

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06989

研究課題名(和文)慢性腎臓病の重症化リスク因子と透析合併感染症起因菌の同定

研究課題名(英文) Identification of risk factor of CKD and pathogenic bacteria of infectious complications in dialysis

研究代表者

小山 絵理 (KOYAMA, Eri)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：60779437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本邦の慢性腎臓病(CKD)患者は年々増加しており、CKD患者の生命予後や合併症発症と口腔健康が関連することが報告され、口腔-腎連関が注目されている。そこで本申請研究では、シャント感染部の細菌叢を明らかにし、口腔内細菌叢との関係を明らかにすることとした。次世代シーケンサーを用いた16SrRNA解析の結果、口腔内細菌叢に黄色ブドウ球菌が多くを占める患者が数人存在した。また、これらの患者の口腔内細菌叢と感染シャントの細菌叢が類似しており、口腔内に特異的に存在する菌がシャント感染部から検出された。

研究成果の概要(英文)：In our country, the chronic kidney disease (CKD) patients increase year by year, and it is reported that oral health is related to life prognosis and the onset of complications in CKD patients, and the relationship between oral and kidney is attracting a great deal of attention.

Therefore, the goal of this study is to identify the bacterial flora in shunt infection and clarify the relationship between oral flora and shunt infection. From the results of 16S rRNA analysis, the ratio of staphylococcus in saliva of several patients was abnormally high and oral flora of saliva was similar to that of infected shunt. And we also found that the oral disease-related bacteria existed in the infected shunt.

研究分野：患者をベースとした臨床疫学研究に、細菌叢といった新たなパラメーターを加え、研究を展開している。

キーワード：歯学 口腔内細菌 慢性腎臓病 感染シャント 16SrRNA

1. 研究開始当初の背景

本邦の慢性腎臓病 (CKD) 患者は年々増加し、その死亡率の高さや透析による医療費の高騰が社会問題になっている。この CKD 患者の増加の背景には、糖尿病性腎症の増加があるとされており、糖尿病による全身的な易感染状態が透析患者の背景にあると考えてよい。その結果、透析患者の主要な死亡原因 (第 2 位) が感染症である。

慢性透析患者においては、血液透析のために上肢の動脈と静脈を外科的に吻合する血管内シャントが必要不可欠であり、90%以上の患者が使用している。しかし、合併症としてシャント感染を起こすことがあり、時に致命的な敗血症に進展する。最近になり、透析専門病院で口腔ケアを導入したところ、血液検査時の C 反応性タンパク (CRP) 値が低下し、シャント感染の頻度が下がったという事例や、シャント感染患者に嫌気性歯周病菌に効果のある抗菌薬 (カルバペネム、第 4 世代セフェム) を投与すると予後良好であったという事例が報告され、シャント感染の起因菌として口腔内細菌が疑われている。しかし、シャント感染部の細菌を網羅的に解析し、口腔内細菌が起因菌であるか検討した研究はない。

2. 研究の目的

本申請研究では、CKD 患者の前向きコホート研究により、咀嚼機能や歯周疾患等の口腔内環境と CKD の病態悪化や感染症発症との因果関係を、宿主の免疫機能との交絡を調整して明らかにすること、慢性透析患者のシャント感染の起因菌を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 透析シャント感染の起因菌および口腔内細菌のシャント感染経路の同定

透析シャント感染が生じた患者に対し、外科的に摘出した感染シャントおよび周辺の皮膚、唾液、デンタルプラーク、そして血液から細菌を採取し、次世代シーケンサーを用いた 16SrRNA 解析を実施し、“感染シャントの細菌叢が口腔内の細菌叢と類似し、口腔内特異的な細菌が感染シャントに存在かを検討する。”

サンプルの取扱い: サンプルの回収、保存方法は既に確立済みである下記の方法に従い実施する。採取する自然唾液は、日内変動が大きいため、共同研究者である岡山大学農学部 森田らが定めた、自然唾液の細菌叢が最も安定している朝食後 2 時間経過後に採取する。また、得られた臨床検体 (皮膚、唾液、デンタルプラーク、感染シャント) は、細菌叢構成の維持のため、迅速に嫌気パックを行い、グリセロール・ストックによる凍結保存を行う。また、採取した血液については、迅速に凍結凍凍し、細菌叢解析に用いる。

