

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10473

研究課題名（和文）肺炎予防に向けた高齢者の舌菌叢遷移を誘導する因子の探索的研究

研究課題名（英文）Exploratory study of factors inducing tongue microbiota transition in the elderly for the prevention of pneumonia

研究代表者

高橋 一也（TAKAHASHI, Kazuya）

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10236268

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）：本研究は、我々が構築した菌叢構成を維持したまま培養可能な口腔の菌叢培養モデルと次世代シーケンス技術を組み合わせることで、高齢者の細菌叢を健康型へと遷移させる方法を、ヒト介入試験をすることなく探索することを目的として実施した。その結果、酸素濃度とpHによって細菌叢が大きく変化する条件を明らかにした。本研究が、「高齢者の舌菌叢を変えることで肺炎関連死リスクを下げる」手法開発の一助となると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者の誤嚥性肺炎発症リスクの低下を目指し、社会的支援が行われていくなかで、摂食嚥下機能の向上、新規の口腔ケア手法の開発など、多面的な研究が並行して進められてきている。また、口腔細菌叢のタイプと肺炎関連死のリスクが関連することが最近報告されてきている。本研究により、「高齢者の舌菌叢を変える」複数の方法の一端を提示することができた。今後、肺炎予防を含めた様々な口腔疾患、全身疾患の予防・治療法を開発する一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to find a method for transitioning the bacterial microbiota of the elderly to a healthy type without human intervention trials, by combining our oral microbiota culture model, which can be cultured while maintaining the microbiota composition, with next-generation sequencing technology. As a result, the conditions under which the bacterial microbiota changes significantly with oxygen concentration and pH were clarified. It is hoped that this study will contribute to the development of a method to reduce the risk of pneumonia-related deaths by changing the tongue microbiota of the elderly.

研究分野：高齢者歯科学

キーワード：高齢者 口腔健康 細菌叢

1. 研究開始当初の背景

高齢者の肺炎は、その高い死亡率から国内はもとより世界的に重要な健康問題として注目されている。特に、オーラルフレイルなどで摂食嚥下機能が著しく低下した場合、多種の口腔常在細菌を含む口腔内容物が誤嚥されやすくなり、肺炎発症のリスクが高まることが知られている。誤嚥性肺炎の原因菌を明らかにする研究も進められてきており、偏性嫌気性菌群や黄色ブドウ球菌などが候補として挙げられてきたが、実験技術的な問題から発症との関連を追求することは難しく、細菌学的アプローチによって誤嚥性肺炎を予防する段には至っていない。このことから、誤嚥性肺炎の予防には、社会的支援や摂食嚥下機能の向上と共に、口腔ケアにより口腔内の総細菌量を減らすことが最重要と認識され、菌量を減らす様々な方法が研究、開発されてきている。

近年、次世代シーケンシング技術と呼ばれる、短時間で大量の塩基配列を解読できる技術が開発され、口腔や腸管に共生する細菌の菌叢(細菌構成のバランス)を比較的簡便に解析できるようになった。高齢者研究分野においても、フレイルの状態に伴って口腔や腸管の菌叢バランスが崩れていく現象(ディスバイオーシス)が観察されており(Ogawa *et al.*, *Sci Rep.* 2018; O' Toole & Jeffery, *Science.* 2015)、ヒト側の機能回復と共にヒト共生菌叢の回復も重要な課題となっている。また2018年、九州大学歯学部口腔予防医学分野のグループにより、日本人の高齢者の舌菌叢は、大きく2つのタイプ(タイプ1型と2型)に分けられること、19ヶ月の追跡調査により、タイプ1型菌叢をもつグループは、タイプ2型菌叢グループより肺炎関連死のリスクが有意に高いことが報告された(Kageyama *et al.*, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018; Asakawa *et al.*, *mSphere.* 2018)(表1)。このことは、口腔のプラーク量だけでなく、プラークの質(菌叢)も肺炎発症に大きく影響していることを示唆している。「高齢者の口腔菌叢を変える」ことによる予防研究への道筋が開けたが、高齢者を被検者とするヒト介入試験が難しい点、投薬や様々な口腔ケアなどの口腔菌叢を攪乱させる介入が多いなど、いくつか研究の伸展を阻む問題が残されている。最近、我々は上記の問題を解決するために、SHI 培地(Tian *et al.*, *Mol Oral Microbiol.* 2010)の組成比を改変することで、口腔の菌叢を維持しながら試験管内で培養できる菌叢培養モデルを構築した(図1)。この系を用いることで、高齢者を被検者としたヒト介入試験を回避し、口腔細菌叢遷移を高解像度で実験的に観察できる可能性が示された。

