

## 【要約】

*Enterococcus faecalis* (EF2001) と *Candida albicans* (TIMM1768) との *in vitro* の培養実験とマウス口腔カンジダ症モデルで *in vivo* の舌の白苔形成に対する EF2001 の効果を検討した。

結果として、2種の混合培養では EF2001 が濃度依存的に *C. albicans* 発育菌糸を取り囲むように付着してプラスチック培養器から菌体を培地中に剥がして浮かす作用が見られた。この際に *C. albicans* 細胞は生きた状態であったことから、EF2001 死菌は強い殺菌能はないが、*C. albicans* の粘膜組織への吸着を防ぎ、バイオフィルム形成や基盤（義歯など）への付着を阻止する可能性が示唆された。*in vivo* でマウス口腔カンジダ症モデルに EF2001 死菌を投与したところ、舌の感染症状を改善する結果が得られた。その際 EF2001 を投与したマウスでは *C. albicans* 侵入粘膜下層で、強い好中球浸潤が見られた。これらの結果は、EF2001 が免疫不全患者で、過増殖する *C. albicans* に直接結合し、その病原性を低下させると共に、少なくとも口腔では局所防御力を増強し、*C. albicans* の組織侵入を阻止することを示したといえる。今後、更に腸管内等でも EF2001 が微生物フローラの正常化に寄与していくのか否かを検討することが必要を思われる。

## [目的]

*Enterococcus faecalis* EF2001 (EF2001) は、すでに広く免疫能の低下した人々に利用されており、免疫力の回復がおこることは経験的に知られている。また、動物実験レベルでその経口摂取が免疫力を回復させることが報告されている。

その免疫力回復のメカニズムとしては本菌体が直接腸に付随する免疫機構 (GALT) を刺激する経路が推定されているが、別な考え方として消化管の微生物環境を正常化することにより、免疫力を回復させるという経路もありうると考えられる。ここでは、加齢ないし、抗生物質の投与、生体防御機能の低下によって増殖し、時として消化管粘膜に定着・侵入する *Candida albicans* に焦点を絞り、その菌の発育形態、更には、粘膜感染のモデルとして、舌表面での侵入をおこす口腔カンジダ症に対する EF2001 の経口摂取の影響を検討した。

本研究では EF2001 が腸球菌ということを踏まえて、免疫機構の最前線の皮膚に連なり、また腸とも連結している口腔内粘膜組織へのカンジダ菌の感染を予防・治療する効果について *in vitro* で解析するとともに、*in vivo* での予防・治療効果を口腔カンジダ症マウスモデルによって解明することを目的とした。

カンジダ菌 (*Candida albicans*) はヒトの常在真菌であり、病原性を示すのは菌糸形発育した本菌であるが、病状悪化の際には舌の上で菌糸が絡みあうように増殖してバイオフィルムを形成する。EF2001 は予備実験的に *C. albicans* と混合培養したところ、*C. albicans* 細胞表面に吸着する性質が見られたので、その結果から推察すると、*C. albicans* 菌糸を取り囲むように付着して *C. albicans* の粘膜組織への吸着を防ぎ、バイオフィルム形成などを阻止する可能性、また、*C. albicans* の菌糸が基盤（義歯など）に付着するのを阻止する可能性が示唆される。本研究では *in vitro* で EF2001 あるいはその抽出成分と *C. albicans* との相互作用を解明するとともに、実際にマウスモデルを用いて EF2001 とその抽出成分の口腔カンジダ症の予防治療効果を確かめたので報告する。

## [研究項目・材料と方法]

### 1. EF2001 の *Candida albicans* TIMM1768 の菌糸形発育に対する効果を *in vitro* の実験系で解析する

*Candida* 菌糸形発育阻止試験を行う。抗生物質含有培地 (1/3 RPMI1640 +FCS) で EF2001 を 30mg/ml～0mg/ml の濃度で 2 倍連続希釈し、そこに *C. albicans* を  $10^4$  cells/well となる様に加えて培養し、3 時間後の菌糸発育阻止効果、または  $5 \times 10^2$  cells/well となる様に加えて培養し、20 時間後の菌糸発育阻止効果を目視、顕微鏡による観察、クリスタルバイオレット染色法

