

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05557

研究課題名(和文) 舌苔の病原性評価ガイドラインの策定に向けた基盤マイクロバイオームデータの構築

研究課題名(英文) A large-scale survey of tongue microbiota of elderly adults for the development of its maintenance approach

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々が唾液とともに飲み込んでいる膨大な数の口腔常在微生物の大半は舌苔に由来する。従って口腔内容物の誤嚥が起こりやすい高齢者の健康管理を考えるうえでは舌苔常在微生物叢(マイクロバイオーム)の構成や動態に対する十分な理解が不可欠である。そこで本研究では地域在住高齢者および施設入所高齢者において微生物DNAを分析する網羅的微生物群集解析法を基盤とした舌苔マイクロバイオームの大規模調査を行なった。本調査により高齢者の舌苔常在微生物叢の正常な細菌構成とその個人差の幅、細菌構成と口腔保健状態との関連が明らかになった。さらに脆弱高齢者の死亡、特に肺炎死亡に関連する舌苔常在微生物叢の構成パターンも特定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本調査により高齢者の舌苔常在微生物叢の構成や健康状態との関連といった基盤データを取得することができた。舌苔微生物叢は嚥下される微生物群の主たる供給源であるにも関わらずこれまでう蝕や歯周炎の直接の原因であるデンタルプラークと比べあまり注目を集めてこなかった。今回の結果は今後舌苔マイクロバイオームの管理に基づく新たな高齢者の健康管理アプローチを構築していくうえで重要な礎になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Tongue microbiota is a primary source of microbial populations that are ingested with saliva. Therefore, careful attention is needed for the health maintenance in elderly adults, because they are susceptible to aspiration of oral contents. This study determined the microbial composition of elderly adults based on a comprehensive microbial community analysis using microbial DNA with a large sample size. We revealed variations in the tongue microbiota composition among community elderly adults, as well as a dysbiotic pattern associated with pneumonia-related death in the frail elderly adults. Our results would be a basis for the development a novel health maintenance approach of elderly adults targeting their tongue microbiota.

研究分野：予防歯科学

キーワード：舌苔 マイクロバイオーム 高齢者 16S rRNA遺伝子 常在微生物叢

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

口腔には数百種、兆を超える数の微生物が常在微生物叢を構築して生息しており、我々は常時大量の微生物を唾液とともに飲み込んでいる。これらの微生物は胃に運ばれ死滅するため人体に害をなすことはないと言われてきたが、腸管に到達した細菌が腸内微生物叢の変動を介して全身の健康に影響を及ぼす可能性が指摘されている。また脳血管障害や老化等の影響で嚥下・咳反射が衰えるとしばしば気管に流入し誤嚥性肺炎を引き起こすことから、特に抵抗力の低い高齢者では嚥下される口腔微生物群のコントロールが重要視されるようになってきている。

我々が飲み込む唾液は口腔の様々な部位から脱落した微生物を含むが、その主要な供給源は歯面よりも粘膜面、特に舌苔である。舌表面は多数の乳頭や溝が存在し、その広大な粘膜面に膨大な数の微生物が共存する舌苔微生物群集（マイクロバイーム）が存在する。それゆえ抵抗力の低い高齢者ではプラークコントロールに加え舌清掃が推奨されている。しかしながらその微生物構成や動態については十分に理解されているとは言い難い。そこで高齢者の感染予防および健康増進を目指すうえで、舌苔マイクロバイームの個人差や健康状態との関連についての基盤データの構築が不可欠であると考えた。

2. 研究の目的

前述の背景から、本研究では高齢者の舌苔マイクロバイームについて微生物 DNA 解析に基づく大規模調査を行った。高齢者の舌苔マイクロバイームの正常像とその個人差の幅を理解するとともに、異常な舌苔マイクロバイームの微生物構成の特定と健康状態に与える影響の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 施設入所高齢者の肺炎と舌苔マイクロバイームの細菌構成との関連の検討

