

*Candida albicans* 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—

奥羽大学大学院歯学研究科口腔感染症学専攻

服 部 宗 太 郎

(指導教員：清浦有祐)

Investigating the Effects of Cytokines on *Candida albicans*

Colonization: Development of a Candidemia Mouse Model

Department of Oral Infectious Diseases

Ohu University, Graduate School of Dentistry

Sotaro Hattori

(Director : Yusuke Kiyoura)

## Abstract

*Candida albicans* (*C. albicans*), a representative resident fungus of the oral cavity, rarely exhibits pathogenicity, but can evoke candidemia in cases of infection for which *C. albicans* enters the bloodstream. The mortality rate from candidemia is extremely high, and the number of patients affected by this is increasing.

An animal model is necessary to clarify the onset mechanism of candidemia and establish treatment methods. A mouse model for oral candidiasis has already been developed and is used widely, so we used it as a basis to develop our mouse model for candidemia. In the present study, as the first stage, *C. albicans* that had proliferated in the oral cavity were transferred to the gut, and we investigated the ideal conditions required for successful colonization by many of these.

The ICR mice were given a subcutaneous injection of 0.2 mg prednisolone, as well as drinking water consisting of tap water with 4 mg/ml tetracycline. After 24 hours, they received an intramuscular injection of 0.1 mg chlorpromazine. Ten minutes later, the mice tongues were inoculated with *C. albicans*.

Next, we attempted to extract *C. albicans* that had moved from the oral cavity to the gut from the mouse feces. We were able to recover *C. albicans* from the feces even 42 days after infection. However, the *C. albicans* extracted from the feces may have resided in the mouse gut prior to inoculation. Therefore, the mice received subcutaneous injections of prednisolone and tap water with tetracycline to drink. We

tried to extract *C. albicans* from the feces of mice without a *C. albicans* infection, but we were unable to do so.

As a way to increase further the number of *C. albicans* colonizing the gut, we injected antibodies against inflammatory cytokines into the peritoneal cavities of mice infected with *C. albicans*. A significant increase in the number of *C. albicans* in the feces was noted in the treatment group given anti-interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) antibody, compared to the control. When antibody to IL-6, another inflammatory cytokine, was administered, significantly fewer numbers of *C. albicans* were found in the feces relative to when anti-IL-1 $\alpha$  antibody was administered.

This demonstrates not only that administration of anti-IL-1 $\alpha$  antibodies significantly increases colonization of *C. albicans* in the gut, but also that IL-1 $\alpha$  is an extremely important cytokine for preventing *C. albicans* infection. On the other hand, IL-6 seems to play a less important role with regard to preventing infection by *C. albicans*.

Key word: *Candida albicans* , inflammatory cytokine,  
candidemia, IL-1 $\alpha$

## 抄 録

口腔常在真菌の代表である *Candida albicans* (*C. albicans*)は、病原性を発揮することは少ない。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の解明と治療方法の確立には、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、広く利用されている。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試みることにした。本研究においては、その第一段階として口腔内で増殖した *C. albicans* が腸管内に移行し、その多くが定着するために最適な条件を探索した。

ICR マウスに 0.2mg のプレドニゾロンを皮下注射し、4mg/ml のテトラサイクリン含有水道水を飲水させた。24時間後に 0.1mg のクロルプロマジンを筋肉注射した。その10分後、マウスの舌に *C. albicans* を接種した。

口腔から腸管内に移行した *C. albicans* を糞中から検出することを試みた。その結果、糞中の *C. albicans* は感染42日後でも多数が検出された。しかし、糞中から検出された *C. albicans* がマウスの腸管内に元々常在していた可能性が考えられた。そこで、マウスにプレドニゾロンを皮下注射し、テトラサイクリン含有水道水を飲水させただけで、*C. albicans* を感染させない場合に、糞中の *C. albicans* の存在を調べたが検出されなかった。

腸管内に定着する *C. albicans* の菌数をさらに増加させる手段として炎症性サイトカインに対する抗体を *C. albicans* 感染マウスの腹腔に投与した。抗 IL-1 $\alpha$  抗体を投与した場合、対照群に比較して糞中の *C. albicans* の菌数

は有意に増加した。IL-1 $\alpha$ と同じく炎症性サイトカインであるIL-6の抗体を投与した場合には，抗IL-1 $\alpha$ 抗体投与と比較して糞中の*C. albicans*の菌数は有意に低かった。

この結果から，抗IL-1 $\alpha$ 抗体の投与が腸管内への*C. albicans*の定着を有意に高めると共に，IL-1 $\alpha$ が*C. albicans*の感染防御に極めて重要なサイトカインであることが示された。一方，*C. albicans*に対する感染防御におけるIL-6の役割は，IL-1 $\alpha$ に比較して低いと考えられる。

キーワード： *Candida albicans*，炎症性サイトカイン，  
カンジダ血症，IL-1 $\alpha$



## 緒 言

*Candida albicans* (以下 *C. albicans* と略す)は口腔常在真菌の代表であるが、通常は口腔内で病原性を発揮することはない<sup>1)</sup>。日和見感染症の原因微生物と考えられている<sup>1)</sup>。高齢者、免疫不全患者、臓器移植患者のような感染防御機能が低下している易感染性宿主で口腔カンジダ症を起こすことはあっても、健常人にカンジダ症を起こすことは稀である<sup>1,2,3)</sup>。

しかし、*C. albicans* を含む *Candida* spp. が血流を介した感染を起こした場合は、極めて重篤な感染症であるカンジダ血症を惹起する<sup>4,5,6)</sup>。米国の調査では、病院内における血流感染の原因微生物の第1位から3位までが *Candida* spp. で占められていた<sup>7)</sup>。また、カンジダ血症の死亡率は40%と極めて高い値を示した<sup>7)</sup>。我が国でもカンジダ血症患者は増加傾向を示し、集中治療室で起こる血流感染症の原因微生物の3位と4位は *Candida* spp. である<sup>5)</sup>。患者の年齢層も成人だけでなく小児も含まれており、その死亡率も成人同様に高いことが報告されている<sup>8)</sup>。そのため、カンジダ血症の有効な予防策と新たな治療法の確立は、感染症研究の中でも重要な課題の一つである。

原因となる *Candida* spp. としては *C. albicans* が最も検出頻度が高いが、最近では *C. albicans* 以外の *Candida* spp. である *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. glabrata* の検出頻度が高まっている<sup>4~6,9)</sup>。

カンジダ血症を起こす頻度が高い者は、悪性腫瘍患者で抗癌剤を投与されている者、臓器移植患者、カテーテルを長期留置されている者、透析患者などである<sup>4)</sup>。皮膚、口腔内、消化管などに常在する *Candida* spp. が感染源とな

る。それらの *Candida* spp.が中心静脈カテーテルを挿入する際にカテーテルに付着して静脈内に感染したり，消化器系の悪性腫瘍の際に消化管の粘膜防御機構の破綻によって血管内に移行することがある。抗菌薬の長期投与に伴う菌交代症では，異常に増殖した *Candida* spp.が腸管血流を介して血液中に侵入する<sup>4)</sup>。以上のような理由で，*Candida* spp.は血管内に侵入してカンジダ血症を惹起する。特に菌交代症については，集中治療室で治療を受けている細菌感染症患者に対する抗菌薬使用が誘因となることが報告されている<sup>5)</sup>。

カンジダ血症を含めたヒトのカンジダ症は常在している *Candida* spp.の内因感染によって起こる<sup>1,2)</sup>。ヒト，特に高齢者の口腔内には *Candida* spp.が多く常在している<sup>1,2)</sup>。したがって，口腔内の *Candida* spp.が口腔内から他の臓器に移行するのであれば，*Candida* spp.を除去する高齢者の口腔ケアはカンジダ血症の予防にも有効な手段となる。

マウスに口腔カンジダ症を惹起する *C. albicans* をマウスの鼻腔から肺に感染させると，顕著な化膿性炎を起こす<sup>1,10)</sup>。したがって，易感染性宿主の口腔内に定着している *C. albicans* が宿主のさまざまな臓器に移行して，その場で定着して病原性を発揮する可能性が考えられる。特に消化器系の臓器に *C. albicans* が定着した状態で前述のカンジダ血症を惹起しやすい状態になれば，*C. albicans* が血管内に移行してカンジダ血症を起こすことが考えられる。

