

HIV 感染者の口腔 *Candida* と唾液抗菌タンパク濃度の関係浪越 智子¹⁾ 大島 朋子²⁾ 千葉 博茂¹⁾
前田 伸子²⁾¹⁾東京医科大学口腔外科学講座²⁾鶴見大学歯学部細菌学教室

【要旨】 本研究では HIV 感染者の唾液中の抗菌タンパク (SLPI、lactoferrin、lysozyme、sIgA) 濃度、舌背からの *Candida* 検出率、菌数を健常者と比較し、これらの抗菌タンパク濃度と *Candida* との関連について検討した。

HIV 感染者群は健常者群よりも *Candida* 検出率、菌数ともに著明に高く、CD4 リンパ球数が減少するにつれて増加する傾向を示した。HIV 感染者群の SLPI は著しく低く lactoferrin と lysozyme は健常者群と同値であったが、sIgA は高い傾向を示した。CD4 リンパ球数に基づき 3つのカテゴリーに分けた CDC 分類で HIV 感染者を分類し比較したところ、SLPI を除く全ての抗菌タンパクは CD4 リンパ球数 $<200/\mu\text{l}$ のカテゴリー 3 で最も低値を示した。HIV 感染者群と健常者群を *Candida* の有無で分けると、ほぼ全ての抗菌タンパクは *Candida* (+) 群で高値だった。また、2種の抗菌タンパク間の相関関係を検討した結果、全ての抗菌タンパク間で正の相関を示した。これらの結果は唾液中の抗菌タンパクの分泌は *Candida* 反応性に上昇するが、CD4 リンパ球数が著しく低い HIV 感染者では分泌が抑制されることを示唆した。さらに、好中球マーカーである myeloperoxidase (MPO) 濃度を検討したところ 4種の抗菌タンパクと同様に *Candida* (+) 群で高値を示すことから、sIgA を除くこれらの抗菌タンパクは *Candida* に反応して口腔組織に浸潤した好中球由来である可能性が示唆された。

はじめに

代表的な日和見感染症である口腔カンジダ症は、HIV 感染者の免疫機能低下が比較的軽度な頃より発症し、口腔疾患の中で最も発症頻度が高いといわれている^{1,2)}。一方、唾液中にはこのような感染症を防ぐために、自然免疫の主役となる複数の抗菌タンパク質や免疫グロブリンが含まれている³⁾。その中でも secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)、lactoferrin、lysozyme および secretory IgA (sIgA) には抗カンジダ活性が認められている⁴⁾。しかし、HIV 感染者の唾液タンパクの抗カンジダ作用に関しては十分な検討がなされていない。そこで、我々は HIV 感染者における

Candida 検出率および菌数と SLPI、lactoferrin、lysozyme そして sIgA の濃度との関係、さらにこれら 4種の抗菌タンパク濃度の変動要因に関して検討し健常者と比較した。また、4種の抗菌タンパクの分泌由来を知るために、好中球浸潤マーカーである唾液中の myeloperoxidase (MPO) 濃度を計測した⁵⁾。

対象および方法

I. 対象

東京医科大学病院口腔外科血液外来を受診した HIV 感染者 81 例 (男性: 女性 77 例: 4 例、平均年齢 36.0 ± 9.8 歳) および対照として健常者 81 例 (男性: 女性 62 例: 19 例、平均年齢 37.2 ± 9.6 歳) を対

2004 年 6 月 19 日受付、2004 年 6 月 29 日受理

キーワード: HIV, *Candida*, 唾液抗菌タンパク

(別冊請求先: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学口腔外科学講座 浪越智子)

象とし、対象者からは事前にインフォームドコンセントを得て本研究を行った。CD4リンパ球数およびRNAコピー数は、口腔のサンプリング時に最も近日に得られた血液データを採用した。

II. *Candida* の分離と培養

滅菌綿棒にて舌背を10回擦過し、*Candida* 選択培地である CHROMagar™ *Candida* (CHROMagar, Paris, France) に塗抹した。これを30°C、48時間培養後、菌数 (CFU/sample) を測定し、さらに *Candida* の菌種をコロニーの色調あるいは api 20 C AUX® (bio-Merieux, Marcy l'Etoile, France) によって同定した。*C. dubliniensis* のみは、コロニーの色調と Tamura ら⁶⁾ の報告に基づいた polymerase chain reaction (PCR) 法にて同定した。

