

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670868

研究課題名(和文) LH-PCR法と次世代シーケンサーを用いた口腔カンジダ症の新たな診断方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel diagnostic method in oral candidiasis using LH-PCR and next-generation sequencing

研究代表者

森山 雅文 (Moriyama, Masafumi)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：20452774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年の抗真菌薬の常習的使用は、治療抵抗性を示す耐性真菌の出現を引き起こすとされている。そこでわれわれは、偽膜性口腔カンジダ症(POC)患者27例と健常者66例を対象に、次世代シーケンサー(NGS)を用いて口腔内真菌叢の網羅的解析を行った。その結果、加齢により総真菌量、検出真菌種数およびCandida属以外の真菌の構成比が増加するものの、POC患者では一人あたりの検出菌種数およびCandida属以外の真菌の構成比は、治療により増加していた。以上より、加齢や真菌の多様性は口腔カンジダ症の発症に関与することが考えられ、NGSは口腔カンジダ症のモニタリングに有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The widespread use of empiric and prophylactic antifungal drugs has caused a shift in fungal biodiversity towards other Candida. We thus used NGS to examine the oral fungal biodiversity of 27 patients with pseudomembranous oral candidiasis (POC) and 66 healthy controls. The total number of fungal species in patients with POC and healthy controls was 67 and 86, respectively. The copy number of total PCR products and the proportion of non-C. albicans, especially C. dubliniensis, in patients with POC, were higher than those in healthy controls. The detection patterns in patients with POC were similar to those in controls after antifungal treatment. Interestingly, the number of fungal species and the copy number of total PCR products in healthy controls increased with aging. These results suggest that high fungal biodiversity and aging might be involved in the pathogenesis of oral candidiasis. We therefore conclude that NGS is a useful technique for investigating oral candida infections.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔カンジダ症 次世代シーケンサー LH-PCR法 診断方法 加齢

### 1. 研究開始当初の背景

近年、適切な口腔ケアが誤嚥性肺炎の発症率を有意に低下させるということが明らかになり、口腔ケアの重要性が再認識されている。口腔カンジダ症に対する口腔ケアとしては、擦過や清拭だけでは不十分なことが多いので、通常抗真菌薬を使用することが多い。しかし安易に抗真菌薬を頻用することで、耐性菌の増加や原因菌種が多様化するという問題が報告されている。これまで口腔カンジダ症の主な原因菌は *Candida albicans* (*C. albicans*) であると考えられてきたが、近年ではそれ以外の真菌も関与しているとの報告もあり、これらの *C. albicans* 以外のカンジダ菌は non-*albicans Candida spp.* とされている。non-*albicans Candida spp.* の特徴は抗真菌薬感受性が低いことであり、適切な抗真菌薬を使用できなかった症例では、難治性を示すことがある。そのため口腔カンジダ症の原因真菌を正確に判別し、診断と適切かつ迅速な抗真菌治療を行うことが、われわれ歯科医師の急務であるといえる。

口腔内真菌の多数を占めるカンジダ属真菌の従来の同定方法には、CHROMagar *Candida* などの培地による培養法を用いて行われてきた。しかし、カンジダ症の主要病原真菌とされている *C. albicans*、*C. tropicalis*、*C. krusei*、*C. glabrata*、*C. palapsilosis* の5種の *Candida* 属しか色分けによる同定ができず、また真菌種により生育速度が異なり、2~4 週間は継続的に培養することが必要であった。さらに色分けされた5種の *Candida* 属以外の真菌の発育を認めた場合は、分離培養後にシーケンス解析を要していた。そのため真菌種の同定には多くの時間を費やす必要がある上に、培養が困難で検出不可能な真菌種も存在するなど、問題点が多かった。

しかし近年になり、ほぼ全ての真菌に存在する ribosomal RNA 遺伝子上の internal transcribed spacer (ITS) 領域を用いた length heterogeneity PCR (LH-PCR) 法が確立された。LH-PCR 法は、ITS 領域をプライマーとした PCR 法であり、微生物群集から直接抽出した DNA を増幅して、回収された PCR 産物の断片長を既知の真菌の塩基配列データベースと照合することにより、真菌叢の網羅的解析を可能にした。ただし断片長からの同定が困難なシグナルについては、さらに DNA シーケンスを行う必要があるため、同定までに培養法と同様に時間を要することがある。

