

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10202

研究課題名（和文）生活習慣病の予防法確立を目指した経年的口腔内細菌叢変化と生活習慣病の関係解明

研究課題名（英文）Study of the relationship over time between oral microbiome and lifestyle diseases with the aim of establishing preventive methods for lifestyle diseases

研究代表者

小林 恒（Kobayashi, Wataru）

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：50234860

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：生活習慣病として脂質異常症、動脈硬化、糖尿病について横断的・縦断的に口腔内細菌叢との関係を解析した。細菌叢の多様性を統計学的に解析すると、何れの疾患でも細菌叢に差を認めた。脂質異常症発症には細菌叢の違いが影響していた。特定細菌の探索に関して群間比較分析と多変量解析の結果から、Megasphaera属が脂質異常症の発症に関連していた。動脈硬化に関しては歯周病菌が関係していることがわかった。糖尿病に関しては細菌属としてはLactobacillus属が関係していた。舌苔の歯周病菌数を比較したところ、歯周病の有無と有意な関連を認め、生活習慣病の予防として歯周病の制御が重要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌はいわゆる一つの臓器として様々な疾患と関係し、腸内環境を整えるヨーグルトのようなプロバイオティクスに関する研究が多くなされている。近年、口腔内細菌も腸内細菌と同様に様々な全身疾患と関連していることが報告されている。特に一部の歯周病菌が認知症、動脈硬化に関与するとともに腸内細菌へも影響を及ぼすことが明らかとなっている。本研究結果から特定の細菌だけではなく口腔内細菌叢全体が変化する多様性が生活習慣病の発症に影響を及ぼしていることを縦断研究から明らかとした。口腔は腸内と違い、直接関与できる部位であることから口腔衛生の向上による生活習慣病予防の可能性があると社会的意義が大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：The relationship between the oral microbiota and dyslipidemia, atherosclerosis, and diabetes mellitus as lifestyle diseases was analyzed in a cross-sectional and longitudinal manner. Statistical analysis of the diversity of the bacterial flora showed differences in the flora in all diseases. Differences in the bacterial flora affected the development of dyslipidemia. The results of intergroup comparative analysis and multivariate analysis regarding the search for specific bacteria showed that the genus Megasphaera was associated with the development of dyslipidemia. With regard to atherosclerosis, periodontal bacteria were found to be associated. As for diabetes, the genus Lactobacillus was associated with diabetes. Comparison of the number of periodontal bacteria on the tongue showed a significant association with the presence or absence of periodontal disease, suggesting the importance of controlling periodontal disease as a preventive measure against lifestyle diseases.

研究分野：口腔科学

キーワード：口腔内細菌 多様性解析 生活習慣病 脂質異常症 動脈硬化 糖尿病 歯周病

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔内には700種類以上の細菌が存在し、一定の細菌が集まっている固有微生物叢である正常フローラを形成し、恒常性を持っている。これらのフローラは生体防御機構とのバランスを維持し、宿主には悪影響を及ぼさないとされるが、このバランスが崩れた際に内因性感染を引き起こす。また、近年口腔細菌叢の構成異常 (dysbiosis) と癌や炎症性腸疾患などの様々な全身疾患との関連について注目されている。

口腔内細菌叢は腸内細菌と同様に1つの臓器として全身疾患に関連していることは過去の報告からも明らかである。しかしながら、歯周病菌のような特定の細菌群の全身への影響を検討した報告はあるが口腔内細菌叢全体を一つとして全身との関係を見た報告はない。よって歯周病菌のような特定の細菌群に加えて口腔内細菌叢全体の構成異常が癌を含めた生活習慣病と関連しているのではないかとということが本研究の学術的「問い」である。

2. 研究の目的

本研究は、一般地域住民における口腔内環境と生活習慣による口腔内細菌叢の横断的に加えて経年的変化を解明し、生活習慣病との関係を明らかにすることで、口腔内環境の改善を通じた生活習慣病の予防法確立を目指している。生活習慣病としては一般地域住民として比較的罹患頻度の高い脂質異常症、動脈硬化、糖尿病の3疾患について検討した。口腔内細菌叢全体の多様性に加えて、Keyとなる特定の細菌の探索および、細菌比だけでなく舌苔中の総細菌数を測定し、口腔内環境と総細菌数との関係も明らかとすることも計画している。

