

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 23 年 10 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21792073

研究課題名（和文）

造血幹細胞移植時の免疫抑制下における 3DS を用いた全身的感染予防プログラムの開発

研究課題名（英文）

Development of the prevention program adapting 3DS from the systemic bacterial infection for the children under immunity control before Hemopoietic stem cell transplantation

研究代表者

角本 法子（KADOMOTO NORIKO）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10508104

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞移植を受ける小児を対象として 3DS を応用した口腔除菌プログラムを開発し適用したところ、口腔内の細菌数を減少させ、それを維持することができた。また口腔粘膜の状態にも改善が見られたことから、3DS が患児の全身的感染予防と QOL の向上に寄与できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We developed a new oral prevention program adapting 3DS (Dental Drug Delivery System). When we applied the new program for the children under immunity control before Hemopoietic stem cell transplantation, the number of bacteria in the mouth decreased and it maintained the low value for 3 months. And the program made less inflammation of oral mucous membrane than usual. Therefore, the new 3DS prevention program can decrease the risk of the children's systemic bacterial infection, and it can improve their Quality of Life.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：小児歯科学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児歯科学

キーワード：3DS, 感染予防, 免疫抑制, 造血幹細胞移植

## 1. 研究開始当初の背景

近年、骨髄移植や末梢血幹細胞移植に関する治療技術や化学療法の飛躍的な進歩により、造血幹細胞移植を受ける小児が増加している。現在では、造血幹細胞移植は小児白血病や悪性リンパ腫などの造血器腫瘍や固形の悪性腫瘍のみならず、自己免疫疾

患や小児の先天性代謝異常にまでその対象が拡大されてきている。造血幹細胞移植を行う患児には、移植前治療として大量化学療法が行われ、しばしば全身放射線照射（Total Body Irradiation: TBI）が併用されるため、骨髄破壊的であることが多い。化学療法や頭頸部を照射野に含めた放射線

療法などは様々な口腔内合併症を惹起する。例えば、免疫抑制時には唾液の流出量が著しく低下し自浄作用が失われるため、口腔粘膜に発赤、腫脹、疼痛を伴う (Oral Complications of Chemotherapy and Head/Neck Radiation, National Cancer Institute, NIH. 2007, Samuel Dreizen et al. Cancer 1976)。また血小板が1万個/mm<sup>3</sup>以下に低下すると、易出血のためにブラッシングを中止せざるを得ず、う蝕や歯周疾患、口内炎が多発しやすい口腔内環境になり、患児のQuality of life: QOLが低下するのみならず、全身の感染の危険性も高まる。移植前処置から移植後2-3週間までは、著しい好中球数減少に加え、前処置による粘膜障害により、合併症として細菌・真菌感染症がおりやすく (Kami M. et al. Jpn. J. Med. Mycol. 2006)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) や緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) およびカンジダ (*Candida albicans*) などの感染が高頻度に見られ、肺炎などによる全身状態の悪化には十分な注意を要する。これらの病原性微生物は菌交代症や日和見感染、院内感染、薬剤耐性などでとくに問題となっており、いずれも口腔内常在菌であることから、重度の骨髄抑制下にある患児の口腔ケアの重要性は高まっていると考えられる。

一方、歯科医療の現場ではう蝕や歯周疾患のリスクの非常に高い患者に対して、マウスピース様のドラッグリテーナーと抗菌薬を応用した口腔内除菌システム (Dental Drug Delivery System: 3DS) が用いられるようになってきている (Nomura Y. et al, J. Oral Sci. 2004)。3DSとは機械的なバイオフィルム破壊 (Professional Mechanical Tooth Cleaning: PMTC) の後、オーダーメイドで作成したマウスピース様ドラッグリテーナーの中に抗菌剤を入れて口腔内に装着することで、歯牙表面に生息する有害な細菌叢を積極的に除去し、口腔内粘膜から無害な細菌叢を供給、定着させる方法である。しかし、これは主として健常な成人に対し、う蝕予防および歯周疾患の治療を目的として用いられる方法であり、骨髄抑制下にある小児に対し、口腔からの全身の感染を予防する目的で使用したとの報告は未だない。

## 2. 研究の目的

広島大学病院小児歯科では、これまでも当院小児科と連携し、小児科病棟入院患児に対して定期的に口腔内診査を行うとともに、歯科衛生士による口腔ケアやブラッシング指導などを行って患児の口腔内環境の改善に努めてきた。

本研究では、造血幹細胞移植のため骨髄抑制下にある患児を対象とし、口腔からの

全身の感染を防止しQOLを向上させるために、各患児専用で作製されるドラッグリテーナーと抗菌薬を用いた3DSを応用した全身の感染予防プログラムを開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 実験1: 3DSプログラムの検討

