

腸内細菌叢構成細菌および免疫機能の変化と *Candida albicans*の腸管内への定着との関係性

森下 貴祥 玉井利代子 清浦有祐

Relationship between Changes in Intestinal Flora Constituting Bacteria and Immune Function and Colonization of *Candida albicans* in the Intestinal Tract

Takayoshi MORISHITA, Riyoko TAMAI and Yusuke KIYOURA

Candida albicans (*C. albicans*) is the primary etiological agent of candidemia. One of the mechanisms of its onset involves migration of oral *C. albicans* to the intestinal tract, where it proliferates, damages the mucous membrane, and enters blood vessels. The present study aimed to examine the influence of bacteria constituting the intestinal flora and changes in immune function on the colonization of *C. albicans* in the intestinal tract using a mouse model of oral candidiasis.

ICR mice were subcutaneously injected with 0.2 mg prednisolone and provided access to water containing 4 mg/ml tetracycline. The next day, 0.1 mg chlorpromazine was injected intramuscularly. Ten minutes later, *C. albicans* was applied to the oral cavity with a swab. Feces were then collected, and *C. albicans* and bacterial counts were determined to derive the microbial count for the intestinal tract. Metagenome analysis was also performed to clarify bacterial types present in the feces.

Five days after infection, fecal *C. albicans* counts were significantly high in the prednisolone+tetracycline group compared to the untreated group, the prednisolone only group, and the tetracycline only group. To examine whether these results could be attributed to a reduction in bacterial count in the intestinal flora, we determined the fecal bacterial count in the prednisolone+tetracycline group.

First, we determined fecal aerobic and anaerobic bacterial counts. Both counts were higher in the prednisolone+tetracycline group than the untreated group. These suggest that colonization of *C. albicans* in the intestinal tract is not promoted by the low number of bacteria in the intestinal flora. To further assess the underlying mechanism, we examined fluctuations in the numbers of various types of bacteria in the intestinal flora using metagenome analysis. In the prednisolone+tetracycline group, the proportion of *Bacteroides* increased while that of *Lactobacillus* decreased, suggesting that a reduction in the number of *Lactobacillus* in the intestinal tract may promote *C. albicans* colonization.

We also examined the impact of administering an anti-PD-1 antibody, which acti-

vates T cell immune function, to mice on the colonization of *C. albicans* in the intestinal tract. When the anti-PD-1 antibody was administered one day before infecting mice with *C. albicans*, there was a significant increase in the colonization of *C. albicans* in the intestinal tract. This could potentially be explained by feedback suppression of T cell function resulting from hyperactivation of T cell function by the anti-PD-1 antibody.

Key words : *Candida albicans*, candidemia, intestinal flora, anti-PD-1 antibody

緒 言

口腔カンジダ症は、口腔常在真菌の *Candida albicans* (*C. albicans*) を始めとした *Candida* spp. が原因となる代表的な口腔感染症である。高齢者のような易感染性宿主で起こりやすいことから、超高齢社会の日本では特に重要な口腔疾患である^{1,2)}。

一方、同じく *Candida* spp. が原因となる疾患にカンジダ血症がある。この疾病の死亡率は40%と極めて高い重篤な疾患である^{2,3)}。日本国内の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. であることが報告されている^{2,4)}。したがって、カンジダ血症の詳しい発症メカニズムの解明は、真菌感染症の研究において極めて重要である。

カンジダ血症の原因となる *Candida* spp. はヒトの常在真菌の一つで、高齢者の口腔内から高い頻度で検出される。そのため、口腔内の *Candida* spp. が腸管内に移行し、その中で定着した菌が粘膜の損傷や粘膜防御機構の破綻等によって血管内に移行することが考えられる²⁾。*C. albicans* は、細胞溶解毒素のカンジダリジンを生産して腸の上皮細胞を損傷する。この毒素により、腸の粘膜上皮を損傷して、腸管内の *C. albicans* が血管内に移行してカンジダ血症を起こすと考えられる²⁾。

そのような場合、血行性に播種された *Candida* spp. が体内の主要な臓器に微小膿瘍や可視的な膿瘍を形成していくことで病変が形成される⁵⁾。カンジダ血症を誘発する要因となるのは、抗菌薬の長期服用の他にカテーテルの血管内留置、高カロリー輸液、尿道カテーテル留置、グルココルチコイドの非経口投与、重度の熱傷、HIV感染に

伴うヘルパー T 細胞の減少、腹部及び胸部外科手術、細胞毒性を有する抗癌剤を用いた癌治療、人工呼吸器の使用、好中球減少症、糖尿病や低体重児出産等がある⁵⁾。

口腔内の *C. albicans* が腸管内に一度でも定着した場合は、長期間留まることが口腔カンジダ症のマウスモデルを使用した実験で明らかにされている²⁾。口腔内に定着した *C. albicans* は日常の飲食物の摂取の際に当然腸管内に移行するので、これを阻止することは不可能である。したがって、*C. albicans* が腸管内に定着した状態で上述した様々な疾患が起きた際には、カンジダ血症の起こる割合が高まると考えられる。そのため、カンジダ血症を予防するために定着菌数を一定の範囲内に抑制することが求められる²⁾。

