

マウス緑膿菌感染に対する酵母マンナンの防御効果

大川 喜男*, 小林真紀子, 吉田 隆之, 鈴木 益子

Protective Effects of Yeast Mannan against *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Mice

Yoshio OKAWA *, Makiko KOBAYASHI, Takayuki YOSHIDA and Masuko SUZUKI

(Received November 22, 2004)

In order to clarify the protective effects and the mechanisms of both mannans, a neutral mannan (WNM) and an acidic mannan (WAM025) fractions from bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, against *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice, we measured anti-*P. aeruginosa* antibody titers in the mice and *in vitro* bacterial-growth inhibitory activity of the phagocytes isolated from the mice. The sera derived from mannans-untreated *P. aeruginosa*-infected mice showed significant levels of anti-*P. aeruginosa* antibody. On the other hand, the sera from the mannans-treated *P. aeruginosa*-infected mice little showed the antibody titers, indicating the infection-protecting activities of the mannans. The *P. aeruginosa* growth inhibitory activity of peritoneal phagocytes, macrophages and polymorphonuclear leucocytes, in mice administered with the mannans was significantly enhanced compared with the activity of those from the untreated mice.

Key words — *Pseudomonas aeruginosa*; mannan; antibody; phagocytes; growth-inhibitory activity

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* はグラム陰性好気性の桿菌で、多くの化学療法剤に抵抗性を持ち、定着性の高い細菌である。術後患者、新生児、老人、また、抗腫瘍剤、免疫抑制剤、放射線による治療で白血球の減少した易感染性宿主である入院患者などに感染症を引き起こす日和見感染菌 (opportunistic pathogen) である。^{1, 2)} 我々はマウス緑膿菌感染に対するキチン、キトサン、そのオリゴ糖、並びに酵母マンナンの防御効果について検討してきた。³⁻⁶⁾ 特に酵母マンナンの感染防御の機構については、マンナン投与マウスの肝臓クッパー細胞の緑膿菌増殖抑制活性とリソゾーム酵素、特に酸性ホスファターゼと中性プロテアーゼ、活性の関与について報告した。⁵⁾ 本論文では、マウス緑膿菌感染に対する

マンナン投与の効果をも、緑膿菌抗体価と腹腔食細胞の緑膿菌増殖抑制活性を測定することにより検討した。

材料及び方法

1) 動物

BALB/c 雄性マウス (日本 SLC) 体重 22 ± 2 g を使用した。

2) 菌株

緑膿菌 *P. aeruginosa* PA-103 E 型株は福島県立医科大学細菌学教室 茂田教授 (現名誉教授) より分与されたもので、ドルセット卵斜面寒天培地で培養した種菌を普通ブイヨン液体培地で 37°C 、24 時間培養した。

3) マンナン画分

パン酵母, *Saccharomyces cerevisiae* (オリエンタル酵母社), から Okubo らの方法⁷⁾ に従い調製した. すなわち, オートクレーブ抽出して得たバルクマンナンを DEAE-セファデックスカラムにより, 水溶出画分 (WNM) と 0.25 M 食塩水溶出画分 (WAM025) に分画して用いた.

4) マンナンの投与方法

WNM 及び WAM025 はそれぞれ滅菌生理食塩水に溶解し, 150 mg/kg/day, 5 日間マウス腹腔内に連続投与した. 各実験で, マウスは 1 群 5 匹を使用した. 本実験は東北薬科大学の動物実験指針に従って行った.

