

令和元年8月29日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26463015

研究課題名(和文) 口腔がん治療により生じる口腔細菌叢の量的・質的变化の次世代シーケンサーによる解析

研究課題名(英文) A study by using next generation sequencer on quantitative and qualitative changes of oral microbiota of oral cancer patients by applying preoperative chemoradiotherapy.

研究代表者

大部 一成 (OBU, 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：口腔がん患者の唾液をサンプルとして術前化学放射線治療の前後における口腔細菌叢の変化を解析したところ、化学放射線治療や手術などの治療(=侵襲)が加わると口腔細菌叢の菌種数が減少していた。細菌の構成比率は増加したものと減少したものがみられ、構成比率が大きく減少した菌種は、*Neisseria flavescens*と*Fusobacterium periodonticum*であった。また、術前化学放射線治療施行群では非施行群と比較して、*Scardovia wiggisiae*と*Oribacterium asaccharolyticum*が高い構成比率で検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Fusobacterium periodonticum は揮発性硫黄化合物(VSC)として口臭の原因ともされていることから、いっそう詳細な検討が必要である。

さらに*Scardovia wiggisiae*はう蝕との関連が指摘されている菌種でもあることから、口腔がん患者に対して化学放射線治療を施行した場合には患者のう蝕リスクが高まるおそれが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Changes of oral microbiota of oral cancer patients, who underwent concomitant chemoradiotherapy (CCRT), were analyzed by using next generation sequencer (NGS).

1. The number of the species of bacteria decreased after CCRT and distribution ratios of *Neisseria flavescens* and *Fusobacterium periodonticum* bacteria lowered after CCRT. 2. distribution ratios of *Scardovia wiggisiae* and *Oribacterium asaccharolyticum* of CCRT group were higher than those of non-CCRT group.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔細菌叢 口腔がん 化学放射線治療 次世代シーケンサー 唾液

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔がんの治療において、手術前や手術後に化学放射線治療を併用することはよく行われている。これらの治療における有害事象のうち口腔粘膜炎はがんやその近傍の細胞に対する抗がん剤や放射線の直接傷害と考えられ、びらんや潰瘍形成といった臨床症状を招来し、ひいては口腔内細菌叢の量的・質的な変化を引き起こしていると考えた。

そこでわれわれは、手術、放射線療法、化学療法などの口腔がん治療が患者の口腔内細菌叢に及ぼす影響を明らかにすることを目的に解析・検討を開始した。

T-RFLP 法を用いた先行研究において、

- a) 口腔内の細菌量は化学放射線療法中に減少すること
- b) 細菌の構成パターンは化学放射線療法によって変動するが、化学放射線療法終了後は徐々に治療前の細菌構成に復する傾向があること
- c) 上記 b)における細菌構成パターンの変動において、増加した細菌は *Neisseria* 属、*Rothia* 属の可能性があることなどが明らかとなった。同時に

化学放射線療法中に口腔内の細菌量が増加することと口腔粘膜炎の重篤度との関連。

Rothia 属中の菌種の特定についての検索。

Neisseria 属や *Rothia* 属の増加は、口腔扁平上皮癌に特徴的な傾向であるのかどうか、などが未解明の問題として残った。

2. 研究の目的

平成 26 年から 31 年における研究（以下、本研究）では、上記未解明の問題の解決に近づくべく、がん治療前後ならびに化学放射線療法中の細菌叢分析を続けながら、九州大学歯学部を設置された次世代シーケンサーを用いてさらに詳細に観察・分析することを目標とした。

3. 研究の方法

本研究では、根治的治療として手術を計画し、術前治療として化学放射線治療を行った口腔がん入院患者（以下 PT 群）を対象とし、術前治療前から術後経口摂取開始までに対し、4 つの時期すなわち、

- A: 術前治療開始前 (BeTr)
- B: 術前治療中の口腔粘膜炎が重篤な時期 (ChRa)
- C: 手術直前の口腔粘膜炎が鎮静化している時期 (B0pe)
- D: 手術後の経口摂取を開始した時期 (AfTr)

を定めて（図 1）、滅菌生理食塩水 5 mL で 30 秒間含嗽後、含嗽液を唾液とともに回収して分析検体に供し、口腔粘膜炎の重篤度や周術期感染症の発症ごとに得られた口腔細菌叢の細菌量と細菌構成パターンの比較を行い、それぞれに特徴的な口腔細菌の検出を目指した。



図 1 唾液採取の時期

さらに手術のみ施行群（以下 non PT 群）を設け、手術直前、手術後の経口摂取開始後の唾液を採取した。

4. 研究成果

計 47 例（術前化学放射線治療施行群：29 例、手術のみ施行群 18 例）を分析した。

- ・唾液検体から得られた菌種数 (OTU (Operational taxonomic unit) 解析) は術前治療開始前 (A の時期) が最も多く、手術後の経口摂取開始後 (D の時期) が最も少なかった (図 2)。
- ・細菌叢の構成の変動量 (Unweighted UniFrac 解析) は術前治療中 (B の時期) にいったん大きくなり、D の時期に最も大きくなった (図 3)。

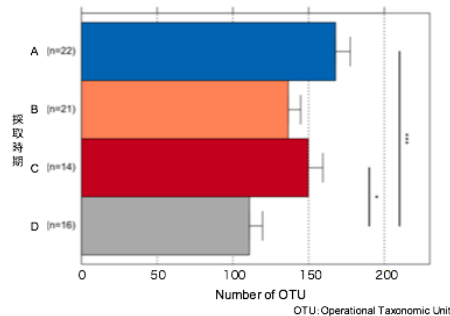


図 2 唾液採取時期ごとの菌種数の変化

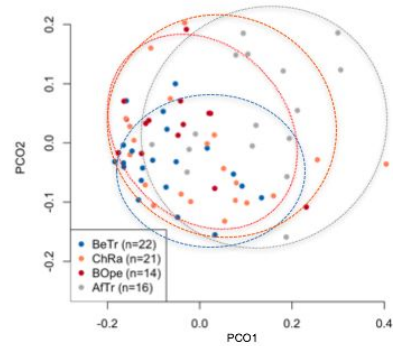


図 3 細菌叢構成の変動量

- ・細菌の構成比率を主たる菌属別に見ると、A の時期においては、*Streptococcus* 属、*Neisseria* 属、*Prevotella* 属、*Rothia* 属の順であったが、経時的に見ると構成比率が増加する菌種と減少する菌種とがあった (図 4)。主要な菌種で見ると、

- ・*Neisseria flavescens* や *Fusobacterium periodonticum* は、A の時期に対して B、C、D の時期において構成比率の減少が大きかった (表 1)。

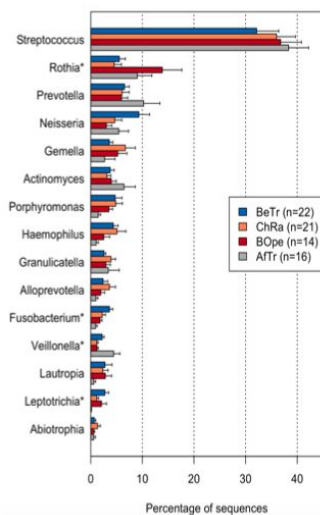


図 4 細菌叢構成比率の変化 (菌種別)

表 1 細菌叢構成比率の変化 (菌種別)

Seqs	Sp10	BeTr (時期A)	ChRa (時期B)	BOpe (時期C)	ATr (時期D)
OTU498	<i>Shuttleworthia satelles</i> (095)	0±0	0±0	0.001±0.001	0±0
OTU191	<i>Oribacterium</i> sp. (108)	0.26±0.114	0.012±0.006	0.036±0.015	0.012±0.006
OTU21	<i>Parvimonas micra</i> (111)	0.63±0.169	0.965±0.276	0.44±0.164	0.965±0.276
OTU17	<i>Veillonella parvula</i> (161)	0.445±0.086	0.592±0.138	0.49±0.128	0.592±0.138
OTU19	<i>Fusobacterium periodonticum</i> (201)	2.125±0.431	0.319±0.072	0.259±0.136	0.319±0.072
OTU113	<i>Leptotrichia</i> sp. (215)	0.218±0.059	0.061±0.026	0.025±0.012	0.061±0.026
OTU295	<i>Leptotrichia</i> sp. (221)	0.022±0.008	0.001±0	0.001±0.001	0.001±0
OTU165	<i>Prevotella</i> sp. (317)	0.028±0.008	0.027±0.014	0.324±0.168	0.027±0.014
OTU122	<i>Fretibacterium</i> sp. (359)	0.052±0.017	0.031±0.011	0.076±0.032	0.031±0.011
OTU382	<i>Moryella</i> sp. (373)	0.001±0.001	0.004±0.002	0.013±0.006	0.004±0.002
OTU423	<i>Lachnospiraceae</i> sp. (455)	0.006±0.002	0±0	0±0	0±0
OTU28	<i>Alloprevotella</i> sp. (473)	1.108±0.507	2.499±1.001	0.217±0.157	2.499±1.001
OTU163	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> (538)	0.003±0.001	0.009±0.005	0.034±0.016	0.009±0.005
OTU7	<i>Streptococcus anginosus</i> (543)	0.661±0.304	1.12±0.329	2.238±0.863	1.12±0.329
OTU173	<i>Prevotella baroniae</i> (553)	0.032±0.01	0.028±0.009	0.119±0.039	0.028±0.009
OTU430	<i>Neisseria flavescens</i> (609)	0.155±0.08	0.61±0.339	0.475±0.221	0.61±0.339
OTU421	<i>Neisseria flavescens</i> (610)	4.024±0.884	1.026±0.393	1.174±0.644	1.026±0.393
OTU4	<i>Streptococcus mitis</i> (677)	11.168±2.487	14.056±2.225	11.768±2.254	14.056±2.225
OTU69	<i>Prevotella nigrescens</i> (693)	0.089±0.026	0.364±0.101	0.283±0.116	0.364±0.101
OTU241	<i>Prevotella oralis</i> (705)	0.003±0.002	0.006±0.002	0.037±0.013	0.006±0.002
OTU34	<i>Atopopium parvulum</i> (723)	0.362±0.117	0.042±0.015	0.042±0.018	0.042±0.015
OTU37	<i>Gemella sanguinis</i> (757)	0.948±0.199	0.231±0.105	0.346±0.228	0.231±0.105
OTU256	<i>Neisseria sicca</i> (764)	0.033±0.015	0.227±0.133	0.11±0.043	0.227±0.133
OTU510	<i>Actinomyces</i>	0.019±0.008	0±0	0±0	0±0
OTU305	<i>Corynebacterium</i>	0.004±0.002	0.042±0.022	0.086±0.039	0.042±0.022

- ・総細菌数は A の時期に対して、B、C、D の時期に増加する傾向を示した (図 5)。
- ・non PT 群において手術前と手術後の間で細菌叢構成の変動が少なかった。

さらに PT 群、non PT 群それぞれの D 時期の検体どうしを Linear Discriminant Analysis Effect Size (LEfSe) 解析により比較分析を行い、PT 群と non PT 群それぞれに特徴的な OTU を抽出した。LDA スコアが 3 を超えている OTU を図 6 に示す。

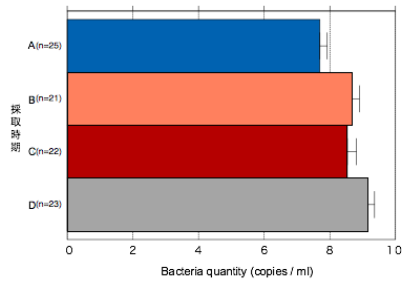


図5 総細菌数の変化

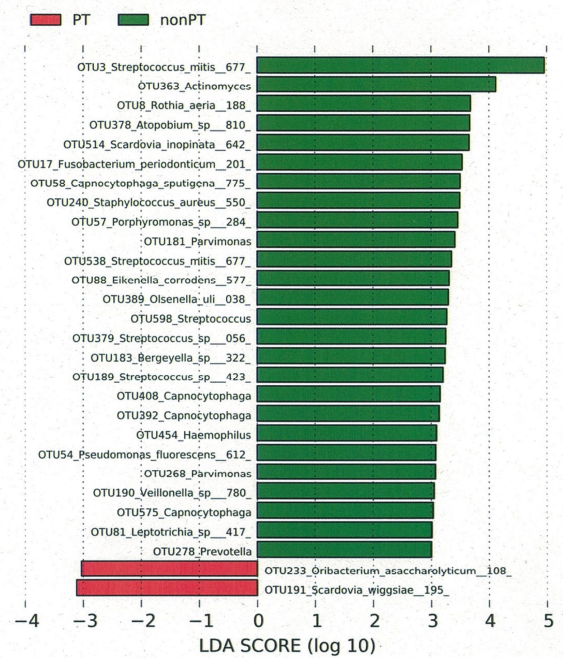


図6 PT群(赤)とnonPT群(緑)のそれぞれに特徴的なOTU

PT群においては、nonPT群と比較して、*Scardovia wiggisiae*と*Oribacterium asaccharolyticum*が高い構成比率で検出された。

以上の結果から、本研究では、口腔がん患者においては化学放射線治療や手術などの治療(=侵襲)が加わると口腔内の菌種数が減少すること、手術が終了し経口摂取開始後には細菌叢構成が最も変動することがわかった。

一方、総細菌数は経口摂取開始後に最も増加していたことと総細菌数を患者の口腔内衛生状態の指標であること考えると、がん治療の経過とともに口腔衛生状態は悪化している可能性が示唆された。

構成比率が大きく減少した菌種のうち、*Neisseria flavescens*は一般に非病原性で健常者において優勢になっているという報告があるが、*Fusobacterium periodonticum*は揮発性硫黄化合物(VSC)として口臭の原因ともされていることから、いっそう詳細な検討が必要である。

さらに*Scardovia wiggisiae*は、う蝕との関連が指摘されている菌種(Kressierer, C.A., et al, J Oral Biosci. 2017 Aug; 59(3): 135-141)でもあることから、口腔がん患者に対して化学放射線治療を施行した場合には患者のう蝕リスクが高まるおそれが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 大部一成、中村誠司：口腔がん治療および術後の経口摂取により生じる口腔内細菌叢の変化～次世代シーケンサーを用いた解析～. 第33回JSPEN(日本静脈経腸栄養学会)学術集会(2018.2.22~23 横浜市)

2. 大部一成、川野真太郎、中村誠司：口腔がん治療により生じる口腔内細菌叢の量的・質的变化の次世代シーケンサーによる解析. 第41回日本頭頸部癌学会(2017.6.8~9 京都市)

〔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：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：川野 真太郎

ローマ字氏名：KAWANO shintaro

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院顎口腔外科

職名：講師

研究者番号（8桁）：00398067

研究分担者氏名：竹下 徹

ローマ字氏名：TAKESHITA toru

所属研究機関名：九州大学

部局名：歯学研究科（研究院）

職名：准教授

研究者番号（8桁）：50546471

研究分担者氏名：中村 誠司

ローマ字氏名：NAKAMURA seiji

所属研究機関名：九州大学

部局名：歯学研究科（研究院）

職名：教授

研究者番号（8桁）：60189040

(2)研究協力者：なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。