

難治性胃潰瘍と *Candida albicans* との 関り合いに関する研究

第 II 編

Rat 実験胃瘍底部真菌の免疫組織学的研究

岡山大学医学部第一内科学教室

(主任：長島秀夫教授 指導：岡山大学長小坂淳夫)

岡山済生会総合病院内科 (院長：大和人士)

人 見 文 雄

(昭和54年1月25日受稿)

Key words: Clamping-Cortisone 法, *Candida albicans*, 螢光抗体法,
組織球, 膠原線維発育度

緒 言

北¹⁾は切除胃潰瘍症例の真菌学的, 組織学的検索をおこない, 400例以上の症例のうち33.6%において潰瘍底に *Candida albicans* (以下 *C. alb.* とする) の存在をみとめ, 特に吐血例において高い頻度で *C. alb.* の血管壁への侵入を認めた。これらの所見より, *C. alb.* が胃潰瘍の治癒を遷延させ, あるいは吐血の原因となる可能性が大であると報告した。著者は第 I 編において胃潰瘍底に螢光抗体法を用いて, *C. alb.* および免疫組織学的に *C. alb.* と共通抗原を有する物質を貪食している組織球を多数みとめ, これらの組織球は潰瘍底のみならず, 広く胃壁に分布していたことから, 胃壁における *C. alb.* に対する生体の反応と解し, これが胃潰瘍慢性化の一因子となりうる可能性の大きいことを報告した。

今回著者は Rat に実験的に作製した胃潰瘍について *C. alb.* を人為的に経口投与し, 胃潰瘍の慢性化に及ぼす *C. alb.* の役割について検討したので報告する。

実験材料および方法

1. 実験動物

250 g 前後の Wister 系雄 Rat 30匹を使用した。

2. 実験的胃潰瘍の作製

梅原の Clamping-Cortisone 法²⁾により実験胃潰瘍を作製した。すなわち, Rat の腹壁を正中線にて切

開し, 肝臓を傷つけないようにして胃を引き出し, 前胃から 5 mm の所にあたる後胃の大彎側の血管の少ない部位を止血鉗子を使用して, 4 × 12 mm の Aluminium 板で 10-15 秒間十分に clamping を行い, 翌日 (24 時間後) に clamping した Aluminium 板を除去し, ついで体重 100 g につき cortisone 7 mg 宛を連日 7 日間筋注した (図 1 及び図 2)。

図 1 実験方法

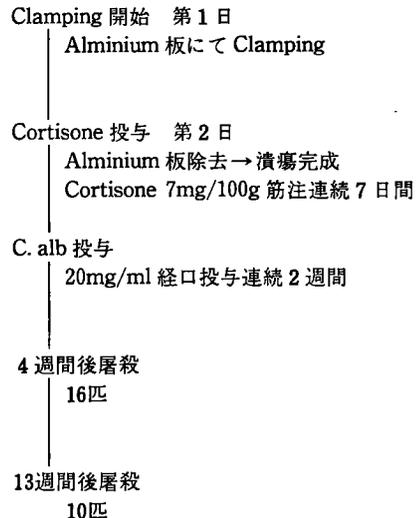
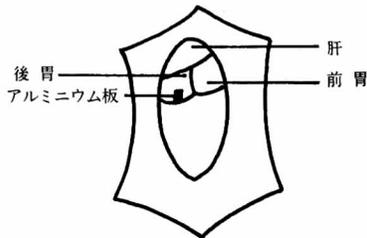


図2 clamping方法



3. C. alb. 投与実験

実験的胃潰瘍作製のため行った上述の cortisone 筋注を終了した直後より2週間毎日 C. alb. をコマゴメ pipette にて経口投与した。使用した C. alb. は標準菌株 C. alb. IFO, 0583 株で、投与は1匹あたり 20mg/ml濃度の C. alb. -ブドウ糖液(20%)、約2~3 mlを使用した。

つぎに実験動物を2群にわけ、1群は clamping 施行後4週間で、他群は13週間でそれぞれ屠殺し、蛍光抗体法による C. alb. の局在観察に用いた。

なお第1群は16匹、第2群は10匹を用い、残り4匹は実験途中で死亡したので観察例より除外した。

4. 組織内 C. alb. の検索方法

蛍光抗体法を用いたが、詳細は第1編と同様である。

5. 一般組織検索方法

一般組織検索および蛍光陽性細胞の同定のために、第1編と同様に、蛍光抗体法に用いた同一標本において、多類類を特異的に染色する Periodic acid-schiff (以下 PAS とする) 反応を用いた。さらに実験潰瘍作製後13週間の観察においては Hematoxylin eosin (以下 HE とする) 染色法を併用した。