心臓外科手術や消化器外科手術のように大きな侵襲が加えられる外科処置では，周術期口腔管理が術後の誤嚥性肺炎の予防に有効であることが報告されている<sup>11~14)</sup>。それと同様に口腔内の *Candida* spp.を除去することが，カンジダ血症の予防につながる可能性がある。

このような口腔内の *Candida* spp.が腸管などに移行してカンジダ血症を惹起することの予防法及び新たな治療法の開発には、動物モデルの開発が有用である<sup>1)</sup>。口腔カンジダ症のマウスモデルはすでに確立され、治療薬の有効性の確認などに使用されている<sup>1)</sup>。この口腔カンジダ症のマウスモデルを発展させる形でカンジダ血症の動物モデルを開発することが最も確実な方法と考えられる。

このような研究目的に沿うカンジダ血症のマウスモデルにおいては、*C. albicans*が口腔内から腸管内に移行して定着し、さらに腸管から血管へ移行してカンジダ血症を起こす必要がある。その第一段階として、口腔内に接種した *C. albicans* が腸管内に移行後、定着が促進する最適な実験条件を明らかにすることを試みた。その結果、炎症性サイトカインに対する抗体の投与が、*C. albicans* の定着促進に有効であることを認めたので報告する。

## 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<sup>1,2)</sup>。OH-1 株を 1 枚のカンジダ 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) 5ml 中に浮遊させたものを使用菌液とした<sup>1,2,15)</sup>。

### 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、奥羽大学動物実験規程に従って行った。マウスは、4 週齢から 10 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，水道水もしくは塩酸クロルテトラサイクリン(以下テトラサイクリンと略す。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>1,2,15)</sup>。なお，実験はすべて1実験群につき4匹から5匹を使用した。

### 3. マウス口腔内への *C. albicans* の接種と菌数の測定

マウス口腔内に *C. albicans* を接種する手順と菌数測定 の概略を図1に示した。

マウスに 0.2mg の免疫抑制剤のプレドニゾロン(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 4mg/ml の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 0.1mg 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口腔内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* を接種した<sup>1,2,15)</sup>。

なお，一部の実験では感染後のマウスに抗マウス IL-1 $\alpha$  抗体(R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)，又は抗マウス IL-6 抗体(R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) の 0.5mg/ml 溶液を 0.2ml 腹腔投与した。

*C. albicans* を接種し，任意の日数を経過させ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 の滅菌 PBS 溶液(和光純薬，大阪)を入れたプラスチックシャーレ内でピンセットを使用して細かい断片とした。舌を断片化した溶液中から 0.1ml を採取して，カンジダ GS 培地に接種後に 37 $^{\circ}$ C 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<sup>1,15)</sup>。

#### 4. マウスの糞中の *C. albicans* 菌数の測定

*C. albicans* を口腔内に接種したマウスの糞中の *C. albicans* 数は、以下のように測定した。マウスのケージを前日に交換し、新たな敷き藁とした。24時間後の敷き藁中のマウスの糞を無作為に10個採取し、1mlの滅菌PBS溶液(和光純薬, 大阪)を入れたプラスチックチューブ内でホモジナイザー(ニッピ, 東京)を使用して糞の浮遊液を作成した。その溶液中から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、マウスの糞中の *C. albicans* 数を測定した。

#### 5. マウス各種臓器中の *C. albicans* 菌数の測定

頸椎脱臼によって屠殺したマウスから、各種の臓器を取り出した。その臓器を滅菌PBS溶液中でバイオマッシャーを使用して断片化し、その溶液をカンジダGS培地に接種後に37°Cで好気培養を行った。

#### 6. マウスの舌のPAS染色

*C. albicans* 接種マウス、あるいはコントロールのマウスから摘出した舌は、4%濃度ホルムアルデヒド溶液で固定した。その後、通法に従ってパラフィン切片を作製し、PAS染色を行うことで、*C. albicans* の舌組織への侵入を調べた<sup>16)</sup>。

#### 7. 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<sup>1,4,17,18)</sup>。

## 結 果

#### 1. 非感染マウスにおける *C. albicans* 検出の有無

マウスを用いた *C. albicans* の感染実験を行う前に、非

感染マウスの体内には *C. albicans* が常在していないことを確認する必要がある。すでに本実験に使用する雌性 ICR マウスの舌組織に *C. albicans* が存在しないことは確認されているが，その他の組織に存在するか否かの確認はなされていない<sup>1)</sup>。

感染実験に使用する雌性 ICR マウスと同じマウス 11 匹を同一の飼育条件下で 7 日間飼育してから，舌，肺，腎臓，肝臓，糞中の *C. albicans* の存在を調べた。その結果，*C. albicans* が検出された検体は皆無であった(表 1)。

## 2. 口腔内における *C. albicans* の定着

本研究は口腔カンジダ症のマウスモデルを基本として，口腔内に定着した *C. albicans* が腸管内へ移行して，腸管内に多くが定着する条件を設定するものである。そこで，まずは口腔内における *C. albicans* の定着を舌組織中の菌数を測定して確認した。その結果，図 2 に示すように感染 3 日後に多くの *C. albicans* が舌組織中で増殖していることを確認した。しかし，それ以降は舌組織中の菌数は低下し，感染 9 日後ではほとんど検出されなかった。

*C. albicans* を口腔内に接種して 3 日後のマウスの舌の写真を示した(図 3)。非接種マウスの舌と比較すると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であった。

## 3. *C. albicans* を口腔内に接種後のマウス舌の PAS 染色像

*C. albicans* の多数の増殖と白苔の形成を認めた接種 3 日後のマウスの舌を採取して PAS 染色を行った(図 4)。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が *C. albicans* の周辺で観察された。しかし，感染 5 日後では PAS 染色で染められた *C. albicans* 数が著しく減少していた。この結果は，図 2 の結果と一致していた。



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

*C. albicans* をマウスの口腔内に接種することによって、ヒトの口腔カンジダ症に類似した舌病変が起こることは既に報告されている。しかし、口腔内で増殖した *C. albicans* のその後の推移と口腔外への移行過程については明確ではない。そこで、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。図 5 に示すように、検出を試みた接種 42 日後まで *C. albicans* は検出された。菌数に関しては接種 42 日後であっても、特に大きな減少は認められなかった。

#### 5. マウス糞中の *C. albicans* の由来に関する検討

表 1 の結果から、糞中の *C. albicans* は感染の結果として出現したもので、常在していたものではないと考えられる。しかし、腸管内にごく僅か定着していた *C. albicans* が、宿主への免疫抑制剤の投与や抗菌薬含有水道水の飲水に伴う免疫機能の低下や腸内細菌叢の激変によって増殖を開始した可能性を完全に否定することはできない。

その可能性の有無を明らかにするために、以下の実験を行った。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マウスを飼育した。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。図 6 に示すように、*C. albicans* はまったく検出されなかった。

なお、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て *C. albicans* を口腔内に感染させた群をポジティブコントロール群としたが、この実験群の糞からは多数の *C. albicans* が検出された。この結果か



ら、本実験においてマウス糞中から検出された *C. albicans* はマウスの腸管内に常在のものではないことが明確に示された。

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

次に炎症性サイトカインに対する抗体を投与することで、糞中の *C. albicans* 数にどのような影響を及ぼすかを明らかにした。マウスにプレドニゾロンを投与し、テトラサイクリン含有水道水を飲水させた後、*C. albicans* を口腔内に接種したのと同様、あるいは 1 日後に IL-1 $\alpha$  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と比較して糞中の *C. albicans* 数が有意に増加した(図 7)。

さらに、IL-1 $\alpha$  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。前述と同様にプレドニゾロンを投与し、テトラサイクリン含有水道水を飲水させた後、*C. albicans* を口腔内に接種した 1 日後に抗 IL-1 $\alpha$  抗体、抗 IL-6 抗体を腹腔投与した。図 8 に示すように、抗 IL-1 $\alpha$  抗体を投与した場合と比較して抗 IL-6 抗体を投与した場合は、糞中の *C. albicans* 数が有意に低下していた。

