


学位論文内容の要旨

受付番号	第 378 号	氏 名	服 部 宗 太 郎	
論文題名	<i>Candida albicans</i> の定着に及ぼすサイトカインの影響 —カンジダ血症のマウスモデル開発の試み—			
指導教員	清 浦 有 祐			

論文内容の要旨(2,000字程度)

I 研究目的(300字程度)

口腔常在真菌の代表である *Candida albicans* (*C. albicans*)は、日和見感染微生物であるため健常人に病原性を発揮する可能性は低い。しかし、*C. albicans* が血流を介した感染を起こした場合は、カンジダ血症を惹起する。カンジダ血症の死亡率は極めて高く、患者数は増加傾向を示している。カンジダ血症の発症メカニズムを解明し、有効な治療方法と予防法を開発するためには、適切な動物モデルが必要となる。口腔カンジダ症のマウスモデルはすでに開発され、様々な研究に用いられている。このマウスモデルを基本にして、カンジダ血症のマウスモデルの開発を目指した。その第一段階として、口腔内に接種した *C. albicans* が腸管内に移行し、定着が促進するための最適な実験条件を設定することを試みた。

II 研究方法(500字程度)

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。OH-1株をカンジダGS培地に接種して、37℃好気条件下で24時間培養し、1%ウシ胎児血清含有RPMI1640培養液に浮遊させたものを使用菌液とした。

2. マウスの感染実験

マウスを使用した感染実験は、奥羽大学動物実験委員会の承認を得て行った。マウスに0.2 mgのプレドニゾロンを皮下注射した。同時にマウスの飲料水を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0.1 mgのクロルプロマジン塩酸塩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口腔内に調整した菌液を接種した。

C. albicans を接種し、任意の日数を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切断し、断片化した溶液中から 0.1 mlを採取してカンジダGS培地に接種後に37℃で好気培養を行った。出現したコロニー数から、マウスの舌組織中の *C. albicans* 数を測定した。

なお、一部の実験では *C. albicans* 接種後のマウスにマウスIL-1 α 抗体、又はマウスIL-6抗体溶液を腹腔投与した。

3. マウスの糞中の *C. albicans* 数の測定

マウスの糞を採取して浮遊液を作成し、0.1 mlを採取してカンジダGS培地に接種後に37℃で好気培養を行った。出現したコロニー数から、マウスの糞中の *C. albicans* 数を測定した。

4. 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。

III 研究結果(600字程度)

1. 非感染マウスにおける *C. albicans* 検出の有無

C. albicans 非感染マウスの舌, 肺, 腎臓, 心臓, 肝臓, 糞, 血液中からは, *C. albicans* が検出されなかった。

2. 口腔内における *C. albicans* の定着

口腔内に *C. albicans* を接種して定着した舌組織中の菌数を測定した。接種3日後に多くの *C. albicans* が舌組織中で増殖していることが確認できた。しかし, それ以降, 舌組織中の菌数は低下し, 接種9日後ではほとんど検出されなくなった。接種3日後のマウスの舌は発赤腫脹して白苔も認められ, ヒトの口腔カンジダ症と類似した所見を示した。

3. *C. albicans* 接種3日後のマウス舌のPAS染色像

接種3日後のマウスの舌を採取してPAS染色を行った。非常に多くの *C. albicans* が舌の角化層に浸潤しているのが認められた。また, 多くの好中球と推定できる白血球の強い浸潤も *C. albicans* の周辺で観察できた。

4. 口腔内に *C. albicans* を接種したマウス糞中の *C. albicans* 検出

マウス口腔内に *C. albicans* を接種後, 糞中に *C. albicans* が検出されるか否かと検出された場合の菌数の推移を調べた。検出を試みた接種42日後まで連続して検出された。菌数に関しては42日後であっても, 特に大きな減少は示さなかった。

5. マウス糞中の *C. albicans* の由来に関する検討

マウスをプレドニゾロン投与群, テトラサイクリン含有水道水飲水群, プレドニゾロンを投与した上で テトラサイクリン含有水道水を飲水させた群, プレドニゾロン非投与で水道水を飲水させた群の4つの実験群に分けて飼育した。実験開始3日後, 9日後の糞を採取して, *C. albicans* の検出を試みたが, まったく検出されなかった。

6. 炎症性サイトカインに対する抗体が糞中の *C. albicans* 数に及ぼす影響

マウスの口腔内に *C. albicans* を接種したのと同時, あるいは1日後にマウスのIL-1 α に対する抗体を腹腔投与した。*C. albicans* 接種1日後に抗体を投与した場合, 抗体を投与しない場合, あるいは同時投与した場合と比較して糞中の *C. albicans* 数は有意に増加していた。さらに, IL-1 α と同じ炎症性サイトカインであるIL-6に対する抗体を用いた実験を行った。IL-1 α 抗体を投与した場合と比較して, IL-6抗体を投与した場合は, 糞中の菌数が有意に低下していた。

IV 考察及び結論(600字程度)

マウスの糞中から検出された *C. albicans* は腸管内にごく少数存在していた *C. albicans* が, テトラサイクリンによって腸内の細菌数が減少したために増殖して検出される可能性が考えられる。そのため, プレドニゾロンの投与とテトラサイクリン含有水道水の飲水させることの両方及びどちらかを *C. albicans* 非感染マウスに行った。実験開始後3日と9日の糞を採取したが, *C. albicans* はまったく検出されなかった。したがって, マウスの腸管内にごく少数定着していた *C. albicans* が抗菌薬による腸管内細菌の減少で増殖したことは否定された。ヒトと異なり, ICRマウスの腸管内には *C. albicans* は常在していないと結論づけることができる。

次に炎症性サイトカインのIL-1 α に対する抗体を *C. albicans* 感染マウスに腹腔投与した場合は, 糞中の *C. albicans* 数が抗体非投与群と比較して有意に高い結果を示した。さらに, マウスIL-6に対する抗体を投与した場合は, IL-1 α 抗体を投与した場合と比較して *C. albicans* 数は, 有意に低下していた。したがって, IL-1 α は *C. albicans* 感染防御で極めて重要な炎症性サイトカインであり, IL-1 α の作用を抑制することで, *C. albicans* の定着が促進すると考えられる。

今回の結果から, 口腔カンジダ症のマウスモデルの実験系にIL-1 α 抗体を投与することで, 口腔から腸管内へ移行する *C. albicans* 数を増加できることが示された。したがって, 口腔カンジダ症のマウスモデルは, 以下の2つを実験手順に加えることでカンジダ血症のマウスモデルに発展させることができると考える。第一にIL-1 α 抗体の投与によって *C. albicans* の腸管内への定着を促進させ, 第二に消化管の粘膜傷害を惹起する抗癌剤を投与して, 腸管内から血管内へ感染を波及させることである。