

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

乙 第 587 号	論文提出者 藤波和華子
論文題目  <i>Candida albicans</i> と量的相関を示す デンチャープラークおよびデンタルプラーク 構成細菌属の探索	

## I. 緒言

我が国における 65 歳以上の高齢者が総人口に占める割合は 2020 年 8 月 1 日現在で 28.7%と過去最高になり、高齢化が急速に進んでいる。このような状況下で、いかに健康寿命を延ばすことができるかが、これからの歯科医療に課せられた重要な任務であると考えられる。平成 28 年歯科疾患実態調査によると、8020 運動の目標達成者の割合は 51.2%であるが、依然として高齢者における義歯装着者は年齢階級が高くなるにつれて増加し、85 歳以上で最も大きな割合を示している。有床義歯を用いた補綴歯科治療の目的は、歯や歯列の欠損によって失われた機能や審美性の回復と改善である。その際、装着された有床義歯が口腔内残存組織の不衛生や口腔機能の不調和をきたすことがあってはならない。患者が義歯装着という新しい口腔内環境に適応し、義歯と生体との調和を維持させていくためには、長期的な口腔健康管理が必要である。

近年、あらゆるライフステージにおいて口腔健康管理の重要性が認識されてきている。この口腔健康管理は、口腔清掃を含む口腔環境の改善に係わる「口腔衛生管理」と口腔機能の回復および維持・増進に係わる「口腔機能管理」の 2 つに大別される。前者の口腔衛生管理は「口腔ケア」として一般に広く認知されている。これに対し、義歯の衛生管理と機能回復に関する 2 項目を含んだ「義歯ケア」の重要性はほとんど認知されていない。

義歯を装着することにより、口腔内環境は生体の免疫機能が働きにくい方向へと変化する。例えば、唾液が持つ抗菌作用は、床下粘膜や歯の不潔域に及びにくい。また、衛生管理を怠った義歯の表面には多くのプラークが付着し、それが口臭だけでなく、残存歯のう蝕や歯周疾患、粘膜異常の原因となることは従来から指摘されてきた。さらに、義歯を装着することで、口腔カンジダ症の発症リスクが高まることも報告されている。

義歯表面に形成されるプラークはデンチャープラークと呼ばれ、デンタルプラークと同様のメカニズムで形成される口腔常在微生物から成るバイオフィームである。近年、誤嚥性肺炎を引き起こす口腔・咽頭常在レンサ球菌やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌に代表される日和見感染菌の多くがデンチャープラークから検出されており、全身疾患を引き起こすリスク要因の一つとして注目され、研究が進められている。このデンチャープラークを構成する微生物の特徴の 1 つとして、真菌である *Candida* の検出率が高いことが挙げられる。口腔内だけではなく皮膚、消化管、膣などの様々な部位に存在する常在真菌である *Candida* は、多くの真菌属の中でヒトとの関りが深い真菌である。そのうち *Candida albicans* (*C. albicans*) は局所的には口腔カンジダ症、全身的には免疫不全者に侵襲的な日和見感染症を起こす医病原真菌である。口腔常在微生物から成るバイオフィーム中では、この *C. albicans* が、デンチャープラークの主要構成微生物として多種多様な細菌種とプラーク内で共存しており、そこには何らかの真菌 - 細菌間における相互作用の存在が示唆されている。この作用がデンチャープラークの微生物構成に反映され、さらにはそのバイオフィームとしての病原性にも影響を及ぼしていると考えられる。

次世代シーケンス解析 ( Next Generation Sequencing : NGS ) の登場は、その並列処理能力の高さにより、培養に頼った従来の微生物叢研究を一変させた。以来、ヒトの様々な部位から採取された試料中の網羅的な微生物叢解析が盛んに行われ、デンチャープラークとデンタルプラークにおいても、それを構成する細菌の種類と量比に関する網羅的な解析例が 2015 年頃から報告され始めている。

