九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Characterization of the Oral Microbiota in Eldaerly Adults on Eateral tube Feeding

安井, 雅樹
九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学講座口腔予防医学分野

https://doi.org/10.15017/19947

出版情報：九州大学, 2010, 博士（歯学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

経管栄養が寝たきり高齢者の
口腔フローラの構成に及ぼす影響

2010 年

安井雅樹

九州大学大学院歯学府歯学専攻

九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学講座

口腔予防医学分野

指導教員　山下　喜久　教授

対象論文

本研究の一部は、学術雑誌 PLoS Pathogens に投稿中である（2010 年 12 月 1 日投稿）。

Characterization of Oral Microbiota in Elderly Adults Receiving Enteral Tube Feeding.

Toru Takeshita, D.D.S., Ph.D, Masaki Yasui, D.D.S., Yoshio Nakano, Ph.D, Yoshihiro Shimazaki, D.D.S., Ph. D., Mikiko Tomioka, D.D.S., Ph.D, Yoshihisa Yamashita, D.D.S., Ph.D

目次

要旨 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1

背景 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3

1 : 対象および方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5

1) 調査対象

2) 調査方法

3) 統計学的分析

2 : 結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11

1) サンプル採取時の健康状況

2) T-RFLP 法により得られたピークパターンの比較

3) Pyrosequence により得られた細菌叢の比較

4) サンプル採取後の 6 ヶ月の健康状態

3 : 考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 22

総括 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25

謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 26

参考文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 27

要旨

近年、我が国は急速な経済成長による生活環境の向上や、公衆衛生・医療技術の発達に伴い平均寿命が急速に延伸しているが、その一方で合計特殊出生率の低下による少子化傾向が著しく、他国に類を見ない異例の速さで老年人口率が増加しており、既に世界最高水準の高齢社会へと変貌している。

こうした高齢化が進行する中で寝たきりの高齢者が年々増加しており、摂食・嚥下管理の問題から長期にわたり経管栄養が施行される高齢者も少なくない。しかし、このような高齢者への経管栄養の施行については全身の健康状況への影響から様々な議論がなされており、経管栄養にすると生存率が下がるという報告や、重度の肺炎に罹患するリスクが高くなるという報告もある。一方、高齢者における嚥下性肺炎や慢性閉塞性肺疾患等の炎症性疾患に口腔細菌が影響を及ぼすこと、および充分な口腔ケアにより高齢者の嚥下性肺炎を減少させることが報告されている。しかし、経管栄養の施行が口腔内の細菌叢に及ぼす影響や、引いてはその結果が全身の健康に及ぼす影響についての情報は極めて限られている。

そこで我々は、寝たきりの長期入院高齢患者および高齢者施設長期入所高齢者98名について、摂食状況を経口摂食と経管栄養の２群に分け、細菌構成の分析手法である Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法を用い口腔細菌叢の中でも舌苔細菌叢に注目しのその分析を行った結果、２群間で舌苔の細菌叢の構成が大きく異なることを認めた。また、２群間で

差が認められた細菌種を特定するために、２群からそれぞれ13名を選出し、これらの細菌叢の構成をpyrosequence によって解析した。その結果、２群間で複数の細菌種の構成比に有意な差が認められた。また、経管栄養群では、口腔には通常検出されることのない細菌種も同定された。

さらに、サンプル採取から6ヶ月間、98名の健康状態を追跡したところ、経管栄養群の方が発熱、肺炎の罹患、死亡者の数が明らかに多かった。

以上の結果から、経管栄養者の舌苔の細菌構成は経口摂食者とは大きく異なることが明らかとなった。すなわち、経口摂食者の口腔内で通常優位な細菌の構成比率が激減し、種々の予想外の細菌種が驚くべき高比率で検出された。摂食機能を失った口腔で常在フローラの均衡が破綻したと考えられる。さらに、経管栄養者に特異的あるいは有意に多く認められた細菌種を考慮すると、経管栄養によって破綻した細菌叢が高齢者の健康を脅かしている可能性が示唆された。

今回の結果から経管栄養の施行のリスクが明確となった。経管栄養は状況によっては有用な処置ではあるが、経管栄養の適用には口腔細菌叢に与える影響を十分に考慮して行う必要がある。

背景

近年、我が国は急速な経済成長による生活環境の向上や、公衆衛生・医療技術の発達に伴い平均寿命が急速に延伸しており、平成 19 年度には 65 歳以上の高齢者人口は、過去最高の 2,700 万人を超え、平成 30 (2018) 年には 3,500 万人に達すると見込まれている。その一方で合計特殊出生率の低下による少子化傾向が著しく、他国に類を見ない異例の速さで老年人口率が増加しており、既に世界最高水準の高齢社会へと変貌している (The World Health Report 2006) 。

さらに高齢化に伴い、平成 5 (1993) 年には約 90 万人であった寝たきりの高齢者数は平成 12 (2000) 年に 120 万人に増加し、平成 22 (2010) 年には 170 万人、平成 37 (2035) 年には 230 万人にも増加すると予想されている (平成 11 年版厚生白書) 。寝たきりの高齢者で、摂食・嚥下に障害のある (特に認知症など) 場合、長期にわたり経管栄養が行われている。米国では、老人ホームに入居する重度の認知症の高齢者の約 3 分の 1 の人が経管栄養であるといわれている。しかし、経管栄養を施行すると重度の肺炎に罹患するリスクが高くなるという報告や生存率が下がるという報告さえある (Abuksis G et al. 2000; Kuo S et al. 2009; Murphy LM et al. 2003) 。我が国第 4 位の死因である肺炎の 95%以上は 65 歳以上の高齢者で占められているが (平成 19 年人口動態月報年計、2008) 、高齢者の肺炎の死亡率は 30 年前から大きく改善しておらず、重要な健康問題として注目されている。高齢者における肺炎発症の

主な原因に不顕性誤嚥のコントロールの難しさが挙げられており(Sekizawa et al. 1990; Nakazawa et al. 1993; Marik and Kaplan 2003) 、抗菌薬の発達した現在においても高齢者の肺炎は難治性である。

嚥下障害のある者に対しては誤嚥性肺炎を防ぐ目的で経管栄養が施行されることもあるが、その反面、経管栄養が肺炎のリスクを上げるという報告は経管栄養を選択する上で極めて悩ましい問題を提起している。呼吸器疾患を引き起こす病原性細菌として *Pseudomonas aeruginosa* が知られている。高齢者では、この細菌は経口摂食者に比べ、経管栄養者の中咽頭からより多く検出されており、経管栄養が口腔細菌叢の構成に影響して、肺炎のリスクを高めていることが窺える。長期間の経管栄養によって、口腔内の環境は劇的に変化すると考えられる。食物や水分の経口摂食がなくなることで、口腔内の自浄作用が低下し、さらに唾液流量も減少する。口腔粘膜の表面は乾き、口蓋には痰や胃からの逆流物が付着する。これらの環境の変化が口腔内細菌叢の構成にも少なからず影響を及ぼすことは多分に考えられる。

しかし、口腔内細菌叢の詳細な構成に関してはその複雑さ故、未だに不明な点が多い。加えて、易感染性の高齢者にとって病原性が低い口腔内常在菌なども病原細菌となりうる可能性もあるため、細菌叢の評価をより難しいものにしている。我々は、培養に依らない 16S rRNA 遺伝子を解析する T-RFLP 法を用いて、高齢者の舌苔細菌叢が肺炎などの健康状態に関与していることを先に報告している。本研究では、寝たきりの高齢者の舌の細菌叢を解析し

て、より詳細な 16S rRNA 遺伝子の情報を得るため、T-RFLP 法に加えて pyrosequence 法を用いて経管栄養者の舌苔細菌叢の解析を行い、経口摂食者との比較、検討を行った。

1：対象および方法

本研究は、福岡県大牟田市の療養型医療施設（2施設）および高齢者施設(1施設）に過去半年以上入院・入所歴のある65歳以上の寝たきり高齢者98名（男性12名、女性86名、平均年齢86.4±6.9歳）を対象とした。平成19年10月から12月にかけて対象者に対し全身健康状態の調査、口腔診査および舌苔試料の採取を行った。