6. 正常 Rat 胃粘膜と C. alb. の共通抗原の有無についての検討

第1編と同様に ouchterlony 微量法を実施したが、共通抗原はみとめなかった。

実 験 成 績

1. 実験潰瘍作製後4週間の観察

Clamping-Cortisone 法により実験潰瘍作製後4週間で屠殺した16匹の Rat 群には全例に、最大径約5 mmの新鮮胃潰瘍が存在した。これらの潰瘍底は広範な壊死性変化を呈し、一部でフィブリン様物質がその表面に沈着しており、PAS 反応および蛍光抗体法により確認しえた真菌は主として酵母型で、一部菌糸型を有しているものあり、壊死層深部まで増殖し

ていた(写真1, 2)。そしてこれらの菌体の周囲に多数のリンパ球、形質細胞および組織球が反応性に出現している部位もみとめられた(写真3)。この反

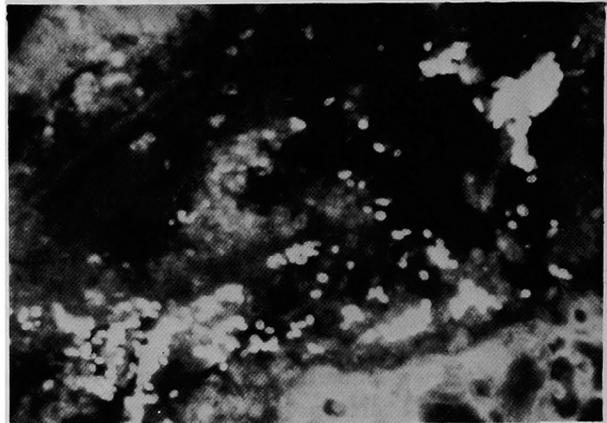


写真1. 蛍光染色による胃潰瘍底真菌

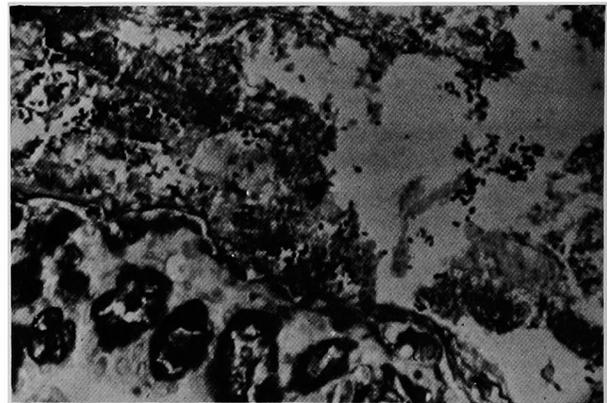


写真2. 写真1と同一切片をPAS染色したもの

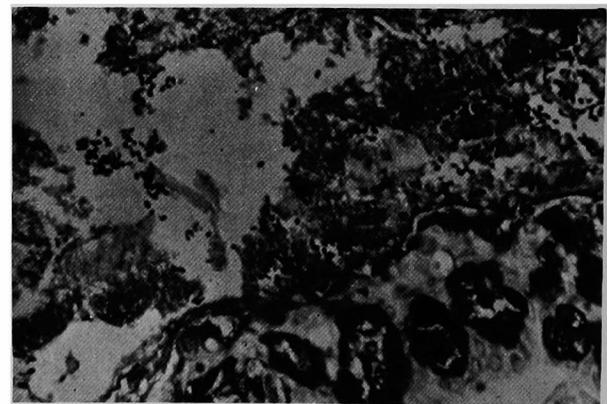


写真3. 胃潰瘍底の炎症細胞群

応性炎症性細胞のうち組織球は蛍光陽性であり、1例ではさらに周囲脂肪組織内に少数散在性にみとめられた(写真4, 5)(表1)。

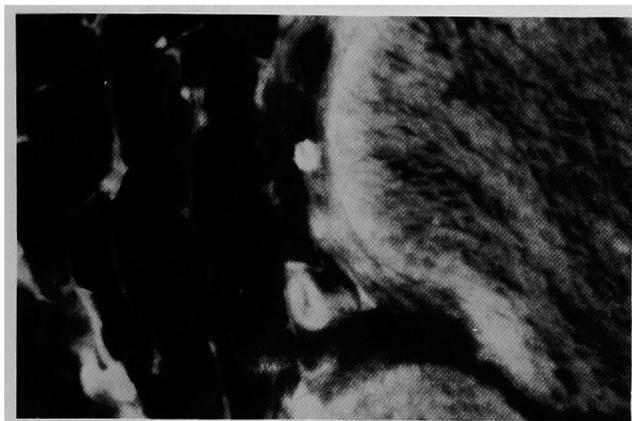


写真4. 蛍光陽性の組織球

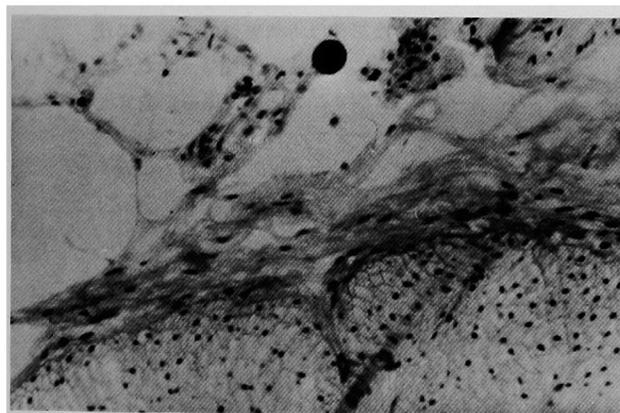


写真5. 写真4と同一切片をPASしたもの

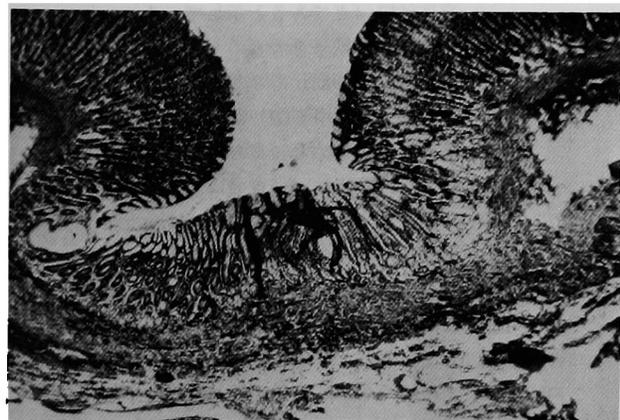


