総 説

口腔カンジダの付着およびバイオフィルム形成

二 川 浩 樹¹ 牧 平 清 超² 江 草 宏³
福 島 整² 川 端 涼 子¹ 浜 田 泰 三²
矢 谷 博 文³

¹広島大学歯学部口腔保健学科口腔保健工学講座

²広島大学大学院医歯薬学総合研究科歯科補綴学教室

³大阪大学大学院歯学研究科

要 旨

総義歯や部分床義歯などの床下の炎症を広義に義歯性口内炎と呼んでいるが、これは不潔な義歯、汚れた義歯による感染であることが知られている。“義歯の汚れ”すなわちデンチャープラークは、義歯性口内炎だけでなく口角炎などを引き起こすことも報告されている。また、材質の劣化を引き起こし、これに伴いデンチャープラークの堆積が助長され、ますます口腔内環境が悪化することが懸念される。さらに、義歯の汚れの中には、カリエス、根面齲蝕あるいは歯周病の病原菌が含まれている。したがって、鉤歯、隣在歯や残存歯に対して悪影響を及ぼし、残存歯数の減少から QOL の低下につながってしまうことが懸念される。また、高齢者においては、一般に口腔諸機能や全身抵抗性が低下しているが、その口腔内に不潔な義歯を入れておくことは、デンチャープラーク中の真菌群の誤飲、誤嚥による消化管や肺への真菌感染症をまねく危険性に常に患者をさらしているようなものである。このような“義歯の汚れ”，すなわち『デンチャープラーク』の実態である *Candida albicans* の付着ならびにバイオフィルム形成について述べる。

Key words: *Candida*, biofilm, adherence, oral candidosis

序 文

“義歯の汚れ”は、義歯性口内炎だけでなく口角炎などを引き起こすことも報告されており、また、義歯材料の劣化を引き起こし、さらにデンチャープラークの堆積（バイオフィルムの形成）が助長され、ますます口腔内環境が悪化することが懸念される¹⁾。義歯の汚れの中には、カリエス、根面齲蝕あるいは歯周病の病原菌が含まれている。ただし、古くから義歯の装着とともに *Candida* の口腔内保菌が増加することや、デンチャープラーク中から高頻度で *C. albicans* を主とした *Candida* 属が検出されることが報告されている^{2, 3)}。

高齢者では、一般に口腔諸機能や全身抵抗性が低下しているが、その口腔内に不潔な義歯を入れておくことは、デンチャープラーク中の真菌群の誤飲、誤嚥による消化管や肺への真菌感染症をまねく危険性に常に患者をさらしているようなものである⁴⁾。

このような中で、以下では *Candida* の固体表面に対する付着機構およびバイオフィルム形成に関わる因子について概説する。

固体表面への付着機構

医科・歯科領域では、カテーテル、義歯などの高分子材料が使用されることが多い。高分子材料は、異物であるとともに、低エネルギー表面（疎水性）であるため、ある種の微生物の付着が起りやすく、院内感染などの原因となることから注目を集めている。

微生物の疎水表面への付着機構は古くから疎水コロイドの凝集理論である DLVO 理論でよく説明されている。DLVO 理論では、Fig. 1 のように反発力として作用する静電的エネルギーと、引力として作用する London van der Waals 力のエネルギー曲線から第一の極小と第二の極小という2つのエネルギー的に安定する部分とその間にあるエネルギーバリアという部分が存在する。通常、微生物の大きさは $0.5\mu\text{m}$ 以上であることからエネルギーバリアをこえることができず、まず第二の極小で可逆的な付着が起こるとされている。この可逆的付着の段階では、体液の流れなどによって比較的容易に付着菌は除去される。ただし、非常に径の小さい構造物はこのエネルギーバリアを容易に通過することができ、polymer bridging などと呼ばれるメカニズムで固体表面と微生物の表面は架橋され (Fig. 2)、付着の確立が起こる¹⁾。

Fig. 1. Possible mechanisms of microbial adherence through DLVO theory.

Fig. 2. Stabilization of microbial adherence by polymer bridging

FIG. 3. Adherence capacity of yeast cells to four types of surface-modified glass slides. Adherence to AMP-glass (□), HA-glass (▨), GA-glass (▤), GL-glass (■).

Fig. 3. Adherence of *Candida* species to modified glass surfaces, and contribution of hydrophobic and electrostatic interactions.

微生物の付着における静電的因子と疎水的因子の関与を検討するため、菌体の物理化学的性質と付着機序の関連を修飾ガラスを用いて検討した。その結果、疎水性の高い菌株は疎水性ガラスへの付着が多く、疎水性の低い菌株は、陽電荷をもったガラスへの付着が高い傾向にあった (Fig. 3)。

Candida バイオフィルムの形成機序

1) ペリクルとバイオフィルム形成

まず、バイオフィルム形成に先立って、*Candida* の義歯表面への初期付着が起こるが、このような初期付着は、微生物が唾液の流れによる自浄作用によっても排除されず、その後、義歯表面で増殖する上で重要なステップであると考えられている。しかし、義歯表面における微生物の増殖、凝集そしてバイオフィルム形成という過程は、病原性の発現において付着以上に重要な意義を持っている。

口腔内に義歯を装着した場合、その表面に速やかにデンチャーペリクル、すなわち主として義歯材料表面に選

J Med Vet Mycol Nikawa et al. 1989

択的に吸着する唾液タンパクから構成される $0.1 \sim 0.7 \mu\text{m}$ の薄い唾液の被膜が形成され、このデンチャーペリクルに対し、口腔内や唾液中で浮遊している、あるいは隣接する組織表面に存在している微生物の付着が引き起こされる。付着した菌は、ペリクルから、あるいは外来性の栄養を得て、増殖を開始する。この時、増殖した菌の一部は、唾液などの体液の流れによって口腔内へと排除されるが、残りの菌は、菌体成分や唾液成分などによって付着した菌と凝集を起こす。このように凝集した菌塊は、唾液の流れによって排除されやすい状態にある。しかし、付着菌の増加や形態変化、菌の増殖による菌密度の増加や代謝物の産生に伴い、このような唾液による凝集作用は、排除という生体にとって有利な作用から、付着菌と増殖した菌や浮遊菌との間の凝集を促進する作用へと変化し、バイオフィルムの形成が促進されと考えられる。Fig. 4 に *C. albicans* のバイオフィルム形成を経時的に調べた場合を示すが、ペリクルが存在していない場合に比べて、唾液ペリクルが存在した場合、初期 (0 ~ 24 時間) のバイオフィルム形成は抑制される⁵⁾。これ

Nikawa, H *et al.*: Archs Oral Biol 38, 631-634, 1993Fig. 4. Biofilm formation of *C. albicans* on uncoated control (a), saliva-(b) and serum-(c) coated acrylics. Nikawa, H *et al.*: Microbial Ecol Health & Dis 9, 35-48, 1996Fig. 5. Effects of serum concentration in saliva on *Candida* biofilm formation.

は唾液本来の生体防御的な作用によるものと思われる。しかし、48時間以上培養した場合、すなわちバイオフィルムが成熟するにしたがって、唾液による防御作用は失われ、逆にバイオフィルム形成が急激に促進される⁵⁾。

また、ペリクル中に血清成分が存在する場合には、*C. albicans*は、形成初期から多量のバイオフィルムを形成

し、それが持続している⁵⁾。また、このような血清成分によるバイオフィルム形成の促進は *C. albicans* だけでなく *C. tropicalis* や *C. glabrata* のバイオフィルム形成でもみられ、特にペリクル中の血清濃度に依存的に増加し (Fig. 5)⁶⁾、すなわち口腔内や義歯床下に炎症が存在することで、さらにバイオフィルムの形成が促進されると

Nikawa, H *et al.*: Mycoses 43, 139-143, 2000

Fig. 6. Biofilm formation of *C. albicans* on uncoated control (a), saliva-(b) and serum-(c) coated denture materials.