による 620nm の吸光度の測定によって解析する。これによって EF2001 と *C. albicans* が同時に存在する条件における *C. albicans* 菌糸形発育阻止能の有無が解析できる。

## 2. EF2001 の *Candida albicans* TIMM1768 によるマウス舌への感染に対する予防、治療効果を *in vivo* の実験系で解析する

まず *C. albicans* がマウス口腔内で増殖定着する条件下で、EF2001 をあらかじめ *C. albicans* と混合し、それを同時に口腔内接種することで口腔カンジダ症発症に対しての予防的効果があるかどうかを検討する。

実際には、菌接種は次ページの実験計画（図 1）に示すように行う。接種前に 1 週間予備飼育を行った ICR 実験時 6 週齢雌マウスに、テトラサイクリン(15mg/ml)を添加した飲料水を与える (Day-2～Day-1 : 1 日間)、口腔内の他の細菌類を除き、前日に EF2001 を経口投与する (Day-1)。それと同時に、免疫抑制剤のプレドニゾロン(100mg/kg)を皮下注射し、感染症に対するマウスの免疫力を抑えることによって、*C. albicans* に対して易感染状態にする (Day-1)。次に、Day0 でクロルプロマジン(14.4mg/kg)を筋肉注射し鎮静させ、また、その薬理作用で口腔内の唾液の分泌を抑え、*C. albicans* 液( $2 \times 10^8$ cells/ml)を綿棒でマウス舌に塗布し感染させる (Day0)。接種菌液の調製は表 1 のように行い、*C. albicans* を EF2001 と混合し、1 時間 37°C で保温し、それを接種菌液とした実験群を作る。感染前 24 時間、3 時間および、感染後 3 時間、24 時間、27 時間の計 5 回、各濃度の EF2001 と対照として Saline を  $50 \mu l/mouse$  ゾンデで経口投与する。感染 2 日後に舌のカンジダ感染の程度をスコアで評価する。また、炭酸ガス吸入で殺処分した直後に、舌表面を綿棒で擦り、舌の *C. albicans* を回収する (Day2)。これらの回収液を希釈し、生菌数を寒天培地上での colony forming unit (CFU) として測定する。舌のスコアと生菌数から EF2001 の効果を判定する。

