

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11366

研究課題名(和文)造血幹細胞移植治療が口腔内細菌叢に与える影響についての臨床および分子生物学的解析

研究課題名(英文)Clinical effects of hematopoietic stem cell transplantation on oral microflora using microbiological analysis

研究代表者

平野 慶子(Hirano, keiko)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：50335618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍の治療のために造血幹細胞移植を受けた小児において、口腔内の状況が悪化していることが多い。このことは、移植前後において口腔環境が激変することにより、口腔内の細菌叢が変化している可能性が示唆される。本研究では、移植前および移植後に唾液とプラークの採取しDNAを抽出し、それらを用いて代表的な口腔細菌についてPCR法を用いて検出した。その結果、口腔レンサ球菌の出現の頻度には大きな変化は無かったが、歯周病細菌においては術後に検出される菌の種類が増加していた。また乳酸桿菌は術後では9割の患者から検出された。以上の結果から、口腔内細菌叢は変化し、歯肉炎や重度の齲蝕を引き起こしている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The oral condition of pediatric patients with cancer worsens following hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), with oral mucositis, caused by environmental fluctuations in the oral cavity that involve oral microflora, one of the major side effects of that procedure. For the present study, saliva and plaque samples were collected from patients before and after undergoing HSCT. Genomic DNA was then extracted from those samples and microbiological examinations using PCR assays were performed. The frequency of occurrence of oral streptococci did not change before and after, while that of periodontal bacteria was increased following the procedure. In addition, the rate of detection of Lactobacillus was 40% before and increased to 90% after HSCT. In a previous study, co-existing Lactobacillus and mutans streptococci in the oral cavity were shown to cause severe caries. The present results suggest that oral mucositis and severe caries are induced by oral microflora alterations.

研究分野：小児歯科学分野

キーワード：小児がん 幹細胞移植 口腔内細菌 乳酸桿菌 齲蝕 歯周病細菌 ミュ-タンス連鎖球菌 周術期歯科治療

1. 研究開始当初の背景

小児期における重度の悪性腫瘍の治療においては放射線療法や大量化学療法が必要でありその後生じる造血機能不全を補うために造血幹細胞移植が必要となる場合が多い。造血幹細胞移植の際には、好中球が極端に減少し、口腔内は潰瘍や水泡、舌苔や乾燥とそれに伴う疼痛口腔粘膜障害が多発し、成人よりも長く1～2週間続く。その後も慢性移植片対宿主病(慢性GVHD)として慢性的な口腔内粘膜の拘縮、刷牙困難や唾液の減少による口腔内乾燥や免疫抑制剤の副作用による骨の吸収や歯肉炎や易感染症の問題もある。特に成長過程における小児においては造血幹細胞移植の直後のみならず、長期にわたるフォローアップが必要と考えた。

唾液減少による口腔内乾燥のために齲蝕の増加が懸念されるが、この場合齲蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* だけでなく乳酸桿菌の増加が考えられる。これまでに口腔乾燥症状を呈するシェーグレン症候群の患者の口腔内では、乳酸桿菌の増加が報告されている。さらに化学療法や免疫抑制剤の口渇、嘔吐やそれに付随した口腔清掃困難の影響で、口腔内の細菌叢が変化する可能性が考えられる。小児期における口腔内細菌叢の確立は、その後の齲蝕や歯周病の罹患に関連する大きな要因となるため、その構成比を検討することが必要であると考え、本研究を企画立案するに至った。また患児の口腔のみならず、全身的な心身の晩期合併症が生じる場合、口腔への関心は低くなる傾向があり、その意味でも特に齲蝕罹患傾向が高い患児に対してはアプローチが必要であると考えた。

2. 研究の目的

長期フォローアップのための一助として口腔細菌叢についての変化について術前とその後の経時的な変化の検討を行う。

(1)造血幹細胞移植治療を予定している小児がん患者の口腔内より移植前と移植後の唾液およびデンタルプラークを採取し、PCR法により口腔内細菌叢の構成菌種を同定し、その構成を検討する。

