

—— 調査報告 ——

*Candida albicans* の舌への定着に対する口腔ケアジェルの抑制効果

Inhibition of *Candida albicans* Adherence to the Tongue by an Oral Care Gel

清浦 有祐, 玉井利代子, 鄧 雪, 富山 舞, 佐藤 則文

Yusuke Kiyoura, Riyoko Tamai, Xue Deng, Mai Tomiyama and Norifumi Sato

## — 調査報告 —

*Candida albicans* の舌への定着に対する口腔ケアジェルの抑制効果Inhibition of *Candida albicans* Adherence to the Tongue by an Oral Care Gel清浦 有祐<sup>1)</sup>, 玉井利代子<sup>1)</sup>, 鄧 雪<sup>1)</sup>, 富山 舞<sup>2)</sup>, 佐藤 則文<sup>2)</sup>Yusuke Kiyoura<sup>1)</sup>, Riyoko Tamai<sup>1)</sup>, Xue Deng<sup>1)</sup>, Mai Tomiyama<sup>2)</sup> and Norifumi Sato<sup>2)</sup>

抄録：口腔ケアジェルの *in vivo* における *Candida albicans* (*C. albicans*) に対する舌への定着抑制効果を調べたので報告する。5週令のICRメスマウスにプレドニゾロンを腹腔投与するとともに、デスポーザブル白金耳を使用してマウスの舌表面全体にヒノキチオール含有ジェルを塗布し、その後もマウスの舌を摘出するまで12時間ごとに塗布した。プレドニゾロン投与24時間後に *C. albicans* を舌に接種した。そして、感染3日後、5日後、7日後に舌を摘出して、舌に定着した *C. albicans* の菌数および炎症性サイトカインの舌における産生量を調べた。その結果、口腔ケアジェルを塗布した場合には、塗布しない場合に比較して定着菌数が有意に低下していた。また、炎症性サイトカインも有意に低下していた。このことから、口腔ケアジェルをあらかじめ舌に塗布することで、*C. albicans* の舌への定着を抑制できることが示された。

キーワード：口腔ケアジェル, *Candida albicans*, 炎症性サイトカイン

## 緒 言

*Candida albicans* は代表的なヒト口腔内常在性真菌であるが、その病原性は強くなく、日和見感染微生物と考えられている<sup>1,2)</sup>。*C. albicans* の口腔内での検出率は、高齢者で増加することが報告されている<sup>3,4)</sup>。高齢者の口腔内に存在する *C. albicans* は口腔カンジダ症を惹起することがある<sup>4,5)</sup>。特に要介護高齢者のように口腔衛生状態が良好でない場合や、生体防御機能が低下している可能性が高い場合には、口腔カンジダ症の発現頻度が高くなる<sup>6-9)</sup>。口腔カンジダ症の発症を予防するには、*C. albicans* を口腔内から除去することが理想であるが、常在性微生物を完全に排除することは困難である。*C. albicans* の病原性は、菌糸を形成して組織に付着することで発揮される<sup>10,11)</sup>。したがって、口腔内に

*C. albicans* が存在しても口腔粘膜に付着することを抑制できれば、カンジダ症の発症も抑制できると考えられる。ヒトの唾液中には *C. albicans* に対する種々の抗菌因子が存在しており、それらの因子の減少や活性の低下が口腔カンジダ症の発症に関与することが明らかにされている<sup>4,11-14)</sup>。そのような場合にはそれらの抗菌因子の減少を補うための試みも行われている<sup>14,15)</sup>。

その一つとしてジェルの口腔内への塗布がある。ジェルを口腔内、特に *C. albicans* が口腔内でも定着しやすい舌表面に塗布することによって、*C. albicans* の舌への定着を抑制しようとするものである。しかし、その有効性に関する *in vivo* の実験報告はほとんどない。そこで、今回は口腔カンジダ症のマウスモデルを使用して、ヒノキチオール含有口腔ケアジェルの *C. albicans* の舌への定着抑制効果を調べた<sup>5,15)</sup>。

## 材料および方法

1. 実験に使用した *C. albicans*

65歳以上の高齢者の唾液から分離した、*C. albi-*

<sup>1)</sup> 奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座 口腔細菌学分野

<sup>2)</sup> イーエヌ大塚製薬株式会社開発研究所

<sup>1)</sup> Ohu University School of Dentistry, Department of Oral Medical Science Division of Oral Bacteriology