この抑制方法を開発するためには、カンジダ血症のマウスモデルを使用した研究が求められる。これに関して、服部らはすでに腸管内における *C. albicans* の定着がサイトカインによって制御されることを報告している²⁾。彼らは、炎症性サイトカインの1つで微生物に対する感染防御作用を示す interleukin-1 α (IL-1 α) は *C. albicans* の定着を阻止するが、interleukin-6(IL-6)は抑制効果を示さないことを *in vivo* のマウスの感染実験で明らかにしている²⁾。IL-1 α による定着抑制は、IL-1 α が G-CSF を介して緊急的な好中球の増多を誘導することで、*C. albicans* の腸管内への定着を阻止するためと考えられる^{2,6)}。

一方、ヒトの体内のさまざまな部位に存在する細菌叢は、従来から真菌の増殖に抑制的に作用するとされている²⁾。マウスに実験的口腔カンジダ症を起こさせる際に、免疫抑制剤のプレドニゾロンを皮下注射すると共に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 (テトラサイク

リン) 含有水道水を飲ませるのは、その細菌叢に影響を与えるためと考えられる^{2,7)}。これによって、口腔内の細菌数が減少して、*C. albicans* の口腔内への定着を促進するとされる。しかし、広域抗菌スペクトルを有するテトラサイクリンであってもすべての細菌に有効ではない^{2,7,8)}。腸内細菌叢を構成する細菌の中には、耐性菌も存在すると考えられる。さらに、細菌種の中には *C. albicans* の腸管内の定着を促進するものも報告されている⁹⁾。したがって、テトラサイクリンによる *C. albicans* の定着促進が、宿主の細菌叢を構成する細菌を減少させるためと考えるのは短絡的である。

以上のことから、本研究では、服部らの試みたカンジダ血症のマウスモデル開発の実験で明確にされていない腸内細菌叢を構成する細菌種のテトラサイクリン投与による変化を明らかにする。さらに、IL-1 α の活性を抑制すること以外の免疫機能のいかなる変化が *C. albicans* の腸管内への定着促進を誘導するかを明確にする。

材料および方法

1. 使用した *C. albicans* の菌株とその調整

服部等の方法に準じて行った。高齢者の口腔内から分離した *C. albicans* OH-1株を使用した^{1,2)}。OH-1株を1枚のカンジダGS培地に接種して、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中に浮遊させたものを使用菌液(10⁹ CFU/ml)とした^{2,10)}。

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服部等の方法に準じて行った^{2,10)}。マウスは、4週齢から15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(テトラサイクリン、武田シエリング・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。実験はすべ

て1実験群につき4匹から7匹を使用した。なお、実験の概略を図1に示す。

3. マウス口腔内への *C. albicans* の感染

服部等の方法に準じて行った^{2,10)}。マウスに2 mg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4 mg/mlのテトラサイクリン含有水道水に変更し、翌日に0.1 mg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(10⁹ CFU/ml)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することで感染させた^{2,10)}。綿棒に含まれる菌液量は0.1 mlであった。

なお、一部の実験では感染前のマウスに抗マウスPD-1抗体(抗PD-1抗体、R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)の0.5 mg/ml溶液を0.2 ml腹腔投与した^{11,12)}。

4. マウスの糞中の *C. albicans* 菌数の測定

C. albicans を口腔内に感染させたマウスの糞中の *C. albicans* 数は、服部等の方法に準じて以下のように測定した²⁾。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、重量を測定した。1 ml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0.1 ml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. マウスの糞中の細菌数の測定

マウスの糞中の細菌数は、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、1 ml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0.1 mlを採取して、変法GAM寒天培地に接種して37°Cで培養を行った。その際に好気条件下と嫌気条件下に分けて培養を行うことで、好気性細菌数と嫌気性

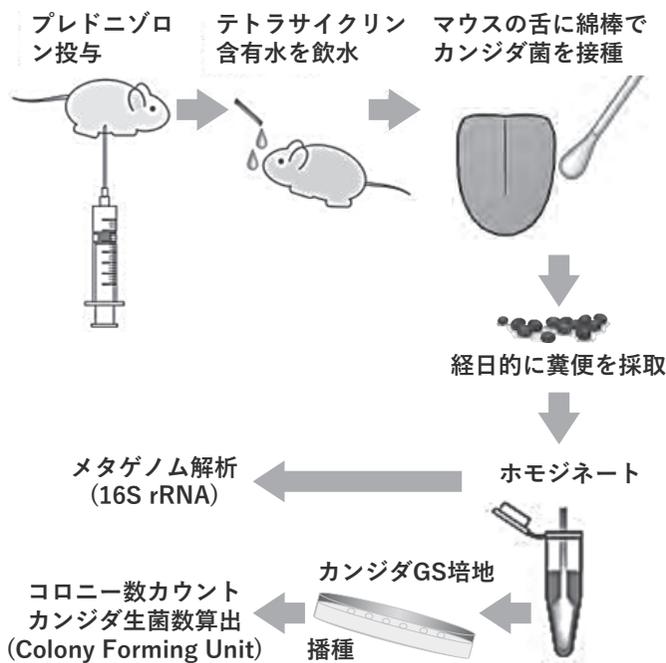


図1 *C. albicans* の感染手順とマウス糞便解析の概略図

細菌数を別々に測定した。

6. 腸内細菌叢の解析

マウス腸内細菌叢を構成する *Firmicutes* 門, *Bacteroides* 門, *Proteobacteria* 門, *Actinobacteria* 門の割合とそれに属する細菌については次世代シーケンサーによる解析を行った。その際はコスモバイオ社（東京）の受託細菌叢検査サービスを利用した。