3DS施行前後の口腔内細菌数および細菌叢の変化について検討した。これらより3DSに使用する薬剤を選定し、至適濃度を決定した。

対象: 健常な成人5名 (研究の目的および方法について説明を行い、同意を得た。)  
方法: 以下のような一連の流れで3DSを行った。

1. 術前口腔内診査
  2. 歯科治療: 必要に応じてう蝕や歯周疾患の治療を行い、口腔内感染源を根絶した。
  3. PMTC: 歯科衛生士が30分以上かけて歯面を機械的に清掃し、バイオフィルムを除去した。
  4. 3DSの施行: 個人用にドラッグリテーナーを作成し、薬剤を入れて使用した。
- 診査項目: 3DS施行の術前、術中、終了時、術後1カ月および術後3カ月時の計5回にわたり、口腔内細菌数および細菌叢の変化について検討した。これらを3DSの効果の指標として、除菌を行う適切な時期や期間を明らかにした。

### 実験2: 3DSの臨床的効果についての検討

対象: 広島大学病院小児科にて造血幹細胞移植および化学療法を受けた患児35名

方法: 全患児に対し、実験1で確立したPMTCと3DSによる一連の口腔ケアプログラムを試みた。そのうちPMTCと3DSの両方を行うことができた群を3DS群とした。また、低年齢や強い嘔吐感のためドラッグリテーナーの口腔内保持が困難であった患児にはPMTCのみを行い、これをPMTC群とした。

1. 術前口腔内診査 (粘膜評価、口腔内細菌数評価)
2. 歯科治療
3. PMTC
4. 3DSの施行: 個人用ドラッグリテーナーを作成し、1%グルコン酸クロルヘキシジンジェルを5分間口腔内に保持する3DSをPMTC後の7日間、就寝前に行った。また、免疫抑制療法を終えたPMTC後30日目に再度粘膜評価を行った。

### 実験3: 3DSの作用機序についての検討

3DSによる口腔内除菌を行うと化学療法を受けている患児の口腔粘膜炎が軽減することから、口腔細菌表面に存在する菌体外毒素が化学療法中の口腔粘膜炎の増悪因子となっているとの仮説を立て、in vitroにて検証した。

方法：

実験にはヒト歯肉由来正常線維芽細胞Gin-1を用い、粘膜障害性の強い化学療法剤であるL-PAMと、細菌由来高分子としてリポ多糖(LPS)、およびリポタイコ酸(LTA)を同時に作用させた際の細胞障害性を検討した。

Gin-1に各種濃度(1nM, 10nM, 100nM)のLPSまたはLTAを添加した後に、L-PAMを作用させて37°C, 5%CO<sub>2</sub>気相下にて24時間培養後、培地中に放出されたLDHをLDH Cytotoxicity Detection Kit (TaKaRa)を用いて測定した。得られた値と、1% TritonXで処理したポジティブコントロールおよび、無処理のネガティブコントロールの差との比率より細胞障害率を算出した。各細胞障害率は、Tukey-Kramer testを用いて検定を行うことにより比較した。

#### 4. 研究成果

##### 実験1の結果：3DSプログラムの確立

m-MSB培地, BHI培地, カンジダ培地を用いて口腔内細菌数の変化を検討した。その結果、3DS施行期間を2週間、使用薬剤を1%クロルヘキシジンとした場合に、全ての培地において術中に細菌数が減少した。m-MSB培地, BHI培地の好気培養および嫌気培養では、終了後に細菌数が検出限界以下まで減少し、その効果は術後3カ月経過しても維持された。

以上より、3DS施行期間を2週間、使用薬剤を1%クロルヘキシジンと決定した。

##### 実験2の結果：3DSにより口腔粘膜障害および口腔内細菌数が減少する

1. 口腔粘膜障害への効果：「頬粘膜」「歯肉」の2点の炎症状態を評価するにあたり、NIH (National Cancer Institute) 作成の有害事象共通用語規準を改変し、頬粘膜と歯肉の評価基準を作成した。これを用いて粘膜障害について3DS群とPMTC群に分類し検討した。

PMTC前とPMTC後30日目との比較を行ったところ、3DS群では有意に粘膜障害が軽減した。一方PMTC群では、粘膜障害の改善は認められなかった。

2. 口腔内細菌数の変化：3DS群ではミュータンスレンサ球菌、嫌気性菌および好気性

菌において、PMTC前と比べ術後14日でCFUが減少した。またカンジダではPMTC前と比べ術後7日でCFUが有意に減少し、30日後まで低値を維持した。一方PMTC群では、いずれの菌群においてもPMTC前後でCFUにほとんど変化は認められなかった。

また、原疾患に対する治療法による口腔ケア効果を比較したところ、化学療法より造血幹細胞移植において、より高い粘膜障害軽減効果が示された。

##### 実験3の結果：3DSの作用機序

Gin-1に対する細胞障害性は、L-PAM単独と比較しLPSまたはLTA存在下の方が有意に高かった。また細胞障害性は、LPSまたはLTAの濃度依存性に増強した。これにより、化学療法剤L-PAMと細菌由来高分子LPSおよびLTAは相乗作用で細胞障害性を高めることが明らかとなり、LPSおよびLTAが粘膜障害の増悪因子となっている可能性が示唆された。