III. 唾液採取と抗菌タンパク濃度の計測

唾液流量を計測するために、HIV感染者14例、健常者26例を対象にして、パラフィンガムを10分間咀嚼する吐唾法により刺激唾液を得た。抗菌タンパク濃度を計測するための唾液試料は、Salivette® (Sarstedt, Köln, Germany) に付属の滅菌ロールワッテを咀嚼後、これを容器に戻し2,500 rpm、15分間遠心して得た。唾液採取は日内変動を避けるために13:30~15:30間に行い、抗菌タンパク濃度測定まで-80°Cで保管した。SLPI, lactoferrin, sIgA および MPO は enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) 法にて計測した (SLPI: Quantikine®, R & D Systems, Minneapolis, MN, USA, lactoferrin: Bioxytech®, OXIS, Portland, OR, USA, sIgA: EIA s-IgA test®, MBL, Nagoya, Japan, MPO: TiterZyme® EIA, Funakoshi, Tokyo, Japan)。Lysozyme は *Micrococcus lysodeikticus* を用いた比濁法にて計測した。すなわち、66.7 mM リン酸緩衝液 (pH 6.6) で5倍希釈した各唾液 150 µl をマイクロプレートに注入し、1 µg/ml に調整した *M. lysodeikticus* の 50 µl を基質として加えた後に、濁度の減少を吸光度 340 nm で計測し lysozyme 活性量に換算した。

IV. 統計学的分析

抗菌タンパク濃度、*Candida* 検出率および菌数は Mann-Whitney の U 検定、ウィルコクソン符号付順位和検定あるいは、対応のある t 検定を用いた。*Candida* 菌数、CD4リンパ球数、RNAコピー数および各抗菌タンパク濃度の相関関係はピアソンの相関係数を用い、さらに Fisher の r の z 変換を行った。P 値は <0.05 で統計学的に有意とした。

結 果

I. *Candida* 菌数、CD4リンパ球数およびRNAコピー数の相関関係

HIV感染者のCD4リンパ球数およびRNAコピー数 (n=68) は、各々1~937/µl、<50 (検出限界未満) ~7.6×10⁵ copy であった (Table 1)。*Candida* 菌数とRNAコピー数はCD4リンパ球数と負の相関関係が認められ、CD4リンパ球数が減少するに従い増加する傾向を示した。

II. HIV感染者群と健常者群の *Candida* 検出率と菌数の比較

HIV感染者群の *Candida* 検出率と平均菌数は57.5%および108.1 CFUで、健常者群よりも著しく高値を示した (p<0.001) (Table 2, 3)。HIV感染者群を Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 分類 (1993) を基に3つのカテゴリーに分類して比較した結果、どのカテゴリーにおいても健常者群より検出率、菌数共に有意に高値を示した。一方、HIV感染者群のカテゴリー間における *Candida* の検出率はカテゴリー3が最も高く (75.0%)、次いでカテゴリー1 (56.3%)、カテゴリー2 (50.0%) であった。平均菌数もカテゴリー3が最も高く (181.3 CFU)、カテゴリー2

Table 1 Correlation analysis of *Candida* count (CFU), CD4+ count and RNA copy load (n=68)

	<i>Candida</i> (CFU)	CD4+ (cells/µl)
CD4+ (cells/µl)	-0.323**	-
RNA copy load (copy)	0.203	-0.418***

Numerals signifies r value of correlation analysis.

** : p<0.01 *** : p<0.001, Fisher's r to z.

Table 2 Comparison of the frequency (%) of *Candida* between control and HIV groups

	Frequency	p [#]
Control (n=72)	20.8	a<0.001 b<0.05 c<0.05 d<0.001
HIV (n=80)	57.5	
Category* 1 (n=16)	56.3	
2 (n=32)	50.0	
3 (n=20)	75.0	

: Mann-Whitney U-test.

* : Category 1 : 2 : 3 ; CD4+500 ≤ : 200~499 : <200

Table 3 Comparison of the mean *Candida* count (CFU) between control and HIV groups

	Mean	<i>Candida</i> count (±SD)	p [#]
Control (n=72)	5.5	(±25.5)	a <0.001
HIV (n=80)	108.1	(±458.7)	b <0.05
Category* 1 (n=16)	7.1	(±11.9)	c <0.05
2 (n=32)	29.7	(±132.2)	d <0.001
3 (n=20)	181.3	(±288.1)	e <0.05

: Mann-Whitney U-test.

* : Category 1 : 2 : 3 ; CD4+500 ≤ : 200~499 : <200

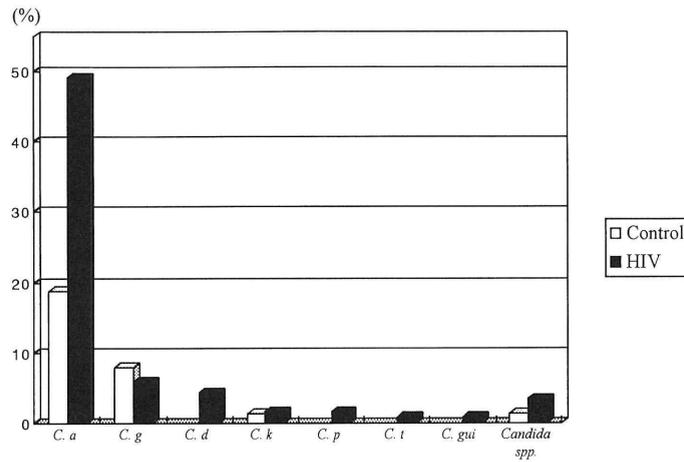


Fig. 1 Distribution and frequency (%) of *Candida* species in control and HIV groups

