

義歯性口内炎における *Candida albicans* 抽出マンナンの病原性に関する研究

高橋 義和

岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座(主任: 金子克教授)

〔受付: 1986年10月14日〕

抄録: 義歯性口内炎患者の義歯床粘膜面 denture plaque から分離した *Candida albicans* (serotype A) T株の表層多糖体である菌体抽出画分(粗多糖体, 粗マンナン, 中性マンナン, 酸性マンナン)を分離, 精製し, これらの菌体抽出画分を抗原として, *C. albicans* 死菌感作モルモットに対しての遅延型皮膚反応試験, マクロファージ遊走阻止試験を行った。また, 菌体抽出画分の起炎性を調べるため皮膚毛細血管透過性亢進試験を行った。さらに, ラット口蓋粘膜に粗多糖体を塗布し, 口蓋床を装着し組織学的観察を行い, 以下の結果を得た。

1. 遅延型皮膚反応試験では粗多糖体のみ強い遅延型皮膚反応活性を示し, マクロファージ遊走阻止試験ではいずれの *C. albicans* T株菌体抽出画分にもマクロファージ遊走阻止活性を示した。これらのことから *C. albicans* T株抽出マンナンに遅延型アレルギー活性があることが認められた。
2. 皮膚毛細血管透過性亢進試験ではいずれの *C. albicans* T株菌体抽出画分にも起炎性が認められた。
3. ラット口蓋粘膜に粗多糖体を塗布し, 口蓋床を装着したラット口蓋粘膜における組織学的観察では, 慢性炎症性所見が認められた。

以上の結果から, *C. albicans* 抽出マンナンは義歯性口内炎の病因の一つとして深く関与していることが示唆された。

Key word: *candida albicans* mannan, denture stomatitis, pathogenicity.

緒 言

義歯性口内炎の原因にはレジン義歯床内の残留モノマーによるレジンアレルギー反応や, 内分泌障害(糖尿病, 甲状腺機能低下症など), 栄養不良, 悪性腫瘍における悪液質などによる全身的因子と, denture plaqueや機械的刺激などによる局所的因子とが考えられている。これら諸因子に起因した義歯性口内炎の臨床的, 基礎的研究¹⁻³⁾は従来から多数みられる。特に, 本実験で取り上げた denture plaque 中の *Candida albicans* と義歯性口内炎とに関する

報告⁴⁻⁶⁾も多い。従来, *C. albicans* による義歯性口内炎の発現は, *C. albicans* が生成する hydrolytic enzyme による上皮表面の破壊⁷⁾や, 遅延型アレルギー反応^{6, 8)}によるものと考えられている。しかし, その起炎物質が *C. albicans* 菌体のいずれの構成成分に由来したものであるかについての報告はない。

そこで, 著者は義歯性口内炎患者の義歯床粘膜面 denture plaque から *C. albicans* (serotype A) T株を分離し, その *C. albicans* から細胞壁構成成分であるマンナンを抽出し, その物質の免疫学のおよび起炎性について検討した。さらに, Olsen ら⁹⁾の方法に従い, 口蓋

Studies on the pathogenicity of *Candida albicans* mannan in denture stomatitis.

Yoshikazu TAKAHASHI

(Department of Microbiology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 11: 246-258, 1986

床下粘膜に粗多糖体を塗布し、実験的義歯性口内炎と *C. albicans* 抽出マンナンとの関連性を組織学的に検討した。

実験方法

1. 実験動物

遅延型皮膚反応試験、マクロファージ遊走阻止試験および皮膚毛細血管透過性亢進試験には、体重400~450gのHartley系雄性モルモット(クリーン:静動協)を、実験的義歯性口内炎の組織学的検討には体重350gのWistar系雄性ラット(SPF:日本クレア)を使用した。

2. 供試菌株

義歯性口内炎患者の義歯床粘膜面に付着していたdenture plaqueから分離した *C. albicans* (serotype A) T株である。

3. 培地と培養法

使用した培地はSabouraud斜面寒天培地と山本ら¹⁰⁾による液体培地(組成:Na₂HPO₄0.4g, KH₂PO₄1.2g, MgSO₄·7H₂O0.1g, NaCl 2.0g, グルコース40.0g, カザミノ酸10.0g, 蒸留水1,000ml, pH6.0)である。

培養は初め、Sabouraud斜面寒天培地に37°C, 24時間培養した *C. albicans* T株を上記液体培地200mlに1白金耳接種し, 37°C, 24時間振盪培養した。その後, この前培養液5mlずつを上記液体培地500mlの入ったコルベン56本に接種し, 計28ℓを37°C, 24時間振盪培養した。

4. *C. albicans* 菌体抽出画分の分離と精製

前述の方法で培養した *C. albicans* T株を5,000r.p.m.10分間遠心して集菌し, 生理的食塩水にて4回洗浄を行って湿潤菌体を得た。湿潤菌体はFig. 1に示すGorinら¹¹⁾の方法で, 2% KOHで100°C, 2時間加熱処理して酢酸で中和後遠心し, 上清にメタノールを加えて沈澱させ粗多糖体を得た。次いで, 粗多糖体にFehling液を加えて沈澱させた銅-マンナン錯化合物を水に懸濁させ, Amberlite IR-120Bを加え振盪してから濾過し, 濾液にメタノールと数滴の濃塩酸を加えて沈澱させ粗マンナンを得た。粗マンナンをDEAE-Cellulose(酢酸型)

カラム(2.64×40cm)にかけ, 流速20ml/hrで, 水溶出し, 次いで0.01M-NaCl, 0.5M-NaCl, さらに1M-NaClで段階的に溶出し, それぞれ5mlずつ分取して, 波長280nmおよびphenol-硫酸法¹²⁾による波長490nmでの吸光度を測定した。水溶出が中性マンナンであり, 1M-NaCl溶出が酸性マンナンである。中性マンナンは再びDEAE-Celluloseカラムにかけ水溶出を行って精製した。

5. 菌体抽出画分の化学分析

菌体抽出画分(粗多糖体, 粗マンナン, 中性マンナン, 酸性マンナン)の糖の定量にはphenol-硫酸法を用い, 波長490nmで吸光度を測定し, mannose量として算出した。蛋白の定量にはLowry-Folin法¹³⁾を用い, 波長750nmで吸光度を測定し, ウシ血清アルブミン量として算出した。リンの定量はFiske-Subbarow法¹⁴⁾により波長660nmで吸光度を測定し算出した。吸光度は島津製分光光度計UV-210を使用し測定した。

6. 遅延型皮膚反応試験(delayed skin reaction test: SR試験)

1) 免疫方法

C. albicans T株菌液にホルマリンを0.4%になるように加え, 4°Cで3日間放置後精製水で洗浄し, アセトンで乾燥し, その2mgを生理的食塩水0.4mlに懸濁し, Freund's complete adjuvant(和光)と1:1に混合してモルモット四肢足蹠皮下に0.2mlずつ計0.8mlを1回注射した。鈴木ら¹⁵⁾の方法に準じ, 注射後12日経過したものを *C. albicans* 死菌感作モルモットとして実験に使用した。

2) 遅延型皮膚反応試験

上記の方法で感作したモルモットの背部を剃毛し, 各菌体抽出画分50μgずつを0.1mlの生理的食塩水に溶かして皮内接種し発赤, 硬結の出現ならびにその程度を48時間経時的に観察した。モルモット1匹につき各菌体抽出画分1個所ずつ接種し計10匹について観察した。

7. マクロファージ遊走阻止試験(macro-phage migration inhibition test: MI試験)

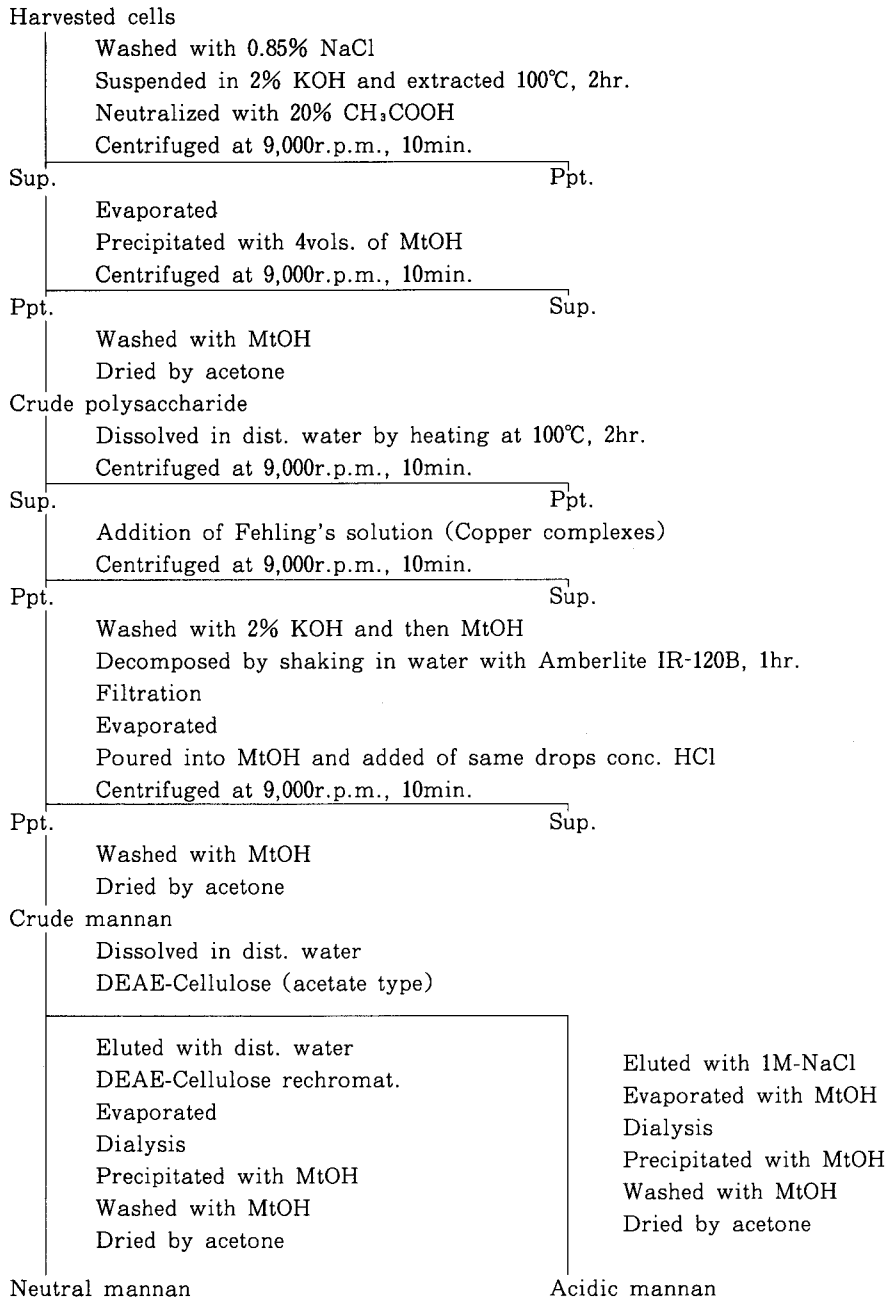


Fig. 1 The procedures of separation and purification of the several fractions from *C. albicans*.

- 1) 免疫方法
モルモットの感作方法は、遅延型皮膚反応試験と同様の方法で行った。
- 2) 細胞培養液
Eagle's MEM 培地 (ニッスイ) に 56°C, 30

