

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10185

研究課題名（和文）口腔内細菌叢の網羅的解析による口腔粘膜障害への臨床アプローチ

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of oral microbiota to clarify causative mechanism of oral mucosal diseases in HSCT patients

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：口腔粘膜障害のメカニズムを検討するために造血幹細胞移植を行う小児の口腔細菌叢の解析を行った。患児27名より移植前、移植1か月後、および移植3か月後において歯垢と唾液をサンプルとして採取し、PCR法にて6種のレンサ球菌と10種の歯周病細菌を同定した。また乳酸桿菌の選択培地を用いてサンプルを播種、培養後コロニー数を計測した。レンサ球菌と歯周病細菌の検出率は移植前から移植1か月後には減少し、移植3か月後には増加した。また歯周病細菌の1人平均検出細菌数は、移植1か月後と移植3か月後では有意な増加を認め、乳酸桿菌の検出率は経時的に増加する傾向を認めた。以上の結果より口腔内細菌叢は移植前後で変化を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞移植を行う患児におけるレンサ球菌および歯周病細菌の検出率は、移植前と比較して移植1か月後に減少し移植3か月後に増加した。特に歯周病細菌の1人平均検出細菌数は移植1か月後と比較して移植3か月後に有意に増加していた。また、乳酸桿菌の出現率は移植前より移植3か月後まで増加の傾向が認められた。これらの結果は、移植後は口腔細菌叢が変化し歯周病への対策が必要と考えられた。さらに乳酸桿菌は齲蝕に与するミュータンスレンサ球菌と同時に存在することで齲蝕が重症化する可能性があるため、その増加は、齲蝕発症のリスクの増大の可能性もある。以上の結果より、移植後も継続的な歯科的管理が重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：A comprehensive analysis of oral microbiota from hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) patients was performed to clarify their role in oral mucosal disease. Dental plaque and saliva samples were collected from 27 child patients before, and one and three months after undergoing HSCT. Six types of streptococci and ten types of periodontal bacteria were detected using a PCR method, and Lactobacillus organisms were counted using selective agar plates. As compared to before, the detection rate of each bacterium was decreased at one month after HSCT, then was increased after three months. Furthermore, the average number of detected periodontal bacteria per person at three months was significantly increased as compared to that at one month after HSCT. Also, the number of Lactobacillus strains was increased over time during the examination period. These results suggest that oral mucosal disease in HSCT patients may be caused by drastic treatment-related changes in oral microbiota.

研究分野：小児歯科学

キーワード：造血幹細胞移植 小児がん 歯周病細菌 乳酸桿菌 口腔粘膜炎症 化学療法 口腔レンサ球菌 齲蝕

1. 研究開始当初の背景

小児がんの患者の治療成績が向上し、多くの患者の長期生存が可能となっている。小児がんの代表的な疾患である白血病や固形腫瘍の神経芽腫や横紋筋肉腫のうち、ステージが高く重度の症例では造血幹細胞移植等が行われている。造血幹細胞移植の前処置として、腫瘍細胞を減少させ免疫細胞を抑制するため化学療法や放射線治療を行う。その際には白血球が減少し免疫能の低下がみられ、急性移植片対宿主病 (graft versus host disease; GVHD) が多発する。急性 GVHD は白血球数の増加とともに消失するが、その後には生じる慢性 GVHD が問題となる。慢性 GVHD では、慢性的に口腔内粘膜に拘縮が生じ、疼痛による刷牙困難や唾液の減少のため口腔内乾燥等が生じ齶蝕が増加することが報告されている。この原因として、造血幹細胞移植における前処置の免疫抑制剤や抗菌剤、抗がん剤に関連して口腔細菌叢の変化が生じることが考えられた。そこで、造血幹細胞移植等の化学療法を受けた患者の口腔検体から細菌を分離し、分子生物学的手法を用いて細菌種の特定を行うことにより、これらの歯科疾患に対して有効な治療薬の選択をすることが必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、造血幹細胞移植等の化学療法を受ける小児がん患者において口腔内細菌叢の変化を決定し、口腔粘膜障害や慢性 GVHD の予防、将来的には為害性のある細菌に対応する含嗽薬などの創薬の基礎的なベースとなる知見を得ることである。