なお、本研究の遂行にあたっては九州大学大学院歯学研究院生命倫理委員会の承認（許可番号19B-2）を受けた。

1）　全身健康状態の調査、口腔診査および舌苔試料の採取

①全身健康状態の調査

全身健康状態は担当の看護師が評価を行った。認知症の程度について、認知症老人の日常生活自立度（認知症度）の分類（老健第135号厚生省老人保健福祉局1993）を参考にし、「Ⅰ；何らかの認知症を有するがほぼ自立」、「Ⅱ；認知症を有するが見守りにより自立」、「Ⅲ；認知症によりしばしば介護が必要（徘徊、失禁等）」、「Ⅳ；認知症により、常に介護が必要」、「Ⅴ；精神症状や問題行動、身体疾患により専門医療が必要」の5群に分類し、Ⅰ、Ⅱを「軽度認知症」、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴを「重度認知症」と分類した。

肺炎の診断としては、胸部レントゲン検査による診断を行った。レントゲン撮影が行えない患者に対しては内科医の検査の下、38 度以上の発熱、長期にわたる咳、呼吸困難、1 分間に 24 回以上の頻呼吸、聴診による呼吸音の異常、褐痰の有無の 6 個の臨床所見のうち 1 つでも認められれば肺炎と診断した。

発熱状態の調査として、1 日 1 回（ 発熱時は適宜追加 ）の定時検温（ 腋下にて測定 ）において 37.5 度以上の発熱があった日を発熱日と定義し、口腔診査を行った月を含む後 6 か月間の発熱日数を調べた。

②口腔診査

口腔診査は、歯科医師 1 名が行った。現在歯については視診により WHO の診査基準に準じて診査し、健全歯、未処置歯、処置歯の判定を行った。舌苔付着の程度は視診により「無しまたは少量の舌苔」、「中程度以上の舌苔」の 2 群に分類した。舌の湿潤度は、安静時に湿潤度検査紙（ 湿潤度検査紙、キソウェット KISO-Wet　Tester、KISO サイエンス株式会社、横浜 ; 図 1 ）を舌尖から約 1cm の舌背部に垂直に立て 10 秒保持し、吸収した唾液によって検査紙が湿潤した長さにより、「0-0.9mm」、「1.0mm-4.9mm」、「5.0mm 以上」の 3 群に分類した（ Kakinoki et al. 2004 ）。

義歯の使用について、食事の際に義歯を使用している場合は「使用」、使用していない場合は「未使用」と定義した。

③舌苔試料の採取

口腔診査終了後、舌背の有郭乳頭から舌尖部にかけての付着物を滅菌済みプラスティックスパチュラ（マドラー、株式会社日本デキシー、横浜）にて可及的に採取し、500 µl の lysis buffer (1% SDS 溶液を加えた1 mM EDTA を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 ; pH 8.0) に懸濁した。採取後、舌苔試料は採取日の夜まで氷上で保管し、その後細菌叢DNA を調整するまで-30ºCで凍結保存した。

2) 舌苔細菌叢の分析

①舌苔試料からのDNA の調製

舌苔試料中に含まれるDNA の抽出は、Takeshita (2007) らの方法を一部改良して行った (Takeshita et al. 2007) 。懸濁液を均一に拡散するために15分間超音波処理を行い、0.3 gのzirconia-silica beads (直径 0.1 mm、Biospec Products、 USA) とtungsten-carbide bead (直径 3 mm、Qiagen、 Germany) 1個を加えて90ºCで10分間加温した後、Disruptor Genie (Scientific Industries、Inc.、 USA) を用いて菌体を震盪、破砕し、200 µl の1% SDS 溶液を加えて、70ºCで10分間加温した。続いて、蛋白質成分を除去するため、フェノール (v/v) による抽出、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1、v/v) 混合溶液による抽出を行った後、エタノール沈殿処理を行い、

生じた沈殿物を50 µl の TE 溶液（1 mM EDTA を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液；pH 8.0）に溶解し、分析時まで-30ºCで凍結保存した。

②PCR 法を用いた16S rRNA 遺伝子断片の網羅的増幅と精製

舌苔試料から抽出したDNA は、PCR 法を用いて16S rRNA 遺伝子の増幅を行い、その増幅断片群を Terminal restriction fragment length polymorphism（T-RFLP）法およびPyrosequence 法の二種類の手法を用いて解析を行った。

PCR 法は、同遺伝子においてほとんどの細菌に共通な塩基配列部位である8F（5'- AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG- 3'）、806R（5'- GGA CTA CCR GGG TAT CTA A- 3'）をプライマーとして使用し、Takeshita ら（2008）の方法に準じて行った（Takeshita et al. 2008）。T-RFLP 法においては、5' 末端を蛍光色素 6-carboxyfluorescein（6-FAM）によって標識した8F と hexachlorofluorescein（HEX）によって標識した806Rを用いた一方で、Pyrosequence 法においては454 Life Sciences adapter A配列と6塩基のバーコード配列（5’-CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG NNN NNN-3’）を5' 末端側に追加した8Fと454 Life Sciences adapter B配列（5’-CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TCT CAG- 3’）を5’ 末端側に追加した806Rを用いた。

いずれの手法においてもPCR 反応にはKOD DNA ポリメラーゼを用いた（東洋紡績株式会社）。1 µl の鋳型 DNA（100 - 500 ng/µlになるよう希釈し

たもの) に5 µl のKOD DNA ポリメラーゼ 10 × PCR buffer (60 mM 硫酸アンモニウム、100 mM 塩化カルシウム、1% Triton X-100、100 µg ウシ血清アルブミンを含む 1.2 M トリス塩酸緩衝液 ; pH 8.0) 、5 µl の2 mM dNTPs、2 µlの25 mM 塩化マグネシウム、各0.5 µlの 1 µM両プライマー、1 µl の KOD DNA ポリメラーゼ (2.5 U/µl) を加えた後、滅菌蒸留水を加えて総量を50 µl としてPCR 反応を行った。PCR 反応にはBiomtra T3 thermocycler (Biomtra, Germany) を用いた。反応条件は98ºC 15秒、60ºC 2秒、72ºC 30秒で30サイクルの反応を行った。PCR 反応終了後に、泳動用ゲル2% (wt/vol) のアガロースを含む1 × TAEを用いて、アガロース電気泳動を行い、バンド出現部位を切り出したのち、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) を用いて未反応プライマー、プライマーダイマー、その他非特異的増幅断片の除去を行った。

③ T-RFLP 法を用いた16S rRNA 遺伝子群の構成パターン解析

T-RFLP 法による解析は98名の被験者全員に対して行った。

精製した16S rRNA 遺伝子増幅断片を含む溶液3 µlを制限酵素HaeIII (認識配列はGGCC) 5 Uを用いて総量を10 µlとし、37ºCで3時間消化した後、Takeshita ら (2008) の方法に準じてキャピラリー電気泳動を行った (Takeshita et al. 2008) 。切断したDNA 溶液 2 µl に対して、9 µl の脱イオン化ホルムアミド、1 µl のサイズスタンダードを混合し、95ºCで5分間加熱し熱

変性させた後、急冷して電気泳動に用いた。電気泳動は ABI3130 Genetic analyzer (Applied Biosystems, USA) を用い、60ºC、15 kV の条件で30分泳動した。データの取り込みおよび解析は GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems, USA) を用いて行った。これにより、それぞれの細菌叢の構成を横軸に細菌種、縦軸に細菌の量を反映した波形パターンとして表した。

98名の波形パターンは、統計ソフトR (R Development Core Team.) を用いて主成分分析 (Principal Component Analysis: PCA) を行い、相互の類似度関係を第一、第二主成分を示す散布図として視覚化した。

④Pyrosequence 法を用いた16S rRNA 遺伝子の塩基配列の決定と細菌群集構成の解析

Pyrosequence 法を用いた解析は、胃瘻経管栄養及び経口摂食の高齢者からそれぞれ無作為に抽出した17名ずつ、計34名の被験者に対して行った。

34名の被験者の抽出DNA はそれぞれバーコード配列の異なる8F プライマーを用いて16S rRNA 遺伝子を増幅後前述の方法で精製し、NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) を用いてDNA 濃度を測定した後、等濃度になるよう混合した。混合検体は454 Life Sciences Genome Sequencer FLX instrument (Roche, Basel, Switzerland) を用いて、adapter A 配列からの塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、タカラバイオドラゴンゲノミクスセンター (四日市市) に受託して行った。

