

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593098

研究課題名(和文)高齢者の造血幹細胞移植における誤嚥性肺炎発症メカニズムの解明とその予防法の開発

研究課題名(英文)The elucidation and development of a prevention method of the aspiration pneumonia development-of-symptoms mechanism in elderly people's hematopoietic stem cell transplantation

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) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：異なる3種類の免疫抑制剤(プレドニゾロン、シクロスポリン、メトトレキサート)を用いた口腔カンジダ症モデルの作製を試みた。この結果、Candida albicansの舌塗布前日にプレドニゾロンによる免疫抑制処置を行ったマウスにおいて、感染後3日目に顕著な体重減少を認め、舌では10000オーダーの菌の定着とヒトの口腔カンジダ症に準ずる病変形成(びらん・潰瘍・白苔)がみられた。シクロスポリンAとメトトレキサートでは、薬剤の複数回接種および高用量接種も試みたが、いずれも病変形成に至らなかった。すなわち、この二剤はマウスにおける口腔カンジダ症のモデル作製には困難を有する薬剤である事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Production of the mycotic stomatitis model using three kinds of different immunosuppressants (prednisolone, cyclosporin, methotrexate) was tried. As a result, in the mouse which performed immune suppression disposal by prednisolone on the day preceding a tongue application of Candida albicans, remarkable weight loss was accepted three days after infection, and the pathological change formation (decomposition, an ulcer, and white moss) according to fixing of the bacillus of 10000 orders and human mycotic stomatitis was seen with the tongue. In the cyclosporin A and methotrexate, although two or more times inoculation and high-dose inoculation of a medicine were also tried, neither resulted in pathological change formation. That is, it was suggested that the cyclosporin A and methotrexate are difficult for model production of the mycotic stomatitis in a mouse.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会系歯学・老年歯科学

キーワード：口腔カンジダ症 Candida albicans 誤嚥性肺炎 炎症性サイトカイン 口腔ケア 抗菌ペプチド

1. 研究開始当初の背景

難治性の造血器系悪性腫瘍の治療法としての造血幹細胞移植が不可欠なものとなるなか、その適用は高齢者にも広まっているが、この有害事象の発現は化学的療法と比較して、極めて高頻度に起こる。この理由としては、大量の抗癌薬や全身に対する放射線治療が行われることに起因する。また、移植後の移植片対宿主反応の予防のための免疫抑制剤投与は口腔感染症のリスクを高め、これが高齢者を対象とした場合は、特に口腔内の衛生環境の悪化した患者が多いことから、口内炎の発症に結びつく例が多く、注意が必要である。高齢者の死亡原因の第一位を占める肺炎の多くは口腔内微生物の誤嚥由来のもので、高齢者の造血幹細胞移植に伴う口腔感染症とそれに続く誤嚥性肺炎の原因としては *Candida albicans* が重要である。*C. albicans* の口腔内常在率は加齢とともに増加し、感染防御能の低下を認める高齢者での口腔カンジダ症の発症頻度は高い。免疫抑制剤の投与により口腔内の粘膜を傷害する場合、*C. albicans* の口腔内における定着が一層促進され、カンジダ症の増悪や本菌の肺への移行が懸念される。我々はこれまで口腔カンジダ症に関する基礎研究を行ってきており、ヒト唾液中に分子量 50K 以上のカンジダ性剥離因子が存在し、その活性は加齢に伴い低下することを報告している。さらにマウスカンジダ症モデルを用いた実験で同剥離因子がカンジダ症発症を抑制する可能性を示した。この他、高齢者において、口腔内に常在する *C. albicans* に対する感染防御機構の破綻は、重篤な口腔カンジダ症発症の原因となる可能性をマウスの感染モデルにて証明した。この一方で、免疫抑制剤の一種であるメトトレキサートの低濃度量投与による肺炎の発症例(数%)が知られ、さらに本剤には口腔粘膜の傷害性の報告もある。したがって、口腔内に *C. albicans* が常在する高齢者への MTX 投与は、本剤による口腔粘膜傷害の影響も手伝い、重篤な口腔カンジダ症とそれに伴う誤嚥性肺炎を導く原因となることが考えられるほか、我々は、*C. albicans* がマウスの肺で強い炎症反応を惹起することをすでに報告している。