分間加熱し非働化したウシ胎児血清 (Gibco) を 20% の割合で加えて使用した。

- 3) マクロファージ遊走阻止試験¹⁵⁾
C. albicans 死菌作モルモットの腹腔内に滅菌した流動パラフィン 20ml を刺激剤として投

与し、3日後に腹腔内をヘパリン(8U/ml)加Hanks液100mlで洗浄しながら腹腔浸出細胞を採取した。分液ロートで流動パラフィンを分離除去後、浸出細胞液を1,000r.p.m. 4分間遠心し、沈渣細胞を細胞培養液に再浮遊後800r.p.m. 3分間遠心して上清を捨て、沈渣細胞の約10倍量の細胞培養液を加えて細胞浮遊液(1.2×10⁷cells/ml)とした。次いで、細胞浮遊液を一端を閉じたヘマトクリット毛細管(外径1.45~1.65mm,長さ75mm:テルモ)に詰め、閉管部を下にして800r.p.m. 3分間遠心し閉管端から7~8mmのところまで細胞を詰めた。この毛細管を細胞と上清との境界面で切断し、シャーレ(内径27mm,高さ13mm)1個に毛細管2本ずつを入れ動揺しないように固定し、抗原として各菌体抽出画分100μg/mlを含む細胞培養液と抗原非添加の細胞培養液を別個に加えたものを作り、カバーガラス(50×35mm)のをせて密閉した。次いで、5%炭酸ガス培養器中で37°C, 24時間培養した。ヘマトクリット毛細管の開放端より遊走した細胞の面積を20倍に拡大して顕微鏡写真を撮り、その面積を求めた。遊走阻止率(MI率)は、次の式により算出した。

$$MI率(\%) = \left(1 - \frac{\text{抗原添加時の遊走面積}}{\text{抗原非添加時の遊走面積}}\right) \times 100$$

8. 皮膚毛細血管透過性亢進試験(permeability increasing factor test: PF試験)

剃毛したモルモット背部皮内に0.5mg/ml, 5mg/ml, 50mg/mlに調整した各菌体抽出画分0.1mlをそれぞれ2箇所ずつ接種し、1時間後に5%ポントミンスカイブルー液を耳静脈より1.2ml/kgの割合で注射した。1時間後にモルモットの頸動脈を切断して屠殺し、十分に脱血後、青染した局所皮膚を全域剝離摘出した。モルモットは各菌体抽出分画について5匹ずつの計20匹を使用した。

血管より透過した局所の色素の定量はHaradaら¹⁰⁾の方法に準じて測定した。すなわち、摘出皮膚片を細切し、アセトンと0.5%Na₂SO₄溶液の混合液(混合比7:3)中に入

れ、室温で24時間放置後、300r.p.m.10分間遠心し、上清を波長620nmで吸光度を測定した。透過色素量は標準曲線より求め、有意性の検定はStudentのt検定を用い、危険率5%以下の場合有意差があると判定した。

9. 実験的義歯性口内炎の組織学的観察

1) 実験動物

実験にはラット13匹を用い、未処置群(3匹)、口蓋床のみ装着群(5匹)、口蓋床下粘膜に粗多糖体を塗布した群(5匹)に分けた。飼育にはオリエンタル酵母実験動物用飼料(M粉末)を与え、自由給水とした。実験前にラット口蓋粘膜での*Candida*の量を調べSPFであるかを確かめるため、口蓋粘膜を滅菌綿棒でぬぐい、カンジダGE培地(ニッスイ)に37°C, 48時間培養し、カンジダチェック(ヤトロン)を用い血清学的同定を行った。

2) 麻酔

麻酔はネプタール(Abbott Laboratories)40mg/kgをラット腹腔内に注射して行った。

3) 口蓋床の作製と装着

口蓋床は石膏模型上で即時重合レジン(ユニファースト®, GC社)を用いて作製した。装着は、ラットを麻酔した後、上顎切歯の歯頸部近心側に切痕を入れ、金属ボルト(直径1mm,長さ6mm)を挿入し、突き出た部分に筆づみ法によって即時重合レジンを盛り口蓋床と連結した。下顎切歯先端部は臼歯部が咬合するように咬合調整した。そして、口蓋床下粘膜に粗多糖体を塗布した群では、粗多糖体(乾燥重量4mg)を週2回ずつ6週間にわたって口蓋床下粘膜に塗布した。また、口蓋床のみ装着群では、口蓋床下粘膜に粗多糖体を塗布した群と同時期に週2回口蓋床の着脱、清掃を行い、6週間にわたって口蓋床を装着した。

4) 組織切片の作製

実験開始6週目にすべてのラットを屠殺し、口蓋部を摘出し、ただちに10%中性緩衝ホルマリンで固定した。その後、脱灰、脱水しパラフィンに包埋した。組織切片は口蓋部を正中付近より矢状断方向に薄切(4μm)し、haematoxy-

lin eosin 染色を施して光顕的に観察した。

結 果

1. *C. albicans* 菌体抽出画分の分離と精製

液体培地28 lで培養した *C. albicans* T株は湿潤体量で180g, そして得られた粗多糖体は9.0gであった。さらに粗多糖体から得られた粗マンナンは3.5gで, 次いで, 粗マンナンから中性マンナン0.4g, 酸性マンナン2.0gが得られた。DEAE-Cellulose カラムによる中性マンナン, 酸性マンナンの分画の結果, Fig. 2のような溶出曲線が得られた。すなわち, 水溶出する部分には, 波長280nmおよびphenol-硫酸法による波長490nmの吸収のいずれにおいても単一のピークがみられた。1 M-NaCl 溶出する部分には水溶出の場合と異なり, 波長280nmの吸収のピークがいくつか生じた。

水溶出マンナン(中性マンナン)と1 M-NaCl

溶出マンナン(酸性マンナン)は, phenol-硫酸法による波長490nmの吸収ピークを示す部分を分取して, 濃縮, 透析を行った。

2. 菌体抽出画分の化学分析

菌体抽出画分の化学分析の結果は Table 1 に示す。粗多糖体では, 糖量は他の菌体抽出画分に比較して幾分少なかったが, 蛋白量やリン量は他の菌体抽出画分より著しく多かった。粗マンナン, 中性マンナン, 酸性マンナンでは, 糖量は同程度の量を示し, 蛋白量は中性マンナンと酸性マンナンでは差異がなく, 粗マンナンではそれらの2倍程度の量を示した。また, リン量は中性マンナンでは検出されず, 酸性マンナンでは痕跡程度であった。

3. 遅延型皮膚反応試験 (SR試験)

