

目次

緒言	1
第1章：糖尿病ラットへの <i>C. albicans</i> 強制経口投与による 慢性肥厚性カンジダ症モデル作製の試み	
1.1 序文	2
1.2 材料および方法	2
1.2.1 動物および飼育条件	2
1.2.2 使用動物および試験群の構成	2
1.2.3 薬物の調製および投与方法	3
1.2.3.1 アロキサン	3
1.2.3.2 <i>C. albicans</i>	3
1.2.4 尿糖・血糖モニタリング	3
1.2.5 剖検および組織の固定	4
1.2.6 包埋および組織標本の作製	4
1.2.7 ヘマトキシリン・エオジン (H. E.) 染色法	4
1.2.8 組織学的解析	5
1.2.9 感染病原微生物の形態学的解析	5
1.2.9.1 過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色法	5
1.2.10 免疫組織学的解析	5
1.2.11 統計学的解析	6
1.3 結果	6
1.3.1 一般状態	6
1.3.2 組織学的解析	6
1.4 考察	10
第2章 糖尿病ラットへのプレドニゾロン間歇投与 - <i>C. albicans</i> 日和見感染誘発による慢性肥厚性カンジダ症モデル作製の試み-	
2.1 序文	12
2.2 材料および方法	12
2.2.1 動物および飼育条件	12
2.2.2 使用動物および試験群の構成	12
2.2.3 薬物の調製および投与方法	13
2.2.3.1 アロキサン	13

2.2.3.2 プレドニゾロン	13
2.2.4 尿糖・血糖モニタリング	13
2.2.5 剖検および組織の固定	13
2.2.6 包埋および組織標本の作製	13
2.2.7 ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色法	14
2.2.8 組織学的解析	14
2.2.9 感染病原微生物の形態学的解析	14
2.2.10 免疫組織学的解析	14
2.2.11 CD4+/CD3+および CD8+/CD3+二重免疫組織学的解析	15
2.2.12 統計学的解析	15
2.3 結果	15
2.3.1 一般状態	15
2.3.2 組織学的解析	17
2.4 考察	22

第3章 *Lactobacillus gasseri* OLL2716 株を含むプロバイオティクスは 糖尿病ラットの慢性肥厚性カンジダ症を抑制する

3.1 序文	24
3.2 材料および方法	24
3.2.1 動物および飼育条件	24
3.2.2 使用動物および試験群の構成	24
3.2.3 薬物の調製および投与方法	25
3.2.3.1 アロキササン	25
3.2.3.2 <i>C. albicans</i>	25
3.2.3.3 LG21 ヨーグルト	25
3.2.4 尿糖・血糖モニタリング	25
3.2.5 剖検および組織の固定	25
3.2.6 包埋および組織標本の作製	26
3.2.7 ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色法	26
3.2.8 組織学的解析	26
3.2.9 感染病原微生物の形態学的解析	26
3.2.10 免疫組織学的解析	26
3.2.11 統計学的解析	26
3.3 結果	26
3.3.1 一般状態	26
3.3.2 組織学的解析	28

3.4 考察	32
第4章 慢性肥厚性カンジタ症から癌に至る発癌メカニズムの解析	
-p16、RAR- β 2、TIMP3、ERCC1 および BRCA1 遺伝子のプロモーター領域の メチル化とタンパク発現の関連性の欠如	
4.1 序文	34
4.2 材料および方法	34
4.2.1 動物および飼育条件	34
4.2.2 実験デザイン	34
4.2.3 薬物の調製および投与方法	36
4.2.3.1 アロキササン	36
4.2.4 尿糖・血糖モニタリング	36
4.2.5 ヘマトキシリン・エオジン (H. E.) 染色法	36
4.2.6 レーザーキャプチャーマイクロダイセクションとメチル化解析	36
4.2.7 免疫組織学的解析	38
4.3 結果	39
4.4 考察	46
結語	49
引用文献	50
謝辞	60

緒言

慢性炎症が癌の発生に関与することが、ピロリ菌や肝炎ウイルス感染による慢性炎症に起因する胃癌および肝細胞癌の症例から注目を浴び、慢性炎症と発癌の関係を解明するため様々な研究が行われている^{1,2}。常在真菌である *Candida albicans* (*C. albicans*) は、糖尿病患者や高齢者に対し、免疫能低下による感染症を誘発し^{3,4}、*C. albicans* 感染が慢性化した口腔ならびに食道における慢性肥厚性カンジダ症患者の一部で癌へ進行することが報告されている⁵⁻¹²。*in vivo*においても持続的な *C. albicans* 感染は発癌プロモーターである Phorbol-12, 13-didecanoate よりも強い発癌促進作用を示す^{8,13,14}。したがって、*C. albicans* 感染は炎症のみならず腫瘍発生に重要な因子であることが明らかになりつつあるが、*C. albicans* 感染による慢性炎症と発癌との関係を解析した研究は非常に少ない^{3,4}。その理由の一つは、ヒトと同様の病変を示す動物モデルが存在しないことである。カンジダ症のラットおよびマウスへの誘発は、免疫抑制剤や抗菌剤を投与することによって比較的容易にできる¹⁵⁻¹⁷。しかし、免疫抑制剤の投与では、効果が軽度であればカンジダ症は回復し、重度になると全身性カンジダ症を発症して動物は死亡するため、長期間持続する *C. albicans* 感染は成立しない。したがって、扁平上皮過形成ならびに癌を発症する *C. albicans* 感染による慢性肥厚性カンジダ症モデルの作製は非常に困難を要する¹⁵⁻¹⁷。

児玉ら¹⁸は、アロキサン投与により糖尿病を誘発させた WBN/Kob ラットの前胃に、*C. albicans* 感染を伴った重度の慢性炎症および扁平上皮増殖性病変が形成され、その一部が扁平上皮癌に進行することを報告した。また佐野ら^{19,20}はアロキサン誘発糖尿病ラットの前胃増殖性病変は、インスリンおよび抗真菌剤のイトラコナゾール投与によって抑制されることから、糖尿病および *C. albicans* 感染が本病変形成に深く関与していることを明らかにした。以上から、糖尿病の WBN/Kob ラットは、前胃に、長期間 *C. albicans* 感染を持続し、癌や過形成を発症する慢性肥厚性カンジダ症のモデルであることは明らかであるが、一方、本モデルの病変の形成にはほぼ生存期間に相当する長期の時間を要すること、また病変の程度は一定でなく、発癌率も低いという事実も指摘された。

そこで、筆者は、*C. albicans* の強制経口投与またはプレドニゾン間歇投与の2種類の方法により、高率かつ重症度の高い慢性肥厚性カンジダ症モデルの作製を試みるとともに、本モデルを用いプロバイオティクスであるヨーグルトの慢性肥厚性カンジダ症に対する予防および治療効果の解析研究を実施した。さらに、*C. albicans* による慢性炎症から癌に至る発癌過程のメカニズム解析のために、前胃病変の増悪化に関与する炎症細胞の同定ならびに癌抑制遺伝子・DNA 修復遺伝子の DNA プロモーター領域のメチル化およびそのタンパク発現の関連性を解析した。

第1章 糖尿病ラットへの *C. albicans* 強制経口投与による慢性肥厚性カンジダ症モデル作製の試み

1.1 序文

児玉ら¹⁸⁻²⁰は、アロキサンにより糖尿病を誘発させたラットの前胃粘膜に *C. albicans* 感染による慢性炎症を伴った扁平上皮癌が発生することを見出し、本動物は過去に報告のない長期間の真菌症を持続し、扁平上皮過形成および癌を発症する慢性肥厚性カンジダ症のモデルであることを報告した。しかし、本モデルの *C. albicans* 感染は糖尿病の持続に伴う易感染性による日和見感染であり、病変の形成にはほぼ生存期間に相当する長期の時間を要すること、また病変の程度に個体差があり発癌率が低いことが問題点として指摘された。そこで、筆者らは、糖尿病ラットに *C. albicans* を直接的に強制経口投与することにより、*C. albicans* 感染による慢性肥厚性カンジダ症モデルを早期かつ効率的に作製することを目指した。

1.2 材料および方法

1.2.1 動物および飼育条件

日本 SLC 株式会社生産の雌 WBN/Kob ラットを用いた。気温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 30\%$ および 12 時間毎の明暗サイクル（8 時から 20 時までの明期および 20 時から 8 時までの暗期）で制御された動物室において動物を金属ケージで飼育し、標準実験動物飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社、東京）および水を自由に摂取させた。なお、本動物実験は摂南大学動物委員会により承認され、実験に用いた動物の取り扱いは、摂南大学の動物実験に関する規定を遵守して行った。

1.2.2 使用動物および試験群の構成

雌の WBN/Kob ラットを総計 40 匹用いた。糖尿病群では、10 週齢のラット 30 匹にアロキサンを単回投与した。非糖尿病群として、10 匹のラットを用いた。糖尿病群のラット 15 匹および非糖尿病群のラット 10 匹の総計 25 匹に対し、12 週齢から 10 週間、*C. albicans* 溶液を強制経口投与した。したがって、本実験の試験群は、アロキサンを投与し糖尿病を誘発させた AL 群(15 匹)、糖尿病に加え *C. albicans* を投与した AC 群(15 匹)、糖尿病を誘発させず *C. albicans* のみを投与した C 群(10 匹)の計 3 群から構成された (Fig. 1)。

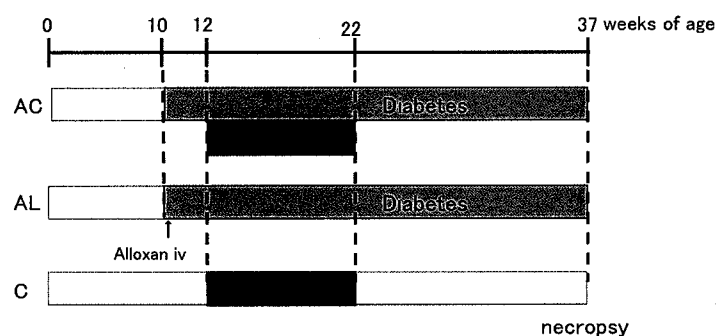


Fig. 1: Experimental design.

1.2.3 薬物の調製および投与方法

1.2.3.1 アロキサン

アロキサンの投与量を、動物が長期間生存し、糖尿病状態を持続すると予測される 40 mg/kg に設定し、投与容量が体重 1 kg につき 1 mL になるように Alloxan monohydrate (シグマアルドリッジジャパン株式会社、東京) を生理食塩水 (大塚製薬株式会社、東京) に溶解した。アロキサンの投与液をいずれも用時に調製し、AL 群および AC 群に対して尾静脈内に単回投与した。

1.2.3.2 *C. albicans*

本研究室内で飼育したアロキサンにより糖尿病を誘発した F344 ラットを用い、増殖性病変が認められた胃から *C. albicans* 株を分離培養した。本株は、遺伝子解析により *Candida albicans* ATCC=18804 の近縁菌であると同定され、使用するまで Microbank (pro-Lab Diagnostics, Ontario, Canada) 中に、 -80°C で保存された。凍結保存していた株を試験開始 1 週間前に Potato Dextrose Agar, Slants (BD BBL Prepared Culture Media) を用いて室温 (23°C) で培養し、月に一度継代を行い、試験終了時まで用いた。投与 72 時間前に Potato Dextrose Agar, Slants (BD BBL Prepared Culture Media) で培養した *C. albicans* に生理食塩水 (大塚製薬株式会社、東京) を加えて溶解し、 6×10^7 個/mL になるように菌数を調整し、最初の 2 週間は週に 3 回、その後 8 週間は週に 1 回強制経口投与 (1 mL/匹) した。

1.2.4 尿糖・血糖モニタリング

AL 群および AC 群の尿糖を、アロキサンの投与日を投与 0 日と起算して投与 0~3 日までの連日、投与後 1~3 週まで週 1 回および投与後 4 週以降は毎月 1 回測定した。全群に対し、血糖を投与後 4 週以降、毎月 1 回測定した。尿糖に関しては新鮮尿中のブドウ糖をプレテスト 3a (和光純薬工業株式会社、大阪) を用い、血糖に関しては尾静脈からの新鮮血をグルテスト E (株式会社三和化学研究所、愛知) を用いて午後の一定時刻 (13~16 時) にそれぞれ測定した。

1.2.5 剖検および組織の固定

37 週齢に剖検を行った。剖検予定週齢に至らず状態が悪化した動物については、その時点で剖検に付した。

動物を深麻酔下で腹部大動脈より放血安楽死させ、各臓器を肉眼的に観察した後、直ちに消化管を摘出し、すべての臓器とともに 10% 中性緩衝ホルマリン溶液 (pH 7.2) に浸漬固定した。また、胃に関しては大弯側から開いた状態で固定した (Fig. 2)。

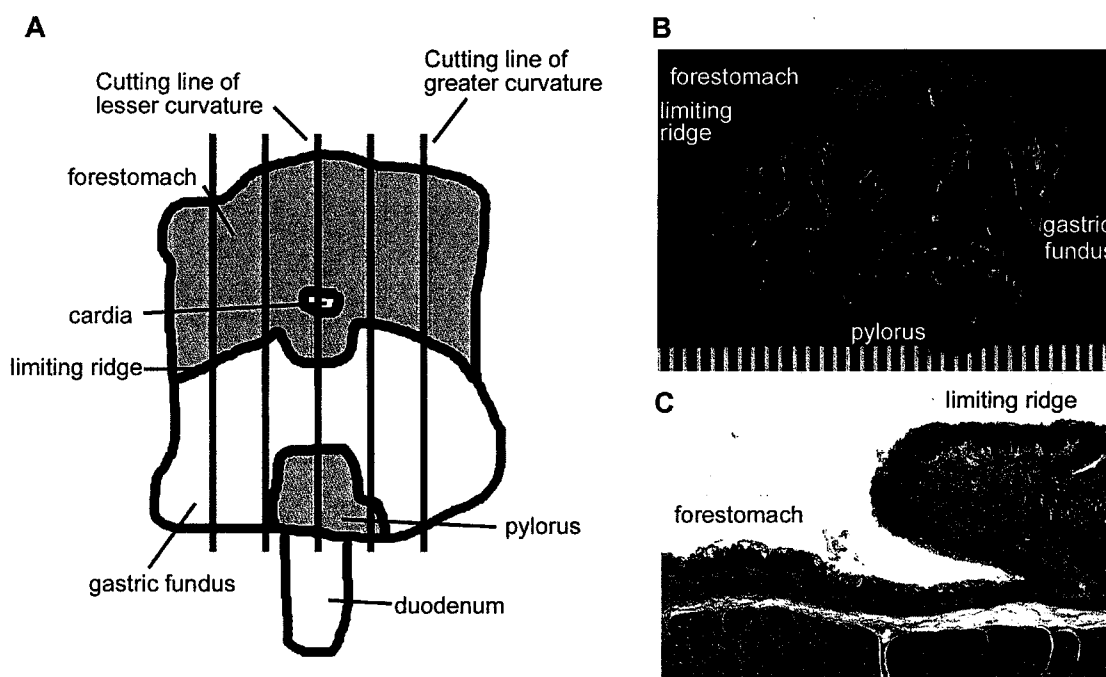


Fig. 2: Cutting line and normal structure of the stomach.

(A) The rat stomach was opened along the greater curvature, cut about 5 mm apart, and 6 pieces were obtained as the pictured 6 portions demarcated with red lines. Two middle pieces were selected and examined as lesser curvatures. Two pieces at both edges were selected and examined as greater curvatures. (B) Macro-image of the stomach of health rat before fixation. (C) Micro-image of the forestomach. HE stain. Scale bar: 100 μ m.

1.2.6 包埋および組織標本の作製

摘出した臓器を 24 時間固定後、常法に従い約 5 mm の厚さで切り出した。前胃に関しては長軸方向に端から 5 mm 間隔で切り出し、全てを標本にした (Fig. 2)。エタノール系 (70 ~ 100%) で脱水、パラフィン包埋後、大型滑走式ミクロトーム (大和光機工業株式会社、埼玉) を用い、約 4 μ m の厚さの組織切片を作製した。

1.2.7 ヘマトキシリン・エオジン (H. E.) 染色法

常法に従い、マイヤーのヘマトキシリンおよびエオジン染色を行った。

1.2.8 組織学的解析

作製された標本を、光学顕微鏡 (Nikon LABOPHOT) を用いて観察し、病理形態学的な解析を実施した。前胃粘膜の扁平上皮における増殖性および炎症性病変の grade 判定は、兒玉らの方法に従った¹⁸。扁平上皮過形成は粘膜の厚さを指標として、対照動物と同程度の変化を「-」、軽度の過形成の変化を「+」、中等度の変化を「++」、「++」以上の高度の変化を「+++」と等級付けし、また扁平上皮癌と診断した例を squamous cell carcinoma の略として「SCC」と規定した。化膿性炎症は、粘膜表層における好中球の浸潤であり、慢性炎症は、粘膜固有層および粘膜下織におけるリンパ球や形質細胞の浸潤である。化膿性炎症および慢性炎症の程度については、粘膜表層ならびに粘膜固有層・粘膜下織の浸潤している細胞の出現頻度が対照動物と同程度の変化を「-」、軽度の変化(10%以下)を「+」、中等度の変化(10-30%)を「++」、高度の変化(30-60%)を「+++」と等級付けした。*C. albicans* 感染の程度は、対照動物と同程度の変化を「-」、軽度の変化(10%以下)を「+」、中等度の変化(10-30%)を「++」、高度の変化(30-60%)を「+++」と等級付けした。

1.2.9 感染病原微生物の形態学的解析

HE 染色切片を鏡検した後、感染性病変の有無にかかわらず、すべての組織標本について以下の染色を施した。

1.2.9.1 過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色法

PAS 染色により、真菌類および一部の細菌類は赤～赤紫色に染色される。

キシレンによる脱パラフィン処理およびエタノール系列 (100～70%) による親水化を施した切片を蒸留水で洗浄した後、1%オルト過ヨウ素酸水溶液で 10 分間糖質の酸化処理を施し、蒸留水で各 1 分間 2 回洗浄した。水分を除去した後、酸化で生じたアルデヒドをシッフ試薬 (武藤化学株式会社、東京) と 15 分間反応させ、多糖類を呈色した。呈色後、切片を亜硫酸水で各 3 分間 3 回洗浄し、さらに 3 分間流水で洗浄した後、マイヤーのヘマトキシリン液に 3 分間浸漬して核染色を行い、10 分間流水および蒸留水で色出した。染色した切片をエタノール系列 (70～100%) およびキシレンで脱水および透徹後、封入した。

1.2.10 免疫組織学的解析

前胃の切片について、形態学的な検査とともに免疫組織学的な解析を行った。免疫染色では、切片にキシレンによる脱パラフィン処理およびエタノール系列 (100～70%) による親水化を施した後に、蒸留水で洗浄し、抗原賦活化処理を行った。抗原賦活化処理として、*C. albicans* に対する免疫染色では酵素処理 (ペプシン、37℃、20 分間) を、また Ki-67 に対する免疫染色では 10 mM のクエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中での熱処理 (10 分間) を行った。その後、50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) with 0.03% Tween-20 (TBST) で洗浄し、0.03% 過酸化水素水を含む 100% メタノールで内在性ペルオキシターゼに対するブロッキ

ングを行った。TBST で洗浄後、免疫グロブリン Fc 受容体や補体受容体を介した非特異的
反応の除去のために、TBST で希釈した 5%正常ヤギ血清によるブロッキングを室温で 5 分間
行い、Dako Real Antibody Diluent で希釈した抗 *C. albicans* 抗体 (1:400、Chemicon、USA)
および抗 Ki-67 抗体 (1:500、Epitomics、USA) を用い、4°C で一晩反応させた。さらに、
TBST で洗浄後、それぞれ二次抗体としてシンプルステインラット MAX-PO (M) または (R)
を用い室温で 60 分間反応後、3,3-diaminobenzidine (DAB) にて発色させた後、直ちに蒸留
水で 10 分間洗浄し、マイヤーのヘマトキシリン液に 1 分間浸漬して対比染色を行い、10
分間流水および蒸留水中で色出しを行った。染色切片をエタノール系列 (70~100%) およ
びキシレンで脱水および透徹後、封入した。細胞増殖の指標として、扁平上皮細胞 (1000
細胞) に対する Ki-67 陽性細胞数を計測した。

1.2.11 統計学的解析

Ki-67 陽性細胞数には、Student の t 検定を、増殖性変化および炎症変化には、
Mann-Whitney U 検定を用い、統計学的に解析した (Stat MateIII、ATMS、東京)。有意水準
5%で検定を行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

1.3 結果

1.3.1 一般状態

AL 群の 1 例を一般状態が悪化したために、14 週齢で剖検した。原因は、重度の糖尿病状
態によるケトアシドーシスであると推測された。

アロキサンを投与後、ほとんどのラットは翌日から高血糖 (≥ 300 mg/dL) および高尿糖
(> 500 mg/dL) を示し、剖検時まで持続した (AC 群: 13/15、AL 群: 13/14)。AC 群の 2 例お
よび AL 群の 1 例は、正常から軽度の血糖および尿糖を示した。剖検時の AC 群および AL 群
の平均体重は C 群と比較し、有意に減少していた (AC: 198.7 ± 19.8 g、AL: 182.2 ± 15.4 g、
C: 237.7 ± 16.2 g)。

1.3.2 組織学的解析

AC 群では 14/15 (93.3%) に、AL 群では 4/14 (28.6%) に、角化亢進を伴う前胃扁平上皮過形
成が形成されたが、C 群では病変は認められなかった (Fig. 3) (Table 1)。扁平上皮過形成
の程度は、AL 群と比較し AC 群で有意に高度であり、そのうち 1 例は扁平上皮癌にまで進
行していた (Fig. 3) (Table 1)。さらに細胞増殖の指標 Ki-67 の陽性率も、AL 群および C
群と比べ AC 群では増加していた (Fig. 4)。

扁平上皮過形成を示した粘膜表層には、糜爛または潰瘍を伴った好中球やマクロファージ
を主体とする化膿性炎症が観察され、粘膜表層の角質層には、細菌ならびに酵母型およ
び菌糸型の *C. albicans* 抗体による免疫染色で陽性を示す *C. albicans* が認められた

(Fig. 5) (Table 2)。粘膜固有層から粘膜下織にかけては、リンパ球や形質細胞が多数浸潤していた。これらの炎症性変化ならびに感染の程度は、AL 群と比較し AC 群で有意に高度であった (Fig. 5) (Table 2)。一方、*C. albicans* のみを投与していた C 群では、細菌感染は全例に認められたが、炎症細胞の浸潤は伴っておらず、*C. albicans* 感染は 1 例にも認められなかった (Table 2)。

Table 1 Histopathologic findings of hyperplastic changes in the forestomach

	AC	AL	C
Effective no. of rats	15	14	10
Squamous cell carcinoma	1 (6.6%)	0	0
Squamous cell hyperplasia	14 (93.3%) **##	4 (28.6%) ##	0
+	2 (13.3%)	2 (14.3%)	
++	8 (53.3%)	2 (14.3%)	
+++	4 (26.7%)	0	

