

Molecular characterization of fungal populations on the tongue dorsum of institutionalized elderly adults.

李, 宏
九州大学大学院歯学府

<https://doi.org/10.15017/21994>

出版情報：九州大学，2011，博士（歯学），課程博士
バージョン：
権利関係：



療養型医療施設・高齢者施設の入所高齢者の
口腔内に認められる真菌種の分布
についての検討

2011 年

李 宏

九州大学大学院歯学府歯学専攻

九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学講座

口腔予防医学分野

指導教員 山下 喜久 教授

対象論文

本研究の一部は、学術雑誌 Journal of Clinical Microbiology に投稿中である
(2011 年 12 月 7 日投稿)。

**Molecular characterization of fungal populations on the tongue dorsum of
institutionalized elderly adults.**

Hong Li, Toru Takeshita, Michiko Furuta, Mikiko Tomioka, Yukie Shibata,
Yoshihiro Shimazaki, Koichi Makimura and Yoshihisa Yamashita

目次

要旨	1
背景	3
対象および方法	5
1. 調査対象	5
2. 調査方法	6
i) 舌苔の採取と DNA 調製	6
ii) 舌苔に含まれる真菌群集の評価	7
iii) 被験者の健康状態の調査	14
iv) 統計解析	16
結果	17
1. 舌背上の真菌群集の定量	17
2. LH-PCR 解析による口腔真菌識別能の確認	18
3. 舌背上の真菌群集の菌種構成の評価	21
4. 真菌量ないし構成と発熱との関連	25
考察	30
総括	35
謝辞	36
参考文献	37

要旨

近年、微生物群集から直接抽出した DNA を解析する手法の開発により、口腔常在フローラの構成と宿主の健康状態との関連が徐々に明らかにされてきている。一方で真菌類の分布には、特に高齢者において、未だ不明な点が多い。本研究では、真菌の internal transcribed spacer (ITS) 領域を利用した網羅的真菌解析系を用いて高齢者の口腔における真菌種分布の解明を目指した。さらにその構成と健康状態との関連について検討を行った。

対象は療養型医療施設および高齢者施設長期入所者 291 名 (85.7 ± 7.4 歳) とした。採取した舌苔から抽出した DNA を用いて含まれる総真菌量を測定したのち、真菌群集の構成の特定を行った。総真菌量の測定には ITS1 領域を利用した定量 PCR 法を用い、真菌種構成の把握は ITS1–5.8S–ITS2 領域を利用した length heterogeneity PCR 法と各断片の塩基配列の決定により行った。

解析を行った291名のうち128名で舌苔検体あたり 10^4 CFU以上の真菌が検出され、そのうち35名では 10^5 CFU以上認められた。 10^4 CFU以上の真菌が認められた128名について構成菌種を同定した結果、最も高頻度で検出されたのは *Candida albicans* (105名; 82.0%) であり、続いて *Candida dublinensis* (78名; 60.9%)、*Malassezia restricta* (57名; 44.5%)、*Candida tropicalis* (45名; 35.1%)、*Candida glabrata* (26名; 20.3%) などが多くの被験者で認められた。舌苔採取の前後約6か月からなる1年間の観察期間における1週間以上の発熱の有無と真菌分布との関係について統計学的に検討したところ、総真菌数が 10^5 CFU以上と

真菌の過増殖が起きている被験者では、*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発熱との関連が認められた。このような関連は舌苔の湿潤度、義歯の使用、生活活動動作、認知機能障害、嚥下障害、抗生剤の使用といった発熱関連因子を多変量ロジスティック回帰分析にて調整した際にも有意であった。本研究により高齢者の口腔内の真菌種の分布が明らかになり、さらにその構成と宿主の健康状態との関連性が示唆された。

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 (14)。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 (4)。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う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 (11)。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。

従来の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 PCR 法で微生物群集から直接抽出した DNA を増幅して、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 (9)。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 (3)。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 (4)。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ある。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名の舌背上にい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。

対象および方法

1. 調査対象

本研究室では平成 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のうち、65 歳以上の高齢者 343 名 (男性 85 名、女性 258 名、平均年齢 85.8 ± 7.4 歳) から舌苔を採取し、抽出した DNA の解析によりその常在細菌構成が肺炎や発熱と関連することを過去に報告している (13)。本研究では、この時に得た DNA 検体を用いて真菌類についての解析を行い、施設入所高齢者における真菌種分布の把握と健康状態との関連性についての検討を行った。本研究においては、追跡調査期間中に退院ないし死亡した 43 名と他の解析で検体を消費してしまった 9 名を除外した 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。なお、本研究の遂行にあたっては九州大学歯学研究院生命倫理委員会の承認 (許可番号 19B-2) を受けた。

2. 調査方法

i) 舌苔の採取と DNA 調製

舌苔の採取と DNA の抽出は富岡らによって以下の方法で行われた (Tomioka M., JAGS, 2010)。

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 (マドラー、株式会社日本デキシー、横浜) にて可及的に採取し、500 μ l の lysis buffer (1% SDS 溶液を加えた 1 mM EDTA を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 ; pH 8.0) 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 の抽出は、Takeshita (2007) らの方法を一部改良して行った (12)。懸濁液を均一に拡散するために 15 分間超音波処理を行い、0.3 g の zirconia-silica beads (直径 0.1 mm, Biospec Products, USA) と 1 個の tungsten-carbide bead (直径 3 mm, Qiagen, Germany) を加えて 90°C で 10 分間加温した後、Disruptor Genie (Scientific Industries Inc., USA) を用いて菌体を震盪、破碎し、200 μ l の 1% SDS 溶液を加えて、70°C で 10 分間加温した。続いて、蛋白質成分を除去するため、フェノール (v/v) による抽出を 1 回、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1, v/v) 混合溶液による抽出を 1 回行った後、エタノール沈殿処理を行い、生じた沈殿物を 50 μ l の TE 溶液 (1 mM EDTA を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 ; pH 8.0) に溶解し、分析時まで -30°C で凍結保存した。

ii) 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た。量的評価には、断片長が比較的短く均一な (200 ~ 400 bases) ITS1 領域を用い、質的評価においてはより大きな断片長多型が認められる (400~1000 bases) ことから ITS1-5.8S-ITS2 領域を利用した。真菌 rRNA オペロンと使用した領域、プライマーの位置関係を図 1 に示す。

