

## 再現性が高い口腔カンジダ症マウスモデル

菊池直宏<sup>1</sup> 玉井利代子<sup>2</sup> 清浦有祐<sup>2</sup>

### Highly Reproducible Mouse Model of Oral Candidiasis

Naohiro KIKUCHI<sup>1</sup>, Riyoko TAMAI<sup>2</sup> and Yusuke KIYOURA<sup>2</sup>

Many attempts have been made to reproduce human oral candidiasis lesions in experimental animals. The present study aimed to determine reproducible experimental conditions which would elicit oral candidiasis in mice. To evaluate oral candidiasis, we measured *Candida albicans* (*C. albicans*) counts on tongues and the production of proinflammatory cytokines strongly associated with inflammation resulting from infection.

ICR mice were subcutaneously injected with 0.2 mg of prednisolone, and provided with drinking water containing 4 mg/ml tetracycline. Chlorpromazine (0.1mg) was injected intramuscularly 24 hours later. Twenty minutes later, *C. albicans* was inoculated onto the tongues of mice.

By the third day after infection, a substantial amount of *C. albicans* was detected on the mouse tongue tissue, with multiple white patches observed on the tongue surface. The tongue tissue of infected mice expressed significantly higher levels of the proinflammatory cytokines MIP-1 $\alpha$  and IL-1 $\alpha$  compared to non-infected mice. In contrast, MCP-1 and TNF- $\alpha$  were not detected. Moreover, compared to non-infected mice, there was no significant increase in IL-17 production.

MIP-1 $\alpha$  is a chemokine that plays an important role in the acute inflammation resulting from *C. albicans* infection. Thus, excessive production of MIP-1 $\alpha$  can potentially damage host tissue, and IL-1 $\alpha$  strongly induces an inflammatory response. Accordingly, these two cytokines are thought to be highly involved in the development of inflammation in tongue tissue. We did not observe increased production of IL-17, which plays the most important role in preventing *C. albicans* infection, in the infected mice. This is likely one of the reasons that, even three days after infection, there was significant proliferation of *C. albicans* in tongue tissue.

Based on our experimental conditions, we easily reproduced oral candidiasis in mice, as well as the associated increase in proinflammatory cytokines. This mouse model will very likely be useful for elucidating the mechanisms of oral candidiasis development, as well as for the development of new therapies against this disease.

Key words : oral candidiasis, mouse model, *Candida albicans*, IL-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$

受付：平成27年5月8日，受理：平成27年6月27日  
奥羽大学大学院歯学研究科口腔感染症学専攻<sup>1</sup>  
奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座口腔感染免疫  
学分野<sup>2</sup>  
(指導：清浦有祐教授)

Department of Oral Infectious Diseases, Ohu  
University, Graduate School of Dentistry<sup>1</sup>  
Division of Oral Infection and Immunity, Department  
of Oral Medical Science, Ohu University School of  
Dentistry<sup>2</sup>  
(Director : Prof. Yusuke KIYOURA)

## 緒言

ヒト口腔内には、様々な微生物が常在して口腔微生物叢を形成している。その中には真菌である *Candida albicans* (*C. albicans*) も含まれる<sup>1,2)</sup>。

通常、それらの微生物が病原性を発揮して感染症を生ずることはない。しかし、高齢者、免疫不全患者、担癌患者、重度の糖尿病患者のような易感染性宿主では、日和見感染症の原因となることが多い<sup>1,3-6)</sup>。

特に口腔常在真菌の代表である *C. albicans* が起こす口腔カンジダ症は、高齢者で多く認められる。超高齢社会である我が国では、今後、この疾患がさらに増加することが予想される<sup>1,7)</sup>。

口腔カンジダ症の研究では、実験動物を用いてヒトの口腔カンジダ症に類似した病変を起こさせる試みが行われている。使用される動物としては、類人猿、ウサギ、ラット、マウス等がある<sup>1,8-13)</sup>。ヒトに近い類人猿を使用することは、ヒト口腔カンジダ症のモデルとしては最も理想的と考えられる<sup>11)</sup>。しかし、実際の実験では多数の個体が必要になることに伴う経済的な問題、あるいは宿主の遺伝的な解析の容易さなどを総合的に考えるとマウスが最も適した実験動物となる<sup>1,10,11)</sup>。

我々はマウスを用いた実験的口腔カンジダ症の研究を進めてきたが、安定的な再現性のある実験結果を得ることは困難なことが多い<sup>14,15)</sup>。また、今までに報告されたマウスの実験的口腔カンジダ症においても、その実験方法は報告者によって様々であり、使用するマウスの系統、薬剤の種類や投与量も異なる<sup>1,11-13)</sup>。そのため、再現性のある結果を得るためには実験条件の再検討が必要となっている。

本研究では、マウスの実験的口腔カンジダ症の条件設定に新たに取り組み、再現性のある条件を確立することを試みた。ヒトにおける口腔カンジダ症は、抗菌薬の長期服用に伴う菌交代症として起こる場合と感染防御システムの低下に伴う日和見感染症として起こる場合がある<sup>1,10,15)</sup>。効率的に安定した再現性のある口腔カンジダ症を起こすには、この二つの実験条件を満たすようにすれば良いと考えられる。

