

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15日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792121

研究課題名（和文） 要介護高齢者の各種真菌の口腔感染状況と全身の健康との関連の解明

研究課題名（英文） Relationship between oral fungal infection in institutionalized elderly adults and their systemic health

研究代表者

富岡 未記子（TOMIOKA MIKIKO）

九州大学・歯学研究院・研究員

研究者番号：70546473

研究成果の概要（和文）：

本研究により療養型医療施設・高齢者施設入所高齢者291名の口腔内に生息する真菌種が特定され、脆弱な高齢者の口腔には *Candida* 菌のみならず *Malassezia restricta* をはじめとする多様な真菌が存在していることが明らかになった。さらに健常者の口腔における主要な真菌種である *C. albicans* 以外の真菌の過増殖を起こしている被験者は高頻度に発熱している者が有意に多く、脆弱な高齢者における口腔真菌分布と健康状態との関連性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This investigation examined oral fungal diversity of 291 institutionalized elderly adults, and revealed that the oral cavity of the elderly is inhabited by a diverse array of fungi not limited to typical *Candida* species. The subjects with oral fungal overgrowth other than *C. albicans* had an increased risk of fever, suggesting that the diversity in distribution is associated with health status in the elderly.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：予防歯科学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：真菌、Internal transcribed region、高齢者、口腔フローラ

1. 研究開始当初の背景

口腔には様々な微生物が複雑な相互作用に基づく生態系（フローラ）を構築して生息しており、真菌もその主要な構成要素の

一つである。ヒトの口腔における最も優勢な真菌は *Candida* 属であり、中でも *Candida albicans* が、次いで *C. glabrata*、*C. tropicalis* などが大勢を占めているとされ

る。これらの真菌は正常フローラの一員であり存在そのものは問題とされることはないが、過剰な増殖を伴った場合には様々な粘膜症状を引き起こすことが知られている。特に宿主の抵抗性が低下した易感染性の患者においては、真菌の極度の増殖に伴った強い疼痛や灼熱感が摂食を阻害することで低栄養状態を招くことがあり、侵襲性の感染を引き起こす場合には死に至ることもある。易感染状態に陥りやすい脆弱な高齢者が急増する我が国においては、口腔常在真菌の健康への関与についての理解が急務とされている。

従来口腔真菌に関する研究の多くは、主として培養法を用いて行われてきた。一方で近年、真菌 ribosomal RNA (rRNA) オペロンの Internal transcribed spacer (ITS) 領域を用いた分子生物学的細菌構成解析法が確立され、その塩基配列データベースが充実してきたことで、培養困難な菌種を含めたより網羅的な真菌群集解析が可能になった。本遺伝子領域はほとんど全ての真菌に存在し、rRNA遺伝子上には真菌共通配列が存在することから、これをプライマーとした微生物群集から直接抽出した DNA に対する PCR法によって異なる様々な真菌種由来のものを同時に回収することができる。加えて、本遺伝子領域は真菌種の系統分類において有用な塩基配列多様性をもつ。最近、口腔含嗽液に含まれる真菌群集構成について、この手法と一度に大量の塩基配列解読が可能な次世代シーケンサーを用いた解析が行われ、若年ないし壮年の被験者20名の検体から101種もの真菌に該当する ITS 領域が検出された。このことは、ヒトの口腔には *Candida*にとどまらず、様々な真菌種が存在していることを明らかにしている。

高齢者は慢性疾患、投薬、口腔衛生状態

の悪化、唾液量の減少、免疫力の低下といった様々な真菌増加要因を持つことから、真菌感染に対して若年者に比べて脆弱であるとされる。一方で我々が知る限り、高齢者の口腔真菌構成について DNA を用いた網羅的な解析法で調べた報告はない。高齢者の口腔ではこれまで考えられてきたように *Candida* 属の典型的な菌種ではなく、未だ培養されていない菌種も含めた予想外の真菌が優位になっている可能性も考えられる。

2. 研究の目的

本研究では療養型医療施設および高齢者施設長期入所している高齢者 291 名の舌背に在る真菌群集について、まず ITS1 領域を利用したリアルタイム PCR 法を行い、量についての評価を行った。続いて、舌苔検体あたり 10^5 CFU 以上の多量の真菌が認められた者について ITS1-5.8S- ITS2 領域の断片長多型を利用した Length heterogeneity PCR (LH-PCR) 法により真菌構成を評価し、得られた断片の塩基配列を決定することでその菌種構成を同定した。さらにそれぞれの真菌群集の構成と検体採取前後 1 年間における発熱日数との関係について検討を行った。本研究は脆弱な高齢者の口腔内に生息する真菌構成の把握とそれらの健康状態との関連性についての解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 調査対象

