

原 著

## *Candida albicans* Aspartic Proteinase の簡易検出法

美禰弘子<sup>1)</sup> 星加和徳<sup>2)</sup> 津島弘文<sup>3)</sup>

川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科<sup>1)</sup>

川崎医科大学 医学部 内科消化器部門 II<sup>2)</sup>

津島メディカルバイオロジー研究所<sup>3)</sup>

(平成6年4月20日受理)

### A Simple Detection Method of *Candida albicans* Aspartic proteinase

Hiroko MINE<sup>1)</sup>, Kazunori HOSHIKA<sup>2)</sup> and Hirohumi TSUSHIMA<sup>3)</sup>

*Department of Clinical Nutrition*

*Faculty of Medical Professions*

*Kawasaki University of Medical Welfare<sup>1)</sup>*

*Kurashiki, 701-01, Japan*

*The Second Division of Gastroenterology*

*Department of Internal Medicine*

*Kawasaki Medical School<sup>2)</sup>,*

*Kurashiki, 701-01, Japan*

*Laboratory for Medical Biology Tsushima Clinic<sup>3)</sup>*

*Hiroshima, 729-16, Japan*

*(Accepted Apr. 20, 1994)*

**Key words :** *Candida albicans*, *Candida* aspartic proteinase, hemoglobin agar plate

#### Abstract

Twelve *Candida* strains were isolated from fur on the patient's tongues and their species were determined by using API-C-AUXANOGRAM. Six *Candida* strains were identified as *Candida albicans*, two as *Candida tropicalis* and two as *Candida parapsilosis* and two were identified as *Candida guilliermondii*.

Those isolated and identified *Candida* strains were inoculated on hemoglobin agar plates and acid proteinase production was simply detected by the existence of halo around their developed streak. All of the six *C. albicans* strains produced acid proteinase but the other six *Candida* strains didn't form any detectable halo around their streak.

*C. albicans* strains were cultured in the human hair-keratin medium and the culture fluid was applied into the holes with a series of protease inhibitors on hemoglobin agar

plates to examine their enzymatic properties.

The proteolytic activity was specifically inhibited only by pepstatin, which clearly showed that this proteolytic enzyme was *Candida* aspartic proteinase (CAP).

## 要 約

患者の舌部白苔より、12株の *Candida* を単離し、アピ C オクサノグラムを利用して菌種の同定をおこなった。6株が *Candida albicans*, 2株が *Candida tropicalis*, 2株が *Candida parapsilosis*, 2株が *Candida guilliermondii* と同定された。

これら単離、同定した12株の *Candida* をヘモグロビン平板培地に移植培養した時に増殖菌帯の周囲に形成されるロハの有無により酸性プロテアーゼ産生を簡易に検出できた。

*C. albicans* は6株すべて酸性プロテアーゼを産生したが、*C. albicans* 以外の6株の増殖菌帯の周囲にはロハが形成されなかった。

*C. albicans* をヒト毛髪ケラチン培地で培養し、培養上清を一連のプロテアーゼインヒビタールとともにヘモグロビン平板培地上のホールに入れて培養し酵素の性状を調べた。

酵素活性は Pepstatin によってのみ阻害された。この結果は検出した酵素が *Candida* Aspartic Proteinase (CAP) であることを示している。

## 緒 言

*Candida* はヒトの腸管や粘膜に常在する酵母様真菌であり、白血病患者<sup>1)</sup>、糖尿病患者、後天性免疫不全症候群患者<sup>2)</sup>、老人などなんらかの理由により体力の低下をおこしたものに日和見的に *Candida* 症をひきおこす。

ヒトから分離される多くの *Candida spp.* のうちで *Candida* 症の主要な起因菌は *Candida albicans* であり、その病原性発現因子は数多く報告されているが<sup>3)4)5)</sup>、最も重要なものは分泌性酸性プロテアーゼの Aspartic Proteinase (*Candida* Aspartic Proteinase: 以後 CAP と省略する) であると考えられている<sup>6)7)8)</sup>。

このため、臨床材料から分離された *Candida* については菌種の同定と同時に CAP 産生力を調べるのが重要である。しかしながら多くの分離菌株の CAP 産生を簡易に調べる方法がなく、*Candida* の病原性と CAP 産生力の関係についての明解な結論は得られていない。

