

## 義歯性口内炎の発症メカニズムに関する研究 —*Candida albicans* の産生するプロテアーゼの関連性について—

小 原 健

岩手医科大学歯学部歯科補綴学第一講座

(主任 : 田中久敏教授)

[受付 : 1987年10月15日]

抄録 : 義歯性口内炎の発症メカニズムを解明するために *Candida albicans* (serotype A) の産生するプロテアーゼとの関連性について検討を加えた。

臨床的に口蓋が正常な義歯装着者群 (正常者群) と口蓋に義歯性口内炎 (Budtz-Jørgensen の分類による Type I, II) の認められる義歯装着者群から *C. albicans* を分離し, プロテアーゼ産生能, 酸産生能および増殖能について調べた。また, *C. albicans* のプロテアーゼ産生能と口蓋粘膜に対する病原性との関係を検索するために, プロテアーゼ産生能の高い菌株と低い菌株を用いてラットの口蓋に実験的に義歯性口内炎を発症させ得るかどうかを試みた。

その結果, *C. albicans* のプロテアーゼ産生能は, 義歯性口内炎 Type II 群から分離した菌株で特に高い傾向を示したが, 正常者群と義歯性口内炎 Type I 群から分離した *C. albicans* の菌株にも高いプロテアーゼ産生能を示すものもあった。また, 酸産生能と増殖能については各群間で差がなかった。動物実験では, プロテアーゼ産生能の高い菌株を接種した実験群において *C. albicans* による角化層内侵入や炎症が高頻度に見られた。

これらのことから, 義歯性口内炎の発症メカニズムに *C. albicans* (serotype A) の産生するプロテアーゼが関与している可能性が示唆された。

**Key words :** denture stomatitis, *Candida albicans*, proteolytic activity, acid production.

### 緒 言

義歯装着者によくみられる疾患の1つに義歯性口内炎がある。この原因に関しては, 義歯性口内炎患者の口腔内より *Candida albicans* が高率に検出されることから, 義歯性口内炎と *C. albicans* との関連性が注目されている<sup>1-13)</sup>。

Budtz-Jørgensen は, 義歯性口内炎の原因として, (1)外傷, (2)感染, (3)アレルギーの3点を挙げ, この中で, 特に重要視されているのは,

外傷と *Candida* 属による感染であると述べている<sup>9)</sup>。さらに, 彼は義歯性口内炎に関する一連の研究にもとづき, 義歯性口内炎の Type と原因を関連づけた。すなわち, Type I の主たる原因は外傷であり, Type II, III の主たる原因は *Candida* 属による感染であり, 外傷は感染の素因を作る因子として働いていると結論づけている。

一方, *C. albicans* による義歯性口内炎の発症メカニズムに関しては, *C. albicans* の産生

A possible role in pathogenesis of denture stomatitis : proteolytic activity of *Candida albicans*.

Ken OHARA

(Department of Removable Prosthodontics, 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. 12 : 303-316, 1987

する酸素, ことにプロテアーゼによって上皮表面が破壊されることも一因と考えられているが<sup>14)</sup>, 相反する見解も報告されており<sup>15-17)</sup>, いまだ結論づけられていない。また, 義歯性口内炎の発症メカニズムにおける *C. albicans* の産生するプロテアーゼの関与に関する研究は, ほとんどが *in vitro* での報告であり, *in vivo* での報告はみあたらない。

そこで著者は, まず実験 I として, 義歯性口内炎との関連性をもっとも注目されている *C. albicans* (serotype A) を口蓋粘膜が臨床的に正常な義歯装着者群と義歯性口内炎 (Budtz-Jørgensen の分類<sup>9)</sup>による Type I~III) に罹患している義歯装着者群から分離し, 分離菌株のプロテアーゼ産生能と義歯性口内炎との関連を調べた。また, *C. albicans* の産生する酸がプロテアーゼの活性化を促進することが示唆されているので<sup>18-21)</sup>, *C. albicans* の酸産生能についても調べ, さらに *C. albicans* の増殖

能の程度が, 産生するプロテアーゼと酸の総量に影響するかどうかを検討した。実験 II として, *C. albicans* のプロテアーゼ産生能の高い菌株と産生能の低い菌株をラットの口蓋に接種することによって, *C. albicans* のプロテアーゼ産生能と口蓋粘膜に対する病原性との関係を検索した。

## 実験方法

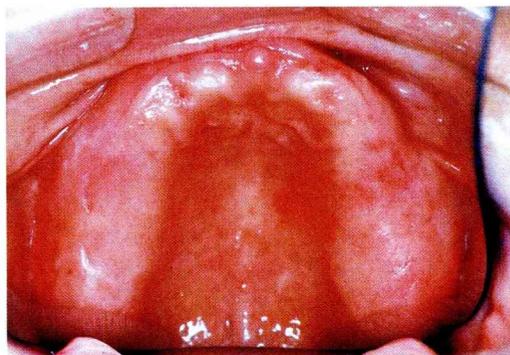
### 実験 I

#### 1. 被験者

被験者は, 本学歯学部附属病院第一補綴科に来院した義歯装着者, 男性22名および女性45名 (総義歯装着者54名, 局部床義歯装着者13名) の計67名で, 平均年齢は64.3歳であった。そのうち, 口蓋粘膜が臨床的に正常な義歯装着者は23名であり, 口蓋粘膜が義歯性口内炎に罹患している義歯装着者は44名であった。さらに後者の群を Budtz-Jørgensen の分類<sup>9)</sup>にしたがって,



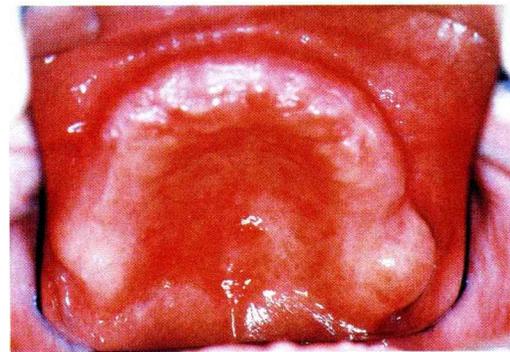
Normal



D. S. Type I



D. S. Type II



D. S. Type III

Fig.1 Classification of denture stomatitis by Budtz-Jørgensen, E. (1978).

以下のように Type I, II, III に分類した (Fig. 1)。

Type I : localized inflammation or pinpoint hyperemia.

Type II : diffuse erythema.

Type III : inflammatory papillary hyperplasia.

