

学 位 論 文 題 名

食物アレルギーにおける
消化管カンジダ症の役割に関する研究

学位論文内容の要旨

Candida albicans は健常人において口腔や消化管などに常在する真菌であるが、消化管内で過剰に増殖した場合にアトピー性皮膚炎の増悪に関与する可能性が示唆されている。その根拠は、アトピー性皮膚炎患者において、健常者に比較して消化管から *C. albicans* が高頻度に検出されること、アトピー性皮膚炎の重症度と血中の *C. albicans* 特異的 IgE 濃度に相関性が認められること、抗真菌薬の内服により皮膚炎の重症度と血清 IgE が減少すること等の臨床的に得られた知見に基づいている。しかしながら、このことを裏付ける実験的証明はこれまでに報告されていない。

食物アレルギーはアトピー性皮膚炎の発症・増悪因子と考えられている。本研究では、消化管カンジダ症が食物アレルギーの発症・増悪を介してアトピー性皮膚炎の増悪に関与するという仮説を設定した。そのメカニズムとして、消化管内で増殖した *C. albicans* は、上皮バリアを侵襲して未分解の食物アレルギーの吸収を促進することにより食物アレルギーの発症・増悪に関与すると考え、このことを動物実験により明らかにすることを目的とした。

1. 精製飼料で飼育したマウスを用いた新しい消化管カンジダ症モデルの作製

従来マウスやラットの消化管にカンジダを常在させることは困難であり、抗生剤や免疫抑制剤等の薬剤処置を施した動物や新生仔を用いて初めて達成された。しかしながら食物アレルギーへの消化管カンジダ症の関与を解析する上でこれらは適当なモデルではないと考え、新しい消化管カンジダ症モデルマウスを作製した。すなわち、BALB/c マウスを天然素材から調製された非精製市販飼料で飼育した場合、*C. albicans* (JCM1542 株) を単回胃内接種してから2週間後には従来の報告どおり糞中 *C. albicans* 菌数は検出限界以下となったが、既知の栄養素のみから調製した精製飼料で飼育した場合には、少なくとも6週間まで糞中 *C. albicans* 菌数が高値で維持された。組織の逆培養および組織学的観察により、精製飼料で飼育したマウスの *C. albicans* の定着部位が前胃粘膜であることを確認し、このマウスを薬剤処置を必要としない新しい消化管カンジダ症モデルとして確立した。

2. 精製飼料のマウス胃内へのカンジダ定着促進機構の解析

マウス胃内容物中の細菌を検索した結果、非精製市販飼料で飼育したマウスでは、*lactobacilli* 菌数が精製飼料で飼育したマウスに比較して多く、胃内容物中の細菌のほとんどすべてが *lactobacilli* であった。マウスの胃を組織学的に観察した結果、非精製市販飼料で飼育したマウスの前胃粘膜表面

には精製飼料で飼育したマウスに比較しての多数のグラム陽性菌が付着しており、これらは *lactobacilli* であると推測された。また、非精製市販飼料で飼育したマウスの胃内容物中の酢酸および乳酸濃度は精製飼料で飼育したマウスに比較して高値であり、さらにこれらの有機酸は *in vitro* において *C. albicans* の増殖を抑制した。これらのことから、精製飼料で飼育したマウスでは、胃内 *lactobacilli* が激減することが一因となり、*C. albicans* が胃に容易に定着すると考えられた。

3. 新しい消化管カンジダ症モデルと抗生剤処置を施した消化管カンジダ症モデルの比較

マウスに *C. albicans* を単回経口接種した後の糞中 *C. albicans* 菌数の推移を追跡した結果、精製飼料で飼育したマウスでは高値で維持されたが、非精製市販飼料で飼育しペニシリンを投与したマウスでは一時的に高値に維持されたもののその後減少した。非精製市販飼料で飼育したマウスの胃内容物中の細菌をペニシリンを添加した培地を用いて検索した結果、ペニシリンを投与したマウスではペニシリンを投与しないマウスに比較して *lactobacilli* を含む細菌が多数検出されたことから、ペニシリンを投与したマウスの胃内ではペニシリン耐性をもつ細菌が増殖することが示された。したがって、非精製市販飼料で飼育したマウスに抗生剤処置を施しても、抗生剤耐性菌が増殖し *C. albicans* の定着が阻害されると考えられた。これらのことから、マウスの消化管に *C. albicans* を長期間定着させるためには、抗生剤を投与するよりも精製飼料で飼育することの方が適していることが明らかとなった。

4. 新しい消化管カンジダ症モデルマウスの深在性カンジダ症モデルへの応用

深在性カンジダ症の発症機序を解析する際には、あらかじめ *C. albicans* を消化管に持続的に定着させた後に免疫抑制処置を施すことにより全身播種を引き起こすモデルが必要とされる。本研究で確立した消化管カンジダ症モデルマウスは、免疫抑制剤の投与により *C. albicans* の深部臓器への播種が引き起こされたので、深在性カンジダ症の発症機序を解析する際のモデルとしても有用であることが示された。

5. 消化管カンジダ症による食物アレルギーの吸収促進と肥満細胞の関与

消化管カンジダ症が食物アレルギーの吸収に及ぼす影響を明らかにするために、代表的な食物アレルギーである卵白アルブミン (OVA) をマウスに経口投与した後の血中 OVA 濃度の推移を ELISA により追跡した結果、消化管カンジダ症マウスにおいては対照マウスに比較して有意な高値を示した。このことは、消化管カンジダ症が未分解の食物アレルギーの消化管吸収を促進することを示唆している。消化管上皮の透過性は肥満細胞が産生するメディエーターによって調節されることが知られている。消化管カンジダ症マウスでは *C. albicans* の定着部位である胃粘膜において顆粒を放出する肥満細胞が多数観察されたので、消化管カンジダ症による食物アレルギーの吸収促進には肥満細胞が関与する可能性が考えられる。肥満細胞欠損マウスである WBB6F1 W/W⁻ マウスを用いて OVA の消化管吸収を調べた結果、W/W⁻ マウスにおいて消化管カンジダ症は食物アレルギーの吸収を促進しなかったため、消化管カンジダ症による食物アレルギーの吸収促進には肥満細胞が関与することが示唆された。

本研究では、新しい消化管カンジダ症モデルを確立するとともに、マウスの飼育に用いる飼料は胃内菌叢に影響するために *C. albicans* の定着に関与する重要な要素であることを明らかにした。したがって、消化管内での *C. albicans* の増殖は食品により制御することが可能であると考えられる。このモデルマウスを用いた解析により、消化管カンジダ症は未分解の食物アレルゲンの吸収を促進することにより食物アレルギーの発症・増悪に寄与する可能性が示唆された。本研究において確立した消化管カンジダ症モデルおよびそれを用いて得られた知見は、消化管カンジダ症が食物アレルギーおよびアトピー性皮膚炎に関与することの証明およびその機構の解明の一助になるものと考えている。

学位論文審査の要旨

主 査	助教授	園 山	慶
副 査	教 授	原	博
副 査	教 授	川 端	潤
副 査	教 授	横 田	篤

学 位 論 文 題 名

食物アレルギーにおける

消化管カンジダ症の役割に関する研究

本論文は総頁数 115 の和文論文で、図 23、表 10、引用文献 134 を含み、8 章で構成されている。別に参考論文 1 編が添えられている。

Candida albicans は健常人の消化管に常在する真菌であるが、アトピー性皮膚炎患者において便中から本菌が高頻度に検出されること、抗真菌薬の内服により皮膚炎の重症度と血清 IgE 抗体が減少すること等の報告から、消化管内で増殖した *C. albicans* はアトピー性皮膚炎の増悪に関与する可能性が示唆されている。しかしながらこれらは臨床上の経験的な知見によるところが大きく、このことを実験的に証明した例はこれまでに報告されていない。筆者は、消化管内で増殖した *C. albicans* は、上皮バリアを侵襲して未分解の食物アレルギーの吸収を促進することにより、アトピー性皮膚炎の悪化因子である食物アレルギーの発症・増悪に関与するという仮説を立て、主として実験動物を用いて実験的検討をしている。本研究は、マウスに与える食餌組成を改変することによって薬剤処置を必要とせずに消化管に *C. albicans* が長期間定着するモデルを確立し、このモデルを用いた解析により、消化管カンジダ症が食物アレルギーの消化管からの吸収を促進し食物アレルギーの発症・増悪に寄与する可能性を指摘している。第一章では本研究の背景、現時点での研究意義、問題点、目的等について論じている。第二章から第七章までは筆者自身による実験動物を用いた実験に基づく研究内容が記載され、本論文の中心をなすものである。第八章では、本研究を要約している。

主な内容は以下の如く要約される。

(1) BALB/c マウスに *C. albicans* を単回経口接種した後の糞中および組織中の *C. albicans* 菌数を培養法により解析し、マウスを天然素材から調製された非精製市販飼料で飼育した場合には *C. albicans* は消化管に持続的に定着しないが、既知の栄養素

のみから調製した精製飼料で飼育した場合には胃に持続的に定着することを明らかにした。したがって、精製飼料で飼育し *C. albicans* を胃内接種したマウスを、薬剤処置を必要としない新しい消化管カンジダ症モデルとして確立した。

(2) マウスの胃内には *lactobacilli* が多数常在することが知られている。本研究は、マウスの胃内細菌を培養法および組織学的観察により解析し、マウスを精製飼料で飼育すると胃内 *lactobacilli* が減少することを明らかにした。また、精製飼料で飼育したマウスでは胃内酢酸濃度および乳酸濃度が減少し、これらの有機酸は *in vitro* において *C. albicans* の増殖を抑制することを示した。したがって、精製飼料で飼育したマウスでは胃内 *lactobacilli* が減少することが一因となり *C. albicans* が胃に容易に定着することが示唆された。

(3) 非精製市販飼料で飼育しペニシリンを投与したマウスにおいて胃内接種した *C. albicans* が持続的に定着しないのは、ペニシリンに耐性をもつ胃内細菌が増殖することが一因であることを示した。したがって、マウスの消化管に *C. albicans* を長期間定着させるためには、抗生剤を投与するよりも精製飼料で飼育することの方が適していることが示唆された。

(4) 本研究で確立した消化管カンジダ症モデルにおいて、免疫抑制剤の投与が *C. albicans* の深部臓器への播種を引き起こすことを示し、このモデルが深在性カンジダ症モデルとしても有用であることを示した。

(5) 本研究で確立した消化管カンジダ症モデルにおいて、代表的な食物アレルギーである卵白アルブミン (OVA) を経口投与した後の血中 OVA 濃度の推移を ELISA により解析し、消化管カンジダ症が未分解の食物アレルギーの吸収を促進することを示した。また、肥満細胞欠損マウスにおいて消化管カンジダ症は食物アレルギーの吸収を促進しないことを示し、消化管カンジダ症による食物アレルギーの吸収促進には肥満細胞が関与することを示唆した。

以上のように、本研究は、精製飼料で飼育したマウスでは胃内 *lactobacilli* が減少することが一因となり *C. albicans* が胃に持続的に定着することを明らかにし、薬剤処置を必要とせずに消化管に *C. albicans* が長期間定着するモデルを世界で初めて確立した点で、国内外で高く評価されている。また、消化管カンジダ症が食物アレルギーの消化管からの吸収を促進することにより食物アレルギーの発症・増悪に寄与する可能性を示したことは、臨床上の経験でしか語られてこなかった仮説を実験的に証明できることを強く示唆する、きわめて興味深いものである。

よって審査員一同は、本論文の提出者 山口奈津は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。