

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22592221

研究課題名(和文) 口腔癌治療における口腔内細菌叢の解析と周術期管理への応用

研究課題名(英文) A study on analysis of oral microbiota of oral cancer patients and application to management perisurgical period

研究代表者

大部 一成(Oobu, Kazunari)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：80243955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)： 口腔がん患者に特徴的な口腔細菌叢の有無と、この細菌叢が口腔がん治療に伴ってどのように変化するかを周術期に採取した唾液検体について検討した。

検体から得られた細菌数は治療開始前で最も多く、化学放射線治療中で最も少なかった。細菌叢の構成は、化学放射線治療によってNeisseria属、Rothia属の構成比率が高まっていることが示唆された(T-RFLP法)が、Ion PGMを用いて分析したところ、Neisseria属、Rothia属の構成比率の増加は統計的に有意ではなかった。

化学放射線療法および手術が口腔細菌叢に及ぼす影響は治療の影響は有意ではなく、個人によって異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： The purpose of this study is to find oral microbiota peculiar to oral cancer patient and to investigate whether oral microbiota changes according to the cancer treatment by using the patient's saliva.

An amount of oral microbiota was highest before starting cancer treatment, and lowest during chemoradiotherapy. Though the proportion of Neisseria species and Rothia species became higher under the chemoradiotherapy analyzed by using T-RFLP method, those increase of proportions were not significant statistically analyzed by using Ion PGM method.

These findings suggest that the influence of chemoradiotherapy and surgery on microbiota was not significant, and changes of oral microbiota differ from patient to patient.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：口腔がん 口腔細菌叢 唾液 T-RFLP法 放射線治療 化学放射線療法 口腔粘膜炎症

1. 研究開始当初の背景

口腔内においては数多くの細菌が細菌叢を形成しており、その様相は宿主の状態とも密接な関係がある。したがって口腔内や宿主に何らかの操作や刺激が加わると口腔内の細菌叢が変化することが考えられる。口腔癌患者は宿主の免疫能の低下が認められることから口腔細菌叢も健常者とは異なっていることが考えられるが、そもそも口腔癌患者に特徴的な口腔細菌叢についての報告はない。

口腔がんに対する治療において、放射線療法や化学療法を選択した場合に治療期間中に口腔粘膜炎の発症や唾液量の減少がしばしば認められる。このような口腔内環境の変化は口腔内の細菌叢にも変化を及ぼしていると予想されるが、口腔がん治療中の口腔細菌叢の変化についての報告も少ない。

また細菌叢の解析に関して、従来の「培養法」ではなく、分子生物学的手法のひとつであり、リボソームRNA (rRNA) を標的として細菌の菌種を同定する方法である「terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)法」を用いることにより、口腔内細菌叢の特徴と口腔がん治療による変化を解析できるのではないかと考えた。

分担研究者である竹下らは、T-RFLP法による口腔細菌叢の解析に精通しており、独自に開発した方法により高い精度で口腔細菌叢の菌種を解析用プログラムにより解析し、データベース化を行ってきた。(Takeshita, Nakano, et al.: Oral Microbiol Immunol 22: 419-428, 2007, Nakano, Takeshita, et al.: J Microbiol Methods, 75: 501-505, 2008, Takeshita, Nakano, et al.: ISME J. 3 (1): 65-78, 2009)

2. 研究の目的

本研究では、患者の唾液をサンプルとしてT-RFLP法による細菌の解析を行うことにより、

(1) 口腔がんの診断が確定した患者の唾液を治療開始前に採取し、口腔がん患者に特徴的な口腔細菌叢があるかどうかを検索する。

(2) 口腔がん患者に手術、放射線、抗がん剤、経口摂取の開始といった臨床的影響が加わることにより、前後の変化を見だし、抗菌薬療法や栄養療法の戦略につなげることを目的とする。

唾液サンプル採取の時期としては、周術期の4点、すなわちがん治療開始前(A期)、化学放射線治療中(B期)、手術直前(C期)、手術後経口摂取開始後(D期)の4つの時期とする。

(3) 術後感染や誤嚥性肺炎の膿瘍腔や喀痰から得られた細菌叢の特徴とその患者の唾液から得られた細菌叢の一致性を解析する。

3. 研究の方法

がん患者の唾液を採取し、T-RFLP法により解析し、

(1) 口腔がんの診断が確定した患者の唾液を治療開始前に採取し、患者に特徴的な口腔細菌叢があるかどうかを検索する。

(2) 続いて放射線療法や化学療法や手術療法を行うことにより細菌叢に変化が見られるかどうかを検索する。

(3) 術前放射線化学療法後に手術を受けた患者は術後10日~2週間目頃から経口摂取を開始するようになるため、経口摂取開始による細菌叢の変化の有無について検索を行う。

(4) さらに術後感染や誤嚥性肺炎を発症した症例においては、膿瘍腔や喀痰から採取した細菌(これらの菌は炎症の起炎菌と考えられる)とがん治療前から採取して分析していた細菌叢との関連を調べ、感染や肺炎発症時に特徴的な口腔内細菌叢を検索する。

助成期間の最終年度では、Ion PGMを用いた16S rRNA遺伝子の塩基配列解析によっても分析を行った。

4. 研究成果

口腔がん患者に特徴的な口腔細菌叢があるかどうか、また放射線や抗がん剤や手術といった治療に伴ってこの細菌叢がどのように変化するかを周術期の4点、すなわちがん治療開始前(A期)、化学放射線治療中(B期)、手術直前(C期)、手術後経口摂取開始後(D期)に採取した唾液検体について検討した。検体から得られた細菌数はA期で最も多く、化学放射線治療中のB期で最も少なかった(表1)。菌種数はA期で最も多く、手術後経口摂取開始後のD期で最も少なかった(図1)。細菌叢の構成は、化学放射線治療によってNeisseria属、Rothia属の構成比率が高まっていることが示唆された(T-RFLP法)。このことをIon PGMを用いた16S rRNA遺伝子の塩基配列解析によって分析したところ、菌種の構成比率はStreptococcusが最も優勢であり、続いてNeisseria、Prevotella、Porphyromonas、Rothia、Veillonella、Gemellaといった菌属が高い比率で検出されたが、T-RFLP法でのNeisseria属、Rothia属の構成比率の増加は統計的に有意とは言えなかった(図2)。

よって化学放射線療法および手術が口腔細菌叢に及ぼす影響は個人によって異なることが示唆された。

表 1 総菌数の変動 (対数)

患者番号	4	5	7	8	9	13	16	17	18
A 期	7.94	7.22	7.27	7.95	8.17	7.98	7.77	7.40	8.02
B 期	6.58	7.37	7.23	4.59	8.20	7.26	8.28	7.04	4.98
C 期	7.43	7.16	7.08	6.44	8.11	8.24	7.35	7.29	7.70
D 期	7.39	7.35	7.46	7.09	8.27	6.28	7.77	7.28	6.45

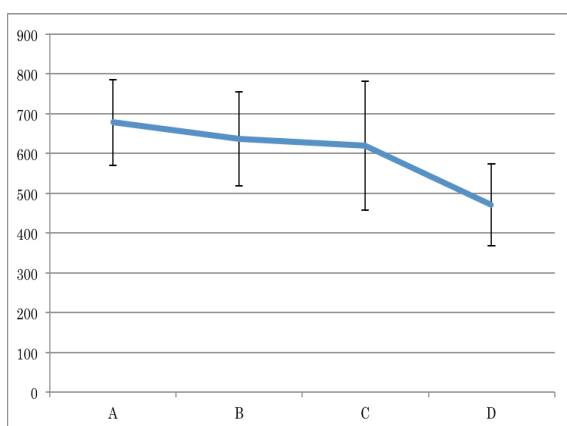


図 1 検出総菌数 (A: 術前治療前、B: 術前治療中、C: 手術直前、D: 経口摂取開始後)

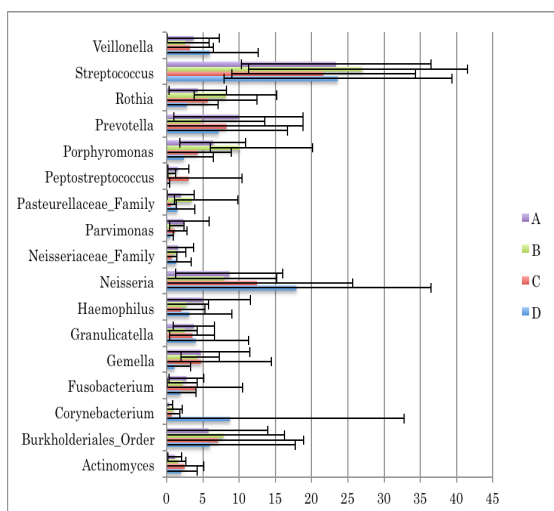


図 2 細菌叢の変動 (A: 術前治療前、B: 術前治療中、C: 手術直前、D: 経口摂取開始後)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大部 一成 (Oobu Kazunari)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：80243955

(2) 研究分担者

川野 真太郎 (Kawano Shintaro)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：00398067

竹下 徹 (Takeshita Toru)
九州大学・歯学研究科 (研究院)・准教授
研究者番号：50546471

中村 誠司 (Nakamura Seiji)
九州大学・歯学研究科 (研究院)・教授
研究者番号：60189040

(3) 連携研究者

山下 喜久 (Yamashita Yoshihisa)
九州大学・歯学研究科 (研究院)・教授
研究者番号：20192403