

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19128

研究課題名(和文) 腸内エコシステムの観点からのフレイルの病態理解と早期バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Understanding the morbid state of the frailty from the intestinal ecosystem and investigation of biomarkers for early diagnosis

研究代表者

徳本 佳奈 (TOKUMOTO, KANA)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：40837126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：フレイルやオーラルフレイルは、後期高齢者が要介護状態に陥る前段階であるが、これらの病態がどのように獲得され、維持されているのかはこれまで十分検討されてこなかった。一方、腸内エコシステムの変調が疾患の発症と大きく関わっていることが報告された。本研究では、フレイル発症における腸内細菌叢の関与を明らかにすることを目的に前向きコホート研究を計画した。高齢者施設に入所する要介護高齢者に対して、臨床審査および介護記録調査を行い、便検体を採取した。解析対象22名のうち、観察期間中に16名が死亡し、平均生存期間は $806.6 \pm 562.8$ 日であった。解析対象の便検体を解析した結果、55種の科が検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フレイルは、身体的・精神心理的・社会的背景が複雑に絡み合い関わって発症する疾患であるため、治療法のみならず診断基準についてもコンセンサスが得られていないのが現状である。本研究成果は、フレイルを腸内エコシステムの変調と捉え、腸内細菌叢の観点からその発症の原因を解き明かそうとした点で、学術的独自性が高い。また、本研究の発展は、治療法の開発に繋がるのみならず、診断基準や重症度分類をも変える可能性を秘めており、フレイルの新たな概念を提唱するものとなる。世界一の長寿国日本が抱える医療界最大の課題であるフレイルの理解は、医療界に革新をもたらすことに疑いの余地がない、創造的かつ革新的な研究である。

研究成果の概要(英文)：When older people require nursing care, frailty including oral frailty might be one of the previous step parameter but these morbid states were not enough revealed. On the other hand, relationship between the modulation of intestinal ecosystem and the frailty onset has been reported. This prospective cohort study aimed to investigate the relationship between frailty onset between human enterobacteria. Totally, 22 older people who required nursing care at nursing home were enrolled in this study. Clinical experiments and excrement sample collection were performed. During the observation period, 16 participants were dead, and average survival time of analyzed subjects were  $806.6 \pm 562.8$  days. As a result of microbiota analysis, 55 kinds of families were identified.

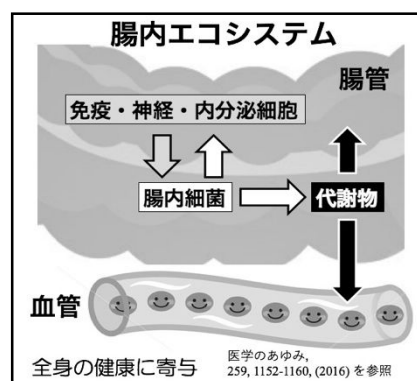
研究分野：補綴系歯学関連

キーワード：要介護高齢者 フレイル 口腔内細菌叢 腸内エコシステム 16S rRNA解析

### 1. 研究開始当初の背景

フレイルやオーラルフレイルは、要介護状態に至る前段階であり、これらの徴候を早期に発見し、食事や運動などの適切な対応をとることが、健康寿命の延伸に繋がると考えられている。後期高齢者では、フレイルの原因の引き金となる身体機能・認知機能の低下、低栄養・低体重への対策が必要不可欠であり、健康寿命の延伸に向けて厚労省はフレイル予防を最重要課題としている。しかし、そのために必要なフレイルの病態や原因の理解はいまだ不十分である。さらにフレイルの病態とその原因を考える際に、基礎代謝や日常動作、運動によるカロリー消費が栄養摂取量を上回るアンバランスが、当初大きく影響することは間違いないが、それを栄養摂取量の増加だけでバランスをとっても筋肉量の回復は難しいことが知られ、栄養摂取や運動だけでは十分解決できない問題が存在することが示唆されている。このような場合に、口腔からどのような栄養摂取を促すべきか、また、どのような栄養補助食品を日常の食事に追加するべきかなどは、補綴歯科専門医を含めた栄養関連職種のもっと注目すべきポイントになっている。

一方、肥満と腸内細菌叢の密接な関係が報告されたことを皮切りに、様々な生活習慣病と腸内細菌叢の関与が明らかとなり、宿主だけでなく腸内細菌叢の機能を含め、包括的に腸内エコシステムを理解することが重要とされるようになった。また、クロストリジウム・ディフィシル感染症や潰瘍性大腸炎に対しても、健全なヒトの糞便を移植する糞便微生物移植が劇的な治癒効果を示すことが報告され、腸内細菌叢の理解が新たな治療法に繋がることが示された。さらに、疾患の進行度（重症度）が、腸内細菌叢の乱れや多様性の減少と相関するなど、疾患の進行度や治療成果の新たな評価指標として腸内細菌叢が取り上げられるようになった。



