



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	dysbiosisと多様性の検討
Author(s)	板垣, 竜樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第16460号
Issue Date	2025-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16460
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94889
Type	doctoral thesis
File Information	Tatsuki_Itagaki.pdf



博 士 論 文

dysbiosis と多様性の検討

令和 7 年 3 月 申請

北海道大学

大学院歯学院口腔医学専攻

板 垣 竜 樹

口腔カンジダと **dysbiosis**

Keyword: 口腔カンジダ、加齢、アルブミン、細菌叢解析、dysbiosis

Author: Tatsuki Itagaki ^{a,b}

a) Oral Diagnosis and Medicine, Faculty of Dental Medicine, Hokkaido University, Kita-13 Nishi-7, Kita-ku,

Sapporo 060-8586, Japan

b) Microbiology, Faculty of Dental Medicine, Hokkaido University, Kita-13 Nishi-7, Kita-ku, Sapporo 060-

8586, Japan

目次

全体要旨	3
第1章 口腔内カンジダ異常増殖と血清生化学的検査の関連性	
1.1 序論	5
1.2 目的	6
1.2.1 患者とデータ収集	6
1.2.2 統計分析	6
1.3 結果	8
1.4 考察	10
1.5 結論	12
1.6 参考文献	13
第2章 細菌叢解析と dysbiosis に関して	
2.1 序論	14
2.2 目的	17
2.2.1 組成データ	17
2.2.2 統計解析	17
2.3 結果	18
2.4 考察	19
2.5 結論	21
2.6 データ利用可能性に関する声明	22
2.7 参考文献	23
謝辞	24
図表	25

抄録

口腔カンジダ症と全身状態の関係の理解は、近年大幅に深まってきた。カンジダは、口腔常在微生物叢を構成しているため、細菌叢の解析も重要である。本研究では、口腔カンジダ保有者の生体試料を用いて、*dysbiosis* との関連要因を調査した。また、口腔カンジダ症は「細菌叢の乱れ (*dysbiosis*)」により生じるものと考えられるため、細菌叢の解析を行い、*dysbiosis* に関する検討をした。

本研究には、2021 年 1 月から 12 月の間に北海道大学病院口腔内科で口腔スワブ検査を受けた合計 314 人の患者が参加した。年齢、性別、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、総血清タンパク質、ビタミン B12、血清アルブミン、鉄、銅、亜鉛のレベルに関するデータを収集した。臨床真菌サンプルを口腔内からスワブで採取し、MALDI Biotyper を使用して、各菌を同定した。共分散分析と多変量ロジスティック回帰分析を適用し解析した。性別の違いを考慮せず、口腔スワブ検査の結果を評価することができた ($p=0.946$)。口腔スワブ検査の結果は、加齢 (オッズ比 : 1.03) および血清アルブミン (オッズ比 : 0.32) と関連していた。つまり、加齢が進むと口腔カンジダ症との関連性が高まり、血清アルブミン値が低いと口腔カンジダ症との関連性が高まることが分かった。

一方、口腔カンジダ症のような *dysbiosis* は、健康に大きな影響を与えることが知られている。これには、常在する微生物のバランスも関係する。この微生物叢を調べるためには、分類操作単位 (Operational taxonomic unit; OTU) を用いられることが多い。

OTU は、微生物を 16S rRNA や 18S rRNA といった遺伝子配列を基にして分類したものである。本研究では、「National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN) JMD (公開データ)」から抽出された 2015 年 10 月から 2020 年 10 月までの

間に地域在住の 1518 人の健康な日本人ボランティアの糞便サンプルを評価した。主成分分析 (Principal component analysis; PCA) を用いた場合、微生物叢の全体的な多様性を分かりやすく低次元で表現できる。また、組成データは、ピアソンの相関係数では解釈が難しい。Aitchison は、比を使用して組成データを解析する方法を開発した。この方法は、相対存在量に基づき、ある基準に対する相対存在量 (相対存在比) を使用して、絶対存在量の推定が行うことができる場合がある。本研究の結果より PCA を用いた結果は、相対的多様性を低次元で示すことができ、比による分析では、細菌叢の細菌それぞれの絶対存在量の変動の推定に役立つことが示唆された。

以上の結果から、口腔カンジダ症は加齢や栄養状態といった全身状態と関連する。また、微生物叢の乱れは、口腔カンジダ症などの疾患を惹起する可能性があることが知られているが、本研究により、微生物叢は個人間で異なることが示唆された。さらに dysbiosis は、一律な細菌叢の組成の変化ではなく、個人により変化しうると考えられた。このような口腔カンジダ症と微生物叢のとらえ方は、今後の疾患の予防あるいは治療に重要な示唆を与えるものと思われる。

1 口腔内カンジダ異常増殖と血清生化学的検査の関連性

1.1 序論

健康な成人の約 30～60%が口腔内にカンジダ属を保有すると推定され[1]、口腔内のカンジダ属の検出は、近年高齢者で増加している[2]。口腔カンジダ症は日和見感染症で、通常、抗真菌薬で治療されるが、抗菌薬に比べて利用できる抗真菌薬の種類は少ない。そのうえ、アゾール系またはエキノキャンディン系に耐性があるカンジダ属が世界中で観察されており、真菌の薬剤耐性は治療のハードルとなっていると報告されている[2,3]。