今回、著者等は酸および熱で変性させたヘモグロビンを基質として加えた寒天平板培地を用いて CAP を簡易測定する方法を検討したので得られた結果について報告する。

## 実験方法

1 臨床材料からの *Candida spp.* の分離、培養、同定。

舌部白苔をカナマイシン100 $\mu$ g/mlを含む Potato-Dextrose-Yeast-Extract 寒天培地(市販の Potato-Dextrose 培地、ニッスイに0.5%の Yeast-Extract, Difco を加えたもの; PDY 培地と省略する)に塗布し37 $^{\circ}$ Cで数日培養する。得られた白色のコロニーについて顕微鏡で酵母型細胞であることを確認した後、新しい PDY 培地に2~3回植え変える。このようにして純粋分離した *Candida spp.* 12種をアピ C オクサノグラム (BIO MERIRUX S. A.)<sup>9)</sup>を用いて菌種の簡易同定をおこなった。19種類の糖を単独に含む(1.2~2.36mg/100 $\mu$ l)培地に分離菌を接種し、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養後、菌の増殖の有無により各糖の同化を判定した。判定後、プロファイルインデックスに基づいて菌種を同定した。

2 培養用ヘモグロビン平板の作成と CAP 産生の測定。

直径18mmの滅菌プラスチックシャーレに、滅菌蒸留水6ml、ろか除菌 Yeast-Carbon Base 液 (DIFCO, 17g/100ml) 2ml、滅菌寒天液(2%, 60 $^{\circ}$ C) 10ml、ろ過除菌酸性ヘモグロビン液

(SIGMA, 2 gを100mM酢酸・酢酸ナトリウムバッファー, pH4.0に溶解) 2 mlをこの順序に加え平板培地にする。酸性ヘモグロビン液の作成方法をくわしく説明する。まず500mgのヘモグロビンに1/10 N 酢酸40mlを加えて溶解し室温で30分放置してヘモグロビンを酸変性させる。3,000回転, 10分間遠心して沈殿物を除去し, 上清をろ過除菌する。ここに滅菌した1/10 M 酢酸ナトリウムを約5ml加え pHを4.0にする。滅菌蒸留水を加えてヘモグロビンが2%となるように調整する。

以上の操作で作成した平板培地を70°Cのインキュベーター中に2時間放置してヘモグロビンを熱変性させたものを培養用ヘモグロビン平板とした。

予備培養した *Candida spp* を培養用ヘモグロビン平板の中央に直線状に塗布し, 37°Cで3日間培養する。移植した *Candida spp* がCAPを産生すれば基質のヘモグロビンが溶解し, 増殖した菌の周辺にハロが形成される。

### 3 CAP 産生用ケラチン培地の作成

*Candida spp* の産生するCAPの性状を調べるために, ケラチンを基質とする液体培地を作成した。CAPはBovine Serum Albuminなどのタンパク質が培地中に存在する時に誘導産生されることはよく知られ, 研究されている<sup>10)11)</sup>。本実験では著者等が研究をすすめているヒト毛髪ケラチンをCAP誘導タンパク質として使用した。定法に従い, 細切したヒト毛髪を0.05 Mジチオスレイトール添加8 M尿素で処理後, 硫酸沈殿でケラチンを得た。蒸留水で十分洗浄して硫酸, 混在するアミノ酸や水溶性のプロテアーゼインヒビター<sup>12)</sup>等を除去する。ホモジェナイザーでエマルジョン状にしたケラチンを高圧蒸気滅菌し, さらに滅菌蒸留水による洗浄をくりかえし, CAPを誘導できるケラチンを調整した。ヒト毛髪ケラチンを0.2%添加した Yeast-Carbon-Base液 (1.7 g/100ml, ろか除菌) 20mlを直径90mmのプラスチックシャーレに入れ, *Candida* 細胞を10<sup>6</sup>個加え, 37°Cで7日間培養した。3,000回転, 10分間遠心した培地上清を用いて産生されたCAPの性状を調べた。

### 4 活性測定用ヘモグロビン平板の作成とCAP産生の測定

基本的な平板作成法は培養用平板の場合と同様である。培養用平板作成で加えた Yeast-Carbon-Baseは必要ないのでかわりに蒸留水を2 ml添加する。またヘモグロビン液に0.2%となるように NaN<sub>3</sub> を添加したものを使用する。

