

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17269

研究課題名（和文）地域住民における腸管への口腔細菌異所性定着とそのリスク因子の解明

研究課題名（英文）Translocation of oral bacteria to the gut in community-dwelling adults

研究代表者

影山 伸哉（Kageyama, Shinya）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：90822495

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では口腔細菌と腸内細菌の解析を行い、口腔細菌の腸管への移行や定着について検討を行なった。その結果、地域住民の腸管において口腔細菌が広範に検出されることが示された。また、腸管における口腔細菌比率の増加は加齢や歯垢の蓄積と関連することも明らかとなった。さらに、口腔細菌比率の高い腸管では、既知の病原細菌が増加し、有益な常在細菌が減少することも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、地域住民の腸管から口腔細菌が高解像度に同定された。本研究の成果は口腔細菌の腸管移行を制御することで疾患発症を予防する新たな歯科医療の確立につながる可能性を秘めている。今後は検体数を増やして、腸管の口腔細菌と腸内細菌の関係性、あるいは腸管の口腔細菌とその後の疾患リスクとの関連についてさらなる研究を進めていく。

研究成果の概要（英文）：This study examined oral and gut microbiota to verify the translocation of oral bacteria to the gut. The oral bacteria was extensively identified in the gut microbiota of community-dwelling adults and their total relative abundance was higher in older subjects or those with dental plaque accumulation. The enrichment of oral bacteria in the gut was associated with a decrease in beneficial and an increase in pathogenic bacteria.

研究分野：予防歯科学

キーワード：口腔マイクロバイオーム 腸管マイクロバイオーム ロングリードシーケンサー 16S rRNA 異所性定着

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

人体には膨大な数の細菌が存在し、それらが複雑な常在微生物叢(マイクロバイーム、MB)を構築している。近年、MB解析手法の急速な進歩によって、常在MBが宿主の健康に重要な役割を果たしていることが次々と報告され、常在細菌への関心は世界的に高まっている。特に、腸管MBは人体で最も主要な常在MBの一つであり、そのバランス異常(dysbiosis)は炎症性腸疾患や大腸がんなどの消化管疾患だけでなく、糖尿病や関節リウマチ、認知症など多様な全身疾患に関わると考えられている。

消化管の入り口に位置する口腔もまた常在細菌の主要なリザーバーの一つで、腸管とは異なるさまざまな細菌種が口腔MBを構築している。口腔MBがう蝕や歯周病などの口腔疾患に関わることは、これまで数多くの研究によって示されてきたが、我々が常に口腔細菌を唾液とともに飲み込んでいることから、現在口腔MBは全身への微生物の供給源、またそれに伴う遠隔部位の疾患発症のトリガーとしても注目を集めている。例えば、嚥下機能の低下した高齢者では、誤嚥により多量の口腔細菌が下気道に流れ込んでしまうが、*Prevotella* や *Veillonella* など一部の口腔細菌が肺の炎症を増強することが指摘されている。また申請者らも、高齢者施設の入所者を対象とした前向きコホート研究において、肺炎死亡のリスクを高める口腔MBの存在について明らかにしている。

一方、唾液とともに飲み込まれた口腔細菌のほとんどは、食道を経由して胃、腸管に運ばれる。一般に口腔細菌は、胃酸や胆汁酸によって腸管に到達する前に死滅することが想定されるが、最近では健康な人においても微量の口腔細菌が腸に到達することが指摘されている。そんな中、炎症性腸疾患や消化管がん、関節リウマチなど様々な疾患患者の腸管MBにおいて、特定の口腔細菌が高比率に検出されることが次々と報告され、これらの疾患の病因論における口腔細菌の関与が疑われるようになってきた。実際、一部の口腔細菌の腸管定着が腸管炎症を誘導することがマウスの実験から示唆されている。

このことから、口腔細菌の異所性定着を制御することが全身疾患の予防につながると期待されるが、口腔から腸管へ流入する細菌群の詳細や異所性定着のリスク因子など、その制御アプローチの基盤となるデータが圧倒的に不足しているのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、地域住民の腸管MBで検出される口腔細菌の比率や種類を把握し、口腔細菌の異所性定着に寄与する口腔・全身のリスク因子を同定することである。

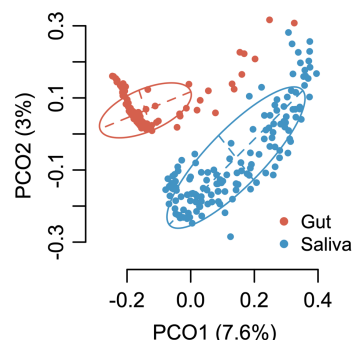
### 3. 研究の方法

本研究では、地域住民より採取した唾液検体と便検体を使用した。唾液検体(2017年)と便検体(2018年)をどちらも採取した1362人から、10歳刻みの節目年齢(40、50、60、70、または80歳)の計146名の検体を選出した。サンプルが不十分だった2人の被験者を除外し、最終的に144名の唾液検体と便検体を解析した。これらのサンプルから抽出されたDNAを鋳型とし、PCR法を用いて細菌16S rRNA遺伝子の全長(V1からV9まで全ての可変領域を含む)を網羅的に増幅した。プライマーには8塩基の検体識別用タグ配列を付与した8Fと1492Rプライマーを用いた。得られた増幅断片を精製した後、異なるタグ配列を持つ増幅断片を等濃度ずつ混合した。その後、混合された増幅断片の塩基配列をロングリードシーケンサーのPacBio Sequel II/IIeシステムにて解読した。解読した塩基配列から、Rスクリプトを用いて低品質の配列(断片長、クオリティスコア、プライマー配列の有無)を除外し、高品質の配列のみを選別した。解析ソフトウェアDADA2を用いて得られた高品質配列のエラー補正を行った後、expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD) や SILVA Database の配列データを用いて各サンプルに含まれる細菌種とその構成比率を決定した。

(図1) Bray-Curtis距離に基づくPCoAプロット

### 4. 研究成果

まず、主座標分析を用いて各検体の細菌構成を比較したところ、口腔MBと腸管MBの細菌構成は大きく異なることが確認できた(図1)。各MBの細菌構成を菌属レベルで確認すると、腸管MBでは*Bacteroides*属や*Faecalibacterium*属が優勢だったのに対し、口腔MBでは*Streptococcus*属や*Neisseria*属が高い比率を占めていた。一方、*Streptococcus*属と*Prevotella*属は口腔MBと腸管MBで共通して高い比率を占めており、腸管MBにおける口腔細菌の存在が窺われた。



そこで、腸管 MB における口腔細菌の占める割合を算出したところ、105 名 (72.9%) の対象者において、腸管 MB から自分の唾液中の口腔細菌が検出されていた (図 2)。また、口腔細菌が腸管 MB において占める割合は 0% から 63.1% と個人差が大きいことや、特に *Streptococcus salivarius* や *Streptococcus parasanguinis*、*Veillonella dispar* が腸管 MB で高い比率を占めることが明らかとなった。さらに、腸管 MB における口腔細菌比率の増加に影響を与える要因を探索したところ、加齢や歯垢の蓄積が口腔細菌比率の増加と有意に関連することも示された (図 3)。

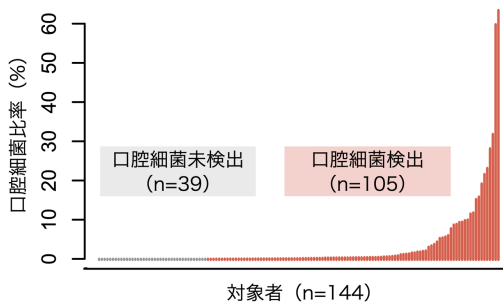
最後に、口腔細菌比率の増加と腸管 MB の細菌構成との関連性について調べたところ、腸内 MB における口腔細菌比率が高い対象者では、*S. salivarius* や *S. parasanguinis*、*Lactobacillus salivarius* などの口腔細菌に加え、マウスの腸炎に関連することが知られている *Klebsiella pneumoniae* の比率が高くなっていった (図 4)。一方で、有益な常在腸内細菌と考えられている *Faecalibacterium prausnitzii* や *Parabacteroides distasonis* の比率が低くなっていった。

以上より、口腔衛生状態を向上させることで口腔細菌の腸管移行が減少し、腸管 MB の細菌構成を良好なバランスに制御できる可能性が示唆された。一方、本研究は解析検体数が少なく、全身の健康状態など口腔細菌異所性定着のリスク因子の詳細については十分に検討できていない。今後は、解析検体数を増やして引き続き口腔と腸管マイクロバイオームの関係性について研究を続けていく。

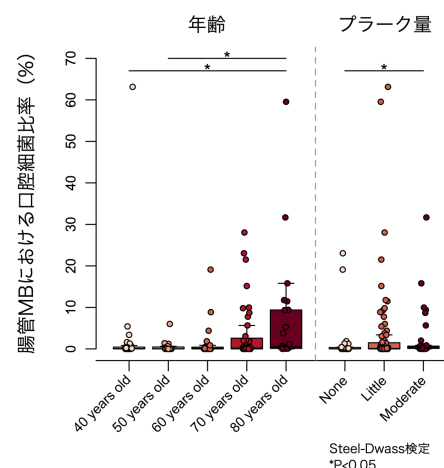
参考文献

Shinya Kageyama, Satoko Sakata, Jiale Ma, Mikari Asakawa, Toru Takeshita, Michiko Furuta, Toshiharu Ninomiya, Yoshihisa Yamashita. High-resolution detection of translocation of oral bacteria to the gut. Journal of Dental Research. 102(7):752-758. 2023.

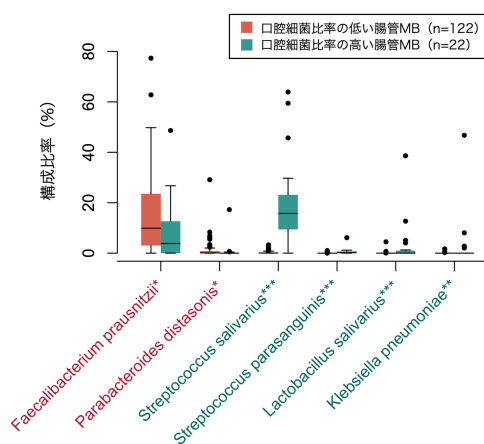
(図2) 各対象者の腸管MBにおける口腔細菌の占める比率



(図3) 年齢、プラーク量と口腔細菌比率



(図4) 口腔細菌比率と腸管MBの構成比率



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Kageyama S., Sakata S., Ma J., Asakawa M., Takeshita T., Furuta M., Ninomiya T., Yamashita Y.	4. 巻 102
2. 論文標題 High-Resolution Detection of Translocation of Oral Bacteria to the Gut	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 752 ~ 758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/00220345231160747	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 Kageyama Shinya, Ma Jiale, Furuta Michiko, Takeshita Toru, Asakawa Mikari, Okabe Yuka, Yamashita Yoshihisa	4. 巻 14
2. 論文標題 Establishment of tongue microbiota by 18 months of age and determinants of its microbial profile	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e0133723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mbio.01337-23	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 影山伸哉、古田美智子、竹下徹、馬佳楽、朝川美加李、山下喜久
2. 発表標題 人工乳栄養児の口腔マイクロバイオーームでは母親由来口腔細菌の占有比率が高い
3. 学会等名 第71回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 影山伸哉、竹下徹、馬佳楽、朝川美加李、山下喜久
2. 発表標題 母乳育児が乳児の口腔マイクロバイオーームの早期成熟を妨げる
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinya Kageyama, Michiko Furuta, Toru Takeshita, Jiale Ma, Mikari Asakawa, Yoshihisa Yamashita
2. 発表標題 Breastfeeding delays maturation of oral microbiota in infancy
3. 学会等名 The 9th International Human Microbiome Congress (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 影山伸哉、古田美智子、竹下徹、馬佳楽、朝川美加李、山下喜久
2. 発表標題 Oral microbiota profiles in 1.5-year-old infants by full-length 16S rRNA gene analysis
3. 学会等名 第96回日本細菌学会・総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 朝川美加李、竹下 徹、影山伸哉、古田美智子、竹内研時、須磨紫乃、山下喜久
2. 発表標題 舌苔細菌叢の加齢変化とその特徴の探索
3. 学会等名 第71回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朝川美加李、竹下徹、影山伸哉、山下喜久
2. 発表標題 健康な地域在住成人における舌細菌叢の年齢別特徴
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

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 adults and tooth loss
3. 学会等名 第96回日本細菌学会・総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 馬佳楽、影山伸哉、竹下徹、朝川美加李、山下喜久
2. 発表標題 全長16S rRNA遺伝子配列解析を用いた重度歯周病患者の歯肉縁下プラークと舌苔の共有菌の解析
3. 学会等名 第96回日本細菌学会・総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 影山伸哉
2. 発表標題 全身への微生物供給源としての口腔マイクロバイオームの重要性
3. 学会等名 第72回日本口腔衛生学会・総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 影山伸哉
2. 発表標題 母親から乳児への口腔細菌母子伝播の高解像度同定
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹下 徹、朝川美加李、影山 伸哉
2. 発表標題 口腔常在微生物叢の肺微生物叢形成への寄与についての検討
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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