

造血幹細胞移植患者における  
口腔粘膜上細菌の *mecA* 保有状況に関する調査研究

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻  
病態機構学講座 歯周病態学分野

海老沼 孝至

**Distribution of oral mucosal bacteria with *mecA* in patients  
undergoing hematopoietic cell transplantation**

Department of Pathophysiology - Periodontal Science  
Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Takayuki EBINUMA

(平成 24 年 12 月 14 日受付)

## 緒言

造血幹細胞移植（Hematopoietic stem cell transplantation：HCT）とは、血液がんや骨髄不全症などの治療のため、大量化学療法や全身放射線治療などによる移植前処置後に、すべての血球に分化・増殖する能力と自己を複製する能力を合わせ持つ造血幹細胞を移植する治療法である<sup>1)</sup>。HCTは、様々な疾患に対して行われるが、治療目的によって2つに大別することができる。1つは、造血系や免疫系に異常をきたす疾患に対して骨髄組織の根本的置換を目的として行われるものであり、主に再生不良性貧血、骨髄異形成症候群、各種免疫不全性疾患に対して行われる。もう1つは、白血病や悪性リンパ腫など造血系の悪性腫瘍の治療のための化学療法や放射線療法を施行した際に造血・免疫系の救済を目的として行われるものであり、同種移植の場合にはドナー由来の免疫担当細胞によるがん免疫療法としての側面を合わせ持っている<sup>1, 2)</sup>。従来は、造血幹細胞自身を同定することが困難なため、造血幹細胞を多く含む骨髄を採取・輸注する骨髄移植が行われてきた。近年では、末梢血あるいは臍帯血も造血幹細胞のソースとして用いる末梢血幹細胞移植と臍帯血移植が盛んに行われるようになった<sup>1, 2)</sup>。日本造血細胞移植学会が取りまとめた全国のHCTの実施件数は、2010年には年間約4,800件に達している<sup>3)</sup>。

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。HCT 患者においては、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。がん治療における口腔粘膜障害への国際的な臨床ガイドラインの一つに Multinational Association of Supportive Care in Cancer / International Society of Oral Oncology (MASCC / ISOO) が作成したものがあある。これによれば、がんの化学療法や HCT 治療を受ける患者のすべてに口腔粘膜障害が発生し得る<sup>4)</sup>。口腔粘膜障害の重症化は移植後 6~12 日がピークとなり<sup>5)</sup>、この期は骨髄抑制により白血球数が極めて少ない易感染期と重なっている。したがって、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。

口腔粘膜障害とグラム陽性菌の菌血症との関連が指摘されている。抗悪性腫瘍剤であるシタラビン (Ara-C) を用いた治療後に口内炎を来たした患者には *viridans streptococci* 菌血症が多いという報告<sup>6)</sup>や、口腔衛生状態と *viridans streptococci* 菌血症は関連があるという報告<sup>7)</sup>がある。他方では、菌交代現象の問題が指摘されている。筆者らの研究グループの先行研究は、移植期の口腔粘膜で、*streptococci* 等の常在菌から、コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (*coagulase-negative staphylococci*, CNS) をはじめとする、健常者の口腔粘膜において通常の培養検査で検出されにくい菌への菌交代現

象が高頻度に起きることを明らかにしている<sup>8)</sup>。このことは口腔粘膜障害が口腔常在菌以外の細菌感染に関与することを示唆するとともに、抗菌薬の長期投与患者でこの傾向が強く、移植期に使用される抗菌薬の影響で菌交代現象が起こり、抗菌薬耐性を有する菌が口腔内に存在する可能性も示唆している。

そこで、筆者らは移植期の口腔粘膜上細菌の抗菌薬感受性を調べた<sup>9)</sup>。9人のHCTの実施日から移植13日後の間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分離培養した67菌株に対して抗菌薬の感受性試験を施行した。得られた菌株のうち9菌株はCNSであり、セフェピム、ペニシリンG、オキサシリン、そしてアンピシリンといったセフェム系、ペニシリン系抗菌薬に対して強い耐性を示した。そのうちの2菌株は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) であった。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ったので、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、可動性遺伝因子である染色体カセット *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*) 中に存在してβ-ラクタム剤に低親和性の細胞壁合成酵素を産生する *penicillin binding protein-2'* (PBP-2') をコードしている外来性遺伝子の *mecA* によって、獲得される<sup>10-12)</sup>。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

