原 著

免疫抑制剤 cyclosporin A を用いたマウス口腔カンジダ症 持続感染モデルの確立

佐藤 洋介¹⁾ 田 中 彰²⁾ 又 賀 泉^{1,3)}

抄録：これまでの副腎皮質ステロイド薬を用いた口腔カンジダ症実験モデルにおいては、口腔カンジダ症が発症しても短期間で自然治癒することから、経時的な変化を観察することは困難であった。そこで、本研究では免疫抑制剤 cyclosporin A（以下 CyA）投与下にカンジダを持続感染させたマウスモデルを作製し、経時的な所見について検討した。菌接種前後に計4回 CyA を投与し口腔内を観察した。舌組織を採取して二分し、半側で菌定着数を調べ、もう半側で病理組織標本を作成して、菌糸の侵入状況、上皮層厚を測定した。菌定着数は菌接種5日目が多く、以降徐々に減少し11日目で概ね検出されなかった。病理組織学的所見では、5日目で角質層内に菌糸と上皮層の肥厚が認められ、菌糸がほとんど見られなくなった11日目においても上皮層の肥厚は残存していた。この口腔カンジダ症持続感染モデルでは、経時的な上皮の組織変化と定着菌数の変化の評価が可能で、本モデルの有用性が示唆された。

キーワード：口腔カンジダ症、実験モデル、マウス、シクロスポリン、上皮変化

緒 言

カンジダ症は、悪性腫瘍に対する化学療法や放射線治療、AIDSなどのウイルス感染、さらに生体侵襲の大きな手術や臓器移植における免疫抑制剤などの投与によって生じる免疫機能が低下した生体において、カンジダ菌種の増殖により発症する日和見感染症であると考えられている¹⁾。通常カンジダ症の病理組織学的診断は、擦過して得られた組織や生検および剖検において採取された組織中に菌を確認し、かつ菌の組織への侵入像を確認することで診断がなされている。口腔カンジダ症における粘膜の特徴として粘膜面に白色調の偽膜付着が認められ、これらの偽膜を剥離すると赤色調の局面が観察され、組織学的にこれらの偽膜は扁平上皮細胞、カンジダ菌、好中球、壊死物質などが混在している。そして通常カンジダ菌糸は、粘膜深層まで侵入することではなく、角化層までとされている。マウス口腔カンジダ感染モデルにおける舌の病理組織像では *Candida albicans*（以下 *C. albicans*）が角化層深部までは侵入することが判明しているが、顆粒層への侵入は現在まで確認されていない²⁾。しかし口腔カンジダ症の中でもまれに、粘膜上皮のびらんやアフタ様潰瘍の形成、上皮層の肥厚（慢性肥厚性カンジダ症）や上皮異形成を呈することもあり、*C. albicans* による組織障害のメカニズムの解明が必要で

ある。

そこで今回、*C. albicans* による口腔粘膜上皮への組織障害のメカニズムを明らかにするため、カンジダ症実験モデルを作製した。従来の口腔カンジダ症実験モデル³⁾においては、口腔カンジダ症が発症しても短期間で自然治癒することから、経時的な粘膜変化を観察することは困難であった。そこで今回は免疫抑制剤である cyclosporin A（以下 CyA）投与下に *C. albicans* を持続感染させたマウスモデルを作製し、経時的な所見について観察した。

