

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592217

研究課題名（和文） 口腔カンジダ菌の病原性獲得に関わる因子の検討ならびに抗菌ペプチドによるその制御

研究課題名（英文） Investigation of factors involved in the acquisition of pathogenicity of oral *Candida* species and their control by anti-microbial peptides

研究代表者

尾崎 登喜雄 (OSAKI TOKIO)

高知大学・その他部局等・名誉教授

研究者番号：70031995

研究成果の概要（和文）：口腔カンジダ症に対する新しい治療戦略を構築すべく口腔カンジダの病原性獲得に関連する因子を検討した結果、口腔カンジダの病原性獲得には唾液中のラクトフェリンやヒスタチン5などの抗菌ペプチドの減少が大きく関与していることが明らかとなった。この結果は、抗菌ペプチドが口腔カンジダ症の発症予防ならびに治療に有用である可能性を示唆しているものと思われる。

研究成果の概要（英文）：To establish a novel strategy for the control of oral candidiasis, we examined factors involved in the acquisition of pathogenicity of oral *Candida* species. We revealed that the acquisition of oral *Candida albicans* is induced by the decrease of salivary anti-microbial peptides such as lactoferrin and histatin 5. This result suggests that anti-microbial peptides are useful for prevention and treatment of oral candidiasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：口腔カンジダ症、病原因子、唾液、抗菌ペプチド

1. 研究開始当初の背景

口腔カンジダ症は、唾液分泌低下、抗菌薬・ステロイド剤の使用、癌化学療法、免疫抑制状態などを契機に発症し、口腔内に種々の病態を引き起こすことは周知のことである（尾崎ら、口科誌、39：982-992：1990）。口腔内のカンジダは口腔カンジダ症のみならず食道カンジダ症やカンジダ性肺炎の原因にもなり（Yamamoto T, et al. J Med Microbiol 54:493:2005）、近年、口腔ケアの重要性が叫ばれるようになってきているが、これとともに、アゾール系抗真菌剤に対して

の耐性を獲得したカンジダ菌の出現が真菌感染症の制御において問題となってきている。カンジダ菌は口腔の常在菌であり健常者の約30%の口腔内より検出されるが、通常、酵母状を呈するカンジダ菌には強い病原性はなく、酵母状形態から菌糸状形態に変化することにより強い病原性を発揮するようになるとされている。我々は、口腔カンジダ症の患者よりカンジダを分離した場合、健常者の口腔常在菌として分離した場合と比べ単に菌数が増加しているだけでなく、その病原性も有意に増強していることを報告して

いる(谷田ら、日口粘膜誌、12:115:2006)。しかしながら、常在菌であるカンジダ菌が口腔内のどのような因子によって酵母状から菌糸状に変化して強い病原性を発揮するようになるかについてはほとんど解明されていない。

一方、我々はこれまで薬剤耐性真菌の制御を目指して、唾液中の抗菌ペプチドならびにラクトフェリン由来の抗菌ペプチド(Peptide 2)について種々の検討も行ってきた(Ueta E, et al. J Lab Clin Med 136:66:2000, Tanida T, et al. J Oral Pathol Med 30:328:2001, Tanida T, et al. J Oral Pathol Med 32:586:2003, Ueta E, et al. J Peptide Res 57:240:2001, Tanida T, et al. Infect Immun 69:3883:2001, Okamoto T, et al. Clin Diag Lab Immunol 11:11:2004)。その中で、抗菌ペプチドと抗菌薬を併用すると、カンジダからATPが排出され、薬剤排出ポンプの1つであるCDR1のmRNA発現ならびに機能が抑制され、その結果、抗真菌剤の細胞内濃度は高く維持され、カンジダの抗真菌剤に対する感受性が増強することを明らかにした(Tanida T, et al. J Antimicrobiol Chemother 57:94:2006)。このことは、抗菌ペプチドの薬剤耐性真菌に対する有効性を示唆しているが、この抗菌ペプチドはカンジダの病原性獲得を阻害する作用を有している可能性があり、Peptide 2による口腔カンジダ症の発症予防という治療戦略が考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、カンジダの増殖能、付着能、プロテアーゼおよびホスホリパーゼ産生能、SAP活性、菌糸形成能、薬剤感受性といった病原性に及ぼす唾液(成分)、唾液中の好中球、常在一般細菌、口腔粘膜上皮からの液性因子等の影響を明らかにするとともに、カンジダの病原性に及ぼす抗菌ペプチド(Peptide 2およびHistatin 5)の影響を明らかにし、抗菌ペプチドの臨床応用に向けての安全性試験を行うこととした。

3. 研究の方法

健常人および口腔カンジダ症患者の舌背より粘膜剥離子を用いてスワビングした検体をクロモアガー培地で培養して菌種を同定するとともに、得られたコロニーをサブロー培地にて培養し、以下の検討に用いる。

(1) 増殖能および上皮細胞への付着能の検討

分離したカンジダの増殖能をサブロー培地を用いて検討する。これとともに、当科で樹立した不死化口腔粘膜上皮細胞(10^5 /mL)

をプラスチックプレート上で培養した後、カンジダ(10^7 /mL)を加え、 37°C で30分間、ローターの上でインキュベートする。その後、検鏡して付着した菌の数をカウントすることにより、付着能を検討する。

(2) プロテアーゼおよびホスホリパーゼ産生能の検討

得られたカンジダ菌のプロテアーゼ(PRT)およびホスホリパーゼ(PLP)産生能をそれぞれPolakおよびPriceらの方法によって検討する。

(3) 薬剤感受性の検討

カンジダのアムホテリシンB、イトラコナゾール、ミコナゾールおよびフルコナゾールに対する感受性を酵母様真菌感受性試験キットにて検討する。

(4) カンジダの遺伝子型の検討

CHROMagarにて*C. albicans*、*C. tropicalis*および*C. krusei*を同定するとともに、それ以外のコロニーについては、血液寒天培地およびAPI 20C AUX培地を用いて菌種を同定する(Phenotyping)。これらとともに一方では、カンジダ菌よりDNAを抽出し、DiversiLabシステムにてRep-PCR解析を行なうとともに、一部の菌では25S rRNAのPCRあるいはrDNAのITS1-5.8S-ITS2領域のシーケンスを行う(Genotyping)。

(5) カンジダの病原性に及ぼす唾液および抗菌ペプチドの影響についての検討

健常人および口腔カンジダ症患者より唾液を採取し、唾液中の抗菌蛋白レベルを検討するとともに、唾液および抗菌ペプチドでカンジダを処理し、その病原性に及ぼす唾液および抗菌ペプチドの影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 分離したカンジダのPhenotype

分離したカンジダ菌のPhenotypeは、*C. albicans*が59株(58.4%)、*C. glabrata*が26株(25.7%)、*C. tropicalis*が8株(8.0%)、*C. parapsilosis*が4株(4.0%)、*C. krusei*が2株(2.0%)、*C. guilliemondii*が2株(2.0%)であった。

(2) カンジダの増殖能および付着能

*C. albicans*および*C. glabrata*の増殖能および付着能は、有意に*C. albicans*の方が優れていた(結果は示さず)。

(3) カンジダのプロテアーゼ(PRT)およびホスホリパーゼ産生能

*C. albicans*はPRT活性およびPLP活性を

有していたが、*C. glabrata*はいずれの活性も有していなかった（図1）。

(4) 薬剤感受性

アムホテリシン B に耐性のカンジダは分離されなかったが、他の抗真菌剤に耐性のカンジダが9株分離され、そのうち8株は Non-albicans *Candida* 属であった。

(5) カンジダの遺伝子型（図2）

Rep-PCR 解析（カットオフ値：95%）による Genotyping の結果、分離されたカンジダは *C. albicans* の2群、*C. glabrata*、*C. tropicalis*、*C. parapsilosis*、*C. krusei*、*C. guilliemondii* の各1群の計7つのグループに分類された（図2）。図2の青で囲んだ *C. albicans* 4株とピンクで囲んだ *C. albicans* 2株の 25S ribosomal RNA を PCR にて解析した結果、ピンクで囲んだ *C. albicans* は *C. dubliniensis* であることが明らかとなった。

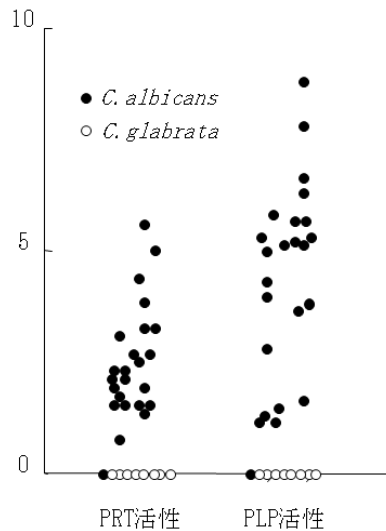


図1 カンジダの PRT および PLP 活性

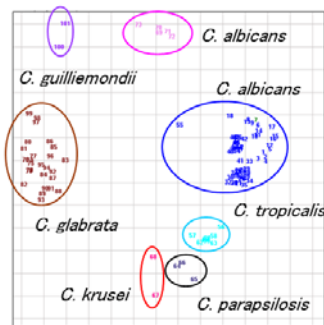


図2 Rep-PCR 法による分類

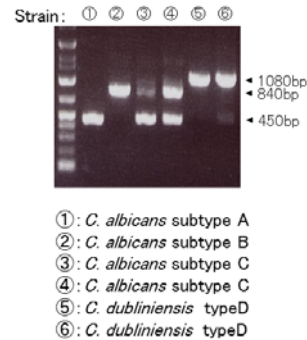


図3 25S ribosomal RNA の PCR 解析
①～④：図2の青で囲んだ *C. albicans* の4株、⑤および⑥：図2のピンクで *C. albicans* の2株

(6) カンジダの病原性に及ぼす唾液および抗菌ペプチドの影響

健康人および口腔カンジダ症患者より採取した唾液でカンジダを処理すると、カンジダの増殖能、付着能、PRT および PLP 産生能はいずれも抑制された。さらに、抑制率と唾液中の Histatin 5 レベルとの間に関連が認められた。

以上のことより、唾液中の Histatin 5 をはじめとする抗菌ペプチドがカンジダの病原性獲得を抑制しており、加齢や口腔乾燥症などによる唾液分泌低下により口腔内の抗菌ペプチドレベルが低下することによりカンジダの病原性が増強し、口腔カンジダ症が発症すると考えられた。したがって、口腔カンジダ症の発症予防ならびに治療に抗菌ペプチドが有用であるように思われる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計3件）

- ① 森下慶子、中村裕一郎、成川玄、高嶋まゆ子、竹内啓晃、杉浦哲朗、山本哲也、Repetitive-sequence-based PCR法を用いた口腔カンジダ菌のGenotypingに関する検討、第65回NPO法人日本口腔科学学会学術集会、2011年4月21日、タワーホール船堀、東京
- ② 森下慶子、Rep-PCR法による口腔カンジダのGenotyping、第21回日本口腔粘膜学会総会・学術集会（シンポジウム）（招待講演）、2011年9月24日、鹿児島大学・鶴陵会館（医学部同窓会館）、鹿児島
- ③ 森下慶子、成川玄、尾崎登喜雄、山本哲也、Repetitive-sequence-based PCR法を用いた口腔カンジダ菌のGenotypingに関する検討、第3回高知口腔科学研究会、2011年5月15日、高知医療センター

・黒潮ホール、高知市

[その他]

ホームページ:

http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_dntst/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 登喜雄 (OSAKI TOKIO)
高知大学・その他部局等・名誉教授
研究者番号: 70031995

(2) 研究分担者

杉原 一正 (SUGIHARA KAZUMASA)
鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号: 00117516

山本 哲也 (YAMAMOTO TETSUYA)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号: 00200824

上川 善昭 (KAMIKAWA YOSHIAKI)
鹿児島大学・歯学部・診療講師
研究者番号: 30332901

佐竹 秀太 (SATAKE HIDETAKA)
(H22のみ)

高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号: 10304685

森下 慶子 (MORISHITA KEIKO)
高知大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 10527584

(H22→H23)

北村 直也 (KITAMURA NAOYA)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号: 70351921

大野 清二 (OHNO SEIJI)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号: 40624995

(H24のみ)