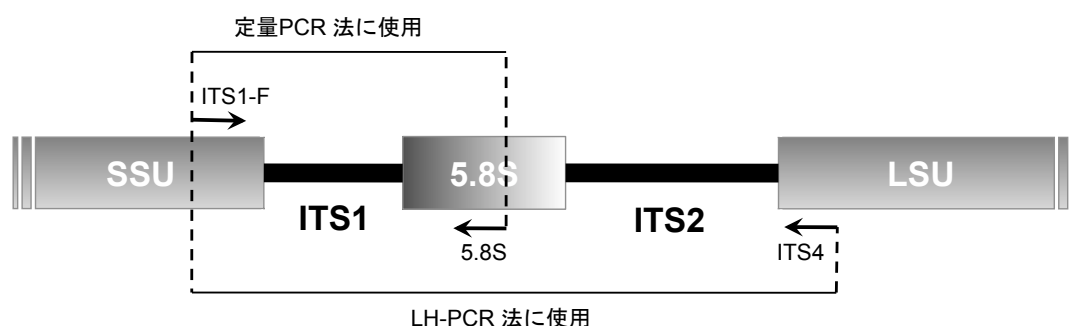


図 1 真菌 rRNA オペロンと解析に使用したプライマー

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。リアルタイム PCR 法は、Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて行った。1 μ l のテンプレート DNA に対し、12.5 μ l 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' (GardesM, 1993, Molecular ecology)) と 5.8s (5'-CGC TGC GTT CTT CAT CG-3' (VilgalysR, 1990, JB)) に滅菌蒸留水を加えて総量 25 μ l 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

①口腔真菌識別能の確認

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。使用した口腔真菌 10 菌種 (20 菌株) を表 1 に記載する。いずれの菌株も帝京大学医真菌研究センター (Teikyo University Institute of Medical Mycology, TIMM) より提供を受けたものである。

表 1 口腔真菌識別能の確認に用いた真菌種

菌種名	菌株名 (TIMM No.)
<i>Candida albicans</i>	3169, 5500
<i>Candida tropicalis</i>	0313, 3380
<i>Candida glabrata</i>	3171, 5512
<i>Candida parapsilosis</i>	3377, 5567
<i>Candida krusei</i>	3378, 5504
<i>Candida guilliermondii</i>	0259, 0260
<i>Candida kefyr</i>	0298, 0302
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0372, 0362
<i>Geotrichum candidum</i>	0697, 0699
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6218, 5586

それぞれの菌株は 5 ml の Yeast peptone dextrose (YPD) 培地にて 37°C で 15 時間震盪培養した後、そのうち 1 ml について舌苔検体において行ったのと同様の方法でゲノム DNA を抽出した。真菌共通配列であるプライマー ITS1-F と ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (15) を用いて、各真菌の ITS1-5.8S-ITS2 領域を PCR 法で増幅した。PCR 反応には KOD Plus Ver. 2 DNA ポリメラーゼ (東洋紡績株式会社) を用いた。1 μ l の鋳型 DNA に 5 μ l の KOD Plus Ver. 2 DNA ポリメラーゼ 10 \times PCR buffer (0.1 mM のエチレンジアミン四酢酸、1 mM のジチオトレイトール、0.001% の Tween 20、0.001% の Nonidet P-40、50% グリセロールを加えた 50 mM トリス塩酸緩衝液 ; pH 8.0) 、5 μ l の 2 mM dNTPs、3 μ l の 25 mM 硫酸マグネシウム、50 pmol の両プライマー、1 μ l の KOD Plus Ver. 2 DNA ポリメラーゼ (1 U/ μ l) を加えた後、滅菌蒸留水を加えて総量を 50 μ l として PCR 反応を行った。泳動用アガロースゲル (2% (wt/vol)) を用いてアガロース電気泳動を行い、非特異的増幅断片の有無を確認した後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) にて塩基配列を決定した。塩基配列の解読には BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、ITS1-F ないし ITS4 をプライマーとして用いた。さらに各断片の断片長をキャピラリー電気泳動で測定するため、5' 末端を蛍光色素 6-carboxyfluorescein (6-FAM) で標識した ITS4 と ITS1-F とを用いて各菌株由来のゲノム DNA について再度 PCR 法を行った。各増幅断片は Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega, Madison, WI) を用いて精製した後、2 μ l に対して 10 μ l の脱イオ

ン化ホルムアミド、0.5 μ l のサイズスタンダード Genescan 1200 LIZ (Applied Biosystems) を混合し、95°C で 5 分間加熱し熱変性させた後、急冷してキャピラリー電気泳動を行った。泳動には ABI3130 Genetic analyzer (Applied Biosystems) を用い、60°C、15 kV の条件で 30 分泳動した。解析ソフトウェア GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems) を用いて、サイズスタンダードに含まれる既知の DNA 断片と対象の DNA 断片の移動距離との比較から断片長を決定した。断片長の測定は各菌株について三回ずつ行った。

