

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12026

研究課題名(和文) 免疫抑制剤服用小児における歯肉増殖症の発症メカニズムの解明と予防プロトコルの確立

研究課題名(英文) Elucidation of the onset mechanism and establishment of the prevention protocol in children with drug-induced gingival hyperplasia undergoing immunosuppressive therapy

研究代表者

島津 貴咲 (Shimazu, Kisaki)

日本歯科大学・生命歯学部・非常勤講師

研究者番号：80582254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：免疫抑制剤であるシクロスポリンは、臓器移植における拒絶反応の抑制やネフローゼ症候群の治療で投与され、治療効果が高い反面、その副作用に悩まされるケースが多い。本研究では、シクロスポリンを服用する小児において、その副作用である薬物性歯肉増殖症の発症メカニズムを解明するため、対象となる小児被験者のプラーク細菌を微生物学的に解析することとした。その結果、小児被験者から採取したプラーク細菌をPCRにより同定する方法を確立でき、シクロスポリン服用の有無で口腔細菌の違いが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫抑制剤シクロスポリンの服用が起因となる歯肉増殖症の発症メカニズムについては、これまでに多くの研究者によって検討されているが、口腔内細菌と薬物性歯肉増殖との関連はいまだ明らかとなっておらず、シクロスポリン服用小児における報告は皆無である。本研究では、薬物性歯肉増殖症の発症率が成人の約3倍である小児に焦点をあて、小児被験者から採取したプラーク細菌をPCRにより同定する方法を確立でき、シクロスポリン服用の有無で口腔細菌の違いが認められたことは有意義である。

研究成果の概要(英文)：The immunosuppressive drug cyclosporine is used to prevent graft rejection after organ transplantation and treat nephrotic syndrome. Despite its high therapeutic efficacy, it causes many problematic side effects. This study aimed to establish a method for identifying plaque bacteria in pediatric patient samples, to elucidate the difference in the plaque bacteria by presence of cyclosporine taking. We established a method for identifying plaque bacteria in pediatric patient samples using PCR. We intend to carry out further studies with more subjects to compare the differences in oral bacterial layers of individuals taking cyclosporine and patients with gingival proliferation, and determine the association between the development of side effects and presence of certain bacteria.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：免疫抑制剤 薬物性歯肉増殖症 口腔内細菌 PCR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シクロスポリン (CsA) は、抗真菌薬として開発された免疫抑制剤で、臓器移植における拒絶反応の抑制やネフローゼ症候群の治療で投与されることが多い。CsA により誘発される副作用として薬物性歯肉増殖症が挙げられ、その発症率は成人で 25~30%、小児で 70%以上と報告されている⁽¹⁾。CsA 服用成人における歯肉縁下プラークの微生物学的検索では、歯肉増殖を有する者が、歯肉増殖のない者と比較して、成人性歯周炎の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* と *Treponema denticola* が有意に多く検出されるという報告がある⁽²⁾。一方、CsA 服用小児における報告は皆無であり、細菌と薬物性歯肉増殖の発症メカニズムとの関連も明らかとなっていない。

薬物性歯肉増殖症の治療は、第一選択としてプラークコントロールなどの歯周治療が行われる。プラークや歯石などの発炎症因子を徹底的に除去することで、臨床症状が一時的に改善されることもある。しかし、薬物性歯肉増殖症は再発も多く、薬物の長期的な使用によって歯周ポケットの改善が認められない場合は、薬物を変更あるいは中止する方法がとられる。また、外科処置として歯肉切除術が選択されることもあるが、歯肉切除後の大量な結合組織の露出による疼痛や出血により、小児患者だけでなく保護者にとっても身体的・心理的負担は大きい。そのため、歯肉増殖の発症を未然に防ぐプロトコルの確立が急務である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CsA 服用小児における薬物性歯肉増殖症の発症と細菌との関連性を明らかにすることで、微生物学的・病理学的エビデンスに基づいた歯肉増殖の効果的な治療を可能にし、さらには、的確な細菌をターゲットとした本副作用の予防プロトコルを確立し、CsA 服用小児の口腔内環境の改善と QOL の向上を目指すことである。

3. 研究の方法

東京都立小児総合医療センター、または国立成育医療研究センターの小児歯科に来院し、本研究に同意の得られた 4-12 歳の患者を対象として試料採取を行った。被験者は、シクロスポリンを服用し歯肉増殖を有する者：CsA-G group、薬物を服用しておらず歯肉増殖のみられない者：CON-NG group の 2 群に分類した。採取した試料は日本歯科大学生命歯学部、もしくは麻布大学の研究施設にて解析を行った。なお、日本歯科大学生命歯学部 (倫理承諾番号：NDU-T2014-44) と、麻布大学 (受付番号：074)、都立小児総合医療センター (倫理承諾番号：H26-118)、および国立成育医療研究センター (倫理承諾番号：2153) の倫理審査委員会より承諾を得ている。