表1 高齢者の舌菌叢タイプとその特徴

| 高齢者の舌菌叢 | 肺炎関連死リスク | 比率の高い菌種  |
|---------|----------|--|
| タイプ1型   | 高        | <i>Str. salivarius</i><br><i>Str. parasanguinis</i> II<br><i>Prevotella histicola</i><br><i>Veillonella atypica</i>            |
| タイプ2型   | 低        | <i>Neisseria flavescens</i><br><i>Porphyromonas pasteri</i><br><i>Fuso. periodonticum</i><br><i>Hae. parainfluenzae</i><br>... |



*Str.*, *Streptococcus*; *Fuso.*, *Fusobacterium*; *Hae.*, *Haemophilus*  
(Kageyama *et al.*, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018;  
Asakawa *et al.*, *mSphere.* 2018 より改変)

2. 研究の目的

高齢者の肺炎死亡率を減らす方法を開発するにあたり、次の3点:(1) 高齢者舌菌叢をタイプ1型から2型へと遷移させる方法・添加物はあるのか?、(2) 被検者の高齢者に負担なく、舌菌叢遷移の誘導法を探索することは可能か?、(3) 投薬や口腔ケアなど口腔菌叢を攪乱させる介入の影響をどう排除するのか? という解決すべき課題が存在する。

本研究は前述の課題に答えるため、「我々が構築した菌叢培養モデル」、「次世代シーケンシングによる菌叢解析」、「R スクリプトによる統計解析」の3つの手法を組み合わせ、高齢者への負担を配慮した実験計画により、高齢者舌菌叢をタイプ1型から2型へと遷移させる方法・添加物を探索することを目的とした。本研究により、「高齢者の舌菌叢を変える」複数の方法を提示でき、肺炎予防を含めた様々な口腔疾患、全身疾患の予防・治療法を開発する一助となることが期待される。

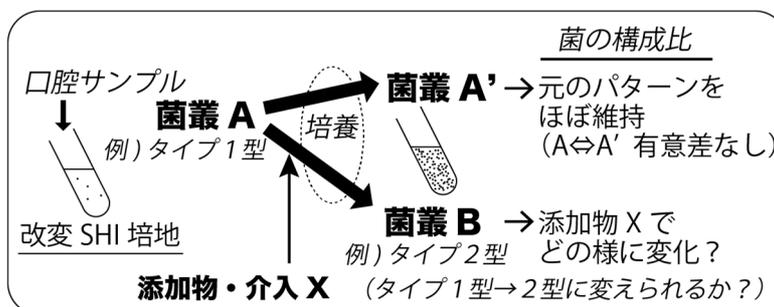


図1. 我々が構築した菌叢培養モデル

培養: 嫌気, あるいは 5% CO2 好気で, 37°C で 20 時間浸透培養する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細菌叢培養モデル

