

平成30年6月18日現在

機関番号：32710

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15778

研究課題名（和文）抗真菌薬添加含嗽薬による口腔内真菌を減少させる試み

研究課題名（英文）Reduction of oral fungi with an antifungal mouthwash

研究代表者

前田 伸子（MAEDA, NOBUKO）

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：10148067

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：我々は口腔環境の健全化により、消化管、全身の健康につながると考えている。一方、口腔内はさまざまな微生物が繁殖しやすい環境でもあり、常に適切な口腔ケアが必須となる。しかし、日々の口腔ケアには問題も多く、その要因であるCandida等の真菌類を抗真菌薬で抑制することで、口腔環境の適切な管理・維持が可能と考え検討を実施してきた。この結果、抗真菌薬の継続使用により、口腔内の真菌数の減少とそれに伴う清掃状態、粘膜症状が改善され、口腔環境の健全化が確認できた。さらに、便通の改善や体重維持も示され、全身の健康維持を支持する結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：A healthy oral environment should be maintained to promote gastrointestinal and general conditions. However, various microorganisms rapidly grow in the oral cavity, requiring sufficient oral care. Daily oral care is often difficult. We investigated how fungi, such as Candida, can be suppressed with antifungal medicines for appropriate management and maintenance of the oral environment. As a result, the continued use of antifungal medicines reduced fungi in the oral cavity and improved oral cleaning conditions and mucosal symptoms, promoting a healthy oral environment. In addition, it improved bowel movements with satisfactory body weight control, supporting its effects on general health maintenance.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：アムホテリシンB カンジダ 歯垢 口腔清掃 粘膜症状 口腔ケア 介護老人施設 QOL

1. 研究開始当初の背景

ヒトの口腔、消化管、膣、皮膚に存在する真菌である *Candida* の病原性を正確に捉えることは極めて難しい。一方、易感染性が高かった宿主である高齢者の口腔で真菌が多く存在することの危険性を指摘する報告が多くみられる^{①-④}。研究者により *Candida* の検出率に差はある^⑤が、健常人の口腔内からも *Candida* は分離され、常在性がある真菌と見なされている^⑥。しかし、近年、*Candida* はヒトにおける侵襲性真菌感染症の最大の原因真菌と見なされ、生命に危険がない粘膜皮膚感染症からあらゆる臓器を侵しうる感染症までさまざまな病態を引き起こすことから、医療現場でもその存在は問題視されている^⑦。また、*Candida* の存在が種々の疾患の一つの誘因となることを指摘する報告^⑧もあり、本真菌に関しては口腔常在微生物という位置づけは疑問視されている。一方、口腔内 *Candida* は以前、歯周病の原因菌であるという誤認により、適切な検討が行われない状況が続いていた背景がある。その後の研究から、本真菌は歯周病の原因微生物ではないが、歯周病の病態を修飾し、増悪させる可能性が示唆されている。このような背景から、我々は、口腔内の *Candida* を除去することで、口腔環境が健全化し、それに伴い消化管も正常化し、さらには全身の健康につながるという仮説（「川の流れ」仮説）を立てた。この仮説実証のため、口腔内の *Candida* を駆除する抗真菌薬には、真菌に特異的に作用し、粘膜からの吸収が極めて少ないアムホテリシン B (AMPH-B) を選択し、それを添加した嗽含薬により、口腔内から真菌が減少することの効果と、その継続性について検討した。この結果、4ヶ月間の AMPH-B の使用により、真菌が減少したこと、さらにそれに呼応して、歯垢の物理的性状が除去しやすいものへと変化することなどを見出した。これにより、口腔内の *Candida* などの真菌を低レベルで維持することが口腔内バイオフィームである歯垢形成を抑制し、口腔環境の健全化が期待できることと考えられた。

2. 研究の目的

(1) これまでの検討で未確認であった AMPH-B による効果発現時間や口腔以外への効果を内科医と連携し、具体的な消化管や全身状態への効果を明確にすることを目的とした。

(2) 口腔ケアがより簡便、適切に実施できれば、老健施設における介護者への負荷が低減できるだけでなく、入所者の QOL も大きく改善されることが予想された。現状の超高齢化社会においても非常に有益な効果が得られるとも考え、AMPH-B の適切な使用方法などの最適化も目的とした。

(3) AMPH-B にはこれまでも、抗真菌作用以外にマクロファージなど免疫系への作用を示唆する報告があり、これらの作用も口腔環

境の改善に寄与している可能性が考えられており、その作用が、本研究の用法・用量においても影響するのかを培養細胞を用いて確認した。

3. 研究の方法

(1) 介護老人保健施設における効果発現時期および全身性への効果検討

試験デザインは非盲検試験法、対象は自由意思及びご家族より同意書を得た入所者、試験薬は日本薬局方アムホテリシン B シロップ 100mg/mL、用法・用量として 1 回 AMPH-B 5mg、1 日 3 回毎食後、全量 10mL 程度に希釈し 10 秒以上うがいする。ただし、状況に応じ医師の判断で適宜増減も可とした。試験期間は 1 年、解析対象は 4 箇月間以上の試験継続者。主要評価項目は言語聴覚士により、口の開き具合、口腔内の乾燥症状、清掃状態、粘膜症状の 4 項目を週単位でスコア化した COACH (Clinical Oral Assessment Chart) スコアを用い、薬剤使用群と未使用群で比較。副次評価項目として、糖尿病、高血圧、脂質代謝異常、便秘、不定愁訴などの各入所者の症状を医師が毎週スコア化した全身スコアと BMI (Body Mass Index) の月次推移、歯科医師により口腔内の *Candida* 数、歯肉炎症状、歯垢の口腔内環境を 4 箇月毎にスコア化した。

(2) 介護老人保健施設における便秘症状改善に伴う認知症への効果検討

試験デザインは非盲検試験クロスオーバー法、対象はご家族より同意書を得た認知症入所者、用法・用量は 1 回 AMPH-B 10mg、1 日 2 回朝・夕食後に歯磨き剤と共に使用した。解析対象は 7 箇月間の試験継続者。主要評価項目は 3 箇月目の薬剤使用群と未使用群における *Candida* スコアの比較、副次評価項目として、月次の便秘スコア、BMI、一般的な口腔ケアの指標である OAG (Oral Assessment Guide) スコア、介護施設での入所者状態を示す国際生活機能分類 ICF (International Classification of Functioning) ステージ評価や介護負担についての職員アンケートを実施した。

(3) 歯垢減少に伴う口腔内細菌数の推移の確認

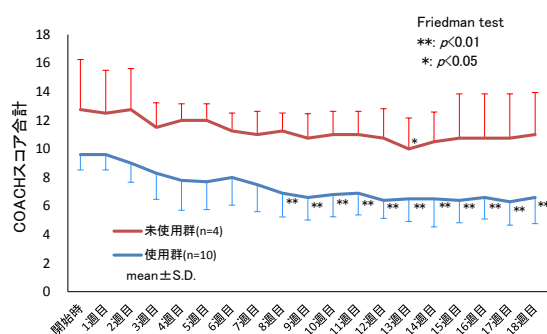
試験デザインは非盲検試験法、対象は自由意思及びご家族より同意書を得た入所者、用法・用量は 1 回 AMPH-B 5mg、1 日 3 回毎食後に歯磨き剤と共に使用した。解析対象は 4 箇月間試験継続者。主要評価項目は 4 箇月後の *Candida* スコアによる真菌数と細菌カウンタによる細菌数の開始時からの変動（細菌カウンタについては、初期値を 100% として算出）、副次的評価項目は 2 箇月毎の *Candida* スコア及び細菌数の推移と BMI の推移とした。