(1) 臨床検査

研究対象者の口腔内診察を行い、歯肉増殖の程度を以下 4 つに分類した；Grade 0：歯肉増殖なし，Grade 1：歯肉乳頭に限局した増殖あり，Grade 2：歯肉乳頭から歯冠部におよぶ歯肉増殖あり，Grade 3：歯冠の 3/4 以上を覆う歯肉増殖あり⁽³⁾。そして、Grade 0 を NG group (CON-NG group)、Grade 2 と Grade 3 を G group (CsA-G group) とした。また、上顎前歯部 (中切歯/乳中切歯) の歯周ポケットの深さ、プロービング時の出血の有無を測定した。

(2) プラークの採取方法

滅菌したキュレット型スケーラーで、上顎前歯部の歯肉縁上と歯肉縁下のプラークを採取した。採取後は速やかに GAM 半流動性高層培地に保存し、研究施設まで直接保冷バッグにて運搬した。

(3) 微生物学的解析

7 種類の菌種を対象とし、それぞれに特異なプライマーを作製した。プラーク細菌の DNA を抽出後、各プライマーを用いて (表 1) PCR 法にて細菌の検索を行った。

Bacteria	F	R
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC25175 ⁽⁴⁾	TATGCTGCTATTGGAGGTTTC	AAGGTTGAGCAATTGAATCG
<i>Streptococcus gordonii</i> DL1 ⁽⁵⁾	TGTACCCCGTATCGTTCCTGTG	AAAGACTGGAGTTGCAATGTGAATA
<i>Streptococcus mitis</i> NDU1381 ⁽⁶⁾	GAGTCCTGCATCAGCCAAGAG	TGCTATCTTCCCTAGCATG
<i>Streptococcus sanguinis</i> 10556 ⁽⁷⁾	GGTGTGTTTGACCCGTTTCAG	AGTCCATCCCACGAGCACAG
<i>Porphyromonas gingivalis</i> 33277 ⁽⁸⁾	CATAGATATCACGAGGAAGTCCGATT	AAACTGTTAGCAACTACCGATGTGG
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> Y4 ⁽⁸⁾	AAACCCATCTCAGAGTCTCTCTTC	ATGCCAATTGACGTTAA AT
<i>Prevotella intermedia</i> NDU251 ⁽⁹⁾	CGTGGACCA AAG ATTCATCGGTGG A	CCGCTTTACTCCCCA ACA AA

表 1 PCR プライマー

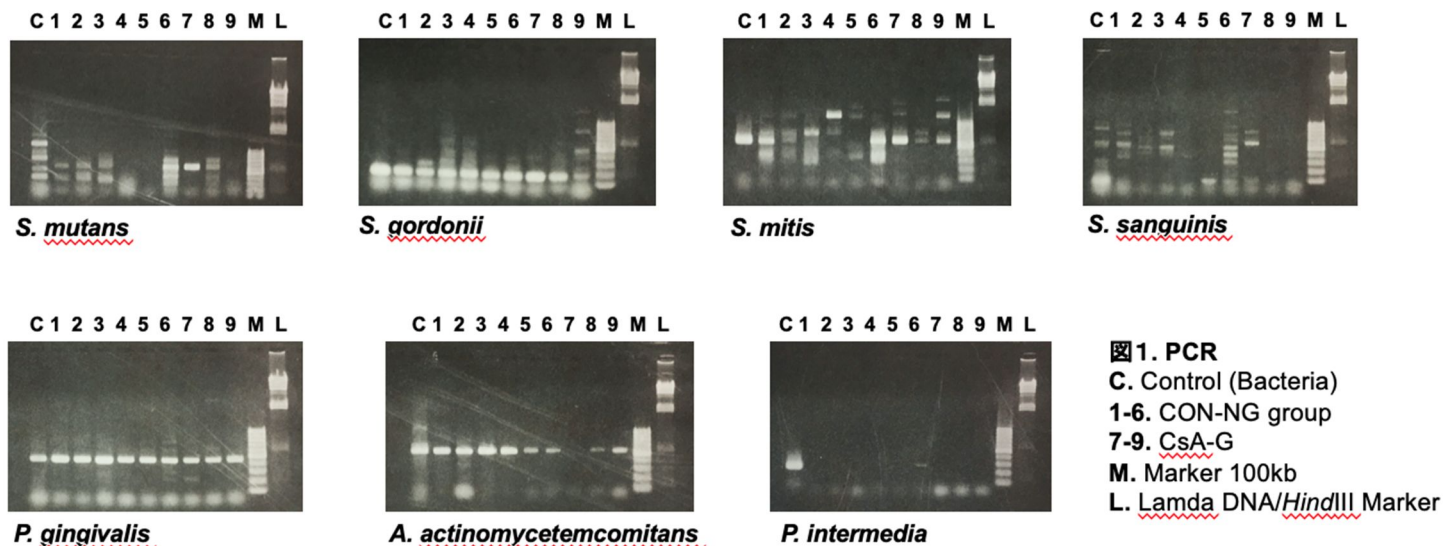
4. 研究成果

(1) 臨床検査

歯周ポケットの深さは、CsA-G group では全ての被験者で最大4mmのポケットが認められたが、CON-NG group では全て3mm以下だった。プロービング時の出血は、CsA-G group では認められなかったが、CON-NG group では6人中2人で認められた。

