

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17183

研究課題名(和文)大量化学療法による口腔細菌の膜輸送体の発現変化と口腔粘膜障害発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of changes in expression of oral bacteria membrane transporters in the relation to occurrence of oral mucosal disorders associated with high-dose chemotherapy

研究代表者

小林 優子(森川優子)(Morikawa, Yuko)

岡山大学・歯学部・客員研究員

研究者番号：70803188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞移植を施行する患児から唾液を採取し、PCR法を行った。移植3か月後のサンプルでは、すべての口腔レンサ球菌と歯周病原菌において、移植1か月後と比較して検出率が増加した。さらに菌種を特定するためにシーケンス解析を行ったところ移植前は Actinomyces 属が最も多かった。それ以降はどのステージにおいても Streptococcus 属が最も多くの割合を占めていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大量化学療法による全身状態の変化や長期にわたる抗生剤の投与によって、移植前では歯肉炎に關与する Actinomyces 属が多く、移植直後から Streptococcus 属へと菌叢が変化している。大量化学療法を行うにあたってターゲットとなる細菌が明らかになれば口腔衛生指導の要点や粘膜障害を予防するための足がかりになると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Saliva samples were collected from children undergoing hematopoietic stem cell transplantation at various time points, then PCR assays of DNA extracted from those specimens were performed. Three months after transplantation, the detection rates of all oral Streptococcus spp. and periodontopathogenic bacteria increased as compared to that at one month after transplantation. In addition, sequence analysis was performed to identify the periodontopathogenic bacteria species. Among all identified before transplantation, Actinomyces spp. showed the highest rate of prevalence, while the most abundant in all stages was the Streptococcus genus. These findings suggest that Actinomyces spp. and Streptococcus spp. bacteria are associated with oral mucosal disorder development. Additionally, they provide useful information regarding oral care for children undergoing hematopoietic stem cell transplantation and prevention of oral mucosal disorders.

研究分野：小児歯科

キーワード：小児がん 大量化学療法 口腔細菌叢 歯周病原菌 ミュータンスレンサ球菌 Streptococcus mutans 口腔粘膜障害

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

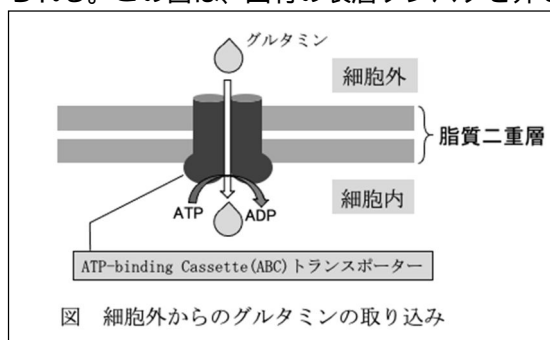
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児がん患者では、治療に用いる抗がん剤を含む大量化学療法によって免疫能が低下し、口腔内には潰瘍や水泡が生じるとともに、舌苔や乾燥が生じることによって口腔粘膜障害が多発することが知られている。これらの口腔内環境の変化により、口腔細菌叢の変化が起こり、細菌の病原性自体にも変化が生じている可能性が考えられている。

また、口腔細菌叢を形成する細菌のうち、グラム陽性細菌の代表的なものとして齶蝕の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* が挙げられる。この菌は、固有の表層タンパクを介して病

原性を発揮している。これらの菌の共通点としては、過酷な口腔内の環境に速やかに対応するための機能を有していることであり、その中で ABC トランスポーターをはじめとする膜タンパクが菌にとって必要な栄養素を取り込み、不要なものを排出することが強固なバイオフィルムを作り



出すことができる要因である。さらに口腔内は温度変化、唾液分泌量、唾液 pH、生活習慣、外来物質の侵入などの因子により環境が大きく変化する。膜輸送体は口腔内細菌がこのような様々な環境の変化に曝露される際に、環境変化によるストレスに応答するために機能することが報告されている。ABC トランスポーターは、細菌からヒトに至るさまざまな生物種に普遍的に存在し、細胞膜に局在し薬剤を細胞外へ汲み出す排出ポンプとして働き、微生物や癌細胞に薬剤耐性を付与することがこれまでに報告されている。グルタミンの取り込みについて *S. mutans* の ABC トランスポーターの 1 つである Gln タンパク (図) が関与していることが明らかになっている (Morikawa et al., Journal of Oral Microbiology, 2020; 参考論文 1)。アンモニウムから合成される非必須アミノ酸グルタミンは、プリンやピリミジンなどを含む多くの化合物の生合成において生育に必要な栄養素である窒素源として用いられることが知られている。この ABC トランスポーターは、*S. mutans* のバイオフィルム形成において大きく関与していることが確認された。そこで我々は大量化学療法を行う小児患者における口腔粘膜障害に関連する口腔細菌において、ABC トランスポーターをはじめとする膜タンパクの発現動態はどのように関連しているのかについて検討した。

2. 研究の目的

小児がん患者においては、大きな侵襲のある抗がん剤等の大量化学療法を受けることから、口腔内環境は健常の小児とはまったく異なると考えられる。そのため、細菌叢を構成する細菌の種類あるいは病原性は、健常の小児とは異なっている可能性が高く、重度の口腔粘膜障害が起こっている可能性がある。しかしながら、その細菌叢を構成する細菌の種類あるいは病原性についてこれまで報告はなされていない。化学療法により免疫能が低下することによる口腔内環境の変化が口腔細菌叢に変化をもたらしている可能性がある。また、それに伴い細菌叢を形成する口腔レンサ球菌の表層タンパク自体が変異している可能性も示唆される。しかしながら、その細菌叢を構成する細菌の種類あるいは病原性についてこれまで報告されていない。本研究の目的は、化学療法を行う小児患者における口腔細菌叢の変化を調査し、さらに、生育環境へ速やかに対応するための ABC トランスポーターをはじめとする膜タンパクの発現状態を調べることにより、菌の病原性を評価口腔粘膜障害の原因の特定につながる知見を得ることである。

3. 研究の方法

(1) 各ステージにおけるプラークおよび唾液サンプルの採取

岡山大学病院小児歯科を受診した小児がん患者で化学療法をうける予定の患者の保護者に研究内容を説明し同意を得られた対象において、齶蝕および歯周疾患に関する詳細な診査を行い、唾液を採取する。その後、移植後約1か月および3か月時に、移植前と同様に口腔内診査および唾液の採取を行う。その際、造血幹細胞移植の有無、免疫抑制剤、放射線治療についてのデータを同時に収集する。

(2) Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による各サンプル中に含まれる口腔細菌種の検出

得られたプラークおよび唾液から、通法に従って細菌 DNA を抽出する。得られた細菌 DNA を用いて、口腔内細菌(表1)における特異的なプライマーを用いた PCR 法にて、サンプル中に含まれる口腔レンサ球菌種の検出を行う。

(3) Semi quantitative-PCR 法による菌の定量

リアルタイム PCR 法を用いて、それぞれのサンプルに含まれる各菌の定量を行う。

(4) サンプルからの菌の分離・培養

サンプルを口腔レンサ球菌の分離には、Mitis-Salivarius 寒天培地を、乳酸菌および歯周病原性細菌の分離には、血液寒天培地を用いて、直接播種した後、それぞれ培養を行う。得られたコロニーを適した液体培地にて培養後-80℃で保存する。

(5) シークエンス解析による細菌の分類と同定

サンプルから抽出した DNA を用いてシークエンス解析を行い、遺伝子配列を解析し細菌の同定を行う。

口腔レンサ球菌 菌名 (略称)	歯周病原細菌 菌名 (略称)
<i>Streptococcus mutans</i> (Sm)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (Pg)
<i>Streptococcus sobrinus</i> (Sb)	<i>Treponema denticola</i> (Td)
<i>Streptococcus salivarius</i> (Ss)	<i>Tannerella forsythia</i> (Tf)
<i>Streptococcus sanguinis</i> (Ssa)	<i>Capnocytophaga ochracea</i> (Co)
<i>Streptococcus oralis</i> (So)	<i>Capnocytophaga sputigena</i> (Cs)
<i>Streptococcus gordonii</i> (Sg)	<i>Prevotella intermedia</i> (Pi)
	<i>Prevotella nigrescens</i> (Pn)
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitance</i> (Aa)
	<i>Campylobacter rectus</i> (Cr)
	<i>Eikenella corrodens</i> (Ec)