一方、近年の技術革新により、次世代シーケンサー (next generation sequence: NGS) が開発され、一度に多くのサンプルから1塩基レベルの遺伝子解析が可能になった。NGS は一回の操作で多くのサンプル群の網羅的な遺伝子解析をきわめて短時間でできるようになったため、シーケンスも同時に行うことが可能となった。また、これまで LH-PCR 法では検出することができなかった真菌についても検出・同定が可能となった。最近の

報告では、口腔内細菌叢の網羅的解析に NGS は用いられているが、口腔内真菌叢の網羅的解析に NGS が用いられている報告はいまだない。

### 2. 研究の目的

本研究では、口腔内真菌叢の解析法の確立を第一の目的として、従来の同定方法である培養法と LH-PCR 法に加え、NGS を用いて健常者の口腔内真菌叢の解析を行い、それぞれの結果を比較検討した。

次に、加齢に伴う口腔内環境の変化が真菌叢の構成の多様化に関与し、口腔カンジダ症の真菌叢の多様化が口腔カンジダ症の発症に関わるとの報告がある。さらに近年の抗真菌薬の常習的使用が、治療抵抗性を示す耐性真菌の出現を引き起こすと報告されており、実際に口腔カンジダ症の難治症例に遭遇することが少なくない。そこで第二に、加齢および口腔カンジダ症による真菌叢の変化について検討を行った。

### 3. 研究の方法

対象は、平成 24 年 7 月から平成 27 年 7 月に九州大学病院顎口腔外科を受診し、口腔内に偽膜形成や発赤などの粘膜症状を認め、塗抹鏡検でカンジダ菌陽性で急性偽膜性口腔カンジダ症 (POC) と診断された 27 例 (男性 3 例、女性 24 例、平均年齢:  $64.2 \pm 14.5$  歳) と、口腔内に粘膜症状を認めず、かつ口腔乾燥を生じるとされる全身疾患の既往がない健常者 66 例 (男性 26 例、女性 40 例、平均年齢:  $34.7 \pm 22.7$  歳) を対象とした。また、患者および健常者とも義歯使用者、喫煙者、妊娠中または授乳中の者、免疫抑制剤やステロイド薬服用者は除外した。

口腔カンジダ症の治療としては、アゾール系抗真菌薬のミコナゾール (MCZ, 商品名: フロリードゲル経口用 2%、持田製薬) を使用した。使用前に口腔内清掃を行い、フロリードゲルとして 1 日 200 ~ 400 mg を 4 回 (毎食後および就寝前) に分け、約 5 分間口腔内の患部 (舌や頬粘膜など) にまんべんなく塗布した。使用後約 1 時間は含嗽や飲食をしないように指導した。粘膜症状や自覚症状が軽快し、塗抹鏡検でカンジダ菌陰性であったものを治癒と診断した。

含嗽検体の採取は、椅子に座った状態で滅菌純水 (5 ml) を口腔内に含み 30 秒間含嗽後にファルコンチューブに採取した。

培地法は、含嗽検体 (5 ml) のうち 1ml を分取して CHROMagar *Candida* 培地に塗布し、30 の好気性条件下にて 48 時間培養、形成したコロニーの大きさ、形態、色などの視覚により識別した。

LH-PCR 法は、真菌共通配列である真菌 rRNA の ITS1-5.8S-ITS2 領域を PCR 法により増幅し、そのサイズを測定した。解析ソフトウェア GeneMapper version 4.0 を用いて、サイズスタンダードに含まれる既知の DNA 断片と

対象の DNA 断片の移動距離との比較から断片長を決定した。ピーク面積が全断片のピーク面積の合計の 1%に満たない断片を除外したのち、断片長の違いが 1 塩基以下であれば同一のものとし全検体の LH-PCR プロファイルをアラインメントした。を行った。菌種によっては培地上での成長速度が異なるため、その後引き続き室温で約 2 週間まで培養した。