この分類により、義歯性口内炎に罹患している義歯装着者群は、Type I 群28名、Type II 群15名、Type III 群1名であった。Type III 群については、1名しか得られなかったため、以下の実験から除外した。

上記のように群分けをした各被験者から、*Candida* 属を分離した。

## 2. *Candida* 属の分離および同定

名被験者から *Candida* 属を分離するにあたり、上顎義歯をはずした後、ただちに滅菌綿棒で上顎義歯粘膜面を拭い、カンジダ GE 培地 (ニッスイ) に塗抹し、37°C にて48時間好氣的に培養した。この培養により得られたコロニーについて、各被験者につき3コロニーをサブロー寒天培地に接種し、37°C にて48時間好氣的に純培養を行った。

*Candida* 属の同定は、グラム染色を行って細胞形態を確認した後、カンジダチェック (ヤトロン) を用いて、血清学的に行った。本実験では、同定の結果得られた *Candida* 属の菌種のうち、*C. albicans* (serotype A) についてプロテアーゼ産生能、酸産生能および増殖能を調べた。

各被験者より分離した *C. albicans* は20% スキムミルクに浮遊させて、-40°C で凍結保存した。実験に際しては、凍結保存した *C. albicans* を常温にもどし、サブロー寒天培地 (ニッスイ) に接種して、37°C にて48時間好氣的に培養したものをを用いた。

## 3. *C. albicans* のプロテアーゼ産生能の評価

各群から分離した *C. albicans* のプロテアーゼ産生能は、Staib<sup>20)</sup> の Serum-Protein-Agar 法 (以下 SPA 法と略す) に準じた方法である BSA 寒天培地と Rùchel<sup>20)</sup> による SPA 法の変

法である YCB-BSA 寒天培地と yeast extract-BSA 寒天培地の計3法を用いて調べた。なお、SPA 法の原法では合成ビタミン製剤として Protovita を用いているが、入手不可能であったため本実験では MacDonal<sup>20)</sup> の処方準じてビタミンを処方した。3法の培地を以下に示す。YCB-BSA 寒天培地 (組成 : yeast carbon base 11.7g bovine serum albumin 2g, agar 20g, distilled water 1000ml, pH4.0), yeast extract-BSA 寒天培地 (組成 : yeast extract 100mg, glucose 20g, bovine serum albumin 2g, MgSO<sub>4</sub> 500mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, agar 20g, distilled water 1000ml, pH4.0), BSA 寒天培地 (組成 : glucose 20g, bovine serum albumin 2g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, MgSO<sub>4</sub> 500mg, biotin 20 µg, nicotinic acid 400 µg, pyridoxal hydrochloride 400 µg, riboflavin 200 µg, thiamine hydrochloride 400 µg, distilled agar 20g, water 1000ml, pH 5.0)。

各菌株のプロテアーゼ産生能を調べる際に、1菌株につき各培地を1個づつ用いた。各培地の中央に菌を1白金耳接種し、37°C にて好氣的に培養した。培養開始後、5日目にプロテアーゼ産生能を評価した。評価するに先だち、プロテアーゼの作用により生じた蛋白分解領域をより明瞭にする目的で、Staib<sup>20)</sup> の方法に準じて染色液 [組成 : naphthalene black 10B 12.5g, methanol acetic acid mixture 1 l (methanol : glacial acetic acid = 9 : 1)] を用いて20分間培地を染色した。その後約24時間中に脱色液 (組成 : aqua dest. 10.0 l, glacial acetic acid 1.5 l, phenol crist. 0.5 l) を3~4回交換しながら脱色した。

*C. albicans* のプロテアーゼ産生能の評価は、透明帯の有無、あるいはその大きさにより、-, ±, +, ++ の4段階に分けて評価した (Fig. 2)。

## 4. *C. albicans* の酸産生能の評価

酸産生能は、培養液の pH 値で評価した。*C. albicans* をサブロー寒天培地で37°C にて48時間好氣的に前培養した。その菌を pH7.0 の滅菌済

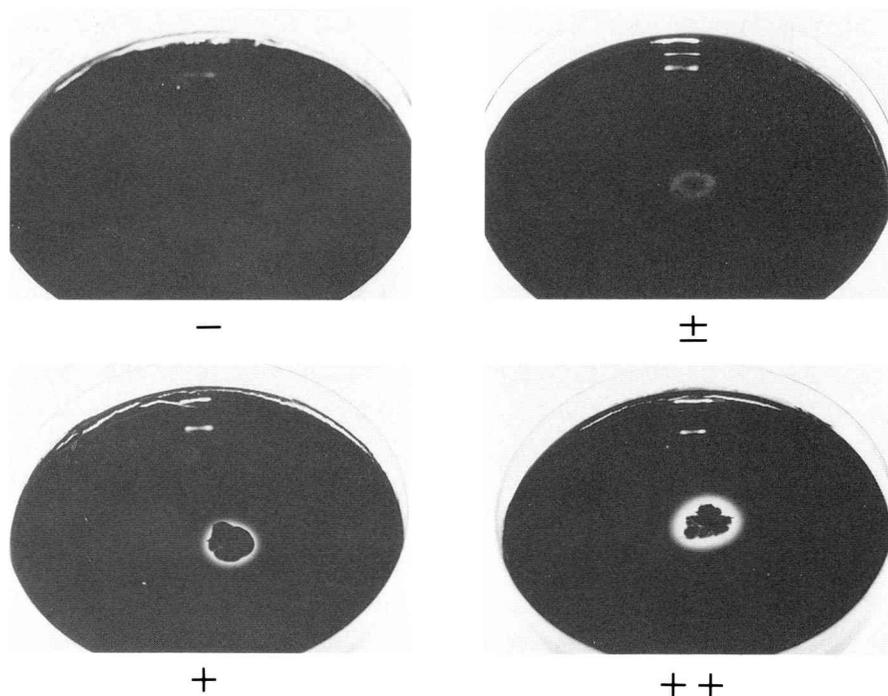


Fig.2 Index for proteolytic activity of *C. albicans*.  
 - : No proteolytic zone, ± : Indistinct proteolytic zone, + : Linear proteolytic zone, ++ : Wide proteolytic zone.

み磷酸緩衝食塩水に浮遊させ、菌数を一定にするために島津社製分光光度計 Spectronic 20 を用い、波長 540nm で吸光度 0.4~0.5 に調製し、菌浮遊液 1 ml を 100ml のサブローブドウ糖液体培地に接種した。菌を接種した培地を、スターラーを用いて攪拌しながら 37°C で好氣的に培養した。培養開始後、24時間、48時間、72時間と経時的に培養液 10ml を採取した。そのうち 1 ml を菌の増殖能の評価に用い、9 ml を濾過滅菌した後に、濾液の pH を岩城硝子社製 M-225 デジタル pH メーターで測定した。

#### 5. *C. albicans* の増殖能の評価

培養液中における *C. albicans* の菌数を生菌数測定法を用いて経時的に測定した。前項 4 で採取した *C. albicans* の菌浮遊液 1 ml を、さらに滅菌済み磷酸緩衝食塩水で  $10^5 \sim 10^7$  に希釈し、希釈液 0.1ml をサブロー寒天培地に接種し、37°C にて 48 時間好氣的に培養した。培養後、1 ml 当たりの colony forming unit (CFU/ml) を計測した。

#### 実験 II

##### 動物実験

*C. albicans* のプロテアーゼ産生能と口蓋粘膜に対する病原性との関係を検索するために、実験 I で各被験者から分離した *C. albicans* の中から、プロテアーゼ産生能が高い菌 3 株 (No. 1~3) と、プロテアーゼ産生能が低い菌 3 株 (No. 4~6) の計 6 株を選択した。この 6 菌株を用いて実験的にラットの口蓋粘膜に義菌性口内炎を発症させ得るかどうか観察した。

実験動物には、Wistar 系雄ラット (平均体重 400g) をコントロール群 4 匹、実験群では菌 1 株につきラット 8 匹の計 52 匹を用いた。ラットは、オリエンタル社製固型飼料を細かく分砕したものと、自由給水により飼育した。

ラットの口腔内に菌を接種する前に、各ラットの口腔内における *Candida* 属の菌の有無を調べた。まず、滅菌綿棒でラットの口蓋部を拭い、カンジダ GE 培地に塗抹し、37°C にて 48 時間好氣的に培養した。得られたコロニーについて

ては、グラム染色を施して形態を観察し、必要に応じてカンジダチェックで血清学的に同定した。

ラットの口腔内に菌を接種する方法として、今回は口蓋床に菌を接種し、口腔内に固定する方法を用いた。

口蓋床を作製するにあたり、ペントバルビタールナトリウム (38mg/kg) を腹腔内に注射し、全身麻酔を施した後、ラットの上顎をアルギン酸印象材で印象採得し、硬石膏で模型を作製した。ついで、模型上で、即時重合レジン (ユニファースト®、GC社製) を用いて筆積法で口蓋床を作製した。

ラットの上顎に口蓋床を固定するにあたっては、麻酔を施した後、電気エンジン用フィッシャーバーで上顎両中切歯間正中部の歯肉側 $\frac{1}{3}$ に前後的に穴を開け、穴にネジをねじ込み、口蓋床を口蓋部に適合させ、口蓋床とネジを即時重合レジんで連結固定した (Fig. 3)。

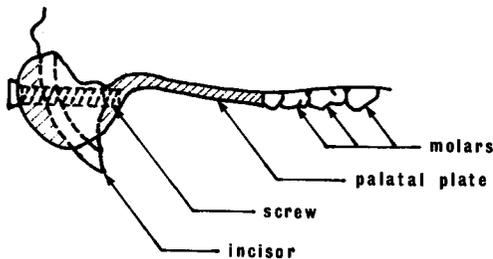


Fig. 3 Scheme of acrylic resin plate fitted in the mouth of rat.

上記の固定法を用いて、実験群のラットには、菌を接種した口蓋床を装着した。また、コントロール群のラットには、菌未接種の口蓋床を装着した。

菌の接種には、サブロー寒天培地で37°Cにて48時間好気的に培養し、培地から集菌したものを直接使い、その量は湿菌体量で約30mgとした。

ラットの口蓋に口蓋床を装着後、2週目にエーテルの過吸入により屠殺した。屠殺直後に、ラットの口腔内における *C. albicans* の存在の有無を調べた。まず、上顎から口蓋床をはずし、口蓋部を滅菌綿棒で拭い、カンジダGE培地に塗

抹し、37°Cにて48時間好気的に培養した。

屠殺後、摘出したラットの口蓋の intermolar region<sup>26)</sup> を10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、固定完了後に10% EDTA 溶液で脱灰した。その後、通法にしたがってパラフィン包埋し、前額断で約6  $\mu$ m の連続切片を作製し、hematoxylin-eosin 染色と periodic acid-Schiff 染色とを施し、観察した。

組織学的検索は、著者らが報告した以下の分類にしたがって観察した<sup>26)</sup>。

(1) Infection : 角化層内に *C. albicans* の侵入がみられるもの。

(2) Inflammation : 上皮の肥厚、上皮内や結合組織内への小円形細胞浸潤などの炎症反応がみられるもの。

なお、Infection, Inflammation を起こす率は、各群のラットの匹数 (コントロール群 : 4匹, 実験群 : 1菌株につき8匹) に対する、組織学的に Infection あるいは Inflammation がみられたラットの匹数を百分率で表わした。

## 結 果

### 1. *Candida* 属の分離および同定

*Candida* 属の検出率は、正常者群で56.0%、義歯性口内炎 Type I 群で64.0%、Type II 群で86.7%と、正常者群よりも義歯性口内炎患者群で高く、特に Type II 群に高い傾向を示した (Table 1)。また、*Candida* 属の菌種別で検出率が最も高かったのは、各群ともに *C. albicans* (serotype A) であり、ついで、*C. tropicalis* と *C. glabrata* であった。*C. albicans* (serotype B) は、総被験者67名中1名から分離したのみであった (Table 2)。これらの *Candida* 属の菌種で、1被験者の口腔内から1種のみを検出したものは、正常者群で53.8%、義歯性口内炎 Type I 群で72.2%、Type II 群で69.2%であった。また、2種を混合して検出したものは、正常者群で46.2%、Type I 群で27.8%、Type II 群で30.8%であった (Table 3)。

### 2. *C. albicans* のプロテアーゼ産生能の評価

YCB-BSA 寒天培地で培養した場合、+を示

Table 1. Occurrence of yeast-like fungi isolated from patients with or without denture stomatitis.

	Patients without denture stomatitis (23)*	Patients with denture stomatitis	
		Type I (28)*	Type II (15)*
positive culture	13 (56.0)	18 (64.0)	13 (86.7)

( ) per cent

( )\* : Number of subjects.

Table 2. Distribution of *Candida* species isolated from patients with or without denture stomatitis.

species of <i>Candida</i>	Patients without denture stomatitis (13)*	Patients with denture stomatitis	
		Type I (18)*	Type II (13)*
<i>C. albicans</i> A	10 (76.9)	15 (83.3)	9 (69.2)
<i>C. albicans</i> B	0	0	1 ( 7.7)
<i>C. tropicalis</i>	5 (38.5)	1 ( 5.6)	4 (30.8)
<i>C. glabrata</i>	3 (23.1)	4 (22.2)	2 ( 5.4)
Non-identified	3 (23.1)	3 (16.7)	1 ( 7.7)

( ) per cent

( )\* : Number of subjects with positive culture.

Table 3. Ratio of isolated species from dentures.

	Patients without denture stomatitis (13)*	Patients with denture stomatitis	
		Type I (18)*	Type II (13)*
1 species only	7 (53.8)	13 (72.2)	9 (69.2)
2 species mixed	6 (46.2)	5 (27.8)	4 (30.8)

( ) per cent

( )\* : Number of subjects.