(2)造血幹細胞移植治療における患者の年齢、頭頸部の放射線治療の有無、慢性GVHDの有無と細菌叢の状態を検討する。

3. 研究の方法

(1)岡山大学大学院医歯薬学総合研究科の倫理委員会の承認後岡山大学病院小児歯科を受診した造血幹細胞移植予定の患児の保護者に研究内容を説明し、同意を得られた対象について、齲蝕および歯周疾患に関する詳細な診査を行い、プラークおよび唾液を採取した。患児に齲蝕を認める場合は治療を行った後採取を行った。サンプルは、移植前と移植後約1か月と移植後約3か月に同様に唾液とプラークの採取を行った。

(2) Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による各サンプル中に含まれる口腔細菌種の検出を行った。まず代表的な口腔レンサ球菌である *Streptococcus mutans*、*Streptococcus sobrinus*、*Streptococcus salivarius*、*Streptococcus sanguinis*、*Streptococcus oralis*、*Streptococcus gordonii* の6種類の口腔レンサ球菌を対象とした。また代表的な歯周病関連細菌として

Porphyromonas gingivalis、*Treponema denticola*、*Tannerella forsythia*、*Capnocytophaga chracea*、*Capnocytophaga sputigena*、*Prevotella intermedia*、*Prevotella nigrescens*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Campylobacter rectus*、*Eikenella corrodens* の10種類の歯周病細菌を対象とした。得られたプラークおよび唾液から通法に従って細菌DNAを抽出し、上記の各特異的なプライマーを用いてPCR法にてサンプル中に含まれる各細菌種の検出を行なった。

(3)齲蝕の原因となる代表的な細菌であるミュータンス連鎖球菌の割合を求めるため、口腔内レンサ球菌中のミュータンス連鎖球菌の割合を調査した。上記で得た患児の唾液を *Mitis salivarius* (MS) 寒天培地とバシトラシン含有 *Mitis salivarius* (MSB) 寒天培地に播種しての菌の分離・培養を行った。また乳酸桿菌の出現の有無を *Lactobacillus selecting* (LBS) 寒天培地に播種してその出現より判定した。

4. 研究成果

(1)造血幹細胞移植前に口腔内細菌を採取に着手できた患児は25名であった。しかし、その後、治療方針変更や他院へ転医、等の理由で6名が中断した。18名が造血幹細胞移植

後（術後）3 か月までの唾液と歯垢のサンプル採取が終了している。現在までに最終段階まで分析が終了しているのは 14 名である。平均年齢は 11 歳 2 か月（4 歳 1 か月～17 歳 0 か月）であった。疾病は急性リンパ性白血病が 6 名、骨髄異形成症候群 3 名、胚細胞腫瘍 2 名再生不良性貧血 2 名、骨芽腫瘍 1 名であった。齶蝕経験歯数の平均値は 5.6 本（0～22 本）であった。なお齶蝕はすべて術前に修復し、入院中は各々通法に従った口腔ケアを行った。

(2)口腔内レンサ球菌の出現状態

齶蝕原性細菌である *S. mutans* および *S. sobrinus* を含めた 6 種類の細菌が出現した。出現率を（出現した患者数 / 患者数）× 100（%）と考え、その数値を（術前、術後 1 か月、術後 3 か月）として表すと *S. mutans* は（29%、17%、9%）であり術前と比較し出現率が減少しており *S. sobrinus*（29%、33%、36%）、*S. salivarius*、（58%、50%、55%）、*S. oralis*（64%、67%、55%）は経時的变化がわずかであった。*S. sanguinis*（64%、25%、36%）、*S. gordonii*（36%、8%、36%）は術後 1 か月で減少し術後 3 か月では術前の状態に戻った。*S. sanguinis* や *S. gordonii* のような術後 1 か月で減少しているものもあったが全体的には術後 3 か月で術前とほぼ変わらない出現率に戻っていた。また齶蝕経験歯数が高い患児のサンプルからは齶蝕の原因となる *S. mutans* および *S. sobrinus* が検出された。