NGS は LH-PCR 法と同様に、PCR 法による真菌 ITS 領域の増幅後、ライブラリ作成およびシーケエンシングを行った。得られたシーケンスデータはまず CLC Genomics Workbench v.7.5.2 にてクオリティスコア閾値 0.01 を条件にトリミングを行い、解読塩基配列に N を含むリードを除外した。続いてプログラミング言語 R を用いて 200 塩基未満のリードおよびフォワードプライマー配列を含まないリードを除外した。BLAST を用いて真菌 ITS 領域塩基配列データベース UNITE に登録された 22,774 の塩基配列に 98% 以上該相同性を示した場合、該当する真菌種とみなした。

#### 4. 研究成果

##### 培養法、LH-PCR 法、および NGS を用いた口腔内真菌叢の解析と比較検討

健常者 5 名を対象とし、含嗽液中の真菌叢を培養法、LH-PCR 法、および NGS にて解析を行った。その結果、培養法では *C. albicans* の 1 種しか検出されなかった。一方、LH-PCR 法では 1 人あたり平均  $6.2 \pm 1.9$  種が検出され、NGS では 1 人あたり平均  $14.8 \pm 1.8$  種が検出された。真菌叢の構成比はいずれも *C. albicans* が最も優勢であったが、一人あたり検出菌種数は NGS が有意に多く、また同時に菌種の同定も可能であった (図 1)。

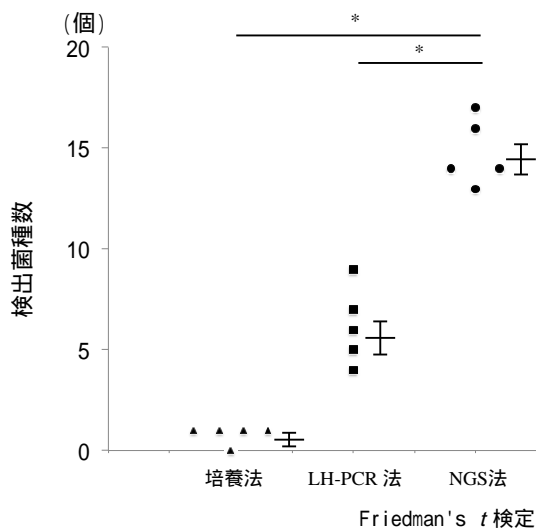


図 1. 各解析法での平均検出菌種数の比較

##### 加齢における口腔内真菌叢の変化

健常者 66 名を対象に、各年代別( 20 歳代、30 歳代、40 歳代、50 歳代以上 ) に分けて含

嗽液中の口腔内真菌叢の解析を行った。一人あたりの総真菌量および NGS による一人あたりの平均検出真菌種数は、年齢と正の相関を示した (図 2)。

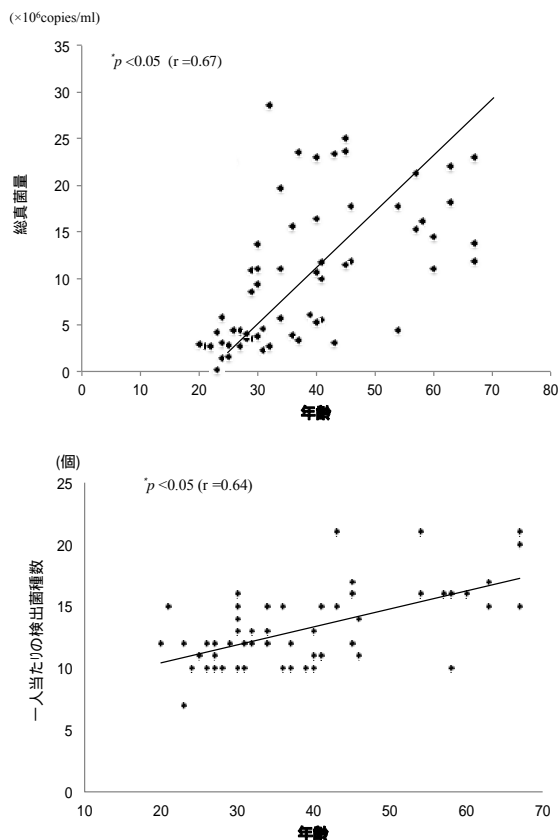


図 2. 上：健常者群でのリアルタイム PCR による総真菌量、下：健常者群での NGS による一人当たりの検出菌種数

また、真菌叢の構成比はどの年代も *C. albicans* が最も多くの割合を占めたが、加齢とともに *C. albicans* の占める割合は減少した (図 3)。