具体的には以下のことを行うことになる。第一に広域スペクトルを持つ抗菌薬の塩酸クロルテトラサイクリン溶液を飲用させることで、マウスの口腔内の細菌の総数を減少させる。そして、後から接種した *C. albicans* がカンジダ症を起こしやすくさせる<sup>1,10,15)</sup>。次に副腎皮質ホルモンのプレドニゾロンをマウスに投与することで、マウスの感染防御システムを低下させる。これらの処置によって、接種した *C. albicans* が日和見感染症としての口腔カンジダ症を起こしやすくさせる<sup>1,10,15)</sup>。上記二つの実験手順によって口腔カンジダ症を起こすことが可能になると考える。

しかし、その場合に安定した再現性のあるマウス口腔カンジダ症を発症させるための実験条件を設定するためには、まずは塩酸クロルテトラサイクリンの濃度・飲用期間の設定およびプレドニゾロン投与量の決定が必要となる。

それらの条件設定の有効性を確認するために、従来は定着した *C. albicans* の菌数、口腔内の炎症症状を指標としてきた<sup>1,10,11,14,15)</sup>。

しかし、それらのみで口腔カンジダ症を捉えることは不十分と考えられる。真菌を含む微生物感染に対して、宿主はまず自然免疫と呼ばれる免疫システムによって防御している<sup>16-18)</sup>。

この自然免疫において宿主組織が産生する炎症性サイトカインは、感染防御において大きな役割を果たすと共に宿主を傷害させる作用をもたらす<sup>19-24)</sup>。そのため、口腔カンジダ症のレベルを把握する因子の一つとして炎症性サイトカインの産生量を測定することも必要となる。

本研究では、*C. albicans* を接種したマウスの舌組織中の炎症性サイトカイン量も測定し、定着した菌数および炎症症状と同様に評価した。

## 材料および方法

### 1. 使用した *C. albicans* の菌株とその調整

高齢者の口腔内から分離した *C. albicans* OH-1株を使用した。この菌株は、マウスの舌に接種することで白苔が形成されることを認めている<sup>14)</sup>。

OH-1株を1枚のカンジダGS培地(栄研, 東京)に接種して、37°C好気条件下で24時間培養した。

増殖したコロニーを回収して、1% ウシ胎児血清 (GIBCO, Carlsbad, CA, USA) 含有 RPMI1640 培養液 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 5 ml 中に浮遊させ、菌数を $10^{13}$ 個/mlに調整したものを使用菌液とした。

## 2. マウスの感染実験

感染実験は奥羽大学動物実験委員会の承認を得て、動物実験規程に従って行った。マウスは、4週齢から5週齢の雌性 ICR マウス (日本クレア, 東京) を使用した。飼育は奥羽大学実験動物研究施設内の安全キャビネットを使用して、飲用水とマウス用飼料を自由に摂取させた。飲用水は、水道水もしくは所定の濃度の塩酸クロルテトラサイクリン (武田シェリング・ブラウアニマルヘルス, 大阪) 含有水道水を、飼料はすべてマウス用飼料 (オリエンタル酵母, 東京) を使用した<sup>14,15)</sup>。なお、実験はすべて1実験群につき5匹を使用した。

## 3. マウスへの *C. albicans* の接種

マウスに0.2mgのプレドニゾロン (共立製薬, 東京) を皮下注射した。同時にマウスの飲料水を水道水から塩酸クロルテトラサイクリン含有水道水に変更した。その24時間後に鎮静を目的として0.1mgのクロルプロマジン塩酸塩 (和光純薬, 大阪) を後肢大腿部に筋肉注射し、その20分後に鎮静したマウスの舌に調整した菌液を接種した。具体的には綿棒を菌液に浸し、その綿棒を10秒間マウスの口腔内に挿入して *C. albicans* を感染させた<sup>14,15)</sup>。綿棒に含まれる菌液量は0.1mlであるため、それに含まれる菌数は $10^{12}$ 個であった。

## 4. マウス舌組織中の *C. albicans* 菌数とサイトカイン産生量の測定

*C. albicans* を感染させ、3日間経過したマウスを頸椎脱臼によって屠殺した。それらのマウスの舌を先端から5mmの位置で切断し、5mlの生理食塩水を入れたプラスチックシャーレ内で舌組織をピンセットでほぐして細かい断片とした。舌組織断片の入った溶液を15mlのプラスチックチューブに移した。チューブをよく攪拌してから、0.1mlを採取してカンジダGS培地に接種後に37°Cで好気培養を行った。出現したコロニー数から、マウス舌組織中の *C. albicans* 菌数を測定した<sup>14,15,25)</sup>。

また、この舌組織断片の入った溶液中のサイトカインを定量することで、舌組織のサイトカイン産生量を求めた。サイトカインはマウス ELISA キット (eBiosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を使用して、マイクロプレートリーダー (モデル 680: Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) で測定した。測定したサイトカインは macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-17 (IL-17) である<sup>23-25)</sup>。

