

令和 2 年 4 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11606

研究課題名(和文) 口腔カンジダによる腸内細菌叢の乱れが全身に及ぼす影響を探る

研究課題名(英文) Exploring the systemic effect on intestinal dysbiosis induced by oral *Candida albicans*

研究代表者

長谷部 晃 (Hasebe, Akira)

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：90281815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、マウスを用いて *Candida albicans* の持続的な摂取が腸内細菌叢に与える影響を調べた。腸内細菌叢においては *Lactobacillales* の割合が増加、*Bacteroides* の割合が減少し、この腸内細菌叢の変化が、マウスにおける腸炎を増悪させることがわかった。また、糞便中の IgA を調べたところ、*C. albicans* を定着させた場合全 IgA 量が多いが、*Bacteroides* や *Lactobacillales* の一種に対する特異的 IgA の増減は腸内細菌叢の変化との関連がなかった。糞便中の短鎖脂肪酸の中で、コハク酸は *C. albicans* を摂取していない場合と比べて有意に高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔にカンジダ症を起こす *Candida albicans* を常時摂取すると、腸内細菌叢において、偏性嫌気性菌の割合が減少し通性嫌気性菌の割合が増加することがわかった。さらに、それにより全身的には腸炎が悪化することがわかった。

カンジダの常時摂取により腸内細菌叢が乱れるメカニズムは、腸管における IgA が関与している可能性や、腸炎の悪化には腸管における一部の短鎖脂肪酸の分泌が関与している可能性を示唆することができたが、本研究により、口腔のカンジダが口腔の炎症のみならず全身の健康状態に影響を及ぼす可能性を示すことができたので、国民に口腔衛生環境の重要性を訴える一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of continuous ingestion of *Candida albicans* on the intestinal flora in mice. As a result, we found that *C. albicans* ingestion induced an increase of *Lactobacillales* and a decrease of *Bacteroides* in the intestinal flora, and that the alteration of the intestinal flora exacerbated colitis in mice. Although the level of IgA in feces was high in mice with *C. albicans* ingestion, it was not associated with specific IgA to *Bacteroides* or *Lactobacillales* in intestinal microflora. Among short-chain fatty acids in feces, succinic acid was significantly high in mice with *C. albicans* ingestion.

研究分野：感染免疫学

キーワード： *Candida albicans* 口腔カンジダ症 腸内細菌叢 IgA 短鎖脂肪酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢が全身に及ぼす影響について注目されており、腸内細菌叢の変化が炎症性の腸疾患だけでなく、アレルギーや自閉症の増悪など多くの点で全身に影響を及ぼしていることが報告されている。腸内細菌叢の好ましくない状態を「dysbiosis」といい、遺伝、環境、感染、食事、抗生物質の使用等種々の原因により生じる dysbiosis が、全身的に影響を及ぼすことが明らかになってきている。

口腔内には、微生物が常在しており、我々は日々これらを唾液とともに飲み込んでいるため、口腔常在菌あるいは口腔を介して摂取した細菌が全身的に影響を与えていると考えられる。とりわけ、真菌で高齢者の口腔カンジダ症の原因となる *Candida albicans* は、抗生物質の服用により優勢となり、結果として抗生物質服用者の腸管内で増殖して dysbiosis を誘導する可能性があること、また、*C. albicans* は代表的な日和見感染の原因菌であるが、日和見感染は宿主の免疫力低下によるものであるということなどから、*C. albicans* を経口摂取するような状況は腸内細菌叢にも強く影響を及ぼす可能性があると考えられる。このように、*C. albicans* は他の口腔細菌に比べて腸内細菌に影響を与えやすい環境で摂取される可能性が高いと思われることから、*C. albicans* 摂取による腸内細菌叢への影響に着目した。

2. 研究の目的

口腔の微生物、特に *C. albicans* を常時摂取することが腸内細菌叢に影響を与えるのか、またその結果として全身の状態に影響を与えるのか調べることで、口腔常在菌が全身に与える影響を明らかにすることを目的とした。さらに、超高齢社会を迎えたわが国において、義歯の使用や免疫力低下と強く関わる口腔カンジダ症の全身への影響を調べることで、高齢者の Quality of Life の向上の一助となりたいと考えた。