<sup>2)</sup> EN Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. R&D Laboratories

表1 実験に用いた口腔ケアジェル成分表

溶剤	精製水, エタノール
湿潤剤	濃グリセリン, プロピレングリコール, ヒアルロン酸ナトリウム
甘味剤	キシリトール
可溶化剤	ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油
粘結剤	ポリアクリル酸ナトリウム, カラギーナン
保存剤	安息香酸ナトリウム
安定剤	エデト酸二ナトリウム
pH調整剤	リン酸水素二ナトリウム, クエン酸
香味剤	香料(ハニーフレーバータイプ), 1-メン トール
有効成分	ヒノキチオール, グリチルリチン酸ジカリ ウム

*cans* 株の一つである OH-1 株をカンジダ GE 培地 (日水製薬, 東京) に接種して, 37°C 好気条件下で 24 時間培養した<sup>5)</sup>。培地上に増殖した菌を回収して 1% ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培養液中に浮遊させた。そして,  $2.5 \times 10^7$ /ml に調整した菌液を作製した<sup>5,15)</sup>。

## 2. 口腔カンジダ症マウスモデルの作製

われわれが従来から行っている方法で行った<sup>5,15)</sup>。すなわち, 5 週令のメス ICR マウス (日本クレア, 東京) にプレドニゾロン (川崎三鷹製薬, 東京) を 100 mg/kg の投与量で皮下注射した。その 24 時間後に  $2.5 \times 10^7$ /ml に調整した *C. albicans* 菌液に浸した綿棒を使用して, マウスの口腔内に菌を接種した。

## 3. 実験に使用した口腔ケアジェル

ヒノキチオール含有口腔ケアジェルである「リフレケアH」(イーエヌ大塚製薬株式会社) を用いた。成分は表1に示す。

## 4. 口腔ケアジェルの塗布

口腔ケアジェルはディスプレイザブル白金耳を使用して, マウスの舌表面に塗布した。塗布は *C. albicans* 接種 24 時間前から開始して 12 時間ごとに塗布した。実験条件ごとにそれぞれ 5 匹のマウスを使用した。

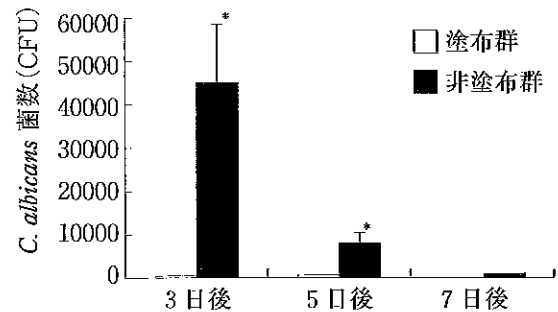


図1 口腔ケアジェル塗布群と非塗布群の舌に定着した *C. albicans* 菌数の相違 \*,  $p < 0.05$  vs 塗布群

## 5. 舌に定着した *C. albicans* の菌数の測定

マウスの頸椎を脱臼させてから舌を摘出して, 5 ml の生理食塩水中で舌の組織をほぐした。その溶液の 0.1 ml をカンジダ GE 培地に接種し, 24 時間後に出現したコロニー数から舌に定着した菌数を測定した<sup>5,15)</sup>。

## 6. 舌における炎症性サイトカイン産生の測定

前述の舌をほぐした生理食塩水の一部を使用して, 舌組織中の炎症性サイトカインである interleukin-1 (IL-1  $\beta$ ) および tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) を ELISA 法で検討した。キットは eBioscience 社 (San Diego, CA, USA) の Mouse IL-1  $\beta$  ELISA Ready-SET-Go! と Mouse TNF- $\alpha$  ELISA Ready-SET-Go! を用い, マイクロプレートリーダー (モデル 680; BioRad Laboratory, Hercules, CA, USA) で測定した。

## 7. 統計処理

結果は, 平均値と標準誤差を求めて示した。有意差の検定は, one-way analysis of variance (ANOVA) を用いた分散分析の後, Bonferroni or Dunn method による多重比較検定を行った。

## 結 果

### 1. 口腔ケアジェルの *C. albicans* の舌への定着に対する抑制効果

接種 24 時間前からジェルを塗布した群では, 非塗布群に比較して有意な定着菌数の低下が認められた (図1)。特に定着菌数が最も高くなる接種 3 日後において, 塗布群と非塗布群の差が最も顕著で