得られた133,928リードの塩基配列データは、180塩基以下のもの、プライマー配列が検出されないもの、適切なバーコード配列の検出されないもの、quality scoreの平均が25以下のもの、解読不能な部分を含むものを除去後、6塩基のバーコード配列に基づき、各塩基配列に由来する被験者ごとに選別した。それぞれの被験者の塩基配列データはその後の分析を容易にするため、解析ソフトウェアcd-hit-454 (Li W et al. 2006) を用いて97%以上の相同性の認められる配列を同一とみなし、代表配列の抽出と同一配列の計数を行った。

これらの塩基配列データを用い、まず被験者間の舌苔細菌叢の類似度の算出を行った。 細菌群集間の類似度には、検出された代表塩基配列の有無に加え配列同士の系統学的距離を考慮した指標 Unifrac (Lozupone C et al. 2005) を用いた。全代表配列データについて解析ソフトウェアNAST (DeSantis TZ et al) でアラインメントを行い、解析ソフトウェアClearcut (Sheneman L et al. 2006) を用いて塩基配列の系統樹を作成した後、解析ソフトウェアFast Unifrac (Hamady M et al. 2009) を用いて34名の被験者全ての組み合わせについて各被験者間の代表配列群の類似度を算出した。統計ソフトRを用いて主座標分析 (Principal Coodinate Analysis: PCoA) を行い、第一、第二主座標を示す散布図において各被験者間の細菌叢の類似度を表す代表配列群の類似度関係を視覚化した。

さらに、それぞれの被験者の舌苔中の細菌種の構成の詳細を明らかにするため、代表配列を解析ソフトウェア RDP classifier (Wang Q et al. 2007) を用

いて細菌属レベルまでの特定を行った。confidence threshold が60%以上であれば該当細菌属とみなした。さらに各細菌属に該当する塩基配列について、解析ソフトウェア BLAST+ (Altschul et al. 1997) を用いてGreengenes データベース (DeSantis TZ et al. 2006) に登録されている「キメラ配列の可能性がない」かつ「environmental sample 由来でない」81679の細菌種の塩基配列の中から最も相同性が高いものを検索し、該当細菌種とみなした。

3) . 統計学的分析

経管栄養群と経口摂食群間における性別、入居施設ならびにベースライン調査時の認知症の程度、全身疾患の状態、義歯の有無、舌苔の量と舌の湿潤度および調査後６ヶ月間の発熱および肺炎の発症の有意差は Fisher の正確確率検定によって、また年齢と歯数及び齲蝕歯数の有意差は t検定によって評価した。また、各細菌の存在比率の経管栄養群と経口摂食群間の有意差は Wilcoxon 符号不順位検定により評価した。T-RFLP 法で得られた波形パターンの類似性の評価については、Analysis of similarities (ANOSIM) を用いた。分析にはすべて統計ソフトRを用い、有意水準は5%とした。

2：結果

１) 試料採取時の健康状態

本研究の対象とした３施設に入居する98名の高齢者のうち、44名が経管栄養を施行されており、残りの54名が経口摂食を行っていた。44名の経管栄養施行者のうち31名が胃瘻栄養を、13名が経鼻経管栄養を受けていた。両群の被験者の試料採取時の健康状態を表1に示す。経管栄養群では、男性と重度認知症の者が有意に多く認められたが、その他の全身の診査項目では差はみられなかった。口腔状態については２群間で舌苔の付着量に有意な差が認められた。また、経管栄養群では義歯を使用している者はいなかった。

表 1　試料採取時の被験者の健康状態

	経管栄養 (N = 44)	経口摂食 (N = 54)	P 値
全身症状			
年齢	85.1 ± 7.5	87.4 ± 6.3	0.10
性別 (女性) — 人 (%)	35 (79.5)	51 (94.4)	0.03
施設 — 人 (%)			0.06
病院 A	27 (61.3)	40 (74.0)	
病院 B	14 (21.6)	7 (12.9)	
介護施設 A	3 (6.8)	7 (12.9)	
認知症 — 人 (%)			<0.001
軽度	5 (11.3)	29 (53.7)	
重度	39 (88.6)	25 (46.2)	
全身疾患 — 人 (%)			
糖尿病	5 (11.3)	5 (9.2)	0.74
脳卒中	38 (86.3)	37 (68.5)	0.05
悪性腫瘍	5 (11.3)	9 (16.6)	0.56
慢性胃腸炎	3 (6.8)	4 (7.4)	1.00
循環器系疾患	18 (40.9)	24 (44.4)	0.83
腎疾患	2 (4.5)	3 (5.5)	1.00
肝疾患	6 (13.6)	8 (14.8)	1.00
口腔内状況			
現在歯数			
	8.4 ± 9.3	7.8 ± 7.6	0.70
齲蝕歯数			
	1.7 ± 3.3	2.1 ± 3.6	0.53
義歯の有無 — 人(%)	0 (0)	16 (29.6)	<0.001
舌苔の量			0.004
なし及び少量	15 (34.0)	35 (64.8)	
普通及び多量	29 (65.9)	19 (35.1)	
舌の湿潤度			1.00
≥ 5.0	13 (29.5)	13 (24.0)	
1.0–4.9	14 (31.8)	22 (40.7)	
< 1.0	17 (38.6)	19 (35.1)	

1)　T-RFLP 法により得られたピークパターンの比較

まず98名の被験者全員について、それぞれの舌苔細菌叢の構成をT-RFLP法を用いて波形パターンとして得た。これらの波形パターンの類似度関係を主成分分析法により図1に視覚的に表すが、経管栄養者の波形パターンは図の左上方に偏り経口摂食者の波形パターンは右下に偏ってプロットされる傾向が認められた。そこで、ANOSIMを用いて経口摂食者群と経管栄養者群間での波形パターンの類似性の検定を行ったところ両群の波形パターンが有意に異なることが確認できた（P = 0.002）。一方、経管栄養者群には胃瘻経管栄養者と経鼻経管栄養者の波形パターンに有意な差は認められなかった（P = 0.778）。

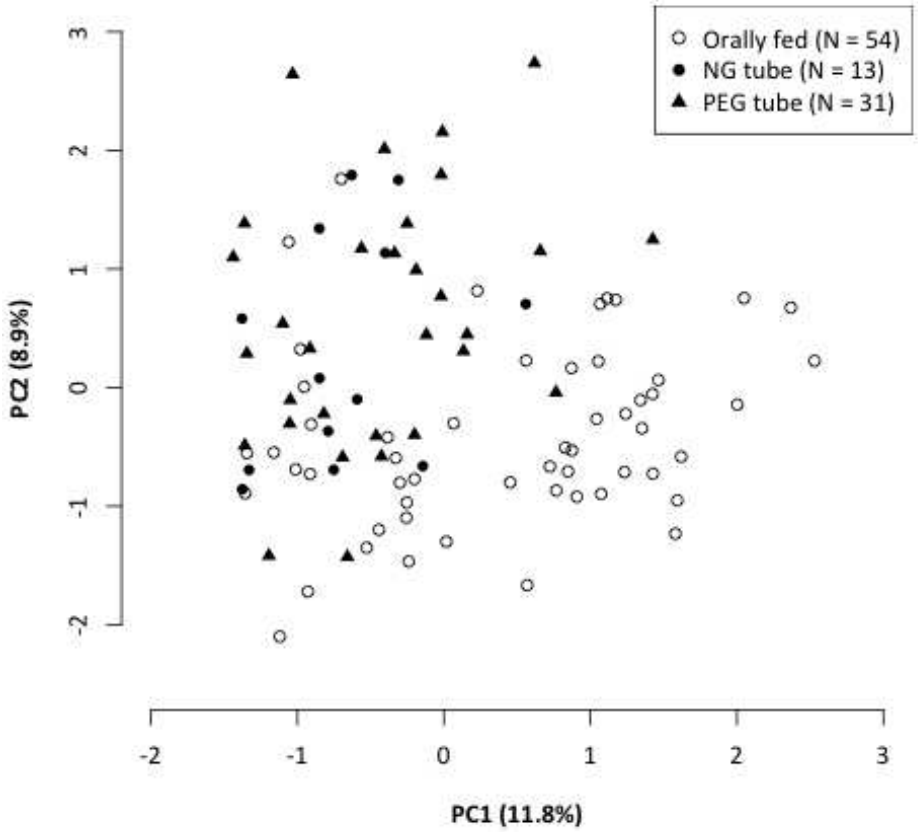

図1　主成分分析によるT-RFLP ピークパターンの類似度関係の比較

2)　Pyrosequence 法を用いた細菌叢構成の比較

両群の細菌叢のより詳細な構成を比較検討するため、胃瘻経管栄養者と経口摂食者を17名ずつ無作為に抽出し、それぞれの被験者内の16S rRNA 遺伝子断片群の塩基配列についてPyrosequence 法を用いて、計123,479リード、被験者一人当たり3,631 ± 2,464リードの16S rRNA の塩基配列を解読し、各被験者の舌苔細菌叢の構成についてより詳細な解析を行った。 解析した34名の被験者の年齢、性別、解析リード数を表2 に示す。

表２　Pyrosequence法による各被験者ごと解析リード数

	経管栄養群			経口摂食群		
被験者	年齢	性別	リード数	年齢	性別	リード数
1	82	男性	2940	88	女性	3063
2	87	女性	499	83	女性	3208
3	87	女性	5130	79	女性	1528
4	82	女性	1030	87	女性	7376
5	76	女性	7223	77	女性	3272
6	75	女性	4006	87	女性	2175
7	96	女性	2810	80	女性	9411
8	72	男性	5519	87	女性	3897
9	70	女性	2265	83	女性	688
10	84	女性	678	87	女性	7874
11	92	女性	8258	80	女性	2763
12	91	女性	2593	76	女性	1483
13	87	女性	2028	77	女性	1725
14	81	女性	4759	87	女性	3465
15	87	女性	1785	90	女性	1726
16	81	女性	1122	79	女性	7598
17	89	女性	6336	89	女性	3246
平均	83.5 ＋ 7.0		3469.5 ± 2301.8	83.3 ＋ 4.6		3794.0 ± 2537.2

得られた塩基配列データを用いて各被験者間の細菌叢構成の類似度Unifracを算出し、その結果を主座標分析によって第一、第二主座標を示す散布図として示すと、図２のように経管栄養者群の舌苔細菌叢の構成は経口摂食者群のものと明らかに異なることが示された。

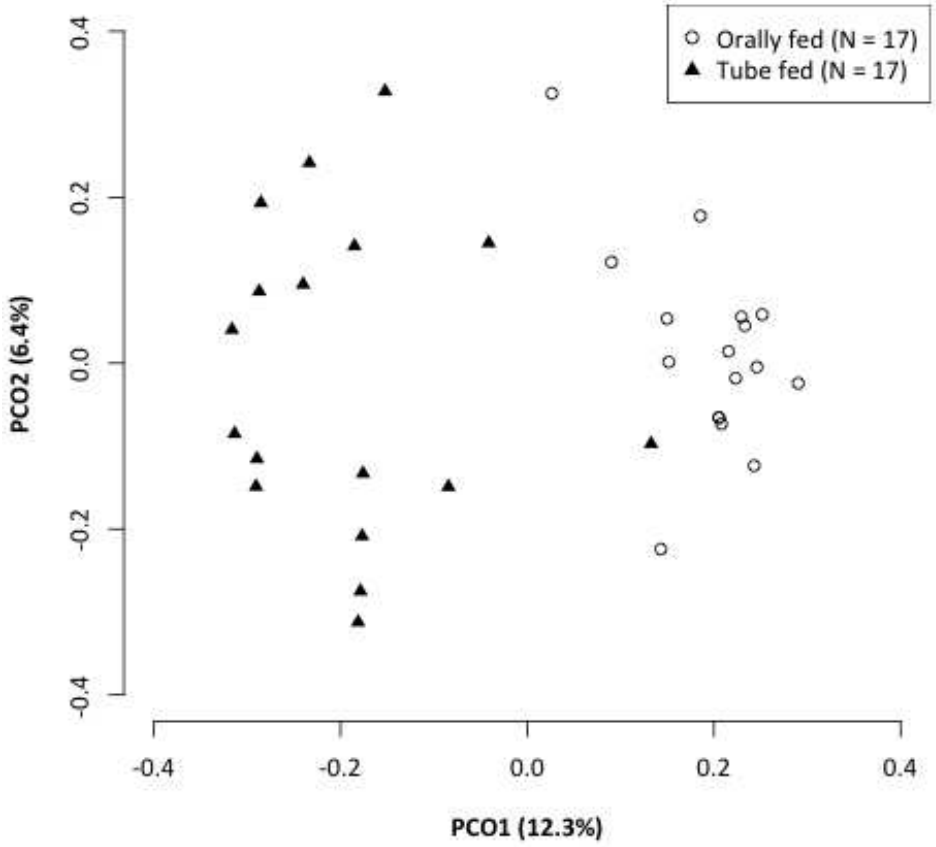

図2　塩基配列に基づく各細菌叢類似度のUnifrac分析結果の主座標分析による散布図

類似度指標 Unifrac でそれぞれの被験者において、各代表配列の検出数が各被験者において認められた全配列数に対して占める割合を加味した場合、散布図上において二群はより明瞭に分離した（図 3）。このことから、経管栄養群では経口摂食群においてはみられない菌種が存在するだけでなく、通常認められる細菌種についてもその存在比率に違いがあることが示唆された。

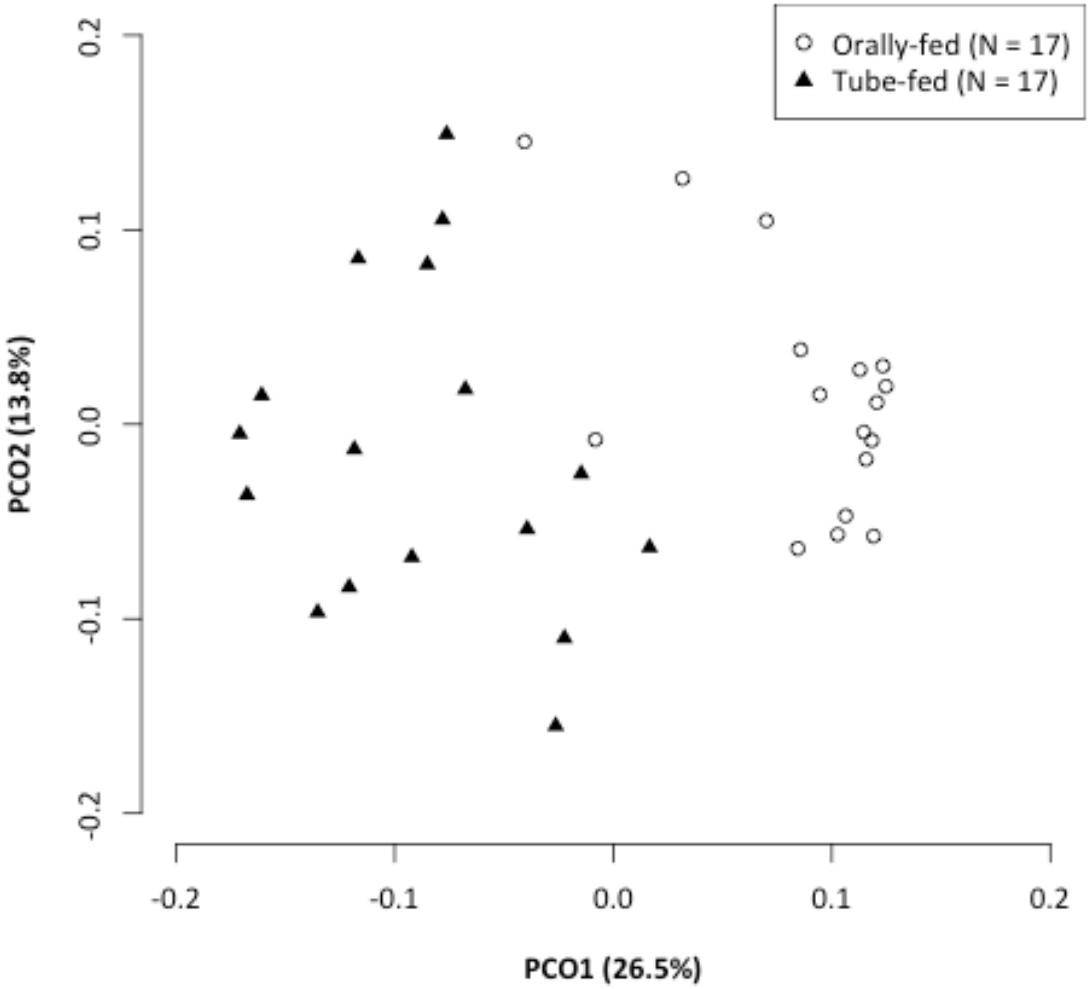

図 3　Unifrac に各代表配列の検出比率を加味した場合の主座標分析による散布図

経管栄養群と経口摂食群のいずれにおいても、舌苔細菌叢は、主に5つの細菌門（Actinobacteria門，Bacteroidetes門，Fusobacteria門，Firmicutes門，Proteobacteria門）から構成されていが、これらの門が各被験者の舌苔細菌叢に占める構成比率は両群で大きく異なっていた。図4に示すように、経口摂食群では Firmicutes 門が圧倒的に優勢であったのに対し、経管栄養群ではその割合は低く、反対に経口摂取群では劣勢であったProteobacteria門とActinobacteria門が経口摂取者に比較して有意に高率で検出された。また、菌叢に占める割合はそれほど高くはなかったが、Synergistetes門とSR1門も経口摂取者に比較して経管栄養者に有意に高率で検出された。

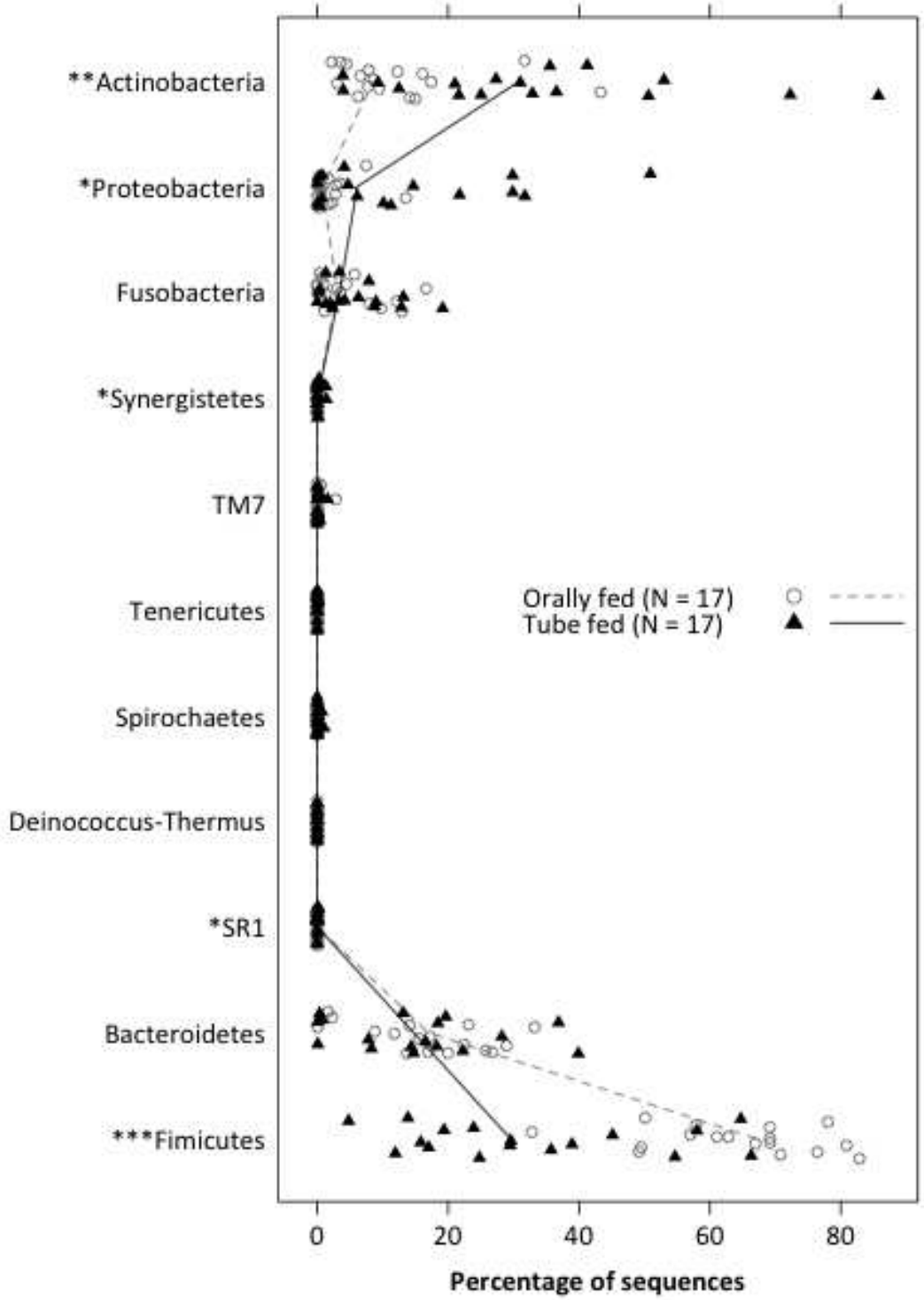

図4　細菌門レベルでの２群間の細菌構成比率の比較

また、両群の細菌叢の違いを細菌属レベルでみると、*Veillonella*属, *Streptococcus*属, *Leptotrichia*属, *Megasphaera*属, *Granulicatella*属, *Selenomonas*属, *Moryella*属が経管栄養群では経口摂食群に比べ各被験者の細菌叢における構成比率が有意に少なかった。逆に、経管栄養群では*Corynebacterium*属, *Fusobacterium* 属, *Peptostreptococcus* 属, *Parvimonas* 属, *Gemella* 属, *Porphyromonas*属, *Actinobaculum*属, *Aggretatibacter*属, *Ottowia*属, *Dialister*属, *Sneathia* 属, *Peptoniphilus* 属, *Mobiluncus* 属, *Kingella* 属, *Helcoccus* 属, *Bifidobacterium*属, *Acrcanobacterium*属, *Anaerococcus*属, *Aerococcus*属が有意により多くを占めていた（図5）。

