

カンジダ菌種の研究：殊に同定法の評価と検出に影響を与える
臨床的要因について

(Studies of *Candida* spp.: especially on evaluation of
identification method and clinical factors affecting the detection)

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

口腔病理学

久保田 順子

(指導：久山 佳代 教授)

目 次

参考論文

Abstract

第 1 章 カンジダ菌種同定のためのマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法と培養試験法の比較研究

緒言

対象及び方法

結果

第 2 章 義歯装着者の *Candida albicans* と non-*albicans Candida* spp. の検出に影響する臨床的要因の研究

緒言

対象及び方法

結果

考察

結論

総括

参考文献

参考論文

本論文は，主となる参考論文「Comparative study of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and culture test for *Candida* identification」Open Journal of Stomatology 9(12), 295-306, 2019, DOI: 10.4236/ojst.2019.912030 および副となる参考論文「義歯装着者の *Candida albicans* と non-albicans *Candida* spp. の検出に影響する臨床的要因の研究」日大口腔科学(印刷中), 2020 をまとめたものである。

Abstract

In the 1990s, the distribution of *Candida* species has changed significantly, and the ratio of mixed infection, including non-albicans *Candida* (non-albicans *Ca*) spp. gradually increased. In particular, *Candida glabrata* showed a remarkable increase. There are several reasons for these changes, such as, conducting epidemiological survey to clarify the distribution of *Candida* species, advances in medical technology, physical condition and lifestyle. There is a need for a highly accurate test method for mixed infections. A new microorganism identification method using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has been developed. However, reports on its use for delineating *Candida* spp. are scarce. In addition, there are few reports on factor analysis of affecting mixed infections.

In chapter 1, the purpose of this study was to compare the identification accuracy of mixed infection between culture test and MALDI-TOF MS. In chapter 2, the purpose of this study was to investigate the relationship between the *Candida* species clarified in chapter 1 and clinical factors.

Subjects were 89 patients with dentures who went to Kubota dental clinic from August 2017 to September 2018. Specimens are collected from the denture's mucosal surface and the tongue and immediately inoculated

onto selective medium for CHROMagar™ Candida, and were also carried out using MALDI-TOF MS. The distribution frequencies of them were analyzed. All subjects were then classified into two groups, *Candida* (+) and *Candida* (-) groups. Furthermore, the *Candida* (+) group was classified into *C.albicans* and non-*albicans Ca* groups. Then, clinical information about oral environments, physical conditions and management of dentures were collected. In addition, statistical analyses were performed.

In chapter 1, the numbers and rates of detection/non-detection by MALDI-TOF MS of genus *Candida* were 58/31 (65.2 % / 34.8 %), respectively. Infection types were single infection in 34 (38.2 %), mixed infection in 24 (27.0 %), and non-infection in 31 (34.8 %) cases. Concerning the single infection, *C.albicans* was the most predominant (58.8 %), followed by *C.parapsilosis* (17.6 %), *C.glabrata* (14.7 %), *C.tropicalis* (5.9 %), and *C.krusei* (2.9 %). As for the mixed infection, the most frequent combination was *C.albicans* and *C.glabrata* (50.0 %), followed by *C.albicans* and *C.parapsilosis* (29.2 %), *C.albicans* and *C.tropicalis* (8.3 %), *C.glabrata* and *C.tropicalis* (4.2 %), *C.albicans*, *C.glabrata*, and *C.parapsilosis* (4.2 %), and *C.albicans*, *C.parapsilosis*, and *C.glabrata* (4.2 %). There were four MALDI-TOF MS positive results that were negative by the culture test. Conversely, there were six MALDI-TOF

MS negative results that were positive by the culture test. The concordance rate of genus *Candida* was 0.64 (0.53-0.76), indicating substantial agreement.

In chapter 2, the results showed no significant difference in gender, age, mouth dryness, medical history, and medications in each group. Saliva pH was significantly lower in the *Candida* (+) group, and even lower in the *C.albicans* group. *Candida* detection on the dorsal tongue was associated with that of the denture. For denture management status and examination, as a result of comparing the *Candida* (+) and the (-) group, denture management, denture conformity, and denture plaque were related factors.

Candida infection is complicated by disease type and oral cavity environment changes due to aging. A rapid microorganism detection method, such as MALDI-TOF MS, will quickly determine the causative pathogen in dental infections. Denture management was a related factor between *C.albicans* and non-*albicans* *Ca* groups.

Keywords

Candida species (spp.), MALDI-TOF MS, *Candida albicans* (*C.albicans*),
non-albicans *Candida* (non-albicans *Ca*), denture management status

キーワード

カンジダ属, MALDI-TOF MS, *Candida albicans* (*C.albicans*),
non-albicans *Candida* (non-albicans *Ca*), 義歯管理状況

第1章 カンジダ菌種同定のためのマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法と培養試験法の比較研究

緒言

カンジダは子囊菌系のなかでも大きい属を形成し、200菌種以上が存在する[1]。カンジダ菌種は、成人、小児を含む健常者の25-50%の口腔内に認められ、義歯装着者に限定した場合、その頻度は60-100%に増す[2]。さらに、可撤性義歯[3]、可撤式矯正装置[4]などのような歯科補綴装置を装着することは、口腔内におけるカンジダのコロニー形成を促進させる。

Candida albicans は最も頻度が高く分離される種であり、カンジダ感染症の約70%を占める [5][6]。一方、non-*albicans Candida* (*Ca*)は、その検出が増えてきており [7][8][9]、ヒトへの感染における新たな役割に関心が集まっている [10][11]。non-*albicans Ca* の感染増加は、診断感度の向上と *C.albicans* と比較して宿主内耐性が優っていると推察される。例えば、ヒトに対する混合感染においては、non-*albicans Ca* は極めて高い抗真菌薬耐性を示すことが報告されている [10]。

CHROMagar™ *Candida* は非常に有用な培地で、口腔検体から分離されるほぼ90%を占める *C.albicans*, *C.tropicalis*, *Pichia kudriavzevii*, *C.glabrata* を識別する [12][13]。しかしながら、混合感染からのカンジ

ダ菌種の識別精度に関する検討は殆ど行われていない。すなわち、混合感染を伴う様々な基礎疾患を持つ患者における CHROMagar™ Candida による同定精度に関するエビデンスは不十分である。飛行時間型質量分析法 (Time Of Flight-Mass Spectrometry, TOF MS)のなかでも検体とマトリックス混合物を用いるマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight-Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)を用いた新しい微生物同定法が開発された。細菌菌種の同定が治療法に直接関与する医学臨床分野や食品製造分野での応用が先行したが[14],カンジダ菌種の識別に関する報告は非常に少ない[15][16][17]。

したがって本研究の目的は、高齢義歯装着者を対象に CHROMagar™ Candida 培養試験法と MALDI-TOF MS のカンジダ混合感染における菌種同定精度を比較し、カンジダ分布状況について検討することである。

対象および方法

1. 研究対象者

対象は 2017 年 8 月から 2018 年 9 月の間に、義歯の調整や検診のために、くぼた歯科・矯正歯科を受診し研究の主旨に同意を得た 89 名の義歯装着者 (男性 49 名, 女性 40 名)とした。平均年齢は、 74.0 ± 9 歳 (43-99 歳)であった。対象者は、1) 義歯の管理は自己で行っている総義