したものは、義歯性口内炎 Type I 群 (53.3%) に多く、++ は正常者群 (60.0%) と義歯性口内炎 Type II 群 (66.6%) に多い傾向を示した。yeast extract-BSA 寒天培地では、+ は正常者群 (50.0%) と義歯性口内炎 Type I 群 (53.3%) に多く、++ は義歯性口内炎 Type II 群

(66.6%) に多い傾向を示した。BSA 寒天培地では、+ は正常者群 (80.0%) に多く、++ は義歯性口内炎 Type II 群 (55.5%) に多い傾向を示した (Table 4)。

なお、3 培地における *C. albicans* のプロテアーゼ産生能の判定結果にはばらつきがみられ

Table 4. Comparison of proteolytic activity of *C. albicans*, serotype A strains in normal mucosa, denture stomatitis, type I and denture stomatitis, type II. Proteolytic activity is greater in denture stomatitis, type II.

	Normal			Type I			Type II		
	YCB	YE	BSA	YCB	YE	BSA	YCB	YE	BSA
-	0	0	0	0	0	13.3	0	0	11.1
±	0	10.0	0	6.7	0	20.0	0	0	0
+	40.0	50.0	80.0	53.3	53.3	40.0	33.3	33.3	33.3
++	60.0	40.0	20.0	40.0	46.7	26.7	66.6	66.6	55.5

(%)

YCB : YCB-BSA agar media.  
 YE : yeast extract-BSA agar media.  
 BSA : BSA agar media.

たものの総合的に評価すると、正常者群と義歯性口内炎 Type I 群から分離した *C. albicans* では+が多く、義歯性口内炎 Type II 群から分離した *C. albicans* では++が多い傾向を示した。

### 3. *C. albicans* の酸産生能の評価

正常者群から分離した *C. albicans* については、培養開始前の培地の pH 値が6.41であったが、培養開始後24時間目で6.14、48時間目で3.50、72時間目で3.32と経時的に培養上清の pH 値が低下した。義歯性口内炎 Type I 群と Type II 群から分離した *C. albicans* についても、経時的に培養上清の pH 値の低下がほぼ同じ値でみられた (Fig. 4)。したがって各群か

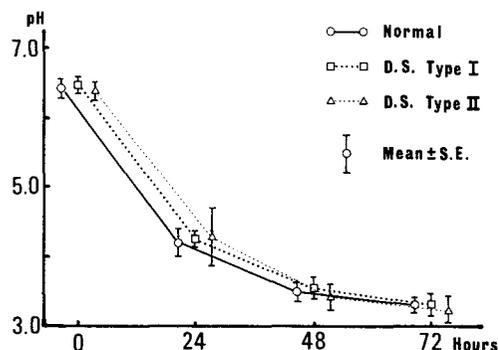


Fig.4 Comparison of pH variation in various strains of *C. albicans*, serotype A (72 hours incubation at 37°C). There were no significant difference amongst strains tested.

ら分離した *C. albicans* の酸産生能には差がみられなかった。

### 4. *C. albicans* の増殖能の評価

培養液中における *C. albicans* の菌数についてみると、正常者群から分離した *C. albicans* では、菌接種時は  $4.40 \times 10^5$  CFU/ml であったが、培養開始後24時間目では  $6.62 \times 10^7$ 、48時間目では  $3.59 \times 10^8$ 、72時間目では  $2.73 \times 10^8$  と経時的に菌数が増加した。義歯性口内炎 Type I 群と Type II 群から分離した *C. albicans* についても、経時的に菌の増殖が同程度に観察された (Table 5)。したがって、各群から分離した *C. albicans* の経時的な菌数の増加には、差がみられなかった。

### 5. 動物実験

#### 1) 微生物学的検索

口蓋床を装着する前には、コントロール群と実験群のすべてのラットの口腔内から *Candida* 属は検出されなかった。屠殺時には、コントロール群のすべてのラットの口腔内から *Candida* 属は検出されなかった。実験群では、*C. albicans* のプロテアーゼ産生能の高い菌株を接種した群と低い菌株を接種した群のすべてのラットの口腔内から *C. albicans* が検出された。

#### 2) 組織学的検索

コントロール群では、著者らの分類した Infection と Inflammation はみられず、口蓋

Table 5. Growth of various strains of *C. albicans*, serotype A (Sabouraud's dextrose liquid media 72 hours incubation, at 37°C). There were no significant difference amongst strains tested.

	0	24h.	48h.	72h.
Nomal	$4.40 \times 10^5$ ( $\pm 6.33 \times 10^4$ )	$6.62 \times 10^7$ ( $\pm 1.35 \times 10^7$ )	$3.59 \times 10^8$ ( $\pm 6.79 \times 10^7$ )	$2.73 \times 10^8$ ( $\pm 5.50 \times 10^7$ )
Type I	$3.65 \times 10^5$ ( $\pm 5.28 \times 10^4$ )	$5.49 \times 10^7$ ( $\pm 1.36 \times 10^7$ )	$3.48 \times 10^8$ ( $\pm 6.18 \times 10^7$ )	$3.86 \times 10^8$ ( $\pm 6.70 \times 10^7$ )
Type II	$4.86 \times 10^5$ ( $\pm 9.62 \times 10^4$ )	$11.2 \times 10^7$ ( $\pm 2.40 \times 10^7$ )	$3.19 \times 10^8$ ( $\pm 7.52 \times 10^7$ )	$2.73 \times 10^8$ ( $\pm 4.63 \times 10^7$ )

Mean CFU/ml ( $\pm$  S.E.)

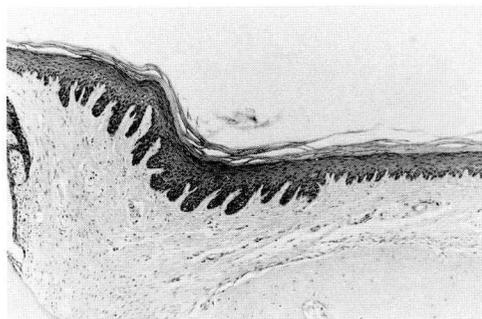


Fig.5 Photomicrograph of normal untreated rat palate. The palatal mucosa exhibits normal orthokeratinized epithelium and lacks evidence of fungal infection. Hematoxylin-Eosin stain  $\times 100$ .

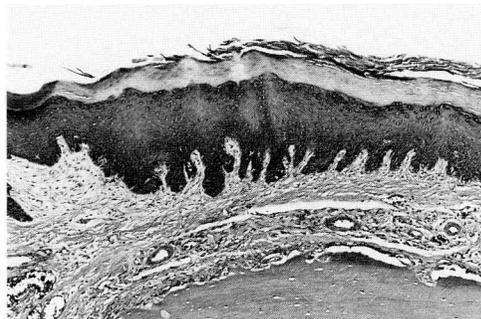


Fig.6 Photomicrograph of control rat palate fitted with acrylic resin plate but not inoculated with *C. albicans*. Other than hyperkeratosis and epithelial hyperplasia, palatal mucosa here was similar to that of normal rat palate in that neither showed evidence of candidal infection. Hematoxylin-Eosin stain  $\times 100$ .

床を装着していないラットの口蓋 (Fig. 5) とほぼ同じ組織像を呈していた。すなわち、正角化した角化層が粘膜上皮表層にみられ、上皮稜は規則的な波状を呈し、上皮直下の結合組織にも炎症性変化はみられなかった。また、一部には軽度の有棘層の肥厚や上皮稜の伸長を示した例もみられたが、いずれの場合も炎症性変化はみられなかった (Fig. 6)。

実験群において、変化がみられた口蓋粘膜上皮には、高頻度に Infection と分類される *C. albicans* の角化層内への侵入が認められ、角化層は顆粒層から剥離している像を呈しており、部位によっては、角化層の消失がみられた (Fig. 7)。また、Inflammation と分類されるような上皮稜が高度に伸長し、かつ不規則な波

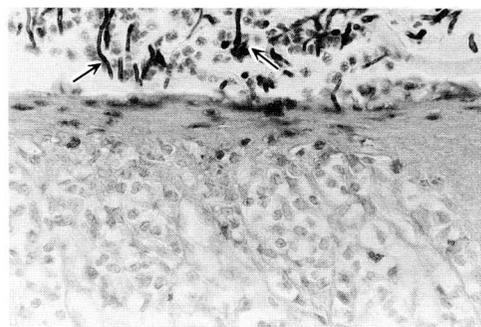
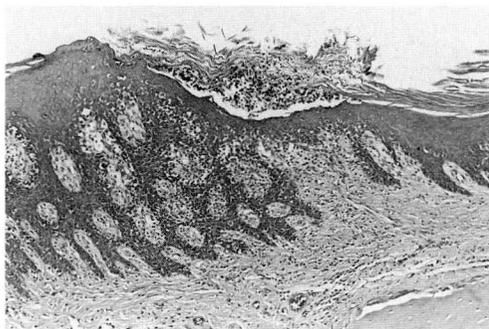


Fig.7 Photomicrograph of *C. albicans* infection of palatal mucosa. Note surface fungal hyphae which extend to corneal layer (arrow). Periodic acid-Schiff stain  $\times 250$ .



**Fig.8** Low power photomicrograph of infected palatal mucosa. Histological features include epithelial hyperplasia, intraepithelial and subepithelial infiltration of chronic inflammatory cells, mainly lymphocytes and plasma cells. Intraepithelial edema is also noted. Hematoxylin-Eosin stain  $\times 100$ .

状を呈し、上皮内や粘膜下組織内には小円形細胞浸潤が認められるものもあった (Fig. 8)。組織所見を正常, Infection, Inflammation の3つに分類すると, Infection を起こす率は, プロテアーゼ産生能の高い菌を接種した群でみると, 菌株No.1では87.5%, 菌株No.2では75.5%, 菌株No.3では62.0%であった。また, プロテアーゼ産生能の低い菌を接種した群でみると, 菌株No.4では0%, 菌株No.5では75.0%, 菌株No.6では12.5%であった。また, Inflammation

を起こす率は, プロテアーゼ産生能の高い菌を接種した群でみると, 菌株No.1では62.5%, 菌株No.2では50.0%, 菌株No.3では37.5%であった。また, プロテアーゼ産生能の低い菌を接種した群でみると, 菌株No.4では12.5%, 菌株No.5では50.0%, 菌株No.6では25.0%であった (Table 6)。したがって, 全体的にはプロテアーゼ産生能の高い菌を接種した群の方が Infection と Inflammation を起こす率が高かった。

### 考 察

#### 1. 義菌性口内炎と *C. albicans* の関係について

義菌性口内炎と *Candida* 感染との関係を最初に注目した人は Cahn であるとされており<sup>6)</sup>, その後, 多くの報告がみられる<sup>1-13)</sup>。これらの報告は, 義菌性口内炎に罹患していない義菌装着者と義菌性口内炎に罹患している義菌装着者からの *Candida* 属の検出率を比較し, 義菌性口内炎患者の口腔内から *C. albicans* が高率に検出されるため, 義菌性口内炎の原因として *C. albicans* が注目されてきた。本研究においても, 義菌性口内炎に罹患していない義菌装着者群では *Candida* 属の検出率は56.0%であ

Table 6. Summarized histological examination. Strains of *C. albicans*, serotype A with high proteolytic activity (numbers 1 ~ 3) produced palatal candidosis more frequently than those with low proteolytic activity (numbers 4 ~ 6).

No.	P.A.			pH variation				Growth variation (CFU/ml)				Hist. Exam.(%)	
	YCB	YE	BSA	0	24h.	48h.	72h.	0	24h.	48h.	72h.	Infect.	Inflamm.
1	++	+	++	6.25	4.24	3.31	3.16	$8.20 \times 10^5$	$2.06 \times 10^8$	$6.18 \times 10^8$	$3.03 \times 10^8$	87.5	62.5
2	++	++	+	6.25	4.36	3.53	3.14	$1.12 \times 10^5$	$1.70 \times 10^8$	$5.35 \times 10^7$	$3.03 \times 10^8$	75.0	50.0
3	++	++	++	6.56	4.10	3.22	3.08	$1.86 \times 10^5$	$3.90 \times 10^7$	$3.60 \times 10^8$	$2.52 \times 10^8$	62.5	37.5
4	+	±	+	6.25	4.24	3.54	3.53	$2.28 \times 10^5$	$5.50 \times 10^7$	$1.04 \times 10^8$	$5.60 \times 10^7$	0	12.5
5	+	+	±	6.50	4.47	3.79	3.65	$2.45 \times 10^5$	$5.65 \times 10^7$	$2.70 \times 10^8$	$9.00 \times 10^8$	75.0	50.0
6	+	+	±	6.50	4.50	3.44	3.28	$4.35 \times 10^5$	$3.10 \times 10^7$	$2.25 \times 10^8$	$2.40 \times 10^8$	12.5	25.0

P.A. : Proteolytic activity.  
YCB : YCB-BSA agar media.  
YE : yeast extract-BSA agar media.  
BSA : BSA agar media.

Hist. Exam. : Histological examination.  
Infect. : Infection.  
Inflamm. : Inflammation.

るのに対して、義歯性口内炎 Type I 群は64.0%, Type II 群は86.7%と高い検出率を示し、Type II 群が最も高い値を示した。このように、*Candida* 属の検出率が義歯性口内炎 Type II 群で高いということは、*Candida* 属の感染が義歯性口内炎 Type II の主たる原因としている Budtz-Jørgensen の見解<sup>9)</sup>を支持している。*Candida* 属の菌種については、義歯性口内炎患者の口腔内から検出される *Candida* 属の菌種のうち、検出率が最も高いのは *C. albicans* であり、ついで *C. glabrata* と *C. tropicalis* であると報告されている<sup>7,12,13)</sup>。さらに、玉本は、*Candida* 属を血清学的に同定し、*C. albicans* を serotype A, B に分けて述べているが<sup>13)</sup>、その結果では、ほとんどが serotype A であり serotype B はわずかであったと報告している。本研究においても、各群において *C. albicans* (serotype A) の検出率が最も高く、ついで *C. tropicalis* と *C. glabrata* が高かった。*C. albicans* (serotype B) は、総被験者67名中1名から分離されたのみであった。

このように、義歯性口内炎を発症させ得る菌種としては、従来の報告と同様に *C. albicans* (serotype A) が関与している可能性が考えられる。

*C. albicans* が義歯性口内炎を発症させるメカニズムに関して、Budtz-Jørgensen<sup>14)</sup>は原因の1つに *C. albicans* の産生する酵素による口蓋粘膜の破壊をあげている。しかし、口腔領域における *C. albicans* のプロテアーゼ産生能と口腔粘膜に対する病原性との関係については相反する報告もあり<sup>15~17)</sup>、いまだ明確な結論は得られていない。Germaine ら<sup>15,16)</sup>は、*C. albicans* によるプロテアーゼの産生と活性化にとって低 pH 環境が必要条件であることと、唾液がプロテアーゼ合成の抑制因子であることから、*C. albicans* が口腔内でプロテアーゼを産生しないという結論を出した。これに対して、Samaranayake ら<sup>17)</sup>は、糖の存在下では唾液中でも *C. albicans* が発育し、プロテアーゼを産生できることから、このプロテアーゼが口腔カンジダ症

の病原としての役割を演じている可能性を示唆した。

もしも、*C. albicans* の産生するプロテアーゼが義歯性口内炎の発症メカニズムに関与しているならば、義歯性口内炎を Budtz-Jørgensen の分類<sup>9)</sup>にしたがって Type I~III に分けた場合に、*C. albicans* が主たる原因と考えられている義歯性口内炎 Type II, III 群から分離した *C. albicans* のプロテアーゼ産生能が高いことが考えられる。そこで、本研究では義歯装着者から分離した *C. albicans* (serotype A) のプロテアーゼ産生能を調べた。

*C. albicans* のプロテアーゼ産生能を調べる方法として、生化学的に定量分析する方法<sup>15,16,20)</sup>もあるが、本研究においては、分析の対照とする菌の株数が多かったため、bovine serum albumin 含有の寒天培地による簡便法である SPA 法に準じた方法<sup>22)</sup>と変法<sup>23)</sup>を用いることとした。SPA 法の変法は Rùchel ら<sup>23)</sup>がプロテアーゼ産生能の検出感度を改善した方法である。また、SPA 法を用いて *C. albicans* のプロテアーゼ産生能を知らべた報告もあるので<sup>14)</sup>、著者はその結果と比較するために SPA 法に準じた方法も用いた。

その結果、SPA 法の原法においては、*C. albicans* のプロテアーゼ産生能が変法に比べてやや低めに検出される傾向があった。得られた結果を各群から分離した *C. albicans* ごとにとみると、正常者群から分離した *C. albicans* については、BSA 寒天培地の結果が YCB-BSA 寒天培地と yeast extract-BSA 寒天培地の結果よりも極端に+が多い値となったため、一定の傾向をつかむことができなかった。変法の結果のみをみると、*C. albicans* のプロテアーゼ産生能は++++がほぼ1:1の割合になっていた。義歯性口内炎 Type I 群から分離した *C. albicans* については、3法いずれにおいても+が多く、義歯性口内炎 Type II 群から分離した *C. albicans* については、3培地とも、いずれにおいても++++が多かった。

Budtz-Jørgensen<sup>14)</sup>は、SPA 法の原法を用い

て正常者と義歯性口内炎患者から分離した *C. albicans* のプロテアーゼ産生能を調べているが、正常者と義歯性口内炎患者から分離した *C. albicans* のプロテアーゼ産生能には差がなく、被験者の口蓋の炎症の有無あるいは程度とプロテアーゼ産生能との間に関係をみいだせなかったと述べている。本研究における SPA 法に準じた方法の結果では、正常者群と義歯性口内炎 Type I 群から分離した *C. albicans* よりも義歯性口内炎 Type II 群から分離した *C. albicans* のプロテアーゼ産生能が高い傾向を示した。Budtz-Jørgensen は *C. albicans* のプロテアーゼ産生能を調べる際に画線培養を行い、-, + の 2 段階で評価している。画線培養すると各コロニーの周囲に生じた透明帯が重なってしまうため、プロテアーゼ産生能の有無は分かっても量的には判断できない。そこで本研究では、1 白金耳量の菌を培地の中央にまとめて接種し、その周囲に形成された透明帯の有無あるいは大きさにより -, ±, +, ++ の 4 段階で *C. albicans* のプロテアーゼ産生能を評価した。そのため、本研究と Budtz-Jørgensen の結果とに相違が生じたものと思われる。

*C. albicans* の産生するプロテアーゼは、至適 pH が 2.2~3.2 であることが分かっており<sup>27-29)</sup>、プロテアーゼの活性化には低 pH 環境が必要条件である。口腔内で *Candida* 属が生息している denture plaque の pH に関する Olsen らの研究では、健常者よりも義歯性口内炎患者の denture plaque の pH が低く、また、その pH が糖の摂取により低下し、2 時間以上にわたってベースラインレベルよりも低い値を持続したと述べている<sup>18)</sup>。また、糖添加液体培地中における *C. albicans* の酸の産生に関する Samaranayake らの研究では、48 時間で pH が 7.0 から 3.5 まで下降し、培養液中の短鎖カルボン酸に関する分析では、pH の下降を生じさせ維持しているのは主に acetate であるとしている<sup>20)</sup>。このように、*C. albicans* は高度に酸産生菌であり、*C. albicans* 自らプロテアーゼの活性にとって適した環境を作ることが推測され

る。

本研究では、義歯性口内炎に罹患していない義歯装着者群と義歯性口内炎患者群から分離した *C. albicans* の酸産生能を、サブローブドウ糖液体培地で培養した際の培養上清の pH で評価した。その結果、各群から分離した *C. albicans* の培養上清の pH は、経時的にほぼ同じ割合で低下した。また、*C. albicans* の増殖能の相違が産生されるプロテアーゼと酸の総量に影響することが考えられるので、pH の測定と並行して、培養液中の菌数を測定した。しかし、各群から分離した *C. albicans* は同じ割合で菌が増殖し、各群間に大きな差はみられなかった。したがって、*C. albicans* の増殖能の程度の相違が本研究における *C. albicans* のプロテアーゼ産生能と酸産生能の結果に影響している可能性は低いものと思われる。

## 2. *C. albicans* のプロテアーゼ産生能と義歯性口内炎との関連性について

義歯性口内炎の発症メカニズムに *C. albicans* の産生するプロテアーゼが関与している可能性について、*in vivo* での研究は報告されておらず、両者の関係はいまだ不明な点が多い。

Olsen ら<sup>30)</sup>は、義歯性口内炎に関する動物実験に、初めてラットを用いた。その結果、ラットの口蓋に生じた病変の組織像がヒトの義歯性口内炎の組織像に類似していたこと、口蓋床装着後一時的に体重の減少を生じるものの口蓋床の装着に耐えられること、安価で入手しやすいことなどの理由から、義歯性口内炎に関する実験にラットが有用であると述べている。また、Shakir らもラットを用いて同様の実験を行い、*Candida* 属の菌種別による病原性について報告している<sup>31,32)</sup>。

本研究では、*C. albicans* のプロテアーゼ産生能と口蓋粘膜に対する病原性との関係を検索する目的で、プロテアーゼ産生能の高い菌株と低い菌株を用い、ラットに実験的に義歯性口内炎を起こすことが可能かどうか試みた。その結果、組織学的にはプロテアーゼ産生能の高い菌株を接種した群において Infection の生じる割

合が高い傾向を示し、また、Inflammationにおいてもやや高い傾向を示した。

Budtz-Jørgensen<sup>38)</sup>, Anneroth ら<sup>39)</sup>, Wictorin ら<sup>40)</sup>, Bergendal ら<sup>46)</sup>の義歯性口内炎 Type II に相当する粘膜の組織所見では、錯角化あるいは角化層の消失、上皮稜の伸長、棘細胞症、上皮内への小円形細胞浸潤、上皮細胞間の浮腫、粘膜下組織内の慢性炎症などがみられたと報告されているが、*C. albicans* の角化層内への侵入は報告されていない。しかし、本研究では上記のような所見のほかに、*C. albicans* の角化層内への侵入が認められた。*C. albicans* が角化層内に侵入した例では、高頻度に角化層が顆粒層から剥離した組織像を示していた。

これらのことから、*C. albicans* の産生するプロテアーゼが義歯性口内炎の発症メカニズムに関与している可能性が高いことが示唆された。しかし、正常者群と義歯性口内炎 Type I 群からも *C. albicans* が検出されることや同一被験者から他の菌種も混在して検出されること、また、正常者群と義歯性口内炎 Type I 群から分離した *C. albicans* の菌株にも高いプロテアーゼ産生能がみられたこと、さらには、プロテアーゼ産生能の低い菌株を接種したラットの口蓋粘膜にも *C. albicans* の角化層内侵入や炎症がみられたものがあったことから、義歯性口内炎の発症には *C. albicans* 以外の菌種や *C. albicans* のプロテアーゼ産生能以外の要因、あるいは、宿主側の要因も関与しているものと思われる、今後の課題としたい。

## 結 論

義歯性口内炎の発症メカニズムにおける *C. albicans* の産生するプロテアーゼと酸の関与の可能性を検討する目的で、口蓋粘膜が臨床的に正常な義歯装着者群（正常者群）と義歯性口内炎（Budtz-Jørgensen の分類による Type I, II）に罹患している義歯装着者群から *C. albicans* (serotype A) を分離し、プロテアーゼ産生能、酸産性能および増殖能を調べた。また、*C. albicans* のプロテアーゼ産生能の高い

菌株と低い菌株をラットの口蓋に接種することにより、*C. albicans* のプロテアーゼ産生能と口蓋粘膜に対する病原性との関係を調べた。その結果、

1. 義歯装着者からの *Candida* 属の検出率は、義歯性口内炎患者、特に Type II 群で高い傾向を示した。検出された菌種は、各群において *C. albicans* (serotype A) が多かった。
2. *C. albicans* (serotype A) のプロテアーゼ産生能は、義歯性口内炎 Type II 群から分離した菌株で高い傾向を示した。
3. *C. albicans* (serotype A) の培養上清中の pH 値はいずれの群においても経時的にはほぼ同じ割合で低下し、酸産生能には群間で差がなかった。
4. サブローブドウ糖液体培地中での *C. albicans* (serotype A) の菌数の増加は、いずれの群においてもほぼ同じ割合で生じ、菌数の経時変化には、群間で大きな差はみられなかった。
5. 動物実験においては、プロテアーゼ産生能の高い *C. albicans* (serotype A) を接種した群において、*C. albicans* の角化層内への侵入や粘膜上皮の炎症が高頻度に生じた。

## 謝 辞

稿を終るにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師岩手医科大学歯学部歯科補綴学第一講座田中久敏教授に深甚なる謝意を表わすとともに、本研究に対して数多くの御援助、御助言をいただいた岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座金子 克教授ならびに岩手医科大学歯学部口腔衛生学講座片山 剛教授に衷心より謝意を捧げます。また、終始御教示をいただいた口腔微生物学講座本田寿子講師ならびに歯科薬理学講座吉田 熙講師に深く感謝の意を表します。さらに種々の御協力をいただきました熊谷啓二講師、遠藤 実助手をはじめ岩手医科大学歯学部歯科補綴学第一講座の教室員各位、ならびに大学院生各位に心から感謝いたします。

**Abstract :** Strains of *Candida albicans*, serotype A were isolated from patients with and without denture stomatitis, and proteolytic activity of each was tested using the original as well as 2 modifications of Staib's Serum-Protein-Agar method. Aerobic growth characteristics and acid production were measured after culturing for 72 hours, at 37 °C in Sabouraud's dextrose liquid media by titration of colony forming units and measurement of pH in the respective supernatants. Each of 3 strains of *C. albicans*, serotype A with low or high proteolytic activity was then tested for its ability to produce palatal candidosis in the rat. Results were as follows :

1. Three different *Candida* species were identified of which *C. albicans*, serotype A was the most frequent.
2. Strains of *C. albicans*, serotype A isolated from patients with denture stomatitis type II tended to have a higher proteolytic activity than those isolated either from controls or patients with denture stomatitis type I.
3. There was no difference noted in either the acid production or growth characteristics of *C. albicans*, serotype A strains isolated from patients with or without denture stomatitis.
4. Strains of *C. albicans*, serotype A with high proteolytic activity produced palatal candidosis more frequently than those with low proteolytic activity.

Results of this study suggest that proteolytic activity of *C. albicans*, serotype A may play a role in the pathogenesis of denture stomatitis.

#### 文 献

- 1) Cawson, R. A. : Denture sore mouth and angular cheilitis. Oral candidiasis in adults. *Br. Dent. J.* 115 : 441-449, 1963.
- 2) Cawson, R. A. : Symposium on denture sore mouth. II. The role of *Candida*. *Dent. Pract. Dent. Rec.* 16 : 138-142, 1965.
- 3) Ritchie, G. M., Fletcher, A. M., Main, D. M. G. and Prophet, A. S. : The etiology, exfoliative cytology, and treatment of denture stomatitis. *J. Prosthet. Dent.* 22 : 185-200, 1969.
- 4) Davenport, J. C. : The oral distribution of *Candida* in denture stomatitis. *Br. Dent. J.* 129 : 151-156, 1970.
- 5) Budtz-Jørgensen, E. and Bertram, U. : Denture stomatitis. I. The etiology in relation to trauma and infection. *Acta Odontol. Scand.* 28 : 71-92, 1970.
- 6) Budtz-Jørgensen, E. : The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand. J. Dent. Res.* 82 : 151-190, 1974.
- 7) Olsen, I. : Denture stomatitis. Occurrence and distribution of fungi. *Acta Odontol. Scand.* 32 : 329-333, 1974.
- 8) Bastiaan, R. J. : Denture sore mouth. Aetiological aspects and treatment. *Aust. Dent. J.* 21 : 375-382, 1976.
- 9) Budtz-Jørgensen, E. : Clinical aspects of *Candida* infection in denture wearers. *J. Am. Dent. Assoc.* 96 : 474-479, 1978.
- 10) Renner, R. P., Lee, M., Andors, L. and McNamara, T. F. : The role of *C. albicans* in denture stomatitis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 47 : 323-328, 1979.
- 11) Arendorf, T. M. and Walker, D. M. : Oral candidal populations in health and disease. *Br. Dent. J.* 147 : 267-272, 1979.
- 12) 中村長隆, 尾上孝利, 梅本俊夫, 河原邑安, 佐川寛典, 三谷春保 : 義歯床粘膜面に付着した denture plaque 中の真菌生息に及ぼす諸因子の検討, 補綴誌, 27 : 863-869, 1983.
- 13) 玉本光弘 : デンチャープラークのカンジダに関する研究(第1報) デンチャープラークのカンジダ叢と義歯性口内炎との関係, 広大歯誌, 16 : 242-249, 1984.
- 14) Budtz-Jørgensen, E. : Proteolytic activity of *Candida spp.* as related to the pathogenesis of denture stomatitis. *Sabouraudia*, 12 : 266-271, 1971.
- 15) Germaine, G. R., Tellefson, L. M. and Johnson, G. L. : Proteolytic activity of *Candida albicans* : Action on human salivary proteins. *Infect. Immun.* 22 : 861-866, 1978.
- 16) Germaine, G. R. and Tellefson, L. M. : Effect of pH and human saliva on protease production by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 31 : 323-326, 1981.
- 17) Samaranayake, L. P., Hughes, A. and MacFarlane, T. W. : The proteolytic poten-

- tial of *Candida albicans* in human saliva supplemented with glucose. *J. Med. Microbiol.* 17 : 13-22, 1984.
- 18) Olsen, I. and Birkeland, J. M. : Assessment of denture plaque pH in subjects with and without denture stomatitis. *Scand. J. Dent. Res.* 83 : 370-374, 1975.
- 19) Olsen, I. and Birkeland, J. M. : Denture stomatitis—yeast occurrence and the pH of saliva and denture plaque. *Scand. J. Dent. Res.* 85 : 130-134, 1977.
- 20) Samaranayake, L. P., Geddes, D. A. M., Weetman, D. A. and MacFarlane, T. W. : Growth and acid production of *Candida albicans* in carbohydrate supplemented media. *Microbios*, 37 : 105-115, 1983.
- 21) Samaranayake, L. P., Weetman, D. A., Geddes, D. A. M. and MacFarlane, T. W. : Carboxylic acids and pH of denture plaque in patients with denture stomatitis. *J. Oral Pathol.* 12 : 84-89, 1983.
- 22) Staib, F. : Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia*, 4 : 187-193, 1965.
- 23) Rùchel, R., Tegeler, R. and Trost, M. : A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20 : 233-244, 1982.
- 24) MacDonald, F. and Odds, F. C. : Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. *J. Med. Microbiol.* 13 : 423-435, 1980.
- 25) Kutuzov, H. and Sicher, H. : Anatomy and function of the palate in the white rat. *Anat. Rec.* 114 : 67-84, 1952.
- 26) 小原 健, 遠藤 実, 金森敏和, 田中久敏 : 義歯性口内炎に関する実験的研究——*Candida albicans* の起炎性に及ぼす糖の影響について, 補綴誌, 31 : 879-885, 1987.
- 27) Remold, H., Fasold, H. and Staib, F. : Purification and characterization of proteolytic enzyme from *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 167 : 399-406, 1968.
- 28) Chattaway, F. W. and Odds, F. C. : An examination of the production of hydrolytic enzymes and toxins by pathogenic strains of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 67 : 255-263, 1971.
- 29) Rùchel, R. : Properties of a purified proteinase from the yeast *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 659 : 99-113, 1981.
- 30) Olsen, I. and Bondevik, O. : Experimental *Candida*-induced denture stomatitis in the Wistar rat. *Scand. J. Dent. Res.* 86 : 392-398, 1978.
- 31) Shakir, B. S., Martin, M. V. and Smith, C. J. : Induced palatal candidosis in the Wistar rat. *Arch. Oral Biol.* 26 : 787-793, 1981.
- 32) Shakir, B. S., Martin, M. V. and Smith, C. J. : Relative effectiveness of various yeasts, *Candida* spp. and *Torulopsis glabrata*, for inducing palatal infection in the Wistar rat. *Arch. Oral Biol.* 28 : 1069-1071, 1983.
- 33) Budtz-Jørgensen, E. : Denture stomatitis. III. Histopathology of trauma- and *Candida*-induced inflammatory lesions of the palatal mucosa. *Acta Odontol. Scand.* 28 : 551-579, 1970.
- 34) Anneroth, G. and Victorin, L. : Denture stomatitis. A histological and microradiographic study of the alveolar mucosa. *Odont. Revy.* 26 : 135-144, 1975.
- 35) Victorin, L., Anneroth, G. and Frithiof, L. : Denture stomatitis. A clinical, electron-microscopic, microradiographic and light-microscopic study. *Acta Odontol. Scand.* 33 : 299-311, 1975.
- 36) Bergendal, T. and Isacson, G. : A combined clinical, mycological and histological study of denture stomatitis. *Acta Odontol. Scand.* 41 : 33-44, 1983.