材料および方法

1. 材料および口腔カンジダ症モデルの作製方法

1) マウス口腔カンジダ症モデルの作製

マウスは7週齢雄 ddY 系統（紀和実験動物研究所、和歌山）を用いた。菌は本学先端研究センター所有の中で事前にプロテアーゼ産生能試験⁴⁾、ホスホリパーゼ産生能試験⁵⁾を行い、活性がともに高いと判定された *C. albicans* (IFM40009: ATCC48130) を用いた。実験群マウスは免疫抑制および口腔カンジダ症の発症状態を維持するために、*C. albicans* 菌接種前日より CyA（Santa Cruz Biotechnology, California）投与を 100mg/kg の投与量で、菌接種前日より一日置きに計4回皮下注射で行った。菌接種前日より滅菌した蒸留水に 0.83g/l のテトラサイクリン塩酸塩（Waco, Tokyo）を加えたものを飲料水とし、自由摂取とした。初回の CyA 投与から24時間後、クロルプロマジン塩酸塩（Waco, Tokyo）を 20mg/kg の腹腔内投与を行い、運動量が鈍くなったマウスの舌表面を歯間ブラシで擦過後、*C. albicans* 菌液 5.0×10^6 cells/25 μ l/mouse を浸み

¹⁾ 日本歯科大学大学院新潟生命歯学研究科顎口腔全身関連治療学（主任：又賀 泉教授）

²⁾ 日本歯科大学新潟病院口腔外科（科長：山口 晃教授）

³⁾ 日本歯科大学新潟生命歯学部口腔外科学講座（主任：又賀 泉教授）

〔受付：2010年9月16日、受理：2010年12月8日〕

図 1 実験的マウス口腔カンジダ症作製手順

こませた約 50mg の綿球を口腔内に挿入し、2～4 時間放置し感染させた。その後、11 日間口腔内の観察を行った。菌接種を行ったものを菌接種群、菌を接種しないで CyA、クロルプロマジン、テトラサイクリン飲料水を与えたものを菌非接種群、菌接種も薬剤投与も行わなかったものを対照群とし 3 群に分けた (図 1)。

2. 観察方法

1) 体重, 血液像

体重は CyA 投与日から連日同時刻に体重測定を行った。免疫不全状態を把握するために血液像を観察した。末梢白血球および好中球の測定は、マウス頸動脈の切断により直接採血管に採血し、その後自動血球計数器 (Celltac MEK-4400, 日本光電, 東京) で測定した。また May-Giemsa 染色塗抹標本の血液細胞像から全白血球に対する好中球、リンパ球の百分比を算出した。

2) 舌表面の肉眼的評価

Takakura ら³⁾ の判定基準を参考にして、肉眼的所見を舌表面に白苔が占める割合から判断して以下のように 0 から 4 のスコアに分けて評価した。

0: 正常

1: 舌背部の白苔が 20% 未満

2: 舌背部の白苔が 20% 以上で 90% 未満

3: 舌背部の白苔が 90% 以上

4: 舌背部の偽膜様の厚い白苔が 90% 以上

3) *C. albicans* 舌内侵入菌数および腎臓内の菌数の測定

ペントバルビタールにて犠牲死させたマウスの舌を舌根から切除し、さらに舌正中で矢状断し二分した。舌の半側は切断直後に舌表面に付着した菌を除去する目的で白苔を綿棒にて可及的に除去し、滅菌生理食塩水で水洗し重量を測定した。残りの舌半側は白苔を除去せず病理組織学的検索のための試料とした。白苔を除去した舌半側を滅菌生理食塩水で 1 ml に調整した後にホモジナイズし、これを菌数測定用試料とした。試料は系統希釈 (1 倍, 10 倍, 100 倍, 1000 倍) したものを、サブロー寒天培地 (Nissui,

Tokyo) 上に 100 μ l 塗抹した。培地は 30℃ にて 2 日間好気培養後コロニー数 (colony forming units: CFU) を求めた。また、マウスの腎臓を採取し同様の方法で腎臓内菌コロニー数を測定した。

4) 舌病変の病理組織学的検索

C. albicans の経時的な病理組織学的変化を検討するため、菌接種 5 日, 11 日目に犠牲死させたマウスから舌を摘出し、その半側を中性緩衝ホルマリンで 2 日間固定した。通法によりパラフィン包埋後、厚さ 5 μ m の病理組織切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色 (H-E 染色) および過ヨウ素酸シッフ染色 (PAS 染色) した標本を光学顕微鏡にて観察し、舌の矢状断面にて上皮肥厚の程度および炎症細胞浸潤数について計測した。上皮肥厚については上皮の厚さを角化層最深部から基底層乳頭部の最深部間の長さをそれぞれ 5 か所計測した。炎症細胞浸潤数については、10⁴ μ m² の視野においてそれぞれ 5 か所計測した (n = 4 匹 × 5 か所 = 20)。