口腔カンジダ症は、年齢、義歯の使用、免疫抑制、細菌叢異常、口腔乾燥、栄養失調、内分泌異常、貧血など、いくつかの潜在的なリスク要因を伴う日和見感染症で[4]、さらに、齲歯の数と唾液中のカンジダコロニー形成単位は関連があると報告されている[5]。本研究の目的は、真菌異常増殖の状態と血清生化学的特性との統計的関係を探索することである。そして、この研究の結果は、多変量解析を用いて特定のリスク要因間の関係を解明することにより、口腔カンジダ症の発症を予防あるいは治療する方法についての詳細な洞察を提供し、日和見感染症の病態や細菌叢の乱れ（dysbiosis）のメカニズムの根本的な解明へとつながるだろう。

1.2 目的

1.2.1 患者とデータ収集

本研究では、2021 年 1 月から 12 月までに北海道大学病院口腔内科を初診で受診した患者の検査データから関連因子を後方視的に検索した。

年齢、性別、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、総タンパク質、ビタミン B12、血清アルブミン、鉄、銅、亜鉛の濃度に関するデータを収集した。臨床真菌サンプルは口腔内スワブで採取され（栄研化学株式会社、東京、日本）、検体は速やかに当院の検査室に運ばれた。カンジダ属の同定には MALDI Biotyper[®]（Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA）による質量分析法を使用した。MALDI Biotyper 分析は製造元の指示に従って実施した。

本研究は、北海道大学病院独立臨床研究審査委員会の承認を得て実施された（承認番号 202-0049）。すべての研究手順は、ヘルシンキ宣言の原則に従って実施され、この論文では、参加者の個人識別情報をいかなる形でも開示しない。したがって、この場合は出版に関する書面による同意は適用されない。

1.2.2 統計分析

口腔内のカンジダ属の陽性率を計算し、その 95%信頼区間（CI）を Agresti 法を使用して推定した。変数間の関係は、共分散分析（ANCOVA）と多変量ロジスティック回帰分析（最尤法）を使用して分析した。性別と *Candida albicans* および *Nakaseomyces glabrata*（別名 *Candida glabrata*）の同時感染との関係は、Cramer の連関係数によって調べた。すべての分析で有意水準は $p < 0.05$ に設定した。

データは、 Excel (Microsoft® Excel® for Microsoft 365 MSO (バージョン 2306、ビルド 16.0.16529.20164、64 ビット) および R バージョン 4.0.3 (2020-10-10) (Copyright © 2020、The R Foundation for Statistical Computing) を使用して分析された。

1.3 結果

このデータセットには 314 人の参加者が含まれており、カンジダ属などの真菌陽性率は 28.0% (95%CI: 23.1~33.3%) であった。表 1.1 にまとめたように、年齢、血清アルブミン (Alb)、ヘモグロビン値 (Hb)、赤血球数 (RBC) は 2 つのグループ間で不均衡だったのに対し、白血球数 (WBC) は 2 つのグループ間で不均衡であったがその程度はわずかであった。88 人の参加者の口腔内ではカンジダ属などの真菌が検出され、そのうち 13 人の口腔内では複数のカンジダ属などの真菌が検出された (表 1.2)。共分散分析の結果、性別と年齢の間には相互作用がなかった ($p = 0.946$)。したがって、年齢で調整した性別の影響は小さいと考えられ ($p = 0.403$)、性別で調整した年齢の影響は大きいと考えられた ($p < 0.05$ 、表 1.3 および図 1.1)。

次に、単変量解析の結果を表 1.4 に示し、2 群間で不均衡な因子を調整した多変量解析を実施した (表 1.5)。貧血の評価指標については、多重共線性を考慮して Hb を選択した。しかし、Hb は性別と強く関連しており、貧血と低アルブミン血症は互いに関連していたため、Hb を因子から除外することができた。Hb を除いた多変量解析の結果をまとめると、WBC の差はごくわずかであると結論付けられた (表 1.6)。本研究に最適なロジスティック回帰モデルを表 1.7 に示し、加齢と血清アルブミンのオッズ比はそれぞれ 1.03 と 0.32 であった。選択された変数は、 p 値を使用したステップワイズ法の結果と同じであった。

表 1.8 に *C. albicans* と *N. glabrata* の同時感染に関連した患者データを示す。カンジダ属保菌者のうち *N. glabrata* 保菌者の割合は 0.1 (0.05~0.19) であった。サンプルサイズが小さく、グループ間に不均衡が認められたため、グループ間の比較はできなかった。さらに、この研究では血液データの欠損が多かったため、これらの比較は信頼

が高い解析を行えなかった。そのため、性別については信頼性が低い単変量解析を実施した。性別と *N. glabrata* の *Cramer* の連関係数は 0.08 (0.005~0.30) であり、関連は認められなかった。

1.4 考察

横断研究は、有病率の調査に適した研究デザインであり、確率変数を使用して近似することで要因間の関係を予測することができる。共分散分析で、口腔内のカンジダ属の異常増殖に関して、性別による違いは認められなかった。したがって、この研究で、口腔内のカンジダ属の異常増殖の有無の陽性率の違いは性別に関係ないと結論付けられた。さらに口腔内のカンジダ属の異常増殖の有無で分けた群で微量元素の均衡が取れていたため、微量元素の影響は認めず、多変量解析のオッズ比に基づくと、白血球数はカンジダ属の異常増殖と関連していない可能性があった。