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^{1,2)}。

結 果

1. マウスに対する免疫抑制剤及び広域抗菌スペクトルを有する抗菌薬の投与が *C. albicans* の腸管内への定着に及ぼす影響

マウスに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ることが, *C. albicans* の腸管内への定着に及ぼす影響を及ぼすのかを調べた。

口腔内に *C. albicans* を感染させて5日後のマウス糞中の *C. albicans* 数は次のようであった。コントロール群に比較して, テトラサイクリン飲水群, プレドニゾロンを投与してさらにテトラサイクリンの飲水も行わせた群はいずれも腸管内に定着した *C. albicans* 数が有意に増加していた。最も定着菌数が多いのはプレドニゾロンを投与してさらにテトラサイクリンを飲水させた群で, 次にテトラサイクリン飲水群であった (図2)。したがって, プレドニゾロンによる免疫抑制とテトラサイクリンによる腸内細菌叢の変化の2つが, *C. albicans* の腸管内への定着を促進することが示された。

2. *C. albicans* 以外の *Candida* spp. の腸管内への定着

C. albicans で認められた腸管内への定着が, *C. albicans* に特有なものであるのか, あるいは他の *Candida* spp. でも起こるのかを調べた。

口腔内に *C. albicans*, *Candida glabrata* (*C. glabrata*), *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) を上述と同様な方法で, 別々のマウスに感染させた。

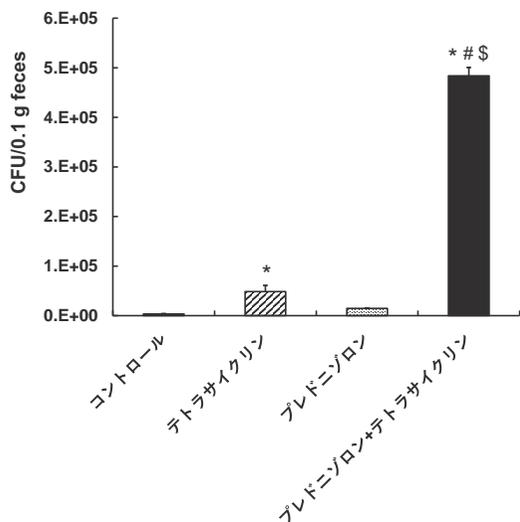


図2 *C. albicans*感染5日後の菌数
 平均値±SDを示す
 * $P < 0.01$: コントロールに対する有意差,
 # $P < 0.01$: テトラサイクリン(-)に対する有意差,
 \$ $P < 0.01$: プレドニゾロン(-)に対する有意差

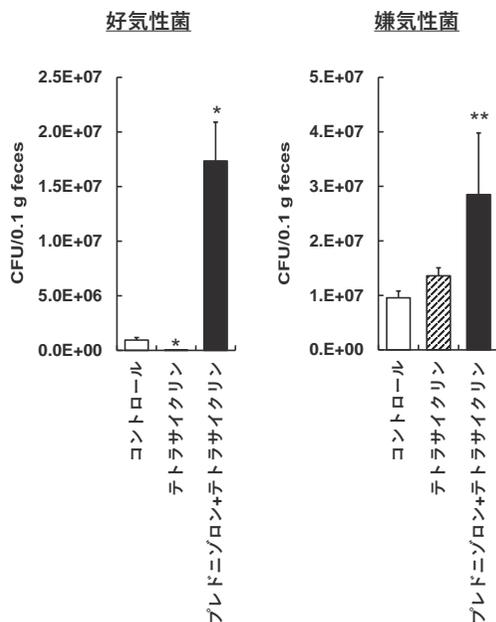


図4 マウス腸管内の細菌数
 平均値±SDを示す
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: コントロールに対する有意差

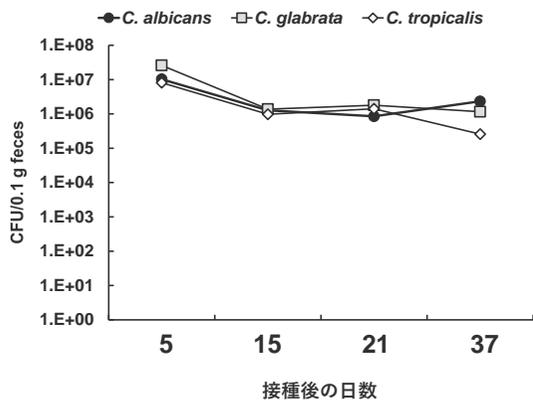


図3 マウス腸管内への*Candida* spp.の定着
 平均値±SDを示す

そして感染後、経日的にマウスの糞を採取して菌数を測定した。感染5日後から37日後までに採取された糞中から、*C. albicans* が検出されたが、それとほぼ同数の *C. glabrata* 及び *C. tropicalis* も検出された (図3)。

