

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09894

研究課題名（和文）口腔細菌叢バランス失調が口内炎に及ぼす影響とその原因因子の解明

研究課題名（英文）Imbalance of oral microbiome influences on severity of the oral ulcerative mucositis

研究代表者

人見 涼露（HITOMI, Suzuro）

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：70548924

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年、様々な疾患によって口腔細菌叢のバランスが変化し、口腔内の創傷治癒が妨げられることが報告されている。本研究は、口腔乾燥による口腔細菌叢バランスの変化を明らかにし、その変化が潰瘍性口内炎の治癒過程にどの程度影響するのかを解明することを目的とした。唾液腺摘出による口腔乾燥モデルラットにおいて摘出1週間後より口腔細菌叢が大きく変化した。唾液腺摘出後に惹起した口内炎は重篤度が増悪し治癒までの時間が延長したが、抗菌薬の投与によりこれらは改善した。口腔乾燥による口内炎治癒の延長には口腔細菌の増加に加え、おそらく口腔細菌叢の変化も関与していることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、頭頸部がん治療中など口腔乾燥に苦しむ患者の口腔内環境変化と口腔粘膜疾患の治癒過程に着目して行われた。本研究結果は、そのような患者における口腔粘膜疾患の病態の理解につながる。また、今後より詳細な口腔細菌叢の解析を行うことで、どの細菌種がどのように疾患の治癒や疼痛に関与しているかが明らかになれば、口腔粘膜疾患の予防や、治療薬の選択に役立つ可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Recently, alterations in the oral microbiota composition have been reported to be induced by various systemic diseases including Sjogren's syndrome. The object of the present study was to investigate the oral microbiota in hyposalivation model rats and examine the involvement of oral bacteria in healing process of oral ulcerative mucositis. In the hyposalivation model, composition of oral microbiota was changed. The severity of oral ulcerative mucositis and bacterial loading level in the ulcer region were exacerbated in the model. The exacerbations were recovered by antibiotic application. Increase in bacterial loading and alteration of oral microbiota composition are likely to be involved in the exacerbation of oral ulcerative mucositis in the hyposalivation model.

研究分野：口腔生理学

キーワード：口内炎 口腔細菌叢

1. 研究開始当初の背景

放射線化学療法を受ける頭頸部がん患者の口腔内にはしばしば潰瘍性口内炎が発症し激痛をもたらす。さらに唾液腺萎縮による口腔乾燥も併発するため、会話や食事などの口腔機能が困難になることから、臨床上大きな問題となっている。

我々はこれまで、このような潰瘍性口内炎の疼痛発症機序を明らかにすることを目的として、口内炎モデルラットを用いて検討を行ってきた。ラットの口腔粘膜に酢酸を短時間作用させると、2日後に潰瘍を伴う口内炎が形成され、強い接触痛や自発痛を引き起こす。これらの疼痛は、抗菌薬の投与によって改善したことから、口内炎の程度や治癒過程および疼痛発症には、口腔細菌が重要なファクターとなっている。さらに、唾液腺を摘出して口腔乾燥を惹起すると、潰瘍性口内炎の程度は増悪し、口内炎組織中の細菌数が増加した。おそらく、唾液の洗浄作用や抗菌作用が失われたことにより細菌数の増加が関与したと考えられる。

近年、口腔細菌叢バランスの変化が様々な疾患の発症や増悪に関与することが報告されている。シェーグレン症候群など口腔乾燥を症状とする自己免疫疾患患者では、口腔細菌叢のバランスが変化する。特に、歯周病関連菌は口内炎発症に重要であり、潰瘍部への病原菌侵入が粘膜潰瘍の創傷治癒を妨げることが報告された。また、健常者でみられた口内炎治癒と口腔細菌数との相関は、がん治療中の患者では失われるという報告もある。つまり口腔乾燥による増悪口内炎の治癒過程や疼痛には、潰瘍部の細菌数だけでなく各種細菌で構成される口腔細菌叢バランスも関与しているかもしれない。しかし、これまで動物モデルにおける口腔細菌叢の解析報告は少なく、特に、創傷治癒や疼痛と細菌叢との関連はまだ良く分かっていない。

2. 研究の目的

口内炎程度や治癒過程に対して口腔乾燥がどのような影響を及ぼすのか、口腔細菌叢バランスに着目して明らかにすることを目的とした。これにより、口内炎改善や疼痛の予防に口腔細菌叢バランスの回復が有効であるかどうかを明らかにできると考えた。

尚、以前口腔乾燥モデルにおける口内炎の程度や治癒過程に関する報告をしたが(Hitomi et al., 2019)、代表者の所属変更に伴い、研究室の環境が大きく変化した。そのため、新しい研究室においてこれらの再現性を確認するため、口腔乾燥モデルの口内炎治癒過程や疼痛変化などについて再度検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 口腔乾燥モデルラットの作製

全身麻酔下にてWistar系雄性ラットの両側唾液腺(顎下腺、舌下腺)を通法通り摘出した(Hitomi et al., 2019)。唾液腺摘出群を2EXT群、唾液腺の露出まで行ったコントロールをSham群とした。

(2) 唾液腺摘出による口内炎重篤度の評価

唾液腺摘出2週間後に、下顎口腔粘膜への酢酸処理にて口内炎を惹起した。その後、口内炎の重篤度を、口内炎スコアによる視覚的評価法と組織学的評価法を用いて評価した。

口内炎スコアは以下を使用した。Score 0: 正常粘膜。Score 0.5: 異常なピンク色かどうか疑わしい。Score 1: わずかだが明確な赤みがある。Score 2: 強い赤みがある。Score 3: 白斑形成のみ(潰瘍なし)。Score 4: 9mm²の1/2未満の上皮剥離(潰瘍)。Score 5: 9mm²の1/2以上の上皮剥離(潰瘍)。

(3) 口腔乾燥モデルに惹起した口内炎部における機械逃避閾値の測定

あらかじめ覚醒下で口腔粘膜を露出させるために、下唇部に磁性のピアスを装着した。測定に馴化した後、酢酸処理前、処理3日目、5日目、7日目に口内炎部の機械逃避閾値を測定した。

(4) 口腔乾燥モデルに惹起した口内炎部の細菌コロニー数の測定

口内炎部の細菌コロニー数を測定するため、口内炎部の組織から超音波によって抽出した組織液を寒天培地に播き、一日培養後の細菌コロニー数を視覚的にカウントした。

(5) 口腔乾燥モデルにおける口腔細菌叢の解析

唾液腺(顎下腺、舌下腺)摘出前、摘出7、14、28日後に下顎口腔前提粘膜を無菌の綿棒で10回拭いて口腔細菌を採取した。外部委託(口腔常在微生物叢解析センター)により16SrRNA遺伝子全長解析を行い、口腔細菌叢の変化を解析した。

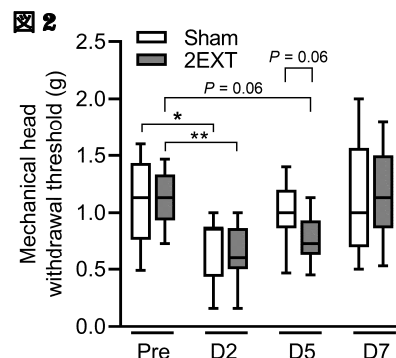
4. 研究成果

両側顎下腺と舌下腺の摘出手術によって口腔内の乾燥が顕著に認められた。しかし、Sham群と比較して体重に差はなかった。

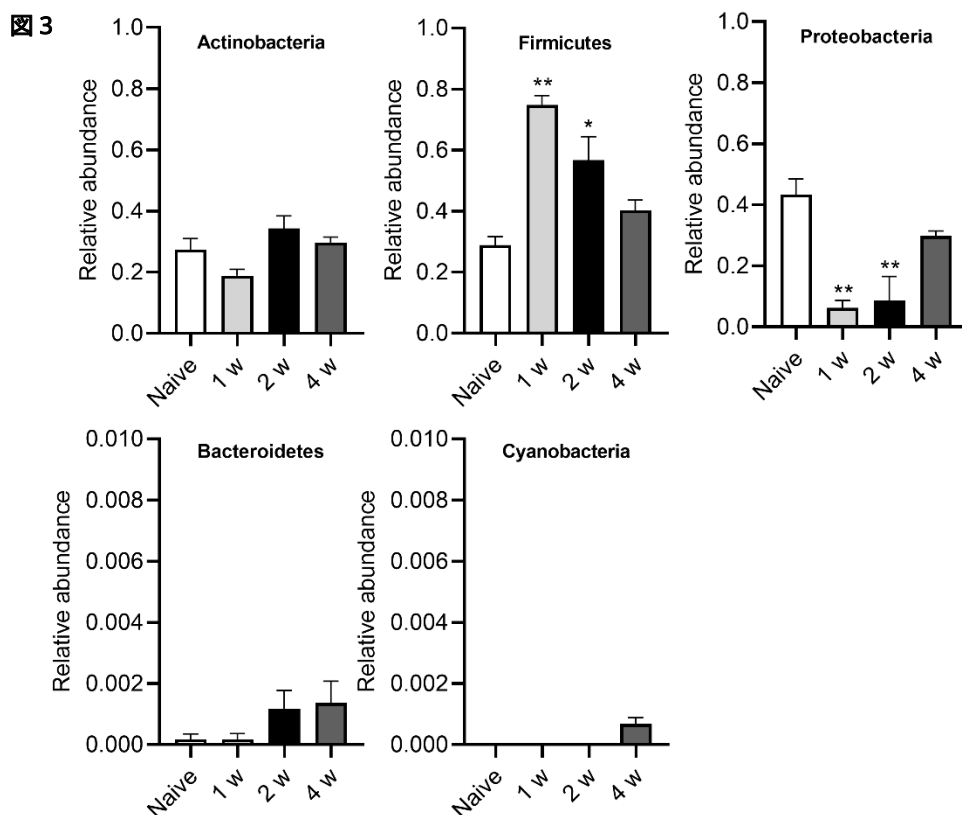
唾液腺摘出2週間後に潰瘍性口内炎を惹起すると、Sham群と比較して2EXT群の口内炎スコア