そこで、本研究では NGS 技術に着目し、デンチャープラークとデンタルプラーク細菌叢に関

する解析を開始した。デンチャープラークとデンタルプラークは、多様な口腔常在微生物から成るバイオフィームであるため、同一試料中に共存する真菌と細菌とを次世代シーケンサーを用いて一括して菌叢解析を行うことが理想ではあるが、現実には困難である。その主な理由は、菌叢解析の基盤となるポリメラーゼ連鎖反応 ( Polymerase Chain Reaction : PCR ) で、増幅すべき標的配列が細菌では 16S rRNA 遺伝子であるのに対し、真菌では ITS ( Internal Transcribed Spacer ) もしくは 5.8S rRNA 遺伝子と異なるため、両者に共通のユニバーサルプライマーを用いたメタゲノム解析が困難であることにある。

そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いた 16S 細菌群集解析のデータとリアルタイム PCR 解析による *C. albicans* 定量データをリンクさせる方法を考案し、デンチャープラークおよびデンタルプラーク中の口腔常在細菌と *C. albicans* の構成パターンを解明すると共に、*C. albicans* と量的な相関を示す細菌属の同定を行い検討した。

## II. 対象および方法

### 1. 研究対象

愛知学院大学歯学部附属病院補綴科診療部にて、定期的なメンテナンスで通院中の 65~88 歳の男女各 9 名ずつ計 18 名 (平均年齢 80.3 歳) を被検者とし、デンチャープラークとデンタルプラークを採取した。装着されていた義歯の種類の内訳は、全部床義歯 1 名、全部床義歯オーバーデンチャー 8 名、多数歯欠損症例の部分床義歯 9 名であった。

デンチャープラークとして義歯研磨面 (0 群各 15 検体) と、義歯粘膜面 (I 群各 15 検体) から合計 30 検体を採取した。義歯研磨面 (0 群) では全部床義歯あるいは部分床義歯の人工歯歯頸部から検体を採取した。義歯粘膜面 (I 群) では、全部床義歯においては根面 (支台歯となる根面部またはインプラント部) と接する粘膜面部から採取し、部分床義歯においては支台歯誘導面と接する隣接面板部から検体を採取した。また、デンタルプラーク (Tooth / Implant 以下 T 群各 16 検体) の採取部位は、残存歯 (全部床義歯粘膜面と接する根面または部分床義歯隣接面板と接する支台歯誘導面) あるいはインプラント周囲とした。合計 46 検体のデンチャープラークとデンタルプラークは探針とエキスカベータを使用して採取し、採取後のプラーク検体はゲノム DNA 抽出作業まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した (本学倫理委員会承認 No. 500)。

### 2. ゲノム DNA 抽出方法

プラーク中のゲノム DNA は Master Pure DNA purification kit ( Epicentre 社、UK ) を用いて抽出した。少量のプラーク検体から細胞壁の厚い *Candida* を含めた全ゲノム DNA を効率良く抽出する方法として、①リゾチームと Proteinase K による酵素処理と超音波処理を行う従来法、②従来法+ビーズ破碎、③ビーズ破碎のみ+ZymoResearch 社のカラム精製キット使用、の三者を比較検討した。それぞれ  $30\ \mu\text{l}$  のゲノム DNA 抽出液から  $4\ \mu\text{l}$  をアガロースゲル電気泳動で解析した結果、従来法にビーズ (  $250\ \mu\text{l}$  ZR Bashing Beads、ZymoResearch 社、USA ) を用いた破碎処理 ( DeltaMixer Se-08、TAITEC 社、埼玉 ) を 3,000 rpm で 10 分間加える方法②従来法+ビーズ破碎の場合に抽出される DNA の鎖長レンジが最も広く、収量も最大になることが判明した。そこで、方法②に従い、従来法+ビーズ破碎の前処理を加えた各検体から Epicentre 社のキットを使用してゲノム DNA を抽出し、Tris buffer ( 10 mM Tris Cl、pH 8.5 ) にて終濃度

