

総 説

マウス口腔カンジダ症モデルの開発とその応用

安 部 茂

帝京大学医真菌研究センター

要 旨

老人における口腔カンジダ症、および吸入ステロイドの使用に伴う咽頭・食道カンジダ症は、患者が非常に多い疾患であり、しかも一部の患者では難治性となる。これら粘膜カンジダ症は、主として常在菌である *Candida albicans* が、宿主の低下した防御能をくぐり抜け、感染が成立する感染症である。鵯口瘡がこれら口腔咽頭カンジダ症の一般的な状態であり、舌、咽頭などに偽膜性の白苔を生じる。私達は新たにマウス口腔カンジダ症および咽頭カンジダ症のモデルを作成した。これら動物モデルは、口腔カンジダ症では、クロルプロマジンにマウスに投与することで、*C. albicans* の口腔内への菌の定着が容易におこるのみでなく、舌白苔などの症状を示し、その数値化が可能となるものである。すでにこの口腔カンジダ症モデルで、ウシラクトフェリン、クローブ、植物精油の経口投与により防御効果が得られており、その免疫学的機序も一部明らかにされてきている。さらに、アゾール系抗真菌剤に耐性を示す *Candida albicans* による本感染症に対しても植物精油が有効なこと、また、ヒト唾液が感染防御に働くことも明らかにされつつある。

Key words: ICR マウス (ICR mice), クロルプロマジン (chlorpromazine), 白苔 (white patches), ラクトフェリン (lactoferrin), 植物精油 (essential oil)

序 文

Candida 属は、広くヒトの消化管に生息し、通常は病原性を示さないが、宿主主体防御能の低下に伴い、様々な感染症をひきおこす。とくに口腔および咽頭、食道カンジダ症は、唾液分泌の低下、糖尿病、抗生物質や免疫抑制剤の長期投与、口腔衛生管理の低下等にもない好発する疾患である^{1, 2)}。現在、本疾患に対する療法として抗真菌剤が使用されているが、一時的に治癒するが多く再発が見られ、今後解決すべき問題点が存在する。HIV 感染患者の 90% に見られる口腔カンジダ症では、患者の免疫能の低下に伴う感染の深刻さがある。治療薬として含嗽薬が無効となり、しかも薬剤の長期使用に伴い耐性菌が出現し薬剤抵抗性の病態を示すようになる³⁾。一方、高齢者、とくに義歯装着者に見られる口腔カンジダ症、ステロイド吸入剤使用者に見られる咽頭・食道カンジダ症は、易感染性をひき起こす原因が取り去られないかぎり一時的に寛解しても再発する疾患であり、抗真菌剤にかわる機能的食品など新たな防御法の実用化が必要とされている状況である。

1. 現在までに作成された口腔カンジダ症モデル

すでにウサギ⁴⁾、ラット⁵⁾ およびマウス⁶⁾ で、多数の実験的口腔カンジダ症モデルが作成されている。その経

緯については Samaranayake らの総説⁷⁾ が参考になる。彼らは、類人猿をもちいたモデルが歯科装着物に関連した口腔カンジダ症モデルとして優れていること、ラットを用いたモデルが、比較的長期間の *Candida* の定着実験などに向いていることと共に、マウスが免疫学的な解析に適している点を強調している。特に比較的、統計学的に解析しやすい個体数が得られるマウスモデルについては、多くの研究結果が発表されている。しかしながら、口腔カンジダ症動物モデル作成に関する研究については、1980 年代まで盛んに研究されていたものの、それ以後の研究者数はむしろ減少してきていた。その原因の一つとしては、感染症を成立させるために、様々な工夫が必要であり、しかも臨床的に見られる口腔カンジダ症の症状をしめすモデルが作りにくかったことがあげられよう。最近になり、本疾患の重要性が再認識され新たなモデルの作成が試みられたり⁸⁾、更に本症の免疫学的な背景も明らかにされつつある⁹⁾。特に鎌井らの *Candida* を浸した綿球で感染を成立させる方法は白苔を作る点で注目されている¹⁰⁾。

2. 臨床症状を示すマウス口腔カンジダ症モデルの開発

私達は、まず簡単にできる口腔カンジダモデルの作製法の確立を目指した¹¹⁾。そこで注目したのが、精神科領域の Francic の報告¹²⁾ などで、彼らは、精神安定剤クロルプロマジンに投与された患者では、口腔カンジダ症が好発することを記している。そこで、私達が、クロルプロマジンが生体防御能としての白血球の機能阻害をする