**Significantly different from AL group P<0.01

##Significantly different from C group P<0.01

Table 2 Histopathologic findings of inflammatory changes in the forestomach

	AC	AL	C
Effective no. of rats	15	14	10
Suppurative inflammation in mucosa	13 (86.7%) **##	4 (28.6%) ##	0
+	2 (13.3%)	1 (7.1%)	
++	6 (40%)	3 (21.4%)	
+++	5 (33.3%)		
Chronic inflammation in submucosa	13 (86.7%) **##	4 (28.6%) ##	0
+	9 (60%)	4 (28.6%)	
++	4 (26.7%)	0	
<i>C. albicans</i> infection	13 (86.7%) **##	4 (28.6%) ##	0
Bacterial infection	15 (100%)	14 (100%)	10 (100%)

**Significantly different from AL group P<0.01

##Significantly different from C group P<0.01

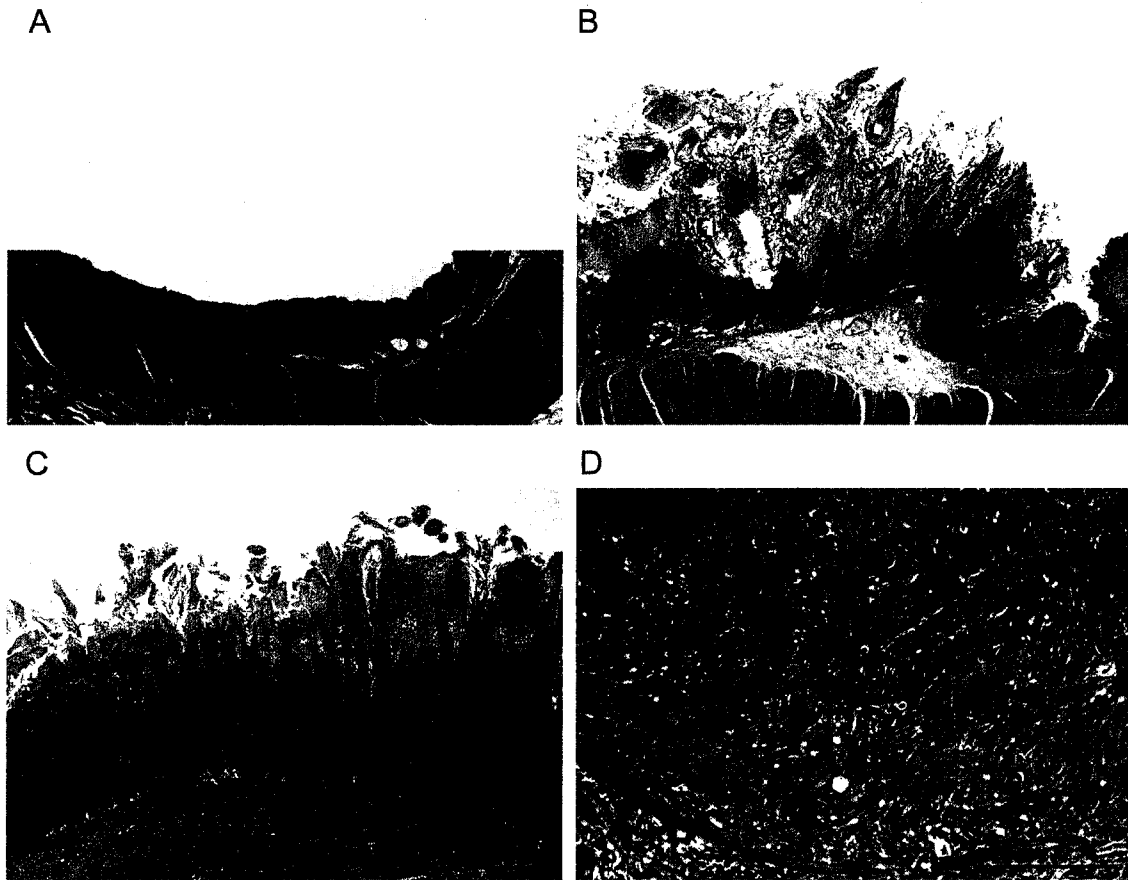


Fig. 3: Mucosal hyperplasia and squamous cell carcinoma induced by *C. albicans*. (A) Normal forestomach mucosa in the C group. Scale bar, 500 μ m. (B) Mild hyperplasia of mucosal squamous epithelium in the AL group. Scale bar, 500 μ m. (C) Severe hyperplasia of mucosal squamous epithelium in the AC group. Scale bar, 500 μ m. (D) Squamous cell carcinoma of the forestomach in the AC group. Scale bar, 100 μ m.

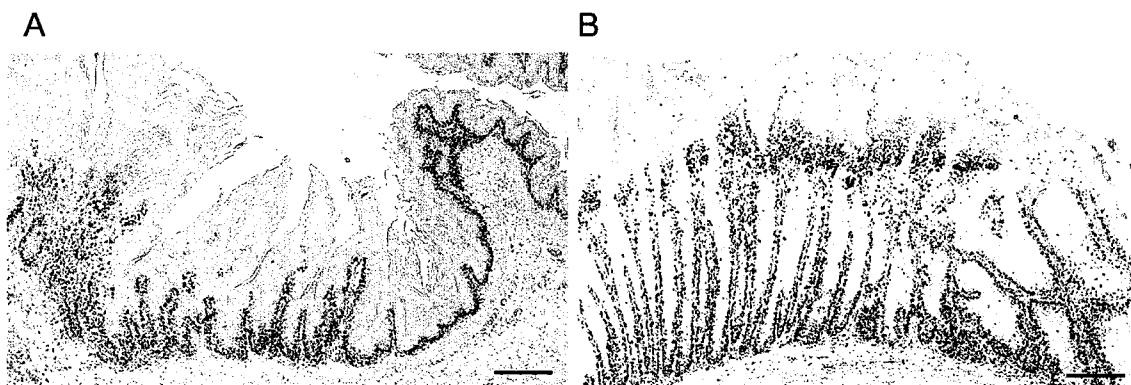


Fig. 4: Cellular proliferation of mucosal epithelium induced by *C. albicans*. The Ki-67 positive cells of mucosal epithelium are increased in the AC group (B) compared to the A group (A). Scale bar, 200 μ m.

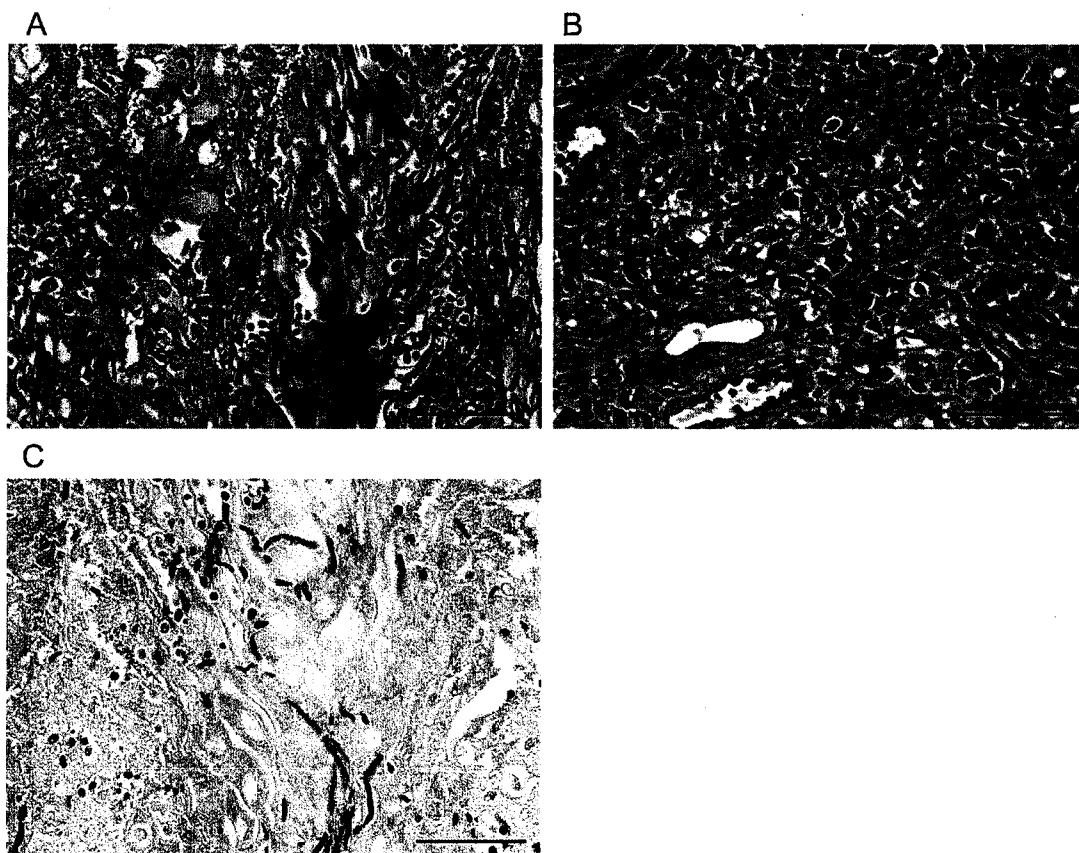


Fig. 5: Mucosal and submucosal inflammation induced by *C. albicans*.

(A) Neutrophil infiltration in the hyperplastic mucosal surface with fungal and bacterial infection in the AC group. (B) Lymphoplasmacytic cell infiltration in the submucosa in the AC group. (C) Fungi positive for a *C. albicans* antigen by immunohistochemical staining in hyperplastic mucosal surface. Scale bar, 50 μ m.

1.4 考察

本研究では、*C. albicans* を強制的に接種することにより、*C. albicans* 感染とそれに伴う粘膜の炎症および増殖性変化をアロキサンのみでは、30%しか発症しない早期に、糖尿病を誘発させた全てのラットに誘発することができた。一方、糖尿病を発症していないラットへの *C. albicans* 接種では、*C. albicans* 感染および炎症性病変は認められなかった。この結果は、血糖コントロール不良の糖尿病患者で口腔カンジダ症に罹患しやすい事実と一致している²¹。加えて、1例ながら、扁平上皮癌が *C. albicans* を投与した糖尿病群のみに認められた。Russel や Jones らは、ラットの口腔カンジダ症の組織学的特徴を詳細に報告しているが²²、我々の研究よりも長期間の実験期間であるにもかかわらず、口腔粘膜は過形成を示すのみで扁平上皮癌には至っていない²²。本研究の結果からも、前胃粘膜は口腔粘膜よりも *C. albicans* 感染やそれに伴う扁平上皮増殖性病変が前胃で発症しやすい可能性は高い。

本研究では、*C. albicans* に感染した粘膜表層に、多数の好中球浸潤を特徴とする重度の化膿性炎症性変化が見られた。好中球は、貪食、殺菌あるいは好中球の細胞外補足により、*C. albicans* を直接的に死滅させることから²³、本炎症反応は *C. albicans* 感染に対する反応を反映している可能性が高い。糖尿病患者では、好中球の殺菌作用が減少しているため、健常人と同程度に病原を除菌することは難しいことが予想される²⁴⁻²⁶。本研究における長期間の糖尿病状態が、*C. albicans* 感染の持続に寄与したのは明らかである。加えて、非糖尿病群では、*C. albicans* 感染と炎症性変化を伴う過形成病変のいずれも認められなかったことから、筆者のモデルでは、糖尿病が *C. albicans* 感染と粘膜の増殖性病変に関与している可能性は高い。さらにヒトの糖尿病は、肝臓、膵臓、子宮、大腸、卵巣、膀胱などの臓器で腫瘍のリスクファクターとなり得ることが報告されており、その原因として糖尿病による高インスリン血症、高血糖、炎症が考えられている²⁷。一方、児玉ら²⁸はインスリン非依存性の糖尿病状態が、遺伝毒性物質誘発の扁平上皮癌を増悪化するという事を明らかにしている。以上から、*C. albicans* と糖尿病の両者が前胃粘膜病変に重要な役割を果たしていることが示唆された。

近年、大腸癌や胃癌のような消化管腫瘍の促進に慢性炎症が関与していることが注目されており、慢性炎症が悪性腫瘍の原因となる可能性が示唆されている^{2,29}。我々の一連の研究においても、粘膜の増殖性病変には *C. albicans* 感染を伴う慢性炎症性変化が随伴していた。今回、扁平上皮癌の発症率の急激な上昇は認められなかったが、*C. albicans* 感染が炎症を惹起し、さらにこの炎症は粘膜を刺激し、粘膜の増殖を誘導しているのは明らかである。また、我々の作製したモデルの重度の粘膜の増殖性病変や扁平上皮癌には、*C. albicans* 感染とともに多数の細菌も感染していることから、*C. albicans* と細菌の重複感染が増殖性変化に対して重要な役割を果たしている可能性も示唆された。

Ki-67 は、細胞増殖マーカーとして用いられ、悪性度との関連が高い細胞周期関連核タンパクである³⁰。上部消化管では、粘膜の異形成の程度に従って Ki-67 の発現が増強する

ことが報告されている^{31, 32}。今回、前胃の Ki-67 陽性細胞は過形成の程度に依存して増加し、AC 群において最も高度であったことから、*C. albicans* 感染に伴う炎症反応が粘膜の増殖に重要な役割を果たしている可能性を裏付けている。

結論として、アロキサン誘発糖尿病ラットに *C. albicans* の強制接種を行うことにより、ほぼ全例に *C. albicans* 感染を早期にかつ高率に誘発し、扁平上皮増殖性病変を増悪化させた慢性肥厚性カンジダ症モデルを確立した。この実験的 *C. albicans* 感染による慢性肥厚性カンジダ症モデルは、病変をほぼ 100%誘発できるモデルであることから、*C. albicans* 感染の予防、治療薬の開発に有用であると考えられた。

第2章 糖尿病ラットへのプレドニゾロン間歇投与-*C. albicans* 日和見感染誘発による慢性肥厚性カンジダ症モデル作製の試み-

2.1 序文

アロキサン投与により糖尿病を誘発した WBN/Kob ラットに *C. albicans* を強制経口投与することにより、早期にかつ高率に扁平上皮増殖性病変を誘発することに成功したことから、糖尿病と *C. albicans* 感染は本病変を成立させる上で重要な因子であることが明確となった(第1章)。

免疫抑制剤や抗菌剤の投与によって、カンジダ症をラットおよびマウスに誘発することは、比較的容易である¹⁵⁻¹⁷。しかし、免疫抑制剤を用いた慢性肥厚性カンジダ症モデルの作製において、免疫抑制剤の投与量や投与頻度の調整は極めて難しい¹⁵⁻¹⁷。しかし、過去の我々の研究室のデータを基盤に考慮すると、糖尿病動物に対し、免疫抑制剤の投与量と頻度をコントロールすると、*C. albicans* の日和見感染をより早期に定着させ、増殖性病変を成立・増悪化できる可能性が示唆された。

また、今回作製したモデルを含めて、我々の研究室が報告した *C. albicans* 感染による慢性肥厚性カンジダ症モデルでは、常に扁平上皮の増殖とともに高度の炎症反応を伴っている¹⁸。慢性炎症は腫瘍の発生に関与し、マクロファージやリンパ球を含む炎症細胞は、サイトカインおよびケモカインの産生や反応により様々な腫瘍の発生進行に関与している^{1,2}。したがって、これらの炎症細胞を慢性肥厚性カンジダ症モデルで解析することは *C. albicans* によって誘発される慢性炎症が扁平上皮過形成から癌に至る発癌過程にどのように関わっているかをより明確化することができる。

そこで今回、糖尿病ラットに、免疫抑制および抗炎症作用をもつプレドニゾロンを投与することによって、*C. albicans* 日和見感染による慢性肥厚性カンジダ症モデルの作製と扁平上皮増殖性病変の増悪化を試みた。さらに、この動物を用いて扁平上皮過形成から癌への進行に関与する炎症細胞も合わせて解析した。

2.2 材料および方法

2.2.1 動物および飼育条件

日本 SLC 株式会社生産の雌 WBN/Kob ラットを摂南大学薬学部病理学研究室内の動物室において自家繁殖した。以後、1.2.1 に準じて動物および設定条件に従った。

2.2.2 使用動物および試験群の構成

雌の WBN/Kob ラットを総計 44 匹用いた。糖尿病群では 8 週齢の動物 33 匹にアロキサンを単回投与し、非糖尿病群として、11 匹の動物を用いた。さらに、糖尿病群のラット 18 匹および非糖尿病群のラット 11 匹の総計 29 匹に対し、プレドニゾロン注射液を 12 週齢(ア

ロキサン投与後 4 週) から 2 週毎に皮下投与(10 mg/kg)した。したがって、本実験の試験群は、アロキサンを投与し糖尿病を誘発させた A 群 (15 匹)、糖尿病に加えプレドニゾロンを投与した AP 群 (18 匹)、糖尿病を誘発させずにプレドニゾロンのみを投与した P 群 (11 匹) の計 3 群から構成された (Fig. 6)。

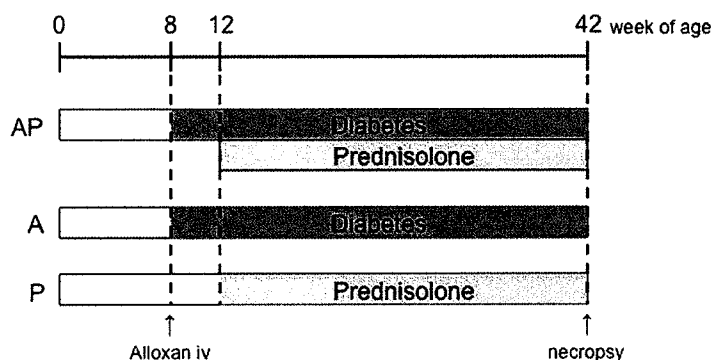


Fig. 6: Experimental design.

Schematic representation of the experimental design to analyze the effects of the combination of diabetes and intermittent prednisolone administration.

2.2.3 薬物の調製および投与方法

2.2.3.1 アロキサン

1.2.3.1 に準じて、アロキサンの調製を行い、AP 群および A 群に対して尾静脈内に単回投与 (45 mg/kg) した。

2.2.3.2 プレドニゾロン

プレドニゾロン (共立製薬株式会社、日本) を、アロキサン投与後 4 週から 2 週間毎に 30 週間、10 mg/kg 用量で皮下投与した。本投与量は、動物が長期間生存できることが予測されるように予備実験の結果から設定された。

2.2.4 尿糖・血糖モニタリング

1.2.4 に準じて尿糖・血糖モニタリングを行った。

2.2.5 剖検および組織の固定

42 週齢に剖検を行った。剖検予定週齢に至らず状態が悪化した動物については、その時点で剖検に付した。以後、1.2.5 に準じて組織の固定を行った。

2.2.6 包埋および組織標本の作製

1.2.6 に準じて包埋および組織標本の作製を行った。

2.2.7 ヘマトキシリン・エオジン (H. E.) 染色法

常法に従い、マイヤーのヘマトキシリンおよびエオジン染色を行った。

2.2.8 組織学的解析

1.2.8 に準じて組織学的解析を行った。

2.2.9 感染病原微生物の形態学的解析

1.2.9 に準じて感染病原微生物の形態学的解析を行った。

2.2.10 免疫組織学的解析

AP 群および A 群の前胃の切片について、形態学的な検査とともに免疫組織学的な解析を行った。免疫染色では、切片にキシレンによる脱パラフィン処理およびエタノール系列 (100～70%) による親水化を施した後に蒸留水で洗浄し、抗原賦活化処理を行った。抗原賦活化処理を Table 3 に示す。その後、50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) with 0.03% Tween-20 (TBST) で洗浄し、0.03% 過酸化水素水を含む 100% メタノールで内在性ペルオキシターゼに対するブロッキングを行った。TBST で洗浄後、免疫グロブリン Fc 受容体や補体受容体を介した非特異的反応の除去のために、TBST で希釈した 5% 正常ヤギ血清によるブロッキングを室温で 5 分間行い、Table 3 に示す一次抗体を用い 4℃で一晩反応させた。TBST で洗浄後、一次抗体に対応する二次抗体を用い室温で 60 分間反応後、3,3-diaminobenzidine (DAB) にて発色させた後、直ちに蒸留水で 10 分間洗浄し、マイヤーのヘマトキシリン液に 1 分間浸漬することにより対比染色を行い、10 分間流水および蒸留水で色出しを行った。染色切片をエタノール系列 (70～100%) およびキシレンで脱水および透徹後、封入した。

細胞増殖の指標として扁平上皮細胞 (1000 細胞) に対する Ki-67 陽性細胞数を計測した。また、マクロファージマーカーの CD68、T 細胞マーカーの CD3、B 細胞マーカーの CD45、好中球マーカーの myeloperoxidase に関して、前胃の角質、扁平上皮、粘膜固有層、粘膜筋板、粘膜下組織における炎症細胞発現の評価を行った。CD68 陽性マクロファージおよび CD3 陽性 T 細胞が対照動物と同程度の発現を「-」、軽度の発現 (10%以下) を「+」、中等度の発現 (10-30%) を「++」、高度の発現 (30-60%) を「+++」、+++より高度な発現 (60%以上) を「++++」と等級付けした。CD45 陽性 B 細胞および myeloperoxidase 陽性好中球が対照動物と同程度の発現を「-」、軽度の発現 (10%以下) を「+」、中等度の発現 (10-30%) を「++」、高度の発現 (30-60%) を「+++」と等級付けした。

Table 3. Antibodies used in this study

Primary antibody	Source	Antigen retrieval	Time	Dilution	Secondary antibody
<i>C. albicans</i>	Chemicon	pepsin	20 min	1:400	Histofine simple stain rat MAX-PO (M)
Ki-67	Serotec	10 mM citrate buffer (pH 6.0)	10 min	1:500	Histofine simple stain rat MAX-PO (Rb)
CD68	Serotec	pepsin	20 min	1:2000	Histofine simple stain rat MAX-PO (M)
CD3	DAKO	pepsin	20 min	1:800	Histofine simple stain rat MAX-PO (Rb)
CD45RA	Serotec	Proteinase K	10 min	1:3200	DAKO LSAB 2 kit/HRP
myeloperoxidase	DAKO	10 mM citrate buffer (pH 6.0)	10 min	1:1200	Histofine simple stain rat MAX-PO (Rb)

2.2.11 CD4+/CD3+および CD8+/CD3+二重免疫組織学的解析

CD3 陽性 T 細胞に占める CD4 または CD8 陽性細胞の比率を比較するために二重免疫染色を行った。AP 群および A 群の前胃を解剖時に O. C. T. Compound (サクラファインテック、東京) 中に包埋し、液体窒素で冷却した n-ヘキサン (和光純薬工業株式会社、大阪) 中で徐々に凍結し、 -80°C 下で保存した。さらに -20°C に設定したクリオスタットで約 $5\mu\text{m}$ の厚さの切片を作製した後、冷風で 5 分間乾燥させ、アセトンで 10 分間固定し、蒸留水で洗浄した。TBST で洗浄後、0.03%過酸化水素水を含む 100%メタノールで内在性ペルオキシダーゼに対するブロッキングを行った。TBST で洗浄後、5%ヤギ正常血清でブロッキングを室温で 5 分間行い、Antibody Diluent で希釈した抗 CD3 抗体 (1:800、Dako) と抗 CD4 抗体 (1:100、Serotec) のカクテルおよび抗 CD3 抗体 (1:800、Dako) と抗 CD8 抗体 (1:200、Serotec) のカクテルを 4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、goat anti-rabbit IgG secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 594 (1:200、Invitrogen) および goat anti-mouse IgG secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (1:200、Invitrogen) のカクテルを室温で 60 分間反応させた。TBST で洗浄した後、DAPI (1:50000、Invitrogen) を室温で 1 分間反応させ、直ちに蒸留水で洗浄後、ProLong Gold antifade reagent (Life Technologies) を用いて封入した。共陽性であった細胞数をカウントし、 100 mm^2 辺りの陽性細胞数を算出した。