は、2日目、5日目7日目で有意に高かった。また、5日目において Sham 群では潰瘍は消失していたが、2EXT 群では潰瘍が残存していた。つまり、口腔乾燥モデルにおいて、潰瘍の程度は増悪し、治癒までの時間が延長した(図1)。

口腔粘膜における機械逃避閾値は、両群において酢酸処理2日目に各 Sham 群と比較して閾値の低下を認めた。酢酸処理5日目では、2EXT 群で低下傾向がみられ、機械アロディニアがより長く続いたことが示唆された(図2)。潰瘍部の細菌コロニー数は唾液腺摘出後の口内炎群において増加していた。



摘出後1週間、2週間、および4週間後の口腔粘膜擦過物における口腔細菌の16S リボソーム(r) RNA 系統解析を行ったところ、1、2週間後において Firmicutes 門の占有率が増加していた。そのうち、特に Lactobacillaceae が増加していた。一方で、Proteobacteria 門の占有率は1、2週間後においてコントロール群と比較して減少していた(図3)。口腔乾燥モデルでは唾液腺摘出後1週間後には口腔細菌叢が変化し、4週間程度で回復傾向を示すことが示唆された。



今後は、さらなる口腔細菌叢解析を行い、それぞれに対する抗菌薬を用いた検討を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Osada Ayaka, Hitomi Suzuro, Nakajima Akira, Hayashi Yoshinori, Shibuta Ikuko, Tsuboi Yoshiyuki, Motoyoshi Mitsuru, Iwata Koichi, Shinoda Masamichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Periodontal acidification contributes to tooth pain hypersensitivity during orthodontic tooth movement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 241-248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2021.11.007	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Soma K, Hitomi S, Hayashi Y, Soma C, Otsuji J, Shibuta I, Furukawa A, Urata K, Kurisu R, Yonemoto M, Hojo Y, Shirakawa T, Iwata K, Shinoda M.	4. 巻 519
2. 論文標題 Neonatal Injury Modulates Incisional Pain Sensitivity in Adulthood: An Animal Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 60-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2023.03.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hitomi S, Nodai T, Kokabu S, Shikayama T, Sago-Ito M, Nakatomi C, Terawaki K, Omiya Y, Shinoda M, Ono K.	4. 巻 18
2. 論文標題 Hepcidin expression in the trigeminal ganglion and the oral mucosa in an oral ulcerative mucositis rat model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 N/S
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0284617	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 人見涼露, 篠田雅路, 小野堅太郎
2. 発表標題 口内炎モデルラットの三叉神経節におけるhepcidinの発現とその役割
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長田彩佳、人見涼露、中嶋昭、篠田雅路
2. 発表標題 歯移動時に生じる歯痛に対する酸感受性疼痛関連チャネルASIC3の役割
3. 学会等名 第26回日本口腔顔面痛学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 人見涼露
2. 発表標題 口内炎疼痛に対する天然成分の鎮痛作用
3. 学会等名 第43回日本疼痛学会
4. 発表年 2021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
研究分担者	小野 堅太郎 (ONO Kentaro) (40316154)	九州歯科大学・歯学部・教授 (27102)	

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
---------	---------