

平成30年6月18日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15852

研究課題名(和文) ヒト高齢者モデルの真猿類マーモセットを用いた顎口腔機能老化と社会行動に関する研究

研究課題名(英文) Common marmoset as a primate model for gerontology in dentistry

研究代表者

糸井 康宏 (KUMEI, Yasuhiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：30161714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：真猿類コモンマーモセットにおいて、顎骨、歯周組織、顎運動、咀嚼・嚥下、呼吸機能の変化など、老化にともなう問題を明らかにし、ヒト高齢者モデルとしてのコモンマーモセットの有用性を評価する。高齢コモンマーモセットを非拘束状態で三次元X線動画を撮像し、顎運動、咀嚼・嚥下、呼吸などの機能について若年対照との比較解析を行なった結果、加齢による解剖学的および機能的変化が認められた。口腔内細菌叢のメタゲノム解析を行なった結果、ヒトとマーモセットに共通の細菌および種特有の細菌が確認され、加齢にともなう口腔内細菌叢の変化が認められた。コモンマーモセットはヒト高齢者の口腔疾患モデルとして高い有用性が確認された。

研究成果の概要(英文)：In the common marmoset, the problems associated with aging such as jaw and cranium, periodontal tissue, jaw movement, chewing / swallowing, respiratory function, etc. were clarified. Then, the utility of common marmoset as a human elderly model was evaluated. Three-dimensional X-ray motion pictures (cineradiograph) were taken with the elderly common marmosets in unconstrained state, and comparative analyzes of functions such as jaw movement, chewing / swallowing, respiration were conducted with reference to juvenile controls. In results, anatomical and functional changes was confirmed, and metagenome analysis of oral bacterial flora, bacteria common to humans and marmosets and the species-specific bacteria were clarified. Changes in the oral flora with aging were also observed. Common marmoset was confirmed to be highly useful as an oral disease model of human elderly.

研究分野：硬組織病態生化学

キーワード：霊長類モデル コモンマーモセット 口腔細菌 X線動画診断 加齢 咀嚼嚥下 呼吸機能 メタゲノム解析

### 1. 研究開始当初の背景

マウスやラットを用いた研究は生命科学の発展に大きく貢献してきたが、霊長類のように高度な知的活動を支える高次脳機能を持たないため、齧歯類で得られた成果をヒトへ外挿するには限界があり、霊長類を使った研究が不可欠である。従来はマカカ属サル等が用いられてきたが、供給数に限界があるため、旺盛な繁殖力をもつヒトと同じ真猿類に属する小型コモンマーモセットが注目され、平成24年文科省省令によりコモンマーモセットを使用した研究推進が推奨されている。研究代表者らは、国内最大のマーモセット民間飼養施設でコモンマーモセットを用いた産学共同研究で、咀嚼・嚥下、顎運動 (Zereto et al., 2015)、姿勢と運動能力 (Watahiki et al., 2016) など、生後の成長発育に伴う身体機能を含む初めての小児歯科的研究を行っている。現在、研究代表者の専用ラボでは若年層(1歳未満)が10頭、高齢層(12歳以上)が10頭、新たな研究用に確保できている。JAXAの協力を得て、平成24年度科研究費助成により、X線3D動画撮影集音システムの開発に成功し、顎骨・歯周組織、顎運動・咬合、咀嚼・嚥下、呼吸・発声などの様々な機能の観察が可能となり (Kumei et al., 2014)、マーモセットを用いたヒト老化モデルの歯科研究を行う準備は整っている。

### 2. 研究の目的

- (1) 高齢コモンマーモセットにおいて、顎骨、歯周組織、顎運動・咬合、咀嚼・嚥下、呼吸・発声などの老化を形態学的に明らかにする。
- (2) コモンマーモセットの口腔機能の老化について、歯周病をモデルとして口腔内細菌叢に注目し、背景にある口腔内マイクロ環境と全身性疾患との関連を明らかにする。
- (3) 老化と行動について社会との関連を調べ、ヒト高齢者モデルとして高齢コモンマーモセットの有用性を評価する。

### 3. 研究の方法

- (1) 2年間を通して研究対象として、高齢コモンマーモセット(雌雄各5:平均年齢14.4±3.5歳)および比較対照として若年マーモセット計10頭(雌雄各5:平均年齢1.1±0.07歳)、霊長類の検証対照としてヒト(男女各4:平均年齢45.0±8.0歳)を専用ラボで飼育する。
- (2) 高齢コモンマーモセットを非拘束状態で三次元X線動画撮像(1000fps または30fps)し、各frame上で、顎運動、咀嚼・嚥下、呼吸について若年対照と比較解析する。
- (3) 一般的な歯科診断(現存歯数、齲蝕、歯肉炎、プラークおよび歯石の付着状況など)に加え、唾液中の細菌叢のヒトとの種差について比較解析を行った。採取した唾液から核

酸DNAを抽出し、16S-rRNA領域を増幅したPCR産物をもとに、次世代シーケンサーを用いて大量の塩基配列を取得し、データベースに対する相同性検索および系統分類解析を行なった。シーケンスライブラリを作成し、得られた塩基配列データを基にして細菌叢プロファイルを作成し、サンプル間のプロファイル比較解析を行なった。

Subject ID	age	gender M: 1 F: 2	teeth present	bleeding		gingivitis no: 0 yes: 1 severe: 2	caries
				1: induced bleeding	2: bleeding		
human							
h-1	41	1	28	1	1	1	0
h-2	49	1	27	1	1	1	0
h-3	61	1	25	1	1	1	2
h-4	37	2	24	1	1	1	0
h-5	42	2	28	0	0	0	0
h-6	42	2	24	1	1	1	0
h-7	38	1	28	0	0	0	0
h-8	51	2	20	1	1	1	0
marmoset							
m-1	12	2	13	0	1	1	3
m-2	12	2	23	0	1	1	1
m-3	15	2	23	0	1	1	2
m-4	12	2	12	1	2	2	4
m-5	10	1	19	0	2	2	1
m-6	12	1	16	0	2	2	1
m-7	15	1	13	2	1	1	2
m-8	18	1	20	0	2	2	4

表1. 研究試料(コモンマーモセットおよびヒト)の口腔内健康状態

### 4. 研究成果

(1) コモンマーモセット頭頸部のX線動画画像若年(図左、2歳)および高齢(図右、22歳)のコモンマーモセットにおいて、残存歯牙、頭蓋骨形状および顔面の凹凸などの解剖学的構造に顕著な違いが認められた(図1)。

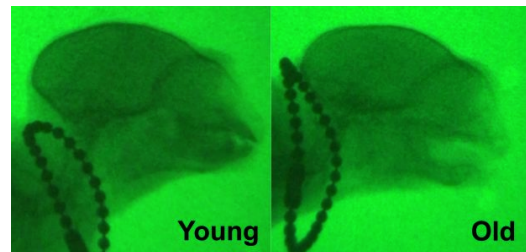


図1. コモンマーモセットの頭頸部X線動画画像

(2) コモンマーモセットの咀嚼・嚥下高齢コモンマーモセット(16歳、図右)と若年コモンマーモセット(2歳、図左)にマッシュマロおよびカステラを給餌し、非拘束状態での咀嚼運動をX線動画撮影した。

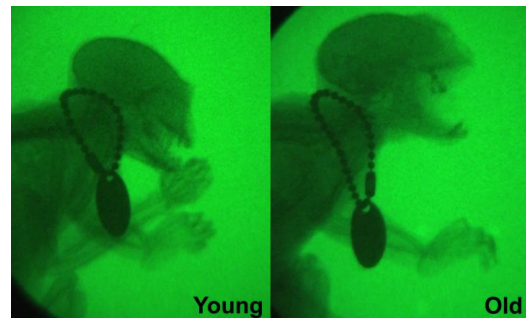


図2. コモンマーモセットの摂食時X線動画画像

カステラの摂食は若年コモンマーモセットと高齢とで差はなかった。しかし、マシュマロの摂食については、若年ではマシュマロを手に保持し、少量ずつ噛み切って咀嚼し咽頭に移送したのに対し、高齢コモンマーモセットでは、大口を開け、一口でマシュマロの全塊を摂食し、咀嚼する傾向が観察された。また、年齢に関係なく、マシュマロを噛みちぎって摂食するよりも、柔らかい少量のカステラを片手に保持し、摂食するのがわかった (Rezende, Zereto, et al., 2018)。

一般的に高齢者では、歯牙欠損や顎・舌運動機能の低下や唾液分泌量の減少、味覚や口腔内感覚の低下、などの諸要因によって咀嚼能力が低下し、さらに咽頭・食道への食べ物の送り込みが遅くなる、といわれている。本研究で用いた X 線動画上では、老齡マーモセットでの食物摂取(嚥下第 1 期)～咽頭(嚥下第 2 期)～食道(嚥下第 3 期)に至る過程が明瞭に示され、食塊の咽頭通過時間が若年マーモセットに比べて有意に延長されることがわかった。その原因として、安静時喉頭位の下垂や嚥下時の喉頭挙上十分でないことが X 線動画上で確認された。

### (3) コモンマーモセットの呼吸機能

高齢者や寝たきり患者では、口腔内の清潔が十分に維持されないため、口腔内で細菌が増殖する。通常、呼吸機能検査では、スパイロメトリによって呼気量と吸気量が測定され、肺活量などで呼吸機能が評価される。一般的に、高齢者や寝たきり患者では嚥下・呼吸機能が低下しており、本来は口腔から食道へ入るべきものが気管に入り、肺炎球菌や口腔内の常在菌(嫌気性菌が原因となることが多い)によって誤嚥性肺炎が誘発され、予後不良で死に至ることも少なくない。これまでは呼吸機能の画像的評価は呼気時、吸気時の三次元 CT をもとに、これに時間軸方向の情報を加えて四次元 CT 画像としてシミュレーションを行なった横隔膜運動モデルが報告されている (Bourne et al., 2008; Ookura et al., 2013)。

しかし、呼吸機能での主要な役割を演じているのは横隔膜運動であり、その運動を注意深く解析することで呼吸器系の病態を正確に把握することが可能となる。我々は、二方向からの X 線照射によって得られる画像を高速カメラ (1000fps) またはビデオカメラ (30fps) で撮像し、X 線動画として編集するシステムを開発し (Kumei et al., 2014)、CT 画像では困難な、非拘束状態での横隔膜運動を記録した (Campos et al., 2017)。本研究では、この X 線動画システムを用いて、高齢および若年コモンマーモセットの横隔膜運動を X 線動画として撮像し、加齢にともなう呼吸機能

変化の実態を画像上で明らかにした。横隔膜は、胸郭下口に位置する厚さ数 mm のドーム状の筋肉質膜であり、吸気時にはドーム天井が下降し、上部にある肺の容積を拡大させ、呼気時には収縮していた筋線維が弛緩することによって、ドーム天井が逆に上昇し、肺の容積を縮小する。

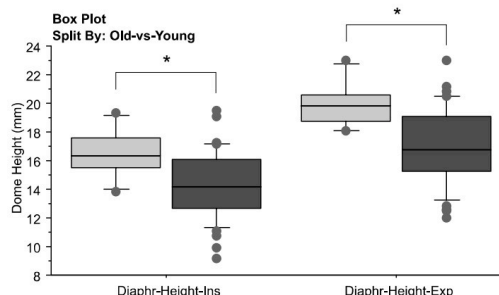


図 3. コモンマーモセットの横隔膜運動：最大吸気時および最大呼気時

非拘束状態で高齢および若年のコモンマーモセットを X 線動画撮像し (30 fps)、横隔膜運動について frame-to-frame 解析を行なった。最大吸気時および最大呼気時いずれも、高齢マーモセットの横隔膜ドーム天井の高さは若年対照に比較して有意に低い ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney U-test) (図 3)。また最大吸気時と最大呼気時との横隔膜ドーム天井間の距離(横隔膜の運動範囲)については、高齢マーモセットは若年対照に比べて、有意に小さい ( $p < 0.01$ ) (図 4)。

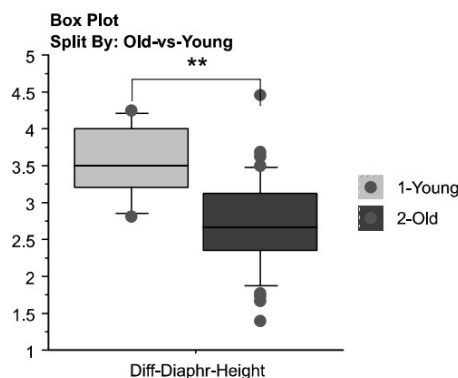


図 4. コモンマーモセットの横隔膜運動：最大吸気と最大呼気との運動範囲

Box-whisker-plot 図は、いわゆる五数要約 (five-number-summary) と呼ばれる強固な要約統計量で表されたグラフであり、低い方から順に、最小値 (minimum 10%)、第 1 四分位点 (25% lower quartile)、中央値 (median)、第 3 四分位点 (75% upper quartile)、最大値 (maximum 90%) が示されている。また、最小値および最大値より 10% を超える低値および高値については個別に表示してある。



(4) 口腔内フローラ: 加齢と歯周病と全身疾患

口腔内には500種以上の細菌が生息しているといわれており、多種多様な細菌が腸内フローラと同様に細菌叢（口腔内フローラ）を形成している（図5）。しかし、口腔内フローラが腸内フローラと異なり、細菌が口腔組織を介して簡単に血管系に侵入し、全身に拡散する危険性が高い。圧倒的な罹患率をもつ国民病ともいべき歯周病では、歯と歯肉の境界に付着したプラーク（歯垢）に密集している細菌の活動によって、歯肉腫脹、歯周ポケットが形成され、歯肉・歯槽骨損壊を継続的に拡大していくとともに、そこから侵入した細菌が血管系を介して全身性に拡がる。最近では、歯周病による動脈硬化、心筋梗塞、脳卒中、糖尿病、認知症などの全身性疾患誘発の危険性も指摘されるようになってきた。また、高齢者に頻発する誤嚥性肺炎についても口腔内細菌の関与が強く疑われている。歯肉炎など歯周病症状の潜在的誘導性の細菌として、ヒトとマウスに共通の細菌および種特有の細菌などが確認され、口腔内細菌の多様性が認められた（図6）。

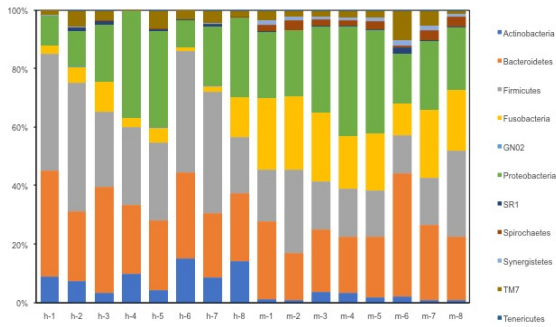


図 5. 口腔細菌叢: コモンマウスとヒト

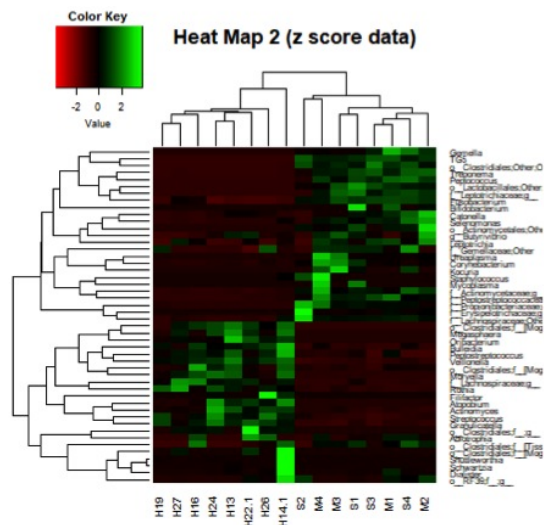


図 6. 口腔細菌叢: コモンマウスとヒトとの相関とヒートマップ

細菌は、海や河川、土壌や大気中、ヒトや動物の腸内、口腔内、皮膚、さらに高温・低温などの極限環境にも細菌の存在が確認されている。個々の細菌間の相互作用のみならず、群集（細菌叢）として環境と相互作用し、環境恒常性の維持に関わっている。このような細菌叢と環境との相互作用を明らかにするためには、細菌叢についての詳細な情報が必要となる。近年、細菌叢をそのまま集団として、環境中の細菌由来の膨大な DNA 情報をコンピューターによるメタゲノム解析手法を用いることで、細菌叢と環境との係わりが次第に明らかにされつつある。口腔内細菌についても、生体恒常性に関わる役割が、加速度的に解明されることが期待される。

本研究によって、ヒトと同じ歯列・歯牙数をもつコモンマウスにおいて、相互に関係する咀嚼嚥下や呼吸機能の詳細が明らかにされた。同時に、両種に共通する細菌および種特有の細菌なども明らかにされ、口腔内細菌の多様性が認められた。今後は、これらの情報をフルに活用して、高齢者歯科研究につなげていくことが重要な課題である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

①. Campos, P.S., Kawamura, L.R.S.M., Hasegawa, K., Kumei, Y., Zeredo, J.L.: Analysis of respiratory movements in a mouse model of late Parkinson's disease submitted to stress. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 査読有 251, 2018, 50-56. DOI: 10.1016/j.resp.2018.02.012.

〔学会発表〕（計 6 件）

①. Kumei, Y., Zeredo, Watahiki, R., Kagiya, K., Fukasawa, K., Baba, O., Natsume, K., Aou, S., Hashimoto, H., Ishioka, N., Inatomi, Y.: Common marmosets in Martian, Lunar, and zero gravity conditions. 25<sup>th</sup> ELGRA (Juan-les-Pins), 2017.

②. Campos, P. S., Kawamura, L. R. S. M., Hasegawa, K., Kumei, Y., Zeredo, J. L.: Cineradiographic analysis of respiratory movements in a murine model for late Parkinson's disease. *ATS Conference (Washington DC)*, 2017.

③. Campos, P. S., Hasegawa, K., Kumei, Y., Kawamura, L.R.S.M., Zeredo, J.L.: Cineradiographic analysis of respiratory movements in a murine model for late Parkinson's disease submitted to stress. 40<sup>th</sup> Jap. Neuroscience Soc. (Makuhari), 2017.

④. Kumei, Y., Zeredo, J. L., Watahiki, R., Kagiya, K., Hibino, H., Hattori, M., Fukasawa, K., Baba, O., Natsume, K., Aou, S., Hashimoto, H., Ishioka, N., Inatomi, Y.:

Common marmoset response and adaptation to partial gravity. 31st Space Utilization Sympo. (Sagamihara), 2016.

- ⑤. Kumei, Y., Zeredo, J. L., Watahiki, R., Hattori, M., Hibino, H., Kagiya, K., Fukasawa, K., Hashimoto, H., Ishioka, N., Inatomi, Y.: Motion sickness of common marmosets in Lunar and Martian gravity environments by parabolic flight. 32<sup>nd</sup> ASGSR (Cleveland), 2016.
- ⑥. Watahiki, R., Zeredo, J.L., Kagiya, K., Hashimoto, H., Ishioka, N., Inatomi, Y., Aou, S., Natsume, K., Baba, O., Kumei, Y.: Postural and Behavioral Response of Primates (Common Marmoset) to Martian, Lunar, and Zero Gravity Conditions. 32<sup>nd</sup> ASGSR (Cleveland), 2016.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桑井 康宏 (KUMEI, Yasuhiro)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合  
研究科・講師  
研究者番号：30161714

### (2) 研究分担者

馬場 麻人 (BABA, Oto)  
徳島大学  
大学院：医歯薬学研究部・教授  
研究者番号：90251545

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

水口 俊介 (MINAKUCHI, Shunsuke)  
東京医科歯科大学・  
大学院医歯学総合研究科・教授

竹原 祥子 (TAKEHARA, Sachiko)  
東京女子医科大学：医学部衛生学・  
特任助教

ゼレド ジョージ (ZEREDO, Jorge)  
国立ブラジリア大学・健康科学部・教授