この結果から、*C. albicans* の腸管内への定着は *C. albicans* だけでなく、他の *Candida* spp. でも認められることが示された。

3. マウスに対する免疫抑制剤及び広域抗菌スペクトルを有する抗菌薬の投与が腸内細菌に及ぼす影響

マウスに対して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場合、腸内細菌叢がいかなる影響を受けるかを調べた。

コントロール群に比較して、テトラサイクリン含有水道水を飲水させた群では、飲水1日後の好気性細菌数は有意に減少したが、嫌気性細菌数の減少は認められなかった。

それらに対してプレドニゾロンを投与し、テトラサイクリン含有水道水の飲水を行わせた群は、コントロール群と比較して好気性細菌数も嫌気性細菌数も増加した (図4)。

以上のことから、広域抗菌スペクトルを有するテトラサイクリンはすべての腸内細菌叢構成細菌に有効なのではなく、嫌気性細菌に対する作用は弱いことが明らかにされた。さらに、テトラサイクリンを飲水させた群で減少した好気性細菌数がプレドニゾロンの投与も同時に行った場合は増加

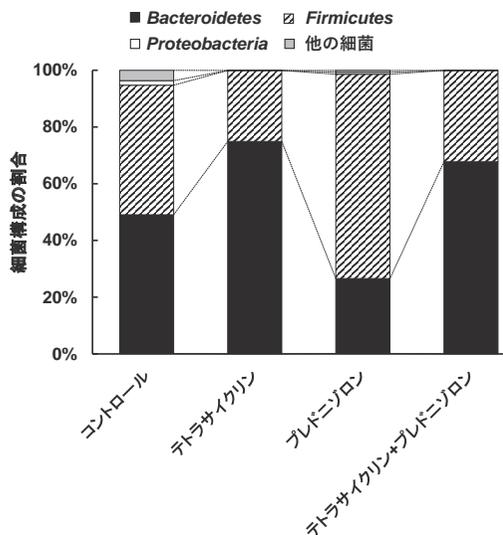


図5 マウス糞便のメタゲノム解析(門)

した。この結果は、プレドニゾロンの投与で増加した好気性細菌は、テトラサイクリンに耐性であることが示された。

4. マウスに対する免疫抑制剤及び広域抗菌スペクトルを有する抗菌薬の投与が腸内細菌叢を構成する細菌門の割合に及ぼす影響

マウスの腸内細菌叢を構成する細菌は、Firmicutes 門, Bacteroides 門, Proteobacteria 門, Actinobacteria 門の4つのグループに大別される。この4つの門の構成割合が、免疫抑制剤の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で、どのように変化するかを調べた。

コントロール群に比較してプレドニゾロンの投与群は、Firmicutes 門が大きく増加し、Bacteroides 門が減少した。テトラサイクリンを飲水させた群では、プレドニゾロン投与群とは反対に Firmicutes 門が減少し、Bacteroides 門が増加した。

プレドニゾロンを投与し、テトラサイクリンを飲水させた群は、Firmicutes 門が減少し、Bacteroides 門が増加した。この結果から4つのグループの構成割合は、プレドニゾロンを投与し、テトラサイクリンを飲水させた群は、テトラサイクリンの飲水のみを行わせた群と同じであることが示された(図5)。

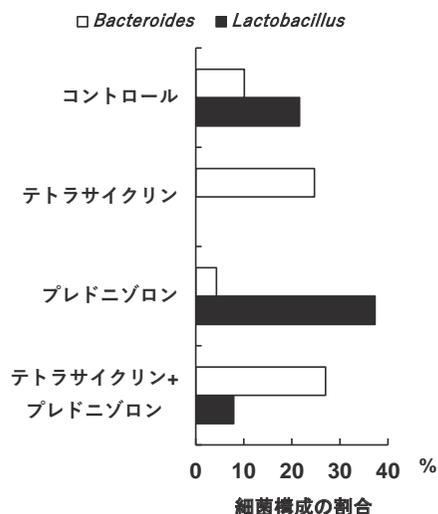


図6 Bacteroides属とLactobacillus属のマウス糞中の割合

5. マウスに対する免疫抑制剤及び広域抗菌スペクトルを有する抗菌薬の投与が腸内細菌叢を構成する細菌属の割合に及ぼす影響

C. albicans が最も定着するプレドニゾロンを投与し、テトラサイクリンを飲水させた群では、Firmicutes 門が減少し、Bacteroides 門が増加した。その中でいかなる細菌属が増減しているかを調べた(表1)。コントロール群よりも最も顕著に減少している細菌属は Lactobacillus 属で、増加している Bacteroides 属であったので、別に図で示した(図6)。