### 研究の概略(図 1)

図 1

HCT 患者と健常者を対象に、口腔粘膜上の細菌から遺伝子サンプルを採取した。このサンプルから polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて 16S rRNA 遺伝子の検出によって細菌採取の確認を行い、確認できたサンプルを対象に *mecA* の検出を行った。得られた結果をもとにデータ集計を行い、*mecA* 保有状況の比較および経時的比較を行った。

### 対象者

被験者は、2011 年 7 月から 2012 年 10 月までの期間で、岡山大学病院の血液・腫瘍内科で HCT を受ける際に口腔感染管理のため医療支援歯科治療部と歯周科に紹介された患者 59 名（男性 37 名，女性 22 名，平均年齢  $52.3 \pm 12.1$  歳）とした（表 1）。

対照となる健常者は、岡山大学病院歯周科を受診した，基礎疾患がなく，過去 3 ヶ月間に抗菌薬の投与歴のない患者 52 名（男性 21 名，女性 31 名，平均年齢  $55.4 \pm 14.2$  歳）とした。

表 1

なお，本研究の施行に当たっては岡山大学大学院医歯薬学総合研究科疫学倫理委員会の承認を受け（番号：457），全被験者から書面にてインフォームドコンセントを得

た。

## 方法

### 1. 口腔内細菌サンプルの採取

HCT 患者においては、先行研究<sup>8)</sup>と同様に、対象期間を HCT 前 1 週間～HCT 後 3 週間と設定し、HCT 前 1 週間～HCT 前日、HCT 施行日～1 週間後、HCT 施行後 1～2 週間、HCT 施行後 2～3 週間の 4 つの期間（図 2）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。比較対象となる健常者については外来受診時に 1 回採取を行った。

図 2

対象者の頬粘膜上に存在する口腔内細菌を、滅菌綿棒を用いて擦過して採取し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS, pH7.4）1 ml を分注した 1.5 ml マイクロチューブに滅菌綿棒を浸漬した。採取後 30 秒間、ボルテックスミキサーを使用し攪拌して、採取した細菌を PBS 中に混濁させ、混濁液を新しいマイクロチューブに移し、微量高速冷却遠心分離機を用いて 4 °C, 12,000g で 15 分間遠心分離した。その後、上清を除去し、底面に溜まったペレットを-30 °Cにて保存した。

### 2. 細菌 DNA の抽出

全 DNA の抽出は、キレート樹脂である Chelex<sup>®</sup>の存在下での煮沸法に基づく InstaGene<sup>™</sup>Matrix（BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA）を用いて、取扱説明書に従い行った。-30 °Cにて保管したペレットに InstaGene<sup>™</sup>Matrix を 200 µl 加え、

56 °Cにて30分間反応させヌクレアーゼを不活化した後、100 °Cにて8分間熱処理を加えることにより細胞を溶解させ、DNAを含む遠心後の上清を回収した。

### 3. 細菌 DNA 検出の確認

#### 1) 16S rRNA 遺伝子の確認

細菌 DNA が採取できていることを確認するため、Maeda らの記載<sup>13)</sup>に従い、PCR 法を用いて 16S rRNA 遺伝子の存在を確認した。抽出した DNA 調整液 (2.5 μl) と、AmpliTaq Gold<sup>®</sup> 360 Master Mix 12.5 μl (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), ユニバーサルプライマー (フォワード 5'-GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA-3', リバーズ 5'-ACGTCRTCCMCACCTTCCTC-3', 各 10 μmol, シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社, 東京, 日本), および Nuclease-free-water (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を最終的に合計 25 μl になるように混合した。95 °C で 10 分間のホットスタートの後、95 °C で 1 分間の変性、56 °C で 1 分間のアニーリング、72 °C で 2 分間の伸長を 1 サイクルとした 35 サイクルを行い、72 °C で 5 分間の最終伸長の PCR 反応にて増幅した。増幅した遺伝子の検出のため、2%アガロースゲルを用いた電気泳動法を行った [トリス-酢酸-エチレンジアミン四酢酸 (TAE) バッファー, 100 V, 30 分間]。分離した遺伝子断片は、臭化エチジウム (0.5 μg/ml) で染色し、紫外線 (波長: 320 nm) 照射下にて検出した。理論上の増幅産物長である 120 bp の遺伝子断片の検出の有無をもって 16S rRNA 遺伝子の存在を確認した。