別刷請求先: 安部 茂

〒192-0395 東京都八王子市大塚 359

帝京大学医真菌研究センター

Macroscopic evaluation of murine oral candidiasis

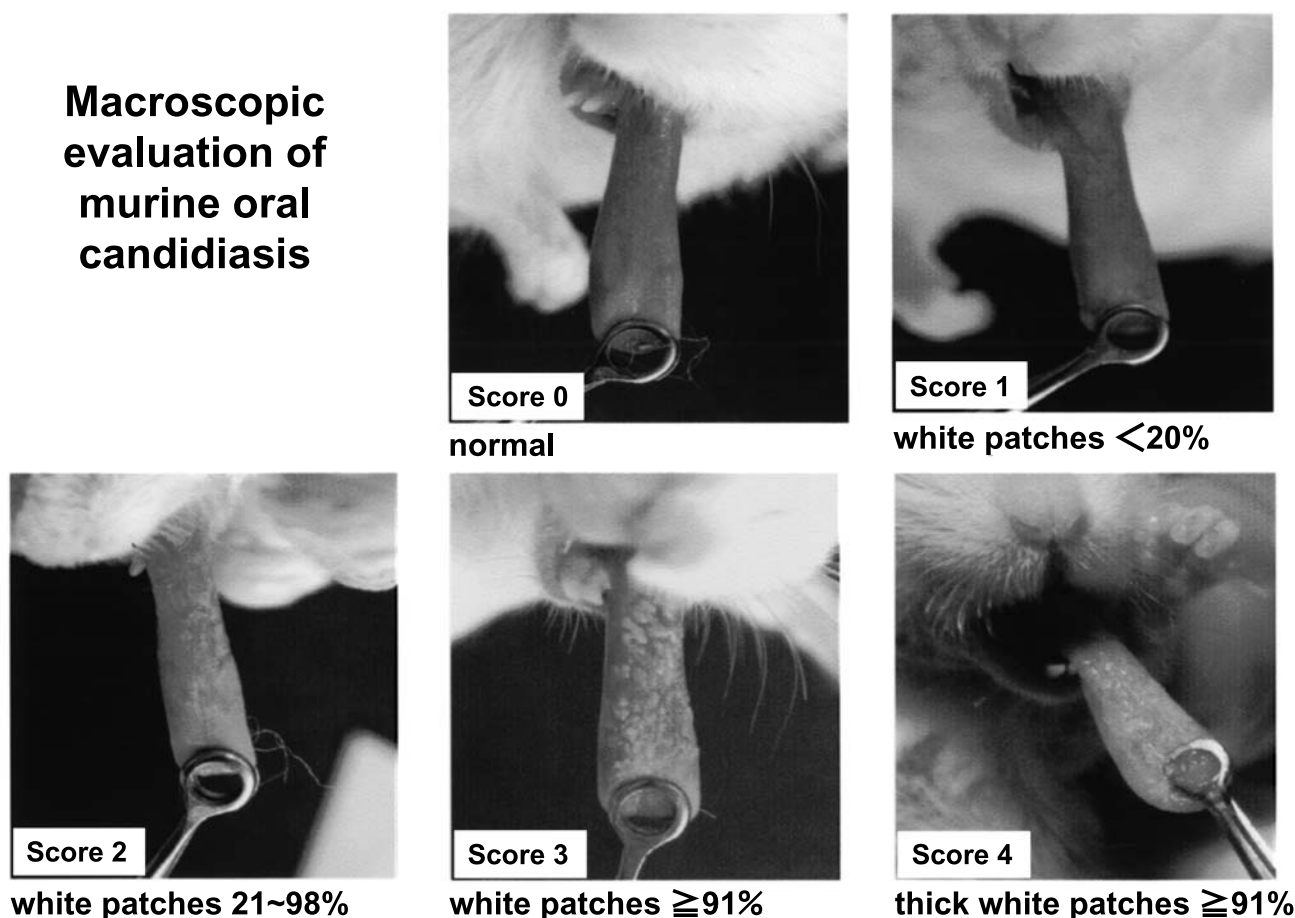


Fig. 1.