6. 抗PD-1抗体の投与がC. albicansの腸管内への定着に及ぼす影響

前述の結果から、マウスに対する免疫抑制剤の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が、*C. albicans* の腸管内への定着を有意に促進することが明らかにされた。しかし、実際にカンジダ血症が発症するためには腸管内により多くの *C. albicans* が定着していることが必要となる。カンジダ症に対する感染防御で中心的な役割を担う T 細胞機能を修飾することで、*C. albicans* の腸管内への定着がどのような影響を受けるのかを明らかにすることを試みた。具体的には T 細胞上にある免疫チェックポイント分子の PD-1 に対する抗体である抗 PD-1 抗体のマウ

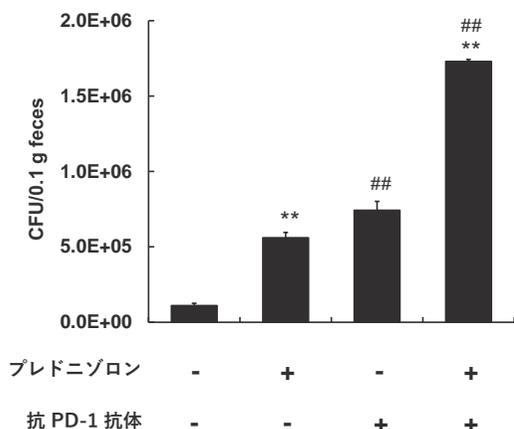


図7 抗PD-1抗体の*C. albicans*の定着に及ぼす影響
平均値±SDを示す

** $P < 0.01$: プレドニゾロン(-)に対する有意差,
$P < 0.01$: 抗 PD-1 抗体(-)に対する有意差

用を有する薬剤の開発に応用されている^{10,13~15})。一方、重篤なカンジダ症であるカンジダ血症が口腔カンジダ症に関連して起こる可能性について示唆はされているが、明確な動物実験モデルは存在していない²⁾。

服部らは実験的口腔カンジダ症を惹起したマウスで、原因菌の*C. albicans*が口腔内から腸管内に特別の実験操作なしに移行することを認めた²⁾。さらに移行した*C. albicans*はそのまま排除されることなく、腸管内に定着することも報告している²⁾。したがって、口腔内に定着した*C. albicans*がカンジダ血症の原因菌となる可能性が考えられる。しかし、問題となるのは定着菌数である。口腔内の*C. albicans*が原因となるカンジダ血症の発症メカニズムは以下のようなことが考えられる¹⁶⁾。すなわち、*C. albicans*が口腔から腸管内に移行し、その中で定着して増菌する。その後、*C. albicans*の産生するカンジダリジンという毒素の作用で、腸管上皮が損傷されて腸管内の*C. albicans*が血管内に移行して、カンジダ血症が起こる可能性である^{21~24)}。

カンジダリジンによる粘膜の損傷以外にも、抗菌薬の長期投与に伴う菌交代現象が起きた場合や宿主の免疫機能が大きく抑制された場合には、*C. albicans*が多量に腸管内で増殖する。それらが、腸管血流を介して血液中に侵入することが考えら

れる¹⁶⁾。

今回の結果では無処置のマウスに*C. albicans*を感染させた場合に比較して、広域抗菌スペクトルを有するテトラサイクリン含有水道水を飲水させ、免疫抑制剤のプレドニゾロンを投与した場合に糞中の*C. albicans*は有意に増加した。以上の結果は、抗菌薬の投与による腸内細菌叢の変化とプレドニゾロンによる免疫抑制が、*C. albicans*が腸管内で増加する理由となることを示している。なお、*C. albicans*以外の*Candida spp.*でも腸管内への安定した定着が起こるのかを調べたところ、*C. glabrata*と*C. tropicalis*のどちらも*C. albicans*と同様な定着性を示した。*C. albicans*以外の*Candida spp.*もカンジダ血症の原因となることはすでに報告されている。中でも*C. glabrata*と*C. tropicalis*は、他の*Candida spp.*よりも高い頻度でカンジダ血症患者から検出されている^{30,31,32)}。この要因の一つは、腸管内における高い定着性にあると考えられる。

通常、抗菌薬による腸内細菌叢の変化には、細菌叢の構成細菌数の減少、もしくは構成細菌種の変化の2つの可能性が考えられる。

テトラサイクリンを飲水させた群は、コントロール群に比較して好気性菌は減少するが嫌気性菌は減少しなかった。したがって、単なる細菌数の減少が*C. albicans*の定着を誘導するものではないことが示された。さらにテトラサイクリンの飲水に加えてプレドニゾロンを投与した群では、テトラサイクリン飲水単独群に比較して好気性細菌は回復した。

以上のことから、プレドニゾロンを投与し、テトラサイクリンを飲水させた群では、*C. albicans*の定着を促進するように腸内細菌叢の構成細菌の種類が変化すると考えられる。具体的には、図6に示すように*Lactobacillus*属が顕著に減少していた。*Lactobacillus*属の減少が*C. albicans*の定着を促進する理由は、以下のように考えられる。

*Lactobacillus*属の一部は、ヘルパーT細胞の1型を活性化して宿主の細胞性免疫を活性化させる一方で、ヘルパーT細胞の2型を抑制する¹⁷⁾。*C. albicans*に対する感染防御において、T細胞は重要な役割を担う。ヘルパーT細胞が減少する後

