

## 亜硫酸ナトリウムの *Candida glabrata* 傷害作用

渡部 俊彦,\* 倉内 寿孝, 小笠原綾子, 三上 健, 山口 正視,<sup>a</sup> 松本 達二

<sup>a</sup> 千葉大学真菌医学研究センター

### Antifungal Activity of Sodium Sulfite against *Candida glabrata*

Toshihiko WATANABE,\* Toshitaka KURAUCHI, Ayako OGASAWARA, Takeshi MIKAMI,  
Masashi YAMAGUCHI,<sup>a</sup> and Tatsuji MATSUMOTO

(Received November 20, 2009)

When *Candida glabrata* was cultured with sodium sulfite, the growth was inhibited and the cells were enlarged. Scanning electron microscopy (SEM) analyses indicated that the surface of *C. glabrata* treated by sodium sulfite appeared to be rough. The cell strength of *C. glabrata* treated by sodium sulfite was lower than that of untreated cells. Transmission electron microscopy (TEM) analyses showed that the cell wall components might be decreased by sodium sulfite. Sodium sulfite inhibited the expression of mRNAs which encoded 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase and  $\alpha$ 1,6-mannosyl-transferase, but not chitin synthase. These findings indicated that sodium sulfite inhibited the construction of cell wall by inhibiting 1,3- $\beta$ -D-glucan synthesis and  $\alpha$ 1,6-mannosyl-transferase. Thus, *C. glabrata* become fragile by treatment with sodium sulfite.

**Key words** — *Candida glabrata*; sodium sulfite; OCH1; CHS1; FKS1

*Candida glabrata* は日和見感染原因真菌の一種で、免疫機能が低下した状態での表在性または深在性カンジダ症の原因となっている。<sup>1–3)</sup> カンジダ菌は義歯に付着しやすく、高齢者ではカンジダ菌に起因する歯肉炎などの口腔内カンジダ症発症率が高いことが報告されている。<sup>4)</sup> 酵素を含んだ義歯の洗浄剤は市販されているが、より安価で菌体の崩壊を促進できる洗浄剤の開発が望まれる。

亜硫酸ナトリウムは、食品の防腐剤として使われ、好気性菌の増殖抑制に有効な物質である。我々は、これまで亜硫酸ナトリウムが *C. albicans* の菌糸分裂を抑制することを報告してきた。<sup>5)</sup> 亜硫酸ナトリウムが、*C. glabrata* に対しても障害活性を示すのであれば、義歯の洗浄剤として応用可能と考え、今回、亜硫酸ナトリウムの *C. glabrata* に対する抗菌活性を検討した。

### 材料および方法

#### 1) 菌株

*C. glabrata* ATCC 2001, *C. glabrata* IFM 5489, 5501, 5510, 5511, 5512, 5515, 5516 および 5517 は、千葉大学真菌医学研究センターより入手した。これらの株は、サブロー培地中で 27℃, 24 時間、振とう培養し、実験に使用した。

#### 2) 試薬

亜硫酸ナトリウムは、SIGMA 社より購入した。

#### 3) 亜硫酸ナトリウムの *C. glabrata* 増殖に及ぼす効果

亜硫酸ナトリウムを *C. glabrata* 懸濁液（最終濃度  $1 \times 10^5$  cells/ml in RPMI1640）に加え、攪拌後、37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。培養後の菌数は、OD<sub>620nm</sub> の濁度により測定した。また、菌の形態は、光学顕微鏡下で観察した。

#### 4) *C. glabrata* 細胞強度の測定

*C. glabrata* 懸濁液 ( $1 \times 10^5$  cells/ml in RPMI1640) に亜硫酸ナトリウム（最終濃度 20 mg/ml）を加え 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。培養後、菌体を遠心洗浄し、RPMI1640 培地に再懸濁させた。ここに、ガラスビーズ (0.5 mm, Biospec Products 社) を加え、MINI-BEAD BEATER (Biospec Products 社) を用い 5,000 rpm で、10 秒間処理した。その後、上清中のタンパク濃度を OD<sub>280nm</sub> 値として測定した。この処理を繰り返し行い、1 回ごとに上清中の OD<sub>280nm</sub> 値を測定した。