3. 研究の方法

岡山大学生命倫理審査委員会より承認を得て(研 1508-016)、実施した。

(1) 口腔内のサンプリング

小児ならびに保護者に対して研究内容の説明を行い同意を得られた小児がん患児の口腔内より、移植前、移植 1 か月後、移植 3 か月後の各時点におけるプラークと唾液をサンプルとして採取した。

(2) 臨床データ

口腔粘膜状態は WHO の口腔内有害事象スケール(Scale0~4。0 が事象なし 4 が経口摂取不可)で記録し、齶蝕罹患状態の記録についての調査を行った。なおこれらの患児は通法に従い移植前から移植後の退院時まで継続的な口腔衛生指導を行い、口腔粘膜炎等の治療は通常と変わらず治療を行った。

(3) 口腔検体からの細菌の分離および培養

採取したサンプルを、レンサ球菌の分析には *Mitis salivarius* (MS) 寒天培地、ミュータンスレンサ球菌数の測定にはバシトラシン含有 *Mitis salivarius* (MSB) 寒天培地を、乳酸桿菌数の測定には *Lactobacillus Selective* 寒天培地に播種し、菌の分離を行った。

(4) PCR 法を用いた各細菌種の同定

菌種の特定のために、分離した菌から通法に従って細菌 DNA を抽出し、得られた DNA をテンプレートとし、各菌種に特異的なプライマーを用いた PCR 法にて、検体中に含まれる代表的な 6 種の口腔レンサ球菌と 10 種の代表的な歯周病細菌を同定した。

(5) 口腔内細菌叢の解析

細菌の移植前、移植 1 か月後、移植 3 か月後の検出率を χ^2 検定と Fisher の正確確率検定を用いて行い、細菌の種類数の比較には Friedman 検定、その後の検定には Turkey 法を使用した。レンサ球菌中のミュータンスレンサ球菌の割合の検定には一元配置の分散分析を行なった。なおこれらの患児は通法に従い移植前から移植後の退院時まで継続的な口腔衛生指導を行い、口腔粘膜炎等の治療は通常と変わらず治療を行った。

4. 研究成果

(1) 当該期間中において造血幹細胞移植前、移植 1 か月後、移植 3 か月後についてのサンプルがそろった 27 名について分析を行った。

(2) 27 名の平均年齢は 9 歳 5 か月 (1 歳 1 か月 ~ 17 歳 1 か月) であり、急性リンパ性白血病 8 名、急性骨髄性白血病が 4 名、再生不良性貧血が 3 名、骨髄異形成症候群が 5 名、固形腫瘍 5 名、その他白血病が 2 名であった。平均齶蝕経験歯数 (DMF + dmf) は 3.1 本であり平均齶蝕歯数 (D + d) は 2.0 本であった。WHO の口腔内有害事象スケールは 0 が 10 名、1 が 12 名、2 が 2 名、3 が 3 名であった。

(3) 経時的な口腔細菌の検出率については全体的に造血幹細胞移植前より移植 1 か月後で減少し、移植 3 か月後に増加するという動向が認められた。この変化についての検定を行ったところ口腔内レンサ球菌においては *Streptococcus mutans* と *Streptococcus sanguinis* は経時的な検出率に有意な差を認めた。歯周病細菌においては *Treponema denticola* と *Porphyromonas gingivalis* はいずれの時期にも