本研究では平成 19 年 10 月から 12 月に大牟田市内の療養型医療施設 (4 施設) に過去に半年以上入院歴のある者、および同市内の高齢者施設 (7 施設) に過去に半年以上入所歴のある者から 65 歳以上の高齢者 291 名 (男性 58 名、女性 233 名、平均年齢

85.7 ± 7.4 歳) を対象とした。

(2) 舌苔の採取と DNA 調製

舌苔試料は、舌背の有郭乳頭から舌尖部にかけての付着物を滅菌済みプラスチックスパチュラにて可及的に採取し、500 µl の lysis buffer に懸濁した。氷上で保管しながら当日の夜までに実験室に持ち帰り、DNA 調製を行うまで -30°C で凍結保存した。

舌苔試料中に含まれる DNA の抽出にはジルコニアビーズを用いた震盪破砕法を用い、フェノールクロロフォルム処理のあとエタノール沈殿を行った。

(3) 舌苔に含まれる真菌群集の評価

舌苔に含まれる真菌群集の量的ないし質的評価には、真菌 rRNA オペロンの ITS 領域を用いた分子生物学的細菌構成解析法を用い、量的評価には ITS1-5.8S-ITS2 領域を利用した。

① 舌苔に含まれる総真菌数の算出

舌苔に含まれる総真菌数の算出にはリアルタイム PCR 法を用いた。1 µl のテンプレート DNA に対し、12.5 µl の QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany) と各 50 pmol の真菌共通配列のプライマー ITS1-F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') と 5.8s (5'-CGC TGC GTT CTT CAT CG-3') に滅菌蒸留水を加えて総量 25 µl として PCR 反応を行った。反応条件は、95°C10 分の予熱の後、95°C3 秒、65°C30 秒での 60 サイクルとした。10³、10⁴、10⁵、10⁶ CFU 相当の *Candida albicans* (TIMM No. 3169) から抽出した DNA について同時に反応を行い、それらの Ct 値と各検体の Ct 値とを比較することにより各検体あたりの総真菌数を算出した。

② 舌苔中の真菌構成の評価

舌苔に含まれる真菌構成の評価には、

ITS1-5.8S-ITS2 領域の断片長多型を利用した LH-PCR 法を用いた。実際の被験者から得られた検体について解析を行う前に、口腔から検出された報告のある真菌株を用いて本手法による識別が可能であるか確認を行ったのち、各舌苔検体から抽出した DNA 検体についてキャピラリー電気泳動を用いた LH-PCR 解析を行うため、蛍光色素 6-FAM で 5'末端を標識した ITS4 と ITS1-F を用い KOD Plus Ver. 2 DNA ポリメラーゼで ITS1-5.8S-ITS2 領域の増幅を行った。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見なし全 128 名の LH-PCR プロフィールをアラインメントした。

LH-PCR 解析において 10 人以上の被験者で検出された ITS1-5.8S-ITS2 断片、もしくはピーク面積が 10% ないしそれを超えるピークとして検出されることのあった断片については、それらの塩基配列を決定し由来する真菌種の特定を行った。該当する断片のピーク面積割合が 128 名の LH-PCR プロフィールのなかで最も大きかった被験者を選び、その DNA サンプルを鋳型として蛍光色素標識を伴わない ITS4 と ITS1-F の両プライマーを用いて PCR 法で同領域を再度増幅しクローニングを行ったのち塩基配列を決定した。さらに BLAST を用いて該当する塩基配列に相当する真菌種を検索した。99% 以上配列が一致したもののの中に既に培養同定が行われている菌種が存在する場合にはその菌種とみなした。