歯または局部床義歯装着者, 2) 口腔内検査及び口腔内細菌検査実施者, 3) 本研究参加に同意している者, 4) 在宅自立生活者である。義歯形態は, 上顎総義歯 25 例, 上顎局部床義歯 47 例, 下顎総義歯 2 例, 下顎局部床義歯 15 例であった。義歯性口内炎の判定は Newton ら[18]に従った。除外基準は, 全身状態として a) 認知症の症状を認める者, b) 免疫抑制療法や化学療法受療中の者, 局所状態として c) 抗真菌薬や殺菌性洗口液の使用者, d) 義歯未装着者とした。

2. 微生物学的検査

(1) 検体採取

検体は朝食後 2 時間以上経過した午前中とし, 患者の義歯床粘膜面および舌背を滅菌精製水に浸した綿棒で 10 回擦過して採取した。

(2) CHROMagar™ 培養試験法

採取された検体は, 直ちに CHROMagar™ Candida (KANTO KAGAKU, Tokyo, Japan)に塗抹した。検体は 25 °Cで 24~48 時間の好気性インキュベーションの後, コロニーはプロトコール (*C.albicans* は特徴的な緑色, *C.glabrata* は紫色~淡桃色, *C.tropicalis* は桃色の縁取りを有する濃青色, *Pichia kudriavzevii* はその表面粗造で白色の縁取りを有する淡桃色, *C.parapsilosis* は白か淡桃色)[19]に従って観察した。カンジダ菌種の推定は 2 人の研究者がキャリブレーションの後, 別々に肉眼にて行った。上記 48 時間後に陰性であった培地は, さらに 37 °Cで 2 週間保温を続

け、コロニー形成が認められない場合は陰性と判定し、一方、認められた検体は MALDI-TOF MS に供した。

(3) MALDI-TOF MS

(2)でコロニーが形成されたすべての検体の前処理は、真菌のコロニーから滅菌楊枝を用いて検体を採取し、ターゲット・プレート上に薄く塗布したのち、1 μ L のマトリックス試薬を添加し、乾燥させた (ダイレクトスマア法)。分析装置 MALDI-TOF MS (BD Burkler MALDI BiotyperTM; BD)でサンプルシートを作成し、前処理後のスライドをセットし分析を行った[20]。サンプルの塗布は 1 回とし、検体に対する BD による測定は数回行い、質量スペクトルの各ピークの平均値と強度を計測した。得られたマススペクトルは、スペクトル・マッチングライブラリーと自動的に照合が行われ、同定結果がスコア値として表された。そのスコア値が 2.0 以上であった場合を、細菌種レベルでの同定結果とした。

3. 統計解析

CHROMagarTM Candida 培養試験法および MALDI-TOF MS により得られた義歯床粘膜からのカンジダ菌種の分布頻度は統計学的検討を施した。2 種の同定法間の一致率はカッパ係数を用いて 95 %信頼区間[CI]で解析した。研究で使用された統計解析ソフトウェアは、Bell Curve for Excel を使用した。

研究対象者全員からインフォームド・コンセントが得られた。本研究は日本大学松戸歯学部倫理委員会の承諾を得て行った (EC-15-14-033-01)。

結 果

1. 研究対象者の特性

対象者の詳細を Table 1 に示す。対象者の性別は男性 49 名，女性 40 名 (平均年齢 74.1 ± 9.1 歳)，装着義歯別人数は上顎総義歯 25 名，下顎総義歯 2 名，上顎局部床義歯 47 名，下顎局部床義歯 15 名，平均人工歯数は 9.88 本であった。義歯床下粘膜は肉眼的に，義歯性口内炎 (DRS) が 18 例 (20.2 %) で認められ，71 例 (79.8 %) では認められなかった。DRS 18 例の肉眼所見は，赤色病変 13 例 (72.2 %)，白色病変 3 例 (16.7%)，赤色白色混在病変 2 例 (11.1 %) であった。

2. 微生物の分布

微生物の分布についての結果は，Table 2 に示す。

(1) CHROMagar™ 培養試験法

計 59 名 (66.3 %) の義歯床粘膜面から検出されたカンジダ (義歯 *Candida*) のコロニーが検出され，34 名 (57.6 %) が単独感染，25 名 (42.4 %) が混合感染であった。単独感染については，*C.albicans* が 24 名 (70.6 %)，*C.parapsilosis* が 4 名 (11.8 %)，*C.glabrata* が 4 名 (11.8 %)，*C.tropicalis* が 2 名 (5.9 %) であった。混合感染については，*C.albicans*

と *C.glabrata* が 15 名 (60.0 %), *C.albicans* と *C.parapsilosis* 5 名 (20.0 %), *C.albicans* と *C.tropicalis* 3 名 (12.0 %), *C.albicans* と *Pichia kudriavzevii* 1 名 (4.0 %), *C.albicans* と *C.parapsilosis* と *C.tropicalis* 1 名 (4.0 %)であった。

(2) MALDI-TOF MS

カンジダ属の検出数は 58 名 (65.2 %)であり, 34 名 (38.2 %)が単独感染, 24 名 (27.0 %)が混合感染であった。単独感染症例については, *C.albicans* が 20 名 (58.8 %)で最も多く, 次いで *C.parapsilosis* 6 名 (17.6 %), *C.glabrata* 5 名 (14.7 %), *C.tropicalis* 2 名 (5.9 %), *Pichia kudriavzevii* 1 名 (2.9 %)の順であった。混合感染症例で最も頻度が高かった組み合わせは, *C.albicans* と *C.glabrata* 12 名 (50.0 %), 次いで *C.albicans* と *C.parapsilosis* 7 名 (29.2 %), *C.glabrata* と *C.tropicalis* 2 名 (8.3 %), *C.albicans* と *C.glabrata* と *C.parapsilosis* 2 名 (8.3 %), そして, *C.albicans* と *C.tropicalis* 1 名 (4.2 %)の順であった。

(3) 培養試験法と MALDI-TOF MS の結果の比較

培養試験法で陰性であったが MALDI-TOF MS で陽性であった症例が 5 例であった (*C.albicans* 3 例, *C.parapsilosis* 1 例, *C.albicans* と *C.glabrata* 1 例)。一方, 培養試験法で陽性であったが, MALDI-TOF MS で陰性となった結果が 6 例であった (*C.albicans* 5 例, *C.albicans* と *C.parapsilosis* 1 例)。

3. 統計解析結果

2種の検査法の一一致度(カッパ係数)は0.64(0.53~0.76)であり、一致していた[21]。Table 2は、すべてのカンジダ属の単独感染と混合感染の一一致率、および混合感染の組み合わせの一一致率を示している。単独感染の一一致率は *C.albicans* 85.0%、*C.glabrata* 80.0%、*C.parapsilosis* 50.0%、*C.tropicalis* 50.0%、*Pichia kudriavzevii* 0.0% であった。また、混合感染の一一致率は *C.albicans* と *C.tropicalis* 100.0%、*C.albicans* と *C.glabrata*, 91.7%、*C.albicans* と *C.parapsilosis* 28.6%、*C.glabrata* と *C.tropicalis* 0.0%、*C.albicans* と *C.glabrata* と *C.parapsilosis* 0.0%であった。さらに、カンジダ陰性の一一致率は80.6%であった。

Table 1. 研究対象者の内訳

Item	Character	
Sex	Male	49
	Female	40
	Total	89
Age (mean±standard deviation)	Male	74.1±9.0
	Female	74.1±9.0
	Total	74.1±9.1
Denture types	Maxillary complete denture	25
	Mandibular complete denture	2
	Maxillary partial denture	47
	Mandibular partial denture	15
Denture stomatitis	Reddish mucosa	13
	Whitish mucosa	3
	Mixed red and white	2
	Total	18

Table 2. 培養試験法 (CHROMagar™) と MALDI-TOF MS のクロス集計結果

	MALDI-TOF MS													Non-detection	Total
	<i>C.a</i> *	<i>C.g</i> **	<i>C.k</i> ***	<i>C.p</i> †	<i>C.t</i> ††	<i>C.a, C.g</i>	<i>C.a, C.k</i>	<i>C.a, C.p</i>	<i>C.a, C.t</i>	<i>C.g, C.t</i>	<i>C.a, C.g, C.p</i>	<i>C.a, C.p, C.t</i>			
<i>C.a</i>	17	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	5	24
<i>C.g</i>	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>C.k</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C.p</i>	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>C.t</i>	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
<i>C.a, C.g</i>	0	0	0	0	0	11	0	2	0	1	0	0	0	0	15
<i>C.a, C.k</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>C.a, C.p</i>	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	1	0	0	1	5
<i>C.a, C.t</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3
<i>C.g, C.t</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C.a, C.g, C.p</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C.a, C.p, C.t</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Non colonies	3	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	25
Total (n)	20	5	1	6	2	12	0	7	1	2	2	2	0	31	89
Concordance rate (%) †	85.0	80.0	0.0	50.0	50.0	91.7	-	28.6	100.0	0.0	0.0	-	-	80.6	
Cohen's kappa	0.70	0.88	-	0.58	0.49	0.78	-	0.29	0.49	-	-	-	-	0.73	0.64(0.53-0.76)

*C.a**: *Candida albicans*

*C.g*** : *Candida glabrata*

*C.k****: *Candida krusei*

C.p†: *Candida parapsilosis*

C.t††: *Candida tropicalis*

† : Number agreed in MALDI-TOF MS and agar dived by total MALDI-TOF MS

第2章 義歯装着者の *Candida albicans* と non-*albicans* *Ca* spp.の検出 に影響する臨床的要因の研究

緒言

1980年代においては、カンジダ症の原因菌として最も多いものとして *C.albicans* があげられておりカンジダ菌種全体の大多数を占めるとされていた[19][22]が、1990年代に入ると、カンジダ菌種分布に大きな変化が現れた。最も目立つのは non-*albicans* *Ca* の比率が徐々に上昇したことであり、特に *Candida glabrata* は他を凌ぐ増加ぶりを示した[22][23]。それらの変化の理由としては、アゾール系抗真菌薬の過剰使用や免疫能の低下した患者の増加、また多様化した *Candida* 菌種分布を知るために世界の広い地域で疫学的サーベイランスが行われるようになって来たことなどがあげられる[19]。代表的なサーベイランスである世界39ヶ国を対象とした ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Program [19][22]によれば、上位5菌種に *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicaris*, *Pichia kudriavzevii* が入り、なかでも *C.albicans* と *Pichia kudriavzevii* が第1位と第5位であるが、残り3菌種の分布比率は国や民族により違いがみられるとされている[23]。その原因として、多剤服用や宿主側である人の全身状態および生

活習慣が関連してくると思われるが、要因解析に関する報告は少ない [7][8][9]。

第 1 章の研究の結果、対象者の義歯床下粘膜面から検出されたカンジダ属(義歯 *Candida*)の 27.0 %が混合感染であった。さらに単独感染症例については、*C.albicans* (58.8 %), *C.parapsilosis* (17.6 %), *C.glabrata* (14.7 %), *C.tropicalis* (5.9 %), *Pichia kudriavzevii* (2.9 %) の順であった。混合感染症例では、*C.albicans* と *C.glabrata* (50.0 %), 次いで *C.albicans* と *C.parapsilosis* (29.2 %)であった。この *Candida* 菌種の分布に影響を与える要因解析を第 2 章で行った。

対象および方法

1. 研究対象者

対象者の 89 名は第 1 章と同一とした。本研究は日本大学松戸歯学部倫理委員会の承認 (EC17-030 号, EC18-021 号)を得て行った。

2. 検査項目

被検者は診療ユニットに着座し、義歯を外して滅菌トレーの上に置いた後、1名の歯科医師により以下の(1)~(5)の手順に沿って検査を行った。尚、検査は朝食から 2 時間以上経過した午前中に実施した。

(1) 対象者のカンジダ菌種情報の収集

第 1 章で実施したデータを用いた。

(2) 口腔水分計による湿潤度の測定

湿潤度の測定は、口腔水分計 (ムーカス, KL-2, ライフ社, 日本)を用いて行い、測定部位は、舌尖より約 10 mm 後方の舌背粘膜部分とした。被験者に舌を突出させ約 200 g の圧で行った。そして 3 回測定したのちその中央値を測定値とし、27 未満を口腔乾燥とした[24]。

(3) 唾液 pH の測定

ブックタイプの pH 試験紙 (TEST PAPER ADVANTEC, 東洋濾紙株式会社, 日本)を用いて行った。試験紙を被験者の舌背に置き、閉口して唾液に湿潤させた後、色の変化を観察し、pH5.4-7.0 の間で 0.2 ごとの 9 段階の色見本と比色し照合させることで測定した。

(4) 既往歴および服薬状況の調査

被験者の全身疾患の既往歴は聞き取りにて、また服用薬剤の種類と数は薬手帳による服薬状況の記録から調査した。

(5) 問診票に基づく義歯管理状況の調査と義歯診察記録

義歯管理状況調査票により、「日中の装着」、「夜間の装着」、「はずした義歯」の保管状態、「義歯用ブラシ」使用の有無、「義歯洗浄剤」使用の有無、「義歯安定剤使用」の有無、「義歯の使用期間」について問診を行った。尚、これらの項目に関しては、日本老年歯科学会ガイドライン「診療室における義歯洗浄と歯科衛生士による義歯管理指導の指針 2013 年版」を引用した[25]。また義歯の状態として、日本補綴歯

科学会「義歯診察・検査記録用紙」[26]を参照し、「義歯の形状」,「義歯の適合」,「デンチャープラーク」の有無について調べた。「義歯の適合」は適合試験材(フィットチェッカー, 株式会社ジーシー, 日本)を用いて,「デンチャープラーク」の有無は視診にて判定した。

3. 統計学的解析

本研究では, 第一章の同定結果から対象者 89 名を *Candida* (+)群 58 名と *Candida* (-)群 31 名の 2 群に分類した (Table 1)。さらに *Candida* (+)群 58 名を, その菌種による感染形態から, *Candida albicans* 群 42 名 (*Candida albicans* の単独感染および混合感染, 以降 *C. albicans* 群)と, non-*albicans Candida* 群 16 名 (*Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii* 4 菌種の単独感染および混合感染, 以降 non-*albicans Ca* 群)の 2 群に分類した (Table 2)。それらの 2 群間と, 性別および年齢, 既往歴および服薬状況, 口腔湿潤度, 唾液 pH, 舌背から検出された *Candida* (舌 *Candida*)との関連, および義歯管理状況と義歯の状態に対して統計学的解析を行った。口腔水分計値および pH 値は Mann-Whitney U test にて比較し, 既往歴, 服薬の有無, 義歯管理状況についての回答割合は, χ^2 検定もしくは度数が 5 未満であれば Fisher's Test にて検討した。有意水準は, 0.05 とした。解析には, 統計ソフト SPSS Statistics V20.0 (IBM 社, 東京)を用いた。

結 果

2 群間と各要因項目との統計学的解析結果について述べる。

(1) 全身状態との関連

1) 年齢

年齢は、*Candida* (+)群の年齢中央値 (4 分位範囲)74 (12.0)歳、*Candida* (-)群では 72.0 (13.0)歳であり有意な差はみられなかった ($p=0.756$) (Table 1)。また *C.albicans* 群と non-*albicans Ca* 群の 2 群間においても、年齢中央値での有意な差はみられなかった ($p=0.066$)(Table 2)。

2) 既往歴

高血圧症，糖尿病，脂質異常症，心疾患，脳血管疾患，呼吸器疾患，消化器疾患，骨粗鬆症の有無と，*Candida* (+)群と *Candida* (-)群の 2 群間では有意な差はみられなかった (Table 3)。また上記の項目と，*C.albicans* 群，non-*albicans Ca* 群の 2 群間との関係においても有意な差はみられなかった (Data not shown)。

3) 服薬状況

降圧剤，血糖降下剤，脂質異常症治療剤，抗血栓剤，消化性潰瘍剤，向精神薬，心疾患治療剤，骨粗鬆症治療剤，気管支拡張剤，ステロイド剤の服用の有無，および多剤服用 (服用なし，1～2 種，3 種以上)と，*Candida* (+)群と *Candida* (-)群の 2 群間において有意な差はみられなかった (Table 3)。また上記の項目と *C.albicans* 群，non-*albicans Ca* 群の 2 群間との関連においても有意な差はみられなかった (Data not shown)。

しかし多剤服用では、*Candida* (+)群において、薬剤数が増加するに従い *Candida* (+)比率が増加する傾向にあった。

(2) 口腔内環境との関連

1) 口腔水分計による湿潤度

Candida (+)群と *Candida* (-)群の 2 群間において、*Candida* (+)群の湿潤度は 29.8 (1.9)、*Candida* (-)群は 30.0 (2.1)であり有意な差はみられなかった ($p=0.451$)(Table 1)。また *C.albicans* 群と、non-albicans *Ca* 群の 2 群間において、*C.albicans* 群の湿潤度は 29.70 (1.9)、non-albicans *Ca* 群は 30.0 (1.90)であり、有意な差はみられなかった ($p=0.514$)(Table 2)。

2) 唾液 pH

Candida (+)群と *Candida* (-)群の 2 群間において、*Candida* (+)群の唾液 pH は 6.70 (0.80)、*Candida* (-)群は中央値 7.00 (0.40)であり、*Candida* (+)群では唾液 pH の低下を示し有意な差が認められた ($p=0.002$)(Table 1)。一方、*C.albicans* 群の唾液 pH は 6.60(0.80)、non-albicans *Ca* 群では 6.80(0.75)であり、有意な差はみられなかった ($p=0.831$)(Table 2)。

3) 舌 *Candida*

Candida (+)群と *Candida* (-)群の 2 群間において、舌 *Candida* の有無、舌 *C.albicans* の有無、舌混合感染の有無において有意な差が認められた ($p<0.001$)。また、舌 non-albicans *Ca* の有無と ($p=1.000$)、舌単独感

染の有無($p=0.401$), 舌 *Candida* 以外の真菌の発現に関しては有意な差はみられなかった($p=0.236$)(Table 4)。

一方, *C.albicans* 群と non-*albicans Ca* 群の 2 群間では, 舌 *C.albicans* の有無 ($p=0.001$)と舌 non-*albicans Ca* の有無 ($p=0.001$), 舌 *Candida* 菌以外の真菌の発現に関しては有意な差が認められた ($p=0.043$)。また舌 *Candida* の有無 ($p=0.672$), 舌混合感染の有無 ($p=0.772$), および舌単独感染の有無 ($p=0.967$)においては有意な差はみられなかった (Table 5)。

4) 義歯管理状況

Candida (+)群と *Candida* (-)群の 2 群間において, 「日中の装着」($p=0.056$), 「夜間の装着」 ($p=0.170$), 「ブラシの使用」 ($p=0.769$), 「義歯安定剤」使用の有無 ($p=0.326$)に関して有意な差はみられなかった。

「はずした義歯」の保管状態 ($p=0.007$), 「義歯洗淨剤」の使用の有無 ($p<0.001$), 「義歯の使用期間」 ($p=0.003$)では有意な差が認められた (Table 6)。

C.albicans 群, non-*albicans Ca* 群の 2 群間においては, 「日中の装着」($p=1.000$), 「夜間の装着」 ($p=0.755$), 「ブラシの使用」 ($p=0.582$), 「義歯安定剤」 ($p=0.117$), 「義歯の作成時期」 ($p=0.523$)では有意な差はみられなかった。「はずした義歯」の保管状態 ($p=0.009$), 「義歯洗淨剤」 ($p=0.003$)では有意な差が認められた (Table 7)。

5) 義歯の状態

Candida (+)群と *Candida* (-)群の 2 群間においては、「義歯の形状」($p=0.127$)では有意な差はみられず、「義歯の適合」($p=0.001$), 「デンチャープラーク」($p<0.001$)において有意な差が認められた (Table 8)。
C.albicans 群, non-*albicans Ca* 群の 2 群間においては、「義歯の形状」($p=0.135$), 「義歯の適合」($p=0.061$), 「デンチャープラーク」($p=0.133$) 共に有意な差はみられなかった (Table 9)。

Table 1. *Candida* の有無による年齢・唾液 pH・口腔粘膜湿潤度との関連

	<i>Candida</i> (+) (n=58)		<i>Candida</i> (-) (n=31)		p値*
	median	interquartile range	median	interquartile range	
年齢	74.0	12.0	72.0	13.0	0.756
口腔粘膜湿潤度	29.8	1.9	30.0	2.1	0.451
唾液pH	6.7	0.8	7.0	0.4	0.002

* Mann-Whitney U test

Table 2. *Candida albicans* と non-*albicans Candida* による年齢・唾液 pH・口腔粘膜湿潤度との関連

	<i>C. albicans</i> (n=42)		non- <i>albicans Ca</i> (n=16)		p値*
	median	interquartile range	median	interquartile range	
年齢	74.5	11.3	71.5	11.5	0.066
口腔粘膜湿潤度	29.70	1.9	30.0	1.90	0.514
唾液pH	6.60	0.8	6.8	0.75	0.831

* Mann-Whitney U test

Table 3. *Candida* の有無による既往歴および服用薬剤との関連

	<i>Candida</i> (+)		<i>Candida</i> (-)		p値*, **	
	n=58	%	n=31	%		
高血圧	28	48.3	14	45.2	0.779	
糖尿病	13	22.4	5	16.1	0.586	
脂質異常症	13	22.4	2	6.5	0.075	
心疾患	9	15.5	1	3.2	0.155	
脳血管疾患	3	5.2	3	9.7	0.416	
呼吸器疾患	2	3.4	2	6.5	0.608	
消化器疾患	3	5.2	2	6.5	1.000	
骨粗鬆症	2	3.4	3	9.7	0.337	
その他***	5	8.6	2	6.5	1.000	
降圧剤	31	53.4	15	48.4	0.649	
血糖降下剤	14	24.1	6	19.4	0.607	
脂質異常症治療剤	16	27.6	4	12.9	0.182	
抗血栓剤	9	15.5	3	9.7	0.531	
消化性潰瘍剤	15	25.9	6	19.4	0.491	
睡眠導入剤・抗不安薬	7	12.1	5	16.1	0.746	
不整脈・狭心症治療剤	7	12.1	2	6.5	0.487	
骨粗鬆症治療剤	2	3.4	2	6.5	0.608	
気管支拡張剤	2	3.4	1	3.2	1.000	
ステロイド剤	1	1.7	1	3.2	1.000	
	無し	16	27.6	12	38.7	
多剤服用	1~2種	20	34.5	9	29.0	0.560
	3種~	22	37.9	10	32.3	

* χ^2 検定, **Fisher's Test, ***通風, 膠原病, 前立腺肥大, 甲状腺機能亢進症を含む。

Table 4. *Candida* の有無による舌 *Candida* との関連

	<i>Candida</i> (+)		<i>Candida</i> (-)		p値 ^{*,**}
	n=58	%	n=31	%	
舌 <i>Candida</i>	50	86.2	11	35.5	< 0.001
舌 <i>C.albicans</i>	43	74.1	8	25.8	< 0.001
舌 non-albicans <i>Ca</i>	7	12.1	3	9.7	1.000
舌混合感染	28	48.3	2	6.5	< 0.001
舌単独感染	22	37.9	9	29.0	0.401

* χ^2 検定, **Fisher's Test

Table 5. *Candida albicans* 群と non-*albicans Candida* 群による舌 *Candida* との関連

	<i>C.albicans</i> (n=42)	non- <i>albicans Ca</i> (n=16)	p値 [*] ,**
舌 <i>Candida</i>	37	13	0.672
舌 <i>C.albicans</i>	36	7	0.001
舌 non- <i>albicans Ca</i>	1	6	0.001
舌混合感染	21	7	0.772
舌単独感染	16	6	0.967

* χ^2 検定, **Fisher's Test

Table 6. *Candida* の有無による義歯管理状況との関連

	<i>Candida</i> (+)		<i>Candida</i> (-)		p値*, **	
	n=58	%	n=31	%		
1. 日中の装着	1日中装着	52	89.7	23	74.2	0.056
	食事の時のみ装着	6	10.3	8	25.8	
2. 夜間の装着	毎日はずす	41	70.7	26	83.9	0.170
	毎日装着	17	29.3	5	16.1	
	水につける	3	5.2	7	22.6	
3. はずした義歯	義歯洗浄剤につける	36	62.1	21	67.7	0.007
	はずしてそのまま	19	32.8	3	9.7	
	歯ブラシ	5	8.6	2	6.5	
4. ブラシの使用	義歯用ブラシ	33	56.9	16	51.6	0.769
	使わない	20	34.5	13	41.9	
5. 義歯洗浄剤	使っている (常に+時々)	34	58.6	23	74.2	< 0.001
	使っていない	24	41.4	8	25.8	
	常に使っている	4	6.9	0	0.0	
6. 義歯安定剤	時々使っている	5	8.6	3	9.7	0.326
	使っていない	49	84.5	28	90.3	
	1年未満	3	5.2	28	29.0	
7. 義歯の使用期間	1年～5年	36	62.1	28	58.1	0.003
	5年以上	19	32.8	28	12.9	

* χ^2 検定, **Fisher's Test

Table 7. *Candida albicans* 群と non-*albicans Candida* 群による義歯管理状況との関連

	<i>C. albicans</i>		non- <i>albicans Ca</i>		p値*, **	
	n=42	%	n=16	%		
1. 日中の装着	1日中装着	37	88.1	15	93.8	1.000
	食事の時のみ装着	5	11.9	1	6.2	
2. 夜間の装着	毎日はずす	29	69.0	12	75.0	0.755
	毎日装着	13	31.0	4	25.0	
	水につける	3	7.1	0	0.0	
3. はずした義歯	義歯洗浄剤につける	21	50.0	15	93.8	0.009
	はずしてそのまま	18	42.9	1	6.2	
	歯ブラシ	3	7.1	2	12.5	
4. ブラシの使用	義歯用ブラシ	23	54.8	10	62.5	0.582
	使わない	16	38.1	4	25.0	
5. 義歯洗浄剤	使っている (常に+時々)	19	45.2	15	93.8	< 0.001
	使っていない	23	54.8	1	6.2	
	常に使っている	2	4.8	2	12.5	
6. 義歯安定剤	時々使っている	2	4.8	3	18.8	0.117
	使っていない	38	90.5	11	68.8	
	1年未満	3	7.1	0	0.0	
7. 義歯の使用期間	1年～5年	26	61.9	10	62.5	0.523
	5年以上	13	31.0	6	37.5	

Table 8. *Candida* の有無による義歯の状態との関連

	<i>Candida</i> (+)		<i>Candida</i> (-)		p値*, **
	n=58	%	n=31	%	
義歯の形状	下顎全部床	1	1.7	1	3.2
	下顎局部床	6	10.3	8	25.8
	上顎全部床	20	34.5	5	16.1
	上顎局部床	31	53.4	17	54.8
	適切	16	27.6	21	67.7
義歯適合	部分的に不適合	32	55.2	9	29.0
	広範囲に不適合	10	17.2	1	3.2
	無	27	46.6	27	87.1
デンチャープラーク	有	31	53.4	4	12.9
					< 0.001

* χ^2 検定, **Fisher's Test

Table 9. *Candida albicans* と non-*albicans Candida* 群による義歯の状態との関連

	<i>C. albicans</i>		non- <i>albicans Ca</i>		p値*, **
	n=42	%	n=16	%	
義歯の形状	下顎全部床	1	2.4	0	0.0
	下顎局部床	4	9.5	2	12.5
	上顎全部床	11	26.2	9	56.2
	上顎局部床	26	61.9	5	31.2
義歯適合	適切	10	23.8	6	37.5
	部分的に不適合	27	64.3	5	31.2
	広範囲に不適合	5	11.9	5	31.2
	無有	17	40.5	10	62.5
デンチャープラーク	25	59.5	6	37.5	0.133

* χ^2 検定, **Fisher's Test

考 察

本研究の結果、MALDI-TOF MS で *C.albicans* (58.8%)が最も多く、次いで *C.parapsilosis* (17.6%), *C.glabrata* (14.7%), *C.tropicalis* (5.9%), *Pichia kudriavzevii* (2.9%)の順であった。種の分布は他の報告と類似していたが[5][6], non-albicans *Ca* の割合が過去の報告[27][28]より高く、殊に院内感染の原因菌として重要な *C.parapsilosis* と *C.glabrata*が多かった。*C.glabrata* は免疫抑制治療と抗菌治療に[10][29], *C.parapsilosis* は侵襲的な処置に深く関連する[11]と述べられている。本研究で認められた non-albicans *Ca* の割合の高さは、研究対象者のコホート特性によると推察された。また本研究の結果、38.2%は一種のカンジダ種しか分離されなかったが、27.0%は2個以上のカンジダ種を持っており、これは Lockhart らの報告[30]と同様な結果を示した。近年の non-albicans *Ca* を含む混合感染の報告では、*C.parapsilosis* (36.6%), *C.tropicalis* (35.4%), *C.glabrata* (24.3%), *Pichia kudriavzevii* (3.75%)と述べられた[31]。一方本研究では、最も高い頻度で見られた組み合わせは、*C.albicans* と *C.glabrata* (50.0%)であり、混合感染の 87.5%は *C.albicans* と non-albicans *Ca* の組み合わせであった。本研究で頻度高く分離された種の中の *C.glabrata* と *C.parapsilosis* は近年、全身性のカンジダ症の原因ともいわれ、*C.glabrata* 感染については死亡例が報告されている[32][33]。

CHROMagar™ Candida 培養試験法と MALDI-TOF MS 間のカッパ係数は 0.644 であり，一致が認められた[21]。単独感染の中で最も高い一致率を示した菌種は *C.albicans* であり，次いで *C.glabrata* であった。これらの高い一致率は，培地上で形成する *C.albicans* (特徴的な緑色)と *C.glabrata* (紫色)のコロニー色が識別しやすいためと考えた。これとは逆に，*C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *Pichia kudriavzevii* は類似したコロニー色を呈するために，低い一致率を示した。さらに，混合感染に関しては，*C.albicans* と *C.parapsilosis*, *C.glabrata* と *C.tropicalis*, *C.albicans* と *C.glabrata* と *C.parapsilosis* の組み合わせは一致率が低い，あるいは一致しなかった。この原因は，培地上の菌数が多く，混合感染のためにコロニーが融合した，あるいはコロニー色の識別が主観的であったことなどが推測された。一方，MALDI-TOF MS の精度は，混合感染でも高値であった。それは各カンジダ種のスペクトルパターンマッチングによって誤認が少なかったためと推測された。その理由として同一菌種でも 2 つ以上の菌株についてのスペクトルがスペクトルライブラリーに登録されていたため，菌株間にスペクトルパターンの相違点があった場合でも，正しい同定が可能であったと考えられた。第 1 章の本研究結果を鑑みると，高齢者における non-albicans *Ca* の感染の拡大が認められ，カンジダ菌種手同定法に関する検討の意義が示された。

MALDI-TOF MS は迅速で正確な微生物検出法であり，non-albicans *Ca*

や混合感染の増加に伴うカンジダ菌種同定への応用価値が示された [34]。

第 2 章の研究の結果，義歯床粘膜面でのカンジダ菌種の分布と全身的な要因との関連性は認められなかった。カンジダ症等の病変がない健康者の口腔からの *C.albicans* の検出は，加齢と共に増加する [35] と述べられているが，本研究では，カンジダ検出の有無及び *C.albicans* か否かの 2 つの群間に，年齢による有意差は認められなかった。本研究の対象者が義歯を装着する高齢者層に集中していたためと考えられた。一方，既往歴および服薬状況と 2 つの群間に有意差は認められなかったものの，服用薬剤数が増加すると *Candida* (+) 比率が上昇する傾向にあった。本研究では対象者が健康または比較的軽度な慢性疾患を有する集団であったため，義歯 *Candida* の検出と有意に関連を示す既往歴は認められなかったと推察された。しかし，既往歴や服薬状況との関連性に対する疫学的証左を得るにはさらなる検討の余地が残された。

そこでカンジダ菌種の分布と口腔内の要因との関連性を検討した。本研究では，カンジダ検出の有無や，*C.albicans* か否かの 2 つの群間に口腔湿潤度との関連性は認められなかった。理由として，対象者が基礎疾患はあるが通院可能で，口腔乾燥を主訴とした集団ではなかったためと推察された。一方，本研究の唾液 pH の結果は *Candida* (+) 群が 6.7 であり，*Candida* (-) 群の 7.0 に比して有意に低く，また *Candida* (+)

群の中でも *C.albicans* 群は 6.6 でさらに低値であった。カンジダ属は他の常在菌の増殖が抑制される低い pH の環境下においても増殖できる [36][37]。殊に *C.albicans* は培地内の pH を弱酸性にまで低下させることにより *C.albicans producing proteinase* を発動させ、不溶性のタンパク質を分解してそれを窒素源として増殖する [38]。従ってカンジダ属、特に *C.albicans* が唾液 pH の低下を導くことが推察された。

加藤らは、義歯 *Candida* 60.6%、舌 *Candida* 88.6% と両者の検出率の差について報告している [39]。しかし本研究では、義歯 *Candida* と舌 *Candida* の検出率が近似し、さらに義歯 *C.albicans* (+) では舌 *C.albicans* (+) の割合が高く、non-*albicans Ca* についても同様であった。これは過去の報告 [40] と矛盾しない結果であり、舌粘膜で増殖したカンジダが口腔内へ移行し [35]、義歯への付着を生じたと推察された。

高齢者において、義歯の存在がカンジダ属のリザーバーとなる可能性も示唆され [41] [42]、特にデンチャープラークは、免疫による防御機構が存在せず唾液の影響が及びにくいため、定着・成長しやすく [43]、カンジダ属を含む比率が高いとされている [42]。種別には *C.albicans* の義歯表面での易増殖性 [42]、*C.glabrata* の細胞表面の高い疎水性によるレジン付着性 [44][45]、また *C.albicans* と *C.glabrata* の混合感染が導く高いバイオフィーム形成能 [44][45] などが報告されている。本研究における義歯管理状況調査の結果、「日中の装着」、「夜間の装着」、「義歯安定

剤」,「ブラシの使用」とカンジダ属の発現との関連は低いと考えられた。特に「ブラシの使用」については,本研究で *Candida* (+)群の半数以上の人がブラシを使用し,また *C.albicans* 群と non-*albicans Ca* 群においても因果関係は認めなかった。これは, Nishi ら[46]のブラシあるいは超音波による機械的清掃では義歯に付着した微生物を殆ど除去出来なかったとの報告と矛盾しない結果であった。一方,「はずした義歯」の保管状態では,そのままの場合の *Candida* (+)が 32.8%, 殊に *C.albicans* 群は 42.8%でありそれぞれの群間で高かった。義歯は口腔外で種々の物質や酸素に触れて細菌が付着するリスクが高くなり,カンジダ属も例外ではない[47]ため,「はずした義歯」の管理上の工夫が重要であることが示された。「義歯洗浄剤」は, *Candida* (+)群では 58.6%, *C.albicans* 群では 45.2%, また non-*albicans Ca* 群では 93.8%が「常に使っている」と回答した。特に non-*albicans Ca* は義歯洗浄剤が効きにくい傾向があることが推察された。これは,義歯洗浄剤が *Streptococcus* 属や *Neisseria* には使用が効果的であるが,カンジダ属に対しては超音波洗浄との併用が必要であるという報告[47]で説明される。「義歯の使用期間」については,長い義歯ほど *Candida* (+)が増加した。またカンジダ属の発現に関して,「義歯の形状」との関連性は認められなかった。「義歯の適合」については,不適合な場合はカンジダ属の検出率が高かった。不適合な義歯は使用年数が経過していることが多く,義歯

と粘膜との空隙に食物残渣の停滞やデンチャープラークの付着がみられ、また患者自身の清潔意識も低下していることにも関連があると考えられた。「デンチャープラーク」が「なし」の場合はカンジダの検出が少なかった。また、デンチャープラークと咽頭からは同種の微生物が検出される傾向があるとしている[41]。デンチャープラークの構成菌によっては、口腔内で十分な栄養が得られなくなると嚥下により消化管や上気道へ移動し、新たな部位で定着をしていくメカニズム[48]からも推察し得る。したがって、デンチャープラークコントロールを単に義歯清掃と考えるのではなく、メディカルデバイス感染症の予防として考える必要性が示唆された[47]。

本研究では、義歯床粘膜面のカンジダ属の検出には 9 つの関連因子（有意差）が認められたが、*C.albicans* と non-albicans *Ca* の関連因子は少なかった。対象が比較的健康的な集団であり、また non-albicans *Ca* 群の対象者数が少なかったことが要因のひとつと思料した。

結 論

本研究の結論は以下の通りである。

- 1) MALDI-TOF MS による義歯床粘膜面から検出されたカンジダ属は単独感染 38.2%，混合感染 27.0%であった。
- 2) CHROMagarTM Candida 培養試験法と MALDI-TOF MS 間のカッパ係数は 0.64 (0.53～0.76)であり，この 2 つの方法は一致が認められた。
- 3) 義歯 Candida (+)群の唾液 pH は，義歯 Candida (-)群に比して有意に低値であった。
- 4) 舌 Candida は，義歯 Candida と有意な関連性が認められた。
- 5) 義歯 Candida の発現は，義歯管理状況（はずした義歯の管理，義歯洗浄剤の使用，義歯の使用期間）が関連していた。
- 6) 義歯 Candida の発現は，義歯の状態（義歯の適合，デンチャープラークの有無）が関連していた。

総 括

総括として，MALDI-TOF MS は混合感染が増加している今日の新しい微生物同定法として有用と考える。また，義歯床粘膜面からのカンジダ属の検出は，唾液 pH，舌 *Candida*，義歯の管理状況や状態との関連が示唆された。

参考文献

- [1] Colombo, A.L., Nakagawa Z., Valdetaro F., Branchini M.L.M., Kussano E.J.U., Nocchi M. (2003) Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp. collected from Brazilian tertiary care hospitals. *Medical Mycology*, 41, 235–239.
- [2] Pires, F.R., Santos, E.B., Bonan, P.R., De Almeida, O.P., and Lopes, M.A. (2002) Denture Stomatitis and Salivary *Candida* in Brazilian Edentulous Patients. *Journal of Oral Rehabilitation*, 29(11), 1115–1119.
- [3] Berdicevsky, I., Ben-Aryeh, H., Szargel, R., and Gutman, D. (1980) Oral *Candida* of Asymptomatic Denture Wearers. *International Journal of Oral Surgery*, 9(2), 113-115.
- [4] Arendorf, T., and Addy, M. (1985) Candidal Carriage and Plaque Distribution before, during and after Removable Orthodontic Appliance Therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, 12(5), 360–368.
- [5] Chin, V.K., Lee, T.Y., Rusliza, B., and Chong, P.P. (2016) Dissecting *Candida albicans* Infection from the Perspective of *C.albicans*

- Virulence and Omics Approaches on Host–Pathogen Interaction: A Review. *International Journal of Molecular Science*, 17(10), 1643.
- [6] Jorge, A.O.C., Totti, M.A.G., de Almeida, O. P., and Scully, C. (1993) Effect of Sialoadenectomy on the Carriage of *Candida Albicans* in the Mouths of Rats. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 22(3), 138–140.
- [7] González, G.M., Treviño-Rangel Rde, J., Palma-Nicolás, J.P., Martínez, C., González, J.G., Ayala, J., Caballero, A., Morfín-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Velarde, F., Ascencio, E.P., Tinoco, J.C., Vázquez, J.A., Cano, M.A., León-Sicairos, N., González, R., Rincón, J., Elías, M.A., and Bonifaz, A. (2013) Species Distribution and Antifungal Susceptibility of Bloodstream Fungal Isolates in Paediatric Patients in Mexico: A Nationwide Surveillance Study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(12), 2847–2851.
- [8] Miceli, M.H., Díaz, J.A., and Lee, S.A. (2011) Emerging Opportunistic Yeast Infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(2), 142-151.

- [9] Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Gibbs, D.L., Newell, V.A., Ellis, D., Tullio, V., Rodloff, A., Fu, W., and Ling, T.A. (2010) Results from the Artemis Disk Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: A 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1366–1377.
- [10] Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W., and Azeredo, J. (2012) *Candida Glabrata*, *Candida Parapsilosis* and *Candida Tropicalis*: Biology, Epidemiology, Pathogenicity and Antifungal Resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 288-305.
- [11] Kothavade, R.J., Kura, M.M., Valand, A.G., and Panthaki, M.H. (2010) Mycological Analysis of the Oral Cavity of Patients Using Acrylic Removable Dentures. *Journal of Medical Microbiology*, 59(8), 873-880.
- [12] Beighton, D., Ludford, R., Clark, D.T., Brailsford, S.R., Pankhurst, C.L, Tinsley, G. F., Fiske, J., Lewis, D., Daly, B., and Khalifa, N. (1995) Use of CHROMagar *Candida* Medium for Isolation of Yeasts

- from Dental Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(11),3025-3027.
- [13] Pfaller, M.A., Houston, A., and Coffmann, S. (1996) Application of CHROMagar Candida for Rapid Screening of Clinical Specimens for *Candida Albicans*, *Candida Tropicalis*, *Candida Krusei*, and *Candida (Torulopsis) Glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(1), 58–61.
- [14] 関口幸恵.(2015)MALDI-TOF MS による微生物同定の現状と活用にあたっての留意点, 腸内細菌学雑誌, 29(4), 169-176.
- [15] Haas, M., Grenouillet, F., Loubersac, S., Ariza, B., Pepin-Puget, L., Alvarez-Moreno, C.A., Valderrama-Beltrán, S.L., Lavergne, R.A., Le Pape, P., and Morio, F. (2016) Identification of Cryptic *Candida* Species by MALDI-TOF Mass Spectrometry, Not All MALDI-TOF Systems Are the Same: Focus on the *C. Parapsilosis* Species Complex. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86(4), 385–386.
- [16] Lacroix, C., Gicquel, A., Sendid, B., Meyer, J., Accoceberry, I., François, N., Morio, F., Desoubeaux, G., Chandenier, J., Kauffmann-Lacroix, C., Hennequin, C., Guitard, J., Nassif, X., and

- Bougnoux, M.E. (2014) Evaluation of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Systems for the Identification of *Candida* Species. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(2), 153–158.
- [17] Rosenvinge, F.S., Dzajic, E., Knudsen, E., Malig, S., Andersen, L.B., Løvig, A., Arendrup, M.C., Jensen, T.G., Gahrn-Hansen, B., and Kemp, M. (2013) Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Clinical Yeast Isolates. *Mycoses*, 56(3), 229–235.
- [18] Newton, A.V. (1962) Denture Sore Mouth: a Possible Etiology. *BrDent J*, 112: 357–360.
- [19] 山口英世 (2012) 病原カンジダ菌種の多様化とその医真菌学的インパクト. *モダンメデア*, 58(9), 261-277.
- [20] 佐々木次雄 (2016) 第2章 微生物の迅速検出・同定法, 微生物迅速試験法, 医薬品医療機器イレギュラトリーサイエンス財団, 株式会社じほう, 東京, 19-30.
- [21] Landis, J.R., and Koch, G.G. (1977) The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, 33(1), 159-174.

- [22] Pfaller, M.A., and Diekema, D.J. (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 133-163.
- [23] Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Gibbs, D.L., Newell V. A., Ellis D., Tullio V., Rodloff A., Fu W., Ling T. A., and the Global Antifungal Surveillance Group (2010) Results from the ARTEMIS D ISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007; a 10.5year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1366 -1377.
- [24] 柿木保明(2003)口腔乾燥症の診断基準に関する調査研究, 厚生労働省厚生労働科学研究費補助金長寿科学総合研究事業「高齢者の口腔乾燥症と唾液物性に関する研究」平成14年度研究報告書. 37-41.
- [25] 日本老年歯科医学会 ガイドライン・社会保険委員会(2013)「診療室における義歯洗浄と歯科衛生士による義歯管理指導の指針 2013年度版」. 日本老年歯科医学会ホームページ.
- [26] 窪木 拓男, 市川 哲雄, 馬場 一美, 秀島 雅之, 佐藤 裕二, 和氣 裕之, 永尾 寛, 上田 (小平) 順加, 大野 (木村) 彩, 玉置 勝司, 津賀 一弘, 櫻井 薫, 佐藤 博信, 石橋 寛二, 矢谷 博文, 大

山 喬史, 赤川 安正, 平井 敏博, 佐々木 啓一, 古谷野 潔
(2013) 補綴歯科治療の難易度を測定するプロトコルの信頼性の検討—(社)日本補綴歯科学会による多施設臨床研究—.日本補綴歯科学会誌, 5(2), 224-239.

[27] Loster, J.E., Wieczorek, A., and Loster, B.W. (2016) Correlation between Age and Gender in *Candida* Species Infections of Complete Denture Wearers: A Retrospective Analysis. *Clinical Interventions in Aging*, 11, 1707–1714.

[28] Sánchez-Vargas, L.O., Ortiz-López, N.G., Villar, M., Moragues, M.D., Aguirre, J.M., Cashat-Cruz, M., Lopez-Ribot, J.L., Gaitán-Cepeda, L.A., and Quindós, G. (2005) Oral *Candida* Isolates Colonizing or Infecting Human Immunodeficiency Virus-Infected and Healthy Persons in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 4159–4162.

[29] González, G.M., Elizondo, M., and Ayala, J. (2008) Trends in Species Distribution and Susceptibility of Bloodstream Isolates of *Candida* Collected in Monterrey, Mexico, to Seven Antifungal Agents: Results of a 3-Year (2004 to 2007) Surveillance Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(9), 2902–2905.

- [30] Lockhart, S.R., Joly, S., Vargas, K., Swails-Wenger, J., Enger, L., and Soll, D.R. (1999) Natural Defenses against *Candida* Colonization Breakdown in the Oral Cavities of the Elderly. *Journal of Dental Research*, 78(4), 857–868.
- [31] Xiao, M., Fan, X., Chen, S.C., Wang, H., Sun, Z.Y., Liao, K., Chen, S.L., Yan, Y., Kang, M., Hu, Z.D., Chu, Y.Z., Hu, T.S., Ni, Y.X., Zou, G.L., Kong, F., and Xu, Y.C. (2015) Antifungal Susceptibilities of *Candida Glabrata* Species Complex, *Candida Krusei*, *Candida Parapsilosis* Species Complex and *Candida Tropicalis* Causing Invasive Candidiasis in China: 3 Year National Surveillance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(3), 802–810.
- [32] Calderone, R.A. (2002) Introduction and Historical Perspectives. *Candida and Candidiasis*. In: Calderone, R., Ed., *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington, DC, 15–25.
- [33] Barchiesi, F., Orsetti, E., Gesuita, R., Skrami, E., Manso, E., and Candidemia Study Group. (2016) Epidemiology, Clinical Characteristics, and Outcome of Candidemia in a Tertiary Referral Center in Italy from 2010 to 2014. *Infection*, 44(2), 205–213.

- [34] Kubota, Y. , Taguchi, C., Saito, M., Shinozaki-Kuwahara, N., Suzuki, T., Suemitsu, M., Nakayama, M., Utsunomiya, T., Endo, H., and Kuyama, K. (2019) Comparative Study of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry and Culture Test for *Candida* Identification. *Open Journal of Stomatology*, 9(12), 295-306.
- [35] 加藤卓朗, 丸山隆児, 西岡清(1995) 直接鏡検陰性の舌からの *Candida albicans* の分離一年齢および基礎疾患による比較一. *日本医真菌学会雑誌*, 36(2), 145-148.
- [36] 菊谷 武, 鈴木 章, 稲葉 繁, 齊藤 昇 (1998) 高齢入院患者における舌背上のカンジダについて一摂取食形態, 唾液分泌量との関係. *老年歯科医学*, 13(1), 23-28.
- [37] Odds F.C. (1988) *Candida and candidosis: A Review and bibliography*. 2nd ed, Bailliere Tindall, London, 93-104
- [38] 松田和子, 佐藤壮彦, 坪井良治, 高益俊, 矢口秀男, 小川秀興 (1988) *Candida albicans* の増殖に及ぼす培地 pH および proteinase(CAPR)の影響一特に培地 pH の変化とグルコースおよびアンモニア濃度との関連について. *日本皮膚科学会雑誌*, 98(1), 57.
- [39] 加藤卓己, 山崎裕, 佐藤淳, 秦浩信, 大内学, 守屋信吾, 北川善

- 政 (2013) 在宅自立高齢者における口腔カンジダ菌の保菌状態に関する再調査. 北海道歯学雑誌, 33(2), 121-139.
- [40] Kawasaki K., Kamikawa Y., Hamada T., Hirabayashi D., Fujisaki J., Nagayama T., Sakamoto R., Nitta T., Mukai H., and Sugihara K. (2011) A clinical study on the relationship between dentures and oral Candida species. *Oral Therapeutics and Pharmacology*, 30(1), 7-15.
- [41] 大村 直幹, 弘田 克彦, 蟹谷 容子, 永尾 寛, 柏原 稔也, 市川 哲雄 (2002) デンチャープラークと咽頭の微生物叢との関連性. 日本補綴歯科学会雑誌, 46(4), 530-538.
- [42] 二川浩樹, 牧平清超, 江草宏, 福島整, 川端涼子, 浜田泰三, 矢谷博文 (2005) 口腔カンジダの付着およびバイオフィルム形成. 日本医真菌学会雑誌, 46(4), 233-242.
- [43] 市川哲雄 (2002) 高齢者歯科における感染症のとらえかた—デンチャープラークから高齢者の口腔ケアを考える—デンタルデバイス感染症. 老年歯科医学, 16(3), 401-405.
- [44] 中川洋一 (2018) 紅斑性カンジダ症への口腔乾燥と義菌のかかわり. 日本補綴歯科学会誌, 10(1), 32-39.
- [45] Pathak, A.K., Sharma, S., and Shrivastva, P. (2012) Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida*

species on acrylic substrate. Journal of applied oral science, 20(1), 70-75.

- [46] Nishi, Y., Seto, K., Kamashita, Y., Kaji, A., Kurono, A., and Nagaoka, E. (2014) Survival of microorganisms on complete dentures following ultrasonic cleaning combined with immersion in peroxide-based cleanser solution. Gerodontology, 31(3), 202-209.
- [47] 市川哲雄, 引田克彦 (1999) 感染予防のためのデンチャープラークコントロール: *Candida spp* と *Herikobacter pylori* を中心として. 日本補綴歯科学会誌, 43(4), 640-648.
- [48] 浜田泰三, 二川浩樹 (2001) デンチャープラークとオーラルヘルスケア. 日本補綴歯科学会誌, 45(5), 561-581, 2001.