

令和3年度京都府公立大学法人若手研究者・地域未来づくり支援事業研究成果報告書

	(所 属)	(職名・学年)	(氏 名)
研究者 (研究代表者)	心身障害者福祉センター 医長・歯科口腔科学	医長・講師	足立 哲也
研究の名称	ラマン分光法を用いた口腔細菌および真菌の代謝物の解析と 感染症の迅速診断への応用		
研究の キーワード	ラマン分光法、口腔カンジダ症、むし歯		
研究の概要	<p>歯科の2大疾患であるう蝕（むし歯）と歯周病（歯槽膿漏）による歯の喪失は、咀嚼機能・嚥下機能・発音・審美性の低下などの著しいQOLの低下を招き、口腔機能の衰え（オーラルフレイル）の原因となり得る。さらに、病原菌の増殖による口腔微生物叢の異常は、様々な全身疾患（糖尿病・肺炎・脳卒中・アルツハイマー病・大腸がんなど）のリスク因子になっている。</p> <p>ヒトの口腔微生物叢は、微生物同士の複雑な相互作用によって定着し、病原性を有するバイオフィルム（細胞外基質）を形成する。微生物が産生するアミノ酸や有機酸、脂肪酸、糖類などの内因性代謝物および核酸、タンパク質、シグナル分子などを内包する細胞外小胞は、微生物間の細胞間コミュニケーションだけでなく、宿主組織に様々な傷害を及ぼす。そのため、微生物固有の分子種の特性を網羅的に同定し、制御することは、健全な口腔環境を維持するだけでなく、健康長寿を延伸するうえで極めて重要である。</p> <p>口腔微生物叢と全身疾患との関係を解明するためには、様々な代謝物を網羅的に解析できる複合的な分析技術が必要である。しかし、これまでの質量分析やNMRでは感度や解析時間が不十分であり、微生物由来の代謝産物を一度に分析する方法はほとんど存在しなかった。</p> <p>申請者は核酸の抽出や蛍光プローブを使わずそのままの状態かつリアルタイムで分子レベルの解析が可能なラマン分光法に着目した。ラマン分光法により口腔内の様々な病原体が生成する特徴的な代謝産物を検出することで、口腔内の微生物叢の状態を高精度で把握でき、臨床応用につながると期待される。</p> <p>本研究では、ラマン分光法により、病原体が産生する代謝物の挙動を明らかにし、口腔微生物叢を分析するための新たな技術基盤を構築する。本研究により、高精度で口腔微生物叢の状態を検査できるようになれば、健康状態を把握することで、早期診断や治療介入が可能となり、健康寿命の大幅な延伸とQOLの向上を期待できる。</p>		
研究の背景	2040 年にかけては、「85歳以上高齢者の急増」と「生産年齢人口の急減」により、医療の質の低下が懸念されている（2040年問題）。ラマン解析により、口腔微生物叢の代謝産物を簡便かつ、高精度で分析することで、患者の個人のリスク予測や予防が可能となり（プレシジョン・メディシン）、健康寿命の大幅な延伸とQOLの向上が期待できる。		

	<p>また、口腔内微生物叢を把握することで、口腔ケアのフィードバックが可能となり、口腔内を清潔に保つことで、疾患のリスクを減らし、医療提供体制を維持することができる。本法が実現できれば、膨張し続ける医療費の削減だけでなく、京都府民の健康増進に寄与する可能性がある。</p>
研究手法	<p>口腔カンジダ症の原因菌<i>Candida albicans</i> (<i>C. albicans</i>)、<i>C.glabrata</i>, <i>C.tropicalis</i>, <i>C.krusei</i>、むし歯の原因菌<i>Streptococcus mutans</i> (<i>S.mutans</i>)、を培養し、ガラス基板上に付着したバイオフィルムのラマンスペクトルを採取した。</p>
研究の成果	<p><i>C. albicans</i>のラマン解析</p> <p>口腔カンジダ真菌<i>C. albicans</i>の構成物質（細胞壁：キチン、細胞膜：エルゴステロール等）の局在の可視化を行った（下図.足立等.IJMS.2022）。</p> <p>また、<i>C. albicans</i>と他の真菌のラマン解析を行ったところ、これらの構成成分の割合が異なることが明らかとなった。さらに、得られたスペクトルの半値幅を縮小し、バーコード化することで口腔由来真菌を簡便に識別できることが可能となった。</p> <p><i>Candida albicans</i> LSEM865</p> <p>Micro-image</p> <p>Chitin (1154 cm⁻¹)</p> <p>Ergosterol (620 cm⁻¹)</p> <p>Thymidine (1227 cm⁻¹)</p> <p>Amide I (1662 cm⁻¹)</p> <p>Cytidine (1534 cm⁻¹)</p> <p>Protein (2940 cm⁻¹)</p> <p>Cytochrome C (748 cm⁻¹)</p> <p>う蝕のラマン解析</p> <p><i>S. mutans</i>のバイオフィルムは主に不溶性のα-1,3-glucanで構成されているとされているが、その詳しい構成成分についてはあまり理解されていなかった。そこで、<i>S. mutans</i>のバイオフィルムのラマン解析を行った結果、結合様式の異なるGlucanの特徴を識別できることが明らかとなった。ラマン分光法ではほぼリアルタイムにGlucanの識別が可能である。これらの結果から、細菌の代謝物をラマンでモニタリングすることで、口腔細菌叢の状態、感染症の診断できる可能性が示唆された。</p>

今後の期待	真菌の構成物質をリアルタイムに解析することができれば、菌種に合わせて適切な抗菌薬を選択することが可能である。データベースに基づいた診断法を確立することで迅速な判断や早期治療が可能となり、QOLの向上が期待できる。
研究発表	<p>1. Pezzotti G, Kobara M, Nakaya T, Imamura H, Miyamoto N, <u>Adachi T</u>, Yamamoto T, Kanamura N, Ohgitani E, Marin E, Zhu W, Nishimura I, Mazda O, Nakata T, Makimura K. Raman spectroscopy of oral <i>Candida</i> species: molecular-scale analyses, chemometrics, and barcode identification. <i>Int. J. Mol. Sci.</i> 23(10) 5359.2022.</p> <p>2. Pezzotti G, Kobara M, Nakaya T, Imamura H, Asai T, Miyamoto N, <u>Adachi T</u>, Yamamoto T, Kanamura N, Marin E, Zhu W, Nishimura I, Osam Mazda O, Nakata T, Makimura K. Raman study of pathogenic <i>Candida auris</i>: imaging metabolic machineries in reaction to antifungal drugs. <i>Frontiers Microbiology</i>. 896359.2022.</p>