

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

藤波 和華子

論文題目

Candida albicans 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

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は、真菌である *Candida albicans* (*C. albicans*) の検出率が高いことが挙げられ、多種多様な細菌種とプラーク内で共存している。その中で真菌 - 細菌間における相互作用の存在が示唆されているが、詳細な報告はみられない。

従来解析技術では、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に関する報告はほとんど認められない。本研究では次世代シーケンス解析 (Next Generation Sequencing : 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。バイオフィームであるプラークでは、同一試料中に共存する真菌と細菌とを共通のユニバーサルプライマーを用いた NGS を行うことは困難である。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し、*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、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は義歯研磨面（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、デンタルプラーク（Tooth / Implant 以下T群）は16検体を採取し、ゲノムDNA抽出作業まで -20°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

プラーク検体から *Candida* を含めた全ゲノム DNA の抽出方法を比較検討した。その結果、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にビーズ破碎処理を加えた前処理を行った後、Epicentre 社の DNA 精製キットを用いてゲノム DNA を抽出し、Tris buffer にて終濃度 $5 \text{ ng} / \mu\text{L}$ 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、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、ユニバーサルプライマーセットを用いた PCR 法にて一括増幅した。これに必要な配列を再度 PCR 法で付加し、メタ 16S ライブラリーを調製後、次世代シーケンサー MiSeq を用いて塩基配列を解読した。取得した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集合体である QIIME2 を用いた。各配列データ (リード) を比較し、類似度の高い配列集団を 1 つのグループにまとめ (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。

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)、義歯粘膜面 (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 α 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 (PCoA) を β 多様性解析として行い、その 2 群間有意差検定には PERMANOVA を用いた。

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

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

CALB1 プライマー および CALB2 プライマーを用いて *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ーサル
プライマーセットである 341F および 805R を用いて全細菌量を定量した。
次に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。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

全 46 検体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。各群 (0 群、I 群、T 群) における細菌構成パターンの検討と群間比較について、3 採取部位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。*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、*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 (α 多様性) は、各群間 (0 群、I 群、T 群) における指標の平均値には有意差が認められ、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、3 群間の多様性 (β 多様性) については、デンチャープラークである 0 群と I 群間の類似性と、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) の相違性が有意に認められた。

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各標的 DNA の増幅特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

C. albicans の検出率は、義歯研磨面 (0 群) では 100%、義歯粘膜面 (I 群) では 93%、およびデンタルプラーク (T 群) では 94%であった。さらに、*C. albicans* 構成比の各群間 (0 群、I 群、T 群) の平均値について有意差は認められなかった。

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

義歯研磨面 (0 群) では、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、*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では、*Schwartzia*、*Scardovia*、*Atopobium*、*Megasphaera*、*Bifidobacterium*、*Veillonella* が有意に正相関を示した ($p < 0.05$)。全 46 検体を集計して解析した結果、*Lactobacillus*、*Scardovia*、*Bifidobacterium* が有意に高い正相関を示した。

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、*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、*Leptotrichia*、*Lachnoanaerobaculum*、*Moryella* が有意に負相関を示した ($p < 0.05$)。そして、デンタルプラークで有意に負相関を示した細菌は、*Lachnoanaerobaculum*、*Corynebacterium*、*Cardiobacterium* が $p < 0.01$ で、*Paludibacter*、*Leptotrichia*、*Peptococcus*、*Propionivibrio* が $p < 0.05$ で有意に負相関を示した。全 46 検体を集計し解析した結果、*Leptotrichia* を最高位に、*Cardiobacterium* や *Porphyromonas*、*Peptococcus* が上位を占めた。

IV. 考察

本研究では、NGS 技術を用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、誤嚥性肺炎の起炎菌として注目される *Streptococcus*、*Corynebacterium*、*Veillonella*、*Prevotella* が検出された事実は、全身疾患との関連を示唆する基礎的データになり得ると考える。これらのことより、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、デンチャープラークコントロールの重要性が示された。

本研究では、プラーク中の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、細菌属構成比と *C. albicans* 構成比との量的相関性を検討した結果、*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り、*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。負相関を有意に示す細菌属は、正相関を示す細菌属と比べて多岐にわたり同定され、*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ことが考えられる。今後、*C. albicans* - 細菌間相互作用を解明することが可能となれば、負相関を示した比較的病原性が弱い *Leptotrichia* のようなものに焦点を当て、*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. 結論

本研究の結果から、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。また、デンチャープラークでは、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、日和見感染菌の *Leptotrichia* が *C. albicans* との量的な負相関を有意に示した。以上のことより、*C. albicans* 構成比とプラーク構成細菌属

(論文内容の要旨)

No.9.....

愛知学院大学

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ことは、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。