以上の結果から抗 IL-1 $\alpha$  抗体の投与は、抗体非投与と比較して *C. albicans* 数の有意な増加を誘導することが示された。なお、抗 IL-6 抗体の投与では抗 IL-1 $\alpha$  抗体に匹敵する効果は認められなかった。

## 考 察

免疫抑制剤のプレドニゾロンを投与し、テトラサイクリン含有水道水を飲水させたマウスの口腔内に *C. albicans* を接種した場合、舌組織中の *C. albicans* 数は 3 日

がピークであり，7日以降は極めて低い菌数となった。しかし，糞中からは継続的に検出が続いた。この理由の一つとして，本実験に使用した ICR マウスの腸管内には *C. albicans* を接種する前から *C. albicans* が常在していたことが考えられる。そのため，継続的に糞中から *C. albicans* が検出される可能性が考えられた。しかし，*C. albicans* を接種していない ICR マウスの舌，肺，腎臓，肝臓，糞を調べても *C. albicans* は検出されなかった。この結果から，*C. albicans* は ICR マウスの常在真菌ではないことが示された。

一方，今回の結果からマウスの腸管内における *C. albicans* の定着は，マウスに免疫抑制剤のプレドニゾロンを投与すると共にテトラサイクリン含有水道水を飲水させた場合に促進されることが明らかにされた。特にテトラサイクリンの飲用で腸管内の細菌が大きく減少することで，*C. albicans* の増殖スペースが確保されると共に栄養分も確保されると考えられる。

そして，糞中の *C. albicans* に関してはさらに一つの可能性がある。それは，マウスの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糞中に検出された可能性である。

*C. albicans* は，ヒトの口腔，腸管の最も代表的な常在真菌である<sup>19~21)</sup>。*C. albicans* を口腔内に接種しなかった ICR マウスの糞及び各種臓器中からは，*C. albicans* は検出されなかったが，検出限界以下のごく少数が存在する可能性を完全には否定できない。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を飲水させることの両方及びどちらかを *C. albicans* 非接種マウスに行った。実験開始後3日目と9日目の糞を採取したが，*C. albicans*

はまったく検出されなかった。

Kim らも C57BL/6J マウスを用いた実験で抗菌薬含有水道水を2週間から4週間の範囲で飲水させたところ、飲水1日後に各種の *Candida* spp. を投与した場合に糞中から同菌が検出されたとしている<sup>22)</sup>。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とは考えにくい。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。

抗菌薬の飲水で腸内の細菌数が減少することが、*C. albicans* の腸管内での定着に重要であることは示されたが、細菌種の変化についても考える必要がある。Kim らの実験ではマウスに投与する抗菌薬の種類の違いが、*Candida* spp. の腸管内の増殖に影響を及ぼしていた。彼らは、セフォペラゾン、アンピシリン、ストレプトマイシンの投与で真菌の増殖が有意に高まるが、クリンダマイシンやメトロニダゾールでは増加が認められないと報告している<sup>22)</sup>。この原因としては、抗菌薬の種類が違えば、それに対して感受性を有する細菌の種類も違うことで、腸内の細菌種が変化するためと考えられる。クリンダマイシンやメトロニダゾールに耐性を示す細菌の増殖は、*Candida* spp. の増殖に抑制的に作用していると考えられる。彼らの報告では、*Candida* spp. が糞中で多く検出された際は、糞中の *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* が減少していた<sup>22)</sup>。

本実験では、多くの細菌種に対して有効な抗菌薬であるテトラサイクリンを投与したことによって、腸管内の *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* の増殖が抑制されたと推察できる<sup>23)</sup>。この抑制が、腸管内における *C. albicans* の増殖を誘導した可能性も考えられる。



今回の結果では、抗菌薬のテトラサイクリン含有水道水と免疫抑制剤のプレドニゾロンが糞中の *C. albicans* 数の増加、すなわち腸管内への *C. albicans* の定着に関与することが示唆された。しかし、プレドニゾロンの投与は1回のみであることから、初めの定着の段階で影響することはあっても、長期間にわたって影響を及ぼすことはないと考える。

次に炎症性サイトカインの IL-1 $\alpha$  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。IL-1 $\alpha$  は、微生物感染の防御で極めて重要な炎症性サイトカインである<sup>1,20,24~27)</sup>。本実験で、IL-1 $\alpha$  に対する抗体と同様に炎症性サイトカインである IL-6 に対する抗体を投与した場合は、IL-1 $\alpha$  抗体投与のような *C. albicans* 数の増加は、認められなかった。この結果から、IL-1 $\alpha$  は真菌感染に対する宿主の防御機構で中心的な役割を担うサイトカインの一つであることが示唆された。

マウス口腔カンジダ症における IL-1 $\alpha$  の役割については、様々な報告がある<sup>1,24~26)</sup>。今回と同一のマウスで同様な実験系を使用して、*C. albicans* を口腔内に接種した場合、接種3日後の舌組織で多量の IL-1 $\alpha$  が産生されていたと報告されている<sup>1)</sup>。その際、IL-1 $\alpha$  と同じ炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  は全く産生されず、MIP-1 $\alpha$  は産生されるが産生量が IL-1 $\alpha$  の 1/10 であった。ヒトの歯肉上皮細胞に *in vitro* で *C. albicans* を感染させた場合に IL-1 $\alpha$  は産生されるが IL-1 $\beta$  は産生されないという報告もある<sup>24)</sup>。さらに *C. albicans* を感染させた口腔上皮細胞や舌の角化細胞でも IL-1 $\alpha$  の産生が認められている<sup>25,26)</sup>。それらのことは、IL-1 $\alpha$  はカンジダ症における感染防御を担う中心的なサイトカインであることをさらに裏付けるも



のである。

IL-1 $\alpha$ の具体的な感染防御メカニズムについては、Altmeierらの報告に述べられているIL-1 $\alpha$ の好中球増多作用が最も適切であると考えられる<sup>26)</sup>。彼らは舌の角化細胞から産生されたIL-1 $\alpha$ が、血管内皮細胞からのgranulocyte colony stimulating factor(G-CSF)産生を誘導することで口腔における*C. albicans*の感染を防御している<sup>26)</sup>。G-CSFは、宿主における恒常的な好中球産生に加えて感染時の緊急的好中球増多作用を示す他に好中球の機能亢進を誘導する<sup>28,29)</sup>。*Candida* spp.の感染防御においては、IL-17が最も重要なサイトカインであるとの報告がある。IL-17は好中球の増殖を高めると共に感染部位への遊走を促進するとされる<sup>30)</sup>。したがって、IL-17はIL-1 $\alpha$ と共に好中球の増殖と機能を高めることで、口腔カンジダ症の防御にかかわっていると考えられる。IL-17が産生されてもIL-1 $\alpha$ の作用が抑制されれば、十分な感染防御は望めないと考えられる。したがって、IL-1 $\alpha$ 抗体の投与で*C. albicans*の感染防御能が低下することは、IL-17の重要性を否定するものではない。

IL-1には、 $\alpha$ 型以外に $\beta$ 型が存在する<sup>27)</sup>。IL-1 $\beta$ は、微生物感染による急性炎症時に単球やマクロファージなどの特定の細胞から限定して産生されるサイトカインと考えられている<sup>27)</sup>。本実験の結果では、IL-1 $\alpha$ に対する抗体のマウスへの投与で糞中の*C. albicans*菌数が有意に増加していた。したがって、*C. albicans*感染に対する宿主の防御機構においてはIL-1 $\beta$ と同等以上にIL-1 $\alpha$ の役割も重要と推察できる。実際、IL-1 $\alpha$ とIL-1 $\beta$ は同じレセプターに結合して同様な生物活性を示すので、産生細胞から遊離後の $\alpha$ 型及び $\beta$ 型の感染防御における役割に相違はほとんどないと考えられる<sup>27)</sup>。

IL-1 と同じく炎症性サイトカインである IL-6 に対する抗体の腹腔投与では、糞中の *C. albicans* 数の有意な増加を認めなかった。*C. albicans* の様々な感染に対してマウスは、IL-6 を産生している。BALB/c マウスに *C. albicans* の生菌  $5 \times 10^5$  個を尾静脈投与した場合に、腎臓及び脾臓中に IL-6 が非感染マウスに比較して有意に高く産生されることが報告されている<sup>31)</sup>。さらに、NMRI 雌性マウスに *C. albicans* の生菌  $3 \times 10^8$  個を腹腔投与した場合も感染 24 時間後をピークとして、IL-6 が血清中に検出されたことが報告されている<sup>32)</sup>。その場合、cyclophosphamide を投与して顆粒球減少を起こさせた場合は、血清中の IL-6 産生量がさらに亢進していた。これは顆粒球の減少によって *C. albicans* のマウス体内での定着が促進されたためと考える<sup>32)</sup>。

これらの実験結果は、今回の実験においても ICR マウスが IL-6 を産生することを強く示唆する。それにもかかわず、IL-6 抗体の投与は糞中の *C. albicans* 数の増加をもたらさなかった。このことは、少なくとも *C. albicans* の感染初期、すなわち舌への定着に対しては、IL-6 が抑制的な役割を果たさないことを意味する。

なお、*C. albicans* 感染に伴って宿主からはさまざまな炎症性サイトカインが産生される。これらのサイトカインに対する抗体を投与することで、*C. albicans* を含む *Candida* spp. に対して宿主が易感染状態となることが報告されている<sup>33,34)</sup>。Ford らは、炎症性腸疾患患者のメタ解析で治療薬として抗 TNF- $\alpha$  抗体を投与された患者は投与されない場合と比較すると、口腔及び食道カンジダ症の発症が有意に高まるとしている<sup>33)</sup>。さらに、乾癬患者に抗 TNF- $\alpha$  抗体を治療薬として投与した場合も口腔内の *Candida* spp. の定着が有意に高まることが報告されている<sup>34)</sup>。

しかし、我々はすでに今回の実験で使用した口腔カンジダ症のマウスモデルで *C. albicans* を口腔内に接種した場合に、舌組織中で TNF- $\alpha$  が産生されないことを報告している<sup>1)</sup>。そのため、TNF- $\alpha$  抗体を投与しても *C. albicans* の口腔を含むマウス体内における定着が促進されることはないと推察できる。マウスの実験系で TNF- $\alpha$  の産生が起こらない理由は、不明である。

本結果から、口腔カンジダ症のマウスモデルの実験系に抗 IL-1 $\alpha$  抗体を投与することで、口腔から腸管内へ移行する *C. albicans* 数を増加させることが示された。しかし、カンジダ血症のマウスモデルを開発するには、*C. albicans* を腸管内に定着させると共に腸管に傷害を起こさせて血管内に感染を拡げる必要がある。結果には示していないが、*C. albicans* を口腔内に接種3日後のマウスの血液を採取し、*C. albicans* の検出を試みたが検出できなかった。したがって、カンジダ血症を惹起するには腸管の粘膜に傷害を与えて、*C. albicans* の腸管外への流出を起こさせる必要がある。

実際の癌患者におけるカンジダ血症では、抗癌剤による腸管粘膜の傷害が起こると考えられる<sup>35,36,37)</sup>。そこで、腸管粘膜傷害を起こす抗癌剤を今回の実験系に加えることで、カンジダ血症を起こす可能性が考えられる。

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。第一に抗 IL-1 $\alpha$  抗体の投与によって *C. albicans* の腸管内への定着を促進させ、第二に腸管の粘膜傷害を惹起する抗癌剤を選択して、それを投与することである。腸管粘膜傷害を起こす抗癌剤としては、テガフル、ギメラシル、オテラシルカリウムなどが候補として考えられる<sup>38)</sup>。



## 利益相反

本研究に関して，開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) 菊池直宏，玉井利代子，清浦有祐：再現性が高い口腔カンジダ症マウスモデル．奥羽大歯学誌 42;55-63 2015.
- 2) Kamagata-Kiyoura, Y., Abe S.: Recent studies on oral candidiasis using a murine model. J. Oral Biosci. 47; 60-64 2005.
- 3) Yuan, X., Hua, X., Wilhelmus, K. R.: Proinflammatory chemokines during *Candida albicans* keratitis. Exp. Eye Res. 90;413-419 2010.
- 4) 風間逸郎，古川恵一：聖路加病院における最近6年間のカンジダ血症についての検討．感染症学誌 77;158-166 2003
- 5) 佐々木淳一：外科系・救急・集中治療領域におけるカンジダ感染症に対する診療指針．日化療会誌 62; 663-673 2014
- 6) 沖中敬二：がん患者におけるカンジダ血症—おもに血液腫瘍，造血幹細胞移植領域において—．Med. Mycol. J. 57; 117-123 2016
- 7) Spec, A., Shindo, Y., Burnham, C.D., Wilson, S., Ablordeppey, E.A., Beiter, E.R., Chang, K., Drewry, A.M., Hotchkiss, R.S.: T cells from patients with *Candida* sepsis display a suppressive immunophenotype. Critical Care 20:15 DOI 10.1186/s13054-016-1182-z 2016
- 8) Pasqualotto, A.C., de Moraes, A.B., Zanini, R.R., Severo, L.C.: Analysis of independent risk factors for death



- among pediatric patient with candidemia and a central venous catheter in place. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 28 ; 799-804 2007
- 9) Jung. D.S., Farmakiotis, D., Jiang, Y., Tarrand, J.J., Kontoyiannis, D.P. : Uncommon *Candida* Species fungemia among cancer patients, Houston, Texas, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 21 ; 1942-1950 2015
- 10) Abe, Y., Ambe, K., Nakagawa, T., Kamata, S., Kiyoura, Y. : Experimental aspiration pneumonia caused by *Candida albicans* in mice. *老年歯学* 21 ; 188-193 2006
- 11) 番場竹生, 須田武保, 寺島哲郎, 赤澤宏平, 佐藤 聡, 土田智子, 中村直樹 ; 消化器外科術後感染症に対する術前口腔ケアの効果に関する検討. *新潟医学会雑誌* 127 ; 309-317 2013
- 12) 比嘉佳基, 中原寛和, 森影恵里, 下出孟史, 内橋隆行, 榎本明史, 山中康嗣, 濱田 傑 : 周術期口腔期の管理～入院センターにおける歯科口腔外科の取り組み～. *近畿大医誌* 40 ; 71-74 2015
- 13) 小佐々 康, 香川智世, 渋谷亜佑美, 村上拓也, 越沼伸也, 肥後智樹, 山本 学 : 滋賀医科大学医学部附属病院歯科口腔外科における周術期口腔機能管理の現状と展望. *滋賀医大誌* 28 ; 45-49 2015
- 14) 藤 大補, 古土井春吾, 明石昌也, 西井美佳, 古森孝英 : 神戸大学医学部附属病院における心臓血管外科患者に対する周術期口腔機能管理の現状. *口腔感染症誌* 23 ; 43-47 2016
- 15) Kamagata-Kiyoura, Y., Abe, S., Yamaguchi, Y., Nitta, T. : Protective effects of human saliva on experimental murine oral candidiasis. *J. Infect. Chemother.* 10 ; 253-255 2004.

- 16) Takakura, N., Sato, Y., Ishibashi, H., Oshima, H., Uchida, K., Abe, S.: A novel murine model of oral candidiasis with local symptom characteristic of oral thrush. *Microbiol. Immunol.* 47;321-326 2003.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) Komeno, Y., Uryu, H., Iwata, Y., Hatada, Y., Sakamoto, J., Iihara, K., Ryu, T.: Esophageal candidiasis as the initial manifestation of acute myeloid leukemia. *Intern. Med.* 54;3087-3092 2015.
- 20) Hau, C.S., Tada, Y., Kanda, N., Watanabe, S.: Immunoresponses in dermatomycoses. *J. Dermatol.* 42;236-244 2015.
- 21) 岡田 賢: 慢性皮膚粘膜カンジダ症. *Jpn. J. Clin. Immunol.* 40;109-117 2017.
- 22) Kim, Y-G., Udayanga, K.G.S., Totsuka, N., Weinberg, J.B., Núñez, G., Shibuya, A.: Gut dysbiosis promotes M2 macrophage polarization and allergic airway inflammation via fungi-induced PGE<sub>2</sub>. *Cell Host Microbe* 15; 95-102 2014.
- 23) 佐藤友昭: X III テトラサイクリン系抗菌薬. 現代歯科薬理学(大谷啓一, 鈴木邦明, 戸莉彰史編) 第5版;279-280 医歯薬出版 東京 2012.
- 24) 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: 口腔カンジダ症の付着およびバイ