C. a ; *C. albicans*, *C. g* ; *C. glabrata*, *C. d* ; *C. dubliniensis*, *C. k* ; *C. krusei*, *C. p* ; *C. parapsilosis*, *C. t* ; *C. tropicalis*, *C. gui* ; *C. guilliermondii*

C. albicans was the most predominant in the control and HIV group. *C. dubliniensis* was detected from only the HIV group.

(29.7 CFU)、カテゴリー1 (7.1 CFU) の順で低くなり、CD4 リンパ球数が増加するに従って減少する傾向が認められ、カテゴリー2 と 3 の間には有意差が認められた (p<0.05)。

Candida の菌種の検出率を検討したところ、HIV 感染者群において 7 菌種が認められたのに対し、健常者群では 3 菌種のみが検出された (Fig. 1)。両群共 *C. albicans* が最も高頻度に検出され、次いで *C. glabrata* であった。また、*C. dubliniensis* は今回の結果では HIV 感染者群のみから検出された。

III. 唾液流量と抗菌タンパク濃度との比較

HIV 感染者群の平均唾液流量は 1.1 ml/min で健常者群よりも著明に低値を示した (p<0.001) (Table 4)。HIV 感染者群の SLPI は健常者群よりも著明に低く (p<0.01)、lactoferrin は両者共に同値を示した。また、HIV 感染者群の lysozyme は健常者群よりもやや低値であったが、一方 sIgA は逆に高い傾向を示した。次

Table 4 Comparison of the antimicrobial protein concentrations (μg/ml) in saliva between control and HIV groups

	Control (n=81)	HIV (n=81)	p [#]
Flow rate* (±SD)	2.0** (±0.8)	1.1*** (±0.5)	<0.01
SLPI (±SD)	0.86 (±1.27)	0.51 (±0.69)	<0.01
lactoferrin (±SD)	6.3 (±5.5)	6.3 (±6.1)	—
lysozyme (±SD)	41.5 (±93.9)	34.8† (±56.4)	—
sIgA (±SD)	158.7 (±122.0)	194.5 (±144.5)	—
MPO (±SD)	0.59‡ (±0.44)	0.89§ (±1.07)	—

: Mann-Whitney U-test.

* : ml/min ** : n=26 *** : n=14 † : n=80

‡ : n=39 § : n=53

Table 5 Comparison of the antimicrobial protein concentrations ($\mu\text{g/ml}$) among HIV positive individuals classified into three categories according to the CDC classification (1993)

Category	1 (n=16)	2 (n=32)	3 (n=20)
CD4+ (cells/ μl)	500 \leq	200~499	<200
SLPI (\pm SD)	0.38 (\pm 0.49)	0.56 (\pm 0.71)	0.42 (\pm 0.59)
lactoferrin (\pm SD)	5.0 (\pm 4.7)	7.1 (\pm 6.1)	4.5 (\pm 3.7)
lysozyme (\pm SD)	29.5 (\pm 43.9)	40.6 (\pm 60.9)	20.1 (\pm 27.5)
sIgA (\pm SD)	191.5 (\pm 187.6)	205.6 (\pm 144.5)	169.5 (\pm 113.0)
MPO (\pm SD)	0.94* (\pm 1.03)	1.09** (\pm 1.36)	0.46*** (\pm 0.53)

* : n=11 ** : n=23 *** : n=13

Table 7 Comparison of the mean MPO concentration ($\mu\text{g/ml}$) and *Candida* count (CFU) between <0.28 $\mu\text{g/ml}$ and 0.28 $\mu\text{g/ml}$ \leq group

	<0.28 $\mu\text{g/ml}$	0.28 $\mu\text{g/ml}$ \leq
Control		
n	12	27
MPO (\pm SD)	0.17 (\pm 0.08)	0.78 (\pm 0.40)
<i>Candida</i> count (\pm SD)	0 (\pm 0.3)	6.3 (\pm 25.0)
HIV		
n	21	32
MPO (\pm SD)	0.15 (\pm 0.08)	1.37 (\pm 1.14)
<i>Candida</i> count (\pm SD)	13.0 (\pm 26.6)	163.3 (\pm 689.2)

: Mann-Whitney U-test a : p<0.001

Table 6 Comparison of the antimicrobial protein concentrations ($\mu\text{g/ml}$) between *Candida*-positive and-negative individuals