5) 血清の採取法

マンナン投与 1 日後の群並びに未処理群とも, 5×10^6 個の緑膿菌をマウスの腹腔内に接種し, 1, 2, 3, 5, 8, 11 週目のマウスよりエーテル麻酔下にパスツールピペットを用いて眼窩静脈より採血し, 血餅除去後遠心分離 (3000 rpm, 15 分) を行い血清を得た.⁸⁾

6) 血清中の抗体価の測定

緑膿菌感染前後の血清中の緑膿菌菌体抗原に対する抗体価を次のように測定した.⁹⁾ ポリ塩化ビニル製の 96 穴マイクロタイタープレートの各ウェルに PBS(-) で希釈したポリ-L-リジン ($10 \mu\text{g/ml}$) を $50 \mu\text{l}$ 加える. 室温に 30 分放置した後 PBS(-) で 3 回洗浄し, 各ウェルに PBS(-) で希釈した緑膿菌菌体抗原 (ホルマリンで不活化したもの) (1×10^8 個/ml) を $50 \mu\text{l}$ 加え, 3000 rpm, 15 分遠心し固定させる. さらに, PBS(-) で希釈した 0.5% グルタルアルデヒドを $50 \mu\text{l}$ 加える. 15 分室温放置後 0.05% Tween 20 含有 PBS(-) (PBS-Tween) で 3 回洗浄し, 100 mM グリシンと 1% BSA を含む PBS(-) を $100 \mu\text{l}$ 加え, 室温で 30 分放置する. PBS-Tween で 3 回洗浄した後, 各血清を 1% BSA 含有 PBS-Tween を用いて 2 倍希釈系列を作製し各ウェルに $50 \mu\text{l}$ ずつ加える. 2 時間室温放置後 PBS-Tween で 3 回洗浄し, 次に PBS(-) で希釈した 0.2% BSA 含有 PBS(-) を用いて西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヒツジ-抗マウス免疫グロブリン G を 1:500 に希釈, 各ウェルに $50 \mu\text{l}$ ずつ加え, さらに 2 時

間放置した後 PBS(-) で 5 回洗浄する. 次に, O-フェニレンジアミン (OPD) 基質液 ($0.2 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ 25.7 ml, 0.1 M クエン酸 24.3 ml, 精製水 50.0 ml, OPD 40.0 mg) を使用 30 分前に調製, さらに H_2O_2 を $10 \mu\text{l}$ 加えたものを各ウェルに $50 \mu\text{l}$ 加え, 10 分室温放置した後 $2 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ を $25 \mu\text{l}$ 加え反応を停止させ, Immuno Reader NJ-2000 (インターメッド製) にて 492 nm における吸光度を測定した. ノーマルマウス血清の抗体価 (Titer) を 1.0 として, 各血清試料の抗体価 (Titer) を測定した.

7) 腹腔食細胞の調製

マウス腹腔浸出細胞 (PEC) はマンナン 5 回連続投与 1 日後にハンクス緩衝液にて採取した. PEC からのマクロファージと多形核白血球 (PMN) の分離は Percoll-グラジエント遠心法によって行った.¹⁰⁾

8) 食細胞による緑膿菌増殖抑制活性

各食細胞 5×10^5 個 / 0.1 ml , 緑膿菌 1×10^6 個 / $10 \mu\text{l}$ 及び正常マウス血清 $10 \mu\text{l}$ とを 96 穴丸底プレート (Falcon) に加え, 37°C , 3 時間 5% CO_2 下で培養した.⁵⁾ 培養後, 水 $100 \mu\text{l}$ を加えて食細胞をラバーポリスマンを用いてはがし, さらに激しくピペッティングして食細胞を破壊し, 細胞内の菌を浮遊させた. その 1000 倍希釈液をプレインハートインフュージョン寒天培地に $20 \mu\text{l}$ 入れ, 37°C , 20 時間培養後, 生じた緑膿菌のコロニー数 (CFU) を数え, 食細胞添加群を A, 非添加群を B として, 増殖抑制率を次式によって算定した.

$$\text{増殖抑制率 (\%)} = \frac{B - A}{B} \times 100$$

9) 統計処理

有意差検定は Student's *t*-test により行った.

