

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10463

研究課題名(和文) 高病原性口腔細菌による好酸球性食道炎の発症・悪化メカニズムの解明

研究課題名(英文) A research for investigating the mechanism how highly pathogenic oral bacteria induces eosinophilic esophagitis.

研究代表者

新林 友美 (Niibayashi, Tomomi)

島根大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：50529675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性食道炎(EoE)の患者では虫歯の原因菌と歯周病原因菌の保菌率が高く、口腔内細菌の種類も少なくなっている状態であることが分かった。また、*Neisseria mucosa*という菌種が口腔内に少ないほど、食道中の好酸球の数が多いことが分かった。これらのことからEoE患者では特定の口腔内細菌が繁殖しやすい環境になっており、ある種の口腔内細菌が病状と関連する可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は口腔内細菌が様々な全身疾患の潜在的な発症リスク因子となりうるという仮説のもとに検討を行ってきた。これは昨今の腸内細菌の研究コンセプトに類似しているものであるが、口腔内細菌での検討は非常に少ない。本研究は種々の全身疾患と口腔内細菌との関連を明らかにすることで、口腔ケアの重要性を理論的に示すと同時に、将来的に疾患リスクの低減や医療費の削減に資するための基礎的な知見を提供する意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus mutans (S.m) and Porphyromonas gingivalis (P.g) are hypathogenic oral bacteria which can cause dental caries and periodontitis respectively. Our present study has demonstrated that patients who suffer from eosinophilic esophagitis tend to show higher detection rate of S.m and P.g in their oral cavity compared to that in healthy subjects. Besides, population of *Neisseria mucosa*, a commensal oral bacteria is negatively correlated to number of eosinophils in esophagus of EoE patients. These results suggest that environment within oral cavity of EoE patients is suitable for growth of several types of oral bacteria including hypathogenic ones, that possibly affects disease state of EoE.

研究分野：全身疾患と口腔内細菌との関連性

キーワード：歯周病原因性菌 streptococcus mutans Neisseria 好酸球性食道炎

## 1. 研究開始当初の背景

### 1-1. 好酸球性食道炎 (eosinophilic esophagitis : 以下 EoE) について

EoE は食道管粘膜に多数の好酸球が浸潤し、機能障害に伴う種々の症状が出現する難治性疾患の1つである。2011年の調査では日本人の有病率は5000人に1人の頻度であることが報告されており、その患者数は近年増加傾向にある。発症者の半数にアトピー素因や喘息の合併がみられることから、食品や微生物、空中の花粉などがアレルゲンとなっておこる慢性アレルギー疾患に類似したメカニズムで発症する可能性が指摘されている。また、好酸球浸潤を誘導するケモカインの遺伝子多型が発症に関与するという報告もある。しかしながら、これらの素因があっても発症しない場合のほうがはるかに多い。したがって、遺伝的な要因だけでなく、環境的な要因が大きく発症に関与することが推察されている。

### 1-2. 口腔内の衛生状態と健康状態との関連

口腔内に存在する細菌は病原性微生物などの有害因子が体内へ侵入するのを防ぐバリアとして機能している。一方で病原性を有する細菌も存在し、それらの菌が歯磨きや歯周炎などによって局所の血管から全身循環に移行することが報告されている。我々はこれまで、う蝕原因性菌である *Streptococcus mutans* (*S.m*) が脳卒中と潰瘍性大腸炎の発症や悪化に直接的に関わること、歯周病原性菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) が非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) を悪化させることを証明してきた。このことは口腔内の衛生状態が悪化して高病原性細菌が多く繁殖すると、自歯の喪失だけでなく、健康寿命の短縮や突然死などといった生命の危機に直結する問題を引き起こす可能性があることを示している。しかしながら、我々の研究は数ある全身疾患のうち、数種類の全身疾患の発症や悪化に口腔内細菌が関与することを示したに過ぎない。すなわち、特定の口腔内細菌の保菌がリスクファクターとなって発症・増悪する全身疾患が依然として潜在している可能性が高い。