SR試験の結果 Table 2 に示す。すなわち, *C. albicans* 死菌感作モルモットにおいて, 粗

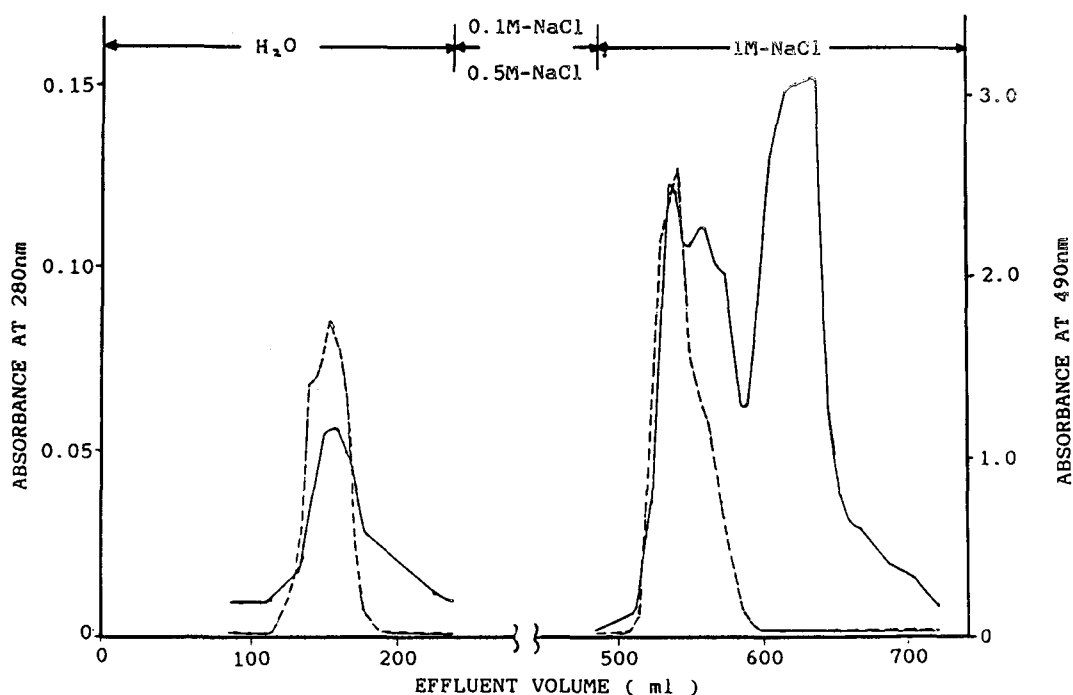


Fig. 2 DEAE-Cellulose column chromatogram of the crude mannan extracted from *C. albicans*.

The column (2.64×40cm) was first eluted with water, and then with step wise of 0.01M, 0.5M and 1M-NaCl. Fractions were collected at a flow rate of 20ml/hr and measured for absorbency at 280nm (—) and by phenol-sulfuric acid method (-----).

Table 1 Analyses of several fractions from *C. albicans*

	Fractions			
	Crude polysaccharide	Crude mannan	Neutral mannan	Acidic mannan
Carbohydrate	81	97	99	99
Protein	18.0	0.65	0.28	0.38
Phosphorus	1.09	0.10	0	0.03

Carbohydrate, protein and phosphorus contents were assayed by the phenol-sulfuric acid method, Lowry-Folin method and Fiske-Subbarow method, respectively. (%)

Table 2 Delayed skin reaction test of *C. albicans* antigens in guinea pigs sensitized with *C. albicans* whole cells.

Antigen fractions	Delayed skin reaction factor test					
	6 hr	9 hr	12hr	18hr	24hr	48hr
Crude polysaccharide	—	51.6±2.6	78.8±3.9	96.3±4.3	123.8±5.8	49.2±5.0
Crude mannan	—	—	9.2±2.0	14.5±1.7	19.3±1.6	9.1±1.3
Neutral mannan	—	—	—	—	—	—
Acidic mannan	—	—	—	—	—	—

Mean induration ± S.E. (mm²) of ten animals.

Table 3 The effects of different antigen fractions on the macrophage migration inhibition tests of peritoneal exudate cells obtained from guinea pigs sensitized with *C. albicans* whole cells.

Antigen fractions	Crude polysaccharide	Crude mannan	Neutral mannan	Acidic mannan
Average inhibition (%)	38.3±3.0	42.0±3.8	63.3±5.7	59.6±5.9

Mean inhibition of migration ± S.E.

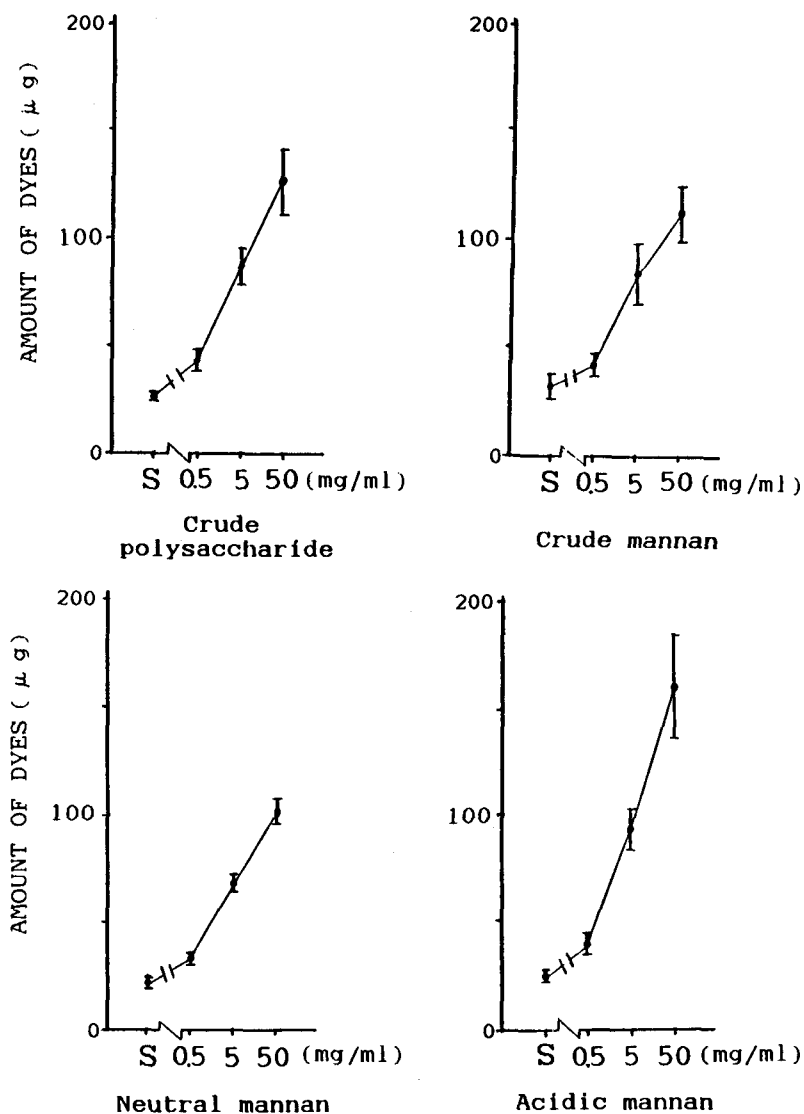


Fig. 3 Permeability increasing factor test of several fractions from *C. albicans* in guinea pigs. Vertical bars represent S.E. of the mean. S: Saline

多糖体接種群は処置後9時間目に発赤と硬結が観察され、24時間後で反応は最大に達し、その範囲は直径10mm以上となり強い遅延型皮膚反応活性(SR活性)を示した。粗マンナン接種群では12時間後にわずかに発赤がみられ、24時間で反応が最大に達したが、そのSR活性は粗多糖体接種群に比較してきわめて弱かった。これに対して、中性マンナン、酸性マンナンではいずれもSR活性は認められなかった。

4. マクロファージ遊走阻止試験(MI試験)

MI試験の結果はTable 3に示す。すなわち、*C. albicans*死菌感作モルモットにおけるMI率は、中性マンナンと酸性マンナンではそれぞれ $63.3 \pm 5.9\%$ 、 $59.6 \pm 5.0\%$ であり最も強いマクロファージ遊走阻止活性(MI活性)を示した。粗多糖体と粗マンナンでは中性マンナン、酸性マンナンに比較してMI活性は低かった。

5. 皮膚毛細血管透過性亢進試験(PF試験)

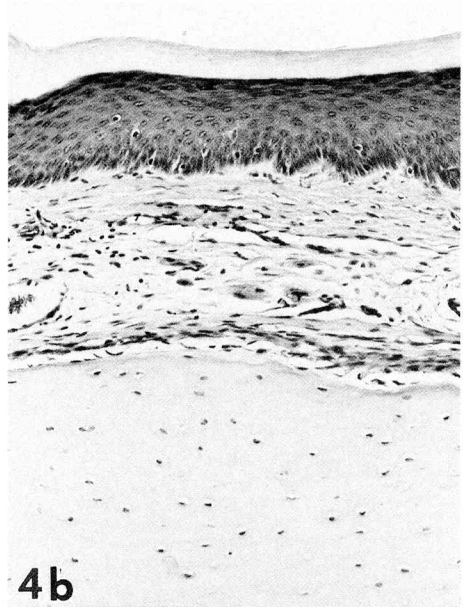
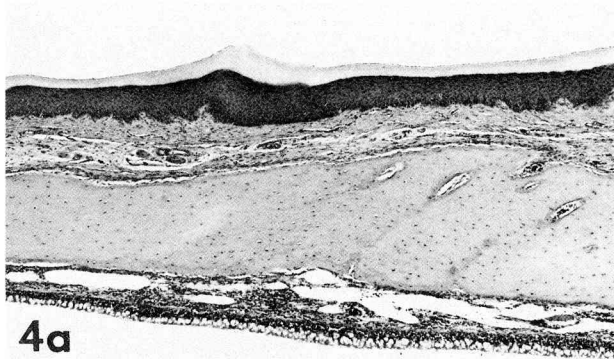


Fig. 4 Section from clinically healthy palatal mucosa of a non-treated Wistar rat. Note the orthokeratinized epithelium. Haematoxylin and eosin stain, (a)×45, (b)×132.

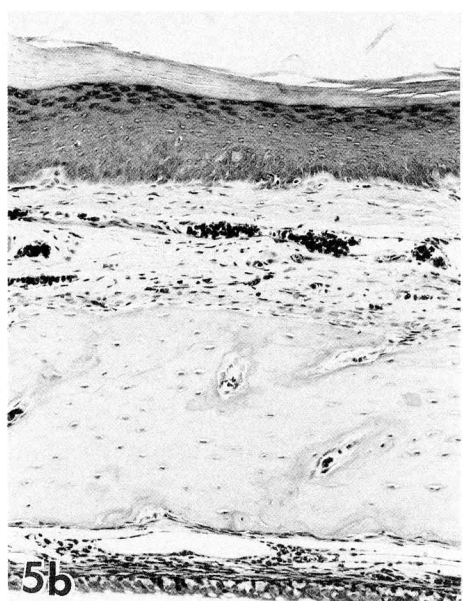
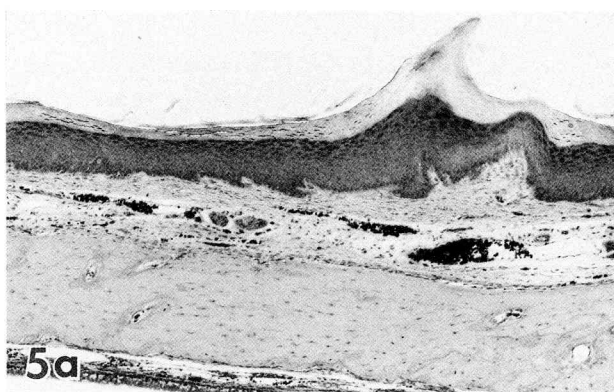


Fig. 5 Palatal section from the rat fitted with an acrylic plate for 6 weeks but not inoculated. Note the lack of inflammatory changes. Haematoxylin and eosin stain, (a)×45, (b)×132.

PF試験の結果はFig. 3に示すように、粗多糖体、中性マンナン、酸性マンナンでは用量依存的に透過色素量が増加した。粗マンナンでは用量0.5~5 mg/mlの範囲で用量依存性であったが、5 mg/mlと50mg/mlの間では、有意差は認められなかった。

6. 実験的義歯性口内炎の組織学的観察

実験前に13匹のラットの口蓋粘膜を滅菌綿棒でぬぐい *Candida* の有無を調べた結果、9匹

から *C. albicans* (serotype A), *C. tropicalis*, *C. glabrata* がわずかに検出された程度であり全てのラットが SPF であることが確認された。

1) 未処置群の組織学的所見

粘膜上皮の厚さは約120 μmで、いずれの部位でもほぼ均一であった (Fig. 4)。また表層には約30 μmの厚さの角化層が全体にわたってみられ、角化層直下の顆粒層にはケラトヒアリン顆粒を有する扁平な細胞が規則的に配列して

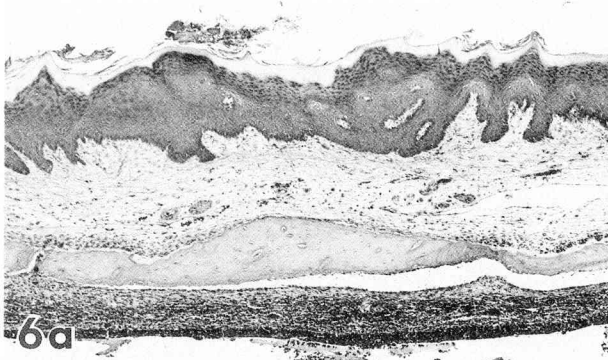
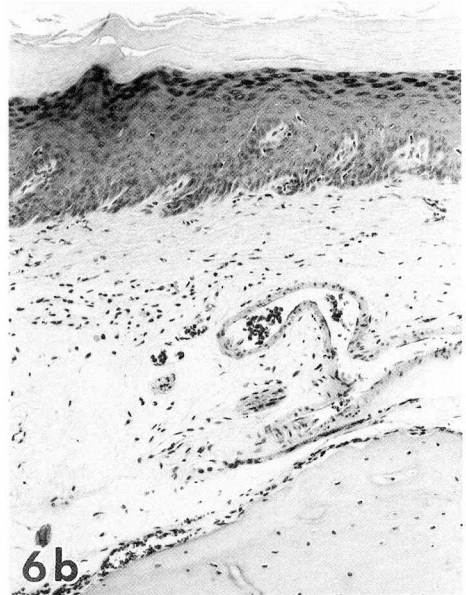


Fig. 6 Palatal section 6 weeks after inoculating with crude polysaccharides and fitting with an acrylic plate. Note acanthosis, subepithelial chronic inflammation and edema. Haematoxylin and eosin stain, (a)×45, (b)×132.



いた。有棘層の厚さは一般に薄い、細胞配列は規則的であった。また基底層は2, 3層の円柱細胞より規則的に配列していた。なお、基底層は軽度の波状がところによりみられるが、上皮稜の形成は認められなかった。

固有層は相対的に骨組織よりも厚さが薄くなっていた。口蓋骨面は平坦であり骨の吸収、添加を示唆する所見は認められなかった。

2) 口蓋床のみ装着群の組織学的所見

粘膜上皮の厚さは約100 μm で、未処置群と同様にほぼ全体にわたってその厚さは均一であった (Fig. 5)。表層の角化層は約30 μm の厚さで、粘膜上皮全体をおおっていた。顆粒層、有棘層、基底層の細胞配列は未処置群と同様であった。

固有層の厚さは未処置群に比較して、若干、幅広くなっていた。口蓋骨面は平坦で骨の吸収、添加を示唆する所見は認められなかった。

3) 口蓋床下粘膜に粗多糖体を塗布した群の組織学的所見

粘膜上皮の厚さは約220 μm で他の2群に比較して全体に厚くなっていた (Fig. 6)。また、表層には平均50 μm の角化層が認められたが、角化層の厚さも均一性の欠如がみられた。顆粒層の厚さは他の2群に比較して厚くなっており、

また、有棘層の肥厚 (acanthosis) もみられた。基底層は他の2群の直線的な配列と著しく異なり、配列が不規則になり固有層に向かって伸長する発達した上皮稜がみられた。

固有層の厚さも他の2群に比較して厚く、小円形細胞浸潤が慢性に認められた。また浮腫を認めるものもあった。口蓋骨面は骨の吸収のため粗糙となり、骨組織の厚さは他の2群より著しく厚さが減少していた。

考 察

C. albicans の細胞壁の構成は細菌類のそれとは著しく異なっていることはよく知られている。すなわち、一般の細菌類に存在するペプチドグリカンやタイコ酸などは *C. albicans* にはまったく存在せず、これらに代わる硬質な構成材である不溶性多糖体の β -グルカンが内層に存在している。さらに、その外側には水溶性多糖体のマンナンや蛋白に富む層が存在し、Sakaguchi ら¹⁷⁾はこの表層多糖体のマンナンは *C. albicans* の抗原活性を担っていると報告している。また、坂口ら¹⁸⁾は内層のグルカンは、人工抗原の場合は別として、生菌細胞壁の構成成分そのままのグルカンは、抗原活性をほとんど発揮しないと報告している。従来より義菌性

口内炎の原因の一つとして denture plaque 中の *C. albicans* の存在があげられているが、*C. albicans* のどの構成成分が原因物質であるかについて検討した報告はない。そこで、著者は *C. albicans* の表層多糖体の一つであるマンナンを分画し、義歯性口内炎における *C. albicans* 抽出マンナンの病原性について検討した。

著者の行った免疫学的反応試験、特に、遅延型皮膚反応試験 (SR試験) ならびにマクロファージ遊走阻止試験 (MI試験) の実験結果では、遅延型皮膚反応活性 (SR活性) は粗多糖体のみ強く認められ、粗マンナンではわずかに認められた。しかし、中性マンナン、酸性マンナンではSR活性は認められなかった。これらの結果は鈴木ら¹⁹⁾の報告と一致している。また、青木ら²⁰⁾は *C. albicans* 菌体から蛋白および多糖体画分を分離し、SR活性は蛋白画分にあり、粗多糖体のSR活性は混在する蛋白に由来するとした。このことから、本実験でみられた粗多糖体、粗マンナンのSR活性も混在する蛋白に由来する可能性が示唆される。

MI試験においては、いずれの *C. albicans* T株菌体抽出画分にもマクロファージ遊走阻止活性 (MI活性) が認められた。特に、粗多糖体に比較して精製した多糖体にMI活性が強く認められる傾向が示された。これらの結果は、鈴木ら¹⁹⁾の報告と一致している。阿多ら²¹⁾も *C. albicans* 感染モルモットにおいて多糖体の精製度が高いほどMI活性が強くなる傾向にあることを報告している。いずれにしても、多糖体がMI活性の主要な成分であると考えられる。しかし、精製多糖体を *C. albicans* 死菌感染モルモットに用いた著者の実験では、SR試験とMI試験とで相異なる反応性を示した。その理由については明らかではないが、橋本ら²²⁾は、多糖体はマクロファージ遊走阻止因子を産生させることは出来るが、いくつかの因子の総和として表現される遅延型皮膚反応因子を産生させることはできないと考察している。本実験では使用した義歯性口内炎患者の義歯床粘膜面 denture plaque から分離した *C. albicans* T株

の菌体抽出画分には、遅延型アレルギー反応を引き起こす抗原活性が備わっていることが認められた。

なお、皮膚毛細血管透過性亢進試験 (PF試験) では、いずれの *C. albicans* T株菌体抽出画分にも皮膚毛細血管透過性亢進活性 (PF活性) が認められた。これと同じく、PF活性を示すものにはコレラ菌の産生するコレラ毒素²³⁾ (cholera toxin) があるが、コレラ毒素は分子量84,000の蛋白質で外毒素であるのに対し、*C. albicans* からの菌体抽出画分は細胞壁構成多糖体で内毒素の要素をもつ物質²⁴⁾であるといわれている。Maibachら²⁵⁾は皮膚カンジダ症の原因は、多量の *Candida* 死菌表層から遊離される内毒素様物質であることを報告している。しかし、その後カンジダ症の原因を、*Candida* 菌体表層から遊離される内毒素であろうとする報告はみられないが、最近、岩田ら²⁶⁾によって抽出された酸性単純蛋白毒素である candidotoxin や、山本ら¹⁰⁾によって抽出された糖蛋白毒素が注目されるようになってきた。

著者は、SR活性およびMI活性を有する粗多糖体を実験的にラット口蓋床下粘膜に塗布し口蓋床を装着した群と、口蓋床のみ装着群との口蓋粘膜の組織学的比較観察では、口蓋床のみ装着群は未処置群の粘膜上皮、固有層および骨組織とほぼ同様の組織所見を示し、組織学的にはあまり大きな差異は認められなかった。Shakirら²⁷⁾もこれと同様な結果を報告しているが、Olsenら⁹⁾は2週間の口蓋床装着で軽度の炎症を引き起こしたと報告している。

口蓋床で口蓋を覆うことは食渣が床下に停滞し、さらに常在する細菌や真菌を増殖させる可能性があるが、本実験では週2回口蓋床の着脱、清掃を行ったため、口蓋床粘膜面ならびに口蓋粘膜の清潔が保持され、炎症の発現がみられなかったと思われる。

粗多糖体を口蓋床下粘膜に塗布した群では、粘膜上皮は有棘層肥厚を示し、基底層は配列が不規則になり上皮稜の発達がみられた。固有層内には小円形細胞浸潤がび慢性に認められ、さ

らに浮腫を認めるものもあり明らかな慢性炎症の組織所見を呈していた。Olsenら⁹⁾やShakirら⁷⁾は口蓋床下粘膜に *C. albicans* を塗布した実験で、粘膜上皮は錯角化、有棘層肥厚を示し、固有層内には中等度の慢性炎症性細胞の浸潤と膿瘍の形成を認めたと報告している。本実験での粗多糖体を口蓋床下粘膜に塗布した群の炎症性変化は、*C. albicans* を口蓋床下粘膜に塗布した群と比較して弱かった。

本実験での *C. albicans* T株菌体抽出画分が内毒素様物質であるかどうかは不明であるが、起炎性物質であることは明らかである。もしも、義歯性口内炎がいずれの原因で起きて、さらに粘膜上皮に外傷性傷害がおき粘膜上皮の透過性が亢進されれば、その結果、起炎性物質が容易に影響し、その起炎性因子により病状がさらに悪化する可能性が推察される。

Budtz-Jørgensen⁸⁾はサルを用いた実験で、義歯性口内炎の原因を *C. albicans* に対する遅延型アレルギー反応と考えた。さらに、Budtz-Jørgensen⁸⁾は義歯性口内炎を引き起こしたサルの血清を用いて、MI試験での遊走阻止率の上昇を認めた。実験的義歯性口内炎の組織学的所見のみからは、慢性炎症性変化が粗多糖体による遅延型アレルギー反応によって生じたものか、あるいは直接起炎性因子によるものなのかは明らかではない。いずれにせよ、*C. albicans* の細胞壁を構成しているマンナンが義歯性口内炎の病因の一つとして深く関与している可能性が本実験から示唆された。

結 論

義歯性口内炎患者の義歯床粘膜面 denture

Abstract: *Candida albicans* (serotype A) T strain was isolated from a patient with denture stomatitis, and polysaccharides (crude polysaccharide, crude mannan, neutral mannan and acidic mannan) were extracted from the cell walls of the *C. albicans* T strain. A delayed skin reaction test and macrophage migration inhibition test were performed using the guinea pigs sensitized with the whole cells of *C. albicans* T strain. Several fractions from *C. albicans* T strain were used as an antigen. A permeability increasing factor test was also performed in order to study inflammatory activity. In addition, experimental denture stomatitis was induced by inoculating crude polysaccharide under an acrylic plate. The results were as follows;

plaque から分離した *C. albicans* (serotype A) T株の表層多糖体(マンナン)である菌体抽出画分の遅延型アレルギー活性を検討するため、*C. albicans* 死菌感作モルモットに対する遅延型皮膚反応試験およびマクロファージ遊走阻止試験を行い、また、起炎性を検討するため皮膚毛細血管透過性亢進試験を行った。さらにラット口蓋粘膜に *C. albicans* T株菌体抽出画分の一つである粗多糖体を塗布し口蓋床を装着し組織学的観察を行い、以下の結論を得た。

1. 義歯性口内炎患者の義歯から分離した *C. albicans* T株から抽出したマンナンには遅延型アレルギー活性をもっていることが認められた。
2. *C. albicans* T株抽出マンナンには起炎性が認められた。
3. *C. albicans* T株抽出マンナンは慢性炎症の組織変化を引き起こすことが認められた。

以上の結果から、*C. albicans* 抽出マンナンは義歯性口内炎の病因の一つとして深く関与していることが示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり、本研究に際し終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜りました岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座 金子克教授、またご専攻の立場からご指導を賜りました岩手医科大学歯学部歯科補綴学第二講座 石橋寛二教授、口腔病理学講座 鈴木鍾美教授、歯科薬理学講座 伊藤忠信教授ならびに吉田熙講師に深く感謝の意を表します。

あわせて、日頃ご助言ご鞭撻を頂きました教室員各位に対し、感謝の意を表します。

1. Crude polysaccharide was exhibited delayed skin reactivity. All extracted fractions were exhibited macrophage migration inhibitory activity.
2. All the extracted fractions were demonstrated to possess the permeability increasing activity.
3. Histologically, the chronic inflammation phase was observed in the palatal mucosa.

These results suggest that *C. albicans* mannan is the cause of denture stomatitis.

文 献

- 1) 浜田泰三 : デンチャーブランクコントロール : 臨床カラーシリーズ2, 永末書店, 京都, 4-7ページ, 1973.
- 2) Budtz-Jørgensen, E. : The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand. J. dent. Res.* 82 : 151-190, 1974.
- 3) McCabe, J. F. and Basker, R. M. : Tissue sensitivity to acrylic resin. A method of measuring the residual monomer component and its clinical application. *Brit. dent. J.* 140 : 347-350, 1976.
- 4) Cawson, R. A. : Denture sore mouth and angular cheilitis. *Brit. dent. J.* 115 : 441-449, 1963.
- 5) Davenport, J. C. : The oral distribution of candida in denture stomatitis. *Brit. dent. J.* 129 : 151-156, 1970b.
- 6) Budtz-Jørgensen, E. : Denture stomatitis IV. An experimental model in monkeys. *Acta odont. Scand.* 29 : 513-526, 1971.
- 7) Chattaway, F. W., Odds, F. C. and Barlow, A. J. E. : An examination of the production of hydrolytic enzymes and toxins by pathogenic strains of *Candida albicans*. *J. gen. Microbiol.* 67 : 255-263, 1971.
- 8) Budtz-Jørgensen, E. : Immune response to *C. albicans* in monkeys with experimental candidiasis in the palate. *Scand. J. dent. Res.* 81 : 360-371, 1973.
- 9) Olsen, I. and Bondevik, O. : Experimental *Candida*-induced denture stomatitis in the Wistar rat. *Scand. J. dent. Res.* 86 : 392-398, 1978.
- 10) 山本容正, 岩田和夫 : *Candida albicans* の産生する糖蛋白毒素に関する研究. 第1報, 分離・精製と物理化学的性状, 真菌誌, 21 : 72-81, 1978.
- 11) Gorin, P. A. J. and Spencer, J. F. T. : Galactomannans of *Trichosporon fermentans* and other yeasts; proton magnetic resonance and chemical studies. *Canad. J. Chem.* 46 : 2299-2304, 1968.
- 12) 福井作蔵 : 還元糖の定量法 : 作物化学実験法A 一般分析法1, 東京大学出版会, 東京, 45-47ページ, 1969.
- 13) Lowry, O. H., Rosenbrough, T., Fan, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
- 14) Fiske, C. H. and Subarow, Y. : The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66 : 375-400, 1925.
- 15) 秋山武久 : マクロファージ遊走阻止試験, モダンメディア, 15 : 648-661, 1969.
- 16) Harada, M., Takeuchi, M., Fukao, T. and Katagiri, K. : A simple method for the quantitative extraction of dye extravasated into the skin. *J. Pharm. Pharmac.* 23 : 218-219, 1971.
- 17) Sakaguchi, O., Suzuki, S., Suzuki, M. and Sunayama, H. : Biochemical and immunochemical studies of fungi VIII. Immunochemical studies of mannan of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Japan. J. Microbiol.* 11 : 119-128, 1967.
- 18) 坂口平, 鈴木益子, 多巻都夫 : 真菌の生化学的免疫化学的研究. 第10報, 酵母 glucan の分離と抗原活性について, 日細誌, 22 : 267-272, 1967.
- 19) 鈴木益子, 林芳郎 : *Aspergillus fumigatus* ならびに *Candida albicans* 菌体感作モルモットにおける培養濾液成分による immune response, 日細誌, 30 : 583-587, 1975.
- 20) 青木良雄, 仲吉洋, 小野美穂子 : 真菌の免疫学的活性物質の研究, 2. *Candida* 菌体成分の免疫学的活性について, アレルギー, 17 : 48-55, 1968.
- 21) 阿多実茂, 近藤 譲, 神戸俊夫, 藤井富美子, 高橋高明, 後藤幸夫 : *Candida albicans* 菌体成分の細胞性免疫学的活性に関する研究, 真菌誌, 18 : 40-47, 1977.
- 22) 橋本達一郎, 綿貫まつ子 : 遅延型過敏症—MIF の生成から反応の発現まで, 蛋白質・核酸・酵母, 18 : 284-290, 1973.
- 23) 伊藤輝代, 横田 健, 松下 秀, 太田健爾, 工藤泰男, 大橋 誠 : コレラ菌の毛細血管透過性亢進因子産生における cAMP 依存性, 日細誌, 41 : 603-610, 1986.
- 24) 山本容正, 岩田和夫 : *Candida albicans* の産生する糖蛋白毒素に関する研究. 第2報, 毒素お

- よび菌体マンナンの *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) のゲル化活性, 真菌誌, 21 : 274-285, 1980.
- 25) Maibach, H. I. and Kligman, A. M. : The biology of experimental human cutaneous moniliasis (*Candida albicans*). *Arch. Dermatol.* 85 : 233-257, 1962.
- 26) 岩田和夫, 内田勝久, 奥平雅彦 : カンジダ毒素と感染における意義, 真菌誌, 10 : 95-107, 1969.
- 27) Shakir, B. S., Martin, M. V. and Smith, C. J. : Induced palatal candidosis in the Wistar rat. *Archs oral Biol.* 26 : 787-793, 1981.