<i>Candida</i> (case number)	Control			HIV		
	negative (n=57)	positive (n=15)	p [#]	negative (n=34)	positive (n=46)	p [#]
SLPI (\pm SD)	0.67 (\pm 0.72)	1.55 (\pm 2.34)	—	0.46 (\pm 0.74)	0.55 (\pm 0.66)	—
lactoferrin (\pm SD)	5.2 (\pm 4.7)	8.7 (\pm 6.0)	<0.05	6.5 (\pm 6.3)	6.2 (\pm 6.0)	—
lysozyme (\pm SD)	26.9 (\pm 31.4)	65.0 (\pm 73.4)	—	25.3 (\pm 51.7)	41.8* (\pm 59.3)	<0.05
sIgA (\pm SD)	152.2 (\pm 121.6)	185.9 (\pm 121.8)	—	177.1 (\pm 131.5)	207.0 (\pm 153.3)	—
MPO (\pm SD)	0.53** (\pm 0.37)	0.93*** (\pm 0.57)	—	0.91 [†] (\pm 1.03)	0.86 (\pm 1.12)	—

: Mann-Whitney U-test

* : n=45 ** : n=31 *** : n=7 † : n=24 ‡ : n=29

に、HIV感染者群をCDCのカテゴリー分類(1993)で分け4種の抗菌タンパク濃度を比較したところ、カテゴリー2のすべての抗菌タンパク濃度は有意差は認められないものの3つのカテゴリーの中で最も高値を示した(Table 5)。カテゴリー1と3ではSLPIは同値で、Table 4に示した健常者群の平均値よりも著明に低値を示した(p<0.05)。

HIV感染者群と健常者群を*Candida*(+)群と*Candida*(-)群に分け抗菌タンパク濃度を比較した結果をTable 6に示した。当初、我々は*Candida*検出率は抗菌タンパク濃度が低値ならば上昇すると予想したが、HIV感染者群におけるlactoferrin以外の全ての抗菌タンパク濃度は、健常者、HIV感染者を問わず

Candida(+)群の方が*Candida*(-)群よりも高い結果となった。特に、健常者群におけるlactoferrinとHIV感染者群におけるlysozymeは*Candida*(+)群で著明に高値を示した(p<0.05)。そこで、同一被験者から期間をあけて数回採取した唾液抗菌タンパク濃度と*Candida*菌数とを比較し、*Candida*の有無あるいは増減と抗菌タンパクとの関連を検討した(Table 8)。その結果、HIV感染者の4種の抗菌タンパク濃度は菌数の多い時期の方が少ない時期よりも高値だった(lactoferrin, lysozyme; p<0.01, sIgA; p<0.05)。健常者は2組のサンプルのみの結果であるがHIV感染者と同様の傾向を示した。Table 9に*Candida*菌数および各抗菌タンパクの相関係数を示した。2種ずつの

Table 8 Comparison of four antimicrobial protein concentrations ($\mu\text{g/ml}$) between two different results of the *Candida* count (CFU)

HIV (ID) <i>Candida</i> count (CFU)	SLPI	lactoferrin	lysozyme	sIgA	MPO
H4					
21	0.13	5.4	3.3	175.9	0.72
1	0.02	1.1	2.2	81.4	0.28
H7					
47	1.5	1.9	57.0	151.4	1.11
4	0.1	1.2	6.1	107.3	0.05
H13					
19	0.4	8.4	168	562.3	1.05
2	1.9	7.2	97.0	87.5	0.41
H18					
1376	1.5	10	102.0	154.5	0.64
16	0.02	1.8	2.6	88.3	0.18
H20					
95	0.2	10.8	46	250.3	2.10
8	0.03	0	0	77.3	0
H21					
33	0.1	3.5	4.9	118.6	0.66
1	0.04	1.3	1.0	144.6	0.36
H22					
458	0.6	18.4	64.0	422.5	
121	0.12	6.8	48.6	377.7	
H29					
57	2.3	34.4	217.0	450.3	
11	0.75	21.5	77.5	333.5	
H42					
79	1.6	10.1	71.0	407.5	
1	1.7	2.8	54.5	257.3	
H47					
41	0.9	10.1	25.2	75.6	
0	0.42	5.0	20.0	77.2	
Mean (\pm SD)	High number 0.92 (\pm 0.76)	11.3 (\pm 9.3)	** 75.8 (\pm 69.4)	** 276.9 (\pm 169.0)	* 1.05 (\pm 0.55)
	Low number 0.51 (\pm 0.72)	4.9 (\pm 6.4)	30.9 (\pm 35.9)	163.2 (\pm 115.5)	0.21 (\pm 0.17)
Control (ID) <i>Candida</i> count (CFU)	SLPI	lactoferrin	lysozyme	sIgA	
S5					
21	2.7	16.8	96.0	196.3	
0	1.7	9.5	83	182.8	
S6					
130	0.8	16.9	27.0	270.8	
60	0.1	4.0	7.0	147.1	
Mean (\pm SD)	High number 1.8 (\pm 1.3)	16.9 (\pm 0.07)	61.5 (\pm 48.8)	233.6 (\pm 52.7)	
	Low number 0.9 (\pm 1.1)	6.8 (\pm 3.9)	45.0 (\pm 53.7)	165.0 (\pm 25.2)	

*: $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$, Differences of paired antimicrobial protein data in HIV group were analyzed using Wilcoxon signed-ranks test, while that of MPO was analysed using Paired *t*-test. Differences of paired data in control group were not analyzed.

抗菌タンパクのすべての組み合わせは両群共に正の相関を示した。また、菌数と抗菌タンパクとの組み合わせは健常者群のみにおいて SLPI 以外のすべての抗菌タンパクで弱い正の相関を示したが、HIV 感染者群では正の相関を示す組み合わせはなかった。

IV. HIV 感染者群と健常者群における MPO 濃度の比較

HIV 感染者群、健常者群共に *Candida* の有無で群分けした際、HIV 感染者群の lactoferrin 以外の全ての抗菌タンパク濃度が *Candida* (−) 群よりも *Candida* (+) 群で高値を示した。この抗菌タンパクの上昇が、*Candida* に対応して口腔組織に集積した好中球由来か、あるいは唾液腺由来かを検討するために、好中球マーカーである MPO 濃度を測定した。HIV 感染者群と健常者群で比較した際、HIV 感染者群の MPO 濃度が高値を示し、さらに CDC カテゴリー分類では カテゴリー2 において最も高い傾向を示した (Table 5)。次に、両群を *Candida* (+) 群と *Candida* (−) 群に分け比較した結果、健常者群では4種の抗菌タンパク濃度と同様に MPO 濃度も *Candida* (+) 群で高い傾向が見られたが、HIV 感染者群では *Candida* (+) 群と (−) 群でほぼ同値を示した (Table 6)。MPO 濃度が $0.28 \mu\text{g/ml}$ 以上存在すれば殺カンジダ活性が認められるとの報告があるため⁷⁾、この濃度を境に HIV 感染者群および健常者群を2群に分けたところ、HIV 感染者における $0.28 \mu\text{g/ml} \leq$ 群の MPO 濃度は健常者の $0.28 \mu\text{g/ml} \leq$ 群よりも有意に高値となった (Table 7)。複数回にわたり唾液を採取した結果も、MPO 濃度は HIV 感染者の4つの抗菌タンパクと同様に *Candida* 菌数が多い方が高値を示した ($p < 0.05$) (Table 8)。Table 9 に MPO と *Candida* 菌数および4種の抗菌タンパクの相関係数を示した。両群で MPO と lactoferrin、MPO と lysozyme および HIV 感染者群での MPO と sIgA の組み合わせに正の相関を示した。

考 察

HIV 感染者では *Candida* の検出率および菌数共に健常者よりも高値を示すことが報告されており⁷⁾、本研究でも同様の結果が得られた。*Candida* 菌数と CD4 リンパ球数および RNA コピー数との関係を比較検討したところ、Table 1 に示したように CD4 リンパ球数に対する *Candida* 菌数と RNA コピー数は負の相関を示した。さらに、CDC 分類 (1993) に基づき HIV 感染者群を3つのカテゴリーに分けて検討した

(Table 3)。カテゴリー3 における *Candida* の平均菌数は他のカテゴリーよりも多く、カテゴリー2 の約6倍、カテゴリー1 の約26倍であった。以上の結果は、*Candida* 菌数の増加は CD4 リンパ球数の減少と強く関連があることを示唆している。

本研究では、HIV 感染者群から健常者群よりも多い7種類の *Candida* が検出された (Fig. 1)。両群とも病原性が最も強い *C. albicans*⁹⁾ が最も優勢な菌種であった。また、*C. dubliniensis* は、HIV 感染者群からのみ検出された。本菌種は、HIV 感染者の口腔から初めて分離され⁹⁾、*C. albicans* と非常に類似した性状を持つことが知られている¹⁰⁾。しかし、日本人の健常者からも分離された報告があり¹¹⁾、本研究では健常者から分離されなかったものの、日本では HIV 感染者特有の菌種ではない可能性が高いと考えられた。

HIV 感染者における4種の抗菌タンパクの役割を知るために健常者と比較検討した。両群の lactoferrin と lysozyme はほぼ同値を示した (Table 4)。Lin ら⁴⁾ は、lactoferrin 単独の抗カンジダ活性への関与は低く、また lysozyme は唾液中から検出される濃度では抗カンジダ活性は認められないと考察しており、我々が得た濃度差が *Candida* 検出率に反映されていない結果からも両抗菌タンパク単独での影響は低いと考えられた。*C. albicans* に対する sIgA 濃度を AIDS 未発症者、AIDS 発症者および健常者で比較した研究で、AIDS 発症者 > AIDS 未発症者 > 健常者の順で高値であったと報告されている¹²⁾。本研究でも HIV 感染者群の sIgA が健常者群より高値を示し、この結果は HIV 感染者における sIgA 上昇は *C. albicans* のみならず多種類におよぶ病原菌の暴露経験によることを示唆している。