## [結果]

1. EF2001 の *Candida albicans* TIMM1768 の菌糸形発育に対する効果を *in vitro* の実験系で解析した。

(1). EF2001 は *C. albicans* の発芽管形成時の基盤への接着を抑制した。

96 穴の培養容器に酵母形のカンジダと EF2001 を入れて 3 時間培養した。

EF2001 が 3.75mg/ml 以上の存在下では培養容器中に観察されるカンジダが減少している。

図 2

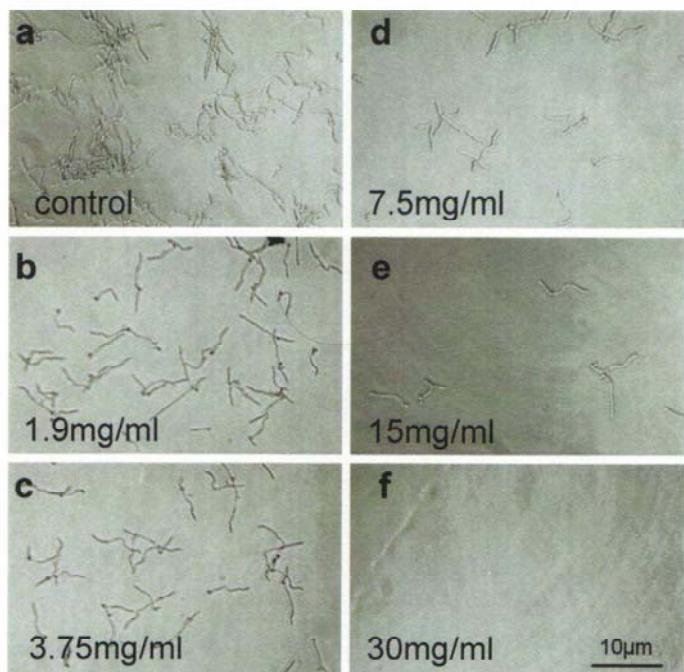


図 3

CV 染色によって定量化した。培養器内の染色量が EF2001 の濃度依存的に減少した。

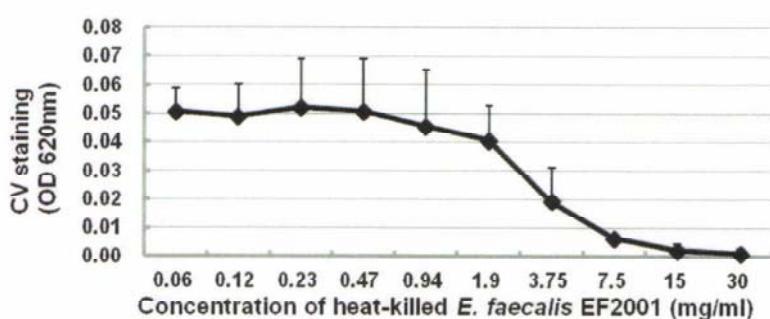
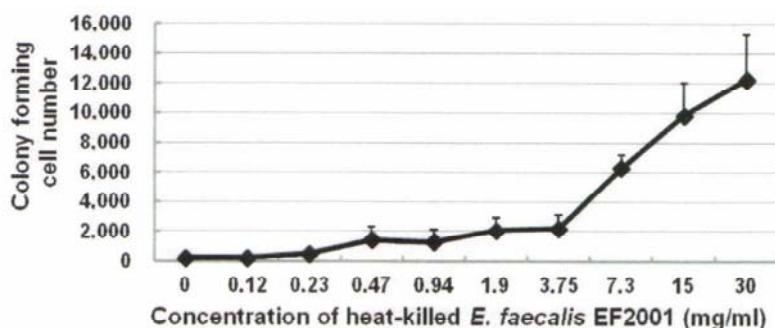


