

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19294

研究課題名(和文)大量化学療法による口腔粘膜障害発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of oral mucositis caused by high-dose chemotherapy

研究代表者

小林 優子(森川優子)(Morikawa, Yuko)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：70803188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞移植を施行する患児から唾液を採取し、PCR法を行ったところ移植後3か月の口腔内細菌は移植前には歯周病原菌の存在が認められた。また、得られた唾液から齶蝕病原性細菌 *Streptococcus mutans* を分離し、その病原性について検討したところ、*S. mutans* 株の齶蝕病原性は移植後3か月までは低い状態であることがわかった。以上の結果から、移植後の患児の口腔内の状況は移植前と比較して大きく変化していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大量化学療法による全身状態の変化や長期にわたる抗生剤の投与によって口腔内の状況が変化し、口腔内細菌叢が変化したと考えられる。このことから、口腔粘膜障害はこの変化によって引き起こされていると考えられる。また、移植後の口腔内の状態は移植直前直後よりもう蝕や歯周疾患のリスクが高くなっている可能性が高いことが示された。このことから、大量化学療法後は長期的な口腔内管理が必要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Saliva samples were collected from children before and again three months after undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), and PCR analysis revealed the presence of multiple bacterial species in the oral cavity in the post-transplant period as compared to before HSCT. In addition, *Streptococcus mutans* organisms were isolated from those samples and their caries pathogenicity was investigated, which showed a low level up to three months following transplantation. These results suggested that HSCT leads to a drastic change in oral condition.

研究分野：小児歯科

キーワード：小児がん 大量化学療法 *Streptococcus mutans*

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

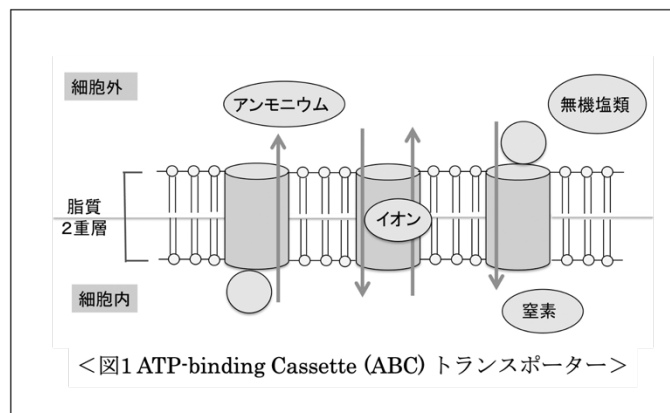
1. 研究開始当初の背景

小児がん患者では、治療に用いる抗がん剤を含む大量化学療法によって免疫能が低下し、口腔内に口内炎、潰瘍や水泡が生じるとともに、舌苔や乾燥が生じることによって口腔粘膜障害が多発することが知られている。これらは口腔内環境の変化により、口腔細菌叢の変化や細菌の病原性自体にも変化が生じている可能性が考えられている。

口腔細菌叢を形成する細菌のうち、グラム陽性細菌の代表的なものとしては、齲蝕の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* が挙げられる。口腔内は温度変化、唾液分泌量、唾液 pH、生活習慣、外来物質の侵入などの因子により環境が大きく変化する。

S. mutans の最大の特徴としては、過酷な口腔内の環境に速やかに対応するための機能を有していることである。その中で、ABC トランスポーターをはじめとする膜タンパクの働きによって、菌にとって必要な栄養素を取り込むとともに不要なものを排出することで、強固なバイオフィームを作り出すことができる。成熟したバイオフィームは抗菌物質に対して抵抗性を示し、宿主の防御機構を破壊するようになる。そのため、バイオフィーム形成に関連する ABC トランスポーターの存在は、菌が病原性を発揮する上で重要なものである。さらに、口腔内細菌がこのような様々な環境の変化に曝露された際に、膜タンパクは環境変化によるストレスに応答し、その発現動態を変化させることが報告されている。このような種々のストレスによる生育条件の悪化に対するストレス応答システムは、細菌において特に重要な防御機構として考えられている。図1に示す

ように、ABC トランスポーターは、細菌からヒトに至るさまざまな生物種に普遍的に存在する。そのため、様々な口腔細菌においても *S. mutans* と同様に ABC トランスポーターが存在し、細菌の生存に関与していると考えられる。