3. 研究の方法

(1) 大規模健診で測定する内容

アンケート調査：喫煙・飲酒・運動習慣

口腔検査：歯数、歯周病検査、口腔乾燥度（口腔粘膜湿潤度）、義歯の使用状況

舌苔中の細菌一斉検索：舌中央奥の部位から舌苔を滅菌マイクロスパーテルで一掻き採取する。細菌検査は次世代シーケンス解析である分子生物学的手法（T-RFLP法）を用いて口腔内細菌を網羅的に検出する（理化学研究所に外注）。

舌苔中の細菌数測定 細胞数測定装置（細菌カウンタ）を用いて細胞数をその場で測定する。

血液検査：脂質異常症関連血液検査（中性脂肪、総コレステロール、HDLコレステロール、LDLコレステロール）、糖尿病関連血液検査（血糖、HgbA1c）

全身的検査：身長・体重、動脈硬化関連検査（心臓足頸指数；cardio ankle vascular index、CAVI検査）

(2) 検討項目

脂質異常症における口腔細菌叢との関係を横断・縦断的に多様性解析により相異性を統計学的に検討した。またLEfSe、ロジステック回帰分析により関連する特異的細菌属を探索した。

動脈硬化に関しても疾患の有無と口腔細菌叢との関係を横断的に多様性解析およびロジステック回帰分析により関連する特異的細菌属を探索した。

糖尿病に関して疾患の有無と口腔細菌叢との関係を横断的に多様性解析およびロジステック回帰分析により関連する特異的細菌属を探索した。

特定口腔内特定細菌が口腔内細菌叢全体に与える影響

口腔内細菌総数と口腔内環境について

(3) 統計解析

口腔内細菌叢の類似性について 多様性解析(PERMANOVA)により解析した。また特定細菌を検索するためにロジステック回帰分析とメタゲノムバイオマーカーを検索するソフトである Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) を使用した。LEfSe は Huttenhower Lab の Galaxy の HP(<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) にアクセスして解析を行った。他の統計解析は R(4.2.2)、vegan パッケージおよび SPSS 28 を用いた。P < 0.05 の場合に有意差あり、P < 0.1 で傾向ありと判断した。

4. 研究成果

(1) 脂質異常症における口腔細菌叢

脂質異常症の診断：血液検査結果より HDL コレステロール 40mg/dl 未満、中性脂肪 150mg/dl 以上、LDL コレステロール 140mg/dl 以上の何れかを満たす場合に脂質異常症ありと診断した。その結果、2017 年対象者の 1073 人中脂質異常症と診断されたのは 324 人、正常が 749 人であった。最初に脂質異常症の有無で 2 群間に分け、横断的に口腔内細菌叢を解析した。つぎに縦断的に 2017 年から 2019 年にかけて脂質異常症への変化は下記の表のような結果となった(表 1)。2017 年の参加者全体の検出された口腔内細菌の分布を図 1 に示す。

横断研究：2017 年の横断研究において脂質異常症の有無で口腔内細菌叢全体の多様性に有意な差があるかどうかを PERMANOVA (Bray-Curtis) で解析した結果、図 2 で示すように有意な差を認めた(p=0.034)。また、LEfSe により脂質異常に関連する細菌を探索した結果 *Atopobium*, *Veillonella*, *Tannerella*, *Treponema*, *Megasphaera*, *Stomatobaculum* が特定された (LDAScore > 2) (図 3)

縦断研究：2017 年から 2019 年にかけて脂質異常症が新たに発生した 77 名と正常のままであった 464 人の口腔内細菌叢全体の多様性に有意な差があるかどうかを同様に解析した結果、有意な差を認めた(p=0.037)(図 4)。脂質異常症発生に関して LEfSe で特定された 2017 年の細菌群を説明変数として年齢、性別、BMI とともに選択してロジスティック回帰分析を行ったところ、*Megasphaera* が有意に関連していた。他の細菌に有意差が認めなかったのは年齢、BMI、性別が脂質異常症発生に強い影響を及ぼしているためと推察された。

(2) 動脈硬化に関する検討

多様性解析

2022 年の参加者を対象として、生活習慣病の中から動脈硬化について検討をおこなった。動脈硬化の有無は CAVI 検査により行った。CAVI < 8 を正常とし、8 ≤ CAVI を動脈硬化ありと判定したところ、737 人中正常は 493 人、動脈硬化ありが 244 名であった。動脈硬化の有無の 2 群間に分け、口腔細菌叢の多様性を PERMANOVA (Bray-Curtis) で解析した結果で示すように有意な差を認めた(p=0.025) (図 5)。

多変量解析

目的変数を動脈硬化の有無、調整因子として年齢、BMI、性別として検出された口腔内細菌をロジステック回帰分析で検討した結果、*Tannerella* と *Filifactor* が有意に関連していた。この結果より侵襲性歯周病菌である Redcomplex の一つである *Tannerella* と Redcomplex 以外で歯周炎と強い関係がある *Filifactor* 属(1)が関連していることが明らかとなった。従

来の報告と本研究結果は合致し、歯周炎と動脈硬化に影響を及ぼしていることが裏付けられた。口腔内細菌の中で強い影響力を持つとされる P.g は *Filifactor alocis* とともに病原性を発揮するとされる。

(3) 糖尿病に関して疾患の有無と口腔細菌叢との関係

多様性解析

2022 年の参加者を対象として、生活習慣病の中から糖尿病について検討をおこなった。糖尿病の有無は HbA1c が 6.5 未満を正常とし、6.5 以上の場合を糖尿病ありと判定して結果、737 人の対象者のうち 678 人が正常、58 人が糖尿病ありと判定された。糖尿病の有無の 2 群間に分け、口腔細菌叢の多様性を PERMANOVA (Bray-Curtis) で解析したところ有意な差を認めた ($p=0.009$) (図 6)。

多変量解析結果

歯周病菌である Redcomplex と動脈硬化で有意な関連を認める *Filifactor* 属および糖尿病と関連するとされる (2) *Lactobacillus* 属をそれぞれ説明変数とし、調整因子として年齢、性別、BMI を選択しロジステック回帰分析を行ったところ、*Lactobacillus* 属が $p = 0.54$ と関連性に傾向を認めた。

(4) 特定口腔内特定細菌が口腔内細菌叢全体に与える影響

全身に影響を及ぼすとされる P.g と口腔内細菌叢全体との多様性に違いがあるかどうかを、2017 年の参加者の口腔内細菌叢のデータを用いて P.g の中央値で 2 分して口腔細菌叢の多様性を PERMANOVA (Bray-Curtis) で解析したところ有意な差を認めた ($p=0.009$) (図 7)。

(5) 口腔内細菌総数と口腔内環境について

本研究では参加者が自分で舌苔から検体を採取する方法を採用しているため、採取量に差が生じる可能性がある。そのため統計解析では、採取される舌苔の細菌比により検討をおこなっている。Rescomplex において、比率での比較では *Tanerella* 属以外の 2 菌種は歯周病と有意な差がなかったが、健診時に歯科医師が採取した検体から測定された細菌数で比較すると *Porphyromonas* 属以外において有意差を認めた。

以上のことより舌苔の細菌数を減らすことが生活習慣病の予防に繋がる可能性が明らかとなった。歯周炎のコントロールすることに加えて、今後プロバイオティクスにより、各種細菌叢を Dysboisis から Eubiosis に変化させることが可能かどうか検証する必要がある。

引用文献

1. Nemoto T, Shiba T, Komatsu K, Watanabe T, Shimogishi M, Shibasaki M, et al. Discrimination of bacterial community structures among healthy, gingivitis, and periodontitis statuses through integrated metatranscriptomic and network analyses. *Msystems*. 2021;6(6):e00886-21.
2. 武藤隆嗣. 糖尿病患者における口腔常在微生物叢に関する研究. *口腔衛生学会雑誌*. 2001;51(1):77-87.

表 1 参加者の特徴(n=763)

| | | |
|--------------------------|-------------|--------|
| 性別 (人) | 男性 316 | 女性 447 |
| 年齢 (歳) | 53.2 ± 14.4 | |
| BMI (kg/m ²) | 22.9 ± 3.6 | |
| 2017年脂質異常症 (人) | 無 541 | 有 222 |
| 2017 2019 正常 正常 | 464 | |
| 正常 異常 | 77 | |
| 異常 異常 | 162 | |
| 異常 正常 | 60 | |

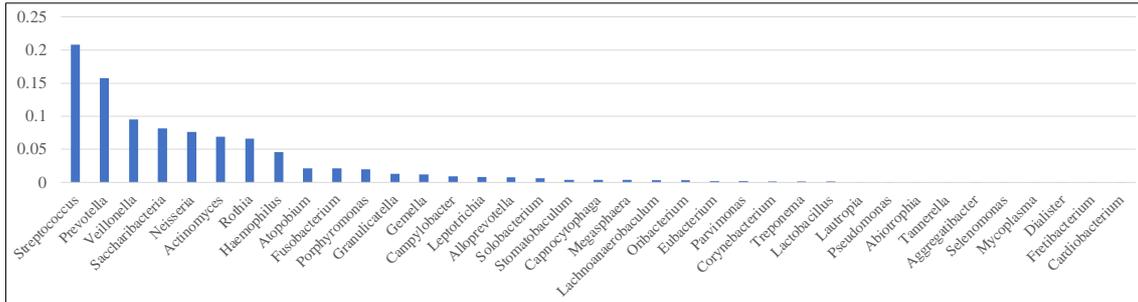


図1 2017年参加者の検出された口腔細菌属

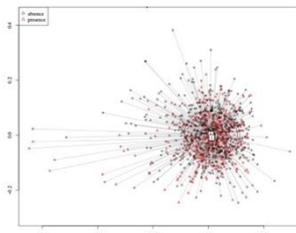


図2. 2017年度参加者における脂質異常症の有無による口腔内細菌叢比較(β多様性解析) p=0.034

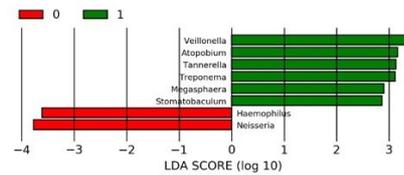


図3 2017年参加者の脂質異常症に関連する口腔内細菌の特定 (LEfSe)

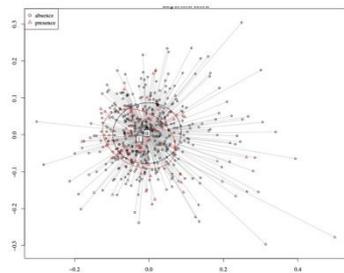


図4. 2019年に脂質異常発症の有無と2017年口腔内細菌叢の関係(β多様性解析) (p=0.037)

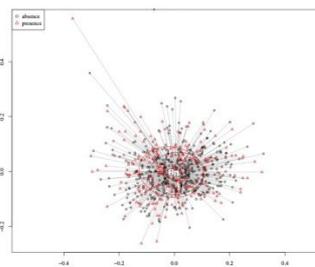


図5. 2022年度参加者における動脈硬化の有無による口腔内細菌叢比較(β多様性解析) p=0.025

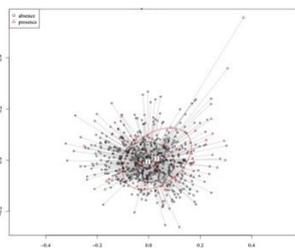


図6 2022年度参加者における糖尿病の有無による口腔内細菌叢比較(β多様性解析) p=0.009

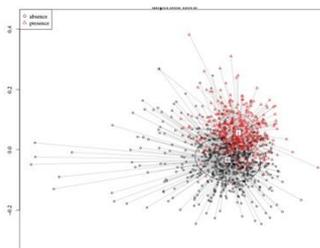


図7 *Porphyromonas* 属の比率を2分して口腔内細菌叢比較(p<0.001)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 高木康貴、小林恒 |
| 2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患と口腔内細菌叢の関連性について |
| 3. 学会等名 第76回日本口腔科学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 小松正太郎、小林恒 |
| 2. 発表標題 一般地域住民における口臭と口腔内細菌の関連について |
| 3. 学会等名 第76回日本口腔科学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 田村好拡、小林恒 |
| 2. 発表標題 一般地域住民における骨粗鬆症と口腔環境の関連及び口腔細菌叢比較 |
| 3. 学会等名 第35回口腔診断学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 小林恒 |
| 2. 発表標題 口腔内細菌と脂質異常症との関係に関する研究 |
| 3. 学会等名 第36回口腔診断学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 高木康貴, 小林恒 |
| 2. 発表標題 口腔内細菌と脂質異常症との関係に関する研究 |
| 3. 学会等名 第69回日本口腔外科学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 小松正太郎, 小林恒 |
| 2. 発表標題 一般地域住民における口臭と口腔内細菌の関連について |
| 3. 学会等名 第69回日本口腔外科学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔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 | 福田 はるか (Fukuta Haruka) (60816594) | 弘前大学・医学部附属病院・医員 (11101) | 削除:2023年7月26日 |
| 研究分担者 | 秋山 なつみ (Akiyama Natumi) (80867375) | 弘前大学・医学部附属病院・医員 (11101) | 削除:2023年2月2日 |

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