##### 考察

化学療法あるいは放射線療法により引き起こされる粘膜障害は、その発生機序の違いにより、化学療法剤投与と放射線照射により口腔粘膜に発生したフリーラジカルで惹起される粘膜障害(primaryの粘膜障害)と、化学療法剤投与による白血球低下で生じる局所感染に起因する粘膜障害

(secondaryの粘膜障害)の二つに分類されると言われている。実験3の結果から、化学療法剤L-PAMは細菌由来高分子LPSおよびLTAと相乗的に細胞障害を起こしたことから、LPSおよびLTAが粘膜障害の増悪因子となっている可能性が示された。LPSおよびLTAはいずれも菌体表層の細胞壁構成成分であるが、菌体表層から遊離し、科学的に非常に安定な構造と高い生理活性を維持しながら口腔内に豊富に存在しており、これらの細菌由来高分子の存在によってsecondaryの粘膜障害が増悪すると考えられた。

また、実験2の結果から、原疾患に対する治療法による口腔ケア効果の比較において、化学療法より造血幹細胞移植においてより高い粘膜障害軽減効果が示された。これは造血幹細胞群でより高頻度にprimaryの粘膜障害が起こること、またそのprimaryの粘膜障害が細菌由来高分子により増悪してsecondaryの粘膜障害を起こすことを示唆している。つまりprimaryの粘膜障害の発生率は治療法に依存するが、口腔ケアによってsecondaryの粘膜障害をコントロールすることで、口腔粘膜障害の予後を大き

く改善させることが可能であることが示された。また、3DS を併用した口腔ケアで歯肉粘膜障害が、他の部位と比較して最も大幅に状態改善した。歯周ポケット周辺は不潔域となりやすいことに加え、一部の歯周病原性菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* や *Porphyromonas gingivalis* など) は細胞浸潤性を持つことなどから、LPS の影響を受けやすかった可能性が考えられる。このことも細菌由来高分子が secondary の粘膜障害を増悪させるという仮説に矛盾しない。

今回の研究で、3DS を用いた口腔ケアプログラムにより、細菌由来の粘膜障害増悪因子を事前に除去することが可能であること、および免疫抑制患児の口腔粘膜障害のリスク低減に有効であることが示された。この口腔ケアは免疫抑制治療開始前に行うことが可能な点で画期的である。前述の通り、L-PAM を含めた多くの化学療法剤はフリーラジカルを発生させることで primary の細胞障害を惹起するが、現在の口腔粘膜障害の予防は主に、化学療法や放射線療法に際して発生するフリーラジカルを含嗽薬や水などで洗い流す、あるいは粘膜局所を冷却して粘膜血管を収縮させることで粘膜における化学療法剤濃度を低下させるなどの方法で行うことが多い。しかしこれらはフリーラジカルが発生している最中、すなわち化学療法などの実施期間中に行う予防法である。実際には発熱や倦怠感、強い嘔吐感を発現している状態で頻回の含嗽が不可能となることも多く、また一度重度粘膜障害が生じてしまうと含嗽そのものが非常に困難となることも珍しくない。麻薬で重度粘膜障害の疼痛コントロールを行っている患者も少なくなく、この疼痛は著しい QOL の低下を招くのみならず、化学療法剤の用量規制因子となることもある。そのため事前のリスク低減処置は重要な支持療法となりえる。

## まとめ

骨髄移植を受けるすべての患児にとって、移植後の口腔粘膜の不快症状は大きな問題である。それらは患児の QOL を低下させるのみならず、口腔からの感染により全身状態を悪化させる可能性もある。

今回、これらの患児に対して移植前から 3DS を応用した口腔ケアプログラムを適用したところ、口腔内の細菌数を減少させ、それを維持することができた。また口腔粘膜の状態にも改善が見られたことから、3DS が患児の全身状態と QOL の向上に寄与できる可能性が示された。またその作用機序は、3DS により口腔細菌由来の粘膜障害増悪因

子を造血幹細胞移植前に除去することで示唆された。

今後は、この 3DS を応用した全身的感染予防プログラムについて、広く周知し臨床応用されるよう学術論文にて発表するとともに、その作用機序について明らかにしていきたい。

## 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 1 件)

横紋筋肉腫治療のために造血幹細胞移植を行った患児の歯科治療と口腔管理: 坪井文, 海原康孝, 角本法子, 光畑智恵子, 香西克之, 日本歯科医療福祉学会雑誌, 15. 18-23, 2010. (査読あり)

〔学会発表〕 (計 1 件)

免疫抑制児の口腔環境と歯科的対応: 坪井文, 鈴木淳司, 吉村 剛, 海原康孝, 中岡美由紀, 角本法子, 大谷聡子, 大原 紫, 松浦和則, 香西克之: 第 48 回日本小児歯科学会大会(名古屋), 2010 年 5 月 19 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

角本 法子 (KADOMOTO NORIKO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 10508104

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし