

機関番号：10101

研究種目：若手研究 B

研究期間：2009～2010

課題番号：21791963

研究課題名 (和文) 口腔カンジダ症の発症因子としての Toll 様受容体、  
制御性 T 細胞に関する研究研究課題名 (英文) Investigation of the pathogenic roles of Toll-like receptor  
and regulatory T cell in oral candidiasis

研究代表者

秦 浩信 (HATA HIRONOBU)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：70450830

研究成果の概要 (和文)：口腔カンジダ症患者と非口腔カンジダ症患者の末梢血単核球の TLR2 の発現レベルを FACS で、炎症性サイトカイン産生能について ELISA 法で比較検討したところ(1)口腔カンジダ症はコントロール群と比較し、TLR2 の発現レベル、および TLR の機能において有意な差は認められなかった。(2)難治性のカンジダ症では、単発性のカンジダ症と比して TLR2 の有意な発現低下が認められ、TLR2 は口腔カンジダ症の、治療に対する抵抗性に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：A case-control study of oral candidiasis was undertaken to determine the TLR2 expression in peripheral blood mononuclear cells, and to assess the inflammatory cytokine production capacity of TLR2.

As a result we found that: (1) there was no significant difference in TLR2 expression and TLR function between oral candidiasis and the control, and (2) the TLR2 level was remarkably low in refractory oral candidiasis compared with curable oral candidiasis. These results suggest that a low level of TLR2 is related to refractoriness of oral candidiasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：病態検査学

## 1. 研究開始当初の背景

医療の高度化に伴い、様々な基礎疾患を抱え、抗がん剤、ステロイド剤、などを投与されている易感染宿主が増加している。口腔常

在真菌である *Candida albicans* は、宿主の抵抗力の減弱に伴い日和見感染として口腔カンジダ症を起こすことが知られている。中には基礎疾患の悪化とともに全身へ播種し、

カンジダ性肺炎など、深在性真菌症をきたし治療に難渋することもある。

**基礎疾患を持たない健常人**においても義歯の使用や、唾液分泌量の低下は口腔常在菌叢を変化させカンジダ属の菌数が増加することによりカンジダ症のリスクを上げることが以前から指摘されてきたが、これらの口腔（局所）の環境の変化だけでは説明のつかない事例も多く存在する。

近年**カンジダの培養検査**が一般臨床でも広まり、データが蓄積されるにつれて健常人においても栄養状態の低下と、口腔カンジダ症の発症が関連することや (E. Paillaud *et al* 2004: Br J Nutrition)、**加齢とともに、カンジダ菌陽性率が増加**してくることも明らかになってきた。(Peterson DE.:1992 Clin Geriatr Med)

## 2. 研究の目的

「基礎疾患をもたない健常人に関して、栄養状態や、加齢に伴う**全身的な免疫能の減弱**を評価することで口腔カンジダ症の新たな発症因子を探る」ことが本研究の目的である。口腔カンジダ症など、粘膜表面からの感染に対しては第一ステップとして**自然免疫**が主体に対応する (綾部時芳 2004:分子消化器病) と考えられており、本研究では、Toll 様受容体と、制御性 T 細胞の二つの因子の関係に着目した。

## 3. 研究の方法

<フローサイトメトリー: FACS>

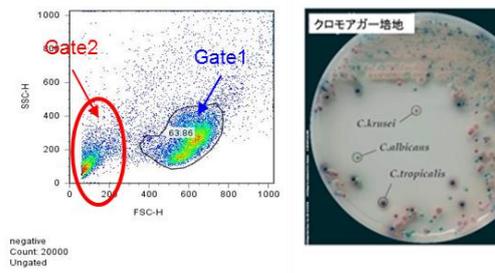
末梢血単核球(PBMC)における TLR-2 の発現健常者の末梢血よりフィコールパックにて PBMC を分離し、マウスならびにヒト TLR2 の特異抗体を結合させたのち、蛍光色素で標識し、フローサイトメーターで発現を解析する。

<カンジダ培養>

Swab サンプルと、マウスの場合にはホモジナイズサンプルもクロモアガー培地上に塗布

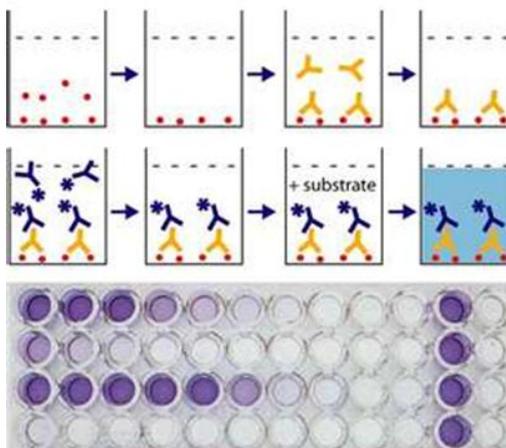
する。36℃で 48 時間培養しコロニーが形成されればカンジダ菌が存在していることを示している。クロモアガー培地上ではカンジダ菌の種類によりコロニーの色が異なり

(C. albicans は緑、C. glabrata は紫色など)カンジダ菌種の同定が可能である。また本法は綿棒で行うスワブ検査よりもカンジダ検出率が高いことが証明されている。



<ELISA 法>

FACS で存在が確認された TLR2 および、TLR4 が実際に機能しているのか、PBMC を TLR2、TLR4 それぞれに特異的なリガンド反応させ NF- $\kappa$ B の転写活性を亢進させて、産生された各種サイトカイン (IL-6, TNF- $\alpha$ ) を ELISA 法 (直接吸着法) を用いて検出することにより確認する。TLR2 の特異的なリガンドとして FSL-1 (Fibroblast stimulating lipopeptide-1)、TLR4 の特異的なリガンドとして LPS (lipopolysaccharide) をそれぞれ使用した。



#### 4. 研究成果

口腔カンジダ症患者と同年代の非口腔カンジダ症患者の末梢血単核球の TLR2、TLR4 の発現レベルを FACS で、炎症性サイトカイン産生能について ELISA 法で比較検討した (表 1)。

年齢(歳)	カンジダ症		計
	非カンジダ症	単発症例 再発症例	
50-59	4	0	4
60-69	7	3	17
70-79	3	2	14
80-	0	3	12
計	14	8	47

表 1 対象者内訳

TLR2 の発現レベルについては、口腔カンジダ症患者群とコントロール群に有意な差は認められなかったが、口腔カンジダ症単発患者と再発を繰り返す難治性患者を比較した場合、難治性患者に、TLR2 発現レベルの有意な低下が認められた。TLR4 は、口腔カンジダ症患者とコントロール群で発現レベルはいずれも低値であった。

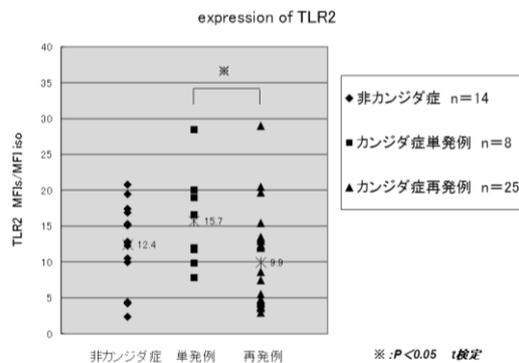


図 1 TLR2 発現レベルの比較

口腔カンジダ症群とコントロール群での TLR の発現レベルに差は認められなかったことから、TLR の機能に差があると推測し、サイトカイン産生能について比較検討を行った。その結果、口腔カンジダ症患者とコントロール群ともにリガンド濃度依存的なサイトカイン産生能の増加を認め、口腔カンジダ症群は非カンジダ症群よりも低い傾向を

認めたが、有意な差は認められなかった (図 2)。

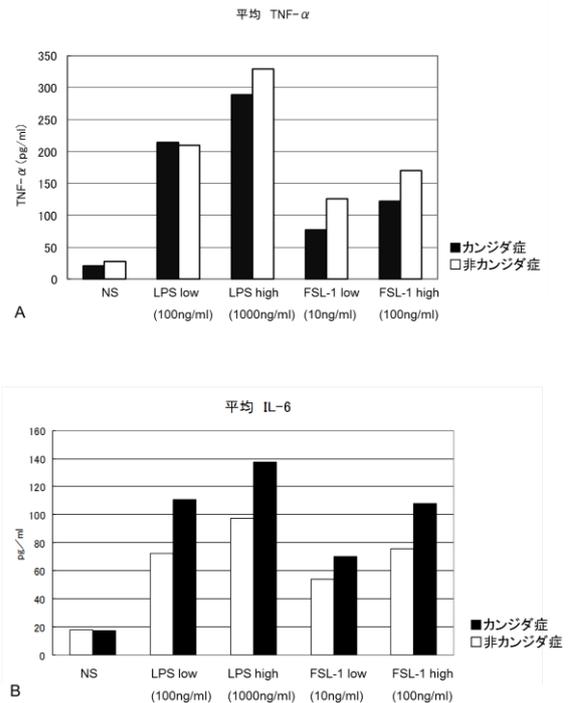


図 2 サイトカイン産生能の比較

(A : TNF- $\alpha$ 、B : IL-6 NS: not stimulate, リガンド濃度を低濃度・高濃度で刺激し、サイトカイン産生能を比較した。

#### 【結果】

1. 口腔カンジダ症はコントロール群と比較し、TLR2 の発現レベル、および TLR の機能において有意な差は認められなかった。

2. 難治性のカンジダ症では、単発性のカンジダ症と比して TLR2 の有意な発現低下が認められた。すなわち TLR2 は口腔カンジダ症の発症因子とはならないが、治療に対する抵抗性に関与している可能性が示唆された。

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6件)

- ① Associations between self-assessed masticatory ability and higher brain function among the elderly. Moriya S Hata H Journal of Oral Rehabilitation. Epub ahead of print(in press) 査読有 2011
- ② Relationships between perceived chewing ability and muscle strength of the body among the elderly. Moriya S Hata H Journal of Oral Rehabilitation Epub ahead of print(in press) 査読有 2011
- ③ 集学的治療におけるサポートシステム 歯科的サポート、秦 浩信、JOHNS、査読無、27(4) 619-623 2011
- ④ がん患者をサポートする口腔ケア 急性期の口腔ケア：頭頸部がんの場合 秦 浩信、DH Style、査読無、5 56-60 2011
- ⑤ Oral health care reduces the risk of postoperative surgical site infection in inpatients with oral squamous cell carcinoma. Sato J Hata H Support Care Cancer 査読有 19(3) 409-16 2010
- ⑥ 根拠がわかる口腔ケア：頭頸部がん・食道がん周術期の局所合併症とその対処 秦 浩信、がん看護、査読無、15 506-510 2010

[学会発表] (計2件)

- ① Hata H, A clinical study of patients with psychosomatic taste disorders The American Academy of Oral Medicine, 2011. Apr. 6 , San Juan Puerto Rico

- ② 後藤隼, 秦浩信, 口腔疾患を有する患者の末梢血単核球における Toll 様受容体の発現, 歯科基礎学会 2009.9.11 , 朱鷺メッセ 新潟)

6. 研究組織

(1)研究代表者

秦 浩信 (HATA HIRONOBU)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：70450830

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし