

氏 名	小川ひかり
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7461号
学位授与の日付	令和 8年 3月 25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	造血幹細胞移植における抗菌薬曝露が <i>Streptococcus mutans</i> の薬剤耐性および性状に及ぼす影響
論文審査委員	高柴 正悟 教授 秋山 謙太郎 教授 中山 真彰 准教授

学位論文内容の要旨

【目的】

造血幹細胞移植 (HSCT) は血液腫瘍に対する治療法の1つであるが、前処置として高用量化学療法、放射線療法とそれに伴う持続的な抗菌薬投与を施行する。それらは宿主側に口腔粘膜障害や唾液線障害、高度な免疫抑制を引き起こす。治療後には齲蝕発症リスクも著しく高まることが知られている。しかし、この周術期での前処置並びに抗菌薬曝露が齲蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* の病原性に与える影響は現時点では明らかとなっていない。本研究の目的は、HSCT を施行された小児患者から *S. mutans* を分離し、移植前処置および抗菌薬の影響がその生物学的特性に与える変化を検討し、移植後の齲蝕発生リスクや口腔ケアの重要性について新たな知見を得ることである。

【方法】

1) 対象患者と菌株の分離・同定

本研究は血液腫瘍と診断され、HSCT を施行された小児患者 39 名を対象とした。患者より移植前、移植 1 か月後、および移植 3 か月後に唾液およびプラークを採取し、Mitis-Salivarius 寒天培地に播種し、37℃、嫌気下で2日間培養した。培地上のコロニーを採取し、Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地にて培養後、細菌 DNA を抽出し、*S. mutans* の特異的プライマーを用いた Polymerase chain reaction (PCR) 法により菌を同定した。同定された *S. mutans* 株を実験に供試した。

2) 検出率の推移

移植前、移植 1 か月後、および移植 3 か月後での *S. mutans* 検出率を比較した。

3) バイオフィーム形成能

患者から分離した *S. mutans* 株をスクロース含有 Todd Hewitt 液体培地で培養し、96穴プレートに分注させ、バイオフィームを形成させた。底面に形成されたバイオフィームを 1% クリスタルバイオレット溶液で染色し、波長 570 nm における吸光度を測定することで形成能を定量的に評価した。

4) 最小発育阻止濃度 (MIC)

抗菌薬感受性は、各種抗菌薬が添加されている3種類のドライプレートを用い、微量液体希釈法により、各供試菌の MIC を決定した。

5) 遺伝子発現解析

抗菌薬耐性株（移植 1か月後）と非耐性株（移植前）を BHI 液体培地にて培養後、RNA を抽出し、RNA シーケンス解析を行った。

解析結果より発現が上昇していた遺伝子（*SMU_1605* , *SMU_1913c*）の発現量を、Real-time RT-PCR 法により調べた。

6) ペニシリン存在下における *SMU_1605* 遺伝子の発現解析

MIC 試験において抗菌薬耐性株はドライプレートに含まれるペニシリンの全濃度において増殖を示したため、セカンダリー MIC 試験を実施した。その結果、64 µg/mL 付近から増殖抑制が認められたため、本研究ではその 1/2 濃度である 32 µg/mL をサブ致死濃度と定義した。抗菌薬耐性株を BHI 液体培地で一晩培養後、サブ致死濃度のペニシリンを添加した培地と無添加培地に継代し、その後 RNA を抽出した。Real-time RT-PCR 法を行い、*SMU_1605* の発現量を比較した。さらに遺伝子発現の濃度依存性を検討するため、ペニシリンを段階的に添加して追加培養を行い、濃度依存的变化も検討した。

7) 蛍光プローブによる細胞膜透過性の解析

蛍光プローブである N-Phenyl-2-naphthylamine (NPN) を用い、抗菌薬耐性獲得株と *S. mutans* MT8148 株の膜透過性を評価した。NPN を菌液に添加し遮光した後、蛍光測定用プレートに調整した菌液を分注し、蛍光分光光度計を用いて蛍光偏光度を測定した。臨床分離株 *S. mutans* MT8148 株を基準として、各時点の分離株の相対値を算出した。

【結果および考察】

S. mutans の検出率は移植前と比較し、移植 1か月後で一過性に低下し、移植3か月後には再上昇した。移植前処置における高用量化学療法や抗菌薬投与により口腔粘膜障害や唾液線障害、免疫抑制など宿主側の環境変化が生じ、それに伴い口腔細菌叢の不安定化と菌交代現象が生じた可能性が考えられる。MIC 試験では、移植 1か月後に分離された *S. mutans* は広域にわたる薬剤耐性の獲得が認められ、RNA シーケンス解析では薬剤排出系や膜関連遺伝子の発現上昇が認められた。また、蛍光プローブ NPN を用いた細胞膜透過性の解析では、移植前および移植 3か月後と比較し、移植 1か月後において蛍光偏光度が低値であった。移植 1か月後の細胞膜はより硬くなり、物質透過性が低下していた可能性が示唆された。さらに、ペニシリン曝露により薬剤排出系の遺伝子の発現上昇が濃度依存的に誘導されたことから、抗菌薬の曝露が排出ポンプの発現を誘導し、薬剤排出能の強化を行い耐性獲得に寄与する可能性を示唆する。一方、移植 3か月後にはバイオフィーム形成能が有意に亢進していたことから、抗菌薬投与の終了後においても齶蝕リスクが再上昇することが考えられる。これらのことから、周術期において移植前の抗菌薬使用時から移植後の長期的な期間において口腔管理が不可欠であると考えられる。

論文審査結果の要旨

【緒言】造血幹細胞移植（HSCT）は血液腫瘍に対する重要な治療法の一つであり、移植前処置として高用量化学療法や放射線療法が施行される。さらに、周術期には感染予防を目的とした持続的な抗菌薬投与が行われる。これらの治療介入により口腔内環境は大きく変化し、移植後の齲蝕発症リスクが上昇することが報告されている。しかし、HSCT周術期における前処置および抗菌薬曝露が、小児の口腔内に常在する齲蝕原性細菌*Streptococcus mutans*（以下*S. mutans*）の生物学的性状に及ぼす影響については十分に明らかにされていない。本研究では、HSCTを施行された小児から分離した*S. mutans*を対象に、移植前後における検出状況および性状変化を検討した。

【方法】HSCTを施行予定の小児患児39名を対象とし、移植前、移植1か月後、および移植3か月後に唾液およびプラークを採取した。分離・同定した*S. mutans*について、各時点における検出率、バイオフィーム形成能、および抗菌薬感受性を評価した。さらに、移植1か月後に分離された抗菌薬耐性株と移植前の非耐性株を用いてRNAシーケンス解析を行い、耐性株で発現上昇が認められた遺伝子について、Real-time RT-PCRにより各時点の分離株およびペニシリン曝露条件下での発現変化を検討した。加えて、蛍光プローブNPNを用いて細胞膜透過性を解析した。

【結果】*S. mutans*の検出率は移植前と比較して移植1か月後に一過性に低下した。移植1か月後に分離された菌株を中心に、複数の抗菌薬に対する耐性獲得が認められた。一方、バイオフィーム形成能は移植3か月後に分離された菌株において有意に高値を示した。RNAシーケンス解析では、薬剤排出関連遺伝子*SMU_1605*の発現が移植前の非耐性株と比較して移植1か月後および3か月後に分離された複数の耐性株で上昇していた。また、ペニシリン曝露下では*SMU_1605*の発現が濃度依存的に誘導された。細胞膜透過性解析では、移植1か月後株において、移植前および移植3か月後株と比較して有意な低下が認められた。

【考察】HSCT施行時期に応じた*S. mutans*の検出率変動は、HSCT周術期における宿主環境の急激な変化に伴う口腔細菌叢の攪乱や菌交代現象の一側面を反映している可能性が示唆された。また、移植1か月後株において観察された広範な抗菌薬耐性獲得に加え、薬剤排出系遺伝子の発現上昇および細胞膜透過性の低下を伴う表現型の変化は、抗菌薬曝露下における*S. mutans*の適応応答を示すものと考えられた。さらに、その後の再定着過程でバイオフィーム形成能が増強する可能性を示した。これらの結果は、抗菌薬曝露が口腔内齲蝕原性細菌の「量」だけでなく「質」を変化させ得ることを示唆しており、臨床的にも重要な知見である。

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。