#### 5) 走査型電子顕微鏡 (SEM) 解析

*C. glabrata* の RPMI1640 懸濁液 ( $1 \times 10^5$  cells/ml) に亜硫酸ナトリウム (final 20 mg/ml) を加え、5% CO<sub>2</sub> 条件下で、37℃ で 24 時間培養した。培養後、菌

をグルタルアルデヒドで固定した。その後、菌体はエタノールで脱水し、乾燥させた。乾燥させた菌体は、白金でコーティングし、SEM(JSM-T330A, JEOL社)で解析した。

## 6) 透過型電子顕微鏡 (TEM) 解析

*C. glabrata* 懸濁液 ( $1 \times 10^5$  cells/ml in RPMI1640) に、亜硫酸ナトリウム (final 20 mg/ml) を加え 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養後、菌を回収し、液体窒素で冷却した液化プロパンに浸して急速に凍結させた。この試料を 2% 四酸化オスミウム含有アセトンに移し、-80°C 条件下で、2~3 日間処理した後、エポキシ樹脂に包埋した。<sup>6)</sup> ダイヤモンドナイフを用いて超薄切片を作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色後、<sup>7)</sup> JEM-1200EX 透過型電子顕微鏡 (JEOL 社) で観察した。

## 7) *C. glabrata* 細胞壁合成酵素 mRNA の定量

*C. glabrata* 懸濁液 ( $1 \times 10^5$  cells/ml in RPMI1640) に、亜硫酸ナトリウム (final 20 mg/ml) を加え、5% CO<sub>2</sub>, 37°C 条件下で 24 時間培養した。培養後、菌を回収し、その total RNA を、Purification Kit MagExtractor (Toyobo) を用いて精製した。Random hexamers (Roche 社) を total RNA に加え、70°C で 3 分間処理した。M-MLV Reverse Transcriptase (Ambion 社) と RNase inhibitor (Promega 社) を加え、42°C で、1 時間処理し cDNA を作製した。測定したい遺伝子の発現量は、7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems 社) を用いて測定した。mRNA の発現量は、18S rRNA に対する相対発現量として結果に表示した。

## 8) 統計解析

実験結果は、平均値 ± 標準偏差で表示し、統計解析は、Student's t-test を用いて行い、 $P < 0.05$  を有意差ありと判定した。

## 実験結果

### 1) *C. glabrata* の増殖に及ぼす亜硫酸ナトリウムの効果

*C. glabrata* ATCC 2001 株に亜硫酸ナトリウムを加え、菌の増殖を濁度 (OD<sub>620nm</sub>) により測定した。その結果、菌の増殖は亜硫酸ナトリウムの濃度依存的に抑制されていた (Fig. 1)。同様の結果は、*C. glabrata* IFM 5489, 5501, 5510, 5511, 5512, 5515, 5516 および 5517 株で認められ (data not shown)、この現象が *C. glabrata* で広く認められる現象であることが明らかになった。

### 2) *C. glabrata* の増殖形態に及ぼす亜硫酸ナトリウムの効果

*C. glabrata* ATCC 2001 に亜硫酸ナトリウムを加え、菌の増殖形態を光学顕微鏡下で観察したところ、亜硫酸ナトリウム処理した *C. glabrata* は、未処理の菌体に比べ肥大化していた (Fig. 2)。菌体の直径を測定したところ、亜硫酸ナトリウム処理 *C. glabrata* の平均直径は、 $7.0 \pm 1.4 \mu\text{m}$  ( $n=4$ ) で、未処理対照群の直径 ( $3.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ,  $P < 0.01$ ,  $n=4$ ) と比較して、有意に増加していた。亜硫酸ナトリウム処理による菌体の肥大は、*C. glabrata* IFM 5489, 5501, 5510, 5511, 5512, 5515, 5516 および 5517 株でも同