近年、SLPI が殺真菌活性を示すことが報告されている¹³⁾。本研究における SLPI は健常者群よりも HIV 感染者群の方が著明に低値であった。しかし、Shugars ら¹⁴⁾ は、HIV 感染者群と健常者群の無刺激唾液における SLPI はほぼ同濃度であると報告している。この違いの原因は明らかではないが、抗菌タンパクの唾液中への総分泌量を考える際、唾液流量を考慮しなければならない。すなわち、HIV 感染者は健常者と比較して明らかに唾液流量が少なく (Table 4)、これは抗 HIV 薬を含む化学療法剤による副作用や唾液腺の炎症による機能抑制が要因と思われる^{15,16)}。今回、HIV 感染者で認められた唾液流量の低下は抗菌タンパクの総量の低下を引き起こし、その結果として *Candida* 検出

Table 9 Correlation analysis of 4 antimicrobial protein concentrations ($\mu\text{g/ml}$) and the mean *Candida* count (CFU) (Control: n=70, HIV: n=79)

	<i>Candida</i> (CFU)	SLPI	lactoferrin	lysozyme	sIgA
SLPI	0.176 -0.042	—	—	—	—
lactoferrin	0.263* -0.093	0.591*** 0.724***	—	—	—
lysozyme	0.376** -0.008	0.825*** 0.604***	0.607*** 0.662***	—	—
sIgA	0.239* 0.008	0.445** 0.503***	0.752*** 0.497***	0.569*** 0.687***	—
MPO [†]	0.073 -0.015	0.041 0.117	0.437** 0.548***	0.363* 0.316*	0.024 0.411**

Top: Control, Bottom: HIV

Numeral signifies r value of correlation analysis.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, Fisher's r to z.

†: Control; n=38, HIV; n=52

率と菌数の増加をもたらすと考えられた。

さらに、*Candida*の有無によって対象者を分け抗菌タンパク濃度を比較した際、HIV感染者群の lactoferrinを除くすべての抗菌タンパクは *Candida* (+) 群の方が *Candida* (-) 群よりも高値であった (Table 6)。このことは、HIV感染者群での lactoferrin 以外の抗菌タンパクは *Candida* 反応性に上昇したと考えられた。また、両群における4種の抗菌タンパクは、全ての組み合わせで正の相関を示し (Table 9)、さらに気道粘液におけるいくつかの抗菌タンパクは相乗的に働くという報告がある¹⁷⁾。このことから、4種の抗菌タンパクは協同的に働き濃度が上昇する可能性が示唆された。また、健常者群では SLPI 以外のすべての抗菌タンパクと *Candida* 菌数の組み合わせで弱い正の相関を示した。以上より、SLPI 以外の3種の抗菌タンパクは *Candida* 菌数に対応して上昇すると考えられた。

この仮説を明らかにするため、同一被験者から期間をあけて数回採取した唾液で、さらに *Candida* 菌数が異なる結果となった2サンプルを選択し、抗菌タンパク濃度の変動について検討した結果、全ての抗菌タンパクは菌数の多い時の方が少ない時よりも高い値を示した (Table 8)。これは、上記の仮説を支持すると思われた。しかし、CDC分類 (1993) によって HIV感染者群を3つのカテゴリーに分け *Candida* の検出率と菌数および抗菌タンパク濃度を比較検討した際、カテゴリー-3が最も *Candida* 検出率および菌数が高かったにも関わらず (Table 2, 3)、SLPIを除くすべての抗菌タンパクが最も低値を示した (Table 5)。これは、

CD4リンパ球数が $<200/\mu\text{l}$ のHIV感染者は獲得免疫のみならず自然免疫も減弱している可能性を示唆している。

4種の抗菌タンパクの由来は炎症により口腔組織に集積した好中球あるいは唾液腺の腺房細胞と考えられる^{13,18-22)}。好中球マーカーであるMPOは⁵⁾、炎症が重篤である程、局所における好中球数が増加するのに伴い高値を示すとの報告がある²³⁾。そこで、4種の抗菌タンパクが好中球由来か否かを知るために唾液中のMPO濃度を計測した。その結果、HIV感染者群の方が健常者群よりも高値を示した (Table 4)。また、喀痰や鼻汁のMPO濃度を検討した他報告と比較すると^{23,24)}、本研究で得られたMPO濃度は非常に高値であった。この結果は、口腔組織に好中球が状況に応じ浸潤し活発に機能していることを示唆している。また、MPO濃度が $0.28 \mu\text{g/ml}$ 以上あれば殺カンジダ活性が認められるとの報告があることから⁷⁾唾液中でも抗菌タンパクとして機能している可能性が考えられる。そこで、両群をこの濃度を境に2群に分け比較したところ、 $0.28 \mu\text{g/ml} \leq$ 群においては、HIV感染者における濃度の方が健常者よりも有意に高値であった (Table 7)。よって、HIV感染者の口腔組織には健常者より多数の好中球が集積していることが示唆された。しかし、HIV感染者でCDC分類のカテゴリー-3に属する被験者のMPO濃度が最も低値であった (Table 5)。これは、CD4リンパ球数が多い他のカテゴリーよりも全身の免疫不全が進行しているため、口腔組織における好中球数および活性が減少したのではないかと

と思われた。さらに、HIV感染者群と健常者群を *Candida* の有無で群分けした結果 (Table 6) や、複数回にわたり唾液を採取した結果 (Table 8) も MPO 濃度は *Candida* が存在する被験者また、同一被験者では *Candida* 数が多い時の方が高値を示した。よって、sIgA 以外の3種の抗菌タンパクは好中球由来であることが強く示唆された。

以上より、全身の指標である CD4 リンパ球数が $200/\mu\text{l}$ 以上ならば唾液抗菌タンパクを含む自然免疫や sIgA のような獲得免疫は *Candida* 反応性に分泌上昇すると考えられた。一方、CD4 リンパ球数が $<200/\mu\text{l}$ ならば唾液分泌量および抗菌タンパク濃度の減少、および粘膜表層組織に集積した好中球の活性減弱²⁴⁾ から *Candida* 増殖を抑制することは不可能となると思われた。したがって、全身状態が著明に悪化している HIV 感染者は獲得免疫のみならず唾液中の自然免疫も抑制され *Candida* の増殖を阻止できないと考えた。

謝 辞

稿を終えるに臨み御助言を頂きました Professor John S. Greenspan (Department of Stomatology and the Oral AIDS Center, School of Dentistry, The University of California, USA) に深甚たる謝意を表します。また、統計指導に御尽力頂いた王 晶先生 (Dundee Dental School and Hospital, UK) に謝意を表します。

なお、本論文の一部は 32 回 American Association for Dental Research (2003. March) および 5th World Workshop on Oral Health and Disease in AIDS (2004. July) において発表した。

References

- 1) McCarthy GM, Mackie ID, Koval J, Sandhu HS, Daley TD: Factors associated with increased frequency of HIV-related oral candidiasis. *J Oral Pathol Med* **20**: 332-336, 1991
- 2) Greenspan D, Greenspan JS: Oral manifestations of human immunodeficiency virus infection. *Dent Clin North Am* **37**: 21-32, 1993
- 3) Wray D, Felix DH, Cumming CG: Alternation of humoral responses to *Candida* in HIV infection. *Br Dent J* **168**: 326-329, 1990
- 4) Lin AI, Johnson DA, Patterson TF, Wu Y, Lu DL, Shi Q, Yeh C-K: Salivary anticandidal activity and saliva composition in an HIV-infected cohort. *Oral Microbiol Immunol* **16**: 270-278, 2001
- 5) Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takeno Y, Suzuki K, Maeda N, Koyama H: Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. *J Infect Dis* **182**: 1276-1279, 2000
- 6) Tamura M, Watanabe K, Mikami Y, Yazawa K, Nishimura K: Molecular Characterization of New Clinical Isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* in Japan: Analysis Reveals a New Genotype of *C. albicans* with Group I Intron. *J Clin Microbiol* **39**: 4309-4315, 2001
- 7) Lehrer RI: Antifungal effects of peroxidase systems. *J Bacteriol* **99**: 361-365, 1969
- 8) Campisi G, Pizzo G, Milici ME, Mancuso S, Margiotta V: *Candidal* carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus-infected subjects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **93**: 281-286, 2002
- 9) Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC: *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiol* **141**: 1507-1521, 1995
- 10) Schorling SR, Kortinga HC, Froschb M, Mühlshlegel FA: The role of *Candida dubliniensis* in oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Crit Rev Microbiol* **26**: 59-68, 2000
- 11) Ohshima T, Yasunari U, Wang J, Namikoshi S, Maeda N: The genotyping of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of Japanese people and the detective frequency of *C. dubliniensis*. *Proceeding of the 81st General Session of the IADR*, June 25-28, 2003, Göteborg.
- 12) Coogan MM, Sweet SP, Challacombe SJ: Immunoglobulin (IgA), IgA1, and IgA2 antibodies to *Candida albicans* in whole and parotid saliva in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Infect Immun* **62**: 892-896, 1994
- 13) Tomee JFC, Hiemstra PS, Heinzl-Wieland R, Kauffman HF: Antileukoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi. *J Infect Dis* **176**: 740-747, 1997
- 14) Shugars DC, Alexander AL, Fu K, Freel SA: Endogenous salivary inhibitors of Human Immunodeficiency Virus. *Arch Oral Biol* **44**: 445-453, 1999
- 15) Atkinson JC, Yeh C, Oppenheim FG, Bermudez D, Baum BJ, Fox PC: Elevation of salivary antimicrobial proteins following HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **3**: 41-48, 1990
- 16) Yeh C-K, Fox PC, Ship JA, Busch KA, Bermudez DK, Wilder A-M, Katz RW, Wolff A, Tylenda CA, Atkinson JC, Baum BJ: Oral defense mechanisms are impaired early in HIV-1 infected patients. *J*

