

令和元年6月9日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11590

研究課題名(和文) 16SrRNA解析を応用した高齢者の低栄養起因口腔・腸内細菌叢の網羅的探索

研究課題名(英文) A comprehensive search applying 16SrRNA sequencing analysis to investigate oral and intestinal flora causing malnutrition in the elderly

研究代表者

水口 真実 (Minakuchi, Mami)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：20634489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：要介護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、門レベルでは過体重者において細菌叢Xの比率、低体重者において細菌叢Yの比率が有意に増加していた。属レベルでは、BMIと正の相関にある細菌として細菌叢Z、負の相関にある細菌として細菌叢Aが抽出された。また一部の低体重者のサンプルが同じクラスターに分布していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、高齢者の栄養不良と腸内細菌叢との関連の詳細が明らかになれば、腸内細菌叢にアプローチする新たな栄養改善療法の開発につながる可能性がある。さらに、口腔内細菌叢と腸内細菌叢の関連が明らかになれば、口腔内細菌叢をバイオマーカーとして栄養不良リスクの高い高齢者を検出し、早期介入を行う有効な手法となり得ることが推測され、超高齢社会における本邦の医療・介護の両面において大きく貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：The results of comprehensive analyses of the intestinal flora and metabolites in the elderly requiring long-term care showed that the ratio of bacterial flora X and Y, at the division level, were significantly higher in overweight and underweight individuals, respectively. At the genus level, the bacterial flora Z and A were identified, respectively, as a bacterium positively and negatively correlated with BMI. Moreover, it became clear that some samples of underweight individuals could be distributed in the same cluster.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：要介護高齢者 低栄養 腸内エコシステム 腸内細菌叢 16SRNA解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、低栄養が高齢者の機能低下や死亡のリスク因子であることが明らかになり、低栄養の予防策の検討が盛んに行われている。そして、高齢者では日常生活動作や認知機能の低下、抑うつや全身疾患が低栄養のリスク因子であると報告されている。さらに最近では、歯数の減少も低栄養のリスク因子であることが明らかになりつつある。申請者らが行った要支援・要介護高齢者の前向きコホート研究でも、機能歯数が少ない高齢者のほうが、一年後に低体重となるリスクが高いという結果が得られ、歯科が高齢者の栄養の維持・改善に貢献できる可能性が示されている(小山ら, 2015)。

歯数の減少が低栄養を引き起こす機序としては、歯数の減少による咀嚼能率の低下が引き起こす摂取可能食物種の減少、蛋白質やミネラル、食物繊維摂取量の減少が考えられ、高齢者の低栄養の22%が食事摂取量の減少によると報告されている。しかし高齢者においては、原因不明の体重減少・栄養不良が24%程度存在すると言われ、これら的高齢者では、栄養補助療法を行っても改善が難しい例が多々ある。興味深いことに、肥満者の腸内細菌叢を無菌動物に移植すると実験動物の体重増加が起こるなど、腸内細菌叢と栄養吸収、脂質代謝、満腹感の間には強い関連が見いだされている。腸内細菌叢の構成が変化したり、発酵状態が変化したりすると、腸管上皮の透過性亢進やGLP-1の様なインクレチンの発現が低下して、脂質の吸収亢進やインシュリンの分泌抑制、血糖値の上昇や糖代謝の抑制により肥満が生じることが明らかになってきた。したがって、低体重や低栄養、さらにはフレイルの一部に、腸内細菌叢の変化が関わっていることは容易に想像できる。

これまで、低栄養と腸内細菌叢との関連は、小児低栄養患者で検討されてきた。クワシオルコル(蛋白質欠乏による低栄養)小児患者では、栄養状態良好な小児と比較して腸内細菌構成が異なっており、同一の食事を摂取しても栄養状態が改善しにくいと報告されている(Smith M et al., 2013)。また乳児では、腸内細菌叢の多様性が未熟な場合に栄養不良となりやすいことも報告されている(Gordon J et al., 2013)。また、低栄養小児の腸内細菌叢を健常無菌マウスに移植すると、食餌を十分摂取しても体重減少がみられることから、腸内細菌叢と栄養の間に、少なくとも食事を介さない何らかの直接の関連があることが示されている。