5) 免疫病理組織学的検索

中性緩衝ホルマリン液に固定した舌半側を含むパラフィンブロックより切片を作成し酵素抗体法を行った。以下を 1 次抗体に、抗 Ki67 ポリクロナール抗体 (以下 Ki67, 800 倍希釈, アブカム, 東京), 抗 p63 モノクロナール抗体 (以下 p63, 200 倍希釈, Dako, Denmark), 抗 p53 モノクロナール抗体 (以下 p53, 希釈済, ニチレイバイオサイエンス, 東京), 抗 CK17 モノクロナール抗体 (以下 CK17, 20 倍希釈, Dako, Denmark) をそれぞれ使用した。抗原賦活化を目的として、0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中に切片を浸漬し、121℃, 20 分間, オートクレーブ処理を行った。CK17 のみ 95℃, 20 分間, 温浴槽による熱処理を行った。0.3% 過酸化水素加メタノール, 30 分処理することによって内因性ペルオキシダーゼ除去を行った。さらに組織切片を PBS で十分に洗浄を行った後、一次抗体を加えて 4℃ で 12 時間反応させた。発色はともに DAB 法にて行い、Mayer のヘマトキシリンにて核染色した。

図2 体重の変化

図3 白血球数の変化

発現の判定は、細胞核が茶褐色に発色する細胞を陽性とし、基底層から測定した上皮全体の距離と基底層から染色されている細胞までの距離の割合を、それぞれ5か所計測し、陽性細胞率として百分率で算出した。

6) 統計学的分析

得られた結果は平均±標準偏差で示し、統計学的解析はStudent's t検定を用いて行った。なお、統計分析にはSPSS13.0J (SPSS)を用いた。

本研究は日本歯科大学新潟生命歯学部動物実験倫理委員会の承認 (No. 95) のもとに行った。

結 果

1) 体重および血液像

体重は菌接種群では、CyA投与4日目で23g (対照群平均: 32g) に減少し、CyA投与の4～8日目で23g前後の低値を示しながら停滞し、9日目以降徐々に増加したが、菌非接種群に比して減少傾向を示した (図2)。

白血球数は、両群でCyA投与4日目に菌非接種群では8割減の1200/μl (対照群平均: 5875/μl)、菌接種群では6割減の2320/μlと最も減少した。菌接種群では、その後多少の増減を示しながら、CyA投与後11日目 (CyA最終投与後5日目) に6767/μlと最高値を示したが、菌接

図4 血液像

図5 舌表面の肉眼的評価

種群が菌非接種群に比して高値で推移する傾向が認められた (図3)。血液分画は、両群ともにリンパ球の割合が30～60% (対照群平均: リンパ球75%) と低い傾向がみられた。一方、好中球の割合は40～60% (対照群平均: 好中球23%) で、菌接種群が菌非接種群に比して高い傾向が認められた (図4)。

2) 舌表面白苔の肉眼所見

肉眼所見では菌接種2日目で舌表面に偽膜様の白苔が出現し、3日目まで継続した。3日目の平均肉眼スコア値は3.7と最大値を示した。4日目以降、白苔は徐々に薄くなり範囲を縮小していった。11日目では平均肉眼スコア値は0.3で、白苔はほとんどみられなくなったが、舌表面は若干腫脹し発赤を伴っていた (図5)。