(4) 統計解析

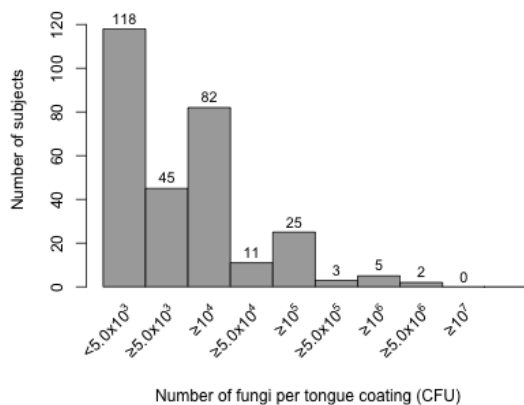
真菌分布と発熱との関連について検討するため統計解析を行った。発熱状況は 7 日以上と 6 日以下に分類し、前者を高頻度発熱群、後者を低頻度発熱群とした。真菌量、

真菌構成と発熱状況の関連の解析にはカイ二乗検定を用いた。さらに多変量ロジスティック回帰分析を用いてその他の発熱関連因子の影響を調整しながら真菌構成と発熱状況との関連について検討した。これらの解析には The Statistical Package for the Social Sciences (version 19.0 for Windows, IBM SPSS Japan) を用いた。

4. 研究成果

(1) 舌背上の真菌群集の定量

舌背上の総真菌量は ITS1 領域を利用したリアルタイム PCR 法を用いて測定した。291 名の長期入院・入所高齢者の各舌苔検体から得られた真菌 DNA 量は 10^1 – 10^7 CFU の *C. albicans* から抽出した真菌 DNA 量に相当するものであった。そのうちの 128 名の検体では真菌量が 10^4 CFU 以上に相当し、35 名は 10^5 CFU 以上に相当した。

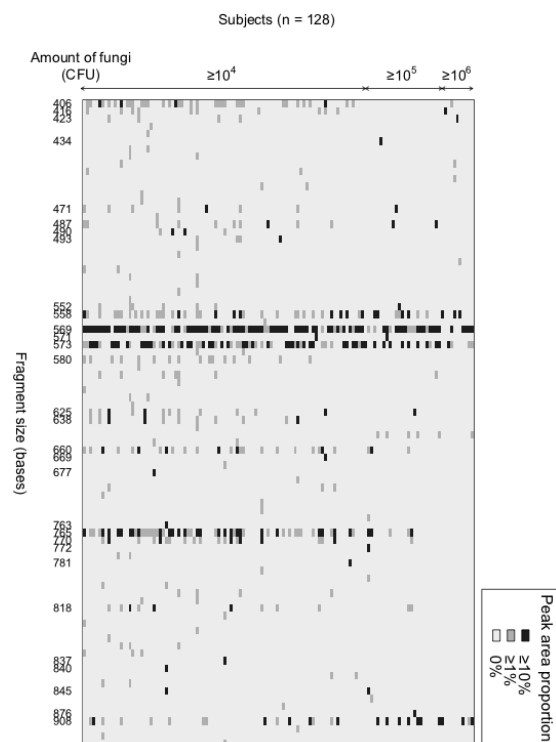


(2) LH-PCR 解析による口腔真菌識別能の確認

キャピラリー電気泳動を用いて増幅断片の分離を行った。表 2 にキャピラリー電気泳動において測定された各菌種由来の断片長を示す。測定された断片長は配列から予測される断片長との間に差異が認められるものの各菌株の 3 回の泳動における誤差 (レンジ) は平均 0.26 ± 0.18 塩基と非常に小さく、キャピラリー電気泳動を用いるこ

とでこれら 10 菌種を十分に識別できることが明らかになった。

(3) 舌背上の真菌群集の菌種構成の評価
定量 PCR 解析で検体あたり 10^4 CFU 以上の真菌が認められた被験者 128 名について、キャピラリー電気泳動を用いた LH-PCR 解析により真菌群集構成の評価を行った。以下に本集団の LH-PCR プロフィールをゲル泳動像様の図として示す。128 名の被験者 (横軸) からは 406 塩基から 935 塩基までの位置に 86 種類のピーク (縦軸) が検出された。このうち 14 のピークは 10 人以上の被験者で検出された。また、最低でも 1 名の被験者にピーク面積が 10% 以上で検出されることがあるピークが 29 存在した。



上記の条件 (10 人以上の被験者で検出されるもの、もしくはピーク面積が 10% ないしそれを超えるピークとして検出されることがあるもの) を満たす 30 のピーク (13 のピークは上記の条件をともに満たす) については塩基配列を決定し、由来する菌種