口腔細菌の種類としては、歯周病

の発症に関連する歯周病原細菌や唾液、舌、頬粘膜、歯肉より分離されることが報告されている乳酸桿菌などが挙げられる。これらの細菌も同様に固有の ABC トランスポーターを有しており、*S. mutans* の ABC トランスポーターと同様に、細菌にとって必要な栄養素を取り込むとともに不要なものを排出しバイオフィームを形成することが知られている。しかしながら、小児がん患者の口腔内では、想定されないレベルでの環境の変化が起きており、これらの膜タンパクの発現動態も変化している可能性が大いに考えられる。そこで我々は大量化学療法を行う小児患者における口腔粘膜障害に関連する口腔細菌において、ABC トランスポーターをはじめとする膜タンパクの発現動態はどのように関連しているのかについて検討した。

2. 研究の目的

乳幼児期に発症した小児がん患者における抗がん剤による化学療法は、その侵襲が大きいため治療が終了した後も全身的に様々な問題が起こる。そのため、治療後の小児患者の QOL が低く長期的なフォローアップが問題となっている。口腔内においても免疫能低下による歯肉炎などの口腔内の炎症が一旦消退しても、口腔内衛生状態が悪く、重篤な齲蝕や歯周疾患に罹患している患者が多い。これは、化学療法により免疫能が低下することによる口腔内環境の変化が口腔細菌叢に変化をもたらせている可能性がある。また、それに伴い細菌叢を形成する口腔レンサ球菌の表層タンパク自体が変異している可能性も示唆される。しかしながら、その細菌叢を構成する細菌の種類あるいは病原性についてこれまで報告はされていない。本研究の目的は、化学療法を行う小児患者における口腔粘膜障害の原因の特定につながる知見を得ることである。

3. 研究の方法

(1) 各ステージにおけるプラークおよび唾液サンプルの採取

岡山大学病院小児歯科を受診した小児がん患者で化学療法をうける予定の患者の保護者に研究内容を説明し同意を得られた対象において、齲蝕および歯周疾患に関する詳細な診査を行い、唾液を採取する。その後、移植後約1か月および3か月時に、移植前と同様に口腔内診査および唾液の採取を行う。その際、造血幹細胞移植の有無、免疫抑制剤、放射線治療についてのデータを同時に収集する。

(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

得られたプラークおよび唾液から、通法に従って細菌 DNA を抽出する。得られた細菌 DNA を用いて、口腔内細菌における特異的なプライマーを用いた PCR 法にて、サンプル中に含まれる口腔レンサ球菌種の検出を行う。

(3) Semiquantitative-PCR 法による菌の定量

リアルタイム PCR 法を用いて、それぞれのサンプルに含まれる各菌の定量を行う。

(4) プラークサンプルからの菌の分離・培養

プラークサンプルを口腔レンサ球菌の分離には、Mitis-Salivarius 寒天培地を、乳酸菌および歯周病原性細菌の分離には、血液寒天培地を用いて、直接播種した後、それぞれ培養を行う。得られたコロニーを適した液体培地にて培養後-80°Cで保存する。

(5) 各ステージで分離したミュータンスレンサ球菌の病原性の検討

①培養菌体のスクロース依存性平滑面付着能

供試菌を1%スクロース含有 BHI 培地に播種し、試験管を水平面から 30° に傾けて 37°C、18 時間静置培養する。培養後、ボルテックスミキサーで 3 秒間攪拌し付着していない菌体の濁度を測定し、培養試験管に強固に付着した菌体の濁度との比率を算出する。

②バイオフィーム形成量の検討

あらかじめ培養した供試菌を 1 / 100 量になるように Todd-Hewitt (TH) 液体培地に播種し、96 穴細胞培養用マイクロテストプレートの各ウェルに 100 μ l ずつ分注した後、37°C で 2 日間嫌気下で培養する。培養後、1%クリスタルバイオレット溶液にて染色を行い、洗浄後、エタノールで固定し、吸光度 570 nm で測定する。

4. 研究成果

小児がん患者において抗がん剤等の大量化学療法を受けた小児において、口腔内環境が変化し重度の齲蝕や歯肉炎が起こることがすでに知られている。また、同時に大量化学療法を受けている小児においては、免疫機能の低下から著しく歯肉の状態が悪化していることが考えられる。このような患者では、齲蝕および歯肉炎発症に関わる菌およびその菌の生育環境も大きく変わっている可能性が高く、その細菌叢は健常の小児のものとは大きく異なると思われる。本研究では岡山大学病院小児科を受診中で保護者の同意が得られた患児11名（表1）