2. 研究の目的

高齢者の造血幹細胞移植に伴う免疫抑制剤の投与と微生物感染による口内炎および誤嚥性肺炎の発症に対する予防法を確立するために、その前段階として、種々の免疫抑制剤を用いて作製した口腔カンジダ症マウスを用いて、免疫抑制剤が口腔粘膜にどのような傷害をもたらす、それが *C. albicans* の口腔内での感染を如何にして増悪していくかを明らかにする。さらには、抗真菌薬を用いない安全な予防法を模索することを目的とする。

3. 研究の方法

**異なる三種の免疫抑制剤処置による口腔カンジダ症モデルの作製条件の設定**

(1) マウス

4 週齢の雌の ICR マウスは日本クレア株式会社(東京)より入手した。マウスは、搬入後すぐに3群に分け、自由給水ならびに自由給餌(MF Certified diet, オリエンタル酵母株式会社、東京)にて1週間の慣らし飼育を行い、5週齢に達したものを実験に供した。

(2) 各種免疫抑制剤の調整と接種法

プレドニゾロン; Pd

:プレドニゾロン注射液「KS」10mg/ml, 共立製薬株式会社, 東京

本薬剤は原液を接種する(調製不要)。マウスの体重別に、100mg/kg(中用量), 200mg/kg(高用量)相当量の薬液を非麻酔下でマウス背部皮下に接種する。

シクロスポリン A; CyA

:Cyclosporine A 50mg(粉末), 和光純薬工業株式会社, 東京

本粉末を予め1mlの100%エタノール(フィルター滅菌済)にて溶解したものをストック溶液(50mg/ml)とし、使用直前に生理食塩水にて50mg/kg(中用量), 100mg/kg(高用量)に調整したものを、非麻酔下でマウスの腹腔内に接種する。

メトトレキサート; MTX

:Methotorexate 100mg(結晶性粉末), 和光純薬工業株式会社, 東京

本粉末を、予め4mlの滅菌0.05M炭酸ナトリウム水溶液にて溶解したものをストック溶液(25mg/ml)とし、使用直前に生理食塩水にて100mg/kg(中用量), 200mg/kg(高用量)に調整したものを、非麻酔下でマウスの腹腔内に接種する。

(3) 免疫抑制処置

免疫抑制処置は、プレドニゾロン(Pd)・シクロスポリン(CyA)・メトトレキサート(MTX)の三剤について、中用量あるいは高用量の薬剤を単回接種(感染日前日に一回接種)あるいは複数回接種(感染日前日と感染日一日後の計二回接種)する場合の二種類の条件で検討した。

	中用量接種群		高用量接種群	
	100mg/kg/回(s.c.)		200mg/kg/回(s.c.)	
Pd接種群	単回接種	二回接種	単回接種	二回接種
	Pd100群	Pd100-100群	Pd200群	Pd200-200群
CyA接種群	50mg/kg/回(i.p.)		100mg/kg/回(i.p.)	
	単回接種	二回接種	単回接種	二回接種
	CyA50群	CyA50-50群	CyA100群	CyA100-100群
MTX接種群	100mg/kg/回(i.p.)		200mg/kg/回(i.p.)	
	単回接種	二回接種	単回接種	二回接種
	MTX100群	MTX100-100群	MTX200群	MTX200-200群

(4) *Candida albicans*

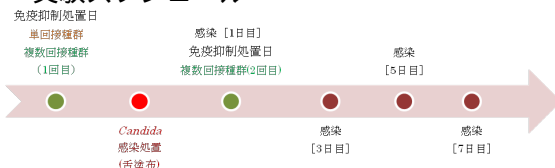
本施設で凍結保存している *C. albicans* OH-1 株は、カンジダ GS 培地(栄研化学株式会社、東京)に播種後、37 の好氣的条件下で培養を行った。24 時間後、全コロニーを白金耳にて回収し、生理食塩水に  $2.5 \times 10^9$