このような研究背景から、申請者は、高齢者における栄養摂取と代謝の悪循環は、中年期の肥満と同様に、腸内エコシステムの変調によって恒常化されていくのではないかと、という問いに辿り着いた。そして、本問いを立証するために、後期高齢者の腸内細菌叢ならびに代謝産物を網羅的に解析した結果、驚くべきことに、腸内細菌叢と彼等のBMIの間には明らかな関係があり、特定の腸内細菌がフレイル状態と関連があることが明らかになったのである。しかし、この横断的な研究成果から示された関係は、必ずしもフレイルの原因に特定の腸内細菌が関与することを示しているのではなく、低栄養やフレイルの結果として腸内細菌叢が適応変化したことを示している可能性もある。したがって、次の研究段階としては、フレイルを発症していない集団を、フレイル発症をエンドポイントとして長期に経過観察をするような前向きコホート研究を実施する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、フレイル発症における腸内細菌叢の関与を明らかにすることを目的に、フレイルに罹患していない被験者を、フレイル発症をエンドポイントとして長期に経過観察する前向きコホート研究を実施し、各種口腔栄養関連指標とともに、どのような腸内細菌（叢）が後期高齢者におけるフレイルの誘因（リスク）となるかを明らかにする。そして、この前向きコホート研究により明らかになる原因腸内細菌（叢）が、実験動物の代謝にどのような影響を与えるかを明らかにし、腸内細菌叢をターゲットとした新たな介入法の開発に繋げる。さらに、フレイル発症原因菌を増加させる食や運動に関連したリスク因子を明らかにし、新たな口腔栄養関連サービスの展開に繋げる。

### 3. 研究の方法

倫理委員会の承認を得た上で、研究協力を得た高齢者施設にて、要介護高齢者の臨床審査および介護記録調査を行った。調査項目は、年齢、性別、要介護度、BMI、Barthel Index、臨床的認知症尺度、食形態、現在歯数、機能歯数とした。また、ケアマネージャーに依頼し、対象者の毎月の体重記録および生存情報（死亡日、死因）を取得した。

本研究では対象者より便検体を採取し、専門業者に依頼して16S rRNA解析を行なった。具体的には、Mpure Bacterial DNA Extraction Kit (MP Bio, 東京, 日本) を用いて、検体からDNAを抽出し、2-step tailed PCR法を用いて、16S rRNAのV4領域のライブラリーを作製した。MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina, San Diego, CA, US) を用いて2x300 bpの条件でMiSeq system (Illumina) にてシーケンシングを行った。得られた配列に対し、usearchのuchimeアルゴリズム29を用いてキメラ配列の除去を行い、菌叢解析用パイプラインQiime30にて配列の類似性（相対率）が97%以上の配列を1つのOperational Taxonomic Unit (OTU) として解析を

行った．そして，出現細菌の相対比率（対象細菌のリード数 / 検体のトータルリード数 × 100）を算出し，比率が 0.1% 未満の細菌は除外した．腸内細菌叢の多様性を測定するため，出現 OTU の多様度を算出した．多様度指数にはシャノンの多様度指数とシンプソンの多様度指数の逆数を用いた．

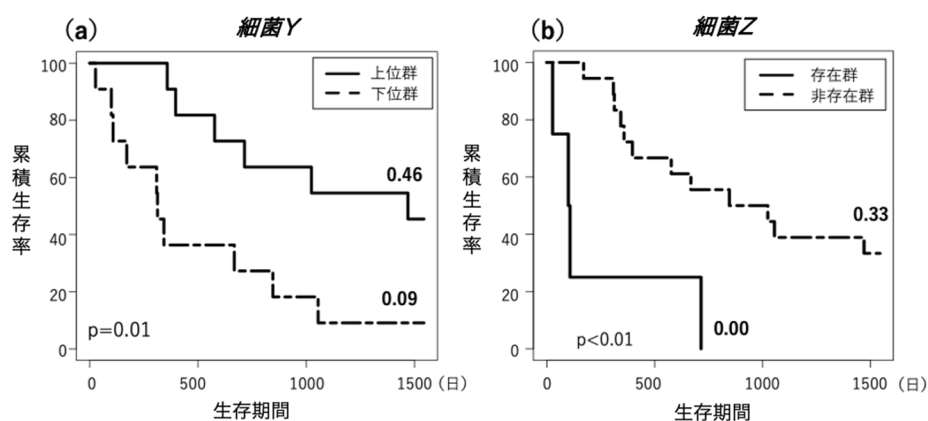
#### 4. 研究成果

2019 年 11 月から 2021 年 12 月まで，1 年ごとに調査を行なった．2020 年度および 2021 年度は，新規対象者に対するベースライン調査と既存の対象者に対する追跡調査を並行して行なった．3 年間で調査を実施できた全対象者は 32 名（ベースライン時平均年齢 ± 標準偏差：88.6 ± 7.7 歳，男 / 女：1 / 2 名）であった．ベースライン調査時に低栄養状態（BMI < 18.5）であった対象者は 14 名（平均年齢 ± 標準偏差：87.9 ± 8.6 歳，男 / 女：1 / 13 名），栄養状態良好（BMI ≥ 18.5）であった対象者は 18 名（平均年齢 ± 標準偏差：89.2 ± 7.0 歳，男 / 女：0 / 18 名）であった．

2019 年および 2020 年にベースライン調査を行なった対象者 28 名のうち，1 年後 6 名が脱落したため，追跡調査を実施できたのは 22 名であった．脱落した 6 名のうち，1 名は同意撤回し，5 名は死亡していた．また，脱落した 6 名のうち，5 名がベースライン時に低栄養状態であった．1 年後の追跡調査を実施できた対象 22 名（ベースライン時平均年齢 ± 標準偏差：87.9 ± 8.4 歳，男 / 女：1 / 21 名）のうち，ベースライン時に低栄養状態であった対象者は 7 名（ベースライン時平均年齢 ± 標準偏差：88.1 ± 11.7 歳，男 / 女：1 / 6 名），栄養状態良好であった対象者は 15 名（ベースライン時平均年齢 ± 標準偏差：87.8 ± 6.8 歳，男 / 女：0 / 15 名）であった．ベースライン時に栄養状態良好であった 15 名のうち，1 年後に低栄養状態になっていたのは 2 名のみであった．

また，2017 年に調査を実施した対象者の便検体の 16S rRNA 解析を実施し，体重変化および生命予後との関連を調査した．ベースライン時から 3 ヶ月後の体重変化率（WCR3），ベースライン時から 6 ヶ月後の体重変化率（WCR6）および便採取日からの生存日数をエンドポイントとした．体重減少と腸内細菌叢の関係は，WCR3 / 6 を従属変数，各細菌の相対比率を説明変数として，観察因子で調整した重回帰分析を用いて検討した．生命予後と腸内細菌叢の関連は，対象を各細菌の相対比率が上位 / 下位の者という 2 群に分け， Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を描き，ロジック検定を用いて累積生存率を比較した．

解析対象は 22 名（平均年齢 ± 標準偏差：86.7 ± 8.7 歳，男 / 女：2 / 20 名）であった．WCR3 および WCR6 の平均値はそれぞれ  $-1.0 \pm 3.4\%$ ， $-0.9 \pm 4.7\%$  であった．体重が減少した対象者は，3 か月後に 12 名，そして 6 か月後に 12 名であった．追跡終了時までの生存者は 6 名で，観察終了までに 16 名が死亡しており，死因は老衰が 10 名，呼吸不全が 3 名，多臓器不全が 2 名，結腸癌術後再発が 1 名であった．平均生存期間は  $806.6 \pm 562.8$  日であった．16S rRNA 解析の結果，55 種の科が検出された．重回帰分析の結果，Barthel Index が低いこと，臨床的認知症尺度が低いこと，細菌 X の相対比率が高いことが，3 ヶ月後の体重減少の有意なリスク因子として同定された．また，細菌 Y の相対比率が下位にある群の累積生存率が，上位群に比べて有意に低かった（図 a）．細菌 Z の存在群の累積生存率が，非存在群に比べて有意に低かった（図 b）．



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tokumoto Kana, Kimura-Ono Aya, Mino Takuya, Osaka Suguru, Numoto Ken, Koyama Eri, Kurosaki Yoko, Nakagawa Shinsuke, Amano Yuki, Nguyen Ha Thi Thu, Higuchi Takaharu, Nawachi Kumiko, Ono Mitsuaki, Kobayashi Yoshitomo, Yamamoto Michiyo, Maekawa Kenji, Kuboki Takuo	4. 巻 66
2. 論文標題 Risk factors for root caries annual incidence and progression among older people requiring nursing care: A one-year prospective cohort study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 250 ~ 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2186/jpr.JPR_D_20_00272	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徳本佳奈, 大野 彩, 三野卓哉, 逢坂 卓, 沼本 賢, 小山絵理, 黒崎陽子, 中川晋輔, 天野友貴, 樋口隆晴, 小林芳友, 山本道代, 前川賢治, 窪木拓男
2. 発表標題 要介護高齢者の根面う蝕年間新規発生率および重症化リスクの検討
3. 学会等名 第30回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

1. 発表者名 徳本佳奈, 大野 彩, 三野卓哉, 逢坂 卓, 沼本 賢, 小山絵理, 黒崎陽子, 中川晋輔, 天野友貴, 樋口隆晴, 縄稚久美子, 大野充昭, 山本道代, 前川賢治, 窪木拓男
2. 発表標題 要介護高齢者の根面う蝕発生および重症化のリスク因子に関する前向きコホート研究
3. 学会等名 第129回公益社団法人日本補綴歯科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大森 江, 大野充昭, 大野 彩, 水口真実, 小山絵理, 徳本佳奈, 山本道代, 大橋俊孝, 窪木拓男
2. 発表標題 要介護高齢者の腸内細菌叢とボディマス指数の関係 介護老人保健施設における横断研究
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会第129回学術大会
4. 発表年 2020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
研究協力者	窪木 拓男  (KUBOKI TAKUO)		
研究協力者	大野 彩  (KIMURA-ONO AYA)		
研究協力者	大野 充昭  (ONO MITSUAKI)		
研究協力者	大原 直也  (OHARA NAOYA)		
研究協力者	後藤 和義  (GOTO KAZUYOSHI)		

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