

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659483

研究課題名（和文） 口腔粘膜疾患におけるカンジダ菌種の網羅的解析による新たな口腔ケア治療戦略

研究課題名（英文） Detection and identification of *Candida* species in oral mucosal lesions for new oral care treatment

研究代表者

笹野 高嗣 (SASANO TAKASHI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：10125560

研究成果の概要（和文）：

口腔扁平苔癬（OLP）の病因として微生物の感染、特に*Candida albicans*の関与もその一つである。そこで本研究では、OLPについて分子生物学的手法を用いて*Candida* speciesの網羅的検出を試み、OLPの病態との関係を検討することを目的とした。結果はOLP患者と健常者において口腔細菌叢ではCFU値に有意差が無かったが、*Candida* speciesの検出率は、OLP患者で有意に高かった。non-*C. albicans*は、OLP患者からは検出されたが健常者からは検出されず、特に *C. glabrata*が重要な意義があると思われる、この菌種が他の*Candida*にはない病原性を有する可能性が示唆され、*Candida* speciesの同定には分子生物学的レベルで検索することが必須と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Candida species were detected and identified in samples from the buccal mucosa, dorsal surface of the tongue and supragingival plaque of subjects with oral lichen planus (OLP). The *Candida* in the samples were cultured on selection agars, and identified by sequence analyses of 18S, 5.8S and 25/28S rRNA. The isolation frequency of *Candida* was higher in subjects with OLP than in those with healthy oral mucosa.

Non-*C. albicans* were only isolated from people with OLP. These results support the notion that subjects with OLP are more likely to have oral colonization with *Candida*, and that non-*C. albicans* are specifically present in subjects with this condition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	0	1,500,000
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	150,000	3,350,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：カンジダ菌種、口腔粘膜疾患、口腔ケア、口腔扁平苔癬

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学的手法の発展に伴い、カンジダ菌種（以下、*Candida species*）の同定は遺伝子レベルで行われるようになり、*Candida albicans* 以外のいわゆる non-*C. albicans* の検出が可能となり、これら non-*C. albicans* と感染症との関係が次第に明らかになってきている（Kaur et al : Curr Opin Microbiol 2005, Davies et al : Oral Oncol 2006, Li et al : Oral Microbiol 2007）。

口腔カンジダ症には偽膜性カンジダ症、肥厚性カンジダ症、萎縮性カンジダ症があるが、中でも萎縮性カンジダ症は定型的な所見がないために診断に苦慮することが多い。遺伝子レベルによる *Candida species* の同定はその診断のキーとなる可能性が高い。

一方、多くの口腔粘膜疾患は難治性であり臨床経過も長く、疼痛症状による摂食障害など患者のQOLを損ねる大きな要因となっている。これら口腔粘膜疾患の原因および発現機序については未だ不明であり、十分な治療法も確立されていなかった。

我々は、口腔粘膜疾患と *Candida Species* の関連について遺伝子レベルで検索し、口腔扁平苔癬の発症に non-*C. albicans* が関与していることを最近突き止めた（後述）。それまで培養レベルで行われていた *Candida Species* の同定に対して、分子生物学的手法を用いて解析した我々の研究は、新規性が高く、このような研究は国内・国外を問わず皆無である。口腔扁平苔癬以外の口腔粘膜疾患にも non-*C. albicans* が関与している可能性は高く、研究の発展性が期待できると思われた。

2. 研究の目的

本研究では、①口腔粘膜疾患患者（口腔扁平苔癬、移植片対宿主病：GVHD、白板症、口腔カンジダ症、非特異的口内炎など）、②口腔癌（頭頸部癌）患者、③摂食障害患者等（後述）について、口腔内 *Candida Species* を遺伝子レベルで解析し、口腔粘膜疾患の要因となる *Candida Species* を多面的要素において解析することにより、研究期間内に新たな口腔粘膜疾患治療法を確立するとともに、*Candida* 制御による新たな口腔ケア戦略を構築する。

3. 研究の方法

口腔粘膜疾患（口腔扁平苔癬、口腔カンジダ症、白板症、非特異的口内炎など）、および全身疾患を有する患者の口腔粘膜をスワブにて採取し、クロモアガー・カンジダ培地を用いて培養後、PCR-RFLP法を用いて遺伝子レベルでの *Candida Species* の同定を行う。さらに、Suquence解析を行い *Candida Species* の遺伝学的系統樹を作製し、口腔粘膜疾患に関与する *Candida Species* の遺伝学的類似性を解析するものである。検体の採取にあたっては、患者さまに本研究の主旨について十分な説明をし、インフォームド・コンセントを得た上で行う。

4. 研究成果

本研究は、口腔粘膜疾患とカンジダ菌種（*Candida speceis*）関連について遺伝子レベルで解析することにより、難治性口腔粘膜疾患に対する新たな抗真菌療法を確立するとともに“口腔カンジダの制御による口腔ケア”という新規概念を提言、実証することを目的とした。本年度は、以下の口腔内 *Candida Species* を 培養レベル（クロモ

アガー・カンジダ培地による)で検索した。

(1) 口腔粘膜疾患患者 (口腔扁平苔癬、移植片対宿主病: GVHD、白板症、口腔カンジダ症、口腔乾燥症、非特異的口内炎など) では、41名中21名に *C. albicans* が検出され、1名に non *C. albicans* が検出され、口腔カンジダの検出率は55%であった。

(2) 頭頸部癌放射線治療の主な急性合併症は粘膜炎、口腔乾燥、感染症などである。従って、口腔粘膜を健全に保つことが、頭頸部癌放射線治療患者の口腔ケアに必須であると考えられる。既に我々は、頭頸部癌放射線治療患者の口腔ケアを行ない、良好な口腔衛生状態が放射線粘膜炎を軽減させることを報告している。しかしながら、口腔ケアの方法は口腔細菌 (プラーク) 除去に主眼が置かれていた。そこで今回は、頭頸部癌放射線治療患者の口腔ケアの効果を口腔カンジダ菌と口腔粘膜症状との観点から検討し若干の知見が得られたので報告する。

【対象】2009年11月から2010年8月に口腔ケアを目的に当診療室を受診した頭頸部癌患者16名 (放射線治療単独6名、化学療法併用10名)。

【方法】口腔ケア: 対象となる患者には毎食後、歯ブラシ・歯間ブラシ・スポンジブラシによるセルフケアを行なってもらった。また歯科医師・歯科衛生士による専門的口腔ケアを概ね週に1回の頻度で行なった。

検体の採取・培養: 口腔内よりスワブで検体を採取し、CHROM アガーカンジダ培地で36°C48時間培養し、カンジダ菌の判定を行なった。

臨床症状の評価: 粘膜炎の grade、放射線治療の休止の有無、治療期間を通しての体重減少について評価した。

【結果】カンジダ菌が検出された群 (検出群) は13名 (81.2%)、カンジダ菌が検出されなかつ

た群 (非検出群) は3名 (18.8%) だった。Grade3以上の口腔粘膜炎がみられた患者は10名 (62.5%) で、そのうち検出群は9名 (90%) と Grade3以上の口腔粘膜炎においては検出群が有意に多かった。また、Grade3以上の口腔粘膜炎における治療内容との関係では、放射線治療のみの症例では全て検出群であり、口腔粘膜が広く照射野に含まれており、検出されたカンジダ菌種は *Candida albicans* 以外のカンジダ菌、いわゆる non-*C. albicans* が含まれていた。化学療法との併用では全て非検出群であった。放射線治療の休止があったのは2名 (12.5%) でいずれも検出群であった。体重減少はカンジダ検出群と非検出群で統計学的有意差はみられなかった。

【考察】本研究結果より、頭頸部癌放射線治療患者では口腔カンジダ菌を制御することによる口腔粘膜のための口腔ケアという概念の必要性が示唆された。

(3) 全身疾患を有する患者では、シェーグレン症候群患者58名中8名に *C. albicans* が検出され、1名に non *C. albicans* が検出され、6名に *C. albicans* と non *C. albicans* の両方が検出され口腔カンジダの検出率は25%であった。

(4) 正常コントロールとしては、80名中6名に *C. albicans* が検出され、1名に non *C. albicans* が検出され口腔カンジダの検出率は8.7%であった。以上より、培養レベルでは口腔カンジダの検出率は頭頸部癌放射線治療患者・口腔癌患者 > 口腔粘膜疾患患者 > シェーグレン症候群患者 > 正常コントロールの順に多く検出され、口腔カンジダの制御による口腔ケアの必要性が示唆された。

(5) 口腔扁平苔癬 (OLP) の病因として微生物の感染、特に *Candida albicans* の関与もその一つである。近年、分子生物学手法の発展に伴い、non-*C. albicans* の検出が可能となり、各種感染症との関与が明らかになってきているが、non-*C. albicans* の OLP への関与は未だ不明である。そこで本研究では、OLP について分子生物学的手法を用いて *Candida* species の網羅的検出を試み、OLP の病態との関係を検討することを目的とした。

【対象および方法】 OLP 患者 15 名、健常者 7 名について、頬粘膜、舌、歯垢から得た試料を培養し、CFU 値を算定後、分子生物学的手法を用いて解析した。

【結果】 OLP 患者と健常者において口腔細菌叢では、CFU 値に有意差が無かったが、*Candida* species の検出率は、OLP 患者で有意に高かった。non-*C. albicans* は、OLP 患者 15 例中 4 例から検出され、健常者からは検出されなかった。non-*C. albicans* として、*Candida glabrata*, *Candida fukuyamaensis*, *Candida parapsilosis* が認められた。尚、*C. glabrata* は、non-*C. albicans* が検出された OLP 患者 4 名全員より検出された。また、*Candida* species の sequence 解析により系統樹を作成した結果、検出された non-*C. albicans* のうち *C. glabrata* が *C. albicans* と他の non-*C. albicans* とは、遺伝学的に遠いグループに属していた。

【考察】 *C. glabrata* の病原性については不明であるが、この菌種が他の *Candida* にはない病原性を有する可能性が示唆された。また、*Candida* species の同定には分子生物学的レベルで検索することが必須と考えられた。

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 1 件)

Mika Masaki, Takuichi Sato, Yumiko Sugawara, Takashi Sasano, Nobuhiro Takahashi. Detection and identification of non-*Candida albicans* species in human oral lichen planus. Microbiol Immunol (査読あり)55, 2011, 66-70.

[学会発表] (計 1 件)

斎藤 美紀子、菅原 由美子、笹野 高嗣、勝良剛詞、林 孝文. 頭頸部癌放射線治療患者における口腔カンジダ菌の解析による口腔ケアの評価. 第 7 回日本口腔ケア学会, 2010 年 11 月 28 日, 大阪.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹野 高嗣 (SASANO TAKASHI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：10125560

(2) 研究分担者

菅原 由美子 (SUGAWARA YUMIKO)
東北大学・病院・助教
研究者番号：30235866

齋藤 美紀子 (SAITOU MIKIKO)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：90401760

酒井 梓 (SAKAI AZUSA)
東北大学・病院・医員
研究者番号：90463778

佐藤 恭子 (SATOU KYOKO)
東北大学・病院・医員
研究者番号：80547266

庄司 憲明 (SHOJI NORIAKI)
東北大学・病院・講師
研究者番号：70250800

(3) 連携研究者

()

研究者番号：