3) 舌内侵入菌数 (CFU) および腎臓内の菌数

舌内侵入菌数は、菌接種5日目がピークで3392CFU/mgと最も多く観察され、CyA投与終了した菌接種6日目以降、徐々に減少し11日目ではほとんど検出されなく

図 6 舌内侵入菌数の経時的変化

なった (図 6)。また、腎臓内では菌は検出されなかった。

4) 病理組織学的所見

舌の病理組織学的所見では、菌接種 5 日目の HE 染色では、角化層の変性と、基底細胞層から有棘細胞層にかけて肥厚所見を認めた (写真 1)。PAS 染色においては、萎縮・剥離傾向を示す角化層内にカンジダ菌糸の侵入が認められた。5 日目、11 日目共にカンジダ菌糸の顆粒層への侵入は認められなかった。一方、菌接種 11 日目の HE 染色所見では、肥厚した上皮層内に軽度の上皮性異形成が認められた。

角化層内へ侵入した菌糸数は、5 日目が $51.4 \text{ cells}/10^4 \mu\text{m}^2$ で最も多く、11 日目では、ほとんど観察されなく

写真 1 舌上皮組織の変化

写真 2 免疫組織化学的染色 (陽性所見一覧)

図7 菌糸数と細胞浸潤数

図8 上皮層の厚径

なった。一方、基底細胞層直下には顆粒球主体の炎症性細胞浸潤を認めた。炎症性細胞浸潤数は5日目と11日目では57.8cells/10⁴μm²、58.5cells/10⁴μm²と感染前に比して高値であった(図7)。また、11日目では上皮内にも顆粒球主体の細胞浸潤が認められた。上皮の肥厚は、5日目で175.6μmと最も厚く、菌糸がほとんど見られなくなった11日目においても上皮層は、感染前に比べて有意に肥厚していた(図8)。

5) 免疫病理組織学的検索

Ki67, p63染色は菌接種群、対照群ともに基底細胞層に带状に陽性細胞が確認された(写真2)。対照群と比較すると、Ki67染色では基底細胞層および傍基底細胞層から上方に向かって陽性細胞が認められ、陽性細胞率は対照群では11.9%であったのに対して菌接種群では39.4%と高かった。p63染色でも陽性細胞率は対照群24.6%に比して実験群45.3%と高値を示した。一方、p53, CK17染色については菌接種群、対照群ともに上皮細胞に陽性細胞は認められなかった(図9)。

図9 免疫病理組織学的検索(陽性細胞率の比較)

考 察

C. albicans はヒト日和見感染病原体で、食細胞の防御能の低下した宿主やT細胞機能に異常を伴う宿主における侵襲性・播種性感染症を選択的に引き起こす。*C. albicans* 感染に代表される口腔カンジダ症は、要介護高齢者の増加や、各種癌治療における合併症として増加傾向にあり、その臨床病態は、びらん、潰瘍形成、慢性肥厚性カンジダ症、上皮性異形成など様々で、口腔粘膜組織障害にいたるメカニズムは解明されていない。Takakuraら³⁾は口腔カンジダ症の病態解明のためにマウス口腔カンジダ症モデルを副腎皮質ステロイド薬の投与方法により作製しているが、カンジダ症の症状継続は難しく比較的短期間で消退してしまうため⁶⁾、臨床を想定した慢性炎症症状の病態を維持させて観察することは難しい。そこで、従来前投薬として用いられている副腎皮質ステロイド薬を免疫抑制剤であるCyAに変更して実験を行った。

C. albicans に対する宿主防御機構は、自然免疫とT細胞依存性獲得免疫である細胞性免疫が共同して働き、表在性カンジダ症では細胞性免疫が大きく関与していると報告されている⁷⁾。CyAの主な作用としてはT細胞系を特異的に抑制し、インターロイキン2の産生を阻害し免疫抑制効果を得るとされる⁸⁾。CyAを中心とした免疫抑制剤による組織への影響は、非特異性食細胞の抵抗力を弱めないで選択的にT細胞媒介免疫とナチュラルキラー(NK)細胞活性に障害を与え、表在性カンジダ症の進行を促すが、肺、肝または脾臓などの深在性の実質器官からの真菌の排泄、深在性真菌症の発症には影響を及ぼさないことが知られている⁹⁾。これらは宿主防御機構が、表在性カンジダ症と深在性真菌症では、大きく異なるためと考えられている。そして表在性カンジダ症の発症においては、その制御のために宿主はT細胞依存性獲得免疫を必要とするのに対して、深在性真菌症に対しては自然免疫の防御的役割が比較的大きいと報告されている¹⁰⁾。McMillanら⁷⁾によれば、ハムス