さらに最近、歯周病原性細菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* をマウスの口腔から投与したところ、腸内細菌叢を大きく変化させ、全身的な炎症を引き起こすことが報告され(Yamazaki K et al., 2014)、口腔内環境と全身疾患の関連メカニズムとして、口腔内細菌による腸内細菌叢の攪乱が注目を集めている。

### 2. 研究の目的

本研究では、次世代シーケンサーを用いた16SrRNA解析により、口腔内細菌叢と腸内細菌叢を網羅的に解析し、高齢者の低体重や低栄養、フレイルと腸内細菌叢との関連を明らかにすること、さらにフレイルの発症や維持と、腸内エコシステム(腸内細菌叢と宿主が緊密な異種生物間相互作用によって構成される複雑な腸内生態系)の変調との関わりを検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

岡山市内の介護老人保健施設あいの里リハビリ苑に入所している要介護高齢者で、管理栄養士に管理された同一の食事を摂取している方を対象とした。家族の同意が得られた入所者全員より、平成29年5月に糞便を回収(岡山大学大学院疫学研究倫理審査委員会 承認番号1606-034)した。解析対象は26名(男性2名、女性24名、平均年齢:  $85.7 \pm 8.7$  歳、要介護度: 要介護度2: 4人 要介護度3: 6人 要介護度4: 9人 要介護度5: 7人 BMI:  $21.0 (17.3-24.3)$ )であった。

得られた検体から genomic DNA を精製し、次世代シーケンサーによる16SrRNA解析を行い、クラスタ解析を行った。

### 4. 研究成果

門レベルにおける解析の結果、過体重者において比率が有意に増加する菌叢 X、低体重者において比率が有意に増加する菌叢 Y が存在した(図1,2)。

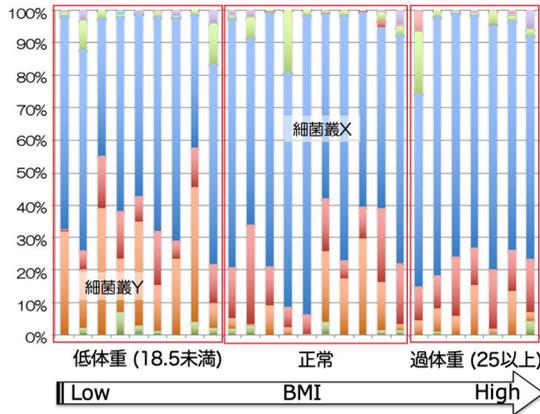


図1.ヒト腸内細菌叢の菌種組成：門レベル

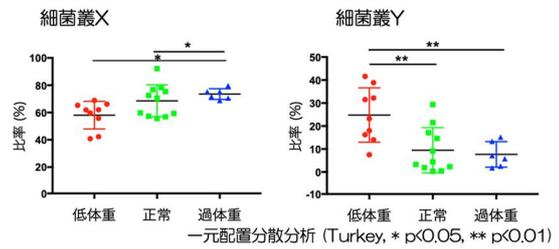


図2.門レベル解析結果

属レベルの解析の結果，BMI と正の相関にある細菌として細菌叢Zが，負の相関にある細菌として細菌叢Aが抽出された（図3,4）.