2.2.12 統計学的解析

Ki-67 陽性細胞数、CD4+/CD3+細胞数および CD8+/CD3+細胞数には、Student の t 検定を用い、増殖性変化および炎症変化および免疫染色による炎症細胞浸潤には、Mann-Whitney U 検定を用いて統計学的に解析した (Stat MateIII、ATMS、東京)。有意水準 5%で検定を行い、 $P<0.05$ を有意とした。

2.3 結果

2.3.1 一般状態

AP 群の 6 例が 12 週齢から 36 週齢の間に死亡または一般状態が悪化したために、それぞれの発見時点で剖検した。死因は、消化管出血が 3 例、上行性感染および敗血症が 1 例であることが剖検によって確認されたが、その他の 1 例に関しては腐敗が強く死因を特定することができなかった。

A 群および P 群の体重は徐々に増加したが、AP 群の体重は増減を繰り返し、徐々に減少した (Fig. 7A)。AP 群および P 群では、プレドニゾロンを投与した翌週に体重が減少し、次の週に回復する現象が剖検時まで繰り返された。剖検時、AP 群の体重は A 群および P 群と比較して有意な低値を示したが ($P<0.001$)、A 群および P 群間で有意な差は認められなかった。

アロキサン投与後、すべてのラットは翌日から高血糖(>300 mg/dL)および高尿糖(>500 mg/dL)を示し、剖検時まで持続した(AP 群: 12/12, A 群: 15/15) (Fig. 7B)。P 群のラットは、観察期間中、血糖値および尿糖はともに正常値 (<200 mg/dL および (-)) を示した。

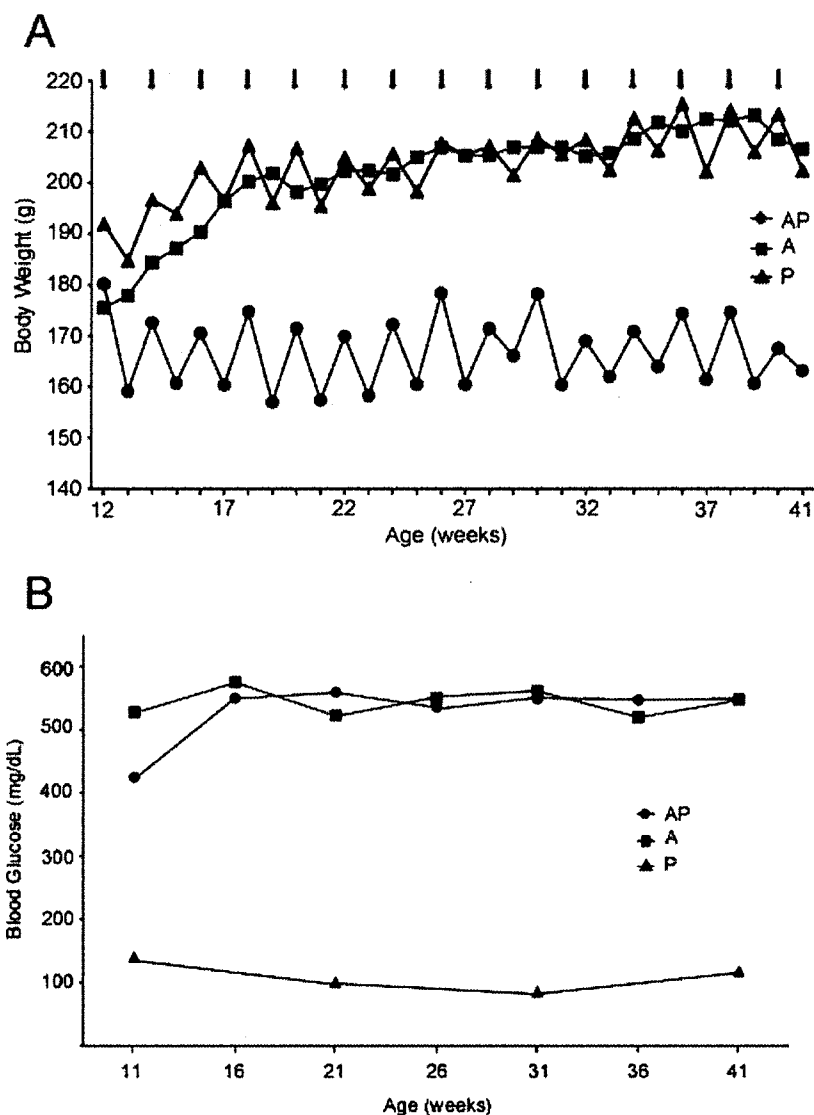


Fig. 7: Monitoring of body weight and glycemia.

Change of average body weight (A) and blood glucose (B) in the AP, A, and P groups. In the AP and P groups, body weight was decreased in the week following prednisolone treatment and recovered the second subsequent week. Severe hyperglycemia continued for 34 weeks from the day of alloxan treatment in the AP and A groups. In contrast, blood glucose levels appeared normal in the P group during the experimental period. Red arrows show the week of prednisolone treatment.

2.3.2 組織学的解析

前胃における扁平上皮過形成は、角化亢進を伴う粘膜上皮の重層化および粘膜丈の肥厚を特徴とし、AP 群と A 群のほぼ全例に認められた (Fig. 8A, B and D)。AP 群における扁平上皮過形成の程度は、3 群で最も高度であり、A 群および P 群と比較し有意に高かった ($P < 0.01$)。AP 群の大部分 (10/12、83.3%) では、扁平上皮過形成は中等度から高度で (Fig. 8D)、そのうち 1 例 (1/12、8.3%) は扁平上皮癌にまで進行していた (Fig. 8E)。これに対し、A 群の扁平上皮過形成では、中等度から高度の病変が 5/15 (33%) にとどまり、さらに P 群では過形成病変は全く認められなかった (Fig. 8C and D)。AP 群の Ki-67 陽性率は、A 群と比較すると軽度に増加していたが、両群間で有意な差は認められなかった (Fig. 9)。

AP 群および A 群の扁平上皮過形成を示す粘膜表層には、好中球やマクロファージが多数浸潤する化膿性炎症が形成されており、有意ではなかったが ($P = 0.106$)、AP 群では A 群よりも高度な例が多く観察された (Fig. 10A and B)。粘膜表層に浸潤した細胞は CD68 陽性マクロファージおよび myeloperoxidase 陽性好中球であり、化膿性炎症が認められる粘膜表層の角質層には、酵母型および菌糸型の *C. albicans* ならびに細菌の重複感染が認められた (Fig. 10C-F)。扁平上皮過形成の程度が強いほど、菌糸型の *C. albicans* が角質から上皮内に浸潤しており、AP 群では他の群と比べ、その程度がより高度な例が多かった。

AP 群および A 群の扁平上皮過形成を示す粘膜の粘膜固有層から粘膜下織には、リンパ球および形質細胞を主体とする炎症細胞が多数浸潤し、さらに AP 群の程度は A 群よりも有意に高度であった ($P < 0.01$) (Fig. 11A and B)。P 群では炎症細胞は認められなかった。CD3 陽性 T 細胞は、扁平上皮、粘膜固有層、粘膜筋板および粘膜下織に認められ、いずれの部位においても、AP 群は A 群よりも有意に高発現していた ($P < 0.01$) (Fig. 11C-E)。また、CD4+/CD3+ および CD8+/CD3+ の T 細胞は、扁平上皮、粘膜固有層および粘膜下織に認められ、いずれも AP 群の陽性細胞数は A 群よりも有意な高値を示した ($P < 0.05$ and $P < 0.01$)。CD4+/CD3+ と CD8+/CD3+ の細胞数を比較すると、AP 群および A 群ともに CD4+/CD3+ 細胞数が上回っており (Fig. 11F-H)、特に、AP 群の粘膜下織での CD4+/CD3+ 細胞数の増加が顕著であった。CD68 陽性マクロファージは扁平上皮、粘膜固有層、粘膜筋板および粘膜下織のいずれにも認められたが、AP 群の CD68 陽性細胞の総数は A 群よりも有意に多く ($P < 0.05$)、特に粘膜筋板および粘膜下織ではその差は明瞭であった (Fig. 11I-K)。CD45 陽性 B 細胞は、粘膜固有層、粘膜筋板および粘膜下織に認められ、AP 群では高度な例が多く観察されたが、AP 群および A 群の両群間に有意な差は認められなかった。

前胃以外の上部消化管において、AP 群の舌粘膜および頬粘膜における *C. albicans* 感染を伴う扁平上皮過形成および慢性化膿性炎症は、A 群および P 群と比べ有意に強く ($P < 0.05$)、特に舌粘膜における病変の程度は AP 群で高度であった。下顎臼歯間の歯肉および口蓋では、AP 群および A 群で扁平上皮過形成を認めたが、両群間に差はなかった。AP 群および A 群ともに、噴門部に近い食道下部で扁平上皮過形成を認めたが、両群間で明瞭な差はなく、食道上部では両群ともに病変はほとんど形成されなかった。

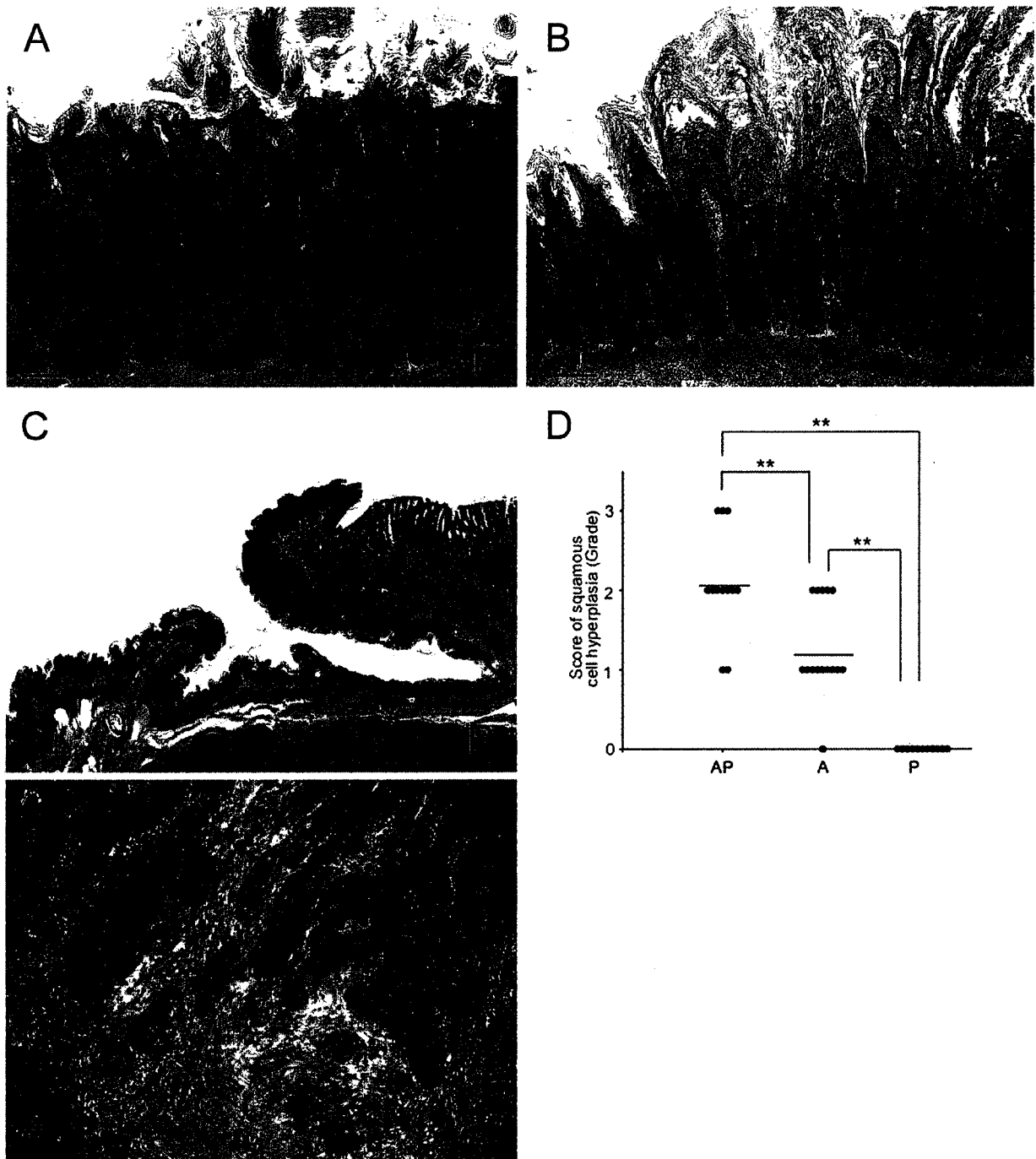


Fig. 8: *C. albicans*-induced mucosal proliferation is enhanced by the administration of prednisolone.

(A and B) Squamous cell hyperplasia of the forestomach can be observed in the AP and A groups. (C) No proliferative change was detected in the P group. (D) Scores of squamous cell hyperplasia in the AP, A, and P groups. The severity in the AP group was the highest in all groups. The bar indicates the mean value. (** $P < 0.01$) (E) Squamous cell carcinoma in the AP group. Scale bar: 100 μ m.

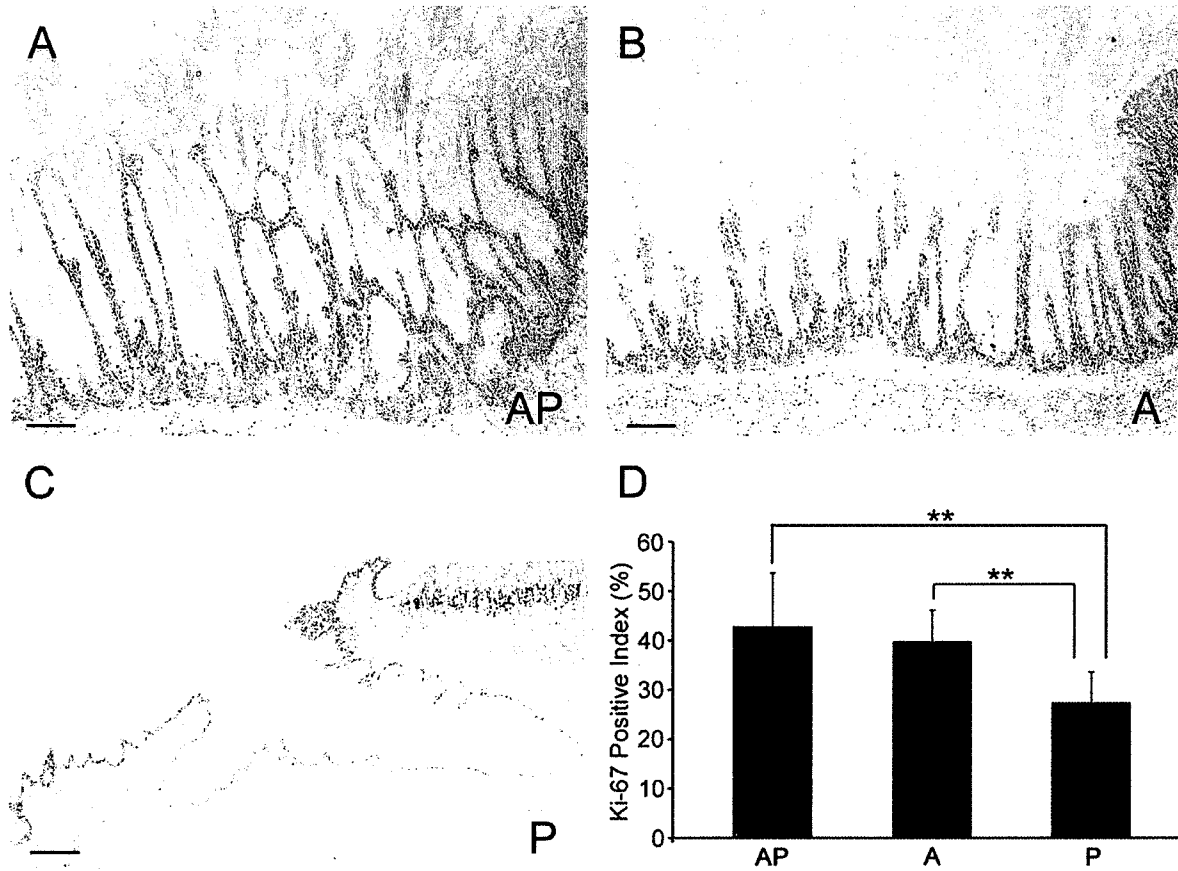


Fig. 9: Ki-67 positive mucosal epithelium induced by *C. albicans*.

(A-C) Ki-67 positive cells in the forestomach. The rates of Ki-67 positive squamous epithelia were increased in the AP and A groups compared to the P group. Scale bar: 100 μ m (D) Comparison of the Ki-67 positive index. The bar indicates the mean value. $**P < 0.01$.

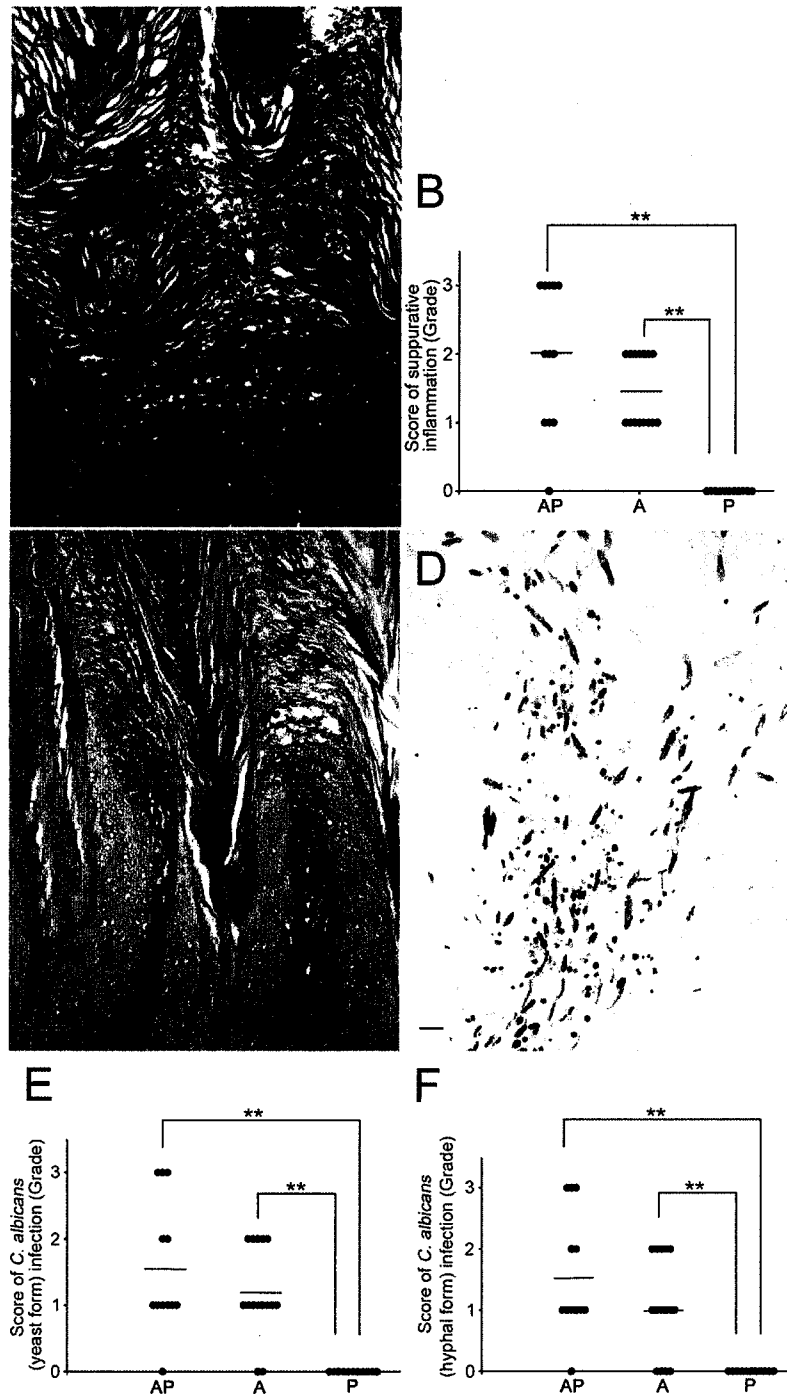


Fig. 10: *C. albicans* infection and suppurative inflammation of the mucosal surface. (A) Suppurative inflammation in the hyperplastic mucosal surface of the AP group. HE stain. (B) Comparison of scores for suppurative inflammation. Suppurative inflammation was slightly enhanced in the AP group compared to that in the A group. (C) *C. albicans* infection in the AP group. PAS reaction. (D) Fungi positive for the *C. albicans* antigen in the AP group. (E and F) Score of *C. albicans* yeast form (E) and hyphal form (F) infection in the mucosal surface. The bar indicates the mean value. ** $P < 0.01$. Scale bar: 50 μm .