- Acquir Immune Defic Syndr **1**: 361-366, 1988
- 17) Singh PK, Tack BF, McCray PB, JR, Welsh MJ: Synergistic and additive killing by antimicrobial factors found in human airway surface liquid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**: L799-L805, 2000
- 18) Sallenave JM, Si-Tahar M, Cox G, Chignard M, Gauldie J: Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils. *J Leukoc Biol* **61**: 695-702, 1997
- 19) Wahl SM, McNeely TB, Janoff EN, Shugars D, Worley P, Tucker C, Orenstein JM: Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in mucosal fluids inhibits HIV. *Oral Diseases* 3 (Suppl 1): 64-69, 1997
- 20) Bard E, Laibe S, Clair S, Biichl S, Millon L, Drobacheff C, Bettinger D, Seillès E, Meillet D: Nonspecific secretory immunity in HIV-infected patients with oral candidiasis. *J Acquir Immune Defic Syndr* **31**: 276-284, 2002
- 21) Moro I, Umemura S, Grago SS, Mestecky J: Immunohistochemical distribution of immunoglobulins, lactoferrin, and lysozyme in human minor salivary glands. *J Oral Pathol* **13**: 97-104, 1984
- 22) Kubagawa H, Bertoli LF, Barton JC, Koopman WJ, Mestecky J, Cooper MD: Analysis of paraprotein transport into the saliva by using anti-idiotypic antibodies. *J Immunol* **138**: 435-439, 1987
- 23) Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ: Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **160**: 1532-1539, 1999
- 24) Tachavanich K, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Suwannagool S, Suvattee V: Opsonophagocytosis and intracellular killing activity of neutrophils in patients with human immunodeficiency virus infection. *Asian Pac J Allergy Immunol* **14**: 49-56, 1996

Relationship between Oral *Candida* and Salivary Antimicrobial Proteins in HIV-Positive Individuals

Satoko NAMIKOSHI¹⁾, Tomoko OHSHIMA²⁾, Hiroshige CHIBA¹⁾,
and Nobuko MAEDA²⁾

¹⁾Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Tokyo Medical University, 6-7-1
NishiShinjuku Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan

²⁾Department of Oral Bacteriology, Tsurumi University School of Dental Medicine, 2-1-3
Tsurumi Tsurumi-ku Yokohama 230-8501, Japan

Abstract

We investigated the relationship between oral *Candida* and salivary antimicrobial proteins by comparing the concentrations of four kinds of salivary antimicrobial proteins: SLPI, lactoferrin, lysozyme and sIgA, and *Candida* presence on the dorsal of tongue, in HIV-positive patients and the healthy subjects. The carriage of *Candida* species in the group of HIV-positive patients was significantly higher than in the group of healthy subjects and tended to increase in inverse proportion to the CD4⁺ counts. Concerning the antimicrobial proteins, in the group of HIV-positive patients, the SLPI level was significantly lower and lactoferrin and lysozyme levels were similar to those of the group of healthy subjects, while sIgA level tended to be higher. When compared among the HIV-positive patients, who were divided into the three categories by CDC classification based on CD4⁺ counts, all the antimicrobial proteins except SLPI showed the lowest level in Category 3, the CD4⁺ counts of which were less than 200/ μ l.

In both HIV-positive patients and healthy subjects, almost every antimicrobial concentration was higher in *Candida*-positive subject. Furthermore, by analyzing all the combinations of two antimicrobial proteins, a significantly positive correlation of the two was observed in every combination.

Therefore, it was suggested that the secretion of salivary antimicrobial proteins might rise against *Candida* in healthy subjects and HIV-positive patients but were suppressed in the HIV-positive patients whose CD4⁺ counts were significantly low. Moreover, the concentration of myeloperoxidase, a neutrophil marker, as well as those of the above four antimicrobial proteins was higher in *Candida*-positives. Consequently, it was suggested that these antimicrobial proteins except sIgA might be secreted by neutrophils that permeated through the oral tissue against *Candida*.

<Key words> HIV, *Candida*, salivary antimicrobial proteins
