

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893147

研究課題名(和文) 要介護高齢者における口腔細菌叢の解析

研究課題名(英文) General Health Status and Oral Microbiome among Elderly Japanese in Nursing Home

研究代表者

小川 泰治(Ogawa, Taiji)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10543481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、高齢者の口腔細菌叢と全身状態との関連の解明を目的とした。大阪府内の介護施設に入居する高齢者50名を対象に、口腔状態の記録、口腔機能検査、ならびに全身的既往歴、服薬中薬剤、生化学検査記録の調査を行った。このうち、15名の唾液から菌DNAを抽出し、次世代シーケンサーによる16S rRNAの網羅的解析を行った。16S rRNA解析の結果、高齢対象者の糖尿病罹患群では非糖尿病罹患群と比較して門、属レベルでの細菌叢が異なっていた。本研究により得られた結果は、糖尿病が口腔細菌叢の構成に影響を及ぼす一因である可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the association between systemic disorder and oral microbiota, we conducted microbiome analyses using salivary samples from 15 subjects living at 3 different nursing homes, 3 with type 2 diabetes mellitus (DM) and 12 without diabetes (non-DM), as well as 9 young healthy controls (HC). Genomic DNA was extracted from each sample, then the V4 regions of the 16S rRNA gene were amplified and sequenced. Alpha diversity, such as operational taxonomic unit richness, was significantly higher in samples from the non-DM as compared with the HC group. In weighted UniFrac distance analysis, salivary microbial communities in the DM group were separately clustered. Furthermore, Actinomyces and Selenomonas showed significantly higher abundance, while that of Alloprevotella had a significantly lower abundance in the DM group as compared to the non-DM group. Thus, saliva may be preferable for assessment of oral bacterial diversity in elderly individuals.

研究分野：高齢者歯科学

キーワード：要介護高齢者 口腔細菌叢 誤嚥性肺炎 口腔清掃 唾液

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の到来により、わが国では肺炎により死亡する高齢者が急増し、厚生労働省の2011年人口動態統計によると、日本人の死因順位において肺炎が脳血管疾患を上回り第3位となった。近年、新型インフルエンザウイルス感染症や新型の多剤耐性菌による院内感染症が世界的に大流行し、感染症対策が再び注目を集めている。しかしながら、わが国の感染症対策は他の先進諸国からも大きく遅れをとり、諸外国からは「感染症後進国」などと揶揄される事態を招いている。今後、わが国では65歳以上の高齢者は増加の一途を辿り、2025年には約3300万人(全人口の27%)に達すると予測されており、肺炎による死者数も増加するであろうことは想像に難くない。

それにも関わらず、わが国の医学分野では、免疫、腫瘍や再生医療など特定の領域ばかりに研究対象が集中している。その結果、感染症対策は後手に回り、感染症が大流行してから初めて対策を講じるが、治療方法の確立はおろか治療に結びつく基礎的な研究成果の蓄積も不十分であるというのが現状である。肺炎の主な発症原因は肺炎球菌であるといわれており、わが国でも肺炎球菌に対するワクチンは既に1980年代後半から実用化されている。しかしながら、ワクチンの接種率は依然として低く、10%台にとどまっている。世界的にも、そしてわが国においても抗菌薬耐性肺炎球菌による感染が非常に多く、免疫力の低下した高齢者では重症化しやすく、死亡率も高い<sup>1</sup>。高齢者の割合が増加する将来においては、他の疾病で入院した高齢者への院内感染や高齢者施設などでの水平感染が一層懸念される。

一方歯科領域では、口腔細菌叢に定着する肺炎起因細菌を口腔清掃で減少させると肺炎の発症率が低下することが以前より証明され、歯科領域から肺炎をコントロールできることが提唱されてきた<sup>2</sup>。高齢者の肺炎で最も多いのは誤嚥性肺炎であり、誤嚥性肺炎と口腔細菌叢は深い関連性を持っている。口腔内環境を改善することで肺炎の発症をコントロールできる歯科医師の社会的役割は、今後益々大きくなると考えられる。

口腔内には、700種類以上の微生物が口腔に固有の細菌叢を構成するといわれており、多数の微生物同士が複雑なネットワー

クを形成していると考えられる。一度形成された細菌叢は、口腔内環境の変化に応じて刻々とその姿を変えていると推察される。また、口腔に生存する微生物は、口腔内疾患のみならず種々の全身疾患を引き起こすことが報告されている。これまで我々は高齢者が口腔内に保有する肺炎原性微生物を調査し、口腔状態との関連について報告してきた。しかし、全身の健康状態や加齢、薬剤服用などに伴う細菌叢の変化、また口腔清掃が及ぼす細菌叢への影響などについては未だ不明な点が多く、口腔内細菌叢に影響を及ぼす宿主および環境因子の解明が急務である。本申請研究では、申請者が大学院および海外留学時代に習得した細菌学と分子生物学の知識をフィードバックし、臨床研究への応用が可能な口腔細菌叢の網羅的解析法の確立、および高齢者の口腔細菌叢に影響を与える宿主および環境因子の解明を目指す。

### 2. 研究の目的

本研究は、誤嚥性肺炎起炎菌のみならず、口腔細菌叢を構成する幅広い菌種をターゲットとする新たな解析法を用い、口腔細菌叢に影響する因子を疫学的に探索することを目指している。これまで、口腔細菌叢を構成する細菌種の解析や、口腔細菌叢に定着する病原性細菌をターゲットとした基礎研究および疫学研究は多数見られるが、未だ口腔細菌叢の全貌の解明には至っていない。口腔細菌叢の量的および質的評価を試みた研究は国内外で報告はなく、独創性に富んでいる。また、基礎研究(生物学的手法)と臨床研究(疫学的手法)を組み合わせた点も本研究の特色である。

### 3. 研究の方法

申請者と同じ研究室に所属する健常成人数名から口腔サンプルを採取し、口腔の細菌叢解析に適したサンプルを選択した。全唾液(安静時または刺激時唾液)、頬粘膜スワブ、舌スワブ、デンタルブランク、義歯ブランクなどが口腔サンプルの候補であるが、データの信頼性やフィールド調査時における採取のしやすさ、被験者への負担などを総合的に考慮し決定した。

また、同一被験者での日内変動や日間変動、口腔清掃前後での菌叢の変化さらには被験者間の差異についても解析を行い、サンプル採取に適した条件の検討を行った。

近畿圏の介護保険施設に併設されている居宅介護支援事業所ならびに地域包括支援センターを利用している要介護高齢者を対象とした。対象被験者から採取した口腔サンプルを用い、前述の方法により解析した。このうち、15名の唾液から菌DNAを抽出し、次世代シーケンサーによる16S rRNAの網羅的解析を行った。コントロール群として、若年者9名から唾液を採取し、同様に解析を行った。これにより得られた細菌叢のデータを、歯科および栄養疫学調査により得られたデータと統合し、統計学的解析を行った。歯科および栄養疫学調査には、口腔機能検査(味覚・口腔感覚、咀嚼能率、咬合力、咀嚼時唾液分泌速度、嚥下機能評価)および食品・栄養摂取と身体計測、血液検査、全身疾患および服用中薬剤の聴取、認知機能検査などが含まれていた。

統計学的分析には、歯科および栄養疫学調査の各項目と口腔の細菌叢との2変量間の関連、次いで多変量解析を用い、多数の口腔機能および食品・栄養摂取と身体計測、血液検査、全身状態の中から、口腔細菌叢のパラメータに有意な関連を持つ項目を抽出した。

#### 4. 研究成果

16S rRNA解析の結果、高齢対象者の口腔細菌叢を構成する細菌として平均157.2菌種が同定された。一方、若年者では平均144.1菌種であった。次に、口腔細菌叢と全身状態との関連を調べたところ、糖尿病罹患群では非糖尿病罹患群と比較してBacteroidetes(門)が劣勢であった。また、若年者と比較してActinobacteria, Bacteroidetesが優勢であり、Fusobacteriaが劣勢であった。さらに、属レベルでは糖尿病罹患群でActinomyces, Selenomonasが優勢であり、Alloprevotellaが劣勢であった。また、若年者と比較するとActinomyces, Rothia, Filifactor, Selenomonas, Synergistesが優勢であり、Virgibacillus, Abiotrophia, Veillonella, Fusobacteriumが劣勢であった。また、種レベルでは糖尿病罹患群でActinomyces israelii および Selenomonas noxiaが優勢であった。これら2つの菌はいずれも口腔の常在菌であるが、糖尿病群では、組織液中の糖濃度上昇などに伴う宿主環境変化により、口腔細菌叢を構成する菌種や組成が変化した可能性がある。また、過去の研究において、詳細なメカニズムは

不明であるものの、過体重群(BMI=27以上)では、口腔細菌叢におけるActinomyces israelii および Selenomonas noxiaの割合が高いことが報告されており、本研究結果と共通する点があると考えられる。

以上より、本研究により得られた結果は、糖尿病が口腔細菌叢の構成に影響を及ぼす一因である可能性を示唆している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

以上より、本研究により得られた結果は、糖尿病が口腔細菌叢の構成に影響を及ぼす一因である可能性を示唆している。

1. Ogawa T, Ikebe K, Okada T, Honda M, Maeda Y. Routine dental prophylaxis may reduce harboring *Staphylococcus aureus* in oral cavity. *J Int Oral Health*. 2016 [in press].
2. Ogawa T, Uota M, Ikebe K, Notomi Y, Iwamoto Y, Shirobayashi I, Kibi M, Masayasu S, Sasaki S, Maeda Y. Taste detection ability of elderly nursing home residents. *J Oral Rehabil*. 2016 [in press].
3. Yoshinaka M, Ikebe K, Uota M, Ogawa T, Okada T, Inomata C, Takeshita H, Mihara Y, Gondo Y, Masui Y, Kamide K, Arai Y, Takahashi R, Maeda Y. Age and sex differences in the taste sensitivity of young adult, young-old and old-old Japanese. *Geriatr Gerontol Int*. 2015 [Epub ahead of print].

[学会発表](計2件)

1. 小川泰治, 魚田真弘, 小川真理子, 八田昂大, 吉備政仁, 池邊一典, 前田芳信. 要介護高齢者の全身状態と口腔細菌叢との関連の検討. 第26回日本老年歯科医学会. 2015年6月12日. 横浜.
2. 小川泰治, 魚田真弘, 小川真理子, 吉備政仁, 池邊一典, 納富由美子, 岩本佳子, 城林 斎, 羽多聖子, 政安静子, 佐々木敏, 前田芳信. 介護施設入居高齢者の口腔機能評価. 大阪大学歯学会 第119回例会. 2015年1月8日. 吹田.

[図書](計0件)

該当事項なし

[産業財産権]

該当事項なし

〔その他〕  
ホームページ等  
該当事項なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小川 泰治 (OGAWA TAJI)  
大阪大学・歯学部附属病院・医員  
研究者番号：10543481

### (2)研究協力者

川端 重忠 (KAWABATA SHIGETADA)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：50273694  
前田 芳信 (MAEDA YOSHINOBU)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：10144510  
寺尾 豊 (TERAO YUTAKA)  
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：50397717  
池邊 一典 (IKEBE KAZUNORI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号：70273696  
小川 真理子 (OGAWA MARIKO)  
大阪大学・大学院歯学研究科・特任研究員  
研究者番号：20754732