実験結果

1) 緑膿菌感染マウスの抗体価に及ぼす酵母マンナンの効果

緑膿菌感染マウスの緑膿菌菌体抗原に対する

抗体価を測定した結果をFig. 1に示す。未処理マウス感染群は11週まで顕著な抗体価の上昇を示したが、マンナン (WNM並びにWAM025) 投与感染群では抗体価の上昇はみられなかった。

2) マンナン投与マウス腹腔浸出細胞 (PEC) による緑膿菌増殖抑制活性

マンナン投与マウス腹腔浸出細胞 (PEC) による緑膿菌増殖抑制活性を検討した結果はTable 1に示した。未処理マウスに比べ、両マンナン投与マウスで顕著な増殖抑制活性がみられた。次に、マンナン投与マウスPECよりPercollグラジント遠心によりマクロファージとPMNを分離し、緑膿菌増殖抑制活性を検討した。その結果、マンナン投与マウスマクロファージ並びにPMNは両者にほぼ同程度の高い増殖抑制活性が認められた (Table 2)。

考 察

著者らは、BRMによるマウス緑膿菌感染防御能について、マンナンやキチン、キトサン並び

にそのオリゴ糖を用いて検討してきた。³⁻⁶⁾ 一般に、緑膿菌の感染防御においてはPMNが重要な役割を果たすこと、また抗体による防御も報告されている。¹¹⁻¹⁶⁾ 先に、マンナン投与マウスは*L. monocytogenes*や緑膿菌感染に対し防御能があること、そのメカニズムの検討から、肝臓のクーパー細胞が重要な役割を担っていることを報告した。⁵⁾

今回、マンナン (WNM並びにWAM025) 投与マウスの緑膿菌感染実験において、緑膿菌菌体抗原に対する抗体価の測定を行ったところ、未処理マウス感染群は明らかに抗体価の上昇を示したが、マンナン投与感染群では抗体価の上昇はみられなかった。これは、緑膿菌の増殖と抗体価の上昇がよく相関しており、マンナン未処理群では緑膿菌の増殖がおこる結果、抗原量が増加し高い抗体価が得られる。一方、両マンナン投与群は顕著な緑膿菌感染防御効果がみられた結果、⁵⁾ マウス体内の抗原量 (緑膿菌数) がほとんどないか顕著に少ないため抗体価の上昇がなかったものと考えられる。⁹⁾

