

①

Candida属真菌の固体表面への
付着に関する研究

二川浩樹

学位論文

Candida属真菌の固体表面への付着に関する研究

学位申請者 二川浩樹

広島大学歯学部歯科補綴学第二講座

(主任：浜田泰三教授)

1990年

謝辞

本研究に際し、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った、広島大学歯学部歯科補綴学第二講座浜田泰三教授に深厚なる謝意を表します。また、本研究を進めるに際し、終始御指導、御校閲を頂いた本学口腔生化学講座奥田九一郎教授に深謝致します。同時に御助言、御校閲を頂いた本学歯科保存学第一講座新谷英章教授に謝意を表します。

尚、本研究を行うに当り、御助言、御協力頂いた、能城光秀講師、笛吹恵美子博士、大山義彦先生をはじめとする本学口腔生化学講座の諸氏、本学歯科保存学第一講座佐藤尚毅講師、並びに本学理学部数理統計学講座谷口正信助教授に感謝致します。同時に、重頭直文助教授、玉本光弘講師、貞森紳丞博士をはじめとする歯科補綴学第二講座の方々に感謝致します。

(なお、本研究の一部は、文部省科学研究費 一般研究 C 62570877(1987-88)、一般研究 C 01571066(1989)の援助の下に行った。)

論 文 内 容 要 旨

主論文題名

Candida属真菌の固体表面への付着に関する研究

学位申請者 二川浩樹

Candidaの義歯に対する付着機構の解明は、義歯性口内炎の治療あるいは予防においても重要であると考えられている。このようなCandidaの付着に関して、疎水的相互作用、静電的相互作用などの非特異的付着因子あるいは adhesin-receptor相互作用による特異的付着などの関与が報告されており、in vivoにおける付着では、これらの付着因子が複雑に関与していると考えられる。このため、従来行われている唾液コートしたレジンを被着体とした系などによっては、付着因子の解析が困難であると考えられる。そこで、本実験では、既知の性質を有する修飾ガラスを用いて、Candida 特に、C. albicans および C. tropicalisの付着に関与する因子について検討を行った。

まず、Satouらの方法により作製した4種の修飾ガラスを用いて、Candida 6菌株の固体表面に対する非特異的付着についての検討を行った。その結果、付着は、菌体および被着体表面の物理化学的性質により左右され、疎水性の高い菌株の付着では疎水的相互作用が強く関与し、疎水性の低い菌株では静電的相互作用が重要であることが示唆された。

しかしながら、in vivoにおいては、義歯表面には、唾液タンパクあるいは血清タンパクなど種々のタンパクから構成されるペリクルが存在することが知られている。このように被着体表面にタンパクが吸着している場合には、非特異的付着因子だけでなく、特異的付着因子が同時に関与すると考えられている。従って、数種の唾液タンパクおよび血清タンパクを固定化したガラスを用いて、C. albicansおよびC. tropicalisのタンパクの存在する表面に対する付着について検討した。

その結果、特異的付着においては、菌体表層のマンナンに関与に比べ、被着体表面に存在する糖鎖がより強く関与していることが示唆された。また、C. albicansの付着では、このような被着体表面の糖鎖に対する特異的付着の関与に加えて、静電的相互作用の関与を認めた。

一方、C. tropicalisでは、被着体表面の糖鎖に対する特異的付着の関与に加えて、疎水的相互作用の関与を認めた。このような被着体表面に存在する糖鎖に対する特異的付着をより詳細に検討する目的で、その表面に一種類の糖のみを固定化したガラスを作製し、この2菌株の特異的付着に関与する糖残基の検討を行った。その結果、C. albicansの特異的付着には、マンノース、マンノサミン、ガラクトサミンおよびフコースが、receptorとして関与しており、さらに、付着阻害実験から、これらの糖に対する付着は、boardな特異性によることが示唆された。また、C. tropicalisの特異的付着には、グルコサミンが関与していることが明かとなった。

このように、Candidaの付着において、被着体表面および菌表面の物理化学的性質により疎水的相互作用および静電的相互作用が関与しており、さらに、種々の糖に対する特異的付着も同時に関与していることが明らかとなった。そして、in vivoにおける細胞や義歯へのCandidaの付着は、このような非特異的および特異的付着因子の各菌株における付着への寄与の違いによって左右されていると考えられるため、これらの付着因子の寄与をモデルによって検討した。すなわち、疎水的相互作用の関与を調べる目的で、唾液コートしたレジンとほぼ等しい接触角を示す親水性ガラス群およびレジンとほぼ等しい接触角を示す疎水性ガラス群を作製した。また、特異的付着のモデルとして糖固定化ガラスを、さらに、静電的相互作用の関与を調べる目的で、アミノ基を固定化したガラスを作製し、三元配置分散分析により、この2菌株の付着における疎水的因子、静電的因子および特異的付着因子の寄与率を算出した。その結果、C. albicansの付着においては、静電的相互作用および特異的付着の関与が大きく、C. tropicalisの付着においては、疎水的相互作用が重要であることが示唆された。

以上、Candidaの固体表面に対する付着に関与する因子を検討した結果、その付着には、菌体および被着体表面の性質により非特異的付着因子および特異的付着因子が関与し、特に、C. albicansの付着においては、静電的相互作用および特異的付着因子の関与が重要であり、C. tropicalisの付着においては、疎水的相互作用が、より重要であることが示された。

目次

第 I 章	緒論	1
第 II 章	<u>Candida</u> 属の非特異的付着	3
第 1 節	概要	3
第 2 節	修飾ガラスの作製およびその性質	4
	第 1 項 修飾ガラスの作製	
	第 2 項 修飾ガラスの疎水性	
第 3 節	<u>Candida</u> の培養条件	6
第 4 節	<u>Candida</u> の物理化学的性質	8
	第 1 項 疎水性の測定	
	1) 菌体の接触角測定	
	2) n-アルカン/水 界面への吸着	
	第 2 項 ゼータ電位の測定	
第 5 節	<u>Candida</u> の付着	15
第 6 節	考察	18

第 III 章 Candida albicans および Candida tropicalis の固定化タンパクに対する付着 ----21

第 1 節	概要	21
第 2 節	タンパク固定化ガラスの作製および その性質	22
第 1 項	カルボキシル基固定化ガラスの作製 および活性化	
第 2 項	唾液採取および使用タンパクについて	
第 3 項	タンパク固定化ガラスの作製 および定量	
第 4 項	タンパク固定化ガラスの疎水性	
第 5 項	タンパク固定化ガラスのゼータ電位	
第 3 節	<u>C. albicans</u> および <u>C. tropicalis</u> の付着 ----	28
第 1 項	培養条件	
第 2 項	固定化タンパクに対する付着	
第 3 項	特異的付着に関する検討	
	1) タンパク固定化ガラスのマンナン処理	
	2) タンパク固定化ガラスからの化学的な糖鎖の切断	
第 4 項	付着阻害実験	
第 4 節	考察	42

第 IV 章	<u>Candida albicans</u> および <u>Candida tropicalis</u> の特異的付着	48
第 1 節	概要	48
第 2 節	糖固定化ガラスおよびコントロールガラスの作製およびその性質	49
第 1 項	糖固定化ガラス作製	
第 2 項	コントロールガラス作製	
第 3 項	修飾ガラスの定性および定量	
	1) 定性	
	2) 定量	
第 4 項	修飾ガラスの疎水性	
第 3 節	<u>C. albicans</u> および <u>C. tropicalis</u> の付着	56
第 1 項	使用菌株および培養条件	
第 2 項	付着実験	
第 4 節	糖付着阻害実験	61
第 5 節	考察	63

第 V 章 Candida albicans および Candida tropicalis の非特異的および特異的付着70

第 1 節 概要70

第 2 節 修飾ガラスの作製およびその性質71

第 1 項 コントロールガラス作製

第 2 項 カルボキシル基固定化ガラス作製

第 3 項 アミノ基固定化ガラス作製

第 4 項 糖固定化ガラス作製

第 5 項 糖およびアミノ基固定化ガラス作製

第 6 項 修飾ガラスの定性および定量

第 7 項 修飾ガラスの疎水性

第 3 節 C. albicans および C. tropicalis の付着80

第 1 項 培養条件

第 2 項 付着に対する付着因子の寄与

第 4 節 考察86

第 VI 章 結果の要約 -----89

第 VII 章 考察 -----91

試薬 -----96

参考文献 -----98

本実験において用いた略号

AMP-glass	アミノプロピールガラス
HA-glass	ヘキシルアルデヒド固定化ガラス
GA-glass	グリオキシル酸固定化ガラス
GL-glass	グルコース固定化ガラス
Saliva-glass	唾液固定化ガラス
Mucin-glass	ムチン固定化ガラス
Serum-glass	血清固定化ガラス
BSA-glass	アルブミン固定化ガラス
Lysozyme-glass	リゾチーム固定化ガラス
Fibrinogen-glass	フィブリノーゲン固定化ガラス
γ -Globulin-glass	γ -グロブリン固定化ガラス
ConA-glass	コンカナバリンA固定化ガラス
pAPG	パラアミノフェニル-0-グリコシド誘 導体
AS	アミノ糖
RA-glass	レソルシルアルデヒド固定化ガラス
Glc-glass	パラアミノフェニル- β -D-グルコピ ラノシド固定化ガラス
Gal-glass	パラアミノフェニル- β -D-ガラクト ピラノシド固定化ガラス
Fuc-glass	パラアミノフェニル- β -D-フルクト ピラノシド固定化ガラス
Man-glass	パラアミノフェニル- α -D-マンノピ ラノシド固定化ガラス

HCHO-glass	ホルムアルデヒド固定化ガラス
GlcN-glass	グルコサミン固定化ガラス
GalN-glass	ガラクトサミン固定化ガラス
ManN-glass	マンノサミン固定化ガラス
GlcNAc	<u>N</u> -アセチルグルコサミン
GalNAc	<u>N</u> -アセチルガラクトサミン
EDA-glass	エチレンジアミン固定化ガラス
AA-glass	アセトアルデヒド固定化ガラス
ABA-glass	アセト酪酸固定化ガラス
AEDA-glass	疎水性エチレンジアミン固定化ガラス
AGlcN-glass	疎水性グルコサミン固定化ガラス
AManN-glass	疎水性マンノサミン固定化ガラス
GA-Lys-glass	<u>N</u> - ϵ -ベンジルオキシカルボニル-L-リジン固定化ガラス
ABA-Lys-glass	疎水性 <u>N</u> - ϵ -ベンジルオキシカルボニル-L-リジン固定化ガラス
GEG-glass	グルコサミン, リジン固定化ガラス
AEG-glass	疎水性グルコサミン, リジン固定化ガラス
GEM-glass	マンノサミン, リジン固定化ガラス
AEM-glass	疎水性マンノサミン, リジン固定化ガラス

第 I 章 緒論

義歯性口内炎は、総義歯、部分床義歯、床矯正装置などの可撤性床装置と関連した床下粘膜の一種の炎症である^{1, 2}。義歯性口内炎の患者のデンチャー プラークからは、種々の Candida が検出され³⁻¹⁰、また、Candida を塗布した実験床によって義歯性口内炎がおこされることから^{11, 12}、Candida が義歯性口内炎の原因菌であるとされている^{1-5, 13}。このような、義歯性口内炎の患者では、Candida は、床下粘膜よりも、むしろ、義歯床粘膜面からの分離頻度が高く^{3, 4}、また、粘膜中への侵入は認められていないことから^{8, 13, 14}、義歯床表面に存在する Candida が、義歯性口内炎において、より重要な役割を果していると考えられている。従って、義歯性口内炎の治療は、義歯から効果的にプラークを取り去ることにより達成されると考えられ^{5, 15-17}、Candida の義歯に対する付着機構の解明は、義歯性口内炎の治療あるいは予防において非常に重要である。しかしながら、Candida の付着機構については、未だ、十分な解析がされておらず、さらに、デンチャー プラークの形成に先立つデンチャー ペリクルは、歯牙表面のペリクルの組成とは異っており¹⁸⁻²²、Candida が、他の口腔内微生物と異なる付着機構を有すると考えられる。このような Candida の付着は、in vitro の系においては、各種床用材料²³⁻³¹、ポリスチレンなどのプラスチック³²⁻³⁴、上皮細胞³⁵⁻⁵⁸ あ

るいはfibrin clots^{57, 58}を被着体として検討され、固体表面に対する付着においては、疎水的相互作用などの非特異的付着が重要であり^{27, 28, 31, 33, 59-61}、細胞に対する付着では、被着体表面に存在するreceptorに対する特異的付着が重要であることが報告されている^{37, 39, 40, 44-46, 48-51, 53-55, 59-63}。in vivoでは、義歯表面には、唾液、浸出液などの成分が吸着し、ペリクルが形成される。このような、ペリクルに対する付着は、唾液あるいは血清によりコートしたレジン被着体としたモデルによって検討されており^{24, 25, 28, 30, 31}、Candidaのペリクルに対する付着機構については、熱動力学に基づく疎水的相互作用の関与が報告されている^{28, 31, 59-61}。しかし、ペリクルを構成する唾液および血清タンパクは、疎水性、親水性、塩基性および酸性アミノ酸により構成され、さらに、その多くが糖タンパクである。従って、Candidaのペリクルに対する付着においては、疎水的相互作用だけでなく、静電的相互作用、特異的付着も同時に関与していると考えられるが、このような種々の因子が複雑に関与しているために、Candidaの付着機構の解析が困難となっている。

著者は、Candidaの固体表面に対する付着に関与する因子を、修飾ガラスおよびタンパクを固定化したガラスを用いて、単純化したモデルにより検討を行った。

第 II 章 Candida属の非特異的付着

第 1 節 概要

微生物の宿主細胞や固体表面への付着は、病原性発現の第一段階であり感染成立において重要な因子と考えられている。このような微生物の付着機構として、疎水的相互作用、London van der Waals 力、静電的相互作用といった物理化学的因子および adhesin-receptor interaction による特異的付着の関与が報告されている⁵⁹⁻⁷⁴。Candidaの固体表面への付着においては、非特異的な付着が重要であると考えられており、特に、疎水的相互作用の関与が重要であると考えられている^{27, 28, 31, 33, 59-61}。しかしながら、静電的相互作用の関与を報告するものもある^{25, 33}。さらに、ペリクルの存在により被着体表面の性質が変化するため⁶⁰、すなわち、疎水性の低下³¹、あるいは、デンチャーペリクル中に塩基性アミノ酸が多く含まれていること²⁰⁻²²などから、疎水的相互作用と同時に静電的相互作用も関与していると考えられる。そこで、本実験では、ガラス面に-NH₂基、-OH基、-COOH基および疎水基を固定化した修飾ガラスを用いて系をより単純化し、Candida属の固体表面への非特異的付着に関与する因子を明らかにすることを目的として行った。

第2節 修飾ガラスの作製およびその性質

第1項 修飾ガラスの作製

Satouら⁷⁵の方法に従い、スライドガラス (Micro slide glass, 白縁磨No.1, マツナミ社製, Kyoto) を、4% (vol/vol) γ -アミノプロピルトリエトキシシラン無水アセトン溶液によりアルキルシラン化したアミノプロピルガラス (以下AMP-glassと略す) を作製した (図 1-a)。このAMP-glassをグリオキシル酸、グルコースおよびヘキシルアルデヒドの3種のアルデヒド化合物の5% (wt/vol) 溶液 (グリオキシル酸、グルコースは水溶液、ヘキシルアルデヒドはテトラヒドロフラン溶液を用いる) により処理後、還元し、中性領域で $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ 基と $-\text{NH}_3^+$ 基をもつグリオキシル酸固定化ガラス (GA-glass; 図 1-b)、 $-\text{CH}_2-(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$ 基および $-\text{NH}_3^+$ 基をもつグルコース固定化ガラス (GL-glass; 図 1-c) および $-(\text{CH}_2)_6$ 基および $-\text{NH}_3^+$ 基をもつヘキシルアルデヒド固定化ガラス (HA-glass; 図 1-d) を作製した。

第2項 修飾ガラスの疎水性

第1項に示す手順に従って作製した修飾ガラスの疎水性を、蒸留水に対するYoungの接触角を室温20℃湿度55%下で、コンタクトアングルメーターを用いて測定するこ

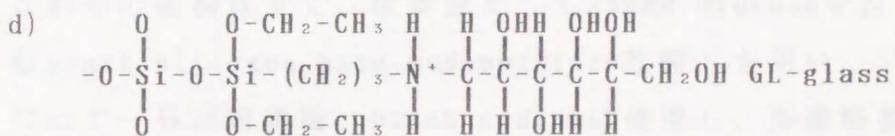
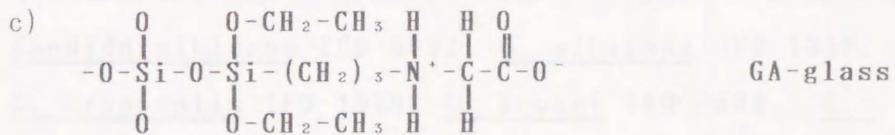
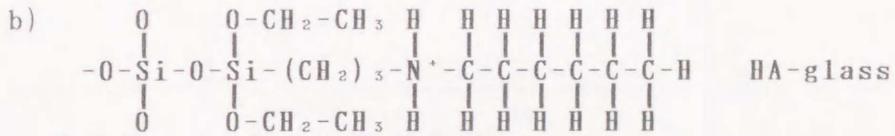
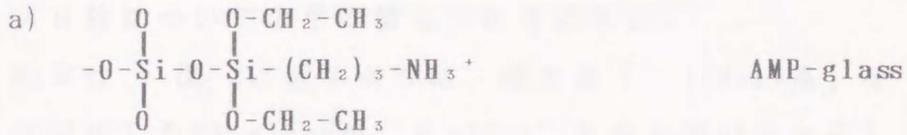


図 1 各修飾ガラスの構造

とにより検討した。接触角は、1試料につき、3点計測し、その平均値を、その試料の代表値とし、各修飾ガラス6枚についての平均値±S.D.を求めた。

結果は、図2に示すように、疎水基[$-(CH_2)_6$ 基]を固定化したHA-glassが、 $\theta = 77.2^\circ$ と最も高い値を示し、以下、AMP-glass、GA-glassと小さくなり、水酸基を固定化したGL-glassが最小の $\theta = 31.7^\circ$ であった。

第3節 Candidaの培養条件

本実験においては、財団法人発酵学研究所から購入した、Candida albicans IF0 0692, C. albicans IF0 1385, C. tropicalis IF0 1070, C. krusei IF0 0584, C. parapsilosis IF0 0640 および C. glabrata IF0 0005の6菌株を用いた。

これらの菌株は全て、炭素源として250mM glucoseを含むyeast nitrogen base medium(Difco社製)を用い、37℃にて一昼夜培養後、batch mediumに接種し、振盪培養(150rpm)を行った。菌体は、対数増殖期後期に集菌し10mM phosphate buffered saline (pH 7.2 PBS)で2回洗浄し、同buffer中に懸濁した。菌濃度は、修飾ガラスへの付着実験においては、 1.1×10^7 cells/ml、n-アルカン/水界面への吸着実験においては、 2.0×10^7 cells/mlに

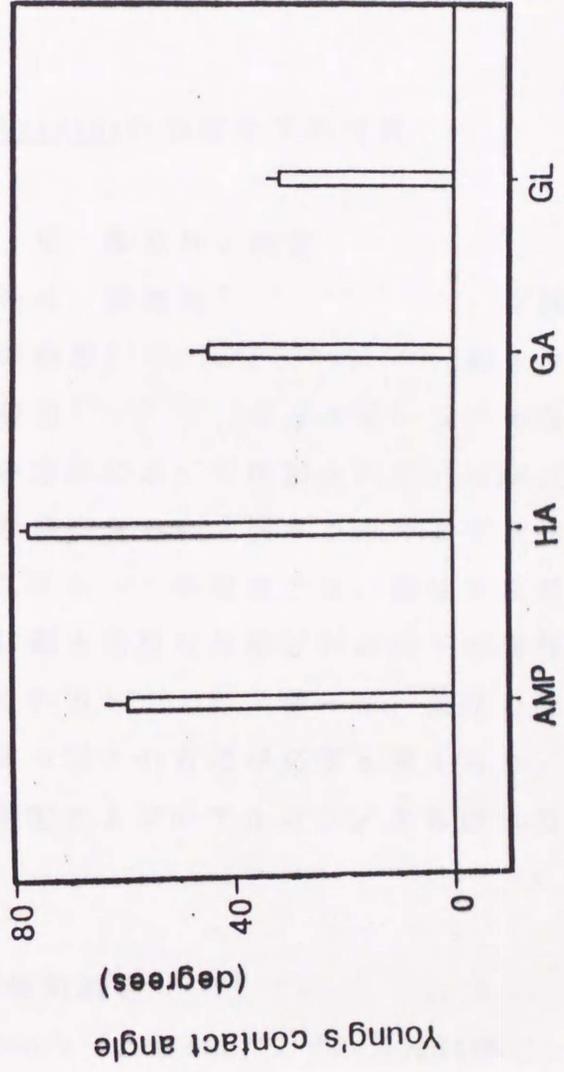


図 2 各修飾ガラスの Young の接触角

spectrophotometerを用いて波長560nmにおける濁度を測定し、調整した。

第4節 Candidaの物理化学的性質

第1項 疎水性の測定

菌体の疎水性は、接触角^{27, 31, 33, 76-79}、2液分配法(油/水界面への吸着)^{28, 33, 56, 78, 80-88}、疎水クロマトグラフィへの吸着^{47, 89-91}、ポリスチレンへの吸着^{32, 92, 93}など種々の方法によって検討されているが、規格化が行われていない。さらに、疎水クロマトグラフィへの吸着、ポリスチレンへの吸着では、菌体と吸着体との間の相互作用に疎水的相互作用以外の因子が関与する可能性が言われている^{33, 34, 60}。従って、菌体の疎水性を検討する上で2つ以上の方法が必要と考えられ、本実験では、接触角測定およびn-アルカン/水界面への吸着法を用いた。

1) 菌体の接触角測定

菌体を、Satouら⁷⁵、Minagiら⁷⁸の方法に準じ、PBS bufferで2回洗浄後、 ϕ 47mmのニトロセルロース製メンブレンフィルター(pore size 1.0 μ m, ADVANTEC TOYO)上に集菌し、デシケーター中にて一昼夜乾燥後、蒸留水に対

する接触角を、第3節と同様の方法により、1菌株につき6点測定し、その測定値から、平均値±S.D.を算出した。

その結果、図3に示すように、C. tropicalisが、最も高い値を示し、以下 C. krusei, C. parapsilosis, C. glabrata と低くなり、C. albicans 2菌株が最も低い値を示した。

