

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09897

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによる剥離上皮膜を有する要介護高齢者の口腔と咽頭の細菌叢解析

研究課題名(英文) Analysis of microbial flora in the oral cavity and pharynx of elderly people requiring long-term care with membranous substances using formed in oral cavity by next-generation sequencer

研究代表者

小笠原 正 (Ogasawara, Tadashi)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

研究者番号：10167314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：舌と口蓋では、経管群が経口群より好気性菌が多い傾向がみられ、経管群の咽頭では嫌気性菌が少ない傾向がみられ、3つの部位ともに経管群の多様性は低かった。また経口群は、舌、口蓋、咽頭で部位特異性がみられたが、経管群では舌、口蓋、咽頭の上位優占菌種は同一であり、Neisseria、Streptococcus、Rothiaが占めて、部位の多様性にも有意な差がなかった。経管群における剥離上皮膜の有無で口蓋の細菌叢の多様性に有意差がなかったが、経口群よりも10%以上高い比率を占めた細菌種が存在した。日和見感染菌であるNeisseria flavescensは、時間経過により比率が増加する傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔乾燥により形成される剥離上皮膜の存在する口腔環境が口腔細菌叢に影響を与えていたことが認められた。経管群の細菌叢は経口群と全体的に大きな違いがないが、一部の細菌種の増加があり、N. flavescensとStreptococcus agalactiae (GBS) が有意に多くみられ、経口群より15%以上多かった。N. flavescens は呼吸器感染の起炎菌として、GBSは衰弱高者に独占的にみられるとされ、GBS肺炎の起炎菌として知られている。口腔細菌の観点からも経過栄養者の呼吸器感染を予防するために剥離上皮膜の形成予防が重要であることを示唆する結果であった。

研究成果の概要(英文)：In the tongue and palate, the tube feeding group tended to have more aerobic bacteria than the oral intake group. The biodiversity of the tube feeding group was lower than that of the oral intake group at all three sites. In the transluminal group, the top three dominant bacterial species in the tongue, palate, and pharynx, Neisseria, Streptococcus, and Rothia were the same. In the tube feeding group, there was no significant difference in the diversity of the three sites, and no site specificity was observed.

There was no difference in the biodiversity of the palatal bacterial flora based on the presence or absence of oral membranous substances in the tube feeding group. In the ratio of Neisseria flavescens and Streptococcus agalactiae, the presence of oral membranous substances were 10% higher than the absence. Oral membranous substances affected the bacterial flora of the tube feeding group. The proportion of Neisseria flavescens tended to increase over time.

研究分野：障害者歯科

キーワード：経管栄養 剥離上皮膜 細菌叢 次世代シーケンサー 要介護高齢者 好気性菌

1. 研究開始当初の背景

経管栄養法は経口摂取が困難な要介護高齢者の栄養維持のために広く用いられており、米国では、進行した認知症の老人ホーム入居者の約 3 分の 1 が経管栄養を受けているとされる¹⁾。経管栄養の者は、口で食べていない、会話ができないなどにより、舌が動かず、唾液が口腔粘膜に湿潤せず、口腔粘膜が乾燥する結果、口腔粘膜や歯面に膜状物質が形成されることがある。経管栄養患者では、口蓋で 40.0%、舌背は 42.5%、歯面は 20%、頬粘膜は 17.5%の者に観察されたとする報告がある^{1, 2)}。さらに口腔に剥離上皮膜がある者のうち 70%の者が咽頭粘膜上に剥離上皮膜が観察されている³⁾。剥離上皮膜は、重層扁平上皮由来の角質変性物と唾液のムチンが主体となり、部分的に炎症性細胞や細菌の集積を認めるものである^{4, 5)}。剥離上皮膜の一部は、口腔粘膜と結合しており、剥離上皮膜の除去時に出血する可能性がある。また剥離上皮膜の存在は、局所の感染、発音障害、かゆみ感、痛み、血行感染、誤嚥性肺炎の危険性があると思われる。さらに咽頭・喉頭に落下し、物理的に気道を閉塞し、呼吸抑制や窒息の危険性がある^{6, 7)}。また口腔は咽頭・喉頭と連続しており、細菌学的な影響があると思われる。経管栄養者の口腔内細菌叢として、舌苔から *Corynebacterium* 属、*Peptostreptococcus* 属、*Fusobacterium* 属などが経口摂取者より有意に多く検出されたとする報告⁸⁾や、口蓋・舌・咽頭から *Streptococcus* 属、*Rothia* 属、*Neisseria* 属が経口摂取者と比べ有意に多く検出されたとの報告⁹⁾があり、経管栄養者の口腔内細菌叢は経口摂取者と異なる^{8, 9)}。剥離上皮膜と発熱との関連についての報告があるものの、剥離上皮膜が存在する口腔内の細菌叢については明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) 経口摂取者と経管栄養者の口蓋・舌・咽頭における細菌叢を次世代シーケンス 16S メタゲノム解析により比較検討するとともに、細菌叢に影響を与えている要因を主成分分析と相関比を用いて検索する。(2) 経管栄養者の患者背景および口腔内所見から発熱との関係を検索し、経管栄養者の発熱リスクを明らかにする。(3) 剥離上皮膜のみられる経管栄養者の口蓋細菌叢を明らかにするために、次世代シーケンサーを用いて剥離上皮膜の有無における口蓋細菌叢の比較検討を行うとともに、経管栄養者の口蓋細菌叢への影響する要因も探索した。(4) 剥離上皮膜を形成している経管栄養者における口腔粘膜ケア後の経過時間による細菌叢の変化を明らかにして、粘膜ケアのタイミングを検討する。

3. 研究の方法

(1) 対象は入院中の経管栄養者(胃瘻:経管群)は 20 名(80.2±7.3 歳) 経口摂取者(以下、経口群)は 19 名(86.2±11.5 歳)であった。細菌検体の採取は、口蓋、舌、咽頭後壁をスワブにて 20 回擦過した。次世代シーケンス 16S メタゲノム解析を行い、各種サンプルの塩基配列を解読し、細菌の種類と構成率を評価した。

(2) 調査対象者は、経管栄養(胃瘻)がなされ、口腔乾燥の臨床診断基準(柿木の分類) 12) 1 度以上の、一切経口摂取がされていない患者 16 名であった。発熱は、若杉らの報告 13) に準じて 37.5 以上とした。なお発熱については、尿路感染症、腸管感染症、皮膚感染症などの診断がついた場合を除いた。

(3) 調査対象者は、経管栄養（胃瘻）の要介護高齢者 18 名であった。次世代シーケンス・メタゲノム解析(16s rRNA の V3-V4 領域)を行った。各種サンプルの塩基配列を解読し、細菌の種類と検出率を評価した。

(4) 調査対象者は、経管栄養（胃瘻）の要介護高齢者 11 名であった。検体採取は、剥離上皮膜を除去するとともに口腔粘膜を清拭後に水を浸したスポンジブラシで口腔粘膜全体を擦拭した。その後、3 時間後、6 時間後、12 時間後、24 時間後、48 時間後に口蓋粘膜から検体を採取した。前述の通り次世代シーケンス・メタゲノム解析(16s rRNA の V3-V4 領域)を行った。

4. 研究成果

(1) 口蓋と咽頭では、経管群の多様性が有意に低かった。舌は、経管群 3.4 ± 0.7 、経口群 3.9 ± 0.8 であり、平均値で経管群が低かったが、有意差を認めなかった。経管群および経口群における口蓋・舌・咽頭の多様性は、部位間で有意差がなかった。経口群は、各部位で検出細菌の優占菌が異なり、部位特異性が認められた。しかし、経管群の口蓋、舌、咽頭の細菌叢は共通しており、Neisseria 属、Streptococcus 属、Rothia 属が優占菌種であり、好気性菌の構成比率が有意に高かった。つまり経管群の咽頭の細菌叢は、口蓋と舌の細菌叢と同様に優占菌種の構成率順位が同じであり、経管群は、酸素の影響が口腔内だけでなく、咽頭まで影響し、細菌叢を規定していることを示していた。主成分分析の結果、3 部位ともに経管群と経口群の細菌叢は明らかに異なっていた。経管・経口が細菌叢を規定する独立した要因として認められた。

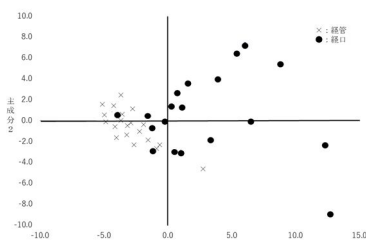


図1. 口蓋：主成分分析による細菌叢からみたサンプルの類似性
寄与率：第1主成分 21.3%、第2主成分 14.9%

主成分分析によるサンプル荷点			
	第1主成分	第2主成分	
経管	2.9 ± 1.6	0.6 ± 3.9	$P=0.30$
経口	-3.8 ± 1.3	0.7 ± 2.2	$P=0.15$

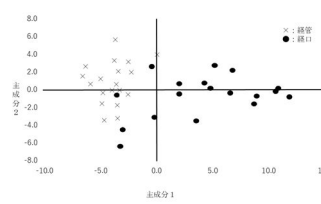


図2. 舌：主成分分析による細菌叢からみたサンプルの類似性
寄与率：第1主成分 32.7%、第2主成分 14.9%

主成分分析によるサンプル荷点			
	第1主成分	第2主成分	
経管	-3.8 ± 1.3	0.7 ± 2.2	$P=0.15$
経口	3.8 ± 1.1	-0.7 ± 2.3	

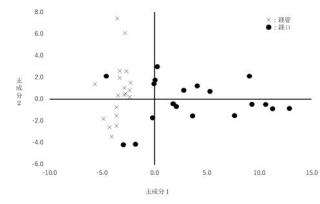


図3. 咽頭：主成分分析による細菌叢からみたサンプルの類似性
寄与率：第1主成分 26.7%、第2主成分 14.9%

主成分分析によるサンプル荷点			
	第1主成分	第2主成分	
経管	-3.8 ± 1.7	0.3 ± 1.4	$P=0.99$
経口	0.7 ± 1.1	-0.2 ± 1.0	

(2) 過去 6 か月以内の発熱者は 7 名であった。調査対象者全員が義歯を使用していなかった。性別、年齢、寝たきり度、意識レベル (JCS)、意思疎通、基礎疾患、および残存歯、う蝕歯、歯周疾患、CPI と発熱との関連は、統計学的に有意な差は得られなかった。高齢者の発熱原因として最も多いのは感染症¹⁰⁾であるとされるが、在宅療養支援診療所において高齢者が発熱した場合、クーリング、解熱剤や抗菌薬の投与で改善し、精査・治療のための受診は少なく、確定診断がなされないことが多い¹¹⁾。今回の結果で発熱と関連が認められたのは、剥離上皮膜のみであり、ほかの口腔内所見は発熱との関連性は認められなかった。経管栄養者の発熱の予防には、剥離上皮膜が形成されない環境の維持が重要であり、粘膜ケアの重要性が示唆された。

(3) 検出された全細菌は 265 菌種であった。平均 0.1% 以上検出された細菌種は 58 菌種であり、そのうち Neisseria 属は 29.42%、Streptococcus 属が 18.98%、Rothia 属が 17.53% と、上位 3 菌属で全体の約 65% を占める結果となった。すべての細菌種の中で、最も多く検出されたのは、平均検出率が 18.08% の Neisseria flavescens であった。以下、Rothia

mucilaginoso (平均検出率 17.53%)、Streptococcus sp.oral taxon 058 (9.70%)、Streptococcus agalactiae (9.28%)、Neisseria sp.oral taxon 020 (6.24%) の順で5%以上の検出率であった。Streptococcus agalactiae、Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii、Haemophilus parainfluenzae、Dialister microaerophilus が剥離上皮膜あり群に有意に多く検出された。

主座標分析により得られた散布図の累積寄与率は58%であった。細菌叢からみた剥離上皮膜あり群は、主に第2象限、第3象限、第4象限に広く分布していることが認められた。剥離上皮膜なし群の細菌叢は集積し、あり群は広く分布しているが、一部、なし群と重なっていた。これは、剥離上皮膜なし群の細菌叢が、口腔乾燥の悪化に伴い、移行的に剥離上皮膜あり群の細菌叢に変化していくことを示していた。主座標分析の第一主成分の付与得点から各項目との相関比を求めた結果、有意な相関比を得られたのが「剥離上皮膜」($r=0.3401$ 、 $p=0.0111$)、「性別」($r=0.3331$ 、 $p=0.0121$)であった。その他の要因は有意な相関比が得られなかった。細菌叢の多様性と酸素要求別の細菌検出率に有意差が認められなかったことから剥離上皮膜の存在により一部の細菌の比率が変化し、他の多くの細菌は大きな変化を認めなかった。

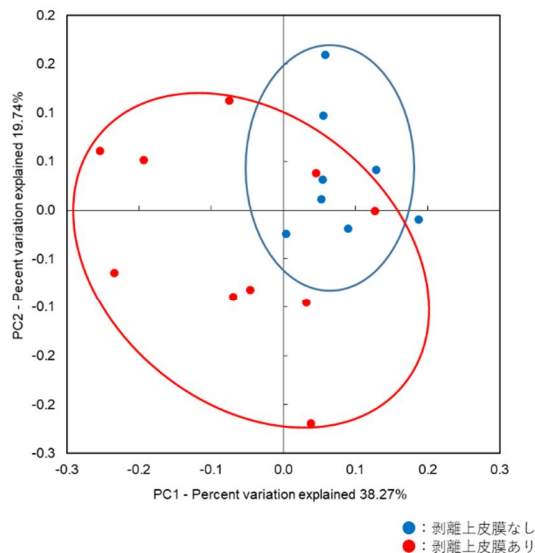


図4. 剥離上皮膜あり／なし群における細菌叢の類似性 (主座標分析: 累積寄与率 58%)

Neisseria flavescens と Streptococcus agalactiae (GBS) が経口群よりも10%以上有意に高い比率を占めた。N. flavescens は日和見感染菌であり、心内膜炎、髄膜炎、敗血症、呼吸器感染症、泌尿器感染症の原因菌である GBS は、経口摂取者で確認されるのは稀であるが、経管栄養者では高い比率で検出され、GBS 肺炎として衰弱高齢者にほぼ独占的に起こる¹²⁾。これらの細菌は、経管栄養者の健康を脅かす危険性があることから、剥離上皮膜の形成予防が重要と判断できた。

(4) 口腔粘膜を清拭した後、6時間後までは比率が減少し、その後増加傾向を認めたのが Corynebacterium;s であった。6時間後まで減少し、24時間後まで増加し、48時間に再び減少したのが Rothia;s と Prevotella;s であった。6時間まで粘膜ケアの効果は認められたが、その後上昇が認められ、24時間後には明確な増加となった。粘膜ケアは、6~12時間毎に実施するのが望ましいと考えられた。

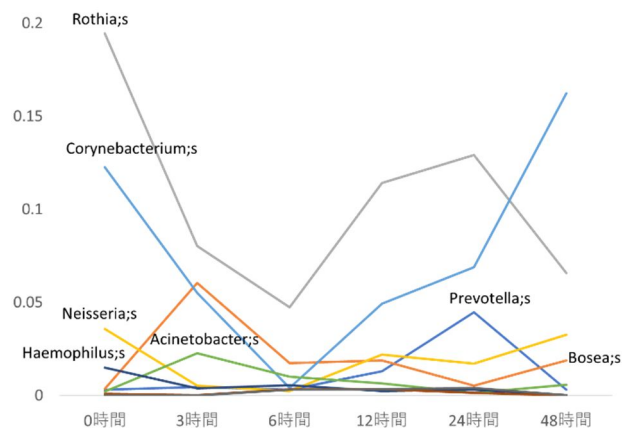


図5. 時間経過による細菌種の変化

- 1) Kawase Y, Ogasawara T, Kawase S, *et al.* Factors affecting the formation of membranous substances in the palates of elderly persons requiring nursing care. *Gerodontology*. 2014 ; 31 : 184-193.
- 2) 小笠原 正, 川瀬 ゆか, 磯野 員達, 他. 要介護高齢者における剥離上皮の形成要因—舌背, 歯, 頬粘膜—. *老年歯誌*. 2014;29(1):11-20.
- 3) 篠塚 功一, 小笠原 正, 岩崎 仁史, 他. 経管栄養の要介護者にみられる咽頭付着物の形成要因. *障歯誌* 2016 ; 37 : 22-27.
- 4) Shen FC, Ogasawara T, Shinotsuka K, *et al.* Histopathological evaluation of oral membranous substance in bedridden elderly persons without oral intake in Japan. *Gerodontology* 2019 ; 36 : 63-70.
- 5) Kohta M, Tadashi O, Hiromasa H, *et al.* Pharyngeal Deposits Comprising Salivary Mucin in Tube-fed Elderly Patients: MUC2 and MUC7 Immunoreactivity. *Dysphagia*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00455-020-10202-2>.
- 6) Joseph, A. P. Case Study: Asphyxia Caused by Inspissated Oral and Nasopharyngeal Secretions. *Am J Nurs*. 2009 ; 109 : 38-43.
- 7) Masao C. A case of airway obstruction due to aspiration of oral mucosal residue. *J Jpn Broncho-Esophagol Soc*. 2014;65:485-88.
- 8) Takeshita T, Yasui M, Tomioka M, *et al.* Enteral tube feeding alters the oral indigenous microbiota in elderly adults. *Appl. Environ. Microbiol*. 2011 ; 77 : 6739-6745.
- 9) 秋枝 俊江, 小笠原 正, 朝比奈 滉直, 他. 経管栄養患者と経口摂取者の口腔・咽頭細菌叢の検索—次世代シーケンスによる解析—. *障歯誌* . 2020 : 41 ; 287-298
- 10) 齋木 実. 発熱. *月刊薬事* . 2019 ; 61(15) : 2807-2811 .
- 11) 近藤 靖子, 近藤 精二, 北川 千裕, 他. 高齢者の高熱症例—治療と経過—. *癌と化学療法* . 2011 ; 38 : 34-36.
- 12) Morven S. Edwards, Carol J. Baker. Group B Streptococcal Infections in Elderly Adults. *Clinical Infectious Diseases*. 2005 ; 41:839-847.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 朝比奈 滉直, 小笠原 正, 秋枝 俊江, 宮原 康太, 松村 康平, 荘司 舞, 島田 茂, 島田 裳彩, 柿木 保明	4. 巻 41
2. 論文標題 経管栄養の要介護高齢者の発熱と口腔内状態	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本障害者歯科学雑誌	6. 最初と最後の頁 375, 381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 秋枝 俊江, 小笠原 正, 朝比奈 滉直, 宮原 康太, 松村 康平, 荘司 舞, 島田 茂, 島田 裳彩, 谷口 誠, 吉田 明弘	4. 巻 41
2. 論文標題 経管栄養と経口摂取の要介護高齢者における口腔・咽頭細菌叢の次世代シーケンス解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本障害者歯科学雑誌	6. 最初と最後の頁 287, 298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 小笠原 正	4. 巻 81
2. 論文標題 保険導入された非経口摂取患者口腔粘膜処置の実際 ~ 剥離上皮膜の安全で効率的な除去方法 ~	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本歯科評論	6. 最初と最後の頁 81, 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 朝比奈 滉直, 秋枝 俊江, 宮原 康太, 島田 勝光, 谷口 誠, 松村 康平, 柿木 保明, 小笠原 正, 植松 紳一郎, 那須 小夢樹, 木村 莉子, 黒田 たまき
2. 発表標題 経管栄養患者における剥離上皮膜と口腔細菌叢 次世代シーケンスによる解析
3. 学会等名 第36回日本障害者歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 朝比奈 滉直, 秋枝 俊江, 朝比奈 伯明, 石原 紀彰, 樋口 雄大, 望月 慎恭, はい鳥 弘之, 小笠原 正
2. 発表標題 経管栄養患者における剥離上皮膜と口腔細菌叢
3. 学会等名 第30回日本老年歯科医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 朝比奈滉直、秋枝 俊江、宮原 康太、谷口 誠、松村 康平、吉田 明弘、小笠原 正
2. 発表標題 経管栄養患者における 剥離上皮膜と口腔細菌叢
3. 学会等名 第102回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hironao Asahina, Kota Miyahara, Noriyasu Mochizuki, Hiroyuki haishima, Makoto Taniguchi, Yasuaki Kakinoki, Akihiro Yoshida, Tadashi Ogasawara
2. 発表標題 Relationship between oral bacterial flora and membranous substances in the palates of bedridden elderly persons with tube feeding
3. 学会等名 Asia Association for Disability and Oral Health in Taiwan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋枝 俊江, 宮原 康太, 磯野 員達, 松村 康平, 黒田 たまき, 木村 莉子, 那須 小夢樹, 島田 茂, 植松 紳一郎, 安東 信行, 谷口 誠, 小笠原 正
2. 発表標題 経管栄養患者と経口摂取者の口腔・咽頭細菌叢の検索 次世代シーケンスによる解析
3. 学会等名 日本障害者歯科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hironao Asahina, Kota Miyahara, Noriyasu Mochizuki, Hiroyuki haishima, Makoto Taniguchi, Yasuaki Kakinoki, Akihiro Yoshida, Hiromasa Hasaegawa, Yoshiyuki Okada, Tadashi Ogasawara
2. 発表標題 Relationship between oral bacterial flora and membranous substances on the palates of bedridden elderly people with tube feeding
3. 学会等名 The first Asia Association for Disability and Oral Health, Kaohsiung, Taiwan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshie Akieda, Hironao Asahina, Kouta Miyahara, Norihisa Mochizuki, Hiroyuki Haishima, Makoto Taniguchi, Yasuaki Kakinoki, Akihiro Yoshida, Hiromasa Hasegawa, Tadashi Ogasawar
2. 発表標題 Plate, tongue and pharyngeal flora of patient with tube feeding. Analysis by Next Generation Sequence
3. 学会等名 The first Asia Association for Disability and Oral Health, Kaohsiung, Taiwan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 朝比奈 滉直、秋枝俊江、朝比奈伯明、石原紀彰、樋口雄大、望月慎恭、配島弘之、谷口 誠、小笠原 正
2. 発表標題 経管栄養患者における剥離上皮膜と口腔細菌叢 次世代シーケンスによる解析
3. 学会等名 一般社団法人日本老年歯科医学会第30回学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 阪口英夫 柿木保明 小笠原 正 齋藤しのぶ	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 96
3. 書名 デンタルハイジーンBOOKS はじめて学ぶ 非経口摂取患者の口腔衛生管理 ~要介護から人生の最終段階まで~	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柿木 保明 (KAKINOKI YASUAKI) (10420762)	九州歯科大学・歯学部・教授 (27102)	
研究分担者	吉田 明弘 (YOSHIDA AKIHIRO) (20364151)	松本歯科大学・歯学部・教授 (33602)	
研究分担者	長谷川 博雅 (HASEGAWA HIROMASA) (60164828)	松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授 (33602)	
研究分担者	岡田 芳幸 (OKADA YOSHIYUKI) (70566661)	広島大学・病院(歯)・教授 (15401)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	朝比奈 滉直 (ASAHINA HIRONAO)	. (33602)	
研究協力者	秋枝 俊江 (AKIEDA TOSHIE)	 (33602)	
研究協力者	宮原 康太 (MIYAHARA KOHTA)	 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------