5 ng /  $\mu$ l に調製した。

### 3. メタ 16S ライブラリー調製と次世代シーケンス解析

NGS の対象配列は、全てのプラーク構成細菌ゲノム中に存在する 16S rRNA 遺伝子座の V3-V4 領域であり、前項で調製したゲノム DNA を鋳型に用いた PCR 法にて一括増幅した。NGS に使用したユニバーサルプライマーセットの塩基配列は次の通りである：フォワードプライマー 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')；リバープライマー 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')。これにフローセル結合配列 ( Bind )、検体識別配列 ( Index )、シーケンスに必要な配列 ( Seq ) を再度 PCR 法で付加し ( Nextera XT Index Primer mix, Illumina 社, USA )、メタ 16S ライブラリーを調製後、次世代シーケンサー MiSeq ( Illumina 社, USA ) を用いて塩基配列を解読した。その際、次世代シーケンサー MiSeq にて解読可能な塩基配列は一方向 301 bp であるため、両方向で解読したペアエンドシーケンスデータから重複部分を手掛かりに合成した 460 bp を V3-V4 領域として取得した。取得した大量の配列データのプロセッシングと系統分類および構成比の算出には菌叢解析ソフトの集合体である QIIME2 を用いた。まず、各配列データ (リード) を比較し、類似度の非常に高い配列集団を同一種として 1 つのグループにまとめ ( Amplicon Sequence Variants : ASVs )、その代表配列を 16S rDNA データベース Greengenes に登録された既知配列データに対して相同性検索し、各プラーク検体中の構成細菌集団を属レベルまで分類した。細菌構成比は、全 ASV の総リード数に対する属ごとのリード数の割合として算出した。次世代シーケンサー MiSeq と QIIME2 を用いた解析は北海道システム・サイエンス社 (北海道) に委託した。

### 4. プラーク細菌叢の多様性解析

NGS により算出された細菌叢構成比について、義歯研磨面 (O 群)、粘膜面 (I 群) およびデンタルプラーク (T 群) の 3 群に分け、Shannon index を指標に用いた  $\alpha$  多様性解析を行い、箱ひげ図を作成した。指標平均値の有意差検定には Wilcoxon 符号付き順位和検定を用いた。さらに構成菌種間の系統樹における UniFrac 距離を基にした主座標分析 ( Principal Coordinate Analysis : PCoA ) を  $\beta$  多様性解析としてを行い、その 2 群間有意差検定には Permutational multivariate analysis of variance ( PERMANOVA ) を用いた。これらの解析により 3 群間の細菌構成の類似性について検討を行った。

### 5. プラーク中の *C. albicans* と構成細菌属との比較定量法についての検討

#### 1) 標的 PCR 産物の評価

プラーク中の *C. albicans* の構成比を求めるため、絶対定量的リアルタイム PCR 法を応用することとし、定量対象となる各標的 DNA について、エンドポイント PCR による増幅特異性の評価を行った。

#### 2) リアルタイム PCR 法による標的濃度測定と *C. albicans* 構成比の算出

絶対定量的リアルタイム PCR 法を応用し、全てのプラーク検体ごとに、CALB1 プライマー (5'-TTTATCAACTTGTCACACCAGA-3') と CALB2 プライマー (5'-ATCCCGCCTTACCACTACCG-3') を用いて *C. albicans* 特異的な 5.8S rDNA 領域 ( CALB ) の定量を行い、同時に細菌のユニバ

## (学位論文の内容を要約したもの)

No. 4

愛知学院大学

一サルプライマーセットである 341 F ( 5' - CCTACGGGNGGCWGCAG - 3' ) および 805 R ( 5' - GACTACHVGGGTATCTAATCC - 3' ) を用いて全細菌量を定量した。次に下記に示す計算式に従いこれらの定量値をモル比に換算し、全細菌量に対して正規化した *C. albicans* の構成比を算出した。

$$C. albicans \text{ 構成比} = \frac{C. albicans \text{ 細胞数}}{\text{全細菌数}} = \frac{\text{CALB モル濃度}}{16S \text{ V3V4 モル濃度}} = \frac{\text{CALB 定量値}/273 \text{ ( bp)}}{16S \text{ V3V4 定量値}/460 \text{ ( bp)}}$$

CALB : 5.8S rDNA領域

さらに、*C. albicans* 構成比について、各群間 ( 0 群、 I 群、 T 群 ) の平均値について Wilcoxon 符号付き順位和検定を行った。

### 6. プラーク中の *C. albicans* と構成細菌属との量的相関関係の検討

NGS で算出された細菌属構成比 ( 方法 3 に示す ) と絶対定量的リアルタイム PCR 法を応用し正規化された *C. albicans* 構成比 ( 方法 5 に示す ) との間の量的な相関性を検討するため、Spearman 順位相関係数検定を行った。

## III. 結果

### 1. プラーク中の細菌構成

個々のプラーク 46 検体中の細菌構成は採取部位に関わらず被検者間の差が大きく、菌構成パターンの変動が大きいことが確認された。

そこで、46 検体を部位別の 3 群 ( 義歯研磨面 : 0 群、義歯粘膜面 : I 群、デンタルプラーク : T 群 ) にまとめ、各群における細菌構成パターンの検討と群間比較を行った。

義歯研磨面 ( 0 群 ) では、*Streptococcus*、*Actinomyces*、*Lactobacillus* といったグラム陽性の通性嫌気性菌が優勢であった。構成比の高い菌属は、*Streptococcus* ( 51.2% )、*Rothia* ( 9.8% )、*Veillonella* ( 9.0% )、*Actinomyces* ( 5.6% )、*Lactobacillus* ( 3.5% ) の順となった。

義歯粘膜面 ( I 群 ) では、*Veillonella* や *Prevotella* といったグラム陰性の偏性嫌気性菌が義歯研磨面 ( 0 群 ) と比べて増加した。ここでの構成比の高い菌属は、*Streptococcus* ( 35.2% )、*Lactobacillus* ( 16.0% )、*Veillonella* ( 7.6% )、*Actinomyces* ( 6.7% )、*Rothia* ( 3.8% ) の順となった。

一方、デンタルプラーク ( T 群 ) では、*Fusobacterium* などの嫌気性グラム陰性桿菌が占める割合がデンチャープラーク ( 0、I 群 ) と比べて増加した。構成比の高い菌属としては、*Streptococcus* ( 15.7% )、*Veillonella* ( 12.8% )、*Prevotella* ( 9.2% )、*Actinomyces* ( 6.4% )、*Fusobacterium* ( 5.4% ) の順となった。

3 つの採取部位 ( 0 群、 I 群、 T 群 ) に共通して最も高い構成比を示した細菌属は、*Streptococcus* であった。また高い構成比を示した上位 10 菌属中には、*Veillonella*、*Actinomyces*、*Lactobacillus*、*Prevotella*、*Leptotrichia* も共通して検出された。このうち *Streptococcus*、*Lactobacillus*、*Rothia*、*Corynebacterium* はデンチャープラーク ( 0、I 群 ) で、デンタルプラーク ( T 群 ) より高い構成比率を占め、逆に *Veillonella*、*Fusobacterium*、*Selenomonas*、*Prevotella*、*Porphyromonas*、*Campylobacter* はデンタ

ルプラーク ( T 群) でデンチャープラーク ( 0、I 群) より高い構成比を示した。

## 2. プラーク細菌叢の多様性

細菌構成の多様性 (  $\alpha$  多様性) を解析した結果、義歯研磨面 ( 0 群)、義歯粘膜面 ( I 群) およびデンタルプラーク ( T 群) の各群間における指標の平均値には有意差が認められた (  $p < 0.05$  )。デンタルプラーク ( T 群) > 義歯粘膜面 ( I 群) > 義歯研磨面 ( 0 群) の順に多様性が豊富となる傾向が認められた。

さらに、これらの 3 群間の多様性 (  $\beta$  多様性) を解析した結果、46.8% の寄与率で、共にデンチャープラークである 0 群と I 群間の類似性が認められ、デンチャープラーク ( 0 群又は I 群) とデンタルプラーク ( T 群) 間の相違性が有意に認められた (  $p < 0.01$  )。