可能性を考え、好中球の抗 *Candida* 活性に対する影響をみたところ、クロルプロマジンが培地中に約 $6\mu\text{M}$ 存在すると *C. albicans* の発育を阻止せずに、好中球の *Candida* 発育阻止能を減弱することがわかった。

次に、マウスにクロルプロマジンを投与し、*C. albicans* を、口腔内に綿棒で塗布し、感染マウスを作製した。マウスは、クロルプロマジンの投与量に依存して、激しい口腔カンジダ症を示した (Fig. 1 参照)。

このマウスは、クロルプロマジン投与によって安静状態になり、約3時間程度動作が極端に少なくなり、舌の動きも少なくなり、舌の乾燥も認められることから、唾液分泌も抑制されるものと推定されている。従って、クロルプロマジンによる口腔カンジダ症の発症原因は、免疫機能抑制、機械的定着促進、唾液分泌抑制などが複雑に絡んでいるものと推定される。いずれにしても、本実験モデルは、基本的には、通常のICRマウスを用いて、一回の感染操作で症状を示す感染動物が作製できる点で操作上の容易さは、他に類をみない。さらに、あらかじめ、マウスに抗炎症ステロイド剤プレドニゾロンを投与することにより症状が持続すること、飲料水に抗生物質塩酸テトラサイクリンを含有させると、菌量が増加することを確認している。

症状としてもっとも明確な舌の白苔をスコア化した。フルコナゾールの経口投与あるいは、アムホテリシンB

の口腔内塗布によりこのモデルで、*Candida* 生菌数が減少するだけでなく、白苔もほとんど認めない正常に近い舌の状態になることが確認された。

3. マウス口腔カンジダ症モデルで明らかにされた植物成分の有効性

現在、口腔カンジダ症などの治療薬としては、アゾール系抗真菌剤が頻用されている。しかしこれらの粘膜カンジダ症については、難治化及び再発の問題が深刻になってきており、新たな治療法の導入が求められている。口腔カンジダ症が、再発しやすい疾患であることから、日常生活のなかで用いられるもので、本症を予防できるものがあれば有益と考え探索してきた。スパイスやハーブまた植物精油の真菌類に対する抗菌活性効果は古来より世界中の食生活、伝統医療の中で活用されてきた。こうした天然物の抗菌活性についての知見はその多くが伝統的、あるいは口承的なものである。なお、植物精油の作用については、井上の総説¹³⁾が詳しい。

そこで真菌感染に有効と言われている植物精油について *C. albicans* の発育能に対する作用を調べた結果、レモングラスオイルの他、多くの植物精油が0.1%以下の濃度で *Candida* の発育に影響を与え、とくに、組織侵襲性の強い菌糸形発育を低濃度で抑制することがわかった¹⁴⁾。

これら植物精油のなかでもっとも刺激性の少ないオイ

ルであるティーツリー油の効果を口腔カンジダ症モデルで検討した¹⁵⁾。感染後、3回4%のティーツリー油を塗布されたマウスでは、顕著な治療効果が見られた。特に特筆すべきこととして、アゾール耐性でフルコナゾールが効きにくい *C. albicans* に対しても著効をしめした点がある。ティーツリー油中の有効成分は、テルピネン4オールであり、このテルペノイドアルコールは、組織浸透性が強いことから、今後、免疫抑制の強い患者で見られる侵襲性の強い口腔カンジダ症に適応されることが期待される。これら植物精油は、ティーツリー油に限らず、ゼラニウム油などもすみやかに口腔カンジダ症の症状を改善する。その効果の一部には、これらのオイルの抗炎症作用が関連すると推定される。実際これらのオイルは、低濃度で炎症性サイトカイン TNF α に対する好中球の応答反応を抑制し¹⁶⁾、好中球の炎症部位への集積を阻止する¹⁷⁾。

これまでの抗菌活性評価の多くは抽出された、いわゆる精油 (essential oil) を用いており、人間の「摂食」や「食習慣」を想定した生ハーブ、スパイス等の抗菌活性を検討の対象としたものは少ない。さらに実際にそれらを経口摂取することで消化管内の菌叢を制御しうる可能性を検討した実験データはほとんどない。そこで、私達は、ハーブ類の抗真菌活性を調べ、クローブやワサビが、*C. albicans* の発育を抑制すること¹⁸⁾、クローブを口腔内に与えると、口腔カンジダ症が、予防されることを明らかにした (論文投稿中)。

4. ラクトフェリンの口腔カンジダ症防御作用

粘膜での感染防御に働く生理的因子としてリゾチーム、ラクトフェリンなどが働いている。私達はラクトフェリンが *Candida* の感染から生体を守ることを明らかにしてきた¹⁹⁾。ラクトフェリンはそれ自体で Fe⁺⁺⁺ を結合し微小環境中の自由鉄濃度を低下させることにより、微生物発育を抑制するだけでなく生体側の主要防御因子の一つである好中球と共同して *Candida* の発育を阻止することを報告している²⁰⁾。このラクトフェリンは、特に、乳児の腸管での感染防御に働くことが示唆されている。高倉らは、口腔カンジダ症モデルでも明確に感染防御効果を発揮することを明らかにした²¹⁾。