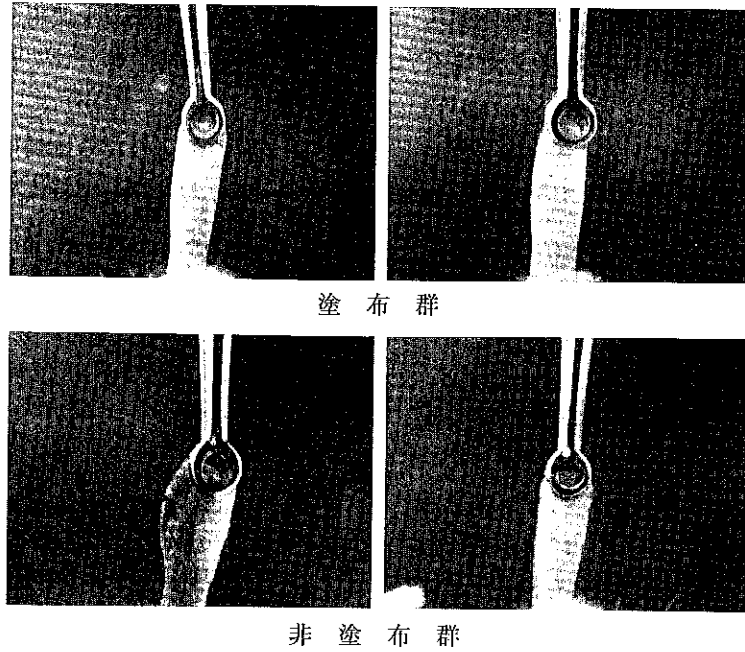


図2 口腔ケアジェル塗布群と非塗布群における舌症状の相違  
 口腔ケアジェル塗布群と非塗布群における *C. albicans* 感染  
 3日後の舌の症状を比較した。非塗布群では舌全体に白苔  
 や糜爛した箇所が散在しているが、塗布群では著名な変化  
 は認められない。

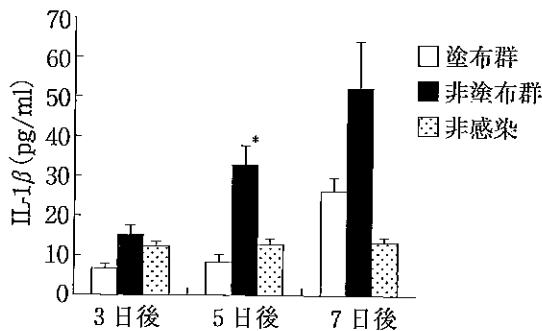


図3 口腔ケアジェル塗布群と非塗布群における舌の  
 IL-1 $\beta$  産生の相違 \* , p<0.01 vs 塗布群

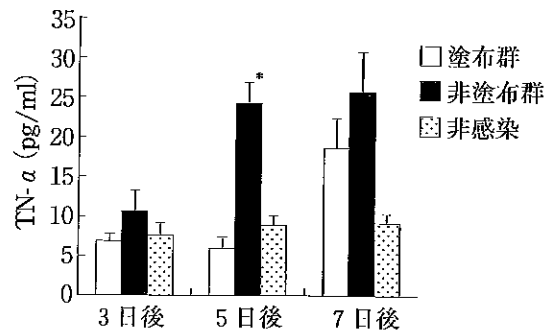


図4 口腔ケアジェル塗布群と非塗布群における舌の  
 TNF- $\alpha$  産生の相違 \* , p<0.01 vs 塗布群

あった。その際の舌の写真を図2に示した。非塗布群では舌全体に白苔や糜爛した箇所が散在しているが、塗布群では著名な変化は認められなかった。

## 2. 口腔ケアジェルの舌組織における炎症性サイトカイン産生に対する抑制効果

舌組織における IL-1 $\beta$  の検出量は感染5日後有意に低下していた。TNF- $\alpha$  も同じく有意に低下していた (図3, 4)。

## 考 察

高齢者、特に要介護高齢者では口腔内の衛生状態が不良になりやすく、十分な口腔ケアが必要となる<sup>7)</sup>。高齢者の口腔環境を考える場合に特に重要となる微生物に *Candida albicans* をはじめとした *Candida* spp.がある<sup>3,4,7)</sup>。*C. albicans* は加齢に伴って口腔内で検出される頻度が高まる微生物で、口腔カンジダ症の原因菌である<sup>3,4)</sup>。口腔カンジダ症は、高齢者などの易感染性宿主でおこりやすい感染症である<sup>3,4)</sup>。また、義歯に付着しやすい微生物なので