Nikawa, H *et al.*: Microbial Ecol Health & Dis 9, 35-48, 1996

Fig. 7. Blastospore-blastospore (①) or -hyphal coadhesion (②), and adhesin expression (③) were observed in biofilm.

考えられる。

このように血清あるいは浸出液は、*Candida* 特に *C. albicans* に対して種々の影響を与える。これには、血清中に含まれるマンナン結合性タンパクや cell clumping factor などの凝集素、あるいは *C. albicans* の germ tube 形成を促進する因子が関与していることが知られている⁷⁾。

最近、興味深いことに、*C. albicans* の α INT1 は germ tube や菌糸の発現、口腔上皮・腸管上皮への付着あるいは病原性と関連性があることが報告されている⁸⁻¹⁰⁾。また、義歯材料に対する *C. albicans* の付着も、血清によりレジンにコートすることにより増加することが報告されている¹¹⁻¹³⁾。

形成されたバイオフィルムを走査型電子顕微鏡 (SEM) によって観察すると、何もコートしていない、すなわちペリクルが存在していないコントロール試料表面では *C. albicans* は、酵母型のままで点在している (Fig. 6)。しかし、ペリクルが存在する場合には酵母型および菌糸の両者が混在し、数層～十数層に堆積したフィルム状の定着像、すなわちバイオフィルム形成が認められる (Fig. 6)。さらに、詳細に観察すると、このようなバイオフィルム中では、*C. albicans* の酵母-酵母、酵母-菌糸間でいわゆる菌体外マトリックスによる凝集が認められる (Fig. 7)。また菌糸が直接レジンと接するところでは紐状の付着素 (アドヘジン) 様物質が観察される (Fig.

Fig. 8. A method to quantify thigmotropic reaction of *C. albicans*. Fig. 9. Ability to form hyphae of *Candida* spp. well-correlated with biofilm formation on pellicle-coated sample.

7). このような血清による *Candida* バイオフィルムの形成促進を生体側から考えた場合、血清中のフィブネクチン、マンナン結合タンパクなどの関与が考えられる¹⁴⁾.

2) シグモトロピズム (コンタクトセンシング) とバイオフィルム形成

C. albicans (および *C. tropicalis* の一部の菌株) には、菌糸形成能があることが、そのひとつの大きな特徴である。このような菌糸形成能は、通常血清中での germ tube (菌糸の前駆体) 形成能として、*Candida* 属や菌株の病原性の指標とされてきた。しかし近年、*Candida* がある表面に接している場合、能動的に栄養を求めて菌糸を伸ばす現象 (シグモトロピズム) あるいはある種の表面構造に沿って菌糸を伸ばす現象 (コンタクトセンシング) である^{15, 16)}.

このような *Candida* のシグモトロピズムは Fig. 8 のようにフィルターの上部に酵母型の *Candida* を接種し、

下部に菌糸を誘導する培地 (TC199, 血清あるいは血清寒天培地など) で容易に誘導できるが (Nikawa ら 1995), この性質はバイオフィルム形成においても非常に重要であり、シグモトロピズム (コンタクトセンシング) の強い菌株ほどバイオフィルム形成能も高くなっている (Fig. 9)^{17, 18)}.

したがって、このように口腔内に歯肉炎や歯周疾患あるいは義歯性口内炎などの炎症が存在する場合、*Candida* バイオフィルムの形成がさらに促進され、さらに炎症の蔓延を招く危険性があると思われる。加えて、以下に述べるように血清存在下では、*Candida* のハイドロキシアパタイト (HAP) およびコラーゲンに対するバイオフィルム形成も促進され¹⁹⁻²¹⁾、パーシャルデンチャーやオーバーデンチャーの鉤歯の炎症によって、さらに *Candida* のバイオフィルム形成が助長されることが懸念される。

Nikawa, H *et al.*: Infect Immun acceptedFig. 10. Cytokine production of HGEC against *C. albicans*. Nikawa, H *et al.*: Infect Immun accepted

Fig. 11. Effects of rhIL-1α and anti-IL-1α on IL-8 production of HGEC.