2) n-アルカン/水 界面への吸着

Minagiら⁷⁾の方法に準じ、各菌株のn-アルカン/水 界面への吸着を検討した。すなわち、 2.0×10^7 cells/mlに調整した菌懸濁液 2.5mlに、n-アルカン(n-ヘキサン、n-オクタンまたは、n-ヘキサデカン)0.5mlを加え、ボルテックスミキサーにて、60sec攪拌した。2相に分離後、直接、下層の菌懸濁液の吸光度(OD₅₆₀)を測定し、吸着率を下式により求めた。

$$\text{吸着率(\%)} = (\text{vortex後のOD}_{560} / \text{vortex前のOD}_{560}) \times 100$$

n-アルカン/水 界面への吸着率を、図4に示す。Candida属の、3種のn-アルカンに対する吸着率は、同様の傾向を示し、各菌株ともn-ヘキサン/水 界面に最も多く吸着し、n-ヘキサデカン/水 界面への吸着率が最小であった。また、n-アルカン/水 界面への吸着率から

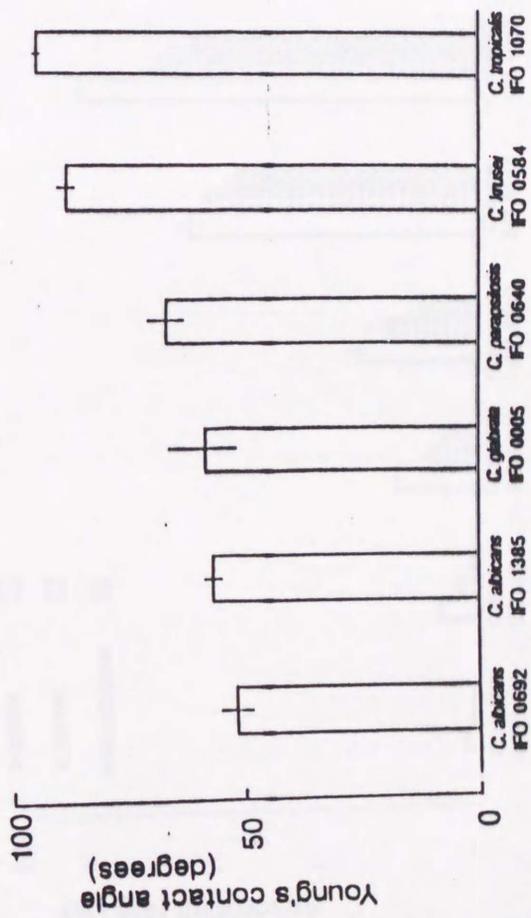


図 3 *Candida* 各菌株の Young の接触角

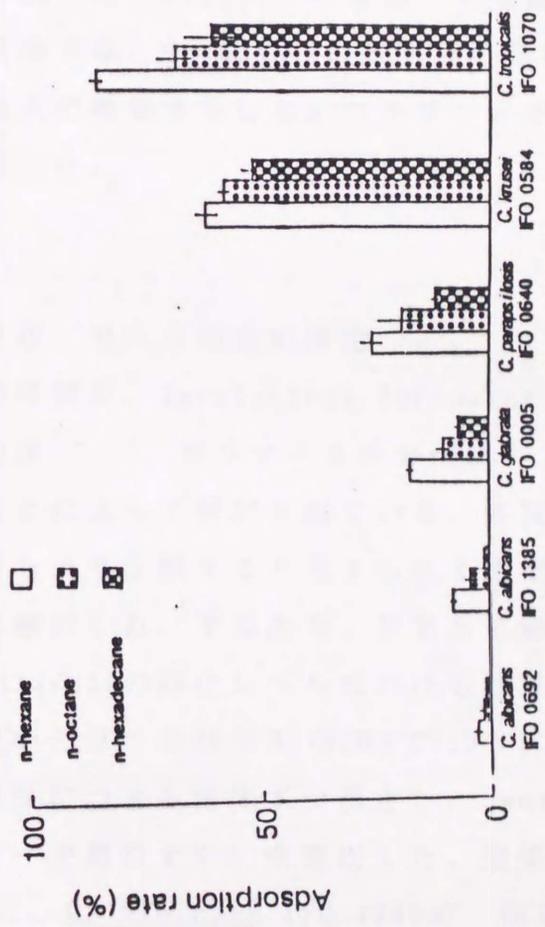


図 4 *Candida* 各菌株の n-アールカン / 水 界面への吸着率

求めた菌株の疎水性の順序は、菌体の接触角のデータと一致し、さらに、各菌株の接触角とn-ヘキサン/水界面への吸着率とのあいだには、有意な相関がみられた(図5)。この結果は、Minagiらの報告⁷²と類似した結果であり、本実験では、Candida属の疎水性の指標として各菌株とも最大の吸着を示したn-ヘキサン/水界面への吸着率を用いた。

第2項 ゼータ電位の測定

菌体の電氣的性質は、Isoelectric focusing^{94,95}、顕微鏡電気泳動法^{96,97}、ポリマー2液分配法⁹⁸、濾紙電気泳動法⁹⁹などによって検討されている。本実験では、菌表面の電位をより反映すると考えられる顕微鏡電気泳動法を用いて検討した。すなわち、PBSに懸濁した菌(1.0×10^7 cells/ml)の静止レベルにおける泳動速度を、白金電極のついたガラス製セル(5.0×27.9×0.403mm)を用いて、各菌株につき8菌体ずつ測定し、Smoluchowskiの式によりゼータ電位±S.D.を算出した。結果は、図6に示すように、C. albicans IFO 1385が、他菌に比べ有意に大きい負の値を示した。

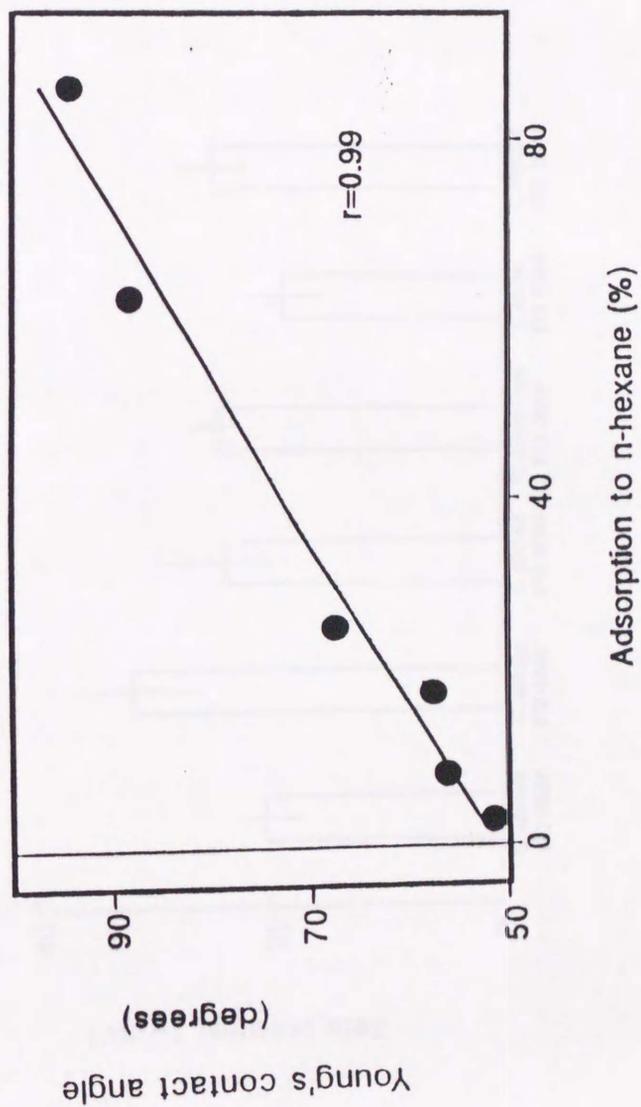


図 5 Candida各菌株の n-へキサン / 水 界面への吸着率と Young の接触角との相関

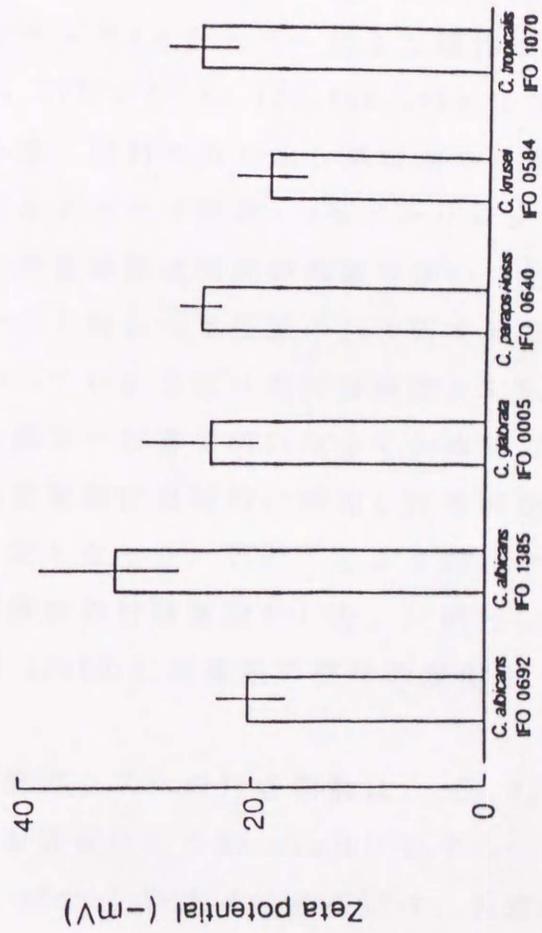


図 6 *Candida* 各菌株のゼータ電位

第5節 Candidaの付着

4種の修飾ガラスを1000mlビーカーの内壁に沿って固定し、菌懸濁液 300ml (1.1×10^7 cells/ml)をビーカーに分注しマグネチック スターラーにより攪拌しながら (200r.p.m.)、37°Cで45, 90, 120, 150, 180および240minインキュベート後、試料を取り出し蒸留水で洗浄後、2.5%グルタルアルデヒドで固定、1%アクリジンオレンジで染色した。付着菌数は蛍光顕微鏡を用いて倍率100倍で各修飾ガラス1枚につき任意の10視野を測定し、6枚の試料片について 1cm^2 当たりの付着菌数 \pm S.D.を求めた。各菌株とも、第II~IV章で用いた全ての修飾ガラスに対して、その付着菌数は直線的に増加し付着開始後150minまでにほぼ一定となった。このことより以後の実験では、180min値を各菌株の付着菌数とした。一例としてC. albicans IF0 1385の付着菌数の経時的变化を 図 7に示す。

各菌株の各修飾ガラスへの付着菌数は、 図 8に示すように、疎水基を固定化したHA-glassに対する付着が、疎水性の低いGL-glassに対する付着に比べ、有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。また、各菌株とも、カルボキシル基を固定化したGA-glassに対する付着に比べ、アミノ基を固定化したAMP-glassに対する付着菌数が有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。

Adherence of *C. albicans* IFO 1385

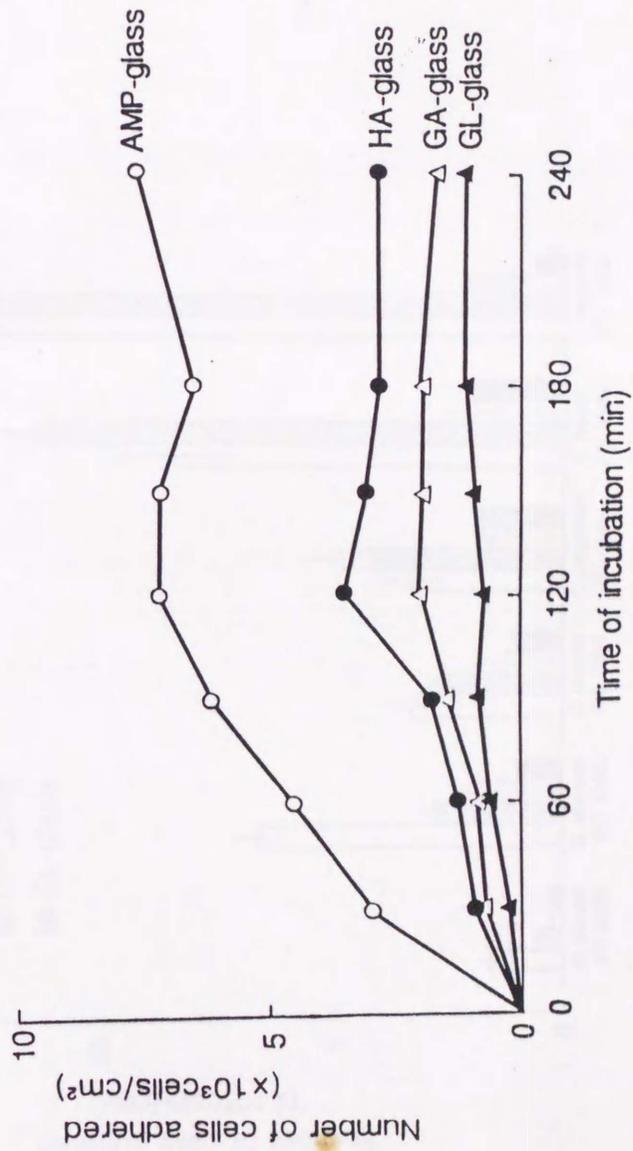


図 7 4 種類の修飾ガラスに対する *C. albicans* の付着菌数の経時的変化

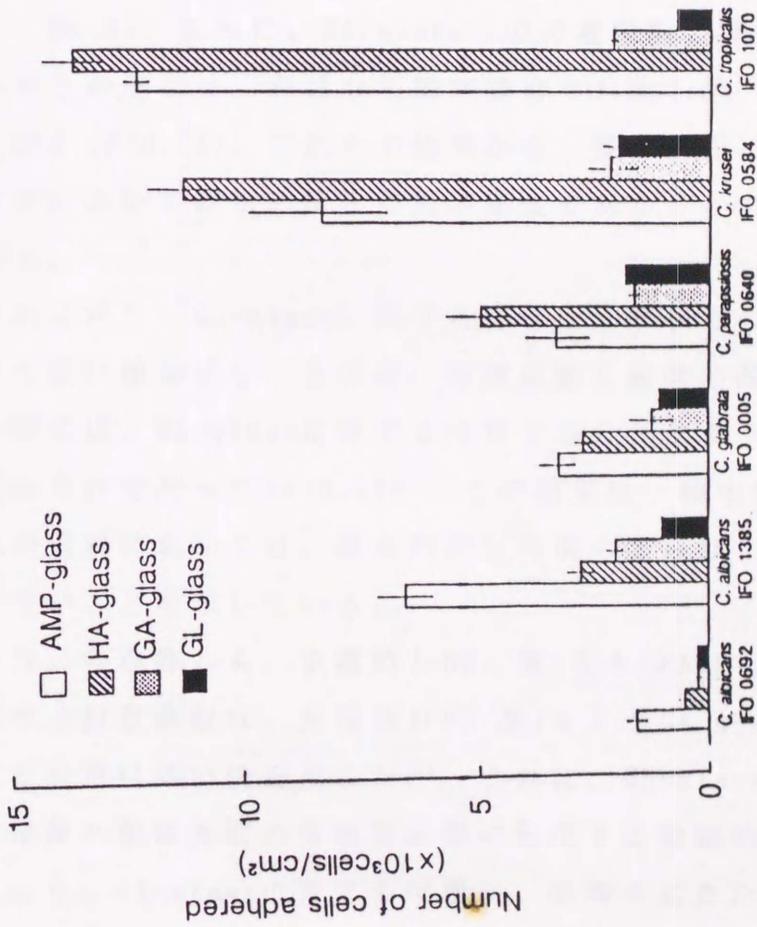


図 8 *Candida* 各菌株の付着実験の結果

第6節 考察

各菌株とも疎水性の高いHA-glassに対する付着は疎水性の低いGL-glassに対する付着に比べ有意に高い値を示した(図8)。さらに、HA-glassへの付着菌数と菌体の疎水性との間には、有意な相関が認められた(図9; $r=0.989$; $P<0.01$)。これらの結果から、疎水表面に対する付着において疎水的相互作用が重要であることが示唆された。

これに対し、GL-glassに対する付着は、すべての菌において低い値を示し、さらに、付着菌数と菌体の疎水性との間には、HA-glassに対する付着でみられたような相関はみられなかった($r=0.222$)。この結果は、親水性表面への付着においては、疎水的相互作用の関与は、ほとんどないことを示している。

一方、各菌株とも、正電荷($-NH_3^+$ 基)をもつAMP-glassに対する付着菌数は、負電荷(COO^- 基)をもつGA-glassに比べて有意に高い値を示したが、これは、GA-glass表面の負電荷と菌体表面の負電荷の間に作用する静電的反発力により、GA-glassに対する付着が、妨害されたためと考えられる。

さらに、疎水性の高い菌株の付着においては、HA-glassに対する付着菌数が最も高い値を示し、疎水性の低い菌株の付着においては、AMP-glassに対する付着が、HA-

HA-glass (●); $r=0.99$

GL-glass (▲); $r=0.27$

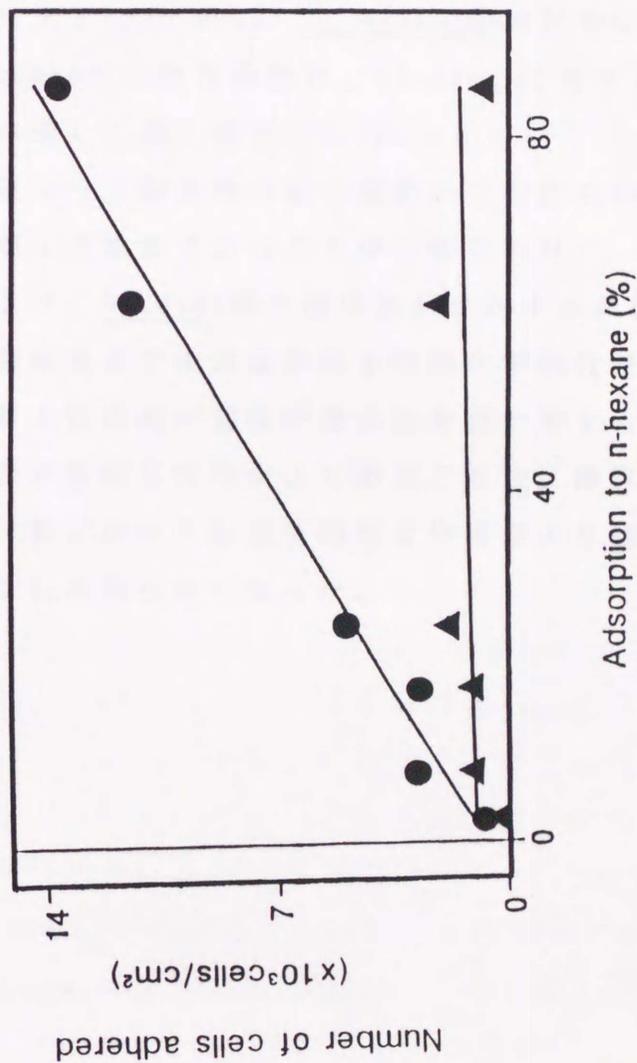


図 9 *Candida* 各菌株の n-ヘキサンの水界面への吸着率と HA-glass および GL-glass に対する付着菌数との相関

glassに対する付着に比べ有意に高い値を示した。特に、最も大きいゼータ電位を示す(IFO 1385)あるいは、最も低い疎水性を示す(IFO 0692) C. albicansの付着においては、AMP-glassへの付着菌数は、HA-glassに対する付着菌数に比べ著しく高い値を示した。

これらの結果より、疎水性の低い菌株の付着においては、静電的引力がより重要であることが示唆された。

以上の結果より、Candida属の固体表面に対する非特異的付着は、菌体および被着体表面の物理化学的性質により変化し、疎水性の高い菌株の疎水性表面に対する付着においては疎水的相互作用がより重要であり、疎水性の低い菌株の付着においては静電的相互作用がより強く関与していることが明らかとなった。

第 III 章 Candida albicans および Candida tropicalis の固定化タンパクに対する付着

第 1 節 概要

第 II 章において、Candida の非特異的付着を検討した結果、その付着は、菌体および被着体表面の物理化学的性質により左右され、疎水的相互作用および静電的相互作用の両者が関与していることが明らかとなった。

しかしながら、義歯表面には、唾液タンパクあるいは血清タンパクから構成されるペリクルが存在することが知られている。このようなペリクルは、構成する唾液および血清タンパクの種類により物理化学的性質は異なり、また、異なる糖鎖が存在すると考えられる。このため Candida のペリクルに対する付着においては、疎水的相互作用、静電的相互作用が、より複雑に関与していると考えられる。さらに、非生物学的表面に対する付着においても、ペリクルの存在により、特異的付着が同時に関与すると考えられている^{80, 88}。従来行われている

in vivo、細胞あるいは唾液によってコートした被着体を用いた系においては、細胞表面やタンパク分子に種々の糖鎖が存在するため¹⁰⁰⁻¹⁰²、また、付着実験中に形成させた人工ペリクルが脱離することがあるため、解析が困難であると考えられる。従って、本実験では、数種の唾液タンパクおよび血清タンパクを固定化したガラス

を用いて系の単純化をはかり、C. albicansおよびC. tropicalisのタンパクの存在する被着体表面に対する付着機構について研究した。

第2節 タンパク固定化ガラスの作製およびその性質

第1項 カルボキシル基固定化ガラスの作製 および活性化

第II章と同様の方法により、AMP-glassを、5% (wt/vol) グリオキシル酸水溶液により室温にて2h処理を行い、0.4% (wt/vol) NaBH₄により室温にて24h還元し、カルボキシル基を固定化したGA-glassを作製した。

このようにして作製したGA-glassのカルボキシル基を、Cuatrecasas¹⁰⁵の方法に基づき活性化を行った。すなわち、GA-glassを0.1M N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド存在下にて、0.1M N-ヒドロキシスクシンイミドジオキサン溶液により、室温にて70min処理を行い、ジオキサン続いてメタノールで十分に洗浄し、80℃ 1h乾燥し活性化GA-glassを作製した。

第2項 唾液採取および使用タンパクについて
Clark & Gibbons¹⁰⁴およびGibbonsら¹⁰⁵の方法に準じて、一人のドナー（成人男性）から、氷上にて安静時全唾液

を採取し、60℃、30minにてインキュベートして酵素類の失活を行い、12000×gにて10min冷却遠心し、その上澄を固定化に用いた。この他のタンパクとして、ムチン、血清、アルブミン、フィブリノーゲン、γ-グロブリン (Sigma Chemical Co., USA) およびリゾチーム (Seikagaku Kogyo Co., LTD.) を用いた。表 1 に、使用タンパクおよびその由来を示す。