天性免疫不全患者で口腔カンジダ症が発症しやすいことは、従来から報告されている^{36,37)}。したがって、*Lactobacillus* 属の減少によってヘルパー T 細胞の活性化が低下すれば、*C. albicans* は腸管内に定着しやすいことになる。*C. albicans* を含む真菌感染症の感染防御で最も重要な細胞は、ヘルパー T 細胞の17型である^{33,34,35)}。この細胞が産生する IL-17というサイトカインは、カンジダ症の成立に関与している^{33,34,35)}。Th17型に対する *Lactobacillus* 属の影響は、不明である。しかし、*Lactobacillus* 属が減少した状態で *C. albicans* の腸管内への定着が促進したことから、*Lactobacillus* 属が Th17細胞も活性化する可能性が考えられる。

また、*Lactobacillus* 属は *C. albicans* に対して、直接的に抗菌活性を発揮することが明らかにされている^{18,19,20)}。Itapary Dos Santos らは、*Lactobacillus* 属の20菌株中の15菌株が *C. albicans* の付着とバイオフィーム形成を抑制することを報告している¹⁹⁾。Matsuda らも、*Lactobacillus gasseri* と *Lactobacillus crispatus* の培養上清が *C. albicans* のバイオフィーム形成を抑制するとしている²⁰⁾。以上のことから、腸内細菌叢中の *Lactobacillus* 属は、*C. albicans* の腸管内における定着を抑制していると考えられる。カンジダ血症を予防するために、*Lactobacillus* 属細菌をプロバイオティクスとして利用することも有益であると考えられる。

C. albicans は、細胞溶解毒素のカンジダリジンを産生して腸の上皮細胞を損傷する。この毒素により、腸上皮が損傷された部位から腸管内の *C. albicans* が血管内に移行してカンジダ血症を起こすと考えられる²¹⁾。カンジダリジンはペプチドであり、*C. albicans* が組織に侵入する際に分泌される毒素である²²⁾。この毒素は上皮を損傷するだけでなく、好中球を感染部位に誘導することで炎症反応を増強する²³⁾。特にカンジダリジン産生の *C. albicans* をマウスに感染させた場合は非産生の *C. albicans* を感染させた場合よりもマウスの死亡率が上昇したことから、カンジダリジンは全身性の感染を誘導する病原因子とされている²⁴⁾。カンジダリジンを産生する *C. albicans* と産生しない *C. albicans* のどちらがより腸管内に定着す

るかは、カンジダ血症の発症に大きく関与する問題である。しかし、*C. albicans* とその他の *Candida* spp. で腸管内における定着性に差が認められなかった。この結果から、カンジダリジン産生の有無によって、*C. albicans* の腸管内への定着性に差はないと考える。

本研究での、T細胞上の免疫チェックポイント分子である PD-1分子に対する抗体である抗 PD-1抗体をマウスに投与した場合の結果は、予期したものと大きく乖離するものであった^{11,25)}。PD-1がT細胞の過剰な活性化を抑制することが明らかにされている^{11,25)}。T細胞上の PD-1にリガンドである PDL-1が結合することでT細胞は活性化が抑制される^{26,27)}。

したがって、*C. albicans* 感染時に抗 PD-1抗体を投与すれば、T細胞機能が一層促進されて、*C. albicans* 感染が抑制されるはずである。実際、*C. albicans* と同じ真菌である *Cryptococcus* の感染の際に、抗 PD-1抗体の投与が感染防御に有効であったことが報告されている^{28,29)}。

しかし、今回の結果では腸管内での *C. albicans* の定着が亢進していた。この理由としては、T細胞の過剰な活性化が抗 PD-1抗体の投与で起きたために、それに対するフィードバックがかかったためと推測できる。これについては、更なる検討が必要である。

Vetizou らは抗 PD-1抗体と同様に T細胞の機能を活性化させる抗 CTLA-4抗体の作用が、腸内細菌叢の構成細菌と関連していることを報告している³⁸⁾。特に腸内細菌叢の中で *Bacteroides* 門に属する *Bacteroides* 目の腸内への定着が、必要であるとしている³⁸⁾。本研究の結果ではプレドニゾロンを投与し、テトラサイクリンを飲水させたマウスの腸内細菌叢中の *Bacteroides* 属の割合は上昇していた。したがって、この *Bacteroides* 属の増加が、抗 PD-1抗体の活性を高めたことも示唆される。

以上のように、*C. albicans* の腸管内への定着の亢進には、腸内細菌叢中の *Lactobacillus* 属の減少と T細胞機能の過剰亢進に対するフィードバックが関与している可能性が示された。

謝 辞

本研究費用の一部はJSPS科研費17K12053の助成を受けたものである。

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) 服部宗太郎, 玉井利代子, 清浦有祐: *Candida albicans* の定着に及ぼすサイトカインの影響. 奥羽大歯学誌 **45**; 13-23 2018.
- 3) Spec, A., Shindo, Y., Burnham, C.D., Wilson, S., Ablordeppey, E.A., Beiter, E.R., Chang, K., Drewry, A.M. and Hotchkiss, R.S.: T cells from patients with *Candida* sepsis display a suppressive immunophenotype. *Critical Care* <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1182-z> 2016.
- 4) 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. 日化療学会誌 **62**; 663-673 2014
- 5) Edward, J.E.: カンジダ症. ハリソン内科学 (Kasper, D.L., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L., Loscalzo, J. 編) 第5版: 1393-1398 メディカル・サイエンス・インターナショナル東京 2017.
- 6) Altmeier, S., Toska, A., Sparber, F., Teijeria, A., Halin, C. and LeibundGut-Landman, S.: IL-1 coordinates the neutrophil response to *C. albicans* in the oral mucosa. *PLOS Pathogens* <https://doi.org/10.1371/Journal.ppat.1005882> 2016.
- 7) 佐藤友昭: XⅢ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, 戸蒔彰史編) 第5版: 279-280 医歯薬出版 東京 2012.
- 8) 谷口初美: 主要化学療法薬の作用機序と耐性機構. 戸田新細菌学 (吉田眞一, 柳 雄介, 吉開泰) 改訂34版: 167-184 南山堂 2013.
- 9) Kim, Y-G., Udayanga, K.G.S., Totsuka, N., Weinberg, J.B., Núñez, G. and Shibuya, A.: Gut dysbiosis promotes M2 macrophage polarization and allergic airway inflammation via fungi-induced PGE₂. *Cell Host Microbe* **15**; 95-102 2014.
- 10) 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.
- 11) Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, K., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N. and Honjo, T.: Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* **291**; 319-322 2001.
- 12) Yadav, M., Jhunjunwaia, S., Phung, Q.T., Lupardus, P., Tanguay, J., Bumbaca, S., Franci, C., Cheung, T.K., Fritsche, J., Weinschenk, T., Modrusan, Z., Mellman, I., Lill, J.R. and Delamarre, L.: Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* **515**; 572-576 2014.
- 13) Kamagata-Kiyoura, Y. and Abe S.: Recent studies on oral candidiasis using a murine model. *J. Oral Biosci.* **47**; 60-64 2005.
- 14) Nalik, J.R., Fidel, P.L. and Odds, F.C.: Animal models of mucosal *Candida* infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **283**; 129-139 2008.
- 15) Segal, E. and Frenkel, M.: Experimental in vivo models of candidiasis. *J. Fungi* **4** 21; <https://doi.org/10.3390/jof4010021> 2018.
- 16) 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.
- 17) Xiao, J.Z., Kondo, S., Yanagisawa, N., Takahashi, N., Odamaki, T., Iwabuchi, N., Iwatsuki, K., Kokubo, S., Togashi, H., Enomoto, K. and Enomoto, T.: Effect of Probiotic *Bifidobacterium longum* BBS36 in relieving clinical symptoms and modulating plasma cytokine levels of Japanese cedar pollinosis during the pollen season. A randomized double-blind, placebocontrolled trial. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **16**; 86-93 2006.
- 18) Li, T., Liu, Z., Zhang, X., Chen, X. and Wang, S.: Local probiotic *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus delbrueckii* exhibit strong antifungal effects against vulvovaginal candidiasis in a rat model. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01033>. 2019.
- 19) Itapary Dos Santos, C., Ramos Franca, Y., Duarte Lim Capos, C., Quaresma Bomfim, M.R., Oliveira Melo, B., Asuncao Holanda, R., Santos, V.L., Gomes Monterio, S., Buozzi Moffa, E., Souza Monteiro, A., Andrade Monteiro, C. and Monteiro-Neto, V.: Antifungal and antivirulence activity of vaginal *Lactobacillus* spp. Products against *Candida* vaginal isolates. *Pathogens* <https://doi.org/10.3390/pathogens8030150> 2019.
- 20) Matsuda, Y., Cho, O., Sugita, T., Ogishima, D. and Takeda S.: Culture supernatants of *Lac-*

