* **41**: 501-513, 1977.
- 18) Wincour PD, Halushka PV, Colwell JA:

The Platelets, p. 341-366, Academic press, New York, 1985.

- 19) Skarnes RC, Watson DW : Characterization of an antibacterial peptide from calf

thymus. Proc Soc Exp Biol Med **93** : 267-269, 1956.

- 20) Broch TD : The effect of salmine on bacteria. Can J Microbiol **4** : 65-71, 1958.

Studies on Fungicidal Substance in the Epidermal Extract

Hisashi Takahashi

Department of Dermatology, Teikyo University School of Medicine

We have engaged in the extraction and purification of the epidermal extract with fungicidal nature, I will introduce the progress of the study to date, and also the basic polypeptides exist in various tissues are also discussed together with the possibility of the same kind of substance on the self-defense in the kingdom of animal other than humans.

この論文は、第35回日本医真菌学会総会の学会賞受賞記念講演として発表されたものです。