## 3. プラーク中の *C. albicans* 構成比について

### 1) 標的 PCR 産物の確認

絶対定量的リアルタイム PCR 法で定量対象となる細菌 16S V3V4 領域は 460 bp、*C. albicans* 特異的 5.8S rDNA ( CALB 領域) は 273 bp となり、いずれも期待された鎖長が単一バンドで増幅され、各標的の増幅特異性の高さが確認できた。

### 2) プラーク中の *C. albicans* と構成細菌属との比較定量結果と *C. albicans* 構成比の決定

プラーク検体中の *C. albicans* の検出率を求めると、義歯研磨面 ( 0 群) では 15 検体全てから検出され、100% となった。一方、義歯粘膜面 ( I 群) では 15 検体中 14 検体から検出され、*C. albicans* の検出率は 93% となった。さらに、デンタルプラーク ( T 群) では 16 検体中 15 検体から検出され、*C. albicans* の検出率は 94% となった。さらに、*C. albicans* 構成比の平均値と標準誤差は 0 群  $0.308 \pm 0.250$ 、I 群  $2.172 \pm 2.046$ 、T 群  $0.375 \pm 0.233$  となり、各群間の有意差は認められなかった。

全 46 検体中、2 検体からは *C. albicans* が検出されず、被検者間の差が確認された。一方、全 46 検体中、5 検体において、全細菌量と比較して *C. albicans* 構成比が高値を示す結果が得られた。

## 4. *C. albicans* と構成細菌属との量的相関関係

### 1) *C. albicans* に対し正相関を示した構成細菌属

部位別に解析を行った結果、義歯研磨面 ( 0 群) では、正相関を示した細菌属は認められなかった (  $p < 0.05$  )。一方、義歯粘膜面 ( I 群) では、グラム陽性嫌気性桿菌の *Scardovia* が有意に正相関を示した (  $p < 0.05$  )。そしてデンタルプラーク ( T 群) では、*Schwartzia*、*Scardovia*、*Atopobium*、*Megasphaera*、*Bifidobacterium*、*Veillonella* の嫌気性菌の計 6 属が有意に正相関を示した (  $p < 0.05$  )。以上の結果より、デンタルプラーク構成細菌属では、デンチャープラーク構成細菌属より *C. albicans* と有意に正相関を示した細菌属が多く認められた。

採取部位に関係なく全 46 検体を集計して解析したところ、いずれもグラム陽性乳酸産生菌である *Lactobacillus*、*Scardovia*、*Bifidobacterium* の 3 属が有意に高い正相関を示した (  $p$

< 0.05 )。

## 2) *C. albicans* に対し負相関を示した構成細菌属

義歯研磨面 (0 群) では、グラム陰性の通性嫌気性菌である *Lautropia* のみが有意に負相関を示した ( $p < 0.05$ )。一方、義歯粘膜面 (I 群) では、嫌気性菌の *Leptotrichia*、*Lachnoanaerobaculum*、*Moryella* の3属が有意に負相関を示した ( $p < 0.05$ )。そして、デンタルプラーク (T 群) で有意に負相関を示した細菌は嫌気性および好気性が混在した、*Lachnoanaerobaculum* (嫌気性菌)、*Corynebacterium* (好気性菌)、*Cardiobacterium* (好気性菌)、*Paludibacter* (嫌気性菌) が  $p < 0.01$  で、また *Leptotrichia* (嫌気性菌)、*Peptococcus* (嫌気性菌)、*Propionivibrio* (嫌気性菌) が  $p < 0.05$  で有意に負相関を示した。以上の結果より、デンタルプラーク構成細菌属では、デンチャープラーク構成細菌属より *C. albicans* と有意に相関を示した細菌属が多く認められた。

全 46 検体を集計し解析したところ、*Leptotrichia* 属を最高位に、*Cardiobacterium* や *Porphyromonas*、*Peptococcus* が上位を占めた ( $p < 0.01$ )。