先行研究では、データの2区分化の結果、80歳代以上の参加者で違いが観察され、他の研究では年齢を10年ごとのカテゴリで比較し、高齢の区分ほどカンジダ属の異常増殖と関連を認めた[6]。さらに、本研究では、カンジダ属が検出された患者群は、検出されなかった患者群よりも平均で6歳年上であり、オッズ比は1.03（陽性確率 = $\exp(-2.88 + 0.03 \times \text{年齢})$ ）であった。このデータセットは、70歳を超えるとカンジダ属陽性の感度と特異度がそれぞれ0.66と0.58（AUC : 0.63（0.56-0.7））を示した。これらの結果から、70～80歳以上で陽性の確率が50%を超えることを示唆し、加齢は口腔カンジダ検査陽性と関連すると考えられる。

本研究結果において、血清アルブミン値とカンジダ属の異常増殖の関連性を認めた。加齢と低栄養状態、感染症は互いに影響するが、栄養摂取による低栄養状態の改善は歯科医師によって介入できる。したがって、歯科医師は患者が適切に咀嚼できるように治療し、栄養素の吸収効率を高め、血清アルブミン値を改善すると口腔カンジダ症の発症を潜在的に予防する可能性がある。また、鉄欠乏性貧血の患者では口腔カ

ンジダ感染の有病率が高いことが報告されている[7]。しかし、血清鉄濃度とカンジダ属の異常増殖の関連性は、本研究では明らかではなかった。

C. albicans と *N. glabrata* の同時感染に関する先行研究の結果は、カンジダ属保菌者のうち *N. glabrata* 保菌者の陽性率は 0.18 (0.12~0.25) で、同時感染は性別と連関はみとめなかった (*P*: 0.005~0.30) [8]。この結果は本研究結果の *C. albicans* と *N. glabrata* の同時感染陽性率と性別に関して同様であった。したがって、以前の研究[8]と本研究の結果は小規模であるが、信頼性が低いわけではない。

本研究では義歯の使用、現在の歯の数、口腔衛生状態は、医療記録から詳細なデータを入手できなかったため、交絡因子として測定されていない。これらは研究デザインと近似に基づく予測の限界であるが、この研究は既存の結果よりも影響力のある評価を示した。今後の研究では、コホート研究を通じて血清アルブミン値と疾患の関係を明らかにすることに焦点を当てるべきである。さらに、年齢を調整して、義歯の使用と口腔カンジダ症の発症との因果関係を検討する必要がある。 *C. albicans* と *N. glabrata* の同時感染の研究では、陽性率からサンプルサイズを計算でき、必要なサンプルサイズは 1 つの変数あたり 390 人 ($>1/0.26 \times 1/0.1 \times 10$) であるため、多施設共同研究や統合研究が望ましい。

1.5 結論

この研究では、口腔内のカンジダ属の陽性率とカンジダ属保有者中の *N. glabrata* 陽性率は、それぞれ約 30%と 5～19%であった。性別と微量元素は、カンジダ検査陽性とは無関係であった。しかし、口腔カンジダ症の発症のメカニズムは複雑で、血清アルブミン値と加齢は、口腔カンジダ検査結果と関連していた。患者の年齢が高いほど、カンジダ検査が陽性になる可能性が高くなり、特に 70 歳を超えると、真菌感染症に注意を払うことが不可欠である。これらの複雑な関係を明らかにするには、さらなる研究が必要である。

1.6 参考文献

1. Hellstein, J.W.; Marek, C.L. Candidiasis: Red and white manifestations in the oral cavity. *Head Neck Pathol.* **2019**, *13*, 25–32. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Pfaller, M.A.; Diekema, D.J.; Gibbs, D.L.; Newell, V.A.; Ellis, D.; Tullio, V.; Rodloff, A.; Fu, W.; Ling, T.A.; Global Antifungal Surveillance Group. 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. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 1366–1377. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Trovato, L.; Calvo, M.; Scalia, G.; Oliveri, S. A Comparative Prospective Study in Evaluating *Candida* spp. In Vitro Susceptibility through Micronaut-AM and Sensititre Yeast-One. *Microbiol. Res.* **2023**, *14*, 1077–1088. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
4. Patil, S.; Rao, R.S.; Majumdar, B.; Anil, S. Clinical Appearance of oral candida infection and therapeutic strategies. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1391. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Cerqueira, D.F.; Portela, M.B.; Pomarico, L.; Soares, R.M.A.; de Souza, I.P.R.; Castro, G.F. Examining dentinal carious lesions as a predisposing factor for the oral prevalence of *Candida* spp. in HIV-infected children. *J. Dent. Child.* **2007**, *74*, 98–103. [[Google Scholar](#)]
6. Nishimaki, F.; Yamada, S.-i.; Kawamoto, M.; Sakurai, A.; Hayashi, K.; Kurita, H. Relationship between the quantity of oral *Candida* and systemic condition/diseases of the host: Oral *Candida* increases with advancing age and anemia. *Mycopathologia* **2019**, *184*, 251–260. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Lu, S.Y. Perception of iron deficiency from oral mucosa alterations that show a high prevalence of *Candida* infection. *J. Formos. Med. Assoc.* **2016**, *115*, 619–627. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Hato, H.; Sakata, K.-I.; Sato, J.; Hasebe, A.; Yamazaki, Y.; Kitagawa, Y. Factor associated with oral candidiasis caused by co-infection of *Candida albicans* and *Candida glabrata*: A retrospective study. *J. Dent. Sci.* **2022**, *17*, 1458–1461. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2 細菌叢解析と dysbiosis に関して