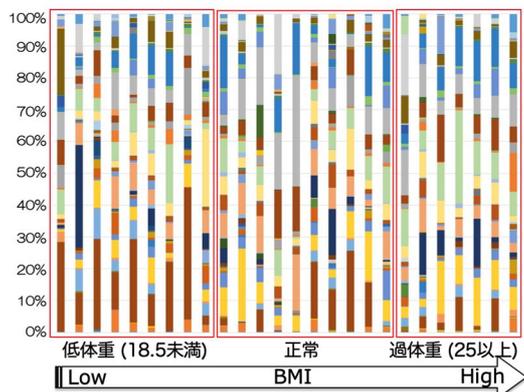


図3.ヒト腸内細菌叢の菌種組成：属レベル

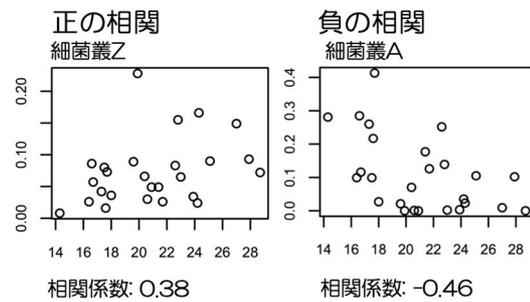


図4.細菌とBMIとの相関

さらに，属レベルの細菌叢データを用いてクラスター解析を行った結果，一部の低体重者のサンプルが同じクラスターに分布していることが明らかとなった（図5）.

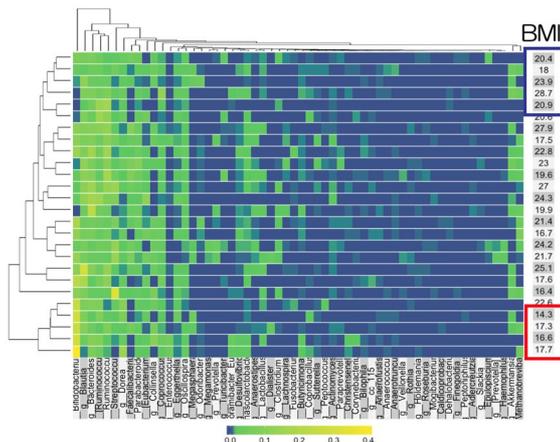


図5.クラスター解析

次に，低体重者と過体重者との腸内細菌代謝産物の違いを検討するため CE-TOFMS によるメタボローム解析を行った．その結果，低体重者で増加する代謝産物や，低体重者で低下する代謝産物が同定された．

以上，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，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．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．今後は，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予定である．

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Fujiwara A, Minakuchi H, Uehara J, Miki H, Inoue-Minakuchi M, Kimura-Ono A, Nawachi K, Maekawa K, Kuboki T. (2019) Loss of oral self-care ability results in higher risk of pneumonia in older inpatients: A prospective cohort study in a Japanese rural hospital. *Gerodontology*, in press, doi: 10.1111/ger.12402.査読有

### 〔学会発表〕(計 12 件)

大森 江, 大野充昭, 大野 彩, 後藤和義, 天野友貴, 水口真実, 小山絵理, 黒崎陽子, 松下 治, 窪木拓男, 大橋俊孝. 腸内エコシステムの観点からのフレイルの病態理解. 第 8 回補綴若手研究会, 2019.3.9-10, 鹿児島

松本博美, 水口真実, 沖田充司, 出口彰子, 中山良子, 藤井攝雄, 梶谷しおり. 口腔ケアラウンド導入の現状と課題-院内口腔管理システムの構築をめざして-. 第 34 回日本静脈経腸栄養学会学術集会, 2019.2.13-15, 品川

田辺俊介, 櫻根裕子, 今井祥子, 長谷川祐子, 金 聖暎, 日野隼人, 内山慶子, 三宅裕高, 森山裕美, 縄稚久美子, 水口真実, 菊地覚次, 白川靖博, 四方賢一, 藤原俊義. 肺移植患者に対する多職種による NST 介入の取り組み. 第 34 回日本静脈経腸栄養学会学術集会, 2019.2.13-15, 品川

沖田充司, 松本博美, 中山良子, 梶谷しおり, 水口真実. 摂食嚥下チーム立ち上げと PEG 導入の現状評価. 第 34 回日本静脈経腸栄養学会学術集会, 2019.2.13-15, 品川

縄稚久美子, 水口真実, 前田あずさ, 窪木拓男. 岡山県における要介護高齢者の食を支える多職種連携人材養成ワークショップの取り組みについて. 文部科学省 課題解決型高度医療人材養成プログラム 連携総括シンポジウム, 2019.2.16-17, 岡山

矢尾真弓, 水口真実, 縄稚久美子, 前田あずさ, 前田直人, 森 貴幸, 野島靖子, 武田宏明, 杉本恭子, 窪木拓男, 浅海淳一. 老人介護・在宅介護施設を用いた PBL 演習の取り組みについて. 文部科学省 課題解決型高度医療人材養成プログラム 連携総括シンポジウム 2019.2.16-17, 岡山

水口真実, 縄稚久美子, 前田あずさ, 窪木拓男. 要介護者の食を支える人材養成セミナーの取組み~ミールラウンドを模した多職種連携ワークショップを通じて~. 第 25 回岡山県保健福祉学, 2019.1.21, 岡山

森光 大, 山本道代, 丸尾かおり, 村田尚道, 水口真実, 中山良子. 地域ケアシステムにおける誤嚥性肺炎を繰り返さないための在宅 NST システムの構築. 第 24 回日本摂食嚥下リハビリテーション学会学術大会, 2018.9.8-9, 仙台

縄稚久美子, 水口真実, 高橋賢晃, 前田あずさ, 三野卓哉, 三木春奈, 黒崎陽子, 小山絵理, 中川晋輔, 沼本 賢, 國友由理, 野村 優, 前川賢治, 菊谷 武, 窪木拓男. 要介護高齢者のためのミールラウンドを模した多職種連携ワークショップの試み. 平成 29 年度公益社団法人日本補綴歯科学会中国・四国支部学術大会, 2017.8.26-27, 山口

縄稚久美子, 水口真実, 前田あずさ, 三野卓哉, 三木春奈, 黒崎陽子, 小山絵理, 中川晋輔, 沼本 賢, 國友由理, 野村 優, 前川賢治, 窪木拓男. 岡山県における栄養管理多職種連携を推進する人材養成セミナーの取り組み. 一般社団法人日本老年歯科医学会第 28 回総会・学術大会. 2017.6.14-16, 名古屋

縄稚久美子, 水口真実, 前田あずさ, 三野卓哉, 三木春奈, 黒崎陽子, 小山絵理, 中川晋輔, 沼本 賢, 國友由理, 野村 優, 前川賢治, 窪木拓男. 岡山県の口腔栄養関連サービスを推進する人材を養成する生涯教育ワークショップの取り組み. 第 36 回日本歯科医学教育学会会総会・学術大会. 2017.7.28-29, 松本

水口真実, 縄稚久美子, 國友由理, 土佐郁恵, 天野友貴, 徳本佳奈, 櫻根裕子, 長谷川祐子, 窪木拓男. 体験型演習を取り入れた在宅栄養管理教育~岡山大学歯学での試み~. 第 32 回日本静脈経腸栄養学会学術集会. 2017.2.23-24, 岡山

### 〔図書〕(計 0 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：窪木 拓男  
ローマ字氏名：Kuboki Takuo  
所属研究機関名：岡山大学  
部局名：医歯薬学総合研究科  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：00225195

研究分担者氏名：大野 彩  
ローマ字氏名：Kimura-Ono Aya  
所属研究機関名：岡山大学  
部局名：大学病院  
職名：助教  
研究者番号(8桁)：20584626

研究分担者氏名：大野 充昭  
ローマ字氏名：Ono Mitsuaki  
所属研究機関名：岡山大学  
部局名：医歯薬学総合研究科  
職名：准教授  
研究者番号(8桁)：60613156

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。