## 5. 統計処理

統計処理は one-way analysis of variance を用いた分散分析の後、Bonferroni or Dunn method による多重比較検定を行った。 $P < 0.05$ を有意とした。

## 結 果

### 1. 飲用水に含む塩酸クロルテトラサイクリン量の決定

マウス口腔内の細菌数を減少させるために、飲用水に塩酸クロルテトラサイクリンを含有させる。その含有量を決定するための実験を行った。図1に示すように、8mg/mlの塩酸クロルテトラサイクリンを含有した水道水を5日間飲用した場合には、水道水を飲用した場合と比較して有意な体重の減少が認められた。したがって、塩酸クロルテトラサイクリンの含有量は4mg/mlとすることとした。

### 2. 塩酸クロルテトラサイクリン含有水道水の飲用によるマウス口腔内の細菌の減少

前述の結果から、塩酸クロルテトラサイクリン4mg/ml含有水道水をマウスに4日間飲用させてから、舌を切断して組織中の細菌数を調べた。その結果、舌組織中の総細菌数は水道水を飲用させた場合と比較して、有意な減少が認められた (図2)。このことから、広域抗菌スペクトルを有する塩酸クロルテトラサイクリンの使用はマウスの口腔内で細菌数の減少を安全かつ有意に導いた。

### 3. 非感染マウス口腔内からの *C. albicans* 検出の有無

マウスの感染実験を行う前に、非感染マウスの

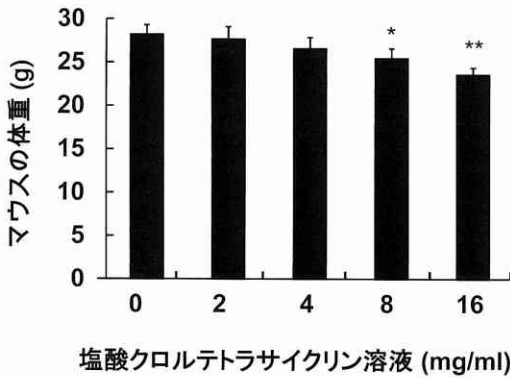


図1 飲用水に含む塩酸クロルテトラサイクリン量の決定  
平均値±SEを示す  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ : 塩酸クロルテトラサイクリン非投与群に対する有意差

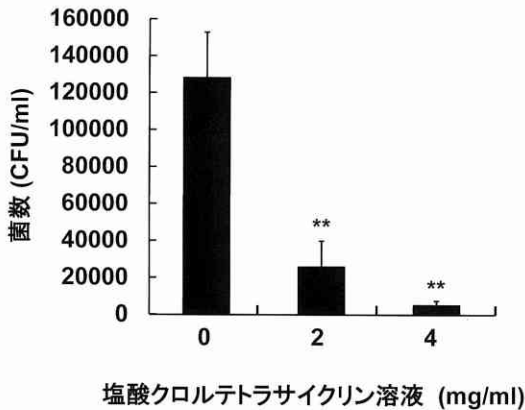


図2 塩酸クロルテトラサイクリン含有水道水の飲用によるマウス口腔内細菌数の減少  
平均値±SEを示す  
\*\* $P < 0.01$ : 塩酸クロルテトラサイクリン非投与群に対する有意差

口腔内には *C. albicans* が常在していないことを確認する必要がある。また、今回の実験における飼育環境では *C. albicans* が感染処置をしない場合には感染しないことも確認しなくてはならない。そのため、感染実験に使用したマウスと同じ条件のマウス20匹を同一条件下で3日間飼育してから、舌を切断して組織中の *C. albicans* を調べた。その結果、*C. albicans* が検出されたマウスは皆無であった。同様な実験を再度繰り返したが、同じ結果であった(表1)。これらの結果から、非感染マウスの口腔内に *C. albicans* は常在しないことが明らかになった。

表1 非感染マウス口腔内からの *C. albicans* 検出の有無

実験1	<i>C. albicans</i> が検出されたマウス
ICR 雌性マウス 4~5週齢	0 / 20匹
実験2	<i>C. albicans</i> が検出されたマウス
ICR 雌性マウス 4~5週齢	0 / 20匹