本研究の特徴は、高齢者の舌菌叢変化を、我々が独自に開発した菌叢培養モデル(図1)を用いて解析することにある。具体的には、数名の中年期以前の成人被検者より滅菌綿棒(ハイドロフラックスワブ, スギヤマゲン)にて舌苔を採取し、添加物を様々な濃度で溶解した改変 SHI 培地に懸濁した。非接触濁度計(OD-Monitor C&T, タイテック)により培養増殖曲線を作成し、対数増殖期の光学密度が2割低下する添加物濃度を算出した。再度、舌苔を採取し、添加物を上記の方法で段階的に溶解した改変 SHI 培地を嫌気、あるいは5% CO<sub>2</sub>を含む好気条件で20時間振盪培養した(菌叢培養モデル)。集菌とDNA抽出の後、16S rRNA 遺伝子のV3-V4領域をPCR増幅し、次世代シーケンサーMiSeq(Illumina)にて塩基配列の解読を行った。配列情報からのOTU table作成、多様性解析、多様性解析などの統計解析は、本講座で構築しているRスク립トワークフローを使用した。また、培養前後や添加物曝露の系列毎に、細胞内ATP定量(BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay, プロメガ)とコロニー形成単位(CFU)を計測することで、総菌増加量の定量解析を行った。

#### (2) 酸素濃度による細菌叢変化の確認

細菌叢培養モデルでプラークを培養する際、酸素濃度を0, 2, 5, 10, 21%に変化させて20時間インキュベートした。サンプルから細菌DNAを抽出し、次世代シーケンサーMiSeq(Illumina)にて塩基配列の解読を行った。

#### (3) pHによる細菌叢変化の確認

細菌叢培養モデルでプラークを培養する際、培地のpHをリン酸緩衝液でpHを6~8に調整(0.5刻み)に変化させて20時間インキュベートした。サンプルから細菌DNAを抽出し、次世代シーケンサーMiSeq(Illumina)にて塩基配列の解読を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 細菌叢培養モデルの確立

細菌叢培養モデルは、接種した舌苔の菌叢を維持しつつ培養することで、ヒト介入試験を回避し、添加物質による菌叢変化を高解像度で解析できることを確認している。また、本手法は、「数菌種の共培養」「菌叢培養モデル」「ヒト介入試験・コホート研究」の様な関係性をもち、鍵となる菌種を用いてメカニズムの追求( )が可能となるだけでなく、実際のヒト試験で介入による菌叢変化を問う( )など、研究を有機的に発展させることが可能となる。高齢者の菌叢を変えることを目指したヒト介入研究は、高齢者自身にも非常に負担がかかるものであり、大量の候補物質をテストするのは現実的ではない。そこで我々は、そのような諸問題を解決した上で菌叢遷移を可能とする方法を検討し、採取したプラークなどの口腔サンプル菌叢を維持しつつ培養できる菌叢培養モデルを構築するに至った(図1)

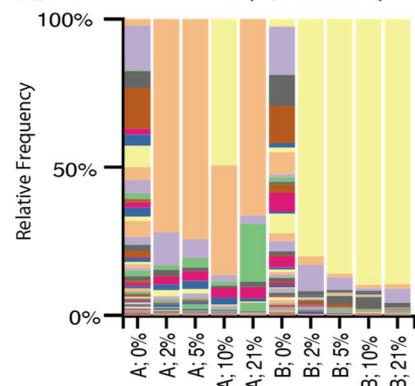


図2 酸素による細菌叢変化

#### (2) 酸素濃度による細菌叢変化

細菌叢培養モデルでプラークを培養する際、酸素濃度を0, 2, 5, 10, 21%に変化させた。その結果、酸素濃度に応じて細菌叢が大きく変化することが明らかとなった(図2)。具体的には、酸素濃度の上昇に伴って多様性が低下し、Neisseria属細菌の比率が大幅に上昇した。現在、サンプル数を増やして実験しており、結果がまとまり次第、学術論文として公表予定である。