第3項 タンパク固定化ガラスの作製および 定量

第1項の手順により作製した活性化GA-glassを、種々の濃度で唾液タンパクを含む0.1M NaHCO₃溶液により異なる pH下で150min処理することによりタンパクを固定化し、続いて0.5M NaClを含む0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0)により室温で1h処理し、活性化カルボキシル基のブロッキングおよび非特異的に吸着したタンパクの除去を行った。

このようにして作製したタンパク固定化ガラス表面のタンパクの固定化量をBCA Protein Assay Reagent (Pierce Chemical Co., 111., USA)により定量を行った。すなわち、タンパク固定化ガラスを、粉碎し、BCA試薬と共に60℃ 1hインキュベート後、562nmの波長で溶液の吸光度を測定し、bovine serum albumin (BSA)を用いて作製した検量線により固定化タンパク量を求めた。

表 1 使用タンパク、その由来および固定化量

Proteins	Origins	Amount of proteins immobilized
saliva	Human whole saliva	$1.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
mucin	Bovine submaxillary glands	$1.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
serum	Human whole serum	$1.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
albumin	Bovine serum	$1.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
lysozyme	Chicken egg white	$1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
fibrinogen	Human plasma	$2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
γ -globulin	Human plasma	$2.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

唾液タンパクの固定化量はpH 8.2における固定化条件で最も高く(図 10)、また、図 10に示すように、唾液の固定化は、100倍、200倍および400倍希釈の唾液を用いて検討した結果、固定化量は、200倍希釈以上の濃度でほぼ一定となったため、pH 8.2において、100倍希釈の唾液による固定化を行った。従って、この他のタンパクの固定化もpH 8.2において行った。

タンパクの固定化量と処理濃度の関係を調べるため100倍～10000倍希釈した血清を用いて行った所、固定化量は、1000倍希釈以上の濃度でほぼ一定となったため、100倍希釈の血清による固定化を行った。なお唾液および血清原液の総タンパク濃度は、それぞれ $2493 \mu\text{g/ml}$ および 95.45mg/ml であった。

この他のタンパクについては、10, 50, 500 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で検討した結果、各タンパクとも50 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で固定化量が、ほぼ一定値を示した(図 11)。従って、500 $\mu\text{g/ml}$ の濃度により固定化を行った。

表 1 にタンパク固定化ガラスへの固定化タンパク量を示す。

第4項 タンパク固定化ガラスの疎水性

各修飾ガラスの蒸留水に対する接触角を第II章と同様の方法により測定した。

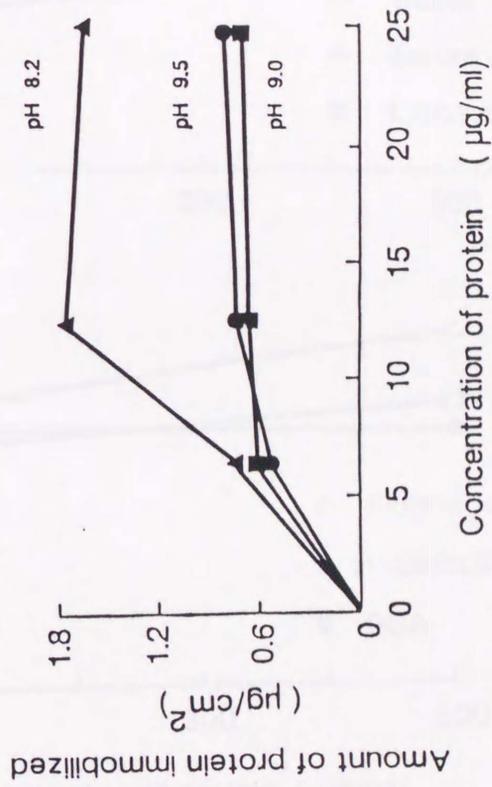


図 10 唾液タンパク固定化ガラスの固定化条件
—処理濃度およびpHの影響—

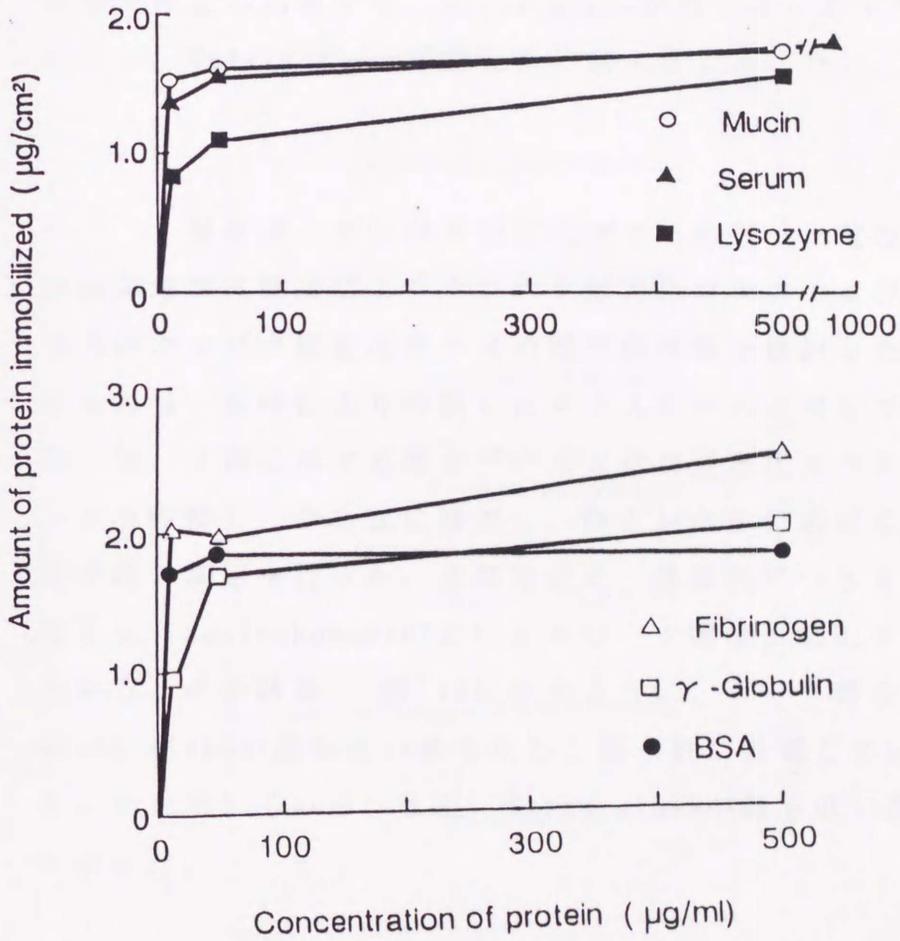


図 11 処理濃度とタンパク固定化量との関係

各タンパク固定化ガラスの接触角を 図 12 に示す。
接触角測定の結果から、Mucin-glassが最も高い疎水性を示し、Saliva-glassが最も低い疎水性を示した。

第 5 項 タンパク固定化ガラスのゼータ電位
顕微鏡電気泳動法によりタンパク固定化ガラスおよび糖鎖切断タンパク固定化ガラスの電氣的性質を検討した。すなわち、粉碎により作製したガラスビーズに対して、第 3 項、4 項に示す処理を行いタンパク固定化ガラスビーズを作製し、PBS に懸濁し、静止レベルにおける泳動速度の測定を行った。泳動速度は、各試料につき 8 回測定し、Smoluchowski の式によりゼータ電位 \pm S.D. を算出した。その結果、図 13 に示すように、ゼータ電位は Mucin-glass が最も高い値を示し、最も負に帯電していることを示している。また、Serum-glass が最も低い値を示した。

第 3 節 C. albicans および C. tropicalis の付着

第 1 項 菌株および培養条件

義歯性口内炎患者の義歯床粘膜面からの Candida の分離頻度は、報告者により若干の違いはあるが、C. albi-

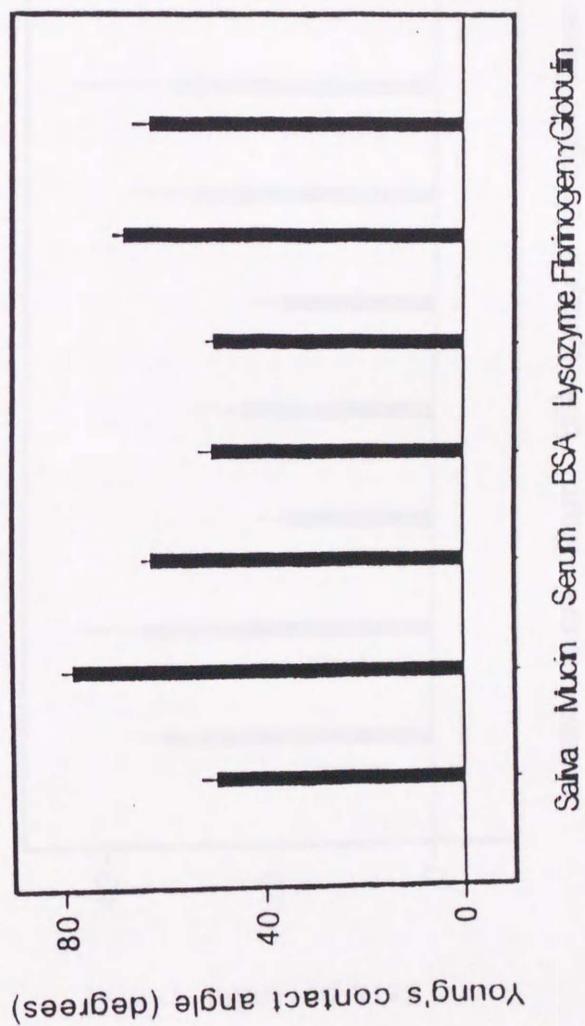


図 12 各タンパク固定化ガラスの Young の接触角

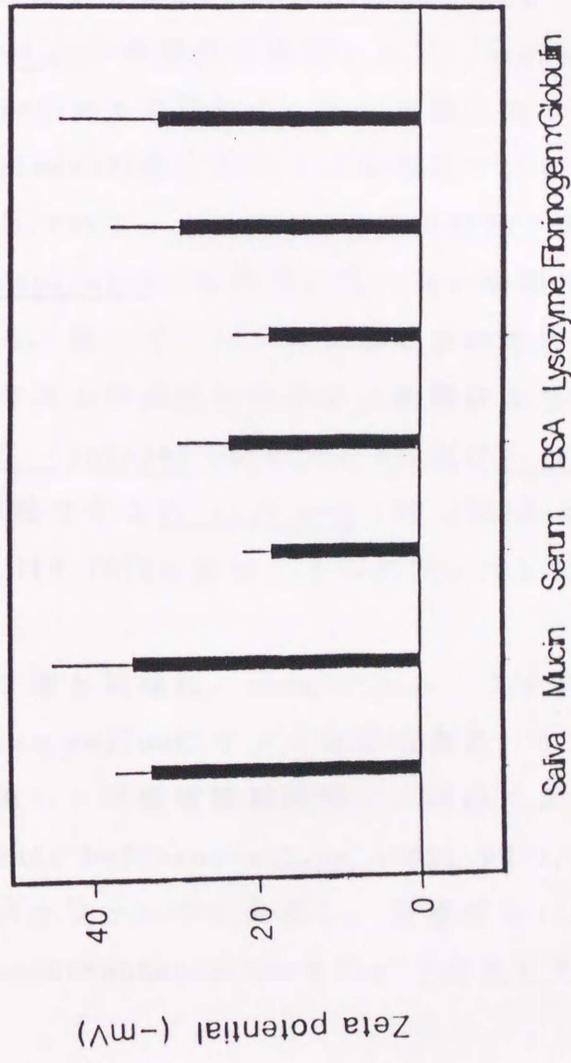


図 13 各タンパク固定化ガラスのゼータ電位

cans serotype Aが最も高く、次いでC. glabrata、C. tropicalisが高いとされている^{3, 4, 8-8}。また、Oddsは^{61, 108}、Candidaの病原性の指標として、hypha形成能、phagocytosisに対する抵抗性、宿主細胞に対する付着能およびproteinaseの産生能の4点を挙げている。そして、この基準に基づいて、C. albicansの病原性が最も高く、次いでC. tropicalisが他菌株に比べ高い病原性を示すと述べている。従って、以下の実験においては、義菌からの分離頻度および病原性の点で、他菌株よりも重要と考えられるC. albicans serotype AおよびC. tropicalisの標準株であるC. albicans IF0 1385および、C. tropicalis IF0 1070を用い、その付着について検討を加えた。

菌株は、第II章と同様に、250mMグルコースを含むyeast nitrogen base mediumにて、一昼夜培養後、Batch mediumに接種し、対数増殖期後期に、遠心により集菌後10mM Phosphate buffered saline (PBS; pH 7.2)にて2回洗浄後同バッファー中に懸濁し、菌濃度を 1.0×10^7 cells/mlにspectrophotometerを用いて調整した。

第2項 固定化タンパクに対する付着

第II章と同様の方法にて行った。すなわち、1000mlビーカーの壁面に沿って底面に垂直に修飾ガラスを保持し300mlの菌懸濁液を注入後200rpmで攪拌しながら37℃に

て3hインキュベートした。水洗後、グルタルアルデヒドで固定、アクリジンオレンジで染色後、蛍光顕微鏡下で1枚につき任意の20視野をカウントし、第Ⅲ章第2項と同様に、各修飾ガラスの単位面積当りの付着菌数を求め、4枚の試料について平均付着菌数を求めた。各付着実験は2回繰返して行い、各菌株の各修飾ガラスに対する平均付着菌数±S.E.を求めた。

第Ⅱ章で示唆された非特異的付着因子の付着への関与を検討する目的で、タンパク固定化ガラスの接触角あるいはゼータ電位とC. albicansおよびC. tropicalisの付着菌数との相関を検討した結果、図 14.15に示すように、C. albicansおよびC. tropicalisの両菌株の付着において、被着体表面の物理化学的性質と付着菌数との間に有意な相関は認められなかった。これは、Candidaのタンパクの存在する表面に対する付着において、非特異的付着のみならず、特異的付着が関与しているためであろうと考えられた。このような Candidaの特異的付着については、Candidaの菌体表層成分であるマンナン、マンノプロテイン、キチンなどのadhesinの関与^{37-41, 44, 45, 49-51, 55, 57, 59-63}、および糖阻害実験によりreceptorとして多くの単糖およびアミノ糖が報告されている^{37, 39, 40, 50, 59-63}。従って、このような特異的因子の関与についての検討を行った。

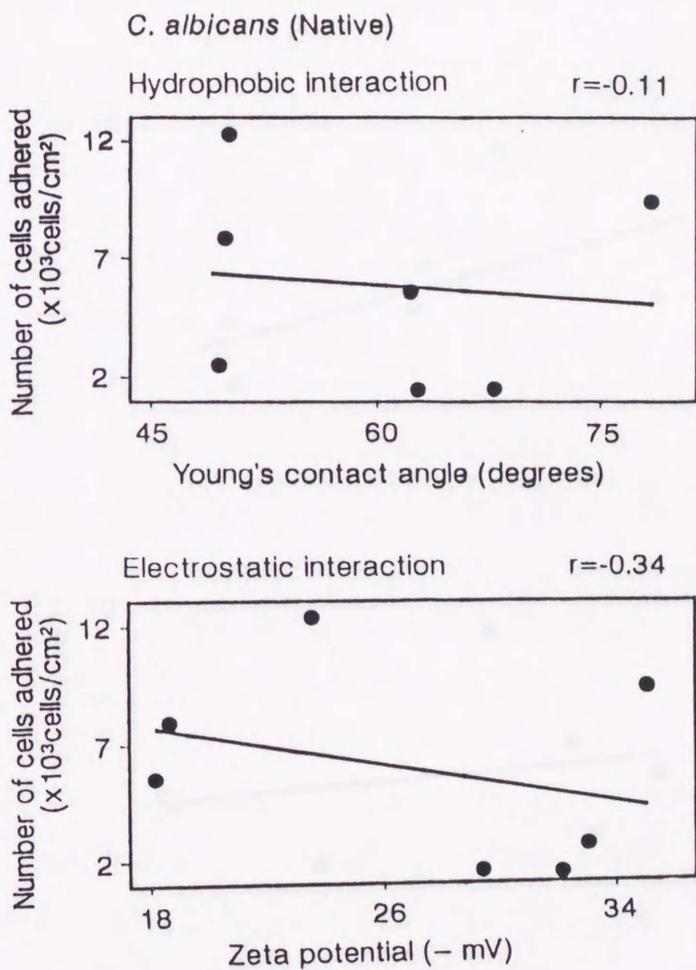


図 14 タンパク固定化ガラスの Young の接触角およびゼータ電位と *C. albicans* の付着菌数との相関

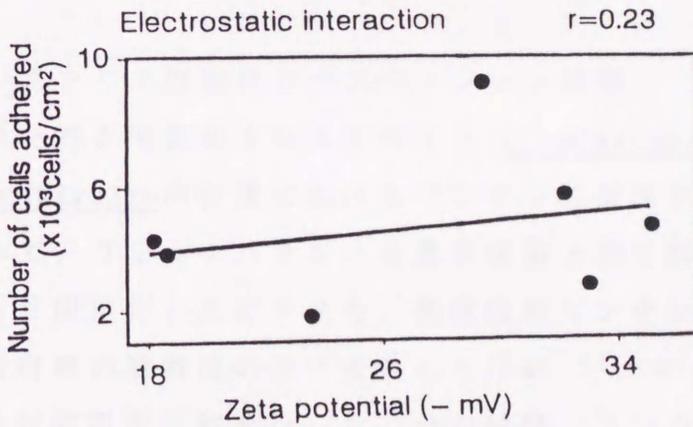
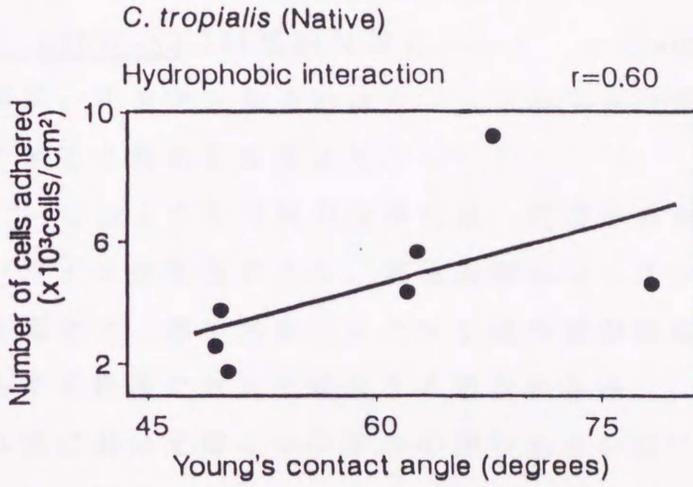


図 15 タンパク固定化ガラスの Young の接触角
およびゼータ電位と *C. tropicalis* の付着菌数との相関

第3項 特異的付着に関する検討

C. albicansの特異的付着において、そのadhesinとして特に、マンナンあるいはマンノプロテインの関与が重要であると報告されており^{40, 41, 44, 45, 50, 51, 57, 59, 62, 63}、このような特異的付着には、被着体表面に存在するレクチン様物質により、菌体表層のマンナンが結合される場合と、菌体由来のレクチン様物質が被着体表面に存在する糖鎖に対して結合する場合がある。本項においては、マンナンの関与あるいは、被着体に存在する糖鎖の関与について以下の検討を行った。

1) タンパク固定化ガラスのマンナン処理

タンパク固定化ガラスに対する C. albicansおよびC. tropicalisの付着におけるマンナンの関与を検討する目的で、コンカナバリンAを第Ⅲ章第3項と同様の方法により固定化したガラスを、菌体表層マンナンによる特異的付着の被着体のモデルとして用い¹⁰⁷、マンナンによる付着阻害実験を行った。その結果、コンカナバリンA固定化ガラスを2mg/ml以上のマンナン水溶液により30 min前処理を行うことによって、約85%の付着阻害を認めた。なお、コンカナバリンAの固定化量は、1.7 μ g/cm²であった。このため、各タンパク固定化ガラスを、マンナン水溶液(5mg/ml)によって、同様の前処理を行い、十分に水洗後、同様の方法により付着実験を行った。

その結果、各タンパク固定化ガラスに対する付着は、処理前後で、有意な変化を認めなかった(図 16)。この結果は、菌体表層のマンナンの付着への関与の可能性は非常に低いことを示唆している。

2) タンパク固定化ガラスからの化学的な糖鎖の切断
マンナンによる付着阻害の結果から、特異的付着への菌体表層マンナンの関与は、小さいことが示唆された。従って、被着体表面に存在する糖鎖に対する特異的付着の検討を行った。一般に、C. albicansは、種々の糖に対して特異的付着を示すことが報告されており^{39, 40, 50, 59-63}、ヘテロオリゴ糖鎖をもつタンパクに対する付着においては、糖付着阻害実験、あるいは、従来の酵素による糖鎖の切断法では、その特異的付着を十分に検討できないと考えられる。従って、第3項で作製したタンパク固定化ガラスに対して、化学的に、O-グリコシドおよびN-グリコシド結合の切断を行った。すなわち Sojar & Bahlの方法¹⁰⁸に基づき、減圧下、室温にて一昼夜乾燥したタンパク固定化ガラスを氷冷上にて、窒素気流下においてトリフルオロメタンスルホン酸により2h処理を行った。反応終了後、ドライアイス-エタノール中で-20℃に冷却を行う間に60% (vol/vol)ピリジン水溶液を用いて中和を行った。十分な水洗により反応溶液を除去し、デシケーター中にて乾燥し、糖鎖切断タンパク固定化ガラ