写真6. 実験潰瘍作製後13週間の潰瘍底

表1 実験潰瘍の状態

	4週間後屠殺群(16匹)	13週間後屠殺群(10匹)
潰瘍	全例に新鮮潰瘍あり (最大径5mm)	2例に慢性潰瘍 6例に潰瘍はん痕あり
C. alb	全例の潰瘍底にあり 主として酵母型 一部菌糸型	全例にみとめず
潰瘍底の組織状態	広範な壊死性変化あり リンパ球 形質細胞 組織球の出現 さらに蛍光陽性の組織球出現	再生上皮により修復 膠原線維の発育は中等度 蛍光陽性細胞なし

なおこの蛍光陽性物質はPAS反応陽性であり、またBlocking Testによって、C. alb. の菌体成分であることが確認された。

2. 実験潰瘍作製後13週間の観察

表2 実験潰瘍第13週の所見

	潰瘍面(mm)	粘膜筋板欠損(mm)	膠原線維発育度
1	1.25	2.25	±
2	0	1.5	+
3	0	5.5	+
4	0	2.0	±
5	0	2.0	-
6	0.5	2.5	+
7	0	1.8	+
8	0	1.6	+

13週間後の屠殺群では表1・2のごとく2例に潰瘍が、また6例に潰瘍癒痕がみとめられた。これらの陥凹性病変は、固有筋層が完全に欠損しており、少数のリンパ球をふくむ膠原線維に置換されていた。又潰瘍癒痕部の表面は周囲粘膜よりのびてきた再生上皮によりきれいにおおわれており、再生上皮は周囲粘膜にくらべ、粘液分泌能が亢進し、杯細胞の出現も高度で一部では腺管内に粘液が貯溜しのう胞状を呈していた。これらの陥凹病変部にはC. alb. の存在は全く確認されず、またC. alb. の菌体成分と思われる蛍光陽性物質を含む組織球も胃管内には全くみとめられなかった。さらに正常胃粘膜部にもC. alb. の存在はみとめられなかった。なお残る2例では潰瘍部とおもわれる部位を発見出来なかったため観察より除外した(写真6)。

考 案

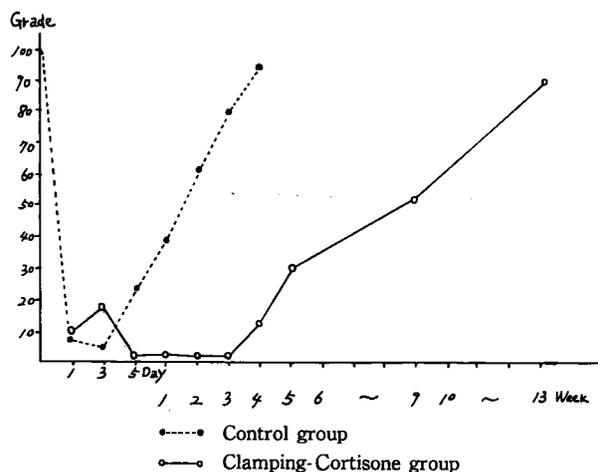
著者は第1編においてヒトの新鮮な切除胃潰瘍底にC. alb. およびC. alb. と共通抗原を有する物質を

貪食している組織球を多数みとめ、同部の組織的な所見と併せ胃壁における *C. alb.* に対する生体反応と解し、*C. alb.* が潰瘍の難治性と何ら関り合いがあることを指摘した。

ところでヒト潰瘍の場合、*C. alb.* は人為的でなく自然にその潰瘍底に存在していたものであるが、Rat 胃内には普通、*C. alb.* は存在しない。そこで著者は人為的に、*C. alb.* を Rat に経口投与し、その潰瘍の経過および潰瘍底組織の変化を観察した。

著者が Rat 実験潰瘍に Clamping-Cortisone 法を用いた理由は、梅原³⁾ が述べているごとく 1) 小動物にも簡単に作れること、2) 全例に確実に (100%) 発生すること、3) 同形、同大であること、4) その性格はヒト胃潰瘍に近似していることを重視したためであり、さらに本実験潰瘍作成後、第4週と第13週に Rat を屠殺した理由は、その最盛期が21~35潰瘍日であり、潰瘍作成後4週間目より治癒率が増加し始め、9週間で50~60%が治癒し、13週間で潰瘍は治癒期に入るとされている事実を根拠として設定したものである(図3)。

図3. Clamping-Cortisone 法によるラット実験潰瘍治癒率



S. Umehara et al.: Gastroenterology, Vol. 11, 128, 1967. より引用

さて著者の実験によると、実験潰瘍の最盛期²⁾ である第4週目においては、*C. alb.* はその潰瘍底に多数みとめられ、同時にそれらの周囲に反応性炎症性細胞(リンパ球、形質細胞、組織球)がみられ、そのうち組織球には蛍光陽性物質が含まれているのがみとめられた。この蛍光物質は *C. alb.* の可溶性成分

であることがみとめられており、*C. alb.* が組織球に貪食されたことを示すものであり、ヒト潰瘍例のみとめられたと同じ結果をえたことになる。すなわち潰瘍底においては組織球は *C. alb.* の清掃細胞として働いており、反応性炎症性細胞の出現と共に *C. alb.* に対する生体反応の現われと解された。

田林⁴⁾ は Clamping-Cortisone 法による実験潰瘍で次のように述べている。すなわち第3~4週目が潰瘍の極期で、潰瘍面は拡大し、潰瘍表面の細胞壊死層や好中球浸潤が著明となり、第5週目になると潰瘍底では結合組織の形成と毛細血管の新生がはじまり、慢性潰瘍としての所見がみられるようになる。第6週をすぎると粘膜再生や潰瘍底の癒痕が本格的になり、潰瘍は縮少し、大型の嚢胞状の腺組織が潰瘍縁に多数発生する。そして第10~13週目で治癒期にはいと報告している。さらに第13週の時期で57% (7例中4例) は再生粘膜が潰瘍面を覆って治癒するが、残りの43%はわずかに潰瘍面を残していると指摘している。また田林は胃潰瘍の治癒経過の状態をわかりやすいように100点満点による点数で、治癒指数(図4)および膠原線維発育度(表3)を呈示した⁴⁾。これによると

図4 治療指数

$$\text{治療指数} = \left(1 - \frac{\text{潰瘍面}}{\text{粘膜筋板欠損}}\right) \times 100$$

治療指数値がマイナスになる場合は潰瘍の下壊れ度を示し、100に近づく程潰瘍の縮少を意味する。

Clamping-Cortisone 法実験潰瘍は、第13週目で治癒指数は87.4点、膠原線維発育度は91.4点であると示している。

これらの結果を著者の *C. alb.* 投与実験潰瘍と比較してみると、第13週目で75% (8例中6例) は再生粘膜が潰瘍面を覆って治癒しており、治癒指数は90点、膠原線維発育度は35点であった。すなわち治癒指数は Clamping-Cortisone 法と特に有意差はみとめられ

ないが、膠原線維発育度は *C. alb.* 投与により低下を示している。このことは *C. alb.* が胃潰瘍の治癒遅延に影響を及ぼしていることの現われと解される。又この時期に蛍光陽性の *C. alb.* を貪食した組織球が胃壁内に見あたらなかったのは、すでにそれらの組織球は清掃細胞として働いた後に胃壁外へ遊走してい

表3 膠原線維発育度

(-)：線維芽細胞及び毛細血管は多数存在するが、肉芽組織の線維化は乏しく、潰瘍底に膠原線維をみとめない。	0点
(±)：肉芽組織の線維化が始まり、膠原線維を1視野に数個みとめる。	20点
(+)：膠原線維を1視野の1/3にみとめる。	40点
(++)：膠原線維を1視野の1/2にみとめる。	60点
(+++)：線維化が進み、多数の膠原線維によって、潰瘍はは網状を呈す。	80点
(IV)：無数の膠原線維により、はん痕形成が完成し、毛細血管及び線維芽細胞をみとめない。	100点

ったものと考えられた。

なおヒト潰瘍例と同様に Rat 胃壁内の細胞が真菌と共通抗原をもつ muco 多糖体である可能性はともに PAS 反応が陽性であったことより考えられるが、第1編同様に ouchterlony 法を用いて、その関係のないことを確認した。

結 論

Wister 系 Rat に Clamping-Cortisone 法により作製した実験胃潰瘍に *C. alb.* を経口投与し、第4週及び第13週後に屠殺しその潰瘍部の蛍光抗体法による免疫組織学的検索をおこなった。その結果第4週屠殺群において、その潰瘍底には *C. alb.* が多数みられ、その周囲に反応性炎症性細胞の浸潤と *C. alb.* を貪食したと考えられる蛍光陽性の組織球がみとめられ、

さらにその組織球の一部は胃組織間にも遊走しているのがみられた。これらの事実は胃壁における *C. alb.* に対する生体の反応がヒトと同様に Rat においてもおこることを証明したことになる。

次に第13週屠殺群においては潰瘍底の膠原線維の発育度が、対称の Clamping-Cortisone 法による実験潰瘍より低下していた。このことは *C. alb.* による潰瘍治癒遷延作用の現われと解される。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただいた岡山大学長小坂淳夫先生ならびに岡山済生会総合病院病理の浜家一雄先生、同院検査室の笠原和恵先生に深く感謝致します。

本論文の要旨は第70回日本内科学会総会、第16回日本医真菌学会総会で発表した。

文 献

1. 北 昭一：胃潰瘍と真菌に関する研究。胃潰瘍底組織内に真菌増生を伴う胃潰瘍の臨床的検討。岡山医学会誌, 80, 87—94, 1968.
2. Umehara, S., et al.: A new Clamping-Cortisone method for experimental chronic gastric ulcer in rats. *Gastroenterology*, 11, 126—127, 1967.
3. 梅原千治, 田林忠綱, 渋谷栄一, 伊藤久雄, 清水正洋, 興石義晴：Clamping-Cortisone 法による抗潰瘍剤の生物検定。治療, 47, 397—408, 1965.
4. 田林忠綱：Clamping-Cortisone 法によるラットの慢性胃潰瘍の作成とその組織学的所見。日本消誌, 62, 1—15, 1965.

The relationship between incurable gastric ulcer and
Candida albicans at the ulcer base

II. Immuno-fluorescent study of experimentally-induced gastric ulcer
in rats using anti-*Candida albicans* antisera

Fumio HITOMI

The First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. H. Nagashima)

Internal Medicine, Okayama Saiseikai General Hospital

(Director : Dr. H. Yamato)

Experimental gastric ulcer was induced in Wistar rats by a Clamping-Cortisone method. *Candida albicans* infection was achieved by oral administration. Animals were sacrificed after the 4th and 13th week. Gastric ulcers were investigated by immuno-fluorescence using anti-*Candida albicans* antisera. In rats sacrificed after the 4th week, *Candida albicans* was fluorescent positive at the ulcer base. As in man, many fluorescent histiocytes were seen not only around, but far from the ulcerated lesions. Inflammatory cells were also numerous at the ulcer base. These findings support the hypothesis that, in man *Candida albicans* infection at the ulcer base is not merely a simple growth, but that it is also involved in the poor curability of gastric ulcer. In animals sacrificed at the 13th week, fibrous change with collagen formation at the ulcer base was less prominent than in those sacrificed at the same period but not infected by *Candida albicans*. Possibly, this is due to the fact that *Candida albicans* inhibits fibrous change and collagen formation (mechanisms of healing) in the gastric ulcer.