ター餌袋に *C. albicans* を接種して組織侵入について観察した結果、接種部周囲粘膜の炎症所見は認めたが粘膜への菌糸の侵入は認めなかったと報告し、この結果から全身的あるいは局所的に抵抗力が低下した状態でないと菌の塗布のみでは組織への侵入の可能性は少ないと考えられている¹¹⁾。

今回、*C. albicans* の持続感染によるカンジダ症実験モデルを作製する目的で CyA の投与を行った。予備実験において、CyA100mg/kg を4日間投与した個体への負荷が低く、確実に口腔カンジダ症を発症させたことより、本薬量をマウスへの CyA 投与量とした。CyA は舌表面からの *C. albicans* の排除を妨げ、カンジダ症を持続的に感染させることに有効であったと報告されている¹⁰⁾。Krause ら⁹⁾ は、CyA がマウスの表在性カンジダ症の発症、継続に対して効果があることを、上皮内囊胞にカンジダ症を発症させることにより証明している。CyA 投与したマウスの血液像では、白血球数が減少したが、特に減少に占めるリンパ球の割合が大きかった。さらに *C. albicans* を接種した群では、好中球の割合が増加する傾向が認められた。また、リンパ球数の回復により、上皮内に侵入した菌糸が減少傾向に転じた。さらに減少していたマウスの体重が増加に転じているのは(図2)、CyA による免疫抑制効果が弱まったことを示唆している。一方、菌接種群における肉眼的評価と舌内に侵入した菌数は相関していなかった。肉眼的評価(図5)では、菌接種後2日目と3日目が最も白苔を認めたが、PAS 染色における感染組織内の菌糸数は、接種5日目最大であり(図7)、また舌内侵入菌数の変化(図6)も同様であった。つまり、肉眼的評価では舌内に侵入していない舌表層に増殖する菌糸を評価している可能性が高く、菌定着後、菌糸が舌内に侵入するまでに、一定の時間を要することが示唆された。

上皮変化として5日目から確認された上皮層の肥厚は、11日目まで持続し(図8)、基底細胞層直下の炎症細胞浸潤も持続していた。つまり、組織内から真菌が排除されても、局所の炎症は持続し、上皮の組織変化が維持されていた。加えて、11日目では上皮内にも顆粒球主体の炎症性細胞浸潤を認めることから、CyA の連続投与が終了し宿主の細胞性免疫の回復に伴い、真菌が排除されたと考えられる。皮膚真菌症においては、真菌による慢性刺激が表皮に及ぶと、ケラチノサイトから炎症性サイトカインが分泌され、それによって顆粒球の遊走や、補体の活性化が惹起され炎症が進行し、感染真菌が排除されるものと考えられているが、培養系を用いた実験では *C. albicans* において IL-8 以外の炎症性サイトカインは検出されていない¹²⁾。今後 *in vivo* での炎症性サイトカインの発現についての検討が課題である。

今回のカンジダ症実験モデルにおいて、その病理組織所見、菌数、舌内の侵入菌数、炎症性細胞浸潤数、血液所見、

体重変化等を勘案すると、菌接種後5日目の状況が、急性期のカンジダ症を最も再現していると思われる。また、組織変化や炎症性細胞浸潤数は11日目まで継続しており、持続感染モデルとしての有用性が示唆された。

