

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792369

研究課題名(和文) 誤嚥性肺炎予防を目指したピロシークエンシング法を用いる口腔細菌叢の網羅的解析

研究課題名(英文) Analysis of the oral microflora for the prevention from aspiration pneumonia.

研究代表者

阿保 備子 (ABO, Tomoko)

鶴見大学・歯学部・寄附講座助教

研究者番号：00420282

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)：本研究では、誤嚥性肺炎と診断された高齢者の口腔内バイオフィームについて、基礎疾患等を考慮しながらその細菌叢を解析した。10名の研究協力者の口腔内から採取したサンプルを用いて、う蝕関連菌検査、歯周疾患関連菌検査、さらに日和見感染菌検査を行った。9名のサンプルから検出された*Fusobacterium nucleatum*は歯周病原菌の一つとして知られているが、プラークや舌苔の形成だけではなくコアグラの形成にも関与していると考えられる。多くの協力者が口腔ケアに関心がなく、*Candida sp.*などの日和見感染菌も多く検出されていることから口腔ケアの重要性を理解してもらう必要がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to estimate the species richness of oral microflora in the disabled elderly persons suffering from aspiration pneumonia and to analyze of the microflora with careful consideration on their underlying diseases. Ten patients participated after adequate informed consents. Saliva and supragingival plaque were collected by rubbing and brushing with a toothbrush or a sponge brush. *Fusobacterium nucleatum* was detected in 9 participants. Because *Fusobacterium nucleatum* is well known as one of the periodontal disease pathogens, it is speculated that this species may be involved in not only the plaque formation on the tooth surface and tongue but also the coagulation on oral mucosal debris. Being detected opportunistic infection bacteria such as *Candida sp.* is very meaningful. A major problem might be inconsideration on the oral hygiene care for the most participants. Oral hygiene care is inevitable way to prevent from aspiration-related pneumonia.

研究分野：予防歯科学

キーワード：誤嚥性肺炎 口腔細菌叢

1. 研究開始当初の背景

近年、加齢に伴う高齢者の肺炎による死亡率の上昇が問題となっている。高齢者肺炎の増加の背景には、様々な基礎疾患の影響や、免疫力の低下が考えられ、さらに脳血管障害、脳変性疾患、認知症の患者が自覚のない不顕性誤嚥を起こしやすくなっていることなどが、要因の一つと考えられる。誤嚥性肺炎は、嚥下機能が低下し唾液とともに口腔・咽頭細菌の肺への吸引が起こるために発症する。誤嚥性肺炎予防の第一は、嚥下反射や咳反射の改善であるが、不顕性誤嚥による唾液中の細菌数を可及的に減らすことが重要と考えられる。要介護高齢者に対する口腔清掃を中心とした口腔ケアが肺炎予防に有効であることが示されている。しかしながら、要介護高齢者は、一般の高齢者に比べ口腔衛生状態は悪く、同時に様々な基礎疾患を持つため、口腔を衛生的に維持するのは容易ではない⑦⑧。

口腔内の細菌は、共生、拮抗しながら生息しており、複雑な細菌叢を形成している。特に、口腔衛生状態の悪化した高齢者の口腔内では細菌数は増加傾向にある。口腔細菌叢はヒトの健康や寿命に深く関連すると思われ、種々の解析がなされている。竹下らは、口腔細菌叢における常在細菌のバランスと歯周組織の健康状態との間に関連があると考え、細菌叢を Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法を用いて報告している。ヒト口腔細菌の種類は現在 600 種類ほどあると考えられていたが、近年、ピロシーケンシング法を用いた研究で、健常者でもその数は 2 万種類以上存在し、大部分が未知の細菌であることが報告されている。

2. 研究の目的

T-RFLP 法やピロシーケンシング法は培養を介さず、細菌叢 DNA の 16S rRNA 遺伝子群

の塩基配列を解析するメタゲノム解析手法であり、この手法が近年確立されたことにより比較的容易に細菌叢の全体像を比較することが可能となった。本研究では、要介護高齢者の口腔内に付着したバイオフィルムのピロシーケンシングを行いその細菌叢を網羅的に解析し、基礎疾患等を考慮しながら健常者の細菌叢と比較検討し、バイオフィルム生成に対する予防体系の開発を目的とした。これにより、要介護高齢者の口腔ケアが容易になり、さらには誤嚥性肺炎の予防に繋がると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 疫学研究倫理審査委員会への承認申請

今回、要介護高齢者を対象とした侵襲性のある測定を行わない疫学研究であり、医科病院の研究協力が必要であった。サンプルはブラッシング歯垢と口蓋に付着しているコアグラ(バイオフィルム)であり、疫学研究倫理に基づき本学と協力先の病院の両倫理審査委員会に計画書を提出し承認を得た。また、サンプル採取時には患者または家族から同意書による同意を得ることとした。サンプルは連結可能匿名化を行い、ID 番号にてサンプル管理を行うこととした。

(2) サンプリング

全身状態に気を付けながら問診と口腔診査を行った。生理食塩水を入れたチューブにスポンジを浸して絞っては口腔内を清掃した後、電動ブラシで磨いた。チューブ内の検体を含んだ生理食塩水をう蝕関連菌検査(培養法)、歯周病疾患関連菌検査(PCR - インベーター法)、日和見感染検査(培養法)用に分注し、残りは-20 で保管した。

(3) バイオフィルムを培養法、T-RFLP 法及びピロシーケンシング法にて比較

竹下らは、T-RFLP 法を用いて、口腔細菌叢における常在細菌のバランスと歯周組織の健

康状態との間に関連があることを報告している。また、ピロシーケンシング法により、ヒト口腔細菌の種類は健常者で2万菌種以上存在し、大部分が未発表の細菌であることが報告されている。

本研究では、要介護高齢者のバイオフィルムの細菌叢を従来行われてきた培養法、そして次世代シーケンサーによるピロシーケンシング法にて比較した。う蝕関連菌検査、歯周疾患関連菌検査、日和見感染菌検査における検出目的菌は下記の通りである。

検査項目	目的菌種
う蝕関連菌検査	乳酸桿菌 ミュータンス菌
歯周疾患関連菌検査	<i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>T. forsythensis</i> <i>T. denticola</i> <i>F. nucleatum</i>
日和見感染菌検査	MRSA MSSA <i>P. aeruginosa</i> <i>hemolytic streptococcus</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>S. marcescens</i> <i>B. catarrhalis</i> <i>Candida sp.</i>

4. 研究成果

本研究は、鶴見大学歯学部および虎の門病院の倫理審査委員会の承認を受けたのち実施した。研究協力者は、虎の門病院呼吸器内科の担当医より誤嚥性肺炎と診断されて入院している高齢者で、診療上の必要性から口腔ケアを施行する症例で、かつインフォームド・コンセン

トが得られた10名(男性8名、女性2名)とした。期間は平成24年12月から平成26年12月までとした。術前に作成したプロトコールに則り、口腔内から採取したサンプルを用いて、各種検査及びピロシーケンシング解析を行った。検査結果は下記の通りである。

No.	年齢	性別	DMFT	主な検出菌
001	75	M	25	<i>T. forsythia</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>P. aeruginosa</i>
002	81	M	24	<i>T. forsythia</i> , <i>F. nucleatum</i>
003	91	M	28	<i>F. nucleatum</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i>
004	81	M	28	<i>F. nucleatum</i> , <i>Candida sp.</i>
005	88	M	28	<i>S. mutans</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>T. denticola</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Candida sp.</i>
006	84	M	28	ND
007	80	M	28	<i>S. mutans</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>F. nucleatum</i>
008	93	F	18	<i>T. forsythia</i> , <i>T. denticola</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>Candida sp.</i>
009	84	M	28	<i>F. nucleatum</i> , <i>P. aeruginosa</i>
010	82	F	28	<i>T. forsythia</i> , <i>F. nucleatum</i> , MRSA, <i>Candida sp.</i>

研究協力者の平均年齢は 83.9 歳、DMFT 指数は 26.3 であった。9 名のサンプルから *Fusobacterium nucleatum* が検出された。無歯顎、有歯顎に関わらず、検出された *Fusobacterium nucleatum* は歯周病原菌の一つとして知られているが、プラークや舌苔の形成だけではなくコアグラの形成にも関与していると考えられる。Han & Wang は、心血管疾患、早産、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患と結腸直腸がん、気道感染症を含む全身疾患が口腔細菌によって増悪する調査結果を報告しており、*F. nucleatum* と *S. mutans* は口腔から全身へ移行する傾向があるとしている。

また、有歯顎と無歯顎の協力者における口腔細菌叢をピロシーケンシング解析にて比較すると下図に示すように phylum の占める割合が異なるのがわかる。しかしながら、全ての協力者は入院中に投薬が行われているため、その影響を考慮する必要がある。

図 1 無歯顎の協力者における口腔細菌叢

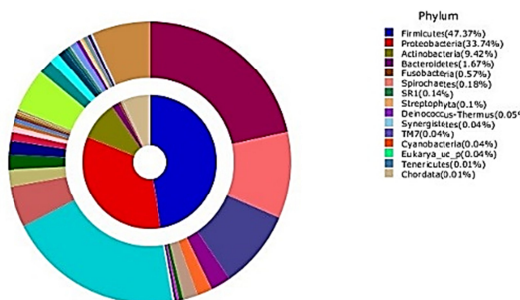
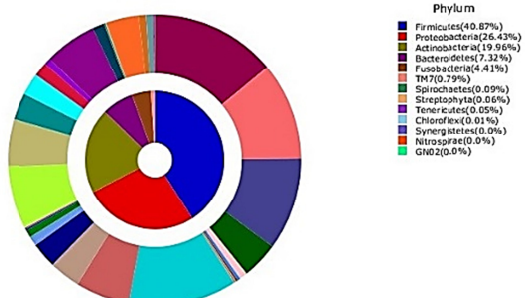


図 2 有歯顎の協力者における口腔細菌叢



多くの協力者が口腔ケアに関心がなく、*Candida sp.*などの日和見感染菌も多く検出されていることから口腔ケアの重要性を理解してもらう必要がある。

今後、本研究で得た結果をもとにさらなる比較検討を行う予定である。これにより、口腔ケアが容易になり、誤嚥性肺炎の予防に繋がると考えられる。

<引用文献>

厚生労働省、人口動態統計

Nakayama K. et al., Tuberculin responses and risk of pneumonia in immobile elderly patients. *Thorax*, 55: 867-869, 2000.

Yamaya M. et al., Intervention to prevent pneumonia among older adults, *J. Am. Geriatr. Soc.*, 49: 85-90, 2001.

Ohrui T. et al. Care for older people, *Intern. Med.*, 42: 932-940, 2003.

Okuda K. et al., Involvement of periodontopathic anaerobes in aspiration pneumonia, *J. periodontol*, 76: 2154-60, 2005.

Yoneyama T. et al., Oral care and pneumonia, *Lancet*, 354: 515, 1999.

Marik P. E., Aspiration pneumonitis and aspiration Pneumonia. *N Engl J Med.*, 344: 665-671, 2001.

Yoneyama T. et al., Oral care reduces pneumonia in older patients in nursing homes, *J. Am. Geriatr. Soc.*, 50: 430-33, 2002.

竹下徹, 口腔フローラの常在細菌構成バランスは口腔の健康状態と関連する. *J. Oral Biosci.*, 53 Suppl.: 64 (Y-6), 2011.

Keijser B. J. et al., Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy

adults, J Dent Res, 87(11): 1016-20, 2008.

Han Y. W. and Wang X., Mobile Microbiome: Oral Bacteria in Extra-oral Infections and Inflammation, J Dent Res 92(6): 485-491, 2013.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

阿保備子、誤嚥性肺炎患者の口腔細菌叢の解析、第64回日本口腔衛生学会・総会、2015年5月28日～2015年5月29日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

阿保備子、誤嚥性肺炎予防のための口腔細菌叢の解析、日本歯科保存学会2014年秋季学術大会(第141回)、2014年10月30日～2014年10月31日、山形テルサ(山形県山形市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿保 備子 (ABO, Tomoko)

鶴見大学・歯学部・寄附講座助教

研究者番号：00420282