

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
(自 署)	研究の総括指導
(自 署)	
(自 署)	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

教育研究分野 小児歯科学分野	身分 大学院生	氏名 小川 ひかり
論 文 題 名 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		
論文内容の要旨（2000字程度） 【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腺障害、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 <i>Streptococcus mutans</i> 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児から <i>S. mutans</i> 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) 対象患児と菌株の分離・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児 39 名を対象とした。患児より移植前、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、 <i>S. mutans</i> 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 <i>S. mutans</i> 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 <i>S. mutans</i> 検出率を比較した。 3) バイオフィルム形成能 患児から分離した <i>S. mutans</i> 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、バイオフィルムを形成させた。底面に形成されたバイオフィルムを 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ をサブ致死濃度と定義した。抗菌薬耐性株を BHI 液体培地で一晚培養後、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、濃度依存的変化も検討した。

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。