cells/ml となるように懸濁させたものを舌塗布用の調整菌液とした。

#### (5) 実験的マウス口腔カンジダ症モデル

マウスは4週齢の個体を搬入し、動物用実験施設にて一週間の慣らし飼育をおこなった後に実験に供した。5週齢に達したマウスは、*C. albicans* 感染日前日に、免疫抑制剤を接種し、その24時間後に2mg/mlのクロルプロマジンを大腿骨部に接種(i.p.)し、十分な鎮静状態が確認されたのちに、マウスの舌表面に*C. albicans*の調整菌液を浸み込ませた綿棒を数回這わせることにより感染処置を施した。複数回接種群では、感染処置をおこなった一日後に、再度一回目と同量の免疫抑制剤を接種(二回目)した。

#### <実験スケジュール>



#### (6) 採取臓器(舌・肺)のCFU算出

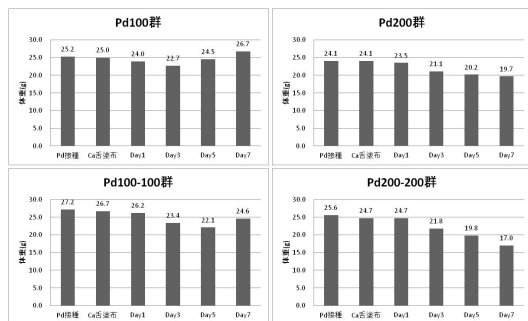
舌塗布(感染)日から1・3・5・7日後にマウスを頸椎脱臼により屠殺し、舌と肺(両肺)を採取した。臓器の肉眼観察および写真撮影の後、各々の臓器を1mlの生理食塩水中で十分にすり潰し、組織を懸濁させた。これを適宜希釈し、カンジダGS培地上に播種後、好気的条件下にて37℃で24時間培養し、培地上に形成されたコロニー数から臓器(舌・肺)当たりのCFUを算出した(平板希釈法)。

### 4. 研究成果

#### (1) 【プレドニゾロン；Pd接種群】

##### 体重変化

接種薬液量が最も少ない中用量単回接種のPd100群では、感染後3日目に体重減少のピークを迎え、感染後5日目にはすでに体重の回復がみられた。次に薬液の接種総量が同じ200mg/kgであるが、接種回数が異なるPd100-100群とPd200群の体重変化の比較をおこなったところ、両群ともに減少のピークはPd100群よりも延長し、Pd100-100群は感染後5日目、Pd200群では感染期間最長の7日目まで継続して体重減少がみられ、両群ともPd100群よりも体重の減少度が高かった。



最も接種薬液量が多かった高用量複二回接種のPd200-200群においても、7日目までの継続した体重減少が認められ、さらに本群の免疫抑制前と感染後7日目の平均体重の比較では、その差が-8.6gと、全群中最大量の体重減少を記録した。

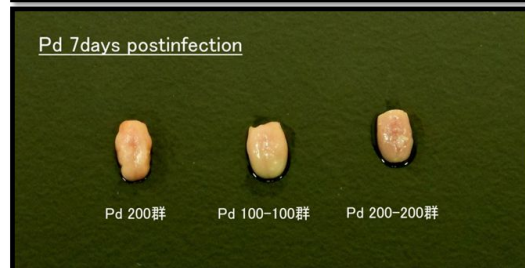
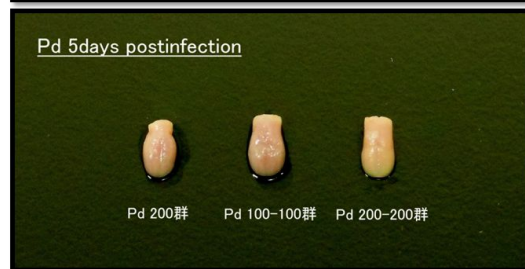
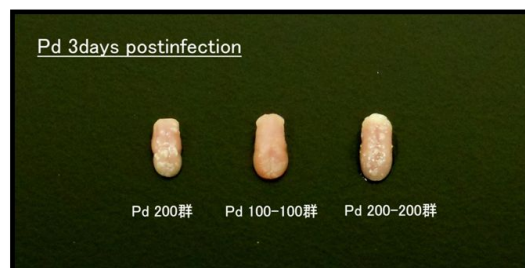
#### 病変形成(舌・肺)

中用量単回接種のPd100群では、感染後3日目の舌で病変形成がみられ、肺の病変は全群ともに確認されなかった。



舌表面の主要病変はびらんで、数か所で軽度の潰瘍形成がみられた。舌病変の形成された領域(分布)に大きな偏りはみられず、病変部は舌全体に分散して形成された。

より明瞭な病変形成を目的におこなった中用量二回接種、高用量単回接種、高用量二回接種の実験では、感染後3日目以降、全群の舌で病変の形成を認めた。

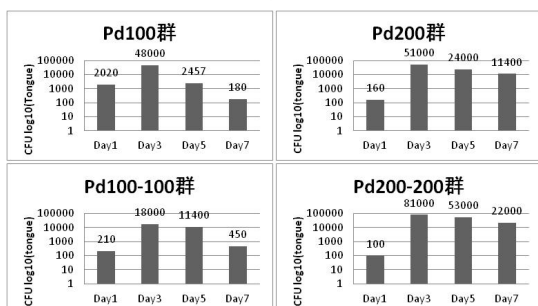


特に、高用量単回接種のPd200群および高用量二回接種のPd200-200群では重篤な病変形成[舌全体におけるびらんと多数の潰瘍形成]を認めた。中用量二回接種のPd100-100群においても病変[びらんおよび舌の一部で軽度の潰瘍形成]を認めたが、薬剤の接種総量が同じであるPd200群と比較すると、病変は非常に軽症であった。Pd接種群における体重の減少度は、薬液の接種量が多く、また接

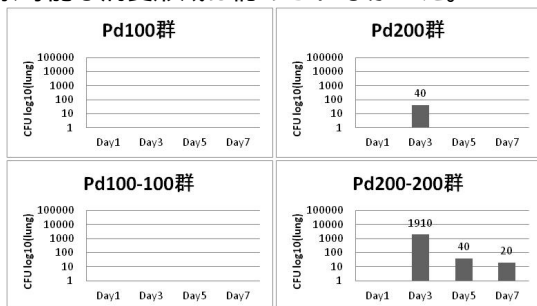


種回数が多く高い傾向を示した。

舌・肺の臓器当たりの感染菌量 (CFU)  
 プレドニゾロン接種群の個体すべての舌において、感染後 1 日目 ~ 7 日目までの観察日全日で *C. albicans* の定着を認めた。臓器当たりの菌量 (CFU) は全群ともに感染後 3 日目が最も多く、同日の舌の菌量は全群が  $10^4$  オーダーを満たしていた。さらに、感染後 3 日目以降も、Pd100-100 群は感染後 5 日目まで、Pd200 群と Pd200-200 群では感染後 7 日目まで  $10^4$  オーダーの菌数を維持していた。プレドニゾロン接種群では、臓器中の菌の定着量は、病変形成の重症度に密着に関わっており、肉眼的に観察可能な舌病変が形成された個体では、臓器あたりの菌数は必ず  $10^4$  オーダーを満たしていた。



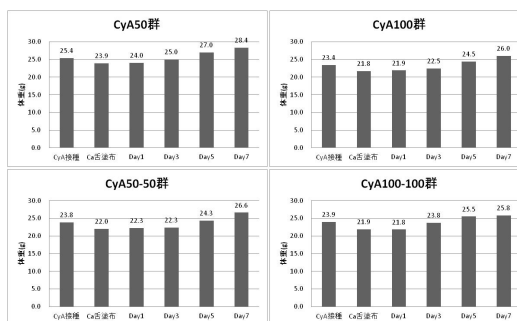
特記すべき所見として、全薬剤接種群のうち、Pd200 群の感染後 3 日目と Pd200-200 群の感染後 3~7 日目においてのみ、肺における菌の定着がみられた。しかし、いずれの肺も菌量は  $10^3$  オーダーを超えず、肉眼的に観察可能な病変形成は認められなかった。



## (2) 【シクロスポリン ; CyA 接種群】

### 体重変化

シクロスポリン接種群は、他の薬剤群と比較して体重減少が非常に早くはじまるが、その回復も早く、プレドニゾロン接種群の体重減少のピークである感染後 3 日目には体重が緩やかに増加し始め、さらには全観察期間を通しての体重の減少量は他の薬剤接種群と比較すると概して少ないのが特徴である。また、本群では、薬剤の接種用量および接種回数が個体の体重変化にほとんど影響しないという特徴も示された。

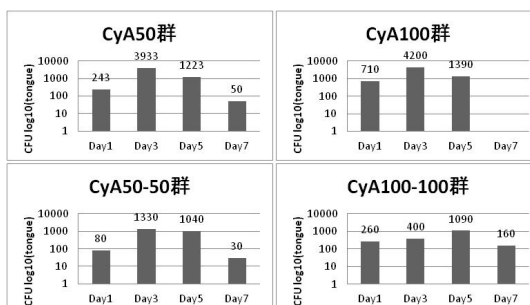


### 病変形成 (舌・肺)

シクロスポリンA接種群の全ての個体で、舌・肺ともに肉眼的に観察可能な病変形成は観察日全日を通して認められなかった。

### 舌・肺の臓器当たりの感染菌量 (CFU)

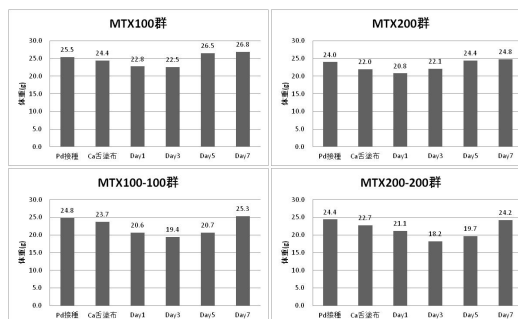
シクロスポリンA接種群の全個体において、菌の定着は舌のみで認められ、肺への菌の定着はみられなかった。また、全個体の舌で  $10^3$  オーダーを超える菌の定着は認められなかった。



## (3) 【メトトレキサート ; MTX 接種群】

### 体重変化

メトトレキサート接種群の個体では、薬剤の体重減少に対する反応性が高い傾向を示し、体重の減少度は、接種する薬剤の総量よりも、むしろ接種回数に依存した (単回 < 二回)。すなわち、同量の薬剤を接種する場合は接種回数を増やすことで、より体重が減少し、さらに体重の減少期間も延長する傾向を示した。

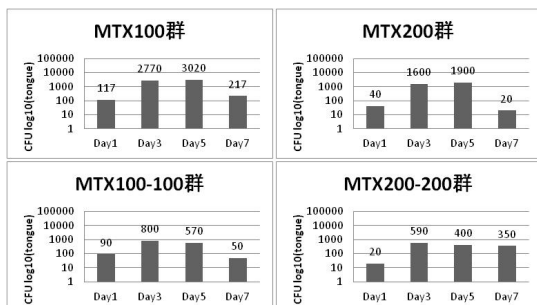


### 病変形成 (舌・肺)

メトトレキサート接種群では、個体の体重減少に対する反応性が強い傾向が示されたが、体重の減少度は病変形成の強度には反映されず、観察日全日を通して、実験群のすべ

で舌および肺における病変は確認されなかった。

舌・肺の臓器当たりの感染菌量 (CFU) メトトレキサート接種群の全個体において、観察日全日を通した菌の定着は舌のみでみられ、肺における菌の定着は認められなかった。また、舌の定着菌数はすべての群で  $10^3$  オーダーを超えることはなかった。



## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

清浦有祐・口腔カンジダ症マウスモデルにおける免疫抑制剤の影響・日本老年歯科医学会第 24 回学術大会・2013 年 6 月 6 日・大阪国際会議場  
蜂谷真也・口腔カンジダ症マウスモデルを使用した新たな抗真菌薬感受性試験法の開発・第 22 回日本歯科医学会総会・2012 年 11 月 10 日・大阪国際会議場

〔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

( )

研究者番号：

### (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

菅又 美穂 (SUGAMATA, Miho)

研究者番号：70530377

(平成 23 年度まで)