熊本県の8つの高齢者施設に入所している217名の高齢者を対象とし調査を行った。ベースライン調査として口腔診査に加え栄養状態、認知機能等についての質問紙調査を行うとともに対象者の舌背部からプラスチックのマドラーを用いて舌苔を採取した。採取した検体から DNA を抽出したのち細菌共通配列をプライマーとして PCR 法を用いて含まれる多種の細菌の 16S rRNA 遺伝子 V1-V2 領域を網羅的に増幅・回収した。各検体由来の増幅断片群は精製後等濃度になるよう調製して混合し、次世代シーケンサー Ion PGM (Thermo Fisher Scientific 社) にて塩基配列を解読した。解読した塩基配列は口腔細菌の 16S rRNA 遺伝子を収載したデータベース Human Oral Microbiome Database (HOMD) と相同性検索を行うことで由来する細菌種を特定し、各検体の細菌構成を決定した。19 か月経過後に各施設において追跡調査を行い、対象者の生存状況と死亡していた場合は死亡原因を調査した。データ欠損がある者等を除いた 173 名についてベースライン時の舌苔細菌叢の構成パターンと生存率との関連について統計的に検討を行なった。

(2) 地域在住高齢者における舌苔マイクロバイームの個人差の理解と口腔保健状態との関連の検討

福岡県糟屋郡久山町で行われている生活習慣病予防健診において歯科を受診した 70 歳～80 歳の高齢者 506 名から舌苔を採取した。歯科健診は現在歯数、歯垢の付着、う蝕、歯肉炎、歯周炎の状態、義歯の有無等についてのデータを取得した。舌苔検体は毛の部分除去し不織布を貼り付けた回転式の電動歯ブラシを用いて舌背中央部直径 15 mm から定量的に採取した。採取した検体は(1)と同様に細菌構成を決定した。加えて 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした定量 PCR 法を用いて総細菌量、総真菌量についても測定した。構成する細菌種同士の共存関係等常在微生物叢における動態を明らかにするとともに、口腔保健状態との関連について検討を行なった。

4. 研究成果

(1) 施設入所高齢者の肺炎と舌苔マイクロバイームの細菌構成との関連

施設入所高齢者 173 名の舌苔微生物叢においては *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa*, *Veillonella atypica*, *Streptococcus parasanguinis* といった細菌種がほぼ全ての被験者から検出され高い割合を占めていた。一方でこれら優占種の構成比率分布は人それぞれ異なっており、腸内細菌叢解析でよく用いられる Partitioning around medoids (PAM) 解析を行うと二つのタイプに分類された。主要な構成細菌のうち *S. salivarius*, *V. atypica*, *P. histicola* といった菌種の構成比率がより高く、*Neisseria flavescens*, *Fusobacterium periodonticum*, *Porphyromonas pasteri* といった菌種の構成比率がより低い者 121 名がタイプ 1、逆の傾向が認められる者 52 名がタイプ 2 に分類された。

両タイプに属する被験者の検体採取後 19 ヶ月での

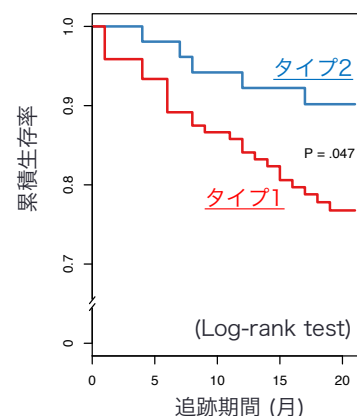


図1 舌苔細菌叢タイプと追跡期間中の生存率

生存率を比較すると、タイプ2の舌苔細菌叢を有する者での死亡者は5名(9.6%)であったのに対し、タイプ1の細菌叢を有する者では27名(22.3%)と高くこの差はLog rank testにおいても有意であった(図1)。Coxの比例ハザードモデルにおいて年齢、性別、現在歯数、嚥下機能、介護レベル、栄養状態、認知機能、併存疾患、施設の種別を調整しても、タイプ2の細菌叢を有するものと比べ、タイプ1を有する者は死亡リスクが3.79倍と有意に高かった。さらに肺炎による死亡に限定した場合も有意な関連が認められるのに対し、肺炎以外の原因による死亡との関連は有意ではなかったことから、舌苔微生物叢における細菌構成パターンが脆弱高齢者における肺炎発症ないし増悪に寄与している可能性が示唆された。(発表論文⑤)

