

氏名	海老沼 孝至		
学位	博士		
専門分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第4720号		
学位授与の日付	平成25年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)		
学位論文題目	造血幹細胞移植患者における口腔粘膜上細菌の <i>mecA</i> 保有状況に関する調査研究		
学位論文審査委員	仲野 道代 教授	大原 直也 教授	
	高柴 正悟 教授		

学位論文内容の要旨

【緒言】

造血幹細胞移植 (Hematopoietic stem cell transplantation : HCT) 患者は、免疫力の低下によって種々の感染症に罹患しやすく、合併した感染症による致死率も高いため、その予防が重要な課題である。さらに、化学療法や全身放射線照射による前処置、HCT、生着という過程を経るなかで、白血球数がほぼ0となる易感染状態が出現する。そのため、感染対策として抗菌薬の投与が行われるが、そのような環境下では、薬剤耐性菌出現の可能性が高まる。他方、化学療法や放射線照射は副作用として、口腔内の広範な糜爛すなわち口腔粘膜障害を高頻度に引き起こす。口腔粘膜障害はHCT期の感染の門戸となり得ることから、適切な口腔感染管理が求められる。

これまでに、移植期の口腔粘膜上細菌の抗菌薬感受性を調べた。すなわち、HCT患者の口腔粘膜障害が頻発する時期に、患者の頬粘膜上の細菌を採取して抗菌薬の感受性試験を施行した。得られた菌株の中からセフェム系、ペニシリン系抗菌薬に対して強い耐性を示すコアグラウゼ陰性ブドウ球菌 (coagulase-negative staphylococci, CNS) が検出され、さらにメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) も検出された。移植期の口腔粘膜上には抗菌薬耐性菌が存在することが明らかとなり、HCT時には菌交代現象が起こり、その時の口腔粘膜障害は抗菌薬耐性菌の感染経路になり得ると考えられた。なお、ブドウ球菌のメチシリン耐性は、外来性遺伝子の *mecA* によって獲得される。

そこで本研究では、HCT期の患者における口腔粘膜上の細菌が保有する *mecA* の検出状況を調べ、培養法で得られたメチシリン耐性 CNS あるいは MRSA の口腔内における存在を分子生物学的に裏付けることを目的とした。

【対象と方法】

HCT患者 (N=59, 男性37名, 女性22名, 52.3±12.1歳) と比較対照者: 健常者 (N=52, 男性21名, 女性31名, 55.4±14.2歳) を対象に、以下の手順で *mecA* を検出した。

1. 頬粘膜上の口腔内細菌サンプルの採取

HCT患者: 対象期間をHCT前後の4つの期間(1~4期)に分け、各期間から1回、1名につき4回、口腔内細菌を採取した。

健常者: 外来受診時に1回採取した。

2. 細菌DNAの抽出

3. 細菌DNA検出の確認(PCR法)

16S rRNA 遺伝子を検出できたサンプルを対象に、*mecA* の検出を行った。

【結果】

1. 細菌サンプルからの DNA 回収率

HCT 患者 59 名から合計 236 回の細菌サンプルを採取する機会があったが、体調の悪化によりサンプル採取を行うことが不可能な患者が存在した。その結果、計 209 サンプルから DNA を回収した。そのうち 16S rRNA 遺伝子を確認でき、*mecA* の検出を調べることができたサンプルは、計 191 サンプル (91.4%) であった。

2. HCT 患者と健常者における口腔粘膜上の細菌が保有する *mecA* の検出率

HCT の 1 週間前から 3 週間後までの期間で、1 回でも口腔粘膜上の細菌から *mecA* が検出された HCT 患者は 59 名中 45 名 (76.3%) であるのに対して、健常者で *mecA* を検出したものは 52 名中 0 名 (0%) であった。HCT 患者での *mecA* 保有率は、健常者に比べ有意に高い結果となった ($p < 0.01$ Fisher's exact test)。

3. HCT 前後の口腔粘膜上の細菌が保有する *mecA* の検出状況の推移

1 期の被験サンプルにおける *mecA* の検出率は 19.2% であり、移植後の経過とともに検出率は増加した。そして *mecA* の検出率は、3 期で 60.9% となり、4 期で 63.2% と増加した。これらの *mecA* 検出率は、1 期での検出率と比較して有意に増加していた ($p < 0.01$ ANOVA)。また、口腔粘膜炎がピークにある 2 期と 3 期の間でも、*mecA* 検出率は有意に増加していた ($p < 0.01$ ANOVA)。

【考察】

HCT 患者における口腔粘膜上の細菌からの DNA 回収率が HCT 後の経過とともに低下した理由として、1 期と 2 期の時期に比べて、3 期と 4 期においては口腔粘膜炎の増悪があり、頬粘膜から細菌サンプルを採取する際、粘膜をより愛護的に扱う必要があったため、検体の採取に失敗した可能性がある。このことは、本研究成果を臨床現場で活用する際に留意すべき点である。

HCT 前後の口腔内は、*mecA* などの抗菌薬耐性を規定する遺伝子のリザーバーとなっている可能性がある。*mecA* は、染色体カセット (SCC) と呼ばれるゲノムアイランド上に位置しており、*mecA* の遺伝子複合体によって媒介される (SCC*mec*)。HCT 後に口腔内で優勢となる CNS が有する *mecA* は、SCC*mec* により他のブドウ球菌にも伝播する可能性がある。HCT 後に口腔衛生状態を良好に維持していくことは、口腔内における抗菌薬耐性を制御する遺伝子を保有する細菌数を減少させるために有効と思われる。口腔粘膜障害等の口腔内感染経路からのメチシリン耐性菌感染対策とともに、メチシリン感受性菌への SCC*mec* によるメチシリン耐性伝播を防ぐための一般的な感染管理論としても、HCT 期の積極的な口腔衛生管理が重要であると考えられた。

【結論】

HCT 患者の口腔粘膜上の細菌が保有する *mecA* の検出率は健常者より高く、移植後の検出率は上昇することが分かった。培養法で得られたメチシリン耐性ブドウ球菌の口腔内における存在を分子生物学的に裏付けた。このことから、移植期における口腔粘膜炎発症の予防ならびに口腔内の保清が必要であることが示唆された。

学位論文審査結果の要旨

造血幹細胞移植 (Hematopoietic stem cell transplantation : HCT) 患者は、免疫力の低下により種々の感染症に罹患しやすく、それによる致死率も高いため、感染症の予防が重要な課題である。さらに、化学療法や全身放射線照射による前処置、HCT、生着という過程を経るなかで、白血球数がほぼ 0 となる易感染状態が出現する。そのため、感染対策として抗菌薬の投与が行われるが、そのような環境下では、薬剤耐性菌出現の可能性が高まる。他方、化学療法や放射線照射は副作用として、口腔内の広範な糜爛すなわち口腔粘膜障害を高頻度に引き起こす。口腔粘膜障害は HCT 期の感染の門戸となり得ることから、適切な口腔感染管理が求められる。

以前の研究で、移植期の口腔粘膜上細菌の抗菌薬感受性を調べた。すなわち、HCT 患者の口腔粘膜障害が頻発する時期に、患者の頬粘膜上の細菌を採取して抗菌薬の感受性試験を行った。得られた菌株の中からセフェム系、ペニシリン系抗菌薬に対して強い耐性を示すコアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (coagulase-negative staphylococci, CNS) が検出され、さらにメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) も検出された。移植期の口腔粘膜上には抗菌薬耐性菌が存在することが明らかとなり、HCT 時には菌交代現象が起こり、その時の口腔粘膜障害は抗菌薬耐性菌の感染経路になり得ると考えられた。なお、ブドウ球菌のメチシリン耐性は、外来性の薬剤耐性遺伝子の *mecA* によって獲得される。

本研究では、HCT 期患者における口腔粘膜上の細菌が保有する *mecA* の検出状況を調べ、培養法で得られたメチシリン耐性 CNS あるいは MRSA の口腔内における存在を分子生物学的に裏付けることを目的とした。

研究結果は、以下の内容であった。

1. HCT 患者における口腔内粘膜上の細菌からの DNA 回収率と、サンプル採取が不可能であった患者を除いた解析対象者率は、HCT 後の経過とともに低下傾向にあった。
2. 健常者の口腔内細菌から検出されなかった *mecA* が、HCT 患者の口腔内細菌からは高頻度に検出された。
3. *mecA* の検出率は、HCT 前に比べ HCT 後の経過とともに有意に増加した。また、HCT 後においても口腔粘膜炎がピークとなる時期における *mecA* の検出率は、他の期に比較して有意に増加した。

以上のことから、HCT 患者の口腔粘膜上細菌が保有する *mecA* の検出率は健常者より高く、移植後の検出率は上昇することが分かった。さらに培養法で得られたメチシリン耐性ブドウ球菌の口腔内における存在を分子生物学的に裏付けた。このことから、移植期における口腔粘膜炎発症の予防ならびに口腔内の保清が必要であることが示唆された。

以上にに基づき、審査委員会は本申請論文が博士 (歯学) の学位論文としての価値を有するものと認めた。