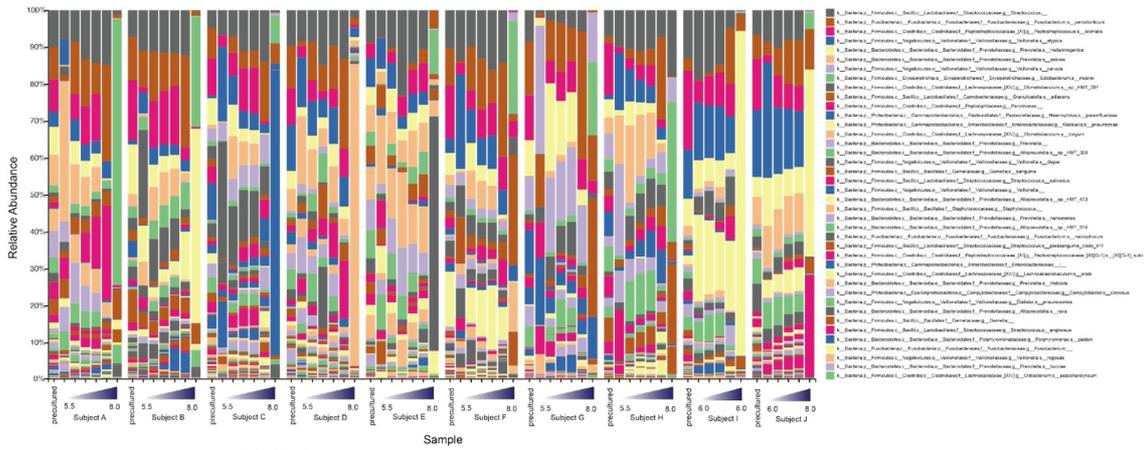


図3 pHによる細菌叢変化

(3) pHによる細菌叢変化

細菌叢培養モデルでプラークを培養する際、培地のpHをリン酸緩衝液でpHを6~8に調整した(0.5刻み)。その結果、特定のpHにおいて細菌叢が大きく変動することが明らかとなった(図3)。α多様性解析の結果、pH6.0, 6.5, 7.0では多様性が大きい、pH5.5, 7.5, 8.0では多様性が低下することが明らかとなった(図4)。また、β多様性解析においてpH5.5, 7.5, 8.0では細菌叢が元のものから大きく変化するディスバイオーシスが確認された(図5)。現在、学術論文の投稿準備中である。

(4) 本研究の将来構想

本研究により、酸素濃度とpHにより口腔細菌叢の変化(ディスバイオーシス)の特性の一端が明らかになった。今後、高齢者サンプルの解析を続けていくことで、「高齢者の舌菌叢を変えることで肺炎関連死リスクを下げる」手法開発の一助となると期待される。

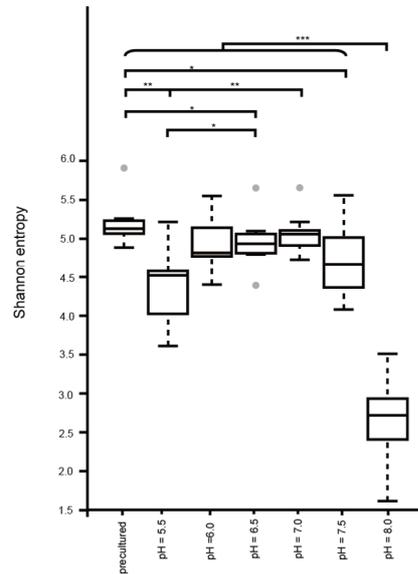


図4 pHによる細菌叢変化(α多様性)

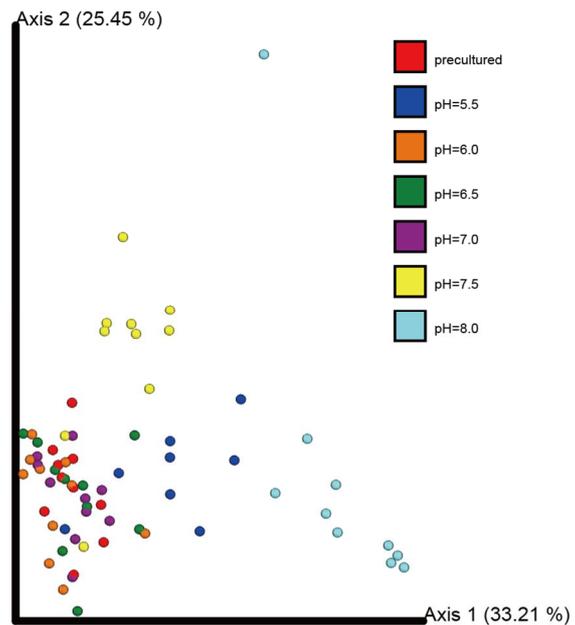


図5 pHによる細菌叢変化(β多様性)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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<br>Wang Dan, Nambu Takayuki, Tanimoto Hiroaki, Iwata Naohiro, Yoshikawa Kazushi, Okinaga Toshinori, Yamamoto Kazuyo | 4. 巻<br>10                |
| 2. 論文標題<br>Interdental Plaque Microbial Community Changes under In Vitro Violet LED Irradiation                            | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Antibiotics  | 6. 最初と最後の頁<br>1348 ~ 1348 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/antibiotics10111348   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Maruyama H, Masago A, Nambu T, Mashimo C, Takahashi K, Okinaga T.  | 4. 巻<br>9          |
| 2. 論文標題<br>Inter-site and interpersonal diversity of salivary and tongue microbiomes, and the effect of oral care tablets. | 5. 発行年<br>2020年    |
| 3. 雑誌名<br>F1000Res   | 6. 最初と最後の頁<br>1477 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.12688/f1000research.27502.1  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Masago A, Maruyama H, Nambu T, Mashimo C, Takahashi K.      | 4. 巻<br>54            |
| 2. 論文標題<br>Influence of tongue brushing on oral microbiome diversity. | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>J Osaka Dent Univ   | 6. 最初と最後の頁<br>205-212 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.18905/jodu.54.2_205                     | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Masago A, Maruyama H, Nambu T, Mashimo C, Takahashi K      | 4. 巻<br>54      |
| 2. 論文標題<br>Influence of tongue brushing on oral microbiome diversity | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Osaka Dental University                         | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>pHによる口腔細菌叢変化についての解析              |
| 2. 発表標題<br>黄堯, 南部隆之, 真下千穂, 円山由郷, 高橋一也, 沖永敏則 |
| 3. 学会等名<br>第74回日本細菌学会関西支部総会                 |
| 4. 発表年<br>2021年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Wang Dan, Nambu Takayuki, Tanimoto Hiroaki, Iwata Naohiro, Yoshikawa Kazushi, Okinaga Toshinori, Yamamoto Kazuyo |
| 2. 発表標題<br>Interdental Plaque Microbial Community Changes under In Vitro Violet LED Irradiation                             |
| 3. 学会等名<br>第74回日本細菌学会関西支部総会   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>並河大裕, 円山由郷, 真砂彩子, 真下千穂, 南部隆之, 沖永敏則, 高橋一也 |
| 2. 発表標題<br>プロポリスが示す細菌種特異的な増殖抑制効果                    |
| 3. 学会等名<br>第73回日本細菌学会関西支部総会                         |
| 4. 発表年<br>2020年                                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>並河大裕, 真砂彩子, 南部隆之, 小淵隆一郎, 奥野健太郎, Kang Wenyan, Zhang Lei, 沖永敏則, 高橋一也 |
| 2. 発表標題<br>高齢者舌苔細菌叢に与えるサルコペニアの影響  |
| 3. 学会等名<br>第31回日本老年歯科医学会  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>真砂彩子, 円山由郷, 南部隆之, 真下千穂, 高橋一也 |
| 2. 発表標題<br>口腔細菌叢の多様性に対する舌ブラシの影響         |
| 3. 学会等名<br>日本細菌学会関西支部会                  |
| 4. 発表年<br>2019年                         |

|                                  |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>南部隆之                  |
| 2. 発表標題<br>口腔細菌パターンを“健康型”へと変える試み |
| 3. 学会等名<br>日本歯科保存学会(招待講演)        |
| 4. 発表年<br>2019年                  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)            | 備考 |
|-------|--|----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 沖永 敏則<br><br>(OKINAGA Toshinori)<br><br>(60582773) | 大阪歯科大学・歯学部・教授<br><br><br>(34408) |    |
| 研究分担者 | 南部 隆之<br><br>(NAMBU Takayuki)<br><br>(80367903)    | 大阪歯科大学・歯学部・講師<br><br><br>(34408) |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|