

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21682

研究課題名(和文)次々世代ロングリードシーケンスによる口腔dysbiosisの新定義

研究課題名(英文)New definition of oral dysbiosis by using the more advanced generation long sequence

研究代表者

山下 喜久(Yamashita, Yoshihisa)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：20192403

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文):香川県まんのう町琴南地区の在宅高齢者について解析した結果、対象者の26.9%がフレイルに該当し、歯数が20歯未満の者では、食欲の低下、孤食、食べる楽しみがないと活力低下となることが分かり、少数歯の者では、フレイル予防のために食事妨げる要因に注意を払う必要があることが示唆された。一方、新型コロナウイルス感染症の影響で、当初の研究計画とは別に、歯科医院に依頼して採集した重度歯周病患について、久山町の健常者と唾液細菌叢の構成を比較した。その結果、歯周組織が健康な者の唾液に優勢であった細菌種のほとんどは、我々が過去に健康的な口腔細菌叢として定義したタイプ2の細菌叢に優勢な細菌種であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の科学研究では分子や細胞を単離し、その性状を解明することが注視されてきた。一方、実際の生命現象は様々な分子や細胞の複雑な相互作用であり、分子や細胞の単離精製では真の生命現象を解明できない。マイクロバイーム(MB)研究は正にそのような限界を超える生命現象解明へのアプローチの一つである。口腔MBに関しては、動物実験で無菌動物を用いても特定の細菌種群を選択的に口腔に定着させることは難しく、特定の口腔細菌種構成の健康への影響やその機序を動物実験で証明することは極めて困難である。そのような限界をヒトを対象とする分子疫学研究で打開しようとする本申請研究の学術的および社会的な意義は大きい。

研究成果の概要(英文):As a result of analyzing the dwelling elderly in the Kotonami area of Manno-town, Kagawa

Prefecture, 26.9% of the subjects were frail. It was found that lack of appetite, eating alone, and lack of enjoyment of eating leads to a decrease in vitality in people with lower than 20 teeth, suggesting that it is necessary to pay attention for factors that interfere with eating in order to prevent frailty in a case of people with lower tooth number.

On the other hand, due to the influence of SARS-CoV2 infection, apart from the original research plan, we asked a dental clinic to collect saliva samples from patients with severe periodontal disease and compared the composition of the salivary flora with those of healthy people in Hisayama-town. As a result, most of the bacterial species that predominated in the saliva of individuals with healthy periodontal tissue were predominant in type 2 flora, which we previously defined as healthy oral flora by ourselves.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：口腔マイクロバイーム 次々世代ロングリードシーケンス 口腔dysbiosis 高齢者

1. 研究開始当初の背景

本邦の国民医療費は平成 25 年に 40 兆円を越えその後年々増え続けており、世界に冠たる我が国の公的医療保険制度の持続可能性を脅かしている。一方で、歯周病等の口腔疾患や周術期の口腔管理の不良が全身の健康に大きく影響することが注目されており、適切な口腔管理による口腔環境の維持改善によって健康寿命を延伸し、引いては国民医療費を効率的に抑制することが期待されている。事実、2012 年には周術期の合併症予防を目的とした口腔機能管理料が公的医療保険に収載され、2016 年の診療報酬改定では口腔疾患とそれに関連する全身疾患の重症化予防への取り組みが重要視されている。さらに、我が国の財政経済政策の基本となる 2017 年以降の「骨太の方針」では口腔予防管理の重要性が明記されており、経済財政基盤の上からも口腔予防管理への社会的期待は年々高まっている。

口腔予防管理の基本は口腔疾患の原因である口腔マイクロバイオームを良好に保つことに他ならないが、効果的な口腔マイクロバイオームの管理については未だ十分な科学的根拠は確立されていない。これからの高齢化社会において歯科医療が社会の期待に応えるためには、病的リスクの高い口腔マイクロバイオームすなわち口腔 dysbiosis を理解し、その制御に必要な情報を蓄積し、口腔マイクロバイオームを科学的見地から効率良く的確にコントロールする技術を確立しなければならない。

申請者の研究分野では、次世代シーケンサーが実用化される以前から Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 法を独自に改良することで様々な疫学フィールドを基盤として口腔マイクロバイオーム研究にいち早く着手し、我が国の口腔マイクロバイオーム研究をその黎明期から牽引してきた実績がある。本研究はこれまでに蓄積してきた多くの経験とその経験から見てきた次世代ショートリードシーケンスから得られる情報の限界を踏まえて、そこから一歩先に抜け出すことを目的として発案した研究構想である。

2. 研究の目的

申請者らは、大規模コホート研究に基づく次世代ショートリードシーケンサーによる口腔マイクロバイオーム解析結果から、口腔疾患や肺炎死亡リスクに関連する口腔 dysbiosis タイプが存在することを提唱した。一方で、このような口腔 dysbiosis は 16S rRNA 遺伝子の短い領域 (V1-V2 領域) の相同性に基づいて定義されており、菌種レベルの同定は正確ではない。そこで、本研究では次々世代ロングリードシーケンサーである PacBio Sequel を用いて 16S rRNA 遺伝子の全長塩基解読を行い、口腔 dysbiosis を菌種レベルでより正確に定義することを目指す。

過去の V1-V2 部位の解析結果では、我々がタイプ 1 と定義した口腔 dysbiosis の者の割合が 55 歳以降に増加していた。そこで、当初香川県地域医療介護総合確保基金が実施する健診事業の参加者の中で 55 歳以上の者を対象として、2020 年と 2022 年に実施する健診時に唾液を採取し、唾液中の細菌種を次々世代ロングリードシーケンサーで解析して正確な口腔 dysbiosis の細菌種構成を新たに定義することとした。さらに、加齢に伴い口腔 dysbiosis へと遷移した者に有意に関連する全身および口腔の因子を特定して、口腔 dysbiosis の誘因を解明することで、新定義された口腔 dysbiosis が口腔ならびに全身の健康に及ぼす影響について Propensity score matching を応用した前向きコホート研究によって明らかにすることを目的としたが、コロナ禍の影響で香川県地域での調査研究が実施できなくなったため、調査対象者を急遽変更して過去に全国の歯科医院に依頼して採集していた重度歯周病患者についての解析を行うことで、上記の目的を達成することとした。

3. 研究の方法

香川県まんのう町琴南地区在住の 75 歳以上の在宅高齢者 252 人(男性 83 人、女性 169 人、平均年齢 82.4 ± 5.4 歳)に対して、口腔の健康状態や生活状況に関しての詳細な調査(口腔診査と質問紙調査)を実施し、口腔マイクロバイオームの分析のため唾液採取の対象者としての適正を確認した。しかし、コロナ禍の影響でまんのう町の高齢者住民から唾液を採取する調査の実施が困難となった。そこで、本研究計画の口腔の健康状態と嚥下機能、IADL、認知機能、栄養状態の関連性の解明とは別に、過去に全国の歯科医院に依頼して採集している重度歯周病患者について、久山町の健常者と唾液細菌叢の構成を比較することで、本研究の主な研究目的である口腔 dysbiosis の新定義を進めることに研究方針を大きく転換した。久山町住民の唾液サンプルについては、他の科研費を用いて進めている口腔細菌叢と腸内細菌叢の比較を目的として採取している唾液サンプルを用いて、上記の重度歯周病患者の唾液サンプルと比較した。

4. 研究成果

香川県まんのう町琴南区在住の 75 歳以上の在宅高齢者を対象とした口腔の健康状態と嚥下機能、手段的日常生活動作能力、認知機能、栄養状態を評価した。琴南地区在住の 75 歳以上の在宅高齢者 252 人の現在歯数は平均 13.2 ± 10.3 本で、無歯顎であった者は 19.7%、28 本以上あった者は 5.6%であった。嚥下機能は改訂水飲みテストで評価し、嚥下機能の低下が疑われる者は 4.9%であった。また、少数歯で義歯を装着していない場合など臼歯部で両側咬合が認められない者は 13.7%であった。手段的日常生活動作能力(Instrumental Activity

Daily Living; IADL)は老研式活動能力指標で評価した。IADLは手段的ADL、知的ADL、社会的ADLに分けられる。社会的ADLの「友だちの家を訪ねる」、手段的ADLの「バスや電車を使って1人で外出できる」、知的ADLの「本や雑誌を読む」が、自立して動作が行えないと回答した者に多かった。認知機能はMini-Cogで評価し、認知機能が低下している者は23.5%であった。栄養状態はMini-Nutritional Assessment Short-Formで評価し、低栄養の可能性のある、あるいは低栄養状態の者は29.1%であった。これらの結果から本調査対象者が当該研究の対象者として適していると判定され、調査の実施主体である香川県歯科医師会と協議して令和3年度に唾液採取を行う準備を進めた。また、唾液を用いた口腔細菌種のロンクグリードシーケンスについては他の集団から集めた唾液サンプルを用いて、目的とするリード数(一人あたり3000リード)の獲得が可能であることが確認できた。

さらにIADLについては現在歯数との関連性が認められ(ポアソン回帰分析でrate ratio 1.007, 95%CI: 1.002-1.013)、歯数が多い者ではIADLの値が高い、つまり自立した社会生活を営む能力が高かった。現在歯数とIADLの関係のメカニズムとして、栄養状態、認知機能、社会参加状況が関与していると考えられた。そのため、その経路を検討するために因果媒介分析を行ったところ、現在歯数とIADLの関係には認知機能と社会参加が媒介していたが(proportion mediatedが認知機能は27.3%、社会参加は22.7%)、栄養状態は関与していなかった。

しかしその後蔓延した新型コロナウイルス感染症の影響で、新たに唾液を採取する計画は、コロナ感染状況が収束しない状況では実施が困難との結論に達した。そこで、本研究計画の口腔の健康状態と嚥下機能、IADL、認知機能、栄養状態の関連性の解明とは別に、過去に全国の歯科医院に依頼して採集している重度歯周病患者について、久山町の健常者と唾液細菌叢の構成を比較することで、本研究の主な研究目的である口腔dysbiosisの新定義を進めることに研究方針を大きく転換した。久山町研究結果から歯周病に関連する唾液細菌叢の特徴を4mm以上の歯周ポケットが0%の歯周組織が健康な者1,239名と50%以上の重症歯周病患者136名を比較すると歯周組織が健康な者の唾液には*Neisseria flavescens*、*Porphyromonas pasteri*、*Veillonella rogosae*、*Haemophilus parainfluenzae*、*Lautropia mirabilis*が有意に優勢であった。これらのほとんどは我々が過去に健康的な口腔細菌叢として定義したタイプ2の細菌叢に優勢な細菌種であった。また、LEfSe解析結果でも歯周組織が健康な者を特徴付けたのは主にタイプ2の細菌種であったが、歯周病患者ではタイプ1の細菌種よりもむしろ歯周病ポケット特異細菌種が唾液細菌叢を特徴付けていた。さらに、歯科医院を受診した重症歯周病患者35名と歯周組織が健康な25名を比較した結果でも久山町研究とほぼ同様な結果が得られた。

香川県まんのう町琴南地区の在宅高齢者についてはその後も解析を継続し、160名を対象として食事を妨げる諸要因とフレイルの関係を多変量ロジスティック回帰モデルで調べた。the Study of Osteoporotic Fractures (SOF) indexでフレイルを評価し、2項目以上が該当する場合をフレイルと定義した。その結果、対象者の26.9%がフレイルに該当した。フレイルをアウトカムとして解析した結果、歯数が20歯未満の者では、食欲の低下、孤食、食べる楽しみがないと活力低下となることが分かった。一方、20歯以上の者では、食事を妨げる諸要因とフレイルには関連が認められず、歯を多く保有すると栄養状態が維持されるため、関連しなかった可能性がある。しかし、少数歯の者では、フレイル予防のために食事妨げる要因に注意を払う必要があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	古田 美智子 (Furuta Michiko) (20509591)	九州大学・歯学研究院・講師 (17102)	
研究分担者	竹下 徹 (Takeshita Toru) (50546471)	九州大学・歯学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	須磨 紫乃 (Suma Shino) (70759365)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	影山 伸哉 (Kageyama Shinya) (90822495)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	朝川 美加季 (Asakawa Mikari) (90852583)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	

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