細菌叢解析: 感染シャント、唾液、デンタルプラーク、皮膚、血液の 16SrRNA 解析データに対し、主成分解析を行い、どのサンプル間の細菌叢が類似しているか検討する。また、口腔内特異的な細菌が感染シャントや血液中に検出された場合は、特異的プライマーを用いて PCR 法にて菌株を同定する。

(2) 口腔内細菌叢および咀嚼機能、歯周疾患等の口腔内環境と CKD の病態悪化や感染症発症との因果関係の解明

a) CKD コホートの作成

研究協力病院の腎臓内科に通院中の CKD 患者に研究参加の同意を得て、CKD コホートを作成する。CKD コホートは連続サンプリングとし、CKD 重症度ステージ 1 (生活改善や薬物療法適応) からステージ 5 (透析、腎移植適応) まで、全ての重症度の患者を含む。

b) 感染症発症および CKD 病態悪化と口腔内環境・口腔内細菌叢の前向きコホート研究

ベースライン評価として、対象患者の残存歯数、機能歯数、歯周組織検査、咀嚼機能、血液・尿検査値、栄養摂取状況、患者基本情報を評価する (表 1)。

表 1 評価項目

| 口腔衛生状態・口腔機能評価 | 血液検査 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> 残存歯数・機能歯数 歯周病の重症度 (歯周組織検査、PD, BOP) 口腔衛生状態 (O' Leary の PCR) 咀嚼機能 | <ul style="list-style-type: none"> eGFR 尿素窒素、クレアチニン、尿酸、クレアチニン・クリアランス C 反応性タンパク アルブミン、HbA1c、血糖値、総ビリルビン、AST、ALT、ALP、γ-GTP、LDL、コレステロール、トリグリセリド |
| 栄養摂取状況・生活習慣 | 尿検査 |
| <ul style="list-style-type: none"> 1日の摂取カロリー、蛋白質、食物繊維、糖質、脂質の摂取量 BMI 飲酒、喫煙、運動習慣 | <ul style="list-style-type: none"> 尿量 尿比重 尿タンパク 尿潜血反応 |

また、実験 1 と同様に、唾液、血液 (2cc) およびデンタルプラークから細菌を採取し、細菌叢解析を実施する。そして口腔内環境、口腔内細菌叢と栄養摂取状態、血液検査値、尿検査値を横断的に検討し、CKD の重症度と相関する細菌叢が存在するかを明らかにする。(細菌叢解析用の血液 2cc は、血液検査の際に増量して採取する。)

さらに上記の対象患者を追跡し、感染症 (シャント感染、敗血症、尿路・消化管・皮膚感染、肺炎等) 発症および CKD 重症度分類のステージの悪化をエンドポイントとし、発生した時点で患者基本情報ならびに唾液、デンタルプラーク、血液を採取し、細菌を抽出する。そして、ベースラインの CKD 重症度、栄養状態等の交絡を調整した多変量解析により、口腔内環境・口腔内細菌叢が感染症発症および CKD 重症化のリスク因子となるかを検討する。また、次世代シーケンサーを用いて血液中の細菌を網羅的に解析し、口腔内特異的な細菌が検出された場合は、PCR 法にて菌種を同定する。関連菌が同定されれば、感染症に対する適切な抗菌治療の開発に繋がる。

4. 研究成果

初年度は、倫理委員会の承認を得て、7名の患者の唾液ならびに感染シャントの細菌からDNAを抽出した。さらに4名の患者に関して、次世代シーケンサーを用いた16aRNA解析を実施した。その結果、2名の患者に関しては、口腔内細菌叢と感染シャントの細菌叢が類似しているという結果が得られた。また、次年度は、前年度に引き続き、残りの3名の患者の唾液、歯垢ならびに感染シャントの細菌からDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いた16SrRNA解析を実施した。その結果、前年度の解析と合わせ、2名の患者に関して、口腔内の細菌叢に黄色ブドウ球菌が多くを占め、感染シャントの細菌叢と類似しているという結果が得られた (図1, 2)。

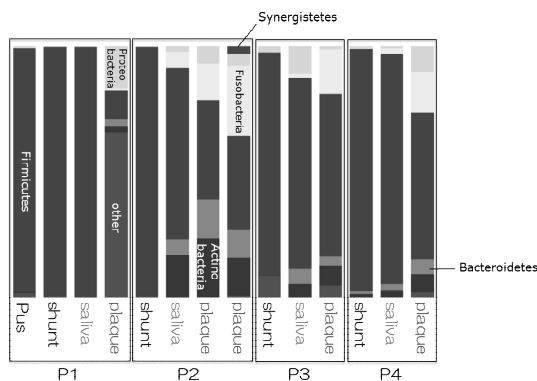


図1. 門レベルでの解析結果を示す。

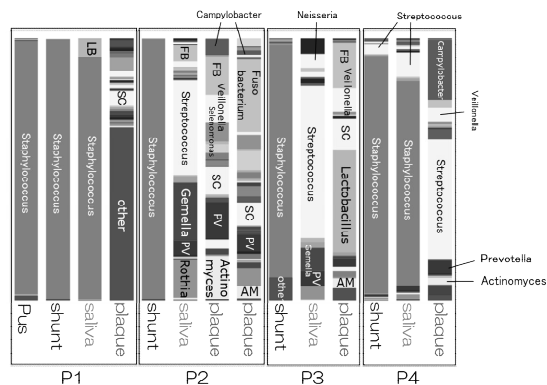


図2. 属レベルでの解析結果を示す。

また、これらの菌種をPCR法にて解析した結果、口腔内に特異的に存在する菌がシャント感染部から検出された (図3)。本結果は、シャントを含むCKD患者の感染には、口腔内細菌の感染が大きく関わっていることを示す重要な結果である。

しかし、透析シャント感染の起因菌やその感染経路も不明であり、実際、これらの患者のシャント感染部は、外界とは交通しておらず、口腔内細菌が血行性に感染した可能性が推測される。また、シャント感染部と口腔内の細菌叢が類似していることがわかり、さらにシャント感染部には口腔内に特異的に生息している菌が検出されたが、未だ口腔内環境とCKDの病態悪化との因果関係は明ら

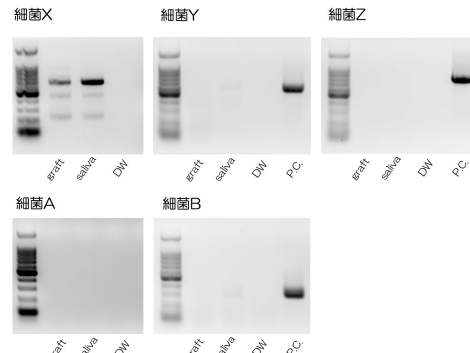


図3. 種レベルでのPCR解析の結果を示す。
口腔内に特異的に存在する細菌Xが、感染シャント (graft)から検出された。

かではない。これら本研究結果は、慢性腎臓病の感染症に口腔内細菌が関与を示す重要な知見である。

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2件)

- (1) Ha Thi Thu NGUYEN, 大野充昭, 大野 彩, 小盛大志, 小山絵理, 窪木拓男, NGSを用いた透析患者感染シャントの16S菌叢解析, 第7回補綴若手研究会, 2018年3月11日, かずさアカデミアパーク(千葉県木更津市)
- (2) 小山絵理. 公益社団法人日本補綴歯科学会 & 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター協同研究 高齢者の歯科口腔。嚥下機能がQOL及び健康寿命に及ぼす影響 研究成果公開シンポジウム 地域在住高齢者における低体重および低栄養発生のリスク因子の検討, 2017年7月1日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山絵理 (KOYAMA, Eri)
岡山大学・大学病院・医員
研究者番号: 60779437

(2) 研究協力者

窪木拓男 (KUBOKI, Takuo)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 00225195

大野 彩 (ONO, Aya)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：20584626

大野充昭 (ONO, Mitsuaki)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：60613156

秋山謙太郎 (AKIYAMA, Kentaro)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：70423291