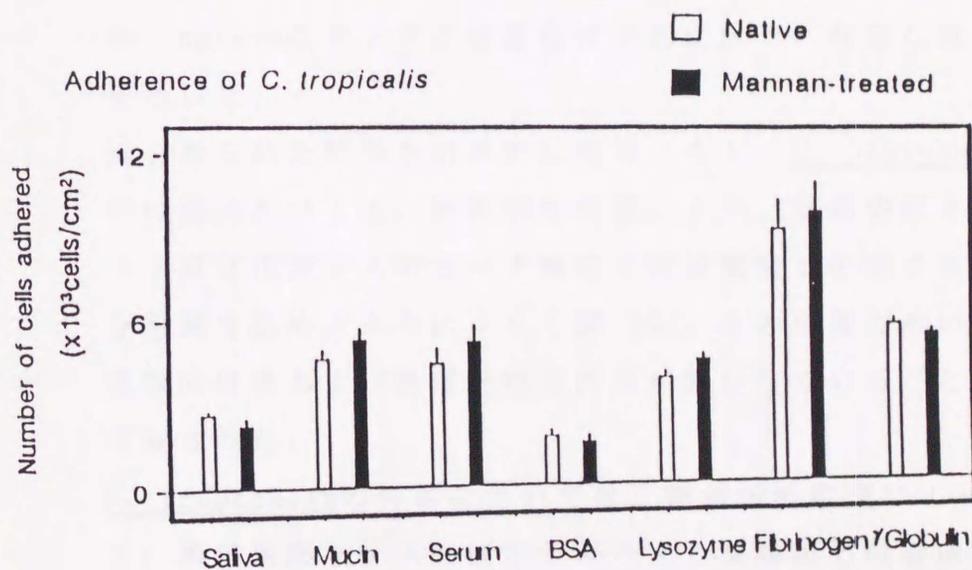
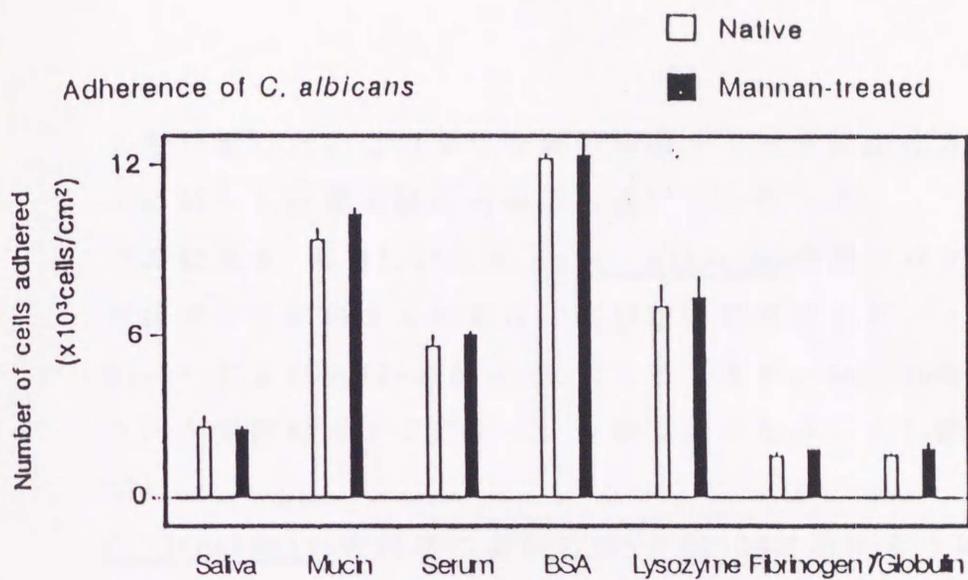


図 16 各タンパク固定化ガラスのマンナン前処理による *C. albicans* および *C. tropicalis* の付着菌数の変化

スを作製した。このような糖鎖切断タンパク固定化ガラスに対する付着実験を同様の方法により行った。

その結果を 図 17,18に示す。C. albicansのタンパク固定化ガラスに対する付着は、糖鎖切断処理により、Mucin-およびSaliva-glassに対する付着が、nativeなタンパク固定化ガラスに比べ、有意な減少を示した(図 17)。

C. tropicalisの付着においては、 図 18に示すように糖鎖切断処理によって、Fibrinogen-glassに対する付着が、nativeなタンパク固定化ガラスに比べ、有意な減少を示した。

以上得られた結果を統計的に処理すると、C. albicansの付着においては、糖鎖切断処理により、糖鎖切断タンパク固定化ガラスのゼータ電位と付着菌数との間に有意な相関を認めるようになり(図 19)、その付着において、特異的付着および静電的相互作用が関与していることが示唆された。

C. tropicalisの付着においては、糖鎖切断処理によって、糖鎖切断タンパク固定化ガラスの接触角と付着菌数との間に有意な相関を認めるようになり(図 20)、その付着において、特異的付着および疎水的相互作用が関与していることが示唆された。

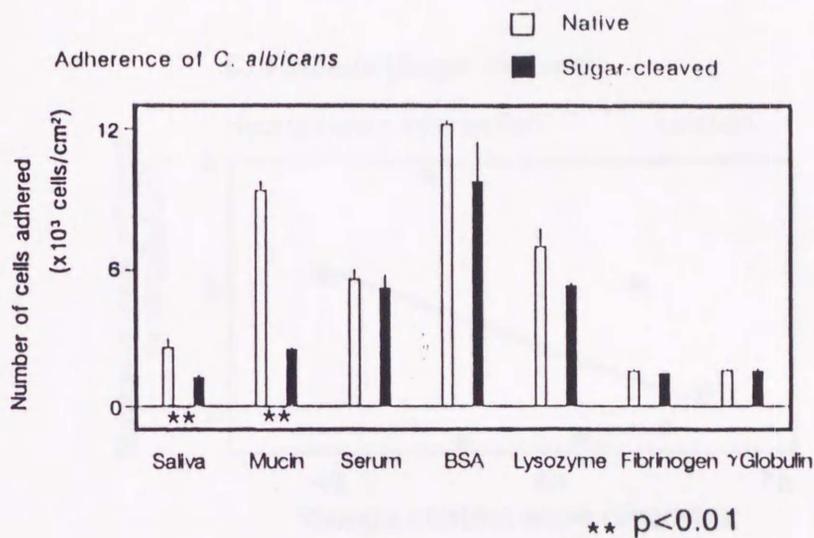


図 17 糖鎖切断タンパク固定化ガラスに対する *C. albicans* の付着実験の結果

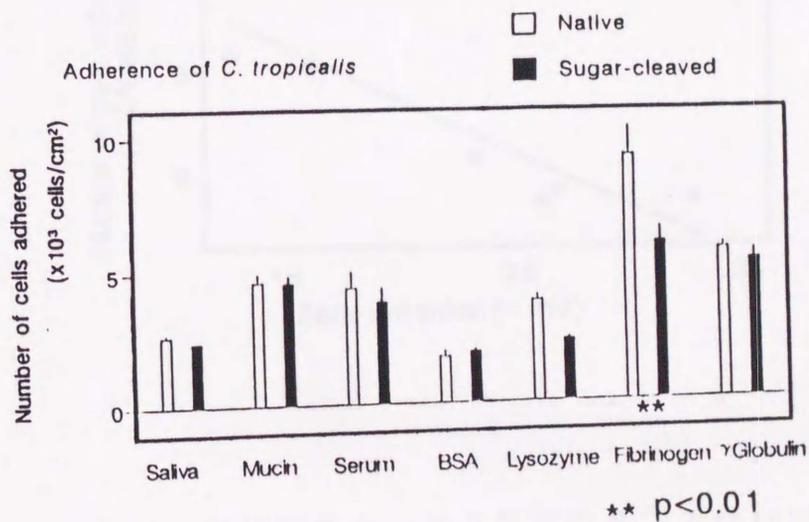


図 18 糖鎖切断タンパク固定化ガラスに対する *C. tropicalis* の付着実験の結果

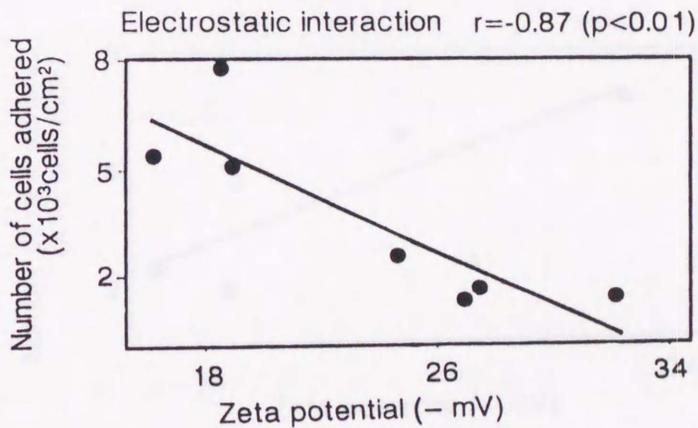
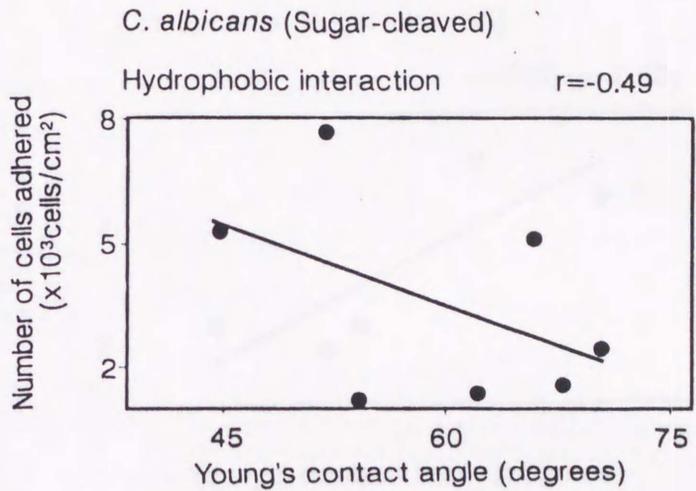


図 19 糖鎖切断タンパク固定化ガラスのYoungの接触角およびゼータ電位と *C. albicans* の付着菌数との相関

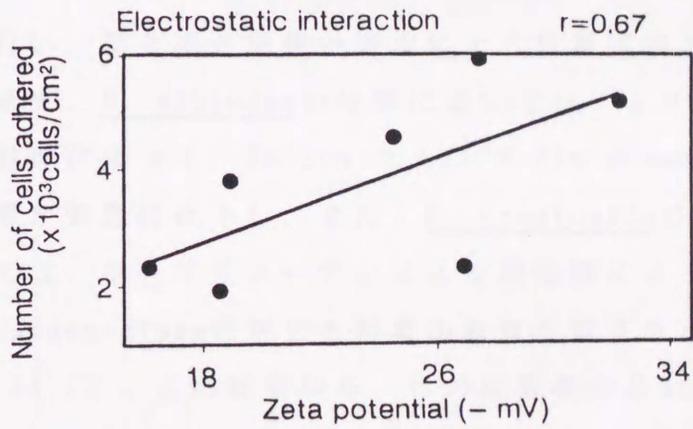
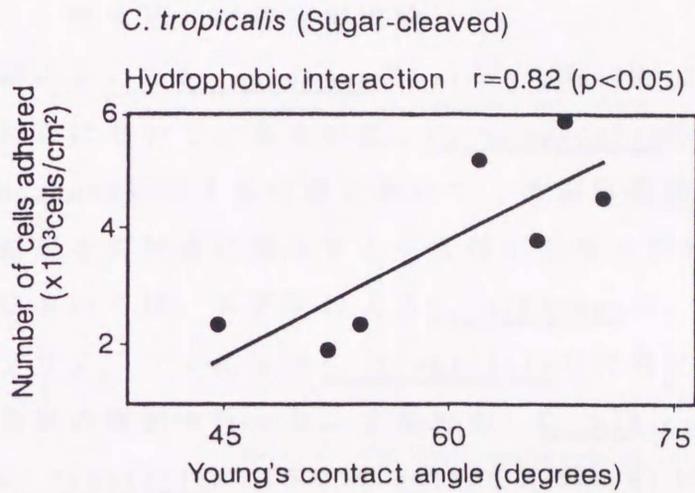


図 20 糖鎖切断タンパク固定化ガラスのYoungの接触角およびゼータ電位と *C. tropicalis* の付着菌数との相関

第4項 付着阻害実験

第3項において C. albicans の Saliva-, Mucin-glass に対する付着において、あるいは、C. tropicalis の Fibrinogen-glass に対する付着において、被着体表面における糖鎖がその付着に関与する可能性が示唆されたため、本項においては、ムチンによる C. albicans の、また、フィブリノーゲンによる C. tropicalis の付着に対する阻害効果の検討を行った。すなわち、C. albicans あるいは C. tropicalis 1.5×10^7 cells を 2.5 mg/ml ムチンあるいはフィブリノーゲン溶液 30 ml により 37°C 60 min 前処理を行い、第2項と同様の方法により付着実験を行った。その結果、C. albicans の付着においては、ムチンによる前処理によって、Saliva-および Mucin-glass に対する付着が有意に低下し、また、C. tropicalis の付着においては、フィブリノーゲンによる前処理によって Fibrinogen-glass に対する付着が有意な低下を示した (図 21.22)。この結果から、この両菌株のこれらのタンパク固定化ガラスに対する付着が、特異的付着によることが確認された。

第4節 考察

in vivo における Candida の固体表面に対する付着を考える場合、固体表面に吸着した唾液タンパクあるいは血清タンパクとの相互作用は重要である。このような

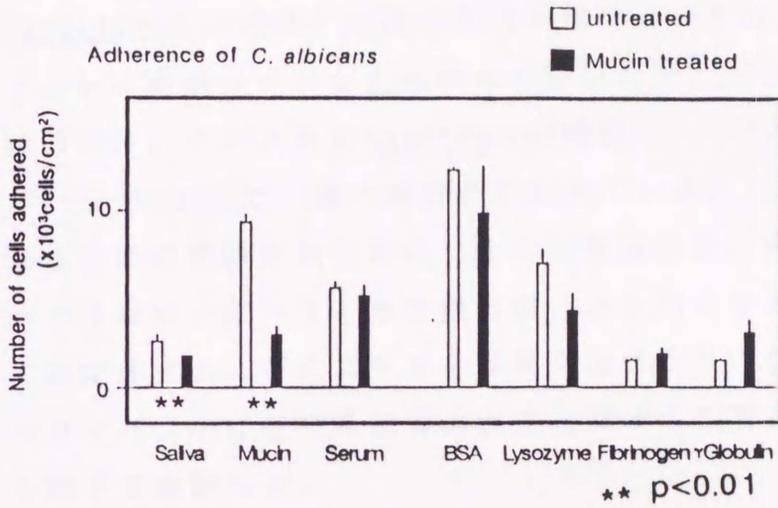


図 21 付着 菌体のムチン処理の *C. albicans* の各タンパク固定化ガラスに対する付着に及ぼす影響

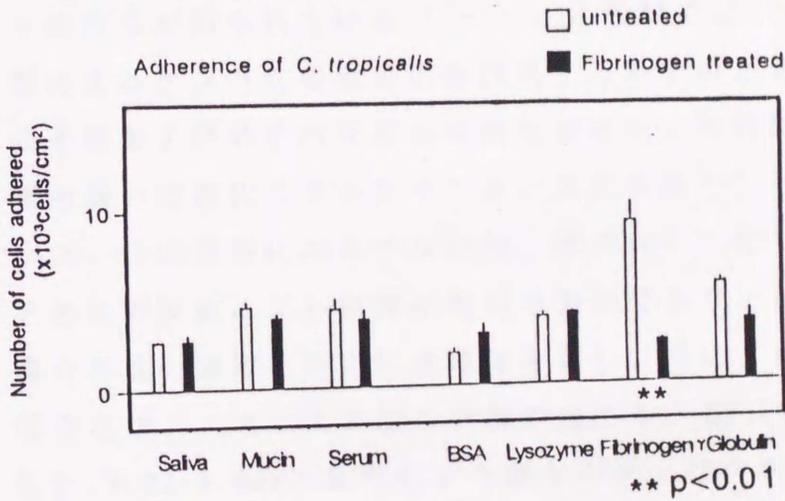


図 22 付着 菌体のフィブリンノーゲン処理の *C. tropicalis* の各タンパク固定化ガラスに対する付着に及ぼす影響

Candidaとタンパクとの間の相互作用については、唾液コート、血清コートした被着体を用いた系^{24, 25, 30, 31}、あるいは、タンパクのCandidaへの吸着¹⁰⁹⁻¹¹²、凝集^{113, 114}によって、種々検討が行われている。しかしながら、系の複雑さのために、その付着機構は、未だ明らかではない。従って、本実験では、タンパクをガラス面に固定化することにより系の単純化をはかり、Candidaのタンパクの存在する被着体表面に対する付着に關与する因子を検討した。

タンパクのガラス面への固定化法には、物理的吸着法、グルタルアルデヒド法、水溶性カルボジイミド法など種々の方法が知られている¹¹⁵⁻¹¹⁷。本実験では、単分子層によるタンパクの固定化を目的としたため、タンパク分子間および分子内反応の可能性がなく、同時に固定化率の高い活性化スクシンイミドエステル法¹¹⁵⁻¹¹⁷を用いた。この活性化エステル法は、非プロトン化したアミノ基との反応により固定化を行う方法であり、pHの低い場合には、固定化反応に長時間を要し、逆に、pHが高い場合には、エステルの加水分解が起こる。従って、pH 8.2, 9.0, 9.5の3条件により種々のタンパクを含む唾液の固定化を検討した。その結果、pH 8.2なる固定化条件において、最大の固定化量を示した(図 10)。従って、他のタンパクの固定化もこの条件により行った。また、特異的付着については、C. albicansの付着にお

いて、数種の単糖およびアミノ糖がreceptorとして関与することが報告されている^{39, 40, 50, 59-63}。このため、酵素法、レクチンおよび糖付着阻害実験による特異的付着の検討が困難であると考えられる。従って、本実験では、特異的付着を検討するため、酵素法などと同様にタンパクのポリペプチド鎖の物理化学的性質に影響せず、これに加えて、酵素法でみられる立体障害の影響のないN-グリコシドおよびO-グリコシド結合の切断作用のあるトリフルオロメタンスルホン酸を用いて¹⁰⁸、タンパク固定化ガラスからの糖鎖の切断を行い、Candidaのタンパクの存在する表面に対する付着における糖鎖の関与を検討した。また、糖鎖切断処理によるタンパクの脱離については、固定化反応が、アミド結合によることから、可能性は非常に低いと考えられるが、接触角の変化による検討を行った。その結果、分子中に糖鎖を含まないBSAあるいは、リゾチームを固定化したガラスでは、有意な変化を認めず、糖鎖切断処理の固定化したタンパクに対する影響はなかったと考えられる。

C. albicansの特異的付着においては、タンパクからの糖鎖の切断によりMucin-glassで73.7%、Saliva-glassで52.2%の有意な付着の減少を認め、さらに、ムチン処理によりC. albicansのMucin-glassおよびSaliva-glassに対する付着が有意な低下を示したことから、これらのタンパクに対する付着において糖鎖がreceptorとして関

与していることが示唆された。

また、図 14に示すように、タンパク固定化ガラスに対する付着においては、その物理化学的性質と C. albicans と付着菌数との間に有意な相関はみられなかったが、糖鎖の切断により、C. albicans の付着は、被着体表面のゼータ電位と高い相関を示した(図 19)。この結果は、第 I 章で得られた C. albicans の付着において、静電的相互作用が強く関与しているという結論と一致しており、さらに、タンパクに対する付着においては、このような静電的相互作用に加えて被着体表面に存在する糖鎖に対する特異的付着が関与していることが示唆された。

このような特異的付着に関して、本実験では、菌体のマンナンよりも被着体表面に存在する糖鎖の関与がより重要であることが示唆されたが、この結果は、Critchley & Douglasによって部分精製された分泌性のマンノプロテイン adhesin に対して得られた結果と類似している。C. tropicalis の特異的付着において、本実験では、糖鎖の切断により、Fibrinogen-glass で 42.5% の付着の有意な減少を認め、さらに、fibrinogen による菌体の前処理により、その付着が阻害されたことから C. tropicalis の付着においても、被着体表面の糖鎖が、その付着に関与していることが示唆された。

さらに、図 15に示すように、タンパク固定化ガラスに対する付着においては、その物理化学的性質と付着との

間に有意な相関はみられなかったが、糖鎖切断処理によって、被着体表面の疎水性と付着菌数との間に有意な相関が認められるようになった(図 20)。この結果は、C. tropicalisの付着において、第 II 章の結果と同様に疎水的相互作用が関与していることに加えて、C. albicansと同様にやはり被着体表面に存在する糖鎖に対する特異的付着が関与していることが示唆された。

このように、in vivoにおいて被着体表面に存在すると考えられる数種のタンパクの存在する表面に対する、C. albicansおよびC. tropicalisの付着を検討した結果、非特異的付着因子だけでなく被着体表面に存在する糖鎖に対する特異的付着因子も関与していることが明らかとなった。

第IV章 Candida albicansおよびCandida tropicalisの特異的付着

第1節 概要

第II章において、Candidaの非特異的付着を検討した結果、その付着は、菌体および被着体表面の物理化学的性質により左右され、疎水的相互作用および静電的相互作用の両者が関与していることが明らかとなった。さらに、第III章において、唾液および血清タンパク固定化ガラスに対する付着を検討した結果、非特異的付着に加えて、被着体表面に存在する糖鎖に対する特異的付着の関与が示唆された。このような、特異的付着に関与する糖残基については、糖阻害実験によりreceptorとして多くの単糖およびアミノ糖が報告されている^{37, 39, 40, 50, 59-83}が、一致した見解をみていない。これは、糖あるいはハプテン阻害実験において、菌表面あるいは細胞表面に存在するレクチン様物質の両者に対して阻害が起こるためと考えられる^{50, 83}。従って、本実験では、単糖誘導体およびアミノ糖をガラス表面に固定化し、単一の糖のみの存在する糖固定化ガラスを用いた単純化した系によって、C. albicansおよびC. tropicalisの特異的付着に関与する糖残基の検索を行った。

第2節 糖固定化ガラスおよびコントロールガラス の作製およびその性質

第1項 糖固定化ガラス作製

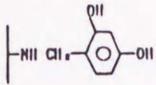
第II章と同様の方法により、AMP-glassを作製後、AMP-glassのアミノ基に対しシッフ反応によりグリオキシル酸を固定化し、カルボキシル基を固定化したGA-glassを作製した。このGA-glassのカルボキシル基に、Robinsonら¹¹⁸、Moczar & Leboul¹¹⁹およびJunowiczら¹²⁰の方法に基づきアミノ糖(AS)およびp-アミノフェニル-O-グリコシド(pAPG)を固定化し、AS-glassおよびpAPG-glassを作製した(図23)。すなわち、1% (wt/vol) 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(WSC)存在下において、GA-glassをASあるいはpAPG水溶液(pH 4.5)により、AS-glassは、室温にて20h、pAPG-glassは低温室にて24h処理後、水洗により余剰のリガンドを除去し作製した。固定化量と溶液濃度との間には図24に示すような関係が認められたため、各処理溶液濃度は0.25% (wt/vol)を用いた。

第2項 コントロールガラス作製

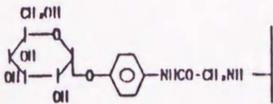
AMP-glassを、ホルムアルデヒド5% (vol/vol)水溶液、レゾシルアルデヒド5% (wt/vol)エタノール溶液により

p-aminophenyl-o-glycoside immobilized glass slides
(pAPG-glass)

