

要介護高齢者の口腔細菌叢とプロバイオティクスの開発 (30-17)

主任研究者 大野 友久 国立長寿医療研究センター 歯科口腔先進医療開発センター
在宅・口腔ケア開発室 室長

研究要旨

近年、腸内細菌叢と全身の健康に関する研究が脚光を浴びている。腸内細菌叢は加齢と共に変化し、様々な疾患を引き起こすことが明らかになってきている。アレルギーやうつ病、肥満など、多くの疾患に腸内細菌叢が関与していることが指摘され、最新の技術であるメタゲノム解析の発展とともに世界的に研究が進められている。一方、口腔は消化器の一部でもあり、腸と同様に体内微生物が多く存在する器官である。歯周炎など、口腔内細菌に起因する疾病が増加してくるのは中年以降、主に高齢者であり、要介護高齢者の口腔内細菌叢は大きく変化していると考えられる。しかし、要介護高齢者などの口腔内細菌叢については、培養検査によるデータは存在するもののメタゲノム解析による詳細なデータは存在しない。

そこで、病的な口腔内環境を持つ高齢者を対象とし、口腔内細菌叢を調査するためにメタゲノム解析による評価を開始した。

それに先立ち、検体採取部位による相違の検討として、健常者 3 名を対象に舌背、下顎口腔前庭、頬粘膜から検体を採取し、メタゲノム解析を実施して細菌叢の相違を評価した。その結果、下顎口腔前庭と頬粘膜は類似した細菌叢であった。

解析担当機関による相違の検討として、健常者 3 名を対象として検体を採取し、同一対象者同一部位につき 3 検体ずつ採取し、谷口歯科医院口腔常在微生物叢解析センター、および株式会社タカラバイオ、株式会社テクノスルガ・ラボの 3 か所に解析を依頼し、解析結果の相違を評価した。その結果、やはりばらつきはあるものの、同じ解析プログラムで解析している谷口歯科とタカラバイオは良く似た傾向を示し、テクノスルガ・ラボは少し異なる結果であった。

抗菌薬投与前後の相違の検討として、国立長寿医療研究センター歯科口腔外科を受診した 65 歳以上の高齢者で、口腔内の炎症があり抗菌薬全身投与予定の患者 3 名を対象として解析を実施した。抗菌薬の投与前と投与 7 日後および 14 日後の 3 回で検体を採取し、その変化について門レベルで検討したところ、投与前と、投与 7 日後および 14 日後で異なる細菌叢を示した。また 7 日後、14 日後を比較すると、門レベルでは似た細菌叢を示したが、属レベルだとはっきりした傾向はわからなかった。細菌の多様性を表す **Rarefaction** グラフでは、抗菌薬投与前が最も多様性が高く、7 日目は多様性が下がり、14 日目はさらに多様性が低くなる結果となった。

同様に、抗真菌薬投与前後の相違の検討も実施し、国立長寿医療研究センター歯科口腔外科を受診した65歳以上の高齢者で口腔粘膜に明らかな偽膜形成が認められ臨床的に口腔カンジダ症と診断される抗真菌薬投与予定の患者4名を対象とした。抗真菌薬の投与前と投与7日後およびその2週間後の3回で検体を採取し、その変化について検討したところ抗真菌薬投与によって、門レベルで細菌の組成に変化が認められた。属レベルでも変化が認められるが、一定の傾向はまだ掴めていない。Rarefaction グラフでは投与前よりも7日後、14日後において細菌の多様性が増加している結果となった。真菌が減少し、その反応として細菌が増えたと考えられる。

細菌培養検査との相違の検討については、メタゲノム解析と同時に、同一患者同一部位から採取した検体について、一般嫌気培養、好気培養、真菌培養検査も実施しているが、現在解析中であり、結果はまだ出ていない。引き続き解析を進める予定である。

主任研究者

大野 友久 国立長寿医療研究センター 歯科口腔先進医療開発センター
歯科口腔先端診療開発部 在宅・口腔ケア開発室 (室長)

分担研究者

角 保徳 国立長寿医療研究センター 歯科口腔先進医療開発センター
歯科口腔先端診療開発部 (センター長)

谷口 誠 谷口歯科医院 口腔常在微生物叢解析センター (歯科医師)

A. 研究目的

近年、腸内細菌叢と全身の健康に関する研究が脚光を浴びている。腸内細菌叢は加齢と共に変化し、様々な疾患を引き起こすことが明らかになってきている。アレルギーやうつ病、肥満など、多くの疾患に腸内細菌叢が関与していることが指摘され、最新の技術であるメタゲノム解析の発展とともに世界的に研究が進められている。一方、口腔は消化器の一部でもあり、腸と同様に体内微生物が多く存在する器官である。腸内は糞便での細菌叢解析になるが、口腔はそれとは異なり、直接観察可能でありまた細菌を直接採取可能であることから、正確な病態と細菌叢の評価が可能である。さらに、薬物や処置の効果の判定がしやすいため、新薬や新しい治療法の発見により繋がりやすいと考えられる。ゆえに、口腔で評価した事項、知見が腸や全身の研究にも応用できる可能性があると考えられる。そのために、まず口腔内での細菌叢の解析方法の確立と新しい診断技術や治療方法を確立していくことが重要であると考えられる。

歯周炎など、口腔内細菌に起因する疾病が増加してくるのは中年以降、主に高齢者である。高齢者においては、加齢に伴う歯の喪失や口腔環境の変化によって、口腔内細菌叢に変化が生じていると考えられる。特に、免疫機能の低下した高齢者である要介護高齢者の口腔内細菌叢は大きく変化していると考えられ、口腔内細菌が誤嚥性肺炎や糖尿病など全身の健康に影響を与えていることが指摘されている(図1)。



図1 要介護高齢者の口腔汚染

しかし、要介護高齢者などの口腔内細菌叢については、培養検査によるデータは存在するもののメタゲノム解析による詳細なデータは存在しない。そこで、病的な口腔内環境を持つ高齢者を対象とし、口腔内細菌叢を調査するためにメタゲノム解析による評価を実施した。メタゲノム解析の技術自体は確立しているが、検体の採取方法の詳細については未だ明確ではないため、その検討も本研究の目的に含めた。最終的には、細菌叢の変化を明らかにすることで口腔内感染症に有効なプロバイオティクスの開発研究や新たな治療方法を検討することに繋げたい。

B. 研究方法

口腔正常細菌叢の定義の明確化、口腔正常細菌叢と各種口腔疾患の細菌叢の相違、薬剤の投与や口腔ケアの実施による口腔内細菌叢の変化を明確化するために、要介護高齢者の口腔内細菌叢のメタゲノム解析を実施し、その結果を評価した。メタゲノム解析は新しい評価手技なので、技術の正当性を担保するために、同一被験者から採取した検体を複数の外部業者にも解析を委託し、解析結果の相違についても検討し、初期にはまず結果の安定化および評価基準の明確化を目指した。さらに、口腔カンジダ症の有無や口腔内感染症の有無などの口腔所見や患者背景を正確に記録し、歯科的対応による口腔内細菌叢の変化について、メタゲノム解析によって検討した。検体採取方法など、解析方法の確立も本研究の目的に含んでいるため、解析結果を検討して適宜方法に修正を加えて実施する必要がある。そのため、まず以下の5つについて解析および検討を開始した。

・検体採取部位による相違の検討

健常者を対象に舌背、下顎口腔前庭、頬粘膜から検体を採取し、メタゲノム解析を実施して、細菌叢の相違を評価した。解析については分担研究者である谷口歯科医院口腔常在微生物叢解析センターに依頼した。

・解析担当機関による相違の検討

健常者を対象として検体を採取した。同一対象者同一部位につき3検体ずつ採取し、谷口歯科医院口腔常在微生物叢解析センター、および株式会社タカラバイオ、株式会社テクノスルガ・ラボに解析を依頼し、解析結果の相違を評価した。検体採取部位は舌背、下顎口腔前庭、頬粘膜の3部位とした。

・抗菌薬投与前後の相違の検討

対象は国立長寿医療研究センター歯科口腔外科を受診した 65 歳以上の高齢者とし、口腔内の炎症があり抗菌薬全身投与予定の患者とした。外来，入院は問わないこととした。解析については分担研究者である谷口歯科医院口腔常在微生物叢解析センターに依頼した。検体採取部位は舌背，頬粘膜の 2 部位とした。抗菌薬の投与前と投与 7 日後および 14 日後の 3 回で検体を採取し，細菌叢の変化について検討した。

・抗真菌薬投与前後の相違の検討

対象は国立長寿医療研究センター歯科口腔外科を受診した 65 歳以上の高齢者とし，口腔粘膜に明らかな偽膜形成が認められ臨床的に口腔カンジダ症と診断される抗真菌薬投与予定の患者とした（図 2）。外来，入院は問わないこととした。解析については分担研究者である谷口歯科医院口腔常在微生物叢解析センターに依頼した。検体採取部位は舌背，頬粘膜の 2 部位とした。抗真菌薬の投与前と投与 7 日後および 14 日後の 3 回で検体を採取し，細菌叢の変化について検討した。



図 2 口腔カンジダ症

・細菌培養検査との相違の検討

メタゲノム解析の検体採取と同時に，同一患者同一部位から採取した検体について，一般嫌気培養，好気培養，真菌培養検査も実施した。採取部位は舌背と頬粘膜とした。培養検査については株式会社 BML に依頼した。培養検査結果とメタゲノム解析結果の相違について検討した。

これら 5 つの検討において，除外基準は本研究への参加に同意が得られなかった者，意思疎通困難な者とした。

検体採取方法は，専用の綿棒を用いて採取し，谷口歯科医院およびテクノスルガ・ラボについては Forensik Swab (SARSTEDT 社製)，タカラバイオについては Omnigene-oral (DNA gentek 社製) を用い，部位毎に口腔粘膜を刷掃することにより行った。採取した検体については，メタゲノム解析の検体は速やかに冷凍庫にて冷凍保存し，培養検査については常温で保存し，速やかに培養検査に提出した。

口腔内細菌叢解析については，次世代シーケンサーを用いた口腔細菌叢のメタゲノム解析を実施した。培養検査は一般嫌気培養，好気培養，真菌培養検査を行った。メタゲノム解析については谷口歯科医院口腔常在微生物叢解析センター，および株式会社タカラバイオ，株式会社テクノスルガ・ラボに依頼した。国立長寿医療研究センター歯科口腔外科で採取した検体を凍結保存し，匿名化した上で図 3 に示す流れで解析等を実施した。

3 か所から得られた菌種組成を集計したグラフなどの解析結果は，共同研究機関である谷口歯科医院口腔常在微生物叢解析センターでも共有し，情報交換および解析結果の解釈

を検討した。

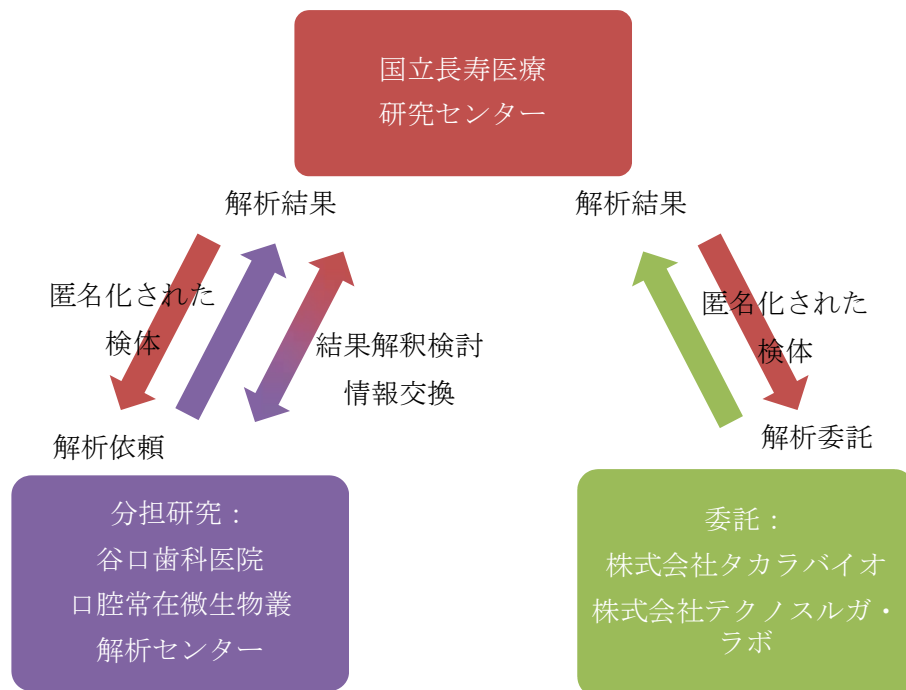


図3 解析担当機関による相違に関する検討 解析結果の流れ

(倫理面への配慮)

厚生労働省の人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に従う。研究を始めるに当たり、各所属組織の倫理規定を遵守し、倫理委員会の承認を得た。各施行において、目的、方法、手順、起こりうる危険についての説明を口頭もしくは文書で提示し、承諾書により被検者の同意を得るなど、インフォームド・コンセントに基づき倫理面への十分な配慮を行った。承諾書には対象者本人が研究の主旨を理解困難な場合には、家族または近親者を代諾者とした。この同意書には拘束権はなく、対象者はいつでも研究への協力を拒否することができる。分担研究者間で共通した認識を持ち、対象者の個人情報の流出にも厳重に留意した。また、今回用いる評価手技自体は侵襲性という側面からみた場合には安全性の高い方法であり、研究等によって生じる当該個人の不利益及び危険性に対する十分な配慮を行い、参加拒否の場合でもいかなる不利益も被らないことを明白にした。

C. 研究結果

初年度は67検体をメタゲノム解析に提出した。その内訳はデータ採取方法の確立目的で健常者27例(3名)、抗菌薬を投与した患者16例(3名)、抗真菌薬を投与した患者24例(4名)であった。

- ・検体採取部位による相違の検討
- ・解析担当機関による相違の検討

上記2つの検討は同時に実施した。健常者3名を対象に舌背，下顎口腔前庭，頬粘膜から検体を採取し，メタゲノム解析を実施して，細菌叢の相違を評価した。得られた結果の細菌組成について門レベルで示したものが図4である。

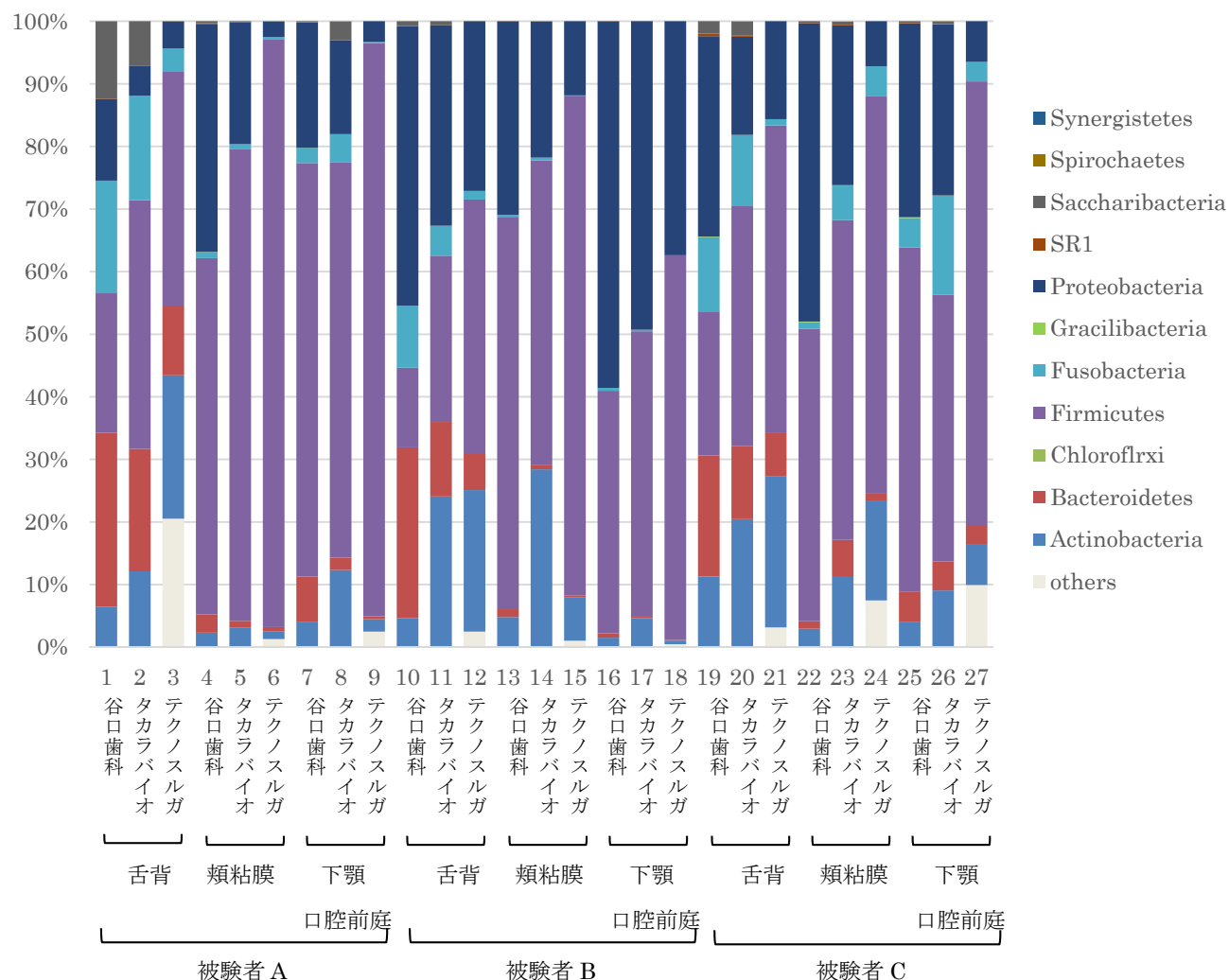


図4 検体採取部位および解析担当機関による相違の検討

同じ個人内で部位については頬粘膜と下顎口腔前庭部で分布の傾向が似ていた。また，解析担当会社間での差違については，谷口歯科医院口腔常在微生物叢解析センターと株式会社タカラバイオの解析結果とは似た傾向を示していた。

・抗菌薬投与前後の相違の検討

分担研究者角 保徳の報告書を参照されたい。

・抗真菌薬投与前後の相違の検討

口腔粘膜に明らかな偽膜形成が認められ，口腔カンジダ症と診断された4名が対象となった。使用した抗真菌薬はアムホテリシンBであり，口腔粘膜に良く触れさせた上でシロップを4回/1日で6日間内服してもらった。投与前と投与7日後および14日後の3回で