2.1 序論

細菌叢の乱れを示す一般的な概念である dysbiosis（ディスバイオーシス）に関する網羅的な探索的研究として、微生物叢と健康状態の関連に関する報告が多くなされている[1-3]。しかしながら、細菌叢解析における文献には科学的な根拠が不十分であるにもかかわらず、正しいと信じられ広まった情報が多い[1-3]。微生物叢解析は、16S リボソーム RNA（16S rRNA）や 18S リボソーム RNA（18S rRNA）遺伝子アンプリコンシーケンシングとショットガンメタゲノムシーケンシングによる細菌・真菌分類が一般的である[1,2]。マイクロバイームデータは、遺伝子配列のバリエーションと相対量から、菌叢を構成する菌種組成を得ることができる[1,2]。これらはサンプル内で標準化された組成データであるため、同一サンプル内の微生物の存在量には順序があるが、異なるサンプル間の微生物の存在量の順序は不明であり、さらに、相対的存在量として扱われる分類操作単位（Operational taxonomic unit; OTU）は、微生物ごとに遺伝子の抽出や増幅の段階で得られる量としてバイアスが入るため、微生物の存在量そのものを正確に反映しているわけではない[1,2]。

組成データベクトルは、ベクトルの要素が正で、通常は 1 とみなされる定数に合計される特殊なタイプの多変量変数である[1,2,4-8]。構成成分にはゼロがなく、相対的な情報のみが保持され、比較は同じ構成のデータ間でのみ行うことができる[1,2,4-8]。ただし、丸め誤差によるゼロや検出力の問題によるゼロがあり、これらに対する処理は、乗法置換法や微小量をゼロとして扱い無視するなど様々な方法がある。便宜的にゼロを使用することでサンプル間の構成要素の違いを強調することもできるが、構成要素が異なるということ以外の比較は困難である。また、任意の構成成分を用い

て副組成を生成可能であり、副組成を用いるときは元の総和と副組成の総和が異なるので、データは圧縮された割合で示されることに注意が必要であるが、比に関しては総和の相違に関する影響を受けない[4-8]。組成データの場合、ユークリッド空間で定義された演算操作の多くは本来の定義とは異なり、中心対数比変換、相加対数比変換、等長対数比変換などを用いた解析が行われる。これらの対数変換は構成成分同士の距離と角度が異なるため、結果とその解釈に注意が必要である。一般的な組成データはその基礎データにおいて、それぞれの構成成分に変動があるが、相加対数比変換を行う際に、レファレンス成分が基礎データにおいての変動がほとんどない成分（不変成分）を選ぶことができれば、組成データから、基礎データにおける変動、すなわち、絶対量変動を特定できる[1,2,4]。このレファレンス成分の推定方法として、組成データと基礎データにおけるピアソンの相関係数の近似式から、太田氏らは Test 1 と Test 2 の 2 種類の検査を発見した[1,2,4,5]。この検査は、比の変動係数を計算すると、不変成分が比の分母になる時に、その変動係数が小さい傾向にあるという性質を利用した検査である[1,2,4]。

腸内細菌の主要な門である Bacillota (別名 Firmicutes) と Bacteroidota (別名 Bacteroidetes) は、世界中のヒトにおいて観察され、腸内細菌叢の解析では、Firmicutes/Bacteroidetes 比と主座標分析 (Principal coordinate analysis; PCoA) がよく使用され、 α 多様性と β 多様性が、細菌叢の多様性の指標として使用されることもある[1-3]。主座標分析や多次元尺度構成法は、互いに独立である p 種類の観測項目（細菌）を p 次元ベクトル空間の座標軸にし、互いの類似度または互いの距離を相関のように扱った n 例の被験者を n 次元部分空間の座標軸にしている[1,2]。細菌叢を構成する細菌は互いに独立ではなく、さらに、よく用いられている非類似度行列は Bray-

Curtis distance などであるが、この距離はユークリッド空間での距離のため、組成データである細菌叢のデータに適用できない[1,2]。すなわち、主座標分析はユークリッド空間で定義された演算操作がアルゴリズムにあるため、 α 多様性と β 多様性指数は、組成データに対して科学的な意味を持たない[1,2]。したがって、細菌叢の多様性の指標として使用された α 多様性と β 多様性は現実には存在しない[1,2]。また、Firmicutes/Bacteroidetes 比を使用する科学的な根拠を示す文献は渉猟する限り存在しない。そこで、dysbiosis の具体的な状態を特定するため、本研究では細菌叢のデータで個人間の細菌の絶対量または相対量の変動を推定した。

2 目的

2.2.1 組成データ

OTU データセットは「National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN) JMD (公開データ)」から抽出された[9]。使用された正規化手法は総和スケールリングであった。本研究では、NIBIOHN が実施した健康と栄養に基づくコホート研究のコホート（以下、NIBIOHN コホートと呼ぶ）から、地域在住の日本人ボランティアの糞便サンプルを評価した[9]。NIBIOHN コホートでは、2015 年 10 月から 2020 年 10 月までの間に 1518 人の健康な日本人成人ボランティアが分析された（年齢範囲：19.5～80 歳、男性：693 人、女性：825 人、6 つの地域：神奈川；厚木、新潟；南魚沼、大阪；大阪、東京；新宿、山口；周南、山梨；中央）[9]。

2.2.2 統計解析

相対的な多様性を示すために標本分散を用いた主成分分析を行った。NIBIOHN JMD (公開データ) は主要な細菌門 4 門でゼロを含む 4 データを除外して、4 門で相加対数比解析を行った。相加対数比変換のレファレンス成分に関しては、基礎データにおいて最も変動が小さい成分を推定する方法として変動係数法を用いた。

データは、Excel (Microsoft® Excel® for Microsoft 365 MSO (バージョン 2306、ビルド 16.0.16529.20164、64 ビット) および R バージョン 4.0.3 (2020-10-10) (Copyright © 2020、The R Foundation for Statistical Computing))を使用して分析された。

2.3 結果

NIBIOHN JMD（公開データ）の副組成の統計量を表 2.1 に示し、また、相対的多様性を示す散布図を示した（図 2.1）。変動係数法の結果は NIBIOHN JMD（公開データ）の副組成では Firmicutes が不変成分である可能性が高いと推定された（表 2.2–2.4）。

Firmicutes がサンプル間で不変成分であると仮定し、相加対数比変換を行うと、Bacteroidetes、Actinobacteria、Proteobacteria はサンプルごとで絶対量に大きな変動がある結果であった（図 2.2）。Firmicutes がサンプル間で不変成分でないと仮定する場合は、Bacteroidetes、Actinobacteria、Proteobacteria はサンプルごとで相対量に変動があるという結果であった（図 2.2）。

2.4 考察

dysbiosis の本質

細菌叢解析のデータは組成データであるため、実際の細菌の絶対量の変動はわからない[1,2]。細菌の相対存在量は細菌同士の相関や定数和制約のための偽相関を反映した相対的な関係性であり、標本標準分散を用いた主成分分析によって低次元で示せる[1,2]。しかし、主成分分析では、絶対量に関する情報は抽出できず、100%積み上げ棒グラフを低次元で示すに過ぎない[1,2]。100%積み上げ棒グラフで示されるような相対的な関係性は一般的に議論されている α 多様性の概念に相当し、主成分スコアはデータが各主成分の軸上でとる値であるため、よく用いられる α 多様性指標と区別して、主成分スコアを相対的多様性指標とするとよいだろう[1,2]。

ピアソンと太田氏らの研究結果から比の変動係数の大きさが小さいほど不変成分である可能性が高い[4,5]。不変成分は不明であるが、変動係数法の Test 1 と Test 2 の合格回数が少ない成分は変化している可能性が高い成分であるので、相対的情報では変化しているかどうか判断ができなかった絶対量に関する変動の有無を推定できる[1,2,4]。さらに、変動係数法により推定された不変成分で相加対数比を使用した場合、個々の細菌の絶対量の増減の推定が可能であるが、細菌叢において、絶対量が不変な細菌の存在は証明されていないため、現実では変動係数法により不変成分の特定は困難である。細菌叢の乱れを dysbiosis と定義するが、細菌叢の比較に関しては特定の疾患患者と健常者の比較を行った研究が多く、本研究でも個人間の細菌量の変動を推定した結果、門レベルで個人間の細菌量の変動は大きかった。したがって、そもそも個人ごとに細菌の組成自体が異なるため、dysbiosis の概念は個人内の経時変化に対して使用すべきである[2]。さらに、Bacteroidetes の比の変動係数が大きいことから

Firmicutes/Bacteroidetes 比を使用する利点は得られず、研究ごとに適切なレファレンス成分が存在する場合がありますと考えられた。

本研究結果から、個人間の比較では細菌叢そのものが大きく異なるため、**dysbiosis** と定義される状態はどのような状態か決めることはできなかった。しかし、個人間で細菌の絶対量の変動は大きいと推定され、**dysbiosis** は個人内の細菌叢の変化に対して使用すべき概念であると考えられた。

2.5 結論

微生物叢の相対的多様性の図示には主成分分析（PCA）が有用であることが示唆された。相対存在量に基づき変動係数法により不変成分を推定することで、基準（不変成分）に対する相対存在量（相対存在比）を使用して、基礎データの絶対量変動の推定が行え、**dysbiosis** の具体的な状態の特定には相加対数比解析が有用である場合がある可能性が示された。

2.6 データ利用可能性に関する声明

この研究の結果を裏付ける OTU データは、<https://microbiome.nibiohn.go.jp/jmd-public> からアクセスできる。(著者は 2023.07.03 にアクセス)

2.7 参考文献

1. Itagaki, T.; Kobayashi, H.; Sakata, K.-i.; Miyamoto, I.; Hasebe, A.; Kitagawa, Y. Compositional Data and Microbiota Analysis: Imagination and Reality. *Microorganisms* **2024**, *12*. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. 板垣, 竜樹.; 長谷部, 晃. 細菌叢解析に関する神話と誤解 : 神話の解読の開始. *北海道歯学雑誌* **2024**, *45*, 10-11. <http://hdl.handle.net/2115/93119>
3. Walker, A. W.; Hoyles, L. Human microbiome myths and misconceptions. *Nature Microbiology*. **2023**, *8*(8), 1392–1396. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ohta, T.; Arai, H.; Noda, A. Identification of the unchanging reference component of compositional data from the properties of the coefficient of variation. *Math. Geosci.* **2011**, *43*, 421–434. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
5. Pearson, K. Mathematical contributions to the theory of evolution: On a form of spurious correlation which may arise when indices are used in the measurement of organs. *Proc. R. Soc. Lond.* **1897**, *60*, 489–498. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
6. Aitchison, J. The statistical analysis of compositional data. *J. R. Stat. Soc. Series B (Methodol)* **1982**, *44*, 139–160. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
7. Aitchison, J.; Egozcue, J. The statistical analysis of geochemical compositions. *Math. Geol.* **1984**, *16*, 531–564. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
8. Aitchison, J. Compositional data analysis: Where are we and where should we be heading? *Math. Geol.* **2005**, *37*, 829–850. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
9. Chen, Y.-A.; Park, J.; Natsume-Kitatani, Y.; Kawashima, H.; Mohsen, A.; Hosomi, K.; Tanisawa, K.; Ohno, H.; Konishi, K.; Murakami, H.; et al. MANTA, an integrative database and analysis platform that relates microbiome and phenotypic data. *PLOS ONE* **2020**, *15*, e0243609. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

謝辞

今回の学位研究にあたり、ご指導やご助言を頂きました長谷部晃教授、坂田健一郎先生やご指導をはじめ様々な御協力を頂きました北海道大学大学院歯学研究院の北川善政教授、宮本郁也教授、その他に私の研究を支えてくださった皆様に深く感謝をいたします。

図表

表 1.1.患者背景。

因子	Group	真菌陰性	真菌陽性	標準化差	サンプルサイズ
人数	-	226	88	-	314
性別 (%)	女性	181 (80.1)	68 (77.3)	0.069	249
	男性	45 (19.9)	20 (22.7)		65
年齢 (mean (SD)) year		60.96 (14.98)	67.12 (14.43)	0.419	314
Alb (mean (SD)) g/dL		4.30 (0.29)	4.18 (0.34)	0.408	255
Cu (mean (SD)) µg/dL		112.46 (18.98)	112.32 (18.01)	0.007	234
Fe (mean (SD)) µg/dL		87.98 (29.51)	85.77 (30.88)	0.073	232
Hb (mean (SD)) g/dL		13.62 (1.57)	13.09 (1.23)	0.376	256
RBC (mean (SD)) × 10 ⁶ /µL		4.47 (0.50)	4.27 (0.44)	0.438	256
TP (mean (SD)) g/dL		7.08 (0.36)	7.03 (0.41)	0.122	255
VB12 (mean (SD)) pg/dL		722.06 (592.73)	723.44 (707.61)	0.002	228
WBC (mean (SD)) ×10 ⁴ /µL		5.77 (1.66)	6.08 (1.97)	0.169	256
Zn (mean (SD)) µg/dL		78.63 (13.49)	77.48 (10.82)	0.094	237

SD: Standard deviation.

表 1.2. 検出した *Candida* 属菌の分類と検出数。

<i>Candida</i> Species	検出数
<i>C. albicans</i>	67
<i>N. glabrata</i>	5
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (syn. <i>Candida guilliermondii</i>)	1
<i>C. tropicalis</i>	0
<i>C. parapsilosis</i>	2
<i>C. albicans</i> + <i>N. glabrata</i>	8
<i>C. albicans</i> + <i>M. guilliermondii</i>	3
<i>C. tropicalis</i> + <i>N. glabrata</i>	1
<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i>	1

表 1.3. ANCOVA の結果。

ANOVA Table (Type III tests)	<i>p</i> -Value
Interaction	0.946
Factor (sex)	0.403
Age	0.000854

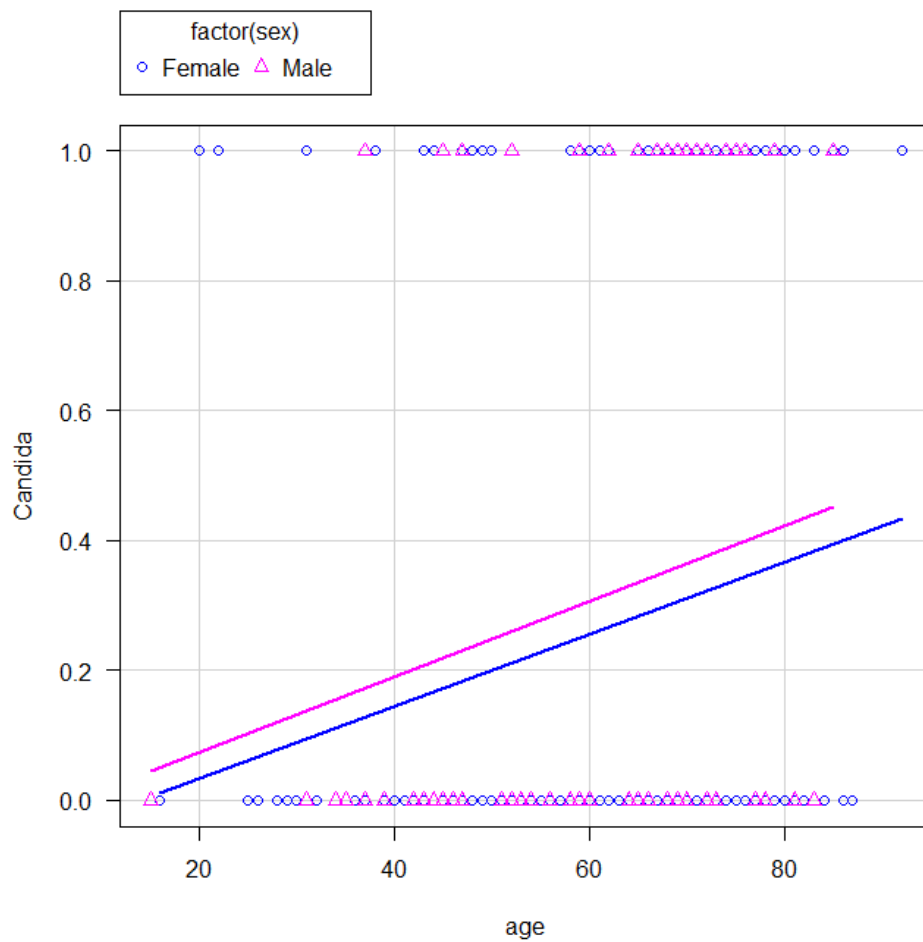


図 1.1. ANCOVA の結果。各性別の回帰直線は平行であった ($p = 0.946$)。回帰分析に基づくと、性別に関連した影響はなかった ($p = 0.403$)。年齢が上がるほど真菌培養検査は陽性になる可能性が高かった ($p < 0.05$)。