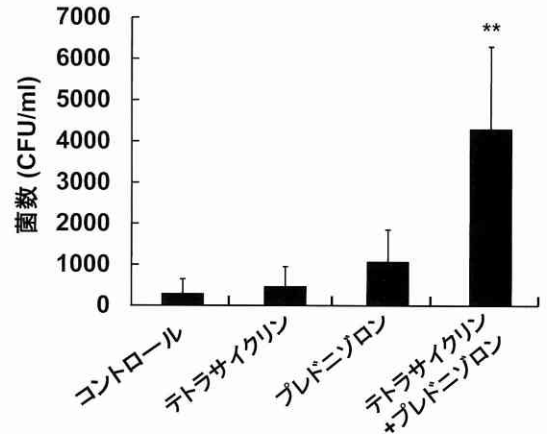


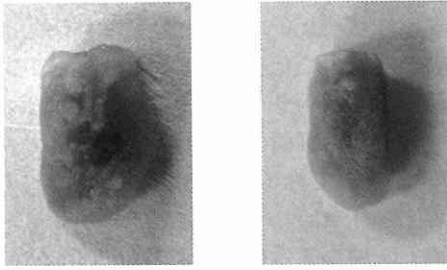
図3 塩酸クロルテトラサイクリン及びプレドニゾロンが *C. albicans* の口腔内定着に及ぼす影響  
平均値±SEを示す  
\*\* $P < 0.01$ : コントロールに対する有意差

#### 4. 塩酸クロルテトラサイクリンおよびプレドニゾロンが *C. albicans* の口腔内定着におよぼす影響

次の4群(1群につき5匹)のマウスの舌に *C. albicans* を接種して3日後の *C. albicans* の舌組織中の菌数を調べた。1群: コントロール群として何らの処置を行わなかった。2群: 感染24時間前から塩酸クロルテトラサイクリン4mg/ml 含有水道水を飲用とした。3群: プレドニゾロン2mg を投与した。4群: 感染24時間前から塩酸クロルテトラサイクリン4mg/ml 含有水道水を飲用とし、プレドニゾロン2mg を投与した。

結果は図3に示したように、塩酸クロルテトラサイクリン含有水道水を飲用させ、プレドニゾロンを投与した場合にのみ多数の *C. albicans* が舌組織中から検出された。マウス口腔カンジダ症の発現には、塩酸クロルテトラサイクリン含有水道水を飲用させることと、プレドニゾロンを投与することが必要であることが示された。

## 感染群



## コントロール群

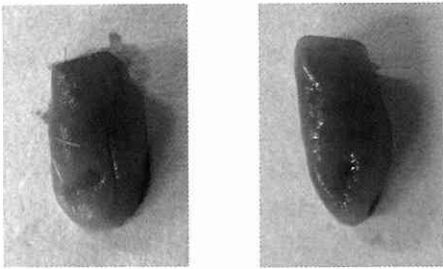


図4 マウス舌における白苔の形成

## 5. マウス舌における白苔の形成

塩酸クロルテトラサイクリン4mg/ml 含有水道水を飲用水とし、プレドニゾロン2mgを投与24時間後に *C. albicans* を舌に接種した。感染3日後の舌を切断したものを図4に示す。感染マウスの舌表面には、ヒト口腔カンジダ症で認められるものと極めて類似した白苔が形成されていた。一方、非感染マウスのコントロール群ではそのような症状は、全く認められなかった。

## 6. 感染マウス舌組織中のケモカイン産生

塩酸クロルテトラサイクリン4mg/ml 含有水道水を飲用水とし、プレドニゾロン2mgを投与24時間後に *C. albicans* を舌に接種した。その3日後に舌を切断して、サイトカインの中でケモカインとしての作用を示す MIP-1 $\alpha$  と MCP-1の産生量を調べた。なお、ケモカイン以外のサイトカインの測定も同様に行った。その結果、図5に示すように MIP-1 $\alpha$  は非感染マウスと比較して有意に高い産生が認められた。一方、MCP-1は非感染マウスと同様に全く産生が認められなかった。

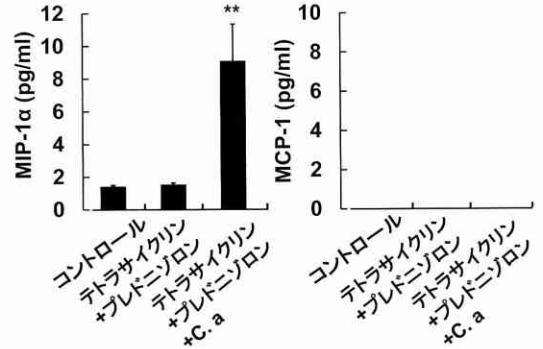


図5 感染マウス舌組織中のケモカイン産生

平均値 $\pm$ SEを示す

\*\*  $P < 0.01$ : コントロールに対する有意差

C. a, *C. albicans*

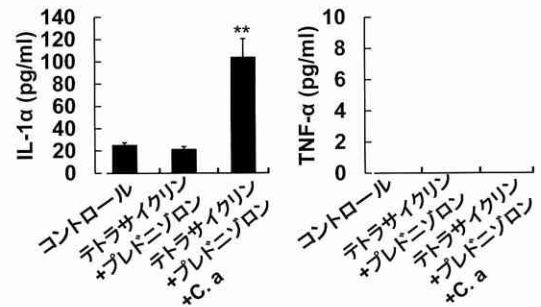


図6 感染マウス舌組織中のサイトカイン産生

平均値 $\pm$ SEを示す

\*\*  $P < 0.01$ : コントロールに対する有意差

C. a, *C. albicans*.

## 7. 感染マウス舌組織中の炎症性サイトカイン産生

次に、炎症性サイトカインとして作用する IL-1 $\alpha$  と TNF- $\alpha$  についても同様に調べた。その結果、IL-1 $\alpha$  は非感染マウスと比較して有意に高い産生が認められたが、TNF- $\alpha$  は MCP-1の場合と同様に全く産生が認められなかった(図6)。