## IV. 考察

### 1. 本研究の意義

本研究で用いた NGS 技術は、これまで検出できなかった細菌を検出可能とし、検体より得られた細菌の遺伝子によって網羅的に細菌の種類と構成比を知ることができる遺伝子解析技術である。従来の解析技術では、難培養性のものや未知のものも含めた網羅的な細菌種の検出・同定が原理的に難しかったため、詳細なデンチャープラーク細菌叢に関する報告はほとんど認められない。そこでデンチャープラークの細菌構成を網羅的に解明するための解析手段として、本研究のデザインに際し、並列処理能力を有する NGS 技術を用いることとした。本研究において、デンチャープラーク細菌叢の類似性や違いが解明されたと共に、介護を要する高齢者の死因の1つとなっている誤嚥性肺炎の起炎菌がデンチャープラークから検出された事実は、本研究成果が口腔領域と全身疾患との関連性を示唆する基礎的データになり得ると考える。

デンチャープラークから検出される口腔常在真菌の *Candida* は、口腔内・咽頭などに存在し、普段はほかの菌とのバランスを保って増殖が抑えられている。しかし、一旦宿主の免疫力の低下や、常在菌のバランスが崩れると、病原性を示すようになる。*C. albicans* がデンチャープラークの主要構成微生物として多種多様な細菌種と共存している観察事実は、そこに何らかの真菌-細菌間相互作用が存在することを示唆しているが、それに関する知見は非常に乏しい。また、*C. albicans* の検出状況はプラーク検体間において大きく変動することが予想されることから、その増殖や定着に対し共生的あるいは拮抗関係にある細菌属の存在が推測される。そこで本研究では、デンチャープラークおよびデンタルプラークを構成する細菌属を網羅的に明らかにすることにより、口腔常在真菌の一つである *C. albicans* との構成パターンを解明すると共に、*C. albicans* との量的な相関を示す細菌属の同定を試みる着想に至った。

真核生物の *Candida* は原核生物固有の 16S rRNA を持たず、細菌と共通のユニバーサルプライマーを用いた NGS が困難であることから、本研究では、プラーク中の *C. albicans* の構成比を求めるために絶対定量的リアルタイム PCR 法を応用し、各検体の全細菌量に対して正規化し

た *C. albicans* 構成比を算出する方法を考案した。さらに、プラーク中の細菌属構成比と *C. albicans* 構成比との間の量的な相関性を検討することで、*C. albicans* の増殖や定着に影響を及ぼす口腔常在細菌の候補をより効率よく探索できる解析方法を考案した。

今回の解析結果から、メンテナンス中の有床義歯装着者を対象とした *C. albicans* を含むデンチャープラーク中における微生物叢の菌構成パターンと、*C. albicans* との量的相関を有意に示す細菌属の一例を提示することができた。したがって、本研究において、*C. albicans* と量的相関関係を示す細菌属を同定できたことは、口腔を含む全身領域に対する口腔健康管理の重要性を再認識する一助になると考える。そして、抗真菌薬として応用可能な口腔細菌由来の生理活性物質開発へ貢献できる基礎データともなり、今後の有床義歯補綴を含む補綴歯科臨床への新たな知見を有する意義深いものと考えられる。

## 2. デンチャープラーク細菌叢の特徴と誤嚥性肺炎の関連

本研究において、定期的なメンテナンスで通院の可能な有床義歯装着者のデンチャープラークを特徴づける主要細菌叢パターンを示すことができたと考えられる。その特徴として、構成比が上位かつデンタルプラークよりも高比率を示した *Streptococcus*、*Lactobacillus*、*Rothia*、*Corynebacterium* の4菌属が挙げられる。