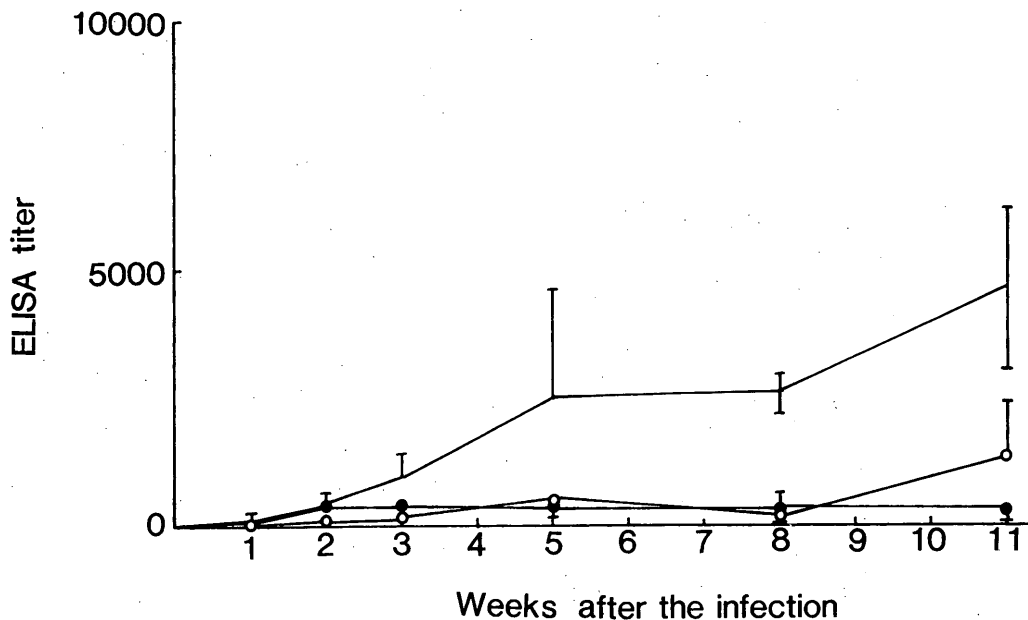


Fig. 1. Anti-*P. aeruginosa* Antibody Level after *P. aeruginosa* infection in Mice Administered with WNM or WAM025

Mice were administered WNM or WAM025 (150 mg/kg/day) ip on days 0-4, and the mice were infected ip with 5×10^6 viable *P. aeruginosa* cells on day 5. The antibody titers were measured at the indicated intervals. The results are expressed as the mean value of five mice \pm S.E.

—, Untreated infection group; ○, WNM-treated infection group; ●, WAM025-treated infection group.

Table 1. Growth-inhibitory Activity of *P. aeruginosa* Cells by PEC in Mice Administered with WNM or WAM025^{a)}

PEC	CFU
None (before incubation)	20 ± 2
None (after incubation)	296 ± 25
Untreated PEC	642 ± 12
WNM-treated PEC	385 ± 26 ^{b)}
WAM025-treated PEC	377 ± 63 ^{b)}

a) Mice were administered WNM or WAM025 (150 mg/kg/day) ip on days 0–4, and growth-inhibitory activity of PEC was determined on day 5. The mixture of *P. aeruginosa* cells and the PEC was incubated for 3-h at 37 °C in 96-well trays, and the colonies in the well were counted as described in Materials and Methods. None (before incubation) and None (after incubation) show the colony numbers before and after the 3-h incubation of *P. aeruginosa* cells only. The results are expressed as the mean value of five cultures ± S.E.

b) $P < 0.001$ versus CFU of Untreated PEC group.

Table 2. Growth-inhibitory Activity of *P. aeruginosa* Cells by Macrophages and PMN Separated from PEC in Mice Administered with WNM or WAM025^{a)}

Cells	CFU	Growth inhibition (%)
None (before incubation)	20 ± 3	
None (after incubation)	603 ± 129	—
Untreated macrophages	1160 ± 79	
WNM-treated macrophages	193 ± 10	68 ^{b)}
WAM025-treated macrophages	169 ± 56	72 ^{c)}
WAM025-treated PMN	180 ± 13	70 ^{d)}

a) Mice were administered WNM or WAM025 (150 mg/kg/day) ip on days 0–4. PEC were separated into macrophages and PMN by percoll-gradient centrifugation on day 5 and the growth-inhibitory activity was determined as shown in Table 1. The results are expressed as the mean value of five cultures ± S.E.

b) $P < 0.01$ versus None (after incubation) group.

c) $P < 0.001$ versus None (after incubation) group.

次にマンナンの防御効果を、腹腔浸出食細胞の緑膿菌増殖抑制活性を指標に検討を加えた。Table 1と2に示したように、マンナン投与マウス腹腔食細胞、マクロファージとPMN、はノーマルマウス腹腔マクロファージに比べ、顕著な緑膿菌増殖抑制活性を示した。マンナン投与マクロファージとPMNで同程度の高い増殖抑制活性があったことから、マンナンによる緑膿菌感染防御にはPMN¹¹⁻¹⁴⁾に加えマクロファージ¹⁷⁾も重要な役割を担っていることが明らかになった。このように、酵母マンナンの緑膿菌感染防御には、先に報告した肝臓クッパー細胞に加え、