表 1.4. 単変量解析の結果 1。

Logistic Regression Analysis	Odds Ratio	95% CI	<i>p</i> -Value	<i>n</i>
Age	1.03	(1.01, 1.05)	0.0013	314
Alb	0.25	(0.09, 0.66)	0.0052	255
Cu	1.00	(0.98, 1.02)	0.96	234
Fe	1.00	(0.99, 1.01)	0.64	232
Hb	0.79	(0.65, 0.97)	0.021	256
RBC	0.41	(0.22, 0.76)	0.0051	256
TP	0.72	(0.33, 1.60)	0.40	255
VB12	1.00	(1.00, 1.00)	0.99	228
WBC	1.10	(0.94, 1.30)	0.23	256
Zn	0.99	(0.97, 1.02)	0.57	237

CI: Confidence interval.

表 1.5.多変量解析の結果 1。

Logistic Regression Analysis	Odds Ratio	95% CI	<i>p</i> -Value	<i>VIF</i>
Analysis of Deviance	-	-	0.0011	-
Age	1.03	(1.00, 1.05)	0.02	1.03
Alb	0.44	(0.15, 1.32)	0.14	1.19
WBC	1.14	(0.96, 1.35)	0.14	1.05
Hb	0.85	(0.68, 1.06)	0.15	1.22

VIF: Variance inflation factor.

表 1.6.多変量解析の結果 2。

Logistic Regression Analysis	Odds Ratio	95% CI	<i>p</i> -Value	<i>VIF</i>
Analysis of Deviance	-	-	0.0010	-
Age	1.03	(1.01, 1.05)	0.01	1.03
Alb	0.33	(0.12, 0.90)	0.03	1.03
WBC	1.11	(0.94, 1.31)	0.24	1.00

表 1.7.多変量解析の結果 3。

Logistic Regression Analysis	Odds Ratio	95% CI	<i>p</i> -Value	<i>VIF</i>
Analysis of Deviance	-	-	0.00058	-
Age	1.03	(1.01, 1.05)	0.01	1.03
Alb	0.32	(0.12, 0.88)	0.03	1.03

表 1.8.患者背景 2。

Factor	Group	<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i> + <i>N. glabrata</i>	標準化差
<i>n</i>	-	72	8	-
性別 (%)	女性	55 (76.4)	7 (87.5)	0.29
	男性	17 (23.6)	1 (12.5)	
年齡 (mean (SD)) year		65.5 (15.0)	75.5(9.6)	0.79

表 2.1. NIBIOHN JMD（公開データ）要約統計量。

Statistics	Firmicutes	Bacteroidetes	Actinobacteria	Proteobacteria
Average	4364.273	4340.497	640.6686	477.1056
Coefficient of variation	0.33551	0.368629	1.252635	1.391281
Skewness	0.151138	-0.11289	2.880394	4.446133
Kurtosis	-0.16456	-0.22359	11.40587	27.3981
Correlation with Firmicutes	1	-0.73877	-0.06821	-0.19843