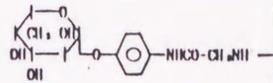
RA-glass*



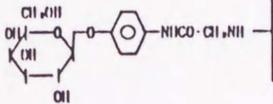
Glc-glass



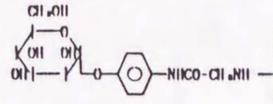
Fuc-glass



Gal-glass



Man-glass

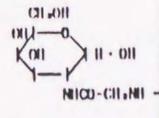


Aminosugar immobilized glass slides
(AS-glass)

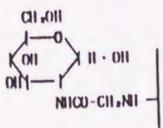
HCHO-glass*



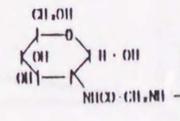
GalN-glass



GlcN-glass



ManN-glass



* controlled glass

図 23 糖固定化ガラスおよびコントロールガラスの構造

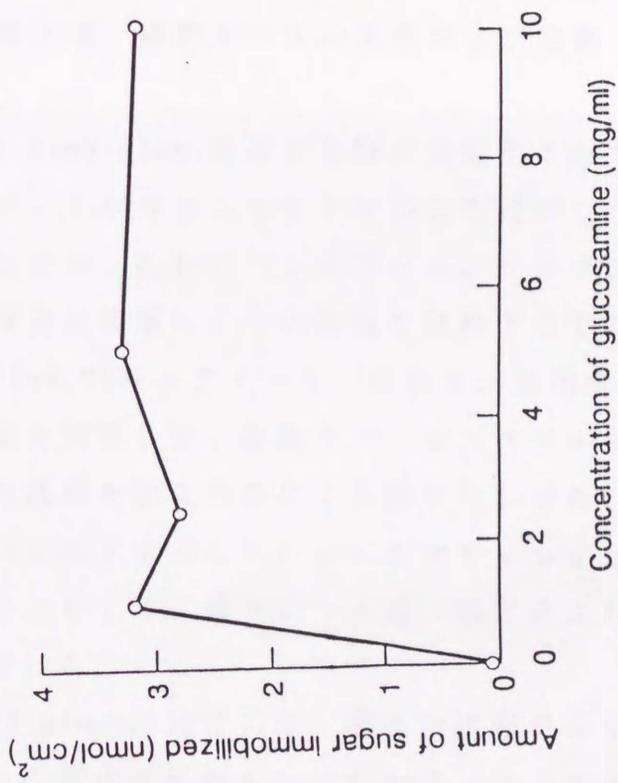


図 24 処理濃度とアミノ糖の固定化量との関係

室温にて2h処理を行い反応後、0.4% (wt/vol) NaBH₄により室温にて24h還元し、2種のHCHO-, RA-glassを作製し、それぞれをAS-glass、pAPG-glassのコントロールとして用いた(図 23)。

第3項 修飾ガラスの定性および定量

1) 定性

GlcN, GalN, ManN-glass表面に各糖が固定化されていることを2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いて¹²¹検討した。すなわち、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン3gを15ml濃硫酸中に溶解し、この溶液を攪拌下にて20ml蒸留水および70ml 95%エタノール中に加え、混和後、濾過し反応試薬を調整した。修飾ガラスをエタノール中に浸漬後、この試薬を加え暗所にて反応を行わせた。その結果、図 25に示すように2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの発色によりアミノ糖がガラス面に固定化されていることを確認した。

また、pAPG-glassの定性には、適当な試薬がなく、さらに、接触角の変化も認めなかったため、以下の定量法によりその固定化の確認を行った。

2) 定量

固定化したリガンドの定量法には、残存法、分解法、滴定法、可溶化法などの方法がある¹¹⁵。本実験では、

**Color Test with
2,4-Dinitrophenylhydrazine**

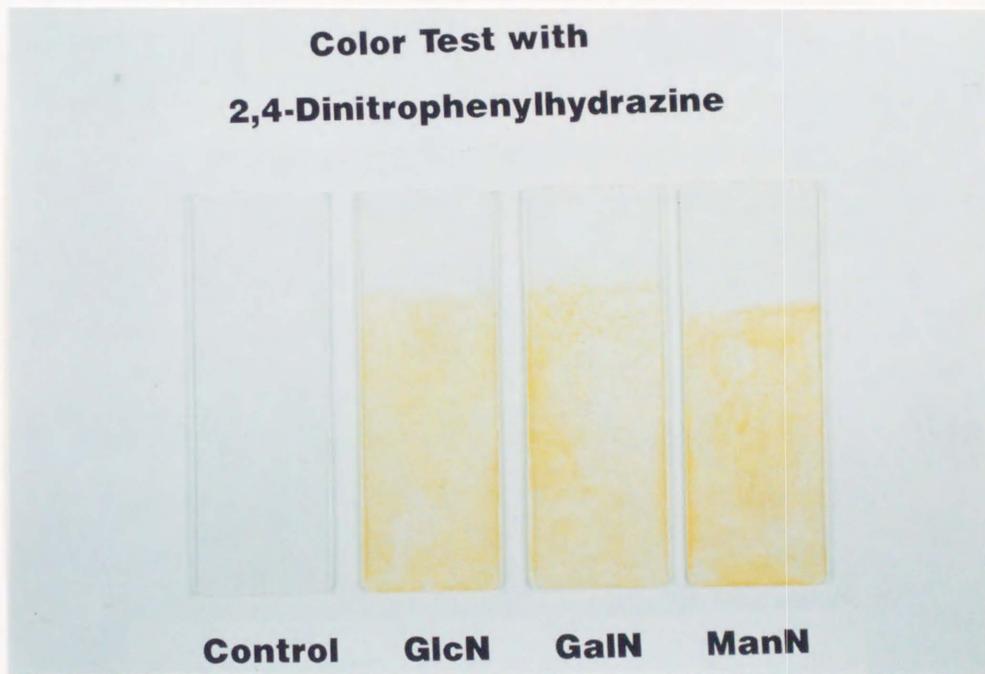


図 25 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンによる
アミノ糖固定化ガラスの定性

Barkerの方法^{1,2}に準じて分解法によりその定量を行った。すなわち、糖固定化ガラス4~5枚を $5 \times 2.6 \text{ cm}^2$ に切断後、粉碎し、封管試験管に入れ、6N HClを加えた後封管した。110°C下で24h加水分解後、ガラスフィルターにて濾過し、濾液を10mlに濃縮後、定量に用いた。定量は、Fieldsの方法^{1,2,3,4}に従い、0.1M NaB_4O_7 の0.1M NaOH溶液 0.5mlに試料0.5mlを加えた後、1.1M 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムを、0.02mlを加え攪拌し、5min反応後、0.1M Na_2SO_3 溶液 1.5mlを0.1M NaH_2PO_4 溶液 98.5mlに加え作製した停止液 1.0mlを加え反応を停止させた。測定は、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムの分解産物の吸収の影響を受けにくい420nmの吸光度を分光光度計を用いて行った。定量は各糖固定化ガラスに対して、2~3回繰返し行い、平均値 \pm S.E.を算出した。この結果から各糖固定化ガラスには、ほぼ等量の糖が固定化されていることが示された(表 2)。

第4項 修飾ガラスの疎水性

第2節に示す手順により作製した各修飾ガラスの蒸留水に対するYoungの接触角を、第II章第2節第2項と同様の方法によりコンタクトアングルメーターを用いて測定した。その結果、AS-glassおよびpAPG-glassの接触角に

表 2 各糖固定化ガラスへのリガンドの固定化量

Amount of sugar immobilized	
Glc-glass	$2.68 \pm 0.25 \text{ nmol/cm}^2$
Gal-glass	$2.78 \pm 0.18 \text{ nmol/cm}^2$
Fuc-glass	$2.63 \pm 0.21 \text{ nmol/cm}^2$
Man-glass	$2.73 \pm 0.14 \text{ nmol/cm}^2$
GlcN-glass	$2.79 \pm 0.17 \text{ nmol/cm}^2$
GalN-glass	$2.72 \pm 0.21 \text{ nmol/cm}^2$
ManN-glass	$2.82 \pm 0.09 \text{ nmol/cm}^2$

において、各ガラス群内において、各ガラス間で有意差は認めなかった(図 26)。

第 3 節 C. albicansおよびC. tropicalisの付着

第 1 項 使用菌株および培養条件

本実験では、第 III 章と同様に、C. albicans IF0 1385 および、C. tropicalis IF0 1070 を用いた。

菌株は、250mM グルコースを含む yeast nitrogen base medium にて、一昼夜培養後、Batch medium に接種し、対数増殖期後期に、遠心により集菌後 10mM phosphate buffered saline (PBS; pH 7.2) にて 2 回洗浄後同バッファー中に懸濁し、菌濃度を 1.0×10^7 cells/ml に spectrophotometer により調整した。

第 2 項 付着実験

第 II 章 第 6 節と同様の方法にて行った。すなわち、1000ml ビーカーの壁面に沿って底面に垂直に修飾ガラスを保持し 300ml の菌懸濁液を注入後 200rpm で攪拌しながら 37°C にて 3 h インキュベートした。十分な水洗により菌液を除去後、グルタルアルデヒドで固定、アクリジンオレンジで染色した。付着菌数は、蛍光顕微鏡下で 1 枚につき任意の 20 視野をカウントし、各修飾ガラスの単

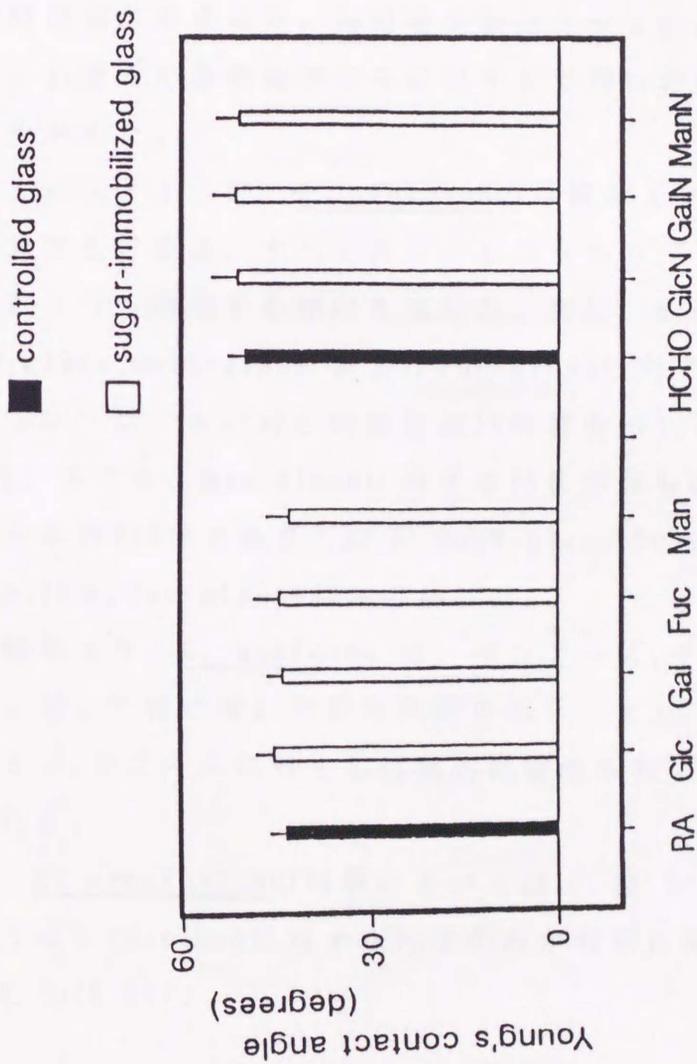


図 26 各修飾ガラスの Young の接触角

位面積当りの付着菌数を求め、4～9枚の試料について平均付着菌数を求めた。各付着実験は2～3回繰返して行い、各菌株の各修飾ガラスに対する平均付着菌数±S.E.を求めた。

図 27に示すように、C. albicansの単糖およびアミノ糖に対する付着は、すべて各コントロールガラスに対する付着よりも増加する傾向を示した。特に、Man-glass, ManN-glass, GalN-glass, および Fuc-glass に対する付着が、コントロールに対し有意に高い付着を示した ($P < 0.01$)。中でも、Man-glass に対する付着が最も高くコントロールの210%であり、以下 ManN-glass 190%, GalN-glass 170%, Fuc-glass 140%であった。

この結果より、C. albicans は、マンノース、マンノサミンに対して特に強い付着特異性を示し、また、ガラクトサミン、フコースに対する特異的付着能も有すると考えられる。

一方、C. tropicalisの付着においては、図 28に示すようにGlcN-glassに対する付着のみが有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。

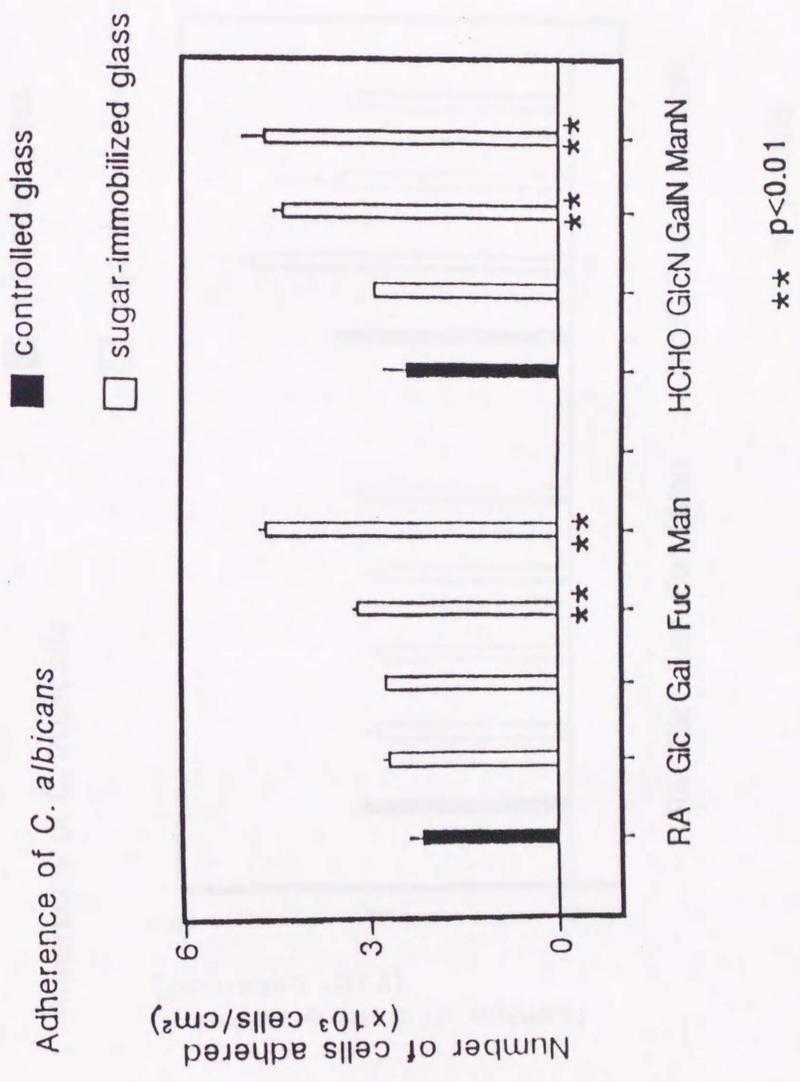


図 27 各修飾ガラスに対する *C. albicans* の付着実験の結果

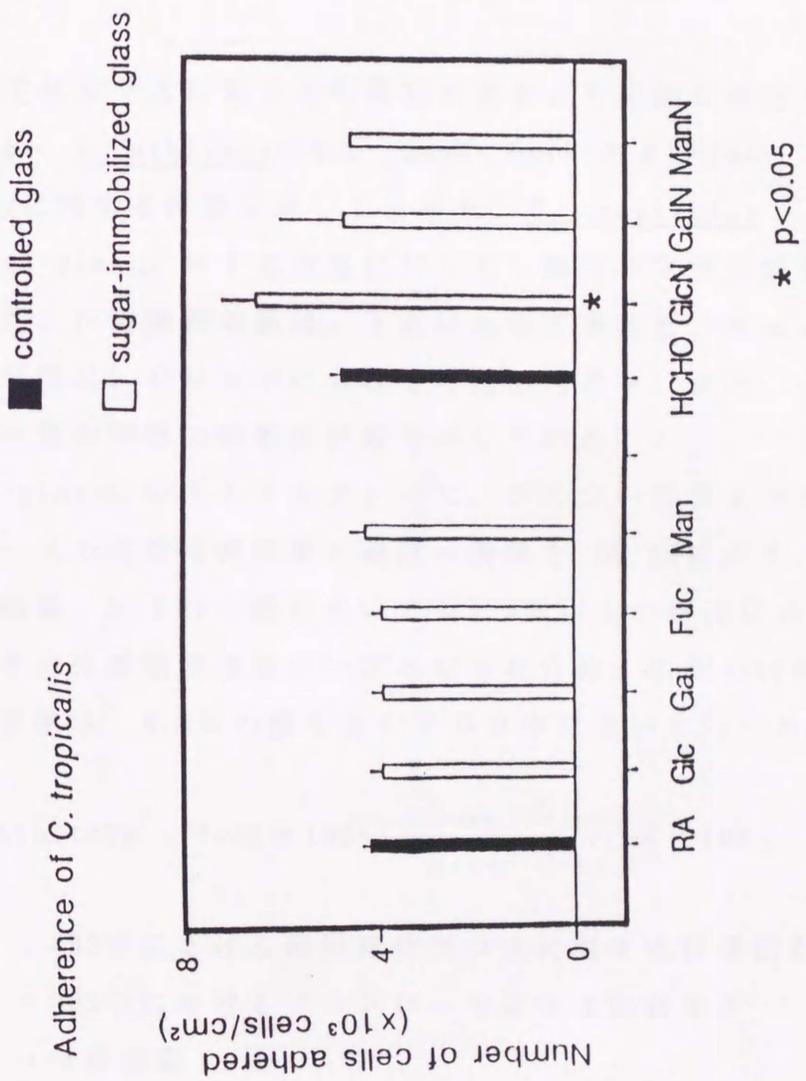


図 28 各修飾ガラスに対する *C. tropicalis* の付着実験の結果

第4節 糖 付着阻害実験

糖固定化ガラスに対する特異的付着をより詳細に検討するため、C. albicansのMan-, ManN-, GalN-およびFuc-glassに対する付着に対して、また、C. tropicalisのGlcN-glassに対する付着に対して、糖付着阻害実験を行った。付着阻害効果は、下式によって求めた。カッコ内の分母は、PBS中における特異的付着を、また、分子は付着阻害後の特異的付着を示している。

ManN-glassに対するフルクトース、グルコースおよびマンノースの付着阻害効果と濃度の関係を 図 29に示す。その結果、いずれの糖においても0.5%以上の濃度においてその付着阻害効果が一定となったため、以下の付着阻害実験は、0.5%の糖を含むPBS中において行った。

$$\text{Inhibitory effect} = 100 - \left(\frac{S_{\text{sugar}} - C_{\text{sugar}}}{S_{\text{PBS}} - C_{\text{PBS}}} \right) \times 100$$

S_{PBS} : PBS中における糖固定化ガラスに対する付着菌数

C_{PBS} : PBS中におけるコントロールガラスに対する付着菌数

S_{sugar} : 糖による阻害後の糖固定化ガラスに対する付着菌数

C_{sugar} : 糖による阻害後のコントロールガラスに対する付着菌数

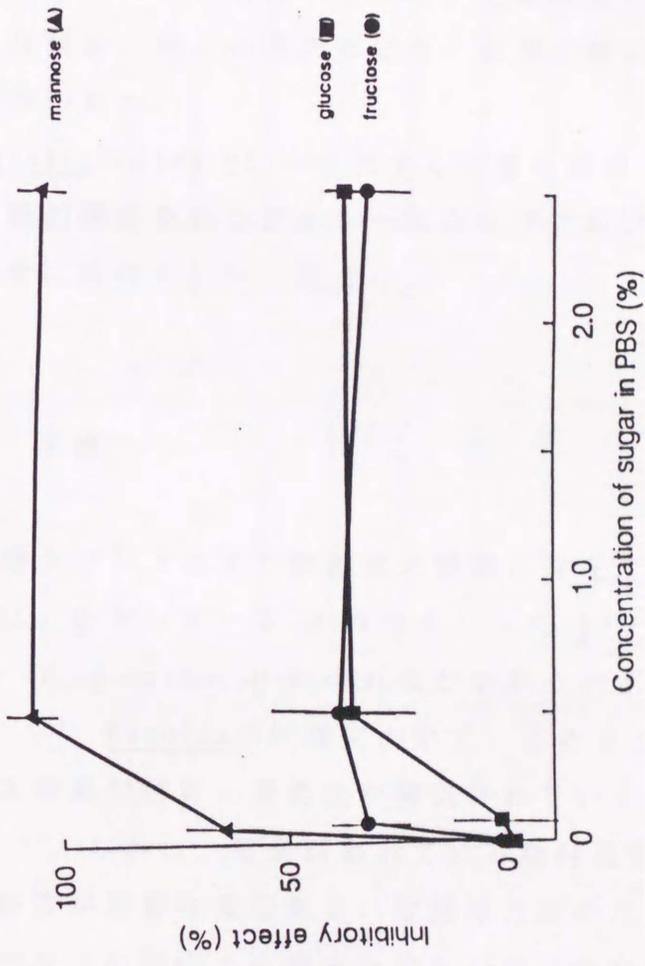


図 29 付着阻害に対する糖の濃度の影響

その結果 図 30a~dに示すように、この4種の糖固定化ガラスに対する付着は、固定化糖と、類似構造をもつ糖により付着阻害がみられた。さらに、各糖固定化ガラスに対する付着は、単一の糖だけでなく数種の糖により付着阻害がみられた。

C. tropicalisのGlcN-glassに対する付着も同様に、固定化糖と類似構造をもつグルコースおよびグルコサミンにより完全に阻害された(図 31)。

第5節 考察

一般に、糖タンパクおよび糖脂質の糖鎖に存在するヘキソースには、D-マンノース、D-ガラクトース、L-フコース、D-グルコース、D-GalNAc、D-GlcNAcなどがあるとされており^{63, 100-102}、Candidaの付着において、このような糖鎖に対する特異的付着の重要性が報告されている^{50, 59, 60, 62, 63}。しかし、従来行われている糖付着阻害実験では、糖鎖が被着体表面あるいは菌体表面のどちらに由来するかなどの理由から十分な知見が得られない可能性が指摘されてる^{50, 63}。また、糖タンパク、糖脂質の糖鎖は、種々の単糖、アミノ糖からなるオリゴ糖、ポリサッカライドから構成されており^{101, 102}、種々の糖残基が混在していると考えられ、レクチンによる付着阻害