検体を採取し、その変化について検討したところ門レベルでの細菌組成について図5の結果が得られた。

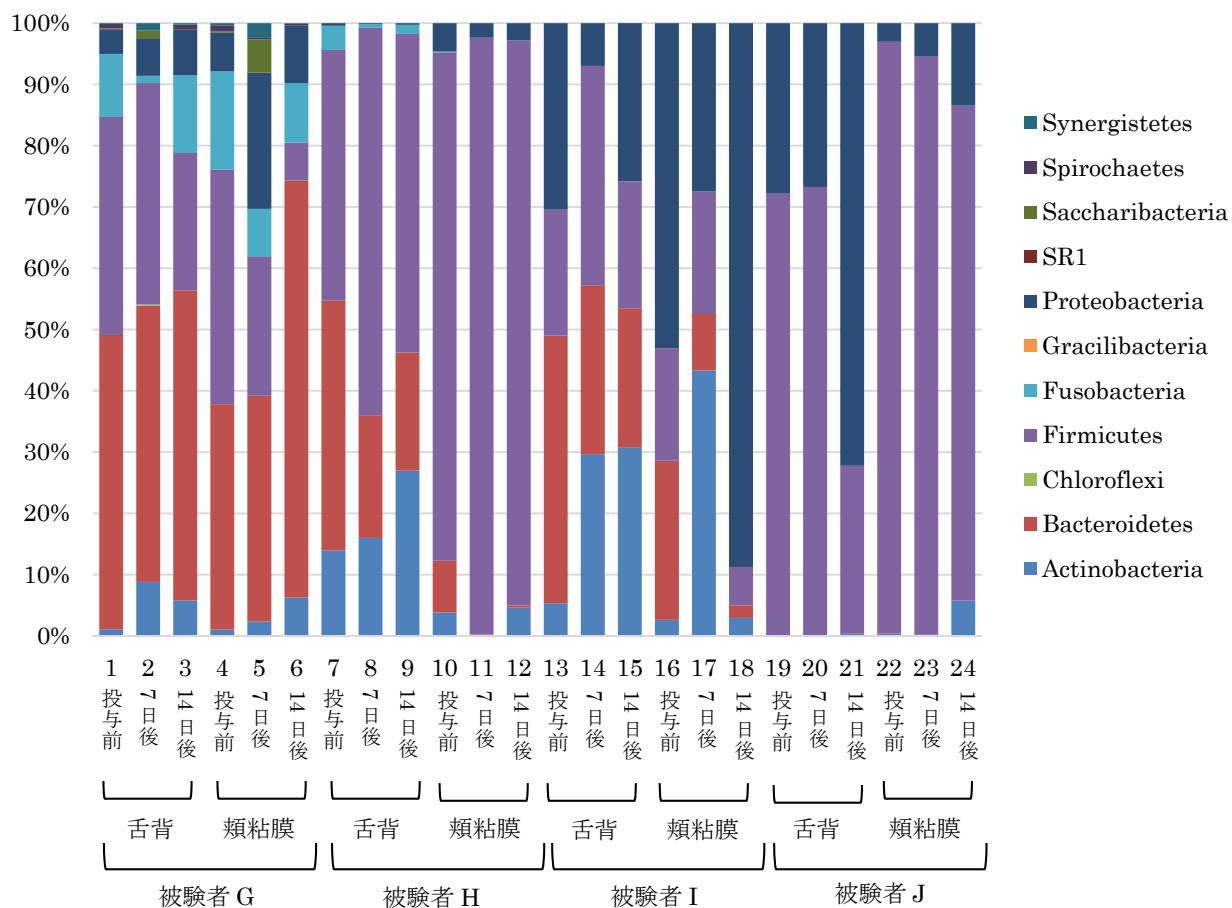


図5 抗真菌薬投与前後の口腔内細菌叢の相違（門レベル）

このグラフは細菌の組成を表すグラフなので、真菌は入っていない。しかし、抗真菌薬投与によって、投与前後で細菌の組成にも変化が認められた。真菌の解析については現在別途実施中であり、まだ結果は得られていない状況である。

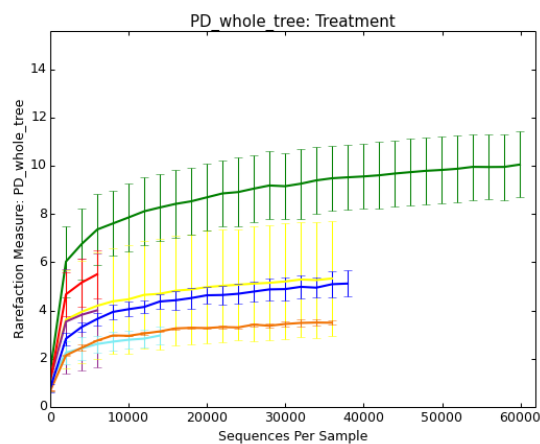


図 6 細菌の多様性を示す Rarefaction グラフ

細菌の多様性を示す Rarefaction グラフが図 6 であるが，抗真菌薬投与前が水色の線で，7 日後が紫色の線，14 日後が黄色の線であるが，投与前よりも 7 日後，14 日後において細菌の多様性が増加している結果となった。

