

授与番号 甲第 355 号

#### 論文内容の要旨

Associations of streptococci and fungi amounts in the oral cavity with nutritional and oral health status in institutionalized elders: a cross sectional study  
—施設入所高齢者における口腔内のレンサ球菌量および真菌量と栄養および口腔の健康状態との関連についての横断研究—

(佐藤華子、矢野明、下山佑、佐藤俊郎、杉山由紀子、岸光男)  
(BMC Oral Health 2021 第 21 巻、記事番号 590、令和 3 年 11 月掲載)

さとう はなこ  
佐藤 華子

#### I. 研究目的

虚弱高齢者ではカンジダなどの口腔真菌が優勢になることが報告されており、口腔微生物叢が全身のフレイルの指標になる可能性がある。しかし低栄養と口腔内細菌叢、特にレンサ球菌などの正常常在細菌との関連は明らかにされていない。本研究は、高齢者の口腔内のレンサ球菌量および真菌量と、栄養状態および口腔の健康状態との関連を明らかにすることを目的とした。

#### II. 研究方法

##### 1. レンサ球菌特異的プライマーの開発と使用したプライマーの検量線の確立

NCBI のデータベースから口腔レンサ球菌特異的プライマーを設計した。16 種の標準菌株 (10 種の口腔レンサ球菌、ブドウ球菌 2 種と化膿レンサ球菌ならびにエンテロコッカス、フゾバクテリウム、大腸菌、各 1 株) のゲノム DNA をテンプレートとした定性的 PCR により、レンサ球菌特異的プライマーの特異度を確認した。また同プライマーと既報による総細菌、真菌特異的プライマーの感度の検討及び Colony Forming Unit (CFU) へ換算するため、レンサ球菌と真菌の培養結果と定量的 PCR の Ct 値の関連を分析した。

##### 2. 施設入所高齢者の舌苔微生物叢と全身的栄養状態および口腔内状況との関連

介護保険施設入所者 41 名 (男性 8 名、女性 33 名、平均年齢  $84.6 \pm 8.3$  歳) を対象とした。要介護度などの全身状態の情報は施設管理者から提供された。口腔内状況は 2 名の歯科医師が、現在歯の状態、口腔がんまたは口腔潜在的悪性疾患の存在、口腔清掃度、義歯の状態、口腔湿潤度、舌苔付着量 (TCI)、Oral Health Assessment Tool (OHAT) を評価した。口腔微生物試料は、舌背から滅菌綿棒で採取した。採取試料が

ら抽出精製したゲノム DNA 10 ng 中のレンサ球菌量、総細菌量、総真菌量を定量的 PCR によって決定した。BMI $\leq$ 20 の者を低栄養高齢者、OHAT スコア $\geq$ 5 の者を口腔内状態不良者とし、低栄養者群と非低栄養者群、口腔内状況不良者群と非不良者群の健康状態と微生物量を t 検定、Mann Whitney の U 検定または Fisher の直接確率検定で比較した。さらに主な関連要因を多重ロジスティック回帰分析に供した。

### III. 研究成績

#### 1. レンサ球菌特異的プライマーの特異度ならびに各プライマーの検量線

レンサ球菌特異的プライマーによる定性的 PCR 産物に対してアガロースゲル電気泳動を行った結果、DNA 増幅産物はすべての口腔レンサ球菌で観察され、他の 6 細菌種からは検出されなかった。レンサ球菌、総細菌、真菌に関する培養法と定量的 PCR の結果の相関係数は、有効定量範囲において、レンサ球菌で 0.985、総細菌で 0.969、真菌で 0.979 であった。

#### 2. 施設入所高齢者の舌苔微生物叢と全身的栄養状態および口腔内状況との関連

低栄養者群と非低栄養者群の比較では、低栄養者群で口腔レンサ球菌量が有意に少なかった ( $p=0.003$ )。加えて、全対象者の口腔レンサ球菌量と BMI の間に、有意な相関関係を認めた ( $r=0.420$ ,  $p=0.006$ )。口腔内状況不良群と非不良者群の比較では不良群で要介護度が高く ( $p<0.001$ )、食事自立者の割合が低かった ( $p=0.001$ )。加えて、口腔内状況不良群では真菌量が有意に高かった ( $p=0.028$ )。ロジスティック回帰分析では、低栄養を目的変数とした場合にレンサ球菌量が、口腔内状況不良を目的変数とした場合は要介護度と真菌量が、それぞれ有意な説明変数として選択された。