検出されなかった。また *Eikenella corrodens*、*Campylobacter rectus* については経時的に有意差を認め

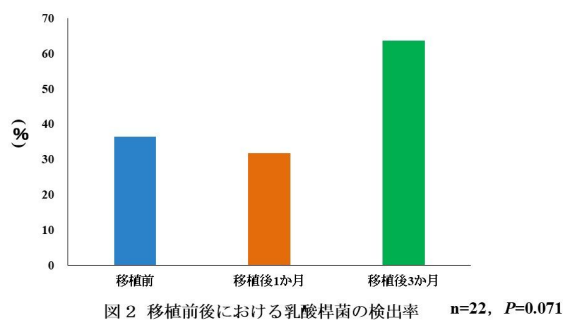
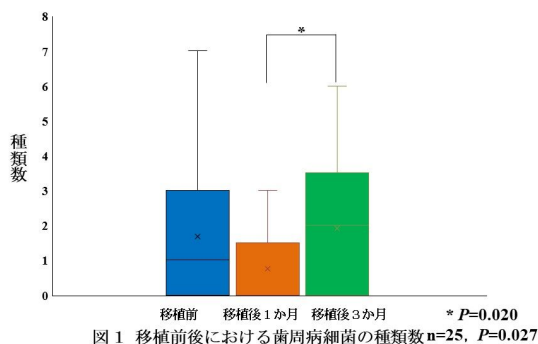
た。
 (4) 口腔レンサ球菌の種類数は移植前と比較すると移植1か月後では減少し、移植後3か月後には移植前と同程度となる傾向にあったが統計的な有意な差は認められなかった。歯周病細菌の種類数は経時的に有意な差を認め、移植1か月後と移植後3か月後では有意な増加を認めた。(P=0.027)(図1)

(5) 乳酸桿菌の検出率は経時的に増加する傾向を認め、移植後3か月では増加していた。(P=0.072)(図2) 移植前後における口腔レンサ球菌中のミュータスレンサ球菌の割合については、移植後1か月後には減少し、移植後3か月後には増加していたが有意な差は認められなかった。

(6) 小児の造血幹細胞移植における周術期中の経時的な口腔細菌の報告は少ないが、今回経時的な歯周病細菌と乳酸桿菌の増加が観察された。これらの原因についてはより一層の探求が必要と思われる。特に口腔内に乳酸桿菌が存在する場合には齲蝕の増加が生じるという Caufield ら¹⁾や Klinke ら²⁾の報告もあり、歯周病と齲蝕の両方の観点から造血幹細胞移植後の小児の口腔については継続的な歯科的管理が必要であると考えられる。

<引用文献>

- 1) Caufield PW, Schön CN, Saraithong P, Li Y, ArgimónSara Golkari S: Oral Lactobacilli and Dental Caries: A Model for Niche Adaptation in Humans, J Dent Res, 94, 2015, 110-118.
- 2) Klinke T, Urban M, Lück C, Hannig C, Kuhn M, Krämer N, Changes in Candida spp., Mutans Streptococci and Lactobacilli following Treatment of Early Childhood Caries: A 1-Year Follow-Up, Caries Res, 2014, 48, 1, 24-31.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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、平野慶子、仲野道代
2. 発表標題 シーケンス解析による造血幹細胞移植前後の口腔内細菌の同定
3. 学会等名 第41回日本小児歯科学会中四国地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野 慶子、 後藤 花奈、 森川 優子、吉田 衣里、仲野 道代
2. 発表標題 造血幹細胞移植を施行した患児の経時的な口腔細菌叢の変化
3. 学会等名 第42回小児歯科学会中四国地方会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平野 慶子、 後藤 花奈、 森川 優子、吉田 衣里、仲野 道代
2. 発表標題 造血幹細胞移植が口腔内細菌叢の特性に与える影響についての検討
3. 学会等名 第44回岡山歯学会学術集会
4. 発表年 2023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	仲野 道代 (松本道代) (Nakano-Matsumoto Michiyo) (30359848)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	後藤 花奈 (Gotou Kana) (90846495)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	

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