従来、誤嚥性肺炎の起炎菌は、口腔内に常在する嫌気性細菌属であると考えられてきた。その中で、Akataらは口腔レンサ球菌属(oral streptococci)、*Corynebacterium*、*Haemophilus*、*Neisseria*、*Prevotella*、*Fusobacterium*、*Veillonella* がその主要な起炎菌であると報告している。近年、誤嚥性肺炎に関与する起炎菌として、口腔レンサ球菌属が嫌気性細菌属より重要であり、そのひとつである *Streptococcus anginosus* は、肺炎以外にも肺内や胸腔に膿瘍を形成し重篤な症状を引き起こしやすく、高齢者では特に注意が必要であると報告されている。また、嫌気性細菌属についても、βラクタマーゼや病原因子の供給源として他の病原体による肺炎の重症化に関与している可能性も考えられ、これらの菌の相互作用などの検討が重要であるとも報告されている。さらに、口腔常在菌から成るプラークが病原微生物のリザーバーとして全身疾患との関連において注目されてきている。したがって、有床義歯と残存歯は全身疾患に関わる微生物を含んだバイオフィルム形成の温床になっており、デンチャープラークコントロールおよびデンタルプラークコントロールの重要性を再認識する必要がある。本研究においては、デンチャープラーク中に誤嚥性肺炎の起炎菌として注目される *Streptococcus*、*Corynebacterium*、*Veillonella*、*Prevotella* が高い構成比で検出された。そのため、有床義歯の徹底した衛生管理を行うことが、誤嚥性肺炎を含む重篤な感染症の予防につながるものと考えられる。

## 3. デンチャープラーク細菌叢の多様性

NGS で検出されたプラーク構成細菌属の種類豊富さと均等性は、デンタルプラーク(T群) > 義歯粘膜面(I群) > 義歯研磨面(O群)の順となり、義歯研磨面よりも義歯粘膜面のデンチャープラーク細菌叢の方が、残存歯・インプラントのデンタルプラーク細菌叢との類似度が高い傾向が示された。これについては、義歯粘膜面の方が根面(支台歯となる根面部またはインプラント部)や部分床義歯の支台歯に接する頻度や時間が長いことを反映しており、デンタルプラーク細菌叢の影響をより強く受けた結果ではないかと考えられる。

適切に管理された有床義歯は口腔外へ撤去する機会が多く、義歯研磨面および義歯粘膜面は偏性嫌気性菌属が定着しづらい比較的好気的な条件となる。また、元々細菌構成比の低い細菌属は、義歯の頻繁な機械的清掃や化学的洗浄によって、さらに定着が困難になると考えられる。これらのことより、デンチャープラークを構成する細菌の多様性が、デンタルプラークと比較して有意に乏しいという本研究結果に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

#### 4. *C. albicans* とプラーク構成細菌属との量的相関関係

0' Donnell らは、デンチャープラーク中に占める *Candida* の増殖と正相関を示した細菌属は *Lactobacillus* であったと報告している。また、Xiao らは、幼児の多発性う蝕症 ( Early Childhood Caries ) の局所から *Candida* と共に高頻度で *Scardovia* が検出されたと報告している。本研究では、デンチャープラークにおいて *C. albicans* と量的に正相関が認められた構成細菌属は *Scardovia* であり、Xiao らの報告と同様な結果が得られた。また、う蝕関連菌である *Lactobacillus* は正相関が認められなかったが、0' Donnell らが報告している正相関を示す傾向が認められた。次に、デンチャープラークとデンタルプラークを含む全 46 検体において *C. albicans* と量的に正相関が認められた構成細菌属は *Scardovia*、*Lactobacillus*、*Bifidobacterium* であった。これらの結果より、デンチャープラークおよびデンタルプラークを構成するグラム陽性乳酸産生細菌の 3 属と *C. albicans* との間には共生的な相互作用が存在すると考えられる。また、Cavalcanti らは、*C. albicans* と一部の口腔レンサ球菌属について共生関係を示唆する報告をしている。本研究においても、う蝕関連菌である *Streptococcus* は *C. albicans* と正相関を示す傾向が認められ、両菌属間の共生的相互作用が存在すると考えられる。