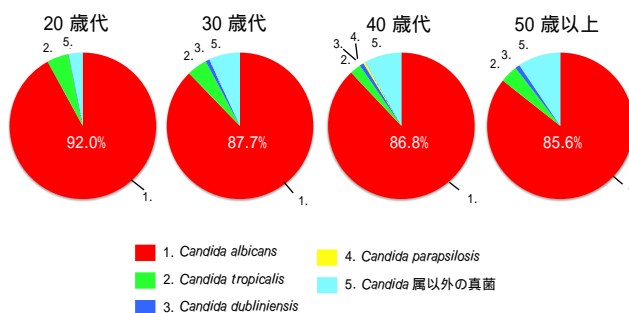
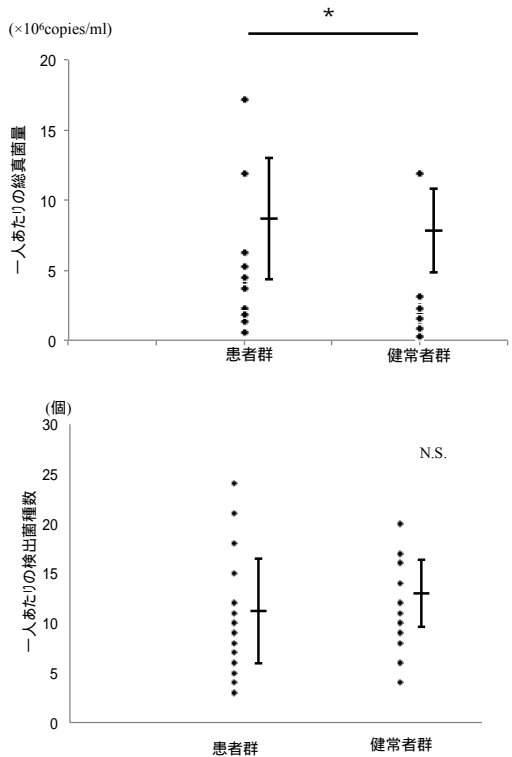


図 3. 加齢による口腔内真菌叢の構成比の変化 (NGS)

##### 口腔カンジダ症患者と健常者の口腔内真菌叢における比較検討

急性偽膜性口腔カンジダ症 (POC) 患者 27 名と健常者のうち年齢を合わせるため 40 歳代以上の 29 名を対象にした。含嗽液中の口

腔内真菌叢を解析した。患者群は健常者群よりも総真菌量は有意に多く、NGS による一人あたりの検出菌種数は、患者群が  $11.6 \pm 8.2$  種、健常者群が  $14.0 \pm 3.5$  種であり、患者群が少なかった (図 4)。



Mann-Whitney U test 検定 (\* $P < 0.01$ )

図 4. 上：口腔カンジダ症患者と健常者群における総真菌量、下：口腔カンジダ症患者と健常者群における一人あたりの検出菌種数

また、NGS による真菌叢の構成比では患者群の方が *C. dubliniensis* の占める割合が高かった (図 5)。

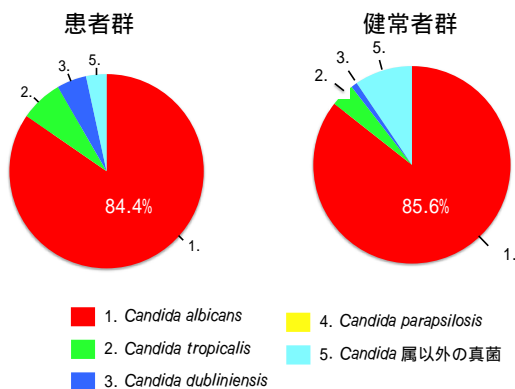


図 5. 口腔カンジダ症患者と健常者における口腔真菌叢の構成比 (NGS)

患者群において検出率の高い上位 26 菌種と健常者群での検出率を比較した (表 1)。両群とも *C. albicans* の検出率は 100%であった。*C. dubliniensis*、*Rhodospiridium babjevae*、*Walleimia sebi* は患者群で有意に高く検出さ

れ、*C. kurusei*、*Antrodiella micra*、*Cladosporium sphaerospermum*、*Sporidiobolales sp* は患者群でのみ検出された。*Exophiala equine*、*Cladosporium halotolerans*、*Agaricomycetes sp* は健常者群での検出率が有意に高かった。

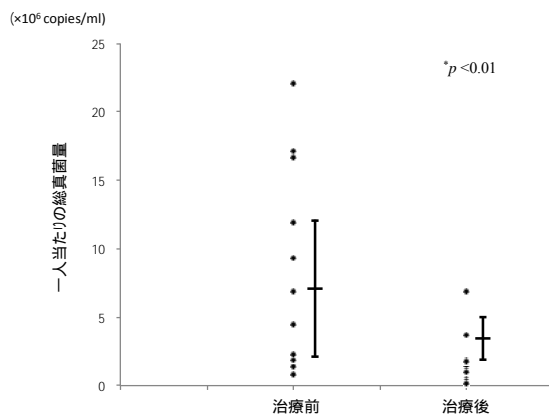
真菌種名	検出率 (%)		p 値
	患者群 (n = 27)	健常者群 (n = 66)	
<i>Candida albicans</i>	27 100.0%	66 100.0%	1.000
<i>Candida dubliniensis</i>	23 85.2%	41 62.1%	0.04695*
<i>Candida tropicalis</i>	18 66.7%	51 77.3%	0.306
<i>Trichosporon cutaneum</i>	17 63.0%	32 48.5%	0.255
<i>Exophiala equina</i>	15 55.6%	55 83.3%	0.00777*
<i>Meyeromyces guilliermondii</i>	12 44.4%	32 48.5%	0.820
<i>Ascomycota sp</i>	11 40.7%	17 25.8%	0.213
<i>Penicillium chermesinum</i>	11 40.7%	14 21.2%	0.072
<i>Candida parapsilosis</i>	9 33.3%	9 13.6%	0.04238*
<i>Cladosporium halotolerans</i>	8 29.6%	39 59.1%	0.01235*
<i>Malassezia restricta</i>	7 25.9%	31 47.0%	0.068
<i>Walleimia sebi</i>	7 25.9%	6 9.1%	0.04807*
<i>Candida krusei</i>	6 22.2%	0 0.0%	0.00039*
<i>Rhodospiridium fluviale</i>	6 22.2%	10 15.2%	0.545
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	5 18.5%	10 15.2%	0.759
<i>Agaricomycetes sp</i>	4 14.8%	31 47.0%	0.00435*
<i>Eurotiales sp</i>	4 14.8%	6 9.1%	0.469
<i>Malassezia sp</i>	4 14.8%	5 7.6%	0.439
<i>Rhodospiridium babjevae</i>	4 14.8%	1 1.5%	0.02384*
<i>Alternaria alternata</i>	3 11.1%	5 7.6%	0.687
<i>Antrodiella micra</i>	3 11.1%	0 0.0%	0.02254*
<i>Aspergillus penicillioides</i>	3 11.1%	3 4.5%	0.352
<i>Aspergillus sp</i>	3 11.1%	17 25.8%	0.166
<i>Basidiomycota sp</i>	3 11.1%	2 3.0%	0.145
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	3 11.1%	0 0.0%	0.02254*
<i>Sporidiobolales sp</i>	3 11.1%	0 0.0%	0.02254*

全検出菌種のうち検出率が 10%以上であったものを表に示す。\* $p < 0.05$  (Fisher の正確確率検定と Yates 補正) 検出率が患者群で有意に高い菌種を赤字で、健常者群で有意に高い菌種を青字で示す。

表 1. 口腔カンジダ症患者と健常者における NGS による各真菌種の検出率

### 口腔カンジダ症患者の治療前後の真菌叢の変化

偽膜性口腔カンジダ症患者のうち、抗真菌薬投与前後の含嗽液検体を採取できた 15 例の口腔内の真菌叢の変化について検討を行った。治療後は治療前に比べ一人あたりの総真菌量は有意に減少し、一人あたりの検出菌種数は増加傾向を示していた (図 6)。



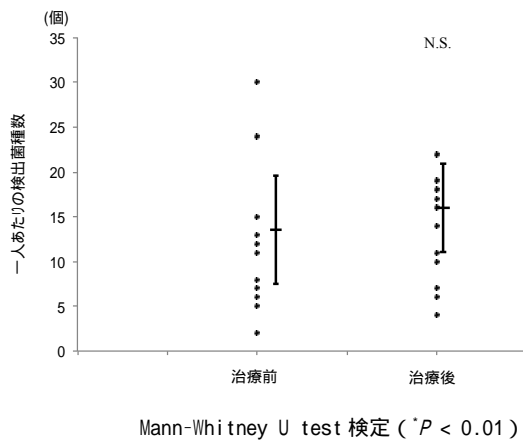


図 6. 上：口腔カンジダ症患者の治療前後における総真菌量、下：口腔カンジダ症患者の治療前後の一人あたりの検出菌種数

治療後の真菌叢の構成は、*C. dubliniensis* および *C. tropicalis* の割合が有意に減少していた。治療前後の真菌叢の構成パターンを比較すると、治療後の *C. albicans* は治療前より有意に高い構成比を示した。また、*C. dubliniensis* や *C. tropicalis* などの構成比は治療前に高かったが、治療後にはそれらが低下した。(図 7)。

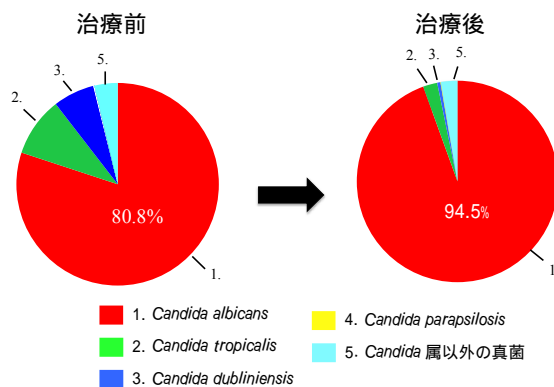


図 7. 口腔カンジダ症患者の治療前後における真菌叢の構成比

本研究の結果から、NGS を用いた解析方法は、培養法だけではなく LH-PCR 法よりも感度が高く、健常者のわずかな真菌量であっても検知が可能であった。また、NGS を用いて口腔内真菌叢と臨床所見との関連を検討すると、加齢により総真菌量、検出真菌種数および *Candida* 属以外の真菌の構成比が増加するものの、POC 患者では一人あたりの検出菌種数および *Candida* 属以外の真菌の構成比は、治療により増加していた。これは、加齢や口腔カンジダ症の発症によって特定の真菌種が過剰に増殖すると、その他の真菌種が相対的に減少したことが原因と推察されることから、口腔カンジダ症の発症には *C. dubliniensis* および *C. tropicalis* が関与していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Imabayashi Y, Moriyama M, Takeshita T, Ieda S, Hayashida JN, Tanaka A, Maehara T, Furukawa S, Ohta M, Kubota K, Yamauchi M, Ishiguro N, Yamashita Y, Nakamura S. Molecular analysis of fungal populations in patients with oral candidiasis using next-generation sequencing. Sci Rep 査読有、6:28110, 2016. DOI: 10.1038/srep28110

Molecular analysis of fungal populations in patients with oral candidiasis using internal transcribed spacer region. Ieda S, Moriyama M, Takeshita T, Maehara T, Imabayashi Y, Shinozaki S, Tanaka A, Hayashida JN, Furukawa S, Ohta M, Yamashita Y, Nakamura S. PLoS ONE 査読有、30;9(6):e101156, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0101156.

〔学会発表〕(計 2 件)

今林佑美、森山雅文、竹下徹、家田晋輔、山下喜久、中村誠司. 「次世代シーケンサーを用いた口腔カンジダ症患者における口腔内真菌叢の網羅的解析」第 63 回 国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会、2015 年 10 月 31 日、福岡

家田晋輔、森山雅文、篠崎昌一、林田淳之介、前原隆、大山恵子、中村誠司. シンポジウム「口腔カンジダ症の新たな診断と治療法確立の試み」第 11 回 口腔ケア学会総会・学術集会 2014 年 6 月 29 日、福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

森山 雅文 (MORIYAMA, Masafumi)  
九州大学・歯学研究院・助教  
研究者番号：20452774

(2)研究分担者

中村 誠司 (NAKAMURA, Seiji)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：60189040

竹下 徹 (TAKESHITA, Toru)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：50546471

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし