

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
印	研究の総括・総合的指導
印	
印	

## 学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野社会環境生命科学	身分 大学院生	氏名 室 美里
<p>論 文 題 名</p> <p>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)</p>		
<p>論文内容の要旨（2000字程度）</p> <p>【緒言】</p> <p>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）。</p> <p>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 からコアグラールゼ陰性ブドウ球菌（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 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>【対象および方法】</p> <p>1) 対象</p> <p>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。</p> <p>2) 口腔粘膜炎の評価</p> <p>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。</p>		

### 3) 口腔粘膜上の細菌サンプルの採取

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、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。