< 表 1 口腔レンサ球菌と歯周病原細菌 >

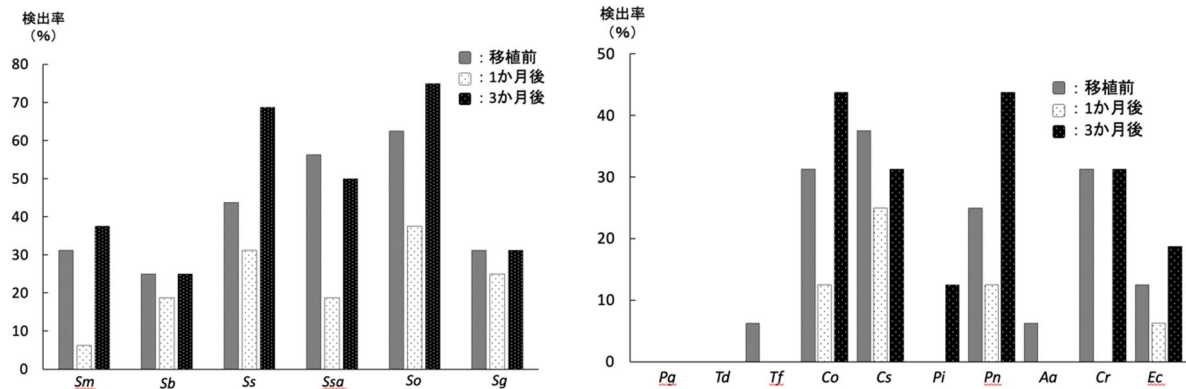
4. 研究成果

小児がん患者において抗がん剤等の大量化学療法を受けた小児において、口腔内環境が変化し重度の齶蝕や歯肉炎が起こることがすでに知られている。また、同時に大量化学療法を受けている小児においては、免疫機能の低下から著しく歯肉の状態が悪化していることが考えられる。このような患者では、齶蝕および歯肉炎発症に関わる菌およびその菌の生育環境も大きく変わっている可能性が高く、その細菌叢は健常の小児のものとは大きく異なると思われる。本研究では岡山大学病院小児科を受診中で保護者の同意が得られた患児17名(表2)より唾液を採取し、それらから細菌 DNA を抽出した。得られた DNA を鋳型として、各口腔内細菌の特異的プライマーを用いて PCR 法を行い菌の同定を行った。サンプルとして、化学療法開始1か月前および開始後約1、3か月後に唾液を採取した。

症例	疾患名	年齢	性別
1	胚細胞腫瘍	13Y0M	男児
2	髄芽腫	13Y8M	女児
3	胚細胞腫瘍	10Y6M	男児
4	急性リンパ性白血病	6Y5M	男児
5	骨髄異形成症候群	16Y0M	男児
6	骨髄異形成症候群	17Y0M	女児
7	急性リンパ性白血病	9Y8M	男児
8	急性リンパ性白血病	8Y4M	男児
9	骨髄異形成症候群	12Y4M	女児
10	急性リンパ性白血病	11Y7M	女児
11	再生不良性貧血	14Y7M	男児
12	汎血球減少症	11Y3M	男児
13	若年性骨髄単球性白血病	4Y11M	男児
14	急性リンパ性白血病	4Y6M	男児
15	骨髄異形成症候群	11Y0M	女児
16	再生不良性貧血	7Y5M	男児
17	リンパ芽球性白血病	3Y11M	女児