多様性の変化について確認するために，さらに属レベルでの変化について図 7 に示す。現時点でグラフから一定の傾向は掴めていないが，やはり抗真菌薬投与前後で細菌叢に変化がある症例が認められる。

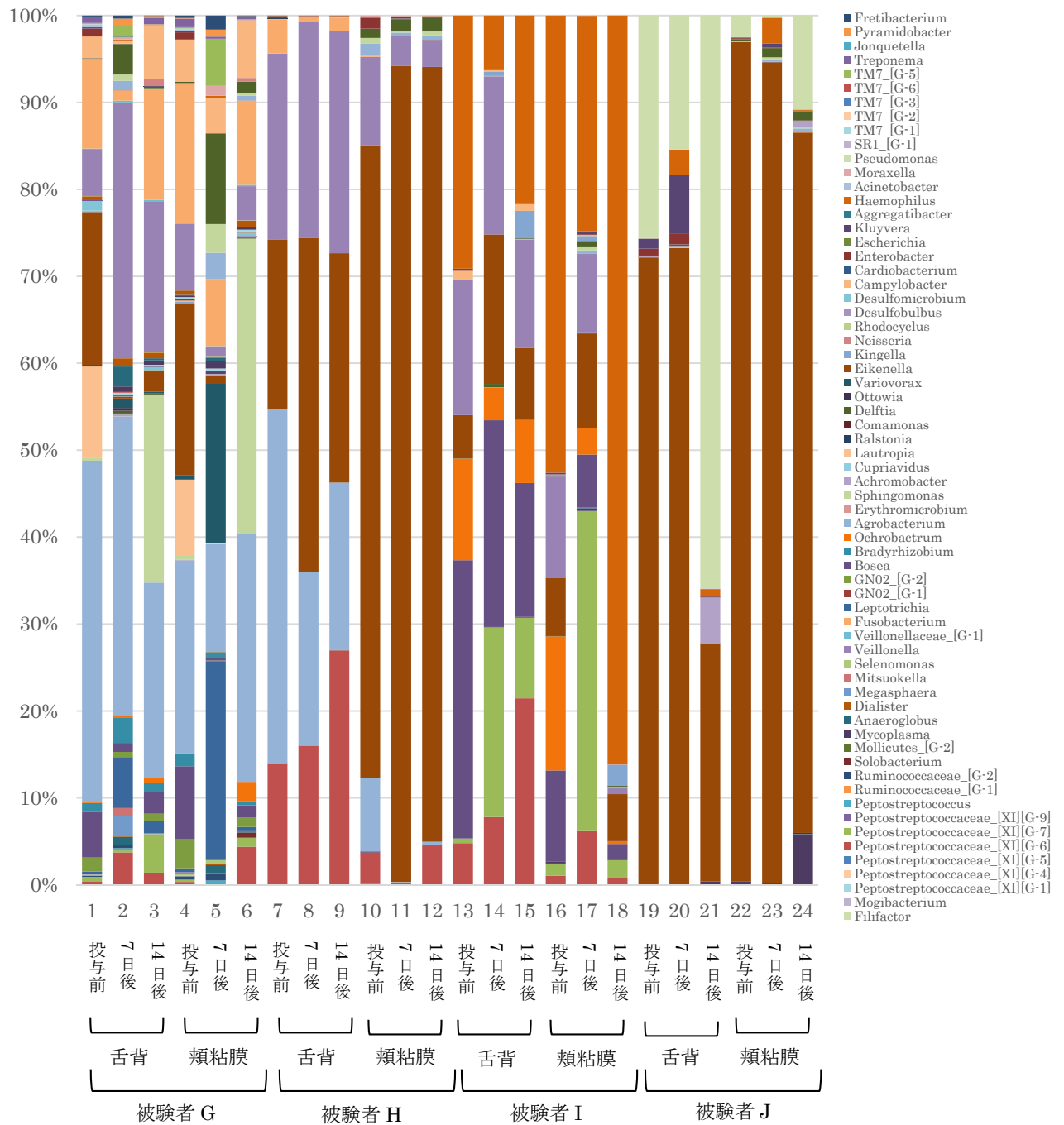


図7 抗真菌薬投与前後の口腔内細菌叢の相違 (属レベル)