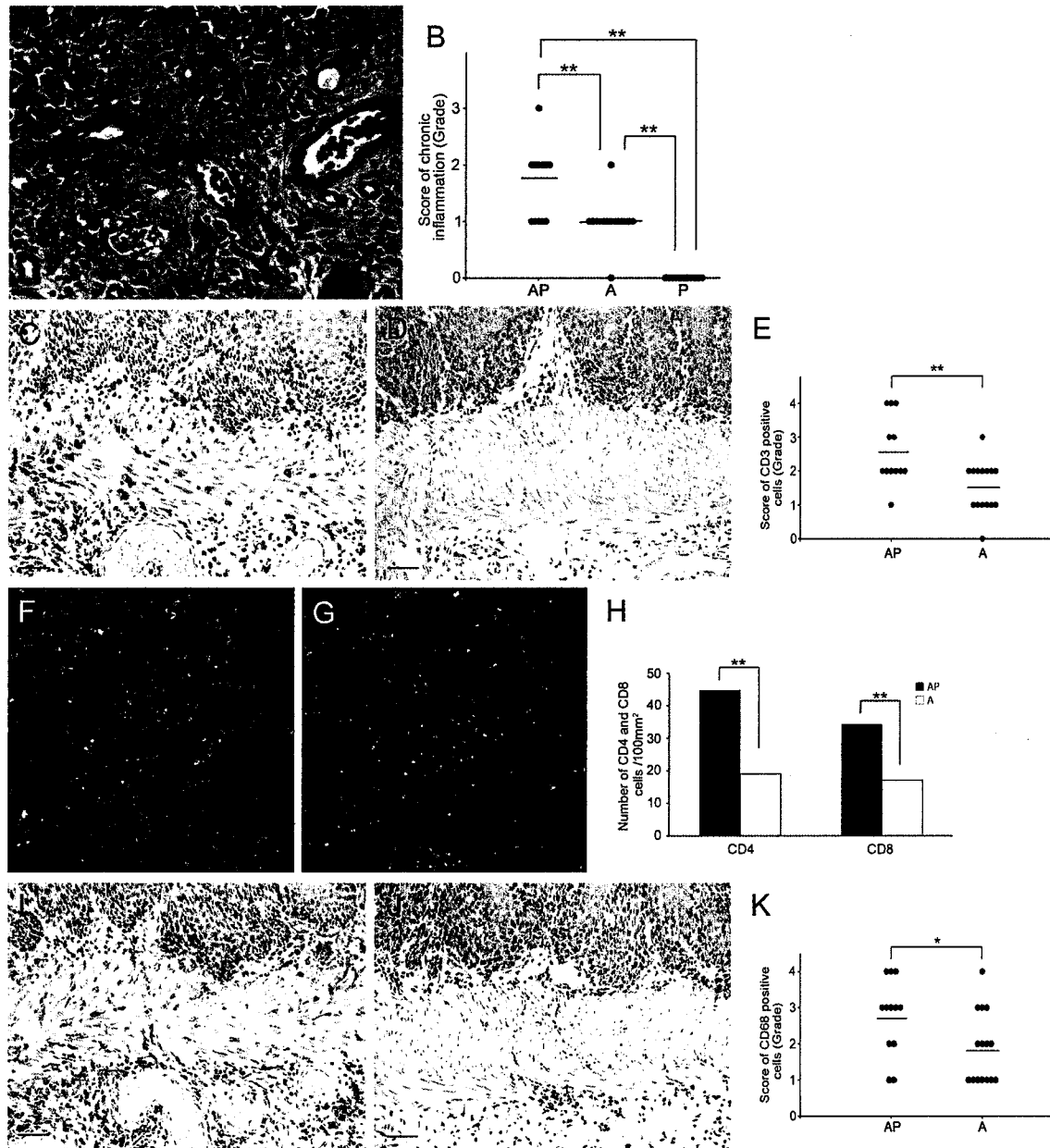


Fig. 11: Exacerbation of chronic inflammation with *C. albicans* infection caused by prednisolone administration correlates with T cell and macrophage increase.

(A) Lymphoplasmacytic cell infiltration in the submucosa in the AP group. (B) Score of chronic inflammation was highest in the AP group compared to that in the other groups. (C and D) In immunohistochemical analysis, the number of CD3 positive T cells was increased in the AP group (C) compared to that in the A group (D). (E) Score of CD3 positive cells in the AP and A groups. (F and G) The number of CD4+/CD3+ T cells (F) exceeded that of CD8+/CD3+ T cells (G). (H) Comparison of the number of CD4+/CD3+ and CD8+/CD3+ T cells in the AP and A groups. (I and J) CD68 positive macrophages were increased in the AP group (I) compared to the A group (J). (K) Score of CD68 positive cells in the AP and A groups. The bar indicates the mean value. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Scale bar: 50 μ m.

2.4 考察

本研究では、アロキサン誘発糖尿病ラットにプレドニゾロンを間歇投与することにより、*C. albicans* を直接接種することなく、高率かつ高度に日和見感染性の慢性肥厚性カンジダ症モデルを確立することができた。プレドニゾロンを含む免疫抑制剤の投与により日和見感染のカンジダ症が発症することはよく知られている事実である^{16,33}。しかし、本試験のプレドニゾロン投与用量では、糖尿病を発症していないラットに、*C. albicans* 感染を伴う前胃の増殖性および炎症性病変は全く認められなかった。したがって、今回用いた低用量のプレドニゾロン投与では、糖尿病要因が加わることにより免疫抑制状態となり、*C. albicans* 感染が成立することで粘膜の過形成を伴う慢性肥厚性カンジダ症を誘発できた可能性が高いと考えられる。

ラットおよびマウスの口腔・消化管のカンジダ症は、*C. albicans* の接種および高用量のプレドニゾロン投与によって誘発されるが³⁴⁻³⁶、既報告では *C. albicans* の感染期間は短く、粘膜の過形成や癌が形成された報告もない。マウスではプレドニゾロン投与後 48 時間後に最も高度な舌カンジダ症が形成されることから、非常に短期間の免疫抑制状態で *C. albicans* 感染が成立することは明らかである³⁷。本研究では、プレドニゾロン投与 1 週目に体重が減少し、投与のない 2 週目で増加に転じたことから、この作用は投与後 2 週目に消失すると考えられる。恐らく、糖尿病によって免疫力が低下している状態で低用量プレドニゾロンを投与すると、投与直後は免疫がさらに抑制され、非糖尿病状態では発症しない *C. albicans* 感染が成立するが³⁸、その 1 週間後には病変は回復し、再び 2 週間後にプレドニゾロンを投与することで感染が再度成立するサイクルを繰り返していると考えられる。本サイクルにより、プレドニゾロンの間歇投与を行った糖尿病ラットでは、*C. albicans* の持続感染が成立し、慢性化することで、扁平上皮増殖性病変や慢性炎症が増悪化する可能性が高いと考えられた。また、*C. albicans* 持続感染が成立し、扁平上皮過形成の程度の強い個体ほど菌糸型の真菌感染の程度も強い傾向にあった。*C. albicans* は、酵母型と菌糸型に変化する二相性真菌であり、ヒトやラットの消化管内では酵母型として常在し、感染が成立すると菌糸型に変化することが知られている。菌糸型は病原性が強く、人の慢性肥厚性カンジダ症において菌糸型が角質内から扁平上皮に広く浸潤しており、今回報告した前胃も同様の病変を形成していたことは、両者の病変の相同性を明示していた。

慢性肥厚性カンジダ症患者の一部では、粘膜が過形成から異形成となり最終的に癌化することが知られている⁵⁻¹²。児玉ら¹⁸は糖尿病ラットの肥厚性カンジダ症においても、ヒトと同様に慢性炎症により扁平上皮過形成から癌へ進行することを報告している。今回、前癌段階と考えられる粘膜の過形成組織に対する免疫組織学的解析から、増殖性病変の増悪化とともに CD4 陽性 T 細胞およびマクロファージが増加することが明らかとなった。微生物の感染により宿主の炎症反応が誘導され、リンパ球およびマクロファージを主体とした慢性炎症反応が微小環境を構築し、腫瘍形成、腫瘍細胞の増殖および生存に関与する^{1,39}。腫瘍微小環境内に最も頻繁に見られる免疫細胞は T 細胞と腫瘍関連マクロファージ(TAM)

であり、T 細胞は腫瘍促進および転移に関与し、TAM は血管新生、浸潤および転移に関与することが報告されている⁴⁰⁻⁴³。さらに、口腔、食道および皮膚の扁平上皮癌や乳癌では、CD4 陽性 T 細胞が TAM の腫瘍促進性を高める機構に重要な役割を果たすことも示されている⁴⁴⁻⁴⁷。今回、ラットの慢性肥厚性カンジダ症で浸潤していた CD4 陽性 T 細胞がマクロファージを調節し、腫瘍化に直接関わったかどうかは明確ではないが、病変の増悪化に両細胞の存在が深く関与していることが推測される。両細胞が慢性的に過形成部位に浸潤することにより、その微小環境に影響を与え、過形成から連続する腫瘍形成を誘導している可能性は高い。

結論として、糖尿病ラットにプレドニゾロンを間歇投与する従来にはない方法により、*C. albicans* を直接的に投与することなく日和見感染を誘導し、高率にかつ長期間感染を持続できる慢性肥厚性カンジダ症モデルの作製に成功した。病変の微小環境には CD4 陽性 T 細胞およびマクロファージが関与し、扁平上皮過形成から連続する腫瘍形成を誘導する可能性が高いと考えられた。

第3章 *Lactobacillus gasseri* OLL2716 株を含むプロバイオティクスは糖尿病ラットの慢性肥厚性カンジダ症を抑制する

3.1 序文

カンジダ症は、糖尿病、免疫抑制剤および抗菌剤の使用、高齢化など、様々な要因によって近年増え続けている疾患である。カンジダ症を有する患者の大部分は、カンジダ症以外の疾患の治療薬を複数服用している場合が多く、真菌薬との相互作用に十分注意する必要がある。

プロバイオティクスは、人体に良い影響を与える乳酸菌等の微生物、またはそれらを含む製品および食品と定義付けされており、また胃腸障害・炎症性腸疾患の改善に有用で、ヘリコバクター・ピロリなどの細菌に対する抗菌作用を有していることが知られている⁴⁸⁻⁵⁰。プロバイオティクスの抗真菌作用に関して、乳酸菌は *in vitro* で *C. albicans* の上皮細胞への接着抑制および *C. albicans* の成長阻害、*in vivo* では、*C. albicans* の増殖阻害によるマウスの膣カンジダ症の改善が報告されている⁵¹⁻⁵³。しかし、膣カンジダ症患者への効果に関しては、一致する見解は得られておらず、現在議論は分かれている^{54,55}。

そこで、本研究では我々が確立した *C. albicans* 接種による慢性肥厚性カンジダ症モデルを用い、胃に定着性を有するプロバイオティクス (*Lactobacillus gasseri* OLL2716 yogurt) が、前胃の *C. albicans* 感染および増殖性病変を抑制するか否かを検討することで、プロバイオティクスの *C. albicans* 感染および慢性肥厚性カンジダ症の予防法としての有用性を調べた。

3.2 材料および方法

3.2.1 動物および飼育条件

1.2.1 に準じて行った。

3.2.2 使用動物および試験群の構成

雌 WBN/Kob ラットを総計 30 匹用い、8 週齢でアロキサンを単回投与し、糖尿病を誘発した。11 週齢から剖検時まで全例に *C. albicans* 溶液を強制経口投与した。さらに、糖尿病ラット 15 匹に対し、LG21 ヨーグルトを 10 週齢から剖検時まで強制経口投与した。したがって、本実験におけるラットの試験群は、アロキサン誘発による糖尿病ラットに *C. albicans* を投与した DC 群 (15 匹)、DC 群に加え LG21 ヨーグルトを投与した DC+LG21 群 (15 匹) の計 2 群から構成された (Fig. 12)。

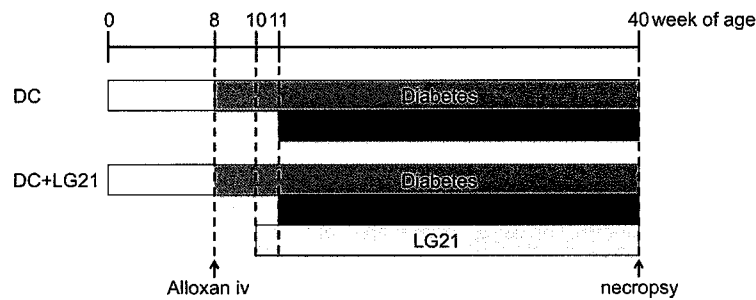


Fig. 12: Experimental design.

Schematic time line representation of the experimental design to analyze the effect of probiotic (yogurt) containing *Lactobacillus gasseri* OLL2716.

3.2.3 薬物の調製および投与方法

3.2.3.1 アロキサン

1.2.3.1 に準じて、アロキサンの調製を行い、DC 群および DC+LG21 群に対して尾静脈内に単回投与(40 mg/kg)した。

3.2.3.2 *C. albicans*

1.2.3.2 に準じて *C. albicans* を調製し、最初の 1 週間は週に 3 回、その後、剖検時まで 28 週間、週に 1 回強制経口投与(1 mL/匹)した。

3.2.3.3 LG21 ヨーグルト

DC+LG21 群には、*Lactobacillus gasseri* OLL2716 株を含む LG21 ヨーグルト(LG21、株式会社明治より提供)をアロキサン投与後 2 週から剖検時まで 30 週間、毎日 (*C. albicans* 投与日以外)、強制経口投与(5 mL/kg)した。LG21 ヨーグルトは、1 mL あたり 1×10^7 cfu の *Lactobacillus gasseri* OLL2716 を含む。

3.2.4 尿糖・血糖モニタリング

1.2.4 に準じて尿糖・血糖モニタリングを行った。

3.2.5 剖検および組織の固定

40 週齢に剖検を行った。剖検予定週齢に至らず状態が悪化した動物については、その時点で剖検に付した。以後、1.2.5 に準じて組織の固定を行った。

3.2.6 包埋および組織標本の作製

1.2.6 に準じて包埋および組織標本の作製を行った。

3.2.7 ヘマトキシリン・エオジン (H. E.) 染色法

常法に従い、マイヤーのヘマトキシリンおよびエオジン染色を行った。

3.2.8 組織学的解析

1.2.8 に準じて組織学的解析を行った。

3.2.9 感染病原微生物の形態学的解析

1.2.9 に準じて感染病原微生物の形態学的解析を行った。

3.2.10 免疫組織学的解析

1.2.10 に準じて免疫組織学的解析を行った。

3.2.11 統計学的解析

1.2.11 に準じて統計学的解析を行った。

3.3 結果

3.3.1 一般状態

DC 群の 2 例および DC+LG21 群の 4 例のラットを 12 週齢から 37 週齢の間に死亡または一般状態の悪化のため、それぞれの発見時点で剖検した。死因は悪性リンパ腫、尿路感染症、重度の糖尿病状態によるケトアシドーシスおよび誤投与であることが剖検によって確認されたが、その他の 2 例に関しては腐敗が強く死因を特定することはできなかった。

アロキサンを投与後、ほとんどすべてのラットは翌日から高血糖 (>300 mg/dL) および高血糖 (>500 mg/dL) を示し、剖検時まで持続した (DC 群: 12/13、DC+LG21 群: 10/11) (Fig. 13A)。DC 群および DC+LG21 群のそれぞれ 1 例は、正常から軽度な血糖および尿糖を示したため、解析から除外した。DC 群および DC+LG21 群間の体重に差はなかった (Fig. 13B)。

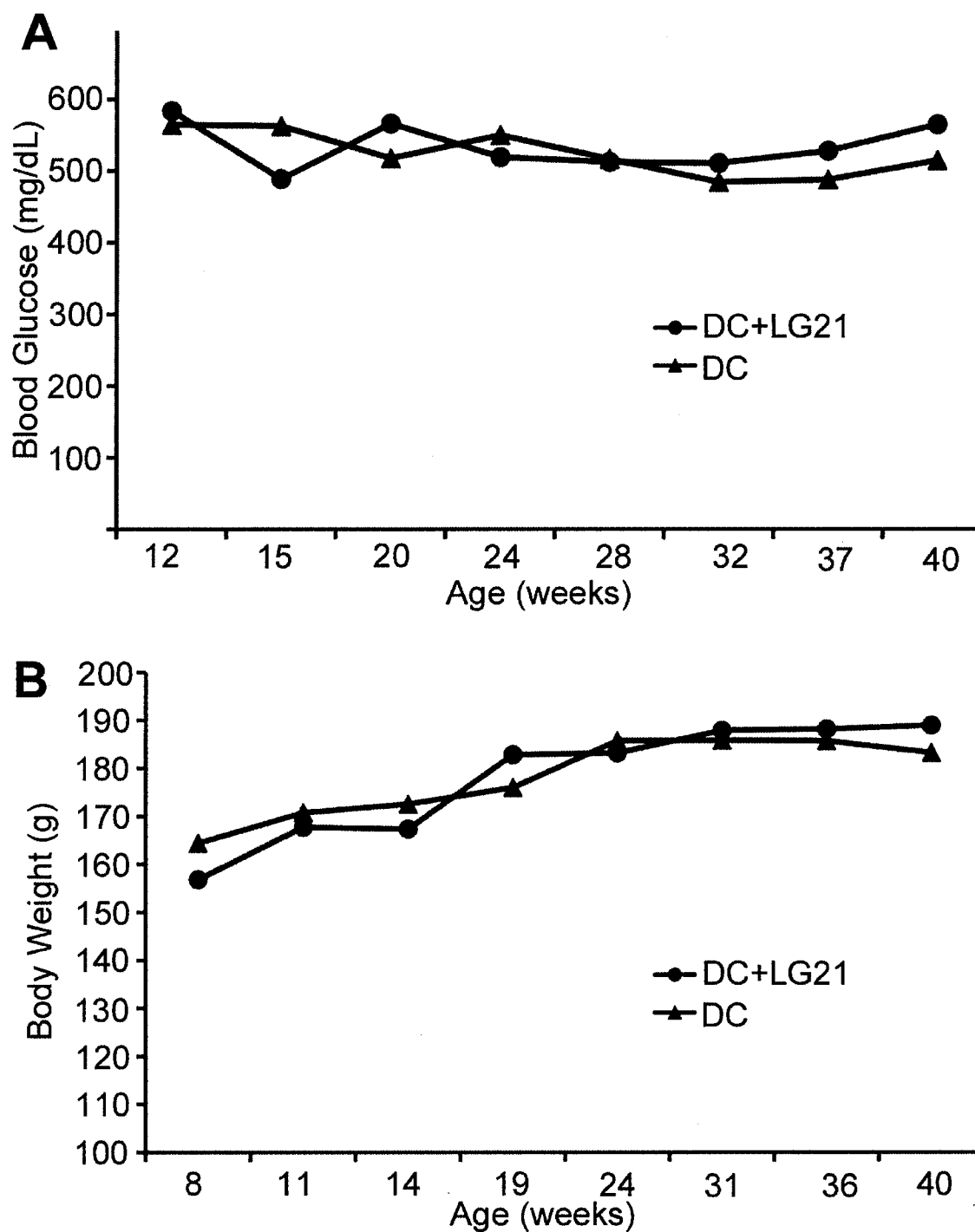


Fig. 13: Monitoring of glycemia and body weight.

Change of average blood glucose (A) and body weight (B) in the DC+LG21 and DC groups. Severe hyperglycemia continued for 32 weeks from the day of alloxan injection. Increase in body weight did not differ between both groups.

3.3.2 組織学的解析

DC 群および DC+LG21 群ともに全例の前胃に炎症を伴う扁平上皮過形成を認め、本病変は両群ともに小弯側で強く、大弯側で弱かった。大弯側では、扁平上皮過形成の程度は、DC+LG21 群で有意に低く、DC 群では中等度から高度病変が 8/12 (66.7%) であったのに対して、DC+LG21 群では高度病変は認められず、中等度病変が 2/10 (20%) に留まった (Fig. 14)。Ki-67 陽性細胞は両群とも主に基底細胞に局在しており、DC+LG21 群の大弯側における Ki-67 陽性細胞の比率は DC 群と比較し有意な低値を示した (Fig. 15)。小弯側では、粘膜の増殖性病変は両群間で差は認められなかった。

扁平上皮過形成となった粘膜表層には、酵母型および菌糸型の *C. albicans* および細菌感染を伴う好中球やマクロファージを主体とする化膿性炎症を認めた。大弯側における粘膜表層の化膿性炎症は、DC 群と比べ DC+LG21 群で僅かに抑制されていた ($P=0.127$) (Fig. 16A-C)。*C. albicans* 感染は、両群間で差は認められなかった (Fig. 16D-F)。小弯側における化膿性炎症および *C. albicans* 感染の程度は両群間で差はなかった。

扁平上皮過形成となった粘膜固有層から粘膜下織にかけて、リンパ球および形質細胞が多数浸潤していたが、その程度は DC 群および DC+LG21 群でほぼ同程度であった。

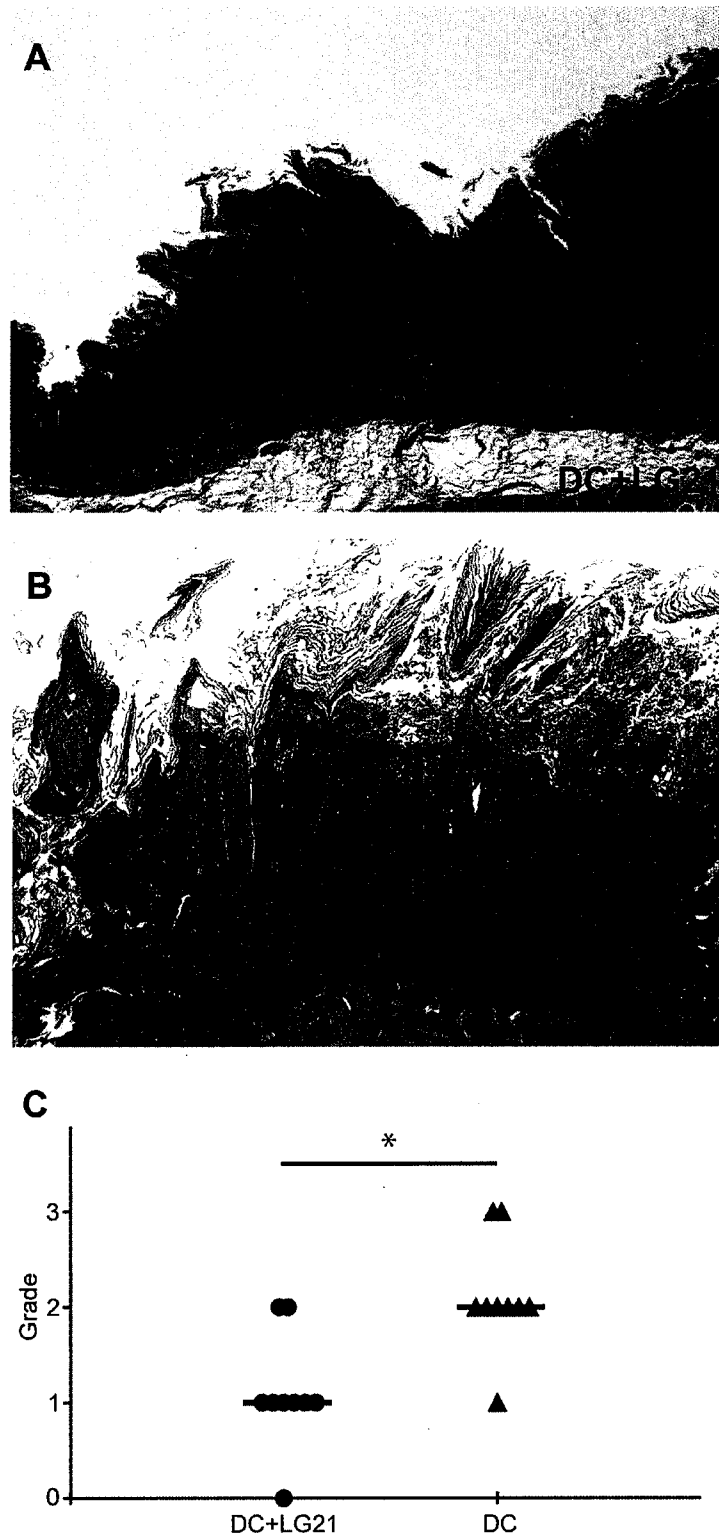


Fig. 14: Probiotic (yogurt) containing *Lactobacillus gasseri* OLL2716 suppressed *C. albicans*-induced mucosal proliferation.

Squamous cell hyperplasia of forestomach mucosa was milder in the DC+LG21 group (A) than the DC group (B). (C) Severity of squamous cell hyperplasia in the both groups. The horizontal line indicates the mean value. * $p < 0.05$ vs DC group. HE stain. Scale bar: 100 μ m.