②各舌苔検体の真菌構成の評価

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。PCR 法における各種条件は上記と同様である。なお、定量 PCR 解析において総菌数が 10^4 CFU/sample 未満であった被験者の検体については適正な解析結果を得ることが困難であったため、本解析の対象は総菌数が 10^4 CFU/sample 以上の者 128 名とした。各増幅断片群は Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega) を用いて精製したのち、上記と同様の方法で熱変性しキャピラリー電気泳動を行い、解析ソフトウェア GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems) を用いて泳動データの解析を行った。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。

③各断片に相当する真菌種の決定

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て由来する真菌種の特定を行った。128 名の LH-PCR プロフィールのなかで該当する断片のピーク面積割合が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、PCR 法で同領域を再度増幅した。増幅産物はアガロースゲル (2% (wt/vol)) を用いた電気泳動によって分離後、対象の断片サイズに該当する部位をゲルから切り出し、Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega) を用い DNA を抽出・精製した。精製された増幅断片をベクタープラスミド pBluescript II SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) に挿入した後、これを用いて大腸菌 DH5 α 株を形質転換し、形質転換株を含む菌液を適当な抗生物質を含む寒天培地に塗布することによって形質転換株を選択した。形質転換株は、ブレインハートインフュージョン (BHI) 培地にて 37°C、12 時間の震盪培養を行った後、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を抽出した。塩基配列の解読には BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit を用い、プラスミド DNA 上の配列である M13f (5'-GGT TTT CCC AGT CAC GAC GTT -3')、M13r (5'-CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC -3') をプライマーとして利用

した。塩基配列解読におけるキャピラリー電気泳動には ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いた。解読した ITS1-5.8S-ITS2 断片長が適当であるか確認した後、BLAST nucleotide algorithm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) を用いて nucleotide collection database から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。99%以上の一致を示す配列の中に既知の菌種が含まれなかった場合には、最も塩基配列の一致率の高いものをその配列に該当する菌種と見なし一致率を表示した。

iii) 被験者の健康状態の調査

本集団の口腔診査、全身状態の評価は既報 (13) の通り行われたものであるが、以下にその方法の詳細を記載する。

①口腔診査

口腔診査は、歯科医師 1 名が行った。歯については視診により WHO の診査基準に準じて診査し、健全歯、未処置歯、処置歯の判定を行った。舌苔付着の程度は視診により「無しまたは少量の舌苔」、「中程度以上の舌苔」の 2 群に分類した。舌の湿潤度は、安静時に湿潤度検査紙 (湿潤度検査紙、キソウェット KISO-Wet Tester、KISO サイエンス株式会社、横浜) を舌尖から約 1cm の舌背部に垂直に立て 10 秒保持し、吸収した唾液によって検査紙が湿潤した長さにより、「0-0.9mm」、「1.0mm-4.9mm」、「5.0mm 以上」の 3 群に分類した (5)。義歯の使用について、食事の際に義歯を使用している場合は「使用」、使用していない場合は「未使用」とした。舌苔中の細菌構成は 16S rRNA 遺伝子を用いた T-RFLP 解析において得られたピークパターンに基づき、クラスター解析を用いてクラスター A、B、C、D の 4 群に分類した。

②全身健康状態の調査

全身健康状態は担当の看護師が口腔診査に先だって評価した。身体活動性については、介護保険制度の障害老人の日常生活自立度 (寝たきり度) の分類 (老健第 102-2 号 厚生省大臣官房老人保健福祉部) を参考にし、「歩行可能 ; 自立または屋内自立」、「座位可能 ; 主にベッド上だが自力座位を保てる」、「寝たきり ; 終日ベッド上」の 3 群に分類した。認知症の程度について

は、認知症老人の日常生活自立度（認知症度）の分類（老健第 135 号 厚生省老人保健福祉局）を参考にし、「I; 何らかの認知症を有するがほぼ自立」、「II; 認知症を有するが見守りにより自立」、「III; 認知症によりしばしば介護が必要（徘徊、失禁等）」、「IV; 認知症により、常に介護が必要」、「V; 精神症状や問題行動、身体疾患により専門医療が必要」の 5 群に分類し、I、II を「軽度認知症」、III、IV、V を「重度認知症」と分類した。嚥下機能の程度については、「嚥下障害なし；食事中的むせがないかしばしば起るが経口摂取は可能」、「嚥下困難；むせや誤嚥が頻繁におこり経口摂取が困難」、「嚥下不可能；経口摂取は全く不可能」の 3 群に分類した。

発熱状態の調査として、1 日 1 回（発熱時は適宜追加）の定時検温（腋下にて測定）において 37.5 度以上の発熱があった日を発熱日と定義し、口腔診査を行った月の前 6 か月間、および口腔診査を行った月を含む後 6 か月間をあわせた計 12 か月間の発熱日数を調べた。さらに、口腔診査前 1 か月間の抗菌薬の投与状況を調べ、「投与無し」、「1-4 日投与」、「5 日以上投与」の 3 群に分類した。

iv) 統計解析

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。この際真菌構成は、検体あたりの真菌量が 10^5 CFU 未満の被験者、検体あたりの真菌量が 10^5 CFU 以上で *C. albicans* が検出される被験者、検体あたりの真菌量が 10^5 CFU 以上で *C. albicans* が検出されない被験者、の3群に分類した。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。

結果

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 CFU から 10^7 CFU の間の *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 (図 2)。

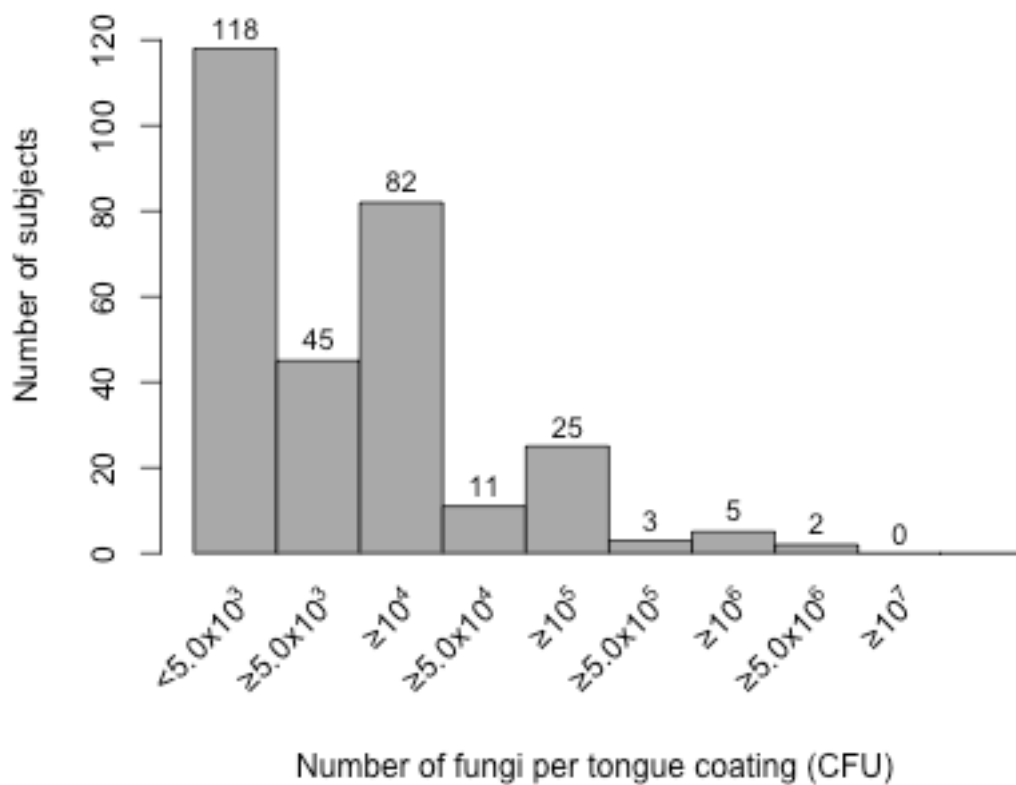


図 2 291 名の被験者の舌苔から検出された真菌の量

2. LH-PCR 解析による口腔真菌識別能の確認

真菌構成の評価には ITS1–5.8S–ITS2 領域を用いた LH-PCR 解析を用いた。被験者由来の検体についての解析を行う前に、口腔から検出された報告のある真菌株について本手法による同部位の増幅・識別が可能であるか確認を行った。10 菌種 (20 菌株) から抽出したゲノム DNA を鋳型とし、真菌共通配列プライマーであるとされる ITS1-F、ITS4 を用いて PCR 法を行ったところ、どの菌株でも非特異的増幅を認めず、各々 1 本のバンドからなる増幅断片を得ることができた (図 3)。

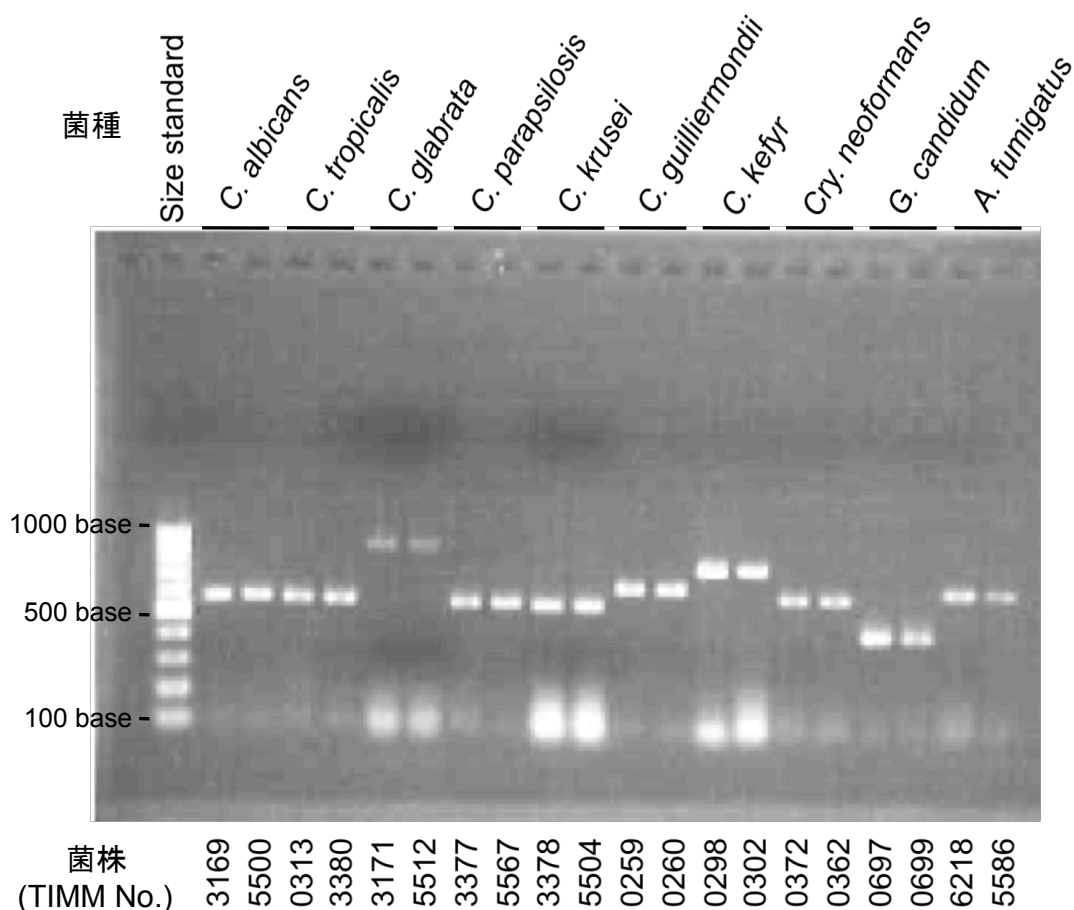


図 3 各菌株から得られた増幅断片

アガロースゲル (2% (wt/vol)) を用いて泳動した。

既知の口腔真菌の本領域は回収できることが確認された一方で、アガロースゲル電気泳動では *C. albicans*、*C. tropicalis*、*C. parapsilosis*、*C. krusei* といった菌種を識別することは困難であることが明らかとなった。各増幅断片の塩基配列を決定し断片長を確認したところ、上記 4 菌種の該当部位の断片長は 574 base ないし 575 base (*C. albicans*)、564 base (*C. tropicalis*)、558 base (*C. parapsilosis*)、547 base ないし 548 base (*C. krusei*) であった。このような断片長の差異の小さな菌種についても識別するために、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。

表2 キャピラリー電気泳動で測定された各菌株由来の増幅断片のサイズ

菌種名	TIMM	測定された断片長			配列から予測 される断片長
	No.	1	2	3	
<i>Candida albicans</i>	3169	567.55	567.87	567.86	574
	5500	568.65	568.68	568.71	575
<i>Candida tropicalis</i>	0313	558.11	557.96	558.2	564
	3380	557.79	557.96	558.32	564
<i>Candida glabrata</i>	3171	906.72	906.86	906.51	919
	5512	907.71	908.31	907.51	920
<i>Candida parapsilosis</i>	3377	551.62	551.77	551.72	558
	5567	551.69	551.85	551.91	558
<i>Candida krusei</i>	3378	540.11	540.46	540.45	547
	5504	541.26	541.63	541.59	548
<i>Candida guilliermondii</i>	0259	637.05	637.64	637.57	645
	0260	637.34	637.64	637.38	645
<i>Candida kefyr</i>	0298	750.2	750.38	750.37	759
	0302	750.58	750.48	750.55	759
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0372	586.39	586.54	586.54	593
	0362	586.47	586.59	586.54	593
<i>Geotrichum candium</i>	0697	405.33	405.26	405.22	410
	0699	405.39	405.31	405.2	411
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6218	623.57	623.54	623.44	635
	5586	623.73	623.67	623.6	635

各菌株に対して3回ずつ行った。単位は塩基。

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。図4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 (図4、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 (図4、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。

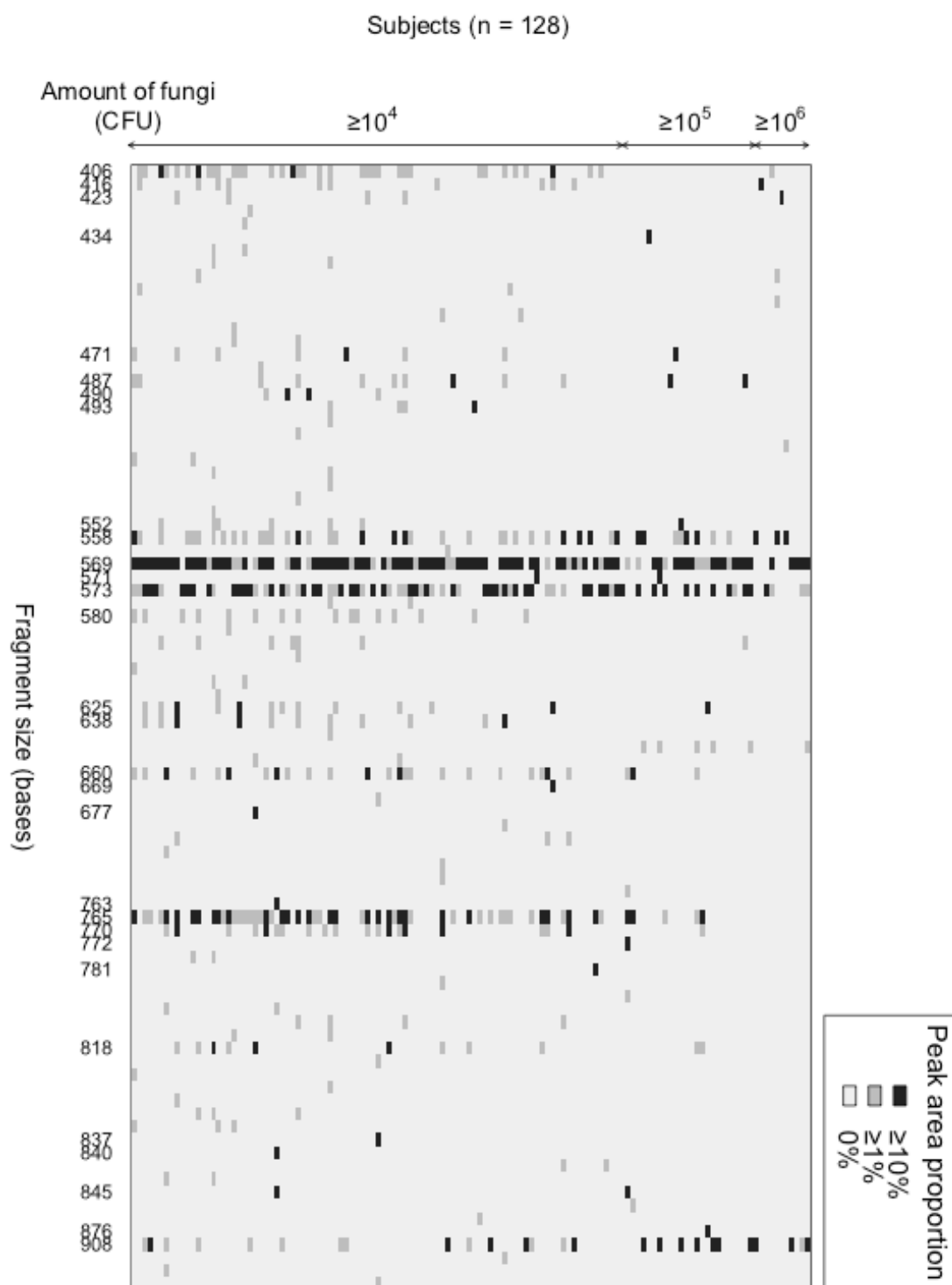


図4 128名の被験者のLH-PCR プロフィール

各ピークのピーク面積比率を各格子のグレースケールで示した。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は、そのサイズを左に示した。被験者128名は総真菌数に従って左から右へ並べた。

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。このうち406塩基、471塩基、490塩基の3つの断片については、類似した配列を有する真菌種が検出されなかったことから真菌の ITS領域由来のものではないとみなし、以降の解析から除外した。残りの27の断片に相当する真菌種を表3に示す。571塩基と573塩基の断片についてはどちらも *Candida dubliniensis*の配列に対し99%以上の相同性を示したことから、両断片を本菌種由来とみなした。同様に763塩基と765塩基の断片についても *Malassezia restricta*の配列と99%以上の相同性を示したため、両断片ともに本菌種由来であるとみなした。105名と最も多くの被験者に検出された569塩基の断片に相当するのは *Candida albicans*であり、*C. dubliniensis* (78名)、*M. restricta* (57名)、*C. tropicalis* (45名) がこれに続いた。検出された多くの断片が既に培養・同定されている菌種に該当していた一方で、uncultured basidiomycete clone BF-OTU192 (26名) や uncultured fungus clone D0-30a_14 (20名) といった未だ培養されておらずその特徴が不明なままである菌種も数多くの被験者の口腔に存在していることが明らかとなった。

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 (% ^a)	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 lusitaniae</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。

^a 検体あたり 10^4 CFU 以上の真菌が認められた 128 名に対する比率を示した。

4. 真菌量ないし構成と発熱との関連

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4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 10^5 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 10^4 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 10^5 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。

表4 口腔内真菌群集と発熱状況との関連

	発熱日数		p値
	7日以上 (67名)	6日以下 (224名)	
舌苔検体あたりの総真菌数			0.037
<10 ⁴ CFU/sample	35 (52.2)	128 (57.1)	
10 ⁴ –10 ⁵ CFU/sample	18 (26.9)	75 (33.5)	
≥10 ⁵ CFU/sample	14 (20.9)	21 (9.4)	
各真菌種の検出			
検体あたり10 ⁴ CFU以上の真菌を有する被験者			
<i>Candida albicans</i>	24 (35.8)	81 (36.2)	1.000
<i>Candida dubliniensis</i>	19 (28.4)	59 (26.3)	0.755
<i>Malassezia restricta</i>	14 (20.9)	43 (19.2)	0.729
<i>Candida tropicalis</i>	15 (22.4)	30 (13.4)	0.084
Uncultured basidiomycete clone BF-OTU192	9 (13.4)	17 (7.6)	0.148
<i>Candida glabrata</i>	9 (13.4)	17 (7.6)	0.148
Uncultured fungus clone D0-30a_14	7 (10.4)	13 (5.8)	0.149
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3 (4.5)	13 (5.8)	1.000
<i>Aspergillus oryzae/flavus</i>	1 (1.5)	12 (5.4)	0.311
<i>Dipodascus capitatus</i>	4 (6.0)	8 (3.6)	0.481
<i>Candida lusitanae</i>	1 (1.5)	10 (4.5)	0.466
Uncultured basidiomycete clone BF-OTU205	5 (7.5)	6 (2.7)	0.134
<i>Candida guilliermondii</i>	2 (3.0)	9 (4.0)	1.000
検体あたり10 ⁵ CFU以上の真菌を有する被験者			
<i>Candida albicans</i>	8 (11.9)	17 (7.6)	0.319
<i>Candida dubliniensis</i>	6 (9.0)	9 (4.0)	0.120
<i>Candida tropicalis</i>	6 (9.0)	5 (2.2)	0.021
<i>Candida glabrata</i>	7 (10.4)	4 (1.8)	0.004
<i>Malassezia restricta</i>	3 (4.5)	2 (0.9)	0.082

以前の研究において既に報告したとおり (13)、本集団においては舌苔の湿润度、義歯の使用、身体活動性、認知症、嚥下障害、抗菌薬の使用、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 (表5)。

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 10^5 CFU以上認められる被験者では、総真菌数が 10^5 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 10^5 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)。

表 5 各臨床指標と発熱状況との関連

パラメーター	発熱状況		p値
	7 日以上 (67名)	6 日以下 (224名)	
年齢 平均 ± 標準偏差	85.3 ± 0.9	85.8 ± 7.4	0.642
性別 人数 (%)			0.822
男性	14 (20.9)	44 (19.6)	
女性	53 (79.1)	180 (80.4)	
舌苔量, 人数 (%)			0.529
なしまたは少量	27 (40.3)	100 (44.6)	
中程度以上	40 (59.7)	124 (55.4)	
舌苔湿潤度, mm, 人数 (%)			<0.001
≥5	19 (28.4)	117 (52.2)	
1.0-4.9	27 (40.3)	88 (39.3)	
<1.0	21 (31.3)	19 (8.5)	
義歯の使用, 人数 (%)			<0.001
使用	19 (28.4)	123 (54.9)	
未使用	48 (71.6)	101 (45.1)	
身体活動性, 人数 (%)			<0.001
歩行可能	4 (6.0)	78 (34.8)	
座位可能	15 (22.4)	84 (37.5)	
寝たきり	48 (71.6)	62 (27.7)	
認知症, 人数 (%)			<0.001
軽度	20 (29.9)	152 (67.9)	
重度	47 (70.1)	72 (32.1)	
嚥下機能, 人数 (%)			<0.001
問題なし	13 (19.4)	142 (63.4)	
嚥下困難	28 (41.8)	74 (33.0)	
嚥下不可能	26 (38.8)	8 (3.6)	
抗菌薬投与日数, 人数 (%)			0.003
0	49 (73.1)	201 (89.7)	
1-4	10 (14.9)	14 (6.3)	
≥5	8 (11.9)	9 (4.0)	
舌苔細菌叢構成パターン, n (%)			<0.000
クラスターA	11 (16.4)	76 (33.9)	
クラスターB	14 (20.9)	11 (4.9)	
クラスターC	26 (38.8)	105 (46.9)	
クラスターD	16 (23.9)	32 (14.3)	

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 ⁵ CFU	1	
≥10 ⁵ CFUかつ <i>C. albicans</i> 検出	1.4 (0.5-4.3)	0.566
≥10 ⁵ 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
認知症		
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

考察

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 (1, 8, 10, 16)。一方で本研究では、*M. restricta* や未だ培養同定されたとの報告がない Uncultured basidiomycete clone BF-OTU192 といった *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。

一方で、ITS 領域を用いて解析が行われた最新の報告によると 101 もの真菌種が若年から壮年の被験者 20 名の口腔から同定されている (3)。我々がより真菌に感染しやすい脆弱な高齢者を対象にしていることを考慮すれば、今回の結果は検出菌種数が少なすぎると思われる。この検出菌種数の違いは両研究が用いた解析手法に起因するものであらうと考えられる。前述の研究で Ghannoum らは膨大な数の塩基配列の解読が可能な次世代シーケンサーを用いて一検体あたり 2,000 近い ITS 領域の塩基配列を決定している。この手法は真菌群集内でごく少量しか存在しないものも同定できる一方で、高感度すぎるが故に偶然口腔に付着したものまで検出してしまうことになる。さらに常

在する真菌量が少ないと思われる健康な若年者の口腔検体ではそのような通過菌を検出する確率はより高くなる。実際、検出された85菌属のうち60は自然界に広範に分布しヒトへの感染があまり報告されていないものであった。彼らの研究において同定されたものの多くはそのような環境由来のものであると考えられ、その点を彼ら自身も指摘している。それに対し我々の解析対象はより多くの真菌が定住すると考えられる高齢者であり、かつ LH-PCR法を用いた構成細菌の評価はある程度の真菌量 (サンプルあたり 10^4 CFU以上) を認めた被験者についてのみ行っている。従って我々の研究によって同定された真菌種は脆弱な高齢者の口腔に定住する真菌群集の主要なメンバーであると考えられる。

本研究で検出された *Candida* 属以外の真菌のうち、*M. restricta* は57名もの被験者から検出され、これは *C. albicans* (105名)、*C. dubliniensis* (78名) に次ぐものであった。*Malassezia* 属の真菌は正常皮膚フローラの主要なメンバーであるが、我々が知る限りこれまで口腔で検出されたとの報告はない。*Malassezia*はその成長において外部からの中鎖ないし長鎖脂肪酸の供給を必要とする basidiomycetes目の真菌であるが、口腔真菌研究においてよく用いられてきた CHROMagar *Candida*や Sabouraud培地はこれらの脂肪酸を含まない。従って口腔での *Malassezia* 属の罹患率はおそらく他の未培養菌同様、不適切な培養条件によって低く見積もられてきた可能性が考えられる。脆弱な高齢者の口腔ではしばしば唾液流量が減少し、それによって乾燥や pH の低下がもたらされる。特に今回の対象者は108名もの寝たきり患者をはじめとす

るとくに脆弱な高齢者であり、通常の口腔粘膜に存在する免疫システムも多くの場合損なわれていると考えられる。このような口腔内環境の大きな変化が皮膚常在真菌の口腔への定着を許す要因となったのかもしれない。

口腔真菌感染が引き起こす症状の多くは粘膜表在性のものであるが、深在性真菌症に至る場合も決して少なくはない。また抗菌薬投与を行っている好中球減少症の患者における持続的な発熱には多くの場合真菌の関与が疑われ抗真菌薬投与が行われる。本研究の対象者は全て65歳以上の高齢者であるうえその三分の一は寝たきり状態であり、発熱のリスクは非常に高い。そこで我々は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。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。例えば、*C. glabrata* は、感染による死亡率が他の *Candida* 菌より高いことが指摘されている (7)。また *C. albicans* に比べて口腔上皮細胞の炎症性サイトカインの誘導が少ないうえ、ヒトの β ディフェンシ

ンに対する感受性が低いとの報告もある (7)。 *C. tropicalis* についても好中球減少症の患者によく検出されることから (6)、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。

今回、培養に依らない分子生物学的手法を用いることで、高齢者の口腔真菌群集の全体像が明らかになった。しかしながらこの手法においても口腔に存在する真菌種の全てを網羅できたわけではない。ITS領域を用いた真菌群集解析においては、いくつかの真菌共通配列を利用したプライマーが用いられているなかで、今回我々は ITS1-Fを使用した。このプライマーは他のユニバーサルプライマーと異なり PCRの際に植物由来の ITS領域を増幅することがない一方で、データベースに登録されているうちの 8.4%の ITS領域の塩基配列にはこのプライマー配列とのあいだに一塩基を超えるミスマッチが存在することが報告されている (2)。さらに様々な PCRバイアスが特定の菌種に偏った選択的増幅の誘因になっている可能性がある。本手法が有用なものであることには疑いはないが、より完全な真菌群集の把握を目指すうえでは異なるプライマーを用いた分子生物学的手法もしくは適切な条件で行った培養法による追加の解析が必要になってくると考えられる。

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。結果の解釈には注意が必要であるとはいえ、分子生物学的手法を用いた網羅的な群集解析は今後と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。

総括

1. 脆弱な高齢者の口腔には *Candida* 菌種に限らず、従来考えられていたよりも多彩な真菌種が生息する。
2. 口腔内の真菌種構成と高齢者の健康状態とは関連する。
3. 分子生物学的手法を用いた網羅的な真菌群集解析は今後も新たな知見をもたらすことが期待できる。

謝辞

長期にわたる調査研究を快くお許しいただき、実際に調査に当たる際にご協力いただきました看護師の皆様や事務職員の方々に心から御礼申し上げます。そして口腔診査および舌苔の採取に快く応じてくださいましたすべての皆様とご家族の方々に感謝の意を表します。

研究の方向性や内容に関して終始多大なご助言、ご指導、ご協力をいただきました口腔予防科学分野山下喜久教授ならびに同分野竹下徹助教に心より御礼申し上げます。また口腔予防医学分野の皆様にも心から感謝申し上げます。

参考文献

1. **Al-Karaawi, Z. M., M. Manfredi, A. C. Waugh, M. J. McCullough, J. Jorge, C. Scully, and S. R. Porter.** 2002. Molecular characterization of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings. *Oral Microbiol Immunol* **17**:44-49.
2. **Bellemain, E., T. Carlsen, C. Brochmann, E. Coissac, P. Taberlet, and H. Kauserud.** 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol* **10**:189.
3. **Ghannoum, M. A., R. J. Jurevic, P. K. Mukherjee, F. Cui, M. Sikaroodi, A. Naqvi, and P. M. Gillevet.** 2010. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog* **6**:e1000713.
4. **Hatakka, K., A. J. Ahola, H. Yli-Knuuttila, M. Richardson, T. Poussa, J. H. Meurman, and R. Korpela.** 2007. Probiotics reduce the prevalence of oral candida in the elderly--a randomized controlled trial. *J Dent Res* **86**:125-130.
5. **Kakinoki, Y., T. Nishihara, M. Arita, K. Shibuya, and M. Ishikawa.** 2004. Usefulness of new wetness tester for diagnosis of dry mouth in disabled patients. *Gerodontology* **21**:229-231.
6. **Kremery, V., and A. J. Barnes.** 2002. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect*

50:243-260.

7. **Li, L., S. Redding, and A. Dongari-Bagtzoglou.** 2007. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res* **86**:204-215.
8. **Lockhart, S. R., S. Joly, K. Vargas, J. Swails-Wenger, L. Enger, and D. R. Soll.** 1999. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. *J Dent Res* **78**:857-868.
9. **Pitkaranta, M., T. Meklin, A. Hyvarinen, L. Paulin, P. Auvinen, A. Nevalainen, and H. Rintala.** 2008. Analysis of fungal flora in indoor dust by ribosomal DNA sequence analysis, quantitative PCR, and culture. *Appl Environ Microbiol* **74**:233-244.
10. **Rothan-Tondeur, M., E. Lancien, T. Pialleport, S. Meaume, R. Moulias, M. Marzais, E. Cambau, and A. F. Le Blanche.** 2001. Prevalence of oropharyngeal candidiasis in geriatric inpatients. *J Am Geriatr Soc* **49**:1741-1742.
11. **Schelenz, S., S. Abdallah, G. Gray, H. Stubbings, I. Gow, P. Baker, and P. R. Hunter.** 2011. Epidemiology of oral yeast colonization and infection in patients with hematological malignancies, head neck and solid tumors. *J Oral Pathol Med* **40**:83-89.
12. **Takeshita, T., Y. Nakano, and Y. Yamashita.** 2007. Improved accuracy in terminal restriction fragment length polymorphism phylogenetic analysis using a novel internal size standard definition. *Oral Microbiol Immunol*

22:419-428.

13. **Takeshita, T., M. Tomioka, Y. Shimazaki, M. Matsuyama, K. Koyano, K. Matsuda, and Y. Yamashita.** 2010. Microfloral characterization of the tongue coating and associated risk for pneumonia-related health problems in institutionalized older adults. *J Am Geriatr Soc* **58**:1050-1057.
14. **White, P. L., D. W. Williams, T. Kuriyama, S. A. Samad, M. A. Lewis, and R. A. Barnes.** 2004. Detection of *Candida* in concentrated oral rinse cultures by real-time PCR. *J Clin Microbiol* **42**:2101-2107.
15. **White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal genes for phylogenetics. Academic Press, San Diego, CA.
16. **Zaremba, M. L., T. Daniluk, D. Rozkiewicz, D. Cylwik-Rokicka, A. Kierklo, G. Tokajuk, E. Dabrowska, M. Pawinska, A. Klimiuk, W. Stokowska, and S. Abdelrazek.** 2006. Incidence rate of *Candida* species in the oral cavity of middle-aged and elderly subjects. *Adv Med Sci* **51 Suppl 1**:233-236.