### IV. 考察及び結論

食事摂取量の減少は宿主であるヒトと同時にレンサ球菌のエネルギー源を制限する。本研究で要介護高齢者の BMI と口腔レンサ球菌量の関連が観察されたのはそれらが原因ではないかと考えられた。一方、真菌量は食事自立度や口腔内の健康状態と関連しており、悪化した口腔内状況で真菌が増殖しやすいことが示された。しかしヒト口腔内における真菌とレンサ球菌のコロニー形成における相互作用は不明である。高齢者のフレイルと口腔微生物叢の関係を明らかにするためには、真菌などの病因となる微生物だけでなく、口腔内常在菌も対象に含めたさらなる検討が必要であると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 小林琢也 教授 (補綴・インプラント学講座 摂食嚥下・口腔リハビリテーション学分野)  
副査 岸 光男 教授 (口腔医学講座 予防歯科学分野)  
副査 下山 佑 准教授 (微生物学講座講座 分子微生物学分野分野)

虚弱高齢者ではカンジダなどの口腔真菌が優勢になることが報告されており、口腔微生物叢が全身のフレイルの指標になる可能性がある。しかし、低栄養と口腔内細菌叢、特にレンサ球菌などの正常常在細菌との関連は明らかにされていない。本研究は高齢者の口腔内レンサ球菌量および真菌量と栄養状態および口腔の健康状態との関連を明らかにすることを目的とした。

本研究では、まず、レンサ球菌特異的プライマーの確立を行った。NCBI のデータベースから口腔レンサ球菌特異的プライマーを設計し、16 種の標準菌株のゲノム DNA をテンプレートとした定性的 PCR によりレンサ球菌特異的プライマーの特異度を確認した。また、同プライマーと既報による総細菌、真菌特異的プライマーの感度の検討および Colony Forming Unit へ換算するため、レンサ球菌と真菌の培養結果と定量的 PCR の Ct 値の関連を分析した。次に、高齢者の舌苔微生物叢と全身的营养状態および口腔内状況との関連について介護保険施設入所者 41 名を対象とし調査した。評価項目は、全身状態、口腔内状態(残存歯の状態、口腔潜在的悪性疾患、口腔清掃度、義歯の状態、口腔湿潤度、舌苔付着量、Oral Health Assessment Tool : OHAT)とした。口腔微生物試料は舌背から採取し、試料から抽出精製したゲノム DNA 10 ng 中のレンサ球菌量、総細菌量、総真菌量を定量 PCR によって決定した。BMI $\leq$ 20 の者を低栄養高齢者、OHAT スコア $\geq$ 5 の者を口腔状態不良者とし、低栄養群と非低栄養群、口腔内状況不良群と非不良群の健康状態と微生物量を t 検定、Mann Whitney の U 検定または Fisher の直接確率検定で比較した。さらに主な関連要因を多重ロジスティック回帰分析に供した。

レンサ球菌特異的プライマーは口腔レンサ球菌 DNA を特異的に増幅し、ほかの 6 細菌種では DNA の増幅は認められなかった。レンサ球菌、総細菌、真菌に関する培養法と定量的 PCR の結果の相関係数は、有効定量範囲において、レンサ球菌で 0.985、総細菌で 0.969、真菌で 0.979 であった。高齢者の舌苔微生物叢と全身的营养状態および口腔内状況との関連については、低栄養群で非低栄養群より口腔レンサ球菌量が有意に少なく、全対象者の口腔レンサ球菌量と BMI の間に有意な相関を認めた。ま

た、口腔内状況不良群は非不良群より要介護度が高く、食事自立者の割合が低く、真菌量が有意に高かった。ロジスティック回帰分析では、低栄養を目的変数とした場合にレンサ球菌量が、口腔内状況不良を目的変数とした場合は要介護度と真菌量がそれぞれ有意な説明変数として選択された。

このことから、口腔レンサ球菌量は、高齢者の栄養状態と関連しているのに対し、真菌量は、食事自立度や口腔内の健康状態と関連していることが明らかとなった。本研究は、高齢者のフレイルを口腔微生物叢から明らかにできる可能性を示した。今後、真菌などの病因となる微生物だけではなく、口腔内常在菌も対象に含めたさらなる検討が必要ではあるが、本研究の成果は、口腔細菌叢より早期に高齢者のフレイルを発見できるツールの開発に繋がり、臨床的意義の非常に大きいものであり、学位論文に値すると評価した。

#### 試験・試問の結果の要旨

最初に本論文の目的、概要について説明がなされた。次いで研究方法、結果ならびに考察と臨床的意義、今後の研究発展について諮問した結果、いずれも適切かつ明瞭な回答が得られた。また今後の研究に対しても意欲的であり、学位に値する学識と研究能力を備えているものと判定した。

主査・副査から多くの質問があり、下記のような質疑応答が行われた。

**問:本研究に対する発想と着眼に至った過程と、この研究の新規性はどこにあるのか。**

答:さまざまな微生物で構成される固有の口腔微生物叢が、口腔および全身の健康の恒常性を維持する上で重要な役割を果たすとの報告があります。口腔内では、レンサ球菌などの固有の微生物が成長し、宿主が提供する環境に基づいて適切な微生物叢を発達させています。微生物叢が確立されると、病原微生物の定着とその後の感染から宿主を保護するのに役立ちます。したがって、正常な口腔微生物叢が乱されると、病原微生物の増殖、口腔および全身性疾患を引き起こす可能性が考えられます。一方、口腔内の真菌の増殖および全身性栄養失調により、口腔細菌叢は変化すると考えられています。食物の経口摂取の減少は、主食からの炭水化物を主なエネルギー源とする口腔レンサ球菌の成長に悪影響を与える可能性があります。したがって、一般的な健康状態と栄養状態の悪化は、真菌を増やし、正常な口腔微生物叢を変化させると考えました。口腔微生物叢の変化を観察し、口腔真菌と口腔内で最も優勢なレンサ球菌の量を同時に測定することで、高齢者のフレイル判断に役立つと仮説し研究を始めました。

問：160 人の入所者に対して被検者が 42 名ですが、被検者数が 1/3 程度であるのはどのような理由があったのか。

答：まず、調査から 1 か月以内の抗菌薬または抗真菌薬の投与、および非経口栄養を受けている人は除外基準としました。次に施設入所者の中には、認知機能が低下している者がおり研究への参加決定を自ら下す能力を欠いていました。そこで、研究プロトコル情報文書をご家族に郵送し、同意書を返送してもらう形式をとったが、わざわざ手間をかけて返送してくれる家族が少なかったと思われ、入所者に対して約 1/3 の被検者にとどまったと考えています。

問：口腔内状態の評価に OHAT を用いているが、OHAT は口腔内の 8 項目に対して、健全から病的までの 3 段階で評価するため、詳細な口腔内の評価をすることが困難であり、違う評価を用いた方がよかったのではないか。

答：OHAT は看護、介護スタッフが要介護者の口腔内を簡便に評価するためのスクリーニングツールで、歯科医師が行う評価と比較すると評価範囲が広いです。今回の被検者は施設入所者高齢者で、常に歯科医療従事者が専門的ケアや歯科医療を受けえる環境ではありません。また、全国にはそのような施設がほとんどです。そこで、今回は看護、介護スタッフが行えて、口腔アセスメントの均てん化が確立されているツールを用いて口腔状態不良者を検出することで、実社会に合わせた評価と結果を導き出すことが出来るのではないかと考え使用しました。

問：経管栄養の入所者は除外されているが、全身的栄養状態は確保されているので、比較対象として入れてもよかったのではないか。また経管栄養の人の口腔内はどのように変化数なのか、わかっている範囲で教えてください。

答：今回の研究では正常な口腔細菌叢の変化を検討しました。確かに、経管栄養の人は全身的栄養の確保がされていますが、口腔の湿潤度は低下している人が多いです。口腔湿潤度が低下すると正常な口腔細菌叢も変化してしまうことから、対象から除外しています。また、食物の経口摂取の減少は、主食からの炭水化物が主なエネルギー源である口腔レンサ球菌の成長に悪影響を与える可能性があるため除外しています。

問：微生物叢の解析にはメタゲノム解析などが行われることが多いですが、PCR 法を選択した理由はありますか。

答：今回の研究では正常な口腔細菌叢の変化を検討しました。メタゲノム解析は全ての微生物叢を明らかにできますが、個体により微生物叢の違いが大きいこと、解析にかかる費用が高額であること、また細菌の属レベル・種レベルの解析には適さないことから

ら、本研究計画の遂行は困難であると考え定量的 PCR 法を選択しました。

**問：脳腸相関が近年話題となっておりますが、本研究の結果から低栄養状態や食事自立度などは腸内微生物叢に影響があると考えますか。**

答：今回の研究において低栄養状態や食事自立度が口腔微生物叢の変化に影響することが明らかとなりました。低栄養状態では正常な腸内細菌叢が破綻することはすでに報告があり、本研究結果と考え合わせると、食塊とともに腸内に運搬される口腔微生物の変化は、腸内細菌叢の変化を促すことは十分に考えられます。今後さらなる検討の課題とさせていただきます。

**問：今後の研究展開について教えてください。**

答：今回の研究では正常な口腔細菌叢の客観的基準を作ることが出来ました。この基準を用いることで、高齢者のフレイルを検出するツールの開発にもつながると思います。また、全身疾患による免疫力の低下や投薬などによる影響、全身が持つ予備力なども評価できるのではないかと考えています。