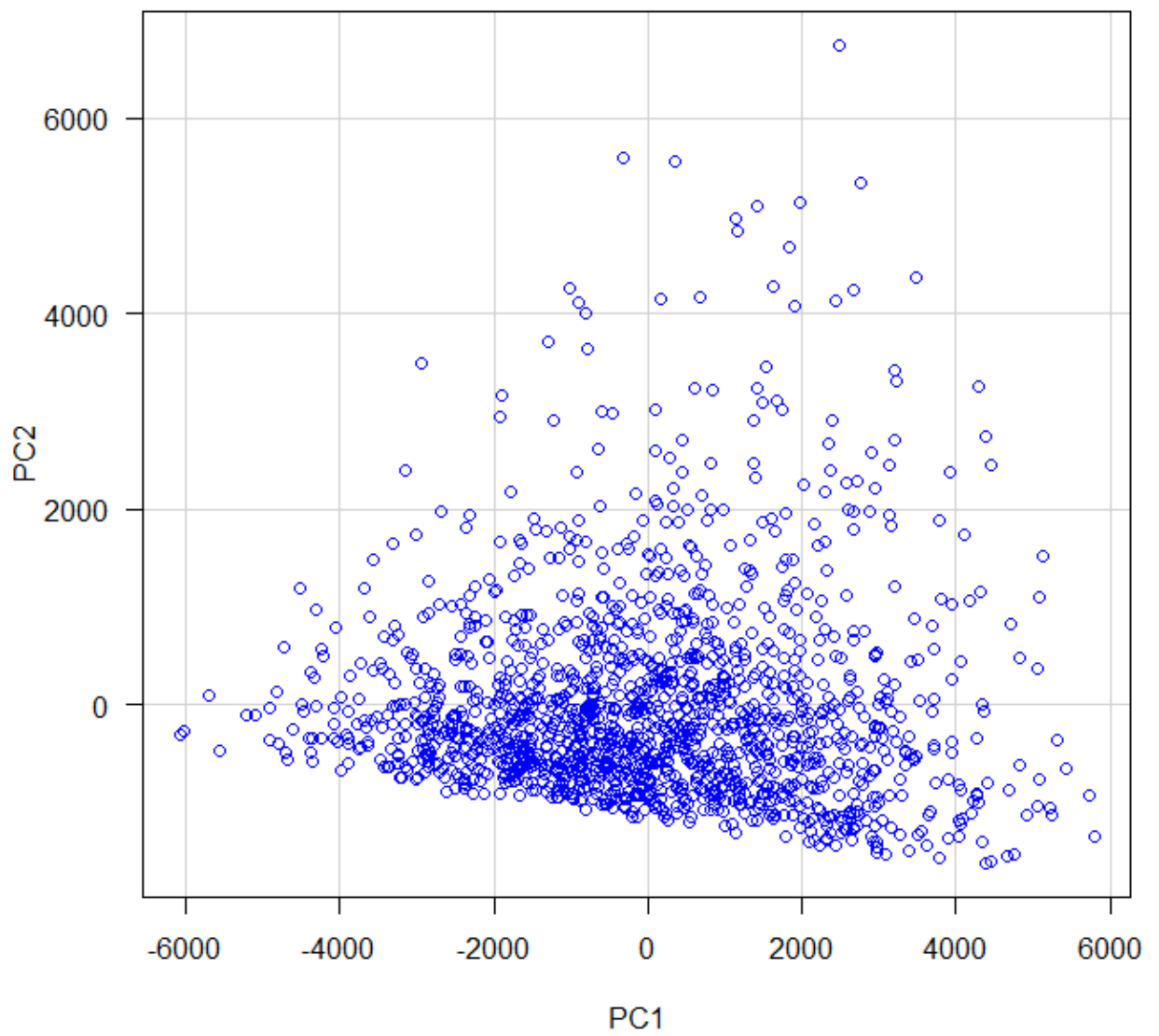


図 2.1. 相対的多様性。主成分スコアを散布図に示した。

表 2.2.比の変動係数。

分子 \ 分母	Firmicutes	Bacteroidetes	Actinobacteria	Proteobacteria
Firmicutes	-	12.84994	3.781632	6.300108
Bacteroidetes	1.031616	-	4.053679	4.616321
Actinobacteria	1.838408	20.28237	-	3.409710
Proteobacteria	2.177372	14.66084	5.966181	-

表 2.3.分母分子の入れ替えの大小比較と Test 1 の結果。

分子 \ 分母	Firmicutes	Bacteroidetes	Actinobacteria	Proteobacteria
Firmicutes	-	大	大	大
Bacteroidetes	小	-	小	小
Actinobacteria	小	大	-	小
Proteobacteria	小	大	大	-
Test 1 合格数	3	0	1	2

表 2.4. Test 2 の結果。

Test 2 合格順位	比の変動係数の小さい順
1	Bacteroidetes/Firmicutes
2	Actinobacteria/Firmicutes
3	Proteobacteria/Firmicutes
4	Actinobacteria/Proteobacteria

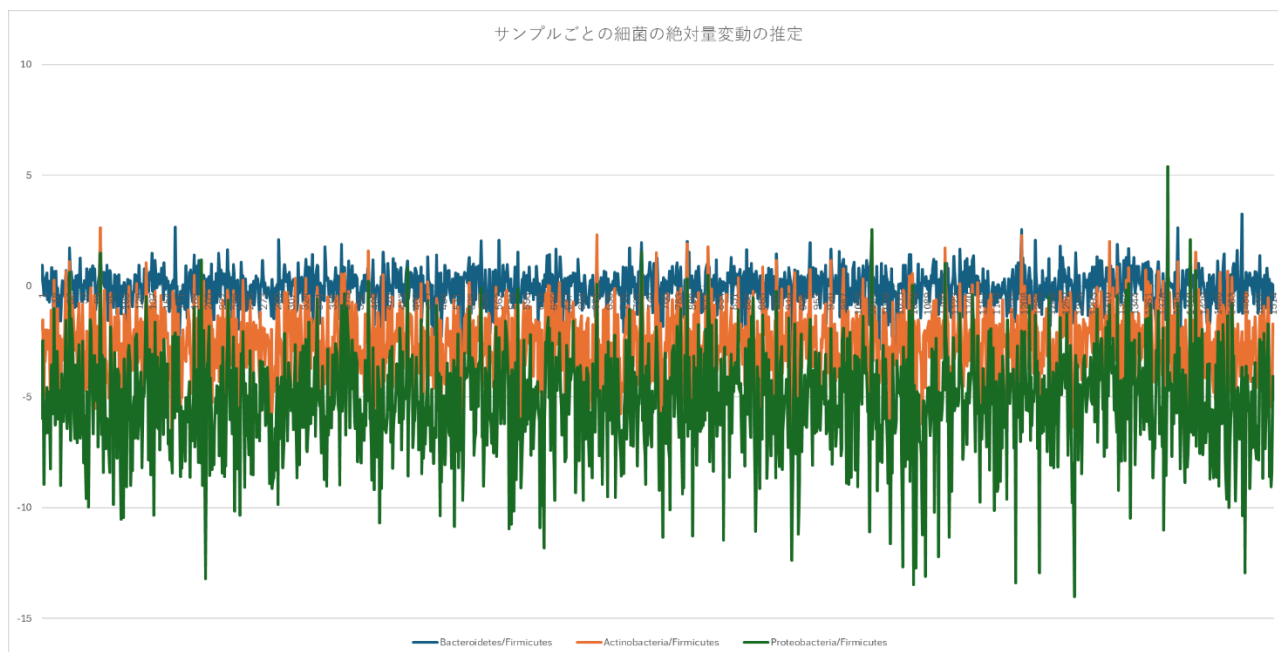


図 2.2. サンプルごとの細菌の絶対量変動の推定。サンプルごとに細菌は大きな変動を示した。