軟組織への伝搬

1) 口腔 *Candida* 症

義歯性口内炎は、口角炎、鰐口瘡、舌炎、口腔および口腔咽頭 *Candida* 症などの急性浅在性 *Candida* 症を合併することがよくある¹⁾。このような急性浅在性 *Candida* 症は、ホルモン異常や消耗性疾患、悪性疾患およびその治療などを背景に起こることが多いが、唾液による、あるいは上皮組織における感染防御機能の低下や全身の抵抗性の減弱によっても（特に高齢者や乳幼児で）引き起こされる¹⁾。このため *Candida* 症がみられる場合には、一見、健康に見える患者に対しても、必要に応じて医科と連携することや十分な経過の観察などが必要である。また、AIDS 患者では、口腔咽頭 *Candida* 症や食道咽頭 *Candida* 症などの他の播種性 *Candida* 症の病巣中心となる可能性が報告されている²²⁾。さらに、ICU 入院患者や

AIDS 患者、免疫不全患者あるいは臓器移植時の免疫抑制患者では、*C. albicans* 以外の non-*albicans Candida* 属（特に *C. krusei*, *C. glabrata* など）による感染も重要視されている²³⁻²⁵⁾。

2) *Candida albicans* に対する歯肉上皮細胞の細胞応答

C. albicans に対する歯肉上皮細胞（以下 HGEC）の細胞応答を検討した場合、*C. albicans* 接種後、IL-1α の分泌は誘導されたが IL-1β の分泌は誘導されなかった（Fig. 10）。また、*C. albicans* 非接種の細胞について、培養 6 時間後までに IL-1α は高い値で検出されたのに対し、IL-1β は検出されず、HGEC は IL-1α を恒常的に分泌しており、*C. albicans* や TNF-α などの刺激を受けるとその分泌をさらに促進し、初期の免疫応答に関与している可能性が示唆された。一方、HGEC に *C. albicans* を接種した場合、約 9 時間後から好中球の走化因子である IL-8 の分泌

は誘導された (Fig. 10). 口腔内における *C. albicans* の感染では, HGEC から IL-8 が産生され, これによって遊走し, 活性化された好中球が生体防御の主要な役割を果たしていると考えられた. また, *C. albicans* の感染による HGEC の IL-8 分泌誘導は, IL-1 β , IL-6 および TNF- α の分泌が誘導されなかったことから, これらのサイトカイン分泌を介さない経路で誘導されていると考えられ

Fig. 12. SEM observation on HGEC and *C. albicans* interaction.

た. 特に IL-8 の分泌は IL-1 α の分泌と時差があり (Fig. 10), またリコンビナントヒト IL-1 α で誘導され, また IL-1 α の抗体によって阻害されることから (Fig. 11), HGEC は *C. albicans* に対して IL-1 α を介して IL-8 を産生していると考えられた.

HGEC に *C. albicans* を接種した場合, 約12時間で HGEC の生細胞数が有意に減少し, SEM の観察で *C. albicans* の菌糸体の侵入像が認められた (data not shown). この一方で, Fig. 12 のような focal adhesion 様の像が認められたため, レーザーコンフォーカル顕微鏡下にて, 抗 ICAM 抗体による免疫染色を行った. その結果, 通常細胞に diffuse に存在する ICAM-1 分子が *C. albicans* の菌糸に集積することが観察された (Fig. 13). このため, HGEC の *C. albicans* の細胞応答に細胞接着分子である ICAM-1 が何らかの形で関与している可能性が考えられ, まず抗 ICAM 抗体を用いて, HGEC と *C. albicans* の接着阻害実験を行った.

その結果, 有意な接着阻害が認められ, *C. albicans* と HGEC が ICAM-1 分子を介して接着することが確認された (Fig. 14). また *C. albicans* を接種後, 経時的に ICAM-1 が誘導されることから (Fig. 14), 続いて, ICAM-1 を介した IL-8 の産生の可能性について検討を行った. その結果, 抗 ICAM 抗体によって IL-8 の産生が mRNA レベ

Egusa et al.: Infect Immun accepted

Fig. 13 . Changes in distribution of ICAM-1 of HGEC, in response to *C. albicans* hyphae.

Egusa et al.: Infect Immun accepted

Fig. 14. Effects of anti-ICAM antibody on the adhesion between HGEC and *C. albicans* (a), and expression of mRNA of ICAM by HGEC after *C. albicans* load.

Egusa et al.: Infect Immun accepted

Fig. 15. Effects of anti-ICAM on IL-8 production of HGEC.

Egusa et al.: Infect Immun accepted

Fig. 16. Effects of anti-IL-1α antibody, anti-ICAM antibody, and their synergistic effects on IL-8 production of HGEC.

Schematic representation of responses of HGECs to *C. albicans* (C.a.).Fig. 17. Hypothesis on mechanism of HGEC response to *C. albicans* challenge.

ルで抑制された (Fig. 15).

これらの結果から, HGEC の IL-8 産生には IL-1α と ICAM-1 とが関連していることが明らかとなったが, IL-1α と ICAM-1 との関連性についてさらに検討を行った. 抗体によるダブルブロックアッセイの結果, HGEC の IL-8 の産生は, 抗 IL-1 抗体によっても抗 ICAM-1 抗体によっても抑制され, さらにその両者によって相乗的に抑制された (Fig. 16). この結果より IL-1α を介した経路と ICAM-1 を介した経路があるのではないかと推測された (Fig. 17).

文 献

- 1) 浜田泰三, 二川浩樹: デンチャープラーク. 医歯薬出版, 東京, 150頁, 1991.
- 2) 二川浩樹, 浜田泰三: デンチャープラーク, 補綴臨床別冊 口腔ケアのためのフォローアップシステム. 225-227, 1996.
- 3) Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T: Denture plaque-past and recent concerns-. J Dent **26**: 299-304, 1998.
- 4) 浜田泰三, 二川浩樹: デンチャープラークとオーラルヘルスケア. 補綴誌 **45**: 561-581, 2001.
- 5) Nikawa H, Nishimura H, Yamamoto T, Hamada T, Samaranyake LP: The role of saliva and serum in *Candida albicans* biofilm formation on denture acrylic surfaces. Microbial Ecol Health & Dis **9**: 35-48, 1996.
- 6) Nikawa H, Nishimura H, Makihiro S, Hamada T, Sadamori S, Samaranyake LP: Effect of serum concentration on *Candida* biofilm formation on acrylic. Mycoses **43**: 139-143, 2000.