図 4

また逆に培養上清中に浮き上がってきたカンジダ細胞は増加した。

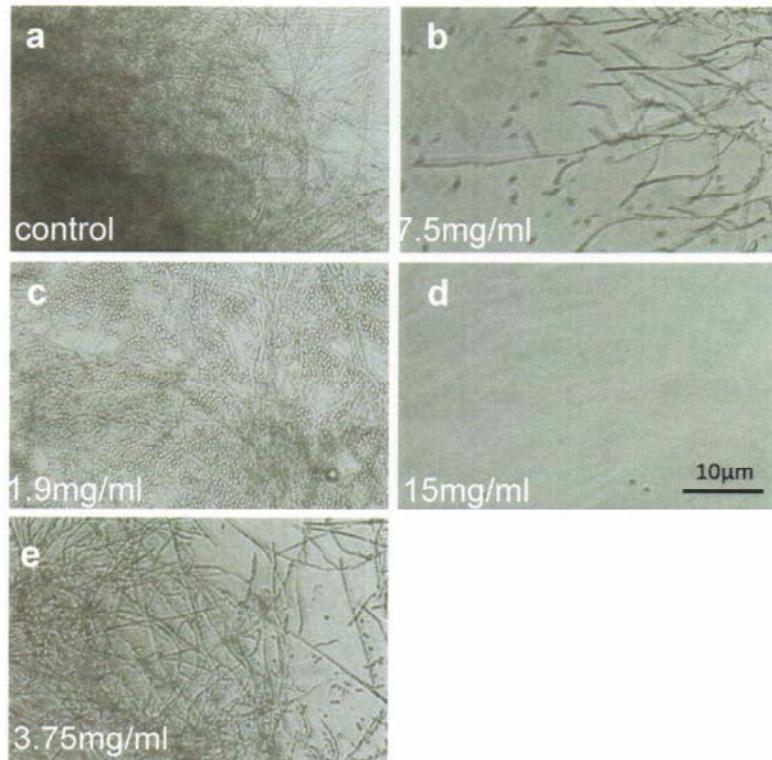


(2). EF2001 はその後の *C. albicans* の菌糸形発育の際にも基盤への付着を抑制した。

96 穴の培養容器に酵母形のカンジダと EF2001 を 16 時間 培養した。

観察される菌糸の量は、EF2001 が 3.75mg/ml の濃度以上で顕著に減少しているのがわかる。

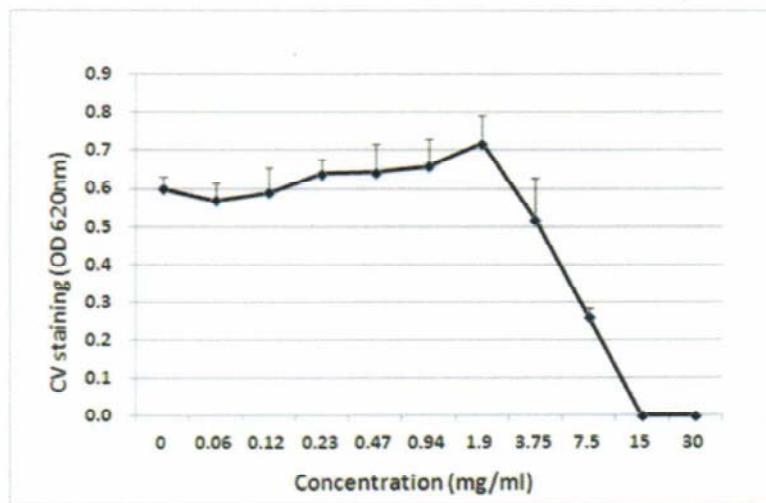
図 5



(3). EF2001 による菌糸形 *C. albicans* の基盤への付着抑制効果を CV 染色法で定量化した。

CV 染色法によって 96 穴培養プレート上のカンジダ菌糸量の変化を調べたところ、3.75mg/ml 以上の EF2001 存在下で濃度依存的に染色量が減少した。これは、プレートから菌糸が剥がれたことによる。