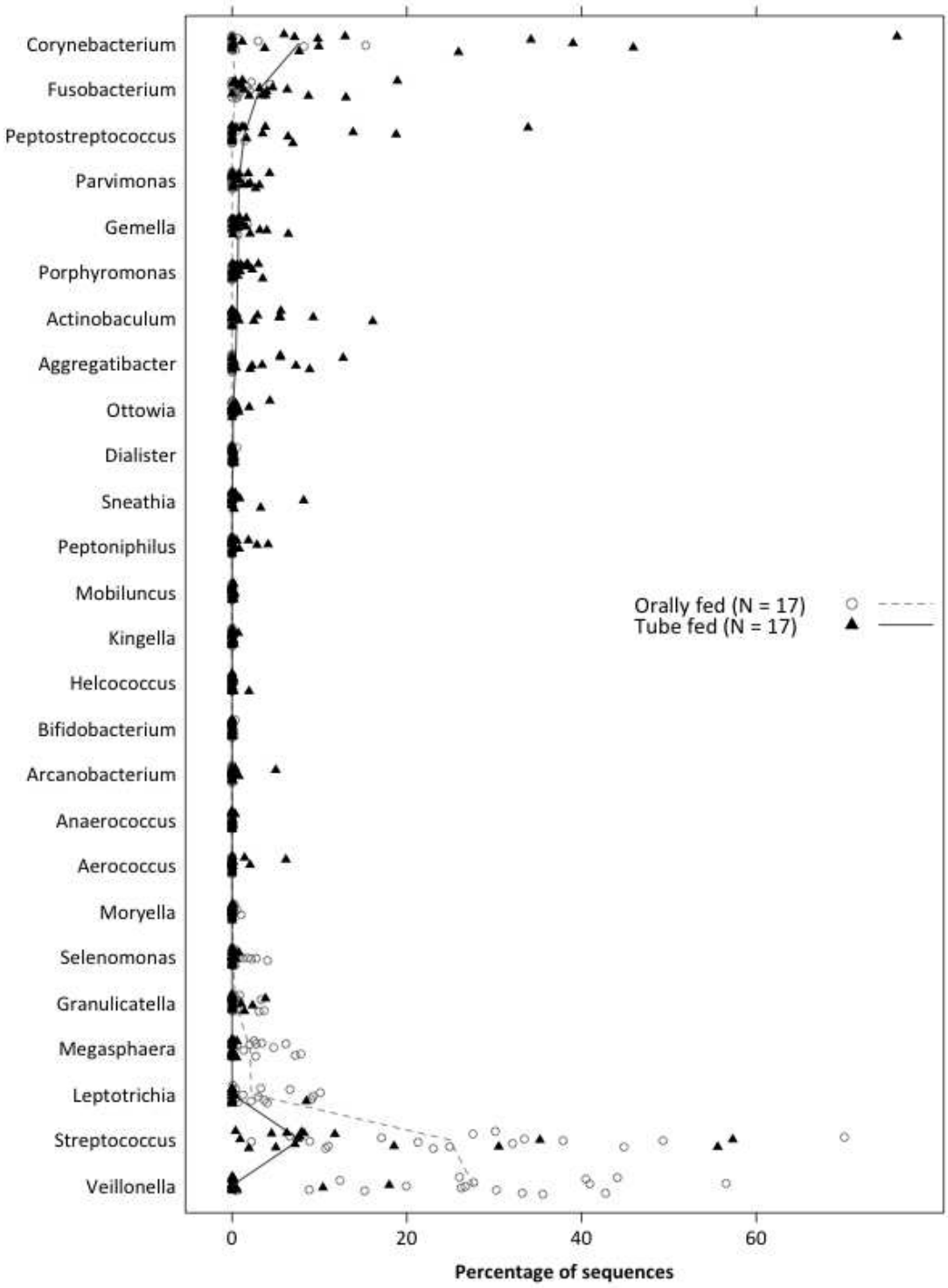

図5　細菌属レベルでの２群間の細菌構成比率の比較

さらに、２群間で特に大きな有意差（$P<0.001$）が認められた細菌種を図6に示した。胃瘻栄養群では、健康な口腔において通常検出されることのない*Streptococcus agalactiae*や*Corynebacterium striatum* が高い比率で検出されることが明らかになった。さらに呼吸器系疾患の病原性細菌と言われる*Haemophilus influenza*（4名）や*Pseudomonas aeruginosa*（2名）も経管栄養群にのみ検出された。それに対して、経口摂食群で大多数を占める口腔常在細菌*Streptococcus salivarius* や *Veillonella parvula*などの常在細菌の比率が経管栄養群では劇的に減少していた。

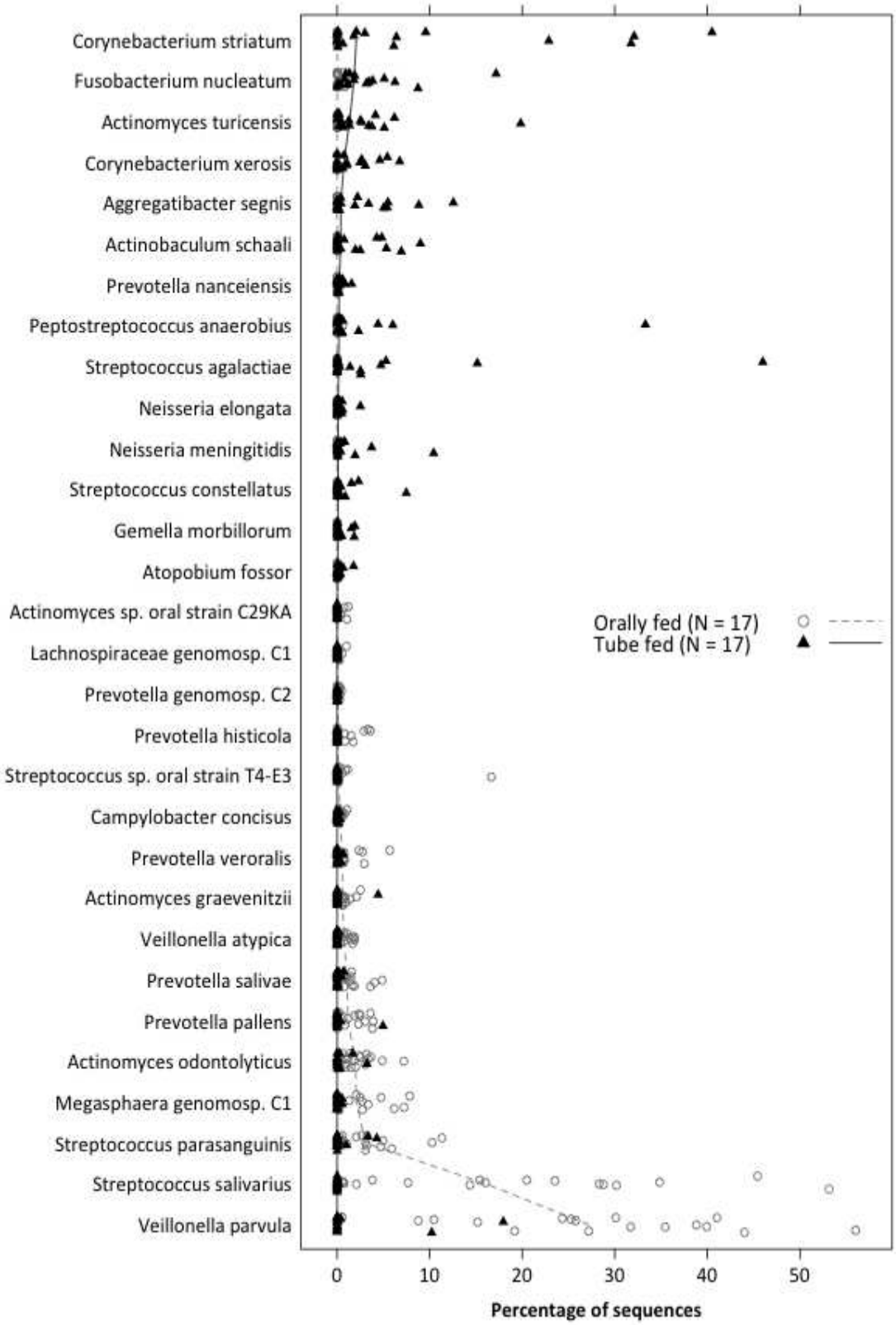

図6　細菌種レベルでの２群間の細菌構成比率の比較

4)　試料採取後の6ヶ月間の健康状態

試料採取後6ヶ月の間、被験者の健康状態について経過を追ったところ、経管栄養群では経口摂食群に比べて有意に高頻度で発熱、肺炎の罹患、死亡が認められた (表３) 。

表３　試料採取後 6 ヶ月間の健康状態

	経管栄養	**経口摂食**	**オッズ比**	
	(N = 44)	**(N = 54)**	**(95% CI)**	**P 値**
肺炎　(人)				
あり	16	5	5.6	0.002
なし	28	49	(1.8 to 16.9)	
発熱　(人)				
10 日以上	14	5	6.3	0.001
9 日以下	20	45	(1.9 to 19.8)	
死亡　(人)				
死亡	10	4	3.6	0.04
生存	34	50	(1.0 to 12.6)	

3：考察

舌には細菌の凝集物、食物残渣、剥離上皮などからなる舌苔と呼ばれる付着物が存在する。舌は口腔内において多大な面積を占め、多数の舌乳頭が複雑な凹凸を形成することから、舌苔中に存在する細菌の構成は口腔環境に強く影響を与えると考えられる。古くから舌苔中の細菌に関する報告は多く(Gordon and Gibbons 1966; Loesche and Kazor 2002) 、介入実験で舌苔を取り除くとデンタル・プラークの形成が抑制されること (Gross et al. 1975) や、舌が口腔微生物のリザーバーとなり唾液中の細菌数に強く影響を及ぼしていること (Yonezawa et al. 2003; White and Armaleh 2004; Abe et al. 2007) が報告されている。