より唾液を採取し、それらから細菌

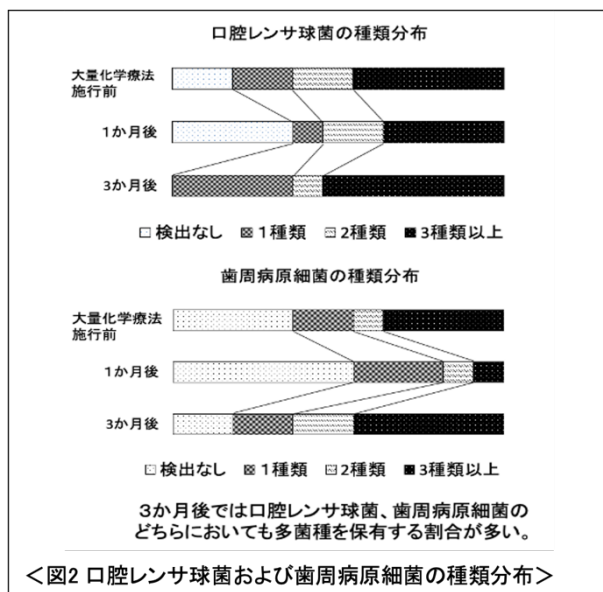
DNA を抽出した。得られた DNA を鋳型として、各口腔内細菌（表2）の特異的プライマーを用いてPCR法を行い菌の同定を行った。サンプルとして、化学療法開始1か月前および開始後約1、3か月後に唾液を採取した。結果として、口腔レンサ球菌の検出率は移植1か月前と比較して移植1か月後で低下した。また、移植3か月後のサンプルでは、1か月後と比較して6種類すべての口腔レンサ球菌において検出率が増加した。同様に移植3か月後のサンプルでは、1か月後と比較して歯周病原菌の10種類中6種類において検出率が増加した。口腔レンサ球菌と歯周病原菌のいずれも移植1か月前と比較して3種類以上の

症例	疾患名	年齢	性別	DMF	dmf
1	胚細胞腫瘍	13Y0M	男児	2	-
2	髄芽腫	13Y8M	女児	22	-
3	胚細胞腫瘍	10Y6M	男児	4	-
4	急性リンパ性白血病	6Y5M	男児	0	13
5	骨髄異形成症候群	16Y0M	男児	7	-
6	骨髄異形成症候群	17Y0M	女児	12	-
7	急性リンパ性白血病	9Y8M	男児	2	1
8	急性リンパ性白血病	8Y4M	男児	0	0
9	骨髄異形成症候群	12Y4M	女児	5	-
10	急性リンパ性白血病	11Y7M	女児	4	-
11	再生不良性貧血	14Y7M	男児	0	-

<表1 症例>

口腔レンサ球菌	歯周病原細菌
菌名（略称）	菌名（略称）
<i>Streptococcus mutans</i> (Sm)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (Pg)
<i>Streptococcus sobrinus</i> (Sb)	<i>Treponema denticola</i> (Td)
<i>Streptococcus salivarius</i> (Ss)	<i>Tannerella foetida</i> (Tf)
<i>Streptococcus sanguinis</i> (Ssa)	<i>Capnocytophaga ochracea</i> (Co)
<i>Streptococcus oralis</i> (So)	<i>Capnocytophaga sputigena</i> (Cs)
<i>Streptococcus gordonii</i> (Sg)	<i>Prevotella intermedia</i> (Pi)
	<i>Prevotella nigrescens</i> (Pn)
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitance</i> (Aa)
	<i>Campylobacter rectus</i> (Cr)
	<i>Eikenella corrodens</i> (Ec)

