

次世代シーケンサーを用いた口腔内真菌叢の網羅的解析：口腔カンジダ症および加齢による真菌叢の変化

今林，佑美

<https://hdl.handle.net/2324/1654796>

出版情報：九州大学，2015，博士（歯学），課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

氏 名	今林 佑美			
論 文 名	次世代シーケンサーを用いた口腔内真菌叢の網羅的解析 ～口腔カンジダ症および加齢による真菌叢の変化～			
論文調査委員	主 査	九州大学	教授	中西 博
	副 査	九州大学	教授	西村 英紀
	副 査	九州大学	教授	森 悦秀

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

口腔カンジダ症は口腔内真菌叢の変化と密接に関係しており、その原因真菌は主に *Candida albicans* (*C. albicans*) と考えられてきた。しかし、加齢による口腔内真菌叢の恒常性の変化や近年の抗真菌薬の頻用による薬耐性菌の増加から、口腔カンジダ症の発症に *C. albicans* 以外の真菌の関与も指摘されている。従来、真菌の同定には CHROMagar candida 培地（培養法）が用いられてきたが、培養が必要であるため時間を要し、さらにカンジダ属真菌のみしか同定できなかった。しかし近年、ほぼ全ての真菌に存在する internal transcribed spacer 領域の断片長多型を利用した length heterogeneity PCR (LH-PCR) 法を用い、培養を必要としない広範な口腔内真菌叢の解析法が確立された。ただし、断片長からの同定が困難な真菌に関しては DNA シークエンスを必要とした。しかし最近になり次世代シーケンサー (NGS) が開発され、多くの DNA サンプルから 1 塩基レベルの遺伝子解析までをきわめて短時間で網羅的に解析することが可能となった。そこで本研究では、口腔カンジダ症の発症に関与する真菌および真菌叢を明らかにするため、NGS による新しい真菌叢の解析法を確立し、口腔内真菌叢の網羅的解析を行った。

本研究は 4 部から構成され、第 1 部では培養法、LH-PCR 法、および NGS を用いた口腔内真菌叢の解析と比較検討を行った。健常者 5 名を対象とし、含嗽液中の真菌叢を培養法、LH-PCR 法、および NGS にて解析を行った。その結果、培養法では *C. albicans* の 1 種しか検出されなかった。一方、LH-PCR 法では 1 人あたり平均 6.2 ± 1.9 種が検出され、さらに NGS では 1 人あたり平均 14.8 ± 1.8 種が検出された。真菌叢の構成比はいずれも *C. albicans* が最も優勢であったが、一人当たり検出菌種数は NGS が有意に多く、また同時に菌種の同定も可能であった。

第 2 部では加齢における口腔内真菌叢の変化の検討を行った。健常者 66 名を対象に、各年代別（20 歳代、30 歳代、40 歳代、50 歳代）に分けて含嗽液中の口腔内真菌叢の解析を行った。一人あたりの総真菌量および NGS による一人当たりの平均検出真菌種数は、年齢との正の相関を示した。真菌の構成比はどの年代も *C. albicans* が最も多くの割合を占めたが、加齢とともに *C. albicans* の占める割合は減少した。

第 3 部では口腔カンジダ症患者の口腔内真菌叢の解析を行った。急性偽膜性口腔カンジダ症患者 27 名と健常者のうち年齢を合わせるため 40 歳代以上の 29 名を対象とし、含嗽液中の口腔内真菌叢を解析した。患者群は健常者群より総真菌量は有意に多く、NGS による一人当たりの検出菌種数は、患者群が 11.6 ± 8.2 種、健常者群が 14.0 ± 3.5 種であり、患者群の菌種数の方が少なかった。また、真菌叢の構成比では患者群の方が *C. dubliniensis* の占める割合が高かった。

第 4 部では口腔カンジダ症患者の治療前後における口腔内真菌叢の比較検討を行った。急性偽膜性口腔カンジダ症患者のうち、抗真菌薬投与前後の含嗽液検体を採取できた 15 例を対象に口腔内の真

菌叢の変化について検討を行った。治療後は治療前に比べ一人あたりの総真菌量は有意に減少し、一人あたりの検出真菌数は増加していた。真菌叢の構成は、治療することによりnon-*C. albicans*、特に*C. dubliniensis*の割合が著明に減少していた。

以上の結果から、NGSを用いた解析方法は、培養法だけではなくLH-PCR法よりも感度が高く、健常者のわずかな真菌量であっても検知が可能であることが明らかとなった。また、NGSを用いて口腔内真菌叢と臨床所見との関連を検討すると、加齢により検出真菌種数およびnon-*C. albicans*の構成比が増加するものの、急性偽膜性口腔カンジダ症患者では一人あたりの検出真菌種数およびnon-*C. albicans*の構成比は、治療により増加することが分かった。これは、口腔カンジダ症の発症によって特定の真菌種が過剰に増殖すると、その他の真菌種が相対的に減少したことが原因と推察され、口腔カンジダ症の発症には*C. dubliniensis*および特定のnon-*C. albicans*が関与していることが示唆された。従って、博士（歯学）の学位授与に値する。