< 表 2 症例 >

口腔レンサ球菌の検出率は、移植1か月前と比較して移植1か月後のサンプルにおいて低下した。また移植3か月後のサンプルでは、すべての口腔レンサ球菌と歯周病原菌において、移植1か月後と比較して検出率が増加した移植前と比較すると口腔レンサ球菌では Ssa 以外の菌種で増加し、歯周病原菌においては検出される菌種は少なくなったものの検出率はほぼ同じであった。



<表3 移植前後における口腔レンサ球菌と歯周病原菌の検出率の推移 >

シーケンス解析では主に9種の菌種が検出された。移植前は *Actinomyces* 属が最も多く全体の50%を占めていた。次に *Streptococcus* 属が多く全体の25%であった。それ以降はどのステージにおいても *Streptococcus* 属が最も多くの割合を占めており、1か月後は33%、3か月後は35%と全体を占める割合も段階的に増加した。

また、*Streptococcus* 属においては重症う蝕に関連がある *S. mutans* や *S. sobrinus* は検出されなかったが、移植前、移植1か月後と比較して移植後3か月において検出された菌種が多かった。

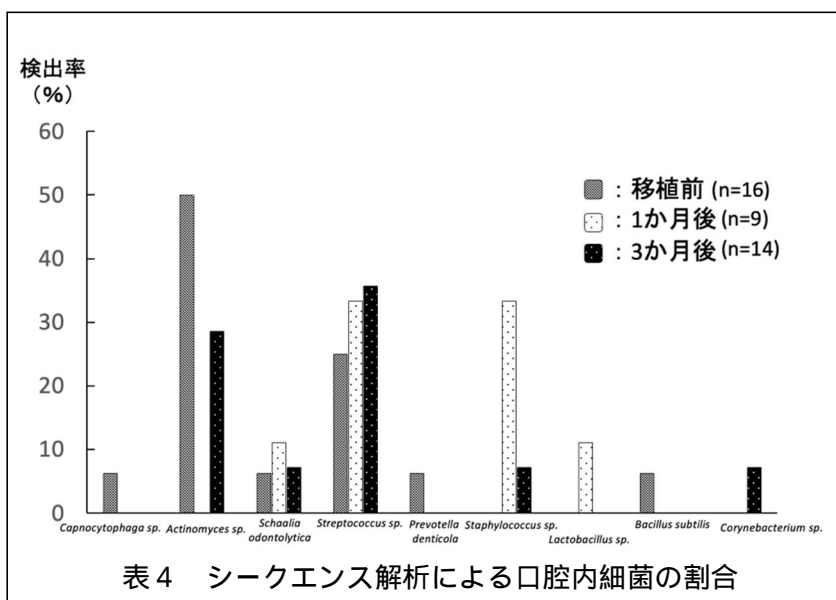


表4 シーケンス解析による口腔内細菌の割合

以上の結果から移植1か月後と比較して移植後3か月後において口腔レンサ球菌、歯周病原菌のほとんどにおいて検出率が上がるため重度の齲蝕や歯周病の発生に関連していると考えられる。特に歯周病原菌においては日和見菌と呼ばれている *Prevotella nigrescens* の検出率が高く、将来的に歯周病のリスクが上がると考えられる。このように移植前と移植後における口腔内の構成細菌は短期間の間に大きく変化しており、生育環境も

大きく変わっているといえる。生育環境へ速やかに対応するために口腔内細菌の性状にも変化が起こっていると考えられる。今後は細菌の病原性について追求していきたい。

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 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森川優子
2. 発表標題 口腔バイオフィルム形成における Streptococcus mutans のグルタミン膜輸送体の機能解析
3. 学会等名 第59回全国小児歯科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森川優子, 小川ひかり, 後藤花奈, 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大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川ひかり, 後藤花奈, 森川優子, 仲野道代
2. 発表標題 造血幹細胞移植を受けた小児がん患者のStreptococcus mutansの抗菌薬耐性に関する検討
3. 学会等名 第41回日本小児歯科学会中四国地方会大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------