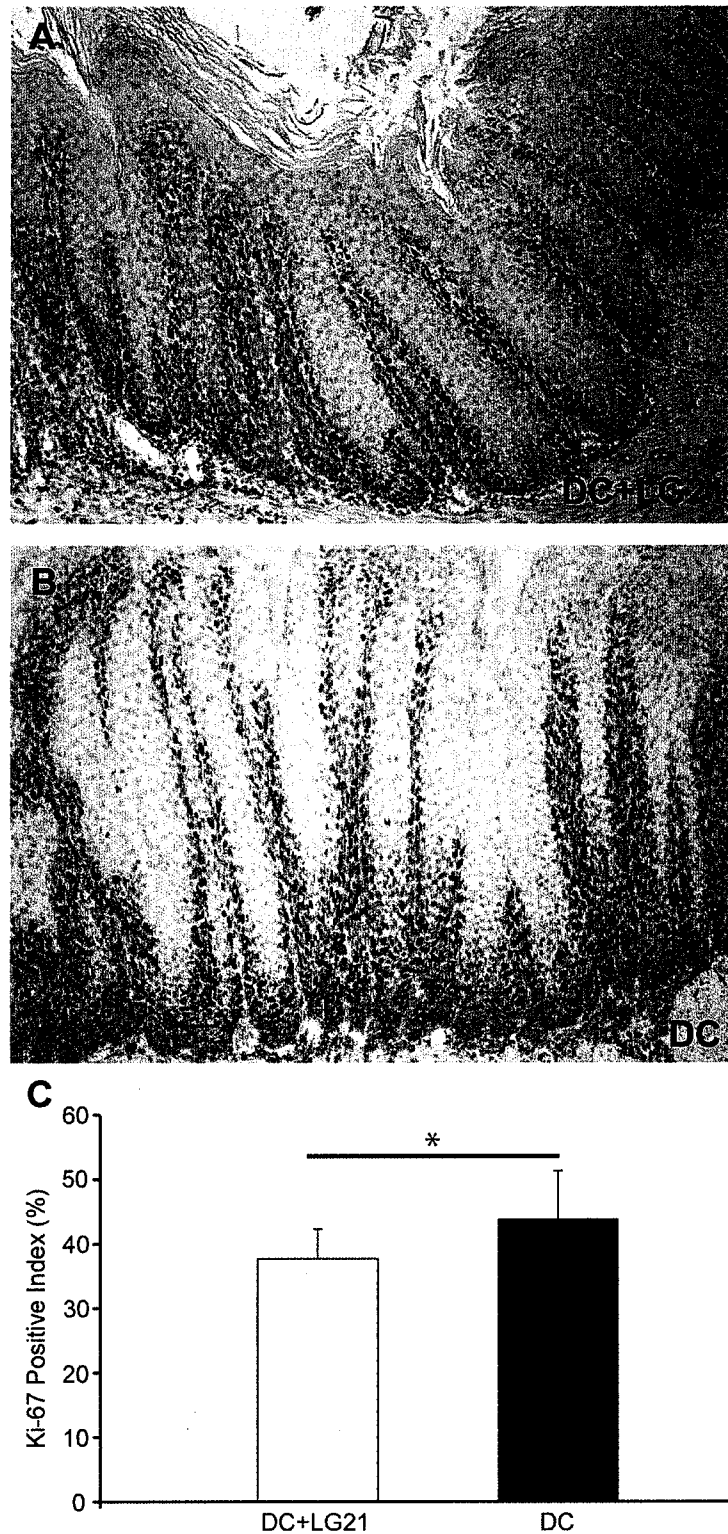


Fig. 15: Ki-67 positive cells were decreased in the DC+LG21 group.

In immunohistochemical analysis, Ki-67 antigen-positive squamous epithelial cells in the forestomach were decreased in the DC+LG21 group (A) compared to the DC group (B). (C) Comparison of Ki-67 positive index in both groups. * $p < 0.05$ vs DC group. Hematoxylin counterstain. Scale bar: 50 μ m.

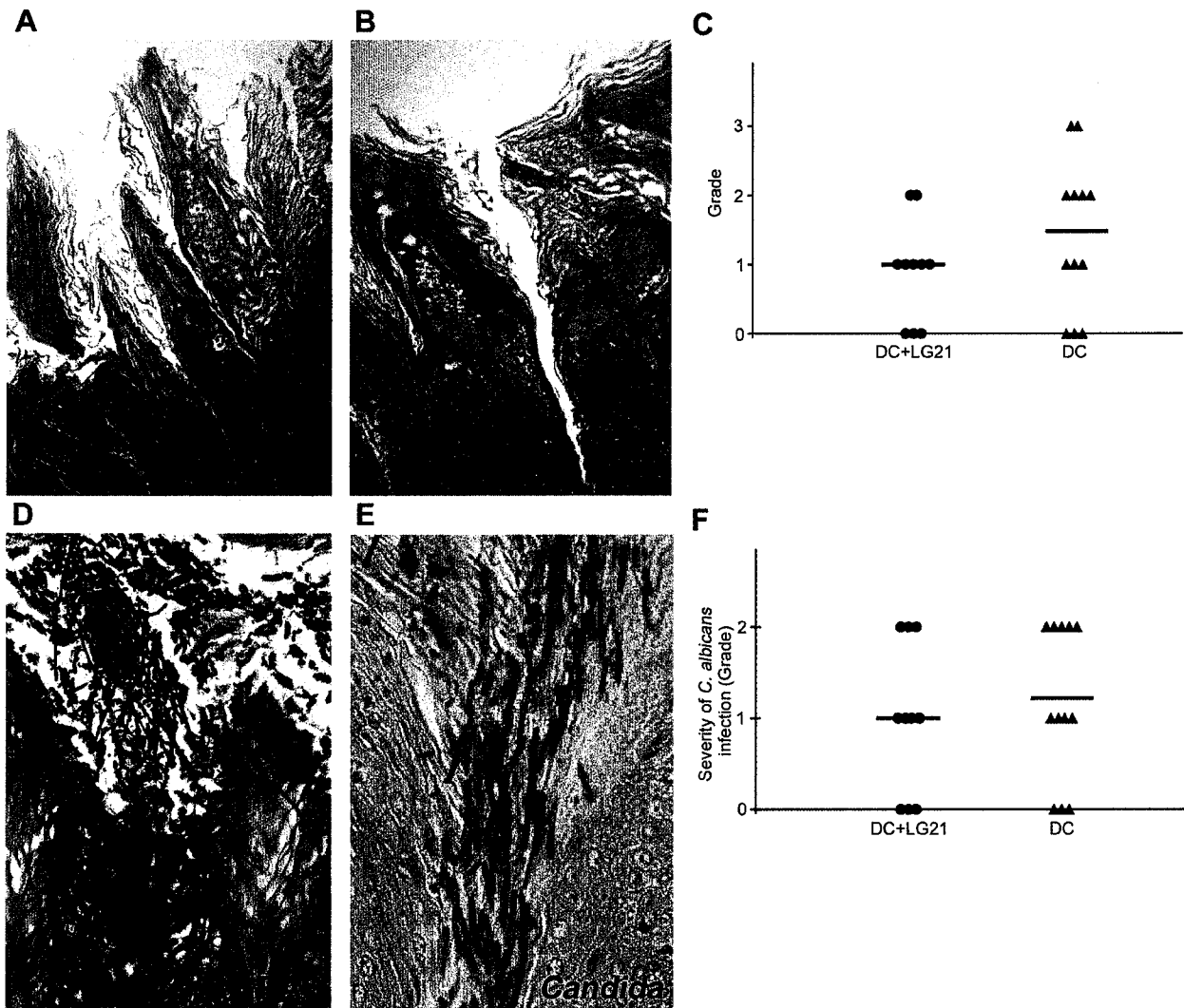


Fig. 16: Effect of probiotic (yogurt) containing *Lactobacillus gasseri* OLL2716 on mucosal inflammation induced by *C. albicans*.

Suppurative inflammation in hyperplastic mucosal surface in the DC+LG21 group (A) was slightly weaker than in the DC group (B). (C) Severity of suppurative inflammation in the both groups. (D) *C. albicans* infection in the DC group. (E) Fungi positive for *C. albicans* antigen by immunohistochemical staining in mucosal surface in the DC group. (F) Severity of *C. albicans* infection in the both groups.

The horizontal line indicates the mean value. A, B, HE stain; D, PAS reaction. Scale bar: A, B, D, 25 μ m; E, 10 μ m.

3.4 考察

本研究では、*Lactobacillus gasseri* OLL2716 株を含むプロバイオティクス(以下 LG21 と略す)は、*C. albicans* 感染誘発性慢性肥厚性カンジダ症による前胃増殖性病変を抑制することが明らかとなった。

ウイルスおよび細菌による慢性炎症を原因とした発癌の報告は多いが、真菌感染による慢性炎症に伴う発癌の報告は少ない^{2,56}。しかし、口腔カンジダ症の患者の一部では、口腔粘膜が過形成から異形成となり最終的に癌化することが知られている^{5-9,11}。本研究では、両群に癌の発生は認めなかったが、LG21 ヨーグルト投与は慢性肥厚性カンジダ症による扁平上皮の増殖活性を低下させ、過形成を抑制したことから、LG21 は、*C. albicans* による粘膜上皮の増殖および発癌の抑制に重要な役割を果たしていることが示唆された。

乳酸菌は、*in vitro* において *C. albicans* の膣上皮細胞への接着を阻害し^{57,58}、カンジダ膣炎マウスへのヨーグルトおよび乳酸菌の経口・膣内投与により *C. albicans* の増殖が抑制される報告がある^{51,52}。臨床的には乳酸菌をカンジダ膣炎の患者に経口あるいは膣内投与することにより *C. albicans* が抑制された報告があるが^{54,55,59,60}、一方で乳酸菌はカンジダ膣炎に効果がない報告もあることから、乳酸菌の抗真菌作用に対する明確な証拠は未だ得られていない^{55,61,62}。今回、LG21 は、*C. albicans* 感染を明瞭に減少させることはできなかったが、*C. albicans* 感染誘発による化膿性炎症を抑制することができた。したがって、LG21 は、軽度ながらカンジダ症に対する抗炎症効果を有すると考えられる。

乳酸産生に伴う pH の低下が真菌の増殖を抑制することで乳酸菌の抗真菌作用が生じると考えられている^{55,63,64}。多くの乳酸菌は胃酸により死滅するが、今回用いた LG21 は乳酸菌の中でも胃酸に抵抗性を示すとともに⁶⁵、胃粘膜に定着しやすい⁶⁶。このことから、胃粘膜に定着した LG21 から産生された乳酸による pH 低下で *C. albicans* の増殖を抑制できた可能性は高い。さらに、LG21 はプロスタグランジン E2 を産生することによって、胃粘膜を保護する効果がある⁵⁰。加えて、乳酸菌は、揮発性脂肪酸、過酸化水素、アセトアルデヒド、およびガセリシンなどのバクテリオシンなどの物質を産生し、細菌や真菌の増殖を阻害することが報告されている^{67,68}。したがって、胃粘膜に定着した LG21 自身が抗真菌および抗炎症作用に寄与した可能性もある。今回の実験から、LG21 が *C. albicans* の増殖を直接抑制したという証拠はないが、*C. albicans* 感染による増殖性および炎症性病変を確かに抑制した。

児玉ら¹⁸は、*C. albicans* 感染に伴う糖尿病ラットの前胃粘膜の増殖性病変は、大弯側と比べ、小弯側で強い傾向があることを示した。本研究において、LG21 は病変の弱い大弯側では増殖性病変を抑制できたが、病変の強い小弯側領域では抑制できなかった。この事実から、LG21 は、増殖性および炎症性病変がより軽度な状態で抑制効果が大きくなることが示唆された。

結論として、*Lactobacillus gasseri* OLL2716 株を含むプロバイオティクスは *C. albicans* 感染による慢性肥厚性カンジダ症の扁平上皮増殖性病変を有意に抑制し、化

膿性炎症を抑制することが明らかとなり、*C. albicans* 感染により誘発される増殖性および炎症性病変に対する予防もしくは治療になり得る可能性を示した。

第4章 慢性肥厚性カンジタ症から癌に至る発癌メカニズムの解析-p16、RAR- β 2、TIMP3、ERCC1 および BRCA1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化とタンパク発現の関連性の欠如

4.1 序文

癌の発生に最も関連する因子は癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子の異常であるが、エピジェネティクス研究により、塩基配列の変異・欠失によるジェネティックな変化のみならず、塩基やヒストンへの修飾によるエピジェネティックな変化によっても癌への進行が生ずることが明らかとなってきた⁶⁹。口腔扁平上皮癌、胃癌および大腸癌では、エピジェネティックな変化は多段階発癌過程のごく早期から認められ、多数の異常が蓄積することで遺伝子異常を誘導することが報告されている⁷⁰⁻⁷³。発癌過程で最も多く研究されているエピジェネティックな変化のメカニズムは DNA メチル化であり、食道、口腔もしくは肺などの扁平上皮癌では、多くの癌抑制遺伝子(p16、CADM1、TIMP3、RAR- β 2、RASSF1A、DAPK1、SOCS-3) および DNA 修復遺伝子(ERCC1、BRCA1、XRCC1、MLH1)のメチル化異常に伴って、タンパク発現が抑制され、細胞周期異常や増殖シグナル異常および突然変異の蓄積などが誘発され、癌の進展に関与するとされている⁷⁴⁻⁷⁹。また、炎症性発癌では、ヘリコバクター・ピロリ感染およびそれに伴う炎症反応が胃粘膜での DNA メチル化異常を誘発することや、喫煙によって誘発される炎症と食道組織でのメチル化異常に相関があることが報告されており、炎症に伴い DNA メチル化に異常が誘発されることが明らかになっている^{71,80}。

そこで、*C. albicans* 感染による腫瘍発生では、扁平上皮過形成から癌に至る発癌過程の進行に伴い、癌抑制遺伝子および DNA 修復遺伝子のプロモーター領域にメチル化異常が誘導され、これによってそのタンパク発現が抑制されている可能性があるのではないかと考え、筆者らが確立した慢性肥厚性カンジダ症モデルを用い、発癌過程に沿ってプロモーター領域のメチル化ならびにそのタンパク発現の解析を行った。

4.2 材料および方法

4.2.1 動物および飼育条件

1.2.1 に準じて行った。

4.2.2 実験デザイン

雌雄の WBN/Kob ラットを用い、10 週齢でアロキサンを単回投与し、糖尿病を誘発させた。アロキサン投与後 30 週以降に深麻酔下で腹部大動脈より放血致死させ、各臓器を肉眼的に観察した後、直ちに消化管を摘出し、すべての臓器とともに 10%中性緩衝ホルマリン溶液(pH 7.2)に浸漬固定した。摘出した臓器を 24 時間固定後、常法に従い約 5 mm の厚さで切り出した。エタノール系(70~100%)で脱水、パラフィン包埋後、大型滑走式ミクロトーム(大和光機工業株式会社、埼玉)を用い、約 4 μ m の厚さの組織切片を作製し、組織学的解

析を行った。

組織解析の結果、前胃の扁平上皮過形成 11 例（雌、40 週齢）、扁平上皮癌 6 例（雌 3 例、64、73、96 週齢および雄 3 例、38、93 (2 例) 週齢）ならびに正常扁平上皮 6 例（雌、40 週齢）を選択した。これらを用いて、メチル化解析と免疫組織学的解析を行った（Fig. 17）。

発癌過程をより詳細に解析するために、前胃切片について 1) 正常扁平上皮 (Fig. 17A)、2) 扁平上皮過形成 (Fig. 17B)、さらに扁平上皮癌については、3) 粘膜筋板が保たれている癌に隣接する過形成 (Fig. 17C and F)、4) 粘膜筋板が崩壊し癌と連続する過形成 (Fig. 17D and F) ならびに 5) 扁平上皮癌 (Fig. 17E and F) のそれぞれの 5 領域に分けて各遺伝子の DNA プロモーター領域のメチル化およびタンパク発現を解析した。

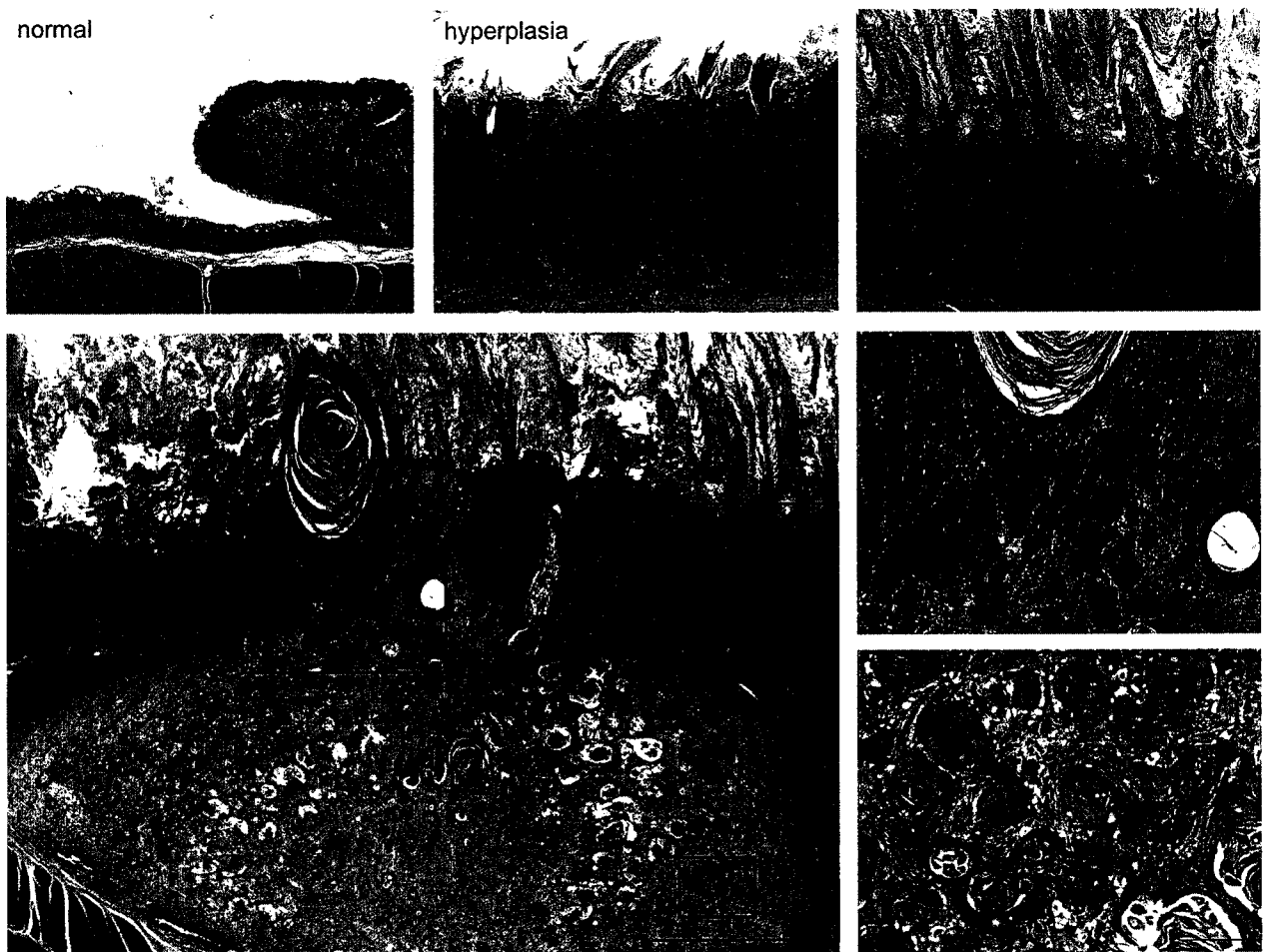


Fig. 17: Analyzed regions of squamous cell epithelia in the forestomach in alloxan-induced hyperplastic candidiasis and squamous cell carcinoma (SCC).

(A) Normal epithelia (normal); (B) squamous hyperplasia (hyperplasia); (C) squamous hyperplasia adjacent to SCC (adjacent); (D) squamous hyperplasia transitioning to SCC (transition); (E) SCC; and (F) low-power magnification of (C)-(E). HE stain. Scale bar: 100 μ m (A-E), 1 mm (F).

4.2.3 薬物の調製および投与方法

4.2.3.1 アロキササン

1.2.3.1 に準じて、アロキササンの調製を行い、尾静脈内に単回投与（雌:40 mg/kg、雄:45 mg/kg）した。

4.2.4 尿糖・血糖モニタリング

1.2.4 に準じて尿糖・血糖モニタリングを行った。

4.2.5 ヘマトキシリン・エオジン（H.E.）染色法

常法に従い、マイヤーのヘマトキシリンおよびエオジン染色を行った。

4.2.6 レーザーキャプチャーマイクロダイセクションとメチル化解析

DNA を回収するため、1) 正常扁平上皮領域、2) 扁平上皮過形成領域、3) 癌に隣接する過形成領域および 5) 癌領域のそれぞれ 4 領域を厚さ 8 μ m の切片を用いて解析した。それぞれの領域を mmi CellCut (MMI Onc., Rockledge, FL, USA) を用いて切り出し、mini Isolation Cap にて回収した。次に、EpiTect Plus Bisulfite Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて、DNA 抽出および Bisulfite 処理を行った。ラットの癌抑制遺伝子 (p16, p15, CADM1, TIMP3, RAR- β 2, RASSF1A, DAPK1, SOCS-3) および DNA 修復遺伝子 (ERCC1, BRCA1, XRCC1, MLH1) の CpG アイランドのプライマー配列 (Table 4) を用いて、Methylation specific PCR (MSP) を行った。MSP では、Epitect MSP Kit (QIAGEN) を使用し、40 ng の bisulfite 処理後 DNA および 0.3 μ M の各プライマーをそれぞれ混合して PCR 溶液とした。PCR のサイクリング条件は 95°C 10 分間を 1 サイクル、94°C 15 秒間、プライマー特異的アニーリング温度 (Table 4 参照) 30 秒間、72°C 30 秒間を 40 サイクル、72°C 10 分間であった。PCR 産物を 4% アガロースゲルで分離し、UV 照射にて確認した。また、SssI methylase (New England Biolabs) で処理した前胃の DNA サンプルを methylated control とし、SssI methylase (New England Biolabs) で処理せず、GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare) を用いて増幅させた前胃の DNA サンプルを unmethylated control として、全ての PCR 解析にそれぞれ加えた。

Table 4. Primer sequences for methylation specific PCR

Gene	M/U	Primer sequence (5' → 3')	Length (bp) position	Annealing temperature (°C)
p16	M	F: aattcgaggagagcgattcg R: gaccgaaaatattcgaaacg	133	52
	U	F: gtgaatttgaggagagtgtttg R: caaccaaaaatattcaaacatt	122	52
p15	M	F: ggaggattattttgttacggatc R: gacgttaaatctacgccgac	138	52
	U	F: gaggattattttgttatggattgg R: taacaacattaaaatctacaccaac	138	52
CADM1	M	F: gaggtaggtgttcgatatggc R: cctataaaaatcaataccgcgac	150	52
	U	F: ggtaggtgtttgatatgggtga R: cacctataaaaatcaataccacaac	150	52
TIMP3	M	F: tttcggaggttattttattggttc R: cgaatttaaccgtacactatacacg	139	52
	U	F: ttttggaggttattttattggttt R: caaatttaaccatacactatacacaat	140	52
RAR- β 2	M	F: ggttgggaaaaagattaatagtttac R: ctctacaacatacaaaaaaacgaa	222	55
	U	F: tgggaaaaagattaatagtttatgt R: ctctacaacatacaaaaaaacaaa	219	55
RASSF1A	M	F: ttgatcgggttatgtcggc R: gataaccacgacccgaaacg	169	55
	U	F: ttgattgggttatgttgggt R: aataaccacaacccaaaaca	169	55
DAPK1	M	F: ttcgagattaggatcgagttc R: caatcataataaactatcacgcc	194	55
	U	F: aggttttgagattaggattgagttt R: cacaatcataataaactatcacacc	200	55
SOCS3	M	F: ggattttattggagtgtcgtaatc R: aatacgtaaattcttaatccccgac	153	55
	U	F: ggattttattggagtgttgaattg R: aatacataaattcttaatccccaac	153	55
ERCC1	M	F: tttaggattatagagagtagcgca R: caaaaaataaaaacgataacaacg	166	55
	U	F: tttaggattatagagagtagtgtga R: aaaaaataaaaacaatacaacacc	164	55
BRCA1	M	F: ggtttttcgggtatttaggtttc R: ttaattccgctccaaacgtt	174	55
	U	F: ggttttttggtatttaggtttt R: aaactttaattccactccaaacatt	179	55
XRCC1	M	F: cgtagaggtttaatcgagtatgc R: cccgaaaaataaaaaataacg	128	55
	U	F: tgtagaggtttaattgagtatgtgt R: ccccaaaaaataaaaaataaca	129	55
MLH1	M	F: cgtgaattttgacgcgtaagcgc R: ccttcaccttaaacgaccgccg	175	55
	U	F: ggattgtgaattttgatgtgaagtgt R: ttcttccttcaccttaaaccaacca	184	55

4. 2. 7 免疫組織学的解析

1) 正常扁平上皮領域、2) 過形成領域、3) 癌に隣接する過形成領域、4) 癌と連続する過形成領域および5) 癌領域の切片について、形態学的解析とともに免疫組織学的な解析を行った。免疫染色では、切片にキシレンによる脱パラフィン処理およびエタノール系列(100～70%)による親水化を施した後に蒸留水で洗浄し、抗原賦活化処理を行った。抗原賦活化処理を Table 5 に示した。その後、50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) with 0.03% Tween-20 (TBST) で洗浄し、0.03% 過酸化水素水を含む 100% メタノールで内在性ペルオキシターゼに対するブロッキングを行った。TBST で洗浄後、免疫グロブリン Fc 受容体や補体受容体を介した非特異的反応の除去のために、TBST で希釈した 5% 正常ヤギ血清によるブロッキングを室温で 5 分間行い、Table 5 に示す一次抗体を用い 4℃で一晩反応させた。また、TBST で洗浄後、一次抗体に対応する二次抗体を用い室温で 60 分間反応後、3,3-diaminobenzidine (DAB) にて発色させた後、直ちに蒸留水で 10 分間洗浄し、マイヤーのヘマトキシリン液に 1 分間浸漬することにより対比染色を行い、10 分間流水および蒸留水で色出しを行った。染色切片をエタノール系列 (70～100%) およびキシレンで脱水および透徹後、封入した。

p16 タンパク発現では、扁平上皮の核に、発現のないものを「-」、軽度の発現を「+」、中等度の発現を「++」、高度の発現を「+++」とそれぞれ等級付けした。RAR- β 2 タンパク発現では、扁平上皮の核に、発現のないものを「-」、軽度の発現を「+」、中等度の発現を「++」、高度の発現を「+++」、さらに細胞質に、発現のないものを「-」、軽度の発現を「+」、中等度の発現を「++」とそれぞれ等級付けした。TIMP3 タンパク発現では、扁平上皮の核に、発現のないものを「-」、発現のあるものを「+」、核周囲の細胞質および核周囲以外の細胞質に、発現のないものを「-」、軽度の発現を「+」、中等度の発現を「++」とそれぞれ等級付けした。ERCC1 および BRCA1 タンパク発現では、扁平上皮の核に、発現のないものを「-」、発現のあるものを「+」と等級付けした。

Table 5. Antibodies used in this study

Primary antibody	Source	Antigen retrieval	Time	Dilution	Secondary antibody
p16	Santa Cruz	pepsin	20 min	1:50	Histofine simple stain rat MAX-PO (M)
TIMP3	Proteintech	-		1:200	Histofine simple stain rat MAX-PO (Rb)
RAR- β 2	abcam	10 mM citrate buffer (pH 6.0)	10 min	1:50	Histofine simple stain rat MAX-PO (Rb)
ERCC1	Santa Cruz	10 mM citrate buffer (pH 6.0)	10 min	1:800	Histofine simple stain rat MAX-PO (M)
BRCA1	Santa Cruz	1 mM EDTA buffer (pH 8.0)	10 min	1:200	Histofine simple stain rat MAX-PO (Rb)

4.3 結果

p16 プロモーターがメチル化された動物の比率は、正常領域および過形成領域で 0%、癌に隣接する過形成領域で 33%、癌領域で 83%であった (Fig. 18A)。扁平上皮の基底細胞における p16 の核のタンパク発現は、正常領域では陰性から陽性であったが、過形成領域、癌に隣接する過形成領域、癌と連続する過形成領域、癌領域へと発癌過程の進行に伴って、その陽性率は増加した (Fig. 18B and C)。p16 タンパク発現は細胞の分化度に応じて異なっており、正常上皮では下層に比べると上層の上皮で強い発現が認められた。分化した細胞のほとんどの核と細胞質が p16 タンパク陽性であったが、基底層では、いくつかの核で p16 タンパク発現が見られたにすぎなかった。しかし、発癌過程の進行に伴い、基底層の核の発現率は上昇し、癌領域では強度に染色されていた。過形成領域から癌領域の分化した細胞の核と細胞質の p16 タンパク発現に差は認められなかった。以上から、前胃扁平上皮の発癌過程の進行とともに、p16 プロモーターのメチル化が増強しているにもかかわらず、基底層の核の p16 タンパクは過剰発現していることが明らかとなった。

TIMP3 プロモーターがメチル化された動物の比率は、正常領域で 0%であったが、急激に上昇し、過形成領域で 64%、癌に隣接する過形成領域で 67%を示したが、癌領域では 0%とメチル化は消失した (Fig. 19A)。扁平上皮の基底細胞における TIMP3 の核のタンパク発現は正常領域では陰性で、過形成領域、癌に隣接する過形成領域では上昇していたが、癌領域では陰性となった (Fig. 19B and C)。核周囲の細胞質におけるタンパク発現は、正常領域では散発的であり、過形成領域および癌に隣接する過形成領域では上昇したが、癌と連続する過形成領域および癌領域では消失した。核周囲以外の細胞質のタンパク発現は、正常領域を含む全ての発癌過程で観察され、分化した細胞で最も強い反応を示した。しかしながら、扁平上皮の発癌過程において細胞質の染色性に一定の傾向は認められなかった。以上から、TIMP3 のプロモーターのメチル化は、前癌段階まで進行するが、癌化に伴い消失し、タンパク発現も癌化に伴い抑制することが明らかになった。

RAR- β 2 プロモーターのメチル化された動物の比率は、正常領域で 0%、過形成領域で 27%、癌に隣接する過形成領域で 83%であったが、癌領域では急速に消失し、0%になった (Fig. 20A)。RAR- β 2 の核のタンパク発現は、正常領域ではごく軽度であったが、発癌過程の進行に伴い徐々に増強し、全ての癌領域で、全層の核に強陽性を示した (Fig. 20B and C)。細胞質の RAR- β 2 タンパク発現は、過形成領域で強くなっていたが、発癌過程の進行に伴い、徐々に減弱した。以上から、RAR- β 2 のプロモーターのメチル化は前癌段階まで進行するが、癌化に伴い消失し、一方、RAR- β 2 タンパク発現は、発癌過程の進行に伴い、細胞質で弱くなり、核で強くなることが示された。

ERCC1 および BRCA1 のプロモーター領域は、いずれの段階でもメチル化されていなかったが、発癌過程の進行に伴って非メチルのバンドも消失した (Figs. 21A and 22A)。核の ERCC1 タンパク発現は、正常領域で陽性であったが、過形成領域で消失し、基底細胞の上層の分化した細胞では、発癌過程の進行に伴って、徐々に再発現した (Fig. 21B and C)。

更に、核の BRCA1 タンパク発現は、正常領域で陽性であったが、過形成領域から癌領域で急速に消失した (Fig. 22B and C)。対照的に、細胞質における ERCC1 および BRCA1 タンパク発現は全ての段階で陰性であった。以上から、ERCC1 および BRCA1 のプロモーター領域は、いずれの段階でもメチル化されず、これらのタンパク発現は早い段階で消失していたが、ERCC1 タンパクは発癌過程の進行に伴い、再発現することが明らかとなった。

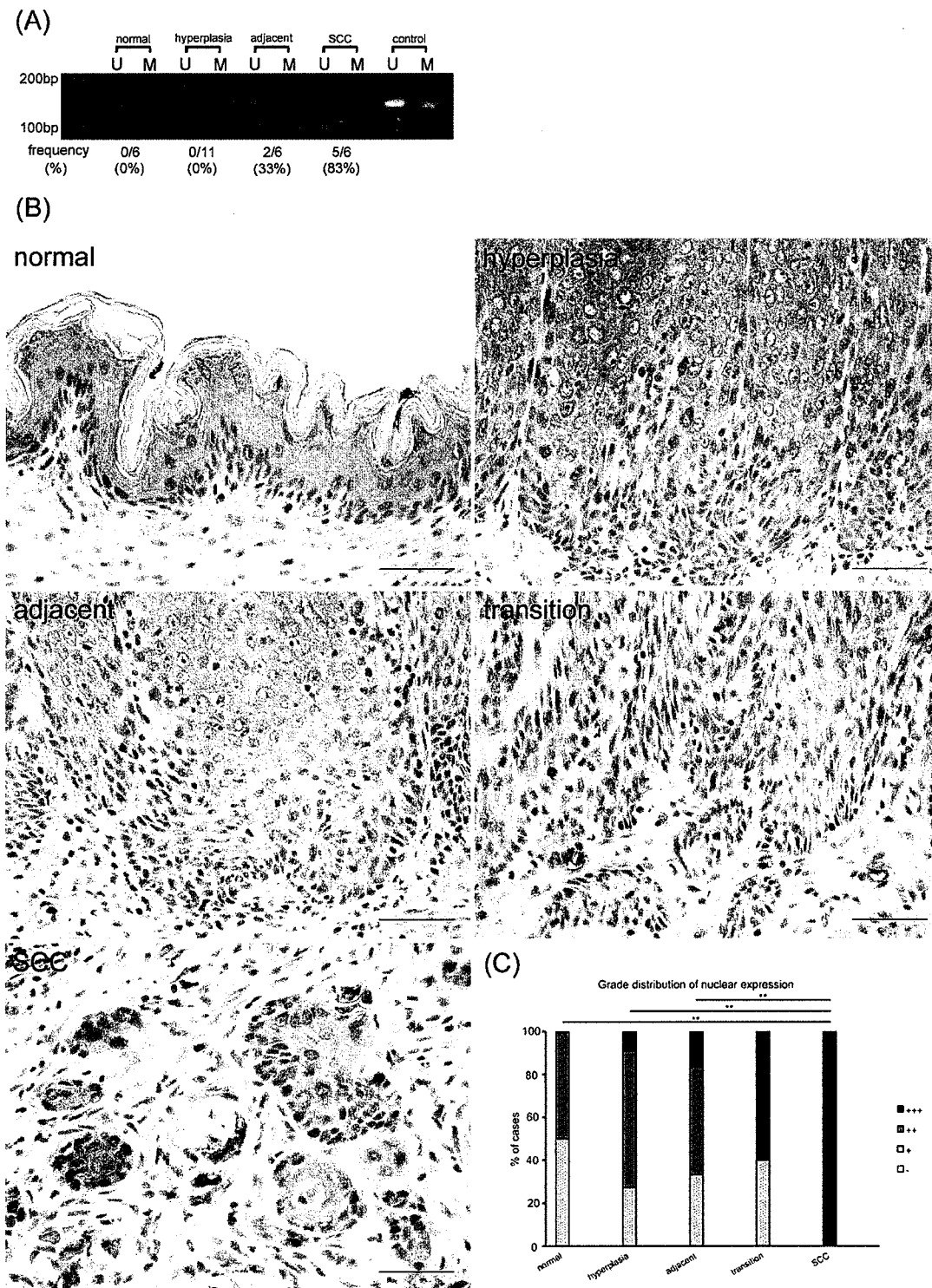


Fig.18: Nuclear p16 protein expression is progressively overexpressed in the carcinogenic process despite increased *p16* promoter methylation.

(A) MSP analysis of *p16*. U: PCR product amplified by unmethylated-specific primers, M: PCR product amplified by methylated-specific primers. (B) In immunohistochemical analysis, the positivity of the nuclei of basal cells gradually increased in accordance with the carcinogenic process. (C) Grade distribution of p16 nuclear expression. ** $p < 0.01$. Scale bar: 50 μ m

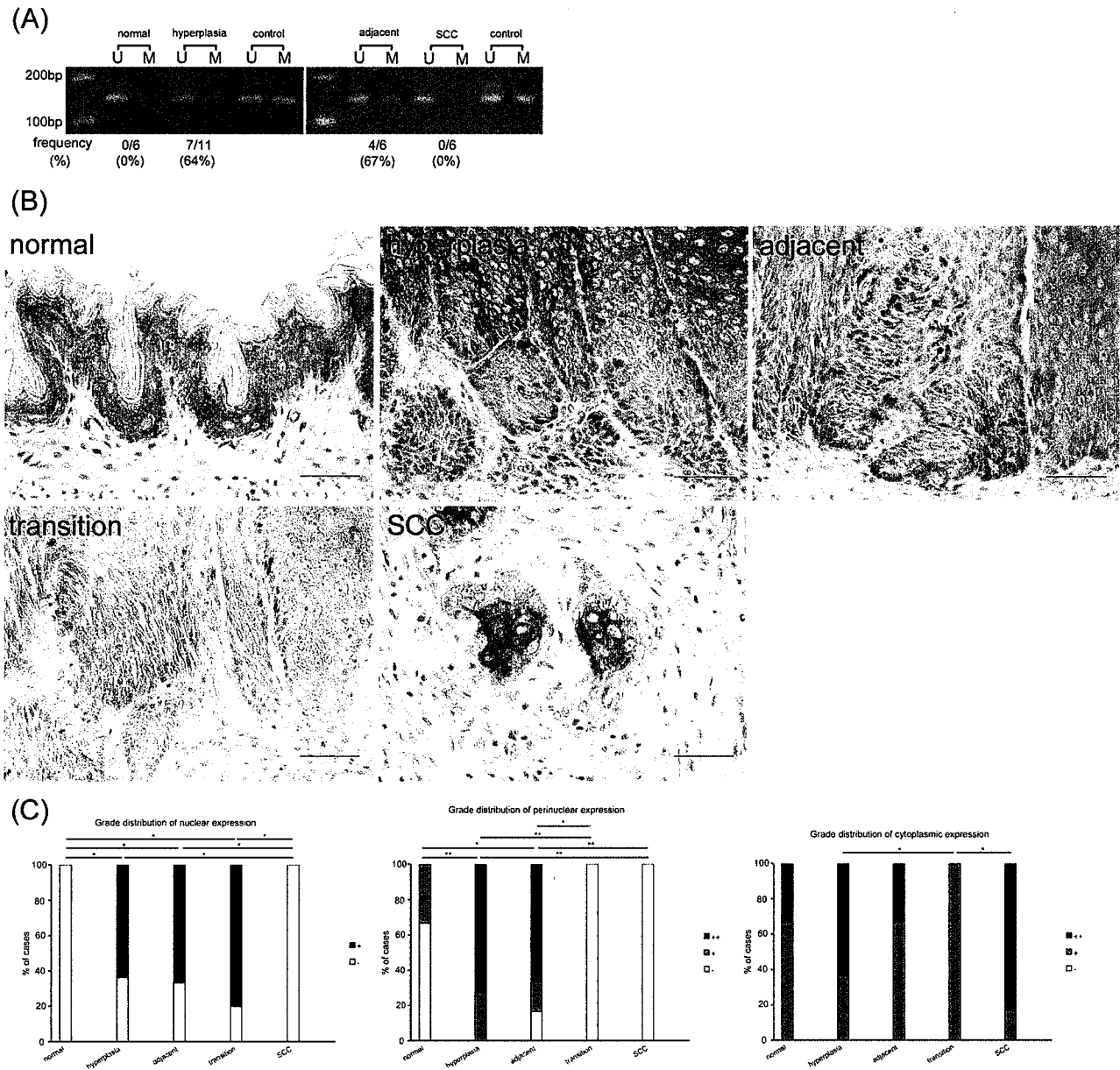


Fig. 19: *TIMP3* promoter methylation increases until the precancerous stage but clearly disappears along with malignant transformation whereas protein expression is suppressed in the carcinogenic process.

(A) MSP analysis of *TIMP3*. U: PCR product amplified by unmethylated-specific primers, M: PCR product amplified by methylated-specific primers. (B) In immunohistochemical analysis, nuclear and perinuclear cytoplasmic *TIMP3* protein expression was suppressed in the carcinogenic process whereas cytoplasmic protein expression was observed throughout. (C) Grade distribution of *TIMP3* nuclear, perinuclear, and cytoplasmic expression. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Scale bar: 50 μ m

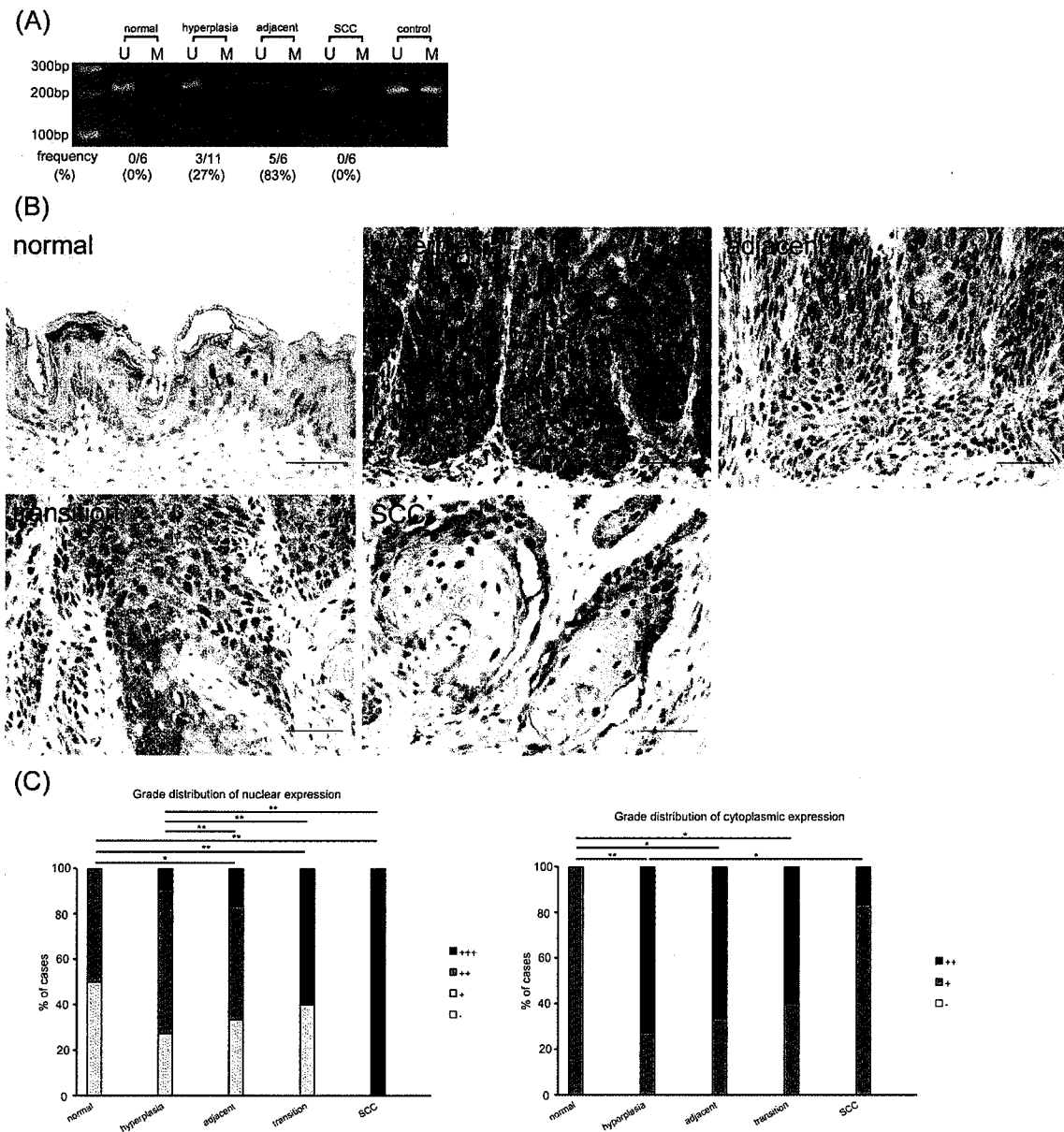


Fig. 20: *RAR-β2* promoter methylation progresses until the precancerous stage but disappears upon malignant transformation. In contrast, its protein expression declines in the cytoplasm but increases in the nucleus during the carcinogenic process.

(A) MSP analysis of *RAR-β2*. U: PCR product amplified by unmethylated-specific primers, M: PCR product amplified by methylated-specific primers. (B) In immunohistochemical analysis, *RAR-β2* nuclear protein expression was gradually enhanced and cytoplasmic protein expression is also advanced in hyperplasia, but was gradually reduced during the carcinogenic process. (C) Grade distribution of nuclear, and cytoplasmic expression. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Scale bar: 50 μ m.

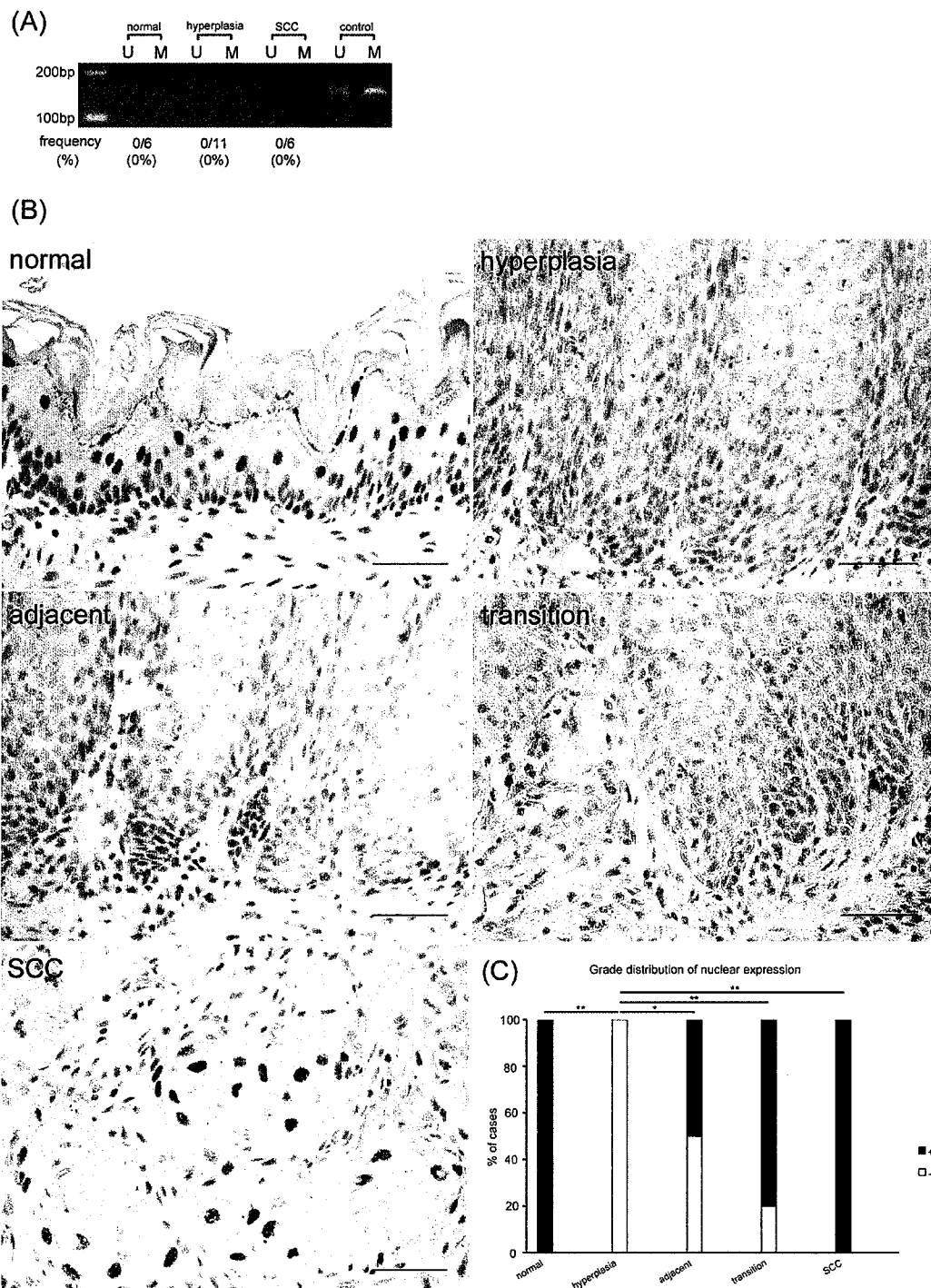


Fig. 21: *ERCC1* promoter is not methylated in carcinogenesis process, and its protein disappears in early stage, but its protein reappears in the nucleus with progression of carcinogenic process.

(A) MSP analysis of *ERCC1*. U: PCR product amplified by unmethylated-specific primers, M: PCR product amplified by methylated-specific primers. (B) In immunohistochemical analysis, *ERCC1* protein expression was detected in the nuclei of normal, and once disappeared in squamous hyperplasia, but gradually reappeared with progression of carcinogenesis process. (C) Grade distribution of nuclear expression. ** $p < 0.01$. Scale bar: 50 μ m

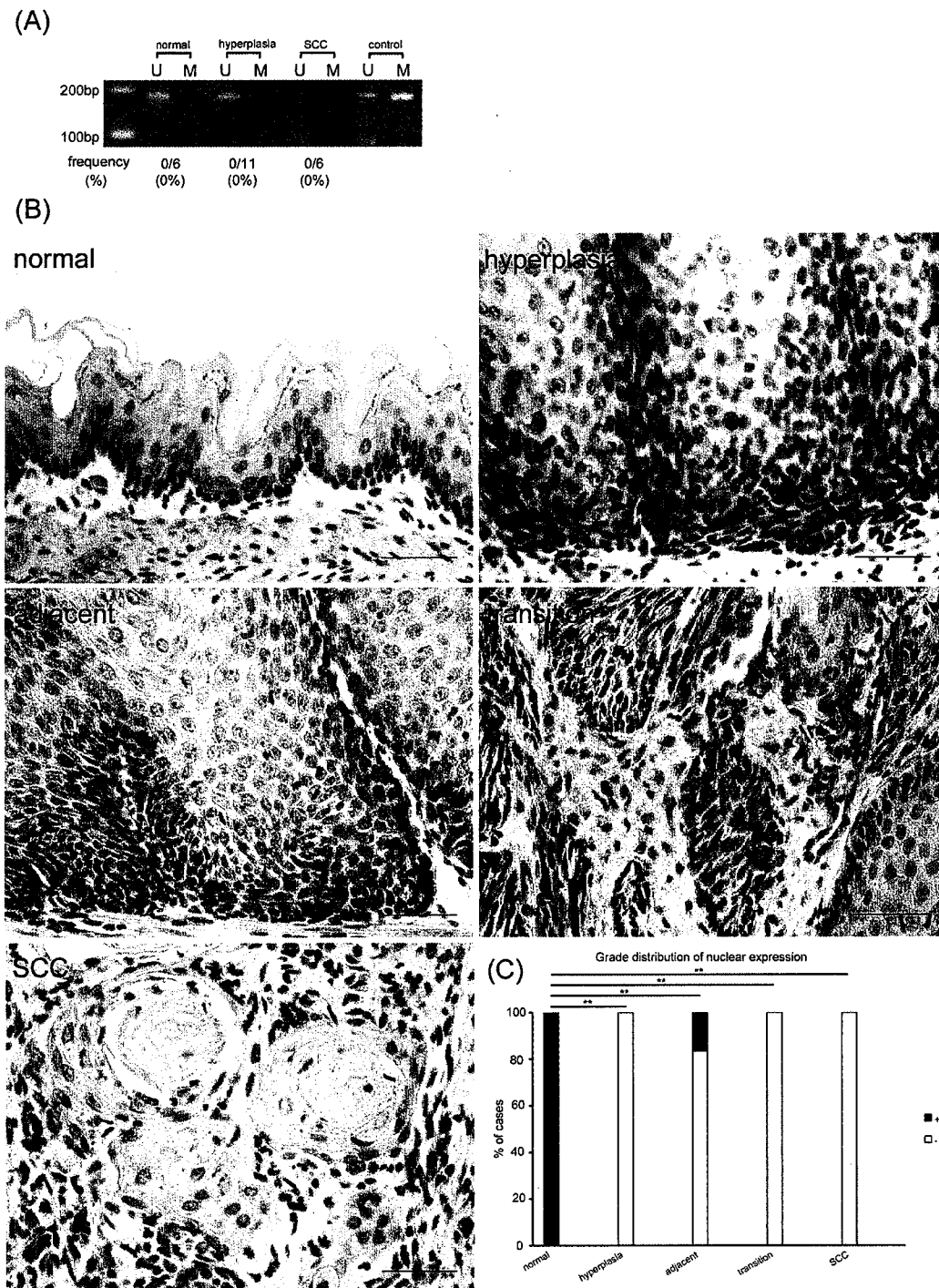


Fig. 22: The *BRCA1* promoter is not methylated during the carcinogenesis process and its protein disappears at an early stage.

(A) MSP analysis of *BRCA1*. U: PCR product amplified by unmethylated-specific primers, M: PCR product amplified by methylated-specific primers. (B) *BRCA1* protein expression was expressed in nuclei of normal tissue but drastically diminishes from hyperplasia to SCC. (C) Grade distribution of nuclear expression. ** $p < 0.01$. Scale bar: 50 μ m

4.4 考察

p16 は癌抑制遺伝子であり、細胞周期の調節以外に細胞老化、アポトーシスの誘導および細胞浸潤に重要な役割を果たす⁸¹。p16 プロモーター領域の過剰メチル化は、口腔癌、食道および肺の扁平上皮癌など多くの腫瘍で報告されており^{69,77,79,82,83}、それに伴い、ほとんどの例でそのタンパク発現は抑制される。今回、ヒトの報告と同様に p16 プロモーターのメチル化が発癌過程の進行とともに亢進した。しかし、そのタンパク発現は癌細胞の核では抑制されなかった。癌で p16 タンパクが過剰発現する原因として、CDKN2A 遺伝子の変異や、Rb 遺伝子欠損に伴うフィードバック調節が知られている^{81,84-86}。また、細胞質における p16 タンパクの過剰発現は、p16-CDK4 複合体の形成や膜貫通タンパクと p16 タンパクの結合に関連することが報告されている^{87,88}。今回の *C. albicans* 感染誘発性の慢性炎症に関連した癌では、p16 タンパクの過剰発現は p16 プロモーター領域のメチル化とは関係なく、CDKN2A の変異もしくは Rb 遺伝子欠損のような別の代替路によって生じたのではないかと考えられる。

TIMP3 は腫瘍の亢進に関与しており、特に、腫瘍の成長、血管新生、癌細胞の浸潤および転移を阻害するとともに、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) のタンパク分解活性と拮抗することが知られている^{89,90}。TIMP3 プロモーター領域のメチル化は、食道癌、胃癌および甲状腺癌など多くの腫瘍で観察されており、TIMP3 タンパクの発現の消失を招く^{89,91,92}。しかし、膀胱癌では TIMP3 プロモーター領域のメチル化が原因ではない TIMP3 タンパクの downregulation も報告されており、この現象は microRNA やヘテロ接合性の消失との関連が示唆されている⁹³⁻⁹⁶。本研究では、TIMP3 プロモーター領域は前癌段階までメチル化され、その後、脱メチル化が生じていたが、同時に TIMP3 タンパク発現の減少も生じていることが明らかになった。加えて、発癌過程の進行に伴って、TIMP3 タンパク発現が徐々に減少していることも示された。したがって、TIMP3 タンパク発現の消失は、以前の報告で示されたプロモーター領域のメチル化と直接関与するのではなく、結果として生じた *C. albicans* 感染誘発性慢性炎症と関連した腫瘍の悪性形質転換に関連している可能性がある。

RAR- β 2 は、細胞増殖阻害およびアポトーシスの誘導を導くことが知られ、食道および口腔粘膜の扁平上皮癌および異形成部位では RAR- β 2 プロモーター領域のメチル化により、RAR- β 2 の遺伝子および mRNA 発現が消失することが報告されている⁹⁷⁻⁹⁹。免疫組織学的解析により、口腔扁平上皮癌や甲状腺癌の核および細胞質では、RAR- β 2 タンパク発現は有意に減少することが報告されているが、本研究で観察された RAR- β 2 タンパク発現の上昇も、希ではあるが悪性腫瘍で報告されている⁹⁹⁻¹⁰²。一方、核内および細胞質の RAR- β 2 タンパク発現は、良性甲状腺腫瘍、口腔粘膜の異形成、前立腺過形成および前立腺上皮内腫瘍のような良性腫瘍や低悪性度腫瘍で報告されている^{99,101,103}。我々が用いた *C. albicans* 感染による慢性炎症を伴う扁平上皮癌は、高分化型であり、リンパ節転移は少なく予後は良好な低悪性度腫瘍である¹⁸ことから、今回認められた核と細胞質に認められた RAR- β 2

タンパク発現は、腫瘍の低悪性度と関連しているのかもしれない。さらに、細胞質の RAR- β 2 タンパク発現は、過形成で急激に上昇し、癌では正常レベルまで低下したが、これと同様の変化が前立腺の過形成および癌で報告されており、前立腺過形成と RAR- β 2 シグナル間には明確な相関があることが示唆される¹⁰³。以上から、RAR- β 2 シグナルの上昇は扁平上皮過形成と関連している可能性は高いと考えられる。

ERCC1 は、ヌクレオチド除去修復に重要な役割を果たす DNA 修復遺伝子であり、大腸癌やグリオーマでは、ERCC1 のタンパクおよび mRNA 発現は減少する¹⁰⁴⁻¹⁰⁶。一方、ヒトの頭頸部の扁平上皮癌および食道癌では ERCC1 タンパクの過剰発現が知られている^{107, 108}。本研究では、過形成領域で ERCC1 タンパク発現はプロモーターのメチル化と関係なく、消失したことから、その原因となる潜在的要因は遺伝子変異、ROS によるタンパク分解、あるいはプロモーターのメチル化以外のエピジェネティックな変化によるのではないかと考えられる¹⁰⁵。注目すべきことに、発癌過程の進行とともに、基底層の上層に位置する細胞の核に、徐々に ERCC1 タンパクの再発現が、プロモーター領域の非メチルおよびメチルのバンドの消失を伴って認められた。非メチルのバンドが消失した明確なメカニズムは不明であるが、本研究はプロモーター領域の異常が *C. albicans* 感染誘発性の腫瘍における ERCC1 タンパク発現を増強させている可能性を示唆していた。

BRCA1 は癌抑制遺伝子であり、その発現タンパクは DNA 修復、転写、細胞周期およびアポトーシスなどの多様なメカニズムを通して DNA の恒常性維持に関与している¹⁰⁹。乳癌や卵巣癌では、BRCA1 遺伝子の変異ならびにタンパク発現の消失が報告され、BRCA1 のプロモーター領域のメチル化により誘発されたタンパクの消失および機能低下も発見されている¹⁰⁹⁻¹¹¹。また、ヒトの食道扁平上皮癌では、BRCA1 のタンパクおよび mRNA 発現は、低いものから高いものまで様々である¹¹²。今回、プロモーターのメチル化に関係なく、発癌過程の早期の段階である過形成領域でタンパク発現は消失していた。BRCA1 の不活性化はプロモーター領域のメチル化状態とは関係なく、腫瘍の形質転換が生じる初期のステージそのものが関与している可能性が考えられる。

ヒトの食道扁平上皮癌では、p16、RAR- β 2 および TIMP3 のタンパク発現は減少し、ERCC1 および BRCA1 タンパク発現は増加および減少のいずれも示し変動する^{82, 91, 98, 108, 112}。今回の *C. albicans* 誘発性扁平上皮癌における TIMP3、ERCC1 および BRCA1 の変化はヒトと概ね一致したが、p16 と RAR- β 2 タンパクの高発現はヒトの低発現と一致しなかった。しかし、パピローマウイルス感染と関与するヒトの食道扁平上皮癌では、p16 タンパクの過剰発現が観察されている¹¹³。*C. albicans* 感染による慢性炎症は p16 の過剰発現に関連していることから、ヒトパピローマウイルスと同様に *C. albicans* が直接 p16 の過剰発現に影響及ぼした可能性もある。RAR- β 2 タンパク発現はヒトの高悪性度の前立腺癌で低下する¹⁰³。筆者の解析した腫瘍は転移率が低く、高分化型で低悪性度の扁平上皮癌であることから¹⁸、腫瘍の悪性度の程度も RAR- β 2 タンパク発現と関与しているのかもしれない。

今回、用いた動物モデルの *C. albicans* 感染誘発性の扁平上皮癌では、解析した遺伝子

のメチル化状態とそのタンパク発現の間に明確な関連性はなかった。我々の知る限り、DNA プロモーターのメチル化状態とタンパク発現の間に相関がないという報告は少ない⁹⁵。DNA のメチル化以外に、RNA レベルは、microRNA によって調節され、タンパク発現はタンパクの安定性によっても調節されている^{114,115}。p16、TIMP3、ERCC1 および BRCA1 遺伝子では、microRNA の低下によって RNA およびタンパク発現は低下する^{96,105,116,117}。さらに p16 タンパクの安定性は ARF によって調節され¹¹⁸、RAR- β 2 タンパク発現上昇には、レチノイン酸の増加が関与している¹¹⁹。筆者の研究から、メチル化以外の因子が、タンパク発現に影響し、また腫瘍発生にも関与している可能性が高い。今後、*C. albicans* 感染誘発性の扁平上皮癌の発癌メカニズムを解析する上で、遺伝子のメチル化とタンパク発現の相関の欠如に関与する因子を究明する、さらなる研究が必要である。

結論として、p16、TIMP3、RAR- β 2、ERCC1 および BRCA1 のタンパク発現の変化は、*C. albicans* 感染性の慢性炎症を伴う扁平上皮癌の発癌過程と関与している可能性が高い。すなわち、過形成段階で ERCC1 および BRCA1 タンパク発現は消失し、続いて p16 および RAR- β 2 タンパク発現の異常蓄積が生じ、さらに最終的に扁平上皮癌で TIMP3 タンパク発現は減少する (Fig. 23)。しかしながら、p16、TIMP3、RAR- β 2、ERCC1 および BRCA1 のプロモーターのメチル化はタンパク発現の消失とは連動せず、その原因ともなり得ない。本研究は p16、RAR- β 2、TIMP3、ERCC1 および BRCA1 のタンパク発現はプロモーターのメチル化状態とは関係なく生じ、これらが *C. albicans* 感染によって引き起こされる炎症性発癌を促進している可能性を示唆していた。

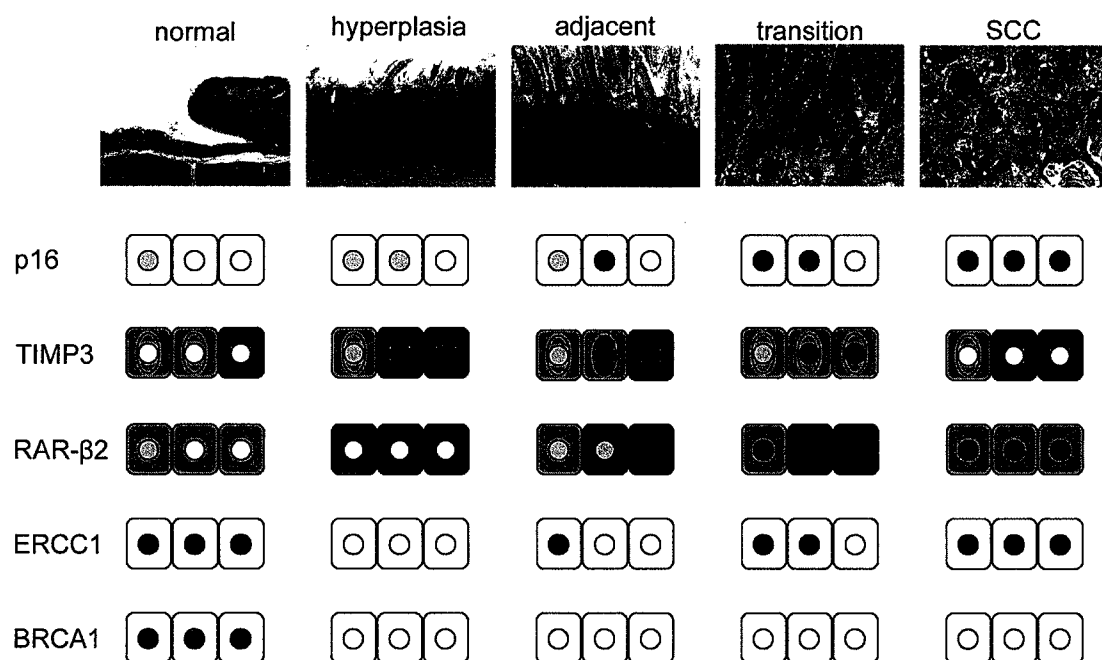


Fig. 23: Schematic representation of alterations of protein expression during SCC carcinogenesis associated with chronic inflammation and *C. albicans* infection.

結語

アロキサン誘発糖尿病ラットに *C. albicans* を強制経口投与またはプレドニゾロンを間歇投与する 2 種類の方法により、前胃の扁平上皮に高率かつ高度の慢性炎症と増殖性病変を発症する慢性肥厚性カンジダ症モデルを確立した。この 2 種類のモデルでは、いずれも少数ながら早期に扁平上皮癌に進行することから、希に扁平上皮癌に進行するヒトの口腔および食道の慢性肥厚性カンジダ症と極めて類似していることが判明した。次に、この慢性肥厚性カンジダ症モデルを用い、*Lactobacillus gasseri* OLL2716 株を含むプロバイオティクスが *C. albicans* 感染によって引き起こされる増殖性および炎症性病変に対し、予防および治療効果があることを明らかにした。以上の結果から、本モデルが慢性肥厚性カンジダ症のモデル動物として極めて有用であることが裏付けられた。また、*C. albicans* 感染による扁平上皮過形成から癌に至る発癌過程の形態学的解析から、慢性肥厚性カンジダ症の増悪化には CD4 陽性 T 細胞およびマクロファージの増加が深く関与していることが示され、発癌メカニズム解析から、p16、TIMP3、RAR- β 2、ERCC1 および BRCA1 のタンパク発現異常が、DNA プロモーター領域のメチル化とは関係なく生じていることを見出した。

本モデルの確立により、持続的な *C. albicans* 感染は扁平上皮過形成を誘導し、さらに扁平上皮癌にまで進行することが明確となり、*C. albicans* が発癌のリスクファクターとなる可能性を示した。すなわち本研究により、糖尿病、免疫抑制剤および抗菌剤の使用、ならびに加齢による免疫力低下により、近年増え続けている深在性カンジダ症患者に発癌の危険性ならびに真菌治療の重要性を提示することができた。。

現在、著者らは、*C. albicans* 認識の中心的な役割を果たす TLR4 とその下流シグナルの解析および腫瘍微小環境におけるマクロファージと STAT3 の関連性ならびに炎症性サイトカインの解析を行うことで、*C. albicans* 感染による発癌の危険性をより明確にするべく取り組んでいる。今後、今回確立した動物モデルを使用し、*C. albicans* 感染による発癌に至るメカニズムをより明確にすることは、抗真菌剤および抗癌剤の開発するために非常に有用であると考えられる。

引用文献

1. Grivennikov SI, Greten FR, and Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 140: 883-899. 2010.
2. Coussens LM, and Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 420: 860-867. 2002.
3. Mayer FL, Wilson D, and Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 4: 119-128. 2013.
4. Kabir MA, Hussain MA, and Ahmad Z. *Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. *ISRN Microbiol*. 2012: 538694. 2012.
5. McCullough M, Jaber M, Barrett AW, Bain L, Speight PM, and Porter SR. Oral yeast carriage correlates with presence of oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol*. 38: 391-393. 2002.
6. Barrett AW, Kingsmill VJ, and Speight PM. The frequency of fungal infection in biopsies of oral mucosal lesions. *Oral Dis*. 4: 26-31. 1998.
7. Sitheequ MA, and Samaranayake LP. Chronic hyperplastic candidosis/candidiasis (candidal leukoplakia). *Crit Rev Oral Biol Med*. 14: 253-267. 2003.
8. Williams DW, Bartie KL, Potts AJ, Wilson MJ, Fardy MJ, and Lewis MA. Strain persistence of invasive *Candida albicans* in chronic hyperplastic candidosis that underwent malignant change. *Gerodontology*. 18: 73-78. 2001.
9. Bakri MM, M. HH, Holmes AR, Cannon RD, and Rich AM. Revisiting the association between candidal infection and carcinoma, particularly oral squamous cell carcinoma. *J Oral Microbiol*. 21. 2010.
10. Gainza-Cirauqui ML, Nieminen MT, Novak Frazer L, Aguirre-Urizar JM, Moragues MD, and Rautemaa R. Production of carcinogenic acetaldehyde by *Candida albicans* from patients with potentially malignant oral mucosal disorders. *J Oral Pathol Med*. 42: 243-249. 2013.
11. Gall F, Colella G, Di Onofrio V, Rossiello R, Angelillo IF, and Liguori G. *Candida* spp. in oral cancer and oral precancerous lesions. *New Microbiol*. 36: 283-288. 2013.
12. Norgaard M, Thomsen RW, Farkas DK, Mogensen MF, and Sorensen HT. *Candida* infection and cancer risk: a Danish nationwide cohort study. *Eur J Intern Med*. 24: 451-455. 2013.
13. O'Grady JF, and Reade PC. *Candida albicans* as a promoter of oral mucosal neoplasia. *Carcinogenesis*. 13: 783-786. 1992.
14. Dwivedi PP, Mallya S, and Dongari-Bagtzoglou A. A novel immunocompetent murine model for *Candida albicans*-promoted oral epithelial dysplasia. *Med Mycol*. 47:

157-167. 2009.