の同定を行った。該当する真菌種を表に示す。

表 3 LH-PCR 解析における各断片に相当する真菌種

断片長 (塩基)	被験者数 (%)	各断片に相当する真菌種
569	105 (82.0)	<i>Candida albicans</i>
573	76 (59.3)	<i>Candida dubliniensis</i>
765	56 (43.7)	<i>Malassezia restricta</i>
558	45 (35.1)	<i>Candida tropicalis</i>
660	26 (20.3)	Uncultured basidiomycete clone BF-OTU192 (99%)
908	26 (20.3)	<i>Candida glabrata</i>
770	20 (15.6)	Uncultured fungus clone D0-30a_14 (99%)
580	16 (12.5)	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
625	13 (10.1)	<i>Aspergillus oryzae/flavus</i>
487	12 (9.3)	<i>Dipodascus capitatus</i>
416	11 (8.5)	<i>Candida lusitanae</i>
818	11 (8.5)	Uncultured basidiomycete clone BF-OTU205 (99%)
638	11 (8.5)	<i>Candida guilliermondii</i>
552	7 (5.4)	<i>Candida parapsilosis</i>
423	5 (3.9)	<i>Saccharomycetales</i> sp. LM475 (99%)
493	4 (3.1)	<i>Candida apicola</i>
571	2 (1.5)	<i>Candida dubliniensis</i>
845	2 (1.5)	<i>Malassezia cuniculi</i> (86%)
763	1 (0.7)	<i>Malassezia restricta</i>
434	1 (0.7)	<i>Candida rugosa</i>
876	1 (0.7)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
669	1 (0.7)	<i>Debaryomyces hansenii</i>
837	1 (0.7)	Uncultured basidiomycete clone BF-OTU202 (98%)
772	1 (0.7)	Uncultured eukaryote clone N307T_248 (99%)
840	1 (0.7)	Uncultured fungus clone FITS_HBP1_BW01 (88%)
677	1 (0.7)	Uncultured basidiomycete clone BF-OTU190 (99%)
781	1 (0.7)	Uncultured eukaryote clone N307T_248 (94%)

10 人以上の被験者で検出されるピークもしくはピーク面積が 10%ないしそれを超えるピークとして検出されることがあったピークについてのみ示した。

* 検体あたり 10⁴ CFU 以上の真菌が認められた 128 名に対する比率を示した。

高齢者の健康状態と口腔内の真菌群集との関連について検討するために、1 年間の観察期間の間に 7 日以上発熱を認めた者 (高頻度発熱群、67 名) と発熱日数が 6 日以下だった者 (低頻度発熱群、224 名) について真菌の感染状況の比較を行った。結果を表に示す。総真菌数は発熱状況とのあいだに有意に関連が認められた。高頻度発熱群では検体あたり 10⁵ CFU 以上の真菌が存在する被験者の数が低頻度発熱群に比べて明らかに多かった。一方で検体あたり 10⁴ CFU 以上の真菌を有する被験者における各真菌種の検出と発熱状況との間には有意な関連が認められなかった。しかしながら検体あたりの総真菌数が 10⁵ CFU 以上と真菌の過増殖が起きている被験者において *C. albicans* 以外の真菌が検出される場合、特に *C. glabrata* や *C. tropicalis* が検出される場合には発熱との有意な関連が認めら

れた。

以前の研究において報告したとおり、本集団においては舌苔の湿潤度、義歯の使用、身体活動性、痴呆、嚥下障害、抗生剤の使用、口腔常在細菌叢の構成といった因子は発熱状況と有意な関連が認められた。これら交絡因子の影響を調整するために、多変量ロジスティック回帰分析を行ったところ、*C. albicans* 以外の真菌が検体あたり 10⁵ CFU 以上認められる被験者では、総真菌数が 10⁵ CFU 未満の被験者に比べ有意に発熱リスクが高いことが示された (オッズ比 18.0; 95%信頼区間, 2.8-117.4; P = 0.002)。一方で検体あたり 10⁵ CFU 以上の真菌が認められても *C. albicans* が認められた場合には有意な発熱リスクの上昇は認められなかった。