## 8. 感染マウス舌組織中の IL-17 産生

サイトカインの中でも IL-17は真菌感染に対する宿主の防御反応において重要な働きをする感染防御のキーとなるサイトカインと考えられている。そのため、このサイトカインについても調べた。図7に示すように産生は認められたが、非感染マウスと比較して有意差は認められなかった。

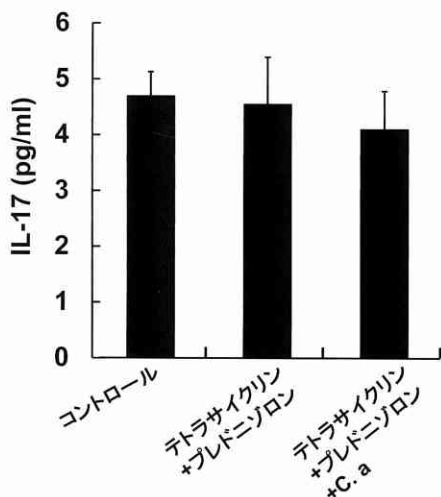


図7 感染マウス舌組織中のIL-17産生

## 考 察

口腔カンジダ症の動物モデルは、口腔カンジダ症の治療法の開発に必要なものである。動物の中でも通常はマウスが選択され、ヒトの口腔カンジダ症の誘因となる条件をマウスに設定する<sup>1,10-13</sup>。

そのため、本実験では初めに *C. albicans* の口腔内への定着を容易にするために、感染1日前から実験終了までテトラサイクリン含有水道水をマウスに飲用させた<sup>10,14,15</sup>。

そのことによって、マウスの口腔内の細菌数を大きく低下させ、*C. albicans* の定着と組織への侵入を容易にすることができると考えた。抗菌薬の中でも塩酸クロルテトラサイクリンを選択した理由は広範囲の抗菌スペクトルを示すことである。ヒトの口腔内には約900種類の細菌が存在すると報告されている。マウスでも同様に多くの種類の細菌が存在すると考えられるため、広域スペクトルのものを使用した<sup>10,14,15</sup>。

また、水道水中の含有濃度は抗菌力を高めるには可能な限り高濃度であることが望まれる。一方、多量の塩酸クロルテトラサイクリンがマウスに強い毒性を発揮する危険性もある。このことから、塩酸クロルテトラサイクリンの含有濃度は、顕著な外観及び体重の変化が認められない範囲で最も高濃度の4mg/mlを用いた。実際、マウスに塩酸

クロルテトラサイクリン4mg/ml含有水道水を飲用させた場合に、マウス口腔内の総菌数は塩酸クロルテトラサイクリン非含有の水道水を飲用させた場合と比較して大きく低下していた。この濃度の塩酸クロルテトラサイクリンの飲用によって、マウス口腔内の細菌の多くは死滅したことから、*C. albicans* が定着しやすい口腔環境になっていると考えられた。

しかし、マウス舌組織内に多数の *C. albicans* が定着するには、図3に示すようにプレドニゾロンの投与が必要であった。この理由としては、長期間の塩酸クロルテトラサイクリン投与による口腔細菌の減少ではなく、短期間（4日間）の投与による一過性の減少であるために *C. albicans* の十分な定着が誘導されないためと考える。

次に *C. albicans* を感染させた舌組織中からは、非感染マウスと比較して MIP-1 $\alpha$  と IL-1 $\alpha$  の有意に高い産生が認められた。しかし、MCP-1, TNF- $\alpha$ , さらに IL-17は差が認められなかった。これらのことから、*C. albicans* によって誘導されるサイトカイン産生では、選択性がある可能性が示された。

IL-17は、ヘルパー T 細胞17型 (T helper 17 cell, Th17細胞) が産生するサイトカインで真菌感染防御の要となる。IL-17は宿主の細胞から、好中球や単球を感染の場を集めるためのケモカイン産生を誘導する<sup>26-28</sup>。加えて Th17細胞は、マクロファージによる *C. albicans* 貪食を促進することが報告されている<sup>26-28</sup>。Th17細胞の機能低下は、真菌感染症の重篤化を招くと考えられる。

しかし、感染1日前から塩酸クロルテトラサイクリンを飲用させ、プレドニゾロンを投与したマウスに *C. albicans* を感染させた今回の実験では、IL-17の産生量が非感染マウスと変わらなかった。このことが感染3日後の舌表面に著名な白苔の形成と舌組織中で *C. albicans* の増殖が認められた原因の一つとも考えられる。

プレドニゾロンは、抗炎症作用と免疫抑制作用を示すステロイド剤である<sup>10,14,15</sup>。また、テトラサイクリン系抗菌薬のミノサイクリンとドキシサイクリンが炎症性サイトカイン産生に対して抑制的に作用することが報告されている<sup>29,30</sup>。