(4) 培養細胞を用いた AMPH-B の抗真菌作用以外の効果の検証

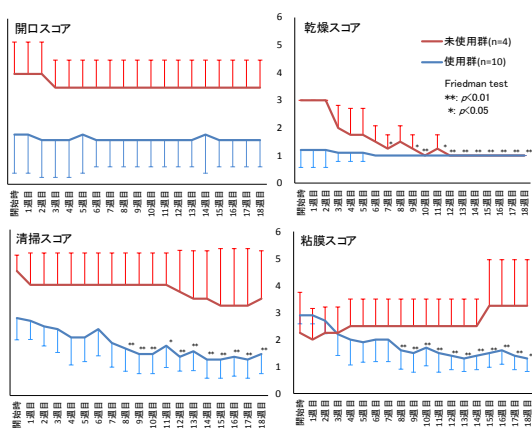
ヒト単球性骨髄性白血病細胞 (THP-1) の培養液に各検体の稀釈液を添加して 22 時間培養後、培養上清を回収した。培養液中の Tumor Necrosis Factor (TNF- α) 含量を酵素結合免疫吸着法 (ELISA 測定キット) で測定した。シロップ製剤は、培養液で溶解・懸濁し、AMPH-B の原薬は 60mg/ml になるようにジメチルスルホキシドに溶解後、培養液で希釈し調整した。

4. 研究成果

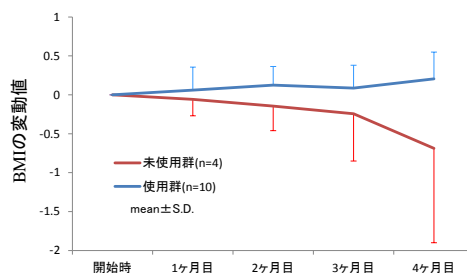
(1) 介護施設において、試験参加の同意が得られた 16 名のうち、薬剤使用に同意した方が 10 名、薬剤使用には同意しなかった方が 6 名であったので、前者を薬剤使用群、後者を未使用群とした。しかし、未使用群において、開始から 1 箇月目で 1 名、3 箇月目で 1 名が死亡し、さらに 5 箇月目で 1 名が口腔カンジダ症を発症して評価除外対象となったため、薬剤使用群 10 名、未使用群 4 名を対象として 4 箇月間での評価を行った。この結果、AMPH-B 使用群では 8 週目で COACH スコア合計値の初期値からの有意な低下を認めた。



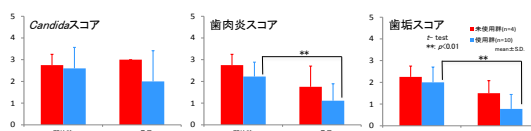
口腔内における AMPH-B の主な効果は、清掃と粘膜症状の改善が主な要因であった。



医師により、糖尿病や高血圧などの全身症状についても確認したが、下剤の使用量および便秘改善のみが報告され、スコアとして設定した数字としての改善は認められなかった。一方、BMI について使用群は開始時の体重が維持したが、未使用群では低下傾向となった。

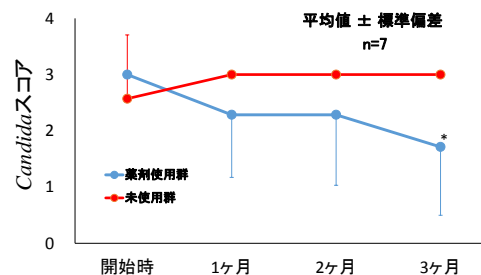


歯科医師による試験開始 4 箇月間後の口腔内環境評価では、健常人で認められていた *Candida* スコアの顕著な低下は認められなかった。一方、歯肉炎と歯垢のスコアに関しては健常人と同様に 4 箇月後には有意な差を持ってスコアが低下し、歯肉炎の改善や歯垢量の減少が示された。また、未使用群ではいずれのスコアも有意な低下は認められず、健常人と同様に高齢者における口腔ケアにおいても AMPH-B の有用性が示唆された。