## 2. 研究の目的

これまで我々が示してきた、全身疾患の発症や悪化と密接な関連がある口腔内高病原性細菌が EoE の発症や悪化と関連する要因となりうるか否かを明らかにすることを目的とした。そのために、EoE 患者において保有率の高い口腔内細菌や、口腔内細菌叢に占める割合が健常者と異なる細菌があるのか否か。特定の菌の保菌や比率の変化が EoE の病状と関連するのかどうか。これら2点について検討を行った。

## 3. 研究の方法

### 3-1. EoE 患者における高病原性細菌の検出と疾患との関連性の検討

島根大学医学部付属病院消化器内科にて診断された EoE 患者 (n=52) から唾液サンプルを採取した。このサンプルから細菌 DNA を単離し、PCR 法と電気泳動によって *S.m* と *P.g* の検出を行った。*S.m* についてはコラーゲン結合タンパク質 (*cnm*) を持つ亜種があり、これが脳卒中や潰瘍性大腸炎の発症・増悪に関与しているため、この亜種の検出も併せて行った。また、歯周病原性菌は *P.g* の他にも複数存在することから、代表的な歯周病原性菌として *Prevotella intermedia* (*P.i*)、*Tannerella forsythia* (*T.f*)、*Treponema denticola* (*T.d*) についても同様の検討を行った。これらの菌の検出率と odds 比を算出し、EoE 患者と健常者 (n=50、特定の疾患、メディケーションなし) の間で比較を行った。尚、odds 比は以下の計算式で算出した。

$$\text{odds 比} = \text{EoE 患者の Z} / \text{健常者の Z} \quad (\text{Z} = \text{各菌の PCR 陽性者数} / \text{PCR 陰性者数})$$

### 3-2. EoE 患者における口腔内細菌叢の検討

検討3-1と同じサンプルを使用し、次世代シーケンサーを用いて細菌の16S rRNA ゲノム配列の V3-V4 領域 (約 600bp) を網羅的にシーケンスした。次いで、Illumina 社のクラウド解析システム (16S Metagenomics) を用いてシーケンスした配列を解析し、細菌の属および種を同定した。その後、EoE と健常者間で菌叢を構成する菌種の多様性の比較 (chao1 値の比較) と菌叢を構成する各菌の比率の比較を行った。

### 3-3. EoE 患者における各口腔内細菌の保菌・比率と病態パラメータとの関連性の検討

上記3-1、3-2の検討で得られた各 EoE 患者の口腔内細菌の保菌率・口腔内細菌叢中の比率と食道組織中好酸球数 (食道組織の HE 染色 1 視野や当りの好酸球数)、末梢血中好酸球比率、血清 IgE 値との相関性を検討した。

### 3-4. EoE 患者における各口腔内細菌の保菌・比率と治療抵抗性との関連性の検討

サンプル採取時点または採取後に薬物治療を受けた EoE 患者 (n=52) のうち、プロトンポンプ阻害剤 (PPI) のみを治療に用いた患者 (n=36)、PPI に治療抵抗性を示したためポノプラザン (PCAB) が適用となった患者 (PPI + PCAB, n=8)、PCAB にも治療抵抗性を示し、ステロイド剤を適用した患者 (steroid, n=8) について3-3と同様の検討を行った。

#### 4 . 研究成果

##### 4 - 1 . EoE 患者における高病原性細菌の検出と疾患との関連性の検討

*S.m* の検出率は健常者で 64% (32/50)、EoE 患者では 84.6% (44/52) であり、EoE 患者の方が高値を示した。Odds 比は 3.09 (95% CI:1.20-7.99,  $p=0.017$ ) と算出されたことから、*S.m* の保菌と EoE 患者であることの間には強い正の相関が認められた。また、*S.m* のうち *cnm* を有する亜種の検出率は健常者 31.8% (7/32) に対して、EoE では 20.5% (9/52) であり、EoE の方がやや低値であった。Odds 比は 0.55 (95%CI:0.17-1.75,  $p=0.310$ ) と算出され、EoE との有意味な相関性は認められなかった。