- tobacillus gasserii* and *L. crispatus* inhibit *Candida albicans* biofilm formation and adhesion to HeLa cells. *Mycopathologia* <https://doi.org/10.1007/s11046-018-0259-4> 2018.
- 21) Allert, S., Forster, T.M., Svensson, C.M., Richardson, J.P., Pawlik, T., Hebecker, B., Rudolphi, S., Juraschitz, M., Schaller, M., Blagojevic, M., Morschhauser, J., Figge, M.T., Jacobsen, I.D., Naglik, J.R., Kasper, L., Mogavero, S. and Hube, B. : *Candida albicans*-induced epithelial damage mediates translocation through intestinal barriers. *Mbio*. <https://doi.org/10.1128/mBio.00915-18> 2018.
 - 22) Richardson, J.P., Mogavero, S., Moyes, D.L., Blagojevic, M., Kruger, T., Verma, A.H., Coleman, B.M., De La Cruz Diaz, J., Schulz, D., Ponde, N.O., Carrano, G., Knienmeyer, O., Wilson, D., Bader, O., Enou, S.I., Ho, J., Kichik, N., Gaffen, S.L., Hube, B. and Naglik, J.R. : Processing of *Candida albicans* Ecelp is critical for candidalysin maturation and fungal virulence. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/mBio.02178-17> 2018.
 - 23) Naglik, J.R., Gaffen, S.L., and Hube, B. : Candidalysin : discovery and function in *Candida albicans* infections. *Curr. Opin. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.06.002> 2019.
 - 24) Swidergall, M., Khalaji, M., Solis, N.V., Moyes, D.L., Drummond, R.A., Hube, B., Lionakis, M.S., Murdoch, C., Filler, S.G. and Naglik, J.R. : Candidalysin is required for neutrophil recruitment and virulence during systemic *Candida albicans* infection. *J. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz322> 2019.
 - 25) Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. and Honjo, T. : Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11** : 141-151 1999.
 - 26) Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourgue, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., Horton, H.F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M.R., Carreno, B.M., Collins, M., Wood, C.R. and Honjo, T. : Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **192** : 1027-1034 2000.
 - 27) Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., Greenfield, E.A., Bourgue, K., Boussiotis, V.A., Carter, L.L., Carreno, B.M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A.H. and Freeman, G.J. : PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* **2** : 261-268 2001.
 - 28) Guerrero, A., Jain, N., Wang, X. and Fries, B. C. : *Cryptococcus neoformans* variants generated by phenotypic switching differ in virulence through effects on macrophage activation. *Infect. Immun.* **78** : 1049-1057 2010.
 - 29) Chen, G.H., Teitzp-Tennenbaum, S., Neal, L.M., Murdoch, B. J., Malachowski, A. N., Malachowskik, Dils, A. J., Olszewski, M. A. and Osterholzer, J. J. : Local GM-CSF-dependent differentiation and activation of pulmonary dendritic cells and macrophages protect against progressive *Cryptococcal* lung infection in mice. *J. Immunol.* **196** : 1810-1821 2016.
 - 30) Kullberg, B. J. and Arendrup, M. C. : Invasive candidiasis. *N. Eng. J. Med.* **373** : 1445-1456 2015.
 - 31) Zeng, Z., Tian, G., Ding, Y., Yang, K., Liu, J. and Deng, J. : Surveillance study of the prevalence, species distribution, antifungal susceptibility, risk factors and mortality of invasive candidiasis in a tertiary teaching hospital in southwest China. *BMC Infectious Diseases* <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4588-9> 2019.
 - 32) Israel, S., Amit, S., Israel, A., Livneh, A., Nir-Paz, R. and Korem, M. : The epidemiology and susceptibility of candidemia in Jerusalem, Israel. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00352> 2019.
 - 33) Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J., Wright, J. F., Liu, L., Migaud, M., Israel, L., Chrabieh, M., Andry, M., Gumbleton, M., Toulon, A., Bodemer, M., El-Baghdadi, J., Whitters, M., Paradis, T., Brooks, J., Collins, M., Wolfman, M. W., Al-Muhsen, S., Galicchio, M., Abel, L., Picard, C. and Casanova, J. L. : Chronic mucocutaneous candidiasis in human with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* **332** : 65-68 2011.
 - 34) Hernandez-Santos, N. and Gaffen, S. L. : Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* **11** : 425-435 2012.
 - 35) Kobayashi-Sakamoto, M., Tamai, R., Isogai, E. and Kiyoura, Y. : Gastrointestinal colonization and systemic spread of *Candida albicans* in mice treated with antibiotics and predomizone. *Microbial Pathogenesis* **117** : 191-199 2018.
 - 36) Chandrakala, C., Parimalam, K., Wahab, A. J.

- and Anad, N. : Correlating CD4 count with mucocutaneous manifestation in HIV-positive patients : A prospective study. *Indian J. Sex Transm. Dis. AIDS*
https://doi.org/10.4103/ijstd.IJSTD_130_15 2017.
- 37) Kirti, Y. K. : Prevalence of oral candidiasis in indian HIV sero-positive patients with CD4+ cell count correlation. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.*
<https://doi.org/10.1007/s12070-018-1342-3> 2019.
- 38) Vetizou, M., Pitt, J. M., Daillere, R., Lepage, P., Waldschmitt, N., Flament, C., Rusakiewicz, S., Routy, B., Roberti, M. P., Duong, C. P. M., Poirier-Colame, V., Roux, A., Becharaf, S., Formenti, S., Golden, E., Cording, S., Eberli, G., Schlitzer, A., Ginhoux, F., Mani, S., Yamazaki, T., Jacquelot, N., Enot, D. P., Berard, M., Nigou, J., Opolon, P., Eggemont, A., Woerther, P. L., Chachaty, E., Chaput, N., Robert, C., Mateus, C., Kroemer, G., Raoult, D., Boneca, I. G., Carbone, F., Chamaillard, M. and Zitvogel, L. : Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* **350** ; 1079-1084 2015.
- 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 奥羽大学大学院歯学研究科口腔感染症学
Reprint requests : Yusuke KIYOURA, Department of Oral Infectious Diseases, Ohu University, Graduate School of Dentistry
31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan