

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏 名（本籍） 岡 本 真 理 子（新潟県）
博士の専攻分野 博 士（歯 学）
学 位 記 番 号 乙 第 259 号
学位授与年月日 平成 28 年 5 月 19 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目 Efficacy of Fungiflora Y Staining for the Diagnosis of Oral Erythematous Candidiasis
（口腔カンジダ症の診断のための塗抹鏡検への蛍光染色の有用性）
Gerodontology 第 30 巻 3 号 220 頁～ 225 頁掲載 平成 25 年 9 月 1 日発行
論文審査委員 主査 教授 花 田 信 弘
副査 教授 斎 藤 一 郎 副査 教授 前 田 伸 子

内 容 の 要 旨

【緒 言】

口腔カンジダ症は、偽膜性カンジダ症、紅斑性（萎縮性）カンジダ症、肥厚性カンジダ症の 3 病型がある。口腔カンジダ症の診断は、臨床所見から臨床診断を行い、病変部から採取したサンプルの顕微鏡検査や培養検査によって *Candida* の存在を確認して確定診断する。培養は種を同定できるという長所を有するが、*Candida* は常在真菌なので *Candida* を検出しただけでカンジダ症と診断することはできない。特徴的な臨床像の存在が診断の要件である。これに対し塗抹標本の鏡検は、仮性菌糸と酵母の形態的な観察が可能であり、また菌体と剥離上皮細胞との関連性も観察できる。*Candida albicans* は病原性を発揮するときに菌糸形をとることから、鏡検で菌糸を確認することが診断において重要だと考えられている。したがって、非定型的所見を呈する例の診断にも用いることができる。塗抹鏡検のための染色法にはグラム染色やギムザ染色があり、その有用性はすでに認められている。しかしながらその一方で、塗抹鏡検は検出感度が低いという問題点が指摘されている。

ファンギフローラ Y は蛍光染色液であり、 β 構造を持つ多糖類への結合能を有するため、*Candida* の細胞壁を明瞭に染色できる可能性がある。眼科領域や皮膚科領域では、真菌や原虫の臨床診断において、その染色の有用性が認められている。しかし口腔カンジダ症に対しては、基礎的研究に応用されているものの、臨床における有用性を検討した論文はなく、総説の一部に一般論としての記載がみられるにすぎない。このような背景から、口腔カンジダ症の診断におけるファンギフローラ Y 染色の有用性の検討が必要と考え、本染色方法における *Candida* の検出精度をギムザ染色と比較し検討した。

【方 法】

1. 対象

2010 年 3 月から 8 月までに鶴見大学歯学部附属病院ドライマウス外来を受診した患者で、臨床所見から紅斑性カンジダ症が疑われた症例のうち真菌培養検査ならびにファンギフローラ Y 染色（株式会社バイオメイト）とサイトクイック染色（簡易ギムザ染色キット；武藤科学株式会社）による塗抹鏡検を行った 48 例を対象とした。

2. 鏡検方法

鏡検のための検体は、少量の水滴（60～70 μ l）を付着させた歯科用ミラーにて舌背を擦過し採取した。歯科用ミラーに付着した擦過後の水滴をスライドガラスの中央に塗抹した後、風乾し、染色した。日常臨床におけるファンギフローラ Y 染色の観察には、ポータブル蛍光顕微鏡 CyScope[®]（パルテックジャパン株式会社）を用いた。本論文作成のための写真撮影には蛍光顕微鏡 BZ-9000（株式会社キーエンス）を用いた。

サイトクイック染色は、細胞質を染色する A 液（エオジン）と核を染色する B 液（メチレンブルー）とで構成されている。観察には光学顕微鏡を用いた。

両染色による鏡検の陽性／陰性の判定の信頼性について、卒後2年目の歯科医師と卒後28年目の口腔外科専門医との評価者間のカッパ係数を算出した。

3. 培養検査方法

培養のための検体採取は、綿棒で舌背を10回擦過し、これをクロモアガー培地に画線塗抹し、37℃で48時間培養した。

クロモアガー培地は菌種によってコロニーの色が違うため、菌種の区別が可能である。本検討ではコロニーの色によって同定結果とし、*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, その他に分けて検討した。培養と鏡検との比較においては、種は問題とせず、総カンジダ生菌数によって検討した。

4. 統計方法

カンジダ症診断におけるサイトクイック染色とファンギフローラ Y 染色の有用性の比較の評価は、培養結果をゴールドスタンダードとして感度・特異度を算出した。さらに、両染色法の精度を χ^2 乗検定で比較した。

【結 果】

1. 患者背景

対象となった患者は26歳から96歳（平均 $\pm$ SD=68.0 $\pm$ 12.0）の女性39名、男性9名の48名であった。疼痛は37/48例（77.1%）に認められた。徴候は、舌の発赤13例、舌乳頭萎縮14例、口角びらん9例、口唇の発赤4例、口蓋の発赤8例、頬粘膜の発赤9例であった。これらの症候から紅斑性カンジダ症を疑った。唾液分泌検査は、安静時唾液1.5 ml/15分、ガムテスト10 ml/10分を基準にすると、68.8%に唾液分泌低下が疑われた。

2. 口腔カンジダ症の診断

培養検査で *Candida* が陽性であったものは48例中37例（77.1%）であった。鏡検で仮性菌糸や酵母が認められたのは、サイトクイック染色が20/48例（41.7%）、ファンギフローラ Y 染色が31/48例（64.6%）であった。培養では陰性であるものの、鏡検で陽性となったものが1例あり、その1例と培養陽性37例の合計38/48例（80.9%）を口腔カンジダ症の確定診断例とした。

3. 培養における検出菌種

培養検査で陽性であった37例において、*C. albicans* が35例、*C. glabrata* が13例、*C. tropicalis* が4例に検出された。多くの症例で複数の菌種が検出されており、*C. albicans* と *C. glabrata* の同時検出が12例あった。*C. albicans* を検出しなかった non-*albicans* 症例の2例では *C. glabrata* とその他がそれぞれ1例ずつ認められた。

4. 鏡検における染色法の比較

サイトクイック染色は、培養で陽性となった37例中19例が塗抹標本でも陽性であり感度が0.51、特異度は培養で陰性となった11例のうち10例が陰性で0.91、陽性尤度比は5.65であった。陽性的中率は0.95、陰性的中率は0.36、精度は0.60であった。ファンギフローラ Y 染色は、培養で陽性となった37例中31例が塗抹標本でも陽性であり感度が0.84、特異度は培養で陰性となった11例のうち11例で1.0、陽性尤度比は >10 であった。陽性的中率は1.0、陰性的中率は0.65、精度は0.88であった。ファンギフローラ Y 染色の精度はサイトクイック染色に比較して有意に高かった（ $p=0.0052$ ）。

評価者間のカッパ係数は、ファンギフローラ Y 染色が0.61、サイトクイックは0.47で、ファンギフローラ Y 染色の方がサイトクイックより一致率が高かった。

【考 察】

口腔カンジダ症の診断にファンギフローラ Y を応用したところ、サイトクイック染色に比較して、菌体の観察が容易であり有用性が高いことが示された。その理由のひとつは、染色液の特性にあると考えられる。*Candida* の細胞壁は β -グルカン、キチンおよびマンナンからなる多糖から構成されている。ファンギフローラ Y は β 構造を持つ多糖類への結合能を有するため、細胞壁の β -グルカンやキチンに結合する。蛍光染色液が細胞壁に結合するため、菌体の周辺部分が特に強い発光を呈す。細胞壁が蛍光を発するために菌体の形態的観察が容易であった。ファンギフローラ Y は剥離上皮細胞や細菌にも非特異的に付着するが、それらの蛍光発色は弱いため、菌体は周囲から浮き上がるように存在する。そのため低倍率の観察でも検出が容易であった。一方サイトクイック染色は、口腔粘膜の擦過によって採取した塗抹標本には剥離上皮や細菌が多数存在し、これらも染色されるため、それが障害となり、菌体の観察がしばしば困難であった。細胞壁は染まらないため菌体の周辺部は透明である。このようなことから、サイトクイック染色とファンギフローラ Y 染色の検出精度に有意差が生じたと考えられる。

ファンギフローラ Y 染色の蛍光は減弱しにくいため暗室が不要である。観察にはポータブル蛍光顕微鏡 CyScope[®]を用い

た。採取した検体を塗抹し、短時間で染色したのち、チェアースライドで観察することができるため、口腔カンジダ症の診断を迅速におこなうことができたことは患者にとって有益であった。

【結 論】

ファンギフローラ Y 染色のポータブル蛍光顕微鏡 CyScope[®]による鏡検は、チェアースライドにおける口腔カンジダ症の確定診断に有用であった。

審査の結果の要旨

口腔カンジダ症は、偽膜性カンジダ症、紅斑性（萎縮性）カンジダ症、肥厚性カンジダ症の3病型がある。口腔カンジダ症の診断は、臨床所見から臨床診断を行い、病変部から採取したサンプルの顕微鏡検査や培養検査によって *Candida* の存在を確認して確定診断とする。培養法は菌種同定で長所を有するが、*Candida* は常在真菌なので培養法で *Candida* を検出しただけでカンジダ症と診断することはできない。特徴的な臨床像の存在が診断の要件である。これに対し塗抹標本の鏡検は、仮性菌糸と酵母の形態的な観察が可能であり、また菌体と剥離上皮細胞との関連性も観察できる。*Candida albicans* は病原性を発揮するときに菌糸形をとることから、鏡検で菌糸を確認することが診断において重要だと考えられている。したがって、非定型的所見を呈する例の診断にも用いることができる。塗抹鏡検のための染色法にはグラム染色やギムザ染色があり、その有用性はすでに認められている。しかしながら、塗抹鏡検は検出感度が低いという問題点が指摘されている。

ファンギフローラ Y は蛍光染色液であり、 β 構造を持つ多糖類への特異的な結合能を有し、*Candida* の細胞壁を明瞭に染色できる。しかし口腔カンジダ症に対して、臨床における有用性を検討した論文はない。このような背景から、口腔カンジダ症の診断におけるファンギフローラ Y 染色の有用性の検討が必要と考え、本染色方法における *Candida* の検出精度をギムザ染色と同様に核内構造を明瞭に染色するサイトクイック染色と比較し塗抹鏡検を行った48例を対象として検討した。

その結果、口腔カンジダ症の診断にファンギフローラ Y を応用したところ、サイトクイック染色に比較して、菌体の観察が容易であり有用性が高いことを示した。その理由のひとつは、染色液の特性にあると学位申請者は考察している。*Candida* の細胞壁は β -グルカン、キチンおよびマンナンからなる多糖から構成されている。ファンギフローラ Y は β 構造を持つ多糖類への結合能を有するため細胞壁の β -グルカンやキチンに結合する。蛍光染色液が細胞壁に結合するため、菌体の周辺部分が特に強い発光を呈す。細胞壁が強い蛍光を発するために菌体の形態的観察が容易であったと述べている。一方、ギムザ染色と同様に核内構造を染色するサイトクイック染色は、口腔粘膜の擦過によって採取した剥離上皮や細菌を同時に染色するため、それが障害となり、カンジダ菌体の観察が困難になったようである。

本研究は今後、超高齢化が進む社会で重要となるカンジダ症を診断する上で、極めて重要な知見を提供するものと考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位を請求する価値が十分にあるものと判定した。