(3)歯周病細菌の出現状態

P. gingivalis、*T. denticola* については出現した患児は認めなかった。*T. forsythia* は術前に 1 名のみ出現した。*C. ochracea*（50%、36%、18%）、*C. sputigena*（57%、21%、45%）、*P. intermedia*（7%、0%、18%）、*P. nigrescens*（21%、21%、0%）、*A. actinomycetemcomitans*（7%、7%、0%）、*C. rectus*（43%、0%、36%）、*E. corrodens*（21%、7%、45%）といった出現率であった。移植前後に最も高頻度で検出された歯周病細菌は *C. ochracea*、*C. sputigena* で術後には経時的に減少した。*C. rectus* は慢性歯周炎の病原菌であるが術前には出現していたが術後 1 か月には出現せず、術後 3 か月後には再び出現した。また *P. nigrescens*、や *E. corrodens* は術前より術後 3 か月に検出率が增大している細菌もあった。

全体として患児が年齢の割には術前より歯周病細菌は多く主として重症な歯周病に特有の細菌も出現していた。

(4)口腔レンサ球菌中のミュ-タンスレンサ球菌の割合

齶蝕に罹患しやすい指標として口腔レンサ球菌中のミュ-タンスレンサ球菌の割合を調査した。（%で表示）しかし術前に 2 名が 34.3%、72.9%、となり術後 1 か月では 47.7% 88.2%と一時的に極めて高い値になる患児もいたが 3 か月後にはほぼ 0～13.7%の範囲に減少していた。

(5)乳酸桿菌の出現率

乳酸桿菌の出現率においては術前が 43%であったが 3 か月後は 91%であった。乳酸桿菌はミュ-タンス連鎖球菌と同時に口腔内の齶窩に存在することにより齶蝕の重症化を招くといわれているためより一層の齶蝕の予防に対する必要があると考える。

口腔内のサンプルを採取することは口腔ケアと共にすでに造血幹細胞移植治療の一環となっており、患者と保護者にも受け入れられているこのため今後継続して造血幹細胞移植の前後において観察研究を継続していく予定である。患児の口腔細菌のサンプルを増やし、さらに特に細菌の出現の経時的な増減と年齢、罹患した疾患また GVHD についての関連を調査する予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 4 件）

K.Hirano, Y.Tsunoda, Y.Takashima, M.Nakano: Perioperative Oral Bacterial Population in Patients Undergoing Hematopoietic Cell Transplantation 第 94 回 IADR、2016 年 6 月 23 日、（韓国、ソウル）

吉田衣里、森川優子、高島由紀子、森本節代、平野慶子、仲野道代、造血幹細胞移植患者における口腔細菌叢の変化、第 63 回日本小児保健学会、2016 年 6 月 25 日、大宮ソニックシティ（埼玉県大宮市）

高島由紀子、吉田衣里、平野慶子、角田陽子、仲野道代、造血幹細胞移植患者の口腔内より分離した細菌叢の経時的変化、第 55 回日本小児歯科学会、2017 年 5 月 25-26 日、西日本総合展示場（福岡県小

倉市)

平野慶子、吉田衣里、森川優子、高島由紀子、仲野道代. 小児がん患者の口腔内細菌叢に対する造血幹細胞移植の影響について、第64回日本小児保健学会、2017年6月29日~7月1日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

[その他]

高島由紀子、抗がん剤治療による歯科的晩期合併症の現状、第23回岡山大学病院小児医療センター合同カンファレンス、2017年1月24日 マスカットキューブ(岡山県岡山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野慶子 (Hirano, Keiko)
岡山大学病院・助教
研究者番号: 50335618

(2) 研究分担者

仲野道代(松本道代) (NAKANO, Michiyo)
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 30359848

(3) 研究分担者

高島由紀子 (TAKASHIMA, Yukiko)
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 30589768

(4) 研究分担者

藤田一世 (FUJITA, Kazuyo)
岡山大学病院・講師
研究者番号: 00437386