健常者と EoE 患者における歯周病原性菌の検出率はそれぞれ *P.g*: 36% (18/50), 53.8% (28/52)、*P.i*: 16% (8/50), 23.1% (12/52)、*T.f*: 70% (35/50), 92.3% (48/52)、*T.d*: 6% (3/50), 7.7% (4/52) であった。Odds 比は *P.g*: 1.78 (95% CI:0.80-3.93,  $p=0.154$ )、*P.i*: 1.58 (95% CI:0.58-4.26,  $p=0.368$ )、*T.f*: 5.14 (95% CI:1.57-16.84,  $p=0.004$ )、*T.d*: 1.31 (95% CI:0.28-6.15,  $p=1.000$ ) と算出された。すなわち *T.f* のみで有意な差が認められ、同菌と EoE であることとの間に強い正の相関があることが示された。

##### 4 - 2 . EoE 患者における口腔内細菌叢の検討

健常者の chao1 値が  $368 \pm 210$  (SD) であったのに対し、EoE 患者では  $157 \pm 37$  であり、両者の間には有意差が認められた ( $p < 0.001$ )。すなわち EoE 患者では口腔内細菌叢を構成する菌種の多様性が減少していることが示された。個別の菌の解析では *Veillonella*, *Porphyromonas*, *Mannheimia* 属の菌の比率が EoE 患者で高いことが示された。種レベルでの解析結果は属レベルでの解析結果を反映しており、*Veillonella atypica*, *Porphyromonas catoniae*, *Mannheimia cavie* の比率が EoE 患者で有意に高かった。また、種レベルの解析では EoE 患者において複数の streptococcus 種 (*pseudopneumoniae*, *infantis*, *oralis*, *sanguinis*) の比率が低いことが特徴的であった。そこで、同じ *Streptococcus* 種である *S.m* がこれらの常在性口腔内 *Streptococcus* 種の増殖に影響を与えている可能性を検討した。EoE 患者における *S.m* の比率 (3-2 の解析結果より得られたデータ) と他の *Streptococcus* 種の比率の相関性を解析したところ、*S.m* の比率が高いほど他の多くの *Streptococcus* 種の比率が有意に低いことが示された (相関係数 *pseudopneumoniae*: - 0.448, *infantis*: - 0.446, *oralis*: - 0.421 (有意差なし), *sanguinis*: - 0.47, *tigurinus*: - 0.501, *vestibularis*: 0.433)。したがって、*S.m* の増殖が他の *Streptococcus* 種の増殖に影響を与えている可能性が示唆された。一方で、*S.m* や *T.f* の保菌と相関する常在性口腔内細菌を属および種レベルで個別に探索したが、有意な相関性が認められる菌は見つからなかった。

##### 4 - 3 . EoE 患者における各口腔内細菌の保菌・比率と病態パラメータとの関連性の検討

本検討で解析対象とした菌の保菌率・口腔内細菌叢中の比率と病態パラメータの値との相関性を総当たりで検討した結果、食道中の好酸球数と *Neisseria mucosa* との組み合わせでのみ有意な差が認められた。具体的には *Neisseria mucosa* の比率が低いほど食道中の好酸球数が多いという負の相関が示された (相関係数: - 0.301)。この相関はこの菌に特有であり、他の *Neisseria* 種を含めた解析として、*Neisseria* 属の比率と食道組織中好酸球数との相関性解析を行っても有意な相関性は認められなかった。

##### 4 - 4 . EoE 患者における各口腔内細菌の保菌・比率と治療抵抗性との関連性の検討

PPI のみで治療を行った EoE 患者では、*Haemophilus* 属の比率および *Haemophilus parainfluenzae* 種の比率と末梢血中好酸球数比率の間に有意な正の相関が認められた (相関係数: 属 = 0.352, 種 = 0.387)。PPI PCAB の患者では *Streptococcus* 属および 2 種類の *Streptococcus* 種 (*tigurinus*, *pseudopneumoniae*) の比率と食道組織中好酸球数の間に有意な負の相関が認められた (相関係数: 属 = - 0.872, 種 = - 0.724, - 0.786)。Steroid 投与に至るまで治療抵抗性を示した患者では *Granulicatella* 属の比率と末梢血中好酸球数比率との間に有意な負の相関が認められた (相関係数: - 0.738) また、*Streptococcus tigurinus* 種の比率と食道組織中好酸球数との間に正の相関が認められた (相関係数: 0.719)。このように、治療抵抗性を示した患者において病態パラメータと有意な相関性が認められた口腔内細菌は存在したが、相関に一貫性がなく、総じて口腔内細菌と EoE の治療抵抗性との関連性を示す結果は得られなかったと考えられる。

以上の結果から、EoE 患者では高病原性口腔内細菌である *S.m* と *T.f* が増殖しやすい状態にある可能性が示唆された。その原因として EoE 患者では口腔内細菌叢の多様性が減少することによって特定の細菌が繁殖しやすい口腔内環境となっていることが考えられる。しかし、一方でそのような環境が特定の菌の増減によって誘発されている可能性は低いと考えられる。また、食道中の好酸球数が *Neisseria mucosa* 比率の減少と相関していたことから、EoE 患者において特定の口腔内細菌が繁殖しやすい口腔衛生環境が病態と関連する可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kamata Y, Kessoku T, Shimizu T, Kobayashi T, Kurihashi T, Sato S, Kuraji S, Aoyama N, Iwasaki T, Takashiba S, Hamada N, Kodama T, Tamura T, Ino S, Higurashi T, Taguri M, Yamanaka T, Yoneda M, Usuda H, Wada K, Nakajima A, Minabe M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Efficacy and safety of PERIODontal treatment versus usual care for Nonalcoholic liver disease: protocol of the PERION multicenter, two-arm, open-label, randomized trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trials	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13063-020-4201-y.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 臼田春樹、田中徹也、岡本貴行、和田孝一郎
2. 発表標題 好酸球性食道炎患者における公病原性口腔内細菌の保菌についての検討
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 臼田春樹、郡司位秀、大町健介、佐々木良二、前田憲邦、藤江徹、朝比奈圭、松浦良二、澄川裕之、鐘築剛、三上隆浩、中村元祐、比良田和典、田中雅彦、齋藤誠、田中延仁、青木誠、吉川浩郎、佐原美鈴、新林友美、Kazi Helal Hossain, Israt Jahan、田中徹也、岡本貴行、和田孝一郎、富永一進、渡邊公人、内田朋良
2. 発表標題 島根県の住民における口腔内高病原性の保菌状況（年齢および性別での差異についての検討）
3. 学会等名 第4回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 臼田春樹、新林友美、岡本貴行、田中徹也、和田孝一郎
2. 発表標題 Streptococcus mutansの保菌は好酸球性食道炎の有病率と相関する
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 臼田春樹
2. 発表標題 好酸球食道炎患者における口腔内細菌の解析
3. 学会等名 第2回中四国薬理学懇話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 臼田 春樹、田中 徹也、岡本 貴行、和田 孝一郎
2. 発表標題 好酸球性食道炎患者における高病原性口腔内細菌の保菌についての検討
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 臼田春樹
2. 発表標題 島根県歯科受診者を対象とした口腔内細菌保菌状況の調査
3. 学会等名 2019年度島根県歯科医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 臼田 春樹、新林 友美、岡本 貴行、和田 孝一郎
2. 発表標題 口腔内細菌の保菌と好酸球性食道炎の関連性についての検討
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 臼田春樹、新林友美、岡本貴行、和田孝一郎
2. 発表標題 口腔内細菌の保菌と好酸球性食道炎の関連性についての基礎的検討
3. 学会等名 第5回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 臼田 春樹、新林 友美、岡本 貴行、和田 孝一郎
2. 発表標題 好酸球性食道炎患者における高病原性口腔内細菌の保菌および口腔内細菌叢についての基礎的検討
3. 学会等名 第74回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

島根大学医学部薬理学講座 <a href="https://www.med.shimane-u.ac.jp/pharmacology/index.html">https://www.med.shimane-u.ac.jp/pharmacology/index.html</a>
---

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	臼田 春樹  (Usuda Haruki)  (30707667)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教    (15201)	

6. 研究組織（つづき）

	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	石原 俊治  (Ishihara Syunji)  (80263531)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授   (15201)	
研究分担者	和田 孝一郎  (Wada koichiro)  (90263467)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授   (15201)	

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