

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10272

研究課題名（和文）異なる口腔環境より採取したカンジダ菌の性状解析に基づく新規誤嚥性肺炎予防法の開発

研究課題名（英文）Development of a new preventive method for aspiration pneumonia based on property analysis of Candida bacteria collected from different oral environments

研究代表者

藤島 慶 (Fujishima, Kei)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：50553153

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：誤嚥性肺炎は主に高齢者に発症し、高齢者の口腔内環境を特徴づける因子の一つに義歯がある。口腔内には誤嚥性肺炎起因菌の一種であるCandida albicans（以後、C.albicans）が常在する。そこで義歯よりC.albicansを採取し、義歯床用材料への付着能、増殖能、抗真菌性成分であるアンホテリシンB、ヒスタチン5への耐性能について解析した。

結果、採取したC.albicansの多くは、指標株JCM1537に比較して、アンホテリシンB、ヒスタチン5に対し有意な耐性を示した。これより、義歯には、抗真菌性成分に耐性をもつ誤嚥性肺炎を惹起するC.albicansが生息する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、義歯上には誤嚥性肺炎発症の起因菌の一種である、Candida albicansが常在し、そして義歯に付着したCandida albicansの多くが抗真菌性成分に対し耐性を担っている可能性があることが示唆された。

義歯に付着するCandida albicansが誤嚥性肺炎発症のリスクファクターになり得るという当研究結果より、特に義歯を装着した高齢者においては、改めて義歯メンテナンスを目的とした定期的なかかりつけ歯科医院受診の必要性、また、自宅での徹底した義歯衛生管理の必要性を社会に啓蒙する点において、当研究成果は社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Aspiration pneumonia mainly develops in the elderly, and dentures are one of the factors that characterize the oral environment of the elderly. Candida albicans (hereinafter referred to as C.albicans), a type of aspiration pneumonia-causing bacteria, always resides in the oral cavity. Therefore, C.albicans were collected from dentures and analyzed for its ability to adhere to denture base materials, ability to proliferate, and resistance to amphotericin B and histatin 5, which are antifungal components.

As a result, many of the collected C.albicans showed significant resistance to amphotericin B and histatin 5 compared to the indicator strain JCM1537. These results suggest that C.albicans, which causes aspiration pneumonia and is resistant to antifungal agents, exist on the denture.

研究分野：口腔微生物学分野

キーワード：誤嚥性肺炎 義歯

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省は、人口動態統計(2019年)において、日本人の死因の第5位は肺炎であること、そして誤嚥による肺炎は高齢者において高頻度に発症することを報告している。

誤嚥性肺炎の原因菌の1つとして、口腔カンジダ菌が挙げられる。口腔内から採取される主なカンジダ菌は、*Candida albicans*、*Candida glabrata*、*Candida krusei*、*Candida tropicalis*の4菌種である。これまでに、糖尿病、HIV感染などの全身的因子がカンジダ菌の性状に影響を及ぼすことが報告されている。また、口腔内の局所においては、口腔衛生状態、口腔乾燥などの局所因子が、カンジダ菌の性状に影響することが報告されている。さらに、解剖学的に異なる部位より採取されたカンジダ菌は、それぞれ異なる酵素活性を示すことが報告されている。

上記に示す既報より、口腔内に生息するカンジダ菌は、口腔を構成する局所因子、宿主の残存歯数、口腔乾燥状態、義歯装着状態などの複雑な口腔環境に自身の性状を順応させ、常在化を獲得していることが推測される。様々な局所因子から構成される複雑な口腔環境に生息する誤嚥性肺炎の起原菌であるカンジダ菌が示す性状の多様性を診断し、その結果に基づいた、誤嚥性肺炎に対する治療法、予防法は確立されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、異なる口腔環境より採取したカンジダ菌の正確かつ迅速な性状解析により、多様な性状を示すカンジダ菌に対して、的確な治療法を選択し、口腔内より為害性のないレベルにカンジダ菌数を減少させる、新規誤嚥性肺炎予防法を確立することである。

3. 研究の方法

本研究の目的は、口腔内より採取したカンジダ菌の性状解析に基づく高齢者に高頻度に発症する誤嚥性肺炎に対し予防法を確立することである。

高齢者の口腔環境を特徴づける因子の一つに義歯の装着がある。そこで、本研究では、義歯より誤嚥性肺炎起原菌であり、最も高頻度に分離される *Candida albicans* の臨床分離株の採取および性状解析を行った。各々の *Candida albicans* の臨床分離株が示す性状解析を実施し、臨床分離株が示す性状と誤嚥性肺炎発症との関連性について検証を行い、誤嚥性肺炎の予防法について模索した。

～義歯からの *Candida albicans* の臨床分離株の採取について～

カンジダ菌臨床分離株は、義歯床粘膜面をふきふきチェック(栄研化学)にて拭い採取した。採取後、CHROM agar 培地への播種・培養を行い、コロニーの色および形態にて菌種の分類を行った。分類後、*Candida albicans* の特異的プライマーである CALB1、CALB2 を用いた PCR 法により、*Candida albicans* の確定診断を行った。