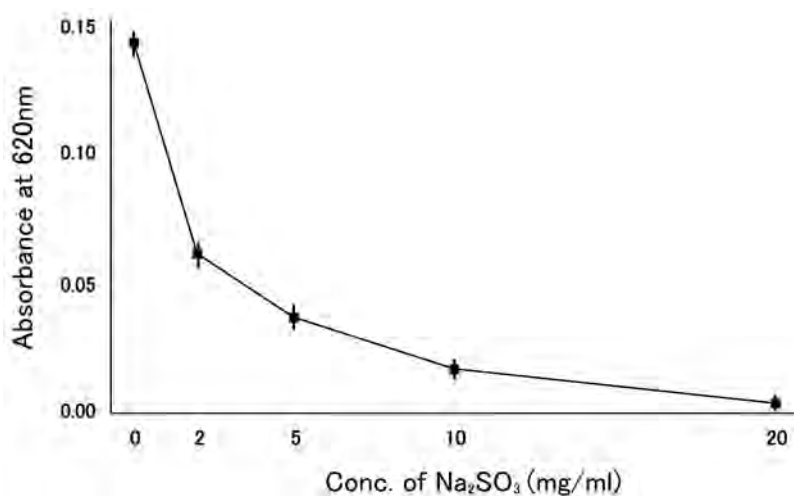


Fig. 1. Effect of sodium sulfite on the growth of *C. glabrata*

Sodium sulfite and *C. glabrata* ATCC2001 (final  $1 \times 10^5$  cells/ml) were mixed in RPMI1640 and incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for several hours. After incubation, the growth rate was measured as absorbance at 620nm.

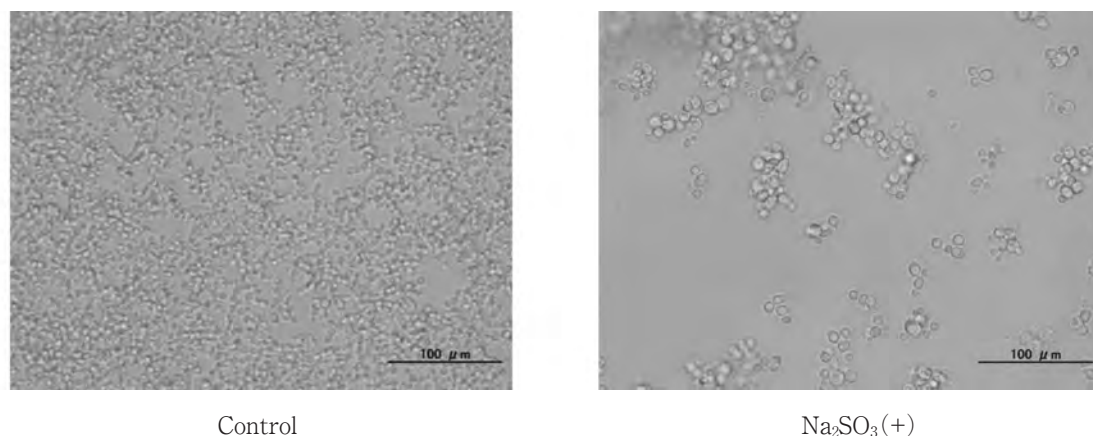


Fig. 2. Effect of sodium sulfite on the growth form of *C. glabrata*

Sodium sulfite (final 20 mg/ml) and *C. glabrata* ATCC2001 (final  $1 \times 10^5$  cells/ml) were mixed in RPMI1640 and incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. After incubation, the growth form was observed by an IX51 microscope.

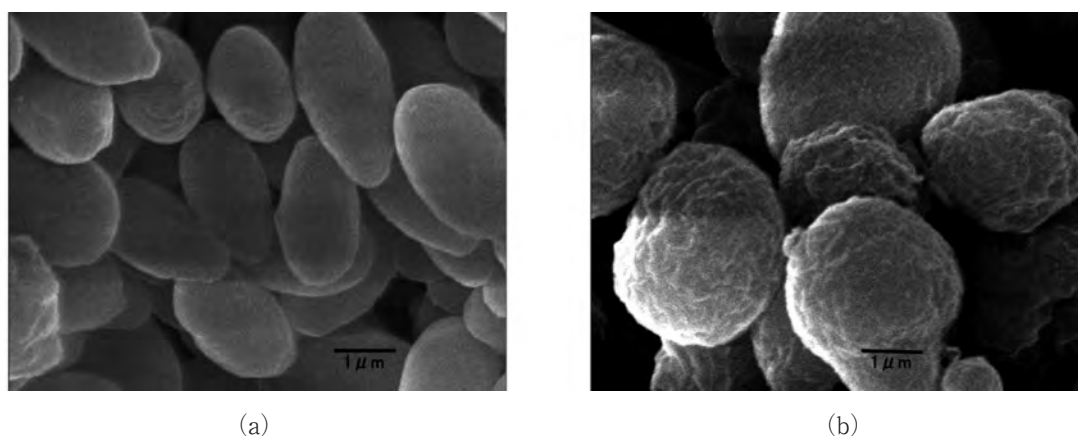


Fig. 3. SEM image of *C. glabrata* treated with sodium sulfite

*C. glabrata* ATCC2001 suspended in RPMI1640 medium ( $1 \times 10^5$  cells/ml) was cultured with/without sodium sulfite (final 20 mg/ml) in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 24 h. After incubation, the cells were fixed with glutaraldehyde solution for 1 h at room temperature. The cells were then dehydrated in ethanol and dried to critical point. The dried cells were coated with platinum and viewed under SEM.

a : control cells ( $\times 15,000$ ). b : cells treated with sodium sulfite ( $\times 15,000$ ).

様に認められた (data not shown). 肥大化した菌体の表層を SEM で観察したところ、未処理 *C. glabrata* の表層は滑らかであったが、亜硫酸ナトリウム処理した *C. glabrata* の表層は、全体に起伏が認められた (Fig. 3). この結果から、亜硫酸ナトリウムが *C. glabrata* の細胞壁構造に傷害を与えている可能性が示唆された.

### 3) *C. glabrata* 細胞強度の測定

亜硫酸ナトリウム処理した *C. glabrata* ATCC 2001 株をガラスビーズで処理し、上清中に放出される菌体内タンパク濃度を測定し、これを菌体崩壊の指標とした. *C. glabrata* ATCC 2001 株をガラスビーズ処理 (5,000 rpm, 10 秒) した場合、処理回数

が 7 回以上で上清中のタンパク濃度の値が最大値となるので、処理回数が 7 回の OD<sub>280nm</sub> 値をすべての菌体が崩壊したときのタンパク濃度とした. 未処理 *C. glabrata* が完全に崩壊したときの OD<sub>280nm</sub> 値は  $0.739 \pm 0.020$  ( $n=3$ ), 亜硫酸ナトリウム処理 *C. glabrata* が完全に崩壊したときの OD<sub>280nm</sub> 値は  $0.759 \pm 0.005$  であった. 亜硫酸ナトリウム処理 *C. glabrata* は、1 回目の処理で崩壊率 18.6% (OD<sub>280nm</sub> 値:  $0.141 \pm 0.009$ ) で、未処理菌体の処理 1 回目の崩壊率 0.9% (OD<sub>280nm</sub> 値:  $0.007 \pm 0.013$ ) と比較して有意に崩壊が進行していた ( $P < 0.001$ ). この結果から、*C. glabrata* は亜硫酸ナトリウム処理により菌体の構造が脆くなっていることが明らかになった.



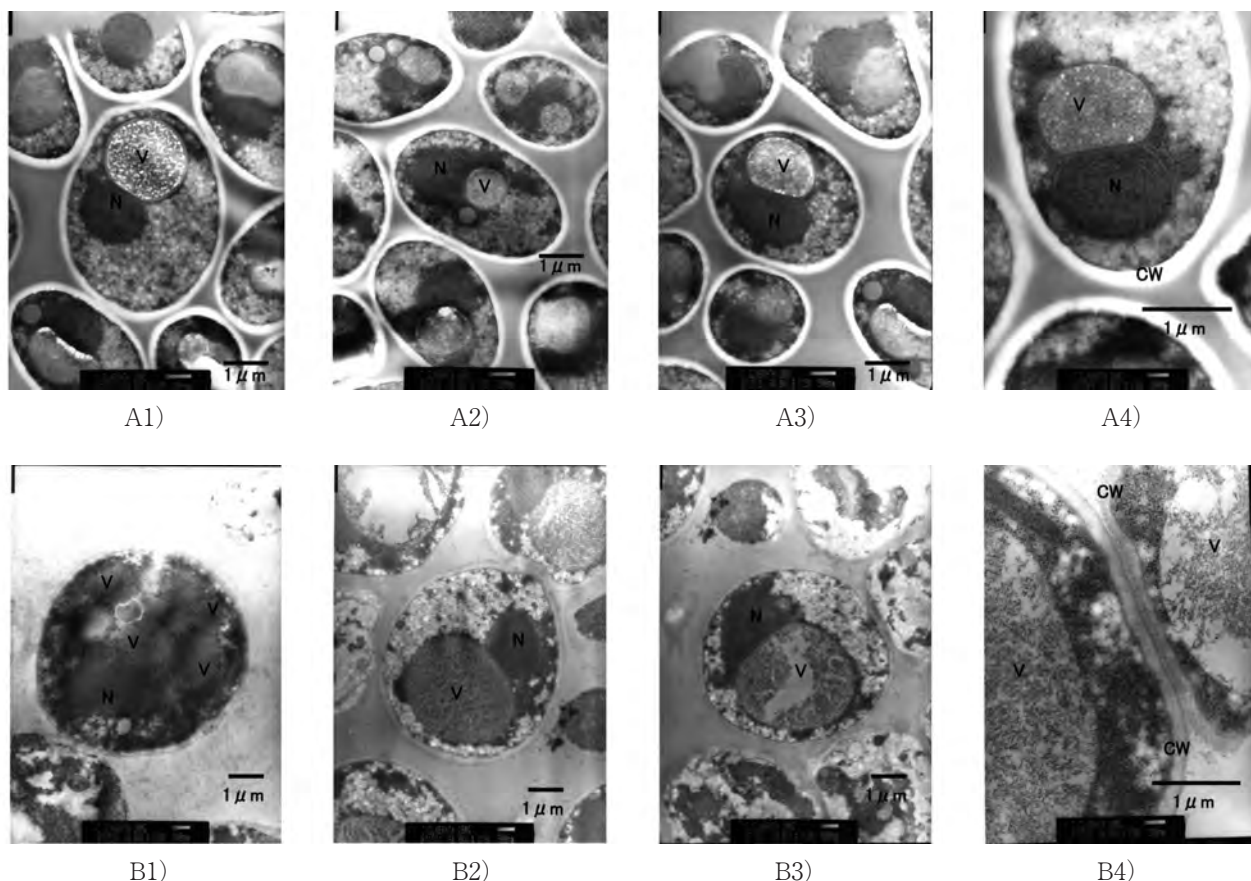


Fig. 4. TEM images of *C. glabrata* treated with sodium sulfite

*C. glabrata* ATCC2001 suspended in RPMI1640 medium ( $1 \times 10^5$  cells/ml) was cultured with sodium sulfite (final 20 mg/ml) in 5%  $\text{CO}_2$  at 37°C for 24 h. The cells were collected by centrifugation, and TEM analysis was conducted as described in materials and methods.

A1) – A3): control cells ( $\times 15,000$ ), A4): control cells ( $\times 30,000$ ), B1) – B3): cells treated with sodium sulfite ( $\times 10,000$ ), B4): cells treated with sodium sulfite ( $\times 30,000$ ), CW: cell wall, N: nucleus, V: vacuole.

#### 4) 亜硫酸ナトリウム処理 *C. glabrata* の透過型電子顕微鏡による解析

亜硫酸ナトリウム処理または未処理 *C. glabrata* ATCC 2001 株の菌体内構造を TEM で撮影し, その結果を Fig. 4 A1) – 4) または Fig. 4 B1) – 4) に表示した. 亜硫酸ナトリウム処理 *C. glabrata* の細胞壁の染色性が, 未処理 *C. glabrata* と比べて低下したことから, 亜硫酸ナトリウム処理により細胞壁構成成分の含有量が減少している可能性が示唆された. また, 細胞質に占める液胞の割合が亜硫酸ナトリウム処理した *C. glabrata* で高くなっていることから, 液胞の増大により菌体内圧が上昇していることが推察された.

#### 5) 亜硫酸ナトリウム処理 *C. glabrata* の細胞壁合成酵素 mRNA 発現量

*C. glabrata* 細胞壁は, 主にマンナン, キチンおよびグルカンで構成されており, OCH1, CHS1 および FKS1 は,  $\alpha 1,6$ -mannosyltransferase, chitin synthase そして  $1,3\beta$ -D-glucan synthase をそれぞれ

コードしている.<sup>8-10)</sup> 亜硫酸ナトリウム処理または未処理 *C. glabrata* の細胞壁合成に関わる各酵素 mRNA 発現量を測定し, 比較検討を行った. 2 mg/ml 亜硫酸ナトリウム処理では, *C. glabrata* の肥大化は認められなかったが (data not shown), この濃度でも FKS1 および OCH1 mRNA 発現量は, 抑制されていた (Table 1). 一方, CHS1 mRNA 発現量は, 菌体の肥大・崩壊が観察される亜硫酸ナトリウム濃度 (20 mg/ml) でも抑制されなかった.

### 考 察

*C. glabrata* などのカンジダ属菌は, 義歯などに付着し, 口腔感染症を引き起こすことがある. 我々は, これまでに亜硫酸ナトリウムが *C. albicans* の増殖を抑制することを報告してきたが, *C. glabrata* に対しても同様の効果を示すかについては不明であった. 本研究では, 亜硫酸ナトリウムの *C. glabrata* に

Table 1. Expression of CHS1, FKS1 and OCH1 mRNA in *C. glabrata* cultured with sodium sulfite

Conc. of Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (mg/ml)	Relative expression of mRNA
OCH1	
0	13.34 ± 0.92
2	9.04 ± 3.82 (NS)
20	6.95 ± 2.67 ( <i>P</i> < 0.001 vs Control)
FKS1	
0	12.49 ± 0.56
2	7.31 ± 2.65 ( <i>P</i> < 0.05 vs Control)
20	3.33 ± 0.96 ( <i>P</i> < 0.001 vs Control)
CHS1	
0	11.33 ± 0.80
2	54.85 ± 27.59 ( <i>P</i> < 0.05 vs Control)
20	16.90 ± 14.69 (NS)

*C. glabrata* ATCC2001 was cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. After incubation, the cells were harvested and the relative expression of mRNA was examined as described in Materials and Methods. Data present the mean ± S.E. (n = 3).

及ぼす影響を増殖性や形態観察を中心に検討した。亜硫酸ナトリウムは、酸性条件下で SO<sub>2</sub> ガスを発生し、このガスが細胞障害作用を示すことが報告されている。<sup>11,12)</sup> 本実験では、亜硫酸ナトリウム自体の *C. glabrata* に及ぼす影響を検討するため、*C. glabrata* と亜硫酸ナトリウムは、中性条件下で反応させた。その結果、*C. glabrata* の増殖は、亜硫酸ナトリウム濃度依存的に抑制された (Fig. 1)。亜硫酸ナトリウムは、培地中の酸素を消費する (2Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> + O<sub>2</sub> = 2Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ので、*C. glabrata* の増殖が抑制される要因として培地中の酸素が欠乏し、菌の好気呼吸が阻害されていることが考えられた。また、亜硫酸ナトリウムで処理した *C. glabrata* は肥大し (Fig. 2)、その時の菌体表面は、通常では認められない起伏が発生していた (Fig. 3)。この結果から、菌が膨張することで *C. glabrata* 菌体細胞壁の崩壊を引き起こしている可能性が示唆された。

細胞壁の崩壊が起きているか否かを、ガラスビーズでの物理的処理に対する耐性で評価したところ、亜硫酸ナトリウム処理 *C. glabrata* は物理的な衝撃に対して非常に脆く、菌体が容易に崩壊した。TEM を用いて、菌体内の構造解析を行ったところ、細胞質内に占める液胞の割合が亜硫酸ナトリウム処理 *C. glabrata* では高くなっており、菌体が肥大する原因の一つに、液胞形成により菌体内圧が上昇していることが示唆された (Fig. 4)。また、亜硫酸ナトリウム処理 *C. glabrata* 菌体細胞壁の酢酸ウラニルと

クエン酸鉛に対する染色性が、未処理菌体の細胞壁に比べ低いことから、菌体細胞壁を構成する成分が減少している可能性が予想された。*C. glabrata* の細胞壁成分生成能力が亜硫酸ナトリウムにより抑制されていることを明らかにするため、細胞壁合成に関わる酵素の mRNA 発現量を測定した。*C. glabrata* の細胞壁は、1,3-β-D-グルカン、マンナンおよびキチンなどの多糖体により構成されている。<sup>13)</sup> また、*C. glabrata* OCH1, CHS1 および FKS1 は、α1,6-mannosyltransferase, chitin synthase および 1,3-β-D-glucan synthase をコードしている。<sup>8-10)</sup> 亜硫酸ナトリウム処理により、*C. glabrata* の OCH1mRNA および FKS1mRNA 発現量が抑制されていたが、CHSmRNA 発現量は亜硫酸ナトリウム 2 mg/ml で有意に増加、20 mg/ml で増加の傾向を示していた。この結果より、亜硫酸ナトリウムは 1,3-β-D-glucan synthase および α1,6-mannosyltransferase などの細胞壁合成に関わる酵素活性の低下を引き起こしている可能性が示唆され、これが菌体細胞壁の強度低下を引き起こす要因と予想された。また、亜硫酸ナトリウム存在下で *C. glabrata* CHSmRNA 発現量が増加したことから、CHS の転写は亜硫酸ナトリウムにより阻害されないことが明らかになった。CHSmRNA 発現量が亜硫酸ナトリウム処理した菌体内で増加したのは、1,3-β-D-グルカンやマンナンの減少により強度が低下した細胞壁の恒常性を保つための反応ではないかと推察している。また、亜硫酸ナトリウム処理した *C. albicans* で、菌体の肥大が観察されないことから、*C. albicans* では亜硫酸ナトリウムによる細胞壁合成阻害は起きていないものと考えられた。

カンジダ菌の義歯への付着は、歯周病の原因となっていることが知られている。<sup>14)</sup> 酵素を使った義歯洗浄剤は既に市販されているが、より殺菌効果の高い洗浄剤の開発が望まれている。本研究で、我々は、亜硫酸ナトリウムが *C. glabrata* の増殖と菌体強度を低下させることを明らかにした。亜硫酸ナトリウムは食品添加物として使用されている物質であり、安全性の面で義歯の洗浄に応用することも可能である。しかし、亜硫酸ナトリウムは口腔感染症の要因となる *C. albicans* を殺菌することができないので、<sup>5)</sup> 亜硫酸ナトリウム単独の処理では、義歯に付着する *Candida* 菌を殺滅することはできない。亜硫酸ナトリウムを単独で使用するよりも、市販の義歯洗浄剤にも含まれている酵素系漂白剤、界面活

性剤, 酵素等と併用することで, 除菌効果を増強できる可能性が示唆された.

## REFERENCES

- 1) Denning D. W., *J. Antimicrob. Chemother.*, **40**, 611–614 (1997).
- 2) Pfaller M. A., Jones R. N., Messer S. A., Edmond M. B., Wenzel R. P., *Diagn. Microbiol. Infect.*, **30**, 121–129 (1998).
- 3) Safdar A., Chaturvedi V., Koll B. S., Larone D. H., Perlin D. S., Armstrong D., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 3268–3272 (2002).
- 4) Zaremba M. L., Daniluk T., Rozkiewicz D., Cylwik-Rokicka D., Kierklo A., Tokajuk G., Dabrowska E., Pawińska M., Klimiuk A., Stokowska W., Abdelrazek S., *Adv. Med. Sci.*, **51**, 233–236 (2006).
- 5) Watanabe T., Ogasawara A., Mikami T., Matsumoto T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **348**, 206–211 (2006).
- 6) Yamaguchi M., Biswas S. K., Suzuki Y., Furukawa H., Takeo K., *FEMS Microbiol. Lett.*, **219**, 17–21 (2003).
- 7) Yamaguchi M., Shimizu M., Yamaguchi T., Ohkusu M., Kawamoto S., *Plant Morphology*, **17**, 57–59 (2005).
- 8) Nakanishi-Shindo Y., Nakayama K., Tanaka A., Toda Y., Jigami Y., *J. Biol. Chem.*, **268**, 26338–26345 (1993).
- 9) Ziman M., Chuang J. S., Schekman R. W., *Mol. Biol. Cell*, **7**, 1909–1919 (1996).
- 10) Mazur P., Morin N., Baginsky W., Sherbeini M., Clemas J., A., *Mol. Cell Biol.*, **15**, 5671–5681 (1995).
- 11) Fine J. M., Gordon T., Sheppard D., *Am. Rev. Respir. Dis.*, **136**, 1122–1126 (1987).
- 12) Ogasawara A., Iino Y., Sato K., Nakajima Y., Bessho S., Watanabe T., Mikami T., Matsumoto T., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1101–1103 (2008).
- 13) Cid V. J., Durán A., del Rey F., Snyder M. P., Nombela C., Sánchez M., *Microbiol. Rev.*, **59**, 345–386 (1995).
- 14) Li L., Redding S., Dongari-Bagtzoglou A., *J. Dent. Res.*, **86**, 204–215 (2007).