(2) PCR

PCRの結果を図1に示す。CON-NG group ($n=6$)では *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* がそれぞれ4, 6, 3, 4, 6, 6, 1で認められた。CsA-G group ($n=3$)では *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* がそれぞれ2, 3, 3, 1, 3, 2で認められたが、*P. intermedia* は認められなかった。



本研究では、小児被験者から採取したプラーク細菌を、PCRにより同定する方法を確立できた。本研究において、全ての小児研究対象者のプラークから *S. gordonii* と、成人性歯周炎の原因菌である *P. gingivalis* が検出されたのは興味深い。今後は被験者数を増やし、シクロスポリン服用の有無、歯肉増殖の有無での口腔細菌層の違いを比較し、副作用の発症と細菌との関連性を解明する必要がある。

引用文献

- (1) Doufexi A et al. 2005.
- (2) Luo Y. et al. 2013.
- (3) Bokenkamp A et al. 1994.
- (4) Igarashi T, Oral Microbiol. Immunol., 1996.
- (5) Soon-Nang Park, Microbiol Immunol 2013.
- (6) Hoshino T, Diagnostic Microbiology and Infection Disease, 2004.
- (7) Suzuki N, J. Clin. Microbiol., 2004.
- (8) Ashimoto A, Oral Microbiol Immunol, 1996.
- (9) Amano A, J Periodontal, 1999.

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Oguchi R, Takahashi Y, Shimazu K, Urano-Tashiro Y, Kawarai T, Konishi K, Karibe H	4. 巻 Jul 24;70(4)
2. 論文標題 Contribution of Streptococcus gordonii Hsa adhesin to biofilm formation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Jpn J Infect Dis	6. 最初と最後の頁 399-404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.JJID.2016.492.	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 該当する

1. 著者名 SHIMAZU Kisaki, KARIBE Hiroyuki, OGUCHI Riyo, OGATA Kiyokazu	4. 巻 -
2. 論文標題 Influence of artificial saliva contamination on adhesion in class V restorations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2019-032	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 Karibe Hiroyuki, Kato Yuichi, Shimazu Kisaki, Okamoto Ayuko, Heima Masahiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Gender differences in adolescents' perceptions toward dentists using the Japanese version of the dental beliefs survey: a cross-sectional survey	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12903-019-0845-y	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Kisaki Shimazu, Yukihiro Takahashi, Kiyokazu Ogata, Yoshihito Shimazu, Hiroyuki Karibe
2. 発表標題 Identification of oral bacteria in children with drug-induced gingival hyperplasia undergoing immunosuppressive therapy
3. 学会等名 J. of Disability and Oral Health. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahashi Y, Oguchi R, Shimazu K, Tashiro Y, Kawarai T, Karibe H, Konishi K
2. 発表標題 Detection of Streptococcus gordonii Hsa gene and expression of Hsa adhesin in wild type strains
3. 学会等名 15th International congress of bacteriology and applied microbiology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Karibe H, Okamoto A, Shimazu K, Kawakami T
2. 発表標題 Geographical differences in orofacial pain conditions and daily activities in Japanese children
3. 学会等名 Int J Paediatr Dent (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Karibe H, Okamoto A, Kato Y, Shimazu K
2. 発表標題 Goddard G. Inter-examiner and intra-examiner reliability of gag reflex measurement
3. 学会等名 31st IADR-SEA & 28th SEAADE (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shimazu K, Takahashi Y, Oguchi R, Ogata K, Shimazu Y, Karibe H
2. 発表標題 Identification of oral periodontal bacteria by PCR methods in children with drug-induced gingival hyperplasia
3. 学会等名 Int. J. Paediatr. Dent. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島津貴咲, 高橋幸裕, 小口莉代, 小方清和, 三井園子, 五十川伸崇, 苅部洋行
2. 発表標題 免疫抑制剤服用小児における薬物性歯肉増殖の微生物学的解析
3. 学会等名 日本障害者歯科学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小方清和、田村文誉、小坂美樹、横山雄士、島津貴咲、三井園子、百瀬智彦、小口莉代、他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 155
3. 書名 子どもの歯科訪問診療 実践ガイド 他職種と連携して小児在宅歯科医療をはじめよう	

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本歯科大学小児歯科学講座ホームページ http://www.ndu.ac.jp/~pedo/researchoutline.html
--

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	高橋 幸裕 (Takahashi Yukihiro) (00281436)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	

6. 研究組織（つづき）

	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	島津 徳人 (Shimazu Yoshihito) (10297947)	麻布大学・生命・環境科学部・准教授 (32701)	
研究分担者	苅部 洋行 (Karibe Hiroyuki) (50234000)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	