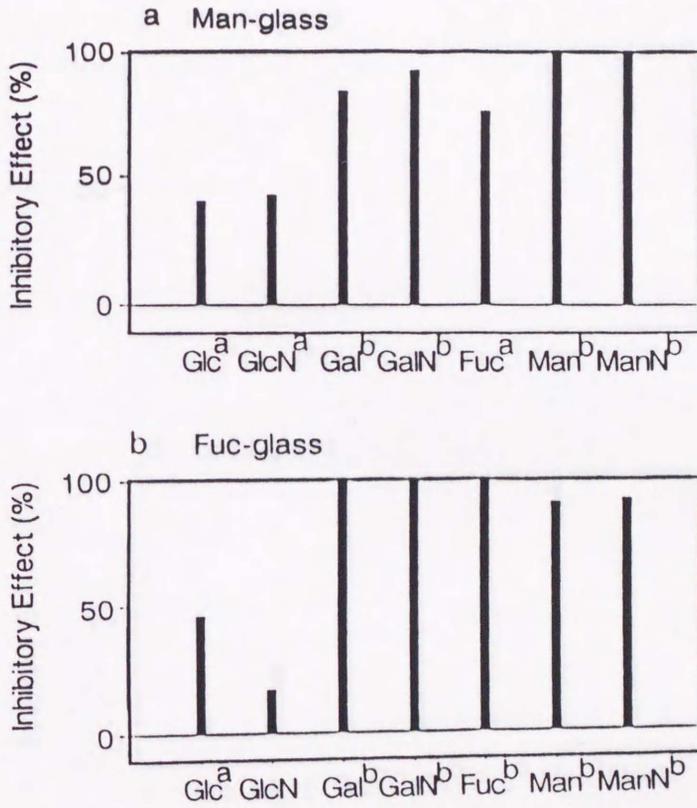


図 30-a, b 糖による *C. albicans* の Man-glass および Fuc-glass に対する付着の阻害実験の結果
部分的付着阻害を示した糖 (a) および完全な付着阻害を示した糖 (b)

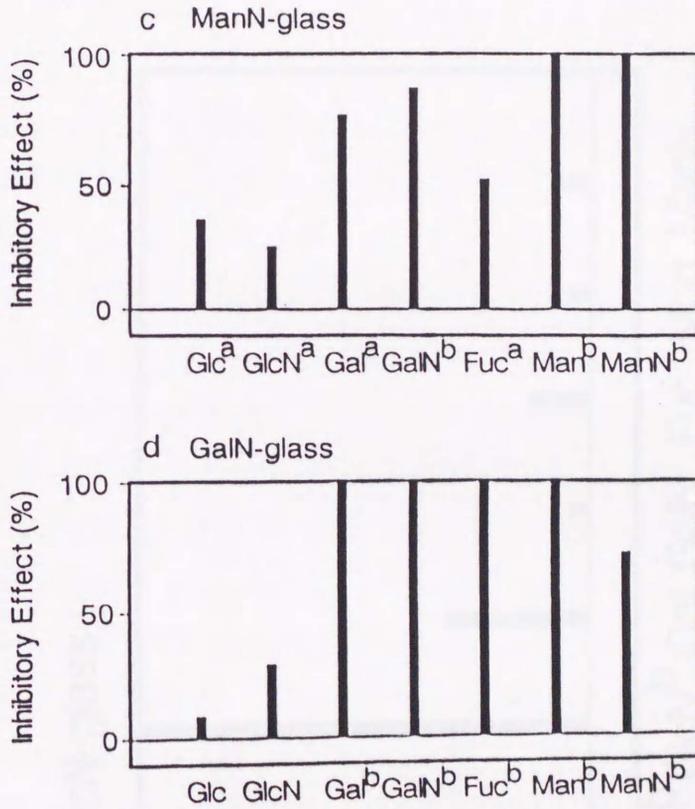


図 30-c,d 糖による *C. albicans* の ManN-glass および GalN-glass に対する付着の阻害実験の結果
部分的付着阻害を示した糖 (a) および完全な付着阻害を示した糖 (b)

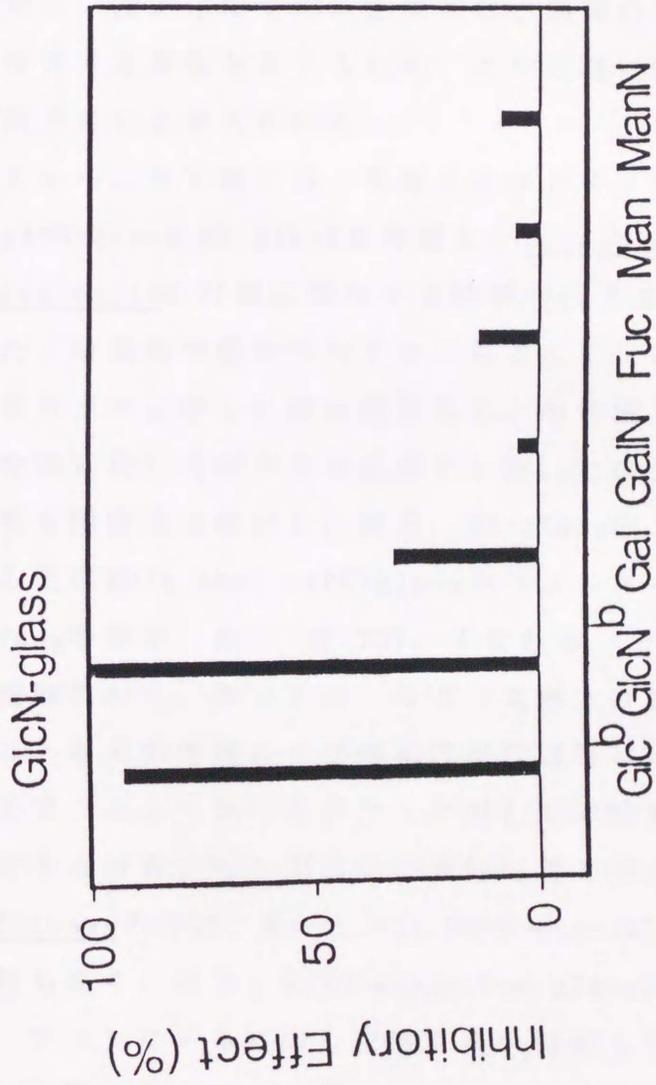


図 31 糖による *C. tropicalis* の付着阻害の結果

40, 50, 51をはじめとする種々の方法^{68, 69, 73, 125, 126}によっても特異的付着の解析が困難であると考えられる。これに対し、固定化糖を用いた系では、既知の単一の糖のみが存在する表面を有するため、より正確に特異的付着を検討できると考えられる。

このことから、本実験では、単糖およびアミノ糖を固定化したpAPG-glass, AS-glassを作製し、C. albicansおよびC. tropicalisの付着に關与する特異的因子を検討した。また、特異的付着のコントロールとして、これらの糖固定化ガラスと等しい疎水性を示し、中性域で帯電しない基を固定化したガラスを必要とした。このため、種々の物質を固定化し検討した結果、AS-glassのコントロールとしてHCHO-glass、pAPG-glassのコントロールとしてRA-glassを使用した(図 23)。すなわち、その構造および接触角から、コントロールガラスおよび糖固定化ガラスは、電気的性質および疎水性がほぼ等しいと考えられるので、コントロールガラスに対しての糖固定化ガラスに対する付着の増加部分が特異的付着と考えられる。

C. albicansのでは、Man-glass, ManN-glassに対する付着が最も高く、以下、GalN-glass, Fuc-glassに対する付着が、コントロールに対し有意に高い付着を示した($P < 0.01$; 図 27)。この結果より、C. albicansは、マンノース, マンノサミンに対して特に強い付着特異性を示し、また、ガラクトサミン, フコースに対する特異的

付着能も有すると考えられる。このうち、L-フコース、D-マンノースに対する付着特異性については、C. albicansの他の strainにおいても、細胞への付着において重要であるとする報告がある^{37, 59, 60, 63}。さらに、このようなC. albicansの各糖固定化ガラスに対する特異的付着を、より詳細に検討するため、Man-, ManN-, GalN-, Fuc-glassに対する糖付着阻害実験を行った。その結果、
図 30a~dに示すように、固定化糖と類似構造をもつ糖の添加により、その付着は完全に阻害され、これらの糖に対する付着が、レクチン様作用によることを確認した¹²⁷。また、各糖固定化ガラスに対する付着は単一の糖だけでなく数種の糖により付着阻害がおこることから、これらの糖に対する特異性は個々の糖に対して mono-specificな特異的付着能を示すのではなく、むしろ broadな特異性によると考えられる。

一方、C. tropicalisの特異的付着については、ほとんど報告はないが、本実験では、5%の危険率で GlcN-glassに対してのみ有意に高い付着を示した(図 28)。また、GlcN-glassに対する付着は、グルコースおよびグルコサミンにより完全に阻害され(図 31)、この付着がレクチン様作用によることを確認し、C. tropicalisの特異的付着において、グルコサミンが関与していることが示唆された。

このように、C. albicansではマンノース、マンノサミ

ン,ガラクトサミン,およびフコースの存在する表面に対する特異的付着を種々の程度で認め、C. tropicalisではグルコサミンに対する特異的付着を認めた。第Ⅲ章において、被着体表面に存在するタンパクに対する付着において認められた特異的付着には、本実験において認められた種々の糖が関与していると考えられる。

第 V 章 Candida albicans および Candida tropicalis の非特異的および特異的付着

第 1 節 概要

第 II ~ IV 章から Candida の付着において、被着体表面および菌表面の物理化学的性質により疎水的相互作用および静電的相互作用が関与しており、さらに、種々の糖に対する特異的付着も同時に関与していることが明らかとなった。また、Klotz & Penn^{4, 5} により C. albicans の細胞への付着においても、疎水的相互作用、静電的相互作用といった非特異的付着因子および特異的付着因子の両者が同時に関与していることが報告されている。従って、各菌株における非特異的および特異的付着因子の付着への寄与の違いが、細胞や義歯表面への Candida の付着を左右していると考えられる。しかし、in vivo あるいは、従来の系においては、このような非特異的および特異的付着因子が複雑に関与するため解析が困難と考えられる。そこで、本実験では、糖、アミノ基固定化ガラスおよびこれらと疎水性の等しいコントロールガラスからなるモデルを用いて、三元配置分散分析法により、C. albicans および C. tropicalis の付着における、疎水的相互作用、静電的相互作用および特異的付着因子の寄与を検

討した。

第2節 修飾ガラスの作製およびその性質

第1項 コントロールガラス作製

まず、第II章と同様の方法により作製したAMP-glassを、5% (vol/vol)ホルムアルデヒド水溶液、あるいは、5% (vol/vol)アセトアルデヒド水溶液により室温にて2h処理を行い、0.4% (wt/vol)NaBH₄により室温にて24h還元し、疎水性の異なる2種のコントロールガラスHCHO-, AA-glassを作製した(図32)。

第2項 カルボキシル基固定化ガラス

第2章と同様の方法により、AMP-glassを、5% (wt/vol)グリオキシル酸水溶液、あるいは、5% (vol/vol)4-アセチル酪酸水溶液により室温にて2h処理を行い、0.4% NaBH₄により室温にて24h還元し、カルボキシル基を固定化したGA-glassおよびABA-glassを作製した。

第3項 アミノ基固定化ガラス

前項にて作製したGA-, ABA-glassを1% (wt/vol)エチレンジアミン水溶液(pH 4.5)中に浸漬後1-エチル-3-(3-ジ

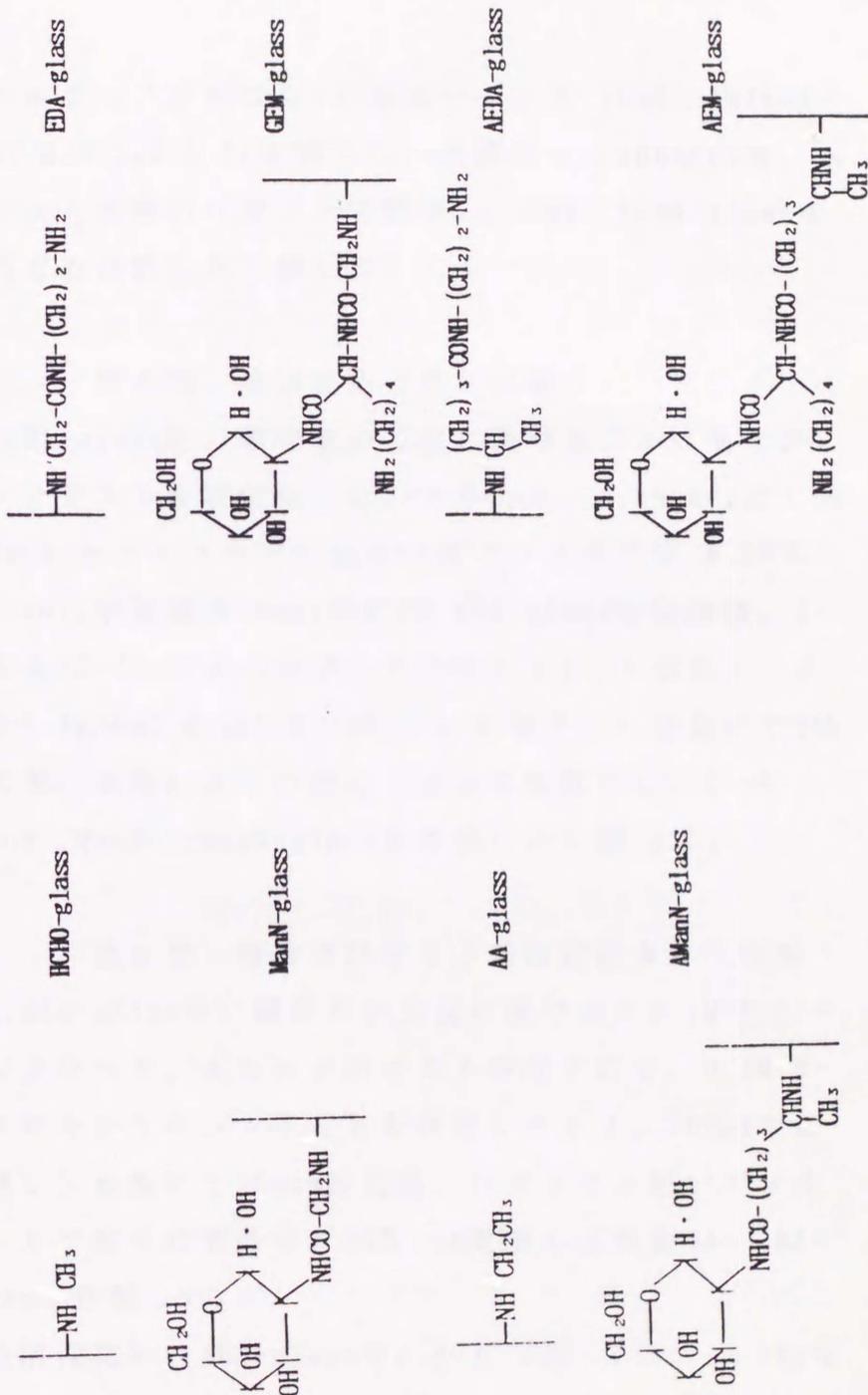


図 32 各修飾ガラスの構造

メチルアミノプロピル)カルボジイミド (WSC) 1g/6ml dist H₂O (pH 4.5)を滴下し、室温にて、20h反応後、水洗により余剰のリガンドを除去し、EDA-, AEDA-glassをそれぞれ作製した(図 32)。

第4項 糖固定化ガラス作製

GA, ABA-glassに、第IV章の方法に基づきグルコサミン、マンノサミンを固定化した。すなわち、0.1N HClにてpH 4.5としたグルコサミンあるいはマンノサミン 0.25% (wt/vol)水溶液中100ml中にGA, ABA-glassを浸漬後、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (WSC) 1g/6ml dist H₂O (pH 4.5)を滴下し、室温にて20h反応後、水洗により余剰のリガンドを除去し、GlcN-, AGlcN-, ManN-, AManN-glassを作製した(図 32)。

第5項 糖およびアミノ基固定化ガラス作製

GA-, ABA-glassを、第III章の方法に基づき、0.1M N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド存在下にて、0.1M N-ヒドロキシスクシンイミドを含むジオキサン100ml中に浸漬し、室温にて70min反応後、ジオキサン続いてメタノールで十分に洗浄し、80°C 1h乾燥し活性化GA-, ABA-glassを作製した。

この活性化GA-, ABA-glassを、N-ε-CBZ-リジン 0.25gを50%ジメチルホルムアミドを含む0.1M NaHCO₃溶液(pH

9.5)に溶解したリガンド溶液に浸漬し、室温にて1h反応後、水洗し、GA-Lys-,ABA-Lys-glassを作製した。次に、このGA-Lys-,ABA-Lys-glassの活性化を、上記と同様の方法により行い、得られた活性化GA-Lys-,ABA-Lys-glassを、0.25% (wt/vol)グルコサミンあるいはマンノサミンの0.1MNaHCO₃溶液 (pH 8.0)に浸漬し、室温にて1h反応後、水洗し、その後、Kisoらの方法^{128,129}に従いトリフルオロ酢酸100mlにチオアニソール 0.5mlを加えた溶液中に室温にて4h浸漬することによりCBZ基の除去を行った。これにより、アミノ基および糖を固定化したGEG-,AEG-,GEM-,AEM-glassを作製した(図 32)。

なお、マンノサミンを固定化したガラス(ManN-,AManN-,GEM-,AEM-glass)は、C. albicansの付着実験に、グルコサミンを固定化したガラス(GlcN-,AGlcN-glass,GEG-,AEG-glass)は、C. tropicalisの付着実験に用いた。

以上の操作により疎水性の低い高い、糖の有無、アミノ基の有無により、表 3 に示す8種の修飾ガラスを作製した。

第6項 修飾ガラスの定性および定量

図 33に示すように、第Ⅲ章第2節の方法により各修飾ガラスを加水分解し、Wolfomらの方法に従い¹³⁰、薄層クロマトグラフィーにより、各ガラス面に、エチレンジ

表 3 各修飾ガラスの性質

		静電的相互作用	
		-NH ₃ ⁺ 基 無	-NH ₃ ⁺ 基 有
疎水的相互作用	疎水性・低	糖 無	HCHO-glass EDA-glass
		糖 有	ManN-glass GEM-glass GlcN-glass GEG-glass
	疎水性・高	糖 無	AA-glass AEDA-glass
		糖 有	AManN-glass AEM-glass AGlcN-glass AEG-glass

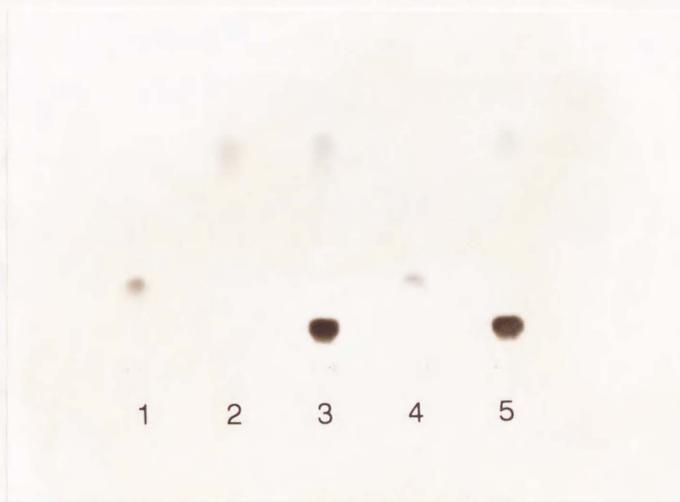


図 33 薄層クロマトグラフィーによる定性
 Lane1~3:標準物質, 1:エチレンジアミン, 2:マンノサ
 ミン, 3:マンノサミンおよびリジン
 Lane4,5:修飾ガラスの酸水解物, 4:EDA-glass, 5:GEM-
 glass

アミン、マンノサミン、およびリジンが固定化されていることを確認した。

また、第Ⅲ章第2節と同様の方法により、固定化された基の定量を行った結果を表4に示す。

第7項 修飾ガラスの疎水性

各修飾ガラスの蒸留水に対する接触角を第Ⅱ章と同様の方法により測定した。

図34に示すように、HCHO-glass、EDA-glass、ManN-glassおよびGEM-glassの接触角において、各ガラス間で有意差は認めなかった。また、これらのガラスは、唾液コートしたレジンとほぼ等しい接触角を示した。以後、これらのガラス群を親水性ガラスと呼ぶ。

また、AA-glass、AEDA-glass、AManN-glassおよびAEM-glassの接触角において、各ガラス間で有意差は認めなかった。また、これらのガラスは、レジンとほぼ等しい接触角を示した。以後、これらのガラス群を疎水性ガラスと呼ぶ。

この親水性ガラスおよび疎水性ガラス群間では、全てのガラス間で有意差を認めた。

表 4 各修飾ガラスへのリガンドの固定化量

	Amount of ligand immobilized
EDA-glass	$2.90 \pm 0.07 \text{ nmol/cm}^2$
AEDA-glass	$2.75 \pm 0.32 \text{ nmol/cm}^2$
AManN-glass	$2.60 \pm 0.28 \text{ nmol/cm}^2$
GEM-glass	
Lys	$2.80 \pm 0.21 \text{ nmol/cm}^2$
ManN	$2.85 \pm 0.18 \text{ nmol/cm}^2$

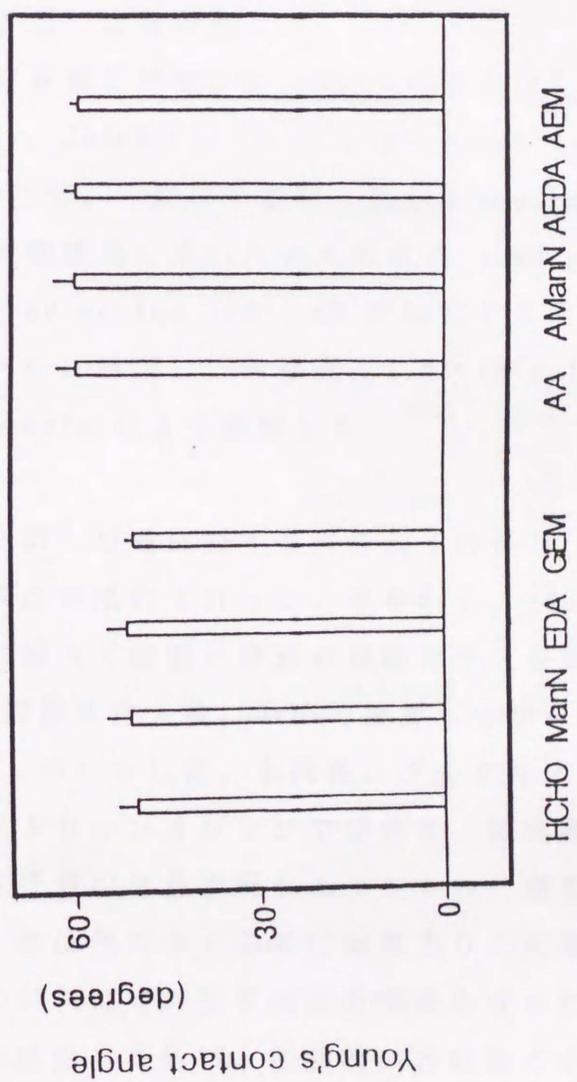


図 34 各修飾ガラスの Young の接触角

第3節 C. albicansおよびC. tropicalisの付着

第1項 培養条件

本実験では第Ⅲ章と同様にC. albicansおよびC. tropicalisを用い、250mMグルコースを含むyeast nitrogen base mediumにて、一昼夜培養後、Batch mediumに接種し、対数増殖期後期に遠心により集菌後 10mM phosphate buffered saline (PBS; pH 7.2)にて2回洗浄後同バッファー中に懸濁し、菌濃度を 1.0×10^7 cells/mlに spectrophotometerにより調整した。

第2項 付着に対する付着因子の寄与

第Ⅲ章と同様の方法にて行った。すなわち、1000mlビーカーの壁面に沿って底面に垂直に修飾ガラスを保持し 300mlの菌懸濁液を注入後200rpmで攪拌しながら37℃にて3hインキュベートした。水洗後、グルタルアルデヒドで固定、アクリジンオレンジで染色後、蛍光顕微鏡下で1枚につき任意の20視野をカウントし、第Ⅲ章第2項と同様に、各修飾ガラスの単位面積当りの付着菌数を求め、4枚の試料について平均付着菌数を求めた。各付着実験は2回繰返して行い、各菌株の各修飾ガラスに対する平均付着菌数 \pm S.E.を求めた。

C. albicansおよびC. tropicalisの各修飾ガラスに対する付着実験の結果を 図 35,36に示す。C. albicansの

Adherence of *C. albicans*

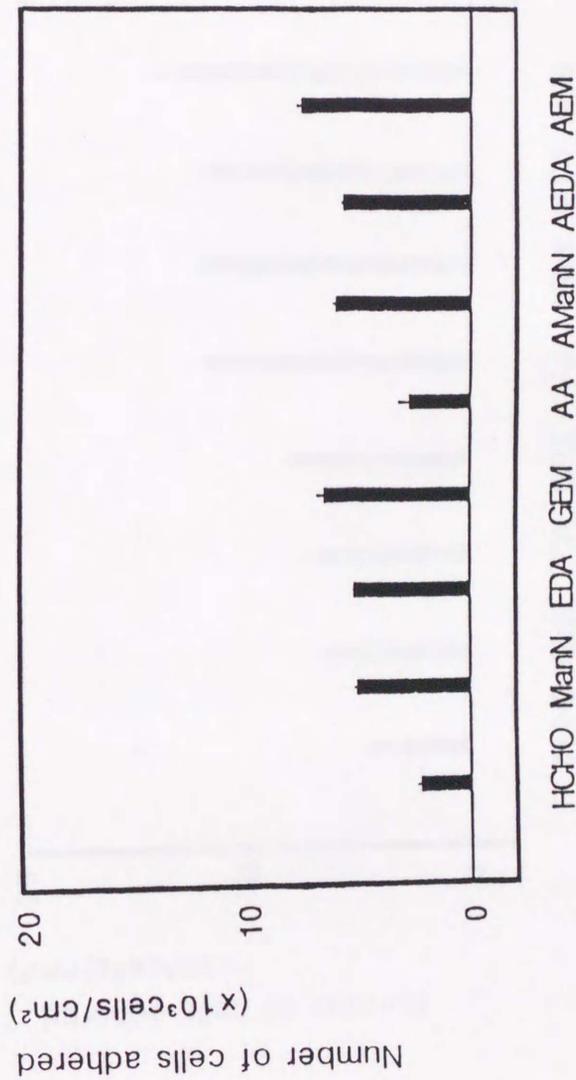


図 35 各修飾ガラスに対する *C. albicans* の付着実験の結果

Adherence of *C. tropicalis*

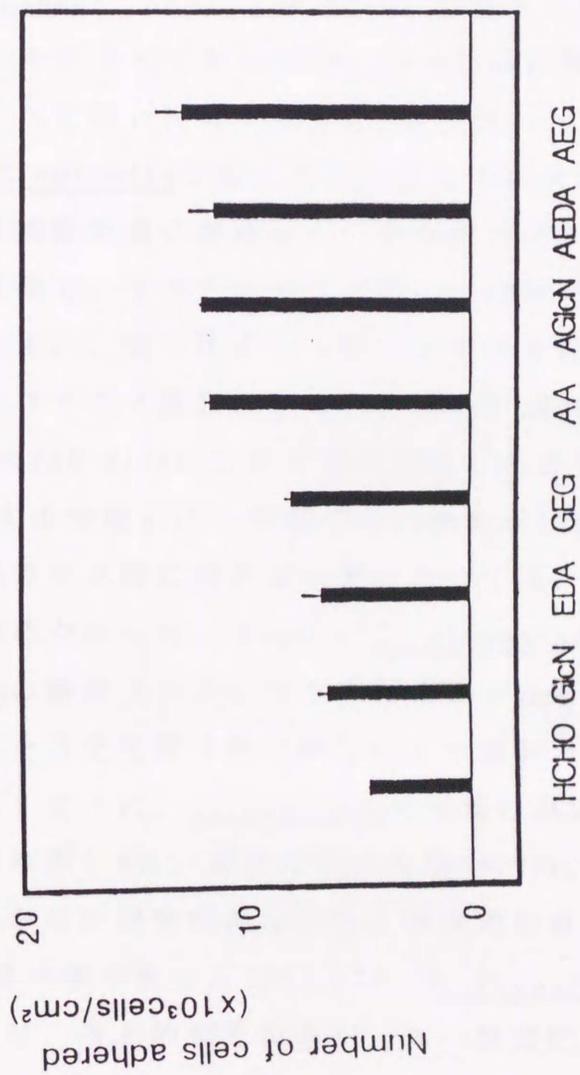


図 36 各修飾ガラスに対する *C. tropicalis* の付着実験の結果

付着においては、糖およびアミノ基固定化ガラス (ManN-, EDA-, GEM-, AManN-, AEDA-, AEM-glass) に対する付着は、コントロールガラスであるHCHO-, AA-glassに対する付着に対してすべて高い付着を示した ($p < 0.01$)。

一方、C. tropicalisでは、ガラス表面の疎水性の違いによる付着菌数の違いが著しく、疎水性ガラス群と親水性ガラス群間で、すべてのガラス間に有意差を認めた ($p < 0.01$)。また、親水性ガラス群に対する付着においては、糖およびアミノ基固定化ガラス (GlcN-, EDA-, AGlcN-, AEDA-, GEG-, AEG-glass) に対する付着は、すべてHCHO-glassに対する付着に比べ有意に高い値を示した。しかし、疎水性ガラス群に対する付着においては、このような傾向は認めなかった。さらに、C. albicansおよびC. tropicalisの修飾ガラスに対する付着における各付着因子の寄与率を3元配置分散分析法により求めた結果、表5に示すように、C. albicansの付着においては、疎水的相互作用4.9%、静電的相互作用38.9%、特異的付着43.6%および静電的相互作用と特異的付着の交互作用4.3%の寄与率であった ($p < 0.01$)。C. tropicalisの付着においては、疎水的相互作用76.7%、静電的相互作用2.8%、特異的付着3.7%であった ($p < 0.01$)。

表 5 分散分析表

C. albicans

要因	S	f	V	F	%
A : 疎水の因子	987.8	1	978.8	35.7**	4.9
B : 静電的因子	7981.4	1	7981.4	290.9**	38.9
C : 特異的因子	8916.8	1	8916.8	325.0**	43.6
A × B	2.1	1	2.1	0.1	—
A × C	93.8	1	93.8	3.4	—
B × C	895.1	1	895.1	32.6**	4.3
A B C	0.4	1	0.4	0.0	—
e	1536.2	56	27.4	—	8.4
T	20404.6	63	—	—	100.0

** p<0.01

C. tropicalis

要因	S	f	V	F	%
A : 疎水の因子	51823.4	1	51823.4	308.1**	76.7
B : 静電的因子	2038.7	1	2038.7	12.1**	2.8
C : 特異的因子	2630.6	1	2630.6	15.6**	3.7
A × B	955.9	1	955.9	5.7	—
A × C	204.3	1	204.3	1.2	—
B × C	27.6	1	27.6	0.1	—
A B C	233.9	1	233.9	1.4	—
e	9419.8	56	168.2	—	16.8
T	67334.4	63	—	—	100.0

** p<0.01

第4節 考察

Candidaのレジンをはじめとするplastic表面へのin vitroにおける付着においては、一般に疎水的相互作用が重要とされ^{27, 28, 31, 33, 59, 61}、疎水性の高いC. tropicalisの付着がC. albicansの付着と共に多いとされている^{60, 61}。そして、C. albicansおよびC. tropicalisのレジンへの付着は、レジンを唾液あるいは血清でコートすることにより変化することが報告されている^{24, 25, 30, 31}。このような付着の変化は、thermodynamicsや疎水的相互作用に基づくvan der Waals力の変化に起因すると考えられている^{31, 61}。しかしながら、Candidaの付着において、菌体および被着体の物理化学的性質に起因する非特異的付着因子および被着体表面の糖鎖に対する特異的付着などが関与することを既に報告した。従って、このような付着の変化は、C. albicansおよびC. tropicalisの付着因子の寄与の相違に由来する複雑な現象によると考えられる。そこで、本実験では、C. albicansおよびC. tropicalisを用いて、両菌株間の付着機構の違い、すなわち、疎水的相互作用、静電的相互作用および特異的付着の各付着因子の寄与の違いを三元配置分散分析により検討を行った。

三元配置分散分析を行うため、表3のような性質を有する修飾ガラスを作製した。すなわち、疎水的相互作用の関与を調べる目的で、唾液コートしたレジンとほぼ

等しい接触角を示す親水性ガラス群およびレジンとほぼ等しい接触角を示す疎水性ガラス群を作製した。また、特異的な付着に対して、C. albicansでは、第IV章の結果から、特に付着の高かったマンノースに対する特異的付着のモデルとしてManN-glassを、C. tropicalisでは、GlcN-glassを用いた。さらに、静電的相互作用の関与を調べる目的で、この糖固定化ガラスおよびコントロールガラスと等しい表面自由エネルギーをもつアミノ基を固定化したガラスを作製した。

C. albicansとC. tropicalisの付着における各付着因子の付着への寄与は、両菌株間で異なっており(表 5)、
図 35に示すようにC. albicansの付着においては、糖およびアミノ基固定化ガラス(ManN-, EDA-, GEM-, AManN-, AEDA-, AEM-glass)に対する付着は、HCHO-, AA-glassに対する付着に対してすべて有意に高い付着を示し($p < 0.01$)、また、HCHO-, AA-glassに対する付着間では、有意差を認めなかった。さらに、表 5 に示すように、付着への各因子の寄与は、疎水的相互作用4.7%、静電的相互作用38.9%、特異的付着43.6%であり、その付着において、特に、特異的付着および静電的相互作用が重要であると考えられる。

C. tropicalisの付着においては、
図 36に示すように、疎水性ガラス群と親水性ガラス群間で、すべてのガラス間に有意差を認めた($p < 0.01$)。一方、親水性ガラス群に

対する付着においては、糖およびアミノ基固定化ガラスに対する付着は、すべてコントロールガラスに対する付着に比べ有意に高い値を示したが、疎水性ガラス群内では、各ガラス間で有意差を認めなかった。この結果は、静電的相互作用および特異的付着因子に比べ疎水的相互作用が、より強く関与していることを示していると考えられる。さらに、表 5 に示すように、付着への各因子の寄与は、疎水的相互作用が76.7%と最も大きく、静電的相互作用2.8%、特異的付着3.7%であり、多くの報告^{27, 28, 31, 33, 61}と同様に C. tropicalis の付着においては、特に、疎水的相互作用が重要であると考えられる。このように、両菌株間において、各付着因子の寄与は異なり、C. albicans の付着においては、特異的付着および静電的相互作用の寄与が大きく、C. tropicalis の付着においては疎水的相互作用の関与が大きいことが示唆された。

第 VI 章 結果の要約

1. Candida の付着は、菌体および被着体表面の物理化学的性質により変化し、疎水性の高い菌株の疎水性表面に対する付着においては疎水的相互作用がより重要であり、疎水性の低い菌株の付着においては静電的相互作用がより強く関与していることが明らかとなった。

2. タンパク固定化ガラスに対する付着実験の結果から、C. albicansの付着においては、特異的付着、静電的相互作用の関与を認め、C. tropicalisの付着では、特異的付着および疎水的相互作用の関与を認めた。

3. C. albicansおよびC. tropicalisの特異的付着を検討した結果、C. albicansは、マンノース、フコース、ガラクトサミンおよびマンノサミンに対し特異的に付着し、さらに、糖付着阻害実験の結果、これらの糖に対する特異性は、それぞれ単一の糖に対する特異性ではなく、broadな特異性によることが示唆された。

一方、C. tropicalisは、グルコサミンに対してのみ特異的付着を示した。

4. 三元配置分散分析により各付着因子の寄与を検討した結果、C. albicansの付着においては、静電的相互作用および特異的付着の関与が大きく、C. tropicalisの付着においては、疎水的相互作用が重要であることが示

唆された。

以上の結果より、Candidaの付着には、被着体および菌体表面の物理化学的性質によって決定される非特異的付着機構、および被着体表面に存在する糖に対する菌株固有の特異的付着機構が関与していることが明らかとなった。

第 VII 章 考察

本研究の目的は、Candidaの固体表面に対する付着に関与する因子を詳細に検討することである。

従来、Candidaのレジン、カテーテルなどのプラスチック表面に対する付着は、被着体表面あるいは菌体表面の疎水性から、すなわち、熱力学の理論に基づいて検討が行われている。しかしながら、口腔内においては、義歯表面にペリクルが形成され、表面の物理化学的性質が変化し、さらに、このようなペリクルが菌に対し特異的な付着部位を与えることが報告されており、種々の付着因子が複雑に関与していると考えられる。このため、Candidaの付着に関与する個々の付着因子について検討を加えることが困難となっている。従って、本研究においては、修飾ガラスを用いてより単純化した系により付着に関与する因子について検討を行った。

まず、第 II 章で述べたように非特異的付着因子の関与について、Satouらの方法により作製した修飾ガラスを用いて検討した結果、疎水性の高い菌株の付着においては疎水的相互作用の関与が大きく、疎水性の低い菌株の付着においては静電的相互作用がより重要であることが明らかとなった。この結果は、Satouらがstreptococciを用いて、また van Loosdrechtらが、二十数種の菌を用いて検討を行った結果と一致するものであり、菌付着においては、菌体および被着体表面の物理化学的性質が重

要であり、疎水的相互作用および静電的相互作用の両者が関与していると考えられる。

しかし、in vivoにおいては、義歯表面には、種々の糖タンパクを含む唾液、浸出液などの吸着により、ペリクルが形成され、このようなペリクルがreceptorとなりうることが報告されている。C. albicansの特異的付着については、最表層のマノプロテインの関与が重要であると報告され、特にそのタンパク部分が重要であることがCritchley & Douglasによって示されている。

一方、被着体表面に存在する糖タンパクの糖鎖は、数種の糖から構成されるヘテロ糖鎖であり、また、Candidaの特異的付着のreceptorとして種々の糖、アミノ糖が報告され一致した見解をみていない。このため、streptococciなどの付着実験で行われている酵素によるシアル酸の除去あるいは、Candidaの細胞、fibrin clotsに対する付着実験において行われている糖あるいはハプテン阻害実験では、十分な知見が得られないことが考えられる。従って、第三章では、被着体表面に存在するタンパクからの糖鎖の化学的切断を行いCandidaの被着体表面に存在する糖鎖に対する特異的付着の関与の有無を検討し、さらに、第四章においては、単一の糖のみの存在する糖固定化ガラスを用いて、第三章でみられた特異的付着においてreceptorとなりうる糖の検討を行った。また、ペリクルに対する付着は、唾液あるいは血清によ

りコートしたレジンを被着体として検討が行われているが、著者は、assay中に(200rpm, 3h incubateにより)、レジン表面から約60%の唾液タンパクが離脱することを確認した。このような、assay中のレジン表面からのペリクルの離脱は、付着実験の結果の解釈において次の2点の問題点を生ずると考えられる。まず、ペリクルに対して付着した Candida が、レジン-ペリクルあるいはペリクル-ペリクル間のタンパクの離脱により除去される。つぎに、ペリクルの離脱によりレジンが露出し、Candida の付着がペリクルに対するものか、レジンに対するものかの結果の判定が困難となることである。第2の可能性については、Gibbons & Etherdenが streptococci の実験的ペリクルおよび uncoated mineral との interaction の区別の必要性を述べている。

従って、Candida の被着体表面に存在するタンパクに対する付着を検討する上でタンパクの固定化が必要と考えられる。このため、第Ⅲ章では、タンパクをガラス面に単分子層により固定化を行い、タンパク固定化ガラスの物理化学的性質および糖鎖の有無と Candida の付着との関係を検討した。その結果、非特異的付着因子の関与としては、第Ⅱ章と同様に、C. albicans の付着では、静電的相互作用の関与が重要であり、C. tropicalis の付着においては、疎水的相互作用の関与を認めた。これに加えて、両菌株の付着において、タンパクに存在する糖

鎖に対する特異的付着が関与していることが示された。さらに、第IV章において、糖固定化ガラスを用い、このような Candida の特異的付着において receptor となりうる糖の検索を行った結果、C. albicans では、マンノース、マンノサミン、フコースおよびガラクトサミンに対する特異的付着を認め、さらに、これらの特異性は broad な specificity によることが示唆された。また、C. tropicalis の特異的付着に対してはほとんど報告はないが、グルコサミンに対する特異性を認めた。

第II～IV章の結果から、Candida、特に C. albicans および C. tropicalis の付着には、被着体および菌体表面の物理化学的性質によって、疎水的相互作用および静電的相互作用が関与し、これと同時に、被着体表面に存在する糖鎖に対する菌株固有の特異的付着が関与していることが明らかとなった。このような付着因子は、すなわち、疎水的相互作用、静電的相互作用および特異的付着因子は、streptococci においては、long range, mid range, short range の interaction として、複雑に関与していることが Busscher & Weerkamp によって仮説的に述べられている。従って、このような各付着因子の寄与の違いが各菌株の種々の表面への付着しやすさを決定していると考えられる。従って、第V章においては、非特異的付着因子および特異的付着因子について三元配置分散分析により検討を加えた。本研究において用いた疎水性ガラス

および親水性ガラスの接触角は、それぞれ、低温長時間重合したレジンおよび唾液コートしたレジンの接触角を基準として決定した。また、静電的相互作用および特異的付着を検討する目的でアミノ基固定化ガラスおよび糖固定化ガラスを作製した。

その結果、C. albicansの付着においては、静電的相互作用および特異的付着の関与が大きく、C. tropicalisの付着においては、疎水的相互作用が重要であることが示唆された。

以上のように、Candidaの付着機構について種々の知見を得たが、今後より in vivoに近い実験系により、その付着を検討していく所存である。

試薬

実験に用いた試薬は、下記の会社より購入した。

Aldrich Chemical Company, Inc.

3-aminopropyltriethoxysilane
4-acetyl butyric acid
ethlenediamine dihydrochloride
tetramethyl urea

片山化学工業

glyoxylic acid
hexylaldehyde
tetrahydrofuran,

Sigma Chemical Co.

p-aminophenyl- β -D-fucopyranoside
p-aminophenyl- β -D-galactopyranoside
p-aminophenyl- β -D-glucopyranoside
p-aminophenyl- α -D-mannopyranoside
N- ϵ -benzyloxycarbonyl-L-lysine (N- ϵ -CBZ-L-lysine)
trifluoromethanesulfonic anhydride
mucin, γ -globulin, fibrinogen, serum, albumin
concanavalin A

和光純薬工業

1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl) carbodiimide

ナカライテスク (半井薬品工業)

resorcyaldehyde

2,4-dinitrophenylhydrazine

N,N'-dicyclohexylcarbodiimide

N-hydroxysuccinimide

thioanisole

trifluoroacetic acid

その他の試薬は、片山化学工業、ナカライテスク (半井薬品工業)、和光純薬工業から購入した。

参考文献

1. 浜田泰三 (1983):
デンチャープラークコントロール. 永末書店,
京都, 1-47, 昭和58.
2. Davenport, J.C. & Hamada, T. (1979):
Denture stomatitis—A literature review
with case reports.
Hiroshima J Med Sci 28, 209-220.
3. Davenport, J.C. (1970):
The oral distribution of candida in den-
ture stomatitis.
Brit Dent J 129, 151-156.
4. Olsen, I. (1974):
Denture stomatitis. Occurrence and distri-
bution of fungi.
Acta Odontol Scand 32, 329-333.
5. Budtz-Jørgensen, E. (1974):
The significance of *Candida albicans* in
denture stomatitis.
Scand J Dent Res 82, 151-190.
6. Bergendal, T., Holmberg, K. & Nord, C.-E.
(1979):
Yeast colonization in the oral cavity and
feces in patients with denture stomatitis.
Acta Odontol Scand 37, 37-45.
7. 玉本光弘 (1984):
デンチャー プラークのカンジダに関する研究
(第1報) デンチャー プラークのカンジダ叢
と義歯性口内炎との関係.
廣大歯誌 16, 242-249, 昭和59.
8. Tamamoto, M., Miyake, Y., Fujita, Y., Suginaka,
H. & Hamada, T. (1986):
Frequency and distribution of Candida spe-
cies from denture wearers.
Hiroshima J Med Sci 35, 39-43.