義歯性口内炎の主たる原因菌ともなる<sup>6)</sup>。したがって、高齢者の口腔および全身の健康を考えた場合に、*C. albicans* は最も注意しなければならない口腔常在微生物の一つである。

われわれは口腔カンジダ症のマウスモデルを使用した実験で、高齢者の口腔内常在の *C. albicans* の病原性を検討した<sup>5)</sup>。その結果は、実験に使用した 15 菌株のすべてがマウスに口腔カンジダ症を惹起するというものであった。

今回の実験では、*C. albicans* の口腔組織への定着に対する口腔ケアジェルの抑制効果を検討した。その結果、口腔ケアジェルを塗布した場合には定着菌数の有意な低下が認められた。さらに、菌数の低下に伴って舌組織中における炎症性サイトカインの産生も大きく低下していた。*C. albicans* は口腔粘膜下に侵入して病原性を発揮する場合には酵母型から菌糸型に変化している。*C. albicans* は粘膜に付着した場合には能動的に菌糸を形成して組織に侵入していくことができる<sup>16)</sup>。侵入した *C. albicans* は分泌性アスパラギン酸プロテアーゼやホスホリパーゼなどを産生することで病原性を発揮して、口腔カンジダ症を増悪していくと考えられる<sup>5,17)</sup>。したがって、*C. albicans* の口腔内での定着を阻止することによって、*C. albicans* の菌糸形成とそれに続く組織への侵入を抑制することができる。

実際にマウスの舌にあらかじめ口腔ケアジェルを塗布した場合には、*C. albicans* の舌への定着を大幅に抑制することができた。これは舌表面にジェルが存在することで、*C. albicans* が舌を足場として菌糸を形成していくことを妨げることを示唆している。そのため、感染に伴う炎症性サイトカインの産生もジェルを塗布した場合には大きく低下した。

*C. albicans* は口腔常在微生物であるので、口腔内から完全に排除することはきわめて難しい<sup>2)</sup>。一方、抗真菌薬の使用は耐性菌の出現を考えると現実的ではない<sup>18,19)</sup>。そのため、口腔組織に定着した *C. albicans* が菌糸を形成して組織に侵入することを抑制する機能を持ちながら、長期間の使用によっても有害事象が出現しにくいケア用品が必要となる。*in vivo* におけるマウスの感染実験で、*C. albicans* を接種する前に口腔ケアジェルを舌に塗布した場合は、定着を大きく抑制したことは高齢者の口

腔ケアにおけるジェル使用の有効性を示している。そして、この口腔ケアジェルはヒトに有害な成分を含んでいない。したがって、要介護高齢者の口腔カンジダ症の予防のために長期間使用することも問題がないと考えられる。特に要介護高齢者の口腔ケアは介護者によって行われることになるため、可及的に容易で安全な方法が望まれる。その点でも今回の口腔ケアジェルは適切なものと考えられる。

## 文 献

- 1) Hauman, C.H., Thompson, I.O., Theunissen, F. and Wolfaart, P.: Oral carriage of *Candida* in healthy and HIV-seropositive persons, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, **76**: 570~572, 1993.
- 2) Steele, C., Leigh, J., Swoboda, R. and Fidel, Jr., P.L.: Growth inhibition of *Candida* by human oral epithelial cells, *J. Infect. Dis.*, **182**: 1479~1485, 2000.
- 3) Lockhart, S.R., Joly, S., Vargas, K., Swalis-Wenger, J., Enger, L. and Soll, D.R.: Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly, *J. Dent. Res.*, **78**: 857~868, 1999.
- 4) Tanida, T., Ueta, E., Tobiume, A., Hamada, T., Rao, F. and Osaki, T.: Influence of aging on candidal growth and adhesion regulatory agents in saliva, *J. Oral Pathol. Med.*, **30**: 328~335, 2001.
- 5) 白井やよい, 鈴木奈央, 清野晃孝, 鎌田政善, 清浦有祐: 口腔内常在 *Candida albicans* によって惹起されるマウス口腔カンジダ症, *老年歯学*, **20**: 34~37, 2005.
- 6) 池邊一典, 喜多誠一, 吉備政仁, 難波秀和, 谷岡望, 小野高裕, 野首 孝: 要介護高齢者の義歯への *Candida* 菌付着状況—生活環境, 痴呆および就寝時の義歯装着の影響—, *老年歯学*, **12**: 213~220, 1998.
- 7) Adachi, M., Ishihara, K., Abe, S., Okuda, K. and Ishikawa, T.: Effect of professional oral health care on the elderly living in nursing homes, *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol., Endod.*, **94**: 191~195, 2002.
- 8) Lamster, I.B., Lalla, E., Borgnakke, W.S. and Taylor, G. W.: The relationship between oral health and diabetes mellitus, *J. Am. Dent. Assoc.*, **139**: 19~24, 2008.
- 9) Subramaniam, P., Babu, K.L. and Nagarathna, J.: Oral manifestations in acute lymphoblastic leukemic children under chemotherapy, *J. Clin. Pediatr. Dent.*, **32**: 319~324, 2008.
- 10) Abe, S., Satoh, T., Tokuda, Y., Tansho, S. and Yamaguchi, H.: A rapid colorimetric assay for determination of leukocyte-mediated inhibition of mycelial growth of *Candida albicans*, *Microbiol. Immunol.*, **38**: 385~388, 1994.
- 11) Kamagata-Kiyoura, Y., Abe, S., Yamaguchi, H. and Nitta, T.: Detachment activity of human saliva in

- vitro for *Candida albicans* cells attached to a plastic plate, *J.Infect.Chemother.*, **9** : 215~220, 2003.
- 12) Almsthal, A. and Wikstrom, M. : Oral microflora in subjects with breduced salivary secretion, *J.Dent. Res.*, **78** : 1410~1416, 1999.
- 13) Edgerton, M., Koshlukova, S.E., Araujo, M.W.B., Patel, R.C., Dong, J. and Bruenn, J.A. : Salivary histatin 5 and human neutrophil defensin 1 kill *Candida albicans* via shared pathways, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44** : 3310~3316, 2000.
- 14) Okutomi, T., Abe, S., Tansho, S., Watanabe, H., Kawase K. and Yamaguchi, H. : Augmented inhibition of growth of *Candida albicans* by neutrophils in the oresence of lactoferrin, *FEMS Immunopl. Med. Microbiol.*, **18** : 105~112, 1997.
- 15) Kamagata-Kiyoura, Y., Abe, S., Yamaguchi, H. and Nitta, S. : Protective effects of human saliva on experimental murine oral candidiasis, *J.Infect. Chemother.*, **10** : 253~255, 2004.
- 16) 二川浩樹, 牧平清超, 江草 宏, 福島 整, 川端涼子, 浜田泰三, 矢谷博文 : 口腔カンジダの付着およびバイオフィルム形成, *真菌誌*, **46** : 233~242, 2005.
- 17) Naglik, J.R., Moyes, D., Makwana, J., Kanzaria, P., Tsihlaki, E., Weindl, G., Tappuni, A.R., Rodgers, C.A., Woodman, A.J., Challacombe, S.J., Schaller, M. and Hube, B. : Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis, *Microbiology*, **154** : 3266~3280, 2008.
- 18) Carrodeguas, C.H., Allen, C.M., Beck, F.M., Buesching, W.J., Koletar, S.L. and Sundsorm, P. : Prevalence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in otherwise healthy outpatients, *J. Oral Pathol.Med.*, **31** : 99~105, 2002.
- 19) Rex, J.H., Rinaldi, M.G. and Pfaller, M.A. : Resistance of *Candida* species to fluconazole, *Antimicrob. agents Chemother.*, **39** : 1~8, 1995.

## Inhibition of *Candida albicans* Adherence to the Tongue by an Oral Care Gel

Yusuke Kiyoura<sup>1)</sup>, Riyoko Tamai<sup>1)</sup>, Xue Deng<sup>1)</sup>, Mai Tomiyama<sup>2)</sup> and Norifumi Sato<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Ohu University School of Dentistry, Department of Oral Medical Science, Division of oral Bacteriology

<sup>2)</sup>EN Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. R & D Laboratories

The purpose of this study was to examine the inhibition of *Candida albicans* (*C. albicans*) adherence to the tongue *in vivo* by an oral care gel containing hinokitiol. Five-week-old female ICR mice were intraperitoneally administered with prednisolone and the entire surface of each animal's tongue was coated with gel using a disposable loop. The gel was applied every 12 hours until tongue isolation. We inoculated tongues with *C. albicans* 24 hours following prednisolone administration, collected tongues 3, 5, and 7 days after infection, and measured bacterial counts and inflammatory cytokine production. Cytokine production and bacterial counts were significantly lower in tongues that were coated with the gel compared to uncoated tongues. These results suggested that pre-coating tongues with the oral care gel could inhibit *C. albicans* adherence.

**Key words** : oral care gel, *Candida albicans*, proinflammatory cytokine

## 台湾と日本の社会状況と老年歯科医学

Societies and Geriatric Dentistry in Taiwan and Japan

劉彦君<sup>1)</sup>, 下山和弘<sup>2)</sup>Yen-Chun Liu<sup>1)</sup> and Kazuhiro Shimoyama<sup>2)</sup>

## はじめに

日本では急速な少子高齢化に伴い種々の社会問題が生じている。医療や年金などの社会保障費の増大はその一つである。台湾では日本ほど少子高齢化は進んでいないが、今後急速に少子高齢化が進むと予測されている。少子高齢化に伴い保健・医療・福祉の分野において種々の対策が日本では実施されているが、台湾においても少子高齢化に伴い適切な対応が迫られている。歯科の分野でも高齢者、要介護高齢者の特性を踏まえた対応の必要性が認識され、関心が徐々に高まりつつある。しかし台湾では、歯学部にて老年歯科医学の講座はいまだない状況にある。台湾の現状に合った老年歯科医療制度を考える際には、日本など高齢化が進んだ国の制度を参考にすることにより、よりよい制度を構築できると思われる。

本稿では日本の状況と比較しながら、台湾の少子高齢化とその問題点を紹介することにする。

## 人口の高齢化

## 1. 台湾の高齢化

台湾の人口は1990年にはおよそ2千万人であったが(表1)、2008年12月末現在でおよそ2千3

百万人である<sup>1)</sup>。台湾では合計特殊出生率が1970年に4.00であったが急激に低下しており、2007年には1.10となっている<sup>2)</sup>(表2)。高齢化率(65歳以上人口の総人口に占める割合)は1993年に7.1%(高齢化社会)になったが、2017年に14.0%(高齢社会)になると予測されている<sup>3)</sup>。驚異的なスピードの高齢化が今後予想されている<sup>3)</sup>(表3)。

少子化の原因は結婚率が低いことが挙げられる。結婚の平均初婚年齢は1971年には男性が28.2歳、女性が22.1歳であったが、2007年には男性が31.0歳、女性が28.1歳となっている<sup>2)</sup>。女性の平均初婚年齢は大きく上昇している。日本と同様、結婚してからの出産がほとんどを占める台湾において、結婚率の低下は出生率の低下につながると思われる。

なお、台湾の政策としては「適当な年齢で結婚し、出産する」ことを奨めており、現在の人口を維持するために合計特殊出生率2.1を目指し、少子化対策を実施し始めている。

## 2. 日本の高齢化

日本の65歳以上人口の割合(高齢化率)は1970年に7%(高齢化社会)に、1994年に14%(高齢社会)に、2007年に21%(超高齢社会)に達した<sup>4)</sup>(表1)。高齢化率が7%から倍の14%に達する所要年数はわずか24年であり、他の先進諸国に例をみないスピードで高齢化が進んでいる。日本の総人口は2005年に第二次世界大戦後初めて減少したことは記憶に新しい。日本の総人口は2006年にはわずかに増加し、およそ1億2千8百万人となったが、人口は今後減少していくと予測されている<sup>4)</sup>(表3)。

<sup>1)</sup>高雄醫學大學口腔衛生學系

<sup>2)</sup>東京医科歯科大学歯学部口腔保健学科生涯口腔保健衛生学講座高齢者口腔保健衛生学分野

<sup>1)</sup>Faculty of Dental Hygiene, Kaohsiung Medical University

<sup>2)</sup>Section of Geriatric Oral Health Care Science, Department of Lifetime Oral Health Care Sciences, School of Oral Health Care Sciences, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University