表 6 各変数における発熱のオッズ

各独立変数	多変量オッズ比 (95%信頼区間)	p値
真菌感染状況		
<10 ⁴ CFU	1	
≥10 ⁴ CFUかつ <i>C. albicans</i> 検出	1.4 (0.5-4.3)	0.566
≥10 ⁴ CFUかつ <i>C. albicans</i> 非検出	18.0 (2.8-117.4)	0.002
年齢	1.0 (0.9-1.0)	0.793
性別		
男性	1	
女性	1.7 (0.6-4.3)	0.298
舌苔量		
なしまたは少量	1	
中程度以上	2.2 (1.0-5.1)	0.059
舌苔湿潤度, mm		
≥5	1	
1.0-4.9	3.2 (1.3-7.4)	0.010
<1.0	14.3 (4.5-45.5)	<0.001
義歯の使用		
使用	1	
未使用	0.7 (0.3-1.7)	0.451
身体活動性, 人数 (%)		
歩行可能	1	
座位可能	1.9 (0.5-7.3)	0.331
寝たきり	3.8 (0.9-15.7)	0.069
痴呆		
軽度	1	
重度	1.6 (0.7-3.8)	0.299
嚥下機能		
問題なし	1	
経口可能	2.7 (1.1-6.7)	0.028
経管	14.0 (3.3-59.9)	<0.001
舌苔細菌叢構成パターン		
クラスター A	1	
クラスター B	3.0 (1.1-8.0)	0.029
クラスター C	2.4 (0.6-9.6)	0.223
クラスター D	3.6 (0.9-13.7)	0.064
抗菌薬投与, 日数		
0	1	
1-4	3.9 (1.2-12.6)	0.023
≥5	5.5 (1.4-21.7)	0.015

本研究における真菌ゲノム DNA の ITS 領域を用いた網羅的真菌群集解析により、

施設入所高齢者の口腔内真菌構成の全体像が明らかになった。本集団においては *C. albicans* が最も高頻度で検出され、これに *C. dubliniensis*、*C. tropicalis*、*C. glabrata* といった典型的な口腔カンジダ菌が続き、これらの点は培養法を用いて行われた過去の数多くの報告と一致していた。一方で、*M. restricta* や未だ培養同定されたとの報告がない *Candida* 属以外の真菌種も比較的高頻度かつ高比率で検出された。以上の結果から高齢者の口腔にはいわゆる口腔カンジダ菌に限らず多様な真菌が生息していることが明らかになった。

観察期間中の発熱日数を被験者の健康状態を示すパラメーターとして真菌種構成との関連について検討を行ったところ、舌苔検体あたりの総真菌量と発熱状況との間には関連が認められ、さらに真菌の過増殖(総真菌数が検体あたり 10^5 CFU 以上) が認められた場合、*C. tropicalis* もしくは *C. glabrata* の検出と発熱との間に有意な関連が認められた。しかし、過増殖の場合でも口腔において最も優位な *C. albicans* が検出されると関連が認められなかった。このような *Candida* 菌種による発熱リスクの違いは、その他の発熱関連因子を調整した多変量ロジスティック解析の結果においても確認された。これらの結果から安直に *C. albicans* に比べて *C. albicans* 以外のカンジダ菌のほうが有害であると結論づけるのは拙速であるが、近年 non-*albicans Candida* の病原性を指摘する報告は数多い。これらの菌種が患者の全身状態に何らかの関与をしている可能性が考えられる。もう一点興味深いのは、今回の真菌構成が以前報告した口腔細菌叢の構成パターンとは独立して発熱に関与している点である。これは細菌種と真菌種が別々のプロセスで健康状態に

影響していることを示唆している。口腔真菌の複雑な病因論を解き明かしていくことで高齢者の健康管理における新たなアプローチの確立につながっていくのではないかと考えられる。

我々の研究は、脆弱な高齢者の口腔内に存在する複雑多様な真菌群集の構成を明らかにし、その健康状態への関連性を示唆した。分子生物学的手法を用いた網羅的な群集解析は今後も口腔フローラ内の真菌成分について新たな洞察をもたらしてくれるものと考えられる。

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)

(1) Li H, Takeshita T, Furuta M, Tomioka M, Shibata Y, Makimura K, Yamashita Y
Molecular characterization of fungal populations on the tongue dorsum of institutionalized elderly adults.
Oral Diseases, in press、査読あり

[学会発表] (計 1 件)

(1) 富岡未記子、岩佐康行
高齢者の舌苔中の真菌の定着と口腔および全身状態との関連性、日本老年歯科医学会第 22 回学術大会、2010 年 6 月 17 日、東京