3. 研究の方法

マウスが嚥下に伴い、常時 *C. albicans* を摂取するようにさせるため、まず 2 週間マウスを AIN-93G で飼育し、その後 16 時間絶食をさせてから経口的に *C. albicans* を摂取させた。*C. albicans* の確認は選択培地であるカンジダ GS 培地を用いて行った。腸内細菌叢の変化は、マウスの糞便を回収し、糞便中の細菌を T-RFLP 法により調べた。また腸内細菌叢の変化が腸炎に及ぼす影響を調べるために、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を用い、腸炎の状態を確認するためにマウスの体重の変化を調べた。マウス糞便中の IgA の量はサンドイッチ ELISA 法で調べ、*Bacteroides fragilis* ならびに *Lactobacillus gasseri* に対する特異的抗体の有無はフローサイトメーターで調べた。糞便中の短鎖脂肪酸は HPLC により調べた。

4. 研究成果

マウス口腔に *C. albicans* を定着させることは難しかったので、上述のような方法によりマウス *C. albicans* を消化管内に定着させることを、マウス糞便から *C. albicans* が検出することで確認した。なお、検出される *C. albicans* の数に有意差はなかった。定着部位については、胃の組織切片の PAS 染色像からマウスの前胃部分と後胃部分の境界付近であることがわかった。また、*C. albicans* が定着したマウスの腸内細菌叢の変化を T-RFLP 法で調べたところ、*C. albicans* が定着した場合には定着していない正常のマウスと比べて通性嫌気性菌の割合が増加し、偏性嫌気性菌の割合が減少していた (図 1)。具体的には Lactobacillales が増加し、Bacteroides が減少していることがわかった。そこで、この腸内細菌叢の変化が全身にどのような影響を与えているのかを調べるために、DSS (2%) を飲水投与することで DSS 誘導性腸炎に対する影響を調べた。DSS により腸炎が誘導されると下痢をすることになり、結果として体重が減少するので、マウスを *C. albicans* の定着の有無ならびに DSS 投与の有無で 4 つのグループに分けて 4 週間弱の間の体重変化を調べた。その結果、*C. albicans* の摂取がないグループでは、DSS の飲水の有無にかかわらず体重の増減に有意差が認められなかったのに対して、*C. albicans* の摂取があるだけで DSS の飲水がなくても体重の増加は抑制されたが、さらに DSS の飲水があると体重は減少した (図 2)。*C. albicans* の摂取がなければ、DSS 飲水はマウスの体重に影響を与えなかったのに対し、*C.*

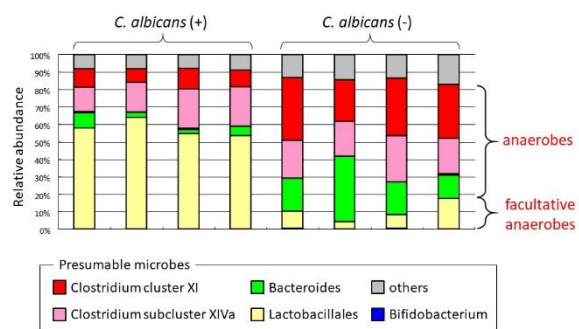


図1. カンジダ定着が腸内細菌叢に及ぼす影響

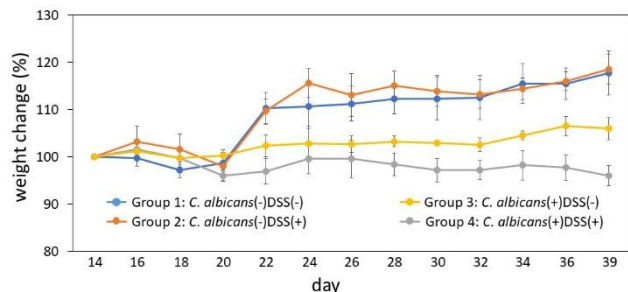


図2. マウスへの *C. albicans* の定着の有無が、2%DSSの飲水投与による体重変化に及ぼす影響

*albicans*の摂取があればDSS 飲水による体重の減少が大きかったことから、*C. albicans* 摂取による腸内細菌叢の変化は、DSS 誘導性腸炎を増悪させることがわかった。

腸管におけるIgAの産生は、腸管の免疫機能に影響を及ぼすことから、まず糞便中に含まれる全IgAの量を調べた。その結果 *C. albicans* の定着により、糞便中の全IgA量は有意に増加することが分かった(図3)。そこで、LactobacillalesならびにBacteroidesの中で代表的な腸内細菌である *Lactobacillus gasseri* と *Bacteroides fragilis* に対する糞便中の特異的IgAの量をフローサイトメトリーにより調べたところ、これらの細菌に対する特異抗体は *C. albicans* の定着の有無と相関がないことがわかった(図4)。また、*C. albicans* が定着しているにもかかわらず、糞便中の *C. albicans* 特異的IgAの量も *C. albicans* の有無と相関が認められなかった(図4)。LactobacillalesならびにBacteroidesの中の一菌種に対する糞便中のIgAを調べたにすぎないが、腸内細菌叢の変化に特異的IgAは関与していないことが推測された。

腸管免疫においては、制御性T細胞が免疫抑制において重要な働きがあることがわかってい

ることから、制御性T細胞の誘導に重要である短鎖脂肪酸の産生に及ぼす腸内細菌叢の影響を調べたところ、糞便中において多くの短鎖脂肪酸は検出されず、検出されたのは乳酸、酢酸とコハク酸であった。乳酸と酢酸では *C. albicans* の摂取の有無で有意差はなく、コハク酸は *C. albicans* の定着がある場合において、ない場合よりも優位に多かった。コハク酸が制御性T細胞に直接関与しているという報告はないため、このコハク酸の増加がどのように影響しているのかは不明である。

以上のことから、*C. albicans* が消化管に定着することにより常時摂取すると、腸内細菌叢に変化が生じ、それにより腸炎の増悪が誘導されることが分かった。また、腸内細菌叢に変化には腸管のIgAは関与していないと考えられ、腸炎の悪化に制御性T細胞の関与があるかどうかはさらなる研究が必要であると言える。この研究により、加齢に伴い口腔から検出率の上昇する *C. albicans* は、口腔カンジダ症など感染による炎症の惹起のみならず、腸内細菌叢に影響を及ぼし、全身の健康状態にも影響を与えていることがわかった。

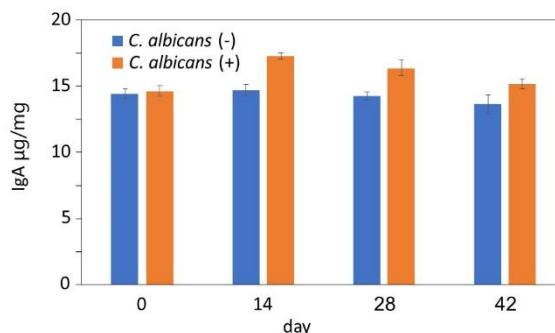


図3. *C. albicans* 定着の有無と糞便中のtotal IgAの関係

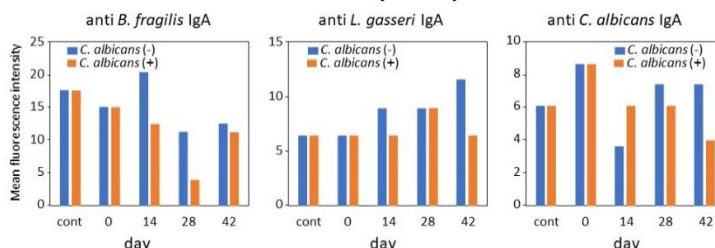


図4. 糞便中の *B. fragilis*、*L. gasseri* あるいは *C. albicans* に対する特異的IgAの量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasebe Akira, Saeki Ayumi, Yoshida Yasuhiro, Shibata Ken-ichiro	4. 巻 93
2. 論文標題 Differences in interleukin-1 release-inducing activity of <i>Candida albicans</i> toward dendritic cells and macrophages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 115 ~ 125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2018.06.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷部 晃、佐伯 歩、柴田 健一郎
2. 発表標題 腸内細菌叢に及ぼす <i>Candida albicans</i> 経口摂取の影響
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷部 晃、佐伯 歩、柴田 健一郎
2. 発表標題 樹状細胞とマクロファージへの <i>Candida albicans</i> のIL-1 産生誘導
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷部 晃、佐伯 歩、柴田 健一郎
2. 発表標題 IL-1 production by dendritic cells and macrophages stimulated with <i>Candida albicans</i>
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷部 晃、佐伯 歩、柴田 健一郎
2. 発表標題 Candida albicans oral ingestion affects intestinal microbial flora .
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	佐伯 歩 (Saeki Ayumi) (70638345)	北海道大学・歯学研究科(研究院)・助教 (10101)	