感染の1日前から塩酸クロルテトラサイクリンを飲用させ、プレドニゾロンを投与したことが、IL-17の産生亢進が認められない原因となる可能性がある。しかし、塩酸クロルテトラサイクリンのサイトカイン産生に対する抑制効果は、*in vitro*におけるヒト細胞への添加、もしくは*in vivo*におけるマウス腹腔への投与によるものである<sup>29,30)</sup>。さらに、MIP-1 $\alpha$ とIL-1 $\alpha$ では産生が抑制されずに亢進していた。そのため、IL-17の有意な産生が認められなかったのは、塩酸クロルテトラサイクリンおよびプレドニゾロンの感染前からの処置によるものではないと考えられる。むしろ、*C. albicans*により誘導されるサイトカイン産生に選択性が認められることが、原因として考えられる。具体的には、*C. albicans*を構成する様々な菌体成分に対する宿主細胞の持つレセプターによる認識とそれに続くサイトカイン産生までのメカニズムの違いである<sup>31)</sup>。

*C. albicans*の感染によって産生が認められたMIP-1 $\alpha$ は単球、リンパ球、好中球、好塩基球、マスト細胞から産生され、単球、樹状細胞、T細胞、NK細胞、好酸球、好塩基球を遊走させる作用を示すケモカインの1種である<sup>32)</sup>。したがって、MIP-1 $\alpha$ の産生は侵入した真菌を早期に貪食・殺菌することに繋がり、微生物感染が生じた際にこのような白血球を遊走させるケモカインが産生されるのは感染防御に極めて重要である<sup>32)</sup>。

MIP-1 $\alpha$ は他のサイトカイン産生を誘導する作用もあり、このことも真菌を宿主の体内から排除することに貢献している<sup>2,32,33)</sup>。しかし、MIP-1 $\alpha$ は*C. albicans*の感染に対して起こる急性炎症で重要な役割を担うケモカインである<sup>2,34)</sup>。そのため、過剰なMIP-1 $\alpha$ の産生は宿主に傷害をもたらす可能性もある。MIP-1 $\alpha$ に対する抗体をマウスに投与すると、IL-1 $\beta$ とTNF- $\alpha$ の産生が抑制されて炎症反応も抑制される<sup>2)</sup>。

実際、*C. albicans*は宿主からのケモカイン産生を強く誘導することが証明されている<sup>22,34,35)</sup>。

しかし、MIP-1 $\alpha$ と同じくケモカインに属するMCP-1は産生が認められなかった。今回の実験で使用した*C. albicans* OH-1株を*in vitro*の実験系でマウスマクロファージ様細胞株に感染さ

せた場合は、MCP-1が大量に産生された。この違いは、*in vivo*において複数種の宿主細胞が*C. albicans*を認識する場合と*in vitro*において単一の細胞種が認識する場合では、継続して起こる細胞内でのシグナル伝達系に差異を生じるためと考えるが、今後の検討課題である。

また、MCP-1の産生が認められなかったことは*C. albicans*に対する感染防御の面では、プラスに作用すると考えられる。MCP-1は未分化ヘルパーT細胞をTh2細胞に分化させることで液性免疫を促進するとされる<sup>23,36,37)</sup>。*C. albicans*の感染防御の中心は細胞性免疫である<sup>26,28)</sup>。Th2細胞が多くなれば、*C. albicans*に対する細胞性免疫機能は低下し、*C. albicans*が体内から排除されにくくなるためである。

その他、産生が認められたサイトカインであるIL-1 $\alpha$ は、白血球の血管外への遊走を促進すると共に毛細血管や線維芽細胞の増殖をもたらし炎症反応の形成に関わる<sup>35,38)</sup>。すなわち、感染初期において真菌感染に対して防御的に作用するサイトカインである。また、その産生量はMIP-1 $\alpha$ の約10倍であった。したがって、実際のマウスの口腔カンジダ症における炎症の形成には、他のサイトカインよりも重要な役割を果たすと考えられる。*In vitro*の実験系で、*C. albicans*をヒト歯肉上皮細胞に感染させた場合はIL-1 $\alpha$ の有意な産生が認められた。しかし、TNF- $\alpha$ の産生は認められずに今回の結果と一致していた<sup>22)</sup>。

これらの結果が示すように、サイトカイン産生は感染する微生物の種類、あるいは*in vivo*か*in vitro*かの実験系によっても大きく異なる。しかし、今回のような*in vivo*の実験系は、よりヒトの口腔カンジダ症の発現を再現できると考える。カンジダ症の治療には、従来から行われている抗真菌薬の投与のみでなく、抗菌物質やプロバイオティクスを用いる試みも行われようとしている<sup>39)</sup>。

このような新たな治療方法の評価では、*in vivo*の感染実験は必須であると考えられる。今回のマウスモデルでは、カンジダ症の防御で最も重要なサイトカインのIL-17の産生が舌で認められた。このことは、抗真菌薬以外の新たな治療法の効果判定にこのモデルを応用できる可能性を示唆している。