経管栄養高齢者の舌苔の細菌構成は正常に経口摂食を行っている者とは明らかに異なっていた。通常の口腔において優勢な常在細菌の比率は激減し、口腔にあまり検出されることのない菌種が驚くべき高比率で検出された。食物、水分が長期間通過しないというのは口腔にとって極めて異常な状況である。摂食に用いられなくなったことが常在する細菌にとって劇的な環境の変化をもたらし、通常の生態系のバランスを破綻させたことが考えられる。

経管栄養高齢者の破綻した口腔フローラからは、高齢者の生命を脅かしうるものが数多く検出された。 経管栄養群で特徴的に検出された*Corynebacterium*属の細菌は口腔内ではほとんど検出されることのない日和見感染菌 *C. striatum, C. xerosis* であり、特に*C. striatum*はしばしば多剤耐性を獲得し院内感染の原因になることが報告されている (Otsuka Y et al. 2006;

Renom F et al. 2007) 。 *Porphyromonas*属 、*Fusobacterium*属、*Peptostreptococcus*属などの嫌気性細菌は嚥下性肺炎の原因になることが古くから知られているものである (Bartlett JG 1987; Bartlett JG 2005; El-Solh AA et al. 2003; Tsai TH et al.2005) 。新生児や高齢者で重篤な感染症状を示すB群連鎖球菌 (Edwards MS et al. 2005) も経管栄養群の高齢者に口腔フローラにおいてしばしば高い比率で認められ、典型的な病原菌である*H. influenzae, P. aeruginosa* も経管栄養高齢者ではより高頻度に検出された。

経管栄養の施行により食事時の誤嚥が回避される一方で、細菌を含んだ唾液などの分泌物の吸引まで防止することは難しい。従って本研究の結果は経管栄養を施行された高齢者は、より病原性の高い細菌群集を持続的に吸引している可能性を強く示唆している。 本研究ではそれらの細菌が病原菌として決定的な役割を果たしている確証はないが、経管栄養施行後の経過の悪化に、口腔フローラの破綻が関連しているとことが十分に考えられる。実際、本研究においても試料採取後6ヶ月間の経管栄養者の死亡率や肺炎発症率は経口摂食者に比べ有意に高かった。

近年、腸や膣をはじめとして常在細菌が生息する様々な部位において、その生態系バランスの破綻が炎症性疾患と関連することが報告されている。経管栄養高齢者における舌苔も、病原菌のリザーバとしてだけでなく、それ自体が不明熱や肺炎の起因になっている可能性も考えられる。しかしながら今回の研究は断面研究であるため、経管チューブの設置によって口腔フローラの破綻を招いたということを証明する十分な知見とは言えない。今後、経

管栄養施行前後や経口摂食の再開前後における菌叢の変化を経時的に観察していく必要があると考えられる。どの環境因子が口腔フローラの破綻を招いたかをより明確にすることで、経管栄養の施行後の経過の悪化を予防する有効な手段を確立することが可能になるかもしれない。

経管栄養が状況によっては有用な措置であるのは言うまでもない。しかしながら口腔で食事を行わない経管栄養高齢者においてはしばしば口腔ケアが無視されている現状が存在する。口腔ケアが破綻した口腔フローラの回復に有効であるかどうかは定かではないが、少なくともその全体量を減らすことでリスクを減らすことは期待できる。経管栄養患者でこそ舌苔の清掃を含めた口腔ケアの必要があるのではないかと考えられる。

いずれにせよ今回の結果は経管栄養の適用がもたらすリスクの一つを明確にしたといえる。口から食事をとるということは常在フローラの維持という点から感染防御においても重要ない意味をもっているのかもしれない。高齢者における安易な経管栄養の適用はなんとしても避けるべきである。

総括

１．経管栄養を施行した寝たきり高齢者の舌苔の細菌叢は、経口摂食している寝たきり高齢者の細菌叢とは大きく異なっていた。

２．経管栄養寝たきり高齢者の舌苔からは、通常口腔内では通常検出されない *Corynebacterium* 属が検出された。さらに呼吸器系疾患の原因菌と言われる *Haemophilus influenza* や *Pseudomonas aeruginos* なども検出された。これらの細菌種は同じ寝たきり高齢者でも経口摂食をしている者にはほとんど検出されなかった。

３．舌苔試料採取後の 6 ヶ月間を追跡いたところ、経管栄養を施行した寝たきり高齢者の健康状況は、経口摂食をする寝たきり高齢者に比較して不良であった。

４．上記の結果から、経管栄養により口腔からの摂食がなくなることによって寝たきり高齢者の口腔内の細菌叢に変化が見られ、病原性細菌の増殖を容易にし、その結果、肺炎などの罹患や死亡する可能性が上昇する可能性が示唆された。

謝辞

長期にわたる調査研究を快くお許しいただき、実際に調査に当たる際にご協力いただきました看護師の皆様や事務職員の方々に心から御礼申し上げます。そして、口腔診査および舌苔の採取に快く応じてくださいましたすべての皆様とご家族の方々に感謝の意を表します。

稿を終えるにあたり、口腔保健推進学講座　口腔予防医学分野において研究を行う機会を与えていただき、さらに研究の方向性や内容に関して終始多大なご助言、ご指導、ご協力をいただきました口腔予防科学分野 山下喜久教授ならびに同分野 竹下徹助教に心より御礼申し上げます。また、口腔予防医学分野の皆様に心から感謝申し上げます。

参考文献

Abe, S., K. Ishihara, et al. (2006) . "Oral hygiene evaluation for effective oral care in preventing pneumonia in dentate elderly." Arch Gerontol Geriatr **43** (1) : 53-64.

Abe, S., K. Ishihara, et al. (2007) . "Tongue-coating as risk indicator for aspiration pneumonia in edentate elderly." Arch Gerontol Geriatr.

Abe, S., K. Ishihara, et al. (2001) . "Prevalence of potential respiratory pathogens in the mouths of elderly patients and effects of professional oral care." Arch Gerontol Geriatr **32** (1) : 45-55.

Abuksis G, Mor M, Segal N, et al. Percutaneous endoscopic gastrostomy: high mortality rates in hospitalized patients. Am J Gastroenterol 2000;95:128-32.

Adachi, M., K. Ishihara, et al. (2007) . "Professional oral health care by dental hygienists reduced respiratory infections in elderly persons requiring nursing care." Int J Dent Hyg **5** (2) : 69-74.

Adachi, M., K. Ishihara, et al. (2002) . "Effect of professional oral health care on the elderly living in nursing homes." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **94** (2) : 191-5.

Altschul, Stephen F., Madden, et al. (1997) Gapped BLAST+ and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. **25 (17)** ; 3389-3402.

Azarpazhooh, A. and J. L. Leake (2006) . "Systematic review of the association between respiratory diseases and oral health." J Periodontol **77** (9) : 1465-82.

Bahrani-Mougeot, F. K., B. J. Paster, et al. (2007) . "Molecular analysis of oral and respiratory bacterial species associated with ventilator-associated pneumonia." J Clin Microbiol **45** (5) : 1588-93.

Bartlett JG. Anaerobic bacterial infections of the lung. Chest 1987;91:901-9.

Bartlett JG. The role of anaerobic bacteria in lung abscess. Clin Infect Dis 2005;40:923-5.

Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. Science 2009;326:1694-7.

DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. Appl Environ Microbiol 2006;72:5069-72.

DeSantis TZ, Jr., Hugenholtz P, Keller K, et al. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. Nucleic Acids Res 2006;34:W394-9.

Didilescu, A. C., N. Skaug, et al. (2005) . "Respiratory pathogens in dental plaque of hospitalized patients with chronic lung diseases." Clin Oral Investig **9** (3) : 141-7.

Edwards MS, Baker CJ. Group B streptococcal infections in elderly adults. Clin Infect Dis 2005;41:839-47.

El-Solh, A. A., C. Pietrantoni, et al. (2004) . "Colonization of dental plaques: a reservoir of respiratory pathogens for hospital-acquired pneumonia in institutionalized elders." Chest **126** (5) : 1575-82.

El-Solh AA, Pietrantoni C, Bhat A, et al. Microbiology of severe aspiration pneumonia in institutionalized elderly. Am J Respir Crit Care Med 2003;167:1650-4.

Finucane TE, Bynum JP. Use of tube feeding to prevent aspiration pneumonia. Lancet 1996;348:1421-4.

Gordon, D. F., Jr. and R. J. Gibbons (1966) . "Studies of the predominant cultivable micro-organisms from the human tongue." Arch Oral Biol **11** (6) : 627-32.

Gross, A., G. P. Barnes, et al. (1975) . "Effects of tongue brushing on tongue coating and dental plaque scores." J Dent Res **54** (6) : 1236.

Hamady M, Lozupone C, Knight R. Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. ISME J 2009;4:17-27.

Ishikawa, A., T. Yoneyama, et al. (2008) . "Professional oral health care reduces the number of oropharyngeal bacteria." J Dent Res **87** (6) : 594-8.

Jacobson, S. E., J. J. Crawford, et al. (1973) . "Oral physiotherapy of the tongue

and palate: relationship to plaque control." J Am Dent Assoc **87** (1) : 134-9.

Janssens JP, Krause KH. Pneumonia in the very old. Lancet Infect Dis 2004;4:112-24.

Kakinoki, Y., T. Nishihara, et al. (2004) . "Usefulness of new wetness tester for diagnosis of dry mouth in disabled patients." Gerodontology **21** (4) : 229-31.

早川太郎・須田立雄・木崎治俊・畑隆一郎・髙橋信博・宇田川信之 (2005) . 口腔生化学. 医歯薬出版株式会社. 第 4 版.

厚生労働省 (2008) . 平成 19 年度人口動態統計月報年計. http://www-bm.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai07/index.html

厚生労働省 (1999) . 平成 11 年版厚生白書 http://wwwhakusyo.mhlw.go.jp/wpdocs/hpaz199901/body.html

厚生労働省大臣官房老人保健福祉部長 (1991) . 「障害老人の日常生活自立度 (寝たきり度) 判定基準」の活用について 老健第 102－2 号.

厚生省老人保健福祉局長 (1993) . 「認知症である老人の日常生活自立度判定基準」の活用について 老健第 135 号

Kuo S, Rhodes RL, Mitchell SL, Mor V, Teno JM. Natural history of feeding-tube use in nursing home residents with advanced dementia. J Am Med Dir Assoc 2009;10:264-70.

Leibovitz A, Plotnikov G, Habot B, Rosenberg M, Segal R. Pathogenic colonization

of oral flora in frail elderly patients fed by nasogastric tube or percutaneous enterogastric tube. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2003;58:52-5.

Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. Bioinformatics 2006;22:1658-9.

Ling Z, Kong J, Liu F, et al. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. BMC Genomics 2010;11:488.

Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol 2005;71:8228-35.

Mager, D. L., L. A. Ximenez-Fyvie, et al. (2003) . "Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces." J Clin Periodontol **30** (7) : 644-54.

Mantilla Gomez, S., M. M. Danser, et al. (2001) . "Tongue coating and salivary bacterial counts in healthy/gingivitis subjects and periodontitis patients." J Clin Periodontol **28** (10) : 970-8.

Marik, P. E. and D. Kaplan (2003) . "Aspiration pneumonia and dysphagia in the elderly." Chest **124** (1) : 328-36.

Mitchell SL, Teno JM, Roy J, Kabumoto G, Mor V. Clinical and organizatio nal factors associated with feeding tube use among nursing home resid ents with advanced cognitive impairment. JAMA 2003;290:73-80.

Murphy LM, Lipman TO. Percutaneous endoscopic gastrostomy does not prolong survival in patients with dementia. Arch Intern Med 2003;163:1351-3.

Nakazawa, H., K. Sekizawa, et al. (1993) . "Risk of aspiration pneumonia in the

elderly." Chest **103** (5) : 1636-7.

Otsuka Y, Ohkusu K, Kawamura Y, Baba S, Ezaki T, Kimura S. Emergence of multidrug-resistant Corynebacterium striatum as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases. Diagn Microbiol Infect Dis 2006;54:109-14.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2009.

Renom F, Garau M, Rubi M, Ramis F, Galmes A, Soriano JB. Nosocomial outbreak of Corynebacterium striatum infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. J Clin Microbiol 2007;45:2064-7.

Rothan-Tondeur M, Meaume S, Girard L, et al. Risk factors for nosocomial pneumonia in a geriatric hospital: a control-case one-center study. J Am Geriatr Soc 2003;51:997-1001.

Sartor RB. Therapeutic correction of bacterial dysbiosis discovered by molecular techniques. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:16413-4.

Scannapieco, F. A., R. B. Bush, et al. (2003) . "Associations between periodontal disease and risk for nosocomial bacterial pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease. A systematic review." Ann Periodontol **8** (1) : 54-69.

Scannapieco, F. A., G. D. Papandonatos, et al. (1998) . "Associations between oral conditions and respiratory disease in a national sample survey population." Ann Periodontol **3** (1) : 251-6.

Scannapieco, F. A., E. M. Stewart, et al. (1992) . "Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in medical intensive care patients." Crit Care Med **20**(6) : 740-5.

Sekizawa, K., Y. Ujiie, et al. (1990) . "Lack of cough reflex in aspiration pneumonia." Lancet **335** (8699) : 1228-9.

Sheneman L, Evans J, Foster JA. Clearcut: a fast implementation of relaxed neighbor joining. Bioinformatics 2006;22:2823-4.

Takeshita T, Tomioka M, Shimazaki Y, et al. Microfloral characterization of the tongue coating and associated risk for pneumonia-related health problems in institutionalized older adults. J Am Geriatr Soc 2010;58:1050-7.

Takeshita, T., Y. Nakano, et al. (2008) . "The ecological proportion of indigenous bacterial populations in saliva is correlated with oral health status." ISME J.

Takeshita, T., Y. Nakano, et al. (2007) . "Improved accuracy in terminal restriction fragment length polymorphism phylogenetic analysis using a novel internal size standard definition." Oral Microbiol Immunol **22** (6) : 419-28.

Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. Gut 2004;53:1-4.

Terpenning, M. (2005) . "Geriatric oral health and pneumonia risk." Clin Infect Dis **40** (12) : 1807-10.

Terpenning M, Shay K. Oral health is cost-effective to maintain but costly to ignore. J Am Geriatr Soc 2002;50:584-5.

Terpenning, M. S., G. W. Taylor, et al. (2001) . "Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population." J Am Geriatr Soc **49** (5) : 557-63.

Tsai TH, Jerng JS, Chen KY, Yu CJ, Yang PC. Community-acquired thoracic empyema in older people. J Am Geriatr Soc 2005;53:1203-9.

van Vliet MJ, Harmsen HJ, de Bont ES, Tissing WJ. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. PLoS Pathog 2010;6:e1000879.

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl Environ Microbiol. 2007 Aug;73 (16) :5261-7.

White, G. E. and M. T. Armaleh (2004) . "Tongue scraping as a means of reducing oral mutans streptococci." J Clin Pediatr Dent **28** (2) : 163-6.

World Health Organization (2006) . The World Health Report 2006 http://www.who.int/whr/2006/en/index.html

Yoneyama, T., K. Hashimoto, et al. (1996) . "Oral hygiene reduces respiratory infections in elderly bed-bound nursing home patients." Arch Gerontol Geriatr **22** (1) : 11-9.

Yoneyama, T., M. Yoshida, et al. (1999) . "Oral care and pneumonia. Oral Care Working Group." Lancet **354** (9177) : 515.

Yoneyama, T., M. Yoshida, et al. (2002) . "Oral care reduces pneumonia in older

patients in nursing homes." J Am Geriatr Soc **50** (3) : 430-3.

Yonezawa, H., K. Takasaki, et al. (2003) . "Effects of tongue and oral mucosa cleaning on oral Candida species and production of volatile sulfur compounds in the elderly in a nursing home." J Med Dent Sci **50** (1) : 1-8.