

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：42639

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16815

研究課題名（和文）反復性膣カンジダ症に対する新たな治療戦略の可能性の検討

研究課題名（英文）Examination of the possibility of new treatment strategies for recurrent vaginal candidiasis

研究代表者

羽山 和美（Hayama, Kazumi）

帝京短期大学・帝京短期大学・講師

研究者番号：50548352

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では反復性膣カンジダ症に対して、治療あるいは予防効果を示す可能性のある天然物質を探索し、治療戦略として利用可能か否かを検討した。一部の乳酸菌は、マウス膣カンジダ症モデルの膣内*C. albicans*生菌数の有意な低下は示さないものの、病原性に寄与する菌糸形発育を抑制する可能性が示された。低分子化ポリフェノールおよび山椒類は、*C. albicans*と混合感染が考えられるブドウ球菌に対する発育を抑制し、ポリフェノールは、ブドウ球菌の発育に伴って現れる悪臭などの不快な諸症状を軽減させた。これらのことからこれら天然物質は再発予防として利用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

反復性膣カンジダ症の再発治療または予防に着目した研究例はまだ少なく、患者は治療のため何度も来院する必要があり大きな負担となっている。本研究では乳酸菌、ポリフェノールなどが*C. albicans*の菌糸形発育を抑制するだけでなく、悪臭など不快な諸症状をも軽減し、日常的な再発予防として使用できる可能性を見出すことができた。以前より研究を行っていた天然物質は、デリケートゾーンにも利用できる化粧水として製品化されている。天然物質は組み合わせるとより効能を高めることが出来るため、治療・予防法の一手段として使用できる可能性があるだろう。よって、本研究の学術的および社会的意義は大きいと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we searched for natural substances that act directly or indirectly against *Candida albicans*, one of the fungi that cause recurrent vaginal candidiasis, and may have therapeutic or preventive effects. Some lactic acid bacteria did not significantly reduce the number of *C. albicans* in the vagina in a murine vaginal candidiasis model, but showed the potential to suppress their hyphal growth, which is associated with pathogenicity. The low molecular weight polyphenols and Japanese pepper suppressed the growth of *Staphylococcus aureus*, which is thought to be a mixed infection with *C. albicans*. It was also shown that the polyphenols may reduce various symptoms, such as unpleasant odors, that are associated with the proliferation of these bacteria. These findings suggest that these natural substances may be useful in preventing recurrence of vaginal candidiasis.

研究分野：真菌

キーワード：Candida albicans 反復性膣カンジダ症 乳酸菌 低分子化ポリフェノール 山椒 ブドウ球菌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外陰腔カンジダ症 (VVC) は、細菌による炎症に次いで、女性の生殖器官の感染症として2番目に多く¹⁾、灼熱感、発赤、腔の腫れ、性交痛や排尿困難などがみられる²⁾。反復性外陰腔カンジダ症 (RVVC) は、1年以内に少なくとも3回この病気を発症した場合と定義されており、これらの患者はストレスの増加、性行為の回避、自尊心と自信の低下などを経験するため、QOLを著しく低下させる³⁾。RVVCは、25歳から49歳の女性の9%に発生し⁴⁾、RVCCは、生涯にわたって最大4億9,200万人の女性に影響を与え、年間1億3,800万人の患者が影響を受けると概算されている⁵⁾。このような状況下でありながら、起因菌である *Candida albicans* は腸内常在微生物であるため排除が困難であるため、ほとんどの患者が症状抑制のために経腔のみならず経口アゾール抗真菌剤の長期治療継続を余儀なくされている現状にある。

2. 研究の目的

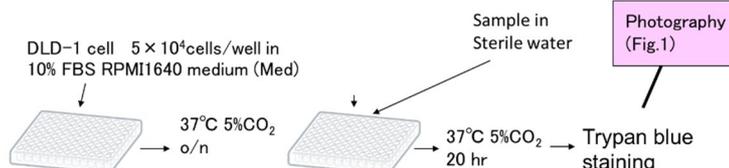
本研究は、いわゆる抗真菌剤とは異なる手段でこの問題を改善することを企図した。具体的には病態をおこす *Candida albicans* の菌糸形発育と、感染に伴う宿主細胞との相互作用、特に炎症反応を抑制することで、不快な諸症状発現を阻止する方法である。材料としては、天然物質を用いる。in vitro 試験で菌糸形 *C. albicans* 株に対して高い発育抑制活性を示す天然物質を選択する。また、再発性腔カンジダ症マウスモデルに天然物質を投与し、より治療効果の高い素材を見出すこととした (Fig.1 参照)。

3. 研究の方法

(1) ヒト結腸癌 DLD-1 細胞を用いた *C. albicans* 感染モデル作成の検討

C. albicans 感染が宿主粘膜細胞へ障害を与えることを確認するため、in vitro で一層に発育させたヒト結腸ガン DLD-1 細胞株に、*C. albicans* を添加して菌糸形発育させ、4時間および23時間後の DLD-1 細胞の生死をトリパンブルー染色により測定した。この in vitro モデルで、各種天然物質が *Candida albicans* の菌糸形発育と、菌発育に伴う DLD-1 細胞の障害を抑制するかどうかを検討した。

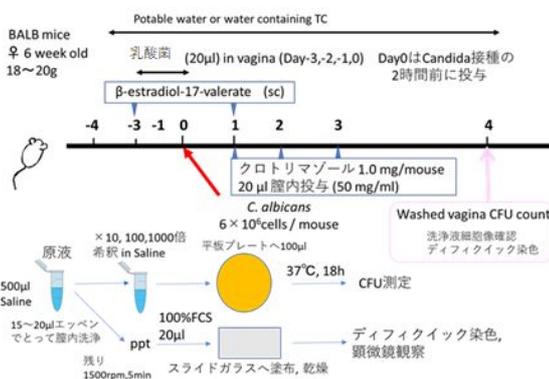
Fig.1 ヒト結腸癌 DLD-1 細胞を用いた *C. albicans* 感染モデル



(2) マウス腔カンジダ症モデルに対する乳酸菌の有効性の検討

丸山ら⁶⁾が作製した腔カンジダ症モデルは、炎症反応として好中球応答が見られことから、そのモデルを用いて検討を行った。予備的研究から、有効性が期待された乳酸菌 *Enterococcus faecalis* の加熱死菌体粉末を使用した (以下、乳酸菌)。各濃度に調製した乳酸菌を、の protocols に準じて、*C. albicans* 腔内感染3日前~当日2時間前 (計4回) 腔内に 20 μ l を腔内投与した。乳酸菌の効果は、腔洗浄液中の *C. albicans* 生菌数および鏡検による細胞像で評価した。実際のタイムスケジュールを、Fig.2 に示した。

Fig.2 腔カンジダ症マウスモデル 実験スケジュール



(3) *C. albicans* と混合感染が考えられるブドウ球菌に対するポリフェノールの発育抑制効果と、発育に伴って現れる悪臭に対する防御効果の検討

RVVC の病態を複雑にしている原因には、混合感染が関与すると推定される。300 mg/ml の乳酸菌は、腔カンジダ症マウスモデルに対して防御効果を示す可能性が見いだされたものの、非常に高濃度を必要とすること、また腔洗浄液中の有意な菌数低下は認められなかった。そこで、

混合感染で問題をおこす各種微生物の増殖を抑えるとともに、膣感染によって発生する悪臭に対して、防御効果を示す可能性がある物質の検討を行うこととした。

膣カンジダ症の混合感染として近年注目されている好気性膣炎患者からは、表皮および黄色ブドウ球菌が検出されている。表皮ブドウ球菌は乳酸を代謝し、悪臭物質であるジアセチルを産生することも報告されている。そこで、本研究ではこれらに有効性を示す物質として、以前より研究を行っていた低分子化ポリフェノールに着目し、表皮ブドウ球菌に対する発育と、発育に伴う悪臭発生に対する抑制効果について検討した。具体的には、本菌をオリゴノール含有 TSA 寒天培地に接種し、37 °C で 20 時間培養後のコロニー数と臭気の評価(官能・生化学)を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト結腸癌 DLD-1 細胞を用いた *C. albicans* 感染モデルの作製とこれらモデルを利用した天然物質の評価検討

DLD-1 細胞に、*C. albicans* を共培養すると、増殖した *C. albicans* 周辺で DLD-1 細胞の変性と死細胞が増加していた。また濃度依存的ではないものの、*C. albicans* の添加から 23 時間後の DLD-1 細胞が障害を受けていることが分かった(データ示さず)。次に *in vitro* で、*C. albicans* の菌糸形発育を抑制する天然物質の探索を、クリスタルバイオレット染色法にて行った。この系で抗真菌薬フルコナゾールはカンジダの発育を明確に止めた。一方、既に *C. albicans* に対して菌糸形発育を阻害することが分かっているライチ由来低分子化ポリフェノールである Oligonol は、菌糸形発育を完全抑制する濃度の 600 $\mu\text{g/ml}$ では、*C. albicans* の発育を抑制したが、DLD-1 細胞にも若干の障害を与えていることが分かった(Fig.3)。一方、スベリヒユより採取された抽出物は、*C. albicans* の菌糸形発育を抑制するのに 10 mg/ml の濃度を要したが、細胞障害を受けている細胞はほとんど見られず、*C. albicans* の菌糸形発育を抑制することで DLD-1 細胞への障害を阻止することが分かった(Fig.4)。

Oligonol は抗炎症効果なども報告されていることから、引き続き本研究での有望な天然物質候補であるが、スベリヒユ抽出物などのように細胞毒性が少なく、またなおかつ Oligonol と相乗的な発育阻止効果を示すような物質を探索する必要があると考えられる。今後はこれらの菌糸形 *C. albicans* 発育抑制と宿主細胞の障害を、ともに評価できる本モデルを使用し、天然物質を探索していくことが重要であると考えられた。

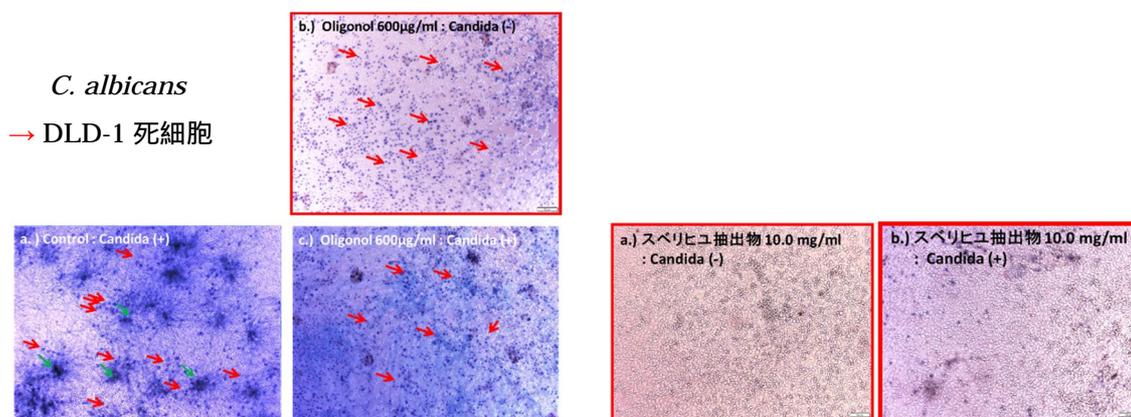


Fig.3 Oligonol の *C. albicans* 菌糸形発育に対する発育抑制と DLD-1 細胞障害

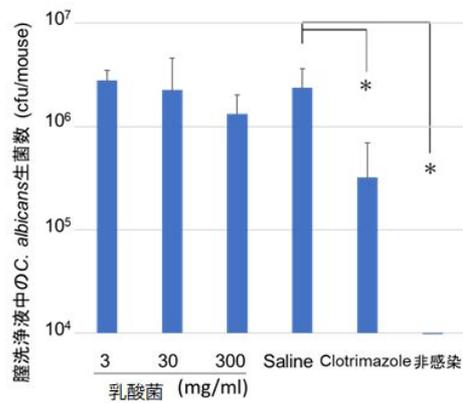
Fig.4 *C. albicans* の菌糸形発育による DLD-1 細胞障害に対するスベリヒユ抽出物の抑制効果

(2) マウス膣カンジダ症モデルに対する乳酸菌の防御効果

Fig.5 に示す通り、乳酸菌の感染前膣投与による膣洗浄液中の生菌数の有意な低下は認められなかった。しかしながら、高濃度乳酸菌 (300 mg/ml) 投与マウスの膣洗浄液では、明確な *C. albicans* の菌糸状は見られない傾向にあり、好中球様の白血球の変化が観察されるものがあった(データ示さず)。また、サンプルの膣洗浄液標本では、乳酸菌 300 mg/ml 投与によって、膣洗浄液中の菌糸形の *C. albicans* 像が有意に検出されなくなることが分かった(Table.1)。

以上のことから、300 mg/ml の乳酸菌は、膣カンジダ症マウスモデルに対して防御効果を示す可能性が見いだされた。

今後、より明確にこの乳酸菌の感染防御効果を明らかにするには、洗浄液だけでなく膣粘膜組織の病理切片における *C. albicans* と白血球像も詳細に検討していく必要があると考えられる。また本モデルは反復性膣カンジダ症を反映したモデルとは言えず、並行してモデル作成を試みていたが、期間内に作製することは困難であった。本研究成果を踏まえて、今後も引き続き検討していきたいと考えている。



- 1群 乳酸菌 3mg/ml n=8
 - 2群 乳酸菌 30mg/ml n=8
 - 3群 乳酸菌 300mg/ml n=7
 - 4群 Saline (control) n=8
 - 5群 clotrimazole (アゾール系抗真菌薬) n=7
 - 6群 非感染 n=3
- Dunnnett t-test, * p<0.05 (10⁴ 以下、測定限界)

Fig.5 各サンプル投与マウス膣洗浄液中の *C. albicans* 生菌数

Table.1 各スライドサンプルの顕微鏡観察による菌糸形 *C. albicans* の有無

	試験マウス数	菌糸あり	菌糸なし	菌糸検出率
Control	19	14	5	14/19 73%
乳酸菌 300 mg/ml	17	6	11	6/17 35%

(χ² テスト, p=0.021)

(3) *C. albicans* と混合感染が考えられるブドウ球菌に対するポリフェノールの発育抑制効果と、発育に伴って現れる悪臭に対する防御効果

Fig.6 に示すように、ライチ由来低分子化ポリフェノールである Oligonol を添加した TSA 培地上で、表皮ブドウ球菌 *S. epidermidis* を培養すると、濃度依存的に *S. epidermidis* の増殖を抑制した。また、0.006 %濃度のオリゴノール添加 TSA 培地では *S. epidermidis* の発育が認められたが、対象に比べてコロニー数の減少、コロニー径の縮小がみられ(Fig.7)、また対照に比べて、わずかではあるが *S. epidermidis* の増殖に伴う臭気を抑制した(Table.2)。Oligonol が抑制する悪臭成分の特定と作用機序の解明については、引き続き検討していきたいと考えている。

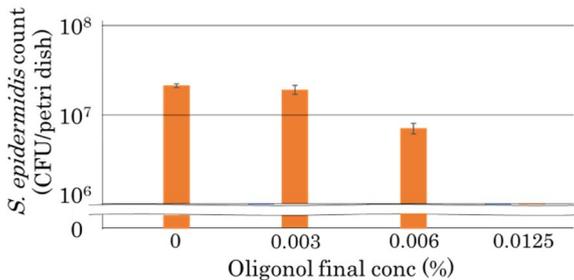


Table.2 各スライドサンプルの顕微鏡観察による菌糸形 *C. albicans* の有無

Oligonol final conc (%)	Odor intensity
0	+++
0.003	++
0.006	+
0.0125	±

Fig.6 Oligonol 含有寒天培地に生育した *S. epidermidis* コロニー数 (CFU/petri dish)

McFarland #1 の 100 倍希釈液

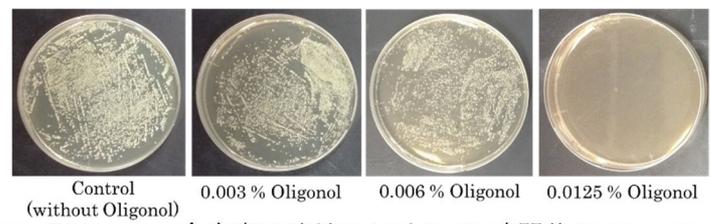


Fig.7 Oligonol 含有寒天培地における 20 時間後の *S. epidermidis* コロニー像

[展望]

本研究の期間内では、反復性膣カンジダ症の治療として利用できる強い *C. albicans* 活性を示す天然物質は、細胞毒性などの観点から見出すことが難しかった。しかしながら、スベリヒユ抽出物などの天然物では、膣カンジダ症の再発予防が期待され、化粧品レベルでのケアへの利用展開が可能だろうと考えている。また、この間に検討してきた天然物の中で、山椒葉および果実の抗真菌活性が注目された。ヤマ山椒とその近縁種である犬山椒の未熟果のハーブウォーターは、

*in vitro*で *C. albicans* の菌糸形発育を抑制すること、また犬山椒の未熟果の圧搾抽出物は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に抗菌効果を示すことを私たちは明かにしている。これらは皮膚・粘膜ケア素材としての利用が十分期待できる。今後も引き続き検討を行っていく。

また、以前より膣カンジダ症予防を想定し研究を行っていた高機能化リゾチームと中鎖脂肪酸であるデカン酸を含有した天然物質が、デリケートゾーンにも使用できる化粧水として製品化された。一部の使用者は膣カンジダ症に伴う悪臭などの諸症状の軽減を実感しており、好評を得ていることから、より効能を高めるような天然物質の探索を行い、今後それらと組み合わせることで、治療法として使用できる素材にまで開発を進めていきたいと考えている。また前述のように、引き続きこれら製品の評価手段として必要な反復性膣カンジダ症マウスモデルの開発も、並行して進めていきたいと考えている。

[引用文献]

- 1) Spence, D : Candidiasis (vulvovaginal). *BMJ Clin. Evid.* 2010.
- 2) Dovník A, Golle A, Novak D, Arko D and Takač I : Treatment of vulvovaginal candidiasis: A review of the literature. *Acta Dermatovenerol. Alp. Pannonica Adriat.* 2015, 24, 5–7.
- 3) Neal CM and Martens MG : Clinical challenges in diagnosis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *SAGE Open Med.* 2022, 10, 20503121221115201.
- 4) Lines A, Vardi-Flynn I and Searle C : Recurrent vulvovaginal candidiasis. *BMJ* 2020, 369, m1995.
- 5) Lírío J, Giraldo PC, Amaral RL, Sarmento ACA, Costa APF and Gonçalves AK : Antifungal (oral and vaginal) therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis: A systematic review protocol. *BMJ Open* 2019, 9, e027489, Erratum in *BMJ Open* 2019, 9, e027489corr1.
- 6) Maruyama N, Takizawa T, Ishibashi H, Hisajima T, Inouye S, Yamaguchi H and Abe S : Protective activity of geranium oil and its component, geraniol, in combination with vaginal washing against vaginal candidiasis in mice. *Biol Pharm Bull.* 2008 Aug;31(8):1501-6.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 羽山和美、安部茂
2. 発表標題 粘膜感染症と感染に伴う炎症に防御効果を示す天然物質由来製品の開発
3. 学会等名 第3回研究交流シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 羽山和美
2. 発表標題 天然物からの機能性化粧品素材の開発
3. 学会等名 第11回化粧品開発展
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------