～採取した *Candida albicans* の臨床分離株の性状解析～

(1) 増殖能検証

前培した *Candida albicans* の臨床分離株を 5mL Trypticase soy broth (TSB) に播種し、経時的に OD の計測を行った。理化学研究所より購入した口腔外由来の指標株 JCM1537 株についても同様に経時的に OD の計測を実施した。OD 計測後、増殖曲線を描記し、指標株、臨床分離株のそれぞれの増殖能について検証を行った。

(2) 義歯床用材料 PMMA への付着能検証

Candida albicans を蛍光指示薬 BCECF-AM でラベリングした。

PMMA ビーズを唾液で coating し、ラベリングした *Candida albicans* を PMMA ビーズに 3 時間作用させた。

3 時間の作用後、Infinite M200 マイクロプレートリーダーで蛍光強度の測定を行い、描記したスタンダードカーブを用いて、PMMA への付着菌数の測定を行い、各菌株間における付着能について比較検証を行った。

(3) 抗真菌薬 amphotericin B への感受性検証

今回、抗真菌薬として、本院において口腔カンジダ症に対し処方される amphotericin B を選択した。まず、amphotericin B に対する感受性検証として、MIC 法による感受性検証を行った。ウェルプレートに段階希釈した amphotericin B に *Candida albicans* を播種し、24 時間培養後、MIC の測定を行った。

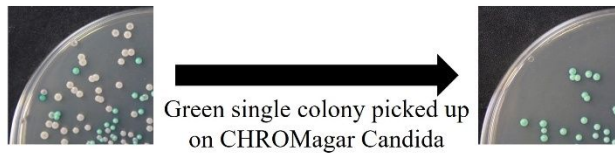
さらに詳しく amphotericin B に対する *Candida albicans* の感受性を検証するために、抗菌活性評価法を用い、各菌株における生存率の比較検証を行った。

4. 研究成果

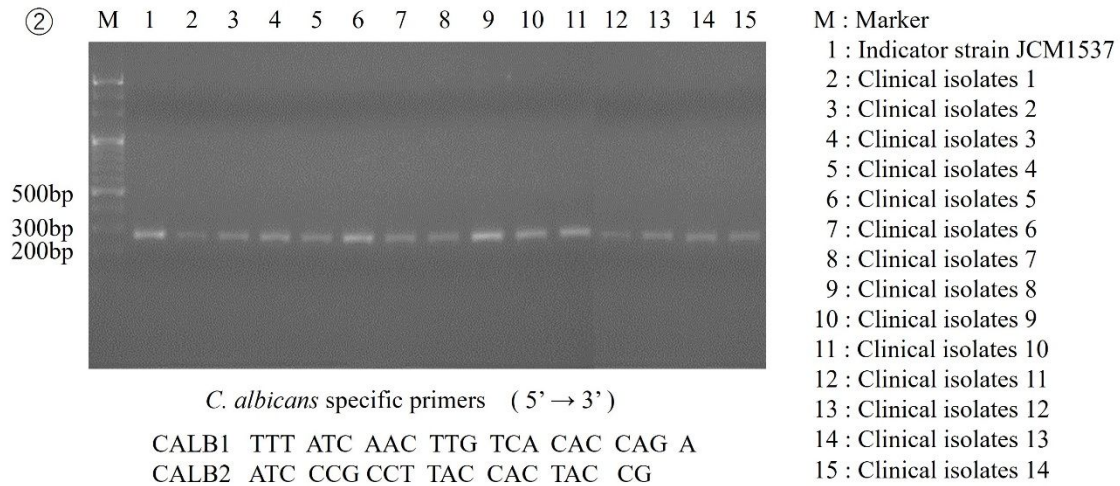
(1) 臨床分離株採取結果

患者が装着している義歯の床粘膜面より、*Candida albicans* の臨床分離株の採取を試みた。52名の患者より *Candida albicans* 臨床分離株の採取を試み、14株の *Candida albicans* 臨床分離株を獲得した。以後、採取した臨床分離株および理化学研究所より購入した指標株 JCM1537株を使用し、性状解析を実施した。

①

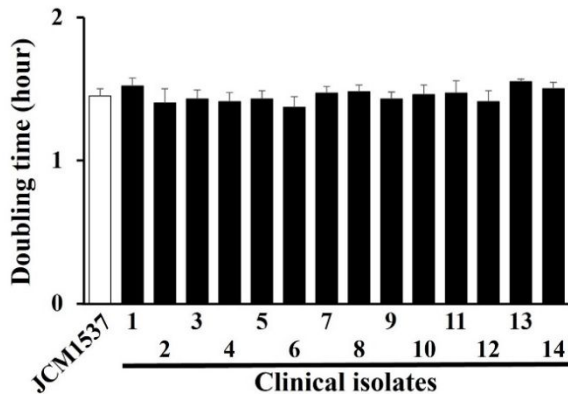


②



(2) 性状解析結果

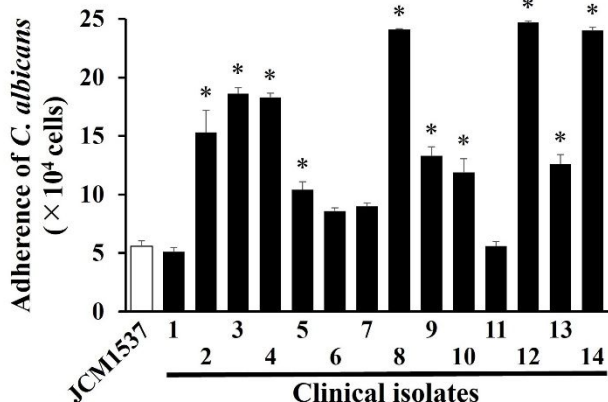
増殖能検証結果



増殖曲線描記後、各株間における増殖能を比較するため、各株における doubling time の算出を行った。その結果を左に示す。

左結果より、指標株 JCM1537 株、各臨床分離株間に増殖能に差は認めなかった。

PMMA への付着能検証結果

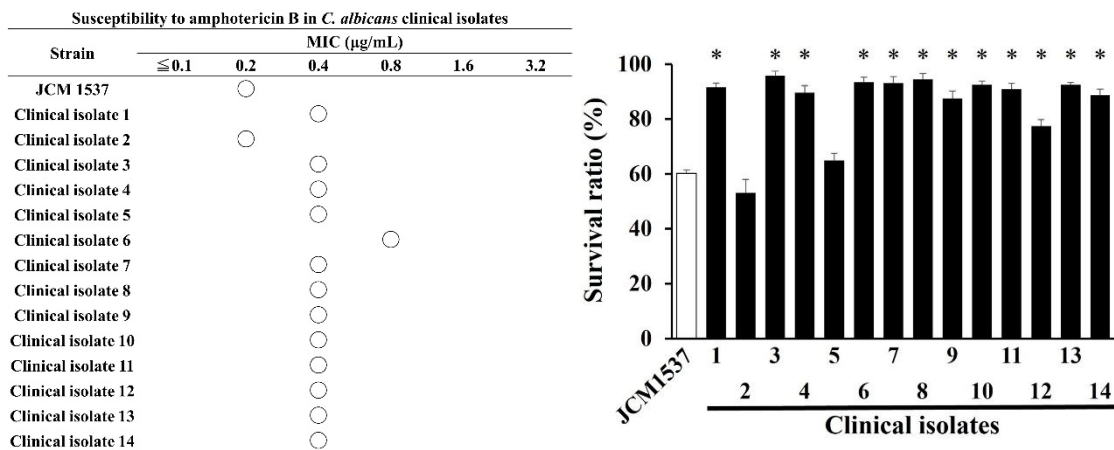


蛍光指示薬 BCECF-AM でラベリングされた *Candida albicans* が唾液で coating された PMMA に付着した際の蛍光強度を Infinite M200 マイクロプレートリーダーにて測定した。測定値および描記したスタンダードカーブを用い、PMMA への付着菌数を算出した。その結果を左に示す。

各株間において PMMA への付着にはバリエーションを認め、臨床分離株 14 株のうち 10 株において、指標株 JCM1537 株よりも有意な付着の亢進を認めた。

抗真菌薬 amphotericin B に対する感受性検証結果

抗真菌薬 amphotericin B は、当院にて口腔カンジダ発症時に処方される抗真菌薬で口腔カンジダ症は誤嚥性肺炎発症の起因菌である *Candida albicans* が口腔内において、ある一定数以上に増殖した結果発症する。口腔内に増殖した *Candida albicans* による誤嚥性肺炎発症抑制には、amphotericin B に対し高感受性であることが望ましい。今回、MIC 法および抗菌活性評価法を用いた感受性検証を行った。その結果を以下に示す。



MIC 法では、採取した臨床分離株 1 株を除き、JCM1537 株よりも高い MIC 値を示した。また、抗菌活性評価法では、臨床分離株 14 株のうち 12 株において有意な生存率に上昇を認めた。

以上の性状解析結果より、高齢者の口腔内を特徴づける義歯には、義歯表面に高付着能を有する *Candida albicans* が生息し、そして義歯床への高付着能を有する *Candida albicans* は抗真菌薬 amphotericin B に対し耐性を獲得している可能性が示唆された。

今検証では、誤嚥性肺炎が高頻度に発症する高齢者において、高齢者の口腔内環境を特徴づける義歯に着目した。今後は、高齢者の口腔環境を特徴する義歯以外の口腔内環境構成因子に着目し検証を行い、誤嚥性肺炎予防法確立に繋がりたいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長田 恵美 (Nagata Emi) (00304816)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	
研究分担者	於保 孝彦 (Oho Takahiko) (50160940)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関