

氏名	室 美里
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5816号
学位授与の日付	平成30年9月27日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Unusual oral mucosal microbiota after hematopoietic cell transplantation with glycopeptide antibiotics: potential association with pathophysiology of oral mucositis (造血幹細胞移植後のグリコペプチド系抗菌薬による口腔粘膜上細菌叢の菌交代現象—口腔粘膜炎との潜在的な関連性)
論文審査委員	大原 直也 教授 高柴 正悟 教授 稲葉 裕明 准教授

学位論文内容の要旨

論文内容の要旨（2000字程度）

【緒言】

造血幹細胞移植（hematopoietic cell transplantation: HCT）に伴う大量化学療法および全身放射線照射は患者の約80%に口腔粘膜炎を引き起こす（Vera-Llonch et al. 2007）。口腔粘膜炎はHCT後2-3週間続き（Takahashi et al. 2010）、重症度は6-12日目にピークを迎える（Kolbinson et al. 1988, Tardieu et al. 1996）。

HCT後の口腔粘膜上細菌は口腔粘膜炎の重症化に関与し得る。Streptococciは口腔粘膜上細菌叢の主要な構成菌種である。ところが、HCT前および施行後4週間にわたって口腔粘膜上細菌を監視培養した結果、長期抗菌薬投与で菌交代現象が起こり、主要構成菌がStreptococciからコアグラゼ陰性ブドウ球菌（coagulase-negative staphylococci: CNS）に変化することが報告されている（Soga et al. 2011）。また、HCT後の歯肉表面で多剤耐性の*Stenotrophomonas maltophilia*が増殖したという報告もある（Soga et al. 2008）。このようにHCT後は口腔粘膜上細菌叢の主要構成菌が変化すると考えられる。これらの報告は、特定の菌種に焦点をあてた培養法に基づいている。しかし、口腔粘膜上細菌叢の全容は明らかになっていない。

PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)法は、変性剤濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲルを用いることで、同じ長さの2本鎖DNA増幅産物を塩基配列の違いにより分離する方法である。また、16S rRNA遺伝子の可変領域を含み、加えて5'末端にGCクランプを付与できるプライマーを用いたPCR法を行うことで、GC含有量が異なるDNA増幅産物を泳動距離の違いにより別々のバンドとして検出することから、細菌叢をバンドパターンとして可視化できる方法である。

本研究の目的は、PCR-DGGE法を用いHCT前後の口腔粘膜上細菌叢を調べ、抗菌薬投与が口腔粘膜上細菌叢に与える影響について明らかにすることとした。さらに得られた情報から口腔粘膜上細菌叢と口腔粘膜炎との関連性についても検討することとした。

【対象および方法】

1) 対象

2014年8月から2015年7月に岡山大学病院でHCTを受けた患者60名を対象とした。本研究は、岡山大学生命倫理審査委員会研究倫理審査専門委員会（承認番号902）の承認を受け、患者の同意を得た上で実施した。

2) 口腔粘膜炎の評価

HCT前7日からHCT後21日の毎日、口腔粘膜炎の重症度をCommon Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v3.0（グレード1: 粘膜の紅斑, グレード2: 斑状潰瘍または偽膜, グレード3: 融合した潰瘍または偽膜, グレード4: 組織の壊死, グレード5: 死亡）で評価した。

3) 口腔粘膜上の細菌サンプルの採取

HCT前1週間頃と口腔粘膜炎の好発時期であるHCT後2-3週間頃の2回、滅菌綿棒で口腔粘膜上細菌を擦過し採取した。

4) PCR-DGGE法による細菌叢の解析

最小限の抗菌薬投与を受けた3名（キノロンおよびβ-ラクタム系抗菌薬単剤投与群：単剤投与群）、および強力な抗菌薬投与を受けた3名（β-ラクタム-グリコペプチド系抗菌薬併用群：併用群）の計6名を対象とし、各群の口腔粘膜上細菌叢の変化を比較した。

- ① 細菌サンプルからQIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN, Venlo, The Netherlands) を用いて全細菌のDNAを抽出した。
- ② MuyzerらのTouch Down法 (Muyzer et al. 1993) を一部改変して、細菌16S rRNA遺伝子の可変領域V3を含み約200bpが得られ、かつ5'末端にGCクランプを付与できるプライマーを使用しPCRを行った。
- ③ 得られた増幅DNA断片を用いてDGGE（変性剤濃度勾配25%-65%、ポリアクリルアミドゲル濃度8%、電圧110V、12時間）を行った。

5) 口腔粘膜上細菌叢構成菌種の同定

- ① 電気泳動後のゲルからDGGEバンドを切り出し、得られたDNAをBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, California, USA) を用いてダイレクトシーケンスした。
- ② 得られたDNA塩基配列をNational Center for Biotechnology Information (NCBI)のデータベースに照合し、口腔粘膜上細菌叢構成菌種を同定した。

【結果】

単剤投与群ではHCT前後で口腔粘膜上細菌叢の大きな変化がみられなかった。一方、併用群での口腔粘膜上細菌叢はHCT前後で構成する菌種数の減少および菌種自体の変化が見られ、HCT後の口腔粘膜上細菌叢は主に *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp.および *Lautropia mirabilis* で構成されていた。

口腔粘膜炎の推移は、単剤投与群ではグレード1以下であり、一方併用群ではグレード2以上であった。

【考察】

併用群におけるグリコペプチド系抗菌薬投与は菌交代現象を引き起こし、口腔粘膜上細菌叢を大きく変化させたと考える。また、併用群で、HCT後に主要構成菌として検出された *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp.および *L. mirabilis* はグリコペプチド系抗菌薬に対してさえも感受性が低いと考えられる。

Enterococcus spp.は腸管細菌叢を構成する代表的な菌種であり (Eckburg et al. 2005)、細菌叢におい

て優勢になると感染症を来たす (Arias and Murray 2012). HCT後, 強力なグリコペプチド系抗菌薬投与を受け *Enterococcus* spp. が優勢となった細菌叢で覆われた口腔粘膜の炎症は, 腸管の感染と病態が類似しているのかもしれない.

L. mirabilis は, 1994年に口腔と肺から発見されたグラム陰性球菌である (Gerner-Smidt et al. 1994). その後, ヒト免疫不全ウイルス感染者の口腔 (Rossmann et al. 1998) における検出の報告があるが, この細菌の生態に関する報告は限られている. *L. mirabilis* が口腔粘膜上細菌叢の主要構成菌となることを示したのは本研究が初めてである. *L. mirabilis* は潰瘍を伴う口腔粘膜炎 (グレード2以上) を有する患者から検出されたことから, 今後, 粘膜障害性等の病原性について調べることは興味深いと思われる.

非口腔常在菌が口腔粘膜上細菌叢の主要構成菌となっていた患者でのみ潰瘍を伴う口腔粘膜炎がみられた. 今後, 高処理能を有する次世代シーケンサー等を利用して検討することで, 口腔粘膜上細菌叢のパターンと口腔粘膜炎の関係が明らかになる可能性があると考えられた.

【結論】

PCR-DGGE 法を用い, HCT 前後の口腔粘膜上細菌叢を分析した. グリコペプチド系抗菌薬投与を受けた HCT 患者の口腔粘膜上細菌叢で *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. および *L. mirabilis* といった非口腔常在菌が主要構成菌となることを示した. さらに, これらの口腔粘膜上細菌叢と口腔粘膜炎との潜在的な関連性を示唆した.

論文審査結果の要旨

造血幹細胞移植 (hematopoietic cell transplantation: HCT) に伴う大量化学療法および全身放射線照射によって患者の約 80%に口腔粘膜炎が生じること、またその症状は HCT 後の 2~3 週間続くなかで、6~12 日目に最も重症化することが良く知られている。その際の口腔粘膜上には種々の細菌が検出されるので、これら細菌は口腔粘膜炎の重症化に関与すると考えられる。通常、口腔粘膜上細菌叢の主要な構成菌種は streptococci であるが、HCT 前から施行後 4 週間にわたって口腔粘膜上細菌を監視培養した結果、長期間の抗菌薬投与の影響で菌交代現象が起こり、主要構成菌が streptococci からコアグラゼ陰性 staphylococci に変化したことが報告されている。また、HCT 後の歯肉表面では多剤耐性の *Stenotrophomonas maltophilia* が増殖したという報告もある。このように HCT 後は口腔粘膜上細菌叢の主要構成菌が変化しているが、これらの報告は培養法によるものであり、培養不能菌を含めて口腔粘膜上細菌叢の全容は明らかになっていない。

このような背景の下で本研究は、HCT 前後の口腔粘膜上細菌叢を網羅的に調べて、スペクトラムの異なる抗菌薬投与が口腔粘膜上細菌叢に与えた影響を明らかにすることを目的とした。さらに、その結果から口腔粘膜上細菌叢と口腔粘膜炎の重症化との関連性についても検討した。

対象患者は、2014 年 8 月から 2015 年 7 月に岡山大学病院で HCT を受けた 60 名の中から、最小限の抗菌薬投与を受けた 3 名 (キノロンあるいはβ-ラクタム系抗菌薬単剤投与群: 単剤投与群)、および強力な抗菌薬投与を受けた 3 名 (β-ラクタム-グリコペプチド系抗菌薬併用群: 併用群) の計 6 名を選択した。HCT 前後の各群の口腔粘膜上細菌叢の変化を比較し、さらに口腔粘膜上細菌叢と口腔粘膜炎の重症度との関係をも検討した。

HCT 前 1 週頃と口腔粘膜炎の好発時期である HCT 後 2~3 週頃の 2 回、頬粘膜を滅菌綿棒で擦過して得た口腔粘膜上細菌サンプルから全細菌 DNA を抽出した。ポリメラーゼチェーン反応と変性剤濃度勾配ゲル電気泳動を組み合わせた PCR-DGGE 法を行い、電気泳動後のゲルから画像解析ソフトウェアを用いて DGGE バンドを選定し切り出した。それらのバンドから DNA 断片を抽出して直接その塩基配列を自動シーケンサーで決定後、National Center for Biotechnology Information のデータベースに照合して菌種の同定を行った。また、HCT 前 7 日から HCT 後 21 日までの毎日、口腔粘膜炎の重症度を Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 で評価した。

その結果、併用群では HCT 前後で異なる DGGE 解析結果を示し、HCT 後の口腔粘膜上細菌叢は主に *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., そして *Lautropia mirabilis* で構成されており、通常口腔では稀な細菌種が口腔粘膜上細菌叢の主要構成菌となっていた。また、併用群でのみにグレード 2 以上の口腔粘膜炎を認めた。以上のことから、HCT 後の口腔粘膜上細菌叢と口腔粘膜炎の重症化には関連性があることが示唆され、今後の HCT 患者の管理に有用な知見を得た。

よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。