## 文 献

- 1) Kamagata-Kiyoura, Y. and Abe S. : Recent studies on oral candidiasis using a murine model. *J. Oral Biosci.* **47** ; 60-64 2005.
- 2) Yuan, X., Hua, X. and Wilhelmus, K. R. : Pro-inflammatory chemokines during *Candida albicans* keratitis. *Exp. Eye Res.* **90** ; 413-419 2010.
- 3) Nicolatou-Galitis, O., Dardoufas, K., Markoulatos, P., Sotiropoulou-Lontou, A., Kyprianou, K., Kolitsi, G., Pissakas, G., Skarleas, C., Koulioulas, V., Papanicolaou, V., Legakis, N. J. and Velegraki, A. : Oral pseudomembranous candidiasis, herpes simplex virus-1 infection, and oral mucositis in head and neck cancer patients receiving radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mouthwash. *J. Oral Pathol. Med.* **30** ; 471-480 2001.
- 4) Manfredi, M., McCullough, M. J., Ai-Karaawi, Z. M., Vescovi, P. and Porter, S. R. : *In vitro* evaluation of virulence attributes of *Candida* spp. Isolated from patients affected by diabetes mellitus. *Oral Microbiol. Immunol.* **21** ; 183-189 2006.
- 5) Han, K. H., Park, S. J., Choi, S. J., Park, J. Y. and Lee, K. H. : Immunological features of macrophages induced by various morphological structures of *Candida albicans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23** ; 1031-1040 2013.
- 6) Raman, S. B., Nguyen, M. H., Cheng, S., Badrane, H., Iczkowski, K. A., Wegener, M., Gaffen, S. L., Mitchell, A. P. and Clancy, C. J. : A competitive infection model of hematogenously disseminated candidiasis in mice redefines the role of *Candida albicans* IRS4 in pathogenesis. *Infect. Immun.* **81** ; 1430-1438 2013.
- 7) Kamagata-Kiyoura, Y., Abe, S., Yamaguchi, H. and Nitta, T. : Reduced activity of *Candida* detachment factors in the saliva of the elderly. *J. Infect. Chemother.* **10** ; 59-61 2004.
- 8) Flattery, A. M., Abruzzo, G. K., Gill, C. J., Smith, J. G. and Bartizal, K. : New model of oropharyngeal and gastrointestinal colonization by *Candida albicans* in CD4<sup>+</sup> T-cell-deficient mice for evaluation of antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40** ; 1604-1609 1996.
- 9) Elahi, S., Pang, G., Clancy, R. and Ashman, R. B. : Cellular and cytokine correlates of mucosal protection in murine model of oral candidiasis. *Infect. Immun.* **68** ; 5771-5777 2000.
- 10) Takakura, N., Sato, Y., Ishibashi, H., Oshima, H., Uchida, K. and Yamaguchi, H. : A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol. Immunol.* **47** ; 321-326 2003.
- 11) 安部 茂 : マウス口腔カンジダ症モデルの開発とその応用. *Jpn. J. Med. Mycol.* **45** ; 227-231 2004.
- 12) Yoshioka, H., Ito-Kuwa, S., Nakamura, K. and Mataga, I. : Virulence of *Candida dubliniensis* using a murine experimental oral candidiasis model in comparison with *Candida albicans*. *Med. Mycol. J.* **53** ; 135-145 2012.
- 13) Johnson, C. C., Yu, A., Lee, H., Fidel, P. L., Jr. and Noverr, M. C. : Development of a contemporary animal model of *Candida albicans*-associated denture stomatitis using a novel intraoral denture system. *Infect. Immun.* **80** ; 1736-1743 2012.
- 14) Kamagata-Kiyoura, Y., Abe, S., Yamaguchi, Y. and Nitta, T. : Protective effects of human saliva on experimental murine oral candidiasis. *J. Infect. Chemother.* **10** ; 253-255 2004.
- 15) 白井やよい, 鈴木奈央, 清野晃孝, 鎌田政善, 清浦有祐 : 口腔常在 *Candida albicans* によって惹起されるマウス口腔カンジダ症. *老年歯学* **20** ; 34-38 2005.
- 16) Jouault, T., Sarazin, A., Esparza, M. M., Fradin, C., Sendid, B. and Poulain, D. : Host responses to a versatile commensal : PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. *Cell. Microbiol.* **11** ; 1007-1015 2009.
- 17) Cheng, S. C., Joosten, L. A. B., Kullberg, B. J. and Netea, M. G. : Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect. Immun.* **80** ; 1304-1313 2012.
- 18) Peters, B. M. and Noverr, M. C. : *Candida albicans*-*Staphylococcus aureus* polymicrobial periodontitis modulates host innate immunity. *Infect. Immun.* **81** ; 2178-2189 2013.
- 19) Schaller, M., Boeld, U., Oberbauer, S., Hamm, G., Hube, B. and Kortling, H. C. : Polymorphonuclear leukocyte (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an *in vitro* model of oral candidosis. *Microbiology* **150** ; 2807-2813 2004.
- 20) van der Graaf, C. A., Netea, M. G., Verschueren, I., van der Meer, J. W. and Kullberg, B. J. : Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect. Immun.* **73** ; 7458-7464 2005.



- 21) Dongari-Bagatoglou, A. and Fidel, P. L., Jr. : The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. *J. Dent. Res.* **84** ; 966-977 2005.
- 22) 二川浩樹, 牧平清超, 江草 宏, 福島 整, 川端涼子, 浜田泰三, 矢谷博文 : 口腔カンジダの付着およびバイオフィーム形成 . *Jpn. J. Med. Mycol.* **46** ; 233-242 2005.
- 23) 呂 正仁, 玉井利代子, 清浦有祐 : *Candida albicans* のマクロファージ様細胞からの選択的サイトカイン産生誘導作用 . *奥羽大歯学誌* **39** ; 80-86 2012.
- 24) 伊藤榮一, 玉井利代子, 清浦有祐 : *Candida albicans* によってマクロファージ様細胞から誘導されるサイトカイン産生に対する alendronate の増強作用 . *奥羽大歯学誌* **39** ; 95-102 2012.
- 25) Abe, Y., Ambe, K., Nakagawa, T., Kamata, S. and Kiyoura, Y. : Experimental aspiration pneumonia caused by *Candida albicans* in mice. *老年歯学* **21** ; 188-193 2006.
- 26) Puel, A., Picard, C., Cypowyj, S., Lilic, D., Abel, L. and Casanova, J. L. : Inborn errors of mucocutaneous immunity to *Candida albicans* in humans : a role for IL-17 cytokines? *Curr. Opin. Immunol.* **22** ; 467-474 2010.
- 27) Kagami, S., Rizzo, H. L., Kurtz, S. E., Miller, L. S. and Blauvelt, A. : IL-23 and IL-17A, but not IL-12 and IL-22, are required for optimal skin host defense against *Candida albicans*. *J. Immunol.* **185** ; 5453-5462 2010.
- 28) De Luca, A., Zelante, T., D'Angelo, C., Zagarella, S., Fallarino, F., Spreca, A., Iannitti, R. G., Bonifazi, P., Renauld, J. C., Bistoni, F., Puccetti, P. and Romani, L. : IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal Immunol.* **3** ; 361-373 2010.
- 29) Zanjani, T. M., Sabetkasaei, M., Mosaffa, N., Manaheji, H., Labibi, F. and Farokhi, B. : Suppression of interleukin-6 by minocycline in a rat model of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* **538** ; 66-72 2006.
- 30) Krakauer, T. and Buckley, M. : Doxycycline is anti-inflammatory and inhibits staphylococcal exotoxin-induced cytokines and chemokines. *Antimicrob. agents Chemother.* **47** ; 3630-3633 2003.
- 31) Gil, M. L. and Gozalbo, D. : Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections. *Front. Biosci.* **14** ; 570-582 2009.
- 32) 宮坂昌之, 小安重夫 : 免疫システムの成り立ち. 標準免疫学 (宮坂昌之, 小安重夫編) 第3版 ; 15-41 医学書院 東京 2013.
- 33) Traynor, T. R. and Huffnagle, G. B. : Role of chemokines in fungal infections. *Med. Mycol.* **39** ; 41-50 2001.
- 34) Schaller, M., Mailhammer, R., Grassl, G., Sander, C. A., Hube, B. and Korting, H. C. : Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. *J. Invest. Dermatol.* **118** ; 652-657 2002.
- 35) Li, L. and Dongari-Bagatoglou, A. : Oral epithelium-*Candida glabrata* interactions *in vitro*. *Oral Microbiol. Immunol.* **22** ; 182-187 2007.
- 36) Chensue, S. W., Warmington, K. S., Ruth, J. H., Sanghi, P. S., Lincoln, P. and Kunkel, S. L. : Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation : relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production. *J. Immunol.* **157** ; 4602-4608 1996.
- 37) Furukawa, K., Kobayashi, M., Herndon, D. N., Pollard, R. B. and Suzuki, F. : Appearance of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) early after thermal injury : role in the subsequent development of burn-associated type 2 T-cell responses. *Ann. Surg.* **236** ; 112-119 2002.
- 38) 中村 晃, 高井俊行 : 炎症のメカニズム. 標準免疫学 (宮坂昌之, 小安重夫編) 第3版 ; 334-347 医学書院 東京 2013.
- 39) Villena, J., Salva, S., Aguero, G. and Alvarez, S. : Immunomodulatory and protective effect of probiotic *Lactobacillus casei* against *Candida albicans* infection in malnourished mice. *Microbiol. Immunol.* **55** ; 434-445 2011.

著者への連絡先：清浦有祐, (〒963-8611)郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座  
 Reprint requests : Yusuke KIYOURA, Department of Oral Medical Science, Ohu University School of Dentistry  
 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan