

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03863

研究課題名（和文）舌苔マイクロバイオームの管理に基づく新たな慢性呼吸器疾患予防アプローチの構築

研究課題名（英文）Construction of a preventive approach for chronic lung diseases based on a maintenance of tongue microbiota

研究代表者

竹下 徹 (Takeshita, Toru)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：50546471

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では微生物DNAを分析する網羅的細菌群集解析法を用いて慢性閉塞性肺疾患と舌苔微生物叢との関連の検討を行った。地域在住高齢者を対象とした調査により舌苔微生物叢の総細菌量が多い者において本疾患の主症状である気流制限の頻度が喫煙の影響を考慮しても有意に高いことを明らかにした。特に優占種の一つであるPrevotella melaninogenicaの量が多いほど気流制限の頻度が高い傾向を認めた。本研究により舌苔微生物叢の状態悪化と慢性閉塞性肺疾患との関連の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は口腔内表面から剥がれ落ちた大量の常在細菌を唾液とともに常時飲み込んでいる。これらの細菌の一部が微量ながら気道にも流入していることが近年明らかとなってきた。本研究ではこうして微小誤嚥される口腔微生物の主要な供給源である舌苔微生物叢の量および組成と肺機能との関連の存在を明らかにした。本研究により口腔管理による舌の常在細菌叢の制御が肺の健康維持に役立つ可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：This study investigated a relationship between chronic obstructive pulmonary disease and tongue microbiota by using a comprehensive molecular approach analyzing bacterial DNA. A molecular epidemiological study for community-dwelling elderly adults demonstrated that a high-biomass tongue microbiota was significantly associated with airflow limitation which is a primary symptom of chronic obstructive pulmonary disease, after adjustment for smoking intensity and other covariates. Of the predominant commensals, a higher amount of Prevotella melaninogenica was associated with a higher prevalence of airflow limitation. Our results indicate that dysbiotic tongue microbiota is associated with a higher prevalence of airflow limitation.

研究分野：予防歯科学

キーワード：口腔常在微生物叢 舌苔 COPD 16S rRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

呼吸器における慢性炎症は気道壁の肥厚や肺胞の破壊に伴う気流制限を引き起こし、重症化すれば呼吸不全から死に至る。慢性閉塞性肺疾患 (COPD) と総称されるこの進行性かつ不可逆性の疾患は世界の死亡原因の第 4 位を占め現在も増加の一途を辿っており、わが国でも 500 万人以上が罹患していると推定されている。本疾患の原因は有害物質の長期吸入であり、最大のリスク因子は喫煙である。一方で非喫煙罹患患者の存在等、喫煙歴のみでは発症・増悪のメカニズムを説明できないことから、タバコ煙以外の炎症誘発物質の特定とそれに対する予防アプローチの確立が待たれている。

2. 研究の目的

本研究では唾液とともに飲み込まれている口腔常在微生物叢が常時気管上部を通過していることに着目し、その主要な供給源である舌苔微生物叢の量や質の悪化と気流制限との関連について検討を行った。COPD の発症・増悪に関わる舌苔微生物叢パターンを特定するとともにその効果的な制御法を探索し、舌苔微生物叢管理という全く新たな視点からの慢性呼吸器疾患予防アプローチの提案を目指した。

3. 研究の方法

(1) 地域在住高齢者における舌苔微生物叢と気流制限との関連についての検討

我々は 2016 年に地域で行われている健診事業にて 70~80 歳の高齢者 506 名から舌苔採取と歯科健診を行い、舌苔微生物叢と歯・歯周組織の健康状態との関連について検討を行った(文献)。このうち同健診にて呼吸機能検査(スパイロメトリー)を受けた者を対象として気流制限を認める者と認めない者の舌苔微生物叢の細菌量および細菌構成を比較し、舌苔微生物叢と気流制限との関連の検討を行った。気流制限はスパイロメトリーにおいて 1 秒率が 70%未満の場合と定義した。

(2) 舌苔微生物叢に吸入薬がもたらす影響の検討

九州大学病院呼吸器科を受診した初診患者で気管支喘息ないし COPD と診断され吸入ステロイドや気管支拡張薬の長期使用が見込まれる者 10 名から研究参加への同意を取得し、初診時および再診時(1、6、12 ヶ月後)に舌苔を採取した。舌苔から DNA を抽出したのち含まれる総細菌量および細菌構成を決定し治療に伴う舌苔微生物叢の変化を観察した。

(3) COPD 患者にみられる舌苔微生物叢の特徴の探索

COPD の診断を受け喫煙関連呼吸器難病の前向きコホート研究にて健康状態の追跡が行われている患者のうち 69 名から研究参加への同意を取得したのち舌苔を採取した。その際に残存歯の数および義歯の装着状況について質問紙にて調査した。舌苔微生物叢の総細菌量および細菌構成を決定し、地域在住高齢者と比較することで COPD 患者にみられる特徴を探索した。

(4) 舌苔微生物叢の採取および総細菌量および細菌構成の決定

各対象者の舌苔は舌背部中央 15 mm 径から採取した。取得した検体からビーズ破砕法を用いて微生物群集 DNA を抽出し、細菌 DNA の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を分析する網羅的細菌群集解析法を用いて細菌構成を決定した。具体的には細菌に共通して存在する塩基配列である 8F 配列および 338R 配列をプライマーとして PCR 法を用いて微生物叢を構成する細菌の 16S rRNA 遺伝子 V1-V2 領域を網羅的に増幅・回収したのち、次世代シーケンサー Ion PGM を用いて塩基配列を決定した。取得した塩基配列は解析ソフトウェア DADA2 を用いて解読エラーの補正を行ったのち、ヒト口腔細菌 DNA の塩基配列を網羅した expanded Human Oral Microbiome Database に相同性検索を行うことで各検体に含まれる細菌構成を決定した。また 16S rRNA 遺伝子 V5 領域をターゲットとした定量 PCR 法を行うことで検体に含まれる総細菌量を決定した。

(5) 口腔常在微生物の気管支内における存在の検証

肺へ口腔常在微生物の微小誤嚥が実際に起きているかを検証するため、2 名の患者から研究参加への同意を得たのち舌苔採取を行うとともに、日常臨床として行われている気管支鏡検査の際に気管支擦過により気管支被覆液を採取した。次世代シーケンサー Ion PGM を用いた 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定に基づく細菌群集解析法により細菌構成を決定した。舌苔と気管支被覆液の細菌構成を比較し、気管支内から検出される菌種と舌苔から検出される菌種との菌種の一致の有無を検証した。

4. 研究成果

(1) 地域在住高齢者における舌苔微生物叢と気流制限との関連についての検討

歯科健診と舌苔採取に加え呼吸機能検査を受け共変量の情報に欠損のない地域在住高齢者

484 名を解析の対象とした。対象者のうちスパイロメトリーにおいて 1 秒率が 70%以上の者 384 名が正常群に、70%未満の者 100 名が気流制限群に分類された。気流制限群では正常群に比べ有意に年齢が高いとともに BMI が低く、女性と喫煙経験のない者が少なかった。歯と歯周組織の状態には両群に有意な違いは見られなかった一方で、舌苔の総細菌量は正常群 (\log_{10} copies, 8.3 ± 0.5) と比べ気流制限群 (8.4 ± 0.4) で有意に多かった ($P = 0.015$)。ロジスティック回帰分析により喫煙歴をはじめとする共変量の影響を調整した場合でも、舌苔の総細菌量が多い者 (上位 50%) では少ない者 (下位 50%) と比べ気流制限の頻度が 1.61 倍高いことが示された ($P < 0.05$)。

続いて両群間の舌苔微生物叢の細菌構成の差異の有無について検証した。UniFrac 指標を用いて全検体間の細菌構成非類似度を評価し二群を比較したところ、全体構成に明らかな違いは認めないことが明らかとなった。一方で Linear discriminant analysis effect size を行ったところ、*Neisseria flavescens* と *Prevotella melaninogenica* をはじめとする複数の優占種の構成比率には両群間に差異があることが明らかとなった。

気流制限と関わる菌種を特定するため、21 の優占種 (平均構成比率が 1%以上) の細菌量を総菌数と構成比率から算出したのち四分位群に分け、気流制限の頻度との関連を検討した。*Prevotella melaninogenica* と *Actinomyces odontolyticus* の細菌量が多い者ほど気流制限は高い頻度で認められ、この関係はロジスティック回帰分析により共変量の影響を調整した場合でも有意だった (図 1)。以上の結果から口腔管理による舌苔微生物叢の制御が肺の健康維持に関わる可能性が示唆された。本結果は ERJ Open Research 誌に原著論文として掲載された (文献)。

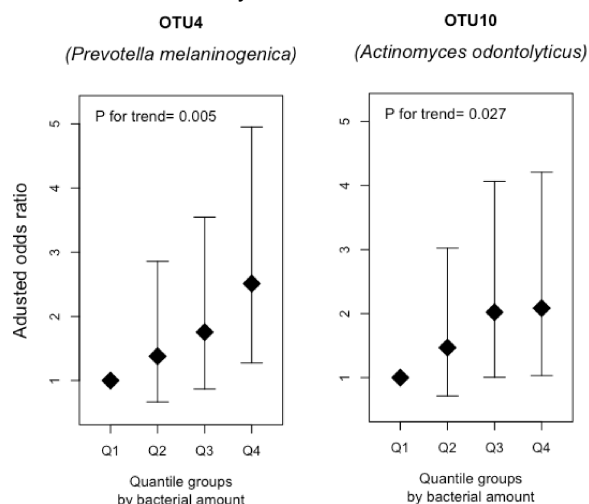


図1 気流制限に対する細菌量 (四分位群) の調整オッズ比

(2) 舌苔微生物叢に吸入薬がもたらす影響の検討

病院において継続的に受診している COPD 患者の舌苔微生物叢の調査を行うにあたり、対象者の多くが吸入ステロイドや気管支拡張薬を治療として服用していることが予想された。こうした吸入薬が舌苔微生物叢の量や組成に影響を及ぼしている可能性を鑑み、吸入薬の長期使用が見込まれる患者 10 名の舌苔微生物叢の総細菌量および細菌構成の変化の観察を行った。最大 12 ヶ月の追跡でも総細菌量は概ね安定しており、期間中大きな順位の変動は認めなかった。また細菌構成非類似度指標 UniFrac を用いて評価した細菌構成の経時変動も大きなものではなく、その変動量は初診時の 10 名の細菌構成の個人差と比較すると明らかに小さかった。以上の結果から吸入ステロイドや気管支拡張薬の服用が舌苔微生物叢に与える影響は限定的なものであることが示唆された。

(3) COPD 患者にみられる舌苔微生物叢の特徴の探索

COPD と診断され継続的に受診している患者の舌苔微生物叢の総細菌量および細菌構成についても 16S rRNA 遺伝子を対象とした網羅的細菌群集解析法を用いて決定した。COPD 患者群の舌苔の総細菌量は前述の地域在住高齢者の気流制限群と同様に正常群と比べて有意に多かった。COPD 群においても正常群同様に舌苔微生物叢は *Streptococcus*, *Prevotella*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Haemophilus* といった通常みられる口腔常在細菌属から構成される一方で、*Streptococcus*, *Veillonella* 属がより高い割合を占めていた。地域在住高齢者群には多くの女性が含まれるのに対し COPD 群は大半が男性であり、こうした両群の背景要因の違いが舌苔微生物叢の差異に寄与している可能性は残るものの COPD の診断を受けた患者でも舌苔微生物叢に差異が認められることが示唆された。

(4) 口腔常在微生物の気管支内における存在の検証

2 名の気管支被覆液は *Rothia*, *Neisseria*, *Porphyomonas*, *Prevotella*, *Streptococcus* といった菌種から構成されていたが、いずれも対象者の舌苔微生物叢の優占種でもあった。今後より多くの対象者で検討を行っていく必要があるが、口腔微生物叢が肺の常在微生物叢の主要な供給源であることが確認された。こうした結果から舌苔微生物叢の維持管理が肺の健康管理につながる可能性が示された。

< 引用文献 >

Asakawa M., Takeshita T., Furuta M., Kageyama S., Takeuchi K., Hata J., Ninomiya T., Yamashita Y. (2018): Tongue Microbiota and Oral Health Status in Community-Dwelling Elderly Adults. *MSPHERE*. 3(4).

Takeshita T., Matsumoto K., Furuta M., Fukuyama S., Takeuchi K., Ogata H., Asakawa M., Kageyama S., Hata J., Ninomiya T., Inoue H., Yamashita Y. (2021): Airflow limitation and tongue microbiota in community-dwelling elderly individuals. ERJ OPEN RESEARCH. 7(2).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Oku Saori, Takeshita Toru, Futatsuki Toshiko, Kageyama Shinya, Asakawa Mikari, Mori Yasuo, Miyamoto Toshihiro, Hata Jun, Ninomiya Toshiharu, Kashiwazaki Haruhiko, Yamashita Yoshihisa	4. 巻 16
2. 論文標題 Disrupted tongue microbiota and detection of nonindigenous bacteria on the day of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1008348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1008348	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, Nagao Yuka, Ma Jiale, Asakawa Mikari, Yoshida Ryoji, Takeshita Toru, Hirose Akiyuki, Yamashita Yoshihisa, Nakayama Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 Compositional Shift of Oral Microbiota Following Surgical Resection of Tongue Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 600884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.600884	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 Takeshita Toru, Matsumoto Koichiro, Furuta Michiko, Fukuyama Satoru, Takeuchi Kenji, Ogata Hiroaki, Asakawa Mikari, Kageyama Shinya, Hata Jun, Ninomiya Toshiharu, Inoue Hiromasa, Yamashita Yoshihisa	4. 巻 7
2. 論文標題 Airflow limitation and tongue microbiota in community-dwelling elderly individuals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ERJ Open Research	6. 最初と最後の頁 00616 ~ 2020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1183/23120541.00616-2020	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 Zhang Daixi, Takeshita Toru, Furuta Michiko, Kageyama Shinya, Asakawa Mikari, Nambu Koki, Yamashita Yoshihisa	4. 巻 6
2. 論文標題 Tongue Microbiota Composition and Dental Caries Experience in Primary School Children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e01252-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.01252-20	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7件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹下徹
2. 発表標題 口腔常在微生物叢の構成と嚥下性肺炎のリスク
3. 学会等名 第68回日本化学療法学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹下徹
2. 発表標題 我々が飲み込んでいる口腔常在微生物叢の構成と健康状態との関連
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹下徹
2. 発表標題 Bacterial composition of overall oral microbiota associated with periodontal disease and health.
3. 学会等名 第68回国際歯科研究学会日本部会(JADR)総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020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疾患との関連
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術大会（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	松元 幸一郎 (Matsumoto Koichiro) (60325462)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	二宮 利治 (Ninomiya Toshiharu) (30571765)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	古田 美智子 (Furuta Michiko) (20509591)	九州大学・歯学研究院・講師 (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
---------	---------