・細菌培養検査との相違の検討

現在2名の口腔カンジダ症患者において、10検体を採取している。現時点で培養検査結果のみ得ているが、メタゲノム解析の結果はまだ出ていない。メタゲノム解析はまとめて実施することで解析費用を抑えることができるため、現在検体を集積中である。

D. 考察と結論

- ・検体採取部位による相違の検討
- ・解析担当機関による相違の検討

やはり個人間で細菌の分布には差があったが、同じ個人内で部位については頬粘膜と下顎口腔前庭部で分布の傾向が似ていた。部位が近いことによると考えられる。舌背と頬粘膜は明らかに菌叢の異なる者が多く、同じ唾液が検体でも舌表面と頬粘膜表面の性状は異なっており、生息する細菌も少し異なると考えられる。今後、検体の採取は舌背と頬粘膜でよいと考えられた。その結果を受けて、抗菌薬および抗真菌薬投与前後での解析はその2部位で検討を実施した。また、解析担当会社間での差違については、いずれもおおむね傾向は一致しているものの、谷口歯科医院口腔常在微生物叢解析センターと株式会社タカラバイオの解析結果とはより似た傾向を示していた。解析結果の違いについて分担研究者の谷口誠と検討したところ、これは解析に使用しているプログラムが **Qiime** で同一であることが影響しており、一方テクノスルガ・ラボは **Metagenome Kin** であり、プログラムによって参照データベースが異なるため、それに伴って結果がやや異なっている可能性があるとのことであった。テクノスルガ・ラボの参照データベースは少し古いとのことで、データベースに載っていない細菌が **others (Rejected hit)** で表示されており、やや比較しにくいだが、これも細菌叢の分布に影響を与えていると思われる。研究計画の2年目に、さらに検体数を増やして検討を継続する予定であるが、解析会社によって結果が異なるため、それ以外の要素でなるべく差がでないように留意する必要があると考えられた。スワブの刷掃方法、部位などをなるべく同一にし、さらには口腔内細菌叢の日内変動があるようなので、採取時間を個人内で一定にする、あるいは検討内容によっては全て同一にして採取する必要があるだろう。摂食直後は自浄作用が大きく働き、通常の細菌叢とは異なる可能性が高いため、現在実施中の検体は、基本的に摂食から最も遠い時間である夕食前に採取するようにし、時間を同一にして比較するようにしている。

- ・抗真菌薬投与前後の相違の検討

口腔カンジダ症は口腔粘膜疾患の中でも比較的高頻度に認められる疾患であり、通常、抗真菌薬を使用して対応する。口腔カンジダ症の原因は免疫不全や糖尿病などの全身疾患、口腔乾燥や口腔清掃状態不良などの局所的要因、ステロイドの投与や抗菌薬の投与など、薬剤投与の副作用など多岐にわたると言われている。抗菌薬の長期投与によって口腔カンジダ症が生じることがしばしば認められる。**Candida** 属は口腔内常在菌叢を構成している一つと考えられており、先に挙げた原因による菌交替現象によって口腔カンジダ症が生じる、いわゆる日和見感染である。今回はその反対に、抗真菌薬によってカンジダが抑制されると、口腔内細菌に影響があるのではないかと考え口腔カンジダ症患者に抗真菌薬であるアンホテリシン **B** を継続投与してその前後で解析を実施し、検討を加えた。その結果、細菌の多様性を示す **Rarefaction** グラフにて、投与前よりも7日後、14日後において細菌の多様性が増加している結果となった。やはり細菌、真菌を含めた口腔内微生物叢の変化が生じてい

るようである。口腔カンジダ症が発症している際には、真菌以外の細菌叢にも何らかの影響が生じている可能性が高く、特定の菌種が真菌数の増減に影響を受けている可能性もある。真菌の増減によって影響を受ける細菌が特定できれば、逆にその細菌をコントロールすることで、真菌の増減に影響することができるかもしれない。2年目も引き続き検体を採取しているところである。

・細菌培養検査との相違の検討

これについてはまだメタゲノム解析の結果が出ていないため、2年目以降に検討を加える予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohno T, Itatsu R, Moriya M, Sato Y, Sumi Y. Evaluation of the physical properties of a newly developed denture adhesive for patients with dry mouth. *J Prosthodont Res.* 63(2):157-161, 2019.
- 2) Ohno T, Hojo K, Fujishima I. Soft obturator prosthesis for postoperative soft palate carcinoma: A clinical report. *J Prosthet Dent.* 119(5):845-847, 2018.
- 3) 大野友久. 【老年医学(下)-基礎・臨床研究の最新動向-】 高齢者の臓器別疾患 歯科・口腔疾患 周術期の口腔機能管理. *日本臨牀.* 76 : 246-250, 2018.
- 4) 藤島一郎, 大野友久. 医科・歯科連携最前線 高齢者の「食べる力」をささえる(第6回) 摂食嚥下リハビリテーションと口腔ケア. *大塚薬報.* 739 : 26-31, 2018.
- 5) 大野友久, 守谷恵未, 角 保徳. 【ここが知りたい耳鼻咽喉科に必要な他科の知識】 高齢者の口腔ケア. *ENTONI.* 221 : 52-59, 2018.
- 6) 大野友久, 守谷恵未, 角 保徳. 【高齢者医療ハンドブック-高齢者医療におけるダイバーシティへの対応】(第I章)高齢者の特性を理解する～生理機能の加齢変化～ 口腔機能. *内科.* 121(4) : 615-619, 2018.
- 7) 角 保徳. 【老年医学(下)-基礎・臨床研究の最新動向-】 高齢者の臓器別疾患 歯科・口腔疾患 高齢者に多い歯科・口腔疾患. *日本臨牀.* 76 : 216-219, 2018.
- 8) 角 保徳. 私の処方 がん治療に伴う口腔粘膜炎への局所処方. *Modern Physician.* 38(8) : 893, 2018.
- 9) 角 保徳. これ、いいね! 口腔乾燥症の方が快適に使える新しい義歯安定剤「ピタッと快適ジェル」. *日本歯科評論.* 78(7) : 132-134, 2018.
- 10) 谷口誠. 口腔細菌叢のメタゲノム解析 口腔細菌叢の解明を目指して *MetaDentProject.* 歯界展望. 131(5) : 1022-1024, 2018.

- 11) 谷口誠. 口腔細菌叢のメタゲノム解析 細菌叢の機能を予測する. 歯界展望.
131(4) : 790-792, 2018.

2. 学会発表

- 1) 大野友久. 看取りと歯科. -死生学や地域包括ケアモデルを導入した医科歯科連携教育体制の構築-総括シンポジウム. 2019.2.16.岡山
- 2) 大野友久. 高齢者の口腔管理. 平成30年度介護保険主治医研修会. 2019.2.8.浜松
- 3) 大野友久. 高齢者歯科. 第1回在宅歯科医療講演会. 2018.11.25.静岡
- 4) 大野友久. 口腔から支える健康長寿. 日本歯科補綴学会東海支部市民フォーラム.
2018.10.27.名古屋
- 5) 大野友久. がん終末期の経口摂取を支える歯科的対応. 第24回日本摂食嚥下リハビリテーション学会学術大会. 2018.9.9.仙台
- 6) 大野友久. 口腔と高齢者. 第11回日本健康医療学会学術大会. 2018.7.8.東京
- 7) 板津遼子, 大野友久, 守谷恵未, 佐藤裕二, 角 保徳. 口腔乾燥症患者のために新たに開発した義歯安定剤の物性評価. 第29回日本老年歯科医学会学術大会. 2018.6.23.
品川
- 8) 尾花三千代, 古屋純一, 松原ちあき, 徳永淳二, 大野友久, 角 保徳. 口腔の湿潤方法と口腔ケア技術に着目したシミュレーション研究. 第29回日本老年歯科医学会学術大会. 2018.6.23.品川
- 9) 西澤有生, 守谷恵未, 大野友久, 松山美和, 角 保徳. 歯科衛生士が実施できる新たな残根歯処理方法の開発. 2018.6.23.品川
- 10) 岩渕博史, 鈴木由香, 澤田しのぶ, 守谷恵未, 大野友久, 大橋純子, 赤星千加子, 加藤幸子, 角 保徳. 口腔ケアジェルを用いた口腔管理の有用性の検討. 第72回国立病院総合医学会. 2018.11.10.神戸
- 11) 松木里沙, 松尾浩一郎, 鈴木 瞳, 守谷恵未, 大野友久, 角 保徳. 急性期病院において経口摂取が口腔衛生状態の改善に及ぼす影響 OHAT による比較. 2018.9.16.福岡
- 12) 秋枝俊江, 宮原康太, 磯野員達, 松村康平, 黒田たまき, 木村莉子, 那須小夢樹, 島田茂, 植松紳一郎, 安東信行, 谷口 誠, 小笠原 正. 経管栄養患者と経口摂取者の口腔・咽頭細菌叢の検索 次世代シーケンスによる解析. 第35回日本障害者歯科学会総会および学術大会. 2018.11.17.東京
- 13) 濱岡秀樹, 池田和幸, 足立哲也, 山本俊郎, 谷口 誠, 岡本亜希子, 濱岡建城, 金村成智. 川崎病発症原因菌としての口腔内バイオフィルム細菌に関するメタゲノム解析. 第148回日本歯科保存学会学術大会. 2018.6.14.横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

※予定を含めて記載すること。該当がない場合には「なし」と記載すること。