(2) 地域在住高齢者における舌苔マイクロバイオームの個人差の理解と口腔保健状態との関連の検討

地域在住自立高齢者の舌苔マイクロバイオームの構成とその個人差を理解するために、住民健康診断に参加し歯科を受診した70歳~80歳の高齢者506名の舌苔の細菌構成を決定した。優占種はどの被験者でもほぼ共通しており、*S. salivarius*, *Prevotella melaninogenica*, *R. mucilaginosa*, *V. atypica*, *N. flavescens*といった菌種が特に高い割合を占めていた(図2)。一方でそれらの構成比率には個人差が認められた。本集団での構成比率分布からネットワーク解析を行うと二つの共存細菌群が検出され、施設入所高齢者の解析においてタイプ1細菌叢を特徴付ける*S. salivarius*, *V. atypica*, *P. histicola*といった菌種が一つの共存細菌群(グループ1細菌群)を、タイプ2細菌叢を特徴付ける*N. flavescens*, *F. periodonticum*, *P. pasteri*といった菌種がもう一つの共存細菌群(グループ2細菌群)を構築していることが明らかとなった。両群の構成比率は強い負の相関を示すことから、舌苔微生物叢においては二群の常在細菌種の拮抗関係が存在することが示唆された。

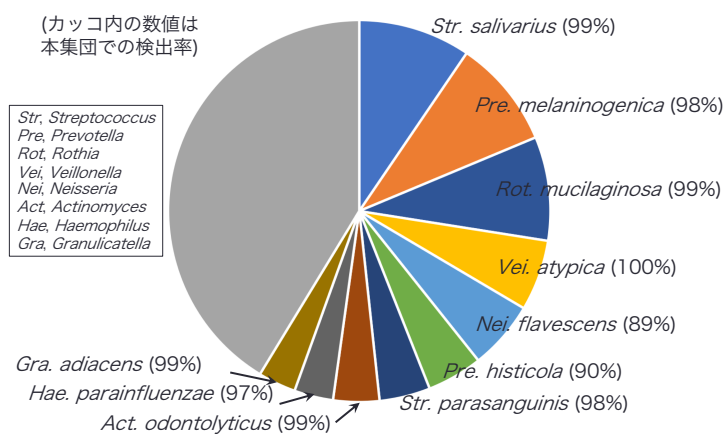


図2 地域在住高齢者の舌苔細菌叢の細菌構成

これらの細菌群の構成比率と各被験者の口腔保健状態との関連をみると、グループ1細菌群の構成比率は付着プラーク量が多い者ほど、残存歯の少ない者ほど、う蝕経験歯数が少ない者ほど有意に高かった。以上の結果から上記の口腔保健状態の悪化したものほど(1)で示された肺炎関連舌苔微生物叢パターンを示していることが明らかとなった。(発表論文①)

以上の研究により高齢者の舌苔常在微生物叢の正常な細菌構成とその個人差の幅、口腔状態との関連、さらに全身の健康との影響が明らかになった。本研究の結果は今後舌苔マイクロバイオームの管理に基づく健康管理アプローチを構築していくうえで重要な礎になると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Asakawa M*, Takehita T*, Furuta M, Kageyama S, Takeuchi K, Hata J, Ninomiya T, Yamashita Y. Tongue microbiota and oral health status in community-dwelling elderly adults. *mSphere*, 査読あり, 15:3(4):e00332-18, 2018
- ② Takeuchi K, Matsumoto K, Furuta M, Fukuyama S, Takehita T, Ogata H, Suma S, Shibata Y, Shimazaki Y, Hata J, Ninomiya T, Nakanishi Y, Inoue H, Yamashita Y. Periodontitis is associated with chronic obstructive pulmonary disease. *J Dent Res*, 査読あり, in press.
- ③ Takeuchi K, Izumi M, Furuta M, Takehita T, Shibata Y, Kageyama S, Okabe Y, Akifusa S, Ganaha S, Yamashita Y. Denture wearing moderates the association between aspiration risk and incident pneumonia in older nursing home residents: a prospective cohort study *Int J Environ Res Public Health*, 査読あり, 16(4):554.
- ④ Takeuchi K, Matsumoto K, Furuta M, Fukuyama S, Takehita T, Ogata H, Suma S, Shibata Y, Shimazaki Y, Hata J, Ninomiya T, Nakanishi Y, Inoue H, Yamashita Y. *Sci Rep*, 査読あり, 8:13354, 2018.
- ⑤ Kageyama S, Takehita T, Furuta M, Tomioka M, Asakawa M, Suma S, Takeuchi K, Shibata Y, Yamashita Y. Relationships of variation of tongue microbiota and pneumonia mortality in nursing home residents. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 査読有,

73(8):1097-1102, 2018.

- ⑥ Yamashita Y, Takeshita T, The oral microbiome and human health. J Oral Sci, 査読有, 59 (2): 201-206, 2017 [Review article]
- ⑦ Zakaria MN, Furuta M, Takeshita T, Shibata Y, Sundari R, Ninomiya T, Yamashita Y. Oral mycobiome in community-dwelling elderly and its relation to oral and general health conditions, Oral Dis, 査読有, 23(7):973-982, 2017
- ⑧ Kageyama S, Takeshita T, Asakawa M, Shibata Y, Takeuchi K, Yamanaka W, Yamashita Y. Relative abundance of total subgingival plaque-specific bacteria in salivary microbiota reflects the overall periodontal condition in patients with periodontitis. PLoS One, 査読有, 12(4):e0174782, 2017.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 竹下徹. 嚥下されている口腔常在微生物叢の構成と健康状態との関連. 第 49 回嫌気性菌感染症学会総会(招待講演). 2019 年
- ② 竹下徹. 健康指標としての口腔常在フローラ. 第 18 回日本抗加齢医学会総会(招待講演). 2018 年
- ③ 竹下徹. 従業員の健康と口腔常在微生物叢. 第 91 回日本産業衛生学会総会(招待講演). 2018 年
- ④ 竹下徹, 影山伸哉, 須磨紫乃, 古田美智子, 竹内研時, 朝川美加李, 岩佐康行, 山下喜久. 舌苔細菌叢の構成と高齢者の肺炎死亡リスクとの関連. 日本嫌気性菌感染症学会総会. 2018 年
- ⑤ 影山伸哉, 竹下徹, 須磨紫乃, 古田美智子, 竹内研時, 朝川美加李, 岩佐康行, 山下喜久. 舌苔マイクロバイオームが高齢者の発熱に及ぼす影響. 第 66 回日本口腔衛生学会総会. 2017 年
- ⑥ 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. 舌苔マイクロバイオームの細菌構成と口腔の健康状態との関連. 第 66 回日本口腔衛生学会総会. 2017 年
- ⑦ Takeshita T, Kageyama S, Asakawa M, Furuta M, Takeuchi K, Ninomiya T, Yamashita Y. Characteristics of salivary microbiome in orally-healthy Japanese adults. 第 90 回日本細菌学会総会. 2017 年
- ⑧ Takeshita T, Kageyama S, Asakawa M, Furuta M, Takeuchi K, Ninomiya T, Yamashita Y. Identification of salivary microbiome in orally-healthy Japanese adults. IHMC2016(国際学会). 2016 年
- ⑨ Takeshita T, Asakawa M, Kageyama S, Yamashita Y. Succession of tongue microbiota in early childhood and its related factors. ISME16(国際学会). 2016 年
- ⑩ 影山伸哉. 施設入所高齢者において認められる舌苔マイクロバイオームの破綻. 第 65 回日本口腔衛生学会・総会(招待講演).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等: <http://www.prevent-dent-kyushu-u.com/> 九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学講座口腔予防医学分野ホームページ

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 古田 美智子

ローマ字氏名: Michiko Furuta

所属研究機関名: 九州大学

部局名: 歯学研究院

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 20509591

研究分担者氏名: 竹内 研時

ローマ字氏名: Kenji Takeuchi

所属研究機関名: 九州大学

部局名：歯学研究院
職名：助教
研究者番号（8桁）：10712680

研究分担者氏名：山下 喜久
ローマ字氏名：Yoshihisa Yamashita
所属研究機関名：九州大学
部局名：歯学研究院
職名：教授
研究者番号（8桁）：20192403

研究分担者氏名：二宮 利治
ローマ字氏名：Toshiharu Ninomiya
所属研究機関名：九州大学
部局名：医学研究院
職名：教授
研究者番号（8桁）：30571765

※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、研究者個人に帰属されます。