カンジダ症発症後の粘膜上皮における病理組織学的所見は、発症群全例において上皮層の変化が観察された。すなわち上皮基底部の形態が非投与群で観察される上皮突起の形態をとらず、明らかな構造異型や軽度の細胞異型が認められた。また上皮下組織において顆粒球・単核球などの炎症性細胞浸潤がみられた。これらの所見は口腔内慢性肥厚性カンジダ症の病理組織学的所見に関する報告¹³⁾と酷似している。慢性肥厚性カンジダ症の病理組織学的所見の特徴は、上皮基底部が幅広く平坦化あるいは棍棒状を呈することが特徴で、異角化や上皮異形成が全例でみられ、カンジダ菌の存在がこの上皮異形成に関与している可能性が高いと報告されている^{7,14)}。

朔ら¹⁵⁾によれば、口腔粘膜癌とカンジダ症の合併がきわめて高頻度でみられると報告し、McCullough ら¹⁶⁾はカンジダあるいは酵母菌感染が口腔粘膜癌あるいは前癌病変の発生要因として重要であることを指摘している。カンジダ感染によって上皮性異形成の病理組織学的変化が生じることは確かであるが¹⁷⁾、炎症反応性の可逆的変化の可能性があり、腫瘍性変化ととらえるには根拠が不足している。現状では、口腔白板症あるいは口腔粘膜癌の病巣が、培地的な役割を果たし二次的にカンジダ症を合併すると考えられている¹⁸⁾。しかし、近年 *Helicobacter pylori* を中心に細菌感染における慢性炎症と発癌の関連性が指摘され、細胞転写因子 NF- κ B の活性化により発癌に至るシステムが明らかになっている¹⁹⁾。また、同様に慢性炎症に伴う DNA メチル化異常が、体細胞分裂に際して癌抑制遺伝子など種々の遺伝子の不活化の原因となり発癌に至ることが明らかになりつつある²⁰⁾。真菌感染によりもたらされた持続慢性炎症が、組織の腫瘍性異形成変化に至る可能性も否定できない。

そこで、増殖マーカーである Ki67 抗体を用いた免疫病理組織学的検索を行ったところ、対照群の舌上皮に比べて実験群では基底細胞層で Ki67 陽性細胞が顕著に増加していた。この結果はマウスの舌上皮基底細胞層には増殖活性が存在し、実験群では対照群に比べてより増殖活性が強いことを明らかにした。小山ら²¹⁾は炎症性細胞数が多いほど、血管内皮細胞、線維芽細胞の数および Ki67 陽性細胞数が多いと述べており、カンジダ感染に対する生体の防御機構として上皮肥厚を起こしている可能性が予想された。

さらに、上皮細胞の軽度異型性について、その変化が炎症による可逆性の変化か、腫瘍性変化か検討を行うため、癌抑制遺伝子である p53 抗体、p53 ファミリーに属する p63 抗体、上皮異型性増殖の指標となる CK17 抗体を用い

て免疫病理組織学的検索を試みた。その結果, p53, CK17では上皮細胞に陽性細胞を認めず, p63では基底細胞層に一層の陽性細胞を認めた。そして実験群においては基底細胞層および傍基底細胞層から上方に向かってp63陽性細胞の浸潤が認められた。p63は, 主に重層扁平上皮や移行上皮の基底細胞層に認められ, 現在基底細胞を認識する免疫組織化学の抗体としても広く用いられている^{22, 23)}。また, 成熟表皮において基底細胞層での細胞接着の維持や上皮幹細胞の増殖を促すと共に, 分化の進行に必要とされる遺伝子群の発現を誘発するという二重の役割を果たすものと考えられている。そして, p63のアイソフォームと他のp53ファミリーの発現バランスが, 正常な上皮組織の形成に重要であるとされており, 癌細胞への分化を制御していると推察されている²⁴⁾。

また, 新崎ら²⁵⁾は, 口腔粘膜の異形成の獲得には変異型p53の介在するアポトーシスの調節機構の存在を述べており, p53, CK17は細胞の異型性を認める際に強く発現する。しかしながら, 本研究ではこれらの発現は免疫組織学的に検出されなかった。

以上の結果から, カンジダ感染マウス舌上皮には増殖性変化を認めるが, 腫瘍性の変化ではなく, 炎症反応性の組織変化による上皮肥厚であることが示唆された。今後はさらにカンジダ症を持続させた経時的観察と, 免疫組織学的に詳細な検討が必要である。

今回免疫抑制剤を用いて確立を試みたマウス口腔カンジダ症持続モデルは, カンジダ菌持続感染による粘膜上皮の組織障害や組織変化の検討に極めて有用なモデルであることが証明された。

結 論

免疫抑制剤CyA投与下に*C. albicans*を持続感染させたマウスモデルを作製し, 経時的な感染所見と粘膜上皮の変化を病理組織学的に観察した。その結果, 菌接種5日目で上皮内侵入菌数最高となり, 病理組織学的に炎症性細胞浸潤と上皮層の肥厚が認められた。この変化は, 11日目まで継続しており, カンジダ症持続感染モデルとしての有用性が示唆された。

謝辞 稿を終えるにあたり, 実験遂行に際し, 御懇篤なるご指導を賜りました先端研究センター仲村健二郎先生, 久和彰江先生, 薬理学講座中村康則先生, 解剖学第2講座吉江紀夫先生, 横須賀宏之先生に厚く御礼申し上げます。さらに, 種々のご協力をいただきました吉岡裕雄先生ならびに口腔外科学講座諸先生方に深謝いたします。

引用文献

- 1) 北村和典: 口腔内カンジダ症の免疫学的研究 *Candida albicans* 菌体成分の免疫応答への作用. 奥羽歯誌 31: 103-112,

- 2004.
- 2) 若山 恵, 渋谷和俊, 直江史郎: カンジダ症の病理像と真菌形態. 臨床と微生物 28: 149-154, 2001.
- 3) Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, et al: A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. Microbiol Immunol 47: 321-326, 2003.
- 4) Polak A: Virulence of *Candida albicans* mutants. Mycoses 35: 9-16, 1992.
- 5) Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO: Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*, Sabouraudia 20: 7-14, 1982.
- 6) 塩原康弘, 大島朋子: 舌における *Candida albicans* 感染に対し影響を及ぼす因子について マウス口腔カンジダ症モデルにおける検討. 鶴見歯学 34: 29-39, 2008.
- 7) McMillan MD and Cowell VM: Effect of chronic *Candida albicans* in the hamster pouch. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 74: 492-498, 1992.
- 8) 大久保哲之, 大阪喜彦, 岡安健至, 他: シクロスポリン投与による創傷治癒遅延機序の実験的検討. 医学のあゆみ 160: 885-886, 1992.
- 9) Krause MW and Schaffner A: Comparison of immunosuppressive effects of cyclosporine A in a murine model of systemic candidiasis and of localized thrushlike lesions. Infect Immunity 57: 3472-3478, 1989.
- 10) 山口英世: 病原真菌と真菌症, 改訂4版, 南山堂, 東京, 2007, 65-73, 236-245頁.
- 11) 岡本祐一, 又賀 泉, 青木茂治, 他: 両側舌縁部に発症した慢性肥厚性口腔カンジダ症の1例. 日口外誌 55: 345-349, 2009.
- 12) 加納 豊: サイトカイン産生からみた皮膚真菌症の病態. 真菌誌 45: 131-136, 2004.
- 13) 内海順夫, 大野 純, 稲葉正則, 他: 慢性肥厚性カンジダ症の臨床病理学的検討. 明海歯誌 25: 120-126, 1996.
- 14) Russel C and Jones H: The histology of prolonged candidal infection of the rat's tongue. J Oral Pathol 4: 330-339, 1975.
- 15) 朔 敬: 口腔粘膜扁平上皮癌とその境界病変, 組織学的評価に関する新しい動向とその病理学的背景. 新潟歯学誌 32: 209-224, 2002.
- 16) McCullough M, Jaber M, Barrett A, et al: Oral yeast carriage correlates with presence of oral epithelial dysplasia. Oral Oncol 38: 391-393, 2002.
- 17) Nagai Y, Takesita N and Saku T: Histopathologic and ultrastructural studies of oral mucosa with candida infection. J Oral Pathol 21: 171-175, 1992.
- 18) Field E, Field J and Martin M: Does candida have a role in oral epithelial neoplasia? J Med Vet Mycol 27: 277-294, 1989.
- 19) 大前知也: ピロリ菌によるNF- κ B活性化. 臨床免疫・アレルギー科 46: 515-520, 2006.
- 20) Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, et al: High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. Clin Cancer Res 12: 989-995, 2006.
- 21) 小山恵美子, 掛橋千賀子, 杉本幸枝, 他: 慢性褥瘡潰瘍における細胞増殖動態の検討. 褥瘡会誌 4: 42-49, 2000.
- 22) 久山佳代, 黒澤仁美, 藤巻 良, 他: 口腔粘膜異形成病変における浸潤および再発・悪性化の予測因子の検討殊に切除断端を用いた免疫組織化学的研究. 日大口腔科学 33: 47-55,