ラクトフェリンの口腔カンジダ症防御効果の特徴は、直接 *Candida* の発育を阻止する抗真菌剤等の効果が感染後1~2日程度で明確になるのに対し、5~6日で発揮される遅延効果であることである。また、ラクトフェリンは口腔内の *Candida* と直接触れない胃ゾンデ投与でも有効性を発揮することから宿主免疫能を介した防御効果を示すと考えられた。実際その免疫学的機序を調べてみると、ラクトフェリン摂取は、口腔領域の防御と関係する頸部リンパ節の感染後にみられるリンパ球数の減少を緩和し、そのリンパ球のコンカナバリンA反応性等のT細胞機能の促進を起こす事がわかった²²⁾。したがって現時点では、ラクトフェリン摂取は免疫能の改善を通して粘膜疾患である口腔カンジダ症に治療効果を示すもの

と考えられる。実際、ラクトフェリンをリゾチームとともに、アゾール剤に無応答になった口腔カンジダ症 (エイズ) 患者に使用することによりアゾール剤が有効になることが報告されている³⁾。

5. 口腔カンジダ症モデルで明らかになりつつあること

現在、この口腔カンジダ症モデルを用いることにより、抗真菌剤及び漢方医療の有効性と舌組織への薬剤の到達量との関係を明らかにする試みを行っている。この研究では含嗽剤の改良などを目指している。

また、組織に定着した *C. albicans* を遊離させる唾液中のタンパク性因子の役割を研究している清浦ら²³⁾はその因子の活性が高齢者の一部の唾液に認められないこと²⁴⁾、更に、正常ヒト唾液はこのマウスモデルで口腔カンジダ症の発症を抑制しうることを見いだしている²⁵⁾。今後更に、この感染モデルを用いて防御因子の役割が解明できることを期待したい。

謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会 (科学研究費基盤研究 C15590401) 及び、漢方医薬研究振興財団の助成を受けました。

文 献

- 1) Odds FC: *Candida* and Candidosis: a review and bibliography. Bailliere Tindale, London, 1988.
- 2) Bodey GP: *Candidiasis Pathogenesis, Diagnosis and Treatment* 2nd Ed. Raven Press, New York, 1993.
- 3) Masci JR: Complete response of severe, refractory oral candidiasis to mouthwash containing lactoferrin and lysozyme. *AIDS* **14**: 2403-2404, 2000.
- 4) Walsh TJ, Gonzalez CE, Piscitelli S, Bacher JD, Peter J, Torres R, Shetti D, Katsov V, Kligys K, Lyman CA: Correlation between *in vitro* and *in vivo* antifungal activities in experimental fluconazole-resistant oropharyngeal and esophageal candidiasis. *J Clin Microbiol* **38**: 2369-2373, 2000.
- 5) Martinez A, Regadera J, Jimenez E, Santos I and Gargallo-Viola D: Antifungal efficacy of GM237354, a sordarin derivative, in experimental oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 1008-1013, 2001.
- 6) Chakir J, Cote L, Coulombe C, Deslauriers N: Differential pattern of infection and immune response during experimental oral candidiasis in BALB/c and DBA/2 (H-2d) mice. *Oral Microbiol Immunol* **9**: 88-94, 1994.
- 7) Samaranyake YH, Samaranyake LP: Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev* **14**: 398-429, 2001.
- 8) de Repentigny L, Aumont F, Ripeau JS, Fiorillo M, Kay DG, Hanna Z, Jolicœur P: Mucosal candidiasis in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* **185**: 1103-1114, 2002.
- 9) Fidel PL Jr: Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. *Med Mycol* **40**: 359-375,

- 2002.
- 10) Kamai Y, Kubota M, Hosokawa T, Fukuoka T, Filler SG: New model of oropharyngeal candidiasis in mice, *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 3195-3197, 2001.
 - 11) Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, Abe S: A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol* **47**: 321-326, 2003.
 - 12) Francic JK Jr: Severe oral moniliasis complicating chlorpromazine therapy. *Am J Psychiatry* **119**: 890, 1963.
 - 13) 井上重治: 微生物と香り. フレグランスジャーナル社, 東京, 2001.
 - 14) 安部 茂, 佐藤祐一, 井上重治, 石橋弘子, 丸山奈保, 滝沢登志雄: 植物精油, とくにレモングラス精油および構成テルペノイド citral の抗 *Candida albicans* 作用. *真菌誌* **43**: 285-291, 2003.
 - 15) 小宮真由美, 石橋弘子, 井上重治, 内田勝久, 山口英世, 安部 茂: マウス口腔カンジダ症モデルにおけるティートリー油の治療効果. *真菌誌* **43**(Supple. 2): 96, 2002.
 - 16) Abe S, Maruyama N, Ishibashi H, Hayama K, Inoue H, Oshima H, Yamaguchi H: Suppression of TNF-alpha induced neutrophil adherence response by essential oils. *Mediat Inflamm* **12**: 323-328, 2003.
 - 17) Abe S, Maruyama N, Hayama K, Inoue S, Oshima H, Yamaguchi H: Suppression of neutrophil recruitment in mice by geranium essential oils. *Mediat Inflamm* **13**: 21-24, 2004.
 - 18) 田口裕基, 小宮真由美, 石橋弘子, 井上重治, 山口英世, 新井 亮, 安部 茂: スパイス及びハーブの試験管内での *Candida albicans* の菌糸系発育抑制作用およびそれらのマウス腸管内 *Candida* 定着に対する効果. *応用薬理* **64**: 53-57, 2003.
 - 19) Wakabayashi H, Abe S, Taraguchi S, Hayasawa H, Yamaguchi H: Inhibition of hyphal growth of azole-resistant strains of *Candida albicans* by triazole antifungal agents in the presence of lactoferrin-related compounds. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1587-1591, 1998.
 - 20) Okutomi T, Abe S, Tansho S, Wakabayashi H, Kawase K, Yamaguchi H: Augmented inhibition of growth of *Candida albicans* by neutrophils in the presence of lactoferrin. *FEMS Immunol Med Mic* **18**: 105-112, 1997.
 - 21) Takakura N, Wakabayashi H, Ishibashi H, Abe S, Teraguchi S, Yamaguchi H, Abe S: Oral lactoferrin treatment of experimental oral candidiasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2619-2623, 2003.
 - 22) Takakura N, Wakabayashi H, Ishibashi H, *et al.*: Effect of orally administered bovine lactoferrin on the immune response in the oral candidiasis murine model. *J Med Microbiol* **54**: 495-500, 2004.
 - 23) Kamagata-Kiyoura Y, Abe S, Yamaguchi H, Nitta T: Detachment activity of human saliva *in vitro* for *Candida albicans* cells attached to a plastic plate. *J Infect Chemother* **9**: 215-220, 2003.
 - 24) Kamagata-Kiyoura Y, Abe S, Yamaguchi H, Nitta T: Reduced activity of *Candida* detachment activity in saliva of the elderly. *J Infect Chemother* **10**: 59-61, 2004.
 - 25) Kamagata-Kiyoura Y, Abe S, Yamaguchi H, Nitta T: Protective effects of human saliva on experimental murine oral candidiasis. *J Infect Chemother* **10**: 253-255, 2004.

Development of Murine Experimental Model for Candidiasis and Its Application

Shigeru Abe

Teikyo University Institute of Medical Mycology,
359, Otsuka, Hachioji, Tokyo 192-0395, Japan

Candida albicans is a major cause of oral and esophageal infections in elder persons with poor oral hygiene and immunocompromised patients with hyposalivation, diabetes mellitus, prolonged use of antibiotics or immunosuppressive drugs. Oral thrush is a common form of oropharyngeal candidiasis whose clinical features consist of white patches appearing as discrete lesions on the buccal mucosa, throat, tongue, and gum linings that develop into confluent pseudomembranes resembling milk curds. We recently reported a simple murine model of thrush-type oral candidiasis that mimics the natural infection in humans and is useful for both symptomatological and mycological evaluation of the responsiveness to antifungal treatments. By using this oral candidiasis model, protective activities of oral administration of several types of herbal preparations such as teatree oil, clove preparation and bovine lactoferrin were clarified. The mechanisms of protective actions of lactoferrin against oral candidiasis were particularly elucidated to include augmentation of T-cell activities of lesional lymphoid tissues. More recent studies suggested that saliva from healthy persons also shows a protective action for this murine oral candidiasis model.

この論文は、第47回日本医真菌学会総会の“ラウンドテーブルディスカッション：
口腔カンジダ症の問題を探る”において発表されたものです。