<表2 口腔レンサ球菌と歯周病原細菌>



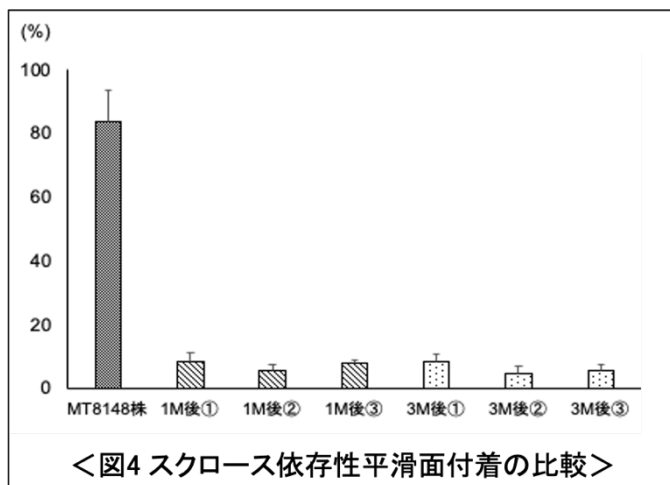
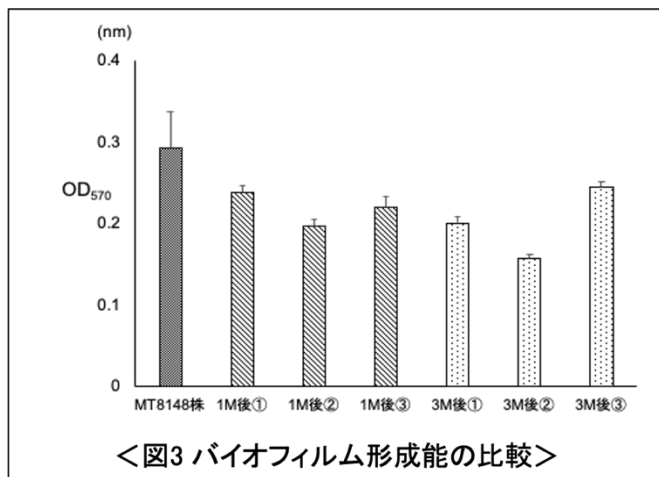
<図2 口腔レンサ球菌および歯周病原細菌の種類分布>

細菌を有する患児の割合が増加した。（図2）

口腔内細菌の分布においては口腔レンサ球菌、歯周病原細菌の両方を有する患児は移植1か月前では約55%であったが移植1か月後に約18%に低下し、3か月後に約82%に増加した。移植1か月後と移植3か月後に検出菌数を比較した場合、移植3か月後に菌数が増加した患児の割合は、口腔レンサ球菌では90%、ミュータンスレンサ球菌では73%であった。

また、得られた唾液から齲蝕病原性細菌

Streptococcus mutans を分離し、その病原性について検討した。開始1か月前のサンプルからは *S. mutans* は分離できなかった。標準株として日本人小児由来の *S. mutans* MT8148 株をコントロール株として用いて、患児より分離された *S. mutans* 株のバイオフ



ィルム形成能の比較を行った。移植後1か月後、移植3か月後の唾液から分離された *S. mutans* 株は、MT8148株と比較するとバイオフィルム形成量の有意な低下が認められた。一方移植1か月後と3か月後の間には有意な差は認められなかった。(図3) さらにスクロース依存性平滑面付着の比較においてはバイオフィルム形成能と同様にMT8148株と比較すると移植後1か月後、移植3か月後の *S. mutans* 株では、ともに有意なバイオフィルム形成能の低下が認められたが、移植1か月後と3か月後の間には有意な差は認められなかった。(図4)

通常、健康な小児では歯周病原細菌は検出されないが、化学療法を施行されている患児の口腔内からは歯周病原細菌が検出された。また移植後の口腔内細菌は多菌種の存在が認められ

た。これは全身状態の変化や長期にわたる抗生剤の投与によって口腔内の状況も変化し、口腔内細菌叢が変化したと考えられる。以上の結果より、移植後3ヶ月後の口腔内の状態は移植直前直後よりもう蝕や歯周疾患のリスクが高くなっていると考えられる。しかしながら、今回実験に供試した患児のサンプルにおける *S. mutans* 株の齶蝕病原性は移植後3か月までは低い状態であることがわかった。今後は他の症例から分離された菌の性状を検討していくと同時に、バイオフィルム形成に関連する膜タンパクの変化について検討することにより齶蝕病原性低下のメカニズムを追究する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morikawa Yuko, Morimoto Setsuyo, Yoshida Eri, Naka Shuhei, Inaba Hiroaki, Matsumoto-Nakano Michiyo	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification and functional analysis of glutamine transporter in Streptococcus mutans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Microbiology	6. 最初と最後の頁 1797320 ~ 1797320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/20002297.2020.1797320	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森川優子、吉田衣里、平野慶子、松三友紀、嶋田 明、塚原宏一、仲野道代
2. 発表標題 造血幹細胞移植施行患児における口腔内細菌叢の推移
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田衣里、森川優子、松三友紀、平野慶子、嶋田 明、塚原宏一、仲野道代
2. 発表標題 小児がん患者に対する口腔ケアの早期介入
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田衣里、森川優子、松三友紀、平野慶子、嶋田 明、塚原宏一、仲野道代
2. 発表標題 小児がん患者に対する歯科介入の効果について
3. 学会等名 第38回日本小児歯科学会中四国地方会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------