

令和 6 年 5 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19606

研究課題名（和文）崩壊した口腔常在微生物叢を占有する外来性定着種の網羅的特定と予後への影響の解明

研究課題名（英文）Understanding of disrupted oral microbiota colonized by non-oral taxa and its association with host's health conditions

研究代表者

竹下 徹（Takeshita, Toru）

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：50546471

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により造血細胞移植患者でみられる口腔常在微生物叢の破綻の詳細が移植周術期における経過を含めて明らかとなった。また高齢者の口腔微生物叢に異常定着を引き起こしうる菌種を特定し、それらの定着と全身状態との関連の存在についても明らかにした。以上の結果から有病者や脆弱高齢者においては口腔が通常想定されていない細菌の全身への供給源となり得ることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は全身状態の悪化した者において口腔が病原微生物のリザーバーとなっている事例を示すとともに、感染防御における正常口腔常在微生物叢の重要性を示すものである。今後口腔常在微生物叢を正常に保つ手法を確立できれば口腔微生物叢のモニタリングと積極的介入に基づく新しい感染防御システムの構築に繋がっていく可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study revealed details of compositional shift in oral indigenous microbiota of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation patients. We also identified non-oral bacterial taxa colonizing disrupted oral microbiota in frail elderly adults and an association between their colonization and the hosts' health status. These results suggest that oral cavity could be a reservoir of unexpected bacterial taxa in compromised patients and frail elderly adults.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：口腔常在微生物叢 16S rRNA 舌苔 異常定着

1. 研究開始当初の背景

口腔では多様ながら一定の組み合わせの菌種群が安定な常在微生物叢を構築し侵入する外来種の定着を妨げている。一方でバリアとなる常在微生物叢が崩壊した口腔生態系についての情報はほとんどない。侵入・定着した思いもよらぬ微生物が腸管や呼吸器に持続的に供給されることで宿主に想定外の影響を与えている可能性は十分にある。我々は本研究開始前に周術期口腔管理に関する調査に携わり、造血細胞移植前処置を受けた多くの患者で通常の口腔では検出されない菌種が舌苔微生物叢を占有していることを明らかにした。加えてそのうち移植当日に *Staphylococcus haemolyticus* 等二菌種のいずれかが検出された患者の1年生存率は3割程度と極めて低く、検出されなかった者の半分に満たなかった。この結果は崩壊した口腔常在微生物叢に侵入した想定外の微生物が致命的な影響を与えている可能性を示した。とはいえこの研究は小規模な横断研究に過ぎず、同様の常在微生物叢崩壊は過去に要介護高齢者でも認められている。従って有病者や脆弱高齢者においてこのような致死的事例がまだまだ見落とされている可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの調査で常在微生物叢の崩壊事例が認められた造血細胞移植患者と要介護高齢者に焦点を絞り、高解像度微生物群集解析法を用いて崩壊した口腔常在微生物叢を占有する外来性定着種を網羅的に把握することを目指した。造血細胞移植患者については破綻した微生物叢の移植前後の経時変動についても理解を目指すとともに、微生物叢構成と予後との関連を検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 造血細胞移植患者における口腔微生物叢の破綻についての調査・分析

九州大学病院にて造血細胞移植を受ける患者20名から入院後移植前処置前に歯科受診を行った際に本研究への参加について同意を取得したのち、舌中央部から舌苔検体を採取した。同じ患者から移植当日と移植3週後に同様の方法で舌苔検体を採取し微生物叢構成の変化を追跡した。舌苔の細菌構成解析は検体から微生物群集DNAを抽出したのちPCR法を用いて細菌16S rRNA遺伝子V1-V2領域を網羅的に増幅し、次世代シーケンサーIon GeneStudio S5 (Thermo Fisher Scientific社)を用いて塩基配列を決定することで行った。加えて細菌16S rRNA遺伝子全長を網羅的に増幅し、次々世代ロングリードシーケンサーPacBio Revio (PacBio社)を用いて塩基配列を決定し高精度に菌種を同定した。菌種同定の際に口腔周囲常在細菌の塩基配列データベース expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD) に登録されている菌種のうち登録されている「Body_Site」が「Oral」に該当するものを口腔常在菌としそれ以外のものを外来由来菌として抽出した。また移植日から数日以内に対象者の肛門スワブ検体を取得し、舌苔検体と同様に16S rRNA遺伝子を利用する細菌群集解析法を用いて細菌構成を決定した。舌苔細菌構成と肛門スワブ検体の細菌構成を比較することで飲み込まれた口腔微生物の腸管への移行について検討した。加えて移植当日には舌苔微生物叢解析用の検体とともに舌苔スワブ検体を採取し培地に塗布し菌体の取得を試みた。

(2) 高齢者における口腔微生物叢の破綻についての調査・分析

高齢者については過去の調査にて採取した施設入所高齢者325名の舌苔の細菌構成を上述の方法にて再解析し、造血細胞移植患者同様に通常口腔ではみられない細菌種の有無を探索した。造血細胞移植患者と同様に菌種同定の際に口腔周囲常在細菌の塩基配列データベース expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD) に登録されている菌種のうち登録されている「Body_Site」が「Oral」に該当するものを口腔常在菌とし、それ以外のものを外来由来菌として抽出した。

4. 研究成果

(1) 造血細胞移植患者における口腔微生物叢の破綻についての調査・分析

造血細胞移植患者の移植当日の舌苔からは次世代シーケンサーおよび次々世代ロングリードシーケンサーのいずれを用いた網羅的細菌群集解析でも通常の口腔で大勢を占める常在細菌種の構成比率の減少と *S. haemolyticus* をはじめとする通常の口腔ではみられない細菌種の検出を認めた。我々の過去の報告同様に造血細胞移植患者の移植当日の口腔常在微生物叢の破綻が本調査においても確認された。

口腔常在微生物叢の破綻の過程について理解するため、移植前処置前、移植当日、移植3週後の経時変化について分析を行った。まず本調査で取得した舌苔の細菌構成を過去に行った健康者の舌苔細菌構成解析の結果と比較すると移植前処置前時点でその細菌構成に差異を認め、造血細胞移植患者では入院時点で既に舌苔微生物叢の細菌構成に変化が起きていることが示唆された。また、舌苔微生物叢の細菌構成は本研究で観察した移植周術期の期間中にも大きな変

動を認めた (図1)。特に入院後移植前処置前の舌苔では高い割合を占める *Neisseria perflava* は前処置後にほとんど検出を認めず、移植前処置として行われる放射線療法および化学療法により本菌の口腔での生息が困難になっていることが示唆された。同様に通常の口腔における

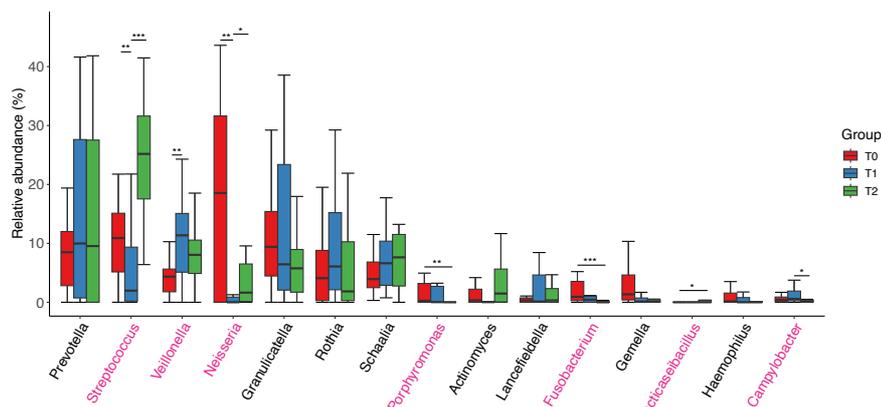


図1 造血細胞移植周術期の舌苔微生物叢の主要な細菌属の構成比率の変化
T0, 入院後移植前処置前; T1, 移植当日; T2, 移植3週後

優占種である *Streptococcus* 属、特に *Streptococcus salivarius* についても構成比率の減少を認めた。一方で *Prevotella*、*Granulicatella*、*Rothia*、*Schaalia* といった菌種は細菌構成比率の有意な減少を認めず、*Veillonella* については移植前処置前から移植当日にかけて構成比率が増加しており、放射線・化学療法の大きな影響を受けない菌種の存在も明らかとなった。移植当日と移植3週後の細菌構成を比較してみると、移植当日に構成比率が大きく減少していた *N. perflava*、*S. salivarius*、*S. parasanguinis* といった菌種の構成比率の増加を認め、口腔常在微生物叢が移植前処置により受けた影響から回復に向かっていることが示唆された。口腔以外に由来する菌種の構成比率も有意ではないものの減少していく傾向を認めた。一方で *Porphyromonas pasteri* や *Fusobacterium periodonticum* といった菌種の構成比率は入院時移植処置前と比べ有意に低く、造血細胞移植に関わる処置による影響は移植3週後にはまだ残っているとも考えられる結果となった。

本研究では移植当日に肛門スワブ検体についても取得しその細菌構成を決定した。本対象者における口腔で検出された菌種の腸管微生物叢における構成比率は最大でも2.5%とそれほど高くなかったものの多くの者で何らかの菌種の検出を認めた。また通常口腔に見られない菌種として舌苔微生物叢から検出された *S. haemolyticus* をはじめとする菌種のうちいくつかは肛門スワブ検体でも検出を認めたことから口腔に由来する細菌の腸管への移行が少なからず起きていることが示唆された。また移植当日の舌スワブ検体の培養によりブドウ球菌の菌体を取得した。

(2) 高齢者における口腔微生物叢の破綻についての調査・分析

施設入所高齢者の舌苔微生物叢はほとんどの者で *S. salivarius*、*Rothia mucilaginosa*、*Veillonella parvula* といった既知の口腔常在微生物種で構成されていた。一方で48名(14.7%)は口腔常在微生物に該当しない菌種が微生物叢の1%以上を占めており、そのうち23名(7.1%)は10%以上を占めていた。このような破綻した口腔常在微生物叢で高い割合を占めていないのは *Streptococcus agalactiae*、*Corynebacterium simulans*、*Actionomyces radidentis*、*Corynebacterium kroppenstedtii*、*Staphylococcus haemolyticus*、*Staphylococcus aureus* といった菌種であった。

こうした微生物叢を有する者は正常な微生物叢を有する者と残存歯数や義歯使用の有無に差は認めないものの、高齢で要介護度が高く、栄養状態が悪化している傾向を認めた。以上の結果から舌苔微生物叢の破綻と全身状態とのあいだの関連が明らかとなった。

(3) まとめ

本研究により造血細胞移植患者でみられる口腔常在微生物叢の破綻の詳細が移植周術期における変化の経過を含めて明らかになるとともに、常在微生物叢の破綻した口腔に定着した外来性とみられる細菌の腸管への移行の可能性が示された。また高齢者の舌苔微生物叢に異常定着を引き起こす菌種を特定し、それらの定着と全身状態との関連の存在についても明らかにした。以上の結果から有病者や脆弱高齢者においては口腔が通常想定されていない細菌の全身への供給源となりうることを示された。

<引用文献>

- ① Oku S, Takeshita T, Futatsuki T, Kageyama S, Asakawa M, Mori Y, Miyamoto T, Hata J, Ninomiya T, Kashiwazaki H, Yamashita Y. Disrupted tongue microbiota and detection of nonindigenous bacteria on the day of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. PLoS Pathog. 2020 Mar 9;16(3):e1008348.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 朝川美加李、竹下徹、影山伸哉、古田美智子、山下喜久
2. 発表標題 Relationship between tongue microbiota composition of elderly adultss and tooth loss
3. 学会等名 第96回日本細菌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹下徹
2. 発表標題 口腔と全身の健康増進に向けた正常な口腔常在微生物叢の理解
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹下徹
2. 発表標題 舌苔微生物叢の正常像と健康との関連
3. 学会等名 第91回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第64回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第69回日本化学療法学会西日本支部総会 合同学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹下徹
2. 発表標題 口腔常在微生物叢の正常像と健康に関わる異常
3. 学会等名 第74回日本細菌学会中国・四国支部総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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	森 康雄 (Mori Yasuo) (90573345)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究 分担者	奥 菜央理 (Oku Saori) (60898972)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	
研究 分担者	古田 美智子 (Furuta Michiko) (20509591)	九州大学・歯学研究院・准教授 (17102)	

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
---------	---------