腹腔の食細胞も役割を果たしているものと考えられる。現在まで著者らは、キチン、キトサンやマンナン投与マウス腹腔マクロファージのセリンプロテアーゼが腫瘍細胞やカンジダの傷害性に関与していることを阻害剤を用いた実験で証明してきた。^{18, 19)}最近、マンナン投与マウスの肝臓クッパー細胞によるインターロイキン1産生にセリンプロテアーゼの関与を示唆した。²⁰⁾さらに、マンナン投与マウス腹腔食細胞の*L. monocytogenes*増殖抑制活性にセリンプロテアーゼの関与を明らかにした。²¹⁾本実験とは別に、緑膿菌の増殖抑制活性にセリンプロテアーゼの

関与を考察するため、セリンプロテアーゼの一つであるエラスターゼについて豚膵臓由来の市販品を用いて検討したところ、強い増殖抑制活性が認められた（データは示さない）。これについては今後、マンナン投与マウス食細胞のセリンプロテアーゼを単離し、その活性を検討する必要がある。このように、細胞内のセリンプロテアーゼは我々が示した各種の細菌や真菌に対する感染防御能を含め、広く生物生体の機能調節に関与していることが考えられる。

REFERENCES

- 1) Flick M. R., Cluff L. E., *Am. J. Med.*, **60**, 501-508 (1976).
- 2) Pennington J. E., Ehrie M. G., *J. Infect. Dis.*, **137**, 764-774 (1978).
- 3) Okawa Y., Kato K., Suzuki K., Suzuki M., Suzuki S., *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo*, **36**, 169-174 (1989).
- 4) Kobayashi M., Katsumata Y., Okawa Y., Suzuki S., Suzuki M., *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo*, **36**, 191-195 (1989).
- 5) Kobayashi M., Okawa Y., Suzuki S., Suzuki M., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 807-809 (1990).
- 6) Okawa Y., Kobayashi M., Suzuki S., Suzuki M., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 902-904 (2003).
- 7) Okubo Y., Suzuki S., *Carbohydr. Res.*, **62**, 135-141 (1978).
- 8) Okawa Y., Howard C. R., Steward M. W., *J. Immunol. Methods*, **149**, 127-131 (1992).
- 9) Winnie G. B., Cowan R. G., *Pediatr. Pulmonol.*, **10**, 92-100 (1991).
- 10) Sakai K., Suzuki S., Suzuki M., *J. Pharm. Dyn.*, **7**, 943-950 (1984).
- 11) Young L. S., Armstrong D., *J. Infect. Dis.*, **126**, 257-276 (1972).
- 12) Bullen J. J., Wallis S. N., Griffiths E., *Immunology*, **30**, 603-610 (1976).
- 13) Tatsukawa K., Mitsuyama M., Takeya K., Nomoto K., *J. Gen. Microbiol.*, **115**, 161-166 (1979).
- 14) Bishop O., Orr T., Bartell P. F., *Infect. Immun.*, **37**, 378-381 (1982).
- 15) Pennington J. E., Small G. J., Lostrom M. E., Pier G. B., *Infect. Immun.*, **54**, 239-244 (1986).
- 16) Okawa Y., *Annual Report Tohoku College of Pharmacy*, **45**, 39-58 (1998).
- 17) Miake S., Nomoto K., Yokokura T., Yoshikai Y., Mutai M., Nomoto K., *Infect. Immun.*, **48**, 480-485 (1985).
- 18) Okawa Y., Ozeki Y., Suzuki K., Sakai K., Suzuki S., Suzuki M., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 1138-1143 (1987).
- 19) Suzuki K., Okawa Y., Suzuki S., Suzuki M., *Microbiol. Immunol.*, **31**, 375-379 (1987).
- 20) Okawa Y., Abe K., Watanabe T., Sasai H., Suzuki M., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1506-1508 (2002).
- 21) Okawa Y., Kobayashi M., Suzuki M., *Journal of Tohoku Pharmaceutical University*, **50**, 149-154 (2003).