できあがった活性測定用平板に寒天穿孔吸引管で直径5 mmのホールをあける。各ホールに培養上清25 $\mu$ lと各種プロテアーゼインヒビター(コントロールには蒸留水) 25 $\mu$ lを入れ, 53°Cで24時間インキュベートした。ホール周辺に形成されるハロの大きさによりCAP活性を測定した。

実験に使用したプロテアーゼインヒビターは, 200 $\mu$ M Pepstain, 20mM EDTA, 2 mM PMSF, 200 $\mu$ g/ml SBTI, 2 mM NEM, 2 mM E-64の6種類である。終濃度はこれらの使用濃度のそれぞれ $\frac{1}{2}$ となる。

## 結 果

### 1 菌種の同定

アピCオクサノグラムを用いて12株の臨床分離菌株を簡易同定(厚膜孢子の確認等はおこなっていない)した結果を表1に示した。*Candida albicans* 6株 *Candida tropicalis* 2株, *Candida parapsilosis* 2株, *Candida guilliermondii* 2株であった。

### 2 培養用ヘモグロビン平板によるCAP産生活性の測定

12種の臨床分離 *Candida spp* を培養用ヘモグロビン平板に移植培養し, ハロ形成に基づいてCAP産生活性を調べた(表2)。

CAP産生がみられたのは, アピCオクサノグラムにより *Candida albicans* と同定された6種のみであり, 他の6種はCAP産生をしなかった。

図1に *Candida albicans* FUKUHARA株におけるハロ形成の様子を示した。

### 3 活性測定用ヘモグロビン平板による *Candida albicans* のCAP産生活性とCAPの性状検査

アピCオクサノグラムにより *Candida albicans* と同定された6株をケラチン培地で培養し, そ

表1 臨床分離 *Candida* のアピ C オクサノグラムによる菌種同定

分離菌名	GLU	GLY	2 KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MIZ	RAF	同定種
MATUNAGA	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>C. albicans</i>
SAKOTANI	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	<i>C. albicans</i>
NAKATANI	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	<i>C. albicans</i>
MORITA	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	<i>C. albicans</i>
FUKUHARA	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	<i>C. albicans</i>
TAMESHIGE	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	<i>C. albicans</i>
MORIMOTO	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>C. parapsilosis</i>
SHIGETANI	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>C. parapsilosis</i>
MITOU	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>C. guilliermondii</i>
NAGAO	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>C. guilliermondii</i>
SASAKI	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>C. tropicalis</i>
MASAHIRO	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>C. tropicalis</i>

+=糖利用により発育が見られたもの - =糖が利用できず発育が見られなかったもの GLU=ブドウ糖 GLY=グリセリン  
 2 KG=2-ケト D グルコン酸 ARA=L-アラビノース XYL=D-キシロース ADO=アドニット  
 XLT=キシリトール GAL=ガラクトース INO=イノシット SOR=D-ソルビトール  
 MDG= $\alpha$ -メチル D-グルコシド NAG=N-アセチル D-グルコサミン CEL=D-セロビオース LAC=乳糖  
 MAL=マルトース SAC=シュクロース TRE=D-トレハロース MLZ=D-メチレトース RAF=D-ラフィノース

表2 分離菌の菌種とハロ形成

分離菌名	同定種	ハロ形成
MATUNAGA	<i>C. albicans</i>	+
SAKOTANI	<i>C. albicans</i>	+
NAKATANI	<i>C. albicans</i>	+
MORITA	<i>C. albicans</i>	+
FUKUHARA	<i>C. albicans</i>	+
TAMESHIGE	<i>C. albicans</i>	+
MORIMOTO	<i>C. parapsilosis</i>	-
SHIGETANI	<i>C. parapsilosis</i>	-
MITOU	<i>C. guilliermondii</i>	-
NAGAO	<i>C. guilliermondii</i>	-
SASAKI	<i>C. tropicalis</i>	-
MASAHIRO	<i>C. tropicalis</i>	-

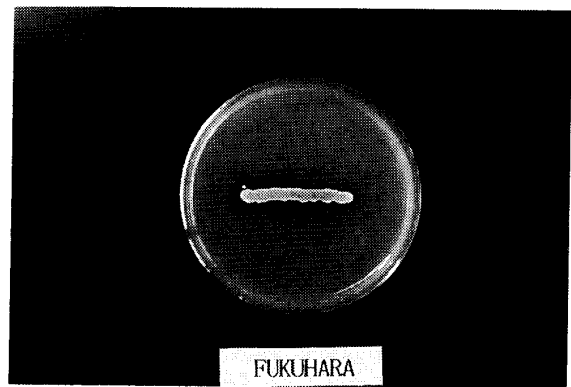


図1 培養用ヘモグロビン平板におけるハロ形成 (*Candida albicans* FUKUHARA 株) 直線状に増殖した菌の周辺に透明なハロが形成されている。

の培養上清を用いて CAP 産生活性とプロテアーゼインヒビターの影響を調べた。

6株すべてにおいて CAP 産生活性がみられたがハロの境界線がくっきりしないため、今回は相互の活性の比較をすることはできなかった。

6種のプロテアーゼインヒビターの影響を調べた結果、Asparatic プロテアーゼのインヒビターである Pepstatin によってのみハロの形成が阻害された。金属プロテアーゼのインヒビターである EDTA, Serine プロテアーゼのインヒビターである PMSF や STI, および Cysteine プロテアーゼのインヒビターである E-64 や NEM では全く阻害されなかった。

これらの結果は今回作成したヘモグロビン平板で測定しているものが *Candida* Aapartic Proteinase (CAP) である事を示している。

図2に *Candida albicans* FUKUHARA 株の CAP 産生活性と Pepstatin による活性阻害の様子を示した。

## 考 察

*Candida spp* の産生する Aapartic プロテアーゼは従来酸性プロテアーゼとよばれ、病原性との関連が様々な方面から検討されてきた。これらの酵素活性の測定は多くの場合酸変成ヘモグロビンを使用するヘモグロビン法<sup>13)</sup>によってい

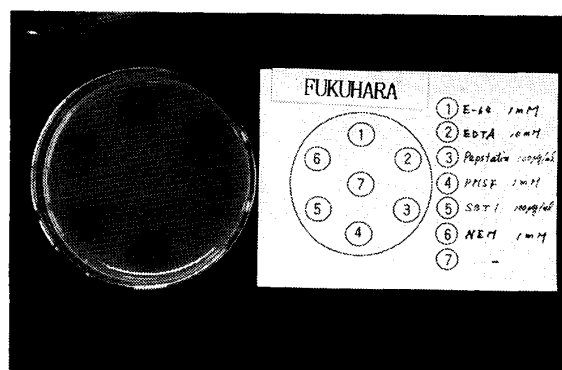


図2 測定用ヘモグロビン平板におけるハロ形成とプロテアーゼインヒビターの作用  
各ホールには *Candida albicans* FUKUHARA 株の培養上清とプロテアーゼインヒビターが入れている。  
Pepstatin を加えたホールの周辺においてのみハロ形成の阻害がみられる。他のプロテアーゼインヒビターを加えたホールではコントロールと同程度のハロが形成されている。

た。この方法では数多くの *Candida* 菌株についての酵素活性を短時間に測定しにくい。今回、著者等はヘモグロビンを1/10Nの酢酸で軽く酸変成させた後にろ過除菌して培養用のヘモグロビン平板培地を作成することに成功した。さらにこれを熱処理して白濁させ、ヘモグロビン分解酵素の作用により生じたハロの観察を容易にすることができた。今回、臨床分離 *Candida* 菌株12種についてハロ形成を調べたところ、*Candida albicans* 6菌株のみがハロを形成しヘモグロビン分解活性があることが示された。これに対し、*Candida tropicalis* 2株、*Candida parapsilosis* 2株および *Candida guilliermondii* 2株はいず

れもハロ形成をせず、ヘモグロビン分解活性は示されなかった。これは、*Candida tropicalis* や *Candida parapsilosis* は Aspartic プロテアーゼを産生するが、その産生量は *Candida albicans* の約1/2~1/3である<sup>14)</sup>とする従来発表されているデータと適合している。今後さらに培養用ヘモグロビン平板を改良して感度を増加させ、菌種による酵素活性の相違も調べたい。

*Candida albicans* に Aspartic プロテアーゼを産生させるための窒素源として、今回ヒト毛髪由来のケラチンを使用した。従来、*Candida* は足部角質由来のケラチンを基質とした場合には Aspartic プロテアーゼを産生するが、毛髪由来のケラチンを基質とすると Aspartic プロテアーゼを産生しないとされてきた<sup>15)16)</sup>。今回、ヒト毛髪由来ケラチンを高圧蒸気滅菌して加熱変成させ、さらに蒸留水による洗浄を繰り返して混在すると考えられる水溶性のプロテアーゼインヒビターを除去することにより *Candida* の Aspartic プロテアーゼの基質としての利用が可能となった。足部角質と比べると毛髪は入手しやすく、処理も簡単である。今後はこれを用いて *Candida albicans* の人体角質への寄生機序を検討してゆきたい。

活性測定用ヘモグロビン平板を用いて *Candida albicans* の産生するヘモグロビン分解酵素の活性測定と阻害剤の影響を簡便に測定でき、測定している酵素が Aspartic プロテアーゼであることを確認できた。今後活性測定用ヘモグロビン平板をさらに改良し、定量的な活性測定と菌株による活性の比較をおこないたい。

## 文 献

- 1) Boday GP (1966) Fungal infections complicating acute leuchemia. *Journal of Chronic Disease* **19**, 667—687.
- 2) Odds FC, Schmid J and Soll DR (1990) Epidemiology of *Candida* infections in AIDS. In: Bossche HV, Mackenzie DWR, Cauwenberg G, Cutsem JV, Drouhet E, Dupon B, eds. *Mycosis in AIDS patients*. Plenum Press, New York, pp 67—74.
- 3) Hoshika K, Kihara T and Mine H (1992) Adherence modes of *Candida albicans* to rabbit esophagus. *Journal of Clinical Electron Microscopy* **25**, 261—267.
- 4) 美祿弘子 津島弘文 星加和徳 (1992) *Candida albicans* 菌体由来多糖によるマウス耳の炎症について。

- 川崎医療福祉学会誌, **2**, 171—176.
- 5) 星加和徳 美祢弘子 (1993) *Candida albicans* の食道粘膜定着に関する研究. 山陽放送学術文化財団「リポート」, **37**, 42—46.
  - 6) Cassone A, DE Bernardis F, Mondello F, Ceddia T and Agatensi L (1987) Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. *Journal of Infections Diseases*, **156**, 777—783.
  - 7) Mori R, Kobayashi I, Shimizu K, Kondoh Y and Tanaka K (1989) Pathogenicity of *Candida albicans* strains with different proteinase activity in the rabbit cornea. *Japanese Journal of Medical Mycology*, **30**, 153—159.
  - 8) Bernardi F, Morelli L, Ceddia T, Lorenzini R and Cassone A (1990) Experimental pathogenicity and acid proteinase secretion of vaginal isolates of *Candida parapsilosis*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, **28**, 125—137.
  - 9) 吉崎悦郎 大当正紀 吉田弘之 珠数顕 猿渡勝彦 餅田親子 (1980) AP120 C Auxanogram による酵母様真菌の簡易同定. 臨床と細菌, **7**, 123—126.
  - 10) Remold H, Fesold H and Staib F (1968) Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **167**, 399—406.
  - 11) Negi M, Tsuboi R, Matsui T and Ogawa H (1984) Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*. *Journal of Investigative Dermatology*, **83**, 32—36.
  - 12) Tsushima H, Ueki A, Mine H, Nakajima N, Sumi H and Hopsu-Haru VK (1993) Purification and characterization of a cystain-type cysteine proteinase inhibitor in the human hair shaft. *Archives of Dermatological Research*, **284**, 380—385.
  - 13) Shimizu K, Kondoh Y and Tanaka K (1987) Proteinase production and pathogenicity of *Candida albicans*. I Invasion into chorioallantoic membrane by *C. albicans* strains of different proteinase activity. *Microbiology and Immunology*, **31**, 1045—1060.
  - 14) 園 英子 竹迫一任 増田朋子 加藤郁之進 内田勝久 山口英世 (1991) *Candida tropicalis* および *Candida parapsilosis* の産生する分泌性酸性プロテアーゼの分離, 精製と性質. 日本医真菌学会雑誌, **32**, 85.
  - 15) 松田和子 服部道廣 鈴木佳子 佐藤壮彦 小川秀興 (1983) *Candida albicans* の産生する角質溶解性タンパク質分解酵素の 2, 3 の生化学的性状について. 日本皮膚科学会誌, **93**, 463—466.
  - 16) 坪井良治 栗田依幸 松田和子 根本信 小川秀興 (1984) *Candida albicans* に対する protease inhibitor の抗真菌作用について. *Japanese Journal of Medical Mycology*, **25**, 387—390.