- 2007.
- 23) 富澤一与, 熊谷有紗, 松本美由, 他: 前立腺癌診断における $34\beta E12$, p63 の有用性. 日赤検査 39: 2-4, 2006.
- 24) Simon S and Dennis J: The role of p63 in epidermal morphogenesis and neoplasia Biochem. Soc. Trans 38: 223-228, 2010.
- 25) 新崎博文, 久山佳代: 口腔粘膜病変における p53, アポトー

シス関連遺伝子産物およびアポトーシスの発現に関する免疫組織化学的研究. Nihon Univ J Oral Sci 26: 127-138, 2000.

別冊請求先: 佐藤洋介 〒951-8580 新潟市中央区浜浦町 1-8
日本歯科大学新潟生命歯学部口腔外科学講座

Establishment of an Experimental Murine Model for Persistent Oral Candidiasis Using the Immuno-suppressant Cyclosporine A

Yosuke SATO¹⁾, Akira TANAKA²⁾, and Izumi MATAGA^{1,3)}

¹⁾ *Oral and Maxillofacial Surgery and Systemic Medicine, Graduate School of Life Dentistry at Niigata*
(Chief: Prof. Izumi MATAGA)

²⁾ *Oral and Maxillofacial Surgery, Niigata Hospital*
(Chief: Prof. Akira YAMAGUCHI)

³⁾ *Department of Oral and Maxillofacial Surgery,*
The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata
(Chief: Prof. Izumi MATAGA)

J. Jpn. Oral Muco. Membr., 16 : 40 ~ 48, 2010

Abstract : Although experimental oral candidiasis was developed in a previously reported animal model using steroids, it was difficult to observe long-term changes because *Candida* spontaneously disappeared. Therefore, we attempted to induce *Candida* infection using cyclosporin A (CyA), which is an immuno-suppressant in mice, and observed the daily changes in oral mucosa. In this experimental trial, we administered CyA by cutaneous inoculation four times before and after infection with *Candida albicans*, and observed the oral cavity.

C. albicans-infected tongue was removed from sacrificed mice and divided into two pieces; one of the pieces was examined for fungal infiltration and the other was examined for histopathological changes, such as hyphal invasion and epithelial thickness. Most fungi were detected on the fifth day after *Candida* inoculation before decreasing gradually, and most *C. albicans* had disappeared by the eleventh day. On histopathological investigation, hyphae and epithelial thickening were observed in the horny layer on the fifth day, and this epithelial thickening remained present on the eleventh day. In this mouse model of persistent oral candidiasis using immuno-suppressants, changes in the epithelium and fungal infiltration could be evaluated, thus suggesting the utility of this model.

Key words : oral candidiasis, experimental model, mouse, cyclosporin A, epithelial change

Reprint requests to Yosuke SATO, Oral and Maxillofacial Surgery and Systemic Medicine, Graduate School of Life Dentistry at Niigata, 1-8, Hamauracho, Chuo-ku, Niigata-shi, Niigata, 951-8580, Japan.

[Received September 16, 2010 : Accepted December 8, 2010]