

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463191

研究課題名(和文)抗体医薬の使用に伴うカンジダ症に対する科学的根拠に基づいた予防法の確立

研究課題名(英文) Establishment of preventive method based on scientific basis for candidiasis associated with use of antibody medicine

研究代表者

清浦 有祐 (Kiyoura, Yusuke)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：90194951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高齢のリウマチ患者への抗体医薬使用による免疫抑制がカンジダ症を起こすメカニズムの解明と新しい予防法の確立を目的として、マウスに抗体を投与後 *Candida albicans* を口腔内で感染させた *in vivo* 実験を行った。その結果、抗 IL-1 抗体を投与したマウスでは糞中の *C. albicans* 菌数は増加したが、抗 IL-6 抗体による菌数変化はなかった。また、抗 IL-1 抗体投与マウスの舌組織の IL-1 産生はほとんど抑制されたが、他のサイトカイン産生の増減はなかった。以上の結果から、IL-1 は *C. albicans* の体内定着を防止する上で重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to elucidate the mechanism by which immunosuppression by antibody medicine use of elderly rheumatism causes candidiasis and establish a new preventive method, after administering the antibody to the inflammatory cytokine to the mouse, *Candida albicans* is administered intraorally. And *in vivo* experiments were carried out. As a result, the number of bacteria of *C. albicans* in feces was increased in the mouse to which the anti-IL-1 antibody had been administered, but it was not changed by the anti-IL-6 antibody. IL-1 production in the tongue tissues of anti-IL-1 antibody-treated mice was almost suppressed, but there was no increase or decrease in other cytokine production. These results suggest that IL-1 is extremely important in preventing the establishment of *C. albicans* in the body.

研究分野：口腔微生物学・免疫学

キーワード：Candida albicans 口腔カンジダ症 IL-1 α 抗体医薬 炎症性サイトカイン 全身性カンジダ症

1. 研究開始当初の背景

慢性関節リウマチは難治性であったが、抗体医薬の登場で治療の劇的な改善が認められた。すなわち、主たる病因である炎症性サイトカインの IL-6 や TNF- α の作用を抗 IL-6 抗体や抗 TNF- α 抗体で抑えると、慢性関節リウマチは寛解する。しかしながら、抗体医薬は感染防御機能の低下をもたらす。その結果、常在微生物の *Candida albicans* (以下 *C. albicans*) などによる日和見感染が発症しやすくなるのが有害事象となっている。患者の年齢層は、超高齢化社会の進展に伴って高齢者の割合が増加している。口腔内における *C. albicans* の定着は加齢に伴って増加し、高齢者の過半数以上の口腔内に常在している。

実際に、抗 IL-6 抗体や抗 TNF- α 抗体を投与された高齢の慢性関節リウマチ患者で、口腔カンジダ症の発症が報告されている。当然、既に感染症を持っている患者に抗体医薬は禁忌だが、非感染の患者でも、抗体医薬の効果を高めるためにメトトレキサートなどの免疫抑制薬を併用するので、口腔粘膜傷害や口腔感染症が極めて起こりやすくなる。さらに、高齢者では口腔衛生環境が悪化している者の割合が高いため、リウマチ治療をおこなった場合には口内炎発症のリスクが高まる。上で述べた通り、慢性関節リウマチ治療における抗炎症性サイトカイン抗体の投与がカンジダ症を含む日和見感染を起こすことは知られているが、その予防法確立のための明確なエビデンスは得られていない。また、抗 IL-6 抗体や抗 TNF- α 抗体投与時の IL-6 や TNF- α 以外のサイトカイン、例えば MCP-1 などのケモカイン産生の動態についての報告は乏しい。

我々は、口腔カンジダ症の発症メカニズムに関するマウスモデルとマクロファージ細胞株を使用した研究を続けてきた。ヒト唾液中には分子量 50K 以上のタンパク質性のカンジダ剥離因子が存在し、その因子の活性が加齢に伴って低下することを報告した。さらに、マウスの感染モデルでその剥離因子が口腔カンジダ症の発症を抑制する可能性も示した。また、高齢者の口腔内に常在する *C. albicans* が宿主の感染防御機構が破綻すると重篤な口腔カンジダ症を起こす可能性をマウスの感染モデルで示した。さらに、このモデルマウスの鼻孔から *C. albicans* を感染させると肺臓内に好中球の強い浸潤を特徴とした炎症像が認められることを報告した。すなわち、免疫抑制剤のプレドニゾロンを投与したマウスで著明なカンジダ症が発生する結果を得ている。一方、同じく免疫抑制作用を示すメトトレキサートやシクロスポリンではプレドニゾロンと比較すると口腔内の炎症症状は低かった。プレドニゾロンを投与した場合には、メトトレキサートおよびシクロスポリン投与と比較して舌表面への *C. albicans* の定着が強まっており、こ

のことが炎症症状の悪化に繋がっていると考えられる。しかしながら、これら免疫抑制薬の間で、舌表面への *C. albicans* 定着の差がみられる機序の解明には至っていない。

これらのことから、高齢のリウマチ患者への抗体医薬使用による免疫抑制がカンジダ症をおこすメカニズムを口腔カンジダ症マウスモデルによる *in vivo* 実験によって解明すると共に、新しい予防法確立のために抗菌性物質を探索する本研究を着想した。

2. 研究の目的

関節リウマチ患者への抗体医薬投与は極めて高い治療効果を示すが、日和見感染症を誘導する危険性が高い。

本研究は、高齢のリウマチ患者への抗体医薬使用による免疫抑制がカンジダ症をおこすメカニズムを口腔カンジダ症マウスモデルによる *in vivo* 実験によって解明すると共に、新しい予防法確立を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、炎症性サイトカインに対する抗体の投与が日和見感染症の発症に及ぼす影響を明らかにするために、ICR マウスに炎症性サイトカイン(IL-6 および IL-1) に対する抗体を投与後に、*C. albicans* を口腔内に感染させて、経日的にマウスの口腔内および糞中の菌数、舌のサイトカイン産生を ELISA 法で検討した。すなわち、メス 4 週令の ICR マウスに抗 IL-6 抗体または抗 IL-1 抗体を 1 回 100 μ g で腹腔注射した後、各々の投与日数経過後に *C. albicans* 菌液 (2.5 $\times 10^7$ /ml) に浸した綿棒でマウスの口腔内を拭って口腔内に菌を定着させた。感染 3 日後マウスの頸椎を脱臼させてから、舌を摘出および糞を採取した。マウスは 1 実験群につき 5 匹使用した(参考文献:Protective effects of human saliva on experimental murine oral candidiasis. Kamagata-Kiyoura Y et al. *J Infect Chemother* 10:253-5, 2004)。供試する *C. albicans* は、申請者が高齢者の口腔内から分離・保存したもので、マウスの実験的口腔カンジダ症を起こす。

- (1) 口腔内 *C. albicans* 菌数測定：口腔内を滅菌生理食塩水に浸した滅菌綿棒で拭い、綿棒を生理食塩水に浸して攪拌させる。その液を使用して、*C. albicans* の菌量を測定した。
- (2) マウスの口腔内の観察：マウスの口腔内は経日的にデジタルカメラで記録をし、抗体投与による *C. albicans* の感染増悪の肉眼所見をとった。
- (3) 舌の採取と炎症性サイトカインの測定：*C. albicans* を口腔内に感染させた後は経日的に舌を採取して、生理食塩水中でほぐしたものをサンプルとしてケモカインを含む炎症性サイトカイン(MCP-1, MIP-1, IL-1, IL-6, TNF- α) の産生を ELISA 法で定量した。

4. 研究成果

- (1) *Candida albicans* (以下 *C. albicans*) 感染マウスの舌組織において、ケモカイン MIP-1 は非感染マウスと比較して有意に高い産生がみられた。一方、MCP-1 は非感染マウスと同様だった (図 1, 2)。
- (2) *C. albicans* 感染マウスの舌組織において、炎症性サイトカイン IL-1 と IL-1 は非感染マウスと比較して有意に高い産生増加があったが、IL-6 と TNF- α の産生増加はなく非感染マウスと同レベルだった (図 1, 2)。
- (3) 口腔カンジダ症マウスモデルは IL-17 を産生していたが、非感染マウスと同レベルだった (図 1, 2)。

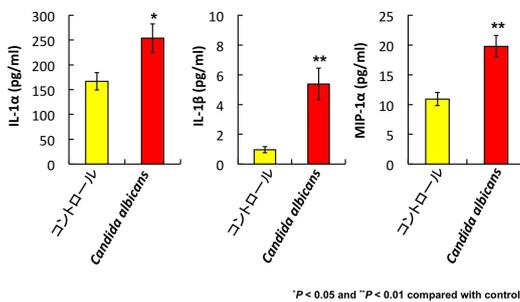


図1: *Candida* 感染3日後に有意な産生がみられたサイトカイン

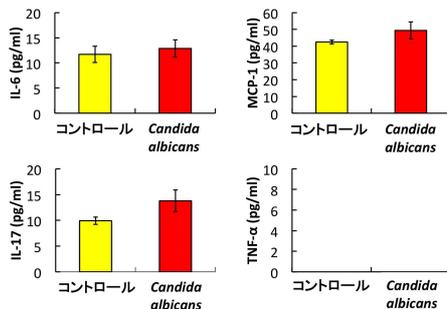


図2: *Candida* 感染3日後で産生に有意差がなかったサイトカイン

- (4) 関節リウマチの治療法として、テトラサイクリン系抗菌薬の使用があることから、マウスに塩酸クロルテトラサイクリン溶液を投与後、*C. albicans* を定着させ菌数を検討した。その結果、コントロール群と比べて、マウスの口腔細菌数は減少し、*C. albicans* の口腔内定着は増加した。
- (5) 塩酸クロルテトラサイクリン溶液を含まないコントロール水道水飲水マウスの舌組織では、口腔常在細菌としてレンサ球菌が多くみられた。
- (6) 抗 IL-1 抗体を投与した ICR マウスでは、*C. albicans* の菌数は増加した。しかしながら、抗 IL-6 抗体を投与した ICR マウスでは、糞中の *C. albicans* の菌数に変化は認められなかった。
- (7) 抗 IL-1 抗体または抗 IL-6 抗体による ICR マウスの体重減少はなかった。また、免疫機能における影響を調べるために、

脾臓重量を測定したが、上記の抗体投与後においてコントロール群と比べて有意な差はみられなかった。

- (8) 抗 IL-1 抗体を投与した ICR マウスの舌組織における IL-1 産生は、抗体を投与していないマウスと比較して減少したが、IL-1, IL-6, MIP-1, IL-17 および IL-33 産生の増減はなかった。
- (9) *C. albicans* を舌に摂取したと同時に、抗 IL-1 抗体を投与した時が最も IL-1 産生が抑制された。さらに、同菌を摂取させた翌日に抗 IL-1 抗体を投与しても、同サイトカインの産生は抗体を投与しなかったマウスに比べて有意に減少した。

種々の炎症性サイトカインが真菌感染の防御に貢献しているとされるが、今回の結果から、その中でも IL-1 は *C. albicans* の体内への定着を防止する上で極めて重要なサイトカインであることが示唆された。

リウマチ患者に対して抗サイトカイン抗体を投与した場合には、種々の微生物が原因となる感染症が惹起されることが報告されている。マウス口腔内に接種した *C. albicans* の糞中の菌数が抗 IL-1 抗体を投与したマウスで増加したことは、サイトカインに対する抗体の投与が全身的な真菌感染症を誘発する危険性を示唆する。特にカンジダ血症は、極めて重篤な結果を招くことが報告されていることから、IL-1 に対する抗体投与は、慎重に行う必要があることが示された。一方、IL-6 に対する抗体投与は、*C. albicans* の糞中の菌数に影響しなかった。この結果は、*C. albicans* 感染に伴って産生される炎症性サイトカインには、感染防御における役割に大きな差があることを示している。今後は、抗 IL-1 抗体によって *C. albicans* の定着が促進されるメカニズムを中心に研究を進める。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Yusuke Kiyoura, Riyoko Tamai, Innate immunity to *Candida albicans*, *Japanese Dental Science Review*, 査読有, Vol. 51, No.3, 2015, pp.59-64, <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2014.12.001>

〔学会発表〕(計2件)

小林美智代・口腔カンジダ症マウスモデルにおける *Candida albicans* の全身臓器への移行・第25回日本口腔感染症学会総会・学術大会・2016年10月16日・神戸市立医療センター中央市民病院 1F 講堂 (兵庫県・神戸市)
清浦有祐・口腔カンジダ症の発症を誘導する口腔フローラの変化・日本老年歯科医学会第27回学術大会・2016年6月19

日・アスティとくしま(徳島県・徳島市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清浦 有祐 (KIYOURA, Yusuke)
奥羽大学・歯学部・教授
研究者番号：90194951

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

玉井 利代子 (TAMAI, Riyoko)
奥羽大学・歯学部・准教授
研究者番号：90367566

(4) 研究協力者

小林 美智代 (KOBAYASHI, Michiyo)
(平成27年4月から)