- 7) Bull FG, Turner NR: A serum mannanbinding protein and candidiasis. *J Med Vet Mycol (Sabouraudia)* **22**: 347-350, 1984.
- 8) Gale CA, Bendel CM, McClellan M, Hauser M, Becker JM, Berman J, Hostetter MK: Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science* **279** (5355): 1355-1358, 1998.
- 9) Kinneberg KM, Bendel CM, Jechorek RP, Cebelinski EA, Gale CA, Berman JG, Erlandsen SL, Hostetter MK, Wells CL: Effect of INT1 gene on *Candida albicans* murine intestinal colonization. *J Surg Res* **87**: 245-251, 1999.
- 10) Bendel CM, Kinneberg KM, Jechorek RP, Gale CA, Erlandsen SL, Hostetter MK, Wells CL: Systemic infection following intravenous inoculation of mice with *Candida albicans* int1 mutant strains. *Mol Genet Metab* **67**: 343-351, 1999.
- 11) Samaranayake LP, McCourtie J, MacFarlane TW: Factors affecting the *in vitro* adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Archs Oral Biol* **25**: 611-615, 1980.
- 12) Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H: Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun* **47**: 11-14, 1985.
- 13) McCourtie J, MacFarlane TW, Samaranayake LP: Effect of saliva and serum on the adherence of *Candida* species to chlorhexidine-treated denture acrylic. *J Med Microbiol* **21**: 209-213, 1986.
- 14) Nikawa H, Nishimura H, Hamada T, Yamashiro H, Samaranayake LP: Effects of modified pellicles on *Candida* biofilm formation. *Mycoses* **42**: 37-40, 1999.
- 15) Gow NAR, Perera THS, Sherwood-Higham J, Gooday GW, Gregory DW, Marshall D: Investigation of touch-sensitive responses by hyphae of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. *Scanning Microscopy* **8**: 705-710, 1994.
- 16) Sherwood J, Gow NAR, Gooday GW, Gregory DW, Marshall D: Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **30**: 461-469, 1992.
- 17) Nikawa H, Nishimura H, Hamada T, Sadamori S: Quantification of thigmotropism (contact sensing) of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Mycopathologia* **38**: 13-19, 1997.
- 18) Nikawa H, Nishimura H, Hamada T, Makihiro S, Samaranayake LP: Relationship between thigmotropism and *Candida* biofilm formation *in vitro*. *Mycopathologia* **144**: 125-129, 1999.
- 19) Makihiro S, Nikawa H, Tamagami M, Hamada T: Bacterial and candidal adhesion to intact and denatured collagen *in vitro*. *Mycoses* **45**: 389-392, 2002.
- 20) Nikawa H, Yamashiro H, Hamada T, Murata H, Agus S: The effect of saliva or serum on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* colonization on hydroxylapatite beads. *J Dent* **26**: 31-37, 1998.
- 21) Nikawa H, Yamashiro H, Makihiro S, Nishimura M, Egusa H, Hamada T: *In vitro* cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses* **46**: 471-478, 2003.
- 22) Holmstrup P, Samaranayake LP: Acute and AIDS-related oral candidosis. in *Oral Candidosis* (Samaranayake, L.P. & MacFarlane, T.W. ed.), Butterworth & Co. Ltd., London, pp.133-155, 1990.
- 23) Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaissie EJ, Li A, Sullivan DJ.: Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med Mycol* **36** Suppl 1: 156-165, 1998.
- 24) Krcmery V Jr, Spanik S, Grausova S, Trupl J, Krupova I, Roidova A, Salek T, Sufliarsky J, Mardiak J: *Candida parapsilosis* fungemia in cancer patients-incidence, risk factors and outcome. *Neoplasma* **45**: 336-342, 1998.
- 25) Huttova M, Hartmanova I, Kralinsky K, Filka J, Uher J, Kurak J, Krizan S, Krcmery V Jr: *Candida* fungemia in neonates treated with fluconazole: report of forty cases, including eight with meningitis. *Pediatr Infect Dis J* **17**: 1012-1015, 1998.

Candida Adherence and Biofilm Formation on Oral Surfaces

Hiroki Nikawa¹, Seicho Mikihiro², Hiroshi Egusa³, Hitoshi Fukushima²,
Ryoko Kawabata¹, Taizo Hamada², Hirohumi Yatani³

¹Division of Oral Health Engineering, Institute of Oral Health Science, Faculty of Dentistry, Hiroshima University
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8555, Japan

²Department of Prosthetic Dentistry, Graduate School of Biomedical Science, Hiroshima University
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8555, Japan

³Graduate School of Dentistry, Osaka University
1-8 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0781, Japan

Candida albicans is the most common fungal opportunistic pathogen in humans. The AIDS epidemic, improved life-sustaining therapy, and aggressive anticancer therapy have contributed to a rise in the number of severely immunocompromised patients. This has led to an increase in oral and systemic fungal infection. Several factors, such as adherence, persistence, dimorphism, germ tube formation, and/or contact sensing, phenotypic switching, interference with the host defense system, synergism with bacteria, and the production of hydrolases or other metabolites, have been proposed to be virulence factors of this fungus. Among these virulence factors, adherence and persistence are thought to be the most important, since the colonization and subsequent biofilm formation of oral surfaces may serve as a reservoir for disseminated infections, such as aspiration pneumonia and gastrointestinal infection. In the review, we summarized the factors involved in the *Candida albicans* biofilm formation.

この論文は、第48回日本医真菌学会総会の“シンポジウム3:カンジダとカンジダ感染症の研究の現状－基礎と臨床の連携を目指す－”において発表されたものです。