- オフィルム形成. Jpn.J.Med.Mycol. 46 ; 233-242 2005.
- 25) Villar, C.C., Kashleva, H., Mitchell, A.P., Dongari-Bagtzoglou, A. : Invasive phenotype of *Candida albicans* affects the host proinflammatory response to infection. Infect. Immun. 73;4588-4595 2005.
- 26) Altmeier, S., Toska, A., Sparber, F., Teijeria, A., Halin, C., LeibundGut-Landman, S. : IL-1 coordinates the neutrophil response to *C. albicans* in the oral mucosa. PLOS Pathogens DOI:10.1371/Journal.ppat.1005882
- 27) 小野 寄 菊 夫 : インターロイキン 1 : 細胞増殖抑制から慢性炎症疾患まで. 薬学雑誌 133;645-660 2013.
- 28) 竹村元三, 湊口信也, 藤原久義 : 血管新生因子 G-CSF. 脈管学 46;317-325 2006.
- 29) 福永理己郎 : G-CSF とその受容体. サイトカイン・増殖因子キーワード事典(宮園浩平, 秋山 徹, 宮島 篤, 宮澤恵二編)第 1 版 ; 103-104 羊土社 東京 2015.
- 30) Conti, H. R., Shen, F., Nayyar, N., Stocum, E., Sun, J. N., Lindemann, M. J., Ho, A. W., Hai, J. H., Yu, J. J., Jung, J. W., Filler, S. G., Masso-Welch, P., Edgerton, M., Gaffen, S. L. : Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defence against oral candidiasis. J. Exp. Med. 206;299-311 2009.
- 31) Chin, V. K., Foong, K. J., Maha, A., Rusliza, B., Norhafizah, M., Chong, P. P. : Early expression of local cytokines during systemic *Candida albicans* infection in a murine intravenous challenge model. Biomedical Reports 2;869-874 2014.
- 32) Steinshamn, S., Waage, A. : Tumor necrosis factor and interleukin-6 in *Candida albicans* infection in normal and



- granulocytopenic mice. *Infect. Immun.* 60;4003-4008  
1992.
- 33) Ford, A. C., Peyrin-Biroulet, L.: Opportunistic infection with anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 108-1268-1276 2013.
- 34) Whitson, M., Khungar, V.: 飲み込むのが困難な錠剤. 移植・免疫不全患者の感染症 (Chandrasekar, P. H.編) 第1版; 292-294 *メディカル・サイエンス・インターナショナル* 東京 2017.
- 35) Wingard, J. R.: ひどくタチの悪い酵母感染症. 移植・免疫不全患者の感染症 (Chandrasekar, P. H.編) 第1版; 241-292 *メディカル・サイエンス・インターナショナル* 東京 2017.
- 36) 前田由紀子, 山崎浩一, 菊地英毅, 原田敏之, 檜澤伸之, 西村正治: パクリタキセルを含む化学療法中に発症した *Clostridium difficile* 腸炎の1例. *日呼吸会誌* 43;668-672 2005.
- 37) 水野滋章: 薬剤起因性消化管傷害の実態. *日大医誌* 73;60-63 2014.
- 38) 橋本浩伸: 胃十二指腸潰瘍. ハイリスク患者のがん薬物療法ハンドブック (安藤雄一, 寺田智祐編) 第1版; 102-103 羊土社 東京 2017.



図表の解説

図 1 *C. albicans* の感染手順と菌数測定 の概略図

図 2 口腔カンジダ症マウスモデルにおける *C. albicans* 接種後の舌の菌数  
平均値 ± SE を示す

図 3 *C. albicans* 接種後の舌の炎症性変化と白苔形成

図 4 *C. albicans* 接種 3 日及び 5 日後の舌の PAS 染色像

図 5 *C. albicans* 接種後のマウス糞中の *C. albicans* 数

図 6 *C. albicans* 非接種マウス糞中の *C. albicans* 検出に  
及ぼすプレドニゾロンとテトラサイクリンの影響  
平均値 ± SE を示す

図 7 IL-1 $\alpha$  抗体投与がマウス糞中の *C. albicans* 数に及ぼす影響

平均値 ± SE を示す

\* \* P < 0.01 : 抗体非投与群に対する有意差

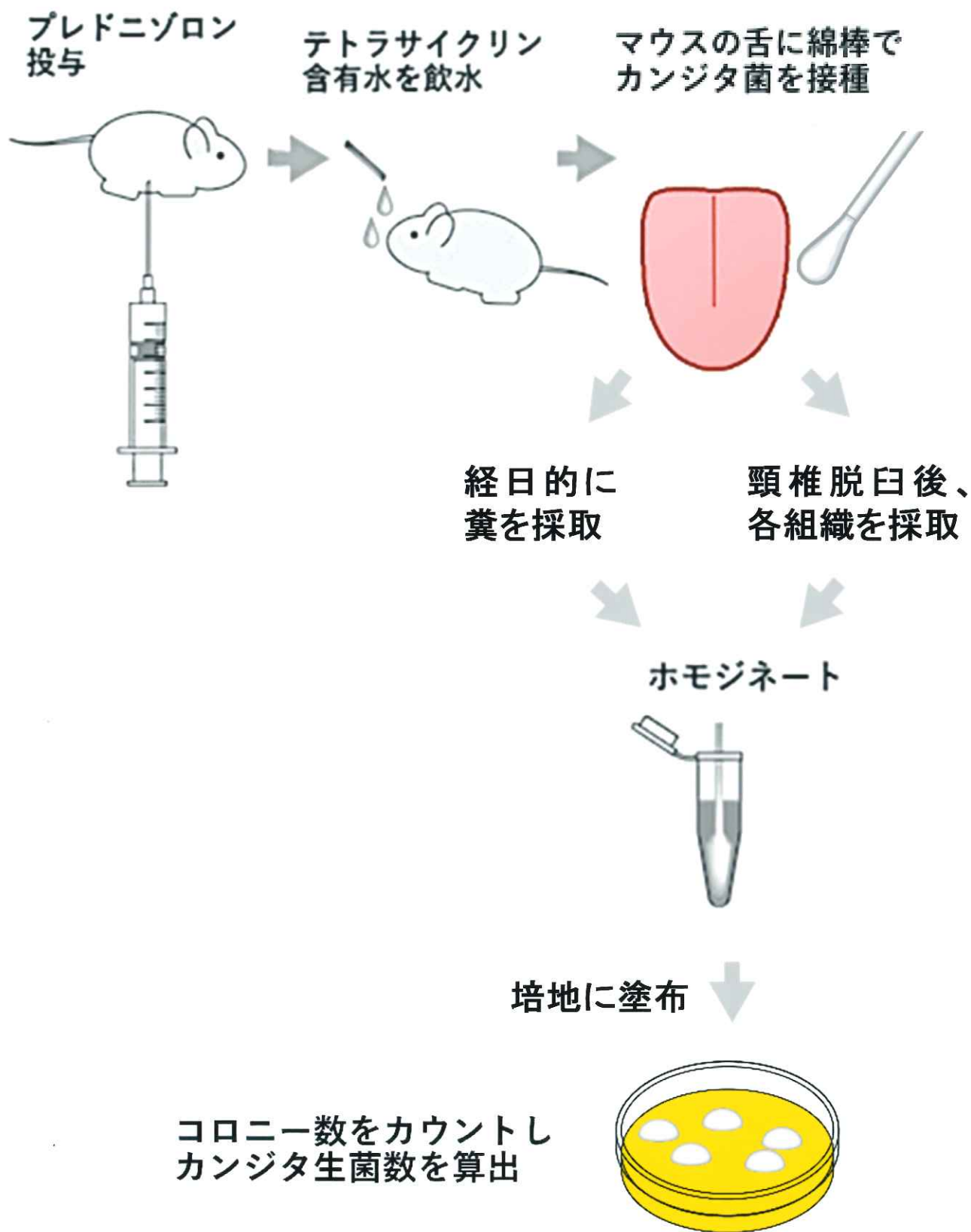
図 8 IL-6 抗体投与がマウス糞中の *C. albicans* 数に及ぼす影響の IL-1 $\alpha$  抗体に対する比較