一方、本研究では、*C. albicans* と量的に負相関が認められた構成細菌属は、グラム陰性菌とグラム陽性菌、嫌気性菌、および好気性菌が混在する、かなり複雑な細菌構成を示した。デンチャープラークにおいて *C. albicans* と負相関が認められた構成細菌属は *Leptotrichia* を含む 4 属であった。*Leptotrichia* は口腔内常在の偏性嫌気性グラム陰性桿菌であり、非病原性とされている。しかし、近年では免疫抑制状態にある患者において、口腔感染症や心内膜炎、更には菌血症を起こすという報告もあり、全身疾患への関連が示唆されている。次に、デンチャープラークとデンタルプラークを含む全 46 検体において *C. albicans* と量的に負相関が認められた構成細菌属の中では、日和見感染菌の *Leptotrichia* が最上位であった。さらに、辺縁性歯周炎関連菌の *Porphyromonas*、*Catonella*、*Capnocytophaga*、*Bulleidia*、根尖性歯周炎関連菌の *Peptostreptococcus*、および感染性心内膜炎起炎菌の *Cardiobacterium* が上位を占めており、*C. albicans* が口腔疾患と全身疾患に関与していることを示唆している。

0' Donnell らは、デンチャープラーク中に占める *Candida* の増減と負相関を示したのは *Fusobacterium* だったとも報告している。また Bor らは *Fusobacterium* における *C. albicans* 増殖抑制能について報告している。本研究においても *Fusobacterium* は義歯粘膜面で検出され、*C. albicans* と量的に負相関を示す傾向が認められ、両菌属間の拮抗的相互作用が存在すると考えられる。

以上のことより、本研究にて考案した解析方法を用いることにより *C. albicans* 増殖や定着に影響を及ぼす口腔常在細菌を効率的に探索できることが明らかとなった。*C. albicans* 構成比と正/負相関を示したプラーク構成細菌属の中には、*C. albicans* に対して共生/拮抗関係

にある細菌属の存在が示唆される。本研究デザインは、ヒトのプラークを研究対象とした *in vivo* 実験の中で *C. albicans* と量的に有意な相関を示した構成細菌属の同定を試みたものである。その結果、*C. albicans* 構成比と正/負相関を示したプラーク構成細菌属が明らかとなった。その中で着目すべき点は、*C. albicans* と量的に有意な負相関を示した細菌属が、正相関を示す細菌属と比べて多岐にわたり同定できたことである。それらの中には *C. albicans* と拮抗関係にあり、増殖を抑制するものが含まれている可能性があり、今後、*C. albicans* - 細菌間相互作用を解明する必要がある。さらなる研究デザインとして *in vitro* 実験系を構築し、*C. albicans* - 細菌間における情報伝達機構を解明することが可能となれば、負相関を示した構成細菌属の *C. albicans* との拮抗的な相互作用を明らかにすることができると考えている。今回の解析結果で負相関を示した *Leptotrichia* のような比較的病原性が弱いものに焦点を当て、*C. albicans* との1対1の共培養系を用いた分子レベルでの相互作用解析を今後展開することにより、抗真菌薬として応用可能な口腔細菌由来の生理活性物質の新たな開発へとつながる可能性が考えられる。

## V. まとめ

本研究の結果より以下の結論を得た。

1. 有床義歯装着者のデンチャープラークにおいて、特徴的な主要細菌叢構成パターンが示された。
2. デンチャープラークにおいて、誤嚥性肺炎の起炎菌として注目される口腔レンサ球菌属や嫌気性細菌属の多くが高い構成比で検出された。
3. *C. albicans* と有意な量的相関を示す細菌属の存在が示された。
4. デンチャープラークにおいて *C. albicans* と負相関が認められた構成細菌属は、全身疾患に関与していることが示唆されている日和見感染菌の *Leptotrichia* が示された。
5. *C. albicans* 構成比とプラーク構成細菌属との量的相関関係から、*C. albicans* の増殖や定着に影響を及ぼす候補となる口腔常在細菌を効率よく探索する解析方法を考案することができた。