15. Samaranayake YH, and Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev.* 14: 398-429. 2001.
16. Costa AC, Pereira CA, Junqueira JC, and Jorge AO. Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. *Virulence.* 4: 391-399. 2013.
17. Naglik JR, Fidel PL, Jr., and Odds FC. Animal models of mucosal *Candida* infection. *FEMS Microbiol Lett.* 283: 129-139. 2008.
18. Kodama Y, Ozaki K, Sano T, Matsuura T, Akagi H, and Narama I. Induction of squamous cell carcinoma of forestomach in diabetic rats by single alloxan treatment. *Cancer Sci.* 97: 1023-1030. 2006.
19. Sano T, Ozaki K, Kodama Y, Matsuura T, and Narama I. Prevention of proliferative changes of forestomach mucosa by blood glucose control with insulin in alloxan-induced diabetic rats. *Cancer Sci.* 100: 595-600. 2009.
20. Sano T, Ozaki K, Kodama Y, Matsuura T, and Narama I. Effects of the antifungal agent itraconazole on proliferative changes of the forestomach mucosa in alloxan-induced diabetic rats. *Toxicol Pathol.* 37: 790-798. 2009.
21. Bartholomew GA, Rodu B, and Bell DS. Oral candidiasis in patients with diabetes mellitus: a thorough analysis. *Diabetes Care.* 10: 607-612. 1987.
22. Russell C, and Jones JH. The histology of prolonged candidal infection of the rat's tongue. *J Oral Pathol.* 4: 330-339. 1975.
23. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, and Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 8: 668-676. 2006.
24. de Leon EM, Jacober SJ, Sobel JD, and Foxman B. Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type 1 and type 2 diabetes. *BMC Infect Dis.* 2: 1. 2002.
25. Nagy KN, Sonkodi I, Szoke I, Nagy E, and Newman HN. The microflora associated with human oral carcinomas. *Oral Oncol.* 34: 304-308. 1998.
26. Wilson RM, Tomlinson DR, and Reeves WG. Neutrophil sorbitol production impairs oxidative killing in diabetes. *Diabet Med.* 4: 37-40. 1987.
27. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, Pollak M, Regensteiner JG, and Yee D. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care.* 33: 1674-1685. 2010.
28. Kodama Y, Ozaki K, Sano T, Matsuura T, and Narama I. Enhanced tumorigenesis of forestomach tumors induced by N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats with hypoinsulinemic diabetes. *Cancer Sci.* 101: 1604-1609. 2010.

29. Rollins BJ. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. *Eur J Cancer*. 42: 760-767. 2006.
30. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, and Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol*. 123: 513-522. 1993.
31. Jordan RC, Bradley G, and Slingerland J. Reduced levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in epithelial dysplasia and carcinoma of the oral cavity. *Am J Pathol*. 152: 585-590. 1998.
32. Zhao J, Guo B, Ma SC, and Zhou XD. Expression of p53 and Ki-67 genes in epithelial dysplasia from old oral mucosa and clinical significance. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 36: 689-691. 2005.
33. Farah CS, Lynch N, and McCullough MJ. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Aust Dent J*. 55 Suppl 1: 48-54. 2010.
34. Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, and Abe S. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol*. 47: 321-326. 2003.
35. Abe S. [Development of murine experimental model for candidiasis and its application]. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 45: 227-231. 2004.
36. Ishibashi H, Uchida K, Nishiyama Y, Yamaguchi H, and Abe S. Oral administration of itraconazole solution has superior efficacy in experimental oral and oesophageal candidiasis in mice than its intragastric administration. *J Antimicrob Chemother*. 59: 317-320. 2007.
37. Okada M, Hisajima T, Ishibashi H, Miyasaka T, Abe S, and Satoh T. Pathological analysis of the *Candida albicans*-infected tongue tissues of a murine oral candidiasis model in the early infection stage. *Arch Oral Biol*. 58: 444-450. 2013.
38. Coutinho AE, and Chapman KE. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol*. 335: 2-13. 2011.
39. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, and Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res*. 2014: 149185. 2014.
40. Roberts SJ, Ng BY, Filler RB, Lewis J, Glusac EJ, Hayday AC, Tigelaar RE, and Girardi M. Characterizing tumor-promoting T cells in chemically induced cutaneous carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 6770-6775. 2007.

41. Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, Basham B, McClanahan T, Kastelein RA, and Olt M. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*. 442: 461-465. 2006.
42. Hanada T, Kobayashi T, Chinen T, Saeki K, Takaki H, Koga K, Minoda Y, Sanada T, Yoshioka T, Mimata H, Kato S, and Yoshimura A. IFN γ -dependent, spontaneous development of colorectal carcinomas in SOCS1-deficient mice. *J Exp Med*. 203: 1391-1397. 2006.
43. Condeelis J, and Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 124: 263-266. 2006.
44. Hatogai K, Kitano S, Fujii S, Kojima T, Daiko H, Nomura S, Yoshino T, Ohtsu A, Takiguchi Y, Doi T, and Ochiai A. Comprehensive immunohistochemical analysis of tumor microenvironment immune status in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016.
45. Mori K, Hiroi M, Shimada J, and Ohmori Y. Infiltration of m2 tumor-associated macrophages in oral squamous cell carcinoma correlates with tumor malignancy. *Cancers (Basel)*. 3: 3726-3739. 2011.
46. Daniel D, Meyer-Morse N, Bergsland EK, Dehne K, Coussens LM, and Hanahan D. Immune enhancement of skin carcinogenesis by CD4⁺ T cells. *J Exp Med*. 197: 1017-1028. 2003.
47. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, and Coussens LM. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*. 16: 91-102. 2009.
48. Sakamoto I, Igarashi M, Kimura K, Takagi A, Miwa T, and Koga Y. Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. *J Antimicrob Chemother*. 47: 709-710. 2001.
49. Uchida M, and Kurakazu K. Yogurt containing *Lactobacillus gasseri* OLL2716 exerts gastroprotective action against acute gastric lesion and antral ulcer in rats. *J Pharmacol Sci*. 96: 84-90. 2004.
50. Uchida M, Shimizu K, and Kurakazu K. Yogurt containing *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21 yogurt) accelerated the healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 74: 1891-1894. 2010.
51. Hamad M, Muta'eb E, Abu-Shaqra Q, Fraij A, Abu-Elteen K, and Yasin SR. Utility of the oestrogen-dependent vaginal candidosis murine model in evaluating the efficacy of various therapies against vaginal *Candida albicans* infection. *Mycoses*. 49: 104-108. 2006.
52. Joo HM, Kim KA, Myoung KS, Ahn YT, Lee JH, Huh CS, Han MJ, and Kim DH.

- Lactobacillus helveticus* HY7801 ameliorates vulvovaginal candidiasis in mice by inhibiting fungal growth and NF-kappaB activation. *Int Immunopharmacol.* 14: 39-46. 2012.
53. Wagner RD, and Johnson SJ. Probiotic *Lactobacillus* and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to *Candida albicans*. *J Biomed Sci.* 19: 58. 2012.
54. Vicariotto F, Del Piano M, Mogna L, and Mogna G. Effectiveness of the association of 2 probiotic strains formulated in a slow release vaginal product, in women affected by vulvovaginal candidiasis: a pilot study. *J Clin Gastroenterol.* 46 Suppl: S73-80. 2012.
55. Falagas ME, Betsi GI, and Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother.* 58: 266-272. 2006.
56. Kuper H, Adami HO, and Trichopoulos D. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med.* 248: 171-183. 2000.
57. Ishijima SA, Hayama K, Burton JP, Reid G, Okada M, Matsushita Y, and Abe S. Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on the in vitro growth of *Candida albicans* and its protective effect in an oral candidiasis model. *Appl Environ Microbiol.* 78: 2190-2199. 2012.
58. Osset J, Garcia E, Bartolome RM, and Andreu A. Role of *Lactobacillus* as protector against vaginal candidiasis. *Med Clin (Barc).* 117: 285-288. 2001.
59. Hilton E, Rindos P, and Isenberg HD. *Lactobacillus* GG vaginal suppositories and vaginitis. *J Clin Microbiol.* 33: 1433. 1995.
60. Reid G, Charbonneau D, Erb J, Kochanowski B, Beuerman D, Poehner R, and Bruce AW. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 35: 131-134. 2003.
61. Shalev E, Battino S, Weiner E, Colodner R, and Keness Y. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* compared with pasteurized yogurt as prophylaxis for recurrent candidal vaginitis and bacterial vaginosis. *Arch Fam Med.* 5: 593-596. 1996.
62. Pirotta M, Gunn J, Chondros P, Grover S, O'Malley P, Hurley S, and Garland S. Effect of *Lactobacillus* in preventing post-antibiotic vulvovaginal candidiasis: a randomised controlled trial. *BMJ.* 329: 548. 2004.
63. Antonio MA, Hawes SE, and Hillier SL. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis.* 180: 1950-1956. 1999.

64. Sobel JD, and Chaim W. Vaginal microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Clin Microbiol.* 34: 2497-2499. 1996.
65. Kimura K. Health Benefits of Probiotics: Probiotics foe *Helicobacter pylori* Infection. *Food Science and Technology Research.* 10: 1-5. 2004.
66. Fujimura S, Kato S, Oda M, Miyahara M, Ito Y, Kimura K, Kawamura T, Ohnuma M, Tatenno H, and Watanabe A. Detection of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 strain administered with yogurt drink in gastric mucus layer in humans. *Lett Appl Microbiol.* 43: 578-581. 2006.
67. Kawai Y, Saito T, Kitazawa H, and Itoh T. Gassericin A; an uncommon cyclic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 linked at N- and C-terminal ends. *Biosci Biotechnol Biochem.* 62: 2438-2440. 1998.
68. Piard JC DM. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait.* 71: 525-541. 1991.
69. Virani S, Colacino JA, Kim JH, and Rozek LS. Cancer epigenetics: a brief review. *ILAR J.* 53: 359-369. 2012.
70. Kang GH. CpG island hypermethylation in gastric carcinoma and its premalignant lesions. *Korean J Pathol.* 46: 1-9. 2012.
71. Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T, Ichinose M, Tatematsu M, and Ushijima T. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Res.* 70: 1430-1440. 2010.
72. Perez-Sayans M, Somoza-Martin JM, Barros-Angueira F, Reboiras-Lopez MD, Gandara Rey JM, and Garcia-Garcia A. Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer (Review). *Oncol Rep.* 22: 1277-1282. 2009.
73. Choi S, and Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res.* 87: 14-32. 2008.
74. Liu WB, Cui ZH, Ao L, Zhou ZY, Zhou YH, Yuan XY, Xiang YL, Liu JY, and Cao J. Aberrant methylation accounts for cell adhesion-related gene silencing during 3-methylcholanthrene and diethylnitrosamine induced multistep rat lung carcinogenesis associated with overexpression of DNA methyltransferases 1 and 3a. *Toxicol Appl Pharmacol.* 251: 70-78. 2011.
75. Liu WB, Ao L, Cui ZH, Zhou ZY, Zhou YH, Yuan XY, Xiang YL, Cao J, and Liu JY. Molecular analysis of DNA repair gene methylation and protein expression during chemical-induced rat lung carcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 408: 595-601. 2011.

76. Li B, Wang B, Niu LJ, Jiang L, and Qiu CC. Hypermethylation of multiple tumor-related genes associated with DNMT3b up-regulation served as a biomarker for early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Epigenetics*. 6: 307-316. 2011.
77. Diez-Perez R, Campo-Trapero J, Cano-Sanchez J, Lopez-Duran M, Gonzalez-Moles MA, Bascones-Ilundain J, and Bascones-Martinez A. Methylation in oral cancer and pre-cancerous lesions (Review). *Oncol Rep*. 25: 1203-1209. 2011.
78. Liu WB, Ao L, Zhou ZY, Cui ZH, Zhou YH, Yuan XY, Xiang YL, Cao J, and Liu JY. CpG island hypermethylation of multiple tumor suppressor genes associated with loss of their protein expression during rat lung carcinogenesis induced by 3-methylcholanthrene and diethylnitrosamine. *Biochem Biophys Res Commun*. 402: 507-514. 2010.
79. Liu WB, Liu JY, Ao L, Zhou ZY, Zhou YH, Cui ZH, Yang H, and Cao J. Dynamic changes in DNA methylation during multistep rat lung carcinogenesis induced by 3-methylcholanthrene and diethylnitrosamine. *Toxicol Lett*. 189: 5-13. 2009.
80. Oka D, Yamashita S, Tomioka T, Nakanishi Y, Kato H, Kaminishi M, and Ushijima T. The presence of aberrant DNA methylation in noncancerous esophageal mucosae in association with smoking history: a target for risk diagnosis and prevention of esophageal cancers. *Cancer*. 115: 3412-3426. 2009.
81. Romagosa C, Simonetti S, Lopez-Vicente L, Mazo A, Lleonart ME, Castellvi J, and Ramon y Cajal S. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*. 30: 2087-2097. 2011.
82. Wang J, Sasco AJ, Fu C, Xue H, Guo G, Hua Z, Zhou Q, Jiang Q, and Xu B. Aberrant DNA methylation of P16, MGMT, and hMLH1 genes in combination with MTHFR C677T genetic polymorphism in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 17: 118-125. 2008.
83. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, and Sidransky D. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 56: 3630-3633. 1996.
84. Larque AB, Conde L, Hakim S, Alos L, Jares P, Vilaseca I, Cardesa A, and Nadal A. P16(INK(4)a) overexpression is associated with CDKN2A mutation and worse prognosis in HPV-negative laryngeal squamous cell carcinomas. *Virchows Arch*. 466: 375-382. 2015.
85. Herschkowitz JI, He X, Fan C, and Perou CM. The functional loss of the

- retinoblastoma tumour suppressor is a common event in basal-like and luminal B breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 10: R75. 2008.
86. Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, and Peters G. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol.* 16: 859–867. 1996.
 87. Zhao P, Mao X, and Talbot IC. Aberrant cytological localization of p16 and CDK4 in colorectal epithelia in the normal adenoma carcinoma sequence. *World J Gastroenterol.* 12: 6391–6396. 2006.
 88. Gump J, Stokoe D, and McCormick F. Phosphorylation of p16INK4A correlates with Cdk4 association. *J Biol Chem.* 278: 6619–6622. 2003.
 89. Guan Z, Zhang J, Song S, and Dai D. Promoter methylation and expression of TIMP3 gene in gastric cancer. *Diagn Pathol.* 8: 110. 2013.
 90. Lindsey JC, Lusher ME, Anderton JA, Bailey S, Gilbertson RJ, Pearson AD, Ellison DW, and Clifford SC. Identification of tumour-specific epigenetic events in medulloblastoma development by hypermethylation profiling. *Carcinogenesis.* 25: 661–668. 2004.
 91. Smith E, De Young NJ, Tian ZQ, Caruso M, Ruszkiewicz AR, Liu JF, Jamieson GG, and Drew PA. Methylation of TIMP3 in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol.* 14: 203–210. 2008.
 92. Brait M, Loyo M, Rosenbaum E, Ostrow KL, Markova A, Papagerakis S, Zahurak M, Goodman SM, Zeiger M, Sidransky D, Umbricht CB, and Hoque MO. Correlation between BRAF mutation and promoter methylation of TIMP3, RARBeta2 and RASSF1A in thyroid cancer. *Epigenetics.* 7: 710–719. 2012.
 93. Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Kishi M, Nakase H, Sakaki T, and Konishi N. Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab Invest.* 85: 165–175. 2005.
 94. Masson D, Rioux-Leclercq N, Fergelot P, Jouan F, Mottier S, Theoleyre S, Bach-Ngohou K, Patard JJ, and Denis MG. Loss of expression of TIMP3 in clear cell renal cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 46: 1430–1437. 2010.
 95. Fendrich V, Slater EP, Heinmoller E, Ramaswamy A, Celik I, Nowak O, Chaloupka B, Gerdes B, and Bartsch DK. Alterations of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3) gene in pancreatic adenocarcinomas. *Pancreas.* 30: e40–45. 2005.
 96. Liu W, Li M, Chen X, Zhang D, Wei L, Zhang Z, Wang S, Meng L, Zhu S, and Li B. MicroRNA-373 promotes migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma by inhibiting TIMP3 expression. *Am J Cancer Res.* 6: 1–14. 2016.

97. Lai ZL, Tsou YA, Fan SR, Tsai MH, Chen HL, Chang NW, Cheng JC, and Chen CM. Methylation-associated gene silencing of RARB in areca carcinogens induced mouse oral squamous cell carcinoma. *Biomed Res Int.* 2014: 378358. 2014.
98. Wang Y, Fang MZ, Liao J, Yang GY, Nie Y, Song Y, So C, Xu X, Wang LD, and Yang CS. Hypermethylation-associated inactivation of retinoic acid receptor beta in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 9: 5257-5263. 2003.
99. Ralhan R, Chakravarti N, Kaur J, Sharma C, Kumar A, Mathur M, Bahadur S, Shukla NK, and Deo SV. Clinical significance of altered expression of retinoid receptors in oral precancerous and cancerous lesions: relationship with cell cycle regulators. *Int J Cancer.* 118: 1077-1089. 2006.
100. Rochaix P, Monteil-Onteniente S, Rochette-Egly C, Caratero C, Voigt JJ, and Joza S. Reduced expression of retinoic acid receptor beta protein (RAR beta) in human papillary thyroid carcinoma: immunohistochemical and western blot study. *Histopathology.* 33: 337-343. 1998.
101. Hoftijzer HC, Liu YY, Morreau H, van Wezel T, Pereira AM, Corssmit EP, Romijn JA, and Smit JW. Retinoic acid receptor and retinoid X receptor subtype expression for the differential diagnosis of thyroid neoplasms. *Eur J Endocrinol.* 160: 631-638. 2009.
102. Mauro LV, Dalurzo M, Smith D, Lastiri J, Vasallo B, Joffei EB, Pallotta MG, and Puricelli L. [Retinoid expression (RARbeta and CRBP1) in non-small-cell lung carcinoma]. *Medicina (B Aires).* 68: 205-212. 2008.
103. Richter F, Joyce A, Fromowitz F, Wang S, Watson J, Watson R, Irwin RJ, Jr., and Huang HF. Immunohistochemical localization of the retinoic Acid receptors in human prostate. *J Androl.* 23: 830-838. 2002.
104. Friboulet L, Postel-Vinay S, Sourisseau T, Adam J, Stoclin A, Ponsonnailles F, Dorvault N, Commo F, Saulnier P, Salome-Desmoulez S, Pottier G, Andre F, Kroemer G, Soria JC, and Olaussen KA. ERCC1 function in nuclear excision and interstrand crosslink repair pathways is mediated exclusively by the ERCC1-202 isoform. *Cell Cycle.* 12: 3298-3306. 2013.
105. Facista A, Nguyen H, Lewis C, Prasad AR, Ramsey L, Zaitlin B, Nfonsam V, Krouse RS, Bernstein H, Payne CM, Stern S, Oatman N, Banerjee B, and Bernstein C. Deficient expression of DNA repair enzymes in early progression to sporadic colon cancer. *Genome Integr.* 3: 3. 2012.
106. Chen HY, Shao CJ, Chen FR, Kwan AL, and Chen ZP. Role of ERCC1 promoter hypermethylation in drug resistance to cisplatin in human gliomas. *Int J Cancer.*

126: 1944–1954. 2010.

107. Ciaparrone M, Caspiani O, Bicciolo G, Signorelli D, Simonelli I, de Campora L, Mazzarella G, Mecozzi A, Pianelli C, Camaioni A, Catalano P, Pasqualetti P, Fabiano A, Radici M, Marmioli L, and Corsi DC. Predictive Role of ERCC1 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients Treated with Surgery and Adjuvant Cisplatin-Based Chemoradiation. *Oncology*. 2015.
108. Ge H, Lu Y, Chen Y, Zheng X, Wang W, and Yu J. ERCC1 expression and tumor regression predict survival in esophageal squamous cell carcinoma patients receiving combined trimodality therapy. *Pathol Res Pract*. 210: 656–661. 2014.
109. Yoshida K, and Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci*. 95: 866–871. 2004.
110. Yang D, Khan S, Sun Y, Hess K, Shmulevich I, Sood AK, and Zhang W. Association of BRCA1 and BRCA2 mutations with survival, chemotherapy sensitivity, and gene mutator phenotype in patients with ovarian cancer. *JAMA*. 306: 1557–1565. 2011.
111. Welcsh PL, and King MC. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet*. 10: 705–713. 2001.
112. Gao Y, Zhu J, Zhang X, Wu Q, Jiang S, Liu Y, Hu Z, Liu B, and Chen X. BRCA1 mRNA expression as a predictive and prognostic marker in advanced esophageal squamous cell carcinoma treated with cisplatin- or docetaxel-based chemotherapy/chemoradiotherapy. *PLoS One*. 8: e52589. 2013.
113. Lu DW, El-Mofty SK, and Wang HL. Expression of p16, Rb, and p53 proteins in squamous cell carcinomas of the anorectal region harboring human papillomavirus DNA. *Mod Pathol*. 16: 692–699. 2003.
114. Esquela-Kerscher A, and Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 6: 259–269. 2006.
115. Li M, Kales SC, Ma K, Shoemaker BA, Crespo-Barreto J, Cangelosi AL, Lipkowitz S, and Panchenko AR. Balancing Protein Stability and Activity in Cancer: A New Approach for Identifying Driver Mutations Affecting CBL Ubiquitin Ligase Activation. *Cancer Res*. 76: 561–571. 2016.
116. Choi YS, and Lee KE. The Significance of miR-34a Expression in Endometrial Carcinogenesis: Correlation With Expression of p16 and Ki-67 Proteins in Endometrial Cancers. *J Cancer Prev*. 20: 268–274. 2015.
117. Chang S, and Sharan SK. BRCA1 and microRNAs: emerging networks and potential therapeutic targets. *Mol Cells*. 34: 425–432. 2012.
118. Kobayashi T, Wang J, Al-Ahmadie H, and Abate-Shen C. ARF regulates the stability

- of p16 protein via REGgamma-dependent proteasome degradation. Mol Cancer Res. 11: 828-833. 2013.
119. Kurie JM, Lotan R, Lee JJ, Lee JS, Morice RC, Liu DD, Xu XC, Khuri FR, Ro JY, Hittelman WN, Walsh GL, Roth JA, Minna JD, and Hong WK. Treatment of former smokers with 9-cis-retinoic acid reverses loss of retinoic acid receptor-beta expression in the bronchial epithelium: results from a randomized placebo-controlled trial. J Natl Cancer Inst. 95: 206-214. 2003.

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行において終始ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜った摂南大学薬学部病理学研究室・松浦哲郎教授、尾崎清和准教授および奈良間功前教授に厚く御礼申し上げます。また、多大なるご協力とご援助を頂いた摂南大学薬学部病理学研究室の皆様へ感謝致します。