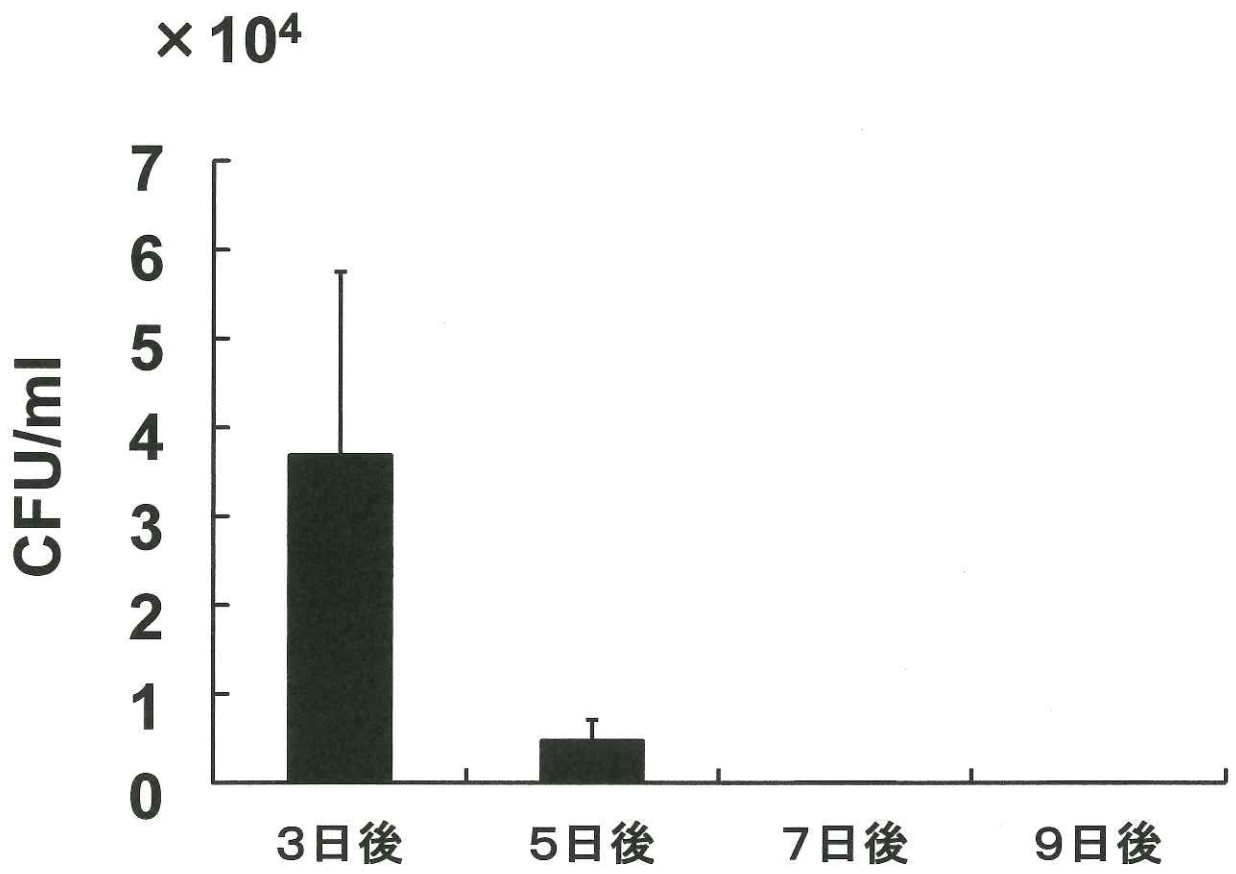
平均値 ± SE を示す

\* P < 0.05 : IL-1 $\alpha$  抗体投与群に対する有意差

表 1 ICR マウスの各組織及び糞中における *C. albicans* の有無

図 1







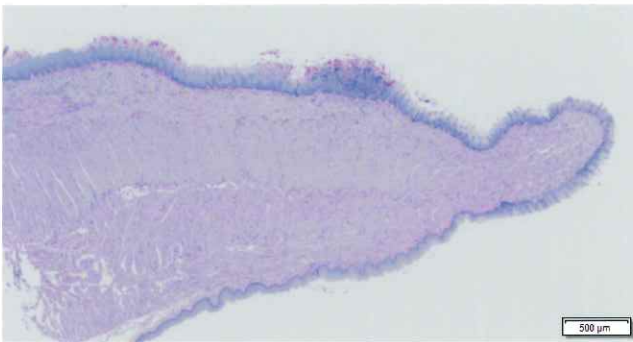


*C. albicans* 接種

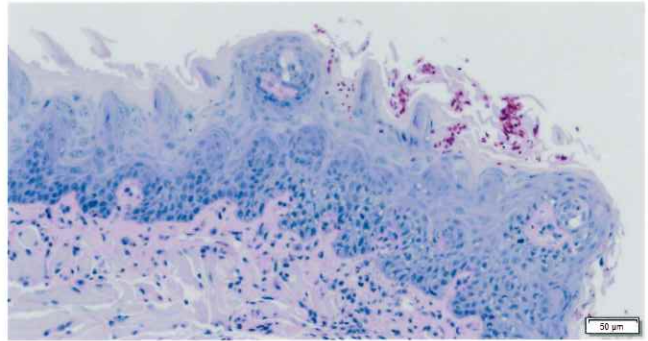
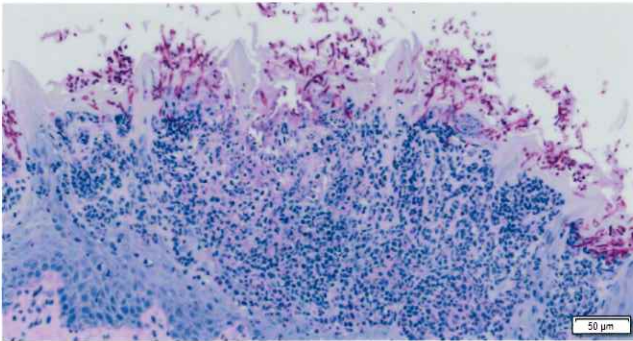
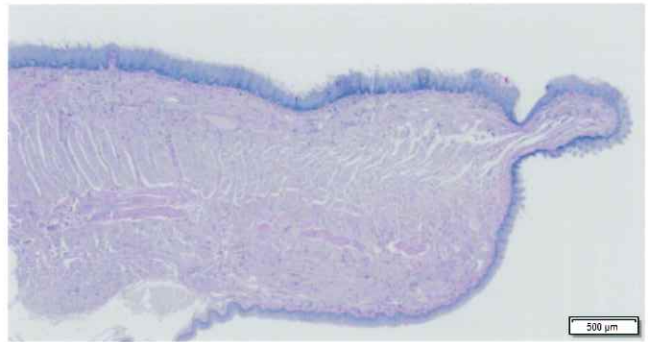


コントロール

接種3日後



接種5日後



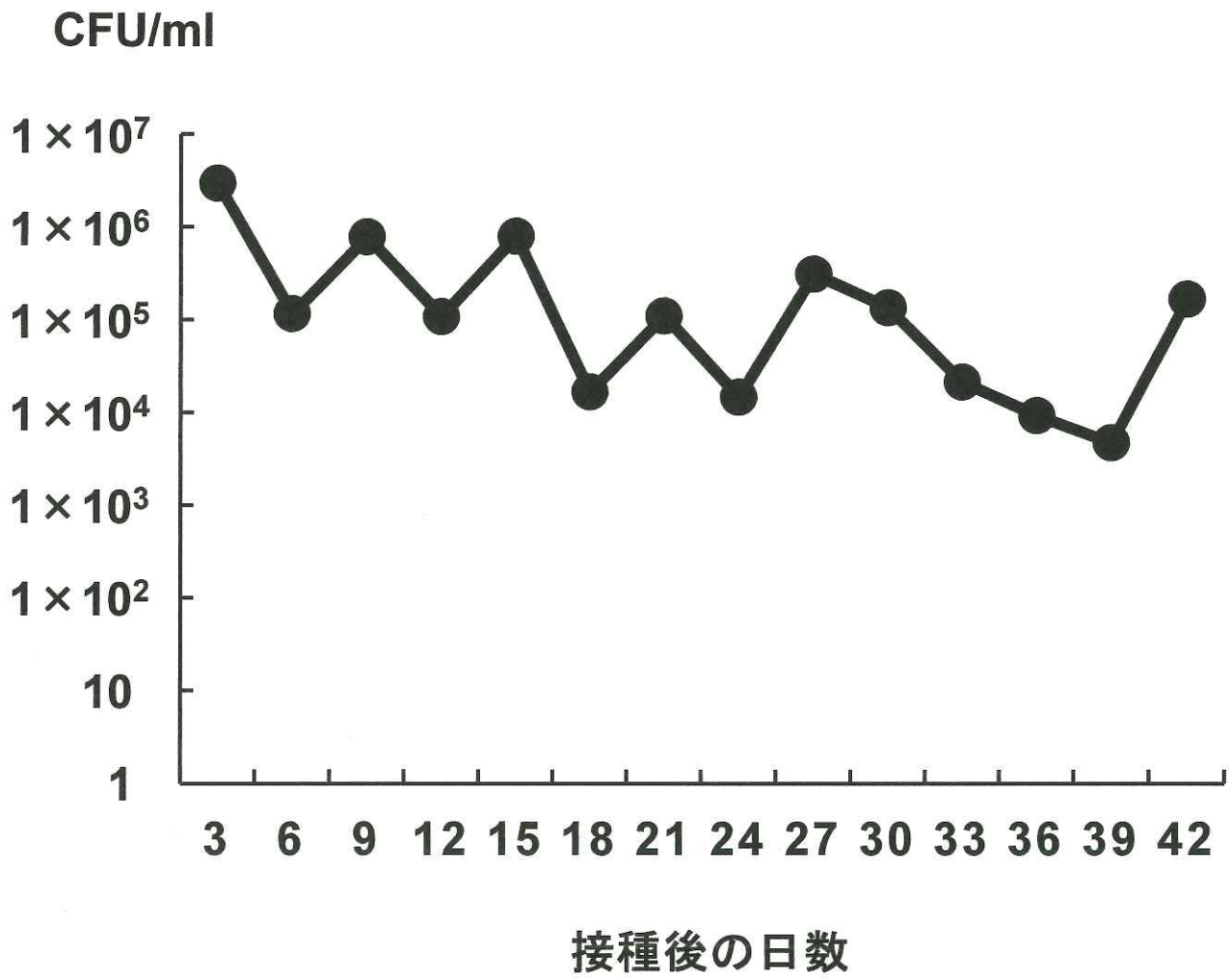
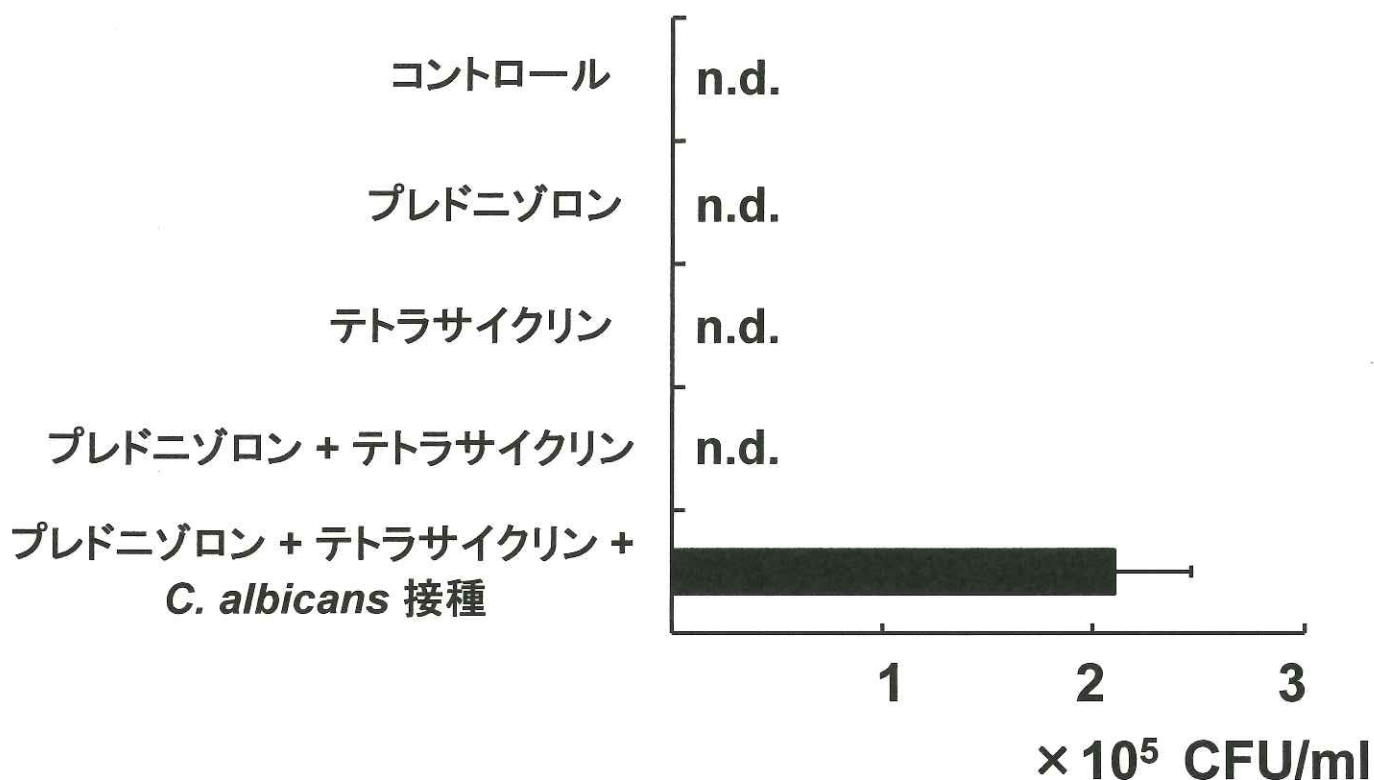




図 6

3日目



9日目

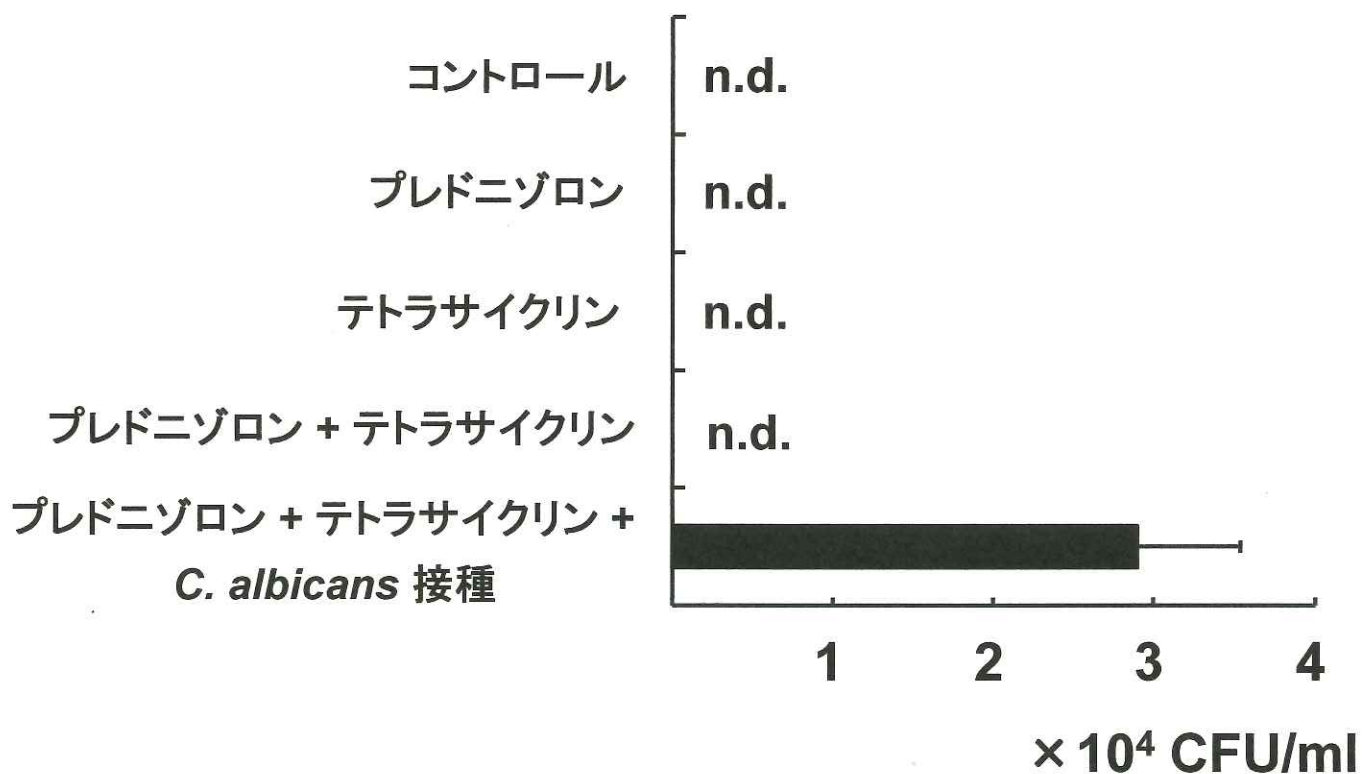
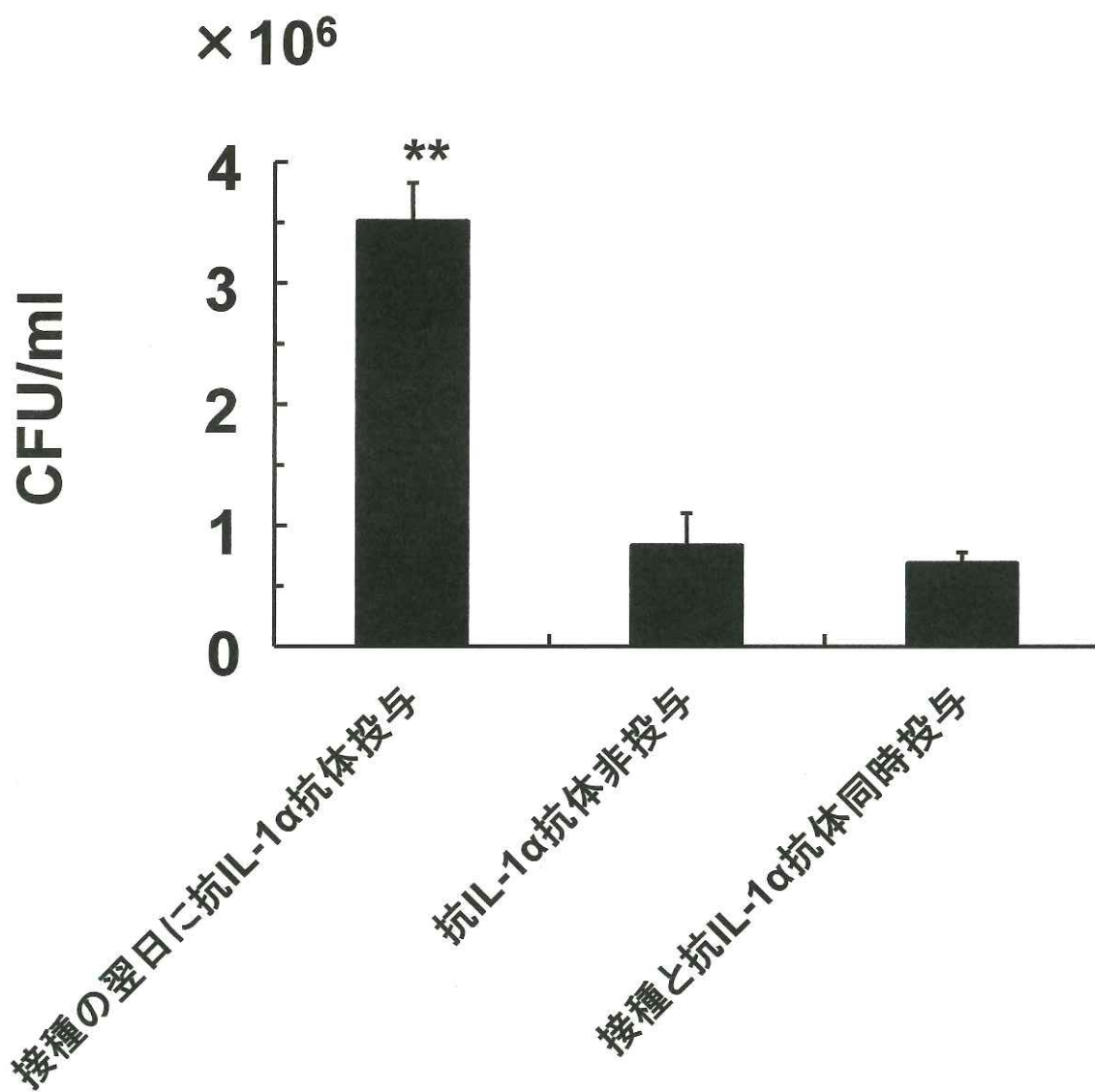


図 7



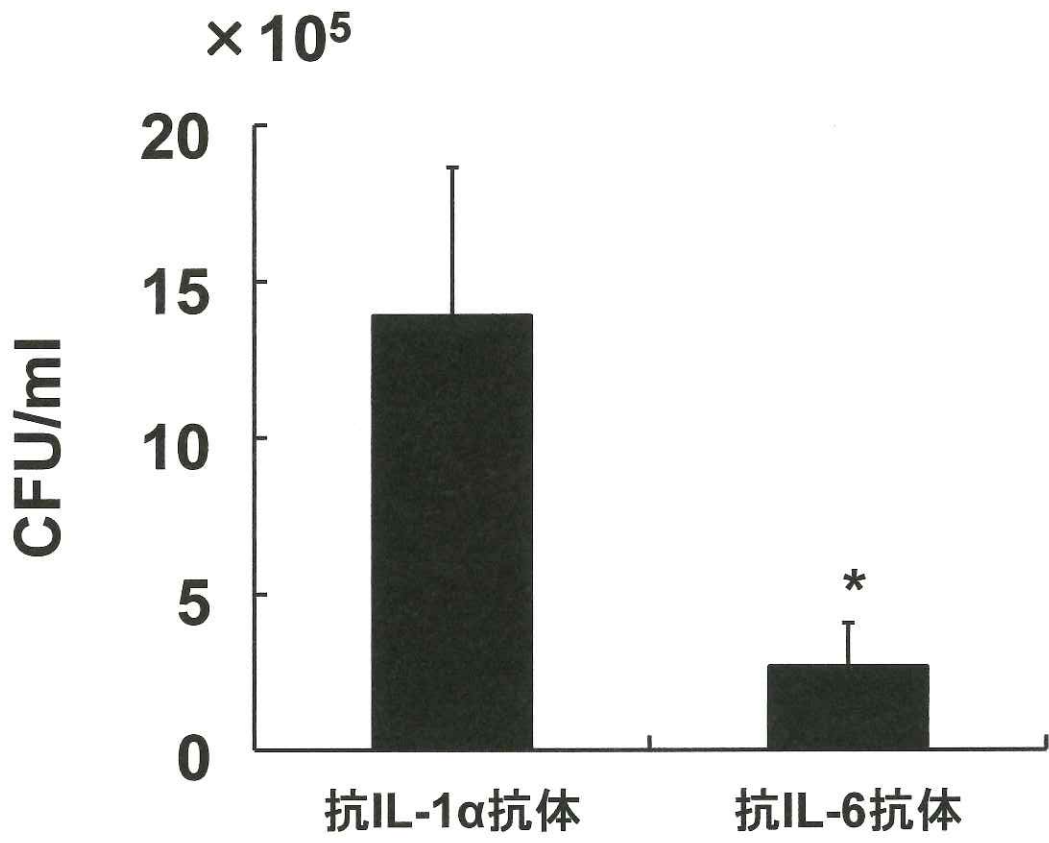




表 1

ICR雌性4~5週令 11匹	<i>C. albicans</i>
舌	—
肺	—
腎 臟	—
肝 臟	—
糞	—