

マンナンによる *Candida albicans* のプラスチック製培養プレート接着阻害効果

岩本留奈, 渡部俊彦, 小笠原綾子, 三上 健, 松本達二*

Adherence of *Candida albicans* Is Inhibited by Yeast MannanLuna IWAMOTO, Toshihiko WATANABE, Ayako OGASAWARA,
Takeshi MIKAMI, and Tatsuji MATSUMOTO*Department of Microbiology, Tohoku Pharmaceutical University, 4-4-1 Komatsushima,
Aoba-ku, Sendai City 981-8558, Japan

(Received October 20, 2005; Accepted January 12, 2006)

The adherence of *Candida albicans* strain NIH A207 to plastic plates was inhibited by the addition of mannan, and plates coated with mannan also inhibited the adherence of *C. albicans* strains TIMM1768, TIMM2640, and JCM2076. Mannan coated the plastic plates under neutral and acidic conditions, but not under alkaline conditions. These results indicate that *C. albicans* cannot attach to mannan. Thus mannan-coated medical equipment might be useful to prevent *C. albicans* adherence.

Key words—*Candida albicans*; mannan; adherence

緒 言

Candida albicans は日和見感染原因菌の 1 種で、増殖環境に応じて酵母形から菌糸形に形態を変化する二形性の真菌である。¹⁾ *C. albicans* は主にヒトの口腔内、膣、腸管内などに存在している。²⁻⁴⁾

マンナンは、*Saccharomyces cerevisiae* や *C. albicans* などの真菌細胞壁を構成する多糖体で、糖鎖部分は、マンノースが α 1-6 結合した主鎖に α 1-6, α 1-3 結合などからなるマンノースオリゴ糖側鎖が結合した櫛形構造を呈している。⁵⁾ 通常、マンナンは、熱水抽出法により精製され、マンナンにタンパク質が結合した糖タンパク質として回収されてくる。

マンナンが、プラスチック製の培養プレートに吸着性を示すことは既に知られており、⁶⁾ この現象はマンナン抗原の免疫学的解析などに利用されている。

口腔内に存在する *C. albicans* が歯垢や歯周病の原因の 1 つである可能性が報告されており、^{7,8)} 歯への *C. albicans* 接着阻害は口腔内病変発生防止の有効な手段になると考えられる。また、カテーテル内部への *C. albicans* の付着が、カテーテル感染の要因の 1 つと予想され、カテーテルへの *C. albicans*

接着阻害方法の開発が望まれている。

本研究では、マンナンで処理したプラスチック製培養プレートに対して、*C. albicans* が接着できないことを見出し、その詳細について検討を行ったので報告する。

方 法

1. 菌株 *C. albicans* NIH A207 株, TIMM1768 株, TIMM2640 株, JCM2076 株は、サブロー培地で 27°C, 24 時間培養を行い、実験に使用した。

2. 試薬 ウシ血清由来 Albumin (A3294) 及び *S. cerevisiae* 由来マンナン (M7504, 以下マンナンと略す) は、Sigma 社より購入した。生細胞数測定試薬 Alamar blue は、Serotec 社より購入した。D(+)-マンノースは、和光純薬より購入した。

3. マンナンの *C. albicans* 接着阻害効果 マンナン溶液 (10, 1, 0.1, 0.01 mg/ml in RPMI1640) 1 ml に、*C. albicans* NIH A207 懸濁液 (1×10^6 cells/ml in RPMI1640) 0.1 ml を加え 24 穴プラスチック製培養プレート (Nunc Delta Surface, Nunc 社製) 内で 37°C, 5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。培養後、上清を除去し、プレート内を RPMI1640 培地で穏やかに洗浄した。ここに RPMI1640 培地 1 ml と Alamar blue 0.1 ml を加え 1 時間培養後、色調の

変化を 540 nm—620 nm の吸光度差として測定した。

4. マンナン処理した培養プレートに対する *C. albicans* の接着性 24 穴プラスチック製培養プレートに、マンナン溶液 (1 mg/ml) 1 ml を加え、37°C, 5% CO₂ 条件下で 2 時間静置した。その上清を除き、プレート内を RPMI1640 培地で洗浄後、*C. albicans* NIH A207 株酵母形生菌 (1×10⁵ cells/ml in RPMI1640) 1 ml を加え 37°C, 5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。培養終了後、プレート内を穏やかに洗浄し、1 ml の RPMI1640 培地を加えた後、Alamar blue 0.1 ml を加え 1 時間培養後に 540 nm—620 nm の吸光度差を測定した。

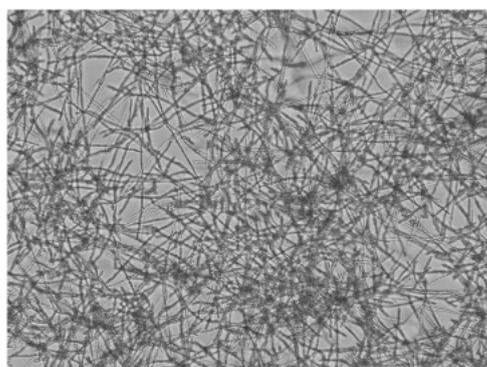
5. 統計処理 得られた実験結果は、Student's *t*-検定を用いて統計解析を行った。

結 果

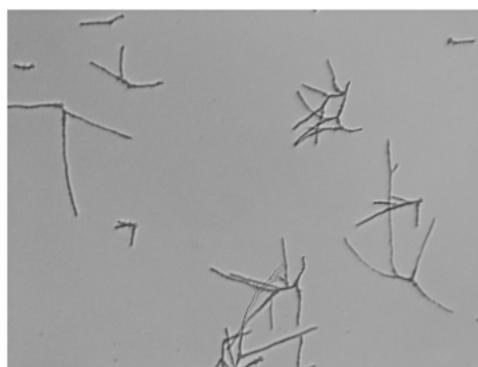
1. マンナンの *C. albicans* 接着性に及ぼす影響 *C. albicans* NIH A207 株懸濁液に、マンナンを加え、24 時間培養を行った。培養後、プレート内を観察したところ、マンナン (10 mg/ml) 処理した系では、マンナン未処理プレートと比べ、プレート内に付着する菌量が著しく低下していた (Fig. 1)。プレートに付着した菌量を Alamar blue を用いて数値化し、マンナン濃度と *C. albicans* 付着量との関係について検討を行った。その結果、マンナン濃度が 1 mg/ml 以上で培養した場合、*C. albicans* のプレートへの付着は著しく阻害され、マンナン濃度が 0.1 mg/ml 以下では菌のプレートへの付着阻害は認められなかった (Fig. 2)。マンノース又は Albu-

min (最終濃度 1 mg/ml) を *C. albicans* NIH A207 株と共に培養しても、プレートへの接着阻害は認められなかった (Data not shown)。また、マンナンを添加した *C. albicans* の倍加時間は未添加群の約 1/3 で、マンナン添加により *C. albicans* の増殖が促進されることから、マンナンによる *C. albicans* 増殖抑制がプラスチックプレート付着菌量低下の原因ではないことを確認している (Data not shown)。

2. マンナン処理した培養プレートに対する *C. albicans* 接着性 マンナンで前処理したプレートを用いて *C. albicans* NIH A207 株を培養し、プレート内に付着する菌量を Alamar blue 法を用いて検討した。マンナン未処理プレートに付着した菌量を 100% とした場合、マンナン処理したプレートに付着する菌量は、10% 以下で、*C. albicans* のプレートに対する付着量がマンナン処理により著しく抑制された (Fig. 3)。マンノースや Albumin で前処理したプレートを用い、*C. albicans* NIH A207 株を培養したが、マンノースや Albumin 前処理では、*C. albicans* の付着阻害は認められなかった。タンパク質がプラスチックに付着する性質があることはよく知られており、ウシ血清 Albumin などが ELISA 法の Blocking 剤として使用されている。マンナン処理したプレートに対する *C. albicans* 付着性低下が、マンナン特異的な現象ではなく、プラスチックプレートに付着性を示すタンパク質に通常認められる現象であるかどうかを検討するために、ウシ血清 Albumin 処理したプラスチックプレートに対する *C. albicans* 接着性について検討を行った。その結



マンナン未添加群



マンナン添加群 (10 mg/mL)

Fig. 1. Effect of Yeast Mannan on Adherence of *C. albicans* NIH A207 to Plastic Plate

C. albicans NIH A207 株懸濁液 (1×10⁵ cells/ml in RPMI1640) 1 ml を 24 well plastic plate に加え、37°C, 5% CO₂ 条件下で 24 時間培養後、plate 内を穏やかに洗浄し、プレート底に付着している菌体を顕微鏡下で観察した (倍率 400 倍)。

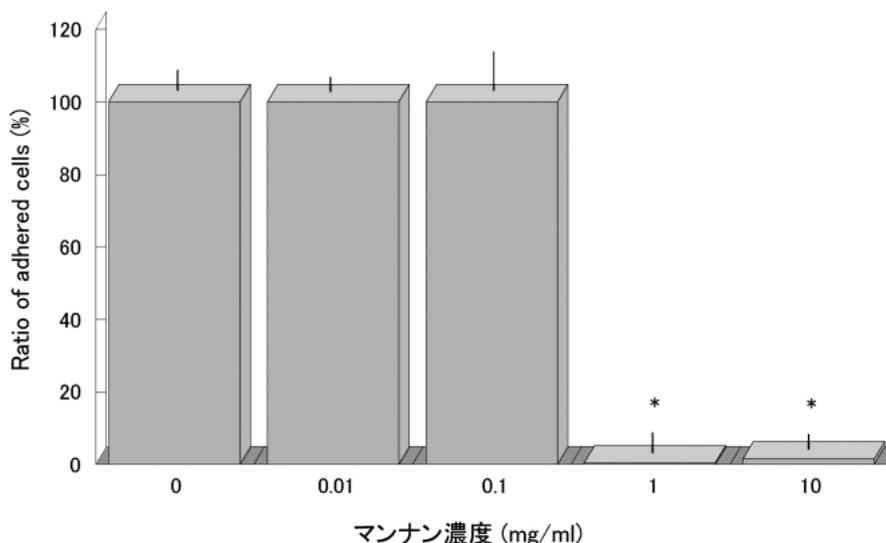


Fig. 2. Adherence of *C. albicans* NIH A207 Treated with Yeast Mannan to Plastic Plate

C. albicans NIH A207 株懸濁液 (1×10^5 cells/ml in RPMI1640) 1 ml を 24 well plastic plate に加え、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下で 24 時間培養後、plate 内を穏やかに洗浄し、付着した菌量を Alamar blue 法で測定した。* $p < 0.001$ vs Control (マンナン濃度 0 mg/ml, $n=4$)。

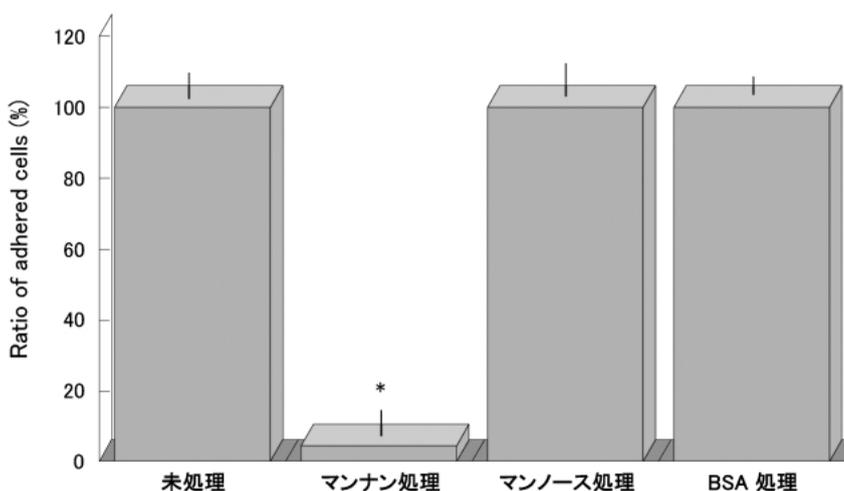


Fig. 3. Adherence of *C. albicans* NIH A207 to Plastic Plate Treated with Yeast Mannan

24 well plastic plate にパン酵母マンナン、マンノース、BSA (1 mg/ml) 1 ml をそれぞれ加え 2 時間処理した。その後、plate 内を洗浄し、ここに *C. albicans* NIH A207 株懸濁液 (1×10^5 cells/ml in RPMI1640) 1 ml を加え、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下で 24 時間培養した。培養後、plate 内を穏やかに洗浄し、付着した菌量を Alamar blue 法で測定した。* $p < 0.001$ vs 未処理 ($n=4$)。

果、ウシ血清 Albumin 処理したプラスチックプレートに *C. albicans* は、接着性を示すことから、タンパク質によるコーティングだけでは、*C. albicans* のプラスチックプレートに対する接着を阻害することができないことが明らかになった (Fig. 3)。また、糖によるプラスチックプレートのコーティングが、*C. albicans* の接着を阻害している可能性も予想されたので、糖による *C. albicans* の接着阻害が可能かどうかを検討した。菌体細胞壁より精製したマンナンには微量のタンパク質が含まれてい

るため、マンナンの構成糖であるマンノースを対照に使用した。その結果、マンノースで処理したプレートに *C. albicans* は、接着性を示すことから (Fig. 3)、マンナン構成糖の単独処理では、*C. albicans* のプラスチックプレートに対する接着を阻害することができないことが推察された。また、可溶性多糖体の 1 つであるデンプン (10 mg/ml) で処理したプラスチックプレートでも同様の検討を行ったが、*C. albicans* の接着を阻害することはできなかった (Data not shown)。

また、マンナン処理したプレートへの *C. albicans* 付着阻害が NIH A207 株以外の株でも同様に起こるか否かを、*C. albicans* TIMM1768 株、TIMM2640 株、JCM2076 株を用いて同様の方法で検討した。その結果、マンナン (1 mg/ml) 処理プレートで培養したすべての *C. albicans* 菌株で、プレートへの付着量が低下した (Fig. 4)。これらの結果から、マンナン処理によりプレート内に形成される被膜が、*C. albicans* のプレートへの接着を阻害していることが明らかになった。

マンナン処理したプレートで培養を行うと 90% 以上の菌の付着が阻害されるが、このプレートを洗浄し、新たに *C. albicans* 菌体を加え培養を行い、菌体のプレートへの付着量を測定すると、プレートへ付着する菌量は、マンナン未処理対照群の約 50% まで減少し、マンナンによる *C. albicans* 接着阻害効果が低下していることが明らかになった (Fig. 5)。しかし、同一プレート内で *C. albicans* の培養を繰り返し行っても、2 回目以降、*C. albicans* の付着阻害効果の減少は認められず、マンナンによる *C. albicans* の接着阻害効果は、長期間持続されることが明らかになった。

3. 異なる pH 条件下でマンナン処理した培養プレートに対する *C. albicans* 接着性 培養プレートへのマンナン被膜形成に最適な pH 条件を検討するために、pH 3, pH 7, pH 11 の各リン酸緩衝液

(PBS(-)) で溶解したマンナン溶液でプレートをそれぞれ処理し、*C. albicans* の付着阻害効果を指標にマンナン被膜形成の有無を評価した。その結果、pH 3, pH 7 で処理したプレートに対して *C. albicans* は付着することができなかったが、pH 11 で処理したプレートには、*C. albicans* は付着することが可能であった (Fig. 6)。

考 察

S. cerevisiae 由来のマンナンに *C. albicans* の付着阻害効果があることを見出したので、今回、その機構について解析を行った。

C. albicans NIH A207 株を RPMI1640 培地に懸濁し、37°C, 5% CO₂ 条件下で培養を行ったところ、*C. albicans* は菌糸形で分裂し、プレート底部に付着する菌が多数認められた (Fig. 1)。これに対し、マンナンを加え培養した系では、プレートに対する *C. albicans* の付着量は著しく低下した (Fig. 2)。この結果から、マンナンには *C. albicans* のプレートへの付着を阻害する効果のあることが明らかになった。マンナン存在下で *C. albicans* 付着阻害が起きる原因として、1) マンナンが、プレート内に被膜を形成し、*C. albicans* 菌体がプレートに接着することを阻害する、又は 2) マンナンが *C. albicans* に作用して、菌の接着能力を低下させていることが予想された。そこで、マンナン前処理したプレート

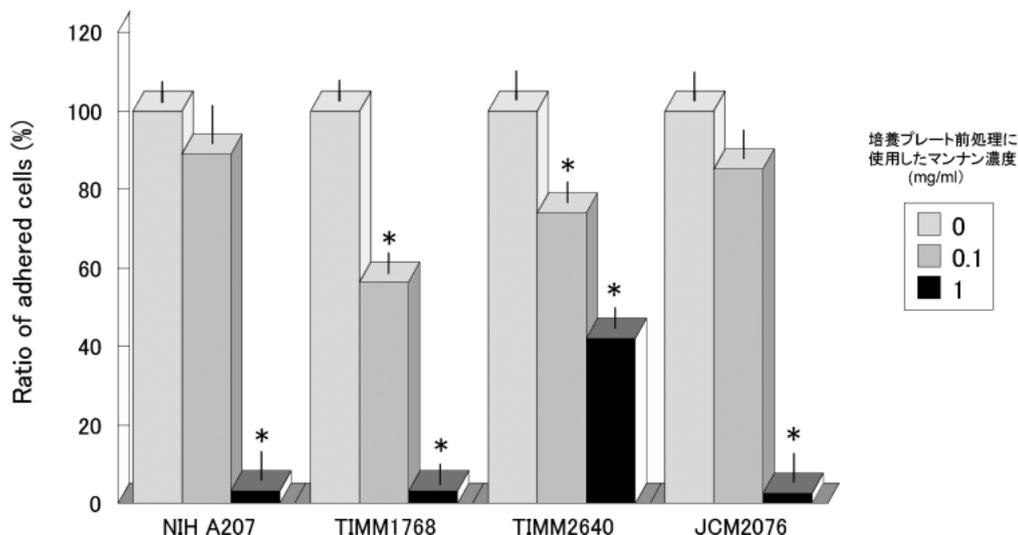


Fig. 4. Adherence of Several *C. albicans* Strains to Plastic Plate Treated with Yeast Mannan

24 well plastic plate にパン酵母マンナン (0.1 又は 1.0 mg/ml) 1 ml を加え 2 時間処理した。その後、plate 内を洗浄し、ここに *C. albicans* NIH A207, TIMM1768, TIMM2640, JCM2076 株懸濁液 (1×10^5 cells/ml in RPMI1640) 1 ml をそれぞれ加え、37°C, 5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。培養後、plate 内を穏やかに洗浄し、付着した菌量を Alamar blue 法で測定した。p < 0.001 vs Control (マンナン 0 mg/ml, n=4)。

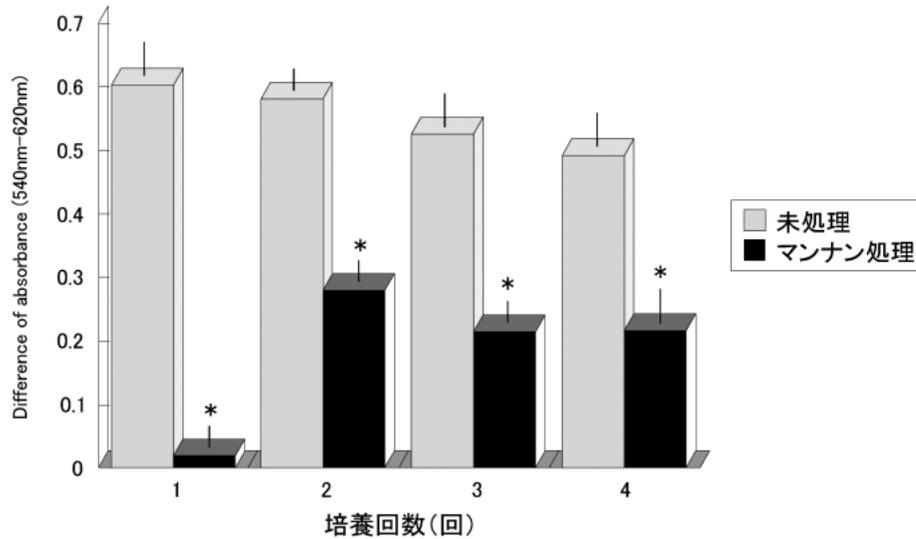


Fig. 5. Stability of Mannan-Coating Plate against Cultivation of *C. albicans*

24 well plastic plate にパン酵母マンナン (1 mg/ml) 1 ml を加え 2 時間処理した後、plate 内を洗浄し、*C. albicans* NIH A207 株懸濁液 (1×10^5 cells/ml in RPMI1640) 1 ml を加え、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下で 24 時間培養した。培養後、plate 内を穏やかに洗浄し、附着した菌量を Alamar blue 法で測定した。その後、plate 内に附着した菌を除去し、*C. albicans* NIH A207 株懸濁液 (1×10^5 cells/ml in RPMI1640) 1 ml を加え、前記と同様に培養と測定を繰り返した。* $p < 0.001$ vs 未処理 ($n=4$)。

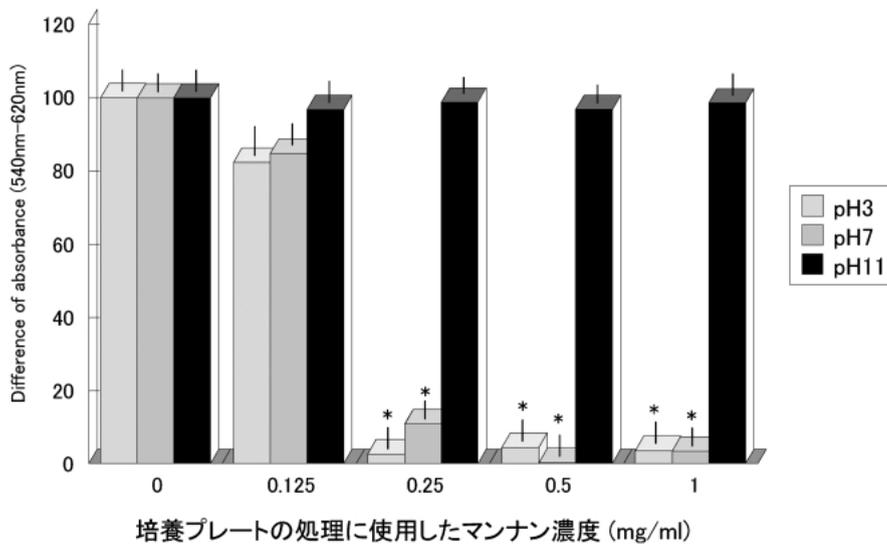


Fig. 6. Adherence of *C. albicans* NIH A207 to Plastic Plate Treated with Yeast Mannan in Several pH Condition

パン酵母マンナンを pH 3, 7, 11 のリン酸緩衝液に溶解 (1 mg/ml) し、この溶液 1 ml を 24 plate plastic plate に加え 2 時間処理した。その後、plate 内を洗浄し、ここに *C. albicans* NIH A207 株懸濁液 (1×10^5 cells/ml in RPMI1640) 1 ml を加え、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下で 24 時間培養した。培養後、plate 内を穏やかに洗浄し、附着した菌量を Alamar blue 法で測定した。* $p < 0.001$ vs Control (マンナン 0 mg/ml, $n=4$)。

内で *C. albicans* を培養し、このプレート内に菌が附着できるか否かの検討を行った。Figure 3 で示したように、マンナン処理したプレートに対しては、*C. albicans* は附着性を示さなかったことから、マンナンが形成する被膜が、*C. albicans* のプレートへの接着を阻害することが明らかになった。

マンナンが、*C. albicans* に直接作用して菌体の接着能力を低下させる可能性も予想されるが、その

効果についての詳細を本研究で明らかにすることはできなかった。しかし、マンナンがプレート内に被膜を形成する時間は、添加後 2 時間以内であるのに対し、RPMI1640 で培養された *C. albicans* が活発に分裂活動を開始するのは、培養開始 4 時間以降であり、菌の増殖が盛んに行われている頃には、既にプレート内に、マンナンによる被膜が形成されていると考えられる。このことから、マンナンによる

C. albicans のプレート付着量低下は被膜形成が主因であり、マンナンが *C. albicans* 付着能力に与える影響は直接関与しないことが推察された。

実験に使用したマンナンは、その構造内にタンパク質を含んだ糖タンパク質である。タンパク質は、プラスチックに対して被膜を形成し易いことから、マンナン以外のタンパク質でも *C. albicans* の接着阻害が起きる可能性が示唆された。そこで、Albumin で前処理したプレートを用いて、*C. albicans* 付着性について検討を行った。また、マンナンの構成糖であるマンノースで処理したプレートについても同様に *C. albicans* の付着性を検討した。その結果、Albumin、マンノース前処理では、*C. albicans* のプレート内への接着を阻害できなかったことから (Fig. 3)、*C. albicans* の接着阻害効果は、タンパク質又は糖だけでは起きない現象であることが明らかになった。マンナンによる *C. albicans* 付着阻害効果が、*C. albicans* NIH A207 株以外の菌株にも有効であるか否かを検討したところ、Fig. 4 で示したように、使用した *C. albicans* すべての株に対して付着阻害が認められ、マンナンの付着阻害効果は *C. albicans* 全般に認められる効果であることが予想された。また、マンナン処理したプレートの *C. albicans* 接着阻害効果の持続性を検討したところ、マンナン処理後のプレートでは、90%以上の菌付着を阻害できたが、同じプレートで *C. albicans* を培養すると、*C. albicans* 付着阻害効果は、約50%まで低下した。しかし、2回目以降の培養では、50%の付着阻害効果が持続されていたことから (Fig. 5)、マンナンにより形成される被膜には、プレートに完全接着した層と、その層にマンナンが混在しているだけの層があることが予想された。被膜の隙間を埋めていただけのマンナンは、1回目の培養で菌と共に除去されるが、プレートに接着した層は、*C. albicans* の培養だけでは分解・剥離されないため、長期間プレート内に保持され、*C. albicans* のプレートへの付着を妨げていることが考えられた。これらの結果から、プラスチック製の医療機器などにマンナン処理を施すことで、*C. albicans* の付着を阻害できる可能性が示唆された。また、*C. albicans* は、歯垢形成の原因の1つであり、本菌の歯への接着を阻害できれば歯垢形成を抑制できると予想されることから、歯へのマンナンコーティングが可能で

あるならば、歯垢形成防止剤としてマンナンを応用できる可能性が示唆された。マンナンの被膜形成に適切な pH 条件を検討したところ、マンナンの被膜形成は中性域から酸性域が良好で、アルカリ性域では、被膜形成効率が低下した (Fig. 6)。口腔内は一般に中性に保たれており、口腔内の環境は、歯にマンナン被膜を形成させるには適当な条件であることが考えられた。アルカリ側で被膜形成ができない理由として、1) マンナンはプレートに静電的に結合しており、マンナンに含まれる酸性基 (COO⁻) などが結合に関与している、又は 2) マンナンのタンパク部分がプレートへの結合に関与しており、アルカリ条件下ではタンパク構造が分解してしまうため被膜が形成されないと予想された。しかし、本研究では被膜形成メカニズムに関する詳細な解析は行うことができなかった。

REFERENCES

- 1) D'Auria F. D., Tecca M., Strippoli V., Salvatore G., Battinelli L., Mazzanti G., *Med. Mycol.*, **43**, 391-396 (2005).
- 2) Hossain H., Ansari F., Schulz-Weidner N., Wetzel W. E., Chakraborty T., Domann E., *Oral Microbiol. Immunol.*, **18**, 302-308 (2003).
- 3) Consolaro M. E., Albertoni T. A., Svidzinski A. E., Peralta R. M., Svidzinski T. I., *Mycopathologia*, **159**, 501-507 (2005).
- 4) Brzozowski T., Zwolinska-Wcislo M., Konturek P. C., Kwiecien S., Drozdowicz D., Konturek S. J., Stachura J., Budak A., Bogdal J., Pawlik W. W., Hahn E. G., *Scand. J. Gastroenterol.*, **40**, 286-296 (2005).
- 5) Kobayashi H., Shibata N., Watanabe M., Komido M., Hashimoto N., Hisamichi K., Suzuki S., *Carbohydr. Res.*, **231**, 317-323 (1992).
- 6) Watanabe T., Takano M., Murakami M., Tanaka H., Matsuhisa A., Nakao N., Mikami T., Suzuki M., Matsumoto T., *Microbiology*, **145**, 689-694 (1999).
- 7) Frank R. M., Steuer P., *J. Prosthet. Dent.*, **53**, 115-124 (1985).
- 8) Jarvensivu A., Hietanen J., Rautemaa R., Sorsa T., Richardson M., *Oral. Dis.*, **10**, 106-112 (2004).