## 2) *mecA* の検出

16S rRNA 遺伝子を確認できたサンプルを対象に, Hiramatsu らの記載<sup>14)</sup>に従い, PCR 法を用いて *mecA* を増幅して検出した。抽出した DNA 調整液 (2.5  $\mu$ l) と, AmpliTaq Gold<sup>®</sup> 360 Master Mix 12.5  $\mu$ l (Applied Biosystems), プライマー (フォワード 5'-TGCTATCCACCCTCAAACAGG-3' , リバース 5'-AACGTTGTAACCACCCCAAGA-3', 各 10  $\mu$ mol, シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社), および Nuclease-free-water (QIAGEN) を最終的に合計 25  $\mu$ l になるように混合した。95 °C で 10 分間のホットスタートの後, 95 °C で 30 秒間の変性, 52 °C で 30 秒間のアニーリング, 72 °C で 1 分間の伸長を 1 サイクルとした 35 サイクルを行い, 72 °C で 7 分間の最終伸長の PCR 反応にて増幅した。増幅した遺伝子の検出のため, 2%アガロースゲルを用いた電気泳動法を行った [TAE バッファー, 100 V, 30 分間]。分離した遺伝子断片は, 臭化エチジウム (0.5  $\mu$ g/ml) で染色し, 紫外線 (波長: 320 nm) 照射下にて検出した。理論上の増幅産物長である 284 bp の遺伝子断片の検出の有無をもって *mecA* の存在を確認した。

## 4. 統計学的検討

各データの統計学的有意性は, Fisher's exact test および ANOVA を用いて検討した。全ての統計解析には IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> Statistics Version 21 (IBM Corporation, NY, USA) を使用した。

## 結果

### 1. 細菌サンプルからの DNA 回収率

各期において 59 名の HCT 患者を対象とした。なお、体調の悪化によりサンプル採取が行うことが不可能な患者が、1 期に 7 名、2 期に 4 名、3 期に 3 名、4 期に 13 名存在した。サンプルを採取できても 16S rRNA 遺伝子を確認できなかったのは、3 期に 10 名と 4 期に 8 名であったので、細菌 DNA の回収率が、1 期では 100%、2 期では 100%、3 期では 82.1%、そして 4 期では 82.6%と、HCT 後の日数が経過すると減少する傾向にあった。そして、合計 209 の細菌サンプルから DNA を回収して 16S rRNA 遺伝子を増幅できたものは 191 サンプルであった (回収率 91.4%)。以上をまとめると、合計 236 回の細菌サンプルを採取する機会から *mecA* の検出を調べることができたものは、全体で 80.9%であった。1 期では 88.1%、2 期では 93.2%、3 期では 78.0%、そして 4 期では 66.4%と、HCT 後の日数が経過すると解析対象率が減少する傾向にあった。一方、健常者からはすべてのサンプルから回収できた。

### 2. HCT 患者と健常者の口腔粘膜上の細菌が保有する *mecA* の検出率 (表 2)

表 2

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* を検出した HCT 患者は 59 名中 45 名 (76.3%) であるのに対して、健常者で口腔粘膜上の細菌から *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* 検出率は、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 前後における口腔粘膜上の細菌が保有する *mecA* の検出状況の推移 (図 3)

HCT 前 1 週間の 1 期での被験サンプルにおける *mecA* の検出率は 19.2% であり、移植後の週数が増加する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

本研究の結果から、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ることが分かった。そして、健常者の口腔内において検出されなかった薬剤耐性遺伝子 *mecA* が HCT 患者の口腔内からは高頻度に検出されていることが、また、その検出頻度は移植後期間を経るにつれて増加していることが分かった。得られた結果は、筆者らの先行研究<sup>9)</sup>で得られた HCT 後に streptococci から CNS への菌交代現象が起こることを、遺伝子レベルで支持するものであった。

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は、3 期と 4 期における対象患者の口腔粘膜は、1 期と 2 期に比べて口腔粘膜炎の増悪がみられたことに関連すると考えられる。すなわち、3 期と 4 期においては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のかもしれない。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となる。

白血球減少期には、発熱性好中球減少症 (FN) が高頻度に発生する。日本では、『好中球数が 500 個/ $\mu\text{L}$  未満、あるいは 1,000 個/ $\mu\text{L}$  未満で 500 個/ $\mu\text{L}$  未満になる可能性がある状況下』で、『1 回の腋窩温で 37.5  $^{\circ}\text{C}$  以上 (口腔内温で 38  $^{\circ}\text{C}$  以上) の発熱』

が生じ、さらに『薬剤熱，腫瘍熱，膠原病，そしてアレルギーなどの発熱の明瞭な原因が除外できる』の3条件を満たした場合を，FNと定義している<sup>15)</sup>。HCTに伴うFNは，敗血症様の症状を呈しながらも原因菌は不明の場合が70～80%を占め<sup>16, 17)</sup>，重症化して致命的となることも希ではない。原因菌が同定されにくい中で経験的抗菌薬治療における第一選択には第四世代セファロスポリンが用いられることが多い。このことが結果的に *mecA* 非保有細菌の淘汰に繋がり，streptococci から CNS への菌交代現象が起こる主要なメカニズムとなっているのであろう。

緒言で述べた通り，*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*）<sup>10-12)</sup>。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。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ことも考えられる。口腔は黄色ブドウ球菌が *mecA* を SCC*mec* により受け取り，MRSA の発生の場になっている可能性がある。事実，筆者らの先行研究でも口腔内から MRSA が検出されている<sup>9)</sup>。

HCT患者においては口腔粘膜上の細菌から，かなりの高頻度で *mecA* が検出されることが明らかとなった。したがって，*mecA* の検出状況を知ることは，メチシリン耐性ブドウ球菌による感染リスクを知るにあたり有効と考えられる。本研究で示したような PCR 法を用いた抗菌薬耐性を規定する遺伝子の検出は，結果を得るまでに数日かかる培養法と比較して有効と考えられる。PCR 法による検出は最短で2～3時間程

度で行える上、近年、簡便でかつ迅速に検査可能、という臨床現場の要望を満たす手法として、Loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) 法による検出も開発されている。LAMP 法は、一定の温度 (60~65°C) で遺伝子の増幅が継続するために増幅効率が非常に高い特徴をもつ。このため、標的遺伝子の増幅に要する時間、すなわち検査時間を大幅に短縮できるうえ、PCR 法と比較し検出感度は同程度である<sup>18)</sup>。口腔内細菌が保有する *mecA* の検出状況を知ることは、培養検査に先行してメチシリン耐性菌の検出に繋がる可能性があり、今後の研究課題と考えられた。

図 4

抗菌薬に頼る感染管理は、薬剤耐性菌出現の可能性が高まり、口腔内細菌に耐性遺伝子を獲得する機会を与えることにもなる (図 4)。HCT 後に口腔衛生状態を良好に維持していくことは、口腔および抗菌薬耐性細菌感染症における抗菌薬耐性を制御する遺伝子の存在を物理的に減らすために有効と思われる。口腔粘膜障害等の口腔内の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 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。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なるご指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の高柴正悟教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行に際し終始ご指導を賜り、様々な面にわたり貴重な御助言とご協力を下さいました、岡山大学病院医療支援歯科治療部の曾我賢彦副部長に深く感謝いたします。様々な面にわたり貴重なご助言とご協力を下さいました歯周病態学分野の前田博史准教授、工藤値英子助教をはじめとする、歯周病態学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。



## 参考文献

1. 神田善伸:造血幹細胞の原理と流れ. 神田善伸編, チーム医療で行う造血幹細胞移植プラクティカルガイド. 南江堂, 東京, 2-9, 2011.
2. 塚本祥吉, 宮村耕一, 川瀬孝和, 高橋聡:造血幹細胞移植:直江知樹, 小澤敬也, 中尾眞二編 血液疾患 最新の治療. 南江堂, 東京, 299-315, 2010.
3. 日本造血細胞移植学会全国データ集計事務局. 平成 23 年度全国調査報告書. 2012; Available from: [http://www.jshct.com/report\\_2011/](http://www.jshct.com/report_2011/). (2012 年 12 月現在)
4. Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, Keefe D, McGuire D, Epstein J, Elting LS, Fox PC, Cooksley C, Sonis ST. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer*, 100, 2026S-2046S, 2004.
5. Takahashi K, Soga Y, Murayama Y, Udagawa M, Nishimoto H, Sugiura Y, Maeda Y, Tanimoto M, Takashiba S. Oral mucositis in patients receiving reduced-intensity regimens for allogeneic hematopoietic cell transplantation: comparison with conventional regimen. *Supportive Care in Cancer*, 18, 115-119, 2009.
6. Kern W, Kurrle E, Schmeiser T. Streptococcal bacteremia in adult patients with leukemia undergoing aggressive chemotherapy. A review of 55 cases. *Infection*, 18, 138-145, 1990.
7. Graber CJ, de Almeida KN, Atkinson JC, Javaheri D, Fukuda CD, Gill VJ, Barrett AJ, Bennett JE. Dental health and viridans streptococcal bacteremia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation*, 27, 537-542, 2001.
8. Soga Y, Maeda Y, Ishimaru F, Tanimoto M, Maeda H, Nishimura F, Takashiba S. Bacterial substitution of coagulase-negative staphylococci for streptococci on the oral mucosa after hematopoietic cell transplantation. *Supportive Care in Cancer*, 19, 995-1000, 2011.
9. Soga Y, Maeda Y, Tanimoto M, Ebinuma T, Maeda H, Takashiba S. Antibiotic sensitivity of bacteria on the oral mucosa after hematopoietic cell transplantation. *Supportive Care in Cancer*, 21, 367-368, 2013.

10. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**, 1549-1555, 2000.
11. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**, 1323-1336, 2001.
12. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resistance Updates*, **6**, 41-52, 2003.
13. Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Kokeyuchi S, Petelin M, Arai H, Tanimoto I, Nishimura F, Takashiba S. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **39**, 81-86, 2003.
14. Hiramatsu K, Asada K, Suzuki E, Okonogi K, Yokota T. Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *FEBS Letters*, **298**, 133-136, 1992.
15. Masaoka T. Management of fever of unknown origin in the neutropenic patient: the Japanese experience. *International Journal of Hematology*, **68**, S9-S11, 1998.
16. Tamura K, Matsuoka H, Tsukada J, Masuda M, Ikeda S, Matsuishi E, Kawano F, Izumi Y, Uike N, Utsunomiya A, Saburi Y, Shibuya T, Imamura Y, Hanada S, Okamura S, Gondoh H; Kyushu Hematology Organization for Treatment (K-HOT) Study Group. Cefepime or carbapenem treatment for febrile neutropenia as a single agent is as effective as a combination of 4th-generation cephalosporin + aminoglycosides: comparative study. *American Journal of Hematology*, **71**, 248-255, 2002.
17. Tamura K, Imajo K, Akiyama N, Suzuki K, Urabe A, Ohyashiki K, Tanimoto M, Masaoka T; Japan Febrile Neutropenia Study Group. Randomized trial of cefepime monotherapy or cefepime in combination with amikacin as empirical therapy for febrile neutropenia. *Clinical Infectious Diseases*, **39**, S15-S24, 2004.
18. Koide Y, Maeda H, Yamabe K, Naruishi K, Yamamoto T, Kokeyuchi S, Takashiba S. Rapid detection of *mecA* and *spa* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Letters in Applied Microbiology*, **50**, 386-392, 2010.