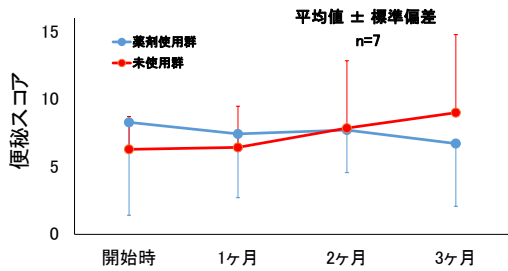
AMPH-B の口腔に対する効果として、清掃及び粘膜症状の改善が 2 箇月程度で認められた。また、口腔環境の改善に伴う全身状態への影響としては「便秘の改善」と「体重維持」が考えられた。前者に関しては全身状態の評価項目である便秘スコアに有意な変動は認められなかったが、医師や職員からの報告で、下剤使用量の低下や排便回数の低下が指摘された。このことから、全身状態の評価に関しては、その評価法を改めて再検討が必要であった。

(2) 前回の試験実施施設側からの要望により、認知症入所者を対象とした試験を実施した。改良点として、試験継続性の観点からクロスオーバー法を試みた。また、評価に関しても、口腔内は *Candida* スコアと OAG スコア、全身性として新たに設定した便秘スコア、BMI と ICF ステージ評価を用いて実施した。15 名の同意取得で開始したが、7 箇月間継続できたのは 7 名のみ、8 名が体調不良などにより試験を中止した。しかし、前回の試験では確認できなかった *Candida* スコアは、3 箇月時点で薬剤使用群と未使用群の間に有意差が認められた。

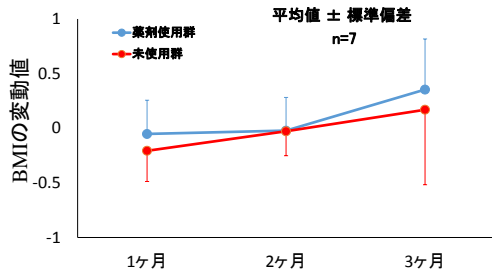


改良した便秘スコアでは有意差は認められなかったが、薬剤使用群には改善傾向、未使用群では悪化傾向となり、便秘の改善が示

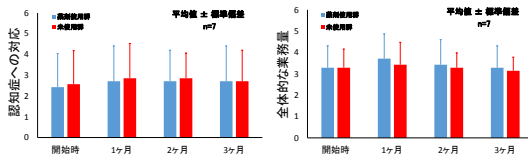
唆できた。



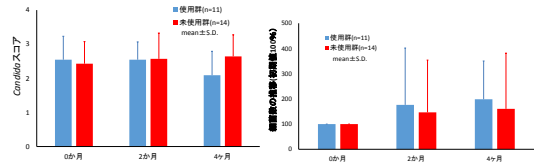
BMI についても有意差は認められなかったが、使用群は未使用群と比較して、常に高い値を示した。



一方、OAG や ICF のステージ評価は、被験者の状態を示す指標には成り得るが、各スコアの状態変化が大きすぎるため、適切な指標とは成りえなかった。例として、歯石やう蝕は歯科医師などの治療介入がないと改善しない症状の評価は不適切であり、評価系には課題が残った。また、認知症への対応や業務量について、被験者毎に評価担当者を設定して評価したが有用性は認められなかった。この要因として、介護状態に問題がある方を評価対象としていないこと、また、担当者も被験者のみに特化できるわけではないので適切な評価なのは疑問との意見が施設側からも挙げられ、評価方法も含め AMPH-B による口腔ケアが介護負担を軽減するかについても今後の課題として更なる検討が必要となった。



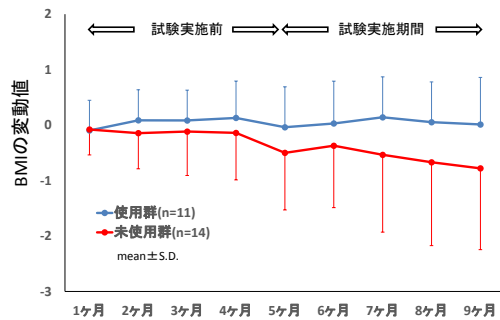
(3) AMPH-B の継続使用により、歯垢抑制が高齢者でも認められることから、真菌数と細菌数との関連を検討した。実施施設は口腔ケアに注力していることから本研究に興味を示し、実施協力を申し出た施設で、これまでとは異なるの施設で実施した。薬剤使用群として 15 名、未使用群が 15 名で開始したが、使用群で 4 名、未使用群で 1 名が 4 箇月間の試験期間中に除外対象となった。結果として、*Candida* スコア及び細菌カウントによる細菌数の有意な低下は確認できなかった。



今回実施した施設は、口腔ケアに注力しており、入所者の口腔清掃状態は良好であった。これに反し、初期の *Candida* スコアはいずれも高く、口腔清掃状態と *Candida* 数の相関は無いことも改めて確認できた。予備検討を含め試験開始前に 2 回、開始後 2 箇月毎に施設を訪問して検査したが、想定通りにはならなかった。

この試験では、薬剤使用群は 45 名のユニットすべてに投薬し、同意が得られている 15 名のみを検診する方法で実施した。薬剤使用者への AMPH-B による歯磨きは入所者自身が実施し、介護士が仕上げ磨きを行う体制であったが、その中の 1 名だけが完全介護で、介護士がすべての清掃を対応していた。その被験者の *Candida* スコアは経時的に低下し、細菌数もそれに連動して低下しており、45 名という大人数を対象とした試験実施方法自体に問題があると考えられた。

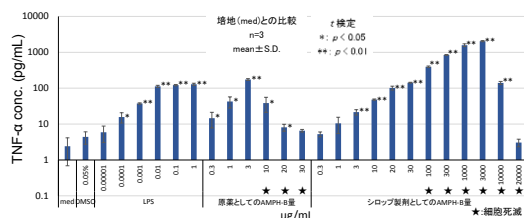
一方、BMI については試験実施前期間と実施期間での推移について、これまでの試験結果と同様に薬剤使用群は体重を維持しており再現性が示された。



(4) AMPH-B の抗真菌作用以外の効果について、1 回 AMPH-B 5mg という用法・用量を考慮し、その使用濃度での培養細胞に対する作用を確認した。なお、AMPH-B は難溶性であり、水やアルコールにもほとんど溶解せず、製剤での AMPH-B は固体分散した懸濁状態のものである。

この結果、AMPH-B 原薬とシロップ製剤中の懸濁した AMPH-B では THR-1 細胞への作用が異なり、原薬では 10 μ g/mL で細胞に障害を与えるのに対し、シロップ製剤では同濃度における TNF- α の産生量は 1/3 程度だが、用量依存的に 3mg/mL まで TNF- α の産生量が増加し、原薬で得られる量の約 20 倍の TNF- α が産生されることが確認された。また、本研究で用いる AMPH-B の濃度は 1 回 5mg であり、10mL の溶液で含嗽した場合、0.5mg/mL となり、約 1000pg/mL の TNF- α 産生が期待できることが確認できた。AMPH-B が溶解した状態と懸濁状態で細胞への作用が異なることなど

検討の余地は多いが、我々が設定した AMPH-B の用法・用量において、リポ多糖 (LPS) 以上に Toll 様受容体を介した自然免疫を活性化させる可能性が強く示唆された。また、1 回 100mg とする日局が定めた AMPH-B 製剤での用量では、TNF- α の産生亢進は認められず、口腔での最適な用法用量ではないと考えた我々の判断を支持する結果であった。



以上の結果から、口腔環境の最適化が全身の健康に寄与すると言う仮説について、試験系や評価系に課題は残したが、AMPH-B を口腔ケアに用いることで、口腔内の真菌数の減少、それに伴う歯垢抑制、清掃状態や粘膜症状の改善による口腔環境の健全化が確認できた。さらに、便通の改善や体重維持、自然免疫の活性化の可能性など示され、全身の健康維持を支持する結果が得られた。

<引用文献>

- ①米山武義、要介護高齢者に対する口腔衛生の誤嚥性肺炎予防効果に関する研究、日本歯科医学会誌 20、pp. 58-68、2001
- ②吉田稔、好中球減少患者における診療指針、Jpn. J. Med. Mycol 45、pp. 209-215、2004
- ③山口英世、病原真菌と真菌症 改訂 4 版 南山堂、2007
- ④大西淑美、高齢者施設入所者の口腔内実態調査—口腔環境とカンジダとの関連—、日本歯科衛生学会雑誌 3(2)、pp. 50-56、2009
- ⑤新見昌一、口腔カンジダ症の基礎および臨床的問題について、the Quintessence 20(8)、pp. 105-114、2001
- ⑥西川朱實、カンジダの菌学、真菌誌 48(3)、pp. 126-128、2007
- ⑦Peter G. Pappas(監訳：三嶋 廣繁)、Treatment Guidelines for Candidiasis(カンジダ症治療の実践的臨床ガイドライン米国感染症学会による 2009 年改訂版)、Clinical Infectious Diseases 48、pp. 503-535、2009
- ⑧羽山和美、口腔および胃内カンジダ感染モデルマウスにおける Lactobacillus pentosus S-PT84 株加熱死菌体の感染防御効果、医真菌学会誌 55(3)、pp. 123-129、2014

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ①山本共夫、原田雷太郎、横田綾子、小関翔子、以下を省略 4 名、4 番目、抗真菌薬添加含嗽薬による口腔内真菌を減少させる試み、日本口腔ケア学会雑誌、査読有、Vol. 13、No. 1、2018、掲載予定
- ②木村陽介、山本共夫、草塩英治、前田伸子、抗真菌剤の長期使用は歯垢量を減少させる、歯科薬物療法、査読有、Vol. 36、No. 1、2017、pp. 9-14、DOI: 10.11263/jsotp.36.02

- ③前田伸子、総説 常在真菌 Candida の病原性—カンジダ症とその対応—、歯科薬物療法、査読有、Vol. 35、No. 3、2016、pp. 115-122、https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsotp/35/3/35_16.14/_pdf

[学会発表] (計 5 件)

- ①草塩英治、介護老人施設における口腔ケアに抗真菌薬を導入した場合の効果とその問題点、第 39 回関東医真菌懇話会、2018
- ②前田伸子、介護老人施設における口腔ケアに抗真菌薬を導入した場合の効果とその問題点、真菌症フォーラム第 24 回学術集会、2018
- ③小関翔子、抗真菌薬を用いた口腔ケアの有用性と今後の展望～QOL 向上を目指して～、第 27 回全国介護老人保健施設大会、2016
- ④横田綾子、経管栄養を受けている入所者の口腔ケアについて、第 13 回日本口腔ケア学会総会・学術大会、2016
- ⑤前田伸子、抗真菌薬添加含嗽薬による口腔ケアの有用性の確認、第 13 回日本口腔ケア学会総会・学術大会、2016

[図書] (計 1 件)

- ①前田伸子他、日本歯科薬物療法学会口腔カンジダ症薬物療法ガイドライン制定委員会編、医歯薬出版株式会社、口腔カンジダ症薬物療法の指針、2016、72(1-6)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 伸子 (MAEDA, Nobuko)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：10148067

(2) 研究協力者

山本 共夫 (YAMAMOTO, Tomoo)
木村 陽介 (KIMURA, Yosuke)
渡邊 仁史 (WATANABE, Hitoshi)
原田 雷太郎 (HARADA, Raitaro)
横田 綾子 (YOKOTA, Ayako)
小関 翔子 (KOZEKI, Shoko)

草塩 英治 (KUSASHIO, Eiji)