9. Catalan, A., Herrera, R. & Martinez, A. (1987):
Denture plaque and palatal mucosa in denture stomatitis: Scanning electron microscopic and microbiologic study.
J Prosthet Dent 57, 581-586.
10. Fouché, M.H., Dent, M., Slabbert, J.C.G. & Coogan, M.M. (1987):
Candidal antibodies in patients undergoing treatment for denture stomatitis.
J Prosthet Dent 57, 587-591.
11. Shakir, B.S., Martin, M.V. & Smith, C.J. (1981):
Induced palatal candidosis in the Wistar rat.
Arch Oral Biol 26, 787-793.
12. Martin, M.V. Craig, G.T. & Lamb, D.J. (1984):
An investigation of the role of true hypha production in the pathogenesis of experimental oral candidosis.
J Med Vet Mycol (Sabouraudia) 22, 471-476.
13. Odds, F.C. (1988):
Candidosis of the oropharynx. in Candida and candidosis, 2nd ed. 117-123.
Butler & Tanner Ltd., London.
14. Bergendal, T. & Isacsson, G. (1983):
A combined clinical, mycological and histological study of denture stomatitis.
Acta Odontol Scand 41, 33-44.
15. 玉本光弘 (1984):
デンチャー プラークのカンジダに関する研究.
(第2報) 真菌細胞壁溶解酵素による床用レジ
ンに付着したカンジダの除去.
廣大歯誌 16, 250-259, 昭和59.
16. Watkinson, A.C., McCreight, M.C. & Warnock, D.W. (1985):
Prevalence and persistence of different strains of *Candida albicans* in treatment

of denture stomatitis.
J Prosthet Dent 53, 365-366.

17. 小谷博夫, 貞森紳丞, 二川浩樹, 浜田泰三 (1989):
義歯性口内炎の臨床的研究. 第1報 デンチャー
— プラークと義歯性口内炎との関係.
補綴誌 33, 208-214, 平成 1.
18. Sönju, T. & Rölla, G. (1973):
Chemical analysis of the acquired pellicle
formed in two hours on cleaned human teeth
in vivo. Rate of formation and amino acid
analysis.
Caries Res 7, 30-38.
19. Öste, R., Rönström, A., Birkhed, D., Edwardsson,
S. & Stenberg, M. (1981):
Gas-liquid chromatographic analysis of
amino acids in pellicle formed on tooth
surface and plastic film in vivo.
Arch Oral Biol 26, 635-641.
20. Millin, D.J. & Smith, M.H. (1961):
Nature and composition of dental plaque.
Nature 189, 664-665.
21. Smith M.H. (1964):
Amino-acid analyses of denture pellicle
and a glycoprotein-containing component of
saliva.
J Dent Res 43, 302.
22. 真田一男, 西野和之, 旗手敏 (1982):
床用レジンに吸着する耳下腺唾液タンパク成分
について.
補綴誌 26, 1128-1134, 昭和 57.
23. Samaranyake, L.P. & MacFarlane, T.W. (1980):
An in-vitro study of the adherence of Candida albicans to acrylic surfaces.
Arch Oral Biol 25, 603-609.
24. Samaranyake, L.P., McCourtie, J. & MacFarlane,
T.W. (1980):

Factors affecting the in-vitro adherence of Candida albicans to acrylic surfaces. Arch Oral Biol 25, 611-615.

25. McCourtie, J. & Douglas, L.J. (1981):
Relationship between cell surface composition of Candida albicans and adherence to acrylic after growth on different carbon sources.
Infect Immun 32, 1234-1241.
26. McCourtie, J. & Douglas, L.J. (1984):
Relationship between cell surface composition, adherence, and virulence of Candida albicans.
Infect Immun 45, 6-12.
27. Minagi, S., Miyake, Y., Inagaki, K., Tsuru, H. & Suginaka, H. (1985):
Hydrophobic interaction in Candida albicans and Candida tropicalis adherence to various denture base resin materials.
Infect Immun 47, 11-14.
28. Miyake, Y., Fujita, Y., Minagi, S., & Suginaka, H. (1986):
Surface hydrophobicity and adherence of Candida to acrylic surfaces.
Microbios 46, 7-14.
29. McCourtie, J., MacFarlane, T.W. & Samaranayake, L.P. (1986):
A comparison of the effects of chlorhexidine gluconate, amphotericin B and nystatin on the adherence of Candida species to denture acrylic.
J Antimicrob Chemother 17, 575-583.
30. McCourtie, J., MacFarlane, T.W. & Samaranayake, L.P. (1986):
Effect of saliva and serum on the adherence of Candida species to chlorhexidine-treated denture acrylic.

J Med Microbiol 21, 209-213.

31. 皆木省吾 (1986):
義歯床用レジンへのカンジダ属の付着機構における疎水的相互作用の関与.
広歯誌 18, 1-14, 昭和 61.
32. Rotrosen, D., Gibson, T.R. & Edwards, Jr. J.E. (1983):
Adherence of Candida species to intravenous catheters.
J Infect Dis 147, 594-595.
33. Klotz, S.A., Drutz, D.J. & Zajic, J.E. (1985):
Factors governing adherence of Candida species to plastic surfaces.
Infect Immun 50, 97-101.
34. Tronchin, G., Bouchara, J.-P., Robert, R. & Senet, J.-M. (1988).
Adherence of Candida albicans germ tubes to plastic: Ultrastructural and molecular studies of fibrillar adhesins.
Infect Immun 56, 1987-1993.
35. Kimura, L.H. & Pearsall, N.N. (1978):
Adherence of Candida albicans to human buccal epithelial cells.
Infect Immun 21, 64-68.
36. Kimura, L.H. & Pearsall, N.N. (1980):
Relationship between germination of Candida albicans and increased adherence to human buccal epithelial cells.
Infect Immun 28, 464-468.
37. Sobel, J.D., Myers, P.G., Kaye, D. & Levison, M.E. (1981):
Adherence of Candida albicans to human vaginal and buccal epithelial cells.
J Infect Dis 143, 76-82.
38. Samaranyake, L.P. & MacFarlane, T.W. (1981):
The adhesion of the yeast Candida albicans

- to epithelial cells of human origin in vitro.
Arch Oral Biol 26,815-820.
39. Segal, E., Lehrer, N. & Ofek, I. (1982):
Adherence of Candida albicans to human vaginal epithelial cells: Inhibition by amino sugars.
Expl Cell Biol 50,13-17.
40. Sandin, R.L., Rogers, A.L., Patterson, R.J. & Beneke, E.S. (1982):
Evidence for mannose-mediated adherence of Candida albicans to human buccal cells in vitro.
Infect Immun 35,79-85.
41. Sobel, J.D., Myers, P., Levison, M.E. & Kaye, D. (1982):
Comparison of bacterial and fungal adherence to vaginal exfoliated epithelial cells and human vaginal epithelial tissue culture cells.
Infect Immun 35,697-701.
42. Epstein, J.B., Kimura, L.H., Menard, T.W., Truelove, E.L. & Pearsall, N.N. (1982):
Effects of specific antibodies on the interaction between the fungus Candida albicans and human oral mucosa.
Arch Oral Biol 27,469-474.
43. Vudhichamnong, K., Walker, D.M. & Ryley, H.C. (1982):
The effect of secretory immunoglobulin A on the in vitro adherence of the yeast Candida albicans to human oral epithelial cells.
Arch Oral Biol 27,617-621.
44. Douglas, L.J. & McCourtie, J. (1983):
Effect of tunicamycin treatment on the adherence of Candida albicans to human

buccal epithelial cells.
FEMS Microbiol Lett 16,199-202.

45. Lee, J.C. & King, R.D. (1983):
Characterization of Candida albicans adherence to human vaginal epithelial cells in vitro.
Infect Immun 41,1024-1030.
46. Persi, M.A., Burnham, J.C. & Duhring, J.L. (1985):
Effects of carbon dioxide and pH on adhesion of Candida albicans to vaginal epithelial cells.
Infect Immun 50,82-90.
47. Reinhart, H., Muller, G. & Sobel, J.D. (1985):
Specificity and mechanism of in vitro adherence of Candida albicans.
Ann Clin Lab Sci 15,406-413.
48. Ghannoum, M.A., Burns, G.R., Elteen, K.A. & Radwan, S.S. (1986):
Experimental evidence for the role of lipids in adherence of Candida spp. to human buccal epithelial cells.
Infect Immun 54,189-193.
49. Klotz, S.A. & Penn, R.L. (1987):
Multiple mechanisms may contribute to the adherence of Candida yeasts to living cells.
Cur Microbiol 16,119-122.
50. Critchley, I.A. & Douglas, L.J. (1987):
Role of glycosides as epithelial cell receptors for Candida albicans .
J Gen Microbiol 133,637-643.
51. Sandin, R.L. (1987):
The attachment to human buccal epithelial cells by Candida albicans : An in vitro kinetic study using concanavalin A.

Mycopathologia 98,179-184.

52. Tobgi, R.S., Samaranayake, L.P. & MacFarlane, T.W. (1987):
Adhesion of Candida albicans to buccal epithelial cells exposed to chlorhexidine gluconate.
J Med Vet Mycol (Sabouraudia) 25,335-338.
53. Ghannoum, M.A. & Elteen, K.A. (1987):
Effect of growth of Candida spp. in the presence of various glucocorticoids on the adherence to human buccal epithelial cells.
Mycopathologia 98,171-178.
54. Kennedy, M.J., Volz, P.A., Edwards, C.A. & Yancey, R.J. (1987):
Mechanisms of association of Candida albicans with intestinal mucosa.
J Med Microbiol 24,333-341.
55. Lehrer, N., Segal, E., Lis, H. & Gov, Y. (1988):
Effect of Candida albicans cell wall components on the adhesion of the fungus to human and murine vaginal mucosa.
Mycopathologia 102,115-121.
56. Kennedy, M.J., Rogers, A.L., Hanselmen, L.R., Soll, D.R. & Yancey, R.J. (1988):
Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in Candida albicans white and opaque phenotypes.
Mycopathologia 102,149-156.
57. Maish, P.A. & Calderone, R.A. (1981):
Role of surface mannan in the adherence of Candida albicans to fibrin-platelet clots formed in vitro.
Infect Immun 32,92-97.
58. Samaranayake, L.P., McLaughlin, L. & MacFarlane, T. (1988):
Adherence of Candida species to fibrin

clots in vitro.

Mycopathologia 102, 135-138.

59. Rotrosen, D., Calderone, R.A. & Edwards, Jr. J.E. (1986):
Adherence of Candida species to host tissues and plastic surfaces.
Rev Infect Dis 8, 73-85.
60. Kennedy, M.J. (1988):
Adhesion and association mechanisms of Candida albicans.
Cur Top Med Mycol 2, 73-169.
61. Odds, F.C. (1988):
Pathogenesis of candidosis. in Candida and candidosis, 2nd ed. 252-278, Butler & Tanner Ltd., London.
62. Douglas, L.J. (1985):
Surface composition and adhesion of Candida albicans.
Biochem Soc Transactions 13, 982-984.
63. Douglas, L.J. (1987):
Adhesion of Candida species to epithelial surfaces.
CRC Crit Rev Microbiol 15, 27-43.
64. Rosenberg, M., Rosenberg, E., Judes, H. & Weiss, E. (1983):
Bacterial adherence to hydrocarbons and to surfaces in the oral cavity.
FEMS Microbiol Lett 20, 1-5.
65. Rosenberg, M. & Kjelleberg, S. (1986):
Hydrophobic interactions: Role in bacterial adhesion.
Adv Microb Ecol 9, 353-393.
66. Beachey, E.H. (1981):
Bacterial adherence: Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces.

J Infect Dis 143, 325-345.

67. Doyle, R.J., Nesbitt, W.E. & Taylor, K.G. (1982):
On the mechanism of adherence of Streptococcus sanguis to hydroxylapatite.
FEMS Microbiol Lett 15, 1-5.
68. Jones, G.W. & Isaacson, R.E. (1983):
Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors.
CRC Crit Rev Microbiol 10, 229-260.
69. Ofek, I. & Perry, A. (1985):
Molecular basis of bacterial adherence to tissues.
in Molecular Basis of Oral Microbial Adhesion. Mergenhagen, S.E. & Rosan, B. (Ed.), 7-13, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
70. 森崎久雄, 服部黎子 (1986):
界面と微生物の相互作用: 界面と微生物. 学会出版センター, 東京, 1-60, 昭和61.
71. Chester, S.H. (1986):
An understanding of the forces in the adhesion of micro-organisms to surfaces.
Proc Biochem 1986, 148-152.
72. Busscher, H.J. & Weerkamp, A.H. (1987):
Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata.
FEMS Microbiol Rev 46, 165-173.
73. Mergenhagen, S.E., Sandberg, A.L., Chassy, B.M., Brennan, M.J., Yeung, M.K., Donkersloot, J. A. & Cisar, J.O. (1987):
Molecular basis of bacterial adhesion in the oral cavity.
Rev Infect Dis 9, sup 5, S467-474.
74. Gibbons, R.J. (1989):
Bacterial adhesion to oral tissues: A

- model for infectious diseases.
J Dent Res 68,750-760.
75. Satou, N., Satou, J., Shintani, H. & Okuda, K. (1988):
Adherence of streptococci to surface-modified glass.
J Gen Microbiol 134,1299-1305.
76. Busscher, H.J., Weerkamp, A.H., van der Mei, H.C., van Pelt, A.W.J., de Jong, H.P. & Arends, J. (1984):
Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion.
Appl Environ Microbiol 48,980-983.
77. van Pelt, A.W.J., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Arends, J. & Weerkamp, A.H. (1984):
Surface free energies of oral streptococci.
FEMS Microbiol Lett 25,279-282.
78. Minagi, S., Miyake, Y., Fujioka, Y., Tsuru, H. & Suginaka, H. (1986):
Cell-surface hydrophobicity of Candida species as determined by the contact-angle and hydrocarbon-adherence methods.
J Gen Microbiol 132,1111-1115.
79. van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G. & Zehnder, A.J.B. (1987):
The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion.
Appl Environ Microbiol 53,1893-1897.
80. Gerson, D.F. & Akit, J. (1980):
Cell surface energy, contact angles and phase partition II. Bacterial cells in biphasic aqueous mixtures.
Biochim Biophys Acta 602,281-284.
81. Gerson, D.F. & Scheer, D. (1980):
Cell surface energy, contact angles and

phase partition III. Adhesion of bacterial cells to hydrophobic surfaces.

Biochim Biophys Acta 602, 504-510.

82. Ofek, I., Whitnack, E. & Beachey, E.H. (1983):
Hydrophobic interactions of group A streptococci with hexadecane droplets.
J Bacteriol 154, 139-145.
83. Gibbons, R.J. & Etherden, I. (1983):
Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles.
Infect Immun 41, 1190-1196.
84. Lichtenberg, D., Rosenberg, M., Sharfman, N. & Ofek, I. (1985):
A kinetic approach to bacterial adherence to hydrocarbon.
J Microbiol Method 4, 141-146.
85. Hazen, K.C., Plotkin, B.J. & Klimas, D.M. (1986):
Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of Candida albicans and Candida glabrata.
Infect Immun 54, 269-271.
86. Weerkamp, A.H., van der Mei, H.C. & Slot, J.W. (1987):
Relationship of cell surface morphology and composition of Streptococcus salvarius K⁺ to adherence and hydrophobicity.
Infect Immun 55, 438-445.
87. Sweet, S.P., MacFarlane, T.W. & Samaranayake, L.P. (1987):
Determination of the cell surface hydrophobicity of oral bacteria using a modified hydrocarbon adherence method.
FEMS Microbiol Lett 48, 159-163.
88. Kennedy, M.J. & Sandin, R.L. (1988):

- Influence of growth conditions on Candida albicans adhesion, hydrophobicity and cell wall ultrastructure.
J Med Vet Mycol (Sabouraudia) 26,79-92.
89. Kabir, S. & Ali, S. (1983):
Characterization of surface properties of Vibrio cholerae.
Infect Immun 39,1048-1058.
90. Walan, A. & Kihlström, E. (1988):
Surface charge and hydrophobicity of Campylobacter jejuni strains in relation to adhesion to epithelial HT-29 cells.
Acta Pathol Microbiol Immunol Scand (APMIS) 96,1089-1096.
91. Stenström, T.A. (1989):
Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles.
Appl Environ Microbiol 55,142-147.
92. Hazen, B.W. & Hazen, K.C. (1988):
Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tube formation of Candida albicans.
Infect Immun 56,2521-2525.
93. Hazen, B.W. & Hazen, K.C. (1989):
Isolation of hydrophobic and hydrophilic variants of Candida albicans.
FEMS Microbiol Lett 57,167-172.
94. Sherbet, G.V. & Lakshmi, M.S. (1973):
Characterization of Escherichia coli cell surface by isoelectric equilibrium analysis.
Biochim Biophys Acta 298,50-58.
95. Heckels, J.E., Blackett, B., Everson, J.S. & Ward, M.E. (1976):

The influence of surface charge on the attachment of Neisseria gonorrhoeae to human cells.

J Gen Microbiol 96, 359-364.

96. 山田 喬 編 (1973):

細胞電気泳動実験法. 文光堂, 東京, 1-213.
昭和48.

97. Olsson, J. Glantz, P.O. & Krasse, B. (1976):
Electrophoretic mobility of oral streptococci.

Arch Oral Biol 21, 605-609.

98. Westergren, G. (1981):

Ionic interaction of oral streptococcal bacteria studied by partition in an aqueous polymer two-phase system.

Arch Oral Biol 26, 1035-1039.

99. Sakai, D.K. (1987):

Adhesion of Aeromonas salmonicida strains associated with net electrostatic charges of host tissue cells.

Infect Immun 55, 704-710.

100. Cook, G.M.W. & Stoddart, R.W. (内海耕慥監訳)
(1982):

細胞表層の糖質と機能. 学会出版センター, 東京,
昭和57.

101. Sharon, N. (大沢利昭訳) (1983):

複合糖質. 学会出版センター, 東京, 昭和58.

102. 箱守仙一郎 (1985):

細胞表面複合糖質と細胞認識: 細胞認識と動物
レクチン (大沢利昭編). 講談社, 東京, 1-28,
昭和60.

103. Cuatrecasas, P. (1970):

Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose polyacrylamide beads.

J Biol Chem 245, 3059-3065.

104. Clark, W.B. & Gibbons, R.J. (1977):
Influence of salivary components and extracellular polysaccharide synthesis from sucrose on the attachment of Streptococcus mutans 6715 to hydroxyapatite surfaces.
Infect Immun 18, 514-523.
105. Gibbons, R.J., Etherden, I. & Moreno, E.C. (1983):
Association of neuraminidase-sensitive receptors and putative hydrophobic interactions with high-affinity binding sites for Streptococcus sanguis C5 in salivary pellicles.
Infect Immun 42, 1006-1012.
106. Odds, F.C. (1987):
Candida infections: An overview.
CRC Crit Rev Microbiol 15, 1-5.
107. 矢野暢人 (1989):
固定化コンカナバリン A に対する Candida albicans の付着.
広大歯誌 21, 28-43, 平成 1.
108. Sojar, H.T. & Bahl, O.P. (1987):
Chemical deglycosylation of glycoproteins.
Method Enzymol 138, 341-350.
109. Kozutsumi, Y., Kawasaki, T. & Yamashina, I. (1980):
Isolation and characterization of a mannan-binding protein from rabbit serum.
Biochem Biophys Res Commun 95, 658-664.
110. Bull, F.G. & Turner, N.R. (1984):
A serum mannan-binding protein and candidiasis.
J Med Vet Mycol (Sabouraudia) 22, 347-350.
111. Bouali, A., Robert, R., Tronchin, G. & Senet, J.-M. (1986):

- Binding of human fibrinogen to Candida albicans in vitro: A preliminary study.
J Med Vet Mycol (Sabouraudia) 24, 345-348.
112. Page, S. & Odds, F.C. (1988):
Binding of plasma proteins to Candida species in vitro.
J Gen Microbiol 134, 2693-2702.
113. Miyake, Y., Minagi, S., Akagawa, Y., Tsuru, H. & Suginaka, H. (1985):
Saliva-induced agglutination of blastospore of Candida albicans.
Jpn J Oral Biol 27, 1234-1237.
114. Minagi, S., Miyake, Y., Kobayashi, K., Akagawa, Y., Tsuru, H. & Suginaka, H. (1985):
Characterization of Candida albicans agglutinating factor in human saliva.
Jpn J Oral Biol 27, 1238-1242.
115. 千畑 一郎, 土佐哲也, 松尾雄志 (1985):
実験と応用アフィニティークロマトグラフィー.
講談社サイエンティフィック, 東京, 30-109,
昭和60.
116. Weetall, H.H. (1976):
Covalent coupling methods for inorganic support materials.
Method Enzymol 44, 134-148.
117. 高坂 彰 (1980):
酵素の固定化と分析化学への応用: 巨大粒子のゲルパーミエーションクロマトグラフィ (大澤一爽、田中善喜編). 喜多見書房, 東京,
265-285, 昭和55.
118. Robinson, D., Phillips, N.C. & Winchester, B. (1975):
Affinity chromatography of human liver α -D-mannosidase.
FEBS Lett 53, 110-113.
119. Moczar, E. & Leboul, J. (1975):

Preparation of N-acetylglucosamine derivatives of proteins.

FEBS Lett 50, 300-302.

120. Junowicz, E. & Paris, J.E. (1973):
Affinity chromatography by enzyme-substrate interaction. Purification of some rat liver glycosidase.
Biochim Biophys Acta 321, 234-245.
121. Shriner, R.L., Fuson, R.C. & Curtin, D.Y. (1956):
The systemic identification of organic compounds. 4th ed. p111-113, John Wiley & Sons Inc., New York.
122. Barker, R., Olsen, K.W., Shaper, J.H. & Hill, R.L. (1972):
Agarose derivatives of uridine diphosphate and N-acetylglucosamine for the purification of a galactosyltransferase.
J Biol Chem 247, 7135-7147.
123. Fields, R. (1972):
The rapid determination of amino groups with TNBS.
Method Enzymol 25, 464-468.
124. 大野素徳, 金岡祐一, 崎山文夫, 前田浩 (1981):
アミノ酸残基官能基の修飾法, アミノ基:
蛋白質の修飾(上). 学会出版センター, 東京, 5-41. 昭和56.
125. Frazier, W. & Glaser, L. (1979):
Surface components and cell recognition.
Ann Rev Biochem 48, 491-523.
126. Brandley, B.K. & Schnaar, R.L. (1986):
Cell-surface carbohydrates in cell recognition and response.
J Leukocyte Biol 40, 97-111.
127. 大沢利昭 (1985):
総論:レクチンと細胞生物学 (大沢利昭編).

講談社, 東京, 1-15, 昭和60.

128. Kiso, Y., Ukawa, K. & Akita, T. (1980):
Efficient removal of N-benzyloxycarbonyl
group by a 'push-pull' mechanism using
thioanisole-trifluoroacetic acid, exempli-
fied by a synthesis of met-enkephalin.
J Chem Soc 1980, 101-103.
129. 泉屋信夫, 加藤哲夫, 青柳東彦, 脇道典 (1987):
保護基の除去と精製、同定:ペプチド合成の基
礎と実験. 丸善, 東京, 143-193, 昭和62.
130. Wolfrom, M.L., Patin, D.L. & de Lederkremer,
R.M. (1965):
Thin-layer chromatography on microcrys-
talline cellulose.
J Chromatog 17, 488-494.