## 表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座

歯周病態学分野

(指導：高柴正悟教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第4回日本口腔検査学会・学術大会（2011年8月，千葉市）

MASCC/ISOO International Symposium on Supportive Care in Cancer (2012年6月，ニューヨーク市，アメリカ合衆国)

表 1. HCT 患者の疾患内訳

疾患	人数
急性骨髄性白血病	17
急性リンパ球性白血病	4
慢性骨髄性白血病	2
悪性リンパ腫	25
再生不良性貧血	2
骨髄異形成症候群	8
骨髄線維症	1
計	59

表 2. HCT 患者と健常者の口腔粘膜上細菌が保有する *mecA* の  
検出状況

	<i>mec A</i>		計
	-	+	
健常者	52	0	52
HCT 患者	14	45	59
計	66	45	111

(\* $p < 0.01$ , Fisher's exact test)

## 図の説明

### 図 1. 本研究の概略

HCT 患者（59 名）と健常者（52 名）を対象として、口腔粘膜上細菌を採取した。採取したサンプルから PCR 法を用いて 16S rRNA 遺伝子の検出によって細菌採取を確認し、確認できたサンプルを対象にして PCR 法を用いて *mecA* の検出を行った。得られた結果をもとにデータ解析を行い、*mecA* の対象者群間での検出状況および HCT 患者での検出状況の経時的変化を解析した。

### 図 2. 検体採取時期

HCT 患者の検体採取時期を、HCT 前 1 週間～HCT 前日（1 期）、HCT 施行日～1 週間後（2 期）、HCT 施行後 1～2 週間（3 期）、HCT 施行後 2～3 週間（4 期）と設定した。

### 図 3. HCT 前後における口腔粘膜上細菌が保有する *mecA* の検出状況の推移

各期で採取した細菌 DNA 中の *mecA* を、PCR 法にて検出した。グラフは、PCR 法にて検出された、各期間における *mecA* の検出率の推移を示す。各期間の検出率の差は、ANOVA を用いて検定した。\*、 $p < 0.01$

#### 図 4. HCT 患者の治療経過, ならびに薬剤耐性遺伝子と口腔粘膜炎との関係

HCT 患者においては, 治療過程を経るなかで免疫力がほぼ 0 となる易感染状態が出現するため, 感染対策として抗菌薬の投与が行われる。そのような環境下では, 細菌は *mecA* に代表される薬剤耐性遺伝子を導入し, 生存を図ろうとすることから, 薬剤耐性菌出現の可能性が高まる。このことは, 移植後の口腔粘膜障害等との相乗効果により, 日和見感染, 敗血症発症のリスクを大いに高めると考えられる。

## HCT患者

(N=59, 男性37名, 女性22名, 52.3±12.1歳)

- ・ HCTを目的に岡山大学病院血液・腫瘍内科に入院
- ・ 感染管理のため歯科を受診

## 健常者

(N=52, 男性21名, 女性31名, 55.4±14.2歳)

- ・ 歯科治療を目的に岡山大学病院歯周科を受診
- ・ 基礎疾患がない
- ・ 3カ月以内に抗菌薬の投薬歴がない

全被験者を対象に書面によるインフォームドコンセント

口腔粘膜上の細菌の遺伝子サンプルを採取

236 サンプル

52 サンプル

PCR法による  
16S rRNA遺伝子および*mecA*を検出

45 サンプル脱落  
(27は採取不可能, 18はDNA回収不可能)

191 サンプル

52 サンプル

データ解析

- ① HCT患者と健常者間で*mecA*保有状況を比較
- ② HCT前後で*mecA*保有状況を経時的比較

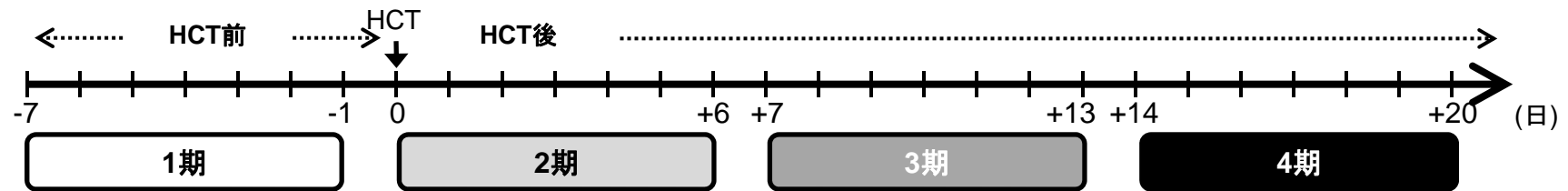


図2(海老沼)



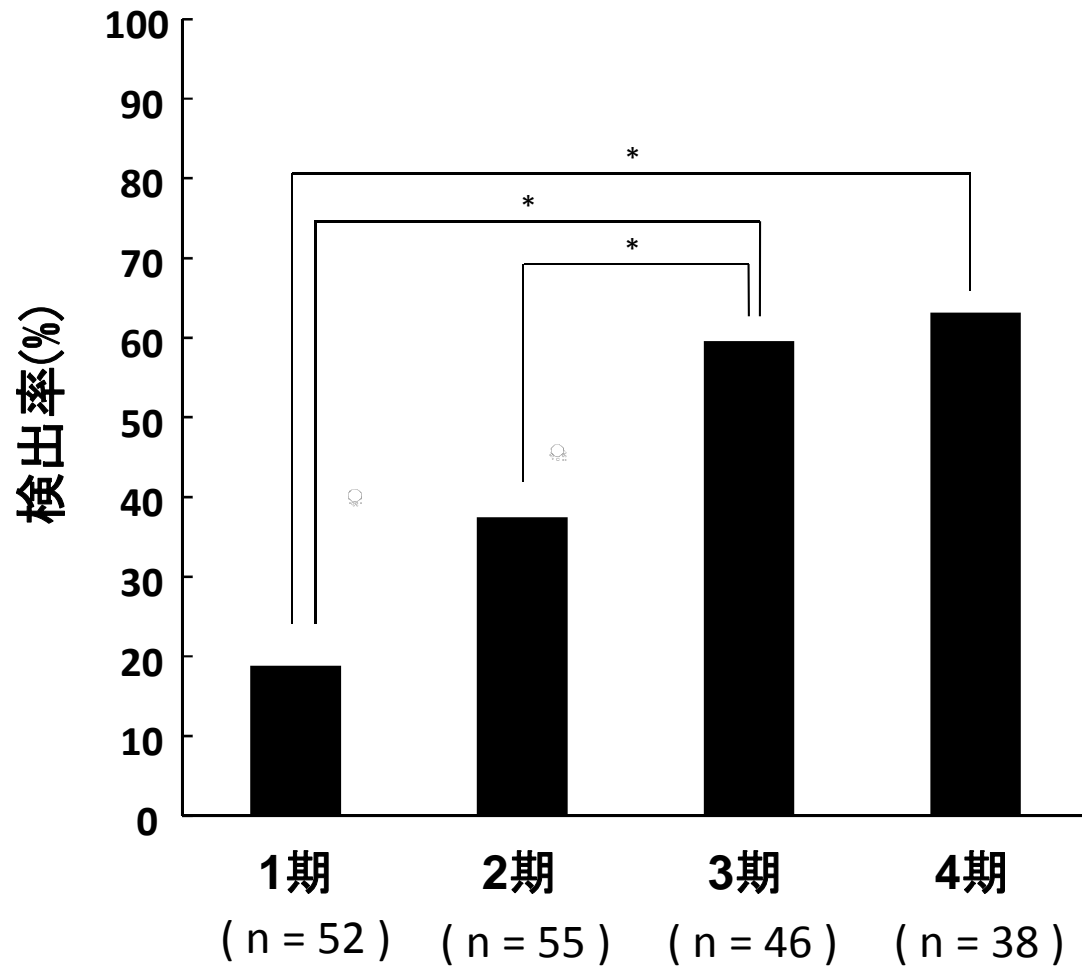


図3(海老沼)

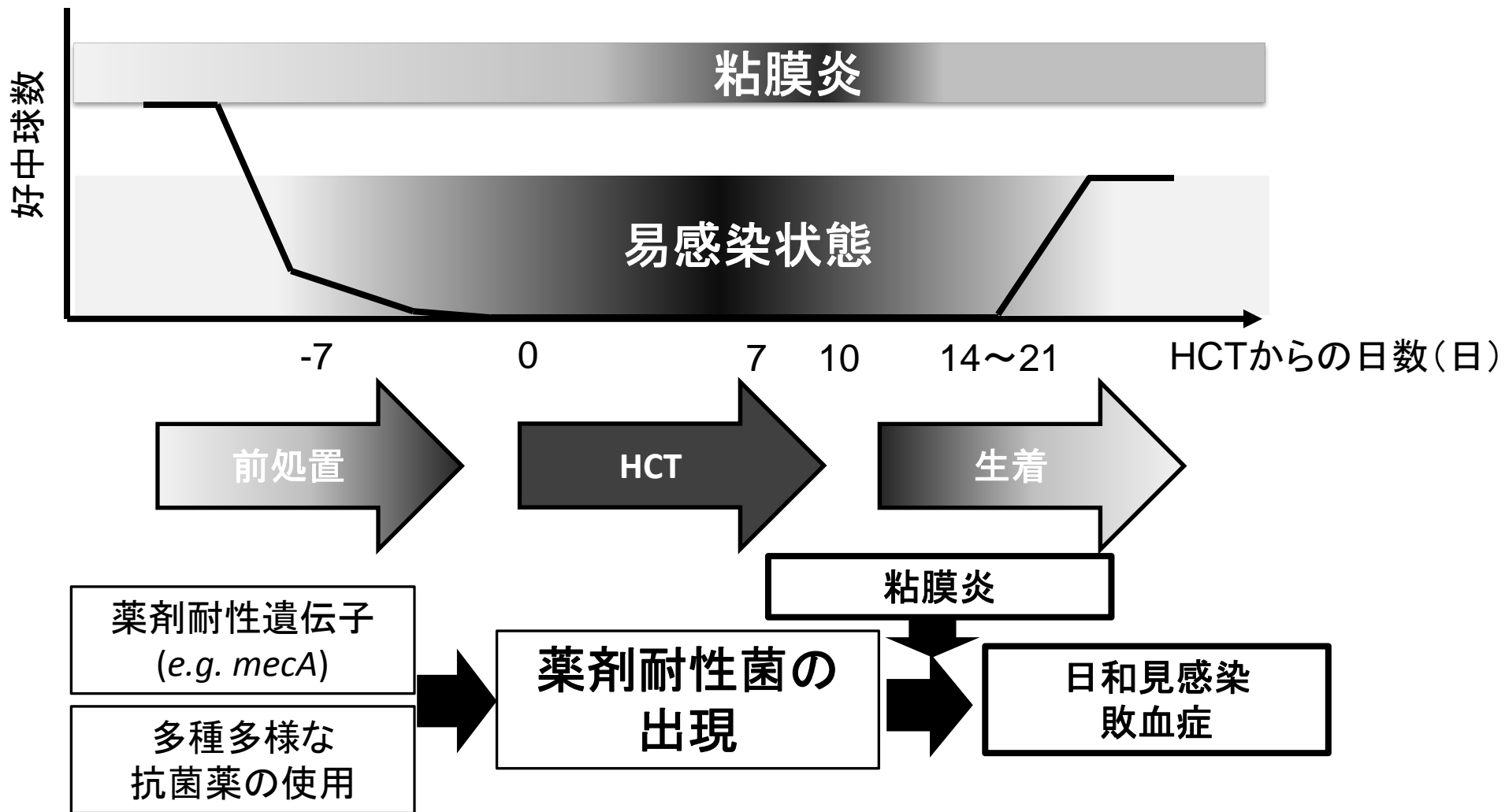


図4(海老沼)