図 6

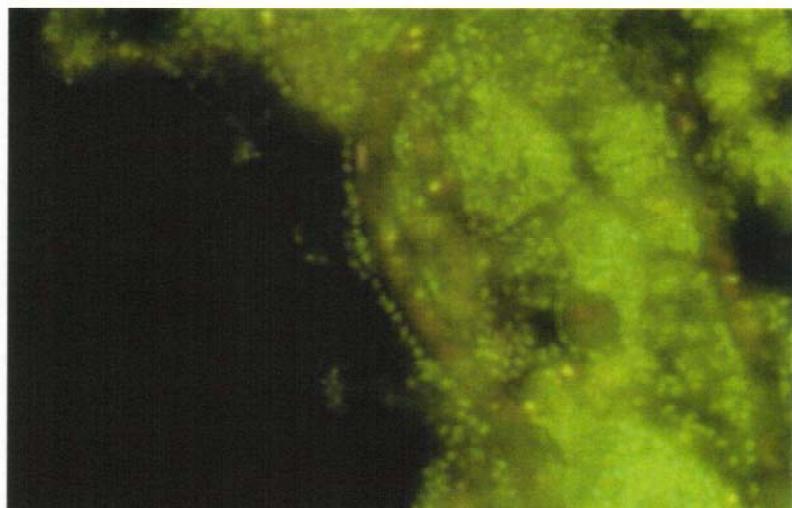


(4). 基盤から剥がされた菌糸形 *C. albicans* は生きていた。

EF2001 に付着され、培養器から剥がれたカンジダ菌糸に対して FUN1 染色法によって生死の判定をした。

その結果、菌糸形のカンジダ細胞内部に赤い色素の結晶が観察されたことから菌糸形のカンジダ細胞は生きて代謝機能を保持した状態であることが明らかである。

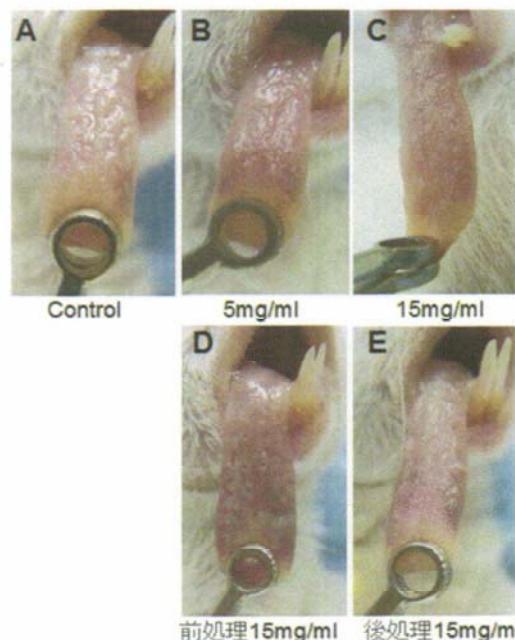
図 7



2. EF2001 の *Candida albicans* TIMM1768 によるマウス舌への感染に対する予防、治療効果を *in vivo* の実験系で解析する

(1) EF2001 は *C. albicans* 接種 48 時間後のマウス症状を改善した

図 8



対照実験(A)で観察されるようにカンジダ接種 48 時間後の舌表面は白く盛り上がったカンジダの塊(白苔)が観察されるが、EF2001 投与群ではその白苔形成が抑制されている。

(2) EF2001 は舌症状のスコアでも有意に抗カンジダ効果を示した。

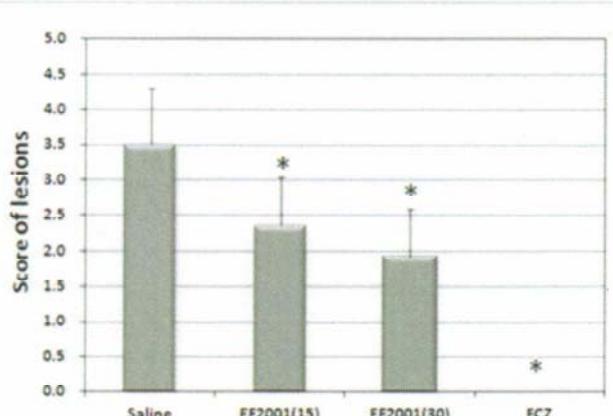
舌症状をその白苔の占める面積と量から判断してスコア化した。その結果、EF2001 の 15mg/ml および 30mg/ml で有意にスコアの改善が示された。

#### 舌症状のスコアの基準

- 0: normal
- 1: fur in less than 20%
- 2: fur in more than 21% but less than 90%
- 3: fur in more than 91% and on the squamous layer
- 4: thick fur in more than 91% and on the squamous layer.

また、カンジダ感染 48 時間に舌表面から白苔を綿棒でかきとり、生細胞数を CFU で表現した。その結果、CFU でも 15mg/ml および 30mg/ml で有意に舌表面のカンジダ菌の減少を示す結果が得られた。

(A)



(B)

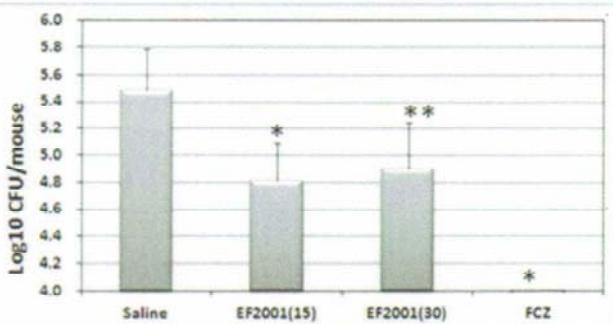
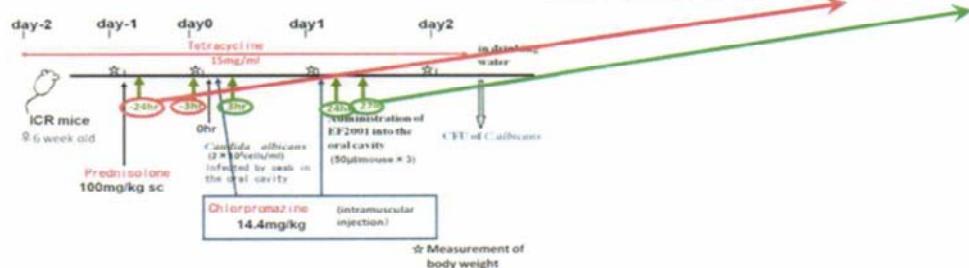
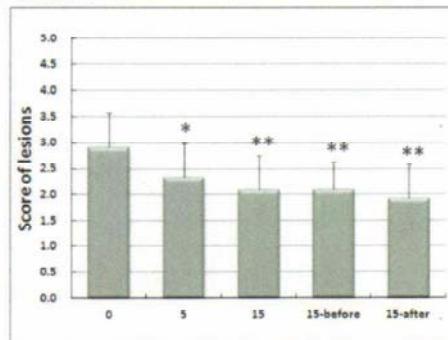


図 9

(3) EF2001 はカンジダ感染に対して予防・治療効果を示した。

カンジダ接種前の 2 回だけ 15mg/ml の EF2001 投与群 (15-before) とカンジダ接種後の 3 回だけ 15mg/ml の EF2001 投与群 (15-after) について 48 時間後の舌表面の白苔形成のスコアを比較して見るとどちらの場合も全 5 回投与した場合と同様の抑制傾向を示した。

図 10

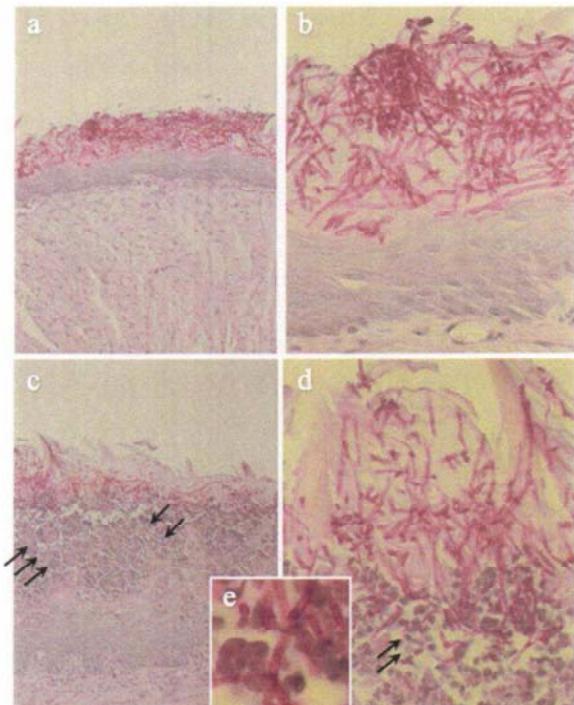


(4) EF2001 投与マウスの舌組織像 (PAS 染色) では、舌表面のカンジダは減少し、好中球の浸潤が見られた。

図 11

a, b; EF2001 無投与マウス  
(対照) の PAS 染色像

c, d; EF2001 投与マウスの  
PAS 染色像



#### [結果のまとめと考察]

1. *C. albicans* 培養液中に EF2001 加熱死菌体を添加すると *C. albicans* 菌糸周囲に EF2001 細胞が付着して培養容器などの基盤への菌糸の付着を抑制した。また、その際に剥がされた *C. albicans* は生細胞であった。
2. マウス口腔カンジダ症モデル実験でも EF2001 は舌症状の有意な改善を示し、舌から綿棒でかき取ったカンジダの CFU 値も有意に減少傾向を示した。
3. 舌組織の PAS 染色像から EF2001 投与により舌表面からは *C. albicans* 菌糸が除去され、舌乳頭の間の部分に残った菌糸周囲に好中球の強い細胞侵潤がみられ、EF2001 が宿主免疫応答を増強することが示唆された。

以上の結果から、EF2001 による舌でのカンジダ感染阻止効果は EF2001 による宿主免疫系の活性化と、直接カンジダ菌糸に付着して感染を阻止する 2 通りの作用機作によって予防・治療効果が出ている可能性が示唆された。この作用が、腸管でも認められるるとすると EF2001 免疫増強メカニズムとして、新しい経路の存在を証明することとなり、意義深いと考えられる。

#### [参考としてカンジダに関する知見と背景]

人体の臓器の中で皮膚の占める割合は非常に大きく、感染防御の最も外側に

位置する機能であり、健常人でもアセモやオムツかぶれなどの皮膚疾患に悩まされることも多々ある。このような皮膚疾患にはしばしばカンジダ菌をはじめとする真菌の感染が関与していることがある。また、がん患者や高齢者などで、口腔からの食餌ができない場合や、免疫能が衰えた場合などに口腔粘膜に口腔カンジダ症を併発する場合がしばしば見られる。これらのカンジダ菌は健常な状態でも腸内に常在するが、酵母形のものが非常に少量存在するのであって、免疫能の弱った状態の粘膜組織でしばしば見られる病原性の高い菌糸形とはまた状態が異なる。

宿主内で複数の菌が共存する環境下では、しばしば複数の菌による複合型のバイオフィルムを形成して菌同士が病原性を高め合う場合と、逆に抑制し合う場合が報告されている。非常に高い病原性を持つ菌に対して、宿主にとって害の少ない菌を添加することによって、他方の菌の病原性を押さえ込むのがプロバイオティクスの一つの考え方であるが、乳酸菌はプロバイオティクスとしての効果を兼ね備えた菌を多く含む菌群である。さらに、その中でも *Enterococcus faecalis* はその能力の高さについて数々の報告を得ている。

## [参考文献]

1. CJ Seneviratne, L Jin, LP Samaranayake (2008) Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Diseases*, 14; 582-590.
2. Parisa Badiiee, Abdolvahab Alborzi, Mohammad Ali Davarpanah, Elaheh Shakiba (2010) Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species from mucosal sites in HIV positive patients. *Archives if Iranian Medicine*, 13 (4); 282-287.
3. Kamagata-Kiyoura Y, Abe S, Yamaguchi H and Nitta T (2003) Detachment activity of human saliva in vitro for *Candida albicans* cells attached to a plastic plate. *J. Infect. Chemother.* 9: 215-220.
4. Yusuke Kamagata-Kiyoura and Shigeru Abe (2005) Recent studies on Oral candidiasis using a murine model. *J. Oral Biosci.* 47(1): 60-64.
5. Takakura N., Sato Y., Ishibashi H., Oshima H., Uchida K., Yamaguchi H. and Abe S (2003) A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol. Immunol.* 47; 321-326.
6. T. Hisajima, H. Ishibashi, T. Yamada, Y. Nishiyama, H. Yamaguchi, K. Funakoshi, S. Abe (2008) Invasion process of *Candida albicans* to tongue surface in early stages of experimental murine oral candidiasis. *Medical Mycology* 46; 697-704.
7. 羽山和美、石橋弘子、北館健太郎、山崎正利、安部茂。 口腔カンジダ症に対するOligonolの効果。 *Jpn. J. Med. Mycol.* 51, 137-142 (2010)
8. Tatsuya Hisajima<sup>1,2</sup>, Naho Maruyama<sup>1</sup>, Yuko Tanabe<sup>3</sup>, Hiroko Ishibashi<sup>1</sup>, Tsuyoshi Yamada, Koichi Makimura, Yayoi Nishiyama, Kengo Funakoshi, Haruyuki Oshima and Shigeru Abe (2008) Protective effects of farnesol against oral candidiasis in mice. *Microbiol Immunol* 52: 327-333.
9. 安部茂 (2004) マウス口腔カンジダ症モデルの開発とその応用。 *Jpn. J.*

Med. Mycol., 45; 227-231.

10. Gu Y-H, Iwasa M, Iwasa H, Kobayashi K, Itokawa Y & Ishida T (2007) Radiation protection effect for EF2001 (*Enterococcus faecalis* 2001). *Med Biol* 151: 289-294.
11. Yuuki Taguchi, Toshio Takizawa, Hiroko Ishibashi, Takehito Sagawa, Ryo Arai, Shigeharu Inoue, Hideyo Yamaguchi, Shigeru Abe (2010) Therapeutic effects of murine oral candidiasis by oral administration of Cassia (*Cinnamomum cassia*) Preparation. *Jpn. J. Med. Mycol.* 51, 13-21.
12. Ishijima SA, Hayama K, Takahashi M, Holmes AR, Cannon RD & Abe S (2012a) N-acetylglucosamine increases symptoms and fungal burden in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol* 50: 252-258.
13. Ishijima SA, Hayama K, Burton JP, Reid G, Okada M, Matsushita Y & Abe S. (2012b) Effect of Streptococcus salivarius K12 on the *in vitro* growth of *Candida albicans* and its protective effect on the oral candidiasis model. *Appl Environ Microbiol* 78: 2190-2199.

第 85 回日本細菌学会総会（2012 年 3 月 27～29 日、長崎）で報告した。

P-172

### Enterococcus faecalis 加熱死菌体によるマウス口腔カンジダ感染の抑制効果について Heat-killed Enterococcus faecalis inhibits oral candidiasis in mice

石川早苗、羽山和美、二宮健太郎、安部茂（帝京大学医療衛生研究センター）  
Sayaka Ishikawa, Kiyomi Hayashi, Kenichi Miyake, and Motoyuki Ando  
(Teikyo University Institute of Medical Mycology)

（会員外特別研究者）酒井正典、日本ペルム株式会社  
Masayuki Sakai (Non-member), Nippon Permutt Co., Ltd.

**Abstract**  
*In vitro*実験の結果  
1. E. faecalis死菌体がマウス口腔カンジダの増殖抑制効果を有する。  
*In vivo*実験のスケジュール  
*In vivo*実験の結果  
研究の背景と目的  
口腔カンジダは世界中の多くの原因細菌であり、口腔内に定着するが、医療施設の創作などでの問題で有効な治療法がない。また、歯科疾患がある。そして口腔カンジダ症は患者の多くをもつ。さらに、歯科疾患は手に心配や意図としての歯内カンジダ症をもつていて、その他の歯科疾患に対するE. faecalis死菌体の効果を検討する。そこで、E. faecalis死菌体の効果を検討していきたい。私たちの歯科疾患に対するE. faecalis死菌体の効果を検討していきたい。  
今回の主な目的は口腔カンジダ症の治療について研究したいと想定する。

**方法概要**  
◎*in vitro*実験  
1. *Candida albicans* Open tube型成形に対するE. faecalis死菌体の効果を検討した。  
2. *Candida albicans* の子孫菌株を用いて検討する。  
◎*in vivo*実験  
1. 本研究対象はのE. faecalis死菌体による口腔内カンジダ症をもつたマウスである。  
2. 本研究対象はのE. faecalis死菌体による口腔内カンジダ症をもつたマウスである。  
◎結果  
1. *E. faecalis*死菌体がマウス口腔への増殖抑制効果を示す。  
2. *E. faecalis*死菌体がマウス口腔への増殖抑制効果を示す。  
3. *E. faecalis*死菌体がマウス口腔への増殖抑制効果を示す。  
4. *E. faecalis*死菌体がマウス口腔への増殖抑制効果を示す。  
5. *E. faecalis*死菌体がマウス口腔への増殖抑制効果を示す。  
6. *E. faecalis*死菌体がマウス口腔への増殖抑制効果を示す。  
7. *E. faecalis*死菌体がマウス口腔への増殖抑制効果を示す。  
8. *E. faecalis*死菌体がマウス口腔への増殖抑制効果を示す。  
9. *E. faecalis*死菌体がマウス口腔への増殖抑制効果を示す。  
10. *E. faecalis*死菌体がマウス口腔への増殖抑制効果を示す。

論文投稿準備中。